

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

**COMPLEXOS DE RUTÊNIO BIOATIVOS: SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO E ENSAIOS BIOLÓGICOS**

Carolina Riverin Cardoso*

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

Orientadora: Professora Dra. Rose Maria Carlos

*bolsista Capes

SÃO CARLOS - SP

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C268cr Cardoso, Carolina Riverin.
Complexos de rutênio bioativos : síntese, caracterização e
ensaios biológicos / Carolina Riverin Cardoso. -- São Carlos
: UFSCar, 2014.
107 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2014.

1. Química inorgânica. 2. Complexos de rutênio. 3.
Luminescência. I. Título.

CDD: 546 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de Doutorado da candidata **Carolina Riverin Cardoso**, realizada em 28 de março de 2014:*

Rose Maria Carlos

Profa. Dra. Rose Maria Carlos

AMC Ferreira

Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira

Tiago Venâncio

Prof. Dr. Tiago Venâncio

Helena C de S. de Assis

Profa. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis

Adelino Netto

Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família e amigos, em especial a minha mãe Rita de Cássia e meu companheiro Ernani pelo apoio incondicional.

*“O pensamento lógico pode levar
você de A a B, mas a imaginação te
leva a qualquer parte do universo”.*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dra. Rose Maria Carlos agradeço pela orientação, amizade, confiança e incentivo durante todos os anos que trabalhamos juntas.

Ao Prof. Dr. Nicholas Farrell, VCU, agradeço pela orientação, receptividade e amizade durante meu estágio no exterior.

Ao Prof. Dr. Tiago Venâncio agradeço pela colaboração nos trabalhos e amizade.

Aos colegas do LAFIB (Márcia, Vam, Paulo, Mariana Camilo, Edjane, Inara, Regina, Míriam, Belém, Bruno, Mariana, João, Débora) agradeço pela amizade, dedicação e principalmente pelos momentos de descontração que deixavam os meus dias mais agradáveis e felizes.

Aos amigos do departamento de química pela amizade e apoio.

A todos os professores e funcionários que de alguma forma colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro concedido.

A minha mãe Rita de Cássia e aos meus irmãos Estela, Arthur e Diego agradeço pelo incentivo, carinho e apoio.

Ao Ernani agradeço pelo companheirismo, carinho e dedicação.

E finalmente agradeço a Deus por ter me dado a vida, por guiar meus passos, e pelo amor incondicional.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A2780	Células tumorais de câncer de mama
Bpy	Bipiridina
BME	2-mercaptoetanol
BSA	Albumina bovina (do inglês, bovine serum albumin)
<i>Cis</i>	Referente ao iômero de posição <i>cis</i> de um composto
CHN	Análise elementar (carbono, hidrogênio e nitrogênio)
CT-DNA	Ácido desoxirribonucléico de bezerro timo
DMF	Dimetilformamida
DFT	Teoria do funcional de densidade (do inglês, Density Functional Theory)
<i>D</i>	Dubleto
<i>Dd</i>	Duplo-dubleto
DMSO	Dimetil sulfóxido
D ₂ O	Água deuterada
DOSY	Espectroscopia de Difusão Ordenada (do inglês, Diffusion-ordered spectroscopy)
DTNB	Reagente de Ellman
AChE	Enzima acetilcolinesterase proveniente do peixe elétrico <i>Electrophorus electricus</i>
E	Potencial

HSA	Albumina humana (do inglês, human serum albumin)
HCT116p53 ^{+/+}	Células tumorais de colorretal
HCT116p53 ^{-/-}	Células tumorais de colorretal sem a proteína p53
IC ₅₀	Concentração de composto necessária para inibir 50% do crescimento celular
ITC	Calorimetria de Titulação isotérmica (do inglês, Isothermal Titration calorimetry)
ImH	Imidazol
K _m	Constante de Michaelis-Menten
K	Temperatura em Kelvin
KCl	Cloreto de potássio
LLCT	Transferência de carga do ligante para ligante (do inglês, ligand to ligand charge transfer)
LMCT	Transferência de carga do ligante para o metal (do inglês, ligand to metal charge transfer)
logP	Coefficiente de partição
<i>M</i>	Multiplete
MLCT	Transferência de carga do metal para o ligante (do inglês, metal to ligand charge transfer)
MeIm	Metilimidazol
Ns	Nanosegundo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

Phen	Fenantrolina
PPM	Partes por milhão
PTBA	Perclorato de tetrabutilamônio
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês, phosphate buffered saline)
pKa	$-\log K_a$
Redox	Potencial de redução e oxidação
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
Ru(II)	Rutênio no estado de oxidação II
Ru(III)	Rutênio no estado de oxidação III
RPMI 1640	Solução nutritiva usada em cultivo celular
RNAse B	Ribonuclease B
S	Singleto
STD	Diferença de Transferência de Saturação (do inglês, Saturation Transfer Difference)
SDS	Tampão Laemmli
T	Tripleto
UV-Vis	Ultravioleta-visível
V_0	Velocidade inicial
V_{\max}	Velocidade máxima
V	Volts
δ	Deslocamento químico nos espectros de RMN
Λ	Comprimento de onda

λ_{em} Comprimento de onda de emissão

τ_{em} Tempo de vida de emissão

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 -. Algumas das principais áreas de atuação da Química Inorgânica Medicinal.....	2
FIGURA 1.2 - Estimativa para 2014 de casos de câncer no Brasil em homens.....	3
FIGURA 1.3 - Estimativa para 2014 de casos de câncer no Brasil em mulheres.....	3
FIGURA 1.4 - Ilustração do ciclo celular e os pontos de checagem.....	5
FIGURA 1.5 - Estrutura da cisplatina e transplatina.....	7
FIGURA 1.6 – Espécies geradas após a hidrólise da cisplatina no meio biológico.....	9
FIGURA 1.7 – Raio-X do complexo formado entre o DNA e a cisplatina (a) Cisplatina 1,2-d(GpG) “intrastrand cross-link” (1A1O). (b) Cisplatina 1,3-d(GpTpG) “intrastrand cross-link” (1DA4). (c) Cisplatina “interstrand cross-link” (1A2E).....	10
FIGURA 1.8 – Estrutura dos complexos carboplatina, oxaliplatina, satraplatina e BBR3464.....	13
FIGURA 1.9 - Estrutura dos complexos de rutênio NAMI-A, KP1019 e satraplatina.....	14
FIGURA 1.10 – Ilustração da redução do Ru(III) a Ru(II) nas células tumorais.....	16
FIGURA 1.11 – Estrutura secundária da proteína HSA com a identificação dos subdomínios (PDB: 1H9Z).....	19
FIGURA 1.12 - Estrutura dos ligantes estudados neste trabalho.....	22
FIGURA 3.1 - Ilustração de um experimento de STD-NMR.....	33

FIGURA 4.1 - Estruturas otimizadas dos complexos e numerações utilizadas na tabela A1, A2, A3 e A4 do anexo A) RuphenImH, B)Ruphen1MeImH, C) RubpyImH e D) Rubpy1MeIm.....	41
FIGURA 4.2 - Ângulo diedral entre Imidazol-Ru-phen-phen.....	42
FIGURA 4.3 - Espectro de UV-Vis teórico (preto) e experimental (vermelho) dos complexos RuphenImH, Ruphen1MeImh e RubpyImH e Rubpy1MeIm em acetonitrila na região de 200 a 650nm.....	43
FIGURA 4.4 - Espectros de RMN ¹ H dos complexos RuphenImH, Ruphen1MeIm, RubpyImH e Rubpy1MeIm em D ₂ O.....	47
FIGURA 4.5 - Estrutura ilustrativa dos complexos com as respectivas enumerações utilizadas na atribuição dos espectros de RMN ¹ H na tabela 4.3 e 4.4.....	48
FIGURA 4.6 - Espectro de absorção normalizado dos complexos em água.....	51
FIGURA 4.7 - Voltametria cíclica dos complexos em água na concentração de 2mg/mL com eletrólito de suporte KCl 0,1 M com Ag/AgCl como eletrodo de referência e 100 mV/s.....	53
FIGURA 4.8 - Voltametria cíclica do complexo NAMI-A em água vs SCE.....	54
FIGURA 4.9 - Espectroeletróquímica do RuphenImH em DMF utilizando PTBA 0,1 M como eletrólito de suporte. A) 1,5 V; B) 0,5 V.....	56
FIGURA 4.10 - Espectroeletróquímica do RuphenImH em DMF utilizando PTBA 0,1 M como eletrólito de suporte. A) -1,5 V; B) 0,5 V....	56
FIGURA 4.11 - Espectros de emissão dos complexos em água.....	58
FIGURA 4.12 - Espectros de excitação dos complexos em água.....	58
FIGURA 4.13 - Emissão do complexo RuphenImH em diferentes solventes.....	59

FIGURA 4.14 - A) Espectro de emissão do complexo RuphenImH e B) Espectro de emissão do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ambos a 77K e no solvente metanol/etanol (4:1).....	60
FIGURA 4.15 - Espectro de absorção das biomoléculas.....	61
FIGURA 4.16 - UV-Vis e emissão do complexo RuphenImH em água....	61
FIGURA 4.17 - Curva de decaimento de emissão para o complexo A) RuphenImH, B) RubpyImH, C) Ruphen1MeIm e D)Rubpy1MeIm em água. A qualidade do ajuste está indicado pelos gráficos de resíduos mostrados abaixo das curvas de decaimento.....	63
FIGURA 4.18 - Cinética do complexo RuphenImH acompanhada por RMN de ^1H em tampão fosfato pH 7,4.....	65
FIGURA 4.19 - (vermelho) RMN ^1H do complexo RuphenImH na ausência de luz e (azul) RMN ^1H do complexo RuphenImH após a exposição do complexo a luz ambiente por 48 horas em tampão fosfato pH 7,4.....	66
FIGURA 4.20 - Estudo de estabilidade do complexo RuphenImH acompanhado por RMN de ^1H em tampão fosfato em pH ácido, neutro e básico.....	68
FIGURA 4.21 - Estudo de estabilidade do complexo Ruphen1MeIm acompanhado por RMN de ^1H em tampão fosfato em pH ácido, neutro e básico.	68
FIGURA 4.22 - Dicroísmo circular dos complexos A) RuphenImH e B) Ruphen1MeIm.....	70
FIGURA 4.23 - Fração de desnaturação da proteína em função da temperatura e calculo de t_m A) HSA e B) HSA/RuphenImH.....	71
FIGURA 4.24 - Titulação da proteína HSA pelo complexo RuphenImH em tampão fosfato $0,1\text{mol.L}^{-1}$ pH 7,4.....	73
FIGURA 4.25 - Parâmetros termodinâmicos calculados a partir do experimento de ITC do complexo RuphenImH/HSA.....	73

FIGURA 4.26 - Espectro de STD-RMN para o complexo RuphenImH na presença da HSA.....	75
FIGURA 4.27 – DOSY-RMN do complexo RuphenImH na ausência de HSA.....	76
FIGURA 4.28 – DOSY-RMN do complexo RuphenImH na presença de HSA.....	77
FIGURA 4.29 - Efeito da citotoxicidade dos complexos de rutênio nas células HCT116 p53 ^{+/+} , HCT116 p53 ^{-/-} e A2780.....	79
FIGURA 4.30 - Citometria de fluxo das células HCT116p53 ^{+/+} e HCT116p53 ^{-/-} quando incubadas com o RuphenImH nos tempos de 24 e 48 horas.....	81
FIGURA 4.31 - Western Blot das proteínas PARP, caspase 3, P53 e β -actina quando incubadas com o complexo RuphenImH e cisplatina.....	82
FIGURA 4.32 - Microscopia confocal do controle e dos complexos RuphenImH e Ruphen1MeIm na célula HCT116 utilizando o marcador de DNA DAPI.....	85
FIGURA 4.33 - Ilustração de um mecanismo citostático versus mecanismo citotóxico.....	86
FIGURA 4.34 - Aumento da emissão do complexo RuphenImH devido à adição de DNA no intervalo de concentração de (0 a 10 μ mol.L ⁻¹)	87
FIGURA 4.35 - Valores de emissão do complexo na região de 660 nm versus concentração de DNA.....	88

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1 - Atribuição do espectro de UV-Vis experimental a partir dos valores do cálculo teórico para o complexo RuphenImH em acetoneitrila.....	44
TABELA 4.2 - Dados percentuais para os teores de C, H e N, experimentais e teóricos para os complexos.....	45
TABELA 4.3 - Deslocamento químico de ^1H δ_{H} (ppm) dos hidrogênios dos complexos RuphenImH e Ruphen1MeIm em D_2O	49
TABELA 4.4 - Deslocamento químico de ^1H δ_{H} (ppm) dos hidrogênios dos complexos RubpyImH e Rubpy1MeIm em D_2O	50
TABELA 4.5. Valores de tempo de vida de emissão para os complexos.....	62
TABELA 4.6 - Valores obtidos do experimento de ITC RuphenImH/HSA: constante de dissociação (K_{d}), número de sítios ativos (n), entalpia (ΔH), entropia (ΔS) e energia livre de Gibbs (ΔG).....	72
TABELA 4.7 - Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) para os complexos de rutênio e cisplatina nas células HCT116 ($\text{p53}^{+/+}$), HCT116 ($\text{p53}^{-/-}$) e A2780.....	79
TABELA 4.8 - Dados do ensaio de proliferação celular para o complexo RuphenImH.....	84

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 3.1 - Via de síntese para o complexo RuphenImH e Ruphen1MeImH.....	26
ESQUEMA 3.2 - Via de síntese para o complexo RubpyImH e RuBpy1MeImH.....	28

RESUMO

COMPLEXOS DE RUTÊNIO BIOATIVOS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ENSAIOS BIOLÓGICOS

O desenvolvimento de complexos polipiridínicos de Ru(II) com atuação antitumoral têm recebido cada vez mais destaque. A luminescência destes compostos abrem muitas possibilidades de atuação em sistemas biológicos. Neste trabalho foi feita a síntese, caracterização e estudos biológicos dos complexos do tipo *cis*-[Ru(L-L)₂L₂]²⁺ onde, L-L = fenantrolina (phen) e bipyridina (bpy) e L = imidazol (ImH) e 1-metilimidazol (1MeIm). Os complexos são de preparação simples e estáveis tanto no estado sólido como em solução aquosa (na ausência de luz) além de serem resistente a hidrólise na faixa de pH de 2 a 10. Os complexos exibem uma intensa absorção na região do visível (490 nm, $\epsilon = 15000 \text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$) e uma intensa banda de emissão e longo tempo de vida em 660 nm e um grande deslocamento de Stokes (5500 cm^{-1}). Estudos de interação do complexo RuphenImH com HSA através das técnicas de CD, STD-NMR, DOSY-NMR e ITC mostrou que o complexo interage de forma não covalente com a HSA. Os complexos apresentaram acentuada inibição da proliferação das células de cancer HCT116p53^{+/+}, HCT116p53^{-/-} e A2780 com os valores de IC₅₀ abaixo 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Se iniciou os estudos de elucidção do modo de ação do complexo RuphenImH frente as células HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-}. O complexo RuphenImH induziu a inibição do ciclo celular na fase G1 em ambas as células mas a inibição foi mais acentuada na célula p53^{+/+} e o complexo ativou a proteína pró-apoptótica PARP somente na célula p53^{-/-} sugerindo diferente modo de ação. Os complexos apresentam características únicas com aplicações em diagnóstico e terapêutico.

ABSTRACT

BIOACTIVE RUTHENIUM COMPLEXES: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ASSAYS

Ru(II) polypyridyl anticancer compounds is drawing increasing attention to drug development. The luminescence of this type of complex open wide possibilities of using molecular systems in biological applications. Herein we investigated, the synthesis, characterization and biologic studies of the complex *cis*-[Ru(L-L)₂L₂]²⁺ where, L-L = 2,2-bipyridine (bpy) and phen = 1,10-phenanthroline (phen) and L = imidazole (ImH) and 1-methyl-imidazole (1MeIm). The complexes which can be easily prepared are stable in solid state and in water solution (without light) and resistant to hydrolysis at pH range from 2 to 10. The complexes display strong absorption in the visible region (490 nm, $\epsilon = 15000 \text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$) and an intense and long lived emission at 660 nm with a large Stokes shift (5500 cm^{-1}). Spectroscopic (CD, STD-NMR and DOSY-NMR) and ITC studies indicate binding of *cis*-[Ru(phen)₂(ImH)₂]²⁺ and HSA occurs via non-covalent interactions. Accordingly, the complexes showed marked cell proliferation inhibition against the cancer cells HCT116p53^{+/+}, HCT116p53^{-/-} and A2780 with IC₅₀ values below $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. The Complex induces G1 cell arrest in both cells although it is more expressive in P53^{+/+} and activates the proapoptotic protein PARP in only p53^{-/-} suggesting diferent pathway with p53-dependent and p53-independent modes of action. The complexes presents unique features for potential diagnostic and therapeutic applications of cancer.

SUMÁRIO

1- Introdução	1
1.1 - Química Inorgânica Medicinal.....	1
1.2 - Câncer.....	2
1.3 - Ciclo celular	5
1.4 - Complexos de metais de transição atuando como agentes quimioterápicos	7
1.4.1 - Cisplatina.....	7
1.4.2 - Mecanismo de ação da cisplatina.....	8
1.4.3 - Desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos de platina	11
1.4.4 - Complexos de rutênio (III).....	14
1.4.5 - Complexos de rutênio (II)	16
1.5 – Interação com as biomoléculas.....	19
1.6 – Planejamento dos complexos	21
2 - Objetivos	23
2.1 - Geral.....	23
2.2 - Específicos.....	23
3 - Procedimento Experimental	24
3.1 – Reagentes	24
3.2 – Síntese.....	24
3.2.1 - Preparação do precursor <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ Cl ₂].....	24
3.2.2 - Síntese do precursor <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ Cl ₂].....	25
3.2.3 - Síntese dos complexos <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (ImH) ₂]Cl ₂ e <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (1MeImH) ₂]Cl ₂	25
3.2.4 - Síntese dos complexos <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (ImH) ₂]Cl ₂ e <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (1MeIm) ₂]Cl ₂	27
3.3 - Equipamentos e Metodologias	29
3.3.1 - Análise Elementar	29
3.3.2 - Eletroquímica	29
3.3.3 - Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis.....	29
3.3.4 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	30
3.3.5 - Luminescência.....	30
3.3.6 - Tempo de vida de emissão	30
3.3.7 - Cálculos computacionais.....	31
3.3.8 - Avaliação da estabilidade dos complexos.....	31
3.3.9 - Estudos de interação DNA-complexo.....	31
3.3.9.1 - Preparação do DNA	31
3.3.9.2 - Interação avaliada pela técnica luminescência.....	32
3.3.10 - Estudos de interação HSA-Complexo	32

3.3.10.1 - Preparação do HSA	34
3.3.10.2 - Interação avaliada pela técnica de ITC	34
3.3.10.3 - Interação avaliada pela técnica de STD-RMN.....	34
3.3.10.4 - Interação avaliada pela técnica de DOSY-RMN	35
3.3.10.5 – Interação avaliada pela técnica de Dicroísmo circular	36
3.3.11 - Ensaio com células	36
3.3.11.1 - Linhagem celular.....	36
3.3.11.2 - Ensaio de viabilidade celular por redução por MTT	36
3.3.11.3 - Citometria de fluxo	37
3.3.11.4 - Imunodeteção de proteína por Western Blott.....	38
3.3.11.5 - Microscopia Confocal	39
3.3.11.6 - Estudo da inibição da proliferação celular	39
4 - Resultados e Discussão	40
4.1 – A estrutura dos complexos	40
4.2 – Análise Elementar – CHN	44
4.3 - Caracterização dos complexos	45
4.3.1 - Caracterização dos complexos por RMN ¹ H	45
4.3.2 - Caracterização dos complexos por UV-Vis.....	50
4.3.3 - Caracterização dos complexos por Voltametria Cíclica	52
4.3.4 - Estudos espectroeletróquímicos	54
4.3.5 - Estudos fotofísicos	57
4.4 – Estudo de estabilidade dos complexos	63
4.5 - Estudos de interação complexo/HSA	69
4.6 - Ensaio biológicos	77
4.6.1 - Ensaio de viabilidade celular.....	77
4.6.2 - Estudo do mecanismo de ação	80
4.6.3 - Absorção do complexo pela célula visualizada por microscopia confocal	84
4.6.4 - Interação do complexo com DNA e sua atuação como sonda DNA ..	85
5 – Conclusões.....	88
6 - Referências.....	90
7 - Anexos	100

1- Introdução

1.1 - Química Inorgânica Medicinal

A Química Inorgânica medicinal estuda as aplicações de íons inorgânicos e seus complexos em sistemas fisiológicos, correlacionando a atividade biológica com as características estruturais e eletrônicas. Os dois principais focos desta área de pesquisa são os estudos dos metais com ocorrência natural em sistemas biológicos e a introdução de metais em sistemas biológicos através da utilização de metalofármacos^{1,2}.

Os elementos inorgânicos desempenham um papel essencial nos processos biológicos e participam efetivamente na constituição de várias proteínas. Estas proteínas altamente elaboradas são denominadas de metaloproteínas e contém um ou mais íon metálico em sua estrutura. Dentre as funções que desempenham estão o transporte de oxigênio no processo respiratório, o transporte de elétrons e função estrutural.³ Com o auxílio de técnicas avançadas de cristalografia - métodos teóricos e experimentais - é possível estudar a estrutura das metaloproteínas e investigar suas interações e sítios de ligação.

Os metais, em particular os metais de transição, oferecem vantagens em relação aos fármacos à base de compostos orgânicos, incluindo uma grande variedade de números de coordenação e geometrias, estados de oxidação acessíveis, capacidade de troca de ligantes no meio fisiológico e uma grande diversidade estrutural⁴. A química inorgânica Medicinal é uma área de investigação crescente que foi inicialmente alimentada pela descoberta da cisplatina cerca de 40 anos atrás. Atualmente, existem no comércio alguns metalofármacos e candidatos a fármacos em fase de testes clínicos⁵. De acordo com o Instituto nacional de Saúde, com sigla em inglês de NIH (National Institutes of Health), a razão de compostos inorgânicos testados por compostos comercializados é similar a de compostos orgânicos (1 a cada 6000)⁶. Além

disso, o sucesso de alguns fármacos como os complexos de platina com ação antitumorais (utilizados em cerca de 50% de todos os tratamentos de câncer) e o complexo de $Gd(III)$ ⁷, utilizado como agente de contraste na técnica de ressonância magnética por imagem (20 milhões de doses administrada por ano)⁵ tornam a área de bioinorganica cada vez mais atraente tanto para pesquisadores quanto para investidores. A figura 1.1, apresenta um esquema com algumas das principais áreas de atuação dos compostos inorgânicos na Química Inorgânica Medicinal.

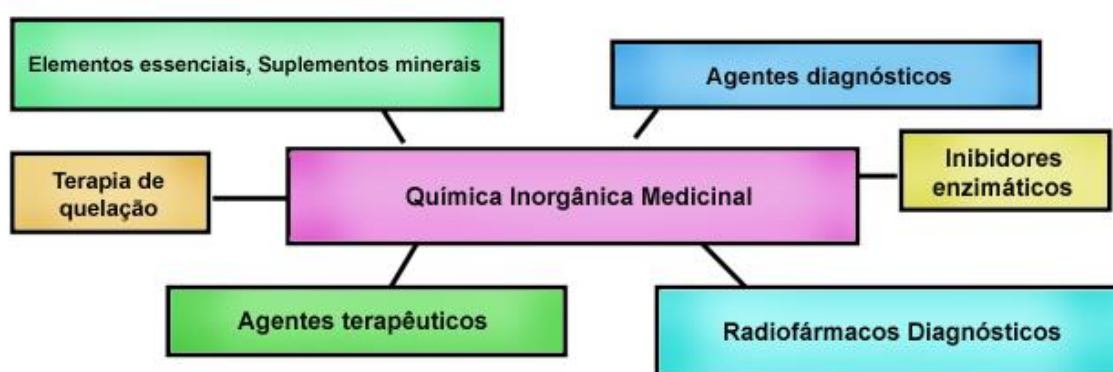


FIGURA 1.1 -. Algumas das principais áreas de atuação da Química Inorgânica Medicinal.

1.2 - Câncer

O câncer é um problema de saúde pública mundial e uma das doenças mais fatais. A incidência de câncer no mundo cresceu 20% e a estimativa será de 27 milhões de novos casos até 2030. Este cenário não é diferente no Brasil, o Instituto Nacional de Câncer no Brasil (INCA) estima cerca de 580 mil casos novos para a doença em 2014. O câncer com maior incidência no Brasil tanto em mulheres como em homens é o câncer de pele não melanona. As figuras 1.2 e 1.3 mostram as estatísticas do INCA⁸ para a incidência dos vários tipos de câncer para homens e mulheres para o ano de 2014.

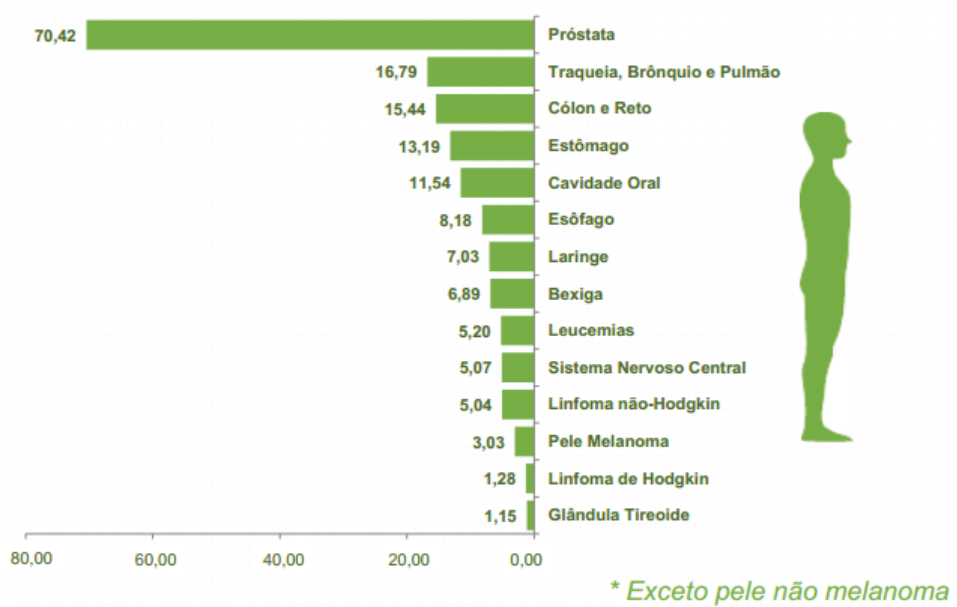


FIGURA 1.2 - Estimativa para 2014 de casos de câncer no Brasil em homens.

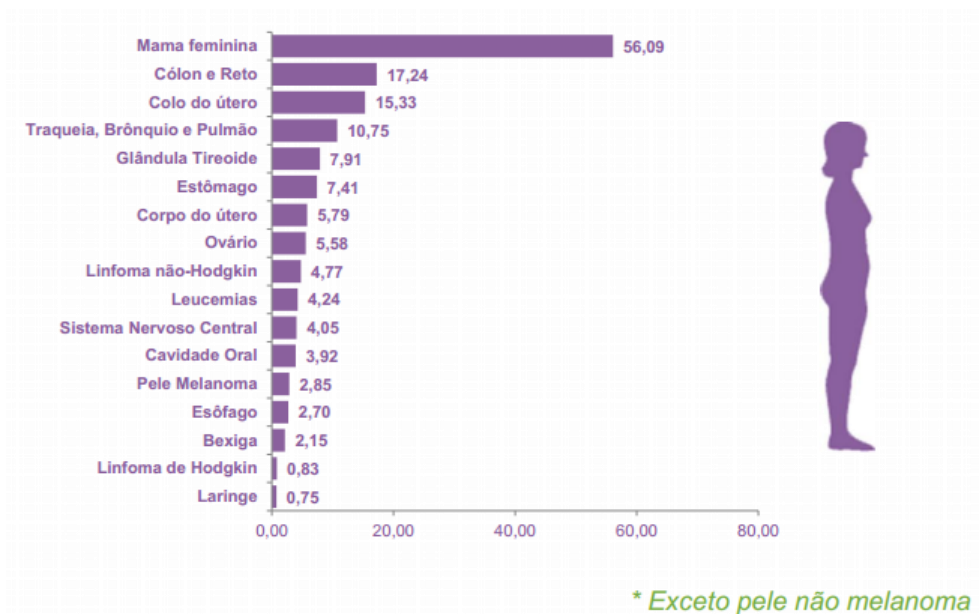


FIGURA 1.3 - Estimativa para 2014 de casos de câncer no Brasil em mulheres.

Estes dados justificam o interesse e investimentos expressivos por parte da indústria farmacêutica e fundos governamentais na área de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos mais seletivos e menos tóxicos em relação aos atualmente no mercado para o tratamento de câncer.

De acordo com o INCA (2014), “câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo”. As causas do câncer dividem-se em fatores interno ou externos ao organismo sendo que o fator comum são danos ao DNA gerando mutações nos genes⁹. Estes genes atuam na manutenção da estabilidade genética e como resultado destas mutações o genoma das células tumorais são instáveis⁹. Esta instabilidade resulta em múltiplas mutações levando a formação de produtos expressos de maneira alterada desequilibrando a regulação do ciclo celular e perda de controle de funções tais como mitose e apoptose¹⁰. Nas células normais, o dano do DNA é reparado sem danos a célula, no entanto, nas células tumorais a capacidade de reparação é dificultada devido à acumulação de múltiplas mutações¹⁰.

Os genes responsáveis pela apoptose e pelo reparo no DNA são conhecidos como genes supressores de tumor¹¹. Um exemplo é o gene p53, mais conhecido como Guardiã do Genoma e considerado de altíssima importância na gênese do câncer humano¹¹. O gene p53 codifica a proteína p53 (massa molecular de 53 kDa) e uma de suas funções é preservar a integridade genômica do DNA ao longo do ciclo celular. Mutações no gene p53 resultam em um descontrole do ponto de checagem do ciclo celular, possibilitando que células danificadas progridam para as fases seguintes do ciclo celular sem que as lesões sejam reparadas ou levadas à morte por apoptose. Cerca de 50% de todos os tumores apresentam alguma mutação no gene p53 levando a perda da sua função. No caso do câncer de cólon retal, as alterações na expressão da proteína p53 estão relacionadas com mais de 70% dos casos¹².

Dentre os tratamentos disponíveis para o câncer, os principais são a cirurgia, radioterapia e a quimioterapia, sendo que na maioria dos casos se faz necessário o uso conjunto desses tratamentos. É sabido que muitos tumores podem desenvolver metástases, o que torna pouco eficaz o tratamento cirúrgico.

Se o tumor primário pode ser removido cirurgicamente, o tratamento quimioterápico parece ser a melhor escolha para o tratamento de metástases devido a sua localização não específica no organismo. Na quimioterapia são usados agentes químicos preparados para atuar na inibição do crescimento do tumor e/ou exterminá-lo. Atualmente, mais de 100 quimioterápicos estão sendo administrados, na maioria das vezes, de forma conjunta para combater o câncer.

A quimioterapia pode ser muito eficaz, mas por não ser um tratamento local, atingindo todas as partes do corpo, pode levar o paciente a ter muitos efeitos colaterais durante o tratamento. Dessa forma, a busca de agentes antitumorais mais seletivos e com menos efeito colateral é o que se busca atualmente.

1.3 - Ciclo celular

Os agentes antitumorais convencionais geralmente agem no ciclo celular interagindo com o DNA de forma a danificá-lo e levar a indução da morte celular por apoptose.¹³ O ciclo celular consiste em 5 fases¹⁴: G₁, S, G₂, M e G₀ (figura 1.4).

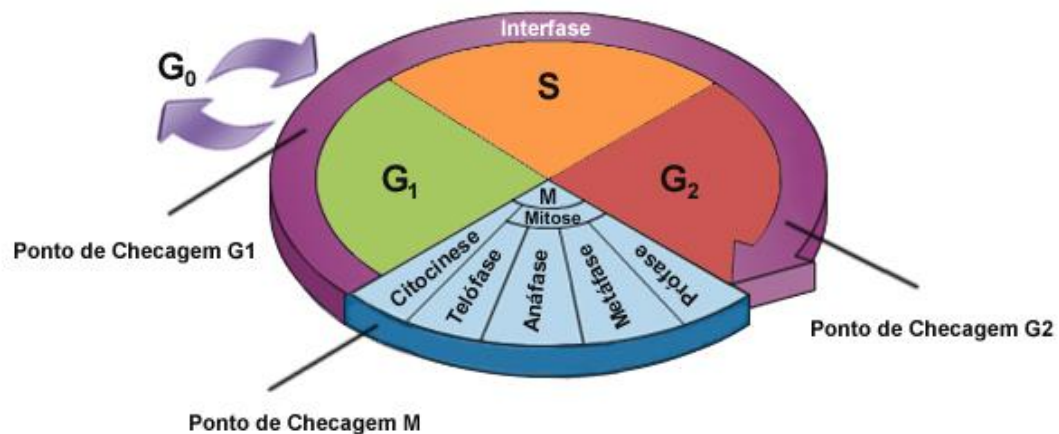


FIGURA 1.4 - Ilustração do ciclo celular e os pontos de checagem.

Na fase G0, a célula está com baixa atividade, aguardando que as condições externas sejam favoráveis a proliferação. A fase G1 é caracterizada por expressão dos genes, síntese de proteínas e transcrição do RNA. Nesta fase a célula cresce e produz todas as proteínas necessárias para a síntese do DNA. No final da fase G1, ocorre o ponto de decisão da célula por progredir no ciclo celular ou não. Se as condições forem favoráveis, a célula avança no ciclo, entrando na fase S, caso contrário, retorna à fase G0 e aguarda a melhoria das condições.

Uma vez que a célula deixou G1 e entrou em S, o restante da progressão do ciclo celular é automático. Durante a fase S a célula replica o seu DNA passando a ter duas fitas completas de DNA para em seguida passar para a fase G2, em que a célula cresce novamente e sintetiza proteínas suficientes para duas células filhas que serão formadas na fase M, que é a fase de mitose. Entre as fases G1/S e G2/M estão os principais pontos de checagem celular, estes pontos chamados checkpoints asseguram a correta execução dos eventos do ciclo celular, garantindo dessa forma a estabilidade genética. É nestes checkpoints que a proteína P53 atua de forma a reparar o dano ao DNA por agentes terapêuticos.

Um agente antitumoral, na maioria dos casos, não consegue distinguir entre células normais e malignas, interferindo na divisão celular de ambas as células, mas ao contrário das células tumorais, as células saudáveis apresentam grande capacidade de reparação.

1.4 - Complexos de metais de transição atuando como agentes quimioterápicos

1.4.1 - Cisplatina

A pesquisa por complexos metálicos atuando como agentes quimioterápicos iniciou-se com a descoberta da ação antitumoral da *cis*-diaminodicloroplatina (II), cisplatina, que foi descrita pela primeira vez em 1844 por Reiset e em 1845 por Peyrone, sendo que Peyrone sintetizou um complexo diferente de Reiset mas de mesma fórmula molecular. Algumas décadas depois, em 1893, Werner propôs que estes complexos de platina de mesma fórmula molecular eram isômeros, sendo o de Reiset a forma *trans* e o de Peyrone a forma *cis*, Figura 1.5.



FIGURA 1.5 - Estrutura da cisplatina e transplatina

Até então não se sabia do potencial antitumoral da cisplatina, quando em 1965, os cientistas Rosenberg e Van Camp observaram a ação inibitória da cisplatina à proliferação celular de uma colônia de bactéria *Escherichia coli* quando um campo elétrico alternado era aplicado¹⁵. A cisplatina era formada eletroliticamente pela reação da platina desprendida do eletrodo com o cloreto de amônio presente no meio reacional. A partir destes resultados, Rosenberg deu início a estudos em camundongos, portadores de sarcoma-180 e leucemia L1210¹⁶. Foram testados tanto o complexo transplatina como a cisplatina, mas apenas o isômero *cis* provocou a regressão completa do tumor em poucos dias.

Devido aos excelentes resultados, a cisplatina foi introduzida nos estudos de testes clínicos em 1971 sendo aprovada sua comercialização pelo

Food and Drug Administration (FDA) em 1978 nos EUA com o nome de *Platinol*, inicialmente para o tratamento de câncer de testículo e ovário, tornando-se um dos medicamentos mais utilizados no tratamento de câncer em todo o mundo¹⁷.

A descoberta da atividade antitumoral da cisplatina foi um marco importante na história da química inorgânica medicinal. Esta descoberta abriu novas frentes de pesquisa com a inclusão dos complexos metálicos na fronteira dos candidatos promissores a agentes antitumorais.

1.4.2 - Mecanismo de ação da cisplatina

Por décadas a comunidade científica tem se dedicado a auxiliar na elucidação do mecanismo de ação desta nova classe de complexos com ação antitumoral. Estudos sobre o mecanismo de ação da cisplatina mostram que o complexo sofre reações sucessivas de hidrólise, no meio intracelular, liberando o ligante cloro e entrando na esfera de coordenação o ligante aquo. Na reação de hidrólise, ocorre a formação de até 6 complexos (Figura 1.6) sendo que o mais reativo apresenta duas moléculas de água na esfera de coordenação (*cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$).

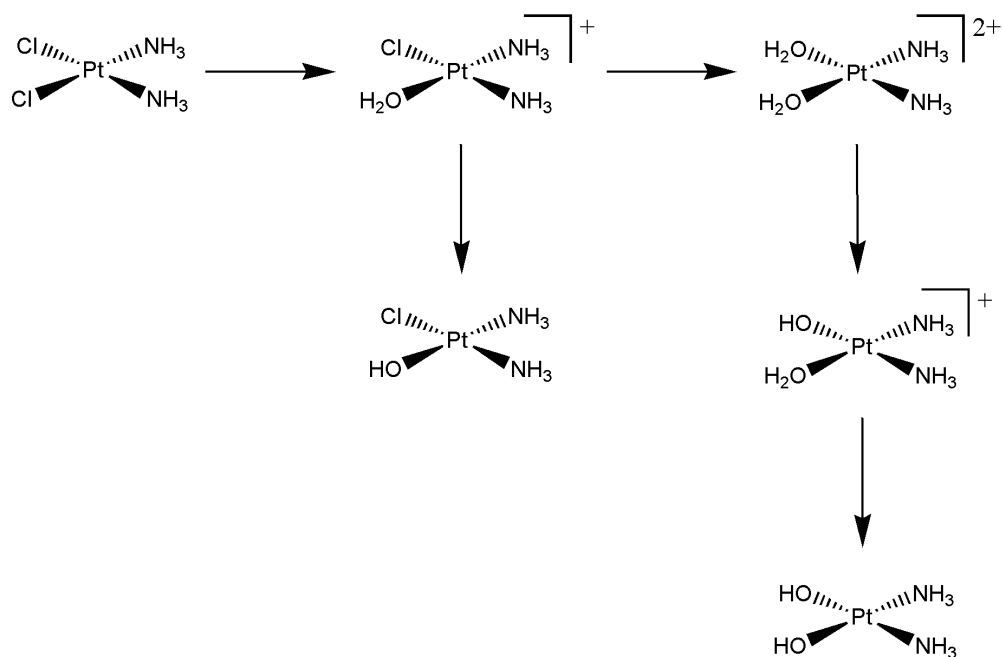


FIGURA 1.6 – Espécies geradas após a hidrólise da cisplatina no meio biológico.

Este complexo formado irá se ligar de forma covalente e irreversível as bases nitrogenadas do DNA, levando a uma distorção significativa na sua estrutura helicoidal que resulta na inibição da sua replicação e transcrição e conseqüentemente a morte da célula por apoptose¹⁸. A figura 1.7 mostra três formas diferentes de coordenação da cisplatina ao DNA e as distorções geradas na estrutura do DNA.¹⁹ Outra via de ação da cisplatina que ainda não é bem elucidada acontece quando a cisplatina se liga ao RNA provocando alterações nas suas funções e conseqüentemente contribuindo na inibição da célula tumoral.²⁰

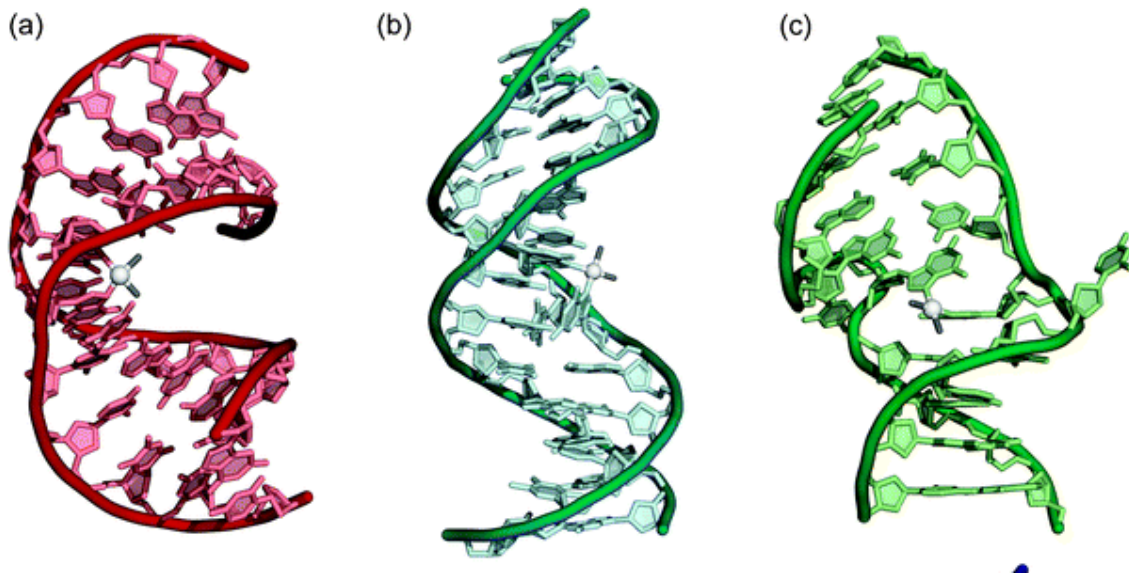


FIGURA 1.7 – Raio-X do complexo formado entre o DNA e a cisplatina (a) Cisplatina 1,2-d(GpG) “intrastrand cross-link” (1A1O). (b) Cisplatina 1,3-d(GpTpG) “intrastrand cross-link” (1DA4). (c) Cisplatina “interstrand cross-link” (1A2E).

Apesar do bom desempenho da cisplatina, alguns fatores afetam a sua eficiência. Mesmo com a concentração de íons cloreto no meio extracelular (100 mmol L^{-1}) bem superior em relação ao meio intracelular (4 a 20 mmol L^{-1}) a aquação da cisplatina no meio extracelular ocorre em pequena proporção.

Estas espécies reativas se ligam fortemente²¹ as proteínas do soro fisiológico, e como consequência não chegam ao meio intracelular. Além disso, a cisplatina é pobremente absorvida pelas células, cerca de 5%, e esta porcentagem pode se ligar fortemente a outras moléculas além do DNA como a glutathiona em uma ligação Pt-S favorecida em vez de se ligar ao DNA.

Quanto menor for a concentração da espécie ativa que irá interagir com o DNA, mais elevada deverá ser a dosagem de cisplatina para obter o efeito necessário, e em consequência da alta dosagem, maiores efeitos colaterais ao paciente.

Dentre os efeitos colaterais mais citados estão à náusea e vômitos, a alta nefrotoxicidade (danos a função renal), neurotoxicidade (danos ao sistema

nervoso), ototoxicidade (perda auditiva) e mielosupressão (redução da atividade da medula óssea).²² Os efeitos colaterais e a resistência adquirida à droga pelas células impulsionaram o desenvolvimento de complexos análogos a cisplatina que apresentassem menos efeito colateral ou efeitos mais toleráveis e com capacidade de atuar nas células resistentes a cisplatina, além da busca por complexos mais estáveis no meio extracelular e mais solúveis.

1.4.3 - Desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos de platina

Nos 40 anos após a aprovação da cisplatina, 23 outros complexos de platina tiveram seus estudos de ensaios clínicos iniciados sendo que apenas dois destes complexos, a carboplatina e a oxaliplatina, ganharam aprovação pelo FDA para serem comercializados mundialmente e outros três compostos, a nedaplatina, a lobaplatina e a heptaplatin, tiveram a sua aprovação no Japão, China e Coreia respectivamente²².

O complexo carboplatina, um composto de platina de segunda geração, recebeu aprovação pelo FDA em 1993 para o uso principalmente no câncer de ovário.²³ A carboplatina difere da cisplatina pela coordenação do ligante carboxilato em vez dos ligantes cloro. Esta substituição levou a um complexo mais solúvel e mais estável a hidrólise prematura. A cinética de aquação dos ligantes lábeis passou de 10^{-5} s na cisplatina para 10^{-8} s na carboplatina. Por causa da menor reatividade da carboplatina, esta pode ser administrada em doses mais elevadas que a cisplatina (300 a 450 mgm^{-2} em vez de 20 a 120 mgm^{-2}). Os efeitos colaterais também foram inferiores aos provocados pela cisplatina. Após a carboplatina sofrer as reações de aquação no meio intracelular, interage com o DNA de maneira semelhante à cisplatina.

Embora a carboplatina substitua a cisplatina no tratamento quimioterápico de alguns tipos de câncer, tais como de ovário, ainda não está

claro se a carboplatina tem eficácia equivalente à cisplatina em todos os tipos de câncer. No caso do câncer de cabeça e pescoço, a cisplatina ainda é o agente quimioterápico mais usado.²⁴

A oxaliplatina foi aprovada na França em 1996, nos EUA em 2002 e no Japão em 2005. Foi o primeiro fármaco capaz de ser ativo às células resistentes à cisplatina. A oxaliplatina possui um ligante bidentado não hidrolisável (diaminociclohexano) em vez de duas aminas e um grupo carboxilato. O seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, mas sugere que sua eficiente atuação às células resistentes a cisplatina é devido a sua ligação em sulcos hidrofóbicos do DNA, diferente das regiões que a cisplatina atua, impedindo a ligação das proteínas de reparo.²² Dentre os efeitos colaterais provenientes do uso da oxaliplatina estão a neurotoxicidade, toxicidade hematológica e toxicidade gastrointestinal.²⁵ Oxaliplatina em combinação com 5-fluorouracilo, foi aprovado na Europa, Ásia e América Latina para o tratamento de câncer colorretal metastático.²⁵

Alguns complexos de platina chegaram até a fase de ensaios clínicos, mas devido à baixa atividade, alto efeito colateral ou até mesmo por razões econômicas tiveram seus ensaios descontinuados. Um exemplo é o complexo trinuclear de platina (II), BBR3464. A sua absorção pelas células tumorais é alta e rápida, apresenta citotoxicidade em concentração até 1000 vezes mais baixa que a cisplatina e atividades em vários tipos de células tumorais²⁶, mas seus ensaios clínicos chegaram apenas até a fase II devido aos efeitos colaterais tais como neutropenia e toxicidade gastrointestinal²⁷

Atualmente, existem quatro complexos de platina em diferentes estágios de ensaios clínicos, sendo que dois deles (satraplatin e picoplatin) estão perto de serem aprovados para comercialização²². A satraplatina, figura 1.8, (JM216) é um complexo de platina (IV) de estrutura octaédrica que contém dois grupos acetato nas posições axiais. Estes grupos deixam o complexo mais hidrofílico e melhoram sua biodisponibilidade oral. Quando a satraplatina chega

a corrente sanguínea é metabolizado e perde seus grupos acetatos ficando com uma estrutura semelhante à cisplatina e atuando de forma semelhante no DNA, inibindo sua transcrição e replicação.²⁸

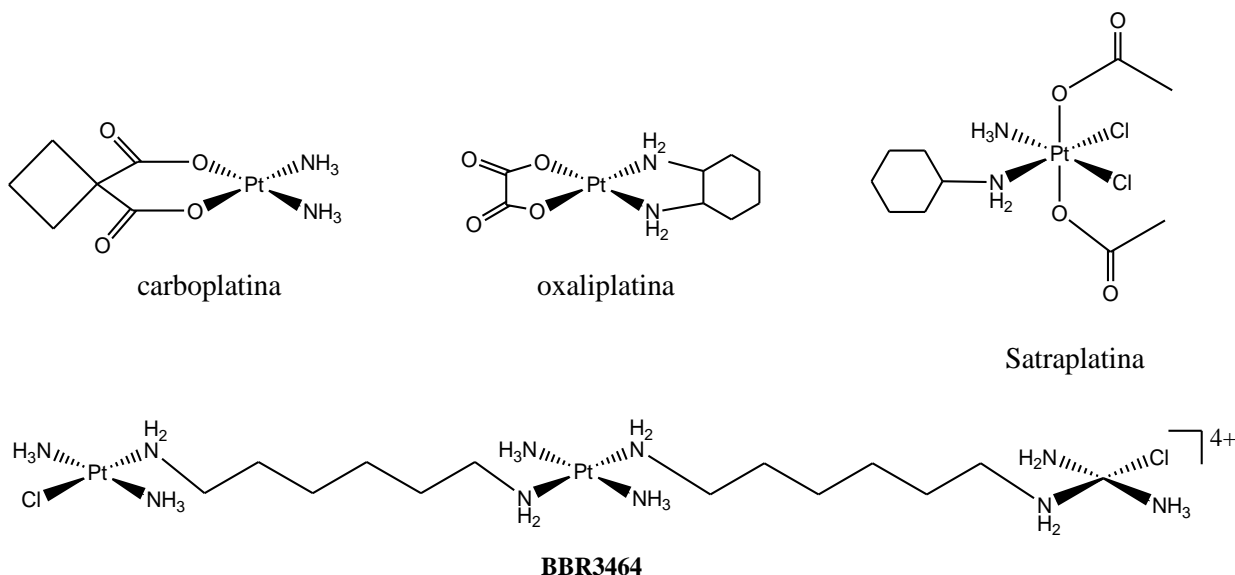


FIGURA 1.8 – Estrutura dos complexos carboplatina, oxaliplatina, satraplatina e BBR3464.

A satraplatina pode vir a ser o primeiro composto de platina a ser administrado por via oral, além de apresentar também atividade anticancerígena contra vários tipos de células resistentes a cisplatina tais como o câncer de pulmão, ovário, cólon de útero, próstata e efeitos colaterais mais moderados.

No decorrer do desenvolvimento de um fármaco vários fatores devem ser avaliados tais como: a estabilidade do composto durante o percurso até o alvo de interesse, sua absorção pelas células, seletividade frente às células tumorais, atividade alta em baixas concentrações de complexo e o mínimo de efeito colateral são alguns dos requisitos.

Os complexos de platina desenvolvidos até o momento mostraram grande potencial inibitório da proliferação das células tumorais com resultados bastante satisfatórios. Entretanto, a constante busca por compostos cada vez mais eficazes e menos tóxicos levaram ao desenvolvimento de complexos com

diferentes centros metálicos e consequentemente diferentes mecanismo de ação. Um exemplo desta nova classe são os complexos de rutênio.

1.4.4 - Complexos de rutênio (III)

Os complexos de rutênio podem ser uma alternativa promissora aos complexos de platina. A química do rutênio é bastante desenvolvida e a via de síntese, dependendo do ligante, pode ser bem simples. A geometria octaédrica e a possibilidade de coordenação de uma variedade de ligantes, com diferentes tipos de dureza e eletronegatividade, além do fácil acesso aos estados de oxidação em meio fisiológico e estabilidade cinética, fazem destes complexos alvos particularmente atraentes de estudo e desenvolvimento de fármacos.⁶

Um número expressivo de complexos de rutênio já foram sintetizados e testados em células tumorais, sendo que dois deles se destacaram e já se encontram na fase de ensaios clínicos: NAMI-A²⁹ e KP1019³⁰ (figura 1.9).

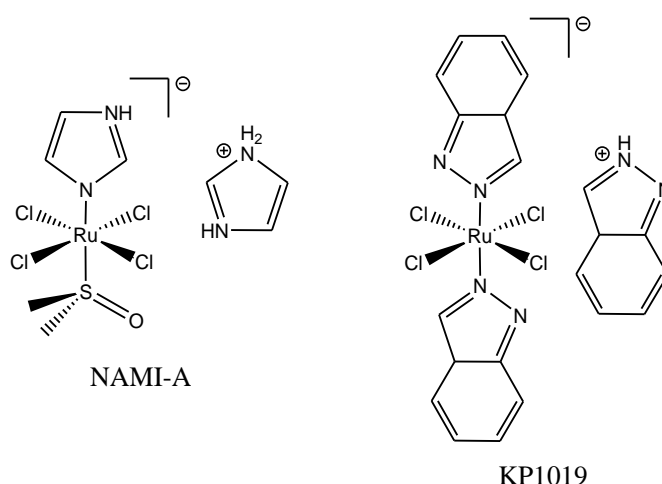


FIGURA 1.9 - Estrutura dos complexos de rutênio NAMI-A e KP1019.

O NAMI-A é seletivo às células em metástase enquanto o KP1019 atua apenas em tumores primários e apresenta excelente atividade às células tumorais de colorretal.³¹

O mecanismo de ação destes complexos ainda não estão totalmente elucidados. Sugere-se que a atividade do NAMI-A não está relacionada com sua ligação ao DNA, ao contrário da cisplatina. Interações do complexo com proteínas do tipo actina que estão na superfície da célula tem sido sugerido como possível mecanismo de ação^{32,33}.

O KP1019 é mais estável a aquação e hidrólise e mais facilmente absorvido pela célula que o NAMI-A. O complexo NAMI-A e KP1019 reagem rapidamente com redutores biológicos (glutaciona e/ou ascorbato) sugerindo que a redução de Ru(III) para Ru(II) seja necessário para ativar seu potencial terapêutico^{34,35,36}.

Outro mecanismo de ação sugerido para explicar a atividade e seletividade dos complexos de Ru(III) às células tumorais é a alta afinidade destes complexos a proteína transferrina. As células tumorais possuem maior quantidade de receptores de transferrina em sua membrana citoplasmática quando comparado a uma célula normal, este fato ocorre porque as células tumorais necessitam de grande quantidade de ferro e nutrientes para se reproduzirem e a afinidade alta dos complexos de rutênio a transferrina facilita o seu transporte em direção às células tumorais.³¹

Sugere-se que os complexos de Ru(III) atuam como pró-droga, sendo ativados após sofrerem redução no interior das células tumorais, por agentes redutores biológicos, tais como a glutaciona e citocromo c, formando a espécie mais ativa, Ru(II), que irá interagir com o DNA ou outra biomolécula.³⁵

A redução de Ru(III) para Ru(II) é favorecida no tecido tumoral em relação ao tecido sadio devido a baixa concentração de oxigênio (hipoxia) nas células tumorais e pH mais ácido provenientes da produção mais intensa de ácido láctico nestas células. O complexo de Ru(II) é mais passível a substituições que o complexo Ru(III), pois o orbital t_{2g} do metal está totalmente preenchido, e ligantes π -doadores que coordenavam fortemente ao complexo Ru(III), não são

mais capazes de coordenar firmemente ao Ru(II). Neste caso, os ligantes ácidos são labilizados rapidamente quando coordenados ao Ru(II), ($k = 1-10 \text{ s}^{-1}$).³⁷

O complexo de Ru(II) formado interage com as biomoléculas encontradas no interior das células tumorais inibindo as suas funções e conseqüentemente levando a morte celular. Os complexos NAMI-A e KP1019 apresentam maior seletividade as células tumorais e menor efeito colateral quando comparados aos complexos de platina, pois a espécie ativa (Ru(II)) é formada preferencialmente no interior das células tumorais. Na figura 1.10 está representada uma ilustração da ativação por redução.

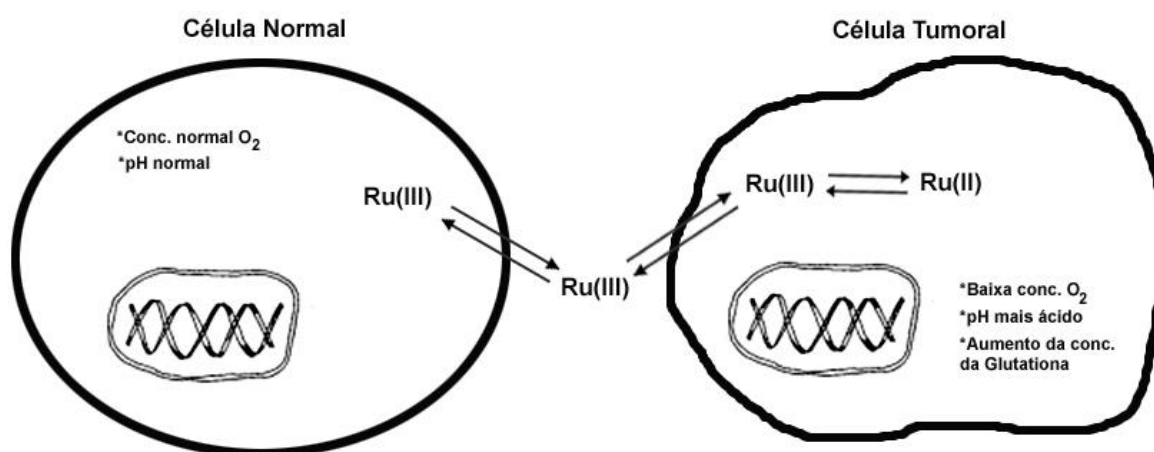


FIGURA 1.10 – Ilustração da redução do Ru(III) a Ru(II) nas células tumorais.

1.4.5 - Complexos de rutênio (II)

Outra classe de complexos que tem apresentado resultados antitumorais significativos são os complexos de rutênio (II). Dentro desta classe estão os complexos com ligantes heterocíclicos como o complexo *cis*-[Ru(azpy)₂Cl₂], com (azpy = 2-fenilazopiridina), que mostrou atividade antitumoral em diferentes linhagens celulares^{38,39}.

As possíveis razões para esta atividade anticancerígena são: reduzida taxa de aquação do ligante cloro devido ao efeito π receptor do ligante

imina aumentando a estabilidade da ligação Ru-Cl; aumento do caráter hidrofóbico do complexo facilitando interações com as proteínas do soro fisiológico que fazem o transporte do fármaco pelo corpo; e também interações com proteínas presentes na membrana celular que facilitam o transporte do fármaco para o interior da célula e efeitos estereoquímico dos ligantes que facilitam a interação com o DNA⁴⁰.

Os complexos organometálicos de rutênio (II) também foram alvos de estudos e sua atividade antitumoral verificada. Vários complexos do tipo RAPTA (contem um ligante areno, dois ligantes cloro lábeis e um ligante PTA (1,3,5-triaza-7-fosfatriciclo-[3.3.1.1] – decano) foram sintetizados e testados na linhagem celular A2870 (câncer de mama) e mostraram atividade na inibição da proliferação celular⁴¹.

Alguns desses complexos tiveram atividade semelhante à carboplatina, mas não foram tão ativos quanto à cisplatina. Entre os complexos organometálicos se destaca o RAPTA-C, que apesar de não ser muito citotóxico mostra certa seletividade as linhagens celulares A2780 e atividade nas células resistentes a cisplatina⁴².

Os complexos de Ru(II) com ligantes polipiridínicos têm sido amplamente utilizados em estudos biológicos em virtude de suas propriedades fotofísicas, fotoquímicas e eletroquímicas, e as capacidades diferenciadas de se ligarem ao DNA, bem como as suas estruturas modulares que facilitam a modulação destas propriedades.

O complexo $[\text{Ru}(\text{tmephen})(\text{terpy})\text{Cl}]$ onde tmephen= tetrametilfenantrolina se liga predominantemente as purinas do DNA inibindo o crescimento das células e o mecanismo parece estar relacionado a labilização do ligante cloro⁴³.

Todos os complexos citados até o momento foram planejados de forma a atuar da mesma maneira que a cisplatina, ou seja, atuarem como um pró-fármaco que ao serem ativadas pela dissociação de um ligante e/ou redução

do centro metálico levam a formação de uma espécie mais reativa que interage com o DNA de forma a levar a morte da célula. Ao contrario, complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}]$ onde $\text{bpy} = 2,2\text{-bipiridina}$ mostraram atividade inibitória em células de K562 (leucemina) e COLO205 (câncer de cólon) sem a dissociação dos ligantes⁴⁴ indicando que o mecanismo de ação destes complexos não é o mesmo observado para a cisplatina.

Neste contexto, a série de complexos de rutênio (II), contendo apenas ligantes bidentados na esfera de coordenação foram preparados com o objetivo de impedir a labilização dos ligantes e aumentar a atividade antitumoral.

Por exemplo, os complexos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ e o $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ (onde $\text{bpy} = \text{bipiridina}$, $\text{phen} = 1,10\text{-fenantrolina}$ e $\text{dppz} = \text{dipiridofenazina}$) são inertes em relação a substituição dos ligantes e apresentaram atividade antitumoral.⁴⁵

Devido à estrutura rígida dos ligantes bidentados estes complexos são luminescentes em meio aquoso, além de apresentarem interações não covalentes do tipo $\pi\text{-}\pi^*$ stacking com os anéis aromáticos das proteínas do soro e/ou DNA⁴⁵. A emissão destes complexos aumenta na presença de DNA e este fato permitiu investigar as interações do complexo frente ao DNA.

As propriedades luminescentes e interação com biomoléculas nos motivaram a propor complexos⁴⁶ com características semelhantes, mas com algumas modificações tais como: adição de dois ligantes imidazólicos no lugar de um ligante polipiridínico, a fim de melhorar a solubilidade dos complexos em meio fisiológico; e também adicionar prováveis interações de hidrogênio entre o ligante imidazol com as biomoléculas DNA e HSA.

Vale ressaltar que para um composto atuar como sonda molecular, a baixa citotoxicidade é um requisito necessário, no entanto, não é inconcebível que um complexo possa atuar como uma sonda e ao mesmo tempo possuir

algum efeito inibitório as células tumorais, se tornando uma multidroga. Este é um dos objetivos de nossos estudos.

1.5 – Interação com as biomoléculas

A proteína do plasma sanguíneo albumina humana (HSA) é alvo de muitos estudos, pois é a proteína mais abundante do plasma e a sua concentração no corpo humano é ao redor de $0,6\text{mmol.L}^{-1}$.

A HSA desempenha várias atividades no meio fisiológico incluindo a regulação da pressão osmótica, manutenção do pH e transporte de uma variedade de moléculas, dentre eles os fármacos.⁴⁷ A estrutura primária da HSA é constituída por uma única cadeia polimérica contendo 585 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 66,5 kD. Esta cadeia polimérica pode ser dividida em três grandes domínios (I, II e III) e subdividido em dois conjuntos de subdomínios (A e B) formando os seis grupos IA, IB, IIA, IIB, IIIA e IIIB. A estrutura secundária é constituída por α -hélice (67%), β -folhas (23%) e randômica (10%).⁴⁸ A estrutura secundária da proteína HSA está representada na figura 1.10.

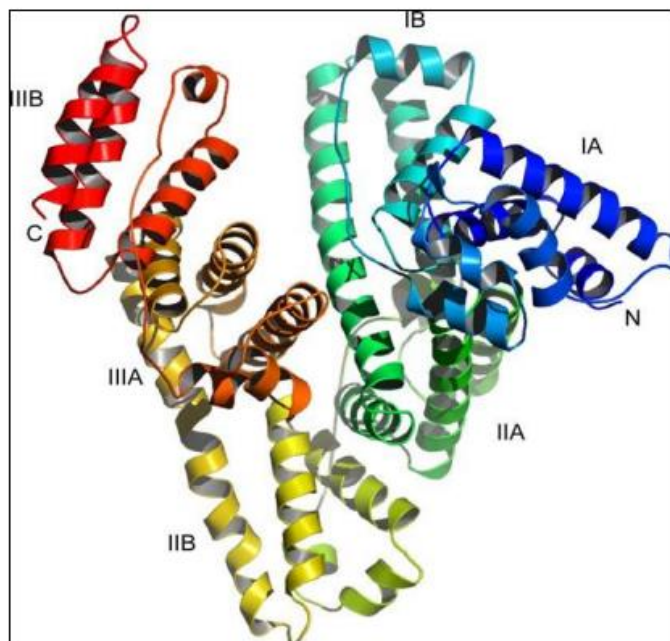


FIGURA 1.11 – Estrutura secundária da proteína HSA com a identificação dos subdomínios (PDB: 1H9Z).

Uma variedade ampla de fármacos interage com a proteína HSA de forma reversível em um ou mais sítios de ligação da proteína, com valores de constante de ligação que variam de 10^4 a 10^6 M^{-1} .⁴⁸ Geralmente existem um sítio ativo principal e outros adjacentes com valores de constantes de interação muito fracas.

Estudos de interação entre HSA e uma grande variedade de fármacos revelaram que a interação ocorre principalmente nos sítios I e II da proteína.^{49,50,51,52} O sítio I, localizado no subdomínio IIA, se liga preferencialmente a ânions heterocíclicos e/ou ácido dicarboxílico. Evidências mostram que o sítio I é grande e flexível podendo se ligar a ligantes grandes como a bilirrubina.^{53,54,55,56,57} O sítio II, localizado no subdomínio IIIA, se liga preferencialmente à ácidos carboxílicos aromáticos com carga negativa. O sítio II aparenta ser menor e menos flexível que o sítio I.⁴⁸

A força da interação HSA-composto pode influenciar na estabilidade, toxicidade, distribuição e eliminação dos complexos. Por exemplo, se o complexo tiver alta afinidade com a HSA, pode ser que este não alcance o alvo de interesse, ao contrário, se a afinidade for muito fraca, o complexo pode ser eliminado muito rapidamente do corpo não atuando de maneira eficiente.

Hoje em dia existem uma grande variedade de técnicas tais como ITC, STD-RMN, DOSY-RMN, dicroísmo circular, luminescência, entre outras que são utilizadas para estudar a interação entre os fármacos com a proteína HSA e também outras biomoléculas.

1.6 – Planejamento dos complexos

No processo de desenvolvimento de um fármaco, se busca compostos não apenas com atividade terapêutica ao alvo de interesse, mas também compostos que apresentem propriedades físico-químicas adequadas a fim de termos boas chances de sucesso nos ensaios *in-vivo* e testes clínicos.

Muitos compostos farmacologicamente ativos têm seus estudos interrompidos por causa da baixa biodisponibilidade, baixo tempo de retenção, entre outros problemas que surgem durante seu desenvolvimento sendo que muitas vezes estes problemas estão relacionados às características físico-químicas impróprias. Os parâmetros de solubilidade, lipofilicidade e estabilidade estão entre as propriedades físico-químicas mais importantes a serem analisadas.

Ao optar por trabalhar com complexos de rutênio (II) foi observado que este centro metálico permite a coordenação de até seis ligantes monodentados. A escolha dos ligantes deve ser feita de forma que o complexo apresente certas características como solubilidade em água para uma melhor absorção e distribuição pelo organismo e lipofilicidade adequada para que o transporte para o interior da célula seja facilitado.

Na busca por estas características para os complexos selecionados, foram escolhidos pela coordenação dos seguintes ligantes: fenantrolina, bipyridina, imidazol e 1-metilimidazol (figura 4.1). O propósito da coordenação dos ligantes bidentados fenantrolina e bipyridina é trazer estabilidade e rigidez aos complexos e fornecer a lipofilicidade necessária para uma rápida absorção pela célula.

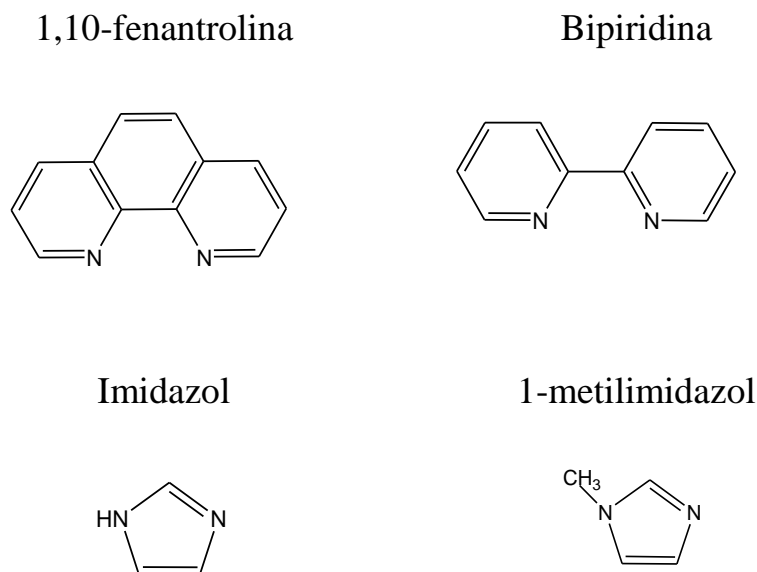


FIGURA 1.12 - Estrutura dos ligantes estudados neste trabalho.

Outra característica importante destes ligantes quando coordenados ao rutênio é levar a absorção e emissão dos complexos para a região do visível. Estas características serão importantes quando se deseja estudar as propriedades fotofísicas dos complexos e sua aplicação como sonda molecular. Além disso, estes ligantes aromáticos fornecem interações do tipo π - π stack com as biomoléculas do organismo.

O propósito da coordenação dos ligantes imidazólicos ao centro metálico de rutênio é o fato de eles fazerem parte da constituição do aminoácido histidina, um importante componente das proteínas básicas e por ser encontrada na maioria dos sítios ativos de enzimas interagindo com os substratos. Além disso, vários compostos que possuem o imidazol na sua constituição apresentaram atividade em vários tipos de alvos como antitumorais, antivirais, antiHIV, antiprotozoários, antimicobacteriana, anti-inflamatórios, analgésicos, entre outros.⁵⁸

Outro interesse em coordenar o imidazol foi de trazer uma parte com caráter mais hidrofílico aos complexos com a finalidade de aumentar a solubilidade deles e proporcionar interações do tipo ligação de hidrogênio com os alvos biológicos.

2 - Objetivos

2.1 - Geral

Desenvolvimento de complexos solúveis, estáveis e luminescentes com atividade inibitória às células tumorais.

2.2 - Específicos

- Sintetizar e caracterizar os complexos $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{ImH})_2]^{2+}$, $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(1\text{MeIm})_2]^{2+}$, $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{ImH})_2]^{2+}$ e $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(1\text{-MeIm})_2]^{2+}$ onde phen = 1,10 fenantrolina, bpy = bipyridina, imH = imidazol e 1Meim = 1-metilimidazol.
- Investigar a solubilidade e estabilidade termodinâmica dos complexos em solução aquosa.
- Estudar a interação do complexo RuphenImH com a proteína albumina humana pelas técnicas de ITC, STD-RMN, DOSY-RMN e dicroísmo circular.
- Estudar a interação do complexo RuphenImH com CT-DNA pela técnica de fluorescência.
- Através de ensaios de MTT, obter os valores de IC_{50} para as células A2780, HCT116p53^{+/+} e HCT116p53^{-/-}.
- Avaliar, através da técnica de microscopia confocal, a localização do complexo no interior da célula HCT116p53^{+/+}.
- Verificar o mecanismo de ação do complexo RuphenImH frente as células HCT116p53^{+/+} e HCT116p53^{-/-} utilizando as técnicas de Western Blot, citometria de fluxo e ensaio de proliferação celular.

3 - Procedimento Experimental

3.1 – Reagentes

$\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, cloreto de lítio (LiCl), 1,10'-fenantrolina (phen), bipyridina (bpy), imidazol (ImH), 1metilimidazol (1MeIm), hexafluorofosfato de amônio (NH_4PF_6) e cloreto de tetrabutylamônio todos de procedência Aldrich, foram utilizados como reagentes nas síntese do precursor e dos complexos.

O cloreto de potássio (KCl) e perclorato de tetrabutylamônio (PTBA) de procedência Fluka foram utilizados como eletrólito de suporte no experimento de voltametria cíclica. Ácido fosfórico (H_3PO_4), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) e fosfato de potássio tribásico (K_3PO_4), todos de procedência Aldrich, foram utilizados no preparo das soluções tampão. Albumina sérica humana (HSA) e CT-DNA provenientes da Aldrich foram utilizadas nos experimentos de interação com os complexos. Todos os solventes usados tinham grau de pureza HPLC e as soluções aquosas foram preparadas com água Milli-Q.

3.2 – Síntese

Todas as sínteses foram realizadas sobre atmosfera inerte de nitrogênio na ausência de luz, agitação e refluxo constante. As sínteses foram feitas em um balão de fundo redondo de três bocas com capacidade de 50mL.

3.2.1 - Preparação do precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂]

A síntese do precursor foi preparado a partir de 100mg (0,38 mmol) de $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 137mg (0.76 mmol) de fenantrolina e 110mg (2,6 mmol) de cloreto de lítio dissolvidos em 10mL de dimetilformamida (DMF) previamente desaerado sob agitação contínua. O sistema permaneceu sob refluxo por oito horas sob atmosfera de nitrogênio, agitação constante e ausência total de luz.

Após este período deixou-se resfriar o sistema e adicionou 150 ml

de acetona previamente destilada e resfriada em banho de gelo. A mistura restante foi mantida sob refrigeração por uma noite para a completa precipitação do complexo.

O complexo foi isolado por filtração a vácuo, lavado com água destilada suficiente para o filtrado ficar incolor e adicionou 0,5 mL de éter. O complexo de coloração roxa foi seco a vácuo e o rendimento foi de 58%. A caracterização do precursor foi feita por UV-Vis e voltametria cíclica.

3.2.2 - Síntese do precursor *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂]

O precursor foi preparado a partir de 100mg (0,38 mmol) de RuCl₃.3H₂O, 120mg (0,76 mmol) de biperidina e 110mg (2,6 mmol) de cloreto de lítio dissolvidos em 10mL de dimetilformamida (DMF) previamente desaerado sob agitação contínua. O sistema permaneceu sob refluxo por oito horas sob atmosfera de nitrogênio, agitação constante e ausência total de luz.

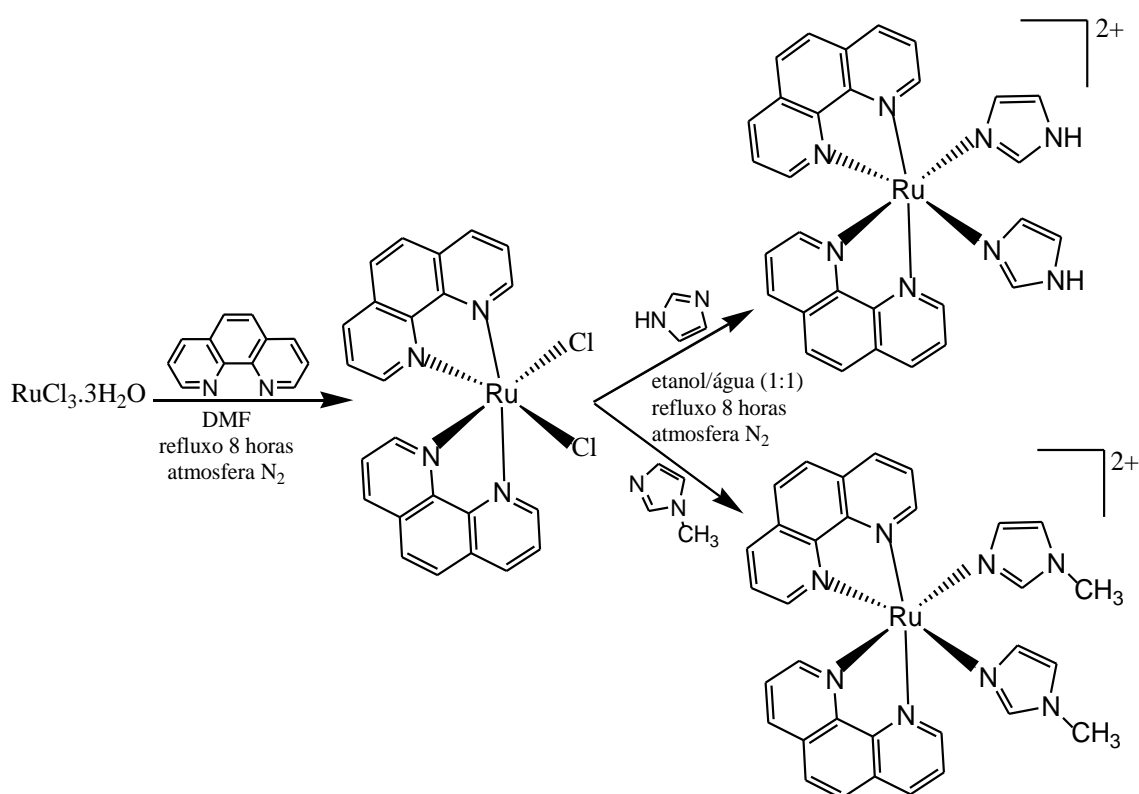
Após este período deixou esfriar o sistema e adicionou 150 ml de acetona previamente destilada e resfriada em banho de gelo. A mistura restante foi mantida sob refrigeração por uma noite para a completa precipitação do complexo. O complexo foi isolado por filtração a vácuo, lavado com água destilada suficiente para o filtrado ficar incolor e adicionou 0,5 mL de éter. O complexo de coloração roxa foi seco a vácuo e o rendimento foi de 65%. A caracterização do precursor foi feita por UV-Vis e voltametria cíclica.

3.2.3 - Síntese dos complexos *cis*-[Ru(phen)₂(ImH)₂]Cl₂ e *cis*-[Ru(phen)₂(1MeImH)₂]Cl₂

Os complexos foram preparado a partir de 100mg (0,187 mmol) do precursor *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂] e 25,6mg (0,375 mmol) de imidazol dissolvidos em 10mL de uma solução etanol/água (1:1) previamente desaerados e sob agitação contínua.

O sistema permaneceu refluxando por oito horas sob atmosfera de nitrogênio puro, agitação e ausência de luz. Após este período deixou resfriar o sistema e adicionou 61,1mg (0,375 mmol) do contra íon hexafluorfosfato de amônio (NH_4PF_6). A mistura restante foi mantida sob refrigeração por uma noite para a completa precipitação do complexo.

O complexo foi isolado por filtração a vácuo e lavado com água e etanol, todos previamente resfriados num banho de gelo. O complexo vermelho foi seco a vácuo e pesado. O rendimento da síntese foi de 79,56% para o complexo RuphenImH e 69,44% para o complexo Ruphen1MeImH. O esquema 3.1 apresenta a via de síntese para obtenção do complexo RuphenImH e Ruphen1MeImH.



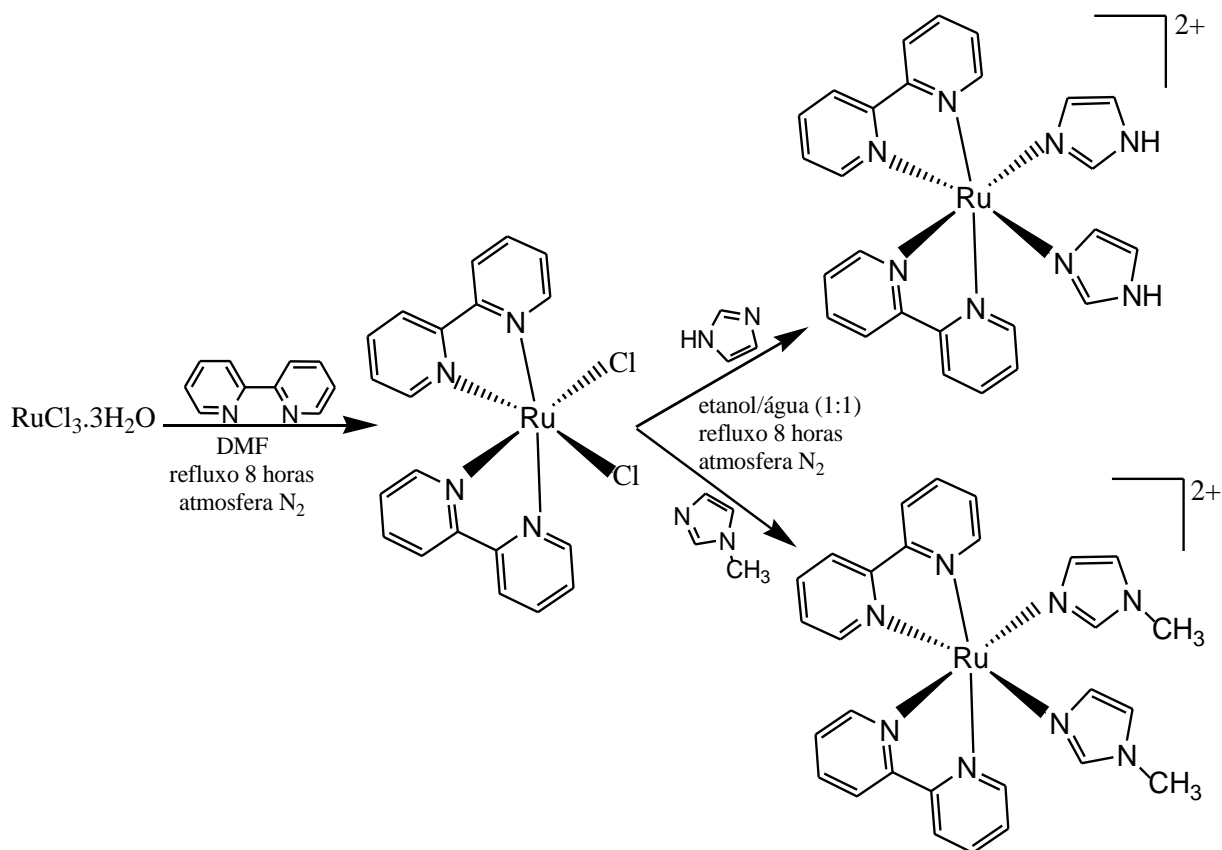
ESQUEMA 3.1 - Via de síntese para o complexo RuphenImH e Ruphen1MeImH.

3.2.4 - Síntese dos complexos *cis*-[Ru(bpy)₂(ImH)₂]Cl₂ e *cis*-[Ru(bpy)₂(1MeIm)₂]Cl₂

Os complexos foram preparados a partir de 100mg (0,206 mmol) do precursor *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂] e 28,04mg (0,412 mmol) de imidazol dissolvidos em 10mL de uma solução etanol/água (1:1) previamente desaerados e sob agitação contínua.

O sistema permaneceu refluxando por oito horas sob atmosfera de nitrogênio puro, agitação e ausência de luz. Após este período deixou resfriar o sistema e adicionou 67,15mg (0,412 mmol) do contra íon hexafluorofosfato de amônio (NH₄PF₆). A mistura restante foi mantida sob refrigeração por uma noite para a completa precipitação do complexo.

O complexo foi isolado por filtração a vácuo e lavado com água e etanol, todos previamente resfriados num banho de gelo. O complexo vermelho foi seco a vácuo e pesado. O rendimento da síntese foi de 70% para o complexo RuBpyImH e 65% para o complexo RuBpy1MeImH. O esquema 3.2 apresenta a via de síntese para obtenção do complexo RuBpyImH e RuBpy1MeImH.



ESQUEMA 3.2 - Via de síntese para o complexo RuBpyImH e RuBpy1MeImH.

Com a finalidade de melhorar a solubilidades dos complexos em soluções aquosas foi feita a troca do contra íon PF_6 por cloreto. Solubilizamos uma quantidade de complexo em um pequeno volume de acetona, suficiente apenas para solubilizar todo o composto, e depois foi-se adicionando o cloreto tetrabutylamônio até observarmos a precipitação do complexo.

O complexo precipitado foi filtrado e lavado com o solvente acetato de etila para retirar o cloreto tetrabutylamônio que estava em excesso. A troca do contra íon deixou a solubilidade do complexo em água ao redor de 6mg/mL , aproximadamente 12 vezes mais que a solubilidade do complexo com o contra-íon PF_6 .

3.3 - Equipamentos e Metodologias

3.3.1 - Análise Elementar

Para a determinação da porcentagem (%) de carbono, nitrogênio e hidrogênio foi utilizado um analisador de C, H e N modelo EA 1108 da FISOONS, na central analítica do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

3.3.2 - Eletroquímica

As medidas eletroquímicas em solvente orgânico foram realizadas no Potenciostato/galvonostato μ AUTOLAB modelo type III, utilizando célula eletroquímica de vidro, com capacidade para 10 mL e três eletrodos: um eletrodo de referência Ag/AgCl em solução $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de PTBA no solvente adequado mantido no interior de um capilar de Luggin-Haber; e os eletrodos de trabalho e auxiliar constituídos de tarugos de platina (Pt) de 1 mm e 4 mm.

As medidas eletroquímicas em solvente aquoso foram realizados em um potenciostato (modelo μ Stat 400, DropSens) no eletrodo DS-110. Foi utilizado uma solução de KCl ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) como eletrólito de suporte. A concentração dos complexos foram de $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

As medidas de espectroeletroquímicas foram realizadas em cela eletrolítica de quartzo de 2 mm de espessura usando o μ AUTOLAB e solvente DMF com $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de PTBA como eletrólito de suporte. Esta cela é composta de redes de platina como eletrodos de trabalho e auxiliar e um fio de Ag/AgCl como eletrodo de referência. O eletrodo auxiliar foi separado dos outros dois eletrodos por um compartimento de vidro.

3.3.3 - Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis

Os espectros de absorção eletrônica foram obtidos na região do UV-Vis utilizando-se um espectrofotômetro de feixe simples UV-Vis-HP KAIKAK

XA (HP Hewlett Packard 8453). Utilizou-se celas de quartzo de 10 mm e 4 mL de capacidade.

3.3.4 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H foram obtidos em um espectrômetro BRUKER modelo AVANCE III 400 MHz pertencente ao laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

3.3.5 - Luminescência

Os espectros de emissão e de excitação a vários comprimentos de onda foram obtidos utilizando-se um espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301 PC (lâmpada de alta pressão de xenônio de 150W e um fotomultiplicador do tipo R928).

3.3.6 - Tempo de vida de emissão

Os experimentos foram realizados no laboratório do grupo de Fotobiofísica da FFCLRP – USP. A fonte de excitação é um laser pulsado *Tsunami 3950 (Spectra Physics)* de titânio-safira (Ti:sapphire) bombeado por laser de estado sólido *Millenia Xs (Spectra Physics)*, de Nd:YVO_4 , que tem saída com potência máxima de 10W no comprimento de onda 350nm. O método de contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (TCSPC) foi usado para determinar o tempo de vida de emissão. O software F900 foi utilizado para ajuste dos dados experimentais de decaimento a funções multiexponenciais, baseado no método de ajustes de funções não lineares por mínimos quadrados. A qualidade do ajuste realizado pelo software foi avaliado pelo parâmetro estatístico χ^2 (chi-square).

3.3.7 - Cálculos computacionais

A estrutura da geometria otimizada foi obtida utilizando o software Gaussian 09⁵⁹, empregando o método teórico de densidade funcional (DFT) e a base funcional B3LYP⁶⁰ com um conjunto de base LanL2DZ.^{61, 62, 63} O solvente acetonitrila foi incluído utilizando o modelo de polarização contínua (PCM).^{64, 65} As estruturas otimizadas foram utilizadas para obter o espectro de absorção teórico.

3.3.8 - Avaliação da estabilidade dos complexos

A estabilidade dos complexos em solução aquosa foi investigada por RMN ¹H na presença e ausência de luz. O tampão fosfato foi preparado em D₂O na concentração de 0,1 molL⁻¹. Os complexos foram solubilizados em tampão na concentração de 5 mgmL⁻¹ e as medidas feitas nos intervalos de tempo de 0 a 72 horas. As soluções foram preparadas e medidas na ausência de luz.

A mesma amostra foi deixada por 24 horas exposta a luz ambiente e depois foi feito um espectro de RMN de ¹H. Os estudos de estabilidade também foram feitos em diferentes valores de pH na ausência de luz acompanhado por RMN de ¹H.

3.3.9 - Estudos de interação DNA-complexo

3.3.9.1 - Preparação do DNA

O CT-DNA (Calf-thymus) foi dialisado em água Mili-Q por 48 horas antes de ser utilizado nos experimentos de interação. A concentração do DNA foi determinada por UV-Vis, usando o coeficiente de extinção molar em 260 nm no valor de 6600 mol⁻¹Lcm⁻¹.

3.3.9.2 - Interação avaliada pela técnica luminescência

Uma solução de complexo foi preparada na concentração de $1\mu\text{molL}^{-1}$ em tampão fosfato ($0,1\text{molL}^{-1}$) pH 7,4. Alíquotas desta solução foram distribuídas em frascos de 2 mL e adicionado diferentes concentrações de CT-DNA (0 a $10\mu\text{molL}^{-1}$), de forma que não altere a concentração de complexo na solução final. O complexo foi incubado com o DNA por uma hora a temperatura ambiente. Após a incubação foi feito as medidas de emissão com o $\lambda_{\text{exc}} = 490\text{nm}$ e $\lambda_{\text{exc}} = 660\text{nm}$. Os espectros foram tratados e analisados.

3.3.10 - Estudos de interação HSA-Complexo

Várias técnicas são usadas nos estudo de interação com o HSA, neste trabalho foram escolhidas as técnicas de calorimetria por dicroísmo circular (CD), calorimetria de Titulação isotérmica (ITC), diferença de transferência de saturação (STD-NMR) e espectroscopia de difusão ordenada (DOSY-NMR).

O CD avalia a conformação da estrutura secundária das proteínas. Quando a conformação da proteína sofre mudanças na presença de um ligante, podemos inferir que a interação proteína-ligante modificou a estrutura secundária da proteína, se a mudança for acentuada pode desativar as funções da proteína ou desnaturá-la. Quando não há variação na banda de CD não é sinônimo de que o ligante não está interagindo com a proteína apenas informa que o ele não alterou a sua estrutura secundária.

O ITC é uma técnica ultrasensível e de alta precisão que fornece os valores da constante de afinidade, número de sítios de ligação e os parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS e ΔG) de uma ampla variedade de interações⁶⁶. Antes da utilização do ITC, a maioria dos equipamentos usados na medida de interação composto-proteínas eram limitados a medir os valores termodinâmicos de forma indireta através da aplicação da fórmula de van't Hoff.⁶⁶ Os experimentos com

ITC tem permitido uma caracterização termodinâmica de forma direta, logo mais precisa, além de determinar todos os parâmetros em apenas um único experimento.

Outra técnica utilizada foi o STD. Esta técnica foi proposta por Mayer e Meyer em 2001⁶⁷ e fornece informações que o ITC não fornece como a determinação de quais átomos do complexo estão interagindo com a proteína.

Este experimento é feito a partir da aplicação de um trem de pulso específico na frequência dos núcleos da proteína (geralmente na região de -1ppm devido à ausência de sinais do complexo). Esta saturação é propagada através dos hidrogênios da proteína até ser transferida aos hidrogênios do complexo. Os hidrogênios do complexo que estiverem mais próximos da proteína irão “sentir” com mais intensidade esta radiação.

A partir deste experimento é gerado um espectro de RMN-STD no qual os sinais de hidrogênio do complexo mais intenso são correspondentes aos hidrogênios que estão em contato com a proteína e/ou próximos. Hidrogênios que interagem fracamente ou não interagem terão sinais pouco intensos ou nulos no espectro de STD. Desta forma é possível inferir o tipo de interação e o sítio de ligação do complexo. Na figura 3.1 está a ilustração do experimento de STD.

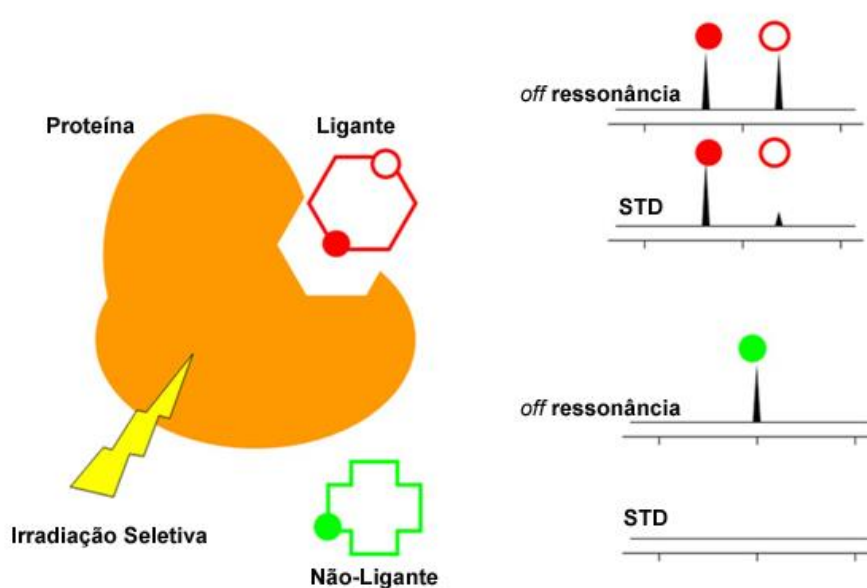


FIGURA 3.1 - Ilustração de um experimento de STD-NMR.

A técnica DOSY-NMR determina a difusão das moléculas no meio reacional. O coeficiente de difusão (D) de uma molécula vai depender do seu peso, tamanho e forma. Esta técnica pode ser usada em estudos de interações em virtude de sua habilidade em identificar simultaneamente o coeficiente de difusão de cada componente de uma mistura, seja de moléculas pequenas, macromoléculas, complexos ou agregados moleculares.⁶⁸

3.3.10.1 - Preparação do HSA

O HSA foi dissolvido em tampão fosfato pH 7,4 ($0,1\text{molL}^{-1}$). A concentração da solução de HSA foi preparada usando o valor do peso molecular de $66.500\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

3.3.10.2 - Interação avaliada pela técnica de ITC

Os experimentos de ITC foram feitos no seguinte equipamento (VP-ITC, MicroCal). Na cela reacional foi adicionado 1,43mL de solução de HSA na concentração ao redor de $30\ \mu\text{molL}^{-1}$ e na seringa foi adicionado a solução de complexo na concentração ao redor de $600\ \mu\text{molL}^{-1}$. O HSA e o complexo devem ser preparados no mesmo tampão e no mesmo valor de pH. O meio reacional foi equilibrado a uma temperatura de $37\ ^\circ\text{C}$ e logo após foi iniciado a titulação. Foram adicionados 30 injeções de $8\ \mu\text{L}$ de complexo no intervalo de tempo de 180s. Os dados obtidos foram analisados pelo programa Origin (versão 7, OriginLab).

3.3.10.3 - Interação avaliada pela técnica de STD-RMN

O complexo e o HSA foram solubilizados em uma solução de tampão fosfato pH 7,4 ($2,03\ \text{mmolL}^{-1}\ \text{Na}_2\text{HPO}_4$ e $0,437\ \text{mmolL}^{-1}\ \text{NaH}_2\text{PO}_4$) com 99% de D_2O nas concentrações de $1\times 10^{-3}\ \text{molL}^{-1}$ e $9\times 10^{-6}\ \text{molL}^{-1}$ respectivamente. Os

espectros on e off-ressonance foram gerados após 256 varreduras com o tempo de recuperação de 4s e aquisição do sinal de 64K pontos. A aquisição em ressonância e fora de ressonância foram obtidos através da irradiação em -1ppm e 30ppm respectivamente. Foi aplicado um trem de pulso de 2000 Guassian, 1 ms cada, com 4 μ s de atraso entre os pulsos com saturação total de 2 s. A fórmula abaixo foi aplicada a fim de encontrar as porcentagens relativas para os sinais do espectro de STD.

$$A_{STD} = \frac{I_{STD}}{I_0} \times \frac{[L]_T}{[P]}$$

Onde $[L]_T$ é a concentração total de complex, $[P]$ é a concentração de proteína, I_{STD} é a intensidade do pico do espectro de STD NMR e I_0 é a intensidade dos picos de ^1H no espectro off-ressonance.

3.3.10.4 - Interação avaliada pela técnica de DOSY-RMN

O experimento de gradiente de campo pulsado com detecção de eco estimulado foi usado com um pulso de gradiente de 1,3ms (delta pequeno) em um tempo de difusão de 60ms (delta grande).

A aquisição do sinal foi feita com 32k pontos em uma janela de 7.211,54Hz, resultando em um tempo de 1,8s. Foram coletados 16 pontos para a construção das curvas, em que a intensidade do gradiente foi variada de 2 a 98%. Cada um dos pontos foi adquirido com 16 varreduras, separadas por um tempo de espera de 2s.

Na preparação das amostras, o complexo e a proteína foram solubilizados em tampão fosfato pH 7,4 (2,03 mmolL⁻¹ Na₂HPO₄ e 0,437 mmolL⁻¹ NaH₂PO₄) com 99% de D₂O e a concentração de proteína foi de 5x10⁻⁴ molL⁻¹ e a concentração de complexo foi de 2,5x10⁻³ molL⁻¹.

3.3.10.5 – Interação avaliada pela técnica de Dicroísmo circular

Para os experimentos de dicroísmo circular foram preparadas soluções de complexo nas concentrações de $3\mu\text{molL}^{-1}$ e $25\mu\text{molL}^{-1}$ em tampão tris/HCl 50mmolL^{-1} pH 7,4 e soluções da proteína albumina humana na concentração de $3\mu\text{molL}^{-1}$ em tampão tris/HCl.

Os complexos foram incubados com as proteínas por 24 horas e depois feitas as medidas no CD. As medidas foram feitas no equipamento JASCO J-815 CD Spectrometer utilizando uma cubeta de quartzo de 0,1cm de caminho óptico a uma temperatura de 37°C . Os espectros foram obtidos com a acumulação de 16 scans no intervalo de comprimento de onda 198-250nm.

3.3.11 - Ensaios com células

Os ensaios com células foram feitos na Virginia Commonwealth University (VCU) no Instituto Massey Cancer Center (MCC) sob a orientação do Professor Nicholas Farrell.

3.3.11.1 - Linhagem celular

As linhagens celulares HCT116p53^{+/+}, HCT116p53^{-/-} e A2780 foram cultivadas no meio de RPMI 1640 (Invitrogen), enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/streptomicina (Invitrogen). As células foram mantidas a 37°C sob tensão de 5% de CO_2 .

3.3.11.2 - Ensaio de viabilidade celular por redução por MTT

O estudo de viabilidade celular foi avaliado pelo ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), que se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem metabolicamente o sal de MTT, por meio da enzima mitocondrial desidrogenase

succínia, em cristais de formazan de cor azul-purpura que se acumulam no citoplasma celular. Quanto maior a inibição da viabilidade celular pelos complexos menor a intensidade da cor azul-purpura. A leitura colorimétrica é feita em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 595nm. O tempo de incubação dos complexos nas células foi de 72 horas e o intervalo de concentração foi de $200 \mu\text{molL}^{-1}$ a $0,0002 \mu\text{molL}^{-1}$.

Neste tipo de investigação procura-se obter um valor baixo de IC_{50} (concentração de complexo capaz de inibir 50% da viabilidade celular), pois este valor implica em citotoxicidade ou antiproliferação a baixas concentrações da droga.

As células foram cultivadas no meio de RPMI 1640, em placas de 96 poços a 5×10^4 células/poço por 24 horas. O meio foi removido e $100 \mu\text{L}$ do complexo foi adicionada em cada poço nas concentrações de [$200 \mu\text{molL}^{-1}$ – $0,0002 \mu\text{molL}^{-1}$] em quadruplicata por 72 horas. O meio foi substituído por $100 \mu\text{L}$ de solução de MTT e incubado por 3 horas a 37°C .

Após o tempo de incubação, a solução de MTT foi removida e $100 \mu\text{L}$ de DMSO foi adicionada para a solubilização dos cristais de formazan produzidos. A quantificação do crescimento celular das células tratadas com o complexo e do controle foram feitos através da medida da absorbância do sal de formazan no comprimento de onda de 595nm. Os valores de IC_{50} foram determinados a partir da comparação dos valores da absorbância das células tratadas com o controle.

3.3.11.3 - Citometria de fluxo

As células HCT116p53^{+/+} e HCT116p53^{-/-} foram tratadas com o complexo nos tempos de incubação de 24 e 48 horas. 1×10^6 células são suspensas em 1mL de uma solução de iodeto de propídio ($3,8 \text{mmolL}^{-1}$ citrato de sódio; $0,05 \text{mgmL}^{-1}$ iodeto de propídio; 0,1% Triton X-100) com $10 \mu\text{L}$ de RNase B (7000 unidade/mL).

As soluções foram deixadas no escuro a 4⁰C até o momento da leitura no equipamento de citometria de fluxo. As células foram analisadas pelo CoulterElite XL-MCL (Beckman Coulter).

3.3.11.4 - Imunodeteccção de proteína por Western Blott

Depois do tratamento das células HCT116p53^{+/+} e HCT116p53^{-/-} com o complexo nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas, ambas as células aderentes a placa como as células que estão flutuando no meio forão recolhidas.

Após a centrifugação, o meio é removido e as células são lavadas com PBS gelado, centrifugado e removido o meio novamente. As células são resuspendidas com o tampão SDS (62,5mM tris-HCl, pH 7,5, 5% glicerol, 4% SDS, 4% inibidor protease (Roche), 5% BME). Depois da total homogeneização, a proteína foi quantificada e separadas em gel de poliacrilamida contendo SDS. Em seguida as proteínas nos geis são transferidas eletroforicamente para a membrana de PVDF segundo o método descrito por Towbin.

As membranas contendo proteínas do gel foram incubadas por duas horas em solução TBS-T (Salina Tamponada de Tris pH 7,4 mais 0,1% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado para bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação de anticorpos. Em seguida, as membranas são incubadas, overnight, com o anticorpo primário na diluição de 1:1000 seguido da incubação do anticorpo secundário anti-rabbit ou anti-mouse conjugado com à enzima horseradish peroxidase (Cell Signaling, Thermo Scientific) na diluição de 1:5000.

A imunodeteccção do complexo ternário formado entre o antígeno, anticorpo primário e anticorpo secundário é realizada por quimiluminescência onde as bandas são vizualizadas por filmes de raio-X.

3.3.11.5 - Microscopia Confocal

5×10^4 células HCT116p53^{+/+} foram cultivadas no meio de RPMI 1640, em placas com 8 slides por 24 horas. As células foram incubadas com o complexo na concentração de 20 μM no volume de 500 μL por 24 horas.

Após o tratamento com o complexo, os slides são lavados 3 vezes com PBS gelado e adiciona-se uma solução de paraformaldeído 3%. A solução de paraformaldeído é removida e as células são novamente lavadas 3 vezes com PBS gelado seguida da secagem da placa. Posteriormente a secagem da placa, é adicionado 7 μL de Vectashield contendo o marcador de DNA (Vector labs). A fluorescência foi observada através do microscópio confocal (Zeiss LSM 510).

3.3.11.6 - Estudo da inibição da proliferação celular

5×10^4 células são cultivadas no meio de RPMI 1640, em placas com 6 slides por 24 horas. As células foram incubadas com o complexo na concentração de 20 μmolL^{-1} no volume de 5 mL nos tempos de 30, 50 e 70 horas. Após o tempo de incubação as células foram removidas com tripsina e contadas. O número de células por mL nos ensaios com o complexo foi comparado com o número de células do controle nos três diferentes tempos.

4 - Resultados e Discussão

4.1 – A estrutura dos complexos

A geometria, ângulos e distância de ligação dos complexos foram obtidas por cálculos computacionais a partir de suas geometrias otimizadas aplicando a metodologia do funcional de densidade, DFT. Na figura 4.2 estão apresentados às estruturas otimizadas e na tabela A1, A2, A3, A4 no anexo estão os valores dos principais ângulos e comprimentos de ligação.

Os complexos possuem uma configuração *cis* e geometria octaédrica distorcida. O grau de distorção pode ser percebido pelo ângulo (N-imidazol(46)Ru(1)N-phen(2)) (posição trans) de 176,38° para o complexo RuphenImH.

O mesmo ocorre para os outros complexos estudados. Comparado os complexos RuphenImH, e RubpyImH foi observado que a distância de ligação Ru-phen (2,09 Å e 2,10 Å) é similar a distância Ru-bpy (2,08 e 2,09). Foi observado ainda, o ligante imidazol está quase perpendicular ao ligante fenantrolina como indicado pelo ângulo diedral de 86,65° (figura 4.3).

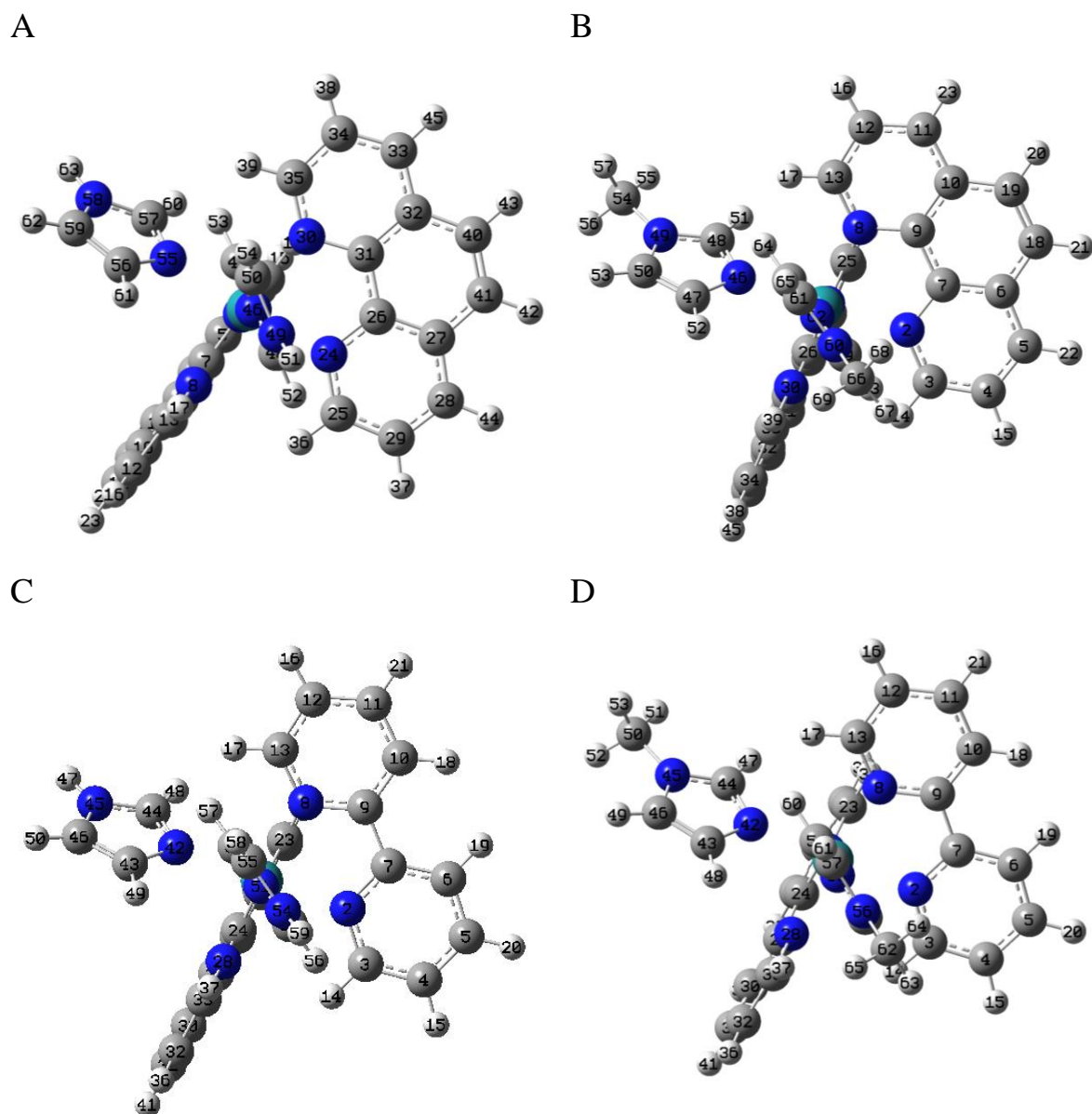


FIGURA 4.1 - Estruturas otimizadas dos complexos e numerações utilizadas na tabela A1, A2, A3 e A4 do anexo A) RuphenImH, B)Ruphen1MeImH, C) RubpyImH e D) Rubpy1MeIm.

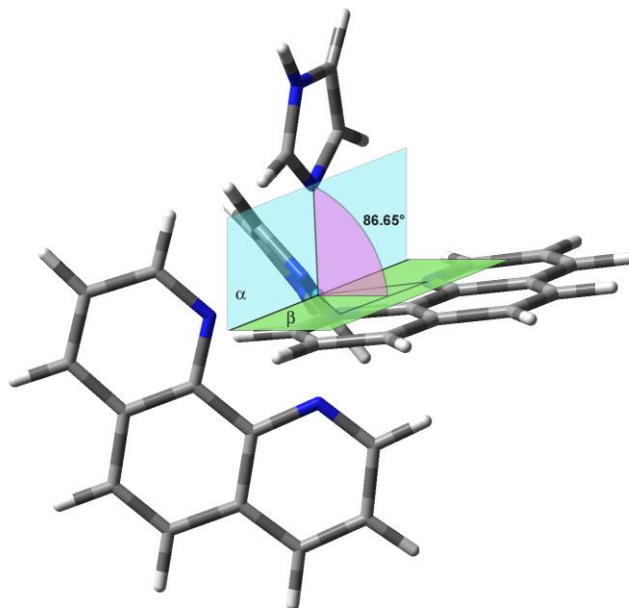


FIGURA 4.2 - Ângulo diedral entre Imidazol-Ru-phen-phen.

Uma maneira de avaliar a confiabilidade dos resultados computacionais teóricos, quando não estão disponíveis as estruturas de Raio-X, é gerar os espectros de UV-Vis teórico a partir das estruturas otimizadas e comparar com os espectros de UV-Vis experimental. Na figura 4.4 estão apresentados os espectros de absorção experimental e teórico sobrepostos para os quatro complexos estudados nesta tese no solvente acetonitrila. Foi verificado que há grande semelhança entre os espectros teórico/experimental para todos os quatro complexos.

Além de verificar a confiabilidade dos dados teóricos a partir dos espectros de UV-Vis foi feita as atribuições das bandas de UV-Vis (tabela 4.1) a partir das transições eletrônicas do espectro de absorção teórico gerado.

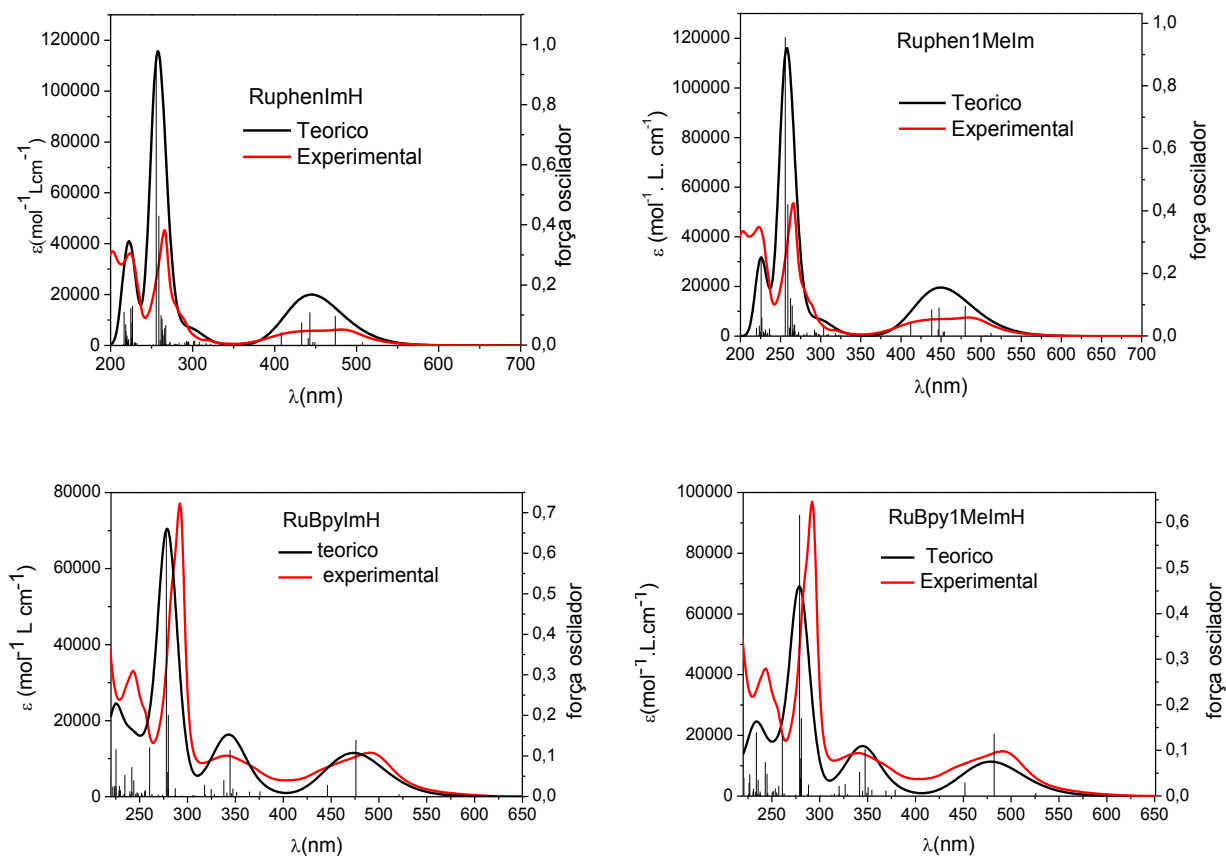


FIGURA 4.3 - Espectro de UV-Vis teórico (preto) e experimental (vermelho) dos complexos RuphenImH, Ruphen1MeImh e RubpyImH e Rubpy1MeIm em acetonitrila na região de 200 a 650nm.

TABELA 4.1 - Atribuição do espectro de UV-Vis experimental a partir dos valores do cálculo teórico para o complexo RuphenImH em acetonitrila

Experimental	teórico		
λ (nm); ε (mol ⁻¹ Lcm ⁻¹)	λ (nm); f^a	Transição eletrônica	Principais transições
224, 36096	224; 0,1228	¹ LLCT	im \rightarrow phen [*]
265, 44707	255; 0,9548	¹ LLCT	phen \rightarrow phen [*]
320, 1839	326; 0,0001	¹ MLCT, ¹ MC	Ru,d π \rightarrow phen [*] Ru,d π \rightarrow Ru,d σ
430nm, 5960	442; 0,1092	¹ MLCT	(Ru,d π \rightarrow phen [*])
484nm, 6402	473; 0,0969	¹ MLCT	Ru,d π \rightarrow phen [*]

^a força de oscilador

4.2 – Análise Elementar – CHN

A análise elementar dos complexos RuphenImH, Ruphen1MeIm, RuBpyImH e RuBpy1MeIm estão na tabela 4.2 e os valores experimentais estão condizentes com os valores teórico esperados concordando com a fórmula molecular proposta.

TABELA 4.2 - Dados percentuais para os teores de C, H e N, experimentais e teóricos para os complexos

Complexo	Experimental (Teórico)		
	C%	H%	N%
<i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (ImH) ₂](PF ₆) ₂ .2H ₂ O (C ₃₀ H ₂₄ F ₁₂ N ₈ P ₂ Ru.2H ₂ O)	39,75(39,01)	2,87(3,05)	12,36(12,13)
<i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (1MeIm) ₂](PF ₆) ₂ .2H ₂ O (C ₃₂ H ₂₈ F ₁₂ N ₈ P ₂ Ru.2H ₂ O)	40,38(40,69)	3,38(3,19)	11,77(11,22)
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (ImH) ₂](PF ₆) ₂ .2H ₂ O (C ₂₆ H ₂₄ F ₁₂ N ₈ P ₂ Ru.2H ₂ O)	36,32(35,66)	3,30(3,19)	13,21(12,76)
<i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ (1MeIm) ₂](PF ₆) ₂ .2H ₂ O (C ₂₈ H ₂₈ F ₁₂ N ₈ P ₂ Ru.2H ₂ O)	38,07(37,21)	3,69(3,54)	13,00(12,40)

4.3 - Caracterização dos complexos

4.3.1 - Caracterização dos complexos por RMN ¹H

Os espectros de RMN ¹H dos complexos RuphenImH, Ruphen1MeIm, RubpyImH e Rubpy1MeIm foram obtidos em D₂O e estão apresentados na figura 4.5. Devido à perda de simetria dos ligantes fenantrolina e bipyridina após a coordenação, foi observado 8 sinais de hidrogênio não equivalentes no espectro de hidrogênio.

O sinal do hidrogênio mais desblindado dos complexos com o ligante fenantrolina, RuphenImH e Ruphen1MeIm, são encontrados ao redor de 9,40 ppm enquanto o sinal do hidrogênio mais desblindados dos complexos com a bipyridina, RubpyImH e Rubpy1MeIm, estão ao redor de 8,90ppm.

Esta diferença de deslocamento químico pode ser atribuído a maior acidez do hidrogênio da fenatrolina em relação a bipyridina. A diferença de

acidez dos hidrogênios pode ser explicado pelos valores de pKa da fenantrolina 4,86⁶⁹ e biperidina 4,33⁷⁰.

O imidazol possui 3 sinais de hidrogênio com deslocamentos químico ao redor de 7,70 ppm a 6,80 ppm. Nos complexos que contém o ligante fenantrolina, os sinais H9 e H10 estão mais próximos quando comparamos aos mesmos hidrogênios nos complexos que possuem a biperidina, provavelmente devido a maior rigidez do ligante fenantrolina em relação a biperidina, deixando os hidrogênios H9 e H10 próximo da equivalência.

Todos os espectros de RMN ¹H para os 4 complexos foram caracterizados e as atribuições estão na tabela 4.2 e 4.3 e as estruturas dos complexos com as enumerações para a atribuição na figura 4.6. Os espectros não apresentaram sinais de hidrogênio referente ao precursor ou ligante livre mostrando o alto grau de pureza dos complexos.

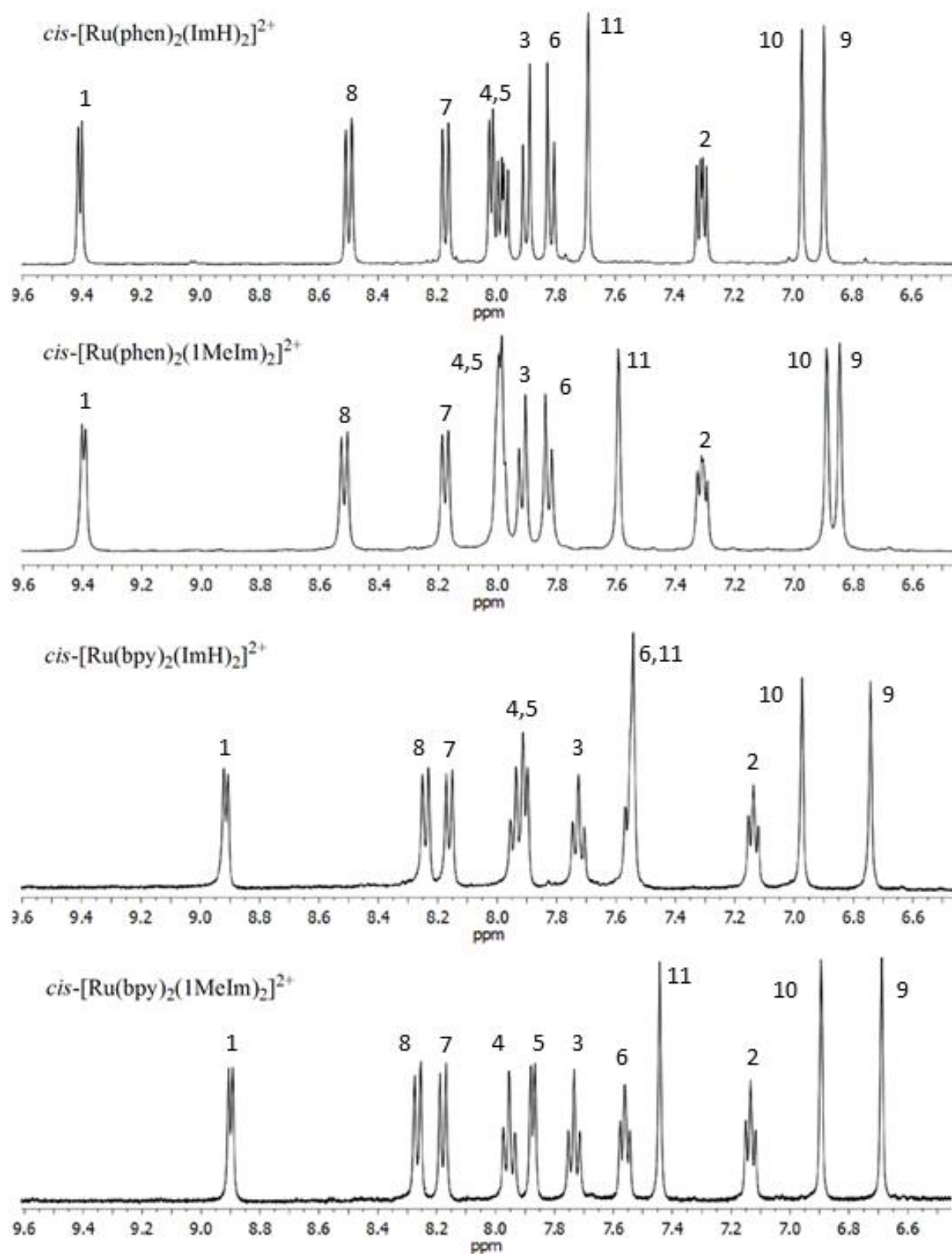


FIGURA 4.4 - Espectros de RMN ^1H dos complexos RuphenImH, Ruphen1MeIm, RubpyImH e Rubpy1MeIm em D_2O .

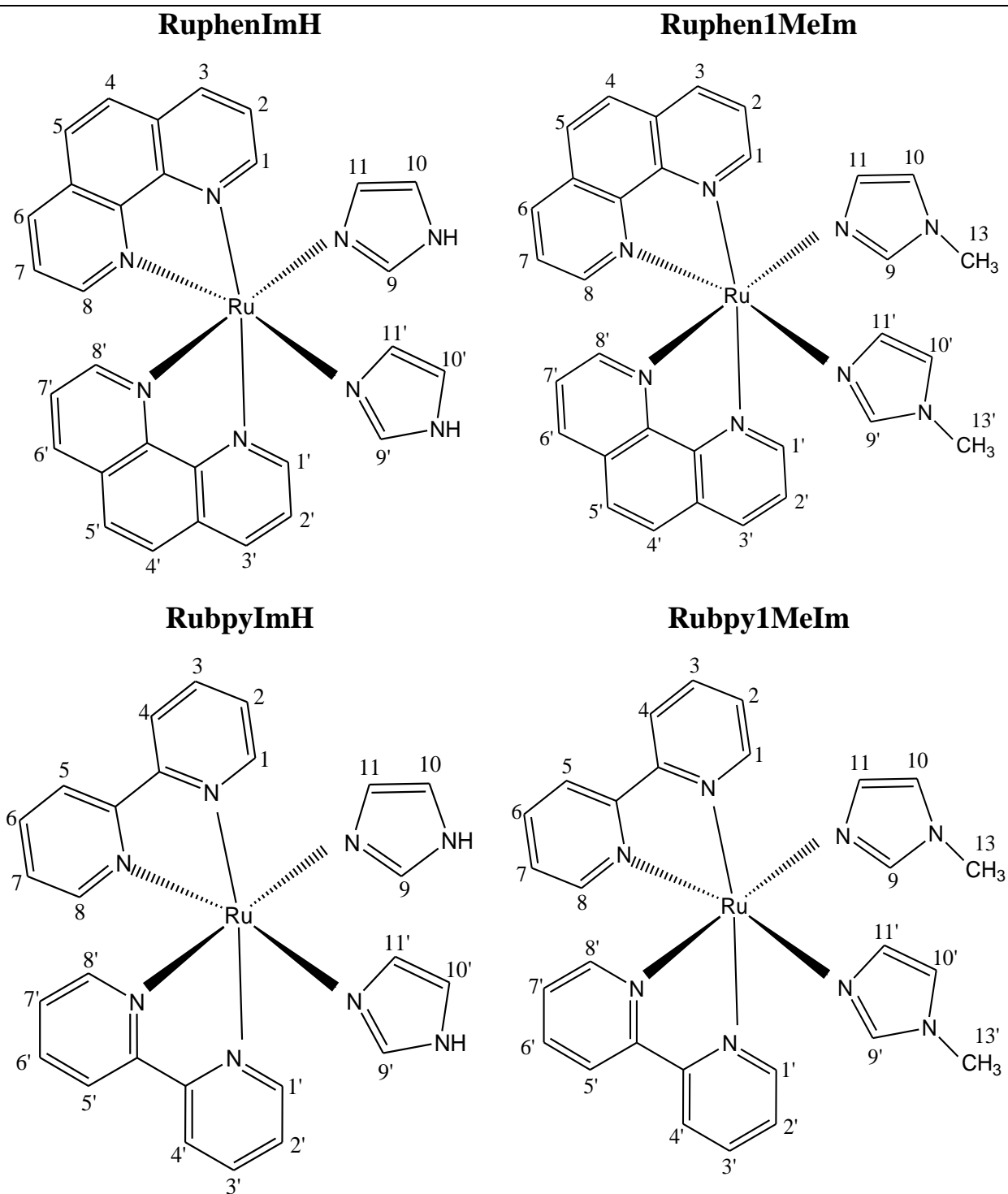


FIGURA 4.5 - Estrutura ilustrativa dos complexos com as respectivas enumerações utilizadas na atribuição dos espectros de RMN ^1H na tabela 4.3 e 4.4.

TABELA 4.3 - Deslocamento químico de ^1H δ_{H} (ppm) dos hidrogênios dos complexos RuphenImH e Ruphen1MeIm em D_2O

RuphenImH		Ruphen1MeIm	
H	δ_{H} (ppm), mult., H	H	δ_{H} (ppm), mult., H
1, 1'	9,41; <i>d</i> (5,2); 2H	1, 1'	9,40; <i>d</i> (5,2), 2H
8, 8'	8,50; <i>d</i> (8,2); 2H	8, 8'	8,52; <i>d</i> (8,2), 2H
7, 7'	8,17; <i>d</i> (8,2); 2H	7, 7'	8,18; <i>d</i> (8,2), 2H
4, 4', 5, 5'	8,00; <i>m</i> ; 4H	4,4'; 5,5'	7,99; <i>m</i> , 4H
3, 3'	7,90; <i>d</i> (8,9), 2H	3, 3'	7,92; <i>d</i> (8,9), 2H
6, 6'	7,82; <i>d</i> (8,9), 2H	6, 6'	7,83; <i>d</i> (8,9), 2H
11, 11'	7,69; <i>s</i> , 2H	11, 11'	7,59; <i>s</i> , 2H
2, 2'	7,31; <i>dd</i> (8,2; 5,3), 2H	2, 2'	7,31; <i>dd</i> (8,2; 5,3), 2H
10, 10'	6,97; <i>s</i> , 2H	10, 10'	6,89; <i>s</i> , 2H
9, 9'	6,89; <i>s</i> , 2H	9, 9'	6,85; <i>s</i> , 2H
		13, 13'	3,45; <i>s</i> , 6H

TABELA 4.4 - Deslocamento químico de ^1H δ_{H} (ppm) dos hidrogênios dos complexos RubpyImH e Rubpy1MeIm em D_2O

RubpyImH		Rubpy1MeIm	
H	δ_{H} (ppm), mult., H	H	δ_{H} (ppm), mult., H
1, 1'	8,91; <i>d</i> (5,6), 2H	1, 1'	8,90; <i>d</i> (5,7), 2H
8, 8'	8,24; <i>d</i> (8,2), 2H	8, 8'	8,26; <i>d</i> (8,2), 2H
7, 7'	8,16; <i>d</i> (8,2), 2H	7, 7'	8,18; <i>d</i> (8,2), 2H
4, 4', 5, 5'	7,93; <i>m</i> , 4H	4, 4'	7,95; <i>t</i> (7,9), 2H
3, 3'	7,73; <i>t</i> (7,9), 2H	5, 5'	7,87; <i>d</i> (5,7), 2H
6, 6', 11, 11'	7,54; <i>m</i> (4H)	3, 3'	7,73; <i>t</i> (7,5), 2H
2, 2'	7,14; <i>t</i> (7,9), 2H	6, 6'	7,56; <i>t</i> (7,5), 2H
10, 10'	6,97; <i>s</i> , 2H	11, 11'	7,44; <i>s</i> , 2H
9, 9'	6,74; <i>s</i> , 2H	2, 2'	7,13; <i>t</i> (7,5), 2H
		10, 10'	6,89; <i>s</i> , 2H
		9, 9'	6,69; <i>s</i> , 2H
		13, 13'	3,47; <i>s</i> , 6H

4.3.2 - Caracterização dos complexos por UV-Vis

Nas figuras 4.7 estão contidos os espectros de absorção dos complexos em água. Quando comparado o espectro a absorção dos complexos RuphenImH e Ruphen1MeIm foi observado que a mudança do ligante imidazol para 1-metilimidazol praticamente não influencia as posições dos máximos de absorção dos complexos apenas a absorvidade molar (ϵ) é diferente, por exemplo, no comprimento de onda de 490 nm o valor de $\epsilon = 5960 \text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$ para o complexo RuphenImH e $\epsilon = 7322 \text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$ para o complexo Ruphen1MeIm.

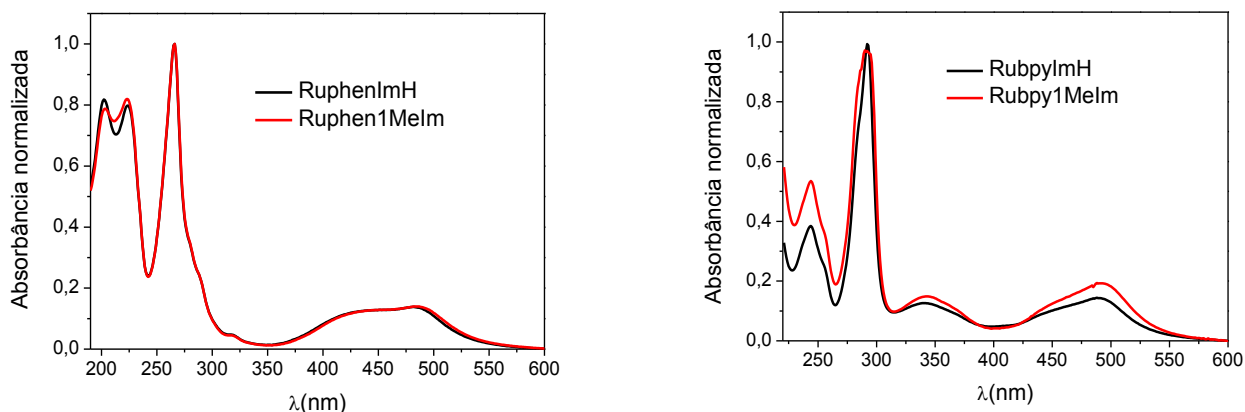


FIGURA 4.6 - Espectro de absorção normalizado dos complexos em água.

No caso dos complexos Rubpy1mH e Rubpy1MeIm, também se observou poucas diferenças entre eles. A maior diferença é observada quando comparamos os espectros de absorção dos complexos com phen e byp, provavelmente as principais transições possuem uma grande contribuição dos ligantes bidentados e apresentam maior força de oscilador, encobrindo as outras transições.

A partir do espectro de absorção teórico foi gerado os dados das transições eletrônicas teórica e por comparação com o espectro de absorção experimental fizemos as atribuições das bandas de absorção. A tabela 4.1 apresenta as atribuições das principais transições eletrônicas para o complexo Ruphen1mH em acetonitrila. As tabelas de transição eletrônica para os outros complexos se encontram no anexo A5, A6 e A7.

No espectro de UV-Vis do complexo Ruphen1mH é possível observar duas transições eletrônicas nos comprimentos de onda de 430 nm e 484 nm provenientes da transição MLCT ($Ru, d\pi \rightarrow phen\pi^*$) com força de oscilador de 0,1092 e 0,0969 respectivamente. As absorções presentes na região do ultravioleta (250 – 320nm) apresentam intensidade alta que são típicas das transições eletrônicas de transferência de carga interna dos ligantes (LLCT), na região de 224 e 265nm estão as transições ($im \rightarrow phen^*$) e ($phen \rightarrow phen^*$). No espectro de absorção eletrônica de complexos de Ru(II) espera-se também

transições centradas no metal Ru(II) \rightarrow Ru(II) ($d\pi \rightarrow d\pi^*$) que por apresentarem intensidade baixa são obscurecidas pelas transições de transferência de carga.

Com a ajuda do cálculo teórico podemos dizer que na região de 320 nm temos uma mistura de transições centradas no metal (MC) e de MLCT com força do oscilador de 0,0001.

4.3.3 - Caracterização dos complexos por Voltametria Cíclica

A partir da técnica de voltametria cíclica, os processos de oxidação e redução dos complexos em água na região foram verificados de 0 a 1,2 volts na velocidade de 100 mV/s. O voltamograma dos complexos estão na figura 4.8 a qual é possível observar um par redox que corresponde a remoção de um elétron do orbital $d\pi$ do Ru(II) para gerar Ru(III).

Os valores de potencial de meia onda, $E_{1/2}$ (Ru²⁺/Ru³⁺) para os complexos RuphenImH, Ruphen1MeImH, RubpyImH e Rubpy1MeImH foram de 0,66V, 0,70V, 0,67V e 0,68V respectivamente. O grupo metila ligado ao anel imidazólico poderia deixar o centro metálico de rutênio mais rico em elétrons e conseqüentemente diminuir o potencial de oxi-redução do Ru em comparação ao complexo com o ligante imidazol, mas pouca diferença é observada entre os potenciais dos complexos sugerindo que o grupo metila não altera efetivamente a densidade eletrônica do centro metálico.

Na figura 4.9 temos a voltametria cíclica do complexo NAMI-A em água. O potencial de meia onda do NAMI-A é 0,015V vs SCE⁷¹. Comparado este valor com os dos complexos usando como referência o Ag/AgCl para o complexo NAMI: -0,0272 vs Ag/AgCl se observou que o valor obtido é bem inferior aos valores de meia onda encontrados para os complexos estudados neste trabalho.

É sabido que o NAMI-A é um pró-fármacos, ou seja, se torna ativo após sofrer uma reação de redução (Ru(III) \rightarrow Ru(II)) no meio fisiológico por

enzimas redutoras. O alto valor de potencial de meia onda dos nossos complexos em comparação ao NAMI-A sugerem que eles serão estáveis a reações redox em meio fisiológico.

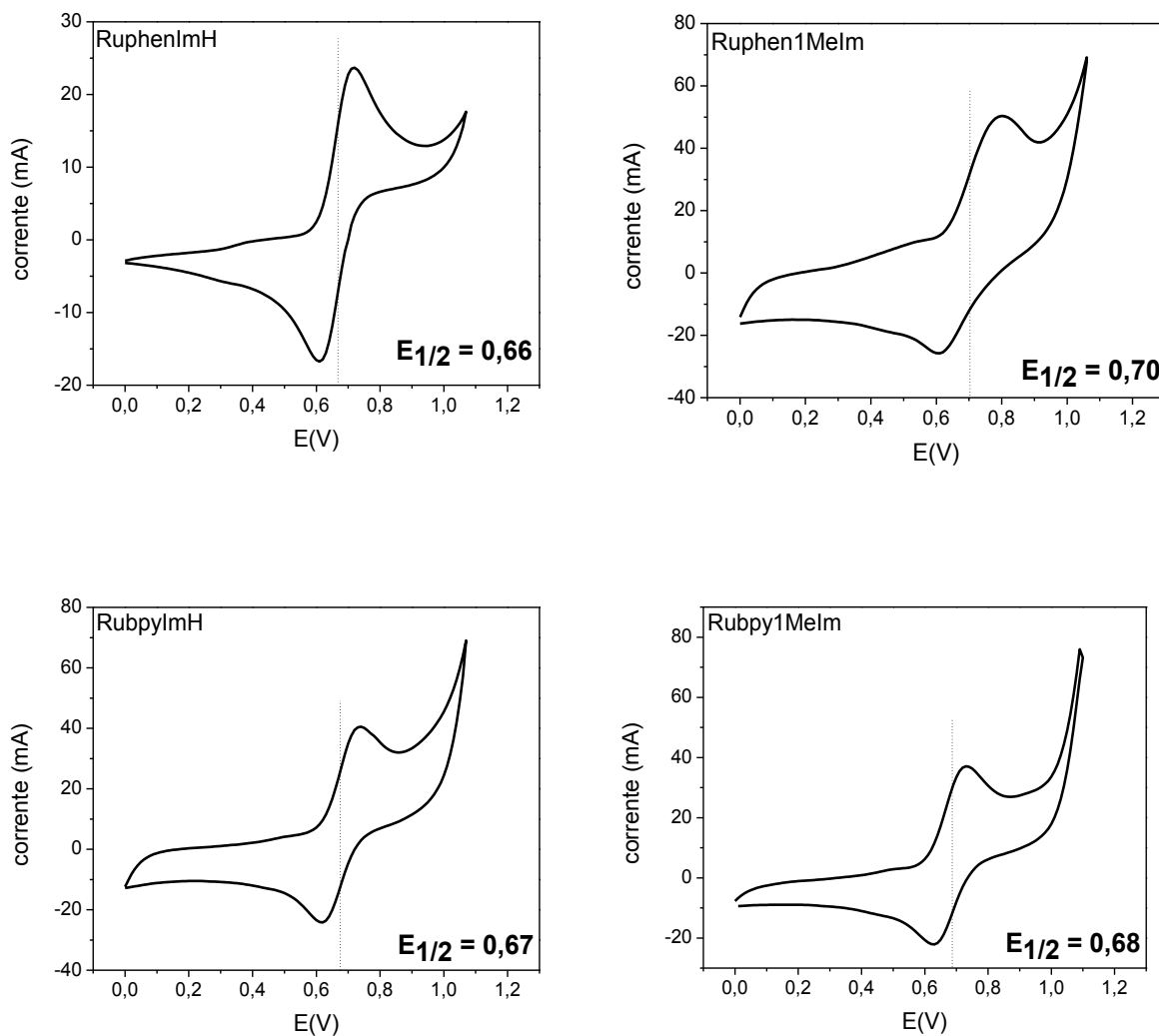


FIGURA 4.7 - Voltametria cíclica dos complexos em água na concentração de 2mg/mL com eletrólito de suporte KCl 0,1 M com Ag/AgCl como eletrodo de referência e 100 mV/s.

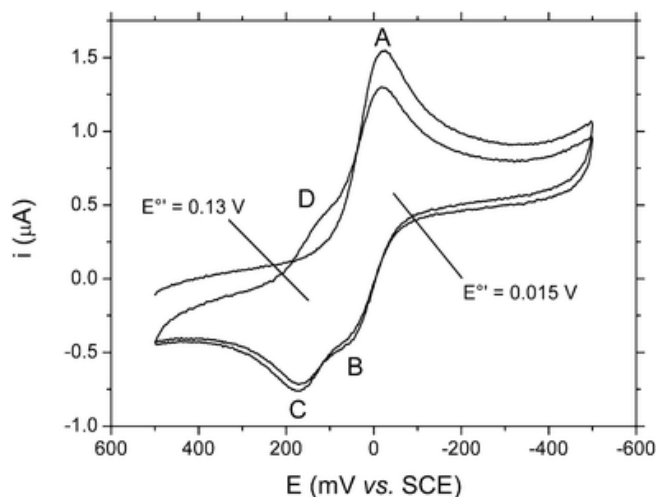


FIGURA 4.8 - Voltametria cíclica do complexo NAMI-A em água vs SCE.

4.3.4 - Estudos espectroeletroquímicos

A fim de obter mais informações a respeito do comportamento eletroquímico do complexo, foi realizado o experimento de espectroeletroquímica acompanhado por UV-Vis para o complexo RuphenImH.

A espectroeletroquímica foi realizada em DMF, neste solvente o potencial de oxi-redução do RuphenImH é (1,2V/1,08V). Escolhemos duas regiões diferentes para aplicar o potencial, uma após a oxidação, em 1,5V e a outra antes da redução em 0,5V. A figura 4.10 exibe a espectroeletroquímica do RuphenImH em DMF.

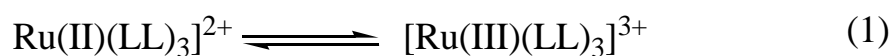
Na eletrólise oxidativa com aplicação do potencial de 1,5 V, observou-se a diminuição da absorção em 490 nm (MLCT Ru→phen) e a formação de duas bandas de menor intensidade em 360 e 650 nm (figura 4.10A).

Quando aplicado um potencial de 0,5 V, relativo a eletrólise redutiva, na mesma solução que foi aplicado o potencial oxidativo de 1,2V se observou que o espectro de absorção volta ao seu estado inicial com a regeneração da banda de MLCT, Figura 4.10B, mostrando que a reação de oxi-redução é reversível. Em geral, a oxidação dos complexos polipiridínicos de Ru(II) envolvem um orbital centrado no metal ($d\pi$), com a formação de um

complexo de Ru(III) com configuração d^5 os quais são inertes a substituição.^{72,73} O espectro de absorção do complexo oxidado $[\text{Ru}(\text{LL})_3]^{3+}$ é caracterizado por uma absorção fraca em 420nm ($\epsilon_{\text{max}} = 3,3 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{Lcm}^{-1}$) e uma absorção larga e fraca a comprimentos de onda maiores.⁷⁴

Também foram feitos experimentos espectroeletróquímicos aplicando potencial na onda corresponde ao ligante fenantrolina, -1,5 V e no potencial 0,5V, os espectros obtidos são mostrados na figura 4.11(A,B). Para os complexos polipiridínicos de Ru(II), $[\text{Ru}(\text{LL})_3]^{2+}$, a redução no ligante LL, mantém a configuração d^6 spin baixo do centro metálico de Ru(II), é geralmente inerte a substituição e o processo é reversível. O espectro de absorção do complexo $[\text{Ru}(\text{II})(\text{LL})_2(\text{LL}^{\cdot-})]^{1+}$ apresenta uma absorção intensa na região de 510 nm ($\epsilon = 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Comparando-se os resultados obtidos nos nossos experimentos espectroeletróquímicos com os observados na literatura para o complexos $[\text{Ru}(\text{LL})_3]^{2+}$ podemos sugerir que a oxidação do complexo leva a formação de um complexo inerte e o processo é reversível. O mesmo pode ser sugerido em relação a redução do complexo. Isto significa que o complexo RuphenImH pode sofrer processos oxidativo e/ou redutivos (equação 1 e 2) mas sem sofrer alterações estruturais e os complexos gerados de Ru(III) e/ou Ru(II)(phen $^{\cdot-}$) são processos reversíveis e inertes.



Este resultados são muito importantes para o desenvolvimento de um complexo com aplicação terapêutica, uma vez que o meio biológico apresenta muitas biomoléculas com atividade oxidativa e/ou redutiva as quais podem definir a estabilidade e metabolismo de um candidato a fármaco.

Os experimentos espectroeletróquímicos foram realizados também para o complexo Ruphen1MeIm e os resultados foram semelhantes aos resultados obtidos para o complexo RuphenImH. As figuras estão no anexo A8.

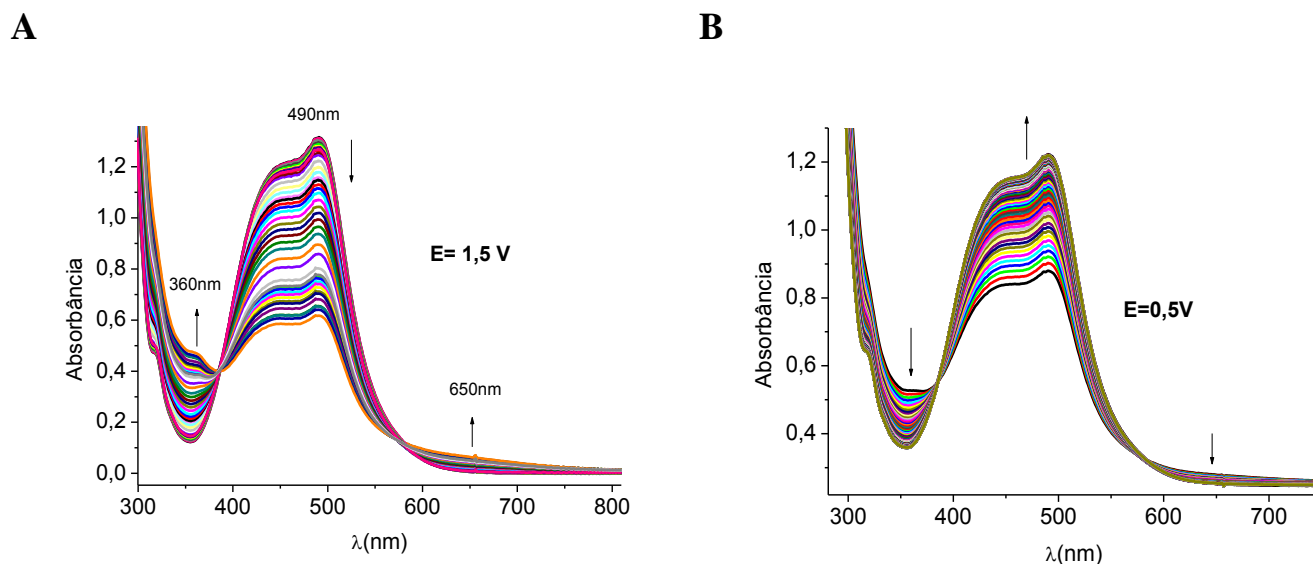


FIGURA 4.9 - Espectroeletróquímica do RuphenImH em DMF utilizando PTBA 0,1 M como eletrólito de suporte. A) 1,5 V; B) 0,5 V.

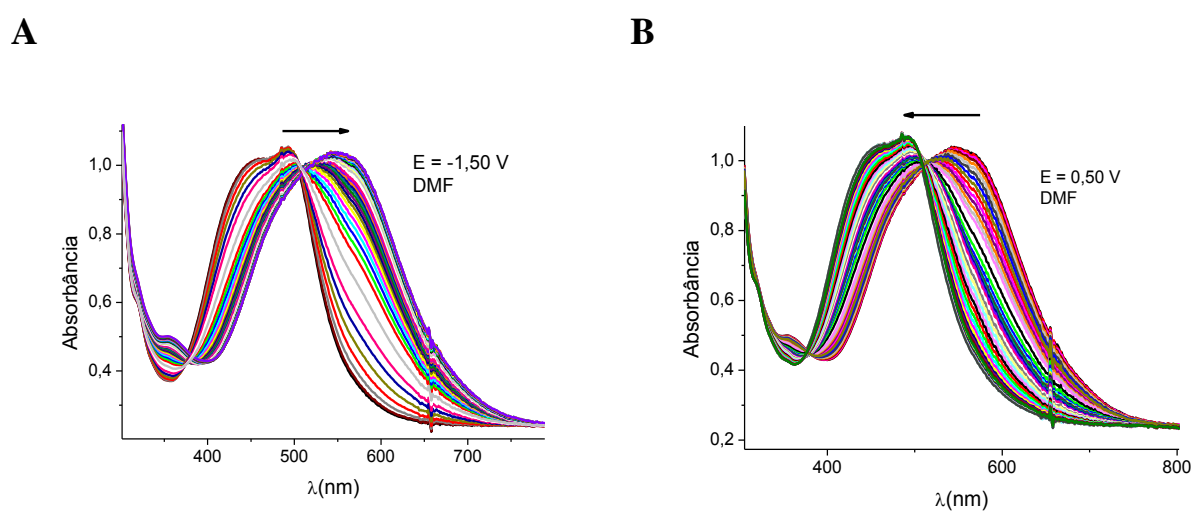


FIGURA 4.10 - Espectroeletróquímica do RuphenImH em DMF utilizando PTBA 0,1 M como eletrólito de suporte. A) -1,5 V; B) 0,5 V.

4.3.5 - Estudos fotofísicos

A figura 4.12 mostra os espectros de emissão dos complexos preparados em água. Os complexos possuem emissão ao redor de 660 nm quando excitados no intervalo de 400 a 550 nm. A intensidade de emissão máxima para os complexos RubpyImH e Rubpy1MeIm se encontra em 670 nm, um pouco mais deslocados para o vermelho em comparação ao valor do máximo de emissão para o RuphenImH e Ruphen1MeIm em 660 nm.

Se sabe que quanto mais rígida é a estrutura de um complexo menos energia não radiativa é perdida por vibrações, devido o ligante fenantrolina deixar a estrutura do complexo mais rígido que o ligante bipyridina, era de se esperar que o complexo com a bipyridina estivesse deslocado mais para o vermelho.

Na figura 4.13 temos os espectros de excitação dos complexos em água ($\lambda_{em} = 660\text{nm}$). A banda de excitação está localizada na mesma região da banda de $^1\text{MLCT}$ (Ru \rightarrow phen) dos espectros de absorção, indicando que a emissão que observamos em 660 nm é uma emissão vinda da transição $^3\text{MLCT}$ (Ru \rightarrow phen ou Ru \rightarrow bpy). A emissão também foi avaliada nos solventes acetonitrila e DMF e foi observado que o máximo de emissão não foi alterado, apenas a intensidade variou com o solvente (Figura 4.14).

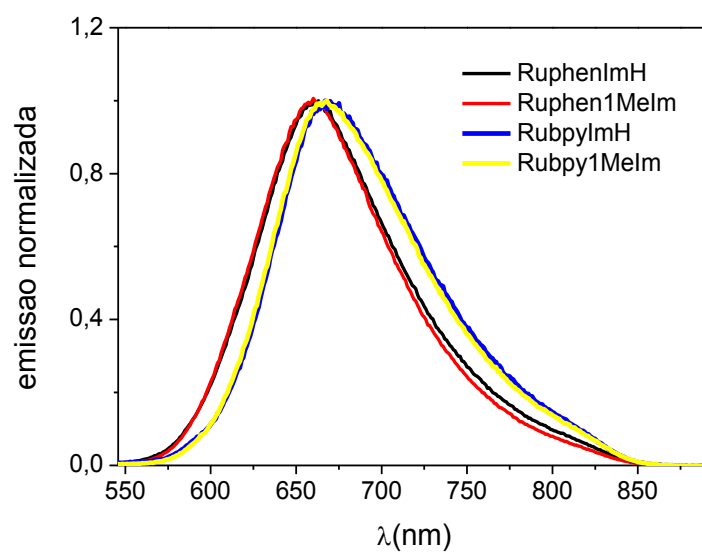


FIGURA 4.11 - Espectros de emissão dos complexos em água.

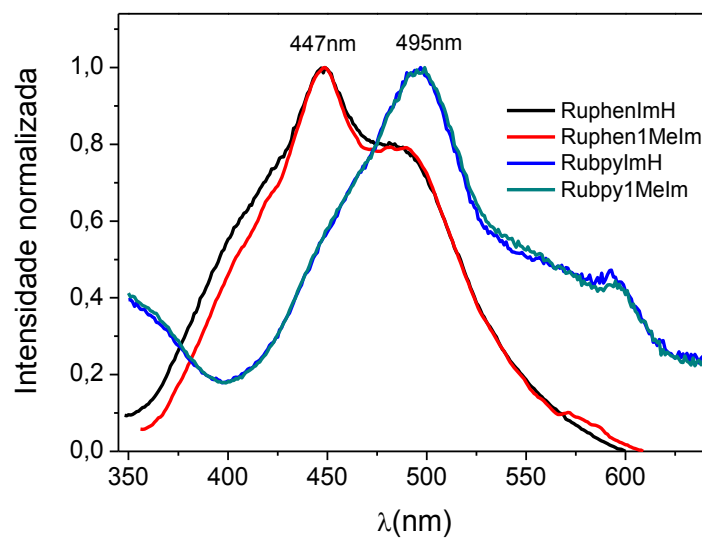


FIGURA 4.12 - Espectros de excitação dos complexos em água.

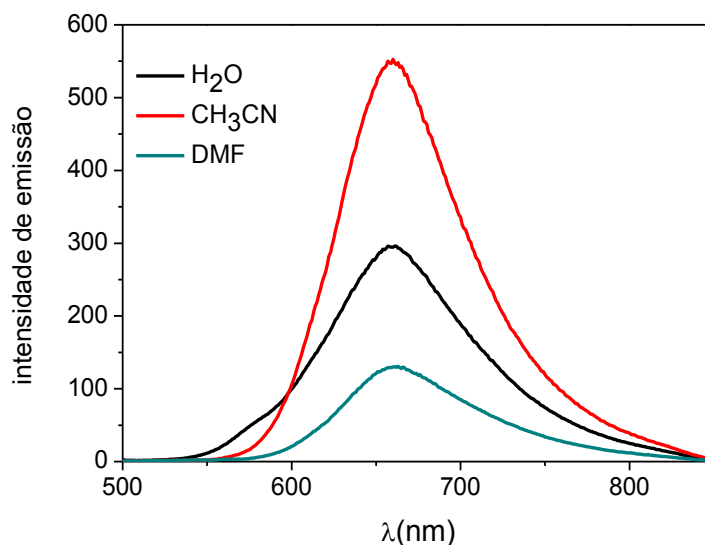
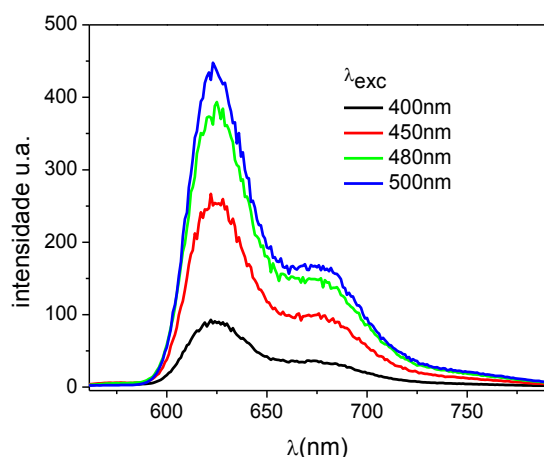


FIGURA 4.13 - Emissão do complexo RuphenImH em diferentes solventes.

As bandas de emissão dos complexos são caracterizadas por uma banda larga, mas a emissão não é necessariamente constituída por apenas uma transição, outras transições podem estar encobertas pela transição mais intensa. Para analisar melhor as transições emissivas do RuphenImH, os experimentos de emissão foram feitos a baixa temperatura (77 k) em uma mistura de solventes metanol/etanol na proporção de (4:1). Na figura 4.15A estão os espectros de emissão para o complexo RuphenImH quando excitado no intervalo de 400 a 500 nm. Diferente do experimento feito à temperatura ambiente se observou duas bandas, uma mais intensa em 623 nm e a outra em 678nm.

Devido à minimização das perdas de energia não-radiativas por vibração, a banda mais intensa foi deslocada aproximadamente 40 nm em relação ao espectro de emissão a temperatura ambiente. Para melhor caracterizar as transições emissivas do complexo, foi feito a emissão do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ nas mesmas condições do RuphenImH. Na figura 4.15B está apresentada o espectro de emissão do $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ a 77 k de temperatura e foi observado o mesmo perfil encontrado para o complexo estudado. Logo se caracterizou as duas transições do complexo como sendo provenientes de transições $^3\text{MLCT Ru} \rightarrow \text{phen}$.

A



B

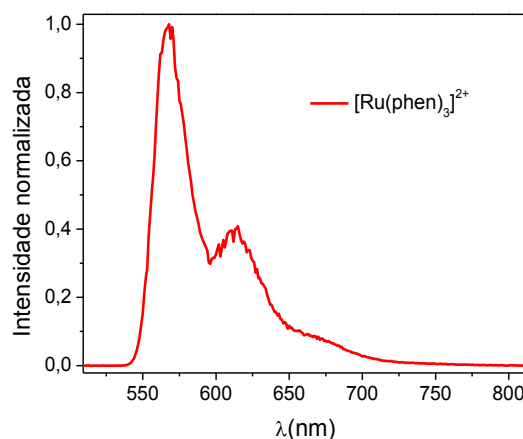


FIGURA 4.14 - A) Espectro de emissão do complexo RuphenImH e B) Espectro de emissão do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ambos a 77K e no solvente metanol/etanol (4:1).

No meio fisiológico, existem muitas biomoléculas emissivas quando excitadas em determinado λ , geralmente abaixo de 600nm. Na figura 4.16 estão os exemplos dessas biomoléculas e a região em que absorvem.

Para que um composto luminescente atue como sensor biológico, o ideal é que apresente emissão em regiões diferentes das biomoléculas, para não sofrerem interferências tanto da absorção quanto da emissão destas biomoléculas. Em adição, o composto deve absorver luz na região do visível e a luminescência do sensor deve ser preferencialmente intensa e acima de 600 nm para evitar danos à célula devido à absorção da luz ultravioleta.

Como esperado, os complexos estudados neste trabalho emitem em 660 e 670 nm quando excitados no intervalo de 450 a 550 nm. Isto significa que a emissão do complexo não sofre interferência da absorção das biomoléculas. Desta forma é possível visualizar o composto no meio fisiológico sem interferência.

Outra característica importante dos complexos é apresentar um grande deslocamento de Stokes, 5500 cm^{-1} , dificultando a interferência por auto

absorção bem como a autofluorescência das espécies nativas nas células, figura 4.17. Este efeito acontece quando a emissão do complexo é reabsorvida pelo composto devido à proximidade das bandas de absorção e emissão.

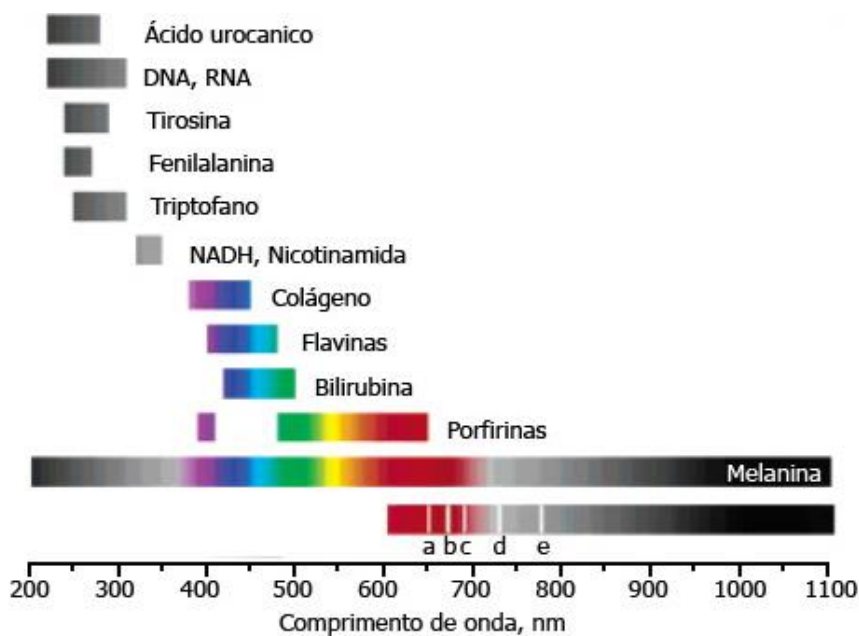


FIGURA 4.15 - Espectro de absorção das biomoléculas.

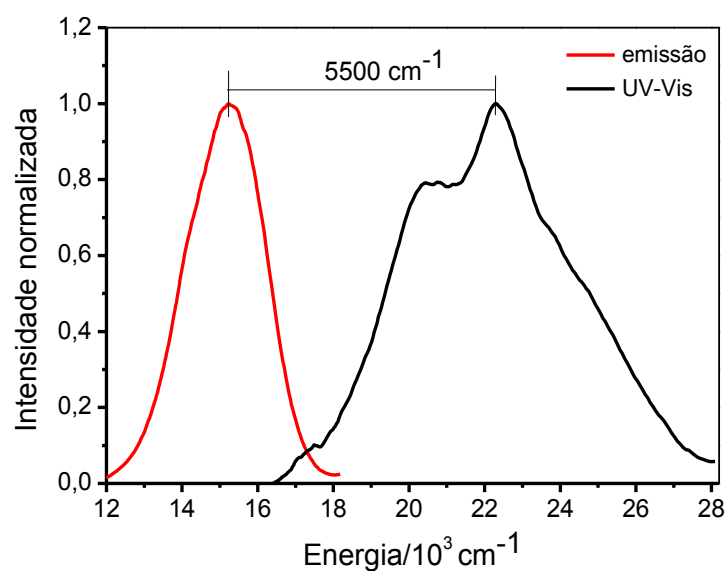


FIGURA 4.16 - UV-Vis e emissão do complexo RuphenImH em água.

Outros parâmetros importantes a serem avaliados é o tempo de vida de emissão (τ_{em}). Os valores de τ_{em} dos complexos em água (tabela 4.4 e Figura 4.18) foram obtidos após um ajuste mono-exponencial, refletindo numa distribuição de apenas um processo emissivo. Os complexos possuem tempo de vida de emissão longo quando avaliamos a luminescência em meio aquoso.

O menor tempo de vida de emissão encontrado foi para o complexo RubpyImH (64ns) e o maior tempo de vida de emissão foi para o complexo Ruphen1MeIm (239ns). O valor alto observado para o complexo Ruphen1MeIm é atribuído a rigidez da fenantrolina e a presença do grupo metila no imidazol que impede perdas de energia de emissão por ligação hidrogênio com o solvente.

TABELA 4.5 - Valores de tempo de vida de emissão para os complexos

complexo	$\tau_{em}(ns)$
RuphenImH	211
Ruphen1MeIm	239
RubpyImH	64
Rubpy1MeIm	71

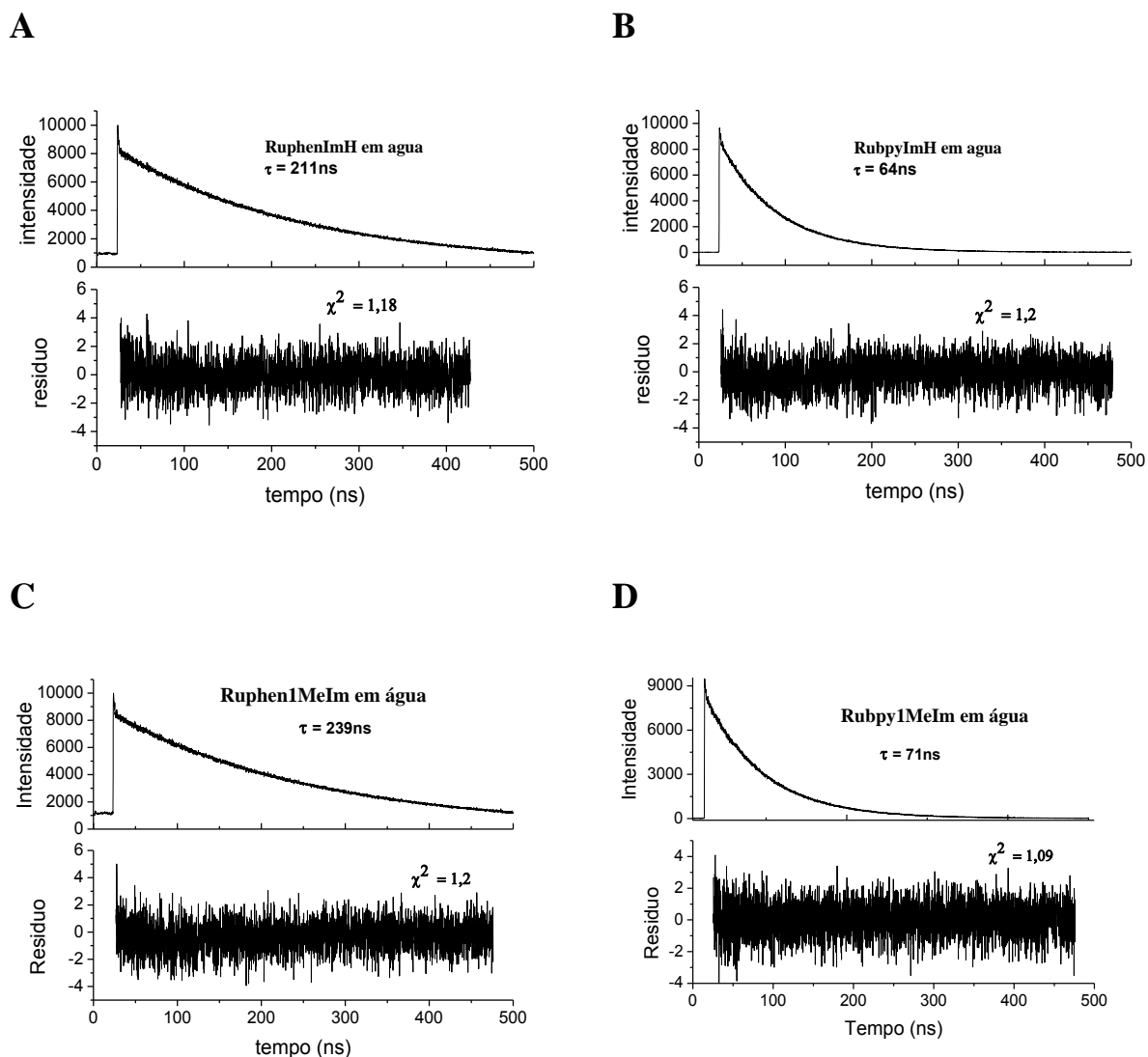


FIGURA 4.17 - Curva de decaimento de emissão para o complexo A) RuphenImH, B) RubpyImH, C) Ruphen1MeIm e D) Rubpy1MeIm em água. A qualidade do ajuste está indicado pelos gráficos de resíduos mostrados abaixo das curvas de decaimento.

4.4 – Estudo de estabilidade dos complexos

Uma etapa importante do trabalho é avaliar se os complexos propostos são estáveis ou não no meio biológico. Sabemos que vários complexos de rutênio e platina atuam como pró-drogas e no meio biológico

sofrem hidrólise e são reduzidos para complexos de Ru(II) gerando as espécies ativas que apresentam propriedades terapêuticas.

Por este motivo, para não haver interpretações errôneas dos ensaios biológicos, é preciso saber se no meio reacional o complexo inicial mantém sua integridade estrutural ou se é transformado em outra espécie que apresenta a atividade almejada.

Neste contexto, a estabilidade dos complexos foi avaliada em tampão fosfato em diferentes valores de pH e na ausência e presença de luz.

Para isso, utilizamos a técnica de RMN de ^1H , pois qualquer mudança que pudesse ocorrer com o complexo no decorrer do tempo poderia ser facilmente observado pelo deslocamento e/ou surgimento de novos sinais no espectro.

Na figura 4.19 está apresentado a cinética do RuphenImH em tampão fosfato pH 7,4 no período de 72 horas na ausência de luz. Podemos observar que não há alteração do espectro no intervalo de tempo de 0 a 72 horas. Este resultado se repetiu para os outros complexos estudados neste trabalho (anexo A9 e A10).

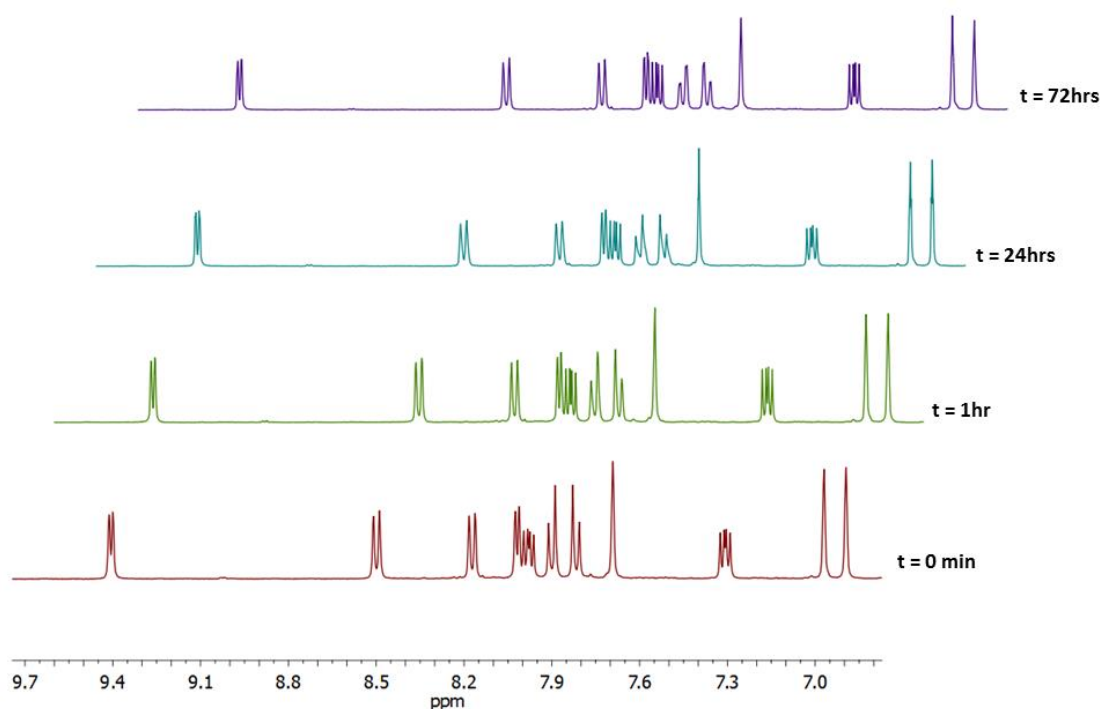


FIGURA 4.18 - Cinética do complexo RuphenImH acompanhada por RMN de ^1H em tampão fosfato pH 7,4.

A estabilidade dos complexos também foi avaliada na presença de luz visível. Neste experimento, a solução usada no experimento de cinética no escuro foi exposta a luz ambiente por 48 horas e na sequência medimos o espectro de RMN de ^1H . No gráfico 4.20 está apresentada a cinética do complexo RuphenImH na presença de luz.

Claramente é observada a formação de um novo composto com deslocamentos químicos em regiões mais desblindadas do espectro além de sinais na região do imidazol livre. Este novo complexo foi caracterizado como sendo o $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{OH})_2]^{2+}$, formado após a labilização do ligante imidazol. Na equação abaixo temos a reação de hidrólise do complexo RuphenImH.

A partir destas observações se optou por fazer todos os ensaios biológicos sempre na ausência de luz para termos a certeza que teríamos apenas o composto de partida em solução.

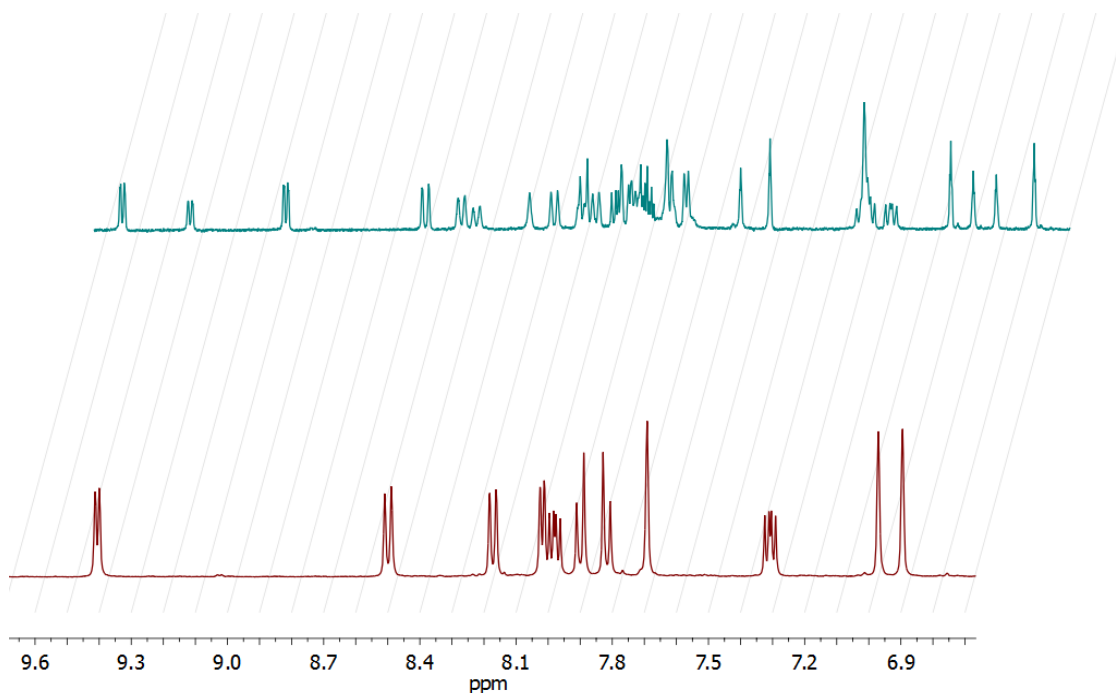
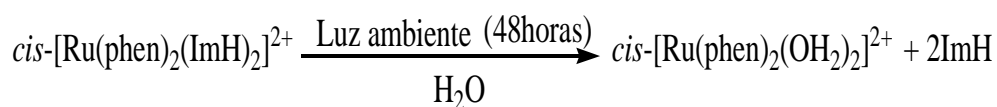


FIGURA 4.19 - (vermelho) RMN ^1H do complexo RuphenImH na ausência de luz e (azul) RMN ^1H do complexo RuphenImH após a exposição do complexo a luz ambiente por 48 horas em tampão fosfato pH 7,4.



A estabilidade do complexo também foi avaliada em meio aquoso nos diferentes valores de pH. Esta avaliação foi considerada importante, pois quando o fármaco é administrado ao paciente, o composto percorre várias regiões no organismo com diferentes valores de acidez e basicidade.

Na figura 4.21 são apresentados os espectros de RMN ^1H do complexo RuphenImH nos pH's selecionados. É possível observar alteração no espectro

apenas no pH 12,2. O aparecimento de sinais na região do imidazol, em menor intensidade, é atribuída à desprotonação do NH do imidazol e formação do íon imidazolato.

É sabido que o pKa do imidazol livre é por volta de 14 e que quando coordenamos o imidazol ao rutênio por uma ligação covalente coordenada, o pKa diminui devido a doação de elétrons sigma do imidazol para o rutênio, logo foi esperado que o pKa do imidazol coordenado fique abaixo de 14, justificando a formação do imidazolato em 12,2. Uma forma de confirmar a formação do imidazolato é comparar com o experimento de estabilidade em diferentes pH's para o complexo Ruphen1MeIm.

Este complexo possui uma metila ligada ao nitrogênio do imidazol (N-CH₃), descartando a possibilidade da desprotonação do imidazol. A figura 4.22 mostra os dados de RMN ¹H referente ao complexo Ruphen1MeIm em vários pH's. Como esperado não se verificou sinais de hidrogênio adicionais na região do imidazol, ficando inalterado o espectro de RMN. Estes experimentos indicam que os complexos não irão sofrer hidrólise ou alterações estruturais no meio fisiológico quando estiverem expostos a diferentes meios de acidez e basicidade.

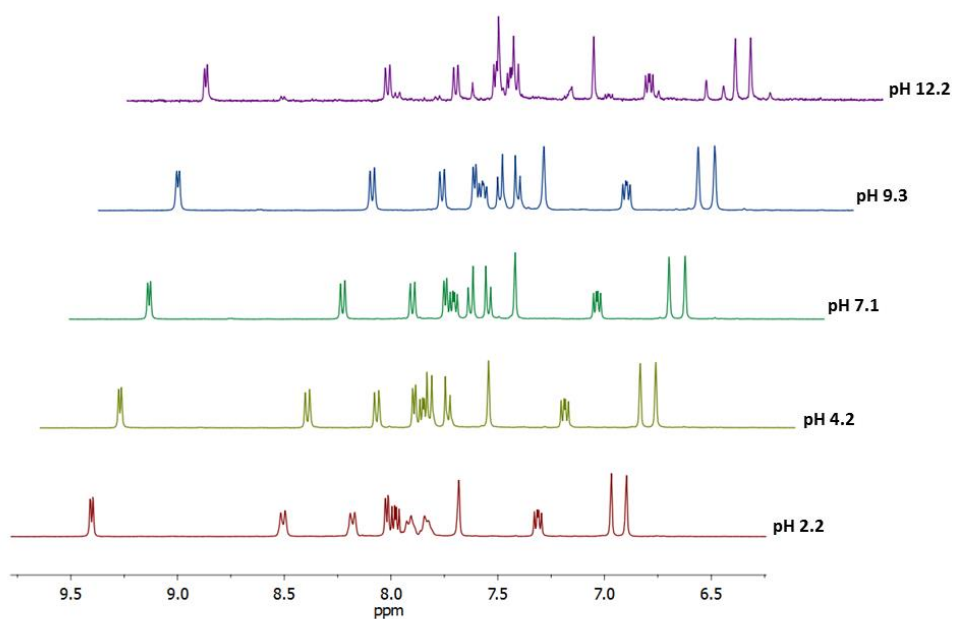


FIGURA 4.20 - Estudo de estabilidade do complexo RuphenImH acompanhado por RMN de ^1H em tampão fosfato em pH ácido, neutro e básico.

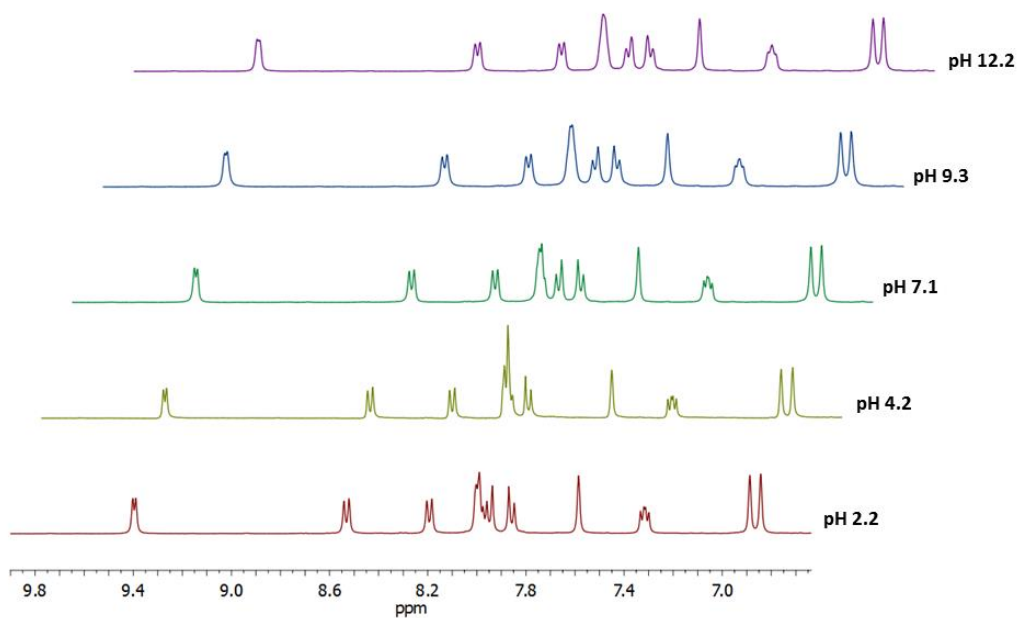


FIGURA 4.21 - Estudo de estabilidade do complexo Ruphen1MeIm acompanhado por RMN de ^1H em tampão fosfato em pH ácido, neutro e básico.

4.5 - Estudos de interação complexo/HSA

Muitos trabalhos na literatura têm mostrado a relevância dos estudos de interação HSA/complexo, pois auxiliam na elucidação do mecanismo de ação de um candidato a fármaco. Isto porque a atividade do composto nas células tumorais está muito relacionada com a força da interação com complexo com as proteínas do soro fisiológico.

As possibilidades de interação da proteína com um complexo de metal de transição dependem da natureza do metal e dos ligantes. Para estes estudos ficou decidido a escolha dos complexos RuphenImH e Ruphen1MeIm com o objetivo de avaliar a importância da interação de hidrogênio nas interações.

Na figura 4.23(A,B) estão os resultados das interações dos complexos com HSA analisado por dicroísmo circular. Neste experimento foi fixado a concentração de HSA em $3\mu\text{molL}^{-1}$ e variado a concentração de complexo (0 , $3\mu\text{molL}^{-1}$ e $25\mu\text{molL}^{-1}$).

As duas bandas de absorção observadas no espectro de CD com máximo de absorção em 208 nm e 220 nm são caracterizados como sendo as absorções provenientes das transições da α -hélices e folhas betas respectivamente. Estas bandas não sofreram variações significativas com o aumento da concentração do complexo sugerindo que a HSA na presença do complexo não sofre alteração em sua estrutura secundária, o que não é a mesma coisa de concluir que não estão interagindo, pois pode haver interação sem que haja modificação na estrutura secundária da proteína.

Outra forma de avaliar a interação pela técnica de CD é fazer o cálculo de t_m (temperatura necessária para desnaturar 50% de proteína). A figura 4.24A apresenta o gráfico de desnaturação da HSA na ausência do complexo RuphenImH e na figura 4.24B temos o gráfico da desnaturação na presença de RuphenImH. O valor de t_m para o HSA foi de 67°C e o valor de t_m para

HSA/RuphenImH também foi de 67° C. Este dado é importante, pois mesmo quando a proteína está interagindo com o complexo a sua temperatura de desnaturação não sofre alteração. O mesmo ocorreu para o complexo Ruphen1MeIm.

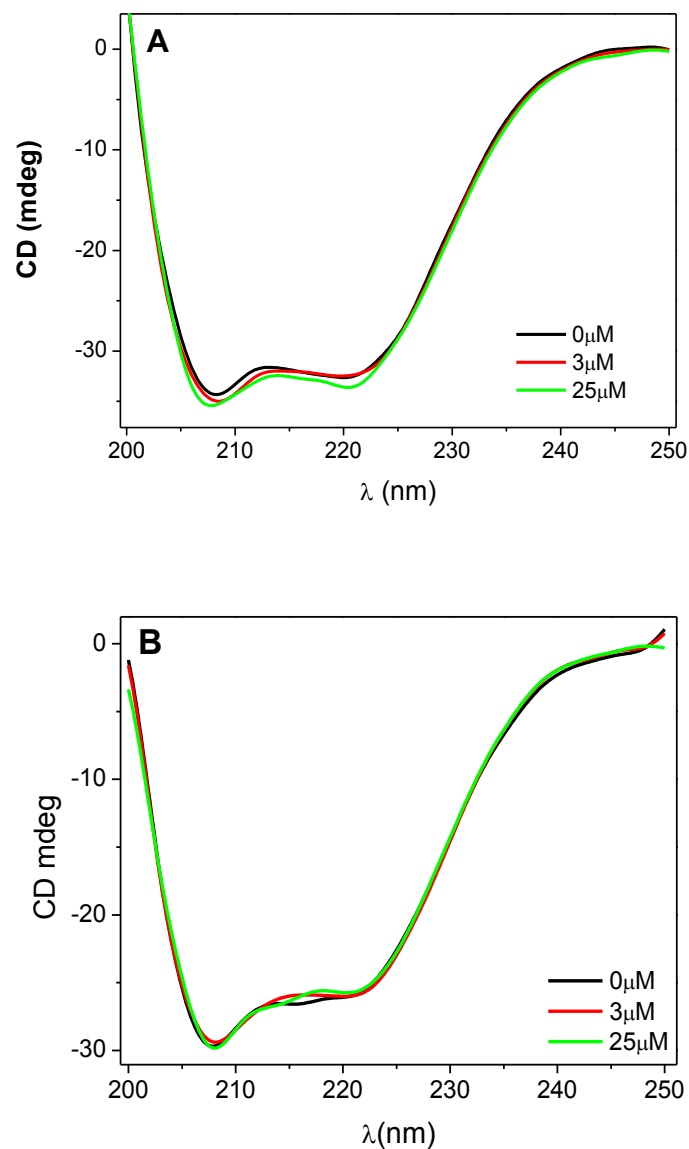


FIGURA 4.22 - Dicroísmo circular dos complexos A) RuphenImH e B) Ruphen1MeIm.

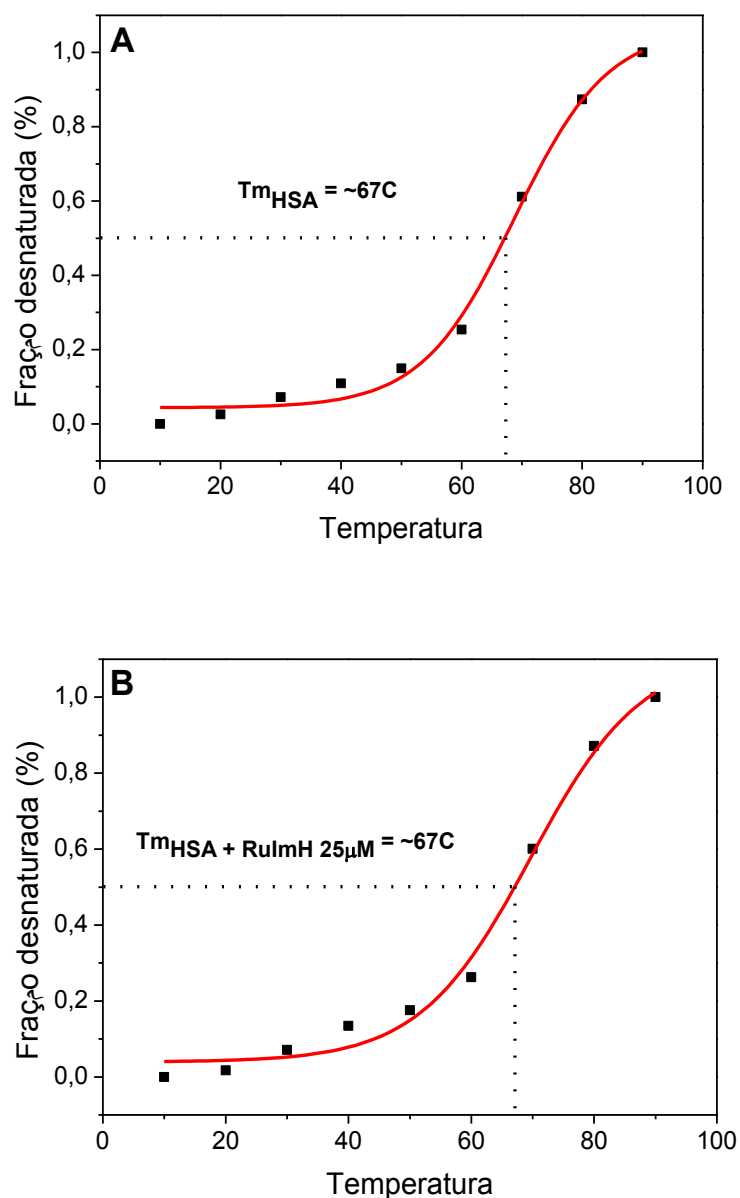


FIGURA 4.23 - Fração de desnaturação da proteína em função da temperatura e calculo de t_m A) HSA e B) HSA/RuphenImh

A técnica de ITC foi empregada para avaliar os parâmetros termodinâmicos (entalpia ΔH , entropia ΔS e energia livre de gibbs ΔG), a constante de dissociação e o número de sítios ativos.

Na figura 4.25 temos o gráfico de ITC correspondente a interação do complexo RuphenImH com a proteína HSA e na tabela 4.5 e gráfico 4.26 os valores termodinâmicos encontrados. A interação RuphenImH com a HSA é

exotérmica com o valor da constante de dissociação de $10,7 \times 10^{-6}$ M e estequiometria da reação de 1:1. A interação é impulsionada pela entalpia ($-11,5 \pm 0,1$ kcal/mol) e uma entropia desfavorável ($-14,4 \pm 0,3$ kcal/mol). A entalpia de ligação reflete principalmente na força das interações (ligação de hidrogénio, pontes salinas e de van der Waals) entre o ligante e a proteína. A entropia de ligação está relacionada com alterações nos graus de liberdade do sistema.

A formação do complexo restringe conformações de ligante e proteína e, portanto, resulta em perdas de entropia de ligação de translação e rotação. Por outro lado, a liberação de moléculas de água resulta em uma contribuição de entropia favorável, com efeito menos pronunciado. A fraca afinidade de interação RuphenImH/HSA sugere uma interação não covalente e de acordo com a literatura⁷⁵, o perfil do gráfico 4.26 é resultante de interação por ligação de hidrogênio.

TABELA 4.6 - Valores obtidos do experimento de ITC RuphenImH/HSA: constante de dissociação (K_d), número de sítios ativos (n), entalpia (ΔH), entropia (ΔS) e energia livre de Gibbs (ΔG)

T (K)	n	$K_d \times 10^{-6}$ (mol L ⁻¹)	ΔH (Kcal.mol ⁻¹)	ΔS (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	ΔG (Kcal.mol ⁻¹)
310	$1,07 \pm 0,028$	$10,7 \pm 0,707$	$-11,62 \pm 0,07$	$-14,7 \pm 0,35$	-7,06

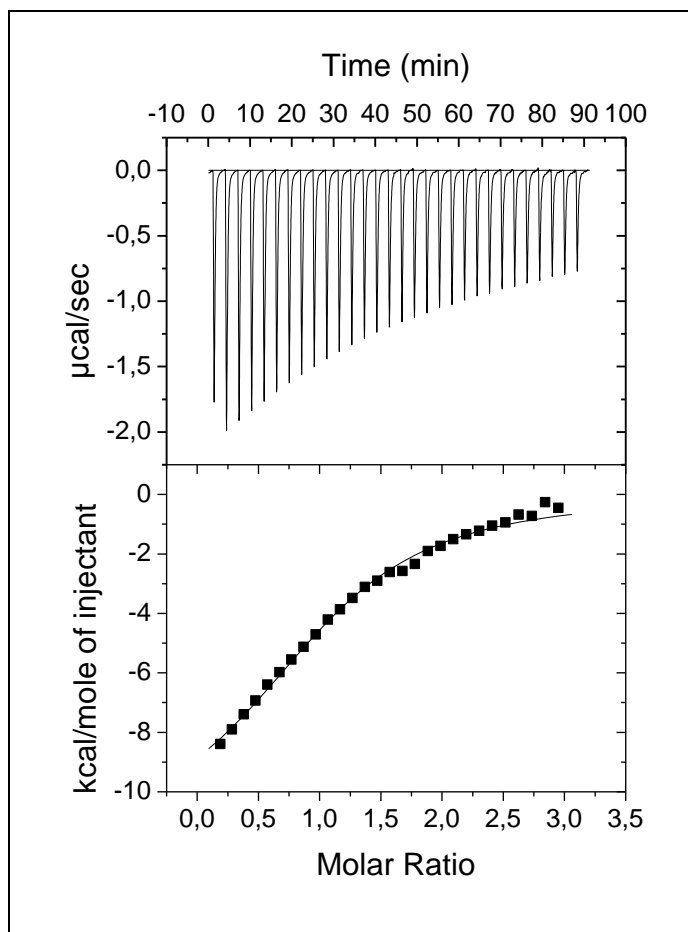


FIGURA 4.24 - Titulação da proteína HSA pelo complexo RuphenImH em tampão fosfato $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,4.

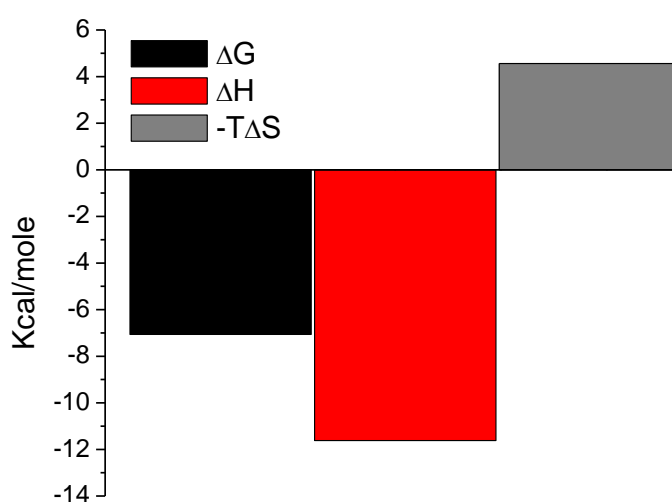


FIGURA 4.25 - Parâmetros termodinâmicos calculados a partir do experimento de ITC do complexo RuphenImH/HSA.

No experimento de STD, a proteína HSA foi irradiada em -1ppm produzindo o espectro on-ressonância. Este experimento foi então comparado com um off-ressonância (irradiação fora do alcance da proteína, em 30ppm) e a diferença entre os sinais resultou no espectro de STD, como mostrado na figura 4.27.

Os sinais exibidos do espectro de STD-RMN são provenientes dos hidrogênios do RuphenImH que estão interagindo com o HSA ou que estão próximos ao HSA em uma distância inferior a 5Å^{76} . A intensidade dos sinais varia de acordo com a proximidade da proteína, este comportamento está relacionado com a força da interação, o que permite obter um mapa de epitopo, como mostrado na figura 4.27.

O mapa do epitopo obtido para RuphenImH sugere que todos os hidrogênios do complexo interagem com a proteína. É interessante notar que os hidrogênios do ligante imidazol exibem uma interação mais forte quando comparados com a interação dos ligantes fenantrolina. Provavelmente, o N-H do anel imidazólico interage com a proteína através de uma ligação de hidrogênio, e os átomos de hidrogênio vicinais “sentem” mais a aproximação da proteína e conseqüentemente apresentam os sinais mais intensos. Não é possível observar o sinal do N-H no espectro de STD devido a troca do próton do N-H pelo deutério do solvente D_2O .

O experimento de STD indicou que a interação entre o complexo e a proteína provavelmente ocorre por interações de caráter polar, o que é confirmado pelo experimento de ITC.

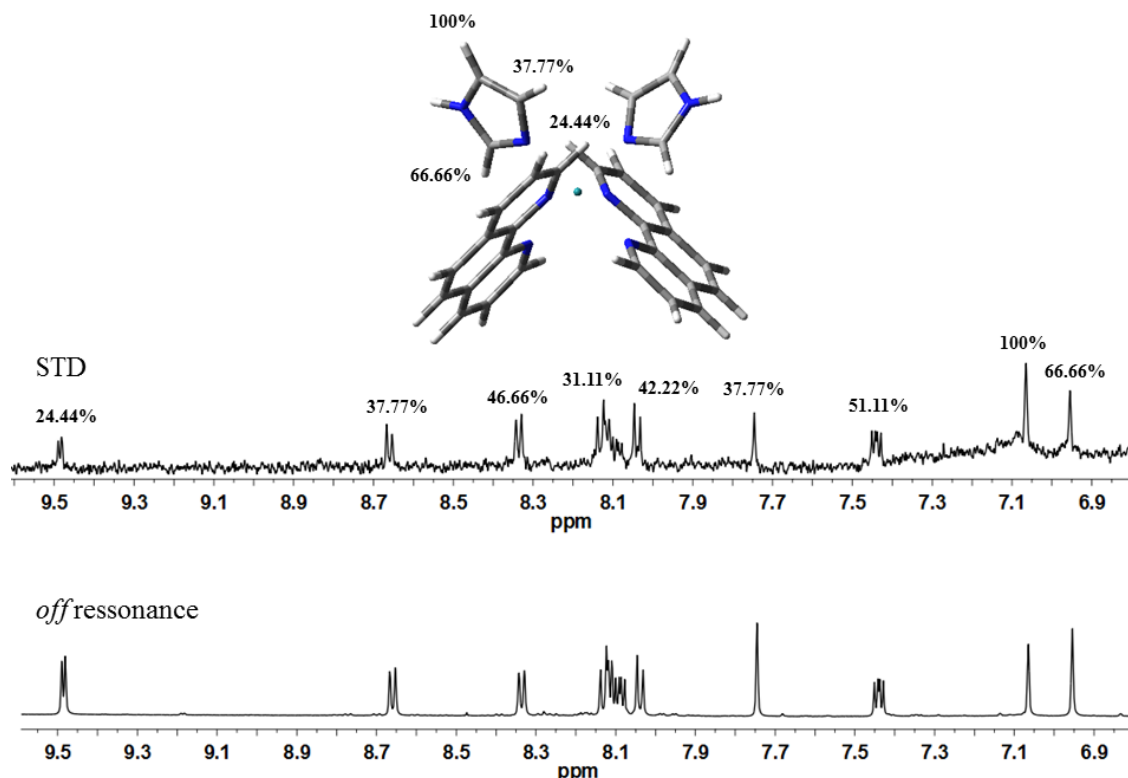


FIGURA 4.26 - Espectro de STD-RMN para o complexo RuphenImH na presença da HSA.

A interação complexo-HSA também foi avaliada por DOSY-RMN e os espectros obtidos estão na figura 4.27 e 4.28. O pequeno deslocamento no coeficiente de difusão do complexo na presença da proteína (média dos coeficientes $D = 2,6 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$) foi obtido quando comparado com o coeficiente do complexo sozinho ($D = 4,78 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$), e proteína sozinha $D = 4,5 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$.

É interessante notar que os coeficientes de difusão do complexo foi o mesmo para todos os sinais $D = 4,78 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. No entanto, quando a proteína está presente, dois coeficientes de difusão diferentes podem ser observados. Os hidrogênios que interagem mais fracamente (segundo dados de por STD) tiveram o coeficiente de difusão de $3,0 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, enquanto que aqueles com maior interação (H2, H2', α , α' , β e β') são menos móveis com difusão mais lenta ($D = 2,2 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$). Estes resultados estão de acordo com os dados

obtidos por STD-RMN, que mostraram os hidrogênios de imidazol (α , α' e β , β') além dos hidrogênios (H2 and H2') da fenantrolina com maiores porcentagens de STD (66,66; 100,00 e 51,11%).

Os estudos de interações entre o Ru1MeImH com a HSA também foi avaliado por ITC e STD, as figuras estão no anexo A11 e A12. Devido a fracas interações entre HSA/Ruphen1MeIm não foi possível obter uma curva de titulação isotérmica proveniente do experimento de ITC, e os sinais do espectro de STD são pouco intensos para se fazer o cálculo das porcentagens de interação. A única diferença estrutural entre os complexos RuphenImH e Ruphen1MeIm é a metila ligada no NH do imidazol. Deste modo pode-se inferir que a ligação de hidrogênio é essencial para que ocorra a interação com a proteína HSA.

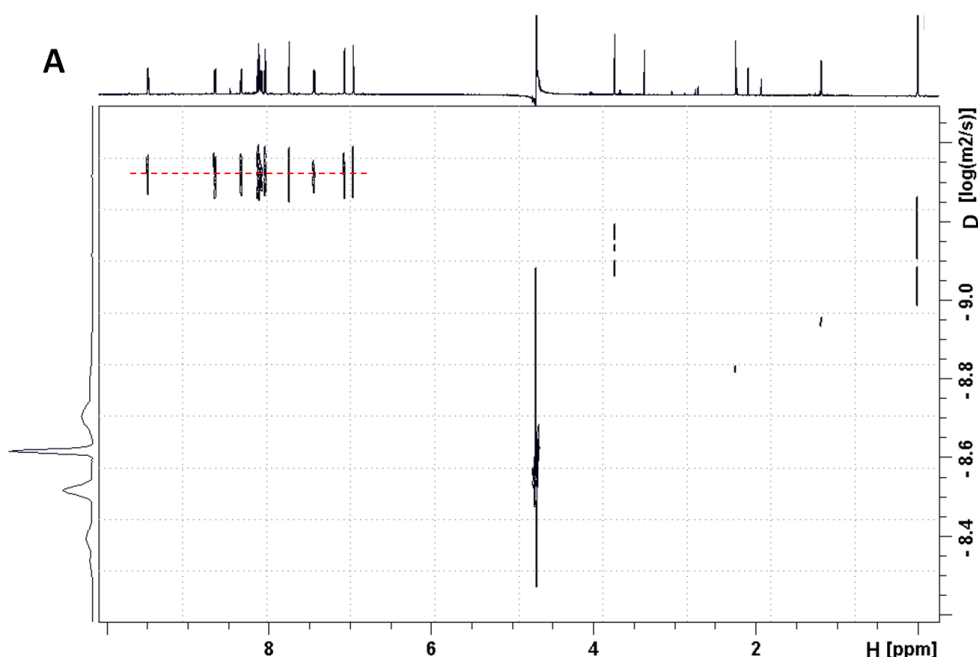


FIGURA 4.27 – DOSY-RMN do complexo RuphenImH na ausência de HSA.

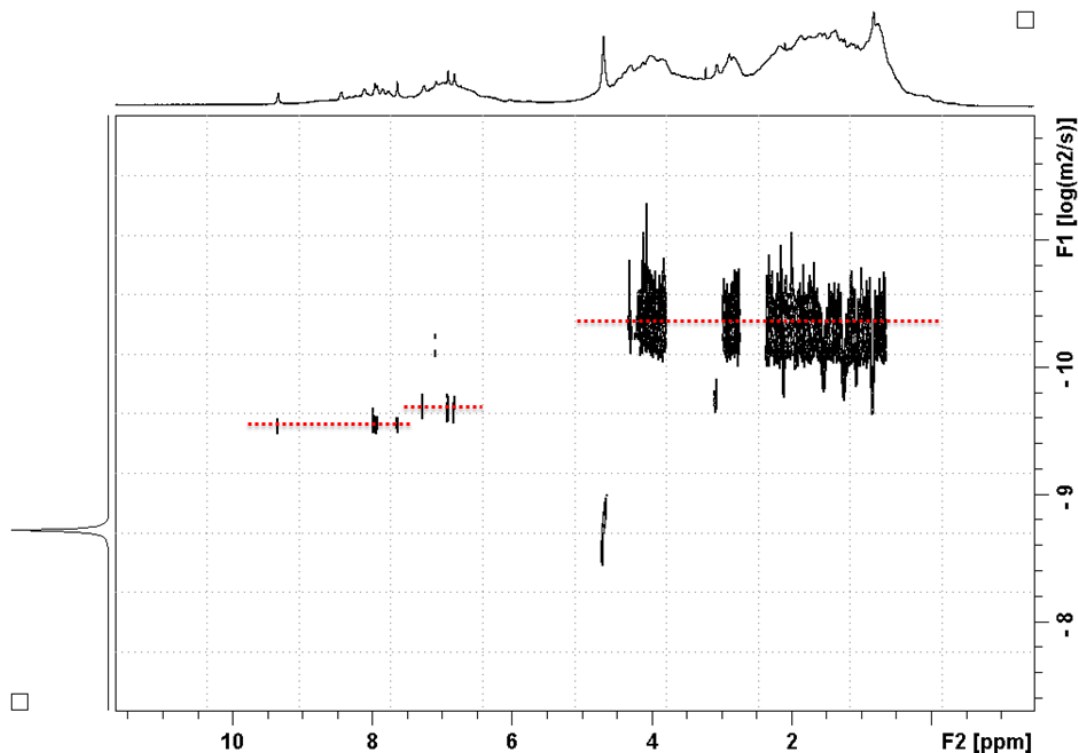


FIGURA 4.28 – DOSY-RMN do complexo RuphenImH na presença de HSA

4.6 - Ensaios biológicos

4.6.1 - Ensaios de viabilidade celular

Nos ensaios de viabilidade celular avalia-se a capacidade dos complexos de inibirem o crescimento *in vitro* de células tumorais. As linhagens celulares escolhidas para os ensaios biológicos foram: HCT116 p53^{+/+} (câncer de colorretal), HCT116 p53^{-/-} (câncer de colorretal com ausência do gene p53) e A2780 (câncer de ovário). As células p53^{+/+} e p53^{-/-} foram escolhidas para efeitos de comparação.

A figura 4.30 mostra o gráfico de porcentagem de inibição celular por concentração de complexo para todos os complexos estudados nas três células testadas. A tabela 4.6 mostra os valores de IC₅₀ para os complexos estudados. A tabela 4.6 apresenta também os valores de IC₅₀ obtidos para a cisplatina, para efeitos de comparação. Vale ressaltar que os experimentos com cisplatina foram realizados sob as mesmas condições experimentais usadas para

os complexos em estudo. Todos os complexos apresentaram valores de IC_{50} abaixo de $10\mu\text{mol.L}^{-1}$, excelentes resultados quando comparamos aos complexos da literatura. Por exemplo, quando comparamos os valores de IC_{50} dos complexos com a cisplatina observamos que nossos complexos apresentaram melhores resultados de inibição nas células HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-}. Apenas para a célula A2780 que a cisplatina mostrou ser superior ou igual aos nossos complexos.

O complexo RuphenImH foi o que apresentou os melhores valores de inibição, com o valor de $0,1\mu\text{mol.L}^{-1}$ para a célula HCT116 p53^{-/-}; $0,72\mu\text{mol.L}^{-1}$ para a célula HCT116 p53^{+/+} e $1,3\mu\text{mol.L}^{-1}$ para a célula A2780. Estes resultados são bastante interessantes não só pelo fato dos valores de IC_{50} serem muito baixos, mas também pelos complexos inibirem em maior proporção a célula HCT116 p53^{-/-} em relação às células HCT116 p53^{+/+}. Sabemos que a proteína supressora de tumor p53 é produzida em resposta a danos ao DNA e sua função é de ativar outras proteínas a fim de parar o ciclo celular e induzir a célula a apoptose ou senescência. Desta maneira, espera-se que uma célula que apresente esta proteína supressora (p53^{+/+}) tenha uma maior capacidade de inibir um agente quimioterápico do que uma célula sem a proteína supressora (p53^{-/-}). O complexo RuphenImH inibiu 7 vezes mais as células p53^{-/-} em comparação as células p53^{+/+}. Este dado é muito relevante, principalmente quando estudos na literatura mostram que muitas células tumorais apresentam o gene p53 mutado, ou seja, este gene não está fazendo as funções que lhe compete.

Por isso como observado nos nossos experimentos, inibir mais a célula HCT116 p53^{-/-} é um indicativo de seletividade dos complexos as células tumorais em relação às células saudáveis.

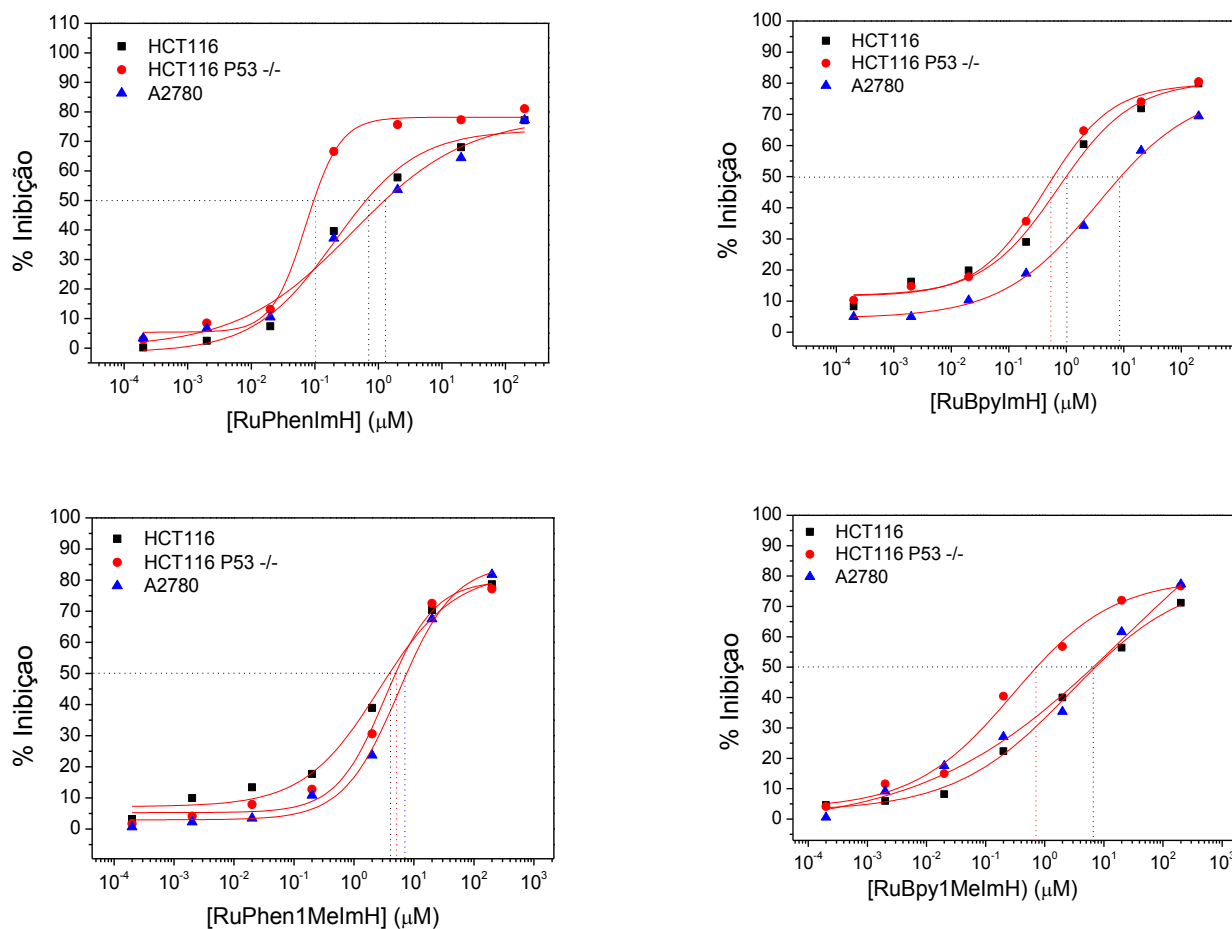


FIGURA 4.29 - Efeito da citotoxicidade dos complexos de rutênio nas células HCT116 p53^{+/+}, HCT116 p53^{-/-} e A2780.

TABELA 4.7 - Valores de IC₅₀ (µmolL⁻¹) para os complexos de rutênio e cisplatina nas células HCT116 (p53^{+/+}), HCT116 (p53^{-/-}) e A2780

Complexes	IC ₅₀ (µmol.L ⁻¹)		
	HCT116 (p53 ^{+/+})	HCT116 (p53 ^{-/-})	A2780
RuphenImH	0,72±0,18	0,10±0,03	1,30±1,0
RubpyImH	1,02±0,22	0,53±0,16	8,24±1,09
Ruphen1MeIm	4,00±0,76	5,13±0,45	6,92±0,79
Rubpy1MeIm	6,52±0,72	0,70±0,19	6,52±0,84
cisplatina	9,15±1,18	6,00±0,78	1,30±0,17

4.6.2 - Estudo do mecanismo de ação

Em consequência dos excelentes resultados de inibição da viabilidade celular, escolhemos o RuphenImH, complexo que apresentou os melhores valores de IC_{50} , para estudos mais aprofundados de elucidação do mecanismo de ação. Ter o conhecimento de como um composto se comporta frente as células tumorais e qual o seu modo de ação dispense muito tempo e vários experimentos. Neste trabalho apenas iniciamos estes estudos.

Dentre os vários ensaios biológicos necessários para se elucidar um mecanismo de ação, optamos pelas análises de citometria de fluxo, western Blot, microscopia confocal e ensaios de proliferação celular.

Nos ensaios de citometria de fluxo, as células HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-} foram incubadas com o complexo RuphenImH por 24 e 48 horas e depois submetidas a análise de citometria de fluxo.

Na figura 4.31 pode-se observar que o complexo induziu o acúmulo do número de células na fase G1 acompanhado pela redução do número de células na fase S. Para a célula p53^{+/+} estas mudanças não foram muito mais acentuadas e não houve grandes alterações quando comparamos os tempos de incubação de 24 e 48 horas. Ter um acúmulo de células em G1 implica que o complexo atuou nesta fase do ciclo celular de forma a não deixar as células continuarem a se dividir, inibindo sua proliferação celular⁷⁷.

Quando as células param na fase G1 elas tanto podem entrar para a fase G0, que é uma fase do ciclo com baixa atividade celular, e permanecer nesta fase (senescência) ou a célula pode ser induzida a morte por apoptose ou outro mecanismo de morte (mecanismo citotóxico). O perfil dos gráficos de citometria de fluxo para as células p53^{+/+} e p53^{-/-} são distintos sugerindo que o complexo atua de diferentes formas nas células com e sem o gene p53.

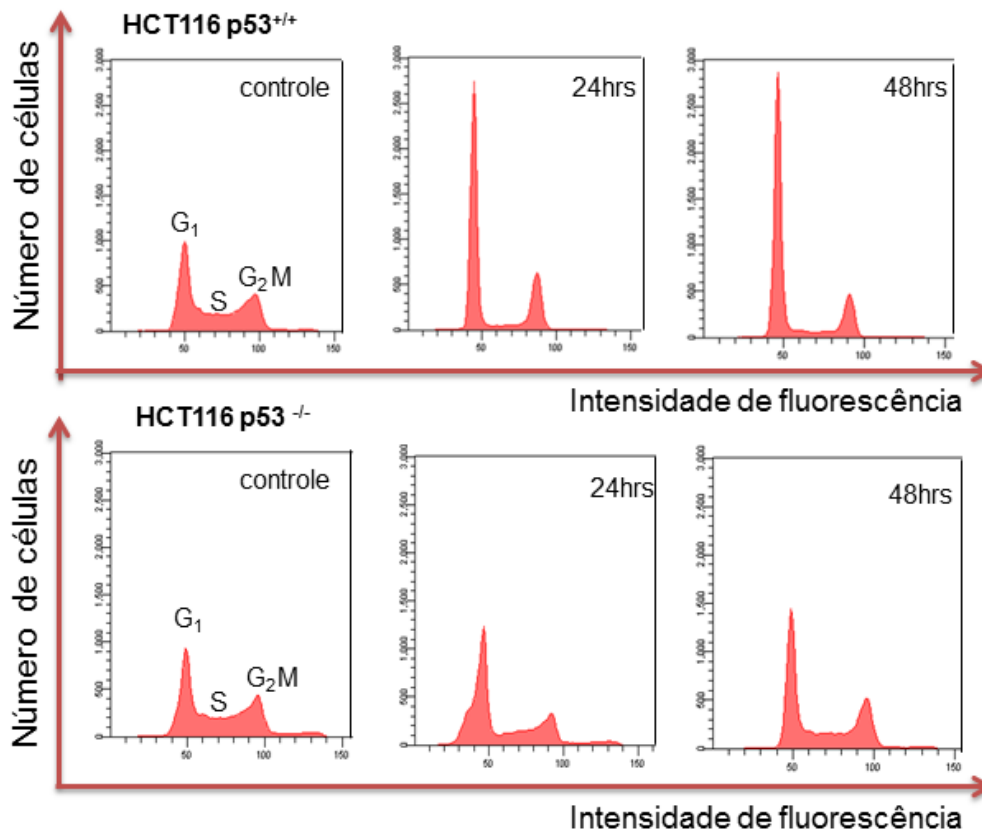


FIGURA 4.30 - Citometria de fluxo das células HCT116p53^{+/+} e HCT116p53^{-/-} quando incubadas com o RuphenImH nos tempos de 24 e 48 horas.

O método de Western Blot é uma técnica bastante sensível e seletiva na detecção de proteínas. As proteínas escolhidas para este estudo foram as pró-apoptóticas p53, PARP e caspase 3. Caso as células p53^{+/+} e p53^{-/-} estejam sendo induzidas pelo complexo a apoptose, estas proteínas serão ativadas e/ou clivadas. As amostras estudadas foram: o controle, o complexo nos tempos de incubação de 48 e 70 horas e a cisplatina, que é o controle positivo.

Na figura 4.32 se observou que a proteína PARP é clivada após 48 e 70 horas de incubação na célula p53^{-/-}, o mesmo não ocorre para a célula p53^{+/+}. No caso da Caspase3, não foi verificado clivagem em nenhuma das células apenas para a cisplatina que é o controle positivo. Na célula p53^{+/+}, a proteínas p53 sofre um leve aumento na concentração com o passar das horas, o que não é observado para a célula p53^{-/-} devido à ausência desta proteína na célula. A

proteína β -actina foi utilizada para normalização da quantidade de proteína nas amostras.

Os resultados de Western Blot levam as seguintes conclusões: O complexo não leva a célula $p53^{+/+}$ a morte por apoptose, este fato não exclui outro tipo de mecanismo de morte como necrose e autofagia. Já em relação a célula $p53^{-/-}$, observamos apoptose devido a ocorrência da clivagem da proteína PARP nos tempos de 48 e 70 horas . Se se compara estes dados aos valores de IC_{50} da tabela 4.5, o menor valor de IC_{50} (7 vezes) para as células $p53^{-/-}$ em relação as células $p53^{+/+}$ pode ser resultado da citotoxicidade do complexo nesta célula.

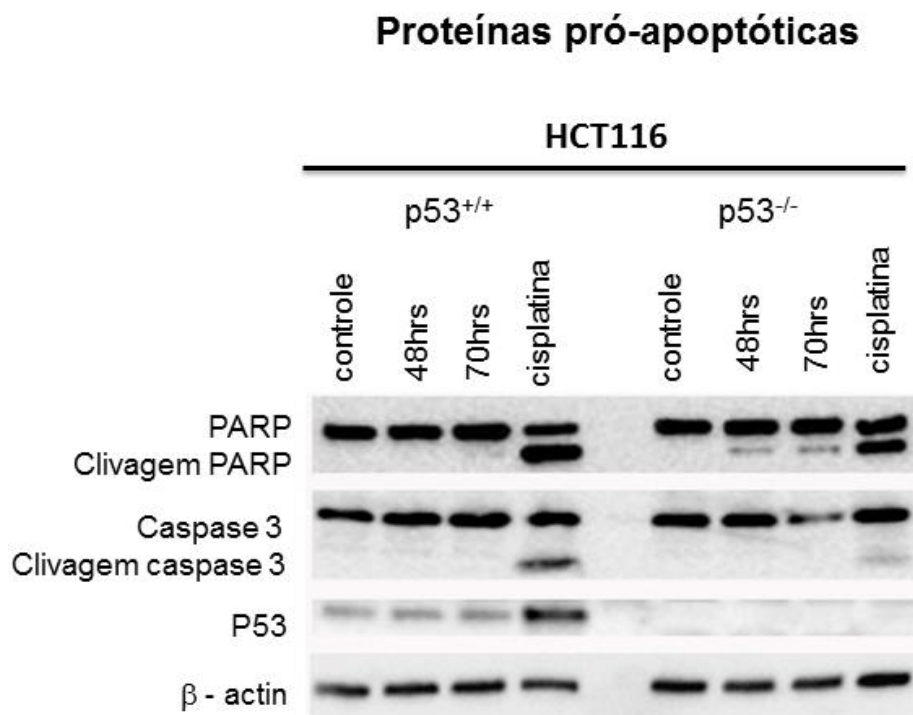


FIGURA 4.31 - Western Blot das proteínas PARP, caspase 3, P53 e β -actina quando incubadas com o complexo RuphenImH e cisplatina.

Quando um quimioterápico inibe a divisão celular das células tumorais sem levar a morte celular se diz que o mecanismo é citostático. Este tipo de mecanismo é tão importante quanto o mecanismo citotóxico (morte

celular), pois não deixa que o tumor cresça e desenvolva para a fase de metástase.

Quando se pensa em um fármaco citostático, que atua de forma não tóxica às células tumorais é possível pensar na hipótese que este mesmo composto possa apresentar baixa toxicidade também as células saudáveis. Não foi possível fazer os estudos de toxicidade com as células saudáveis para este trabalho, mas existem planos de executá-los em breve.

Quimioterápicos citostáticos podem ser administrados juntamente com quimioterápicos citotóxicos para juntos inibirem e matar as células tumorais. Nem sempre um fármaco é puramente citostático ou citotóxico, na grande maioria possui as duas vias⁷⁸. Uma maneira de avaliar se os complexos atuam de forma citostática, é contar o número de células em determinados intervalos de tempo e comparar com o controle. Se o número de células não alterar com o tempo podemos sugerir que o complexo está inibindo a proliferação celular de forma citostática.

Os resultados obtidos no ensaio de proliferação celular para o complexo RuphenImH nas células p53^{+/+} e p53^{-/-} estão apresentados na tabela 4.7. Os dados mostrados na Tabela 4.6 indicam que o número de células não varia significativamente com o passar das horas (30, 50 e 70 horas) tanto para as células p53^{+/+} quanto para as células p53^{-/-}, ao contrário do controle que apresenta um grande aumento do número de células com o tempo.

Estes dados confirmam a tese de que o complexo RuphenImH atua de forma citostática. Por outro lado, de acordo com os experimentos de Western Blot, o complexo também apresenta certa citotoxicidade frente a célula p53^{-/-}.

Este também é um resultado relevante visto que a maioria das células tumorais apresentam o gene p53 mutado, logo podemos inferir que o complexo RuphenImh possui certa seletividade as células tumorais em relação as saudáveis. Estas duas conclusões fazem do complexo RupehnImH um candidato a fármaco com grande potencial terapêutico.

TABELA 4.8 - Dados do ensaio de proliferação celular para o complexo RuphenImH

Tempo (horas)	30	50	77
HCT116 P53 +/+ (10⁴ cells/mL)			
Controle	120	190	320
RuphenImH	37	42	45
HCT116 P53 -/- (10⁴ cells/mL)			
Controle	96	120	160
RuphenImH	30	32	35

4.6.3 - Absorção do complexo pela célula visualizada por microscopia confocal

Uma vez que os complexos emitem luz de 660 nm, se utilizou a técnica de Microscopia Confocal para verificar a internalização do RuphenImH e Ruphen1MeIm na célula HCT116 p53^{+/+}.

A célula sem complexo (controle) foi tratada e com o complexo por 24 horas na concentração de 20 μmolL^{-1} . O marcador de DNA (DAPI) foi adicionado para melhor visualizar o núcleo da célula. A figura 4.33 mostra que os complexos consegue ultrapassar a barreira celular e estão localizados tanto no citoplasma quanto no núcleo.

Não se sabe se a passagem do complexo pela membrana celular foi por difusão simples ou facilitada por algum receptor presente na membrana. Provavelmente o ligante fenantrolina foi importante para a sua internalização por ser a parte mais lipofílica do complexo. Também é importante ressaltar que os

complexos são estáveis no meio intracelular, pois sua luminescência permaneceu no interior da célula.

Se houvesse alguma mudança na coordenação do complexo como a labilização do ligante monodentado e entrada de água a emissão desapareceria, pois o aquo-complexo não possui emissão.

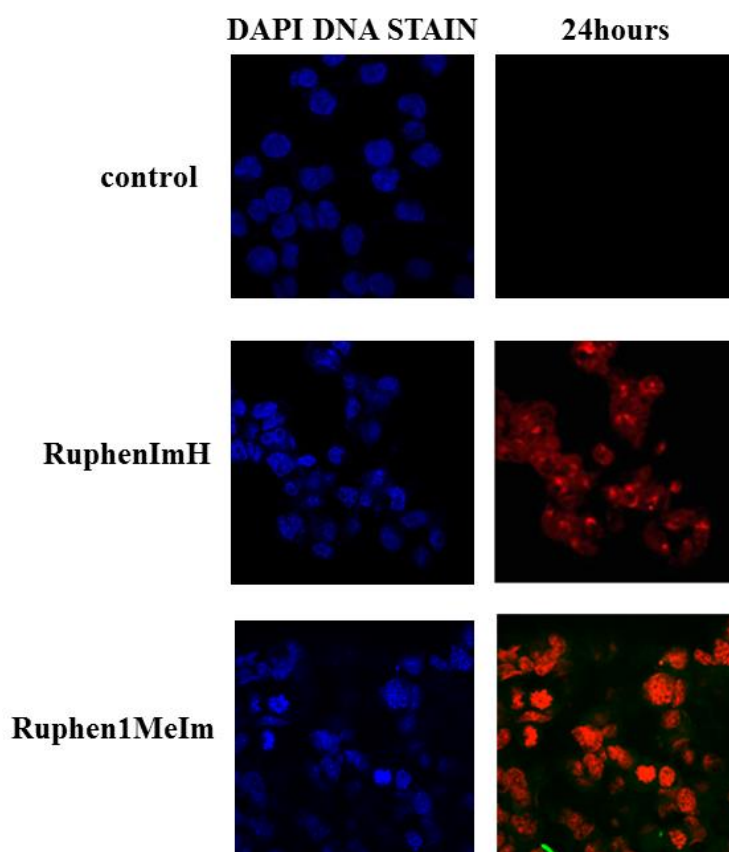


FIGURA 4.32 - Microscopia confocal do controle e dos complexos RuphenImH e Ruphen1MeIm na célula HCT116 utilizando o marcador de DNA, DAPI.

4.6.4 - Interação do complexo com DNA e sua atuação como sonda DNA

A maioria dos agentes quimioterápicos convencionais atuam no DNA causando danos irreversíveis a esta macromolécula o que leva a inibição das células tumorais. Não é regra um fármaco interagir com o DNA, mas na maioria dos casos é a partir desta interação que se desencadeia a morte celular

ou inibição da sua proliferação. De acordo com a ilustração⁷⁹ mostrada na figura 4.34, quando o dano ao DNA é de forma intensa, a probabilidade de ocorrer apoptose é maior. Ao contrário, quando o dano é leve este pode levar a outra via de atuação como a inibição da proliferação celular e o mecanismo citostático.

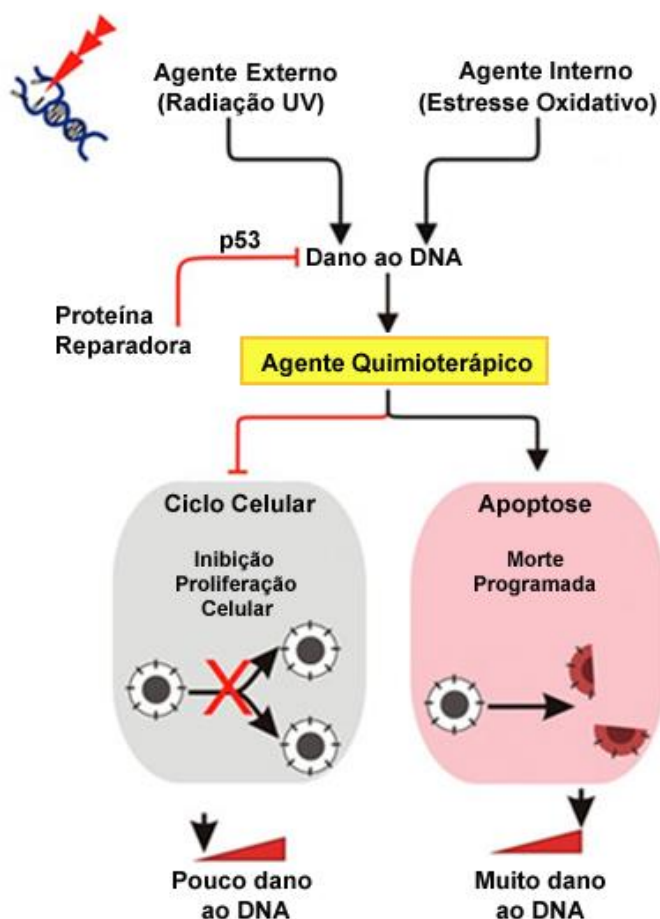


FIGURA 4.33 - Ilustração de um mecanismo citostático versus mecanismo citotóxico.

Para saber se o complexo RuphenImH interage com o DNA, se utilizou a técnica de fluorescência. O complexo RuphenImH apresenta emissão na região de 660 nm em tampão fosfato pH 7,4 quando excitado com luz de 490 nm (máximo de absorção da banda de ¹MLCT (Ru → phen). Quando se adicionou DNA na solução de complexo, em um intervalo de concentração de 1,0 μmolL⁻¹ a 10,0 μmolL⁻¹, se observou um aumento gradual da emissão do

complexo até a concentração de $8,0\mu\text{mol.L}^{-1}$ quando a emissão começa a ficar constante Figura 4.35.

A figura 4.36 mostra a variação do máximo de emissão do complexo com a adição de DNA. O aumento de emissão do complexo com a concentração do DNA sugere a interação complexo-DNA e indica que a interação do complexo ocorre no sítio hidrofóbico do DNA⁸⁰, pois quando ocorre a interação, a estrutura do complexo fica mais rígida e as moléculas de água que estavam solvatando o complexo se afastam fazendo com que o complexo perca menos energia por vibração não radiativa levando ao aumento da emissão do complexo.

Estes resultados não só mostram que o complexo interage com o DNA como também demonstram que o complexo pode atuar como sonda de DNA já que a intensidade de emissão do complexo aumenta na presença desta biomolécula. Vale ressaltar que estes dados são recentes e que pretendemos aprofundar estes estudos futuramente.

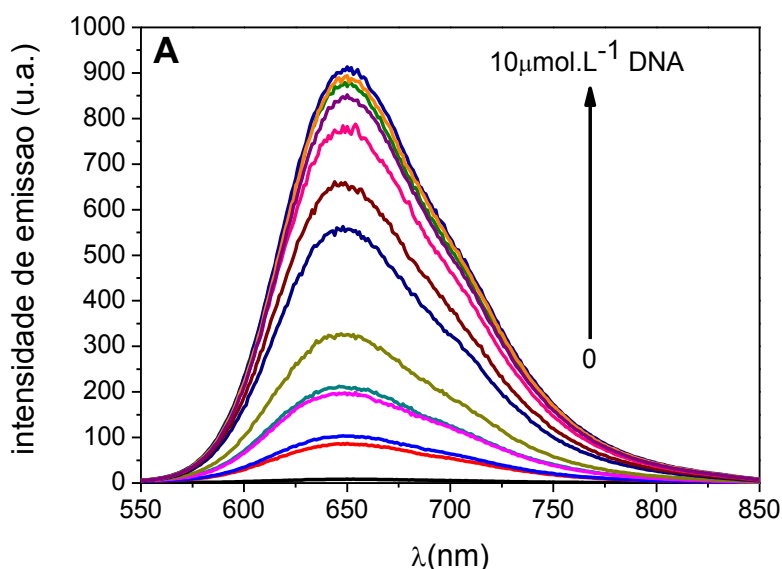


FIGURA 4.34 - Aumento da emissão do complexo RuphenImH devido à adição de DNA no intervalo de concentração de (0 a $10\mu\text{molL}^{-1}$)

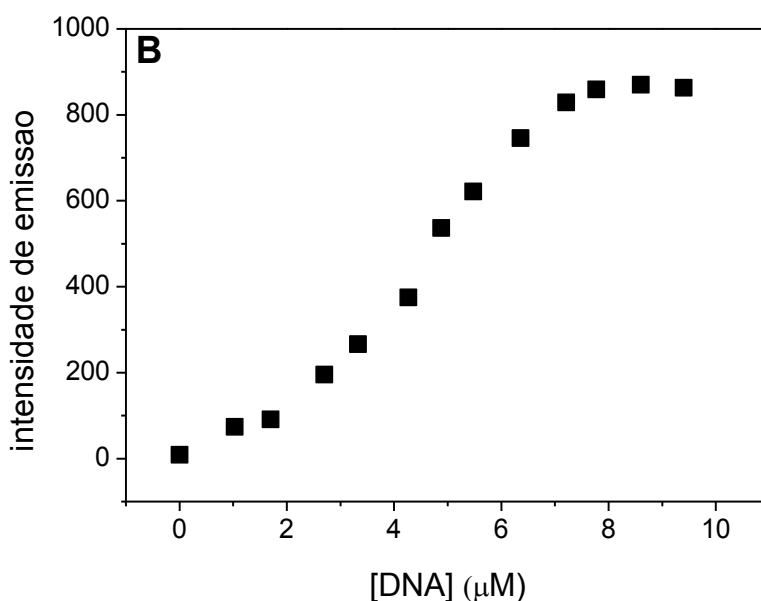


FIGURA 4.35 - Valores de emissão do complexo na região de 660 nm versus concentração de DNA.

5 – Conclusões

Os resultados obtidos até o momento são promissores para a atuação dos complexos estudados neste trabalho como bons candidatos a fármaco para tratamento de câncer. Os complexos podem ser preparados de maneira simples com altos rendimentos o que compensa o custo com reagentes relativamente caros como $\text{RuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Os complexos são estáveis no estado sólido e em solução aquosa quando mantidos sob o abrigo da luz. São bastante solúveis em meio aquoso (6mg/mL) e estáveis a variações de pH entre 2 a 12. Apresentam atividade anticancerígena *in vitro* comparáveis e na maioria dos casos superiores ao fármaco comercial cisplatina.

O complexo RuphenImH é seletivo às células tumorais como mostrado nos experimentos com as células $\text{p53}^{-/-}$ e provavelmente possui baixa toxicidade às células normais devido ao mecanismo de ação citostático. Vale ressaltar que a manutenção da emissão do complexo no interior da célula permite que o complexo atue como uma sonda biomolecular, permitindo o mapeamento do fármaco e sua reatividade no sistema biológico.

A emissão intensa a 660 nm, tempo de vida de emissão longo são propriedades fundamentais para um diagnóstico. A emissão em 660nm além de não danificar o tecido também não sofre interferência da absorção e/ou emissão de outras biomoléculas. O complexo RuphenImH interage de forma não covalente com a proteína HSA, sem alterar sua configuração secundária, atua como sonda de DNA e é um bom inibidor da enzima acetilcolinesterase. Todos estes fatores tornam os nossos complexos bons candidatos a fármacos.

6 - Referências

-
- ¹ MONGE, A.; CHORGHADÉ, M.; ERHARDT, P.W.; GANELLIN, C.R.; KOGA, N.; LINDBERG, P.; PERUN, T.J.; TOPLISS, J.G.; TRIVEDI, B.K.; WERMUTH, C.G. “Medicinal Chemistry in the development of societies”. *Eur. J. Med. Chem.*, **35**, p.1121-1125, 2000.
- ² FARRELL, N. “Biomedical uses and applications of inorganic chemistry An overview”. *Coord. Chem. Rev.*, **232**, p.1-4, 2002.
- ³ HOLM, R. H., KENNEPOHL, P., SOLOMON, E. I. “Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology”. *Chem. Rev.*, **96**, 2239–2314, 1996.
- ⁴ RIJT, S. H. V.; SADLER, P. J. “Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs”. *Drug Discov. Today*, **14**, 1089-97, 2009.
- ⁵ BARRY, N. P. E.; SADLER, P. J. “Exploration of the medical periodic table: towards new targets”. *Chem. Commun.*, **49**, 5106, 2013.
- ⁶ CLARKE, M.J. “Ruthenium metallopharmaceuticals” *Coord. Chem. Rev.*, **232**, 69-93, 2002.
- ⁷ GUO, Z., SADLER, P. J. “Metals in Medicine”. *Angew. Chem.*, **38**, 1512-1531, 1999.
- ⁸ <http://www.inca.gov.br>. Acessado em 10/01/2014.
- ⁹ LORD, C. J.; ASHWORTH, A. “The DNA damage response and cancer therapy”. *Nat.*, **481**, 287-294, 2012.
- ¹⁰ JACKSON, A. L.; LOEB, L.A. “The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer”. *Mutat Res.*, **477**, 7–21, 2001.
- ¹¹ PINHO, M. S. L.; “Expressão das proteínas p53 e Cox-2 em adenocarcinoma intestinal e mucosa adjacente”. *Rev. bras. colo-proctol.*, **20**, 258-260, 2000.
- ¹² SMITH, G.; CAREY, F. A.; BEATTIE, J.; MURRAY J. V. W.; LIGHTFOOT, T. J.; COXHEAD, J.; GARNER, R.C.; STEELE, R. J. C.; WOLF, C. R. “Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53-alternative genetic pathways to colorectal cancer”. *PNAS*, **99**, 9433-9438, 2002.
- ¹³ NORBURY, C. J.; ZHIVOTOVSKY, B. “DNA damage-induced apoptosis”. *Oncogene*, **23**, 2797–2808, 2004.
- ¹⁴ WILKINS, L. W. “Anti-Cancer Drugs: An International Journal on Anti-Cancer Agents”. *Pharm. Pharmacy*, **11**, 127, 2012.
- ¹⁵ ROSENBERG B, VANCAMP L, KRIGAS T. “Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode”. *Nat.*, **205**, 698-699, 1965.
- ¹⁶ ROSENBERG, B., VANCAMP, L., TROSKO, J. E., MANSOUR, V. H. “Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents”. *Nat.*, **222**, 385-6, 1969.

-
- ¹⁷ BOULIKAS T.; VOUGIOUKA M. "Cisplatin and platinum drugs at the molecular level". *Oncol Rep.*, **10**, 1663-82, 2003.
- ¹⁸ SADLER, P.J. "Metals in Medicine: Design and mechanism of action". *Adv. Inorg. Chem.*, **36**, p.1-48, 1991.
- ¹⁹ TODD, R. C.; LIPPARD, S. J. "Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds". *Metallomics*, **1**, 280-291, 2009.
- ²⁰ CHAPMAN, E. G.; DEROSE, V. J. "Enzymatic Processing of Platinated RNAs" *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 1946–1952, 2010.
- ²¹ NEAULT, J. F.; TAJMIR-RIahi, H. A. "Interaction of cisplatin with human serum albumin. Drug binding mode and protein secondary structure". *Biochimica et biophysica acta*, **1384**(1), 153-159, 1998.
- ²² 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.
- ²³ HARRAP, K. R.; "Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative." *Cancer Treat Rev.*, **12**, 21-33, 1985.
- ²⁴ GO, R. S.; ADJEL, A. A. "Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin". *J Clin Oncol.*, **17**, 409-22, 1999.
- ²⁵ BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M. "Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (Review)". *Oncol Rep.*, **10**, 1663–1682, 2003.
- ²⁶ ROBERTS, J. D.; BEGGIOLIN, G.; MANZOTTI, C.; PIAZZONI, L.; FARRELL, N. "Comparison of cytotoxicity and cellular accumulation of polynuclear platinum complexes in L1210 murine leukemia cell lines". *J. Inorg. Biochem.*, **77**, 47-50, 1999.
- ²⁷ SESSA, C.; CAPRI, G.; GIANNI, L.; PECCATORI, F.; GRASSELLI, G.; BAUER, J.; ZUCCHETTI, M.; VIGANO, L.; GATTI, A.; MINOIA, C.; LIATI, P.; VAN DEN BOSCH, S.; BERNAREGGI, A.; CAMBONI, G.; MARSONI, S. "Clinical and pharmacological phase I study with accelerated titration design of a daily times five schedule of BBR3464, a novel cationic triplatinum complex". *Ann. Oncol.*, **11**, 977–983, 2000.
- ²⁸ CHOY, H.; PARK, C.; YAO, M. "Current Status and Future Prospects for Satraplatin, an Oral Platinum Analogue". *Clin Cancer Res.*, **14**, 1633-1638, 2008.
- ²⁹ SAVA, G.; ALESSIO, E.; BERGAMO, A.; MESTRONI, G. "Sulfoxide Ruthenium Complexes: Non Toxic Tools for the Selective Treatment of Solid Tumor Metastases". *Metallopharmaceuticals I - Topics in Biological Inorganic Chemistry*, **1**, 143-169, 1999.

- ³⁰ 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.
- ³¹ PONGRATZ, M.; SCHLUGA, P.; JAKUPEC, M. A.; ARION, V. B.; HARTINGER, C. G.; ALLMAIER, G.; KEPPLER, B. K. "Transferrin binding and transferrin-mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP1019, studied by means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy". *J. Anal. At. Spectrom.*, **19**, 46–51, 2004
- ³² GAVA, B.; ZORZET, S.; SPESSOTTO, P.; COCCHIETTO, M.; SAVA, G. "Inhibition of B16 Melanoma Metastases with the ruthenium complexes imidazolium trans-dimethylsulfoxide tetrachlororuthenate and down-regulation of tumor cell invasion". *J. Am. Pharmacol., Exp. Ther.*, **317**, 284–291, 2006.
- ³³ SAVA, G.; FRAUSIN, F.; COCCHIETTO, M.; VITA, F.; PODDA, E.; SPESSOTTO, P.; FURLANI, A.; SCARCIA, V.; ZABUCCHI, G. "Actin-dependent tumour cell adhesion after short-term exposure to the antimetastasis ruthenium complex NAMI-A". *Eur. J. Cancer*, **40**, 1383–1396, 2004.
- ³⁴ WEBB, M. I.; WALSBY, C. J. "Control of ligand-exchange processes and the oxidation state of the antimetastatic Ru(III) complex NAMI-A by interactions with human serum albumin". *Dalton Trans.*, **40**, 1322, 2011.
- ³⁵ SCHLUGA, P.; HARTINGER, C. G.; EGGER, A.; REISNER, E.; GALANSKI, M.; JAKUPEC, M. A.; KEPPLER, B. K. "Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP". *Dalton Trans.*, **14**, 1796-1802, 2006.
- ³⁶ BRINDELL, M.; PIOTROWSKA, D.; SHOUKRY, A. A.; STOCHEL, G.; ELDIK, R. "Kinetics and Mechanism of the Reduction of (ImH)[*trans*-RuCl₄(dmsO)(Im)] by Ascorbic Acid in Acidic Aqueous Solution". *J. Biol. Inorg. Chem.*, **12**, 809–818, 2007.
- ³⁷ CLARKE, M. J. "Ruthenium metallopharmaceuticals". *Coordination Chemistry Reviews*, **236**, 209-233, 2003.
- ³⁸ HOTZE, A.C.G; VELDERS, A.H.; UGOZZOLI, F.; BIAGINI-CINGI, M.; MANOTTI-LANFREDI, A.M.; HAASNOOT, J.G.; REEDIJK, J. "Synthesis, Characterization, and Crystal Structure of α -[Ru(azpy)₂(NO₃)₂] (azpy = 2-(Phenylazo)pyridine) and the Products of Its Reaction with Guanine Derivatives". *Inorg. Chem.*, **39**, 3838, 2000.
- ³⁹ VELDERS, A.H.; KOUIJMAN, H.; SPEK, A.L.; HAASNOOT, J.G.; DE VOS, D.; REEDIJK, J. "Strong Differences in the in Vitro Cytotoxicity of Three Isomeric Dichlorobis(2-phenylazopyridine)ruthenium(II) Complexes". *Inorg. Chem.*, **39**, 2966, 2000.
- ⁴⁰ NOVAKOVA, O.; KASPARKOVA, J.; VRANA, O.; VANVLIET, P.M.; REEDIJK, J.; BRABEC, V. "Correlation between Cytotoxicity and DNA-

Binding of Polypyridyl Ruthenium Complexes". *Biochem.*, **38**, 12369-12378, 1995.

⁴¹ MORRIS, R. E.; AIRD, R.E.; MURDOCH, P. D. S.; CHEN, H.; CUMMINGS, J.; HUGHES, N. D.; PARSONS, S., PARKIN, A.; BOYD, G.; JODRELL, D. I.; SADLER, P. J. "Inhibition of Cancer Cell Growth by Ruthenium(II) Arene Complexes". *J. Med. Chem.*, **44**, 3616-3621, 2001.

⁴² KILPIN, K. J.; CAMMACK, S.M.; CLAVEL, C.M.; DYSON, P. J. "Ruthenium(II) arene PTA (RAPTA) complexes: impact of enantiomerically pure chiral ligands". *Dalton Trans.*, **42**, 2008–2014, 2013.

⁴³ CHENG, C.-C.; LEE, W.-L.; SU, J.-G.; LIU, C.-L.; CHIN, J. "Covalent Interaction of Ru(terpy)(tmephen)Cl⁺ with DNA: A Potential Ruthenium-Based Anticancer Drug". *Chem. Soc. (Taipei)*, **47**, 213, 2000.

⁴⁴ HELMS, J.; HUANG, B.L.; PRICE, R.; SULLIVAN, B.P.; SULLIVAN, B.A. "Coordination Chemistry of Tropolone-Based Antimitotic Drugs and the Antineoplastic Behavior of Some Ruthenium(II) and Platinum(II) Derivatives". *Inorg. Chem.*, **34** 5335, 1995.

⁴⁵ FRIEDMAN, A. E.; CHAMBRON, J. C.; SAUVAGE, J. P.; TURRO N. J.; BARTON, J. K. "A molecular light switch for DNA: Ru(bpy)₂(dppz)₂⁺". *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 4960, 1990.

⁴⁶ CARDOSO, C. R.; DE AGUIAR, I.; CAMILO, M. R.; LIMA, M. V.; ITO, A. S.; BAPTISTA, M. S.; PAVANI, C.; VENÂNCIO, T.; CARLOS, R. M. "Synthesis, spectroscopic characterization, photochemical and photophysical properties and biological activities of ruthenium complexes with mono- and bidentate histamine ligand". *Dalton Trans.*, **41**, 6726-34, 2012.

⁴⁷ KRAGH-HANSEN, U. "Molecular aspects of ligand binding to serum albumin". *Pharmacological reviews*, **33**, 17-53, 1981.

⁴⁸ KRAGH-HANSEN, U.; CHUANG, V. T. G.; OTAGIRI, M. "Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin". *Biological and pharmaceutical bulletin*, **25**, 695-704, 2002.

⁴⁹ SUDLOW, G.; BIRKETT, DJ.; WADE, DN. "The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin". *Mol Pharmacol*, **11**, 824-832, 1975b.

⁵⁰ SUDLOW, G.; BIRKETT, DJ.; WADE, DN. "Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin". *Mol Pharmacol*, **12**, 1052-1061, 1976.

⁵¹ CARTER, DC.; HO, JX. "Structure of serum albumin". *Adv Protein Chem* **45**, 153-203, 1994.

⁵² VORUM, H. "Reversible ligand binding to human serum albumin". *Theoretical and clinical aspects. Dan Med Bull*, **46**, 379-399, 1999.

⁵³ KRAGH-HANSEN, U. "Relations between high-affinity binding sites for L-tryptophan, diazepam, salicylate and Phenol Red on human serum albumin". *Biochem. J.*, **209**, 135-142, 1983.

-
- ⁵⁴ KRAGH-HANSEN, U. "Relations between high-affinity binding sites of markers for binding regions on human serum albumin". *Biochem. J.*, **225**, 629-638, 1985.
- ⁵⁵ KRAGH-HANSEN, U. "Evidence for a large and flexible region of human serum albumin possessing high affinity binding sites for salicylate, warfarin, and other ligands". *Mol. Pharmacol.*, **34**, 160-171, 1988.
- ⁵⁶ YAMASAKI, K.; MARUYAMA, T.; KRAGH-HANSEN, U.; OTAGIRI, M. "Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site". *Biochim. Biophys. Acta*, **1295**, 147-157, 1996.
- ⁵⁷ DOCKAL, M.; CHANG, M.; CARTER, D. C.; RÜKER, F. "Five recombinant fragments of human serum albumin-tools for the characterization of the warfarin binding site". *Protein Sci.*, **9**(8), 1455-1465, 2000.
- ⁵⁸ NARASIMHAN, B.; SHARMA, D.; KUMAR, P. "Biological importance of imidazole nucleus in the new millennium". *Med Chem Res*, **20**, 1119-1140, 2011.
- ⁵⁹ FRISCH, M. J. et al. *Gaussian 09, Revision B.1*; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.
- ⁶⁰ LEE, C. T.; YANG, W. T.; PARR, R. G. "Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density". *Phys. Rev.*, **37**, 785, 1988.
- ⁶¹ DUNNING, T. H.; HAY, P. J. "Modern Theoretical Chemistry" Plenum: New York,; Vol. **3**, 1976.
- ⁶² HAY, P. J.; WADT, W. R. *J. Chem. Phys.*, **82**, 270, 1985.
- ⁶³ HAY, P. J.; WADT, W. R. *J. Chem. Phys.*, **82**, 299, 1985.
- ⁶⁴ BICKELHAUPT, F. M. In *Reviews in Computational Chemistry*; Lipkowitz, K. B., Boyd, D. R. E., Eds.; Wiley: New York, **15**, p 1, 2000.
- ⁶⁵ NOODLEMAN, L.; LOVELL, T.; HAN, W. G.; TORRES, R. A.; HIMO, F. "Comprehensive Coordination Chemistry II"; Elsevier: Oxford, U.K., 2004.
- ⁶⁶ IHTSHAMUL, H. "Thermodynamics of drug-DNA interactions". *Arch. Biochem. Bioph.*, **403**, 1-15., 2002.
- ⁶⁷ MAYER, M.; MEYER, B. "Group Epitope Mapping by Saturation Transfer Difference NMR to Identify Segments of a Ligand in Direct Contact with a Protein Receptor". *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 6108-6117, 2001.
- ⁶⁸ CABEÇA, L. F., "Topologia de Complexos Formados entre Drogas/ β Ciclodextrinas/Lipossomas/Células, Aplicando Técnicas de Ressonância Magnética Nuclear – RMN" Campinas, Programa de Pós-Graduação em Química - UNICAMP, 2009, Pg. 20.
- ⁶⁹ Schilt, A. A.; Frederick, S. "Acid dissociation constants of 1,10-phenanthrolines". *J. phys. Chem.*, **60**, 1546, 1956.

-
- ⁷⁰ HOWARD, P. H. Handbook of Environmental Fate and Exposure Data For Organic Chemicals, Vol 5, pag. 1, 2000.
- ⁷¹ RAVERA, M.; BARACCO, S.; CASSINO, C.; ZANELLO, P.; OSELLA, D. "Appraisal of the redox behaviour of the antimetastatic ruthenium(III) complex [ImH][RuCl₄(DMSO)(Im)], NAMI-A". Dalton Trans., 2347-2351, 2004.
- ⁷² TOKEL-TAKVORYAN, N.E.; HEMINGWAY, R.E.; BARD, A.J. "Electrogenerated chemiluminescence. XIII. Electrochemical and electrogenerated chemiluminescence studies of ruthenium chelates". JACS., **95**, 6582-6589, 1973.
- ⁷³ JURIS, A.; BALZANI, V. "Ru(II) polypyridine complexes: photophysics, photochemistry, eletrochemistry, and chemiluminescence". Coordination Chemistry Reviews, 84, 85-277, 1988.
- ⁷⁴ KALYANASUNDARARN, K. "Photophysics, photochemistry and solar energy conversion with tris(bipyridyl)ruthenium(II) and its analogues" Coord. Chem. Rev., **46**, 159-244, 1982.
- ⁷⁵ MICROCAL, LLC. Isothermal Titration Calorimetry and Drug Design, 2006.
- ⁷⁶ VIEGAS, A.; MANSO, J.; NOBREGA, F. L.; CABRITA, E. J. "Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding". J. Chem. Educ., **88**, 990–994. 2011.
- ⁷⁷ XIE, Y.Y.; HUANG, H.L.; YAO, J.H.; LIN, G.J.;JIANG, G.B.; LIU, Y.J. "DNA-binding, photocleavage, cytotoxicity in vitro, apoptosis and cell cycle arrest studies of symmetric ruthenium(II) complexes". Eur. J. Med.Chem., **63**, 603 – 610, 2013.
- ⁷⁸ XIE, Y.Y.; HUANG, H.L.; YAO, J.H.; LIN, G.J.;JIANG, G.B.; LIU, Y.J. "DNA-binding, photocleavage, cytotoxicity in vitro, apoptosis and cell cycle arrest studies of symmetric ruthenium(II) complexes". Eur. J. Med.Chem., **63**, 603 – 610, 2013.
- ⁷⁹ http://www.sbi.uni-rostock.de/research/research_projects/single/15/. Acessado em 05/01/2014.
- ⁸⁰ HUANG, H.L.; LI, Z.Z.; LIANG, Z.H.; YAO, J.H.; LIU, Y.J. "Synthesis, cellular uptake, apopotosis, cytotoxicity, cell cycle arrest, interaction with DNA and antioxidant activity of ruthenium(II) complexes". European Journal of Medicinal Chemistry 46, 2011, 3282 - 3290.

7 - Anexos

Tabela A1. Ângulos e distâncias teórico do complexo RuphenImH

Átomos	Distancia ligação (Å)	Átomos	Ângulos ligação (°)
Ru(1)N-imidazol(46)	2,12	N-Phen(2)Ru(1)N-phen(8)	79,62
Ru(1)N-imidazol(55)	2,12	N-imidazol(46)Ru(1)N-imidazol(55)	91,43
Ru(1)N-phen(2)	2,09	N-imidazol(46)Ru(1) N-phen(30)	86,62
Ru(1)N-phen(8)	2,10	N-imidazol(46)Ru(1) N-phen(24)	89,54
N-imidazol(58)-H-imidazol(63)	1,01	N-imidazol(46)Ru(1) N-phen(2)	176,38
N-imidazol(49)-H-imidazol(51)	1,01		

Tabela A2. Ângulos e distâncias teórico do complexo Ruphen1MeIm

Átomos	Distancia ligação (Å)	Átomos	Ângulos ligação (°)
Ru(1)N-imidazol(46)	2,12	N-Phen(2)Ru(1)N-phen(8)	79,57
Ru(1)N-imidazol(62)	2,12	N-imidazol(46)Ru(1)N-imidazol(62)	91,48
Ru(1)N-phen(2)	2,09	N-imidazol(62)Ru(1) N-phen(2)	89,67
Ru(1)N-phen(8)	2,10	N-imidazol(62)Ru(1) N-phen(8)	86,96
N-imidazol(49)-CH3-imidazol(54)	1,473		
C-imidazol(60)-CH3-imidazol(66)	1,473		

Tabela A3. Ângulos e distâncias teórico do complexo RubpyImH

Átomos	Distancia ligação (Å)	Átomos	Ângulos ligação (°)
Ru(1)N-imidazol(42)	2,13	N-bpy(2)Ru(1)N-bpy(8)	78,68
Ru(1)N-imidazol(51)	2,13	N-imidazol(42)Ru(1)N-imidazol(51)	91,61
Ru(1)N-bpy(2)	2,08	N-imidazol(51)Ru(1) N-bpy(2)	89,52
Ru(1)N-bpy(8)	2,09	N-imidazol(51)Ru(1) N-bpy(8)	85,76
N-imidazol(45)-H-imidazol(47)	1.01		
N-imidazol(54)-H-imidazol(59)	1.01		

Tabela A4. Ângulos e distâncias teórico do complexo Rubpy1MeIm

Átomos	Distancia ligação (Å)	Átomos	Ângulos ligação (°)
Ru(1)N-imidazol(42)	2,13	N-bpy(2)Ru(1)N-bpy(8)	78,64
Ru(1)N-imidazol(58)	2,13	N-imidazol(42)Ru(1)N-imidazol(58)	91,29
Ru(1)N-bpy(2)	2,08	N-imidazol(42)Ru(1) N-phen(22)	89,71
Ru(1)N-bpy(8)	2,09	N-imidazol(42)Ru(1) N-phen(28)	86,03
N-imidazol(56)-CH ₃ -imidazol(62)	1,47		
N-imidazol(45)-CH ₃ -imidazol(50)	1,47		

Tabela A5. Atribuição do espectro de UV-Vis experimental a partir dos valores do calculo teórico para o complexo Ruphen1MeIm.

Comprimento de onda experimental	Comprimento de onda teórico	Transição eletrônica	Principais transições	Força do oscilador (<i>f</i>)
224nm	225nm	¹ LLCT, ¹ LLCT	1meim→ phen* phen→ phen*	0,255
265nm	255nm	¹ LLCT	phen→ phen*	0,9562
	260nm	¹ LLCT	Ru,dπ→1M eim	0,0239
320nm	326nm	¹ MLCT, ¹ MC	Ru,dπ→phe n* Ru,dπ→Ru, dσ	0,0001
430nm	447nm	¹ MLCT	Ru,dπ→phe n*	0,0904
484nm	479nm	¹ MLCT	Ru,dπ→phe n*	0,0961

Tabela A6. Atribuição do espectro de UV-Vis experimental a partir dos valores do cálculo teórico para o complexo RubpyImH.

Comprimento de onda experimental	Comprimento de onda teórico	Transição eletrônica	Principais transições	Força do oscilador (<i>f</i>)
243nm	225nm	¹ LLCT, ¹ LLCT	bpy→bpy* ImH→ bpy*	0,1167
	260nm	¹ MLCT	Ru,dπ→Im H*	0,1213
293nm	280nm	¹ LLCT, ¹ MC	bpy→bpy* Ru,dπ→Ru, dσ	0,2010
342nm	328nm	¹ MC ¹ MLCT	Ru,dπ→Ru, dσ Ru,dπ→bpy* , Ru,dπ→Im H	0,0052
	344nm	¹ MLCT	Ru,dπ→bpy*	0,1149
454nm	446nm	¹ MLCT	Ru,dπ→bpy*	0,0287
494nm	476nm	¹ MLCT	Ru,dπ→bpy*	0,1396

Tabela A7. Atribuição do espectro de UV-Vis experimental a partir dos valores do calculo teórico para o complexo Rubpy1MeIm.

Comprimento de onda experimental	Comprimento de onda teórico	Transição eletrônica	Principais transições	Força do oscilador (f)
243nm	195nm	1LLCT , 1LLCT	$1MeIm \rightarrow bpy^*$ $1MeIm \rightarrow$ $1MeIm$	0,1184
292nm	278nm	1LLCT ,	$bpy \rightarrow bpy^*$	0,6169
	328nm	1MLCT , 1MC	$Ru, d\pi \rightarrow$ $1MeIm$ $Ru, d\pi \rightarrow Ru, d\sigma$	0,0041
340nm	346nm	1MLCT	$Ru, d\pi \rightarrow bpy^*$	0,1031
454nm	450nm	1MLCT	$Ru, d\pi \rightarrow bpy^*$	0,0298
490nm	481nm	1MLCT	$Ru, d\pi \rightarrow bpy^*$	0,1367

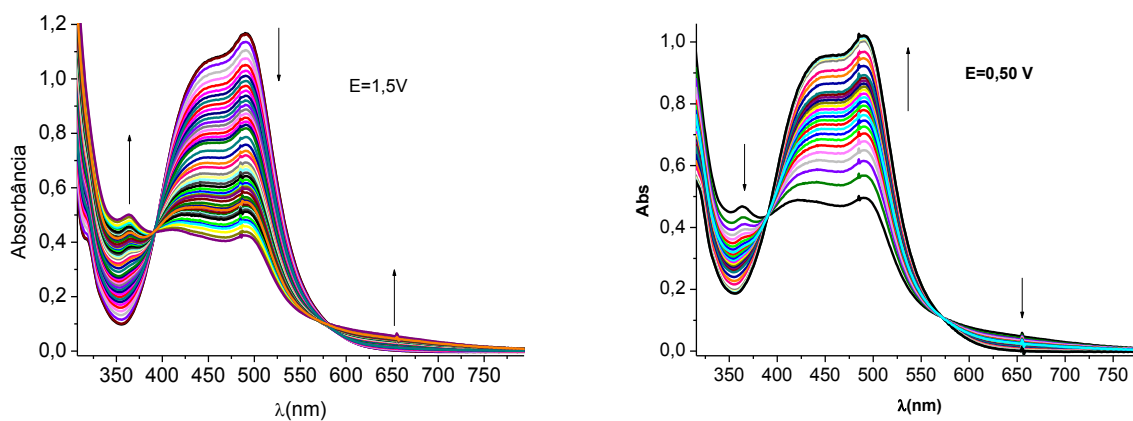


FIGURA A8 - Espectroeletróquímica do Ruphen1MeIm em DMF utilizando PTBA 0,1 M como eletrólito de suporte. A) 1,5 V; B) 0,5 V.

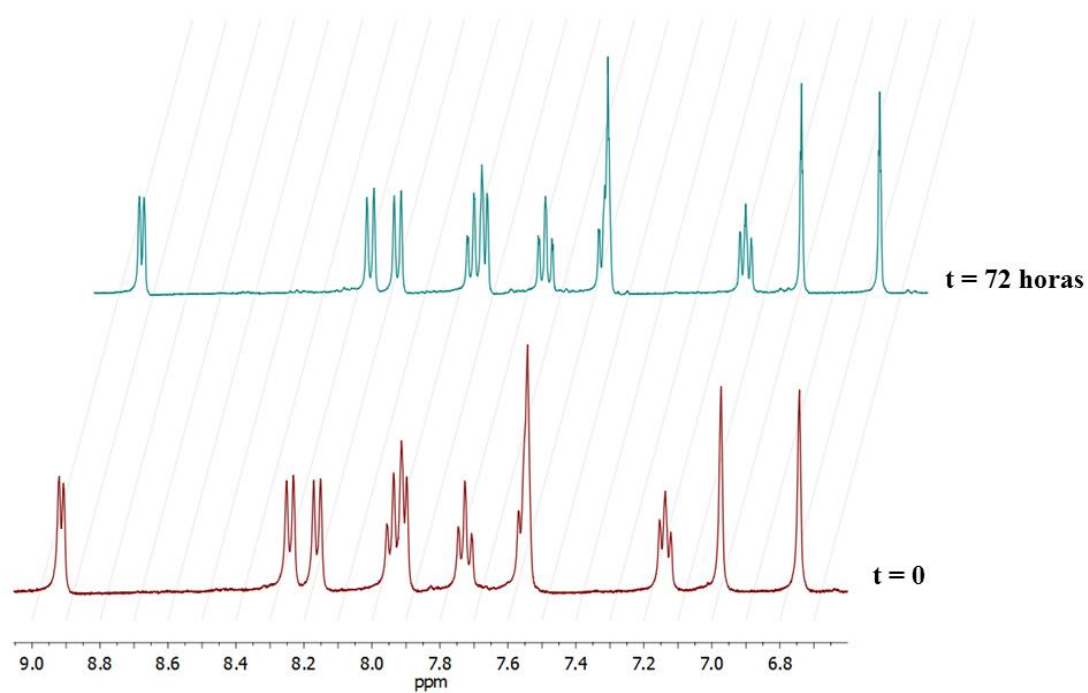


Figura A9. RMN ¹H do complexo RubpyImH em tampão fosfato pH 7,4 na ausência de luz no tempo 0 e 72 horas.

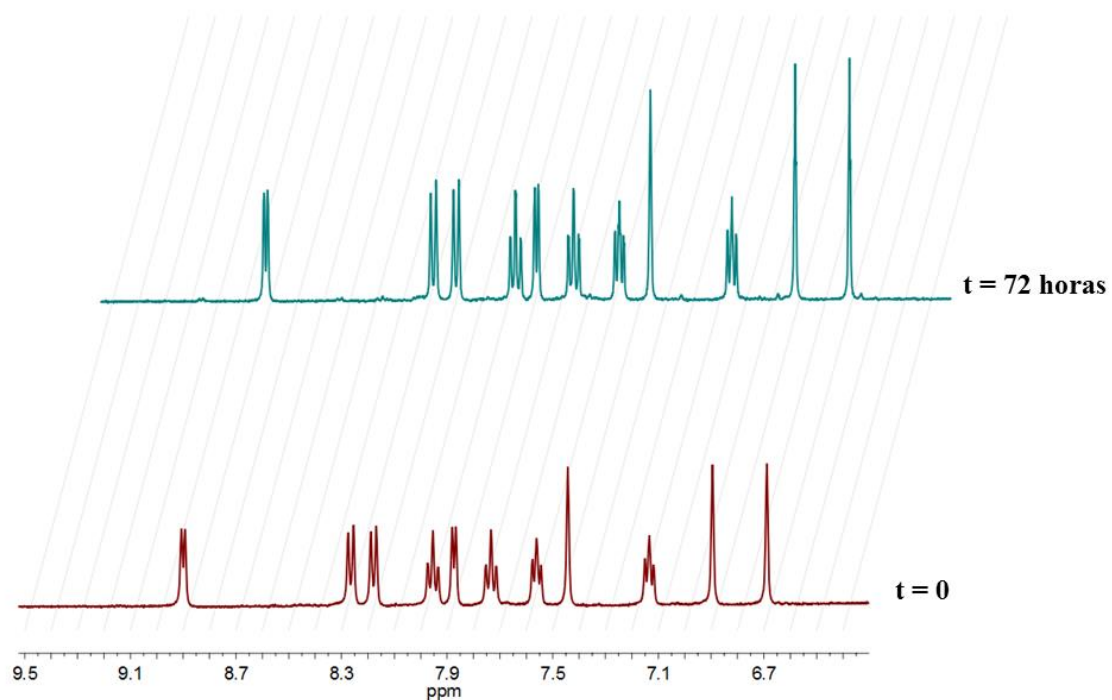


Figura A10. RMN ^1H do complexo Rubpy1MeIm em tampão fosfato pH 7,4 na ausência de luz no tempo 0 e 72 horas.

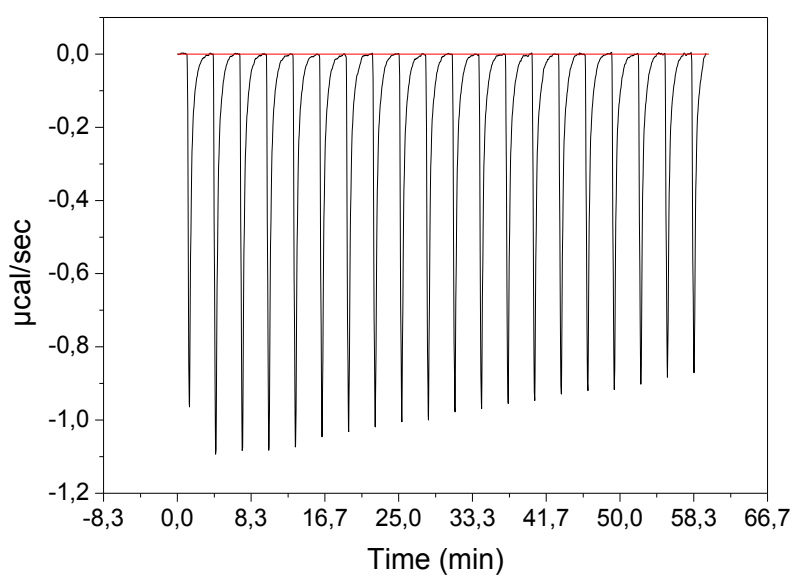


Figura A11 - Titulação da proteína HSA pelo complexo Ruphen1MeIm em tampão fosfato $0,1\text{mol.L}^{-1}$ pH 7,4.

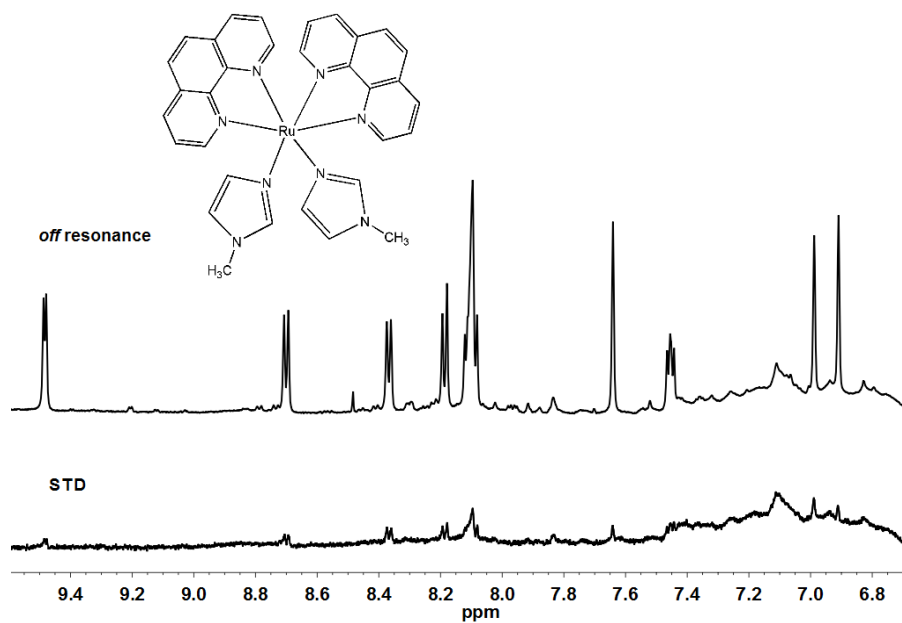


Figura A12 - Espectro de STD-RMN para o complexo Ruphen1MeIm na presença da HSA.