

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Desenvolvimento de potenciais metalofármacos de rutênio
contendo 1,1’-*bis*(difenílfosfino)ferroceno e ligantes
mercapto”**

Adriana Pereira Mundim Guedes Macêdo*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTORA EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
INORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista

*** bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Adriana Pereira Mundim Guedes Macêdo, realizada em 25/02/2019:

Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista
UFSCar

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti
UFSCar

Prof. Dr. Filipe Vieira Rocha
UFSCar

Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes
UNESP

Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso
IQSC/USP

Aos meus amados pais, Miguel e Florisbela, que me trouxeram ao mundo, seguiram meus passos e fizeram de tudo para que as tempestades se tornassem verdadeiras brisas em minha vida. Aos meus irmãos Michelle e Miguel Jr. pela amizade, confiança, incentivo e amor incondicional. Ao meu esposo Carlos Jr. pela compreensão, incentivo, amor e ser meu porto seguro durante toda essa jornada.

Amo incondicionalmente todos vocês!!!!

“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas mudam o mundo”.

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente nas minhas orações e iluminar os meus passos;

Ao Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista pela oportunidade oferecida, orientação, disposição de trabalho e por todas as contribuições em minha formação profissional;

A Profa. Dr. Elisângela que abriu as portas do seu laboratório sem restrições, permitindo a realização dos experimentos biológicos *in vitro* desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis e sua aluna Maria Alice, pela disponibilidade do laboratório e ajuda na realização do experimento *in vivo* de CAMs;

Aos Professores Dr. Victor Marcelo Deflon, Dr. Eduardo E. Castellano e Dr. Rodrigo de Souza Corrêa pela colaboração na resolução das estruturas cristalográficas;

Ao Departamento de Química da UFSCar e ao Programa de Pós-Graduação em Química, em especial às secretárias Ariane, Cristina e Luciani;

Aos técnicos Ademir Sartori, Luciana Vizotto e Paulo Lambertucci por toda a a disposição, ajuda e dedicação;

A Francielli, pela amizade, ajuda na realização dos testes biológicos e pelas valiosas discussões durante o desenvolvimento deste trabalho;

A Aliny, pela amizade, compreensão, pela estadia e por me permitir fazer parte de seu convívio familiar.

Um agradecimento especial aos meus amigos João Honorato, Gabriel, Beatriz e Celisnolia, pela receptividade, atenção, carinho, companhias nas horas de lazer e discussões científicas;

Aos amigos do LERCI: Wilmer, Legna, Kátia, Tamires, Analu, Celisnolia, Leticia, Gabriel, João Honorato, Beatriz, Rafael e Sabrina. Obrigada pela disponibilidade em ajudar, pelas discussões científicas e pelos momentos de descontração;

Aos amigos do LabMeeb: Caio e Letícia Klein;

Aos meus familiares, pelo incentivo, orações, por compartilhar momentos de alegrias e tristezas, e pela compreensão de minha ausência em muitos momentos de confraternização.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A549	Linhagem de célula tumoral humana de pulmão
Acetona-d ₆	Acetona deuterada
AC	[Ru(pyAC)(bipy)(dppf)]PF ₆
An	Anexina-V
bipy	2,2'-bipiridina
CAM	Membrana corioalantóide de embrião de galinha
<i>cis</i>	Isômero de posição <i>cis</i>
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CT-DNA	DNA do timo de bezerro
DA	Dansil-L-argininina
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DIA	[Ru(dmp)(bipy)(dppf)]PF ₆
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
dmp	4,6-diamino-2-mercaptopirimidina
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
dppf	1,1'- <i>bis</i> (difenilfosfino)ferroceno
DU-145	Linhagem de célula tumoral humana de próstata
Ehrlich	Carcinoma de mama murino
E _{pa}	Potencial de pico anódico
E _{pc}	Potencial de pico catódico
E _½	Potencial de meia onda
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Et ₃ N	Trietilamina
HER-2	Receptor de fator de crescimento epidérmico humano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HO	hoechst 33342
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
HSA	Albumina do soro humano
hTopo IB	Enzima topoisomerase humana tipo IB
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular

IL	Transição eletrônica intraligante
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IS	Índice de seletividade
JC-1	Corante catiônico iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina
LERCI	Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos
MDA-MB-231	Linhagem de célula tumoral humana de mama triplo-negativa
MCF-7	Linhagem de célula tumoral humana de mama RE positivo
MCF-10A	Linhagem de célula não-tumoral humana de mama
M-IMI	[Ru(mmi)(bipy)(dppf)]PF ₆
mmi	2-mercapto-1-metilimidazol
M-TIU	[Ru(6m2TU)(bipy)(dppf)]PF ₆
6m2TU	6-metil-2-tiouracil
MLCT	Transferência de carga do metal para o ligante
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
PI	Iodeto de propídio
pyAC	6-mercaptopiridina-3-ácido carboxílico
PBS	solução salina tamponada de fosfato
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C{ ¹ H}	Ressonância magnética nuclear de carbono desacoplado do hidrogênio
RMN ³¹ P{ ¹ H}	Ressonância magnética nuclear de fósforo desacoplado do hidrogênio
RPMI	Instituto Memorial Park Roswell
PTBA	Perclorato de tetrabutilamônio
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
TIA	[Ru(tzdt)(bipy)(dppf)]PF ₆
TIU	[Ru(2TU)(bipy)(dppf)]PF ₆
<i>trans</i>	Isômero de posição <i>trans</i>

tzdt	2-mercaptotiazolina
2TU	2-Tiouracil
δ	Deslocamento químico em RMN / Vibração de deformação IV
ϵ	Coeficiente de extinção molar ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
α, β, γ	Ângulos da cela unitária
a, b, c	Comprimentos da cela unitária
Å	Angstrom, 10^{-8} centímetros
ν	Vibração de estiramento (cm^{-1})
η	Viscosidade
σ / σ^*	Orbital sigma / orbital sigma antiligante
π / π^*	Orbital pi / orbital pi antiligante
J	Constante de acoplamento (Hz)
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
K_{sv}	Constante de Stern Volmer
K_b	Constante de ligação
k_q	Constante de velocidade de supressão bimolecular

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1 - Dados de análise elementar (CHNS) e condutividade molar dos complexos em CH ₂ Cl ₂	52
TABELA 4.2 - Tentativas de atribuição dos principais modos vibracionais dos complexos de fórmula geral [Ru(NS)(bipy)(dppf)]PF ₆	56
TABELA 4.3 - Principais atribuições das transições eletrônicas referentes as bandas encontradas nos espectros de absorção na região UV-visível dos complexos.....	58
TABELA 4.4 - Potenciais dos voltamogramas cíclicos dos complexos em 0,1 mol L ⁻¹ de PTBA em CH ₂ Cl ₂ à 100 mV / s.....	60
TABELA 4.5 - Deslocamentos químicos (δ) e constante de acoplamento dos átomos de fósforos da bifosfina ($^2J_{P-P}$) obtidos no RMN $^{31}P\{^1H\}$ em CH ₂ Cl ₂ /D ₂ O.....	63
TABELA 4.6 - Deslocamentos químicos dos sinais referentes aos átomos de hidrogênio dos ligantes mercapto.....	65
TABELA 4.7 - Deslocamentos químicos dos sinais referentes aos átomos de carbono dos ligantes mercapto.....	65
TABELA 4.8 - Principais comprimentos e ângulos de ligação obtidos nas estruturas de raios x dos complexos TIA, AC, M-TIU e TIU.....	73
Tabela 4.9 - Valores de $^2J_{P-P}$ e os δ_d obtidos nos espectros de RMN $^{31}P\{^1H\}$ dos complexos sintetizados em DMSO.....	80
TABELA 4.10 - Porcentagem de isomerização dos complexos TIA e M-IMI nos solventes DMSO, DCM e MeOH em diferentes tempos.....	88
TABELA 4.11 - Valores de IC ₅₀ obtidos para os complexos sintetizados, seus respectivos ligantes mercapto livre e o fármaco cisplatina, frente as linhagens de células tumorais e não-tumoral, no período de 48 h.....	91
TABELA 4.12 - Valores de IS para os complexos nas diferentes linhagens de células tumorais, no período de 48 h.....	92
TABELA 4.13 - Valores de IC ₅₀ obtidos para os complexos sintetizados frente a linhagem de célula tumoral humana de mama triplo-negativa (MDA-MB-231), no período de 24h.....	93
TABELA 4.14 - Valores de Log P dos complexos.....	96

TABELA 4.15 - Análise histológica das CAMs apresentando Média \pm desvio padrão (DP) dos parâmetros histológicos classificados em uma escala de 0-3. ANOVA, Tukey.....	119
TABELA 4.16 - Valores das constantes K_{sv} e k_q , calculadas a partir da interação entre os complexos e a HSA, nas temperaturas de 298 e 310 K.....	122
TABELA 4.17 - Parâmetros de ligação obtidos para os complexos nas temperaturas de 298 e 310 K.....	123
TABELA 4.18 - Parâmetros termodinâmicos obtidos para os complexos nas temperaturas de 298 e 310 K.....	124
TABELA 4.19 - Valores de K_b para os compostos com hipocromismo > 5%.....	134

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Característica do processo de metástase em várias etapas (adaptado da ref. 17)	3
FIGURA 1.2 - Modelo para o intravasamento das células de câncer de mama.....	5
FIGURA 1.3 - Medicamentos contendo platina comercializados mundialmente (adaptado da ref.37)	8
FIGURA 1.4 - Complexos de rutênio (III) com atividade anticâncer (adaptado da ref.46)	10
FIGURA 1.5 - Estruturas químicas e valores de IC ₅₀ frente a célula MDA-MB-231, dos complexos de Ru (II) com diferentes ligantes derivados da fosfina, bipyridina e mercaptos.....	13
FIGURA 1.6 - Estruturas químicas e valores de IC ₅₀ frente a célula MDA-MB-231, dos complexos de Ru (II) com diferentes ligantes derivados da fosfina, bipyridina e naftoquinonas.....	14
FIGURA 1.7 - Equilíbrio tautomérico entre tiona e tiol, e a forma tiolato.....	18
FIGURA 3.1 - Estruturas químicas e siglas dos complexos de Ru(II) sintetizados.....	32
FIGURA 3.2 - Imagens representativas mostram as alterações morfológicas de células MDA-MB-231 detectadas com dupla marcação de Hoechst 33342 (azul) e PI (vermelho).....	37
FIGURA 3.3 - Gráfico representativo bidimensional de densidade de FL1/Anexina V/FITC versus FL2/PI utilizado para quantificar o percentual de células viáveis, apoptóticas e necróticas.....	38
FIGURA 3.4 - Cronograma de cada fase do experimento com o ovo galado, para avaliar o potencial anti-angiogênico dos complexos TIA, M-IMI e M-TIU.....	43
FIGURA 4.1 - Diferentes formas de coordenação bidentada do ligante 2-tiouracil com o metal.....	53
FIGURA 4.2 - Espectros de absorção na região do infravermelho do precursor (—), ligante livre 2-mercaptotiazolina (—) e do complexo TIA (—), em pastilha de KBr.....	55
FIGURA 4.3 - Espectros de absorção na região UV-visível do complexo TIA em CH ₂ Cl ₂	58

FIGURA 4.4 - Voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial de oxidação do complexo [Ru(tzdt)(bipy)(dppf)] PF ₆ (TIA) em 0,1 mol L ⁻¹ de PTBA em CH ₂ Cl ₂ à 100 mV/s.....	60
FIGURA 4.5 - Espectro de RMN ³¹ P{ ¹ H} do complexo TIA, em CH ₂ Cl ₂ /D ₂ O.....	62
FIGURA 4.6 - Estruturas químicas dos ligantes mercapto.....	64
FIGURA 4.7 - Espectro de RMN ¹ H do complexo TIA, em acetona-d ₆	67
FIGURA 4.8 - Mapa de contorno de COSY (¹ H- ¹ H), obtido para o complexo TIA, em acetona-d ₆	67
FIGURA 4.9 - Espectro de RMN ¹³ C{ ¹ H} do complexo TIA, em acetona-d ₆	69
FIGURA 4.10 - Mapa de contorno de HSQC (¹ H- ¹³ C) do complexo TIA, em acetona-d ₆	69
FIGURA 4.11 - Espectro de DEPT-135 do complexo TIA, em acetona-d ₆	70
FIGURA 4.12 - Estruturas cristalinas dos complexos (a) TIA, (b) AC, (c) M-TIU e (d) TIU, com elipsoides de 30% de probabilidade.....	72
FIGURA 4.13 - Espectros de RMN ³¹ P{ ¹ H} registrados nos tempos 0, 24, 48 h, 72 h, 7 dias, 15 dias e 30 dias, para o complexo TIA em DMSO.....	77
FIGURA 4.14 - Espectros de RMN ³¹ P{ ¹ H} registrados nos tempos 0, 24, 48 h, 72 h, 7 dias, 15 dias e 30 dias, para o complexo M-IMI em DMSO.....	79
FIGURA 4.15 - Espectros de RMN ³¹ P{ ¹ H} registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo AC em DMSO.....	81
FIGURA 4.16 - Espectros de RMN ³¹ P{ ¹ H} registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo DIA em DMSO.....	82
FIGURA 4.17 - Espectros de RMN ³¹ P{ ¹ H} registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo M-TIU em DMSO.....	82
FIGURA 4.18 - Espectros de RMN ³¹ P{ ¹ H} registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo TIU em DMSO.....	83
FIGURA 4.19 - Espectros de RMN ³¹ P{ ¹ H} registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo TIA em solução de DMSO/Meio de cultura.....	84
FIGURA 4.20 - Espectros de RMN ³¹ P{ ¹ H} registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo M-IMI em solução de DMSO/Meio de cultura.....	85
FIGURA 4.21 - Espectros de RMN ³¹ P{ ¹ H} registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo AC em solução de DMSO/Meio de cultura.....	86

FIGURA 4.22 - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo DIA em solução de DMSO/Meio de cultura.....	86
FIGURA 4.23 - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo M-TIU em solução de DMSO/Meio de cultura.....	87
FIGURA 4.24 - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo TIU em solução de DMSO/Meio de cultura.....	87
FIGURA 4.25 - Fórmulas estruturais e cargas parciais atômicas para as moléculas dos solventes.....	90
FIGURA 4.26 - Estrutura dos complexos com seus átomos e moléculas não coordenados destacados no círculo.....	94
FIGURA 4.27 - Ciclo celular.....	98
FIGURA 4.28 - Ensaio de cometa corado com brometo de etídio (BE).....	100
FIGURA 4.29 - Efeito do complexo TIA na morfologia da linhagem de células MDA-MB-231.....	101
FIGURA 4.30 - Efeito do complexo M-IMI na morfologia da linhagem de células MDA-MB-231.....	102
FIGURA 4.31 - Análise morfologia celular com marcação HO/PI.....	103
FIGURA 4.32 - Efeito sobre o mecanismo de morte de células MDA-MB-231 induzido pelos complexos de Ru (II) no período de 48 h.....	105
FIGURA 4.33 - Avaliação do potencial de membrana.....	107
FIGURA 4.34 - Avaliação dos níveis de EROs.....	109
FIGURA 4.35 - Ensaio de fechamento da risca para análise de migração das células MDA-MB-231.....	111
FIGURA 4.36 - Ensaio em câmara de <i>Boyden</i>	112
FIGURA 4.37 - Ensaio clonogênico de células MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações dos complexos, por 48 h.....	114
FIGURA 4.38 - Sobrevivência clonogênica analisada para a linhagem de célula MDA-MB-231, após tratamento com os complexos por 48 h.....	115
FIGURA 4.39 - Análises de CAMs.....	117
FIGURA 4.40 - Imagens obtidas de CAMs coradas com hematoxilina-eosina (HE) de diferentes grupos de tratamento.....	118

FIGURA 4.41 - Espectros de fluorescência da HSA com a adição de diferentes concentrações do complexo TIA (5-50 μ M), temperatura de 298 K.....	120
FIGURA 4.42 - Estrutura tridimensional da HSA, com seus principais sítios de ligação.....	126
FIGURA 4.43 - Espectros de fluorescência de DA-HSA.....	128
FIGURA 4.44 - Diminuição da intensidade de fluorescência de HSA-DA com a adição dos complexos.....	129
FIGURA 4.45 - Efeito da HSA na citotoxicidade dos complexos frente as células tumorais de mama (MDA-MB-231) após 48h.....	130
FIGURA 4.46 - Espectros de absorção no UV-visível do complexo TIA com a titulação de CT-DNA, em pH 7,4.....	133
FIGURA 4.47 - Gráficos da viscosidade do DNA com o aumento da concentração dos complexos (A) TIA, M-IMI e CQ, (B) AC, DIA, M-TIU, TIU e CQ.....	136
FIGURA 4.48 - Ensaio de relaxamento do DNA plasmidial superenovelado por hTopo IB na presença de concentrações crescentes do complexo TIA e M-IMI.....	137
FIGURA 4.49 - Ensaio de relaxamento do DNA plasmidial superenovelado por hTopo IB na presença de concentrações crescentes dos ligantes livres.....	138
FIGURA 4.50 - O ensaio de relaxamento do DNA com a pré-incubação dos compostos com hTopo IB a 37°C durante 5 min, na presença de concentrações crescentes dos complexos TIA e M-IMI.....	139
FIGURA 4.51 - Ensaio de relaxamento de DNA plasmidial superenovelado por hTopo IB em função do tempo com DMSO, na presença de complexos TIA (8 μ M) e M-IMI (8 μ M).....	140
FIGURA 4.52 - Ensaio de interação composto-DNA em dependência da concentração.....	141
FIGURA 4.53 - Cinética de clivagem.....	142
FIGURA 4.54 - Cinética de Religação.....	143
FIGURA 5.1 - Possíveis alvos de ação propostos para os complexos Ru (II) com os ligantes mercapto.....	148

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 3.1	- Rota sintética para obtenção do complexo [Ru(pyAC)(bipy)(dppf)]PF ₆	27
ESQUEMA 3.2	- Rota sintética para obtenção do complexo [Ru(2TU)(bipy)(dppf)]PF ₆	28
ESQUEMA 3.3	- Síntese dos complexos [Ru(tzdt)(bipy)(dppf)]PF ₆ , [Ru(mmi)(bipy)(dppf)]PF ₆ , [Ru(dmp)(bipy)(dppf)]PF ₆ e [Ru(6m2TU)(bipy)(dppf)]PF ₆	31

RESUMO

“DESENVOLVIMENTO DE POTENCIAIS METALOFÁRMACOS DE RUTÊNIO CONTENDO 1,1’-B/S(DIFENILFOSFINO)FERROCENO E LIGANTES MERCAPTO”. A atividade antimetastática, alta seletividade e citotoxicidade em várias linhagens de células tumorais humanas, tornam os complexos de rutênio (II) atraentes para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos no tratamento do câncer. Neste estudo, foram sintetizados seis novos complexos de rutênio com ligantes de interesse biológico, cujo a fórmula geral é $[Ru(N-S)(bipy)(dppf)]PF_6$, onde N-S= 2-mercaptotiazolina, 2-mercapto-1-metilimidazol, 6-mercaptopiridina-3-ácido carboxílico, 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina, 6-metil-2-tiouracil e 2-tiouracil. Todos os complexos sintetizados foram caracterizados por condutividade molar, análise elementar, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e na região do UV/visível, ressonância magnética nuclear de $^{31}P\{^1H\}$, 1H e $^{13}C\{^1H\}$, voltametria cíclica e de pulso diferencial, e alguns complexos, por difração de raios X de monocristal. A atividade citotóxica dos complexos foi avaliada frente a diferentes linhagens de células tumorais e não-tumoral, assim como o possível mecanismo de ação desses complexos frente as células MDA-MB-231. Além disso, foram avaliadas a interação desses complexos com as biomoléculas de HSA e DNA, e a inibição da enzima topoisomerase IB. Os resultados mostraram altos índices de citotoxicidade e seletividade para linhagem celular de tumor de mama triplo-negativo (MDA-MB-231), com valores de IC_{50} na faixa de 0,33-3,78 μM . O aumento da porcentagem de células na fase sub-G1 na análise do ciclo celular, alterações morfológicas características de apoptose e aumento de células apoptóticas marcadas com Anexina-V mostram que a apoptose é o mecanismo de morte celular induzido na linhagem de células MDA-MB-231 após o tratamento com os complexos. Múltiplos alvos de ação foram identificados para os complexos, como a indução de danos ao DNA, despolarização mitocondrial com redução do potencial de membrana mitocondrial, aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio e inibição da enzima topoisomerase IB. Adicionalmente, foram evidenciadas atividades antimetastáticas, com a inibição da migração celular e inibição da angiogênese em modelos de membrana CAM. Os complexos mostraram forte interação com a HSA com valores de K_b na faixa de 10^5 - 10^7 e afinidade pelo sítio IA da proteína. Os complexos mostraram interação eletrostática com

o DNA. Esses resultados promissores observados para os complexos sintetizados, caracterizam potenciais fármacos anticâncer.

ABSTRACT

"DEVELOPMENT OF POTENTIAL RUTHENIUM METALLODRUGS CONTAINING 1,1'-BIS (DIPHENYLPHOSPHINO) FERROCENE AND MERCAPTO BINDING". The antimetastatic activity, high selectivity and cytotoxicity in various human tumor cell line makes ruthenium (II) complexes attractive for the development of new chemotherapeutic agents for cancer treatment. In this study, six new ruthenium complexes with biological interest ligands of general formula $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{bipy})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, where NS = 2-mercaptothiazoline, 2-mercapto-1-methylimidazole, 6-mercapto-pyridine-3-carboxylic acid, 4,6-diamino-2-mercapto-pyrimidine, 6-methyl-2-thiouracil and 2-thiouracil, were synthesized. The complexes were characterized by molar conductivity, elemental analysis, infrared and UV / visible region absorption spectroscopy, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ nuclear magnetic resonance, cyclic and differential pulse voltammetry, and some complexes, by monocrystal X-ray diffraction. The cytotoxic activity of the complexes was evaluated against different tumor cell lines and non-tumor cells, as well as the possible mechanism of action of these complexes against MDA-MB-231 cells. In addition, the interaction of the complexes with the biomolecules of HSA and DNA, and the inhibition of the enzyme topoisomerase IB, were evaluated. The results showed high cytotoxicity and selectivity for triple-negative breast tumor cell line (MDA-MB-231), with IC_{50} values in the range of 0.33–3.78 μM . The cells percentage increase in sub-G1 phase of the cell cycle analysis, distinct morphological alterations and the increase in apoptotic cells labeled with Annexin-V show that apoptosis is the mechanism of cell death induced in MDA-MB-231 cell line after treatment with the complexes. Multiple targets of action were identified for the complexes, such as induction of DNA damage, mitochondrial depolarization with reduction of mitochondrial membrane potential, increase of reactive oxygen species levels and inhibition of Topoisomerase IB enzyme. In addition, antimetastatic activities were evidenced due by both cell migration and angiogenesis in CAM membrane model inhibition. The complexes exhibited strong interaction with HSA with K_b values in the range of 10^5 – 10^7 and affinity for the IA site of the protein. The complexes showed electrostatic interaction with DNA. These results observed for the synthesized complexes present promising characteristics of potential anticancer drugs.

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 - Câncer e tipos de tratamento	1
1.2 - Estatística do Câncer	2
1.3 - Metástase: angiogênese, migração e invasão	3
1.4 - Câncer de mama	5
1.5 - Quimioterápicos inorgânicos contra o câncer.....	7
1.6 - Complexos de Rutênio.....	9
1.7 - Ligantes bifosfínicos e bipyridínicos	16
1.8 - Ligantes mercapto, N,S doadores.....	17
Capítulo 2- Objetivos	21
2.1- Objetivo Geral.....	21
2.2- Objetivos específicos	21
Capítulo 3- Parte Experimental	23
3.1 - Materiais e Métodos.....	23
3.1.1 - Obtenção da atmosfera inerte.....	23
3.1.2 - Solventes e Reagentes	23
3.2 - Instrumentação e Técnicas experimentais	24
3.2.1 - Balança analítica.....	24
3.2.2 - Condutividade Molar	24
3.2.3 - Análise Elementar (CHNS).....	24
3.2.4 - Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV).....	25
3.2.5 - Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis)	25

3.2.6 - Eletroquímica	25
3.2.7 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	25
3.2.8 - Difração de raios X.....	26
3.3 - Síntese dos complexos de rutênio	26
3.3.1 - Síntese de Precursores.....	26
3.3.1.1 - Síntese do complexo $[RuCl_2(PPh_3)_3]$	26
3.3.1.2 - Síntese do complexo <i>cis</i> - $[RuCl_2(bipy)(dppf)]$	27
3.3.2 - Síntese do complexo $[Ru(pyAC)(bipy)(dppf)]PF_6$, pyAC: 3-ácido carboxílico-6-mercaptopiridina: (AC)	27
3.3.3 - Síntese dos complexos $[Ru(2TU)(bipy)(dppf)]PF_6$, 2TU= 2-tiouracil: (TIU).....	28
3.3.4 - Síntese dos complexos $[Ru(N-S)(bipy)(dppf)]PF_6$, N-S: 2-mercaptotiazolina (tzdt), 2-mercapto-1-metilimidazol (mmi), 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (dmp), 6-metil-2-tiouracil (6m2TU).....	29
3.4 - Teste de estabilidade dos complexos em solução	32
3.5 - Lipofilicidade	32
3.6 - Testes Biológicos, <i>in vitro</i>	33
3.6.1 Linhagens e Cultura Celular	33
3.6.2 - Ensaio colorimétrico de citotoxicidade celular (MTT)	34
3.6.3 - Análise do ciclo celular.....	35
3.6.4 - Análise de dano no DNA - Ensaio cometa	35
3.6.5 - Morfologia Celular	36
3.6.6 - Detecção de morte celular	37
3.6.6.1 - Análise morfológica das células por microscopia de fluorescência (HO/PI).....	37
3.6.6.2 - Ensaio Apoptose (Anexina V-FITC / Iodeto de Propídio).....	37

3.6.7 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial JC-1	39
3.6.8 - Detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO)	39
3.6.9 - Ensaio de migração celular	40
3.6.9.1 - Método de fechamento da risca: <i>Wound Healing</i>	40
3.6.9.2 - Método de Câmara de <i>Boyden</i>	41
3.6.10 - Ensaio de sobrevivência clonogênica	41
3.7 - Avaliação do potencial anti-angiogênico em modelo CAM, <i>in vivo</i>	42
3.7.1 – Análise histopatológica.....	43
3.8 - Interação com Biomoléculas	43
3.8.1 - Interação com HSA	43
3.8.1.1 – Espectroscopia de Fluorescência.....	43
3.8.1.2 - Competição pelo Sítio I da HSA	44
3.8.1.3 - Efeito da HSA sobre a citotoxicidade	45
3.8.2 - Interação com DNA.....	45
3.8.2.1 - Titulação espectroscópica por UV-visível.....	45
3.8.2.2 - Viscosidade.....	46
3.9 - Inibição da Topoisomerase IB.....	47
3.9.1 - Purificação da Topoisomerase IB humana (hTopo IB)	47
3.9.2 - Ensaio de relaxamento do DNA	47
3.9.3 - Cinética de clivagem	48
3.9.4 - Cinética de religação.....	49
Capítulo 4- Resultados e Discussão	51
4.1 - Síntese e Caracterização	51
4.1.1 - Síntese dos complexos	51

4.1.2 - Caracterização dos complexos	51
4.1.2.1 - Análise Elementar e Condutividade Molar.....	51
4.1.2.2 - Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)	53
4.1.2.3 - Espectroscopia eletrônica de absorção na região UV-visível (UV-vis)	57
4.1.2.4 - Estudo Eletroquímico	59
4.1.2.5 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	61
4.1.2.5.1 – Caracterização dos complexos por RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	61
4.1.2.5.2 – Caracterização dos ligantes e complexos por RMN ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	64
4.1.2.6 –Difração de raios X.....	71
4.1.2.7 –Estabilidade dos complexos em solução	73
4.2–Testes Biológicos	91
4.2.1 - Avaliação da citotoxicidade	91
4.2.2 - Lipofilicidade	95
4.2.3 - Análises do ciclo celular	96
4.2.4 - Análise de dano no DNA - Ensaio cometa	98
4.2.5 - Ensaio de morfologia celular	100
4.2.6 - Estudo de apoptose pelo método de coloração HO / PI.....	102
4.2.7 - Ensaio de apoptose por citometria de fluxo.....	104
4.2.8 - Detecção do potencial de membrana mitocondrial.....	105
4.2.9 - Detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO)	108
4.2.10 - Migração Celular	109
4.2.11 - Ensaio clonogênico	112

4.2.12 - Avaliação da atividade antiangiogênica pelo ensaio CAM.....	115
4.3 - Interação com Biomoléculas e inibição enzimática	119
4.3.1 - Estudo de interação com albumina do soro humana (HSA)	119
4.3.1.1 - Avaliação do sítio de ligação na HSA.....	125
4.3.1.2 - Efeito da HSA sobre a atividade citotóxica	129
4.3.2– Estudo de interação com o DNA	131
4.3.2.1 – Titulação espectroscópica	131
4.3.2.2 – Viscosidade	134
4.3.3 – Inibição enzimática da Topoisomerase IB humana	136
4.3.3.1 – Efeito dos complexos na atividade de relaxamento	136
4.3.3.2 - Cinética de clivagem e religação na Topoisomerase	141
Capítulo 5- Conclusões	145
Referências Bibliográficas	149
Apêndice A	160

Capítulo 1 – Introdução

1.1 - Câncer e tipos de tratamento

O câncer é uma das doenças mais grave e comum vista na medicina clínica que afeta aproximadamente 200 tipos diferentes de células, que se caracteriza pela perda de controle da proliferação celular e um ganho da capacidade de invadir tecidos adjacentes ou sofrer metástase para órgãos distantes via vasos sanguíneos¹. Essa perda de controle é consequência direta de mutações em um ou mais genes que regulam o crescimento e a morte celular programada². Com isso, as células cancerígenas possuem suas próprias funções, fornecendo seus sinais de crescimento, replicando sem nenhum controle, com capacidade de promover a formação de novos vasos sanguíneos, conseguindo migrar e invadir tecidos adjacentes ou mais distantes via membrana basal e vasos sanguíneos ou linfáticos^{3,4}. Essas células são, geralmente, menos especializadas nas suas funções que as suas correspondentes normais. Conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções¹.

Existem vários tipos de tratamento contra o câncer, a escolha do tratamento vai depender do tipo de câncer e o estágio em que se encontra. As principais formas de tratamento são: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Na cirurgia tem-se a remoção física do tumor local¹. A radioterapia utiliza raios ionizantes que incidem sobre as células para redução do tumor⁵. A quimioterapia, a mais utilizada dentre os tratamentos, em que se utiliza fármacos para o tratamento¹. Algumas pessoas com câncer utilizam apenas um tratamento, mas a maioria delas tem uma combinação de tratamentos, como cirurgia com quimioterapia e / ou radioterapia.

Outras formas de tratamento que também vem sendo utilizadas são a imunoterapia e hormonioterapia. A imunoterapia é um tratamento destinado a aumentar as defesas naturais do corpo para combater o câncer. Essas terapias incluem citocinas, vacinas contra o câncer e, mais notavelmente, certos anticorpos monoclonais identificados como inibidores de “*checkpoint*”⁶⁻⁸. A hormonioterapia, se trata de um tratamento mais específico para células com receptores hormonais, como o câncer de mama e próstata, no qual os medicamentos administrados irão agir bloqueando a ação

dos hormônios de testosterona (homem)⁹ e estrógeno (mulher), evitando que estes hormônios estimulem o crescimento das células tumorais¹⁰.

1.2 - Estatística do Câncer

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, sendo um grande problema de saúde pública, onde o crescente número de novos casos a cada ano é alarmante. O número 14,1 milhões de novos casos de câncer em 2012 subiu para um número estimado de 18,1 milhões em 2018^{11,12}. A estimativa prevista no ano de 2012 foi mais de 20 milhões de novos casos de câncer em 2025¹¹.

O número estimado de mortes mundial em 2018 é de 9,6 milhões¹². Trata-se de um aumento frente à média anual registrada em 2012, quando houve 8,2 milhões de mortes¹¹. Os três tipos de cânceres com maior incidência no mundo são: pulmão, mama e colorretal^{12,13}.

No Brasil é estimado para o biênio de 2018/2019 a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer, para cada ano¹⁴. Depois do câncer de pele, os principais tipos de câncer mais incidentes no Brasil no biênio de 2018-2019 são o câncer de próstata, mama feminino, colorretal e pulmão. Entre as mulheres, a maior incidência é o câncer de mama (59.700 por ano) e nos homens o câncer de próstata (68.220 por ano). Dentre os diferentes tipos de câncer, aqueles com maior número de mortalidade são classificados em primeiro lugar o câncer de próstata, e em segundo o câncer de pulmão¹⁴.

Grande parte dos casos de câncer estão ligados aos fatores de risco relacionados ao modo de vida e ambiente, como o tabagismo, alcoolismo, obesidade, sedentarismo, poluição do ar, exposição excessiva ao sol, dentre outros¹³. Dessa forma, uma proporção substancial desse grande número de casos de câncer poderia ser evitada através da aplicação do conhecimento existente sobre controle do câncer e da implementação de programas de controle do tabagismo, alcoolismo, vacinação (para câncer de cólon e útero), detecção precoce e tratamento, além de campanhas de saúde pública para promover a atividade física e alimentação mais saudável^{13,15}.

1.3 - Metástase: angiogênese, migração e invasão

A metástase é definida como sendo a disseminação de células cancerígenas do tumor primário a órgãos distantes. A disseminação metastática do tumor primário tem como consequência o pior prognóstico, sendo responsável por mais de 90% da mortalidade de pacientes com câncer¹⁶. Devido à complexidade do processo metastático os mecanismos moleculares envolvidos são pouco compreendidos. Para a ocorrência de metástase, as células cancerígenas precisam se dissociar do tumor primário, migrar e invadir tecidos adjacentes, intravasarem nos vasos sanguíneos ou linfáticos, disseminar e extravasar para outros tecidos^{17,18}. Essas etapas da metástase estão ilustradas na Figura 1.1.

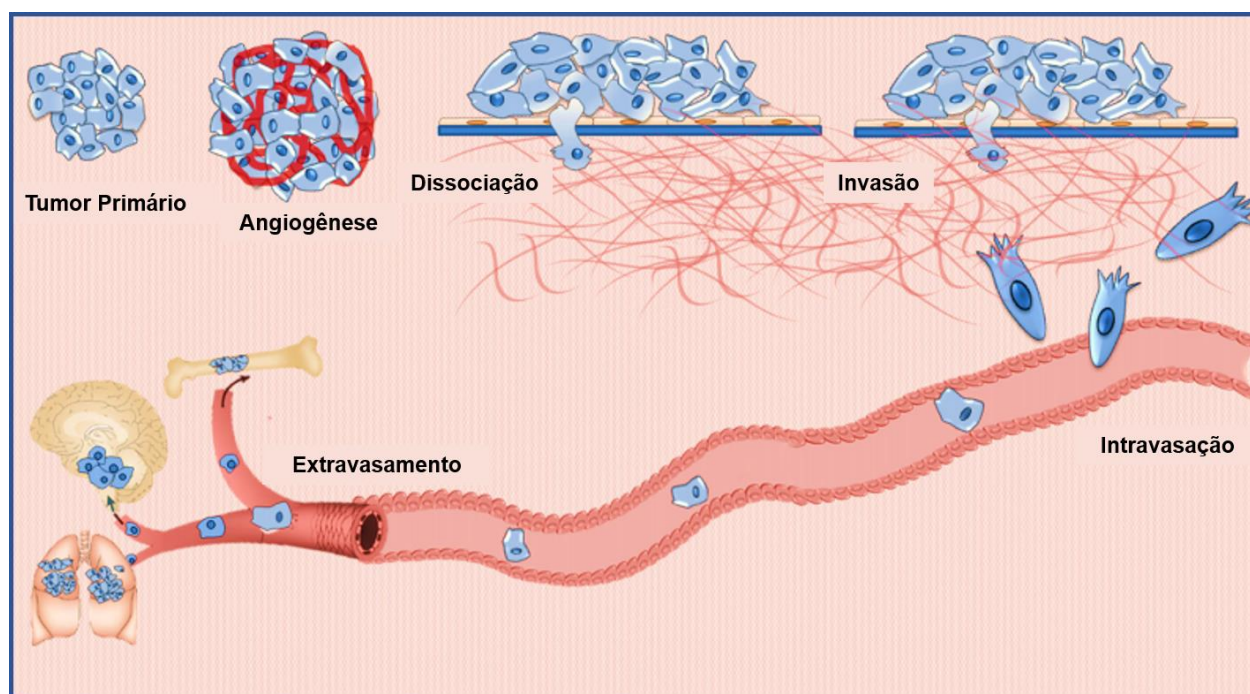


FIGURA 1.1 - Característica do processo de metástase em várias etapas (adaptado da ref. 17).

O crescimento tumoral e a metástase são processos dependentes da angiogênese, a qual é caracterizada pela formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes¹⁹. Uma vez que um tumor se formou, novos vasos sanguíneos são necessários para o crescimento e fornecimento de nutrientes que se encontram na corrente sanguínea, para ajudá-lo a se desenvolver, invadir os tecidos adjacentes e se

disseminar²⁰. No adulto, como parte de processos fisiológicos, como cicatrização de feridas e ciclos reprodutivos femininos, a angiogênese é ativada, mas apenas de forma transitória. Em contraste, durante a progressão do tumor, uma "troca angiogênica" é quase sempre ativada e permanece ligada, fazendo com que a rede vascular normalmente quiescente forme novos vasos continuamente, para ajudar a sustentar crescimentos neoplásicos em expansão²¹.

A migração celular está envolvida na concepção de vida, o desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas, a resposta imunitária e processos patológicos, tais como a metástase e inflamação^{22,23}. No caso de tumores de mama, a migração das células ocorre individualmente na morfologia ameboide (Figura 1.2). Estas células se movimentam linearmente em associação com as fibras da matriz extracelular (MEC). Algumas dessas fibras MEC convergem para os vasos sanguíneos, funcionando como um caminho para as células do carcinoma migrarem para os vasos sanguíneos, sendo mediada por quimioatrativos. Macrófagos associados ao tumor promovem a invasão e o intravasamento de células de carcinoma secretando fator de crescimento epidérmico (EGF) e remodelando a arquitetura da MEC. As células de carcinoma também secretam o fator estimulador de colônias (CSF-1) para recrutar os macrófagos para o local do intravasamento. A expressão do EGF e o comportamento quimiotático *in vitro* estão correlacionados com a capacidade de invasão e metástase das células de carcinoma⁹.

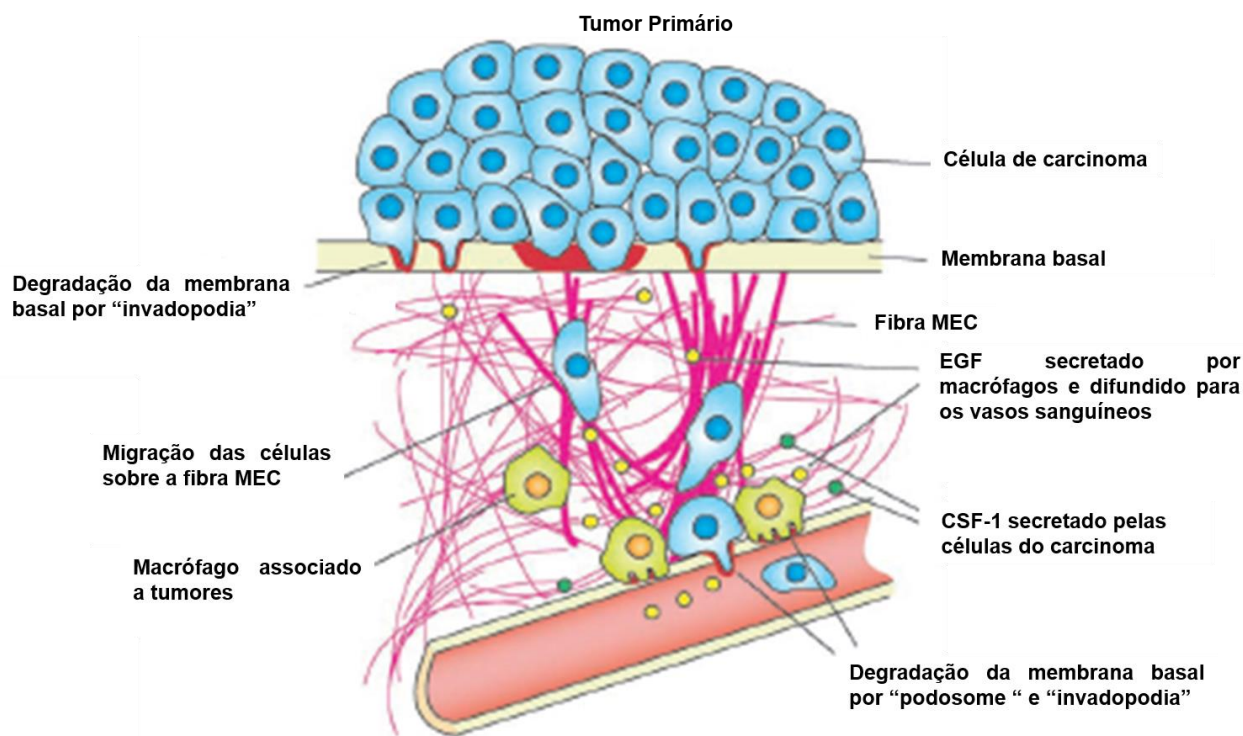


FIGURA 1.2 - Modelo para o intravasamento das células de câncer de mama. Células de carcinoma, que adquirem um fenótipo migratório através de alterações na expressão gênica resultante de sinais do microambiente, como degradar a membrana basal subjacente e separar do tumor primário (adaptado da ref. 9).

A invasão de células tumorais ocorre por meio da penetração de barreiras teciduais, como a passagem da membrana basal e infiltração nos tecidos intersticiais subjacentes²⁴. Para isso, as células adquirem um fenótipo associado ao aumento da expressão de vários genes envolvidos na motilidade celular^{9,25}. Isso permite às células tumores responder aos sinais do microambiente que desencadeiam a invasão do tumor⁹. Para atravessar uma matriz, a célula deve modificar sua forma e interagir com a matriz extracelular. A capacidade migratória é um pré-requisito para ocorrer uma invasão, pois uma célula não consegue invadir sem antes migrar. No entanto a célula pode se mover sem invadir²⁴.

1.4 - Câncer de mama

O câncer de mama é o segundo tipo mais comum no mundo e o mais frequente entre as mulheres. Aproximadamente 1,7 milhão de novos casos foram

diagnosticados em todo o mundo em 2012. O número estimado de mortes por câncer de mama no ano de 2015 foi de 561.334 e a previsão é um aumento de 43% na taxa de mortalidade até 2030. Grande parte desse número está relacionado com o câncer de mama metastático¹⁶.

Os carcinomas invasivos da mama são conhecidos por um grupo heterogêneo de tumores com diferentes comportamentos biológicos, prognóstico e resposta à terapia. A sobrevida mediana é altamente influenciada pelo subtipo característico e o acesso ao tratamento ideal. Os subtipos moleculares do câncer de mama estão relacionados com a expressão ou não de receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) e o receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2). O subtipo molecular luminal A apresenta RE e/ou RP positivos, e HER-2 negativo, esse perfil molecular apresenta baixo grau histológico e bom prognóstico. O subtipo luminal B apresenta RE positivo e/ou RP positivo, e HER-2 positivo, este possui um maior índice de proliferação celular e um pior prognóstico, quando comparado ao luminal A. De modo geral, os cânceres de mama de subtipo luminal são tratados por hormonioterapia. É provável, no entanto, que a resposta possa diferir entre os subtipos luminal.

O subtipo HER-2 superexpresso (não luminal) apresenta RE e RP negativos e HER-2 positivo, esse subtipo possui o segundo pior prognóstico em relação aos demais. Essa classificação teve grande importância na indicação do tratamento contra o câncer de mama. Pacientes com diagnóstico primário de carcinoma de mama e com superexpressão de HER-2 possuem um pior prognóstico em relação aos pacientes que não apresentam essa amplificação gênica. Entretanto pode se beneficiar de terapia alvo-específica, com o fármaco trastuzumabe (nome comercial herceptina), que é um anticorpo monoclonal que pode ser usado isolado ou associado à quimioterapia, melhorando consideravelmente o prognóstico dessas pacientes²⁶⁻²⁸.

O subtipo basal, considerado um câncer de mama triplo-negativo (TNBC) por não expressar os receptores RE, RP e HER-2, representam aproximadamente 15% de todos os cânceres, mais frequente em mulheres jovens. O TNBC é mais agressivo, invasivo, com alto índice mitótico, de pior prognóstico e sem definição de alvo terapêutico, apresentando um desfecho clínico menos favorável que os outros subtipos de câncer de mama. A agressividade do TNBC está relacionada ao alto risco de recorrência nos

primeiros 3 anos após o tratamento inicial. A maioria dos óbitos ocorrem nos primeiros 5 anos e após diagnóstico da doença metastática, é observado uma sobrevida significativamente menor em TNBC^{29,30}. O TNBC não responde a tratamentos com fármacos antiestrogênicos e monoclonais, normalmente é tratado com uma combinação de terapias como cirurgia, radiação e quimioterapia. No entanto, a eficácia do tratamento é limitada, pois TNBC não possui receptores específicos para uma terapia direcionada e apresenta resistência à vários fármacos³¹. Portanto, o tratamento de TNBC é ainda um desafio para a oncologia, mostrando a necessidade do desenvolvimento de novos quimioterápicos com melhor eficácia e maior especificidade para esse subtipo de câncer de mama.

1.5 - Quimioterápicos inorgânicos contra o câncer

Os complexos metálicos despertaram grande interesse na química medicinal voltada ao câncer, após a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina na década de 60³². Até então as pesquisas estavam voltadas somente aos compostos orgânicos e produtos naturais, uma vez que os metais eram vistos apenas como agentes carcinogênicos e tóxicos.

A descoberta da atividade anticâncer da cisplatina ocorreu de forma acidental, quando Rosenberg estudava o crescimento de uma colônia de bactérias *Escherichia coli* na presença de campo elétrico. Em seus experimentos, foi observada a formação de filamentos de bactérias, em consequência da completa interrupção da divisão celular³². Quando investigada a causa desse fenômeno observado, descobriram que a platina do eletrodo se dissolvia no meio de cultura, que continha sais de amônio, formando complexos com o metal. Uma das hipóteses de compostos formados foram os complexos *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] e *trans*-[PtCl₂(NH₃)₂], que foram sintetizados e testados nas mesmas condições, sendo que o complexo na forma *cis* apresentou os mesmos resultados biológicos iniciais, enquanto o complexo na forma *trans* se mostrou inativo³³. Quando inoculado o complexo *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] em ratos com Sarcoma-180, a regressão do tumor foi total³⁴. Os testes prosseguiram para a fase clínica e foi aprovado, a sua utilização como fármaco no tratamento de câncer de próstata, em 1978³⁵. Atualmente a cisplatina é utilizada para vários outros tipos de câncer, como o câncer de ovário, pulmão,

cabeça, estômago, esôfago, linfomas, melanoma, colorretal, entre outros. No Brasil, um dos nomes comerciais da cisplatina é C-Platin^{36,37}.

Apesar do sucesso da cisplatina, os efeitos colaterais associados ao seu uso não foram diferentes de outros quimioterápicos orgânicos, causando náusea, vômito, nefrotoxicidade e neurotoxicidade. Além disso, apresentam baixa solubilidade em solução aquosa, limitando a dose administrada³⁸. Essas desvantagens associadas a cisplatina, levaram ao desenvolvimento de outros fármacos antitumorais de platina, como a *cis*-diamino(2-ciclobutanodicarboxilato) platina (II) (carboplatina) e *trans*-1R,2R-diaminociclohexano-oxalatoplatina (II) (oxaliplatina), com aprovação para comercialização mundial (Figura 1.3).

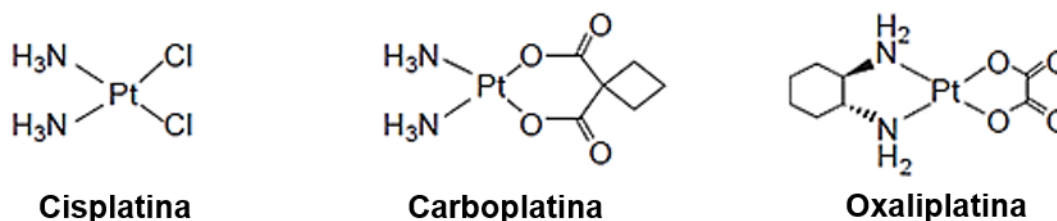


FIGURA 1.3 - Medicamentos contendo platina comercializados mundialmente (adaptado da ref.37).

A carboplatina foi o segundo fármaco a ser aprovado, e sua estrutura difere da cisplatina pela presença do ligante carboxilato no lugar dos ligantes cloridos, contribuindo para uma maior solubilidade em solução aquosa e menor toxicidade, o que permite maiores doses para serem administradas. No entanto, este fármaco apresenta menor atividade que a cisplatina para os cânceres de cabeça, pescoço e bexiga, mas com eficácia semelhante à cisplatina em câncer de pulmão^{35,38}. Já a oxaliplatina se difere da cisplatina pela presença do grupo abandonador oxalato e o ligante inerte diaminociclohexano, sendo menos tóxico que a cisplatina e com atividade para câncer colorretal metastático^{35,38}.

Outros compostos de platina conseguiram aprovação para alguns países, como a nedaplatina, lobaplatina e a heptaplatina, cujo a comercialização é restrita ao Japão, China e coreia do sul, respectivamente³⁹.

O mecanismo proposto para a ação do fármaco cisplatina envolve a entrada do complexo na célula e consequente hidrólise, com a saída ligantes cloridos e entrada

de água. Após sofrer hidrólise, o complexo se liga ao seu alvo biológico que se encontra no núcleo, que é o DNA. A ligação da cisplatina ao DNA causa uma lesão irreparável no DNA, o que irá impedir a replicação da célula e desencadear a morte celular via apoptose^{35,40}.

1.6 - Complexos de Rutênio

Em busca de um equilíbrio entre os benefícios e a toxicidade, novas pesquisas foram desenvolvidas com diferentes metais. Dentre os metais em estudo, tem-se em destaque o rutênio, pois seus complexos mostraram novas perspectiva para a aplicação contra vários tipos de câncer. As propriedades desse metal são interessantes para o desenvolvimento de um fármaco, pois seus complexos, em geral, apresentam uma geometria octaédrica, com facilidade de modulação de diferentes ligantes na esfera de coordenação e possuem diferentes estados de oxidação em condições fisiológicas, sendo mais comuns II e III^{41,42}. Todas essas propriedades, o torna promissor na utilização como fármaco na terapia do câncer.

Existem inúmeros complexos de rutênio sendo estudados no mundo todo, mostrando resultados interessantes em teste *in vitro* frente à diferentes linhagens de células tumorais⁴³⁻⁴⁵. Dentre os complexos estudados têm-se alguns que se encontram em fase de testes clínicos⁴⁶, como os complexos de rutênio (III): KP1019 (Ind *trans*-[RuCl₄bis(1H-Ind)]) e KP1339 (Na *trans*-[RuCl₄bis(1H-Ind)]), Ind=indazol, os quais são análogos de KP418 (Im *trans*-[RuCl₄bis(1H-Im)]). Outro complexo de rutênio (III), denominado NAMI-A (Im *trans*-[RuCl₄(1H-Im)(DMSO)]), Im=imidazol, também chegou até os testes clínicos, no entanto foi reprovado para progressão dos testes por não apresentar a eficácia esperada no tratamento. As estruturas químicas dos complexos de Ru (III) mencionados são apresentados na Figura 1.4.

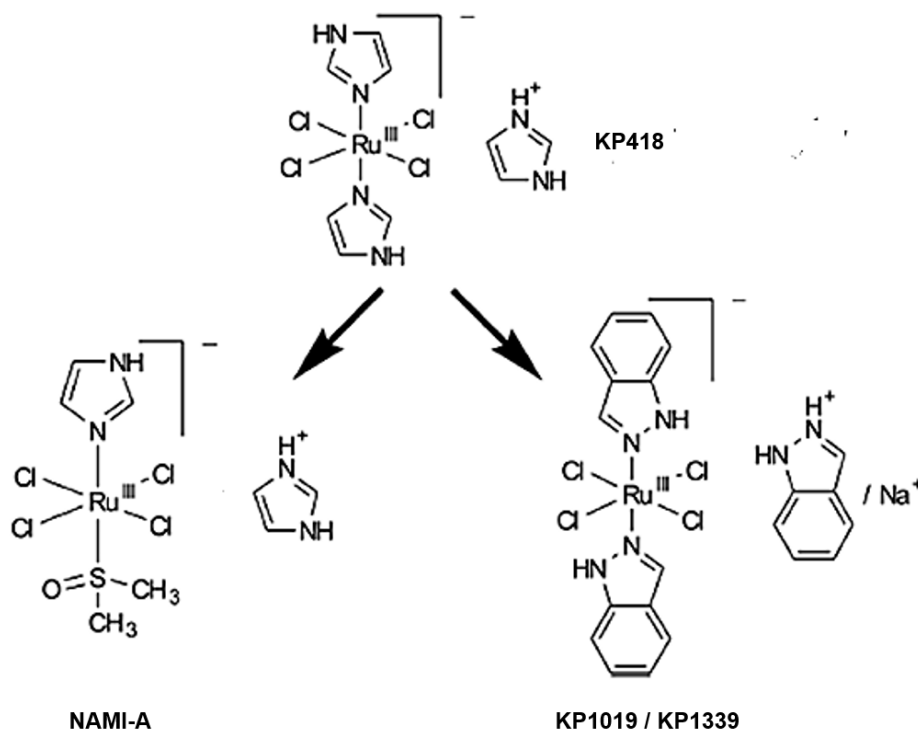


FIGURA 1.4 - Complexos de rutênio (III) com atividade anticâncer (adaptado da ref.46).

O complexo NAMI-A foi uma grande promessa, mediante seus estudos chegaram ao fim dos testes clínicos na Fase II. O complexo NAMI-A mostrou-se promissor, com propriedades antimetastáticas interessantes em testes pré-clínicos⁴⁷⁻⁴⁹. Quando avaliado em testes clínicos de fase I/II, em pacientes com câncer de pulmão metastático, o tratamento combinado com gemcitabina, um fármaco de primeira linha para esse tipo de tumor, mostrou uma resposta negativa, apresentando um perfil de toxicidade alto, com resultados não tão convincentes, em que a eficácia do tratamento foi menor do que a esperada apenas para gemcitabina, sendo considerado um complexo insuficientemente eficaz para uso posterior⁵⁰. Foram 30 anos em estudos, desde sua síntese, com propriedades desde então promissoras, no entanto não foi obtida a resposta esperada no teste clínico, com isso deixando para a ciência suas contribuições químicas e biológicas para o avanço nas pesquisas⁵¹.

O KP418 apresentou atividades terapêuticas contra linhagens de células de leucemia P388 e melanoma B16⁵². Em ratos com câncer de colorretal, o tratamento com o composto KP418, causou uma redução significativa do tumor. Seu análogo KP1019 apresentou melhor atividade, com resultados superiores ao fármaco de referência 5-

fluorouracil, contra o câncer colorretal. Os resultados mostraram baixa toxicidade do composto em doses eficazes⁵³. Com base nessa atividade promissora, o KP1019 foi selecionado para outros testes clínicos. Em testes *in vitro* em linhagens de câncer colorretal e *in vivo* em carcinoma de cólon quimio-resistente MAC15A, o complexo se mostrou ativo⁵⁴. Em ensaio clínico de Fase I com KP1019 não causou sérios efeitos colaterais, estabilizando a doença por até dez semanas em cinco de seis pacientes⁵³.

O mecanismo de ação proposto para KP1019 envolve, a administração do composto via intravenosa, que irá ser transportado na corrente sanguínea pela transferrina (Tf) e direcionado para células tumorais, esse mecanismo oferece uma alta seletividade de tratamento e baixa toxicidade, envolvendo o acúmulo deste composto em células tumorais que expressam em grande quantidade o receptor Tf, e subsequente redução em espécies de Ru(II) e a indução de apoptose através da via mitocondrial intrínseca^{55,56}.

A principal limitação apresentada para KP1019 é sua baixa solubilidade em solução aquosa o que pode ser um dos fatores que impediram o avanço dos testes clínicos. Para solucionar o problema de solubilidade, um complexo análogo conhecido como KP1339 foi sintetizado, trocando o contra íon indazol por sódio⁵⁷. Com base na sua maior solubilidade em água, o KP1339 foi selecionado como candidato principal para o desenvolvimento dos testes clínicos, facilitando a aplicação clínica de doses maiores do composto para os pacientes. Nos estudos clínicos de Fase I, o KP1339 apresentou menores efeitos colaterais que seu análogo KP1019, exibindo maior tolerância dos pacientes ao tratamento⁴⁶.

Como representantes de complexos rutênio (II), têm-se os arenos [Ru (η^6 -bifenil) Cl (en)] PF₆ (RM175) e [Ru (η^6 -p-cimeno) Cl₂ (PTA)] (RAPTA-C, PTA = 1,3,5-triazo-7-fosfoadamantano). O RAPTA-C apresentou baixa atividade em testes *in vitro*, no entanto foi muito ativo em testes *in vivo*, onde foi capaz de impedir o crescimento do tumor e a metástase do carcinoma mamário em camundongos, bloqueando a angiogênese, como o NAMI-A⁵⁸. Quando avaliado em testes *in vivo* contra carcinomas ovariano e colorretal, o RAPTA-C foi capaz de reduzir cerca de 75% do tumor, com a inibição da angiogênese, mostrando ser um composto antimetastático e antiangiogênico^{59,60}. Em estudos pré-clínicos com RM175, mostrou atividade contra tumores resistentes à cisplatina, como o carcinoma ovariano⁶¹. Em testes *in vivo* foi ativo

contra carcinoma mamário e causou a redução de metástase⁶². A cinética de troca dos ligantes cloridos desses arenos é mais rápida que a cisplatina, da mesma forma, são as interações das espécies hidrolisadas com o DNA. Apesar de nenhum desses complexos ter completado à fase clínica, tais propriedades os tornam interessantes na aplicação anticancerígena⁶³⁻⁶⁵.

Na terapia fotodinâmica (PDT) contra o câncer, tem-se o primeiro composto fotodinâmico à base de Ru (II) em fase clínica, conhecido como TLD1433 (rac-[Ru(dmb)₂(IP-3T)]Cl₂), sendo dmb= 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina, IP-TT = 2,2' : 5',2''-tertiofeno)-imidazol[4,5-f][1,10]-fenantrolina. A eficácia do tratamento PDT com TLD1433, no retardo do crescimento *in vivo* do adenocarcinoma do cólon subcutâneo C26.WT em camundongos, foi significativa, mostrando uma redução do tumor após 24 h de tratamento. A PDT com 5 mg kg⁻¹ de TLD1433 resultou em um atraso médio no crescimento do tumor de 9 dias⁶⁶. O estudo clínico da fase Ib com TLD1433, realizado com nove pacientes com câncer de bexiga não muscular invasivo, na primeira etapa que avalia a segurança e tolerabilidade, foi considerado um sucesso. O tratamento desses pacientes com a TLD1433, mostrou-se eficaz nos pontos finais primários e secundários (e ponto final exploratório em 90 dias) em seis pacientes, o que permitiu sua aprovação para a próxima fase dos testes clínicos (fase II)⁶⁷.

Inúmeros compostos estão sendo sintetizados e avaliados contra diferentes tipos de câncer em todo o mundo. No laboratório de estrutura e reatividade de compostos inorgânicos (LERCI), os complexos de rutênio sintetizados apresentam em sua esfera de coordenação ligantes relativamente inertes, como bifosfinas e polipiridínicos, que contribuem para a atividade anticâncer e estabilizam o centro metálico, dos quais as propriedades químicas e biológicas desses ligantes serão mais bem discutidos no próximo item. Além desses, tem-se mais outros ligantes coordenados ao centro metálico, com atividades biológicas conhecidas ou que mimetizam estruturas químicas com funções essenciais dentro do organismo. Dentre os ligantes avaliados tem-se os derivados de mercaptos⁶⁸ e naftoquinonas⁶⁹ (lausona e lapachol). Todos eles mostraram atividades promissoras frente a diferentes linhagens de células tumorais. Algumas estruturas químicas e seus respectivos valores de IC₅₀ obtidos frente a linhagem de câncer de mama humano (MDA-MB-231) são apresentados nas Figuras 1.5 (mercaptos) e 1.6 (naftoquinonas).

Mercaptos

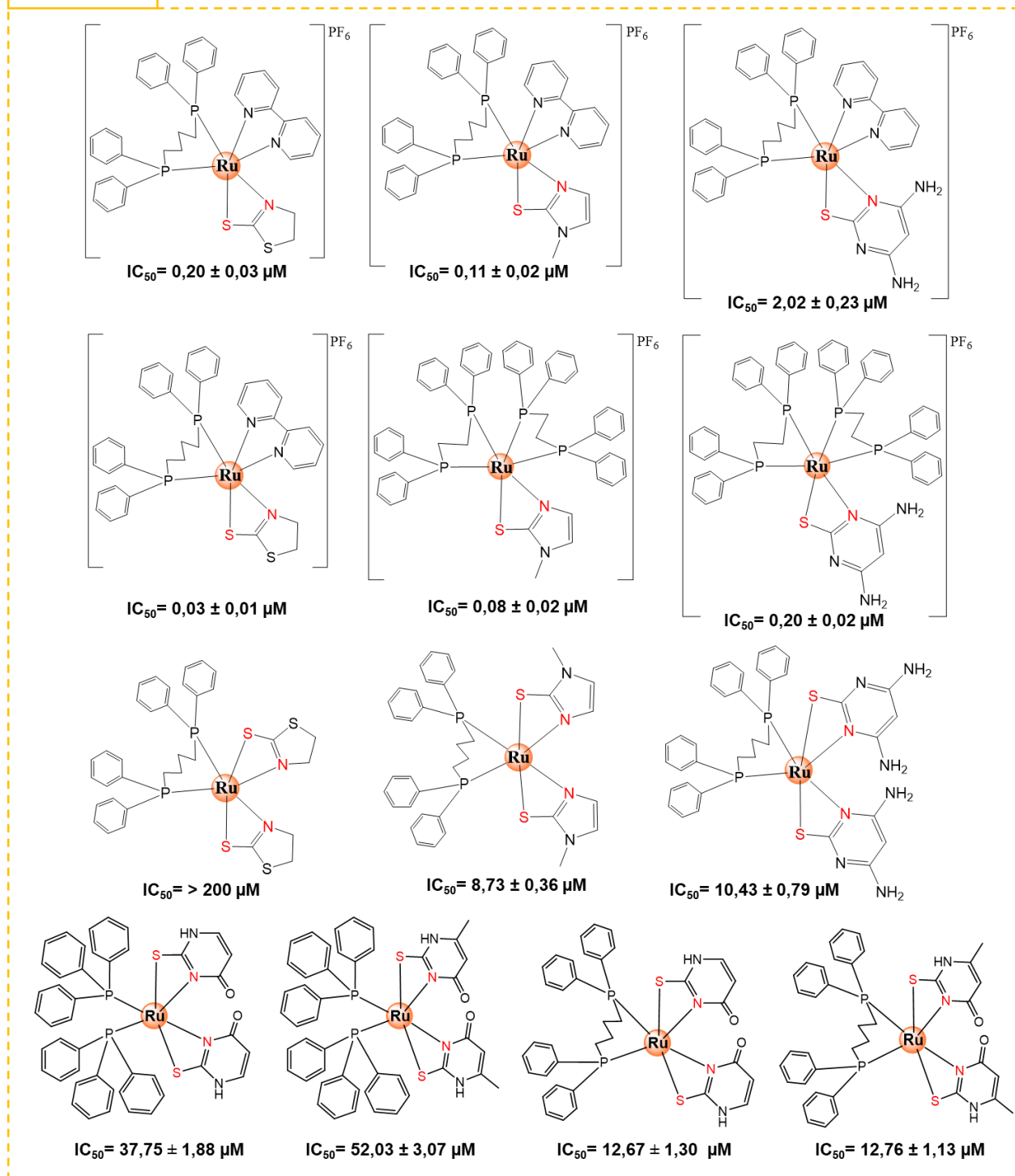


FIGURA 1.5 - Estruturas químicas e valores de IC_{50} frente a célula MDA-MB-231, dos complexos de Ru (II) com diferentes ligantes derivados da fosfina, bipyridina e mercaptos.

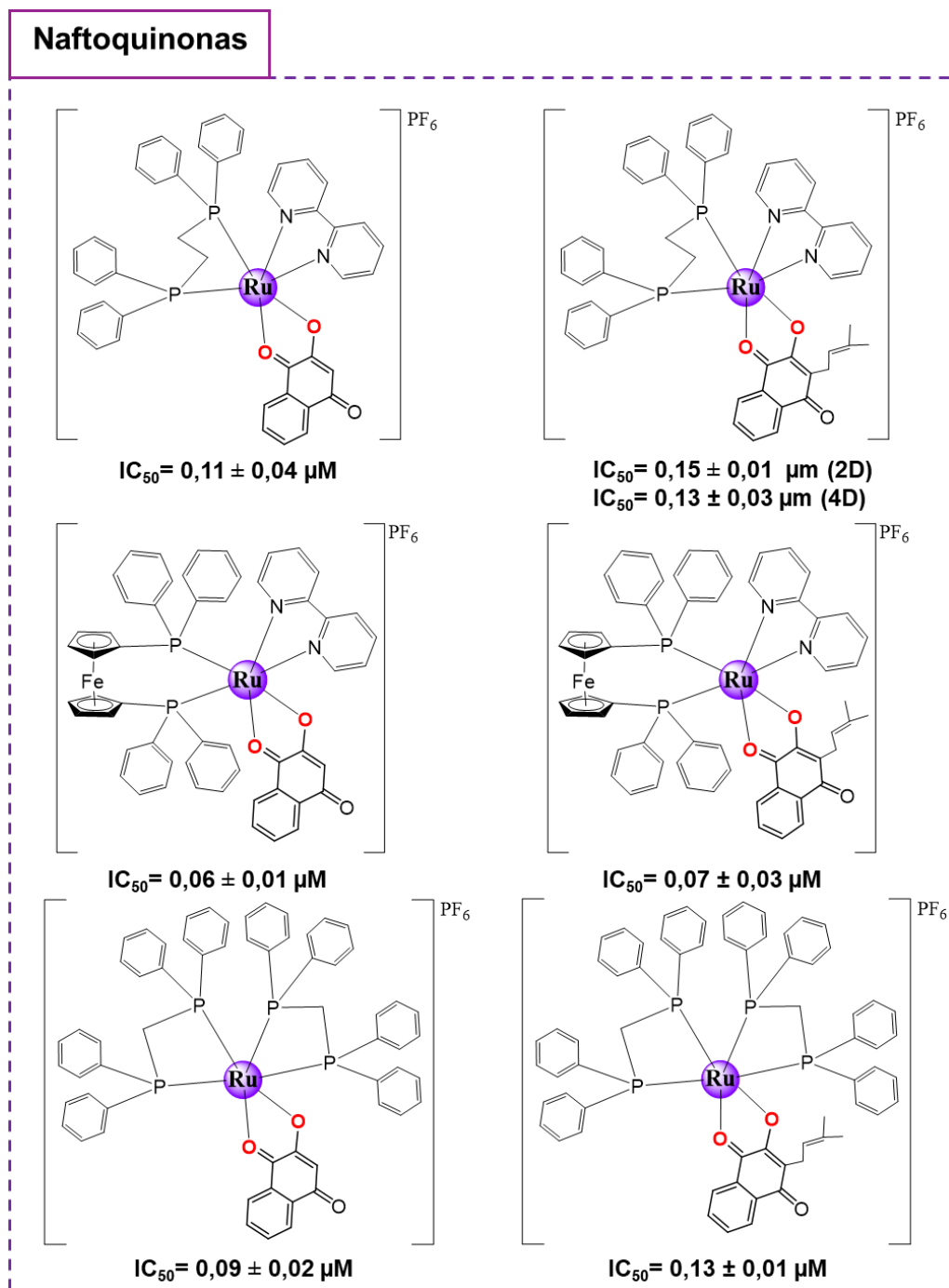


FIGURA 1.6 – Estruturas químicas e valores de IC_{50} frente a célula MDA-MB-231, dos complexos de Ru (II) com diferentes ligantes derivados da fosfina, bipyridina e naftoquinonas. 2D e 4D referem-se aos isômeros, isolado e com os dois juntos, respectivamente.

Como pode ser visto nas Figuras 1.5 e 1.6, a atividade citotóxica dos complexos varia com as diferentes fosfinas e quando se tem duas delas na esfera de coordenação. Nos complexos derivados dos ligantes mercapto a melhor atividade foi obtida com a presença de duas bifosfinas, este fato pode ser atribuído ao aumento da

lipofilicidade dos complexos, que pode contribuir para permeação destes, na membrana lipoproteica das células. A variação dos substituintes ligados aos átomos de fósforo também pode influenciar na atividade desses complexos, pois podem variar seus efeitos de labilidade, retroatividade, valor de pKa, impedimento estérico e lipofilicidade. Dentre as bifosfinas avaliadas nos complexos apresentados na Figura 1.6, aqueles com a dppf têm uma tendência de serem mais ativos, embora os valores de IC₅₀, entre os complexos contendo os ligantes naftoquinonas, se encontrem muito próximos. As variáveis entre as fosfinas, que podem contribuir para a atividade são muitas, no caso da dppf, além da presença do ferro, esta possui um pKa menor que a dppe.

Estudos realizados para investigar a relevância da reatividade de auto-oxidação e os pKas das bifosfinas substituídas à atividade anticâncer mostraram que os complexos com as bifosfinas de oxidação mais lenta e com menor pKa são mais ativas, quando na forma complexada a oxidação dessas bifosfinas é protegida, permitindo a entrega no alvo biológico⁷⁰. Esses resultados evidenciam a importância dos ligantes bifosfínicos na atividade anticâncer dos complexos.

Comparando-se a atividade citotóxica entre os complexos derivados dos ligantes tiouracilas (Figura 1.5), tem-se melhor atividade aqueles contendo a bifosfina. Importante destacar também, a importância do ligante bipyridínico na atividade biológica dos complexos, em que os complexos sem a bipyridina, foram menos ativos, com aumento significativo nos valores de IC₅₀ dos complexos.

Dentre todos os complexos apresentados nas Figuras 1.5 e 1.6, é importante também enfatizar a contribuição dos ligantes mercaptos e das naftoquinonas na atividade biológica dos complexos, em que é observado melhor atividade para os complexos com as naftoquinonas. A potencialidade da atividade biológica dos complexos é evidente, quando os valores de IC₅₀ são comparados com seus ligantes livres (IC₅₀ = > 100 µM), os quais não apresentam atividade citotóxica frente as células tumorais.

A atividade citotóxica dos complexos é inerente ao sinergismo das atividades dos ligantes que se encontram na esfera de coordenação, que contribuem para a estabilidade do centro metálico, potencializam a atividade biológica, possivelmente aumentam a permeação celular, alcançando diferentes alvos biológicos e desencadeando diferentes modos de ação nas células, essas são características que conferem uma peculiaridade para cada complexo.

1.7 - Ligantes bifosfínicos e bipyridínicos

As fosfinas são caracterizadas como ligantes neutros, que apresentam um par de elétrons disponível para fazer ligação σ , ocupando o orbital vazio do metal, bem como fazer retrodoação do metal para o orbital híbrido $\sigma^*\pi$ vazio da fosfina⁷¹. As fosfinas conseguem modular as propriedades eletrônicas e reatividade do metal ao qual se encontram ligado de maneira dependente do seu grupo substituinte, além de que estes também podem influenciar no caráter lipofílico da fosfina, sendo uma característica atraente para o desenho de metalofármacos. Quando se tem substituintes retiradores de elétrons na bifosfina, a sua capacidade de doar elétrons σ diminui, levando à redução da energia do orbital receptor da bifosfina e consequente aumento da capacidade de retrodoação. Portanto, a capacidade σ doador / π receptor de cada fosfina é dependente do seu grupo substituinte^{72,73}.

Outra característica importante das fosfinas é o efeito *trans* labilizante que elas possuem, o que pode levar à dissociação do ligante que se encontra *trans* posicionado a ela, gerando sítios livres para coordenação que podem contribuir para processos de catálise e na atividade citotóxica^{74,75}. Muitos trabalhos da literatura mostram a contribuição das fosfinas nas atividades antitumorais dos metais, como o composto Aurofinina, usado para artrite reumatoide, que se mostrou ativo em testes *in vitro* e *in vivo* contra leucemia. A importância da fosfina para a atividade deste composto foi comprovada quando testado na sua ausência, em que o composto não foi ativo^{76,77}.

Um interessante substituinte da fosfina é o ferroceno, um organometálico neutro, estável, não tóxico e permeável à membrana celular⁷⁸. Possui propriedades redox interessantes, sendo facilmente oxidado para formar o seu cátion Fc^+ . Esse organometálico (ferrocenil) pode se ligar a outro centro metálico, de modo a aumentar suas propriedades antiproliferativas frente às células cancerígenas⁷⁹. O ferroceno pode funcionar como uma região hidrofóbica inerte, aumentando a lipofilicidade do complexo bimetálico, e consequentemente a sua permeabilidade dentro das células⁸⁰.

As propriedades anticancerígenas do ferroceno estão associadas com a geração de radicais hidroxila, os quais promovem a clivagem do DNA⁸⁰. Quando incorporados em complexos o seu mecanismo de ação pode ser diferente, sendo uma peculiaridade de cada composto. As ações terapêuticas das espécies bimetálicas se

tornam multimodais que resultam em um efeito aditivo ou sinérgico dos distintos sítios metálicos.

Estudos *in vitro* realizados com o complexo *fac*-[RuCl₃(NO)(dppf)] frente à linhagem de célula tumoral de mama (MDA-MB-231) mostraram que a citotoxicidade desse complexo foi superior a seu precursor RuCl₃(NO)₂H₂O e o ligante livre dppf, sendo seis vezes mais ativo que a cisplatina. Com base na ausência de atividade de seu precursor, é possível evidenciar o papel crucial da dppf na atividade anticâncer deste composto⁸¹.

Os ligantes bipyridínicos são interessantes para aplicação biológica pois sua estrutura química mimetiza moléculas biológicas, como ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, entre outros, os quais são importantes para manter as funções metabólicas no organismo. Esses ligantes são adequados a retrodoação, pois apresentam orbitais π* vazios disponíveis, e um par de elétrons livres para fazer ligação σ com o metal, contribuindo assim, para a estabilização do centro metálico com baixos estados de oxidação^{82,83}.

1.8 - Ligantes mercapto, N,S doadores

A combinação de um grupo exocíclico de tiona e uma molécula heterocíclica, que pode conter nitrogênio, oxigênio e enxofre ou a combinação destes, gera um grupo de moléculas com considerável potencial de coordenação. Um fator importante associado a esse potencial é o tautomerismo do grupo funcional tioamida (-N-C=S) que pode ser encontrado na forma de tiona ou tiol, quando na forma iônica são chamados de tiolatos^{84,85} (Figura 1.7). Esse equilíbrio tautomérico pode ser alterado em solução com a mudança de pH do meio. Em meio altamente ácido, as espécies estão totalmente protonadas, com todos os sítios de coordenação bloqueados. Com valores de pKa variando entre 5 e 11, é possível obter a forma desprotonada⁸⁶.

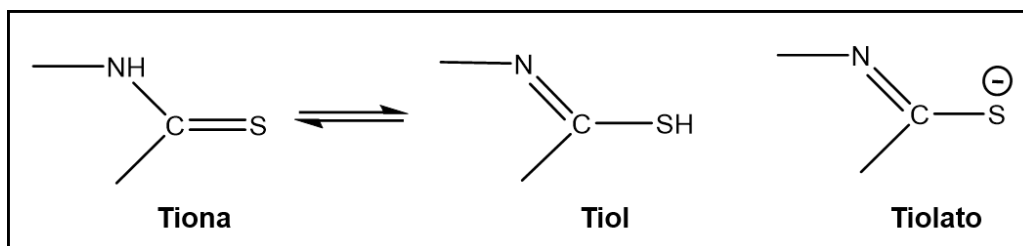


FIGURA 1.7 - Equilíbrio tautomérico entre tiona e tiol, e a forma tiolato.

A presença de dois átomos doadores nesses ligantes, como o átomo de S, que é um centro mole, e o átomo de N, considerado como um centro duro, permite a coordenação desses ligantes a uma variedade de metais moles e duros. A coordenação desses átomos ao centro metálico pode ocorrer de diferentes formas: monodentado neutro N ou S, bidentado N,S, em ponte, monodentado aniônico ou ainda se ligando em dois átomos metálicos^{86,87}.

As tioamidas são extensivamente estudadas devido às suas aplicações clínicas, como agentes antituberculose, antibacteriano e antitumorais⁸⁸. Entre as tioamidas tem-se o grupo de ligantes tiazóis com um amplo espectro de atividade biológica, dentre elas a atividades anticâncer, antibacteriana, anti-inflamatória, herbicidas, dentre outras⁸⁹. Além dos tiazóis tem-se as tiopiridinas e tiopirimidinas que apresentam grande importância bioquímica, por se assemelharem com as bases púricas e pirimidínicas⁸⁴.

Os ligantes tiouracilas e análogos estruturais pertencentes ao grupo das tiopiridinas, tem sido alvo de estudos, por exibirem interessantes atividades biológicas, bioquímicas e farmacológicas. Os tiouracilas representam uma classe de bases nucleicas modificadas derivadas da uracila. Tem-se o 2-tiouracil, como um análogo quimicamente modificado de uma base de RNA, que desempenha atividade quimioterápica por meio de sua incorporação ao ácido nucleico⁹⁰. O composto 2-tiouracil e seus derivados são capazes de induzir modificações na glândula tireóide, sendo utilizados como fármacos para tratar hipertireoidismo. Além disso, podem atuar como inibidores seletivos de óxido nítrico^{91,92}. Metilados e tio-derivados da uracila como o 6-metil-2-tiouracil (6M2TU) são clinicamente utilizados para acelerar os processos de regeneração celular. Estimulam fatores celulares e de imunidade, proporcionando um efeito anti-inflamatório, inibindo a atividade de enzimas proteolíticas^{92,93}.

Com base na versatilidade química e atividades biológicas dos ligantes fosfínicos, bipyridinas e os diferentes ligantes mercapto, pretende-se avaliar o efeito sinérgico desses ligantes, quando coordenados ao metal, uma vez que, já se tem relatado na literatura e em trabalhos desenvolvidos no laboratório, atividades anticâncer interessantes de complexos metálicos contendo ligantes mercapto com diferentes bifosfinas e bipyridinas⁹⁴⁻⁹⁷. Estudos subsequentes serão desenvolvidos no presente trabalho com a bifosfina dppf, uma fosfina que apresenta o ferroceno ligado aos fosforo, que apresenta interessantes propriedades biológicas que podem contribuir para a atividade anticâncer, também a bipyridina para somar nessa atividade, ambos capazes de fazer a retrodoação, favorecendo a estabilidade química do centro metálico. Além desses ligantes, serão adicionados à esfera de coordenação, os derivados de ligantes mercapto, que se tem relatado as grandes contribuições químicas e biológicas destes para diversas doenças. Dentre os diversos ligantes mercapto serão avaliadas as influências dos grupos substituintes (CH_3 -, NH_2 - e COO^-) na atividade anticâncer dos compostos sintetizados, em que se espera contribuições favoráveis dos ligantes metilas para a entrada dos complexos nas células, assim como o par de elétron livre no átomo de N do grupo amina que favorece a basicidade do ligante, já o grupo carboxila na sua forma desprotonada permite fazer interações com regiões hidrofílicas de biomoléculas, ligações de hidrogênio com algumas moléculas presentes no sistema biológico, o que podem favorecer ou não para a atividade dos complexos. O par de elétrons livres presente nos átomos de N, S e O permite maiores interações com a moléculas e biomoléculas, pois esses elétrons estão disponíveis para fazer possíveis ligações com moléculas presentes no meio biológico, sendo mais favoráveis para o átomo menos eletronegativo, como o enxofre.

Capítulo 2- Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Sintetizar, caracterizar e investigar o possível mecanismo de ação dos complexos de rutênio (II) de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{N-S})(\text{bipy})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, como possíveis candidatos a fármacos anticâncer.

2.2- Objetivos específicos

1- Sintetizar complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{N-S})(\text{bipy})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, em que N-S= 2-mercaptotiazolina (tzdt), 2-mercapto-1-metilimidazol (mmi), 3-ácido carboxílico-6-mercaptopiridina (pyAC), 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (dpm), 6-metil-2-tiouracil (6m2TU), 2-tiouracil (2TU), dppf= 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno e bipy=2,2'-bipiridina;

2- Caracterizar os complexos sintetizados utilizando as técnicas de condutividade molar, análise elementar, espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/visível, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, COSY ($^1\text{H}-^1\text{H}$) e HSQC ($^1\text{H}-^{13}\text{C}$), voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial, e difração de raios X quando obtido o monocristal;

3- Avaliar a estabilidade química dos complexos em solução;

4- Determinar a lipofilicidade dos compostos;

5- Avaliar a atividade citotóxica dos complexos frente as linhagens de células tumorais humana de mama (MDA-MB-231 e MCF-7), pulmão (A549), próstata (DU-145) e carcinoma de mama murino (Ehrlich). Também avaliar a atividade citotóxica na linhagem não tumoral de mama humano (MCF-10A);

6- Analisar o ciclo celular por citometria de fluxo, das células MDA-MB-231 tratadas com os complexos;

7- Analisar o dano no DNA pelo ensaio cometa;

8- Avaliar o tipo de morte celular induzida pelos complexos, pelo método de coloração com HO/PI e por citometria de fluxo;

- 9- Analisar a morfologia das células MDA-MB-231 tratadas com os complexos;
- 10- Avaliar a alteração do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo;
- 11- Analisar dos níveis de EROs nas células tratadas com os complexos por espectroscopia de fluorescência;
- 12- Avaliar a inibição da migração pelo ensaio de fechamento da risca e câmara de “Boyden”;
- 13- Avaliar a sobrevivência clonogênica das células MDA-MB-231, após tratamento com os complexos;
- 14- Avaliar a atividade antiangiogênica pelo ensaio de membrana corioalantoide em embrião de galinha (CAM)
- 15- Avaliar a Interação dos complexos com a HSA e o sítio de ligação na HSA;
- 16- Avaliar o efeito da ligação complexo-HSA na atividade citotóxica dos complexos;
- 17- Avaliar a interação dos complexos com o DNA por titulação espectroscópica UV-visível e viscosidade;
- 18- Avaliar a inibição da enzima topoisomerase IB, pelos complexos TIA e M-IMI.

Capítulo 3- Parte Experimental

3.1 - Materiais e Métodos

3.1.1 - Obtenção da atmosfera inerte

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em atmosfera inerte sob argônio, livre de umidade e oxigênio. A linha de argônio foi mantida com a passagem do fluxo de gás por colunas de purificação com sílica gel, cloreto de cálcio e peneira molecular e outra com catalisador do tipo BTS-R-3-11 (Fluka Chemika), mantida a 60°C. O sistema utilizado na linha de gás é realizado para desoxigenar e secar, o gás utilizado é comercial de procedência White Martins.

3.1.2 - Solventes e Reagentes

Os solventes orgânicos utilizados neste trabalho obtidos da Aldrich ou Synth foram submetidos a tratamento prévio de purificação por métodos usuais⁹⁸. Dimetilsulfóxido (Aldrich), etanol, acetona e éter etílico foram utilizados como fornecidos. Os solventes deuterados (Aldrich) utilizados na espectroscopia de RMN foram utilizados como fornecidos.

O sal $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, de procedência Aldrich foi utilizado como fornecido na síntese dos complexos precursores $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$ e $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{dppf})]$. Todos os seguintes reagentes químicos também foram utilizados como fornecidos: Perclorato de tetrabutilamônio (PTBA, Fluka), hexafluorofosfato de potássio (KPF_6 , Fluka), 2,2'-bipiridina (Aldrich), trifenilfosfina (PPh_3) (Aldrich), 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (dppf, Aldrich), 2-mercaptotiazolina (Aldrich), 2-mercapto-1-metilimidazol (Aldrich), imidazol (fluka), 3-ácido carboxílico-6-mercaptopiridina (Aldrich), 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (Aldrich), 6-metil-2-tiouracil (Aldrich), 2-tiouracil (Aldrich), trietilamina (Aldrich), trizma base (Sigma) e trizma-HCl (Sigma).

Os reagentes utilizados nos experimentos biológicos foram utilizados como fornecidos e armazenados em geladeira ou freezer, de acordo com as recomendações do fabricante. Os reagentes químicos e biológicos utilizados: DNA do timo de bezerro

(CT-DNA, Aldrich), Albumina do soro humano (HSA, Aldrich), solução Hoechst 33342 (Aldrich), iodeto de propídio (BD Biosciences), kit Anexina-V (BD Bioscience), J cell-1 (BD Biosciences), dansil-L-arginina (Aldrich), varfarina (Aldrich), azul de tripano (Sigma), Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Aldrich), tripsina (Vitrocell), solução tampão fosfato-salino (PBS 1x, pH 7,4, 10 mM), soro fetal bovino (SFB, Vitrocell). Na manutenção das células tumorais foram utilizados os meios de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM e DMEM/F12, Vitrocell) e RPMI (Vitrocell).

3.2 - Instrumentação e Técnicas experimentais

3.2.1 - Balança analítica

Todos os sólidos foram pesados em uma balança analítica METTLER AE 240.

3.2.2 - Condutividade Molar

As medidas de condutividade molar a 25°C foram realizadas em um condutímetro Meter Lab CDM 2300 MICRONAL, modelo B-330, equipado com célula de Pt com constante igual 0,089 cm⁻¹, utilizando-se soluções com concentrações de 1,0 x 10⁻³ mol/L de cada composto, em CH₂Cl₂.

3.2.3 - Análise Elementar (CHNS)

As determinações dos teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre dos compostos foram realizadas utilizando um analisador CHNS modelo EA 1108 da FISONs, localizado no Laboratório de Microanálise do Departamento de Química da UFSCar.

3.2.4 - Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos de amostras sólidas diluídas em pastilha de KBr (1:100 mg), na região compreendida entre 4000-200 cm^{-1} , utilizando um espectrofotômetro BOMEM MICHELSON FT MB-102.

3.2.5 - Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis)

Os espectros na região do ultravioleta e visível (250nm-800nm) foram obtidos em um espectrofotômetro de arranjo de diodo da Hewlett Packard, modelo 8452A ou Cary 500 de duplo feixe da Varian. Os compostos foram dissolvidos em CH_2Cl_2 , e os espectros foram obtidos em várias diluições, partindo de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm.

3.2.6 - Eletroquímica

Os voltamogramas cíclicos e pulso diferencial foram obtidos utilizando um potenciostato da Bioanalytical System, modelo BAS100W a temperatura de 25 °C. As medidas foram realizadas em uma célula eletroquímica de vidro com um sistema de três eletrodos, sendo um de referência Ag/AgCl em solução 0,1 mol L^{-1} de PTBA em CH_2Cl_2 e os outros dois, eletrodos de trabalho e auxiliar, constituídos de platina. As soluções eletrolíticas foram preparadas em CH_2Cl_2 (PTBA, 0,1 mol L^{-1}) na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ dos complexos a serem analisados.

3.2.7 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN dos complexos sintetizados foram obtidos no espectrômetro BRUKER DRX 400 MHz localizado no Departamento de Química da UFSCar. As soluções foram preparadas em acetona- d_6 (CD_3) $_2\text{CO}$ para aquisição dos espectros de RMN unidimensional de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT-135, e bidimensional de COSY

(^1H - ^1H) e HMQC (^1H - ^{13}C). Os espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ foram obtidos em sua maioria em solventes não deuterados contendo capilares com D_2O como referência externa.

3.2.8 - Difração de raios X

Os cristais foram obtidos por evaporação lenta de solvente. Para obtenção de cristais dos compostos, foram solubilizadas uma pequena quantidade da amostra em diclorometano e em seguida adicionado metanol, resultando em uma solução final de razão 4:1 (v/v). Após a evaporação lenta do líquido começaram a se formar as primeiras sementes (germes) que crescerem e deram origem aos cristais.

Após a obtenção dos monocristais, as medidas de difração de raios X foram realizadas no Instituto de Física de São Carlos-USP pelos professores Drs. Eduardo Ernesto Castellano e Javier Ellena ou no Instituto Química de São Carlos-USP pelo professor Dr. Victor Marcelo Deflon. As coletas de dados foram realizadas com radiação $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda=0,71073 \text{ \AA}$) monocromada por grafite, nos difratômetros Enraf-Nonius Kappa-CCD ou Bruker Kappa Apex II, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. As estruturas foram resolvidas por métodos diretos com SHELXS-97 e refinadas com SHELXL-97⁹⁹.

3.3 - Síntese dos complexos de rutênio

3.3.1 - Síntese de Precursores

3.3.1.1 - Síntese do complexo $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$

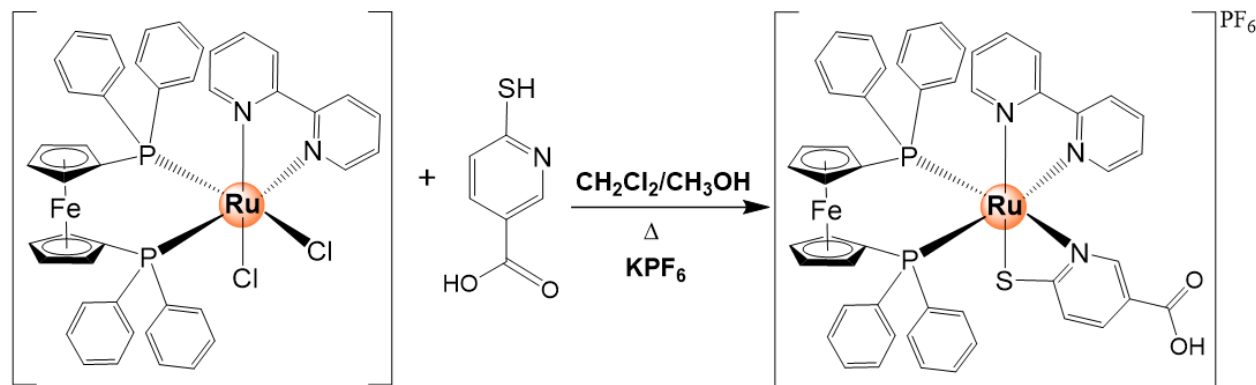
O complexo $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$ foi sintetizado como descrito na literatura¹⁰⁰. Em um balão de duas bocas contendo 100 mL de metanol previamente desaerado foi dissolvido 1,00g (3,50 mmol) de $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e deixado sob refluxo e atmosfera de argônio durante 15 min. Após resfriamento da solução adicionou-se 5,75 g (21,70 mmol) de trifenilfosfina (PPh_3). A mistura reacional foi novamente refluxada por 3 h. Após o resfriamento um sólido marron cristalino foi obtido, sendo separado por filtração e lavado com metanol e hexano à quente, para a retirada do excesso de trifenilfosfina livre, e secado à vácuo. Rendimento 92%.

3.3.1.2 - Síntese do complexo *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppf)]

O complexo *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppf)] foi sintetizado como descrito na literatura¹⁰¹. Adicionou-se 500 mg (0,56 mmol) de 314 mg (0,56 mmol) do complexo [RuCl₂(PPh₃)₃] dissolvido em 50 mL de diclorometano previamente desaerado. A solução permaneceu sob agitação por 30 minutos, adicionou-se 88,48 mg (0,56 mmol) do ligante 2,2'-bipiridina e deixou-se a mistura reacional sob agitação por mais 2 h, reduziu-se o volume da solução para aproximadamente 2 mL e então precipitou-se e lavou-se com éter etílico. O precipitado formado foi separado por filtração e secado à vácuo. Rendimento 85%.

3.3.2 - Síntese do complexo [Ru(pyAC)(bipy)(dppf)]PF₆, pyAC: 3-ácido carboxílico-6-mercaptopiridina: (AC)

Adicionou-se 100 mg (0,113 mmol) do complexo *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppf)] a uma solução contendo dissolvido 21,04 mg (0,13 mmol) do ligante 3-ácido carboxílico-6-mercaptopiridina em 50 mL de diclorometano/metanol previamente desaerado. A mistura reacional foi deixada sob refluxo no período de 24 h mantendo-se agitação magnética e atmosfera inerte, adicionou-se a essa solução 25,00 mg (0,13 mmol) de KPF₆ e deixou-se reagindo por mais 1 h. Reduziu-se o volume da solução para aproximadamente 5 mL e formou-se um precipitado de coloração alaranjada. O precipitado formado foi filtrado em um funil de placa sinterizada, lavado com água, éter etílico e secado a vácuo. A síntese do complexo [Ru(pyAC)(bipy)(dppf)]PF₆ é apresentada no ESQUEMA 3.1.

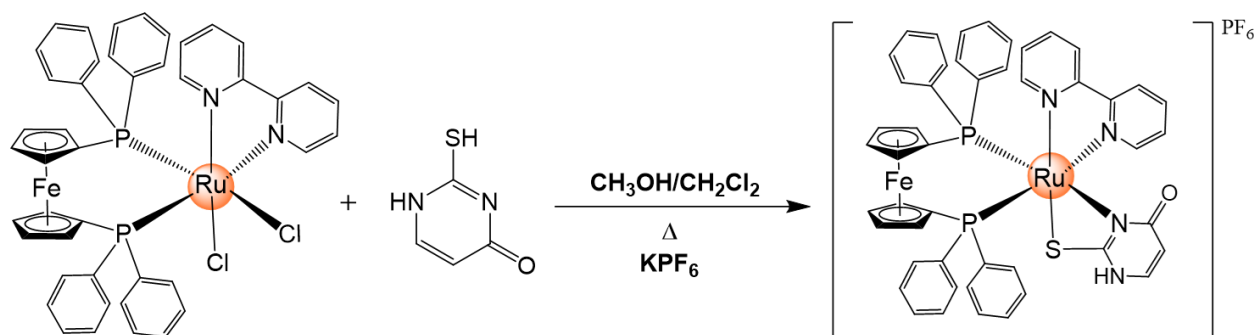


ESQUEMA 3.1 - Rota sintética para obtenção do complexo [Ru(pyAC)(bipy)(dppf)]PF₆ (AC).

Rendimento 80%. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, 298K) δ : 9,09 (1H, d, J 5,5, bipy); 8,66 (1H, d, J 7,9, bipy); 8,51 (1H, m, bipy); 8,37 (1H, d, J 7,9, bipy); 8,29 (1H, t, J 7,6, bipy); 7,81 (1H, t, J 7,4, bipy); 7,71 (2H, t, J 8,3, Ph); 7,60 (2H, m, bipy e Ph); 7,36 (7H, m, 5H-Ph e 2H-pyAC); 7,16 (7H, m, Ph); 6,98 (1H, m, bipy); 6,90 (2H, t, J 7,9, Ph); 6,57 (4H, m, 3H-Ph e H-pyAC); 5,62 (1H, s, Cp-dppf); 4,72 (2H, s, Cp); 4,48 (1H, s, Cp); 4,37 (1H, s, Cp); 4,33 (2H, s, Cp); 4,18 (1H, s, Cp); 3,43 (OH-pyAC). RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6 , 125,74 MHz, 298 K) δ : 184,70 (CS); 164,77 (C-pyAC); 158,58 (C-bipy); 156,55 (C-bipy); 154,46 (C-bipy); 150,77 (C-bipy); 146,65 (C-pyAC); 134,98 (C-pyAC); 130,52 (C-pyAC); 140,00-120,22 (C-bipy e C-Ph da dppf); 85,00-71,03 (C-Cp da dppf).

3.3.3 - Síntese dos complexos $[\text{Ru}(2\text{TU})(\text{bipy})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, 2TU= 2-tiouracil: (TIU)

Adicionou-se 100 mg (0,113 mmol) de *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{dppf})]$ a uma solução contendo 21,66 mg (0,17 mmol) do ligante 2-tiouracil em 50 mL de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ previamente desaerado. A mistura reacional foi aquecida sob refluxo no período de 2 h mantendo-se agitação magnética e atmosfera inerte, adicionou-se a essa solução 31,19 mg (0,17 mmol) de KPF_6 e deixou-se reagindo por mais 1 h. Reduziu-se o volume da solução para aproximadamente 5 mL e formou-se um precipitado de coloração amarela. O precipitado formado foi filtrado em um funil de placa sinterizada, lavado com água e secado a vácuo. A síntese do complexo $[\text{Ru}(2\text{TU})(\text{bipy})(\text{dppf})]\text{PF}_6$ é apresentada no ESQUEMA 3.2.



ESQUEMA 3.2 – Rota sintética para obtenção do complexo $[\text{Ru}(2\text{TU})(\text{bipy})(\text{dppf})]\text{PF}_6$ (TIU).

Rendimento 78 %. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, 298K) δ : 12,01 (N-H); 8,95 (1H, d, J 5,5, bipy); 8,50 (1H, d, J 8,1, bipy); 8,40 (1H, d, J 8,1, bipy); 8,31 (1H, d, J 5,2, Ph); 8,08 (1H, t, J 7,7, bipy); 7,87 (1H, t, J 7,7, bipy); 7,71 (2H, t, J 8,7, Ph); 7,56 (1H, t, J 7,3, Ph); 7,41 (2H, t, J 8,7, Ph); 7,26 (8H, m, bipy e 7H-Ph); 7,07 (5H, m, bipy e 4H-Ph); 6,74 (4H, m, bipy e 3H-Ph); 6,99 (1H, d, J 7,4, CH-TU); 5,47 (1H, s, Cp); 5,10 (1H, d, J 7,4, CH-TU); 4,80 (1H, s, Cp); 4,70 (2H, m, Cp); 4,44 (1H, s, Cp); 4,40 (1H, s, Cp); 4,10 (1H, s, Cp); 3,81 (1H, s, Cp). RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (DMSO- d_6 , 125,74 MHz, 298 K) δ : 178,00 (CS); 165,56 (C=O); 159,30 (C-bipy); 158,80 (C-bipy); 156,45 (C-bipy); 138,70 (C-bipy); 138,40 (CH-TU); 137,80-124,20 (C-bipy e C-Ph); 107,00 (CH-TU); 84,00-70,00 (C-Cp da dppf).

3.3.4 - Síntese dos complexos $[\text{Ru}(\text{N-S})(\text{bipy})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, N-S: 2-mercaptotiazolina (tzdt), 2-mercapto-1-metilimidazol (mmi), 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina (dmp), 6-metil-2-tiouracil (6m2TU)

Adicionou-se 0,15 mmol de trietilamina a uma solução contendo 19,28 mg (0,13 mmol) do ligante N-S em 50 mL de diclorometano/metanol previamente desaerado, após dissolução, 100 mg (0,11 mmol) de *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{dppf})]$ foi adicionado. A mistura reacional foi deixada em refluxo no período de 24 h mantendo-se agitação magnética e atmosfera inerte, adicionou-se a essa solução 25,12 mg (0,13 mmol) de KPF_6 e deixou-se reagindo por mais 1 h. Reduziu-se o volume da solução para aproximadamente 5 mL e formou-se um precipitado. O precipitado formado foi filtrado em um funil de placa sinterizada, lavado com água, éter etílico e secado a vácuo. A síntese dos complexos é apresentada no Esquema 3.3.

$[\text{Ru}(\text{tzdt})(\text{bipy})(\text{dppf})]\text{PF}_6$ (TIA):

Precipitado alaranjado, rendimento de 87%. RMN ^1H (acetona- d_6 , 400 MHz, 298K) δ : 9,22 (1H, d, J 5,7, bipy); 8,64 (1H, d, J 8,0, bipy); 8,54 (1H, d, J 5,7, bipy); 8,43 (1H, d, J 8,1, bipy); 8,25 (1H, t, J 7,5, bipy); 7,96 (1H, t, J 7,4, bipy); 7,85 (2H, t, J 8,7, Ph da dppf); 7,67 (3H, m, Ph); 7,43 (7H, m, bipy e 6H-Ph); 7,30 (1H, t, J 7,0, Ph); 7,16 (5H, m, bipy e 4H-Ph); 6,91 (2H, t, J 8,7, Ph); 6,81 (2H, t, J 8,8, Ph); 5,71 (1H, s, Cp da dppf);

4,86 (1H, s, Cp); 4,71 (1H, s, Cp); 4,55 (1H, s, Cp); 4,33 (2H, m, Cp); 4,29 (1H, s, Cp); 3,69 (1H, s, Cp); 3,13 (1H, m, CH₂ de tzdt); 2,73 (1H, m, CH₂-tzdt); 2,46 (1H, m, CH₂-tzdt); 2,11 (1H, m, CH₂-tzdt). RMN ¹³C{¹H} (acetona-d₆, 125,74 MHz, 298 K) δ: 184,35 (CS); 159,89 (C-bipy); 158,41 (C-bipy); 156,11 (C-bipy); 151,30-121,79 (C-bipy e C-Ph da dppf); 86,65-71,34 (C-Cp da dppf); 56,20 (CH₂-N de tzdt), 31,46 (CH₂-S de tzdt).

[Ru(mmi)(bipy)(dppf)]PF₆ (M-IMI):

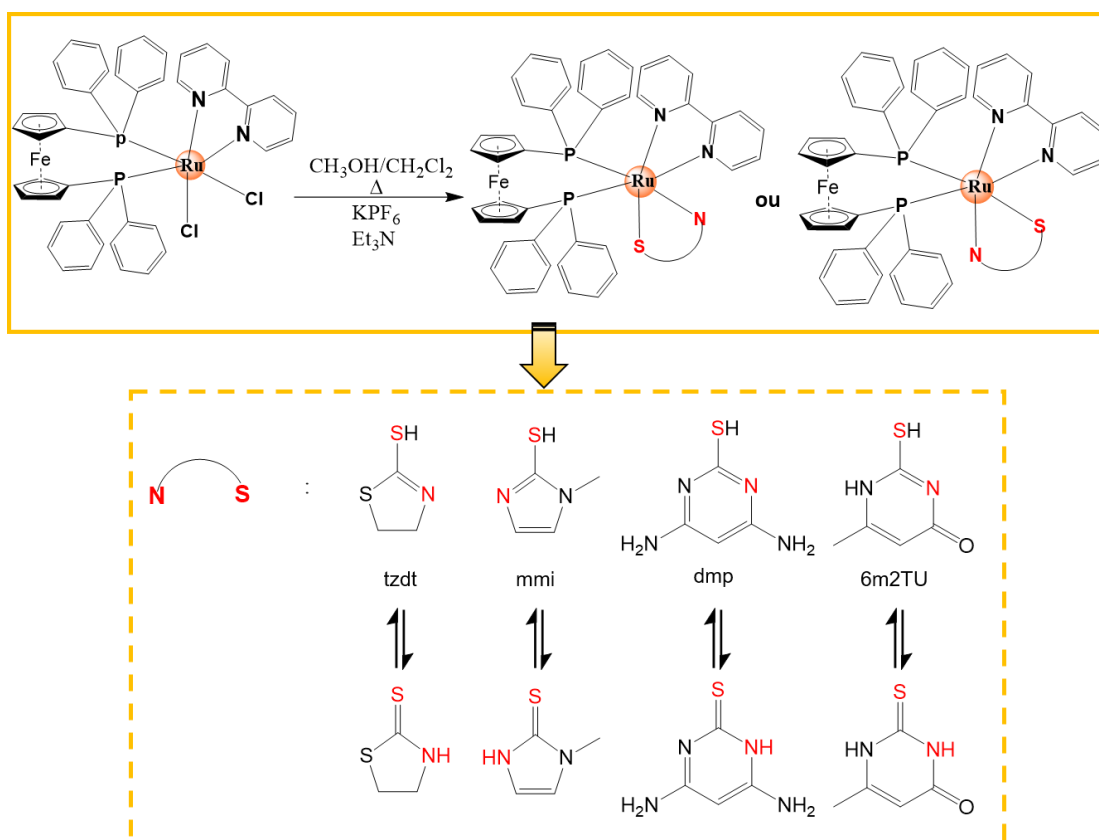
Precipitado amarelo, rendimento de 70%. RMN ¹H (acetona-d₆, 400 MHz, 298K) δ: 9,10 (1H, d, *J* 5,6, bipy); 8,48 (1H, d, *J* 8,1, bipy); 8,43 (1H, d, *J* 8,0, bipy); 8,04 (1H, t, *J* 7,6, bipy); 7,98 (1H, t, *J* 7,6, bipy); 7,56 (2H, t, *J* 8,1, Ph); 7,49 (1H, t, *J* 7,1, Ph); 7,42 (10H, m, bipy e 9H-Ph); 7,13 (9H, m, 8H-Ph e CH-mmi); 7,06 (1H, d, *J* 5,5, bipy); 6,58 (1H, s, CH-mmi); 4,97 (2H, s, Cp-dppf); 4,90 (1H, s, Cp); 4,65 (1H, s, Cp); 4,55 (2H, d, *J* 6,0, Cp); 4,49 (1H, s, Cp); 3,95 (1H, s, Cp); 2,86 (3H, s, CH₃-mmi). RMN ¹³C {¹H} (acetona-d₆, 125,74 MHz, 298 K) δ: 161,46 (C-bipy); 159,57 (CS); 158,62 (C-bipy); 156,28 (C-bipy); 150,86 (C-bipy); 137,00-127,00 (C-bipy e C-Ph); 125,67 (CH-mmi); 123,60-122,07 (C-bipy); 118,90 (CH-mmi); 81,00-70,88 (C-Cp da dppf); 29,30 (CH₃-mmi).

[Ru(dmp)(bipy)(dppf)]PF₆ (DIA):

Precipitado marron, rendimento de 85%. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, 298K) δ: 9,01 (1H, d, *J* 5,4, bipy); 8,63 (2H, d, *J* 8,0, bipy e Ph); 8,36 (1H, d, *J* 7,8, bipy); 8,21 (1H, t, *J* 7,6, bipy); 7,79 (3H, m, bipy e 2H-Ph); 7,65 (1H, t, *J* 7,1, Ph); 7,50 (2H, t, *J* 8,6, Ph); 7,37 (4H, m, bipy e 3H-Ph); 7,20 (4H, m, Ph); 7,03 (5H, m, bipy e 4H-Ph); 6,79 (2H, m, bipy e Ph); 6,50 (2H, t, *J* 8,7, Ph); 5,95 (3H, d, *J* 6,5, Cp e NH₂); 4,89 (1H, s, Cp); 4,68 (1H, s, Cp); 4,56 (1H, s, Cp); 4,49 (1H, s, H-dmp); 4,35 (1H, s, Cp); 4,24 (1H, s, Cp); 4,10 (1H, s, Cp), 3,99 (2H, s, NH₂), 3,31 (1H, s, Cp) . RMN ¹³C {¹H} (DMSO-d₆, 125,74 MHz, 298 K) δ: 182,25 (CS); 161,30 e 161,00 (C-dmp); 159,35 (C-bipy); 156,30 (C-bipy); 154,30 (C-bipy); 148,80-122,00 (C-bipy e C-Ph); 79,40 (CH-dmp); 78,20-70,00 (C-Cp da dppf).

[Ru(6m2TU)(bipy)(dppf)]PF₆ (M-TIU):

Precipitado alaranjado, rendimento de 75%. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, 298K) δ: 11,88 (N-H); 8,95 (1H, d, *J* 5,6, bipy); 8,48 (1H, d, *J* 8,1, bipy); 8,37 (1H, d, *J* 8,1, bipy); 8,33 (1H, d, *J* 5,1, Ph); 8,05 (1H, t, *J* 7,8, bipy); 7,85 (1H, t, *J* 7,8, bipy); 7,73 (2H, t, *J* 8,6, Ph); 7,55 (1H, t, *J* 7,4, Ph); 7,40 (2H, t, *J* 8,7, Ph); 7,25 (9H, m, bipy e 8H-Ph); 7,06 (3H, m, bipy e 2H-Ph); 7,13 (2H, t, *J* 7,1, Ph); 6,79 (2H, t, *J* 8,6, Ph); 6,72 (2H, t, *J* 8,7, bipy); 5,45 (1H, s, Cp); 4,97 (1H, s, CH-6m2TU); 4,77 (1H, s, Cp); 4,70 (2H, s, Cp); 4,44 (1H, s, Cp); 4,42 (1H, s, Cp); 4,07 (1H, s, Cp); 3,88 (1H, s, Cp); 1,70 (3H, s, CH₃-6m2TU). RMN ¹³C {¹H} (DMSO-d₆, 125,74 MHz, 298 K) δ: 177,94 (CS); 166,11 (C=O); 158,90 (C-bipy); 158,40 (C-bipy); 156,43 (C-bipy); 149,31 (C-bipy); 148,97 (C-6m2TU); 137,80-121,68 (C-bipy e C-Ph da dppf); 105,60 (CH-6m2TU); 83,50-71,15 (C-Cp da dppf); 17,30 (CH₃-6m2TU).



ESQUEMA 3.3 - Síntese dos complexos [Ru(tzdt)(bipy)(dppf)]PF₆, [Ru(mmi)(bipy)(dppf)]PF₆, [Ru(dmp)(bipy)(dppf)]PF₆ e [Ru(6m2TU)(bipy)(dppf)]PF₆.

As estruturas químicas dos complexos sintetizados e suas respectivas siglas são apresentadas na Figura 3.1.

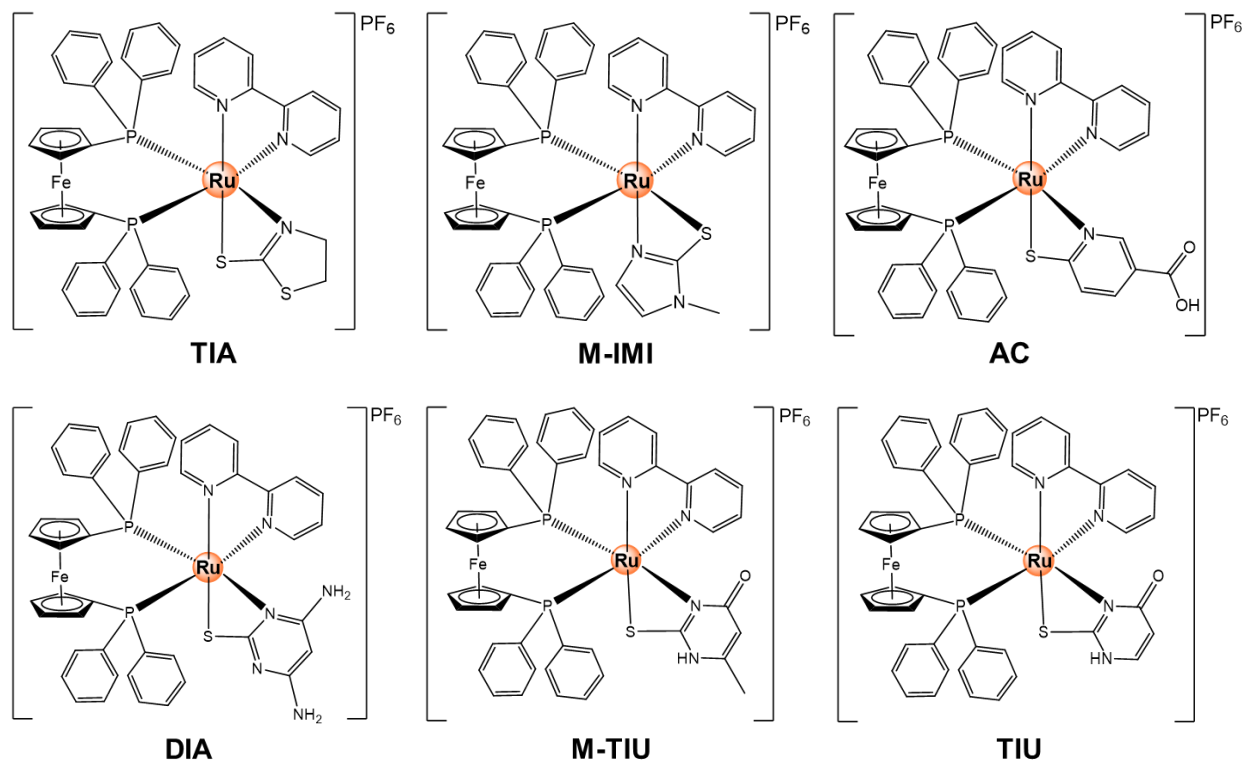


Figura 3.1 – Estruturas químicas e siglas dos complexos de Ru(II) sintetizados.

3.4 - Teste de estabilidade dos complexos em solução

A estabilidade dos complexos foi avaliada em solventes utilizados para os testes biológicos. Duas soluções foram avaliadas, uma com o composto em DMSO e a outra, o composto em uma mistura de solvente contendo DMSO/meio de cultura (80/20%). Espectros de RMN ³¹P{¹H} foram registrados nos tempos 0 (logo após solubilização do complexo), 24 e 48h.

3.5 - Lipofilicidade

O valor de log P foi determinado pelo método shake flask utilizando-se uma fase orgânica, com n-octanol, e uma fase aquosa¹⁰². As alíquotas da solução de cada complexo em DMSO foram adicionadas (1% DMSO no volume final das soluções de n-octanol/água), individualmente, em três microtudos contendo uma mistura de 750 µL de n-octanol e 750 µL de água destilada, que permaneceram sob agitação durante 24 h. Em seguida, as duas fases foram separadas e a concentração dos complexos foram

determinadas nas fases orgânica e aquosa por espectroscopia de absorção UV-visível. O valor de log P foi calculado pela Equação 1:

$$\log P = \log (Co/Ca) \quad (\text{Equação 1})$$

onde, Co e Ca são as concentrações molares do complexo na fase orgânica e na fase aquosa, respectivamente.

A média dos valores de log P, da triplicata de cada complexo, e os valores dos coeficientes de absorvidade molar (ϵ) dos complexos em n-octanol foram obtidos através do gráfico de absorbância verso as concentrações conhecidas dos complexos, usando a Lei de Lambert-Beer.

3.6 - Testes Biológicos, *in vitro*

Os experimentos *in vitro* envolvendo a avaliação das propriedades biológicas dos complexos de rutênio foram desenvolvidos no Laboratório de Genética Molecular e Citogenética (LGMC), sob supervisão da Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira-Lacerda, no Departamento de Ciências Biológicas da UFG. O experimento *in vivo* em modelo CAM, foi desenvolvido no laboratório de pesquisa Experimental e Biotecnológica, sob supervisão do Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis, PUC-Goiás.

3.6.1 Linhagens e Cultura Celular

As linhagens de células tumorais humanas, de mama triplo-negativo (MDA-MB-231) e de pulmão (A549), foram cultivadas em meio de cultura DMEM contendo penicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), estreptomicina (100 mg mL^{-1}), L-glutamina (2 mM) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As linhagens de células tumorais humanas, de mama (MCF-7) e próstata (DU-145), e carcinoma de mama murino (Ehrlich) foram cultivadas em meio de cultura RPMI, suplementado com 10% de SFB e antibióticos. A célula não tumoral de mama humano da linhagem MCF-10A, foi cultivada em meio DMEM/F12, suplementado com 5% de soro de cavalo, fator de crescimento epidermal humano (EGF) (20 ng mL^{-1}), hidrocortisona ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), insulina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 1% de penicilina/estreptomicina.

As células de Ehrlich foram mantidas em cultura após obtenção e quantificação das células presentes no líquido da cavidade peritoneal de camundongos Swiss portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE), após 24 h em cultivo foram realizados os testes *in vitro*.

As linhagens celulares foram mantidas em cultura a 37°C, 5% CO₂ em estufa umidificada, para serem utilizadas em ensaios ou cultivadas em garrafas de cultura.

3.6.2 - Ensaio colorimétrico de citotoxicidade celular (MTT)

Para avaliar o efeito citotóxico dos complexos frente às linhagens celulares tumorais e não tumoral utilizou-se o método colorimétrico do MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium). O princípio deste método foi descrito por Mosman¹⁰³, que consiste em medir a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas.

Para o teste, $1,0 \times 10^5$ células do TAE (célula em suspensão) e $1,0-1,5 \times 10^4$ das demais células (células aderentes) foram semeadas em microplacas de 96 poços. Após 24 h, para as linhagens aderentes, as células foram tratadas em oito concentrações diferentes dos complexos de rutênio dissolvidos em DMSO (1% (v/v) na solução de tratamento), e como fármaco de referência utilizou-se a cisplatina dissolvida em dimetilformamida (DMF, 1% (v/v) na solução de tratamento). No controle negativo, as células foram tratadas somente com DMSO 1% (v/v). Após o tratamento, as células foram deixadas em estufa, a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 h (linhagem MDA-MB-231) e 48 h (todas as linhagens celulares). Ao final do período de incubação, foi adicionado aos poços da placa, 50 µL de MTT na concentração de 1 mg L⁻¹, e após 3 h de incubação com MTT, foram acrescentados 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% diluído em HCl/0,01N ou somente com álcool isopropílico para dissolver os cristais azul de formazan. A absorbância da densidade óptica (DO) da solução foi medida em 545 nm usando espectrofotômetro de microplaca Stat Fax 2100 (Awareness Technology). O valor de IC₅₀ (concentração (µM) que inibe 50% da viabilidade celular) foi determinada por meio da curva dose resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.01 para Windows.

3.6.3 - Análise do ciclo celular

As fases do ciclo celular podem ser caracterizadas por variações no seu conteúdo de DNA, que quando analisado por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo permite quantificar a percentagem de células em cada fase do ciclo.

Para análise do ciclo celular, 3×10^5 de células MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 12 poços, após 24 h de incubação as células foram tratadas com os complexos nas concentrações de $\frac{1}{2} IC_{50}$ e IC_{50} , no controle negativo não foi colocado complexo. Após exposição das células aos complexos, por 48 h, estas foram removidas da placa, centrifugadas e na sequência lavadas com PBS. Ao final da lavagem o sobrenadante foi desprezado, e o “pellet” celular foi incubado com 2 mL de álcool etílico gelado (70%) por 24 h, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ao final da incubação as células foram lavadas novamente com PBS e em seguida incubadas por 15 min em uma solução contendo ribonuclease A (RNase A) 0,05% e iodeto de propídio ($50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). A análise da percentagem de células em fase sub-G1, G0/G1, S e G2/M foi realizada no citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences), através do software ModFit.

3.6.4 - Análise de dano no DNA - Ensaio cometa

O ensaio cometa é um método versátil e sensível para a detecção de danos na fita simples e/ou dupla, do DNA, sendo uma ferramenta importante para avaliar as respostas celulares aos danos no DNA quando expostas ao tratamento¹⁰⁴.

O experimento foi realizado utilizando a versão alcalina do ensaio cometa¹⁰⁵, em que 1×10^5 de células MDA-MB-231 foram plaqueadas na ausência ou presença dos complexos TIA, M-IMI, M-TIU e TIU na concentração da IC_{50} durante 48 h. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS e homogeneizadas com 100 μL de agarose com baixo teor de fusão (0,5%), e então colocadas em lâminas pré-cobertas com agarose padrão (1,5%). Em seguida, as lâminas foram refrigeradas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min e, posteriormente, imersas em solução de lise (2,4 M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Tris, 10% DMSO e 1% Triton-X, pH 10) por 24 h. Após a etapa de lise, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese contendo tampão (NaOH 300mM, EDTA 1mM, pH ~ 13), em corrente de 25V, 300 mA. Na etapa seguinte, as lâminas foram

colocadas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) por 15 min. Após a secagem elas foram então fixadas em etanol 100% por 3 min. As lâminas foram coradas com brometo de etídio ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e analisadas imediatamente após coloração. As lâminas foram preparadas em duplicata e 100 nucleóides foram analisados (50 nucleóides de cada lâmina) usando um microscópio de fluorescência (Leica, Wetzlar, Alemanha) acoplado a um computador. As imagens capturadas foram analisadas usando o *software* CometScore 15 de acordo com a migração dos fragmentos, considerando os seguintes parâmetros: comprimento do cometa, diâmetro da cabeça e comprimento da cauda. A partir desses parâmetros, a classe de dano foi determinada conforme proposto¹⁰⁶, em classe 0, 1, 2, 3 ou 4. Um valor de índice de dano (ID) foi atribuído a cada nucleóide de acordo com a sua classe, a partir da Equação 2: $\text{ID} = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$, onde n = número de nucleóides em cada classe analisada. Dessa forma, o ID para 100 nucleóides, variou de 0 (completamente intacto: 100 nucleóides \times 0) a 400 (com dano máximo: 100 nucleóides \times 4).

3.6.5 - Morfologia Celular

Afim de avaliar a morfologia das células MDA-MB-231 quando expostas aos complexos, foram semeadas 1×10^5 células/poço em placas de 12 poços e mantidas na estufa a 37°C e 5% CO_2 , por 24 h. Após esse período, as células foram tratadas com as concentrações de $\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$ e IC_{50} dos complexos. Com o auxílio de um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS 100) acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam 1SP – 1.3 *Megapixels*) as imagens das células foram capturadas nos períodos de 0, 24 e 48 h. As alterações morfológicas e proliferativas das células foram analisadas a partir das imagens obtidas.

3.6.6 - Detecção de morte celular

3.6.6.1 - Análise morfológica das células por microscopia de fluorescência (HO/PI)

Para detectar o tipo de morte celular através das alterações morfológicas das células, foram semeadas $2,0 \times 10^5$ de células MDA-MB-231 em uma placa de 12 poços. Após 24 h, as células foram tratadas com as concentrações de $\frac{1}{2} IC_{50}$ e IC_{50} dos compostos e novamente incubadas por 48 h. Após o tempo de tratamento, as células foram tripsinizadas e centrifugadas, em seguida suspensas em solução de Hoechst 33342 (HO, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e iodeto de propídio (PI, $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e incubadas a 37°C por 10 minutos na ausência de luz. Essas células coradas com HO/PI foram colocadas em lâminas para serem analisadas no microscópio de fluorescência (Leica, Wetzlar, Alemanha). Um total de 300 células em diferentes campos da lâmina foram contadas e analisadas com o auxílio de um microscópio de fluorescência acoplado a um computador. Cada experimento foi realizado em duplicata. As porcentagens de células apoptóticas (apoptose inicial e tardia) e necróticas foram determinadas a partir do número total de células. As características morfológicas celulares que foram detectadas em microscópio de fluorescência com a dupla marcação HO/PI são representadas na Figura 3.2.

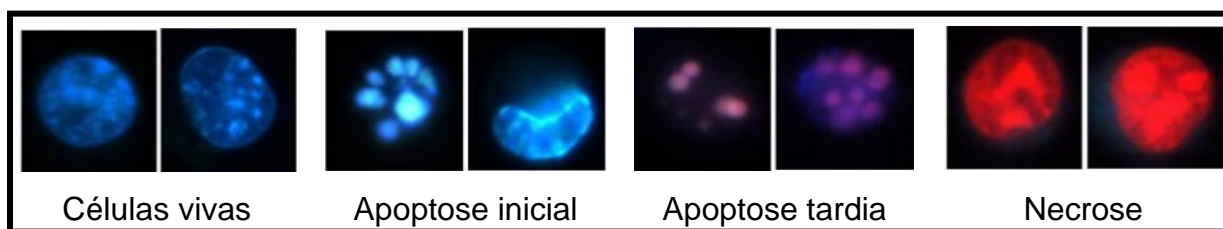


FIGURA 3.2 - Imagens representativas obtidas no microscópio de fluorescência mostram as alterações morfológicas de células MDA-MB-231 detectadas com dupla marcação de Hoechst 33342 (azul) e PI (vermelho).

3.6.6.2 - Ensaio Apoptose (Anexina V-FITC / Iodeto de Propídio)

A detecção de apoptose pela dupla marcação com Anexina V-FITC/Iodeto de Propídio (An/PI) consiste na ligação da anexina V-FITC à fosfatidilserina presente na

superfície externa da membrana celular quando está iniciando o processo apoptótico, e na ligação do iodeto de propídio ao DNA das células no processo final da apoptose ou necrose¹⁰⁷. Para detecção de apoptose foi utilizado o Kit de detecção de apoptose Anexina V/ PI de acordo com as instruções do próprio fabricante.

2×10^5 de células MDA-MB-231 foram semeadas em microplacas de 12 poços e incubadas em estufa umidificada a 37°C e 5% CO₂, por 24 h. Após esse período, as células foram tratadas com os complexos nas concentrações de $\frac{1}{2}$ IC₅₀ e IC₅₀, e nos controles negativos somente células e meio de cultura, por 48 h. Após tratamento, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS. O tampão específico para o teste foi adicionado, e posteriormente foram acrescentados 5µL de Anexina V-FITC e 1 µL de PI. As células foram então incubadas à temperatura ambiente por 15 min, e posteriormente analisadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences). Os dados obtidos foram analisados utilizando o *software* CellQuest.

Na Figura 3.3 tem-se um gráfico representativo mostrando o perfil de distribuição das células em quatro quadrantes de acordo com a marcação de corantes. No primeiro quadrante (Q1) estão as células vivas, as quais não apresentam nenhuma marcação; no segundo quadrante (Q2) as células em apoptose inicial, aquelas com marcação somente para anexina-V (AN+)/(PI-); no terceiro quadrante (Q3) as células em apoptose tardia, aquelas com dupla marcação de Anexina-V e PI (AN+)/(PI+); quarto quadrante (Q4) as células em necrose com marcação somente de PI (AN-)/(PI+).

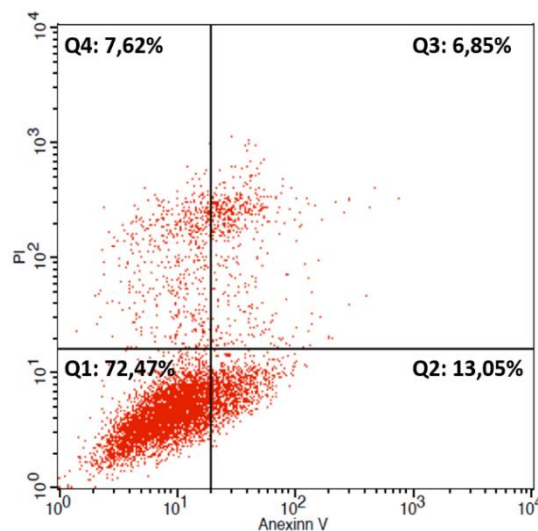


FIGURA 3.3 - Gráfico representativo bidimensional de densidade de FL1/Anexina V/FITC *versus* FL2/PI utilizado para quantificar o percentual de células viáveis, apoptóticas e necróticas.

3.6.7 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial JC-1

A perda do potencial de membrana mitocondrial está relacionada com a morte celular por apoptose, sendo que esse evento ocorre antes da externalização de fosfatidilserina e coincide com a ativação de caspases. O corante catiônico JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbo-cianina), é um marcador fluorescente lipofílico que penetra na organela e emite fluorescência nos comprimentos de onda de 590 nm (luz vermelha) ou 520 nm (luz verde), de acordo com o potencial de membrana mitocondrial interno. Em mitocôndrias funcionais, o JC-1 penetra, acumula no interior desta organela e emite coloração vermelha, ao passo que, mitocôndrias com baixo a médio potencial de atividade da membrana, fluorescem verde¹⁰⁸.

Para avaliar o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), 1×10^5 de células MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 24 poços, posteriormente tratadas com a concentração de IC_{50} dos complexos TIA, M-IMI, M-TIU e AC por 24 h. Após o período de tratamento, as células foram removidas das placas por tripsinização, lavadas com PBS e centrifugadas. Após centrifugação, as células foram incubadas com o corante JC-1 (BD Biosciences) a 37°C no escuro, durante 15 min. As células coradas foram lavadas, ressuspensas em tampão de ensaio e imediatamente analisadas por citometria de fluxo. Os dados obtidos no citômetro de fluxo foram analisados no *software* Cell Quest.

3.6.8 - Detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Para investigação da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) no meio intracelular foi utilizado o 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA, Sigma Aldrich), que é um composto não fluorescente capaz de permear a membrana celular, mas quando em presença de ERO o grupo acetato é clivado formando um composto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF).

Células MDA-MB-231 (5×10^5) foram tratadas com as concentrações de $2 \times IC_{50}$ e IC_{50} obtidas no tratamento de 24 h com os complexos TIA (6,0 μ M e 3,0 μ M) e M-IMI (3,8 μ M e 1,9 μ M), em seguida incubadas por 3 h a 37 °C. No controle positivo foi adicionado H₂O₂ (10 μ M), o qual foi incubado por 30 minutos. Após o tempo de exposição ao tratamento, as células foram incubadas com 10 μ M de H₂DCF-DA em DMEM livre de

soro, por 30 min a 37°C, no escuro. Na sequência, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS gelado por 2 vezes, tripsinizadas, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, e ressuspensas em PBS. A solução de cada amostra foi adicionada em duplicata em uma placa opaca de fundo transparente, e imediatamente analisadas no fluorímetro (fluorimeter Synergy/H1-Biotek) em um comprimento de onda de excitação em 400 nm e emissão em 525 nm. Foram realizados 3 experimentos independentes para cada complexo, sendo determinado os níveis de EROs para cada complexo, a partir da média das intensidades de fluorescência obtidas.

3.6.9 - Ensaio de migração celular

3.6.9.1 - Método de fechamento da risca: *Wound Healing*

O ensaio de *wound healing* é muito utilizado para estudar as características do processo migratório das células, bem como avaliar os compostos que podem inibir a migração celular¹⁰⁹.

As células MDA-MB-231 ($2,0 \times 10^5$) foram semeadas em placas de 12 poços e incubadas em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37°C até a cultura atingir uma confluência de 90-100%. Em seguida, com o auxílio de uma ponteira, de volume máximo 200 µL, e uma régua, foi feita uma risca no centro de cada poço. Cuidadosamente, os poços foram lavados com PBS para remoção de fragmentos celulares e células desaderidas da área riscada. As células foram tratadas com os complexos na concentração de $\frac{1}{2}$ IC₅₀, exceto os controles que receberam apenas meio cultura. Após tratamento, imagens da risca de cada poço, foram capturadas em dois campos diferentes, nos tempos 0 (após tratamento), 24 e 48 h, utilizando um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS 100) acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam 1000-1.3 *Megapixels Live Resolution*). A área de fechamento da risca pela migração celular foi medida através do *software ImageJ*, e a porcentagem de fechamento da risca foi calculada utilizando a Equação 3:

$$\% \text{ Fechamento da risca} = [(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h}) / (A_{t=0h})] \times 100$$

onde, $A_{t=0h}$: medida da área riscada no tempo de 0 h e $A_{t=\Delta h}$: medida da área riscada no tempo de 24 e 48 h.

3.6.9.2 - Método de Câmara de *Boyden*

Neste ensaio foram utilizados insertos com membranas microporosas (8 μ m) de polietileno tereftalato em placas de 24 poços. Inicialmente os insertos foram hidratados com meio de cultura (350 μ L de meio de cultura no poço da placa e 350 μ L no inserto) por 2 h. Após hidratação, as células MDA-MB-231 foram semeadas ($0,5 \times 10^5$) dentro dos insertos contendo 350 μ L de meio sem SFB, e em seguida adicionado os compostos M-IMI (1,0 e 0,5 μ M) e M-TIU (1,70 e 0,85 μ M). Nos poços da placa onde foram imersos os insertos, foi adicionado 750 μ L de meio de cultura com 10% de SFB, o qual atuará como um quimioatraente para induzir a migração celular. No controle positivo o inserto foi preparado sem adição de complexos, e imerso no poço contendo meio de cultura com 10% de SFB. No controle negativo o inserto foi preparado sem adição de complexos e imerso no poço contendo somente meio de cultura. As placas contendo os insertos foram mantidas em estufa umidificada, com 5% de CO₂ a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação as células que não migraram foram removidas do interior dos insertos com auxílio de hastes flexíveis de algodão. As células que conseguiram penetrar e migrar pelos poros foram fixadas em metanol e em seguida coradas com uma solução de azul de toluidina (1%(v/v)) diluído em solução de borato de sódio (1%(v/v)). A membrana do inserto foi recortada e montada em uma lâmina histológica com auxílio de óleo de imersão. Com o auxílio de um microscópio óptico acoplado a uma câmera fotográfica, imagens foram capturadas em cinco campos diferentes da membrana, compreendendo cerca de 80% da superfície analisada. As células em cada um dos campos foram contadas através do *software Image J*.

3.6.10 - Ensaio de sobrevivência clonogênica

Para avaliar a capacidade dos complexos de inibir a formação de colônias e/ou diminuir o tamanho delas, 4×10^2 das células MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 6 poços. Após 24 h, as células foram tratadas (exceto os controles) com

diferentes concentrações dos complexos, em seguida foram incubadas a 37°C e 5% CO₂, por 48 h. Após o período de tratamento, o meio foi removido, as células lavadas cuidadosamente com PBS e posteriormente adicionado o meio de cultura com 10% de FBS. As células foram novamente incubadas na mesma condição por 10 dias. Após esse período de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com uma solução de metanol e ácido acético (3:1 (v/v)) durante cinco minutos e em seguida, coradas com o corante panótico (Newprov). O número de colônias e seu tamanho foram medidos utilizando o *plugin Colony Area* para o programa Image J.

3.7 - Avaliação do potencial anti-angiogênico em modelo CAM, *in vivo*

O modelo de membrana corioalantóide de embrião de galinha (CAM) foi usado para avaliar a atividade anti-angiogênica dos complexos TIA, M-IMI e M-TIU, de acordo com a metodologia descrita por Melo-Reis e colaboradores¹¹⁰. Quarenta ovos de galinha férteis (ovos com o embrião) foram incubados a 37 °C em uma atmosfera umidificada (60-70% de umidade relativa). No quinto dia de incubação, um orifício circular foi aberto na grande extremidade do ovo, a membrana que cobria a CAM foi removida e os ovos foram devolvidos à incubadora. No décimo terceiro dia de incubação, os ovos foram divididos em quatro grupos de tratamento com 10 ovos cada: (1) meio DMEM com DMSO 1% (controle); (2) células MDA-MB-231 (3 x 10⁵ células / CAM); (3) complexo TIA (0,5 µM), (4) complexo M-IMI (0,3 µM) e (5) complexo M-TIU (3,2 µM) previamente preparados em solução com as células MDA-MB-231. 50 µL das soluções de cada grupo foram adicionados em cima da CAM sob condições estéreis e após 72h, a resposta angiogênica foi avaliada. As CAMs foram fixadas em solução de formaldeído durante 5 minutos, cortadas com tesouras curvadas e mantidas em placas de Petri com solução de formaldeído a 10%. A análise e quantificação da rede vascular recém-formada foi realizada através de imagens capturadas das membradas. A porcentagem de áreas de vasos em cada membrana foi determinada usando o *software* GIMP 2.8 e ImageJ 1.49. As imagens foram preparadas para que a saturação da luz e o contraste permitissem uma melhor resolução dos vasos sanguíneos que foram quantificados em pixels correspondentes. O cronograma de cada fase do experimento é apresentado na Figura 3.4.

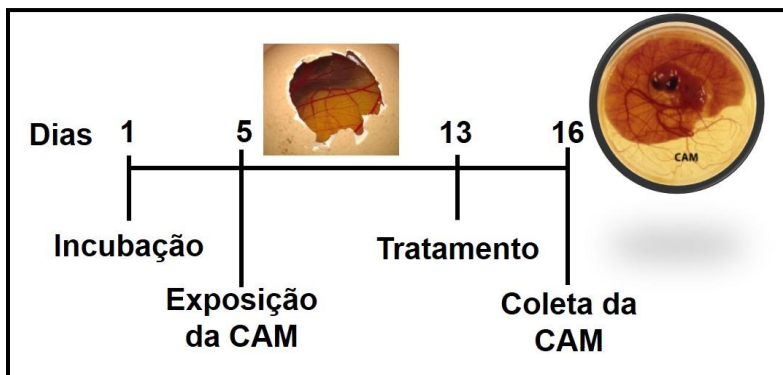


FIGURA 3.4 - Cronograma de cada fase do experimento com o ovo galado, para avaliar o potencial anti-angiogênico dos complexos TIA, M-IMI e M-TIU.

3.7.1 – Análise histopatológica

As membranas foram fixadas por 24h e depois imersas em parafina para análise histopatológica. Cinco CAMs foram então cortadas de blocos de parafina, corados com hematoxilina-eosina (HE) e examinadas em um microscópio óptico (Carl Zeiss Axiovert w, Göttingen, Alemanha) contendo o *software* AxioVision 4.8 (Carl Zeiss). Foram avaliados diferentes parâmetros, dentre eles: integridade da camada epitelial coriônica e alantoide, presença de elementos inflamatórios, neovascularização e hiperemia. Os resultados foram classificados visualmente de acordo com a intensidade e os dados foram transformados em variáveis quantitativas através da atribuição das seguintes pontuações: ausente (0), discreto (1-25%), moderado (26-50%) e acentuado (mais de 50%).

3.8 - Interação com Biomoléculas

3.8.1 - Interação com HSA

3.8.1.1 – Espectroscopia de Fluorescência

O estudo de interação dos complexos com a HSA (albumina do soro humano) foi realizado utilizando espectroscopia de fluorescência. Os complexos foram solubilizados em DMSO, e posteriormente incubados, nas concentrações de 5–50 μ M

com 5% de DMSO no volume final, com a HSA (5 μ M) em tampão Tris-HCl (pH 7,4). Após 5 min de incubação as soluções de complexo e HSA foram adicionadas (em triplicata) na placa preta opaca de 96 poços. Os espectros de fluorescência foram registados nas temperaturas de 298 e 310 K com um comprimento de onda de excitação de 270 nm e de emissão em 305 nm. Os espectros foram registrados utilizando o fluorímetro Synergy / H1-Biotek, acoplado a um computador.

As constantes de extinção de Stern-Volmer (K_{sv}), nas temperaturas de 298 e 310 K, foram calculados usando a Equação 4:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (\text{Equação 4})$$

Onde, F_0 é a intensidade de fluorescência na ausência do supressor, F é a intensidade de fluorescência na presença do supressor e $[Q]$ é a concentração do agente supressor, que neste caso são os complexos, k_q é a constante de velocidade de supressão biomolecular e τ_0 é o tempo de meia vida médio da HSA na ausência do supressor. A constante K_{sv} foi obtida a partir do gráfico plotado de F_0/F versus $[\text{complexo}]$ onde o K_{sv} é o coeficiente angular da equação da reta obtida no gráfico.

A constante de ligação (K_b) entre os complexos e a HSA foi determinada utilizando a Equação 5:

$$\log \frac{(F_0-F)}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad (\text{Equação 5})$$

Onde K_b é a constante de ligação entre o complexo e a HSA, n é o número de sítios de ligação por molécula de HSA e $[Q]$ é a concentração do complexo. A constante K_b e n foram obtidos a partir da reta plotada no gráfico de $\log (F_0-F)/F$ versus $\log [Q]$, onde o K_b é o inverso de log do coeficiente linear da reta e o n o coeficiente angular.

3.8.1.2 - Competição pelo Sítio I da HSA

Para avaliar a interação dos complexos com o sítio I da HSA, conhecido também como FA7, utilizou-se como sonda fluorescente, o dansil-L-arginina. Os

experimentos foram realizados com a adição em diferentes concentrações dos complexos e o fármaco varfarina (0-50 μM) em uma mistura de HSA (5 μM) e dansil-L-arginina (DA, 5 μM) em tampão Tris-HCl (pH = 7,4). A solução de complexo-DA-HSA foi adicionada em triplicata nos poços de uma placa opaca de 96 poços e analisados no fluorímetro (Synergy / H1-Biotek) acoplado a um computador. Após 5 min de incubação, os espectros de fluorescência foram registrados na temperatura de 298 K no comprimento de onda de excitação de 340 nm e emissão na faixa de 370-650 nm.

3.8.1.3 - Efeito da HSA sobre a citotoxicidade

O efeito da HSA na viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231, isoladamente ou em combinação com os complexos, foi avaliado usando a concentração de IC_{50} dos complexos com diferentes concentrações da HSA, nas razões molares de 1:1, 1:3, 1:5 e 1:10. A solução de complexo-HSA foi pré-incubada por 20 min a 37°C antes de realizar o tratamento nas células. As células MDA-MB-231 ($1,5 \times 10^4$) foram semeadas em placa de 96 poços e incubadas por 24 h em estufa umidificada a 37°C e 5% CO_2 . Após o período de incubação a solução de tratamento foi adicionada às células e novamente incubado como descrito anteriormente, por 48 h. Após esse período de tratamento foi adicionado o MTT, e os cristais formados após 3h, foram solubilizados com SDS. A viabilidade celular foi medida e calculada como descrito no item 3.6.2.

3.8.2 - Interação com DNA

3.8.2.1 - Titulação espectroscópica por UV-visível

Para os estudos de interação com o DNA, foi preparado uma solução estoque de CT-DNA (*calf thymus*). Aproximadamente 2 mg de CT-DNA foi solubilizada em 1 mL de tampão Tris-HCl (4,5 mM de Tris HCl, 0,5 mM de Tris base e 50 mM de NaCl) num pH 7,4. A concentração de DNA foi determinada por espectroscopia na região do UV-visível. A partir da absorvidade molar do DNA em 260 nm, $6600 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{L}$, do caminho óptico ($b = 1 \text{ cm}$) e da absorbância, determinou se a concentração do CT-DNA por meio da lei de Lambert-Beer: $A_{260} = \epsilon_{260} \times b \times C$.

As titulações espectroscópicas foram realizadas empregando-se duas cubetas: na cubeta 1 (branco), adicionou-se o tampão tris-HCl e DMSO, e na cubeta 2 foi adicionado o tampão Tris-HCl e a solução do complexo em DMSO. Após sucessivas adições de 20 µL de CT-DNA, solubilizado em tampão Tris-HCl, pH 7,4, em ambas cubetas, registrou-se os espectros a cada adição. A constante de interação (K_b) com o DNA foi determinada pela Equação 6:

$$\frac{[DNA]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\epsilon_a - \epsilon_b)} + \frac{1}{[K_b(\epsilon_a - \epsilon_b)]} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

ϵ_a = é o coeficiente de extinção aparente, que corresponde à razão entre a absorbância medida e a concentração do complexo (observada/ complexo);

ϵ_f = absortividade molar do complexo livre (sem adição de DNA);

ϵ_b = absortividade molar do complexo ligado ao DNA;

K_b = constante de interação entre o complexo e o DNA.

3.8.2.2 - Viscosidade

As medidas de viscosidade foram realizadas em um banho termostatizado a 25 °C, empregando um viscosímetro de Ostwald. A viscosidade da solução de ct-DNA foi medida na presença de quantidades crescentes dos complexos e cloroquina (composto intercalante). As soluções dos complexos foram preparadas em diferentes relações (complexo/DNA) no intervalo de 0-0,2. Os tempos de fluxo da solução de complexo/DNA foram medidos com um cronômetro digital, cada amostra foi medida por cinco vezes, usando as médias destas para os cálculos. Com os dados obtidos foi possível construir um gráfico $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ vs. [complexo]/[biomolécula], onde η é a viscosidade da biomolécula em presença do complexo e η_0 é a viscosidade da biomolécula. Estes valores foram calculados mediante os tempos de fluxo medidos e corrigidos com o tempo de fluxo dos solventes.

3.9 - Inibição da Topoisomerase IB

Os experimentos realizados para avaliar a capacidade dos complexos TIA e M-IMI de inibir a enzima de topoisomerase IB humana (hTopo IB), foram realizados no laboratório de Biologia Molecular da Università Degli Studi di Roma Tor Vergata, Itália, pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Alessandro Desideri.

3.9.1 - Purificação da Topoisomerase IB humana (hTopo IB)

Saccharomyces cerevisiae EKY-3 (ura3-52, his3 Δ 200, leu2 Δ 1, trp1 Δ 63, top1: TRP1, MAT α) foi transformada com o plasmídeo YCpGAL1-e-hTopoIBwt, como descrito na literatura¹¹¹. O plasmídeo expressa a topoisomerase IB humana sob promotor indutível por galactose e contém, no N-terminal, uma sequência FLAG (DYKDDDY) indicado por “e”. Esta sequência é reconhecida pelo anticorpo monoclonal M2 e a sua purificação foi realizada utilizando uma coluna de gel de afinidade anti-FLAG (Sigma-Aldrich). As células transformadas cresceram durante a noite em complemento sintético (SC)-Uracil mais 2% de dextrose. Após diluição 1:100 em (SC)-Uracil mais rafinose a 2%, e incubação por 24 h, as células foram induzidas a produzir Enzima IB com 2% de galactose por 6 h. Após extração da enzima, os extratos foram colocados em uma coluna de gel de afinidade M2 anti-FLA, já equilibrada de acordo com as instruções do fabricante. A hTopo IB foi eluída com a coluna FLAG por competição com cinco volumes de uma solução contendo 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de péptido FLAG em TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, pH 7,4). Foram adicionados 40 % de glicerol em todas as frações recolhidas. Todas as frações foram armazenados a -20 ° C.

3.9.2 - Ensaio de relaxamento do DNA

A atividade enzimática foi monitorada em uma reação com volume total de 30 μL contendo 1 μL de hTopo IB, mais 1 μL de DNA (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) superenovelado pBlueScript KSII (+) e 28 μL do tampão de reação (20 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ BSA acetilado e 150 mM KCl, pH 7,5). A reação foi incubada a

37°C e parada com uma concentração final de 0,5 % SDS, após 30 min ou em cada tempo respectivo. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%) por 18 h a 30 V em tampão TBE (50 mM Tris, 45 mM ácido bórico e 1 mM EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 g/mL), lavados com água destilada e fotografados sob iluminação UV.

O efeito dos complexos TIA e M-IMI na atividade enzimática foi analisado adicionando diferentes concentrações dos compostos de 0,75-300 µM. A análise dose dependente foi realizada adicionando simultaneamente a topoisomerase IB e o plasmídeo superenrolado, ou com 5 min de pré-incubação do composto e hTopo IB antes da adição do DNA (substrato), na presença de composto ou DMSO (controle negativo). A capacidade do ligante livre de interferir na atividade do hTopo IB também foi verificada nas mesmas concentrações dos complexos.

Os experimentos em função do tempo foram realizados com incubação simultânea de compostos ou pré-incubação de composto e enzima ou composto e DNA, durante os tempos indicados. Interação entre o composto-DNA também foi analisada por incubação tanto na presença, quanto na ausência da enzima.

3.9.3 - Cinética de clivagem

O substrato oligonucleotídeo CL14 (5'-GAAAAAAGACTTAG-3') foi radiomarcado com [γ -³²P] ATP na sua extremidade 5'. A cadeia complementar de CP25 (5'-TAAAAATTTTTCTAAGTCTTTTTTC-3') foi fosforilada no seu extremo 5' com ATP não marcado. Ambas as cadeias foram aneladas a um excesso molar de 2 vezes de CP25 em relação a CL14, criando uma cadeia dupla parcial CL14 / CP25, que contém o local de clivagem preferencial da hTopo IB.

A reação de clivagem foi realizada incubando 20 nM de substrato com um excesso de enzima em tampão de reação a 37°C, com DMSO (controle) ou na presença do composto, na concentração escolhida, da análise dose-dependente. 5 min de pré-incubação do composto e enzima, antes da adição de substrato, foram realizadas quando indicado. Em diferentes tempos, 5 µL da mistura de reação foi retirado e parado com 0,5% de SDS. Após a precipitação com etanol, as amostras foram ressuspensas em 6µL de tripsina (1 mg ml⁻¹) e incubadas a 37 °C por 1 h. As amostras foram analisadas

utilizando desnaturação (uréia 7 M / gel de poliacrilamida a 20%) por electroforese em gel, utilizando tampão TBE. Os experimentos foram realizados em triplicata, e um gel representativo é mostrado. A porcentagem de bandas de clivagem foi quantificada pelo *software PhosphorImager e ImageQuant*.

3.9.4 - Cinética de religação

Para avaliar a cinética da religação, utilizou-se o duplex assimétrico CL14 / CP25 (20 nM), preparado como descrito no item 3.9.3. O substrato foi incubado com um excesso de enzima hTopo IB por 30 min, a 37 °C, em tampão de reação (20 mM Tris-HCl a pH 7,5, 0,1 mM Na₂EDTA, 10 mM MgCl₂, 50 µg mL⁻¹ de BSA acetilado e 150 mM KCl). Após a formação do complexo de clivagem, 5 µL de amostra da mistura reacional foi removida e usada como tempo zero. Em seguida, a mistura foi pré-incubada durante 5 min com DMSO ou complexo, seguido pela adição de um excesso molar de 200 vezes do oligonucleotídeo complementar R11 (5'-AGAAAAATTTT-3') ao longo do duplex CL14/CP25. Esta adição permite que a enzima realize a etapa de religação, restaurando um oligonucleotídeo duplex completo, como o produto. Nos pontos indicados no decorrer do tempo, alíquotas de 5 µl foram retiradas, e a reação interrompida com 0,5 % de SDS. Após a precipitação com etanol, as amostras foram ressuspensas em 6 µl de tripsina (1 mg mL⁻¹) e incubado a 37 °C durante 1 h. As amostras foram analisadas por electroforese em gel de poliacrilamida utilizando desnaturação (7 M uréia / 20% poliacrilamida). Os experimentos foram realizados em triplicata. A porcentagem de banda religada foi determinada pelo *software PhosphorImager e ImageQuant*.

Capítulo 4- Resultados e Discussão

4.1 - Síntese e Caracterização

4.1.1 - Síntese dos complexos

A síntese dos novos complexos ocorreu por meio de reações de substituição dos ligantes cloridos do precursor *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppf)] pelos ligantes mercapto N,S doadores (2-mercaptotiazolina, 2-mercapto-1-metilimidazol, 3-ácido carboxílico-6-mercaptopiridina, 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina e 2-tiouracil e 6-metil-2-tiouracil). Os ligantes foram solubilizados em uma mistura de solvente de CH₂Cl₂/CH₃OH (3:1) em um sistema de refluxo, na presença de KPF₆ e para a maioria deles utilizou-se Et₃N (um agente desprotonante⁸⁵).

As sínteses do precursor e dos complexos foram realizadas sob atmosfera de argônio para impedir a oxidação da bifosfina (dppf) e do centro metálico. As mudanças de coloração da solução e insolubilidade do produto em metanol, evidenciaram a formação dos complexos de interesse. Os complexos AC e TIU foram sintetizados sem a utilização de Et₃N, apenas o solvente metanol presente no meio reacional foi suficiente para desprotonar o ligante.

4.1.2 - Caracterização dos complexos

Os compostos sintetizados neste trabalho foram caracterizados por diferentes técnicas convencionais, dentre elas, a análise elementar, condutividade molar, UV-vis, IV, voltametria, RMN ³¹P{¹H}, ¹H e ¹³C{¹H}, COSY (¹H-¹H) e HSQC (¹H-¹³C) e raios X para os complexos que foram obtidos o monocristal.

4.1.2.1 - Análise Elementar e Condutividade Molar

Após a síntese dos complexos, a composição química destes foi determinada por análise elementar das porcentagens de C, H, N e S. Por meio desta

técnica analítica foi possível determinar a fórmula molecular dos compostos e conseqüentemente avaliar a pureza das amostras analisadas. A partir dos dados obtidos na microanálise (Tabela 4.1) foi possível sugerir as estruturas químicas dos compostos, os quais seus valores foram condizentes com as fórmulas químicas propostas. No caso do complexo DIA tem-se a presença de solvente retido na rede cristalina, com duas moléculas de H₂O. O complexo M-TIU com ½ H₂O retida na rede cristalina, a qual foi possível ser observada na estrutura de raios X.

A relação de eletrólitos entre o complexo e o contra-íon foi determinada medindo-se a condutividade molar da solução dos compostos (1 x 10⁻³ mol L⁻¹) em diclorometano (Tabela 4.1), onde os valores obtidos estão dentro da faixa de eletrólitos 1:1 (12-77 S cm² mol⁻¹ em diclorometano)¹¹². Baseando-se nas estruturas propostas para os complexos, os resultados se mostraram de acordo com o esperado, sugerindo a saída de dois cloridos do precursor e a entrada de um ligante aniônico coordenado de forma bidentada N,S.

TABELA 4.1- Dados de análise elementar (CHNS) e condutividade molar dos complexos em CH₂Cl₂.

Análise elementar					Condutividade Molar (S cm ² mol ⁻¹)
Complexos	%C	%H	%N	%S	
[Ru(tzdt)(bipy)(dppf)]PF ₆	51,67 (52,52)	4,08 (3,75)	4,01 (3,91)	6,23 (5,97)	49,10 (1:1)
[Ru(mmi)(bipy)(dppf)]PF ₆	53,41 (53,89)	3,92 (3,86)	5,09 (5,24)	2,91 (3,00)	60,20 (1:1)
[Ru(pyAC)(bipy)(dppf)]PF ₆	53,71 (54,07)	3,54 (3,63)	4,36 (3,78)	2,78 (2,89)	37,80 (1:1)
[Ru(dmp)(bipy)(dppf)]PF ₆ . 2H ₂ O	50,54 (50,80)	3,64 (4,09)	8,17 (7,41)	2,74 (2,83)	29,00 (1:1)
[Ru(6m2TU)(bipy)(dppf)]PF ₆ . ½ H ₂ O	53,07 (53,18)	3,89 (3,83)	4,91 (5,06)	2,68 (2,90)	39,70 (1:1)
[Ru(2TU)(bipy)(dppf)]PF ₆	53,46 (53,15)	3,65 (3,72)	5,42 (5,17)	2,64 (2,96)	30,90 (1:1)

Experimental (calculado)

4.1.2.2 - Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho apresentados neste trabalho foram obtidos em pastilhas de KBr na região entre $4000\text{-}300\text{ cm}^{-1}$ e suas atribuições propostas para os complexos foram baseadas comparando-se com os espectros dos ligantes, complexo precursor e dados da literatura⁹⁴.

Sabe-se que os ligantes tiona heterocíclicos, são caracterizados pelo tautomerismo na forma tiona-tiol, no entanto todos seus derivados monossustituídos de piridinas, pirimidina, tiazol, imidazol e purina se encontram preferencialmente na forma de tiona no seu estado sólido⁸⁵. Os modos vibracionais correspondentes ao grupo tiocarbonila (C=S) são encontrados em números de onda mais baixo e com intensidades menores que o grupo carbonila (C=O), pois se trata de um grupo menos polar com ligação mais fraca entre o carbono e o enxofre¹¹³. Nos espectros dos ligantes mercapto, o grupo C=S está ligado diretamente a um átomo de carbono que está adjacente a um átomo de nitrogênio, ocorrendo um acoplamento entre os modos vibracionais que resultam em várias bandas na região de $1570\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ ¹¹⁴.

Em função do tautomerismo dos ligantes mercapto, encontra-se reportado na literatura uma versatilidade muito grande de coordenação destes ligantes com o metal, e elas aumentam com o aumento de substituintes, como é o caso dos ligantes 2-tiouracil e 6-metil-2-tiourail. Para determinar a forma em que os ligantes estão coordenados ao metal, as técnicas de espectroscopia de absorção na região de infravermelho, RMN e raios X foram de grande importância. Na Figura 4.1 tem-se as possíveis formas de coordenação bidentada do ligante 2-tiouracil com o centro metálico.

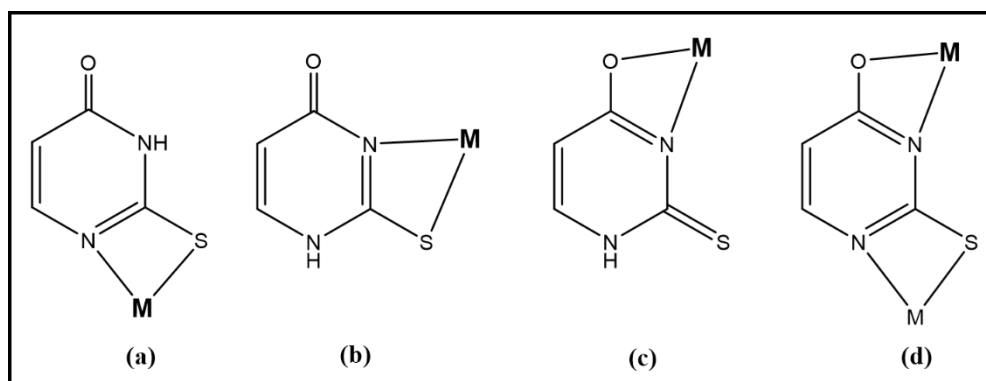


FIGURA 4.1- Diferentes formas de coordenação bidentada do ligante 2-tiouracil com o metal.

Comparando-se o espectro do precursor (linha preta) com os espectros do complexo TIA (Figura 4.2) e os demais complexos no apêndice (Figura A1-A5), é possível observar que os principais modos vibracionais referentes à bifosfina e bipy permanecem praticamente inalterados após substituição dos íons cloridos do precursor. As bandas que surgiram nos espectros dos novos complexos são atribuídas aos ligantes derivados de tionas heterocíclicas e ao contra-íon PF_6^- .

Nos espectros dos complexos sintetizados (linha vermelha) têm-se bandas de média e baixa intensidade na região de $3100\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ referentes aos estiramentos C-H do grupo fenila da dppf e da bipy; na região de $1400\text{-}990\text{ cm}^{-1}$, que são atribuídas às deformações angulares da ligação C-H no plano, e entre 990 e 600 cm^{-1} tem-se as bandas de deformações angulares fora do plano dos estiramentos C-H dos anéis aromáticos da fosfina e da bipy. Bandas de forte intensidade na região de $1631\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ são características dos estiramentos vibracionais de C=N e C=C dos ligantes mercapto, dppf e bipy^{86,87,115,116}. As bandas de alta intensidade em torno de 840 cm^{-1} e 557 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos vibracionais do contra-íon PF_6^- , confirmando sua presença nos complexos. Uma banda forte observada em 1517 cm^{-1} no espectro do ligante livre, referente a C-N. Após coordenação essa banda é deslocada para 1530 cm^{-1} , o que indica a predominância da forma tautomérica N=C-SH, em que o complexo é formado.

Importante destacar a ausência de banda na região de $3400\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ correspondentes ao estiramento N-H nos espectros dos complexos TIA, M-IMI, DIA e AC, e também a ausência da banda referente ao modo vibracional $\nu\text{S-H}$ na região de $2600\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ ¹¹³. Essas observações indicam que os ligantes N,S doadores, estão coordenados ao centro metálico Ru(II) na forma aniônica. Uma banda de vibração forte em torno de 697 cm^{-1} correspondente ao estiramento C-S^{117,118} e outra em 1435 cm^{-1} do estiramento C=N^{117,118}, indicam a coordenação do ligante na forma tiolato, onde o enxofre exocíclico se encontra aniônico e o anel heterocíclico na forma $-\text{C}=\text{N}-$.

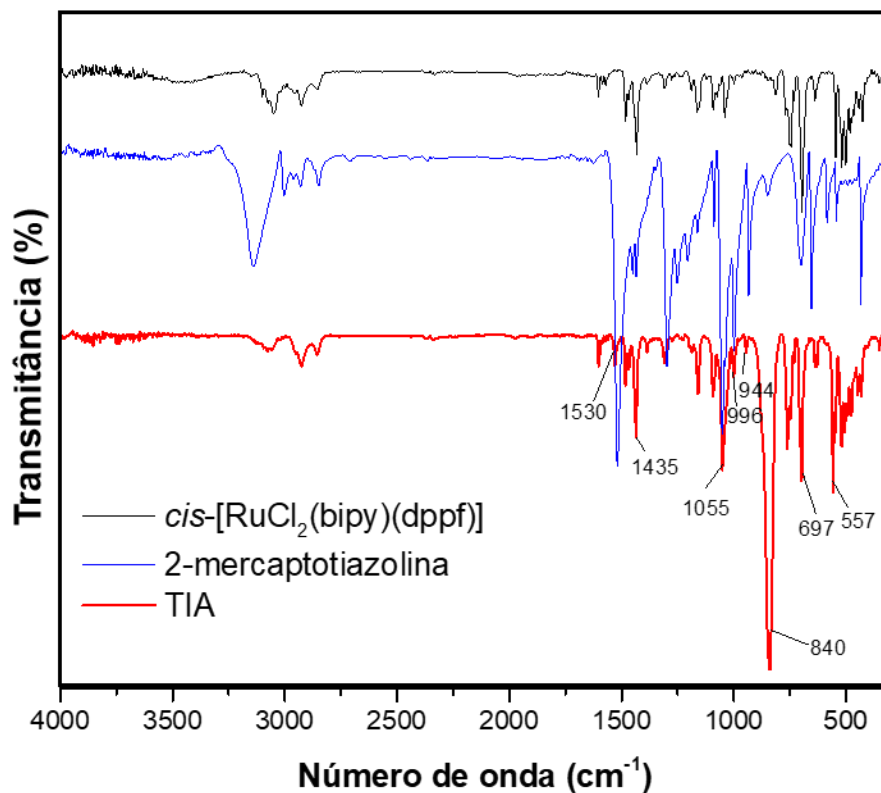


FIGURA 4.2 - Espectros de absorção na região do infravermelho do precursor (—), ligante livre 2-mercaptotiazolina (—) e do complexo TIA (—), em pastilha de KBr.

As principais tentativas de atribuição das frequências vibracionais, obtidas nos espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos, são mostradas na Tabela 4.2.

TABELA 4.2 – Tentativas de atribuição dos principais modos vibracionais dos complexos de fórmula geral [Ru(NS)(bipy)(dppf)]PF₆.

Atribuições	Número de onda (cm ⁻¹)					
	TIA	M-IMI	AC	DIA	M-TIU	TIU
vN-H	--	--	--	3505f; 3402f	3341m	3351m
vC-H	3058f	3054f	3058f	3054f	3056f	3057f
v _{as} C-H(φ)	2926f	2928f	2923f	2927f	2923f	2924f
v _s C-H(φ)	2856f	2854f	2853f	2854f	2855f	2855f
vC=O	--	--	1716m	--	1663F	1662F
vC=N (bipy)	1601m	1603m	1603f	1604f	1603f	1603f
vC-C(φ)	1587f	1585f	1586F	1578m	1587f	1587f
δC-H + vC-N	1530m	1526f	1540f	1542m	1528m	1517m
vC=C(φ) (dppf)	1481f	1480m	1481f	1480f	1481f	1482f
vC=C(φ) (dppf)	1467f	1469f	1468f	1465f	1469f	1471f
vC=N	1435m	1435m	1434m	1435m	1434m	1434m
vN-CH ₃	--	1396f	--	--	--	--
βC-H(φ)	1307f	1309f	1309f	1309f	1309f	1309f
vC-OH	--	--	1386f	--	--	--
vC-S	1197f	1283f	1257f	1241m	1263F	1266F
δC-H (Cp)	1038f	1039f	1039f	1039f	1041f	1038f
v anel	1000f	1000f	1000f	1000f	1000f	1000f
v PF ₆	840F	841F	843F	843F	843F	844F
δC-H(φ) (bipy)	761m	764f	765m	764f	762m	763m
δC-H(φ)	748f	748f	747m	747f	751m	747m
vC-S	697F	699F	699F	696F	697F	697F
PF ₆	557F	557F	557F	557F	557F	557F
vFe-Cp	547m	547m	545m	545m	547m	547m
vP-C(φ)	519m	520m	519F	519m	519F	519F

F= forte; m= média; f= fraca.

Nos espectros dos complexos M-TIU e TIU (apêndice A4 e A5) é evidenciado a coordenação bidentada pelos sítios N,S, pois o estiramento correspondente ao $\nu\text{C=O}$ dos complexos M-TIU e TIU se encontra em 1663 cm^{-1} , o que está muito próximo do estiramento $\nu\text{C=O}$ dos ligantes livres, em torno de 1670 cm^{-1} . Caso o oxigênio estivesse envolvido na coordenação, o grupo C=O teria sua ligação enfraquecida, com um caráter de ligação simples, o que alteraria significativamente a posição da banda do estiramento $\nu\text{C=O}$ no espectro, o que não foi observado. Também foi possível evidenciar a coordenação dos ligantes na forma aniônica, devido a ausência da banda referente ao modo vibracional $\nu\text{S-H}^{113}$.

As bandas referentes aos estiramentos de Ru-N e Ru-S na região de $300\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ ⁸⁶, não foram possíveis de serem identificadas devido à sobreposição das bandas do precursor com as do ligante nessa região.

4.1.2.3 - Espectroscopia eletrônica de absorção na região UV-visível (UV-vis)

Os espectros eletrônicos dos complexos sintetizados apresentam um perfil espectral semelhante entre si, uma vez que se trata do mesmo precursor. Levando-se em conta as características eletrônicas dos ligantes e do centro metálico, envolvidas nestes complexos, pode-se prever algumas transições eletrônicas. As fosfinas apresentam orbitais d vazios de baixa energia, sendo previsível a transição de transferência de carga do metal-ligante quando coordenada ao centro metálico de baixo estado de oxidação. Na estrutura química dos ligantes bifosfinícos e bipyridínicos têm-se duplas conjugadas alternadas que aumentam a energia de transição $\pi \rightarrow \pi^*$ gerando bandas de transição intraligantes, com absorção na região ultravioleta.

Na Figura 4.3 tem-se o espectro de absorção eletrônica no UV-vis do complexo TIA ($1,00\text{--}4,82 \times 10^{-5}\text{ M}$) em CH_2Cl_2 , com bandas de absorção eletrônica em 302 e 438 nm. Analisando os espectros de todos os complexos (Figura 4.4 e Figura A6-A10), é possível observar na região ultravioleta, uma banda entre 290 e 302 nm referente às transições intraligantes IL ($\pi \rightarrow \pi^*$) da bipy, dppf e ligantes mercapto (N,S doadores). Uma banda na região visível (400-440 nm), caracterizada pela transferência de carga do metal Ru ($d\pi$) para o ligante (π^*) (MLCT), que se encontra sobreposta com a

transição d-d do átomo de Fe da bifosfina (dppf)¹¹⁹⁻¹²¹. As principais atribuições das transições eletrônicas referentes às bandas de absorção observadas nos espectros de UV-vis dos complexos e seus valores de ϵ (absortividade molar) são mostradas na Tabela 4.3.

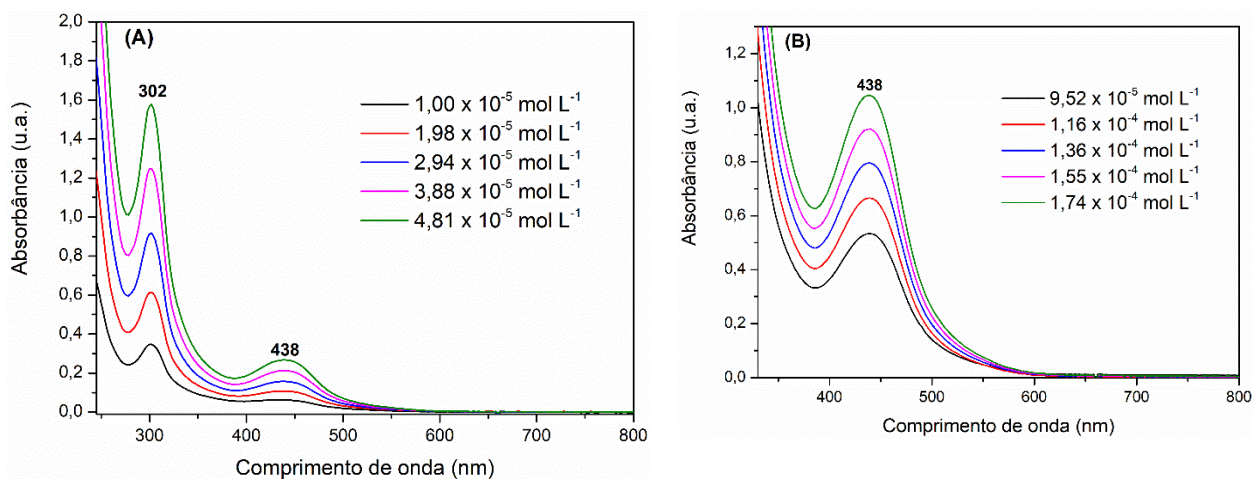


FIGURA 4.3 - Espectros de absorção na região UV-visível do complexo TIA em CH_2Cl_2 . (A) $\epsilon_{302\text{nm}} = 3,12 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e (B) $\epsilon_{438\text{nm}} = 5,94 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

TABELA 4.3 - Principais atribuições das transições eletrônicas referentes as bandas encontradas nos espectros de absorção na região UV-visível dos complexos.

Complexo	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$) bipy, dppf, C=S		IL + d-d + TCML	
	λ (nm)	ϵ ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	λ (nm)	ϵ ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
TIA	302	$3,12 \times 10^4$	438	$5,94 \times 10^3$
M-IMI	298	$2,58 \times 10^4$	452	$3,96 \times 10^3$
AC	292	$2,97 \times 10^4$	400	$8,82 \times 10^3$
DIA	300	$2,69 \times 10^4$	442	$5,26 \times 10^3$
M-TIU	302	$2,36 \times 10^4$	430	$4,41 \times 10^3$
TIU	298	$2,26 \times 10^4$	420	$4,72 \times 10^3$

4.1.2.4 - Estudo Eletroquímico

As técnicas eletroquímicas permitem avaliar a energia necessária, na forma de potencial, para promover a oxidação ou redução de determinada espécie química em solução. Em compostos de coordenação essa energia fornece informações adicionais sobre as propriedades receptoras e doadoras dos ligantes, às quais estão intimamente ligados à densidade eletrônica nas camadas de valência do metal¹²². O comportamento eletroquímico dos compostos sintetizados foi estudado usando as técnicas de voltametria cíclica (VC) e a voltametria de pulso diferencial (VPD).

Todos os complexos sintetizados são bimetálicos Ru/Fe (II), logo tem-se em seus voltamogramas de VC e VPD dois processos de oxidação referentes aos pares RuII/RuIII e FeII/FeIII. Para atribuição dos processos a cada metal foi necessário realizar uma eletrólise dos complexos em uma solução de PTBA 0,1 mol L⁻¹ em dimetilformamida, aplicando um potencial de 1100 mV durante 3 h. O produto da eletrólise foi caracterizado por técnicas analíticas para identificação do metal Fe (III). Em solução de NH₄SCN a cor da solução fica vermelha com a presença de Fe (III), devido à formação do composto [Fe(SCN)₆]³⁻. Em outro teste, com K₄[Fe(CN)₆], a solução torna-se azul com a formação do composto KFe[Fe(CN)₆]. Como a solução do complexo é alaranjada, o segundo teste foi mais adequado, pois permitiu observar a mudança de coloração da solução com maior clareza, sendo possível identificar o processo correspondente ao par redox FeII/FeIII.

Na caracterização dos processos observados nos voltamogramas cíclicos dos complexos (Tabela 4.4), foi evidenciada, a presença de Fe(III) no primeiro potencial para todos os complexos da série, sendo assim o processo em menor potencial atribuído ao par redox FeII/III, o E_{pa} se encontra na faixa de 834–1024 mV, e o outro, em maior potencial, referente ao processo do par redox RuII/III, em E_{pa} na faixa de 1300–1500 mV. Na Figura 4.4, podem ser observados os voltamogramas de VC e VPD do complexo TIA, com potencial de oxidação em 966 mV (FeII/FeIII) e 1508 mV (RuII/III). Os voltamogramas de VC e VPD dos demais complexos podem ser encontrados no apêndice (Figuras A11-A15).

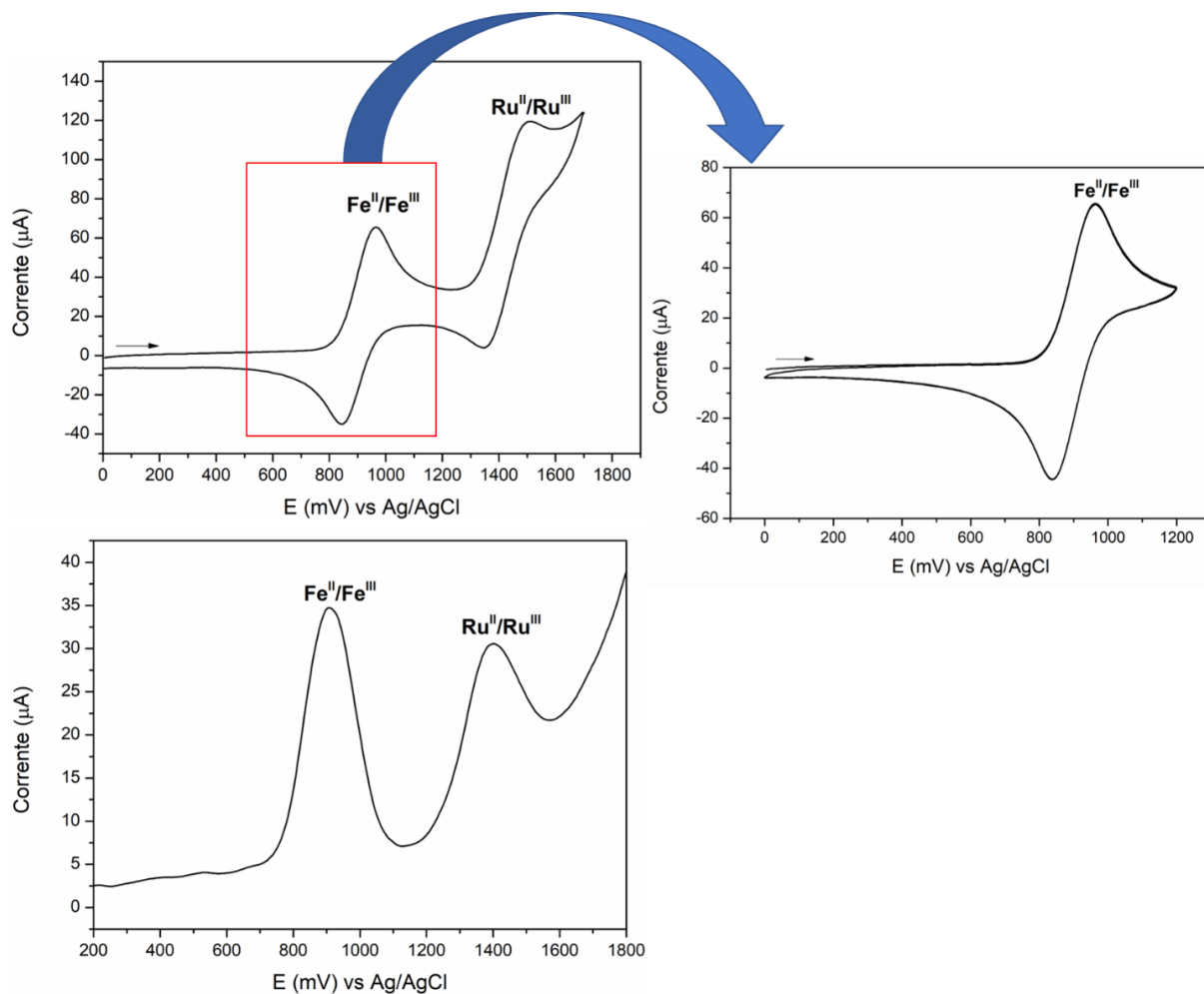


FIGURA 4.4 - Voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial de oxidação do complexo $[Ru(tzdt)(bipy)(dppf)] PF_6$ (TIA) em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PTBA em CH_2Cl_2 à 100 mV / s .

Tabela 4.4 - Potenciais dos voltamogramas cíclicos dos complexos em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PTBA em CH_2Cl_2 à 100 mV / s .

Complexos	Fe ^{II} /Fe ^{III}				Ru ^{II} /Ru ^{III}			
	E_{pa}	E_{pc}	$E_{1/2}$	$ I_{pa}/I_{pc} $	E_{pa}	E_{pc}	$E_{1/2}$	$ I_{pa}/I_{pc} $
Precursor	1032	908	970	0,99	685	557	621	1,35
TIA	966	844	905	1,10	1508	1350	1429	1,15
M-IMI	973	871	922	1,13	1247	---	---	---
AC	960	834	897	1,05	1380	1249	1314	1,05
DIA	998	851	924	1,07	1425	1255	1340	1,10
M-TIU	958	824	891	1,10	1455	1313	1384	1,11
TIU	979	816	897	1,30	1505	1294	1399	1,40

Observa-se (Tabela 4.4) que os processos referentes ao RuII/III e FeII/III trocam de posição em relação ao complexo precursor. No precursor *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppf)] os processos reversíveis em E_{pa}= 685 e 1032 mV são referentes aos pares redox RuII/III e FeII/III¹²³, respectivamente, já os complexos contendo os ligantes mercapto, os processos de menor potencial são atribuídos ao par FeII/III. Esse fato pode estar relacionado com a substituição dos dois cloridos (σ e π doador) pelos ligantes N,S, que são σ doadores e π retores, como os ligantes coordenam diretamente ao centro metálico Ru, seu potencial de oxidação fica mais sensível com a variação do ligante. Dessa forma, a entrada do ligante π receptor, diminui a densidade eletrônica do centro metálico, tornando o potencial de oxidação do Ru mais alto. Além disso, o aumento dos potenciais para os dois processos com a coordenação do ligante pode ser atribuído à maior estabilidade que a coordenação do ligante N,S confere ao composto.

Comparando-se os valores de E_{pa} dos complexos, observa-se um menor valor para o complexo M-IMI, o que pode ser justificado pela presença do grupo metila no ligante mercapto, o qual irá doar elétrons tornando o ligante mais básico, com o centro metálico mais rico em densidade eletrônica, a sua oxidação é facilitada com menor valor de potencial.

4.1.2.5 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A técnica de RMN oferece informações sobre o número de átomos magneticamente distintos do núcleo estudado, assim como o ambiente químico de cada tipo. Neste trabalho foram estudados os núcleos de ³¹P, ¹H e ¹³C.

4.1.2.5.1 – Caracterização dos complexos por RMN ³¹P{¹H}

O RMN ³¹P {¹H} foi utilizado para caracterização dos complexos, bem como para acompanhar as sínteses e a estabilidade química dos compostos em solução. O espectro de RMN ³¹P{¹H} do complexo precursor *cis*-[RuCl₂(bipy)(dppf)] em CH₂Cl₂, como já descrito na literatura¹²³, apresenta um sistema de spin AX com dois dubletes, em δ 42,15 e δ 36,50, e uma constante de acoplamento ²J_{P-P} = 30,70 Hz, evidenciando sua

isomeria *cis*.

Os espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ obtidos para os complexos sintetizados apresentam dois dubletes, indicando a inequivalência magnética dos átomos de fósforo da bifosfina. A coordenação dos ligantes foi evidenciada com o deslocamento químico dos sinais da bifosfina para regiões de maiores frequências, quando comparado ao precursor (Tabela 4.5). Isso ocorre devido à substituição dos ligantes cloridos presentes no precursor pelos ligantes doadores N,S, que promovem uma desblindagem dos átomos de fósforo mais eficientemente, ou seja, os fósforos se encontram mais desprotegidos. Dessa forma todos os compostos apresentaram ligantes coordenados de forma bidentada pelos átomos doadores N,S dos ligantes mercapto, o que também foi possível ser evidenciado nos espectros de absorção na região de infravermelho. Além disso também foi possível identificar em todos os espectros, um hepteto em δ -144 correspondente ao átomo de fósforo do contra-íon PF_6^- .

Na Figura 4.5 é mostrado o espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo TIA em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$, de sistema spin AX, com dois dubletes em δ 52,58 e δ 45,76, e um hepteto de δ -144, com uma constante de acoplamento $^2J_{\text{P-P}} = 34,50$ Hz. Os espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos demais complexos são mostrados no apêndice (Figuras A16–A20).

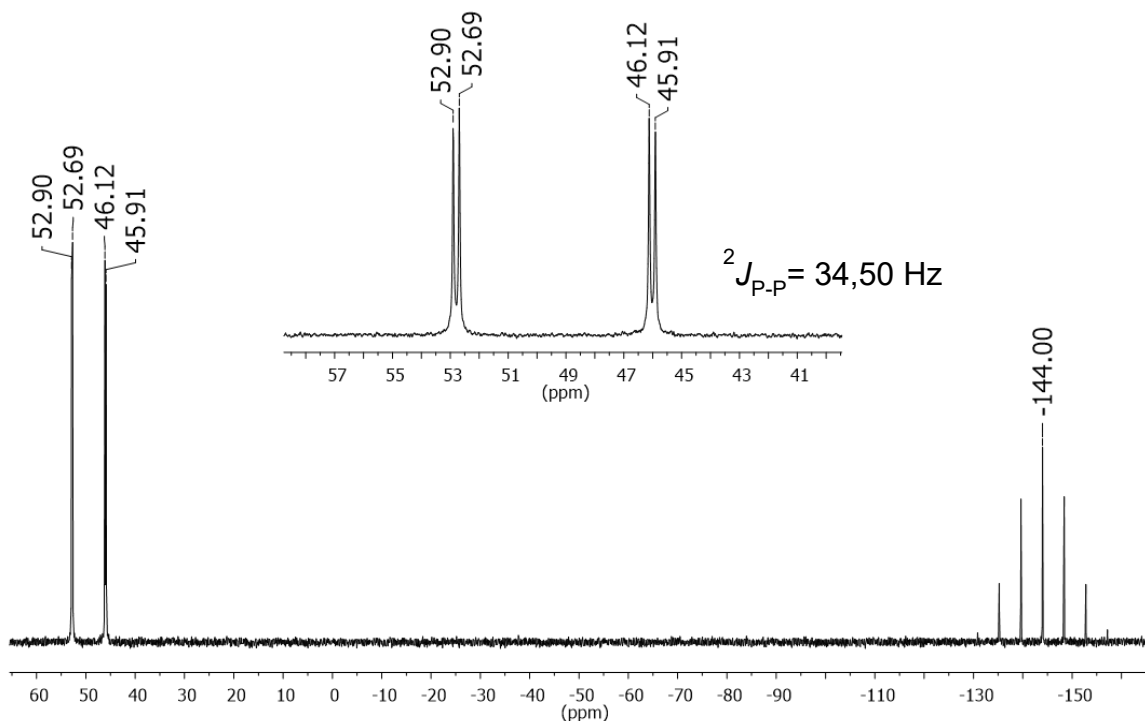


FIGURA 4.5 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo TIA, em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

TABELA 4.5 - Deslocamentos químicos (δ) e constante de acoplamento dos átomos de fósforos da bifosfina (${}^2J_{P-P}$) obtidos no RMN ${}^{31}P\{^1H\}$ em CH_2Cl_2/D_2O .

Complexos	δ	${}^2J_{P-P}$ (Hz)
cis-[RuCl₂(bipy)(dppf)]	42,15 e 36,50	30,70
TIA	52,79 e 46,02	34,50
	47,31 e 40,02*	24,40
M-IMI	45,20 e 41,44	24,20
	46,34 e 44,74*	30,40
AC	50,19 e 43,90	34,50
DIA	49,85 e 45,89	34,30
M-TIU	50,38 e 44,09	33,00
	48,84 e 46,02*	34,60
TIU	49,88 e 44,51	33,00
	50,11 e 46,78*	34,60

*Isômero em menor proporção no meio reacional.

A espectroscopia de RMN ${}^{31}P\{^1H\}$ foi uma técnica muito importante para determinar as condições ideais das sínteses de cada complexo, como o tempo de reação, a utilização de agente desprotonante, o solvente ideal e identificação de misturas de compostos ou isômeros em solução. Para a maioria dos complexos utilizou-se a trietilamina para a desprotonação dos ligantes, exceto para os complexos AC e TIU, pois a adição de trietilamina gerava várias espécies em meio reacional, com o aparecimento de vários sinais no espectro de RMN. Possivelmente essa adição promove a desprotonação de mais de um átomo, o que aumenta os pontos de coordenação dos ligantes mercapto desses complexos. Dessa forma, a desprotonação do ligante pyAC foi possível no meio reacional, onde a mistura de solvente diclorometano/metanol ou diclorometano/etanol foram suficientes para desprotonar o ligante e obter apenas um produto.

As reações de síntese dos complexos M-IMI, M-TIU e TIU apresentaram isômeros em solução, que foi identificado pela presença de quatro dubletes no RMN ${}^{31}P\{^1H\}$ (Tabela 4.5), seus espectros estão no apêndice (Figura A21–A23). Essas

misturas são decorrentes de isômeros de ligação em solução, variando o átomo do ligante mercapto que se encontra *trans* à fosfina, sendo um isômero com o nitrogênio *trans* à fosfina e o outro com o enxofre *trans* à fosfina. No entanto, foi possível separar um dos isômeros dos complexos M-IMI e M-TIU, por diferença de solubilidade, com a precipitação de apenas um produto em metanol, que foi possível ser evidenciado no espectro RMN³¹P{¹H} com somente dois dubletes. Já o complexo TIU, a presença de isômeros foi evitada com a redução do tempo de reação, sendo duas horas de reação o tempo suficiente para obtenção de apenas um produto.

4.1.2.5.2 – Caracterização dos ligantes e complexos por RMN ¹H e ¹³C{¹H}

Os ligantes mercapto foram caracterizados por RMN ¹H e ¹³C{¹H} em acetona-d₆ ou DMSO-d₆, e seus espectros obtidos são mostrados no apêndice (Figura A24-A31). Os deslocamentos químicos referentes aos átomos de hidrogênio e carbono dos ligantes 3 e 4, em DMSO-d₆, foram obtidos de caracterizações feitas anteriormente em outro trabalho do grupo de pesquisa⁶⁸. As estruturas químicas dos ligantes, com identificação dos átomos de hidrogênios e carbonos, são mostradas na Figura 4.6, e os valores do deslocamento químico correspondente a cada átomo de hidrogênio e carbono estão listados nas Tabelas 4.6 e 4.7, respectivamente.

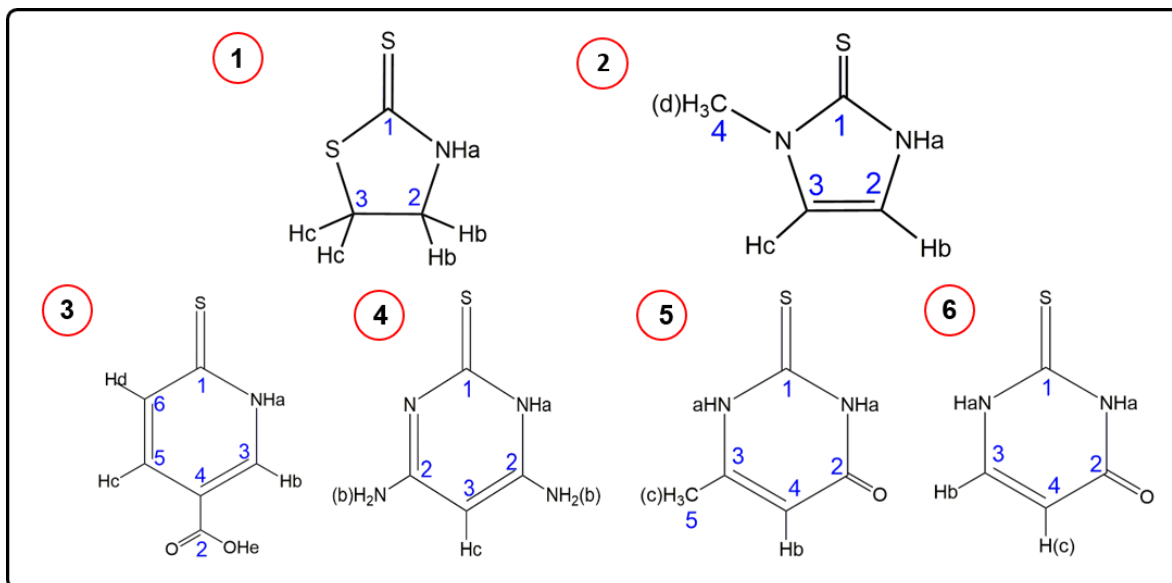


FIGURA 4.6 – Estruturas químicas dos ligantes mercapto. (1) 2-mercaptotiazolina, (2) 2-mercapto-1-metilimidazol, (3) 3-ácido carboxílico-6-mercaptopiridina, (4) 4,6-diamino-2-mercaptopirimidina, (5) 6-metil-2-tiouracil, (6) 2-tiouracil.

TABELA 4.6 - Deslocamentos químicos dos sinais referentes aos átomos de hidrogênio dos ligantes mercapto.

Ligantes	δ				
	Ha	Hb	Hc	Hd	He
1	8,87	4,02	3,61	-	-
2	11,13	6,88	6,99	3,52	-
3	13,76	8,04	7,70	7,31	3,57
4	12,70	6,73	5,30	-	-
5	12,28	5,69	2,07	-	-
6	12,38	7,40	5,81	-	-

TABELA 4.7 - Deslocamentos químicos dos sinais referentes aos átomos de carbono dos ligantes mercapto.

Ligantes	δ					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
1	201,63	52,25	34,10	-	-	
2	164,07	120,00	114,34	34,23	-	
3	181,30	164,80	140,50	135,30	132,90	116,00
4	177,80	177,70	74,50	-	-	-
5	175,78	160,99	153,11	103,64	-	
6	175,98	161,03	142,07	105,24	-	

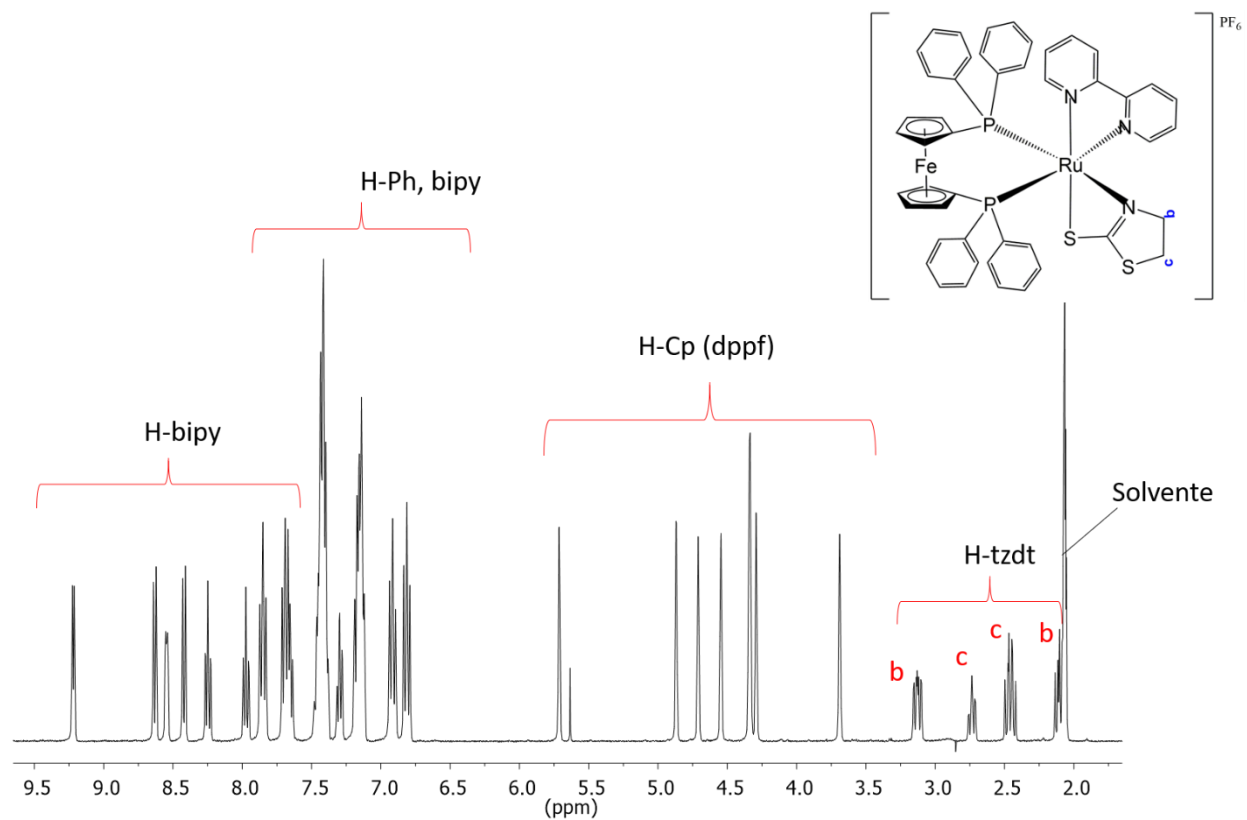
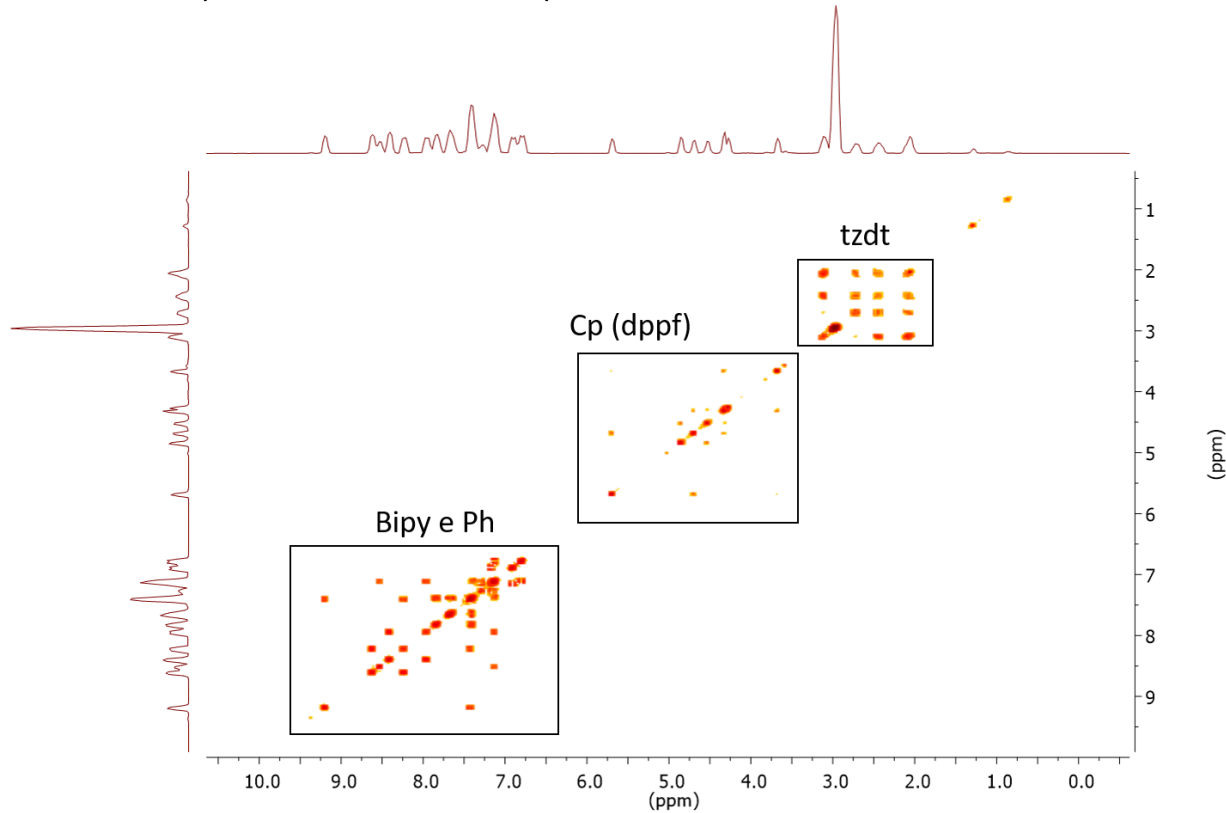
Em solução pode ser encontrado duas formas tautoméricas (tiona e tiol) do ligante mercapto. Assim, para fazer uma atribuição consistente do átomo de hidrogênio ligado aos átomos de enxofre ou nitrogênio, a coexistência dos dois tautômeros precisa ser considerada. No espectro de RMN ^1H , o próton ligado ao átomo de nitrogênio é observado como um singleto em 10,1 ppm, quando o próton está ligado ao átomo de enxofre, o sinal observado no RMN ^1H é em 3,30 ppm¹¹⁸. Nos espectros de RMN ^1H dos ligantes mercapto é observado o sinal de N-H, predominando a forma tiona em solução. A análise dos espectros de RMN obtidos para os complexos permitiram confirmar a presença dos ligantes mercapto na esfera de coordenação do metal, bem como a desprotonação do átomo de nitrogênio (NHa) dos ligantes ao se coordenarem, pois não é observado o sinal de ressonância referente a este hidrogênio nos espectros de RMN

^1H dos complexos. Portanto, a coordenação desses ligantes ao centro metálico Ru (II) foi na forma desprotonada.

A caracterização dos complexos necessitou de diferentes técnicas de RMN para melhores atribuições dos sinais, tais como, RMN ^1H , COSY (^1H - ^1H), ^{13}C { ^1H }, DEPT-135 e HSQC (^1H - ^{13}C). As análises dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram desafiadoras, pois se tratavam de espectros com um grande número de sinais sobrepostos em uma mesma região, os quais são atribuídos aos átomos de hidrogênio dos anéis da bifosfina e bipyridina, sendo assim, as técnicas bidimensionais foram importantes para melhorar a compreensão e atribuições dos sinais.

Nos espectros de RMN ^1H dos complexos sintetizados é possível distinguir dois conjuntos de sinais, em regiões diferentes. Em região de alta frequência δ 6,50–9,22 tem-se o conjunto de sinais dos hidrogênios aromáticos das fenilas da bifosfina, bipyridina e de alguns ligantes mercapto; em δ 3,69–5,95 tem-se o conjunto de sinais referentes aos hidrogênios ligados aos anéis de ciclopentadienil da dppf.

O complexo TIA exibiu sinais no espectro de RMN ^1H (Figura 4.7) referentes aos hidrogênios aromáticos da bifosfina e bipyridina, e também os quatro hidrogênios do ligante 2-mercaptotiazolina (tzdt). Para este complexo tem-se quatro multipletes em δ 2,11, 2,46, 2,73 e 3,13, referentes aos hidrogênios de dois grupos metileno do ligante tzdt. Os oito hidrogênios dos anéis de ciclopentadienil são atribuídos a sete sinais, onde se tem um multiplete em δ 4,33 que integra para 2H, e seis singletes integrando para 1H cada, em δ 3,69, 4,29, 4,55, 4,71, 4,86 e 5,71. Os hidrogênios aromáticos da bipyridina se encontram na região de δ 6,81–9,22, distribuídos em dubletes e tripletes com valores de constante acoplamento e integrais condizentes aos hidrogênios esperados. Os hidrogênios dos grupos fenilas da dppf são encontrados na região de δ 6,81–7,85 e apresentaram integrais condizentes ao número de hidrogênios esperados. Para este complexo os sinais de hidrogênio do ligante tzdt não estavam em região de maior concentração de sinais, o que facilitou na identificação deles. No entanto as atribuições de todos os sinais foram mais bem esclarecidas quando analisado o mapa de contorno da correlação H-H, COSY (^1H - ^1H). No mapa de contorno de COSY (^1H - ^1H) (Figura 4.8) foi possível identificar o acoplamento entre os átomos de hidrogênios vizinhos, que foram analisadas dentro da faixa de deslocamentos químicos correspondentes aos conjuntos de sinais identificados nos espectros.

FIGURA 4.7 - Espectro de RMN ^1H do complexo TIA, em acetona- d_6 .FIGURA 4.8 - Mapa de contorno de COSY (^1H - ^1H), obtido para o complexo TIA, em acetona- d_6 .

Nos espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos compostos sintetizados foram encontradas regiões muito complexas, com um grande número de sinais sobrepostos, de difícil distinção, o que ocorre em função do grande número de carbonos aromáticos presentes nas estruturas dos complexos, que apresentam deslocamentos químicos muito próximos. Portanto, as atribuições dos conjuntos de sinais dos átomos de carbono e hidrogênio referente a cada complexo e ligante mercapto foram realizadas a partir da análise do mapa de contorno da correlação entre os núcleos de ^1H e ^{13}C , HSQC (^1H - ^{13}C), onde foi possível identificar as correlações de ligações simples hidrogênio-carbono.

Na Figura 4.9 é mostrado o espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo TIA, no qual foram identificados os deslocamentos químicos dos átomos de carbono do ligante. Em uma análise combinada com o mapa de contorno de HSQC (^1H - ^{13}C), foi possível fazer as atribuições dos átomos de carbono dos ligantes. No mapa de contorno de HSQC (^1H - ^{13}C) (Figura 4.10), estão identificadas as regiões correspondentes de cada ligante do complexo. Em região de menor frequência δ 57–30, estão localizados os átomos de carbono do grupo metileno do ligante tzdt, sendo o sinal em δ 56,20 referente ao $\text{CH}_2\text{-N}$ e o sinal em δ 31,46, referente ao $\text{CH}_2\text{-S}$. Os dois grupos metilenos, também foram identificados no espectro DPT-135 (Figura 4.11), em que os sinais de CH_2 se diferem dos demais com o sinal negativo. A identificação desses carbonos na estrutura do complexo analisado, indicam a coordenação do ligante tzdt ao centro metálico.

Na região em que se tem um grande número de sinais (δ 121–159), foram identificados os carbonos que acoplam com os hidrogênios aromáticos da bipyridina e fenilas da dppf. Os carbonos (C-H) dos anéis de ciclopentadienil da dppf (Cp-dppf), foram atribuídos aos sinais que se encontram na região de δ 79–71.

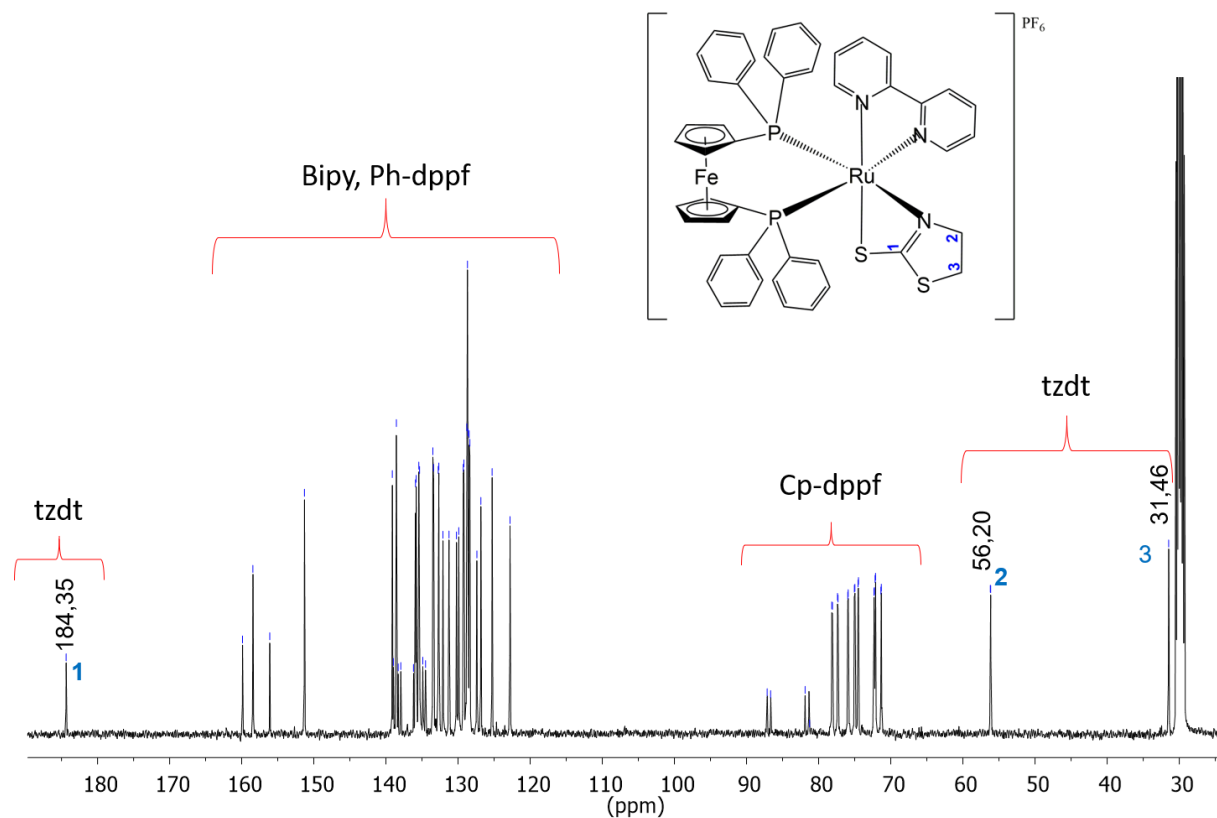


FIGURA 4.9 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo TIA, em acetona- d_6 .

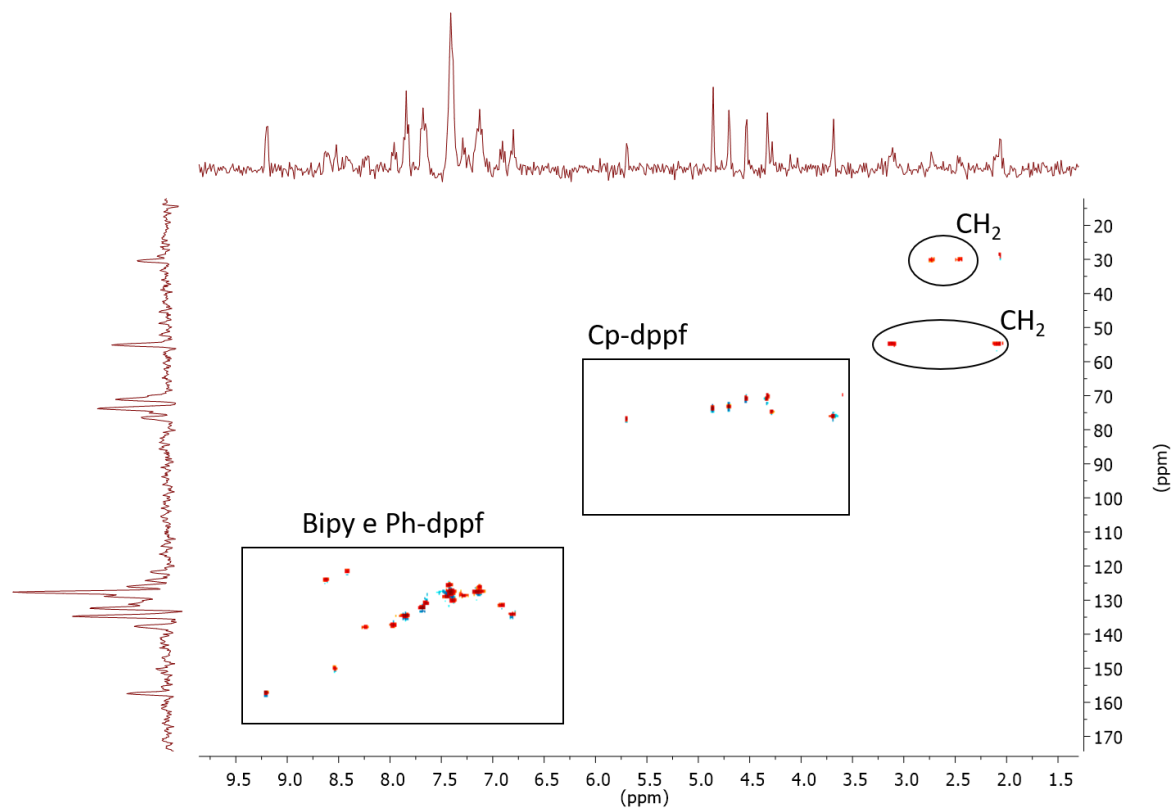


FIGURA 4.10 - Mapa de contorno de HSQC (^1H - ^{13}C) do complexo TIA, em acetona- d_6 .

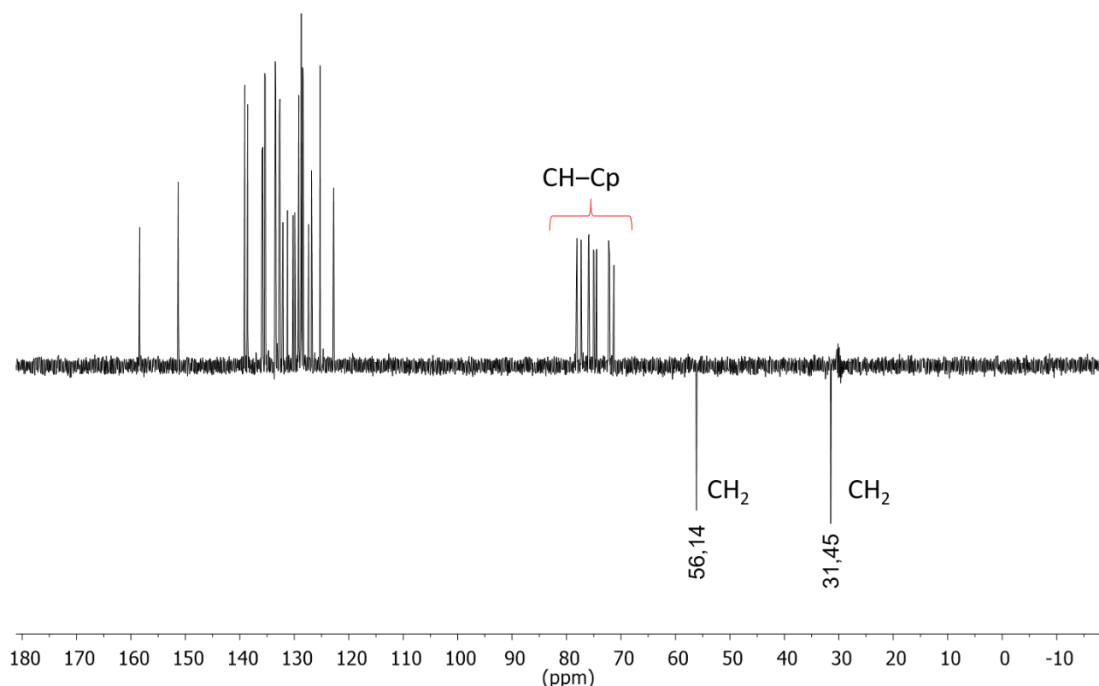


FIGURA 4.11 - Espectro de DEPT-135 do complexo TIA, em acetona- d_6 .

A identificação dos sinais referentes aos carbonos quaternários foi realizada comparando-se o espectro de $\text{RMN}^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, com mapa de contorno de COSY ($^1\text{H}-^1\text{H}$) ou com o espectro de DEPT-135, pois os sinais desses carbonos vão estar presentes somente no espectro de $\text{RMN}^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$. O carbono quaternário do ligante tzdt pôde ser atribuído com maior clareza, pois se encontrava em uma região mais desblindada e distante dos outros sinais, sendo assim o sinal em δ 184,35 é referente ao carbono C-S do ligante tzdt. Os sinais localizados na região de δ 160-156 foram atribuídos aos carbonos quaternários da bipyridina. Os dois carbonos quaternários de Cp-dppf foram atribuídos aos sinais em δ 86,65 e δ 82,42. Já os deslocamentos químicos referentes aos carbonos quaternários das fenilas, não foram possíveis de serem atribuídos, devido à sobreposição dos sinais.

Os espectros de RMN^1H e $\text{RMN}^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, e os mapas de contornos de COSY ($^1\text{H}-^1\text{H}$) e HSQC ($^1\text{H}-^{13}\text{C}$) dos outros complexos da série se encontram no apêndice (Figura A32–A51). As identificações dos sinais referentes a cada ligante da esfera de coordenação dos complexos podem ser visualizadas nas figuras dos seus respectivos espectros.

4.1.2.6 –Difração de raios X

A difração de raios X é uma técnica importante para a caracterização estrutural de compostos químicos, pois fornece com precisão a sua estrutura tridimensional. Neste trabalho foram determinadas as estruturas cristalinas dos compostos TIA, AC, M-TIU e TIU, as quais são apresentadas na Figura 4.12, onde as moléculas de solvente e do contra-íon foram omitidas para melhor visualização da estrutura. O complexo TIA cristalizou em um sistema ortorrômbico, de grupo espacial $P-1$, e monoclinico, de grupo espacial $P2_{1/n}$ (M-TIU e AC) e $P2_1$ (TIU).

Os monocristais obtidos para os complexos TIA, AC, M-TIU e TIU confirmaram as estruturas propostas por outras técnicas, sendo estruturas de geometria octaédrica distorcida, formada pelo ligante N,S coordenado na forma bidentada ao centro metálico, com o átomo de nitrogênio em posição *trans* ao átomo de fósforo e o átomo de enxofre *trans* ao átomo de nitrogênio da bipyridina. Os dados cristalográficos e de refinamento das estruturas TIA, AC, M-TIU e TIU são apresentados no apêndice (Tabela A1).

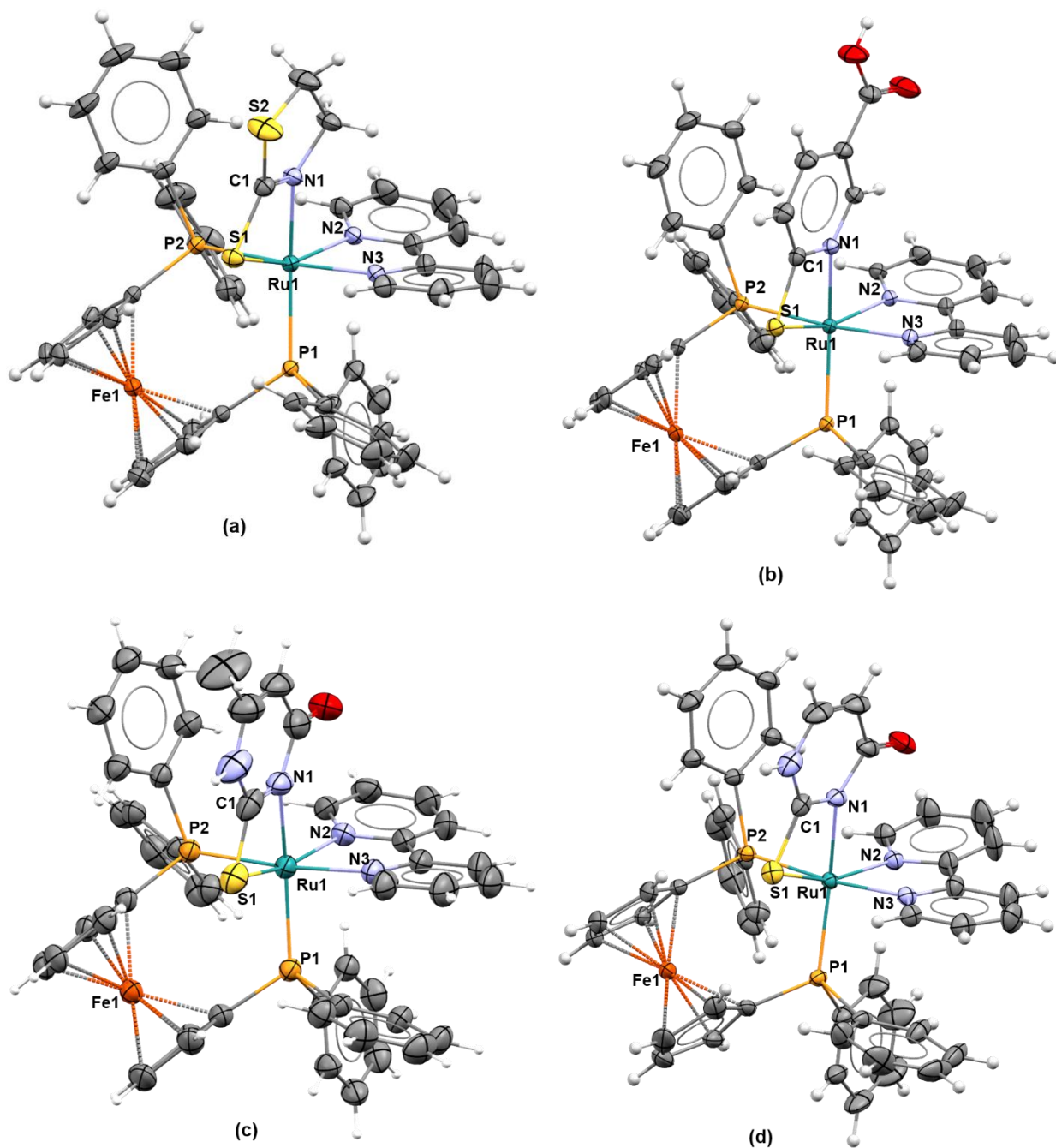


FIGURA 4.12 - Estruturas cristalinas dos complexos (a) TIA, (b) AC, (c) M-TIU e (d) TIU, com elipsoides de 30% de probabilidade. As moléculas de solvente de cristalização e o contraíon PF_6^- foram omitidas.

Os principais comprimentos e ângulos de ligação estão resumidos na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Principais comprimentos e ângulos de ligação obtidos nas estruturas de raios x dos complexos TIA, AC, M-TIU e TIU.

	Distâncias (Å) / Ângulos (°)			
	TIA	AC	MTIU	TIU
Ru-P ₁	2,3414(9)	2,3413(8)	2,3187(9)	2,3489(11)
Ru-P ₂	2,3248(9)	2,3328(8)	2,3380(9)	2,3167(11)
Ru-N ₁	2,115(3)	2,105(3)	2,158(3)	2,164(4)
Ru-N ₂	2,111(3)	2,128(3)	2,110(3)	2,109(4)
Ru-N ₃	2,140(2)	2,126(3)	2,130(3)	2,123(4)
Ru-S ₁	2,4616(9)	2,4142(8)	2,4158(11)	2,4118(12)
C ₁ -S ₁	1,719(3)	1,724(3)	1,662(5)	1,717(6)
P ₁ -Ru-P ₂	95,54(3)	96,42(3)	96,52(3)	95,57(4)
N ₁ -Ru-S ₁	66,59(7)	67,73(8)	66,81(11)	66,79(12)

Os valores de distancias e ângulos de ligação para os complexos estão de acordo com os dados apresentados na literatura para outros complexos de Ru (II) bifosfínico^{121,124,125}. Os altos valores de ângulo de ligação da dppf P–Ru–P (95,54–96,52°), assim como os baixos valores dos ângulos S–Ru–N (66,58–67,73°) para os complexos tipo [Ru(NS)(bipy)(dppf)]PF₆ levam à distorções das estruturas octaédricas.

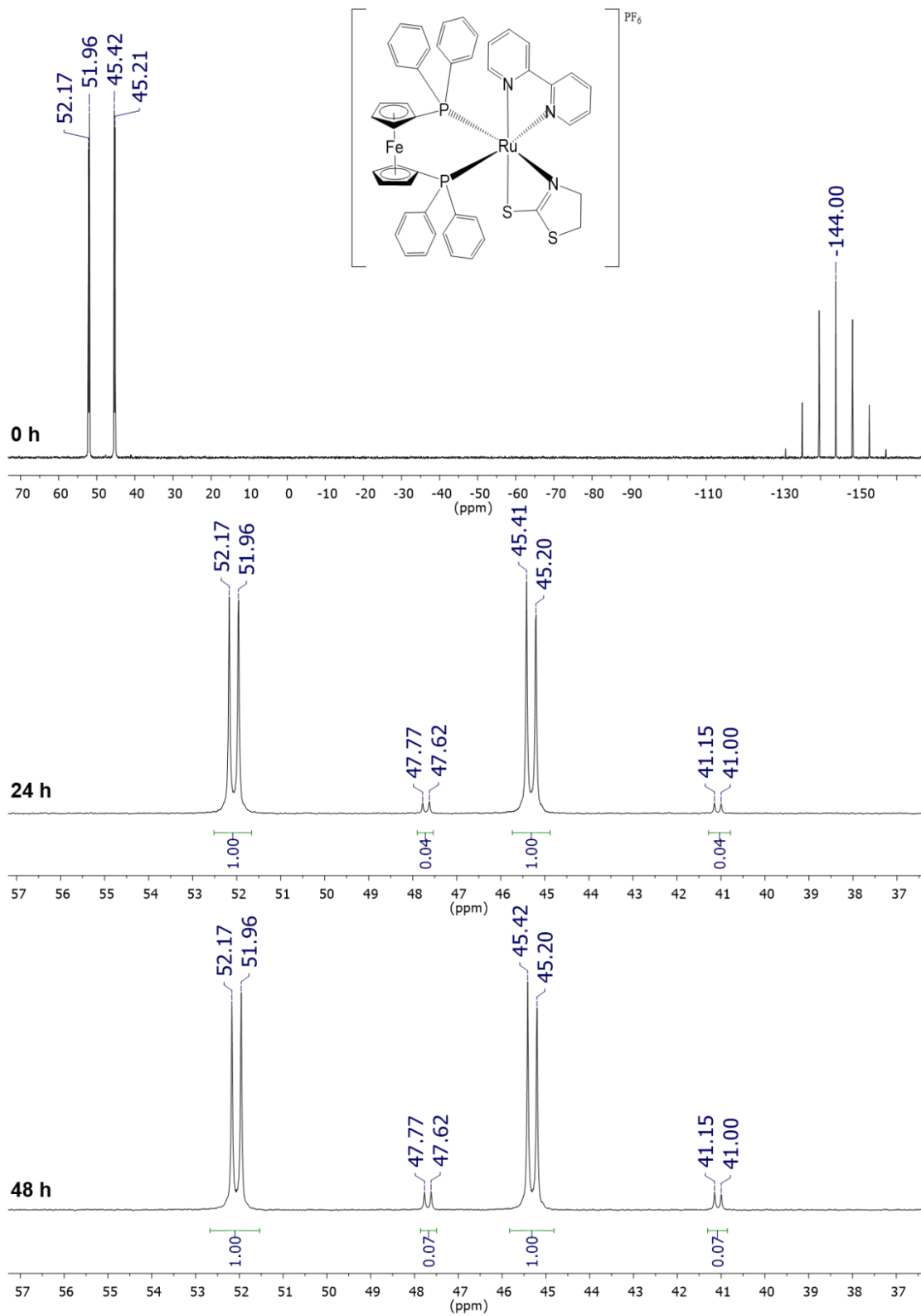
As distâncias do tiona (C=S) são maiores para os complexos que o ligante livre (1,68 Å)⁸⁵ e menores que a forma tiol (C–S) de 1,81 Å⁸⁵, indicando uma diminuição do caráter de dupla ligação, como resultado da coordenação ao centro metálico.

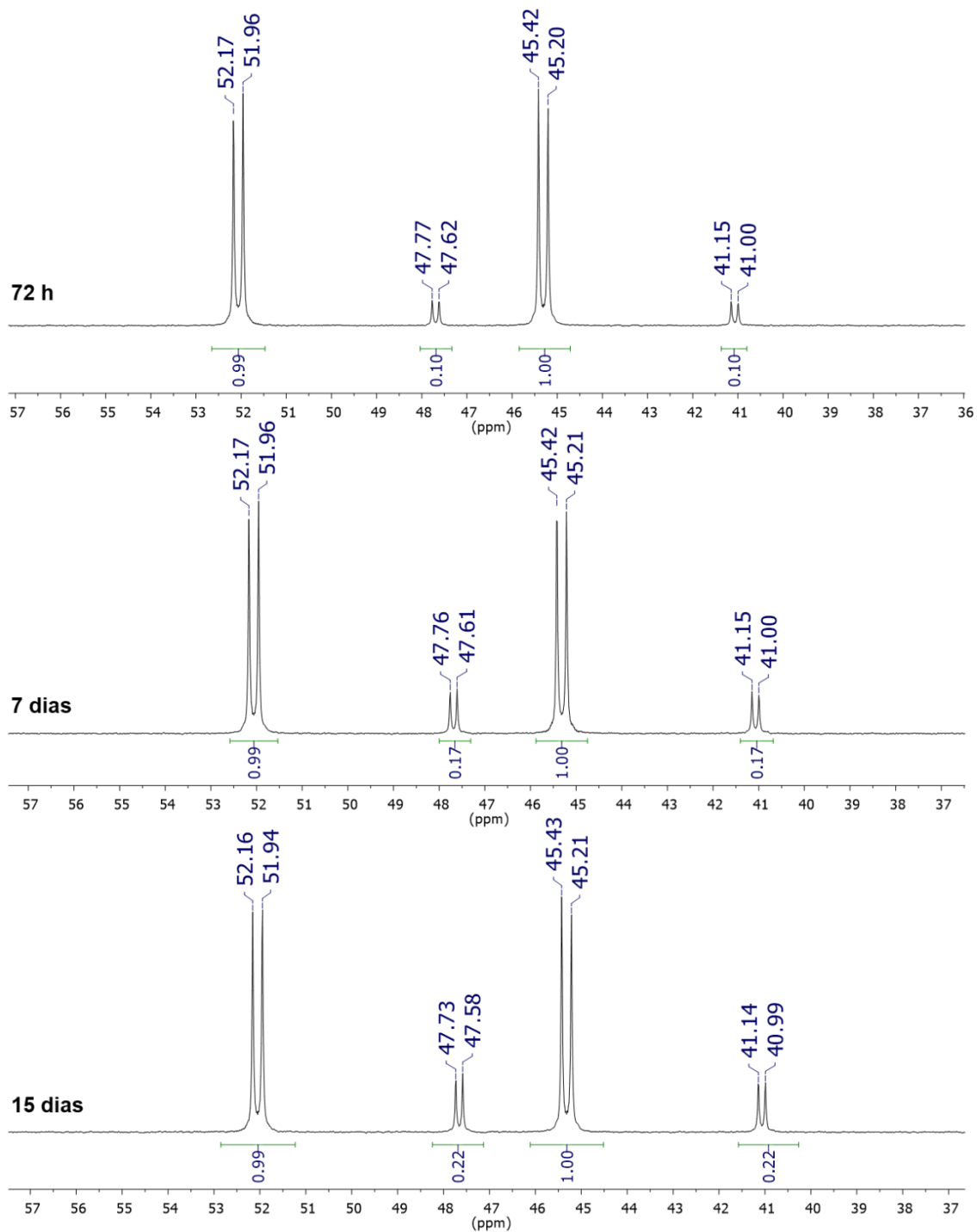
4.1.2.7 –Estabilidade dos complexos em solução

A estabilidade dos complexos foi avaliada em soluções que foram utilizadas para a realização dos testes biológicos. Primeiramente foi monitorada por RMN ³¹P{¹H} a estabilidade dos complexos em DMSO, o qual foi utilizado para solubilizar os complexos. Se tratando de um solvente coordenante, a possibilidade de coordenação foi cogitada e então investigada. O tempo de estudo de estabilidade foi baseado no tempo de tratamento nas células, sendo registrados espectros nos tempos de 0, 24 e 48 h. A

estabilidade dos complexos também foi avaliada em DMSO/meio de cultura (20/80%(v/v)), uma vez que o meio de cultura foi utilizado nos experimentos *in vitro*.

Os complexos com os ligantes mercapto de cinco membros, como o tzdt e mmi, foram instáveis em DMSO, sendo observado o aparecimento de dois dubletes diferentes no espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (Figura 4.13) para o complexo TIA em 47,7 e 41,1 ppm, quando comparado as intensidades dos sinais referentes ao complexo inicial com a espécie formada no período de 48 h, notou-se que havia 93% do produto inicial, mostrando que a espécie do complexo inicial está presente em maior proporção, sendo esta, a majoritária e responsável pela potencial atividade observada nos ensaios *in vitro*. A fim de verificar se essa isomerização estava ocorrendo de fato, devido a pequena porcentagem do isômero observado em 48 h, a solução do complexo foi monitorada por um período maior, o que foi evidenciado o aumento do isômero em solução para 22%, em 15 dias. Portanto, o complexo TIA está mesmo isomerizando lentamente em DMSO. Para o complexo M-IMI foi observado o aparecimento de dois dubletes diferentes do complexo inicial, em 45,8 e 45,1 ppm, no tempo 0 h, permanecendo 75% da espécie inicial em 48 h (Figura 4.14). Comparando-se os complexos TIA e M-IMI, é possível observar uma velocidade de isomerização mais rápida para o complexo M-IMI. Os sinais referentes aos dois dubletes formados em solução foram atribuídos aos isômeros dos complexos e não a coordenação do solvente DMSO, pois esses mesmos sinais foram identificados no meio reacional em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$.





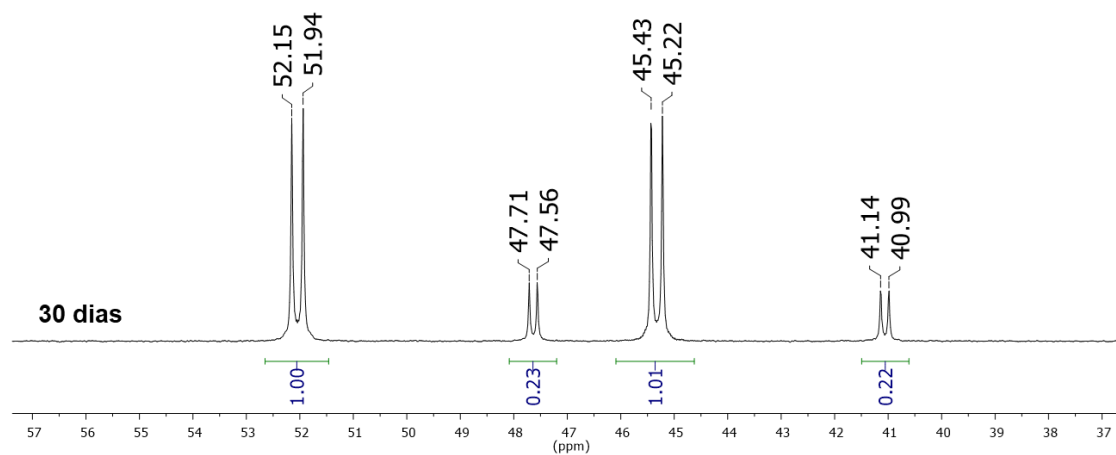
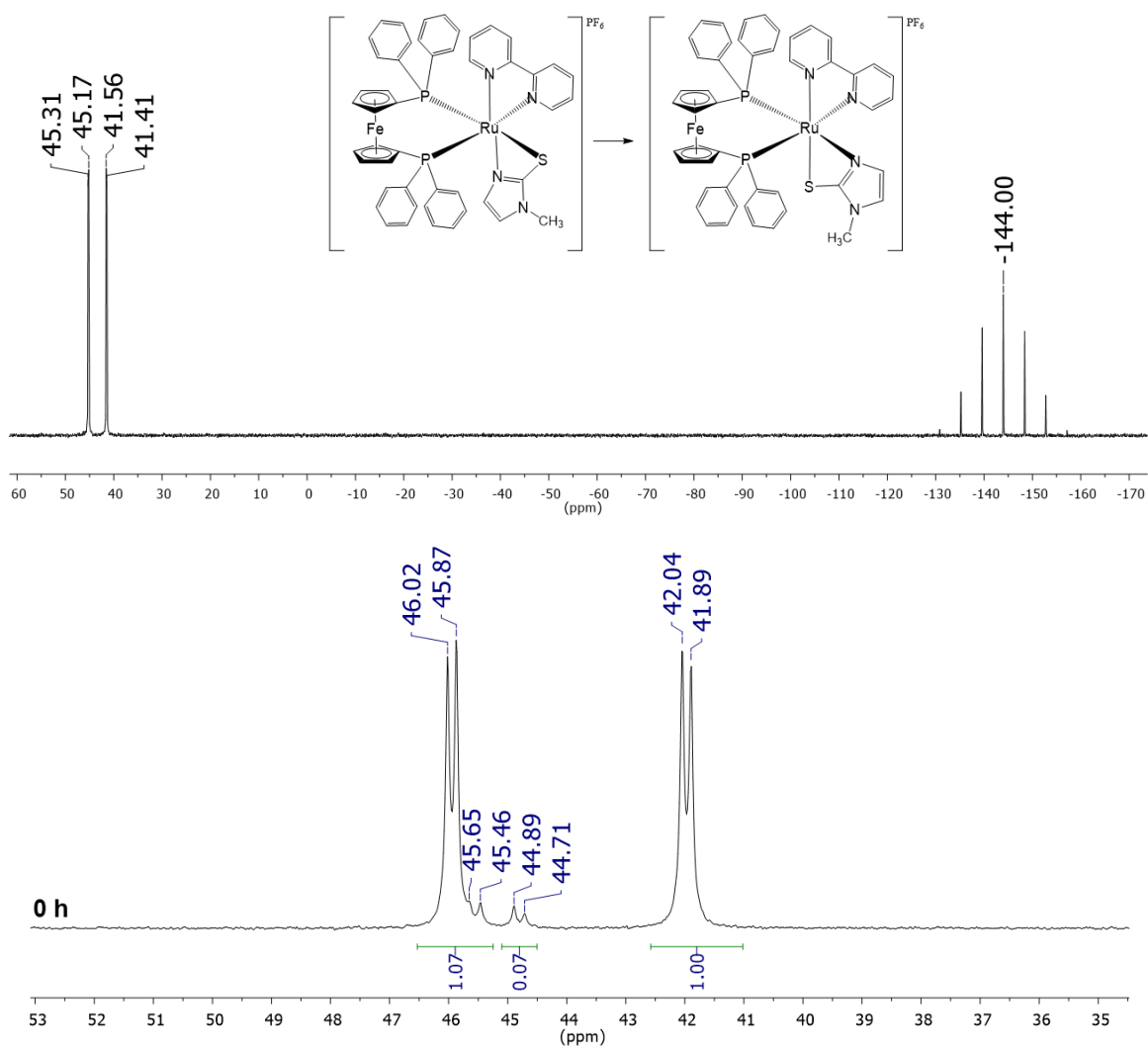
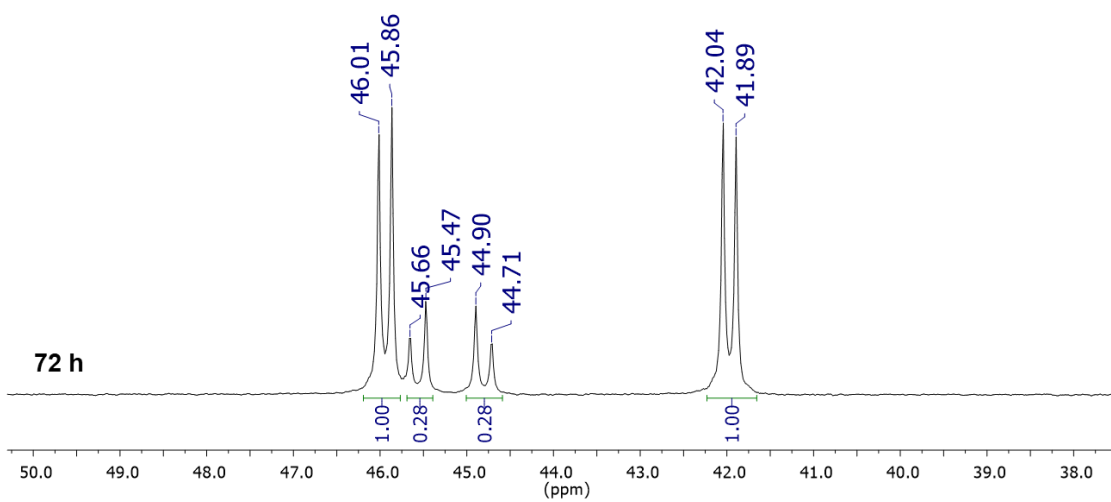
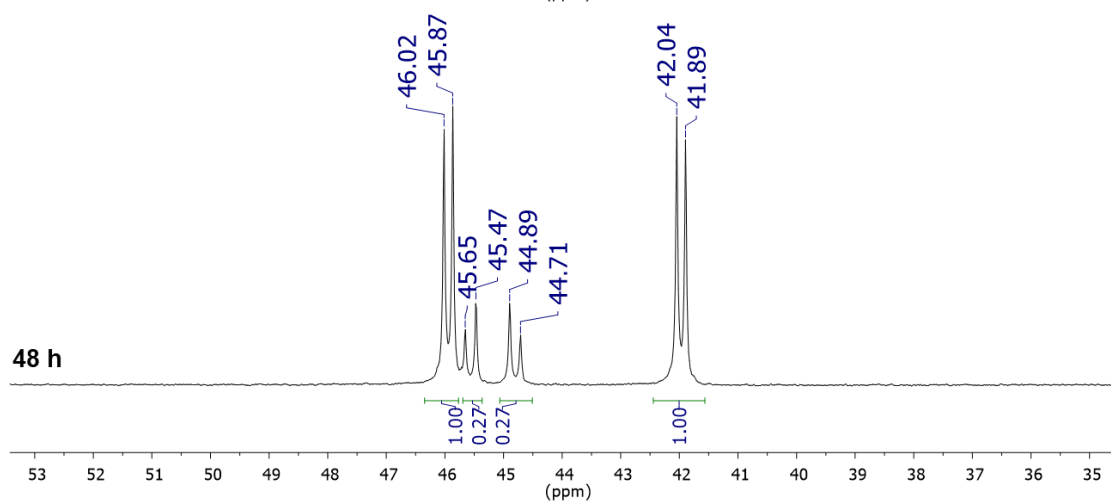
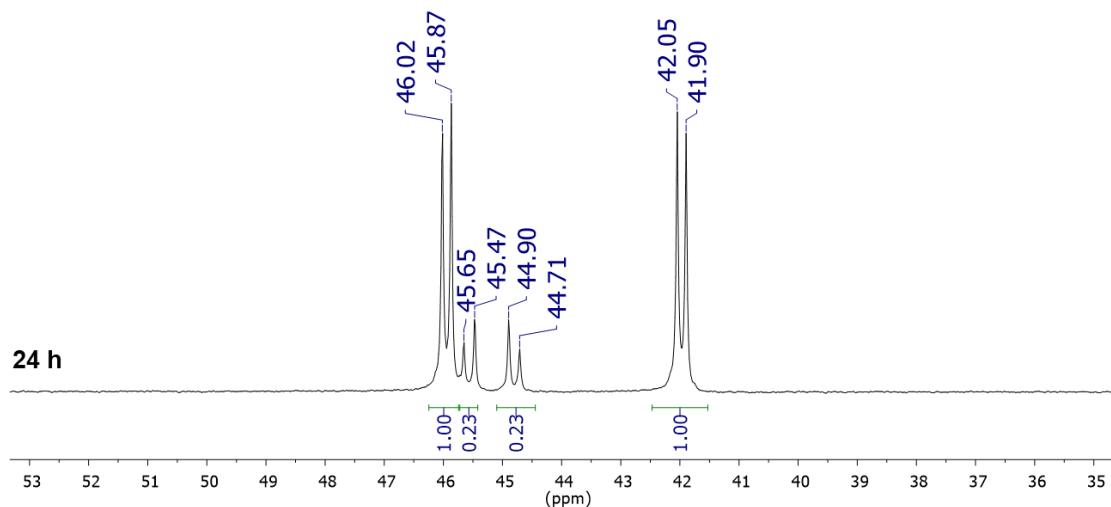


FIGURA 4.13 - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ registrados nos tempos 0, 24, 48 h, 72 h, 7 dias, 15 dias e 30 dias, para o complexo TIA em DMSO.





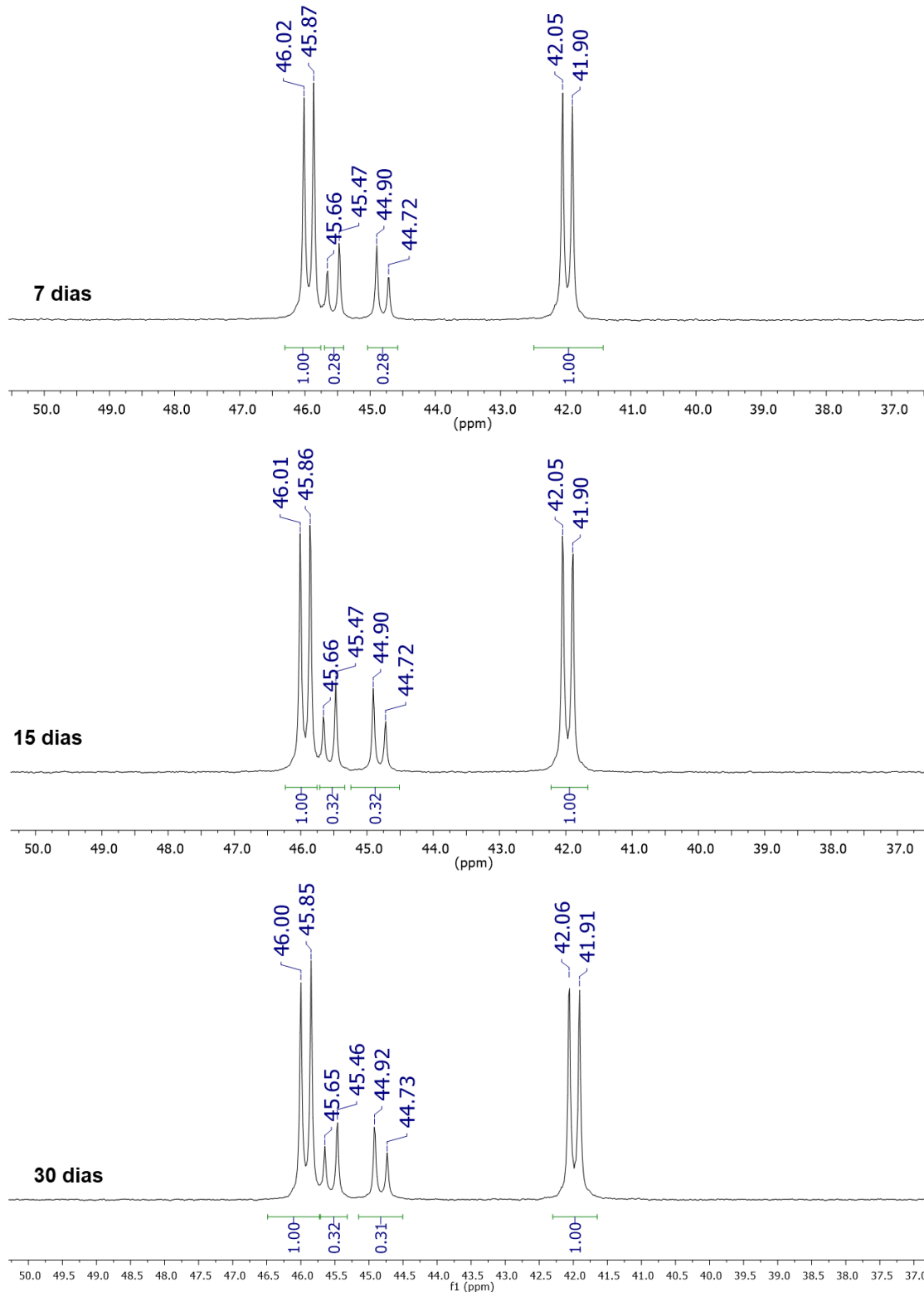


FIGURA 4.14 - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ registrados nos tempos 0, 24, 48 h, 72 h, 7 dias, 15 dias e 30 dias, para o complexo M-IMI em DMSO.

Quando analisado os espectros do complexo M-IMI em DMSO, observou-se que os deslocamentos químicos dos dois dubletos da espécie formada em solução se

encontravam muito próximos, o que poderia ser uma evidência de fósforos *trans* ao mesmo átomo de ligantes diferentes, como o nitrogênio da bipyridina e do ligante mercapto. Para melhor compreensão da estrutura química da espécie inicial do complexo M-IMI e de seu isômero, foram analisadas as constantes de acoplamento dos pares de dubletes obtidos nos espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ de todos os complexos em DMSO e comparadas com as constantes de acoplamento de M-IMI. Os valores obtidos de $^2J_{\text{p-p}}$ são mostrados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 – Valores de $^2J_{\text{p-p}}$ e os δ_{d} obtidos nos espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos sintetizados em DMSO.

Complexos	δ_{d}	$^2J_{\text{p-p}}$ (Hz)
TIA	52,4 e 45,6	34,4
	47,7 e 41,1*	24,4
M-IMI	46,2 e 42,2	24,3
	45,8 e 45,1*	30,5
AC	50,5 e 43,7	34,8
DIA	49,8 e 45,4	34,3
M-TIU	49,1 e 43,4	31,4
TIU	49,4 e 43,5	32,3
<i>cis</i>-[RuCl₂(bipy)(dppf)]	45,91 e 37,07	31,8

*Isômero formado em solução.

Analisando as constantes de acoplamento dos complexos que possuem estruturas de raios X, é possível atribuir os sinais correspondentes aos átomos que se encontram *trans* as fosfinas. Nas estruturas de raios X dos complexos TIA, AC, M-TIU e TIU, o átomo de N dos ligantes mercapto se encontram *trans* a fosfina, os quais são atribuídos aos sinais observados no RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ com constantes de acoplamento muito próximas, na faixa de 31,4–34,8. Na isomerização do complexo TIA, o átomo de enxofre fica *trans* a fosfina, seus dubletes apresentam $^2J_{\text{p-p}} = 24,4$. Comparando-se as constantes de acoplamento obtidas para o complexo M-IMI com os demais complexos, é possível observar que a maior constante de acoplamento, referente aos sinais do isômero em menor proporção, está próxima dos valores obtidos de $^2J_{\text{p-p}}$ referente ao N do ligante

mercapto *trans* a fosfina. A espécie inicial corresponde a ${}^2J_{p-p} = 24,3$, apresenta um valor muito próximo da constante de acoplamento do isômero de TIA (${}^2J_{p-p} = 24,4$), o qual corresponde ao átomo de enxofre *trans* a fosfina. Portanto, é possível inferir que a espécie inicial do complexo M-IMI apresenta seu ligante mercapto coordenado via enxofre *trans* a fosfina, o qual é isomerizado para a espécie com o nitrogênio *trans* a fosfina, com ${}^2J_{p-p} = 30,5$.

Os complexos AC, DIA, M-TIU e TIU se mostraram estáveis em DMSO durante o período analisado, de 48 h, seus espectros se encontram nas Figuras 4.15–4.18.

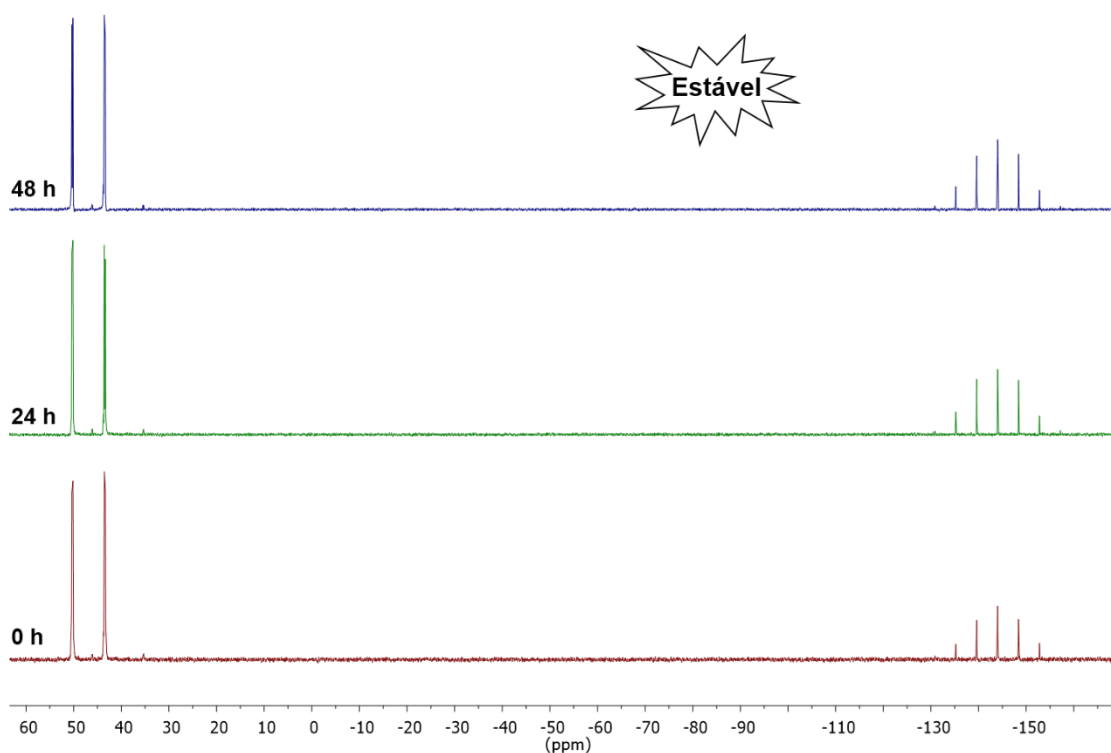


FIGURA 4.15 - Espectros de RMN ${}^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo AC em DMSO.

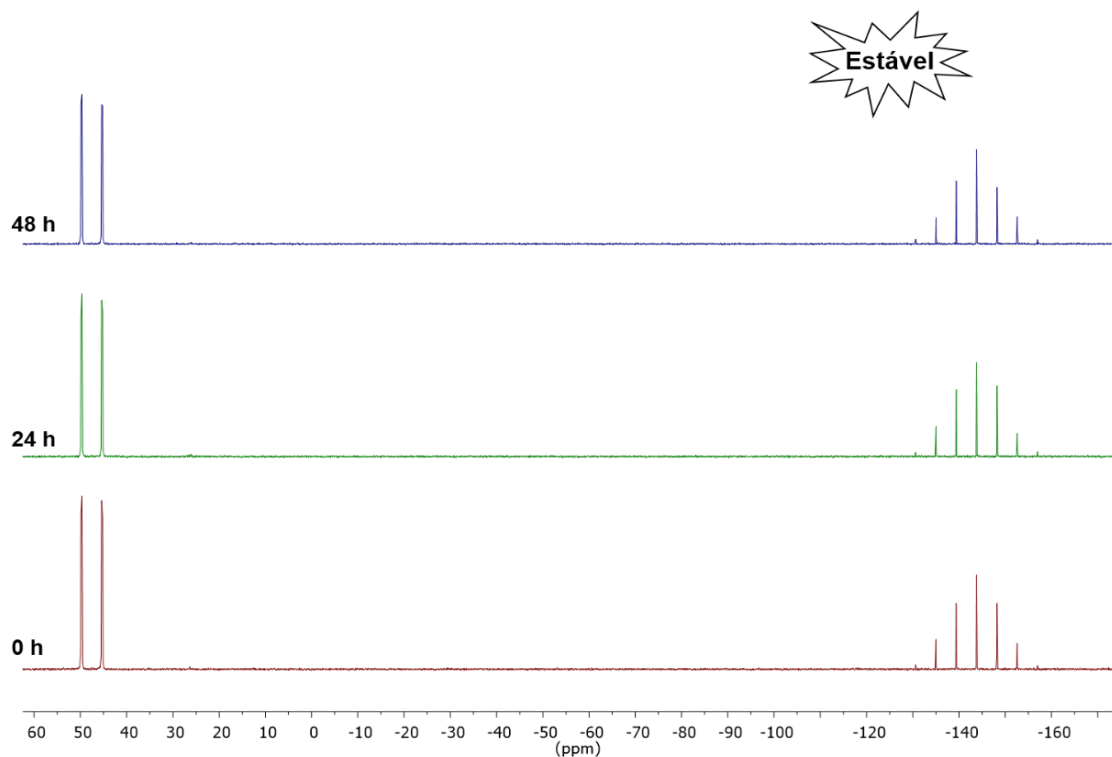


FIGURA 4.16 - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo DIA em DMSO.

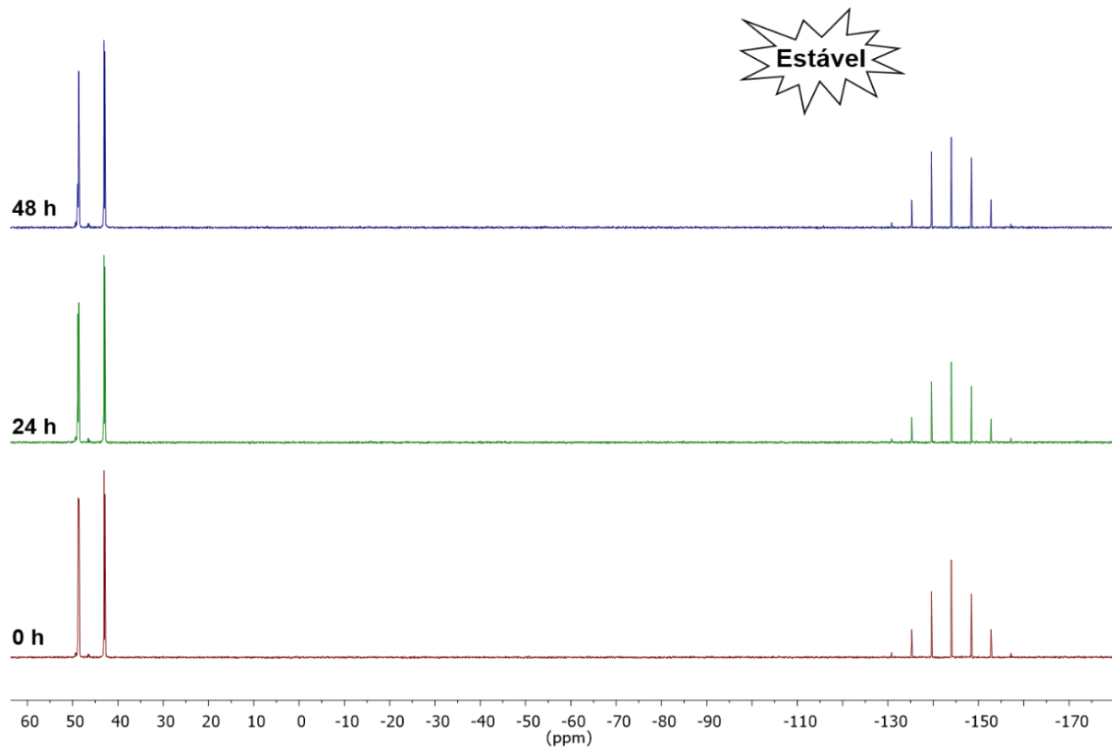


FIGURA 4.17 - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo M-TIU em DMSO.

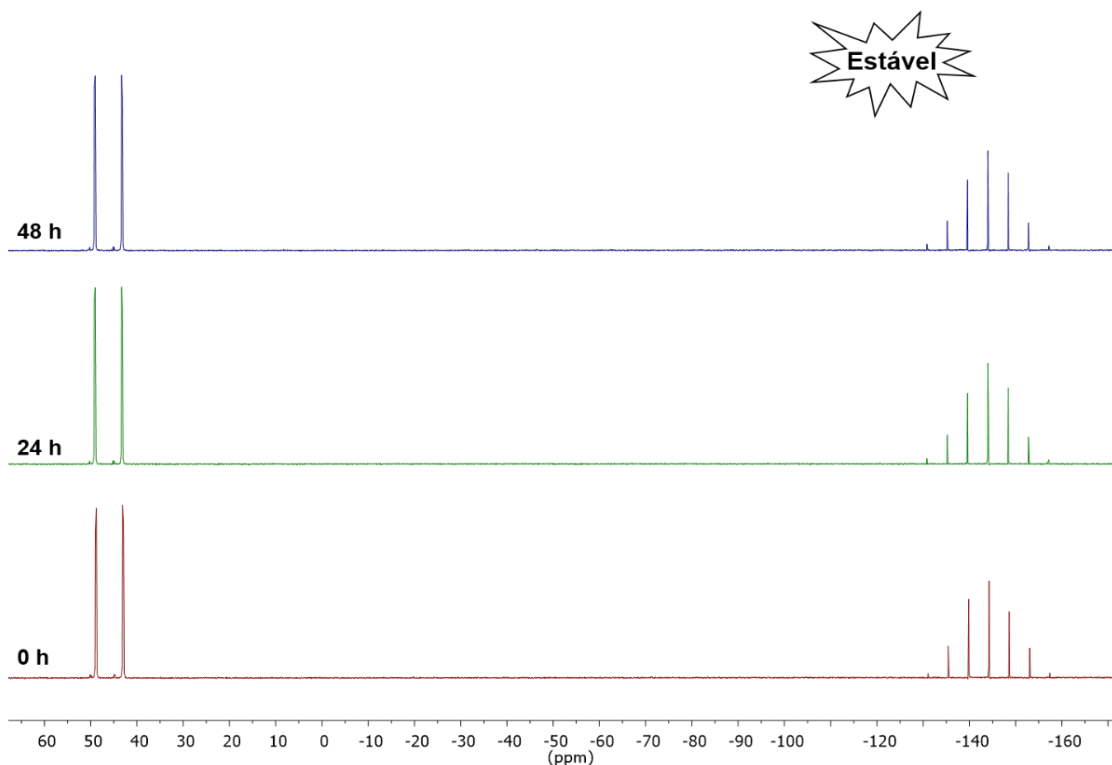


FIGURA 4.18 - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo TIU em DMSO.

Quando avaliados em solução de DMSO/meio de cultura, os complexos TIA (Figura 4.19), M-IMI (Figura 4.20) se mostraram instáveis. Nos espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo TIA, os deslocamentos químicos que surgiram são similares a aqueles observados em DMSO, portanto a espécie formada é a mesma nas duas diferentes soluções. Nos espectros do complexo M-MI (Figura 4.20) surgiram dois dubletos em 45,1 e 42,0 ppm, mantendo-se a espécie inicial em 74% no período de 48 h.

Os complexos AC, DIA, M-TIU e TIU se mostraram estáveis em solução de meio/DMSO no período de 48 h (Figura 4.21–4.24).

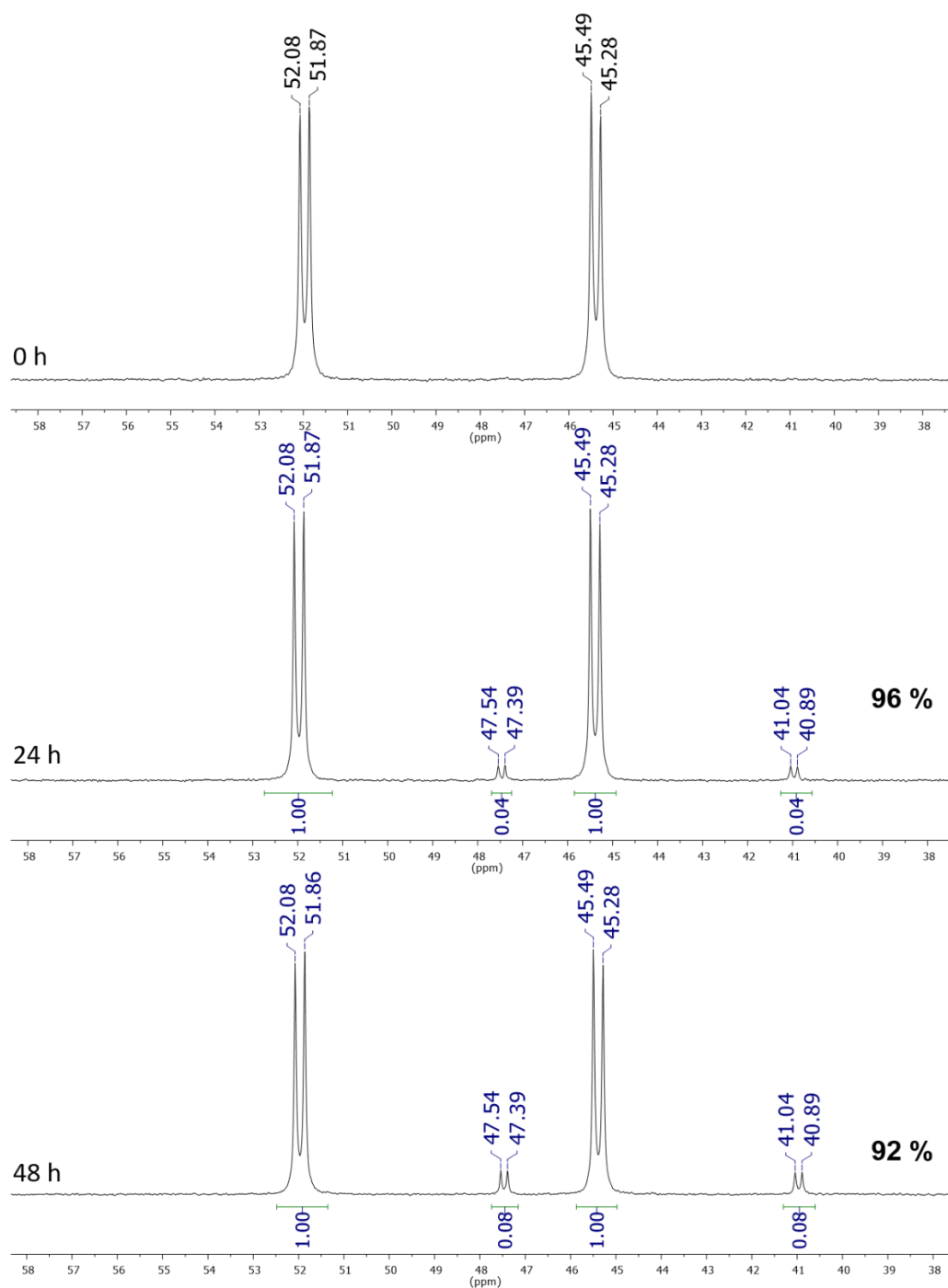


FIGURA 4.19 - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo TIA em solução de DMSO/Meio de cultura.

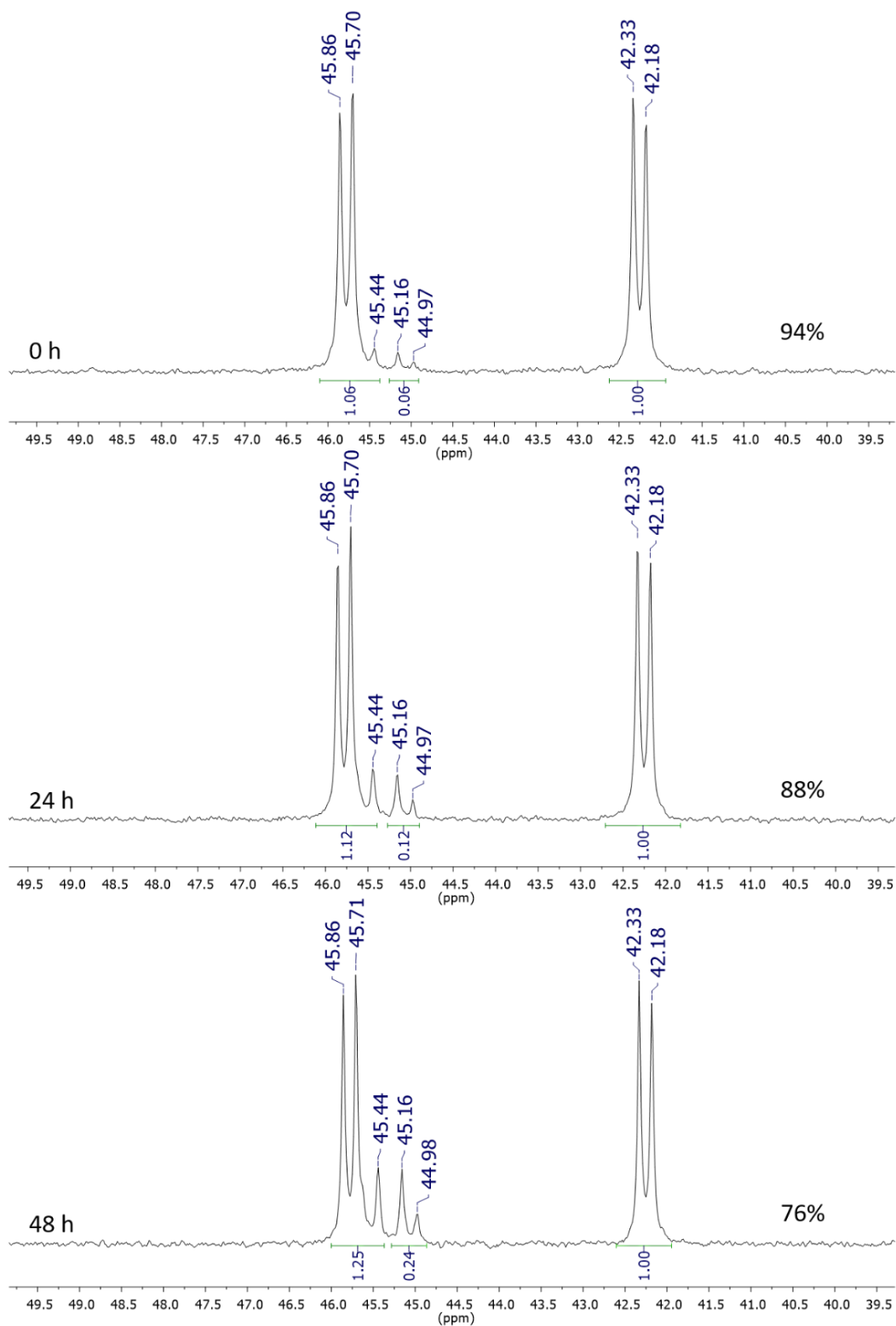


FIGURA 4.20 - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo M-IMI em solução de DMSO/Meio de cultura.

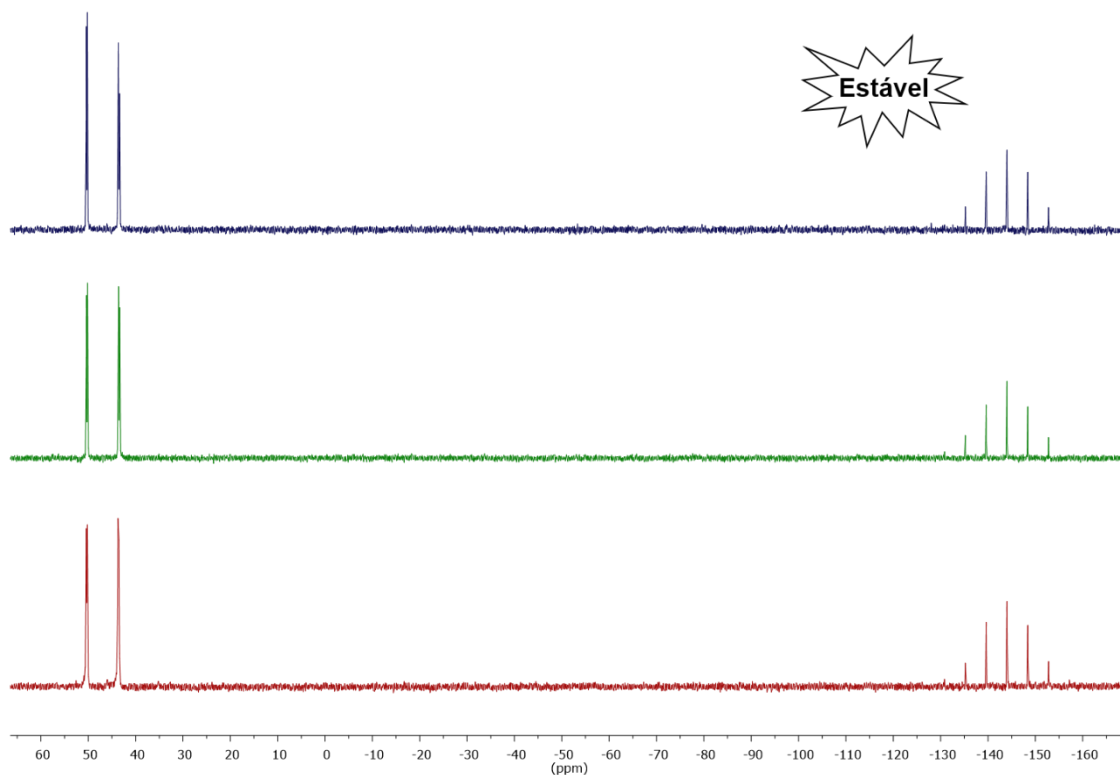


FIGURA 4.21 - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo AC em solução de DMSO/Meio de cultura.

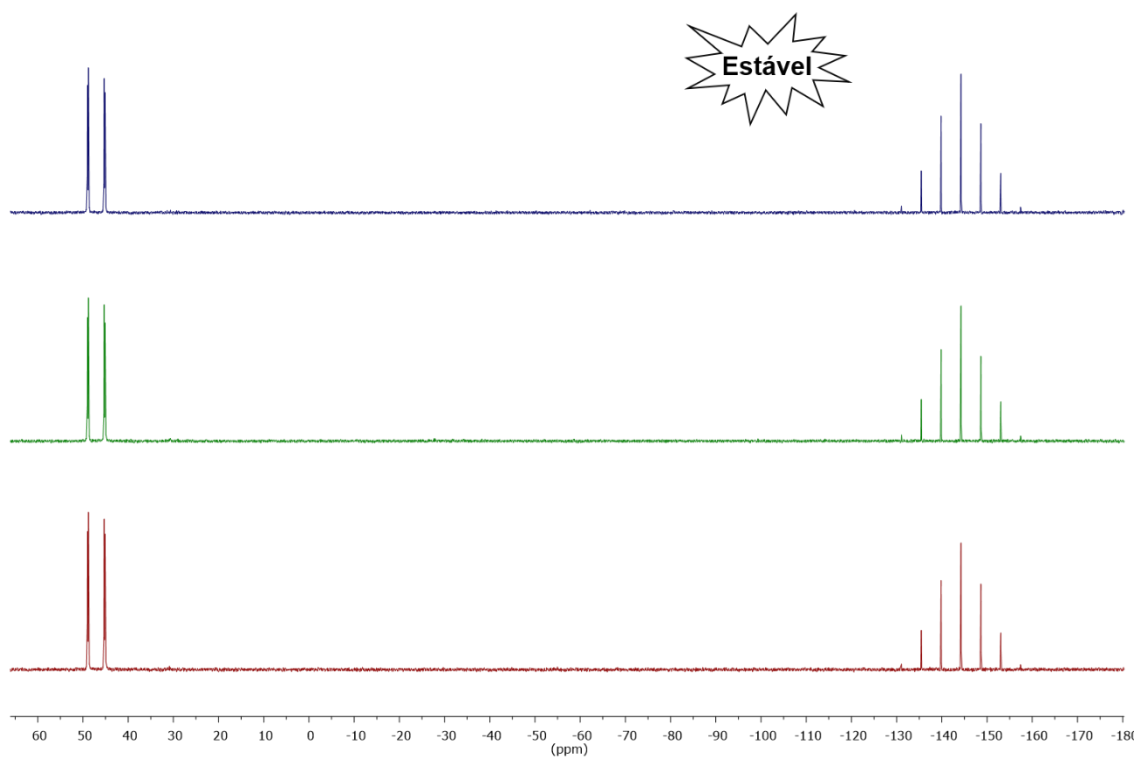


FIGURA 4.22 - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo DIA em solução de DMSO/Meio de cultura.

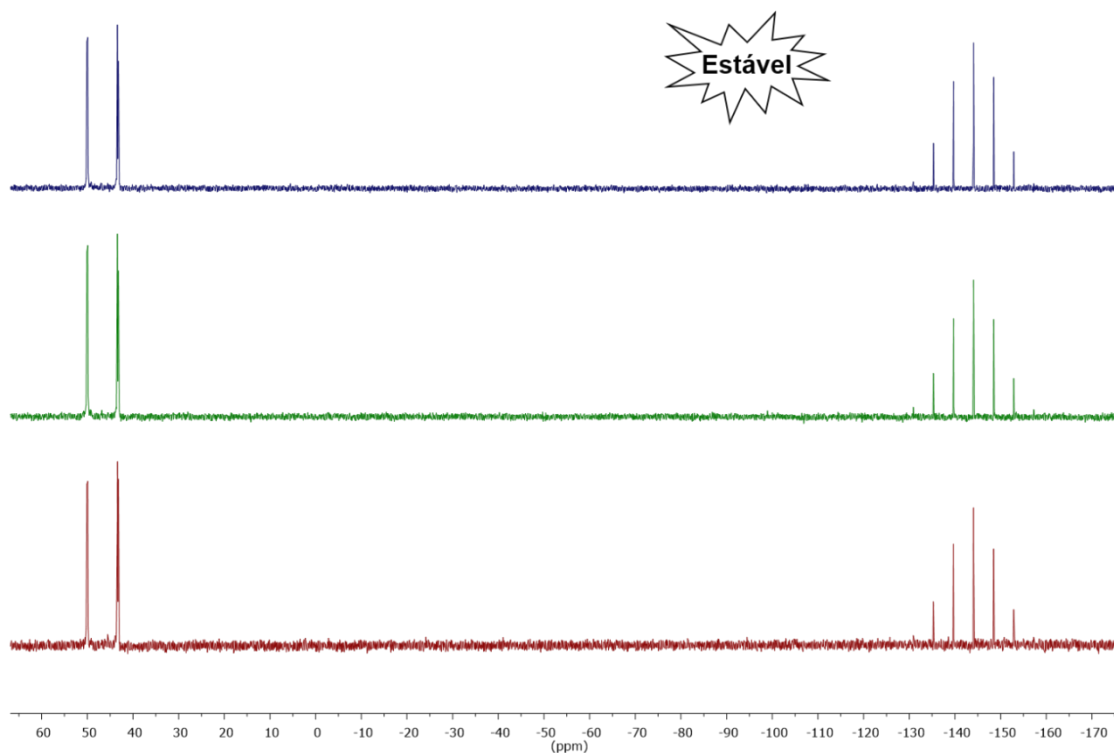


FIGURA 4.23 - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo M-TIU em solução de DMSO/Meio de cultura.

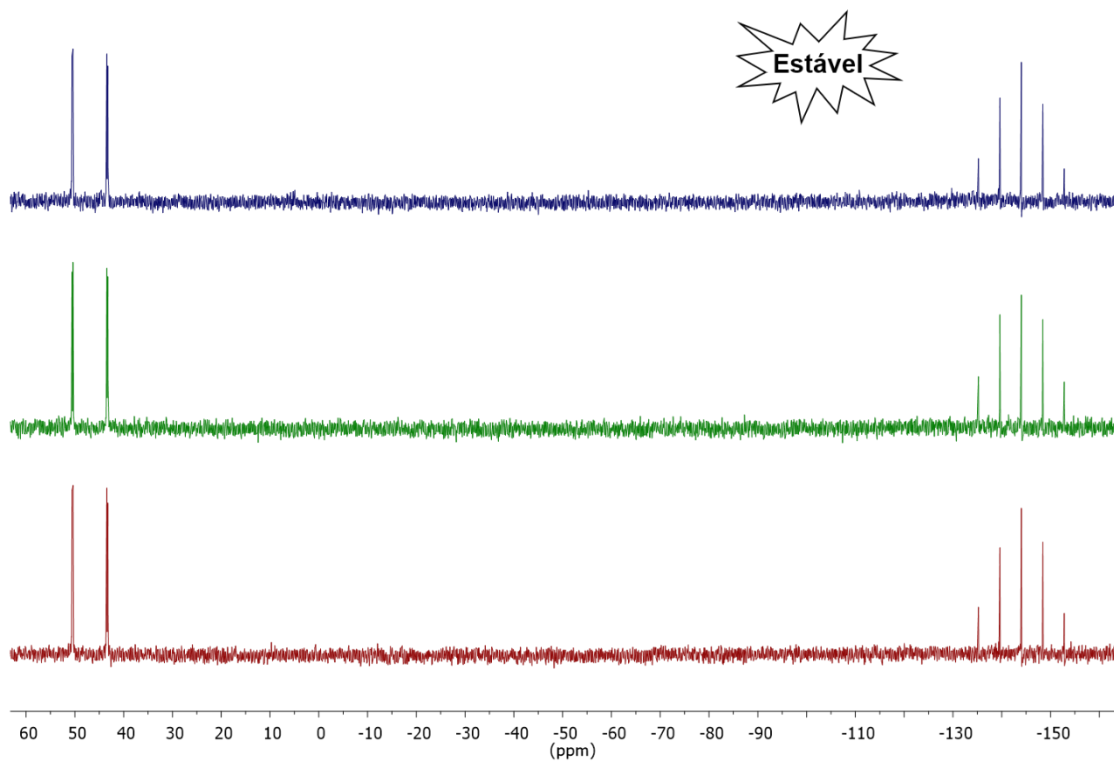


FIGURA 4.24 - Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ registrados nos tempos 0, 24 e 48 h, para o complexo TIU em solução de DMSO/Meio de cultura.

Para os complexos em que a isomerização estava ocorrendo em DMSO, outros solventes foram testados para verificar a influência do solvente na isomerização dos complexos TIA e M-IMI. As integrais dos espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (Figura A52-A55) foram atribuídas para mensurar o aumento de isômeros em solução ao longo dos tempos analisados. Nos solventes apróticos polares, como o dimetilsulfóxido e diclorometano, a velocidade de isomerização do complexo TIA é mais rápida no DMSO (Tabela 4.10). Quando avaliado no solvente prótico polar metanol, a velocidade de isomerização do complexo TIA foi semelhante ao diclorometano, com apenas 2 % do isômero em 48 h (Tabela 4.10). Para o complexo M-IMI foi observado uma maior variação na velocidade de isomerização com a mudança de solvente. A velocidade de isomerização do complexo M-IMI segue a seguinte ordem: MeOH>DMSO>DCM, com 35, 27 e 17% em 48h, respectivamente.

Tabela 4.10 - Porcentagem de isomerização dos complexos TIA e M-IMI nos solventes DMSO, DCM e MeOH em diferentes tempos.

		% do isômero formado em solução						
		Tempo						
Complexo	Solvente	0 h	24 h	48 h	72 h	7 d	15 d	30 d
TIA	DMSO	0%	4%	7%	10%	17%	22%	22%
M-IMI		7%	23%	27%	28%	28%	32%	32%
TIA	DCM	0%	0%	2%				
M-IMI		0%	9%	17%				
TIA	MeOH	0%	0%	2%				
M-IMI		2%	27%	35%				

h= hora; d= dia. DMSO=dimetilsulfóxido, DCM= diclorometano e MeOH=metanol

No caso, duas hipóteses podem ser aventadas:

- 1) A isomerização é promovida pelo hidrogênio da molécula de água solvatada no solvente usado.

- 2) A isomerização é promovida pelo hidrogênio do solvente, que interage com o átomo com densidade de carga negativa, quando coordenado ao centro metálico.

A isomerização dos complexos pode ser catalisada pela capacidade do solvente protonar, com intensidade específica, o átomo com densidade de carga negativa do ligante coordenado ao Ru(II). Considerando que no DMSO o hidrogênio da água aparece no RMN ^1H , em 3,33 ppm, no metanol em 4,87 ppm e no diclorometano em 1,52 ppm, neste caso pode-se assumir que o hidrogênio da água solvatada no DMSO é mais ácido que o hidrogênio também da água, solvatado no diclorometano. Neste caso pode-se imaginar que a interação entre, por exemplo, o hidrogênio da água com o átomo de densidade eletrônica negativa do ligante coordenado ao centro metálico permitiria o processo de isomerização do complexo. No caso específico da isomerização do complexo TIA ser mais rápida no DMSO, que no diclorometano e metanol nos leva a crer que a interação complexo- $\text{H}^+\text{-O-H-DMSO}$ é mais adequada à isomerização que a interação complexo- $\text{H}^+\text{-O-H-CH}_3\text{-O-H}$ e complexo- $\text{H}^+\text{-O-H-Cl}_2\text{-CH}_2$, e por isto a isomerização do TIA neste último solvente é mais lenta. No solvente polar prótico como o metanol, tem-se a possibilidade de solvatação pelo próton do solvente, em que o deslocamento químico deste próton é 3,31 ppm, neste caso o ligante será solvatado mais fortemente devido à ligação de hidrogênio, de modo que a densidade eletrônica do ligante será estabilizada, dificultando a isomerização, tornando-a mais lenta para este complexo.

Comparando-se a velocidade de isomerização entre os complexos TIA e M-IMI, é possível observar uma isomerização mais rápida para o complexo M-IMI, o que está relacionado ao mais baixo potencial redox deste complexo ($E_{pa} = 1247$ mV), que o complexo TIA ($E_{pa} = 1508$ mV) e também aos respectivos deslocamentos químicos dos átomos de fósforos *trans* ao nitrogênio 52,40 ppm para o TIA e 46,20 ppm, para o átomo de fósforo *trans* ao enxofre do ligante mercapto do M-IMI, mostrando que os elétrons estão mais localizados no átomo de fósforo do segundo complexo. As contribuições para essas diferenças eletrônicas se encontra na basicidade do ligante, no caso do complexo M-IMI, o ligante mercapto possui um grupo metil na posição 1 do anel imidazólico o que irá doar a densidade eletrônica por efeito indutivo, tornando-o mais básico, além disso o átomo do ligante que se encontra *trans* a fosfina é o enxofre, um átomo mole que deixa o centro metálico mais rico em densidade eletrônica, assim diminuindo o potencial redox

do rutênio. Em consequência disso, o fósforo que se encontra *trans* ao enxofre está mais protegido.

No caso da segunda hipótese acima mencionada, via hidrogênio do solvente, esta nos parece menos viável para os solventes apróticos polares, pois a densidade de carga que se encontra nesses solventes é muito baixa, como pode ser observado na Figura 4.25, em análises da superfície de potencial eletrostático através de cálculo quântico¹²⁶.

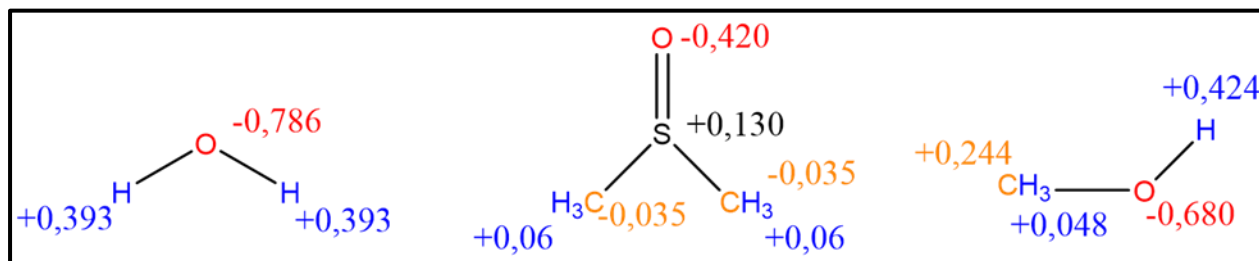


Figura 4.25 - Fórmulas estruturais e cargas parciais atômicas para as moléculas dos solventes.

Como pode ser observado na Figura 4.25, no átomo de eletronegatividade mais alta, como o oxigênio, aparece com carga negativa elevada em todas as moléculas, enquanto os átomos de hidrogênio ligados ao átomo possuem carga positiva elevada, como no metanol. Assim, a interação entre o ligante do complexo e o metanol deve ser preferencialmente com o hidrogênio ligado ao átomo de oxigênio. Os átomos dos grupos CH_3 em todas as moléculas apresentam cargas muito pequenas, de modo que não devem interagir de forma apreciável com nenhum íon. O mesmo deve ser levado em consideração para os grupos CH_2 do solvente diclorometano.

Em ambos os casos, o mecanismo de isomerização envolvido nos processos é o *twist* sem ruptura da ligação, pois não se observa presença de novos compostos em solução⁸³.

4.2–Testes Biológicos

4.2.1 - Avaliação da citotoxicidade

A atividade citotóxica dos complexos sintetizados foi avaliada frente às diferentes linhagens de células tumorais e não-tumoral pelo ensaio de MTT. A triagem foi feita em diferentes tipos de câncer buscando aquele em que os compostos teriam melhor resposta, ou seja, menor valor de IC₅₀ (concentração inibitória de 50% da viabilidade celular) e maior índice de seletividade (IS). Os valores de IC₅₀ obtidos no tratamento com os compostos e de seus respectivos ligantes livres em diferentes linhagens tumorais e não-tumoral são mostrados na Tabela 4.11.

TABELA 4.11 - Valores de IC₅₀ obtidos para os complexos sintetizados, seus respectivos ligantes mercapto livre e o fármaco cisplatina, frente as linhagens de células tumorais e não-tumoral, no período de 48 h.

Compostos	IC ₅₀ (µM) - 48h					
	DU-145	A549	MCF-7	MDA-MB-231	Ehrlich	MCF-10A
[RuCl ₂ (bipy)(dppf)]	na	na	na	na	na	na
TIA	6,14 ± 0,54	0,64 ± 0,08	7,17 ± 0,48	0,48 ± 0,02	1,16 ± 0,20	1,86 ± 0,16
M-IMI	2,56 ± 0,72	2,36 ± 0,01	6,32 ± 0,31	0,33 ± 0,03	0,42 ± 0,01	1,48 ± 0,08
AC	31,04 ± 1,31	7,07 ± 0,63	6,98 ± 0,013	3,78 ± 0,18	7,59 ± 0,47	5,94 ± 0,01
DIA	8,28 ± 0,76	5,66 ± 0,35	15,49 ± 0,45	1,74 ± 0,04	7,55 ± 0,18	7,36 ± 0,09
M-TIU	4,36 ± 0,41	6,48 ± 0,16	4,66 ± 0,53	3,26 ± 0,01	5,84 ± 0,72	3,28 ± 0,17
TIU	5,79 ± 0,15	5,62 ± 1,05	5,56 ± 0,39	2,02 ± 0,17	7,49 ± 0,78	3,11 ± 0,16
tzdt	>200	>200	>200	>200	>200	>200
mmi	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Acpy	>200	>200	>200	>200	>200	>200
dmpm	>200	>200	>200	>200	>200	>200
6m2TU	>200	>200	>200	>200	>200	>200
2TU	>200	>200	>200	>200	>200	>200
cisplatina	2,33 ± 0,40	14,42 ± 1,45	13,98 ± 0,40	2,43 ± 0,20	27,80 ± 1,50	23,90 ± 0,78

na= não avaliado

Comparando-se os valores de IC₅₀ dos compostos sintetizados frente às linhagens tumorais avaliadas, nota-se uma melhor resposta para a linhagem de célula

tumoral de mama triplo-negativo (MDA-MB-231), com valores de IC_{50} menores que o fármaco de referência. Os ligantes mercapto livres não foram ativos, com valores de IC_{50} superiores a 200 μM , no entanto quando complexados ao metal a atividade melhorou drasticamente, evidenciando a eficiência dos compostos inorgânicos. Outra observação interessante seria a solubilidade dos complexos com relação ao precursor, em que os novos complexos obtidos foram solúveis em DMSO, já o precursor não apresentou solubilidade nas concentrações utilizadas, não sendo possível determinar o seu valor de IC_{50} .

A seletividade é um fator importante para um tratamento eficaz com menor efeito colateral, pois uma maior seletividade para as células tumorais garante uma menor agressão das células não-tumorais. A partir dos dados de IC_{50} obtidos para as linhagens tumorais e não tumoral (MCF-10A), foi possível calcular o índice de seletividade ($IS = IC_{50}(MCF-10A) / IC_{50}(célula\ tumoral)$) dos complexos, os quais são mostrados na Tabela 4.12. Os resultados IS mostraram maior seletividade para a linhagem MDA-MB-231, sendo os complexos TIA, M-IMI e DIA os mais seletivos, com IS de 3,87, 4,48 e 4,23, respectivamente.

TABELA 4.12 - Valores de IS para os complexos nas diferentes linhagens de células tumorais, no período de 48 h.

Complexos	Índice de seletividade (IS)				
	DU-145	A549	MCF-7	MDA-MB-231	Ehrlich
TIA	0,30	2,90	0,26	3,87	1,60
M-IMI	0,58	0,63	0,23	4,48	3,52
AC	0,19	0,41	0,85	1,57	0,78
DIA	0,89	1,30	0,47	4,23	0,97
M-TIU	0,75	0,50	0,70	1,00	0,56
TIU	0,53	0,55	0,56	1,54	0,41
cisplatina	10,26	1,66	1,71	9,83	0,86

Quando as células MDA-MB-231 foram expostas aos complexos durante 24 h, os valores de IC_{50} (Tabela 4.13) foram mais elevados do que o tratamento de 48 h, mostrando um comportamento dependente do tempo, em que o aumento de tempo de

exposição das células aos complexos melhora a atividade dos complexos, reduzindo a concentração utilizada para inibir 50% da viabilidade celular (IC_{50}).

TABELA 4.13 - Valores de IC_{50} obtidos para os complexos sintetizados frente a linhagem de célula tumoral humana de mama triplo-negativa (MDA-MB-231), no período de 24 h.

Complexos	IC_{50} (μM)
TIA	3,04 \pm 0,02
M-IMI	1,91 \pm 0,16
AC	14,09 \pm 0,09
DIA	3,79 \pm 0,05
M-TIU	3,37 \pm 0,01
TIU	4,63 \pm 0,01
cisplatina	3,82 \pm 0,25

A linhagem MDA-MB-231 foi selecionado para dar continuidade com os estudos, uma vez que os compostos foram mais ativos e seletivos para essa linhagem. Além disso, esse resultado é interessante, pois se trata de uma linhagem tumoral humana de mama, metastática triplo-negativa (TNBC) ou seja, não possuem os receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) e fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2). O TNBC responde à quimioterapia convencional, mas reincide com mais frequência do que os tipos positivos para receptores de hormônios, levando aos piores resultados e difícil prognóstico, representando a maior porcentagem dos casos de mortalidade relacionados ao câncer de mama¹²⁷.

Analisando as estruturas dos compostos sintetizados, é possível observar que todos os complexos possuem em sua esfera de coordenação os ligantes 2,2-bipiridina e 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno, a diferença entre eles se encontra nos ligantes derivados de mercapto, os quais são formados por heterocíclicos com diferentes grupos substituintes não coordenados ao centro metálico, que podem estar influenciando na atividade desses complexos (Figura 4.26). A influência desses átomos ou moléculas

não coordenadas, foi então avaliada na tentativa de esclarecer uma possível relação entre estrutura e atividade dos complexos frente as células tumorais.

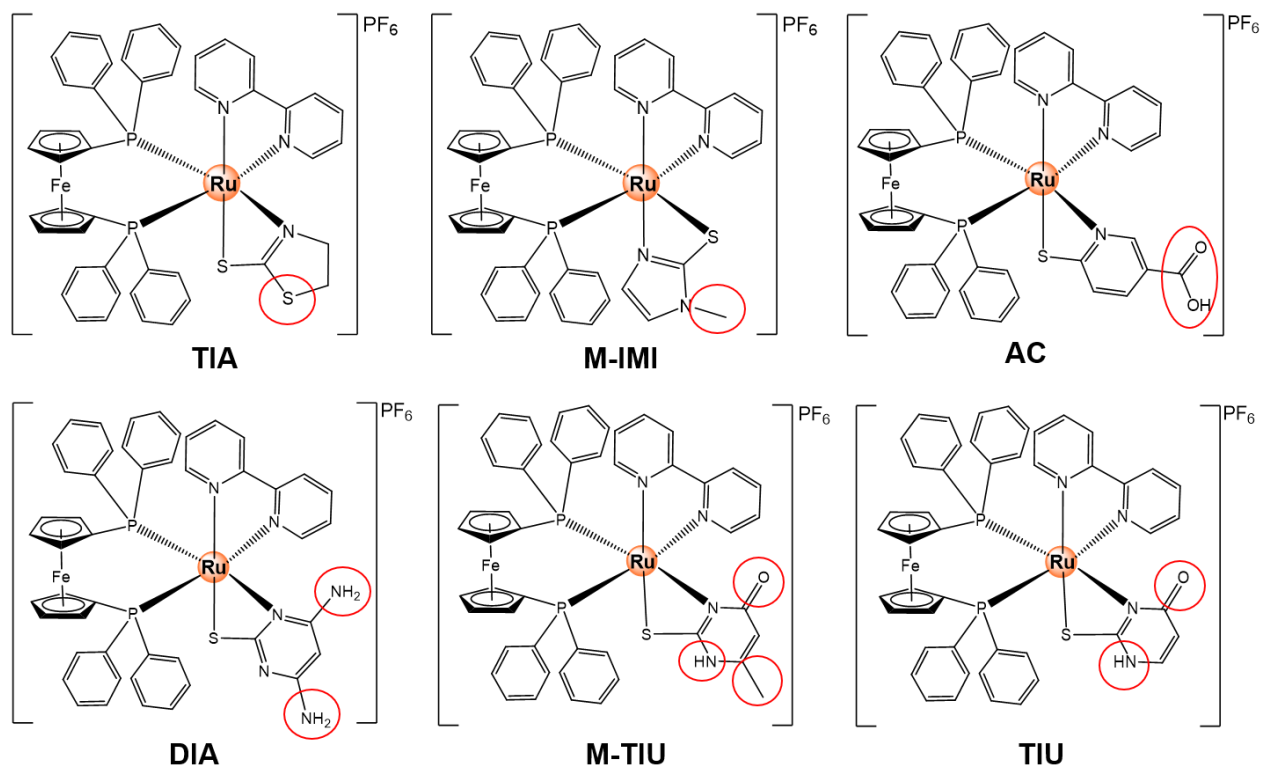


FIGURA 4.26 - Estrutura dos complexos com seus átomos e moléculas não coordenadas destacados no círculo.

Analisando os valores de IC₅₀ obtidos para os complexos frente às diferentes linhagens, é possível observar que os complexos contendo os ligantes mercapto de cinco membros (TIA e M-IMI) foram os mais ativos, sendo ligantes menos volumosos, o seu impedimento estérico é menor, o que pode estar facilitando a entrada desses complexos na célula. Ao comparar os átomos não coordenadas dos ligantes mercapto, é possível observar que os ligantes que apresentam o grupo metila, mmi e 6m2TU, são os mais ativos para a maioria das linhagens tumorais, quando comparado aos seus análogos TIA e 2TU, respectivamente, o que evidencia a contribuição dessa molécula para atividade citotóxica dos complexos. Os complexos com os grupos carboxila e aminas (AC e DIA) foram os menos ativos. Esses substituintes são grupos mais hidrofílicos que o grupo CH₃, o que possivelmente pode estar interferindo na adsorção desses complexos na membrana celular. O grupo carboxila em solução de pH

7,4 se encontra desprotonado, o que pode permitir sua ligação com outras moléculas presentes no meio extra ou intracelular, podendo interferir na biodisponibilidade do complexo. As aminas primárias não coordenadas presentes no ligante dão um caráter mais básico ao ligante, o que permite fazer ligações de hidrogênio com outras moléculas e biomoléculas presentes no meio extracelular, o que pode estar interferindo na atividade do complexo DIA. Além disso, os complexos mostraram diferentes respostas nas atividades celulares, quando avaliado o mecanismo de morte celular e seus alvos biomoleculares, o que também podem estar interferindo na citotoxicidade desses complexos.

A menor atividade citotóxica de complexos de rutênio (II) bifosfina/diimina contendo ligantes com grupo carboxila desprotonados não coordenados, foi evidenciada em trabalhos realizados no nosso grupo de pesquisa, em que essa atividade foi melhorada quando esterificado esses ligantes com etanol, pois a esterificação aumentou a lipofilicidade dos complexos e bloqueou o sítio aniônico do grupo carboxilato, o que possivelmente contribuiu para a permeação do complexo na célula¹²⁸.

Outros trabalhos realizados no laboratório com complexos de rutênio (II) contendo esses ligantes mercapto com diferentes bifosfinas, também mostraram melhor atividade citotóxica com os ligantes -tzdt e -mmi, evidenciando que esses ligantes são os melhores dentro dos derivados de ligantes mercaptos estudados⁶⁸.

4.2.2 - Lipofilicidade

A lipofilicidade é um dos fatores determinantes nas propriedades farmacocinéticas de um composto e sua interação com alvos biomoleculares, pois ela está correlacionada principalmente com a solubilidade, permeabilidade, citotoxicidade e biodisponibilidade dos compostos. O coeficiente de partição octanol/água (log P) mede a capacidade lipofílica de um composto, o que pode indicar a capacidade de uma molécula atravessar a membrana celular^{129,130}.

Os valores de log P obtidos para os compostos sintetizados são mostrados na Tabela 4.14. Ao avaliar a lipofilicidade dos compostos, observou-se que os valores de Log P foram todos positivos, indicando maior afinidade dos compostos pela fase orgânica. Os valores de log P obtidos para os compostos sintetizados, foram moderados, dentro da

faixa ideal para alcançar uma melhor permeabilidade (usualmente entre 0 e 3). A hidrofobicidade dos compostos é uma das propriedades mais importantes para expressar a atividade biológica dos compostos, uma vez que é necessário atravessar membranas biológicas para alcançar seus respectivos locais de ação¹²⁹. Esses compostos hidrofóbicos podem aumentar a captação celular e melhorar a atividade anticancerígena. A lipofilicidade dos complexos é muito próxima, o que inviabiliza fazer uma relação entre os valores de Log P e o valores de IC₅₀.

TABELA 4.14 - Valores de Log P dos complexos.

Complexos	Lipofilicidade (Log P)
TIA	0,92 ± 0,09
M-IMI	1,22 ± 0,09
AC	1,03 ± 0,19
DIA	0,92 ± 0,15
M-TIU	1,19 ± 0,43
TIU	1,42 ± 0,30

4.2.3 - Análises do ciclo celular

O efeito citotóxico dos compostos frente às células cancerígenas pode ser resultado de indução de apoptose ou parada do ciclo celular, ou a combinação dos dois processos. Para investigar o efeito dos complexos na distribuição do ciclo celular, as células MDA-MB-231 foram expostas as concentrações de $\frac{1}{2}$ IC₅₀ e IC₅₀ dos complexos no período de 48 h. A parada do ciclo celular foi estudada utilizando citometria de fluxo em células coradas com iodeto de propídio.

As Figuras 4.27A-B mostram a distribuição do ciclo das células MDA-MB-231 na presença ou ausência dos complexos de rutênio (II). No controle negativo, é observado que a maioria das células MDA-MB-231 estão em fases G₀/G₁ e S. A porcentagem de células tratadas com os complexos nas concentrações de $\frac{1}{2}$ IC₅₀ e IC₅₀ apresentaram um aumento de células em fase G₀/G₁, acompanhado de uma redução da fase S, exceto o complexo TIU (2,00 μ M). Os dados sugerem que os complexos TIA, M-IMI, AC e M-TIU estão induzindo parada do ciclo celular na fase G₀/G₁, já o complexo

TIU é observado um aumento de células em fase S, onde ocorre a replicação do DNA, e com o complexo DIA não é observado alterações significativas no ciclo celular.

Outra mudança importante na cinética do ciclo celular (Figura 4.27B), foi o aumento de células sub-G1 de 0,26% nas células controle para 5,43% (0,25 μ M) e 13,47% (0,50 μ M) com significância de $p < 0,001$ nas células tratadas com complexo TIA, 4,74% (0,15 μ M) e 10,32% (0,30 μ M) para o complexo M-IMI, 3,59% (1,80 μ M) e 6,68% (3,60 μ M) para o complexo AC, 1,31% (0,85 μ M) e 3,85% (1,70 μ M) para o complexo DIA, 10,75% (1,60 μ M) e 52,07% (3,20 μ M) com significância de $p < 0,001$ no tratamento com o complexo M-TIU e 2,38% (1,00 μ M) e 8,09% (2,00 μ M) para o complexo TIU. Esse aumento de células em fase sub-G1 indica morte celular por apoptose¹³¹. Além disso, esses dados mostram que a exposição de células MDA-MB-231 a diferentes concentrações dos complexos resulta em um aumento de células apoptóticas de maneira dependente da concentração. A indução de apoptose e o bloqueio do ciclo celular causado pelo complexo M-TIU (3,20 μ M) pode estar relacionado com a fragmentação do DNA das células MDA-MB-231, o que foi investigado no ensaio cometa. Todos esses resultados indicam que as atividades antiproliferativas dos complexos são causadas principalmente pela indução de apoptose e parada do ciclo celular em fase G0/G1.

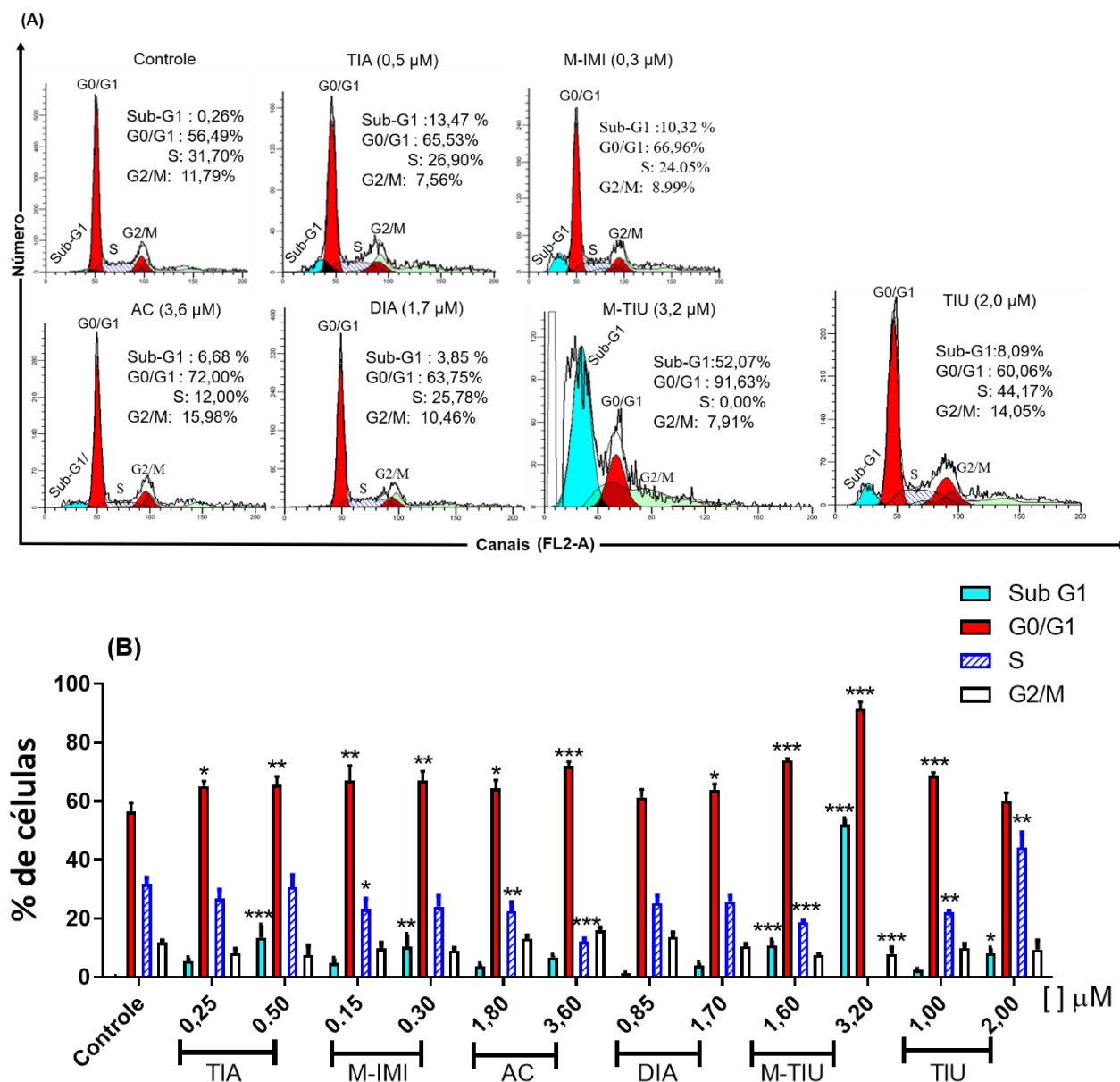


FIGURA 4.27 - Ciclo celular. (A) Perfil de fluorescência PI (eixo x) versus contagens de células (eixo y) em várias fases (Sub-G1, G0/G1, S e G2/M). (B) Distribuição do ciclo celular das células MDA-MB-231 após tratamento com complexo 1, 2 e 3 por 48 h. Os dados foram analisados usando o software ModFit (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Dados são as médias \pm DP de dois experimentos. Diferenças significativas do controle são indicadas por * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.2.4 - Análise de dano no DNA - Ensaio cometa

O dano ao DNA é um método útil para inibir a replicação do DNA, pois a presença de dano no DNA, leva à fragmentação deste, o que é uma característica da apoptose¹³². Os complexos selecionados para análise de dano no DNA, foram aqueles

que mostraram mudanças significativas no ciclo celular, as quais podem estar relacionadas com a fragmentação do DNA, como o aumento de sub-G1 e da fase S. No ensaio cometa as células MDA-MB-231 foram incubadas com os complexos TIA (0,50 μM), M-IMI (0,30 μM), M-TIU (3,20 μM) e TIU (2,00 μM) por 48 h, seguido de coloração com brometo de etídio e eletroforese em gel. Como mostrado na Figura 4.28A, as células tratadas com complexos apresentaram fragmentação do DNA com a presença de cometas bem formados.

Como pode ser visto na Figuras 4.28B, o comprimento da cauda do cometa representa a extensão do dano ao DNA, o qual é classificado em diferentes graus de fragmentação do DNA (0-4). O controle não tratado apresenta maior parte do número de nucleóides em classes de cometa 1 e 2, no entanto, as células MDA-MB-231 tratadas com compostos mostraram a maioria dos cometas em classes 3 e 4. O índice de dano foi maior que o controle não tratado, de 65 (controle) para 139 (TIA), 221 (M-IMI), 195 (M-TIU) e 172 (TIU). Esses resultados indicam claramente que os complexos estão induzindo a fragmentação do DNA de forma indireta, o que é mais uma evidência de morte celular induzida por apoptose.

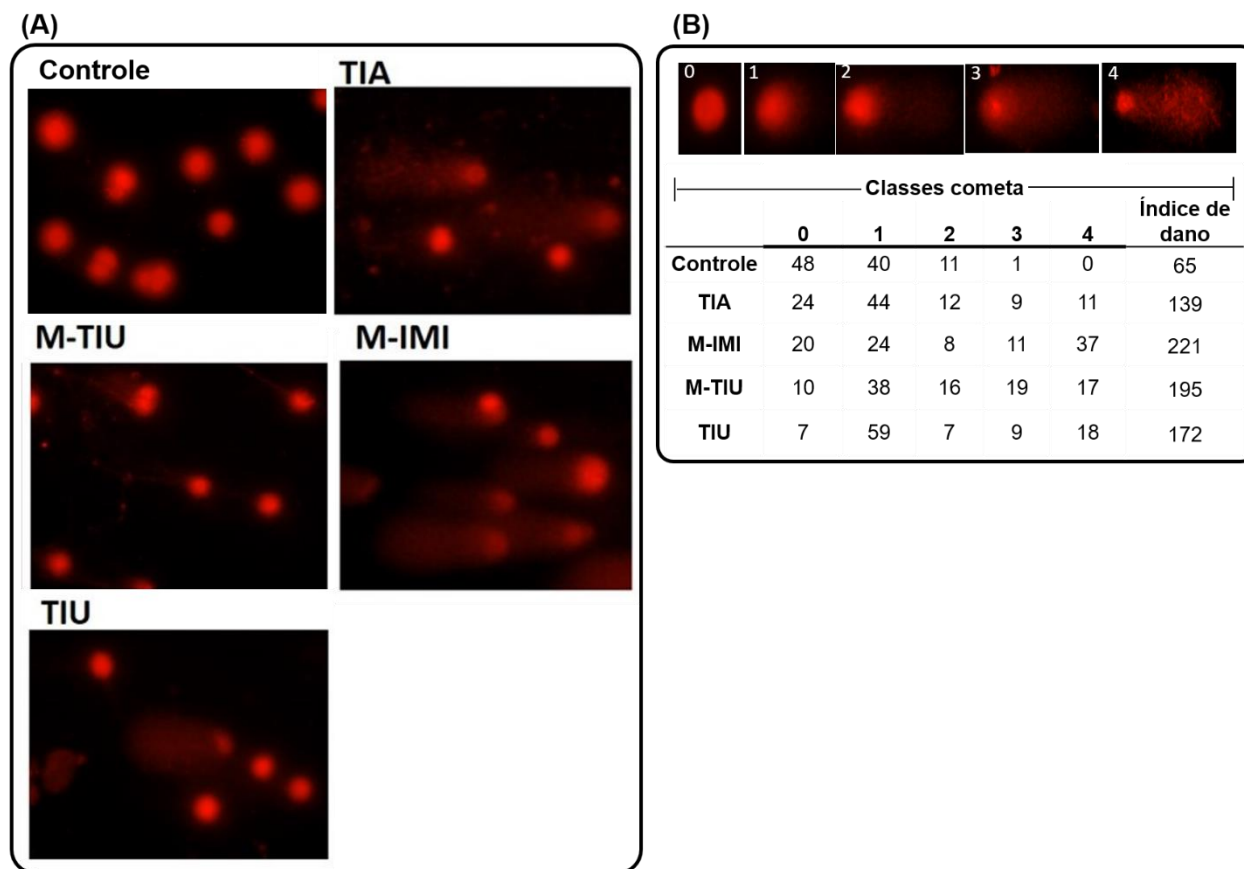


FIGURA 4.28 - Ensaio de cometa corado com brometo de etídio (BE). (A) Cometas das células tumorais MDA-MB-231: controle, 0,50 μM do complexo TIA, 0,3 μM do complexo M-IMI, 3,20 μM do complexo M-TIU e 2,00 μM do complexo TIU, durante 48 h de incubação. (B) Classificação das classes de cometas (0-4) e determinação do índice de dano no DNA de acordo com a quantidade fragmentada de DNA na cauda do cometa após o tratamento das células MDA-MB-231 na presença ou ausência de complexos por 48 h. Classe 0: nenhum dano no DNA, classe 1: dano no DNA muito baixo, classe 2: dano no DNA leve, classe 3: dano no DNA médio e classe 4: dano no DNA alto.

4.2.5 - Ensaio de morfologia celular

As mudanças morfológicas das células MDA-MB-231, na ausência e presença de complexos, foram investigadas a partir de imagens capturadas por uma câmera acoplada ao microscópio de luz, sendo analisadas as imagens obtidas nos tempos de 0, 24 e 48 h.

De acordo com os resultados obtidos no tratamento com os complexos AC, DIA e TIU, em apêndice (Figura A56, A57 e A59), a morfologia das células MDA-MB-231 não foi alterada em nenhuma das concentrações e tempos de incubação analisados. No entanto, quando tratadas com os complexos TIA (Figura 4.29), M-IMI (Figura 4.30) e M-

TIU em apêndice (Figura A58), nas concentrações de 0,50, 0,30 e 3,20 μM (IC_{50} dos complexos), respectivamente, a morfologia das células MDA-MB-231 no tempo de 48 h foi alterada, onde é possível observar uma diminuição da densidade celular, com encolhimento celular, algumas em formato circular e parcialmente desaderidas. Esses efeitos causados na morfologia das células MDA-MB-231 após o tratamento com os complexos TIA, M-IMI e M-TIU podem ser indicativos de apoptose.

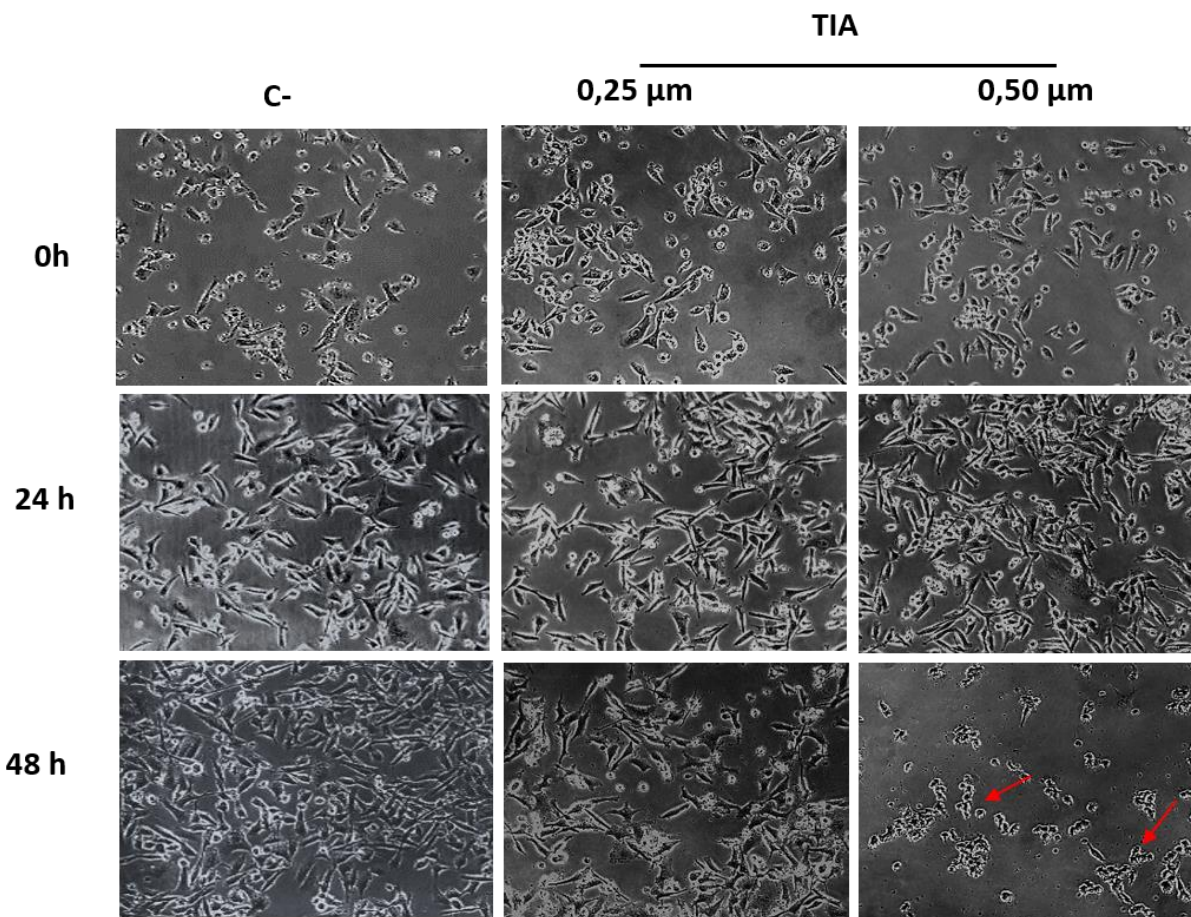


FIGURA 4.29 - Efeito do complexo TIA na morfologia da linhagem de células MDA-MB-231. As setas indicam as alterações morfológicas observadas nas células tratadas.

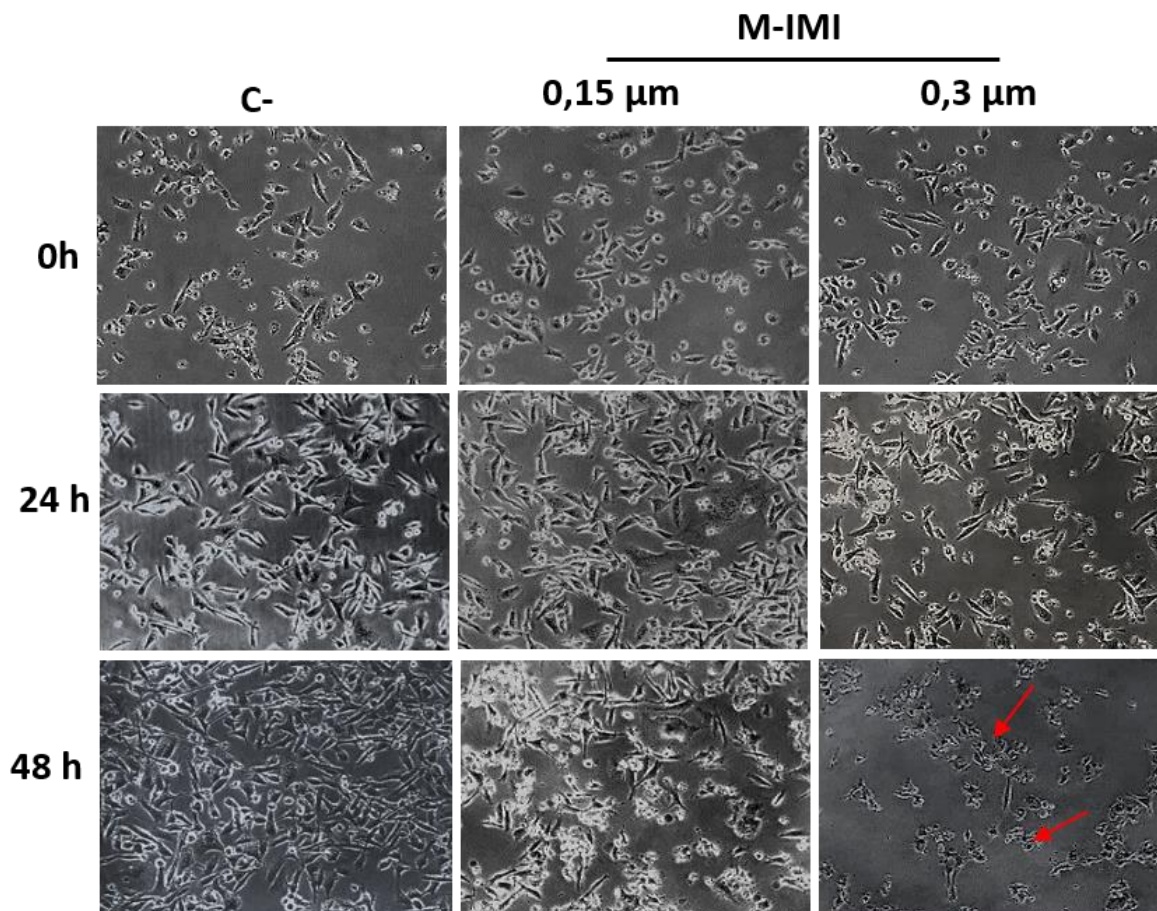


FIGURA 4.30 - Efeito do complexo M-IMI na morfologia da linhagem de células MDA-MB-231. As setas indicam as alterações morfológicas observadas nas células tratadas.

4.2.6 - Estudo de apoptose pelo método de coloração HO / PI

A morte celular pode ser dividida em dois tipos principais: apoptose e necrose. Embora formas distintas de morte celular sejam consideradas, esses dois processos podem ocorrer de forma independente, sequencial ou simultaneamente¹³³. A morte celular por apoptose apresenta alterações morfológicas e bioquímicas características, dentre elas, o encolhimento celular, condensação da cromatina, membrana celular e organelas preservadas, citoplasma retido em corpos apoptóticos que são rapidamente fagocitados por macrófagos ou células normais adjacentes. Em células necróticas as principais alterações morfológicas envolvem o inchaço nuclear e celular, ruptura da membrana celular e liberação do conteúdo citoplasmático, resultando em processos inflamatórios.

A apoptose induzida nas células MDA-MB-231 tratadas com os complexos nas concentrações de $\frac{1}{2}$ IC₅₀ e IC₅₀ no período de 48 h foi investigada utilizando dupla marcação com Hoechst 33342 (HO) e iodeto de propídio (PI). A coloração HO/PI é sensível ao DNA e foi usada para acessar mudanças na morfologia nuclear. Além disso, diferenças na integridade da membrana celular permitem diferenciação de células necróticas e apoptóticas, uma vez que o HO pode passar pela membrana celular e o PI não. Imagens representativas mostrando as mudanças morfológicas das células são mostradas na Figura 4.31A, onde as células vivas apresentam coloração azul brilhante, as células apoptóticas em fase inicial estão coradas de azul com encolhimento nuclear, cromatina condensada e corpos apoptóticos, as células em apoptose tardia apresentam a sobreposição de cores dos dois corantes, pois essas células apresentam uma perda parcial da membrana celular e, por fim, as células necróticas com coloração apenas vermelha, com inchaço nuclear.

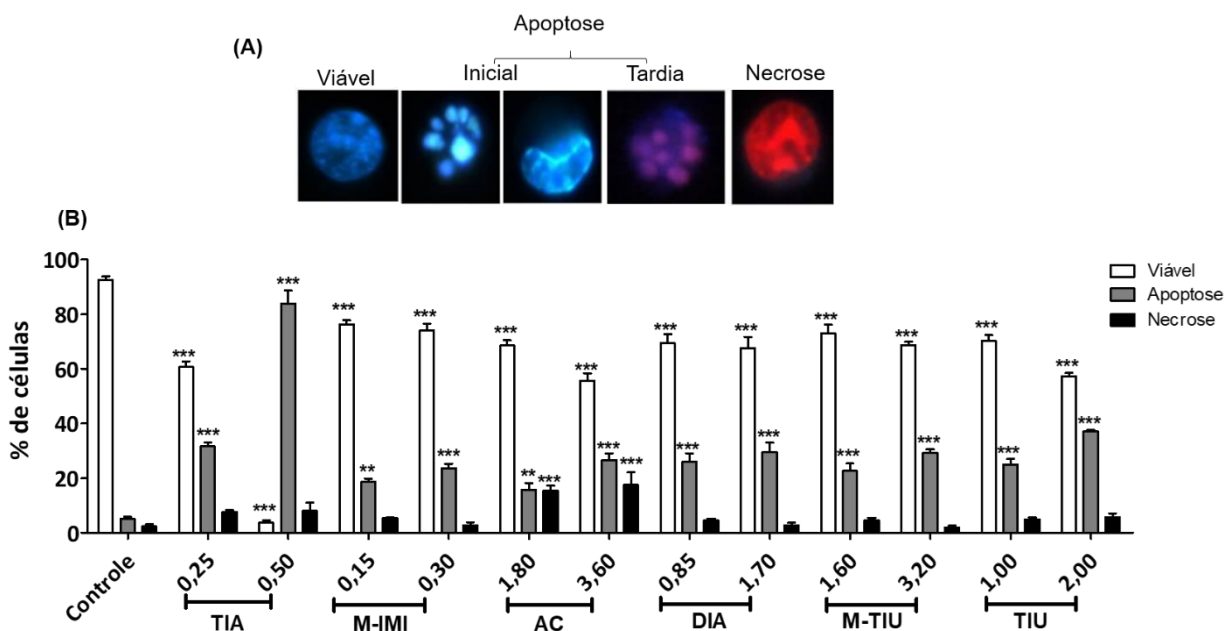


FIGURA 4.31 - Análise morfológica celular com marcação HO/PI. (A) Imagens representativas mostram alterações morfológicas de células MDA-MB-231 detectadas com dupla coloração com Hoechst 33342 (HO) e iodeto de propídio (PI). (B) Porcentagem de células em apoptose e necrose após tratamento com $\frac{1}{2}$ IC₅₀ e IC₅₀ dos complexos, pela dupla coloração com HO / PI. Diferenças significativas do controle são indicadas por ** p < 0,01 e *** p < 0,001.

As células do controle e as células tratadas com os complexos foram detectadas no microscópio de fluorescência e quantificadas de acordo com as suas

diferenças morfológicas. As células expostas aos complexos (Figura 4.31B) mostraram tipo de morte predominante por apoptose, e a porcentagem de células apoptóticas aumentou de modo dependente da concentração dos compostos. Resultados semelhantes foram observados com outros complexos de rutênio (II) ¹³⁴⁻¹³⁶.

4.2.7 - Ensaio de apoptose por citometria de fluxo

A apoptose também foi avaliada por citometria de fluxo usando marcação das células com anexina-V para detectar a externalização da fosfatidilserina, uma característica inicial de apoptose¹³⁴. Para diferenciação entre células apoptóticas e necróticas, as células foram duplamente coradas com anexina-V e PI.

Como pode ser observado na Figura 4.32A, o tratamento de 48 h com 0,50, 0,30, 2,00 μM dos complexos TIA, M-IMI e TIU, respectivamente, apresentou maior porcentagem de células em apoptose tardia e necrose. No tratamento das células com o complexo M-TIU (3,2 μM) a maior porcentagem de células estava em apoptose tardia, enquanto, os complexos AC (3,6 μM) e DIA (1,7 μM) a maior porcentagem de células se encontravam em apoptose inicial. A porcentagem total de células apoptóticas (apoptose inicial e apoptose tardia) é superior a aquelas em necrose, indicando que os complexos estão induzindo apoptose das células MDA-MB-231, possivelmente em menor tempo de exposição ao tratamento seria observado maior número de células no início de apoptose, pois a exposição da fosfatidilserina é um evento inicial de apoptose.

Na Figura 4.32B, tem-se as distribuições das porcentagens de células viáveis, em apoptose (inicial e tardia) e necrose após tratamento de 48 h com as concentrações de $\frac{1}{2}$ IC_{50} e IC_{50} dos complexos, onde é possível observar que todos os complexos podem induzir apoptose com diferentes potencias, o que leva a um aparente aumento dependente da concentração da porcentagem de células em apoptose.

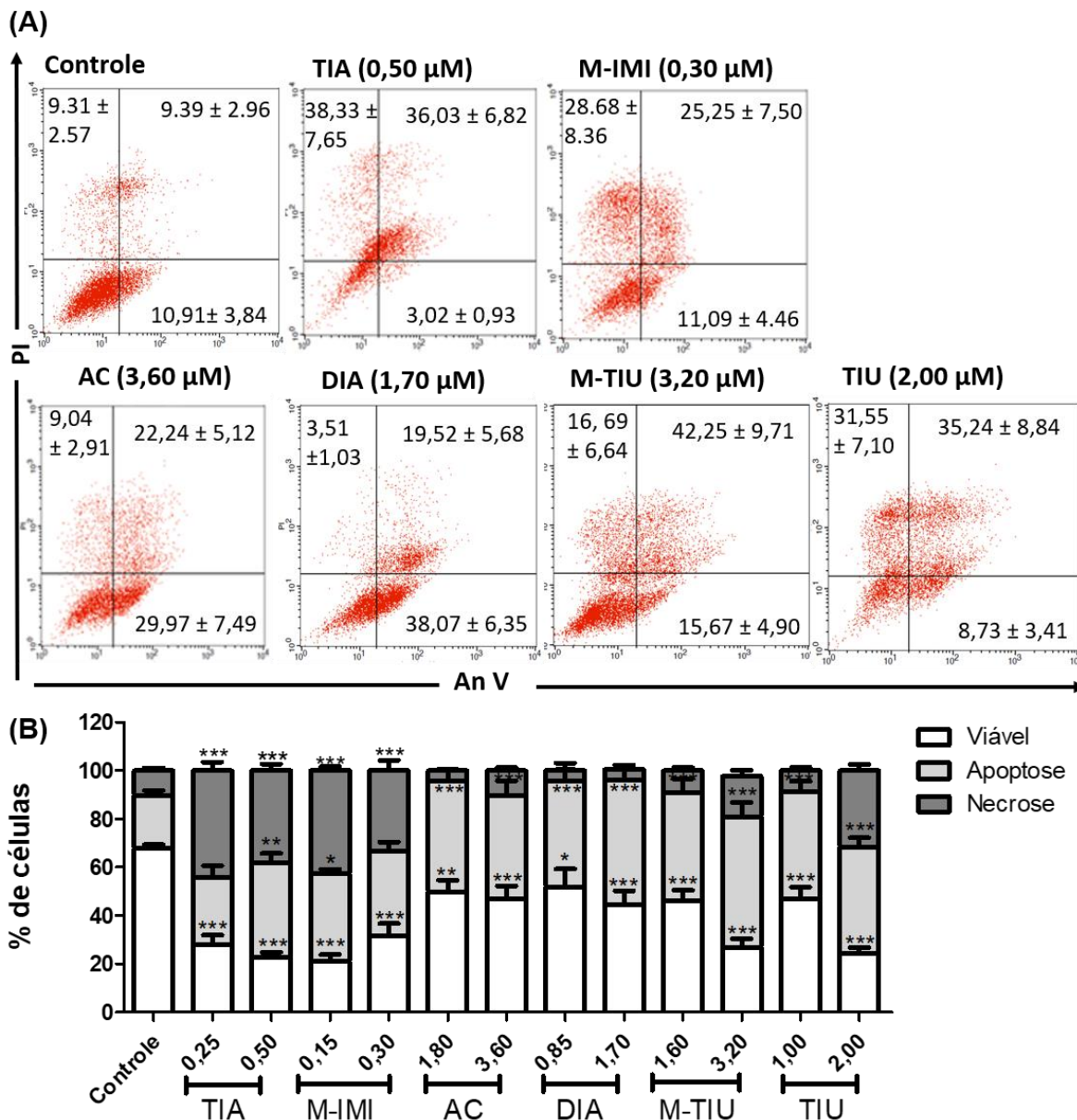


FIGURA 4.32 - Efeito sobre o mecanismo de morte de células MDA-MB-231 induzido pelos complexos de Ru (II) no período de 48 h. (A) Determinação percentual de células MDA-MB-231 expostas ao tratamento com a IC_{50} dos complexos por 48 h. Análise de citometria de fluxo usando a coloração dupla de anexina V-FICT / PI. (B) Porcentagem de células em apoptose inicial, tardia e necrose após o tratamento com $\frac{1}{2} IC_{50}$ e IC_{50} dos complexos. Diferenças significativas do controle são indicadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.2.8 - Detecção do potencial de membrana mitocondrial

Sabendo que complexos são capazes de induzir morte celular por apoptose e com o intuito de entender qual a via de morte celular é ativada, realizou-se o ensaio

que avalia o potencial de membrana da mitocôndria uma vez que essa organela desempenha um papel central nos sinais apoptóticos originados nas vias apoptóticas extrínseca e intrínseca, ou seja, as mitocôndrias decidem o destino de uma célula controlando o processo de apoptose^{135,137}. A disfunção mitocondrial está relacionada com a apoptose e muitas vezes ocorre muito antes de quaisquer alterações morfológicas características de apoptose, sendo a despolarização do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) uma característica de disfunção mitocondrial.

A disfunção mitocondrial, que envolve a apoptose, é observada com o abaixamento do potencial de membrana, o qual pode ser detectada medindo-se a variação do $\Delta\Psi_m$ das células coradas com JC-1, por citometria de fluxo. O corante JC-1 foi usado como uma sonda fluorescente para detectar mudanças no potencial da membrana mitocondrial. Em alto $\Delta\Psi_m$, o JC-1 forma agregados que emitem fluorescência vermelha, e em baixo $\Delta\Psi_m$, o JC-1 forma monômeros que emitem fluorescência verde (Figura 4.33A). Os compostos selecionados para essa análise foram os dois mais ativos (TIA e M-IMI), o complexo menos ativo (AC) e o complexo que apresentou maior número de células em apoptose com aumento em sub-G1 (M-TIU).

Como pode ser visto na Figura 4.33B, no controle negativo, a maior população de células se encontra na região de agregados (fluorescência vermelha), sendo observado apenas $4,98 \pm 1,22\%$ das células na região de monômeros (fluorescência verde). Após o tratamento da célula MDA-MB-231 com $3,20 \mu\text{M}$ do M-TIU e $3,60 \mu\text{M}$ do AC por 24 h, o aumento de células com disfunção mitocondrial foi significativo em relação ao controle ($p < 0,001$, Figura 4.33C), com $66,53 \pm 4,17\%$ e $24,10 \pm 7,81\%$, respectivamente. Em contrapartida, o tratamento com os complexos TIA ($0,50 \mu\text{M}$) e M-IMI ($0,30 \mu\text{M}$), a quantidade de células coradas de verde foi de $13,84 \pm 4,63\%$ e $5,59 \pm 1,86\%$, respectivamente. Esses resultados indicam que os complexos TIA, M-TIU e AC foram capazes de induzir despolarização mitocondrial com maior eficiência. Possivelmente, os complexos TIA, M-TIU e AC estão induzindo apoptose das células MDA-MB-231 pela via mitocondrial.

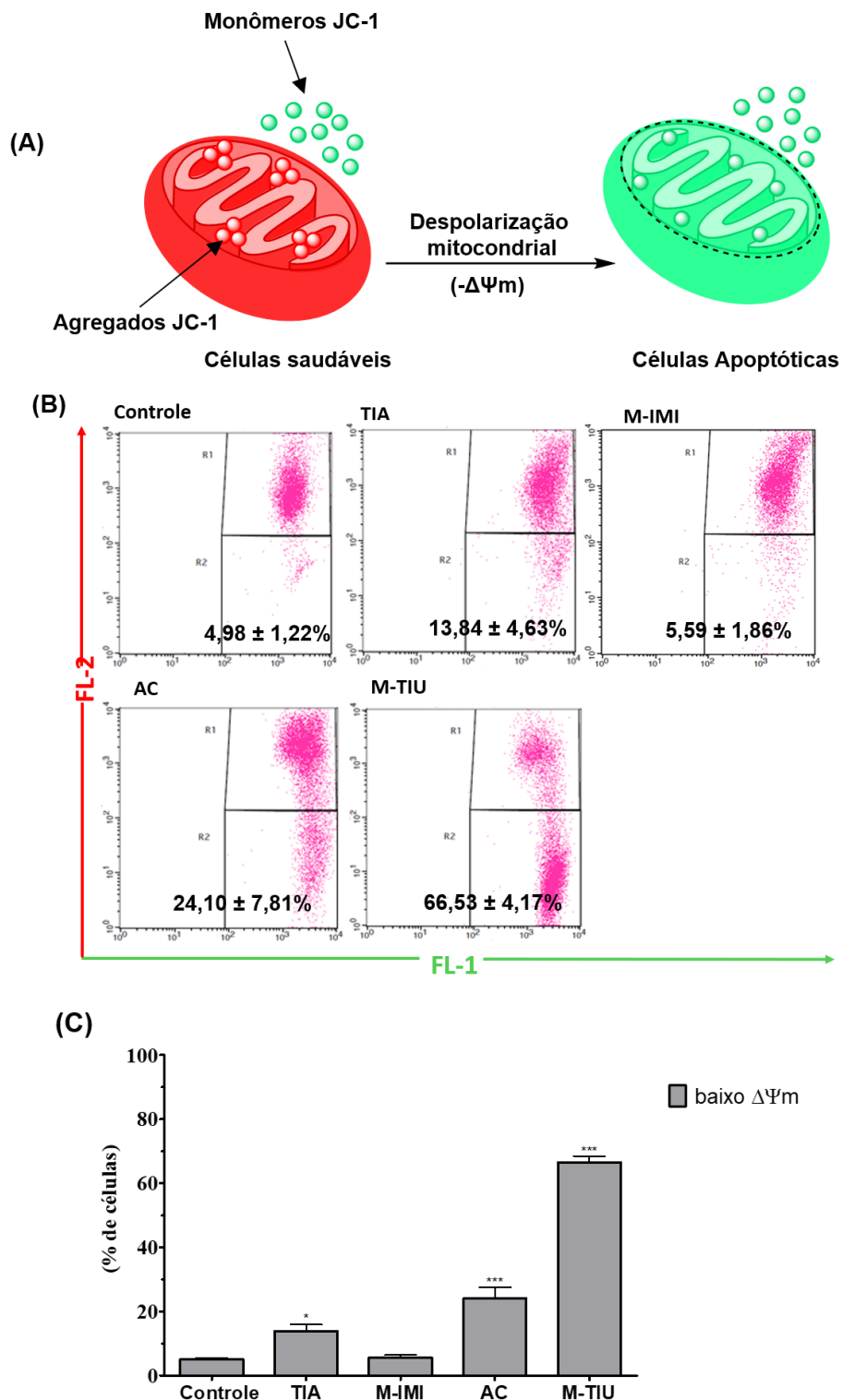


FIGURA 4.33 - Avaliação do potencial de membrana. (A) Disfunção mitocondrial com a despolarização da mitocôndria, em alto $\Delta\Psi_m$, o JC-1 forma monômeros que emitem fluorescência vermelha, e em baixo $\Delta\Psi_m$, o JC-1 forma um agregado que emite fluorescência verde. (B) Níveis de despolarização mitocondrial por citometria de fluxo, após 24h de tratamento com os complexos TIA, M-IMI, M-TIU e AC. (C) Porcentagem de células com perda da $\Delta\Psi_m$, indicando células apoptóticas. Diferenças significativas do controle são indicadas por * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

4.2.9 - Detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

As EROs atuam como importantes mediadores de apoptose em células cancerosas e também podem causar danos ao DNA^{138,139}. Estas espécies são fundamentais para manter a sobrevivência e a homeostase celular, quando em condições de equilíbrio entre sua formação e remoção. Porém, quando há alterações acentuadas neste equilíbrio, um estado pró-oxidante é gerado, levando ao estresse oxidativo¹³⁸. No processo apoptótico, o dano inicial induzido pelo estresse não mata as células diretamente, mas desencadeia um processo de sinalização apoptótica que leva à morte celular¹⁴⁰.

Os efeitos dos complexos nos níveis de EROs intracelulares foram avaliados usando uma sonda de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA). O DCFH-DA, uma molécula apolar, atravessa a membrana celular e é hidrolisado enzimaticamente por esterases intracelulares a DCFH não fluorescente. Na presença de espécies reativas de oxigênio, o DCFH é rapidamente oxidado em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) altamente fluorescente¹⁴¹. O acúmulo de EROs nas células MDA-MB-231 foi quantificado pela determinação da intensidade de fluorescência do produto oxidado diclorofluoresceína (DCF) utilizando um fluorímetro de microplacas. As concentrações utilizadas para avaliação da formação de espécies reativas de oxigênio, foram a IC₅₀ e 2x IC₅₀ do tratamento de 24 h obtido para linhagem MDA-MB-231.

Como mostra Figura 4.34, a exposição das células por 3 h com 10 µM de H₂O₂ (controle positivo), resultou em um aumento de 3,17 vezes a intensidade de fluorescência em comparação ao controle não tratado, quando analisadas as células tratadas com os complexos TIA, M-IMI, DIA, M-TIU e TIU observou-se um aumento significativo ($p < 0,001$) da fluorescência, indicando aumento dos níveis de EROs nas células. O aumento observado no tratamento com 1,90 e 3,80 µM do complexo M-IMI foi de 3,89 e 4,67 vezes maior que o controle negativo, respectivamente. Esses valores foram superiores ao controle positivo com H₂O₂. Todos os complexos mostraram aumento da fluorescência com o aumento da concentração, indicando que a geração de EROs ocorre de maneira dependente da concentração. Portanto, esses complexos podem aumentar os níveis intracelulares de EROs e facilitar a apoptose celular. Além disso, a capacidade de elevação dos níveis de EROs apresentada para os complexos,

são consistentes com seus níveis citotóxicos *in vitro*.

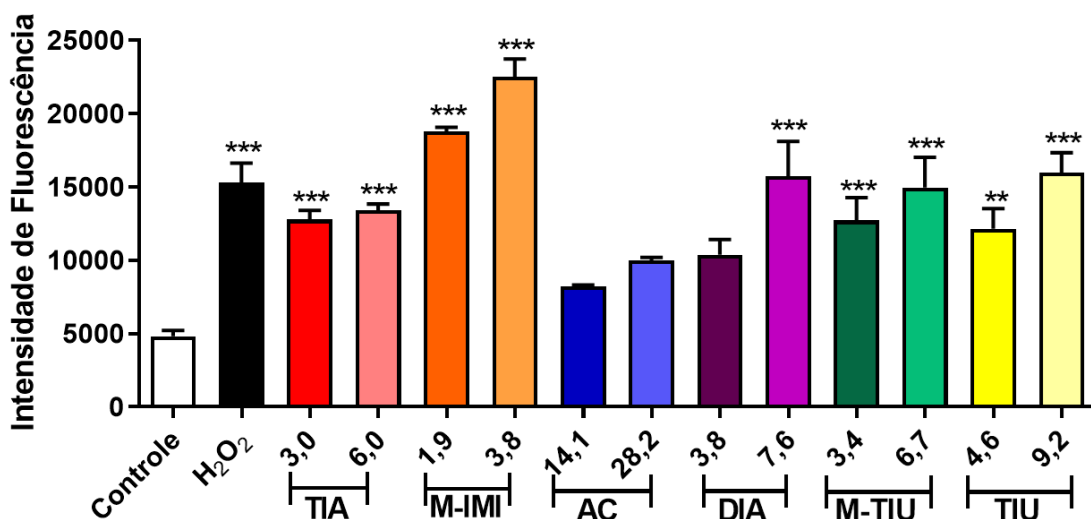


FIGURA 4.34 - Avaliação dos níveis de EROs. A acumulação de ERO em células MDA-MB-231 foi quantificada determinando a intensidade de fluorescência do produto oxidado diclorofluoresceína (DCF) após exposição de células por 3 h com H₂O₂ (controle positivo) e os complexos e rutênio (II). Diferenças significativas do controle são indicadas por **p < 0,01 e ***p < 0,001.

O aumento de EROs dentro da célula pode causar despolarização mitocondrial, assim como o dano no DNA. Curiosamente os níveis de EROs no tratamento com o complexo M-IMI foi superior aos demais complexos, uma vez que não foi observado despolarização do potencial de membrana mitocondrial para este complexo. Possivelmente o aumento dos níveis de EROs causado pelo complexo M-IMI esteja relacionado somente com o dano no DNA, o que foi observado no ensaio cometa. Os outros complexos apresentaram despolarização do potencial de membrana e aumento dos níveis de EROs, possivelmente a via mitocondrial e o dano DNA estejam relacionadas com o aumento de EROs.

4.2.10 - Migração Celular

O câncer de mama é a neoplasia mais comum entre as mulheres, sendo que o crescimento tumoral e a ocorrência de metástase elevam as taxas de mortalidade por esta doença. A capacidade de invasão, migração celular e implantação tumoral são peculiaridades das células metastáticas que permitem a disseminação da doença e

consequente pior prognóstico¹⁶.

Sabendo que o ensaio de migração celular é uma das técnicas utilizadas para avaliar as propriedades antimetastáticas dos compostos¹⁴², o efeito dos complexos de rutênio (II) na migração de células MDA-MB-231 foi avaliado utilizando o ensaio de fechamento da risca. No ensaio de migração celular, a extensão do fechamento da ferida foi avaliada na ausência e presença de $\frac{1}{2}$ IC₅₀ dos compostos, por 48 h, visto que nessas concentrações não havia alterações na morfologia das células e também nenhum efeito citotóxico, viabilizando a migração das células.

Na Figura 4.35A, é possível observar que o tratamento com o composto M-IMI apresentou um fechamento da área da risca em 42,00%, enquanto que, no controle não tratado, as células migraram fechando 88,00% da área da risca, portanto a inibição da migração no tratamento com o complexo M-IMI comparado ao controle não tratado foi de 48% no tempo de 48 h. Quando analisado o tratamento com os outros complexos, é possível observar que todos eles foram capazes de inibir a migração celular. Na Figura 4.35B é possível observar o fechamento da risca nos períodos de 24 e 48 h. No período de 24 h, o complexo TIA foi capaz de inibir eficientemente a migração celular, apresentando somente 11% do fechamento da risca. Dentre os complexos analisados, o TIA foi quem inibiu mais eficientemente a migração celular (Figura 4.35C), inibindo 69,28 % da migração. A ordem crescente de inibição da migração celular é de DIA < AC < M-TIU < M-IMI < TIU < TIA.

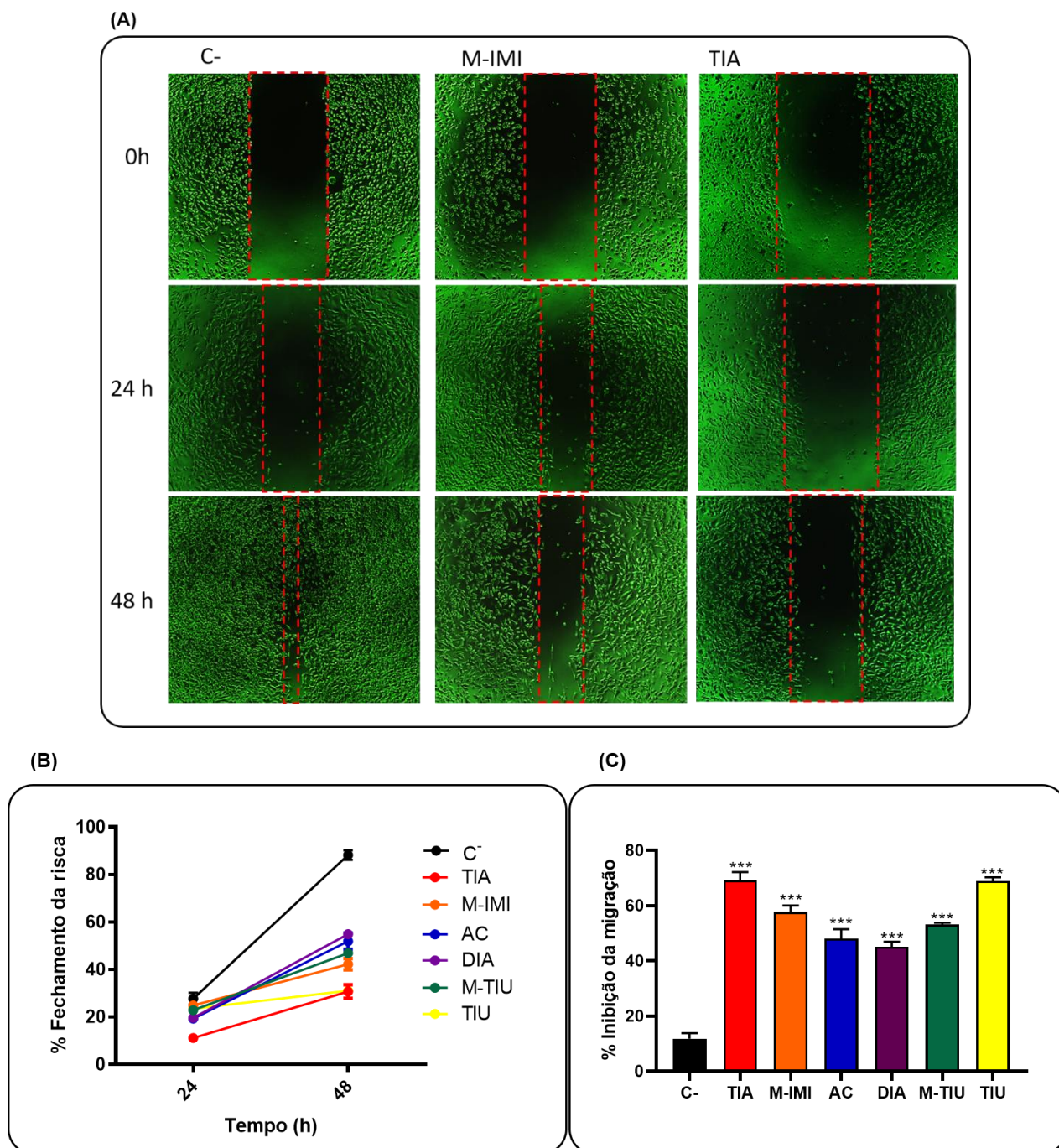


FIGURA 4.35 - Ensaio de fechamento da risca para análise de migração das células MDA-MB-231. (A) Imagens do fechamento da risca obtidas das células na ausência de tratamento (controle negativo) e tratadas com $0,15 \mu\text{M}$ do complexo M-IMI, $0,25 \mu\text{M}$ do complexo TIA nos tempos de 0, 24 e 48 h. (B) Porcentagem do fechamento da área da risca, das células tratadas com a $\frac{1}{2}$ IC_{50} dos complexos nos tempos de 24 e 48 h. (C) Porcentagem de inibição da migração celular após tratamento com os complexos por 48 h.

A capacidade do complexo M-IMI e M-TIU de interferir na migração das células MDA-MB-231 foi também avaliada pelo ensaio de migração por câmara de

“Boyden”. Como mostrado na Figura 4.36A-B, o tratamento das células durante 3 h com 0,50 e 1,00 μM do complexo M-IMI inibiu 36,50 e 76,00% da migração celular e o tratamento com 0,85 e 1,70 μM do complexo M-TIU, inibiu 0,00 e 45,10%, respectivamente. Os compostos mostraram atividade anti-migratório dependente da concentração, ou seja, a inibição da migração celular ocorre de maneira dependente da concentração. Como foi possível observar, o complexo M-IMI inibiu eficientemente a migração da célula mesmo em baixa concentração, evidenciando o potencial anti-migratório deste complexo. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos no ensaio de fechamento da risca, onde esses compostos também foram capazes de inibir o fechamento da risca.

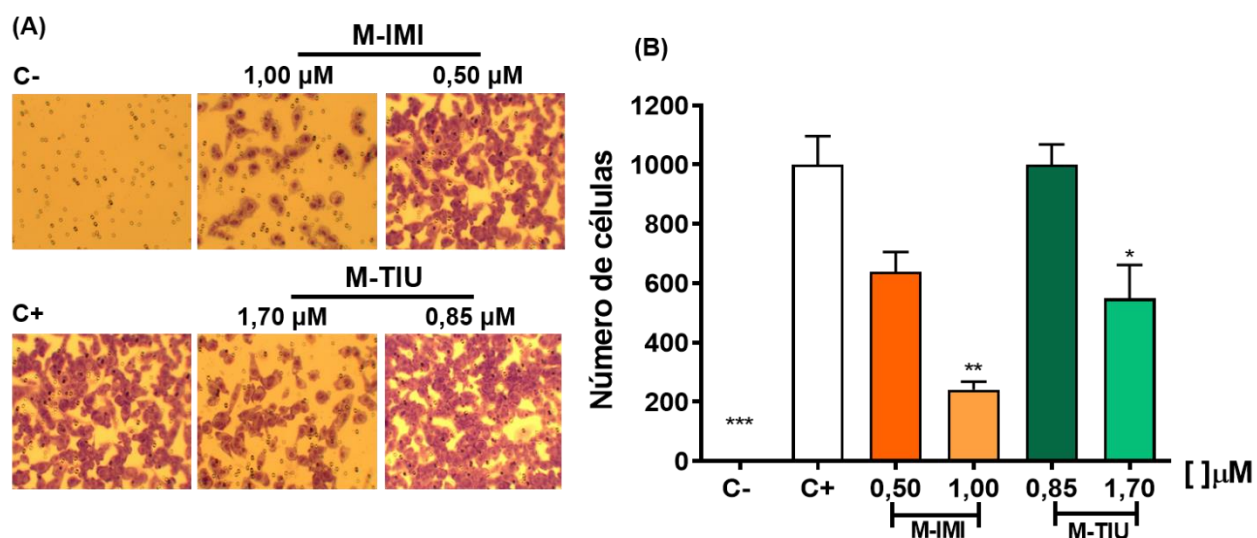
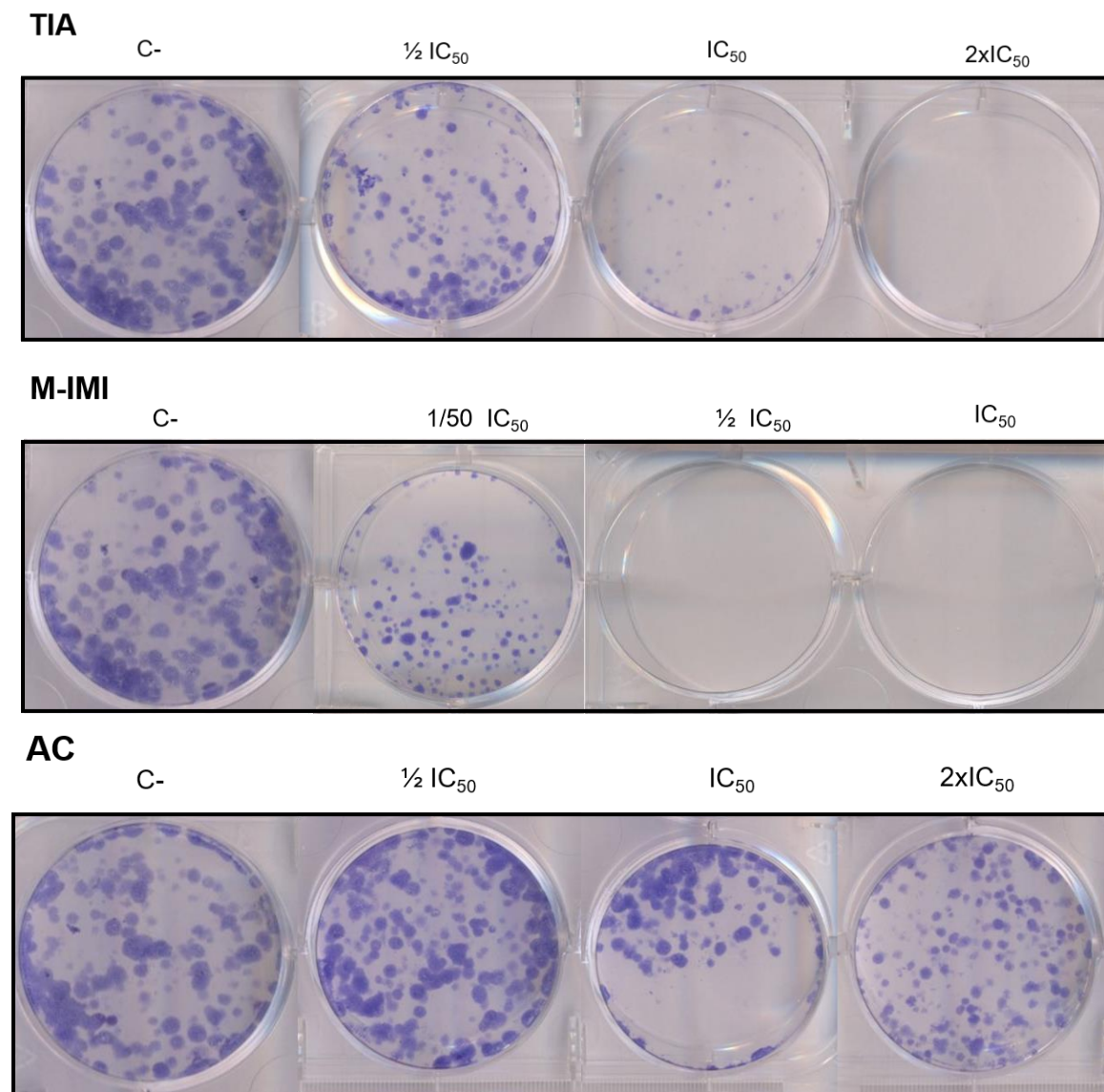


FIGURA 4.36 - Ensaio em câmara de *Boyden*. (A) Migração na câmara de “Boyden” de células MDA-MB-231 tratadas com 1,00 e 0,50 μM do complexo M-IMI e 1,70 e 0,85 μM do complexo M-TIU por 24 h. (B) Quantificação das células que migraram após tratamento com os complexos. Diferenças significativas em comparação com o controle positivo são indicadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.2.11 - Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico ou sobrevivência clonogênica, foi realizado para avaliar a sobrevivência a longo prazo das células que mantiveram a capacidade de gerar um considerável número de células-filhas, com formação de colônias, após um tratamento que induz morte associada à divisão celular, como dano no cromossomo, apoptose, etc.¹⁴³.

O ensaio clonogênico as células MDA-MB-231 foram tratadas com os complexos em diferentes concentrações e a capacidade de formação de colônias das células que sobreviveram após o tratamento foi analisada. Como mostrado na Figura 4.37, os complexos foram capazes de inibir a formação de colônias de uma maneira dependente da concentração, bem como diminuir seu tamanho.



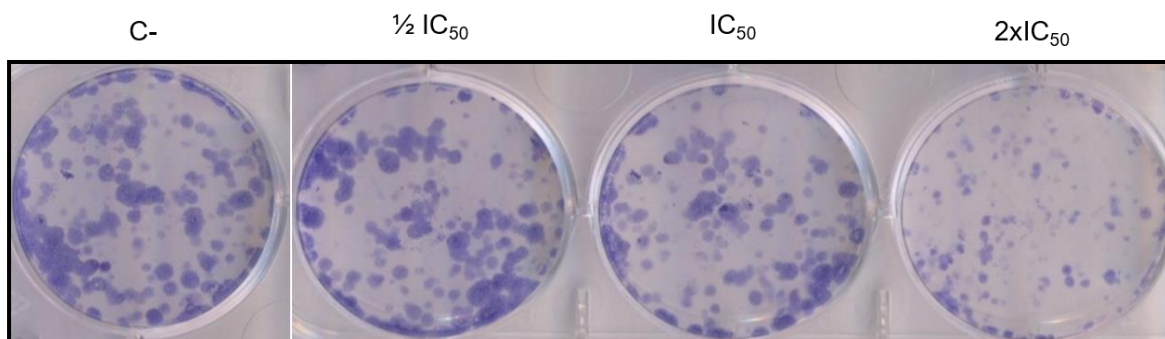
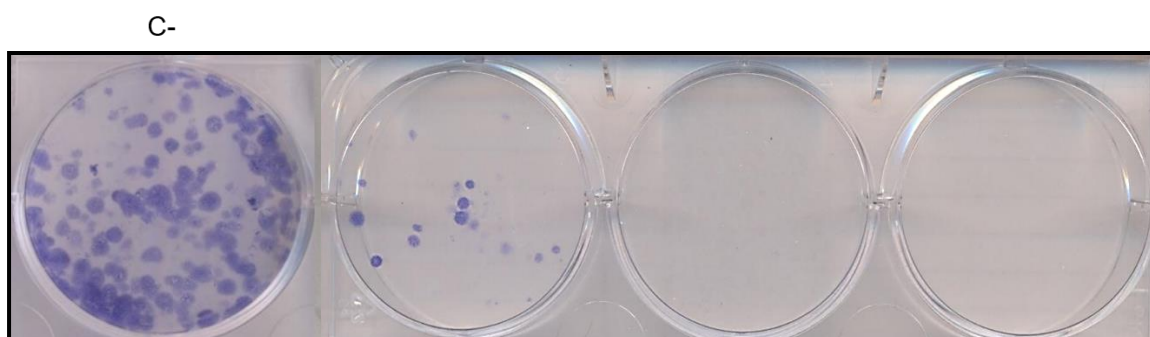
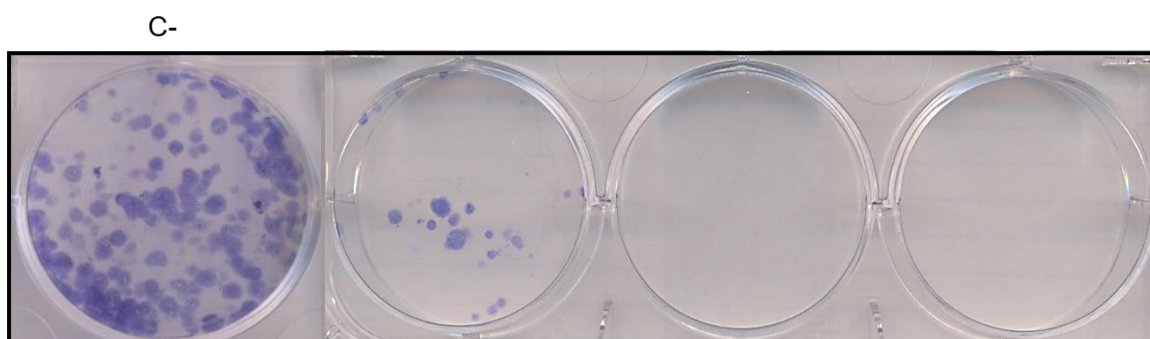
DIA**M-TIU****TIU**

FIGURA 4.37 - Ensaio clonogênico de células MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações dos complexos, por 48 h.

A média da área de colônias das células do controle negativo e dos tratamentos com os complexos foram analisadas no image-J. Para o cálculo das frações de sobrevivência (FS) de cada tratamento foi utilizado a Equação 7:

$$FS = \frac{\text{área de colônia em cada tratamento}}{\text{área de colônia do controle negativo}} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

A média da área do controle negativo foi considerada em 100%.

A porcentagem da área de colônia (Figura 4.38) calculadas para os complexos, mostraram que os complexos M-IMI, M-TIU e TIU foram capazes de inibir completamente a formação de colônias na concentração de IC_{50} , com 0% de colônias. A inibição da sobrevivência celular segue a ordem de $AC < DIA < TIA < TIU < M-TIU < M-IMI$. No tratamento com o complexo M-IMI só foi possível observar formação de colônias em baixa concentração ($1/50 IC_{50}$). Os complexos AC e DIA, não foram capazes de inibir eficientemente a formação de colônias nas concentrações de $1/2 IC_{50}$ e IC_{50} , nessas concentrações as células que sobreviveram ao tratamento conseguiram duplicar e formar colônias. Na concentração de $2x IC_{50}$ os complexos AC e DIA conseguiram inibir 38,19 e 19,61 %, respectivamente. Todos esses resultados mostraram que os complexos foram capazes de prevenir a formação de colônias, assim como, a migração celular, em baixas concentrações, indicando um efeito citotóxico e citostático.

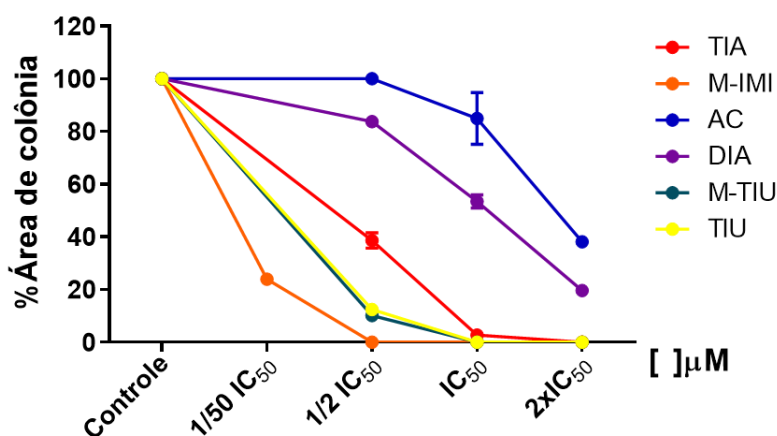


FIGURA 4.38 - Sobrevivência clonogênica analisada para a linhagem de célula MDA-MB-231, após tratamento com os complexos por 48 h.

4.2.12 - Avaliação da atividade antiangiogênica pelo ensaio CAM

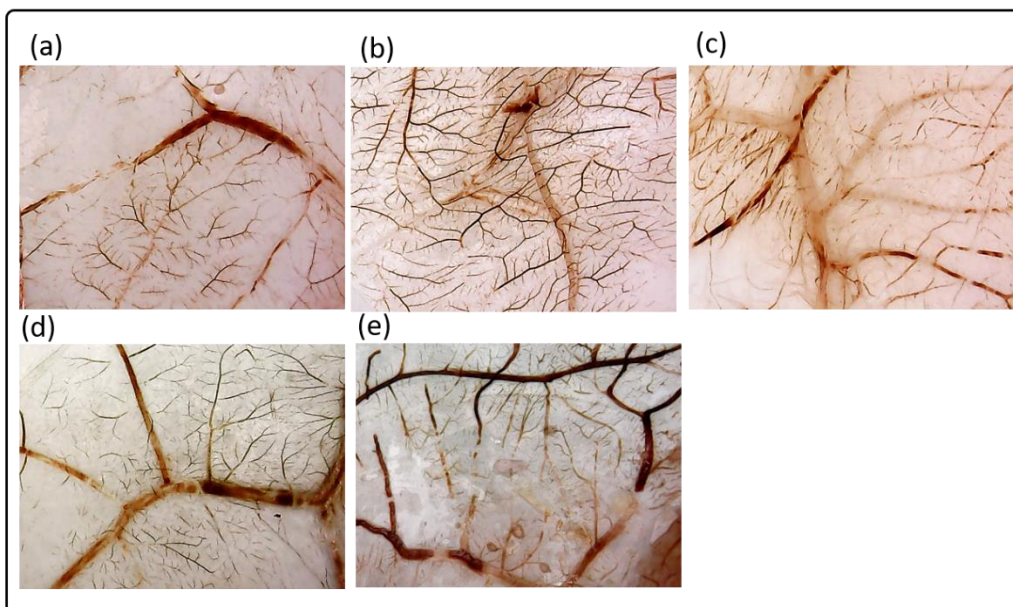
A partir da formação de um tumor novos vasos sanguíneos são necessários para o crescimento e fornecimento de nutrientes que estão na corrente sanguínea, para ajudá-lo a se desenvolver, invadir os tecidos adjacentes e se espalhar. A formação desses novos vasos é conhecida como angiogênese, sendo a inibição da angiogênese um alvo potencial para novos tratamentos contra o câncer, uma vez que as atividades anticancerígena e, particularmente, antimetastática, são frequentemente relacionados a um efeito antiangiogênico. Com isso, torna-se importante avaliar os efeitos anti-

metástático induzidos pelos agentes anticancerígenos e a sua influência sobre o processo de angiogênese¹⁴⁴.

O modelo de membrana coriolantóide de embrião de galinha (CAM) é um método alternativo *in vivo* muito utilizado para estudar angiogênese, pois a visibilidade, a acessibilidade e o rápido crescimento do desenvolvimento da CAM oferecem vantagens para o estudo e manipulação das funções vasculares. Vários estudos relataram o uso bem-sucedido da CAM na biologia do câncer e na angiogênese tumoral, pois muitas células tumorais colocadas na CAM mostraram englobar e seguir todos os passos da progressão do tumor: crescimento, angiogênese, invasão, extravasamento e metástase, permitindo um estudo experimental do potencial antiangiogênico de muitos compostos. A eficácia de vários agentes pró e antiangiogênicos foram avaliadas utilizando métodos qualitativos e quantitativos para determinar a densidade vascular e as respostas morfológicas da CAM^{145,146}.

As células MDA-MB-231 foram utilizadas como controle positivo, pois são células metastáticas que apresentam desenvolvimento vascular, angiogênese e metástase em CAM de aves¹⁴⁷. A Figura 4.39A, mostra imagens de diferentes CAM a partir de controles tratados com água (a), 3×10^5 células MDA-MB-231 (b) e co-tratadas com células MDA-MB-231 e complexos TIA (c), M-IMI (d) e M-TIU (e). As membranas tratadas com os complexos apresentam um menor número de vascularização quando comparadas às membranas tratadas com apenas células tumorais (controle positivo). A quantificação dessa vascularização (Figura 4.39B) mostrou uma diminuição significativa na porcentagem de rede vascular formada nas CAMs tratadas com os complexos TIA (0,5 μ M), M-IMI (0,3 μ M) e M-TIU (3,2 μ M) quando comparados com o controle positivo, mostrando potenciais atividades antiangiogênicas nessas concentrações. A porcentagem de vascularização foi menor no tratamento com o complexo TIA, mostrando um maior efeito inibitório da angiogênese. Como esses complexos apresentaram atividades antimigratória, em ensaio de fechamento da risca e câmara de *Boyden* (complexo M-IMI), e antiangiogênico em CAMs, estes podem ser indicados como possíveis agentes antimetastáticos.

(A)



(B)

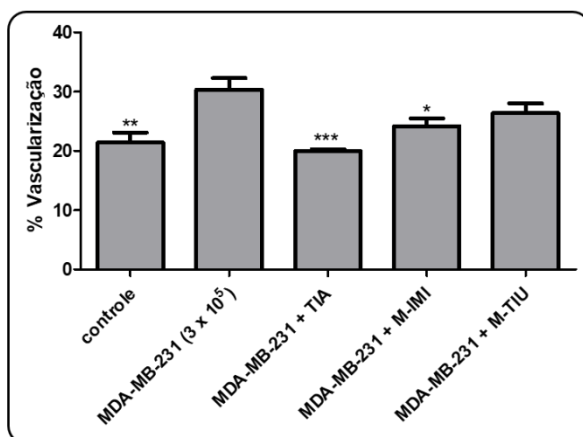


FIGURA 4.39 - Análises de CAMs. (A) Imagens representativas de CAMs, após tratamento de 72 h com (a) meio DMEM com 1% DMSO (controle negativo), (b) MDA-MB-231 (controle positivo), (c) 0,50 μ M complexo TIA + MDA-MB-231, (d) 0,30 μ M complexo M-IMI + MDA-MB-231 e (e) 3,20 μ M complexo M-TIU + MDA-MB-231. (B) Porcentagem de vascularização das dez CAMs obtidas por grupo de tratamento. ANOVA e teste de Tukey para análise das porcentagens de vascularização. * $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em comparação ao controle positivo.

A análise histopatológica das CAMs testadas confirmou a atividade antiangiogênica dos complexos (Figura 4.40). Nenhuma das membranas tratadas com os complexos mostraram a redução da hiperemia tecidual e dos anticorpos celulares infiltrados, invalidando a regressão do câncer. A análise dos parâmetros histopatológicos (Tabela 4.15) mostrou um aumento significativo da rede vascular formada em comparação com o controle negativo ($p < 0,05$), demonstrando uma potente atividade angiogênica dessas células utilizando o modelo CAM. Nas membranas tratadas com os

complexos, ocorreu uma redução dos vasos e infiltrados celulares, evidenciando a atividade inibitória da progressão da angiogênese. Resultados semelhantes foram observados com outros complexos de rutênio (II)^{146,148}.

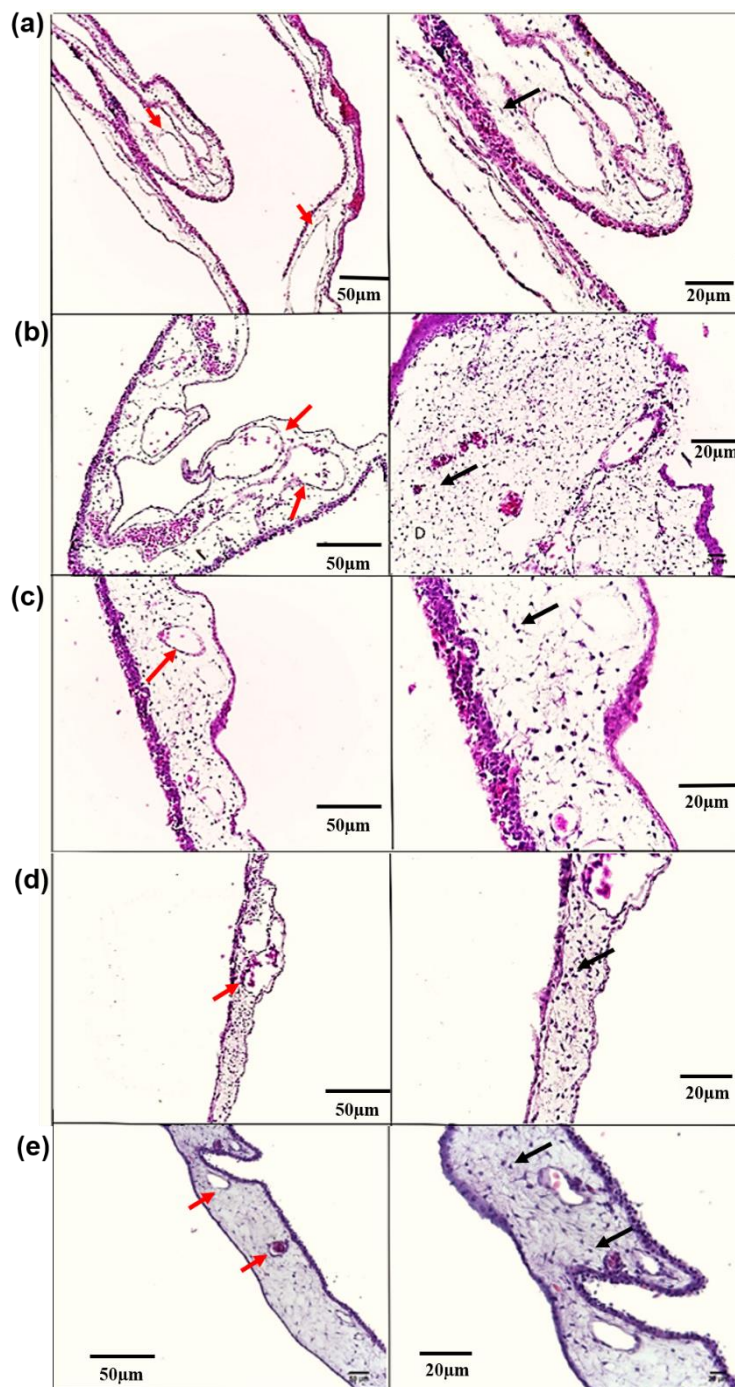


FIGURA 4.40 - Imagens obtidas de CAMs coradas com hematoxilina-eosina (HE) de diferentes grupos de tratamento. (a) controle negativo, (b) 3×10^5 MDA-MB-231 (controle positivo), (c) $0,50 \mu\text{M}$ TIA + MDA-MB-231, (d) $0,30 \mu\text{M}$ M-IMI + MDA-MB-231 e (e) $3,20 \mu\text{M}$ M-TIU + MDA-MB-231. Setas em vermelho indicam revascularização e setas pretas indicam células inflamatórias. As imagens à esquerda de cada tratamento foram obtidas com aumento de 20 e à direita aumento de 40.

TABELA 4.15 - Análise histológica das CAMs apresentando Média \pm desvio padrão (DP) dos parâmetros histológicos classificados em uma escala de 0-3. ANOVA, Tukey.

Tratamento	Vasos sanguíneos	Infiltrado Celular	Fibroblasto	Tamanho dos Vasos
Meio + 1% DMSO	1,20 \pm 0,44	1,40 \pm 0,54	1,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0
MDA	2,80 \pm 0,44 ^a	2,20 \pm 0,83 ^a	2,40 \pm 0,54 ^a	2,00 \pm 0,70 ^a
TIA+MDA-MB-231	1,20 \pm 0,44 ^b	1,40 \pm 0,54 ^b	1,40 \pm 0,5 ^b	1,80 \pm 0,44 ^a
M-IMI+MDA-MB-231	1,60 \pm 0,51 ^b	1,30 \pm 0,51 ^b	1,30 \pm 0,51 ^b	1,60 \pm 0,51 ^a
M-TIU+MDA-MB-231	1,50 \pm 0,54 ^b	1,30 \pm 0,54 ^b	1,30 \pm 0,54 ^b	1,60 \pm 0,44 ^a

^a p<0.05 quando comparado com água; ^b p<0.05 quando comparado com a MDA-MB-231.

4.3 - Interação com Biomoléculas e inibição enzimática

4.3.1 - Estudo de interação com albumina do soro humana (HSA)

A HSA, como a proteína mais abundante no sistema circulatório (40 mg mL⁻¹), desempenha um papel importante na ligação e entrega de fármacos em muitos sítios de ligação, também aumenta a solubilidade de fármacos hidrofóbicos no plasma, sendo assim, uma proteína importante para estudar as suas interações com os possíveis fármacos. Existem várias estratégias buscando a seletividade de compostos anticancerígenos, uma delas seria o carreamento desses compostos pela HSA, até o alvo de interesse¹⁴⁹.

A supressão é um processo de redução da intensidade da fluorescência de uma determinada espécie, normalmente ocorre quando se tem colisão, transferência de energia e formação de complexos (HSA-composto). Existem dois processos de supressão: dinâmico e estático. Na supressão dinâmica ocorre a colisão entre o fluoróforo e o supressor no estado excitado e na supressão estática ocorre a formação de aduto entre o fluoróforo e o supressor no estado de menor energia, no estado fundamental. A supressão estática e dinâmica pode ser distinguida pela dependência diferente da temperatura e da viscosidade. A supressão dinâmica é dependente da difusão, em temperaturas mais altas tem-se uma difusão mais rápida e conseqüentemente maiores quantidades de supressão colisional, resultando no aumento

da constante de supressão. No caso, de supressão estática o aumento da temperatura resultará no decréscimo da constante de supressão, pois o aumento da temperatura levará a uma dissociação de complexos fracamente ligados, logo, menores quantidade de supressores estáticos¹⁵⁰.

Sabendo que HSA é uma biomolécula que apresenta fluorescência, devido principalmente a presença do fluoróforo triptofano, foi então avaliada a interação entre os complexos sintetizados e a HSA em duas diferentes temperaturas (298 K e 310K), utilizando a técnica de fluorescência. Os espectros de fluorescência mostraram uma diminuição progressiva da intensidade de fluorescência da proteína com o aumento da concentração dos complexos (5-50 μ M), como pode ser observado nos espectros de fluorescência da HSA com o complexo TIA (Figura 4.41). Esse comportamento observado indica uma interação entre o complexo e a HSA, onde a fluorescência intrínseca da proteína está sendo suprimida com a interação dos complexos. A supressão da fluorescência também foi observada com os outros complexos, como pode ser visto nos seus espectros de fluorescência apresentados em apêndice (Figura A60–A64).

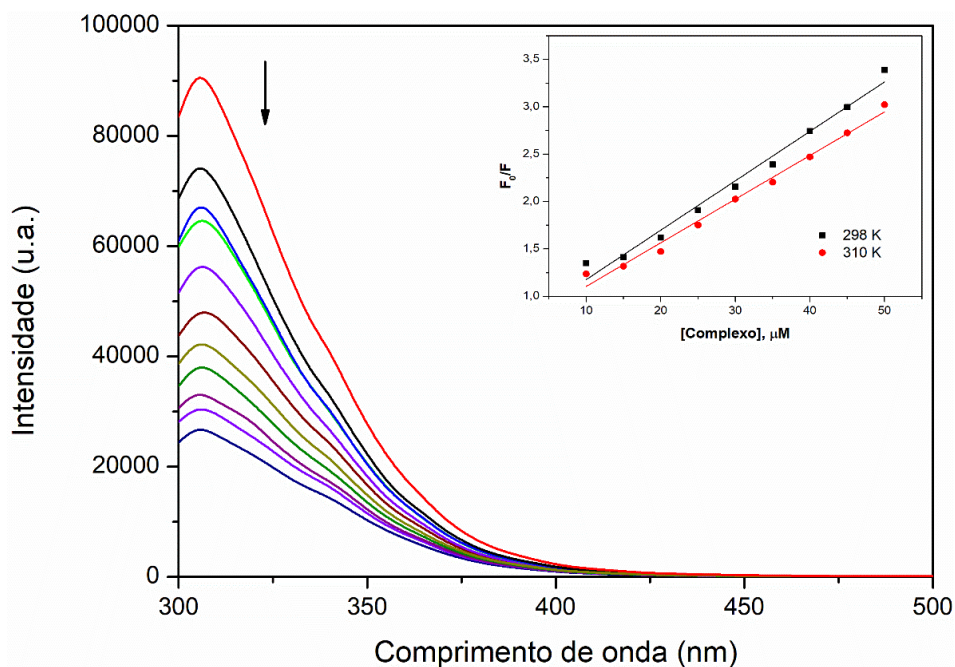


FIGURA 4.41 - Espectros de fluorescência da HSA com a adição de diferentes concentrações do complexo TIA (5-50 μ M), temperatura de 298 K. Figura do canto superior direito têm-se as retas obtidas de F_0/F versus [complexo] nas temperaturas de 298 e 310 K.

A análise quantitativa da supressão da fluorescência foi determinada pela constante de Stern-Volmer (K_{sv}), sendo calculada utilizando a equação de Stern-

Volmer¹⁵⁰. Outra constante avaliada foi a de supressão bimolecular (k_q), considerando que o τ_0 do triptofano na albumina é igual a 10^{-8} s ¹⁵¹. Os valores de k_q foram determinados utilizando a Equação 8 : $k_q = \frac{K_{sv}}{\tau_0}$.

A partir dos valores de K_{sv} e k_q obtidos nas duas diferentes temperaturas, 298 K e 310 K, foi possível determinar o mecanismo de interação predominante entre os complexos e a HSA. Como pode ser observado na Tabela 4.16, os valores de K_{sv} e k_q diminuem com o aumento da temperatura, para a maioria dos complexos, caracterizando um mecanismo de interação predominantemente estático. Em mecanismo de interação estático, o aumento da temperatura causou uma desestabilização do aduto formado entre o complexo e a HSA (complexo-HSA) no estado fundamental, levando a uma diminuição de K_{sv} . O valor de k_q depende da probabilidade de colisão entre a proteína e o composto, reflete a eficácia de supressão ou a acessibilidade do triptofano ao supressor que é o complexo. O valor máximo de k_q para um mecanismo de interação dinâmico é de $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ¹⁴⁶ e os valores de k_q encontrados para HSA com o compostos avaliados foi da ordem de $10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, sendo este superior ao valor limite, sugerindo um mecanismo de interação estático¹⁵⁰. Apenas o complexo AC tem um comportamento diferente dos demais, apresentando aumento de K_{sv} e k_q com o aumento da temperatura, possivelmente está ocorrendo mais de um mecanismo. Esse comportamento pode estar relacionado com a presença do grupo carboxilato não coordenado, que pode estar interagindo de forma diferente com a proteína.

TABELA 4.16 - Valores das constantes K_{sv} e k_q , calculadas a partir da interação entre os complexos e a HSA, nas temperaturas de 298 e 310 K.

Complexos	Temperatura (K)	K_{sv} ($\times 10^4 M^{-1}$)	k_q ($\times 10^{12} M^{-1} s^{-1}$)
TIA	298	$7,54 \pm 0,08$	7,54
	310	$5,27 \pm 0,04$	5,27
M-IMI	298	$5,34 \pm 0,06$	5,34
	310	$4,84 \pm 0,08$	4,84
AC	298	$11,17 \pm 0,01$	11,17
	310	$13,07 \pm 0,05$	13,07
DIA	298	$9,09 \pm 0,15$	9,09
	310	$7,35 \pm 0,17$	7,35
M-TIU	298	$3,29 \pm 0,01$	3,29
	310	$2,96 \pm 0,05$	2,96
TIU	298	$5,13 \pm 0,07$	5,13
	310	$4,67 \pm 0,06$	4,67

Sabendo da existência de interação por meio de um mecanismo de supressão predominantemente estático entre os complexos e a HSA, torna-se importante avaliar a magnitude dessa interação, o qual pode ser determinada pela constante de ligação (K_b). Dessa forma, os parâmetros de ligação foram obtidos utilizando a Equação 5. Na Tabela 4.17 são mostrados os valores de K_b e n obtidos para os complexos.

TABELA 4.17 - Parâmetros de ligação obtidos para os complexos nas temperaturas de 298 e 310 K.

Complexos	Temperatura (K)	K_b (M^{-1})	n
TIA	298	$1,53 \times 10^6$	1,32
	310	$3,53 \times 10^6$	1,40
M-IMI	298	$3,16 \times 10^6$	1,42
	310	$9,61 \times 10^6$	1,55
AC	298	$3,90 \times 10^5$	1,13
	310	$1,79 \times 10^6$	1,28
DIA	298	$5,01 \times 10^6$	1,41
	310	$1,50 \times 10^7$	1,54
M-TIU	298	$1,10 \times 10^5$	1,12
	310	$6,10 \times 10^5$	1,30
TIU	298	$4,70 \times 10^5$	1,24
	310	$2,17 \times 10^6$	1,40

Os valores K_b confirmam a existência de interação dos complexos de Ru (II) com a HSA. Em se tratando de complexos lipofílicos, eles podem interagir eficientemente com regiões hidrofóbicas da HSA, como pode visto pela forte interação entre o complexo e a HSA, com valores K_b na faixa de 10^5 – 10^7 . Além disso, o valor de n (1,13-1,55), que é aproximadamente igual a 1, indica uma ligação de 1:1, onde o complexo se liga a um sítio de ligação da HSA. Esses valores de K_b também foram encontrados na literatura para outros complexos de rutênio (II), evidenciando a afinidade dos complexos de rutênio pela HSA⁴⁴.

Existem diferentes tipo de forças de interação, dentre elas estão as forças de interações hidrofóbicas, eletrostáticas, Van der Waals, ligações de hidrogênio, entre outros. Sabendo disso, o tipo de força de interação envolvida entre os complexos e a HSA foi investigado. Vários parâmetros termodinâmicos, como a energia de Gibbs (ΔG°), variação da entalpia (ΔH°) e variação da entropia (ΔS°), sofrem influência com as interações, e com isso foram calculados. Os parâmetros termodinâmicos de cada complexo nas temperaturas de 298 K e 310 K foram determinados utilizando as Equações 9 e 10:

$$\ln \frac{K_{b1}}{K_{b2}} = \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \frac{\Delta H^\circ}{R} \quad (\text{Equação 9})$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (\text{Equação 10})$$

Onde, K_{b1} e K_{b2} são as constantes de ligação correspondentes das temperaturas T_1 (298 K) e T_2 (310 K), respectivamente, e o $R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos são mostrados na Tabela 4.18.

Tabela 4.18 - Parâmetros termodinâmicos obtidos para os complexos nas temperaturas de 298 e 310 K.

Complexos	T (K)	ΔG° (kJ mol ⁻¹)	ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
TIA	298	-35,28	53,51	297,95
	310	-38,86		297,97
M-IMI	298	-37,01	71,18	318,35
	310	-41,44		318,35
AC	298	-31,89	97,43	433,98
	310	-37,11		433,99
DIA	298	-38,22	70,51	364,86
	310	-42,59		364,84
M-TIU	298	-28,76	109,61	464,33
	310	-34,33		464,32
TIU	298	-32,36	98,07	437,68
	310	-37,60		437,64

A partir dos sinais dos parâmetros termodinâmicos é possível determinar o tipo de interação que está ocorrendo entre os complexos e a proteína¹⁴⁹. Os sinais esperados de contribuições para ΔH° e ΔS° são:

- ✓ Sinais positivos para ΔH° e ΔS° , indicam um tipo de interação hidrofóbica;
- ✓ Sinais negativos para ΔH° e ΔS° , indicam força de Van der Waals e interação por ligações de hidrogênio.
- ✓ Sinal negativo para ΔH° e positivo para ΔS° , indicam interações eletrostáticas.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4.16, é evidente que o processo da ligação é espontâneo, uma vez que os valores de ΔG^0 são negativos. Além disso, os valores positivos obtidos para ΔH^0 e ΔS^0 indicam uma força de interação hidrofóbica entre os ligantes do complexo e a HSA¹⁵².

Quando o complexo se liga a proteína, ocorre uma alteração parcial da estrutura conformacional da HSA, onde os fragmentos apolares localizados no interior da proteína, são expostos para o solvente. Essa parcial mudança na estrutura da proteína leva a uma reorganização das moléculas do solvente ao redor da proteína aumentando o efeito hidrofóbico^{152,153}. Esse efeito está associado a moléculas apolares. Dessa forma, as interações hidrofóbicas serão determinantes para a estabilização do sistema proteína-complexo.

4.3.1.1 - Avaliação do sítio de ligação na HSA

A organização estrutural da HSA fornece uma variedade de locais de ligação do ligante. Existem dois principais locais de ligação na HSA, localizados nos subdomínios IIA e IIIA. Esses subdomínios se diferem em tamanho, flexibilidade e na afinidade de ligação. O subdomínio IIA é maior e mais flexível quando comparado ao subdomínio IIIA da biomolécula. De acordo com a nomenclatura de Sudlow, ânions heterocíclicos volumosos, por exemplo o fármaco varfarina, se ligam ao sítio I de Sudlow (localizado no subdomínio IIA), enquanto o local do sítio II de Sudlow (localizado no subdomínio IIIA) tem preferência por carboxilatos aromáticos com uma conformação estendida, como por exemplo, o fármaco ibuprofeno¹⁵⁴. Na estrutura de HSA o seu único resíduo de triptofano (Trp-214) está localizado na posição 214 e no subdomínio IIA do arcabouço proteico. Para melhor compreensão da localização desses sítios na proteína, é mostrado na Figura 4.42 a estrutura tridimensional da HSA.

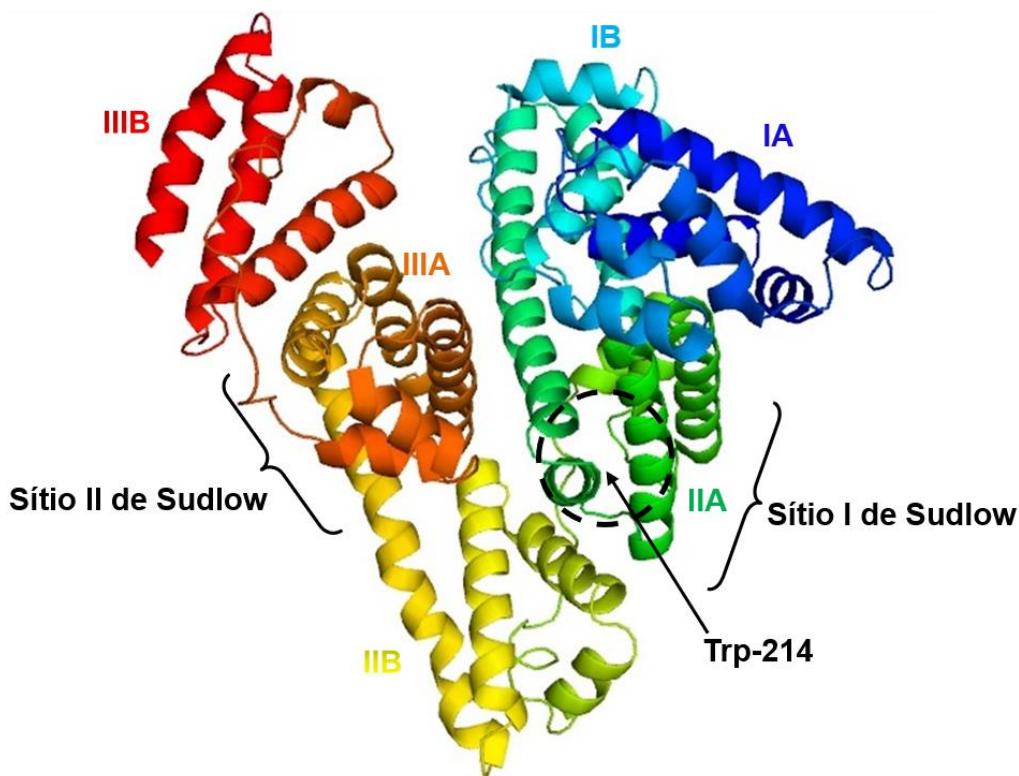


FIGURA 4.42 - Estrutura tridimensional da HSA, com seus principais sítios de ligação.

Sabendo que os complexos interagem com HSA, se ligando a um sítio da proteína, seria interessante investigar o sítio de ligação deste complexo na HSA. Em se tratando de complexos volumosos, possivelmente o sítio mais acessível a esses complexos seria o sítio I de Sudlow. Com isso, foi avaliada a interação desses complexos com o sítio I, usando uma sonda fluorescente de dansil-L-arginina (DA), que se liga especificamente ao sítio I da HSA^{155,156}. A formação do complexo DA-HSA aumenta a intensidade de fluorescência de DA, e o deslocamento dessa sonda leva ao decréscimo da fluorescência.

A ligação DA-HSA aumentou eficientemente a fluorescência deslocando o máximo do comprimento de onda de emissão para o azul em 445 nm (Figura 4.43), com isso foi possível avaliar a supressão da fluorescência de DA-HSA nessa região. Os espectros de fluorescência DA-HSA (Figura 4.43A) mostraram uma supressão da fluorescência de DA-HSA com o aumento da concentração do complexo TIA (5-50 μ M), assim como os outros complexos da série (Figura A65-A69). No entanto, o potencial de redução da intensidade do sinal de DA-HSA foi diferente entre os complexos. Esses resultados evidenciam o efeito competitivo entre os complexos e o DA pelo sítio I da

proteína, o que pode causar um deslocamento de DA do sítio I na HSA, e conseqüentemente diminuir a fluorescência. Portanto, aqueles complexos com maior afinidade pelo sítio apresentaram maior supressão da fluorescência de DA-HSA.

Nos espectros de fluorescência de DA-HSA com a varfarina (Figura 4.43B), é possível observar uma redução da fluorescência e deslocamento do máximo de emissão para comprimento de onda menor com o aumento da concentração da varfarina (5-50 μM), fenômeno característico do aumento de hidrofobicidade em torno do fluoróforo¹⁵⁰. Essas mudanças indicam a existência de uma competição direta entre a varfarina e o DA, o qual foi capaz de expulsar a sonda fluorescente da HSA. Outras evidências de ligação da varfarina na HSA, podem ser verificadas pelas sobreposições das fluorescências de DA livre, varfarina livre e varfarina ligada a HSA, apresentadas nos espectros.

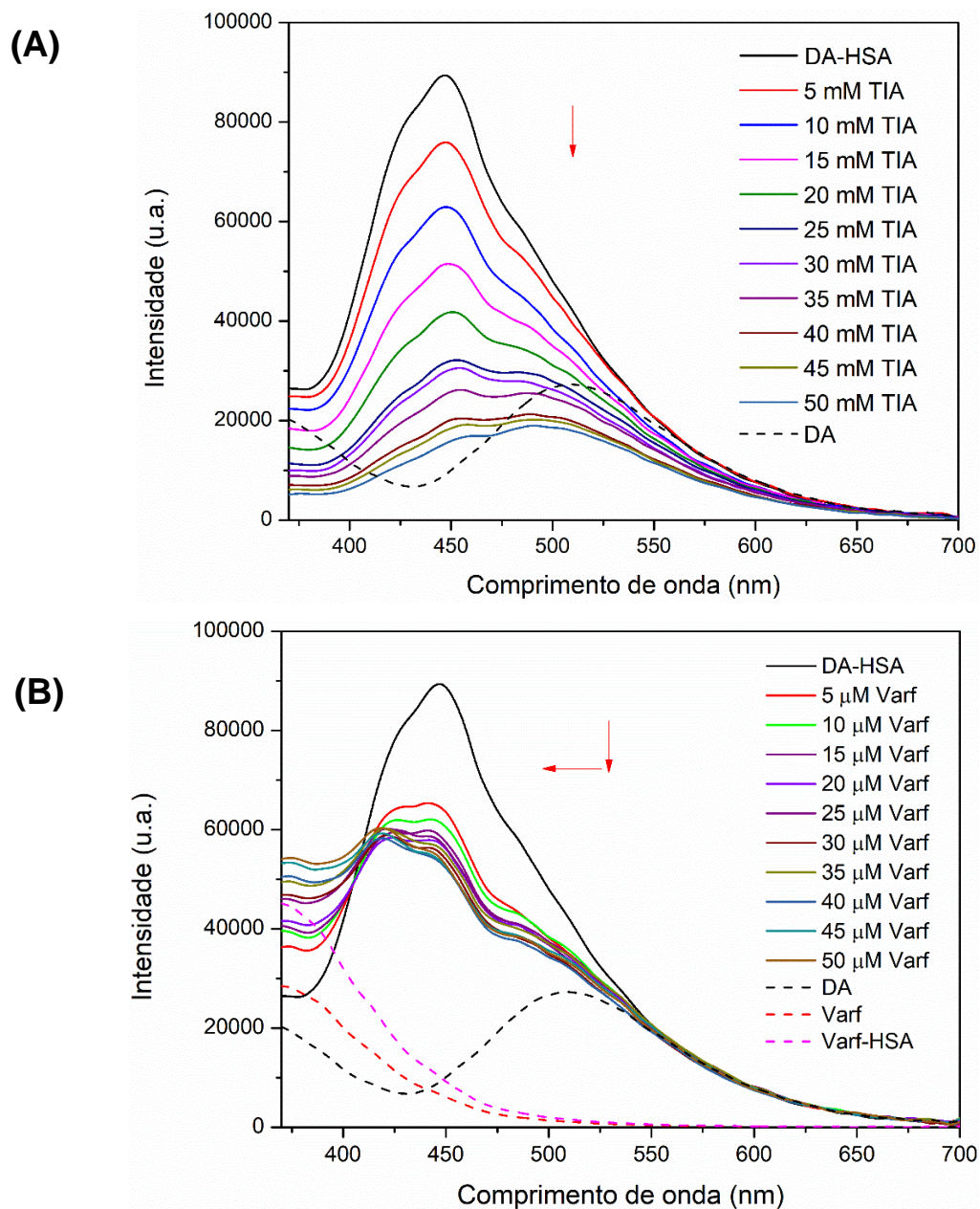


FIGURA 4.43 - Espectros de fluorescência de DA-HSA. (A) Supressão da fluorescência de DA-HSA com adição do complexo TIA (5-50 μ M), a 298 K. (B) Em (---) espectro de DA, (- - -) espectro da varfarina, (- - -) espectro da varfarina com HSA. Em linha preta tem-se apenas DA-HSA ($[HSA]=[DA]=5 \mu M$), as outras linhas são na presença de quantidades crescentes do complexo M-IMI (5-50 μ M). As setas indicam o comportamento dos espectros com o aumento da concentração do composto.

O gráfico da Figura 4.44 mostra a diminuição da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração dos complexos, a partir do comprimento de onda máximo de emissão da fluorescência de DA-HSA, é possível observar que todos eles reduziram a fluorescência, mostrando um efeito competitivo com a sonda

fluorescente pelo sítio I, possivelmente este é o sítio o qual os complexos estão se ligando na HSA. No caso do complexo M-IMI a redução da fluorescência não foi tão evidente, possivelmente este complexo tem maior afinidade por outro sítio da HSA. O decréscimo da varfarina não é mostrada no gráfico devido ao deslocamento da banda de supressão.

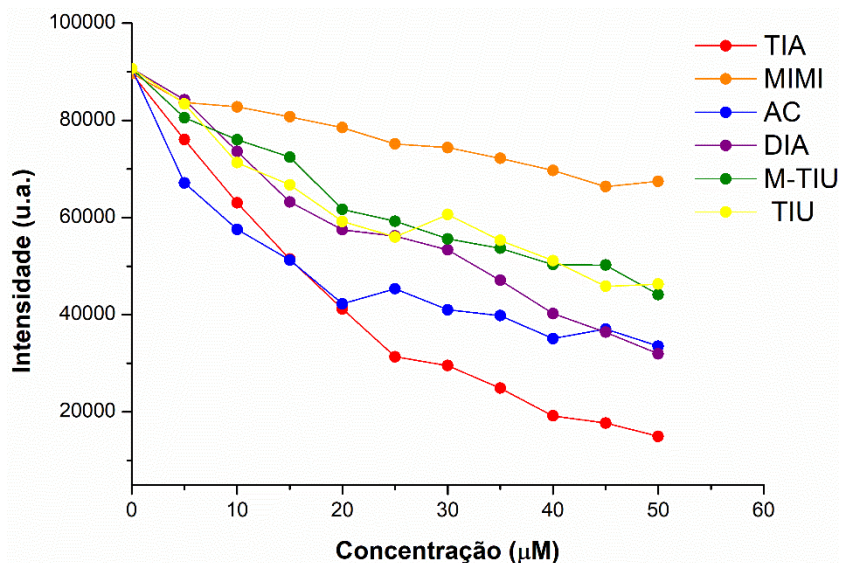


FIGURA 4.44 - Diminuição da intensidade de fluorescência de HSA-DA com a adição dos complexos. A fluorescência foi medida a 445 nm, com excitação a 340 nm.

4.3.1.2 - Efeito da HSA sobre a atividade citotóxica

Interações com a albumina podem influenciar na biodisponibilidade dos compostos e afetar a sua atividade biológica. Uma vez que, os compostos mostraram forte interação com a HSA, com valores de K_b na ordem de 10^5 - 10^7 , experimentos foram realizados para avaliar se a ligação entre o complexo e a HSA poderia estar influenciando na atividade citotóxica do complexo frente à linhagem de células MDA-MB-23. Com isso, os compostos, na concentração de IC_{50} , foram pré-incubados com a HSA nas proporções de 1:1, 1:3, 1:5 e 1:10 e depois adicionados nas células MDA-MB-231, após 48h foi avaliada por MTT, a influência dessa interação na atividade anticancerígena dos compostos. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 4.45.

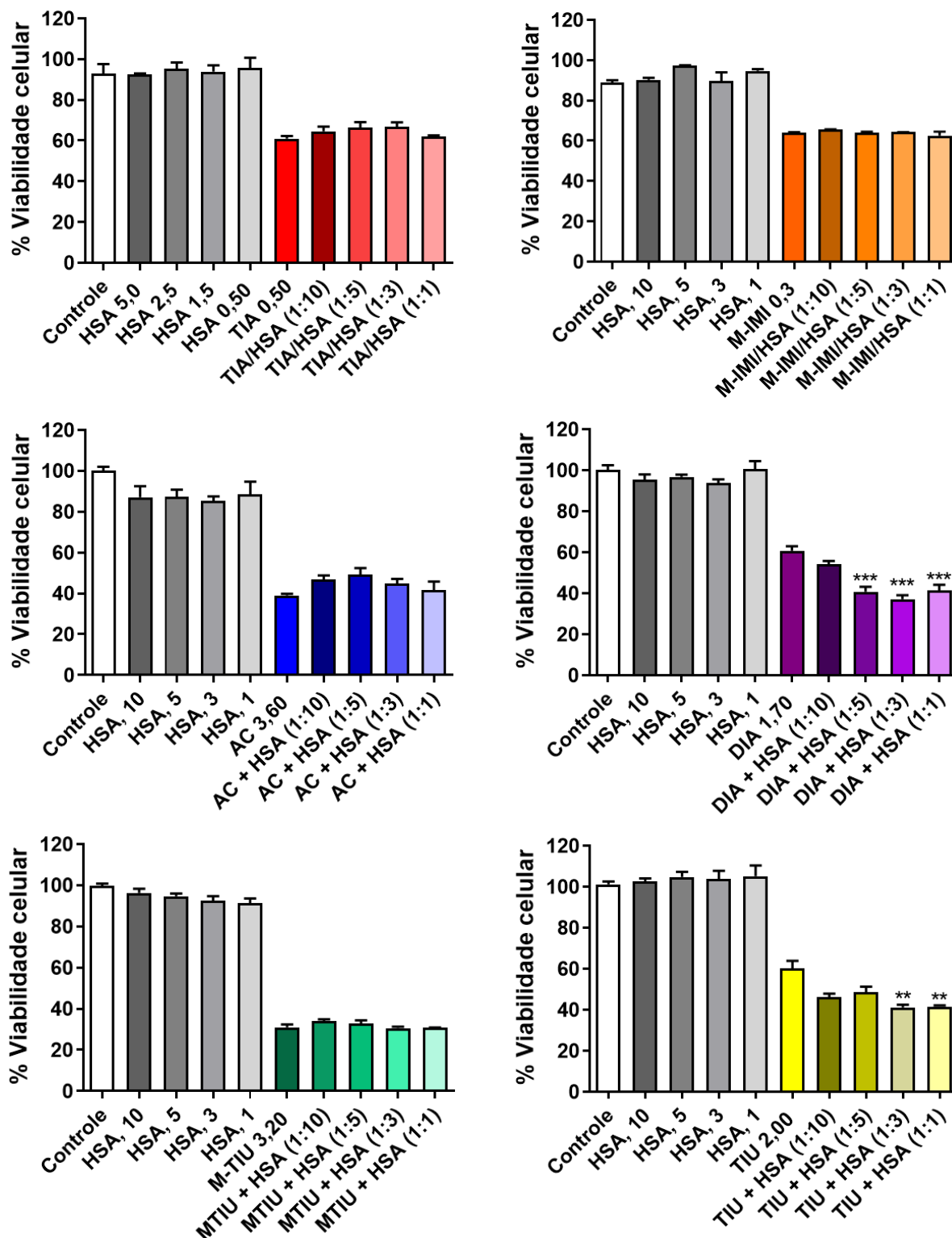


FIGURA 4.45 - Efeito da HSA na citotoxicidade dos complexos frente as células tumorais de mama (MDA-MB-231) após 48h. Os dados são as médias ± DP da triplicata de três experimentos. Diferenças significativas do complexo livre (IC₅₀) são indicadas por ** p < 0,01 e *** p < 0,001.

Como pode ser visto na Figura 4.45, a viabilidade celular na presença de somente HSA não mudou significativamente quando comparado às células controle sem HSA (controle negativo), mostrando insensibilidade da célula MDA-MB-231 na presença da proteína. A pré-incubação dos complexos TIA, M-IMI, AC e M-TIU com HSA não afetou significativamente a ação dos complexos frente à células MDA-MB-231, pois os valores de IC₅₀ apresentaram pequenas variações nas diferentes proporções de HSA, onde a viabilidade das células permaneceram relativamente iguais às células tratadas com o complexo livre, indicando que a interação com HSA não inativa esses complexos. Em contrapartida, a interação do complexo DIA, com a HSA, nas proporções de 1:1, 1:3 e 1:5, diminuiu significativamente ($p < 0,001$) a viabilidade das células, sendo mais ativos que o complexo livre, frente às células MDA-MB-231. A interação do complexo TIU com a HSA nas proporções de 1:1 e 1:3, também mostrou melhor atividade que o complexo livre. Esses resultados corroboram com os valores de K_b apresentados para os complexos, onde o DIA foi o complexo que apresentou maior valor de K_b na temperatura de 37°C, a qual foi a temperatura utilizada para pré-incubação dos complexos com a HSA.

Possivelmente a ligação entre os complexos e a HSA está ocorrendo de forma reversível, permitindo sua liberação no alvo de interesse, que são as células tumorais, mantendo sua atividade. Essa ligação reversível com a HSA é importante para o carregamento e direcionamento seletivo dos complexos para as células tumorais, dado ao fato de que a albumina se acumula nos tecidos tumorais como consequência do efeito de permeabilidade e retenção (EPR) aumentada¹⁵⁷.

4.3.2– Estudo de interação com o DNA

4.3.2.1 – Titulação espectroscópica

Outra biomolécula de interesse como alvo de interação dos compostos e possível causa da morte celular é o DNA. Alguns trabalhos relataram que o possível modo de ação da cisplatina é através da ligação covalente do complexo com as bases nitrogenadas do DNA, o que impede a replicação do DNA, levando à morte celular¹⁵⁸.

Tendo em vista o quimioterápico inorgânico cisplatina como referência, isso torna necessário avaliar a se há alguma semelhança no modo de ação dos novos complexos de rutênio de interesse biológico. Com isso foi realizado diferentes técnicas para determinar a força e o tipo de interação entre os complexos e o DNA^{159,160}.

A titulação espectroscópica é uma técnica muito utilizada para a avaliação de interações entre moléculas e o DNA, onde são analisadas as mudanças no espectro do composto com a adição de alíquotas do DNA, a partir de uma concentração conhecida de DNA e do composto. A principal mudança avaliada é a diminuição da banda de absorção (hipocromismo) e o seu deslocamento. Com isso, é possível determinar a magnitude da interação dos complexos com o DNA, a partir da constante de ligação (K_b), que pode ser determinada a partir da Equação 6.

Na análise dos espectros de absorção UV-Vis foi monitorada a banda em torno de 300 nm, sendo atribuída a uma transição intraligante $\pi-\pi^*$. Nos espectros do complexo TIA (Figura 4.46), é possível observar um hipocromismo da banda em 303 nm, no entanto a porcentagem de hipocromismo foi muito próximo do observado para os espectros com adição de somente tampão, sendo a diferença das porcentagem de hipocromismo inferior 5%, isso indica que o decréscimo da banda de absorção observada estava relacionada com o efeito de diluição da amostra e não à interação. Esse comportamento pode caracterizar um tipo de interação fraca ou inexistente, não sendo possível determinar um valor de K_b para este complexo.

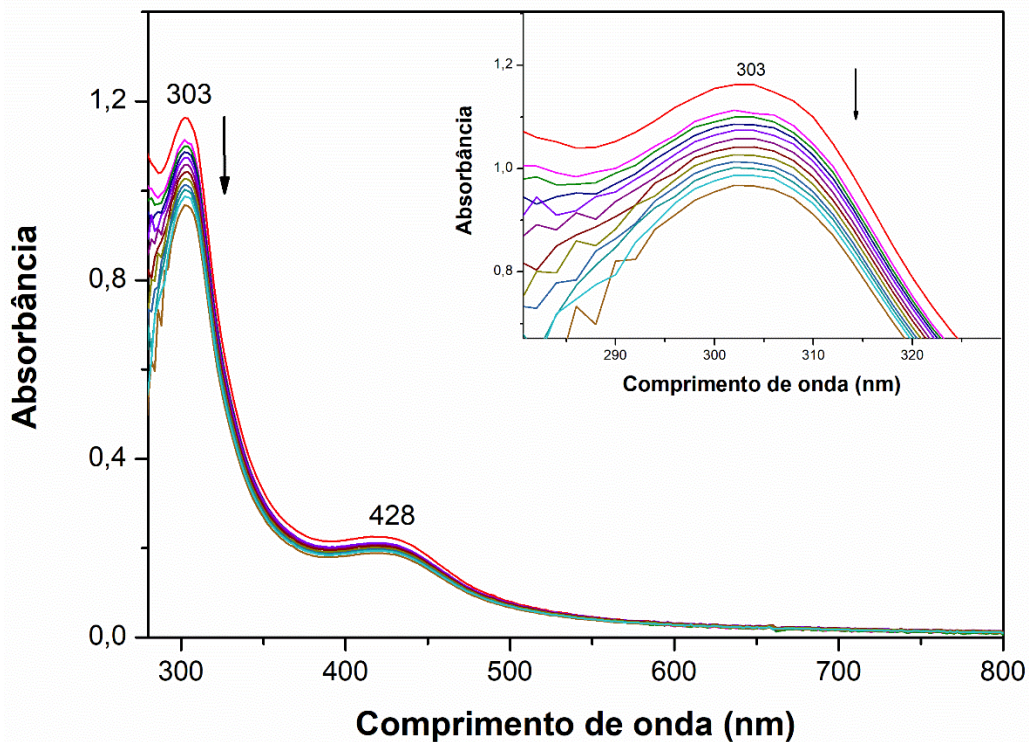


FIGURA 4.46 - Espectros de absorção no UV-visível do complexo TIA com a titulação de CT-DNA, em pH 7,4. No canto superior direito tem-se a ampliação dos espectros na região da banda 303 nm para melhor visualização do hipocromismo.

Os valores de K_b foram determinados a partir da reta obtida de $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs $[DNA]$, onde K_b é a razão entre o coeficiente angular e linear da reta. As retas obtidas para os complexos que foram calculados o K_b , estão inseridas nas figuras dos espectros de cada composto. Os valores de K_b e a porcentagem de hipocromismo obtido da diferença entre o hipocromismo de adição de DNA e tampão, calculados para os complexos, são apresentados na Tabela 4.19.

TABELA 4.19 - Valores de K_b para os compostos com hipocromismo > 5%.

Complexos	K_b	Interação	Hipocromismo (%)
TIA	--	Fraca/inexistente	< 5
M-IMI	--	Fraca/inexistente	< 5
AC	--	Fraca/inexistente	< 5
DIA	$1,96 (\pm 0,42) \times 10^3$	Fraca	6,55
M-TIU	$9,25 (\pm 0,15) \times 10^2$	Fraca	12,63
TIU	$6,53 (\pm 0,24) \times 10^2$	Fraca	8,07

Os complexo M-IMI e AC (Figura A70 e A71) apresentaram o mesmo comportamento que o TIA, mostrando uma fraca interação com o DNA ou até mesmo inexistente, neste caso não foi possível determinar a existência ou não da interação com o DNA utilizando somente essa técnica. Quando avaliados os complexos DIA, M-TIU e TIU (Figura A72–A74), foi possível calcular o valor de K_b , os quais foram na ordem de 10^2 - 10^3 . Esses valores de K_b , indicam um modo de interação fraco, quando comparado a outros complexos de rutênio (II) existentes na literatura^{43,66,129}. Essas interações fracas apresentadas pelos complexos são condizentes com as estruturas desses complexos, visto que, os complexos não apresentam ligantes de cadeia extendidas com planaridade para fazer uma intercalação no DNA, são muito volumosos para poder se acomodar entre os pares de base do DNA e apresentam ligantes coordenados de forma bidentada, o que dificilmente serão labilizados para a ligação covalente do complexo no DNA.

4.3.2.2 – Viscosidade

O modo possível de interação entre complexos e ct-DNA também foi avaliado por experimentos de viscosidade. A viscosidade de um fluido está relacionada a resistência ao fluxo, a uma determinada temperatura, ou seja, quanto maior a viscosidade de um fluido, maior será o seu tempo de escoamento. Devido à sua sensibilidade à alteração do comprimento do DNA, a medição da viscosidade é

considerada o meio mais eficaz para estudar o modo de ligação do complexo ao DNA em solução¹⁶¹.

As variações na viscosidade do DNA determinam o modo de interação entre os complexos e o DNA. O aumento da viscosidade dos DNA, indica um modo de interação não covalente intercalativo, onde se tem a inserção de uma molécula aromática planar entre dois pares de bases adjacentes do DNA, resultando no alongamento e desenovelamento da hélice do DNA. No caso de interações pelo sulco do DNA, a viscosidade da solução de DNA não aumenta, pois essa interação não induz grandes mudanças conformacionais no DNA^{159,160}. Em interações eletrostáticas tem-se pequenas variações da viscosidade do DNA, em função de interações eletrostática entre moléculas carregadas positivamente com os grupamentos fosfatos do DNA¹⁶⁰. Neste contexto, foi avaliada as alterações na viscosidade relativa do ct-DNA com o aumento da concentração dos complexos e a cloroquina (CQ).

A partir dos dados obtidos nos experimentos de viscosidade do DNA, foi construído de um gráfico de $(\eta / \eta_0)^{1/3}$ vs [complexo]/[DNA], onde η e η_0 são as viscosidades específicas do DNA, na presença e ausência dos complexos, respectivamente (Figura 4.47). A cloroquina (CQ) foi utilizada como padrão de intercalação com o DNA, pois sob condições apropriadas, a CQ aumenta a viscosidade relativa do DNA. Como pode ser visto na Figura 4.47, a CQ mostrou um aumento na viscosidade do DNA com o aumento da concentração de CQ, enquanto que, os complexos não alterou significativamente a viscosidade relativa do DNA, indicando um modo de interação eletrostático. A interação eletrostática entre os complexos e o DNA é condizentes, pois se trata de complexos catiônicos que podem estar fazendo interações eletrostáticas com os grupos fosfatos carregados negativamente no DNA.

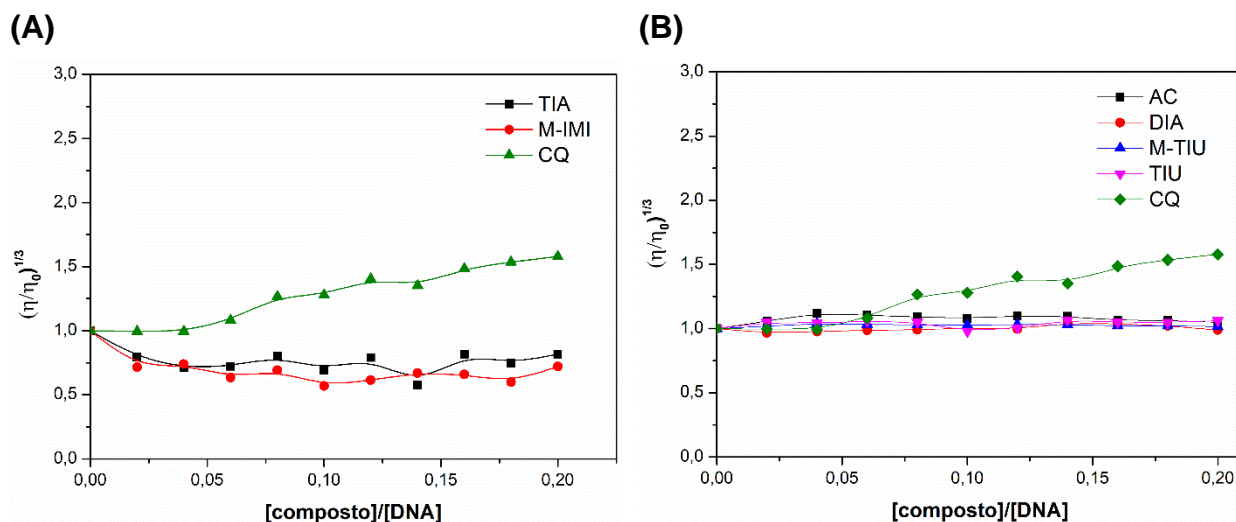


FIGURA 4.47 - Gráficos da viscosidade do DNA com o aumento da concentração dos complexos (A) TIA, M-IMI e CQ, (B) AC, DIA, M-TIU, TIU e CQ.

4.3.3 – Inibição enzimática da Topoisomerase IB humana

A enzima topoisomerase IB humana (hTopo IB) é um importante alvo anticancerígeno que pode ser inibida por compostos naturais e sintéticos, usados para bloquear a proliferação de células tumorais. O função dessa enzima está associada a manutenção e replicação do DNA, promovendo a relaxação do DNA superenovelado, o que essencial para a transcrição e replicação do DNA. Em células tumorais as enzimas estão mais expressas que em células normais, o desenvolvimento de compostos com inibição destas enzimas seria um estratégia de ação seletiva para células tumorais^{162,163}.

4.3.3.1 – Efeito dos complexos na atividade de relaxamento

As topoisomerases promovem o relaxamento do DNA superenovelado, levando a uma migração mais lenta na corrida eletroforética. A presença de um inibidor da enzima irá impedir o relaxamento do DNA superenovelado, apresentando no gel um perfil de bandas semelhantes ao do DNA superenovelado sozinho.

A eficiência dos complexos TIA e M-IMI na inibição da atividade de relaxamento da hTopo IB foi testada por ensaios de relaxamento, reagindo um substrato de DNA plasmidial superenovelado com a enzima, na presença de concentrações

crecentes dos complexos (Figura 4.48 linhas 4–13). As reações, foram incubadas durante 30 min a 37°C e paradas com SDS (Figura 4.48). Os dois complexos foram capazes de inibir a enzima de um modo dependente da concentração. O complexo TIA atingiu inibição total na concentração de 12,5 μM , enquanto o complexo M-IMI não atingiu uma inibição completa, mesmo na concentração mais alta usada no experimento. O ensaio de inibição enzimática também foi realizado na presença de DMSO, mostrando que a enzima hTopo IB mantém a sua atividade (controle positivo Figura 4.48, linha 3). O substrato sozinho mostrou ser totalmente estável, linha 1 (controle negativo).

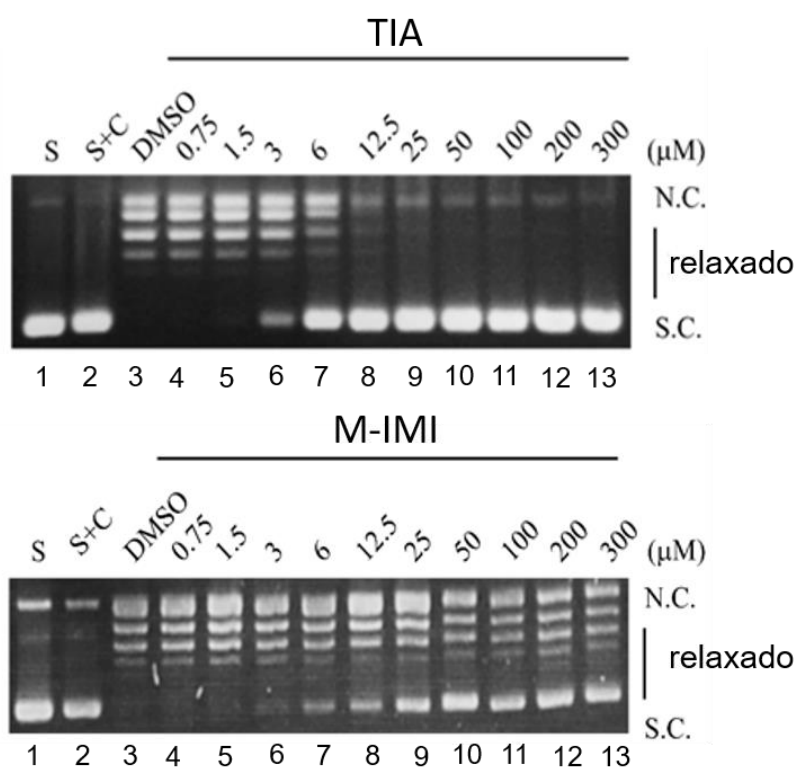


FIGURA 4.48 - Ensaio de relaxamento do DNA plasmidial superenovelado por hTopo IB na presença de concentrações crescentes do complexo TIA e M-IMI. Linha 1, substrato de DNA; linha 2, DNA incubado com a maior concentração do complexo (300 μM); linha 3, DNA e enzima na ausência de composto, apenas DMSO. NC, plasmídeo circular cortado; SC, DNA plasmidial superenovelado.

Foram realizados os ensaios de relaxamento na presença dos ligantes livres, 2-mercaptotiazolina (tzdt) e 2-mercapto-1-metilimidazol (mimi) (Figura 4.49). Resultados mostraram que os ligantes livres não indicaram nenhum efeito de inibição em todas as concentrações analisadas, demonstrando que a inibição enzimática ocorre

apenas após coordenação ao rutênio, evidenciando melhor atividade dos complexos, pois nos complexos pode havendo um efeito sinérgico entre os ligantes presentes na esfera de coordenação mais o metal, o que potencializa a sua atividade.

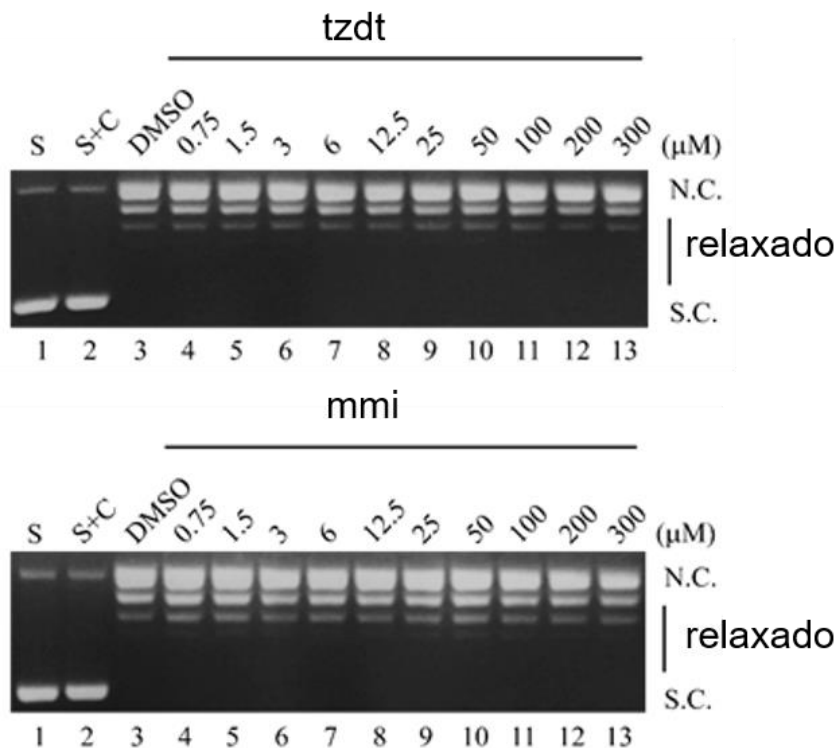


FIGURA 4.49 - Ensaio de relaxamento do DNA plasmidial superenovelado por hTopo IB na presença de concentrações crescentes dos ligantes livres, 2-mercaptotiazolina (tzdt) e 2-mercapto-1-metilimidazol (mmi).

Para os dois complexos, o efeito inibitório é fortemente aumentado após 5 min de pré-incubação com a enzima hTopo IB, antes da adição do DNA. Nessa condição, o complexo M-IMI foi capaz de inibir totalmente a ação de hTopo IB na concentração de 25 μ M (Figura 4.50).

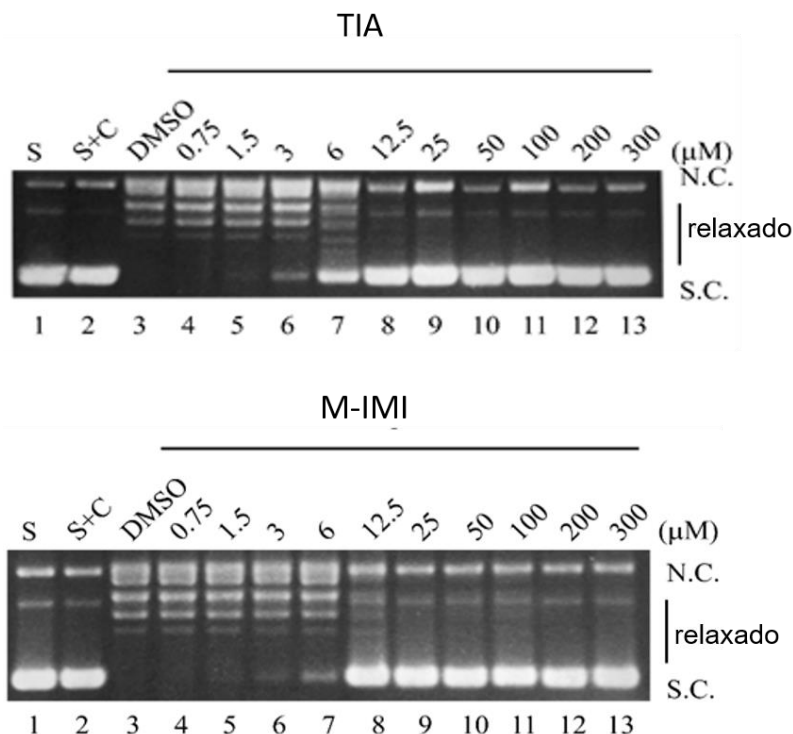


FIGURA 4.50 - O ensaio de relaxamento do DNA com a pré-incubação dos compostos com hTopo IB a 37°C durante 5 min, na presença de concentrações crescentes dos complexos TIA e M-IMI.

O efeito dos compostos na atividade enzimática também foi avaliado em função do tempo (Figura 4.51), usando apenas DMSO no controle (linhas 2–5), depois foram avaliados na presença dos complexos (linhas 6–9). Outras reações foram realizadas com a pré-incubação dos complexos com a enzima por 5 minutos, na ausência do DNA, depois desse tempo o DNA foi adicionado (linhas 10-13). Os resultados mostraram que os complexos não foram capazes inibir totalmente a enzima nas concentrações escolhidas, no entanto o efeito inibitório foi melhorado após a pré-incubação dos complexos com a enzima. Estes resultados indicam que a inibição ocorre através de uma interação entre a enzima e os complexos, que ocorre de maneira dependente da concentração, como observado na Figura 4.51. Além disso, os complexos também foram pré-incubados com o DNA superenovelado, antes da adição da enzima (linhas 14-17), onde o padrão de bandas apresentado no gel de agarose, foi idêntico ao observado sem a pré-incubação com a enzima, indicando que os complexos não interagem com o DNA.

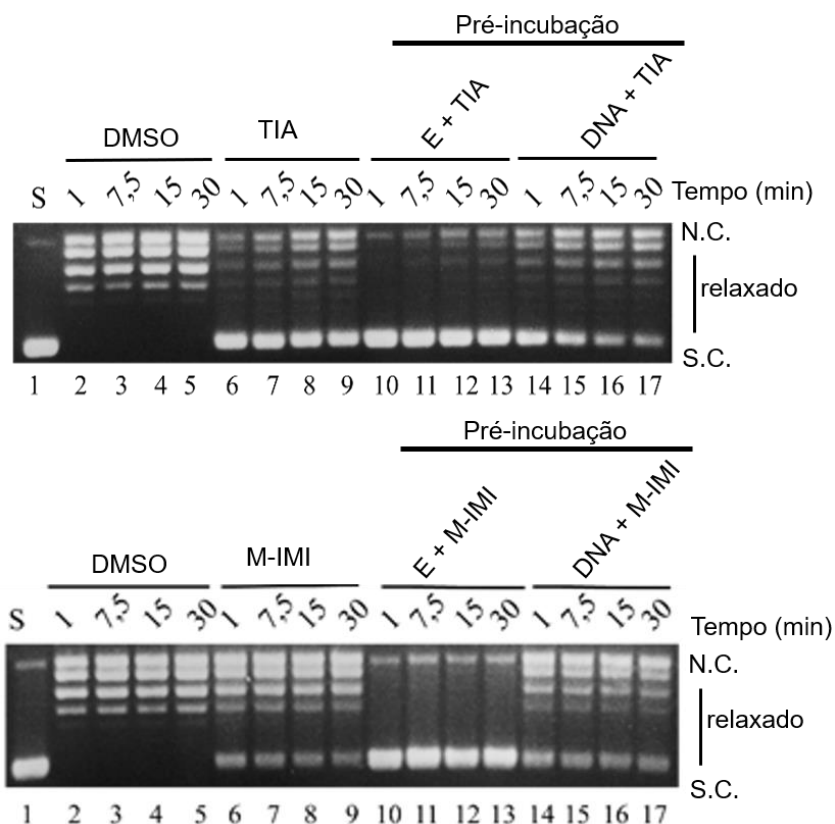


FIGURA 4.51 - Ensaio de relaxamento de DNA plasmidial superenovelado por hTopo IB em função do tempo com DMSO, na presença de complexos TIA (8 μ M) e M-IMI (8 μ M). Após 5 min de pré-incubação do composto com hTopo IB antes da adição do DNA e a pré-incubação do composto com o DNA, antes da adição da enzima.

Para entender melhor a interação dos complexos com o DNA, foram analisados os produtos da incubação dos complexos com o DNA, na ausência de enzima, por eletroforese em gel de agarose (Figura 4.52). Como pode ser observado, os complexos não apresentaram interação com o DNA em nenhuma das concentrações utilizadas, o que indica inexistência de interação intercalativa ou covalente com o DNA, corroborando com os resultados obtidos nos estudos de interação por titulação e viscosidade.

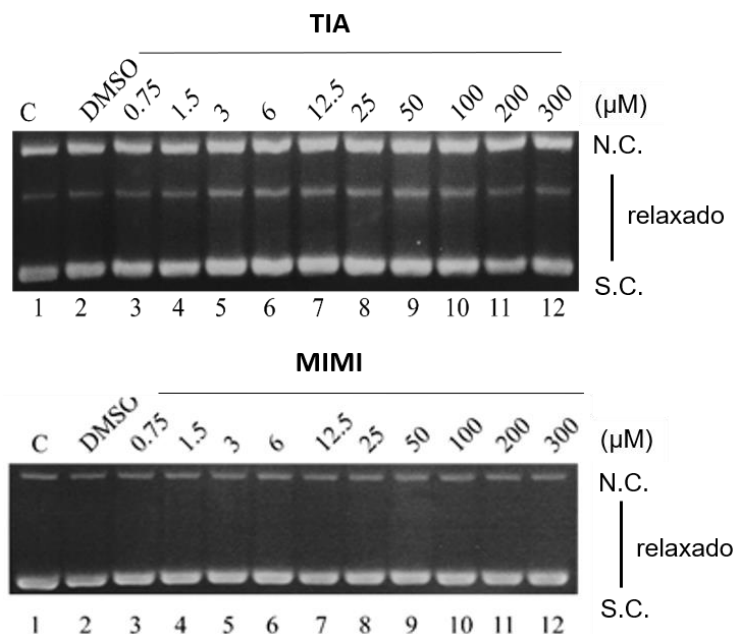


FIGURA 4.52 - Ensaio de interação composto-DNA em dependência da concentração. O plasmídeo superenovelado foi incubado por 30 min a 37 ° C, na presença de concentrações crescentes dos complexos TIA e M-IMI.

4.3.3.2 - Cinética de clivagem e religação na Topoisomerase

Os complexos podem interagir com a enzima em diferentes etapas do ciclo catalítico, podendo ser na clivagem, rotação ou processos de religação. Esses compostos podem ser classificados como inibidores quando estiverem impedindo a reação de clivagem e como venenosos quando estiverem impedindo o processo de religação. Portanto diferentes experimentos foram realizados para identificar qual etapa do ciclo catalítico que os complexos estariam exercendo sua função.

O ensaio de clivagem é realizado incubando a enzima com o substrato suicida (CL14 / CP25), marcado radioativamente na extremidade 5' do CL14 (Figura 4.53A), esse substrato suicida contém o local de clivagem preferido da enzima¹⁶⁴. A análise dos produtos de reação em função do tempo, é mostrado na Figura 4.53, onde a banda correspondente ao fragmento de DNA clivado é indicado como "CL1". Como pode ser observado na Figura 4.53B e C, na presença de DMSO (controle) o substrato é clivado de forma rápida e eficiente (linhas 3-8). A presença do complexo TIA (8 μM) inibe cerca de 40% da clivagem, enquanto a pré-incubação deste composto e a enzima, por 5 min antes da adição do substrato, produz inibição da clivagem de 80%, como mostra o

gráfico de porcentagem do produto clivado em função do tempo (Figura 4.53 D). No caso do complexo M-IMI (25 μ M), observa-se uma inibição de 40% da clivagem, que aumenta para 60% após a pré-incubação com a enzima.

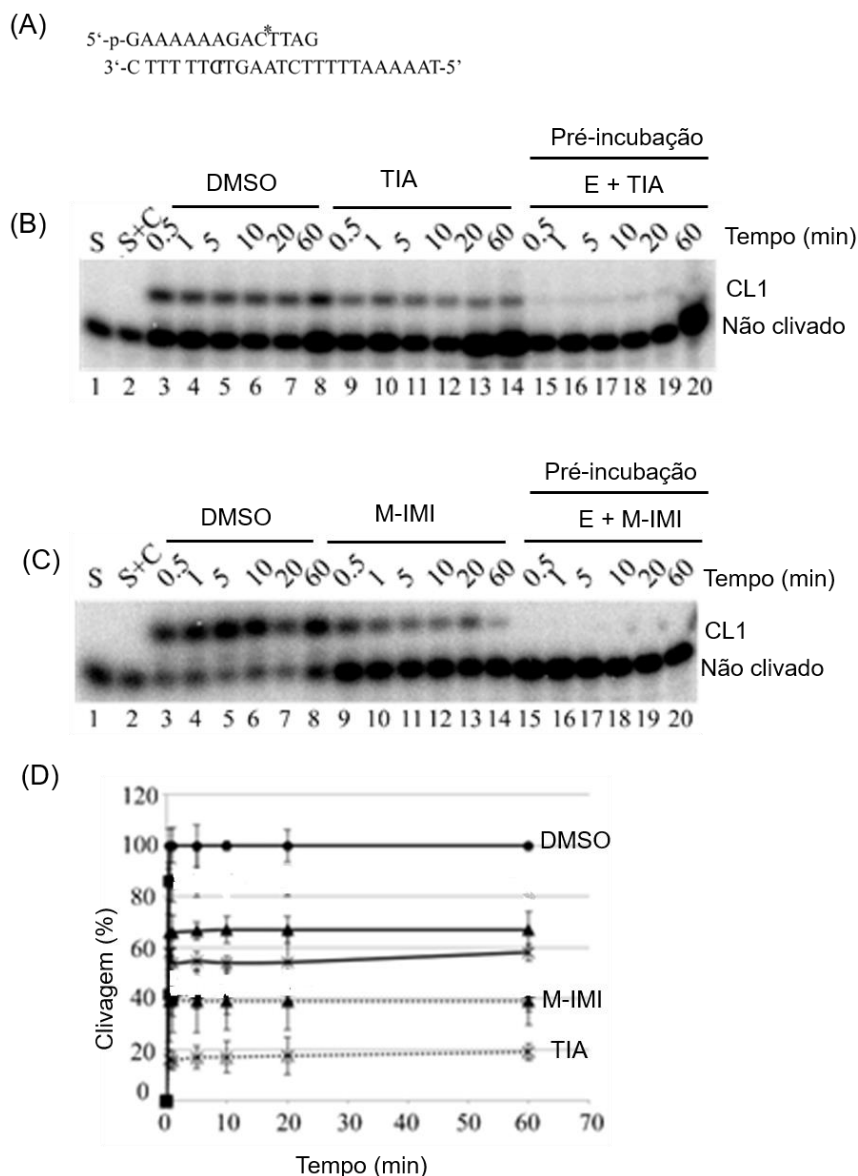


FIGURA 4.53 - Cinética de clivagem. (A) O substrato suicida CL14 / CP25 para medir a cinética de clivagem da enzima, e o local de ligação preferido da topoisomerase indicado por *. Reação de clivagem na presença de DMSO ou 8 μ M do complexo TIA (B) e 25 μ M do complexo M-IMI (C), e após 5 min de pré-incubação do composto com a enzima. Em S: controle com apenas o substrato suicida; S+C: substrato suicida mais o composto; CL1: fragmento de DNA clivado. (D) Gráfico da porcentagem de clivagem em função do tempo em linha completa, comparando a DMSO, TIA (8 μ M) e M-MI (25 μ M). Em linha tracejada estão os complexos na mesma concentração com pré-incubação. Os dados reportados são a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

A reação de religação foi realizada incubando, por 30 min, o substrato oligonucleotídico CL14 / CP25 com a enzima hTopo IB, permitindo a enzima produzir o complexo clivado (Figura 4.54A). Depois que a clivagem ocorreu, a cadeia complementar R11 foi adicionada, para iniciar o processo de religação. Em diferentes tempos, as alíquotas são removidas, tratadas com SDS, tripsinizadas e analisadas por PAGE (Figura 4.54 B e C). Como mostra o gráfico da porcentagem do produto de religação em função do tempo (Figura 4.54 D), que na presença de 25 μ M do complexo M-IMI (25 μ M), o efeito de inibição da religação foi de 34% enquanto, o complexo TIA não produziu nenhum efeito de inibição.

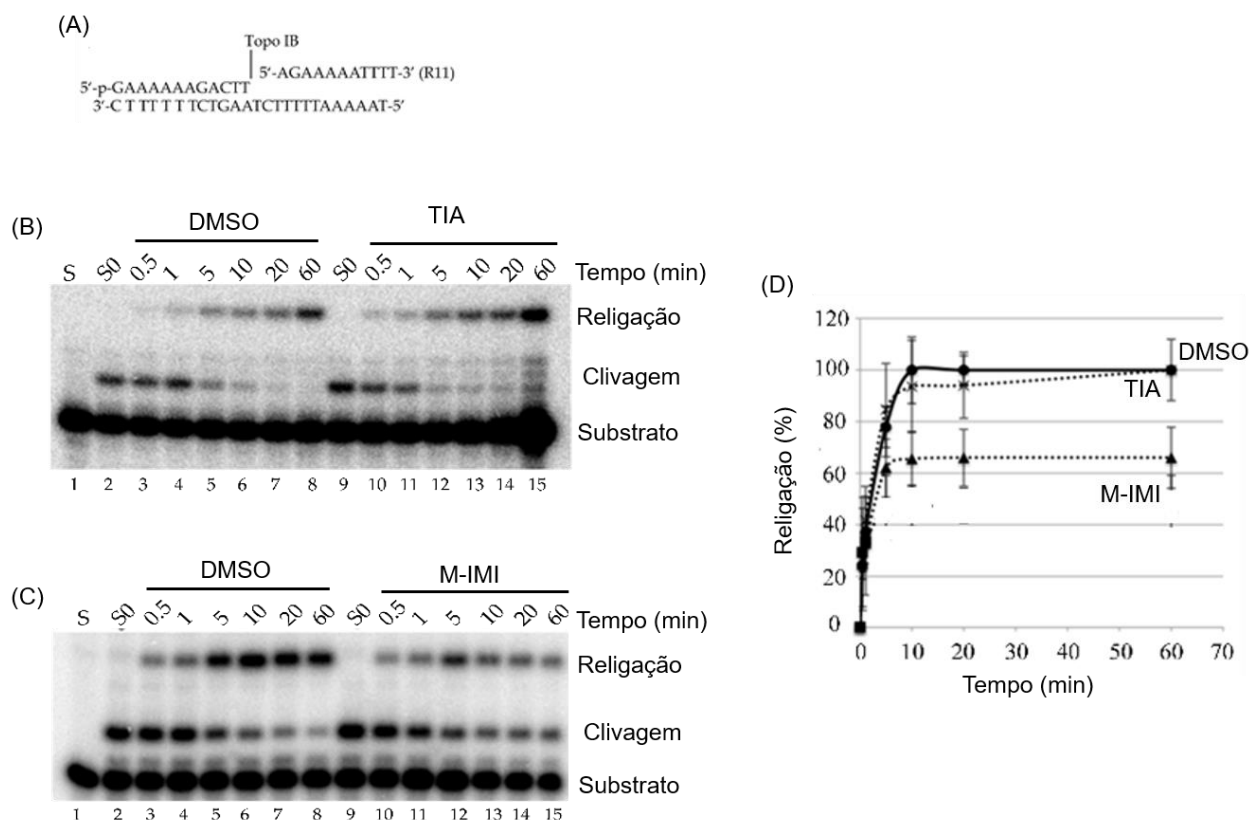


FIGURA 4.54 - Cinética de Religação. (A) O substrato CL14 / CP25 e o oligonucleotídico complementar R11 utilizado para medir a reação de religação da hTopo IB. A reação de religação com 5 min pré-incubação, a 37 ° C, na presença de DMSO ou 8 μ M do complexo TIA (B) e 25 μ M do complexo M-IMI (C). (D) Gráfico representando a porcentagem de religação em função do tempo, com a pré-incubação de 5 min na presença de DMSO e os complexos. Os dados reportados são a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

Esses resultados indicam que os dois complexos mais citotóxicos para a linhagem de células MDA-MB-231 foram capazes de inibir eficientemente a clivagem de hTopo IB e esse efeito aumentou após a pré-incubação. O complexo M-IMI foi capaz de

afetar a reação de religação. Por outro lado, o complexo TIA não mostrou nenhum efeito nesta etapa do ciclo catalítico. Estes resultados indicam que o complexo TIA atua como um inibidor catalítico da topoisomerase IB humana, em vez disso os complexos M-IMI age como um inibidor e tóxico para a enzima. Na literatura tem-se vários compostos de rutênio que mostraram ser bons inibidores da Topo IB, reafirmando a capacidade de inibição da topoisomerase pelos complexos de rutênio (II)^{96,163}. Dessa forma, a topoisomerase é um dos possíveis alvos de ação anticâncer dos complexos TIA e M-IMI.

Capítulo 5- Conclusões

Neste trabalho foram sintetizados seis novos complexos de rutênio (II) contendo em sua esfera de coordenação ligantes mercapto, bem como o ligante 1,1'-*bis*(difenilfosfino)ferroceno e 2,2'-bipiridina, os quais foram caracterizados por técnicas de condutividade molar, análise elementar, espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/visível, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, COSY ($^1\text{H}-^1\text{H}$) e HSQC ($^1\text{H}-^{13}\text{C}$), voltametria e difração de raios X.

Os resultados obtidos por meio das técnicas de caracterização dos complexos confirmaram a estrutura proposta. A composição química dos compostos sintetizados determinada por análise elementar (CHNS), mostrou valores condizentes com as fórmulas químicas propostas, com a presença de moléculas de água para os complexo DIA e M-TIU. Os dados de condutividade molar mostraram uma relação de eletrólitos 1:1.

As técnicas de espectroscopia de absorção na região do infravermelho, RMN e raios X identificaram a presença dos ligantes mercapto e o contra-íon PF_6^- na esfera de coordenação do metal, o modo de coordenação bidentada pelos átomos de nitrogênio e enxofre de forma aniônica, bem como a disposição desses átomos na estrutura tridimensional dos complexos, evidenciando uma geometria octaédrica distorcida, com o átomo de nitrogênio em posição *trans* ao átomo de fósforo e o átomo de enxofre *trans* ao átomo de nitrogênio da bipiridina.

Os dados de voltametria cíclica mostraram que os complexos obtidos apresentam potenciais de oxidação mais elevados do que o respectivo precursor, indicando uma maior estabilidade dos complexos, sendo identificados os potenciais referentes aos pares redox $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ e $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$, com o potencial mais baixo na faixa de 834–1024 mV referente a oxidação do Ferro (II).

Na análise da estabilidade química dos complexos, no período de 48 h, em solvente coordenante DMSO, os complexos AC, DIA, M-TIU e TIU se mostraram estáveis, assim como em solução de DMSO e meio de cultura celular.

Ao avaliar a atividade citotóxica e antiproliferativa dos complexos frente a diferentes linhagens de células tumorais, foi possível notar que os complexos foram mais

seletivos e eficazes para as células tumorais de mama triplo negativas MDA-MB-231, com valores de IC₅₀ menores que o fármaco de referência. Dentre os complexos avaliados os complexos TIA e M-IMI foram os mais ativos para todas as linhagens de células tumorais utilizadas, evidenciando uma melhor resposta para complexos menos volumosos. Quando avaliada a citotoxicidade frente à MDA-MB-231 no período de 24 h os valores de IC₅₀ foram mais elevados do que o tratamento de 48 h, mostrando um comportamento dependente do tempo.

Ao avaliar a lipofilicidade dos compostos observou-se que os valores de Log P foram todos positivos, indicando maior afinidade dos compostos pela fase orgânica, sendo os complexos com maiores valores de lipofilicidade os mais ativos.

Ao avaliar a cinética do ciclo celular, os dados sugerem que os complexos TIA, M-IMI, AC e M-TIU induziram parada do ciclo celular na fase G₀/G₁, já o complexo TIU mostrou um aumento de células em fase S, onde ocorre a replicação do DNA, e com o complexo DIA não foi observado alterações significativas no ciclo celular. Com isso, são correlacionadas as atividades antiproliferativas dos complexos principalmente pela indução de apoptose e parada do ciclo celular em fase G₀/G₁.

Os resultados obtidos a partir das observações das alterações morfológicas das células em função do tempo, com marcação das células com HO/PI e anexina-V, mostraram que os complexos induzem morte celular por apoptose. A apoptose induzida pelos complexos, pode estar relacionada com a presença de dano no DNA observado no ensaio cometa e na cinética do ciclo celular, com os complexos TIA, M-IMI, M-TIU e TIU. Na verificação de indução de apoptose pela via mitocondrial, os complexos M-TIU e AC foram capazes de induzir despolarização mitocondrial com maior eficiência, sendo observado um aumento de células com disfunção mitocondrial de 66,53 ± 4,17% e 24,10 ± 7,81%, respectivamente. Além disso, os complexos foram capazes de induzir aumento de espécies reativas de oxigênio no meio intracelular, sendo outro mecanismo de indução de apoptose, que pode estar relacionado com a mitocôndria e o dano ao DNA.

Ao avaliar a possível atividade antimetástática dos complexos, foram investigadas a capacidade de inibição da migração celular pelo ensaio de fechamento da risca e câmara de *boyden*, e inibição de angiogênese utilizando o método alternativo com CAM. Os complexos foram capazes de inibir eficientemente a migração da célula, sendo observado uma inibição em diferentes potenciais, seguindo a ordem de DIA < AC < M-

TIU < M-IMI < TIU < TIA. No ensaio de câmara de *boyden* o complexo M-IMI foi capaz de inibir a migração eficientemente nas duas concentrações utilizadas. Além disso, os complexos TIA, M-IMI e M-TIU foram capazes de inibir a angiogênese, com menor porcentagem de vascularização para o complexo TIA, o que foi também evidenciado em análises de histopatológico das CAMs. Portanto, esses complexos podem ser indicados como possíveis agentes antimetastáticos. Além disso, os complexos foram capazes de prevenir a formação de colônias, em baixas concentrações, evidenciando um efeito citotóxico e citostático.

Ao avaliar a interação dos complexos com a proteína de transporte HSA, os complexos foram capazes de causar supressão da fluorescência pelo mecanismo de interação estático por meio de interações hidrofóbicas entre os complexos e a HSA. Os complexos mostraram fortes interações com a HSA, com valores de K_b na faixa de 10^5 – 10^7 . Quando avaliado o sítio de interação desses complexos com a HSA, eles apresentaram alta afinidade pelo sítio I da HSA, o qual apresentou um efeito competitivo com a sonda fluorescente de dansil-L-arginina. A forte interação dos complexos com a HSA não interferiu na atividade citotóxica dos complexos, sendo evidenciado até melhor atividade para os complexos TIU e DIA, nas proporções de 1:1 e 1:3, o que indica o modo de ligação reversível.

Na avaliação da interação dos complexos por titulação espectroscópica e viscosidade, os complexos apresentaram um modo de interação não covalente, eletrostático. Quando avaliada a capacidade de inibição da enzima Topoisomerase IB, os complexos TIA e M-IMI mostraram-se ativos. Os resultados indicam que o complexo TIA atua como um inibidor catalítico da enzima, e o complexo M-IMI, como um inibidor e tóxico para a enzima, indicando que a topoisomerase é um dos possíveis alvos de ação anticâncer desses complexos.

Tendo em vista os diferentes alvos de ação apresentados pelos complexos, podem ser classificados como agentes anticâncer “multi-target”. Os possíveis mecanismos de ação observado para esses complexos são ilustrados na Figura 5.1.

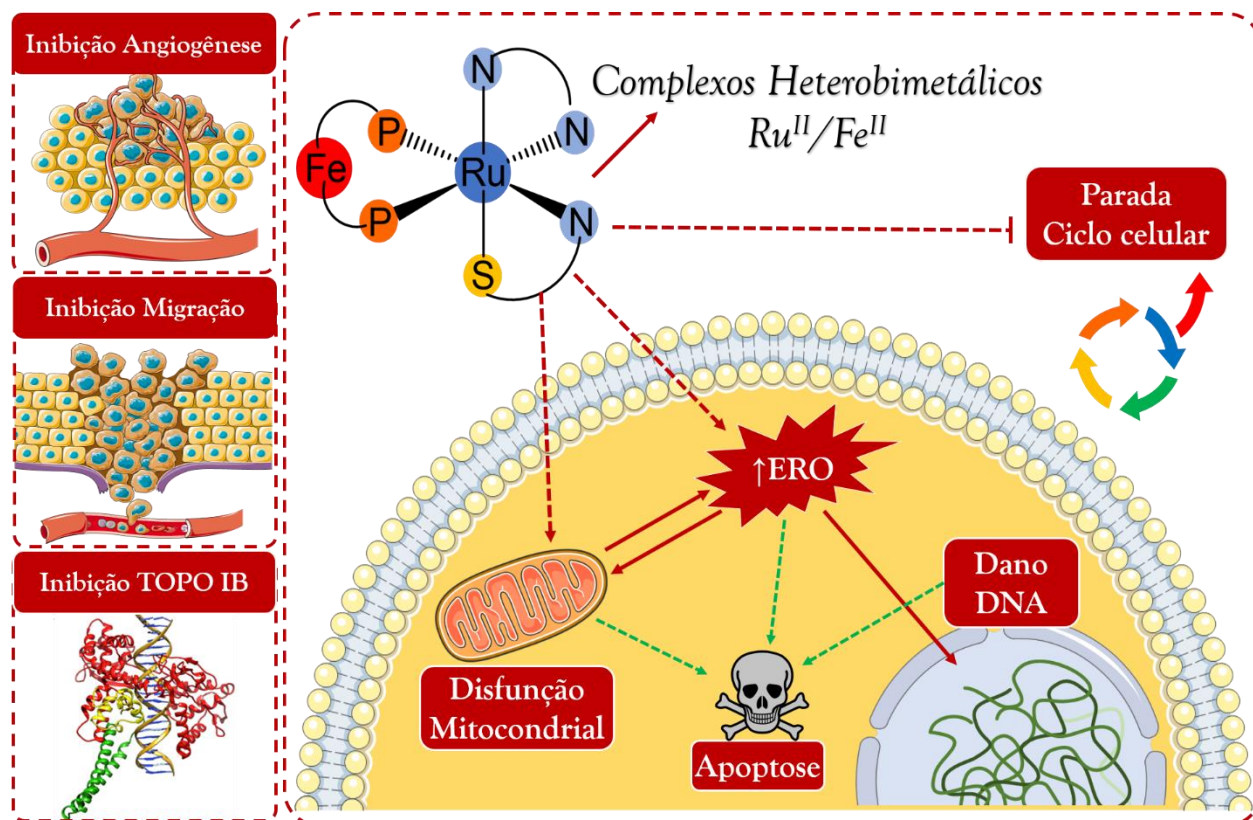


FIGURA 5.1 – Possíveis alvos de ação propostos para os complexos Ru (II) com os ligantes mercapto.

Referências Bibliográficas

- 1 - ALMEIDA, V. L.; LEITÃO ANDREI; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. “Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução”. *Quim. Nova*, **28**: 118-129, 2005.
- 2- PEDRAZA-FARINA, L. G. “Mechanisms of oncogenic cooperation in cancer initiation and Metastasis”. *Yale J. Biol. Med.*, **79**: 95-103, 2006.
- 3 - BHUTIA, S. K.; MAITI, T. K. “Targeting tumors with peptides from natural sources”. *Trends Biotechnol*, **26**: 210-217, 2008.
- 4 - YAMAGUCHI, HIDEKI; WYCKOFF, J.; CONDEELIS, JOHN. “Cell migration in tumors”. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**: 559-564, 2005.
- 5 - BASKAR, R.; LEE, K. A.; YEO, R.; YEOH, K-W. “Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions”. *Int. J. Med. Sci.*, **9**: 193-199, 2012.
- 6 - ZHANG, H.; CHEN, JIBEI. “Current status and future directions of câncer immunotherapy”. *J. Cancer*, **9**: 1773-1781, 2018.
- 7 - YU, Y.; CUI, J. “Present and future of cancer immunotherapy: A tumor microenvironmental perspective (Review)”. *Oncology Letters*, **16**: 4105-4113, 2018.
- 8 - Sharma, P.; Allison, J. P. “Immune Checkpoint Targeting in Cancer Therapy: Toward Combination Strategies with Curative Potential”. *Cell*, **161**:205-214, 2015.
- 9 - NELSON, C.J.; LEE, J. S.; GAMBOA, M. C.; ROTH, A. J. “Cognitive effects of hormone therapy in men with prostate cancer”. *Cancer*, **133**:1097-1106, 2008.
- 10 - Murphy, C. C.; Bartholomew, L. K.; Carpentier, M. Y.; Bluethmann, S. M.; Vernon, S. W. “Adherence to adjuvant hormonal therapy among breast cancer survivors in clinical practice: a systematic review”. *Breast Cancer Res Treat*, **134**:459–478, 2012.
- 11- FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. “Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012”. *Int. J. Cancer*, **136**: 359-386, 2015.
- 12- FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. “Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries”. *CA Cancer J. Clin*, **68**: 394-424, 2018.
- 13- PETO, J. “Cancer epidemiology in the last century and the next decade”. *Nature*, **411**: 390-395, 2001.
- 14 - Instituto Nacional de Câncer de José de Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>. Acessado em: 03 de dezembro de 2018.
- 15 -THUN, M. J.; DELANCEY, J. O.; CENTER, M. M.; JEMAL A.; WARD E. M. “The global burden of cancer: priorities for prevention”. *Carcinogenesis*, **31**:100-110, 2010.
- 16 - CARDOSO, F.; SPENCE, D.; MERTZ, S.; CORNELIUSSEN-JAMES, D.; SABELKO, K.; GRALOW, J.; CARDOSO, M-J.; PECCATORI, F.; PAONESSA, D.; BENARES, A.; SAKURAI, N.; BEISHON, M.; BARKER, S-J.; MAYER, M. “Global analysis of advanced/metastatic breast cancer: Decade report (2005–2015)”. *The Breast*, **39**: 131-138, 2018.
- 17 - ALIZADEH, A.; SHIRI, S.; FARSINEJAD, SADAF. “Metastasis review: from bench to bedside”. *Tumor Biol.*, **35**: 8483-8523, 2014.

- 18 - CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. "A Perspective on Cancer Cell Metastasis". *Science*, **331**: 1559-1564, 2011.
- 19 - ZIYAD, S; IRUELA-ARISPE, M. L. "Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis". *Genes & Cancer*, **2**: 1085-1096, 2011.
- 20 - NISHIDA, N.; YANO, H.; NISHIDA, T.; KAMURA, T.; KOJIRO, M. "Angiogenesis in cancer". *Vasc Health Risk Manag*, **2**: 213-219, 2006.
- 21 - HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation". *Cell*, **144**: 646-674, 2011.
- 22 - LAUFFENBURGER, D. A.; HORWITZ, A. F. "Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process". *Rev. Cell*, **84**: 359-369, 1996.
- 23 - CASTELLONE, R. D.; LEFFLER, N. R.; DONG, L.; YANG, L. V. "Inhibition of tumor cell migration and metastasis by the proton-sensing GPR4 receptor". *Cancer Letters*, **312**: 197-208, 2011.
- 24 - KRAMER, N.; WALZL, A.; UNGER, C.; ROSNER, M.; KRUPITZA, G.; HENGSTSCHLÄGER, M.; DOLZNIG, H. "In vitro cell migration and invasion assays". *Mutation Research*, **752**: 10-24, 2013.
- 25 - ANANTHAKRISHNAN, R.; EHRLICHER, A. "The Forces Behind Cell Movement". *Int. J. Biol. Sci.*, **3**: 303-317, 2007.
- 26 - SCHNITT, S. J. "Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy". *Modern Pathology*, **23**: 60-64, 2010.
- 27 - BRENTON, J. D.; CAREY, L. A.; AHMED, A. A.; CALDAS, C. "Molecular Classification and Molecular Forecasting of Breast Cancer: Ready for Clinical Application?". *J Clin Oncol.*, **23**:7350-7360, 2005.
- 28 - SERRA, K. P.; RAMALHO, S.; TORRESAN, R.; VASSALLO, J.; SARIAN, L. O. Z; SILVA, G. R. P.; DERCHAIN, S. "Nova classificação dos carcinomas da mama: procurando o luminal A". *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, **36**: 575-580, 2014.
- 29 - KAUR, P.; NAGARAJA, G. M.; ZHENG, H.; GIZACHEW, D.; GALUKANDE, M.; KRISHNAN, S.; ASEA, A. "A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease". *BMC Cancer*, **12**: 1-12, 2012.
- 30 - RAKHA, E. A.; ELLIS, I. O. "Triple-negative/basal-like breast cancer: review". *Pathology*, **41**: 40-47, 2009.
- 31 - ABRAMSON, V. G.; LEHMANN, B. D.; BALLINGER, T. J.; PIETENPOL, J. A. "Subtyping of Triple-Negative Breast Cancer: Implications for Therapy". *Cancer*, **121**: 8-16, 2015.
- 32 - ROSENBERG, B.; CAMP, L. V.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia Coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, **265**: 698-699, 1965.
- 33 - ROSENBERG, B.; CAMP, L. V.; GRIMLEY, E. B.; THOMSON, A. J. "The Inhibition of Growth or Cell Division in *Escherichia coli* by Different Ionic Species of Platinum (IV) Complexes". *J. Biol. Chem.*, **242**: 1347-1352, 1967.
- 34 - ROSENBERG, B.; CAMP, L. V. "The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds". *Cancer Res.*, **30**: 1799-1802, 1979.
- 35 - Neves, A. P.; Vargas, M. D. "Complexos de Platina (II) na Terapia do Câncer". *Rev. Virtual Quim.*, **3**: 196-209, 2011.
- 36 - WONG, E.; GIANDOMENICO, C. M. "Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs". *Chem. Rev.*, **99**: 2451-2466, 1999.
- 37 - Barnard, C. Platinum Group Metal Compounds in Cancer Chemotherapy. *Johnson Matthey Technol. Rev.*, **61**: 52-59, 2017.

- 38 - GALANSKI, M.; ARION, V. B.; JAKUPEC, M. A.; KEPPLER, B. K. "Recent Developments in the Field of Tumor-Inhibiting Metal Complexes". *Current Pharmaceutical Design*, **9**: 2078-2089, 2003.
- 39 - WHEATE, N. J.; WALKER, S.; CRAIG, G. E. OUN, R. "The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials". *Dalton Trans.*, **39**: 8113-8127, 2010.
- 40 - KOSTOVA, I. "Platinum Complexes as Anticancer Agents". *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, **1**: 1-22, 2006.
- 41 - ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. "Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects". *Platinum Metals Rev.*, **45**: 62-69, 2001.
- 42 - ANG, W. H.; DYSON, P. J. "Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: towards targeted chemotherapy". *Eur. J. Inorg. Chem.*, **20**: 4003-4018, 2006.
- 43 - COLINA-VEGAS, L.; LUNA-DULCEY, L.; PLUTÍN, A. M.; CASTELLANO, E. E.; COMINETTI, M. R.; BATISTA, A. A. "Half sandwich Ru(II)-acylthiourea complexes: DNA/HSA-binding, anti-migration and cell death in a human breast tumor cell line". *Dalton Trans.*, **46**: 12865-12875, 2017.
- 44 - OLIVEIRA, K. M.; LIANY, L-D.; CORRÊA, R. S.; DEFLON, V. M.; COMINETTI, M. R.; BATISTA, A. A. "Selective Ru(II)/lawsone complexes inhibiting tumor cell growth by apoptosis". *J. Inorg. Biochem.*, **176**: 66-76, 2017.
- 45 - BAROLLI, J. P.; CORRÊA, R. S.; MIRANDA, F. S.; RIBEIRO, J. U.; JÚNIOR, C. B.; ELLENA, J.; MORENO, V.; COMINETTI, M. R.; BATISTA, A. A. "Polypyridyl Ruthenium Complexes: Novel DNA-Intercalating Agents against Human Breast Tumor". *J. Braz. Chem. Soc.*, **28**: 1879-1889, 2017.
- 46 - TRONDL, R.; HEFFETER, P.; KOWOL, C. R.; JAKUPEC, M. A.; BERGERBD, W.; KEPPLER, B. K. "NKP-1339, the first ruthenium-based anticâncer drug on the edge to clinical application". *Chem. Sci.*, **5**: 2925-2932, 2014.
- 47 - OSZAJCA, M.; COLLET, G.; STOCHEL, G.; KIEDA, C.; BRINDELL, M. "Hypoxia-selective inhibition of angiogenesis development by NAMI-A analogues". *Biometals*, **29**: 1035-1046, 2016.
- 48 - SAVA, G.; ZORZET, S.; TURRIN, C.; VITA, F.; SORANZO, M.; ZABUCCHI, G.; COCCHIETTO, M.; BERGAMO, A.; DIGIOVINE, S.; PEZZONI, G.; SARTOR, L.; GARBISA, S. "Dual Action of NAMI-A in Inhibition of Solid Tumor Metastasis: Selective Targeting of Metastatic Cells and Binding to Collagen". *Clin. Cancer Res.*, **9**: 1898-1905, 2003.
- 49 - RADEMAKER-LAKHAI, J. M.; BONGARD, D. V. D.; PLUIM, D.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. "A Phase I and Pharmacological Study with Imidazolium-*trans*-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a Novel Ruthenium Anticancer Agent". *Clin. Cancer Res.*, **10**: 3717-3727, 2004.
- 50 - SUZANNE, L.; BURGERS, S. A.; BAAS, P.; PLUIM, D.; TIBBEN, M.; WERKHOVEN, E. V.; ALESSIO, E.; SAVA, G.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. "Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy". *Invest New Drugs*, **33**: 201-214, 2015.
- 51 - ALESSIO, E. "Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective". *Eur. J. Inorg. Chem.*, **0**: 1549-1560, 2017.
- 52 - KEPPLER, B. K.; RUPP, W. "Antitumor activity of imidazolium-bisimidazole-tetrachlororuthenate (III)". *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **111**: 166-168, 1986.
- 53 - HARTINGER, C. G.; JAKUPEC, M. A.; ZORBAS-SEIFRIED, S.; GROESSL, M.; EGGER, A.; BERGER, W.; ZORBAS, H.; DYSON, P. J.; KEPPLER, B. K. "KP1019, A

- New Redox-Active Anticancer Agent – Preclinical Development and Results of a Clinical Phase I Study in Tumor Patients”. *Chem. Biodivers.*, **5**: 2140-2155, 2008.
- 54 - Kapitza, S.; PONGRATZ, M.; JAKUPEC, M. A.; HEFFETER, P.; BERGER, W.; LACKINGER, L.; KEPPLER, B. K.; MARIAN, B. “Heterocyclic complexes of ruthenium(III) induce apoptosis in colorectal carcinoma cells”. *J Cancer Res Clin Oncol*, **131**: 101-110, 2005.
- 55 - HARTINGER, C. G.; ZORBAS-SEIFRIED, S.; JAKUPEC, M. A.; KYNAST, B.; ZORBAS, H.; KEPPLER, B. K. “From bench to bedside – preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A)”. *J. Inorg. Biochem.*, **100**: 891-904, 2006.
- 56 - Naves, M. A.; Graminha, A. E.; Vegas, L. C.; Luna-Dulcey, L.; Honorato, João; Menezes, A. C. S.; Batista, A. A.; Cominetti, M. R. “Transport of the Ruthenium Complex [Ru(GA)(dppe)₂]PF₆ into Triple-Negative Breast Cancer Cells Is Facilitated by Transferrin Receptors”. *Mol. Pharm.*, **16**: 1167-1183, 2019.
- 57 - KUHN, P-S.; PICHLER, V.; ROLLER, A.; HEJL, M.; JAKUPEC, M. A.; KANDIOLLER, W.; KEPPLER, B. K. “Improved reaction conditions for the synthesis of new NKP-1339 derivatives and preliminary investigations on their anticancer potential”. *Dalton Trans.*, **44**: 659-668, 2015.
- 58 - SCOLARO, C.; BERGAMO, A.; BRESCACIN, L.; DELFINO, R.; COCCHIETTO, M.; LAURENCZY, G.; GELDBACH, T.; SAVA, G.; DYSON, P. J. In Vitro and in Vivo Evaluation of Ruthenium(II)-Arene PTA Complexes. *J. Med. Chem.*, **48**: 4161-4171, 2005.
- 59 - WEISS, A.; BERNDSEN, R. H.; DUBOIS, M.; MÜLLER, C.; SCHIBLI, R.; GRIFFIOEN A. W.; DYSON, P. J.; NOWAK-SLIWINSKA, P. “In vivo anti-tumor activity of the organometallic ruthenium(II)-arene complex [Ru(η^6 -p-cymene)-Cl₂(pta)] (RAPTA-C) in human ovarian and colorectal carcinomas”. *Chem. Sci.*, **5**: 4742–4748, 2014.
- 60 - Berndsen, R. H.; Weiss, A.; Abdul, U. K.; Wong, T. J.; Meraldi, P.; Griffioen, A. W.; DYSON, P. J.; NOWAK-SLIWINSKA, P. “Combination of ruthenium(II)- arene complex [Ru(η^6 -p-cymene) Cl₂(pta)] (RAPTA-C) and the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib results in efficient angiostatic and antitumor activity”. *Scientific Reports*, **7**: 1-16, 2017.
- 61 - AIRD, R.; CUMMINGS, J.; RITCHIE, A. A.; MUIR, M.; MORRIS, R.; CHEN, H.; SADLER, P. J.; JODRELL, D. I. “In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer”. *Brit. J. Cancer*, **86**: 1652-1657, 2002.
- 62 - BERGAMO, A.; MASI, A.; PEACOCK, A.F.A.; HABTEMARIAM, A., SADLER, P. J.; SAVA, G. “In vivo tumour and metastasis reduction and in vitro effects on invasion assays of the ruthenium RM175 and osmium AFAP51 organometallics in the mammary cancer model”. *J. Inorg. Biochem.*, **104**: 79-86, 2010.
- 63 - BERGAMO, A.; GAIDDON, C.; SCHELLENS, J. H. M.; BEIJNEN, J. H.; SAVA, G. “Approaching tumour therapy beyond platinum drugs status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates”. *J. Inorg. Biochem.*, **106**: 90-99, 2012.
- 64 - DYSON, P. J. “Systematic Design of a Targeted Organometallic Antitumour Drug in Pre-clinical Development”. *CHIMIA*, **61**: 698-703, 2007.
- 65 - GIANFERRARA, T.; BRATSOS, I.; ALESSIO, E. “A categorization of metal anticancer compounds based on their mode of action”. *Dalton Trans.*, **31**: 7588-7598, 2009.

- 66 - Fong, J.; Kasimova, K.; Arenas, Y.; Kaspler, P.; Lazic, S.; Mandel, A.; Lilge, L. "A novel class of ruthenium-based photosensitizers effectively kills in vitro cancer cells and in vivo tumors". *Photochem. Photobiol. Sci.*, **14**: 2014-2023, 2015.
- 67 - MONRO S; COLÓN, K. L.; YIN, H.; ROQUE, J.; KONDA, P.; GUJAR, S.; THUMMEL, R. P.; LILGE, L.; CAMERON, C. G.; MCFARLAND, S. A. "Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433". *Chem. Rev.*, **119**: 797-828, 2018.
- 68 – DA SILVA, M. M. Busca por complexos de rutênio (II) com propriedades quimioterapêuticas: avaliação da atividade antitumoral, potencial mutagênico e inibição da enzima topoisomerase IB. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2017. Tese de Doutorado, 232 p.
- 69 – OLIVEIRA, K. M. Avaliação das propriedades anticâncer de complexos de rutênio (II) contendo os bioligantes lapachol e lausona. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2018. Tese de Doutorado, 157 p.
- 70 - BERNERS-PRICE, S. J.; NORMAN, R. E.; SADLER, P. J. The Autoxidation and Proton Dissociation Constants of Tertiary Diphosphines: Relevance to Biological Activity. *J. Inorg. Biochem.* **31**: 197-209, 1987.
- 71 - VALLE, E. M. A.; DO NASCIMENTO, F. B.; FERREIRA, A. G.; BATISTA, A. A. "Sobre uma degenerescência acidental nos deslocamentos químicos de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ em complexos difosfínicos de rutênio". *Quim. Nova*, **31**: 807-812, 2008.
- 72 - ORPEN, A. G.; CONNELLY, N. G. "Structural Evidence for the Participation of P-X σ^* Orbitals in Metal-PX₃ Bonding". *J. CHEM. SOC., CHEM. COMMUN.*, 1310-1311, 1985.
- 73 - POELHSITZ, G. V. Nitrosilo complexos de rutênio com ligantes bifosfínicos: espectroscopia, eletroquímica, estudo da reatividade e liberação de NO. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2005. Tese de Doutorado, 284 p.
- 74- QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. "Complexos Fosfínicos e suas Aplicações na Medicina". *Quím. Nova*, **19**: 651, 1996.
- 75 - COE, B. J.; GLENWRIGHT, S. J. "Trans-effects in octahedral transition metal complexes". *Coordin. Chem. Rev.* **203**: 5-80, 2000.
- 76 - SIMON, T. M.; KUNISHIMA, D. H.; VIBERT, G. J.; LORBER, A. "Screening Trial with the Coordinated Gold Compound Auranofin Using Mouse Lymphocytic Leukemia P3881". *Cancer Res.*, **41**: 94-97, 1981.
- 77 - MIRABELLI, C. K.; JOHNSON, R. K.; SUNG, C. M.; FAUCETTE, L.; MUIRHEAD, K.; CROOKE, S. T. "Evaluation of the in Vivo Antitumor Activity and in Vitro Cytotoxic Properties of Auranofin, a Coordinated Gold Compound, in Murine Tumor Models". *CANCER RESEARCH*, **45**: 32-39, 1985.
- 78 - BIOT, C.; FRANÇOIS, N.; MACIEJEWSKI, L.; BROCARD, J.; POULAIN, D. "Synthesis and Antifungal Activity of a Ferrocene-Fluconazole Analogue". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **10**: 839-841, 2000.
- 79 - ORNELAS, C. "Application of ferrocene and its derivatives in cancer research". *New J. Chem.*, **35**: 1973-1985, 2011.
- 80 - PATRA, M.; GASSER, GILLES. "The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives". *Nature Reviews Chemistry*, **1**: 1-66, 2017.
- 81 - POELHSITZ, G. V.; BOGADO, A. L.; DE ARAUJO, M. P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E. E.; BATISTA, A. A. "Synthesis, characterization, X-ray structure and preliminary in vitro antitumor activity of the nitrosyl complex fac-

- [RuCl₃(NO)(dppf)], dppf = 1,10 -bis(diphenylphosphine)ferrocene". Polyhedron, **26**: 4707-4712, 2007.
- 82 - JURIS, A.; BALZANI, V. "Ru(II) polypyridine complexes: photophysics, photochemistry, electrochemistry, and chemiluminescence". Coord. Chem. Rev., **84**: 85-277, 1988.
- 83 - SANTIAGO, M. O. Síntese, caracterização e estudos cinéticos da isomerização de compostos de Ru(II) contendo ligantes (X-bipy) (X=H, -NO₂, -Me, -COOH, -SMe, O=SMe, -Cl, -OMe). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2004. Tese de Doutorado, 147 p.
- 84 - LOBANA, T. S.; KAUR, P.; CASTINEIRAS, A. "Synthesis, spectroscopy and structure of *cis,cis,trans*:N,N;P,P;S,S-[bis(triphenylphosphine)][bis(pyrimidine-2-thiolato)]ruthenium(II)". J. Coordin. Chem., **58**: 429-435, 2005.
- 85 - RAPER, E. S. "Complexes of heterocyclic thionates. Part 1. Complexes of monodentate and chelating ligands". Coordin. Chem. Rev. **153**: 199-255, 1996.
- 86 - RAPER, E. S. "Complexes of heterocyclic thione donors". Coordin. Chem. Rev., **61**: 115-184, 1985.
- 87 - RAPER, E. S. "Complexes of heterocyclic thionates. Part 2: complexes of bridging ligands". Chem. Rev., **165**: 475-567, 1997.
- 88 - APPELT, P.; FAGUNDES, F. D.; FACCHIN, G.; KRAMER, M. G.; BACK, D. F.; CUNHA, M. A. A.; SANDRINO, B.; WOHNATH, K.; DE ARAUJO, M. P. "Ruthenium (II) complexes containing 2-mercaptothiazolates as ligands and evaluation of their antimicrobial activity". Inorg. Chim. Acta, **436**: 152–158, 2015.
- 89 - DE SOUZA, M. V. N.; FERREIRA, S. B.; MENDONÇA, J. S.; COSTA, M.; REBELLO, F. R. "Métodos de obtenção e aplicações sintéticas de tiazóis, uma importante classe de compostos heterocíclicos". Quim. Nova, **28**: 77-84, 2005.
- 90 - BECK, C. F.; HOWLETT, G. J. "The Nature of the Miscoding Caused by Growth in the Presence of 2-Thiouracil". J. Mol. Biol., **111**: 1-17, 1977.
- 91 - PALUMBO, A.; D'ISCHIA, M. "Thiouracil Antithyroid Drugs as a New Class of Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitors". Biochem. Biophys. Res. Commun., **282**: 793-797, 2001.
- 92 - DA SILVA, M. A.V. R.; AMARAL, L. M. P. F.; Szterner, P. "Experimental study on the thermochemistry of 2-thiouracil, 5-methyl-2-thiouracil and 6-methyl-2-thiouracil". J. Chem. Thermodynamics, **57**: 380-386, 2013.
- 93 - GROSMIRE, L.; DELARBRE, J-L. "Vibrational spectra of 6-methyluracil, 6-methyl-2-thiouracil and their deuterated analogues". J. Mol. Struct., **1011**: 42–49, 2012.
- 94 - EL-KHATEEB, M.; DAMER, K.; GÖRLS, H.; WEIGAND, W. "Pyridine- and pyrimidine-2-thiolate complexes of ruthenium". J. Organomet. Chem., **692**: 2227–2233, 2007.
- 95 - XANTHOPOULO, M. N.; HADJIKAKOU, S. K.; HADJILIADIS, N.; SCHÜRMAN, M.; JURKSCHAT, K.; MICHAELIDES, A.; SKOULIKA, S.; BAKAS, T.; BINOLIS, J.; KARKABOUNAS, S.; CHARALABOPOULOS, K. "Synthesis, structural characterization and in vitro cytotoxicity of organotin(IV) derivatives of heterocyclic thioamides, 2-mercaptobenzothiazole, 5-chloro-2-mercaptobenzothiazole, 3-methyl-2-mercaptobenzothiazole and 2-mercaptonicotinic acid". J. Inorg. Biochem., **96**: 425-434, 2003.
- 96 - DE CAMARGO, M. S.; DA SILVA, M. M.; CORREA, R. S.; VIEIRA, S. D.; CASTELLI, SILVIA; D'ANESSAC, I.; GRANDIS, R. D.; VARANDA, E.; DEFLON, V. M.; DESIDERI, A.; BATISTAA, A. A. "Inhibition of human DNA topoisomerase IB by

- nonmutagenic ruthenium(II)-based compounds with antitumoral activity". *Metallomics*, **8**: 179-192, 2016.
- 97 - MONDELLI, M. A.; GRAMINHA, A. E.; CORRÊA, R. S.; DA SILVA, M. M.; CARNIZELLO, A. P.; POELHSITZ, G. V.; ELLENA, J.; DEFLON, V. M.; CARAMORI, G. F.; TORRE, M. H.; TAVARES, D. C.; BATISTA, A. A. "Ruthenium(II)/4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine complexes: Synthesis, characterization, X-ray structures and in vitro cytotoxicity activities on cancer cell lines". *Polyhedron*, **68**: 312-318, 2014.
- 98 - PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. E.; PERRIN, D. R. *Purification of Laboratory Chemicals*. 2a ed. New York, Pergamin Press, 1980.
- 99- Sheldrick, G.M."Crystal structure refinement with SHELXL". *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.*, **71**: 3, 2015.
- 100 - STEPHENSON, T. A.; WILKINSON, G. "New complexes of ruthenium (II) and (III) with triphenylphosphine, triphenylarsine, trichlorostannate, pyridine and other ligands". *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **28**: 945-956, 1966.
- 101 - MA, G.; MACDONALD, R.; FERGUSON, M.; CAVELL, R. G.; PATRICK, B. O.; JAMES, B. R.; HU, T. Q. "Ruthenium(II) diphosphine/diamine/diimine complexes and catalyzed hydrogen-transfer to ketones". *Organomet.*, **26**: 846-854, 2007.
- 102 - BHARATE, S. S.; KUMARA V.; VISHWAKARMA, R. A. "Determining Partition Coefficient (Log P), Distribution Coefficient (Log D) and Ionization Constant (pKa) in Early Drug Discovery". *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **19**: 461- 469, 2016.
- 103 - MOSMANN, T. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays". *J. Immunological Methods*, **65**: 55-63, 1983.
- 104 - TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, F. "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology Testing". *Environ. Mol. Mutagen.*, **35**: 206-221, 2000.
- 105 - SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells". *Exp. Cell Res.*, **175**: 184-191, 1988.
- 106 - KOBAYASHI H., SUGIYAMA C., MORIKAWA Y., HAYASHI M., SOFUNI T. "A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay". *MMS Commun.*, **3**: 103-115,1995.
- 107 - HENRY, C. M.; HOLLVILLE, E.; MARTINS, S. J. "Measuring Apoptosis by Microscopy and Flow cytometry". *Methods*. **61**: 90-97, 2013.
- 108 - COSSARIZZA, A.; BACCARANI-CONTRI, M.; KALASHNIKOVA, G.; FRANCESCHI, C. "A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1)". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197**: 40-45, 1993.
- 109 - YARROW, J. C. et al. "A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods". *BMC Biotechnol.*, **4**: 1-9, 2004.
- 110 - MELO-REIS, P. R.; ANDRADE, L. S.; SILVA, C. B.; ARAÚJO, L. M. M.; PEREIRA, M. S., MRUE, F., CHEN-CHEN, L. "Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex". *Braz. J. Biol.*, **70**:189-194, 2010.
- 111 - BJORNSTI, M. A.; BENEDETTI, P.; VIGLIANTI, G.A.; WANG, J. C. "Expression of human DNA topoisomerase I in yeast cells lacking yeast DNA topoisomerase I:

- restoration of sensitivity of the cells to the antitumor drug camptothecin". *Cancer Res.*, **49**: 6318-6323, 1989.
- 112 - VELHO, R. G. Medidas de condutividade na caracterização de complexos inorgânicos: um levantamento bibliográfico. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2006. Dissertação de Mestrado, 60 p.
- 113 - SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. "Spectrometric Identification of organic Compounds". 7a ed. John Wiley & Sons, 2005. p. 106.
- 114 - JOLLEY, J.; CROSS, W. I.; PRITCHARD, R. G.; MCAULIFFE, C. A.; NOLAN, K. B. "Synthesis and characterisation of mercaptoimidazole, mercaptopyrimidine and mercaptopyridine complexes of platinum(II) and platinum(III). The crystal and molecular structures of tetra(2-mercaptobenzimidazole) and tetra(2-mercaptoimidazole)platinum(II) chloride". *Inorganica Chim. Acta*, **315**: 36-43, 2001.
- 115 - LOBANA, T.S.; SINGH, R. "Chemistry of pyridinethiols and related ligands -4. ¹Complexes of bis(pyridine-2-thiolato- or 1-oxopyridine-2-thione) ruthenium(II) with bis(diphenylphosphino)alkanes". *Polyhedron*, **14**: 907-912, 1995.
- 116 - WILLIAMS, D. J.; LY, T. A.; MUDGE, J. W. "Main group metal halide complexes with sterically hindered Thioureas XIV. A reinvestigation of coordination sensitive modes in the solid state vibrational spectrum of 1,3-dimethyl-2(3H)-imidazolethione and related compounds". *Inorganica Chimica Acta*, **218**:133-138, 1994.
- 117- Knupp, V. F., Nicesio, I. C., Queiroz, F. de M., Matos, R. M., Passos, B. de F. T. "Síntese e caracterização estrutural de complexos mono e bimetálicos de paládio e platina com ligantes contendo nitrogênio e enxofre". *Química Nova*, **20**: 382-387, 1997.
- 118- ABBEHAUSEN, C.; CASTRO, J. F.; SPERA, M. B. M.; HEINRICH, T. A.; COSTA-NETO, C. M.; LUSTRI, W. R.; FORMIGA, A. L. B.; CORBI, P. P. "Synthesis, spectroscopic characterization, DFT studies and biological assays of a novel gold(I) complex with 2-mercaptothiazoline. *Polyhedron*, **30**: 2354-2359, 2011.
- 119 - BATISTA, A. A.; SANTIAGO, M. O.; DONNICI, C. L.; MOREIRA, I. S.; HEALY, P. C.; BERNERS-PRICE, S. J.; QUEIROZ, S. L. "Electrochemical and spectroscopic studies on RuCl₂(PPh₃)₂(N)₂ and RuCl₂(PPh₃)₂(N-N) complexes (N=pyridine derivatives and N-N=phenanthroline or bipyridine derivatives) X-ray structure of RuCl₂(PPh₃)₂(phen)". *Polyhedron*, **20**: 2123-2128, 2001.
- 120 - WONG, C. Y.; LEE, F. W.; CHE, C. M.; CHENG, Y. F.; PHILLIPS, D. L.; ZHU, N. "Spectroscopic Studies and Structures of trans-Ruthenium(II) and Ruthenium(III) Bis(cyanide) Complexes Supported by a Tetradentate Macrocyclic Tertiary Amine Ligand". *Inorg. Chem.*, **47**: 10308-10316, 2008.
- 121 - CORRÊA, R. S.; DA SILVA, M. M.; GRAMINHA A. E. MEIRA C. S.; DOS SANTOS, J. A.F.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P.; VON POELHSITZ G.; CASTELLANO, E. E.; BLOCH C.; COMINETTI, M. R.; BATISTA, A. A. "Ruthenium(II) complexes of 1,3-thiazolidine-2-thione: Cytotoxicity against tumor cells and anti-Trypanosoma cruzi activity enhanced upon combination with benzimidazole". *J. Inorg. Biochem.*, **156**: 153-163, 2016.
- 122 - LIMA, B. A. V. Avaliação das Atividade Citotóxicas de Alguns Complexos Fosfínicos de Rutênio (Células Tumorais MDA-MB-231). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2010. Dissertação de Mestrado, 208 p.
- 123 - GALLATTI, T. F.; BOGADO, A. L., POELHSITZ, G. V.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E. E.; BATISTA, A. A.; ARAUJO, M. P. "Heterobimetallic [Ru(II)/Fe(II)] complexes: on the formation of trans and cis-[RuCl₂(dppf)(diimines)]". *J. Organomet. Chem.*, **692**: 5447-5452, 2007.

- 124 - BAROLLI, J. P.; MAIA, P. I. S.; COLINA-VEGAS, L.; MOREIRA, J.; PLUTIN, A. M.; MOCELO, R.; DEFLON, V. M.; COMINETTI, M. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; BATISTA, A. A. "Heteroleptic tris-chelate Ruthenium(II) complexes of *N,N*-disubstituted-*N'*-acylthioureas: synthesis, structural studies, cytotoxic activity and confocal microscopy studies". *Polyhedron*, **126**: 33-41, 2017.
- 125 - PINHEIRO, S. O.; DE SOUSA, J. R.; SANTIAGO, M. O.; CARVALHO, I. M.M.; SILVA, A. L. R.; BATISTA, A. A.; CASTELLANO, E. E.; ELLENA, J.; MOREIRA, I. S.; DIÓGENES, I. C. N. "Synthesis, characterization and structure of ruthenium(II) phosphine complexes with N-heterocyclic thiolate ligands". *Inorganica Chim. Acta*, **359**: 391-400, 2006.
- 126 - COX, S. R.; WILLIAMS, D. E. "Representation of the Molecular Electrostatic Potential by a Net Atomic Charge Model". *J Comput Chem*, **2**, 304-323, 1981.
- 127 - Nhugeaw, T.; Temboot, P.; Hansongnern, K.; Ratanaphan, A. "Cellular responses of BRCA1-defective and triple-negative breast cancer cells and in vitro BRCA1 interactions induced by metallo-intercalator ruthenium (II) complexes containing chlorosubstituted phenylazopyridine". *BMC Cancer*, **14**: 1-19, 2014.
- 128 - HONORATO, J.; COLINA-VEGAS, L.; CORREA, R. S.; GUEDES, A. P. M.; MIYATA, M.; PAVAN, F. R.; ELLENA, J.; BATISTA, A. A. "Esterification of the free carboxylic group from the lutidinic acid ligand as a tool to improve the cytotoxicity of Ru(II) complexes". *Inorg. Chem. Front.*, **6**: 376-390, 2019.
- 129 - MILUTINOVIĆ, M. M.; RILAK, A.; BRATSOS, I.; KLISURIĆ, O.; VRANEŠ, M.; GLIGORIJEVIĆ, N.; RADULOVIĆ, S.; BUGARČIĆ, Ž. D. "New 4'-(4-chlorophenyl)-2,2':6',2"-terpyridine ruthenium(II) complexes: Synthesis, characterization, interaction with DNA/BSA and cytotoxicity studies". *J. Inorg. Biochem.*, **169**: 1-12, 2016.
- 130 - HAGHDOOST, M.; GOLBAGHI, G.; LÉTOURNEAU, M.; PATTEN, S. A.; CASTONGUAY, A. "Lipophilicity-antiproliferative activity relationship study leads to the preparation of a ruthenium(II) arene complex with considerable *in vitro* cytotoxicity against cancer cells and a lower *in vivo* toxicity in zebrafish embryos than clinically approved *cis*-platin". *Eur. J. Med. Chem.*, **132**: 282-293, 2017.
- 131 - DARZYNKIEWICZ, Z.; BRUNO, S.; BINO, G. D.; GORCZYCA, W.; HOTZ, M. A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F. "Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry". *Cytometry*, **13**: 795-808, 1992.
- 132 - TOMAZ, A. I.; JAKUSCH, T.; MORAIS, T. S.; MARQUES, F.; ALMEIDA, R. F. M.; MENDES, F.; ENYEDY, E. A.; SANTOS, I.; PESSOA, J. C.; KISS, T.; GARCIA, M. H. "[Ru(II)(η⁵-C₅H₅)(bipy)(PPh₃)]⁺, a promising large spectrum antitumor agent: Cytotoxic activity and interaction with human serum albumin". *J. Inorg. Biochem.*, **117**: 261-269, 2012.
- 133 - ELMORE, S. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death". *Toxicologic Pathology*, **35**: 495-516, 2017.
- 134 - CHEN, W.-X.; SONG, X.-D.; HE, S.-F.; SUN, J.; CHEN, J.-X.; WU, T.; MAO, Z.-W. "Ru (II) complexes bearing guanidinium ligands as potent anticancer agents". *J. Inorg. Biochem.*, **164**: 91-98, 2016.
- 135 - WAN, D.; LAI, S.-H.; ZENG, C.-C.; ZHANG, C.; TANG, B.; LIU, Y.-J. "Ruthenium (II) polypyridyl complexes: synthesis, characterization and anticancer activity studies on BEL-7402 cells". *J. Inorg. Biochem.*, **173**: 1-11, 2017.
- 136 - ZENG, C.-C.; LAI, S.-H.; YAO, J.-H.; ZHANG, C.; YIN, H.; LI, W.; HAN, B.-J.; LIU, Y.-J. "The induction of apoptosis in HepG-2 cells by ruthenium(II) complexes through an

- intrinsic ROS-mediated mitochondrial dysfunction pathway". *Eur. J. Med. Chem.*, **122**: 118-126, 2016.
- 137 - TAN, C. P.; LU, Y. Y.; JI, L. N.; MAO, Z. W. "Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds". *Metallomics*, **6**: 978-995, 2014.
- 138 - MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. M. "Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy". *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **32**: 157-170, 2000.
- 139 - ZHANG, C.; HAN, B. J.; ZENG, C. C.; LAI, S. H.; LI, W.; TANG, B.; WAN, D.; JIANG, G. B.; LIU, Y. J. "Synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity and anticancer effects of ruthenium(II) complexes on BEL-7402 cells". *J. Inorg. Biochem.*, **157**: 62-72, 2016.
- 140 - SIMON, H.-U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, F. "Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction". *Apoptosis*, **5**: 415-418, 2000.
- 141 - LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. "Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress". *Chem. Res. Toxicol.*, **5**: 227-231, 1992.
- 142 - WU, Q.; HE, J.; MEI, W.; ZHANG, Z.; WU, X.; SUN, F. "Arene ruthenium(II) complex, a potent inhibitor against proliferation, migration and invasion of breast cancer cells, reduces stress fibers, focal adhesions and invadopodia". *Metallomics*, **12**: 2204-2212, 2014.
- 143 - FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; BREE, C. V. "Clonogenic assay of cells in vitro". *Nature Protocols*, **1**: 2315-2319, 2006.
- 144 - SUBAUSTE, M. C.; KUPRIYANOVA, T. A.; CONN, E. M.; ARDI, V. C.; QUIGLEY, J. P.; DERYUGINA, E. I. "Evaluation of metastatic and angiogenic potentials of human colon carcinoma cells in chick embryo model systems". *Clin. Exp. Metastasis*, **226**: 1033-1047, 2009.
- 145 - NOWAK-SLIWINSKA, P.; SEGURA, T.; IRUELA-ARISPE, M. L. "The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering". *Angiogenesis*, **17**: 779-804, 2014.
- 146 - MAGALHAES, L. F.; MELLO-ANDRADE, F.; PIRES, W. C.; SILVA, H. D.; SILVA, P. F. F.; MACEDO, L. M.; CASTRO, C. H.; CARNEIRO, C. C.; CARDOSO, C. G.; REIS, P. R. M.; OLIVEIRA, L. C.; CAETANO, R. R.; BATISTA, A. A.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. "*cis*-[RuCl(BzCN)(bipy)(dppe)]PF₆ induces anti-angiogenesis and apoptosis by a mechanism of caspase-dependent involving DNA damage, PARP activation, and Tp53 induction in Ehrlich tumor cells". *Chem. Biol. Interact.*, **278**: 101-113, 2017.
- 147 - LOKMAN, N. A.; ELDER, A. S. F.; RICCIARDELLI, C.; OEHLER, M. K. "Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) assay as an *in vivo* model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis". *Int. J. Mol. Sci.*, **13**: 9959-9970, 2012.
- 148 - MELLO-ANDRADE, F.; COSTA, W. L.; PIRES, W. C.; PEREIRA, F. C.; CARDOSO, C. G.; LINO-JUNIOR, R. S.; IRUSTA, V. R. C.; CARNEIRO, C. C.; MELO-REIS, P. R.; CASTRO, C. H.; ALMEIDA, M. A. P.; BATISTA, A. A.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. "Antitumor effectiveness and mechanism of action of Ru(II)/amino acid/diphosphine complexes in the peritoneal carcinomatosis progression". *Tumour Biol.*, **278**: 1-18, 2017.
- 149 - DEMORO, B.; DE ALMEIDA, R. F. M.; MARQUES, F.; MATOS, C. P.; OTERO, L.; PESSOA, J. C.; SANTOS, I.; RODRÍGUEZ, A.; MORENO, V.; LORENZO, J.;

- GAMBINO, D.; TOMAZ, A. I. "Screening organometallic binuclear thiosemicarbazone ruthenium complexes as potential anti-tumour agents: cytotoxic activity and human serum albumin binding mechanism". *Dalton Trans.*, **42**: 7131-7146, 2013.
- 150 - LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2. ed. New York: PLenum Press, 954 p.
- 151 - MORAIS, T. S.; SANTOS, F. C.; JORGE, T. F.; CÔRTE-REAL, L.; MADEIRA, P. J. A.; MARQUES, F.; ROBALO, M. P.; MATOS, A.; SANTOS, I.; GARCIA, M. H. "New water-soluble ruthenium(II) cytotoxic complex: Biological activity and cellular distribution". *J. Inorg. Biochem.*, **130**: 1-14, 2014.
- 152 - ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. "Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability". *Biochemistry*, **20**: 3096-3102, 1981.
- 153 - MOREIRA, M. B.; FRANCISCATO, D. S.; TOLEDO, K. C. F.; SOUZA, J. R. B.; NAKATANI, H. S.; SOUZA, V. R. "Investigação da supressão da fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio". *Química Nova*, **38**: 227-232, 2015.
- 154 - FASANO, M.; CURRY, S.; TERRENO, E.; GALLIANO, M.; FANALI, G.; NARCISO, P.; NOTARI, S.; ASCENZI, P. "The Extraordinary Ligand Binding Properties of Human Serum Albumin". *IUBMB Life*, **57**: 787-796, 2005.
- 155 - FANALI, G.; DI MASI, A.; TREZZA, V.; MARINO, M.; FASANO, M.; ASCENZI, P. "Human serum albumin: From bench to bedside". *Mol. Aspects Med.*, **33**: 209-290, 2012.
- 156 - RYAN, A. J.; GHUMAN, J.; ZUNSZAIN, P. A.; CHUNG, C.; CURRY, S. "Structural basis of binding of fluorescent, site-specific dansylated amino acids to human serum albumin". *J. Struct. Biol.*, **174**: 84-91, 2011.
- 157 - MAEDA, H. "The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting". *Advan. Enzyme Regul.*, **41**: 189-207, 2001.
- 158 - LEVINA, A.; MILTRA, A.; LAY, P. A. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. *Metallomics*, **1**: 458-470, 2009.
- 159 - PALCHAUDHURI, R.; HERGENROTHER, P. J. "DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action". *Current Opinion in Biotechnology*, **18**: 497-503, 2007.
- 160 - PAGES, B. J.; ANG, D. L.; WRIGHT, E. P.; ALDRICH-WRIGHT, J. R. "Metal complex interactions with DNA". *Dalton Trans.*, **44**: 3505-3526, 2015.
- 161 - REDDY, P. V.; REDDY, M. R.; AVUDODDI, S.; KUMAR, Y. P.; NAGAMANI, C.; DEEPIKA, N.; NAGASURYAPRASAD, K.; SINGH, S. S.; SATYANARAYANA, S. "Design, Synthesis, DNA binding affinity, cytotoxicity, apoptosis and cell cycle arrest of Ru(II) polypyridyl complexes". *Anal. Biochem.*, **485**: 49-58, 2015.
- 162 - CHAMPOUX, J. J. "DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism". *Annu. Rev. Biochem.*, **70**: 369-413, 2001.
- 163 - CASTELLI, S.; COLETTA, A.; D' ANNESSA, I.; FIORANI, P.; TESAURO, C.; DESIDERI, A. "Interaction between natural compounds and human topoisomerase I". *Biol. Chem.*, **39**: 1327-1340, 2012.
- 164 - SVEJSTRUP, J. Q.; CHRISTIANSEN, K.; GROMOVA, I. I.; ADERSEN, A. H.; WESTERGAARD, O. "New technique for uncoupling the cleavage and religation reactions of Eukaryotic Topoisomerase I.: The mode of action of camptothecin at a specific recognition site". *J. Mol. Biol.*, **222**: 669-678, 1991.

Apêndice A

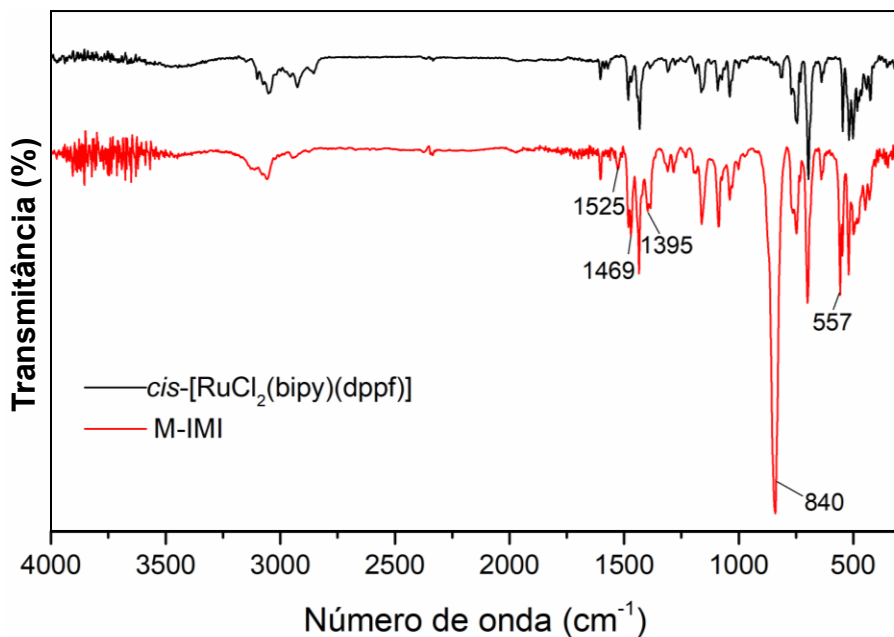


FIGURA A1 - Espectro de infravermelho do precursor (—) e do complexo M-IMI (—), em pastilha de KBr.

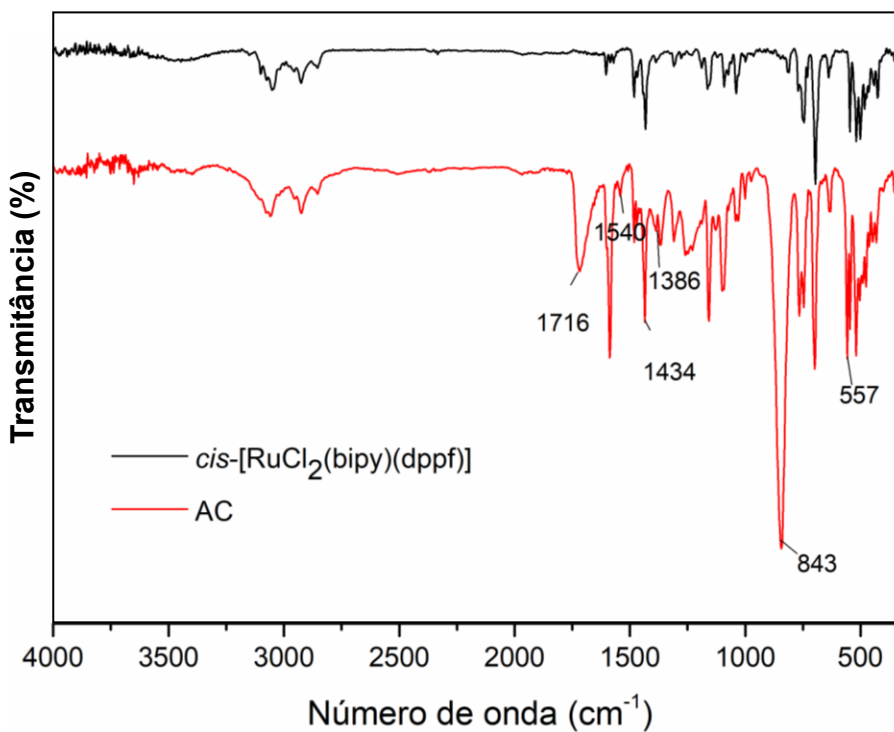


FIGURA A2 - Espectro de infravermelho do precursor (—) e do complexo AC (—), em pastilha de KBr.

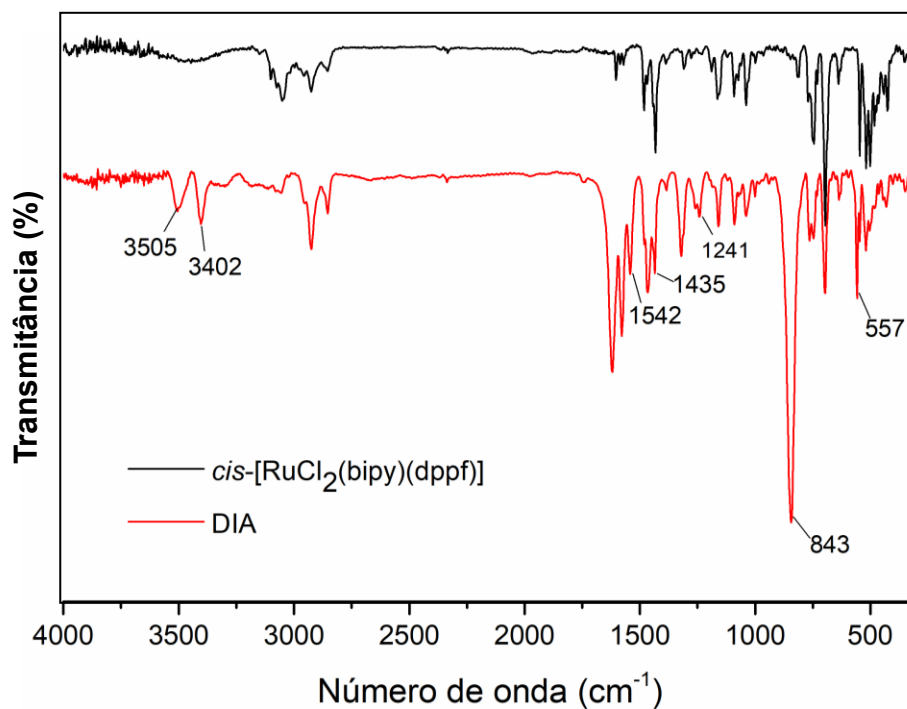


FIGURA A3 - Espectro de infravermelho do precursor (—) e do complexo DIA (—), em pastilha de KBr.

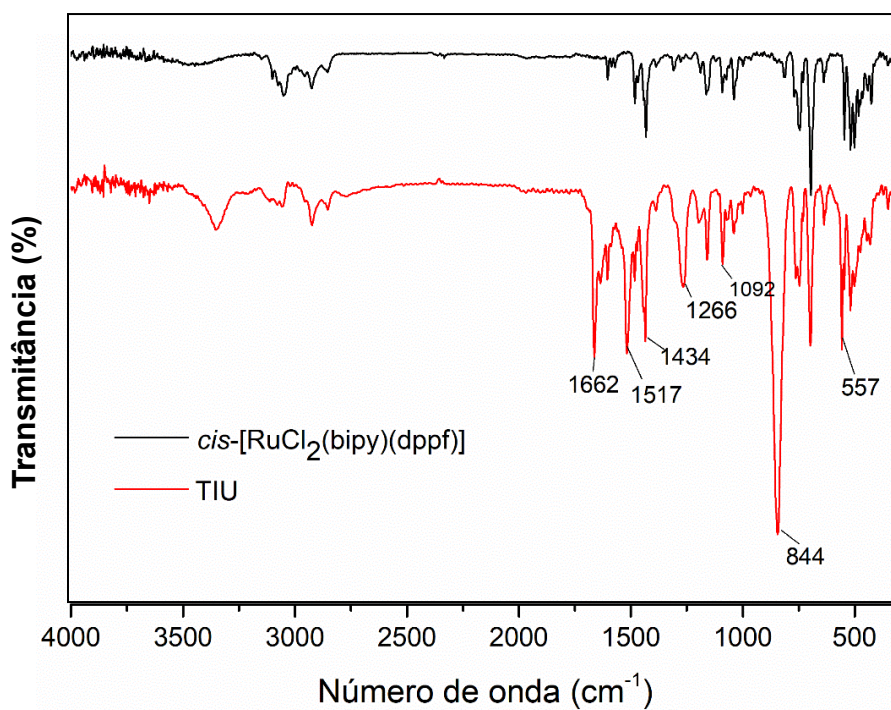


FIGURA A4 - Espectro de infravermelho do precursor (—) e do complexo TIU (—), em pastilha de KBr.

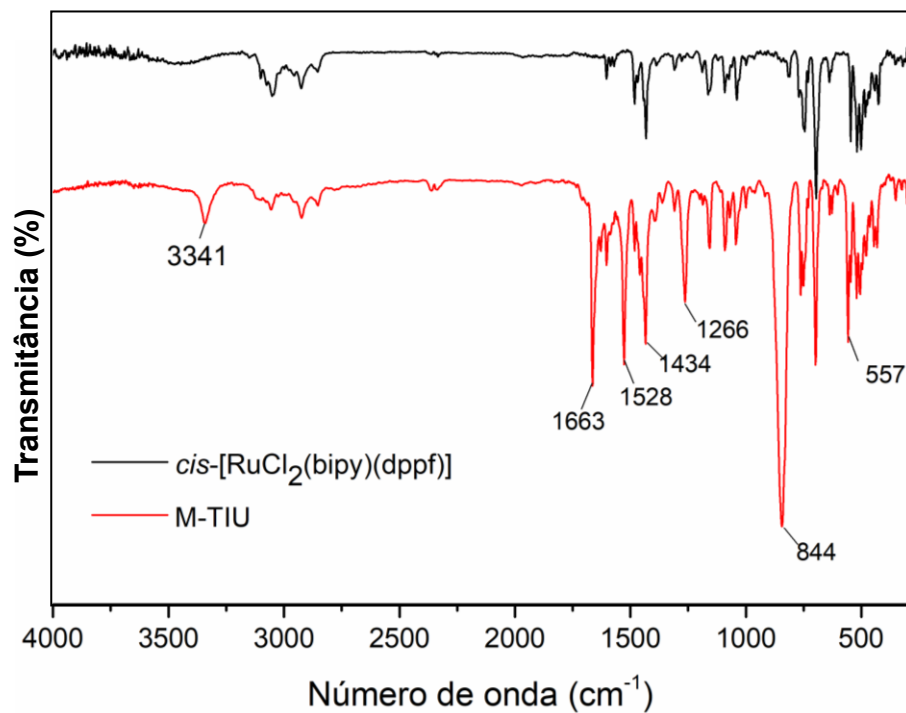


FIGURA A5 - Espectro de infravermelho do precursor (—) e do complexo M-TIU (—), em pastilha de KBr.

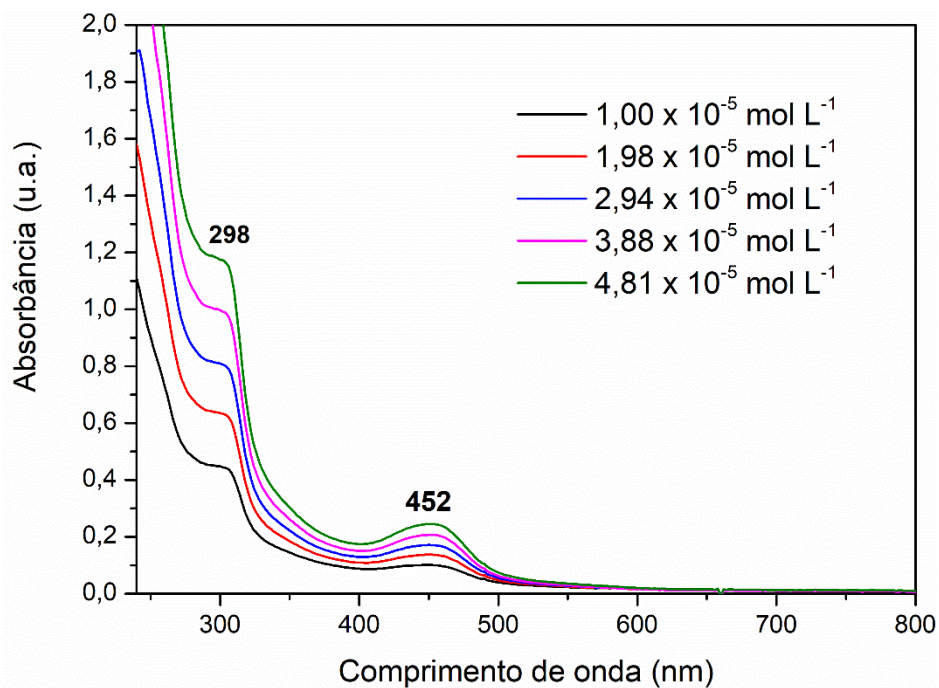
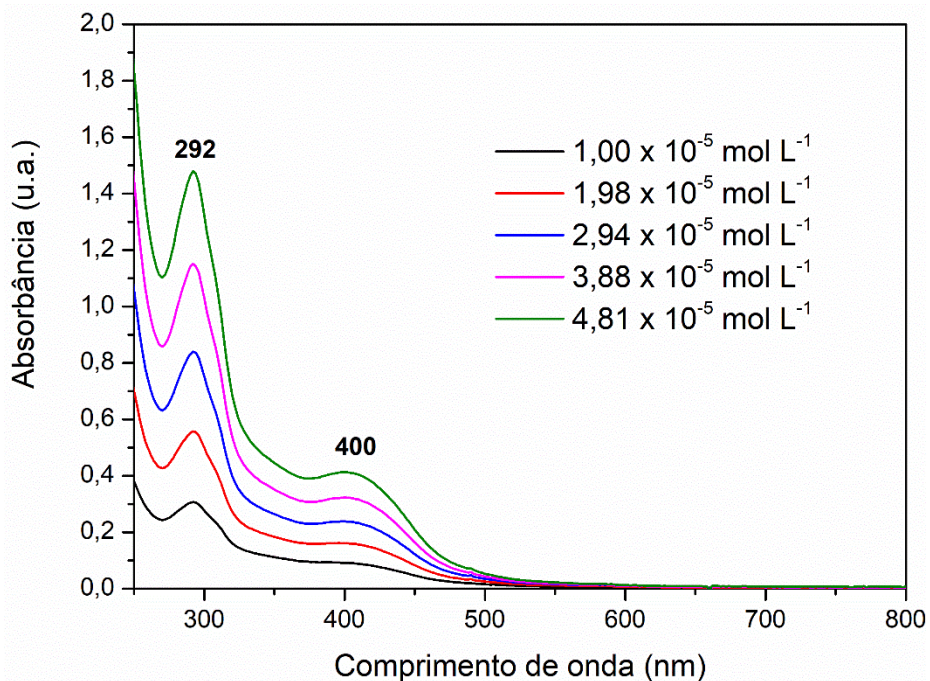
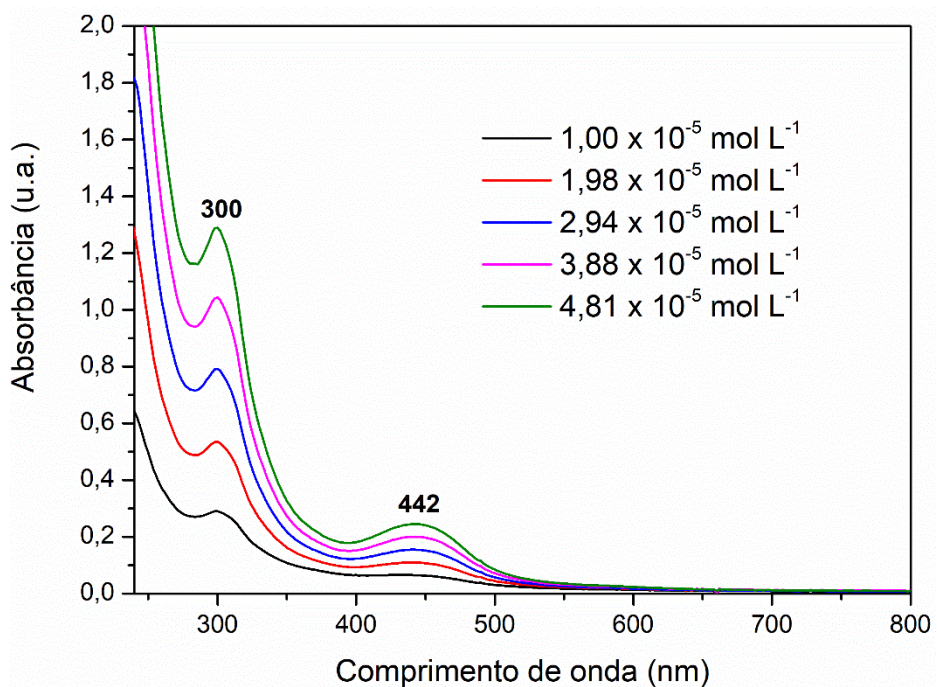
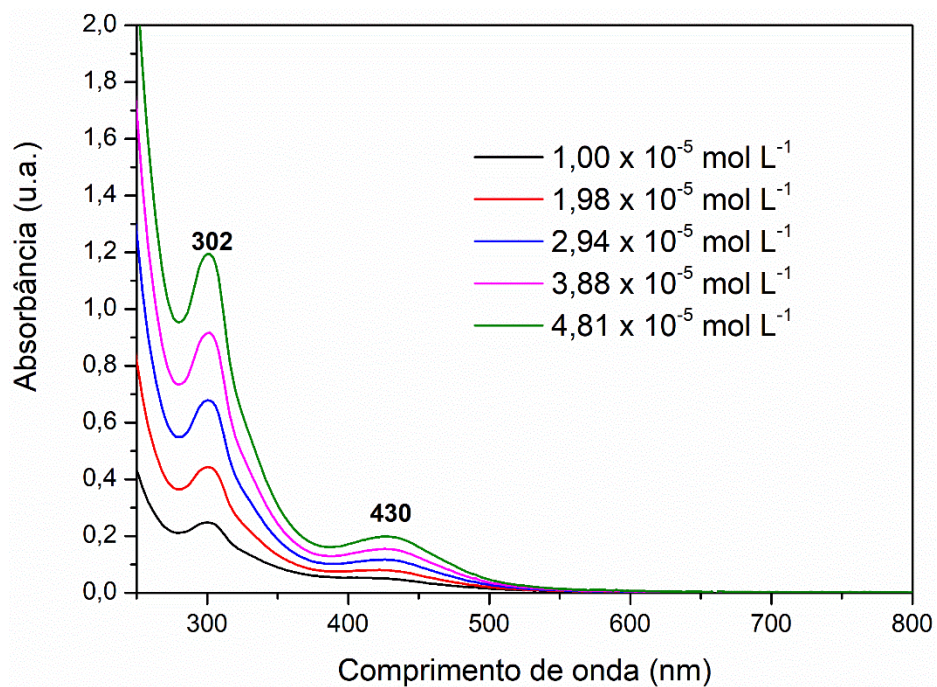
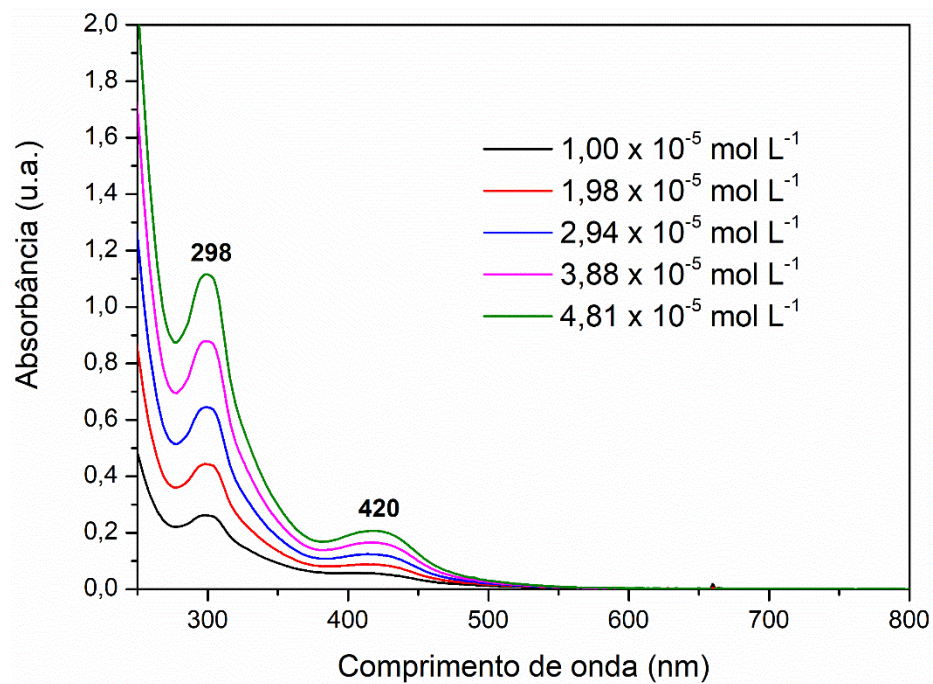


FIGURA A6 - Espectro eletrônico de absorção UV-visível do complexo M-IMI em CH_2Cl_2 .

FIGURA A7 - Espectro eletrônico de absorção UV-visível do complexo AC em CH₂Cl₂.FIGURA A8 - Espectro eletrônico de absorção UV-visível do complexo DIA em CH₂Cl₂.

FIGURA A9 - Espectro eletrônico de absorção UV-visível do complexo M-TIU em CH₂Cl₂.FIGURA A10 - Espectro eletrônico de absorção UV-visível do complexo TIU em CH₂Cl₂.

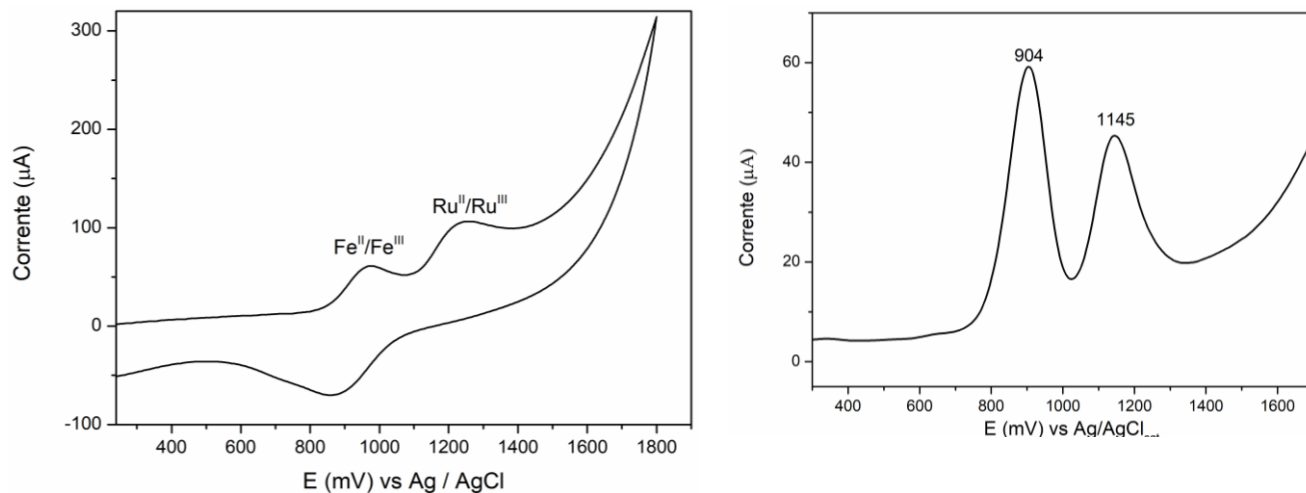


FIGURA A11 - Voltamogramas Cíclico e de pulso diferencial de oxidação do complexo M-IMI em 0,1 mol L⁻¹ de PTBA em CH₂Cl₂ à 100 mV / s.

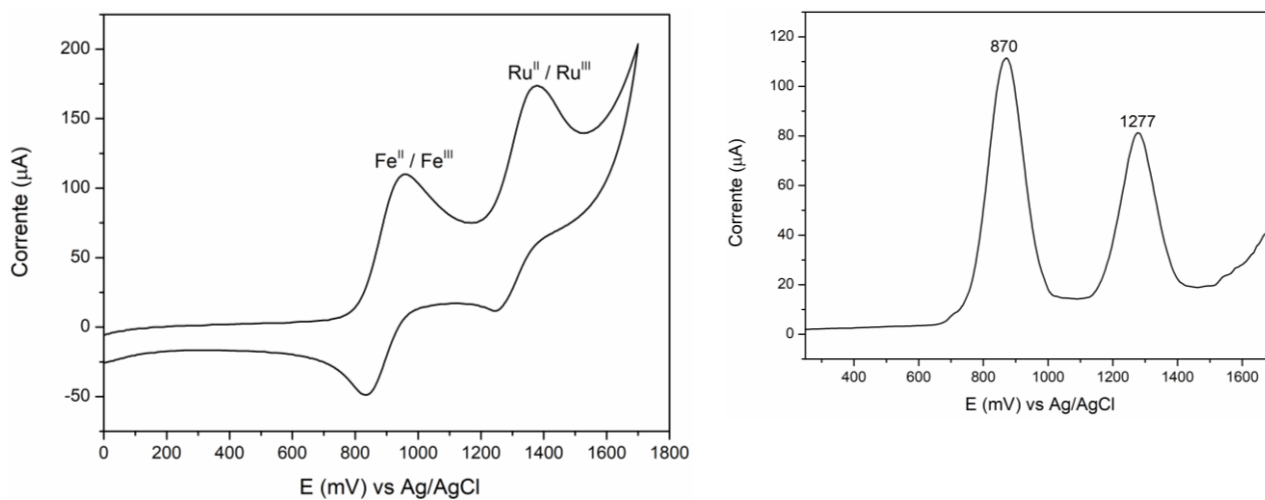


FIGURA A12 - Voltamogramas Cíclico e de pulso diferencial de oxidação do complexo AC em 0,1 mol L⁻¹ de PTBA em CH₂Cl₂ à 100 mV / s.

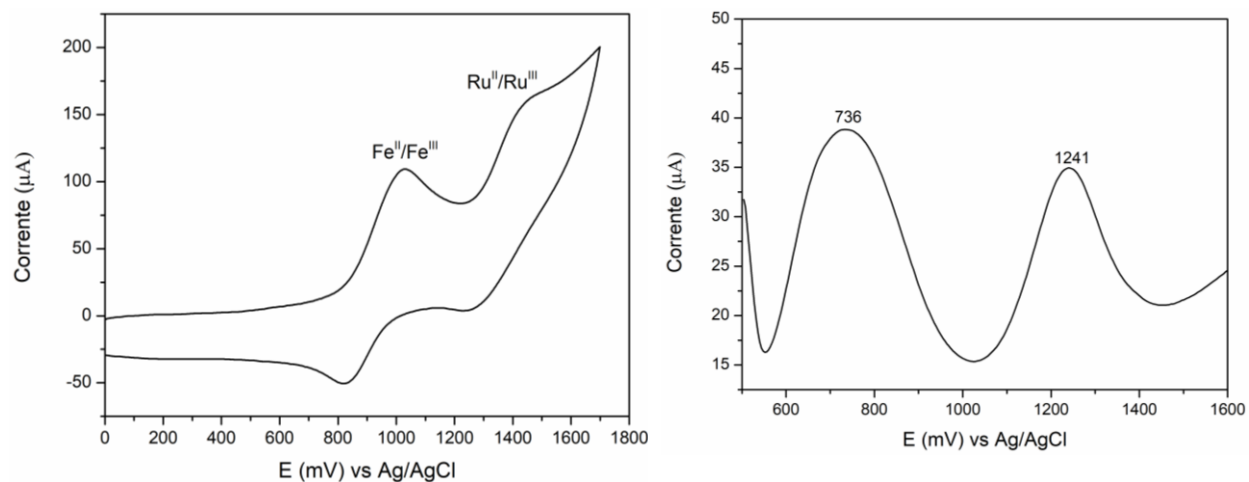


FIGURA A13 - Voltamogramas Cíclico e de pulso diferencial de oxidação do complexo DIA em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PTBA em CH_2Cl_2 à 100 mV / s .

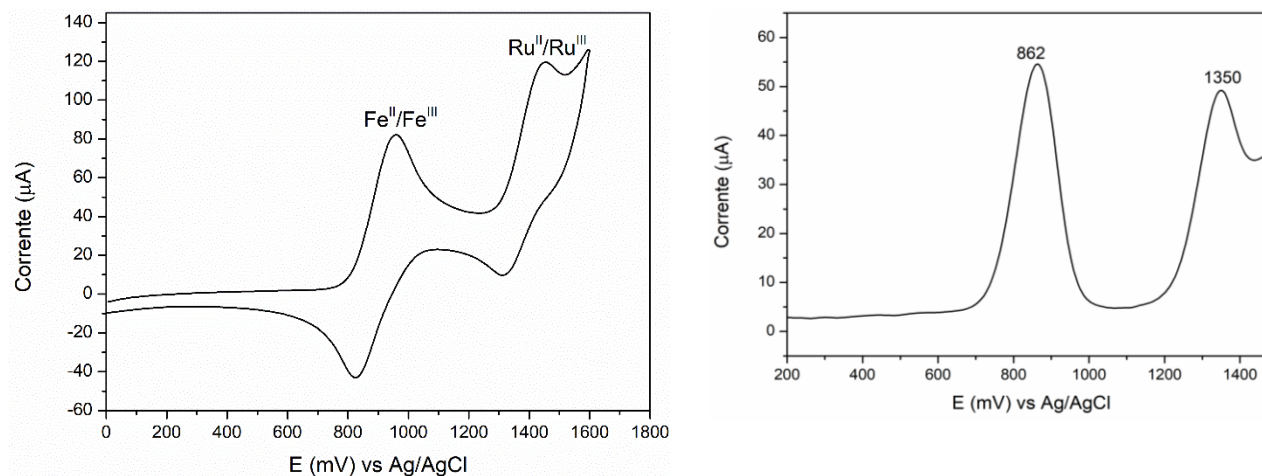


FIGURA A14 - Voltamogramas Cíclico e de pulso diferencial de oxidação do complexo M-TIU em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PTBA em CH_2Cl_2 à 100 mV / s .

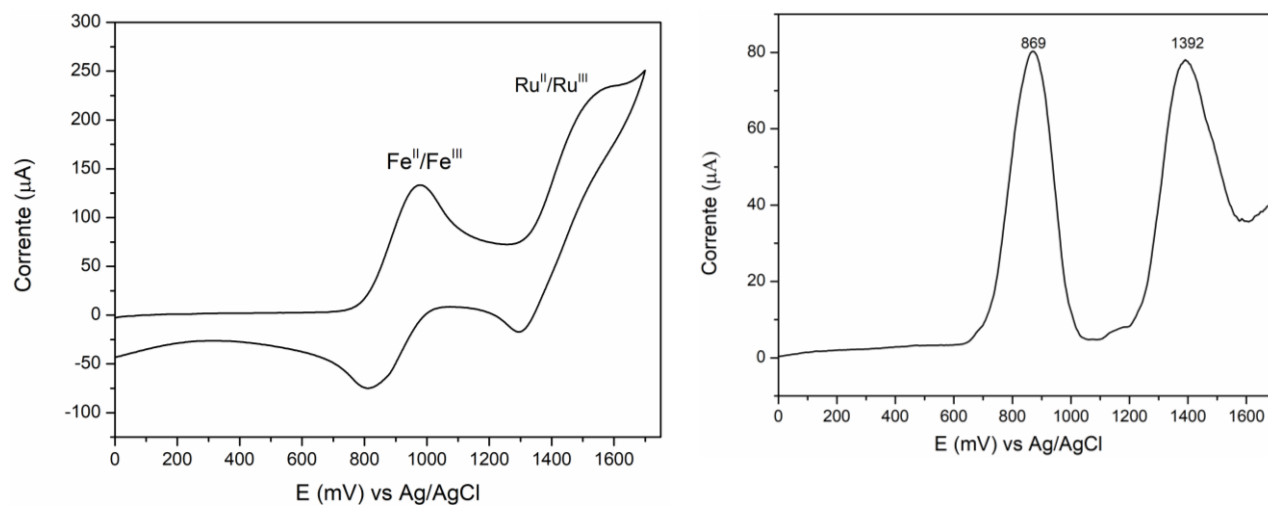


FIGURA A15 - Voltamogramas Cíclico e de pulso diferencial de oxidação do complexo TIU em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PTBA em CH_2Cl_2 à 100 mV / s .

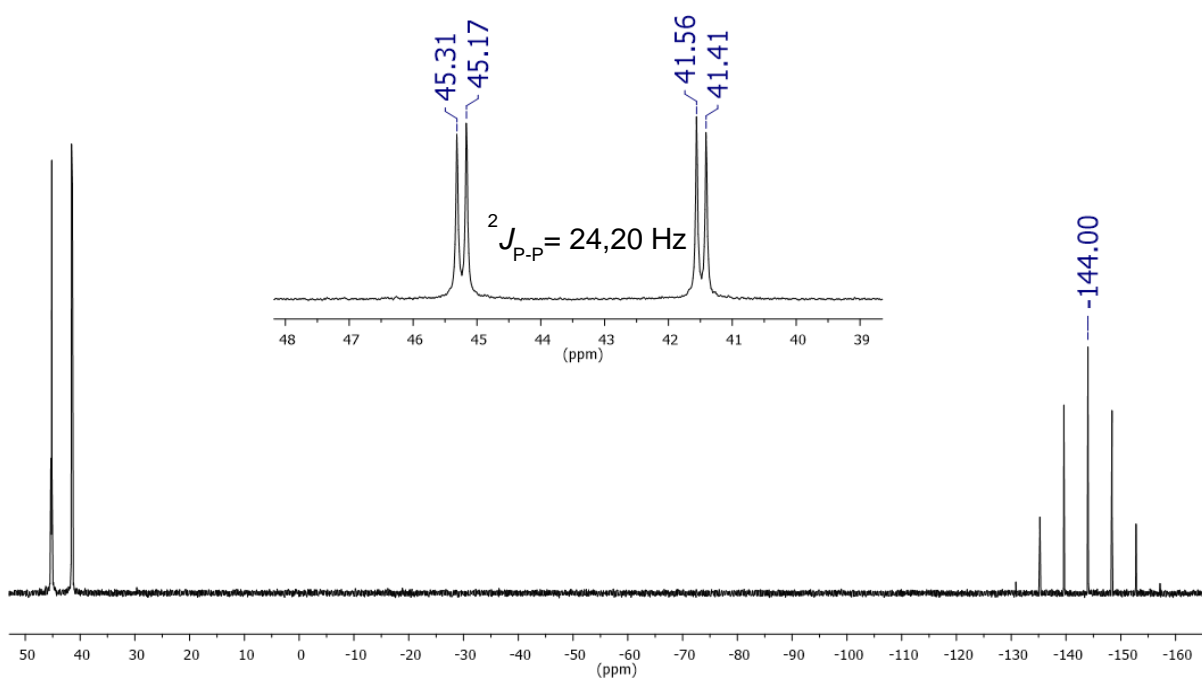
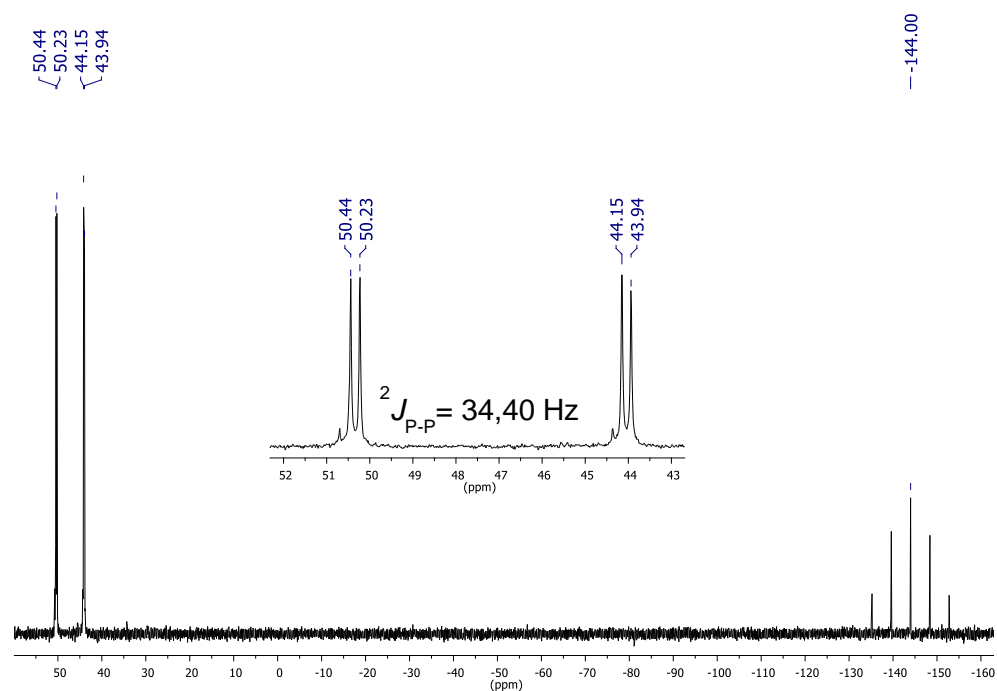
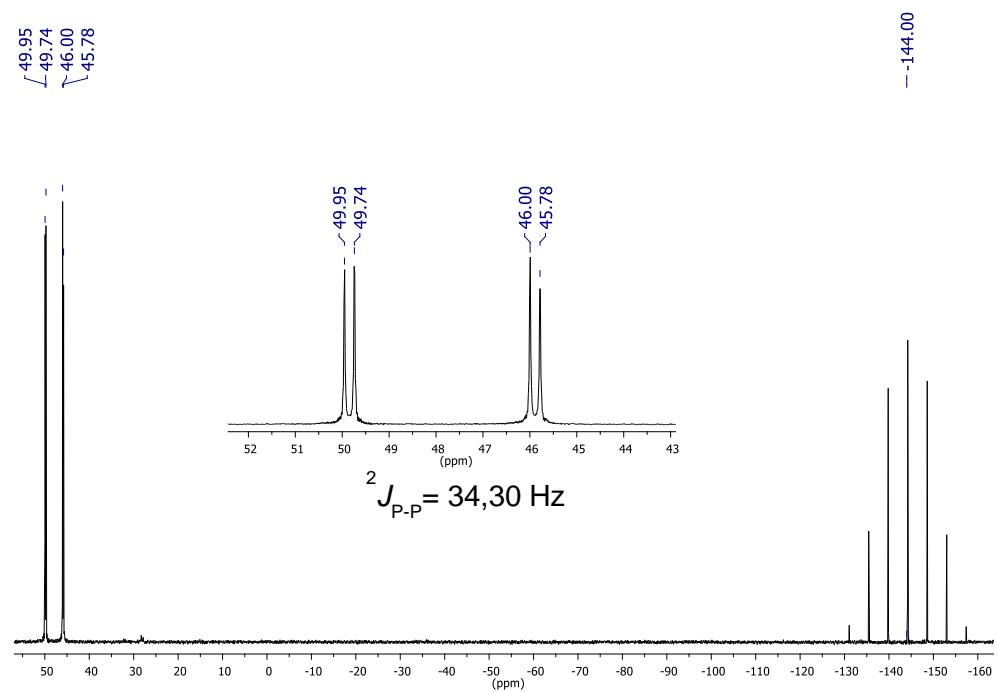
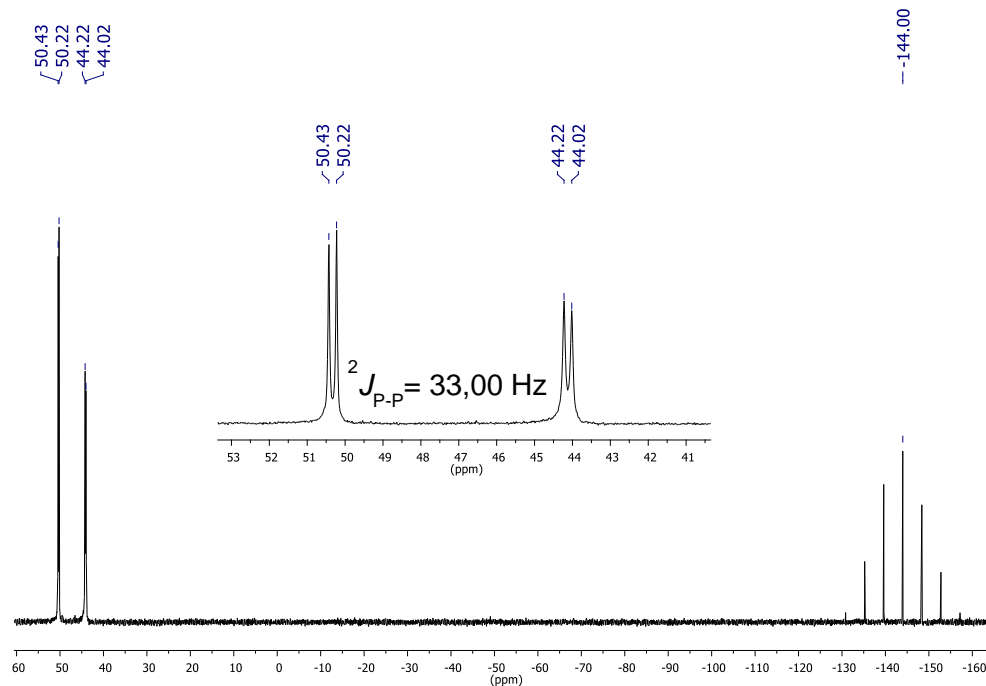
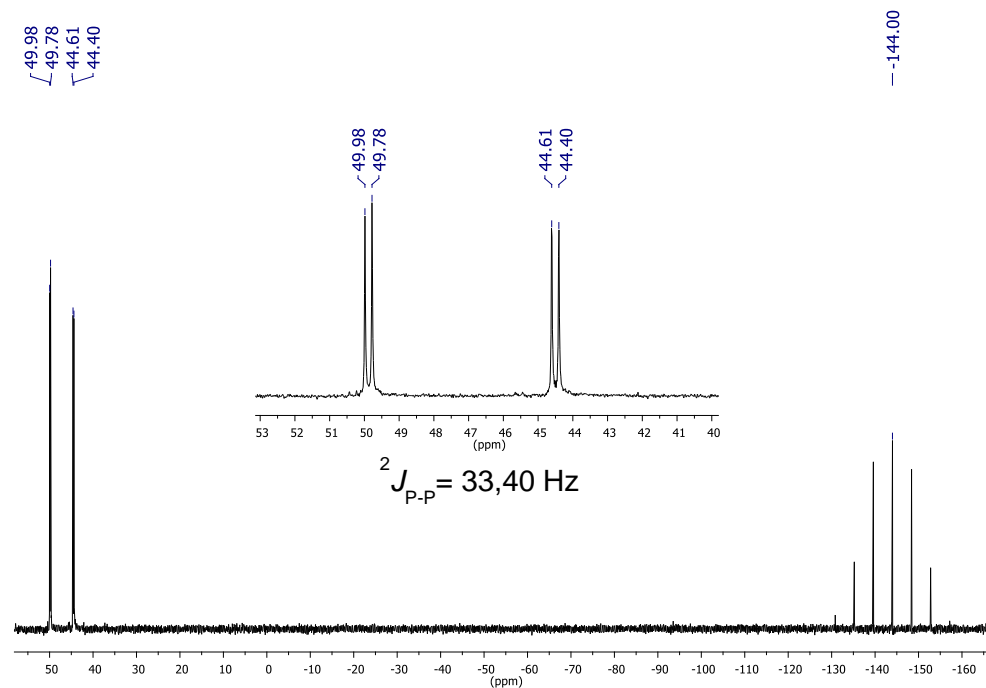


FIGURA A16 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo M-IMI em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

FIGURA A17 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo AC em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.FIGURA A18 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo DIA em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

FIGURA A19 - Espectro de RMN ${}^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo M-TIU em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.FIGURA A20 - Espectro de RMN ${}^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo TIU em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

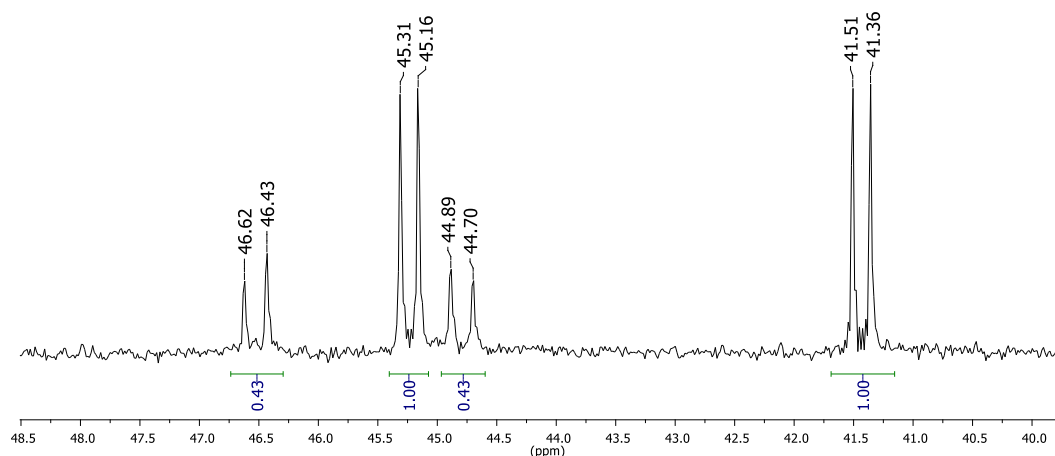


FIGURA A21 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{1\text{H}\}$ do complexo M-IMI em solução de $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$.

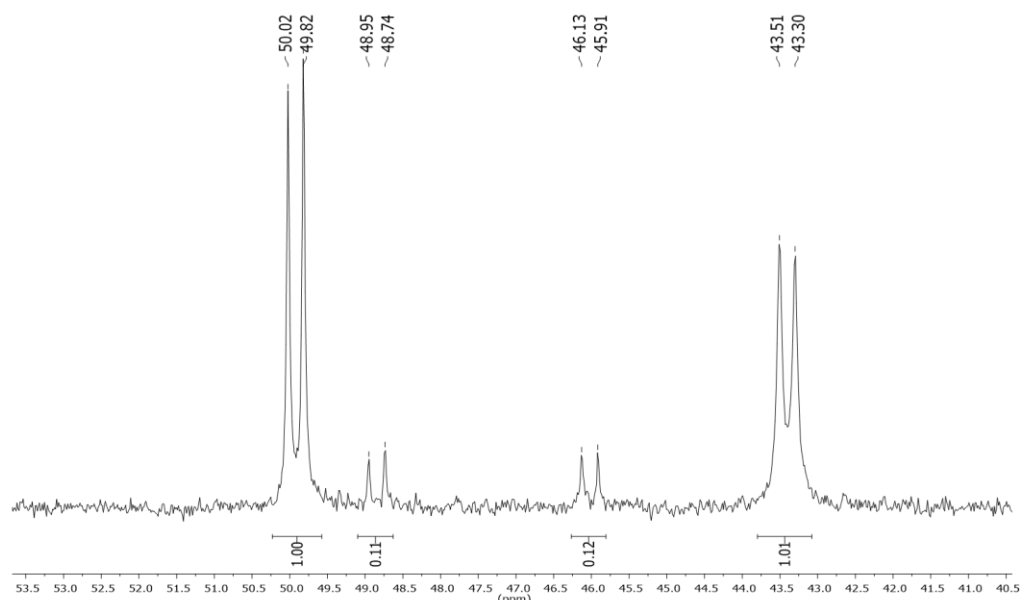


FIGURA A22 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{1\text{H}\}$ do complexo M-TIU em solução de $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$.

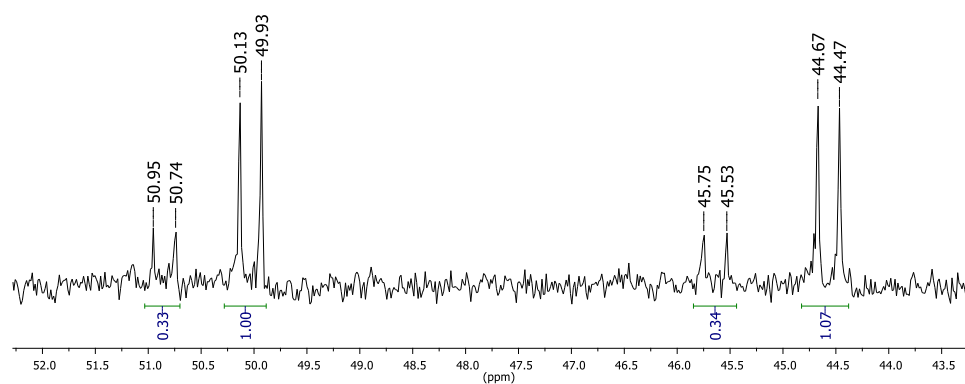
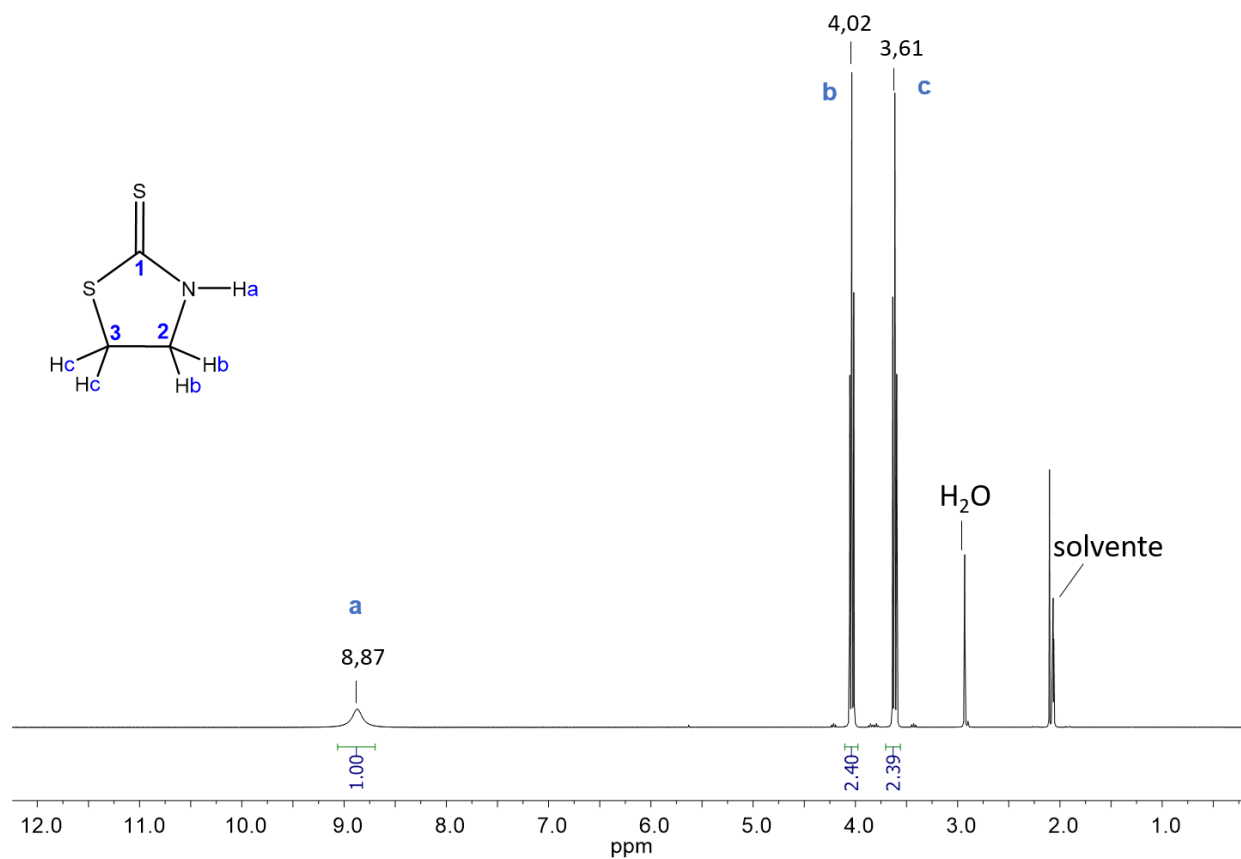
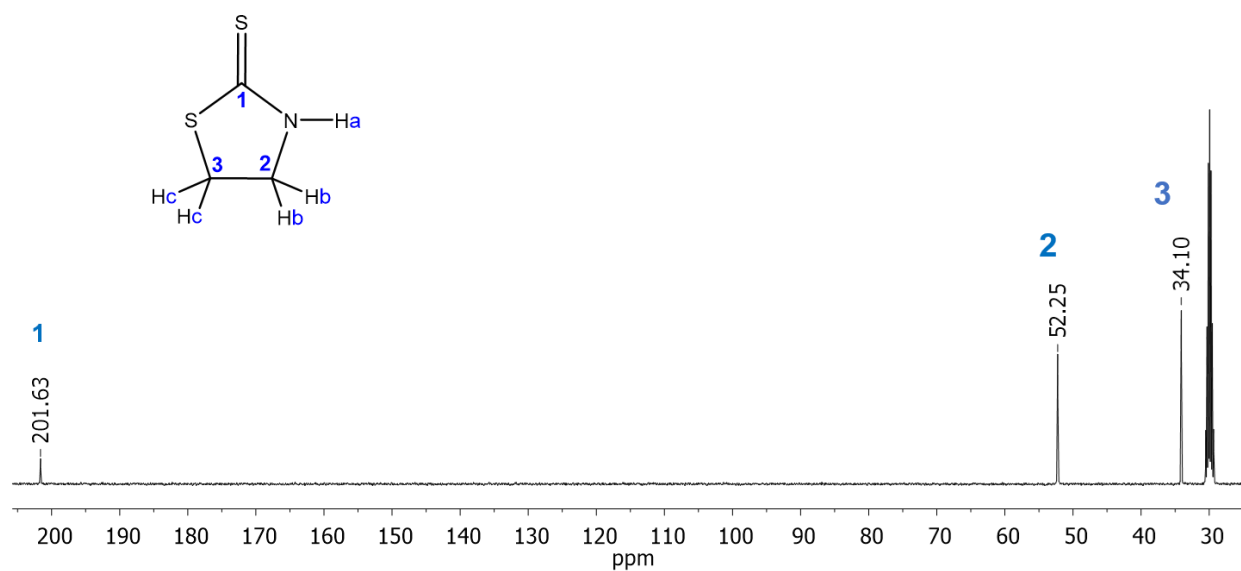
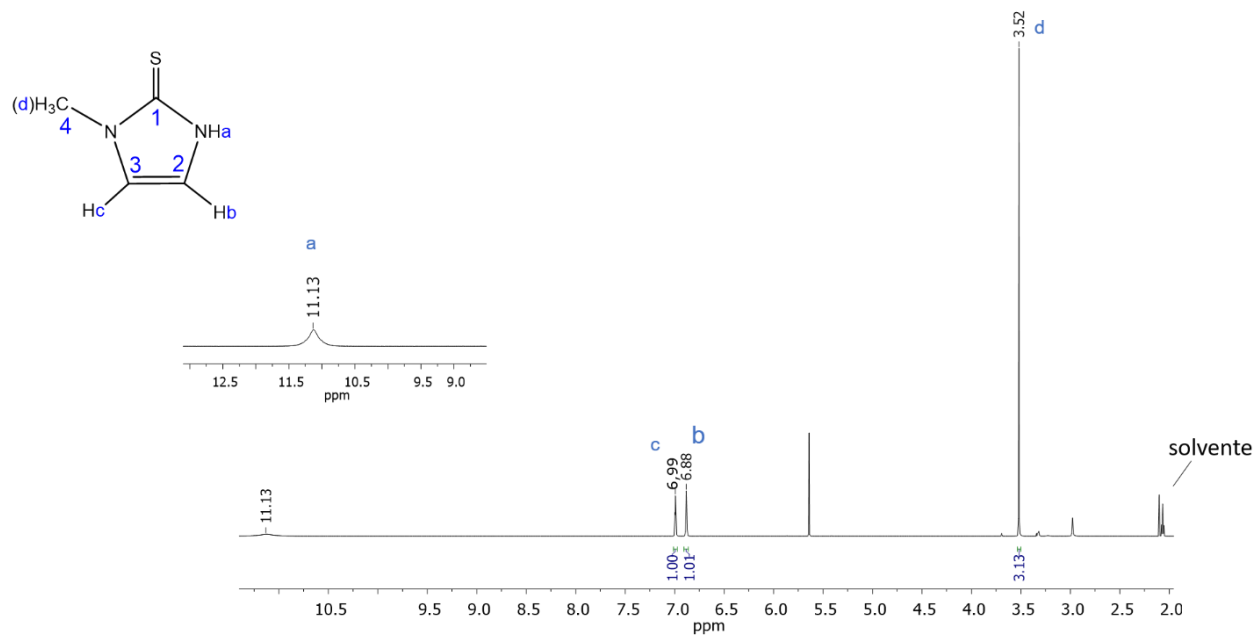
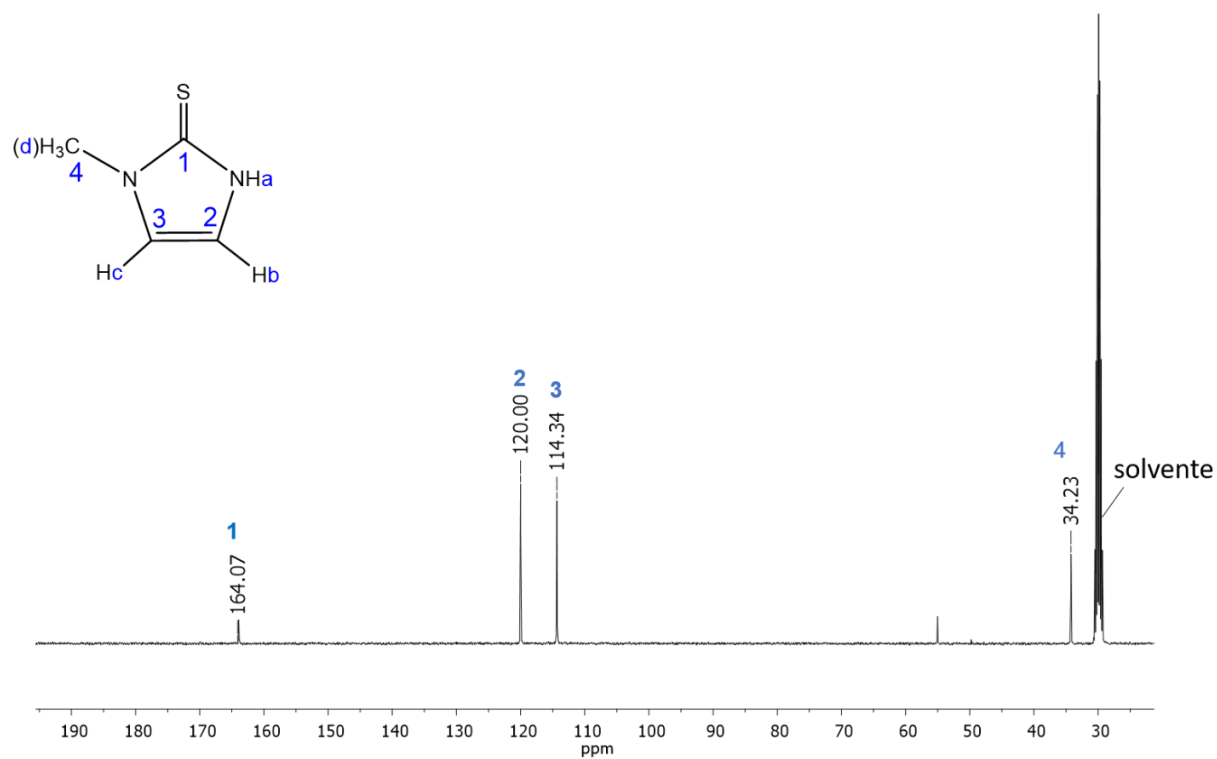
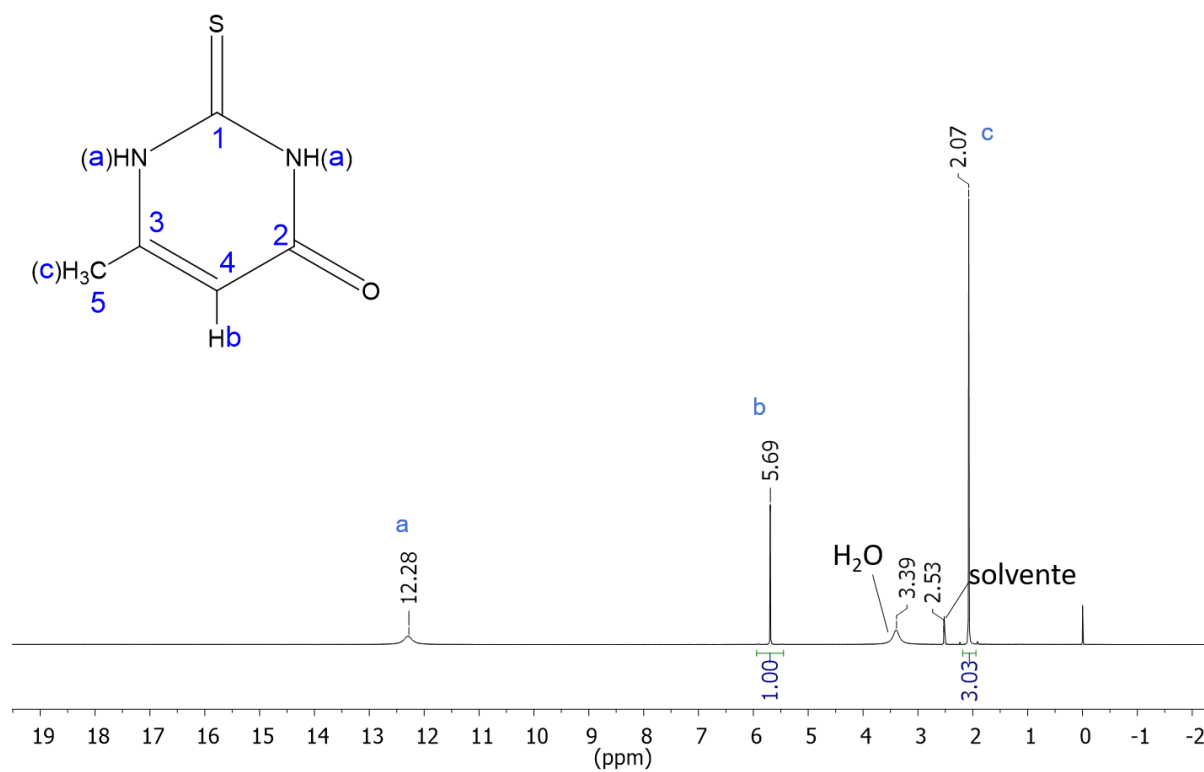
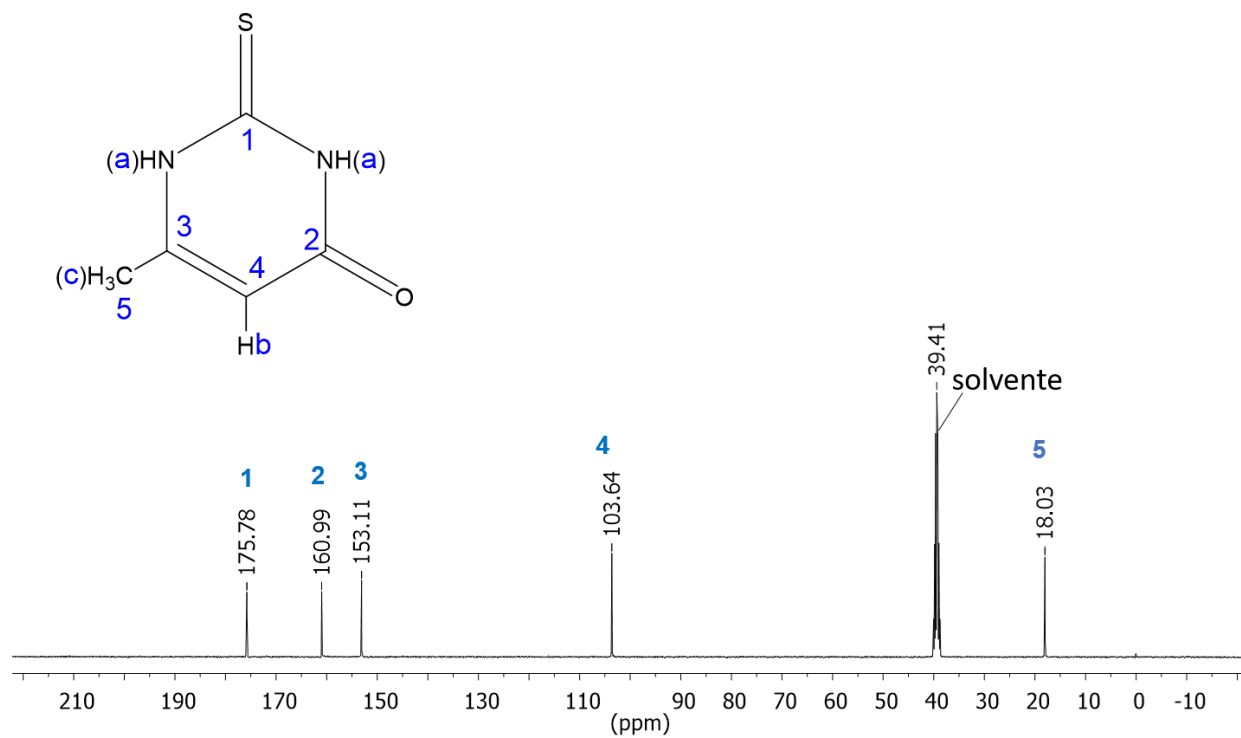
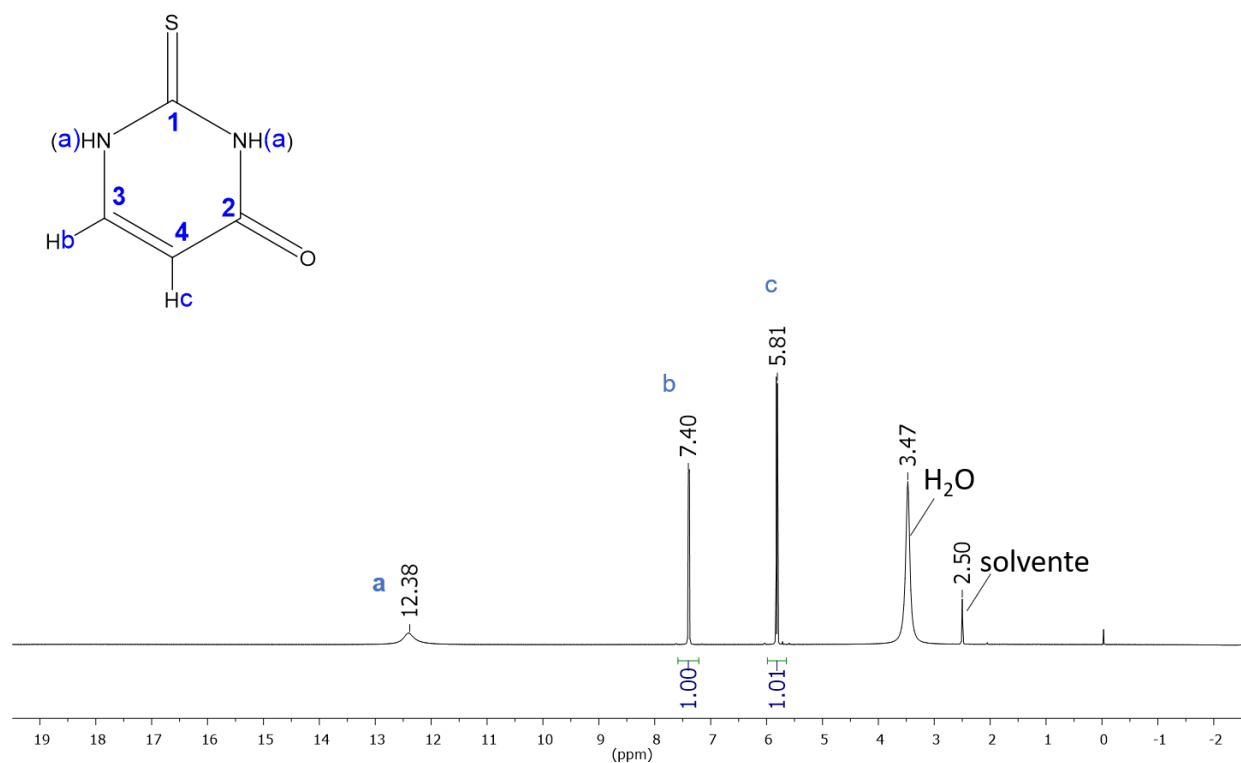
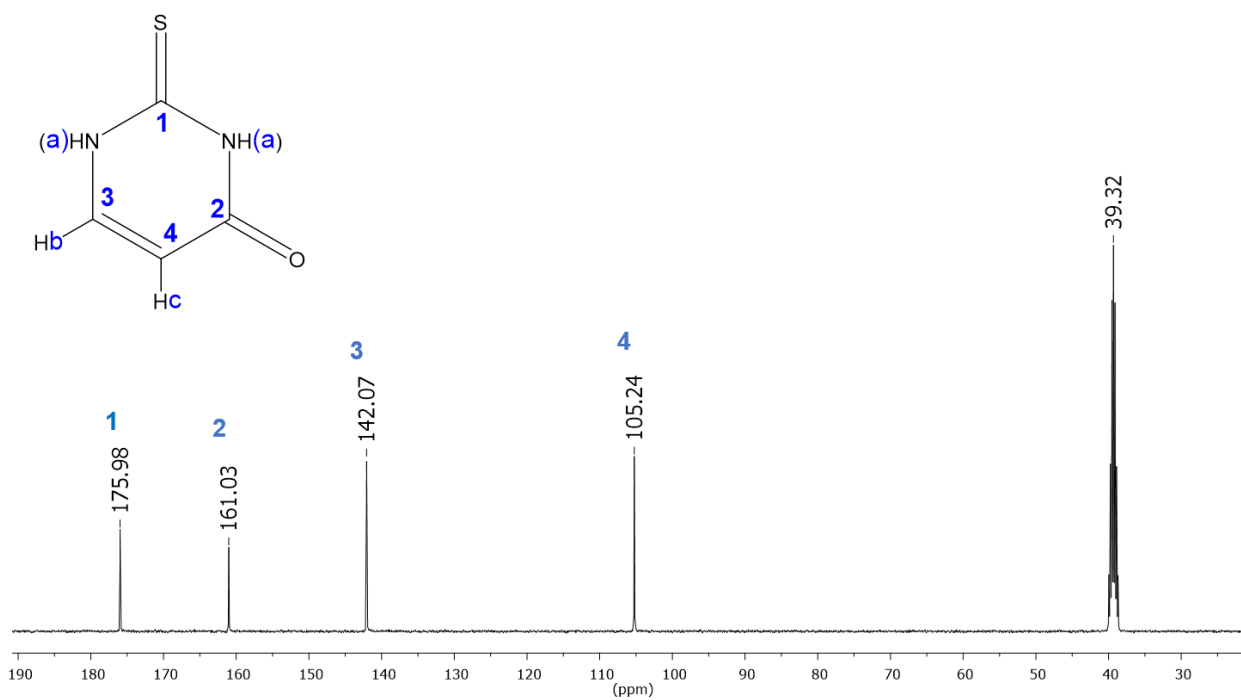


FIGURA A23 - Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{1\text{H}\}$ do complexo TIU em solução de $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$.

FIGURA A24 - Espectro de RMN ¹H do ligante 2-mercaptotiazolina, em acetona-d₆.FIGURA A25 - Espectro de RMN ¹³C{¹H} do ligante 2-mercaptotiazolina, em acetona-d₆.

FIGURA A26 - Espectro de RMN ^1H do ligante 1-metil-2-mercaptoimidazol, em acetona- d_6 .FIGURA A27 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante 1-metil-2-mercaptoimidazol, em acetona- d_6 .

FIGURA A28 - Espectro de RMN ¹H do ligante 6-metil-2-tiouracil, em DMSO-d₆.FIGURA A29 - Espectro de RMN ¹³C{¹H} do ligante 6-metil-2-tiouracil, em DMSO-d₆.

FIGURA A30 - Espectro de RMN ^1H do ligante 2-tiouracil, em DMSO-d_6 .FIGURA A31 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ligante 2-tiouracil, em DMSO-d_6 .

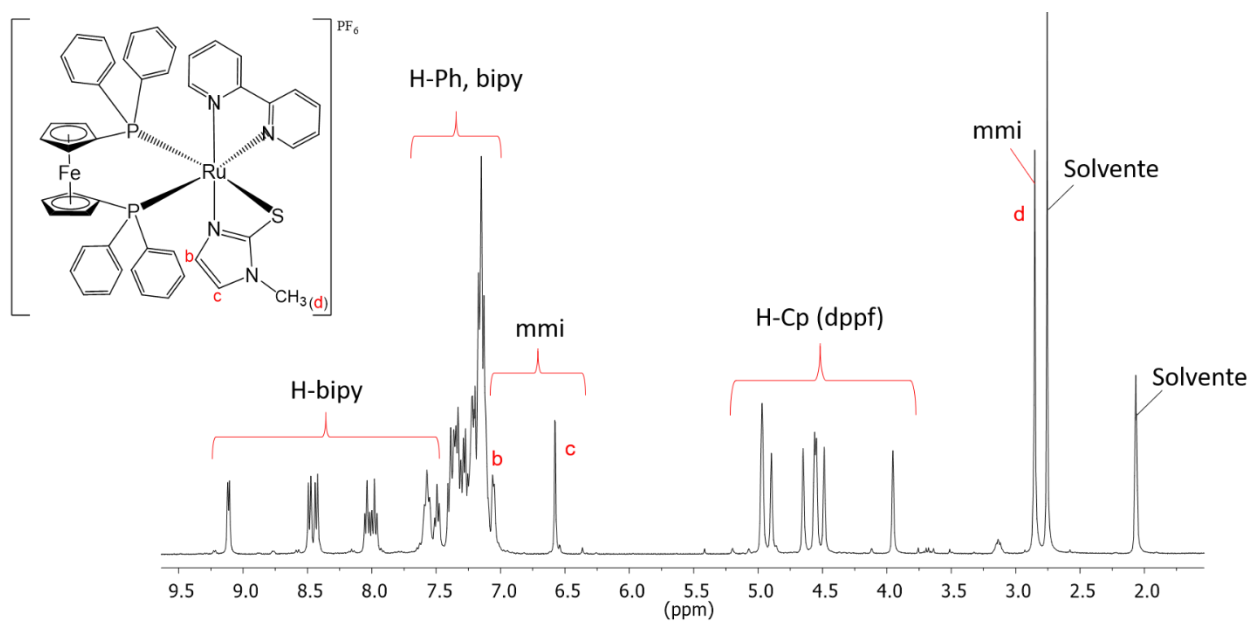


FIGURA A32 - Espectro de RMN ¹H do complexo M-IMI, em acetona-d₆.

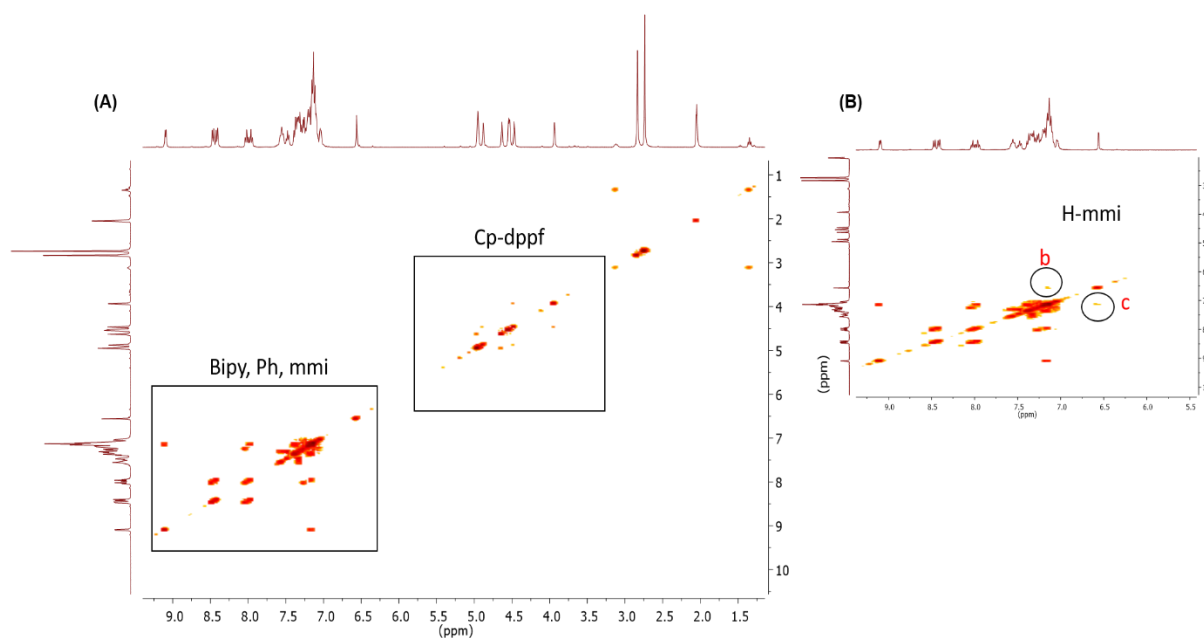
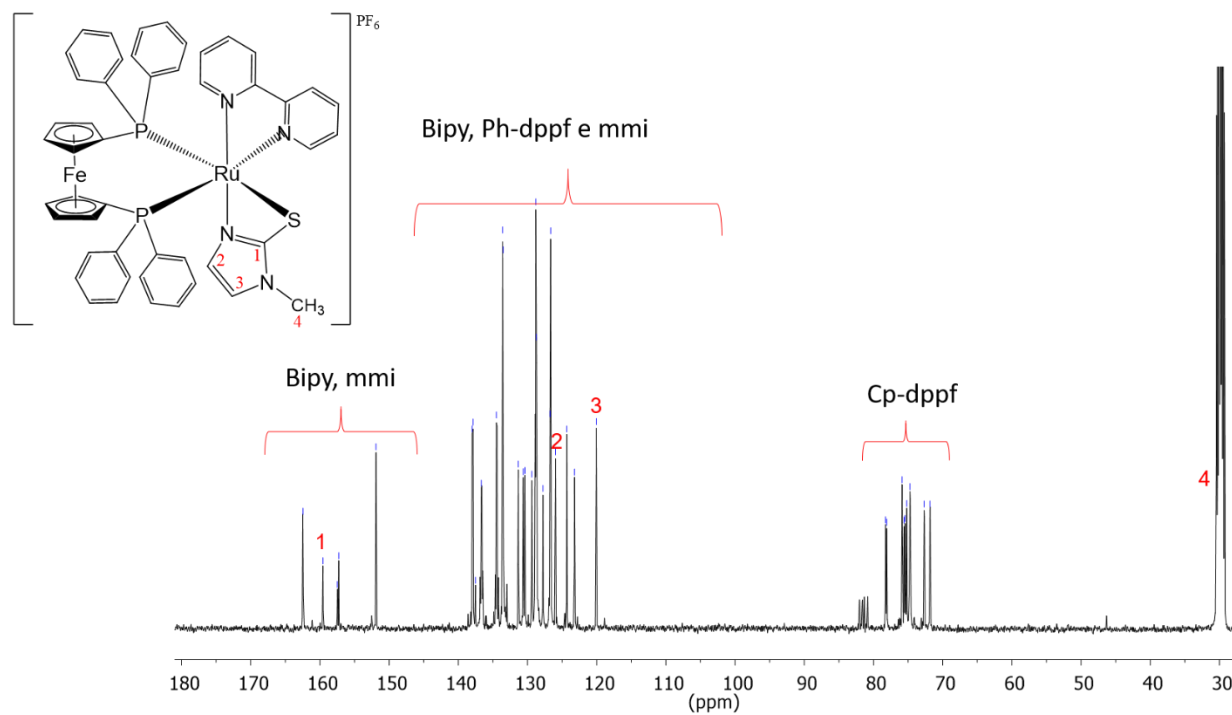
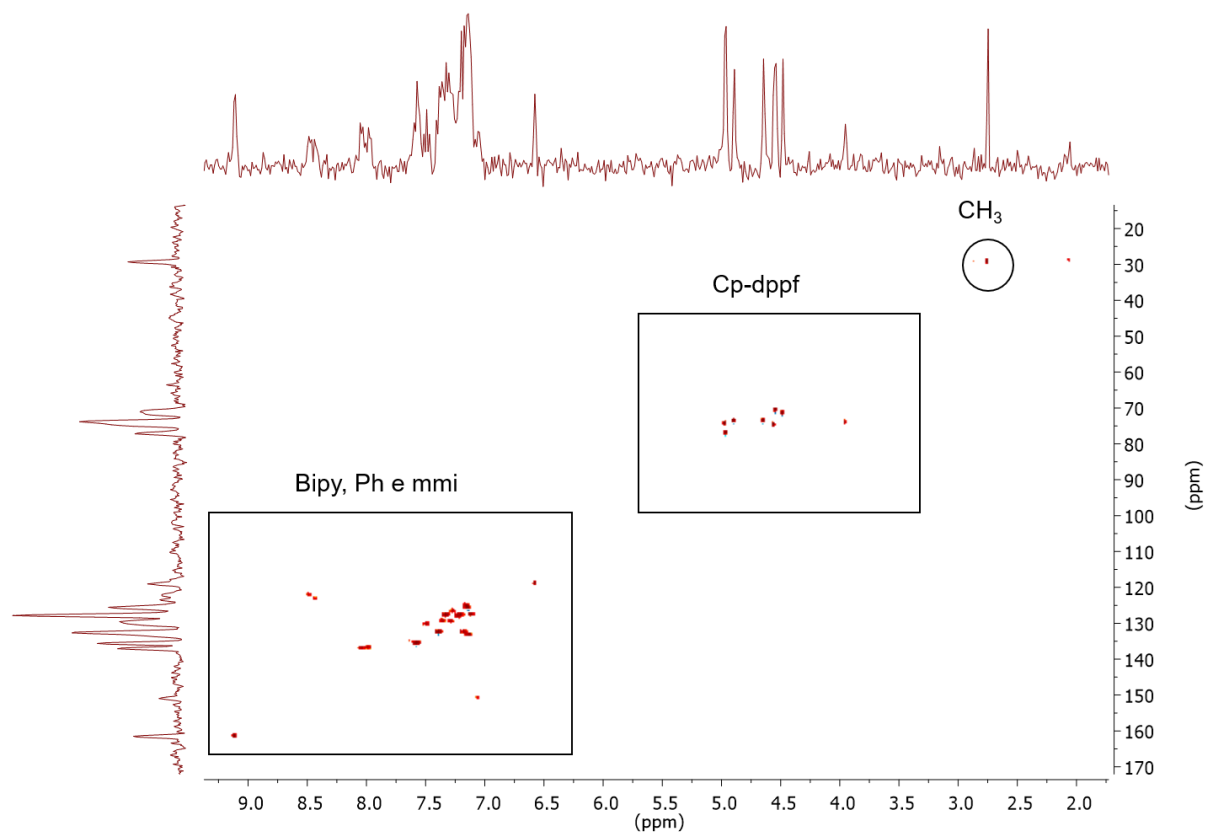
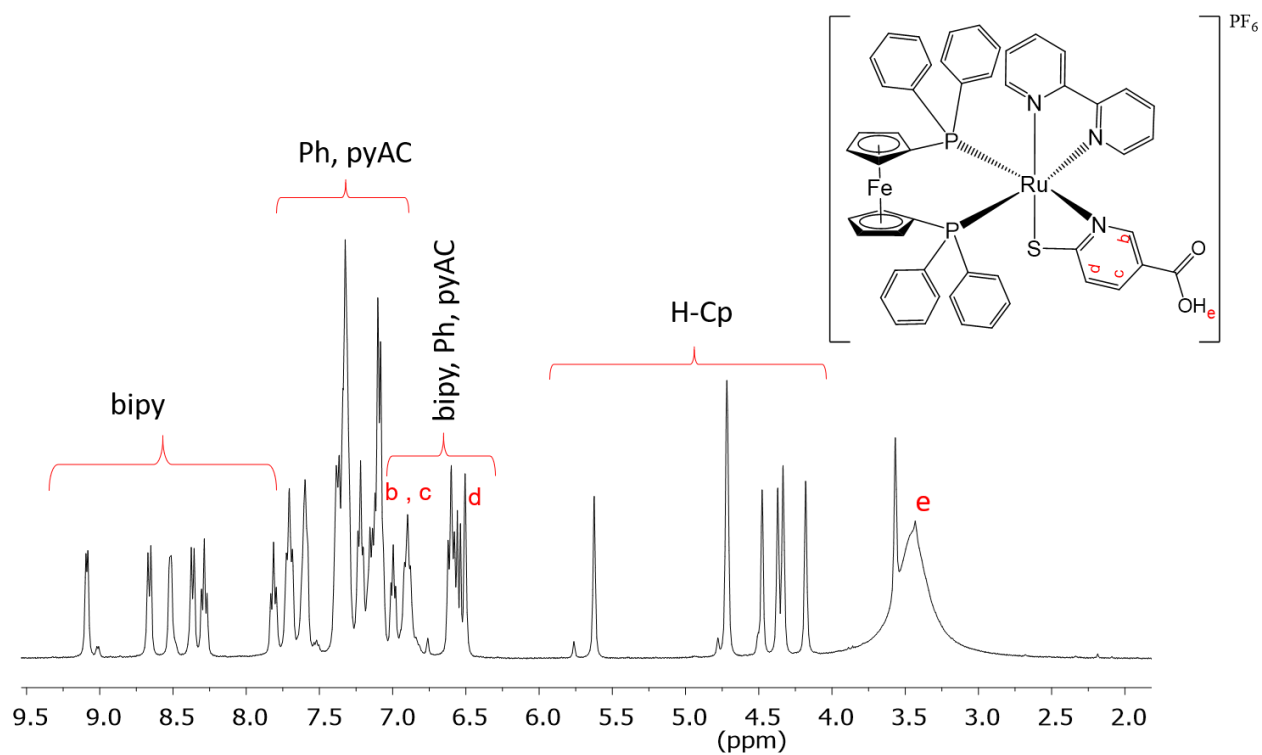
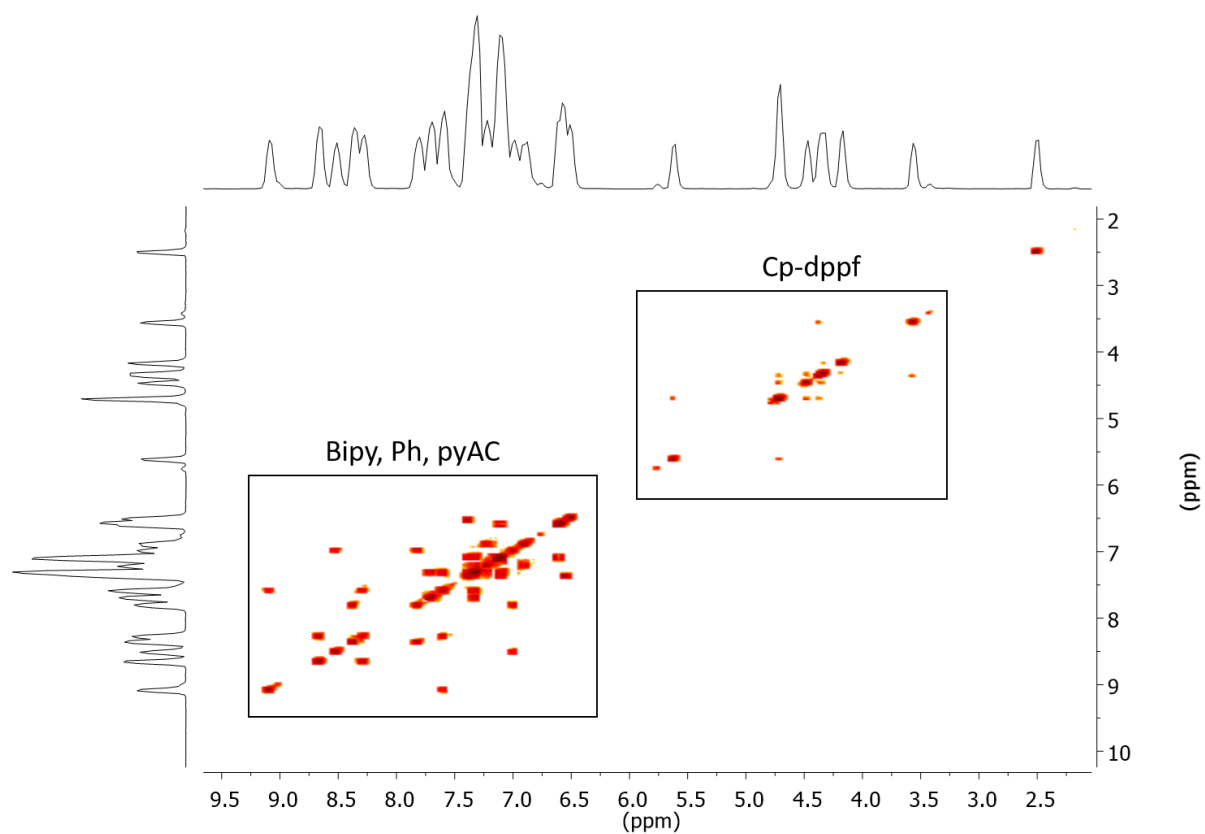
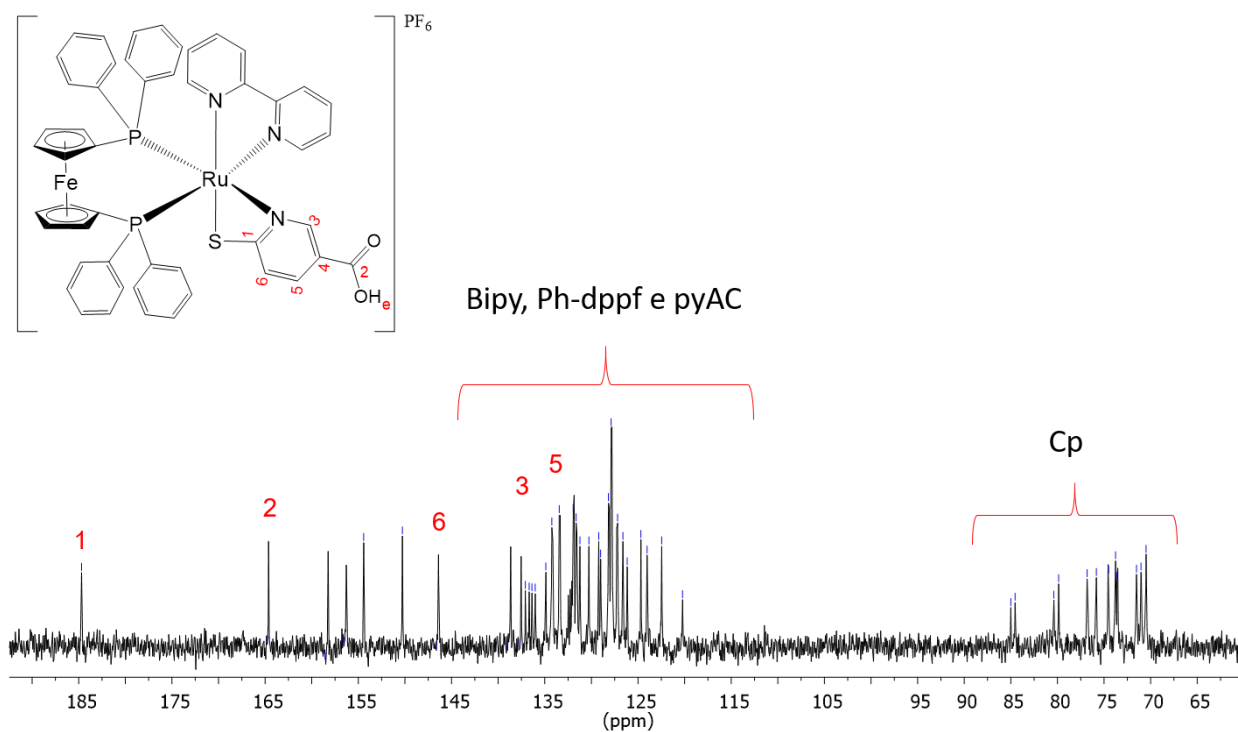
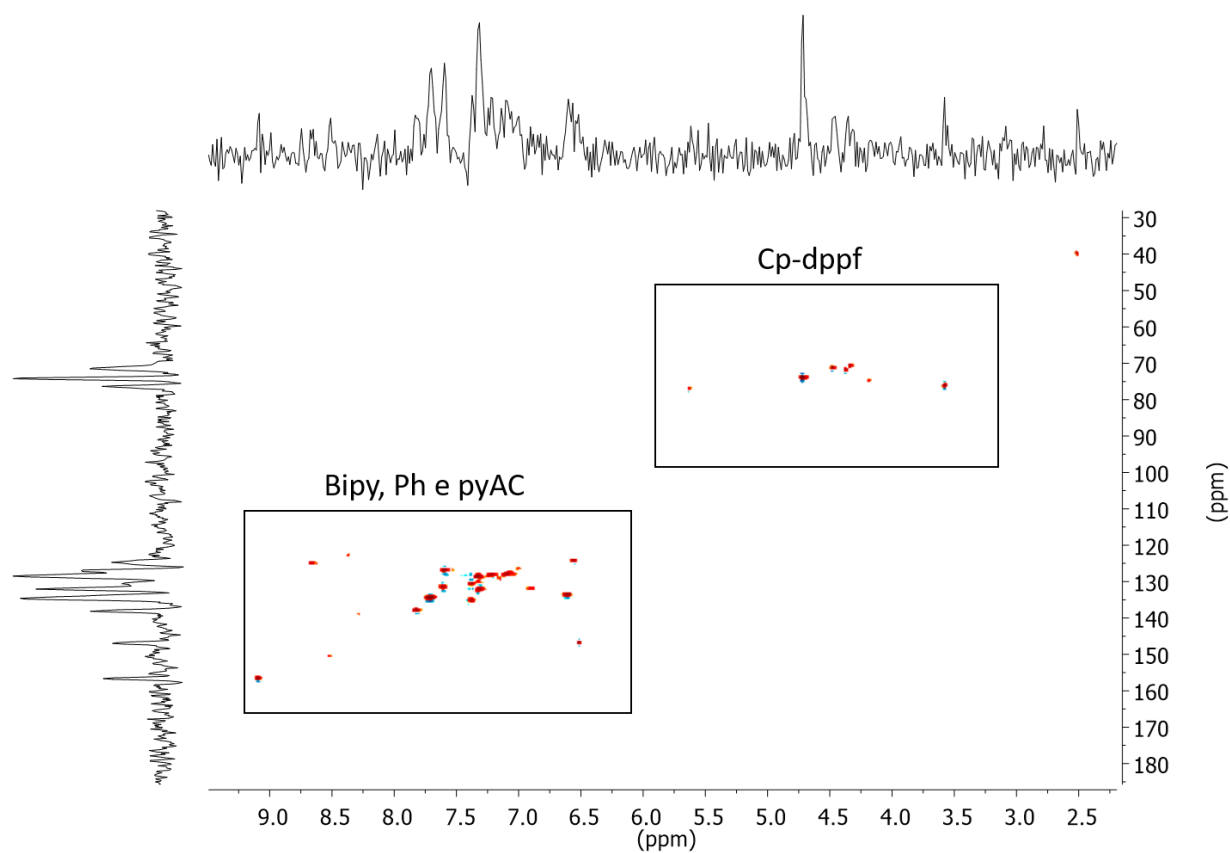
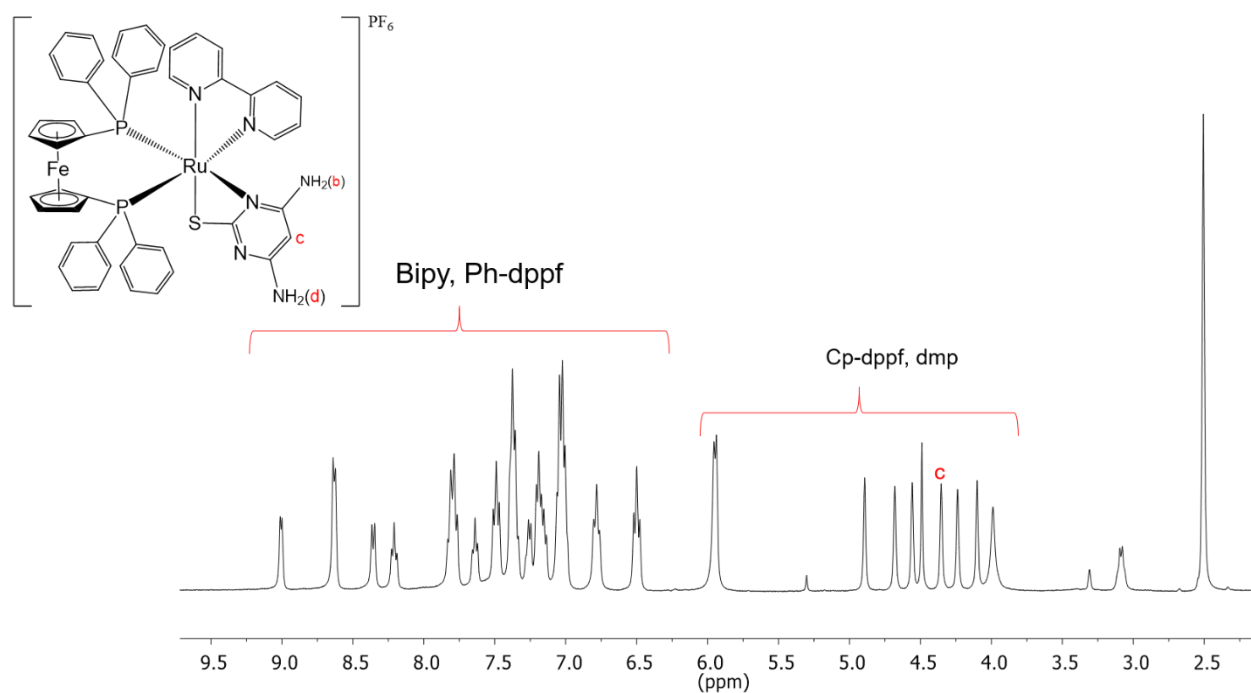
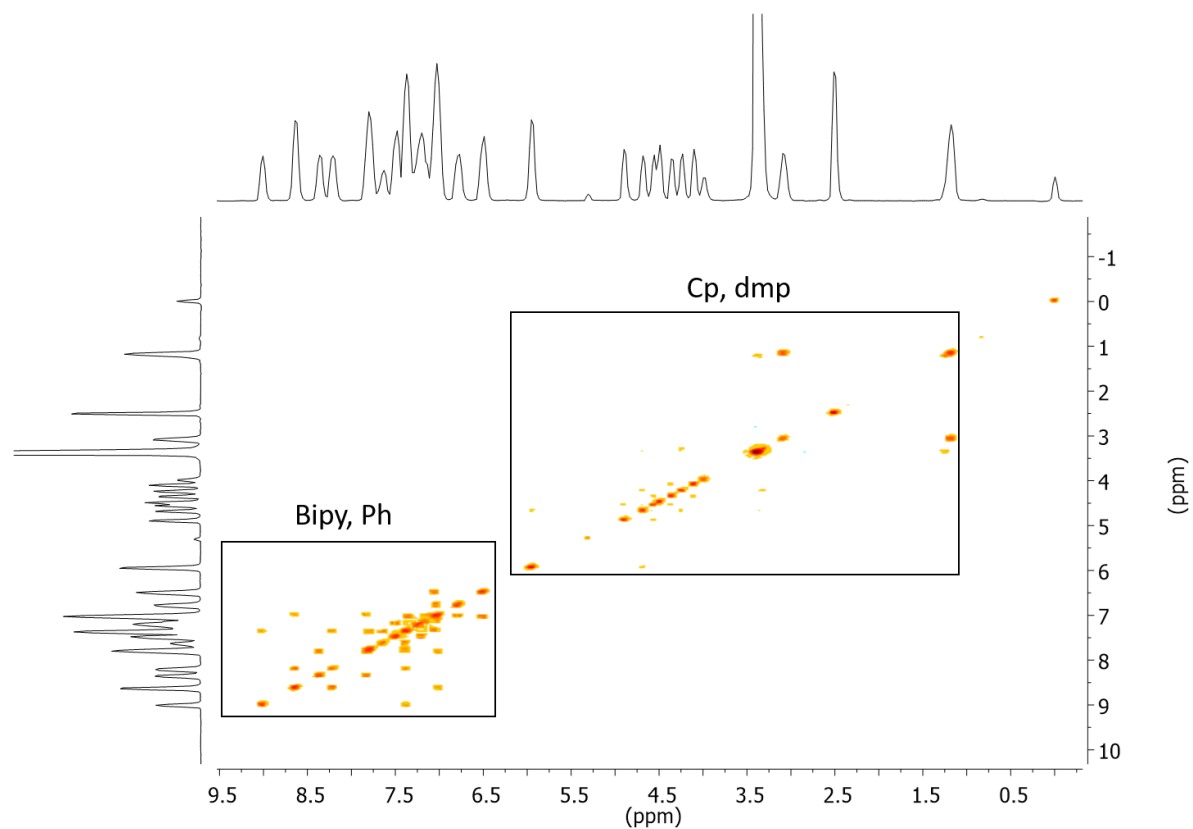


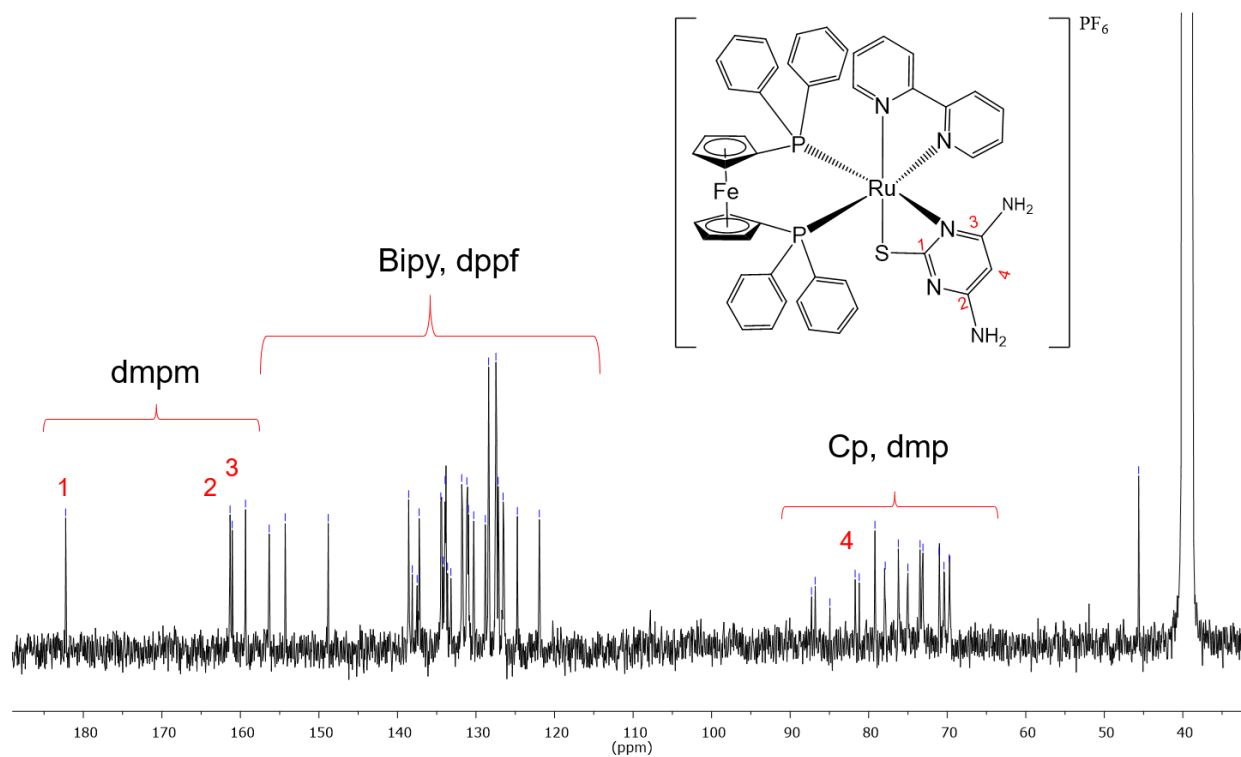
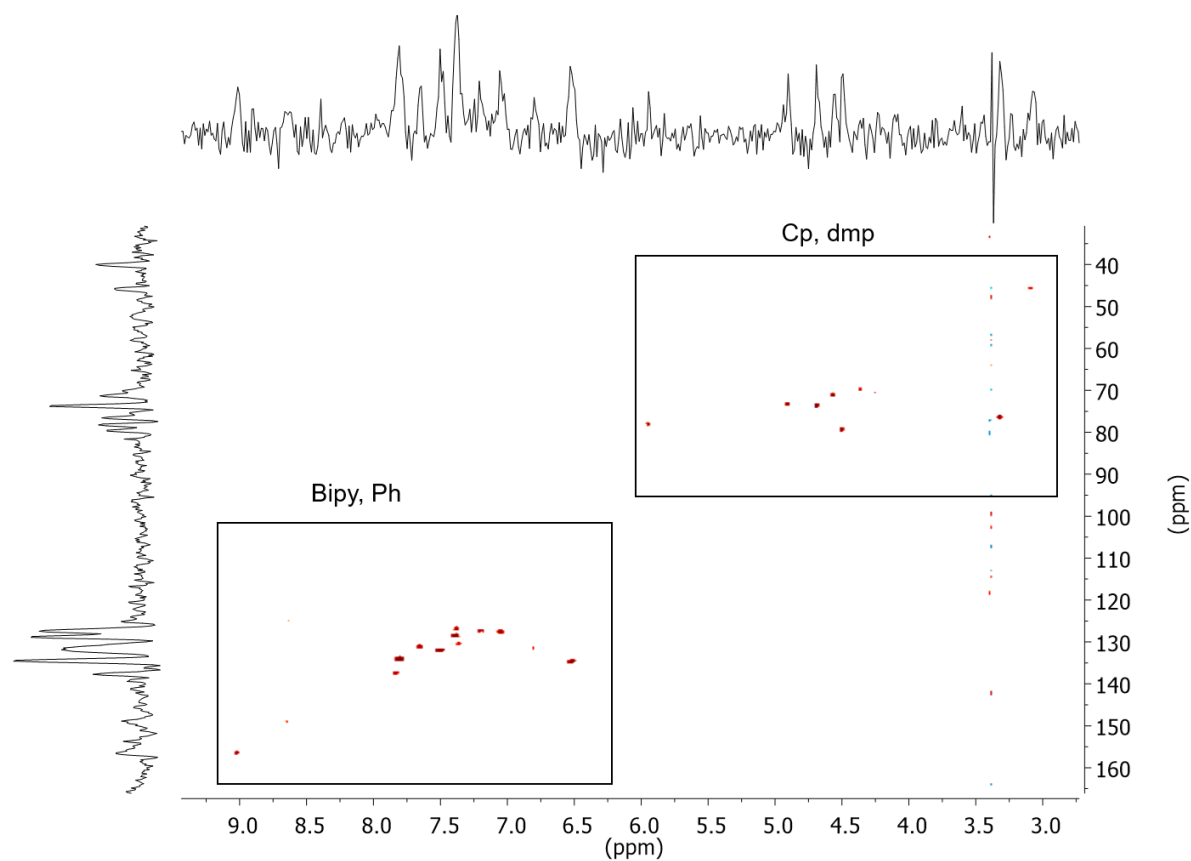
FIGURA A33 - Mapa de contorno de COSY (¹H-¹H), obtido para o complexo M-IMI (A), em (B) a ampliação da região referente aos acoplamentos dos hidrogênios aromáticos para identificação dos hidrogênios do ligante mmi, em acetona-d₆.

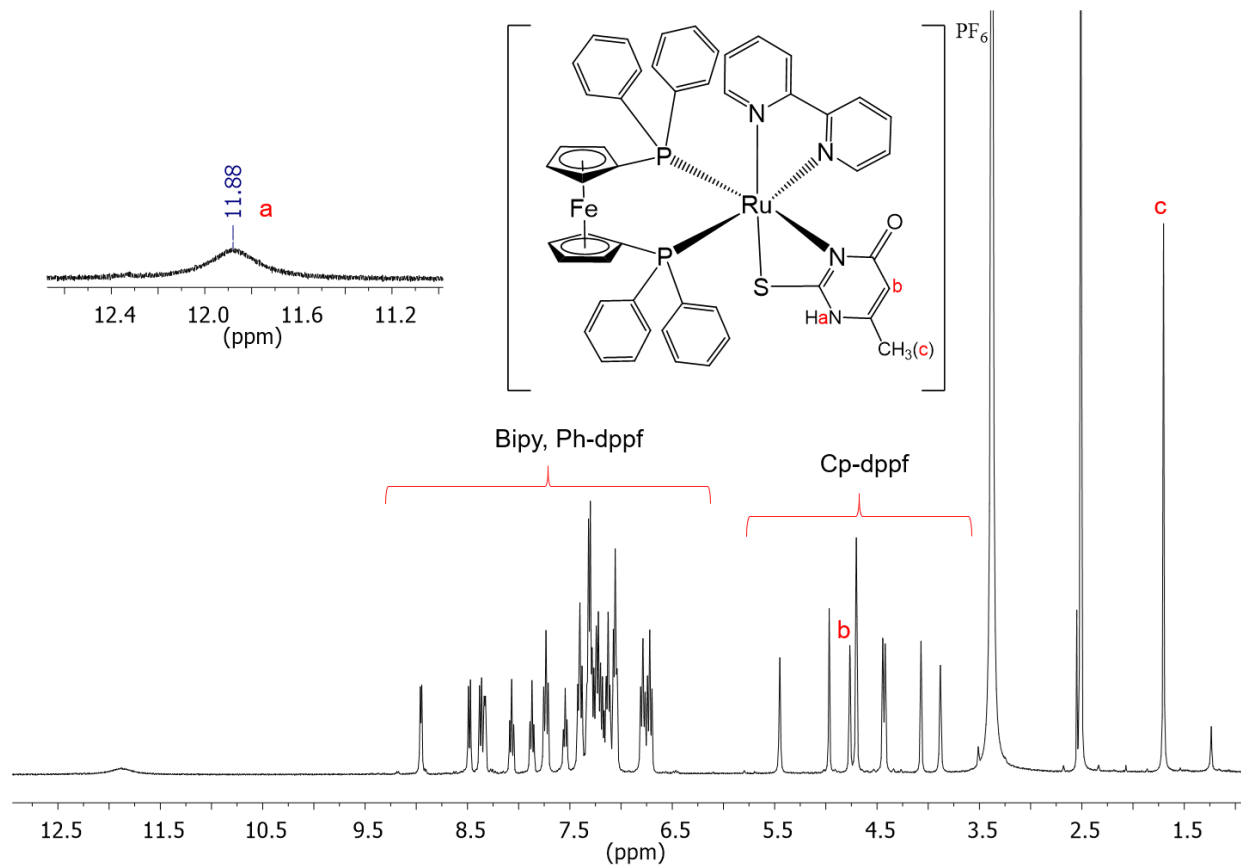
FIGURA A34 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo M-IMI, em acetona- d_6 .Figura A35 - Mapa de contorno de HSQC (^1H - ^{13}C) do complexo M-IMI, em acetona- d_6 .

FIGURA A36 - Espectro de RMN ^1H do complexo AC, em DMSO-d_6 .FIGURA A37 - Mapa de contorno de COSY (^1H - ^1H), obtido para o complexo AC, em DMSO-d_6 .

FIGURA A38 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo AC, em DMSO-d_6 .Figura A39- Mapa de contorno de HSQC (^1H - ^{13}C) do complexo AC, em DMSO-d_6 .

FIGURA A40 - Espectro de RMN ¹H do complexo DIA, em DMSO-d₆.FIGURA A41 - Mapa de contorno de COSY (¹H-¹H), obtido para o complexo DIA, em DMSO-d₆.

FIGURA A42 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo DIA, em DMSO-d_6 .FIGURA A43 - Mapa de contorno de HSQC (^1H - ^{13}C) do complexo DIA, em DMSO-d_6 .

FIGURA A44 - Espectro de RMN ^1H do complexo M-TIU, em DMSO-d_6 .

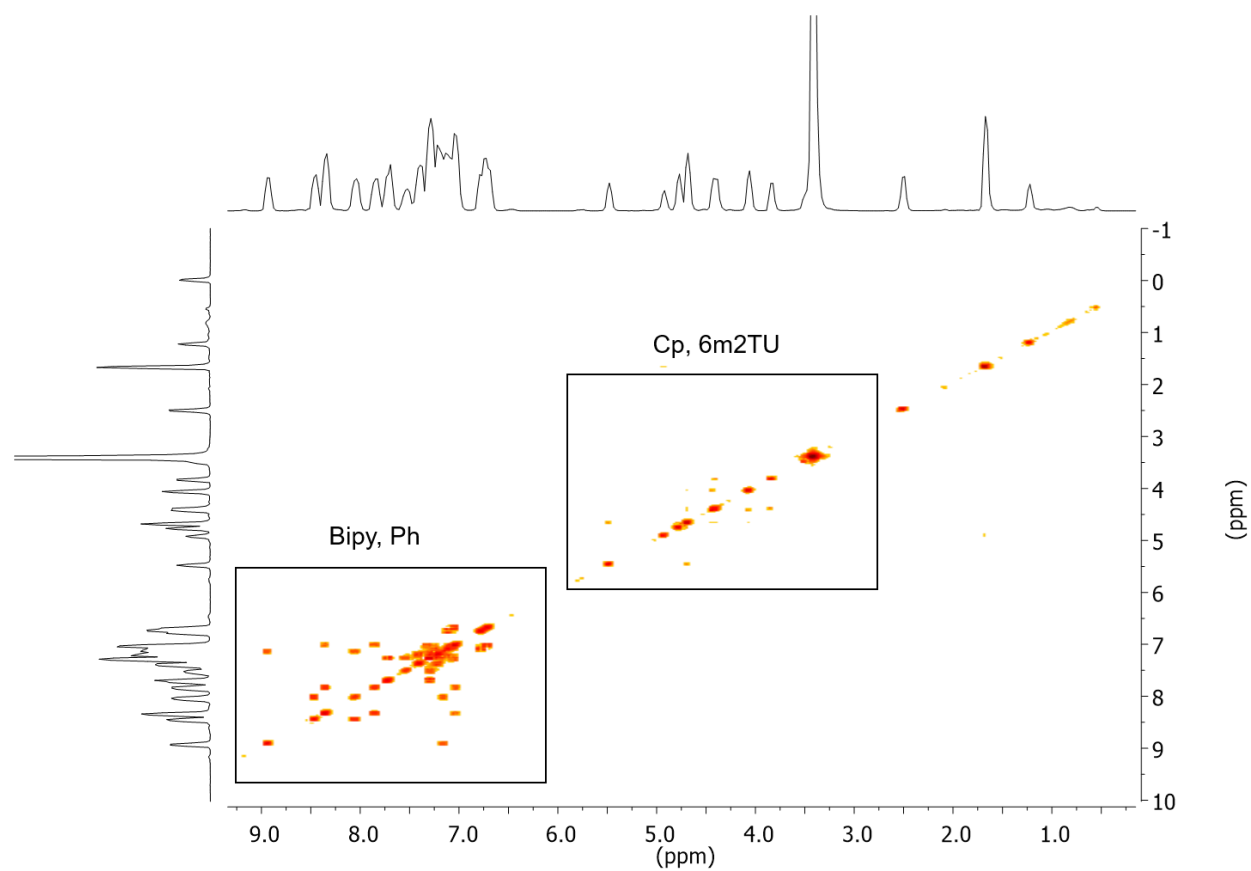


FIGURA A45 - Mapa de contorno de COSY (^1H - ^1H), obtido para o complexo M-TIU, em DMSO-d_6 .

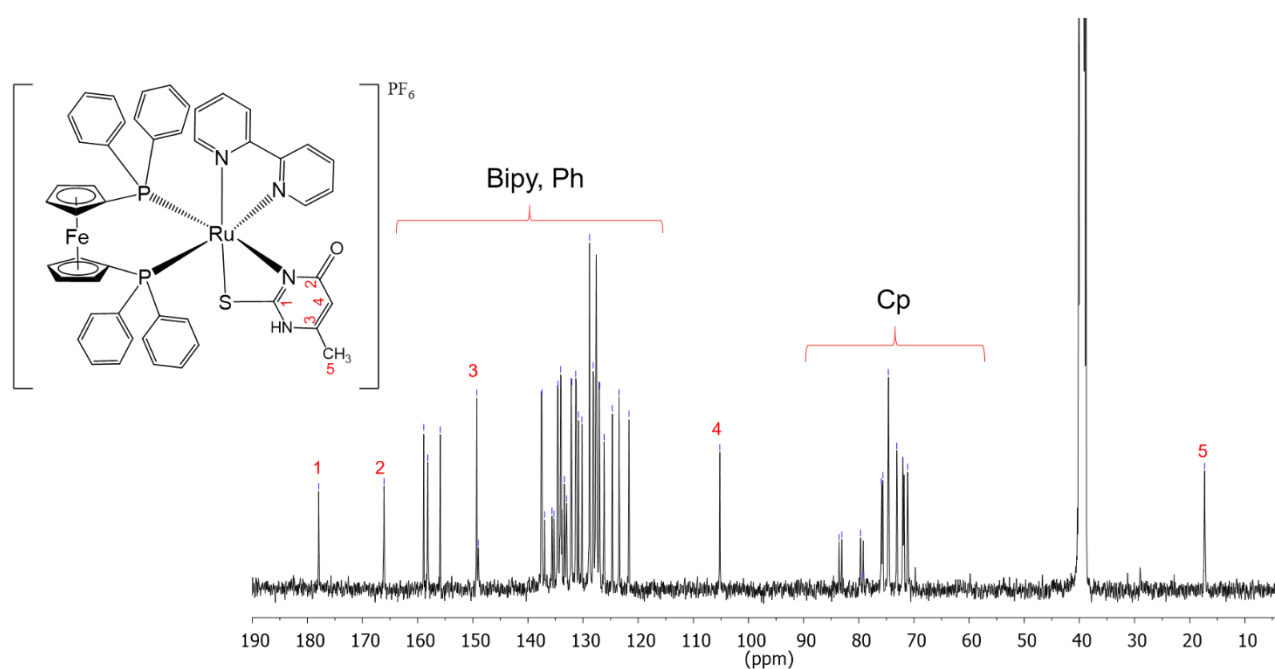
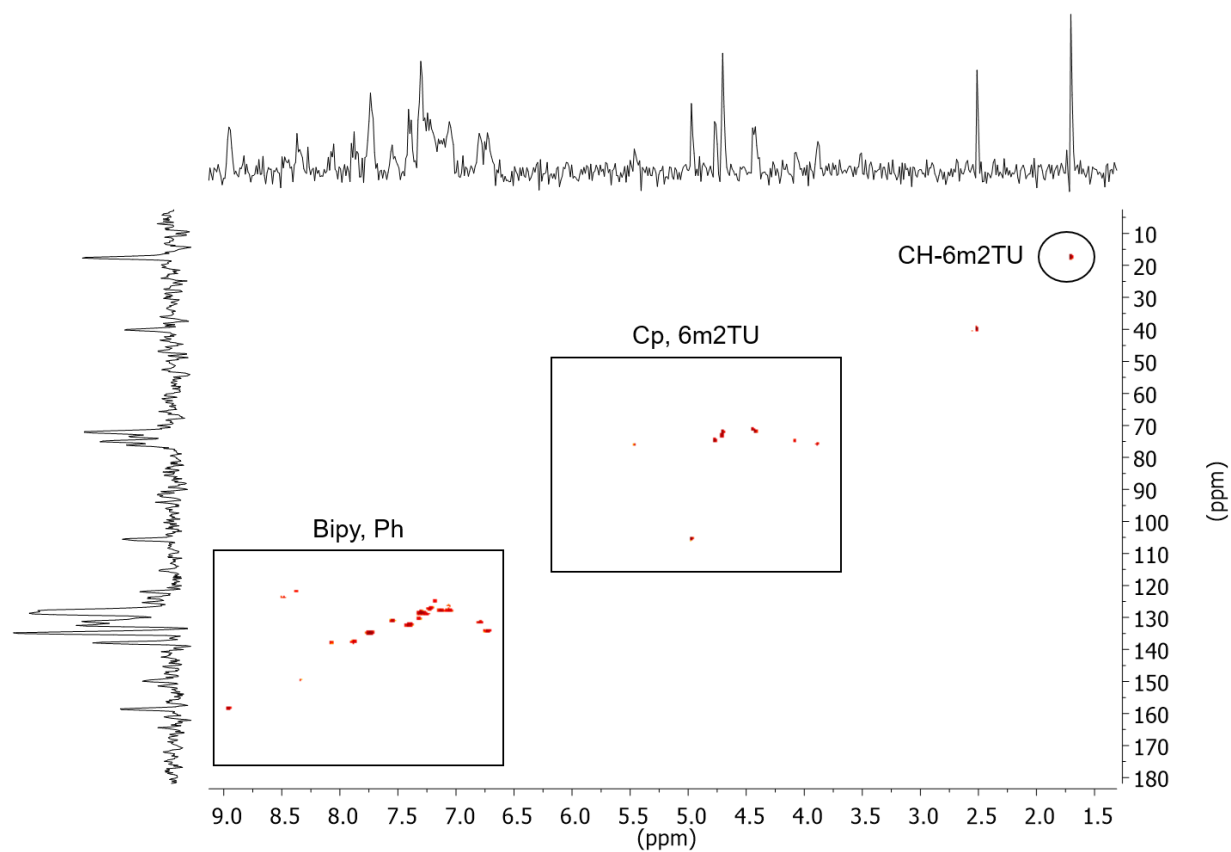
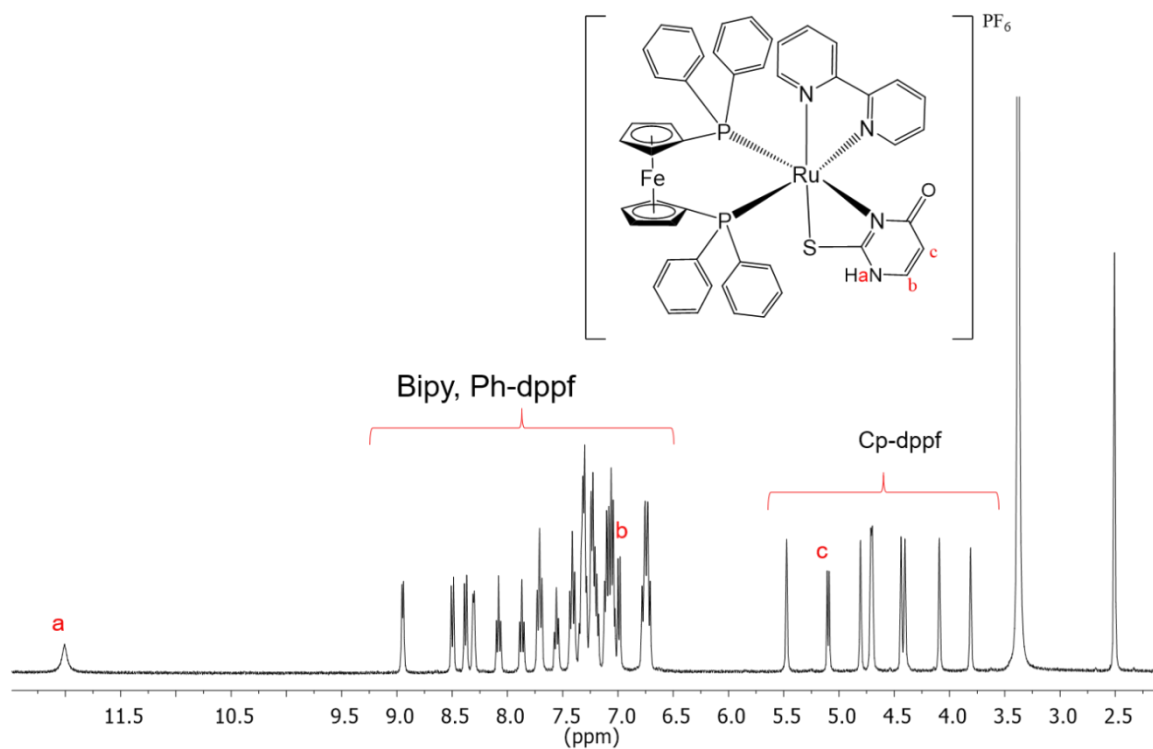
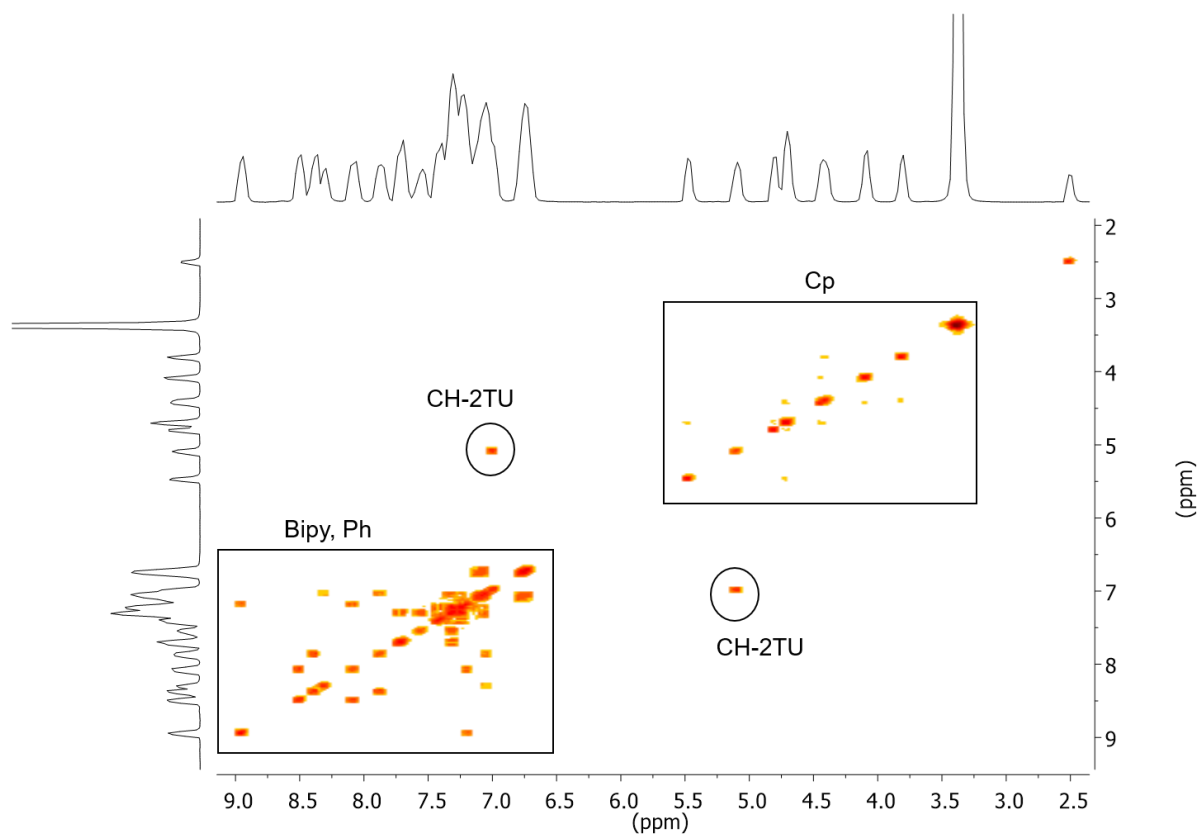


FIGURA A46 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo M-TIU, em DMSO-d_6 .

Figura A47- Mapa de contorno de HSQC (^1H - ^{13}C) do complexo M-TIU, em DMSO-d_6 .

FIGURA A48 - Espectro de RMN ^1H do complexo TIU, em DMSO-d_6 .FIGURA A49 - Mapa de contorno de COSY (^1H - ^1H), obtido para o complexo TIU, em DMSO-d_6 .

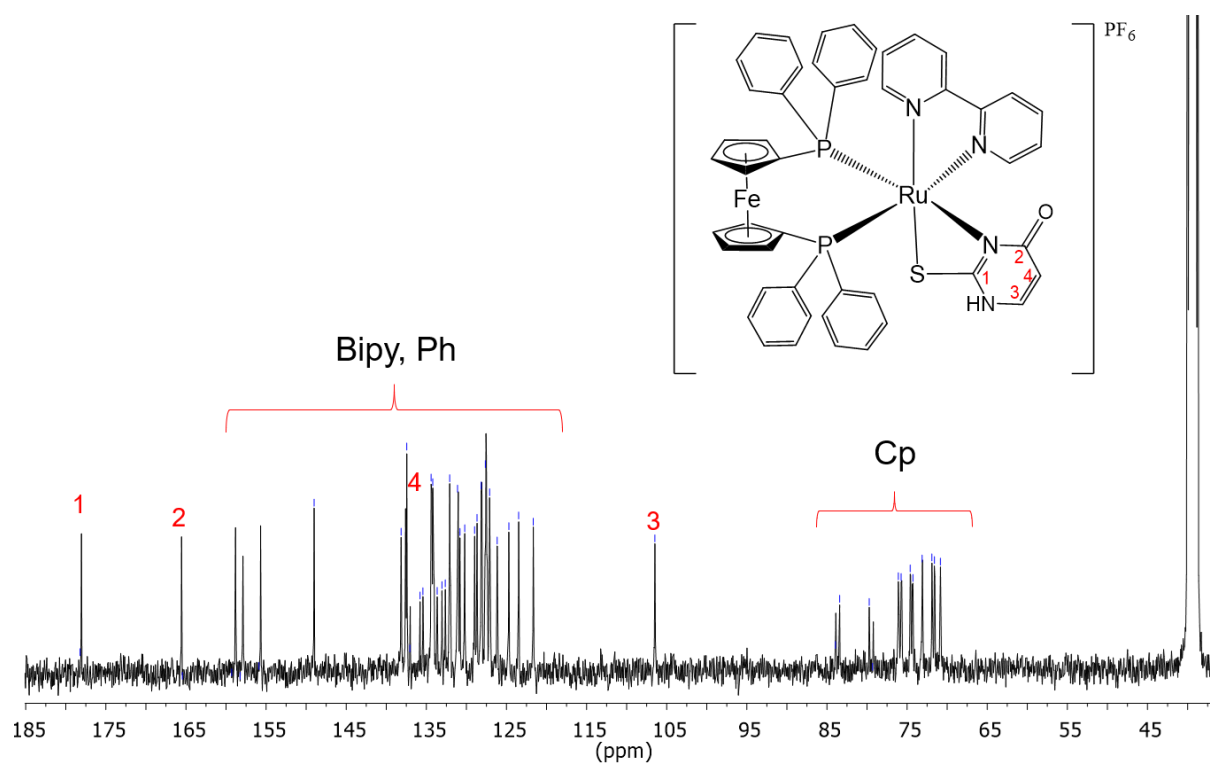
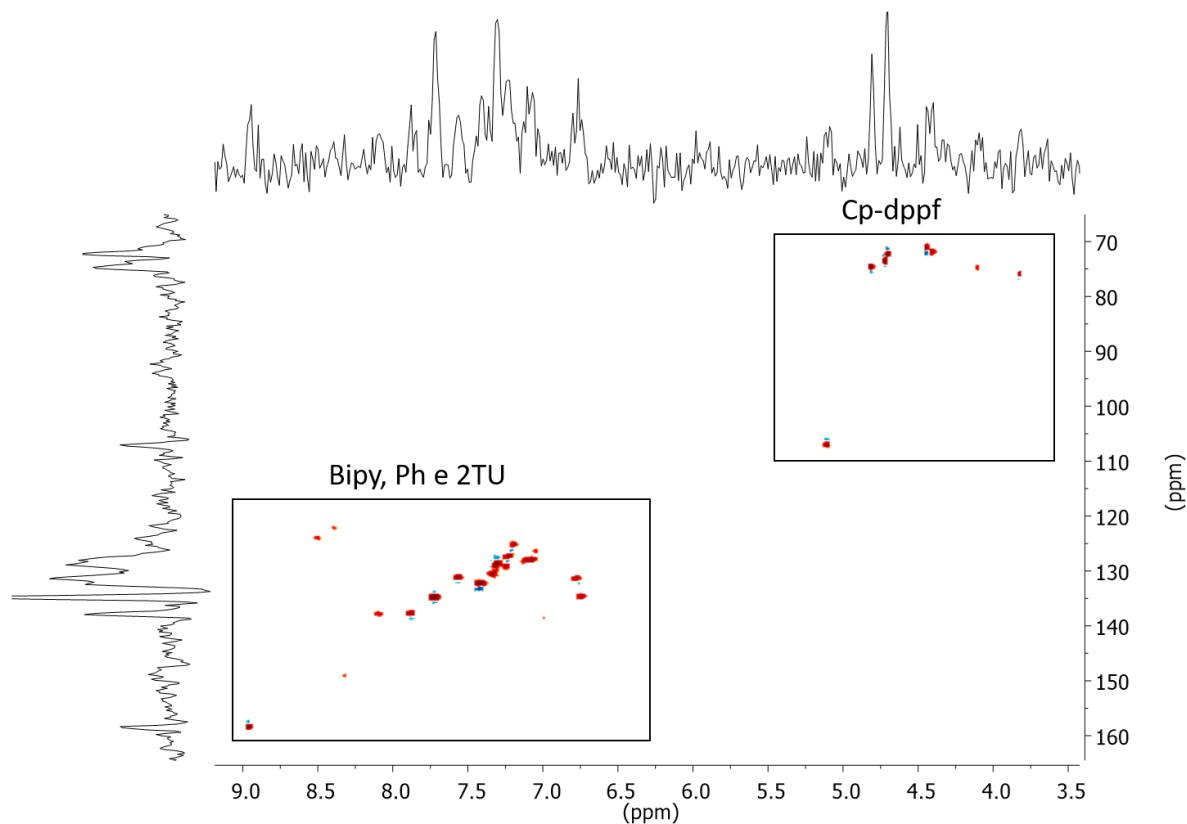
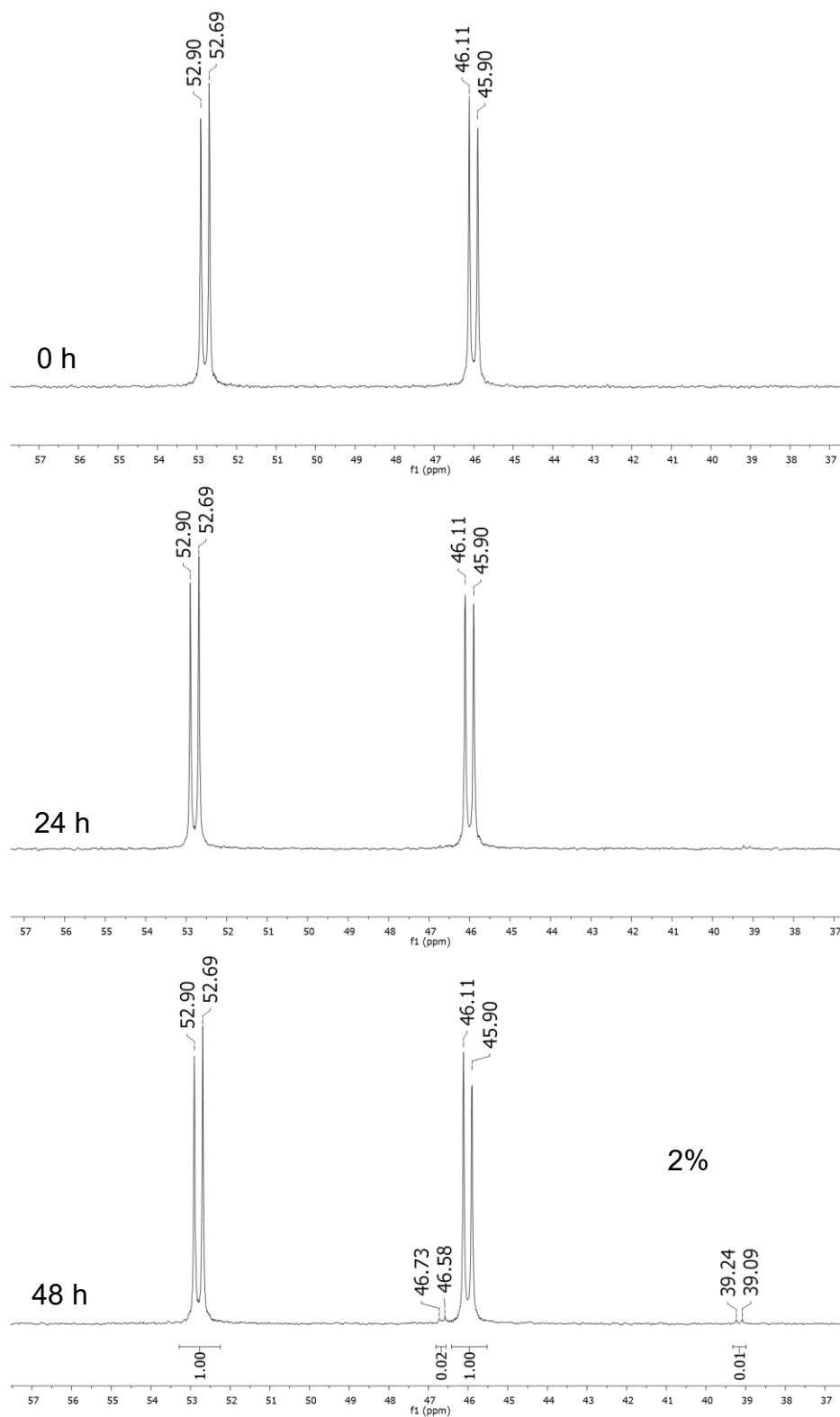
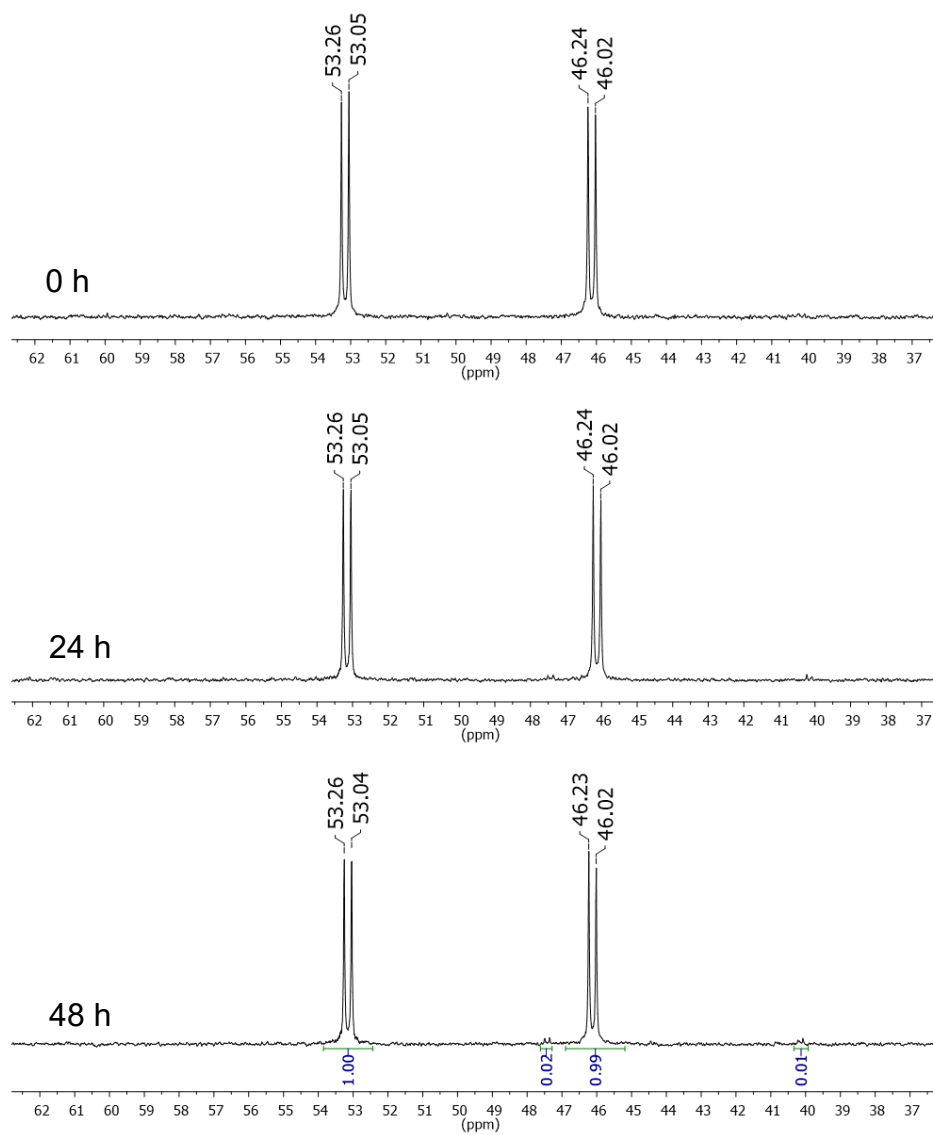
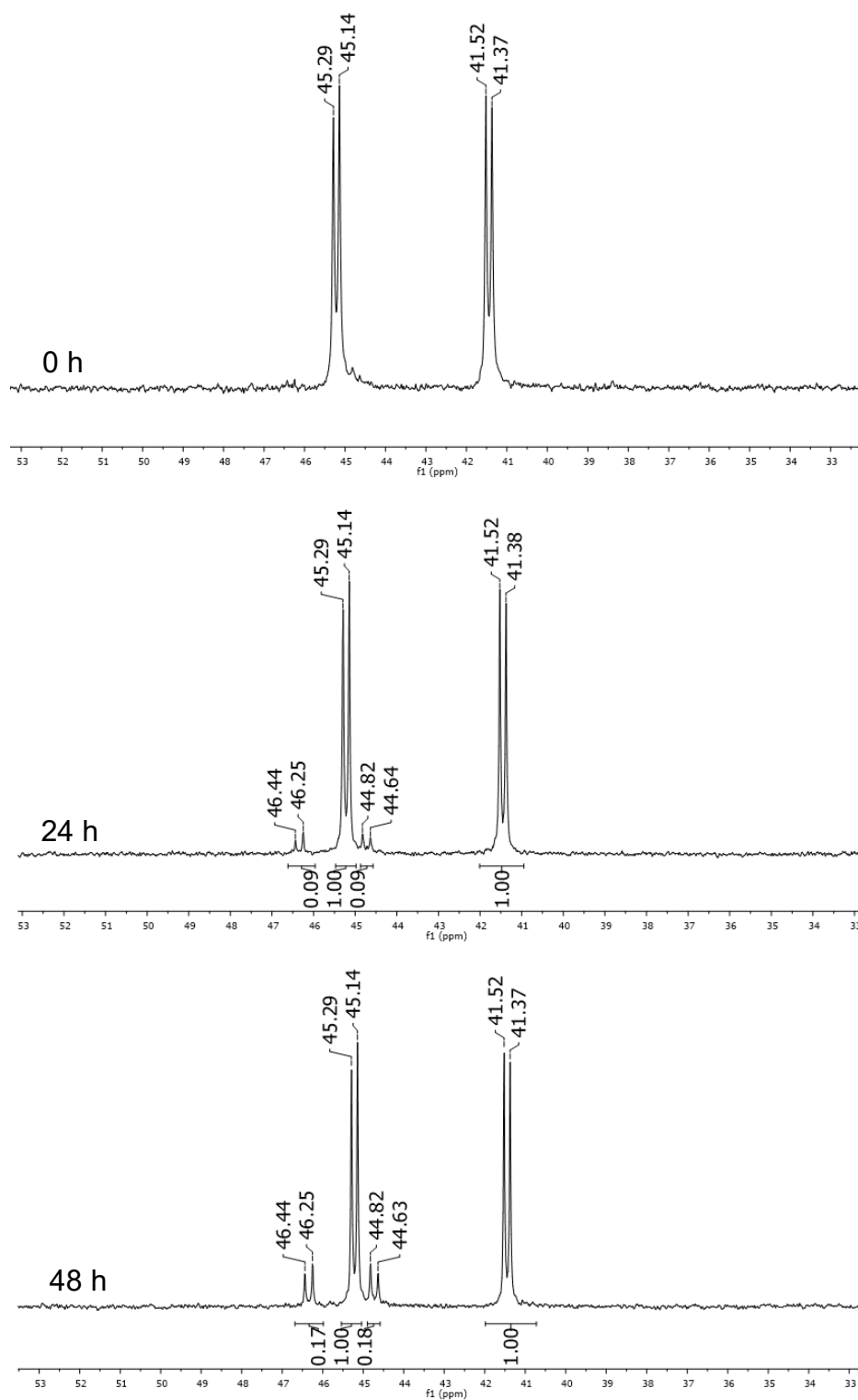
FIGURA A50 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo TIU, em DMSO-d_6 .FIGURA A51- Mapa de contorno de HSQC (^1H - ^{13}C) do complexo TIU, em DMSO-d_6 .

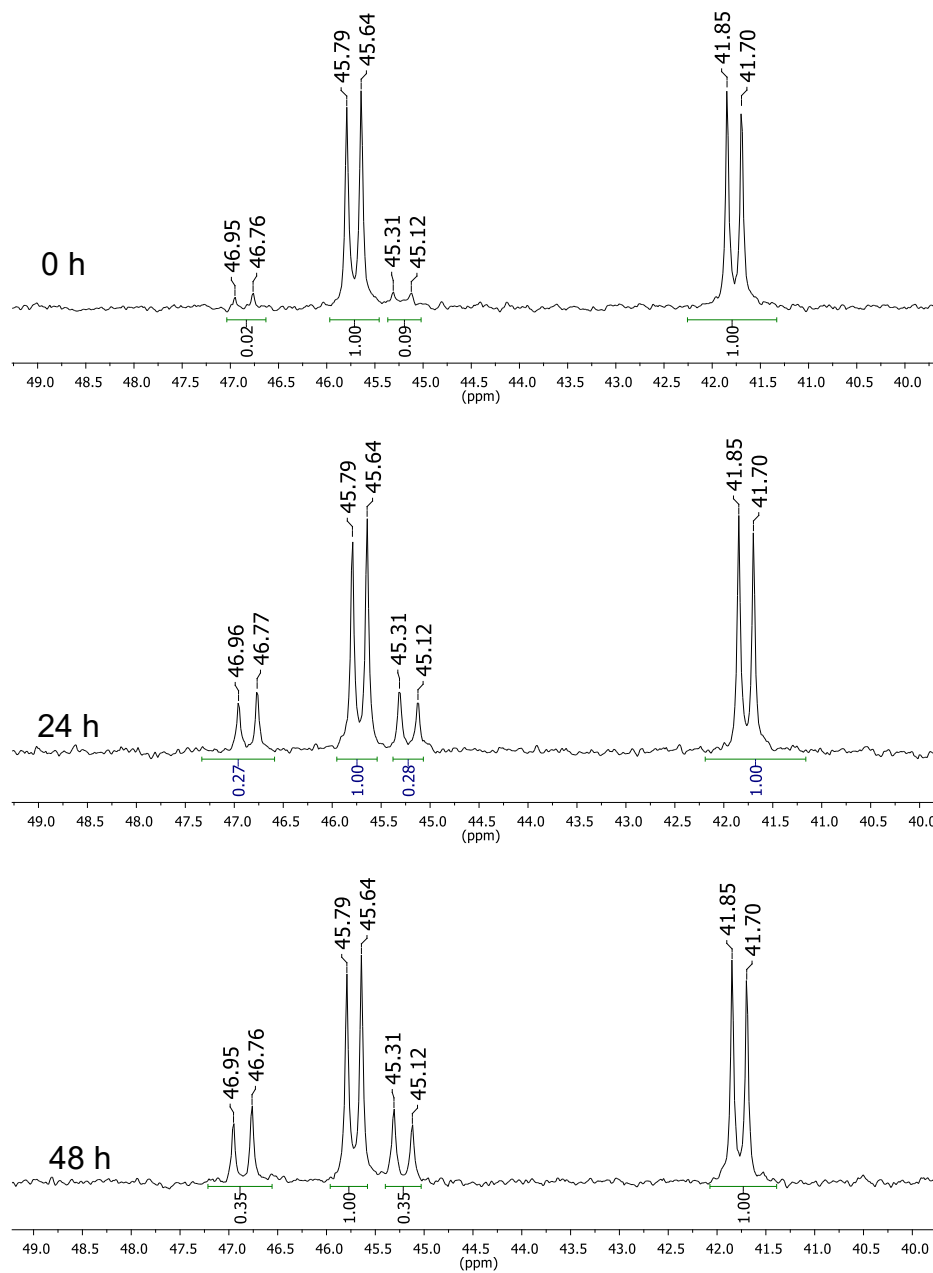
TABELA A1 – Dados cristalográficos dos complexos TIA, AC, M-TIU e TIU.

	TIA	AC	M-TIU	TIU
Fórmula Molecular	[RuFeC ₄₇ H ₄₀ N ₃ P ₂ S ₂]PF ₆	[RuFeC ₃₀ H ₄₀ N ₃ O ₂ P ₃]PF ₆ · H ₂ O	[RuFeC ₄₉ H ₄₁ N ₄ O ₃ P ₃]PF ₆ · ½ H ₂ O	[RuFeC ₄₈ H ₃₉ N ₄ O ₃ P ₃]PF ₆ · ½ CH ₂ Cl ₂
Massa Molecular (g mol⁻¹)	1074,77	1128,75	1106,75	1126,18
Sistema Cristalino	Triclinico	Monoclinico	Monoclinico	Monoclinico
Grupo Espacial	P-1	P 21/n	P 21/n	P 21
Cela unitária (Å, °)	a = 12,0000(3) Å; α = 84,480(1)°; b = 13,6647(3) Å; β = 82,190(1)° c = 14,6078(4) Å; γ = 71,029(1)°	a = 10,0195(5) Å; α = 90° b = 22,3927(10) Å; β = 97,852(2)° c = 21,5008(11) Å; γ = 90°	a = 9,9229(2) Å; α = 90° b = 22,2280(5) Å; β = 98,6570(10)° c = 21,5280(4) Å; γ = 90°	a = 10,2894(4) Å; α = 90° b = 19,7862(8) Å; β = 92,4030(10)° c = 12,1102(5) Å; γ = 90°
Volume (Å³)	2240,75(10)	4778,8(4)	4694,25(17)	2463,32(17)
Z	2	4	4	2
Densidade (g / cm³)	1,593	1,569	1,566	1,518
μ (mm⁻¹)	0,924	0,834	0,845	0,858
F₍₀₀₀₎	1088	2288	2244	1138
Tamanho do cristal (mm³)	0,180 x 0,120 x 0,060	0,370 x 0,150 x 0,090	12 x 20 x 32	0,230 x 0,090 x 0,060
Intervalo de θ	1,409 a 25,352°	1,819 a 26,417°	2,911 a 26,371°	1,683 a 26,398°
Limites coletados	-13 ≤ h ≤ 14, -12 ≤ k ≤ 16, -17 ≤ l ≤ 17	-12 ≤ h ≤ 12, -27 ≤ k ≤ 28, -26 ≤ l ≤ 25	-11 ≤ h ≤ 12, -27 ≤ k ≤ 25, -26 ≤ l ≤ 26	-12 ≤ h ≤ 12, -24 ≤ k ≤ 24, -15 ≤ l ≤ 15
Reflexões coletadas	37950	91129	33051	76569
Reflexões independentes	7900 [R(int) = 0,0257]	9829 [R(int) = 0,0376]	9546 [R(int) = 0,0559]	10079 [R(int) = 0,0355]
Completeza para θ (%)	96,3	100,0	99,6	100,0
Dados / restrições / parâmetros	7900 / 0 / 568	9829 / 0 / 614	9546 / 0 / 662	10079 / 4 / 601
S	1,022	1,070	1,054	1,050
Índice R final [I > 2 σ (I)]	R1 = 0,0356, wR2 = 0,0848	R1 = 0,0410, wR2 = 0,1055	R1 = 0,0529, wR2 = 0,1354	R1 = 0,0306, wR2 = 0,0812
Índice R (Todos os dados)	R1 = 0,0469, wR2 = 0,0916	R1 = 0,0488, wR2 = 0,1115	R1 = 0,0703, wR2 = 0,1421	R1 = 0,0329, wR2 = 0,0830
Δρ_{máx} e Δρ_{min} (e. Å⁻³)	0,780 e -0,544	0,7454 e 0,6210	1,132 and -0,880	0,623 e -0,547

Figura A52 - Espectros de RMN³¹P{¹H} do complexo TIA em DCM.

Figura A53 - Espectros de RMN³¹P{¹H} do complexo TIA em MeOH.

Figura A54 - Espectros de RMN³¹P{¹H} do complexo M-IMI em DCM.

Figura A55 - Espectros de $\text{RMN}^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo M-IMI em MeOH.

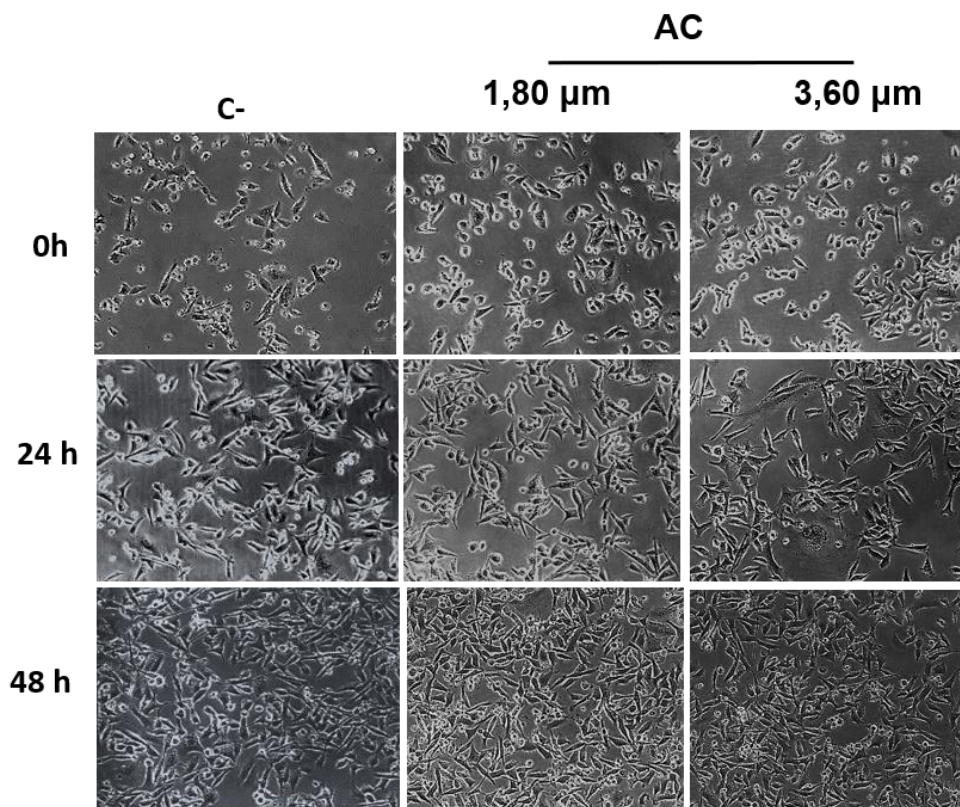


FIGURA A56 - Efeito do complexo AC na morfologia da linhagem de células MDA-MB-231.

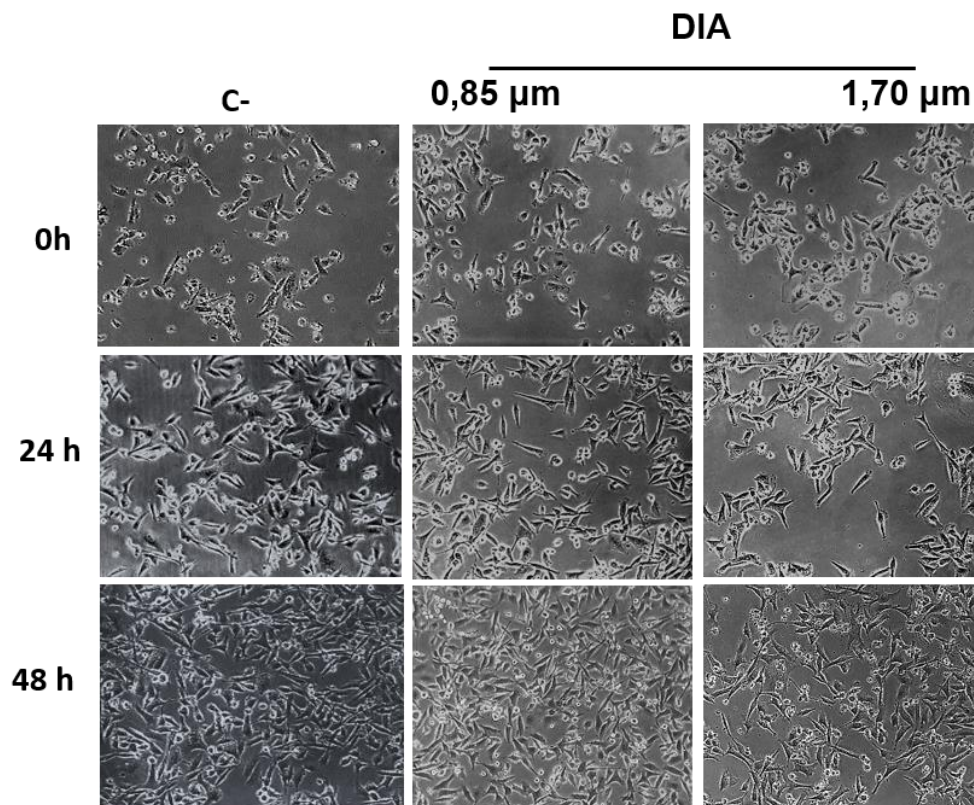


FIGURA A57 - Efeito do complexo DIA na morfologia da linhagem de células MDA-MB-231.

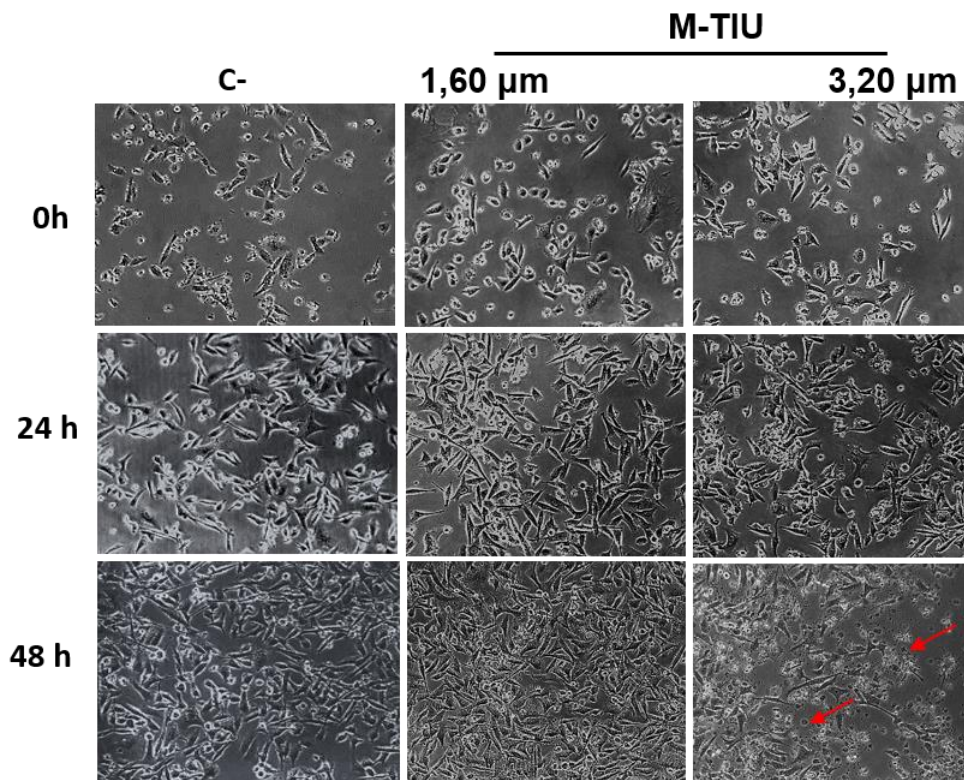


FIGURA A58 - Efeito do complexo M-TIU na morfologia da linhagem de células MDA-MB-231. As setas indicam as alterações morfológicas observadas nas células tratadas.

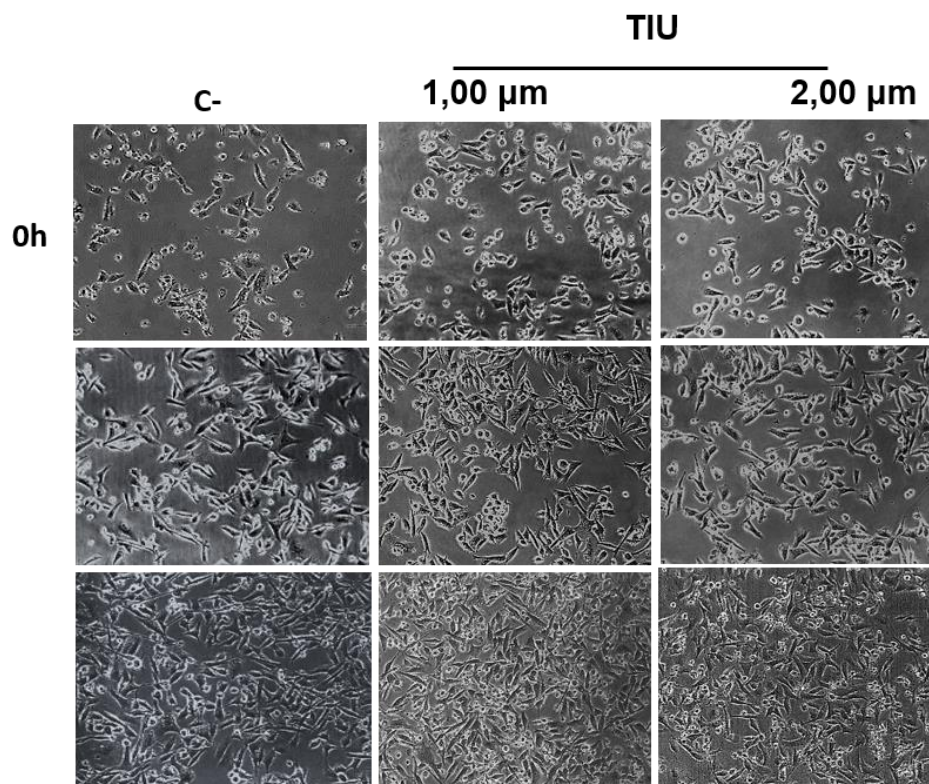


FIGURA A59 - Efeito do complexo TIU na morfologia da linhagem de células MDA-MB-231. As setas indicam as alterações morfológicas observadas nas células tratadas.

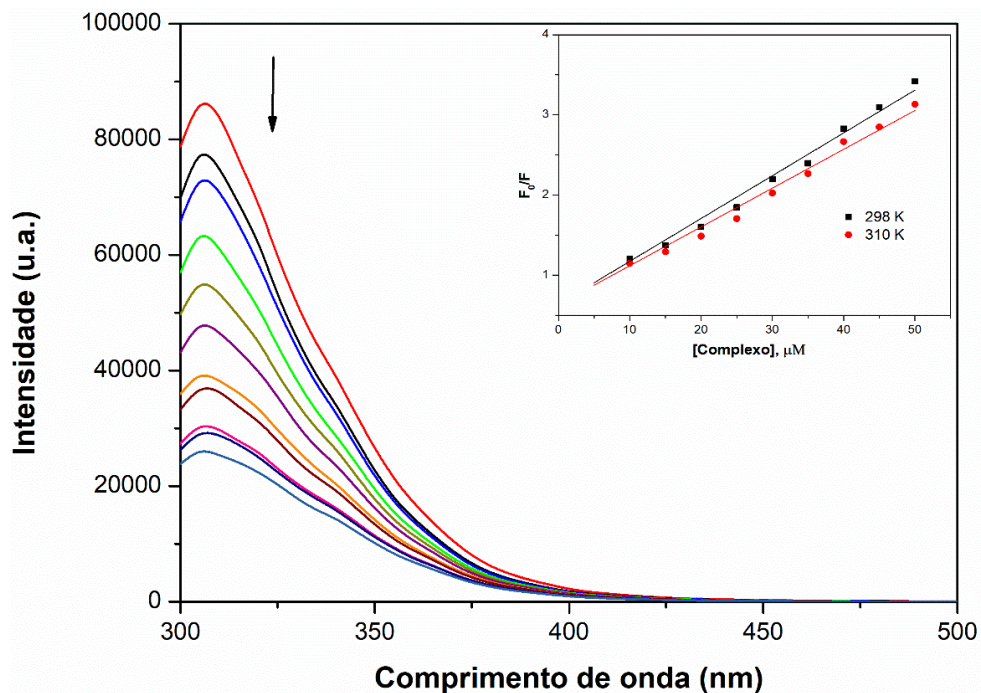


FIGURA A60 - Espectros de fluorescência da HSA com a adição de diferentes concentrações do complexo M-IMI (5-50 μM), temperatura de 298 K. Figura do canto superior direito são as retas obtidas de F_0/F versus [complexo] nas temperaturas de 298 e 310 K.

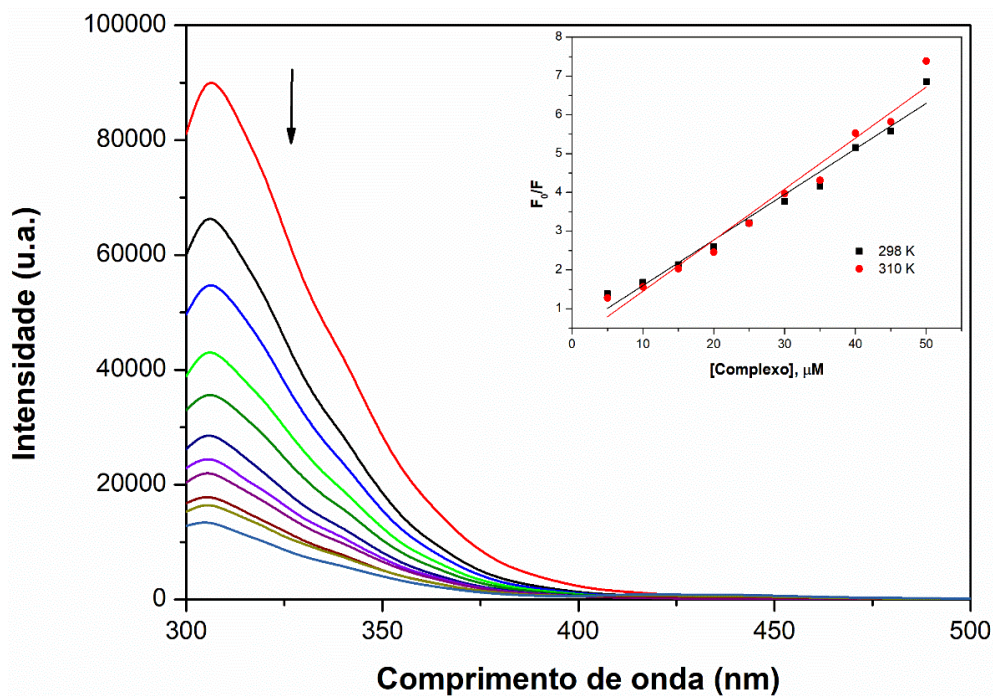


FIGURA A61 - Espectros de fluorescência da HSA com a adição de diferentes concentrações do complexo AC (5-50 μM), temperatura de 298 K. Figura do canto superior direito são as retas obtidas de F_0/F versus [complexo] nas temperaturas de 298 e 310 K.

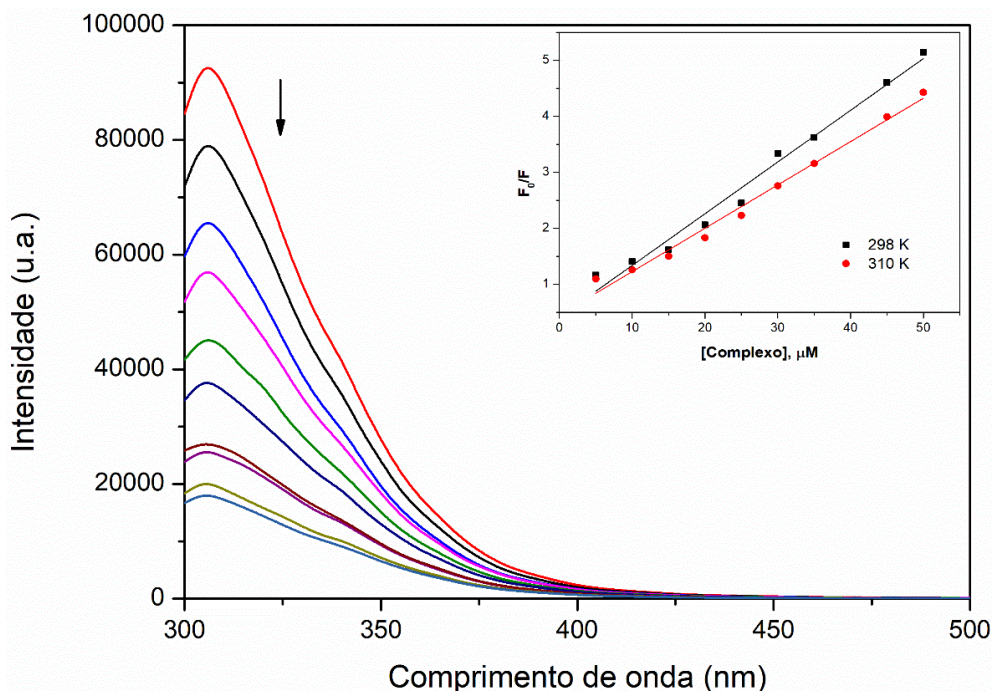


FIGURA A62 - Espectros de fluorescência da HSA com a adição de diferentes concentrações do complexo DIA (5-50 μM), temperatura de 298 K. Figura do canto superior direito são as retas obtidas de F_0/F versus [complexo] nas temperaturas de 298 e 310 K.

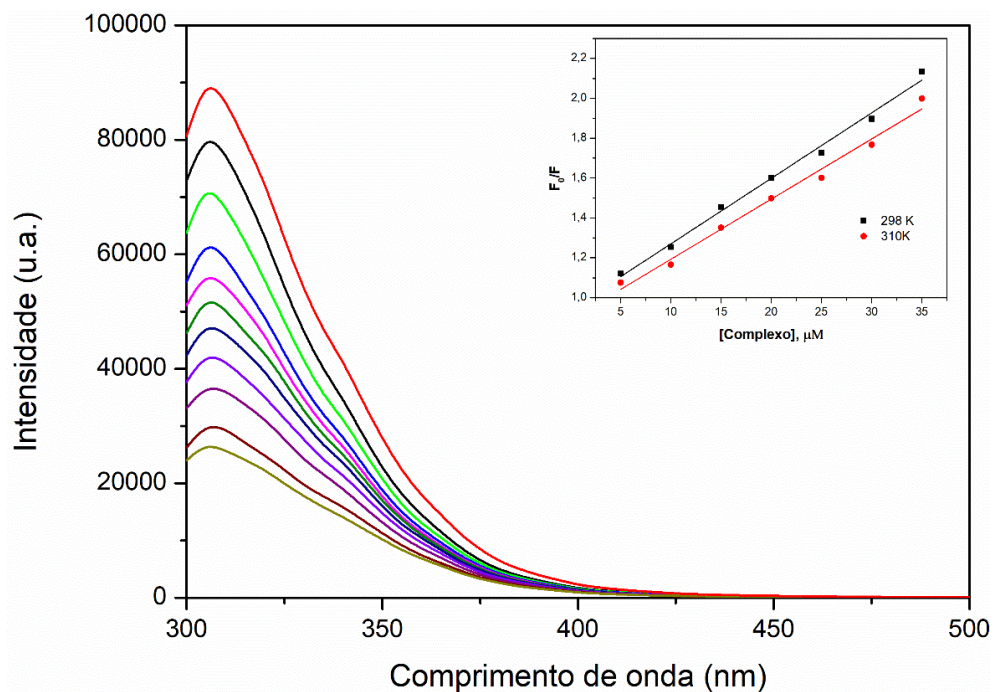


FIGURA A63 - Espectros de fluorescência da HSA com a adição de diferentes concentrações do complexo M-TIU (5-50 μM), temperatura de 298 K. Figura do canto superior direito são as retas obtidas de F_0/F versus [complexo] nas temperaturas de 298 e 310 K.

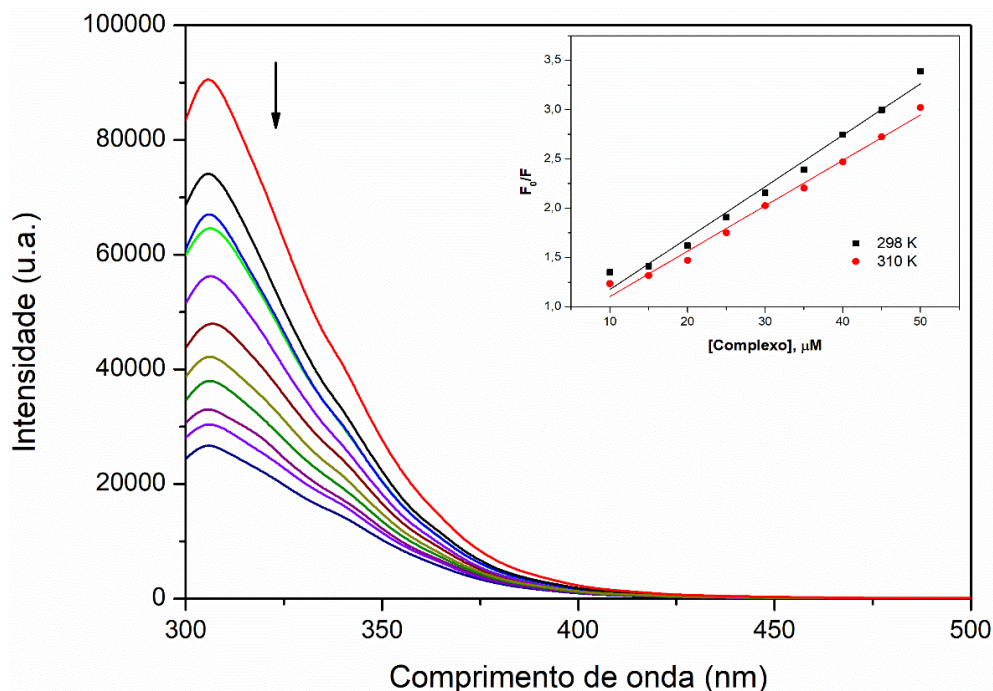


FIGURA A64 - Espectros de fluorescência da HSA com a adição de diferentes concentrações do complexo TIU (5-50 μM), temperatura de 298 K. Figura do canto superior direito são as retas obtidas de F_0/F versus [complexo] nas temperaturas de 298 e 310 K.

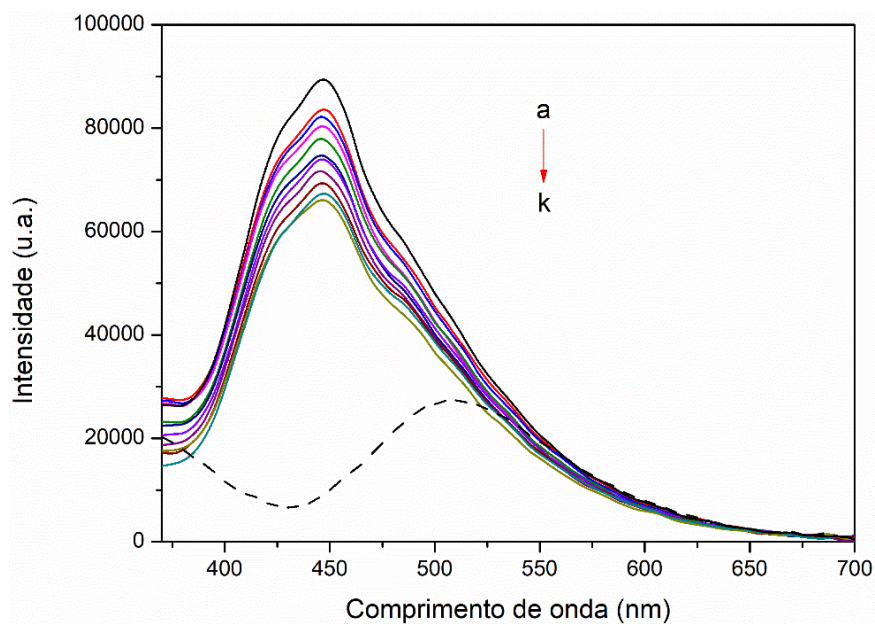


FIGURA A65 - Supressão da fluorescência de DA-HSA com adição do complexo M-IMI, a 298K. Em (- - -) tem-se somente DA, (a) apenas DA-HSA ($[\text{HSA}] = [\text{DA}] = 5 \mu\text{M}$), b-k na presença de quantidades crescentes do complexo M-IMI (5-50 μM).

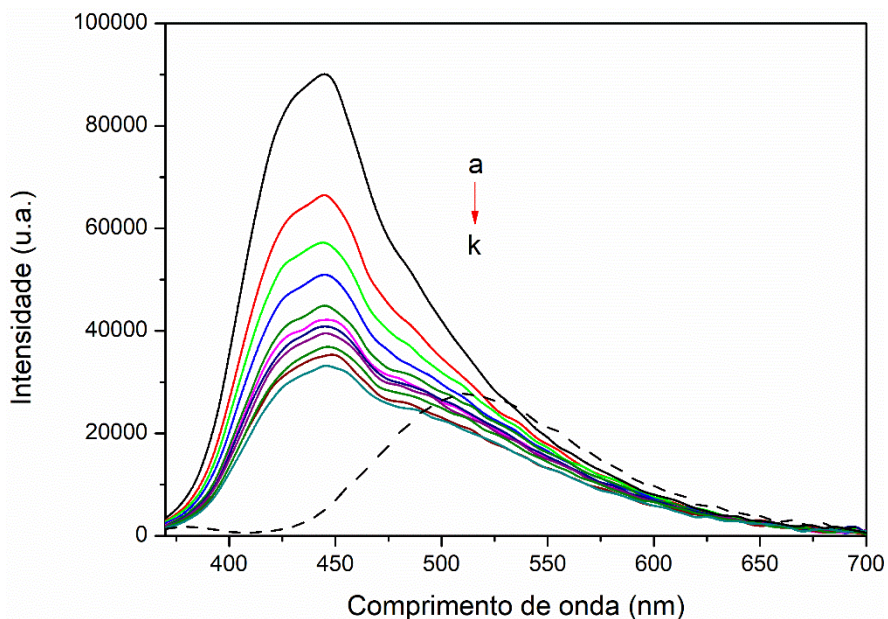


FIGURA A66 – Supressão da fluorescência de DA-HSA com adição do complexo AC, a 298K. Em (- - -) tem-se somente DA, (a) apenas DA-HSA ($[HSA]=[DA]=5\ \mu M$), b-k na presença de quantidades crescentes do complexo AC (5-50 μM).

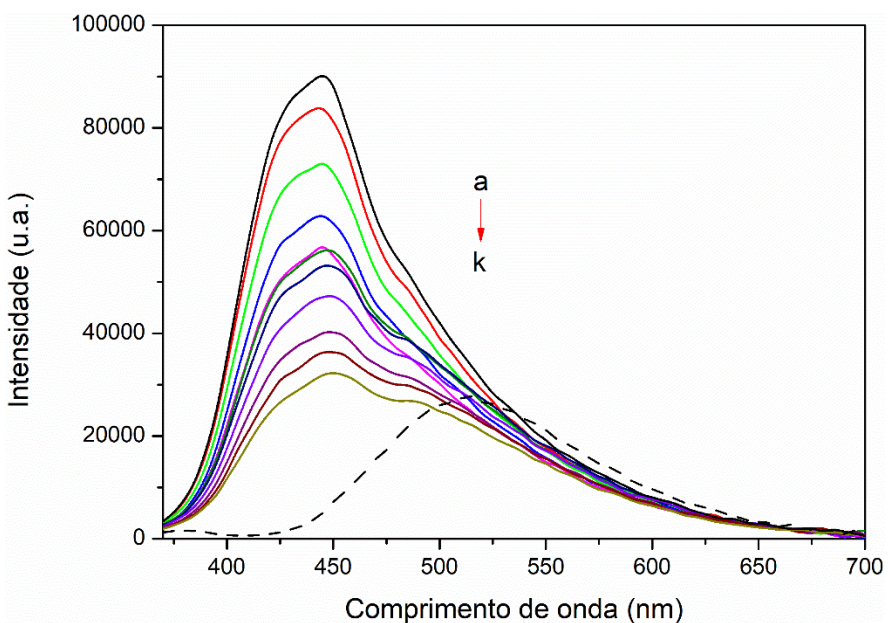


FIGURA A67 - Supressão da fluorescência de DA-HSA com adição do complexo DIA, a 298K. Em (- - -) tem-se somente DA, (a) apenas DA-HSA ($[HSA]=[DA]=5\ \mu M$), b-k na presença de quantidades crescentes do complexo DIA (5-50 μM).

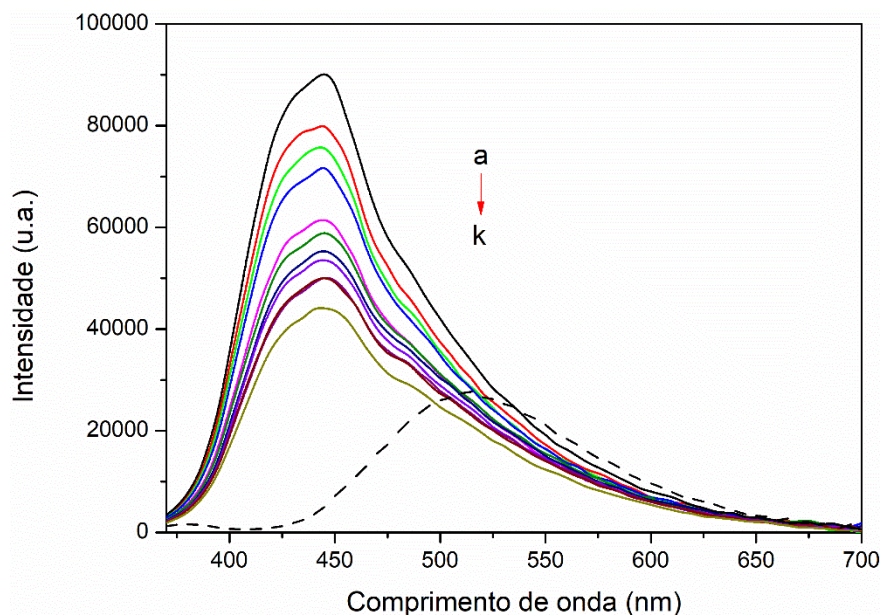


FIGURA A68 - Supressão da fluorescência de DA-HSA com adição do complexo M-TIU, a 298K. Em (- - -) tem-se somente DA, (a) apenas DA-HSA ($[HSA]=[DA]= 5 \mu M$), b-k na presença de quantidades crescentes do complexo M-TIU (5-50 μM).

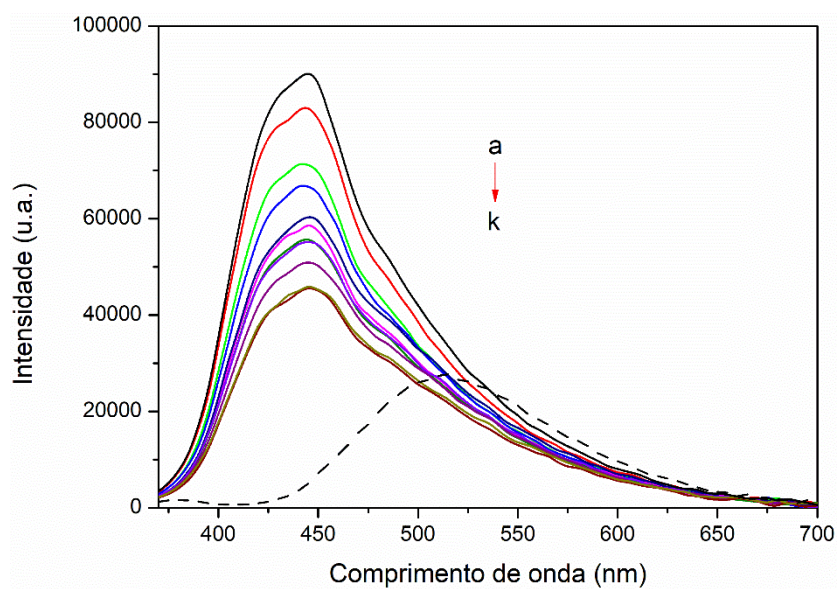


FIGURA A69 - Supressão da fluorescência de DA-HSA com adição do complexo TIU, a 298K. Em (- - -) tem-se somente DA, (a) apenas DA-HSA ($[HSA]=[DA]= 5 \mu M$), b-k na presença de quantidades crescentes do complexo TIU (5-50 μM).

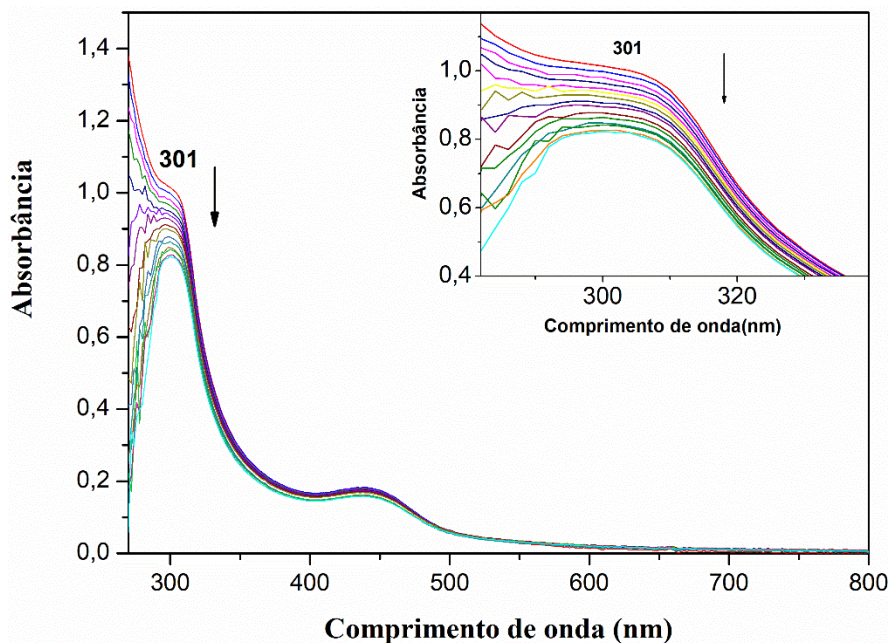


FIGURA A70 – Espectros de absorção no UV-visível do complexo M-IMI com a titulação de CT-DNA, em pH 7,4. No canto superior direito tem-se a ampliação dos espectros na região da banda 301 nm para melhor visualização do hipocromismo.

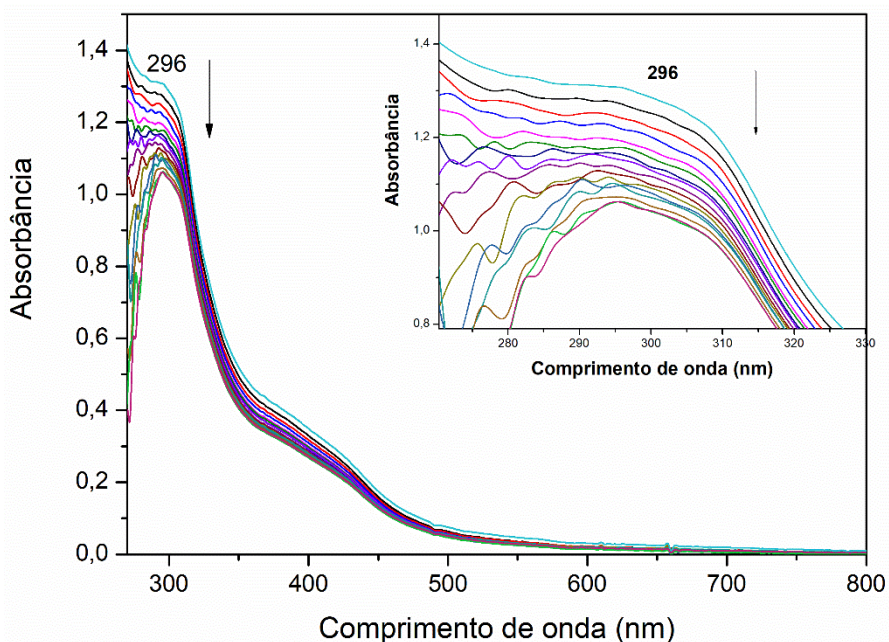


FIGURA A71 – Espectros de absorção no UV-visível do complexo AC com a titulação de CT-DNA, em pH 7,4. No canto superior direito tem-se a ampliação dos espectros na região da banda 296 nm para melhor visualização do hipocromismo.

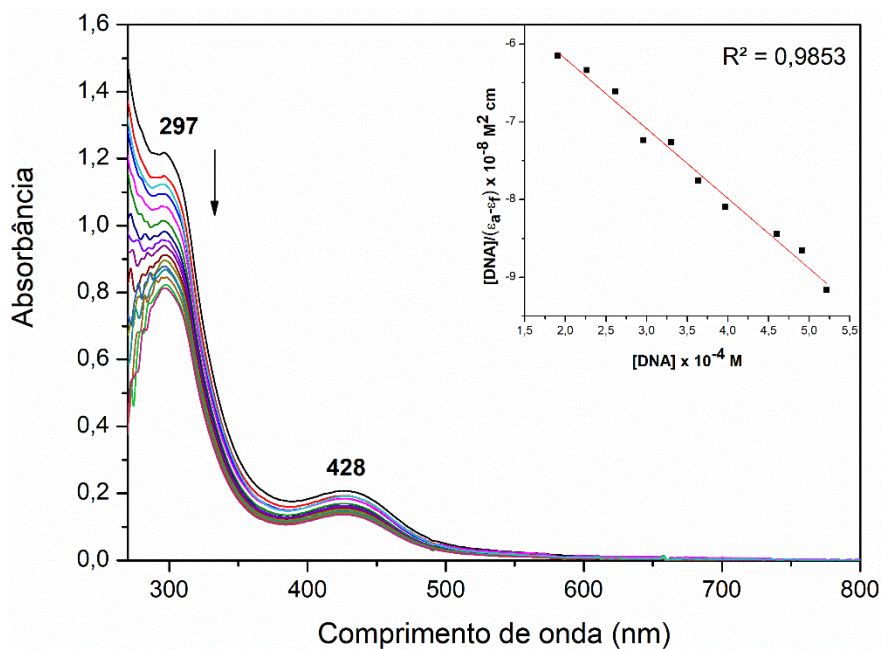


FIGURA A72 – Espectros de absorção no UV-visível do complexo DIA com a titulação de CT-DNA, em pH 7,4. No canto superior direito tem-se a reta obtida da $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs $[DNA]$ para o cálculo de K_b .

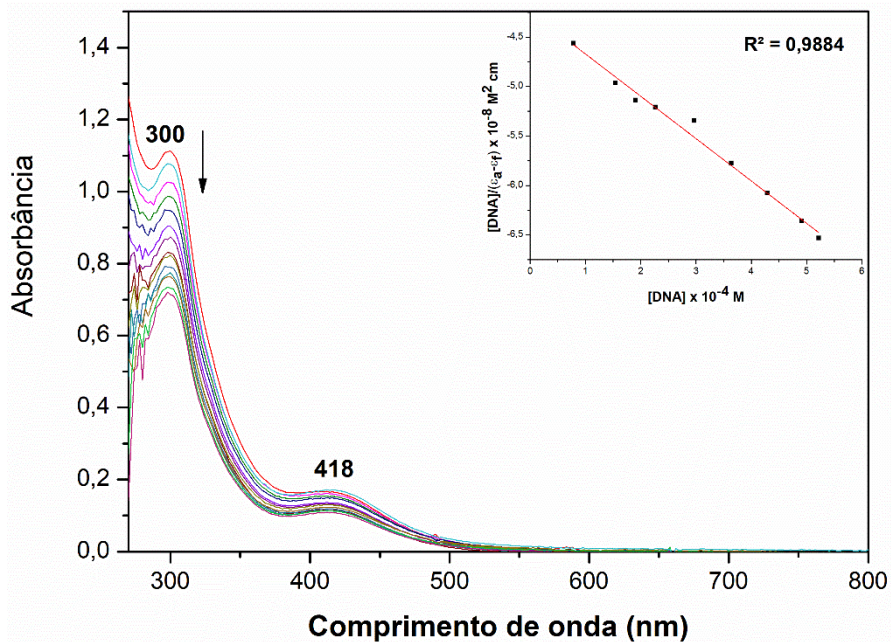


FIGURA A73 – Espectros de absorção no UV-visível do complexo M-TIU com a titulação de CT-DNA, em pH 7,4. No canto superior direito tem-se a reta obtida da $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs $[DNA]$ para o cálculo de K_b .

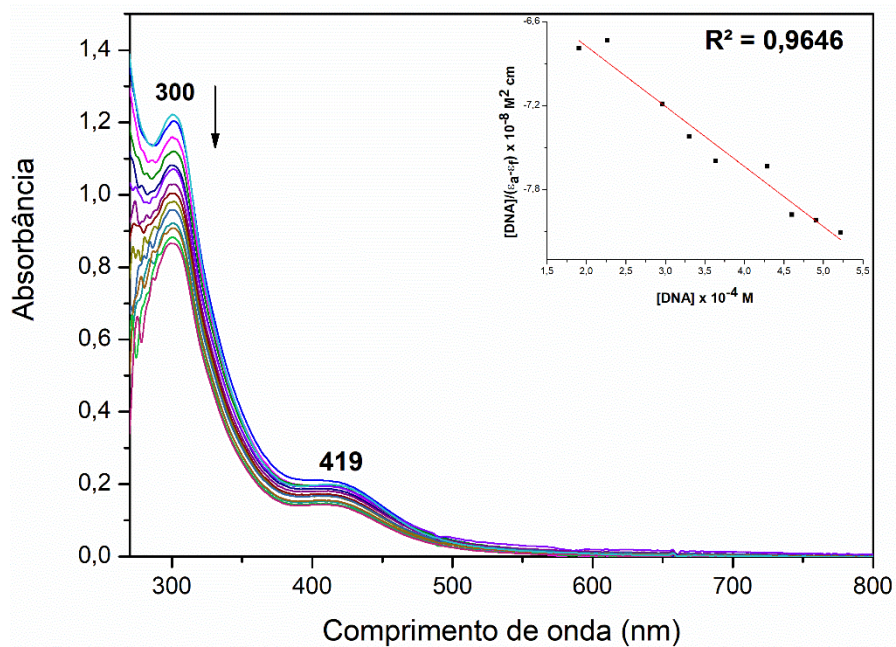


FIGURA A74 – Espectros de absorção no UV-visível do complexo TIU com a titulação de CT-DNA, em pH 7,4. No canto superior direito tem-se a reta obtida da $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_i)$ vs $[DNA]$ para o cálculo de K_b .