

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Priscila Pereira Silva

Síntese, caracterização físico-química e estudo da atividade antitumoral de complexos ternários de Cu(II) com um antibiótico e uma α,α -diamina e de Ru(II) com α,α -diaminas.

Belo Horizonte

2013

UFMG/ ICEX/ DQ 956^a

T. 428^a

Priscila Pereira Silva

Síntese, caracterização físico-química e estudo da atividade antitumoral de complexos ternários de Cu(II) com um antibiótico e uma α,α -diamina e de Ru(II) com α,α -diaminas.

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências - Química .

Belo Horizonte

2013

Silva, Priscila Pereira
S586s Síntese, caracterização físico-química e estudo da
2013 atividade antitumoral de complexos ternários de Cu(II)
T com um antibiótico e uma α, α -diamina e de Ru(II) com
 α, α -diaminas / Priscila Pereira Silva. 2013.
xxiv, 156 f.: il.

Orientador: Elene Cristina Pereira Maia.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais. Departamento de Química.

Bibliografia: f. 148-156.

1. Química Inorgânica - Teses 2. Complexos
metálicos - Teses 3. Antibióticos - Teses 4. DNA -
Teses 5. Agentes antineoplásicos - Teses I. Maia,
Elene Cristina Pereira, Orientadora II. Título.

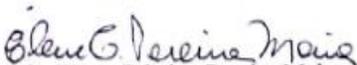
CDU 043

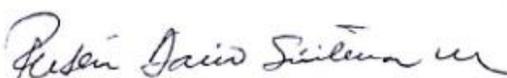


"Síntese, Caracterização Físico-Química e Estudo da Atividade Antitumoral de Complexos Ternários de Cu(II) com um Antibiótico e uma α,α -diamina e de Ru(II) com α,α -diaminas"

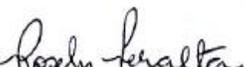
Priscila Pereira Silva

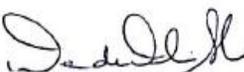
Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


 Profa. Elene Cristina Pereira Maia
 UFMG


 Prof. Rubén Dario Sinisterra Millán
 UFMG


 Profa. Cynthia Lopes Martins Pereira
 UFMG


 Prof. Rosely Aparecida Peralta
 UFSC


 Prof. Denise de Oliveira Silva
 USP

Belo Horizonte, 05 de abril de 2013.

“Cada um de nós tem que vir com seu tijolinho para construir a grande parede do conhecimento. Não importa o tamanho do seu tijolo, o importante é participar da construção do conhecimento.”

(prof.^a Ana Maria da Costa Ferreira)

“Os homens sempre precisam estar pesquisando, sempre aprendendo; contudo, há um infinito além.”

(Ellen G. White)

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus por ter me concedido a oportunidade de concretizar este sonho e por ter me guiado e protegido até aqui.

Agradeço aos meus pais, Helder e Cláudia, que sempre primaram por minha educação e me apoiaram a investir na minha formação acadêmica. Agradeço aos meus irmãos, Bruno e Camila, pelo companheirismo.

Sou muito grata também ao meu noivo, Everton, que me incentivou a enfrentar este desafio.

Serei eternamente grata à professora Elene C. P. Maia com quem muito aprendi. Carinhosamente considero-a como minha “mãe-científica”, pois ela me instruiu nos caminhos da pesquisa científica e me ensinou a dar os primeiros passos nessa empreitada tão grandiosa.

Agradeço ao prof. Wendell Guerra pelo incentivo e apoio para concretização deste trabalho.

No convívio no laboratório de pesquisa conheci pessoas especiais que marcarão para sempre minha vida: Edgar e Luz, amigos do coração, obrigada pelo apoio e pelos momentos especiais que vivemos juntos; Ivana Marzano, obrigada por ser essa pessoa especial que sempre se preocupa com todos ao seu redor; Flávia e Cláudio, sou grata a vocês por todo o incentivo dado à minha carreira profissional; Arshad Islam, obrigada pela amizade; Simone, obrigada pelo exemplo de determinação.

Muito obrigada Giselle, Mariele, Meiriane e Patrícia pela amizade desde os primeiros meses do curso de graduação.

Agradeço aos professores e alunos colaboradores deste trabalho: prof. Nelson G. Fernandes e prof. Adailton J. Bortoluzzi pelas análises de raios X de monocristal; prof.^a Ana M.

C. Ferreira pelas análises de RPE; prof. Hernán Terenzi e Tiago Bortolotto pelos ensaios de clivagem do ADN plasmidial, profa. Françoise Botelho pelos testes *in vivo*.

Manifesto minha gratidão a todos os professores e funcionários do Departamento de Química da UFMG, especialmente ao prof. Humberto O. Stumpf e às secretárias da pós-graduação: Paulete, Lilian, Kátia e Tatiane.

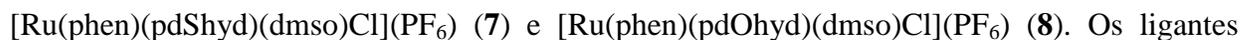
Agradeço aos colegas de trabalho da UFV – *Campus* de Rio Paranaíba que me deram todo o suporte necessário para conclusão deste trabalho. De modo especial agradeço a professora Vânia M. M. Valente que durante este período definiu muito bem a expressão bíblica: “há amigos mais chegados que um irmão”.

Meus respeitosos agradecimentos aos professores Rubén D. S. Millan e Cynthia L. M. Pereira por terem aceitado fazer parte da pré-banca. Também agradeço às professoras Rosely A. Peralta e Denise Oliveira por terem aceitado o convite para participar da banca examinadora desse trabalho.

Agradeço às Instituições de Ensino UFMG e UFV pela oportunidade de aprimoramento profissional e ao CNPq, FAPEMIG e INCT-Catálise pelo apoio financeiro à pesquisa.

RESUMO

Foram preparados oito complexos inéditos, sendo seis de Cu(II) e dois de Ru(II):



Os ligantes utilizados foram os compostos N-doadores 1,10-fenantrolina (phen) e 2,2'-bipiridina (bpy); os antibióticos doxicilina (dox) e tetraciclina (tc); as hidrazidas do ácido 2-tiofenocarboxílico (Shyd) e do ácido 2-furóico (Ohyd) e dois ligantes inéditos: N'-(6-oxo-1,10-fenantrolina-5(6H)-ilideno)tiofeno-2-carbohidrazida (**pdShyd**) e N'-(6-oxo-1,10-fenantrolina-5(6H)-ilideno)furano-2-carbohidrazida (**pdOhyd**). Os complexos preparados foram caracterizados por análise elementar, condutimetria, espectroscopias no UV-vis e no IV, RPE (complexos de cobre), RMN de ^1H (complexos de rutênio), difração de raios X de monocristal (complexos **3**, **5** e **6**) e espectrometria de massas (complexos **1**, **2**, **7** e **8**). A titulação espectrofotométrica dos compostos com CT-ADN indicou que todos os complexos se ligam a essa macromolécula. Foram feitos testes de citotoxicidade na linhagem celular K562 de todos complexos e ligantes. A citotoxicidade se correlaciona com a quantidade de Cu ligada ao ADN intracelular. Também foram feitos testes de fotocitotoxicidade, todos os complexos se mostram mais ativos após a irradiação. Para os complexos **1** e **2** foram feitos estudos de clivagem e fotoclivagem do ADN. Esses compostos são os agentes mais potentes para clivagem de ADN relatados na literatura até o momento. A administração do complexo **1** causou retardo no desenvolvimento de tumor de Erlich inoculado em camundongos.

Palavras chave: antitumoral, complexos de Cu(II) e Ru(II), interação com o ADN.

ABSTRACT

Eight new complexes were prepared, six of Cu(II) and two of Ru(II):
[Cu(phen)(dox)(H₂O)(ClO₄)](ClO₄) (1); [Cu(phen)(tc)(H₂O)(ClO₄)](ClO₄) (2);
[Cu(phen)(Shyd)(acn)(ClO₄)](ClO₄) (3); [Cu(bpy)(Shyd)(acn)(ClO₄)](ClO₄) (4);
[Cu(phen)(Ohyd)(acn)(ClO₄)](ClO₄) (5); [Cu(bpy)(Ohyd)(acn)(ClO₄)](ClO₄) (6);
[Ru(phen)(pdShyd)(dmsO)Cl](PF₆) (7) and [Ru(phen)(pdOhyd)(dmsO)Cl](PF₆) (8). The ligands used were the N-heterocyclic donors 1,10-phenanthroline (phen) and 2,2'-bipyridine (bpy), the antibiotics doxycycline (dox) and tetracycline (tc), the hydrazides of 2-thiophenecarboxylic acid (Shyd) and 2-furoic acid (Ohyd) and two novel N-heterocyclic donors: N'-(6-oxo-1,10-phenanthroline-5(6H)-ylidene)thiophene-2-carbohydrazide (**pdShyd**) and N'-(6-oxo-1,10-phenanthroline-5(6H)-ylidene)furan-2-carbohydrazide (**pdOhyd**). The complexes were characterized by elemental analysis, conductimetry, UV-vis and IR spectroscopy, EPR (for copper complexes), NMR (for ruthenium complexes), single crystal X-ray diffraction (for complexes 3, 5 and 6) and mass spectrometry (for complexes 1, 2, 7 and 8). The cytotoxic effect of all complexes and ligands in a chronic myelogenous leukemia cell line was studied. Exposure to UV-A irradiation enhances the cytotoxic activity of all complexes. The cytotoxic activity of these complexes correlated well with the intracellular concentration of copper and the number of Cu-DNA adducts formed inside the cells. Complexes 1 and 2 present an expressive plasmid DNA cleavage activity generating single and double-strand breaks, under mild reaction conditions, and even in the absence of any additional oxidant or reducing agent. Spectrophotometric titrations with CT-DNA indicated that all complexes bind to this macromolecule. They are the most potent DNA cleavage agents reported so far. The administration of complex 1 retards the appearance of *Ehrlich* tumor inoculated in mice.

Keywords: antitumor, Cu(II) and Ru(II) complexes, DNA interactions

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
SUMÁRIO	x
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS	xxiii
INTRODUÇÃO	1
1. COMPLEXOS METÁLICOS QUE FORMAM LIGAÇÕES COVALENTES COORDENADAS COM O ADN	3
2. COMPLEXOS METÁLICOS QUE INTERAGEM COM O ADN DE FORMA NÃO-COVALENTE .	8
3. COMPLEXOS METÁLICOS QUE INDUZEM A CLIVAGEM DO ADN	12
OBJETIVOS	17
CAPÍTULO 1: PARTE EXPERIMENTAL: MATERIAIS, INSTRUMENTOS E MÉTODOS, PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E SÍNTESES	19
1- MATERIAIS	20
<i>1.1- Células e cultura</i>	20
<i>1.2- Reagentes e solventes</i>	20
2- INSTRUMENTOS E MÉTODOS	24
<i>2.1- Análise Elementar - CHN</i>	24
<i>2.2- Absorção Atômica</i>	24
<i>2.3- Análises Condutimétricas</i>	24
<i>2.4- Espectroscopia vibracional na região do infravermelho</i>	25
<i>2.5- Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível</i>	25
<i>2.6- Reflectância Difusa</i>	25
<i>2.7- Ressonância Paramagnética Eletrônica - RPE</i>	25
<i>2.8- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN de ¹H</i>	26

2.9- Espectrometria de Massas - ESI.....	26
2.10- Cristalografia de Raios X de Monocristal.....	26
3- PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	28
3.1- Determinação do coeficiente de partição octanol-água.....	28
3.2- Testes de citotoxicidade frente à linhagem de células tumorais	28
3.3- Testes de fotocitotoxicidade frente à linhagem celular K562.....	29
3.4- Determinação da acumulação intracelular de cobre	31
3.5- Determinação do número de adutos Cu-ADN.....	31
3.6- Determinação das constantes de ligação ADN-complexo.....	32
3.7-Testes de clivagem do ADN	32
3.8-Testes de fotoclivagem do ADN.....	34
3.9-Testes in vivo.....	34
4- SÍNTESES.....	35
4.1- Síntese dos ligantes.....	35
4.1.1- Ligante pdShyd (C ₁₇ H ₁₀ N ₄ O ₂ S).....	35
4.1.2- Ligante pdOhyd (C ₁₇ H ₁₀ N ₄ O ₃).....	35
4.2- Preparações dos complexos.....	36
4.2.1- [Cu(dox)(phen)(OH ₂)(ClO ₄)](ClO ₄) – Complexo 1.....	36
4.2.2- [Cu(tc)(phen)(OH ₂)(ClO ₄)](ClO ₄) – Complexo 2.....	36
4.2.3- [Cu(Shyd)(phen)(acn)(ClO ₄)](ClO ₄) - Complexo 3.....	36
4.2.4- [Cu(Shyd)(bpy)(acn)(ClO ₄)](ClO ₄) - Complexo 4.....	37
4.2.5- [Cu(Ohyd)(phen)(acn)(ClO ₄)](ClO ₄) - Complexo 5.....	37
4.2.6- [Cu(Ohyd)(bpy)(acn)(ClO ₄)](ClO ₄) - Complexo 6.....	37
4.2.7- [Ru(pdShyd)(phen)(dmsO)Cl](PF ₆) - Complexo 7	38
4.2.8- [Ru(pdOhyd)(phen)(dmsO)Cl](PF ₆) - Complexo 8	38

CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE COMPLEXOS TERNÁRIOS DE COBRE(II) COM OS LIGANTES TETRACICLINA, DOXICICLINA E 1,10-FENANTROLINA. 39

1. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS.....	40
1.1- Análises elementar e condutivimétrica.....	40

1.2- Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível a partir de soluções aquosas e no estado sólido (reflectância difusa)	41
1.3- Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	44
1.4- Ressonância Paramagnética Eletrônica - RPE	49
1.5- Espectrometria de Massas	51
2- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS COMPLEXOS 1 E 2	55
2.1- Estudos da citotoxicidade dos compostos frente à linhagem K562.....	55
2.2- Estudos da acumulação intracelular dos complexos na linhagem celular K562.....	56
2.3- Estudos de interação dos compostos com o ADN.....	58
2.3.1- Determinação da concentração de complexo ligado ao ADN intracelular	58
2.3.2- Determinação das constantes de ligação ADN-complexo.....	59
2.3.3- Estudos de clivagem do ADN plasmidial.....	62
2.4- Coeficiente de partição.....	64
2.5- Estudos da fotocitotoxicidade e da fotoclivagem do ADN promovida pelos complexos 1 e 2	66
2.6- Testes in vivo.....	69
3- CONCLUSÃO	72
CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE QUATRO COMPLEXOS TERNÁRIOS DE COBRE(II) COM LIGANTES HETEROCÍCLICOS α,α-DIAMINA E DERIVADOS DE HIDRAZIDAS.	74
1- CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS 3, 4, 5 E 6.....	75
1.1 - Análises elementares e condutivimétricas	76
1.2 - Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	76
1.3 - Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível.....	81
1.4 - Ressonância paramagnética eletrônica.....	83
1.5 - Difração de raios X de monocristal.....	85
2- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS COMPLEXOS 3, 4, 5 E 6..	90
2.1- Estudos da citotoxicidade dos compostos frente a linhagem celular K562	90
2.2- Determinação do coeficiente de partição octanol/água para os compostos.....	92

2.3- Estudos da acumulação intracelular a longo prazo	93
2.4- Estudos de interação dos compostos com o ADN.....	94
2.4.1- Determinação da concentração de complexo ligado ao ADN	94
2.4.2- Determinação das constantes de ligação ADN-complexo	96
2.4.3- Correlação entre citotoxicidade e afinidade complexo-ADN	98
2.5- Estudos da fotocitotoxicidade dos complexos 3, 4, 5 e 6.....	99
3- CONCLUSÃO	101
CAPÍTULO 4: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDOS DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE LIGANTES DERIVADOS DE α,α-DIAMINAS COM HIDRAZIDAS E DE SEUS RESPECTIVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO(II)	103
1- CARACTERIZAÇÕES DOS LIGANTES.....	104
1.1 – Análise elementar e ponto de decomposição	105
1.2 – Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho	106
1.3 – Ressonância Magnética Nuclear.....	108
1.4 – Espectrometria de massas	112
2- CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS 7 E 8	116
2.1- Análise Elementar e Condutivimétrica	116
2.2 - Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	117
2.3 - Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível.....	119
2.4 - Espectrometria de Massas	120
2.5 – Ressonância Magnética Nuclear.....	126
3- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS LIGANTES E DOS COMPLEXOS 7 E 8.....	129
3.1- Estudos da citotoxicidade dos compostos frente à linhagem celular K562	129
3.2- Estudos da fotocitotoxicidade dos compostos frente à linhagem celular K562	130
4- CONCLUSÃO	133
PERSPECTIVAS FUTURAS	134
ANEXO 1: SÍNTESES E CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DE COMPOSTOS NÃO INÉDITOS USADOS COMO REFERÊNCIA NOS TESTES BIOLÓGICOS OU	

COMO PRECURSORES NA SÍNTESE DE NOVOS LIGANTES E COMPLEXOS METÁLICOS.	136
1-SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA 1,10-FENANTROLINA-5,6-DIONA.....	136
1.1- <i>Síntese da 1,10-fenantrolina-5,6-diona (phen)</i>	136
1.2- <i>Caracterização da 1,10-fenantrolina-5,6-diona (phen)</i>	137
2- SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO CIS-DICLOROTETRAQUIS(DIMETILSULFÓXIDO)RUTÊNIO(II)	141
2.1- <i>Síntese do complexo cis-[RuCl₂(dms_o)₄]</i>	141
2.2- <i>Caracterização do complexo cis-[RuCl₂(dms_o)₄]</i>	141
3-SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO [Cu(PHEN)₂](ClO₄)₂.....	144
3.1- <i>Preparação do [Cu(phen)₂](ClO₄)₂</i>	144
3.2- <i>Caracterização do [Cu(phen)₂](ClO₄)₂</i>	144
ANEXO 2 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA OS LIGANTES NÃO INÉDITOS.	145
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas propostas para os complexos de [PtCl ₂ (dox)] e [PtCl ₂ (tc)].	4
Figura 2. Estrutura dos complexos NAMI-A e KP1019.	7
Figura 3. Representação esquemática das três formas das moléculas de ADN plasmidial	33
Figura 4. Estruturas propostas para os complexos 1 (superior) e 2(inferior).	40
Figura 5. Espectros eletrônicos de soluções aquosas na concentração de 2,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ : (A) phen, dox e complexo 1 e (B) phen, tc e complexo 2.	42
Figura 6. Espectros de reflectância difusa: (A) dox e complexo 1 e (B) e tc e complexo 2.	43
Figura 7. Espectros eletrônicos de soluções aquosas na concentração de 1,5 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ : (A) complexo 1 e (B) complexo 2.	44
Figura 8. Espectro vibracional na região do infravermelho para complexo 1.	45
Figura 9. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo 2.	45
Figura 10. Espectros de RPE para complexo 1 (A) e complexo 2 (B), adquiridos em solução congelada de metanol a 77K, usando modulador de 15 G. Requadros: Espectros de RPE no intervalo de 800 a 2200 G.	49
Figura 11. Espectro ESI(+)-MS em solução MeOH:H ₂ O (1:1) do complexo 1.	51
Figura 12. Espectro ESI(+)-MS em solução MeOH:H ₂ O (1:1) do complexo 2.	52
Figura 13. (A) Ampliação do espectro de ESI do complexo 1 em MeOH/H ₂ O (50/50). (B) Distribuição isotópica para as espécies [Cu(dox)(phen)H] ⁺ e [Cu(dox)(phen)(ClO ₄)] ⁺ calculadas com auxílio do programa Qual Browser versão 2.0.7copyright® Thermo Fischer Scientific Inc. 1998-2007.	53
Figura 14. (A) Ampliação do espectro de ESI do complexo 2 em MeOH/H ₂ O (50/50). (B) Distribuição isotópica para as espécies [Cu(tc)(phen)H] ⁺ e [Cu(tc)(phen)(ClO ₄)] ⁺ calculadas com auxílio do programa Qual Browser versão 2.0.7copyright® Thermo Fischer Scientific Inc. 1998-2007.	54
Figura 15. Curvas dose-resposta para determinação da CI ₅₀ para complexos 1 e 2.	55
Figura 16. Concentração intracelular de cobre após tratamento por 72h com complexos 1 e 2. Os valores representam a média de três experimentos independentes.	57

Figura 17. Número de adutos de Cu-ADN por milhão de nucleotídeos em função da concentração dos complexos 1 e 2.....	59
Figura 18. Espectro de soluções contendo complexo 1 ($2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e concentrações crescentes de ADN de 0 a $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão HEPES pH 7,3, $I = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Requadro: $[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{ADN}]$	60
Figura 19. Espectro de soluções contendo complexo 2 ($2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e concentrações crescentes de ADN de 0 a $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão HEPES pH 7,3, $I = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Requadro: $[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{ADN}]$	61
Figura 20. Clivagem do ADN plasmidial superenovelado após ser exposto a diferentes concentrações ($5 - 40 \text{ mmol L}^{-1}$) dos complexos por 4 horas à 37°C em solução tampão de Tris-HCl 10 mmol L^{-1} (pH=7,4). À esquerda experimentos para complexo 1 e à direita para complexo 2.....	62
Figura 21. Efeito de inibidores de EROs na clivagem do ADN superenovelado promovida pelos complexos 1 (A) e 2 (B). Condições de reação: $[\text{complexo}] = 20 \text{ } \mu\text{mol L}$, tempo de reação de 4 h a 37°C em 10 mmol L^{-1} Tris-HCl (pH 7,4). Os inibidores de EROs utilizados foram: dmsO (10%), KI (10 mmol L^{-1}), SOD (15 unidades) e NaN_3 (10 mmol L^{-1}).....	63
Figura 22. Curvas de inibição do crescimento celular após incubação das células com os complexos 1 e 2 por 5 horas sem irradiação (círculos abertos) e com irradiação UV-A por 5 min (quadrados cheios).	66
Figura 23. Clivagem do ADN promovida pelos complexos 1 (à esquerda) e 2 (à direita). Condições de reação: $[\text{ADN}] = 400 \text{ ng}$, $\sim 30 \text{ } \mu\text{M}$ em pares de base; $[\text{tampão}] = 10 \text{ mM}$ Tris-HCl (pH 7,4); $[\text{complexo}] = 0$ a $40 \text{ } \mu\text{M}$; Os dados apresentados são referentes a dois experimentos independentes.....	67
Figura 24. Efeito dos inibidores EROs na clivagem do ADN superenovelado promovida pelos complexos 1 (à esquerda) e 2 (à direita). Condições de reação: $[\text{ADN}] = 400 \text{ ng}$, $\sim 30 \text{ } \mu\text{M}$ em pares de base; $[\text{tampão}] = 10 \text{ mM}$ Tris/HCl (pH 7,4); $[\text{complexo}] = 20 \text{ } \mu\text{M}$; $[\text{DMSO}] = 10\%$ (v/v); $[\text{SOD}] = 15$ unidades; $[\text{KI}] = 10 \text{ mM}$; $[\text{NaN}_3] = 10 \text{ mM}$; tempo = 5 min sub luz UV-A ($\lambda = 365 \text{ nm}$, 12 W). Resultados representativos para dois experimentos independentes.....	68

Figura 25. Curvas de sobrevivência de camundongos com tumor de <i>Erhlich</i> inoculado, sendo tratados com tampão PPS (teste controle), complexo 1 (concentrações de 1 e 8 mg/Kg) e $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ (1 mg/Kg).....	70
Figura 26. Foto dos animais no 13º dia de experimento. A- animal do grupo controle; B- animal do grupo Complexo 1 (8mg/kg de peso corporal). C-animais do grupo Complexo 1 (1mg/kg) e D- animais do grupo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ (1mg/kg de peso corporal).....	71
Figura 27. Estruturas dos complexos 3, 4, 5 e 6.	75
Figura 28. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo 3.	79
Figura 29. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo 4.	79
Figura 30. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo 5.	80
Figura 31. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo 6.	80
Figura 32. Espectros eletrônicos de soluções aquosas $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em pH=7,2 do complexo 3, Shyd e phen (A); complexo 4, Shyd e bpy (B), complexo 5, Ohyd e phen (C) e complexo 6, Ohyd e bpy; l=1 cm.	81
Figura 33. Espectros eletrônicos de soluções aquosas $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A - complexo 3; B - complexo 4; C - complexo 5; D - complexo 6; l=10 cm.....	83
Figura 34. Espectros de RPE para complexos 3, 4, 5 e 6 adquiridos em solução congelada de metanol a 77K, usando modulador de 15 G.....	84
Figura 35. Representação da estrutura cristalina do complexo 3 utilizando o programa Ortep [77]. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.	85
Figura 36. Representação da estrutura cristalina do complexo 5 utilizando o programa Ortep [77].	86
Figura 37. Representação da estrutura cristalina do complexo 6 utilizando o programa Ortep [77]. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.	86
Figura 38. Curvas de dose-resposta da inibição do crescimento celular pela concentração do complexo 3 (curva A), complexo 4 (curva B), complexo 5 (curva C) e complexo 6 (curva D). Tempo de incubação de 72h. Esses valores representam a média de três experimentos independentes.	90

Figura 39. Inibição do crescimento celular em função da concentração de cobre intracelular, após incubação das células por 72 horas com concentrações equitóxicas dos complexos 3, 4, 5 e 6. Os valores representam a média de três experimentos independentes.	93
Figura 40. Número de adutos Cu-ADN por milhão de nucleotídeos em função da concentração dos complexos 3, 4, 5 e 6, tempo de incubação 72 horas.	95
Figura 41. Espectros de soluções contendo o complexo 3 ($2,5 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹) e crescentes concentrações de ADN de 0 a $2,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em tampão HEPES pH 7,2, força iônica = 1×10^{-3} mol L ⁻¹ . Requadro: $[ADN]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[ADN]$. $K = 5,1 \times 10^4$	96
Figura 42. Espectros de soluções contendo o complexo 4 ($2,5 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹) e crescentes concentrações de ADN de 0 a $2,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em tampão HEPES pH 7,2, força iônica = 1×10^{-3} mol L ⁻¹ . Requadro: $[ADN]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[ADN]$. $K = 6,7 \times 10^3$	97
Figura 43. Espectros de soluções contendo o complexo 5 ($5,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹) e crescentes concentrações de ADN de 0 a $4,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em tampão HEPES pH 7,2, força iônica = 1×10^{-3} mol L ⁻¹ . Requadro: $[ADN]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[ADN]$. $K = 2,2 \times 10^4$	97
Figura 44. Espectros de soluções contendo o complexo 6 ($2,5 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹) e crescentes concentrações de ADN de 0 a $2,4 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em tampão HEPES pH 7,2, força iônica = 1×10^{-3} mol L ⁻¹ . Requadro: $[ADN]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[ADN]$. $K = 2,6 \times 10^3$	98
Figura 45. Correlação entre citotoxicidade e a constante de ligação ao ADN.	99
Figura 46. Valores de CI ₅₀ após incubação das células com os complexos 3, 4, 5 e 6 por 4 horas sem irradiação (colunas cinza) e com irradiação UV-A ($\lambda = 365$ nm) por 5 min (colunas pretas).	100
Figura 47. Esquema de síntese dos ligantes pdSyd e pdOhyd.	104
Figura 48. Mecanismo de reação da formação de imina a partir de uma cetona e uma amina primária.	105
Figura 49. Espectro vibracional na região do infravermelho para pdShyd.	107
Figura 50. Espectro vibracional na região do infravermelho para pdOhyd.	107
Figura 51. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz) em CDCl ₃ do pdShyd.	108
Figura 52. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (200 MHz) em CDCl ₃ do pdShyd.	109

Figura 53. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) em CDCl_3 do pdOhyd.	109
Figura 54. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (200 MHz) em CDCl_3 do pdOhyd.	110
Figura 55. Espectro ESI(+)-MS em solução MeOH:H $_2$ O (1:1) do pdShyd.	113
Figura 56. Espectro de massas referente à fragmentação do pico principal do ESI(+)-MS do pdShyd em solução MeOH:H $_2$ O (1:1).	114
Figura 57. Espectro ESI-MS em solução MeOH:H $_2$ O (1:1) do pdOhyd.	115
Figura 58. Estruturas propostas para complexo 7 (acima) e complexo 8 (abaixo).	116
Figura 59. Espectro vibracional do complexo 7.	118
Figura 60. Espectro vibracional do complexo 8.	118
Figura 61. Espectros eletrônicos de soluções $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ dos ligantes pdShyd e pdOhyd e dos complexos 7 e 8 em dimetilsulfóxido.	120
Figura 62. Espectro ESI(+)-MS em solução MeOH:H $_2$ O (1:1) do complexo 7.	121
Figura 63. Espectro de massas referente à fragmentação do pico principal do ESI(+)-MS do complexo 7 em solução MeOH:H $_2$ O (1:1).	122
Figura 64. Distribuição isotópica para a espécie $[\text{Ru}(\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2\text{S})(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)((\text{CH}_3)_2\text{SO})\text{Cl}]^+$, (a) experimental; (b) calculado com auxílio do programa Qual Browser versão 2.0.7copyright® Thermo Fischer Scientific Inc. 1998-2007.	123
Figura 65. Espectro ESI(+)-MS em solução MeOH:H $_2$ O (1:1) do complexo 8.	124
Figura 66. Espectro referente à fragmentação do pico principal do ESI(+)-MS do complexo 8 em solução MeOH:H $_2$ O (1:1).	124
Figura 67. Distribuição isotópica para a espécie $[\text{Ru}(\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_3)(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)((\text{CH}_3)_2\text{SO})\text{Cl}]^+$, (a) experimental; (b) calculado com auxílio do programa Qual Browser versão 2.0.7copyright® Thermo Fischer Scientific Inc. 1998-2007.	125
Figura 68. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) do complexo 7 em dmsd- d_6	126
Figura 69. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) do complexo 8 em dmsd- d_6	127
Figura 70. Curvas de dose-resposta dos ligantes pdShyd e pdOhyd e complexos 7 e 8.	130

Figura 71. Curvas dose resposta para os complexos 7 e 8 com e sem irradiação UV-A por 5 minutos, tempo de incubação de 4 horas.	132
Figura 73. Esquema da síntese da 1,10-fenantrolina-5,6-diona.	136
Figura 74. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto phend.....	138
Figura 75. Espectro RMN de ^1H (200 MHz) do composto phend em dmsó-d6.	139
Figura 76. Espectro ampliado do RMN de ^1H (200 MHz) do composto phend em dmsó-d6. .	139
Figura 77. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo cis- $[\text{Ru}(\text{dmsó})_4\text{Cl}_2]$	143
Figura 78. Espectro vibracional na região do infravermelho para o ligante dox.	145
Figura 79. Espectro vibracional na região do infravermelho para o ligante tc.	145
Figura 80. Espectro vibracional na região do infravermelho para o ligante phen.	146
Figura 81. Espectro vibracional na região do infravermelho para o ligante bpy.	146
Figura 82. Espectro vibracional na região do infravermelho para o ligante Shyd.	147
Figura 83. Espectro vibracional na região do infravermelho para o ligante Ohyd.	147

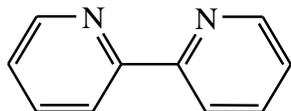
LISTA DE TABELAS

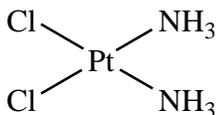
Tabela 1. Algumas propriedades e dados dos reagentes e solventes utilizados nos procedimentos e preparações.....	21
Tabela 2. Faixas com as concentrações citotóxicas dos ligantes e complexos frente a linhagem celular K562.....	29
Tabela 3. Faixas com as concentrações citotóxicas dos complexos frente à linhagem celular K562 com tempo de incubação de 4h na ausência e na presença de irradiação UV-A por 5min.	30
Tabela 4. Dados das análises elementares e condutimétrica para os complexos 1 e 2.	41
Tabela 5. Atribuição das principais frequências (cm^{-1}) na região do infravermelho dos ligantes dox e phen e dos complexos 1 e 2.....	46
Tabela 6. Parâmetros de RPE para complexos 1 e 2.....	50
Tabela 7. Valores de CI_{50} para ligantes e complexos com tempo de incubação de 72h.	56
Tabela 8. Valores de K_{ow} para os ligantes e para os complexos 1 e 2.	65
Tabela 9. Dados das análises elementares e condutimétricas dos complexos 1, 2, 3 e 4. Os valores foram calculados para as fórmulas mínimas: 3- $\text{CuC}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_9\text{SCl}_2$; 4- $\text{CuC}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_9\text{SCl}_2$; 5- $\text{CuC}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{Cl}_2$ e 6- $\text{CuC}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{Cl}_2$	76
Tabela 10. Algumas frequências (cm^{-1}) na região do infravermelho dos ligantes Shyd, Ohyd, phen e bpy e dos respectivos complexos metálicos.	77
Tabela 11. Parâmetros de RPE ($g//$, g^{\perp} , $A//$ e $g// / A// $) para os complexos 3, 4, 5 e 6.....	84
Tabela 12. Parâmetros de rede das estruturas determinadas para os complexos 3, 5 e 6.....	87
Tabela 13. Comprimento de ligação dos átomos doadores ligados diretamente ao cobre(II) para as estruturas cristalinas dos complexos 3, 5 e 6.	88
Tabela 14. Ângulos de ligação entre os átomos doadores dos ligantes e o íon Cu(II) determinados para os complexos 3, 5 e 6.....	89
Tabela 15. Valores de CI_{50} frente à linhagem celular K562 para ligantes e complexos.....	91
Tabela 16. Valores de K_{ow} para ligantes (estimados) e complexos (experimentais).	92

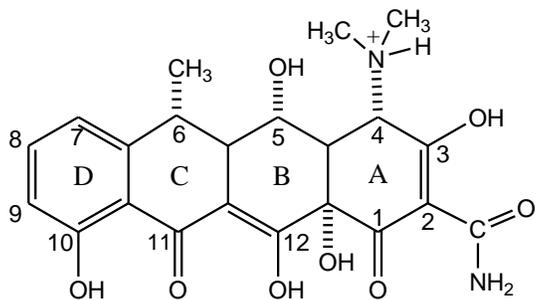
Tabela 17. Dados obtidos das análises elementares e do ponto de fusão dos ligantes.....	106
Tabela 18. Proposta d atribuição dos sinais de RMN de ^1H dos ligantes pdShyd e pdOhyd. ..	111
Tabela 19. Dados das análises elementares e condutimétricas dos complexos 7 e 8 para as fórmulas mínimas: 7- $\text{RuC}_{31}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}_2\text{PClF}_6$; 8- $\text{RuC}_{31}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_4\text{SPClF}_6$	117
Tabela 20. Valores de CI_{50} para os ligantes phend, pdShyd, pdOhyd e para os complexos 7 e 8 com tempo de incubação de 72horas.	129
Tabela 21. Valores de CI_{50} para complexos 7 e 8 com e sem irradiação UV-A por 5 minutos, tempo de incubação de 4 horas.	131
Tabela 22. Dados obtidos das análises elementares e do ponto de fusão do phend.....	137
Tabela 23. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H da phend	140
Tabela 24. Dados das análises elementares e condutimétricas do complexo cis- $[\text{Ru}(\text{dmsO})_4\text{Cl}_2]$. Os valores foram calculados para a fórmula mínima: $\text{RuC}_8\text{H}_{24}\text{S}_4\text{O}_4$	142
Tabela 25. Dados das análises elementares e condutimétricas do complexo $[\text{Cu}(\text{phen})_2](\text{ClO}_4)_2$	144

LISTA DE ABREVIATURAS

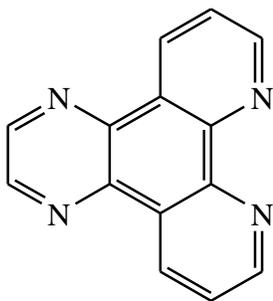
- Λ_M = Coeficiente de condutividade molar
- δ = Deslocamento químico do hidrogênio (RMN de ^1H)
- ν = Estiramento (IV)
- **acn** = Acetonitrila (CH_3CN)
- **ADN** = Ácido Desoxirribonucléico (sigla em inglês: DNA)
- **ARN** = Ácido Ribonucléico (sigla em inglês: RNA)
- **BCRJ** = Banco de Células do Rio de Janeiro
- **bpy** = 2,2'-bipiridina



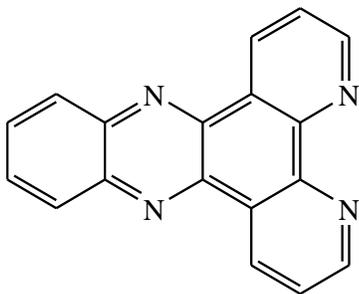
- **CHN** = Análise elementar dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio
 - **CI₅₀** = Concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular
 - **cis-DDP** = cis-diaminodicloroplatina(II) - cisplatina
- 
- The image shows the chemical structure of cis-DDP (cisplatin). It features a central platinum atom (Pt) coordinated to two chlorine atoms (Cl) and two ammonia molecules (NH₃). The two chlorine atoms are on the left side, and the two ammonia molecules are on the right side, all in a cis configuration.
- **CT-DNA** – ADN de Timo de Vitelo
 - **dmsO** = Dimetilsufóxido ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$)
 - **dox** = Doxiciclina



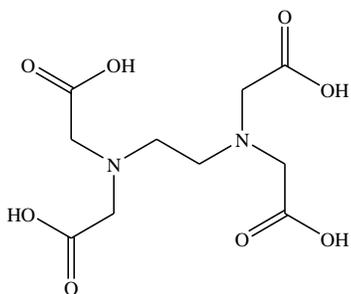
- **dpq** = Dipirido[3,2-f:2'3'-h]quinoxalina



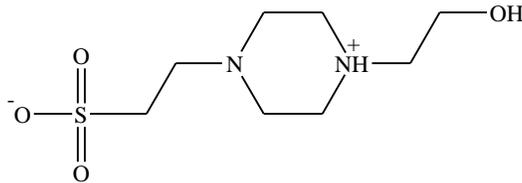
- **dppz** = Dipirido[3,2-a:2'3'-c]fenazina



- **edta** = ácido etilenodiaminotetracético

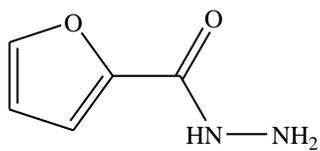


- **EROs** = Espécies Reativas de Oxigênio. As principais espécies são o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o dioxigênio singlete (1O_2), o radical hidroxil (HO^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2),
- **ESI(+)-MS** = Espectrometria de massas com ionização por eletrospray no modo positivo.
- **FI** = Forma I do ADN plasmidial, forma superenovelada
- **FII** = Forma II do ADN plasmidial, forma circular aberta.
- **FIII** = Forma III do ADN plasmidial, forma linear.
- **GFAAS** = Espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite
- **Hepes** = Ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazino]-etanossulfônico



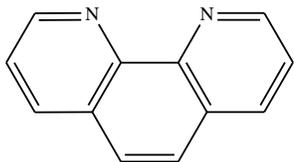
- **K_{ow}** = Coeficiente de partição octanol/água
- **MeOH** = metanol
- **MM** = massa molar

- **Ohyd** = hidrazida do ácido 2-furóico

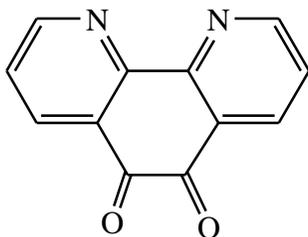


- **PBS** = Tampão Fosfato Salina

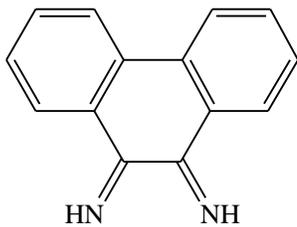
- **phen** = 1,10-fenantrolina



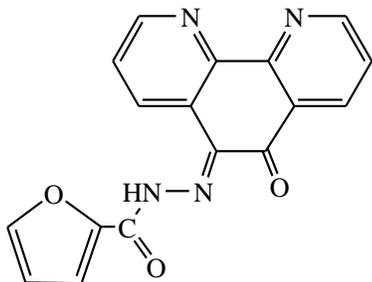
- **phend** = 1,10-fenantrolina-5,6-diona



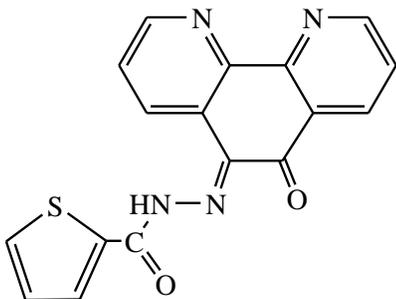
- **phi** = fenantreno-9,10-diimina



- **pdOhyd** = N'-(6-oxo-1,10-fenantrolina-5(6H)-ilideno)tiofeno-2-carbohidrazida



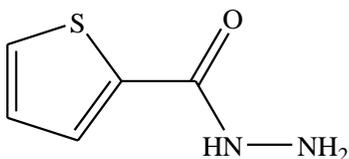
- **pdShyd** = N'-(6-oxo-1,10-fenantrolina-5(6H)-ilideno)furano-2-carbohidrazida



- **RMN de ¹H** = Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

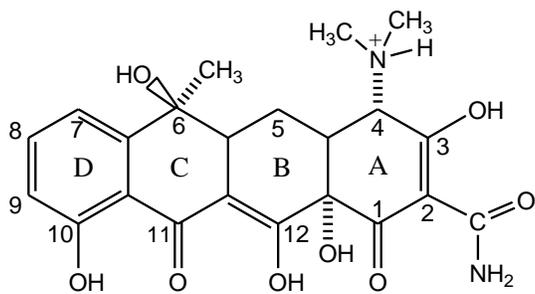
- **RPE** = Ressonância Paramagnética Eletrônica

- **Shyd** = hidrazida do ácido 2-tiofenocarboxílico

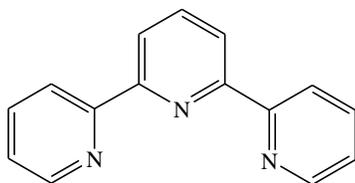


- **SOD** = Superóxido dismutase

- **tc** = tetraciclina



- **terpy** = 2,2':6',2''-terpiridina



INTRODUÇÃO

O câncer é basicamente uma doença de células caracterizada por um desvio dos mecanismos de controle que dirigem a proliferação e a diferenciação celular, esse processo é resultado de alterações no ADN [1]. As neoplasias¹ malignas tendem a ser muito agressivas determinando a formação de tumores [2].

O agente antineoplásico ideal deveria induzir apoptose² nas células cancerígenas e ser atóxico às células saudáveis. Contudo, atualmente, nenhum agente quimioterápico atende a essas especificações e os mais efetivos são também os mais tóxicos. Essa é uma das razões que motiva a busca por novos compostos com atividade antitumoral. Os agentes antitumorais, mesmo que por mecanismos de ação distintos, são capazes de perturbar ou inibir a divisão celular.

Desde a elucidação dos mecanismos de ação das mostardas nitrogenadas na década de 40, o ADN tem sido tido como o principal alvo de agentes antitumorais devido ao seu papel fundamental na replicação celular. Somado a isso, o ADN apresenta-se como um alvo ideal para interações com cátions metálicos, uma vez que é rico em ânions fosfatos e átomos de oxigênio e nitrogênio, que são bons doadores de par de elétrons.

A medicina tem se beneficiado com a introdução de complexos metálicos nos tratamentos clínicos. Uma das utilizações mais importantes e promissoras de complexos metálicos em terapia é no tratamento do câncer, devido ao aumento da sobrevivência de vários pacientes com o uso de antitumorais à base de platina [3]. A pesquisa de complexos metálicos com propriedades antitumorais iniciou-se com a descoberta da atividade antitumoral do complexo cis-diaminodichloroplatina(II), comumente conhecido como cisplatina, por

¹ Neoplasia: proliferação celular anormal e descontrolada.

² Apoptose: morte celular programada. É um tipo de autodestruição celular que ocorre de forma ordenada.

Rosenberg e van Camp no final dos anos sessenta [4, 5] e tem sido estimulada com o surgimento de novos complexos ativos.

A introdução dos complexos metálicos como antineoplásicos foi um grande avanço, pois foram preparados metalofármacos eficazes em cânceres cujas taxas de sobrevivência eram mínimas. Os complexos metálicos têm sido amplamente explorados nos estudos de ligação ao ADN, pois possuem propriedades espectroscópicas e redox únicas, alta estabilidade e boa versatilidade estrutural. Além disso, esses compostos possuem potencialidade para serem usados em terapia fotodinâmica [6]. A terapia fotodinâmica envolve um fotossensibilizador, que pode ser um composto orgânico ou um complexo metálico, que dentro das células tumorais com a exposição à irradiação luminosa na presença de oxigênio leva à produção de espécies reativas de oxigênio. Este fato inicia uma série de eventos que inclui a fragmentação da molécula de ADN, o que resulta na morte celular.

Os modos de reconhecimento são baseados em interações eletrostáticas, intercalação, ligação nas cavidades do ADN e/ou ligações de hidrogênio [6].

A elucidação dos mecanismos de ação das drogas quimioterápicas nas células normais e cancerosas, somada à compreensão dos processos fisiológicos aos quais esses complexos são submetidos quando administrados como fármacos têm proporcionado melhorias no tratamento [7] e ajudado pesquisadores a proporem novos fármacos para serem usados no tratamento dessa enfermidade.

A grande maioria dos metalofármacos que estão atualmente em uso clínico como antineoplásicos são compostos baseados em platina, cujo mecanismo de ação está relacionado primariamente à sua interação com o ADN das células através da formação de ligações covalentes coordenadas [8]. Outro exemplo do uso de metais no tratamento do câncer são sais de gálio, tais como nitrato e cloreto de gálio(III) [9].

1. Complexos metálicos que formam ligações covalentes coordenadas com o ADN

A introdução da cisplatina (cis-DDP) na clínica médica em 1971 causou um grande impacto possibilitando a cura completa de mais de 90% dos tumores testicular e ovariano [8]. O mecanismo de ação da cisplatina relaciona-se com a formação de adutos cisplatina-ADN. A formação desses adutos consiste em uma etapa fundamental para induzir a atividade anticancerígena desse complexo, porém antes do ataque ao ADN, a cisplatina sofre um processo de aquação, onde os cloretos lábeis são substituídos por moléculas de água. As espécies catiônicas ativadas, $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)\text{Cl}]^+$, $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ e $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)(\text{OH})]^+$, interagem com o ADN de forma mono e bifuncionalizada [8].

As espécies ativadas de cis-DDP formam ligações covalentes coordenadas cruzadas intra e interfita, substituindo as moléculas de água por nitrogênios das bases purinas. A ligação da cisplatina ao ADN é irreversível, sendo um processo controlado cineticamente [9]. A cisplatina liga-se principalmente às bases guaninas adjacentes presentes no sulco³ maior do ADN, o que provoca uma distorção nesta macromolécula. Essas modificações conformacionais na estrutura do ADN interferem nos mecanismos de transcrição e replicação celular, desencadeando processos de morte celular [10]. Embora haja uma concordância consensual que a ligação da cisplatina ao ADN seja o principal mecanismo de ação, as espécies ativadas também podem interagir com outros componentes do meio intracelular, como proteínas, enzimas, etc.

³A dupla hélice de ADN consiste em uma estrutura cilíndrica com superfície irregular, formando dois sulcos (cavidades) de tamanhos diferentes. As principais funções dos sulcos do ADN são de fornecer informações acerca das bases que se encontram ligadas numa determinada região da dupla cadeia sem necessidade de abertura das fitas e de permitir acessibilidade para ligação de proteínas ao ADN.

Apesar do sucesso terapêutico da cisplatina, restrições tais como aparecimento de resistência celular, efeitos colaterais severos e baixa solubilidade em água maximizaram os esforços dedicados ao desenvolvimento de novos quimioterápicos que fossem capazes de reverter essas limitações.

A princípio, muitos esforços foram dedicados na preparação de complexos análogos à cisplatina, incluindo modificações nos ligantes amino doadores ou substituição dos cloretos lábeis por carboxilatos [11]. Esses novos compostos foram designados como compostos de platina de segunda geração.

O grupo de pesquisa da professora Elene C. P. Maia adotou a estratégia de substituir os dois grupos aminos por antibióticos da família das tetraciclinas [12], como representado na Figura 1. As tetraciclinas constituem um dos grupos mais importantes de antibióticos. Os compostos desse grupo são considerados fármacos seguros, pois não apresentam efeitos colaterais severos. Estudos com os complexos de platina(II) formados com os antibióticos doxiciclina (dox) e tetraciclina (tc) mostraram que esses compostos entram nas células cancerosas, interagem com o ADN e inibem o crescimento das mesmas.

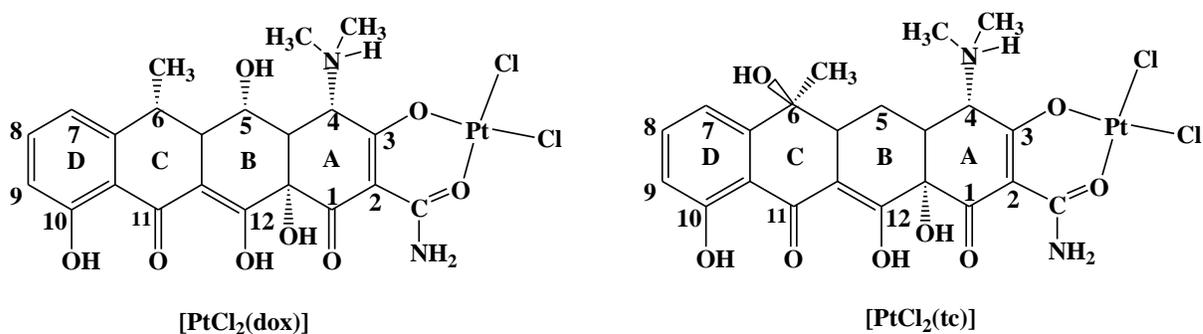


Figura 1. Estruturas propostas para os complexos de [PtCl₂(dox)] e [PtCl₂(tc)].

Alguns dos compostos de segunda geração são usados na clínica médica e outros estão, atualmente, em ensaios clínicos [13]. Carboxiplatina e oxaliplatina são dois exemplos

bem sucedidos dessas modificações, esses compostos juntamente com a cisplatina são aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) para administração como agentes antineoplásicos. Existe consenso entre os pesquisadores que o principal mecanismo de ação associado a esses três metalofármacos é a capacidade deles em estabelecer ligações covalentes coordenadas com as nucleobases do ADN [14].

Em continuidade ao desenvolvimento de complexos ativos contra linhagens de células resistentes à cisplatina, foram desenvolvidos os compostos multinucleares de platina(II). Os trabalhos do grupo de pesquisa do professor Farrell abriram novos caminhos para pesquisa nesse ramo, onde muitos compostos polinucleares de Pt(II) foram desenvolvidos. Alguns apresentaram citotoxicidade comparável à cis-DDP em células sensíveis e foram ativos em células resistentes. O composto trinuclear $\{[\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2]_2\mu\text{-}[\text{trans-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2)]\}^{4+}$, conhecido como BBR3464, em testes pré-clínicos revelou citotoxicidade em concentrações até mil vezes menor que a cisplatina. Contudo na fase I de ensaios clínicos o composto apresentou toxicidade sistêmica e na fase II apresentou-se como um antitumoral ineficiente. Estudos de modelo sugerem que isto pode ser devido a uma combinação de baixas doses que podem ser administradas devido à toxicidade e a reatividade elevada, o que causa degradação rápida do fármaco *in vivo* [15, 16].

Outra estratégia para desenvolvimento de uma nova classe de antitumorais de platina consistiu na preparação de compostos de platina(IV). A vantagem adicional conferida por esses complexos de Pt(IV) em relação aos clássicos complexos de Pt(II) relaciona-se com a possibilidade de variação da lipofilia e do controle do potencial de redução do complexo pela alteração dos ligantes nas posições axiais, o que possibilita a ação desses complexos em linhagens resistentes à cisplatina [17].

Milhares de complexos de platina já foram preparados e testados quanto à atividade antitumoral, mas somente alguns mostraram atividade comparável à cisplatina [11]. Contudo, é importante ressaltar que o modo de interação de complexos metálicos com o ADN formando ligações covalentes coordenadas não é exclusivo dos compostos de platina. Com objetivo de produzir compostos mais eficazes e menos tóxicos, também foram empregados esforços no desenvolvimento de quimioterápicos com outros centros metálicos, os compostos de rutênio são exemplos dessa nova linha de pesquisa [18].

Complexos de rutênio não impedidos estericamente e que possuem pelo menos um ligante lábil têm capacidade de estabelecer ligação covalente coordenada com o ADN e este é aceito como o principal mecanismo de ação de muitos complexos com esse metal. Um exemplo de complexo de rutênio que se liga covalentemente ao ADN é o cis-bis(1,10-fenantrolina)diclororutênio(II) [19]. Devido às diferentes possibilidades de geometrias e conformação de ligantes, os compostos de rutênio se ligam ao ADN e afetam sua conformação de modo diferente da cisplatina e compostos análogos de Pt(II) [20].

Para alguns complexos de Ru^{3+} é necessária sua redução a Ru^{2+} para então sofrerem as reações de aquação e serem ativados para atingirem o ADN, que é um dos alvos desses antitumorais. Esse aspecto mostra-se como uma vantagem adicional em relação aos compostos de platina, pois os complexos de rutênio são seletivamente ativados nos tecidos cancerosos que são menos oxigenados e mais ácidos que os tecidos normais. Essas condições propiciam ambiente adequado para redução do metal. As alterações bioquímicas que acompanham a formação de tumores alteram o ambiente fisiológico, deixam-no mais ácido e com menor concentração de oxigênio em relação aos tecidos saudáveis, o que propicia as reações de redução necessárias para ativação dos complexos de rutênio [21].

Atualmente, compostos de rutênio têm recebido considerável atenção devido aos complexos $[\text{ImH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{Im})(\text{dmsO})]$ (NAMI-A) e $[\text{ImdH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{Imd})_2]$ (KP1019), onde In=pirazol e Imd= imidazol, representados na Figura 2, terem entrado em ensaios clínicos como agentes antitumorais [22].

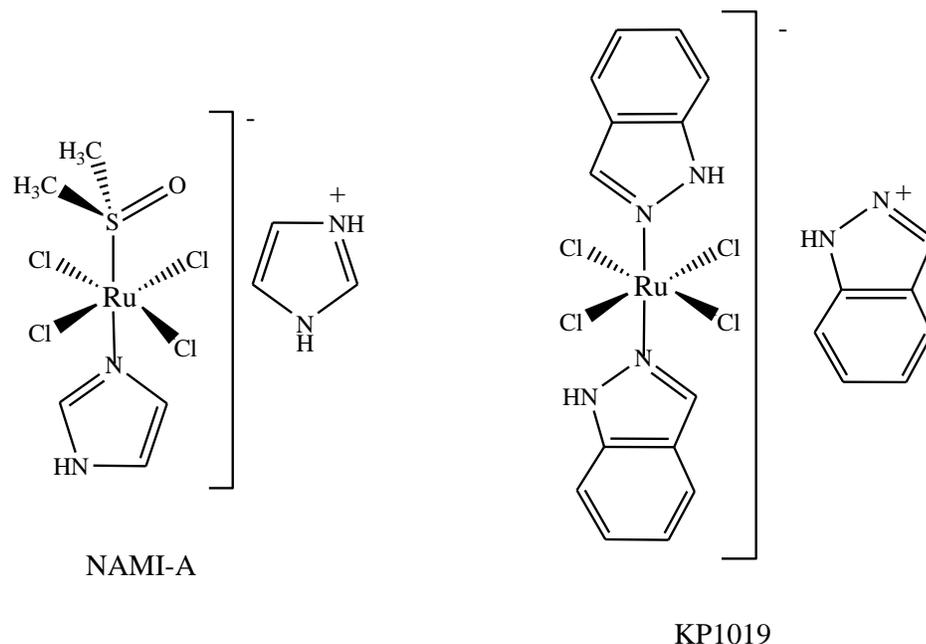


Figura 2. Estrutura dos complexos NAMI-A e KP1019.

A velocidade de aquação do NAMI-A é mais elevada do que a da cisplatina, e, conseqüentemente, a sua ligação ao ADN é também mais rápida. Somado a isso, NAMI-A modifica a dupla hélice de ADN de um modo diferente do modo da cisplatina. Bacac *et al* mostraram que o ligante dmsO pode ser trocado por uma molécula de água, o que resulta no aquacomplexo ativo $[\text{trans-RuCl}_4(\text{H}_2\text{O})(\text{Im})]^-$, que é a espécie que se liga ao ADN [23].

Bergamo *et al* propuseram que a atividade do composto KP1019 deve mais a um efeito citotóxico direto sobre as células de tumor do que a uma interferência nos processos de invasão de células de tumor e metástase [24].

2. Complexos metálicos que interagem com o ADN de forma não-covalente

Muita pesquisa tem sido dedicada ao estudo das interações covalentes coordenadas de complexos metálicos com o ADN, especialmente no campo de quimioterápicos à base de platina. Contudo, nas últimas décadas, novos modos de interação de complexos metálicos com o ADN têm despertado a atenção de muitos pesquisadores. Os complexos que interagem com o ADN por intercalação são complexos inertes.

Das interações não covalentes de compostos metálicos com o ADN, a intercalação, possivelmente, é a interação mais comumente estudada. A intercalação como um modo de associação de uma molécula com o ADN foi proposta pela primeira vez em 1961 por Lerman para explicar a forte afinidade do ADN por moléculas aromáticas heterocíclicas [25].

Intercaladores são moléculas que possuem anéis aromáticos que, por serem planos, podem se inserir entre os pares de base da dupla hélice do ADN. No ADN forma B, o mais comum, os planos das bases nitrogenadas, as quais formam pares unidos por ligações de hidrogênio, são praticamente perpendiculares ao eixo da hélice. Esses pares de bases são estabilizados por essas ligações de hidrogênio e pelas interações de van der Waals estabelecidas entre os pares de bases planares, o que possibilita o empilhamento das bases nucleotídicas. Compostos aromáticos podem empilhar entre os pares de bases de ADN, sendo estabilizados por meio de interações dipolo-dipolo.

A intercalação de um composto aromático entre os pares de bases nitrogenadas causa alterações hidrodinâmicas no ADN, devido a mudanças provocadas nos ângulos de torção ribose-fosfato [25, 26]. Essas modificações estruturais resultam em mudanças funcionais e, conseqüentemente, inibem a transcrição e a replicação celular, além de impedirem os processos de reparação do ADN. Estes efeitos são totalmente revertidos após a remoção do

intercalador e a estrutura de dupla-hélice do ADN não é destruída pela remoção do intercalador [27].

Em razão da habilidade em inibir a síntese de ácidos nucléicos *in vivo*, existe muito interesse no estudo dos intercaladores, pois eles podem atuar como promissores agentes antitumorais. Intercaladores compõem o grupo mais importante de produtos químicos que interagem reversivelmente com a dupla hélice do ADN e são os medicamentos mais comumente usados na terapia anticancerígena. Como exemplo, pode-se citar a mitoxantrona, actinomicina e doxorubicina [28, 29].

A química de intercaladores do ADN, inicialmente restrita aos compostos orgânicos, expandiu-se, com sucesso, para os complexos metálicos que possuem ligantes bidentados com sistemas π estendidos. Os complexos metálicos podem apresentar propriedades fotofísicas e eletroquímicas que podem ser utilizadas como adjuvantes para impedir a replicação do ADN.

No início da década de 50, com os trabalhos do químico australiano Francis Dwyer sobre complexos polipiridílicos, surgiram as primeiras pistas da interação existente entre complexos inertes e o ADN. Dwyer e colaboradores investigaram as atividades biológicas de complexos de coordenação simples, tais como o rutênio complexado aos ligantes 2,2'-bipiridina e 1,10-fenantrolina. Eles descobriram que alguns complexos exibiam atividades bacteriostática e bactericida e eram capazes de inibir o crescimento de tumor em um modelo xenográfico⁴ em rato [30].

Em 1974, enquanto investigavam a ligação de metais a bases tioladas, Lippard e colaboradores prepararam o complexo planar $[\text{Pt}(\text{terpy})\text{Cl}]^+$ (terpy = 2,2':6',2''-terpiridina) e perceberam que esse complexo induzia uma mudança na estrutura tridimensional do ARN transportador. Estudos posteriores mostraram que o complexo $[\text{Pt}(\text{terpy})\text{Cl}]^+$ por possuir o

⁴ Modelo xenográfico: consiste na implantação de tumores humanos no tecido subcutâneo de camundongos geneticamente modificados de linhagem com ausência de linfócitos [31].

ligante planar terpiridina interagiu de modo não covalente com o ADN, de modo semelhante ao dos corantes planares [32]. Contudo, a presença do cloreto, um ligante lábil, permitia ao complexo $[\text{Pt}(\text{terpy})\text{Cl}]^+$ também formar ligação covalente coordenada com o ADN [33].

Para confirmação da proposição de interação com o ADN por intercalação, foi sintetizado, pelo grupo de pesquisa do professor Lippard, o cátion complexo 2-hidroxietanotiolato(2,2'-terpiridina)platina(II), $[\text{Pt}(\text{terpy})(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH})]^+$, com o ligante 2-hidroxietanotiolato no lugar do cloreto para eliminar o sítio de coordenação lábil. Os autores demonstraram por uma série de estudos que o complexo catiônico $[\text{Pt}(\text{terpy})(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH})]^+$ liga-se fortemente ao ADN por um mecanismo envolvendo intercalação [32].

Em trabalhos subsequentes, Lippard e colaboradores expandiram a família de intercaladores de modo a incluir outros complexos com ligantes heterocíclicos planares, foram preparados os complexos $[\text{Pt}(\text{bpy})(\text{en})]^{2+}$, $[\text{Pt}(\text{phen})(\text{en})]^{2+}$ e $[\text{Pt}(\text{phi})(\text{en})]^{2+}$, onde en = etilenodiamino, phen=1,10-fenantrolina e phi = 9,10-fenantrenoquinona diimina [34]. Lippard e colaboradores demonstraram que complexos quadráticos com platina(II) contendo grupos heterocíclicos planares como ligantes poderiam ligar-se ao ADN de forma não-covalente, intercalando entre os pares de base. Dessa forma, Lippard lançou as bases para futuros trabalhos de ligação de complexos metálicos ao ADN pelo modo de intercalação.

Os metalintercaladores foram estendidos para três dimensões com os trabalhos da professora Jackeline K. Barton e colaboradores [35-37]. Os primeiros experimentos descrevendo a intercalação de complexos octaédricos ao ADN foram focados nos complexos tris(1,10-fenantrolina) de rutênio, crômio, zinco, níquel e cobalto. Foi proposto que os complexos catiônicos $[\text{M}(\text{phen})_3]^{n+}$, onde M = Ru, Cr, Zn, Ni ou Co e n = número de oxidação do metal, ligavam-se ao ADN de forma não-covalente e dual: intercalação parcial de uma das fenantrolinas entre os pares de base nucleotídicas localizados no sulco maior e

interações hidrofóbicas no sulco menor [38]. Intercalação e ligação à cavidade menor do ADN são, de fato, os dois modos mais comuns de associação não covalente de pequenas moléculas com ácidos nucleicos. A extensão da intercalação e a eficiência da ligação de complexos metálicos ao sulco do ADN dependem de certas condições, tais como: temperatura, força iônica, carga do centro metálico e a sequência de bases de ADN [37].

Estudos com complexos metálicos tris(1,10-fenantrolina) proveram bases para a conceitualização de como complexos octaédricos poderiam interagir com o ADN. Embora uma das fenantrolinas se intercale parcialmente entre os pares de base nitrogenadas, a afinidade dos cátions complexos $[M(\text{phen})_3]^{n+}$ pelo ADN mostrou-se pouco expressiva [39]. Um acréscimo na extensão do número de anéis aromáticos heterocíclicos confere aos ligantes intercalativos maior caráter π -acceptor e, conseqüentemente, aumentam significamente a afinidade dos seus complexos pelo ADN. Compostos de conjugação estendida derivados da 1,10-fenantrolina têm sido relatados como ligantes estratégicos para preparação de metalintercaladores. Os compostos dipirido[3,2-a:2'3'-c]fenazina (dppz) e dipirido[3,2-f:2',3'-h]quinoxalina (dpq), por exemplo, combinam interessantes propriedades, tais como: habilidade de ligar-se de forma bidentada ao metal, rigidez e estrutura aromática planar altamente conjugada [40].

O ligante dppz possui alto grau de conjugação e, portanto, apresenta transições do tipo $\pi^* \rightarrow \pi$ de baixa energia, características que conferem a essa molécula luminescência com elevada eficiência quântica. Complexos polipiridínicos de rutênio com o ligante dppz são usados como marcadores luminescentes do ADN. O complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$, por exemplo, tem sua luminescência aumentada de um fator de 10^4 quando em presença de ADN, cuja constante de ligação ao complexo é da ordem de 10^6 M^{-1} [41]. Devido à combinação bem sucedida de estabilidade química, propriedades eletroquímicas, reatividade dos estados

excitados e luminescência com bons rendimentos quânticos e tempos de vida longos, esses complexos polipiridínicos de rutênio podem atuar como efetivos agentes clivadores do ADN quando submetidos a estímulos luminosos [42-45], sendo bons candidatos à terapia foto dinâmica.

Também têm sido reportados metalointercaladores bifuncionalizados que consistem em complexos que podem ligar-se ao ADN de forma covalente coordenada e que também possuem ligantes como braços laterais aromáticos que podem intercalar-se entre os pares de bases do ADN. Esses compostos interagem com o ADN de duas formas simultaneamente: (a) formação de ligação covalente coordenada entre o metal e os pares de base do ADN e (b) intercalação do ligante aromático desses complexos com os pares de base do ADN [46, 47].

Os agentes que interagem com o ADN de modo intercalativo são complexos que possuem ligantes planares estendidos e que são cineticamente inertes, geralmente, são de íons metálicos de configuração eletrônica d^6 (octaédricos) ou d^8 (quadráticos). Muitos desses complexos exibem estrutura tridimensional rígida. A maioria dos complexos que são modelados para esse fim são fotoquimicamente ativos.

3. Complexos metálicos que induzem a clivagem do ADN

Complexos metálicos também podem reagir com o ADN e o ARN promovendo clivagem da fita dessas macromoléculas. As reações de complexos de metais de transição com polinucleotídeos geralmente seguem duas categorias: as que envolvem reações de oxidorredução do centro metálico e, conseqüentemente, mediam a oxidação do ácido nucléico e as que envolvem coordenação do centro metálico ao esqueleto ribose-fosfato e mediam a hidrólise do polímero [48].

O ADN e o ARN são polímeros naturais muito estáveis e, conseqüentemente, de elevada resistência à hidrólise. Os fosfodiésteres que formam as fitas do ADN são excepcionalmente estáveis, o tempo de meia-vida para que sofram hidrólise espontânea em condições fisiológicas é de 130 mil anos [49]. As cadeias fosfodiester são estáveis o suficiente para ajustar-se ao seu papel na manutenção da integridade do material genético [50]. No entanto, a hidrólise das ligações fosfodiester é imprescindível para manutenção da vida celular. Entre as funções que necessitam da clivagem da ligação fosfodiester pode-se citar a reparação do ADN e a hidrólise de ARNs mensageiros a fim de que a proteína codificada não seja sintetizada de forma desnecessária [51]. Existem nos organismos vivos enzimas com centros ativos metálicos, também conhecidas como nucleases, que desempenham essa função de catalisar a hidrólise dos ésteres de fosfato. O papel biológico dessas metaloenzimas inclui ainda a degradação ou digestão de polímeros e desempenho na defesa viral (enzimas restritivas) [52].

Nas nucleases, os íons metálicos são cofatores essenciais e estão diretamente envolvidos na hidrólise de fosfodiésteres [53]. Em comparação com a reação não-catalisada, as nucleases aumentam a velocidade da clivagem hidrolítica de uma ligação fosfodiester de um de fator de 10^{12} [54]. Entre as nucleases naturais, podem ser citadas as fosfatases.

Devido à função das nucleases naturais de catalisar a clivagem hidrolítica da cadeia de fosfodiésteres do ADN em condições fisiológicas, há um crescente interesse no desenvolvimento de nucleases químicas sintéticas que possam reconhecer e clivar estruturas ou sequências específicas do ácido nucléico [55]. Muitas nucleases são capazes de clivar a dupla fita do ADN. A clivagem da dupla fita é mais letal para a célula, pois é mais difícil de ser refeita pelos processos de reparação enzimática [56]. Dessa forma, nucleases sintéticas podem ser uma interessante estratégia para preparação de agentes antineoplásicos mais

resistentes a um dos mecanismos de defesa celular que consiste na amplificação do processo de reparação do ADN.

Dois mecanismos principais estão envolvidos na atividade de nucleases artificiais: hidrolítico e oxidativo. Devido à geração de radicais livres pelo processo oxidativo, existe uma preferência pela preparação de nucleases que atuem por processo hidrolítico. Contudo, a susceptibilidade do anel de ribose à oxidação levou à utilização de muitos complexos que clivam o ADN por mecanismo oxidativo [57].

A primeira nuclease sintética foi descoberta por Sigman e colaboradores enquanto estudavam mecanismos de inibição da polimerase do ADN de *Escherichia coli* pelo ligante 1,10-fenantrolina no final dos anos 70. Após árdua investigação eles perceberam que a espécie ativa bis(1,10-fenantrolina)cobre(I) na presença de peróxido de hidrogênio era responsável por promover eficientemente a clivagem do ADN [58, 59]. Na primeira etapa do mecanismo de ação nucleolítica do bis(1,10-fenantrolina)cobre(I) ocorre a formação do intermediário essencial, que consiste na ligação reversível do complexo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ ao sulco menor do ADN. A segunda etapa é dada pela oxidação do intermediário $[\text{ADN}-\text{Cu}^+(\text{phen})_2]$ por peróxido de hidrogênio. As espécies reativas de oxigênio formadas induzem a clivagem da fita do ADN pela abstração de um hidrogênio da desoxirribose [54].

Complexos de cobre e de alguns outros metais de transição, especialmente o ferro, cujo metal está no estado de oxidação reduzido, na presença de oxigênio ou peróxido de hidrogênio podem promover a formação de radicais livres via reação de Fenton e reação de Haber-Weiss. As espécies reativas de oxigênio formadas têm potencialidade para degradarem o anel ribose do ADN.

A aplicação da reação de Fenton para promover clivagem do ADN em um sítio específico foi reportada pela primeira vez por Dervan e colaboradores [60] na modelagem do

complexo Ferro-bleomicina. Bleomicina é um glicopeptídeo, de origem natural, que possui ação antitumoral e atividade antibiótica.

Outro complexo de ferro que cliva eficazmente o ADN com o emprego de mecanismo oxidativo é o composto formado por etilenodiaminotetraacético (edta) e o íon ferroso [60]. O complexo $[\text{Fe}(\text{edta})]^{2-}$ na presença de H_2O_2 ou O_2 e um agente redutor, que atua como catalisador da geração de radicais hidroxilas, cliva eficientemente tanto fita simples quanto fita dupla do ADN. O íon ferroso, tal como outros íons metálicos redox-ativos, por si só, mesmo na presença de peróxido de hidrogênio, não parece interagir apreciavelmente com o ácido nucléico. Contudo, quando complexado a um ligante aniônico como edta produz radicais hidroxilas em quantidades apreciáveis resultando na clivagem do ADN [48].

Apesar da eficiente atividade de clivagem do ADN promovida pelos complexos metálicos que atuam por mecanismo oxidativo, as nucleases sintéticas hidrolíticas têm atraído considerável atenção devido à sua capacidade de clivar o ADN em sequências seletivas distintas das enzimas naturais [61] e por conduzirem a clivagem da ligação fosfodiéster de modo a formar fragmentos de ADN que podem ser religados enzimaticamente, o que não é possível quando a clivagem da fita do ADN é feita por mecanismo oxidativo [62].

Nas nucleases naturais os íons $\text{Mg}(\text{II})$, $\text{Ca}(\text{II})$ e $\text{Zn}(\text{II})$ foram recrutados para clivar as ligações fosfodiéster, devido à capacidade desses íons de diminuir o pK_a da molécula de água coordenada, criando assim um nucleófilo hidroxila ativo. Observando as nucleases naturais conclui-se que o principal critério para a atividade hidrolítica eficaz consiste na presença de um íon metálico que atue como um bom ácido de Lewis, que tenha boa afinidade por ligantes duros como oxigênio e que possua boa labilidade substitucional. Os íons metálicos de transição mais eficazes para atuar como centro ativo em nucleases sintéticas hidrolíticas são $\text{Zn}(\text{II})$, $\text{Cu}(\text{II})$ e $\text{Fe}(\text{III})$ e o metal alcalino terroso $\text{Ca}(\text{II})$ [63].

Embora existam muitos sistemas mononucleares que são hidroliticamente eficazes [63, 64], há uma tendência atual de preparação de compostos di e multinucleares, de forma similar às nucleases naturais, para atuarem como nucleases hidrolíticas artificiais [65]. Nesse sentido, vários compostos metálicos inspirados em metaloenzimas que catalisam a hidrólise de ésteres de fosfato têm sido sintetizados. O grupo de pesquisa do professor Ademir Neves tem desenvolvido pesquisa pioneira no Brasil nesta área [66-70].

De modo geral, o mecanismo de quebra hidrolítica da fita do ADN é resultado do ataque nucleofílico de uma espécie M-OH, onde M= íon metálico, a um dos oxigênios do fosfato da cadeia do ADN. Dessa forma, é formado um intermediário de fósforo pentacoordenado e posteriormente as etapas seguintes levam à fragmentação da fita de ADN.

Como já foi dito, a mais importante aplicação de complexos metálicos na clínica médica é no tratamento do câncer. Entretanto, existem problemas associados ao seu uso, em particular efeitos colaterais e o aparecimento de resistência celular, que ainda não foram resolvidos. Várias estratégias têm sido empregadas visando à obtenção de novos fármacos que não sejam reconhecidos pelos mecanismos de resistência celular e que apresentem especificidade para células tumorais. Entre elas pode-se citar modificação do centro metálico, alteração do nox dos centros metálicos, introdução de ligantes com sistema aromático estendido, complexos multinucleares etc. A nossa estratégia neste trabalho para reverter problemas de resistência e diminuir efeitos colaterais será associar antibióticos a metais que já possuam atividade antitumoral associada.

Neste trabalho, serão relatadas a síntese, caracterização físico-química, no estado sólido e em solução, interações com o ADN e atividade citotóxica de alguns complexos ternários inéditos de cobre(II) e rutênio(II).

OBJETIVOS

A nossa estratégia para o desenvolvimento de novos fármacos é a de combinar íons metálicos que possuem propriedades antitumorais, Cu(II) e Ru(II), com ligantes que também apresentam citotoxicidade, a fim de obter complexos mais ativos.

Mais especificamente, pretende-se:

1- Sintetizar e caracterizar físico-quimicamente novos complexos ternários⁵ de Cu(II) com tetraciclinas e 1,10-fenantrolina. A estratégia consiste em aliar as propriedades dos antibióticos tetraciclina ou doxicilina às do complexo de cobre com a 1,10-fenantrolina. O complexo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ é capaz de promover a quebra da fita do ADN [58, 59].

2- Preparar e caracterizar físico-quimicamente complexos ternários inéditos de Cu(II) com ligantes N-doadores do tipo α,α -diaminas⁶ e hidrazidas dos ácidos 2-tiofenocarboxílico e 2-furóico. Como no caso anterior, já há relatos na literatura da atividade citotóxica de complexos metálicos destes ligantes [71].

3- Sintetizar e caracterizar físico-quimicamente novos complexos ternários de rutênio(II), a partir do precursor cis-diclorotetraquis(dimetilsulfóxido)rutênio(II). A química de complexos de rutênio-dmso tem sido amplamente desenvolvida devido ao fato de essas espécies exibirem atividade antitumoral e serem pouco tóxicas [72 – 75]. Preparar ligantes inéditos através da reação de condensação de um composto heterocíclico contendo a estrutura α,α -diamina (1,10-fenantrolina-5,6-diona) com hidrazidas dos ácidos 2-tiofenocarboxílico e 2-furóico, a fim de aprimorar a extensão de intercalação do composto entre os pares do ADN.

⁵ Complexos ternários são compostos que possuem três constituintes, cuja formação pode ser simplificada pelas reações de equilíbrio: (i) $\text{M} + \text{A} \rightleftharpoons \text{MA}$; (ii) $\text{MA} + \text{L} \rightleftharpoons \text{MAL}$; onde M= íon metálico, A= ligante primário e L= ligante secundário.

⁶ α,α -diamina: consiste no grupo funcional $-\text{N}=\text{C}-\text{C}=\text{N}-$, compostos com essa estrutura são comumente utilizados na química de coordenação sendo conhecidos como ligantes N-doadores (exemplos: 1,10-fenantrolina, 2,2'-bipiridina e 1,10-fenantrolina-5,6-diona).

- 4- Estudar o efeito citotóxico dos compostos em células tumorais.
- 5- Estudar a interação dos compostos com a molécula do ADN.
- 6- Estudar o efeito fotocitotóxico dos complexos sintetizados.

**CAPÍTULO 1: PARTE EXPERIMENTAL: MATERIAIS, INSTRUMENTOS E
MÉTODOS, PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E SÍNTESES.**

1- MATERIAIS

1.1- 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 um paciente 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 CO₂. O meio RPMI 1640 e o soro fetal foram adquiridos da Biosan® em Belo Horizonte.

Os testes de citotoxicidade, acumulação intracelular de cobre, extração do ADN intracelular e posterior determinação da quantidade de cobre foram todos realizados no laboratório de pesquisa da professora Elene C. Pereira Maia.

1.2- Reagentes e solventes

A água utilizada nas sínteses e no preparo das soluções foi purificada em aparelho deionizador da marca Millipore, SinPak®.

Todos os reagentes e solventes utilizados neste trabalho são de grau analítico e nenhum deles passou por purificação prévia. A Tabela 1 apresenta informações sobre os reagentes e solventes utilizados neste trabalho.

Tabela 1. Algumas propriedades e dados dos reagentes e solventes utilizados nos procedimentos e preparações.

Nome do reagente ou Solvente	Fórmula química (MM)	Marca/lote
1,10-fenantrolina monohidratada	$C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$ (198,24 g/mol)	Aldrich / STBC4883V
2,2'-bipiridina	$C_{10}H_8N_2$ (156,19 g/mol)	Vetec / 0905574
Acetonitrila	CH_3CN (41,05 g/mol)	Tedia / 912411R
Ácido acético	CH_3COOH (60,04 g/mol)	Sigma-Aldrich / 90700
Ácido Clorídrico	HCl (36,46 g/mol)	Fmaia / 43066
Ácido nítrico ultrapuro	HNO_3 (63,01 g/mol)	Suprapur / 1004410250
Ácido nítrico fumegante	HNO_3 (63,01 g/mol)	Vetec / 1009067
Ácido sulfúrico	H_2SO_4 (98,08 g/mol)	Vetec / 0502270
Brometo de potássio	KBr (119,01 g/mol)	Sigma / 034K0203
Brometo de sódio	NaBr (102,89 g/mol)	Vetec / 0

Cloreto de cálcio	CaCl ₂ (110,98 g/mol)	Vetec / 022901
Cloreto de magnésio	MgCl ₂ (95,21 g/mol)	Synth / 58361
Cloreto de potássio	KCl (74,55 g/mol)	Vetec / 022196
Cloreto de sódio	NaCl (58,44 g/mol)	Vetec / 012433
Cloreto de rutênio(III)	RuCl ₃ (207,42 g/mol)	Aldrich / WI 53201
Cloridrato de doxiciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ ·HCl (480,91 g/mol)	Sigma / 58H0946
Cloridrato de tetraciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ ·HCl (480,91 g/mol)	Sigma / 107K07642
Clorofórmio	CHCl ₃ (119,38 g/mol)	Synth / 27300
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂ (84,93 g/mol)	Merck / 1060501000
Dimetilsulfóxido	C ₂ H ₆ OS (78,13 g/mol)	Synth / 103518
Etanol	C ₂ H ₆ O (46,06 g/mol)	Synth / 90450
Éter etílico	C ₄ H ₁₀ O (74,12 g/mol)	Vetec / 0501856
Hepes	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S (238,30 /mol)	Sigma / 77H5437

Hexafluorofosfato de amônio	NH_4PF_6 (163,00 g/mol)	Sigma-Aldrich / 09820
Hidrazida do ácido 2-furóico	$\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{OS}$ (126,12 g/mol)	Aldrich / S114495087
Hidrazida do ácido 2-tiofenocarboxílico	$\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$ (142, 21 g/mol)	Aldrich / 080M1239V
Hidróxido de sódio	NaOH (40,00 g/mol)	Fmaia / 114700
Metanol	CH_4O (32,04 g/mol)	Synth / 142693
Nitrometano	CH_3NO_2 (61,04 g/mol)	Vetec / 004092
n-octanol	$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$ (130,23 g/mol)	Synth / 87608
Perclorato de cobre(II) hexaidratado	$\text{CuO}_8\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (370,53 g/mol)	Aldrich / 11504LH
Sulfato de sódio	Na_2SO_4 (142,04 g/mol)	Sigma-Aldrich / 1203H57

Para extração do ADN utilizou-se um Kit adquirido da Sigma® (Sigma's GenElute Mammalian ADN genômico Miniprep Kit).

O ADN utilizado nas titulações espectrofotométricas foi o sal de sódio de ADN de timo de vitelo (CT-DNA) obtido da Sigma Co.

2- INSTRUMENTOS E MÉTODOS

2.1- Análise Elementar - CHN

Os compostos foram encaminhados para análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio. A dosagem do teor desses elementos nos complexos e ligantes preparados foi realizada no equipamento Perkin Elmer - modelo 2400.

2.2- Absorção Atômica

A porcentagem de cobre nos complexos foi determinada com auxílio do espectrofotômetro de absorção atômica Hitachi - modelo Z8200.

As quantidades de cobre dentro das células, nas amostras de ADN e nas alíquotas coletadas para definição do coeficiente de partição foram determinadas por absorção atômica em um espectrofotômetro Varian[®], modelo Zeeman AA240Z, equipado com forno de grafite (GFAAS), atomizador e amostrador automático.

2.3- Análises Condutimétricas

A condutividade molar dos complexos foi obtida com auxílio de um aparelho da marca Digimed, modelo DM 31, usando uma constante de célula $1,06 \text{ cm}^{-1}$. Foram feitas soluções $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ dos complexos em nitrometano ($\Lambda_M = 8,80 \text{ } \mu\text{S/cm}$) de grau espectroscópico. As análises foram realizadas após a calibração do equipamento com solução padrão de brometo de tetrametilamônio ($\Lambda_M = 102,20 \text{ } \mu\text{S/cm}$) da Digimed[®] à temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.4- Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

As amostras foram preparadas na forma de pastilhas com brometo de potássio em grau espectroscópico. Estas pastilhas foram introduzidas diretamente no caminho óptico do equipamento para leitura do percentual de transmitância. O aparelho usado foi um Perkin-Elmer 283B, na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

2.5- Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível

Os espectros eletrônicos foram registrados em um espectrofotômetro duplo feixe Cary 100 Varian. As análises foram realizadas em cubetas de quartzo com 0,1; 1,0 e 10,0 centímetros de caminho óptico. As amostras foram dissolvidas em água deionizada ou dimetilsulfóxido.

2.6- Reflectância Difusa

Os espectros de refletância difusa (UV-Vis no estado sólido) foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC.

2.7- Ressonância Paramagnética Eletrônica - RPE

Os espectros de RPE foram registrados no estado sólido e em solução metanólica congelada a 77K. O espectrofotômetro RPE utilizado foi BRUKER, modelo EMX, operando na frequência de banda-X (9,49 GHz). Essas análises foram realizadas na Universidade de São Paulo em colaboração com a professora Ana Maria da Costa Ferreira.

2.8- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN de ^1H

Os experimentos em um espectrômetro de RMN Bruker Advance DRX 200 com frequência de 200 MHz. As amostras foram solubilizadas em 0,7 mL do solvente deuterado adequado e acondicionadas em tubo de 5 mm.

2.9- Espectrometria de Massas - ESI

Os espectros de massas foram feitos no modo positivo a 180°C a partir de soluções MeOH:H₂O (50:50) dos compostos . As amostras foram injetadas no aparelho por infusão direta. Os espectros de massas dos complexos **1** e **2** foram adquiridos no equipamento MicroTOF Ic Bruker Daltonics da Central Analítica do Instituto de Química da USP e os demais espectros de massas foram registrados no equipamento Thermo Scientific LCQ Fleet em colaboração com o professor Rodinei Augusti do Departamento de Química da UFMG.

2.10- Cristalografia de Raios X de Monocristal

Os dados de difração de raios X de monocristal do complexo **5** foram coletados a 293K em um difratômetro de Oxford Atlas Gémeos Ultra equipado com um tubo de molibdênio (MoK α $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite usando o Crysalis-Pro para coleta de dados e processamento de software [76]. A estrutura foi desenhada com auxílio do programa ORTEP-3 para Windows [77].

Os dados para difratometria de raios X dos monocristais dos complexos **3** e **6** foram coletados em um difratômetro Enraf-Nonius CAD – 4 [78] equipado com um tubo de molibdênio (MoK α $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite à temperatura de 293 K. A redução de dados foi realizada com auxílio do programa HELENA do Platon [79]. As figuras

foram criadas através dos programas: PLATON [80] com elipsóides a 40% de probabilidade e MERCURY [81].

Para os três monocristais as estruturas cristalinas foram resolvidas por métodos diretos com a utilização do programa SIR97 [82] e refinadas pelo método dos mínimos quadrados com matriz completa com a utilização do programa SHELXL97 [83].

As estruturas cristalinas foram determinadas pelos grupos de pesquisa do professor Nelson Gonçalves Fernandes do Departamento de Química da UFMG (complexo **5**) e do professor Adailton Bortoluzzi do Departamento de Química da UFSC (complexos **3** e **6**).

3- PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1- Determinação do coeficiente de partição octanol-água

Para inferir sobre a lipofilia dos complexos foi usado um sistema com dois solventes imiscíveis, n-octanol e água. Esse sistema bifásico é o mais simples empregado como modelo interfacial de membranas biológicas e mostra a tendência de penetração e permeabilidade de fármacos nas mesmas, cujas características são relacionadas à lipofilia das moléculas.

Para determinação do coeficiente de partição foram adicionados em um frasco de vidro, 100 μL de solução aquosa $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do composto, seguido da adição de 1400 μL de água deionizada e 1500 μL de n-octanol. No final, obteve-se uma mistura água/octanol 50% (v/v). O frasco foi hermeticamente fechado, colocado em ambiente escuro e mantido sob agitação vigorosa por 24 horas. Passado esse período, a mistura foi centrifugada e em seguida foram retiradas aliquotas de ambas as fases para serem dosados por GFAAS.

O coeficiente de partição n-octanol-água (K_{ow}) para os complexos foi determinado pelo total de cobre medido na fase n-octanólica dividido pelo total de cobre encontrado na fase aquosa.

3.2- Testes de citotoxicidade em células tumorais

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 designado como CI_{50} . Para isto, $1,0 \times 10^5$ células mL^{-1} foram incubadas durante 72 horas na ausência e na presença de várias concentrações dos ligantes e complexos testados. Após este período, as células foram contadas e o valor de CI_{50} foi determinado com o auxílio do programa computacional OriginPro8, sendo os dados analisados com ajuste sigmoidal (Boltzmann). A viabilidade das células foi verificada por exclusão com azul de

Tripan e o número de células foi determinado por análise no contador Coulter. As soluções-estoque dos ligantes e dos complexos foram preparadas em água. As faixas de concentração utilizadas para ligantes e complexos são descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Faixas com as concentrações utilizadas dos ligantes e complexos

Compostos	Faixa de concentração utilizada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
dox	10,0 a 35,0
tc	25,0 a 80,0
phen	0,5 a 8,0
bpy	20,0 a 40,0
Shyd	> 400
Ohyd	> 400
pdShyd	0,5 a 5,0
pdOhyd	0,5 a 5,0
complexo 1	0,5 a 5,0
complexo 2	0,5 a 8,0
complexo 3	0,5 a 8,0
complexo 4	5,0 a 30,0
complexo 5	0,5 a 8,0
complexo 6	20,0 a 37,0
complexo 7	25,0 a 50,0
complexo 8	25,0 a 50,0

3.3- Testes de fotocitotoxicidade

Para estudos da fotocitotoxicidade, 1×10^5 células mL^{-1} foram incubadas no escuro por cinco horas na ausência e na presença de diferentes concentrações dos complexos. Em

seguida, as células foram lavadas três vezes com tampão isotônico⁷ gelado. Após lavagem, as células foram ressuspensas em tampão isotônico e submetidas à irradiação por 5 minutos com luz UV-A (365nm, 610 $\mu\text{W cm}^{-2}$). Para esse procedimento foi utilizada uma cabine para análises de fluorescência Spectroline Modelo CX-20. Após irradiação, o tampão isotônico foi substituído pelo meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e as células foram incubadas no escuro por mais 72 horas. A sensibilidade aos compostos foi medida pela concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular (CI_{50}). Para comparação, ensaios de citotoxicidade foram realizados com protocolo idêntico, mas sem a exposição das células à irradiação. A Tabela 3 apresenta os valores das faixas de concentração utilizadas com tempo de incubação de 4h na ausência e na presença de 5 min de irradiação UV-A.

Tabela 3. Faixas de concentração dos complexos utilizadas nos estudos de fototoxicidade. Tempo de incubação de 4h na ausência e na presença de irradiação UV-A por 5min.

Complexos	Faixa de concentração citotóxica ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
	Sem irradiação	Com irradiação
1	0,5 a 5,0	0,1 a 1,5
2	1,0 a 9,0	0,1 a 4,0
3	1,0 a 5,0	0,5 a 3,0
4	10,0 a 50,0	5,0 a 25,0
5	2,0 a 8,0	0,5 a 6,0
6	20,0 a 80,0	5,0 a 40,0
7	20,0 a 90,0	12,0 a 25,0
8	20,0 a 90,0	10,0 a 27,0

⁷ Tampão isotônico preparado com 132,0 mmol L^{-1} NaCl; 3,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl; 1,0 mmol L^{-1} CaCl_2 ; 0,5 mmol L^{-1} MgCl_2 e 20,0 mmol L^{-1} HEPES, pH ajustado com solução de HCl para 7,3.

3.4- Determinação da acumulação intracelular de cobre

Após 72 horas de incubação de 1×10^5 células·mL⁻¹ com diferentes concentrações dos compostos estudados, uma alíquota foi retirada, lavada duas vezes com tampão isotônico gelado e o resíduo ressuspensionado em HNO₃ a 33%. A concentração de cobre intracelular foi determinada por Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS).

A concentração intracelular de cobre na ausência dos compostos estudados foi igual a $1,60 \times 10^{-16}$ mol·célula⁻¹, a qual corresponde à concentração fisiológica desse metal nas células da linhagem K562 [84]. Considerando-se que o volume de uma célula é de aproximadamente $1,0 \times 10^{-12}$ L [85], a concentração intracelular de cobre é de $1,60 \times 10^{-4}$ mol·L⁻¹. A concentração intracelular de cobre determinada sem a adição do complexo foi subtraída dos valores encontrados nas amostras que foram incubadas na presença dos compostos.

3.5- Determinação do número de adutos Cu-ADN

Para determinação do número de adutos Cu-ADN seguiu-se o seguinte protocolo: 2×10^6 células da linhagem K562 foram incubadas por duas horas (complexos **1** e **2**) e por 72 horas (complexos **3** a **6**) com diferentes concentrações dos complexos. Para extração do ADN utilizou-se um Kit adquirido da Sigma® (Sigma's GenElute Mammalian DNA genômico Miniprep Kit). Resumidamente, as células incubadas com os compostos foram lavadas duas vezes com o meio RPMI, posteriormente foram incubadas com RNase A⁸, a fim de obter um ADN genômico livre de ARN. Em seguida, as células foram tratadas com proteinase K e lisadas⁹ em uma solução contendo um sal caotrópico para assegurar a profunda desnaturação

⁸ RNaseA é uma ribonuclease que cliva a fita-simples do ARN.

⁹ A lise celular é um processo em que uma célula é quebrada ou destruída como resultado de alguma força externa ou condição.

de macromoléculas. Depois de lavar para remover contaminantes, o ADN foi eluído em uma solução de Tris-EDTA.

A concentração do ADN por nucleotídeos foi determinada por análise espectrofotométrica na região do UV-Vis utilizando-se a lei de Lambert-Beer, $A = \epsilon \cdot l \cdot c$; onde A é a absorvância, ϵ é a absortividade molar, l é o caminho óptico e c a concentração da substância absorvente no meio. A absortividade molar para a macromolécula de ADN é $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 260 nm, o que permite calcular a concentração do mesmo em uma solução [86]. A razão absorvância em 260 nm / absorvância em 280 nm variou na faixa de 1,6 a 1,9. A concentração de cobre foi determinada por absorção atômica em forno de grafite e auto amostrador.

3.6- Determinação das constantes de ligação ADN-complexo

Uma solução de ADN de timo de vitelo (CT-ADN) foi preparada em tampão Hepes (pH 7,2). A concentração dessa solução foi determinada através de espectros na região do UV-visível. Os cálculos foram feitos através da lei de Lambert-Beer. Para o CT-ADN, em λ de 260 nm ϵ é igual a $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Foram preparadas soluções dos complexos em tampão Hepes (pH 7,2) na concentrações de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ou $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, a concentração de CT-ADN adicionada às soluções dos complexos variou de 0 a $4 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

3.7-Testes de clivagem do ADN

Para os complexos **1** e **2** foram feitos testes para avaliar a capacidade desses compostos em promover a clivagem do ADN plasmidial.

O ADN plasmidial¹⁰ pode apresentar três conformações distintas que estão esquematicamente representadas na Figura 3. A forma superenovelada do ADN plasmidial (forma I, F I) é altamente tensionada. Quando FI sofre uma quebra simples (em apenas uma das fitas) ocorre o relaxamento da estrutura superenovelada e o ADN plasmidial assume a forma circular aberta (forma II, F II). Se houver outro evento de clivagem na cadeia complementar perto do local da primeira quebra, há a formação de uma quebra dupla e o ADN plasmidial fica na sua forma linear (forma III, F III). As três formas possuem mobilidade eletroforéticas diferentes, portanto podem ser separadas por eletroforese em gel de agarose e então analisada a quantidade e a forma de ADN clivado.

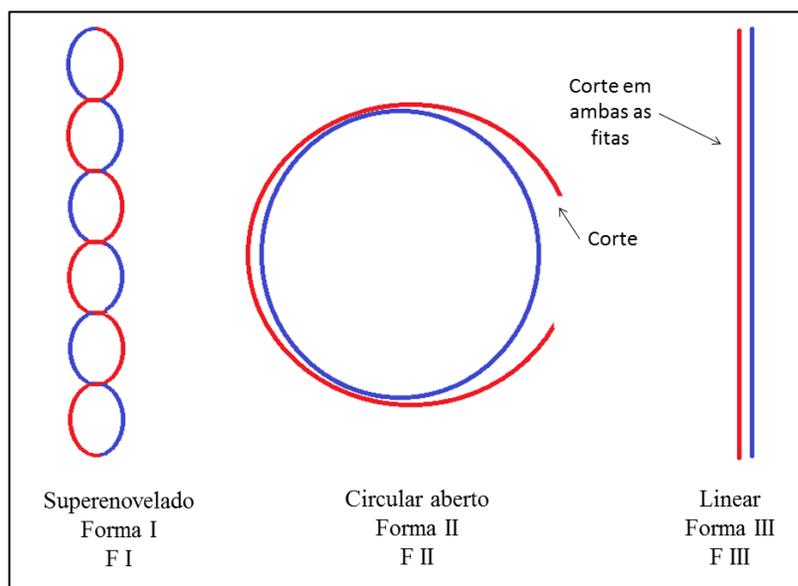


Figura 3. Representação esquemática das três formas das moléculas de ADN plasmidial

Os estudos de clivagem do ADN foram feitos no grupo de pesquisa do professor Hérnan Terenzi do Departamento de Bioquímica da UFSC.

¹⁰ Os plasmídeos são moléculas circulares duplas de ADN que estão separadas do ADN cromossômico. Geralmente ocorrem em bactérias e por vezes também em organismos eucarióticos.

3.8-Testes de fotoclivagem do ADN

Para os complexos **1** e **2** também foram feitos testes de clivagem do ADN plasmidial após exposição à luz UV-A por 5 minutos. Os resultados desses estudos foram muito promissores revelando um aumento de 40 vezes na clivagem do ADN plasmidial pela exposição à luz UV-A por 5 min.

3.9-Testes *in vivo*

Para o complexo **1**, o mais citotóxico, foram feitos ensaios de sobrevivência de camundongos após inoculação intraperitoneal¹¹ de 100µL de 1×10^6 células do tumor de *Ehrlich* em camundongos Balb C. Os camundongos foram tratados com o complexo **1** e com o com complexo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ para efeitos de comparação. Esses compostos foram administrados intraperitonealmente aos camundongos a cada dois dias até o 11º dia.

Esses testes foram realizados em colaboração com os professores Françoise Vasconcelos Botelho e Marcelo José Barbosa Silva do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia.

¹¹ O peritônio é uma membrana serosa de parede dupla que forra a parede abdominal e dela se reflete sobre as vísceras para revesti-las em variável extensão.

4- SÍNTESES

4.1- Síntese dos ligantes

4.1.1- Ligante **pdShyd** (C₁₇H₁₀N₄O₂S)

Em um balão de fundo redondo acoplado com sistema de refluxo foram dissolvidos 1,0 mmol (0,210 g) de 1,10-fenantrolina-5,6-diona (síntese descrita no capítulo 5, seção 1.1) em 50 mL de etanol. A essa solução adicionaram-se 1,5 mmol (0,213 g) de ácido 2-tiofenecarboxílico hidrazida (Shyd) e 10 mL de ácido acético. A solução resultante permaneceu em refluxo por 5 horas. Em um rotaevaporador o volume da solução foi reduzido à metade. O precipitado formado foi separado por filtração a vácuo, lavado com éter etílico frio e seco na pistola de Abderhalden¹² com vapor de clorofórmio. Rendimento: 83%.

4.1.2- Ligante **pdOhyd** (C₁₇H₁₀N₄O₃)

Procedimento semelhante ao usado para síntese do ligante **pdShyd** foi utilizado para preparação do **pdOhyd**, cuja única diferença consiste na adição de 0,189 g (1,5 mmol) de hidrazida do ácido 2-furóico (Ohyd) ao invés de 1,5 mmol de Shyd. Rendimento: 82%.

¹² A pistola de secagem Abderhalden é um aparato de vidro que consiste em uma câmara de vácuo cilíndrica de parede dupla que se localiza entre um frasco contendo solvente e um condensador de refluxo. As amostras são colocadas no cilindro, o qual é em seguida evacuado e mantido à temperatura de evaporação do solvente utilizado para refluxo.

4.2- Preparações dos complexos

4.2.1- [Cu(dox)(phen)(OH₂)(ClO₄)](ClO₄) – Complexo 1

O complexo **1** foi preparado pela mistura de uma solução de Cu(ClO₄)₂·6H₂O (0,1853 g, 0,5 mmol, dissolvidos em 2 mL de água) com uma solução de doxiciclina (0,2405 g, 0,5 mmol, dissolvidos em 8mL de água). A mistura foi agitada durante 40 min, seguida pela adição de uma solução de 1,10-fenantrolina monohidratada (0,0996 g, 0,5 mmol dissolvidos em 5,0 mL de metanol). A mistura resultante foi agitada por mais três horas. O precipitado verde foi filtrado, lavado com água deionizada e seco na pistola de secagem Abderhalden com vapor de clorofórmio. Rendimento: 59%.

4.2.2- [Cu(tc)(phen)(OH₂)(ClO₄)](ClO₄) – Complexo 2

Procedimento semelhante ao usado para síntese do complexo **1** foi utilizado para preparação do complexo **2**, cuja única diferença consiste na adição do ligante tetraciclina (tc) ao invés do ligante doxiciclina (dox). Rendimento: 61%.

4.2.3- [Cu(Shyd)(phen)(acn)(ClO₄)](ClO₄) - Complexo 3

O complexo **3** foi preparado pela reação de Cu(ClO₄)₂·6H₂O (0,185 g, 0,5 mmol) com a hidrazida do ácido 2-tiofenecarboxílico (0,071 g, 0,5 mmol) em 8,0 mL de acetonitrila. À mistura adicionaram-se 2,0 mL de solução de 1,10-fenantrolina monohidratada (0,099 g, 0,5 mmol) também dissolvida em acetonitrila. A solução resultante de coloração verde foi deixada na geladeira para evaporação lenta do solvente. Depois de alguns dias, ocorreu a formação de cristais azuis escuros. Esses cristais foram filtrados, lavados com acetonitrila fria e reservados para análises posteriores. Rendimento: 19 %.

4.2.4- [Cu(Shyd)(bpy)(acn)(ClO₄)](ClO₄) - Complexo 4

De modo semelhante ao preparo do complexo **3**, o complexo **4** foi preparado pela reação de Cu(ClO₄)₂·6H₂O (0,185 g, 0,5 mmol) com a hidrazida do ácido 2-tiofenecarboxílico (0,071 g, 0,5 mmol) em 8,0 mL de acetonitrila. À essa mistura adicionaram-se 2,0 mL de solução de 2,2'-bipiridina (0,078 g, 0,5 mmol) também dissolvida em acetonitrila. A solução resultante de coloração verde foi deixada na geladeira para evaporação lenta do solvente. Um sólido azul foi separado por filtração a vácuo, lavado com acetonitrila fria e seco sob vácuo na pistola de secagem Abderhalden com vapor de clorofórmio. Rendimento: 27%.

4.2.5- [Cu(Ohyd)(phen)(acn)(ClO₄)](ClO₄) - Complexo 5

O complexo **5** foi preparado pela reação de Cu(ClO₄)₂·6H₂O (0,185 g, 0,5 mmol) com a hidrazida do ácido 2-furóico (0,063 g, 0,5 mmol) em 4,0 mL de acetonitrila. À mistura adicionaram-se 2,0 mL de solução de 1,10-fenantrolina monohidratada (0,099 g, 0,5 mmol) também dissolvida em acetonitrila. A solução resultante de coloração azul escuro foi deixada na geladeira para evaporação lenta do solvente. No dia seguinte observou-se a presença de cristais azuis escuros junto à solução. Esses cristais foram filtrados, lavados com acetonitrila fria e reservados para análises posteriores. Rendimento: 46%.

4.2.6- [Cu(Ohyd)(bpy)(acn)(ClO₄)](ClO₄) - Complexo 6

De modo semelhante ao preparo do complexo **5**, o complexo **6** foi preparado pela reação de Cu(ClO₄)₂·6H₂O (0,185 g, 0,5 mmol) com a hidrazida do ácido 2-furóico (0,063 g, 0,5 mmol) em 4,0 mL de acetonitrila. À mistura adicionaram-se 2,0 mL de solução de 2,2'-bipiridina (0,078 g, 0,5 mmol) também dissolvida em acetonitrila. A solução resultante de

coloração azul escuro foi deixada na geladeira para evaporação lenta do solvente. Passados alguns dias foi possível observar a presença de cristais azuis escuros junto à solução. Esses cristais foram filtrados, lavados com acetonitrila fria e reservados para análises posteriores. Rendimento: 30%.

4.2.7- [Ru(pdShyd)(phen)(dmsO)Cl](PF₆) - Complexo 7

0,25 mmol (0,121g) do complexo cis-[RuCl₂(dmsO)₄] (síntese descrita no capítulo 5, seção 2.1) foram dissolvidos a quente em 7,0 mL de metanol. Em seguida, 0,25 mmol (0,084 g) do ligante **pdShyd** foram suspensos em 25,0 mL de metanol e em seguida essa suspensão foi adicionada lentamente à solução metanólica do cis-[RuCl₂(dmsO)₄]. O sistema foi colocado em refluxo por uma hora. Ao fim desse tempo, adicionaram-se lentamente ao sistema 0,25 mmol (0,045 g) de 1,10-fenantrolina dissolvida em 6,0 mL de metanol, seguida da adição de 0,75 mmol (0,123 g) do sal hexafluorofosfato de amônio. A suspensão resultante foi mantida em refluxo por mais três horas. Depois de resfriada à temperatura ambiente, a suspensão foi filtrada a vácuo. O sólido foi lavado com etanol frio, seco com auxílio da pistola de secagem Abderhalden utilizando vapor de clorofórmio. Rendimento: 48%.

4.2.8- [Ru(pdOhyd)(phen)(dmsO)Cl](PF₆) - Complexo 8

Protocolo semelhante ao usado para síntese do complexo **7** foi utilizado para preparação do complexo **8**, cuja única diferença consiste na adição de 0,080 g (0,25 mmol) do ligante **pdOhyd** ao invés do ligante **pdShyd** Rendimento: 52%.

**CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTITUMORAL DE COMPLEXOS TERNÁRIOS DE COBRE(II)
COM OS LIGANTES TETRACICLINA, DOXICICLINA E 1,10-FENANTROLINA.**

1. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

Para a caracterização dos complexos **1** e **2**, cujas estruturas propostas estão representadas na Figura 4, foram realizadas análise elementar, medidas de condutividade, espectroscopia vibracional e eletrônica, ressonância paramagnética eletrônica e espectroscopia de massas.

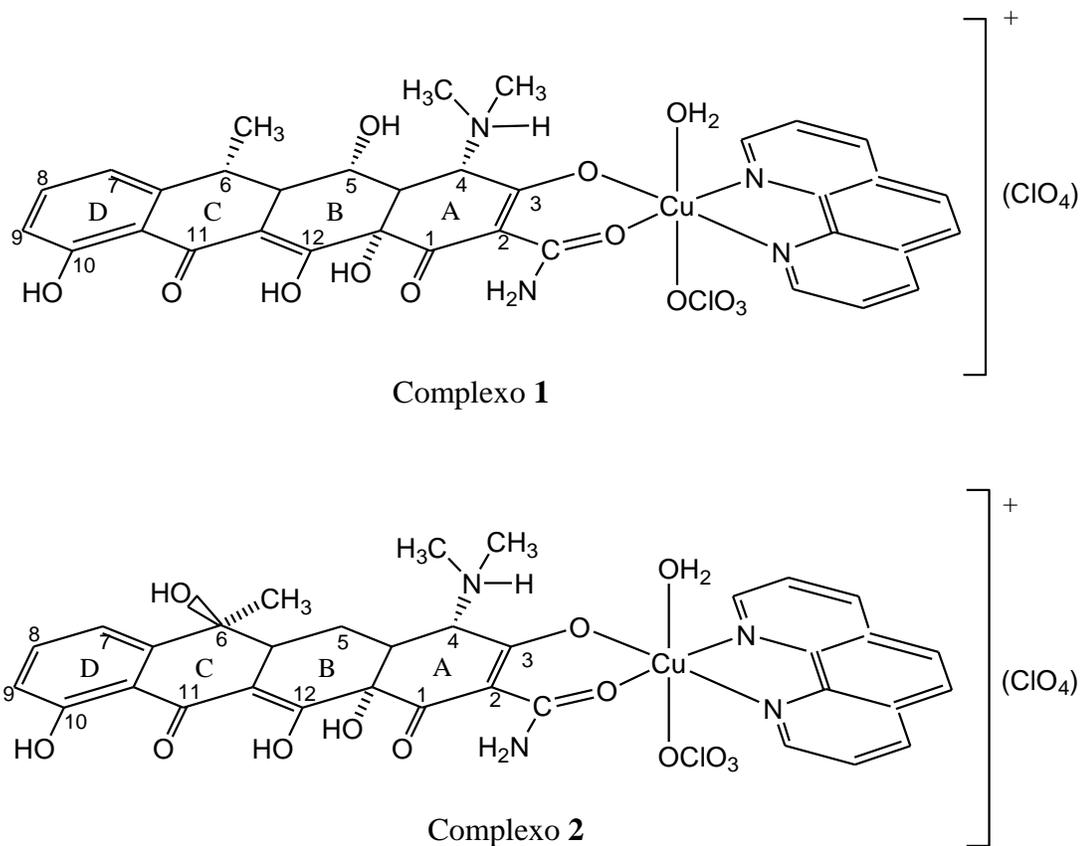


Figura 4. Estruturas propostas para os complexos **1** (superior) e **2**(inferior).

1.1- Análises elementar e condutivimétrica

A Tabela 4 apresenta os teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e cobre e os valores de condutividades molares dos complexos **1** e **2**. Os teores de C, H, N e Cu obtidos

experimentalmente para os complexos **1** e **2** estão de acordo com a fórmula mínima: $\text{CuC}_{34}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_{17}\text{Cl}_2$ e apresentam erros inferiores a 5%. Os valores obtidos para a condutividade molar dos complexos **1** e **2** indicam tratar-se de eletrólitos 2:1 [87].

Tabela 4. Dados das análises elementares e condutimétrica para os complexos 1 e 2.

	%C	%H	%N	%Cu	Λ_M ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	
1- $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$ MM= 905,11 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	45,0 (45,1)	3,8 (3,8)	6,1 (6,2)	7,0 (7,0)	174
2- $[\text{Cu}(\text{tc})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$ MM= 905,11 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	45,6 (45,1)	4,0 (3,8)	6,5 (6,2)	7,1 (7,0)	188

1.2- Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível a partir de soluções aquosas e no estado sólido (reflectância difusa)

Os ligantes doxiciclina e tetraciclina possuem mais de uma possibilidade de coordenação a metais. Devido a essa variedade de possibilidades de complexação, torna-se necessário um estudo mais detalhado para atribuir corretamente o sítio de coordenação desses ligantes ao cobre(II). Uma análise muito útil nesse caso é a espectroscopia na região do ultravioleta e visível, uma vez que essa técnica fornece informações sobre a estrutura eletrônica de complexos metálicos.

Os espectros de absorção na região do UV-Vis dos ligantes dox, tc e phen e dos complexos **1** e **2** são mostrados na Figura 5.

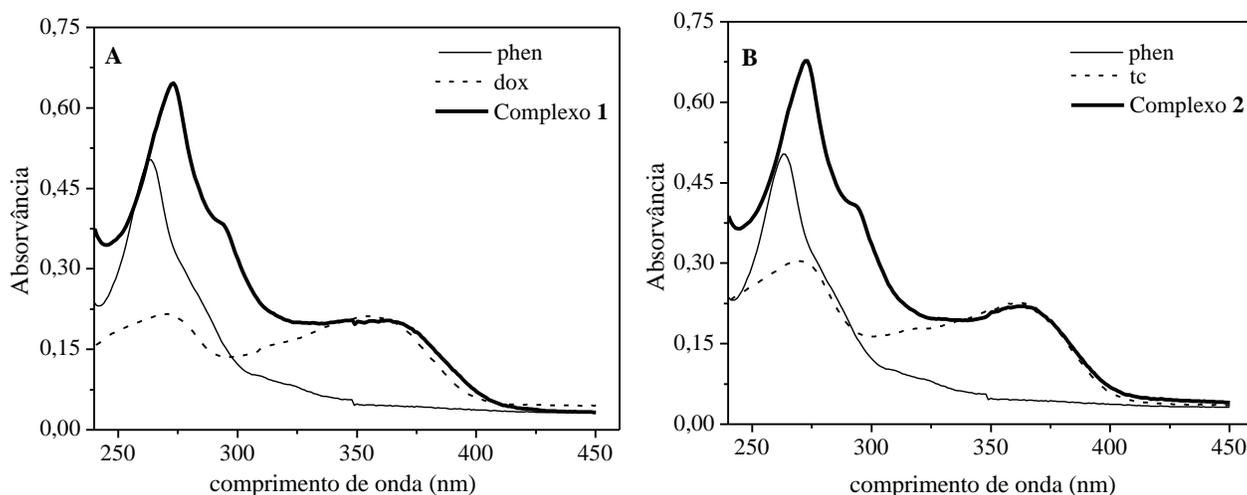


Figura 5. Espectros eletrônicos de soluções aquosas na concentração de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$: (A) phen, dox e complexo 1 e (B) phen, tc e complexo 2.

Os espectros eletrônicos dos ligantes dox e tc em água exibem duas bandas principais centradas em 273 e 363 nm para a doxiciclina e 269 e 362 nm para a tetraciclina. De acordo com McCormick e colaboradores [88], a transição $\pi-\pi^*$ do sistema tricarbonil do anel A das tetraciclina contribui apenas para a banda próxima de 270 nm, enquanto a transição $\pi-\pi^*$ do cromóforo BCD contribui para as duas bandas e em especial para a banda centrada em torno de 360 nm [89] (para identificação dos anéis A, B, C e D ver estrutura dos complexos **1** e **2** dox e tc na Figura 4).

As transições $\pi-\pi^*$ do ligante possuem altos coeficientes de absorvidade molar por serem completamente permitidas pelas regras de seleção (Laporte e spin). Nos complexos, estas bandas podem sofrer deslocamentos devido à ligação do íon metálico. Tanto as tetraciclina quanto a 1,10-fenantrolina absorvem em torno de 260 nm. Nos complexos, estas absorções sofrem deslocamento batocrômico e efeito hiperacrômico, confirmando a coordenação dos ligantes e sugerindo a participação de grupos do anel A, da dox ou da tc, na coordenação ao metal. Avaliando a banda em 360 nm dos complexos **1** e **2** não é observada

nenhuma mudança quando comparado aos ligantes dox e tc livres. Esse resultado sugere a não participação do cromóforo BCD das tetraciclinas na coordenação ao centro metálico.

No estado sólido, os espectros de ambos os complexos (refletância difusa), Figura 6, exibem uma banda larga resultado de transições d-d na faixa de 500-800 nm, centrada aproximadamente em 680 nm. Essa banda é típica de geometria octaédrica tetragonalmente distorcida, que é característica de complexos de cobre(II).

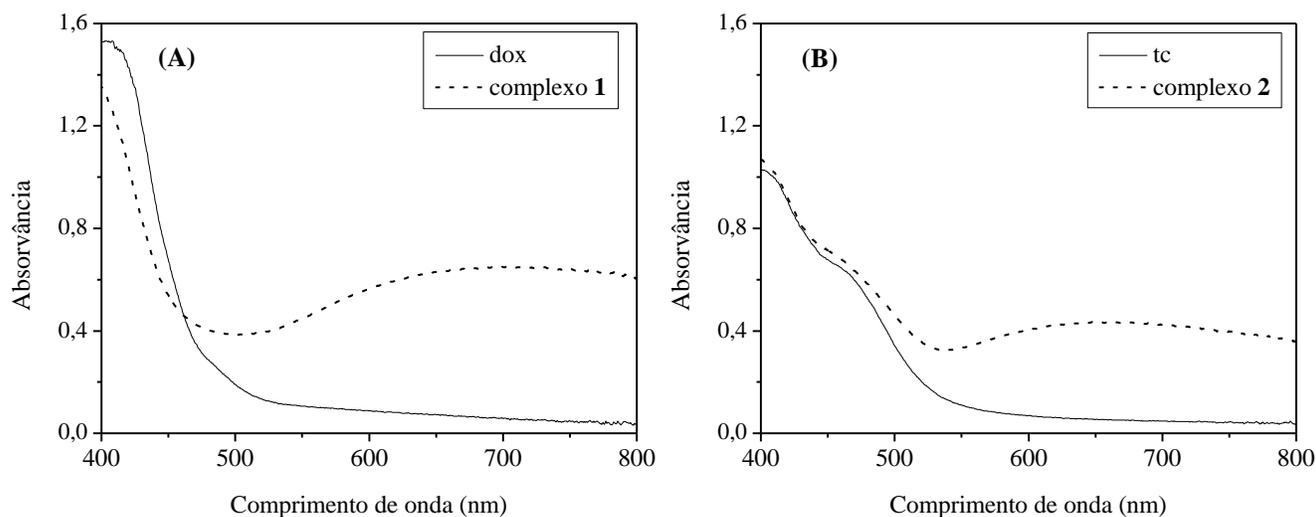


Figura 6. Espectros de reflectância difusa: (A) dox e complexo 1 e (B) e tc e complexo 2.

A Figura 7 apresenta os espectros eletrônicos na região do UV-Vis desses complexos em soluções aquosas, as bandas d-d deslocam-se para energia mais alta, aparecendo em 642 nm ($\epsilon = 51,9 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para complexo 1 e em 637 nm ($\epsilon = 61,0 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para complexo 2, indicando a substituição do ligante axial ClO_4^- por uma molécula do solvente. Este resultado está de acordo com a condutividade dos complexos em solução.

Os espectros vibracionais dos complexos, cujas análises serão descritas a seguir, apresentam absorções em frequências características de íon perclorato livre (atuando como contra-íon) e de íon perclorato monodentado. Nos espectros eletrônicos, as bandas d-d dos complexos 1 e 2 em solução aquosa são centradas em 635 e 632 nm, respectivamente. Quando

comparadas as bandas d-d dos complexos no estado sólido sofrem um deslocamento para menor comprimento de onda (maior energia). Esse fato indica que para ambos os complexos o ClO_4^- , que atua como ligante axial no estado sólido, é substituído por uma molécula de água quando em solução aquosa. O deslocamento da banda ocorre para maior energia em solução aquosa devido ao fato do perclorato ser um ligante mais fraco que a água e, portanto, diminuir a diferença de energia entre os orbitais t_{2g} e eg .

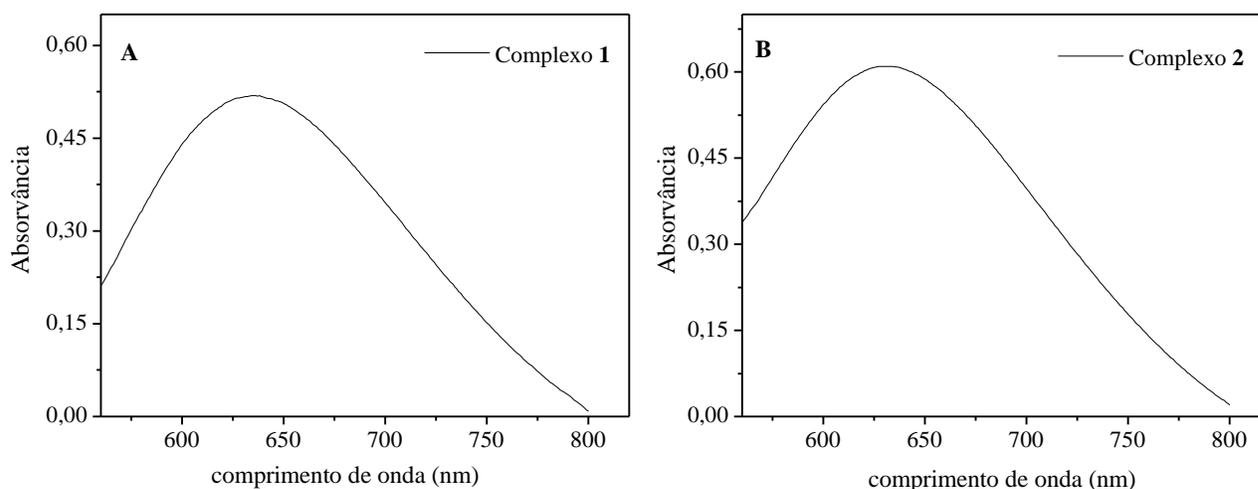


Figura 7. Espectros eletrônicos de soluções aquosas na concentração de $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$: (A) complexo 1 e (B) complexo 2.

1.3- Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Embora a espectroscopia eletrônica tenha confirmado o envolvimento do anel A na coordenação ao metal, só essa informação não é suficiente para uma atribuição correta do sítio de ligação dos ligantes dox e tc ao cobre, pois no anel A existe mais de um sítio de coordenação possível. É necessário, portanto, a utilização de outras técnicas para um maior esclarecimento, a seguir serão analisados os espectros vibracionais desses complexos.

Nas Figuras 8 e 9 são apresentados os espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos **1** e **2**, os espectros vibracionais no IV dos ligantes dox, tc e phen são mostrados no anexo I nas Figuras 78, 79 e 80, respectivamente.

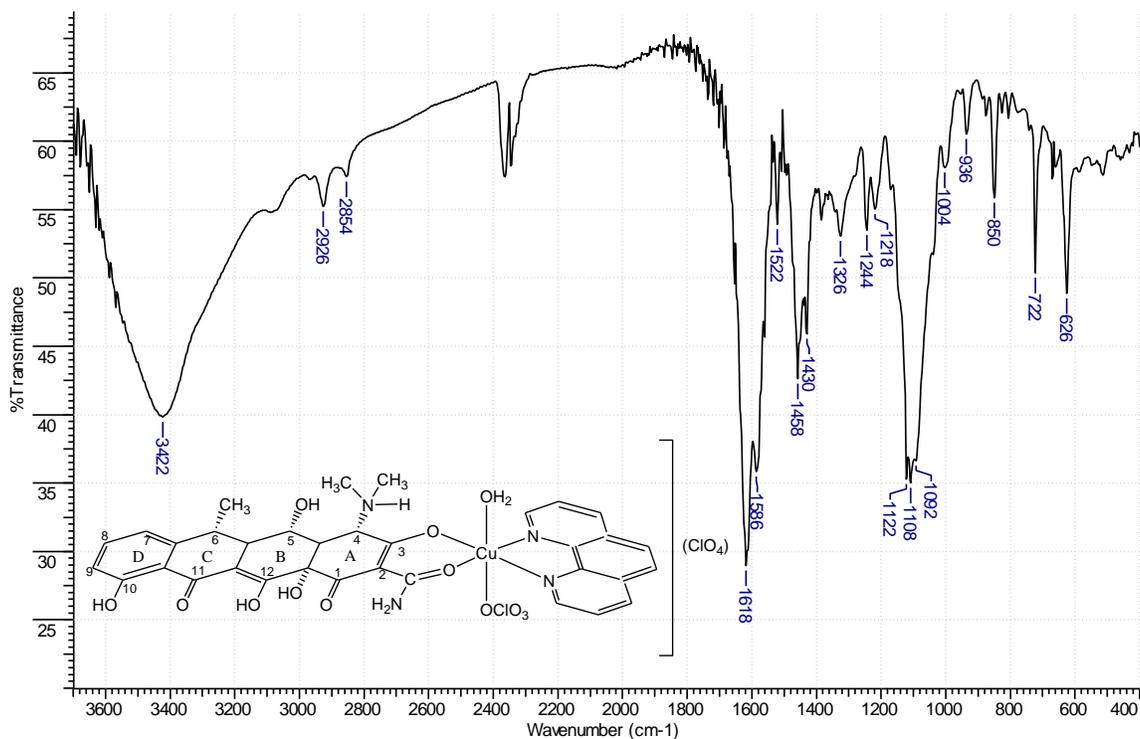


Figura 8. Espectro vibracional na região do infravermelho para complexo 1.

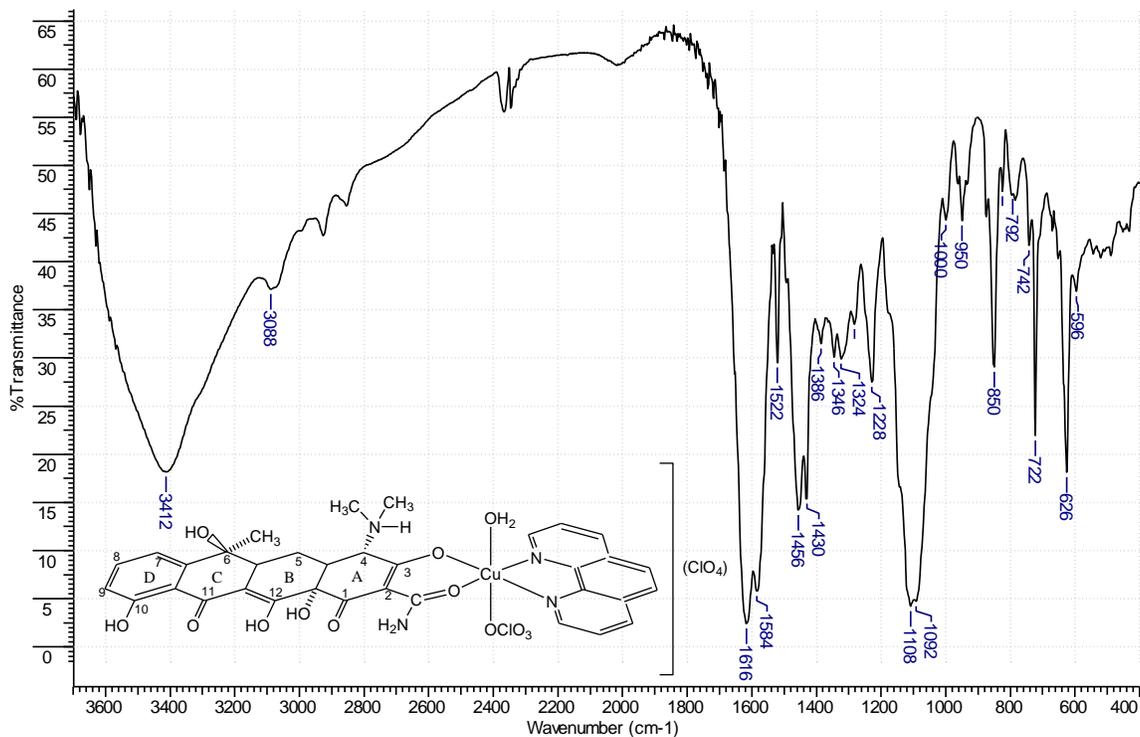


Figura 9. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo 2.

Na Tabela 5 estão apresentadas as bandas importantes para inferir sobre o modo de coordenação dos ligantes dox e tc ao Cu(II), a atribuição das bandas dos ligantes foi feita de acordo com a literatura [90].

Tabela 5. Atribuição das principais frequências (cm^{-1}) na região do infravermelho dos ligantes dox e phen e dos complexos 1 e 2.

Composto	Frequência dos estiramentos em cm^{-1}			
	$\nu(\text{OH}); \nu(\text{NH})$	$\nu(\text{CO})_{\text{amida}}$	$\nu(\text{CO})$ C1 e C11	$\nu(\text{ClO}_4)$
Dox	3447; 3331	1669	1616, 1580	-
tc	3364, 3305	1674	1617, 1583	-
Complexo 1	3422	1522	1618, 1586	1122, 1108, 1092
Complexo 2	3412	1522	1616, 1584	sobreposta, 1108, 1092

A análise dos espectros vibracionais dos complexos foi feita com base em um estudo detalhado dos espectros vibracionais de vários derivados das tetraciclinas feito por Dziegielewski e colaboradores [90]. A doxiciclina e a tetraciclina apresentam em sua estrutura três carbonilas. Segundo Dziegielewski e colaboradores, a carbonila referente à amida do anel A, Figura 4, dá origem a uma banda intensa por volta de 1670 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\nu\text{C}=\text{O}$ e as outras duas bandas em 1616 cm^{-1} e 1578 cm^{-1} são referentes aos estiramentos das carbonilas em C1 e C11, respectivamente [90]. A ausência da banda em 1670 cm^{-1} nos espectros de infravermelho dos complexos 1 e 2, sugere a coordenação do cobre à carbonila da amida nos complexos 1 e 2, pois essa banda é muito sensível à

coordenação de íons metálicos [91]. É feita a proposta de que essa banda tenha se deslocado para 1522 cm^{-1} em ambos os complexos. A coordenação da carbonila amídica ao cobre enfraquece a ligação C=O, o que resulta na presença dessa banda em região de menor energia. A permanência das duas outras bandas em torno de 1616 cm^{-1} e 1578 cm^{-1} exclui a participação dos oxigênios dessas carbonilas na coordenação ao metal, o que é coerente com os dados de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível. Os estiramentos referentes aos grupos hidroxil e amida das tetraciclinas aparecem nos complexos como uma banda larga e intensa centrada em 3422 e 3412 cm^{-1} , respectivamente para complexos **1** e **2**.

A análise elementar é condizente com dois íons perclorato para cada complexo. O exame dos espectros vibracionais dos complexos **1** e **2** nos permite concluir que existem dois comportamentos distintos para esses íons percloratos. Os espectros na região do infravermelho de ambos os complexos apresentam três bandas intensas em torno de 1121 e 1108 cm^{-1} e em 1087 cm^{-1} , o que pode ser explicado pela presença de um perclorato atuando como contra-íon e outro perclorato como ligante monodentado.

O comportamento dos íons percloratos nos complexos pode ser inferido pelas frequências dos estiramentos Cl-O. Segundo Nakamoto [92], o íon perclorato livre pertence ao grupo pontual tetraédrico (T_d) de elevada simetria e possui apenas dois estados fundamentais ativos no infravermelho, ν_3 (banda de alta intensidade) e ν_4 (banda de baixa intensidade). Embora o íon perclorato seja um fraco coordenante, ele pode se coordenar a metais de forma mono ou bidentada. A complexação desse íon a metais resulta em uma redução de simetria, onde ocorre a transição do grupo pontual de T_d para C_{3v} , quando o ClO_4^- atua como ligante monodentado ou de T_d para C_{2v} , quando ClO_4^- atua como ligante bidentado. Como resultado do abaixamento de simetria as vibrações antes degeneradas são agora desdobradas. A complexação do perclorato de forma monodentada resulta na divisão de ν_3 em

duas bandas, enquanto que a coordenação bidentada resulta na divisão de ν_3 em três bandas. Independente do modo de coordenação, a banda ν_4 não sofre desdobramento, contudo pode ocorrer deslocamentos e essa banda torna-se mais intensa [92].

As espécies que contêm um perclorato coordenado ao Cu(II) também foram identificadas nos espectros de massas dos complexos, que serão descritos a seguir. Nos estudos de espectroscopia eletrônica foi mostrado que embora um dos percloratos atue como ligante no estado sólido, em solução esse ânion é substituído por uma molécula do solvente quando este é coordenante. Conseqüentemente, quando os complexos estão em solução, ambos os percloratos atuam como contra-íons, o que é condizente com os resultados de condutividade molar.

As demais bandas dos complexos, localizadas entre 1500 - 500 nm, resultam da sobreposição de vibrações de grupos funcionais da dox ou tc e da phen e apresentam intensidade menor, se comparadas às bandas das carbonilas e dos percloratos.

O modo de coordenação de tetraciclinas via o oxigênio amídico e o oxigênio do C3 foi observado para complexos de tetraciclinas com os metais platina(II), paládio(II) e mercúrio(II), sendo que este último possui estrutura cristalina determinada [93-95]

1.4– Ressonância Paramagnética Eletrônica - RPE

A Figura 10 apresenta os espectros de RPE¹³ dos complexos **1** e **2** medidos em soluções metanólicas congeladas.

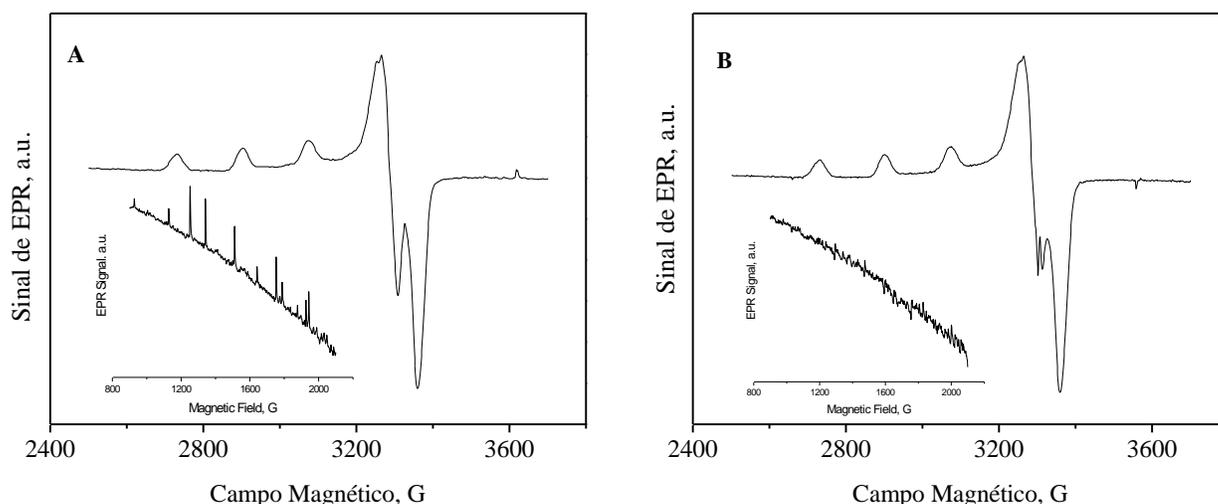


Figura 10. Espectros de RPE para complexo 1 (A) e complexo 2 (B), adquiridos em solução congelada de metanol a 77K, usando modulador de 15 G. Requadros: Espectros de RPE no intervalo de 800 a 2200 G.

A Tabela 6 apresenta os parâmetros espectroscópicos dos espectros de RPE para os complexos 1 e 2.

¹³ RPE é uma técnica usada para estudar complexos com elétrons desemparelhados. Essa técnica baseia-se no fato de que um spin eletrônico pode adotar duas orientações ao longo da direção definida por um campo magnético aplicado β . A diferença de energia entre os estados $m_s = +1/2$ e $-1/2$ é: $\Delta E = g\mu\beta$, onde g é a constante giromagnética que depende da identidade da partícula e μ é o momento magnético [96]. Para o elétron livre g_e é 2,0023. O valor g indica a simetria do ambiente ligante e dá uma indicação da disponibilidade quanto aos níveis de energia do complexo. As linhas presentes em um espectro de RPE podem ser desdobradas pela interação do spin eletrônico com o spin nuclear de átomos vizinhos que apresentem momento magnético. Em íons metálicos paramagnéticos, o desdobramento dominante vem do próprio íon metálico chamado estrutura hiperfina (A).

Tabela 6. Parâmetros de RPE para complexos 1 e 2.

Complexo	g_{\perp}	$g_{//}$	g_{iso}	$A_{//}$ (G)	$A_{//}$ (10^{-4} cm $^{-1}$)	$g_{//} / A_{//}$ (cm)
1	2,063	2,271	2,132	172	183	124
2	2,063	2,274	2,132	171	183	124

Ambos os complexos exibem parâmetros espectroscópicos similares, uma vez que o ambiente químico ao redor do íon Cu(II) é muito semelhante nos dois compostos. Os requadros da Figura 10 mostram que, na região em torno de 1500G, não ocorre acoplamento hiperfino, o que seria indicativo de espécies binucleares. As ausências de tais sinais atestam a inexistência de interações magnéticas entre átomos de cobre e indicam tratar-se de complexo mononuclear.

A presença de quatro linhas nos espectros de RPE é típica de cátions Cu(II), pois esse íon metálico possui momento nuclear $I = 3/2$, portanto o sinal hiperfino que é desdobrado em $n = 2I + 1$ será igual a 4 [97].

Os espectros de RPE de ambos os complexos, cujos valores de g seguem a ordem $g_{//} > g_{\perp} > 2.0023$, são consistentes com as geometrias octaédrica alongada segundo o eixo z , piramidal quadrática ou quadrática [98]. Nesses casos ocorre a simetria típica de configuração d^9 no estado fundamental, com um elétron desemparelhado no orbital $d_{x^2-y^2}$.

Para complexos de cobre(II) a razão empírica $g_{//} / A_{//}$ é frequentemente usada para avaliar a distorção tetraédrica em estruturas tetragonais ou em sítios ativos de proteínas de cobre. Essa relação empírica fornece um indicativo da extensão da distorção tetraédrica em um ambiente tetragonal ao redor do metal. Se esta razão estiver na faixa de 105 - 135 cm, a geometria observada ao redor do íon será provavelmente mais corretamente descrita como

quadrado planar, e se esta relação for > 250 cm aponta para ambientes distorcidos tetraedricamente [99]. Ambos os complexos exibem razão $g_{\parallel} / A_{\parallel}$ típica de geometrias de base quadrada.

1.5- Espectrometria de Massas

As Figuras 11 e 12 apresentam os espectros de massas para os complexos **1** e **2**. Avaliando os espectros verifica-se um pico principal em m/z 686 que pode ser atribuído à espécie $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})\text{-H}]^+$ ou $[\text{Cu}(\text{tc})(\text{phen})\text{-H}]^+$ (massa calculada 686,14). No espectro de massas do complexo **2**, também está presente um pico em m/z 668 que corresponde a perda de uma molécula de água na espécie $[\text{Cu}(\text{tc})(\text{phen})\text{-H}]^+$ (valor calculado 668,13). Em ambos os complexos também está presente um pico menor com m/z igual a 785,9 que correspondente às espécies $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})(\text{ClO}_4)]^+$ ou $[\text{Cu}(\text{tc})(\text{phen})(\text{ClO}_4)]^+$ (massa calculada 786,1).

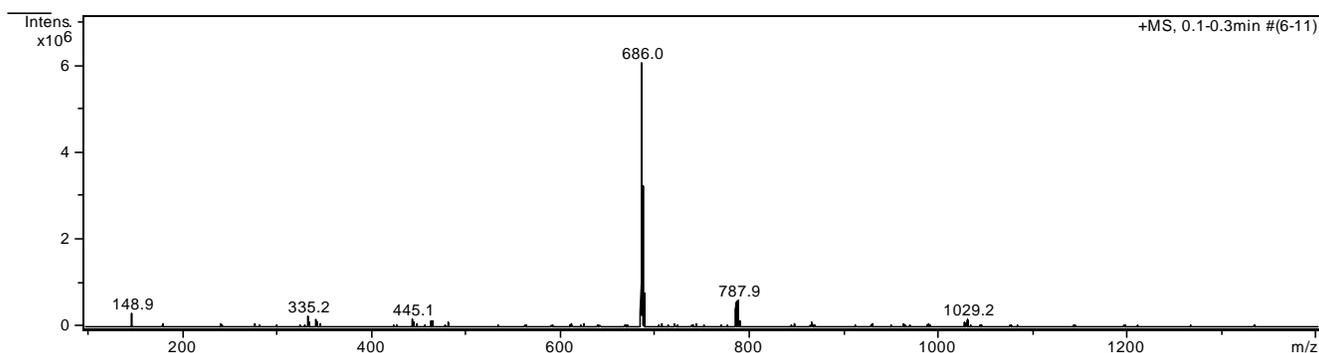


Figura 11. Espectro ESI(+)-MS em solução MeOH:H₂O (1:1) do complexo 1.

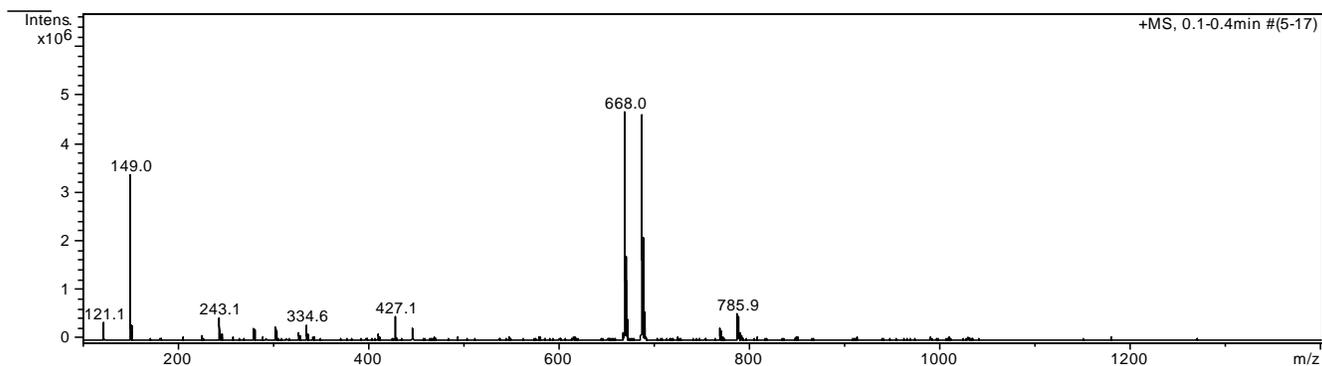


Figura 12. Espectro ESI(+)-MS em solução MeOH:H₂O (1:1) do complexo 2.

A distribuição de isótopos para as espécies $[\text{Cu}(\text{tc})(\text{phen})\text{H}(-\text{H}_2\text{O})]^+$, $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})\text{H}]^+$, $[\text{Cu}(\text{tc})(\text{phen})\text{H}]^+$, $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})(\text{ClO}_4)]^+$ e $[\text{Cu}(\text{tc})(\text{phen})(\text{ClO}_4)]^+$ foram calculadas com o programa Qual Browser (2.0.7copyright © versão da Fischer Thermo Scientific Inc.) (Figuras 13 e 14). Os picos m/z 668 e 686 mostraram distribuição isotópica característica de $^{63}\text{Cu} / ^{65}\text{Cu}$, enquanto o pico m/z 786 exibe características de isótopos de cobre e cloro. Houve uma boa concordância com os espectros experimentais.

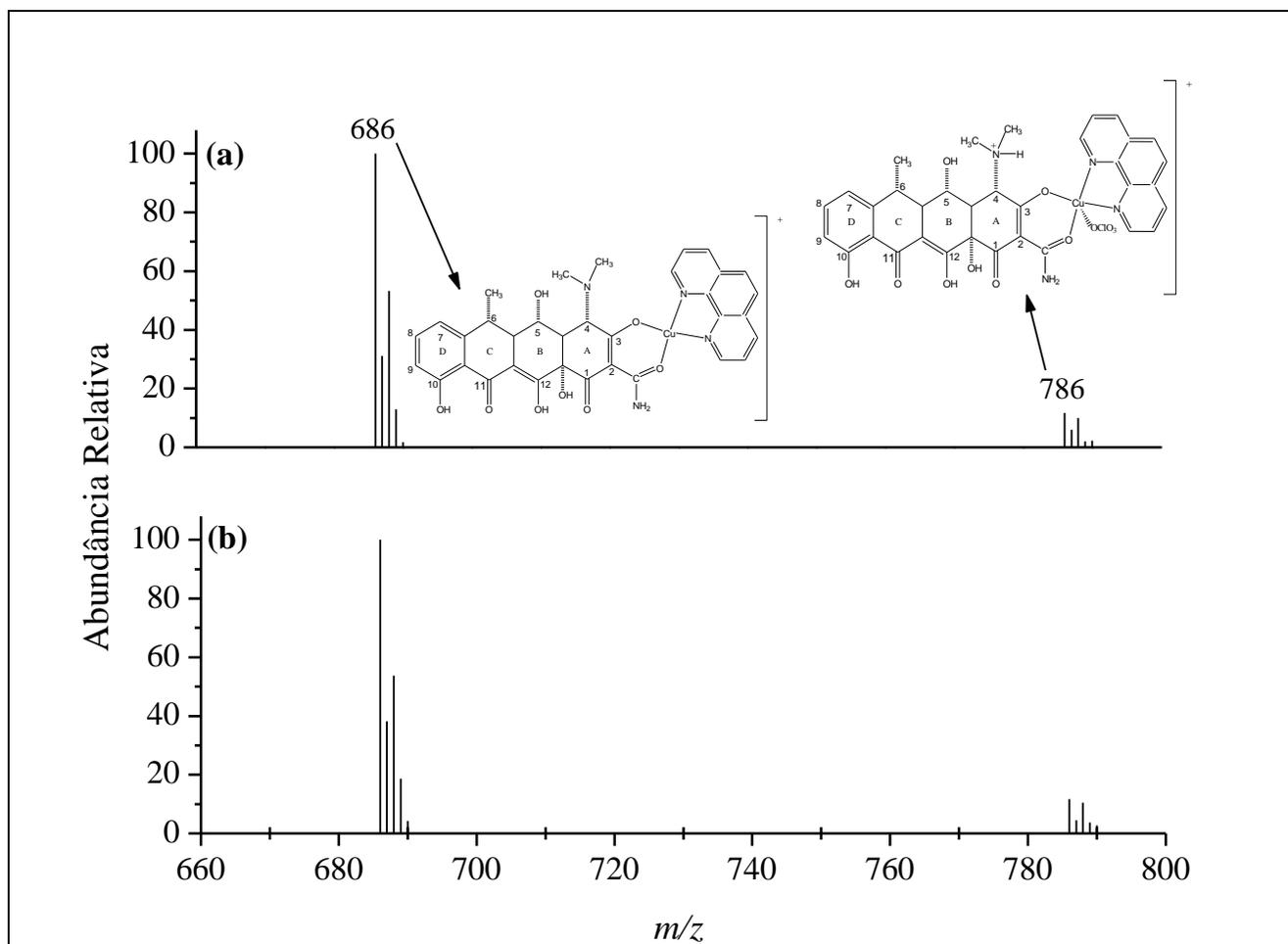


Figura 13. (A) Ampliação do espectro de ESI do complexo 1 em MeOH/H₂O (50/50). (B) Distribuição isotópica para as espécies [Cu(dox)(phen)H]⁺ e [Cu(dox)(phen)(ClO₄)]⁺ calculadas com auxílio do programa Qual Browser versão 2.0.7copyright® Thermo Fischer Scientific Inc. 1998-2007.

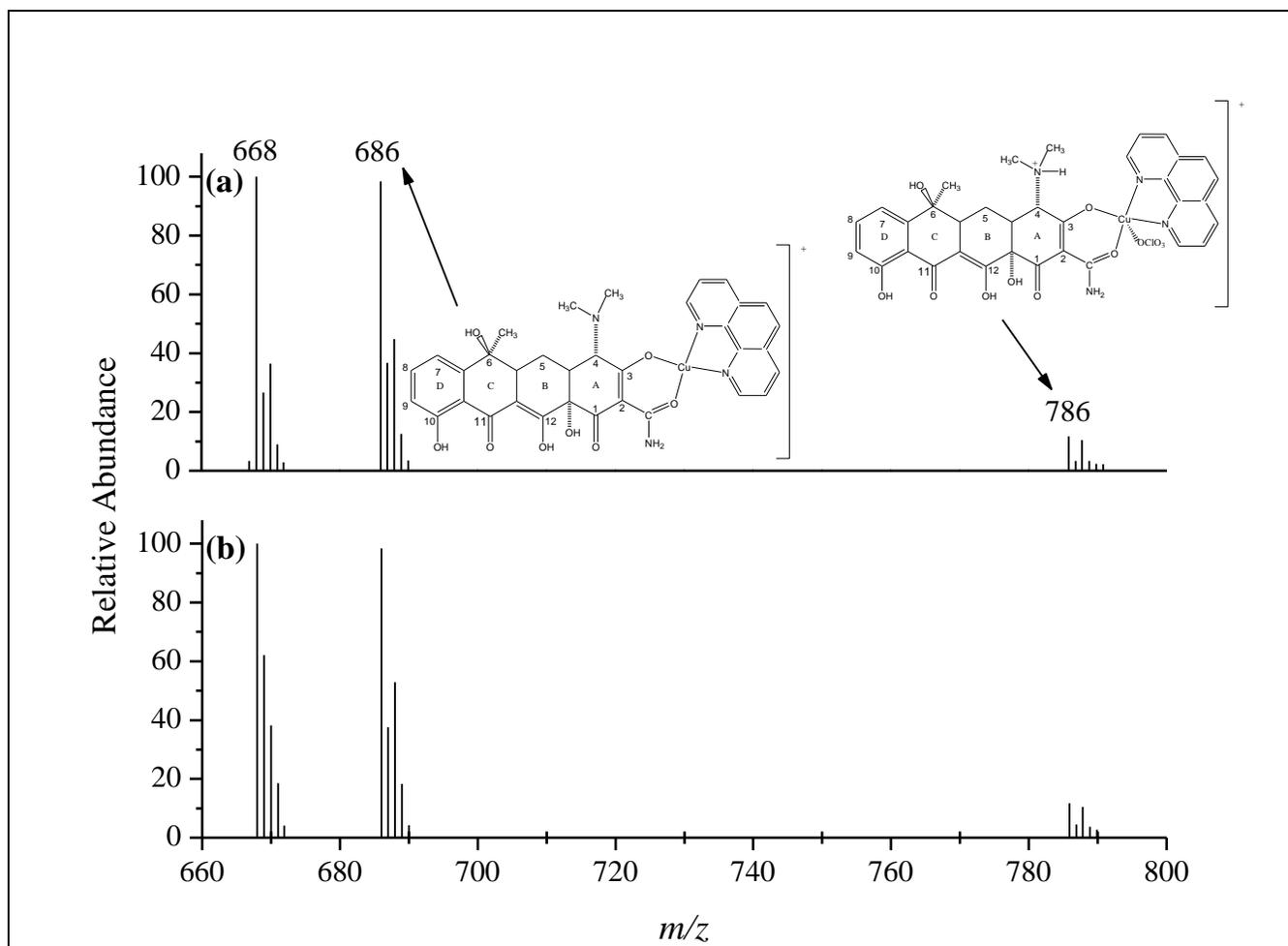


Figura 14. (A) Ampliação do espectro de ESI do complexo 2 em MeOH/H₂O (50/50). (B) Distribuição isotópica para as espécies $[\text{Cu}(\text{tc})(\text{phen})\text{H}]^+$ e $[\text{Cu}(\text{tc})(\text{phen})(\text{ClO}_4)]^+$ calculadas com auxílio do programa Qual Browser versão 2.0.7copyright® Thermo Fischer Scientific Inc. 1998-2007.

2- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS COMPLEXOS 1 E 2

2.1- Estudos da citotoxicidade dos compostos

Testes *in vitro* permitem obter dados significativos sobre a citotoxicidade de um determinado composto de forma rápida e segura [100]. Muitas vezes, os resultados dos testes *in vitro* são também observados nos testes *in vivo*, portanto, constitui-se como uma etapa preliminar na avaliação da atividade antitumoral de um composto. Posteriormente, para os compostos mais ativos *in vitro*, os estudos podem ser continuados em modelo animal, testes *in vivo*.

Segundo protocolo descrito na seção 3.2 do capítulo 1, as citotoxicidades dos compostos frente à linhagem K562 foram determinadas. A Figura 15 apresenta as curvas dose-resposta, porcentagens de inibição do crescimento celular *versus* as concentrações de complexo administradas no meio celular, para os complexos 1 e 2. Essas curvas indicam que os complexos inibem o crescimento das células tumorais de uma maneira dependente da concentração.

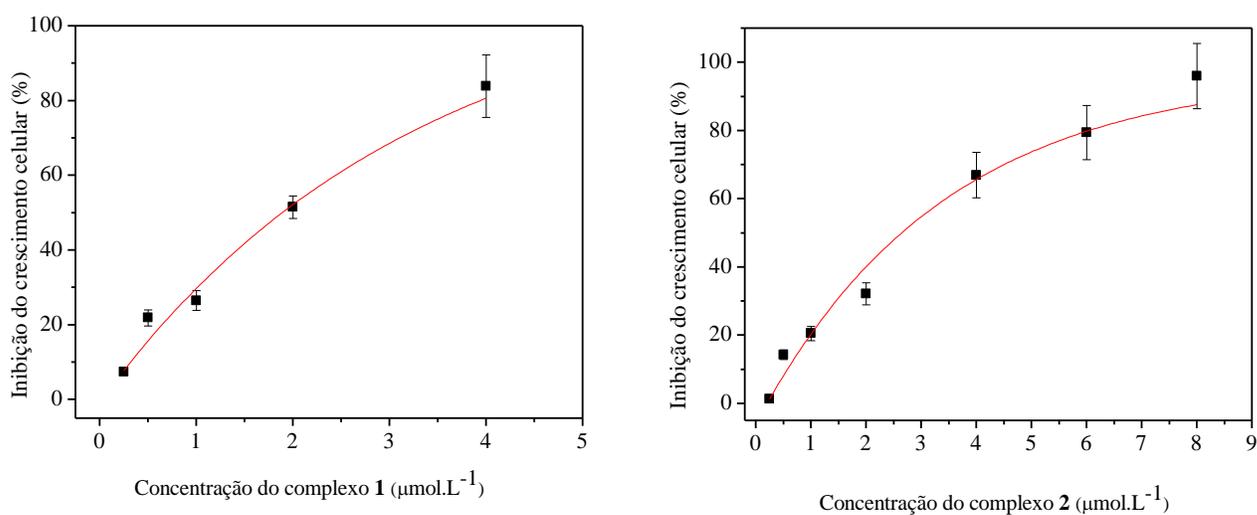


Figura 15. Curvas dose-resposta para determinação da CI_{50} para complexos 1 e 2.

Ambos os complexos inibem o crescimento celular das células K562 com valores de CI_{50} de 1,93 e 2,59 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para complexos **1** e **2**, respectivamente. Valores obtidos para os ligantes livres e para o complexo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ (síntese descrita no capítulo 5, seção 3.1) são apresentados na Tabela 7 para efeito de comparação.

Tabela 7. Valores de CI_{50} para ligantes e complexos com tempo de incubação de 72h.

Compostos	CI_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1} \pm \text{s.d.}$)
dox	$17,70 \pm 0,90$
tc	$52,37 \pm 3,10$
phen	$3,17 \pm 0,25$
$[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$	$3,44 \pm 0,30$
Complexo 1	$1,93 \pm 0,20$
Complexo 2	$2,59 \pm 0,26$

Em todos os casos, os complexos são mais ativos que os respectivos ligantes livres. O complexo **1** é mais ativo que o complexo **2**, e ambos são mais ativos que o complexo referência $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$. O complexo bis(1,10-fenantrolina)cobre(II) foi escolhido como referência por ser uma conhecida nuclease sintética. Uma série de experimentos, que serão descritos a seguir, mostram que os complexos **1** e **2** são potentes nucleases.

2.2- Estudos da acumulação intracelular dos complexos na linhagem celular K562

Para atingir um alvo celular, uma droga precisa, inicialmente, passar pela membrana celular. Esse processo consiste em uma etapa crucial para a atividade farmacológica de determinado composto. A maior parte dos casos de resistência celular aos antitumorais parece

estar relacionada com uma diminuição no teor intracelular do fármaco [85]. Por isso, é importante o estudo da acumulação intracelular de Cu(II). A concentração celular de cobre após tratamento das células com concentrações equitóxicas dos complexos foi determinada, de acordo com protocolo descrito na seção 3.4 do capítulo 1. A Figura 16 mostra as curvas de acumulação intracelular dos complexos **1** e **2** nas células K562 após 72 horas de incubação.

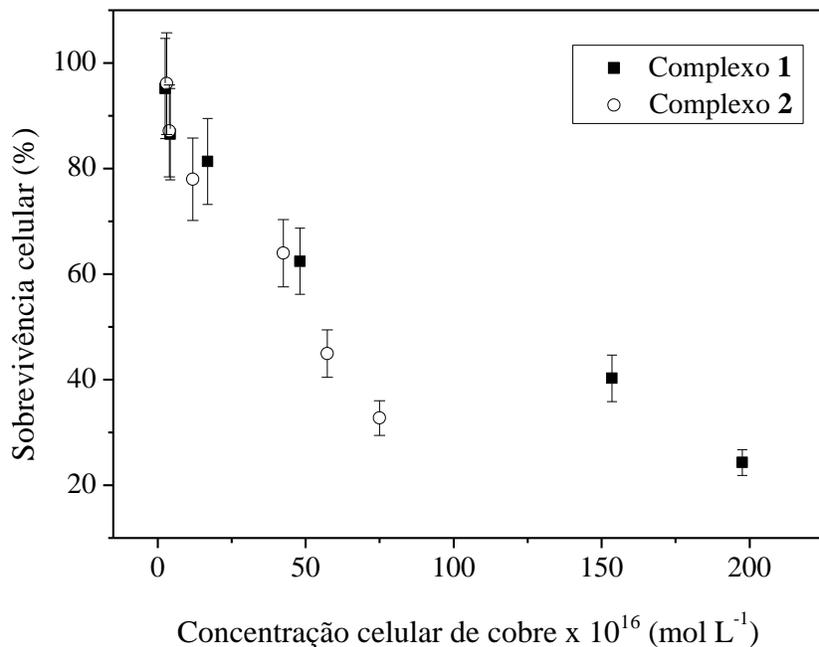


Figura 16. Concentração intracelular de cobre após tratamento por 72h com complexos 1 e 2. Os valores representam a média de três experimentos independentes.

A partir da análise do gráfico é possível observar correlação entre a atividade citotóxica e a acumulação celular de cobre. Esse fato é indicativo que a inibição do crescimento celular está relacionada à quantidade de complexo dentro das células. Para ambos os complexos a concentração intracelular requerida para inibir 50% do crescimento celular é de aproximadamente de 55×10^{-16} mol celula⁻¹.

2.3- Estudos de interação dos compostos com o ADN

Nos experimentos anteriores foi mostrado que os complexos **1** e **2** entram nas células e inibem seu crescimento. Uma vez dentro dessas células, diferentes sítios de interação são possíveis, sendo o ADN um alvo potencial. Para averiguar se a atividade antitumoral dos complexos se relaciona com a interação dos mesmos com o ADN, foram estudadas as interações dos complexos com essa macromolécula de três formas: determinação da concentração de complexo ligado ao ADN intracelular, titulação espectrofotométrica com ADN para determinação das constantes de ligação ADN-complexo e estudos de clivagem do ADN plasmidial.

2.3.1- Determinação da concentração de complexo ligado ao ADN intracelular

A fim de verificar se os complexos se ligam ao ADN no interior das células, as células foram tratadas com os complexos, posteriormente o ADN foi extraído e a concentração de cobre dosada por GFAAS (procedimento detalhado na seção 3.5 capítulo 1). A Figura 17 apresenta o número de adutos Cu-ADN formados em função das concentrações dos complexos adicionadas no meio extracelular.

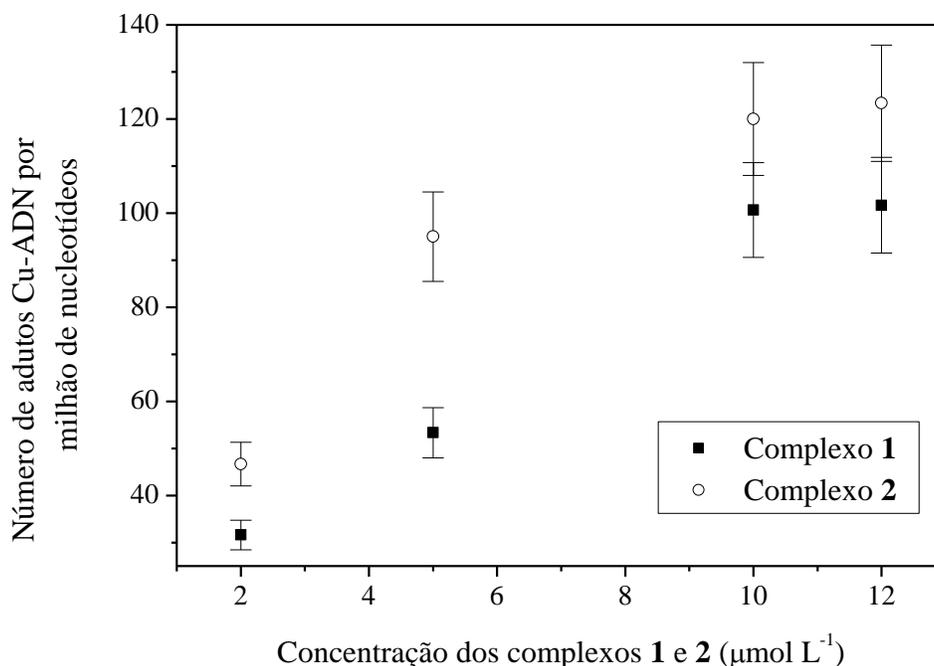


Figura 17. Número de adutos de Cu-ADN por milhão de nucleotídeos em função da concentração dos complexos 1 e 2.

A partir da análise da Figura 17 é possível verificar que os compostos se ligam ao ADN intracelular. Somado a isso, o número de adutos Cu-ADN aumenta com o acréscimo das concentrações de complexo adicionado ao meio extracelular, o que sugere uma relação entre a atividade citotóxica e a ligação dos complexos ao ADN.

2.3.2- Determinação das constantes de ligação ADN-complexo

Os resultados dos experimentos da seção anterior 2.3.1 mostraram que os complexos se ligam ao ADN no interior das células. A fim de determinar a constante de afinidade dos complexos pelo ADN foi feita a titulação espectrofotométrica dos complexos **1** e **2** com o CT-ADN (ADN de timo de vitelo), conforme protocolo relatado na seção 3.6 do capítulo 1.

As Figuras 18 e 19 apresentam as curvas de absorção na região do ultravioleta-visível dos complexos **1** e **2** com subsequentes adições de ADN. A partir dos dados desses espectros foi possível calcular a constante de afinidade dos complexos pelo ADN [101]

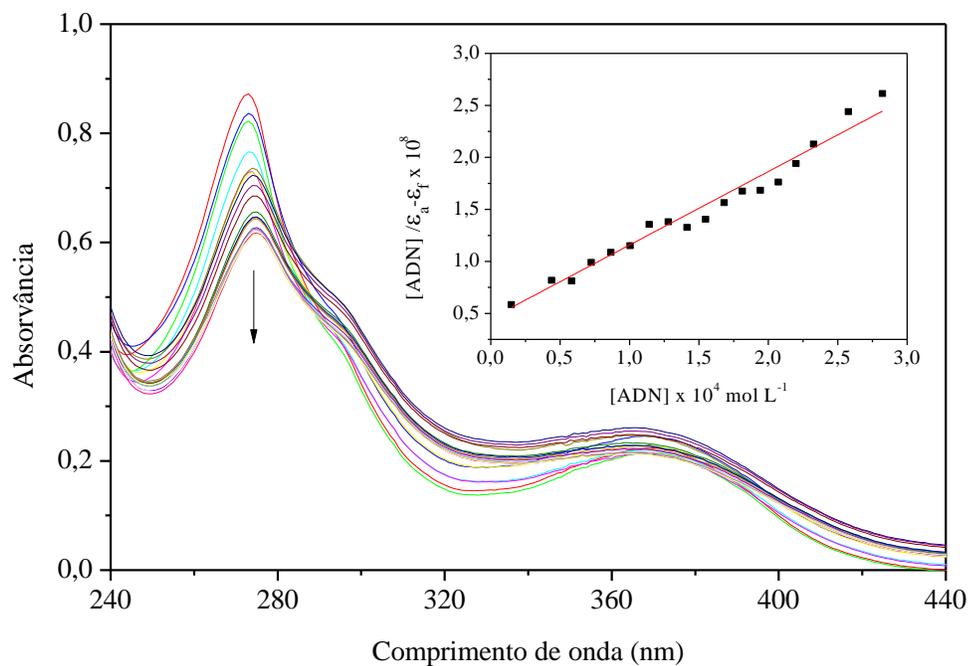


Figura 18. Espectro de soluções contendo complexo 1 ($2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e concentrações crescentes de ADN de 0 a $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão HEPES pH 7,3, $I = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.
Requadro: $[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{ADN}]$.

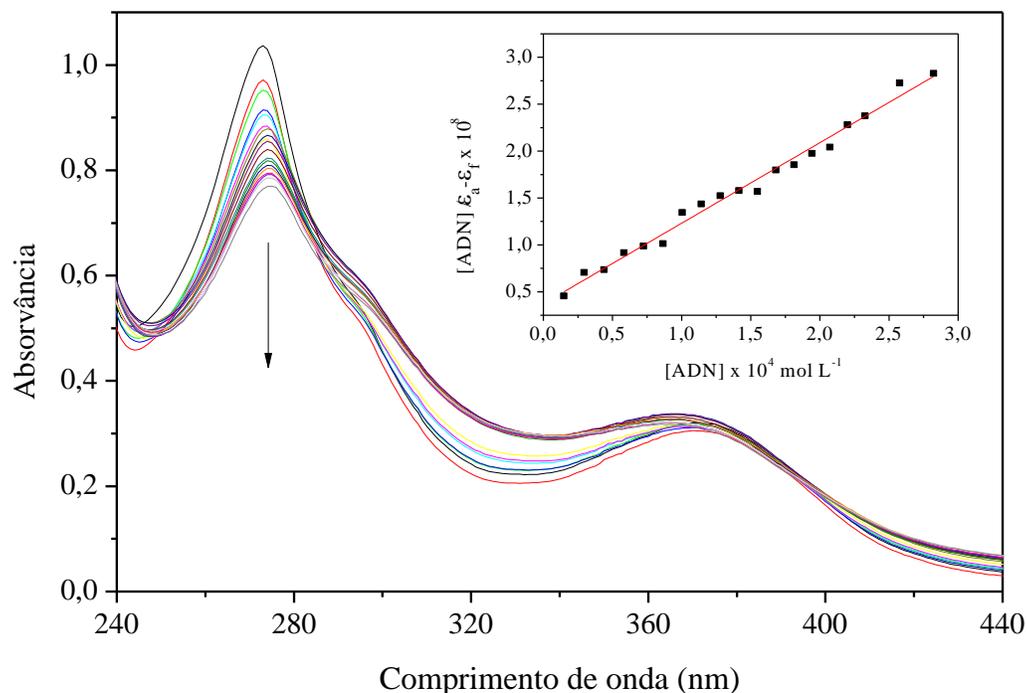


Figura 19. Espectro de soluções contendo complexo 2 ($2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e concentrações crescentes de ADN de 0 a $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão HEPES pH 7,3, $I = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Requadro: $[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{ADN}]$.

A constante de afinidade do complexo pelo ADN é dada pela razão entre a inclinação e o intercepto da curva $[\text{ADN}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{ADN}]$, em que $[\text{ADN}]$ é a concentração de ADN em pares de base, ϵ_a é a razão da absorvância / [complexo], ϵ_f é o coeficiente de extinção do complexo livre [101]. O efeito de diluição é descartado devido à presença da variável ϵ_a que considera a concentração do complexo após cada adição de ADN. Em todos os casos a adição de ADN induz efeito hipocrômico e pequeno deslocamento batocrômico, indicando que os complexos ligam-se ao ADN de tимо de vitelo.

A constante de afinidade do complexo 1 pelo ADN é de $2,02 \times 10^4$, enquanto que a do complexo 2 é de $2,95 \times 10^4$. Esses valores são comparáveis aqueles reportados para outros

complexos de cobre(II) com 1,10-fenantrolina como ligante (faixa de 10^2 a 10^5 mol L⁻¹) [102-109]

2.3.3- Estudos de clivagem do ADN plasmidial

A Figura 20 apresenta a atividade de clivagem do ADN plasmidial pelos complexos **1** e **2**, segundo protocolo descrito na seção 3.7 do capítulo 1.

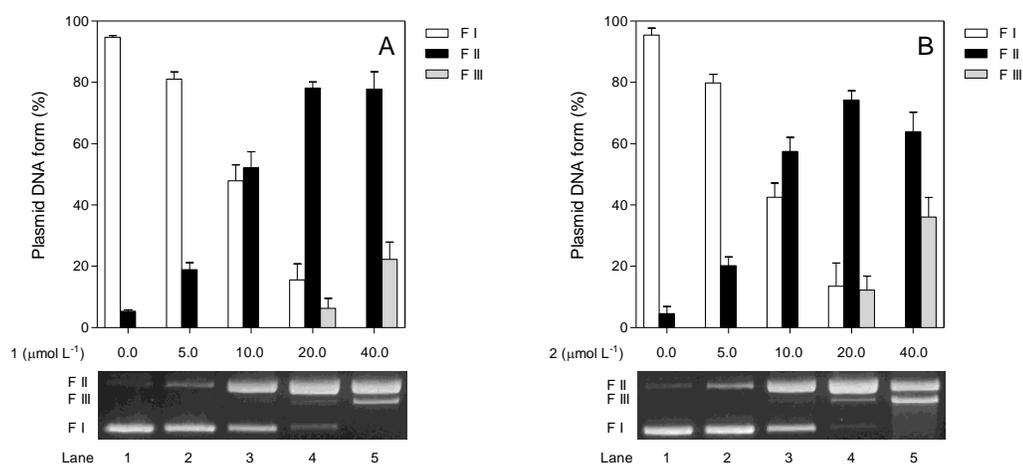


Figura 20. Clivagem do ADN plasmidial superovulado após ser exposto a diferentes concentrações (5 – 40 mmol L⁻¹) dos complexos por 4 horas à 37°C em solução tampão de Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ (pH=7,4). À esquerda experimentos para complexo 1 e à direita para complexo 2.

Esses complexos apresentaram excelente atividade de clivagem do ADN plasmidial convertendo-o em suas formas clivadas (FII e FIII), mesmo em condições moderadas de reação (37°C, pH 7,4) e sem adição de qualquer agente redutor ou oxidante. Para ambos os complexos em concentrações a partir de 20 μmol L⁻¹, o ADN plasmidial na forma I, FI, é inferior a 20%.

A Figura 21 apresenta testes de clivagem do ADN plasmidial realizados na presença de inibidores de espécies reativas de oxigênio (EROs): (a) dimetilsulfóxido para radical hidroxil (OH^\bullet); (b) superóxido dismutase (SOD) para radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$); (c) iodeto de potássio para espécies do tipo peróxido e (d) azida de sódio para oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$).

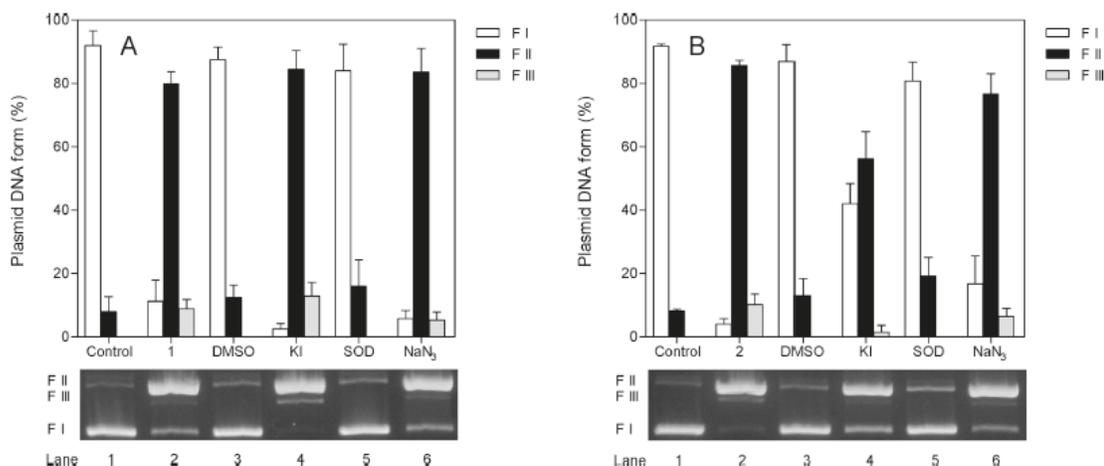


Figura 21. Efeito de inibidores de EROs na clivagem do ADN superenovelado promovida pelos complexos 1 (A) e 2 (B). Condições de reação: [complexo] = 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tempo de reação de 4 h a 37°C em 10 mmol L^{-1} Tris-HCl (pH 7,4). Os inibidores de EROs utilizados foram: dmsso (10%), KI (10 mmol L^{-1}), SOD (15 unidades) e NaN_3 (10 mmol L^{-1}).

Quando foram adicionados inibidores de radical hidroxila (OH^\bullet) e de radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a atividade de clivagem foi suprimida, indicando que essas espécies são formadas e participam do processo de clivagem do ADN. A adição de NaN_3 , um inibidor de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), não afetou a clivagem do ADN plasmidial promovida pelos complexos 1 e 2.

Uma vez que o mecanismo oxidativo de clivagem do ADN plasmidial por muitos complexos metálicos envolve redução do centro metálico, testes foram feitos na presença de batocuproína¹⁴. Após a adição da batocuproína, a clivagem do ADN plasmidial na presença

¹⁴ Batocuproína é um agente quelante conhecido por sua alta seletividade para determinação do íon Cu(I) , formando com esse metal o complexo: $[\text{Cu}(\text{batocuproína})_2]^+$.

dos complexos **1** e **2** foi completamente inibida, o que sugere a participação do cobre(I) no evento de clivagem.

A presença de ligantes específicos aos sulcos do ADN revelou resultados semelhantes para ambos os complexos. Quando o ADN plasmidial supernovelado foi pré-tratado com distamicina, um agente específico para o sulco menor do ADN, não ocorreu inibição da clivagem. No entanto, quando o ADN plasmidial supernovelado foi pré-tratado com verde de metila, um agente específico para o sulco maior do ADN, ocorreu inibição completa da clivagem do ADN plasmidial. Esses resultados sugerem que os complexos **1** e **2** clivam o ADN preferencialmente pelo sulco maior.

2.4- Coeficiente de partição

Nos estudos de determinação da quantidade de cobre ligada ao ADN intracelular e na determinação da constante de afinidade dos complexos pelo ADN foi mostrado que os complexos **1** e **2** interagem com o ADN. Contudo, os resultados desses estudos revelaram que o complexo **2** tem maior afinidade por essa macromolécula, embora seja menos ativo que o **1** na linhagem celular K562.

Uma proposta para explicar essa aparente contradição é determinar a lipofilia desses complexos. A lipofilia está relacionada com a facilidade de entrada dos complexos na membrana celular. Embora a doxiciclina e a tetraciclina sejam isômeros estruturais, a diferença de posição de uma hidroxila entre as duas moléculas causa mudanças significativas na lipofilia das mesmas e, conseqüentemente, nos complexos formados com esses antibióticos também. Para averiguar a diferença de lipofilia dos complexos **1** e **2**, o coeficiente de partição de cada um deles foi determinado, segundo procedimento descrito na seção 3.1 do

capítulo 1. A Tabela 8 mostra os valores dos coeficientes de partição dos ligantes (conforme literatura) e dos complexos.

Tabela 8. Valores de K_{ow} para os ligantes e para os complexos 1 e 2.

Compostos	K_{ow}
dox	0,80*
tc	0,05*
Complexo 1	0,82
Complexo 2	0,12

*Valores encontrados na literatura [98].

A doxiclina é cerca de dezesseis vezes mais lipofílica que a tetraciclina. Os complexos de cobre(II) com esses dois ligantes também seguem essa mesma tendência, sendo o complexo **1** cerca de sete vezes mais hidrofóbico que o **2**. Em trabalho anterior [12] foi mostrado que o complexo $[Pt(dox)Cl_2]$ é cerca de 1,5 vezes mais citotóxico e 2,5 vezes mais lipofílico que o complexo $[Pt(tc)Cl_2]$. Nos casos dos complexos **1** e **2**, **1**, cujo ligante é a doxiciclina, é cerca de 1,3 vezes mais ativo e 6,8 vezes mais lipofílico que **2**.

Propõe-se que o complexo mais lipofílico, **1**, entra mais rapidamente nas células e por isso seja mais citotóxico, enquanto que o complexo mais hidrofílico, **2**, interage melhor com o ADN que é uma molécula carregada.

2.5- Estudos da fotocitotoxicidade e da fotoclivagem do ADN promovida pelos complexos 1 e 2

Devido ao fato de as tetraciclinas apresentarem alta fotossensitividade [111, 112] têm sido reportados trabalhos sobre a capacidade desses antibióticos de fotoinduzir danos ao ADN na ausência [113] e na presença de íons Cu(II) [114]. Esses fatos estimularam o estudo da fotocitotoxicidade dos complexos **1** e **2**.

A Figura 22 apresenta as curvas de inibição do crescimento celular após incubação das células com os complexos **1** e **2** com e sem irradiação. Esses experimentos foram feitos conforme procedimento descrito na seção 3.3 do capítulo 1.

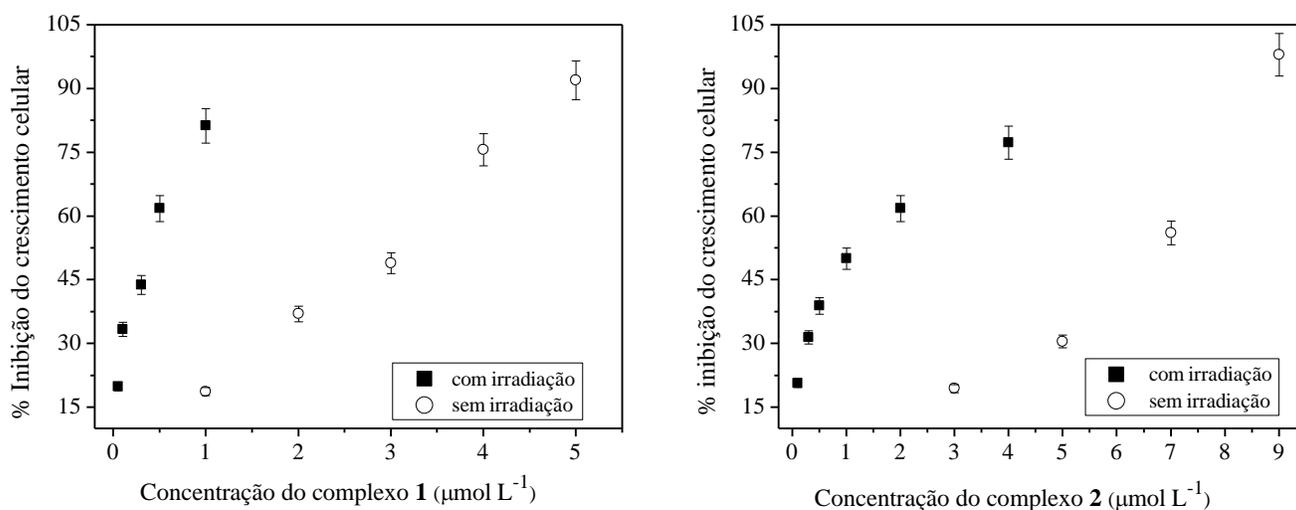


Figura 22. Curvas de inibição do crescimento celular após incubação das células com os complexos **1** e **2** por 5 horas sem irradiação (círculos abertos) e com irradiação UV-A por 5 min (quadrados cheios).

Os valores de CI_{50} obtidos no escuro para os complexos **1** e **2** são respectivamente $3,23 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $6,65 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que os valores de CI_{50} após irradiação para os

complexos **1** e **2** são respectivamente $0,35 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. A exposição à luz UV-A aumentou a citotoxicidade em aproximadamente nove vezes para **1** e sete vezes para **2**.

A Figura 23 apresenta os testes de clivagem do ADN plasmidial após exposição à luz UV-A. Os resultados desses estudos foram muito promissores revelando um aumento de 40 vezes na clivagem do ADN plasmidial pela exposição à luz UV-A.

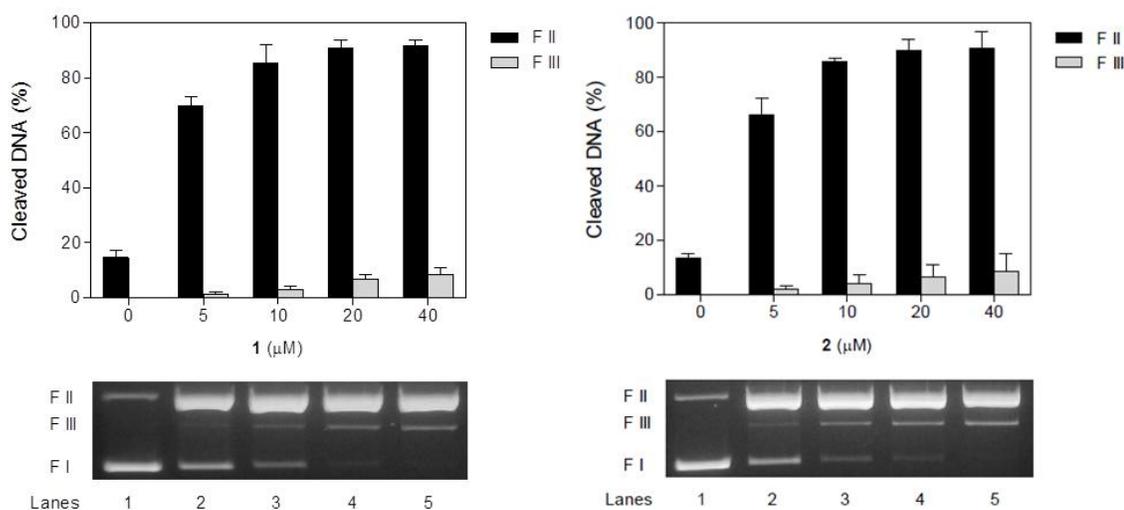


Figura 23. Clivagem do ADN promovida pelos complexos **1** (à esquerda) e **2** (à direita). Condições de reação: [ADN] = 400 ng, $\sim 30 \mu\text{M}$ em pares de base; [tampão] = 10 mM Tris-HCl (pH 7,4); [complexo] = 0 a 40 μM ; Os dados apresentados são referentes a dois experimentos independentes.

Para verificar a estabilidade dos complexos **1** e **2** frente à irradiação UV-A foram feitas análises por espectroscopia eletrônica e espectrometria de massas antes e após 5 minutos de exposição à irradiação UV-A. Em ambas as análises não foram observadas mudanças após exposição dos complexos **1** e **2** à irradiação UV-A, o que indica que os complexos **1** e **2** são estáveis frente à irradiação UV-A. Portanto, os promissores resultados dos ensaios de fotocitotoxicidade e fotoclivagem do ADN provavelmente estejam

relacionados a alguma alteração no mecanismo de clivagem do ADN quando irradiado e não a uma mudança estrutural dos complexos.

Para verificar a participação das espécies reativas de oxigênio na cisão do ADN promovida pelos complexos **1** e **2** sob irradiação UV-A, diferentes inibidores de EROs foram utilizados: (a) dimetilsufóxido para OH^\bullet ; (b) superóxido dismutase (SOD) para $\text{O}_2^{\bullet-}$; (c) iodeto de potássio para espécies do tipo peróxido e (d) azida de sódio para $^1\text{O}_2$.

A Figura 24 apresenta as porcentagens de fotoclivagem do ADN superenovelado promovida pelos complexos **1** e **2** sob efeito de inibidores EROs.

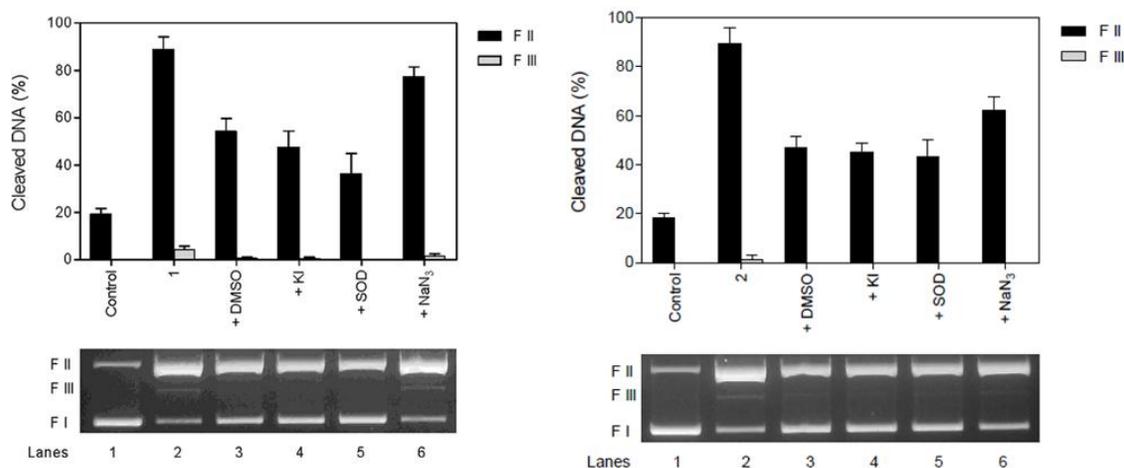


Figura 24. Efeito dos inibidores EROs na clivagem do ADN superenovelado promovida pelos complexos **1** (à esquerda) e **2** (à direita). Condições de reação: [ADN] = 400 ng, ~30 μM em pares de base; [tampão] = 10 mM Tris/HCl (pH 7,4); [complexo] = 20 μM ; [DMSO] = 10% (v/v); [SOD] = 15 unidades; [KI] = 10 mM; [NaN₃] = 10 mM; tempo = 5 min sob luz UV-A ($\lambda = 365$ nm, 12 W). Resultados representativos para dois experimentos independentes.

A partir desses estudos de clivagem do ADN plasmidial foi possível observar que a adição de um inibidor do oxigênio singlete (NaN_3) ocasiona uma diminuição da porcentagem de clivagem do ADN promovida pelos complexos **1** e **2**. Quando a reação é efetuada no escuro o NaN_3 não produz nenhum efeito. Este resultado sugere que a espécie oxigênio

singlete ($^1\text{O}_2$) participa do mecanismo de fotoclivagem do ADN. Os reagentes dmsO, SOD e KI também inibem parcialmente a fotoclivagem do ADN plasmidial. Esses resultados indicam que as espécies radicalares OH^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$ também participam do processo de fotoclivagem do ADN como previamente observado nas reações feitas no escuro.

Os resultados de fotocitotoxicidade e fotoclivagem do ADN pelos complexos **1** e **2** se mostram muito promissores, pois existe uma demanda por agentes sintéticos que tenham sua atividade de clivagem do ADN aumentada sob irradiação UV para serem aplicados em terapia fotodinâmica.

2.6- Testes *in vivo*

Foi mostrado que os complexos interagem com o ADN e que *in vitro* inibem o crescimento de células tumorais em doses baixas. Estes resultados promissores estimularam a pesquisa da atividade desses compostos *in vivo*. Para os tests *in vivo* foi escolhido o complexo **1** por ele ser o mais ativo na linhagem celular K562. Conforme protocolo descrito na seção 3.9 do capítulo 1 os camundongos foram tratados com tampão PBS e com os complexos **1** e $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ (para efeitos de comparação).

A Figura 25 apresenta as curvas de sobrevivência dos camundongos tratados com tampão PBS, complexo **1** e $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ versus o tempo em dias após inoculação do tumor de *Erhlich*.

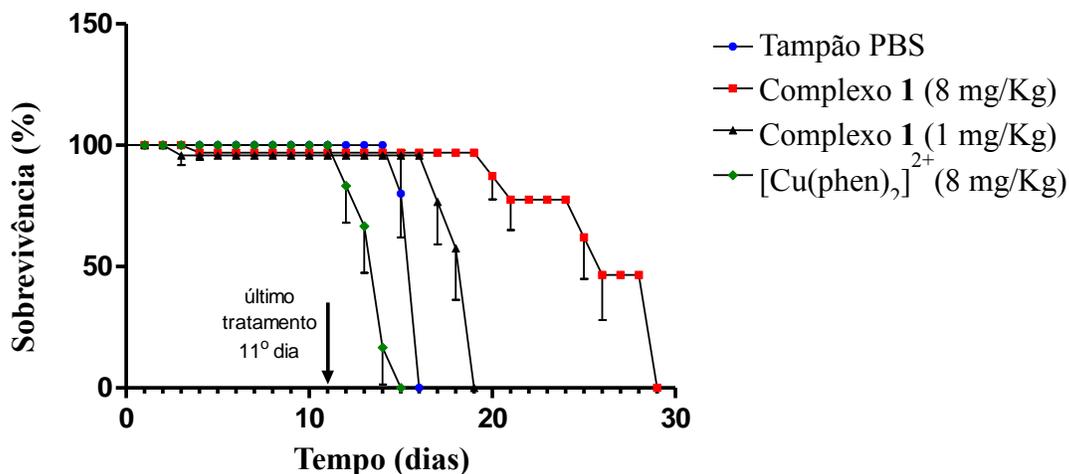


Figura 25. Curvas de sobrevivência de camundongos com tumor de *Erlich* inoculado, sendo tratados com tampão PPS (teste controle), complexo 1 (concentrações de 1 e 8 mg/Kg) e [Cu(phen)₂]²⁺ (1 mg/Kg).

Os camundongos foram separados em quatro grupos, segundo o tratamento que lhes foi aplicado: Grupo A- tampão PBS (grupo controle); Grupo B- 8mg/Kg do complexo 1; Grupo C- 1mg/Kg do complexo 1 e Grupo D- 1mg/Kg do [Cu(phen)₂]²⁺. Os camundongos do grupo A (controle) apresentaram um decréscimo na sobrevivência a partir do 15º dia após a inoculação do tumor. Enquanto que os camundongos tratados com o complexo [Cu(phen)₂]²⁺, Grupo D, morreram em um tempo inferior ao do grupo controle, o que evidencia a toxidez desse composto *in vivo*. Os grupos B e C, cujos camundongos foram tratados com o complexo 1 apresentaram maior taxa de sobrevivência quando comparados ao grupo controle. A administração do complexo 1 na concentração de 8mg/Kg de peso corporal praticamente dobra a sobrevida dos animais quando comparado ao grupo controle. Esses resultados são muito importantes, abrindo perspectiva para a utilização desse complexo no tratamento do câncer.

A Figura 26 apresenta fotos de animais de cada um dos grupos no 13º dia de tratamento. É possível observar nas fotos que enquanto os animais dos grupos A, C e D se

apresentam com grande volume corporal devido ao crescimento do tumor, o animal do grupo B apresenta tamanho aparentemente normal evidenciando o retardo no crescimento do tumor.

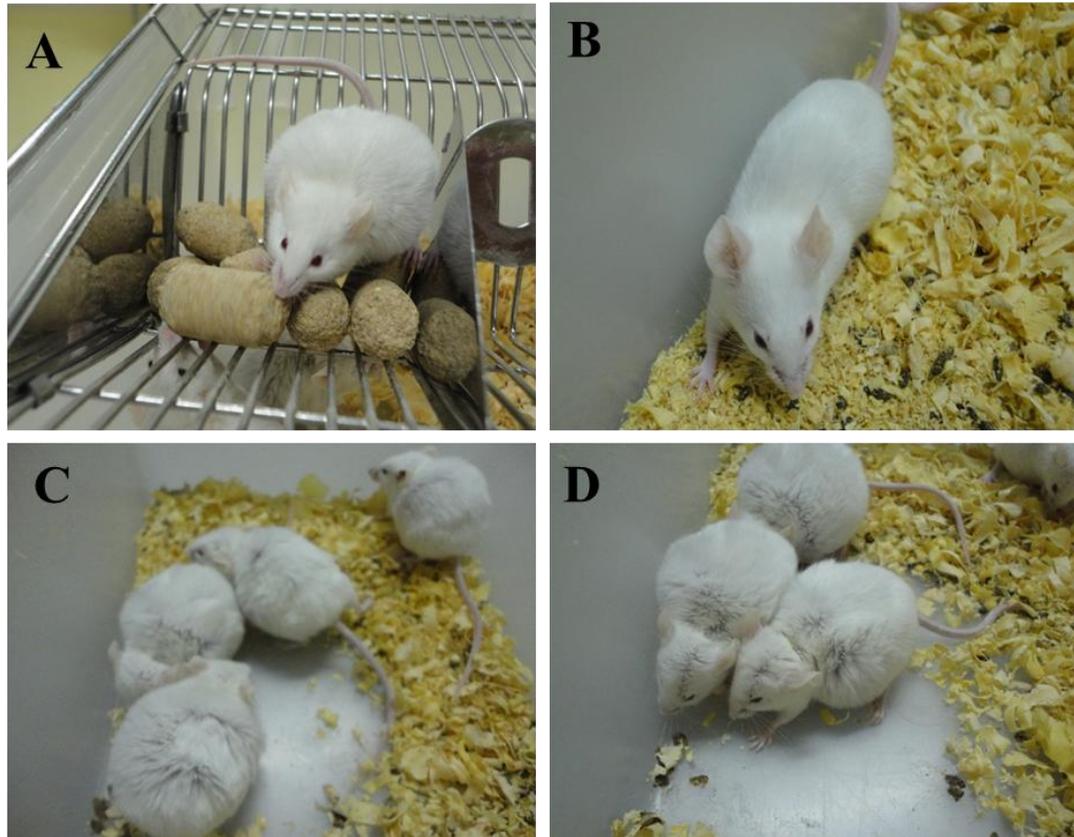


Figura 26. Foto dos animais no 13º dia de experimento. A- animal do grupo controle; B- animal do grupo Complexo 1 (8mg/kg de peso corporal). C-animais do grupo Complexo 1 (1mg/kg) e D-animais do grupo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ (1mg/kg de peso corporal).

3- CONCLUSÕES

Dois novos complexos ternários de cobre(II) com os antibióticos doxiciclina e tetraciclina e o composto 1,10-fenantrolina foram preparados e caracterizados. Ambos os compostos exibem geometria octaédrica distorcida ao redor do íon Cu(II), que está coordenado equatorialmente a dois ligantes bidentados: 1,10-fenantrolina e tetraciclina ou doxiciclina e axialmente coordenado a uma molécula de água e um íon perclorato. Em ambos os compostos, o cobre(II) se liga às tetraciclinas via oxigênio da hidroxila e oxigênio da amida no anel A e liga-se à 1,10-fenantrolina através dos seus dois nitrogênios heterocíclicos.

A sensibilidade de células de leucemia mielóide crônica (K562) aos complexos é maior que aos ligantes livres. Embora as diferenças nos valores de CI_{50} dos complexos **1** e **2**, $[Cu(phen)_2]^{2+}$ e phen não sejam tão expressivas, os primeiros se apresentam como promissores agentes para tratamento do câncer uma vez que não são tóxicos como a phen e o $[Cu(phen)_2]^{2+}$. Somado a isso, os complexos **1** e **2** apresentam atividade expressiva de clivagem do ADN plasmidial em condições moderadas de reação e mesmo na ausência de qualquer agente oxidante ou redutor adicional. Esses complexos estão entre os mais ativos relatados até o momento. Sob irradiação UV-A por cinco minutos a atividade de clivagem do ADN plasmidial e a citotoxicidade desses compostos são consideravelmente ampliadas de cerca de quarenta e oito vezes, respectivamente. Estes resultados abrem perspectivas para o uso dos compostos em terapia fotodinâmica.

Também foi demonstrado que o efeito citotóxico dos complexos aumenta com o acréscimo da concentração intracelular de cobre. Uma vez dentro das células, os complexos reagem com o ADN e o número de adutos Cu-ADN formados é proporcional à concentração de complexo adicionada ao meio extracelular.

O complexo **1** foi testado *in vivo* em camundongos com tumor de *Ehrlich* inoculado. Esse complexo na concentração de 8mg/Kg de peso corporal se apresentou eficaz no retardo do aparecimento e do desenvolvimento desse tumor

Devido aos excelentes resultados obtidos com esses complexos um depósito de patente foi realizado sob número PI10025235 [115] e dois artigos foram publicados [116, 117].

**CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTITUMORAL DE QUATRO COMPLEXOS TERNÁRIOS DE
COBRE(II) COM LIGANTES HETEROCÍCLICOS α,α -DIAMINA E DERIVADOS
DE HIDRAZIDAS.**

1- CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS 3, 4, 5 E 6

A Figura 27 apresenta as estruturas dos quatro novos complexos ternários de cobre(II) que foram preparados conforme protocolos descritos nas seções 4.2.3 a 4.2.6 do capítulo 1. Esses compostos contêm como um dos ligantes a hidrazida do ácido 2-tiofenecarboxílico (complexos **3** e **4**) e a hidrazida do ácido 2-furóico (complexos **5** e **6**). Os complexos **3** e **5** possuem como segundo ligante o composto 1,10-fenantrolina, enquanto os complexos **4** e **6** possuem como segundo ligante o composto 2-2'-bipiridina.

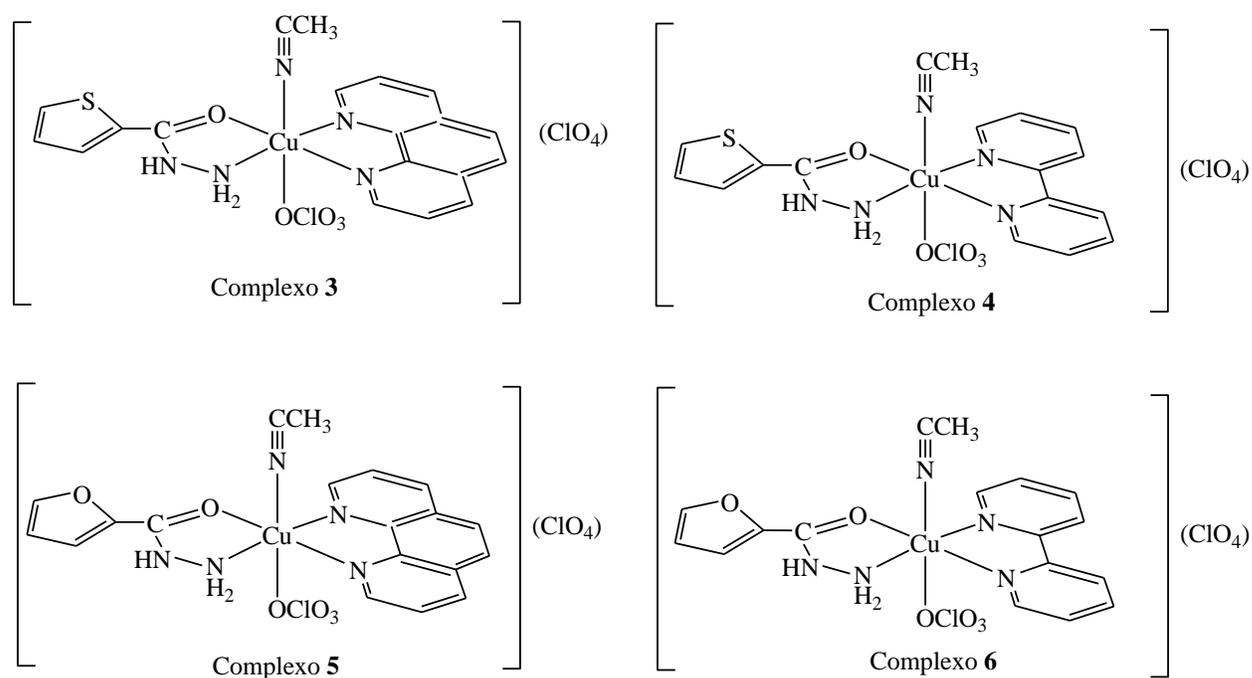


Figura 27. Estruturas dos complexos 3, 4, 5 e 6.

Esses quatro complexos foram caracterizados por análise elementar, medidas de condutividade, análises espectroscópicas na região do infravermelho e do ultravioleta-visível e ressonância paramagnética eletrônica. Para os complexos **3**, **5** e **6** foi possível isolar cristais adequados para a determinação das estruturas pela técnica de difração de raios X de monocristal.

1.1 - Análises elementares e condutivimétricas

Os dados referentes aos teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e cobre e às condutividades molares desses quatro complexos estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Dados das análises elementares e condutimétricas dos complexos 1, 2, 3 e 4. Os valores foram calculados para as fórmulas mínimas: 3- $\text{CuC}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_9\text{SCl}_2$; 4- $\text{CuC}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_9\text{SCl}_2$; 5- $\text{CuC}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{Cl}_2$ e 6- $\text{CuC}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{Cl}_2$.

Complexos	%C	%H	%N	%Cu	Λ_M ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	
3 – $[\text{Cu}(\text{Shyd})(\text{phen})(\text{acn})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$ MM= 625,91 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	35,08 (36,46)	2,56 (2,74)	10,38 (11,19)	10,38 (10,15)	
4 – $[\text{Cu}(\text{Shyd})(\text{bpy})(\text{acn})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$ MM= 601,89 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	30,16 (33,93)	2,83 (2,85)	9,34 (11,64)	11,23 (10,56)	133,0
5 – $[\text{Cu}(\text{Ohyd})(\text{phen})(\text{acn})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$ MM= 609,91 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	37, 87 (37, 42)	2, 49 (2, 81)	11, 14 (11, 49)	10,83 (10,36)	202,9
6 – $[\text{Cu}(\text{Ohyd})(\text{bpy})(\text{acn})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)$ MM= 585,89 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	33,15 (34,86)	2,49 (2,92)	10,34 (11,96)	12,00 (10,85)	194,9

Os resultados de análise elementar desses complexos condizem com as fórmulas moleculares propostas. As condutividades molares dos complexos **3**, **4**, **5** e **6** apresentam valores típicos de eletrólitos 2:1 [87].

1.2 - Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os estiramentos importantes para auxiliar na proposição do modo de coordenação dos ligantes ao metal são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Algumas frequências (cm⁻¹) na região do infravermelho dos ligantes Shyd, Ohyd, phen e bpy e dos respectivos complexos metálicos.

Composto	Frequência dos estiramentos em cm ⁻¹						
	ν (C=C,C=N)	ν (NH)	ν (CO)	ν (NN)	ν (ClO ₄)	ν (CuO)	ν (CuN)
Shyd	-	3238, 3196	1627	942	-	-	-
Ohyd	-	3266,	1622	963	-	-	-
phen	1585	-	-	-	-	-	-
bpy	1590	-	-	-	-	-	-
Complexo 3	1608	3054, 2940	1638	931	1142, 1115, 1090	552	434
Complexo 4	1602	3050, 2942	1646	940	1142, 1110, 1088	536	416
Complexo 5	1596	3140 3032	1646	940	1144, 1119, 1083	566	434
Complexo 6	1599	3263 3104	1645	941	1141, 1110, 1087	567	433

Nas Figuras 28 a 31 são representados os espectros vibracionais na região do infravermelho dos complexos **3** a **6**, os espectros IV dos ligantes phen, bpy, Shyd e Ohyd são mostrados respectivamente nas Figuras 80 a 83 no Anexo I.

A espectrometria na região do infravermelho desses complexos confirmou a coordenação dos ligantes Shyd e Ohyd ao metal via um nitrogênio e o oxigênio da carbonila,

conforme já demonstrado na literatura [118]. Quando livre, esses ligantes apresentam absorção respectivamente em 1627 e 1622 cm^{-1} , referentes ao estiramento $\nu\text{C}=\text{O}$, enquanto que nos complexos essas bandas deslocaram-se para frequências maiores 1652 cm^{-1} (complexo **3**) e 1646 cm^{-1} para demais complexos. Também foi possível verificar mudanças nas absorções referentes a νNH . A coordenação do metal à phen ou à bpy pode ser confirmada pela presença das bandas em torno de 1600 cm^{-1} referentes ao estiramento $\nu\text{C}=\text{NH}$ no espectro dos complexos.

Os espectros na região do infravermelho dos quatro ligantes apresentaram bandas de baixa intensidade aproximadamente em 2000 cm^{-1} que podem ser atribuídas ao estiramento $\text{C}\equiv\text{N}$, confirmando a participação do ligante acetonitrila na coordenação ao metal. Bandas de nitrilas geralmente aparecem na entre 2260-2100 cm^{-1} [119]. Contudo, devido à coordenação ao metal e o conseqüente enfraquecimento da ligação $\text{C}\equiv\text{N}$, nos espectros na região do IV dos complexos essa banda será deslocada para região de menor energia.

O comportamento fracamente coordenado do íon perclorato pode ser distinguido pelas frequências dos estiramentos Cl-O. Quando livre o ânion perclorato, T_d , exibe um estiramento simétrico, ν_3 . Quando um dos oxigênios do perclorato coordena-se ocorre uma redução de simetria e, portanto, a banda ν_3 é dividida em duas outras bandas [92]. Os quatro complexos apresentam três bandas intensas de estiramento Cl-O, o que pode ser explicado pela presença um ânion perclorato livre, contra-íon, e o outro atuando como ligante monoligado ao cobre(II). Essa proposição foi confirmada pela análise de raios X de monocristal que descreveremos a seguir.

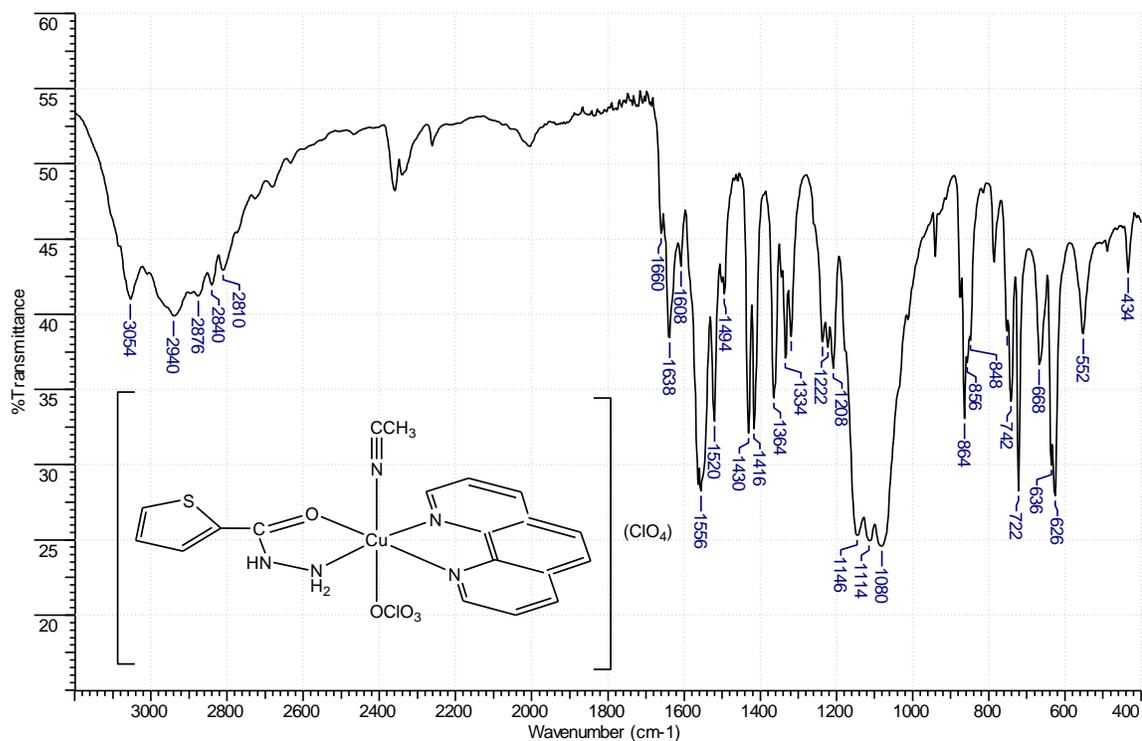


Figura 28. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo 3.

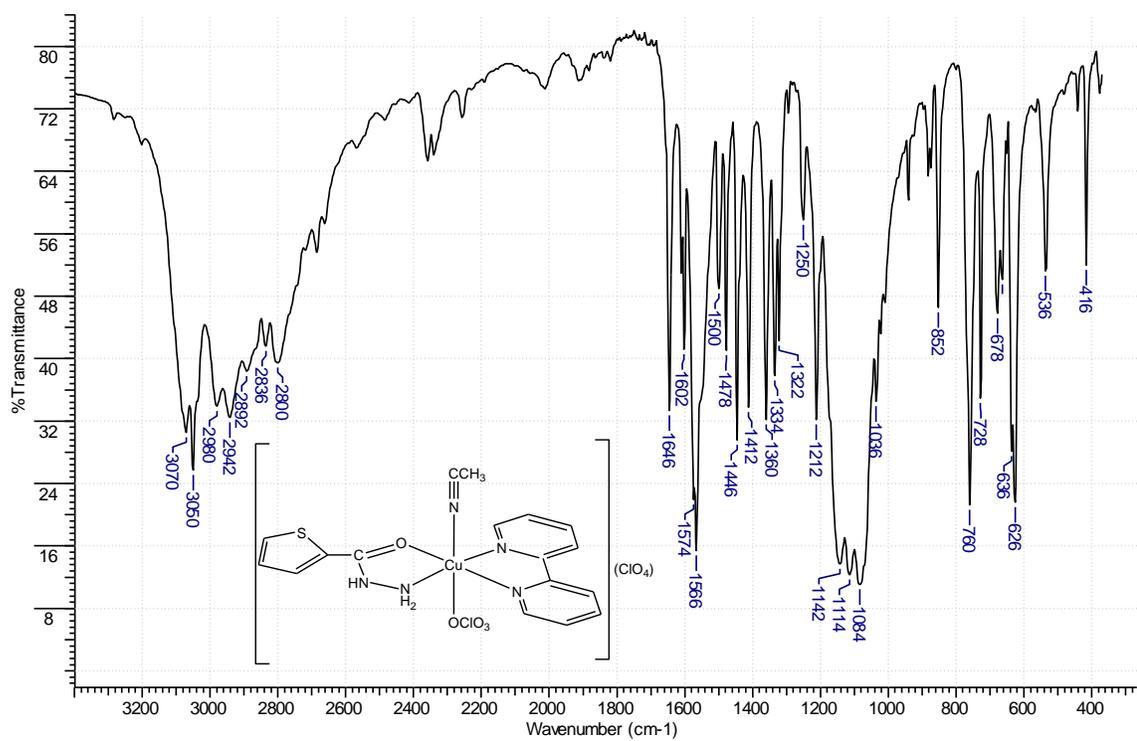


Figura 29. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo 4.

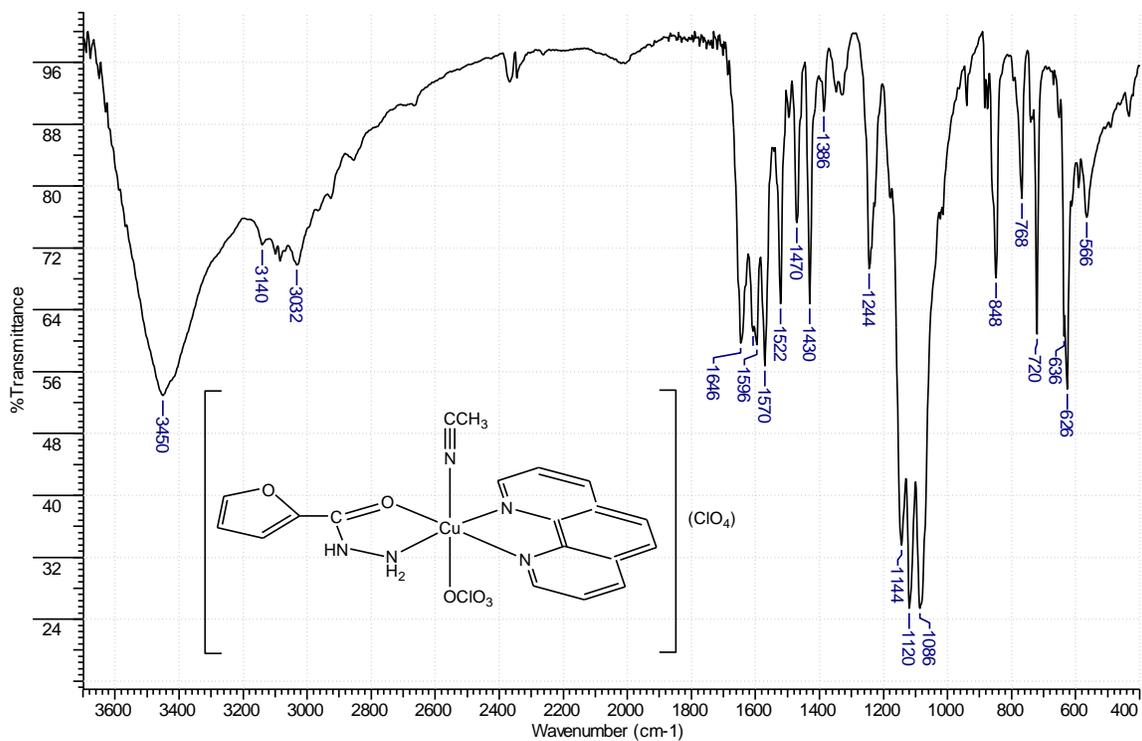


Figura 30. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo 5.

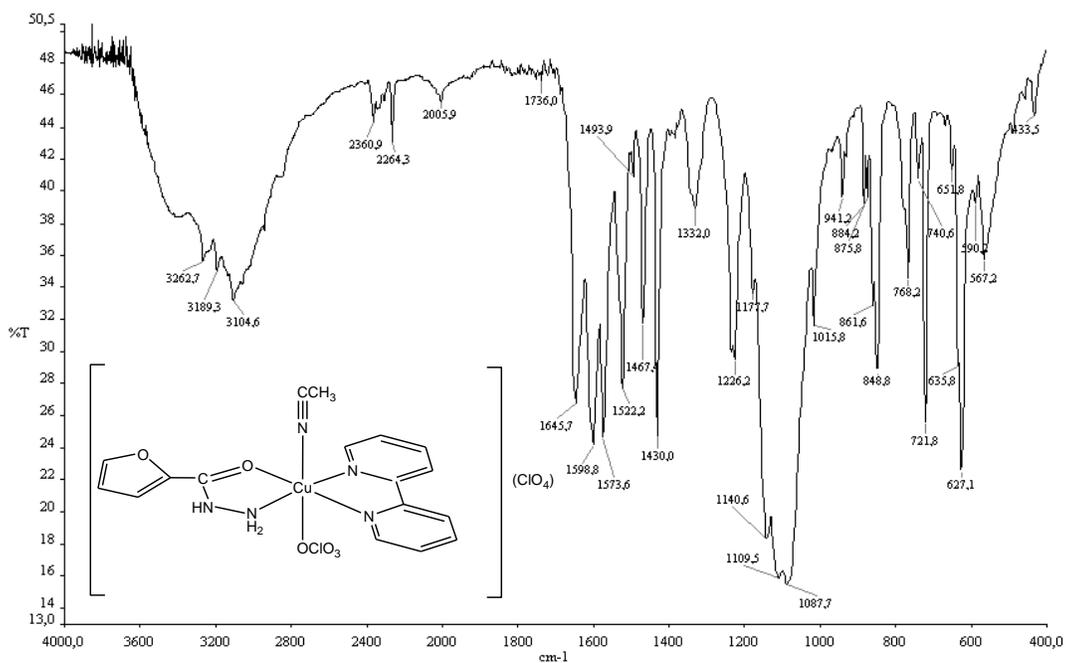


Figura 31. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo 6.

1.3 - Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível

Os espectros eletrônicos dos complexos **3**, **4**, **5** e **6** e dos ligantes Shyd, Ohyd, phen e bpy são apresentados na Figura 32.

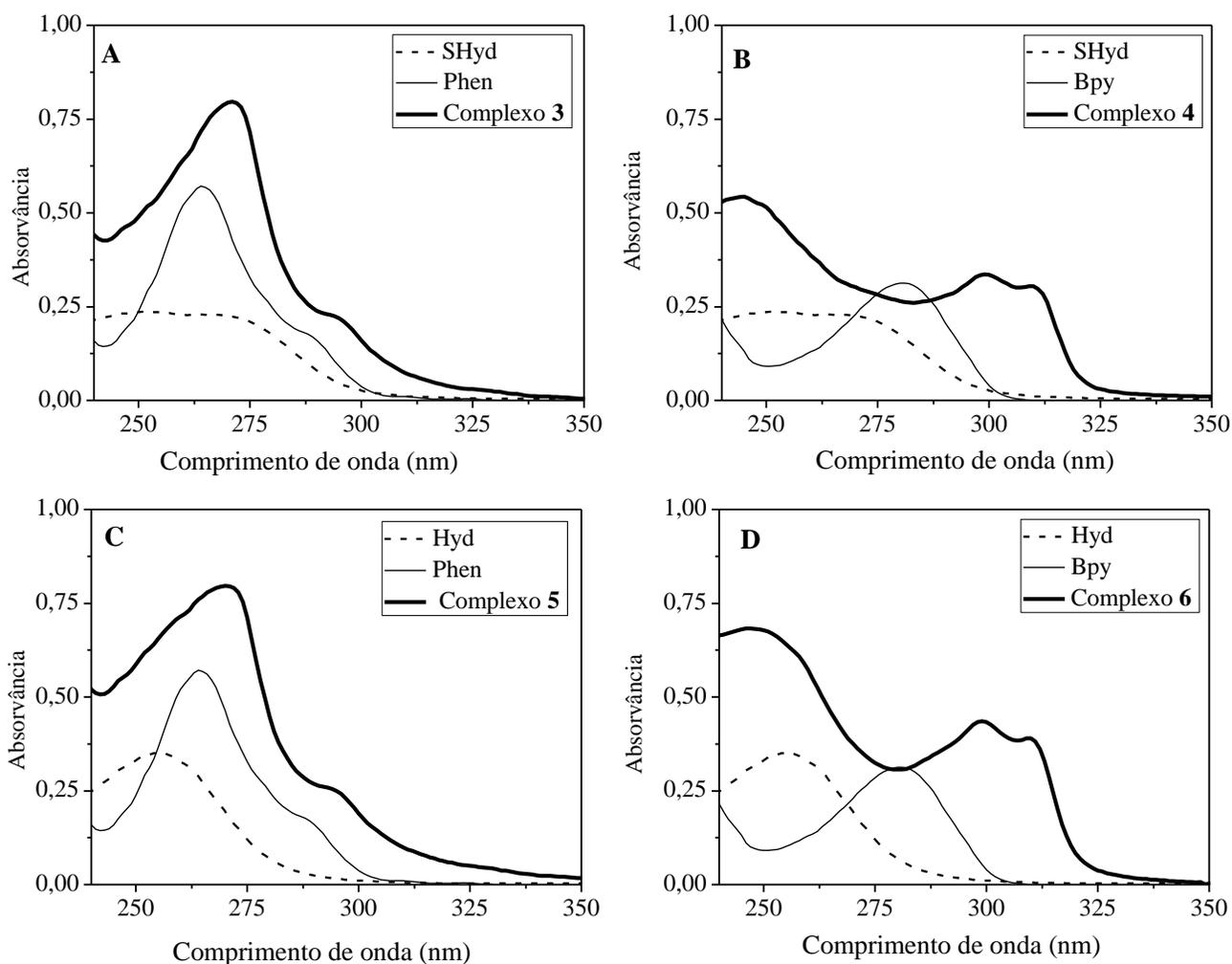


Figura 32. Espectros eletrônicos de soluções aquosas $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{pH}=7,2$ do complexo **3**, Shyd e phen (A); complexo **4**, Shyd e bpy (B), complexo **5**, Ohyd e phen (C) e complexo **6**, Ohyd e bpy; $l=1 \text{ cm}$.

A banda do ligante 1,10-fenantrolina de alta energia centrada em 264 nm, referente a transições do tipo $\pi-\pi^*$, sofre um deslocamento batocrômico para 271 nm nos complexos **3** e **5**. As bandas dos complexos **3** e **5** em 271 nm corresponde a sobreposições das bandas dos

ligantes phen e Shyd ou Ohyd. Enquanto que a banda da 2,2'-bipiridina centrada em 280 nm, referente a transições do tipo $\pi-\pi^*$, sofre deslocamento para 298 nm nos complexos **4** e **6**. A banda da phen (264 nm) aparece em menor comprimento de onda (maior energia) em relação à banda da bpy (280 nm) devido ao fato de a primeira possuir maior extensão de conjugação. Esse comportamento é observado também para os complexos preparados com esses ligantes. Os complexos **4** e **6** apresentam bandas em 244 nm referentes às contribuições dos ligantes Shyd para o primeiro e Ohyd para o segundo.

Na Figura 38 são mostrados os espectros UV-Vis dos complexos **3** a **6**, que exibem uma banda d-d larga centrada nos seguintes comprimentos de onda: complexo **3** – 671 nm; complexo **4** – 645 nm; complexo **5** – 682 nm e complexo **6** – 674 nm. Essa banda é típica de geometria octaédrica tetragonalmente distorcida, que é característica de complexos de cobre(II).

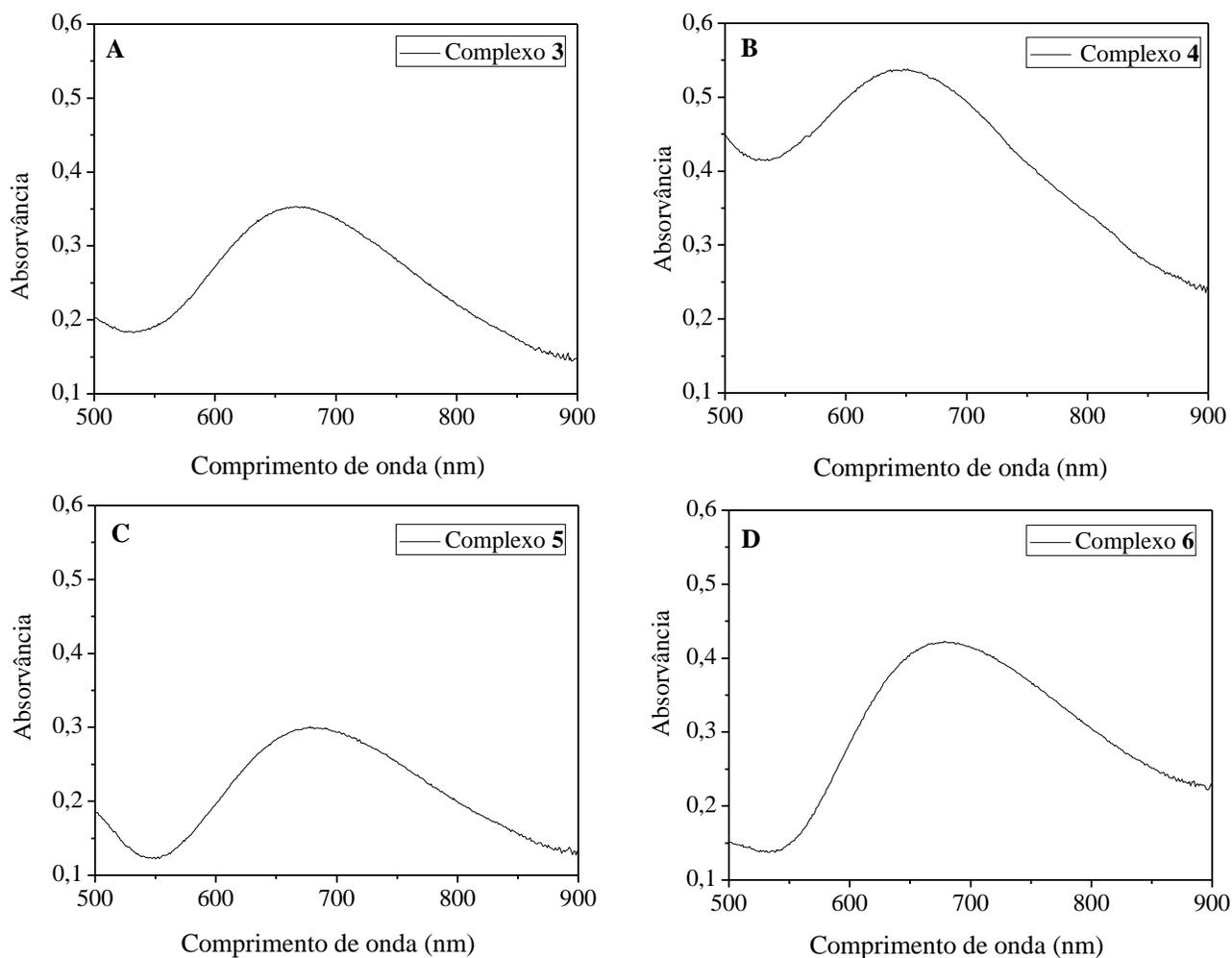


Figura 33. Espectros eletrônicos de soluções aquosas $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A - complexo 3; B - complexo 4; C - complexo 5; D - complexo 6; $l=10 \text{ cm}$.

1.4 - Ressonância paramagnética eletrônica

A Figura 40 representa os espectros de RPE dos complexos **3**, **4**, **5** e **6** e a Tabela 11 relaciona os parâmetros dos espectros de RPE desses complexos.

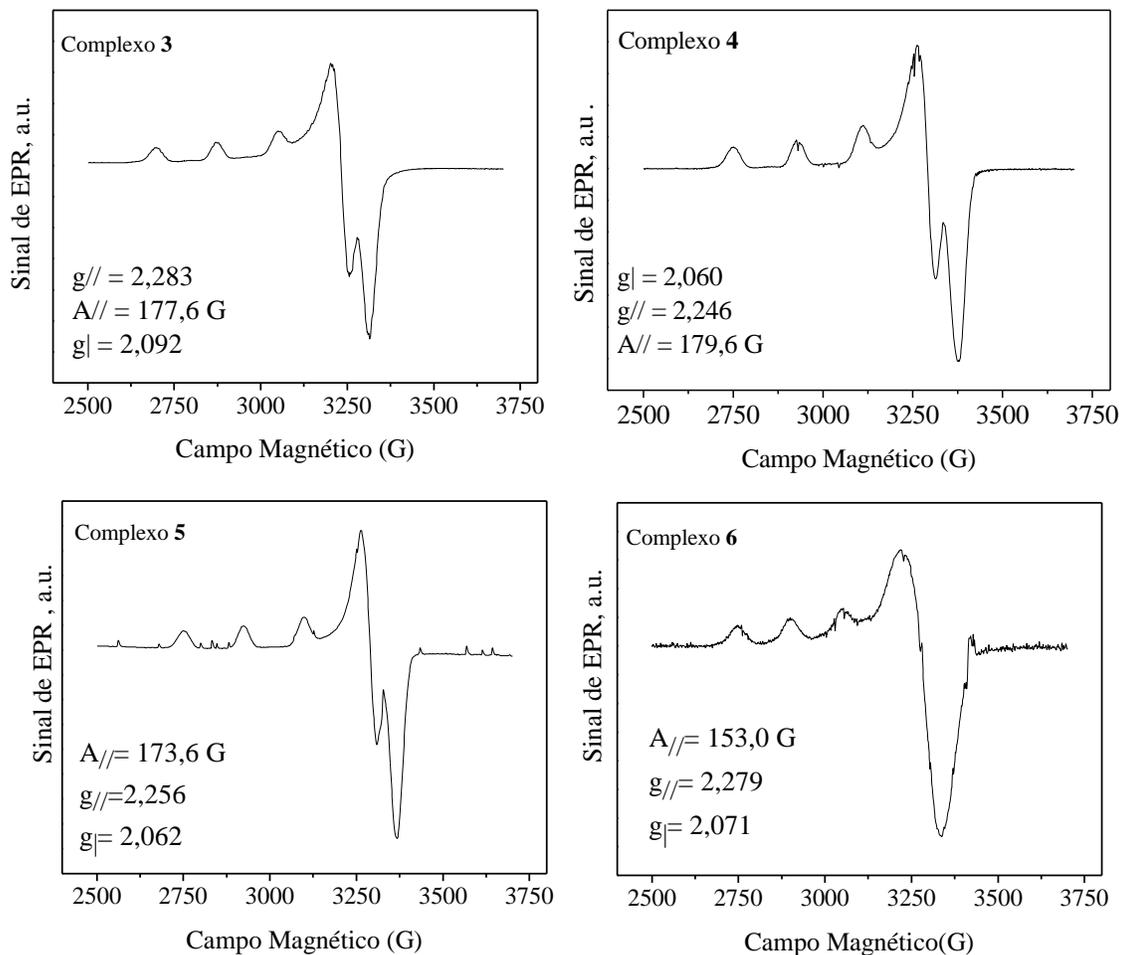


Figura 34. Espectros de RPE para complexos 3, 4, 5 e 6 adquiridos em solução congelada de metanol a 77K, usando modulador de 15 G.

Tabela 11. Parâmetros de RPE (g_{\perp} , g_{\parallel} , A_{\parallel} e $g_{\perp} / |A_{\parallel}|$) para os complexos 3, 4, 5 e 6

Complexos	Parâmetros de RPE				
	g_{\perp}	g_{\parallel}	A_{\parallel} (G)	A_{\parallel} (10^{-4} cm^{-1})	$g_{\perp} / A_{\parallel} $ (cm)
3	2,092	2,283	177,6	189,3	120,6
4	2,060	2,246	179,6	188,3	119,3
5	2,062	2,256	173,6	182,8	123,4
6	2,071	2,279	153,0	162,8	140,0

* $A_{\parallel} (\text{cm}^{-1}) = A_{\parallel} (\text{G}) \cdot g_{\parallel} \cdot 0,46686 \times 10^{-4}$

A discussão realizada para os espectros de RPE dos complexos **1** e **2**, feita no capítulo 2 seção 1.4, pode ser estendida para os RPE dos complexos **3**, **4**, **5** e **6**. A ordem dos valores dos parâmetros $g_{\parallel} > g_{\perp}$ é consistente com simetria axial, típica de configuração d^9 no estado fundamental, com um elétron desemparelhado no orbital dx^2-y^2 . Esses resultados são coerentes com as estruturas cristalinas determinadas para esses complexos por difração de raios X de monocristal, que serão descritas na seção seguinte.

1.5 - Difração de raios X de monocristal

As estruturas dos complexos **3**, **5** e **6** foram determinadas pela técnica de difração de raios X de monocristal. Não foi possível obter cristais adequados para difração de raios X do complexo **4**. As estruturas cristalinas dos complexos **3**, **5** e **6** são respectivamente representadas nas Figuras 35, 36 e 37. Essas figuras representam a média das posições dos átomos nas estruturas cristalinas à temperatura ambiente.

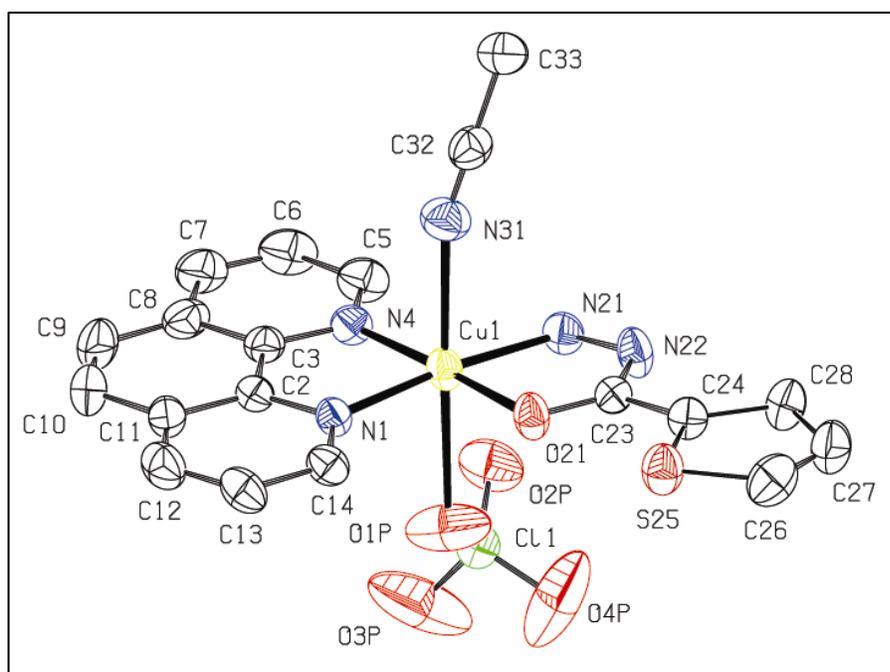


Figura 35. Representação da estrutura cristalina do complexo **3** utilizando o programa Ortep [77]. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.

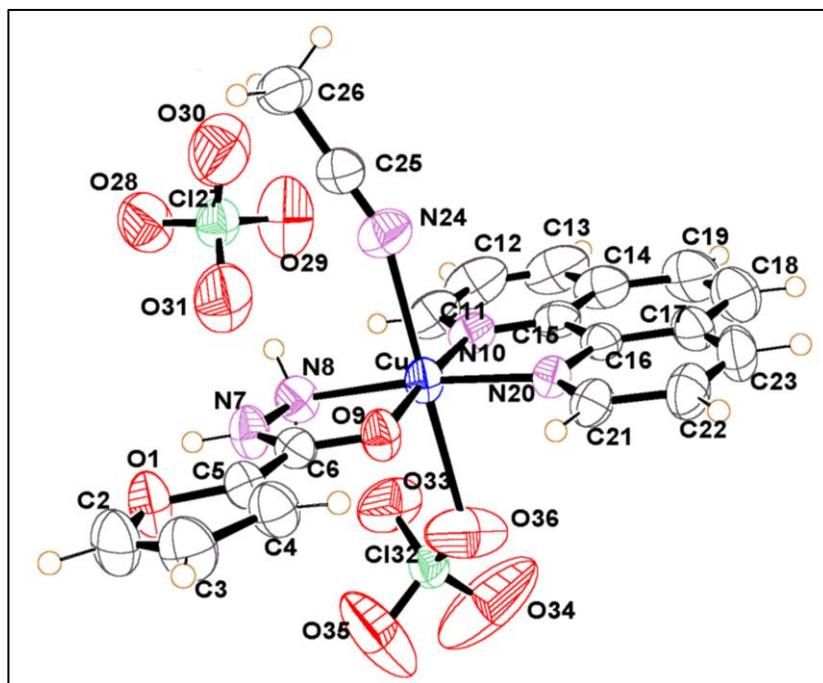


Figura 36. Representação da estrutura cristalina do complexo 5 utilizando o programa Ortep [77].

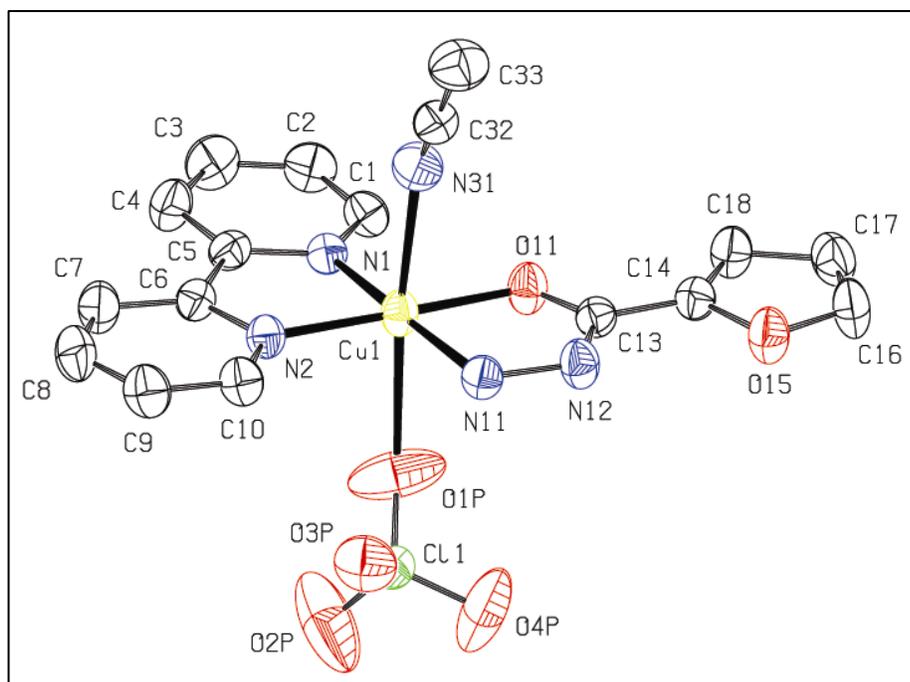


Figura 37. Representação da estrutura cristalina do complexo 6 utilizando o programa Ortep [77]. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.

Os parâmetros de rede dos três complexos são descritos na Tabela 12.

Tabela 12. Parâmetros de rede das estruturas determinadas para os complexos 3, 5 e 6.

	Complexo 3	Complexo 5	Complexo 6
Fórmula empírica	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ CuN ₅ O ₉ S	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ CuN ₅ O ₁₀	C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ CuN ₅ O ₁₀
Massa Molar	625,88 g/mol	609,82 g/mol	585,80 g/mol
Temperatura	293(2) K	293(2) K	293(2) K
Comprimento de onda da radiação	0,71069 Å	0,71073 Å	0,71069 Å
Sistema cristalino	Triclínico	Triclínico	Triclínico
Grupo espacial	P-1	P-1	P-1
Dimensões das células unitárias	a = 9,8454(18) Å	a = 9,8120(2) Å	a = 9,8696(8) Å
	b = 11,2366(7) Å	b = 11,2001(3) Å	b = 10,9174(1) Å
	c = 11,3933(9) Å	c = 11,3551(2) Å	c = 11,2164(8) Å
	α = 103,131(7)°	α = 104,564(2)°	α = 104,008(8)°
	β = 99,895(9)°	β = 100,049(2)°	β = 90,736(6)°
	γ = 91,467(9)°	γ = 90,218(2)°	γ = 103,496(7)°
Volume	1206,5(3) Å ³	1187,76(5) Å ³	1137,17(17) Å ³
Z / densidade (calc.)	2 / 1,723 g/cm ³	2 / 1,705 g/cm ³	2 / 1,711 g/cm ³
Índices limites	-11 ≤ h ≤ 11, -13 ≤ k ≤ 13, -13 ≤ l ≤ 0	-13 ≤ h ≤ 13, -15 ≤ k ≤ 14, -15 ≤ l ≤ 15	-11 ≤ h ≤ 11, -12 ≤ k ≤ 13, -13 ≤ l ≤ 0
Índices R [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0502; wR2 = 0,1266	R1 = 0,0489; wR2 = 0,1578	R1 = 0,0519; wR2 = 0,1362
Índice R todas as reflexões	R1 = 0,1053; wR2 = 0,1461	R1 = 0,0608; wR2 = 0,1638	R1 = 0,0920; wR2 = 0,1558
Faixa angular da coleta	1,87 a 25,07°.	2,76 a 29,38°	1,88 to 2,07°.

As três estruturas determinadas exibem geometria octaédrica distorcida ao redor íon cobre(II). No complexo **3** as posições equatoriais são ocupadas pelos ligantes Shyd e phen, enquanto que nos complexos **5** e **6** essas posições são ocupadas pelos ligantes Ohyd e phen (**5**) ou bpy (**6**). Os ligantes Ohyd, Shyd, phen e bpy estão ligados de maneira bidentada ao centro metálico, conforme mostrado nas Figuras 35, 36 e 37. As hidrazidas coordenam-se ao Cu(II) via nitrogênio terminal e oxigênio da carbonila, enquanto os ligantes N-doadores (phen e bpy) ligam-se ao metal via dois nitrogênios heterocíclicos. As posições axiais são ocupadas por uma molécula de acetonitrila e uma de perclorato. O segundo ânion perclorato atua como contra-íon dos complexos e é estabilizado por ligações de hidrogênio estabelecidas com a acetonitrila coordenada na posição axial.

As distâncias interatômicas determinadas entre os átomos doadores dos ligantes e o íon Cu(II) são listadas na Tabela 13.

Tabela 13. Comprimento de ligação dos átomos doadores ligados diretamente ao cobre(II) para as estruturas cristalinas dos complexos 3, 5 e 6.

	Complexo 3	Complexo 5	Complexo 6
Cu-O _(Shyd ou Ohyd)	Cu-O(1): 1,973(3) Å	Cu-O(9): 1,970(2) Å	Cu-O(1): 1,963(3) Å
Cu-N _(Shyd ou Ohyd)	Cu-N(4): 2,016(4) Å	Cu-N(8): 2,033(2) Å	Cu-N(4): 2,036(4) Å
Cu-N(A) _(phen ou bpy)	Cu-N(1): 1,977(4) Å	Cu-N(10): 1,998(2) Å	Cu-N(1): 1,980(4) Å
Cu-N(B) _(phen ou bpy)	Cu-N(2): 2,007(4) Å	Cu-N(20): 1,985(2) Å	Cu-N(2): 1,989(4) Å
Cu-N _(acetonitrila)	Cu-N(3): 2,407(5) Å	Cu-N(24): 2,373(3) Å	Cu-N(3): 2,424(5) Å
Cu-O _(perclorato)	Cu-O(2): 2,570(5) Å	Cu-O(36): 2,631(3) Å	Cu-O(2): 2,579(5) Å

Os comprimentos de ligação Cu-N_(acetonitrila) nos três complexos é cerca de 2,4 Å, enquanto que a distância Cu-O_(perclorato) é em torno de 2,6 Å. Esses valores estão em acordo

com aqueles disponíveis na literatura [120] e são bem maiores que os comprimentos de ligação estabelecidos entre o Cu(II) e os átomos doadores nas posições equatoriais. Isso indica que esses complexos possuem geometria octaédrica distorcida devido ao efeito Jahn-Teller, típico de íons metálicos com configuração eletrônica d^9 .

A Tabela 14 traz informações sobre os ângulos de ligação estabelecidos entre os átomos doadores dos ligantes e o íon Cu(II).

Tabela 14. Ângulos de ligação entre os átomos doadores dos ligantes e o íon Cu(II) determinados para os complexos 3, 5 e 6.

	Complexo 3	Complexo 5	Complexo 6
$O_{(Shyd\ ou\ Ohyd)}-Cu-N_{(Shyd\ ou\ Ohyd)}$	81,72(15)°	81,56(9)°	81,85(14)°
$N_{(A)_{(phen\ ou\ bpy)}}-Cu-N_{(B)_{(phen\ ou\ bpy)}}$	83,08(16)°	82,87(10)°	81,89(15)°
$O_{(Shyd\ ou\ Ohyd)}-Cu-N_{(A)_{(phen\ ou\ bpy)}}$	94,34(15)°	93,54(9)	94,30(14)°
$O_{(Shyd\ ou\ Ohyd)}-Cu-N_{(B)_{(phen\ ou\ bpy)}}$	177,29(16)°	176,02(9)°	176,00(14)°
$N_{(Shyd\ ou\ Ohyd)}-Cu-N_{(A)_{(phen\ ou\ bpy)}}$	174,00(17)°	172,89(9)°	175,47(15)°
$N_{(Shyd\ ou\ Ohyd)}-Cu-N_{(B)_{(phen\ ou\ bpy)}}$	100,79(17)°	101,85(10)°	101,91(16)°
$N_{(acetoneitrila)}-Cu-O_{(Shyd\ ou\ Ohyd)}$	90,73(16)°	91,01(10)°	89,00(16)°
$N_{(acetoneitrila)}-Cu-N_{(Shyd\ ou\ Ohyd)}$	87,70(18)°	88,59(11)°	85,51(17)°
$N_{(acetoneitrila)}-Cu-N_{(A)_{(phen\ ou\ bpy)}}$	96,90(17)°	96,68(10)°	96,86(16)°
$N_{(acetoneitrila)}-Cu-N_{(B)_{(phen\ ou\ bpy)}}$	90,38(17)°	91,12(10)°	92,62(16)°

Os átomos de oxigênio dos ânions percloratos se encontram desordenados à temperatura ambiente.

2- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS COMPLEXOS 3, 4, 5 E 6

2.1- Estudos da citotoxicidade dos compostos em células tumorais

A Figura 38 apresenta as curvas dose-resposta citotóxica para os complexos 3, 4, 5 e 6. Tanto os ligantes quanto os complexos inibem o crescimento das células tumorais de uma maneira dependente da concentração.

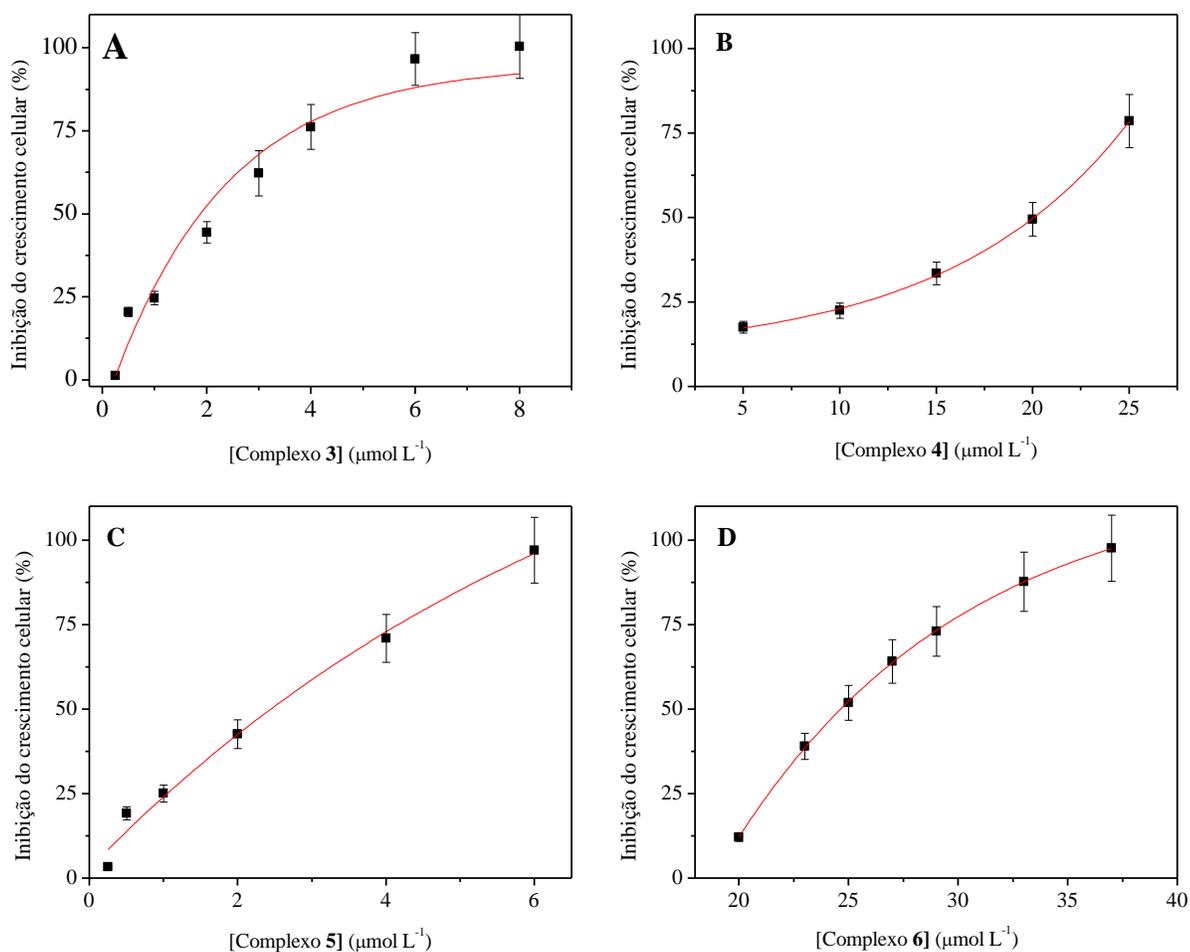


Figura 38. Curvas de dose-resposta da inibição do crescimento celular pela concentração do complexo 3 (curva A), complexo 4 (curva B), complexo 5 (curva C) e complexo 6 (curva D). Tempo de incubação de 72h. Esses valores representam a média de três experimentos independentes.

Os valores de CI_{50} determinados a partir dessas curvas são mostrados na Tabela 15.

Todos os complexos foram mais ativos que os correspondentes ligantes livres.

Tabela 15. Valores de CI_{50} frente à linhagem de células tumorais para ligantes e complexos.

Compostos	CI_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Shyd e Ohyd	> 400
phen	$3,2 \pm 0,3$
bpy	$29,9 \pm 3,0$
$[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$	$3,4 \pm 0,3$
Complexo 3	$1,8 \pm 0,2$
Complexo 4	$20,7 \pm 2,1$
Complexo 5	$2,2 \pm 0,2$
Complexo 6	$25,0 \pm 2,5$

Os complexos que possuem a phen como ligante heterocíclico N-doador são mais ativos que os que possuem a bpy. A phen possui maior extensão π , o que a torna melhor intercalante entre os pares de base do ADN, além de os complexos formados com esse ligante serem mais lipofílicos. Comparando os complexos com o mesmo ligante heterocíclico N-doador, os complexos com Shyd foram mais ativos que os complexos com Ohyd. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que o ligante Shyd é mais lipofílico que o ligante Ohyd. Dessa forma, o complexo **3** que possui os ligantes phen e Shyd é o mais ativo.

Os complexos **3** e **5** mostraram-se mais ativos que o composto $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$, indicando que a substituição de uma bpy por uma phen aprimora a atividade citotóxica do complexo.

2.2- Determinação do coeficiente de partição octanol/água para os compostos

A Tabela 16 apresenta os valores encontrados para os coeficientes de partição dos quatro complexos e os valores de K_{ow} dos ligantes estimados teoricamente pelo programa ALOGPS 2.1 disponível online [121].

Tabela 16. Valores de K_{ow} para ligantes (estimados) e complexos (experimentais).

Compostos	K_{ow}
phen	154,9*
bpy	46,8*
Shyd	1,23*
Ohyd	0,31*
Complexo 3	0,66
Complexo 4	0,33
Complexo 5	0,52
Complexo 6	0,09

* valores de K_{ow} estimados pelo programa ALOGPS 2.1

Uma análise dos valores calculados de K_{ow} dos ligantes mostra que a phen é cerca de três vezes mais lipofílica que a bpy, enquanto o ligante Shyd é cerca de quatro vezes mais lipofílico que o ligante Ohyd. A phen interage melhor com a fase orgânica que a bpy devido à maior extensão aromática. A diferença entre os ligantes Shyd e Ohyd está no anel heterocíclico ligado à hidrazida. O primeiro é constituído por um anel tiofeno, cujo heteroátomo é o enxofre, enquanto o segundo possui um anel furano, cujo heteroátomo é o oxigênio. Como o átomo de oxigênio é capaz de estabelecer ligações de hidrogênio com as

moléculas de água, o ligante Ohyd é mais hidrofílico. Sendo assim, o complexo **3** cujos ligantes são phen e Shyd é o mais lipofílico, seguido dos complexos **5**, **4** e **6**.

2.3- Estudos da acumulação intracelular a longo prazo

A concentração celular de cobre após tratamento das células com concentrações equitóxicas dos complexos foi determinada. A Figura 39 apresenta o perfil de incorporação celular dos complexos **3**, **4**, **5** e **6** na linhagem celular K562.

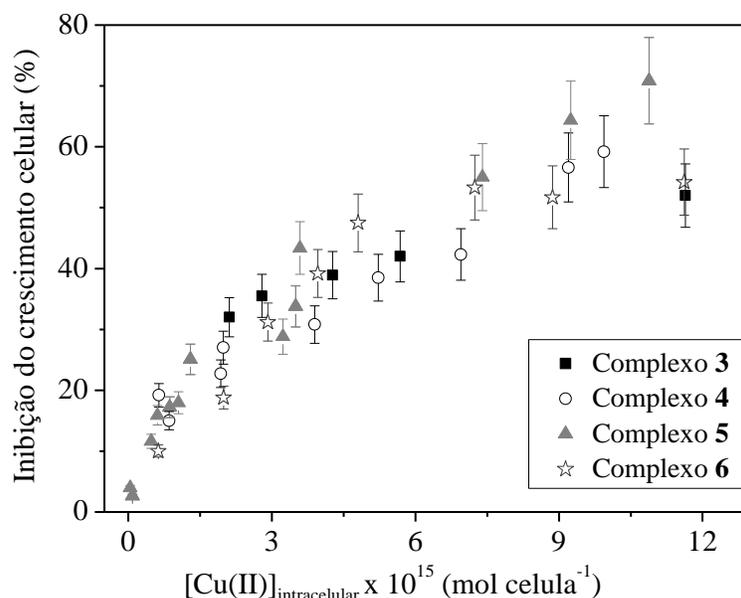


Figura 39. Inibição do crescimento celular em função da concentração de cobre intracelular, após incubação das células por 72 horas com concentrações equitóxicas dos complexos **3**, **4**, **5** e **6**.

Os valores representam a média de três experimentos independentes.

Para os quatro complexos há uma boa correlação entre a atividade citotóxica e a acumulação do composto dentro das células, ou seja, o aumento da concentração intracelular dos compostos causa um aumento da inibição do crescimento celular. Embora, os complexos **4** e **6** necessitem de uma concentração externa cerca de dez vezes maior que os complexos **3** e

5 para provocar efeitos citotóxicos semelhantes, a concentração intracelular atingida pelos quatro complexos para inibir 50% do crescimento celular é de aproximadamente 7×10^{-15} mol·célula⁻¹.

2.4- Estudos de interação dos compostos com o ADN

Todos os complexos estudados são capazes de inibir o crescimento de células tumorais. Uma vez dentro das células, diferentes sítios de ligação são possíveis, sendo o ADN um potencial alvo. Para averiguar se a atividade antitumoral dos complexos relaciona-se com efeitos causados pelos complexos ao ADN, foram feitos estudos das interações dos complexos com essa macromolécula por absorção atômica e por espectrometria UV-Vis.

2.4.1- Determinação da concentração de complexo ligado ao ADN

Procedimento semelhante ao descrito na seção 3.5 do capítulo 1 foram realizados para complexos **3**, **4**, **5** e **6**. Os resultados são apresentados na Figura 40.

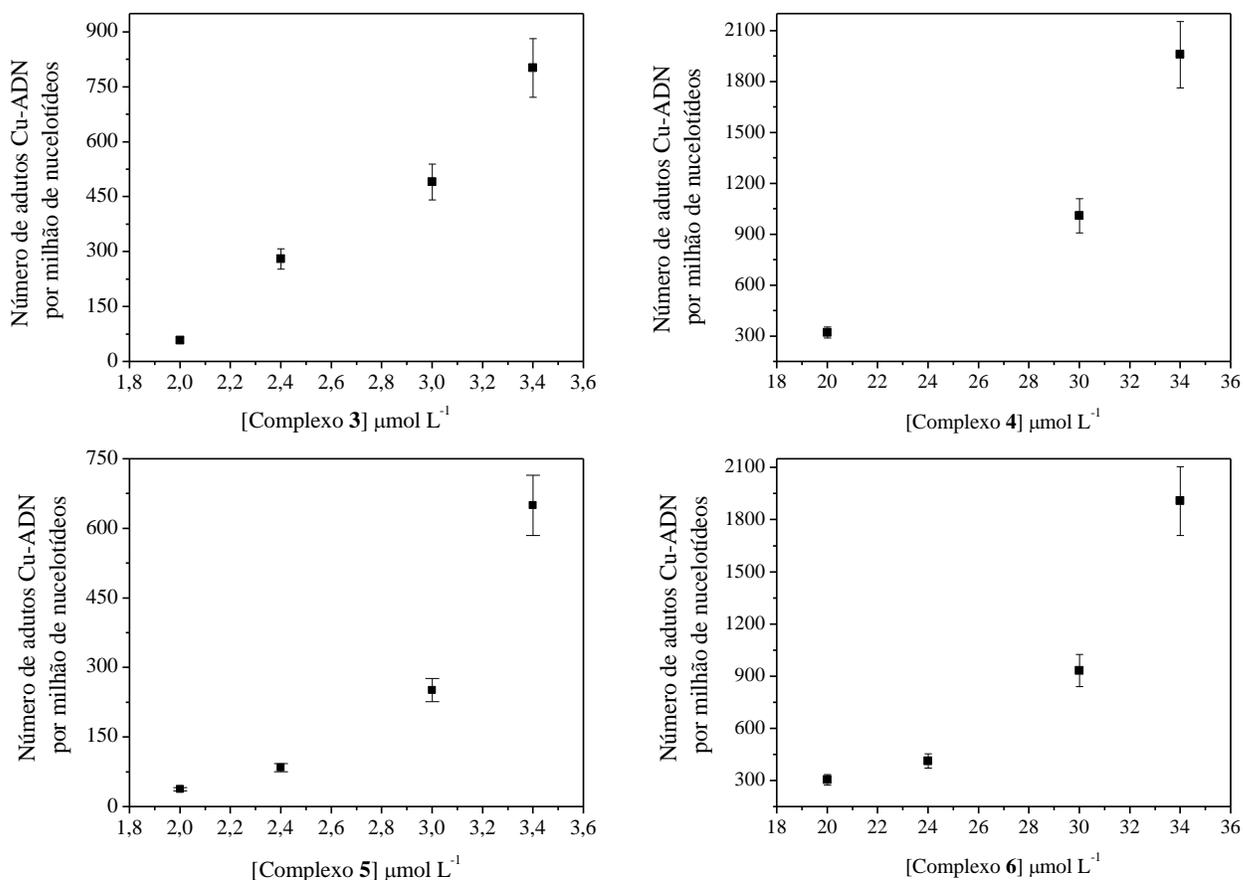


Figura 40. Número de adutos Cu-ADN por milhão de nucleotídeos em função da concentração dos complexos 3, 4, 5 e 6, tempo de incubação 72 horas.

Este experimento indica que quando as células são expostas a esses compostos formam-se, no núcleo das mesmas, adutos complexo-ADN. O número desses adutos foi determinado pela razão entre a concentração molar de cobre (determinada por absorção atômica) e a concentração molar de ADN (determinada por análise espectrométrica). A Figura 40 se refere aos valores de adutos Cu-ADN em função das concentrações extracelulares dos complexos. O número de adutos aumenta com o aumento da concentração de complexo adicionada.

2.4.2- Determinação das constantes de ligação ADN-complexo

A partir do experimento anterior, foi possível concluir que os complexos **3**, **4**, **5** e **6** ligam-se ao ADN no interior das células. A fim de determinar a constante de afinidade dos complexos pelo ADN, foi feita a titulação espectrofotométrica desses complexos com o CT-ADN conforme procedimento descrito no capítulo 1 seção 3.6. Os gráficos desses experimentos são mostrados a seguir nas Figuras 41 a 44.

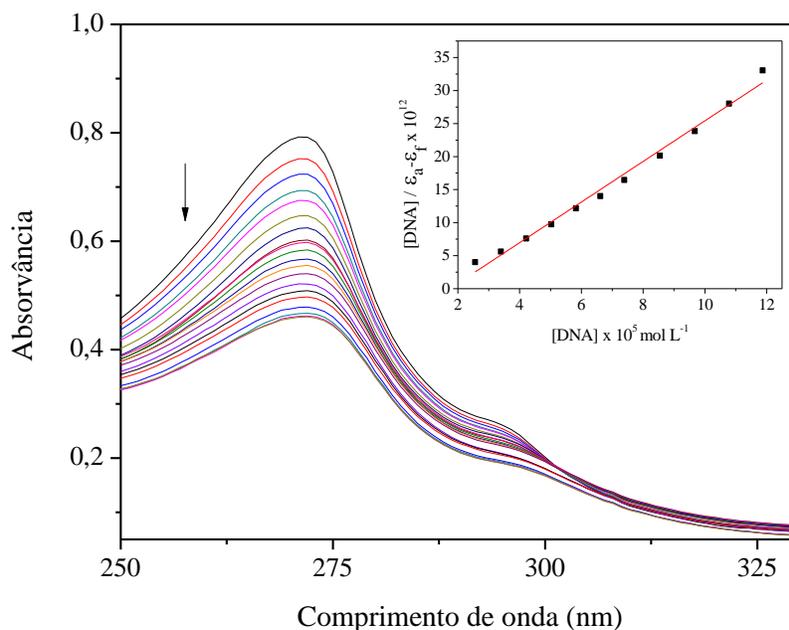


Figura 41. Espectros de soluções contendo o complexo 3 ($2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e crescentes concentrações de ADN de 0 a $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão HEPES pH 7,2, força iônica = $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Requadro: $[ADN] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[ADN]$. $K = 5,1 \times 10^4$

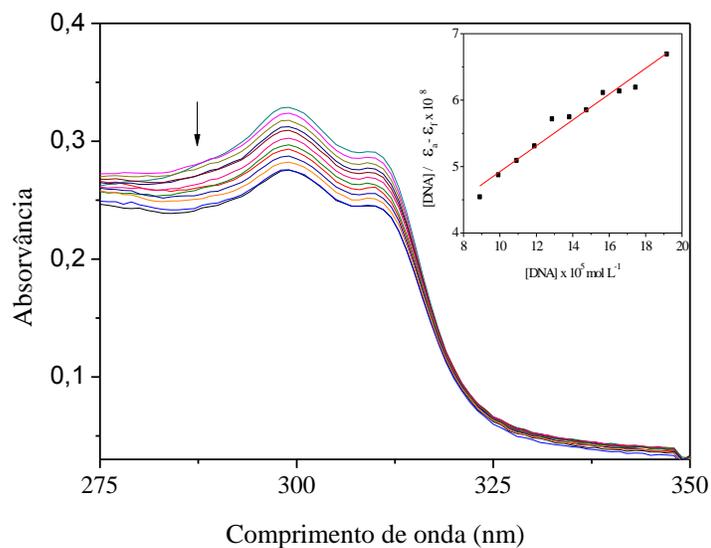


Figura 42. Espectros de soluções contendo o complexo 4 ($2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e crescentes concentrações de ADN de 0 a $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão HEPES pH 7,2, força iônica = $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Requadro: $[\text{ADN}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{ADN}]$. $K = 6,7 \times 10^3$

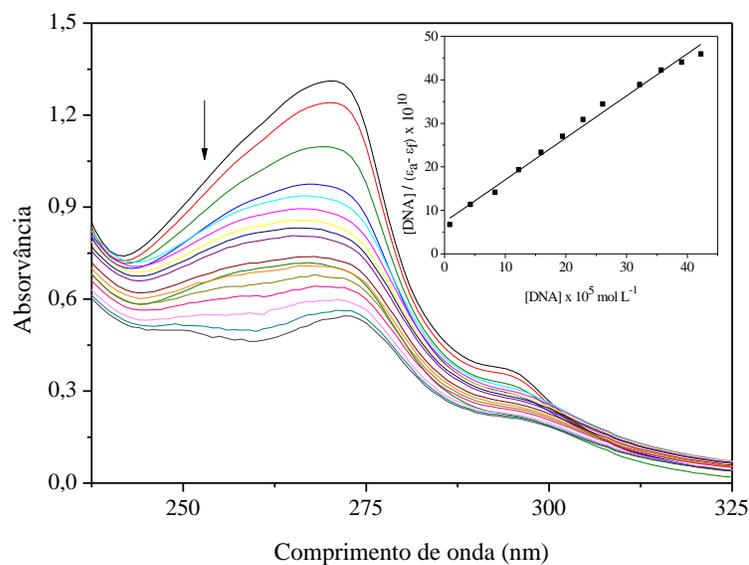


Figura 43. Espectros de soluções contendo o complexo 5 ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e crescentes concentrações de ADN de 0 a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão HEPES pH 7,2, força iônica = $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Requadro: $[\text{ADN}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{ADN}]$. $K = 2,2 \times 10^4$.

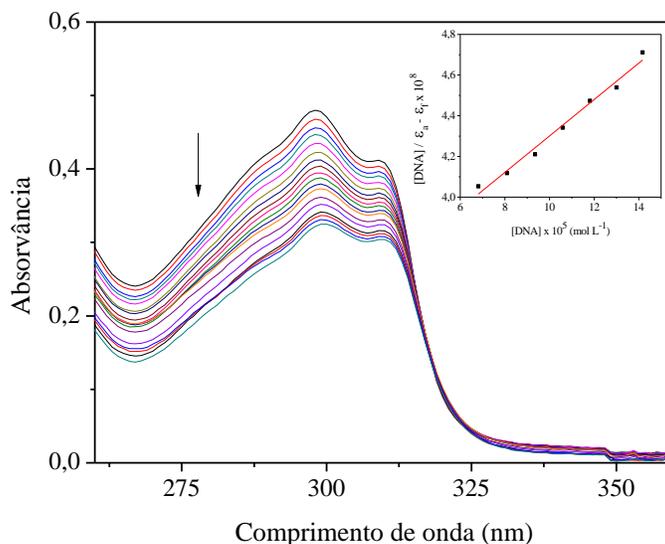


Figura 44. Espectros de soluções contendo o complexo **6** ($2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e crescentes concentrações de ADN de 0 a $2,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão HEPES pH 7,2, força iônica = $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Requadro: $[\text{ADN}] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{ADN}]$. $K = 2,6 \times 10^3$

As constantes de afinidade pelo ADN são: $5,1 \times 10^4$ para o complexo **3**, $6,7 \times 10^3$ para o complexo **4**, $2,2 \times 10^4$ para o complexo **5** e $2,6 \times 10^3$ para o complexo **6**. Nos complexos contendo a Shyd, a substituição da phen pela bpy causa uma diminuição na afinidade pelo ADN de 7,6 vezes, e nos complexos contendo a Ohyd, a afinidade também diminui de 8,5 vezes quando a phen é trocada pela bpy. Quando os complexos contendo a phen são comparados, **3** e **5**, a presença da Shyd dobra a afinidade pelo ADN. O mesmo efeito é observado quando se compara os complexos **4** e **6**: a substituição da Shyd pela Ohyd diminui a afinidade de 2,6 vezes.

2.4.3- Correlação entre citotoxicidade e afinidade complexo-ADN

Foi mostrado que os complexos **3**, **4**, **5** e **6** são capazes de inibir o crescimento das células e que interagem com o ADN no interior das mesmas. A Figura 45 apresenta um

gráfico com os valores de CI_{50} versus as constantes de ligação ao ADN dos complexos **3**, **4**, **5** e **6**. Esse gráfico indica que existe correlação direta entre a atividade citotóxica e a interação dos complexos com o ADN.

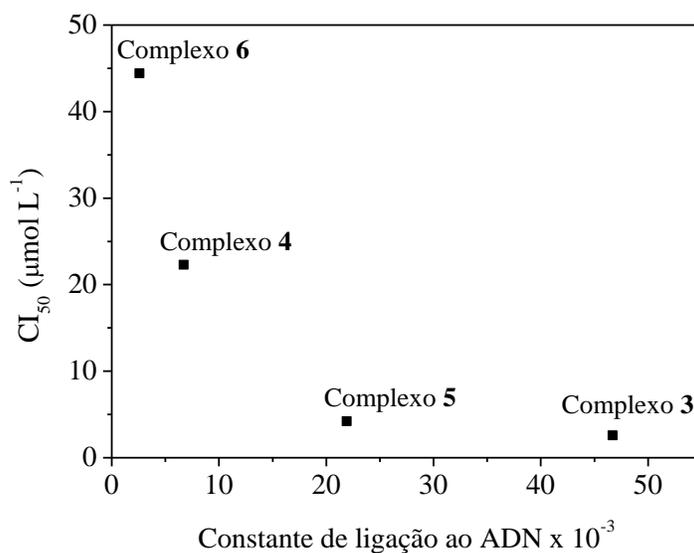


Figura 45. Correlação entre citotoxicidade e a constante de ligação ao ADN.

A Figura 45 revela que existe correlação entre atividade citotóxica e afinidade do complexo pelo ADN. Quanto maior a constante de afinidade complexo-ADN maior é o efeito citotóxico do complexo.

Os complexos mais ativos são os que possuem como um dos ligantes a 1,10-fenantrolina, esses também foram os que mostraram maior afinidade pelo ADN. Esses resultados enfatizam a proposição de que a atividade antitumoral desses compostos relaciona-se à sua interação com o ADN.

2.5- Estudos da fotocitotoxicidade dos complexos 3, 4, 5 e 6

Também foi investigada a atividade citotóxica dos complexos **3**, **4**, **5** e **6** após exposição à luz UV-A, conforme procedimento relatado na seção 3.3 do capítulo 1. Na Figura

46, são mostrados os valores de CI_{50} obtidos no escuro (colunas cinzas) e após exposição à luz UV-A (colunas pretas).

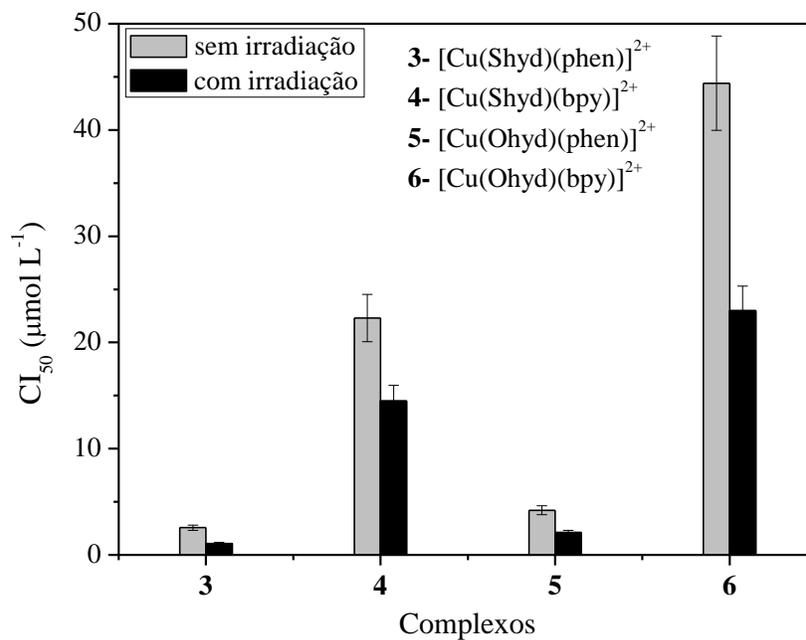


Figura 46. Valores de CI_{50} após incubação das células com os complexos 3, 4, 5 e 6 por 4 horas sem irradiação (colunas cinza) e com irradiação UV-A ($\lambda = 365 \text{ nm}$) por 5 min (colunas pretas).

A exposição à luz UV-A duplica a atividade citotóxica dos complexos 3, 4, 5 e 6.

3- CONCLUSÕES

Quatro novos complexos ternários de cobre(II) contendo como um dos ligantes a hidrazida do ácido 2-tiofenecarboxílico ou a hidrazida do ácido 2-furóico e como segundo ligante um composto N-doador a 1,10-fenantrolina ou a 2,2'-bipiridina foram preparados e caracterizados. Os quatro compostos exibem geometria octaédrica distorcida ao redor do íon Cu(II), que está coordenado equatorialmente a dois ligantes bidentados: 1,10-fenantrolina ou 2,2'-bipiridina e hidrazida do ácido 2-tiofenecarboxílico ou do ácido 2-furóico. As posições axiais do complexo são ocupadas por uma molécula de acetonitrila e um íon perclorato. Nos quatro complexos, o cobre(II) se liga às hidrazidas via oxigênio carbonil e nitrogênio terminal, também aos ligantes N-doadores através dos dois nitrogênios heterocíclicos.

Todos os quatro complexos inibem o crescimento de células tumorais de maneira dependente da concentração. A coordenação dos ligantes ao cobre(II) aumenta a atividade citotóxica comparada aos ligantes livres. A substituição da bpy pela phen leva a um acréscimo da atividade, enquanto que a substituição do ligante Shyd por Ohyd gera um complexo menos ativo. Os complexos contendo Shyd são mais lipofílicos que aqueles contendo Ohyd, o que pode facilitar a sua entrada nas células, o que explicaria a maior atividade citotóxica.

O efeito citotóxico cresce com a concentração intracelular de cobre. Uma vez dentro das células, os complexos reagem com o ADN e o número de adutos Cu-ADN formados é proporcional à concentração de complexo adicionada ao meio extracelular. É muito difícil associar o efeito citotóxico a interações com alvos intracelulares. Na maioria dos trabalhos descritos na literatura, são feitos estudos de interação com potenciais alvos da ação farmacológica isolados das células, no caso, ADN isolado. Nesse caso, foi mostrado que os complexos interagem com o ADN dentro das células. Vale a pena ressaltar que existe uma boa correlação entre atividade citotóxica e constante de ligação ao ADN. Estes resultados são

muito importantes porque estabelecem uma relação direta entre interação com o ADN e atividade citotóxica.

A fotoirradiação dobra o efeito citotóxico dos compostos.

**CAPÍTULO 4: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDOS DA
ATIVIDADE ANTITUMORAL DE LIGANTES DERIVADOS DE α,α -DIAMINAS
COM HIDRAZIDAS E DE SEUS RESPECTIVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO(II)**

1- CARACTERIZAÇÕES DOS LIGANTES

A Figura 47 apresenta as reações de síntese dos ligantes inéditos **pqShyd** e **pdOhyd**.

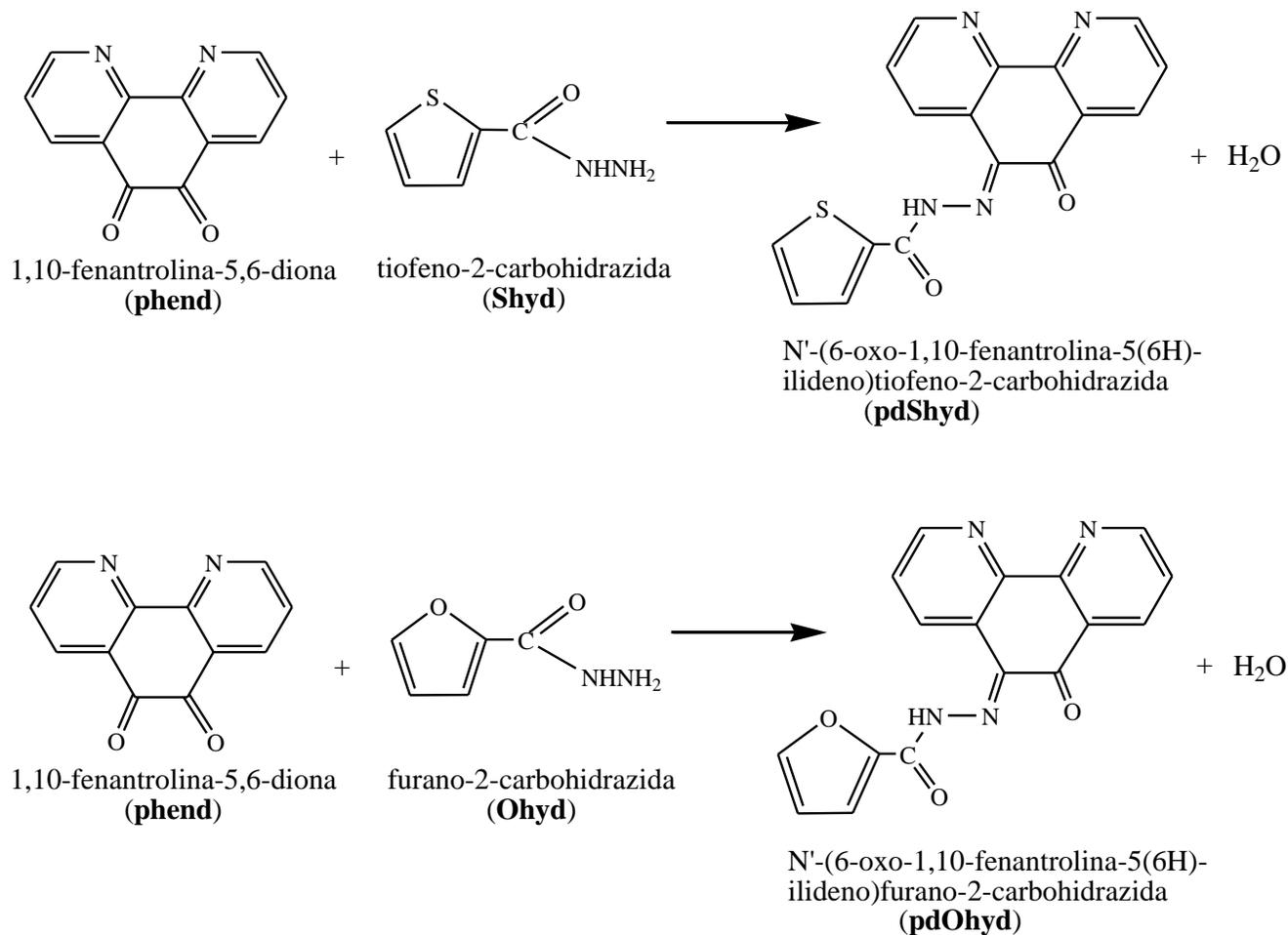


Figura 47. Esquema de síntese dos ligantes **pdSyd** e **pdOhyd**.

Esses ligantes foram preparados de modo semelhante, pela reação do composto 1,10-fenantrolina-5,6-diona com o derivado de hidrazida (Shyd para ligante **pdShyd** e Ohyd para ligante **pdOhyd**), cujos procedimentos de sínteses estão descritos na seção 4.1 do capítulo 1.

O mecanismo de reação para obtenção desses ligantes envolve a formação de uma imina pela reação de uma carbonila com uma hidrazida. A etapa-chave é a adição nucleofílica

para render um intermediário carbinolamina, o qual então perde água para gerar a imina. Um esquema do mecanismo de ação da formação da imina pode ser observado na Figura 48, feita conforme referência [122].

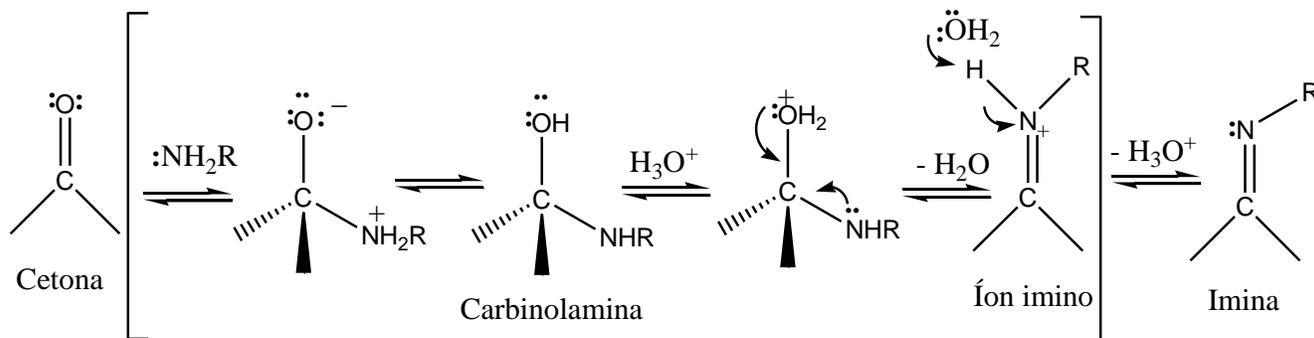


Figura 48. Mecanismo de reação da formação de imina a partir de uma cetona e uma amina primária.

Na formação de uma imina um catalisador ácido é requerido para protonar a carbinolamina intermediária, convertendo o OH em H_2O , um melhor grupo abandonador.

Esses ligantes foram caracterizados por análise elementar, medida do ponto de decomposição, espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia de massas e RMN de ^1H .

1.1 – Análise elementar e ponto de decomposição

Na Tabela 17 apresenta os valores obtidos experimentalmente e calculados dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos ligantes **pdSyd** e **pdOhyd**.

Tabela 17. Dados obtidos das análises elementares e do ponto de fusão dos ligantes.

	%C	%H	%N
	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)
pdShyd (C ₁₇ H ₁₀ N ₄ O ₂ S) MM= 334,35 g mol ⁻¹	60,9 (61,1)	3,0 (3,0)	16,5 (16,8)
pdOhyd (C ₁₇ H ₁₀ N ₄ O ₃) MM= 318,29 g mol ⁻¹	61,1 (64,1)	3,1 (3,2)	16,9 (17,6)

Os dados obtidos na análise elementar são condizentes com as estruturas propostas para os ligantes preparados, com erros percentuais inferiores a 5%. Quando submetidos ao aquecimento esses ligantes iniciam processo de decomposição em 225°C para ligante **pdShyd** e 240°C para ligante **pdOhyd**

1.2 – Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho dos **pdShyd** e **pdOhyd** são apresentados nas Figuras 49 e 50. As intensas bandas em 1666 e 1626 cm⁻¹ (**pdShyd**) e 1715 e 1628 cm⁻¹ (**pdOhyd**) são referentes respectivamente a $\nu(\text{C}=\text{O})$ da carbonila pertencente a phend e da carbonila proveniente da Shyd (**pdShyd**) ou da Ohyd (**pdOhyd**). As bandas em 1580 cm⁻¹ (**pdShyd**) e 1578 cm⁻¹ (**pdOhyd**) são referentes a $\nu(\text{C}=\text{C})$ em sistemas aromáticos [119].

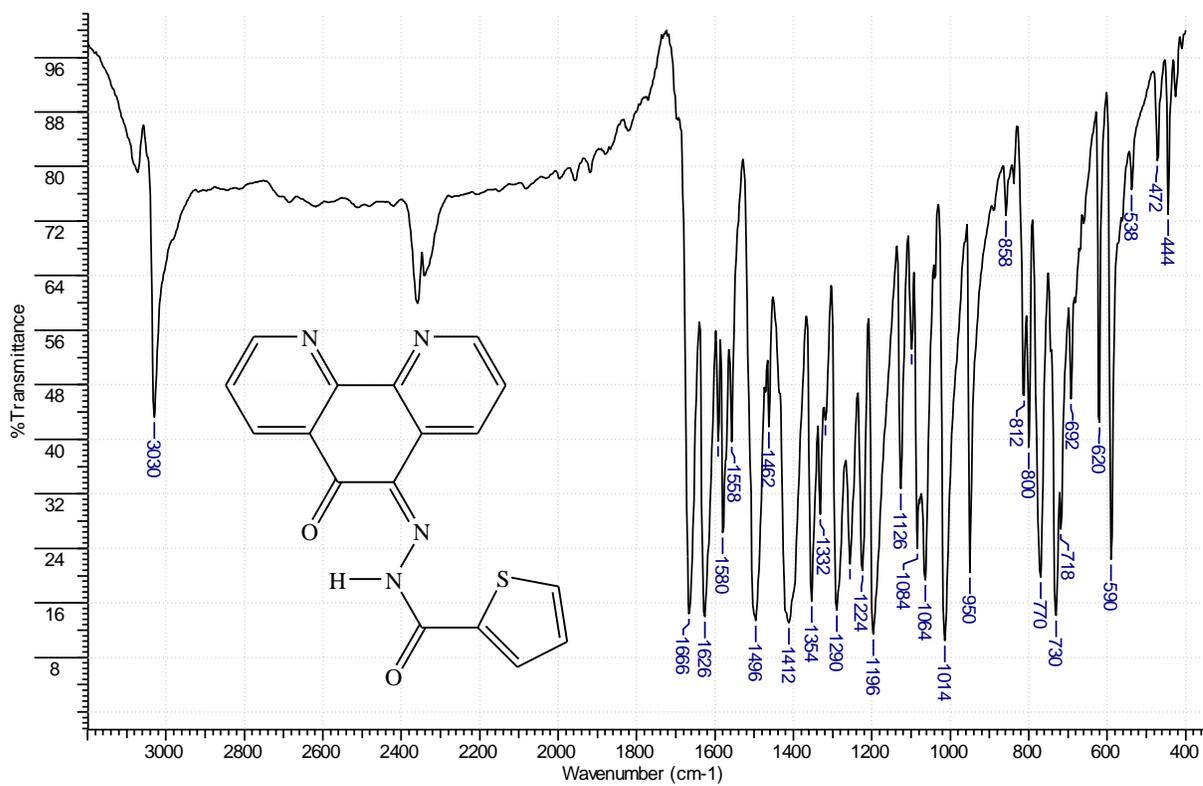


Figura 49. Espectro vibracional na região do infravermelho para pdShyd.

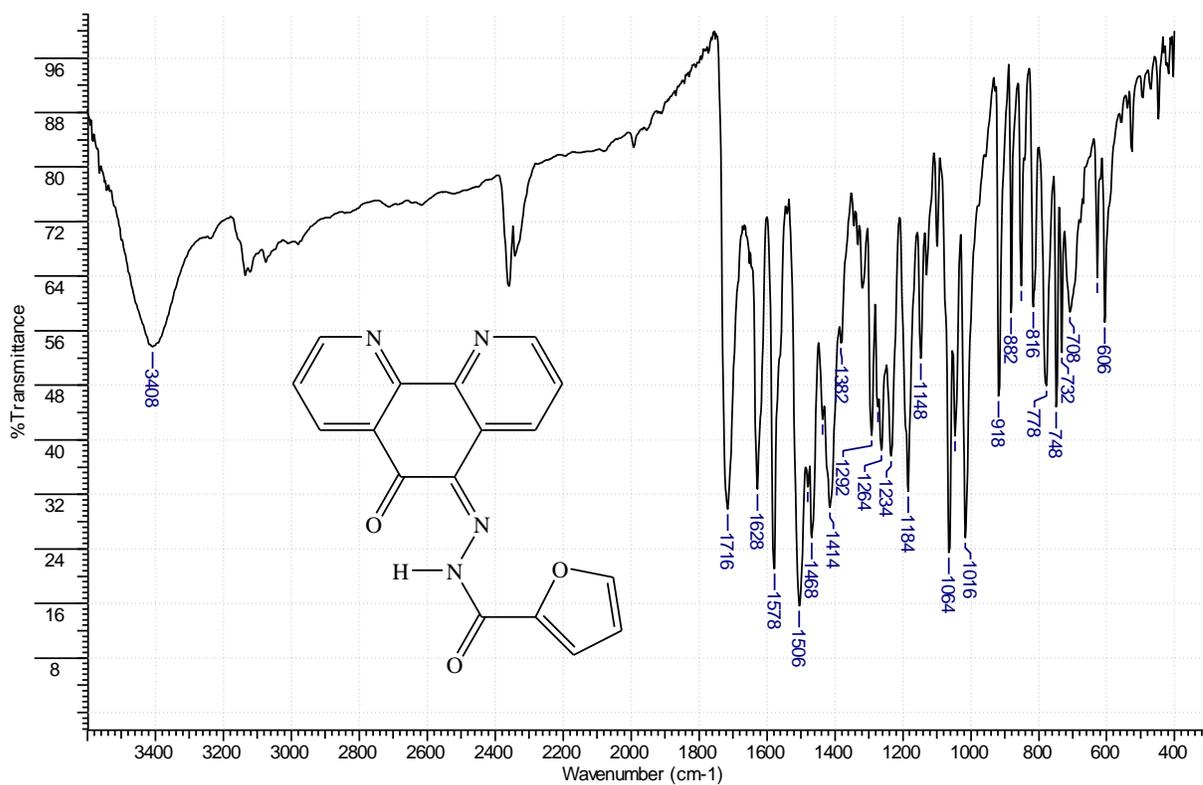


Figura 50. Espectro vibracional na região do infravermelho para pdOhyd.

1.3 – Ressonância Magnética Nuclear

Para auxiliar na elucidação estrutural dos ligantes **pdShyd** e **pdOhyd** foram registrados espectros de RMN de ^1H . As Figuras 51 a 54 apresentam os espectros de RMN de ^1H para os ligantes **pdShyd** e **pdOhyd**.

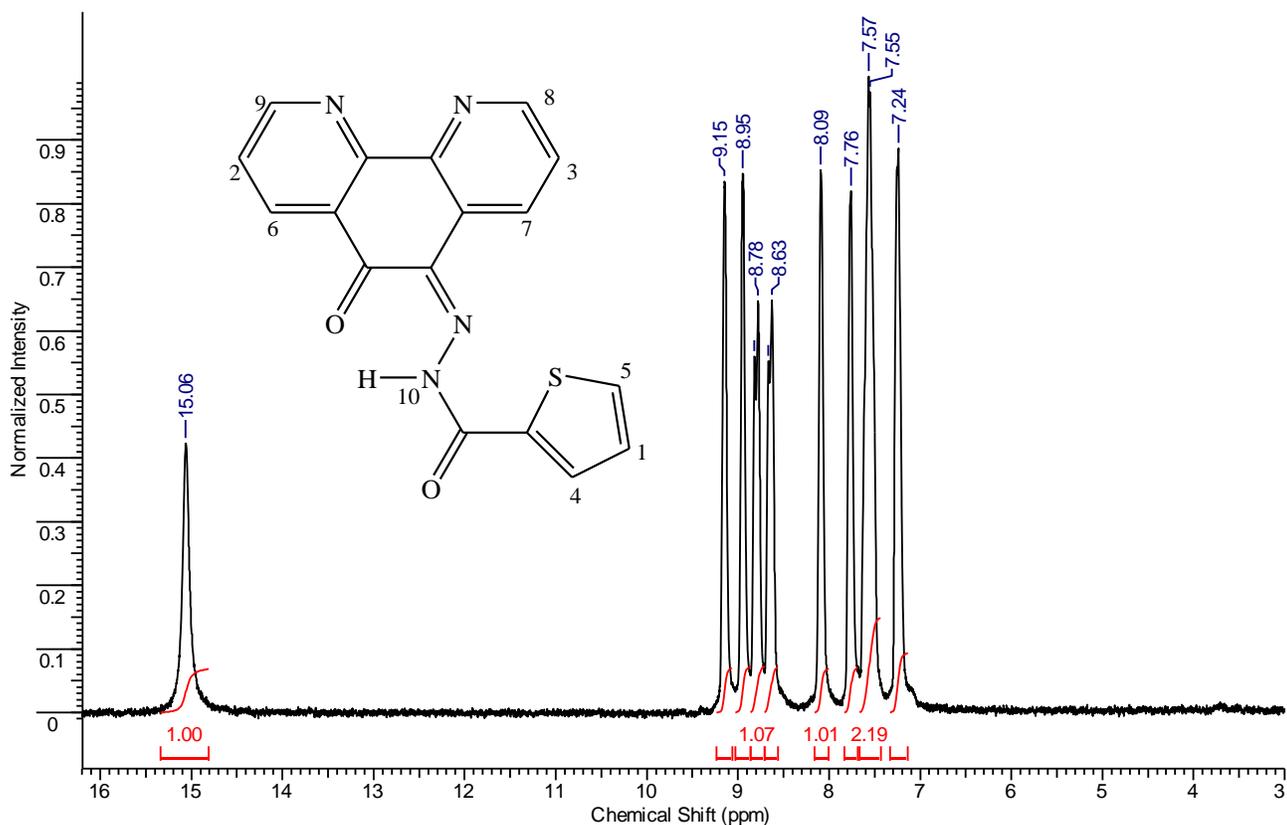


Figura 51. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) em CDCl_3 do **pdShyd**.

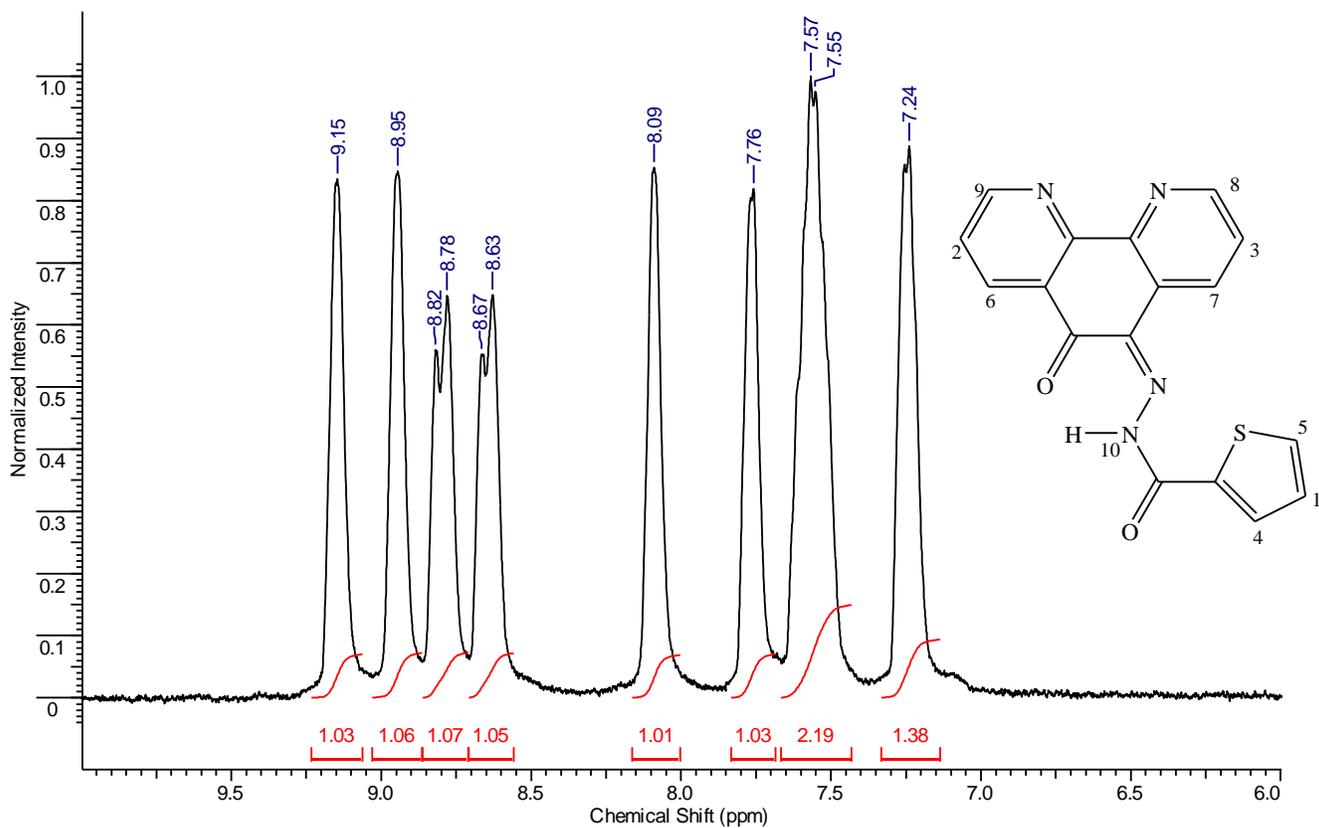


Figura 52. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (200 MHz) em CDCl_3 do pdShyd.

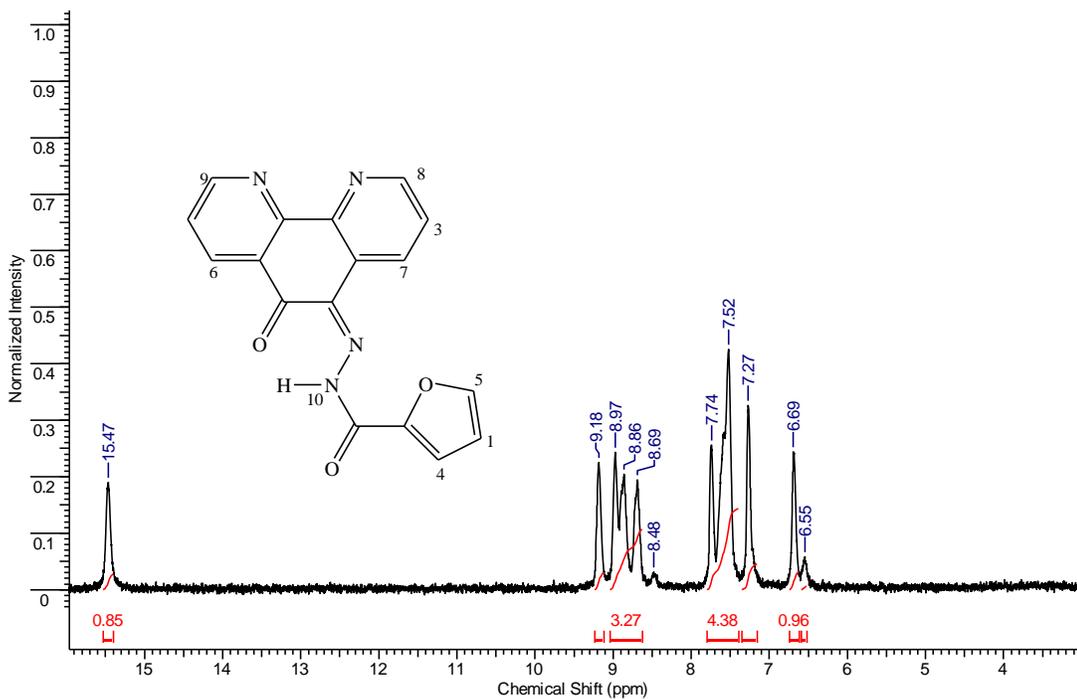


Figura 53. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) em CDCl_3 do pdOhyd.

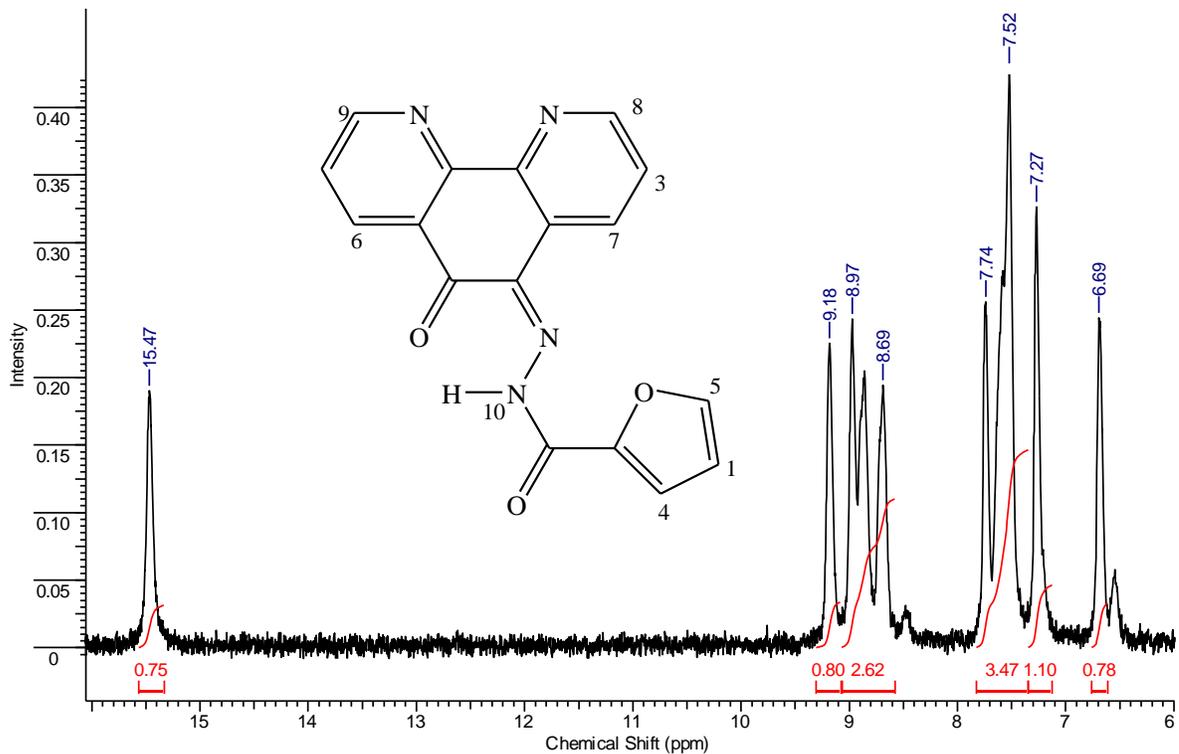


Figura 54. Ampliação do espectro de RMN de ¹H (200 MHz) em CDCl₃ do **pdOhyd**.

O ligante **pdShyd** foi bem solúvel em CDCl₃, enquanto que o **pdOhyd** não foi muito solúvel, apresentando espectro de RMN de ¹H de menor resolução. A Tabela 18 descreve a atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹H desses ligantes.

Tabela 18. Proposta d atribuição dos sinais de RMN de ¹H dos ligantes pdShyd e pdOhyd.

pdShyd			pdOhyd		
δ (ppm)	Integral	Atribuição	δ (ppm)	Integral	Atribuição
7,24	1,38	H1	6,69	0,78	H1
7,56	2,19	H2 e H3	7,27	1,1	H2
7,76	1,03	H4	8,11	3,47	H3, H4 e H5
8,09	1,01	H5			
8,65	1,05	H6	8,92	2,62	H6, H7 e H8
8,80	1,07	H7			
8,95	1,06	H8			
9,15	1,03	H9	9,18	0,80	H9
15,06.	1,00	H10	15,47	0,75	H10

Como os ligantes **pdShyd** e **pdOhyd** são muito semelhantes, a seguir será feita a análise do espectro de RMN de ¹H apenas do ligante **pdShyd**, pois a mesma interpretação pode ser estendida ao ligante **pdOhyd**. Todos os prótons, exceto o H10, são pertencentes a sistemas aromáticos e apresentam deslocamentos químicos superiores a 7 ppm. Embora o H10 não pertença a um sistema aromático, ele possui deslocamento químico atípico, em torno de 15ppm. Esse elevado deslocamento químico é condizente com a alta desblindagem desse próton devido ao fato de ele estabelecer uma ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila, formando um estável anel de seis membros. Outro fator que confere alta desblindagem a esse próton é o fato de estar diretamente ligado a um nitrogênio que é um átomo muito eletronegativo. Quanto mais próximo de um átomo eletronegativo mais desprotegido está o hidrogênio em questão. Dessa forma, pode-se concluir que os prótons H1, H2 e H3 são os mais protegidos, pois se encontram a duas ligações de um heteroátomo,

enxofre (H1) e nitrogênio (H2 e H3), e a três ligações de uma carbonila (H1 e H2) e de uma imina (H3). Como o enxofre é menos eletronegativo, o H1 é o mais protegido, como a imina está ligada a um nitrogênio, o H2 é mais protegido que o H3. A seguir, estão os prótons do tiofeno H4 que estão a duas ligações de uma carbonila, e o H5 que pertence a um carbono diretamente ligado ao enxofre. Os prótons H6 e H7, pertencentes a 1,10-fenantrolina-5,6-diona, estão a duas ligações da carbonila (H6) e da imina (H7).

E, por fim, os prótons H8 e H9 são aqueles que possuem maior deslocamento químico entre os aromáticos, pois pertencem a carbonos diretamente ligados a nitrogênio. Por efeito indutivo esses prótons são bastante desblindados.

Os espectros de RMN de ^1H confirmam a formação dos ligantes **pdShyd** e **pdOhyd**.

1.4 – Espectrometria de massas

Os estudos de ESI-MS confirmaram as fórmulas propostas para os ligantes **pdShyd** e **pdOhyd**. O espectro de ESI-MS do **pdShyd**, Figura 55, no modo positivo apresenta um pico principal em m/z 690,6 que corresponde a uma espécie dimérica desse composto com um íon sódio $[(\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2\text{S})(\text{C}_{17}\text{H}_9\text{N}_4\text{O}_2\text{S})\text{Na}]^+$ (massa calculada 690,7). Também pode ser observado nesse espectro a presença de um pico secundário de m/z 335,0 que pode ser atribuído à molécula do **pdShyd** protonada, $[(\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2\text{S})\text{H}]^+$ (massa calculada 335,36).

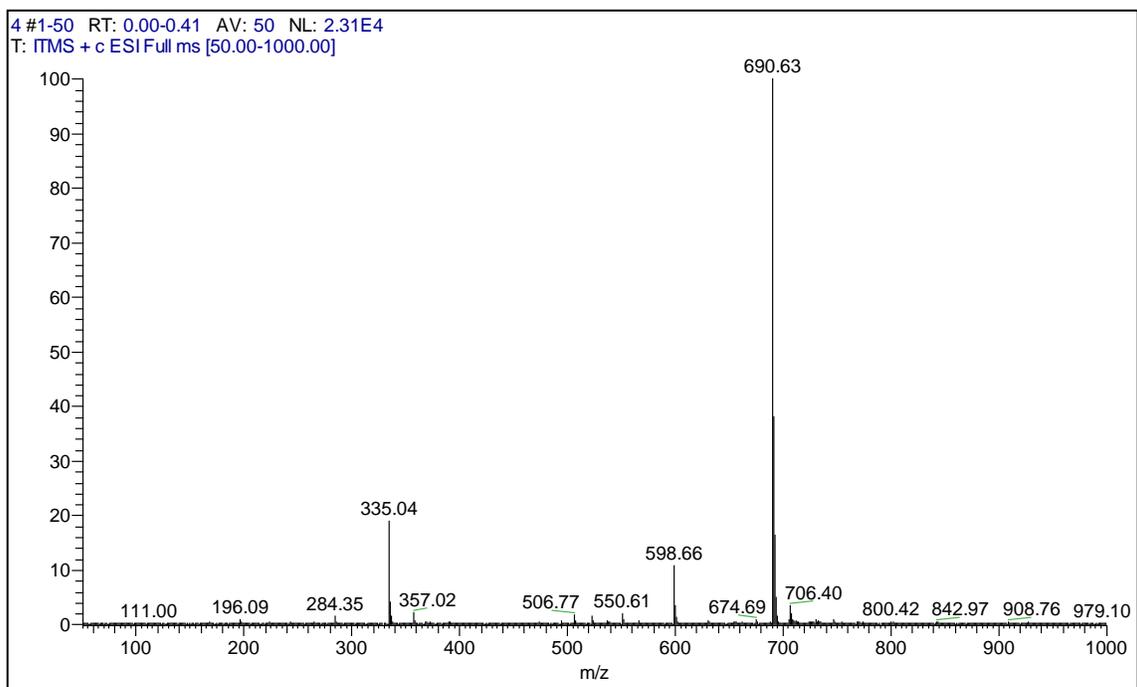


Figura 55. Espectro ESI(+)-MS em solução MeOH:H₂O (1:1) do pdShyd.

Para confirmar a proposição que o pico principal do espectro ESI-MS do **pdShyd** corresponde a um dímero desse composto somado a um íon sódio, fez-se a fragmentação desse pico também no modo positivo, Figura 56. O ESI-MS-MS apresenta um pico principal em m/z 357,0 que corresponde a uma molécula do composto **pdShyd** com um íon sódio $[(C_{17}H_{10}N_4O_2S)Na]^+$ (massa calculada 357,3).

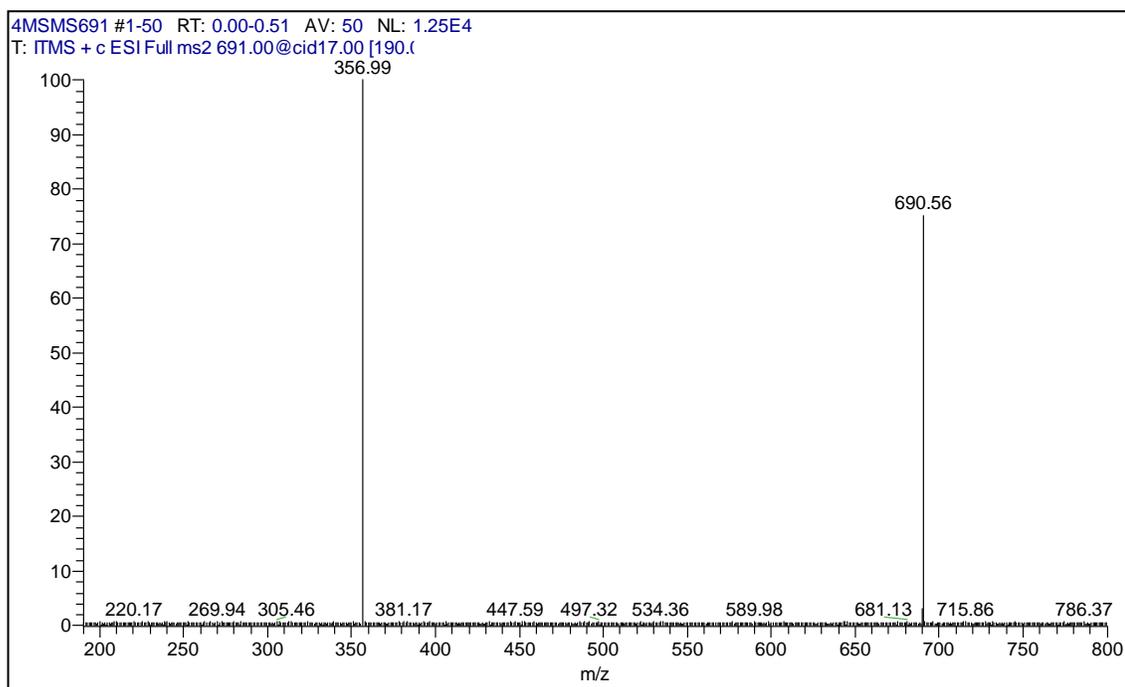


Figura 56. Espectro de massas referente à fragmentação do pico principal do ESI(+)-MS do pdShyd em solução MeOH:H₂O (1:1).

O espectro de ESI-MS do **pdOhyd**, Figura 57, no modo positivo apresenta um pico principal em m/z 319,0 que corresponde a uma molécula desse ligante protonada $[(C_{17}H_{10}N_4O_3)H]^+$ (massa calculada 319,3). Nesse espectro também ocorre a presença de um pico secundário em m/z 658,7 que pode ser atribuído a uma espécie dimérica do **pdOhyd** com um íon sódio $[(C_{17}H_{10}N_4O_3)(C_{17}H_9N_4O_3)Na]^+$, cuja massa calculada corresponde a 658,6.

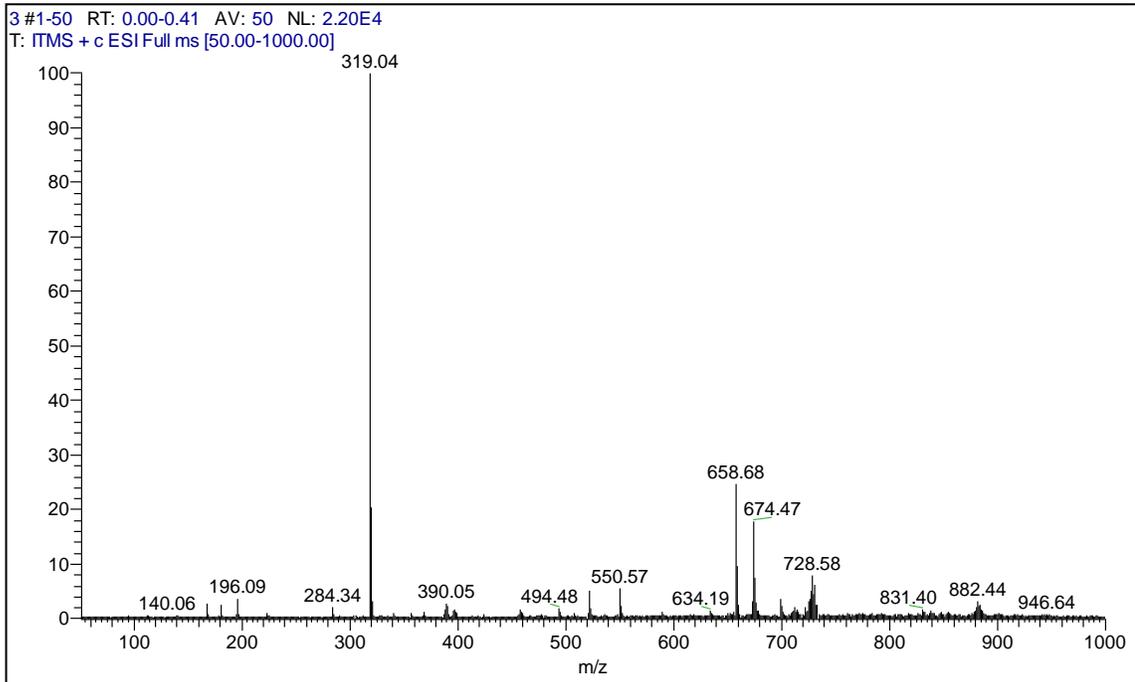


Figura 57. Espectro ESI-MS em solução MeOH:H₂O (1:1) do pdOhyd.

2- CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS 7 E 8

A Figura 58 apresenta as estruturas propostas dos complexos ternários de rutênio(II) que foram preparados conforme procedimentos descritos nas seções 4.2.7 e 4.2.8 do capítulo 1.

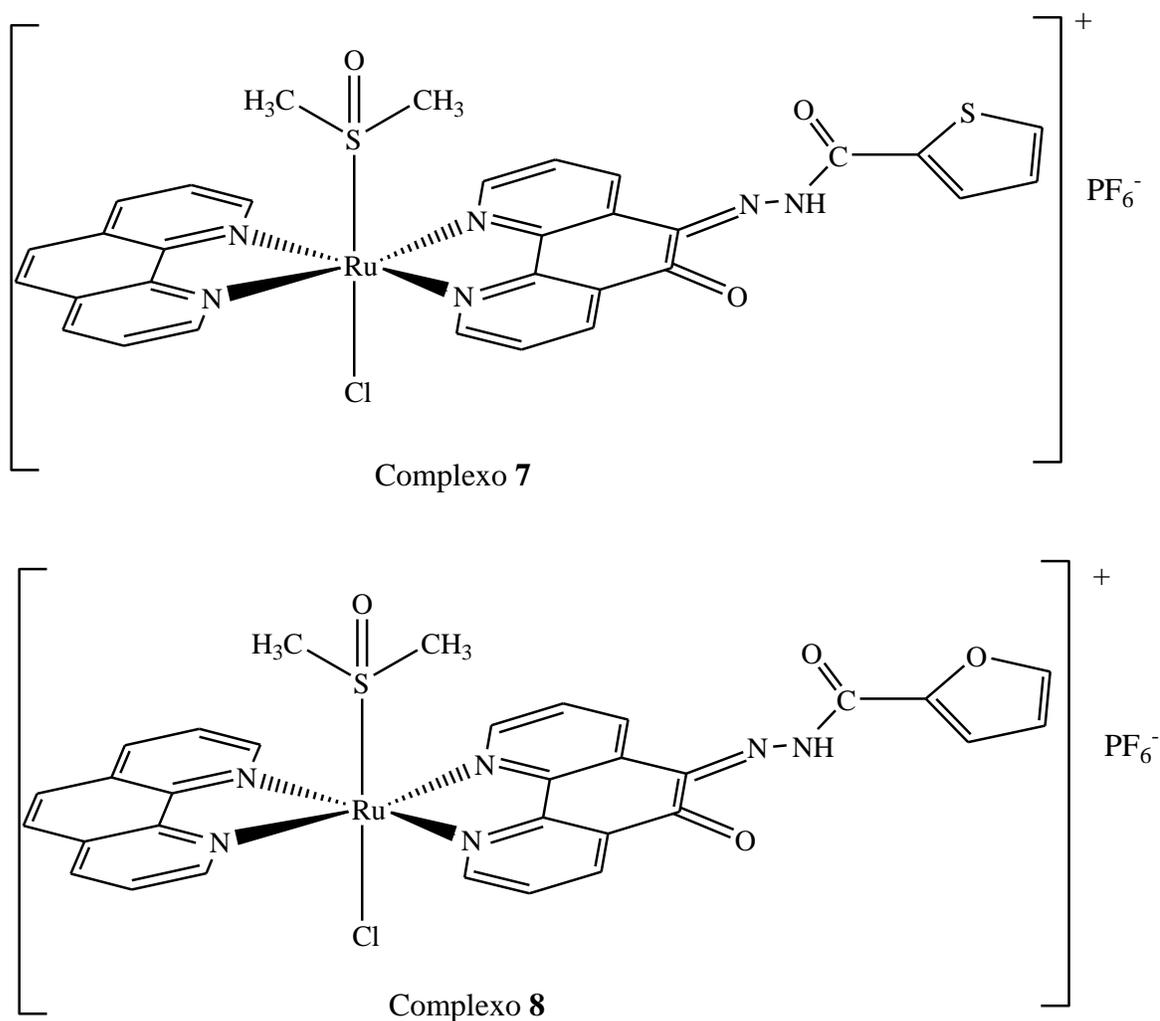


Figura 58. Estruturas propostas para complexo 7 (acima) e complexo 8 (abaixo).

2.1- Análise Elementar e Condutivimétrica

Os resultados da porcentagem de carbono, hidrogênio, nitrogênio e condutividade molar para os complexos 7 e 8 encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19. Dados das análises elementares e condutimétricas dos complexos 7 e 8 para as fórmulas mínimas: 7- $\text{RuC}_{31}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}_2\text{PClF}_6$; 8- $\text{RuC}_{31}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_4\text{SPClF}_6$.

Complexos	%C	%H	%N	Λ_M ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	
7 – $[\text{Ru}(\text{pdShyd})(\text{phen})(\text{dmsO})\text{Cl}]\text{PF}_6$ MM= 873,97 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	41,09 (42,59)	2,58 (2,77)	9,63 (9,61)	89,6
8 – $[\text{Ru}(\text{pdOhyd})(\text{phen})(\text{dmsO})\text{Cl}]\text{PF}_6$ MM= 858,11 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	41,91 (43,39)	2,81 (2,82)	9,74 (9,79)	77,9

Os resultados de análise elementar dos complexos **7** e **8** condizem com as fórmulas moleculares propostas e os valores de condutividade são típicos de eletrólitos 1:1 [87].

2.2 - Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros vibracionais dos complexos **7** e **8** são apresentados nas Figuras 59 e 60.

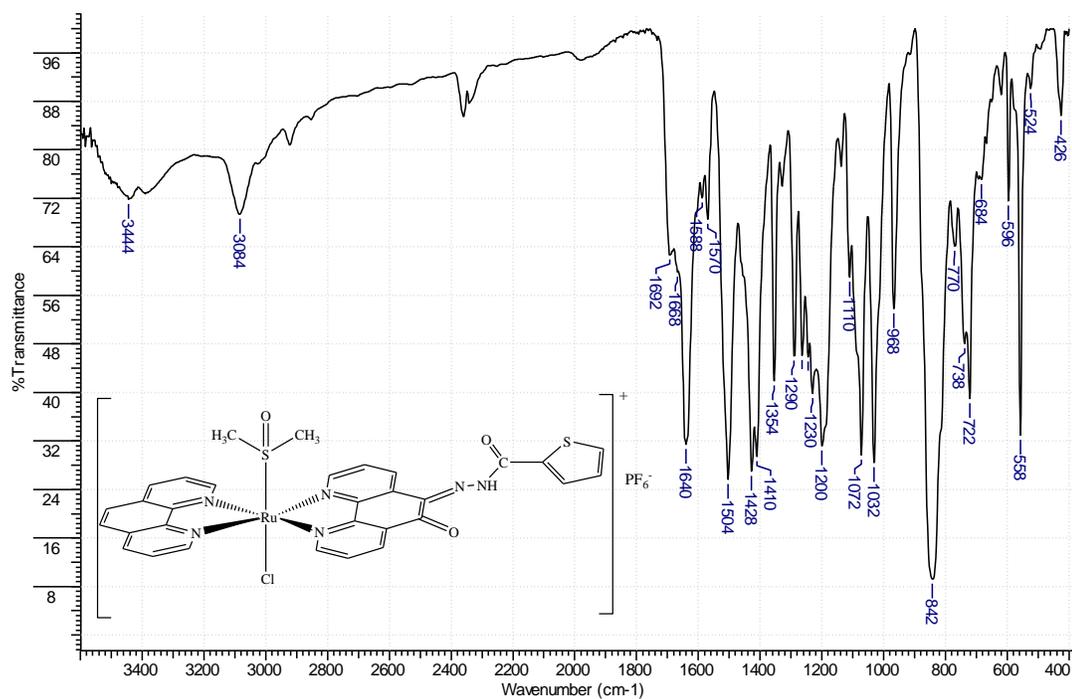


Figura 59. Espectro vibracional do complexo 7.

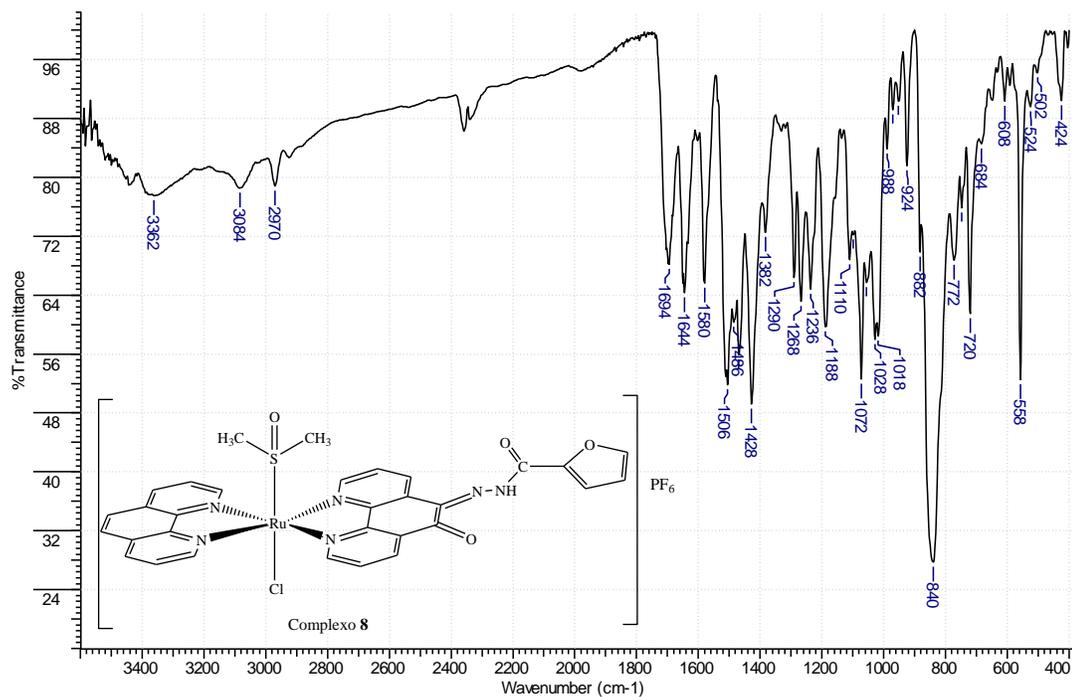


Figura 60. Espectro vibracional do complexo 8.

Os espectros no infravermelho dos complexos **7** e **8** apresentam respectivamente bandas em 1032 e 1028 cm^{-1} referentes $\nu(\text{S-O})$, o que confirma a presença do ligante dmsO em ambos os complexos. A ausência da banda em 478 cm^{-1} , referente a $\nu(\text{Ru-O})$, indica que o ligante dmsO presente nos complexos coordena-se pelo átomo de enxofre. Outra evidência que confirma a presença do ligante S-dmsO¹⁵ são as presenças das bandas em 722 e 684 cm^{-1} para **7** e em 720 e 684 cm^{-1} para **8**, referentes aos estiramentos assimétricos e simétricos da ligação C-S. O comportamento dessas bandas reforça a atribuição do ligante dmsO coordenado pelo átomo de enxofre. Quando o dmsO coordena-se pelo átomo de oxigênio as bandas referentes aos estiramentos simétrico e assimétrico C-S são fracas e deslocam-se para menores energias e frequentemente o estiramento simétrico não é observado [123].

As intensas bandas em 1570 e 1428 cm^{-1} para **7** e em 1580 e 1428 cm^{-1} para **8** referentes aos estiramentos C=C e C-N, respectivamente, indicam a coordenação do ligante phen ao rutênio. Os ligantes **pdShyd** e **pdOhyd** são confirmados na coordenação ao metal pela presença das bandas em 1640 e 1644 cm^{-1} para complexos **7** e **8**, respectivamente, referentes a estiramentos C=O.

Em ambos os espectros vibracionais as intensas bandas em torno de 840 e 558 cm^{-1} são características do íon PF_6^- livre, ou seja, atuando como contra-íon [124].

2.3 - Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível

A Figura 61 apresenta os espectros eletrônicos dos ligantes **pdShyd** e **pdOhyd** e dos complexos **7** e **8**.

¹⁵ O dmsO é um ligante ambidentado que pode se coordenar pelo átomo de enxofre (S-dmsO) ou de oxigênio (O-dmsO).

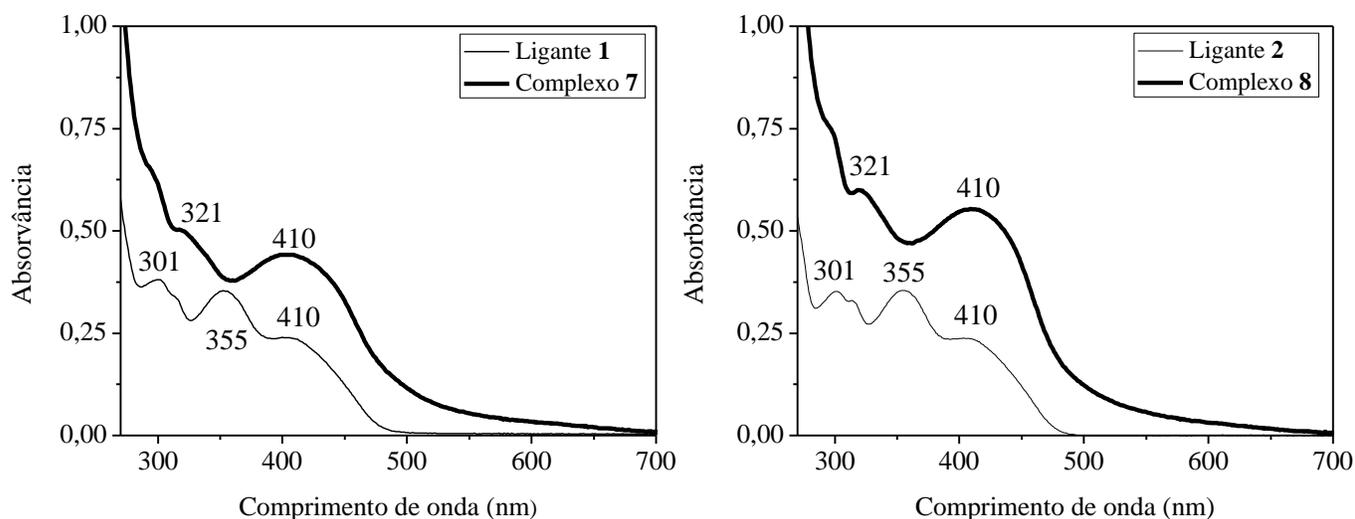


Figura 61. Espectros eletrônicos de soluções $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ dos ligantes pdShyd e pdOhyd e dos complexos 7 e 8 em dimetilsufóxido.

As bandas dos espectros eletrônicos UV-Vis dos complexos **7** e **8** apresentam bandas em 321 e 410 nm que podem ser relacionadas as transições intraligantes do tipo π - π^* . As bandas em 321 nm sofrem deslocamento hipsocrômico e efeito hipercrômico em relação aos ligantes livres **pdShyd** e **pdOhyd**, enquanto as bandas em 410 nm sofre efeito hipercrômico. As largas e intensas bandas em 410 nm nos complexo **7** ($\epsilon = 1773 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e **8** ($\epsilon = 2218 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) também podem também ser atribuídas a transferência de carga metal ligante (TCML), típicas de complexos de rutênio(II) com ligantes polipiridil [125, 126]. Essas alterações nos espectros eletrônicos dos complexos em relação ao dos ligantes são indicativos da coordenação do metal ao ligante.

2.4 - Espectrometria de Massas

A Figura 62 apresenta o espectro de massas do complexo **7**.

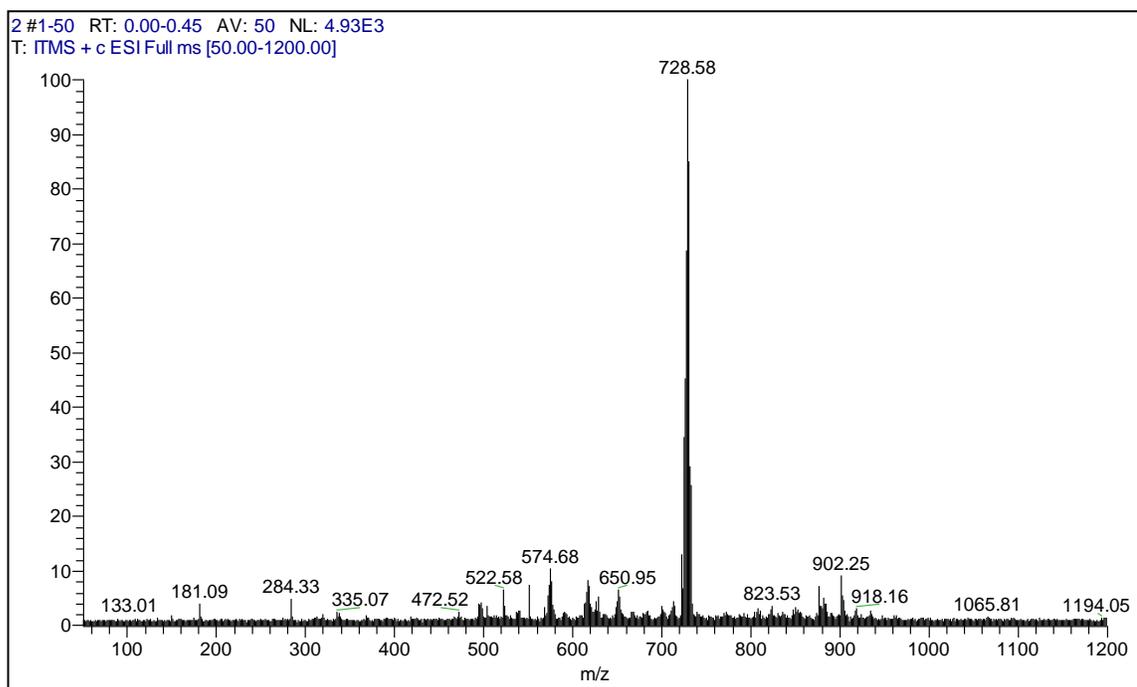


Figura 62. Espectro ESI(+)-MS em solução MeOH:H₂O (1:1) do complexo 7

O espectro de ESI(+)-MS do complexo **7** no modo positivo apresenta pico principal em m/z 728,6 atribuído à espécie $[\text{Ru}(\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2\text{S})(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)((\text{CH}_3)_2\text{SO})\text{Cl}]^+$, cujo valor calculado corresponde a 729,2. A Figura 63 apresenta a fragmentação desse pico.

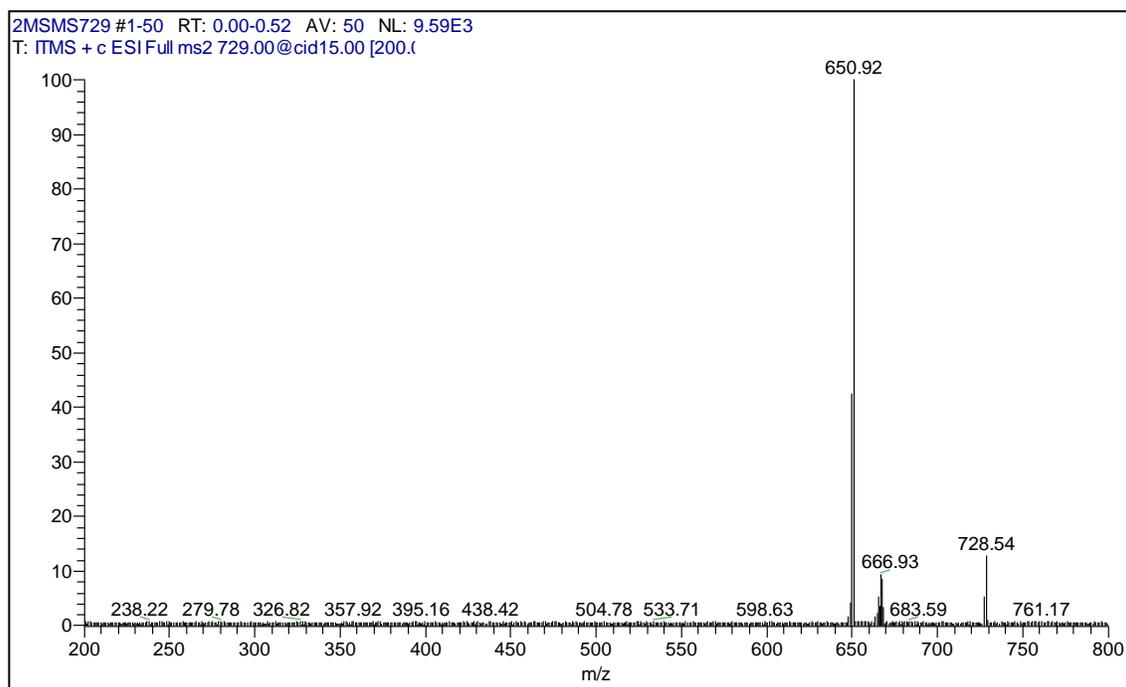


Figura 63. Espectro de massas referente à fragmentação do pico principal do ESI(+)-MS do complexo 7 em solução MeOH:H₂O (1:1).

O espectro ESI(+)-MS-MS do pico m/z 728,6 apresenta um sinal em m/z 650,9 que pode ser atribuído a perda do ligante dmsso, $[\text{Ru}(\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2\text{S})(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)\text{Cl}]^+$, cujo valor calculado corresponde a 651,1. No espectro ESI-MS, observa-se ainda picos em: (a) m/z 181,1 que pode ser atribuído ao ligante 1,10-fenantrolina protonado e (b) m/z 335,1 referente ao **pdShyd** protonado, esses picos possuem abundância relativa inferior a 10%, o que indica estabilidade do complexo 7 em solução.

A Figura 64 apresenta um comparativo da distribuição isotópica do pico principal do ESI-MS com valores teóricos calculados com auxílio do programa Qual Browser versão 2.0.7copyright® Thermo Fischer Scientific Inc. 1998-2007, observa-se uma grande similaridade com os espectros experimentais.

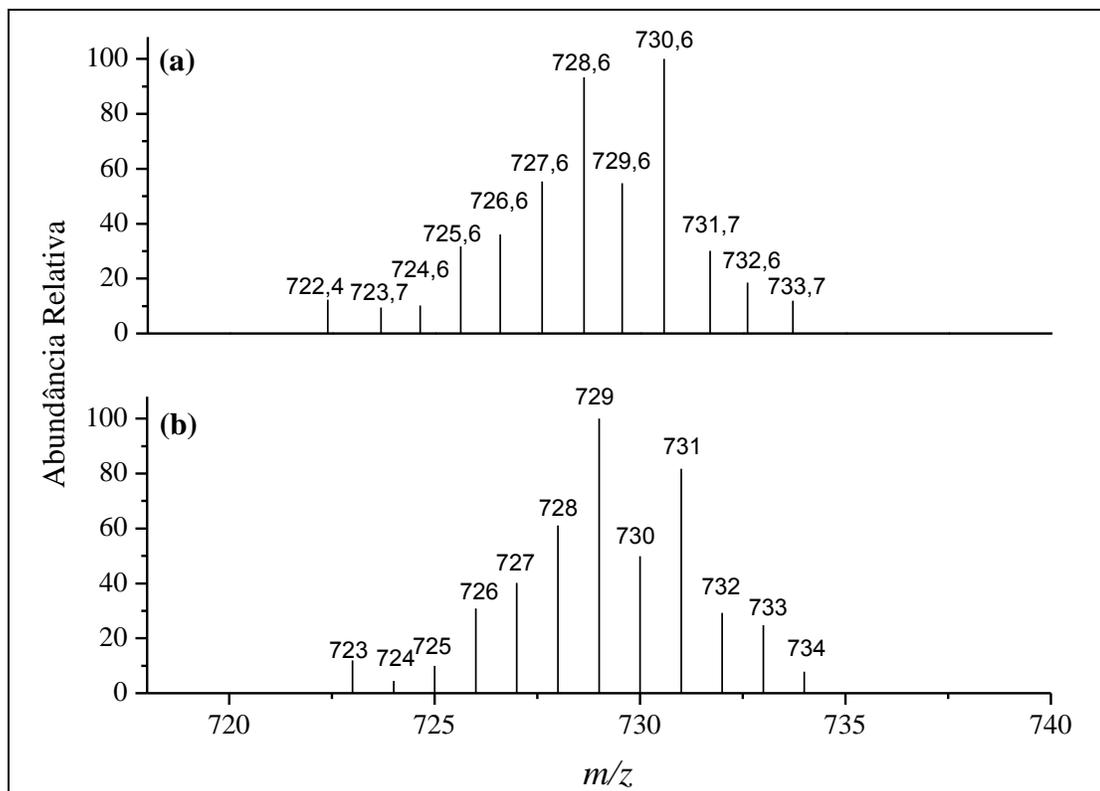


Figura 64. Distribuição isotópica para a espécie $[\text{Ru}(\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2\text{S})(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)((\text{CH}_3)_2\text{SO})\text{Cl}]^+$, (a) experimental; (b) calculado com auxílio do programa Qual Browser versão 2.0.7copyright® Thermo Fischer Scientific Inc. 1998-2007.

De modo análogo, o espectro de ESI(+)-MS, Figura 65, do complexo **8** no modo positivo apresenta pico principal em m/z 712,6 atribuído à espécie $[\text{Ru}(\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_3)(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)((\text{CH}_3)_2\text{SO})\text{Cl}]^+$, cujo valor calculado corresponde a 713,1. O espectro ESI-MS-MS desse pico, Figura 66, revela pico principal em m/z 624,9 também atribuído ao complexo sem o ligante dmsso, $[\text{Ru}(\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_3)(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)\text{Cl}]^+$, cujo valor calculado corresponde a 635,0.

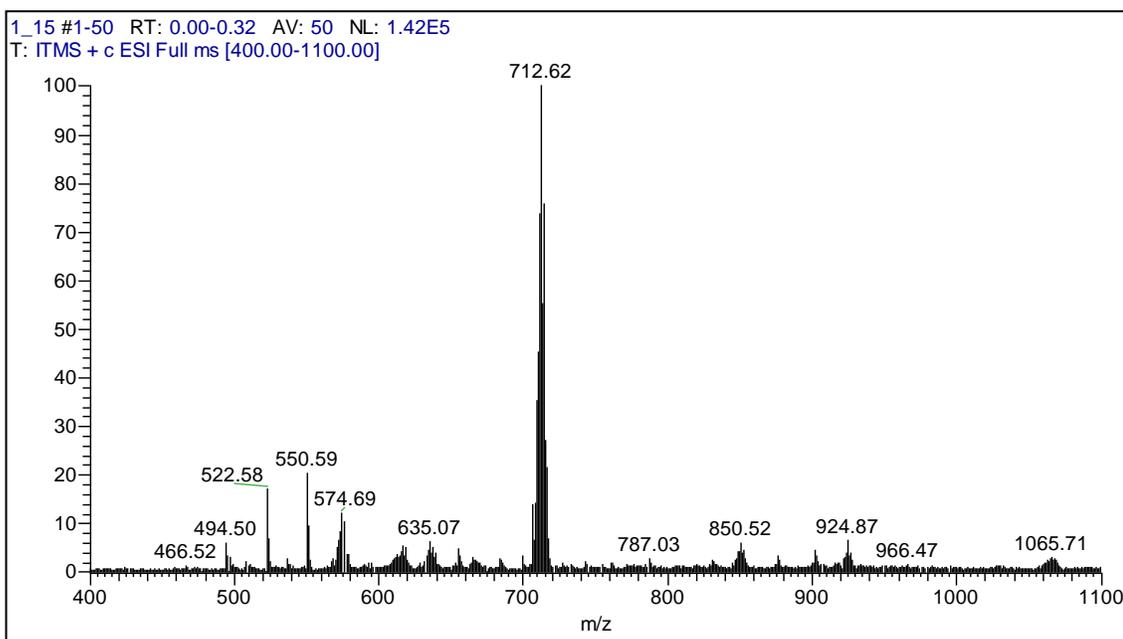


Figura 65. Espectro ESI(+)-MS em solução MeOH:H₂O (1:1) do complexo 8.

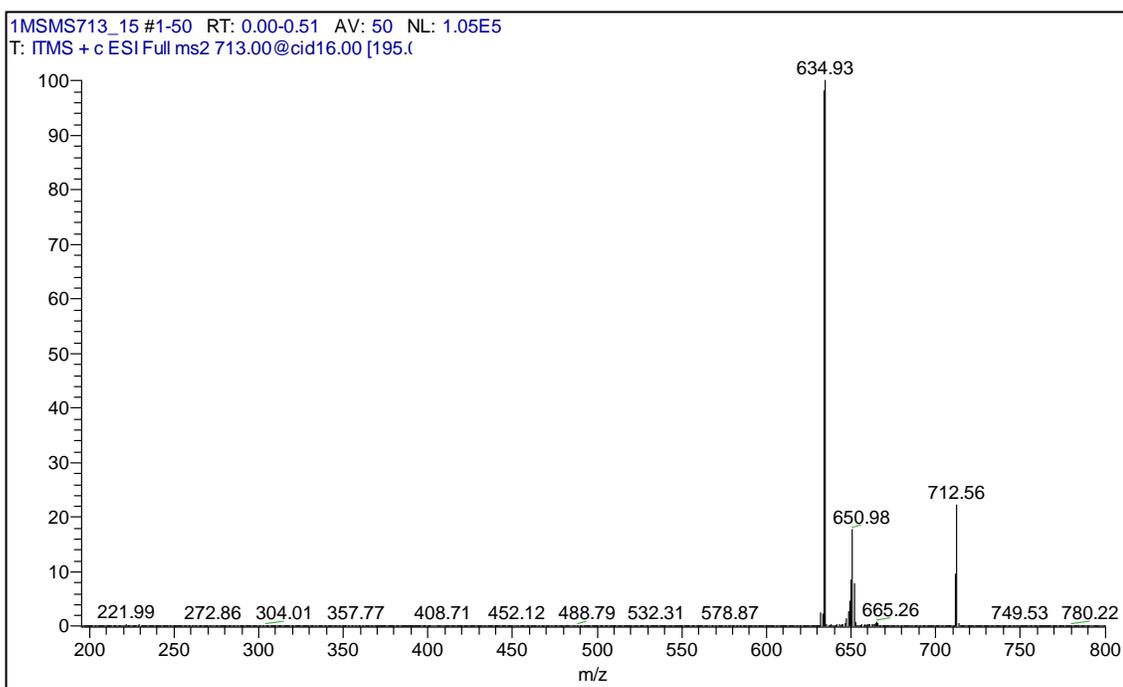


Figura 66. Espectro referente à fragmentação do pico principal do ESI(+)-MS do complexo 8 em solução MeOH:H₂O (1:1).

A Figura 67 apresenta um comparativo da distribuição isotópica do pico principal do ESI-MS com valores teóricos calculados. A distribuição isotópica simulada (teórica) possui grande similaridade com o ESI(+)-MS experimental.

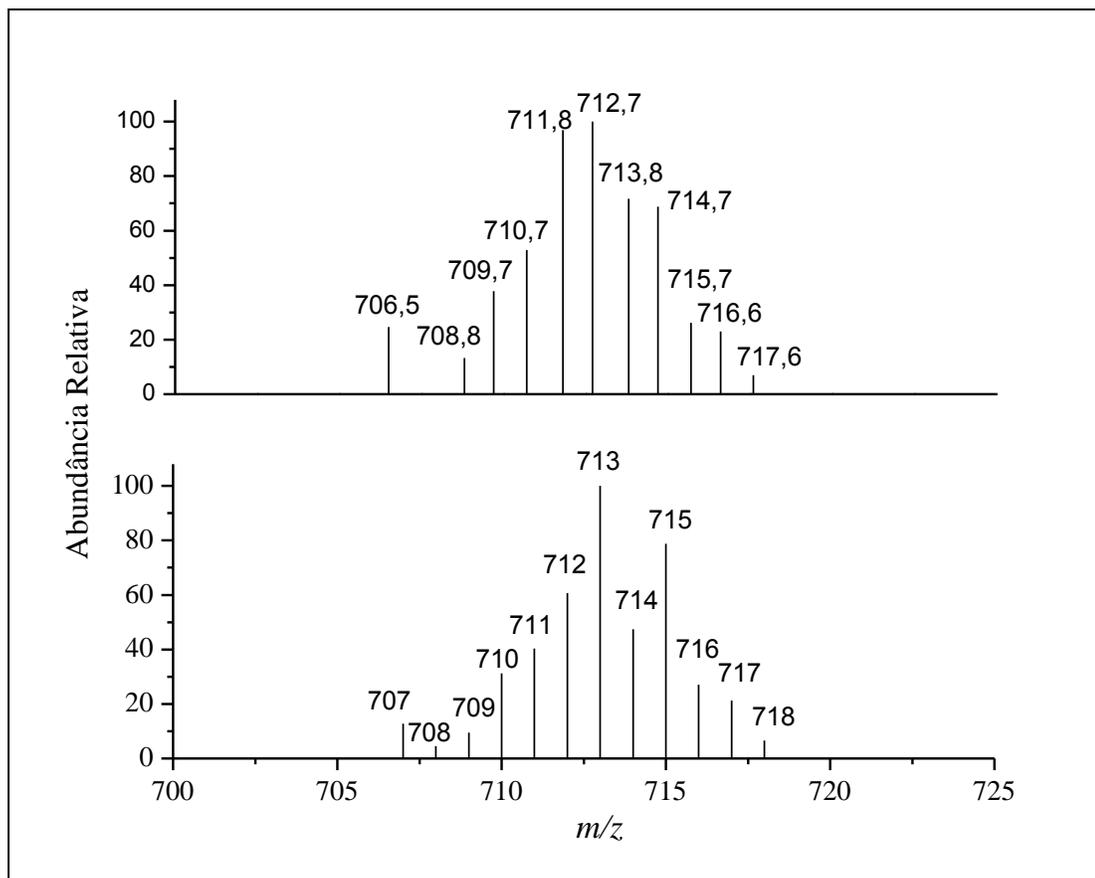


Figura 67. Distribuição isotópica para a espécie $[\text{Ru}(\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_3)(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)((\text{CH}_3)_2\text{SO})\text{Cl}]^+$, (a) experimental; (b) calculado com auxílio do programa Qual Browser versão 2.0.7copyright® Thermo Fischer Scientific Inc. 1998-2007.

Os estudos de ESI(+)-MS confirmaram as fórmulas propostas para os complexos **7** e **8** e a presença dos mesmos em solução.

2.5 – Ressonância Magnética Nuclear

As Figuras 68 e 69 apresentam os espectros de RMN de ^1H dos complexos **7** e **8** em dms -d_6 , a fim de auxiliar na proposição do sítio de coordenação dos ligantes **pdShyd** e **pdOhyd** ao rutênio.

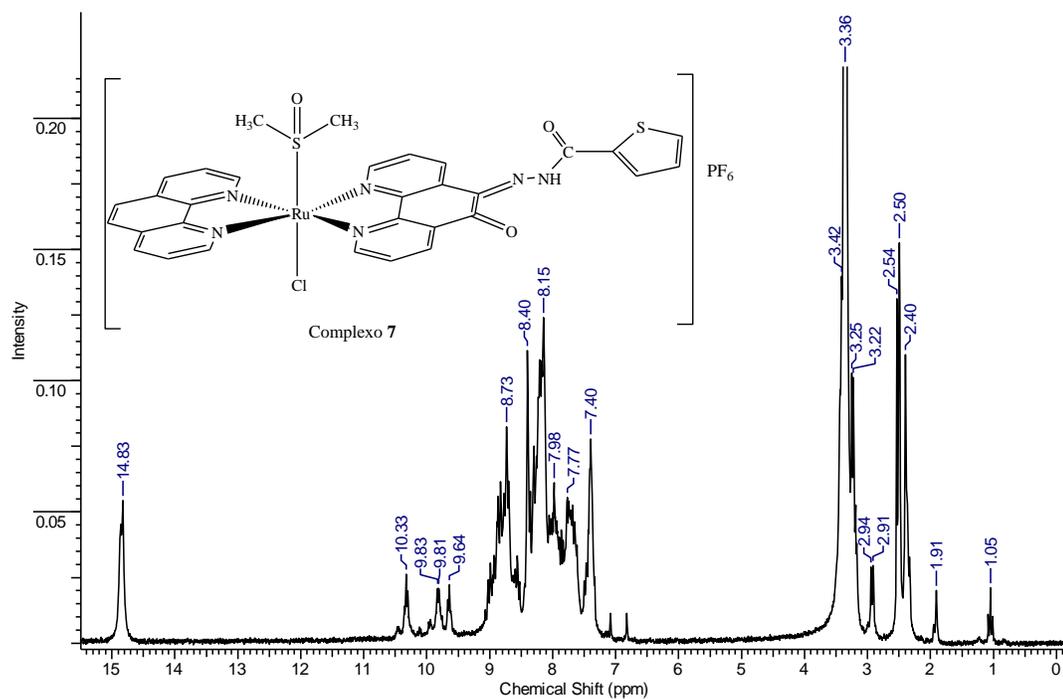


Figura 68. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) do complexo **7** em dms -d_6

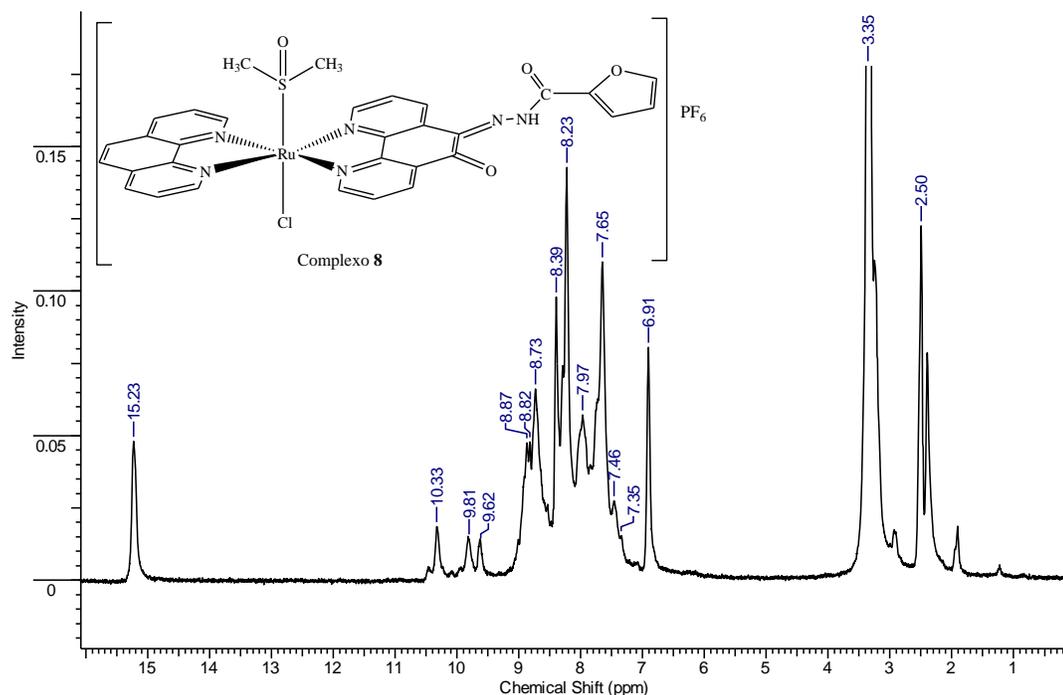


Figura 69. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) do complexo **8** em dms0-d6.

Embora a atribuição de todos os sinais dos espectros de RMN de ^1H dos complexos **7** e **8** seja muito difícil devido à sobreposição de sinais na região de prótons pertencentes a sistemas aromáticos, é possível a partir desses espectros obter algumas informações importantes a respeito do sítio de coordenação dos ligantes **pdShyd** e **pdOhyd** ao rutênio. Os espectros de RMN de ^1H dos ligantes foram feitos em CDCl_3 , enquanto que dos complexos foram feitos dms0-d6, assim pequenas diferenças nos deslocamentos químicos podem ocorrer devido ao efeito do solvente. Como o dms0 é um solvente mais polar que o clorofórmio, os sinais dos prótons nos espectros dos complexos aparecerão em deslocamentos químicos maiores.

Um indicativo que descarta a possibilidade de coordenação do metal à parte hidrazida dos ligantes **pdShyd** e **pdOhyd** são os sinais em δ 7,40 ppm (complexo **7**) e δ 6,91 ppm (complexo **8**) referentes ao H1 que praticamente não sofreram alterações em relação aos ligantes livres. Também é possível observar em ambos os espectros que os sinais dos prótons

H10 dos ligantes **pdShyd** e **pdOhyd** localizados em δ 14,83 (complexo **7**) e δ 15,23 (complexo **8**) não sofreram alterações significativas indicando que as carbonilas não participam da coordenação ao metal. Esses sinais estão em menor deslocamento químico comparado aos ligantes, devido ao fato de o solvente mais polar deixar a carbonila menos disponível para estabelecer ligação de hidrogênio com o H10.

Em ambos os espectros é possível observar sinais em torno de 10,33 e 9,81 ppm que podem ser atribuídos aos prótons H8 e H9 dos ligantes **1** e **2**, pois os mesmos sofreram mudanças para deslocamentos químicos maiores devido à coordenação dos nitrogênios ao rutênio. Cabe ressaltar que os prótons da phen localizados próximos aos nitrogênios heterocíclicos possivelmente estejam nessa região, pois também estão próximos ao sítio de coordenação.

Em ambos os espectros ocorre a presença de um sinal intenso em 3,35 ppm que é referente a presença de moléculas de água absorvidas pelo dmsó-d₆. Também é possível observar sinais menores bem próximos ao sinal da água, esses sinais são referentes aos prótons do ligante S-dmsó.

3- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS LIGANTES E DOS COMPLEXOS 7 E 8

3.1- Estudos da citotoxicidade dos compostos em células tumorais

Conforme procedimento descrito na seção 3.2 do capítulo 1, a sensibilidade das células de leucemia mielóide crônica, linhagem K562, aos ligantes **pdShyd** e **pdOhyd** e aos complexos **7** e **8** foi avaliada e a CI_{50} determinada.

A Tabela 20 traz os valores de CI_{50} dos complexos e dos ligantes, enquanto que a Figura 70 apresenta as curvas dose-resposta citotóxica.

As curvas dose-resposta dos compostos indicam que tanto ligantes quanto complexos inibem o crescimento das células tumorais de uma maneira dependente da concentração. No entanto, à diferença dos casos anteriores, os complexos **7** e **8** apresentaram-se menos ativos que os ligantes livres.

Tabela 20. Valores de CI_{50} para os ligantes phend, pdShyd, pdOhyd e para os complexos 7 e 8 com tempo de incubação de 72horas.

Compostos	CI_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1} \pm \text{s.d.}$)
phend	$1,55 \pm 0,16$
pdShyd	$2,59 \pm 0,26$
pdOhyd	$2,06 \pm 0,21$
Complexo 7	$36,13 \pm 3,6$
Complexo 8	$35,80 \pm 3,6$

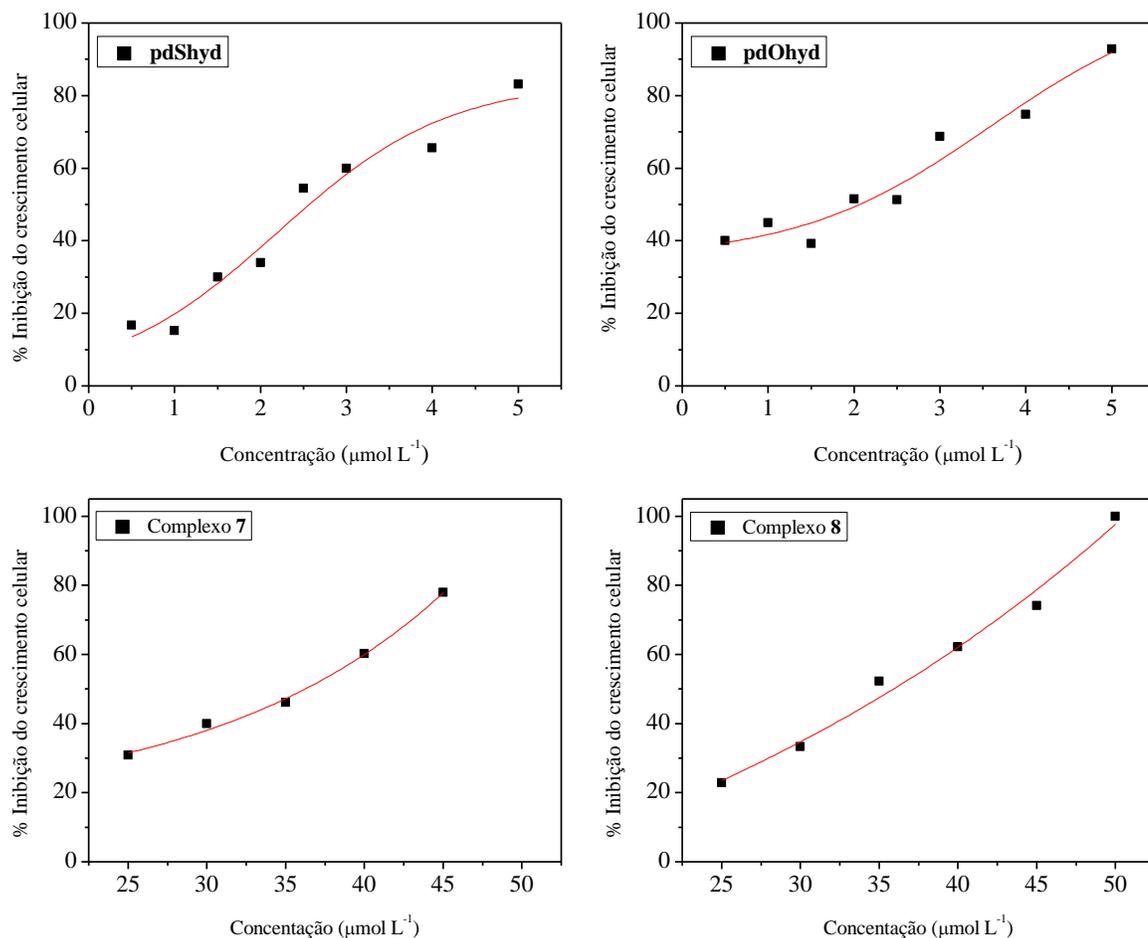


Figura 70. Curvas de dose-resposta dos ligantes pdShyd e pdOhyd e complexos 7 e 8.

Embora os resultados de CI_{50} não tenham sido muito expressivos esses valores são significativamente diminuídos quando as células são submetidas a cinco minutos de irradiação UV-A como descrito nos procedimentos a seguir.

3.2- Estudos da fotocitotoxicidade dos compostos

O efeito da exposição à luz UV-A na atividade citotóxica dos complexos 7 e 8 foi investigado. Para a avaliação da atividade fotocitotóxica, foi realizado protocolo semelhante ao descrito no capítulo 1 seção 3.3. Na Tabela 21, são apresentados os valores de CI_{50} obtidos

no escuro e após exposição à luz UV-A. As curvas dose-resposta são apresentadas na Figura 71.

Tabela 21. Valores de CI_{50} para complexos 7 e 8 com e sem irradiação UV-A por 5 minutos, tempo de incubação de 4 horas.

Complexos	Sem irradiar CI_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1} \pm \text{s.d.}$)	Com irradiação CI_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1} \pm \text{s.d.}$)
7	$55,06 \pm 5,5$	$18,82 \pm 1,9$
8	$51,81 \pm 5,2$	$17,26 \pm 1,8$

A exposição das células, previamente incubadas com os complexos **7** e **8**, à irradiação UV-A por 5 minutos induz um aumento na atividade de citotóxica de cerca de três vezes para ambos os complexos.

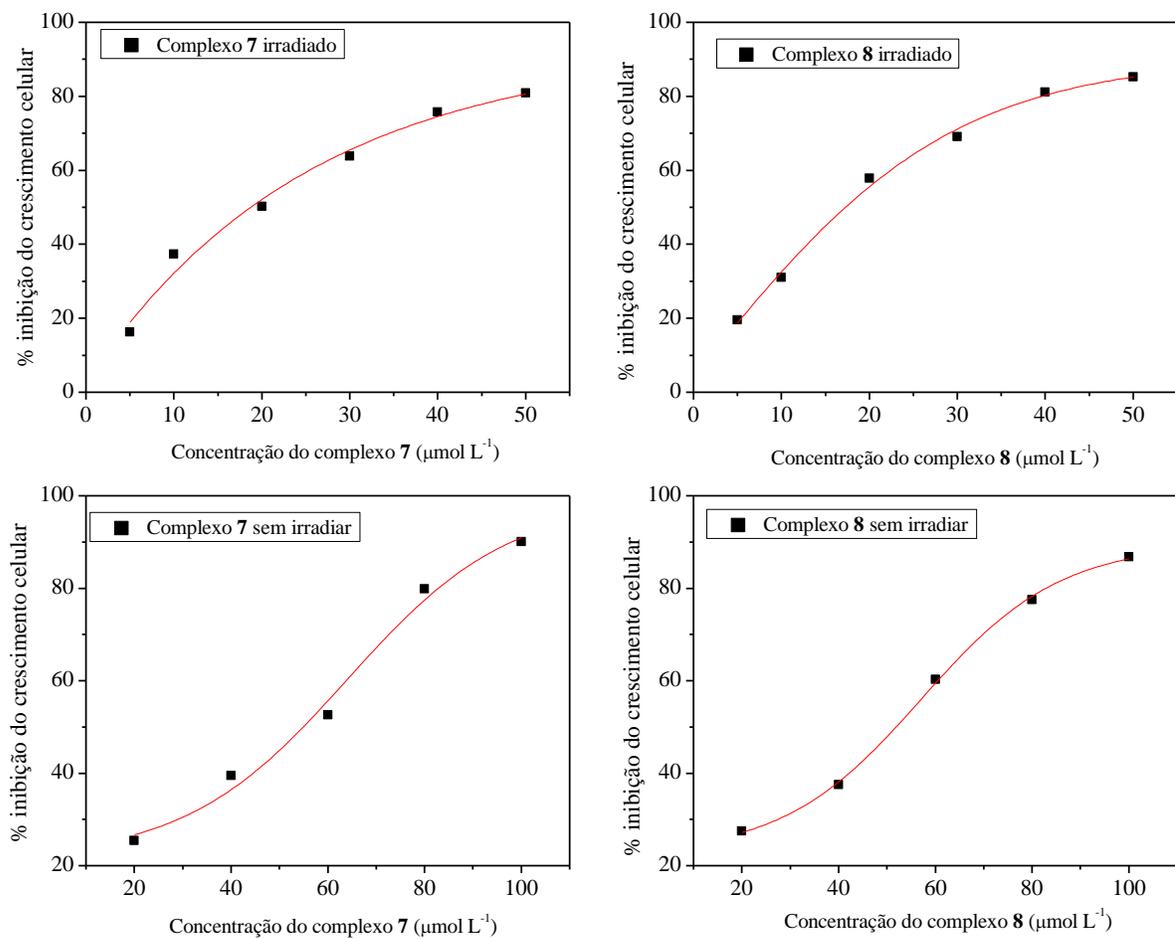


Figura 71. Curvas dose resposta para os complexos 7 e 8 com e sem irradiação UV-A por 5 minutos, tempo de incubação de 4 horas.

4- CONCLUSÕES

Dois novos ligantes, **pdShyd** e **pdOhyd**, heterocíclicos contendo as estruturas α,α -diamina e hidrazida foram sintetizados a partir da reação da 1,10-fenantrolina-5,6-diona com os derivados de hidrazida do ácido 2-tiofenocarboxílico ou do ácido 2-furóico. Também foram sintetizados e caracterizados dois novos complexos ternários de rutênio(II) hexacoordenados contendo os compostos inéditos **pdShyd** ou **pdOhyd**, a phen, uma molécula de dmsO, um íon cloreto e um ânion hexafluorofosfato como contra-íon. Em ambos os complexos, o rutênio(II) se liga aos ligantes **pdShyd** ou **pdOhyd** e à phen via os nitrogênios heterocíclicos e se liga ao dmsO via o átomo de enxofre. Essas proposições foram feitas baseadas nos estudos de espectroscopia vibracional na região do infravermelho e de RMN de ^1H . Estudos por espectrometria de massas mostraram que esses complexos estão presentes em solução.

Esses complexos não apresentaram atividade citotóxica expressiva. Contudo, quando células tumorais tratadas com esses complexos são submetidas a cinco minutos de irradiação UV-A, a atividade citotóxica aumenta cerca de três vezes.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os complexos **1** e **2** apresentam expressiva atividade de clivagem do ADN plasmidial, ligam-se ao ADN preferencialmente no sulco maior e clivam a fita do ADN por mecanismo oxidativo. Testes em células de leucemia mielóide crônica mostraram que os complexos são mais citotóxicos que os ligantes livres. Foi mostrado que o efeito citotóxico aumenta com o aumento da concentração intracelular de cobre. Uma vez dentro das células, os complexos reagem com o ADN, e o número de adutos formados Cu-ADN é proporcional à concentração externa de complexo adicionado. Conclui-se que a interação desses complexos com o ADN está envolvida no mecanismo de ação citotóxica.

Em condições de fotoirradiação a espécie oxigênio singlete participa do processo de clivagem do ADN promovida pelos complexos, ampliando a clivagem do ADN plasmidial cerca de 40 vezes e a citotoxicidade cerca de oito vezes.

O complexo **1** foi capaz de retardar o desenvolvimento de tumor de *Erlich* em camundongos tratados com esse composto.

Com relação a esses compostos pretendemos aprofundar os estudos *in vivo* da atividade antitumoral e toxicidade, incluindo estudos de fotoatividade. Também pretendemos estudar o mecanismo da clivagem do ADN dentro das células.

A família de complexos ternários de Cu(II) com ligantes N-doadores e hidrazidas, complexos **3**, **4**, **5** e **6**, também apresentaram citotoxicidade superior a dos ligantes livres. Como no caso dos complexos **1** e **2**, foi mostrado que a citotoxicidade está relacionada com a acumulação intracelular de cobre e que o número de adutos Cu-ADN cresce com o aumento da quantidade de complexo adicionada no meio extracelular. Os complexos **3** e **5** que

possuem como ligante comum a 1,10-fenantrolina apresentaram resultados mais promissores como antitumorais.

Com relação a esses quatro complexos serão continuados estudos de clivagem do ADN e, possivelmente, também serão feitos estudos em modelo animal para avaliar a atividade de retardo do desenvolvimento de tumores inoculados em camundongos.

Os complexos **7** e **8**, que possuem como centro metálico o Ru(II) e como ligantes compostos bidentados α,α -diaminas, dmsO e cloreto, não apresentaram atividade citotóxica expressiva. Contudo, como perspectivas futuras pretende-se iniciar estudos da atividade antibacteriana desses complexos. A motivação para tais estudos é o fato de que há relatos na literatura de complexos de rutênio contendo fármacos orgânicos como ligantes que superam a resistência desenvolvida por bactérias (ou microorganismos) em relação ao ligante livre [127, 128].

ANEXO 1: SÍNTESES E CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DE COMPOSTOS NÃO INÉDITOS USADOS COMO REFERÊNCIA NOS TESTES BIOLÓGICOS OU COMO PRECURSORES NA SÍNTESE DE NOVOS LIGANTES E COMPLEXOS METÁLICOS.

1-SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA 1,10-FENANTROLINA-5,6-DIONA

1.1- Síntese da 1,10-fenantrolina-5,6-diona (phend)

O composto 1,10-fenantrolina-5,6-diona foi sintetizado a fim de ser usado como precursor para preparação dos ligantes **pdShyd** e **pdOhyd**, os quais foram usados para preparar os complexos **7** e **8**. A rota sintética da phend está esquematizada na Figura 73.

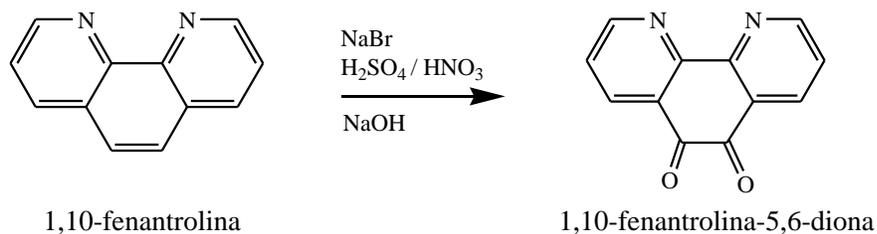


Figura 72. Esquema da síntese da 1,10-fenantrolina-5,6-diona.

O procedimento usado para preparação desse composto foi adaptado da literatura [129]. Adicionaram-se a um balão de fundo redondo 5,0g de 1,10-fenantrolina e 30 mL de ácido sulfúrico concentrado. À solução resultante adicionaram-se 2,5g de brometo de sódio. Após completa solubilização do NaBr acrescentaram-se à solução 17 mL de ácido nítrico fumegante. A solução permaneceu em refluxo por 50 minutos.

Ao atingir a temperatura ambiente, a solução foi vertida em um béquer e colocada em banho de gelo para neutralização com uma solução de hidróxido de sódio (5 mol L⁻¹), foram

usados cerca de 150 mL. Quando o pH 6,9 foi atingido cessou-se a adição de solução de NaOH e fez-se a filtração a vácuo da suspensão. Sob constante agitação, adicionaram-se à solução-mãe 100 mL de diclorometano. A mistura resultante foi transferida para um funil de separação, e o extrato orgânico foi separado. Ao extrato orgânico adicionaram-se 2,0 g de sulfato de sódio previamente seco na estufa para eliminação de qualquer resíduo de água presente nessa solução.

O solvente do extrato orgânico foi removido com auxílio de um rotaevaporador, ao sólido resultante foram adicionados 100 mL de metanol. A solução metanólica foi reservada na geladeira. Decorridas 12 horas, observou-se a presença de cristais agulhas de coloração amarelo-laranja, que foram separados da solução por filtração simples e lavados com éter etílico.

1.2- Caracterização da 1,10-fenantrolina-5,6-diona (phend)

Para confirmação da obtenção do composto phend foram dosados os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio, foi medido o ponto de fusão, foram feitas análises da espectrometria vibracional na região do infravermelho e do RMN de ^1H . A Tabela 22 traz informações sobre CHN e PF.

Tabela 22. Dados obtidos das análises elementares e do ponto de fusão do phend

	%C	%H	%N	Faixa PF.
	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	(°C)
phend ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$) MM= 210,19 g mol ⁻¹	68,6 (65,5)	2,9 (2,6)	13,3 (12,8)	258 – 260

Os dados obtidos na análise elementar confirmam a obtenção da phend. A fusão do composto 1,10-fenantrolina-5,6-diona foi observada no intervalo de 258-260 °C em concordância com o valor encontrado na literatura (260 °C) [130]. Esse é um forte indicativo da pureza do composto.

A Figura 74 apresenta o espectro na região do infravermelho da 1,10-fenantrolina-5,6-diona.

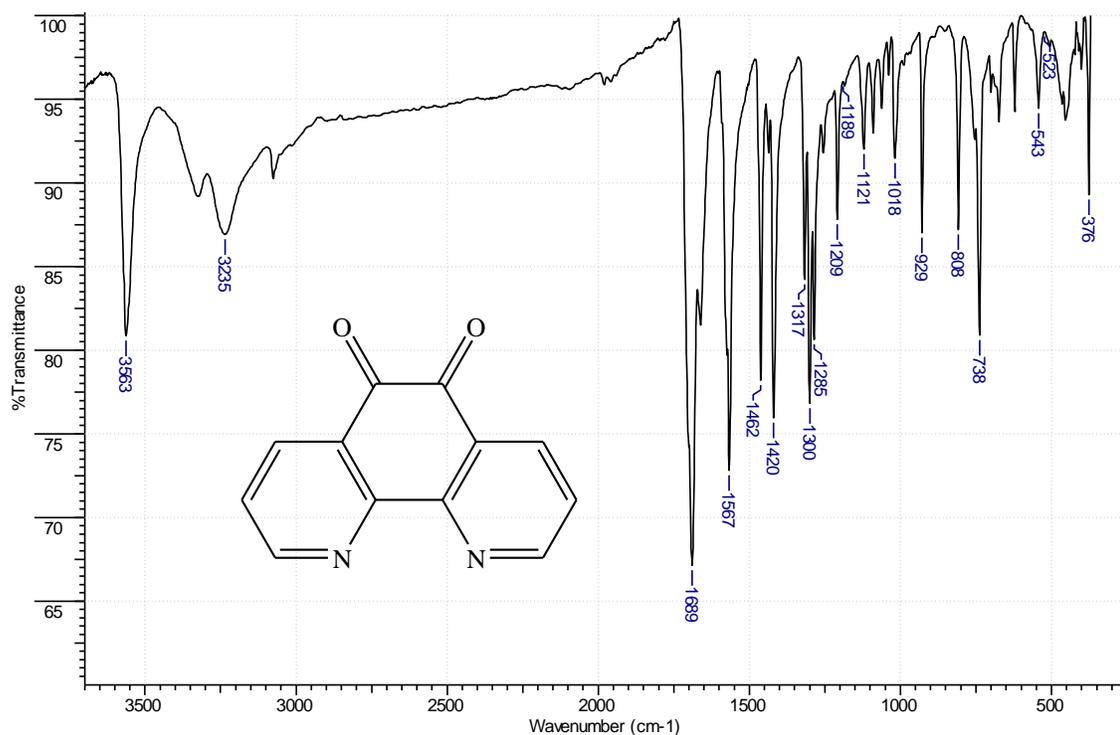


Figura 73. Espectro vibracional na região do infravermelho para o composto phend..

Esse espectro evidenciou a formação do composto pela presença da banda intensa em 1689 cm⁻¹ referente ao estiramento C=O. Notam-se também no espectro de infravermelho outras bandas características de grupos funcionais desse composto como as intensas bandas em 1567 cm⁻¹ e 1420 cm⁻¹ referentes respectivamente aos estiramentos C=C e C-N, ambos de sistemas aromáticos.

As Figuras 75 e 76 apresentam os espectros de RMN de ^1H

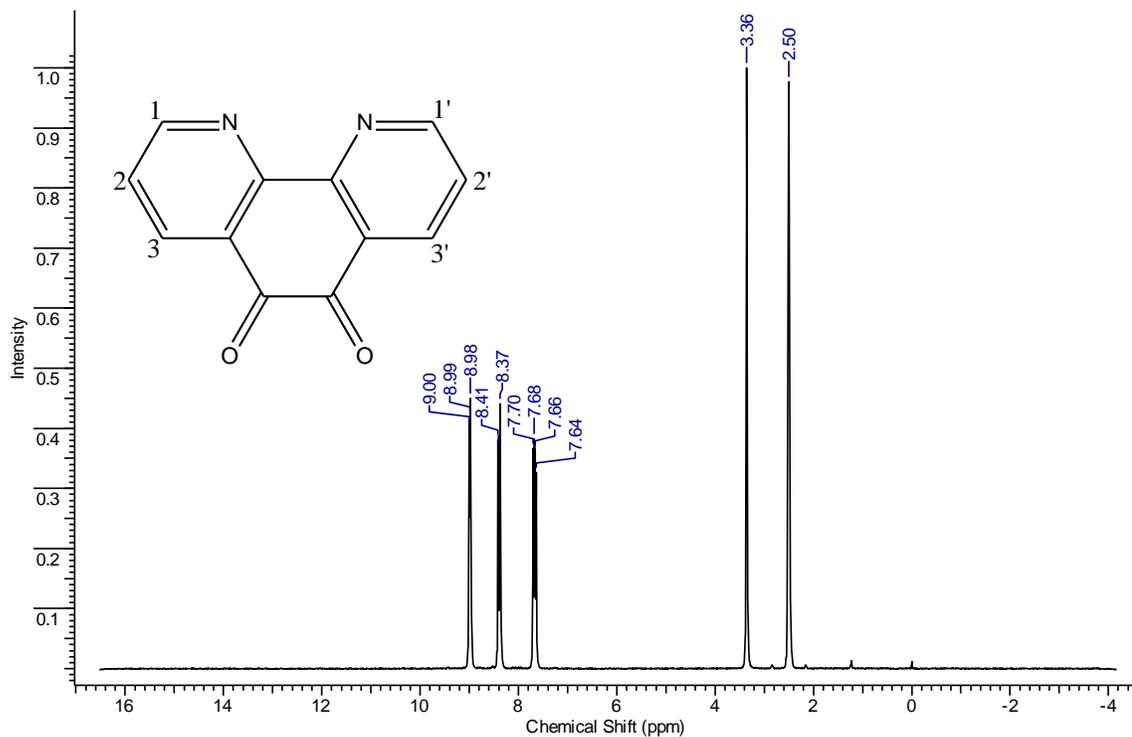


Figura 74. Espectro RMN de ^1H (200 MHz) do composto phend em dms0-d_6 .

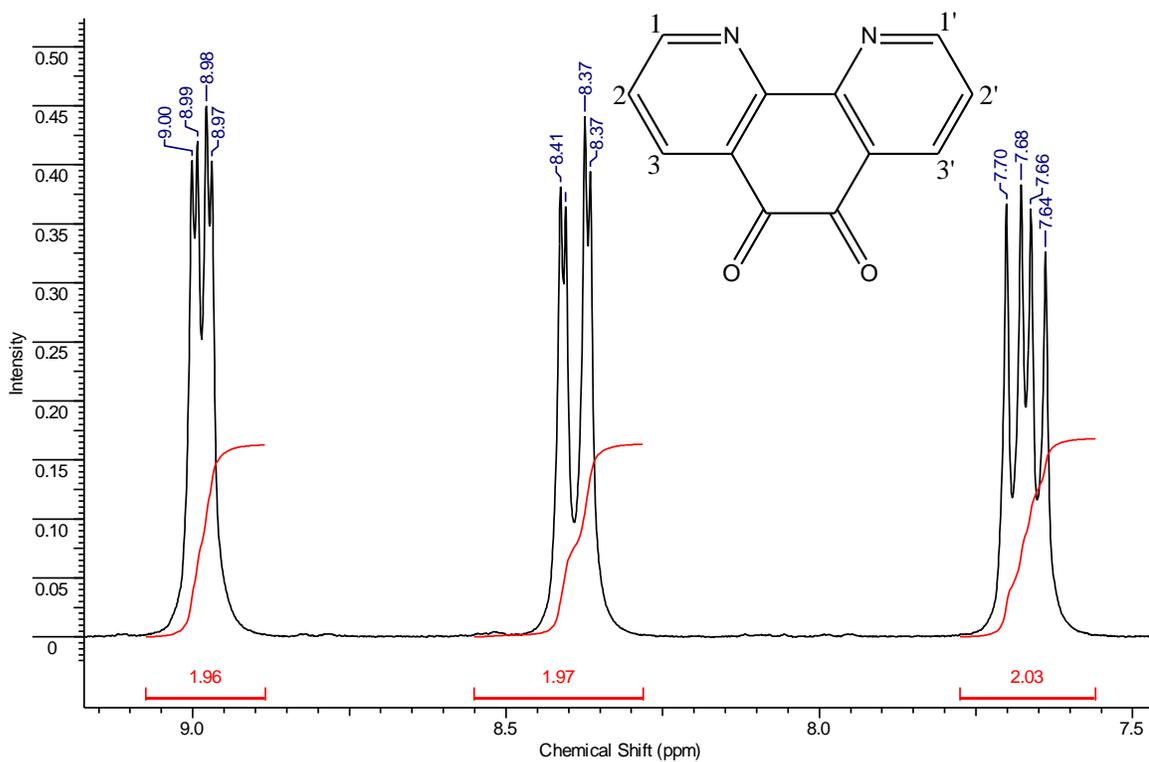


Figura 75. Espectro ampliado do RMN de ^1H (200 MHz) do composto phend em dms0-d_6 .

Os sinais do espectro de RMN de ^1H do phend estão descritos na Tabela 23.

Tabela 23. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H da phend

δ_{H} ppm (multiplete; J Hz)	Integral	Atribuição
7,53 (dd; J_{2-3} 8,0 e J_{2-1} 8,0)	2,03	H2 e H2'
8,43 (dd; J_{3-2} 8,0 e J_{3-1} 1,6)	1,97	H3 e H3'
9,04 (dd; J_{1-2} 6,3 e J_{1-3} 1,8)	1,96	H1 e H1'

Todos os prótons dessa molécula apresentam deslocamento químico superior a 6,5 ppm o que é condizente com os sistemas aromáticos da phend.

O primeiro multiplete, um duplo duplete com constantes de acoplamento de J_{2-3} e J_{2-1} de 8,0 Hz, corresponde ao hidrogênio mais protegido, ou seja, o que está mais distante de átomos eletronegativos, os hidrogênios H2 e H2'. O sinal seguinte em δ 8,43 também corresponde a um duplo duplete devido aos acoplamentos J_{3-2} 8,0 Hz em orto e J_{3-1} 1,6 Hz em meta. Esse sinal corresponde aos hidrogênios H3 e H3', que sofrem maior efeito de desblindagem por efeito indutivo da carbonila. E por último, o terceiro duplo duplete devido aos acoplamentos J_{1-2} 6,3 Hz em orto e J_{1-3} 1,8 Hz em meta aparece em δ 8,43 e corresponde aos hidrogênios H1 e H1', que pertencem a carbonos que estão diretamente ligados a nitrogênios. Os sinais em δ 3,36 e 2,50 correspondem respectivamente aos prótons da água e do dmsO. O solvente dmsO absorve moléculas de água com facilidade.

O espectro de RMN de ^1H comprovou a formação do composto e que o mesmo foi obtido com certo grau de pureza, devido à ausência de sinais de possíveis contaminantes.

2- SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO CIS-DICLOROTETRAQUIS(DIMETILSULFÓXIDO)RUTÊNIO(II)

Uma pesquisa na literatura [131] revelou o complexo cis-diclorotetraquis(dimetilsulfóxido)rutênio(II) como um bom material de partida para síntese de complexos de rutênio. Somado a isso, foi descoberto na década de 70 que esse complexo é um bom agente anticancerígeno, apresentando atividade semelhante à do complexo cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂] [132]. A descoberta da importância medicinal desse complexo de rutênio desencadeou uma série de estudos sobre a atividade biológica do sistema. Esse complexo foi usado como composto precursor nas sínteses dos complexos **7** e **8**.

2.1- Síntese do complexo cis-[RuCl₂(dmsO)₄]

O procedimento para preparo desse complexo foi modificado da literatura [133]. 6,22 g (3,0 mmol) de cloreto de rutênio(III) foram dissolvidos em 17,0 mL de dimetilsulfóxido, a solução foi colocada em refluxo por 30 minutos. Em um rota-vapor o volume dessa solução foi reduzido à metade. A essa solução adicionaram-se 10,0 mL de etanol, instantaneamente ocorreu formação de precipitado amarelo. O precipitado amarelo foi filtrado, lavado com etanol e seco na pistola de secagem Abderhalden com vapor de clorofórmio. Rendimento: 40%.

2.2- Caracterização do complexo cis-[RuCl₂(dmsO)₄]

Para confirmar a formação do cis-[Ru(dmsO)₄Cl₂] foram realizados os seguintes estudos: análise elementar, medida de condutividade e análise espectroscópica na região do infravermelho.

Os resultados da porcentagem de carbono, hidrogênio, nitrogênio e condutividade molar para o complexo cis-[Ru(dmsO)₄Cl₂] encontram-se na Tabela 24.

Tabela 24. Dados das análises elementares e condutimétricas do complexo cis-[Ru(dmsO)₄Cl₂].

Os valores foram calculados para a fórmula mínima: RuC₈H₂₄S₄O₄.

Complexos	%C	%H	%N	Λ_M ($\mu S/cm$)
	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	
cis-[Ru(dmsO) ₄ Cl ₂] MM= 484,07 g·mol ⁻¹	20,0 (19,9)	4,5 (4,9)	0,0 (0,0)	0,4

Os resultados de análise elementar confirmam a obtenção do complexo. A condutividade molar indicou tratar-se de um composto neutro [87].

A espectroscopia vibracional permite inferir a respeito da natureza do átomo coordenante em complexos em que o dmsO esta presente como ligante. A Figura 69 apresenta o espectro vibracional do complexo cis-[RuCl₂(dmsO)₄].

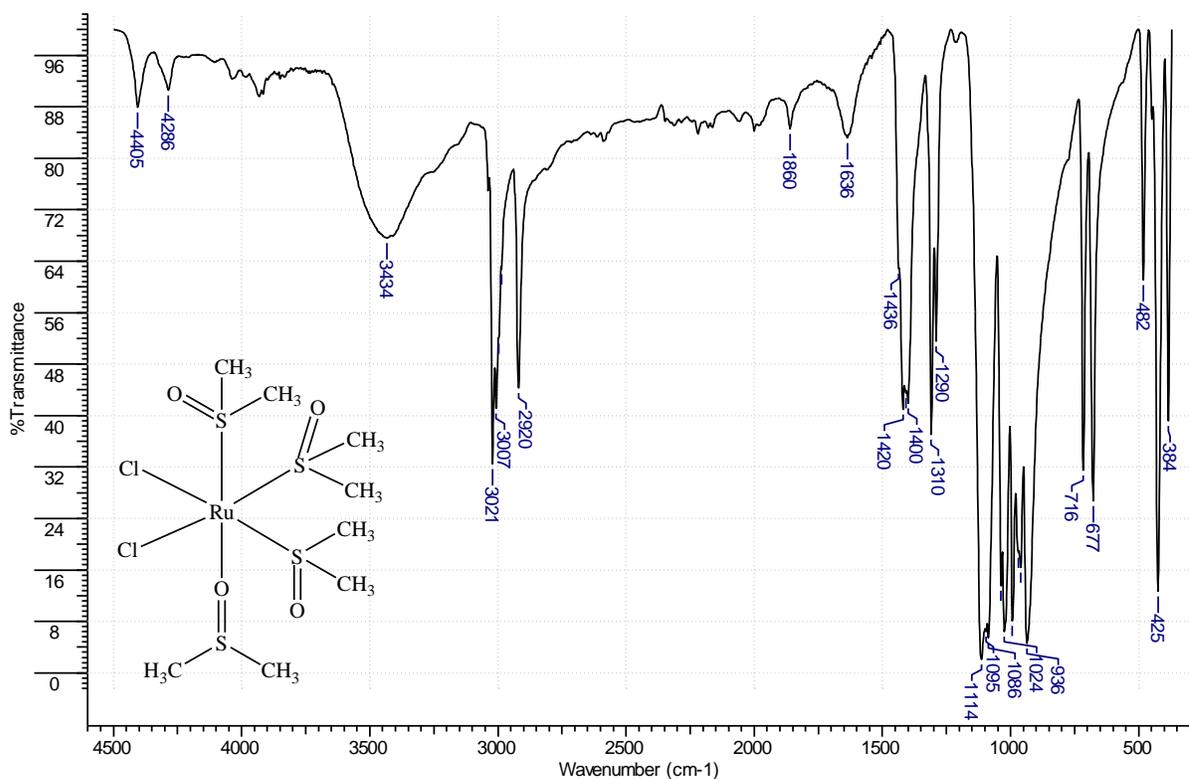


Figura 76. Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo cis-[Ru(dmsO)₄Cl₂].

A análise do espectro vibracional do complexo [RuCl₂(dmsO)₄] evidencia a coordenação do ligante dimetilsulfóxido ao rutênio através da presença de bandas características em 3007 e 2920 cm⁻¹ referentes a νCH₃; 1100 e 1085 cm⁻¹ devido ao νSO – quando coordenado pelo átomo de S e 936 cm⁻¹ devido ao νSO – quando coordenado pelo átomo de O. Somado a isso, tem-se as bandas em 716 e 677 cm⁻¹ referentes a νC-S; em 482 cm⁻¹ referente a νRu-O e em 425 cm⁻¹ devido a δCSO [92].

A estrutura sugerida para esse composto envolve três moléculas de dmsO coordenadas ao rutênio através dos átomos de enxofre (S-dmsO), ocupando posições adjacentes na face triangular de um octaedro. Duas delas estão em posições opostas às dos ligantes cloreto, que exibem configuração cis, e o sexto sítio do octaedro é ocupado por uma molécula de dmsO coordenada via o átomo de oxigênio (O-dmsO) [131].

3-SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO [Cu(phen)₂](ClO₄)₂

3.1- Preparação do [Cu(phen)₂](ClO₄)₂

0,5 mmol de Cu(ClO₄)₂·6H₂O (0,185 g) foram dissolvidos em 2,0 mL de acetonitrila. A essa solução foram adicionados 3,0 mL de solução de 1,0 mmol (0,180 g) de 1,10-fenantrolina monohidratada também dissolvida em acetonitrila. A solução resultante de coloração verde foi deixada na geladeira para evaporação lenta do solvente. Depois de alguns dias, ocorreu formação de cristais verdes escuros, que foram separados por filtração e lavados com acetonitrila fria. Rendimento: 55%.

3.2- Caracterização do [Cu(phen)₂](ClO₄)₂

Para confirmação da obtenção do perclorato de bisfenantrolinacobre(II) foram medidos os teores de C, H, N e Cu e a condutividade molar. A Tabela 25 apresenta os resultados experimentais e teóricos das análises elementares que estão de acordo com a fórmula mínima: CuC₂₄H₂₀N₄O₈Cl₂ e apresentam erros inferiores a 5%. O valor de condutividade molar é típica de eletrólitos 2:1 [87].

Tabela 25. Dados das análises elementares e condutimétricas do complexo [Cu(phen)₂](ClO₄)₂

	%C	%H	%N	%Cu	Λ_M ($\mu\text{S/cm}$)
	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	Exp. (Calc.)	
[Cu(phen) ₂](ClO ₄) ₂ MM= 622,86 g·mol ⁻¹	46,5 (46,3)	2,7 (2,6)	9,4 (9,0)	9,8 (10,2)	229

**ANEXO 2 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA OS
LIGANTES NÃO INÉDITOS.**

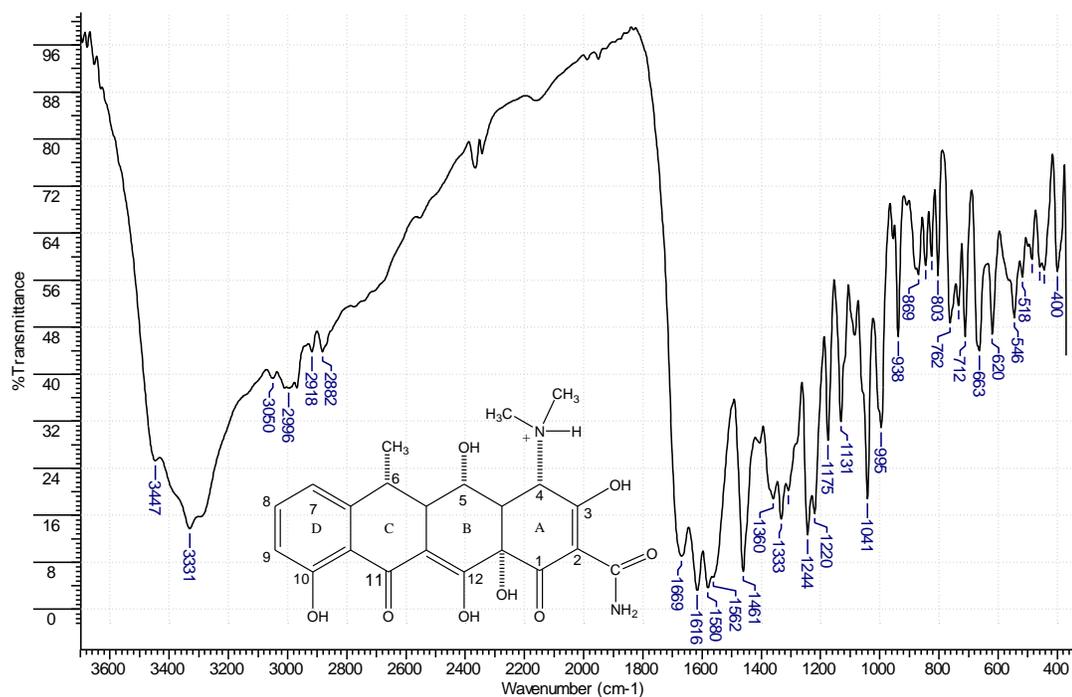


Figura 77. Espectro vibracional na região do infravermelho para o ligante dox.

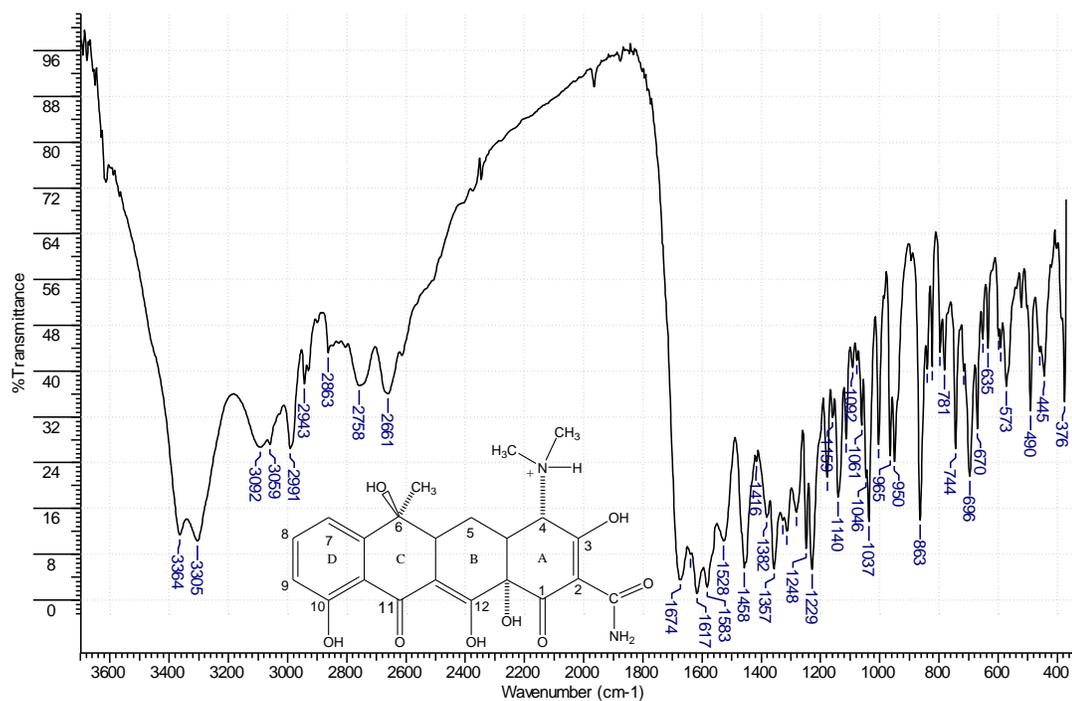


Figura 78. Espectro vibracional na região do infravermelho para o ligante tc.

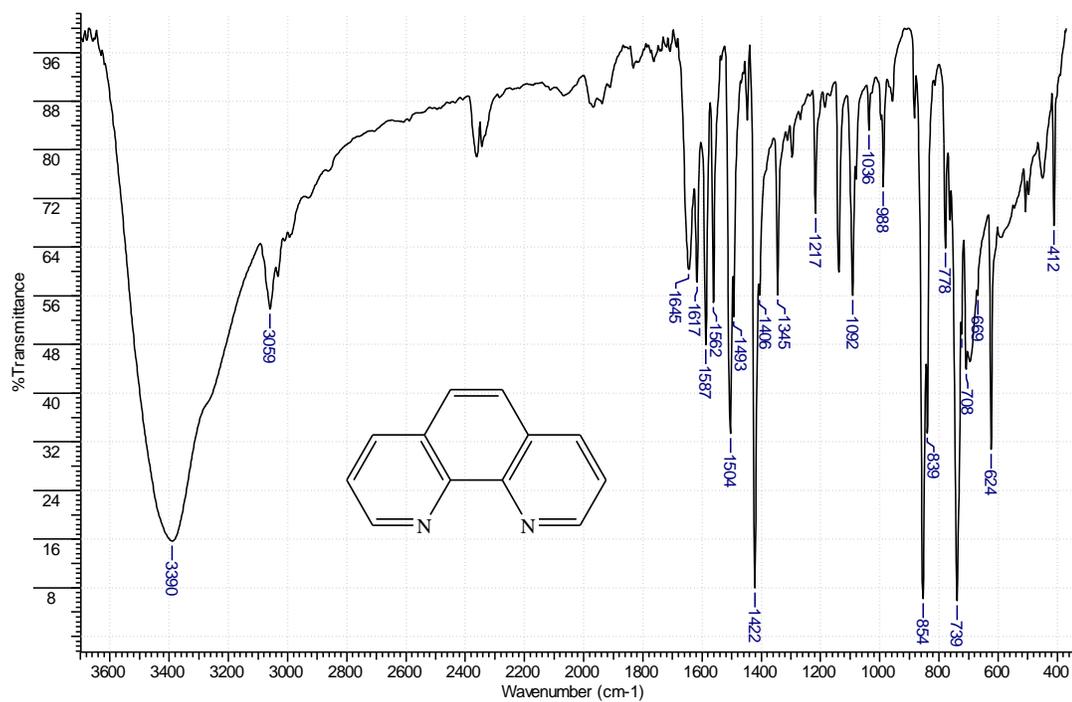


Figura 79. Espectro vibracional na região do infravermelho para o ligante phen.

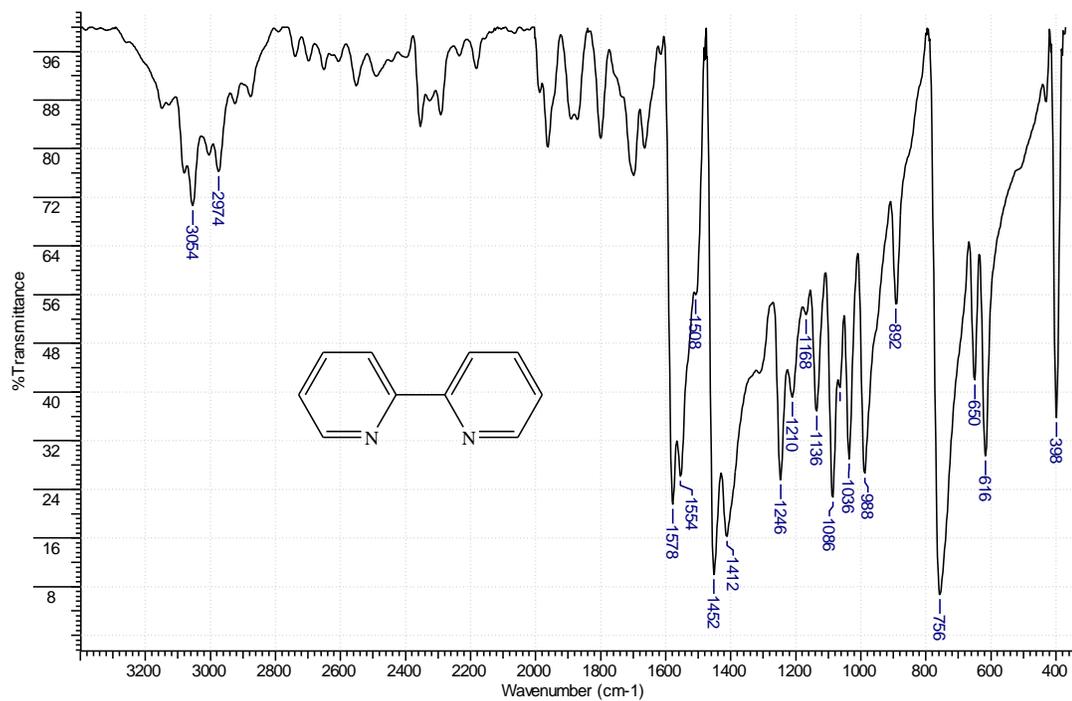


Figura 80. Espectro vibracional na região do infravermelho para o ligante bpy.

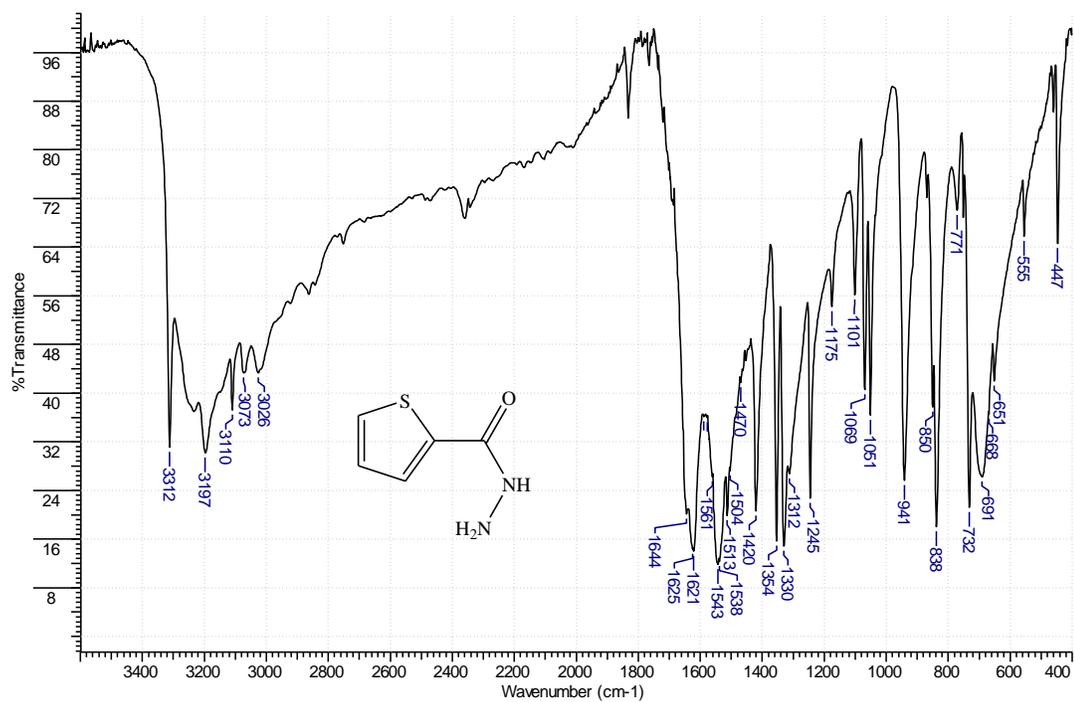


Figura 81. Espectro vibracional na região do infravermelho para o ligante Shyd.

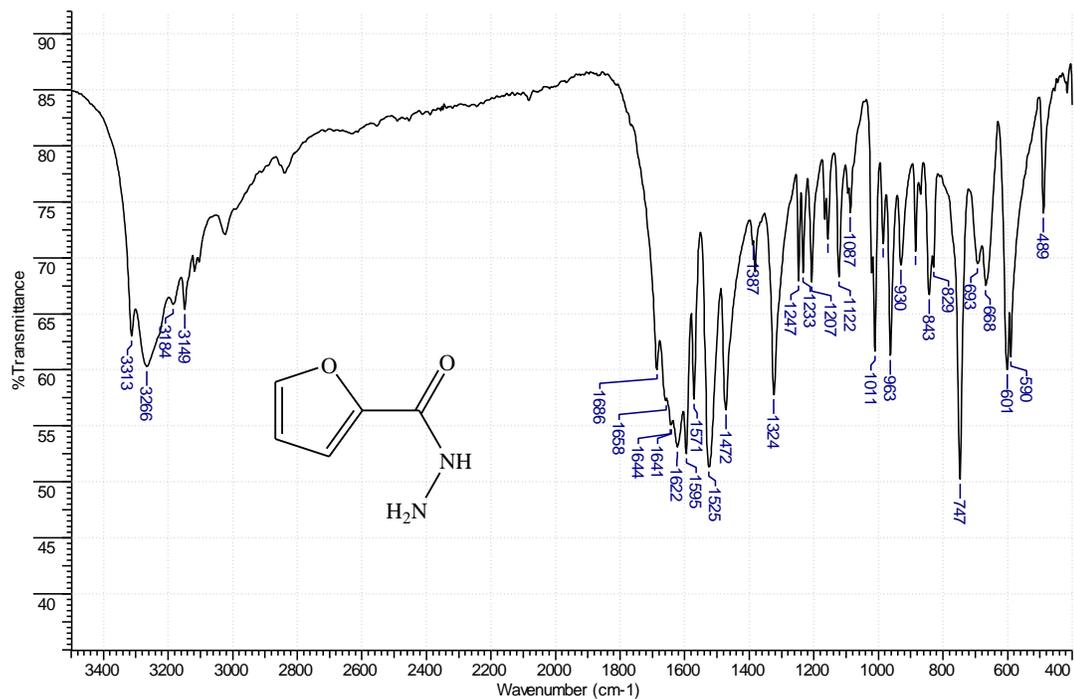


Figura 82. Espectro vibracional na região do infravermelho para o ligante Ohyd.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Katzung, B.C. *Farmacologia Básica e Clínica*, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, **1994**
- 2- http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322 acesso 20/06/2012.
- 3- Neidle, S.; Thurston, D. *Nat. Rev.* **2005**, 5, 285.
- 4- Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Trosco, J.E.; Mansour, V. H. *Nature* **1969**, 222, 385
- 5- Rosenberg, B.; van Camp, L. *Cancer Research* **1970**, 30, 1799
- 6- Uma, V.; Elango, B.; Nair, U. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 3484.
- 7- Hurley, L. H., *Nature Reviews Cancer.* **2002**, 2, 188.
- 8- Pizarro, A. M.; Sadler, P. J. *Biochimie* **2009**, 91, 1198.
- 9- Bancroft, D. P.; Lepre, C. A.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6860
- 10- Reedijk, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, 3611.
- 11- Fontes, A. P.S; Almeida, S. G.; Nader, L. A. *Quim Nova.* **1997**, 20, 398.
- 12- Silva, P. P.; de Paula, F. C. S.; Guerra, W.; Silveira, J. N.; Botelho, F. V.; Vieira, L. Q.; Bortolotto, T.; Fischer, F. L.; Bussi, G.; Terenzi, H.; Pereira-Maia, E. C. *J. Braz.Chem. Soc.* **2010**, 21, 1237.
- 13- Boerner, L. J. K.; Zaleski, J. M. *Current Opinon in Chemical Biology*, **2005**, 9, 135.
- 14- Todd, R. C.; Lippard, S. J. *Metallomics.* **2009**, 1, 280.
- 15- Brown, S. D.; Trotter, K. D.; Sutcliffe, O. B.; Plumb, J. A.; Waddell, B.; Briggs, N. E. B.; Wheate, N. *J. Dalton Trans.* **2012**, 41, 11330
- 16- Farrell, N. P. *Drugs of the Future* **2012**, 37, 795.
- 17- Hall, M. D.; Hambley, T. W. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 232, 49.
- 18- Levina, A.; Mitra, A.; Lay, P. A. *Metallomics* **2009**, 1, 458.
- 19- Barton, J. K.; Lolis, E. *J. Am. Chem. Soc* **1985**, 107, 708.

- 20- Brabec, V.; Nováková, O. *Drug Resistance Updates* **2006**, 9, 111.
- 21- Schluga, P.; Hartinger, C. G.; Egger, A.; Reisner, E.; Galanski, M.; Jakupec, M. A.; Keppler, B. K. *Dalton Trans.* **2006**, 14, 1796.
- 22- Hartinger, C.G., Zorbas-Seifried, S., Jakupec, M.A., Kynast, B., Zorbas, H., Keppler, B.K., *J. Inorg. Biochem.* **2006**, 100, 891.
- 23- Bacac, M.; Hotze, A. C. G.; van der Schilden, K.; Haasnoot, J. G.; Pacor, S.; Alessio, E.; Sava, G.; Reedijk, J. *J Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 402.
- 24- Bergano, A.; Massi, A.; Jakupec, M. A.; Keppler, B. K.; Sava, G. *Met Based Drugs*, **2009**, 1.
- 25- Lerman, L. S. *J. Mol. Biol.* **1961**, 3, 18.
- 26- Bauer, W.; Vinograd, J. *J. Mol. Biol.* **1970**, 54, 281.
- 27- Lerman, L. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1963**, 49, 94.
- 28- Usha, S.; Johnson, I. M.; Malathi, R. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2006**, 284, 57.
- 29- Brana, M. F.; Dominguez, G.; Saez, B.; Romerdahl, C.; Robinson, S.; Barlozzari, T., *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, 37, 541.
- 30- Dwyer, F. P.; Mayhew, E.; Roe, E. M. F.; Shulman, A. *J. Cancer.* **1965**, 19, 195.
- 31- Matsuzaki, W. S.; Rodrigues, F. C. M.; Malheiros, C. A.; Rahal, F. *Rev. Col. Bras. Cir.* **2006**, 23, 228.
- 32- Jennette, K. W.; Lippard, S. J.; Vassiliades, G. A.; Baueri, W. R. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1974**, 71, 3839.
- 33- Wang, A. H. J.; Nathans, J.; van der Marel, G.; van Boom, J. H.; Rich, A. *Nature* **1978**, 276, 471.
- 34- Howe-Grant, M.; Lippard, S. J. *Biocemistry.* **1979**, 18, 5762.

- 35- Barton, J. K.; Dannenberg, J. J.; Raphael, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 4967.
- 36- Barton, J. K.; Danishefsky, A. T.; Goldberg, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 2172.
- 37- Barton, J. K.; Goldberg, J. M.; Kumar, C. V.; Turro, N. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2081.
- 38- Zeglis, B. M.; Pierre, V. C.; Barton, J. K. *Chem Comm* **2007**, 4565.
- 39- Erkkila, K.E.; Odom, D. T.; Barton, J. K. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2777.
- 40- Miranda, F. S.; Signori, A. M.; Vicente, J.; de Souza, B.; Priebe, J. P.; Szpoganicz, B.; Gonçalves, N. S.; Neves, A. *Tetrahedron* **2008**, 64, 5410.
- 41- Friedman, A. E.; Chambron, J. C.; Sauvage, J. P.; Turro, N. J.; Barton, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 4960.
- 42- Richard M. Hartshorn, Jacqueline K. Barton *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 15.
- 43- Catharina Hiort, Per Lincoln, Bengt Norden. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3448.
- 44- Marcus Wilhelmsson, Fredrik Westerlund, Per Lincoln, and Bengt Nordén *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12092.
- 45- Mi Hee Lim, Hang Song, Eric D. Olmon, Elizabeth E. Dervan, Jacqueline K. Barton *Inorg. Chem.* **2009**, 48, 5392.
- 46- Sigel, A., Sigel, H., Eds.; *Metal Ions in Biological Systems*; Marcel Dekker: New York, **2004**, 42, 143.
- 47- Baruah, H.; Barry, C. G.; Bierbach, U. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, 4, 1537
- 48- Bertini, I.; Gray, H. B.; Lippard, S.; Valentine, J. In *Bioinorganic chemistry*; Barton, J. K., ed; University Science Books: Mill Valley, **1994**, chap. 8.
- 49- Radzicka, A.; Wolfenden, R. *Science* **1995**, 267, 90.
- 50- Deal, K. A.; Burstyn, J. N. *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 2792.
- 51- Hegg, E. L.; Burstyn, J.; *Coord. Chem. Rev.* **1998**, 173, 133

- 52- Strater, N.; Lipscomb, W.; N.; Klabunde, T.; Krebs, B. *Angew. Chem.* **1996**, 35, 2024.
- 53- Piovezan, C.; Silva, J. M. R.; Neves, A.; Bortoluzzi, A. J.; Haase, W.; Tomkowicz, Z.; Castellano, E. E.; Hough, T. C. S.; Rossi, L. M. *Inorg. Chem.* **2012**, 51, 6104.
- 54- . Sigman, D. S.; Mazumder, A.; Perrin, D. M. *Chem. Rev.* **1993**, 93, 2295.
- 55- Burstyn, J. N.; Deal, K. A. *Inorg. Chem.* **1993**, 32, 3585.
- 56- Povirk, L.F.; *Mutat. Res.* **1991**, 257, 127.
- 57- Liu, C.; Zhou, J.; Li, Q.; Wang, L.; Liao, Z.; Xu, H. J. *Inorg. Biochem.* **1999**, 75, 233.
- 58- D'Aurora, V.; Stern, A. M.; Sigman, D. S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, 78, 170.
- 59- D'Aurora, V.; Stern, A. M.; Sigman, D. S. *Biochem. Commun.* **1978**, 80, 1025.
- 60- Dervan, P. B. *Science* **1986**, 232, 464.
- 61- Parveen, S.; Arjmand, F. *Spectrochimica Acta Part A* **2012**, 85, 53.
- 62- Patra, A. K.; Bhowmick, T.; Ramakumar, S.; Nethaji, M.; Chakravarty, A. K. *Dalton Trans.* **2008**, 48, 6966.
- 63- Oliveira, M. C. B.; Scarpellini, M.; Neves, A.; Terenzi, H.; Bortoluzzi, A. J.; Szpoganics, B.; Greatti, A.; Mangrich, A. S.; Souza, E. M.; Fernandez, P. M.; Soares, M. R. *Inorg. Chem.* **2005**, 44, 921.
- 64- Morrow, J. R.; Iranzo, *Curr Opin Chem Biol* **2004**, 8, 192.
- 65- Boerner, L. J. K.; Zaleski, J. M. *Curr Opin Chem Biol* **2005**, 9, 135.
- 66- Neves, A.; Brito, M. A.; Vencato, I.; Drago, V.; Griesar, K.; Haase, W. *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 2360.
- 67- Neves, A.; Rossi, L. M.; Bortoluzzi, A.; Szpoganicz, B.; Schwingel, E.; Haase, W.; Ostrovski, S. *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 1788.

- 68- Scarpellini, M.; Neves, A.; Hörner, R.; Bortoluzzi, A. J.; Szpoganics, B.; Zucco, C.; Silva, R. A. N. Drago, V.; Mangrich, A. S.; Ortiz, W. A.; Passos, W. A. C.; Oliveira, M. C. B.; Terenzi, H. *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 8353.
- 69- Greatti, A.; Scarpellini, M.; Peralta, R. A.; Casellato, A.; Bortoluzzi, A. J.; Xavier, F. R.; Jovito, R.; Brito, M. A.; Szpoganicz, B.; Tomkowicz, Z.; Rams, M.; Haase, W.; Neves, A. *Inorg. Chem.* **2008**, 47, 1107.
- 70- Piovezan, C.; Jovito, R.; Bortoluzzi, A. J.; Terenzi, H.; Fischer, F. L.; Severino, P. C.; Pich, C. T.; Azzolini, G. G.; Peralta, R. A.; Rossi, L. M.; Neves, A. *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 2580.
- 71- Souza, G. D.; Rodrigues, M. A.; Fernandes, L. A.; Silva, P. P.; Ruggiero, R.; Pereira-Maia, E. C.; Guerra, W. *Cent. Eur. J. Chem.* **2013**, 11, 290.
- 72- Iengo E, Zangrado E, Minatel R, Alessio E. *J Am Chem Soc.* **2002**; 124, 1003.
- 73- Iengo, E.; Zangrado, E.; Alessio, E. *Eur J Chem.* **2003**, 13, 2371.
- 74- Sava, G.; Alessio, E.; Bergamo, A.; Mestroni, G.; Clarke, M. J. Topics in biological inorganic chemistry, vol. 1, Metallo-pharmaceuticals. Berlin: Springer; **1999**. p. 143.
- 75- Keppler, B. K; Lipponer, K. G.; Stenzel, B.; Kratz, F. Metal complexes in cancer therapy. Weinheim: VCH; **1993**. p. 189.
- 76- CRYALISPRO, Version 1.171.33.55 (release 05-01-2010 CrysAlis 171.NET). Oxford Diffraction Ltd.: Oxfordshire, UK, **2010**.
- 77- Weber, S. *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, 30, 565.
- 78- ENRAF-NONIUS. CAD-4 Software. Enraf-Nonius, Delft, The Netherlands, **1989**.
- 79- Spek, A. L. HELENA, CAD-4 Data Reduction Program, University of Utrecht, Netherlands, **1996**.
- 80- Spek, A. L. *Acta Crystallographica Section D*, D65, **2009**, 148.

- 81- Macrae, C. F.; Edgington, P. R., McCabe, P., Pidcock, E., Shields, G. P., Taylor, R., Towler, M. & Van De Streek, J. Mercury: *Journal of Applied Crystallography*. **2006**, 39, 453.
- 82- Altomare A.; Burla, M. C.; Camalli, M.; Cascarano, G. L.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Moliterni, A. G. G.; Polidori, G.; Spagna, R. *Journal of Applied Crystallhography*. **1999**, 32, 115.
- 83- Sheldrick, G. M. *Acta Crystallographica Section A*. **2008**, 64, 112.
- 84- Rey, N. A.; Neves, A.; Silva, P. P.; Paula, F. C. S.; Silveira, J. N.; Botelho, F. V.; Vieira, L. Q.; Pich, C. T.; Terenzi, H.; Pereira-Maia, E. C. *J.Inorg. Biochem.* **2009**, 103, 1323.
- 85- Pereira-Maia, E. C.; Garnier-Suillerot, A. *J. Biol. Inorg. Chem.*. 2003, 8, 626.
- 86- Rahban,M.; Divsalar, A. Saboury, A. A.; Golestani, A. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 5798.
- 87- Geary, W. J. *Coord. Chem. Rev.* 1971, 7, 81.
- 88- McCormick, J. R. D.; Fox, S. M.; Smith, L. L.; Bitler, B. A.; Reichenthal, J.; Origoni, V. E.; Muller, W. H.; Winterbottom, R.; Doersclusk, A. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 2849.
- 89- Mitscher, L. A.; Bonacci, A. C.; Sokoloski, T. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1968**, 78.
- 90- Dziegielewski, J.; Hanuza, J.; Jezowska-Trzebiatowska, B. *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Chim.* **1976**, 24, 307.
- 91- E. Chartone-Souza, T. L. Loyola, M. Bucciarelli-Rodriguez, M. A. Menezes, N. A. Rey, E. C. Pereira-Maia, *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 95, 1001.

- 92- Nakamoto, K. In *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, Wiley Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc.; New York, **1986**.
- 93- Chartone-Souza, E.; Loyola, T. L.; Bucciarelli-Rodriguez, M.; Menezes, M. A.; Rey, N. A.; Pereira-Maia, E. C. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 95, 1001.
- 94- Guerra, W.; Azevedo, E. A.; Monteiro, A. R. S.; Bucciarelli-Rodriguez, N.; Chartone-Souza, E.; Nascimento, A. M. A.; Fontes, A. P. S.; Moyec, L.; Pereira-Maia, E. C. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 99, 2348.
- 95- Jogun, K. H.; Stezowski, J. J. *J. Chem. Soc.* **1976**, 98, 6018.
- 96- Knowles, P. F.; Marsh, D.; Rattle, H. W. E. *Magnetic Resonance of Biomolecules*, John Wiley & Sons, **1976**, p. 343.
- 97- Romanowski, S. M. M.; Mangrich, A. S.; Neves, A. *Qui. Nova* **2001**, 24, 592.
- 98- Garriba, E.; Micera, G. *J. Chem. Educ.* **2006**, 83, 1229
- 99- Muller, J.; Felix, K.; Maichle, C.; Langfelder, E.; Stranchle, J.; Weser, F. U. *Inorg. Chim. Acta* **1995**, 233, 11
- 100- Rogero, S. A.; Lugão, A. B.; Ikedab, T. I.; Cruz, A. S. *Materials Research* **2003**, 6, 317.
- 101- Kumar, R. S.; Arunachalam, S.; Periasamy, V. S.; Preethy, C. P.; Riyasdeen, A.; Akbarsha, M. A. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, 103, 117.
- 102- Patra, A. K.; Dhar, S.; Nethaji, M.; Chakravarty, A. R. *Dalton Trans.* **2005**, 5, 896.
- 103- Patra, A. K.; Nethaji, M.; Chakravarty, A. R. *Dalton Trans.* **2005**, 16, 2798.
- 104- Selvakumar, B.; Rajendiran, V.; Uma Maheswari, P.; Stoeckli-Evans, H.; Palaniandavar, M. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, 100, 316.
- 105- Patra, A. K.; Nethaji, M.; Chakravarty, A. R. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, 101, 233.

- 106- Patra, A. K.; Bhowmick, T.; Ramakumar, S.; Nethaji, M.; Chakravarty, A. R. *Dalton Trans.* **2008**, 48, 6966.
- 107- Roy, S.; Patra, A. K.; Dhar, S.; Chakravarty, A. R. *Inorg. Chem.* **2008**, 47, 5625.
- 108- Ramakrishnan, S.; Rajendiran, V.; Palaniandavar, M.; Periasamy, V. S.; Srinag, B. S.; Krishnamurthy, H.; Akbarsha, M. A. *Inorg. Chem.* **2009**, 48, 1309.
- 109- De Souza, B.; Bortoluzzi, A. J.; Bortolotto, T.; Fischer, F. L.; Terenzi, H.; Ferreira, D. E. C.; Rocha, W. R.; Neves, A. *Dalton Trans.* **2007**, 39, 2027.
- 110- Silva, H.; Barra, C. V.; Costa, C. F.; Almeida, M.; César, E. T.; Silveira, J. N.; Garnier-Suillerot, A.; Paula, F. C. S.; Pereira-Maia, E. C.; Fontes, A. P.; *J. Inorg. Biochem.* **2008**, 102, 767.
- 111- Orentreich, N.; Harber, L. C.; Tromovitch, T. A. *Arch. Dermatol.* 1961, 83, 730–737.
Cullen, S. I.; Catalano, P. M.; Helfman, R. *J. Arch. Dermatol.* **1966**, 93, 77.
- 112- Frost, P.; Weinstein, G. D.; Gomez, E. C. *J. Am. Med. Assoc.* **1971**, 216, 326.
- 113- Piette, J.; Decuyper, J.; Van de Vorst, A. *J. Invest. Dermatol.* **1986**, 86, 653.
- 114- Khan, M. A.; Mustafa, J.; Musarrat, J. *Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2003**, 525, 109.
- 115- Pereira-Maia, Elene; Guerra, W.; Silva, P. P. Processo de Síntese de Complexos de Cobre com Atividade Antitumoral. Processo de síntese de complexos de cobre com atividade antitumoral PI10025235 data do depósito 13/07/2010.
- 116- Silva, P. P. ; Guerra, W. ; Silveira, J. N. ; Ferreira, A. M. C.; Bortolotto, T.; Fischer, F. L.; Terenzi, H.; Neves, A.; Pereira-Maia, E.C. *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 6414.
- 117- Bortolotto, T.; Silva, P. P.; Neves, A.; Pereira-Maia, E. C.; Terenzi, H. *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 10519.
- 118- Fontes, A. P. S.; Guerra, W.; Machado, F. C.; Almeida, M. V.; Alves, W. A.; Ferreira, A. M. C. *Quim. Nova* **2004**, 29, 382.

- 119- Barbosa, L. C. A. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Ed. UFV. 2007, Viçosa.
- 120- Wilson, A. J. C., International Tables for Crystallography, Volume C, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, **1992**.
- 121- <http://www.vcclab.org/lab/alogps/start.html> acessado em 13 de maio de 2012.
- 122- John McMurry, *Química Orgânica*, tradução da 6ª ed. p. 690
- 123- Cotton, F. A.; Francis, R.; Horrocks, W. D. *J. Phys. Chem.* **1960**, 64, 1534.
- 124- Hasen, P. W.; Jeasen, P. W. *Spectrochim. Acta* **1994**, 50, 169.
- 125- Murali, S.; Sastri, C. V.; Maiya, B. G. *Proc. Indian Acad. Sci.* **2002**, 114, 403.
- 126- Wu, S.J.; Chen, C.Y.; Chen, J.G.; Li, J.Y.; Tung, Y.L.; Ho, K.C.; Wu, C.G. *Dye. Pigment.* **2009**, 84, 1-
- 127- Shailendra, N. S.; Bharti, N.; Gonzalez-Garza, M. T.; Cruz-Vega, D. E.; Garza, J.C.; Saleem, K.; Naqvi, F.; Azam, A. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, 11, 2675.
- 128- Sanchez-Delgado, R. A.; Navarro, M.; Perez, H.; Urbina, J. A. *J Med Chem* **1996**, 39, 1095.
- 129- Goss, C. A.; Abruna, H. D. *J. Inorg. Chem.* **1985**, 24, 4263.
- 130- Catálogo Sigma-aldrich online
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=pt&N4=496383|ALDRICH&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC acesso 01/02/2011.
- 131- Silva, D. O.; Toma, H. E. *Quím. Nova.* **1993**, 16, 40.
- 132- Mestroni, G.; Zassinovich, G.; Alessio, E.; Bomtempo, A. *Inorg. Chim. Acta* **1987**, 63, 137.
- 133- Tarighi, S.; Abbasi, A. *JSUT* **2007**, 33, 19.