

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
CITOTÓXICA DE COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE PLATINA E
ZINCO

RAFAELA OLIVEIRA MOREIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
JANEIRO - 2015

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
CITOTÓXICA DE COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE PLATINA E
ZINCO**

RAFAELA OLIVEIRA MOREIRA

"Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais."

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Christiane Fernandes Horn

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JANEIRO – 2015**

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE PLATINA E ZINCO

RAFAELA OLIVEIRA MOREIRA

“Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciências Naturais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais”

Aprovado em 23 de janeiro de 2015.

Comissão Examinadora:

Prof. Josane Alves Lessa (Dra., Química) - UERJ

Prof. Leonardo Munaldi Lube (Dr., Ciências Naturais) - IFF

Prof. Milton Masahiko Kanashiro (Dr., Biociências e Biotecnologia) - UENF

Prof. Christiane Fernandes Horn (Dra., Química) - UENF
ORIENTADORA

Aos meus pais, Sérgio e Márcia, de quem herdei o bom caráter e o gosto pelos estudos, e que me motivaram a cada dia a ir em busca dos meus sonhos. Aos meus avós, José e Célia, que com sua simplicidade e paz me ensinaram que as coisas mais importantes da vida não podem ser compradas com dinheiro ou status. Ao meu esposo Dérick, companheiro dos bons e maus momentos desta caminhada. E especialmente aos meus filhos, Luísa e Davi, minha força motriz.

AGRADECIMENTOS

À Deus;

À Luísa e Davi, pelo amor incondicional;

Aos meus pais e meus irmãos, por tudo;

Ao Dérick, pelo amor e companheirismo;

À Prof^a. Christiane pela orientação e incentivo;

Ao Prof. Adolfo pelo auxílio e discussões;

Ao Prof. Franz, por todo auxílio na realização dos experimentos, pelos ensinamentos e discussões;

Ao técnico Marcelo Mathias por todo auxílio na realização de análises químicas.

Aos professores Milton Masahiko Kanashiro e João Carlos de Aquino Almeida pela colaboração na realização deste trabalho;

À Samila, Érika e Wagner, por todo o trabalho que desenvolvemos juntos durante estes últimos anos;

Aos companheiros de laboratório e amigos Michelle, Camila, Leonardo, Luísa, Monique, Thiago, Clícia, Vagner, Luana, e aos demais alunos do laboratório 103, pela amizade e ajuda;

Aos professores Milton Masahiko Kanashiro, Leonardo Munaldi Lube e Josane Alves Lessa que fizeram parte da banca;

A UENF e CAPES pela estrutura e concessão de bolsa;

A todos os que direta ou indiretamente estiveram envolvidos neste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ESQUEMAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. A Química Inorgânica na Medicina	16
1.2. O Câncer: aspectos gerais, seu desenvolvimento e os principais tipos de tratamento.....	17
1.2.1. Quimioterapia Antineoplásica e Mecanismos de Morte Celular.....	23
1.3. Compostos de Coordenação e Quimioterapia Antineoplásica.....	31
1.3.1. Cisplatina	31
1.3.2. Fármacos de segunda e terceira geração análogos à cisplatina.....	34
1.3.3. Compostos de coordenação com atividade antitumoral	37
2. OBJETIVOS	48
2.1. Objetivo Geral	48
2.2. Objetivos Específicos.....	48
3. PARTE EXPERIMENTAL	49
3.1. Técnicas Empregadas	49
3.1.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	49
3.1.2. Espectroscopia no infravermelho	49
3.1.3. Análise elementar.....	50
3.1.4. Determinação do ponto de fusão	50
3.1.5. Condutivimetria.....	50
3.1.6. Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS)	50
3.2. Sínteses dos Compostos Orgânicos.....	50
3.2.1. Síntese do ligante (2-hidroxibenzil) (2-piridilmetil)amina (L1)	50
3.2.2. Síntese do ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (L2).....	51
3.2.3. Síntese do precursor 1-(1-naftiloximetil)oxirano (P1).....	51
3.2.4. Síntese do ligante 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L3)	52

3.2.5. Síntese do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P2).....	53
3.2.6. Síntese do ligante 1-(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina-3-(2-naftiloxi)-propan-2-ol (L4).....	53
3.3. Sínteses dos Compostos Inorgânicos.....	54
3.3.1. Síntese dos complexos de zinco [Zn(L1)Cl ₂] (C1) e [Zn(L2)Cl] (C2).....	54
3.3.2. Síntese do complexo [Zn(L3)Cl] (C3).....	54
3.3.3. Síntese dos complexos [Zn(L4)Cl] (C4)	55
3.3.4. Síntese dos complexos [Pt(L1)Cl] (C5), [Pt(L2)Cl] (C6) e [Pt(L4)Cl] (C8).....	55
3.3.5. Síntese do complexo [Pt(L3)Cl] (C7).....	56
3.4. Estudos Biológicos.....	57
3.4.1. Preparo das soluções do compostos e cultura das células tumorais.....	57
3.4.2. Avaliação da viabilidade celular por metabolização do MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio).....	59
3.4.3. Avaliação do tipo de morte celular através de marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio (PI)	60
3.4.4. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (Sub-G1).....	60
3.4.5. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (JC-1).....	61
3.4.6. - Avaliação da atividade de caspases	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1. Caracterização dos Compostos Orgânicos.....	62
4.2. Caracterização dos Complexos de Platina e Zinco	63
4.2.1. Caracterização dos complexos de zinco já descritos na literatura: C ₁ e C ₂	63
4.2.2. Caracterização dos complexos inéditos de platina e zinco: C3 – C8.....	64
4.3. Estudos da atividade citotóxica dos complexos.....	82
4.3.1. Estudos de citotoxicidade celular através do método de metabolização do MTT.....	82
4.3.2. Avaliação da Externalização de fosfatidilserina (marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio).....	84
4.3.3. Avaliação do ciclo celular (Sub-G1) por citometria de fluxo	86
4.3.4. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM)	87
4.3.5. Avaliação da expressão das caspases 3, 6, 8 e 9	88
5. CONCLUSÕES.....	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema do ciclo celular destacando a atividade dos complexos Ciclina-CDK de mamíferos e os pontos de checagem (adaptado de Lodish *et al.*, 2005). 21
- Figura 2.** Capacidades adquiridas pelas células neoplásicas, necessárias para o crescimento e progressão tumoral (adaptado Hanahan e Weinberg, 2011). 22
- Figura 3.** Fármacos comerciais utilizados na quimioterapia antineoplásica (Almeida *et al.*, 2005; Wheate *et al.*, 2010; <http://newdrugapprovals.org/>). 25
- Figura 4.** Fármacos comerciais utilizados na quimioterapia antineoplásica (ALMEIDA *et al.*, 2005; <http://newdrugapprovals.org/>). 27
- Figura 5.** Vias extrínseca e intrínseca da apoptose (adaptado de Hengartner, 2000). 30
- Figura 6.** Hidrólise da cisplatina e estruturas formadas durante este processo (Fonte: <http://cisplatina.paginas.sapo.pt/mecanismosaccao.html>). 31
- Figura 7.** Principais adutos formados através da interação da cisplatina com o DNA: (a) interação entre duas fitas (1,2-interfitas); (b) interação 1,2- intrafita; (C) ligação cruzada 1,3- intrafita e (d) interação com DNA e proteína (Gonzalez *et al.*, 2001). 32
- Figura 8.** Interações da cisplatina (CDDP) com a célula: (1) Espécies Reativas de Oxigênio; (2) DNA; (3) receptores de membrana; (4) mitocôndrias; (5) proteína p53; (6) sinalização de cálcio; (7) caspases; (8) proteínas multirresistentes (adaptação de Florea e Busselberg, 2011). 33
- Figura 9.** Estrutura química da carboplatina (Monneret, 2011). 34
- Figura 10.** Estrutura química da oxaliplatina (Monneret, 2011). 35
- Figura 11.** Estrutura química da nedaplatina e sua interação com o DNA, semelhante à da cisplatina (Shimada *et al.*, 2013). 36
- Figura 12.** Estrutura química da lobaplatina (Monneret, 2011). 36
- Figura 13.** Estrutura química da heptaplatina (Monneret, 2011). 37
- Figura 14.** Estruturas química dos complexos de cobre (1), (2) e (3) (HUANG *et al.*, 2013). 40
- Figura 15.** Estudos de marcação com Anexina V e iodeto de propídio realizados para da linhagem BEL-7404 após incubação com o complexo (1) por 48 horas. Q1 = células em necrose, Q2 e Q4 = células em apoptose e Q3 = células vivas (Huang *et al.*, 2013). 42
- Figura 16.** Complexos de cério(III) sintetizados a partir dos ligantes H-ClQ, H-ClIQ e H-BrQ, respectivamente (Chen *et al.*, 2013). 42
- Figura 17.** Estudos de marcação com Anexina V e iodeto de propídio realizados para da linhagem SK-OV-3 após incubação com os complexos por 12 horas na concentração da

IC ₅₀ . Q1 = células em necrose, Q2 e Q4 = células em apoptose e Q3 = células vivas (Chen <i>et al.</i> , 2013).....	44
Figura 18. Distribuição do ciclo celular da linhagem SK-OV-3 após tratamento com os complexos por 48 h (Chen <i>et al.</i> , 2013).....	45
Figura 19. Espectros de UV-Vis para os complexos na ausência (linha tracejada) e.....	46
Figura 20. Espectros no infravermelho do ligante L1 e do complexo C5.....	65
Figura 21. Espectros no infravermelho do ligante L2 e do complexo C6.....	65
Figura 22. Espectros no infravermelho do ligante L3 e dos complexos C3 e C7.....	66
Figura 23. Espectros no infravermelho do ligante L4 e dos complexos C4 e C8.....	66
Figura 24. Espectro de ESI-(+)-MS obtido para o composto C3, em água:metanol (1:1).....	70
Figura 25. Principais espécies presentes no espectro de ESI-(+)-MS obtido para o composto C3.....	71
Figura 26. Espectro de ESI-(+)-MS obtido para o composto C4, em água:metanol (1:1).....	72
Figura 27. Principais espécies presentes no espectro de ESI-(+)-MS para o composto C4.....	73
Figura 28. Espectro de ESI-(+)-MS obtido para o composto C5, em H ₂ O/MeOH (1:1).....	74
Figura 29. Estruturas propostas para as espécies identificadas no espectro de ESI-(+)-MS para o composto C5.....	75
Figura 30. Espectro de ESI-(+)-MS obtido para o composto C6, em H ₂ O/MeOH (1:1).....	76
Figura 31. Estruturas propostas para as espécies observadas no espectro de ESI-(+)-MS para o composto C6.....	77
Figura 32. Espectro de ESI-(+)-MS obtido para o composto C7, em H ₂ O/MeOH (1:1).....	78
Figura 33. Estruturas propostas para as espécies observadas no espectro de ESI-(+)-MS para o composto C7.....	78
Figura 34. Espectro de ESI-(+)-MS obtido para o composto C8, em H ₂ O/MeOH (1:1).....	79
Figura 35. Estruturas propostas para as espécies observadas no espectro de ESI-(+)-MS para o composto C8.....	80
Figura 36. Espectros de RNM ¹⁹⁵ Pt para os complexos de platina (C5-C8), obtidos em DMSO deuterado, utilizando uma solução de K ₂ PtCl ₄ em água como padrão interno.....	81
Figura 37. Estrutura dos ligantes orgânicos e complexos de platina e zinco sintetizados e estudados neste trabalho.....	82
Figura 38. Porcentagem de morte celular por necrose (quadrante superior esquerdo), apoptose tardia (quadrante superior direito) e apoptose inicial (quadrante inferior direito)	

induzida pelos compostos C7 e C8 na linhagem leucêmica U937 após 24 horas de incubação. O Quadrante inferior esquerdo representa a população de células viáveis..... 85

Figura 39. Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem U937 sem tratamento (controle) e após 24 horas de incubação com o complexo C7..... 86

Figura 40. *Dot-plots* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para a linhagem U937 não tratada (controle) e tratada com o composto C7 após 24 h de incubação. Quadrante superior direito: células possuindo mitocôndrias com potencial de membrana normal; quadrante inferior direito: células que apresentam mitocôndrias com perda do potencial de membrana. 88

Figura 41. Avaliação da atividade das caspases 3, 6, 8 e 9 em células U937 após incubação com o composto C7 por 3, 6 e 12 horas (n=2), utilizando o *Colorimeter Sampler Kit (Invitrogen)*. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, representando os valores com diferença significativa estatisticamente em relação ao controle (células não tratadas)..... 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de IC ₅₀ (μmol.L ⁻¹) obtidos para os complexos (1), (2) e (3), ligante PYP, sais de cobre e cisplatina frente a linhagens tumorais e normal (HUANG <i>et al.</i> , 2013).	41
Tabela 2. Valores de IC ₅₀ (μmol.L ⁻¹) encontrados para os complexos de cério, seus respectivos ligantes, sal metálico e cisplatina (Chen <i>et al.</i> , 2013).	43
Tabela 3. Resultados de espectroscopia no infravermelho para os compostos C1 e C2, obtidos em pastilha de KBr.	63
Tabela 4. Resultados de análise elementar (C, H e N) para os compostos de C1 e C2.	64
Tabela 5. Principais bandas observadas nos espectros no infravermelho dos complexos de platina e zinco (C3 – C8) e suas atribuições.	67
Tabela 6. Resultados de análise elementar (C, H e N) para os compostos de C5, C6 e C8.	68
Tabela 7. Dados da análise de condutividade elétrica para os complexos de platina e zinco C3 – C8.	69
Tabela 8. Valores de IC ₅₀ obtidos para os complexos, ligantes, sais metálicos e cisplatina, através do ensaio de MTT.	83

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntese do ligante L1 (Neves <i>et al.</i> , 1993).....	51
Esquema 2. Síntese do ligante L2. (Horn <i>et al.</i> , 2000).....	51
Esquema 3. Síntese do precursor P1 (Lopes, 2012).....	52
Esquema 4. Síntese do ligante L3 (Lopes, 2012).	52
Esquema 5. Síntese do precursor P2 (Lopes, 2012).....	53
Esquema 6. Síntese do ligante L4 (Lopes, 2012).	53
Esquema 7. Síntese do complexo C1 (Fernandes, 2014).	54
Esquema 8. Síntese do complexo C2 (Fernandes <i>et al.</i> , 2010).	54
Esquema 9. Síntese do complexo C3.	55
Esquema 10. Síntese do complexo C4.	55
Esquema 11. Síntese do complexo C5.	56
Esquema 12. Síntese do complexo C6.	56
Esquema 13. Síntese do complexo C8.	56
Esquema 14. Síntese do complexo C7.	57
Esquema 15. Representação da redução do MTT a formazam pela succinato desidrogenase mitocondrial.	59

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo realizar a síntese, caracterização e investigação da atividade antitumoral de compostos de coordenação de platina e zinco contendo ligantes N,O-doadores. Os quatro ligantes (L1 – L4) utilizados na síntese dos compostos de coordenação foram sintetizados utilizando-se rotas sintéticas previamente descritas na literatura, sendo L1= (2-hidroxibenzil) (2-piridilmetil)amina; L2= N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)] propilamina; L3= 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol; L4= 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(2-naftiloxi)-2-propanol. Após a síntese dos ligantes, os mesmos foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN). Posteriormente, eles foram reagidos com sais metálicos de platina (K_2PtCl_4) e zinco (ZnCl_2) sendo obtidos oito complexos. Os mesmos foram caracterizados através das técnicas de análise elementar (C, H, N), espectroscopia no infravermelho, ponto de fusão, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS), medidas de condutividade elétrica e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e platina (^1H e ^{195}Pt RMN). Foram realizados estudos de atividade antitumoral frente a linhagens de células leucêmicas humanas (THP-1, U937 e MOLT-4), pulmão (H460), e cólon (COLO205). A investigação inicial da atividade biológica dos compostos foi realizada através do teste de viabilidade celular empregando-se o ensaio de metabolização do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tretazólio). Posteriormente, para os compostos mais ativos foram realizados estudos de viabilidade celular frente a células normais do sangue periférico (PBMC do inglês, “peripheral blood mononuclear cells”), marcação com Anexina V e iodeto de propídio (PI), avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (sub-G1), avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM) por citometria de fluxo (JC-1), e avaliação da ativação das caspases, para elucidação do tipo e mecanismo de morte celular induzida pelos compostos em estudo. Os resultados obtidos nos estudos de viabilidade celular mostraram que os compostos C7 e C8 são os mais citotóxicos contra as linhagens tumorais estudadas, apresentando valores de IC_{50} entre 6 – 78 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Os estudos de determinação do tipo e mecanismo de morte celular indicaram que o composto C8 induz morte celular por necrose na linhagem de células leucêmicas U937, enquanto o composto C7 induz morte celular por

apoptose, possivelmente pelas vias intrínseca e extrínseca simultaneamente, sendo um composto promissor na busca por novos metalofármacos com atividade antitumoral.

Palavras-chave: câncer, zinco, platina, atividade antitumoral, apoptose.

ABSTRACT

This work aims to conduct the synthesis, characterization and investigation of antitumor activity of platinum and zinc coordination compounds containing N,O-donors ligands. The four ligands (L1 - L4) used in the synthesis of coordination compounds were synthesized using synthetic routes described previously in the literature, L1 = (2-hydroxybenzyl)(2-pyridylmethyl)amine; L2 = N-(2-hydroxybenzyl)-N-(2-pyridylmethyl)[(3-chlorophenyl)(2-hydroxy)]propylamine; L3 = {2-hydroxybenzyl-1-(2-pyridylmethyl)amino}-3-(1-naphthyloxy)-2-propanol; L4 = 2-hydroxybenzyl{1-(2-pyridylmethyl)amino}-3-(2-naphthyloxy)-2-propanol. After synthesis of the ligands, they were characterized by infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance (^1H NMR). Subsequently, they were reacted with platinum (K_2PtCl_4) and zinc (ZnCl_2) metal salts, and eight complexes were obtained. The complexes were characterized by elemental analysis (C, H, N), infrared spectroscopy, melting point, mass spectrometry with electrospray ionization (ESI (+) - MS and ESI(+)-MS/MS), conductivity measurements and nuclear magnetic resonance of hydrogen and platinum (^1H and ^{195}Pt NMR). Antitumor activity studies were performed against human leukemic cell lines (THP-1, U937 and MOLT-4), lung (H460), and colon cancer (COLO205). The initial investigation on the biological activity of the compounds was performed by cell viability assay employing the metabolism of MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Furthermore, for the most active compounds, studies of cell viability compared to "peripheral blood mononuclear cells" (PBMC), labeling with annexin V and propidium iodide (PI), evaluation of the cell cycle by flow cytometry (sub-G1), evaluation of the mitochondrial membrane potential (MMP) by flow cytometry (JC-1), and evaluation of the activation of caspases were carried out, in order to investigate the type and mechanism of cell death induced by the compounds. The results obtained in the cell viability studies showed that the C7 and C8 compounds are more cytotoxic against tumor cell lines under investigation, with IC_{50} values ranging from 6-78 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Studies to determine the type and cell death mechanism indicated that the C8 compound induces necrotic cell death in leukemic cell line U937 and compound C7 induces cell death by apoptosis, probably by both intrinsic and extrinsic pathways. Then, C7 is a promising compound in the search for new metallodrugs with antitumor activity.

Keywords: cancer, zinc, platinum, antitumor activity, apoptosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Química Inorgânica na Medicina

A utilização de compostos contendo metais vem sendo feita há mais de 5.000 anos. O cobre, utilizado para fins de esterilização, o ouro e posteriormente o ferro, empregados na fabricação de medicamentos, e o zinco, utilizado como agente cicatrizante, são exemplos da utilização dos metais na antiguidade. No entanto, apenas nos últimos 100 anos a atividade medicinal de compostos inorgânicos vem sendo estudada de forma racional (Orvig e Abrams, 1999; Medici *et al.*, 2014).

A *cis*-diaminodichloroplatina(II) (*cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂]) é o exemplo mais conhecido de composto de coordenação utilizado na medicina, teve sua atividade biológica descoberta acidentalmente por Barnett Rosenberg e seus colegas em 1960, quando estudavam os efeitos do campo elétrico em culturas da bactéria *Escherichia coli* (Rosenberg *et al.*, 1965). Após observar que a cisplatina era capaz de inibir a divisão celular da bactéria *E. Coli*, Rosenberg investigou sua atividade citotóxica e constatou sua elevada atividade antitumoral (Rosenberg *et al.*, 1969).

Uma década após o descobrimento da sua atividade citotóxica já eram feitos testes clínicos em pacientes terminais com a cisplatina e não demorou muito para que ela passasse a ser o medicamento mais utilizado no tratamento do câncer. Ainda nos dias de hoje a cisplatina é um dos principais antineoplásicos existentes, sendo utilizada principalmente no tratamento dos cânceres de ovário, testículo, pulmão, cabeça, esôfago, estômago e melanoma (Fontes *et al.*, 2005).

A descoberta da cisplatina motivou a busca por novos compostos contendo a platina e também por uma ampla variedade de compostos contendo diversos metais e ligantes. Desde então, um grande número de compostos inorgânicos com atividade antitumoral, antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiviral, antiartrítica, antibiótica e antiparasitária foram desenvolvidos em todo o mundo (Farrell, 2002; Thompson e Orvig, 2003; Zhang *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2011; Florea e Busselberg, 2011; Lessa *et al.*, 2012; Shimada *et al.*, 2013; Chitambar *et al.*, 2013; Medici *et al.*, 2014).

É importante ressaltar que, por muitas vezes, determinado composto orgânico apresenta baixa ou nenhuma atividade biológica, e quando complexado à algum metal, esta atividade passa a ser observada ou é potencializada, tornando o

complexo final promissor na terapia almejada. Thati e colaboradores investigaram a atividade anticancerígena frente a células de carcinoma epitelial humano de cumarinas e seus respectivos complexos de coordenação de prata, revelando a potencialização do efeito citotóxico após a complexação com prata (Thati *et al.*, 2007). Este mesmo grupo relatou que os compostos de prata apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA), sendo que na ausência do metal, as cumarinas não apresentaram atividade (Creaven *et al.*, 2006). Lopes, 2012 e Borges, 2013 observaram a potencialização da atividade citotóxica de ligantes orgânicos contendo o grupo naftol quando os mesmos foram complexados a metais de transição. Recentemente, Stojkovic e colaboradores sintetizaram quatro ligantes N,O-doadores e obtiveram seus respectivos complexos de paládio, e quando testados contra linhagens tumorais de câncer de pulmão, câncer de mama e leucemia, os complexos apresentaram atividade de 2 a 12 vezes maior que seus respectivos ligantes (Stojkovic *et al.*, 2015).

Dentre os diversos tipos de atividades biológicas exibidas por compostos de coordenação, a atividade antitumoral é de extrema importância, uma vez que os medicamentos atualmente utilizados na clínica para o tratamento do câncer têm sua utilização limitada por seus severos efeitos colaterais e pelo desenvolvimento de resistência às drogas observado em alguns tipos de câncer (Almeida *et al.*, 2005; INCA, 2014).

1.2. O Câncer: aspectos gerais, seu desenvolvimento e os principais tipos de tratamento

Denomina-se câncer, tumor ou neoplasia maligna, o conjunto de doenças que têm como característica principal o crescimento desordenado de células indiferenciadas ou com baixo grau de diferenciação, denominadas células anaplásicas. Estas células são pouco semelhantes ao tecido de origem e possuem alta capacidade de se disseminar em tecidos ou órgãos, desencadeando o processo chamado de metástase, quando as células migram para regiões adjacentes ou mesmo distantes do tumor de origem (Kumar *et al.*, 2005; Cotran *et al.*, 2000; Griffiths, 2000; INCA, 2014).

Durante muito tempo acreditou-se que o câncer poderia ser causado por fatores externos, como a exposição a produtos químicos, tabaco, radiações, infecções, etc. ou por fatores internos, como a ocorrência de erro na duplicação do DNA por falha da enzima DNA polimerase (Kumar *et al.*, 2005; INCA, 2014). No entanto, estudo recente associa a ocorrência de câncer ao número de divisões das células normais para a renovação e manutenção da homeostase do tecido e sugere que apenas um terço dos casos de câncer pode ser atribuído aos fatores ambientais ou hereditários, enquanto o restante seria devido a uma espécie de "má sorte" na ocorrência de mutações aleatórias surgidas durante a replicação do DNA em células tronco normais (não cancerosas) (Tomsssetti e Vogelstein, 2015).

Independente dos tecidos para os quais migrou nos processos de metástase, a classificação primária do câncer é feita de acordo com o tipo de célula normal de origem (Almeida *et al.*, 2005). Acredita-se que quase todos os tipos de câncer se encaixam em um dos grupos seguintes:

Carcinomas: são os tipos de câncer mais comuns e originam-se de células de revestimento, que incluem a pele (células ectodermais) e uma série de revestimentos internos (células endodermais), como os da boca, garganta, brônquios, esôfago, estômago, intestino, bexiga, útero e ovários, revestimentos dos dutos mamários, próstata e pâncreas. Os carcinosarcomas e teratomas são tumores derivados de tecidos embrionários;

Sarcomas: originados de tecidos de suporte, como ossos, tecido gorduroso, músculo e tecido fibroso de reforço;

Linfomas: originados de linfócitos, células encontradas em todo o organismo, especialmente em glândulas linfáticas e no sangue. São divididos em Hodgkin e não-Hodgkin, de acordo com o tipo de célula afetada;

Leucemia: origina-se de células da medula óssea (produtora de células sanguíneas brancas). Neste tipo de câncer ocorre um drástico aumento na concentração de glóbulos brancos, e os principais problemas enfrentados são o mau funcionamento das células anormais e a restrição do espaço da medula óssea para que novas células saudáveis sejam produzidas;

Mielomas: são malignidades ocorridas nas células plasmáticas da medula óssea que produzem os anticorpos;

Tumores das células germinativas: originam-se de células dos testículos e/ou ovários;

Melanomas: originam-se dos melanócitos, células da pele que produzem pigmento (melanina);

Gliomas: originam-se de células do tecido de suporte cerebral ou da medula espinhal, raramente metastático;

Neuroblastomas: tumor geralmente pediátrico originado de células malignas embrionárias advindas de células neuronais primordiais, desde gânglios simpáticos até medula adrenal e outros pontos (Almeida *et al.*, 2005).

Hoje o câncer acomete adultos e crianças causando enfermidades e elevado número de mortes, por isso é considerado um dos principais problemas mundiais de saúde. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), apontam que o câncer é responsável por cerca de 13% de todas as mortes no mundo, tendo levado a óbito cerca 8,2 milhões de pessoas em 2012. A estimativa é que a incidência do câncer continue crescendo, podendo chegar a 21,4 milhões de novos casos e ser responsável por 13,2 milhões de óbitos no ano de 2030 (OMS, 2014).

Ainda segundo a OMS, mais de 30% das mortes por câncer poderiam ser evitadas modificando ou evitando fatores de risco importantes, como o uso do tabaco, o excesso de peso ou obesidade, dieta pouco saudável, falta de atividade física, uso de álcool, infecção por HPV, poluição do ar urbano, fumaça interior gerada pelo uso doméstico de combustíveis sólidos. Dentre estes, o uso do tabaco é o fator de risco mais importante para o câncer, causando cerca de 22% das mortes por câncer globais e cerca de 71% das mortes globais de câncer de pulmão. Em muitos países de baixa renda, até 20% das mortes por câncer são devidos à infecção por HPV (OMS, 2014).

Segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer) só no ano de 2010, o câncer levou a óbito 1.136.947 indivíduos no Brasil. O câncer de pele não-melanoma é o mais incidente entre os brasileiros, seguido pelos de próstata, pulmão, estômago, cólon e reto no sexo masculino, e pelos de mama, colo do útero, cólon, reto e pulmão no sexo feminino. As leucemias são as que mais acometem as crianças (INCA, 2014).

A estimativa do INCA para o ano de 2014, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer no Brasil, dentre eles 182 mil novos casos de câncer de pele do tipo não melanoma, 69 mil novos casos de câncer de próstata, 57 mil novos casos de câncer de mama feminina, 33 mil novos casos de câncer de cólon e reto, 27 mil novos casos de câncer de pulmão, 20 mil novos casos

de câncer de estômago e 15 mil novos casos de câncer de colo do útero (INCA, 2014).

O cenário mundial e nacional retratado brevemente reforça a magnitude do problema do câncer no país e no mundo, problema este que só será amenizado com a aplicação de programas eficientes de prevenção e diagnóstico precoce da doença, além da oferta de tratamento ágil e de qualidade aos indivíduos acometidos (INCA, 2014; OMS, 2014).

Diversos fatores e mecanismos estão envolvidos na transformação de uma célula normal em uma célula potencialmente maligna (cancerosa), e a maior parte deles interferem na divisão celular. Sendo assim, compreender o funcionamento do ciclo celular e seus mecanismos é de grande importância para que se possa compreender o desenvolvimento do câncer (Almeida *et al.*, 2005).

O ciclo celular pode ser dividido em dois momentos, denominados interfase e fase M (mitose). Como ocorrem muitos eventos durante estas duas fases do ciclo celular, ambas são divididas em subfases, sendo a interfase subdividida em G1 (aumento de massa), S (síntese de DNA) e G2 (crescimento final), enquanto a mitose (divisão propriamente dita) é dividida em prófase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese. Durante o ciclo celular existem momentos em que a célula faz uma checagem para verificar possíveis “erros” ou danos e “decidir” se o ciclo deve ou não continuar, sendo chamados de pontos de checagem (ver Figura 1) (Alberts *et al.*, 2010).

Ao final do G1, ocorre o primeiro ponto de checagem do ciclo celular, onde a célula certifica-se de que sua massa é suficiente para se dividir, se o ambiente é propício à divisão e se o DNA está danificado e precisa ser reparado antes de iniciar o processo de replicação. Caso tudo esteja indo bem, a célula inicia o período S (Alberts *et al.*, 2010).

Ao final do G2, ocorre outro ponto de checagem, onde a célula volta a se certificar se seu tamanho está apropriado e se todo o DNA foi replicado, para então, iniciar a mitose. Nos pontos de checagem, caso algo esteja errado, a célula permanece nas fases iniciais ou se direciona à fase G0, um estado de repouso especializado (não pertencente ao ciclo celular) até que o “erro” seja corrigido. A regulação do ciclo celular é realizada através da atividade de proteínas, como as ciclinas, quinases e p53 (Novák *et al.*, 2002; Vermeulen *et al.*, 2003, Lodish *et al.*, 2005).

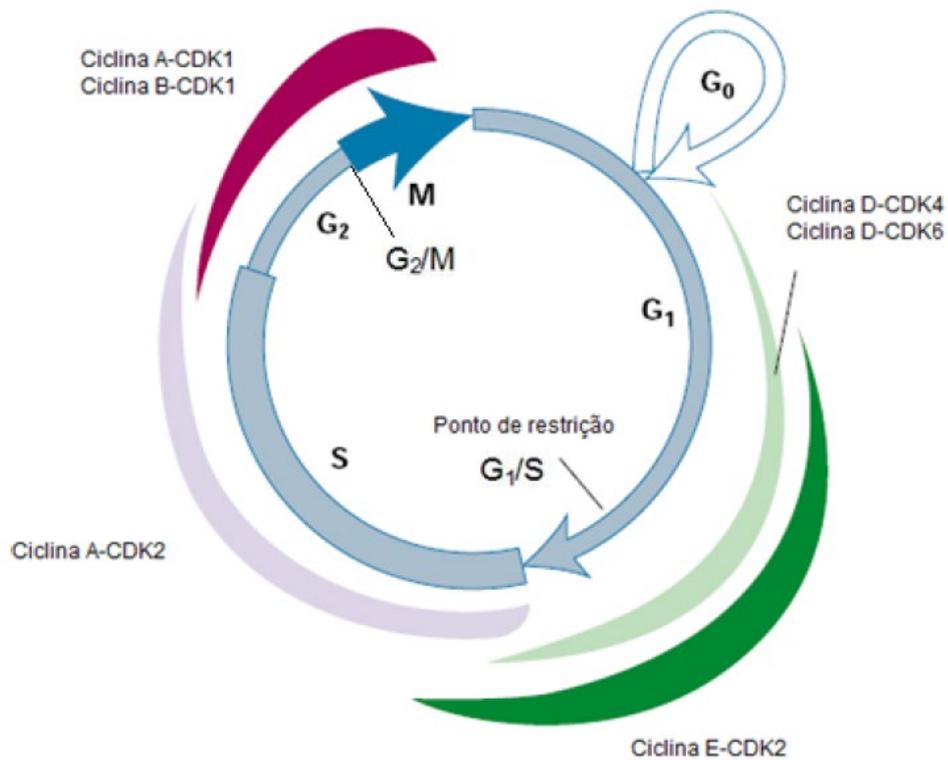


Figura 1. Esquema do ciclo celular destacando a atividade dos complexos Ciclina-CDK de mamíferos e os pontos de checagem (adaptado de Lodish *et al.*, 2005).

De modo geral, as células de organismos multicelulares, só se multiplicam na presença de estímulos externos (provenientes de outras células). Para um ser multicelular, uma multiplicação desenfreada pode ser desastrosa. A grande maioria dos cânceres surge a partir de uma sequência de mutações em genes relacionados com a regulação/controla da proliferação celular (Alberts *et al.*, 2010).

O processo de carcinogênese, ou desenvolvimento do câncer, ocorre lentamente, podendo passar-se anos até que o mesmo seja detectável. Este processo pode ser dividido em três principais estágios:

- **Iniciação:** as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos ou carcinógenos que provocam modificações em alguns de seus genes. Neste estágio inicial, as células já se encontram geneticamente alteradas, porém ainda não é possível detectar o tumor clinicamente;
- **Promoção:** as células geneticamente alteradas no estágio de iniciação, sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores e são transformadas em células malignas, de forma lenta e gradual. Acredita-se que a suspensão do contato com agentes promotores muitas vezes interrompe o processo de carcinogênese neste estágio;

- Progressão: multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas (malignas). Nesse estágio o câncer já está instalado e evolui até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (INCA, 2014).

Hanahan e Weinberg propuseram que a grande diferenciação das células tumorais fosse resultado de seis alterações essenciais em sua fisiologia celular, que lhes conferem capacidades necessárias para o crescimento e progressão do tumor: auto suficiência em fatores de crescimento, insensibilidade a fatores inibidores de crescimento, evasão do programa de morte celular (apoptose), potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase, modificação ou reprogramação do metabolismo celular, fuga da resposta imunológica, instabilidade genômica e mutação e promoção de inflamação (Figura 2) (Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011).

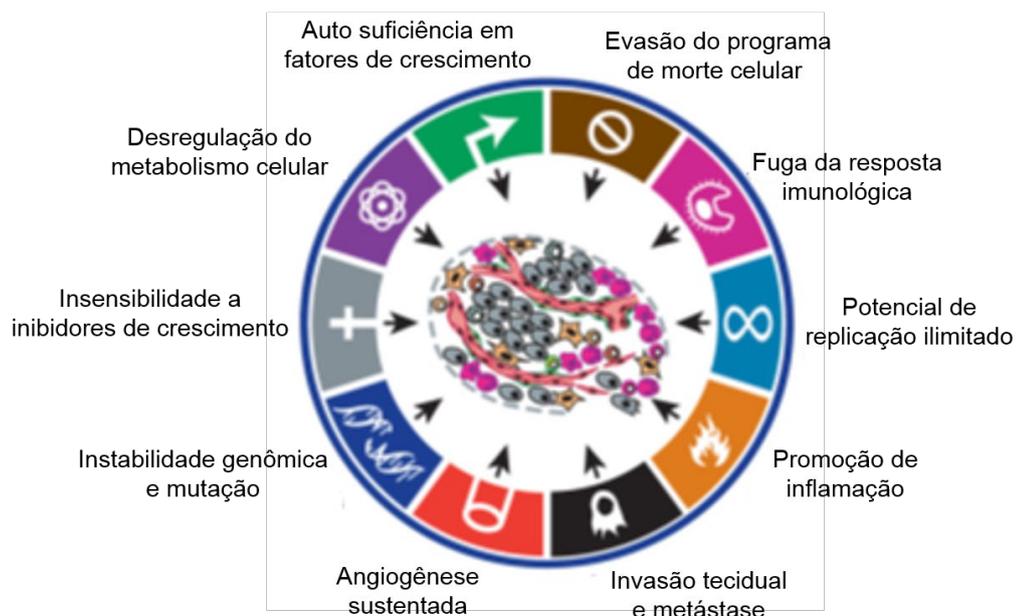


Figura 2. Capacidades adquiridas pelas células neoplásicas, necessárias para o crescimento e progressão tumoral (adaptado Hanahan e Weinberg, 2011).

Os atributos neoplásicos citados exigem um alto fluxo energético. As células cancerosas podem, por exemplo, captar cerca de 10 a 50 vezes mais glicose do que as células normais próximas ao tumor, utilizar qualquer substrato como fonte energética, competir com o hospedeiro pela glicose disponível, além de requerer uma quantidade elevada de ferro. Este metabolismo rápido e altamente exigente pode levar a desnutrição ou até mesmo a um quadro de caquexia, conhecida como

o conjunto de anemia, anorexia e perda de peso (Martins, 2003; Waitzberg *et al.*, 2011; Chitambar *et al.*, 2013).

Os principais tipos de tratamento do câncer são a cirurgia, a quimioterapia e radioterapia. Além destes, tratamentos alternativos como a hormonioterapia, a fotorradiação com derivados hematoporfirínicos (HTP) e a imunoterapia têm sido utilizados (Machado, 2000; Salmon, 1998; Instituto Oncoguia, 2014).

Boa parte dos pacientes com câncer alcança a cura total através da cirurgia e/ou da radioterapia, tratamentos eficazes quando o tumor ainda não sofreu metástase. A cirurgia é o tipo de tratamento mais antigo e mais definitivo, principalmente quando o tumor encontra-se em estágio inicial de desenvolvimento e em condições favoráveis de retirada. A radioterapia, por sua vez, é o tratamento mais utilizado para tumores localizados que não podem ser totalmente retirados por cirurgia, ou para tumores que costumam reincidir (Instituto Oncoguia, 2014).

Infelizmente, na maioria dos casos, a neoplasia desenvolve precocemente micrometástases e há a necessidade de uma abordagem sistêmica, que pode ser efetuada com a quimioterapia (Chabner e Longo, 1996; Spence e Johnston, 2001).

A quimioterapia antineoplásica refere-se à administração de drogas capazes de destruir, controlar ou inibir o crescimento das células tumorais, erradicando o tumor ou reduzindo-o, para que os sintomas da doença sejam amenizados e se alcance a cura ou prolongamento da vida do paciente (Instituto Oncoguia, 2014).

1.2.1. Quimioterapia Antineoplásica e Mecanismos de Morte Celular

O primeiro quimioterápico antineoplásico foi desenvolvido a partir do gás mostarda, composto utilizado nas Guerras Mundiais como arma química. Verificou-se que após a exposição de soldados a este agente, estes desenvolveram hipoplasia medular e linfóide, o que motivou seu uso no tratamento dos linfomas malignos. A partir da publicação dos estudos clínicos realizados com o gás mostarda e das observações sobre os efeitos do ácido fólico em crianças com leucemias, em 1946, observou-se um crescente avanço nos estudos na área de quimioterapia antineoplásica (Bonassa, 1998).

Os avanços científicos das décadas seguintes levaram ao desenvolvimento de antimetabólicos, como o metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina e 5-fluorouracil, cujas estruturas são apresentadas na Figura 3. Nos anos 60 e 70,

surgiram os agentes naturais como os antibióticos actinomicina D e doxorubicina (representadas na Figura 3), assim como substâncias puras extraídas de vegetais, como os alcalóides de vinca (Pratt e Ruddon, 1979, Brandão *et al.*, 2010).

Na década de 70 a quimioterapia antineoplásica foi fortemente impulsionada pela introdução da cisplatina ($\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$) (Figura 3), um poderoso agente antitumoral que teve sua atividade descoberta acidentalmente e é amplamente utilizado até os dias de hoje (Wheate *et al.*, 2010, Monneret, 2011). Desde então, algumas dezenas de novos fármacos contribuíram substancialmente com os avanços da quimioterapia moderna, dentre eles o taxol, com alta atividade contra o câncer de mama, os inibidores de topoisomerase I, como o Irinotecano, os antimetabólicos fludarabina e cladribina (ver estruturas na Figura 3) (Nygren, 2001; Brandão *et al.*, 2010).

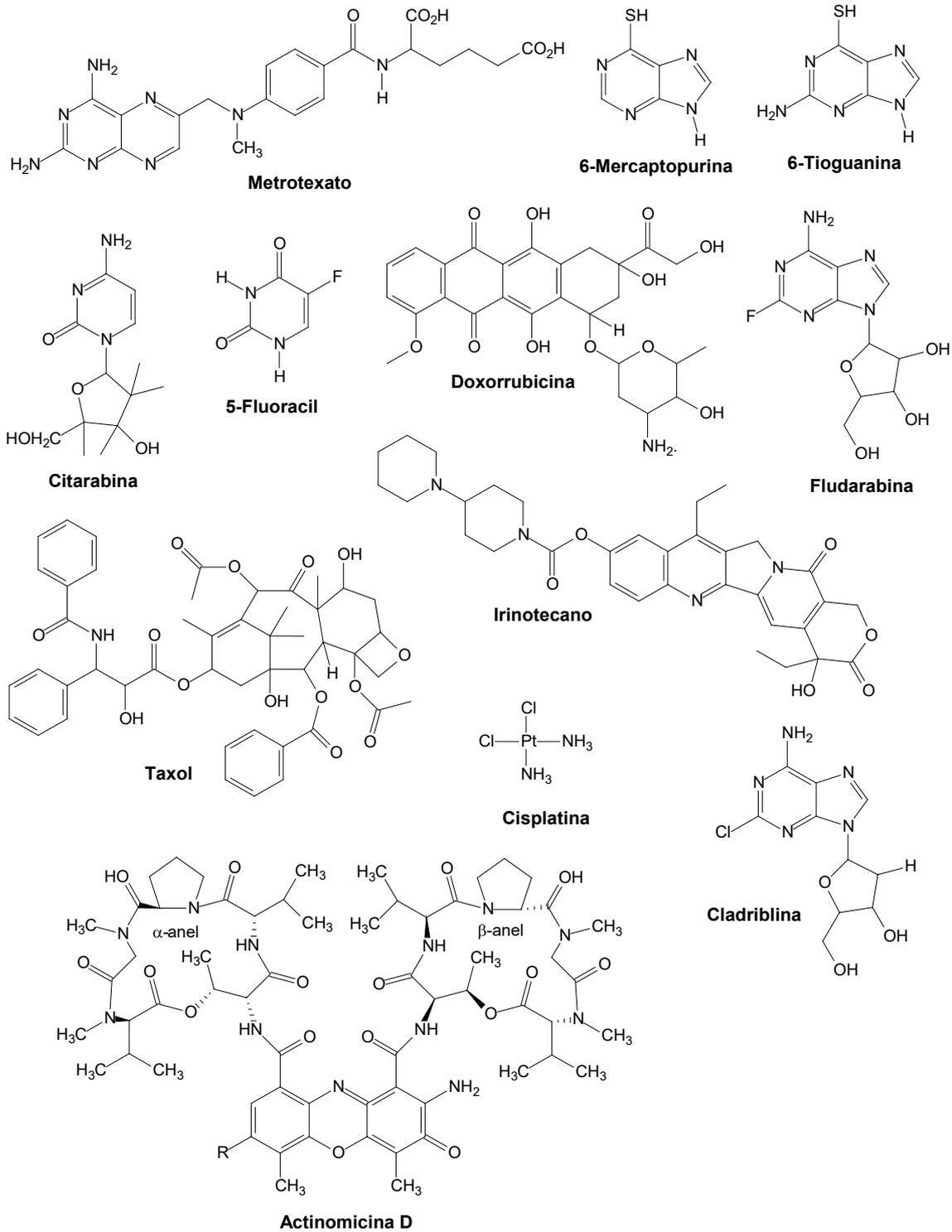


Figura 3. Fármacos comerciais utilizados na quimioterapia antineoplásica (Almeida *et al.*, 2005; Wheate *et al.*, 2010; <http://newdrugapprovals.org/>).

Avanços em estudos de mecanismo de ação dos quimioterápicos utilizados na clínica permitem dividi-los em grandes grupos, de acordo com seu tipo de ação, sendo os principais:

- Antimetabólitos: agem principalmente na fase de síntese, impedindo que a célula componha a nova fita de ácido nucléico (metotrexato, pemetrexede, 5-fluorouracil, 6-mercaptopurina, citarabina, gencitabina, etc.). Os antimetabólitos também podem ser incorporados ao DNA ou RNA no lugar das bases nitrogenadas originais, o que impede a leitura correta da informação genética e duplicação e transcrição e translação do DNA (estruturas apresentadas nas Figuras 3 e 4);
- Agentes alquilantes (ou metalantes, no caso dos complexos de platina): formam ligações estáveis entre as hélices do DNA, impedindo sua separação e duplicação do material genético (cisplatina, carboplatina, ciclofosfamida, ifosfamida, etc.). Interfere nas topoisomerasas responsáveis pelas modificações estruturais das hélices de DNA, levando à fragmentação do DNA e induzindo apoptose (estruturas apresentadas nas Figuras 3 e 4);
- Antimicrotúbulos: os alcaloides da vinca (vincristina, vimblastina, vindesina e vinorelbina), impedem a polimerização dos microtúbulos e a formação do fuso mitótico, as taxanas (taxol e docetaxel e as epotilonas (ixabepilona, etc.) impedem a despolimerização do fuso mitótico. Estes medicamentos acarretam a parada do ciclo celular durante a mitose, induzindo a morte celular (estruturas apresentadas nas Figuras 3 e 4);
- Antibióticos naturais: as antraciclinas interferem na topoisomerase II (enzima fundamental para duplicação do DNA), outros antibióticos naturais (como mitomicina C, actinomicina D, etc.) intercalam-se ao DNA e impedem sua leitura correta (estruturas apresentadas nas Figuras 3 e 4) (Kovacs *et al.*, 2008).

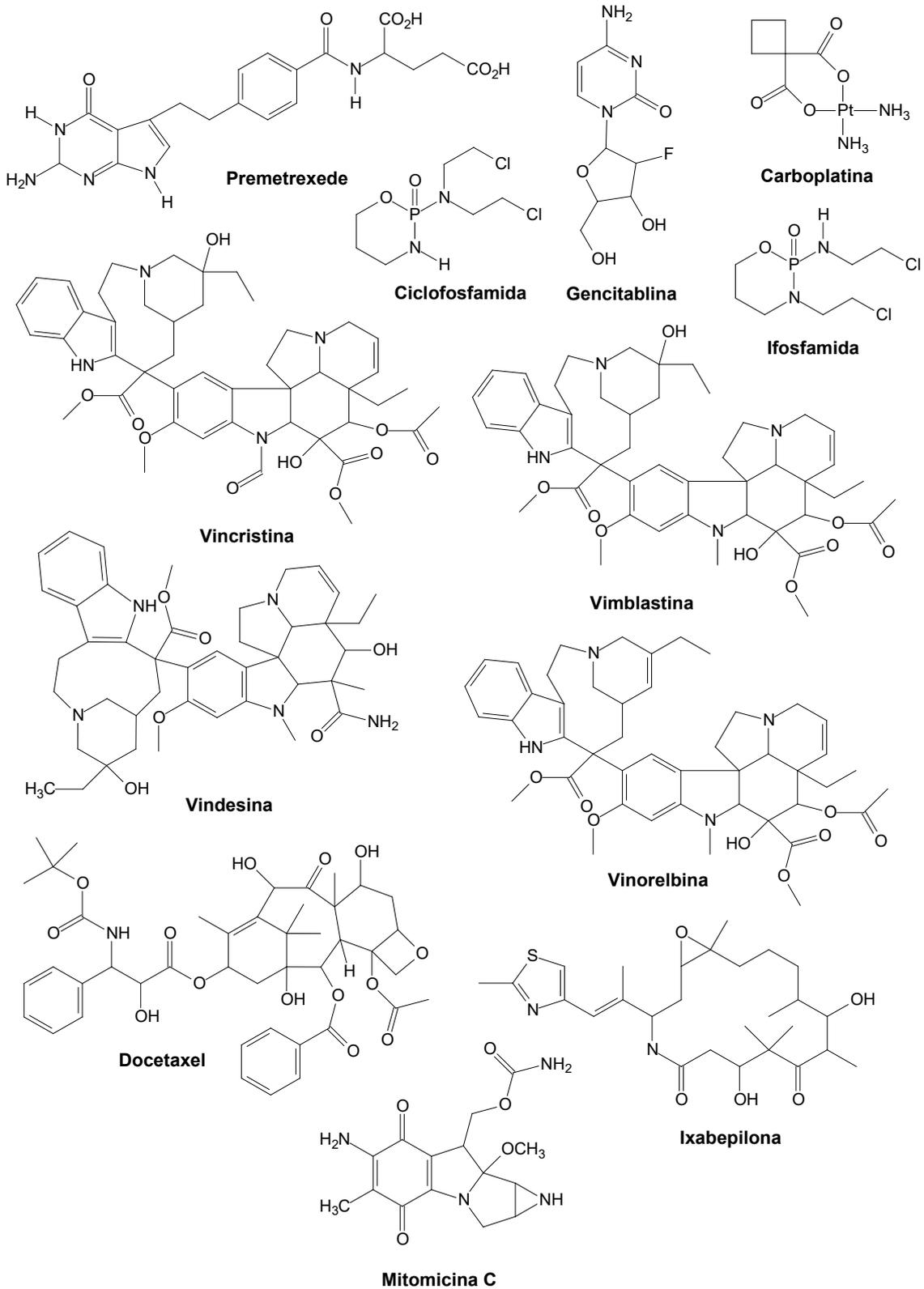


Figura 4. Fármacos comerciais utilizados na quimioterapia antineoplásica (ALMEIDA *et al.*, 2005; <http://newdrugapprovals.org/>).

Apesar dos grandes avanços da medicina nos últimos anos, a quimioterapia antineoplásica ainda enfrenta dois grandes problemas, a resistência às drogas

utilizadas e os severos efeitos colaterais advindos de seu uso. A resistência pode ser devida a mutações, também é observada a resistência em casos de utilização descontrolada da quimioterapia, como nos casos de tratamento descontinuado, intervalos irregulares e uso de doses inadequadas, por exemplo. Os efeitos colaterais são observados devido a não especificidade dos antineoplásicos, que atuam lesando tanto células malignas quanto células normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico (INCA, 2014; Almeida *et al.*, 2005).

Os severos efeitos colaterais causados pelos quimioterápicos antineoplásicos e a resistência às drogas comerciais motiva a busca por novas moléculas químicas com potencial atividade contra o câncer (Almeida *et al.*, 2005). Dentre as características desejáveis aos candidatos a quimioterápicos estão a capacidade de transpassar membranas biológicas, elevada e ampla atividade citotóxica, reduzidos efeitos colaterais e desencadeamento de morte regulada (Berreiro *et al.*, 2002; Benite *et al.*, 2007).

Dentre os principais tipos de morte celular (apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência), a apoptose é o tipo de morte preferível na ação dos quimioterápicos (Okada *et al.*, 2004; Dimri, 2005; Castedo *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2002).

A apoptose, morte celular regulada, ocorre individualmente e não leva à uma resposta inflamatória e nem acarreta danos as células vizinhas (Anazette e Melo, 2007). É um processo conservado durante a evolução celular, e seu descontrole perturba a complexa e delicada relação entre a proliferação e a morte celular, levando ao desenvolvimento de patologias (Plati *et al.*, 2011). O excesso de morte celular programada (apoptose) pode desencadear doenças neurodegenerativas e imunodeficiência, ao passo que sua diminuição pode, por exemplo, contribuir para o desenvolvimento e a progressão do câncer (Cotter, 2009).

No processo de apoptose são observadas diversas mudanças na morfologia celular, sendo a redução do volume celular umas das primeiras alterações observadas em células apoptóticas. Em seguida ocorre a marginalização e condensação da cromatina, as organelas também se condensam e na maioria dos casos permanecem intactas (em alguns casos ocorre a ruptura da membrana externa da mitocôndria). O DNA se desintegra formando fragmentos com padrão característico (múltiplos de 180 - 200 pares de base) e são contidos pela membrana

nuclear (Widlak e Garrard, 2009 Galluzi *et al.*, 2007). Surgem protuberâncias na membrana celular (“blebs”), as quais aumentam e posteriormente se rompem, originando os chamados corpos apoptóticos, porções celulares envolvidas pela membrana citoplasmática contendo as organelas empacotadas, com ou sem fragmentos nucleares. Os corpos apoptóticos são então rapidamente fagocitados por macrófagos teciduais ou por células do parênquima, sem gerar qualquer reação inflamatória (Taylor *et al.*, 2008).

Durante o processo de apoptose são observados diversos eventos bioquímicos, sendo os mais frequentes, ativação de caspases, permeabilização das membranas mitocondriais, ativação de fosfatidilserina e promoção da interligação de proteínas (“crosslinking”) (Pellegrine *et al.*; 2008). Existem evidências de que a apoptose pode ser disparada por várias rotas distintas, dependendo do estímulo que desencadeia o processo de morte, sendo as duas principais decorrentes da ativação de caspases, por via extrínseca (receptores de morte) ou intrínseca (via mitocondrial) (Figura 5) (Anazette e Melo, 2007).

A via extrínseca da apoptose é mediada por receptores de morte localizados na superfície externa da membrana celular, que se ligam a proteínas sinalizadoras extracelulares. Os receptores de morte transmitem sinais de apoptose quando ativados, disparando imediatamente a cascata de caspases. Quando os receptores são ativados ocorre uma aproximação entre três moléculas receptoras (trimerização) e formação de “cluster”, também chamado domínio de morte, que se liga a uma molécula de proteína adaptadora chamada FADD, que se liga a pró-caspase 8, formando o complexo indutor de morte (DISC). Com a formação do DISC, as caspases iniciadoras (8 e 10) são clivadas, tornando-se ativas para clivar as caspases efetoras (3, 6 e 7), desencadeando a morte por apoptose (Fischer e Schulze-Osthoff, 2005; Stefan *et al.*, 2007).

A via intrínseca (ou mitocondrial), por sua vez, é geralmente ativada em resposta a sinais extracelulares (radiação, agentes químicos, etc.) e a danos internos, como danos ao DNA. Tais fatores induzem a transcrição da proteína p53, que promove a transcrição de proteínas pró-apoptóticas (Bak e Bad) da família Bcl-2, presentes na membrana mitocondrial externa, que regulam o extravasamento do citocromo c para o citoplasma (Knudson *et al.*, 1995; Fischer e Schulze-Osthoff, 2005; Jiang *et al.*, 2007; Adams e Cory, 2001).

O citocromo que extravasa para o citoplasma, devido ao comprometimento do potencial de membrana mitocondrial, forma um complexo oligomérico com a proteína Apaf-1, conhecido como apoptossomo, promovendo a ativação catalítica da caspase-9, que cliva e ativa a caspase 3, desencadeando a morte celular por apoptose. Além do citocromo c, outras proteínas como a SMAC/DIABLO (responsável pela inibição de proteínas inibidoras de caspases) também são liberadas da mitocôndria. A via mitocondrial também pode ser ativada por via extrínseca, pela clivagem da proteína Bid (pró-apoptótico da família Bcl-2) mediada pela caspase 8. Uma vez clivada, a tBid induz a liberação do citocromo c, formação do apoptossomo e ativação de caspases efetoras, amplificando os sinais de morte gerados pelos receptores de morte (Lorenzo *et al.*, 1999; Fischer & Schulzeosthoff, 2005, Alenzi *et al.*, 2010; Burz *et al.*, 2009; Ola *et al.*, 2011). A Figura 5 ilustra as vias intrínseca e extrínseca da apoptose.

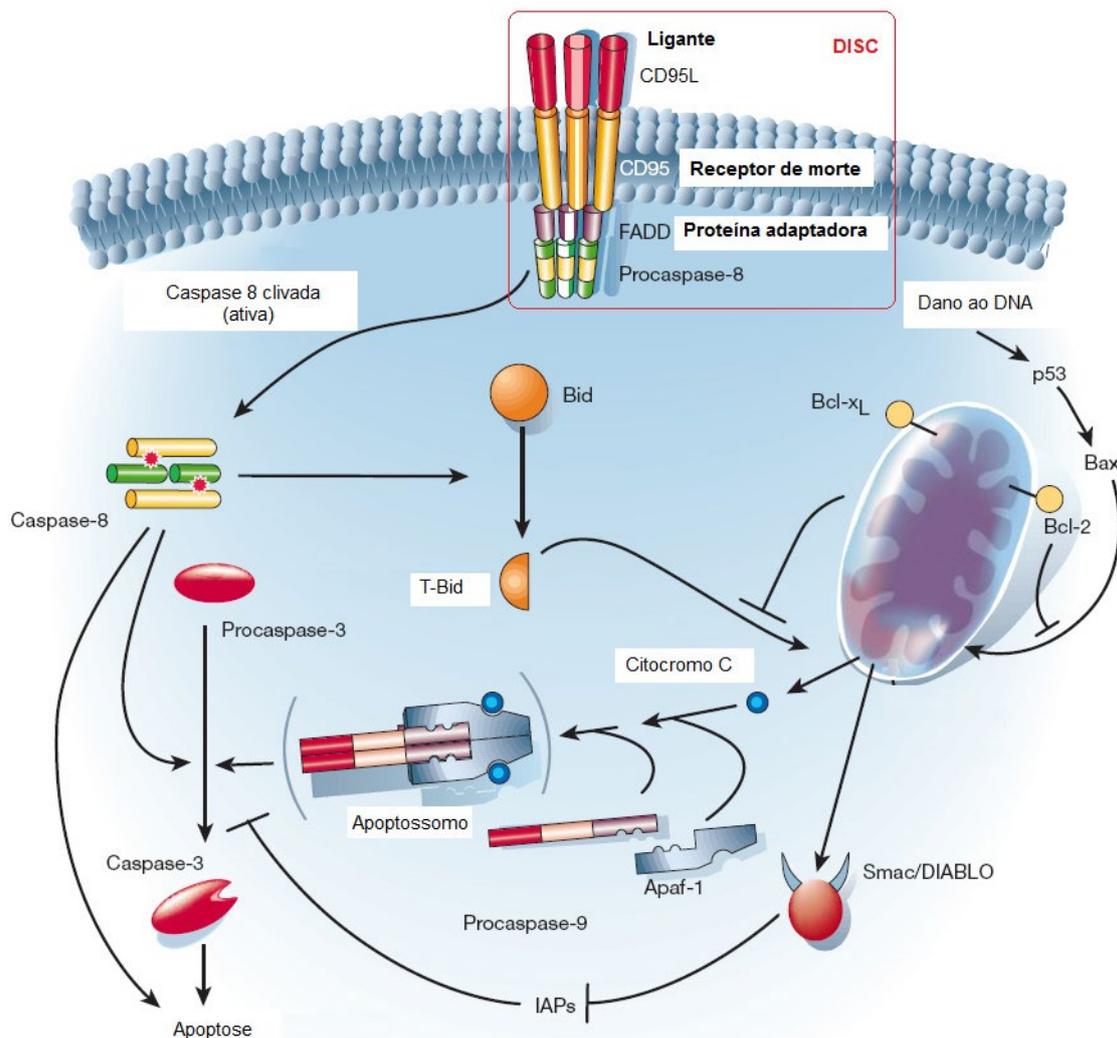


Figura 5. Vias extrínseca e intrínseca da apoptose (adaptado de Hengartner, 2000).

1.3. Compostos de Coordenação e Quimioterapia Antineoplásica

1.3.1. Cisplatina

Com o advento da cisplatina, muitos estudos foram realizados no sentido de elucidar seu mecanismo de ação, e um dos primeiros passos foi a observação de que ao entrar na célula, ela sofre sucessivas reações de hidrólise, formando as espécies ativas $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ e $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ (Figura 6), que reagem com os alvos celulares. É importante lembrar que fora da célula, a alta concentração dos íons cloreto (≈ 100 mM) impede a hidrólise e mantém a cisplatina em sua forma neutra $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, enquanto que a baixa concentração de cloreto (≈ 4 mM) no meio intracelular favorece a formação das espécies hidrolisadas. Estudos sugerem que a entrada da cisplatina na célula ocorre principalmente por difusão, podendo ocorrer também por transporte ativo, através da participação de transportadores de cobre e transportadores catiônicos orgânicos (TCO) (Jamieson e Lippard; 1999).

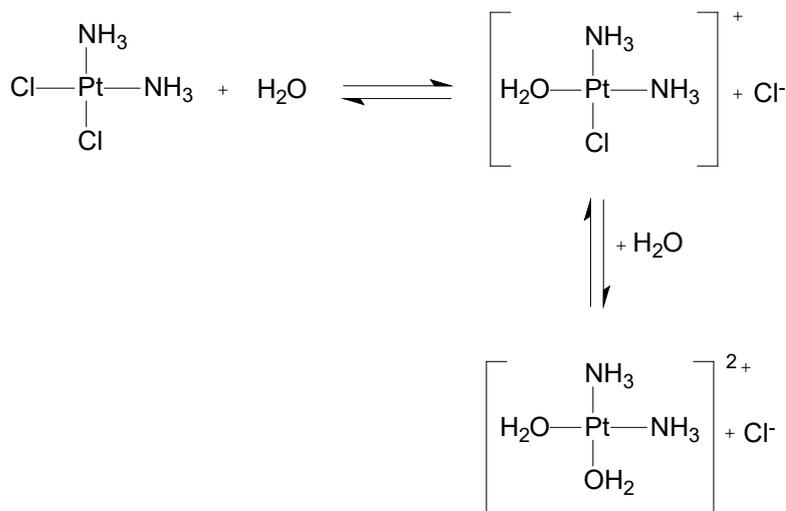


Figura 6. Hidrólise da cisplatina e estruturas formadas durante este processo (Fonte: <http://cisplatina.paginas.sapo.pt/mecanismosaccao.html>).

No interior da célula, em sua(s) forma(s) ativa, a cisplatina pode ligar-se ao DNA de diferentes formas, formando adutos com o mesmo (Figura 7) (Florea e Busselberg, 2011; Gonzalez *et al.*, 2001).

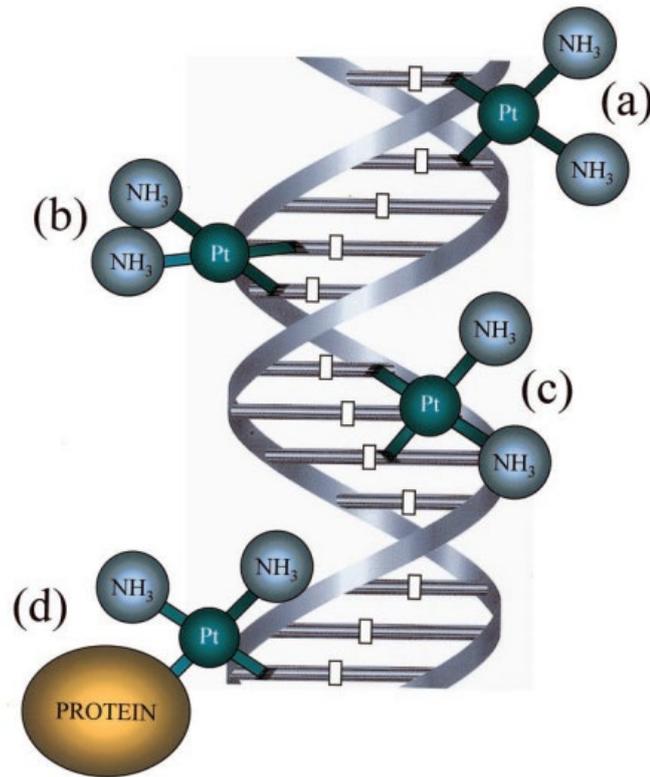


Figura 7. Principais adutos formados através da interação da cisplatina com o DNA: (a) interação entre duas fitas (1,2-interfitas); (b) interação 1,2- intrafita; (c) ligação cruzada 1,3-intrafita e (d) interação com DNA e proteína (Gonzalez *et al.*, 2001).

Hoje sabe-se que além da formação de adutos com o DNA (Figura 8 (2)), a cisplatina pode induzir a formação EROs (Espécies Reativas de Oxigênio) (Figura 8 (1)), interferir na homeostase de cálcio (Figura 8 (6)), e levar à morte celular por ativação simultânea de várias vias de sinalização (Figura 8 (3, 4, 5 e 7)) (dependente do tipo de célula), levando a apoptose por via intrínseca e/ou extrínseca (Floreza e Busselberg, 2011).

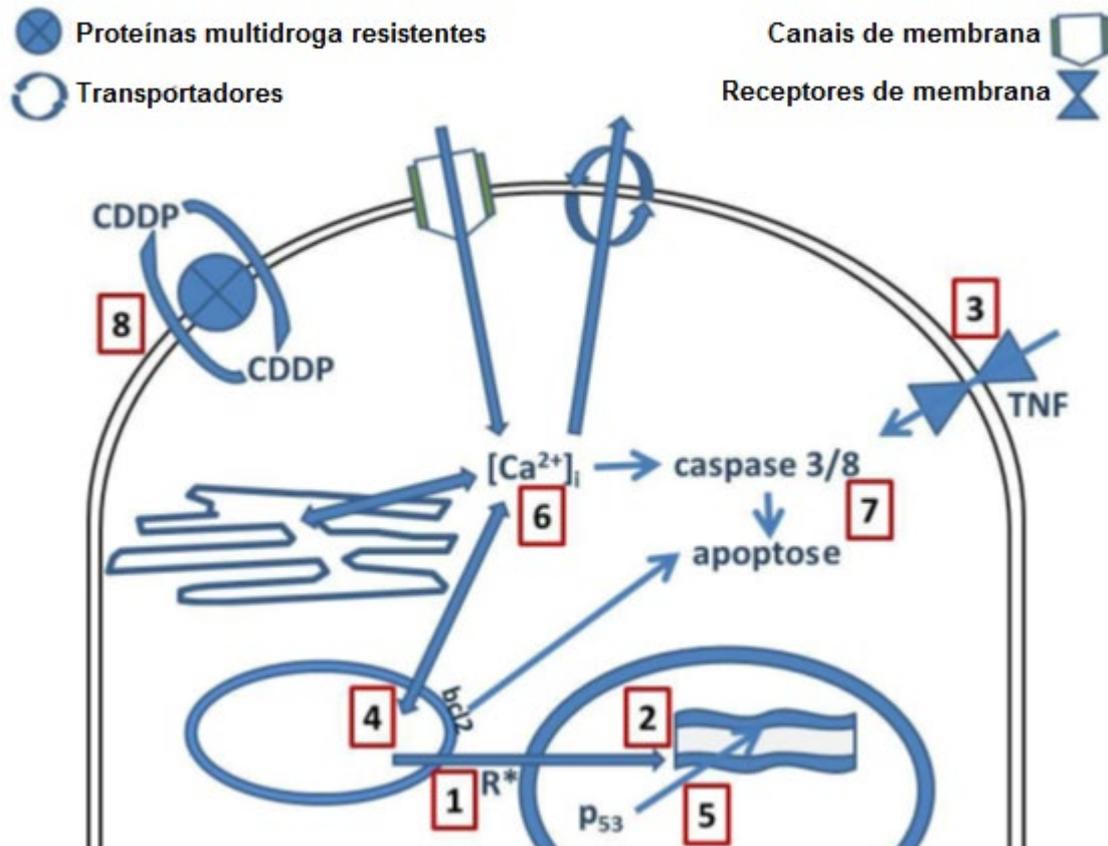


Figura 8. Interações da cisplatina (CDDP) com a célula: (1) Espécies Reativas de Oxigênio; (2) DNA; (3) receptores de membrana; (4) mitocôndrias; (5) proteína p53; (6) sinalização de cálcio; (7) caspases; (8) proteínas multirresistentes (adaptação de Florea e Busselberg, 2011).

Embora a cisplatina tenha se mostrado um poderoso agente quimioterapêutico, sendo altamente eficaz no tratamento de diversos tipos de cânceres, a resistência adquirida a este fármaco tem sido verificada. Quando as células cancerosas se tornam resistentes à cisplatina, as doses precisam ser aumentadas, no entanto, uma dose muito elevada pode conduzir a toxicidade severa ao organismo. Vários mecanismos estão envolvidos no processo de resistência à cisplatina (Figura 8 (8)), e incluem aumento do efluxo, inativação e alterações no alvo da droga, mecanismos de reparo do DNA (reparo de adutos), e evasão das vias apoptóticas (Florea e Busselberg, 2011).

Além da resistência, os severos efeitos colaterais (nefrotoxicidade, ototoxicidade, mielosupressão e neurotoxicidade, entre outros) constituem fator limitante para a utilização da cisplatina. Estes fatos, em conjunto, motivam o desenvolvimento de novas drogas contendo platina e outros metais de transição que possam atuar na terapia do câncer (Hernandes *et al.*, 2010; Dilworth e Hulting, 2013).

1.3.2. Fármacos de segunda e terceira geração análogos à cisplatina

O advento da cisplatina levou ao desenvolvimento de milhares de outros compostos de platina, dos quais poucos passaram por testes clínicos, dois foram aprovados para amplo uso clínico (a carboplatina e a oxaliplatina), e outros três foram aprovados para uso clínico em países específicos: nedaplatina (Japão), lobaplatina (China) e heptaplatina (Coréia) (Weiss e Christian, 1993; Lebwohl e Canetta, 1998; Wheate *et al.*, 2010).

A carboplatina (cis-diamino(2-ciclobutanodicarboxilato) platina(II)) (Figura 9), teve seu uso clínico aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1985. O carboxilato em sua estrutura lhe confere maior solubilidade em água, quando comparado à cisplatina. A carboplatina liga-se em menor extensão às proteínas do plasma (menos reativa), além de ser mais facilmente excretada pela urina, fatores que justificam sua reduzida toxicidade em relação à cisplatina, podendo ser administrada em maiores doses. Alguns tipos de cânceres, no entanto, são menos sensíveis à carboplatina do que à cisplatina, como os de cabeça, pescoço e bexiga (Wheate *et al.*, 2010; Pasetto *et al.*, 2006).

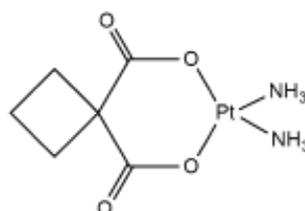


Figura 9. Estrutura química da carboplatina (Monneret, 2011).

A oxaliplatina, (trans-1R,2Rdiaminociclohexano-oxalatoplatina(II)) (Figura 10), apresenta em sua estrutura um grupo abandonador oxalato e um ligante carreador diaminociclohexano. É um fármaco ativo em linhagens de células resistentes à cisplatina, principalmente de câncer colorretal, pois os adutos de platina formados neste caso não são reconhecidos pelo sistema de reparo do DNA, e não oferece nefrotoxicidade, uma vez que seus metabólitos ativos se acumulam pouco no plasma (Pasetto *et al.*, 2006).

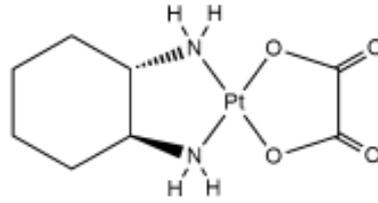


Figura 10. Estrutura química da oxaliplatina (Monneret, 2011).

A nedaplatina foi desenvolvida com o intuito de diminuir os efeitos colaterais induzidos pela cisplatina, como nefrotoxicidade e toxicidade gastrointestinal. Estudos de Fase II mostraram que a nedaplatina é eficaz no tratamento de câncer de pulmão de células não-pequenas, câncer de esôfago, câncer de colo do útero, câncer de cabeça e pescoço e câncer urotelial (de bexiga), além de apresentar propriedades radiosensibilizadoras. No entanto, até o momento ainda não foram relatados estudos de fase III com a nedaplatina (Shimada *et al.*, 2013).

A nedaplatina reage com nucleosídeos para formar complexos platina-nucleosídeos, semelhante à cisplatina (Figura 11), sua espécie ativa se liga ao DNA, inibindo sua duplicação. Seu tempo de eliminação é considerado curto, tendo uma meia-vida de 1,1-4,4 h (cisplatina – até 72 h) e um perfil farmacocinético semelhante ao da carboplatina (Shimada *et al.*, 2013).

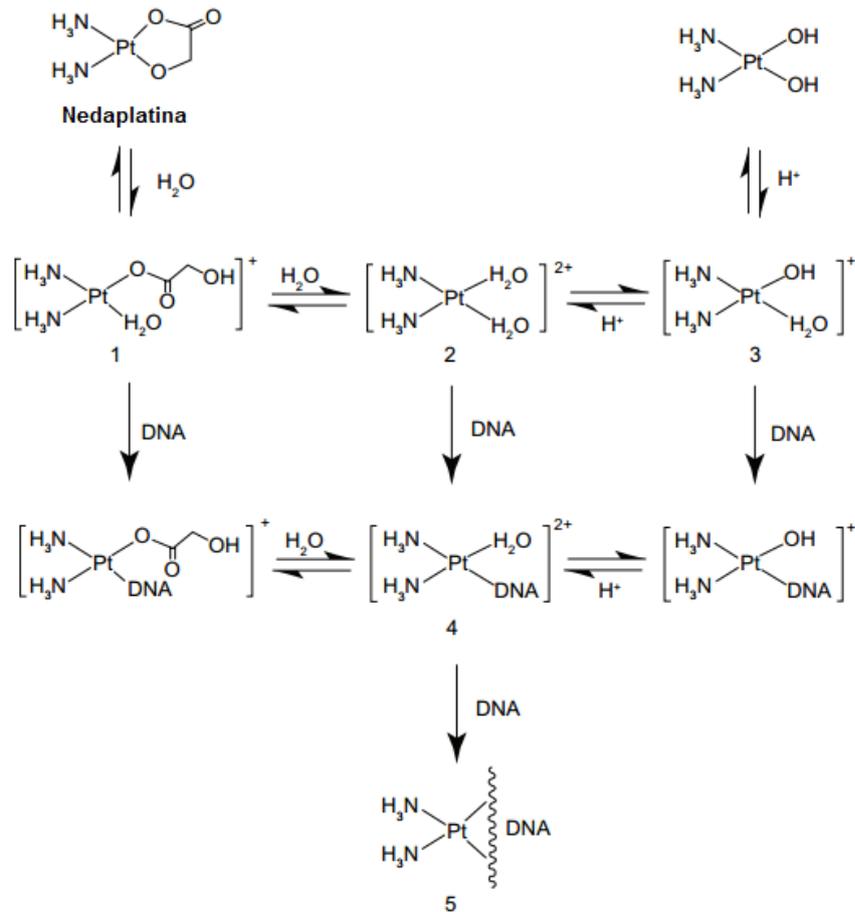


Figura 11. Estrutura química da nedaplatina e sua interação com o DNA, semelhante à da cisplatina (Shimada *et al.*, 2013).

A lobaplatina, ou D-1946 (Figura 12), de acordo com estudos clínicos de Fases I e II, mostrou-se um antitumoral eficiente no tratamento de cânceres de pulmão, gástrico, ovariano e testicular. Foi aprovada na China para o tratamento de leucemia mielóide crônica, câncer de mama metastático inoperável e câncer de pulmão de células pequenas. Recentemente, um grupo de pesquisa Chinês demonstrou que a lobaplatina inibe a progressão do ciclo celular, paralisando-o na fase G1, em células de carcinoma hepatocelular, além de regular a expressão de quinases como a ciclina B e CDK's e genes de supressão tumoral como o p53 (Monneret, 2011).

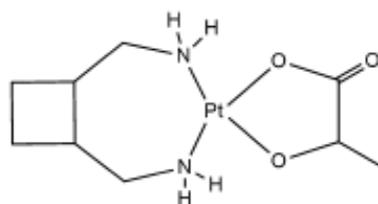


Figura 12. Estrutura química da lobaplatina (Monneret, 2011).

A heptaplatina (Figura 13), metalofármaco liberado para uso clínico na Coreia, passou por estudos clínicos de Fase I, II e III e atualmente é utilizado no tratamento de câncer gástrico. Diferentes estudos de fase III divergem no que tange a nefrotoxicidade da heptaplatina comparada à cisplatina, e a vantagem de sua utilização é relativa aos mais brandos efeitos colaterais de neutropenia e vômitos, e menores níveis de proteinúria (Wheate *et al.*, 2010).

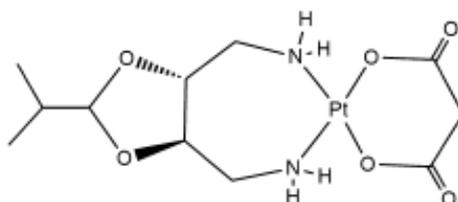


Figura 13. Estrutura química da heptaplatina (Monneret, 2011).

Estudos recentes indicaram que os compostos de platina, sozinhos ou combinados com outros fármacos, são utilizados para tratar cerca de 40-80% dos pacientes com câncer, estes estudos comprovam a importância desta classe de metalofármacos e estimula a busca por novos compostos, mais eficientes e menos tóxicos (Thayer, 2010).

O sucesso e ampla utilização clínica da cisplatina e análogos motivou a busca não só por novos compostos de platina, como por compostos contendo outros centros metálicos. Alguns compostos contendo gálio (Ga) (Verani *et al.*, 2012), titânio (Ti) (Chen e Zhou, 2010) e rutênio (Ru) (Bergamo e Sava, 2007) foram selecionados para realização de testes clínicos, e compostos contendo outros centros metálicos como paládio (Pd), ouro (Au), cobre (Cu), ferro (Fe) e zinco (Zn) apresentaram elevadas atividades antitumorais *in vivo* e *in vitro* e podem ser considerados candidatos a metalofármacos (Hillard *et al.*, 2006; Ronconi e Sadler, 2007; Casini *et al.*, 2008; Rijt e Sadler, 2009; Graf e Lippard, 2012; Butler e Sadler, 2013; Medici *et al.*, 2014).

1.3.3. Compostos de coordenação com atividade antitumoral

Na busca por sucessores à cisplatina, muitos são os complexos metálicos sintetizados. Embora a grande maioria destes compostos não ultrapasse as

fronteiras de um simples estudo inicial de atividade antineoplásica, nota-se que outros metais, além da platina, vêm se destacando na busca por novos metalofármacos com atividade antineoplásica (Medici *et al.*, 2014).

Muitos compostos de ferro e cobre tem sua atividade antitumoral investigada. Uma vez que estes metais são endógenos, acredita-se que possam ser menos tóxicos ao organismo, diminuindo seus efeitos colaterais. Os sais de ferroceno foram os primeiros compostos de ferro a apresentarem atividade antitumoral, e até hoje são sintetizados complexos derivados de ferroceno, que se mostram ativos contra câncer de mama, por exemplo (Hillard *et al.*, 2006; Graf e Lippard, 2012; Medici *et al.*, 2014). Dentre os complexos de cobre, os que contém tiosemicarbazonas, hidrazonas, e grupos planares como ligante têm se mostrado promissores, sendo ativos contra diversos tipos de câncer, como os de fígado, cólon, melanoma e leucemia, entre outros (Medici *et al.*, 2014; Borges, 2013; Despaigne *et al.*, 2014; Arjmand *et al.*, 2014). Dentre os diferentes tipos de mecanismos de ação propostos para compostos de cobre estão a possível interação dos mesmos com o DNA e a formação de espécies reativas de oxigênio, entre outros (Borges, 2013; Despaigne *et al.*, 2014).

Estudos recentes mostram que compostos de gálio inibem o crescimento de células tumorais através da homeostase do ferro. Semelhanças químicas entre o gálio(III) e o ferro(III) permitem que o gálio imite o ferro e interponha-se em processos críticos dependentes de ferro na proliferação celular. Outros modos de ação dos compostos contendo gálio podem estar relacionados aos seus efeitos anti-mitóticos, que resultam da capacidade deste metal de inibir a polimerização da tubulina (proteína componente dos microtúbulos) (Lessa *et al.*, 2012; Chitambar *et al.*, 2013).

Os primeiros e mais simples compostos de gálio a passar por testes clínicos foram os sais nitrato, cloreto e citrato de gálio, que exibiram elevada atividade contra câncer de bexiga e linfoma não-Hodgkin. O nitrato de gálio foi o mais investigado dentre os sais de gálio, e verificou-se que o mesmo não produz mielossupressão, podendo ser utilizado em pacientes com baixos níveis de glóbulos brancos ou plaquetas, também não foi observada resistência cruzada com outros quimioterápicos (Lessa *et al.*, 2012; Chitambar *et al.*, 2013).

Nos últimos 15 anos, os compostos de paládio também começaram a se destacar na busca por novos quimioterápicos. A química de coordenação do paládio

é bastante similar à da platina, no entanto, o paládio é cerca de 10^5 vezes mais propenso a trocar seus ligantes que a platina, o que pode resultar na rápida hidrólise de fármacos a base de paládio (Medici *et al.*, 2014). Diversos estudos apresentam complexos de paládio(II) com elevada atividade contra carcinoma cervical, leucemia mielóide crônica, osteossarcoma, melanoma, glioma, adenocarcinoma, câncer colorretal, de mama, de pulmão, de cabeça, de pescoço, de próstata e de ovário (Nadeem *et al.*, 2010; Medici *et al.*, 2014).

Além destes, a literatura relata compostos de ouro, prata, zinco, cério, titânio, dentre outros metais, com atividade contra diferentes tipos de câncer (Medici *et al.*, 2014; Horn *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2013).

Recentemente, Huang e colaboradores estudaram a atividade citotóxica de três complexos de cobre: $(\text{PYP})_2\text{Cl}_4$ (1), $[\text{Cu}_4(\text{PYP})_4(\text{ClO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2) e $[\text{Cu}_2(\text{PYP})_2\text{Cl}_4]_n$ (3), onde PYP = 5-piridina-2-il-1,3-dioxolo-4,5-isoquinolina (Figura 14) (Huang *et al.*, 2013).

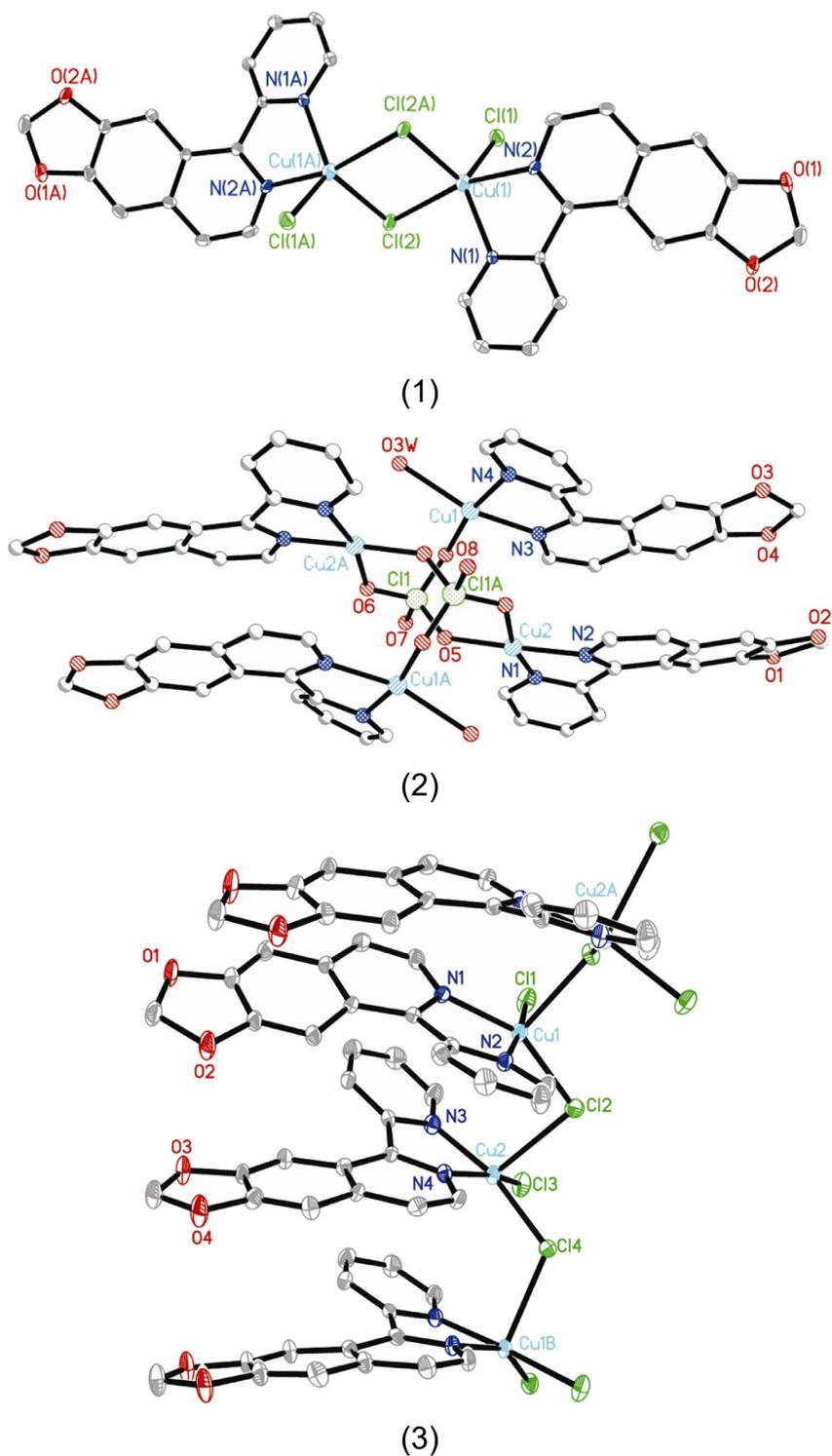


Figura 14. Estruturas química dos complexos de cobre (1), (2) e (3) (HUANG *et al.*, 2013).

Os três compostos tiveram sua atividade citotóxica estudada contra 6 linhagens tumorais (BEL-7404 (hepática), SK-OV-3 (ovário), A549 (pulmão), A375 (melanoma), MGC-803 (câncer gástrico), NCI-H460 (pulmão)) e células normais hepáticas (HL-7702). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de IC₅₀ (μmol.L⁻¹) obtidos para os complexos (1), (2) e (3), ligante PYP, sais de cobre e cisplatina frente a linhagens tumorais e normal (HUANG *et al.*, 2013).

Complexos	BEL-7404	SK-OV-3	A549	A375	MGC-803	NCI-H460	HL7702
PYP	27,57 ±1,13	56,32 ±1,23	54,61 ±0,53	28,15 ±0,70	38,26 ±1,37	88,45 ±3,34	>100
1	1,48 ±0,73	17,67 ±0,19	0,31 ±0,25	4,29 ±0,14	3,376 ±0,14	3,65 ±0,17	21,31 ±0,14
2	17,45 ±1,26	30,76 ±0,36	10,24 ±0,28	15,29 ±1,24	9,68 ±0,25	28,43 ±0,24	35,22 ±0,04
3	3,22 ±0,15	16,38 ±0,51	1,32 ±0,12	18,57 ±0,91	2,25 ±0,46	8,36 ±0,45	54,77 ±0,07
CuCl ₂ .2H ₂ O	74,38 ±5,68	--	81,31 ±2,17	60,26 ±3,04	72,15 ±3,17	41,07 ±1,54	>100
Cu(ClO ₄).6H ₂ O	63,26 ±4,14	--	87,54 ±6,22	69,13 ±1,12	52,24 ±2,29	53,19 ±4,10	>100
Cisplatina	64,22 ±1,21	84,21 ±0,24	17,21 ±0,58	78,54 ±2,25	23,58 ±0,43	48,52 ±0,32	74,25 ±0,11

O ligante apresentou atividade moderada contra quatro das células estudadas, porém, os complexos de cobre apresentaram atividade mais elevada que o ligante para todas as linhagens, mostrando a importância da complexação na potencialização da atividade do ligante. Os resultados obtidos para os complexos são ainda mais animadores quando comparados aos obtidos pela cisplatina, uma vez que eles foram mais ativos que a droga comercial frente a todas as linhagens. Além disto, os complexos foram menos tóxicos para as células normais do que para as linhagens tumorais (Huang *et al.*, 2013).

Estudos mais refinados de marcação com Anexina V e iodeto de propídio, medida do potencial de membrana mitocondrial e ativação de caspases foram realizados com o complexo (1), com o objetivo de estabelecer seu mecanismo de ação. A linhagem celular utilizada nestes estudos foi a BEL-7404 (Huang *et al.*, 2013).

Os estudos de marcação com Anexina V e iodeto de propídio (Figura 15) mostraram que o complexo (1), na concentração da IC₅₀, induz a morte celular da linhagem BEL-7404 predominantemente por apoptose (36,8%) (Huang *et al.*, 2013).

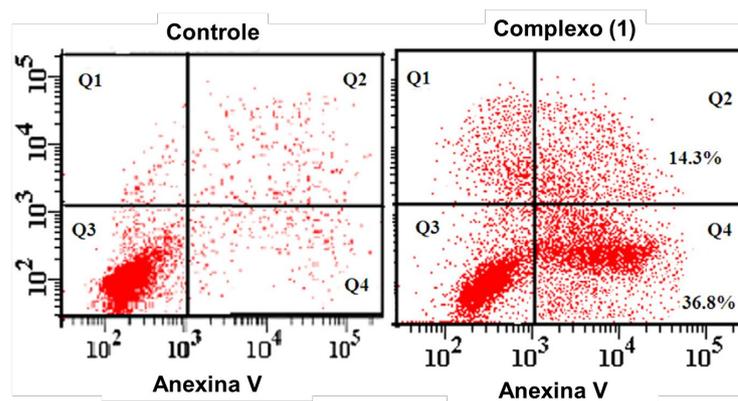


Figura 15. Estudos de marcação com Anexina V e iodeto de propídio realizados para da linhagem BEL-7404 após incubação com o complexo (1) por 48 horas. Q1 = células em necrose, Q2 e Q4 = células em apoptose e Q3 = células vivas (Huang *et al.*, 2013).

Medidas do potencial de membrana indicaram que o tratamento com o complexo (1) reduz o potencial da membrana mitocondrial, provando que a mitocôndria está envolvida no processo de morte celular induzida pelo mesmo. O estudo de ativação da caspase 3 mostrou que esta caspase (efetora) é ativada pelo composto (1). Estes estudos confirmam a morte celular por apoptose (Huang *et al.*, 2013).

Chen e colaboradores sintetizaram três complexos de cério (Figura 16) que apresentaram elevada atividade citotóxica frente a linhagens de câncer de ovário (SK-OV-3), hepatoma (BEL-7404) e câncer de pulmão (NCI-H460). Também foi estudado o efeito dos complexos frente a células de hepatócito normal (HL-7702) e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2 (Chen *et al.*, 2013).

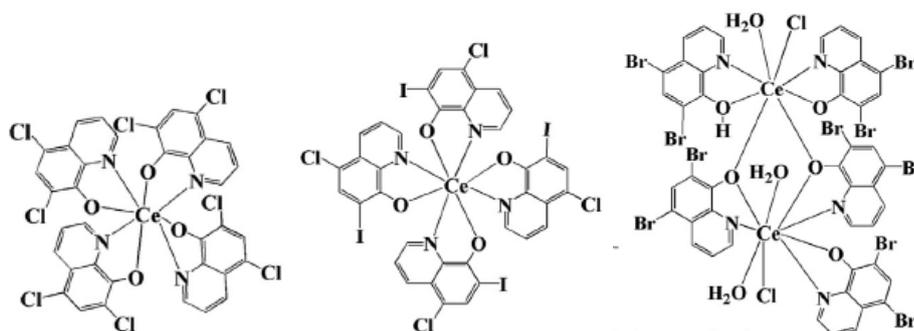


Figura 16. Complexos de cério(III) sintetizados a partir dos ligantes H-ClIQ, H-ClIQ e H-BrQ, respectivamente (Chen *et al.*, 2013).

Tabela 2. Valores de IC₅₀ (μmol.L⁻¹) encontrados para os complexos de cério, seus respectivos ligantes, sal metálico e cisplatina (Chen *et al.*, 2013).

Compostos	SK-OV-3	BEL-7404	NCI-H460	HL-7702
H-ClQ	11,54 ±0,33	9,39 ±0,06	43,60 ±0,23	97,43 ±0,93
H-ClIQ	3,61 ±0,08	15,93 ±0,13	40,79 ±0,33	24,62 ±0,23
H-BrQ	0,40 ±0,07	14,03 ±0,10	3,40 ±0,26	76,44 ±0,53
1	0,10 ±0,04	0,10 ±0,01	1,16 ±0,01	1,35 ±0,03
2	0,09 ±0,02	3,25 ±0,02	4,71 ±0,01	5,69 ±0,04
3	0,10 ±0,02	5,23 ±0,05	9,51 ±0,05	6,03 ± 0,07
CeCl ₃	>100	>100	>100	>100
Cisplatina	88,76 ±0,11	129,79 ±2,17	66,32 ±0,06	85,98 ±0,60

Os resultados apresentados são bastante promissores, pois os três complexos estudados apresentaram valores de IC₅₀ muito menores que os encontrados para a cisplatina e foram menos tóxicos frente a células normais (HL-7702) do que frente as cancerígenas. Estudos de Anexina-V (Figura 17), ciclo celular (Figura 18) e interação com o DNA (Figura 19) mostraram que os complexos de cério causam morte por indução de apoptose, provavelmente por intercalação no DNA, uma vez que espectros de UV-vis obtidos para o complexo sozinho e na presença do DNA indicam um decaimento da banda do complexo quando o mesmo entra em contato com a molécula DNA (Chen *et al.*, 2013).

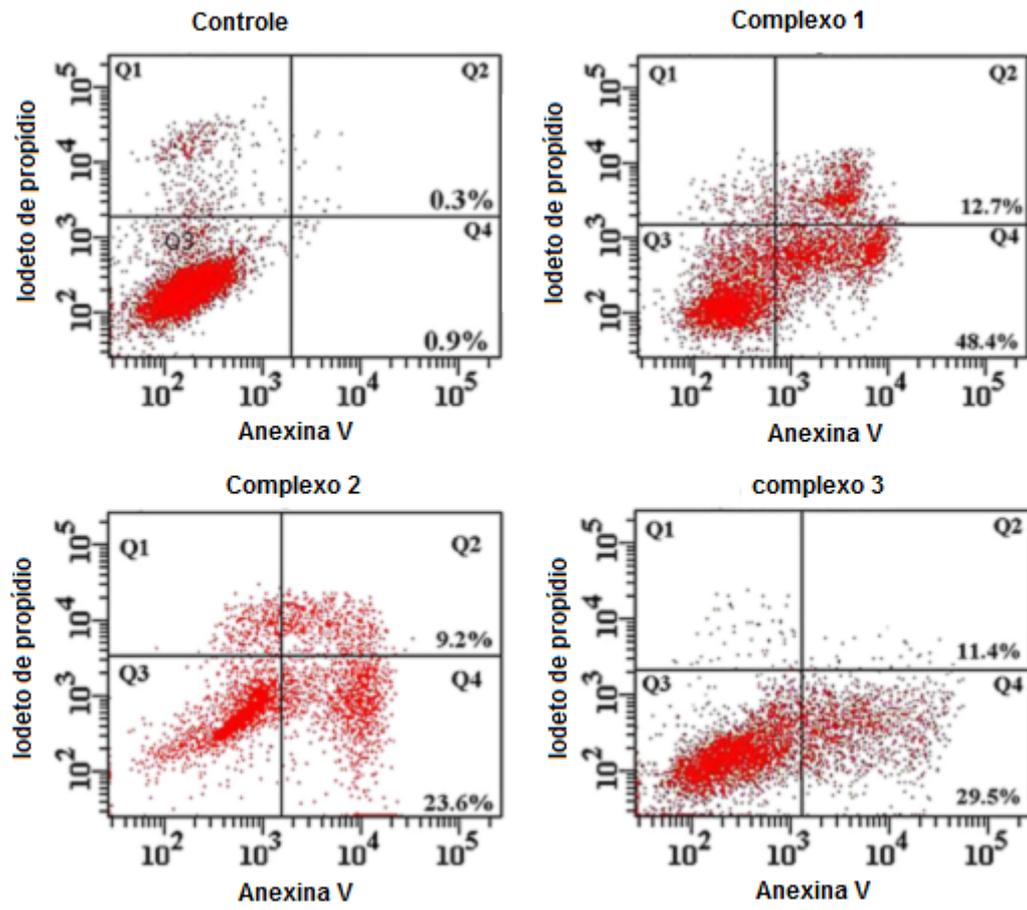


Figura 17. Estudos de marcação com Anexina V e iodeto de propídio realizados para da linhagem SK-OV-3 após incubação com os complexos por 12 horas na concentração da IC_{50} . Q1 = células em necrose, Q2 e Q4 = células em apoptose e Q3 = células vivas (Chen *et al.*, 2013).

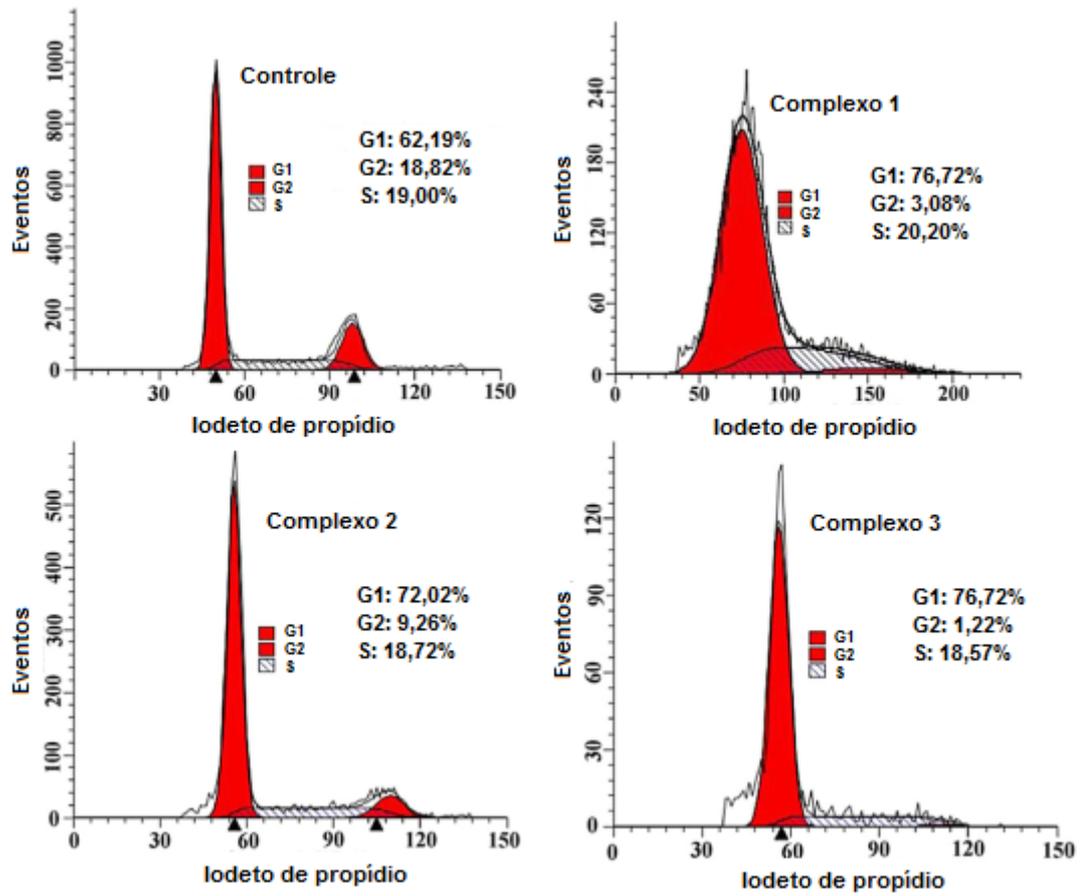


Figura 18. Distribuição do ciclo celular da linhagem SK-OV-3 após tratamento com os complexos por 48 h (Chen *et al.*, 2013).

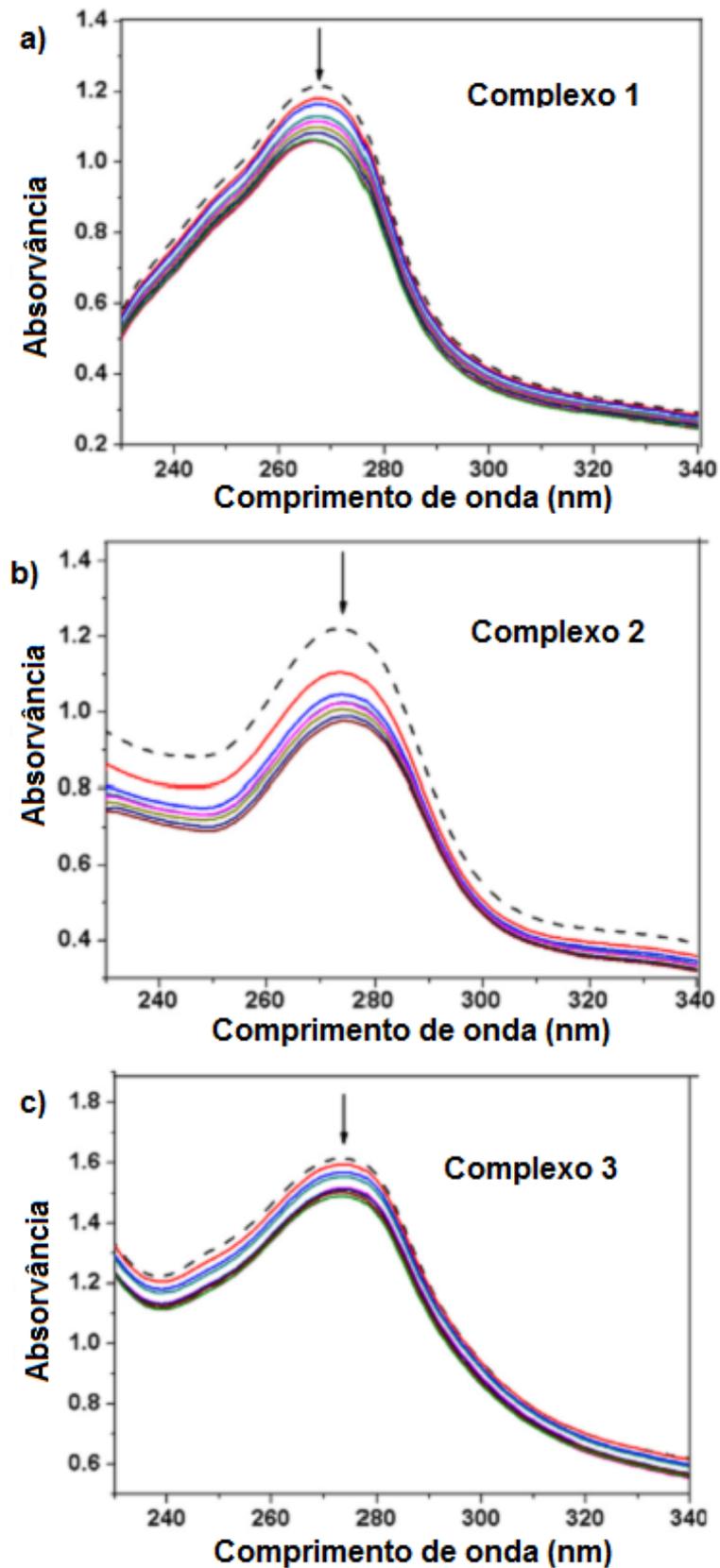


Figura 19. Espectros de UV-Vis para os complexos na ausência (linha tracejada) e presença (linhas sólidas) do DNA: a) complexo 1 nas proporções de 1: 1 a 9: 1 (complexo: DNA); b) complexo 2 nas proporções de 1: 1 a 6: 1 (complexo: DNA); c) complexo 3 nas proporções de 1: 1 a 9: 1 (complexo: DNA) (Chen *et al.*, 2013).

O cenário brevemente relatado nesta introdução destaca a importância da busca por novos agentes quimioterápicos, uma vez que os já existentes têm sua utilização limitada por fatores como os severos efeitos colaterais induzidos pelos mesmos e pelo desenvolvimento de resistência de alguns tipos de câncer aos medicamentos disponíveis no mercado. Nesta busca, os complexos metálicos são bons candidatos, uma vez que vem se mostrando muito ativos frente a diversos tipos de câncer. Sendo assim, é de extrema importância estudar a citotoxicidade de novos complexos metálicos e investigar o tipo e os mecanismos de morte celular induzidos pelos mesmos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo principal a síntese e a caracterização de quatro complexos de zinco e quatro complexos de platina, contendo os ligantes N,O-doadores e o estudo da atividade citotóxica dos compostos obtidos frente a linhagens de leucemia, câncer de pulmão e cólon.

2.2. Objetivos Específicos

- Síntese de quatro ligantes N,O-doadores e caracterização dos mesmos por espectroscopia no infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H ;

- Síntese de complexos de platina (inéditos) e zinco, através de reações entre os sais metálicos ZnCl_2 e K_2PtCl_4 e os ligantes sintetizados;

- Caracterização dos complexos obtidos pelas técnicas de espectroscopia no infravermelho, análise elementar de C, H e N, difração de raios X de monocristal, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS), medidas de condutividade elétrica, ponto de fusão, ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{195}Pt ;

- Investigação da citotoxicidade *in vitro* dos complexos obtidos através do ensaio colorimétrico de metabolização do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) utilizando as linhagens U937, THP-1, MOLT-4 de leucemia, H460 de câncer de pulmão, COLO205 de câncer de cólon e células normais do sangue periférico (PBMC);

- Realização de estudos de marcação com Anexina-V, avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (sub-G1), avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM) por citometria de fluxo (JC-1) e avaliação da ativação das caspases para o composto mais ativo, afim de verificar o mecanismo de morte celular induzido pelo mesmo.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Técnicas Empregadas

As sínteses dos ligantes e dos compostos de coordenação foram realizadas utilizando-se solventes de grau PA e reagentes de fontes comerciais (Aldrich, Acros, Vetec, Synth e Merck), sem prévia purificação. As reações orgânicas foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD) (sílica gel 60 F₂₅₄ – Merck), utilizando-se solvente adequado. Foram utilizadas placas de agitação com aquecimento das marcas Fisatom ou Fisher para realizar a agitação e o aquecimento, quando necessário, das reações de síntese orgânica e inorgânica. Quando se fez necessária a evaporação de solventes nas sínteses orgânicas, esta foi realizada empregando-se evaporador rotatório da marca Fisatom.

3.1.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

As análises por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e platina empregadas na caracterização dos compostos orgânicos e complexos foram realizadas em um espectrômetro BRUKER modelo Ascend™ 500, operando a 500 MHz, utilizando-se clorofórmio ou DMSO deuterado como solventes. As soluções foram preparadas a partir de 30-50 mg de amostra, em 880 µL de solvente em tubos de 2,5 mm utilizando como referência interna o TMS (tetrametilsilano) para as análises dos ligantes orgânicos e o K₂PtCl₄ (tetracloroplatinato de potássio) para as análises dos complexos.

3.1.2. Espectroscopia no infravermelho

As análises por espectroscopia no infravermelho dos compostos orgânicos e inorgânicos foram realizadas em um espectrômetro no infravermelho Shimadzu IRA ffinity-1. As amostras foram analisadas em pastilha de KBr para compostos sólidos e em filme sob pastilha de KBr para compostos oleosos, empregando-se acetona para a preparação do filme.

3.1.3. Análise elementar

As porcentagens de C, H e N foram determinadas em um analisador de CHNSO Thermo Scientific Flash 2000.

3.1.4. Determinação do ponto de fusão

Os pontos de fusão dos compostos de coordenação foram obtidos em um aparelho Microquímica MQAPF-301.

3.1.5. Condutivimetria

As medidas de condutividade elétrica foram obtidas em um condutivímetro Biocristal, a 25 °C. Utilizaram-se solventes de grau espectroscópico e concentração de 1×10^{-3} mol.dm⁻³ das espécies analisadas, de acordo com a solubilidade dos compostos em estudo.

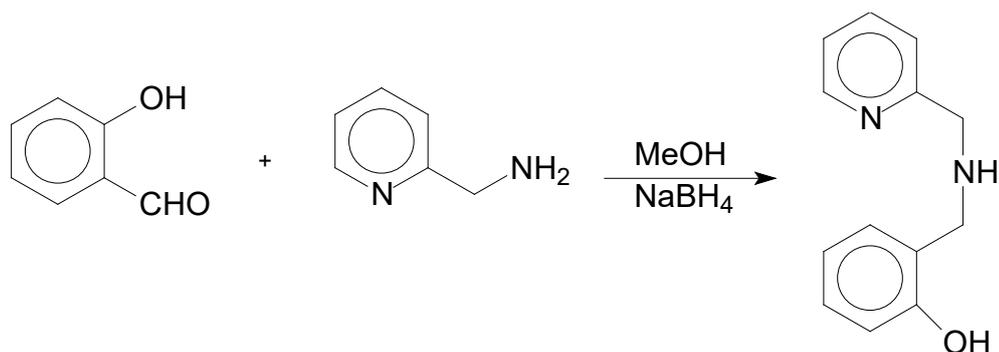
3.1.6. Espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS)

Os espectros de massas foram obtidos empregando-se um espectrômetro de massas (MicroTOF LC Bruker Daltonics spectrometer). A técnica de ionização utilizada foi a de ionização por *electrospray*, em modo positivo (ESI(+)-MS) e ESI(+)-MS/MS).

3.2. Sínteses dos Compostos Orgânicos

3.2.1. Síntese do ligante (2-hidroxibenzil) (2-piridilmetil)amina (L1)

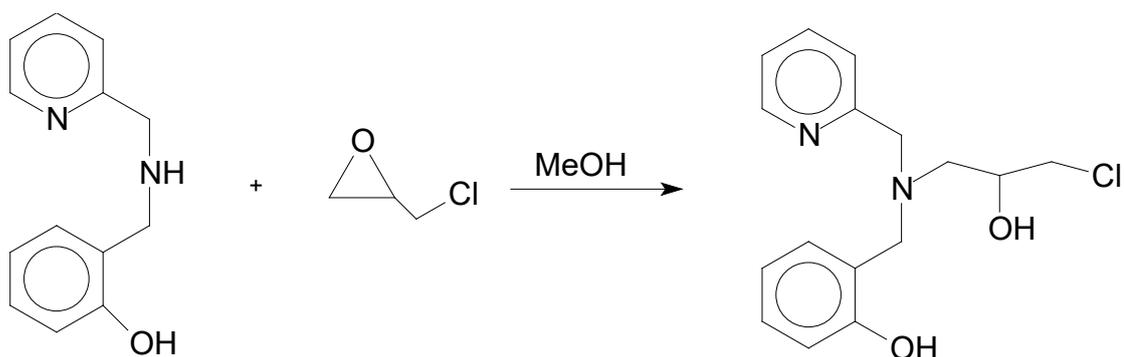
O ligante L1 (Esquema 1) foi sintetizado utilizando-se metodologia descrita na literatura (Neves *et al.*, 1993). Rendimento: 88 %.



Esquema 1. Síntese do ligante L1 (Neves *et al.*, 1993).

3.2.2. Síntese do ligante N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)] propilamina (L2)

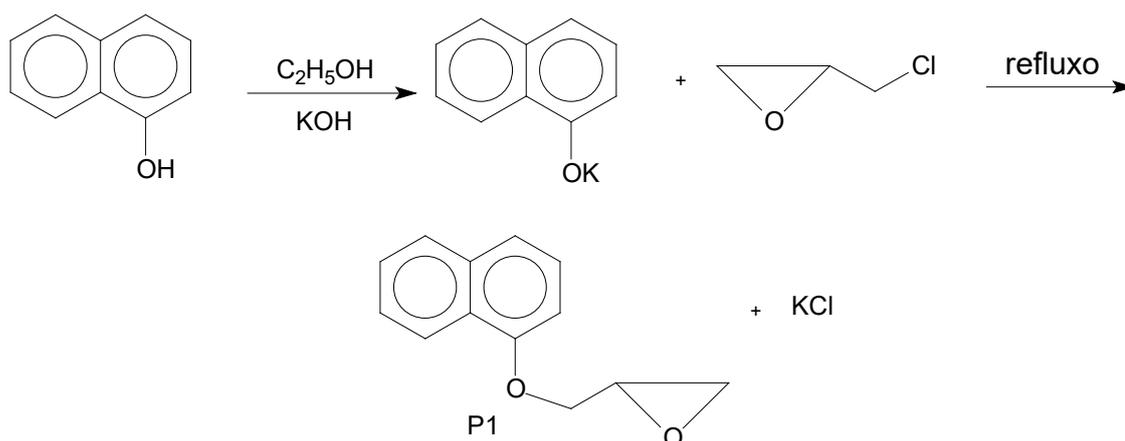
O ligante L2 (Esquema 2) foi sintetizado empregando-se metodologia previamente descrita na literatura (Horn *et al.*, 2000). Rendimento: 83 %.



Esquema 2. Síntese do ligante L2. (Horn *et al.*, 2000).

3.2.3. Síntese do precursor 1-(1-naftiloximetil)oxirano (P1)

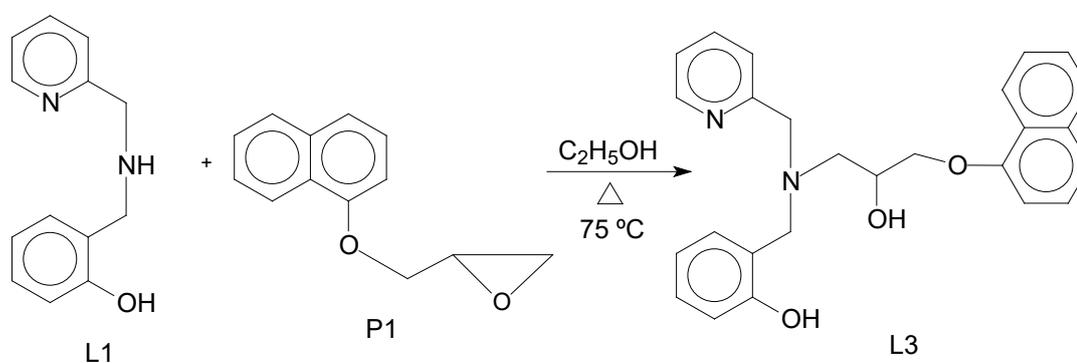
O precursor P1 (Esquema 3) foi sintetizado segundo metodologia previamente relatada na literatura (Lopes, 2012) e foi utilizado como precursor na síntese do ligante L3. Rendimento: 78 %.



Esquema 3. Síntese do precursor P1 (Lopes, 2012).

3.2.4. Síntese do ligante 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (L3)

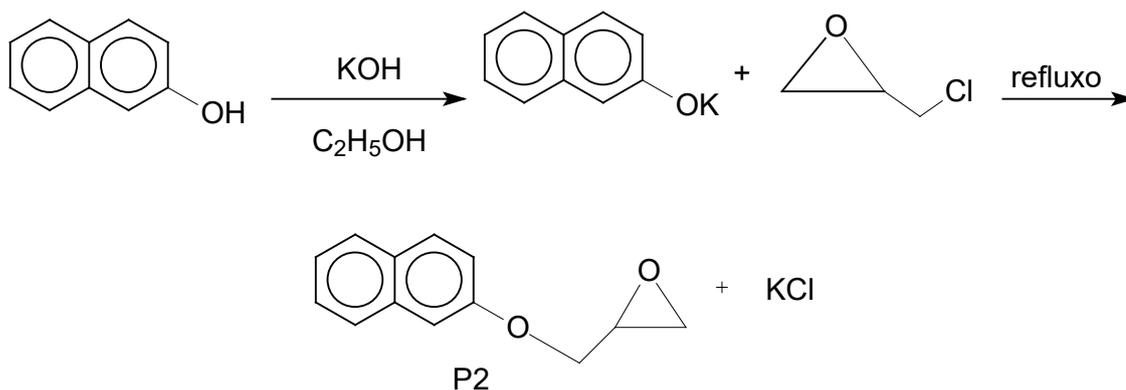
Para a síntese do ligante L3 (Esquema 4) foram utilizados o ligante L1 e o precursor P1, empregando rota sintética relatada previamente na literatura (Lopes, 2012). Rendimento: 68 %.



Esquema 4. Síntese do ligante L3 (Lopes, 2012).

3.2.5. Síntese do precursor 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P2)

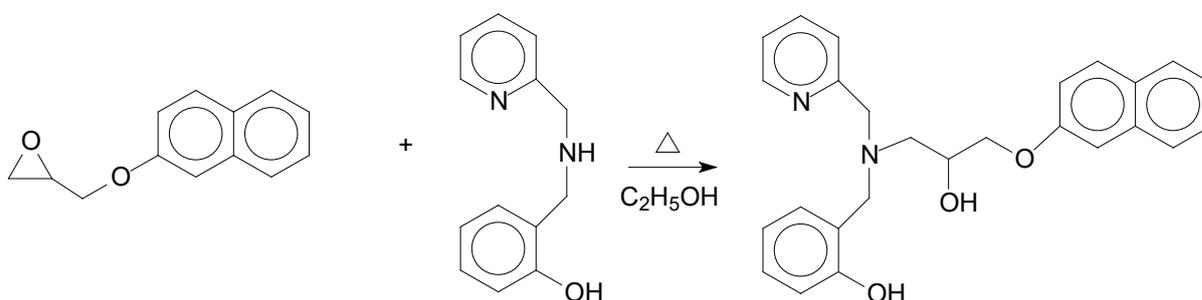
O precursor P2 (Esquema 5) é necessário à síntese do ligante L4 e foi preparado segundo metodologia descrita previamente (Lopes, 2012). Rendimento: 52 %.



Esquema 5. Síntese do precursor P2 (Lopes, 2012).

3.2.6. Síntese do ligante 1-(2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina-3-(2-naftiloxi)propan-2-ol (L4)

A síntese do ligante L4 (Esquema 6) foi realizada de acordo com rota sintética previamente descrita na literatura (Lopes, 2012). Rendimento: 80 %.

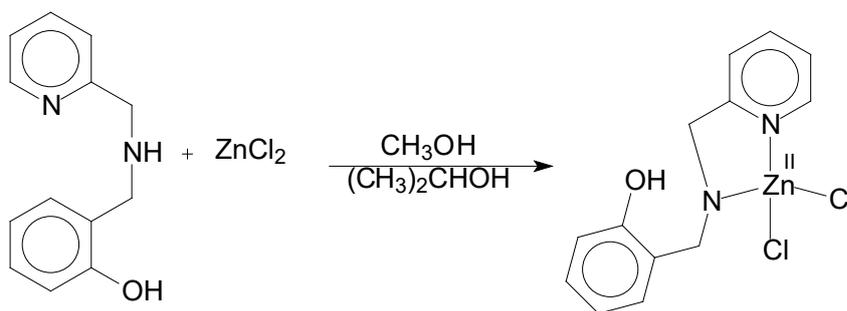


Esquema 6. Síntese do ligante L4 (Lopes, 2012).

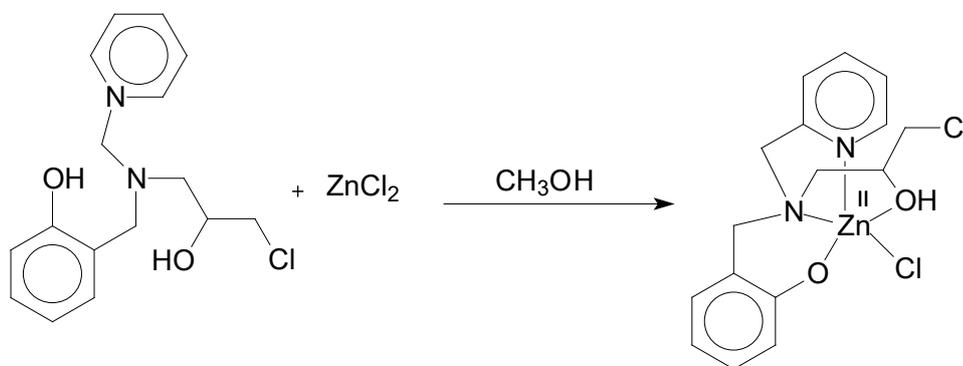
3.3. Sínteses dos Compostos Inorgânicos

3.3.1. Síntese dos complexos de zinco [Zn(L1)Cl₂] (C1) e [Zn(L2)Cl] (C2)

As sínteses dos complexos C1 e C2 (Esquemas 7 e 8) foram realizadas empregando-se metodologias previamente descritas na literatura (Fernandes *et al.*; 2010; Fernandes *et al.*, 2014). Rendimento: C1 = 0,27 g; 79 %, C2 = 0,30 g; 70 %.



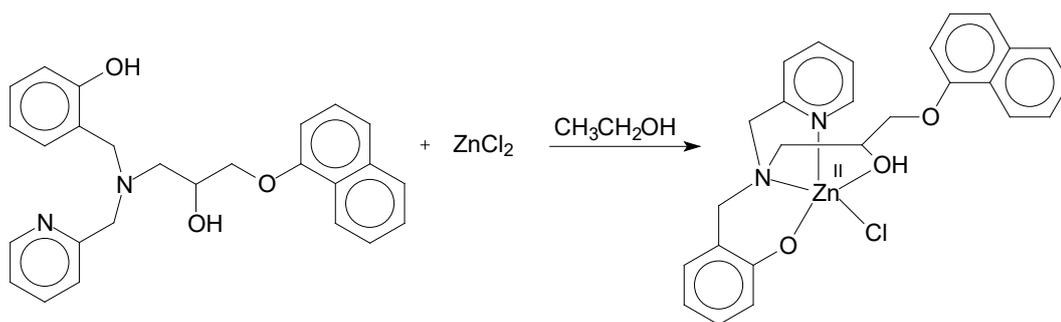
Esquema 7. Síntese do complexo C1 (Fernandes, 2014).



Esquema 8. Síntese do complexo C2 (Fernandes *et al.*, 2010).

3.3.2. Síntese do complexo [Zn(L3)Cl] (C3)

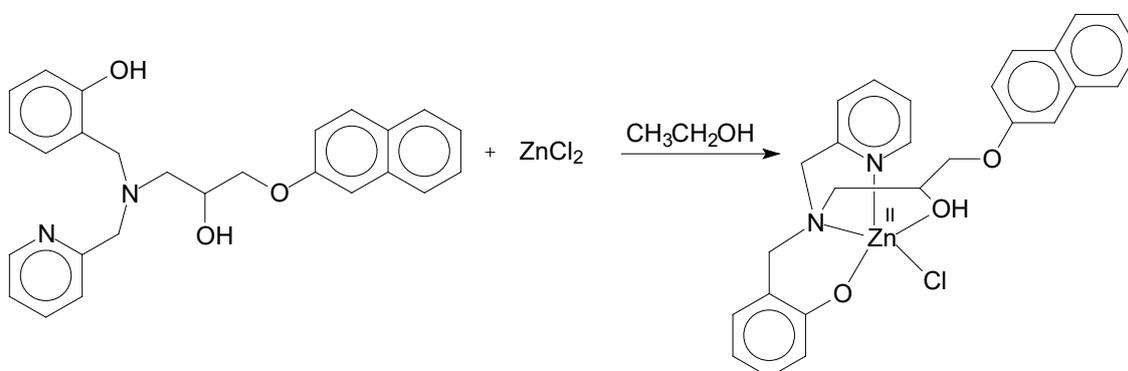
Para a obtenção do complexo C3 (Esquema 9) reagiu-se o ligante L3 (0,414 g; 1,0 mmol) e o sal de zinco ZnCl₂ (0,136 g; 1,0 mmol), ambos em solução etanólica (20 mL cada). A solução resultante, de aspecto branco leitoso foi mantida sob refluxo por 48 h. Ao final deste tempo a solução foi filtrada e o complexo isolado na forma de um pó branco. Rendimento: 0,14 g (26 %). Ponto de fusão: 235 °C.



Esquema 9. Síntese do complexo C3.

3.3.3. Síntese dos complexos [Zn(L4)Cl] (C4)

Para a obtenção do complexo C4 (Esquema 10) reagiu-se o ligante L4 (0,414 g; 1,0 mmol) e o sal de zinco ZnCl_2 (0,136 g; 1,0 mmol), ambos em solução etanólica (20 mL cada). A reação foi mantida sob agitação e a formação de um pó de coloração cinza foi observada. O complexo, na forma de um pó cinza claro obtido foi isolado através de filtração. Rendimento: 0,13 g (23 %). Ponto de fusão: 230°C.

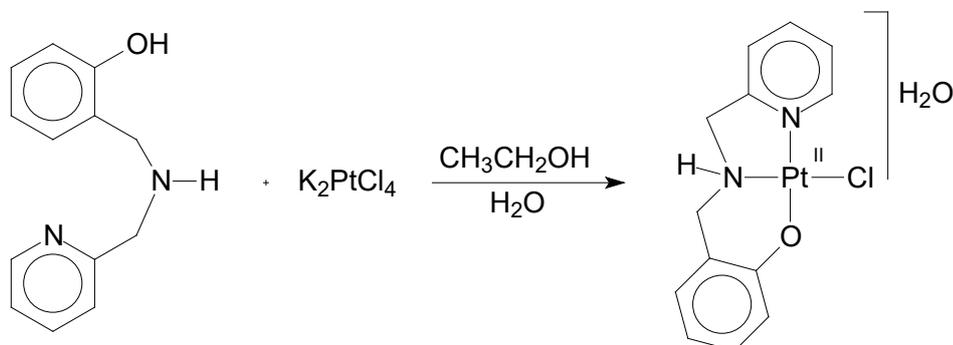


Esquema 10. Síntese do complexo C4.

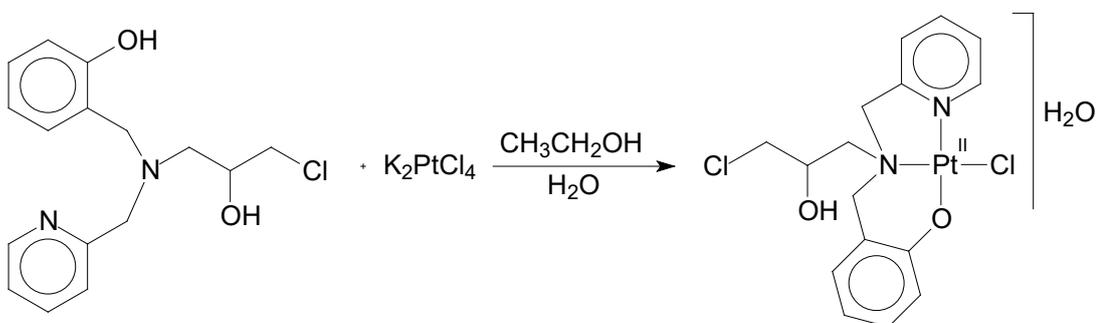
3.3.4. Síntese dos complexos [Pt(L1)Cl] (C5), [Pt(L2)Cl] (C6) e [Pt(L4)Cl] (C8)

Para a obtenção dos complexos C5, C6 e C8 (Esquemas 11 - 13) reagiu-se os respectivos ligantes (L1 = 0,214 g, L2 = 0,307 g e L4 = 0,414 g; 1,0 mmol) e o sal de platina K_2PtCl_4 (0,415 g; 1,0 mmol) em solução etanólica (50 mL), sob agitação, por dois dias. Após este tempo, foram adicionados 50 mL de H_2O às soluções, que permaneceram sob agitação por mais 24 h. As soluções foram filtradas e o sólido

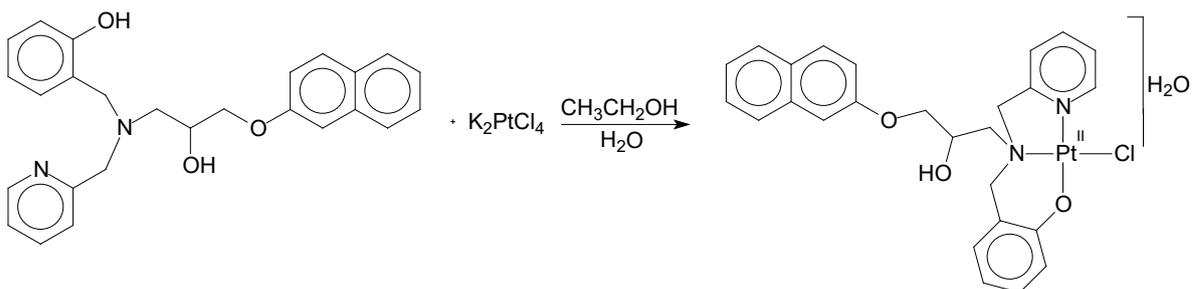
obtido em cada uma delas coletado. Cor: C5 = amarelo-claro; C6 = cinza claro; C8 = bege claro. Rendimento: C5 = 0,29 g (62 %), C6 = 0,18 g (32 %), C8 = 0,29 g (44 %). Ponto de fusão: C5 = 295 °C, C6 = 265 °C, C8 = 190 °C.



Esquema 11. Síntese do complexo C5.



Esquema 12. Síntese do complexo C6.

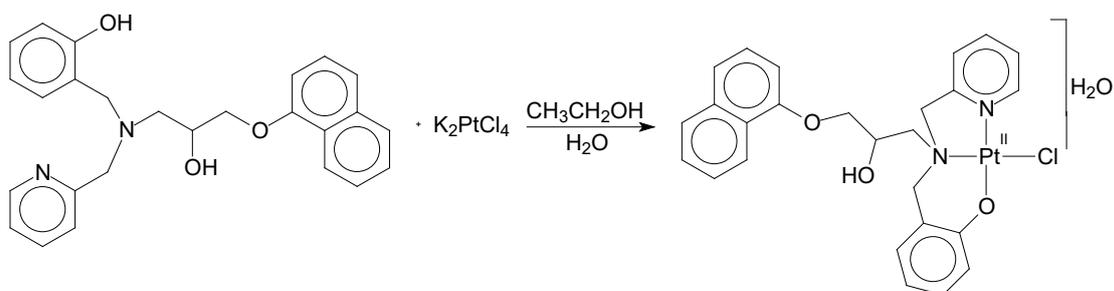


Esquema 13. Síntese do complexo C8.

3.3.5. Síntese do complexo [Pt(L3)Cl] (C7)

Para a obtenção do complexo C7 (Esquema 14) reagiu-se o ligante L3 (0,414 g; 1,0 mmol) dissolvido em 50 mL de etanol e o sal de platina K_2PtCl_4 (0,415 g; 1,0

mmol) dissolvido em 50 mL de água, sob agitação, por 24 h. Após este tempo a solução foi filtrada para remover um sólido marrom que se formou (complexo contendo impurezas). A seguir, 50 mL de isopropanol foram adicionados e a solução foi deixada em repouso. Após 4-6 dias, microcristais amarelos foram obtidos. Rendimento: 0,15 g (23 %). Ponto de fusão: 245 °C



Esquema 14. Síntese do complexo C7.

3.4. Estudos Biológicos

3.4.1. Preparo das soluções dos compostos e cultura das células tumorais

a) Diluição e armazenamento dos compostos orgânicos e de coordenação

Para a realização dos testes biológicos foram preparadas soluções estoque dos complexos sintetizados, assim como dos respectivos ligantes e sais metálicos utilizados em suas sínteses e cisplatina, empregando-se DMSO (dimetilsulfóxido) como solvente. As soluções estoque foram armazenadas em congelador para que se mantivessem estáveis. As diluições dos compostos foram realizadas através do método de diluição seriada utilizando-se o meio de cultura D-MEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 20 µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10 % de soro fetal bovino (Gibco, BRL). A concentração das soluções estoque preparadas foi de 2×10^{-2} mol.L⁻¹ e as concentrações finais utilizadas nos experimentos foram 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µmol.L⁻¹.

b) Cultura das linhagens de células neoplásicas

Células leucêmicas humanas (THP-1, U937, MOLT-4), pulmão (H460), e cólon (COLO205), adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC), foram cultivadas em meio D-MEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 20 µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10 % de soro fetal bovino (Gibco, BRL). As culturas foram armazenadas em garrafas de cultura apropriadas e mantidas em estufa (Forma Scientific Inc., modelo 3159) com temperatura e pressão de CO₂ controlados (37 °C e 5 % de CO₂). O meio de cultura foi renovado a cada dois dias.

c) Cultura das linhagens de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

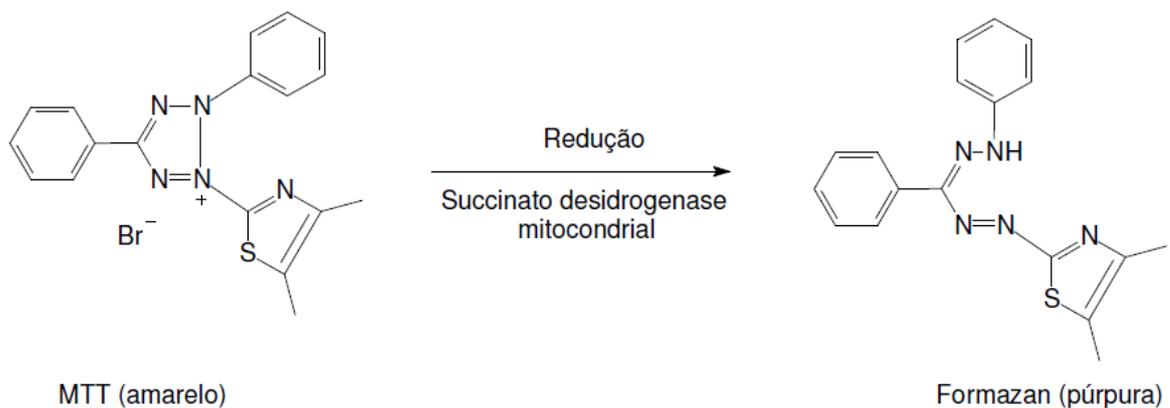
As células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) foram obtidas do sangue de voluntários saudáveis. O sangue venoso foi coletado pelo sistema de tubos "Vacutainer™" (*Becton Dickinson*) contendo heparina sódica e processado pela metodologia descrita por Bennett e Breit (1994). O sangue total coletado foi lentamente adicionado sobre o Ficoll-Paque™ Plus (1,08 g/mL), na proporção de 2:1 (20 mL de sangue para 10 mL de Ficoll), em tubos de 50 mL, e centrifugado (Centrifuga Sorval, RT7) a 1500 rpm por 40 min, a 20 °C. O plasma, que compõe a primeira camada do gradiente obtido, foi descartado e o anel de células mononucleares foi removido, lavado três vezes com meio de cultura (DMEM/F12) gelado e centrifugado a 1500 rpm por 10 min a 4 °C. Após o processo de lavagem o "pellet" formado foi ressuspensionado em DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 20 µg/mL de gentamicina e 0,25 µg/mL de enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB) (Sigma, S0812). As células foram mantidas em garrafas de cultura e em estufa (37 °C e 5% de CO₂) por duas horas para aderência dos monócitos. Após este período as células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC), presentes no sobrenadante, foram recolhidas e utilizadas para realização do teste de viabilidade celular por metabolização do MTT.

d) Padronização da concentração da cultura celular

Após o cultivo das células, uma porção das mesmas foi corada com azul de Tripán 0,2 % (Sigma, T6146) para a realização da contagem do número de células em câmara de Neubauer e avaliação da viabilidade celular. Após a contagem, a concentração de células foi ajustada para 1×10^6 células/mL para a realização dos experimentos.

3.4.2. Avaliação da viabilidade celular por metabolização do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio)

O teste de viabilidade celular pelo ensaio de metabolização do MTT (Sigma, M2128) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mosmann (1983), que consiste na redução do MTT a formazan (composto de cor púrpura) pela succinato desidrogenase mitocondrial (Esquema 15).



Esquema 15. Representação da redução do MTT a formazan pela succinato desidrogenase mitocondrial.

Em placas de 96 poços foram adicionados 100 μ L por poço das células cultivadas com a concentração devidamente ajustada (1×10^6 células/mL), as placas foram mantidas em estufa por 6-8 h e em seguida foram adicionados 100 μ L por poço dos compostos nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 μ mol.L⁻¹. Após a adição dos compostos as placas foram mantidas em estufa (37°C e 5% de CO₂) por

36 h. Passado o período de incubação foram adicionados, em cada poço, 20 µL de solução de MTT (5,0 mg/mL dissolvido em tampão fosfato salino pH 7,2 - PBS) seguido de incubação por mais 4 horas em estufa. Após este período, foram retirados 120 µL do sobrenadante e os cristais formados foram homogeneizados com 150 µL de uma solução de isopropanol com 0,0014 % de HCl concentrado. As placas de 96 poços foram centrifugadas e uma alíquota de 100 µL de cada poço foi transferida para uma placa limpa para ser avaliada em espectrofotômetro (MULTISKAN-EX) utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Poços contendo 100 µL de células e 100 µL de meio de cultura foram utilizados como controle positivo (branco). Todos os testes foram realizados em dois experimentos isolados, cada um em triplicata. Os resultados de absorbância obtidos foram convertidos em porcentagem de células viáveis, que foram inseridas no programa Prisma para que a IC₅₀ fosse calculada.

3.4.3. Avaliação do tipo de morte celular através de marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio (PI)

A linhagem U937 foi plaqueada na concentração de 1×10^6 células/mL em placa de 24 poços e tratada com os compostos C7 e C8 na concentração de $2 \times$ IC₅₀, durante 24 horas. A marcação com Anexina V/PI foi feita de acordo com o protocolo do kit *AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit* (SIGMA-ALDRICH). Após a incubação, as células foram lavadas 2 vezes em PBS e ressuspensas no tampão de ligação fornecido pelo kit (100mM HEPES/NaOH, pH 7,5, contendo 1400 mM de NaCl e 25 mM de CaCl₂). Em tubo apropriado, foram adicionados 500 µL da solução de tampão de ligação contendo as células tratadas, 5µL de Anexina V e 10 µL de Iodeto de Propídio (PI) para cada amostra. As amostras foram deixadas no escuro por exatamente 10 minutos. Imediatamente após esse tempo, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS Calibur).

3.4.4. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (Sub-G1)

Células U937 foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/mL em placas de 24 poços e tratadas com $2x$ IC_{50} do composto C7 e incubadas por 24 horas em estufa ($37^\circ C$ e 5% de CO_2). As células controle foram incubadas apenas com meio DMEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com $20 \mu g/mL$ de gentamicina (Gibco, BRL). Em seguida as células foram processadas segundo método descrito por Gong *et al.*, 1994. Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço (2 mL) foi transferido para tubos de 2 mL e centrifugado por 10 minutos a $200 \times g$. As células foram lavadas duas vezes com PBS, foi adicionado lentamente 1mL de etanol 70% gelado e as células foram submetidas a fixação por 30 minutos a $4^\circ C$. Após o período de fixação, as células foram sedimentadas por centrifugação a $200 \times g$ por 5 min e lavadas com tampão fosfato-citrato (200 mM , $pH=7,8$). O sobrenadante foi desprezado e as células foram incubadas com $50 \mu L$ de RNase ($100 \mu g/mL$ Sigma, R4875), à temperatura ambiente, por 15 min. A seguir, foram adicionados $400 \mu L$ de iodeto de propídio (concentração final $50 \mu g/mL$; Sigma, P4170). As células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS Calibur) onde foram contados 10.000 eventos por amostra. Os histogramas e as porcentagens de células em sub-G1 foram obtidos através do software WinMDI, versão 2.9.

3.4.5. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (JC-1)

Células U937 foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/mL em placas de 24 poços, tratadas com $2x$ IC_{50} do composto C7, e incubadas por 12 horas em estufa ($37^\circ C$ e 5% de CO_2). Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço (1 mL) foi transferido para tubos de 2 mL e centrifugado por 5 minutos a $400 \times g$. O sobrenadante foi desprezado e as células incubadas por 15 minutos em estufa ($37^\circ C$ e 5% de CO_2) com $500 \mu L$ de solução de JC-1 ($25 \mu g/mL$ diluído 1:1000 em meio de cultura D-MEMF12). As células em suspensão foram centrifugadas por 5 minutos a $400 \times g$ e lavadas duas vezes com 2 mL de meio de cultura D-MEMF12. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em $500 \mu L$ de meio D-MEMF12 sem soro fetal bovino. A leitura das amostras foi realizada imediatamente em citômetro de fluxo (FACS Calibur). Os gráficos *Dot-plot* e a porcentagem de

células com mitocôndrias normais e comprometidas foram obtidos através do software WinMDI, versão 2.9.

3.4.6. - Avaliação da atividade de caspases

Para verificar a via apoptótica induzida pelo composto C7 foi utilizado o *Colorimeter Sampler Kit (Invitrogen)* contendo substratos para as caspases 3 e 6 (efetoras para ambas as vias), 9 (ativadoras da via mitocondrial) e 8 (ativadoras da via dos receptores de morte). Foram seguidos os procedimentos descritos pelo fabricante. Culturas de células da linhagem U937, na concentração de 1×10^6 células/mL, foram incubadas com uma concentração de $2 \times IC_{50}$ do composto C7 por 3, 6, 12 horas. Posteriormente as células foram centrifugadas por 5 minutos a 200 xg e resuspendidas em 100 μ L do tampão de lise. As amostras foram centrifugadas por 1 min (10.000 xg) e, em seguida, foram adicionados 50 μ L do tampão de reação contendo 10 mM de DTT (ditiotretitol) a cada amostra e 5 μ L do substrato (4 mM). As amostras foram incubadas a 37 °C, no escuro, e foram realizadas leituras em espectrofotômetro (Epoch™, BioTek® Instruments, Inc.) utilizando o comprimento de onda de 450 nm nos tempos de 0, 1 e 2 horas. Os ensaios foram feitos em duplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos Compostos Orgânicos

Todos os compostos orgânicos (L1 – L4) têm sua síntese e caracterização descritas na literatura (Neves *et al.*, 1993; Horn *et al.*, 2000; Lopes, 2012), portanto, foram empregadas em suas caracterizações apenas as técnicas de espectroscopia no infravermelho (Anexo 1) e ressonância magnética nuclear de ^1H (Anexo 1) a fim de confirmar a obtenção e a pureza dos mesmos.

4.2. Caracterização dos Complexos de Platina e Zinco

Neste item serão apresentadas as caracterizações dos complexos de platina e zinco através das técnicas de espectroscopia no infravermelho, ponto de fusão, análise elementar (C, H e N), medidas de condutividade elétrica, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS e ESI-MS/MS) e ressonância magnética nuclear de ^{195}Pt para os complexos de platina.

4.2.1. Caracterização dos complexos de zinco já descritos na literatura: C1 e C2

Para estes compostos, já descritos na literatura (Fernandes *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2014), foram empregadas as técnicas de espectroscopia no infravermelho (Tabela 3) e análise elementar de C, H e N (Tabela 4) a fim de comprovar sua obtenção e pureza.

Tabela 3. Resultados de espectroscopia no infravermelho para os compostos C1 e C2, obtidos em pastilha de KBr.

Absorção (cm^{-1})	C1	C2
ν OH	3332	3435
ν NH	3226	-
ν $\text{CH}_{\text{aromático}}$	3032	3028
ν_{as} CH_2	2958, 2939, 2901	2943, 2914
ν_{s} CH_2	2858	2748
ν $\text{C}=\text{C}$; ν $\text{C}=\text{N}$	1593, 1573, 1504, 1454 e 1435	1595, 1437
ν $\text{C}-\text{O}^{\text{a}}$	1273	1278
γ - CH^{b} ; β -anel $^{\text{c}}$	760, 738	764, 734

a= estiramento de C-O do fenol; b= deformação C-H fora do plano de heteroaromáticos; c= deformação do anel heteroaromático.

Tabela 4. Resultados de análise elementar (C, H e N) para os compostos de C1 e C2.

Complexo	% C_{teórico}	% C_{exp.}	% H_{teórico}	% H_{exp.}	% N_{teórico}	% N_{exp.}
C1 (C₁₃H₁₄Cl₂N₂Zn)	44,54	44,57	4,03	4,03	7,99	8,24
C2 (C₁₆H₁₈Cl₂N₂O₂Zn)	47,26	47,29	4,46	4,21	6,89	7,02

Os resultados obtidos estão de acordo com aqueles relatados na literatura, confirmando a obtenção e pureza dos mesmos.

4.2.2. Caracterização dos complexos inéditos de platina e zinco: C3 – C8

Os complexos inéditos de platina e zinco foram caracterizados pelas técnicas de espectroscopia no infravermelho, análise elementar de C, H e N, condutividade elétrica, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS) e ressonância magnética nuclear de ¹⁹⁵Pt para os complexos de platina.

4.2.2.1. Espectroscopia no infravermelho

Os espectros no infravermelho obtidos para os complexos de platina e zinco apresentam bandas típicas dos ligantes orgânicos empregados em suas sínteses. São observadas bandas de deformação axial de O–H, bandas características da deformação axial de CH aromático, bandas de deformação axial simétrica e assimétrica de CH₂, bandas características da deformação axial dos anéis aromáticos (C=C e C=N) e bandas de deformação do anel heteraromático, entre outras. Também são observadas bandas características de deformação axial de C-O do fenol e do naftol. As bandas observadas e suas atribuições estão listadas na Tabela 5. As Figuras 20 – 23 apresentam os espectros no infravermelho dos complexos em comparação com os espectros dos seus respectivos ligantes.

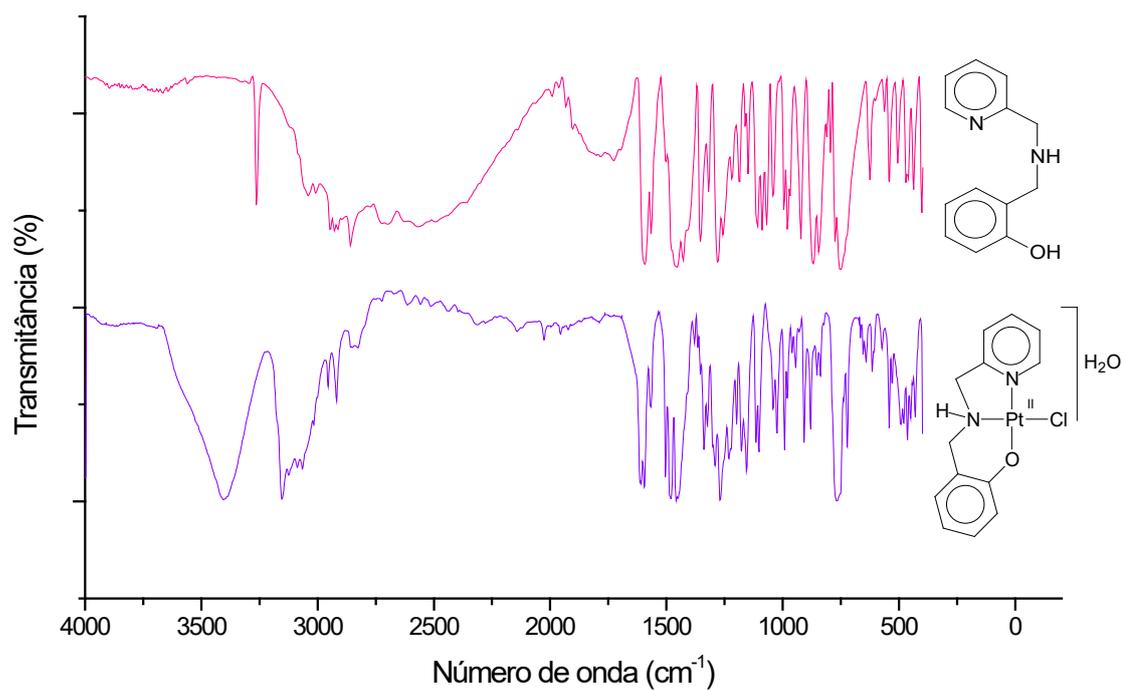


Figura 20. Espectros no infravermelho do ligante L1 e do complexo C5.

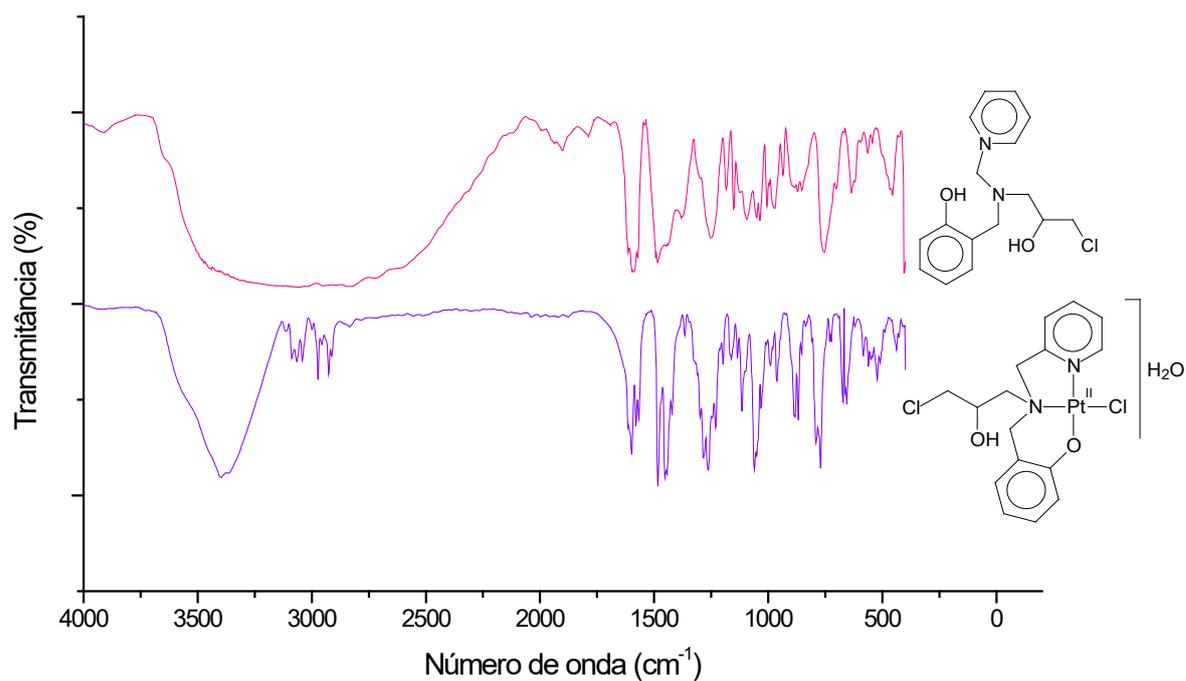


Figura 21. Espectros no infravermelho do ligante L2 e do complexo C6.

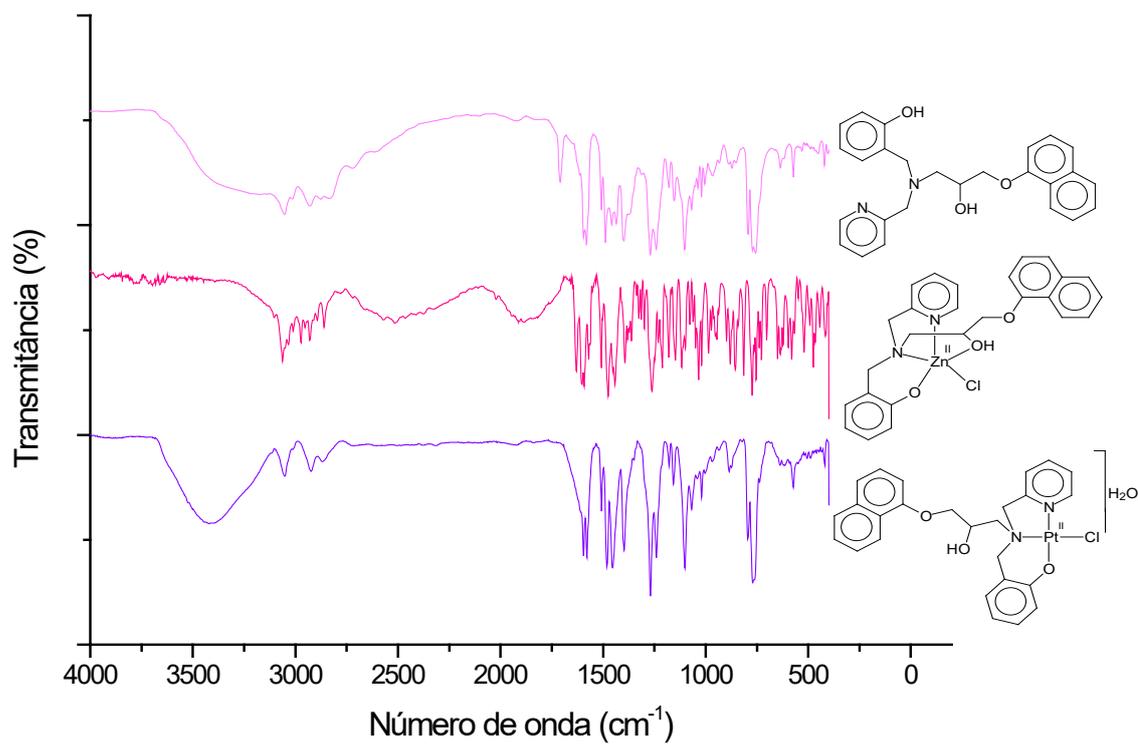


Figura 22. Espectros no infravermelho do ligante L3 e dos complexos C3 e C7.

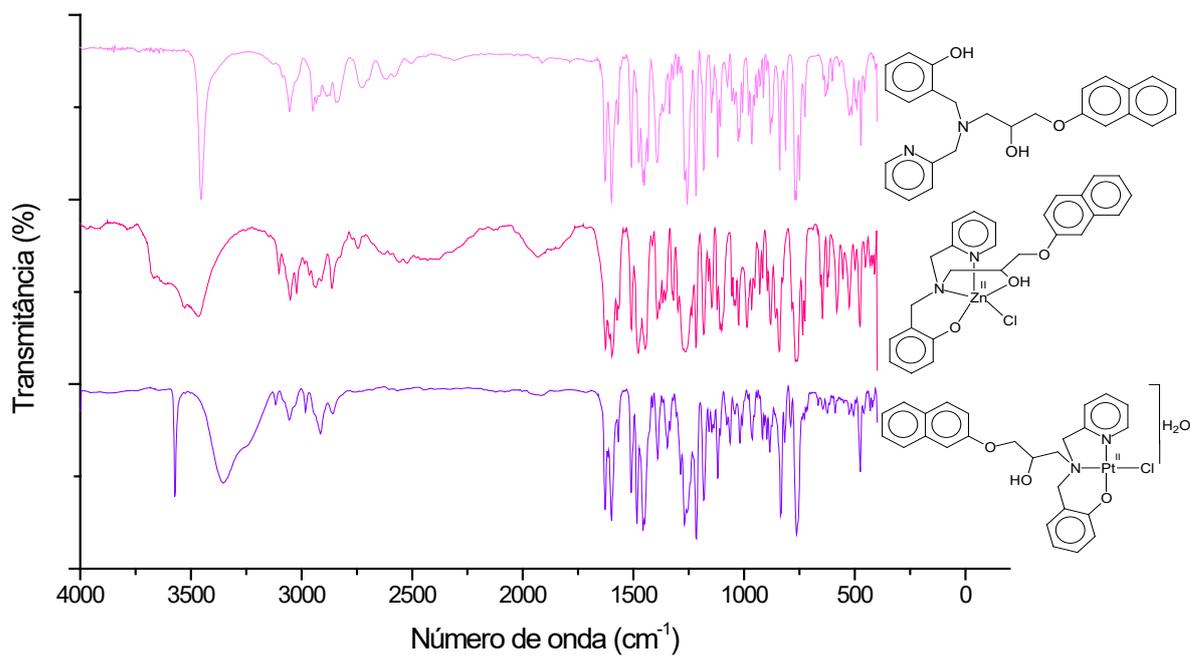


Figura 23. Espectros no infravermelho do ligante L4 e dos complexos C4 e C8.

Tabela 5. Principais bandas observadas nos espectros no infravermelho dos complexos de platina e zinco (C3 – C8) e suas atribuições.

Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)					
	C3	C4	C5	C6	C7	C8
v OH	3647	3464	3408	3400	3359	3346
v NH	--	--	3155	--	--	--
v CH _{Aromático}	3057	3049	3088	3088	3069	3073
v _{as} + v _s CH ₂	2910, 2860, 2748	2962, 2893, 2860	2955, 2918	2972, 2926	2983, 2923	2988, 2915
v C=N; v C=C	1593, 1508,147 5, 1446, 1402	1626, 1566, 1506, 1477, 1444	1595, 1479, 1450	1599, 1483, 1452	1598, 1479, 445	1599, 1510, 1485, 1448
v C-O ^a	1242	1217	1269	1114	1121	1118
γ-CH ^b ; β-anel ^c	792, 760	844, 767	767	769	762	758

a= estiramento de C-O do fenol; b= deformação C-H fora do plano de heteroaromáticos; c= deformação do anel heteroaromático.

O deslocamento das bandas para regiões de diferentes números de onda em relação aos espectros no infravermelho dos ligantes mostra que houve mudança na geometria da molécula e o enfraquecimento de algumas ligações, confirmando a complexação.

4.2.2.2. Análise elementar de C, H e N

Os resultados obtidos da análise elementar de C, H e N realizada para os complexos de platina e zinco são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados de análise elementar (C, H e N) para os compostos de C5, C6 e C8.

Complexo	% C_{teórico}	% C_{exp.}	% H_{teórico}	% H_{exp.}	% N_{teórico}	% N_{exp.}
C3 (C₂₆H₂₅ClN₂O₃Zn)	60,72	61,09	4,90	5,19	5,45	5,58
C4 (C₂₆H₂₅ClN₂O₃Zn)	60,72	60,98	4,90	5,19	5,45	5,63
C5 (C₁₃H₁₅ClN₂O₂Pt)	33,81	33,47	3,27	3,11	6,07	5,86
C6 (C₁₆H₂₁Cl₂N₂O₃Pt)	35,83	35,98	3,38	3,48	5,22	5,03
C7 (C₂₆H₂₇ClN₂O₄Pt)	47,17	46,89	4,11	4,05	4,23	3,97
C8 (C₂₆H₂₇ClN₂O₄Pt)	47,17	47,13	4,11	3,98	4,23	4,10

O resultados da análise elementar são concordantes com as estruturas propostas, confirmando a obtenção de complexos contendo um centro de platina ou zinco coordenado a uma molécula do respectivo ligante e um cloreto. Também é confirmada a presença de uma molécula de água de cristalização em todos os complexos de platina.

4.2.2.3. Medidas de condutividade elétrica

As medidas de condutividade elétrica dos complexos de platina e zinco (Tabela 7) foram realizadas em solução de dimetilformamida ou dimetilsulfóxido, de acordo com a solubilidade de cada complexo, na concentração de $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Segundo Geary (1971), as espécies presentes nas soluções dos complexos podem ser consideradas não-eletrólitas, pois apresentaram condutividade elétrica inferior à $65,0 \mu\text{S/cm}$ (DMF) e $23,0 \mu\text{S/cm}$ (DMSO).

Tabela 7. Dados da análise de condutividade elétrica para os complexos de platina e zinco C3 – C8.

Complexo	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Espécie de eletrólito ¹
C3 (DMF)	14,99	não-eletrólito
C4 (DMF)	15,65	não-eletrólito
C5 (DMSO)	16,72	não-eletrólito
C6 (DMSO)	12,18	não-eletrólito
C7 (DMSO)	18,36	não-eletrólito
C8 (DMSO)	20,14	não-eletrólito

¹ Atribuição segundo Geary (1971).

4.2.2.4. Espectrometria de massas com ionização por *electrospray*

Os espectros de ESI-(+)-MS em solução água:metanol (1:1) para os complexos C3 (Figura 24) e C4 (Figura 26) são bastante semelhantes, ambos os espectros apresentam sinais de m/z 309, 415, 477, 957 e 993. Os sinais de m/z 309 e 415 são referentes ao ligante, correspondendo, respectivamente, ao cátion formado pelo ligante protonado após a perda de um grupo metileno e um fenol $[\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2]^+$ e ao cátion do ligante protonado $[\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3]^+$.

O sinal de m/z 477 representa o cátion mononuclear formado por um centro metálico de Zn(II) coordenado a uma molécula do ligante desprotonado $[\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3\text{Zn}]^+$. Os sinais de m/z 957 e 993 representam cátions binucleares, o primeiro deles é formado por dois centros de Zn(II) coordenados a duas moléculas do ligante, uma com o fenol desprotonado e outra com o fenol e o álcool desprotonados (m/z 957) $[\text{C}_{52}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_6\text{Zn}_2]^+$ e a segunda é formada por dois centros de Zn(II) coordenados a duas moléculas do ligante com o fenol desprotonado e a um cloreto (m/z 993) $[\text{C}_{52}\text{H}_{50}\text{ClN}_4\text{O}_6\text{Zn}_2]^+$.

Além destes sinais, o espectro do complexo C3 apresenta um sinal de m/z 371, referente ao cátion formado por uma molécula do ligante após a perda de um grupo metileno e um fenol coordenado a um centro metálico de Zn(II) $[\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2\text{Zn}]^+$.

O espectro obtido para o complexo C4 também apresenta sinais adicionais de m/z 437, 513 e 891. O cátion de m/z 437 é formado por uma molécula do ligante e um íon sódio $[\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}]^+$, o de m/z 513 é formado por um centro metálico de

Zn(II) coordenado a uma molécula do ligante e um íon cloreto $[\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{Zn}]^+$ e o de m/z 891 é formado por dois centros de Zn(II) coordenados a duas moléculas do ligante, uma totalmente desprotonada e a segunda apenas com o fenol desprotonado $[\text{C}_{52}\text{H}_{51}\text{N}_4\text{O}_6\text{Zn}]^+$.

As Figuras 25 e 27 apresentam as estruturas das principais espécies observadas nos espectros de ESI-(+)-MS para os dois complexos. Todas as espécies propostas foram confirmadas através da comparação entre os perfis isotópicos teóricos e experimentais.

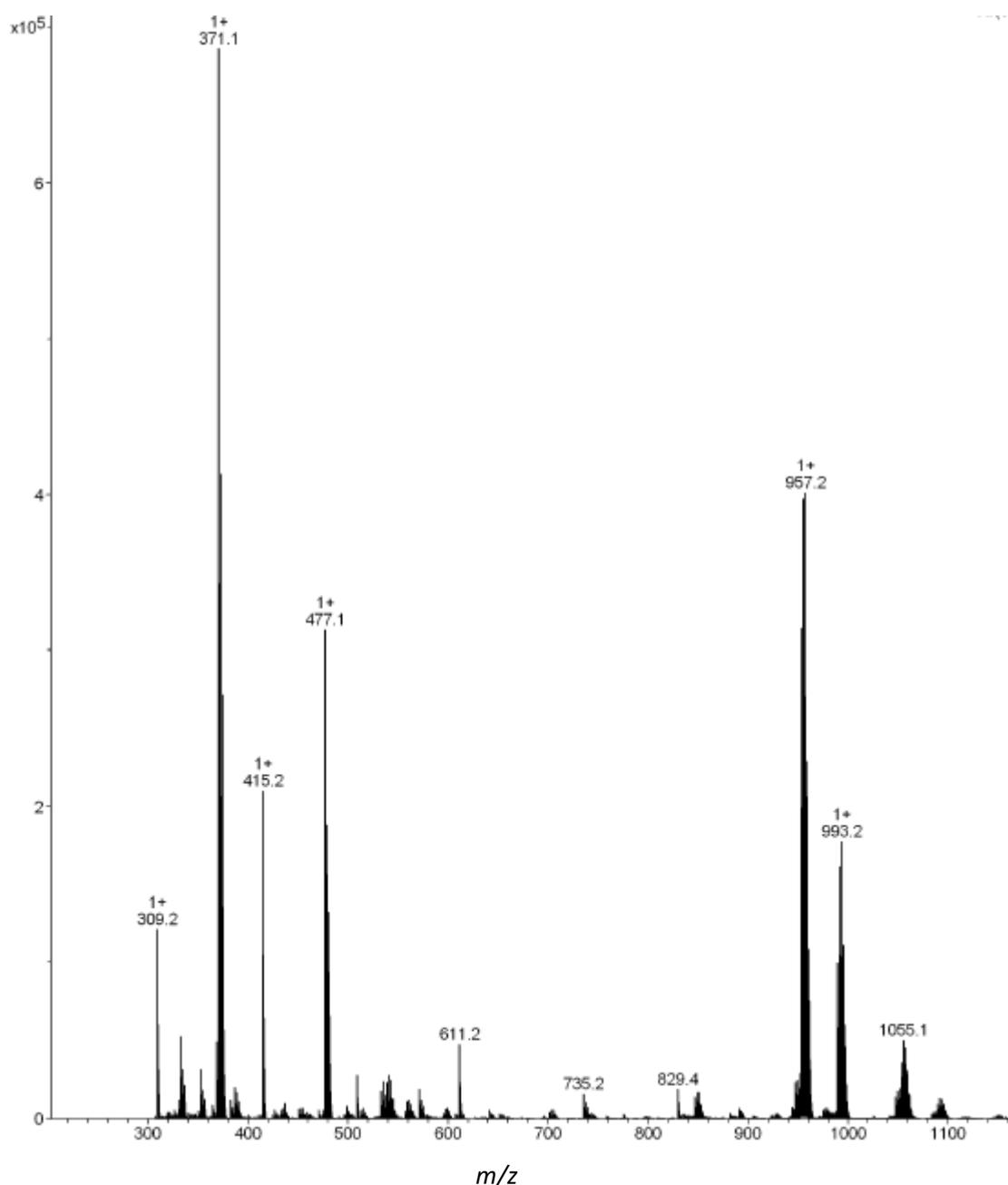


Figura 24. Espectro de ESI-(+)-MS obtido para o composto C3, em água:metanol (1:1).

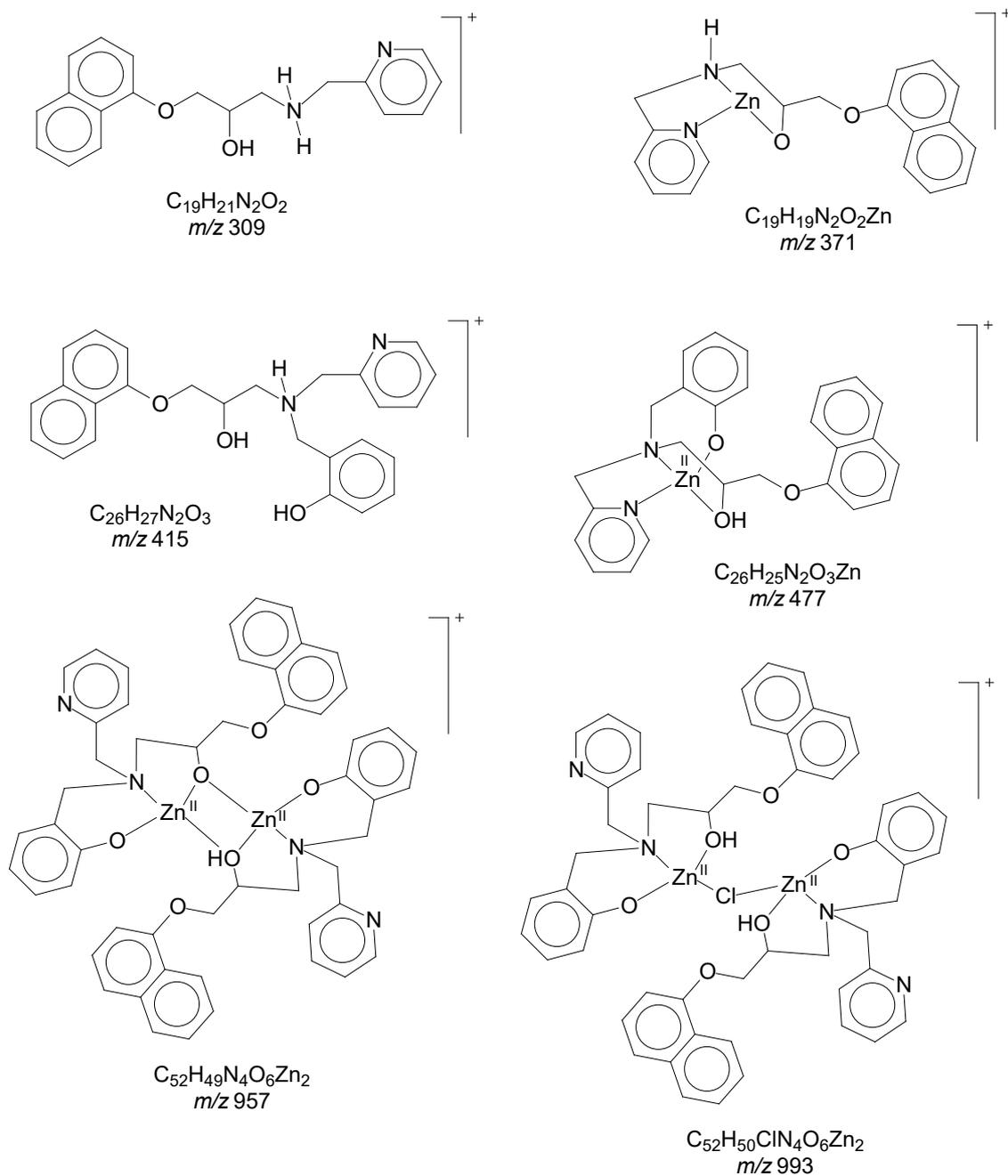


Figura 25. Principais espécies presentes no espectro de ESI(+)-MS obtido para o composto C3.

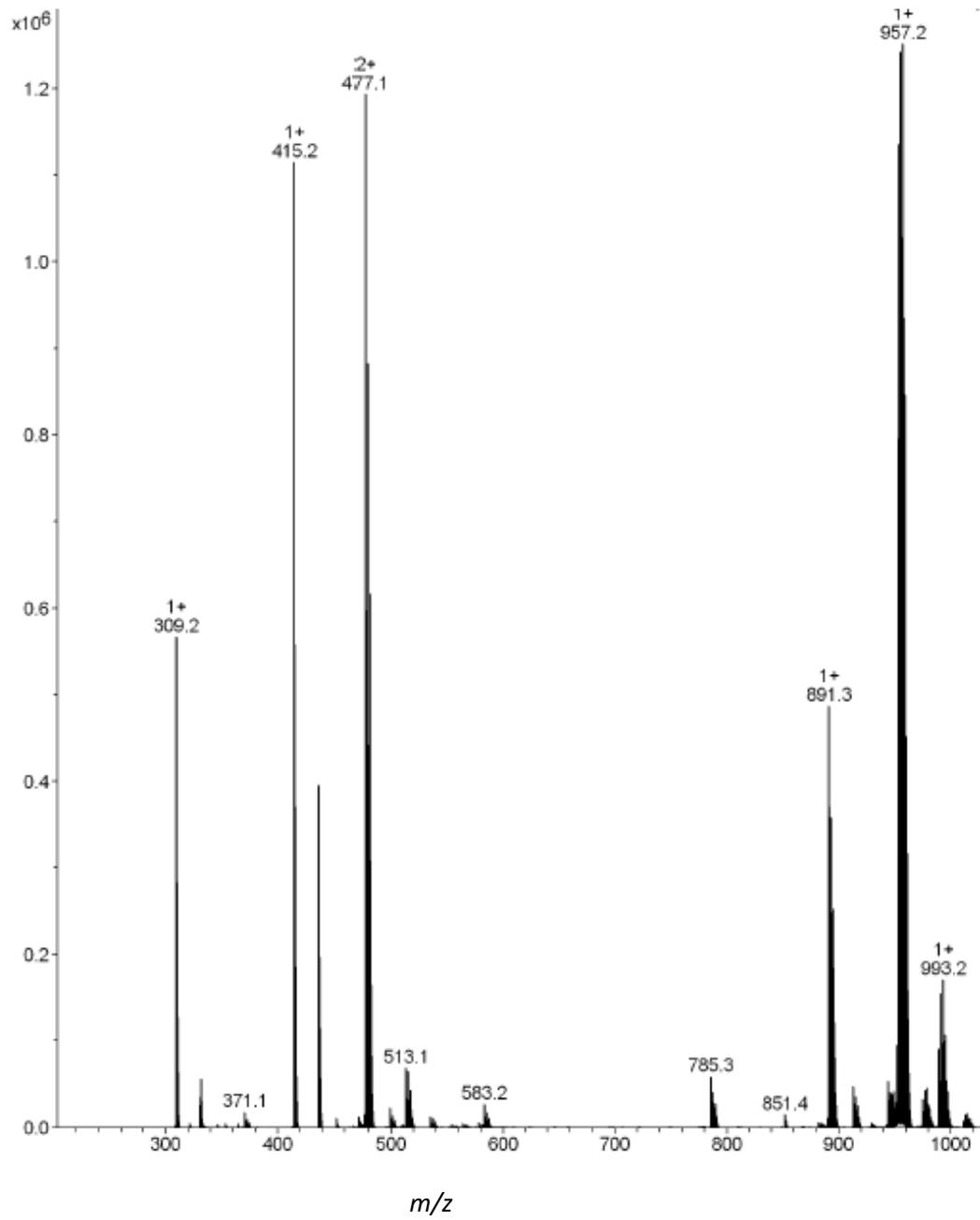


Figura 26. Espectro de ESI(+)-MS obtido para o composto C4, em água:metanol (1:1).

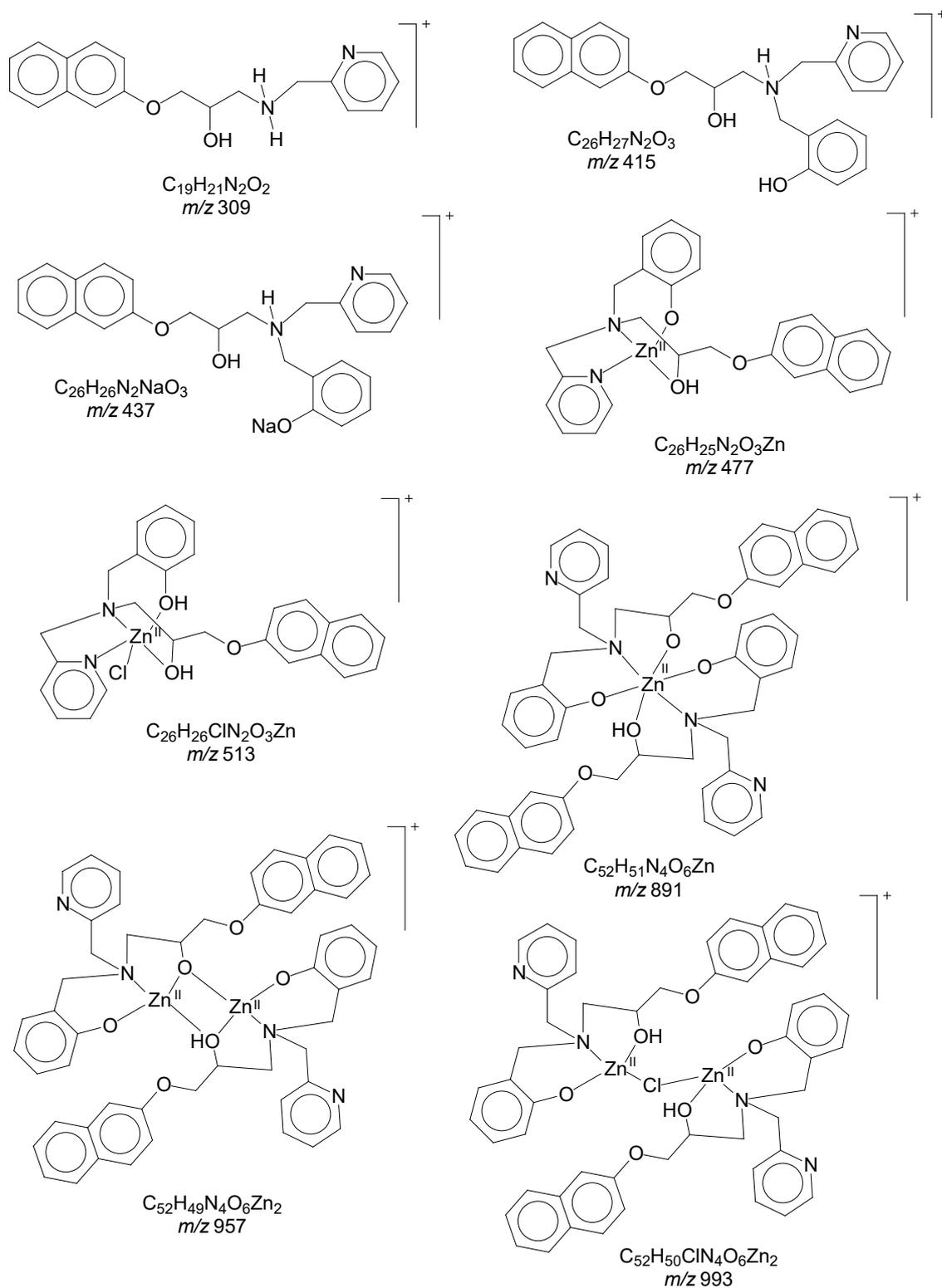


Figura 27. Principais espécies presentes no espectro de ESI(+)-MS para o composto C4.

No espectro de ESI(+)-MS em solução água:metanol (1:1) para o composto C5 (Figura 28) foram identificadas seis espécies catiônicas, cinco mononucleares (m/z 426, 445, 516, 622 e 659) e uma binuclear (m/z 851). O sinal de m/z 426 corresponde ao complexo após a perda do íon cloreto e coordenação a uma

molécula de água, o sinal de m/z 445 corresponde ao complexo com o fenol do ligante protonado, o sinal de m/z 516 corresponde ao cátion formado por um centro metálico de platina coordenado a duas moléculas do ligante, sendo uma delas fragmentada (perda do grupo fenol), o sinal de m/z 622 corresponde ao cátion formado por um centro metálico de platina coordenado a duas moléculas do ligante, uma com o fenol protonado e o sinal de m/z 659 corresponde ao cátion formado por um centro metálico de platina coordenado a duas moléculas do ligante com os fenóis protonados e um ligante cloro. O cátion binuclear de m/z 851 corresponde a dois centros metálicos de platina coordenados a duas moléculas do ligante desprotonado e duas moléculas de água. A Figura 29 apresenta as estruturas propostas para as espécies observadas no espectro de ESI-(+)-MS para o composto C5.

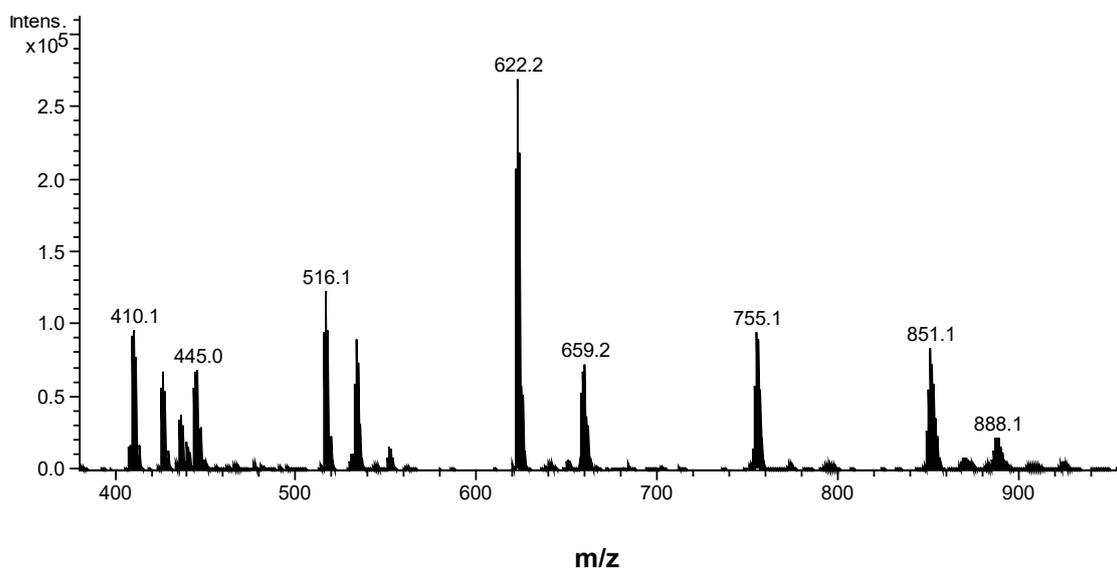


Figura 28. Espectro de ESI-(+)-MS obtido para o composto C5, em H₂O/MeOH (1:1).

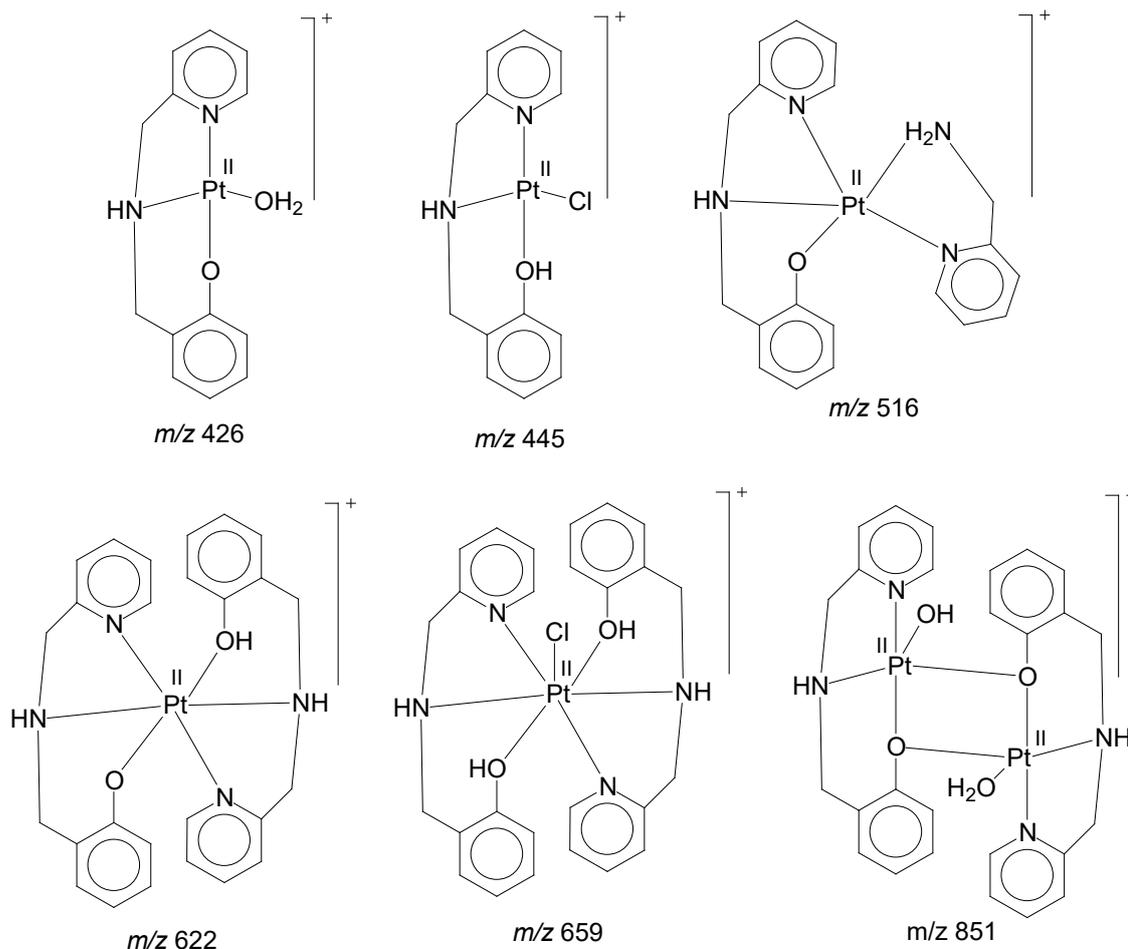


Figura 29. Estruturas propostas para as espécies identificadas no espectro de ESI-(+)-MS para o composto C5.

O espectro de ESI-(+)-MS em solução água:metanol (1:1) para o composto C6 (Figura 30) apresenta quatro espécies catiônicas mononucleares (m/z 501, 537, 549 e 575) e uma espécie catiônica binuclear (m/z 1037). O sinal de m/z 501 corresponde ao cátion do complexo após a perda do íon cloreto, o sinal de m/z 537 corresponde ao cátion do complexo com o ligante protonado, o sinal de m/z 549 corresponde ao cátion formado pelo complexo após perda do íon cloreto e coordenação a uma molécula de água e uma de formaldeído e o sinal de m/z 575 corresponde ao cátion formado por um centro metálico de platina coordenado a uma molécula do ligante, na qual o íon fenolato está interagindo com um íon potássio e um cloreto. O cátion binuclear de m/z 1037 corresponde a dois centros metálicos de platina coordenados a duas moléculas do ligante desprotonado unidos por uma ponte cloro. Dados de ESI-(+)-MS/MS mostram que o íon de m/z 501 é formado pela fragmentação do cátion de m/z 1037, liberando uma molécula neutra de massa 536, a qual é constituída por um centro metálico de platina coordenado a uma molécula

do ligante no qual o átomo de oxigênio do fenol encontra-se desprotonado e a um ligante cloro. A Figura 31 apresenta as estruturas propostas para as espécies observadas no espectro de ESI-(+)-MS para o composto C6.

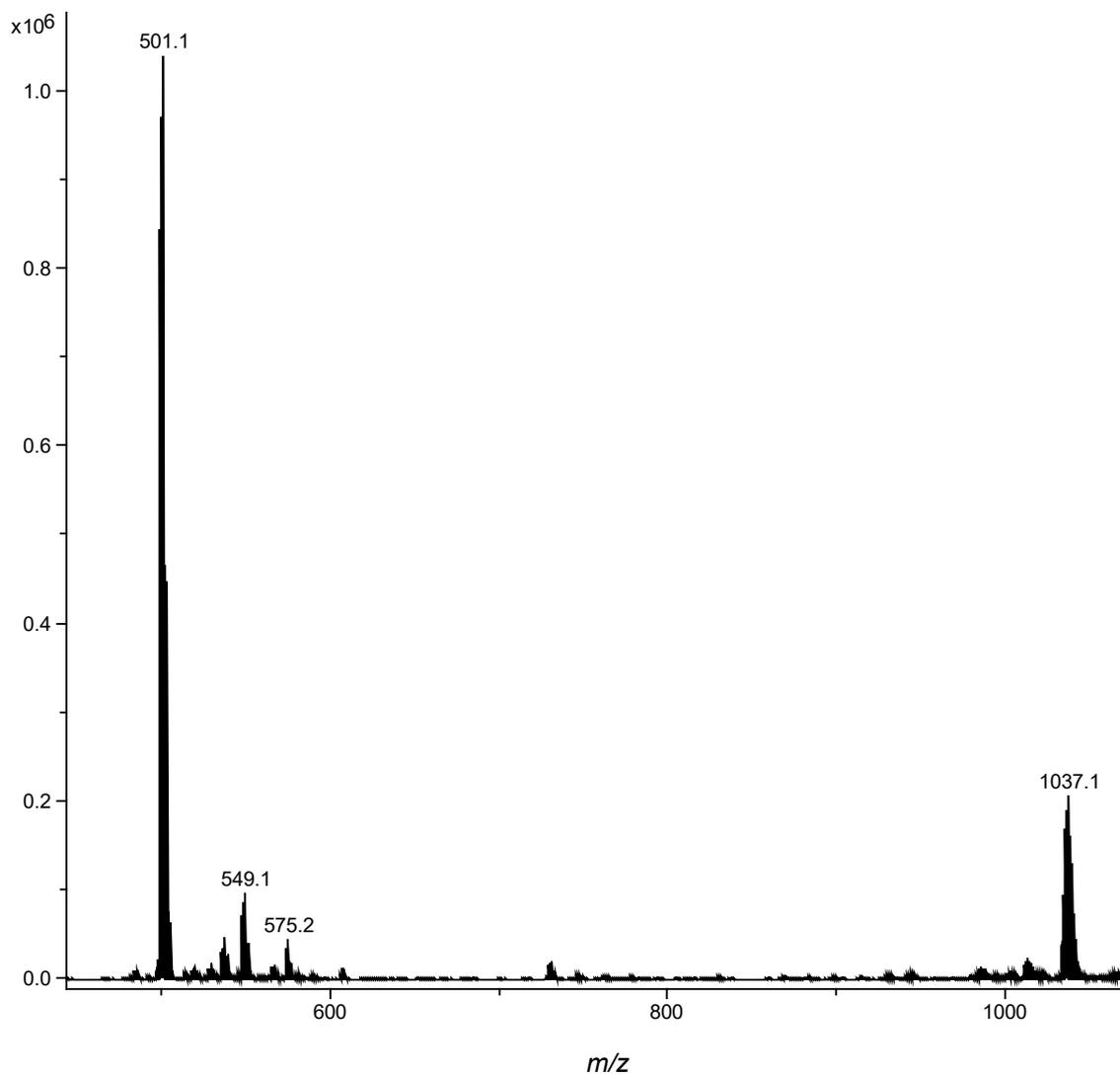


Figura 30. Espectro de ESI-(+)-MS obtido para o composto C6, em H₂O/MeOH (1:1).

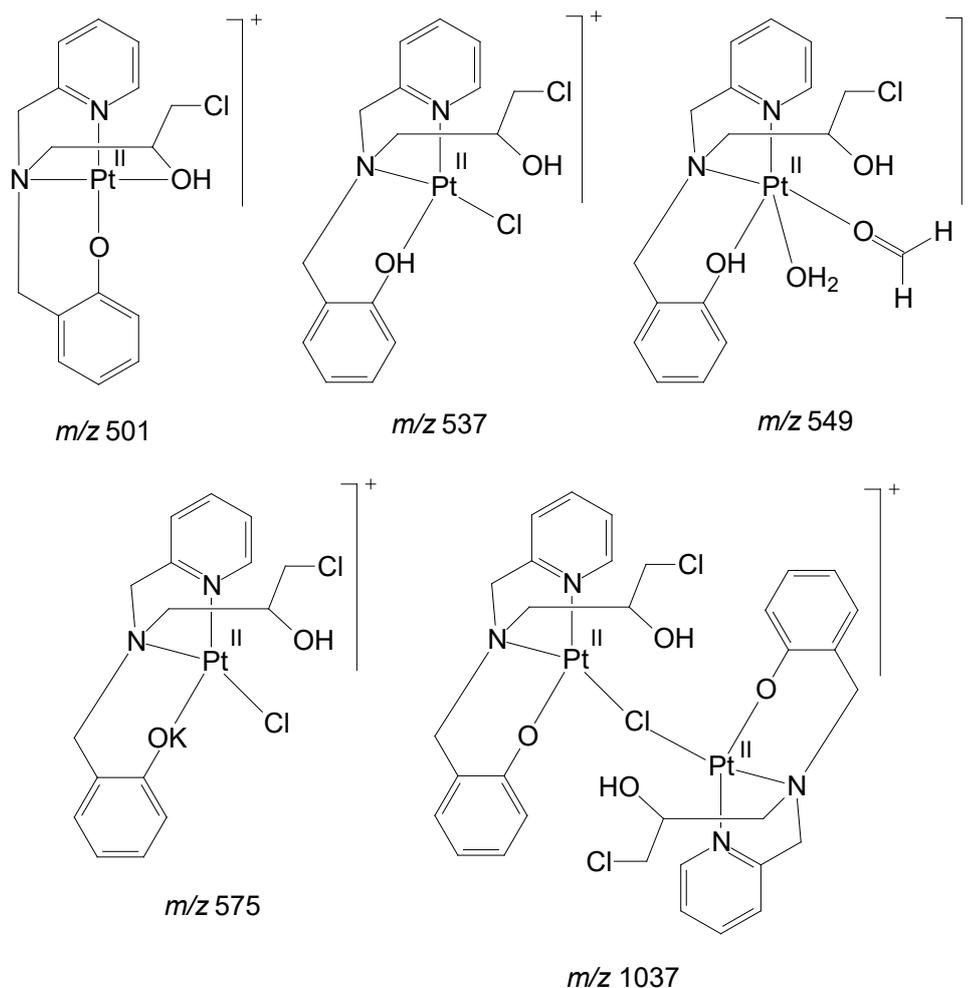


Figura 31. Estruturas propostas para as espécies observadas no espectro de ESI-(+)-MS para o composto C6.

No espectro de ESI-(+)-MS em solução água:metanol (1:1) para o complexo C7 (Figura 32) foram identificadas duas espécies catiônicas mononucleares (m/z 542 e 608) e duas espécies catiônicas binucleares (m/z 1158 e 1251). O sinal de m/z 542 corresponde ao cátion do complexo após a fragmentação do ligante (perda do anel piridínico) e o sinal de m/z 608 corresponde ao cátion do complexo. O sinal de m/z 1251 corresponde ao cátion formado por dois centros metálicos de platina coordenados a duas moléculas do ligante e unidos por uma ponte cloro. Dados de ESI-(+)-MS/MS mostram que os íons de m/z 608 e 1158 são formados pela fragmentação do cátion de m/z 1251. O cátion de m/z 1158 se origina da fragmentação de uma das moléculas do ligante da espécie de m/z 1251 e o cátion de m/z 608 é formado pela perda de um centro metálico de platina, uma molécula do ligante e um cloro da espécie de m/z 1251. A Figura 33 apresenta as estruturas

propostas para as espécies observadas no espectro de ESI-(+)-MS para o composto.

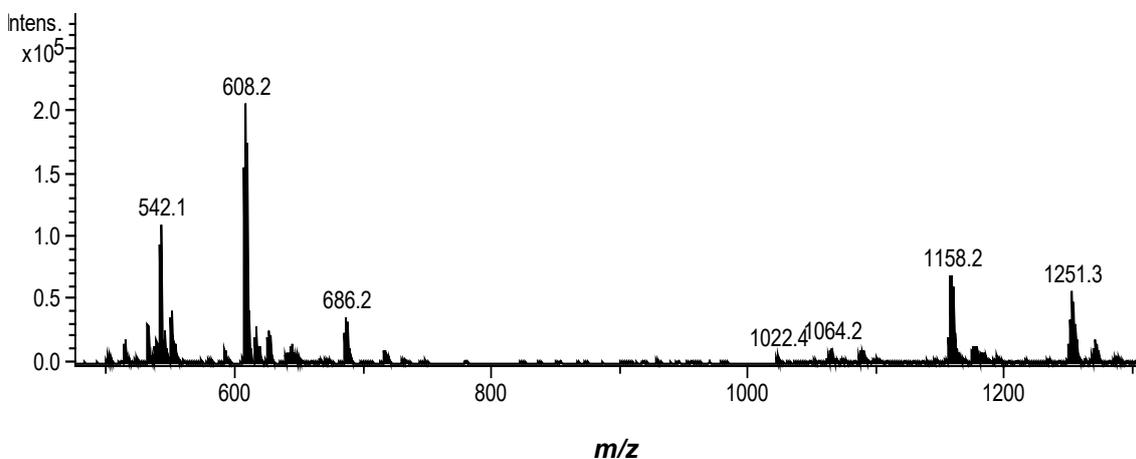


Figura 32. Espectro de ESI-(+)-MS obtido para o composto C7, em H₂O/MeOH (1:1).

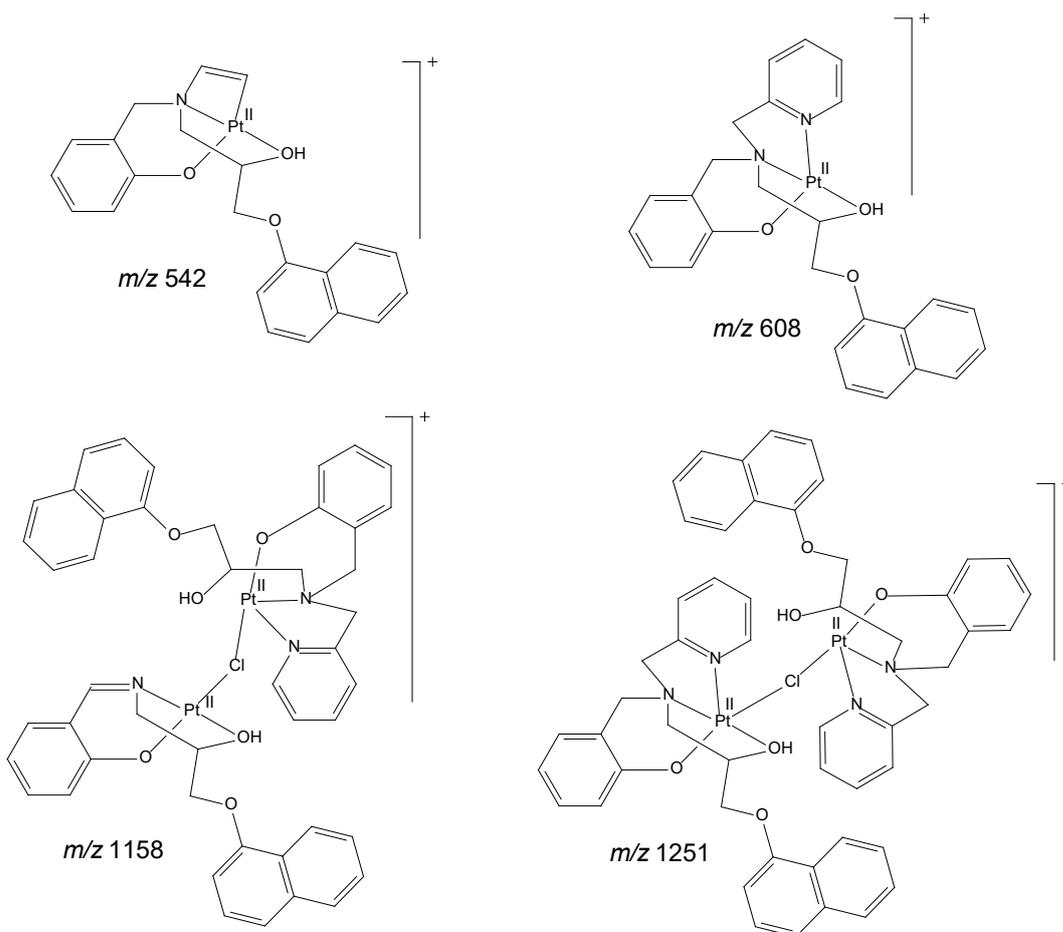


Figura 33. Estruturas propostas para as espécies observadas no espectro de ESI-(+)-MS para o composto C7.

No espectro de ESI-(+)-MS em solução água:metanol (1:1) para o composto C8 (Figura 34) foram identificadas cinco espécies catiônicas (m/z 415, 608, 916, 1022 e 1059), uma delas é referente ao ligante L4 protonado (m/z 415) e as demais são espécies mononucleares de platina (m/z 608, 916, 1022 e 1059). O sinal de m/z 608 corresponde ao cátion do complexo, o sinal de m/z 916 corresponde ao cátion formado por um centro metálico de platina coordenado a duas moléculas do ligante (uma delas fragmentada – perda do anel fenólico), o sinal de m/z 1022 corresponde ao cátion formado por um centro metálico de platina coordenado a duas moléculas do ligante (uma delas protonada) e o sinal de m/z 1059 corresponde ao cátion formado por um centro metálico de platina coordenado a duas moléculas do ligante protonadas e um ligante cloro. Dados de ESI-(+)-MS/MS mostram que o íon de m/z 415 é formado pela fragmentação da espécie de m/z 1022. Nesta fragmentação ocorre a liberação de uma molécula neutra de massa 607, a qual corresponde a um composto contendo um centro de Pt(II) coordenado a uma molécula do ligante L4 no qual oxigênio do álcool se encontra desprotonado. A Figura 35 apresenta as estruturas propostas para as espécies observadas no espectro de ESI-(+)-MS para o composto.

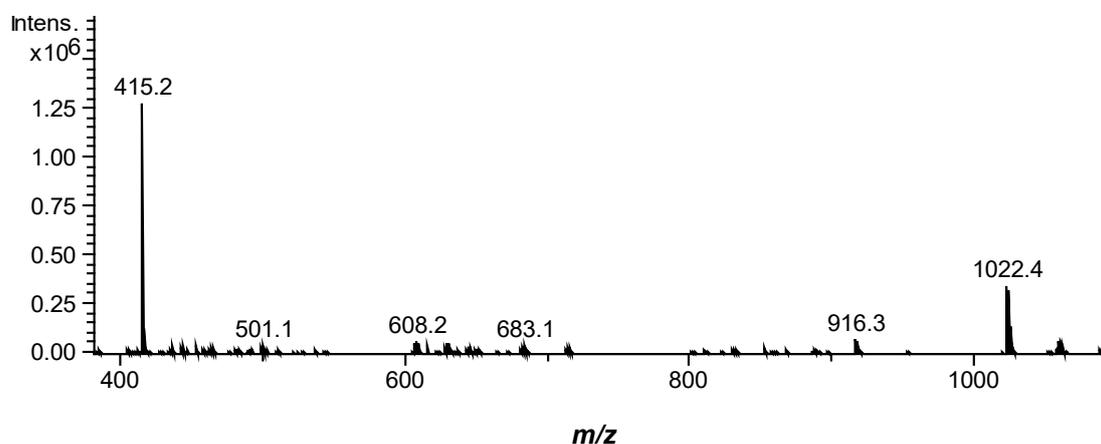


Figura 34. Espectro de ESI-(+)-MS obtido para o composto C8, em H₂O/MeOH (1:1).

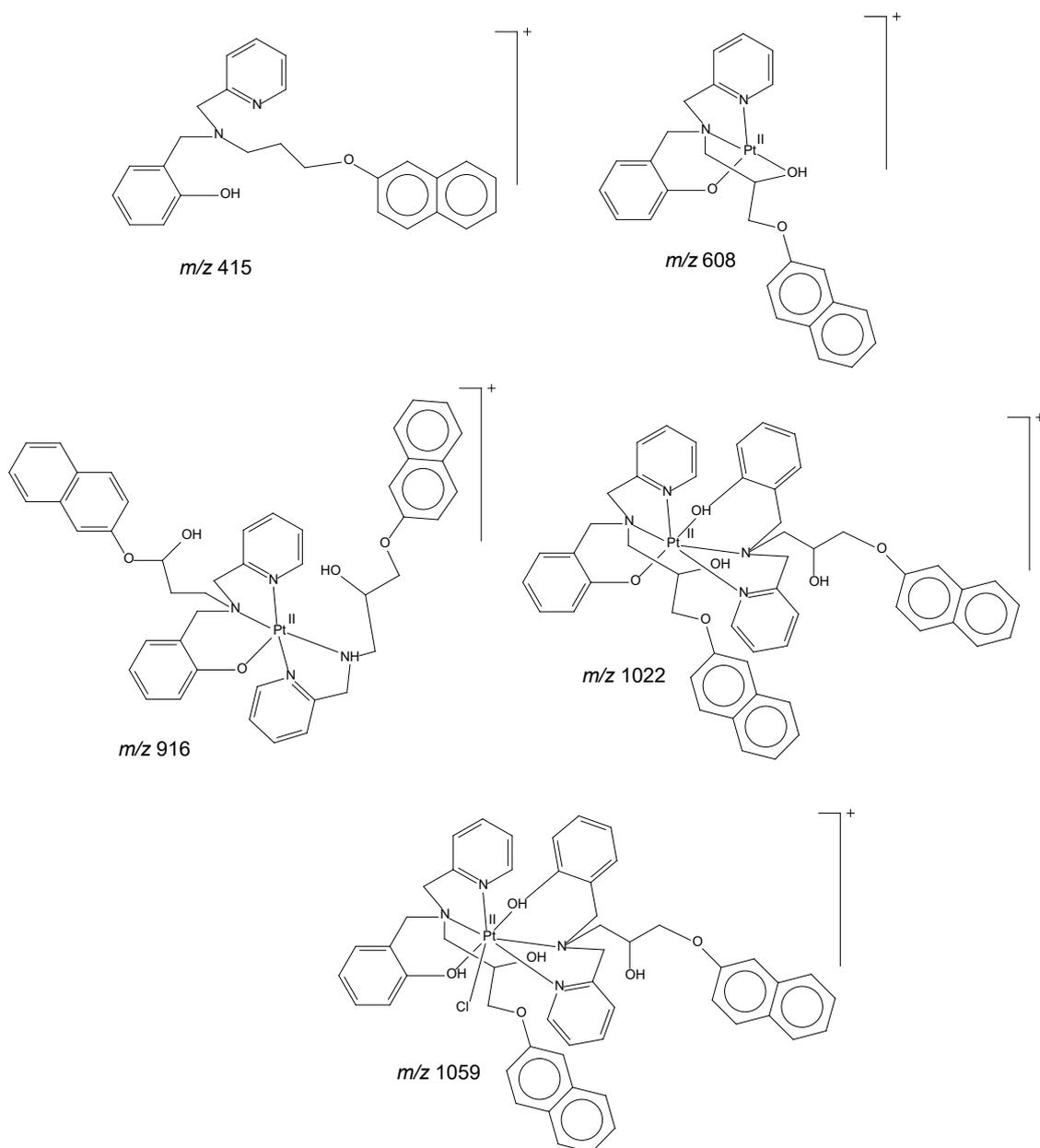


Figura 35. Estruturas propostas para as espécies observadas no espectro de ESI(+)-MS para o composto C8.

4.2.2.6. Ressonância magnética nuclear de ^{195}Pt

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^{195}Pt para os complexos C5-C8 (Figura 36) apresentam sinais dentro da faixa de deslocamento prevista na literatura para complexos de Pt(II), de -500 a -5000 ppm, e o sinal do sal usado como padrão (K_2PtCl_4) foi observado em todos os espectros em -1616 ppm, valor próximo ao encontrado na literatura para o íon $[\text{PtCl}_4]^{2-}$, -1631 ppm (Ursini, 1997). Para os complexos C5, C6 e C7 foi observado apenas um sinal de intensidade

significativa em -1949, -2112 e -1928 ppm, respectivamente, e para o complexo C8 foram observados dois sinais em -1928 e -2112 ppm.

Acredita-se que os sinais em -1949 (C5) e -1928 (C7 e C8) ppm representam centros de platina com ambiente de coordenação similar ao proposto para o estado sólido, estando coordenado a um nitrogênio piridínico, um nitrogênio amínico, um oxigênio fenolato e um cloreto. Para o composto C6, que apresentou apenas um sinal em -2112 ppm, acredita-se que o centro metálico, em solução, esteja em um ambiente químico diferente do proposto para o estado sólido, o que pode ser devido a coordenação ao solvente DMSO ou pela coordenação do grupo álcool do ligante, por exemplo. Para o composto C8, onde foi observado, além do sinal em -1928 ppm, um sinal em -2112 ppm, acredita-se que podem existir duas espécies em equilíbrio quando em solução, ou mesmo a formação de uma espécie binuclear de platina.

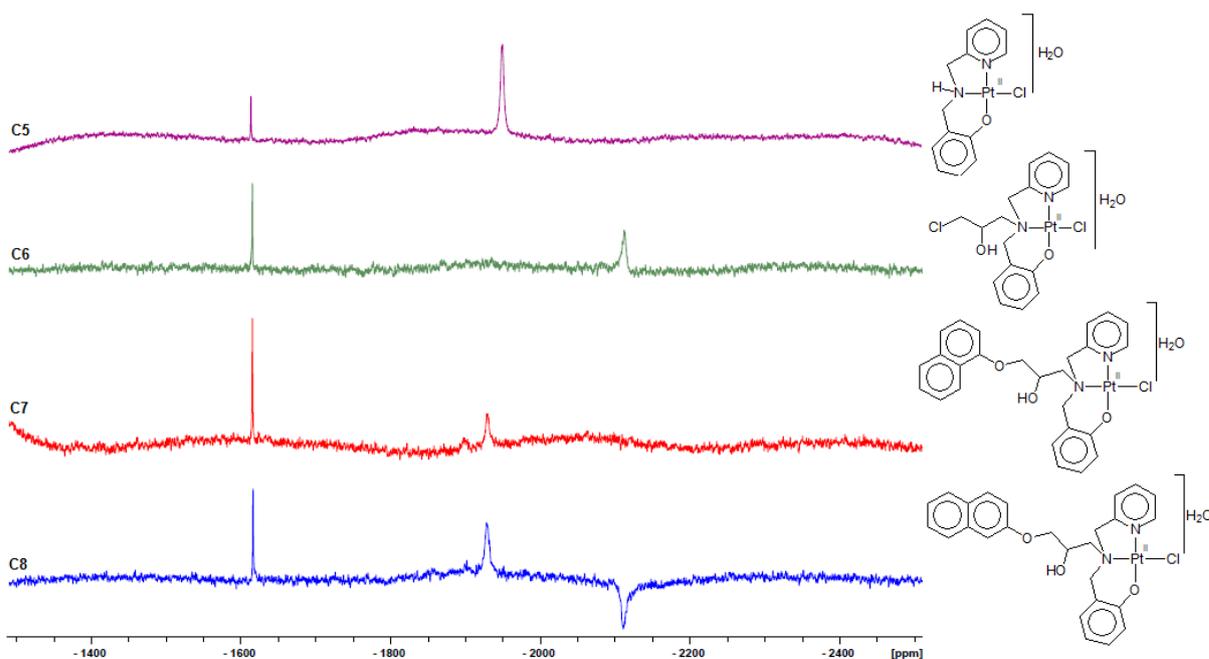


Figura 36. Espectros de RNM ^{195}Pt para os complexos de platina (C5-C8), obtidos em DMSO deuterado, utilizando uma solução de K_2PtCl_4 em água como padrão interno.

4.3. Estudos da atividade citotóxica dos complexos

4.3.1. Estudos de citotoxicidade celular através do método de metabolização do MTT

O estudo inicial de citotoxicidade foi realizado para os complexos de platina e zinco e seus respectivos ligantes (Figura 37), sais metálicos e cisplatina através do microensaio colorimétrico utilizando MTT (3-(4,5- dimetiliazol-2-il)-2,5-difenil brometo tretazólico). Este método é utilizado como ensaio padrão para avaliar a atividade citotóxica de compostos químicos e é baseado na redução do MTT pela enzima succinato desidrogenase, presente na mitocôndria. O MTT reduzido originará um precipitado de cor púrpura (denominado formazam, o qual pode ser quantificado através de espectrofotometria. Este experimento quantifica a população de células viáveis, que são as células metabolicamente ativas capazes de reduzir o MTT (Albrecht *et al.*, 2004).

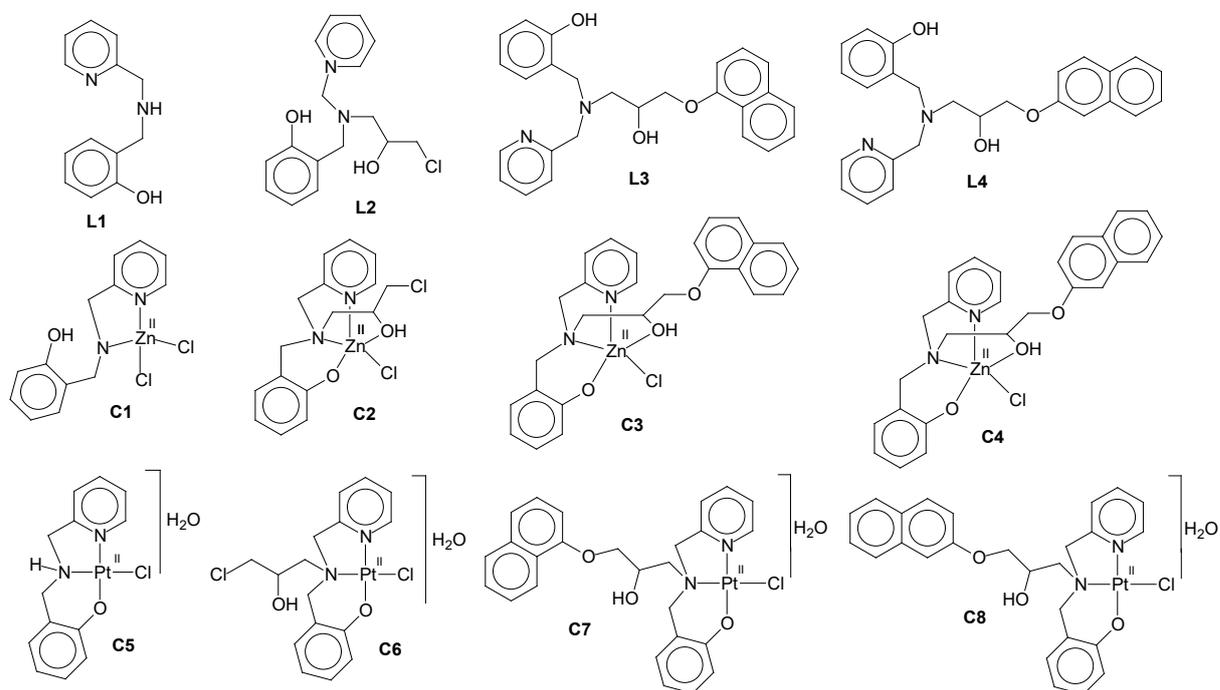


Figura 37. Estrutura dos ligantes orgânicos e complexos de platina e zinco sintetizados e estudados neste trabalho.

Os resultados obtidos são representados pelo índice de citotoxicidade 50% (IC₅₀), ou seja, a concentração capaz de matar ou reduzir a viabilidade celular em

50%. A IC₅₀ foi determinada a partir das curvas dose resposta obtidas nos experimentos utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0 e a Tabela 8 apresenta os resultados de IC₅₀ obtidos.

Tabela 8. Valores de IC₅₀ obtidos para os complexos, ligantes, sais metálicos e cisplatina, através do ensaio de MTT.

COMPOSTO	IC ₅₀ (μmol.L ⁻¹)					
	Colo205 [#]	H460 [#]	U937 [#]	THP-1 [#]	Molt-4 [#]	PBMC [#]
L1	> 100	> 100	> 100*	> 100*	> 100*	***
L2	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	***
L3	> 100	> 100	28 ± 2	68 ± 2	43 ± 1	> 100
L4	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
ZnCl ₂	> 100	> 100	> 100*	> 100*	> 100*	***
K ₂ PtCl ₄	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	***
C1	> 100	> 100	> 100*	> 100*	> 100*	***
C2	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	***
C3	> 100	> 100	> 100**	> 100**	24 ± 1	***
C4	> 100	> 100	> 100**	> 100**	58 ± 2	***
C5	> 100	> 100	72 ± 2	> 100	> 100	***
C6	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	***
C7	30 ± 2	51 ± 1	11 ± 1	6 ± 1	9 ± 1	22 ± 1
C8	38 ± 2	78 ± 1	15 ± 2	20 ± 1	11 ± 2	42 ± 1
Cisplatina	41 ± 2	>100	8 ± 1*	10 ± 1*	6 ± 1*	44 ± 2

[#] Sendo: Colo205 - linhagem de câncer de cólon, H460 – linhagem de câncer de pulmão, U937 – linhagem de leucemia monocítica aguda, THP-1 – linhagem de leucemia monócita humana, Molt-4 – linhagem de leucemia linfóide aguda e PBMC - células normais do sangue periférico.

* Dados publicados (Fernandes *et al.*, 2014).

** Dados publicados (Borges, 2013).

*** Dados que não foram obtidos devido à baixa atividade dos complexos contra as linhagens tumorais.

Os complexos de zinco não apresentaram atividade contra as linhagens tumorais estudadas, exceto os compostos C3 e C4, contra a linhagem MOLT-4. Os complexos de platina C5 e C6 também não apresentaram atividade citotóxica relevante. Os complexos de platina C7 e C8 apresentaram elevada atividade

citotóxica frente a todas as linhagens estudadas, sendo seus valores de IC₅₀ muito próximos, ou até menores que os valores encontrados para a cisplatina.

Os ligantes isolados e sais metálicos não apresentaram atividade citotóxica significativa, exceto para o ligante L3 frente as três linhagens leucêmicas (U937, THP-1 e MOLT-4). Estes resultados indicam que a atividade citotóxica depende tanto do ligante orgânico (uma vez que os complexos formados com os ligantes que possuem o grupo naftol em suas estruturas (L3 e L4) apresentam maior atividade) como do centro metálico, sendo os complexos de platina mais ativos que os de zinco.

Compostos de cobre similares a C7 e C8 também apresentam elevada atividade antitumoral contra linhagens de células leucêmicas e de melanoma, (Lopes, 2012, Borges, 2013) Na literatura, existem estudos que relatam a alta atividade citotóxica de compostos de coordenação com a inserção de grupos planares em suas estruturas, e normalmente atribuem a elevada atividade de complexos que contém estes grupos à capacidade dos mesmos de interagir com o DNA (Lopes, 2012; Emam *et al.*,2015).

Com a finalidade de verificar a seletividade dos compostos mais ativos para as células tumorais (C7 e C8), foi realizado experimento de viabilidade celular empregando-se células mononucleares normais do sangue periférico (PBMC). Os resultados mostram que os dois complexos são mais tóxicos para as células leucêmicas do que para as células saudáveis, apresentando uma seletividade similar à da cisplatina para estas linhagens.

4.3.2. Avaliação da Externalização de fosfatidilserina (marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio)

Com o objetivo de confirmar o tipo de morte celular induzida pelos compostos mais ativos (C7 e C8) foram realizados estudos de marcação com Anexina V e iodeto de propídio (PI), utilizando a linhagem leucêmica U937. A concentração dos compostos utilizada foi de 2 x IC₅₀ e após 24 h de incubação as células foram marcadas e analisadas no citometro de fluxo. Células normais não sofrem nenhum tipo de marcação, células que se encontram em estágio de apoptose inicial são marcadas com Anexina V somente, células em apoptose tardia (apoptose-necrose)

são marcadas com Anexina V e PI e células em necrose são marcadas somente com PI.

A figura 38 mostra que o composto C7 induz morte por apoptose (98%) na linhagem leucêmica U937, enquanto o composto C8 induz necrose (96%). Estudo similar mostra que a cisplatina induz majoritariamente apoptose (96%) nesta mesma linhagem (Borges, 2013).

A indução de morte celular por necrose é indesejada na atividade citotóxica dos complexos, por ser uma morte mais agressiva, que causa inflamação e danos as células vizinhas, portanto, os estudos posteriores foram realizados apenas para o complexo C7, o qual induz morte celular por apoptose.

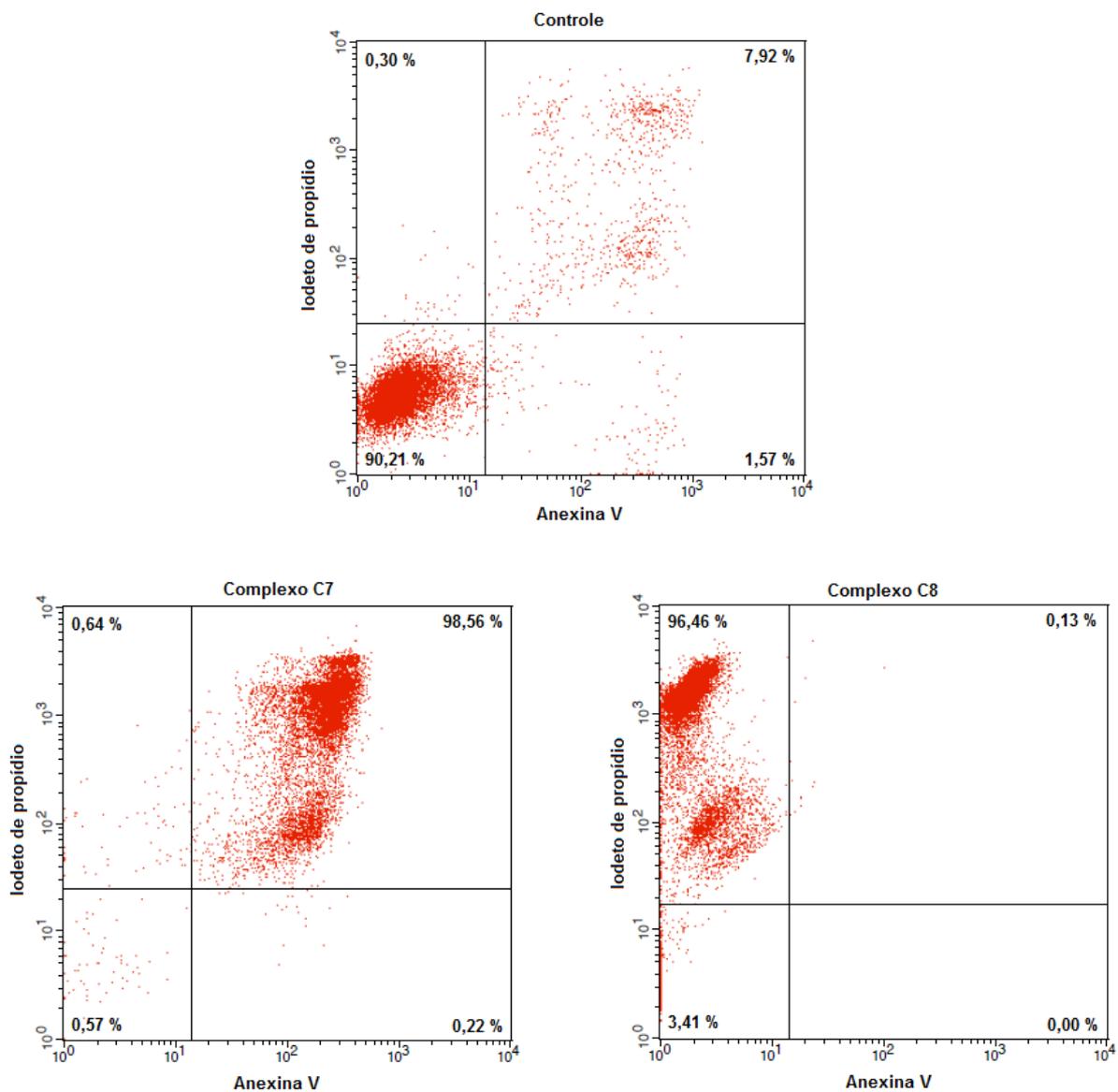


Figura 38. Porcentagem de morte celular por necrose (quadrante superior esquerdo), apoptose tardia (quadrante superior direito) e apoptose inicial (quadrante inferior direito) induzida pelos compostos C7 e C8 na linhagem leucêmica U937 após 24 horas de incubação. O Quadrante inferior esquerdo representa a população de células viáveis.

4.3.3. Avaliação do ciclo celular (Sub-G1) por citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada na identificação da distribuição das células nas fases do ciclo celular. Neste experimento, as fases são distinguidas pelo conteúdo do DNA das células em fase G1 (crescimento 1), S (síntese) e G2/M (crescimento 2/mitose). As fases G2 e M são observadas na mesma região do histograma por possuírem conteúdo de DNA semelhante (Nunez, 2001). Nos estágios tardios da apoptose, o DNA das células é clivado por endonucleases em fragmentos de 200 pares de base ou múltiplos. O processamento das amostras remove o DNA fragmentado e as células com baixo conteúdo de DNA aparecem na região Sub-G1 do histograma (Gong *et al.*, 1994). A presença da população celular nesta região do histograma pode ser considerada um indicativo de morte celular por apoptose.

Células U937 controle e tratadas com o complexo C7 na concentração de 2x IC₅₀ por 24 h foram avaliadas e os resultados obtidos são apresentados na Figura 39. Pode-se observar que a porcentagem de células controle (não tratadas) em sub-G1 foi de 7,38%, enquanto para as células tratadas com o complexo C7 foi de 61,38%. Dados da literatura indicam que para a cisplatina, na concentração de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 89% das células U937 estão nesta região do histograma (Borges, 2013).

Estes resultados confirmam a indução de morte celular por apoptose pelo complexo C7, corroborando com os resultados obtidos no experimento de marcação com Anexina V/PI.

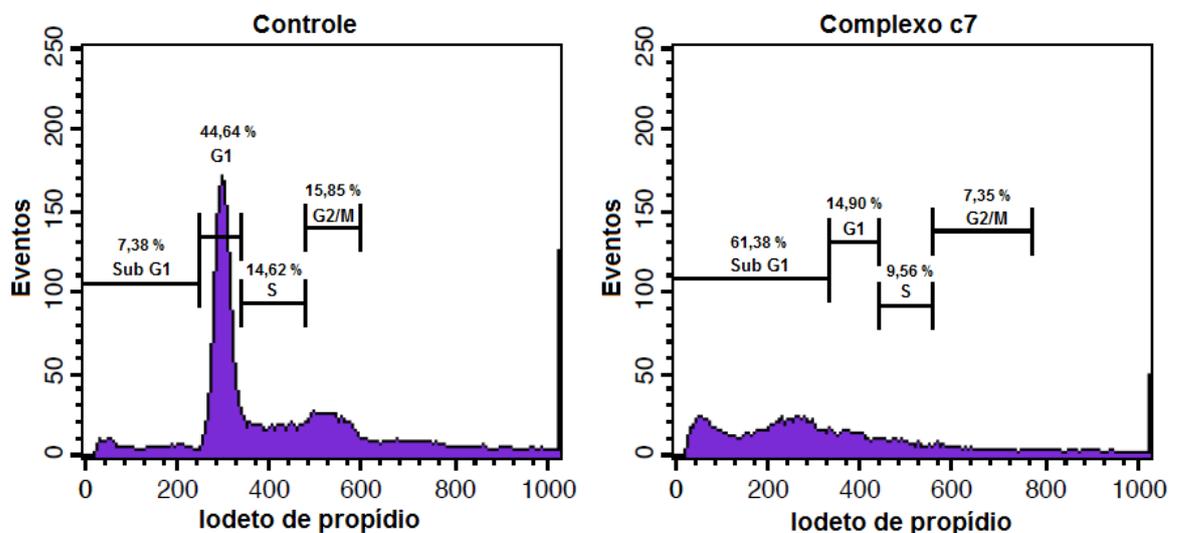


Figura 39. Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem U937 sem tratamento (controle) e após 24 horas de incubação com o complexo C7.

4.3.4. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM)

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi realizada utilizando o marcador catiônico lipofílico fluorescente JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) que se difunde livremente para o interior da célula. Na mitocôndria que apresenta potencial de membrana normal, a carga residual negativa da matriz mitocondrial, gerada pelo bombeamento de prótons para o espaço intermembranoso, permite o acúmulo deste fluorocromo no interior da mitocôndria. Quando a concentração do JC-1 se torna elevada na matriz mitocondrial ele forma agregados que fluorescem na região do vermelho. A forma monomérica do JC-1 emite fluorescência verde, assim, em células onde ocorreu o colapso do potencial de membrana mitocondrial não ocorre a formação de agregados de JC-1 e as células apresentam citoplasma com fluorescência verde (Smiley *et al.*, 1991; Cossarizza *et al.*, 1993). O citômetro de fluxo quantifica as células que apresentam o PMM normal, por meio do detector FL1 (fluorescência 1) que capta luz na região do verde (510-527 nm) e PMM alterado, através do detector FL2 (fluorescência 2) que capta luz na região do laranja (585-590 nm).

A Figura 40 mostra os resultados da avaliação do PMM de células U937 normais e tratadas com 2x IC₅₀ do complexo C7 na forma de gráficos *Dot-plots*, que representam os parâmetros de intensidade de fluorescência verde (FL1) e vermelha (FL2). A porcentagem de células com dissipação do potencial de membrana mitocondrial foi determinada a partir da redução da intensidade de fluorescência vermelha das amostras.

Pode-se observar que no controle (células U937 sem tratamento), apenas 5% das células apresenta dissipação do PMM, contra 96% de dissipação do PMM para as células tratadas com o complexo C7. Dados obtidos por Borges (2013) para a cisplatina na concentração de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ mostram que esta induz a dissipação do PMM de 88% das células U937.

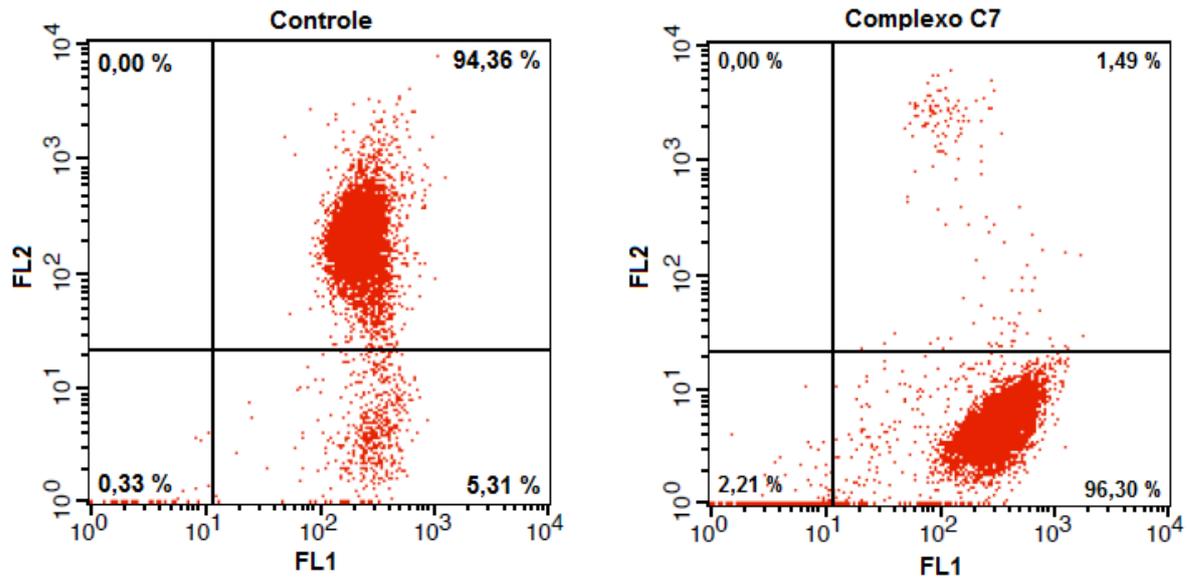


Figura 40. *Dot-plots* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para a linhagem U937 não tratada (controle) e tratada com o composto C7 após 24 h de incubação. Quadrante superior direito: células possuindo mitocôndrias com potencial de membrana normal; quadrante inferior direito: células que apresentam mitocôndrias com perda do potencial de membrana.

A alteração do potencial de membrana mitocondrial é indicativo de que o complexo C7 induz a morte celular da linhagem U937 por apoptose com comprometimento da mitocôndria (provável via intrínseca), e estes dados corroboram com os resultados obtidos pelos estudos de marcação com Anexina V/PI e avaliação do ciclo celular.

4.3.5. Avaliação da expressão das caspases 3, 6, 8 e 9

Para a avaliação de atividade de caspases foram utilizados substratos para caspases efetoras (3 e 6), comum as duas vias de apoptose, para a caspase 8, específica da via de receptores de morte e para a caspase 9, específica da via mitocondrial. A Figura 39 mostra o padrão de expressão de caspases para células U937 controle (não tratadas) e tratadas com o complexo C7 por 3, 6 e 12 horas. Os resultados mostram que o composto C7 induz a expressão de todas as caspases investigadas, sugerindo que ambas as vias apoptóticas (intrínseca e extrínseca) podem estar sendo ativadas. Os resultados também indicaram que no tempo de 3 horas de incubação já é observado o pico de expressão para todas as caspases, com posterior decaimento nos tempos de 6 e 12 h, indicando que o complexo age

rapidamente contra as células utilizadas. Resultados obtidos para o composto de cobre contendo o mesmo ligante revelam uma atividade mais lenta, com pico de expressão das caspases entre 6 e 12 horas (Borges, 2013).

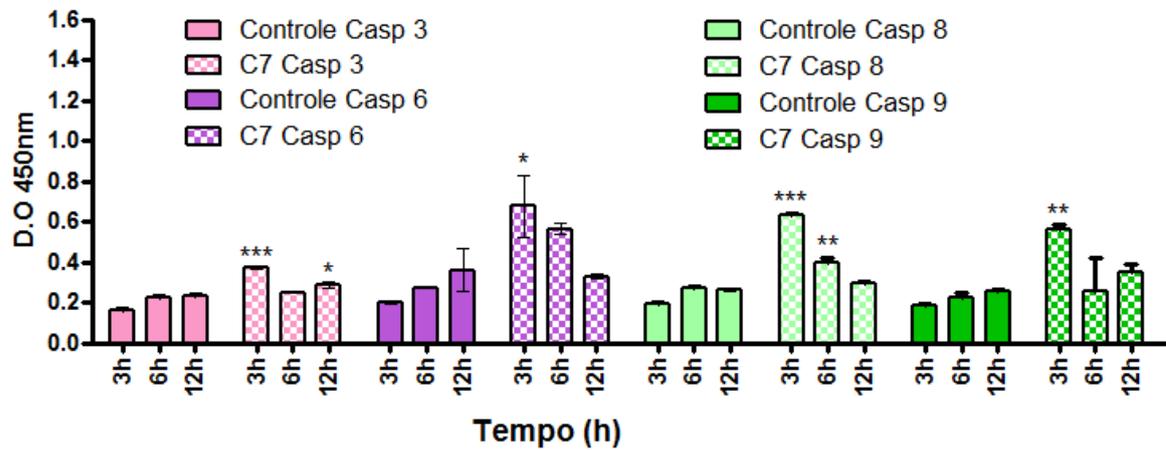


Figura 41. Avaliação da atividade das caspases 3, 6, 8 e 9 em células U937 após incubação com o composto C7 por 3, 6 e 12 horas (n=2), utilizando o *Colorimeter Sampler Kit (Invitrogen)*. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, representando os valores com diferença significativa estatisticamente em relação ao controle (células não tratadas).

5. CONCLUSÕES

- As metodologias empregadas nas sínteses dos compostos orgânicos e de coordenação foram adequadas, sendo possível obter os quatro ligantes propostos e oito complexos metálicos, sendo seis inéditos;
- A caracterização dos mesmos foi realizada com sucesso, sendo possível comprovar a estruturas dos compostos já relatados na literatura e propor estruturas plausíveis para todos os complexos inéditos;
- O ensaio de viabilidade celular (MTT) - mostrou que os compostos de platina C7 e C8 apresentam elevada atividade citotóxica contra todas as linhagens estudadas. Os complexos de zinco, assim como os sais metálicos, os ligantes orgânicos e os complexos de platina C5 e C6 não apresentaram atividade relevante, mostrando que atividade é dependente tanto da estrutura do ligante orgânico como do metal ao qual este está coordenado;
- Os compostos foram mais citotóxicos para células neoplásicas do que para células humanas normais (PBMC), apresentando seletividade similar à da cisplatina;
- Os resultados de marcação com Anexina V e PI, de avaliação do ciclo celular (Sub-G1) e medidas do potencial de membrana mitocondrial mostram que o tipo de morte induzida pelo complexo C8 é a necrose e pelo complexo C7 é a apoptose, com comprometimento da mitocôndria;
- Os resultados obtidos indicam que o complexo de platina C7 é promissor na busca por novas drogas antineoplásicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, J.M., Cory, S. (2001) Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*, 26: 61-66.

Alberts, B., Johnson, A., Raff, L., Walter, R. L. (2010) *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmed, 5 ed., 1268 p.

Albrecht, H., Brodbeck-Hummel, D., Hoever, M., Nickel, B., Regenass, U. Cellular Assays in Drug Discovery In: Dingermann, T., Steinhilber, D., Folkers, G. (2004). *Molecular Biology in Medicinal Chemistry*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p. 3-39.

Alenzi, F. Q., Lotfy, M., Wyse, R. (2010) Swords of cell death: caspase activation and regulation. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 11 (2): 271-280.

Almeida, V. L.; Leitão, A.; Reina, L. C. B.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L.; Lopes, M. T. P. (2005) Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, 28:118-129.

Anazetti, M. C., Melo, P. S. (2007) Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesquisa*, 1 (1): 37-58 (disponível em: www.metrocamp.com.br/pesquisa).

Arjmand, F., Muddassir, M., Yousuf, I. Design and synthesis of enantiomeric (R)- and (S)-copper(II) and diorganotin(IV)-based antitumor agents: Their in vitro DNA binding profile, cleavage efficiency and cytotoxicity studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 136: 62–71.

Barreiro, E. J., Fraga, C. A. M., Miranda, A. L. P., Rodrigues, C. R. (2002) A química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e antitrombóticos. *Química Nova*, 25 (1): 129-148.

Benite, A. M. C., Machado, S. P., Barreiro, E. J. (2007) Uma visão da química bioinorgânica medicinal. *Quim. Nova*, 30 (8): 2062-2067.

Bergamo, A.; Gagliardi, R.; Scarcia, V.; Furlani, A.; Alessio, E.; Mestroni, G.; Sava, G. (1999). In vitro cell cycle arrest, in vivo action on solid metastasizing tumors, and host toxicity of the antimetastatic drug NAMI-A and cisplatin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289 (1): 559-564.

Bergamo, A.; Sava, G. (2007) Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy. *Dalton Trans.* 13: 1267-1272.

Bonassa, E. M. (1998) *Enfermagem em terapêutica oncológica*. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 168 p.

Borges, F. V. (2013). Síntese, Caracterização e Avaliação da Atividade Antineoplásica de Complexos de Cobre e Zinco Frente a Linhagens Leucêmicas e Melanômicas. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Programa de Pós-

Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

Brandão, G. C., Kroon, E. G., Duarte, M. G. R., Braga, F. C., Filho, J. D. S., Oliveira, A. B. (2010) Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of extracts and constituents from *Polygonum spectabile* Mart. *Phytomedicine*, 17: 926–929.

Burz, C., Berindan-Neagoe, I., Balacescu, O., Irimie, A. (2009) Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol.*, 48 (6): 811-821.

Butler, J. S., Sadler, P. J. (2013) Targeted delivery of platinum-based anticancer complexes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17:175–188.

Casini, A., Hartinger, C., Gabbiani, C., Mini, E., Dyson, P.J., Keppler, B.K., Messori, L. (2008) Gold(III) compounds as anticancer agents: Relevance of gold–protein interactions for their mechanism of action. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102: 564–575.

Casini, A., Guerri, A., Gabbiani, C., Messori, L. (2008) Biophysical characterisation of adducts formed between anticancer metallodrugs and selected proteins: New insights from X-ray diffraction and mass spectrometry studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102: 995-1006.

Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Andreau, K., Medema. R., Kromer, G. (2004) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23: 2825-2837.

Chabner, B. A.; Longo, D. L. (1996) *Cancer chemotherapy and biotherapy*; 2a. ed., Lippincott-Raven: Filadélfia.

Chen, X., Zhou, L. (2010) The hydrolysis chemistry of anticancer drug titanocene dichloride: An insight from theoretical study. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 940: 45–49.

Chen, Z., Wei, J., Liu, Y., Liu, M., Gu, Y., Huang, K., Wang, M., Liang, H. (2013) High antitumor activity of 5,7-dihalo-8-quinolinolato cerium complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 68: 454–462.

Chitambar, C. R., Purpi, D. P., Woodliff, J., Yang, M. Y., Wereley, J. P. (2007) Development of gallium compounds for treatment of lymphoma: Gallium maltolate, a novel hydroxypyronone gallium compound induces apoptosis and circumvents lymphoma cell resistance to gallium nitrate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 322: 1228-1236.

Chitambar, C. R., Antholine, W. E. (2013) Iron-Targeting Antitumor Activity of Gallium Compounds and Novel Insights Into Triapine (R)-Metal Complexes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18 (8): 956-972.

Cossarizza, A., Baccarani-Contri, M., Kalashnikova, G., Franceschi, C. (1993). A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochemical Biophysical Research Communications*. Vol. 197, p. 40-45.

Cotter, T. G. (2009) Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*, 9 (7): 501-507.

Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T., (2000) *Patologia Estrutural e Funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara, 6 ed., 1251 p.

Creaven, B.S.; Egan, D.; Kavanagh, K.; McCann, M.; Noble, A.; Tathi, B. (2006) Synthesis, characterization and antimicrobial activity of a series of substituted coumarin-3-carboxylato silver(I) complexes. *Inorganica Chimica Acta.*, 359: 3976-3984.

Despaigne A. A. R., Silva, J. G., Costa, P.R., Santos, R. G., Beraldo, H. (2014) ROS-Mediated Cytotoxic Effect of Copper(II) Hydrazone Complexes against Human Glioma Cells. *Molecules*, 19: 17202-17220.

Dilworth, J. R., Hueting, R. (2013) Metal complexes of thiosemicarbazones for imaging and therapy. *Inorganica Chimica Acta*, 389: 3-15.

Dimri, G. P. (2005) What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell.*, 7:505-512.

Farrell, N. (2002) Biomedical uses and applications of inorganic chemistry. An overview. *Coordination Chemistry Reviews*, 232:1- 4.

Fernandes C., Horn A. Jr, Vieira-Da-Motta O., Assis V. M., Rocha M. R., Mathias L. S., Bull E. S., Bortoluzzi A. J., Guimarães E. V., Almeida J. C., Russell D. H. (2010) Synthesis, characterization and antibacterial activity of FeIII, CoII, CuII and ZnII complexes probed by transmission electron microscopy. *J. Inorg. Biochem.*, 104: 1214-23.

Fernandes, C., Horn Jr., A., Vieira-da-Motta, O., Kanashiro, M. M., Rocha, M. R., Moreira, R. O., Morcelli, S. R., Lopes, B. F., Mathias, L. S., Borges, F. B., Borges, L. J. H., Freitas, W. R., Visentin, L. C., Almeida, J. C. A., Schenk, G. (2014) Synthesis, characterization, antibacterial and antitumoral activities of mononuclear zinc complexes containing tridentate amine based ligands with N₃ or N₂O donor groups. *Inorganica Chimica Acta*, 416: 35-48.

Fischer, U., Schulze-Osthoff, K. (2005) New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacological Reviews*, 57: 187-215.

Florea, Ana-Maria, Büsselberg, D. (2011) Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers*, 3: 1351-1371.

Fontes, A. P. S., César, E. T., Beraldo, H. (2005) A Química Inorgânica na Terapia do Câncer. *Cadernos temáticos de química nova na escola*, 6:13-18.

Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., Kroemer, G. (2007) Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.*, 14 (7): 1237-1243.

Geary, W. J. (1971) The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds. *Coord. Chem. Rev.*, 7:81-122.

Gong, J., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z. (1994). A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Analytical Biochemistry*. Vol. 218, p.314–319.

Gonzalez, V.M., Fuertes, M.A., Alonso, C., Perez, J.M. (2001) Is Cisplatin induced cell death always produced by apoptosis? *Molecular Pharmacology*, 59: 657-663.

Graf, N., Lippard, S.J. (2012) Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64: 993-1004.

Griffiths, A.; Miller, J. H.; Suzuki, D.; Lewontin, R. C.; Gelbart, W. M. (2000) *Introdução à Genética*. 7a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Griffith, D., Cecco, S., Zangrando, E., Bergamo, A., Sava, G., Marmion, C. J. (2008) Ruthenium(III) dimethyl sulfoxide pyridinehydroxamic acid complexes as potential antimetastatic agents: synthesis, characterisation and in vitro pharmacological evaluation. *J Biol Inorg Chem*, 13: 511–520.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cel*, 100: 57-70.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144: 646-674.

Hernandes, M. Z., Pontes, F. J. de S., Coelho, L. C. D., Moreira, D. R. M., Pereira, V. R. A., Leite, A. C. L. (2010) Recent Insights on the Medicinal Chemistry of Metal-Based Compounds: Hints for the Successful Drug Design. *Current Medicinal Chemistry*, 17: 3739-3750.

Hillard, E., Vessieres, A., Thouin, L., Jaouen, G., Amatore, C. (2006) Ferrocene-mediated proton-coupled electron transfer in a series of ferrocifen-type breast-cancer drug candidates. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 45: 285–290.

Horn Jr., A.; Neves, A.; Vencanto, I.; Drago, V.; Zucco, C.; Werner, R.; Haase, W. A. (2000) New Dinucleating N,O Donor Ligand (H2BPCINOL) and the Structural and Magnetic Properties of two Diiron Complexes with the di- μ -Alkoxo Motif. *J. Braz. Chem. Soc.*, 11:7-10.

Horn Jr., A., Fernandes, C., Parrilha, G. L., Kanashiro, M. M., Borges, F. V., Melo, E. J. T., Schenk, G., Terenzi, H, Pich, C. T. (2013) Highly efficient synthetic iron-dependent nucleases activate both intrinsic and extrinsic apoptotic death pathways in leukemia cancer cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 128: 38-47.

Huang, K., Chen, Z., Cheng Liu, Y., Wang, M., Wei, J., Xie, X., Zhang, J., Hu, K., Liang, H. (2013) Copper(II/I) complexes of 5-pyridin-2-yl-[1,3]dioxolo[4,5-g]isoquinoline: Synthesis, crystal structure, antitumor activity and DNA interaction. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70: 640–648.

Inca (2014) http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=81 – acessado em outubro de 2014

Jamieson, E.R., Lippard, S.J., (1999) Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem Rev.*, 99: 2467-2498.

Jiang, J.; Tang, X.; Dou, W.; Zhang, H.; Liu, W.; Wang, C.; Zheng, J. Synthesis and characterization of the ligand based on benzoxazole and its transition metal complexes: DNA-binding and antitumor activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, aceito em 29 de janeiro de 2010.

Kaptiza, S., Pongratz, M., Jakupec, M. A., Heffeter, P., Berger, W., Knudson, C. M., Tung, K. S., Tourtellotte, W. G., Brown, G. A., Korsmeyer, S. J. (1995) Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*, v. 270, p. 96-99.

Kim, R., Tanabe, K., Uchida, Y., Emi, M., Inoue, H., Toge, T. (2002) Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Chemother. Pharmacol.*

Kovacs, M. J., Franco, M. H. P., Carvalho, V. A. (2008) *Temas em Psico-oncologia*. São Paulo: Grupo Editorial Summus, 645 p.

Kumar, V; Cotran, RS; Robbins, S. L. (2005) *Patologia Básica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 7 ed.

Lebwohl, D.; Canetta, R. (1998) Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *European Journal of Cancer*, 34 (10): 1522-1534.

Lessa, J. A., Parrilha, G. L., Beraldo, H. (2012) Gallium complexes as new promising metallodrug candidates. *Inorganica Chimica Acta*, 393: 53–63.

Lodish, L., Berk, A., Matsudaria, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipurisky, L., Darnell, J. (2005) *Molecular Cell Biology*. Artmed, 5 ed, 973 p.

Lopes, B.F. (2012). Síntese, Caracterização e Avaliação da Atividade Antineoplásica de Compostos de Coordenação de Cobre: Influência do Naftol e da Cumarina na Atividade Biológica. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

Lorenzo, H. K., Susin, S. A., Penninger, J, Kroemer, G. (1999) Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase- independent effector of cell death. *Cell Death Differ.*,6: 516-524.

Machado, A. E. D. (2000) Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química. Nova*, 23:237.

Martins, A. M. C. R. P. da F. (2003) Metabolismo da glutamina na célula tumoral. *Arq. Inst. Biol.* (São Paulo), 70 (2): 231-237.

Meier, P., Finch, A., Evan, G. (2000) Apoptosis in development. *Nature*, 407: 796-801.

Medici, S., Peana, m., Nurchib, v.m., Lachowicz, J. I., Crisponi, G., Zoroddu, M. A. (2014) Noble metals in medicine: Latest advances. *Coordination Chemistry Reviews* (artigo *in press* – versão *on line*: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854514002070#> - acessado em outubro de 2014).

Monneret, C. (2011) Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 69: 286-295.

Nadeem, S., Bolte, M., Ahmad, S., Fazeelat, T., Tirmizi, S.A., Rauf, M.K., Sattar, S.A., Siddiq, S., Hameed, A., Haider, S.Z. (2010) Synthesis, crystal structures and antibacterial and antiproliferative activities in vitro of palladium(II) complexes of triphenylphosphine and thioamides, *Inorg.Chim. Acta*, 363: 3261–3269.

Neves, A.; Brito, M. A.; Vencanto, I.; Drago, V.; Griesar, L. R.; Schenk, G. (1993) Synthesis, Crystal Structure and Properties of a New Binuclear Iron (III) Complex as a Model for the Purple Acid Phosphatases. *Inorganica Chimica Acta*, 214:5-8.

Nygren, P. (2001) What is cancer chemotherapy? *Acta Oncologica*, 40: 166-174.

Novák, B., Sible, J. C., Tyson, J. J. (2002) *Checkpoints in the Cell Cycle*. Encyclopedia of life sciences, p. 1-8.

Okada, H., Mak, T.W. (2004) Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 4: 592-603.

Ola, M. S., Nawaz, M., Ahsan H. (2011) Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*, 351: 41-58.

OMS (2014) <http://www.who.int/en/> - acessado em setembro de 2014.

Oncoguia (2014) <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamentos/77/50/> – acessado em setembro de 2014

Orvig, C., Abrams, M. J. (1999) Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction. *Chemical Reviews*, 99(9):2201-2203.

Pasetto, L. M., D'Andrea, M. R., Alba Brandes, A. A., Rossi, E., Monfardini, S. (2006) The development of platinum compounds and their possible combination. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 60: 59–75.

Pellegrine, M. P., Pinto, R. C. V., Castilho, L. R. (2008) Mecanismo de crescimento e morte e células animais cultivadas *in vitro*. In: BONFIM, C. C. B. (2013) Avaliação do Potencial Antileucêmico de Adutos Aromáticos de Morita-Baylis-Hillman. Monografia (Farmácia) – João Pessoa – PB, Universidade Federal da Paraíba, 87 p.

Plati, J., Bucur, O., Khosravi-Far, R. (2011) Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol (Camb)*, 3 (4): 279-296.

Pratt, W.; Ruddon, R., (1979) *The anticancer drugs*. New York: Oxford University Press.

Rijt, S. H., Sadler, P. J. (2009) Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discovery Today*, 14 (23/24): 1089-1097.

Ronconi, L., Sadler, P. J. (2007) Using coordination chemistry to design new medicines. *Coordination Chemistry Reviews*, 251: 1633–1648.

Rosenberg, B., Van Camp, L., Krigas, T. (1965) Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205: 698-699.

Rosenberg, B., Van Camp, L., Trosko, J.E., Mansour, V.H. (1969) Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents. *Nature*, 222: 385-386.

Salmon, S. E., (1998) *Farmacologia Básica & Clínica*, Katzung, B.G., ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, p. 629-655.

Shimada, M., Itamochi, H., Kigawa, J. (2013) Nedaplatin: a cisplatin derivative in cancer chemotherapy. *Cancer Management and Research*, 5: 67-76.

Smiley, S. T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T. W., Steele, G. D., Chen, L.B. (1991). Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate forming lipophilic cation JC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 88, p. 3671-3675.

Spence, R. A. J.; Jonhston, P. G. (2001) *Oncology*; ed. Oxford University Press: Oxford, p. 1-14, 121-132.

Stefan, J., Salvesen, R., Salvesen, S. (2007) The apoptosome: signaling platform of cell death. *Natural Review*, 8: 405-413.

Stojković, D. L., Jevtić, V. V., Radić, G. P., Todorović, D. V., Petrović, M., Zarić, M., Nikolić, I., Baskić, D., Trifunović, S. R. (2015) Stereospecific ligands and their complexes. XXII. Synthesis and antitumor activity of palladium(II) complexes with some esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-(2,2'-di(4-hydroxy-benzyl))-acetic acid. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 143: 111–116.

Taylor, R. C., Cullen, S. P., Martin, S. J. (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 9 (3): 231-241.

Thati, B., Noble, A., Creaven, B. S., Walsh, M., Kavanagh, K., Egana, D., A. (2007) An in vitro investigation of the induction of apoptosis and modulation of cell cycle events in human cancer cells by bisphenanthroline-coumarin-6,7-dioxacetatocopper(II) complex. *Chemico-Biological Interactions*, 168:143–158.

Thompson, K. H., Orvig, C. (2003) Boon and Bane of Metal Ions in Medicine. *Science*, 300:936-939.

Tomasetti, C., Vogelstein, B. (2015) Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*, 347: 78-81.

Ursini, C.V. (1997) Ressonância magnética nuclear de platina-195 em compostos organometálicos. *Química Nova*, 20(1): 72-82.

Verani, C. N. (2012) Metal complexes as inhibitors of the 26S proteasome in tumor cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 106: 59-67.

Vermeulen, K., Bockstaeke, D. R. V., Berneman, Z. N. (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36: 131-149.

Waitzberg, D. L., Nardi, L., Horil, L. M. (2001) Desnutrição em câncer. *Onco &*, outubro/novembro 2011.

Weiss, R. B.; Christian, M. C. (1993). New Cisplatin Analogues in Development: A Review. *Drugs*, 46 (3): 360-377.

Widlak, P., Garrard, W. T. (2009) Roles of the major apoptotic nuclease-DNA fragmentation factor-in biology and disease. *Cell Mol Life Sci.*, 66 (2): 263-27.

Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G. E., Oun, R. (2010) The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Transactions*, 39 (35): 8113-8127.

Xue, L. W., Zhao, G. Q., Han, Y. J., Feng, Y. X. (2011) Synthesis, Structures, and Antimicrobial Activity of Nickel(II) and Zinc(II) Complexes with 5-Methoxy-2-[(3-methylaminopropylimino)methyl]phenol. *Russian Journal of Coordination Chemistry*, 37(4):262–269.

Zhang, C.X.; Lippard, S.J. (2003) New metal complexes as potential therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7: 481–489.

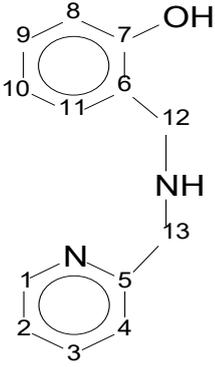
ANEXO 1

Tabela 1. Resultados de espectroscopia no infravermelho para os ligantes L1 – L4, obtidos em pastilha de KBr, onde os valores entre parênteses são os relatados na literatura.

Absorção (cm⁻¹)	L1 (L1literatura)	L2 (L2literatura)	L3 (L3literatura)	L4 (L4literatura)
v NH	3263 (3263)	--	--	--
v OH	3063 (200 – 3200)	3500 – 2500 (3500 – 2500)	3500 – 2800 (3300 – 2800)	3200-3500 (3300)
v CH _{aromático}	3047, 3012 (3040, 3009)	3032, 3014 (3053, 3016)	3053 (3051)	3053 (3055)
v _{as} CH ₂	2947(2947)	2949 (2951)	2930 (2927)	2949 (2928)
v _s CH ₂	2860(2862)	2841 (2831)	2833 (2831)	2835 (2828)
v C=C e C=N	1597, 1568, 1492, 1433 (1589, 1566, 1458, 1427)	1595, 1572, 1485, 1438 (1595, 1587, 1487, 1435)	1581, 1489, 1398 (1581, 1489, 1400)	1627, 1599, 1508, 1450 (1628, 1597, 1512, 1469)
O-H _{fenol}	1356 (1358)	1249 (1250)	1269 (1269)	1257 (1258)
v C-O	1284 (1280)	1151 (1151)	1242 (1242)	1217 (1217)
v C-N	1109 (1111)	1095 (1095)	--	--
γ-CH ^a ; β-anel ^b	769 (756)	754 (756)	792, 756 (791, 756)	839, 763 (837, 752)
v C-Cl	--	636 (636)	--	--

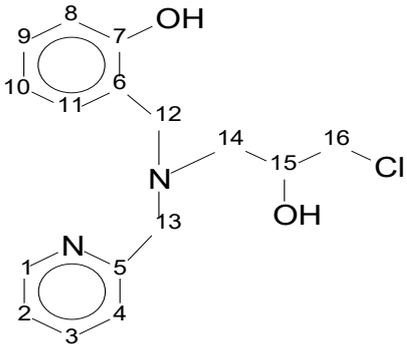
a= deformação C-H fora do plano de heteroaromáticos; b= deformação do anel heteroaromático.

Tabela 2. Dados de RMN ^1H para o ligante L1, obtido em CDCl_3 , e comparação com valores relatados na literatura.

		
L1	Dados experimentais obtidos δ_{H}	Literatura* (CDCl_3) δ_{H}
C		
5	-	-
6		-
7	-	-
CH		
1	8,58 (dd, $J=5,31$; $J=1,65$)	8,58
2	7,23-7,15 (m)	7,23 – 7,15
3	7,65 (dt, $J=7,69$; $J=7,69$; $J=1,65$)	7,65
4	7,23-7,15 (m)	7,23 – 7,15
8	6,86 (m)	6,86
9	7,23-7,15 (m)	7,23 – 7,15
10	6,77 (dt, $J=7,32$; $J=7,32$; $J=0,92$)	6,78
11	6,97 (d, $J=7,32$)	6,97
CH₂		
12	3,83 (s)	3,89
13	4,00 (s)	4,00
NH		
	2,90 (s)	Não observado

* Fonte: Lube, 2011. d= duplete; dt= duplo tripleto; m= multiplete; s= simpleto.

Tabela 3. Dados de RMN ^1H do ligante L2, obtidos em CDCl_3 , e comparação com valores relatados na literatura.

		
L2	Dados experimentais obtidos δ_{H}	Literatura* (CDCl_3) δ_{H}
C		
5	-	-
6		
7	-	-
CH		
1	8,58 (m)	8,5 (d)
2	7,28-7,11 (m)	7,10-6,6 (m)
3	7,67 (dt, $J=7,69$; $J=7,69$; $J=1,83$)	7,50 (dt)
4	7,28-7,11 (m)	7,10-6,6 (m)
8	6,90-6,74 (m)	7,10-6,6 (m)
9	7,28-7,11 (m)	7,10-6,6 (m)
10	6,90-6,74 (m)	7,10-6,6 (m)
11	7,01 (dd, $J=7,32$; $J=1,47$)	7,10-6,6 (m)
15	4,10-3,38 (m)	3,90-3,60 (m)
CH₂		
12	4,10-3,38 (m)	3,90-3,60 (m)
13	4,10-3,38 (m)	3,90-3,60 (m)
14	2,87-2,73 (m)	3,40 (dd)
16	3,48 (m)	2,70 (dd)

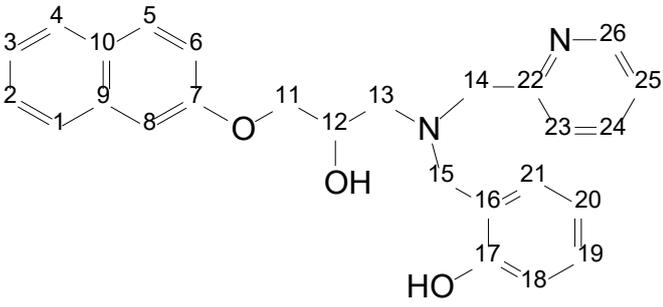
* Fonte: Horn *et al.*, 2000.

Tabela 4. Dados de RMN ^1H do ligante L3, obtidos em CDCl_3 , e comparação com valores relatados na literatura.

L3	Dados experimentais obtidos	Literatura* (CDCl_3)
	δ_{H}	δ_{H}
C		
7	-	-
9	-	-
10	-	-
16	-	-
17	-	-
22	-	-
CH		
1	8,03 (d)	8,03 (d)
2	7,49 – 7,46 (m)	7,48 (t)
3	7,49 – 7,46 (m)	7,48 (t)
4	7,78 (d)	7,78 (d)
5	7,43 – 7,41 (m)	7,44 – 7,41 (m)
6	7,34 (t)	7,34 (t)
7	6,76 (d)	6,77 (d)
12	4,40 – 4,36 (m)	4,39 – 4,35 (m)
18	6,93 – 6,88 (ddd)	6,89 (d)
19	7,24 – 7,18 (m)	7,25 – 7,17 (m)
20	6,81 (tt)	6,81 (t)
21	7,09 – 7,05 (ddd)	7,06 (d)
23	7,24 – 7,18 (m)	7,25 – 7,17 (m)
24	7,68 (td)	7,69 (t)
25	7,24 – 7,18 (m)	7,25 – 7,17 (m)
26	8,63 (d)	8,63 (d)
CH₂		
11	4,17 (m); 4,07 – 4,02 (m)	4,13 (d); 4,08 – 4,03 (m)
13	3,00 (d)	3,00 (d)
14	4,07 – 4,02 (m); 4,15 – 4,12 (m)	4,08 – 4,03 (m); 4,19 – 4,15 (m)
15	3,99 – 3,90 (m); 3,83 – 3,79 (m)	4,00 – 3,92 (m); 3,84 – 3,79 (m)

* Fonte: Lopes, 2012. d= duplete; dd= duplo duplete; ddd= duplo duplo duplete; t= tripleto; m= multiplete.

Tabela 5. Dados de RMN ^1H do ligante L4, obtidos em CDCl_3 , e comparação com valores relatados na literatura.

		
L4	Dados experimentais obtidos	Literatura* (CDCl_3)
	δ_{H}	δ_{H}
C		
7	-	-
9	-	-
10	-	-
16	-	-
17	-	-
22	-	-
CH		
1	7,77 – 7,66 (m)	7,71-7,68 (m)
2	7,77 – 7,66 (m)	7,42 (t)
3	7,44 (t; J 3,6; J 7,6)	7,32 (t)
4	7,77 – 7,66 (m)	7,74 (d)
5	7,33 (t; J 3,7; J 7,5)	7,17 (d)
6	7,20 (m)	7,10 – 7,07 (m)
8	7,25 (m)	7,10 – 7,07 (m)
12	4,27 (s)	4,28 – 4,25 (m)
18	7,20 (m)	6,87 (dd)
19	7,10 – 7,01 (m)	7,04 – 7,02 (m)
20	6,89 – 6,78 (m)	6,79 (t)
21	7,10 – 7,01 (m)	7,04 – 7,02 (m)
23	7,33 (t; J 3,7; J 7,5)	7,17 (d)
24	7,77 – 7,66 (m)	7,65 (dd)
25	7,44 (t; J 3,6; J 7,6)	7,24 – 7,20 (t)
26	8,64 – 8,60 (m)	8,61 (m)
CH₂		
11	4,14 – 3,96 (m)	4,06 – 4,02 (m); 4,00 – 3,92 (m)
13	2,96 – 2,87 (m)	2,91 (m)
14	4,14 – 3,96 (m)	4,11 (d); 4,00 – 3,92 (m)
15	4,14 – 3,96 (m); 3,79 (d; J ₁₅₋₁₅ 6,99)	4,00 – 3,92 (m); 3,78 (d)

* Fonte: Lopes, 2012. d= duplete; dd= duplo duplete; t= tripleto; m= multipleteo.