

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Ívina Paula de Souza Medeiros

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE ALGUNS
COMPLEXOS DE Pt(II), Cu(II) E Ga(III)**

Belo Horizonte

2011

UFMG/ICEx/DQ.856^a

DQ.492^a

Ívina Paula de Souza Medeiros

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE ALGUNS
COMPLEXOS DE Pt(II), Cu(II) E Ga(III)**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química – Química Inorgânica.

Belo Horizonte

2011

M488e Medeiros, Ívina Paula de Souza
2011 Estudo do potencial antitumoral de alguns complexos
D de Pt(II), Cu(II) e Ga(III) [manuscrito] / Ívina Paula
de Souza Medeiros. 2011.
113 f. : il.

Orientadora: Elene Cristina Pereira Maia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.

Bibliografia: f. 82-87.

Inclui anexos: f. 88-113.

1. Química inorgânica - Teses 2. Complexos
metálicos - Teses 3. Agentes antineoplásicos - Teses
I. Maia, Elene Cristina Pereira, Orientadora II.
Título.

CDU 043



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br



"Estudo do Potencial Antitumoral de Alguns Complexos de Pt(II), Cu(II) e Ga(III)"

Ívina Paula de Souza Medeiros

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Profª. Elene Cristina Pereira Maia - Orientadora
UFMG


Prof. Frédéric Jean Georges Frézard
UFMG


Prof. Rubén Dario Sinisterra Millán
UFMG

Belo Horizonte, 28 de março de 2011.

Aos meus maiores educadores e mestres: minha mãe, Marilene dos Santos Caldeira de Souza e ao meu pai, Apolônio de Souza. Também ao meu irmão, Jonatha Augusto de Souza e meu tio e padrinho, Roberto Carmo de Souza. Agradeço por todo amor, coragem, e incentivo que recebi e recebo de vocês.

A vocês dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me abençoado e iluminado para que eu concretizasse esse trabalho.

À professora e orientadora Elene Cristina Pereira Maia, pelo carinho, amizade e inenarrável orientação, que me conduziram na trilha pelo caminho científico.

À professora Josianne Nicácio Silveira do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG pelo empenho, amizade e análises no GFAAS.

Ao professor Nicolás Adrián Rey pelo carinho, amizade, dedicação e por dois dos complexos desse estudo.

Aos professores Adailton J. Bortoluzzi e Judith Felcman, pelos demais complexos também necessários para esse estudo.

À querida amiga Priscila, que me ensinou e acompanhou imensamente o desenvolvimento desse trabalho, dividindo muitas vezes sucessos e fracassos.

Aos também amigos e companheiros Ivana e Edgar, por todo carinho e disposição e todos os demais amigos e colegas de laboratório.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Química, especialmente às secretárias da pós graduação, pela disponibilidade e auxílio sempre que julguei necessário.

Aos meus amigos que, próximos ou distantes, me apoiaram e torceram por mim.

Aos meus pais, meu irmão e tio Roberto pela compreensão, incentivo e paciência de sempre.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

RESUMO

Neste trabalho foi estudado o potencial antitumoral de dez complexos metálicos, previamente caracterizados, sendo sete deles de Pt(II), dois de Cu(II) e um de Ga(III). Dentre os compostos de platina(II), **1**, **2** e **3** são complexos de cisplatina com aminoácidos; **4** e **5** de cisplatina e ligantes purínicos; e **6** e **7** são complexos de Pt(II) com antibióticos usados no tratamento da tuberculose, respectivamente, a pirazinamida e a isoniazida. **8** e **9** são complexos de Cu(II) e **10** um complexo de Ga(III). Os objetivos foram: i) estudar o efeito dos complexos no crescimento de células tumorais; ii) estudar a incorporação dos complexos de Pt(II) mais ativos pelas células tumorais; iii) estudar a interação dos complexos mais ativos com o ADN e iv) estudar a interação dos complexos que se ligarem ao ADN com um nucleotídeo modelo. Uma das principais aplicações de complexos metálicos em clínica médica é no tratamento do câncer. O ADN, devido à sua importância no ciclo de divisão celular, é um dos principais alvos de antitumorais. Visando esclarecer o mecanismo de ação dos compostos mais ativos foram feitos estudos da sua interação com o ADN por espectrofotometria de absorção na região do UV-Vis e com um nucleotídeo modelo, a guanosinamonofofato, por espectrometria de RMN de ^1H uni- e bidimensional COSY e de ^{31}P . Além da elucidação do mecanismo de ação, outro aspecto fundamental é o estudo da incorporação celular dos complexos, pois uma quantidade suficiente de droga deve se acumular dentro das células e, mais especificamente, dentro do núcleo. A concentração intracelular de platina foi determinada por espectrometria de absorção atômica em forno de grafita. Para todos os complexos foi avaliada a concentração necessária para inibir em 50% o crescimento celular, CI_{50} , na linhagem de leucemia mielóide crônica, K562. Os complexos **1**, **2** e **5** não apresentaram atividade citotóxica significativa. Já **3**, **4**, **6** e **7** exibiram uma boa atividade citotóxica, com valores de CI_{50} , respectivamente, de 2,93, 1,00, 6,34 e 24,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Em todos os casos, a coordenação a íons Pt(II) aumentou a atividade, pois a CI_{50} de todos os complexos foi inferior à dos ligantes livres. Foi encontrada uma boa correlação entre a atividade citotóxica e a concentração intracelular de platina, após a incubação das células com concentrações equitóxicas de **3**, **4**, **6** e **7**. A incubação com a CI_{50} leva a uma concentração intracelular de platina igual a $2,18 \times 10^{-16}$; $0,47 \times 10^{-16}$; $2,65 \times 10^{-16}$ e $23,18 \times 10^{-16}$ mol célula^{-1} , para **3**, **4**, **6** e **7**, respectivamente. Estes resultados são importantes, pois evidenciam que o efeito citotóxico observado está diretamente relacionado à presença da platina. Foi demonstrado que **4** e **6** formam um complexo ternário com o ADN, sendo os

valores das constantes de afinidade, respectivamente, $1,45 \times 10^5$ e $5,92 \times 10^3$. O complexo **4** foi o mais ativo e apresentou afinidade pelo ADN cerca de 25 vezes maior que **6**. As interações entre **3** e **6** e um nucleotídeo modelo, a 5'-GMP, foram estudadas por RMN. Os resultados obtidos indicam que o complexo **3** liga-se ao N7 da base nitrogenada. Para o complexo **6**, foi proposta a formação de um quelato, no qual a platina se coordena à 5'-GMP via N7 e um oxigênio do grupo α -fosfato. Os resultados obtidos sugerem que o mecanismo da atividade citotóxica dos compostos de platina(II) estudados pode envolver a interação com o ADN e o sítio dessa interação pode ser o N7 da guanina. Os complexos de Cu(II), **8** e **9**, apresentaram valores de CI_{50} relativamente altos e foram descartados como possíveis agentes antitumorais. Finalmente, o complexo de Ga(III), **10**, foi muito ativo com a CI_{50} de $1,80 \mu\text{mol L}^{-1}$. Foi evidenciada a formação de uma espécie ternária entre **10** e o ADN, com uma constante de afinidade de $5,67 \times 10^4$. Foi proposto que **10** se coordena ao nucleotídeo 5'-GMP, através de um oxigênio do grupo α -fosfato. O complexo **10** pode ser considerado um promissor agente antitumoral.

Palavras-chave: Metalos-antitumorais. Citotoxicidade. Concentração Intracelular. Interação com ADN. Nucleotídeo modelo.

ABSTRACT

This work reports on the antitumoral potential of ten metallic complexes, previously characterized, seven of them being of Pt(II), two of Cu(II) and one of Ga(III). Among the platinum(II) complexes, **1**, **2**, and **3** are complexes of cisplatin and aminoacids; **4** and **5** of cisplatin and purinic ligands; and **6** and **7** are Pt(II) complexes with two antibiotics used in the treatment of tuberculosis, the pyrazinamide and the isoniazide, respectively. **8** and **9** are compounds of Cu(II) and **10**, a Ga(III) complex. The goals of this work were: i) to study the effect of the complexes on the growth of tumor cells; ii) to study the uptake of the most active Pt(II) complexes by tumor cells; iii) to study the interaction of the most active complexes with DNA; and iv) to study the interactions of the complexes able to bind DNA with a nucleotide model. The most important use of metallic complexes in medical practice is in the treatment of cancer. DNA, due to its importance in the cellular cycle, is one of the main targets for antitumorals. Aiming to elucidate the mechanism of action of the most active compounds, a study of their interactions with DNA was undertaken by UV-Vis spectrophotometry, and with a nucleotide model, the guanosine 5'-monophosphate by mono-dimensional ^1H , two-dimensional ^1H COSY and ^{31}P NMR spectrometry. Besides the elucidation of the mechanism of action, another fundamental aspect is the study of cellular uptake of the compounds, since a sufficient amount of drug must accumulate inside cells and, more specifically, in the nucleus. The intracellular platinum concentration was assessed by flameless atomic absorption spectrometry. For all compounds, the concentration required to inhibit 50 % of cell growth, the IC_{50} , was determined in a chronic myelogenous leukemia cell line, the K562. Complexes **1**, **2**, and **5** did not show a significant cytotoxic activity whereas **3**, **4**, **6**, and **7** have exhibited a considerable activity, with IC_{50} values of 2.93, 1.00, 6.34, and 24.4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. In all cases, coordination to Pt(II) ions led to an increase in the activity, since the IC_{50} of all complexes was inferior to that of free ligands. A good correlation between cytotoxic action and intracellular platinum concentration was found, after incubating cells with equitoxic concentrations of **3**, **4**, **6**, and **7**. The incubation with IC_{50} doses led to an intracellular platinum concentration of 2.18×10^{-16} ; 0.47×10^{-16} ; 2.65×10^{-16} , and 23.18×10^{-16} mol cell $^{-1}$, for **3**, **4**, **6**, and **7**, respectively. These results are important because they indicate that the observed cytotoxic effect is directly related to the presence of platinum. Compounds **4** and **6** form a ternary complex with DNA, with the affinity constants of 1.45×10^5 and 5.92×10^3 ,

respectively. Complex **4** was the most active and showed an affinity to DNA approximately 25 times higher than that of **6**. The interactions between **3** or **6** and the guanosine 5'-monophosphate were studied by NMR. The results obtained indicate that complex **3** binds to N7 of the nitrogenated base. For complex **6**, the formation of a quelate, in which platinum(II) coordinates to 5'-GMP via N7 and one of the oxygens of the α -phosphate group, was proposed. The obtained results suggest that the mechanism of the cytotoxic activity of the platinum(II) complexes studied may involve an interaction with DNA and that N7 of guanine can be the site of this interaction. The Cu(II) complexes, **8** and **9**, showed relatively high IC_{50} values and were discarded as potential antitumoral agents. Finally, the gallium(III) complex, or complex **10**, was very active with the IC_{50} of $1.80 \mu\text{mol L}^{-1}$. The formation of a ternary species between **10** and DNA, with the affinity constant of 5.67×10^4 , was evidenced. The coordination of gallium to the nucleotide 5'-GMP was proposed to occur through an α -phosphate oxygen. Complex **10** can be considered a promising antitumoral agent.

Keywords: Metallo-antitumorals. Cytotoxicity. Intracellular concentration. DNA interaction. Model nucleotide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes na população brasileira para o ano de 2010	19
Figura 1.2 – Estrutura dos isômeros do diaminodicloroplatina(II) descobertos por (a) Reiser e (b). Peyrone	23
Figura 1.3 – Equilíbrio químico presente em uma solução aquosa de cisplatina	25
Figura 1.4 – Adutos (a) intrafitas do tipo cis-GG, cis-GA e cis-GNG (b) interfitas e (c) monofuncional formados entre cisplatina e bases nitrogenadas do ADN.	26
Figura 1.5 – Interação entre diaminohidroxoplatina(II) e bases púricas (a) guanina e (b) adenina	26
Figura 1.6 – Estruturas químicas de outros compostos de platina com atividade antitumoral. (a) carboplatina e (b) oxaloplatina foram aprovados pela FDA e apresentam utilização clínica.	28
Figura 1.7 – Complexos do tipo bis(platina).	29
Figura 1.8 – Estruturas químicas de compostos de Pt(IV) com atividade antitumoral.	29
Figura 1.9 – Complexos de gálio(III) com atividade antitumoral, (a) maltolato de gálio e (b) KP46.	30
Figura 1.10 – Estruturas propostas para 1, 2 e 3.	32
Figura 1.11 – Estruturas propostas para 4 e 5.	33
Figura 1.12 – Estruturas propostas para 6 e 7.	34
Figura 1.13 – Estruturas para 8 e 9.	35
Figura 1.14 – Estrutura para 10, os 2 contra-íons, ClO_4^- , foram omitidos.	36
Figura 4.1 – Curva de citotoxicidade de 1 frente a linhagem celular K562. Os valores foram obtidos pela média de 4 experimentos independentes.	49
Figura 4.2 – Curva de citotoxicidade de 2 frente a linhagem celular K562. Os valores foram obtidos pela média de 4 experimentos independentes.	50
Figura 4.3 – Curva de citotoxicidade de 3 frente a linhagem celular K562. Os valores foram obtidos pela média de 4 experimentos independentes.	50
Figura 4.4 – Inibição do crescimento celular em função da concentração de Pt intracelular, após incubação das células K562 com 3 por 72 horas. Os valores representam a média de 2 experimentos independentes.	51

Figura 4.5 – Curva de citotoxicidade de 4 frente a linhagem celular K562. Os valores foram obtidos pela média de 4 experimentos independentes.	53
Figura 4.6 – Curva de citotoxicidade de 5 frente a linhagem celular K562. Os valores foram obtidos pela média de 4 experimentos independentes.	53
Figura 4.7 – Inibição do crescimento celular em função da concentração de Pt intracelular após incubação das células K562 com 4 , por 72 horas. Os valores representam a média de 2 experimentos independentes.	54
Figura 4.8 – Curva de citotoxicidade de 6 frente a linhagem celular K562. Os valores foram obtidos pela média de 4 experimentos independentes.	55
Figura 4.9 – Curva de citotoxicidade de 7 frente a linhagem celular K562. Os valores foram obtidos pela média de 4 experimentos independentes.	55
Figura 4.10 – Inibição do crescimento celular em função da concentração de Pt intracelular, após incubação das células K562 com 6 , por 72 horas. Os valores representam a média de 2 experimentos independentes.	56
Figura 4.11 – Inibição do crescimento celular em função da concentração de Pt intracelular, após incubação das células K562 com 7 , por 72 horas. Os valores representam a média de 2 experimentos independentes.	56
Figura 4.12 – Curva de citotoxicidade de 8 e 9 frente a linhagem celular K562. Os valores foram obtidos pela média de 4 experimentos independentes.	58
Figura 4.13 – Curva de citotoxicidade de 10 frente à linhagem celular K562. Os valores foram obtidos pela média de 4 experimentos independentes.	59
Figura 4.14 – Espectro de absorção na região UV-Vis da solução contendo $5,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 4 e concentração de ADN variando de 0 a $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão HEPES pH = 7,3, a 25°C.	61
Figura 4.15 – Espectro de absorção na região UV-Vis da solução contendo $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 6 e concentração de ADN variando de 0 a $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão HEPES pH = 7,3, a 25°C.	61
Figura 4.16 – Espectro de absorção na região UV-Vis da solução contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 10 e concentração de ADN variando de 0 a $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão HEPES pH = 7,3, a 25°C.	62
Figura 4.17 – Fórmula estrutural para a 5'-GMP.	63
Figura 4.18 – Fragmentos dos espectros de RMN ^1H obtidos para (a) 5'-GMP, (b) 3'-GMP após 4 horas de mistura na razão molar [5'-GMP]:[3] = 4:1, em tampão fosfato, pD = 7,2. .	65

- Figura 4.19** – Fragmentos dos espectros unidimensionais de RMN ^1H obtidos para **6-5'-GMP** nos tempos de **(a)** 0 horas e **(b)** 14 horas de mistura, na razão molar contendo $[5'\text{-GMP}]:[6] = 2:1$, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, $\text{pD} = 5,0$ 66
- Figura 4.20** – Fragmentos dos espectros bidimensionais de ^1H COSY RMN obtidos para **(a)** **6** e **6-5'-GMP** nos tempos de **(b)** 0 horas e **(c)** 14 horas de mistura, na razão molar contendo $[5'\text{-GMP}]:[6] = 2:1$, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, $\text{pD} = 5,0$ 67 e 68
- Figura 4.21** – Espectros de RMN ^{31}P obtidos para **(a)** **5'-GMP** e para **6-5'-GMP** nos tempos de **(b)** 0 horas e **(c)** 14 horas de mistura na razão molar contendo $[5'\text{-GMP}]:[6] = 2:1$, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, $\text{pD} = 5,0$ 69
- Figura 4.22** – Proposta de estrutura para o aduto **6-5'-GMP** formado a partir da mistura na proporção molar contendo $[5'\text{-GMP}]:[6] = 2$, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, $\text{pD} = 5,0$ 70
- Figura 4.23** – Fragmentos dos espectros de ^1H RMN obtidos para **(a)** **10**; e misturas na proporção molar $[5'\text{-GMP}]:[10] = 2:1$ nos tempos de **(b)** 0 horas e **(c)** 5 horas, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, $\text{pD} = 6,0$ 72
- Figura 4.24** – Fragmentos dos espectros de ^1H bidimensionais COSY obtidos para **(a)** **10**, e misturas na proporção molar $[5'\text{-GMP}]:[10] = 2:1$ nos tempos de **(b)** 0 horas e **(c)** 5 horas, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, $\text{pD} = 6,0$ 73 e 74
- Figura 4.25** – Espectros de RMN ^{31}P obtidos para **(a)** **5'-GMP**, e misturas na proporção molar $[5'\text{-GMP}]:[10] = 2:1$ nos tempos de **(b)** 0 horas e **(c)** 5 horas, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, $\text{pD} = 6,0$. 74
- Figura 4.26** – Estrutura da Guanosina. 75
- Figura 4.27** – Fragmentos dos espectros de ^1H unidimensionais obtidos para **(a)** guanosina; e misturas contendo a proporção molar $[\text{guanosina}]:[10] =$ **(b)** 2:1 e **(c)** 4:1, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, $\text{pD} = 6,0$ 76
- Figura 4.28** – Fragmentos dos espectros de ^1H bidimensionais COSY obtidos para **(a)** guanosina e misturas contendo a proporção molar $[\text{guanosina}]:[10] =$ **(b)** 2:1 e **(c)** 4:1, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, $\text{pD} = 6,0$ 77 e 78
- Figura A1** – Espectro de ^1H RMN obtido para **3**, em tampão fosfato, $\text{pD} = 7,2$ 88
- Figura A2** – Espectros de RMN ^1H obtidos para **(a)** **5'-GMP**; e misturas contendo a proporção molar $[5'\text{-GMP}]:[3] = 4:1$ nos tempos de **(b)** 4 horas e **(c)** 28 horas, em tampão fosfato, $\text{pD} = 7,2$ 88 a 91
- Figura A3** – Espectros de RMN ^1H obtidos para **(a)** **6**; e misturas contendo a proporção molar $[5'\text{-GMP}]:[6] = 2:1$ nos tempos de **(b)** 0 horas e **(c)** 14 horas, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, $\text{pD} = 5,0$ 92 a 94

- Figura A4** – Espectros de RMN ^1H bidimensionais COSY obtidos para (a) **6**; e misturas contendo a proporção molar $[5'\text{-GMP}]:[\mathbf{6}] = 2:1$ nos tempos de (b) 0 horas e (c) 14 horas, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, pD = 5,0. 95 a 97
- Figura A5** – Espectros de RMN ^1H obtidos para (a) **10**; e misturas contendo a proporção molar $[5'\text{-GMP}]:[\mathbf{10}] = 2:1$ nos tempos de (b) 0 horas e (c) 5 horas, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, pD = 6,0. 98 a 100
- Figura A6** – Espectros de RMN ^1H bidimensionais COSY obtidos para (a) **10**; e misturas contendo a proporção molar $[5'\text{-GMP}]:[\mathbf{10}] = 2:1$ nos tempos de (b) 0 horas e (c) 5 horas, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, pD = 6,0.
- Figura A7** – Espectro de ^1H RMN obtido para **10**, em $\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN } 9:1$, pD = 6,0. 104
- Figura A8** – Espectros de RMN ^1H obtidos para (a) guanosina; e misturas contendo a razão molar $[\text{guanosina}]:[\mathbf{10}] =$ (b) 2:1 e (c) 4:1, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, pD = 6,0. 105 a 107
- Figura A9** – Espectro de RMN ^1H bidimensional COSY obtido para **10**, em $\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN } 9:1$, pD = 6,0. 108
- Figura A10** – Espectros de RMN ^1H bidimensionais COSY obtidos para (a) guanosina; e misturas contendo a proporção molar $[\text{guanosina}]:[\mathbf{10}] =$ (b) 2:1 e (c) 4:1, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, pD = 6,0. 109 a 111

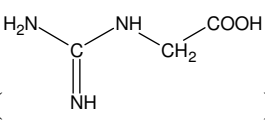
LISTA DE TABELAS

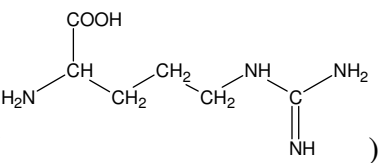
Tabela 1.1 – Proporções estequiométricas entre ligantes e íons metálicos e fórmula molecular dos complexos formados.	31
Tabela 3.1 – Descrição dos solventes usados na preparação das soluções estoques de cada um dos complexos testados e seus ligantes.	42
Tabela 3.2 – Concentração das soluções usadas para cada um dos complexos e maior razão molar [ADN]:[complexo] atingida em cada caso.	44
Tabela 3.3 – Condições experimentais para estudo da interação de 3 e 6 com 5'-GMP.	45
Tabela 3.4 – Condições experimentais para estudo da interação entre 10 e 5'-GMP e entre 10 e guanosina.	46
Tabela 4.1 – Valores de CI_{50} frente à linhagem celular K562. Valores determinados para os ligantes 1 , 2 , 4 , 5 e 6 e para os complexos 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 e 7 . Os valores representam a média de quatro experiências independentes.	48
Tabela 4.2 – Valores de CI_{50} ; concentração de $[Pt]_i$ na CI_{50} frente à linhagem celular K562 para os complexos 6 e 7 . Os valores representam a média de quatro experiências independentes.	57
Tabela 4.3 – Valores de CI_{50} frente à linhagem celular K562. Valores determinados para os complexos 8 e 9 . Os valores representam a média de quatro experiências independentes.	57
Tabela 4.4 – Deslocamentos químicos de 1H observados para a 5'-GMP e para o aduto 3 -5'-GMP, na razão molar $[5'-GMP]:[3] = 4:1$, $pD = 7,2$, em diferentes intervalos de tempo. .	64
Tabela 4.5 – Deslocamentos químicos de 1H e ^{31}P observados para 5'-GMP e para aduto 6 -5'-GMP, na proporção molar $[5'-GMP]:[6] = 2:1$ em $D_2O/DMSO d_6$, $pD = 5$, em diferentes intervalos de tempo.	67
Tabela 4.6 – Deslocamentos químicos para 1H e ^{31}P da 5'-GMP livre e após mistura contendo a proporção molar $[5'-GMP]:[10] = 2:1$ nos tempos de 0 e 4 horas de reação, em $DMSO-d_6/D_2O$, $pD = 5$ e força iônica $2,50 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de $NaNO_3$	71
Tabela 4.7 – Deslocamento químicos da guanosina livre e após mistura com 10 em $DMSO-d_6/D_2O$, $pD = 5$, força iônica $2,50 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de $NaNO_3$	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila (CH_3CN)

ADN – Ácido desoxirribonucléico

Aga – Ácido Guanidoacético ()

Arg – Arginina ()

CI_{50} – Concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular

DMSO – Dimetilsulfóxido ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$)

DMSO d_6 – Dimetilsulfóxido deuterado ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$)

D_2O – óxido de deutério

FDA – Food and Drug Administration

5'-GMP – 5'-Guanosinamonofofato

GFAAS – Espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite

INCA – Instituto Nacional de Câncer

RMN – Ressonância magnética nuclear

TFD – Terapia Fotodinâmica

TMS – Tetrametilsilano ($(\text{CD}_3)_4\text{Si}$)

UV – Região do ultravioleta no espectro eletromagnético

Vis – Região do visível no espectro eletromagnético

$[\text{Pt}]_i$ – Concentração de platina intracelular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	CÂNCER: INCIDÊNCIA E ESTIMATIVAS DE CASOS NO BRASIL E NO MUNDO	18
1.2	AS CÉLULAS: ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS SAUDÁVEIS	21
1.3	O CÂNCER E A QUÍMICA INORGÂNICA	22
1.3.1	Mecanismo de Ação da Cisplatina	24
1.3.2	Aspectos Clínicos e Desenvolvimento de Novos Quimioterápicos	27
1.4	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS ESTUDADOS	31
2	OBJETIVOS	38
3	PARTE EXPERIMENTAL	40
3.1	EQUIPAMENTOS	40
3.2	REAGENTES E MATERIAIS	41
3.3	ESTUDO DA CITOTOXICIDADE: DETERMINAÇÃO DA CI_{50}	42
3.4	ESTUDO DA FOTOCITOTOXICIDADE: DETERMINAÇÃO DA CI_{50}	43
3.5	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DOS COMPOSTOS	43
3.6	ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS 4 , 6 E 10 COM O ADN	44
3.7	ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS 3 , 6 E 10 COM 5'-GUANOSINAMONOFOSFATO E GUANOSINA	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	ESTUDO COMPARATIVO DAS ATIVIDADES ANTITUMORAIS DOS COMPOSTOS TESTADOS	48
4.2	ESTUDO DA FOTOCITOTOXICIDADE: DETERMINAÇÃO DA CI_{50}	59
4.3	ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS 4 , 6 E 10 COM O ADN	60
4.4	ESTUDO DA INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS 3 , 6 E 10 COM A 5'-GMP E DE 10 COM GUANOSINA	63
5	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS	82

ANEXO A – ESPECTROS COMPLETOS DE RMN ^1H UNI- E BIDIMENSIONAIS	88
TRABALHOS CIENTÍFICOS	112

Capítulo 1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Uma área que tem despertado grande interesse na Química Inorgânica é o estudo das funções, metabolismo e a aplicações de íons metálicos e seus complexos em sistemas biológicos, em especial no tratamento de doenças. Esta área da pesquisa situa-se na interface de várias disciplinas como a química de coordenação, a físico-química celular, a farmacologia, a bioquímica, entre outras. A aplicação de complexos metálicos tem grande importância no tratamento de câncer, devido ao aumento da sobrevivência de vários paciente com o uso de antitumoral a base de platina [1, 2].

1.1 Câncer: Incidência e Estimativas de Casos no Brasil e no Mundo

Tumor ou neoplasia é um termo genérico que indica aumento anormal de uma parte ou totalidade de um tecido, ocasionado pela multiplicação desordenada de células. Esses tumores podem ser benignos ou malignos. Tumor benigno é aquele no qual a massa das células que se multiplicaram encontra-se localizada e se assemelha ao tecido original. Raramente ele oferece riscos. Já o tumor maligno, também designado por câncer, pode invadir tecidos e órgãos e, assim, ocasionar metástase, ou seja, se espalhar para outras regiões do corpo.

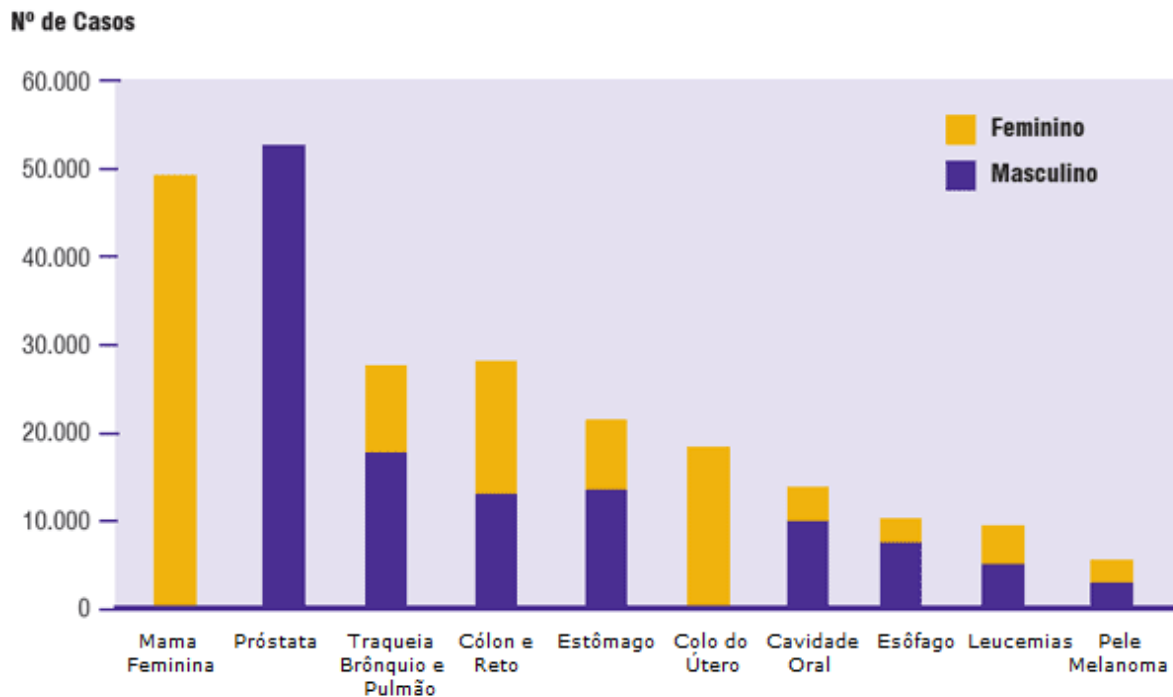
São conhecidos atualmente mais de 200 tipos de cânceres, sendo estes, desde 2003, a segunda maior causa de morte no Brasil. Isso representa quase 17% dos óbitos de causa conhecida, registrados em 2007, no sistema de Informações sobre Mortalidade [3]. Sendo assim, compreender e controlar as tais doenças constituem um grande interesse científico, político e social.

A Política Nacional de Atenção Oncológica, incorporada pela Portaria nº 2.048, de 3 de setembro de 2009, define, para o país, abrangente controle do câncer, e considera vários componentes, desde as ações voltadas à prevenção até a assistência de alta complexidade, integradas em redes de atenção oncológica, com o objetivo de reduzir a incidência e a mortalidade por câncer [3].

De acordo com relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (*World Cancer Report 2008*), o impacto global causado pelo câncer mais que

dobrou em 30 anos, devido ao contínuo crescimento populacional aliado ao seu envelhecimento.

As estimativas mundiais para o ano de 2008 foram de cerca de 12,4 milhões de novos casos de câncer e 7,6 milhões de óbitos. Destes, os mais incidentes foram o câncer de pulmão (1,52 milhões de casos novos), mama (1,29 milhões) e cólon e reto (1,15 milhões). Já no Brasil, as estimativas, para os anos de 2010 e 2011 são similares, e apontam para a ocorrência de 489.270 novos casos anuais. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, o que muito se assemelha ao cenário mundial. A **Figura 1.1** faz uma estimativa dos tipos de câncer previstos para a população brasileira em 2010 [3].



Fonte: Instituto Nacional de Câncer - INCA/MS

Figura 1.1 – Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes na população brasileira para o ano de 2010.

O cenário atual nos mostra a fundamental importância e relevância no estabelecimento de medidas eficazes para controlar o câncer, o que requer compreensão sobre a doença e seus determinantes.

Qualquer pessoa, independente de classe social ou cor, é passível de desenvolver algum tipo de câncer. As causas do desenvolvimento de um tumor não são completamente claras, embora muitos esforços tenham sido despendidos no sentido de elucidá-las.

Muitos fatores sejam ambientais ou hereditários, se mostram de risco no desenvolvimento da doença. Esses fatores, isolados ou combinados, tem permitido o estabelecimento de causa-efeito sobre determinados tipos de câncer. Os fumantes, por exemplo, têm um risco relativo 10 vezes maior de desenvolver câncer de pulmão quando comparados aos não fumantes. O câncer de esôfago pode ser associado ao consumo combinado de álcool, tabaco e residência rural. Já o câncer na cavidade bucal pode ser favorecido pelo consumo combinado de álcool, tabaco, chimarrão, churrasco e cozimento de alimentos em fogão à lenha. Por outro lado, a ingestão de frutas cítricas e vegetais ricos em caroteno parece ser um fator de proteção contra essas neoplasias [3].

Alguns tipos de vírus também parecem estar relacionados com no mínimo seis tipos de câncer em seres humanos e constituem cerca de 15% dos casos de câncer no mundo. Hepatite B, por exemplo, pode causar 80% dos casos de câncer de fígado. A bactéria *Helicobacter pylori* é responsável por muitas úlceras estomacais e também implica em câncer de estômago [4].

O envelhecimento também se mostra como fator relevante ao aumento da suscetibilidade maligna, pois ele traz mudanças nas células, além do fato das células das pessoas idosas terem sido expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco para câncer.

Ainda assim, a identificação dos fatores de risco não são facilmente reconhecíveis. Para as doenças crônicas, as primeiras manifestações podem demorar anos para o surgimento após exposições aos fatores de risco.

O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade.

A radioterapia consiste na utilização de radiações para destruir um tumor ou impedir que suas células aumentem. Tais radiações são direcionadas, ou seja, o paciente as recebe apenas na parte do corpo afetada. Segundo dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), metade dos pacientes acometidos do câncer é tratada com radiações, sendo o número de pessoas curadas por esse tratamento crescente. Em alguns casos, a neoplasia fica controlada ou até desaparece [3]

A quimioterapia consiste na utilização de medicamentos capazes de destruir as células doentes formadoras do tumor. Ao atingirem a corrente sanguínea, os fármacos são levados a todas as partes do corpo, possibilitando a morte das células doentes, além de impedir a metástase.

O transplante de medula torna-se necessário quando doenças malignas afetam as células do sangue. Ele consiste na substituição de uma medula óssea doente, ou deficitária, por células normais de medula óssea, com o objetivo de reconstituição de uma nova medula.

Menos divulgado e como proposta alternativa no tratamento contra o câncer destaca-se a terapia fotodinâmica (TFD). Trata-se de uma técnica menos invasiva, na qual um composto fotossensível é introduzido no paciente e se acumula preferencialmente em células que se reproduzem rapidamente. Posteriormente, as células são irradiadas, via laser, através de um cateter de fibra ótica junto ao tecido doente. A luz, que normalmente apresenta comprimento de onda na faixa de 600 e 800 nm, ativa o composto, formando espécies que afetam o tumor. Uma vez irradiado, verifica-se que, em geral, não há total destruição do tumor. No entanto, a região fotolisada fica necrosada e o efeito é propagado. Isso leva a acreditar que a morte do tecido ocorre através do comprometimento do sistema de irrigação tumoral [5].

1.2 As Células: Algumas Características das Células Saudáveis

As células são as unidades funcionais e estruturais dos seres vivos. As células animais, independente de suas estruturas ou funções, são formadas basicamente por duas partes: o citoplasma e o núcleo.

A membrana plasmática é o constituinte mais externo do citoplasma e constitui o limite entre o meio intracelular e o ambiente extracelular. Ela é formada por uma bicamada fosfolipídica, na qual os grupamentos apolares (hidrofóbicos) se orientam para o centro da membrana, enquanto os grupamentos polares (hidrofílicos) ficam nas duas superfícies da membrana. Dentre as funções da membrana plasmática destaca-se a de manter constante a concentração no meio intracelular, garantido permeabilidade seletiva.

As trocas de substâncias entre as células e o meio onde elas vivem ocorrem através da membrana. Moléculas pequenas e alguns íons, como Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , podem

atravessar a membrana plasmática através de canais constituídos por proteínas. Quando essa travessia não consome energia, diz-se que se trata de transporte passivo. Este, por sua vez, pode ocorrer na ausência de proteínas carreadoras (difusão passiva) ou em sua presença (transporte facilitado). Quando a travessia consome energia, fala-se em transporte ativo [6].

No citoplasma se localizam o citoesqueleto, as organelas e os depósitos ou inclusões, geralmente temporários, de carboidratos, proteínas, lipídeos ou pigmentos. O citoesqueleto é responsável por contração celular, movimentação das células, além de influenciar na forma das células e movimento das organelas. As organelas desempenham diversas funções, dentre elas disponibilizam energia química em energia facilmente utilizável pelas células, síntese de proteínas, digestão intracitoplasmática, oxidação de substratos orgânicos específicos, entre outros [6].

Já o núcleo contém os cromossomos que são formados por genes. Estes são as unidades funcionais que guardam e fornecem instruções para a organização das estruturas, formas e atividades das células no organismo. Eles contêm toda a informação genética numa "memória química" – o ácido desoxirribonucléico (ADN). É através do ADN, organizado em cromossomos, que as informações para o funcionamento da célula são transmitidas às células filhas. O núcleo também é responsável pela síntese de todos os tipos de ácidos ribonucléicos (ARN) que, por sua vez, serão responsáveis pela síntese protéica no citoplasma.

As células saudáveis são susceptíveis a mutações gênicas, ou seja, alterações na sequência de nucleotídeos formadores dos genes. Caso isso ocorra, informações erradas são geradas, podendo levar à modificação das atividades. Algumas alterações, a princípio não causam prejuízos às células normais. Em outros casos, levam à formação de células diferentes, que, algumas vezes podem ser classificadas como cancerosas.

1.3 O Câncer e a Química Inorgânica

A pesquisa de complexos metálicos com propriedades antitumorais iniciou-se com a descoberta da ação antitumoral de cis-diaminodicloroplatina(II), cisplatina, no fim da década de 60 do século XX, por Barnet Rosenberg e tem sido estimulada com a descoberta da atividade citotóxica de diversos outros complexos de platina e outros metais, tais como gálio e cobre [7, 8].

O complexo diaminodicloroplatina(II) foi descrito pela primeira vez em 1844 por Reiset e, um ano mais tarde, Peyrone descreveu um outro composto com a mesma fórmula molecular. Em 1893, Werner propôs que esses complexos fossem isômeros, sendo o de Reiset a forma trans (**Figura 1.2, a**) e o de Peyrone o isômero cis (**Figura 1.2, b**) [7,9]

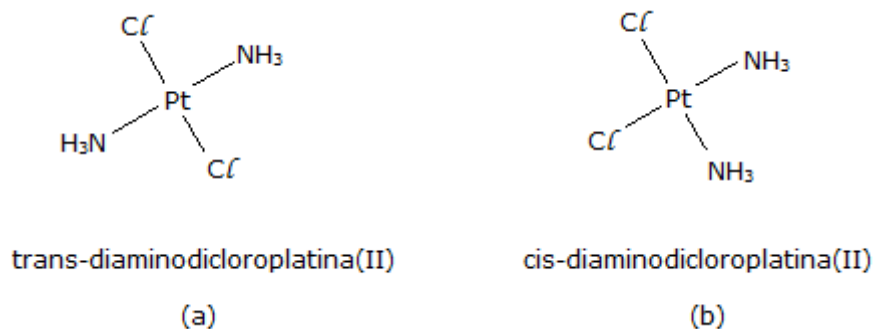


Figura 1.2 – Estrutura dos isômeros do diaminodicloroplatina(II) descobertos por (a) Reiser e (b) Peyrone

Entretanto, foi apenas a partir de 1964 que Rosenberg, ao estudar a ação do campo elétrico alternado em uma colônia de bactérias *Escherichia coli*, observou que a divisão celular dessas bactérias era inibida. Com persistência do crescimento depois de interrompida a corrente elétrica, tornou-se possível localizar o verdadeiro agente inibidor, a cisplatina. Esta era formada eletroliticamente pela reação da platina desprendida dos eletrodos e o cloreto de amônio presente no meio nutriente [10].

A partir desses resultados, Rosenberg administrou diaminodicloroplatina(II) em camundongos portadores de sarcoma-180, um modelo de tumor usado para ensaios farmacológicos. O isômero trans não mostrou resultados satisfatórios. No entanto, o resultado foi surpreendente para o isômero cis (cisplatina) – este provocou a regressão completa do tumor em 36 dias [7, 10].

Já no início da década de 70, a cisplatina foi introduzida em testes clínicos, demonstrando eficácia contra cânceres sólidos, genitourinários, ginecológicos, broncogênicos, da cabeça e do pescoço. Sua utilização como agente quimioterápico foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) em 1978. Apenas como exemplo, esse fármaco possibilita 90% dos casos de cura para câncer testicular e aproximadamente 100% quando diagnosticado precocemente [10, 11].

Pode-se dizer que a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina abriu uma nova perspectiva, incluindo os complexos metálicos como possíveis agentes antitumorais. Desde então, vários esforços foram despendidos no sentido de elucidar o mecanismo de ação da cisplatina e outros compostos de coordenação. Um grande empecilho, no entanto, encontra-se no comportamento usual de complexos perante as reações de substituições (sendo a mais importante a hidrólise), de equilíbrio, oxirreduções, entre outras.

1.3.1 Mecanismo de Ação da Cisplatina

Os primeiros passos que desencadeiam a morte das células por compostos de platina envolvem quatro etapas: entrada e acumulação nas células; ativação do complexo de platina; ligação com os ácidos nucleicos formando uma variedade de adutos Pt-ADN; e, finalmente, os danos ao ADN [11].

Durante muitos anos acreditava-se que cisplatina entrava nas células pelo mecanismo de difusão passiva. A alta concentração de íons cloreto no meio extracelular possibilita que Cl^- da cisplatina não seja substituído por moléculas de água, de forma que este composto se mantém na forma neutra. No interior da célula a concentração de íons cloreto é significativamente menor, o que possibilita a ocorrência de reações de substituição, levando a formação de outras quatro espécies mais reativas. A **Figura 1.3** ilustra o equilíbrio entre cisplatina e outras espécies aquosas. Atualmente, no entanto, a hipótese de transporte ativo mediado pela existência de proteínas de membranas está crescendo. Paul Andrews e colaboradores sugerem que o influxo de cisplatina nas células foi relacionada à atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase, pois eles verificaram que a inibição do funcionamento desta enzima diminuía a incorporação de cisplatina pelas células tumorais [12]. Já Safaei e colaboradores mostraram o papel regulador da proteína CTR1 (transportadora de cobre) na acumulação de diversas drogas de platina em leveduras [13].

Uma vez dentro das células, parece haver um consenso que o principal alvo da cisplatina seja o ADN, pois diversas classes de adutos são isoladas quando se adiciona cisplatina a esse ácido nucleico. As espécies positivamente carregadas do complexo (**Figura 1.3**) são as mais reativas, ligando-se ao ADN na posição N7 (nitrogênio do anel imidazólico) de bases purinas (adenina e guanina) para formar, principalmente, adutos em que cada átomo

de platina se liga a duas posições do ADN. Lippard e colaboradores mostraram que 47-50% dos adutos são do tipo 1,2-intrafitas envolvendo guaninas adjacentes, $\text{cis}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{d}(\text{GpG})\}]$ (cis-GG), enquanto 23-28%, também do são tipo 1,2-intrafitas, envolvem guanina e adenina adjacentes, $\text{cis}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{d}(\text{ApG})\}]$ (cisAG). Além desses, 8-10% dos produtos contêm adutos 1,3-intrafitas envolvendo guaninas não adjacentes, cis-GNG e adutos interfitas. Outros 2-3% são resultantes de produtos monofuncionais com guanina (**Figura 1.4**) [14, 15]. A **Figura 1.5** ilustra a interação entre as bases nitrogenadas – guanina e adenina – com a espécie cis-diaminohidroxiplatina(II) [11].

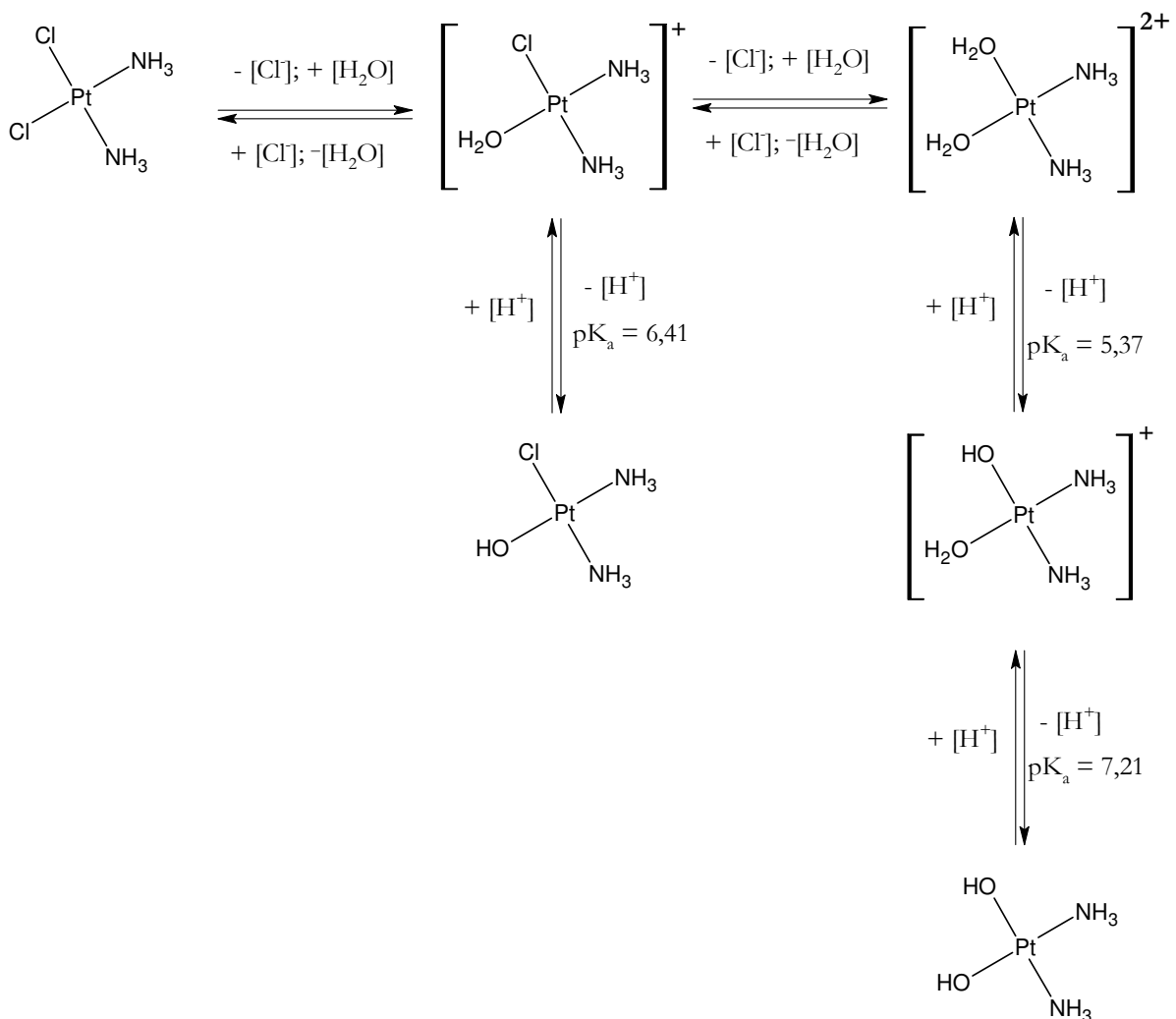


Figura 1.3 – Equilíbrio químico presente em uma solução aquosa de cisplatina

Essas ligações cruzadas entre complexo e ADN apresentam forte caráter covalente, o que causa uma significativa distorção na estrutura helicoidal do ADN e, portanto, danos. Estes danos levam à ruptura de diversos processos celulares, incluindo transcrição e replicação. Estes, por sua vez, podem desencadear a morte celular. Outros estudos feitos por

Lippard e colaboradores demonstram que compostos de platina influenciam não somente na estrutura de dupla hélice do ADN com também nos nucleossomos [11, 16].

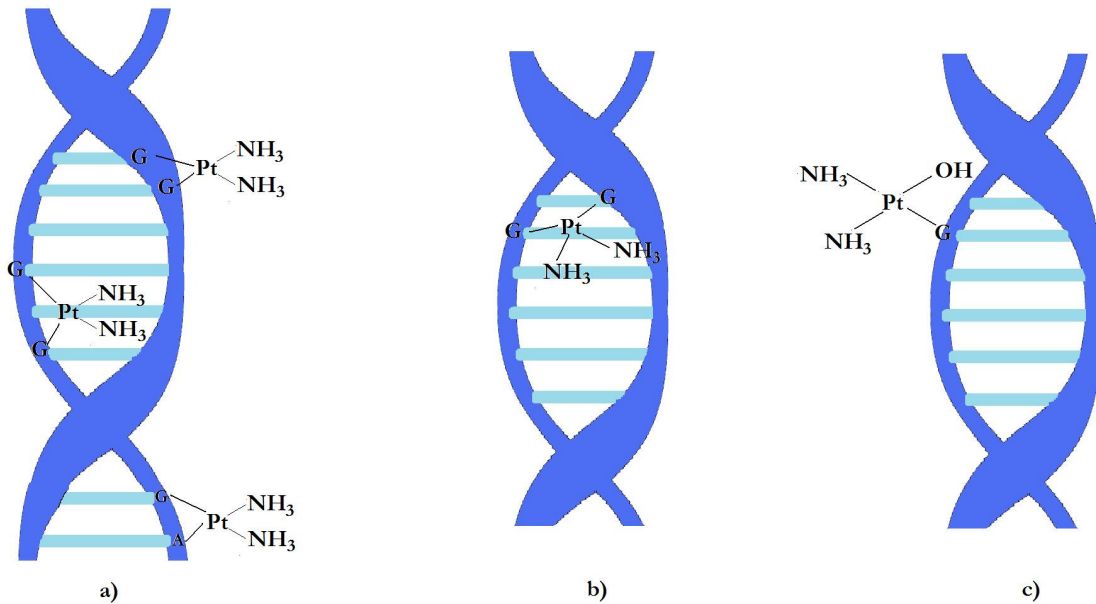


Figura 1.4 – Adutos (a) intrafitas do tipo cis-GG, cis-GA e cis-GNG (b) interfita e (c) monofuncional formados entre cisplatina e bases nitrogenadas do ADN.

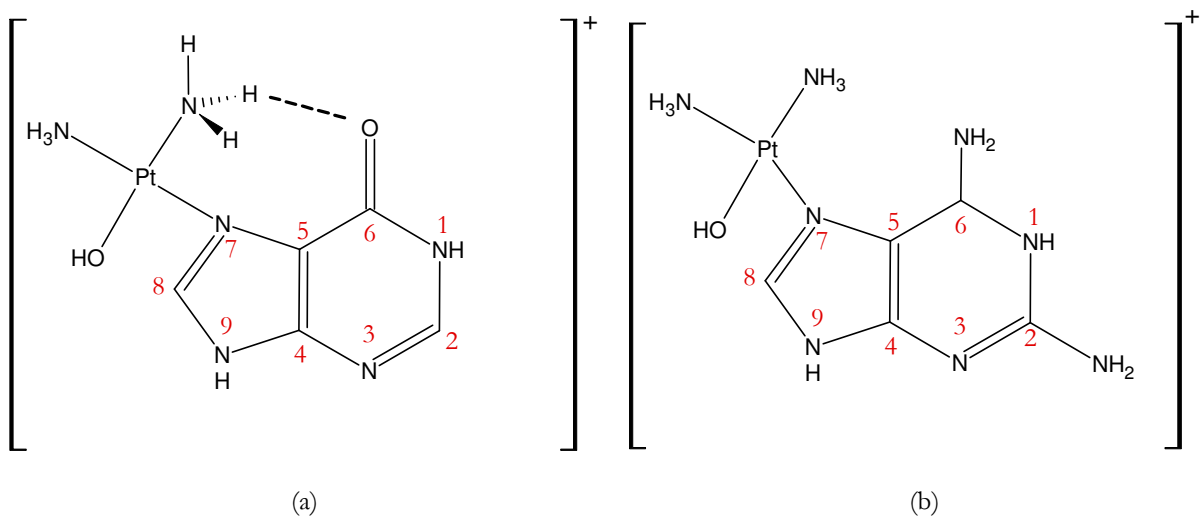


Figura 1.5 – Interação entre diaminohidroxoplatina(II) e bases púricas (a) guanina e (b) adenina

Há duas diferentes formas de morte celular induzida pelo uso de cisplatina: apoptose e necrose. Na apoptose, fenômeno em geral muito rápido, a cromatina sofre condensação e se concentra junto a membrana nuclear que se mantém intacta. Essa membrana

sofre prolongamentos e o núcleo se desintegra. Também muito marcante neste processo é a fragmentação internucleossômica que é ativada produzindo fragmentos de ADN. Já na necrose, ocorre aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e, conseqüente ruptura celular. Nesse processo o conteúdo celular é liberado, causando danos às células vizinhas e até uma inflamação local. O modo pelo qual a cisplatina promove a morte celular depende da dose e o efeito desse fármaco e seus derivados sobre o ADN é controlado pela hidrólise e transporte intracelular e pela ligação que ocorre entre o composto e o ácido nucléico [17, 18].

1.3.2 Aspectos Clínicos e Desenvolvimento de Novos Quimioterápicos

A utilização da cisplatina como agente antitumoral possibilitou um aumento da sobrevida de pacientes com diversos tipos de câncer. No entanto, efeitos colaterais, aliados à resistência desenvolvida pela utilização desse fármaco são fatores limitantes no tratamento. Dentre os efeitos colaterais destacam-se náuseas, vômitos, hipomagnesia, supressão da medula óssea, toxicidade no trato intestinal e nefrotoxicidade, sendo este último o principal. Tais efeitos colaterais são atribuídos a interações da cisplatina (ou de seus derivados) com outros alvos, tais como proteínas e peptídeos. A glutathione, como exemplo, ao se complexar à cisplatina reduz a concentração intracelular do fármaco e, assim, menor quantidade do composto ficará disponível para atingir os alvos farmacológicos desejáveis [10].

Estudos também mostram que as alterações das funções renais devem-se, principalmente, a indução de danos nos túbulos proximais implicando na diminuição da capacidade de filtração na função renal. Além disso, o uso da cisplatina também pode ocasionar alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais dos rins [19].

Felizmente, os efeitos colaterais podem ser minimizados por medidas protetoras, tais como a pré e pós hidratação intravenosa por manitol ou dimetiltiouréia [19].

a) Outras classes de drogas a base de platina

A resistência celular e os efeitos tóxicos associados à cisplatina conduziram ao desenvolvimento de outras classes de drogas, objetivando-se obter compostos mais eficazes e

menos tóxicos, seja pela coordenação de outros ligantes à platina, seja pelo desenvolvimento de complexos de outros íons metálicos.

Durante muito tempo acreditava-se que a geometria quadrado planar e a estereoquímica cis eram pré-requisitos para a atividade antitumoral de compostos de Pt(II), ou seja, espécies do tipo cis-PtX₂L₂, nos quais a platina apresentava estado de oxidação 2+. Para esses complexos, os ligantes substituíveis X deveriam apresentar uma labilidade moderada, tais como Cl⁻ ou dicarboxilatos. Já os ligantes L deveriam possibilitar manter a identidade do fragmento [Pt²⁺L₂] para a interação com os nucleófilos das células neoplásicas, ou seja, não poderiam dissociar do centro metálico, devendo, portanto, serem razoavelmente inertes, tais como aminas. De fato, dois outros complexos dessa classe também apresentam utilização clínica: carboplatina (**Figura 1.6 (a)**) e oxaloplatina (**Figura 1.6 (b)**) [11].

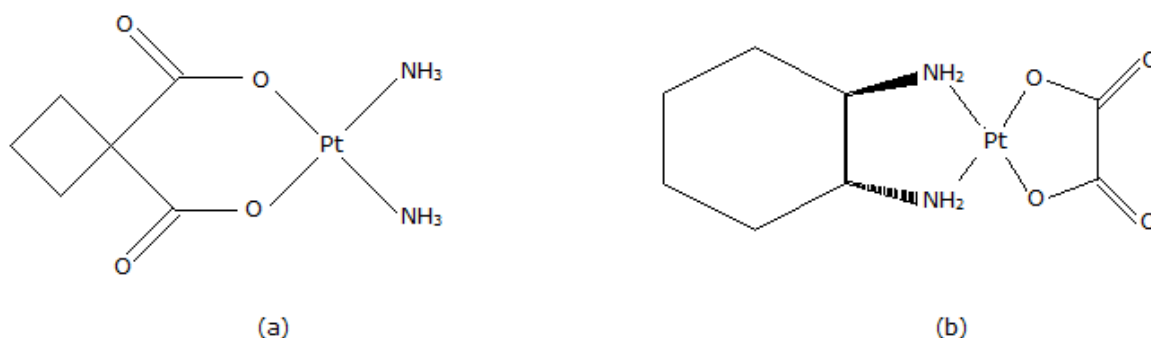


Figura 1.6 – Estruturas químicas de outros compostos de platina com atividade antitumoral. (a) carboplatina e (b) oxaloplatina foram aprovados pela FDA e apresentam utilização clínica.

Diamino(1,1-ciclobutanodicarboxilato)platina(II), ou carboplatina, mesmo apresentando basicamente o mesmo espectro de atividade que a cisplatina tem menos efeitos colaterais, além de não ser eficiente no combate a células tumorais resistentes à cisplatina. Já a oxaloplatina, apresenta menor efeito nefrotóxico, no entanto, também apresenta menor espectro de atividade.

Atualmente, no entanto, outras classes de compostos de platina têm mostrado atividade animadora. Uma família de complexos dinucleares contendo duas esferas monofuncionais de platina ligadas por cadeias diaminas foi descrita por Farrell e colaboradores [20, 21]. Os primeiros compostos dinucleares descritos (1,1/c,c e 1,1/t,t) (**Figura 1.7**) receberam especial atenção por terem atividade citotóxica nas células sensíveis comparável à da cisplatina, porém muito mais alta nas células resistentes à cisplatina.

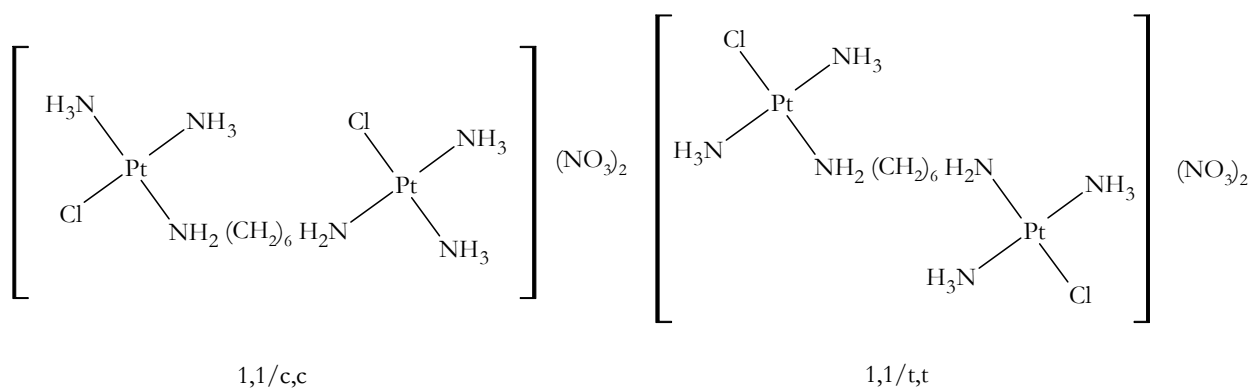


Figura 1.7 – Complexos do tipo bis(platina).

Atualmente vem sendo mostrada atividade promissora para alguns complexos de Pt(IV), tais como iproplatina, tetraplatina e JM-216 (**Figura 1.8**). Este último encontra-se em fase (III) nos ensaios clínicos. Tais complexos são mais solúveis em água, sendo isto uma vantagem para a utilização desses compostos como fármacos, uma vez que muitas reações biológicas ocorrem em meio aquoso, além de apresentarem maior estabilidade em meio ácido, o que possibilitaria que eles fossem administrados via oral [11, 22, 23].

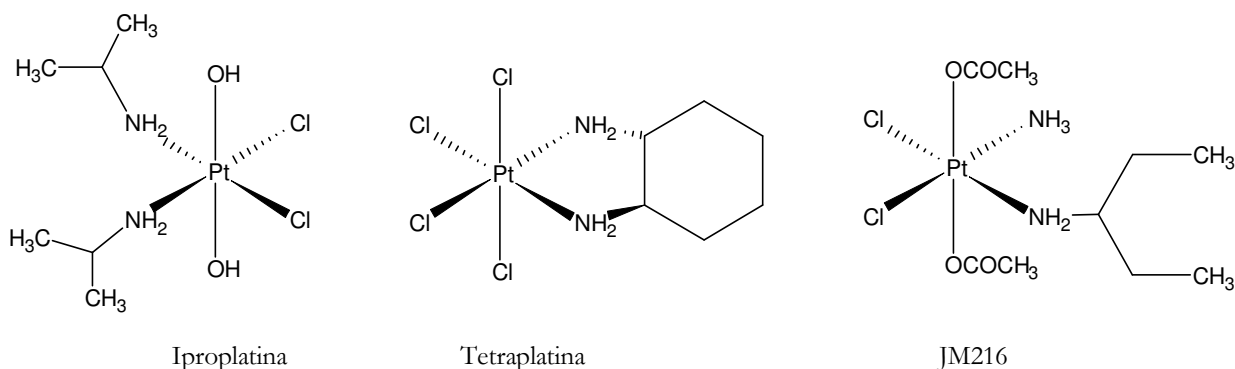


Figura 1.8 – Estruturas químicas de compostos de Pt(IV) com atividade antitumoral.

b) Classes de drogas com atividade antitumoral a base de gálio

Outros exemplos de compostos com atividade antitumoral são sais de gálio, tais como $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ e GaCl_3 ou seus complexos tais como maltolato de gálio (**Figura 1.9 (a)**) que entrou em fase de triagem clínica. Estudos clínicos mostram que gálio é efetivo no tratamento de linfoma e câncer de bexiga [24, 25].

A toxicidade e baixa biodisponibilidade dos sais de Ga(III) têm incentivado muitos grupos de pesquisa a buscar novas drogas a base de gálio. Maltolato de gálio e KP46 (**Figura 1.9 (b)**) que foram sintetizados por Bernstein e colaboradores, podem ser administrados em baixas doses possibilitando uma redução dos efeitos colaterais associados. Maltolato de gálio é ativo contra muitas linhagens de linfoma resistentes a nitrato de gálio e KP46 é aproximadamente dez vezes mais ativo que cloreto de gálio [26, 27, 28].

Complexos de gálio(III) entram nas células pelos mesmos mecanismos de entrada de ferro(III). Esses íons são internalizados por um mediador-receptor de transferrina para se ligar a um receptor específico (TfR). Assim, a entrada de complexos de Ga(III) em células tumorais é favorecida pelo fato de as células tumorais expressarem níveis muito mais altos de TfR quando comparadas às células saudáveis [29, 30, 31].

O mecanismo envolvido na atividade antitumoral dos complexos de gálio parece ser multifatorial, sendo um alvo celular considerado significativo a enzima ribonucleotideo redutase. No entanto, estudos mostram que o gálio também inibe outras enzimas tais como ATPase, ADN polimerase, inibe a entrada de ferro(III), modifica a estrutura tridimensional do ADN e interfere na síntese protéica [24, 32, 33].

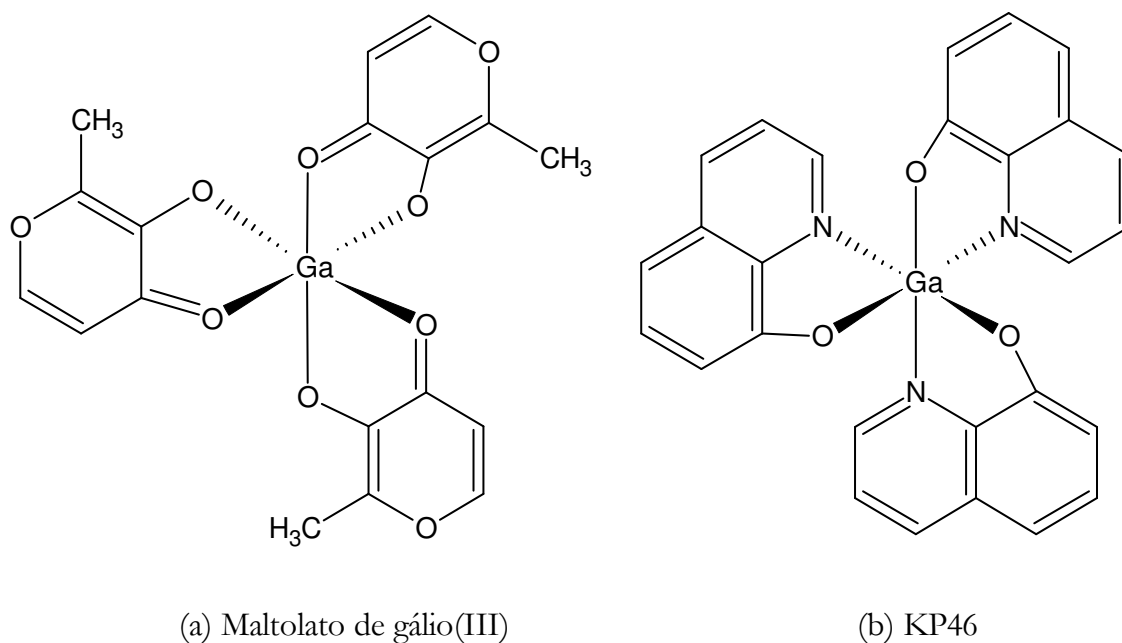


Figura 1.9 – Complexos de gálio(III) com atividade antitumoral, (a) maltolato de gálio e (b) KP46.

1.4 Síntese e Caracterização dos Complexos Estudados

Neste trabalho foram estudados dez complexos com diferentes ligantes e íons metálicos. Todos já haviam sido sintetizados e caracterizados por 3 diferentes grupos de pesquisa de Universidades Brasileiras.

Os complexos de Pt(II), **1**, **2**, **3**, **4** e **5**, foram preparados e caracterizados pelo grupo de pesquisa da professora por Judith Felcman da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro [34, 35]. Já os complexos **6** e **7**, também envolvendo íons de Pt(II), foram sintetizados e caracterizados pelo grupo de pesquisa do Professor Nicolás Adrián Rey, na mesma Universidade [36, 37]. Finalmente, os complexos **8**, **9** e **10**, envolvendo íons Cu(II) ou Ga(III), foram sintetizados e caracterizados pelo grupo de pesquisa do professor Adailton J. Bortoluzzi, da Universidade Federal de Santa Catarina [38, 39].

A tabela a seguir, **Tabela 1.1**, representa as proporções estequiométricas entre íon metálico e ligante, bem como as fórmulas moleculares dos complexos.

Tabela 1.1 – Proporções estequiométricas entre ligantes e íons metálicos e fórmula molecular dos complexos formados.

Código	Proporção entre íon metálico e ligante		Fórmula molecular dos complexos
	Íon-metálico	Ligante	
Complexo 1	1 Pt(II)	1 C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	[Pt(C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂)(NH ₃) ₂ Cl]Cl
Complexo 2	1 Pt(II)	1 C ₃ H ₇ N ₃ O ₂	[Pt(C ₃ H ₆ N ₃ O ₂)(NH ₃) ₂ Cl]
Complexo 3	2 Pt(II)	2 C ₃ H ₇ N ₃ O ₂	[Pt ₂ (C ₃ H ₆ N ₃ O ₂) ₂ (NH ₃) ₂ Cl ₂].H ₂ O
Complexo 4	1 Pt(II)	1 C ₁₂ H ₁₁ N ₅ F	[Pt(C ₁₂ H ₁₁ N ₅ F)Cl ₂ (NH ₃)]
Complexo 5	1 Pt(II)	1 C ₁₅ H ₁₁ N ₅	[Pt(C ₁₅ H ₁₁ N ₅)Cl ₂ (NH ₃)]
Complexo 6	1 Pt(II)	2 C ₅ H ₅ N ₃ O	[Pt(C ₅ H ₅ N ₃ O) ₂ Cl ₂]. ³ / ₂ H ₂ O
Complexo 7	2 Pt(II)	3 C ₆ H ₇ N ₃ O ₂	[Pt ₂ (C ₆ H ₇ N ₃ O) ₃ Cl ₄]. ⁷ / ₂ H ₂ O
Complexo 8	1 Cu(II)	1 C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₂	[Cu(C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₂)Cl ₂].CH ₃ CN
Complexo 9	1 Cu(II)	1 C ₂₁ H ₂₃ N ₅	[Cu(C ₂₁ H ₂₃ N ₅)Cl ₂]
Complexo 10	1 Ga(III)	1 C ₂₉ H ₃₂ N ₅ O ₂	[Ga(C ₂₉ H ₃₂ N ₅ O ₂).(ClO ₄) ₂]

a) Complexos 1, 2 e 3

O alto efeito nefrotóxico da cisplatina levou o grupo de pesquisa da professora Judith Felcman a estudar a interação entre cisplatina e ácido guanidoacético e entre cisplatina e arginina. Isso porque o ácido guanidoacético, sintetizado a partir da arginina, atua no metabolismo renal.

Essas interações possibilitaram a formação de três complexos, sendo um deles proveniente da interação entre cisplatina e arginina, **1**, e dois provenientes da interação entre ácido guanidoacético e cisplatina, **2** e **3**. Esses complexos foram previamente caracterizados por análise elementar (CHN), absorção atômica, análise condutimétrica, análise termogravimétrica, difração de pó e espectroscopia na região do infravermelho. Para **2** também foi feita a ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C . As estruturas que foram propostas para esses três complexos estão representadas na **Figura 1.10** [34].

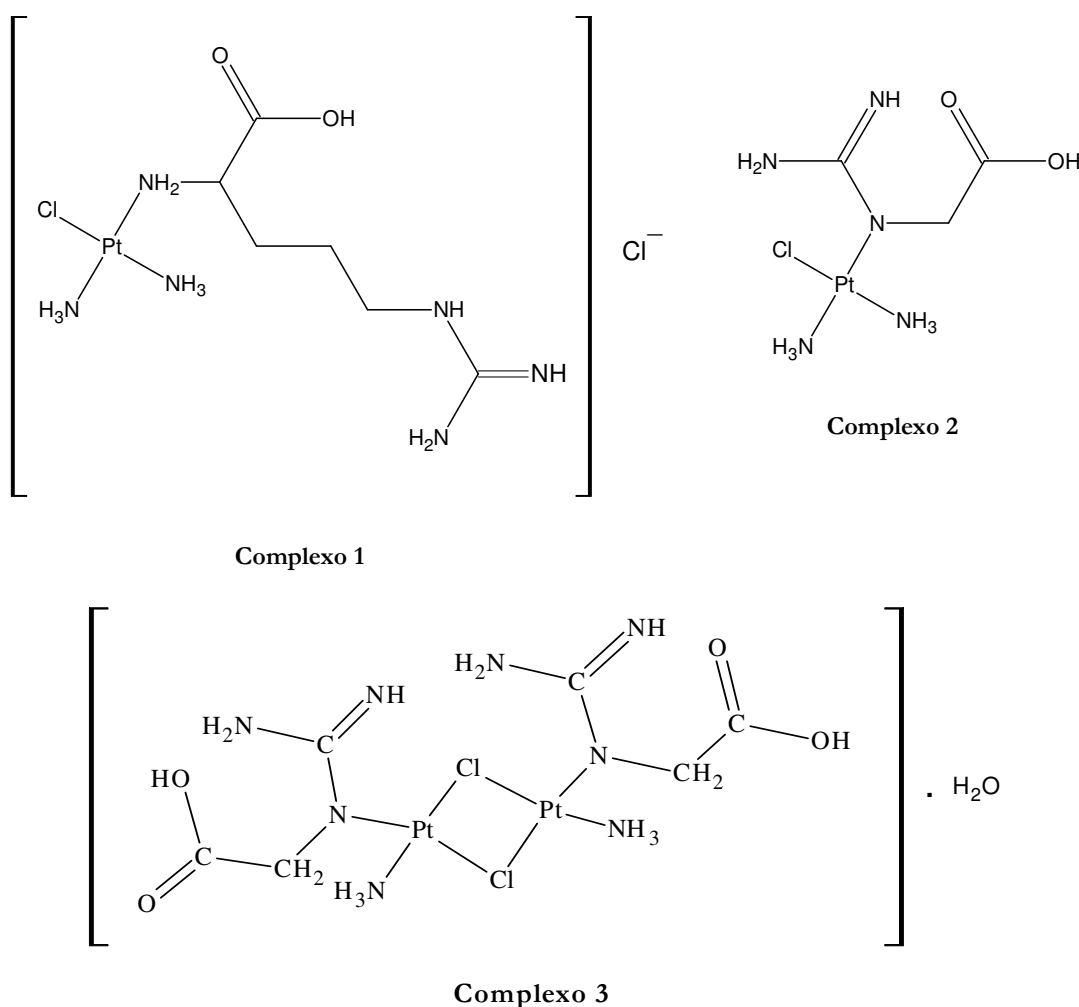


Figura 1.10 – Estruturas propostas para **1**, **2** e **3**.

b) Complexos 4 e 5

O grupo de pesquisa da professora Judith Felcman também sintetizou complexos com cisplatina e ligantes purínicos. Tal estudo levou a formação de dois novos complexos, **4** e **5**, previamente descritos e caracterizados por análise elementar (CHN), absorção atômica, espectro de massas, análise termogravimétrica e espectroscopia na região do infravermelho. As estruturas que foram propostas para esses dois complexos constam na **Figura 1.11** [35].

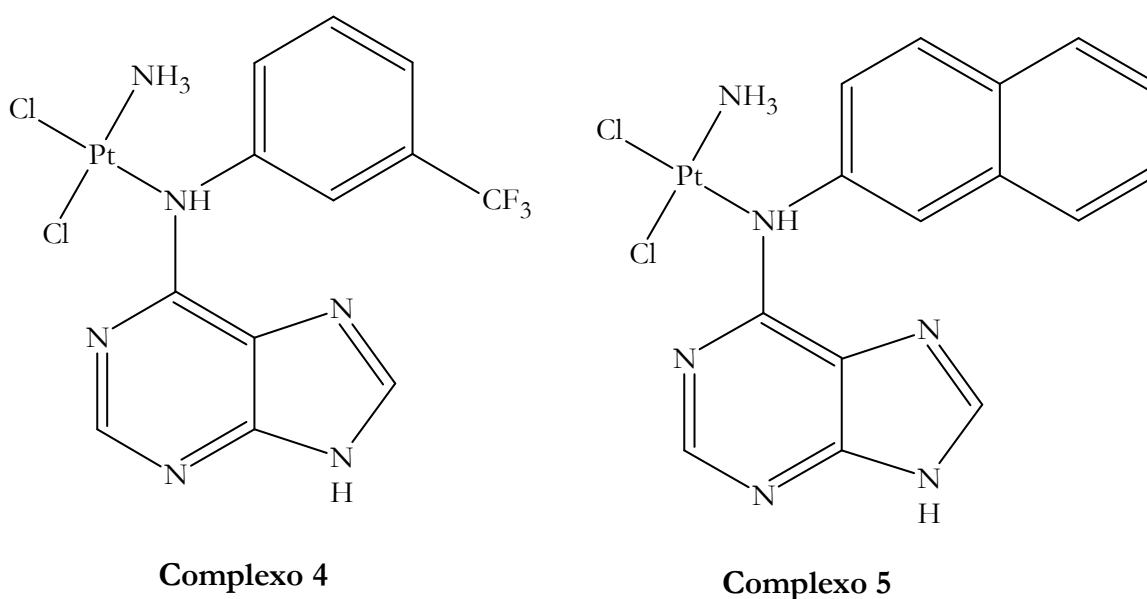


Figura 1.11 – Estruturas propostas para **4** e **5**.

c) Complexos 6 e 7

A utilização da pirazinamida, $C_5H_5ON_3$, e da isoniazida, $C_6H_7ON_3$, no tratamento contra tuberculose estimulou o grupo de pesquisa do Professor Nicolás Adrián Rey a estudar a possível complexação entre Pt(II) e os referidos ligantes. Após a reação entre tetracloroplatinato de potássio e pirazinamida em solução aquosa foi obtido um precipitado, de coloração amarela-parda, denominado complexo **6**. Já a reação entre $K_2[PtCl_4]$ e a isoniazida também produziu um precipitado amarelo um pouco mais escuro, complexo **7**. Cada um dos precipitados foi analisado por análise elementar (CHN), análise termogravimétrica, espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear para 1H , o que levou a grupo de pesquisa à proposta das estruturas representadas na **Figura 1.12** [36, 37].

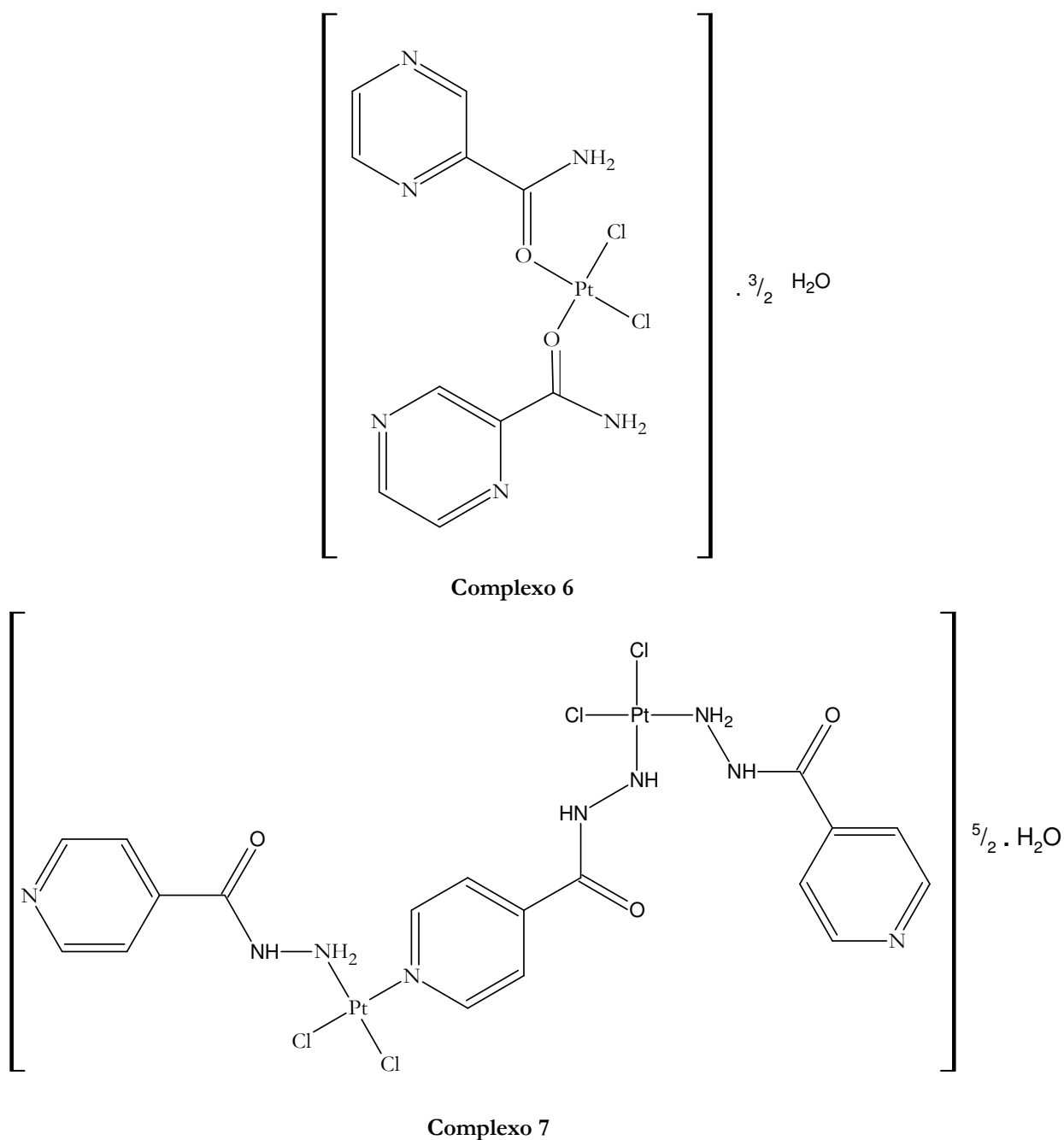
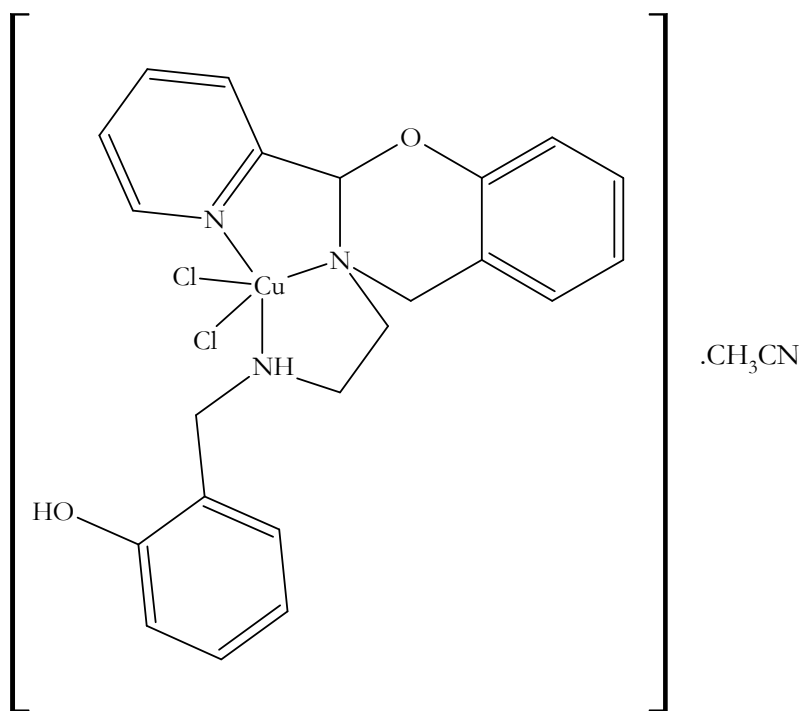


Figura 1.12 – Estruturas propostas para **6** e **7**.

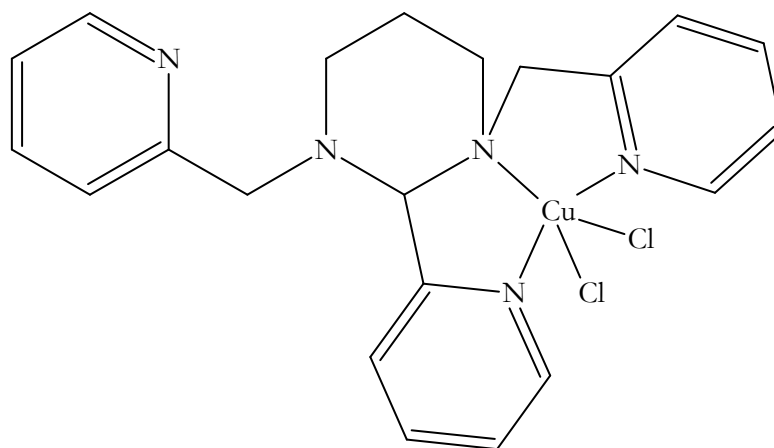
d) Complexos 8, 9 e 10

A proposta de síntese para os complexos **8** e **9** foi baseada na estabilidade verificada para complexos de cobre com ligantes N doadores. A acidez de Lewis associada à geometria variável permite que o cobre, quando coordenado a ligantes nitrogenados multidentados, forme complexos com atividades interessantes, tais como ação de hidrolases,

sondas conformacionais e agentes terapêuticos [38]. Assim, o grupo de pesquisa do professor Adailton J. Bortoluzzi sintetizou e caracterizou dois novos complexos de cobre(II), **8** e **9** (**Figura 1.13**). Em cada um dos casos a caracterização foi feita por difração de raio X, espectroscopia nas regiões do infravermelho e do ultravioleta-visível.



Complexo 8



Complexo 9

Figura 1.13 – Estruturas para **8** e **9**.

Finalmente o complexo **10** (**Figura 1.14**), também sintetizado pelo grupo de pesquisa do professor Adailton J. Bortoluzzi, foi obtido a partir da reação entre Ga(NO₃)₃ e 3-

((3-bis(piridin-2-metil)amino)propil)(piridin-2-ilmetil)amino)metil)-5-hidroxi-2-metilbenzaldeído em metanol e caracterizado por análise elemental (CHN), espectroscopia na região do infravermelho e difração de raio X [39].

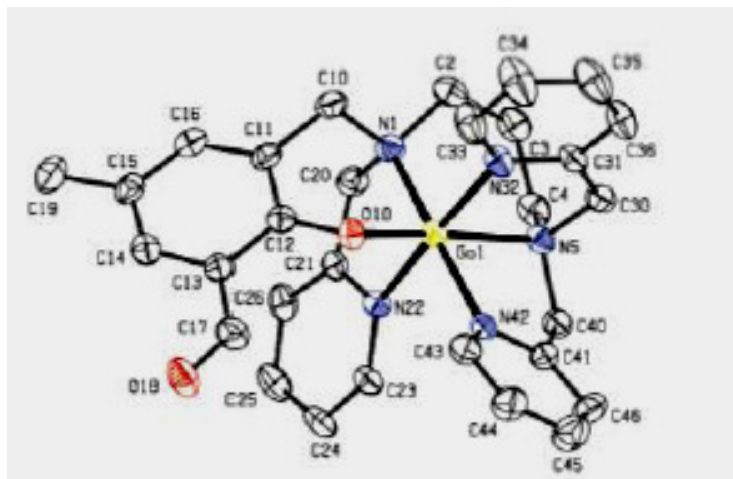


Figura 1.14 – Estrutura para **10**, os 2 contra-íons, ClO_4^- , foram omitidos.

Capítulo 2

Objetivos

2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho é estudar o potencial antitumoral de dez novos complexos formados entre íons metálicos, Pt(II), Cu(II) e Ga(III), e diferentes ligantes.

Mais especificamente os objetivos a serem alcançados pelo trabalho são:

- i. Estudo do efeito dos complexos no crescimento de células tumorais;
- ii. Estudo da incorporação dos complexos mais ativos de Pt(II) pelas células tumorais;
- iii. Estudo da fotoirradiação, sobre a atividade dos complexos **8** e **9**;
- iv. Estudo da interação dos complexos mais ativos com o ADN;
- v. Estudo da interação dos complexos que interagem com o ADN com nucleotídeos modelo.

Capítulo 3

Parte Experimental

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos

a) Contagem das Células.

O número de células foi determinado em um contador de partículas, modelo 22, série AK32252 da BECKMAN COULTER.

b) Absorção Atômica

As dosagens de platina foram feitas por espectrometria de absorção atômica em um espectrômetro Varian[®], modelo Zeeman 220, equipado com forno de grafite, atomizador e amostrador automático, com a colaboração da Profa. Josianne N. Silveira (Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Faculdade de Farmácia – UFMG).

c) Fotocitotoxicidade

As amostras foram irradiadas com um aparelho de laser da Laserline Equipamentos e Módulos de Raio Laser usando uma sonda modelo 1RM03/6505, potência de 3mW e comprimento de onda de 650 nm.

d) Espectrômetro na região do Ultravioleta-Visível

Os espectros eletrônicos foram adquiridos em um espectrômetro de duplo feixe CARY 100 VARIAN. As análises foram realizadas em cubetas de quartzo com 0,1 e 1,0 cm de caminho óptico. As amostras foram dissolvidas em água deionizada ou DMSO.

e) Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^1H e COSY foram feitos a 400 MHz em um espectrômetro de BRUKER AVANCE DRX 400, à temperatura ambiente. As amostras foram analisadas em D_2O ou uma mistura de $\text{D}_2\text{O}/(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, usando TMS como referência. Já os espectros de ^{31}P , feitos no mesmo aparelho, foram calibrados usando H_3PO_4 como referência.

3.2 Reagentes e Materiais

a) Células e cultura

A linhagem celular K562 (número CR083 do acervo do BCRJ) foi adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro. Esta linhagem celular foi obtida a partir de efusão pleural de uma mulher de 53 anos de idade com leucemia mielóide crônica em fase blástica terminal.

A linhagem de células foi cultivada em meio RPMI 1640, contendo L-glutamina e suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37°C , em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO_2 . O meio RPMI 1640 e o soro fetal foram adquiridos da Cultilab® em São Paulo.

b) Reagentes e solventes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e nenhum deles passou por purificação prévia. Foram adquiridos da Sigma® (sal sódico de DNA de timo de vitelo, HEPES, penicilina, azul de Tripan, NaNO_3 , fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, guanosina 5'-monofosfato de sódio, guanosina), da Aldrich (óxido de deutério, dimetilsulfóxido deuterado), da Vetec (dimetilsulfóxido), da Carlo Erba (etanol), da Quiral Química do Brasil S/A (cisplatina) e da Merck (ácido nítrico ultrapuro, acetonitrila, acetona, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio e cloreto de magnésio).

Os complexos metálicos estudados, sintetizados e caracterizados por outros grupos de pesquisa, foram utilizados sem nenhum tratamento prévio. As suas estruturas e origem estão descritas no item 1.4.

As soluções denominadas de tampão HEPES isotônico contém $132,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de NaCl ; $3,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de KCl ; $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de CaCl_2 ; $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de MgCl_2 e $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de HEPES.

3.3 Estudo da Citotoxicidade: Determinação da CI_{50}

A sensibilidade das células de leucemia mielóide crônica, linhagem K562, aos compostos foi avaliada pela concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50%, parâmetro este conhecido como CI_{50} . Para isto, 10^5 células mL^{-1} foram incubadas durante 72 horas na ausência e na presença de várias concentrações dos complexos testados. Após este período, as células foram contadas e a CI_{50} foi determinada com o auxílio do programa computacional OriginPro7, sendo os dados analisados com ajuste sigmoidal (Boltzmann). A viabilidade das células foi verificada por exclusão com azul de Tripán e o número de células foi determinado por análise no contador Coulter.

As soluções-estoque dos complexos e seus ligantes ($1,00 \times 10^{-2}$ mol L^{-1}) foram preparadas nos solventes indicados na **Tabela 3.1**. Para os ensaios, estas soluções foram diluídas em água de modo que a concentração de solvente orgânico nos ensaios com células não ultrapassasse 1%. Testes controle foram realizados incubando-se as células com o solvente orgânico na maior concentração utilizada e foi verificado que ele não afeta o crescimento nem a viabilidade celular nas condições destes estudos.

Tabela 3.1 – Descrição dos solventes usados na preparação das soluções estoques de cada um dos complexos testados e seus ligantes.

Solvente		Solvente	
Complexo 1	DMSO / H ₂ O	Complexo 6	DMSO
Ligante 1	H ₂ O	Ligante 6	C ₂ H ₅ OH / H ₂ O
Complexo 2	DMSO	Complexo 7	DMSO
Ligante 2	H ₂ O		
Complexo 3	DMSO	Complexo 8	H ₂ O
Complexo 4	DMSO	Complexo 9	H ₂ O
Ligante 4	C ₂ H ₅ OH		
Complexo 5	DMSO	Complexo 10	ACN
Ligante 5	C ₂ H ₅ OH		

3.4 Estudo da Fotocitotoxicidade: Determinação da CI_{50}

Para os complexos **8** e **9**, também foi avaliado o efeito da radiação, em 650 nm, na sua citotoxicidade. Para isto, 10^5 células mL^{-1} foram incubadas durante 4 horas na ausência e na presença de várias concentrações dos complexos testados. Após este período, o meio de cultura foi substituído por tampão HEPES isotônico. Em seguida, as amostras foram irradiadas com a sonda laser por 10 minutos. As células foram, então, novamente incubadas com RPMI por 72 horas. Passado este período, as células foram contadas e a CI_{50} foi determinada com o auxílio do programa computacional OriginPro7, sendo os dados analisados com ajuste sigmoidal (Boltzmann). A viabilidade das células foi verificada por exclusão com azul de Tripán e o número de células foi determinado por análise no contador Coulter.

Para efeito de comparação, foram realizados testes de citotoxicidade com os compostos nas mesmas condições descritas acima, mas sem irradiação. 10^5 células mL^{-1} foram incubadas por 4 horas na ausência e na presença de várias concentrações dos complexos testados. Após este período, as células foram lavadas com tampão HEPES isotônico e, em seguida, incubadas novamente com RPMI por 72 horas.

3.5 Determinação da Concentração Intracelular dos Compostos

Para os compostos de platina que foram mais potentes na inibição do crescimento celular, **3**, **4**, **6** e **7**, foi feito um estudo da citotoxicidade em função da concentração intracelular de complexo.

Após 72 horas de incubação das células com diferentes concentrações dos compostos estudados, uma alíquota foi retirada, lavada duas vezes com tampão HEPES isotônico gelado e o resíduo ressuspendido em HNO_3 a 33%. A concentração de Pt intracelular foi determinada por espectrometria de absorção atômica.

3.6 Estudo da Interação dos Complexos 4, 6 e 10 com o ADN

As interações dos complexos **4**, **6** e **10** com o ADN de timo de vitelo foram estudadas por espectrofotometria de absorção na região do UV-Visível.

A uma solução de cada um dos complexos foram adicionadas concentrações crescentes de ADN e os espectros registrados. A **Tabela 3.2** descreve as concentrações de cada um dos complexos e a maior razão molar [ADN]:[complexo] atingida em cada caso. A faixa de concentração de ADN usada para cada composto será indicada na parte da discussão dos resultados. A concentração de ADN por nucleotídeo foi determinada em 260 nm, pelo $\epsilon = 6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A força iônica foi mantida constante com $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl e o pH foi fixado em 7,2 com tampão HEPES, 20 mmol L^{-1} . A absorvância do ADN foi subtraída pela adição de quantidades iguais de ADN na solução do complexo e na solução referência.

Tabela 3.2 – Concentração das soluções usadas para cada um dos complexos e maior razão molar [ADN]:[complexo] atingida em cada caso.

Complexo	Concentração de complexo / mol L^{-1}	Razão máxima entre [ADN]:[complexo]
4	$5,00 \times 10^{-4}$	2:1
6	$3,00 \times 10^{-4}$	1:1
10	$1,00 \times 10^{-4}$	3:1

3.7 Estudo da Interação dos Complexos 3, 6 e 10 com 5'-Guanosinamono-fosfato e Guanosina

Foi estudada, por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, a interação entre os complexos **3**, **6** e **10** com a 5'-guanosinamono-fosfato, 5'-GMP, e do complexo **10** com a guanosina.

a) Complexos de Pt(II)

A interação do complexo **3** com a 5'-GMP foi estudada por RMN de ^1H . Foram dissolvidos 0,0038 g de **3** em quantidade mínima de DMSO d_6 e o volume completado com tampão fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$, $0,20 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pD} = 7,2$) de modo a obter uma solução de concentração $5,67 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de **3**. A força iônica foi mantida constante com $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 em D_2O . A solução estoque da 5'-GMP $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada em tampão fosfato, $\text{pD} = 7,2$. Foram feitas 4 leituras, sendo a primeira apenas de **3** e as outras três leituras para a proporção molar $[\text{5'-GMP}]:[\mathbf{3}] = 4:1$, nos tempos de 0, 4 e 28 horas após a mistura. O espectro da 5'-GMP livre nas mesmas condições experimentais também foi registrado.

A interação do complexo **6** com a 5'-GMP foi estudada por RMN monodimensional e bidimensional COSY de ^1H e ^{31}P . Foram dissolvidos 0,0103 g de **6** em quantidade mínima de DMSO d_6 e o volume completado com D_2O de modo a obter uma solução de concentração $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de **6**. A força iônica foi mantida constante em $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ com a adição de NaNO_3 em D_2O e o $\text{pD} = 5,0$. A solução estoque da 5'-GMP, $0,20 \text{ mol L}^{-1}$, foi preparada em D_2O , $\text{pD} = 5,0$. Nesse caso foi avaliado o efeito do tempo e da temperatura sobre a reação. Foram registrados espectros de uma solução contendo a proporção molar $[\text{5'-GMP}]:[\mathbf{6}] = 2:1$ nos tempos de 0, 4 e 15 horas após o início da reação, a temperatura ambiente. Também foi feito outro ensaio incubando a mistura reacional a 50°C sob agitação mecânica por 16 horas. Após esse período foi feita a leitura da amostra. A leitura para a 5'-GMP livre também foi realizada nas condições do experimento. A **Tabela 3.3** sintetiza as condições experimentais.

Tabela 3.3 – Condições experimentais para estudo da interação de **3** e **6** com 5'-GMP.

Complexo	Razão [5'-GMP]:[complexo]	pD	Força Iônica	Tempo de reação
$5,67 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} de 3	0:1	7,2	$1,0 \times 10^{-1}$ mol L^{-1}	-
	4:1			t = 0 h
	4:1			t = 4 h
	4:1			t = 28 h
$1,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} de 6	0:1	5,0	$1,0 \times 10^{-1}$ mol L^{-1}	-
	2:1			t = 0 h
	2:1			t = 4 h
	2:1			t = 15 h
	2:1			t = 16 h*

* Amostra deixada sob agitação mecânica, a 50°C , por 16 horas

b) Complexo de Ga(III)

O estudo da interação do complexo de Ga(III), **10**, com a 5'-GMP foi feito através de RMN de ^1H uni- e bidimensional COSY e ^{31}P . Foram dissolvidos 0,0037 g de **10** em quantidade mínima de DMSO d_6 e o volume completado com D_2O de modo a obter uma solução de concentração $9,68 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de **10**. A força iônica foi mantida constante em $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ com a adição de NaNO_3 em D_2O e o pD = 6,0. A solução estoque de 5'-GMP, $0,20 \text{ mol L}^{-1}$, foi preparada em D_2O , pD = 6,0. Foram feitas três leituras, sendo a primeira apenas para o complexo e as outras duas para a mistura reacional contendo a proporção molar $[\text{5'-GMP}]:[\mathbf{10}] = 2:1$ nos tempos de 0 e 5 horas. Todas as leituras foram feitas com amostras a temperatura ambiente.

A interação de **10** com a guanosina também foi estudada. Foram preparadas soluções do complexo, $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, e a da guanosina, $5,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, ambas em $\text{D}_2\text{O}/(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ com força iônica fixada em $2,50 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 em D_2O . As leituras também foram realizadas a temperatura ambiente. Nesse caso também foi avaliado o efeito da proporção estequiométrica. A **Tabela 3.4** sintetiza as condições experimentais para os dois casos: interação com a 5'-GMP e interação com a guanosina.

Tabela 3.4 – Condições experimentais para estudo da interação entre **10** e 5'-GMP e entre **10** e guanosina.

Razão Estequiométrica	pD	Força Iônica	Tempo de reação
$[\text{5'-GMP}]^1:[\mathbf{10}]^2 = 0:1$	6,0	$1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	-
$[\text{5'-GMP}]^1:[\mathbf{10}]^2 = 2:1$			t = 0 h
$[\text{5'-GMP}]^1:[\mathbf{10}]^2 = 2:1$			t = 5 h
$[\text{Guanosina}]^3:[\mathbf{10}]^4 = 0:1$	6,0	$1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	-
$[\text{Guanosina}]^3:[\mathbf{10}]^4 = 2:1$			t = 0 h
$[\text{Guanosina}]^3:[\mathbf{10}]^4 = 4:1$			t = 0 h

¹ A concentração da solução de 5'-GMP utilizada foi $0,20 \text{ mol L}^{-1}$.

² A concentração da solução de **10** utilizada foi $9,68 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

³ A concentração da solução de guanosina utilizada foi $2,50 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

⁴ A concentração da solução de **10** utilizada foi $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo Comparativo das Atividades Citotóxica dos Compostos Testados

a) Complexos de Pt(II)

Na **Tabela 4.1** estão relacionados os valores de CI_{50} obtidos para os complexos de platina: **1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7**. Os valores de CI_{50} obtidos para a cisplatina e a carboplatina também são mostrados para efeito de comparação.

Tabela 4.1 – Valores de CI_{50} frente à linhagem celular K562. Valores determinados para os ligantes **1, 2, 4, 5 e 6** e para os complexos **1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7**. Os valores representam a média de quatro experimentos independentes.

Complexo	$CI_{50} / \mu\text{mol L}^{-1}$	Ligante Livre	$CI_{50} / \mu\text{mol L}^{-1}$
1	194,2	Ligante 1	Nenhuma inibição até $450 \mu\text{mol L}^{-1}$
2	257,5	Ligante 2	Nenhuma inibição até $400 \mu\text{mol L}^{-1}$
3	2,93		
4	1,00	Ligante 4	Nenhuma inibição até $50 \mu\text{mol L}^{-1}$
5	200,1	Ligante 5	Nenhuma inibição até $200 \mu\text{mol L}^{-1}$
6	6,34	Ligante 6	Nenhuma inibição até $150 \mu\text{mol L}^{-1}$
7	24,4		
Cisplatina	1,00		
Carboplatina	9,90*		

*Valor retirado da literatura na linhagem de células GLC4 [40].

As **Figuras 4.1** e **4.2** representam as curvas dose-resposta obtidas para **1** e **2** respectivamente. Os complexos **1** e **2** possuem estruturas similares, diferindo apenas pelo aminoácido (**Figura 1.10**). Embora **1** tenha sido mais ativo, nos dois casos a atividade é muito baixa, mais de 190 vezes menos potente que cisplatina, o que não despertou nosso interesse para estudos posteriores com esses complexos. Ainda assim, pode-se afirmar que a coordenação aumenta a atividade, pois o ligante livre, nos dois casos, não exibe nenhum efeito citotóxico até $400 \mu\text{mol L}^{-1}$.

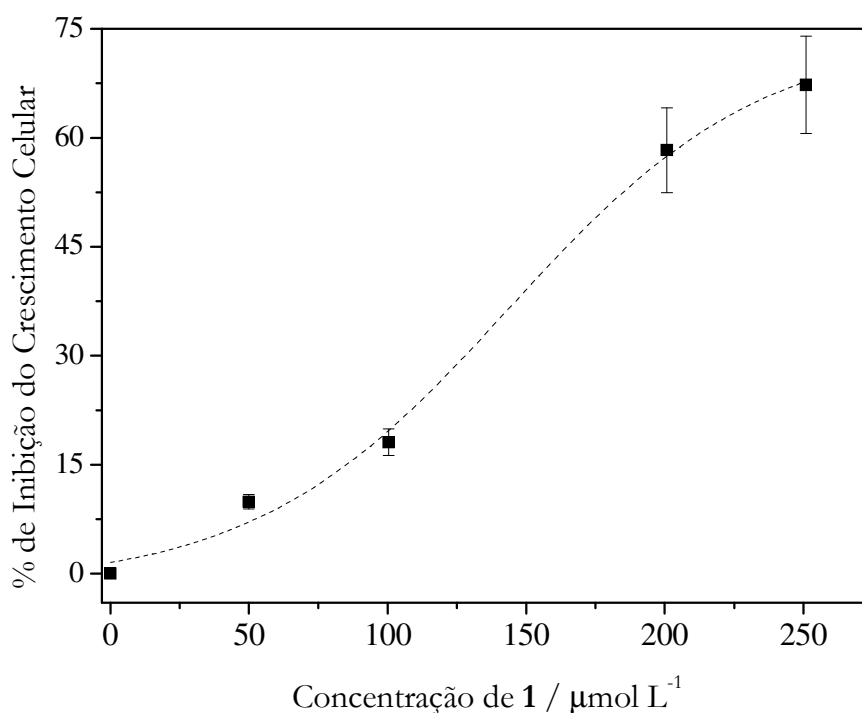


Figura 4.1 – Curva de citotoxicidade de **1** frente a linhagem celular K562. Os valores foram obtidos pela média de 4 experimentos independentes.

O complexo **3**, que é dinuclear, sendo que cada Pt(II) encontra-se ligada a uma cadeia alifática, uma amônia e dois cloretos em ponte, apresenta atividade significativa. A coordenação da Pt(II) possibilitou tal inibição do crescimento celular, pois o ligante livre não apresentou nenhuma inibição até $450 \mu\text{mol L}^{-1}$. A **Figura 4.3** mostra a curva dose-resposta para **3** frente a linhagem celular testada.

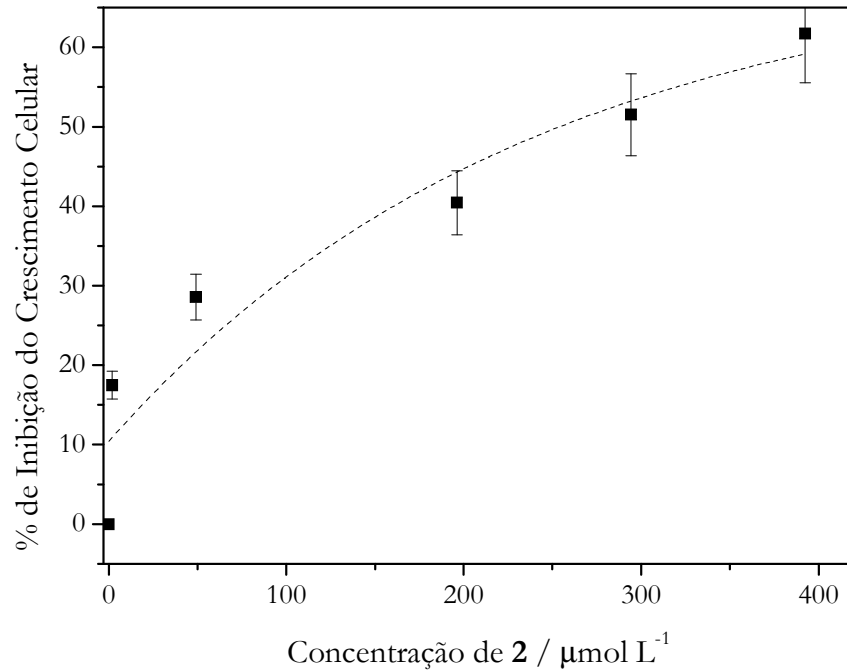


Figura 4.2 – Curva de citotoxicidade de **2** frente a linhagem celular K562. Os valores foram obtidos pela média de 4 experimentos independentes.

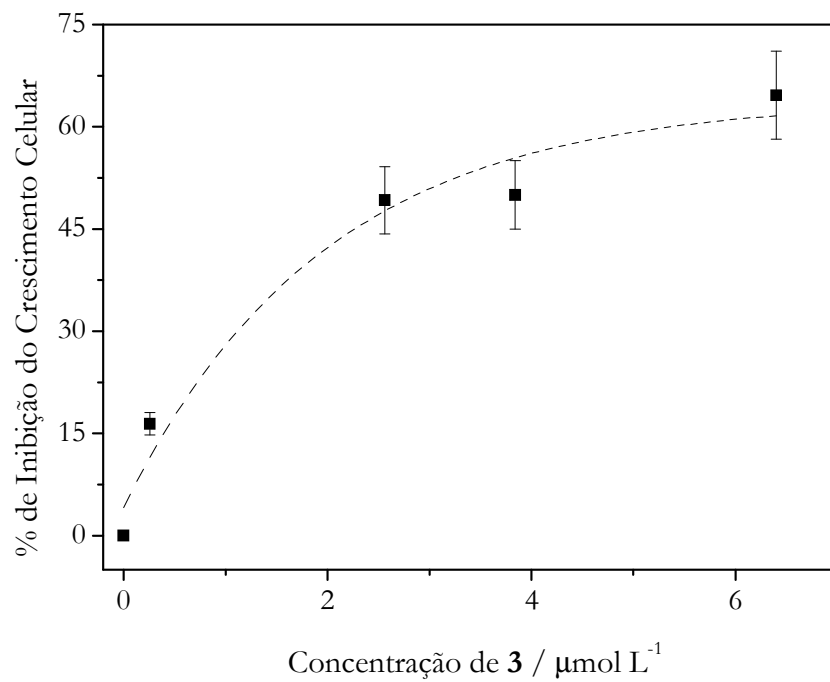


Figura 4.3 – Curva de citotoxicidade de **3** frente a linhagem celular K562. Os valores foram obtidos pela média de 4 experimentos independentes.

O complexo **3**, que pode ser considerado um dímero de **2**, exibe um efeito citotóxico mais de 80 vezes maior que **2**. Isso sugere que no interior das células não ocorre a fragmentação do dímero em monômeros, pois isso faria com que **3** fosse apenas cerca de duas vezes mais ativo que **2**. Uma possível explicação é que as interações com alvos intracelulares sejam diferente nos dois casos. O ADN é considerado o principal alvo da ação citotóxica de compostos de platina e os compostos do tipo bis(platina) podem formar ligação do tipo interfitita de modo diferente dos compostos mononucleares. Outra possibilidade é que **3** tenha uma maior afinidade pelo ADN, ou ainda, que ele entre nas células mais facilmente. Como o complexo **2** não possui atividade citotóxica significativa, não foram feitos estudos mais detalhados sobre mecanismo de ação. Já para o complexo **3**, a fim de verificar se há correlação entre a atividade citotóxica e a concentração de platina no interior das células, $[Pt]_i$, foi dosada a concentração de Pt após 72 horas de incubação. A **Figura 4.4** mostra a inibição do crescimento celular *versus* concentração de Pt intracelular.

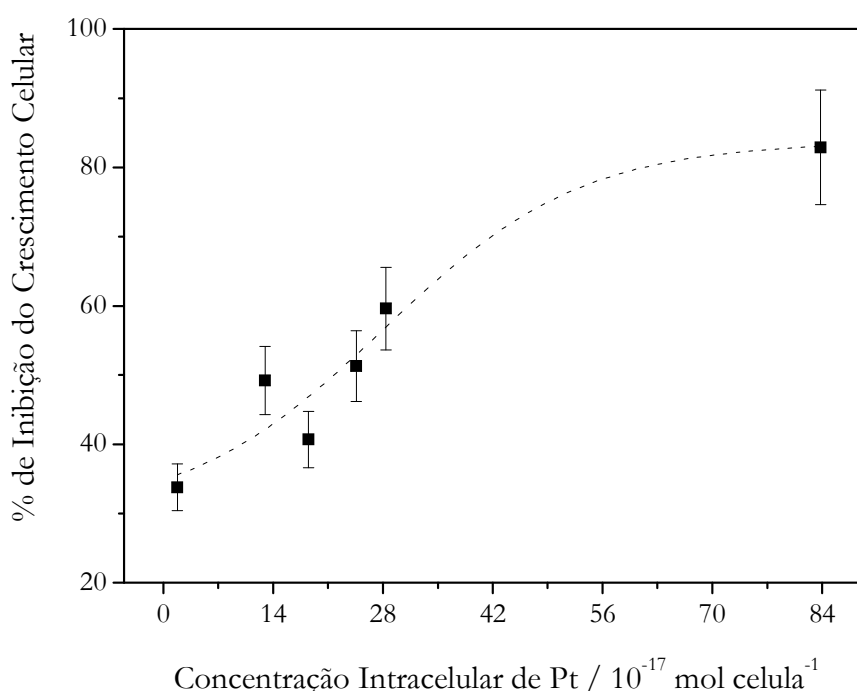


Figura 4.4 – Inibição do crescimento celular em função da concentração de Pt intracelular, após incubação das células K562 com **3** por 72 horas. Os valores representam a média de 2 experimentos independentes.

Como pode ser observado, há uma boa correlação entre a citotoxicidade e a incorporação do composto pelas células. A inibição do crescimento celular aumenta com o aumento da concentração intracelular de platina, o que indica que atividade citotóxica observada é devida à ação do composto de platina. Na CI_{50} a concentração de Pt intracelular é $2,18 \times 10^{-16}$ mol célula⁻¹. Considerando o volume de uma célula de 10^{-12} L, o valor obtido para $[Pt]_i$ é de $2,18 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Como composto **3** é dinuclear, para cada mol de complexo há dois mol de platina, então, $2,18 \times 10^{-16}$ mol de platina por célula corresponde a $1,09 \times 10^{-16}$ mol de complexo por célula.

Pereira-Maia e Garnier-Suilerot demonstraram que a incubação de células GLC4 com concentrações equitóxicas de cisplatina e carboplatina levava à mesma concentração intracelular de platina: $9,8 \times 10^{-17}$ mol célula⁻¹ [40]. As mesmas autoras estudaram o efeito de alguns complexos dinucleares de platina(II) sintetizados no grupo de pesquisa da professora Ana P. S. Fontes na Universidade Federal de Juiz de Fora e também verificaram que doses equitóxicas de complexo conduziam a teores similares de platina dentro das células, aproximadamente $1,2 \times 10^{-16}$ mol célula⁻¹ [41].

Os complexos **4** e **5** (**Figura 1.11**) apresentam estruturas similares, diferindo apenas pelo substituinte no anel benzênico do ligante. No complexo **4**, há um grupo $-CF_3$ na posição meta do anel benzênico. Já no complexo **5** há um grupo naftil ligado ao mesmo nitrogênio que se coordena ao centro metálico.

O composto **4** inibe o crescimento celular com a CI_{50} de $1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ (**Figura 4.5**), enquanto para **5**, a CI_{50} encontrada foi de $200,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (**Figura 4.6**). Ainda não conseguimos explicar esta diferença na atividade dos dois complexos. De acordo, em testes previamente descritos, Denise Rosa em sua tese de doutorado encontrou que o complexo **4** apresentou atividade contra as formas promastigotas *Leishmania amazonensis* (cepa MHOM/BR/77/LTB0016), enquanto **5** foi inativo [35].

Como **5** apresentou atividade citotóxica muito baixa, apenas para **4** foi dosada a concentração de Pt intracelular após incubação das células K562 por 72 horas. A **Figura 4.7** mostra a inibição do crescimento celular *versus* a concentração de Pt intracelular.

Na CI_{50} , a concentração de Pt intracelular para **4** é $4,69 \times 10^{-17}$ mol célula⁻¹, cerca da metade do valor encontrado para o complexo **3**, ou ainda para a cisplatina ou a carboplatina.

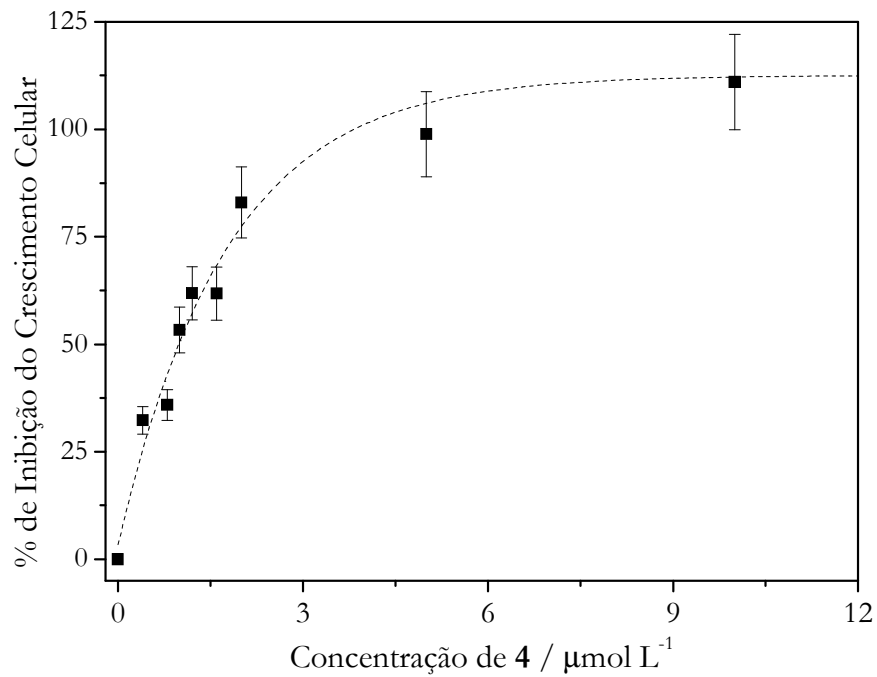


Figura 4.5 – Curva de citotoxicidade de 4 frente a linhagem celular K562. Os valores foram obtidos pela média de 4 experimentos independentes.

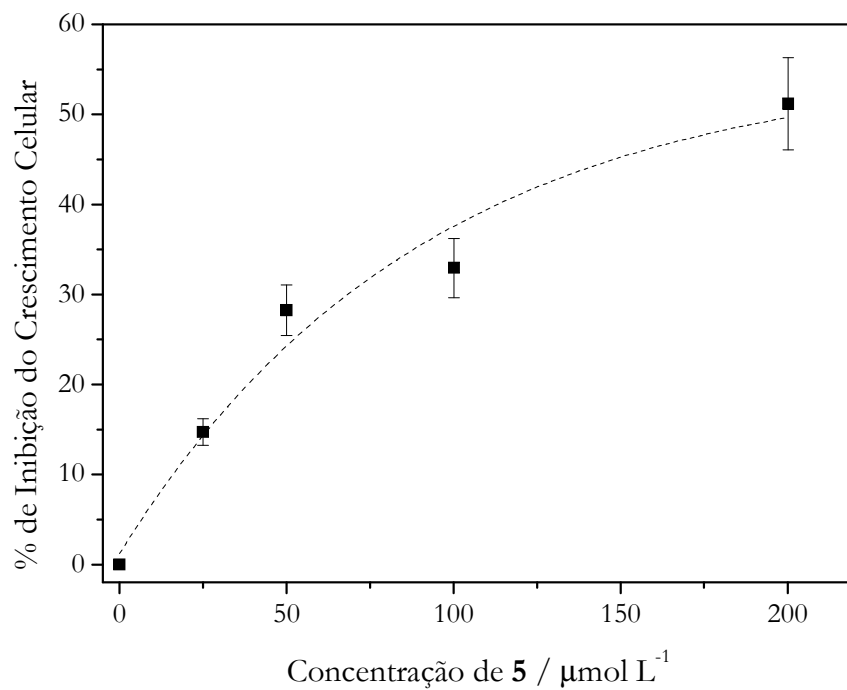


Figura 4.6 – Curva de citotoxicidade de 5 frente a linhagem celular K562. Os valores foram obtidos pela média de 4 experimentos independentes.

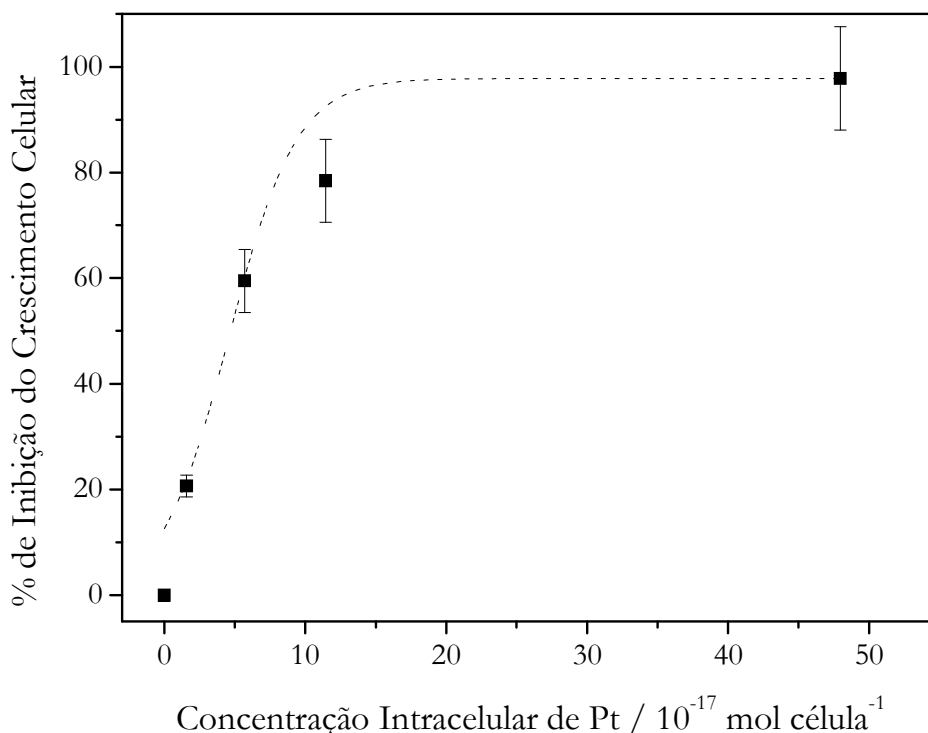


Figura 4.7 – Inibição do crescimento celular em função da concentração de Pt intracelular após incubação com **4** das células K562 por 72 horas. Os valores representam a média de 2 experimentos independentes.

Os complexos **6** e **7** (**Figura 1.12**), embora estruturalmente diferentes, tinham em comum o fato de seus ligantes serem usados no tratamento contra tuberculose. As **Figuras 4.8** e **4.9** representam as curvas dose-resposta obtidas para **6** e **7** respectivamente.

O complexo **6** foi mais ativo ($CI_{50} = 6,34 \mu\text{mol L}^{-1}$) que **7** ($CI_{50} = 24,4 \mu\text{mol L}^{-1}$). A atividade de **6** pode ser atribuída ao complexo, pois o ligante livre não apresentou atividade até $150 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para esses complexos também foi determinada a concentração de Pt intracelular em função da concentração de composto adicionada, **Figuras 4.10** e **4.11**. Na **Tabela 4.2** estão mostrados os valores de CI_{50} e a concentração de Pt intracelular determinada na CI_{50} .

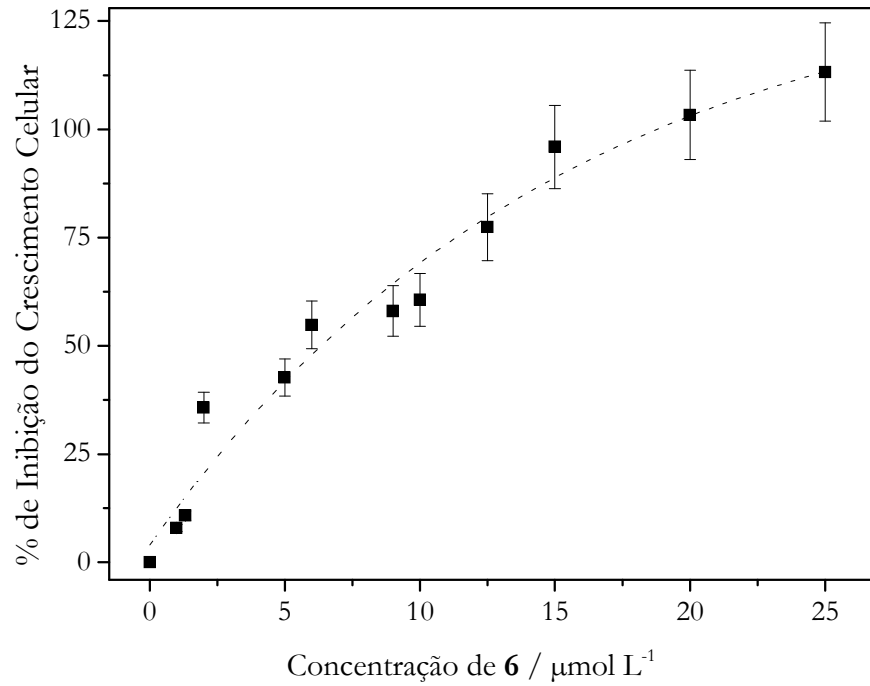


Figura 4.8 – Curva de citotoxicidade de **6** frente a linhagem celular K562. Os valores foram obtidos pela média de 4 experimentos independentes.

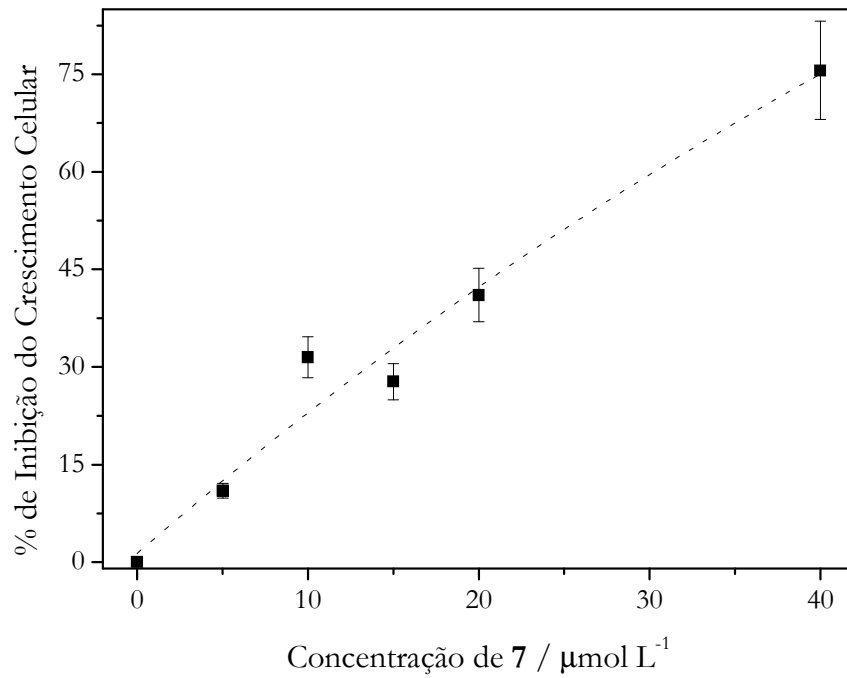


Figura 4.9 – Curva de citotoxicidade de **7** frente a linhagem celular K562. Os valores foram obtidos pela média de 4 experimentos independentes.

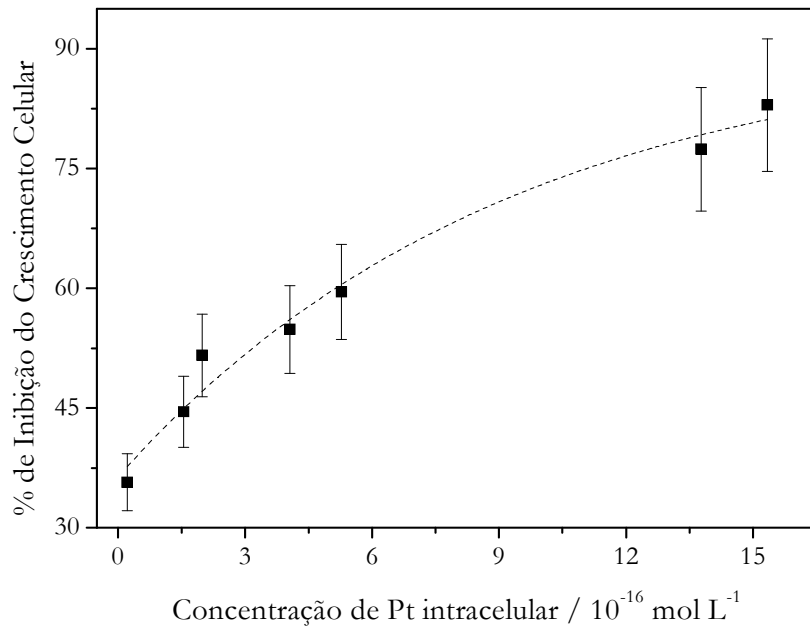


Figura 4.10 – Inibição do crescimento celular em função da concentração de Pt intracelular, após incubação das células K562 com **6**, por 72 horas. Os valores representam a média de 2 experimentos independentes.

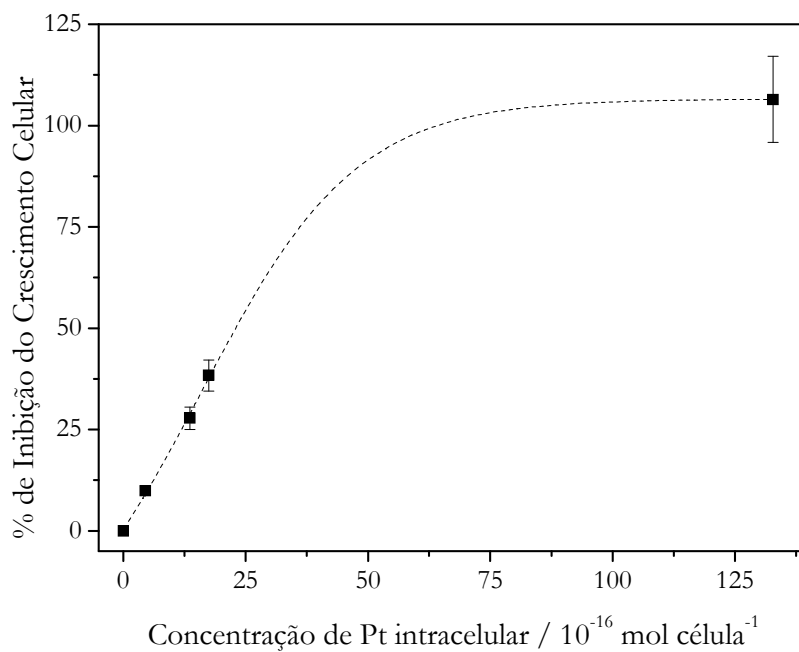


Figura 4.11 – Inibição do crescimento celular em função da concentração de Pt intracelular, após incubação das células K562 com **7**, por 72 horas. Os valores representam a média de 2 experimentos independentes.

Tabela 4.2 – Valores de CI_{50} e concentrações de $[Pt]_i$ na CI_{50} frente à linhagem celular K562 para os complexos **6** e **7**. Os valores representam a média de quatro experimentos independentes.

Complexo	$CI_{50} / \mu\text{mol L}^{-1}$	$[Pt]_i / \text{mol célula}^{-1*}$	$[Pt]_i / \text{mol L}^{-1**}$
6	6,34	$2,65 \times 10^{-16}$	$2,65 \times 10^{-4}$
7	24,4	$23,18 \times 10^{-16}$	$23,18 \times 10^{-4}$

*Valores estimados com base no gráfico $[Pt]_i$ versus percentual de inibição do crescimento celular

**Valores calculados considerando o volume celular médio de $1,0 \times 10^{-12}$ L [40].

O complexo **6** é mononuclear, enquanto **7** é dinuclear. Comparando a atividade de **6** com **7** pode-se constatar que **6** é cerca de quatro vezes mais ativo. Na CI_{50} a $[Pt]_i$ para **7** é $23,18 \times 10^{-16}$ mol célula⁻¹, o que equivale a $11,59 \times 10^{-16}$ mol célula⁻¹ do complexo. Assim, a concentração intracelular de **6** na CI_{50} é cerca de quatro vezes maior que **7**. Como complexos diferentes tais como cisplatina e carboplatina apresentam mesmos valores de $[Pt]_i$ na CI_{50} pode-se propor que o mecanismo de ação de **6** e **7** seja diferente.

b) Complexos de Cobre

Na **Tabela 4.3** estão relacionados os valores obtidos para a CI_{50} dos complexos de cobre(II): **8** e **9**.

Tabela 4.3 – Valores de CI_{50} frente à linhagem celular K562. Valores determinados para os complexos **8** e **9**. Os valores representam a média de quatro experimentos independentes.

	$CI_{50} / \mu\text{mol L}^{-1}$
8	49,92
9	81,03

Os complexos **8** e **9** não apresentaram atividade muito elevada quando comparados aos complexos de platina ou ainda outros complexos de cobre(II) descritos pelo grupo de pesquisa de Elene Cristina Pereira Maia, onde o composto de cobre mais ativo

apresentou CI_{50} de $1,93 \mu\text{mol L}^{-1}$ [42]. A **Figura 4.12** mostra a curva de citotoxicidade para **8** e **9** frente a linhagem celular testada. A baixa atividade desses complexos não despertou nosso interesse para estudos posteriores. Ainda assim, foi estudado o efeito da radiação sob a atividade desses complexos.

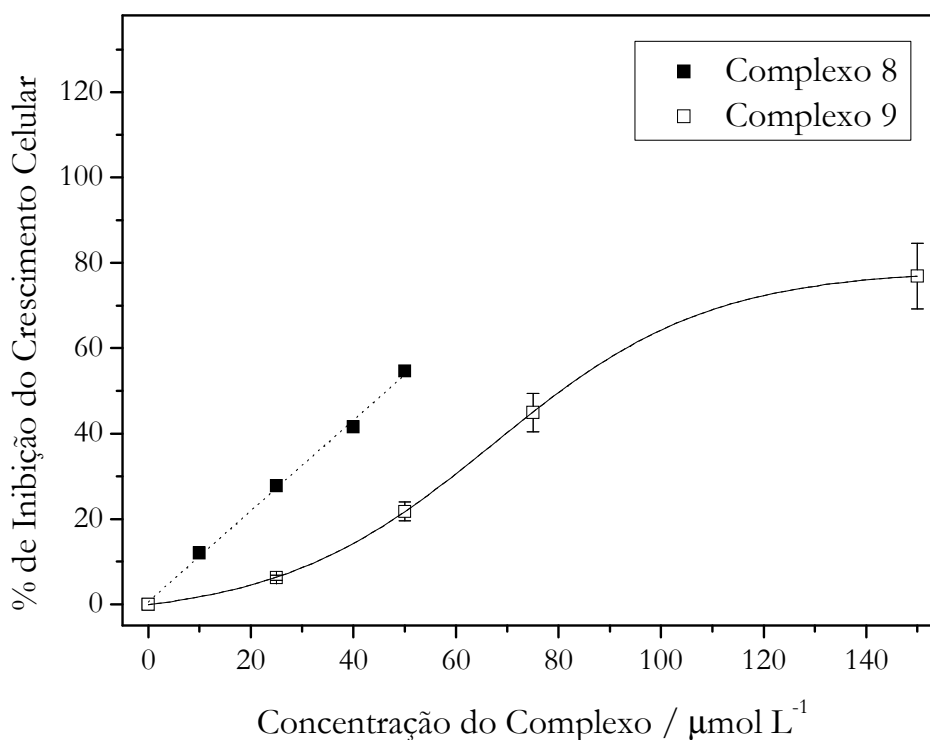


Figura 4.12 – Curva de citotoxicidade de **8** e **9** frente a linhagem celular K562. Os valores foram obtidos pela média de 4 experimentos independentes.

c) Complexo de Gálio

O complexo **10** (**Figura 1.14**) apresentou atividade citotóxica consideravelmente elevada, sendo sua $CI_{50} = 1,80 \mu\text{mol L}^{-1}$ na linhagem celular testada. A **Figura 4.13** mostra a curva de citotoxicidade de **10**.

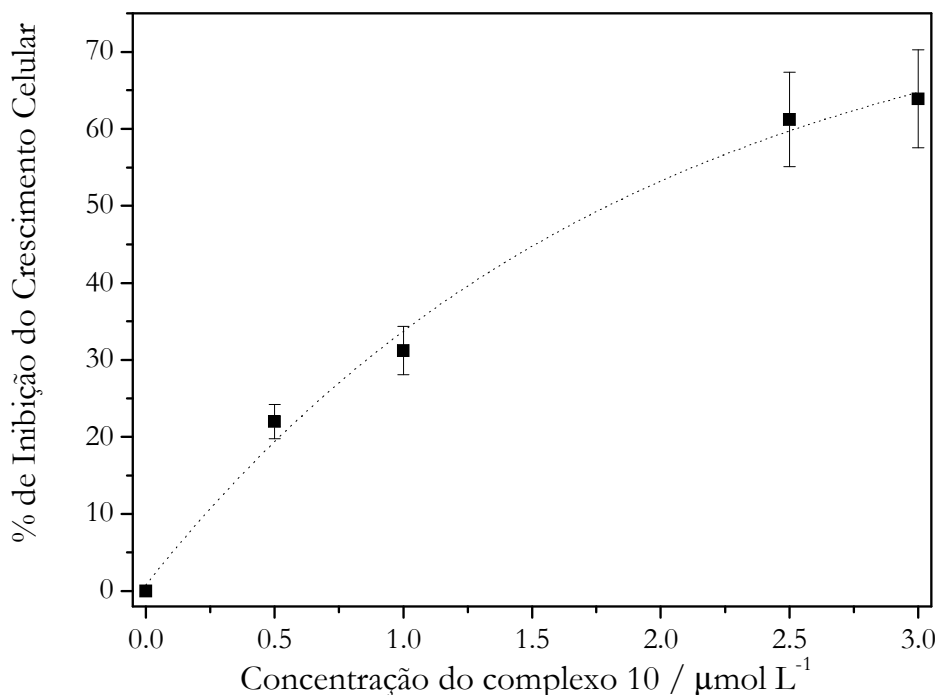


Figura 4.13 – Curva de citotoxicidade de **10** frente à linhagem celular K562. Os valores foram obtidos pela média de 4 experimentos independentes.

4.2 Estudo da Fotocitotoxicidade: Determinação da CI_{50}

Uma alternativa para o tratamento do câncer é a terapia fotodinâmica, que utiliza sondas que são excitadas em presença de luz e oxigênio para produzir o efeito fotocitotóxico. Nestes processos, ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio que são responsáveis pela morte das células cancerosas. Compostos de cobre e de ferro podem gerar espécies reativas de oxigênio através de reações de Fenton. Esta propriedade pode ser usada com finalidade terapêutica, pois estas espécies reativas de oxigênio podem clivar a molécula de ADN. A descrição na literatura de compostos de cobre que apresentam atividade nucleásica sob fotoativação [43, 44], nos levou a investigar se a atividade citotóxica dos compostos **8** e **9** seria aumentada por fotoirradiação.

A CI_{50} obtida para **8** na ausência de irradiação foi de $75,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ e a CI_{50} encontrada para amostra irradiada foi de $55,8 \mu\text{mol L}^{-1}$. Já para **9**, não houve inibição do

crescimento celular igual ou superior a 50% até 180 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Apesar da atividade do composto **8** ter aumentado, este aumento não foi muito significativo.

4.3 Estudo da Interação dos Complexos **4**, **6** e **10** com o ADN

a) Complexos de Pt(II)

Acredita-se que o mecanismo de ação antitumoral dos compostos de platina tenha como principal alvo a ligação ao ADN. Isso nos levou a estudar as interações dos compostos **4** e **6** com este alvo intracelular por espectroscopia na região do UV-Vis. O complexo **3**, embora tenham apresentado alto efeito citotóxico, não foi estudado por esse método, pois não apresentou banda de absorção nessa região do espectro.

Para esse estudo, foram registrados os espectros das soluções dos complexos **4** e **6** na região do UV-Vis, na ausência e na presença de concentrações crescentes de ADN.

A adição de ADN a **4** e **6** induz a um efeito de deslocamento hipocrômico, indicando a formação de um complexo ternário com ADN. A representação dos dados obtidos com **4** a $5,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $[\text{ADN}]$ variando de 0 a $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ é mostrada na **Figura 4.14**, enquanto a representação para **6** a $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $[\text{ADN}]$ variando de 0 a $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ é mostrada na **Figura 4.15**.

A partir dos dados espectrofotométricos, a constante de afinidade, K , foi calculada de acordo com a equação:

$$\frac{[\text{ADN}]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[\text{ADN}]}{(\epsilon_o - \epsilon_f)} + \frac{1}{K(\epsilon_o - \epsilon_f)}$$

na qual $[\text{ADN}]$ é a concentração mol L^{-1} de ADN em nucleotídeos; ϵ_a é a razão da absorvância/[complexo]; ϵ_f é o coeficiente de extinção do complexo livre e ϵ_o é o coeficiente de extinção do complexo em sua forma totalmente ligada. A razão entre inclinação/intercepto no gráfico $[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{ADN}]$ fornece o valor de K .

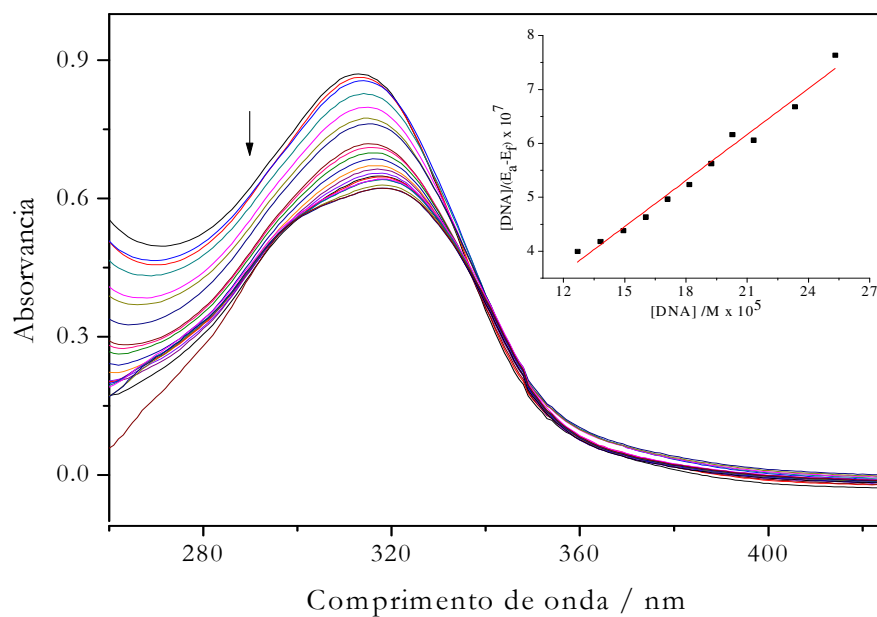


Figura 4.14 – Espectro de absorção na região do UV-Vis da solução contendo $5,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de **4** e concentração de ADN variando de 0 a $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão HEPES pH = 7,3, a 25°C

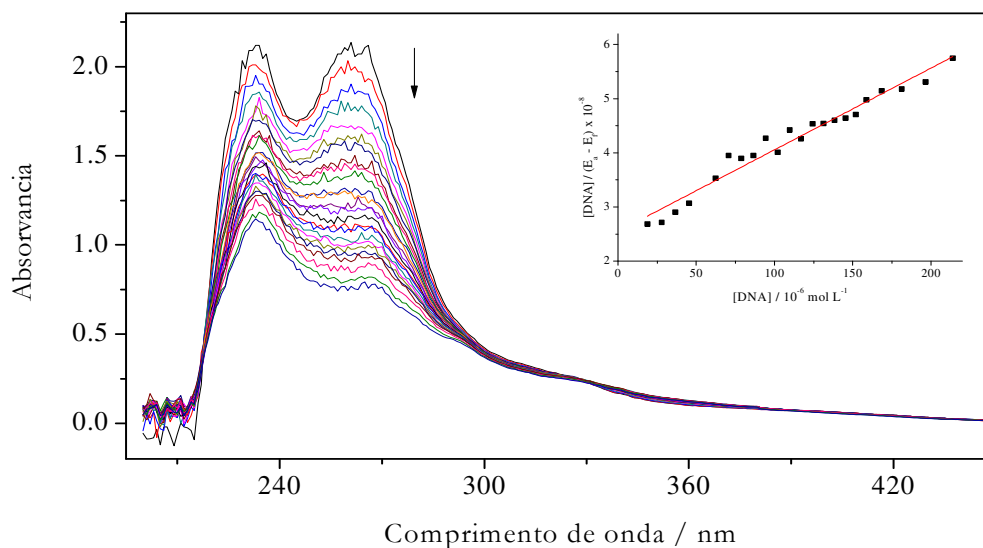


Figura 4.15 – Espectro de absorção na região UV-Vis da solução contendo $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de **6** e concentração de ADN variando de 0 a $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão HEPES pH = 7,3, a 25°C

O complexo **4** apresenta afinidade pelo ADN cerca de 25 vezes maior que **6**, sendo os valores das constantes de afinidade, respectivamente, $1,45 \times 10^5$ e $5,92 \times 10^3$. Em estudos similares com complexos de Pt(II) e doxíciclina e Pt(II) e tetraciclina Pereira-Maia *et al*, encontraram valores de constantes de afinidade em torno de 5×10^4 [45].

Pode-se dizer que **4** e **6** formam complexos estáveis com o ADN, embora a estabilidade de ADN-**4** seja maior. Essa maior afinidade pode ser relacionada com a maior atividade de **4**, verificada pela menor CI_{50} .

b) Complexo de Ga(III)

Como o complexo de gálio, **10**, se mostrou muito ativo, também foi estudada sua interação com o ADN. **10** interage com o ADN, sendo essa interação também observada por um efeito de deslocamento hipocrômico no espectro UV-Vis do complexo. A representação dos dados experimentais obtidos com **10** a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e [ADN] variando de 0 a $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ é mostrada na **Figura 4.16**

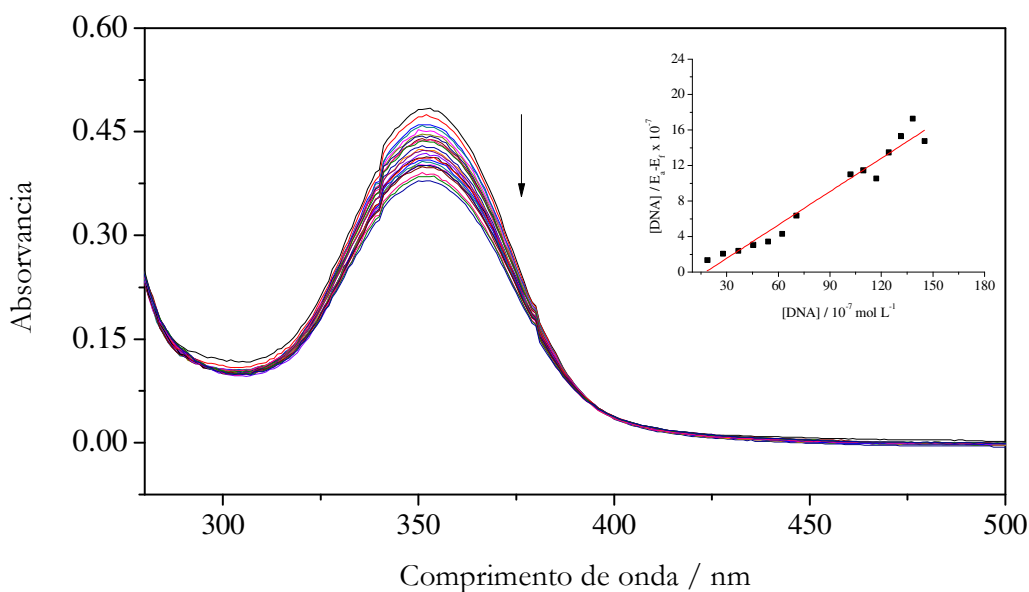


Figura 4.16 – Espectro de absorção na região UV-Vis da solução contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de **10** e concentração de ADN variando de 0 a $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão HEPES pH = 7,3, a 25°C

A constante de afinidade entre **10** e o ADN é $5,67 \times 10^4$, revelando a estabilidade para o complexo formado entre **10** e ADN.

4.4 Estudo da Interação dos Complexos **3**, **6** e **10** com a 5'-GMP e de **10** com Guanosina

Os ácidos nucleicos são polímeros de ribonucleotídeos ou desoxiribonucleotídeos. O nucleotídeo contém uma pentose, uma base nitrogenada e grupos fosfato. Os sítios de coordenação mais comuns são os fosfatos e as bases. Os heteroátomos das bases, nitrogênios amínicos e piridínicos, e oxigênios das carbonilas constituem possíveis sítios. Os nitrogênios endocíclicos são melhores doadores do que os exocíclicos devido à deslocalização do par de elétrons do nitrogênio no anel. Esses heteroátomos das bases coordenam-se preferencialmente a metais mais macios como Pt(II) ou Cu(II). Já os oxigênios negativamente carregados dos grupos fosfato, as hidroxilas da ribose e as carbonilas das bases são bons coordenantes para íons metálicos mais duros como os alcalinos ou alcalinos terrosos. Na **Figura 4.17** está representado um nucleotídeo modelo, a 5'-guanosina-monofosfato, ou 5'-GMP [46].

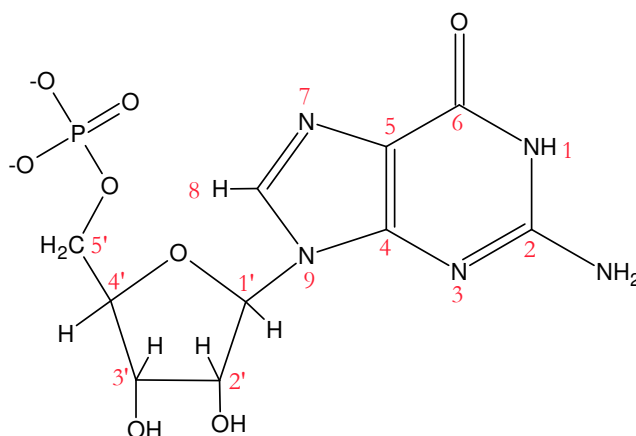


Figura 4.17 – Fórmula estrutural para a 5'-GMP.

Nos experimentos anteriores, foi demonstrado que os complexos **3**, **6** e **10** inibem o crescimento das células tumorais em concentrações razoavelmente baixas e que eles interagem com o ADN. A fim de obter informações sobre o sítio de ligação de cada um desses complexos com o ADN, foram estudadas as interações entre **3**, **6** e **10** com a 5'-GMP, e de **10** com a guanosina. As atribuições dos espectros de ^1H RMN da 5'-GMP, da guanosina e de

seus adutos com os complexos metálicos estudados foram feitas com a ajuda dos espectros de ^1H COSY bidimensional.

a) Complexos de Pt(II)

Como discutido previamente, a cisplatina tem como principal alvo o ADN e a interação entre eles leva à formação de um importante aduto com o nitrogênio 7 da guanina. Como modelo para estudar o sítio de interação de compostos metálicos com o ADN, foi utilizada a 5'-GMP. A interação da cisplatina com esse nucleotídeo leva, principalmente, à formação do aduto $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{N7-GMP})_2]^{2-}$ (**Figura 1.4**). A ligação da platina ao N7 da base pode ser verificada via espectroscopia de RMN ^1H pelo deslocamento do hidrogênio 8 para campo baixo [15, 18, 47].

A **Tabela 4.4** mostra os deslocamentos químicos observados para a 5'-GMP livre e $[\text{5'-GMP}]:[\mathbf{3}] = 4$. Os espectros não sofreram variação significativa após 4 h de reação.

Tabela 4.4 – Deslocamentos químicos de ^1H observados para a 5'-GMP e para o aduto **3**-5'-GMP, na razão molar $[\text{5'-GMP}]:[\mathbf{3}] = 4:1$, pD = 7,2.

	δ / ppm 5'-GMP	δ / ppm 3-5'-GMP	
		t = 4 horas	$\Delta\delta$
H8	8,19	8,63 e 8,73	+ 0,44
H1'	5,91	5,89	- 0,02
H2'	#	#	#
H3'	4,52	4,46	- 0,06
H4'	4,35	4,29	- 0,06
H5'	4,05	3,99	- 0,06

Embebido no sinal do solvente

A 5'-GMP exibe o sinal de H8 em δ 8,19. No espectro da solução contendo o complexo **3** pode-se observar dois novos sinais em δ 8,63 e 8,73, o que indica a formação de um aduto entre **3** e o N7. Nenhum outro hidrogênio foi significativamente deslocado em relação à 5'-GMP livre.

A **Figura 4.18** mostra o deslocamento de H8 da 5'-GMP na ausência (a) e na presença de **3** (b). Os espectros completos são mostrados no anexo A, **Figuras A1 e A2**.

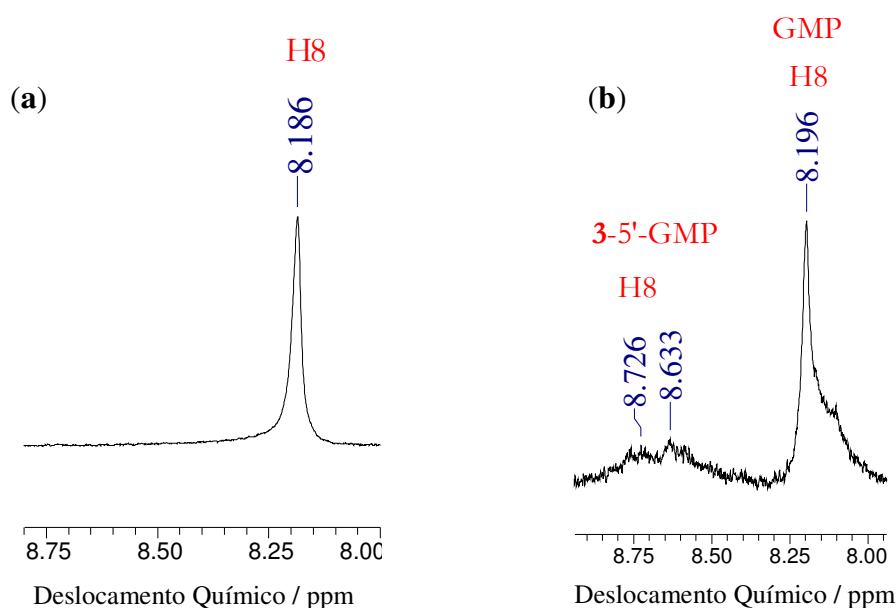


Figura 4.18 – Fragmentos dos espectros de RMN ^1H obtidos para (a) 5'-GMP, (b) 3-5'-GMP após 4 horas de mistura na razão molar [5'-GMP]:[**3**] = 4:1, em tampão fosfato, pD = 7,2.

O complexo **3** é dinuclear (**Figura 1.10**). Assim, o surgimento de dois sinais (δ 8,73 e 8,63), sugere a existência de duas espécies em equilíbrio: [**3**-5'-GMP] e [**3**-(5'-GMP) $_2$]. O equilíbrio entre espécies 1:1 e 1:2 entre complexos dinucleares de Pt(II) e a 5'-GMP também foi descrito por Farrell e colaboradores [48]. Outra possível explicação é a existência de dois isômeros em equilíbrio. Nos dois casos, uma ligação Pt-Cl deveria ser quebrada para a formação da ligação Pt-N7. Não foi possível realizar o estudo de RMN de ^{195}Pt devido a baixa solubilidade do complexo.

Estudo similar foi realizado entre o complexo **6** e a 5'-GMP. A **Tabela 4.5** mostra os deslocamentos químicos da 5'-GMP livre e da mistura na proporção molar [5'-GMP]:[**6**] = 2:1, logo após realizada a mistura e depois de 16 horas. Não foram observadas variações significativas nos espectros com variações do tempo, indicando que a reação é relativamente rápida. As **Figuras 4.19 e 4.20** mostram, respectivamente, fragmentos dos espectros RMN mono- e bidimensional COSY de ^1H (os espectros completos são apresentados no apêndice A, **Figuras A3 e A4**), e a **Figura 4.21** mostra os espectros de RMN de ^{31}P .

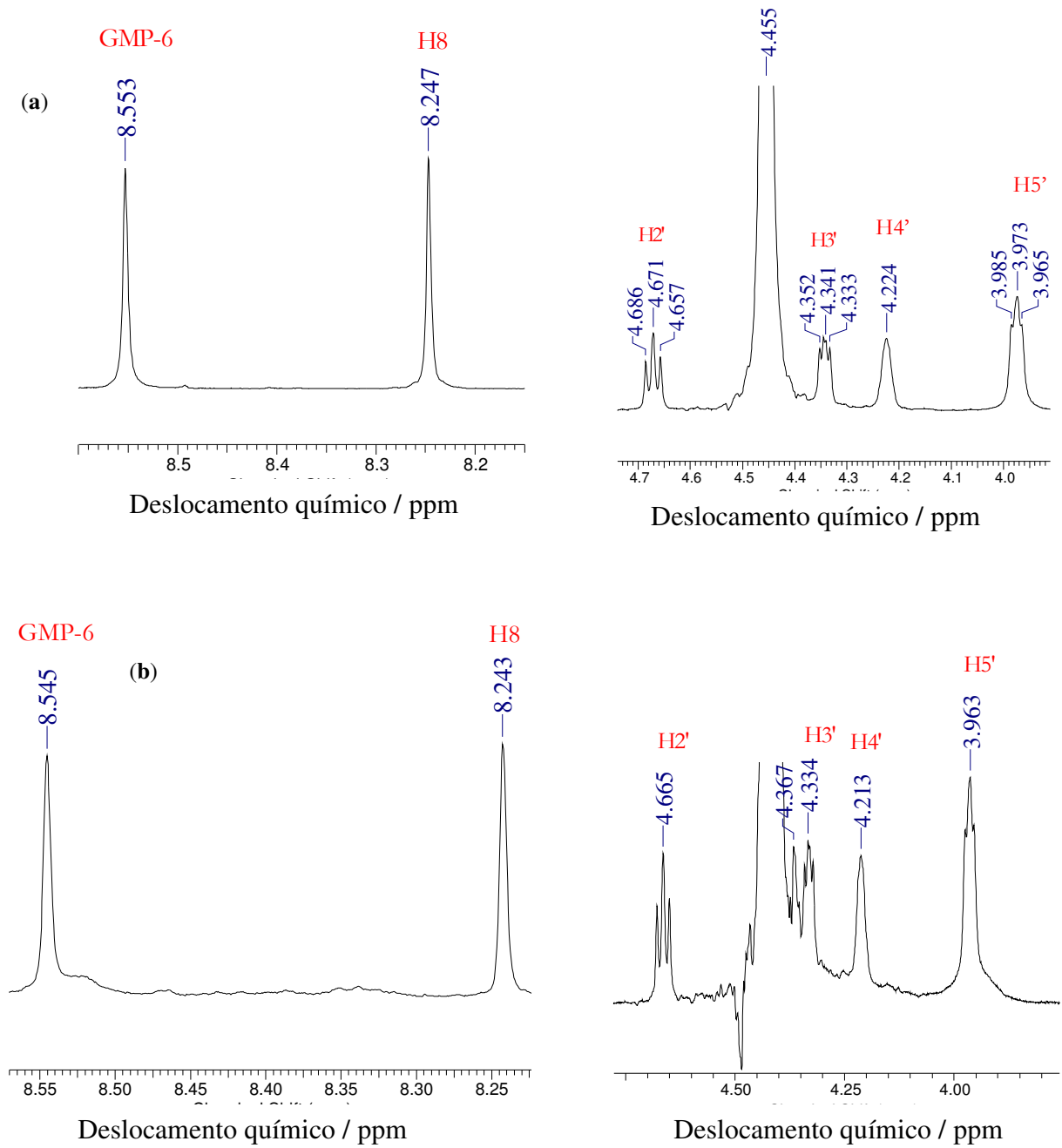
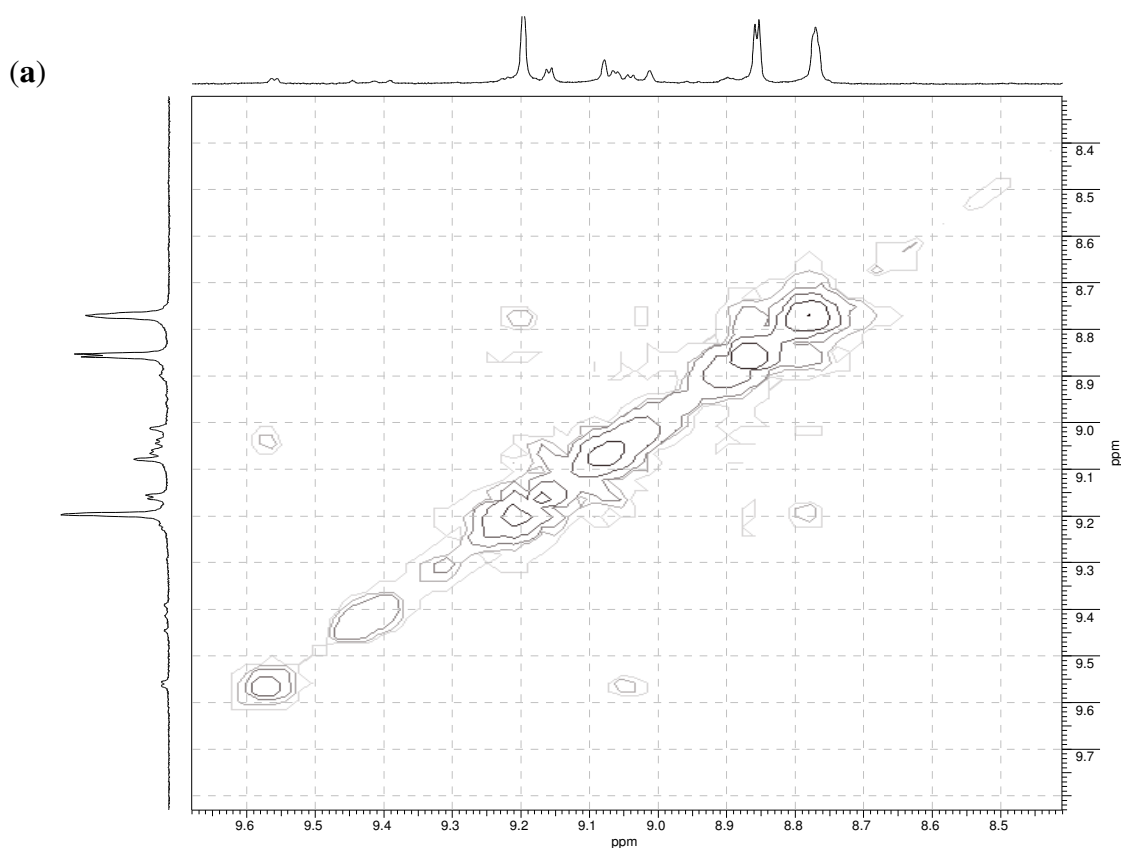


Figura 4.19 – Fragmentos dos espectros unidimensionais de RMN ^1H obtidos para 6-5'-GMP nos tempos de (a) 0 horas e (b) 14 horas de mistura, na razão molar contendo [5'-GMP]:[6] = 2:1, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, $\text{pD} = 5,0$.

Tabela 4.5 – Deslocamentos químicos de ^1H e ^{31}P observados para 5'-GMP e para aduto 6-5'-GMP, na proporção molar [5'-GMP]:[6] = 2:1 em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, pD = 5, em diferentes intervalos de tempo.

	δ GMP / ppm	δ / ppm		
		6-5'-GMP		
		t = 5 min	$\Delta\delta$	t = 16 horas*
H8	8,23	8,55	+ 0,32	8,55
H1'	6,06	6,03	- 0,03	6,02
H2'	4,73	4,67	- 0,06	4,67
H3'	4,54	4,34	- 0,20	4,35
H4'	4,42	4,22	- 0,20	4,22
H5'	4,19	3,97	- 0,22	3,97
P	1,324	1,997	+ 0,67	1,949

* Após mistura dessa amostra, o sistema foi deixado sob agitação mecânica e aquecimento (temperatura de 45°C) por 16 horas



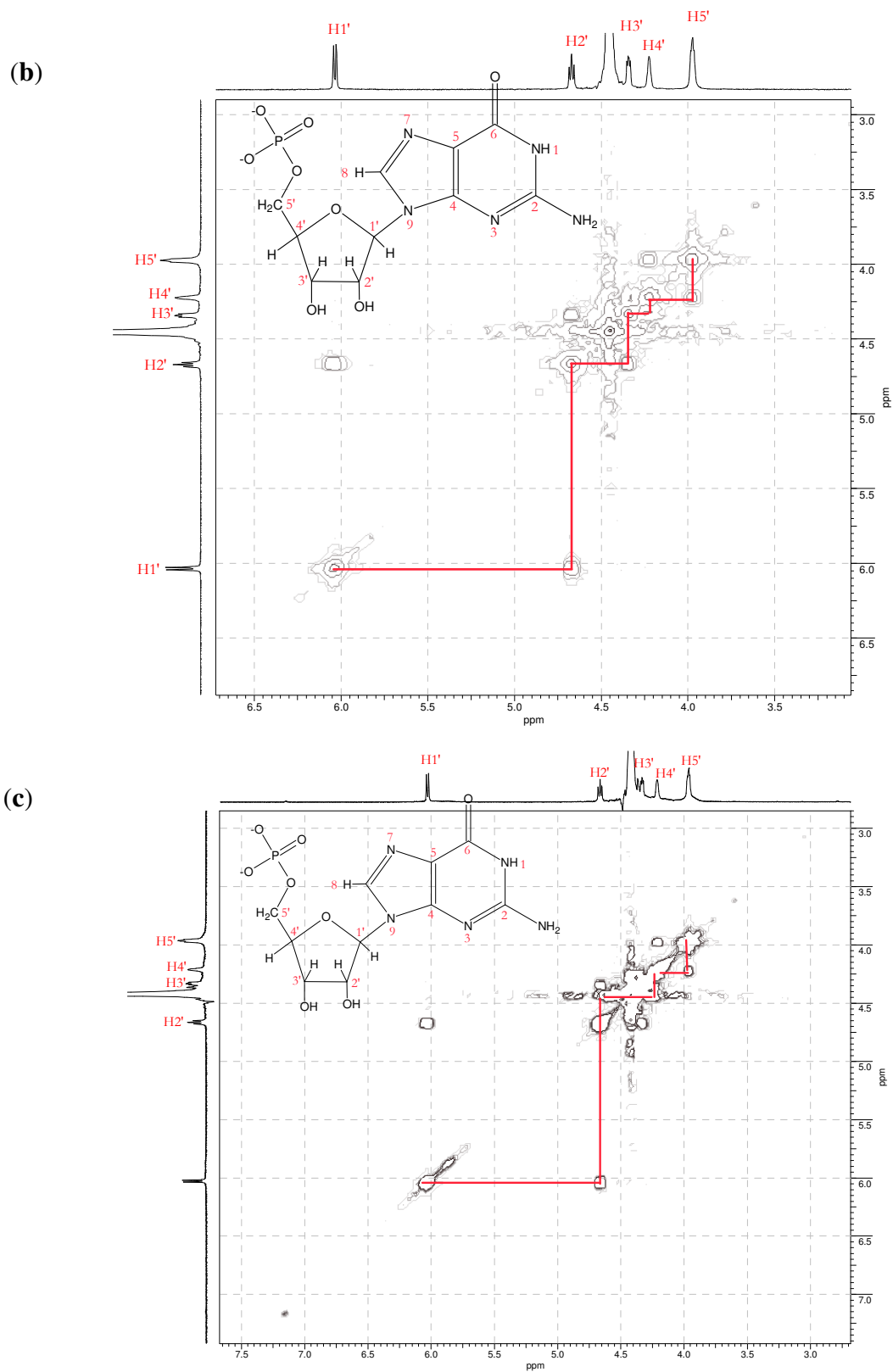


Figura 4.20 – Fragmentos dos espectros bidimensionais de ^1H COSY RMN obtidos para (a) **6** e **6-5'-GMP** nos tempos de (b) 0 horas e (c) 14 horas de mistura, na razão molar contendo $[\text{5'-GMP}]:[\text{6}] = 2:1$, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, pD = 5,0.

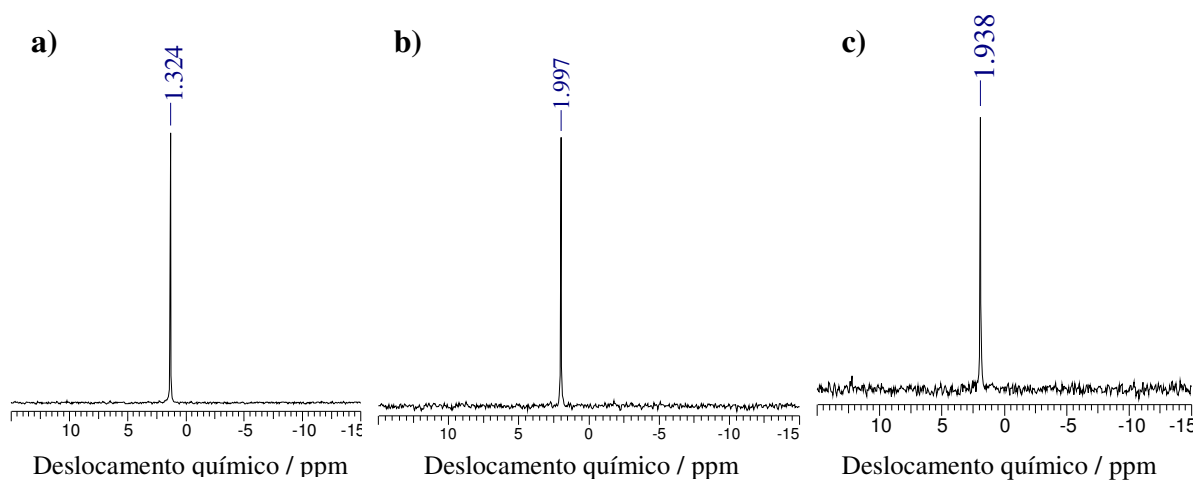


Figura 4.21 – Espectros de RMN ^{31}P obtidos para (a) 5'-GMP e para 6-5'-GMP nos tempos de (b) 0 horas e (c) 14 horas de mistura na razão molar contendo [5'-GMP]:[6] = 2:1, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, pD = 5,0.

Pode-se observar na **Tabela 4.5** que o H8 da 5'-GMP foi o mais afetado pela adição de **6**, seguido de H5', H4' e H3'. O H8 da 5'-GMP dá origem a um singlete em δ 8,24. Após adição de **6**, há o aparecimento de um novo sinal em δ 8,55, atribuído ao H8 da espécie complexada entre 6-5'-GMP. Isso sugere a ligação entre o N7 e a platina, o que causa a diminuição da proteção do referido próton. Os deslocamentos químicos observados para H5', H4' e H3' também foram significativos, o que pode ter sido causado pelo envolvimento de um oxigênio do grupo fosfato na coordenação à platina. Para verificar essa hipótese, foi registrado o RMN de ^{31}P da 5'-GMP na ausência e na presença de **6**. O sinal de ^{31}P sofre um deslocamento de 0,67 ppm, confirmando a participação do grupo fosfato na coordenação ao íon metálico. Com base nesses resultados, foi proposta a estrutura, mostrada na **Figura 4.22**, para o aduto formado entre **6** e 5'-GMP, na qual a platina encontra-se ligada a dois sítios da 5'-GMP: o N7 da base e um oxigênio do α -fosfato. Estes átomos doadores substituem os dois cloretos presentes originalmente no complexo **6**. Adutos com estruturas similares foram descritos para análogos da cisplatina [49].

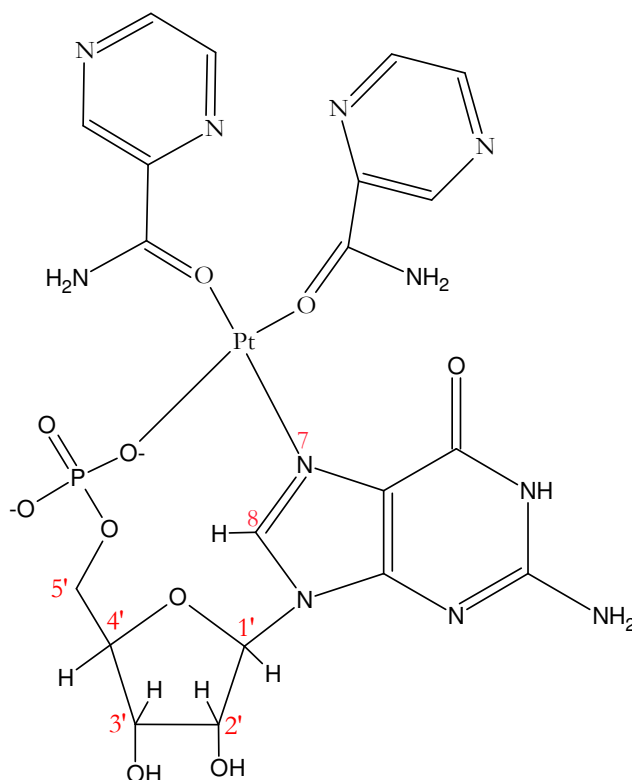


Figura 4.22 – Proposta de estrutura para o aduto 6-5'-GMP formado a partir da mistura na proporção molar contendo $[5'\text{-GMP}]:[6] = 2$, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, $\text{pD} = 5,0$.

Um manuscrito contendo os resultados que obtivemos para os complexos **6** e **7** está sendo redigido visando a publicação de um artigo em periódicos científicos, em colaboração com o grupo de pesquisa do professor Nicolás A. Rey, que fez a síntese e caracterização.

b) Complexo de Gálio

A interação entre o complexo **10** e a 5'-GMP foi estudada por RMN de ^1H uni- e bidimensional COSY e de ^{31}P . A **Tabela 4.6** mostra os deslocamentos químicos de ^1H e ^{31}P da 5'-GMP livre e da mistura na proporção molar $[5'\text{-GMP}]:[10] = 2:1$ e as **Figuras 4.23**, **4.24** e **4.25** mostram, respectivamente, fragmentos dos espectros de ^1H uni- e bidimensional COSY (os espectros completos são mostrados no anexo A, **Figuras A5** e **A6**, respectivamente) e os espectros de ^{31}P RMN obtidos.

Tabela 4.6 – Deslocamentos químicos para ^1H e ^{31}P da 5'-GMP livre e após mistura contendo a proporção molar [5'-GMP]:[**10**] = 2:1, em DMSO- d_6 /D $_2$ O, pD = 6 e força iônica $2,50 \times 10^{-2}$ mol L $^{-1}$ de NaNO $_3$.

	δ GMP / ppm	δ / ppm	
		10-5'GMP	
		t = 5 h	$\Delta\delta$
H8	8,23	8,55	+ 0,32
H1'	6,06	6,04	- 0,02
H2'	4,73	4,69	- 0,04
H3'	4,54	4,73	+ 0,19
H4'	4,42	4,24	- 0,18
H5'	4,19	3,99	- 0,20
P	1,324	2,057	0,73

No RMN de ^1H , a adição de **10** ocasiona variações significativas nos deslocamentos químicos de H8, H3', H4' e H5'. O H8 da 5'-GMP sofreu um deslocamento de 0,32 ppm o que sugere a ligação entre o N7 e o Ga(III), o que causa a diminuição da proteção do referido próton. Os deslocamentos químicos observados para H5', H4' e H3' pela adição de **10** podem ter sido causados pelo envolvimento de um oxigênio do grupo fosfato na coordenação ao Ga(III). Variação significativa em relação à 5'-GMP livre também ocorreu no deslocamento químico de ^{31}P , + 0,73 ppm para campo baixo. Tais deslocamentos sugerem a coordenação bidentada entre o Ga(III) e os átomos N7 e oxigênio do grupo fosfato. Nenhuma variação significativa foi observada após 5 h de reação.

Outro sítio de coordenação possível para o gálio seriam os oxigênios das hidroxilas da pentose. Neste caso, variações significativas dos sinais de H1' e H2' seriam esperadas, o que não ocorreu. De fato, Demicheli *et al* estudaram a interação entre complexos de Sb(V) e nucleotídeos modelo e demonstraram que a coordenação ocorre via oxigênio do açúcar, o que leva a uma variação significativa nos sinais de RMN de H1' e de H2' [50].

Para confirmar o envolvimento do grupo fosfato e verificar a possível interação com o açúcar, o estudo seguiu pela interação de **10** com a guanosina.

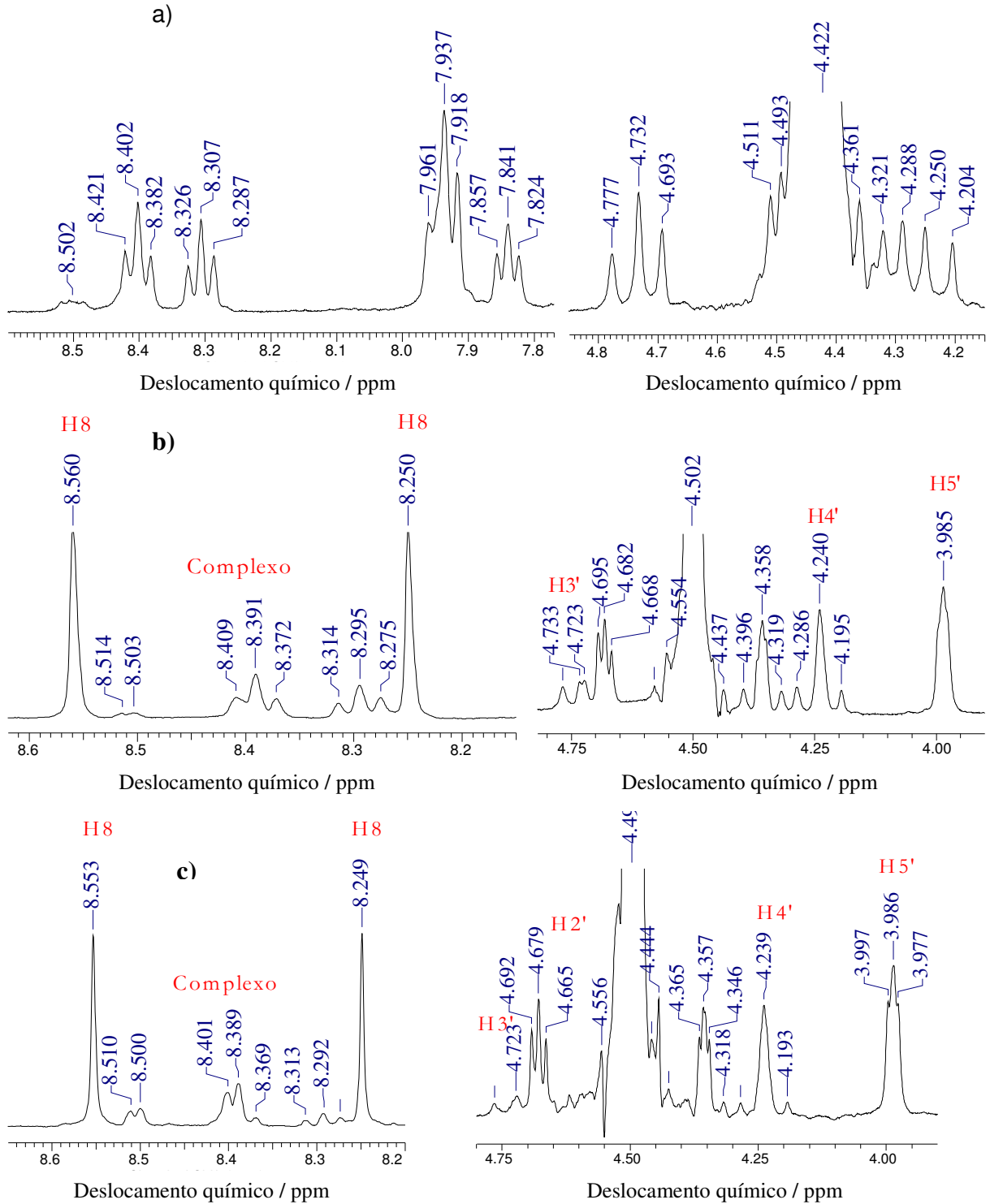


Figura 4.23 – Fragmentos dos espectros de ^1H RMN obtidos para (a) **10**; e misturas na proporção molar $[5'\text{-GMP}]:[\mathbf{10}] = 2:1$ nos tempos de (b) 0 horas e (c) 5 horas, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, pD = 6,0.

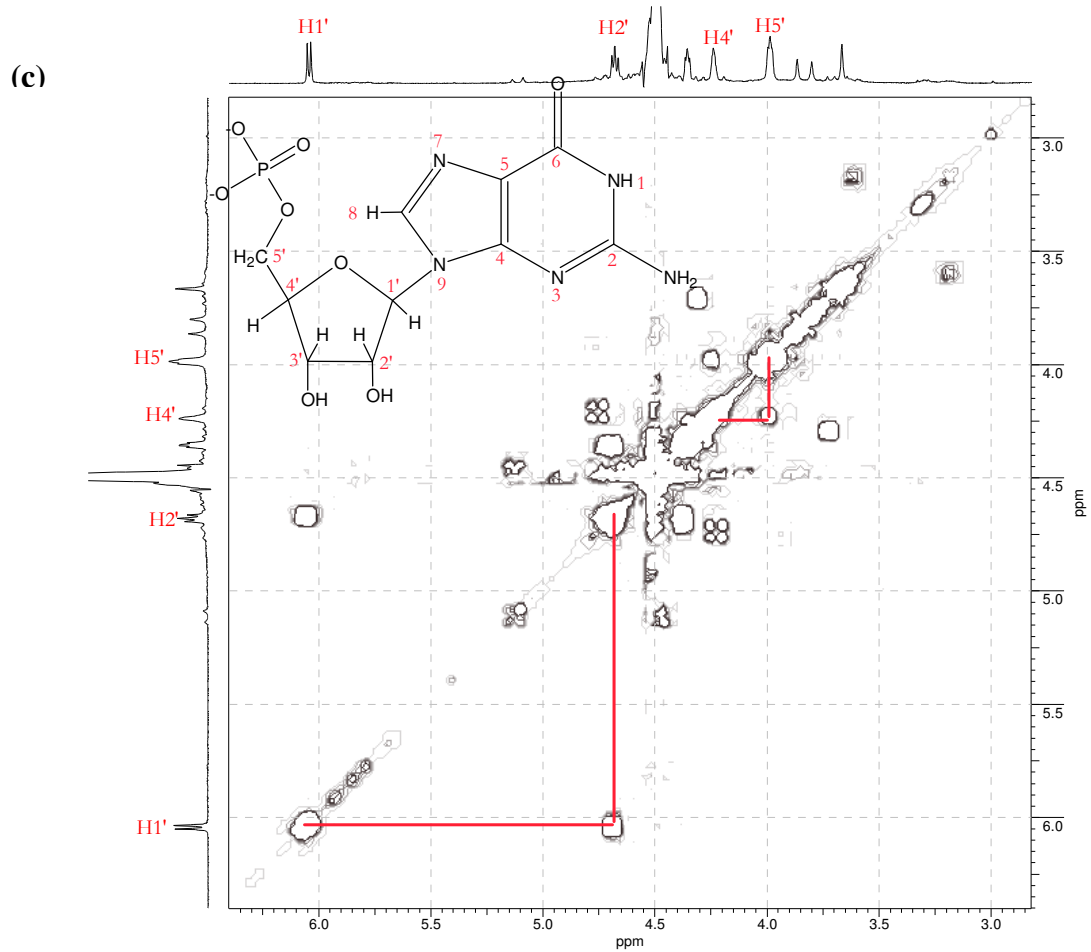


Figura 4.24 – Fragmentos dos espectros de ^1H bidimensionais COSY obtidos para (a) **10**, e misturas na proporção molar $[5'\text{-GMP}]:[\mathbf{10}] = 2:1$ nos tempos de (b) 0 horas e (c) 5 horas, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, pD = 6,0.

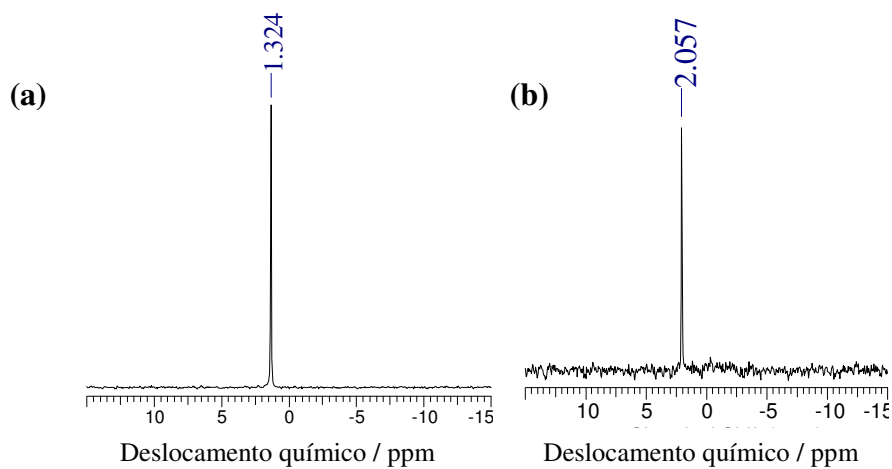


Figura 4.25 – Espectros de RMN ^{31}P obtidos para (a) $5'\text{-GMP}$ e (b) misturas na proporção molar $[5'\text{-GMP}]:[\mathbf{10}] = 2:1$ no tempo 5 horas, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, pD = 6,0.

A **Tabela 4.7** mostra os deslocamentos químicos para a guanosina (**Figura 4.26**) na ausência e presença de **10** em diferentes concentrações de guanosina. As **Figuras 4.27** e **4.28** mostram fragmentos dos espectros obtidos, respectivamente, de ^1H uni- e bidimensional COSY (os espectros completos são encontrados no anexo A, **Figuras A7, A8, A9** e **A10**).

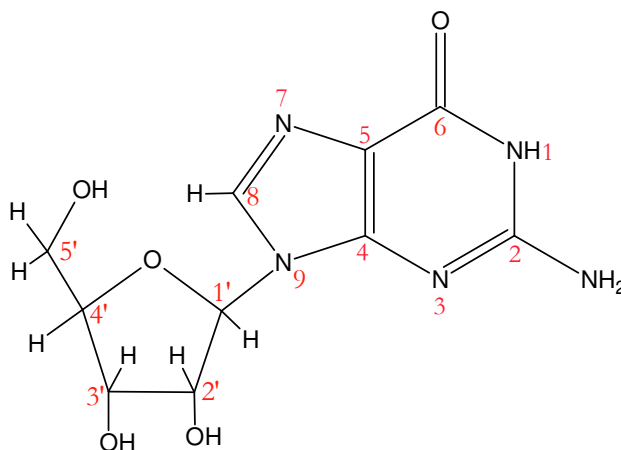


Figura 4.26 – Estrutura da Guanosina

Tabela 4.7 – Deslocamento químicos da guanosina livre e após mistura com **10** em $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$, pD = 6, força iônica $2,50 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 ,

	δ Guanosina / ppm	δ Guanosina, razão [10]:[guanosina] / ppm		
		1:2	1:4	$\Delta\delta$
H8	8,01	7,99	7,99	- 0,02
H1'	5,82	5,88	5,88	0,06
H2'	4,60	4,70	4,70	0,10
H3'	4,28	4,38	4,38	0,10
H4'	4,11	4,21	4,21	0,10
H5'	3,79	3,86	3,86	0,07
H5'	3,70	3,81	3,81	0,11

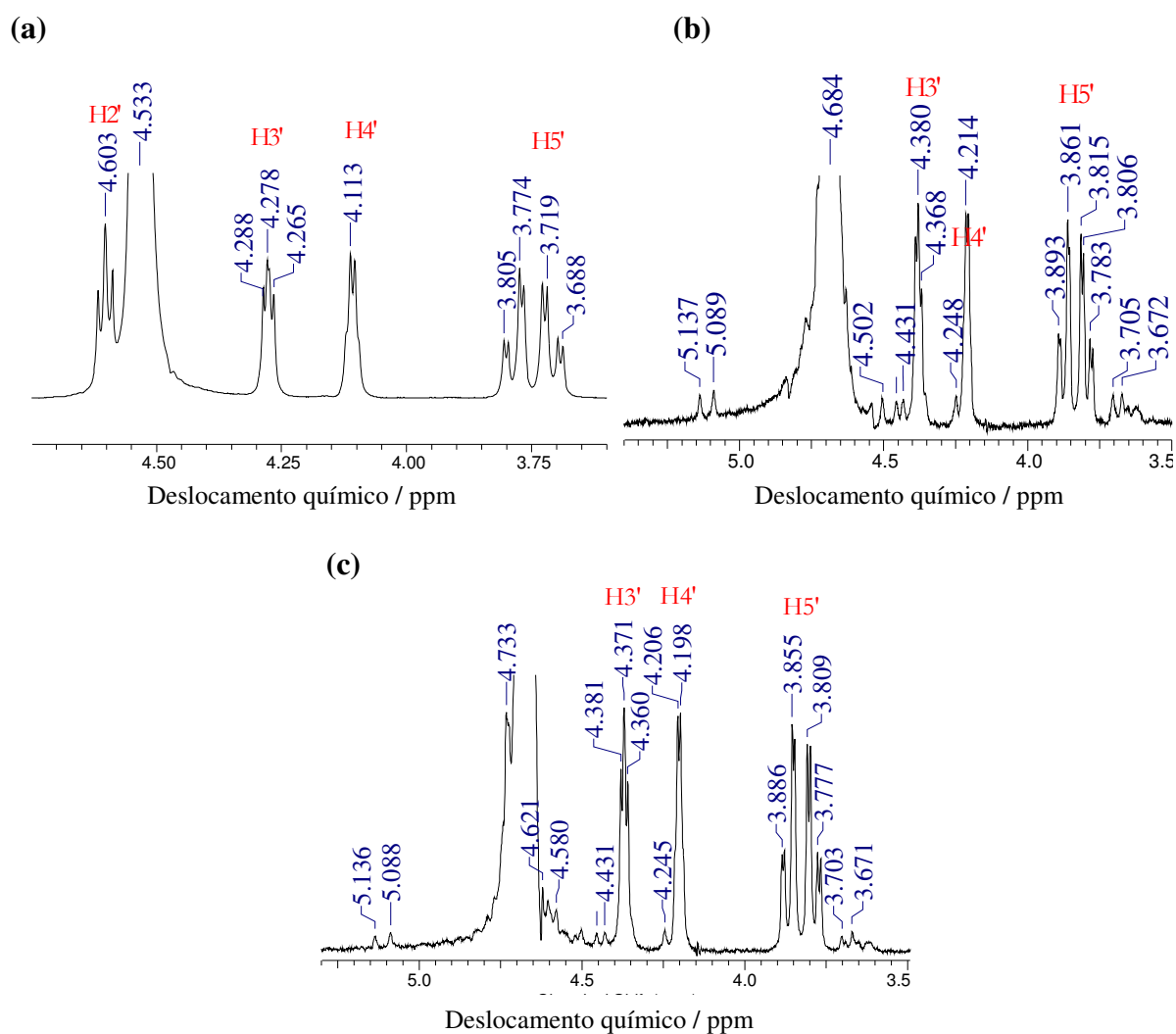
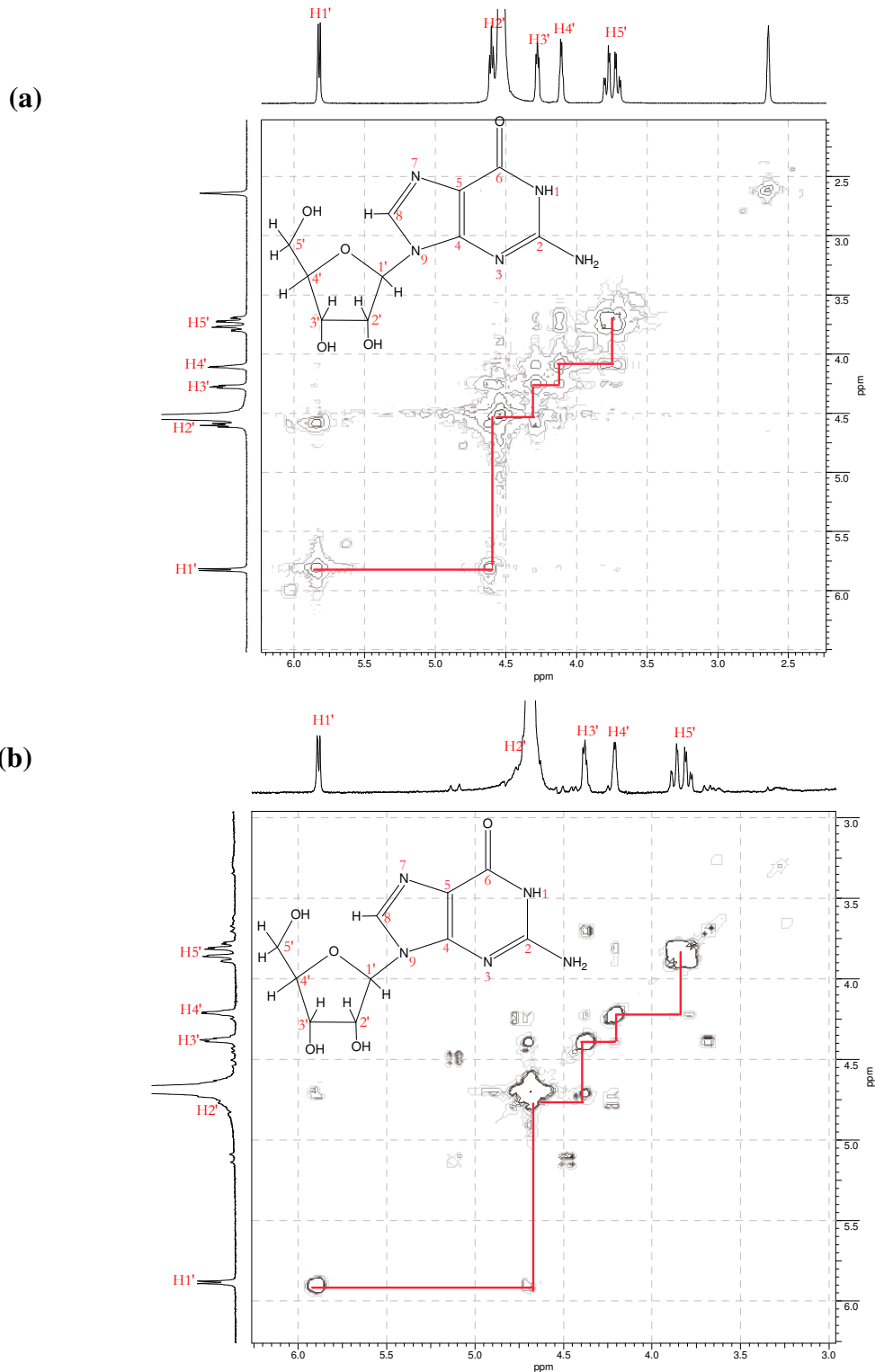


Figura 4.27 – Fragmentos dos espectros de ^1H unidimensionais obtidos para (a) guanosina; e misturas contendo a proporção molar [guanosina]:[**10**] = (b) 2:1 e (c) 4:1, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, pD = 6,0.

A diferença entre a guanosina e a 5'-GMP é a ausência do grupo fosfato. A análise dos resultados mostra que as variações dos deslocamentos químicos causadas pela adição de **10** no espectro da guanosina são, em geral, menores do que as observadas no caso da 5'-GMP. Os sinais de H2', H3', H4' e H5' sofrem variações pequenas em torno de + 0,1 ppm para campo baixo. Não foram observadas variações significativas nos sinais dos hidrogênios para as diferentes proporções estequiométricas.

Com base nos resultados descritos acima, foi proposto que o complexo **10** interage com a 5'-GMP pelo átomo de N7 e oxigênio do grupo fosfato. Collery *et al.*, em um artigo de revisão sobre o uso de compostos de Ga(III) no tratamento de câncer, relataram que o ADN é alvo de interações com antitumorais a base de gálio. Em presença de excesso de

ADN, o gálio se liga ao fosfato sem interação com as bases nucleicas; já para maiores concentrações de gálio também foram observadas interações com a guanina ou a adenina [24].



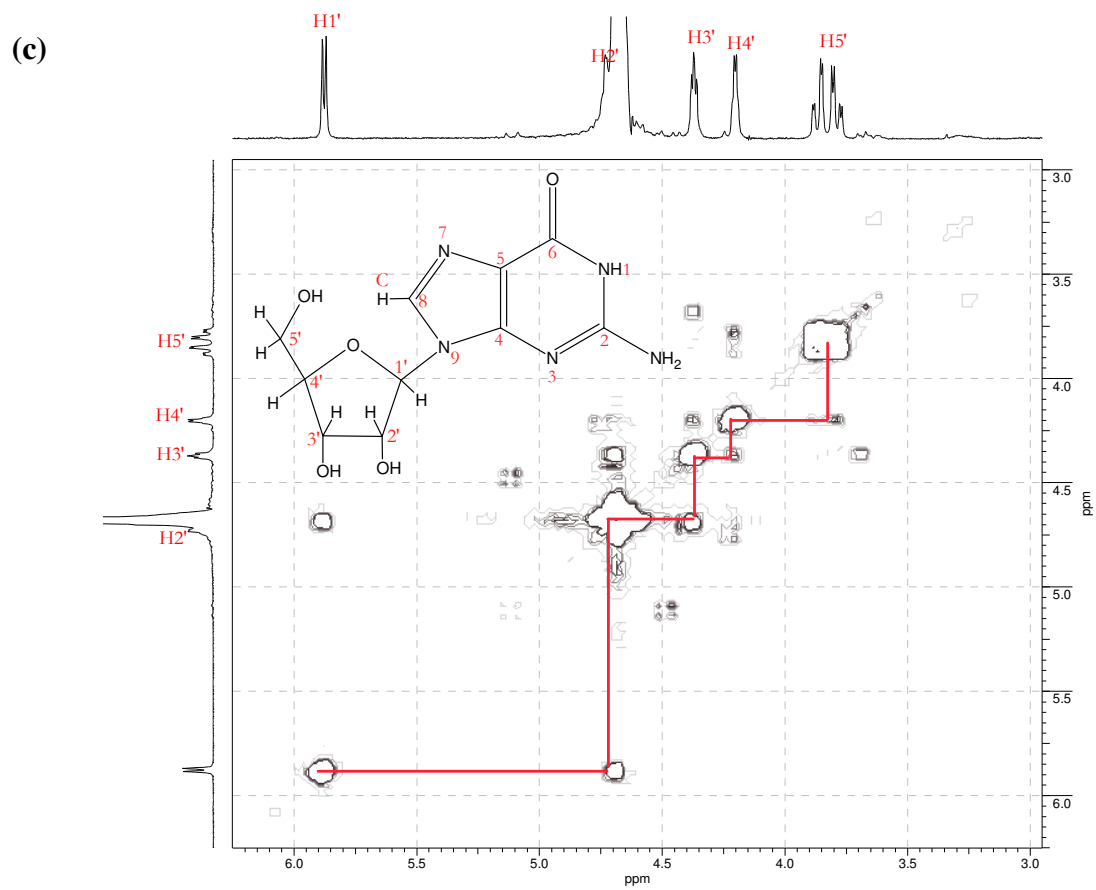


Figura 4.28 – Fragmentos dos espectros de ^1H bidimensionais COSY obtidos para (a) guanosina e misturas contendo a proporção molar [guanosina]:[**10**] = (b) 2:1 e (c) 4:1, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, pD = 6,0.

Capítulo 5

Conclusões Finais

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi estudado o potencial antitumoral de dez complexos metálicos, previamente caracterizados, sendo sete deles de Pt(II), dois de Cu(II) e um de Ga(III). Para todos eles foi avaliada a concentração necessária para inibir em 50% o crescimento celular, CI_{50} , na linhagem de leucemia mielóide crônica, K562.

Dentre os compostos de platina(II), **1**, **2** e **3** são complexos de cisplatina com aminoácidos; **4** e **5** de cisplatina e ligantes purínicos; e **6** e **7** são complexos de Pt(II) com antibióticos usados no tratamento da tuberculose, respectivamente, a pirazinamida e a isoniazida.

1, **2** e **5** não apresentaram atividade citotóxica satisfatória. Já **3**, **4**, **6** e **7** exibiram atividade citotóxica satisfatória, com valores de CI_{50} , respectivamente, de 2,93, 1,00, 6,34 e 24,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Em todos os casos, a coordenação a íons Pt(II) aumentou a atividade, pois a CI_{50} de todos os complexos foi inferior à dos ligantes livres. Foi encontrada uma boa correlação entre a atividade citotóxica e a concentração intracelular de platina, após a incubação das células com concentrações equitóxicas de **3**, **4**, **6** e **7**. A incubação com a CI_{50} leva a uma concentração intracelular de platina igual a $2,18 \times 10^{-16}$; $0,47 \times 10^{-16}$; $2,65 \times 10^{-16}$ e $23,18 \times 10^{-16}$ mol célula⁻¹, para **3**, **4**, **6** e **7**, respectivamente. Estes resultados são importantes, pois evidenciam que o efeito citotóxico observado está diretamente relacionado à presença da platina no interior das células

Foi demonstrado que **4** e **6** formam um complexo ternário com o ADN, sendo os valores das constantes de afinidade, respectivamente, $1,45 \times 10^5$ e $5,92 \times 10^3$. O complexo **4**, que apresenta maior efeito citotóxico (menor CI_{50}) foi o mais ativo e apresentou afinidade pelo ADN cerca de 25 vezes maior que **6**.

Visando identificar o sítio de ligação ao ADN, as interações entre **3** e **6** e um nucleotídeo modelo, a 5'-GMP, foram estudadas por RMN. Os resultados obtidos indicam que o complexo **3** liga-se ao N7 da base nitrogenada. Para o complexo **6**, foi proposta a formação de um quelato, no qual a platina se coordena à 5'-GMP via N7 e um oxigênio do grupo α -fosfato.

Os resultados obtidos sugerem que o mecanismo da atividade citotóxica dos compostos de platina(II) estudados envolvem a interação com o ADN e o sítio dessa interação parece ser o N7 da guanina.

Os complexos de Cu(II), **8** e **9** apresentaram valores de CI_{50} relativamente altos e foram descartados como possíveis agentes antitumorais.

Finalmente, o complexo de Ga(III), **10**, foi muito ativo com a CI_{50} de $1,80 \mu\text{mol L}^{-1}$. Foi evidenciada a formação de uma espécie ternária entre **10** e o ADN, com uma constante de afinidade de $5,67 \times 10^4$. Foi proposto que **10** se coordena ao nucleotídeo 5'-GMP, através do nitrogênio 7 da guanina e de um oxigênio do grupo α -fosfato. O complexo **10** pode ser considerado um promissor agente antitumoral.

Em estudos posteriores seria interessante avaliar o efeito citotóxico em outras linhagens tumorais, por exemplo, linhagens resistentes à cisplatina. Outro estudo importante seria avaliar se a interação dos compostos com o ADN conduz à apoptose ou à necrose celular. Finalmente, seria interessante estudar se os compostos mais ativos não são tóxicos para células normais nas concentrações tóxicas às células tumorais.

REFERÊNCIAS

1. NEIDLE, S.; THURSTON, D. Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies. **Nature Reviews**, v 5, 285-296, 2005.
2. BENITE, A.M.C.; MACHADO, S.P.; BARREIRO, E.J. Considerações sobre a Química Bioinorgânica Medicinal. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v IV (2), 131-142, 2007.
3. Disponível em <http://www.inca.gov.br> acessado em 01 de dezembro de 2010
4. PATRICK, G.L. **Na Introduction to Medicinal Chemistry**. Oxford, 4ª Edição.
5. SIMPLICIO, F.I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos. **Química Nova**, v. 25, nº 5, 801-807, 2002
6. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Guanabara Koogan, 11ª Edição.
7. ROSENBERG, B.; CAMP, L.V.; TROSCO, J.E.; MANSOUR, V.H. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumoral Agents. **Nature**, 222, 385-386, 1969
8. ZHANG, C.X.; LIPPARD, S.J. New Metal Complexes as Potential Therapeutics. **Current Opinion Chemical Biology**, v 7 (4), 481-489, 2003.
9. REEDIJK, J. New Clues for Platinum Antitumoral Chemistry: Kinetically Controlled Metal Biding to DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100 (7), 3611-3616, 2003.
10. CHAUDHARY, A.; SINGH, A.K.; SINGH, R.V. Investigations of the Possible Pharmacological Effects of Organotin(II) Complexes. **Journal Inorganic Biochemistry**, 100, 1632-1645, 2006.
11. TODD, R.C.; LIPPARD, S.J. Inhibition of Transcription by Platinum Antitumoral Compounds. **RSC Publishing**, v 1, nº 4, 269-369, 2009.
12. JENNERWEIN, M.; ANDREWS, P.A. Drug Accumulation and DNA Platination in Cells Exposed to Aquated Cisplatin Species. **Cancer Letters**, 81, 215-220, 1994.
13. SAFAEI, R. Role of Copper Transporters in the Uptake and Efflux of Platinum Containing Drugs. **Cancer Letters**, 234, 34-39, 2006.
14. JAMIESON, E.R.; LIPPARD, S.J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. **Chemical Reviews**, 99, 2467-2498, 1999.

15. FICHTINGER-SCHEPMAN, A.M.J.; VEER, J.L.; HARTOG, J.H.J.; LOHMAN, P.H.M.; REEDIJK, J. Adducts of the Antitumor Drug cis-Diamminedichloroplatinum(II) with DNA: Formation, Identification, and Quantitation. **Biochemistry**, 24, 707-713, 1985.
16. SAAD, J.S.; NATILE, G.; MARZILLI, L.G. Origins of the Distortions in the Base Pair Step Adjacent to Platinum Anticancer Drug-DNA Adducts. Fundamental NMR Solution Studies Utilizing Right-Handed Cross-Link Models Having 5' 3'-Flanking Residues. **Journal of the American Chemical Society**, 131, 12314-12324, 2009.
17. GRIVICICH, I.; REGNER, A; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 53 (3), 335-343, 2007.
18. WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cellular Processing of Platinum Anticancer Drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, 4, 307-320, 2005.
19. ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P.; Antioxidantes da Dieta como Inibidores da Nefrotoxicidade Induzida pelo Antitumoral Cisplatina. **Revista de Nutrição**, 17 (1), 89-96, 2004.
20. FARRELL, N.; Qu, Y.; BIERBACH, U.; VALSECCHI, M.; MENTA, E. Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. **Wiley VCH: Weinheim, Germany**, 479-496, 1999.
21. FARRELL, N.; APPLETON, T.G.; QU, Y.; ROBERTS, J.D.; FONTES, A.P.S.; SKOV, K.A.; WU, P.; ZOU, Y. Effects of Geometric Isomerism and Ligand Substitution in Bifunctional Dinuclear Platinum Complexes on Binding Properties and Conformational Changes in DNA. **Biochemistry**, 34, 15480-15486, 1995.
22. GUERRA, W.; SILVA, H.; ALMEIDA, M.V; FONTES, A.P.S. Síntese e Caracterização de um Novo Complexo de Platina(IV) a partir de seu Análogo de Platina(II) Utilizando Iodo Molecular como Agente Oxidante: uma Rota Sintética Interessante para Obtenção de Complexos de Platina. **Química Nova**, 30 (1), 56-58, 2007
23. HALL, M.D.; AMJADI, S.; ZHANG, M.; BEALE, P.J.; HAMBLEY, T.W. The Mechanism of Action of Platinum(IV) Complexes in Sensitive and Resistant Ovarian Cancer Cell Lines. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 98, 1614–1624, 2004.
24. COLLERY, P.; KEPPLER, B.; MADOULET, C.; DESOIZE, B. Gallium in Cancer Treatment. **Critical Reviews in Oncology. Critical Reviews in Oncology/Hematology**, 42, 283–296, 2002.

25. FOSTER, B.J.; CLAGETT-CARR, K.; HOTH, D.; LEYLAND-JONES, B. Gallium Nitrate: the Second Metal with Clinical Activity. **Cancer Treatment. Report.**, 70, 1311-1319, 1988.
26. BERNSTEIN, L.R.; TANNER, T.; GODFREY, C.; NOLL, B.; Chemistry and Pharmacokinetics of Gallium Maltolate, a Compound with High Oral Gallium Bioavailability. **Metal-Based Drugs**, 7 (1), 33-47, 2000.
27. COLLERY, P.; LECHENAULT, F.; CAZABAT, A., JUVIN, E.; KHASSANOVA, L.; EVANGELOU, A.; KEPPLER, B.K. Inhibitory Effects of Gallium Chloride and Tris(8-quinolinolato) Gallium III on A549 Human Malignant Cell Line. **Anticancer Research**, 20, 955-958, 2000.
28. RUDNEV, A.V.; FOTEEVA, L.S.;KOWOL, C.; BERGER, R.; JAKUPEC, M.A.; ARION, V.B.; TIMERBAEV, A. R.; KEPPLER, B. K. Preclinical Characterization of Anticancer Gallium(III) Complexes: Solubility, Stability, Lipophilicity and Binding to Serum Proteins. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 100, 1819-1826, 2006.
29. LARSON, S.M.; RASEY, J.S; ALLEN, D.R., NELSON, N.J; GRUNBAUM, Z.; HARP, G.D.; WILLIAMS, D.L. Common Pathway for Tumor Cell Uptake of Gallium-67 and Iron-59 via a Transferrin Receptor. **Journal of the National Cancer Institute**, 64, 41-53, 1980.
30. CHITAMBAR, C.R.; ZIVKOVIC, Z. Uptake of Gallium-67 by Human Leukemic Cells: Demonstration of Transferrin Receptor-Dependent and Transferrin-Independent Mechanisms. **Cancer Research**, 47, 3929–3934, 1987.
31. HEGGE, F.N.; MAHLER D.J.; LARSON, S.M. The Incorporation of Ga-67 into Ferritin Fraction of Rabbit Hepatocytes in Vivo. **The Journal of Nuclear Medicine**, 18, 937-939, 1977.
32. JAKUPEC, M.A.; GALANSKI, M.; ARION, V.B.; HARTINGER, C.G.; KEPPLER, B.K. Antitumor Metal Compounds: More Than Theme and Variations. **Dalton Transactions**, 2, 183-194, 2008.
33. CHITAMBAR, C.R.; NARASIMHAN, J.; GUY, J.; SEM, D.S.; O'BRIEN, W.J. Inhibition of Ribonucleotide Reductase by Gallium in Murine Leukemic L1210 Cells. **Cancer Research**, 51, 6199-6201, 1991.
34. PINTO, L.D. **Síntese e Caracterização de Compostos Resultantes da Interação de cisplatina com Ácido Guanidoacético e Arginina**. 2006. Dissertação – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

35. ROSA, D. **Estudo de 6-aminopurinas e de seus Complexos de Platina(II) como Potencias Leishmanicidas**. 2007. Tese – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.
36. VIEIRA, L.S.; FREITAS, M.C.R.; DINIZ, R.; REY, N.A. Síntese e Caracterização de um complexo de Pt(II) da Pirazinamida. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP, 2010.
37. PIRES, B.O.; FREITAS, M.C.R.; DINIZ, R.; REY, N.A. Um Novo Complexo de Pt(II) da Isoniazida: Síntese e Caracterização. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP, 2010.
38. SCHILLING, E.L.; TERRA, G.G.; BORTOLUZZI, A.J. Novo Complexo Mononuclear de Cu(II) como Modelo Funcional de Hidrolases: Síntese, Estrutura e Espectroscopia UV-Vis. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP, 2010.
39. BORTOLUZZI, A.J; TERRA, G.G.; PEREIRA-MAIA, E.C.; MEDEIROS, I.P.S. Synthesis, Characterization and Anticancer Activity of a new Mononuclear Gallium(III) Complex. In: XV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, Angra dos Reis, RJ, Brazil, 2010.
40. PEREIRA-MAIA, E.C.; GARNIER-SUILLEROT, A. Impaired Hidrolysis of Cisplatin Derivatives to Aquated Species Prevents Energy-Dependent Uptake in GLC4 Cells Resistant to Cisplatin. **Journal Biology Inorganic Chemistry**, 8, 626-634, 2003.
41. TEIXEIRA, C.E.; DE ALMEIDA, M.V.; FONTES, A.P.S.; MAIA, E.C.P.; GARNIER-SUILLEROT, A; COURI, M.R.C.; FELÍCIO, E.C.A. Synthesis, Characterization, Cytotoxic Activity, and Cellular Accumulation of Dinuclear Platinum Complexes Derived from N,N'-di-(2-aminoethyl)-1,3-diamino-2-propanol, aryl Substituted N-benzyl-1,4-butanediamines, and N-benzyl-1,6-hexanediamines. **Journal Inorganic Biochemistry**, 95, 297-305, 2003.
42. SILVA, P.P. **Síntese, Caracterização e Estudos da Potencial Atividade de Alguns Complexos de Cobre(II)**. 2009. Dissertação – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais.
43. DE SOUZA, B.; BORTOLUZZI, A.J.; BORTOLOTTI, T.; FISCHER, F.L.; TERENCEZI, H.; FERREIRA, D.E.C.; ROCHA, W.R.; NEVES, A. DNA Photonuclease Activity of four new Copper(II) Complexes under UV and Red Light: Theoretical/Experimental

- Correlations with Active Species Generation. **Dalton Transactions (2003 Print) JCR**, 39, 2027-2035, 2010.
44. LAHIRI, D.; BHOWMICK, T.; PATHAK, B.; SHAMEEMA, O.; PATRA, A.K.; RAMAKUMAR, S.; CHAKRAVARTY, A.R. Anaerobic Photocleavage of DNA in Red Light by Dicopper(II) Complexes of 3,3'-dithiodipropionic Acid. **Inorganic Chemistry**, 48(1), 339-349, 2009.
 45. SILVA, P.P.; DE PAULA, F.C.S.; GUERRA, W.; SILVEIRA, J.N.; BOTELHO, F.V.; VIEIRA, L.Q.; BORTOLOTO, T.; FISCHER, F.L.; BUSSI, G.; TERENCEZI, H.; PEREIRA-MAIA, E.C. Platinum(II) compounds IF tetracyclines as potential anticancer agents: cytotoxicity, uptake and interactions with DNA. **Journal of Brazilian Chemical Society**, 21(7), 1237-1246, 2010.
 46. PEREIRA-MAIA, E.C.; DEMICHELI, C.P. **Química de Coordenação em Sistemas Biológicos**. In: Robson Fernandes de Farias. Química de Coordenação e Atualidades. Campinas, Ed Átomo 2005.
 47. JANSEN, B.A.J.; PÉREZ, J.M.; PIZARRO, A.; ALONSO, C.; REEDIJK, J.; NAVARRO-RANNINGER, C. Sterically Hindered Cisplatin Derivatives with Multiple Carboxylate Auxiliary Arms: Synthesis and Reactions with Ganosine-5'-Monophosphate and Plasmid DNA. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 85, 229-235, 2001
 48. MELLISH, K.J.; QU, Y.; SCARSDALE, N.; FARRELL, N. Effect of geometric isomerism in dinuclear platinum antitumour complexes on the rate of formation and structure of intrastrand adducts with oligonucleotides. **Nucleic Acids Research**, 25(6), 1265-1271, 1997.
 49. REILY, M.D.; MARZILLI, L.G. Novel, Definitive NMR Evidence for N(7), α -PO₄ Chelation of 6-Oxopurine Nucleotide Monophosphates to Platinum Anticancer Drugs. **Journal of the American Chemical Society**, 108, 8299-8300, 1986.
 50. DEMICHELI, C.; SANTOS, L.S.; FERREIRA, C.S.; BOUCHEMAL, N.; HANTZ, E.; EBERLIN, M.N.; FRÉZARD, F. Synthesis and characterization of Sb(V)-adenosine and Sb(V)-guanosine complexes in aqueous solution. **Inorganica Chimica Acta**, 359, 159-167, 2006.
 51. COURI, M.R.C.; DE ALMEIDA, M.V.; FONTES, A.P.S.; ; D ARC SOUZA CHAVES, J.; TEIXEIRA, C.E.; ALVES, R.J.; PEREIRA-MAIA, E.C.; GARNIER-SUILLEROT, A. Synthesis of Polyamines from Ethylenediamine and Their Platinum(II) Complexes,

- Potential Antitumor Agents. **European Journal of Inorganic Chemistry** *JCR*, v. 2006, n. 9, 1868-1874, 2006
52. MA, Y.; DAY, C.S.; BIERBACH, U. Synthesis, structure, and reactivity of monofunctional platinum(II) and palladium(II) complexes containing the sterically hindered ligand 6-(methylpyridin-2-yl)acetate. **Journal Inorganic Biochemistry**, 99, 2013-2023, 2005.
53. ARJMAND, F.; MUDDASSIR, M. Design and synthesis of heterobimetallic topoisomerase I and II inhibitor complexes: In vitro DNA binding, interaction with 5'-GMP and 5'TMP and cleavage studies. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 101, 37-46, 2010.
54. MARZILLI, L.G.; ANO, S.O.; INTINI, F.P.; NATILE, G. New concepts relevant to cisplatin anticancer activity from unique spectral features providing evidence that adjacent guanines in d(GpG), intrastrand-cross-linked at N7 by a *cis*-platinum(II) moiety, can adopt a head-to-tail arrangement. **Journal of the American Chemical Society**, 121, 9133-9142, 1999.
55. ADAMS, K.M.; MARZILLI, L.G. *fac*-[Re(CO)₃(H₂O)₃]⁺ Nucleoside monophosphate adducts investigated in aqueous solution by multinuclear NMR spectroscopy. **Inorganic Chemistry**, 46, 4926-4936, 2007.
56. WONG, H.C.; INTINI, F.P. NATILE, G.; MARZILLI, L.G. Diminishing dynamic motion problems of platinum anticancer drug adducts of guanine derivatives with hybrid ligand approach: evidence for *cis* interligand interactions especially between 3'-GMP's. **Inorganic Chemistry**, 38, 1006-1014, 1999.
57. EASTMAN, A. Reevaluation of interaction of *cis*-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA. **Biochemistry**, 25, 3912-3915, 1986.
58. ZAMBLE, D.B.; MU, D.; REARDON, J.T.; SANCAR, A.; LIPPARD, S.J.; Repair of cisplatin-DNA adducts by the mammalian excision nuclease. **Biochemistry**, 35, 10004-10013, 1996.
59. REEDIJK, J. New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 100(7), 3611-3616, 2003.

ANEXO A – ESPECTROS COMPLETOS DE RMN ^1H UNI- E BIDIMENSIONAIS

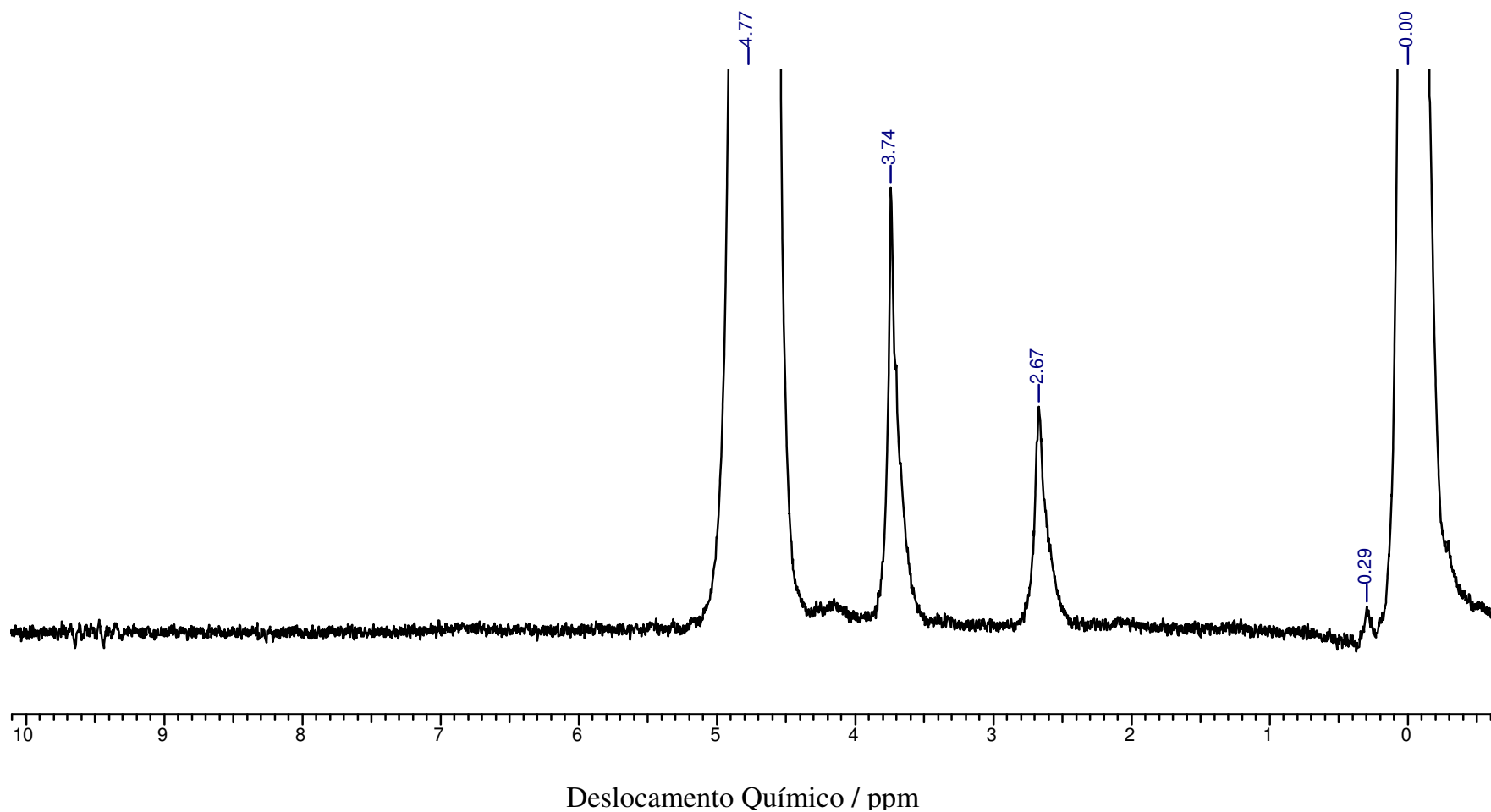
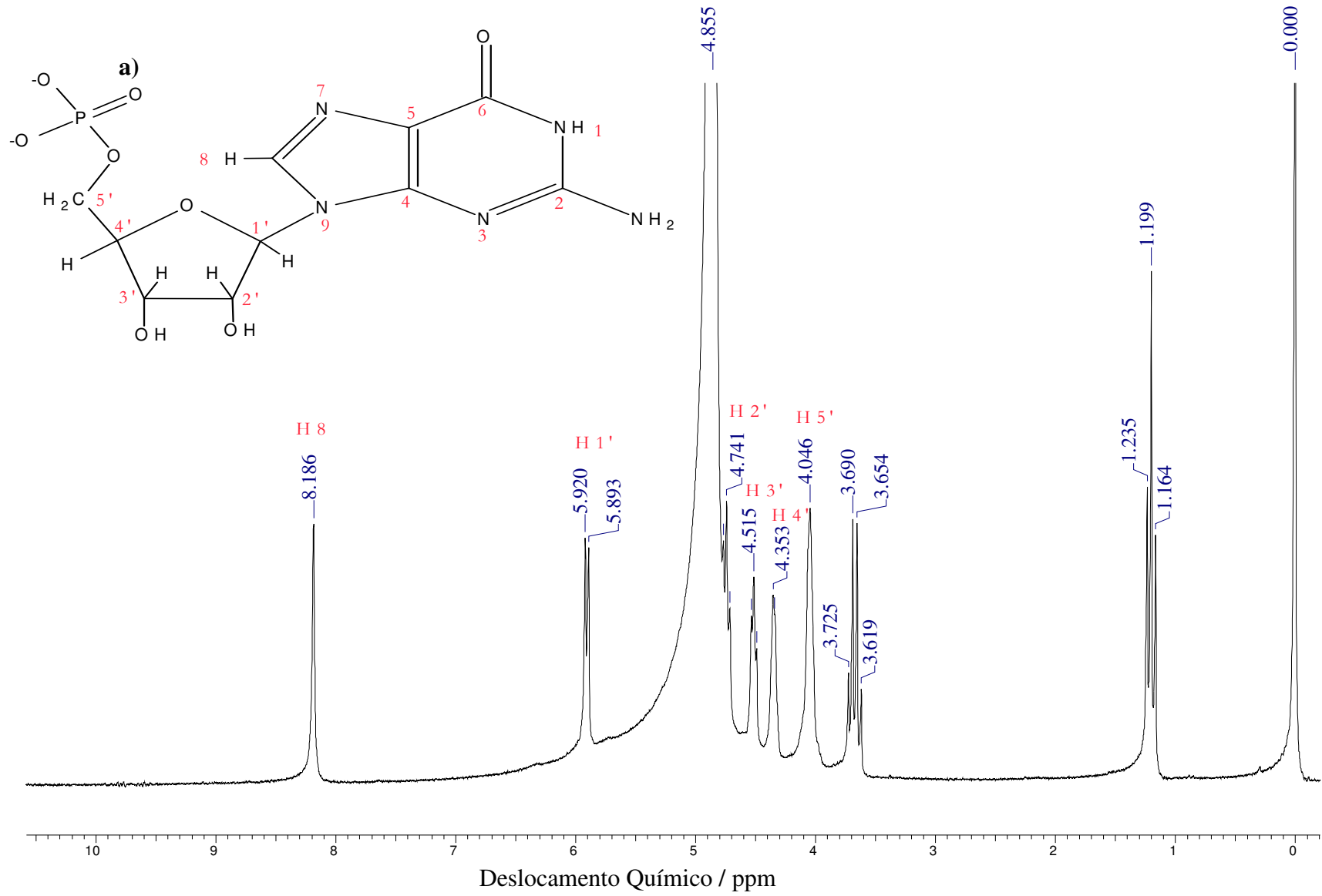
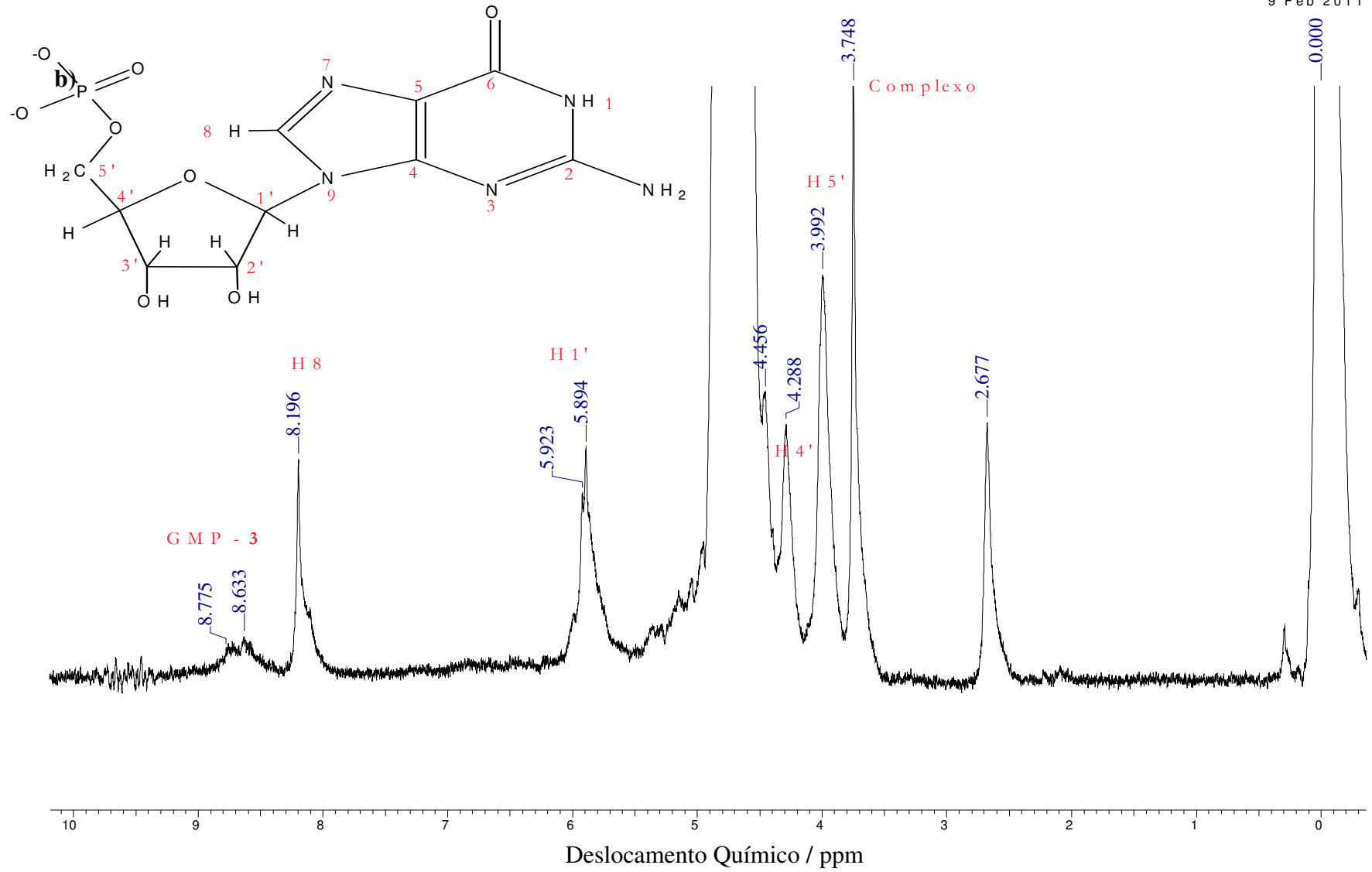


Figura A1 – Espectro de ^1H RMN obtido para **3**, em tampão fosfato, pD = 7,2.





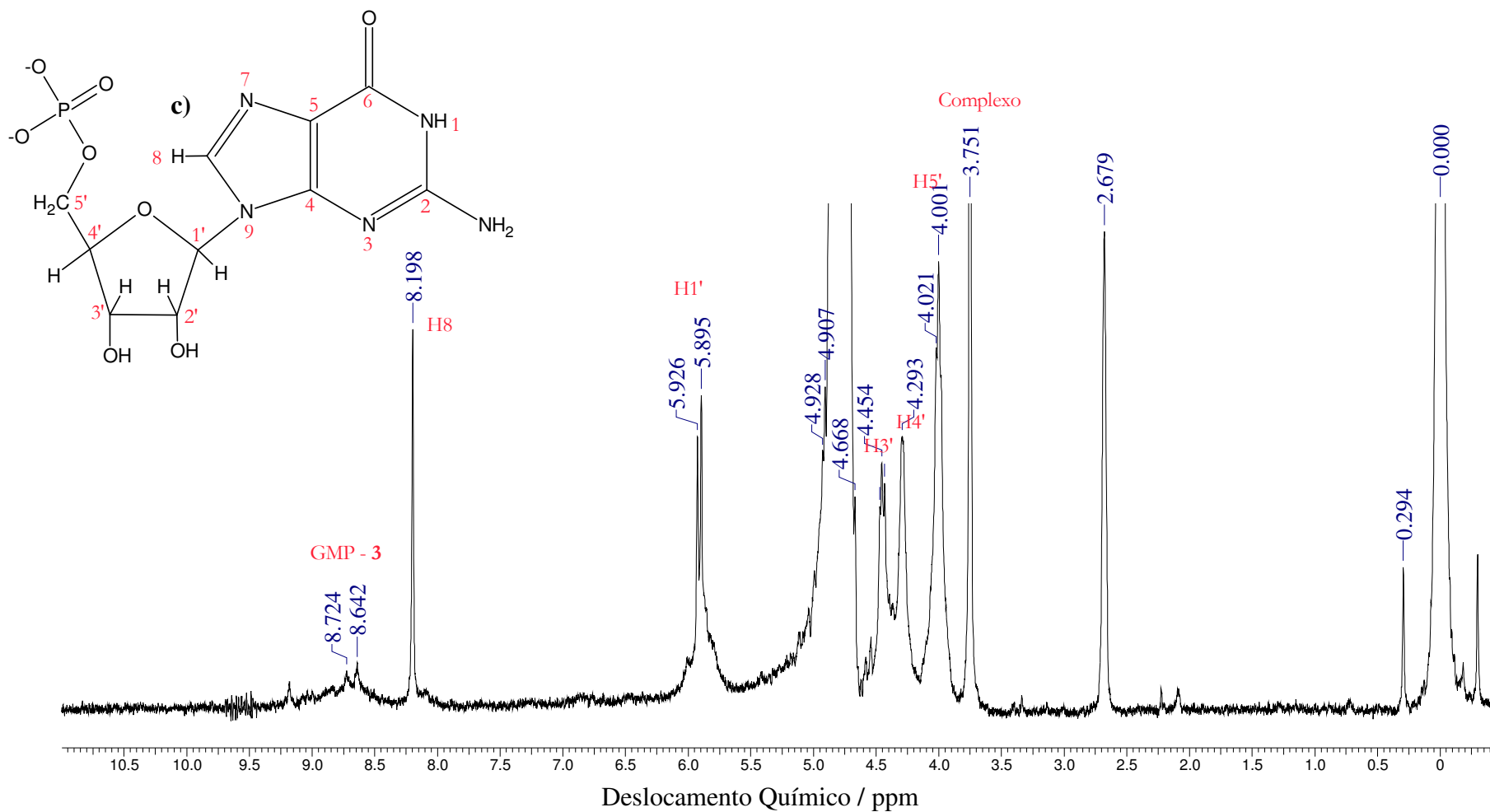
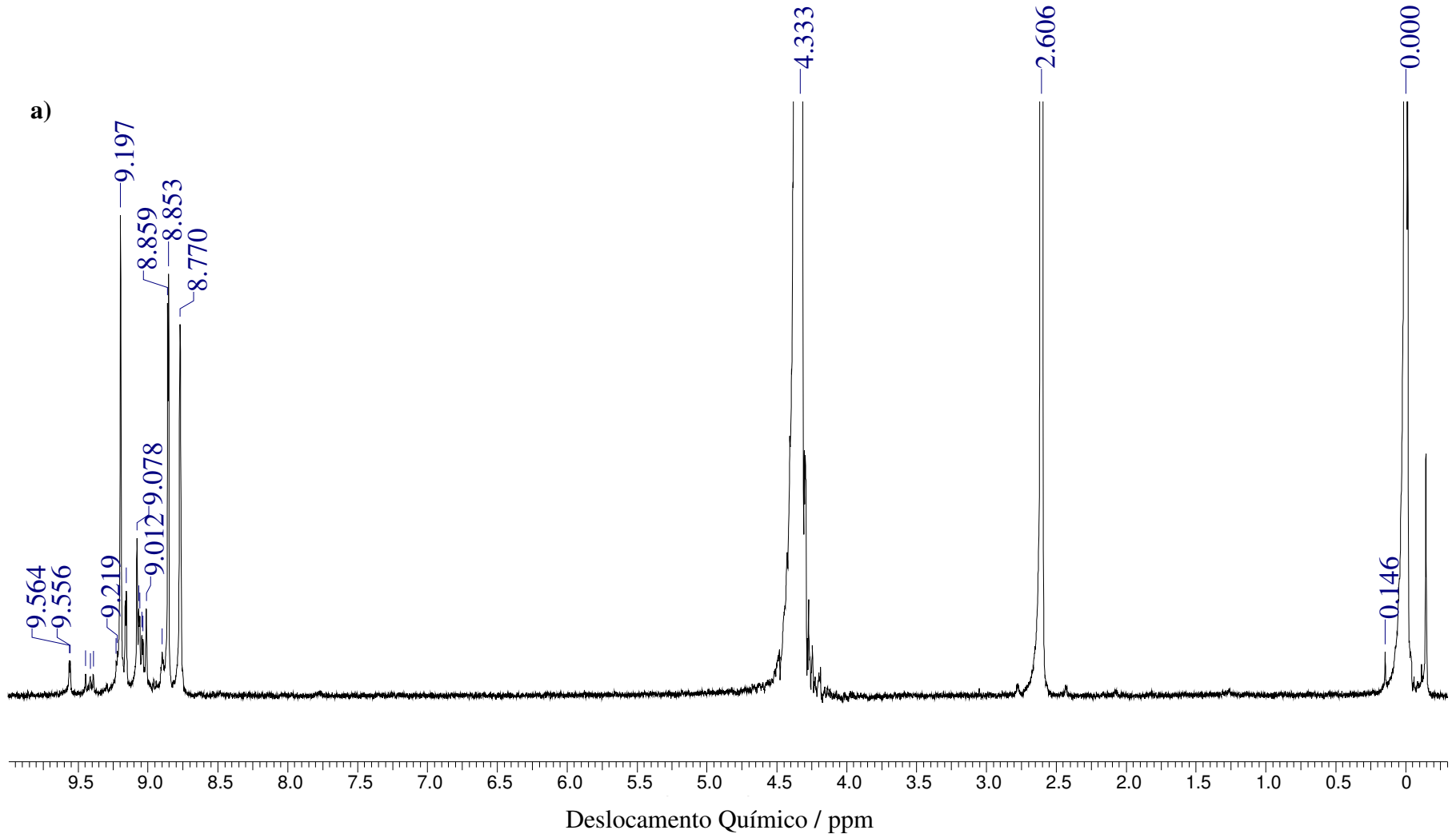


Figura A2 – Espectros de RMN ¹H obtidos para (a) 5'-GMP; e misturas contendo a proporção molar [5'-GMP]:[3] = 4:1 nos tempos de (b) 4 horas e (c) 28 horas, em tampão fosfato, pD = 7,2.



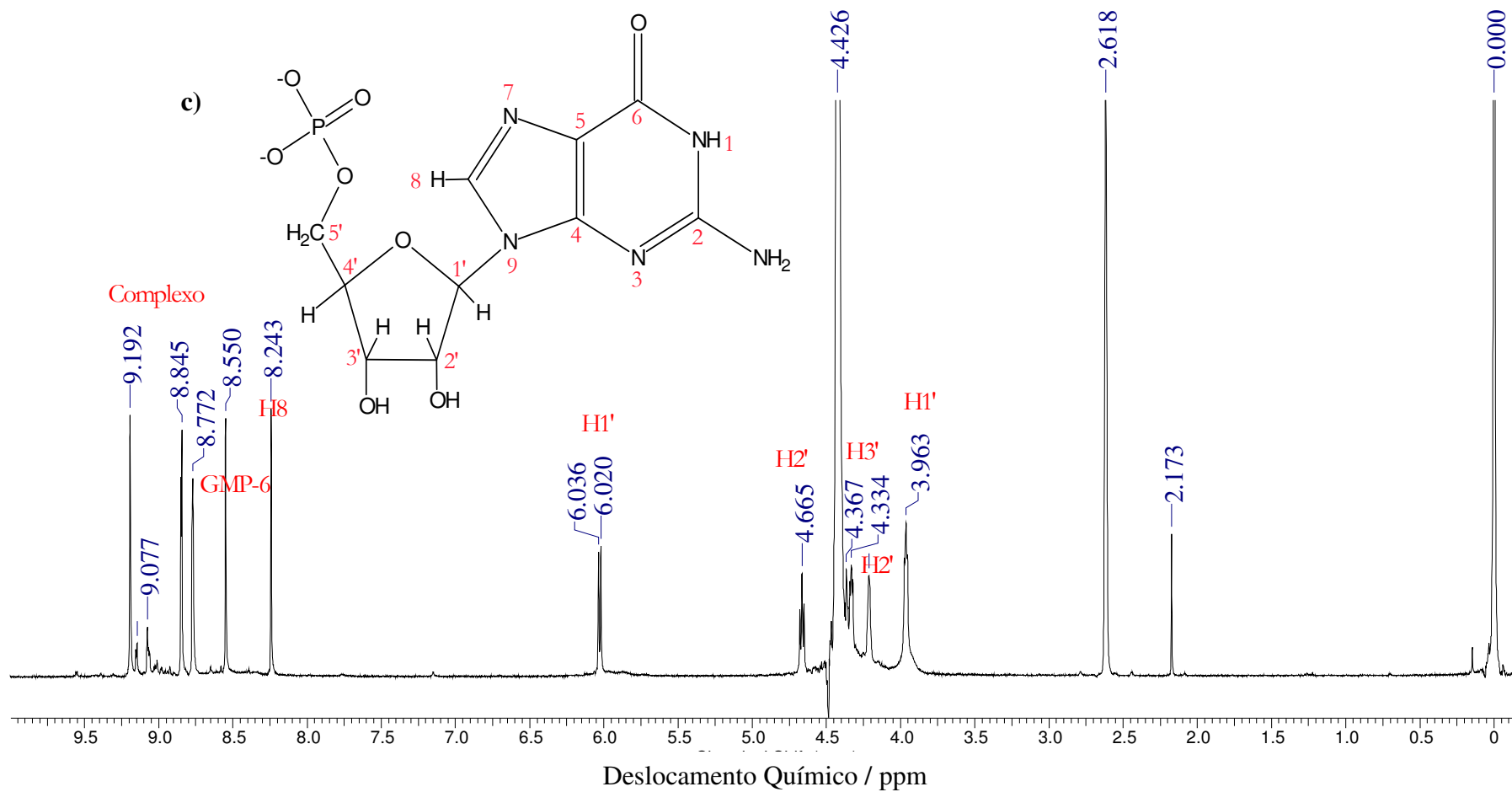
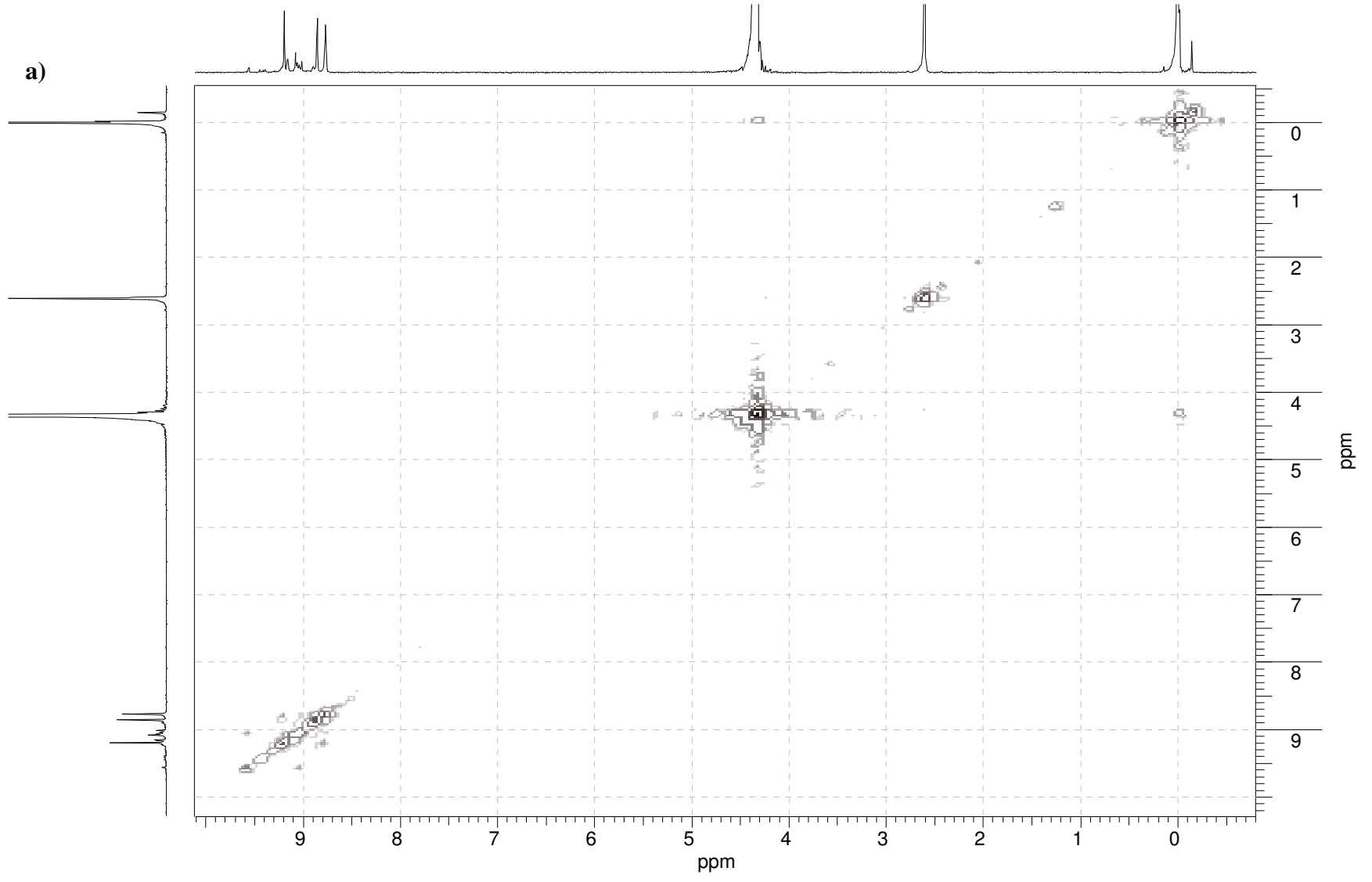
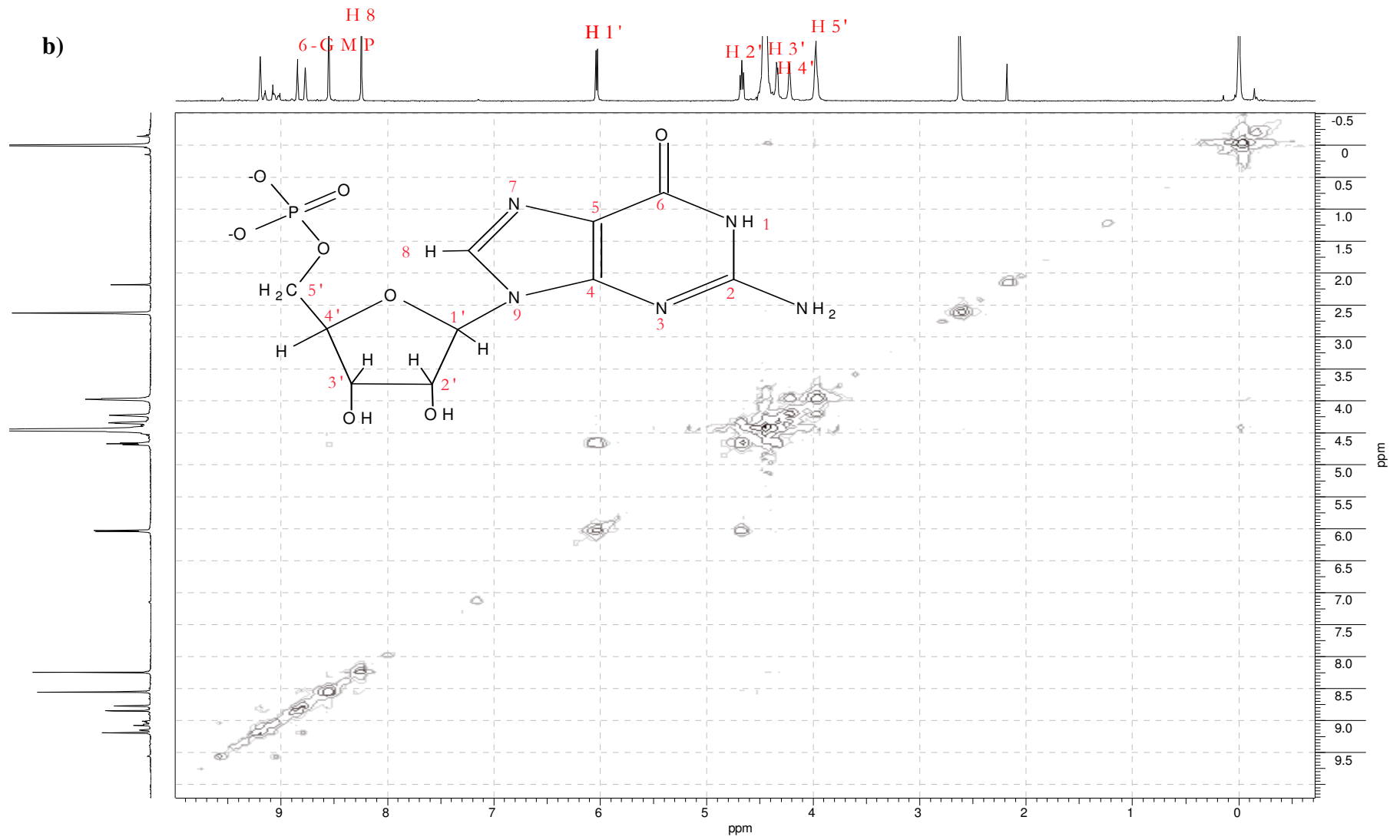


Figura A3 – Espectros de RMN ^1H obtidos para (a) **6**; e misturas contendo a proporção molar $[5'\text{-GMP}]:[\mathbf{6}] = 2:1$ nos tempos de (b) 0 horas e (c) 14 horas, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, $\text{pD} = 5,0$.





c)

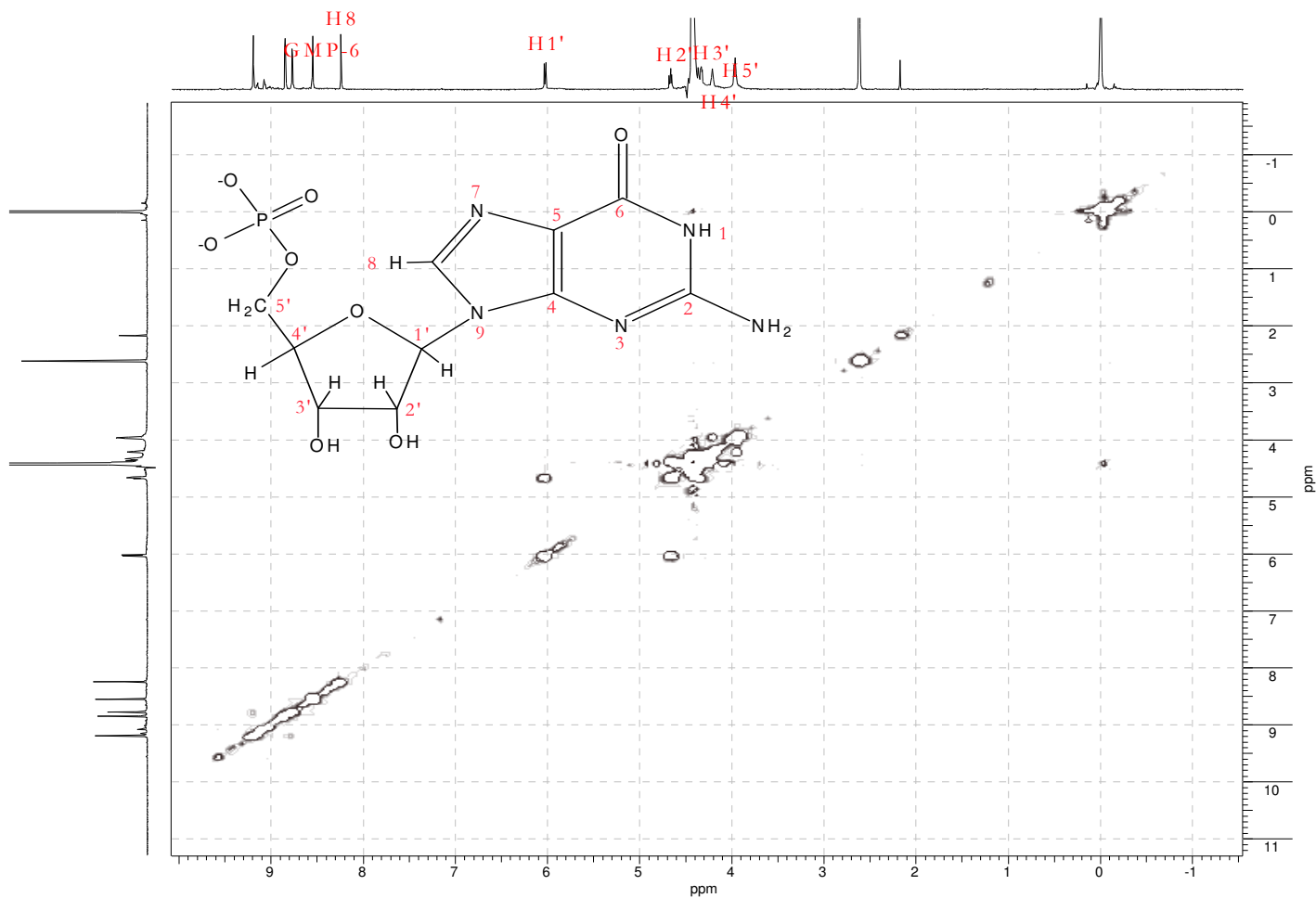
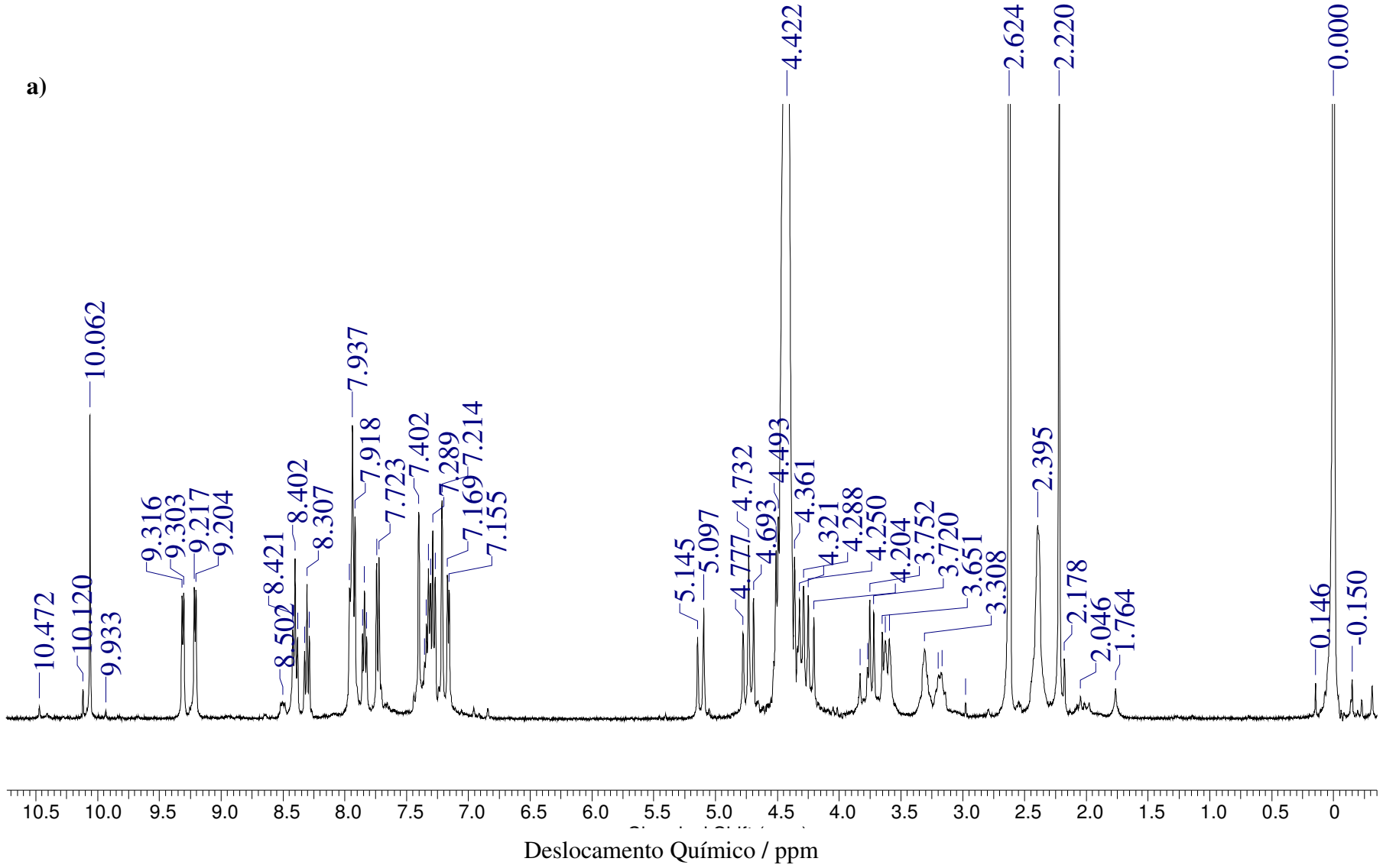
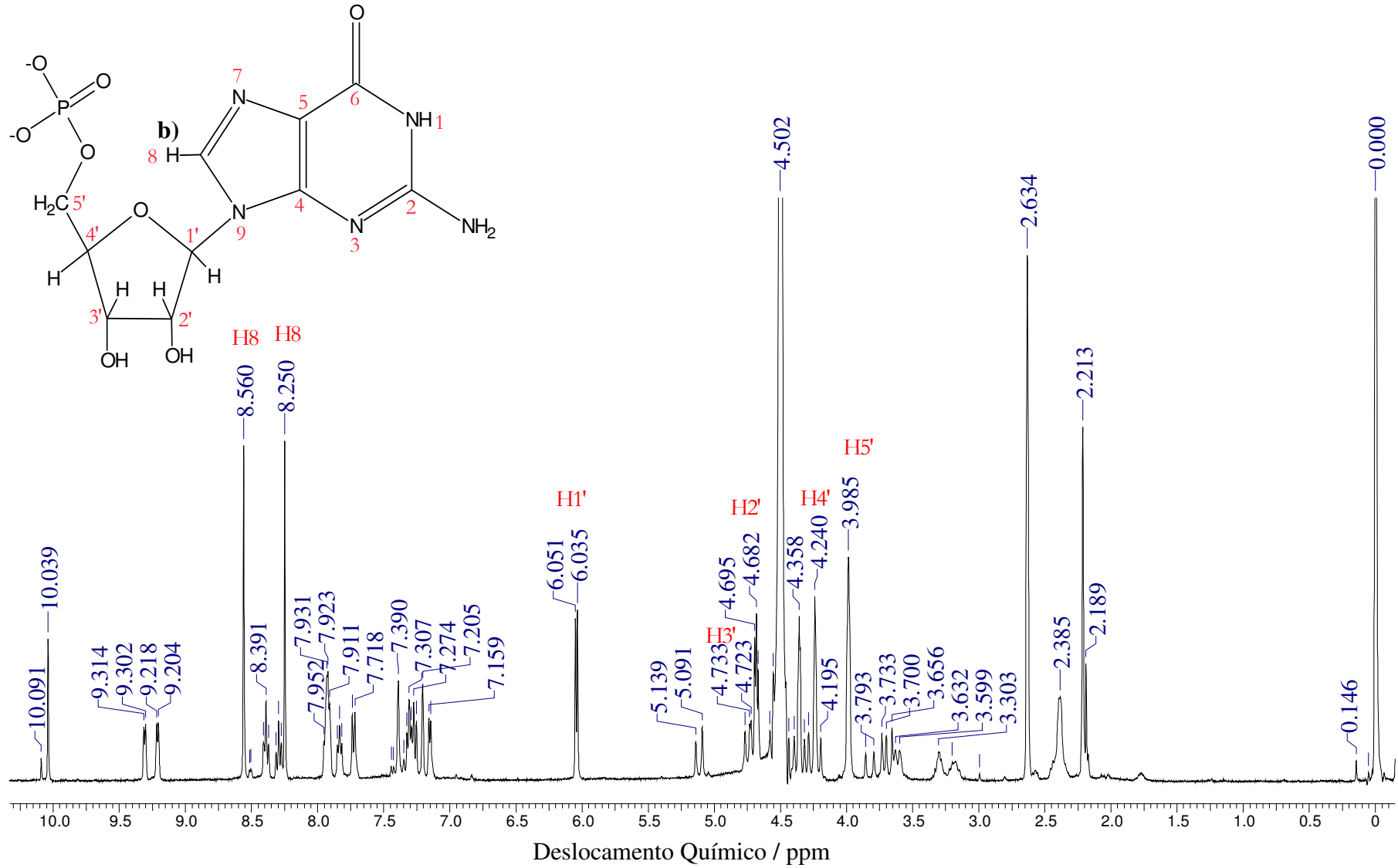


Figura A4 –Espectros de RMN ¹H bidimensionais COSY obtidos para (a) **6**; e misturas contendo a proporção molar [5'-GMP]:[**6**] = 2:1 nos tempos de (b) 0 horas e (c) 14 horas, em D₂O/DMSO d₆, pD = 5,0.





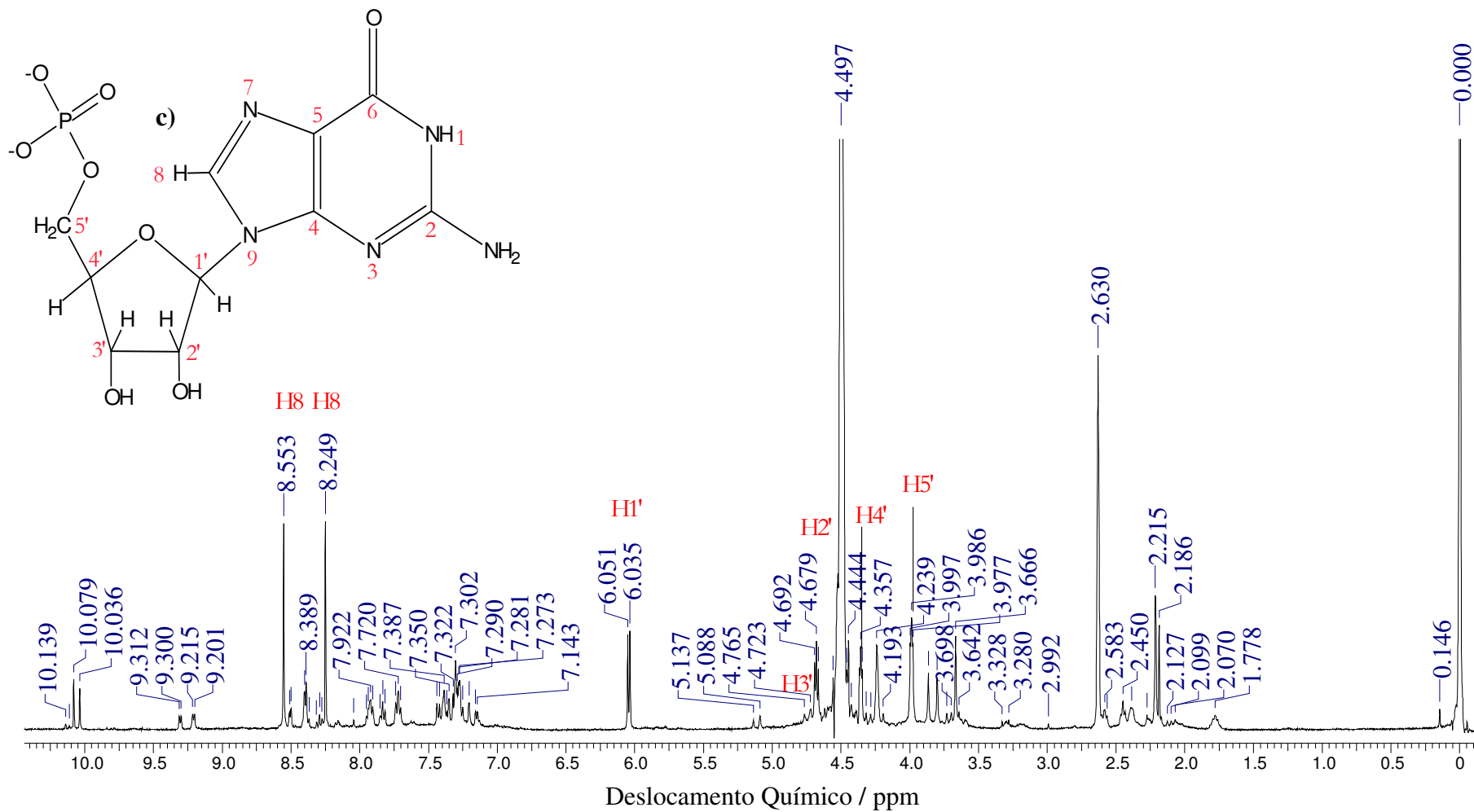
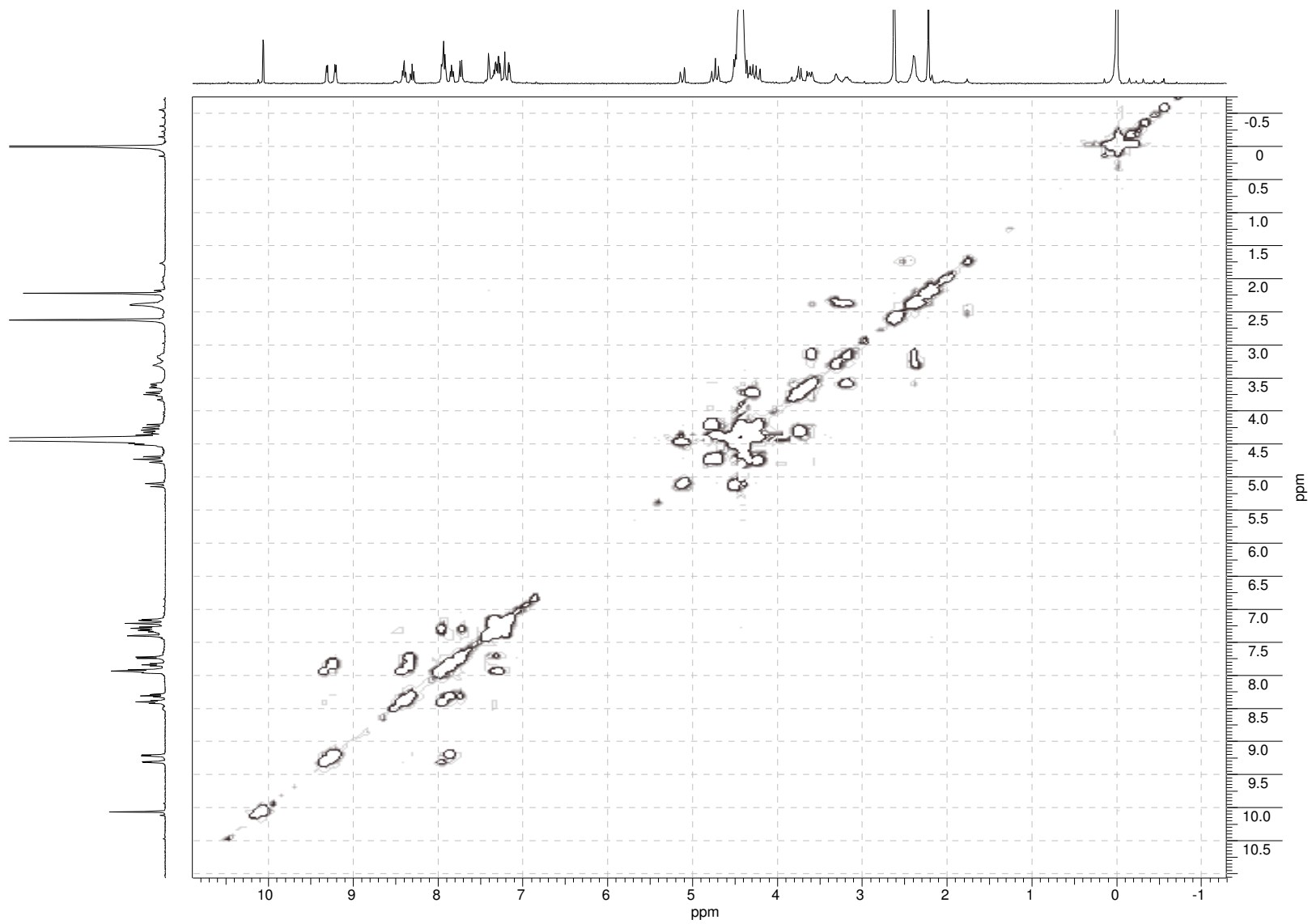
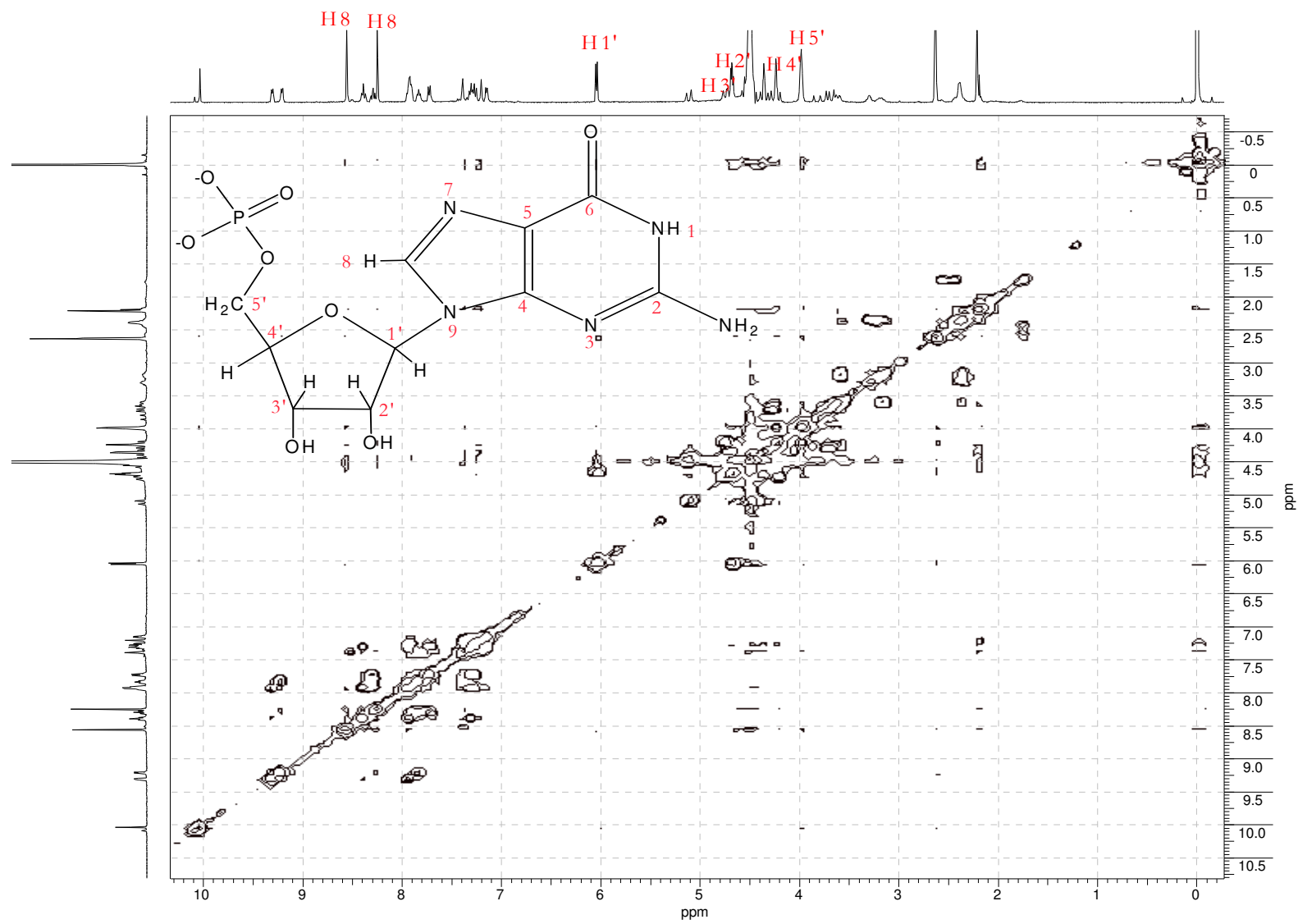


Figura A5 – Espectros de RMN ¹H obtidos para (a) **10**; e misturas contendo a proporção molar [5'-GMP]:[**10**] = 2:1 nos tempos de (b) 0 horas e (c) 5 horas, em D₂O/DMSO d₆, pD = 6,0.

a)



b)



c)

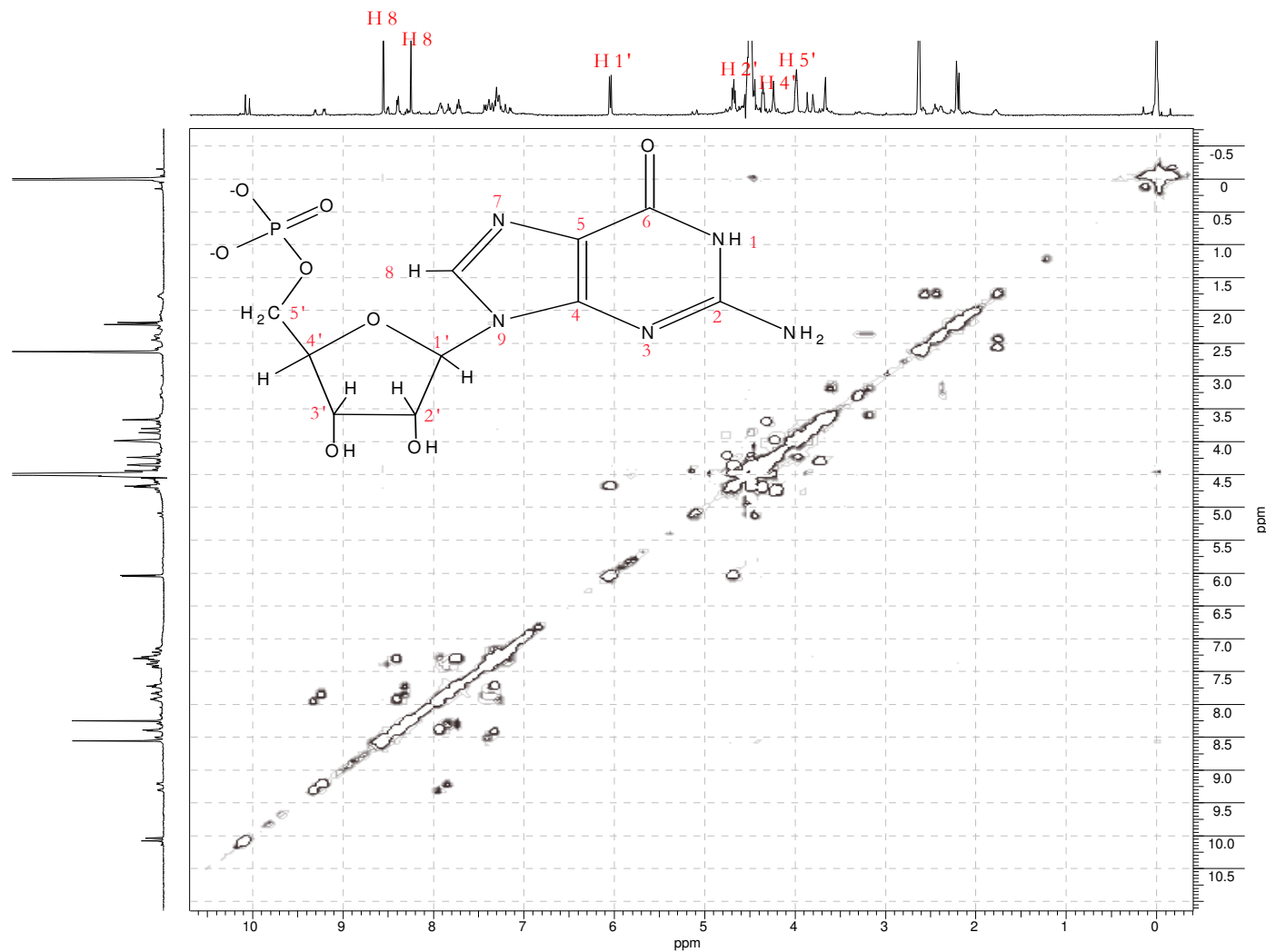


Figura A6 – Espectros de RMN ^1H bidimensionais COSY obtidos para (a) **10**; e misturas contendo a proporção molar $[5'\text{-GMP}]:[\mathbf{10}] = 2:1$ nos tempos de (b) 0 horas e (c) 5 horas, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, pD = 6,0.

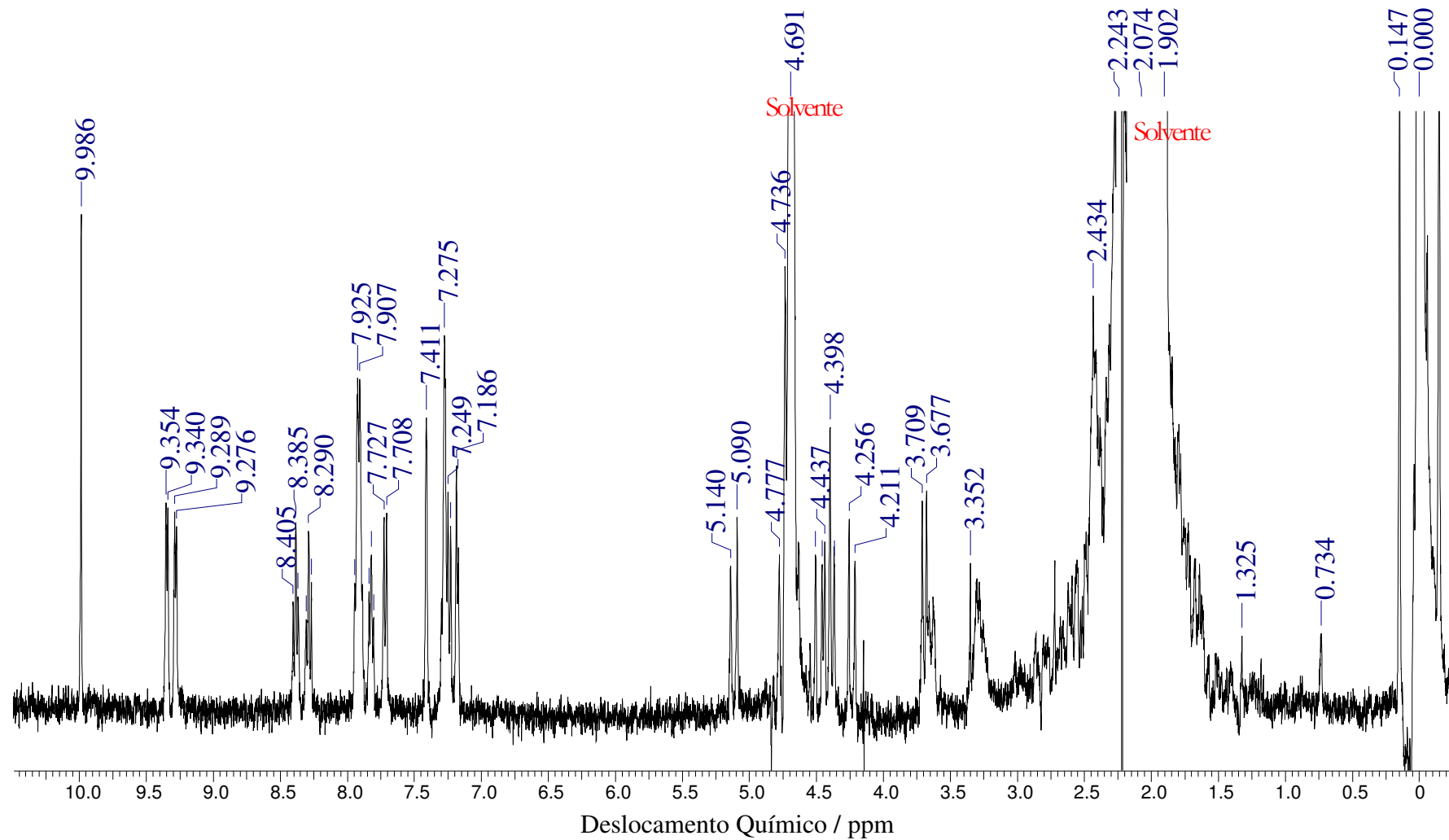
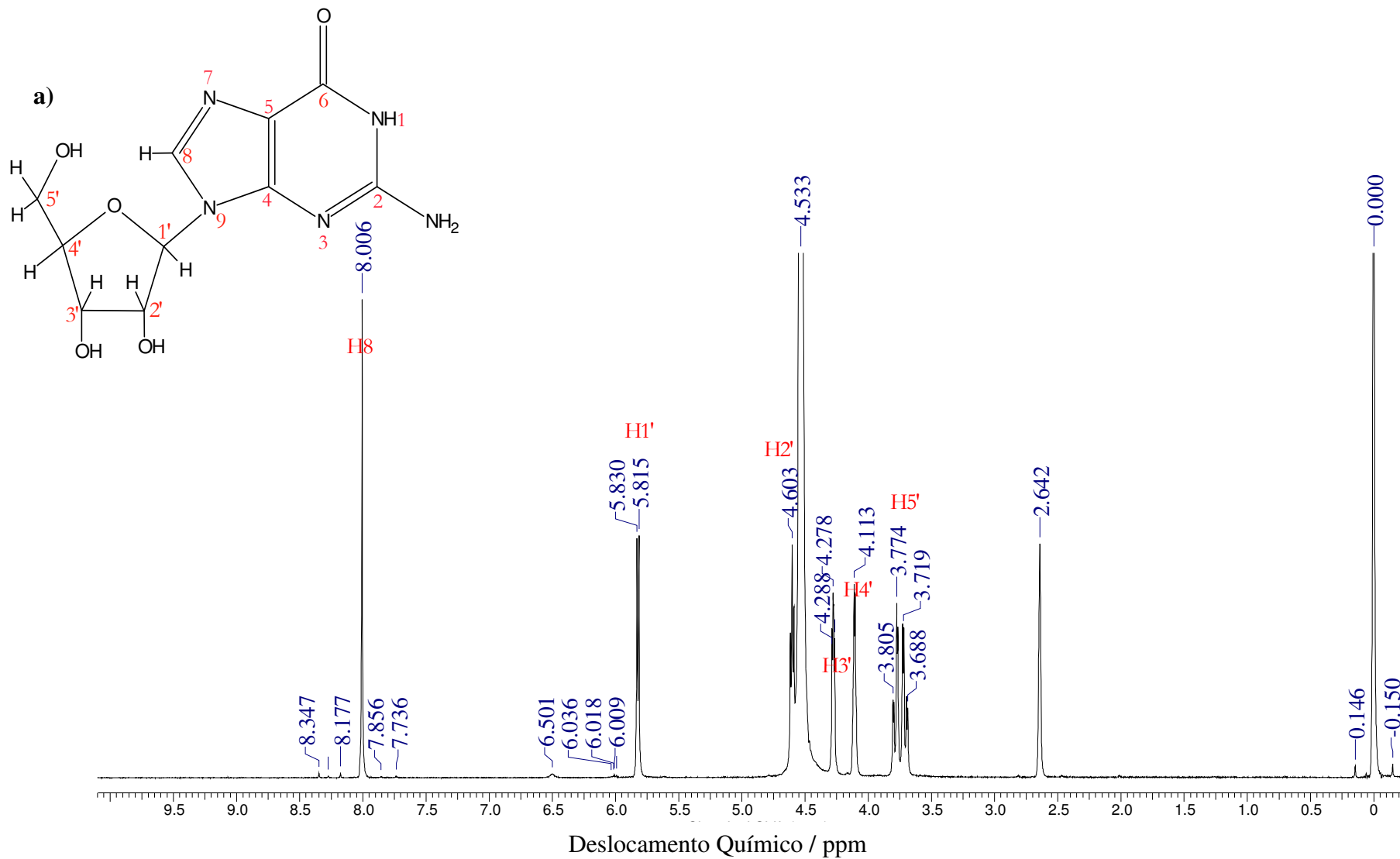
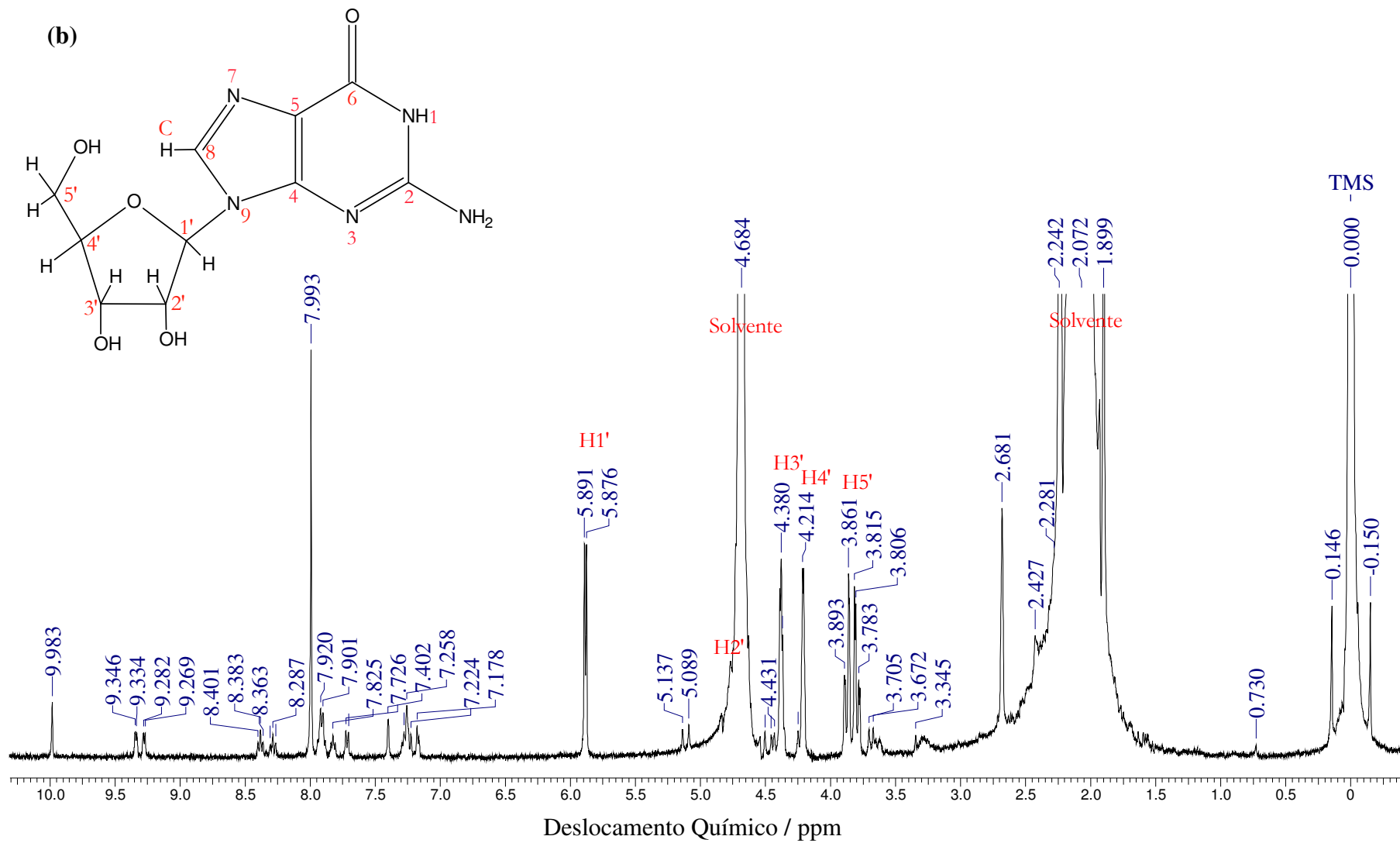


Figura A7 – Espectro de ^1H RMN obtido para **10**, em $\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 9:1, pD = 6,0.





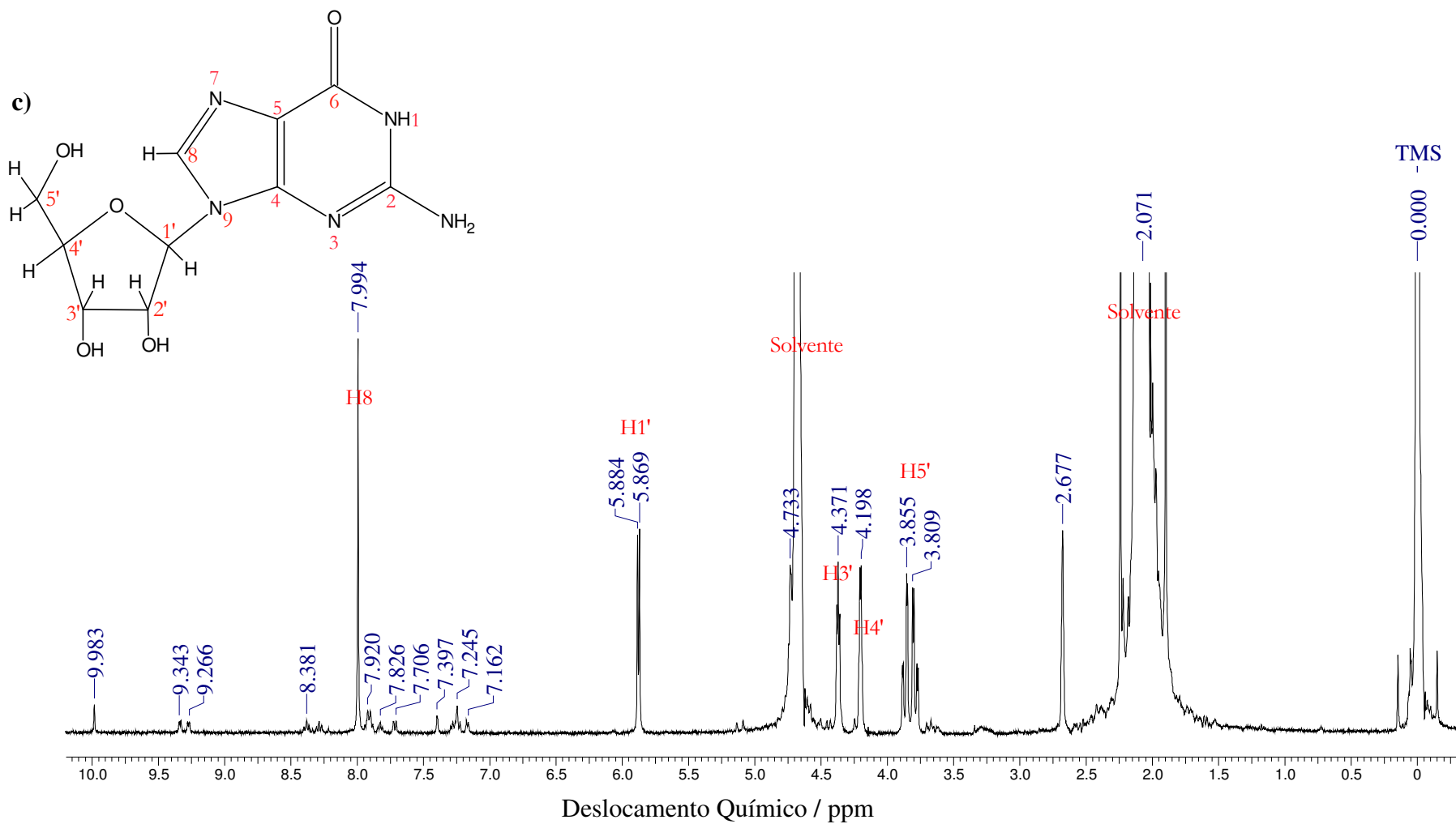


Figura A8 – Espectros de RMN ^1H obtidos para (a) guanosina; e misturas contendo a razão molar [guanosina]:[10] = (b) 2:1 e (c) 4:1, em $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO } d_6$, pD = 6,0.

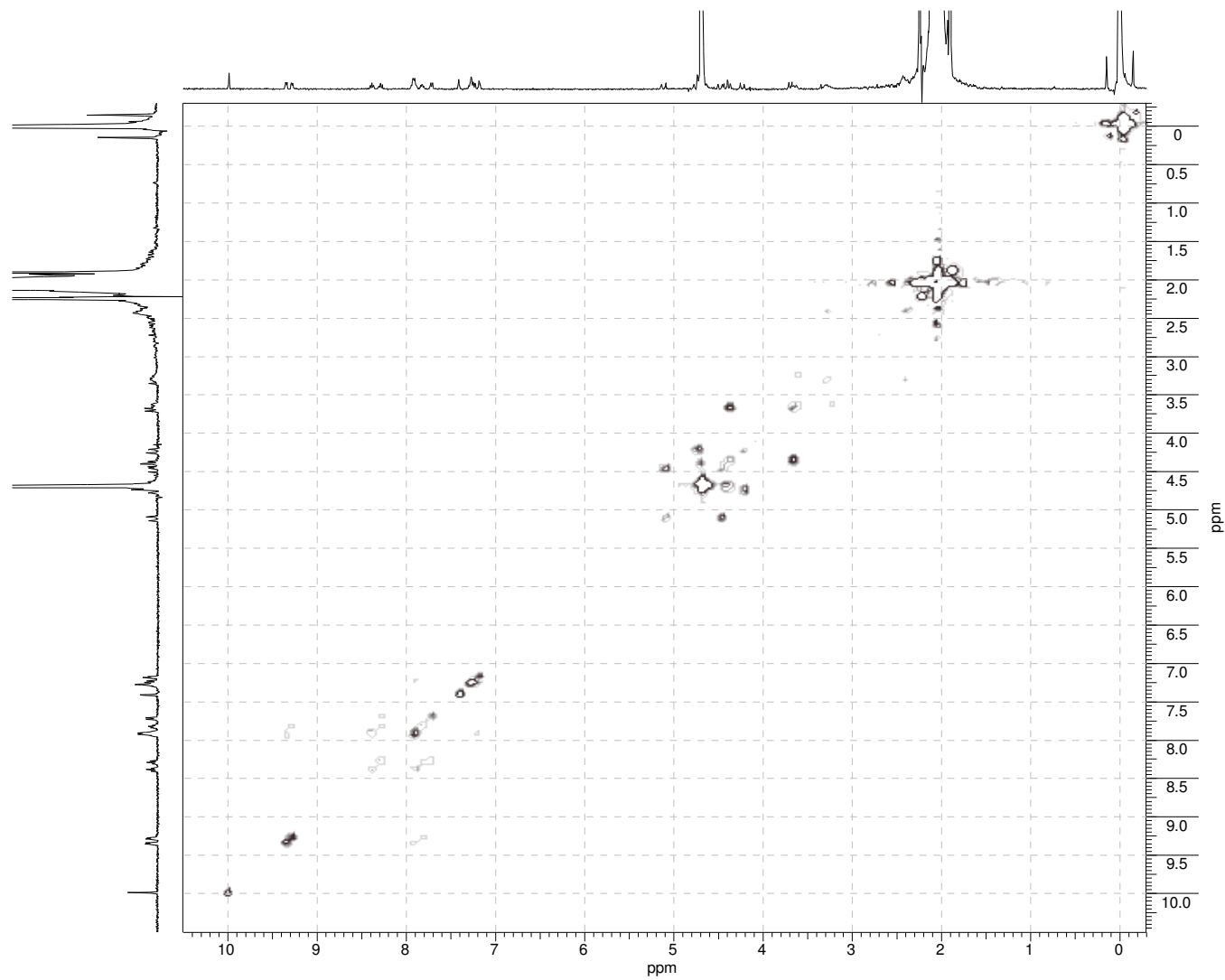
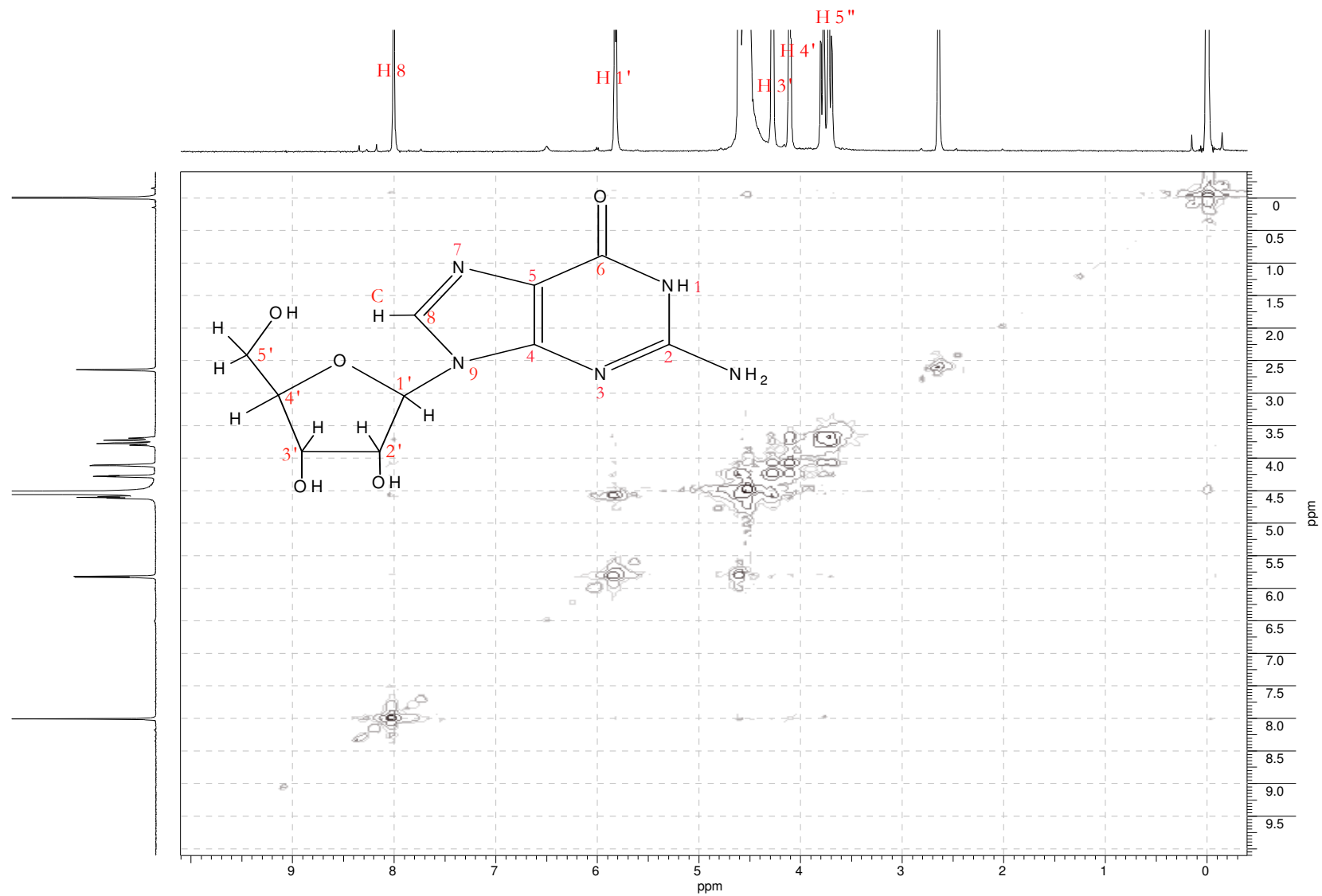
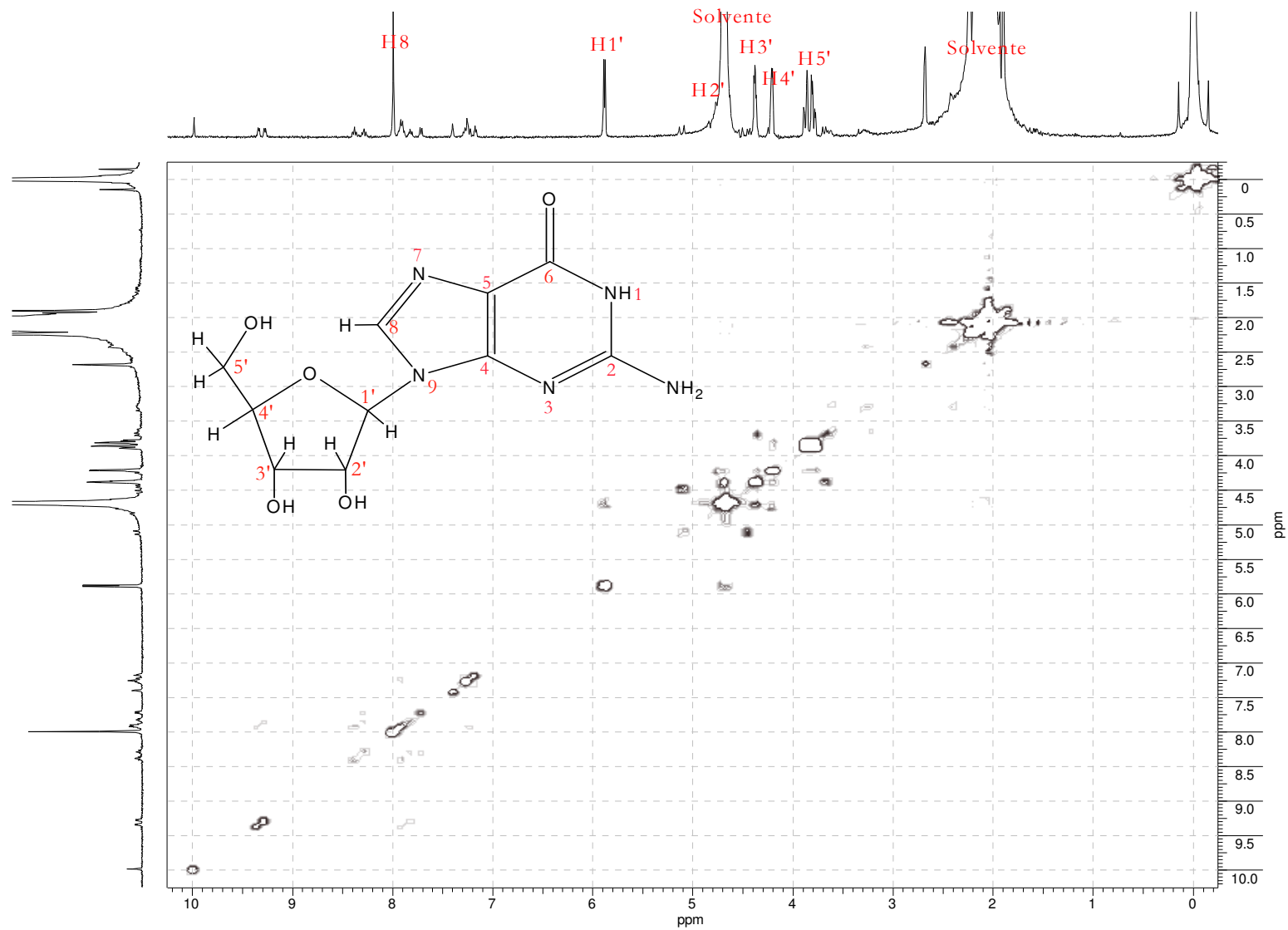


Figura A9 – Espectro de RMN ^1H bidimensional COSY obtido para **10**, em $\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 9:1, pD = 6,0.

a)



b)



c)

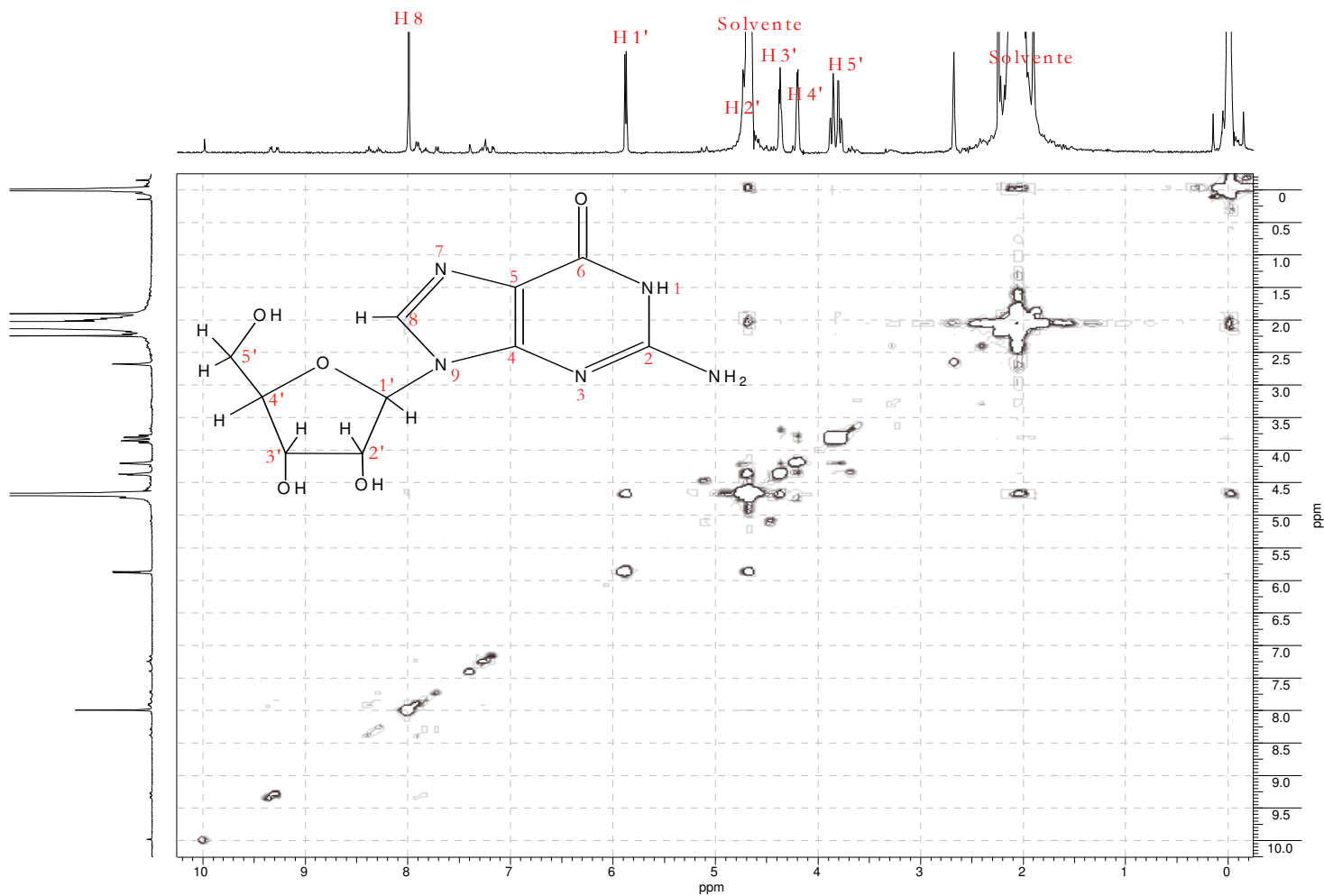


Figura A10 – Espectros de RMN ¹H bidimensionais COSY obtidos para (a) guanosina; e misturas contendo a proporção molar [guanosina]:[10] = (b) 2:1 e (c) 4:1, em D₂O/DMSO d₆, pD = 6,0.

TRABALHOS CIENTÍFICOS

Trabalhos apresentados em congressos

Apresentação de Painel

1. SOUZA, I.P.; SILVEIRA, J.N.; PINTO, L.D.; FELCMAN, J.; PEREIRA-MAIA, E.C. Atividade citotóxica e incorporação de complexos de Pt(II) com aminoácidos em células tumorais. **33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2010, Águas de Lindóia, SP.
2. SOUZA, I.P.; SILVEIRA, J.N.; ROSA, D.; FELCMAN, J.; PEREIRA-MAIA, E.C. Cytotoxic activity and cellular incorporation of two Pt(II) complexes with substituted 6-aminopurines. **XV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, II Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry**, 2010, Angra dos Reis, RJ.
3. CARVALHO, L.A.; SOUZA, I.P.; SILVA, P.P.; FRANCO, M.S. AUGUSTI, R.; PEREIRA-MAIA, E.C. Synthesis, characterization, end cytotoxicity of a bismuth(III) complex of tetracycline. **XV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, II Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry**, 2010, Angra dos Reis, RJ.
4. BORTOLUZZI, A.J.; TERRA, G.G. PEREIRA-MAIA, E.C.; SOUZA, I.P. Synthesis, characterization and anticancer activity of a new mononuclear gallium(III) complex. **XV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, II Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry**, 2010, Angra dos Reis, RJ.

Apresentação em sessão coordenada

1. SARTORI, L.M.; PIRES, B.O.; RIBEIRO, T.S.; FREITAS, M.C.R.; DINIZ, R. BORRÉ, L.B.; SAN GIL, R.A.S.; DOS SANTOS, H.F.; COSTA, L.A.S.; SOUZA, I.P.; PEREIRA-MAIA, E.C. Platinum(II) complexes of antituberculosis drugs: SSNMR spectroscopy, DFT studies and cytotoxicity. **XV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, II Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry**, 2010, Angra dos Reis, RJ.

2. FRANCO, M.S.; MARZANO, I.M.; SILVA, P.P.; SOUZA, I.P.; CARVALHO, L.A.; SANTOS, C.; FERNANDES, N.G.; CHARTONE-SOUZA, E.; BUCCIARELLI-RODRIGUEZ, M.; PEREIRA-MAIA, E.C. Crystal structure antibacterial and cytotoxic activities of $[\text{Bi}(\text{sulfapyridine})_3\text{Cl}_3]$. **XV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, II Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry**, 2010, Angra dos Reis, RJ.

Artigo Aceito

SILVA, P.P.; MARZANO, I.M.; SOUZA, I.P.; PEREIRA-MAIA, E.C. Coordination compounds as antitumoral agents: Cellular uptake and cytotoxic action. *Global Journal of Inorganic Chemistry*.