

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
CITOTÓXICA DE COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) E
GÁLIO(III)

ÉRIKA SOARES BULL DE NADAI

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO - 2016

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
CITOTÓXICA DE COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) E
GÁLIO(III)

ÉRIKA SOARES BULL DE NADAI

"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

MARÇO – 2016

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
CITOTÓXICA DE COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) E
GÁLIO(III)

ÉRIKA SOARES BULL DE NADAI

“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 18 de março de 2016.

Comissão Examinadora:

Prof. Marcos Dias Pereira (Dr. em Ciências) - UFRJ

Prof. João Carlos de Aquino Almeida (Dr. em Ciências biológicas) - UENF

Prof. Nicolás Adrián Rey (Dr. em Química) – PUC-Rio

Prof. Christiane Fernandes Horn (Dr^a. em Química) - UENF

ORIENTADORA

Dedico este trabalho à memória das minhas inesquecíveis avós, Maria Calente Soares e Ida Jacob Bull. Obrigada por me ensinarem a ser forte diante dos obstáculos da vida. Nunca esquecerei seus ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

- À Deus, razão da minha existência;
- Aos meus familiares, principalmente à papai (Lindolfo), mamãe (Vera), Érich e Kelly (irmãos), pelo incentivo diante às dificuldades e compreensão perante minhas ausências;
- Ao Diogo, a qual estive ao meu lado em todo o percurso desta caminhada, pelo amor, paciência e compreensão;
- À Prof^a. Christiane pela orientação, incentivo e disponibilidade, mas principalmente por acreditar em mim, mesmo sabendo que eu não teria disponibilidade integral para dedicar-me ao doutorado. Muito obrigada;
- Ao Prof. Adolfo, pelo auxílio e proveitosas discussões;
- Aos professores Milton M. Kanashiro, João Carlos de Aquino Almeida, Roberto W. A. Franco e Adailton João Bortoluzzi, pela colaboração na realização deste trabalho;
- Aos companheiros de grupo de pesquisa e demais companheiros de laboratório, pelo companheirismo e ajuda nestes quatro anos;
- À Wagner, Samila e Rafaela, meus companheiros de testes biológicos;
- À Laura, Franz e Willian pelo auxílio e companheirismo durante os testes biológicos;
- Aos técnicos da UENF, Marcelo, Juliana e Rita, pela disponibilidade em contribuir neste trabalho;
- À Sarah, por tornar esta caminhada mais serena, com valiosos conselhos e incentivo;
- Aos amigos Tânia, Alvanir pela amizade e apoio nesta caminhada;
- Aos professores Marcos Dias Pereira, João Carlos de Aquino Almeida e Nicolás Adrián Rey, que fizeram parte da banca;
- À todos aqueles que, direta e indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ABREVIações	XVII
RESUMO.....	XX
ABSTRACT	XXII
1. INTRODUÇÃO	24
1.1. ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER	24
1.2. ASPECTOS BIOQUÍMICOS DAS CÉLULAS CANCEROSAS	26
1.2.1. Indução de morte celular programada no tratamento do câncer	30
1.2.2. Interação de compostos antitumorais com o DNA	33
a) Interações covalentes com o DNA	33
b) Interações não-covalentes com o DNA.....	34
1.3. COMPLEXOS METÁLICOS COM ATIVIDADE ANTITUMORAL	36
1.3.1. Cisplatina e outros complexos de platina na terapia do câncer	36
1.3.2. Desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer que não contém platina	41
a) Atividade antitumoral de novos complexos de cobre(II)	43
b) Atividade antitumoral de novos complexos de gálio(III)	49
2. JUSTIFICATIVA	55
3. OBJETIVOS	56
3.1. OBJETIVO GERAL.....	56
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
4. MATERIAIS E MÉTODOS	58
4.1. TÉCNICAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS E INORGÂNICOS.....	58
4.1.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	58
4.1.2. Espectroscopia de infravermelho	58
4.1.3. Análise elementar	59
4.1.4. Determinação do ponto de fusão	59
4.1.5. Condutivimetria	59
4.1.6. Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS).....	59
4.1.7. Difração de raios X	59
4.1.8. Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)	59
4.2. SÍNTESE DOS LIGANTES	60
4.2.1. Síntese do (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (HL1).....	60
4.2.2. Síntese do N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H ₂ L2)	61
4.2.3. Síntese do 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P1)	61
4.2.4. Síntese do 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (H ₂ L3).....	61

4.2.5. Síntese do 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P2)	62
4.2.6. Síntese do 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (H ₂ L4).....	62
4.3. SÍNTESE DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO.....	63
4.3.1. Síntese dos compostos de coordenação de cobre(II)	63
a) Síntese do [Cu(HL1)(Cl ₂).1,5H ₂ O (C1)	63
b) Síntese do [Cu(H ₂ L2)(Cl)]Cl.3H ₂ O (C2)	64
c) Síntese do [(H ₂ L3)Cu(μ-Cl) ₂ Cu(H ₂ L3)]Cl ₂ .5H ₂ O (C3).....	65
d) Síntese do [(H ₂ L4)Cu(μ-Cl) ₂ Cu(H ₂ L4)]Cl ₂ .4H ₂ O (C4).....	65
4.3.2. Síntese dos compostos de coordenação de gálio(III) inéditos	66
a) Síntese do [Ga(L1)(NO ₃)(OH ₂).C ₂₄ H ₂₀ B.4H ₂ O (C5)	66
b) Síntese do [Ga(HL2)(NO ₃).C ₂₄ H ₂₀ B].6H ₂ O (C6)	66
c) Síntese do [Ga(H ₂ L3)(NO ₃) ₂ .C ₂₄ H ₂₀ B. 4H ₂ O (C7)	67
d) Síntese do [Ga(HL4)(NO ₃)(OH ₂).C ₂₄ H ₂₀ B.2H ₂ O (C8).....	67
4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL	68
4.4.1. Preparação dos compostos e das células tumorais	68
a) Diluição e armazenamento dos compostos orgânicos e de coordenação	68
b) Descongelamento das células neoplásicas	69
c) Cultura das linhagens de células neoplásicas.....	69
d) Congelamento das células neoplásicas	69
e) Cultura das linhagens de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	70
f) Padronização da concentração da cultura celular	70
4.4.2. Avaliação da viabilidade celular por metabolização do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tretazólio).....	71
4.4.3. Avaliação do tipo de morte celular mediada pelos compostos	72
a) Avaliação da Externalização de fosfatidilserina (marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio).....	72
b) Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (Sub-G1).....	72
4.4.4. Avaliação da via apoptótica ativada pelo complexos	73
a) Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (JC-1)	73
b) Análise ultraestrutural das mitocôndrias de células U937 por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	74
4.4.5. Análise estatística	75
4.5. INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS COM DNA PLASMIDIAL.....	75
4.5.1. Espectros de absorção.....	75
4.5.2. Espectros de emissão.....	76
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS	77
5.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹ H RMN).....	77
5.1.2. Espectroscopia de infravermelho	84
5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE COBRE(II) JÁ DESCRITOS NA LITERATURA (C1-C4)	86
5.2.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho	87
5.2.2. Difração Raios X	90
5.2.3. Análise elementar, condutivimetria e ponto de fusão	95
5.2.4. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	96
5.3. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE GÁLIO(III) INÉDITOS (C1-C4).....	99
5.3.1. Espectroscopia na região do infravermelho	99

5.3.2. Análise elementar, condutivimetria e ponto de fusão	103
5.3.3. Espectroscopia de massas com ionização por electrospray (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS).....	104
5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL	111
5.4.1. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR METABOLIZAÇÃO DO MTT (3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENIL BROMETO TRETAZÓLICO).....	111
5.4.2. Avaliação do tipo de morte celular mediada pelos compostos.....	115
a) Avaliação da Externalização de fosfatidilserina (marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio).....	115
b) Avaliação do ciclo celular (Sub-G1) por citometria de fluxo	121
5.4.3. Avaliação da via apoptótica ativada pelos complexos.....	125
a) Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM)	125
b) Análise ultra-estrutural das mitocôndrias de células tumorais por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	129
5.5. INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS COM DNA PLASMIDIAL	135
5.5.1. ESPECTROS DE ABSORÇÃO	135
5.5.2. ESPECTROS DE EMISSÃO	138
6. CONCLUSÃO	143
7. PERSPECTIVAS E DESDOBRAMENTOS DO TRABALHO.....	144
8. LITERATURA CITADA.....	145
9. ANEXOS	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Combinação da cisplatina com algumas outras drogas na terapia de diversos tipos de câncer (DASARI et al., 2014).	40
Tabela 2. Inibição da massa tumoral da linhagem celular inoculada em murinos após tratamento com o complexo de cobre(II) $[Cu_3(p-3-bmb)_2Cl_4(CH_3OH)_2]_n$ (adaptado de LI et al., 2014).	45
Tabela 3. Citotoxicidade (IC_{50} , $\mu mol L^{-1}$) do complexo $[Cu(IPrDP)_2] \cdot 3H_2O$ contra cinco linhagens tumorais humanas em comparação com a cisplatina* (QIU et al., 2015)..	46
Tabela 4. Concentração inibitória (IC_{50} , $\mu mol L^{-1}$) do complexo de cobre(II), $[Cu(L)(dppz)]ClO_4$ e cisplatina contra duas linhagens tumorais de mama (DHIVYA et al., 2015).	48
Tabela 5. Atividade citotóxica (IC_{50}) do complexo de gálio(III) $[Ga(L)_2](NO_3)$ contra as linhagens celulares tumorais A2780 (ovário), MCF-7 (mama) e PC-3 (próstata) após 72 horas de incubação (MACHADO et al., 2014)..	50
Tabela 6. Valores de IC_{50}^a ($\mu mol L^{-1}$) após 96 h de incubação dos complexos (1)-(10), nitrato de gálio (III) e cisplatina contra as linhagens de células cancerosas: HN (palato mole), CAI27, CAI33 (língua) e FaDu (hipofaringe), determinados por análise colorimétrica (KALUDEROVIĆ et al., 2011).	54
Tabela 7. Dados de RMN de 1H para o ligante HL1 obtidos em $CDCl_3$ (400 MHz), com suas atribuições e comparações com valores relatados literatura.	78
Tabela 8. Dados de RMN de 1H para o ligante H_2L2 obtidos em $DMSO-D_6$ (400 MHz), com atribuições e comparação com valores relatados na literatura.	79
Tabela 9. Dados obtidos na espectroscopia de RMN de 1H para precursor P1, obtidos em $CDCl_3$ (400 MHz), suas atribuições e comparações com dados relatados na literatura.....	80
Tabela 10. Dados de ressonância magnética nuclear 1H para o ligante H_2L3 obtido em $CDCl_3$ (60MHz), suas atribuições e comparação com valores relatados na literatura (400MHz).....	81
Tabela 11. Dados obtidos na espectroscopia de ressonância magnética nuclear de 1H para o precursor P2 obtidos em $CDCl_3$ (400 MHz), suas respectivas atribuições e comparações.....	82
Tabela 12. Dados de RMN de 1H do ligante H_2L4 obtidos em $DMSO-D_6$ (400 MHz), suas atribuições e comparação com valores relatados na literatura.	83

Tabela 13. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho para os ligantes HL1 e H ₂ L2, obtidos em pastilha de KBr (para HL1) e em filme sobre pastilha de KBr (para H ₂ L2).....	84
Tabela 14. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho para o precursor P1 e seu respectivo ligante H ₂ L3, obtidos em filme sobre pastilha de KBr.	85
Tabela 15. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho para o precursor P2 e seu respectivo ligante H ₂ L4, obtidos em pastilha de KBr.....	86
Tabela 16. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho para os complexos C1-C4, obtidos em pastilha de KBr.	90
Tabela 17. Principais distâncias (Å) e ângulos de ligação (°) para os complexos [(H ₂ L3)Cu(μ-Cl) ₂ Cu(H ₂ L3)]Cl ₂ (C3), [(H ₂ L4)Cu(μ-Cl) ₂ Cu(H ₂ L4)]Cl ₂ .4CH ₃ OH (C4). ...	92
Tabela 18. Parâmetros cristalográficos para o complexo [(H ₂ L3)Cu(μ-Cl) ₂ Cu(H ₂ L3)]·Cl ₂ (C3).....	93
Tabela 19. Dados de análise elementar (C, H e N), de condutivimetria, realizada na concentração de 1,0x10 ⁻³ mol L ⁻¹ , e o ponto de fusão para os complexos de cobre(II) C1-C4.....	95
Tabela 20. Parâmetros Hamiltonianos de spin obtidos por simulação dos espectros experimentais para os complexos de cobre(II) (C1 a C4) utilizando o programa Qpow.....	98
Tabela 21. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho para os complexos C5-C8, obtidos em pastilha de KBr.	102
Tabela 22. Dados de análise elementar (C, H e N), de condutivimetria, realizada na concentração de 1,0x10 ⁻³ mol L ⁻¹ , e ponto de fusão para os complexos C5-C8.	103
Tabela 23. Principais m/z e respectivas espécies identificados no espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS) para o complexo C5.	106
Tabela 24. Principais m/z e respectivas espécies identificados no espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS) para o complexo C6.	107
Tabela 25. Principais m/z e respectivas espécies identificados no espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS) para o complexo C7.	109
Tabela 26. Principais m/z e respectivas espécies identificados no espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS) para o complexo C8.	110

Tabela 27. IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) dos compostos sobre a viabilidade celular baseado no ensaio de citotoxicidade celular por MTT, após 36 horas de incubação.	113
Tabela 28. Valores de IC ₅₀ obtidos para os complexos de cobalto(III), zinco(II) e platina(II) contendo os ligantes HL1-H ₂ L4, através do ensaio de MTT.	115
Tabela 29. Porcentagem de morte celular por apoptose induzida pelos complexos C4 e C8.....	116
Tabela 30. Valores das constantes de ligação (K _b) para os complexos, determinados a partir método de titulação por absorção.	138
Tabela 31. Valores das constantes de intercalação (K _q) para os complexos, a partir equação de Stern-Volmer.....	141

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e consequente metástase (ROSAS et al., 2013).	27
Figura 2. Ciclo de replicação celular esquemático para célula em mitose (LODISH et al., 2005).	29
Figura 3. Características morfológicas de apoptose, autofagia e necrose (adaptado de TAN et al., 2014).	30
Figura 4. Vias extrínseca e intrínseca da apoptose (adaptado de TAN et al., 2014).	31
Figura 5. Algumas formas das ligações cruzadas que podem ocorrer entre um agente alquilante e o DNA (ALMEIDA et al., 2005).	34
Figura 6. (A) Intercalação de um ligante planar do complexo aos pares de bases de DNA. (B) Intercalação de complexos de Co(II) e Cu(II). (C) complexo de rutênio intercalado ao fragmento de DNA (CG-GC) (Adaptado de SIRAJUDDIN et al., 2013).	35
Figura 7. Estruturas dos complexos de platina(II) com atividade antitumoral que foram aprovados ou estão em fase de ensaios clínicos como agentes antineoplásicos (BARRY e SADLER, 2013).	37
Figura 8. Bioativação intracelular da cisplatina (AVENDAÑO e MENENDEZ, 2008).	38
Figura 9. Seleção de agentes antineoplásicos contendo metais (adaptado de TAN et al., 2014).	42
Figura 10. Estrutura para o complexo de cobre(II), $[Cu_3(p-3-bmb)_2Cl_4(CH_3OH)_2]_n$, onde $p-3-bmb = 1[(2-(piridina-3-il)-1H-benzoimidazol-1-il)metil]-1Hbenzotriazol$ (LI et al, 2014).	43
Figura 11. Efeito do complexo de cobre(II) na viabilidade, por MTT, das linhagens celulares HeLa e SGC-7901. Tempo de incubação: (*) 24h, (#) 48h e (&) 72h (LI et al., 2014).	44
Figura 12. Estrutura para o complexo $[Cu(IPrDP)_2] \cdot 3H_2O$ (QIU et al., 2015).	45
Figura 13. Espectros de absorção do complexo $[Cu(IPrDP)_2] \cdot 3H_2O$ na ausência e presença de incrementos de CT-DNA (QIU et al., 2015).	47
Figura 14. Estrutura do complexo $[Cu(L)(dppz)]ClO_4$ (DHIVYA et al., 2015).	47
Figura 15. (A) Alterações fisiológicas das linhagens tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-231 quando tratadas com $[Cu(L)(dppz)]ClO_4$ em relação ao controle (CON), coradas com laranja de acridina e brometo de etídio. (B) Porcentagem de	

células normais, apoptóticas e necróticas com 24 e 48 horas de tratamento com [Cu(L)(dppz)]ClO ₄ (*p<0,05) (DHIVYA et al., 2015).....	48
Figura 16. Proposta de estrutura para o complexo de gálio(III) [Ga(L) ₂](NO ₃) (MACHADO et al., 2014).....	49
Figura 17. Estruturas dos complexos de gálio(III), (1) e (2), onde X= NHEt ₃ ⁺ para o complexo (1) e PPh ₄ ⁺ para o complexo (2) (FISCHER-FODOR et al., 2014).....	50
Figura 18. Citotoxicidade e correspondentes valores de IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) dos compostos (1), (2) e carboplatina contra as linhagens de carcinoma de ovário A2780 e A2780cis (adaptado de FISCHER-FODOR et al., 2014).....	51
Figura 19. Imagens da linhagem celular A2780cis em microscópio eletrônico de transmissão após 24 horas de incubação (acima) e em microscópio ótica de contraste de fase (abaixo). (a) células não-tratadas; (b) células tratadas com o complexo (1) na concentração de 5 μmol L ⁻¹ ; (c) células tratadas com o complexo (2) na concentração de 5 μmol L ⁻¹ (FISCHER-FODOR et al., 2014).....	52
Figura 20. Complexos de gálio (III) (1)-(10) (GÓMEZ-RUIZ et al., 2009; KALUDEROVIC et al., 2010).....	53
Figura 21. Proposta de rota sintética para o ligante HL1.	60
Figura 22. Proposta de rota sintética para o ligante H ₂ L2.	61
Figura 23. Proposta de rota sintética para o precursor P1.	61
Figura 24. Proposta de rota sintética para o ligante H ₂ L3.	62
Figura 25. Proposta de rota sintética para o precursor P2.	62
Figura 26. Proposta de rota sintética para o ligante H ₂ L4.	63
Figura 27. Proposta de complexo de cobre(II) obtido com o ligante HL1.....	64
Figura 28. Proposta de complexos monomérico e dimérico de cobre(II) obtido com o ligante H ₂ L2.....	64
Figura 29. Proposta de complexo dimérico de cobre (II) obtido com o ligante H ₂ L3.	65
Figura 30. Proposta de complexo dimérico de cobre (II) obtido com o ligante H ₂ L4.	66
Figura 31. Proposta de complexo de gálio (III) obtido com o ligante HL1.	66
Figura 32. Proposta de complexo de gálio (III) obtido com o ligante H ₂ L2.....	67
Figura 33. Proposta de complexo de gálio(III) obtido com o ligante H ₂ L3.....	67
Figura 34. Proposta de complexo de gálio(III) obtido com o ligante H ₂ L4.....	68

Figura 35. Representação da redução do MTT a formazam pela succinato desidrogenase mitocondrial.....	71
Figura 36. Espectros de infravermelho para o ligante HL1 e para o complexo C1, obtidos em pastilha de KBr. A proposta para o composto C1 é baseada em dados de difração de raios X (BORGES et al., 2016).	87
Figura 37. Espectros de infravermelho para o ligante H ₂ L2 e para o complexo C2, obtidos em filme sobre pastilha de KBr (para H ₂ L2) e em pastilha de KBr (C2). As propostas para C2 são baseadas em dados de difração de raios X (FERNANDES et al., 2010).	88
Figura 38. Espectros de infravermelho para o ligante H ₂ L3 e para o complexo C3, obtidos em filme sobre pastilha de KBr (para H ₂ L3) e em pastilha de KBr (C3). A proposta para o composto C3 é baseada em dados de difração de raios X (FERNANDES et al., 2015).	88
Figura 39. Espectros de infravermelho para o ligante H ₂ L4 e para o complexo C4, obtidos em pastilha de KBr. A proposta para o composto C4 é baseada em dados de difração de raios X (FERNANDES et al., 2015).	89
Figura 40. ZORTEP para o cátion [(H ₂ L3)Cu(μ-Cl) ₂ Cu(H ₂ L3)] ²⁺ (C3).	91
Figura 41. ZORTEP para o cátion [(H ₂ L4)Cu(μ-Cl) ₂ Cu(H ₂ L4)] ²⁺ (C4) (FERNANDES et al., 2015).	94
Figura 42. Sobreposição dos cátions dos complexos C3 e C4 (FERNANDES et al., 2015).	94
Figura 43. Espectros de ressonância paramagnética eletrônica para os complexos de cobre(II), C1-C4, em solução de DMSO, a 100 K, sendo linha preta para espectros experimentais e linha vermelha para espectros simulados.....	97
Figura 44. Espectros de infravermelho para o ligante HL1 e para o complexo C5, obtidos em pastilha de KBr.....	99
Figura 45. Espectros de infravermelho para o ligante H ₂ L2 e para o complexo C6, obtidos em filme sobre pastilha de KBr (para H ₂ L2) e em pastilha de KBr (C6).....	100
Figura 46. Espectros de infravermelho para o ligante H ₂ L3 e para o complexo C7, obtidos em filme sobre pastilha de KBr (para H ₂ L3) e em pastilha de KBr (C7).....	100
Figura 47. Espectros de infravermelho para o ligante H ₂ L4 e para complexo C8, obtidos em pastilha de KBr.....	101
Figura 48. ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1) para o complexo C5.	105
Figura 49. ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1) para o complexo C6.	107
Figura 50. ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1) para o complexo C7.	108

Figura 51. ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1) para o complexo C8.	110
Figura 52. Porcentagem de morte celular por necrose (quadrante A), apoptose tardia (quadrante B), células vivas (quadrante C) e apoptose primária (quadrante D), após a incubação por 24 horas do complexo C4 (53,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e cisplatina (400,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) contra a linhagem de carcinoma de pulmão H460.....	117
Figura 53. Porcentagem de morte celular por necrose (quadrante A), apoptose tardia (quadrante B), células vivas (quadrante C) e apoptose primária (quadrante D), após a incubação por 30 horas do complexo C4 (26,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 53,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e da cisplatina (200,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 400,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) contra a linhagem de câncer de pulmão H460.....	118
Figura 54. Porcentagem de morte celular por necrose (quadrante A), apoptose tardia (quadrante B), células vivas (quadrante C) e apoptose primária (quadrante D), após a incubação por 24 horas do complexo C4 (80 $\mu\text{mol L}^{-1}$) contra a linhagem de linfoma histiocítico U937.....	119
Figura 55. Porcentagem de morte celular por necrose (quadrante A), apoptose tardia (quadrante B), células vivas (quadrante C) e apoptose primária (quadrante D), após a incubação por 24 horas do complexo C8 (18,0 e 36,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e cisplatina (21,4 e 42,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$) contra a linhagem de leucemia linfóide aguda Molt-4.	120
Figura 56. Porcentagem de morte celular por necrose (quadrante A), apoptose tardia (quadrante B), células vivas (quadrante C) e apoptose primária (quadrante D), após a incubação por 30 horas do complexo C8 (18,0 e 36,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e cisplatina (21,4 e 42,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$) contra a linhagem leucêmica Molt-4.....	121
Figura 57. Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem de carcinoma de pulmão H460, após 30 horas de incubação com o complexo C4 (26,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 53,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e com a cisplatina (200,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 400,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$).....	122
Figura 58. Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem de linfoma histiocítico, U937, após 24 horas de incubação com o complexo C4 (80,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$).	123
Figura 59. Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem de leucemia linfóide aguda Molt-4, após 24 horas de incubação com o complexo C8 (18,0 e 36,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e cisplatina (21,4 e 42,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$).	124
Figura 60. Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem de leucemia linfóide aguda Molt-4, após 30 horas de incubação com o complexo C8 (18,0 e 36,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e cisplatina (21,4 e 42,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$).	125
Figura 61. <i>Dot-plots</i> da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para a linhagem de carcinoma de pulmão H460, submetidas à incubação por 30 horas com o complexo C4 (26,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 53,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e com a cisplatina (200,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 400,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Quadrante B: células com	

potencial de membrana mitocondrial normal; Quadrante D: células com perda do potencial de membrana mitocondrial.....	127
Figura 62. <i>Dot-plots</i> da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para a linhagem de linfoma histiocítico U937 submetida à incubação por 24 horas com o complexo C4 (80,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Quadrante B: células com potencial de membrana mitocondrial normal; Quadrante D: células com perda do potencial de membrana mitocondrial.....	128
Figura 63. <i>Dot-plots</i> da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para a linhagem Molt-4 submetida à incubação por 30 horas com o complexo C8 (18,0 e 36,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e cisplatina (21,4 e 42,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Quadrante B: células com potencial de membrana mitocondrial normal; Quadrante D: células com perda do potencial de membrana mitocondrial.....	129
Figura 64. Microscopia eletrônica de transmissão da linhagem de linfoma histiocítico U937.....	130
Figura 65. Microscopia eletrônica de transmissão após tratamento da linhagem de linfoma histiocítico U937 incubadas em C4 (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 4 horas. Estrela: alterações morfológicas nas mitocôndrias; setas: esvaziamento do conteúdo mitocondrial e inchaço.....	131
Figura 66. Microscopia eletrônica de transmissão após tratamento da linhagem de linfoma histiocítico U937 incubadas em C4 (40 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 4 horas.	132
Figura 67. Microscopia eletrônica de transmissão após tratamento da linhagem de linfoma histiocítico U937 incubadas em C4 (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 8 horas.	133
Figura 68. Microscopia eletrônica de transmissão após tratamento da linhagem de linfoma histiocítico U937 incubadas em C4 (40 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 8 horas.	134
Figura 69. Espectros de absorção para complexo de cobre(II) C1.	136
Figura 70. Espectros de absorção para complexo de cobre(II) C3.	136
Figura 71. Espectros de absorção para complexo de cobre(II) C4.	136
Figura 72. Espectros de absorção para complexo de gálio(III) C7.....	137
Figura 73. Espectros de absorção para complexo de gálio(III) C8.....	137
Figura 74. Espectros de emissão de fluorescência do GelRed intercalado com DNA plasmidial ([DNA]= 2.0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , [GelRed]= 2.0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹), na ausência e presença do complexo de cobre(II) C1 com [DNA]:[GelRed]:[complexo] variando de 10:1:0 a 10:1:10.	139
Figura 75. Espectros de emissão de fluorescência do GelRed intercalado com DNA plasmidial ([DNA]= 2.0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , [GelRed]= 2.0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹), na ausência e	

presença do complexo de cobre(II) C3 com [DNA]:[GelRed]:[complexo] variando de 10:1:0 a 10:1:10. 140

Figura 76. Espectros de emissão de fluorescência do GelRed intercalado com DNA plasmidial ([DNA]= 2.0×10^{-4} mol L⁻¹, [GelRed]= 2.0×10^{-5} mol L⁻¹), na ausência e presença do complexo de cobre(II) C4 com [DNA]:[GelRed]:[complexo] variando de 10:1:0 a 10:1:10. 140

Figura 77. Espectros de emissão de fluorescência do GelRed intercalado com DNA plasmidial ([DNA]= 2.0×10^{-4} mol L⁻¹, [GelRed]= 2.0×10^{-5} mol L⁻¹), na ausência e presença do complexo de cobre(II) C8 com [DNA]:[GelRed]:[complexo] variando de 10:1:0 a 10:1:10. 141

LISTA DE ABREVIÇÕES

ANOVA: Análise de Variância Entre Grupos

APAF-1: Protease de ativação apoptóticas de fator 1 (do inglês, ativar Apoptotic protease activating factor 1)

ATCC: Coleção de Cultura de Tipo Americano (do inglês, American Type Culture Collection)

C1: $[\text{Cu}(\text{HL1})(\text{Cl}_2)] \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$

C2: $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L2})(\text{Cl})]\text{Cl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

C3: $[(\text{H}_2\text{L3})\text{Cu}(\mu\text{-Cl})_2\text{Cu}(\text{H}_2\text{L3})]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

C4: $[(\text{H}_2\text{L4})\text{Cu}(\mu\text{-Cl})_2\text{Cu}(\text{H}_2\text{L4})]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

C5: $[\text{Ga}(\text{L1})(\text{NO}_3)(\text{OH}_2)_2]\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{B} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

C6: $[\text{Ga}(\text{HL2})(\text{NO}_3)(\text{OH}_2)]\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{B} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

C7: $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{L3})(\text{NO}_3)_2]\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{B} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

C8: $[\text{Ga}(\text{HL4})(\text{NO}_3)(\text{OH}_2)]\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{B} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Colo-205: linhagem celular humana estabelecida de adenocarcinoma colorretal.

CT-DNA: DNA de timo de vitelo

DISC: Complexo de sinalização de morte (do inglês, Death inducing signaling complex)

DMEM-F12: Meio de Eagle Modificado por Dulbecco: mistura de nutriente F-12 (do inglês, Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12)

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, ethylenediamine tetraacetic acid)

EPON: resina epóxi

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

FADD: Fas Associado ao Domínio de Morte (do inglês, Fas-Associated Death Domain)

FDA: Administração de alimentos e fármacos (do inglês, U.S. Food and Drug Administration)

FL1: Fluorescência 1

FL2: Fluorescência 2

GR: GelRed

H₂L₂: N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)] propilamina
H₂L₃: 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol
H₂L₄: 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol
H460: linhagem celular humana estabelecida carcinoma de pulmão
HL1: (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina
IAPs: Proteínas Inibidoras de Apoptose (do inglês, Inhibitor of Apoptosis Protein)
IC₅₀: Índice de Citotoxicidade de 50%
INCA: Instituto Nacional do Câncer
IP: Iodeto de Propídio
JC-1: Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolil carbocianina
K_b: Constante de ligação
K_q: Constante de intercalação
MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão
Molt-4: linhagem celular humana estabelecida leucemia linfocítica aguda
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tretazólio
p.b.: pares de bases
PBMC: células mononucleares do sangue periférico (do inglês, peripheral blood mononuclear cells)
PBS: Tampão Salino Fosfato (pH 7,2) (do inglês, Phosphate Buffer Saline)
PMM: Potencial de Membrana Mitocondrial
RMN: Ressonância Magnética Nuclear
RNAase: Ribonuclease A
RMI: Ressonância Magnética por Imagem
RPE: Ressonância Paramagnética Eletrônica
RPM: Rotações Por Minuto
SEB: enterotoxina B de *Staphylococcus* (do inglês, *Staphylococcal* enterotoxin B)
SFB: Soro Fetal Bovino
THP-1: linhagem celular humana estabelecida de leucemia monocítica aguda
TMS: tetrametilsilano
TNFR: receptores de fator de necrose tumoral (do inglês, Tumor necrosis factor)
U937: linhagem celular humana estabelecida de linfoma histiocítico
UV-vis: Região do Ultravioleta-Visível
WHO: Organização Mundial da Saúde (do inglês, The World Health Organization)

RESUMO

Neste trabalho são apresentadas as sínteses e caracterizações de compostos de cobre(II) e de compostos inéditos de gálio(III), obtidos com ligantes N,O doadores: HL1= (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina, H₂L2= N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)] propilamina, H₂L3= 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol, H₂L4= 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol. Os ligantes H₂L3 e H₂L4 contêm os grupos alfa e beta naftol em suas estruturas, respectivamente, e foram sintetizados com o intuito de se avaliar seu efeito na atividade antitumoral. Os compostos obtidos foram caracterizados por variadas técnicas físico-químicas, sendo propostas as estruturas: [Cu(HL1)(Cl₂)]·1,5H₂O (C1), [Cu(H₂L2)(Cl)]Cl·3H₂O (C2), [(H₂L3)Cu(μ-Cl)₂Cu(H₂L3)]Cl₂·3H₂O (C3), [(H₂L4)Cu(μ-Cl)₂Cu(H₂L4)]Cl₂·4H₂O (C4), [Ga(L1)(NO₃)(OH₂)₂]C₂₄H₂₀B·3H₂O (C5), [Ga(HL2)(NO₃)(OH₂)]C₂₄H₂₀B·5H₂O (C6), [Ga(H₂L3)(NO₃)₂]C₂₄H₂₀B·4H₂O (C7) e [Ga(HL4)(NO₃)(OH₂)]C₂₄H₂₀B·2H₂O (C8).

Foram realizados estudos da citotoxicidade dos compostos de coordenação, dos seus respectivos ligantes e sais metálicos, contra células tumorais humanas, através de ensaio colorimétrico utilizando o corante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Neste estudo, foram investigadas as linhagens humanas de linfoma (U937- linfoma histiocítico), leucêmicas (THP-1- leucemia monocítica aguda e Molt-4- leucemia linfóide aguda), de pulmão (H460- carcinoma de pulmão), de cólon (Colo 205- adenocarcinoma colorretal) e células normais (PBMC- Células Normais do Sangue Periférico). A partir destes experimentos, constatou-se que os complexos C4 e C8 são os mais promissores contra as linhagens estudadas. Para estes compostos, foram realizados estudos de avaliação do tipo de morte celular e da via apoptótica através das técnicas de marcação com anexina V e iodeto de propídio (IP), avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (sub-G1), avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM) por citometria de fluxo (JC-1) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Estes estudos indicaram que os compostos C4 (IC₅₀= 39,3 μmol L⁻¹ e 26,5 μmol L⁻¹ contra U937 e H460, respectivamente) e C8 (IC₅₀= 18,0 μmol L⁻¹ contra Molt-4) são capazes de induzir a morte celular por apoptose, com alterações fisiológicas nas mitocôndrias. Além disso, estudos de interação com o DNA indicam que os complexos C3, C4 e C8 são

fracos agentes intercalantes. Sugere-se que os complexos C4 e C8 são promissores na busca por novos metalofármacos com atividade antineoplásica, indicando que o grupo naftol tem grande influência na atividade antitumoral.

Palavras-chave: cobre(II), gálio(III), ligantes N,O-doadores, naftol, atividade antitumoral, apoptose, microscopia eletrônica de transmissão (MET).

ABSTRACT

This work presents the synthesis and characterization of compounds of copper(II), and new compounds of gallium(III) obtained with ligands N, O donors: HL1= (2-hydroxybenzyl)(2-pyridylmethyl)amine, H₂L2= N-(2-hydroxybenzyl)-N-(2-pyridylmethyl)[(3-chlorophenyl)(2-hydroxy)]propylamine, H₂L3= 1-{2-hydroxybenzyl (2-pyridylmethyl)amino}-3-(1-naphthoxy)-2-propanol, H₂L4= 1-[2-hydroxybenzyl(2-pyridylmethyl)amino]-3-(2-naphthoxy)-2-propanol. The ligands H₂L3 and H₂L4 containing alpha and beta naphthol groups in their structures, respectively, were synthesized in order to evaluate its effect on antitumor activity. The compounds obtained were characterized by different physico-chemical techniques and proposals structures: [Cu(HL1)(Cl₂)]·1.5H₂O (C1), [Cu(H₂L2)(Cl)]Cl·3H₂O (C2), [(H₂L3)Cu(μ-Cl)₂Cu(H₂L3)]Cl₂·3H₂O (C3), [(H₂L4)Cu(μ-Cl)₂Cu(H₂L4)]Cl₂·4H₂O (C4), [Ga(L1)(NO₃)(OH₂)₂]C₂₄H₂₀B·3H₂O (C5), [Ga(HL2)(NO₃)(OH₂)]C₂₄H₂₀B·5H₂O (C6), [Ga(H₂L3)(NO₃)₂]C₂₄H₂₀B·4H₂O (C7) e [Ga(HL4)(NO₃)(OH₂)]C₂₄H₂₀B·2H₂O (C8)..

Cytotoxicity studies were performed for coordination compounds, of the respective ligands and metal salts against human tumor cells by colorimetric assay using the dye MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoline bromide). In this study it was investigated strains of human lymphoma (U937- histiocytic lymphoma), leukemic (THP-1- acute monocytic leukemia and Molt-4- acute lymphocytic leukemia), lung (H460- lung carcinoma), colon (Colo 205- colorectal adenocarcinoma) and normal cells (PBMC- Peripheral Blood Mononuclear Cells). From these experiments, it was found that the complex C4 and C8 are the most promising against strains studied. For these compounds were conducted studies evaluating the type of cell death and the apoptotic pathway through selection techniques with annexin V and propidium iodide (PI), evaluation of the cell cycle by flow cytometry (sub-G1), evaluation of mitochondrial membrane potential (MMP) by flow cytometry (JC-1), and transmission electron microscopy (TEM). These studies indicated that compounds C4 (IC₅₀= 39.3 μmol L⁻¹ and 26.5 μmol L⁻¹ against H460 and U937, respectively) and compound C8 (IC₅₀= 18.0 μmol L⁻¹ against Molt-4) are capable of inducing cell death by apoptosis, with physiological changes in the mitochondria. Furthermore, interaction with DNA studies indicate that complexes C3, C4 and C8 are weak intercalating agents. It's suggested that the complex C4 and C8 are promising in the search for new metallodrugs with antineoplastic activity, indicating that the naphthol group has great influence on the antitumor activity.

Keywords: copper(II), gallium(III) ligands N,O-donor, naphthol, antitumor activity, apoptosis, transmission electron microscopy (TEM).

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais do câncer

O câncer constitui-se de uma doença, que engloba mais de 200 tipos diferentes, com multiplicidade de causas. Este se caracteriza pelo crescimento desordenado das células que perdem a sua capacidade funcional. Por apresentarem um rápido crescimento, tornam-se muito agressivas e incontroláveis, gerando tumores malignos que podem ser espalhar por outras regiões do corpo, além do tecido de origem (metástase), o que compromete o funcionamento geral do organismo. As neoplasias malignas (câncer) têm como origem células com baixo grau de diferenciação ou indiferenciadas, denominadas anaplásicas. Estas células possuem pouca semelhança com o tecido de origem e alta capacidade de disseminação. Já as neoplasias benignas são formadas por células com alto grau de diferenciação, sendo semelhantes ao tecido de origem e com crescimento lento (ALMEIDA et al., 2005; VERANI et al., 2012; ROSAS et al., 2013; INCA, 2016; WHO, 2016). O câncer iniciado a partir de tecidos epiteliais, como mucosas e pele, são denominados carcinoma, e aqueles iniciados nos tecidos conjuntivos, como músculos, ossos e cartilagem, são chamados sarcoma. Todos os tipos de células do corpo podem sofrer alterações e se transformar em células cancerosas, no entanto, alguns tecidos possuem maior tendência a sofrer tais mutações. Entre os órgãos mais afetados estão mama, pulmão, cólon e reto, colo de útero, pele, estômago, esôfago, medula óssea, cavidade oral e próstata (INCA, 2016).

O câncer pode ser causado por fatores externos (meio ambiente e hábitos próprios) ou internos (geneticamente pré-determinados), podendo estar inter-relacionados, o que aumenta a probabilidade de surgimento de células malignas. Estima-se que 80% a 90% dos casos estejam associados a fatores externos (ALMEIDA et al., 2005; INCA, 2016). No entanto, já existem estudos que sugerem que sua incidência está diretamente relacionada ao número total de divisões das células normais, necessárias para a manutenção da homeostase do tecido e à probabilidade de mutações. Devido à impossibilidade de relacionar o alto número de divisões à ocorrência do câncer para estas células, Tomasetti e Vogelstein sugerem que as mutações são, de forma majoritária, geradas aleatoriamente, a partir dos processos de divisão celular de células-tronco não-mutadas. Desta forma, os fatores

ambientais e genéticos muitas vezes podem tornar a doença mais agressiva, mas sugere-se que não seja sua causa direta. Estes autores apontam que apenas um terço das células em divisão tem tendência a sofrer mutações, sendo estas motivadas por fatores ambientais ou de predisposição genética (TOMASETTI e VOGELSTEIN, 2015).

O câncer é a principal causa de morte em países economicamente desenvolvidos e a segunda principal causa de morte em países em desenvolvimento. Para 2030, estima-se 27 milhões de novos casos de câncer no mundo (INCA, 2016; WHO, 2016). No Brasil, a estimativa para 2016, indicam 596 mil novos casos de câncer. As estimativas apontam que o câncer de pele do tipo não melanoma (176 mil novos casos) será o mais incidente no Brasil, seguido pelos cânceres de próstata (61 mil), mama feminina (58 mil), cólon e reto (34 mil), pulmão (28 mil), estômago (20,5 mil) e colo de útero (16 mil) (INCA, 2016).

Os principais tipos de tratamento para o câncer são a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Apenas um terço dos pacientes consegue a cura do câncer através de medidas locais (cirurgia e radioterapia), já que estes tipos de tratamento são eficazes somente quando o tumor ainda não está em metástase. Entre 60% e 70% dos casos requerem um tratamento mais sistêmico. Nestes casos a quimioterapia é indicada já que a neoplasia é caracterizada pelo desenvolvimento de micrometástases (ALMEIDA et al., 2005; INCA, 2016; WHO, 2016).

A quimioterapia tem como meta a destruição das células tumorais, preservando as normais. No entanto, a maioria dos agentes quimioterápicos lesa tanto células cancerosas como as normais, já que estas drogas atuam de forma não-específica. As células normais que mais sofrem com os quimioterápicos são as de crescimento rápido, como as capilares, as gastrointestinais e as do sistema imunológico, resultando em efeitos colaterais, tais como náuseas, perda de cabelo e maior sensibilidade a infecções. No entanto, na procura de um índice terapêutico favorável, exige-se que os benefícios do uso de quimioterápicos superem seus efeitos colaterais (ALMEIDA et al., 2005; KALUDEROVIC et al., 2011; INCA, 2016).

Para se obter êxito no tratamento do câncer por quimioterapia, é muito importante o diagnóstico precoce do tumor (com diâmetro inferior a 1cm). A partir dos estudos para a maior eficiência da quimioterapia, observam-se resultados com índices entre 75% e 90% de cura em diversos tipos de câncer (ALMEIDA et al., 2005).

1.2. Aspectos bioquímicos das células cancerosas

A formação do câncer (carcinogênese) geralmente ocorre de forma lenta, podendo levar vários anos para que o tumor tenha massa detectável. Antes de ser considerado um tumor, o processo de carcinogênese passa pelos estágios de iniciação, promoção e progressão (INCA, 2016).

- Estágio de iniciação: nesta fase, o tumor não pode ser clinicamente detectado. As células estão geneticamente modificadas por efeito de um agente carcinogênico (oncoiniciador);

- Estágio de promoção: a célula modificada é gradualmente transformada em célula maligna, por contato de um agente cancerígeno oncopromotor. No estágio de promoção ocorre o aumento populacional de células com genes modificados.

- Estágio de progressão: caracterizado pela multiplicação descontrolada das células malignas (agente oncoacelerador). Neste estágio, o câncer já está instalado e evolui para o surgimento de indicadores clínicos da doença (ALMEIDA et al., 2005; INCA, 2016).

A desnutrição é um dos indicadores clínicos do câncer. Este indicador é a causa do óbito de 20 a 40% dos indivíduos com câncer. O conjunto de anorexia, anemia, perda de peso, massa muscular e gordurosa leva o paciente com câncer a um estado de caquexia (desnutrição grave). Este quadro clínico está relacionado ao desenvolvimento das células neoplásicas, gerando modificações no organismo do indivíduo em função da reação contra a presença do tumor ou em decorrência da ação de substâncias produzidas pelas próprias células cancerosas (WAITZBERG et al., 2011).

Os fatores que promovem a iniciação ou progressão de carcinogênese são denominados carcinógenos. O fumo, por exemplo, é um agente carcinógeno completo, já que possui componentes que se enquadram nos três estágios de carcinogênese (ALMEIDA et al., 2005).

O câncer é gerado a partir de alterações em genes específicos, os proto-oncogeneses, as quais são inativos em células saudáveis. Quando os proto-oncogeneses são ativados, estes são transformados em oncogenes, sendo responsáveis pela transformação das células normais em células cancerosas (tumoriais). Os proto-oncogenes incluem genes que controlam de forma direta a proliferação celular, genes que são supressores de tumor e genes responsáveis pelo reparo do DNA (NUSSBAUM et al., 2002; BOIM et al., 2003), assim, qualquer

alteração desses genes, modifica as funções normais de uma célula (CASSIDY, et al., 2002; BOIM et al., 2003; ROSAS et al., 2013). A partir de lesões genéticas (mutações), um proto-oncogene pode se transformar em um oncogene, que possui autonomia de crescimento para a célula fazer modificações nos mecanismos de divisão celular (RANG et al., 2004). Os proto-oncogenes codificam proteínas que promovem a divisão celular, enquanto que os genes supressores tumorais são responsáveis por codificar proteínas que diminuem a velocidade de crescimento celular. Assim, estas duas classes de genes são responsáveis pela regulação do ciclo celular (LODISH et al., 2005; ALBERTS et al., 2010).

As células modificadas passam a se comportar de forma anormal, multiplicando-se de forma descontrolada, o que leva à necessidade do surgimento de novos vasos sanguíneos para a nutrição destas células, processo denominado angiogênese (Figura 1). As células tumorais possuem a capacidade de se desprenderem da massa tumoral formada e, ao serem transportados através de vasos sanguíneos ou linfáticos, migrarem para órgãos distantes do local de origem, originando as metástases. A célula tumoral é, de forma geral, menos especializada funcionalmente que as suas células de origem. Os tecidos invadidos perdem suas funções conforme as células normais vão sendo substituídas pelas células transformadas, causando disfunções e falência do órgão invadido, podendo chegar, em casos mais severos, à morte do indivíduo (ROSAS et al., 2013; INCA, 2016).

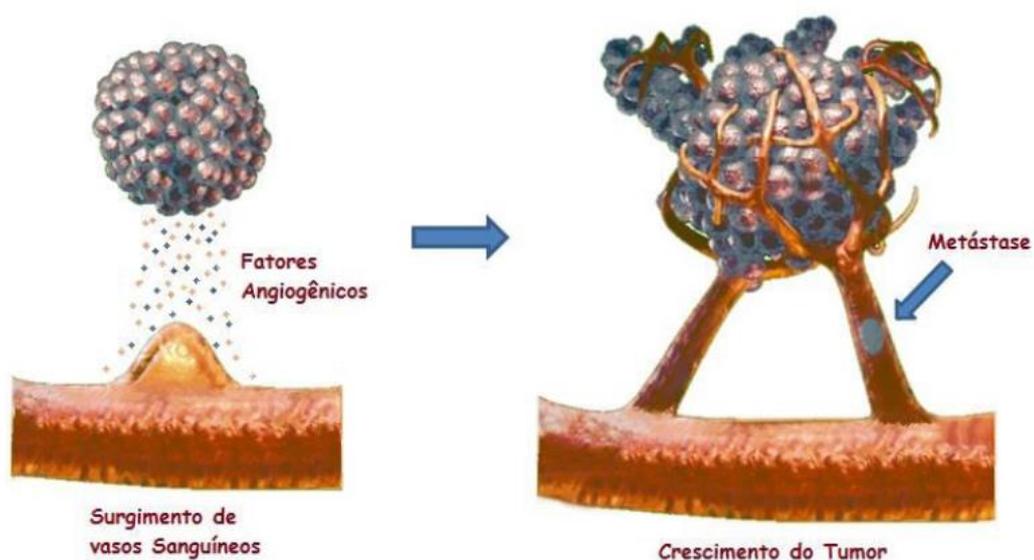


Figura 1. Formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e consequente metástase (ROSAS et al., 2013).

Assim, a formação de um tumor é decorrente de alterações fisiológicas das células, tais como a insensibilidade a fatores inibidores de crescimento, evasão do processo de morte celular programada (apoptose), potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada, invasão do tecido e metástase. Essas alterações auxiliam no desenvolvimento do tumor e dificultam o processo natural de defesa das células. Estas características promovem a perda no controle do ciclo celular, uma das principais características do câncer (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

A maior parte dos mecanismos que estão envolvidos no desenvolvimento de células malignas tem interferência na divisão celular (Figura 2). Na fase G_0 encontram-se as células que não estão sofrendo replicação. Nesta fase, o DNA está super-enovelado e com baixa atividade nuclear. A seguir, a célula passa para a fase G_1 , etapa de preparação da célula para a multiplicação, com a síntese de constituintes essenciais para a nova célula gerada e preparação para a síntese do DNA, que acontecerá na fase S. Diversos mecanismos reguladores da multiplicação celular acontecem nas fases G_1 e S. Produtos de oncogêneses ativam a multiplicação celular, enquanto que controles de retroalimentação (“feedback”), como os genes supressores tumorais, detêm a multiplicação celular quando danos no DNA são detectados. Outro mecanismo regulador do ciclo celular é a apoptose, a qual induz a morte de células modificadas que podem levar ao câncer. Na fase G_2 , ocorre a preparação para a mitose (fase M), que corresponde à divisão celular com manutenção do número de cromossomos específicos de cada espécie. Após a separação da célula mãe (citocinese), o ciclo de replicação celular é finalizado, com o retorno para a fase G_0 . Uma célula tumoral não finaliza o ciclo de replicação celular, passando da fase M diretamente para uma nova fase G_1 (BOIM et al., 2003; ALMEIDA et al., 2005; ALBERTS et al., 2010).

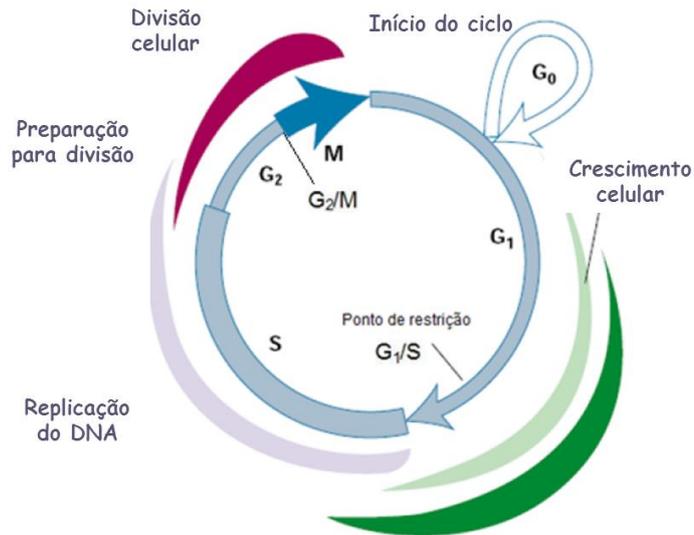


Figura 2. Ciclo de replicação celular esquemático para célula em mitose (LODISH et al., 2005).

O gene Tp53 é o gene supressor tumoral mais frequentemente alterado em tumores malignos. Este gene é responsável pela codificação da proteína p53, regulador do ciclo celular. O ciclo celular possui um sistema de pontos de verificação e controle para que erros ocorridos durante a divisão celular não se propaguem. A proteína p53 atua nos pontos de checagem G₁/S e G₂/M, a fim de verificar, respectivamente, se a célula está pronta para iniciar a síntese de DNA e se a duplicação do DNA ocorreu de forma satisfatória. Se houver erros durante o processo de divisão celular, a proteína p53 induz a codificação da proteína p21, responsável por inibir o início da síntese do DNA e início da mitose, estacionando o ciclo celular para o seu reparo (NOVÁK et al., 2002; VERMEULEN et al., 2003).

O reparo do DNA compreende um complexo sistema de enzimas conforme o tipo de lesão detectada. Mutações em genes que codificam proteínas utilizadas no reparo do DNA estão vinculadas a diferentes tipos de cânceres, como o de cólon, pele, leucemia, linfoma, mama e ovário. A proteína p53 induz a apoptose em células cujas lesões não podem ser reparadas, sendo esta uma das ações mais importantes do organismo para a proteção contra o câncer (NOVÁK et al., 2002; VERMEULEN et al., 2003; BERNARDI et al., 2003; ALBERTS et al., 2010).

1.2.1. Indução de morte celular programada no tratamento do câncer

Dependendo dos estímulos e funcionamento das células, a morte celular pode ocorrer por diversos mecanismos. Existem pelo menos 13 tipos diferentes de mortes celulares (GALLUZZI et al., 2012). Os mecanismos de morte celular podem ser processos programados ou não-programados. Atualmente, os processos de morte celular programada são divididos em apoptose, autofagia e necroptosis (necrose programada). As diferenças entre apoptose, necrose e autofagia estão relacionadas a alterações morfológicas, bioquímicas e biomoleculares das células (GALLUZZI et al., 2012; TAN et al., 2014).

Por muito tempo a necrose era caracterizada como um tipo não programado de morte celular, mas recentemente, descobriu-se que este tipo de morte celular pode acontecer de forma programada (GALLUZZI et al., 2012; TAN et al., 2014). A necrose se caracteriza pelo aumento do volume citoplasmático e perda rápida da integridade da membrana celular, podendo causar um processo de inflamação no tecido. Já na autofagia, observa-se acúmulo de autofagossomos e autolisossomos no citoplasma e perda de organelas. Em contraste, a apoptose se caracteriza pela redução do volume celular, condensação da cromatina nuclear, formação de prolongamentos de membrana (*blebbing*), fragmentação do DNA, externalização da fosfatidilserina e formação de corpos apoptóticos, sem o comprometimento dos tecidos adjacentes (Figura 3) (ALBERTS et al., 2010; TAN et al., 2014).

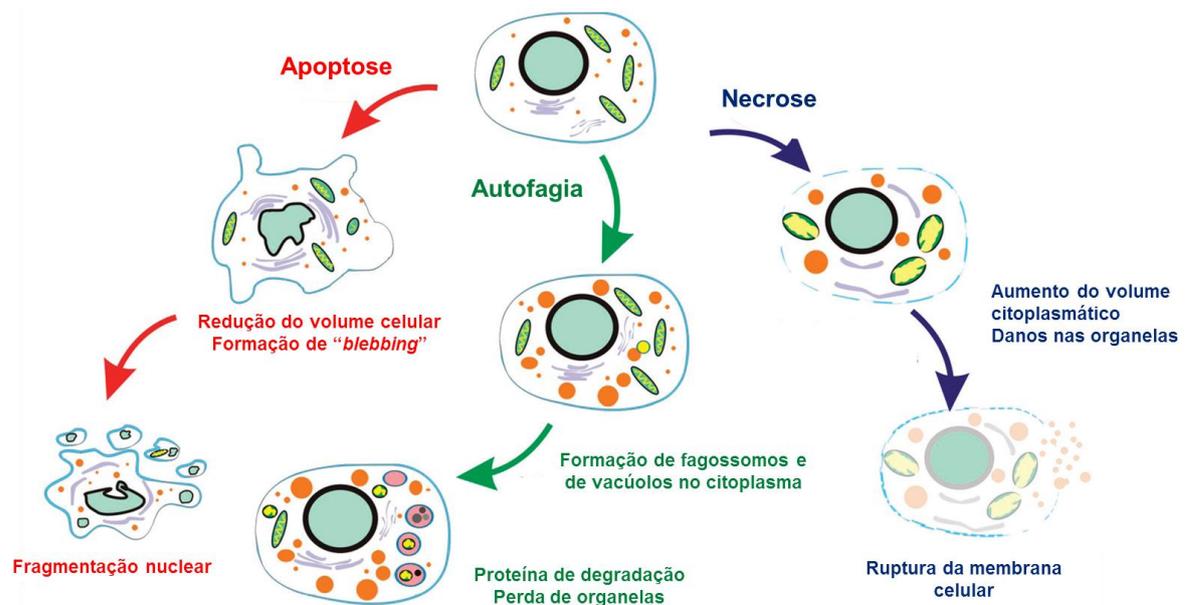


Figura 3. Características morfológicas de apoptose, autofagia e necrose (adaptado de TAN et al., 2014).

Observou-se que a apoptose ocorre espontaneamente em células tumorais, incentivando estudos que confirmaram que a maioria dos agentes quimioterápicos leva à morte celular por apoptose. Esta característica incentivou a procura por novas drogas que promovam especificamente a morte celular por este mecanismo (BURGESS, 2013; FERNANDES et al., 2015; LIU et al., 2015; MONTAGNER et al., 2015). A morte celular por apoptose é um processo bioquimicamente programado a partir de estímulos específicos ou a partir de diversos tipos de danos ou estresse celulares, que podem levar ao câncer (ALMEIDA et al., 2005). Desta forma, falhas no processo de apoptose podem causar o aumento da sobrevivência e proliferação de células tumorais (TAN et al., 2014).

A sinalização da apoptose é dependente de uma cascata enzimática mediada por caspases. As caspases (caspases 3, 6, 7, 8, 9 e 10) pertencem a uma família das proteases, que inicialmente são produzidas nas células na forma de precursores inativos, pró-caspases (zimogênio), que promovem a iniciação e regulação das vias apoptóticas após a clivagem proteolítica (ALBERTS et al., 2010; TAN et al., 2014).

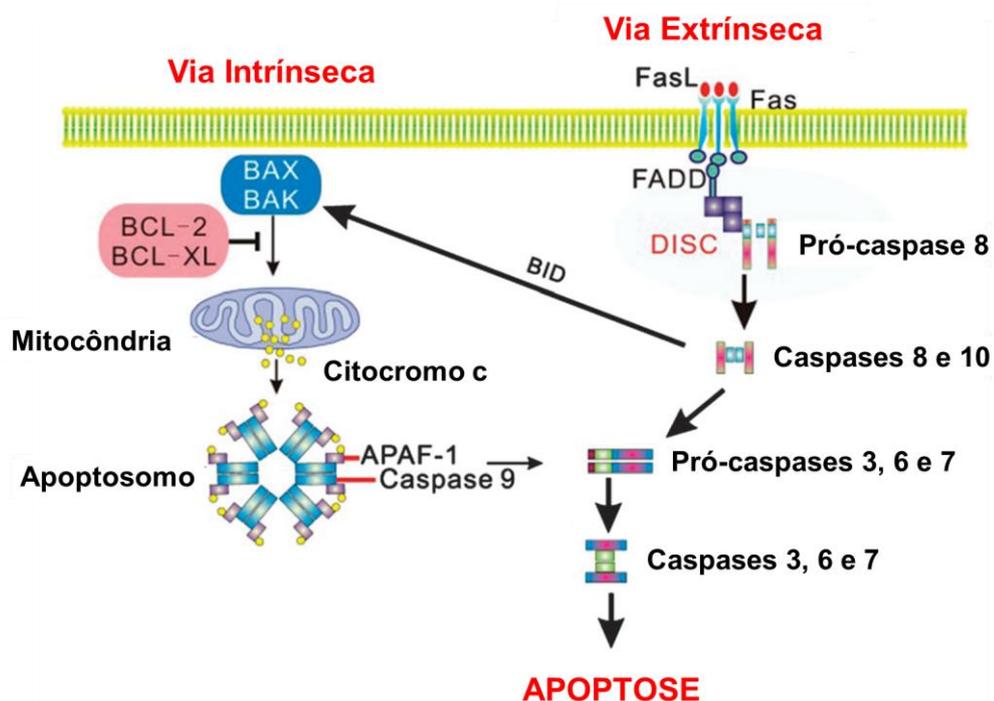


Figura 4. Vias extrínseca e intrínseca da apoptose (adaptado de TAN et al., 2014).

A morte celular por apoptose pode ser iniciada por estímulos extrínsecos ou intrínsecos (Figura 4). A via extrínseca ocorre por sinalização apoptótica externa,

com a ativação de receptores de morte da superfície da membrana celular. Esses receptores pertencem à família de receptores de fator de necrose tumoral (TNFR), sendo o receptor FAS, um dos mais estudados em relação à indução de morte celular por apoptose (ROUVIER et al., 1993; LOCKSLEY et al., 2001; TAN et al., 2014). Assim que estes receptores são ativados por ligantes específicos, ativam de forma imediata a cascata de caspases. Inicialmente, os receptores ativados ligam-se a uma proteína adaptadora, denominada FADD. Esta, por sua vez liga-se, pelo seu domínio efetor de morte, a pró-caspase 8, formando o complexo indutor de morte (DISC). Após a formação do DISC, as caspases 8 e 10 (iniciadoras) são ativadas e se tornam capazes de promover a ativação das caspases 3, 6 e 7 (efetoras), desencadeando, desta forma, o processo de apoptose (FISCHER e SCHULZE-OSTHOFF, 2005; STEFAN et al., 2007; TAN et al., 2014).

Quando a apoptose é iniciada por estímulos intrínsecos (mitocondrial), esta pode ser estimulada por várias formas de estresse celular, como radiação ou agentes químicos. Estes estímulos induzem a transcrição da proteína p53, que promove a transcrição de proteínas apoptóticas. Estas proteínas se subdividem em duas classes, as anti-apoptóticas, como BCL-2 e BCL-XL (fatores de sobrevivência) e as pró-apoptóticas, como BAX, BAK e BAD (fatores de morte) (FISCHER e SCHULZE-OSTHOFF, 2005; JIANG et al., 2007; TAN et al., 2014). A via intrínseca é, geralmente, ativada por sinais extracelulares e fatores internos, como danos ao DNA, regulados por proteínas da família BCL-2 e encontrados na membrana mitocondrial externa. Estas proteínas regulam o extravasamento do citocromo c para o citoplasma. O citocromo c, uma proteína transportadora de elétrons, presente nas cristas mitocondriais, que faz parte da cadeia respiratória (produção aeróbica de ATP). O citocromo c extravasado para o citoplasma forma um complexo com a proteína APAF-1, denominado apoptossomo, na qual promove a ativação da caspase-9. Assim como a caspase 8, a caspase 9 ativa a caspase 3 que, por fim, induz a apoptose da célula (ADAMS e CORY, 1998; ANTONSSON et al., 2000; TAN et al., 2014). Além do citocromo c são liberados da mitocôndria as proteínas SMAC/DIABLO, responsáveis pela inibição das IAPs (proteínas inibidoras de apoptose) (FISCHER e SCHULZE-OSTHOFF, 2005).

A via mitocondrial também pode ser ativada pela via extrínseca através da clivagem da BID, uma proteína pró-apoptótica da família BCL-2 mediada pela caspase 8. A seguir, a BID induz a liberação do citocromo c, além da formação do

apoptossomo e ativação das caspases efetoras (FISCHER e SCHULZE-OSTHOFF, 2005; TAN et al., 2014).

1.2.2. Interação de compostos antitumorais com o DNA

Diversos compostos antineoplásicos utilizados clinicamente tem seu modo de atuação relacionado ao DNA, sendo este um dos alvos mais estudados na busca por novos fármacos antitumorais (BARONE et al., 2013; SIRAJUDDIN et al., 2013; SILVA et al., 2013; DHIVYA et al., 2015; RAGHEB et al., 2015; SU et al., 2015). O estudo da interação das moléculas de potencial quimioterápico com o DNA tornou-se um estudo na interface entre Química, Biologia Molecular e Medicina. A forma de interação das moléculas com o DNA desempenha um importante papel na determinação dos mecanismos de ação e na busca por medicamentos mais eficientes e com menores efeitos colaterais. As moléculas podem alterar e/ou inibir o funcionamento do DNA, causando a morte celular (SIRAJUDDIN et al., 2013).

Um fármaco pode interagir com a molécula de DNA por três formas diferentes conhecidas: (i) interagindo com proteínas de ligação de DNA, tais como polimerases e fatores de transcrição; (ii) interferindo na atividade de transcrição do DNA, o que induz a formação de uma hélice tripla formada por DNA-RNA; e (iii) através da interação de pequenas moléculas da droga de forma direta com o DNA. Neste último caso, a maior parte dos agentes antineoplásicos interagem com o DNA de forma covalente ou não-covalente (BARONE et al., 2013; SIRAJUDDIN et al., 2013).

a) Interações covalentes com o DNA

Os agentes tumorais que interagem covalentemente com o DNA tem como principal característica sua atuação como eletrófilo sobre as macromoléculas nucleofílicas do DNA. Estas ligações são formadas por reações de alquilação com centros nucleofílicos do DNA (principalmente bases purínicas e pirimidínicas), formando ligações cruzadas (“cross-link”) e por isso as moléculas que atuam de forma covalente com o DNA também são chamados de agentes alquilantes. Estas ligações atuam nas fases G_1 e S do ciclo celular, com posterior bloqueio em G_2 . A Figura 5 mostra alguns tipos de ligações cruzadas possíveis com o DNA. As interações covalentes com o DNA são irreversíveis e a formação dos adutos droga/DNA inibe a replicação celular. Existem ainda, agentes alquilantes que não se

ligam diretamente ao DNA, ligando-se a grupos fosfato e proteínas associadas ao DNA (ALMEIDA et al., 2005; BARONE et al., 2013; SIRAJUDDIN et al., 2013).

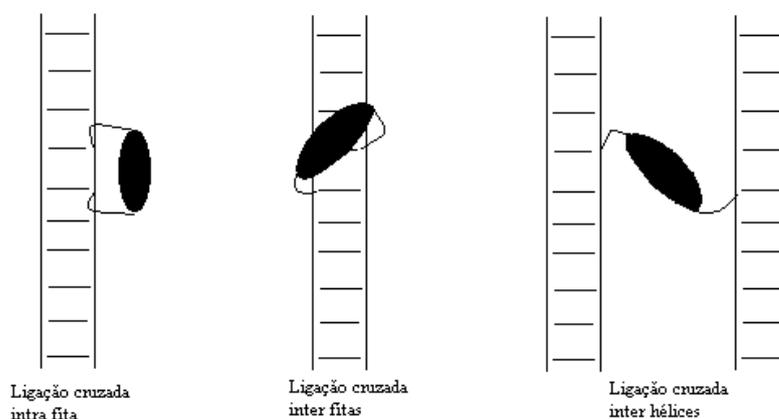


Figura 5. Algumas formas das ligações cruzadas que podem ocorrer entre um agente alquilante e o DNA (ALMEIDA et al., 2005).

Os agentes alquilantes são os antitumorais mais estudados e utilizados da atualidade. O principal sítio de alquilação destes compostos é a posição N7 da guanina, podendo também, em menores proporções, serem ligados nas posições N1 e N3 da adenina, N3 da citosina e O6 da guanina (ALMEIDA et al., 2005). A cisplatina, um famoso quimioterápico, liga-se ao DNA de forma covalente, fazendo ligações cruzadas intra-fitas e inter-fitas através dos nitrogênios (N7) da guanina, além da adenina e citosina do DNA (SIRAJUDDIN et al., 2013).

b) Interações não-covalentes com o DNA

Os agentes de interação não-covalente com o DNA são, geralmente, menos tóxicos. No entanto, estes causam modificações conformacionais e perturbações estruturais no DNA que interferem em importantes funções desta biomolécula, como na sua interação com proteínas e rupturas nos filamentos de DNA. O modo de interação não-covalente com o DNA pode ser classificado em três tipos: ligação de fenda, ligação externa (externo à hélice) e intercalação (BARONE et al., 2013; SIRAJUDDIN et al., 2013).

Os compostos que atuam como agentes intercalantes têm como principal alvo a fenda menor do DNA. Por este mecanismo, os agentes intercalantes se empilham de forma paralela às bases nitrogenadas do DNA, sem a formação de ligações

covalentes e sem quebrar as ligações de hidrogênio existentes entre as bases nitrogenadas. Este se intercala nos pares de bases nitrogenadas C-G (citosina-guanina), com uma interação do tipo π , sendo os agentes intercalantes constituídos, geralmente, por anéis aromáticos, apresentando alta densidade eletrônica (Figura 6). Devido ao volume molecular do agente intercalante, sua interação com as bases nitrogenadas C-G provoca um espaçamento entre as bases C-G de 3,4 Å para cerca de 7 Å, formando um eixo de cerca de 90° em relação ao eixo do DNA (POOT e KILLER, 1995; ALMEIDA et al., 2005; SIRAJUDDIN et al., 2013).

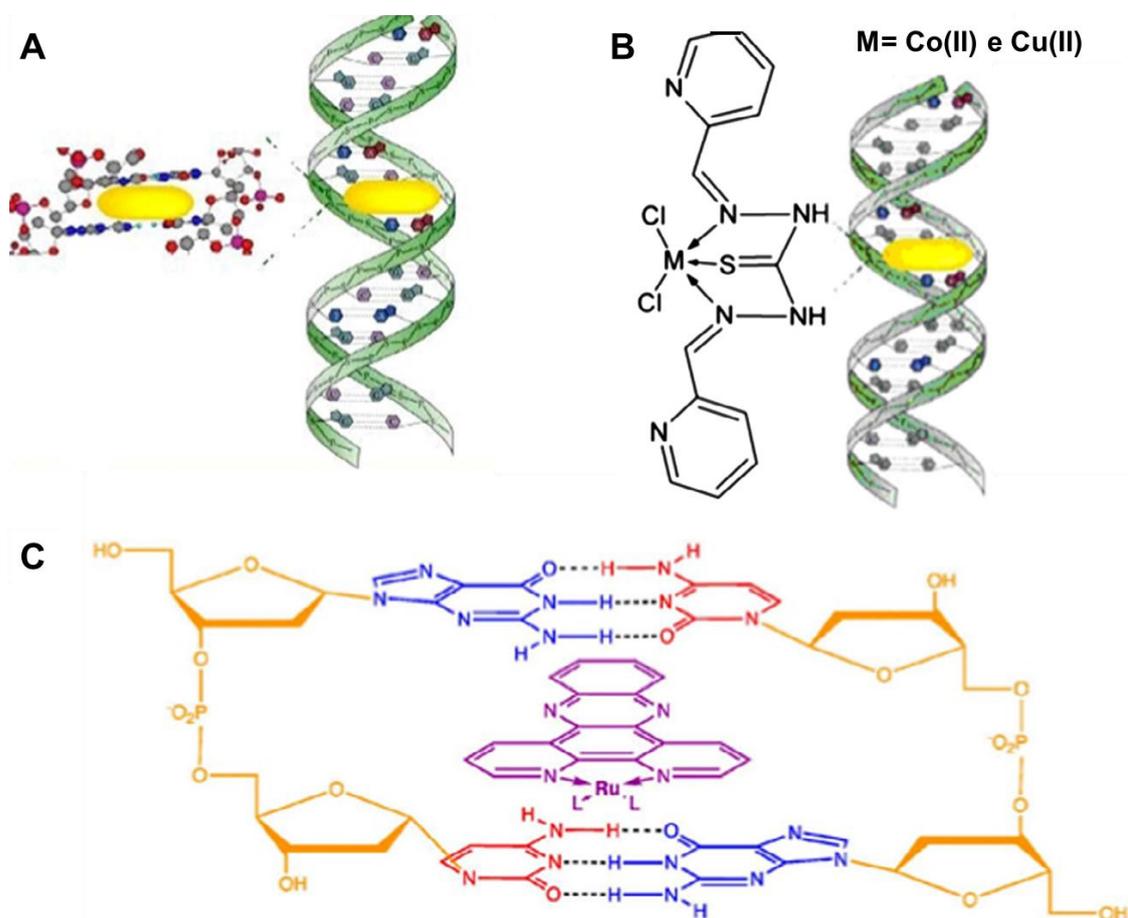


Figura 6. (A) Intercalação de um ligante planar do complexo aos pares de bases de DNA. (B) Intercalação de complexos de Co(II) e Cu(II). (C) complexo de rutênio intercalado ao fragmento de DNA (CG-GC) (Adaptado de SIRAJUDDIN et al., 2013).

Por sua vez, os ligantes de fenda são, geralmente, moléculas com estruturas mais flexíveis em comparação aos agentes intercalantes. A interação com o DNA desse tipo de compostos também acontece em suas fendas, mas causando menores distorções no DNA em relação aos intercalantes. Este tipo de interação

acontece por meio de interações eletrostáticas ou por forças intermoleculares. Já os agentes de ligação externa, interagem de forma eletrostática na estrutura externa à hélice da molécula de DNA (BARONE et al., 2013; SIRAJUDDIN et al., 2013).

1.3. Complexos metálicos com atividade antitumoral

Compostos inorgânicos têm sido utilizados na medicina por muitos séculos, frequentemente sem o conhecimento de suas estruturas ou mecanismos de ação (SCHWIETERT et al., 1999). Neste sentido, destacam-se os compostos de cobre (usados na antiguidade para esterilização), o ouro e o ferro (fabricação de medicamentos) e o zinco (agente cicatrizante) (ORVIG e ABRAMS, 1999; MEDICI et al., 2014).

A partir dos sucessos obtidos na utilização de compostos de coordenação como a cisplatina, no tratamento de câncer, e de compostos de gadolínio e tecnécio como agentes de contraste para RMI (ressonância magnética por imagem), estabeleceram-se as condições para a consolidação de uma nova área de estudo: a química inorgânica medicinal. (PETTINARI et al., 2011; BARRY e SADLER, 2013). Atualmente, um significativo número de compostos contendo metais está sendo testado em ensaios clínicos como agentes antineoplásicos (BARRY e SADLER, 2013).

A química inorgânica medicinal compreende a introdução de um íon metálico em um sistema biológico. Uma característica dos compostos metálicos é tornarem-se catiônicos em solução. A atração de cargas opostas leva a tendência dos compostos metálicos se ligarem ou interagirem com moléculas biológicas, já que a maioria destas é rica em elétrons, tais como proteínas e DNA (WARAD et al., 2013).

1.3.1. Cisplatina e outros complexos de platina na terapia do câncer

O *cis*-diamindicloroplatina(II), também conhecido como cisplatina (Figura 7), é um composto de coordenação sintetizado pela primeira vez por M. Peyrone em 1844, sendo que sua estrutura foi elucidada somente em 1893, por Alfred Werner. Em 1960, Rosenberg verificou que certos produtos de eletrólise, utilizando eletrodos de platina, são capazes de inibir a divisão celular em *Escherichia coli*. Após a descoberta de que o composto *cis*-diamindicloroplatina(II) (cisplatina) seria o agente

responsável pela atividade antimicrobiana observada, surgiu o interesse na investigação deste complexo como agente antitumoral. As propriedades citotóxicas da cisplatina foram descobertas na década de 1960, sendo este o primeiro composto de platina aprovado pela FDA (U.S. Food and Drug Administration) para o tratamento de câncer, em 1978, o que fez despertar o interesse nos complexos de platina(II) e demais complexos metálicos como potenciais fármacos antineoplásicos (ROSENBERG et al., 1965; ROSENBERG et al., 1967; ROSENBERG et al., 1971; ROSENBERG et al., 1999; DASARI et al., 2014).

A cisplatina é clinicamente comprovada para combater diversos tipos de cânceres, incluindo tumores de testículo, ovário, pulmão, cérebro, rins, cabeça e pescoço (SANTINI et al., 2011; ANBU et al., 2012; LI et al., 2014; DASARI et al., 2014; MJOS et al., 2014; DHIVYA et al., 2015). Desde o início do desenvolvimento pré-clínico e clínico da cisplatina como agente quimioterápico, muitos análogos deste composto foram sintetizados e suas atividades citotóxicas testadas. Cerca de treze análogos à cisplatina foram avaliados em ensaios clínicos. A Figura 7 apresenta as estruturas da cisplatina e de alguns de seus análogos (BARRY e SADLER, 2013; DASARI et al., 2014; MJOS et al., 2014).

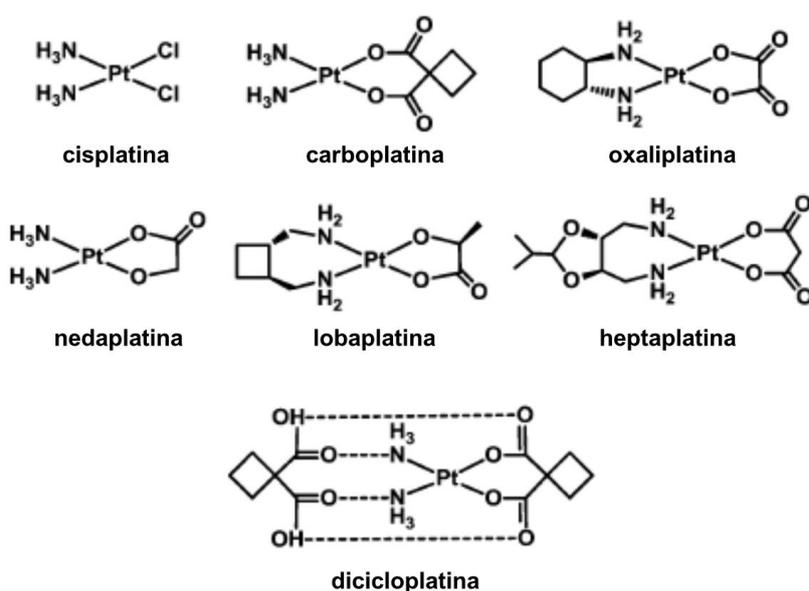


Figura 7. Estruturas dos complexos de platina(II) com atividade antitumoral que foram aprovados ou estão em fase de ensaios clínicos como agentes antineoplásicos (BARRY e SADLER, 2013).

Ao ser administrada via intravenosa, cerca de 90% da cisplatina é transportada para os tecidos ligados a albumina e outras proteínas do plasma. Como

a concentração de íons cloreto no meio extracelular é relativamente alta, a cisplatina é transportada ainda em sua forma inativa. Este transporte para o meio intracelular pode ocorrer por difusão ou pelo transportador de cobre CTR-1. Já dentro da célula, encontramos baixa concentração de cloreto, fazendo com que os cloretos sejam deslocados da cisplatina através de reações com nucleófilos, como a água. Neste estágio, a cisplatina adquire carga positiva, tornando-se ativa como fármaco (Figura 8) (GOODMAN e GILMAN, et al., 2005; DASARI et al., 2014).

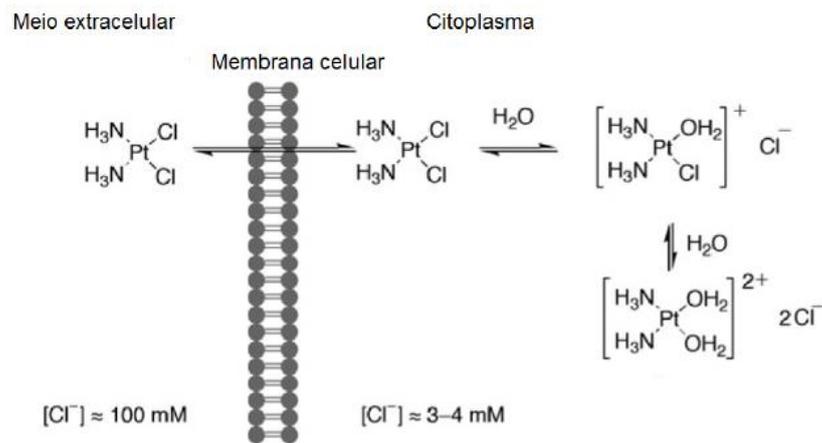


Figura 8. Bioativação intracelular da cisplatina (AVENDAÑO e MENENDEZ, 2008).

Dentro das células, o modo de ação da cisplatina está relacionado à sua capacidade de formar ligações cruzadas (alquilação) do tipo interfilamentares e intrafilamentares com o DNA. O principal sítio de ação da cisplatina é o N7 da guanina, embora também ocorra interação com a adenosina e citosina. Assim, este quimioterápico interfere no mecanismo de reparo e causa danos ao DNA e, conseqüentemente, induz a apoptose em células cancerosas (BARRY e SADLER, 2013; SIRAJUDDIN et al., 2013; DASARI et al., 2014; MJOS et al., 2014). Além deste, vários mecanismos moleculares de ação também estão relacionados à cisplatina, incluindo:

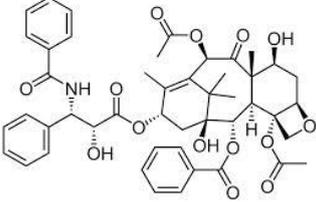
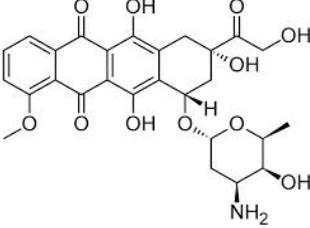
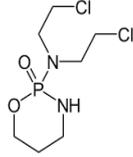
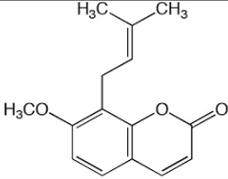
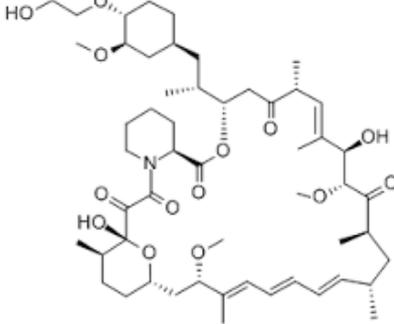
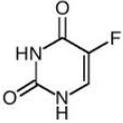
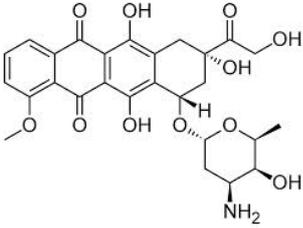
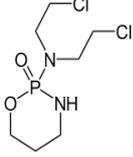
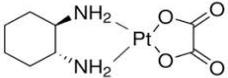
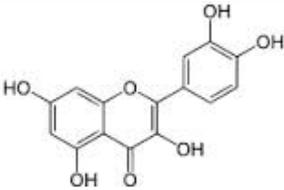
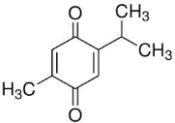
- indução de estresse oxidativo, caracterizada pela produção de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e redução do potencial da membrana mitocondrial;
- indução da sinalização da p53, que é uma proteína supressora tumoral, e parada do ciclo celular;
- diminuição da regulação de proteínas proto-oncogênese e proteínas anti-apoptóticas;

- ativação das vias intrínseca e extrínseca da morte celular por apoptose (DASARI et al., 2014; MJOS et al., 2014).

Ao se tratar células e tecidos com a cisplatina pode-se observar, além da morte celular por apoptose, a necrose e a autofagia, sendo a primeira a principal forma de morte celular resultante da citotoxicidade induzida pela cisplatina e seus análogos (JOHNSTONE et al., 2002; ANBU et al., 2012; SANTINI et al., 2011; DASARI et al., 2014; LI et al., 2014; TAN et al., 2014).

O surgimento de tumores resistentes é um dos principais problemas na utilização clínica da cisplatina e seus análogos. Mesmo cânceres sensíveis à cisplatina podem desenvolver resistência durante o tratamento com esta droga. Outro fator indesejável na terapia com a cisplatina são os efeitos colaterais, que incluem a toxicidade renal e gastrointestinal, hepatotoxicidade, ototoxicidade, danos neurotóxicos e cardiotoxicos (KALUDEROVIC et al., 2011; ANBU et al., 2012; WARAD et al., 2013; KONARIKOVA et al., 2013; LI et al., 2014; DASARI et al., 2014; DHIVYA et al., 2015). Além disso, apesar do câncer ser um dos principais problemas da sociedade e um dos alvos primários estudados pela química medicinal, os mecanismos celulares pelos quais os agentes antineoplásicos atuam não estão totalmente compreendidos (KALUDEROVIC et al., 2011). Estes fatores justificam a combinação da terapia da cisplatina com outras drogas (Tabela 1), a fim de potencializar o seu efeito citotóxico (DASARI et al., 2014), assim como a busca por novas drogas com significativa atividade antitumoral e reduzidos efeitos colaterais.

Tabela 1. Combinação da cisplatina com algumas outras drogas na terapia de diversos tipos de câncer (DASARI et al., 2014).

Droga combinada e tipo de câncer	Estruturas					
Paclitaxel: Ovário, mama, pulmão, melanoma, cabeça e pescoço						
Doxorubicina e ciclofosfamida: Glândula salivar			Doxorubicina	ciclofosfamida		
Osthole: Pulmão						
Everilimus: Câncer de bexiga urotelial						
Fluorouracila, doxorubicina e ciclofosfamida: Glândula salivar				Fluorouracila	Doxorubicina	ciclofosfamida
Oxaliplatina, quercetina e timoquinona: Ovário				Oxaliplatina	quercetina	timoquinona

1.3.2. Desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer que não contém platina

Os complexos de platina não são os únicos compostos de coordenação utilizados no tratamento do câncer. A descoberta da atividade citotóxica de complexos com outros metais, como ferro, paládio, cobre, ouro, ósmio, irídio, zinco, gálio, cobalto, rutênio e titânio, também tem ampliado o leque de íons metálicos que vêm sendo estudados para este fim. Busca-se, com estes estudos, a minimização dos efeitos colaterais associados aos fármacos, bem como o aumento da atividade citotóxica dos mesmos (HORN et al., 2013; CHEWA et al., 2014; FERNANDES et al., 2014; FISCHER-FODOR et al., 2014; SARIOGLU et al., 2014; STEINER et al., 2014; ZHANG et al., 2014; TAN et al., 2014; DHIVYA et al., 2015; MONTAGNER et al., 2015; MOREIRA, 2015; QIU et al., 2015; MORCELLI et al., 2016). Além dos compostos de platina, existem compostos de rutênio (NAMI-A e KP1019), titânio (titanoceno) e gálio ($\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, Ga-maltolato e KP46) que estão na fase de ensaios clínicos para o tratamento contra o câncer (BARRY e SADLER, 2013; TAN et al., 2014). A Figura 9 apresenta alguns exemplos de compostos de coordenação com atividade antitumoral, incluindo os que estão em fase de ensaios clínicos.

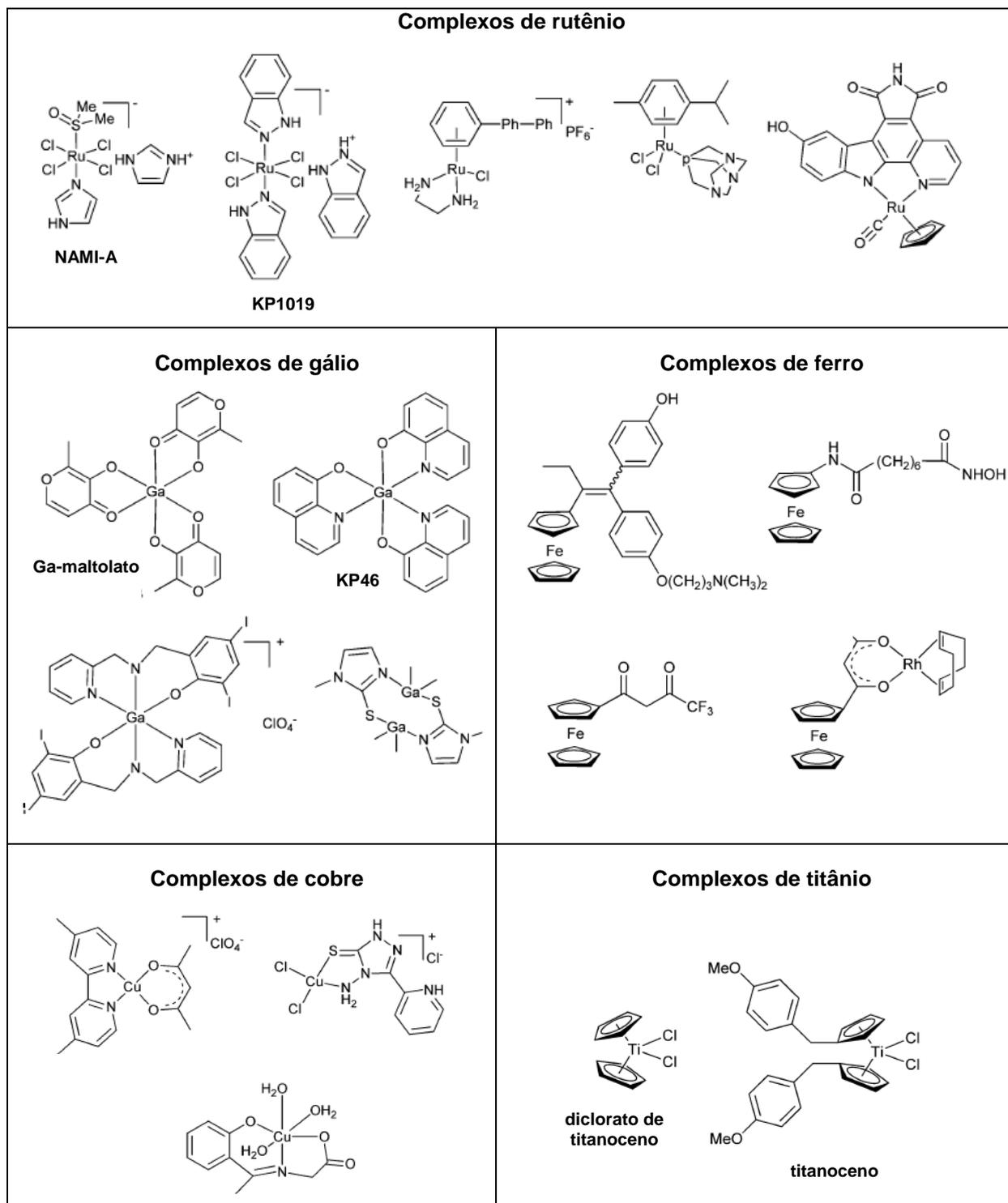


Figura 9. Seleção de agentes antineoplásicos contendo metais (adaptado de TAN et al., 2014).

Nos estudos das propriedades antineoplásicas de outras drogas a base de metais são postuladas várias propostas para seus mecanismos de ação. A partir destes estudos, podemos constatar que o metal e os ligantes coordenados ao metal têm grande influência na atividade citotóxica dos respectivos complexos metálicos, variando fatores importantes como a natureza lipofílica ou hidrofílica e reatividade

biológica dos compostos (STEINER et al., 2014; DHIVYA et al., 2015). Neste trabalho, foi estudada a influência na atividade antineoplásica dos íons cobre(II) e gálio(III) quando complexados a quatro ligantes N,O-doadores.

a) Atividade antitumoral de novos complexos de cobre(II)

Um metal que merece atenção no estudo da atividade antitumoral é o cobre. Este metal é considerado um elemento traço essencial para uma grande parte das espécies de animais. Nos humanos, este elemento está associado a vários processos bioquímicos, participando da estrutura e função de um grande número de metaloenzimas, como a superóxido dismutase e citocromo oxidase. Além disso, a atividade deste íon sobre espécies reativas de oxigênio tem demonstrado influência no desenvolvimento e potencial citotóxico de tumores. Pesquisas mostram que complexos contendo cobre(II) estão em crescente desenvolvimento na pesquisa de novos agentes quimioterápicos (LI et al., 2014; SHAO et al., 2014; STEINER et al., 2014; TAN et al., 2014; DHIVYA et al., 2015; QIU et al., 2015).

O complexo de cobre(II), $[\text{Cu}_3(\text{p-3-bmb})_2\text{Cl}_4(\text{CH}_3\text{OH})_2]_n$, onde p-3-bmb= 1[(2-(piridina-3-il)-1H-benzoimidazol-1-il)metil]-1Hbenzotriazol (Figura 10) (ZHAO et al., 2013), foi recentemente investigado quanto a sua atividade antitumoral, *in vitro* e *in vivo* (LI et al., 2014).

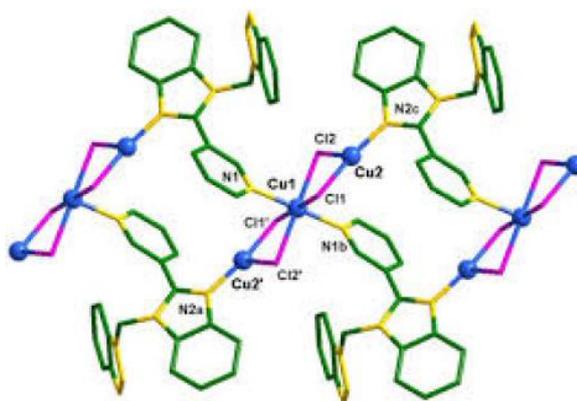


Figura 10. Estrutura para o complexo de cobre(II), $[\text{Cu}_3(\text{p-3-bmb})_2\text{Cl}_4(\text{CH}_3\text{OH})_2]_n$, onde p-3-bmb= 1[(2-(piridina-3-il)-1H-benzoimidazol-1-il)metil]-1Hbenzotriazol (LI et al, 2014).

A atividade citotóxica do complexo contra as linhagens tumorais humanas HeLa (colo de útero) e SGC-7901 (estômago) foi avaliada via metabolização de MTT

(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tretazólio) (Figura 11). Os valores de IC_{50} (Índice de Citotoxicidade de 50%) foram de 24,2 e 27,64 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para HeLa e SGC-7901, respectivamente, para um período de incubação de 24 h. Observa-se para o tempo de incubação de 72 horas valores de IC_{50} de 7,18 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (HeLa) e 8,35 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (SGC-7901), o que demonstra a dependência da atividade do complexo com o tempo de incubação (LI et al., 2014).

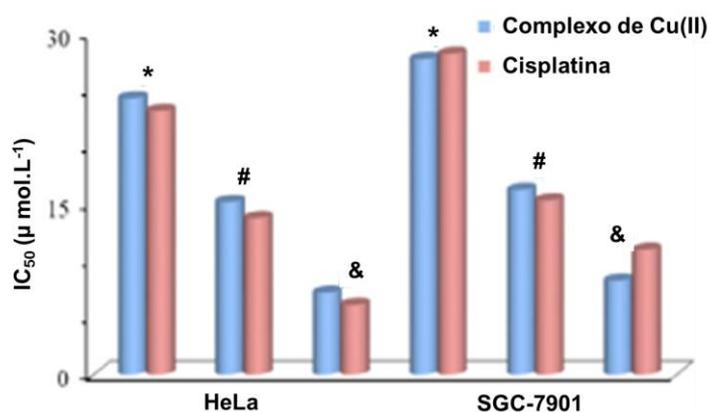


Figura 11. Efeito do complexo de cobre(II) na viabilidade, por MTT, das linhagens celulares HeLa e SGC-7901. Tempo de incubação: (*) 24h, (#) 48h e (&) 72h (LI et al., 2014).

A avaliação do ciclo celular sugere que o complexo de cobre(II) favorece o posicionamento das células tumorais na fase G1. Além disso, observou-se que a relação entre as concentrações das proteínas BCL-2 e BAX foi diminuída, com consequente aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), diminuição do potencial de membrana mitocondrial, liberação de citocromo c e ativação intrínseca (mitocondrial) das caspases 3 e 9. Estes fatores indicam o desencadeamento da morte celular por apoptose (LI et al., 2014).

Os estudos *in vitro* impulsionaram as investigações *in vivo* deste complexo de cobre(II). Para os experimentos *in vivo* foi utilizada a linhagem de sarcoma S180 (câncer de músculo), inoculado em murinos. Após 7 dias de tratamento com o complexo de cobre(II) (1, 5 e 10 mg kg^{-1}) e com a cisplatina (1 mg kg^{-1}) foi observada uma significativa diminuição do crescimento do tumor (Tabela 2) (LI et al., 2014).

Além disso, com a continuação do tratamento por 20 dias, foi observado que o complexo de cobre(II) (10 mg kg^{-1}) aumenta a taxa de sobrevivência dos animais em até 69,64% em relação ao controle. Esses resultados sugerem que o complexo de cobre(II) é um potencial agente anticancerígeno (LI et al., 2014).

Tabela 2. Inibição da massa tumoral da linhagem celular inoculada em murinos após tratamento com o complexo de cobre(II) $[\text{Cu}_3(\text{p-3-bmb})_2\text{Cl}_4(\text{CH}_3\text{OH})_2]_n$ (adaptado de LI et al., 2014).

	Dosagem	Massa tumoral inicial (g)	Massa tumoral final (g)	Massa tumoral inicial/ Massa tumoral final	Inibição (%)
NaCl	0,9%	18,23±1,59	31,88±2,12	1,75±0,29	-
Complexo de Cobre(II)	10 mg/kg	18,01±1,12	26,79±2,01	1,49±0,22	14,89
	5 mg/kg	18,23±1,22	27,59±2,42	1,51±0,25	13,71
	1 mg/kg	18,54±1,33	30,25±2,32	1,63±0,26	6,86
Cisplatina	1 mg/kg	18,42±1,21	28,59±1,61	1,55±0,20	11,43

Qiu e colaboradores estudaram a atividade antitumoral do complexo de cobre(II) $[\text{Cu}(\text{IPrDP})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Figura 12), contra as linhagens tumorais humanas U2OS (osteossarcoma), A549 (pulmão), HCT116 (cólón), MDA-MB-231 (mama) e HepG2 (fígado) (QIU et al., 2015).

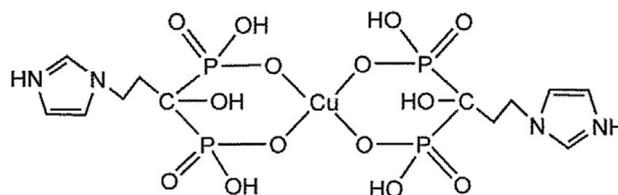


Figura 12. Estrutura para o complexo $[\text{Cu}(\text{IPrDP})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (QIU et al., 2015).

Analisando o experimento de viabilidade celular das cinco linhagens tumorais humanas quando incubadas com o complexo de cobre(II) $[\text{Cu}(\text{IPrDP})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, podemos afirmar que este exibiu efeito citotóxico promissor e comparável à cisplatina contra a linhagem de câncer de cólon HCT116 (Tabela 3) (QIU et al., 2015).

Tabela 3. Citotoxicidade (IC_{50} , $\mu\text{mol L}^{-1}$) do complexo $[\text{Cu}(\text{IPrDP})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ contra cinco linhagens tumorais humanas em comparação com a cisplatina* (QIU et al., 2015).

Composto	Linhagem celular				
	U2OS	A549	HCT116	MDA-MB-231	HepG2
$[\text{Cu}(\text{IPrDP})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (48 h)	54,33±3,84	48,49±2,99	16,05±1,16	48,96±2,01	41,38±0,57
$[\text{Cu}(\text{IPrDP})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (72 h)	44,65±1,47	38,30±1,00	11,16±0,52	36,09±1,39	37,66±0,91
Cisplatina (48 h)	11,04±0,34	19,85±1,49	16,28±0,44	29,94±1,65	6,78±0,54
Cisplatina (72 h)	10,82±0,37	15,38±0,58	11,80±0,26	14,05±1,01	5,63±0,34

*Valores de IC_{50} determinados por viabilidade celular (MTT) a partir de três experimentos isolados.

A análise da distribuição do ciclo celular das linhagens tumorais indica que após tratamento com o complexo $[\text{Cu}(\text{IPrDP})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, as células foram posicionadas na fase G2/M, uma característica semelhante àquela apresentada pela ação da cisplatina contra mesmas linhagens.

A interação do complexo $[\text{Cu}(\text{IPrDP})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ com CT-DNA (DNA de timo de vitelo) foi realizada através do estudo do espectro de absorção. A constante de ligação (K_b) do complexo foi determinada por titulação por absorção e a subsequente análise de regressão linear. Na Figura 13, podemos observar um efeito hipocrômico e um ligeiro efeito batocrômico (~4nm) próximo a 260 nm no espectro de absorção do complexo, o que é atribuído à sua intercalação ao DNA. O valor de K_b ($1,23 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) obtido sugere uma força de afinidade moderada. O estudo de dicroísmo circular corroborou os experimentos de absorção sobre a moderada interação por intercalação do complexo de cobre(II) com o DNA, estudo este importante para a investigação do modo de ação do composto com as células tumorais (QIU et al., 2015).

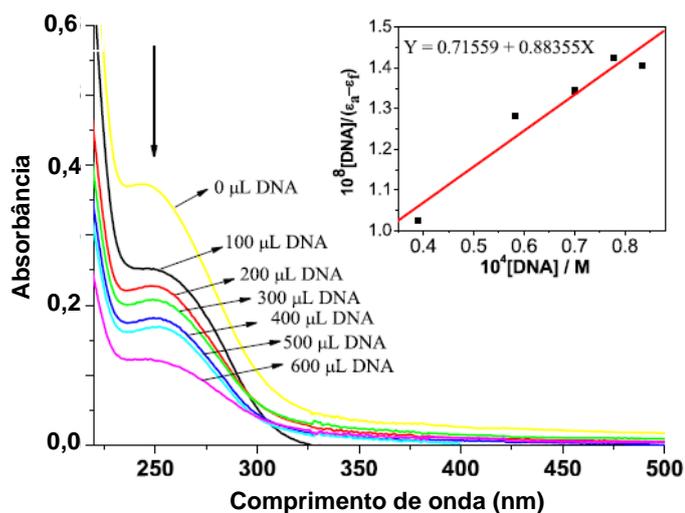


Figura 13. Espectros de absorção do complexo $[\text{Cu}(\text{IPrDP})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ na ausência e presença de incrementos de CT-DNA (QIU et al., 2015).

O efeito da complexação do íon cobre(II), $[\text{Cu}(\text{L})(\text{dppz})]\text{ClO}_4$, onde HL= 2-[(2-dimetilaminoetilimina)metil]fenol e dppz= dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (Figura 14) (JAIVIDHYA et al., 2012), sobre linhagens tumorais foi estudada por Dhivya e colaboradores. A viabilidade celular do complexo de cobre(II) contra as linhagens tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-231 foi estudada após os tempos de incubação de 24 e 48 horas (Tabela 4). O complexo foi capaz de afetar a viabilidade celular de ambas as linhagens de forma significativa e com valores de IC_{50} muito menores que para a cisplatina (controle positivo). O íon Cu^{2+} livre em solução não resultou em atividade citotóxica significativa, mostrando que a complexação é indispensável para a atividade do composto (DHIVYA et al., 2015).

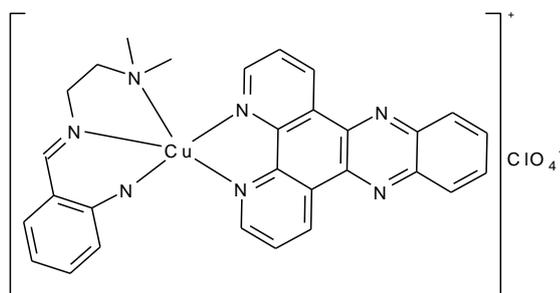


Figura 14. Estrutura do complexo $[\text{Cu}(\text{L})(\text{dppz})]\text{ClO}_4$ (DHIVYA et al., 2015).

Tabela 4. Concentração inibitória (IC_{50} , $\mu\text{mol L}^{-1}$) do complexo de cobre(II), $[\text{Cu(L)(dppz)}]\text{ClO}_4$ e cisplatina contra duas linhagens tumorais de mama (DHIVYA et al., 2015).

Composto	MCF-7 (IC_{50} , $\mu\text{mol L}^{-1}$)		MDA-MB-231 (IC_{50} , $\mu\text{mol L}^{-1}$)	
	24h	48h	24h	48h
$[\text{Cu(L)(dppz)}]\text{ClO}_4$	$0,65\pm 0,01$	$0,59\pm 0,01$	$1,40\pm 0,05$	$0,96\pm 0,02$
Cisplatina	$28,2\pm 1,1$	$24,90\pm 1,21$	$39,4\pm 1,3$	$36,9\pm 0,9$
CuCl_2	>30	>30	>30	>30

Três experimentos independentes, cada um em triplicata.

Através da técnica de fluorescência utilizando os corantes laranja de acridina e brometo de etídio, os autores estudaram a morfologia das células após 24 e 48 horas de tratamento com o complexo (Figura 15). Podemos observar que o complexo induz de forma majoritária a morte celular por apoptose, apesar da necrose também ocorrer de forma significativa. Demais estudos, como potencial da membrana mitocondrial, liberação de caspases, ativação de proteínas pró-apoptóticas (p53, BAX e BCL-2), sugerem que o complexo $[\text{Cu(L)(dppz)}]\text{ClO}_4$ induz uma via intrínseca de morte celular por apoptose nas linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 (DHIVYA et al., 2015).

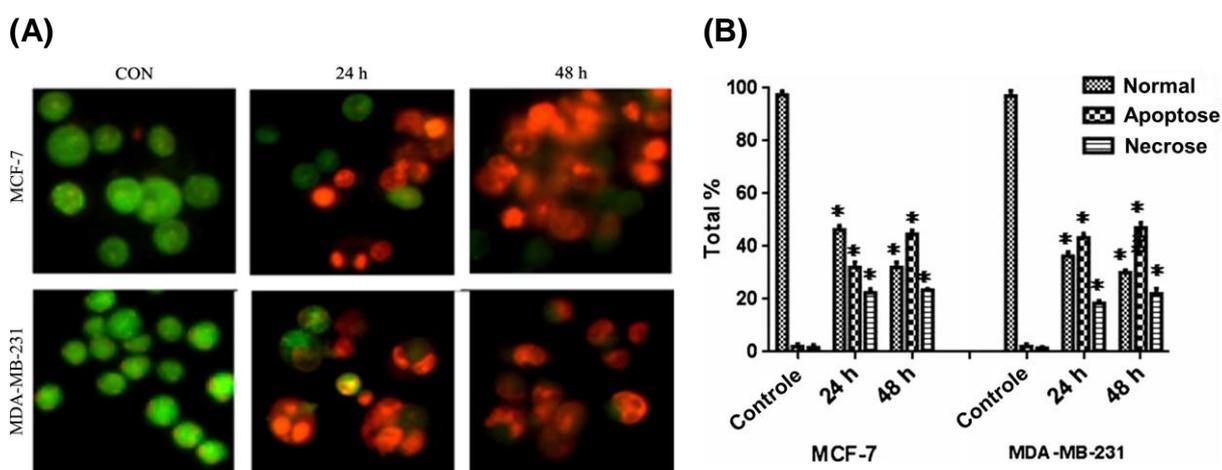


Figura 15. (A) Alterações fisiológicas das linhagens tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-231 quando tratadas com $[\text{Cu(L)(dppz)}]\text{ClO}_4$ em relação ao controle (CON), coradas com laranja de acridina e brometo de etídio. (B) Porcentagem de células normais, apoptóticas e necróticas com 24 e 48 horas de tratamento com $[\text{Cu(L)(dppz)}]\text{ClO}_4$ (* $p < 0,05$) (DHIVYA et al., 2015).

b) Atividade antitumoral de novos complexos de gálio(III)

O gálio(III) é um dos íons metálicos que está em crescente estudo em relação à sua atividade antineoplásica. Este elemento é classificado como não-essencial para os animais, no entanto, tem mostrado atividade terapêutica contra vários tipos de câncer (FISCHER-FODOR et al., 2014; SARIOGLU et al., 2014; OYEWUMI et al., 2014; TAN et al., 2014). O gálio é o segundo metal em resultados com fins quimioterápicos. A partir do seu promissor potencial antineoplásico, o nitrato de gálio(III), foi introduzido em ensaios clínicos na década de 80. Este é utilizado no tratamento de câncer de bexiga e linfoma não-Hodgkin. Os compostos de gálio(III) Ga-maltolato e KP46 (Figura 9) também encontram-se na fase de ensaios clínicos no tratamento de câncer (FISCHER-FODOR et al, 2014; SARIOGLU et al, 2014).

Estudos sugerem que o gálio(III) apresente um comportamento bioquímico semelhante ao do ferro(III), devido a semelhanças em seus raios iônicos, eletronegatividades e afinidades eletrônicas. Apesar destas semelhanças, o gálio(III) leva a efeitos fisiológicos distintos dos encontrados para compostos de ferro(III), já que o gálio(III) apresenta natureza redox inerte, o que o impede de participar de reações redox de importância biológica, levando ao bloqueio de ciclos biológicos envolvendo o ferro(III) (VERANI et al., 2012; SARIOGLU et al, 2014). Por sua semelhança ao ferro(III), nos compostos de gálio(III) clinicamente testados, o íon metálico pode ser transportado para o interior celular através da ligação com a transferrina (FISCHER-FODOR et al, 2014).

A fim de verificar a potencialização da atividade citotóxica na complexação do ligante HL= 2-(benzotiazol-2-il-hidrazonometil)-6-metóxfenol, Machado e colaboradores estudaram a atividade do complexo de gálio(III) $[Ga(L)_2](NO_3)$ (Figura 16), e do seu ligante (HL) contra as linhagens tumorais A2780 (ovário), MCF-7 (mama) e PC3 (próstata) (MACHADO et al., 2014).

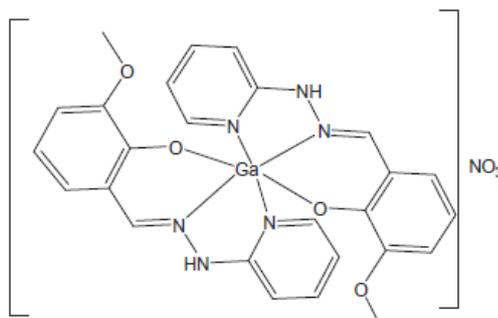


Figura 16. Proposta de estrutura para o complexo de gálio(III) $[Ga(L)_2](NO_3)$ (MACHADO et al., 2014).

A atividade citotóxica do complexo foi avaliada através do experimento de viabilidade celular (Tabela 5), na qual podemos constatar que a complexação promoveu um aumento da atividade em relação ao ligante (HL). Além disso, observa-se que o complexo possui uma melhor citotoxicidade que a cisplatina, utilizada como controle positivo, nas linhagens MCF-7 e PC3 (MACHADO et al., 2014).

Tabela 5. Atividade citotóxica (IC_{50}) do complexo de gálio(III) $[Ga(L)_2](NO_3)$ contra as linhagens celulares tumorais A2780 (ovário), MCF-7 (mama) e PC-3 (próstata) após 72 horas de incubação (MACHADO et al., 2014).

Composto	IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		
	A2780	MCF-7	PC3
HL	$3,0 \pm 1,6$	$4,9 \pm 0,6$	$9,4 \pm 2,9$
$[Ga(L)_2](NO_3)$	$1,7 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,8$	$9,3 \pm 2,0$
Cisplatina	$2,5 \pm 0,3$	$28,0 \pm 6,0$	$51,0 \pm 7,0$

Foi estudada a citotoxicidade de dois complexos de gálio(III), **(1)** e **(2)** (Figura 17) contra a linhagem celular de carcinoma de ovário, A2780, e contra uma linhagem análoga, mas resistente à cisplatina, A2780cis (FISCHER-FODOR et al., 2014).

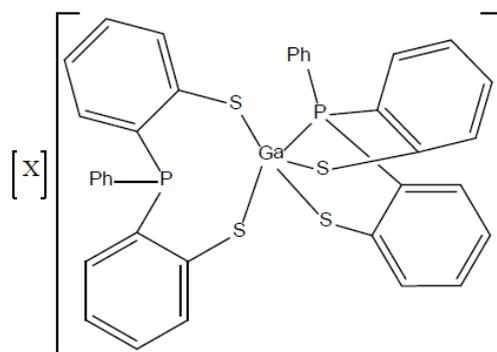


Figura 17. Estruturas dos complexos de gálio(III), **(1)** e **(2)**, onde $X = NH_4^+$ para o complexo **(1)** e PPh_4^+ para o complexo **(2)** (FISCHER-FODOR et al., 2014).

A citotoxicidade *in vitro* dos complexos **(1)** e **(2)** contra as linhagens de câncer de ovário foram avaliadas por método colorimétrico (MTT) (Figura 18). A carboplatina foi utilizada como referência positiva, já que este composto é utilizado

como medicamento quimioterápico padrão para câncer de ovário e possui modo de ação semelhante à cisplatina. Os valores de IC_{50} calculados através deste experimento mostram que os complexos **(1)** e **(2)** apresentam atividade similar à carboplatina contra linhagem A2780, mas valores de IC_{50} muito inferiores à carboplatina contra a linhagem resistente à cisplatina A2780cis. O efeito citotóxico é atribuído ao complexo já que os cátions NH_4^+ e PPh_4^+ , não demonstraram atividade significativa quando utilizados como controle no experimento (FISCHER-FODOR et al., 2014).

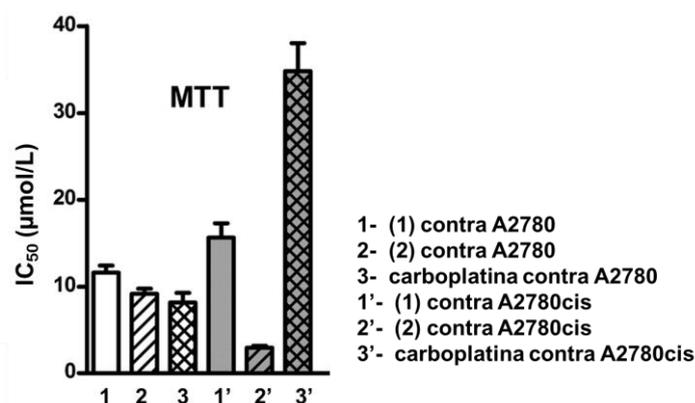


Figura 18. Citotoxicidade e correspondentes valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) dos compostos **(1)**, **(2)** e carboplatina contra as linhagens de carcinoma de ovário A2780 e A2780cis (adaptado de FISCHER-FODOR et al., 2014).

A análise morfológica da linhagem A2780cis mostra que houve modificações na cultura celular após tratamento com os complexos **(1)** e **(2)** (Figura 19). Foi observado que, além da proliferação celular mais lenta e perda de adesão, as células apresentaram morfologia diferente quando tratadas com os complexos de gálio(III), como formação de vacúolos e matriz mitocondrial rarefeita, modificações típicas da morte celular por apoptose (FISCHER-FODOR et al., 2014).

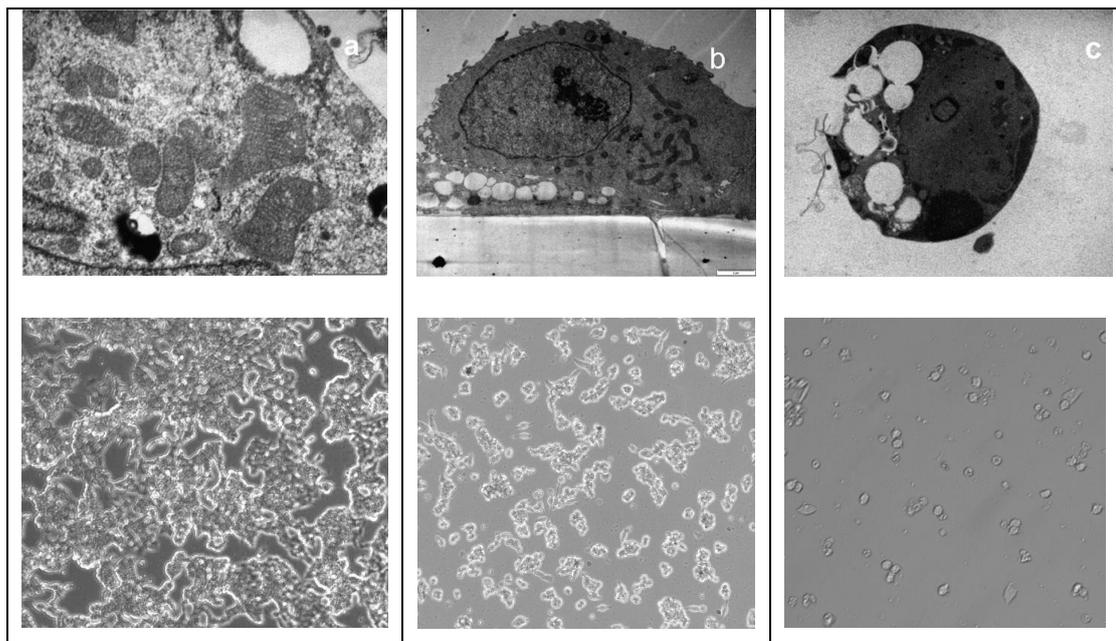


Figura 19. Imagens da linhagem celular A2780cis em microscópio eletrônico de transmissão após 24 horas de incubação (acima) e em microscópio ótica de contraste de fase (abaixo). **(a)** células não-tratadas; **(b)** células tratadas com o complexo **(1)** na concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$; **(c)** células tratadas com o complexo **(2)** na concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (FISCHER-FODOR et al., 2014).

Além disso, observou-se através do experimento de eletroforese em gel de agarose que os complexos têm a capacidade de causar modificações no DNA das células cancerosas, através de sua clivagem. Os autores concluem que o complexo **(2)** pode representar uma alternativa para as drogas contendo platina no tratamento de câncer de ovário, podendo atuar sozinho ou em combinação, a fim de melhorar a atividade de quimioterápicos já existentes (FISCHER-FODOR et al., 2014).

Os complexos de gálio(III), di e tetranucleares (complexos **(1)-(10)**), mostrados na Figura 20, foram estudados como potenciais agentes terapêuticos para o tratamento de carcinoma escamoso de pescoço e cabeça (KALUDEROVIĆ et al., 2011).

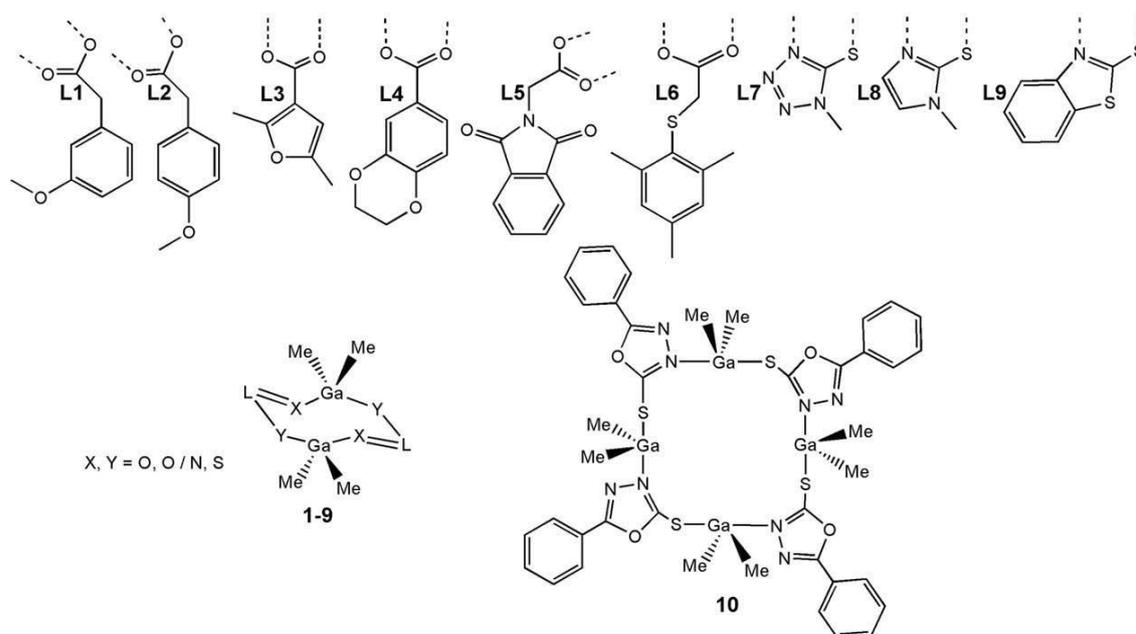


Figura 20. Complexos de gálio (III) **(1)-(10)** (GÓMEZ-RUIZ et al., 2009; KALUDEROVIC et al., 2010).

A atividade antiproliferativa dos complexos de gálio foi avaliada contra as linhagens de células cancerosas: HN (palato mole), Cal27 e Cal33 (língua) e FaDu (hipofaringe) (Tabela 6). Estes demonstraram elevada atividade quando comparados ao composto de referência, $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, e atividade igual ou inferior à cisplatina, controle positivo. As maiores atividades foram observadas contra linhagens Cal27 e Cal33. O complexo **(8)** demonstrou a maior citotoxicidade de todos os compostos da série, possuindo atividade comparável a da cisplatina contra a linhagem celular Cal27, com IC_{50} de $4,6 \text{ mol L}^{-1}$ para a cisplatina e para o complexo **(8)** (KALUDEROVIĆ et al., 2011).

Tabela 6. Valores de IC_{50}^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$) após 96 h de incubação dos complexos **(1)-(10)**, nitrato de gálio (III) e cisplatina contra as linhagens de células cancerosas: HN (palato mole), Cal27, Cal33 (língua) e FaDu (hipofaringe), determinados por análise colorimétrica (KALUDEROVIĆ et al., 2011).

Compostos	$IC_{50} \pm DP$			
	HN	Cal27	Cal33	FaDu
1	15,28 ± 1,42	14,98 ± 1,62	18,52 ± 1,59	18,43 ± 0,63
2	16,27 ± 1,41	15,25 ± 1,81	20,35 ± 3,61	15,88 ± 0,88
3	15,31 ± 1,36	13,58 ± 1,23	19,38 ± 3,31	16,35 ± 0,24
4	10,77 ± 1,93	10,62 ± 0,8	13,86 ± 1,48	14,27 ± 0,12
5	12,37 ± 2,73	12,10 ± 1,18	16,34 ± 1,47	15,74 ± 0,13
6	13,81 ± 2,16	11,63 ± 0,88	14,19 ± 1,41	15,37 ± 0,16
7	10,92 ± 2,04	9,18 ± 0,14	11,41 ± 1,26	12,04 ± 0,11
8	7,88 ± 0,22	4,63 ± 0,36	4,62 ± 0,38	4,33 ± 0,11
9	21,98 ± 2,56	19,14 ± 2,88	29,92 ± 1,91	25,55 ± 3,25
10	14,03 ± 2,52	12,79 ± 1,78	17,43 ± 1,42	19,37 ± 0,66
Ga(NO₃)₃	> 100	> 100	>100	>100
Cisplatina	1,54 ± 0,06	4,61 ± 0,11	2,48 ± 0,20	1,33 ± 0,39

^aValores médios ± DP (desvio padrão) a partir de três experimentos.

Para os complexos mais promissores, **(3)**, **(5)** e **(8)**, foram realizados estudos do processo de morte celular, ativação das caspases e análise do ciclo celular estabelecendo informações sobre o mecanismo de ação destes compostos contra as linhagens Cal27 e FaDu. Observou-se que para os compostos, a indução de morte celular por apoptose contra a linhagem Cal27 é independente da ativação das caspases, após 4 horas de incubação. Constatou-se também que, apesar dos compostos não interromperem o ciclo celular, provocaram significativo aumento do número de células apoptóticas, com concomitante declínio de todas as fases do ciclo celular. Por outro lado, constatou-se que a citotoxicidade induzida em células FaDu pelos compostos é mediada pela ativação extrínseca das caspases 3 e 8. Assim, os estudos para esta linhagem indicam que o provável mecanismo de morte celular envolve alterações em seu ciclo celular (KALUDEROVIĆ et al., 2011).

2. JUSTIFICATIVA

O câncer está entre as principais causas de morte em todo o mundo. Assim, a necessidade de melhorar o tratamento desta doença é uma preocupação permanente da Química Medicinal. Apesar de esta área ser, tradicionalmente, dominada pela química orgânica (FISCHER-FODOR et al., 2014), após a revisão da literatura exposta neste trabalho, torna-se claro que os compostos de coordenação estão em crescente foco no estudo da atividade antineoplásica de diversos tipos de tumores. Com base nos estudos *in vitro*, muitos compostos estão sendo levados para os estudos *in vivo*, apresentando resultados satisfatórios (HORN et al., 2013; CHEWA et al., 2014; FERNANDES et al., 2014; FISCHER-FODOR et al., 2014; SARIOGLU et al., 2014; STEINER et al., 2014; ZHANG et al., 2014; TAN et al., 2014; BORGES et al., 2016; DHIVYA et al., 2015; FERNANDES et al., 2015; MONTAGNER et al., 2015; MOREIRA, 2015; QIU et al., 2015; MORCELLI et al., 2016). Vimos também que testes pré-clínicos e clínicos estão sendo realizados para vários complexos metálicos (BARRY e SADLER, 2013; TAN et al., 2014), o que colabora para o interesse de pesquisas acadêmicas e tecnológicas no desenvolvimento de novas drogas, menos tóxicas, mais seletivas e eficientes. Desta forma, a utilização de agentes quimioterápicos a base de metais, que possuem a capacidade de controlar o crescimento tumoral e prolongar a vida dos pacientes, tem tido êxito.

Buscando ampliar os estudos neste campo, esta pesquisa visou à síntese de compostos de coordenação de cobre(II) e gálio(III) que apresentam características consideradas de interesse para atuarem como metalofármacos com atividade antineoplásica. Será discutida a avaliação do efeito do íon metálico, da isomeria e da inserção de grupos α e β -naftol nas estruturas dos complexos, permitindo a correlação entre estrutura e atividade dos mesmos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Sintetizar compostos de coordenação de cobre(II) e novos compostos de gálio(III), caracterizá-los por diversas técnicas de análise (caracterização espectroscópica, eletroquímica, estrutural e magnética) e avaliar a atividade antitumoral dos mesmos, ampliando os estudos no caso dos compostos de cobre(II).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar ligantes polidentados através de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e espectroscopia de absorção na região do infravermelho. Neste projeto, foi realizada a síntese de quatro ligantes:

HL1= (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina;

H₂L2= N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)] propilamina;

H₂L3= 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol;

H₂L4= 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol.

- Sintetizar e caracterizar complexos de Cu(II) e novos complexos de Ga(III), utilizando-se as seguintes técnicas: espectroscopia de infravermelho, condutivimetria, análise elementar, difração de raios X, espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS-MS), ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e ponto de fusão. Os complexos de cobre(II) foram sintetizados de acordo com a literatura e sua caracterização foi realizada com o intuito de comprovar a pureza dos mesmos. Esta foi realizada empregando-se as técnicas supracitadas.

- Investigar a atividade antitumoral dos compostos obtidos através da avaliação da porcentagem de morte celular induzida pelos mesmos, através de ensaio colorimétrico utilizando o corante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Neste estudo foram investigadas as linhagens humanas U937 (linfoma histiocítico), THP-1 (leucemia monocítica aguda), Molt-4 (leucemia linfóide aguda), H460 (carcinoma de pulmão), Colo 205 (adenocarcinoma colorretal). Este estudo foi realizado no LBR/CBB/UENF com colaboração do professor Milton M. Kanashiro;

- Investigar a citotoxicidade *in vitro* dos compostos mais promissores contra as células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Este estudo foi realizado no LBR/CBB/UENF com colaboração do professor Milton M. Kanashiro;
- Para os compostos mais ativos, serão realizados estudos para avaliar o mecanismo de morte celular e investigação da via apoptótica através das técnicas de marcação dupla de anexina V e iodeto de propídio (IP) por citometria de fluxo, avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo (sub-G1), avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM) por citometria de fluxo (JC-1), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e avaliação da interação dos compostos com DNA plasmidial por espectroscopia de absorção (UV-vis) e emissão (fluorescência).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. TÉCNICAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO E SÍNTESE DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS E INORGÂNICOS

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 (TLC) (sílica gel 60 F₂₅₄ – Merck), utilizando-se solvente adequado. Foram utilizadas placas de agitação com aquecimento das marcas Fisher ou Go stirrer, 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.

4.1.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

As análises por ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram empregadas na caracterização dos compostos orgânicos, utilizando-se clorofórmio deuterado como solvente. As soluções foram preparadas a partir de 10-15 mg de amostra, em 500 µL de solvente em tubos de 2,5 mm, utilizando TMS (tetrametilsilano) como referência interna. Os espectros foram obtidos no LCQUI-UENF, em um equipamento JEOL modelo Eclipse 400⁺, operando a 400 MHz para ¹H.

4.1.2. Espectroscopia de infravermelho

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

4.1.3. Análise elementar

As porcentagens de C, H e N foram determinadas em analisador de CHNS-O modelo Flash 2000 da Thermo Scientific. As análises foram realizadas no LCQUI-UENF.

4.1.4. Determinação do ponto de fusão

Os pontos de fusão dos compostos de coordenação foram obtidos em um aparelho Microquímica MQAPF-301. As análises foram realizadas no LCQUI-UENF.

4.1.5. Condutivimetria

As medidas de condutividade foram obtidas em condutímetro MS TECNOPONI, a 25°C. Foram utilizados solventes de grau espectroscópico, de acordo com a solubilidade dos compostos em estudo, e concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ das espécies analisadas. As análises foram realizadas no LCQUI-UENF.

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

Os espectros de massas foram obtidos empregando-se espectrômetro de massas microTOF (Bruker). A técnica de ionização utilizada foi a de ionização por *electrospray*, em modo positivo (ESI(+)-MS) e ESI(+)-MS/MS), empregando-se metanol/água (1:1) para dissolução dos compostos. As análises foram realizadas no LCQUI-UENF.

4.1.7. Difração de raios X

Os dados foram coletados com um difratômetro Kappa APEXII Duo pelo Prof. Adailton J. Bortoluzzi (Departamento de Química da UFSC). A estrutura foi resolvida por métodos de refinamento, usando o software PLATON.

4.1.8. Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

Os espectros de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) foram obtidos usando-se um espectrômetro Bruker E500, com cavidade cilíndrica sensível, operando em banda X (9 GHz) a 100 K. As configurações experimentais utilizadas

foram: campo magnético central de 3.200 G; varredura largura de 2.000 G; potência de microondas de 2 mW; modulação de frequência de 100 kHz; modulação de amplitude de 10 G; ganho de 60 dB; tempo de varredura de 180 s; constante de tempo de 20,48 ms, número de varreduras: 1. O MgO:Cr^{3+} ($g = 1,9797$) foi utilizado como sinal de referência. As simulações dos espectros de RPE foram realizadas utilizando o programa Qpow. As análises por ressonância paramagnética eletrônica foram empregadas na caracterização dos compostos inorgânicos de cobre(II), utilizando-se DMSO (dimetilsulfóxido) como solvente. Os espectros foram obtidos no LCFIS-UENF.

4.2. SÍNTESE DOS LIGANTES

Inicialmente foram sintetizados os quatro ligantes propostos neste projeto: HL1-H₂L4. Os ligantes sintetizados foram utilizados na obtenção dos complexos de cobre(II) e gálio(III).

4.2.1. Síntese do (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (HL1)

O ligante HL1 foi sintetizado utilizando a rota sintética previamente descrita na literatura (NEVES et al., 1993), reagindo-se 4,0 mL (38,0 mmol) de salicilaldeído e 4,0 mL (38,5 mmol) de 2-(aminometil)piridina, com posterior redução com borohidreto de sódio (3,24 g; 85,6 mmol). Rendimento: 5,6 g; 69,3%.

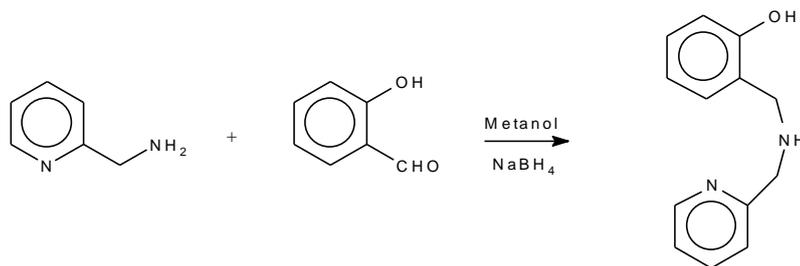


Figura 21. Proposta de rota sintética para o ligante HL1.

4.2.2. Síntese do N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H₂L2)

O ligante H₂L2 foi sintetizado utilizando a rota sintética previamente descrita na literatura (HORN Jr et al., 2000), reagindo-se 7,9 g (37,1 mmol) (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina e 3,5 mL (44,3 mmol) de epícloridrina. Rendimento: 9,4 g; 82,6%.

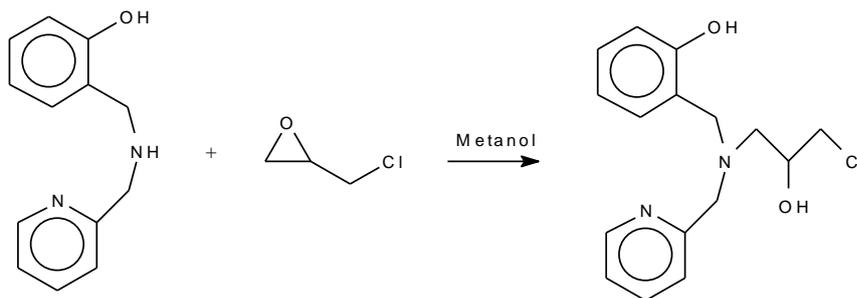


Figura 22. Proposta de rota sintética para o ligante H₂L2.

4.2.3. Síntese do 2-(1-naftiloximetil)oxirano (P1)

O precursor do ligante H₂L3 (P1) foi sintetizado segundo Corrêa (2006), reagindo-se 10,4 g (72,1 mmol) de α -naftol, 4,0 g (71,4 mmol) de hidróxido de potássio e 33,6 mL (42,9 mmol) de epícloridrina, adicionados nesta ordem (CORRÊA, 2006). Rendimento: 9,4 g; 98,7%.

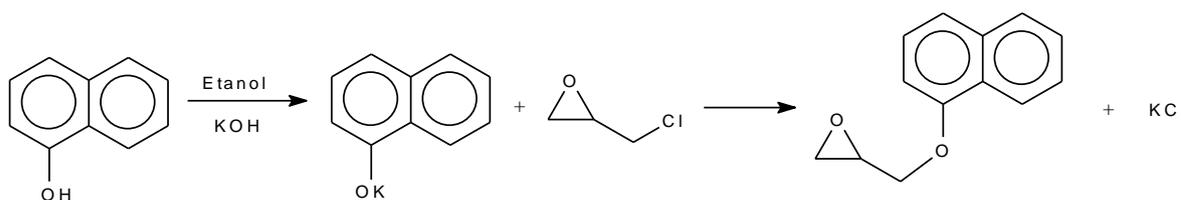


Figura 23. Proposta de rota sintética para o precursor P1.

4.2.4. Síntese do 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (H₂L3)

O ligante H₂L3 foi sintetizado utilizando a rota sintética descrita na literatura (FERNANDES et al., 2015). A reação foi realizada entre 4,9 g (24,0 mmol) de 2-(1-

naftiloximetil)oxirano (P1) e 5,1 g (24,0 mmol) de (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (HL1). Rendimento: 8,0 g; 80,4%.

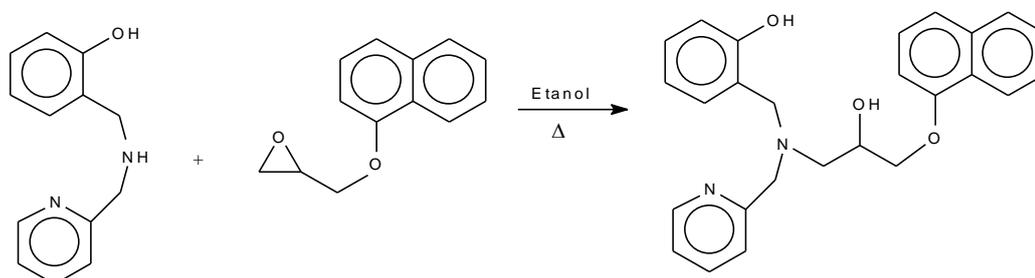


Figura 24. Proposta de rota sintética para o ligante H₂L3.

4.2.5. Síntese do 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P2)

O precursor do ligante H₂L4 (P2) foi sintetizado segundo Corrêa (2006), reagindo-se 10,0 g (69,4 mmol) de β-naftol e 4,0 g (71,4 mmol) de hidróxido de potássio, com posterior adição de 33,6 mL (42,9 mmol) de epícloridrina (CORRÊA, 2006). Rendimento: 7,8 g; 56,3%.

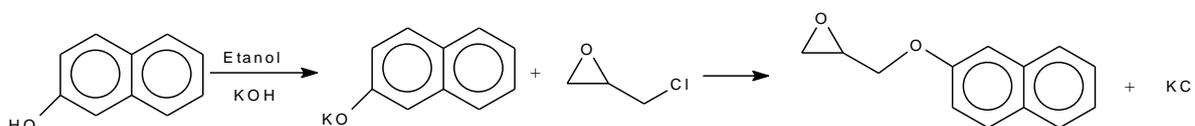


Figura 25. Proposta de rota sintética para o precursor P2.

4.2.6. Síntese do 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (H₂L4)

O ligante H₂L4 foi sintetizado utilizando a rota sintética descrita na literatura (FERNANDES et al., 2015). A reação foi realizada entre 4,9 g (24,0 mmol) de 2-(2-naftiloximetil)oxirano (P2) e 5,1 g (24,0 mmol) de (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (HL1). Rendimento: 6,1 g; 61,5%.

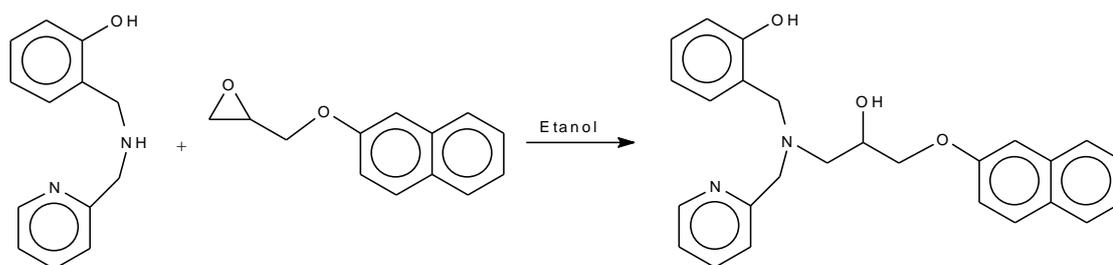


Figura 26. Proposta de rota sintética para o ligante H₂L₄.

4.3. SÍNTESE DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO

A seguir, são apresentadas as sínteses para os compostos de coordenação contendo os metais de transição cobre(II) e gálio(III). Na síntese de compostos de coordenação de cobre(II), utilizou-se metodologias previamente empregadas pelo grupo (FERNANDES et al., 2010; BORGES et al., 2016; FERNANDES et al., 2015). Entretanto, neste trabalho estes compostos foram investigados contra outras linhagens tumorais (Colo 205, H460, Molt-4), ampliando o estudo inicial que foi realizado contra as linhagens leucêmicas (THP-1 e U937) e normais (PBMC).

4.3.1. Síntese dos compostos de coordenação de cobre(II)

a) Síntese do [Cu(HL1)(Cl₂)]·0,5H₂O (C1)

O complexo C1 foi sintetizado segundo Borges (2016). Adicionou-se uma solução metanólica (5 mL), contendo o ligante (2-hidroxi-benzil)(2-piridilmetil)amina (HL1) (0,33 g; 1,5 mmol), a uma solução metanólica (15 mL) contendo [CuCl₂].2H₂O (0,26 g; 1,5 mmol). Foi obtida uma solução verde-escura, a qual permaneceu em agitação magnética, à temperatura ambiente, por 40 min. A seguir, esta foi deixada em repouso. Após uma semana, cristais de coloração verde formaram-se na solução, os quais foram cuidadosamente separados (BORGES, 2016). Rendimento: 0,43 g; 82,0%.

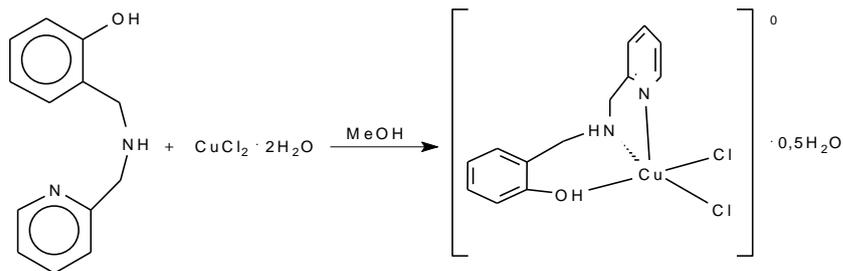


Figura 27. Proposta de complexo de cobre(II) obtido com o ligante HL1.

b) Síntese do $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}_2)(\text{Cl})]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (C2)

O complexo C2 foi sintetizado segundo Fernandes (2010). Reagiu-se uma solução metanólica (15 mL) contendo N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (H_2L_2) (0,68 g; 2,2 mmol) e uma solução metanólica (15 mL) contendo $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,43 g; 2,2 mmol), resultando em uma solução verde-azulada. A solução foi deixada em repouso após 40 min de agitação magnética, à temperatura ambiente. Após uma semana, cristais verdes formaram-se na solução, os quais foram cuidadosamente separados. Fernandes e colaboradores (2010) propuseram para o complexo C2, pela análise de difração de raios X, uma mistura de espécies mono e dimérica no estado sólido. (FERNANDES et al., 2010). Rendimento: 0,55 g; 82,0%.

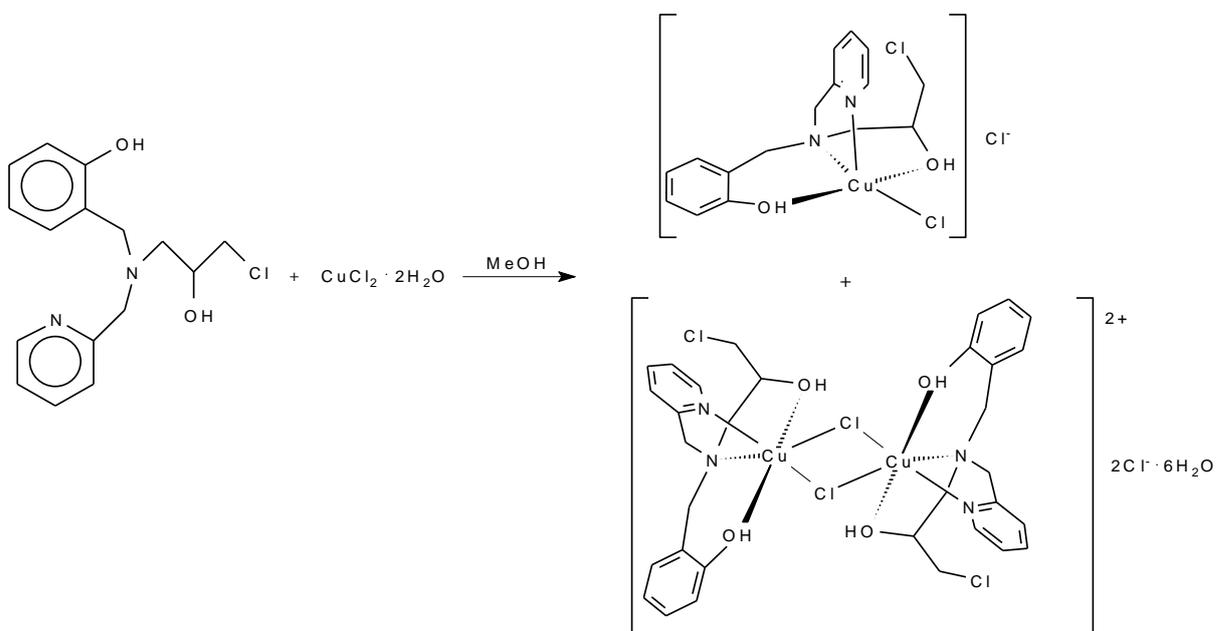


Figura 28. Proposta de complexos monomérico e dimérico de cobre(II) obtido com o ligante H_2L_2 .

c) Síntese do $[(H_2L3)Cu(\mu-Cl)_2Cu(H_2L3)]Cl_2 \cdot 3H_2O$ (C3)

A síntese do complexo C3 foi realizada através da rota sintética na literatura (FERNANDES et al., 2015). Para a obtenção do complexo C3, a solução etanólica (20 mL) do ligante H_2L3 , 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (0,55g; 1,3 mmol), foi colocada em refluxo por cerca de 1 h. A seguir, o sal metálico, $[CuCl_2] \cdot 2H_2O$ (0,22 g; 1,3 mmol), foi adicionado à solução do ligante ainda quente. O sistema foi colocado sob refluxo por mais 4 h. Foi obtida uma solução verde-escura, a qual foi deixada em repouso, à temperatura ambiente. Após três dias, cristais de coloração verde formaram-se na solução, os quais foram cuidadosamente separados. Rendimento: 0,23 g; 30,8%.

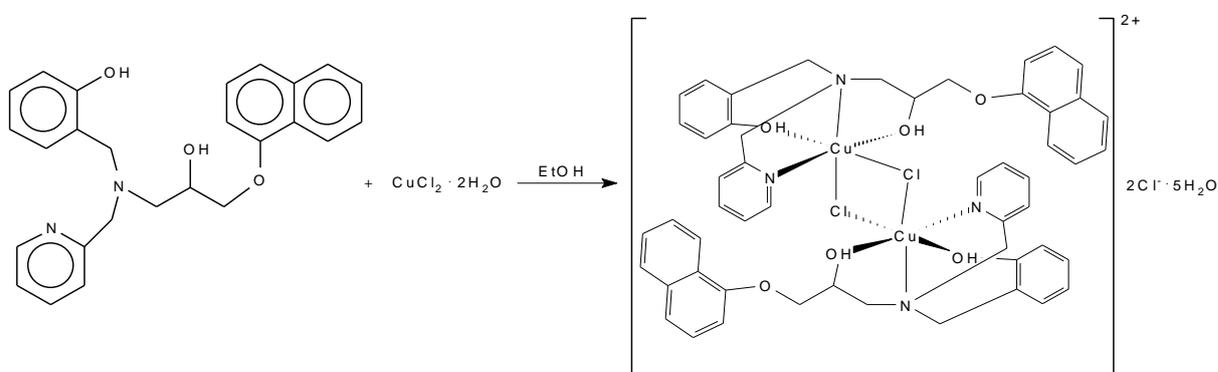


Figura 29. Proposta de complexo dimérico de cobre (II) obtido com o ligante H_2L3 .

d) Síntese do $[(H_2L4)Cu(\mu-Cl)_2Cu(H_2L4)]Cl_2 \cdot 4H_2O$ (C4)

A síntese do complexo C3 foi realizada através da rota sintética na literatura (FERNANDES et al., 2015).

Para a obtenção do complexo C4, a solução em acetonitrila (20 mL) do ligante 1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol (H_2L4) (0,40g; 1,0 mmol) foi colocada em refluxo por cerca de 1 hora. A seguir, o sal metálico, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,17 g; 1,0 mmol), foi adicionado à solução do ligante ainda quente. O sistema foi colocado sob refluxo por mais 4 h. Foi obtida uma solução verde límpida, a qual foi deixada em repouso, à temperatura ambiente. Após 2 dias, cristais de coloração verde formaram-se na solução, os quais foram cuidadosamente separados. Rendimento: 0,34 g; 63,1%.

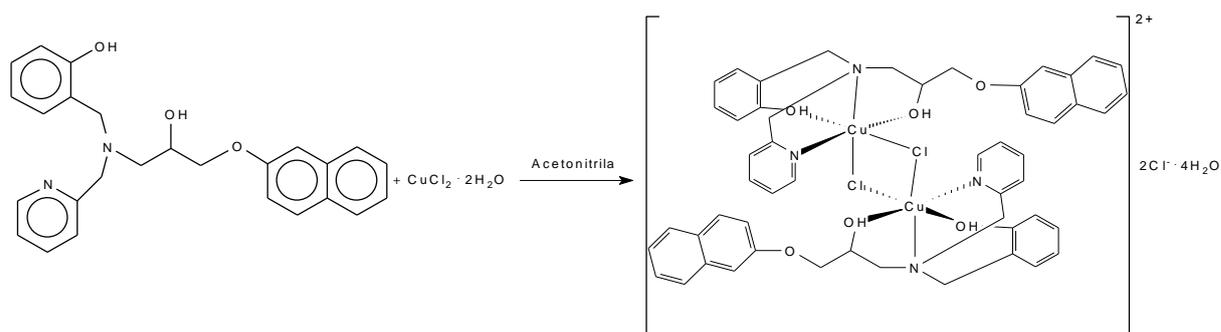


Figura 30. Proposta de complexo dimérico de cobre (II) obtido com o ligante H₂L4.

4.3.2. Síntese dos compostos de coordenação de gálio(III) inéditos

a) Síntese do [Ga(L1)(NO₃)(OH₂)₂]C₂₄H₂₀B · 3H₂O (C5)

À uma solução etanólica do ligante HL1, (2-hidroxibenzil)(2-piridilmetil)amina (HL1) (0,21 g; 1,0 mmol) adicionou-se 1 mmol de acetato de sódio (0,14 g). Após 30 min, o sal de gálio, [Ga(NO₃)₃ · 6H₂O] (0,36 g; 1,0 mmol) e tetrafenilborato de sódio (0,32 g; 1,0 mmol) foram, respectivamente, adicionados à solução reagente. Houve imediata formação de um precipitado de cor branca. A reação ficou sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por mais 2 h. O precipitado foi filtrado à vácuo. Rendimento: 0,13 g; 17,3%.

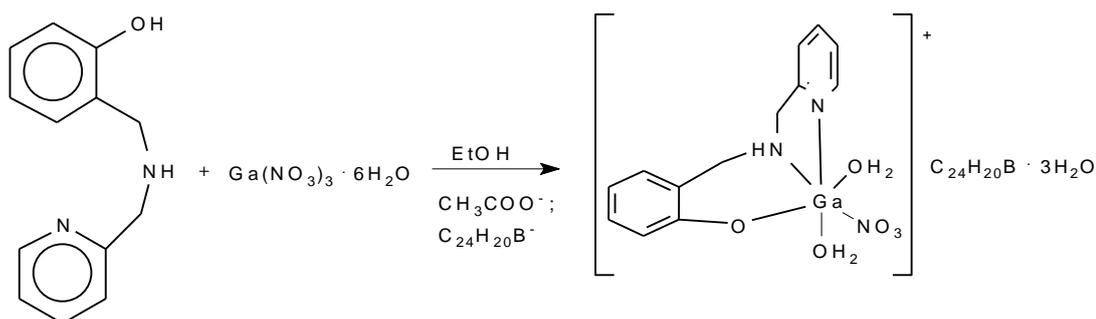


Figura 31. Proposta de complexo de gálio (III) obtido com o ligante HL1.

b) Síntese do [Ga(HL2)(NO₃)(OH₂)]C₂₄H₂₀B · 3H₂O (C6)

À uma solução etanólica do ligante H₂L2, N-(2-hidroxibenzil)-N-(2-piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxi)]propilamina (0,31 g; 1,0 mmol) adicionou-se 1mmol de acetato de sódio (0,14 g). Após 30 min, o sal de gálio, [Ga(NO₃)₃ · 6H₂O] (0,36 g;

1,0 mmol) e tetrafenilborato de sódio (0,32 g; 1,0 mmol) foram, respectivamente, adicionados à solução reagente. Houve imediata formação de um precipitado de cor branca. A reação ficou sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por mais 2 horas. O precipitado foi filtrado à vácuo. Rendimento: 0,22 g; 23,3%.

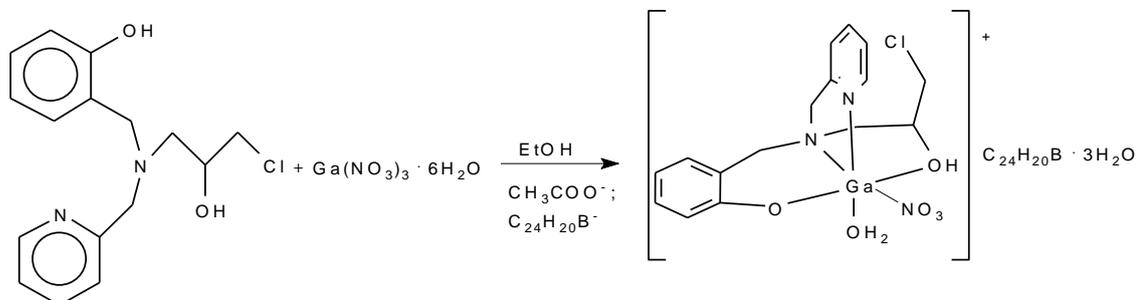


Figura 32. Proposta de complexo de gálio (III) obtido com o ligante H₂L2.

c) Síntese do [Ga(H₂L3)(NO₃)₂]C₂₄H₂₀B·4H₂O (C7)

À uma solução etanólica do ligante H₂L3, 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (0,41 g; 1,0 mmol) adicionou-se 1 mmol de acetato de sódio (0,14 g). Após cerca de 30 min, o sal de gálio, [Ga(NO₃)₃].6H₂O (0,36 g; 1,0 mmol) foi adicionado e, a seguir, o tetrafenilborato de sódio (0,32 g; 1,0 mmol). Houve imediata formação de um precipitado branco. A reação ficou sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 2 h. O precipitado foi filtrado à vácuo. Rendimento: 0,25 g; 24,5%.

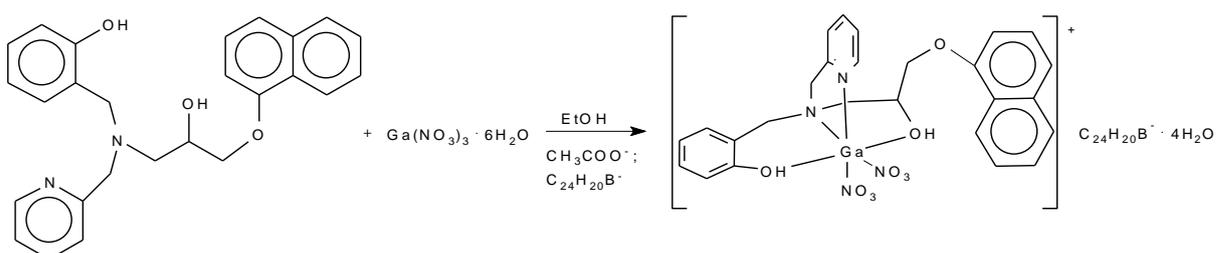


Figura 33. Proposta de complexo de gálio(III) obtido com o ligante H₂L3.

d) Síntese do [Ga(HL4)(NO₃)(OH₂)]C₂₄H₂₀B·2H₂O (C8)

Adicionou-se 1mmol de acetato de sódio (0,14 g) à uma solução etanólica do ligante H₂L4, 1-{2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino}-3-(1-naftiloxi)-2-propanol (0,41 g; 1,0 mmol). Após cerca de 30 min, o sal de gálio, [Ga(NO₃)₃].6H₂O (0,36 g; 1,0

mmol) foi adicionado e, a seguir, o tetrafenilborato de sódio (0,32 g; 1,0 mmol). Houve imediata formação de um precipitado de cor branca. A reação ficou sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 2 h. O precipitado foi filtrado à vácuo. Rendimento: 0,52 g; 52,4%.

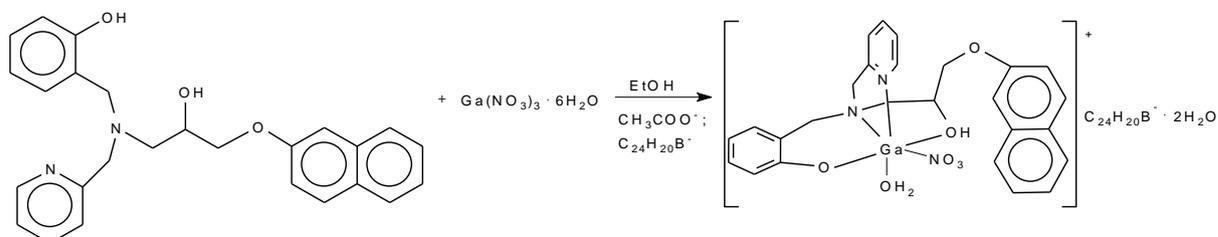


Figura 34. Proposta de complexo de gálio(III) obtido com o ligante H₂L4.

4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

Os testes biológicos foram realizados utilizando-se células tumorais U937 (linfoma histiocítico), THP-1 (leucemia monocítica aguda), Molt-4 (leucemia linfóide aguda), H460 (carcinoma de pulmão), Colo 205 (adenocarcinoma colorretal) e as células normais PBMC (células mononucleares do sangue periférico).

4.4.1. Preparação dos compostos e das células tumorais

a) Diluição e armazenamento dos compostos orgânicos e de coordenação

Para a realização dos testes biológicos foram preparadas soluções estoque, na concentração de 2×10^{-2} mol L⁻¹ dos compostos sintetizados (orgânicos e inorgânicos) empregando-se DMSO (dimetilsulfóxido) como solvente. Já soluções estoques, na concentração de 2×10^{-2} mol L⁻¹ dos sais utilizados nas reações inorgânicas e da cisplatina, foram preparadas utilizando-se água deionizada como solvente. As soluções estoque foram armazenadas em geladeira de 2 a 6°C. Para alcançar as concentrações de trabalho (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 μmol L⁻¹), os compostos, previamente dissolvidos em DMSO ou água deionizada, foram diluídos em meio de cultura D-MEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 20mg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL), o que reduz a concentração de DMSO na solução, já que acima de 5%, em volume, este solvente

passa a ser tóxico para as células. O composto de coordenação cisplatina foi utilizado como controle positivo nos testes biológicos.

b) Descongelamento das células neoplásicas

As linhagens de células foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC). As linhagens de células tumorais, que estavam armazenadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas para posterior cultivo. Após o descongelamento das células em banho-maria (37°C), estas foram colocadas em 5mL de meio de cultura D-MEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 20mg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, BRL). Após a centrifugação por 5 minutos (1500RPM), as células foram ressuspensas em D-MEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 20mg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL) e colocadas em garrafas de cultura estéril.

c) Cultura das linhagens de células neoplásicas

Todas as linhagens foram cultivadas em meio D-MEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 20mg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). As células foram cultivadas em garrafas de cultura 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 diariamente ou conforme detecção da necessidade.

Para as células aderentes houve a necessidade de desaderi-las do fundo da garrafa antes da sua utilização. O meio de cultura contido dentro das garrafas de cultivo das células aderentes foi descartado e adicionado 1,0 mL de uma solução contendo 2,5% de tripsina, 0,1% de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) em PBS (tampão salina fosfato). Após desaderi-las foi adicionado de meio de cultura suplementado.

d) Congelamento das células neoplásicas

Após a expansão das células estas foram congeladas para manutenção do estoque. Cerca de 5 mL de cultura celular foram centrifugados por aproximadamente 5 minutos (1500 RPM). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas

em 900µL de meio de cultura e 100µL de DMSO (Hybri-Max, Sigma), por conteúdo de uma garrafa de cultura. As células foram acondicionadas a -80°C entre 24 e 72 horas e, a seguir, acondicionadas em nitrogênio líquido.

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

As células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) foram adquiridas 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 coletado adicionado sobre o Ficoll-Paque™ Plus (1,08 g/mL) de forma lenta, 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 minutos, a 20 °C. O plasma, primeira camada do gradiente obtido na centrifugação, foi descartado. A seguir, o anel de células mononucleares foi cuidadosamente removido, lavado três vezes com meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, BRL) gelado e centrifugado a 1500 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o "pellet" formado foi ressuspenso em RPMI1640 (Gibco, BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 20 µg/mL de gentamicina e 0,25 µg/mL de enterotoxina B de *Staphilococcus* (SEB) (Sigma, S0812), a fim de induzir a proliferação celular. As células foram mantidas em garrafas de cultura e em estufa (37°C e 5% de CO₂) por cerca de quatro 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.

f) Padronização da concentração da cultura celular

As células neoplásicas e normais (PBMC) foram coradas 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. A concentração de células neoplásicas e normais foi ajustada conforme requerido para os ensaios biológicos.

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

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 (Figura 35).

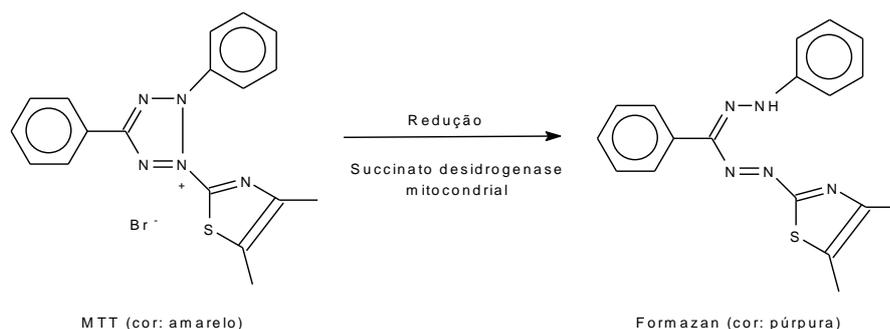


Figura 35. Representação da redução do MTT a formazan pela succinato desidrogenase mitocondrial.

As células neoplásicas e normais (PBMC), na concentração de 1×10^6 células/mL, foram plaqueadas em volume de 100 μ L/poço, em placas de 96 poços. Após um período entre 4-8 horas em estufa (37°C e 5% de CO₂), foram adicionados 100 μ mol/L/poço de cada composto nas concentrações finais de trabalho (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 μ mol/L). Após 36 horas incubação com os compostos, em estufa (37°C e 5% de CO₂), foram adicionados 20 μ L de solução de MTT (5,0mg/mL dissolvido em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,2) em cada poço de incubação. As placas foram mantidas em estufa por mais 4 horas. Após este período, foram retirados cuidadosamente 120 μ L do sobrenadante de cada poço. A seguir, foram adicionados 150 μ L de uma solução de isopropanol (Merck) com 0,0014% de HCl concentrado para a homogeneização dos cristais de formazan formados. A placa de 96 poços foi centrifugada por 10 min (1500RPM) e foram transferidos 100 μ L/poço do sobrenadante para uma placa de 96 poços limpa, sendo esta avaliada em espectrofotômetro (Epoch™, BioTek® Instruments, Inc.) utilizando o comprimento de onda de 570nm. A cisplatina foi utilizada nas concentrações entre 6,25-100 μ mol/L para fins comparativos. Poços contendo 100 μ L de células e 100 μ L de meio de cultura foram utilizados como controle positivo (branco). Todos os testes foram realizados em triplicata para cada experimento. Além disso, o experimento foi

repetido mais uma vez a partir de outro descongelamento da mesma linhagem (repetição isolada do experimento). Os resultados de densidade óptica obtidos foram convertidos em porcentagem de células viáveis, inseridos no programa Prisma e obtidos dados de regressão não-linear para que a IC_{50} fosse calculada.

4.4.3. Avaliação do tipo de morte celular mediada pelos compostos

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

A linhagens (1mL) foram plaqueadas na concentração de 2×10^6 células/mL (para as linhagens não aderentes U937 e molt-4) e 1×10^6 células/mL (para a linhagem aderente H460) em placa de 12 poços e, após um período entre 5-8 horas em estufa (37°C e 5% de CO_2), foram tratadas com 1mL dos complexos na concentração final de $1 \times IC_{50}$ e $2 \times IC_{50}$, durante 24 e/ou 30 horas. As células controle foram incubadas apenas com meio DMEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 20 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Gibco, BRL). A marcação dupla com anexina V e iodeto de propídio (PI) foi realizada de acordo com o protocolo do kit *AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit* (SIGMA-ALDRICH). Após a incubação, as células foram centrifugadas por 5 minutos (1500 RPM) e o pellet formado lavado (duas vezes) com 500 μL de PBS. A seguir, as células foram novamente centrifugadas por 5 minutos (1500 RPM), sendo o pellet formado ressuspensionado em 500 μL de tampão de ligação (1:10) fornecido pelo kit (100mM HEPES/NaOH, pH 7,5, contendo 1400 mmol L^{-1} de NaCl e 25 mmol L^{-1} de CaCl_2). Em tubo apropriado, foram adicionados 500 μL da solução contendo as células tratadas, 5 μL de anexina V e 10 μL de iodeto de propídio (PI) para cada amostra. As amostras foram deixadas no escuro por exatamente 10 minutos. Após esse período, foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS Calibur), sendo contabilizados 10.000 eventos por amostra.

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

Células (1mL) foram plaqueadas na concentração de 2×10^6 células/mL (para as linhagens não aderentes U937 e molt-4) e 1×10^6 células/mL (para a linhagem aderente H460) em placas de 12 poços e, após 5 a 8 horas em estufa (37°C e 5% de CO_2), tratadas na concentração final de $1 \times IC_{50}$ e $2 \times IC_{50}$ dos

complexos (1mL) e incubadas por 24 e/ou 30 horas em estufa (37 °C e 5% de CO₂). As células controle foram incubadas apenas com meio DMEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 20 µg/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 centrifugado por 10 minutos a 200 xg. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e as células lavadas com 1mL PBS estéril (duas vezes). Descartou-se a maior parte do sobrenadante, deixando um volume suficiente para ressuspender o “pellet”. A seguir, foi adicionado 1mL de etanol 70% gelado (4 a -20°C), de forma lenta, e as células foram submetidas a fixação por 30 minutos a 4°C. Após o período de fixação, as células foram centrifugadas a 200 xg por 5 min e lavadas (duas vezes) com 1 mL de tampão fosfato-citrato (200 mmol L⁻¹, pH=7,8). O sobrenadante foi desprezado e as células foram incubadas com 500 µL de tampão de RNase (RNase 100 µg/mL Sigma, R4875; 50µg.mL⁻¹ de iodeto de propídio Sigma, P4170; 0,1% de triton 1x). Incubar as amostras por 30 min a 37°C. Por fim, 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.

4.4.4. Avaliação da via apoptótica ativada pelo complexos

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

As células (1mL) foram plaqueadas na concentração de 2 x 10⁶ células/mL (para as linhagens não aderentes U937 e molt-4) e 1x10⁶ células/mL (para a linhagem aderente H460) em placas de 12 poços e, após um período entre 5-8 horas em estufa (37°C e 5% de CO₂), tratadas na concentração final de 1x IC₅₀ e 2x IC₅₀ dos complexos (1mL), e incubadas por mais 24 e/ou 30 horas em estufa (37°C e 5% de CO₂). As células controle foram incubadas apenas com meio D-MEMF12 (Gibco, BRL) suplementado com 20 µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL). Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço (2 mL) foi centrifugado por 5 minutos a 400 xg. O sobrenadante foi desprezado e às células foram adicionados 500 µL de solução de JC-1 (25 µg/mL diluído 1:1000 em meio de cultura D-MEMF12 não suplementado). Estas foram incubadas por 15 minutos em estufa (37°C e 5% de

CO₂). As células em suspensão foram centrifugadas por 5 minutos a 400 xg e lavadas duas vezes com 2 mL de meio de cultura D-MEMF12 não suplementado. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 500 µL 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 obtidas através do software WinMDI, versão 2.9.

b) Análise ultraestrutural de células U937 por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Células U937, na concentração de 1×10^6 células/mL, foram plaqueadas em placa de 6 poços (3 mL cada poço). Após um período entre 5-8 horas em estufa (37°C e 5% de CO₂), as células foram tratadas com complexo, na concentração final de 0,5x IC₅₀ e 1x IC₅₀, e incubadas por mais 4 e 8 horas em estufa (37 °C e 5% de CO₂).

Após este período, as células foram centrifugadas por 10 minutos (200 xg). A seguir, foram lavadas (2x) com 2mL de Tampão Salino Fosfato (PBS, pH 7,2), e centrifugadas novamente. O *pellet* foi fixado por 1 hora com glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1mol L⁻¹ (pH 7,4), a temperatura ambiente. Após período de fixação, as células foram lavadas (2x) com o mesmo tampão e pós-fixadas por 20 minutos, protegidas da luz, em solução 1:1 com tetróxido de ósmio (1%) e ferricianeto de potássio (0,8%), lavadas 3X com o mesmo tampão e desidratadas em séries crescentes de acetona: 50%, 70%, 90% e a 100% 3x (durante 20 minutos cada etapa). As amostras foram infiltradas em resina, utilizando uma mistura de acetona/EPON[®], na proporção de 2:1, 1:1, 1:2 por 8h cada troca. A seguir, as amostras foram embebidas em EPON puro, acomodadas em moldes de silicone e polimerizada por 48 horas a 60 °C. Os blocos polimerizados foram seccionados em ultramicrótomo *Reichert Ultracult S* e os cortes ultrafinos colocados em grades de cobre. As micrografias foram tiradas em Microscópio Eletrônico de Transmissão, modelo TEM-900 (Zeiss, Alemanha).

4.4.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas para os testes de viabilidade e indução de apoptose utilizando o programa Graph Pad versão 5.0. Para todos os experimentos, foi utilizado o teste estatístico One-way ANOVA. As diferenças significativas foram consideradas como $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$.

4.5. INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS COM DNA PLASMIDIAL

O DNA plasmidial utilizado nos experimentos descritos a seguir foi previamente extraído da bactéria *Escherichia Coli* e sua concentração inicial determinada espectrofotometricamente pela absorvidade molar.

4.5.1. Espectros de absorção

Os espectros eletrônicos foram obtidos em um espectrofotômetro de UV-Vis Cary 50 Bio, Varian acoplado a um computador. As leituras foram efetuadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm, empregando-se solvente grau espectroscópico Vetec.

Para o estudo de absorção, as soluções dos complexos e DNA plasmidial foram preparadas a partir de um tampão Tris-HCl (50 mmol L^{-1} de NaCl e 5 mmol L^{-1} de tris-HCl, em água e pH 7,32). As soluções dos complexos ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas a partir de 1% de DMF (para dissolução dos mesmos) e 99% de tampão Tris-HCl, sendo preparadas no mesmo dia do experimento. Também foi utilizada uma solução de DNA plasmidial ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão Tris-HCl. A solução de DNA foi armazenada a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e utilizada em até 4 dias. Durante a medida do espectro de absorção, o mesmo incremento ($5 \text{ } \mu\text{L}$ para os complexos C7 e C8 e $10 \text{ } \mu\text{L}$ para os complexos C1, C3 e C4) de solução de DNA plasmidial foi adicionado a 3 mL da solução dos complexos e à 3 mL da solução de referência (solução do tampão tris-HCl + NaCl). Após a adição do DNA, as soluções permaneceram em repouso por 5 minutos, antes da realização da análise (235 a 600 nm). As soluções utilizadas estavam à temperatura ambiente. Foram obtidas duplicatas dos experimentos.

4.5.2. Espectros de emissão

Os espectros de emissão foram obtidos em um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse da Varian, acoplado a um computador. As leituras foram efetuadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm, empregando-se solvente grau espectroscópico Vetec. Os espectros foram registados em 515 nm para excitação e uma faixa de 530 a 710 nm para emissão, com uma largura de fenda de 10 nm para excitação e 20 nm para emissão.

Para a obtenção dos espectros de emissão, foi preparada uma solução contendo $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de DNA e $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ GelRed (Biotium-concentração inicial= $12,12 \text{ mmol L}^{-1}$) ($[\text{DNA}]/[\text{GelRed}] = 10: 1$) em tampão Tris-HCl (50 mmol L^{-1} de NaCl e 5 mmol L^{-1} de tris-HCl, em água e pH 7,32). A solução foi deixada em repouso durante 5 minutos antes do início do experimento. Durante a medida do espectro de emissão (590 nm), a solução dos complexos ($2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 1% de DMF e 99% de água deionizada) foi adicionada a uma solução de DNA e GelRed em incrementos de 3 μL . Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente. Foram obtidas duplicatas dos experimentos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

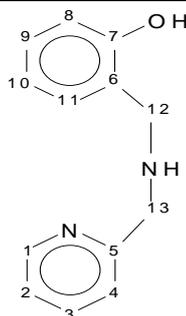
5.1. Caracterização dos compostos orgânicos

Após sintetizados, os ligantes, HL1-H₂L4 (Anexo 2a) e precursores (P1 e P2) foram caracterizados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H) e espectroscopia de infravermelho, a fim de confirmar a obtenção e pureza de tais compostos. Desta forma, os dados das caracterizações realizadas e respectivos dados da literatura estão organizados em tabelas a seguir.

5.1.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹H)

As Tabelas 7 a 12 apresentam os dados de ressonância magnética nuclear de ¹H obtidos para o ligante HL1-H₂L4 e precursores P1 e P2, na qual foram condizentes com os dados da literatura, corroborando para a obtenção dos mesmos.

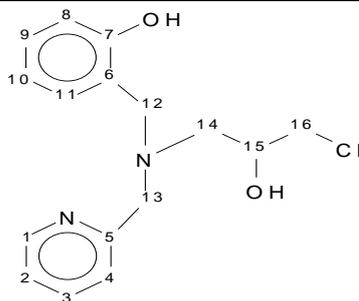
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H para o ligante HL1 obtidos em CDCl_3 (400 MHz), com sua atribuições e comparações com valores relatados literatura.



Atribuição	HL1	
	δ_{H} obtido (CDCl_3)	δ_{H} literatura* (CDCl_3)
CH		
1	8,58 (<i>dd</i> , $J= 5$ Hz; $J= 2$ Hz)	8,58
2	7,23-7,15 (m)	7,23-7,15
3	7,65 (<i>dt</i> , $J= 8$ Hz; $J= 8$ Hz; $J= 2$ Hz)	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 (<i>dt</i> , $J= 7$ Hz; $J= 7$ Hz; $J= 1$ Hz)	6,78
11	6,97 (<i>d</i> , $J=7$ Hz)	6,97
CH₂		
12	3,83 (s)	3,89
13	4,00 (s)	4,00
NH	2,90 (s)	Não observado
OH	Não observado	Não observado

* Fonte: LUBE, 2011. s= sinal simples; d= sinal duplo; dt= duplo sinal triplo; m= sinal múltiplo.

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H para o ligante H_2L_2 obtidos em DMSO-D_6 (400 MHz), com atribuições e comparação com valores relatados na literatura.



H_2L_2		
Atribuição	δ_{H} obtido (DMSO-D_6)	δ_{H} literatura* (CDCl_3)
CH		
1	8,52 (<i>ddd</i> , $J=5$ Hz, $J=2$ Hz e $J=1$ Hz)	8,52 (<i>dd</i> , $J=4,20$ Hz e $J=1,01$ Hz)
2	7,28 (<i>dt</i> , $J=5$ Hz; $J=1$ Hz)	7,06-7,22 (<i>m</i>)
3	7,78 (<i>dt</i> , $J=8$ Hz; $J=2$ Hz)	7,64 (<i>ddd</i> , $J=6,31$ Hz, $J=6,31$ Hz e $J=1,61$ Hz)
4	7,41 (<i>d</i> , $J=8$ Hz)	7,06-7,22 (<i>m</i>)
8	6,77 (<i>dd</i> , $J=8$ Hz; $J=1$ Hz)	6,77 (<i>dd</i> , $J=8,29$ Hz; $J=1,22$ Hz)
9	7,09 (<i>dt</i> , $J=8$ Hz; $J=1$ Hz)	7,06-7,22 (<i>m</i>)
10	6,74 (<i>dt</i> , $J=8$ Hz; $J=1$ Hz)	6,71 (<i>ddd</i> , $J=7,38$ Hz, $J=7,38$ Hz e $J=1,22$ Hz)
11	7,17 (<i>dd</i> , $J=8$ Hz; $J=2$ Hz)	6,94 (<i>dd</i> , $J=7,77$ Hz; $J=1,64$ Hz)
15	4,10-3,38 (<i>m</i>)	4,00-3,80 (<i>m</i>)
CH₂		
12	3,80-4,00 (<i>m</i>)	3,80-4,00 (<i>m</i>)
13	3,80-4,00 (<i>m</i>)	3,80-4,00 (<i>m</i>)
14	2,73-2,84 (<i>m</i>)	2,74-2,86 (<i>dd</i>)
16	3,39-3,60 (<i>m</i>)	3,43-3,51 (<i>dd</i>)

*Fonte: LUBE, 2011. *d*= sinal duplo; *dd*= duplo sinal duplo; *ddd*= duplo duplo sinal duplo; *dt*= duplo sinal triplo; *m*= sinal multiplo.

Tabela 9. Dados obtidos na espectroscopia de RMN de ^1H para precursor P1, obtidos em CDCl_3 (400 MHz), suas atribuições e comparações com dados relatados na literatura.

Atribuição	P1	
	δ_{H} obtido (CDCl_3)	δ_{H} literatura* (CDCl_3)
CH		
2	6,83 (d, $J = 7,5$ Hz)	6,83 (d, $J = 7,68$ Hz)
3	7,37 (t, $J = 8$ Hz)	7,36 (t, $J = 8,00$ Hz)
4	7,46 (d, $J = 7,5$ Hz)	7,45 (d, $J = 7,60$ Hz)
5	7,80-7,82 (m)	7,78 – 7,81 (m)
6	7,50 (t, $J = 4$ Hz)	7,49 (m)
7	7,50 (t, $J = 4$ Hz)	7,49 (m)
8	8,30 – 8,32 (m)	8,29 – 8,31 (m)
12	3,49 – 3,54 (m)	3,47 – 3,51 (m)
CH₂		
11	4,42 (dd; $J = 11$ Hz; $J = 3$ Hz); 4,18 (dd; $J_{11-11} = 11$ Hz; $J_{11-12} = 6$ Hz)	4,39 (dd; = 11,00 Hz; $J = 5,59$ Hz)
13	2,99 (t, $J = 4$); 2,87 – 2,88 (m)	2,96 (t, $J = 4,90$ Hz; $J = 4,20$ Hz); 2,84 (dd; $J = 11,00$ Hz; $J = 2,92$ Hz)

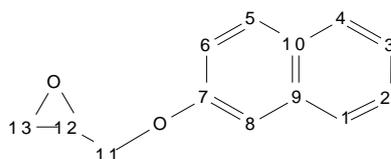
*Fonte: LOPES, 2012. d= sinal duplo; dd= duplo sinal duplo; t= sinal triplo; m= sinal múltiplo.

Tabela 10. Dados de ressonância magnética nuclear ^1H para o ligante $\text{H}_2\text{L3}$ obtido em CDCl_3 (60MHz), suas atribuições e comparação com valores relatados na literatura (400MHz).

H₂L3		
CH	δ_{H} obtido	δ_{H} literatura* (CDCl_3)
1	8,03 (<i>d</i>)	8,03 (<i>d</i>)
2	7,49 – 7,46 (<i>m</i>)	7,48 (<i>t</i>)
3	7,49 – 7,46 (<i>m</i>)	7,48 (<i>t</i>)
4	7,78 (<i>d</i>)	7,78 (<i>d</i>)
5	7,43 – 7,41 (<i>m</i>)	7,44 – 7,41 (<i>m</i>)
6	7,34 (<i>t</i>)	7,34 (<i>t</i>)
7	6,76 (<i>d</i>)	6,77 (<i>d</i>)
12	4,40 – 4,36 (<i>m</i>)	4,39 – 4,35 (<i>m</i>)
18	6,93 – 6,88 (<i>ddd</i>)	6,89 (<i>d</i>)
19	7,24 – 7,18 (<i>m</i>)	7,25 – 7,17 (<i>m</i>)
20	6,81 (<i>tt</i>)	6,81 (<i>t</i>)
21	7,09 – 7,05 (<i>ddd</i>)	7,06 (<i>d</i>)
23	7,24 – 7,18 (<i>m</i>)	7,25 – 7,17 (<i>m</i>)
24	7,68 (<i>dt</i>)	7,69 (<i>t</i>)
25	7,24 – 7,18 (<i>m</i>)	7,25 – 7,17 (<i>m</i>)
26	8,63 (<i>d</i>)	8,63 (<i>d</i>)
CH₂		
11	4,17 (<i>m</i>); 4,07 – 4,02 (<i>m</i>)	4,13 (<i>d</i>); 4,08 – 4,03 (<i>m</i>)
13	3,00 (<i>d</i>)	3,00 (<i>d</i>)
14	4,07 – 4,02 (<i>m</i>); 4,15 – 4,12 (<i>m</i>)	4,08 – 4,03 (<i>m</i>); 4,19 – 4,15 (<i>m</i>)
15	3,99 – 3,90 (<i>m</i>); 3,83 – 3,79 (<i>m</i>)	4,00 – 3,92 (<i>m</i>); 3,84 – 3,79 (<i>m</i>)

* Fonte: FERNANDES et al., 2015. *s*= sinal simples; *d*= sinal duplo; *dt*= duplo sinal triplo; *ddd*= duplo duplo sinal; *m*= sinal múltiplo.

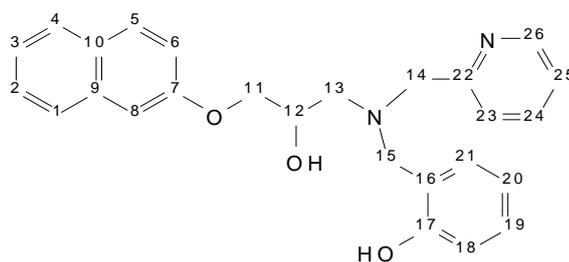
Tabela 11. Dados obtidos na espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H para o precursor P2 obtidos em CDCl_3 (400 MHz), suas respectivas atribuições e comparações.



Atribuição		P2
o	δ_{H} obtido	δ_{H} literatura* (CDCl_3)
CH		
1	7,72 – 7,79 (<i>m</i>)	7,71 – 7,78 (<i>m</i>)
2	7,36 (<i>t</i> , $J = 7$ Hz)	7,42 – 7,46 (<i>m</i>)
3	7,45 (<i>t</i> , $J = 7$ Hz)	7,32 – 7,36 (<i>m</i>)
4	7,72 – 7,79 (<i>m</i>)	7,71 – 7,78 (<i>m</i>)
5	7,72 – 7,79 (<i>m</i>)	7,71 – 7,78 (<i>m</i>)
6	7,19 (<i>dd</i> , $J = 9$ Hz; $J = 2$ Hz)	7,19 (<i>dd</i> , $J = 8,76$; $J = 3,6$ Hz)
8	7,16 (<i>s</i>)	7,14 (<i>d</i> , $J = 3,4$ Hz)
12	3,42 – 3,48 (<i>m</i>)	3,41 – 3,44 (<i>m</i>)
CH₂		
11	4,36 (<i>dd</i> , $J = 11$ Hz; $J = 3$ Hz); 4,10 (<i>dd</i> , $J = 11$ Hz; $J = 6$ Hz)	4,35 (<i>dd</i> , $J = 10,97$ Hz; $J = 3,40$ Hz); 4,08 (<i>dd</i> , $J = 10,76$ Hz; $J = 5,12$ Hz)
13	2,82 – 2,84 (<i>m</i>); 2,96 (<i>t</i> , $J = 4,5$ Hz)	2,95 (<i>t</i> , $J = 4,88$ Hz; $J = 4,16$ Hz); 2,82 (<i>dd</i> , $J = 5,56$ Hz; $J = 2,65$ Hz)

*Fonte: LOPES, 2012. *d*= sinal duplo; *dd*= duplo sinal duplo; *dt*= duplo sinal triplo; *m*= sinal múltiplo.

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H do ligante $\text{H}_2\text{L4}$ obtidos em DMSO-D_6 (400 MHz), suas atribuições e comparação com valores relatados na literatura.



H₂L4		
Atribuição	$\delta_{\text{H}}^{\text{obtido}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{literatura}^*}$ (CDCl_3)
CH		
1	7,74 (<i>d</i> , $J= 8$ Hz)	7,68 – 7,71 (<i>m</i>)
2	7,45 (<i>t</i> , $J= 7,5$ Hz; $J= 1$ Hz)	7,42 (<i>t</i>)
3	7,33 (<i>t</i> , $J= 7,5$ Hz; $J= 1$ Hz)	7,32 (<i>t</i>)
4	7,78 (<i>d</i> , $J= 9$ Hz)	7,74 (<i>d</i>)
5	7,81 (<i>d</i> ; $J= 8$ Hz)	-
6	7,04 (<i>dd</i> , $J= 8$ Hz; $J= 2,5$ Hz)	7,02-7,04 (<i>m</i>)
8	7,16 (<i>d</i> , $J= 2,5$ Hz)	7,17 (<i>d</i>)
12	3,99-4,02 (<i>m</i>)	2,28-4,25 (<i>m</i>)
18	6,77 (<i>dd</i> , $J= 8$ Hz; $J= 1$ Hz)	6,87 (<i>dd</i>)
19	7,11 (<i>dt</i> , $J= 7,5$ Hz; $J= 1$ Hz)	7,02 – 7,04 (<i>m</i>)
20	6,75 (<i>dt</i> , $J= 7,5$ Hz; $J= 1$ Hz)	6,79 (<i>t</i>)
21	7,18 (<i>d</i> , $J= 7,5$ Hz; $J= 1$ Hz)	7,07 – 7,10 (<i>m</i>)
23	7,42 (<i>d</i> ; $J= 8$ Hz)	-
24	7,75 (<i>t</i> , $J= 8$ Hz)	7,65 (<i>dd</i>)
25	7,27 (<i>dt</i> , $J= 6,5$ Hz; $J= 1$ Hz)	7,20-7,24 (<i>m</i>)
26	8,52 (<i>dd</i> , $J= 5$ Hz, $J= 1$ Hz)	8,61 (<i>m</i>)
CH₂		
11	3,79 - 3,94 (<i>m</i>)	3,92 - 4,00 (<i>m</i>)
13	2,63 - 2,67 (<i>m</i>); 2,71 - 2,74 (<i>m</i>)	2,91 (<i>m</i>)
14	3,79 - 3,94 (<i>m</i>)	3,92 - 4,00 (<i>m</i>)
15	3,74 (<i>s</i>)	3,78 (<i>d</i>)

*Fonte: FERNANDES et al., 2015. *d*= sinal duplo; *dd*= duplo sinal duplo; *dt*= duplo sinal triplo; *m*= sinal múltiplo.

5.1.2. Espectroscopia de infravermelho

A comparação dos espectros de infravermelho dos compostos orgânicos obtidos com dados da literatura também foi utilizada para comprovar a obtenção destes compostos. As Tabelas 13 a 15 apresentam os dados de espectroscopia de infravermelho obtidos para os ligantes HL1-H₂L4 e para os precursores P1 e P2.

Tabela 13. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho para os ligantes HL1 e H₂L2, obtidos em pastilha de KBr (para HL1) e em filme sobre pastilha de KBr (para H₂L2).

Absorção (cm ⁻¹)	HL1	HL1 _{Literatura} [*]	H ₂ L2	H ₂ L2 _{Literatura} [*]
v NH	3256	3263	-	-
v OH _{álcool}	-	-	-	3188
v OH _{fenol}	3063	3200 – 2500	3500 - 2500	3500 – 2500
v CH _{aromático}	3037, 3003	3040, 3009	3045	3053, 3016
v _{as} CH ₂	2947	2947	2943	2951
v _s CH ₂	2868	2862	2821	2831
v C=C e C=N	1590, 1567, 1444, 1427	1589, 1566, 1458, 1427	1602, 1481, 1438	1595, 1587, 1487, 1435
δ C-O-H _{fenol} ^a	1354	1358	-	-
v C-O _{fenol}	1281	1280	1230	1250
v C-N	1109	1111	1081	1095
γ-CH ^b e β-anel ^c	754	756	737	756

*Fonte: LUBE, 2011. a= deformação axial de fenol; b= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos; c= deformação do anel de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos.

Tabela 14. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho para o precursor P1 e seu respectivo ligante H₂L3, obtidos em filme sobre pastilha de KBr.

Absorção (cm⁻¹)	P1	P1^{Literatura}*	H₂L3	H₂L3^{Literatura}*
ν OH	3472	-	3500 – 2800	3300 – 2800
ν CH _{aromático}	3051, 3001	3055, 3003	-	3051
ν_{as} CH ₂	2922	2926	2928	2927
ν_s CH ₂	2873	2874	2833	2831
ν C=C e ν C=N	1573, 1505, 1466, 1396	1579, 1508, 1462, 1396	1582, 1489, 1398	1581, 1489, 1400
$\nu_{as, s}$ C-O-C	1281, 1236	1271, 1240	1269	1269
ν C-O-H _{fenol} ^a	-	-	1240	1242
δ CH _{aromático}	1219, 1163	1101	1101	1103
γ -CH ^b e β -anel ^c	788, 768	793, 771	795, 756	791, 756

*LOPES, 2012; a= deformação axial de fenol; b= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos; b= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos; c= deformação do anel de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos.

Tabela 15. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho para o precursor P2 e seu respectivo ligante H₂L4, obtidos em pastilha de KBr.

Absorção (cm⁻¹)	P2	P2_{Literatura}[*]	H₂L4	H₂L4_{Literatura}[*]
ν OH	3451	3482	3449	3300
ν CH _{aromático}	3051, 3000	3057, 3001	3049	3055
ν_{as} CH ₂	2928	2924	2958	2928
ν_s CH ₂	2860	2874	2831	2828
ν C=C e ν C=N	1637, 1598, 1501, 1468,	1629, 1599, 1508, 1469,	1627, 1599, 1508, 1453	1628, 1597, 1512, 1469
ν C-O-H _{fenol} ^a	1386	1388	-	-
$\nu_{as, s}$ C-O-C	1254	1258	1251	1258
ν C-O ^a	-	-	1251	1217
δ CH _{aromático}	1220, 1180	1217, 1184	1180	1180
γ -CH ^b e β - anel ^c	839, 753	839, 748	841, 765	837, 752

*LOPES, 2012; a= deformação axial de fenol; b= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos; b= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos; c= deformação do anel de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos.

Os compostos orgânicos HL1-H₂L4 foram utilizados na síntese dos compostos de coordenação a partir da reação com sais de cobre(II) e gálio(III). Os ligantes propostos possuem três ou quatro grupos que são potencialmente coordenantes. Quando complexados com íons metálicos como, por exemplo, o cobre(II) e o gálio(III), os ligantes propostos levaram à formação de complexos com ambientes de coordenação insaturados ou contendo ligantes lábeis, como moléculas de solvente, o que facilitará a interação destes com os sistemas biológicos.

5.2. Caracterização dos complexos de cobre(II) já descritos na literatura (C1-C4)

Para os compostos de cobre(II) (Anexo 2b), já descritos na literatura, a caracterização foi realizada a fim de confirmar a obtenção e pureza de tais

compostos, sendo os resultados comparados com aqueles já relatados na literatura (FERNANDES et al., 2010; FERNANDES et al., 2015; BORGES et al., 2016).

5.2.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho

Através da espectroscopia de infravermelho para os complexos de cobre(II) (C1-C4), observou-se que bandas de absorção referentes aos respectivos ligantes são encontradas nos espectros de infravermelho dos complexos (Figura 36 a 39). A reação de complexação dos ligantes com o metal é confirmada pelas variações no número de ondas das bandas dos complexos, bem como suas intensidades, em relação ao seu ligante.

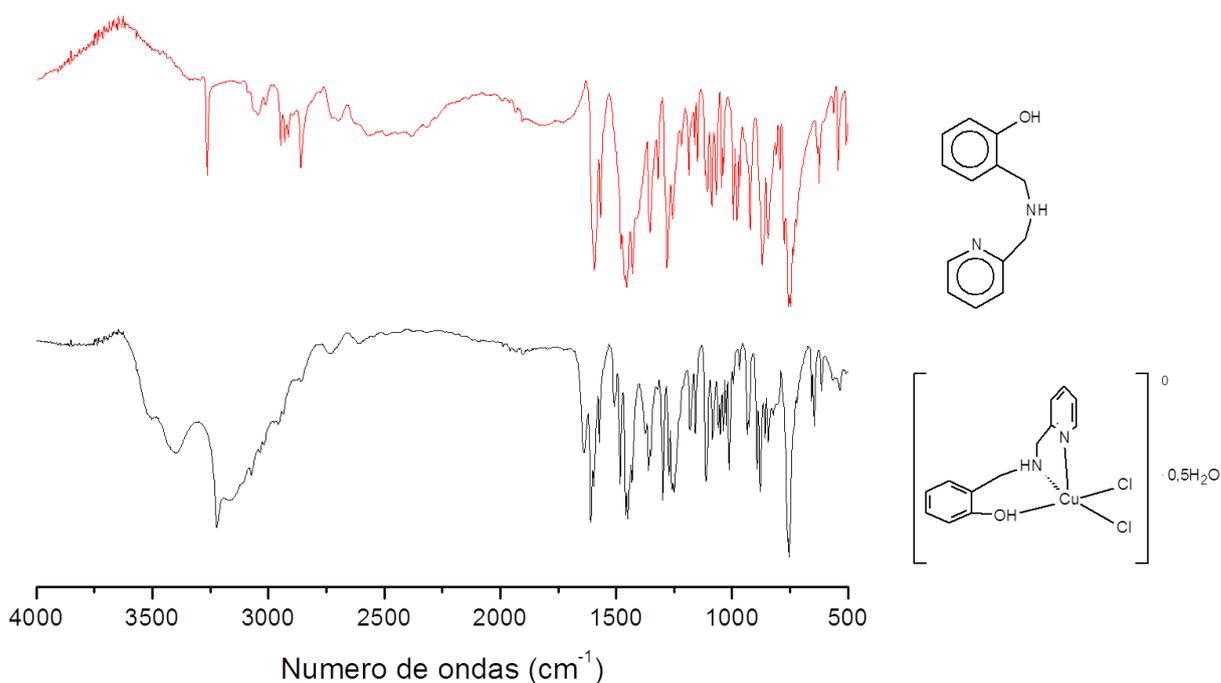


Figura 36. Espectros de infravermelho para o ligante HL1 e para o complexo C1, obtidos em pastilha de KBr. A proposta para o composto C1 é baseada em dados de difração de raios X (BORGES et al., 2016).

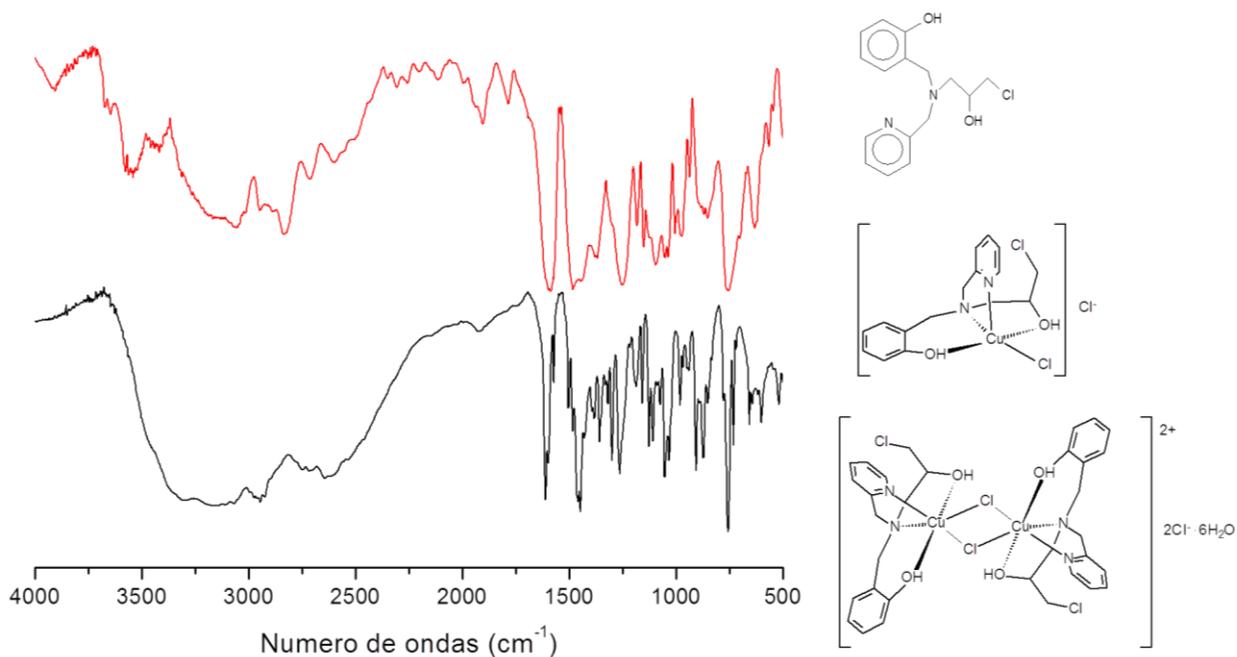


Figura 37. Espectros de infravermelho para o ligante H₂L2 e para o complexo C2, obtidos em filme sobre pastilha de KBr (para H₂L2) e em pastilha de KBr (C2). As propostas para C2 são baseadas em dados de difração de raios X (FERNANDES et al., 2010).

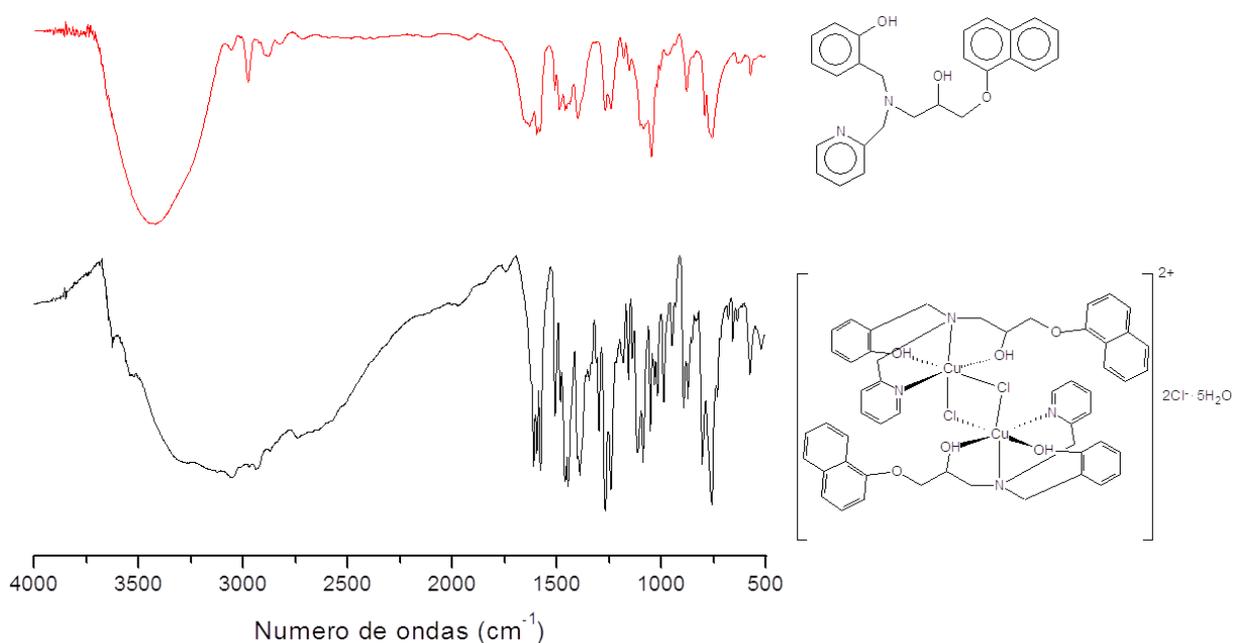


Figura 38. Espectros de infravermelho para o ligante H₂L3 e para o complexo C3, obtidos em filme sobre pastilha de KBr (para H₂L3) e em pastilha de KBr (C3). A proposta para o composto C3 é baseada em dados de difração de raios X (FERNANDES et al., 2015).

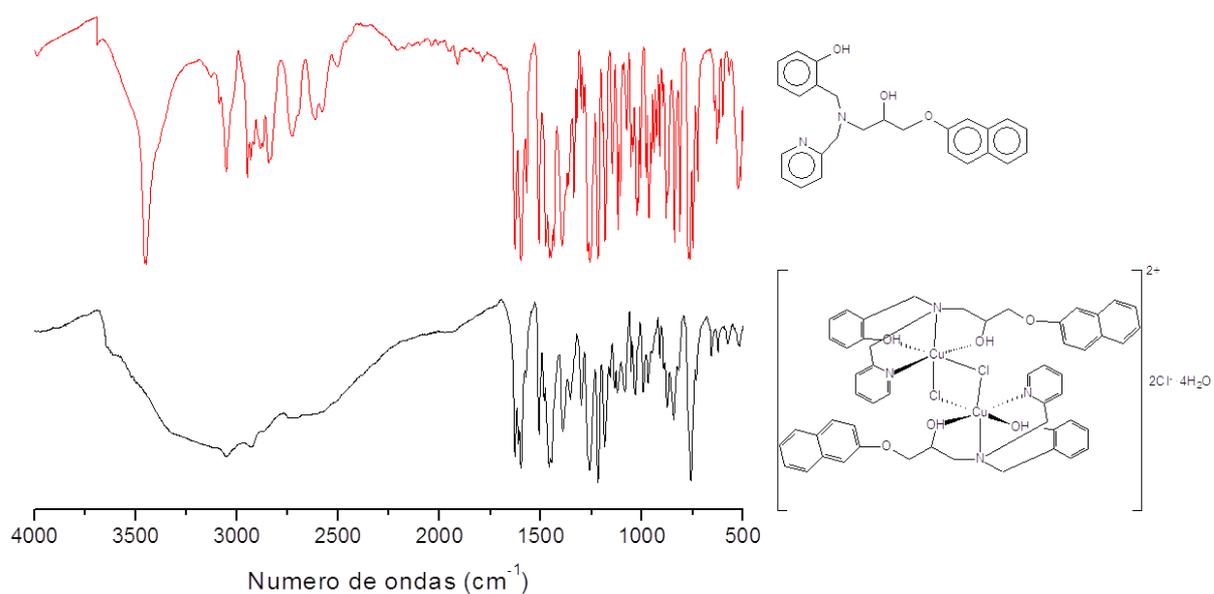


Figura 39. Espectros de infravermelho para o ligante H_2L_4 e para o complexo C_4 , obtidos em pastilha de KBr. A proposta para o composto C_4 é baseada em dados de difração de raios X (FERNANDES et al., 2015).

A Tabela 16 apresenta as atribuições detalhadas das bandas observadas nos espectros de infravermelho obtidos para os complexos C_1 - C_4 .

Tabela 16. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho para os complexos C1-C4, obtidos em pastilha de KBr.

Absorção (cm⁻¹)	C1	C2	C3	C4
v OH	3396	3500-2500	3500-2500	3500-2500
v NH	3216	-	-	-
v CH _{Aromático}	3060	3045; 3034	3051	3051
v CH ₂ ; v CH ₃	2932	2946; 2627	-	-
v _{as} CH ₂ , v _s CH ₂	-	-	2930; 2867; 2746	2929; 2867; 2746
v C=C; v C=N	1607; 1587; 1449	1614; 1443	1612; 1597; 1574; 1438; 1393	1628; 1600; 1456; 1393
v _{as} C-O-C			1269	1261
v C-O _{fenol}	1236	1259	1235	1219
δ CH _{aromático}	1112	1125	1084	1180
γ-CH ^a , β-anel ^b	748	759	808; 757	837; 766

a= deformação axial de fenol; b= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos; c= deformação do anel de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos.

5.2.2. Difração de Raios X

A análise por difração de raios X de monocristal para o complexo [(H₂L3)Cu(μ-Cl)₂Cu(H₂L3)]Cl₂ (C3) (Figura 40) indica que esta espécie consiste em um cátion dimérico, no qual os centros de cobre(II) estão unidos por duas pontes cloro, resultando em uma estrutura centro-simétrica. Consequentemente, os átomos se denominam pelos mesmos números. Existem dois cloretos como contra-íons, Cl(1) e Cl(1'). Nesta estrutura, cada átomo de cobre(II) está coordenado a um nitrogênio amínico (N(1) ou N(1')), a um nitrogênio piridínico (N(22) ou N(22')), a um oxigênio do grupo álcool (O3 ou O3'), a um oxigênio fenólico, o qual se encontra na forma protonada (O(10) ou O(10')), a coordenação a dois ligantes cloro (Cl(1) e Cl(1')) em ponte resulta em centros de cobre(II) hexacoordenados, com geometria octaédrica distorcida.

Os átomos de oxigênio do álcool (O(3) e O(3')) estão *trans* aos átomos de nitrogênio piridínico (N(22) e N(22')), respectivamente). Os átomos de oxigênio fenólico (O(10) e O(10')) estão *trans* ao átomo de cloro (Cl(1') e Cl(1), respectivamente). Os átomos de nitrogênio amínico (N(1) e N(1')) estão *trans* ao átomo de cloro (Cl(1) e Cl(1')), respectivamente).

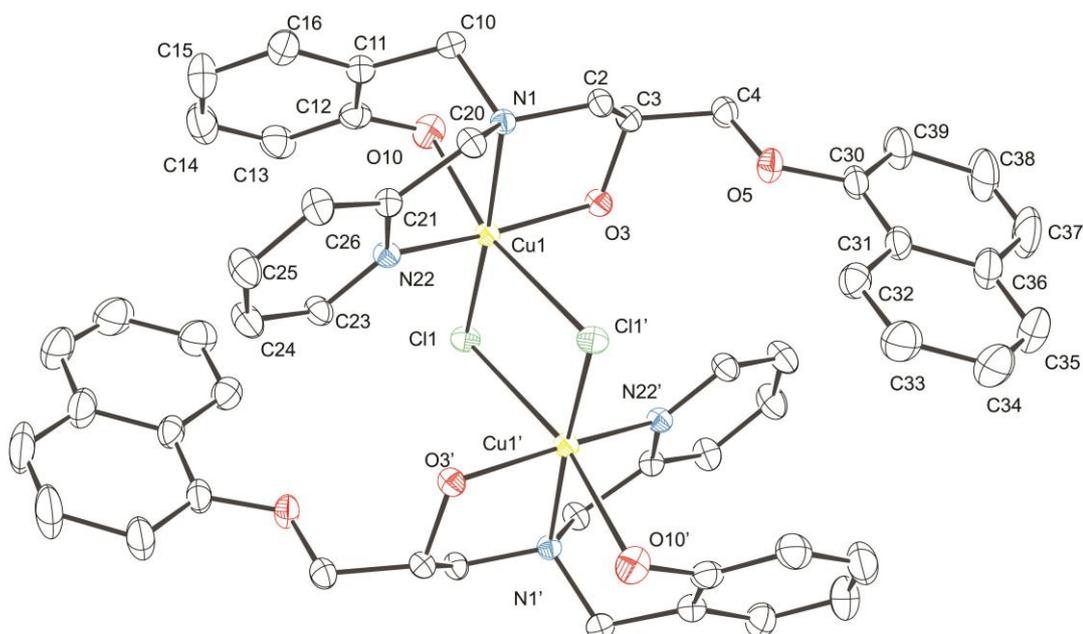


Figura 40. ZORTEP para o cátion $[(\text{H}_2\text{L}_3)\text{Cu}(\mu\text{-Cl})_2\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}_3)]^{2+}$ (C3).

Pode-se observar pela Tabela 17 que o complexo C3 possui as ligações em posição axial mais longas (Cu(1)-Cl(1'); Cu(1')-Cl(1); Cu(1)-O(10); Cu(1')-O(10')) e quatro ligações mais curtas, sendo quatro no plano equatorial e uma na posição axial. Esta distorção tetragonal é consequência da configuração d^9 , já que a assimetria de preenchimento dos níveis energéticos provoca a distorção de Jahn-Teller, com alongamento axial em z (*z-out*). Este efeito se caracteriza pela quebra da degenerescência dos orbitais *d*, levando a distorções na geometria do complexo (LEE, 1999; CHOI et al., 2003; FERNANDES et al., 2015).

O complexo C3 apresenta geometria distorcida, conforme pode ser observado pelos ângulos formados pelos átomos N(22)-Cu(1)-N(1) 83,21(5)°; O(3)-Cu(1)-N(1) 84,20(5)°; N(22)-Cu(1)-Cl(1) 99,81(4)°; O(3)-Cu(1)-Cl(1) 94,02(4)°; N(22)-Cu(1)-Cl(1') 85,82(4)°; O(3)-Cu(1)-Cl(1') 85,18(4)°; N(1)-Cu(1)-Cl(1') 93,64(4)°; Cl(1)-Cu(1)-Cl(1') 94,326(13)°.

Tabela 17. Principais distâncias (Å) e ângulos de ligação (°) para os complexos [(H₂L3)Cu(μ-Cl)₂Cu(H₂L3)]Cl₂ (C3), [(H₂L4)Cu(μ-Cl)₂Cu(H₂L4)]Cl₂.4CH₃OH (C4).

Distâncias (Å) e ângulos de ligação (°)	C3	C4 ^a
Cu(1)-N(22)	1,9783(13)	1,9910(2)
Cu(1)-O(3)	1,9824(11)	1,9854(18)
Cu(1)-N(1)	2,0374(13)	2,0360(2)
Cu(1)-Cl(1)	2,2436(4)	2,2445(7)
Cu(1)-O(10)	2,5939(14)	2,495(2)
Cu(1)-Cl(1')	2,8657(4)	2,8823(8)
N(22)-Cu(1)-O(3)	164,01(5)	163,55(8)
N(22)-Cu(1)-N(1)	83,21(5)	83,25(9)
O(3)-Cu(1)-N(1)	84,20(5)	82,89(8)
N(22)-Cu(1)-Cl(1)	99,81(4)	101,35(7)
O(3)-Cu(1)-Cl(1)	94,02(4)	93,23(5)
N(22)-Cu(1)-O(10)	104,74(5)	88,46(8)
O(3)-Cu(1)-O(10)	83,23(5)	99,40(8)
Cl(1)-Cu(1)-O(10)	89,48(3)	89,26(5)
O(10)-Cu(1)-Cl(1')	168,03(3)	174,23(6)
N(1)-Cu(1)-Cl(1)	171,67(4)	173,46(6)
N(22)-Cu(1)-Cl(1')	85,82(4)	85,88(6)
O(3)-Cu(1)-Cl(1')	85,18(4)	86,36(6)
N(1)-Cu(1)-Cl(1')	93,64(4)	94,28(2)
Cl(1)-Cu(1)-Cl(1')	94,33(13)	90,71(2)
N(1)-Cu(1)-O(10)	82,23(5)	86,21(8)

Fonte: ^aFERNANDES et al., 2015.

Na Tabela 18, encontram-se os dados cristalográficos para o complexo [(H₂L3)Cu(μ-Cl)₂Cu(H₂L3)]Cl₂ (C3).

Tabela 18. Parâmetros cristalográficos para o complexo [(H₂L3)Cu(μ-Cl)₂Cu(H₂L3)]·Cl₂ (C3).

Fórmula empírica	C ₅₂ H ₅₂ Cl ₄ Cu ₂ N ₄ O ₆	
Peso molecular	1097,86	
Temperatura	190(2) K	
Comprimento de onda	0,71073 Å	
Sistema cristalino	Triclínico	
Grupo espacial	P-1	
Parâmetros de cela	a = 8,7095(2) Å	α = 86,9340(10)°.
	b = 10,7960(3) Å	β = 77,2440(10)°.
	c = 15,7740(3) Å	γ = 79,0790(10)°
Volume	1420,28(6) Å ³	
Z	1	
Densidade calculada	1,284 Mg/m ³	
Coeficiente de absorção	0,984 mm ⁻¹	
F(000)	566	
Dimensões do cristal	0,33 x 0,18 x 0,08 mm ³	
Intervalo de θ na coleta	1,92 para 31,48°	
Intervalo hkl na coleta	-12 ≤ h ≤ 12, -15 ≤ k ≤ 15, -23 ≤ l ≤ 23	
Reflexões coletadas	32822	
Reflexões independentes	9416 (R _{int} = 0,0269)	
Correção de absorção	Semi-empírica	
Fatores de transmissão máx. e mín	0,925 e 0,737	
Método de refinamento	Matriz completa em F ²	
Dados / parâmetros	9416 / 312	
GOF	1,068	
Índices finais R [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0385, wR2 = 0,1053	
Índices R (todos os dados)	R1 = 0,0503, wR2 = 0,1100	
Picos máx. e mín.	1,337 e -1,012 e Å ⁻³	

Com uma estrutura similar ao do composto isomérico C3, os dados de difração de raios X para o complexo C4 (Figura 41) foram publicados juntamente com os dados do composto C3, por Fernandes e colaboradores (2015). O complexo C4, assim como C3, apresenta-se como dimérico no estado sólido, com geometria

octaédrica distorcida. Pelas Tabelas 17 e 18, observamos que a maioria das distâncias e ângulos de ligação dos isômeros C3 e C4 são semelhantes. A principal diferença entre as estruturas destes compostos está na distância de ligação de Cu-O_{fenólico}, sendo 2,5939(4) Å para C3 e 2,495(2) Å para C4. Como resultado disso, observam-se diferenças relacionadas aos ângulos de ligação que envolvem a ligação do cobre(II) com o fenol (FERNANDES et al., 2015). A Figura 42 mostra que os anéis naftolênicos dos complexos C3 e C4 são posicionados ortogonalmente um em relação ao outro.

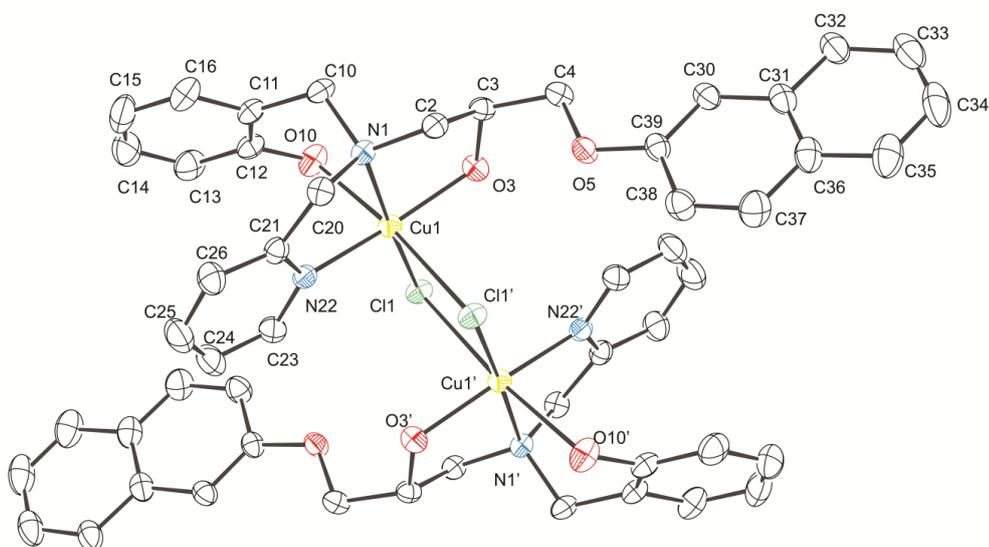


Figura 41. ZORTEP para o cátion $[(H_2L_4)Cu(\mu-Cl)_2Cu(H_2L_4)]^{2+}$ (C4) (FERNANDES et al., 2015).

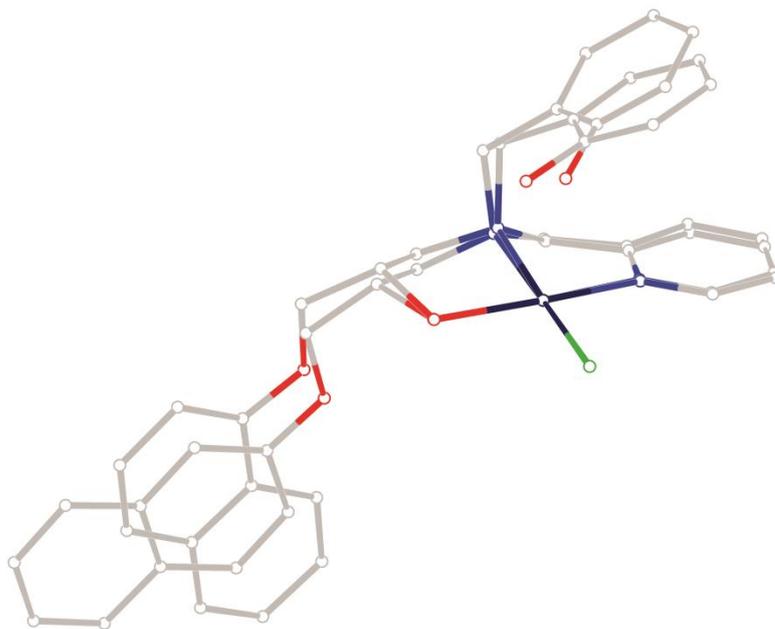


Figura 42. Sobreposição dos cátions dos complexos C3 e C4 (FERNANDES et al., 2015).

5.2.3. Análise elementar, condutivimetria e ponto de fusão

Os dados da análise elementar (Tabela 19) em conjunto com os valores de condutividade para os compostos de cobre(II) e difração de raios X são condizentes com os complexos $[\text{Cu}(\text{HL1})\text{Cl}_2] \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (P.M.= 355,99 g/mol) para C1, $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L2})\text{Cl}]\text{Cl}$ (P.M.= 441,24 g/mol) e $[(\text{H}_2\text{L2})\text{Cu}(\mu\text{-Cl})_2\text{Cu}(\text{H}_2\text{L2})]\text{Cl}_2$ (P.M.= 882,48 g/mol) para C2, $[(\text{H}_2\text{L3})\text{Cu}(\mu\text{-Cl})_2\text{Cu}(\text{H}_2\text{L3})]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (P.M.= 1187,99 g/mol) para C3 e $[(\text{H}_2\text{L4})\text{Cu}(\mu\text{-Cl})_2\text{Cu}(\text{H}_2\text{L4})]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (P.M.= 1168,98 g/mol) para C4, respectivamente. Dados referentes aos compostos de cobre já foram previamente publicados sendo que estas análises foram realizadas com o intuito de se avaliar a pureza dos mesmos e determinar exatamente o peso molecular, necessário para estudos em solução e biológicos.

Tabela 19. Dados de análise elementar (C, H e N), de condutivimetria, realizada na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, e o ponto de fusão para os complexos de cobre(II) C1-C4.

	Análise Elementar			Condutivimetria		Ponto de Fusão
	%C Exp. (Calc.)	%H Exp. (Calc.)	%N Exp. (Calc.)	Condutividade (DMF) $\mu\text{S cm}^{-1}$	Espécie de eletrólito ^a	$^{\circ}\text{C}$
C1	43,16 (43,65)	4,44 (4,23)	7,53 (7,83)	48,4	parcialmente catiônico	168
C2	43,27 (43,55)	4,43 (4,34)	7,60 (6,35)	59,8	1:1	110
C3	52,73 (52,57)	5,39 (5,26)	4,94 (4,72)	95,9	1:1	150
C4	53,31 (53,38)	5,39 (5,17)	4,87 (4,79)	91,2	1:1	129

^aFonte: GEARY, 1971.

Assim, como foi relatado anteriormente por Fernandes e colaboradores para o complexo C2, complexos diméricos podem sofrer hidrólise em solução, resultando em espécies monoméricas (FERNANDES et al., 2010). Os dados de condutividade mostram que os complexos C3 e C4, neutros em estado sólido, tornam-se catiônicos em solução de DMF. Assim, podemos sugerir que C3 e C4, assim como C2, não mantêm o arranjo dimérico, observado em estado sólido, quando dissolvidos em

solução de DMF, favorecendo a formação de espécies monoméricas. Além disso, através do valor de condutividade para o complexo C1 ($48,4 \mu\text{S cm}^{-1}$), pode-se sugerir que os cloretos são parcialmente deslocados da esfera de coordenação em solução de DMF.

5.2.4. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica fornece informações importantes em relação ao estado de oxidação, tipo de ligante e simetria de complexos metálicos (WILLIAMS et al., 2003).

Os espectros RPE para os complexos de cobre(II) C1-C4 (Figura 43) foram simulados considerando o efeito Zeeman e interações hiperfinas, típicas de complexos de cobre(II) monoméricos. Embora os compostos C2, C3 e C4 sejam dímeros no estado sólido, sugere-se, através dos seus espectros de RPE, que estes complexos sejam monoméricos em solução de DMSO e, portanto, a estrutura dimérica observada por difração de raios X não é mantida, assim como é sugerido através da condutividade em solução de DMF para estes complexos. Isto ocorre devido à labilidade dos ligantes cloro que formam pontes entre os centros de cobre(II) no estado sólido. Usualmente, a interação resultante do momento do quadrupolo nuclear com o gradiente do campo elétrico é muito pequena e pode ser ignorada (RAO et al., 2012).

Os espectros são típicos de compostos monoméricos de cobre(II) em ambiente axial simétrico ($g_{xx} = g_{yy} = g_{//}$, $g_{zz} = g_{\perp}$, $A_{xx} = A_{yy} = A_{//}$, $A_{zz} = A_{\perp}$) para configuração eletrônica $3d^9$ e spin eletrônico $S = 1/2$. O spin nuclear para ^{63}Cu (69% de abundância natural) e ^{65}Cu (31% de abundância natural) é $I = 3/2$, resultando em espectros contendo quatro componentes hiperfinas ($2I + 1$) paralelas e perpendiculares, provenientes da interação dipolo-dipolo entre o momento magnético do núcleo e o momento eletrônico do íon paramagnético (Efeito Zeeman) (WILLIAMS et al., 2003). O $\text{MgO}:\text{Cr}^{3+}$ ($g = 1,9797$), não representado na Figura 43, foi utilizado como sinal de referência.

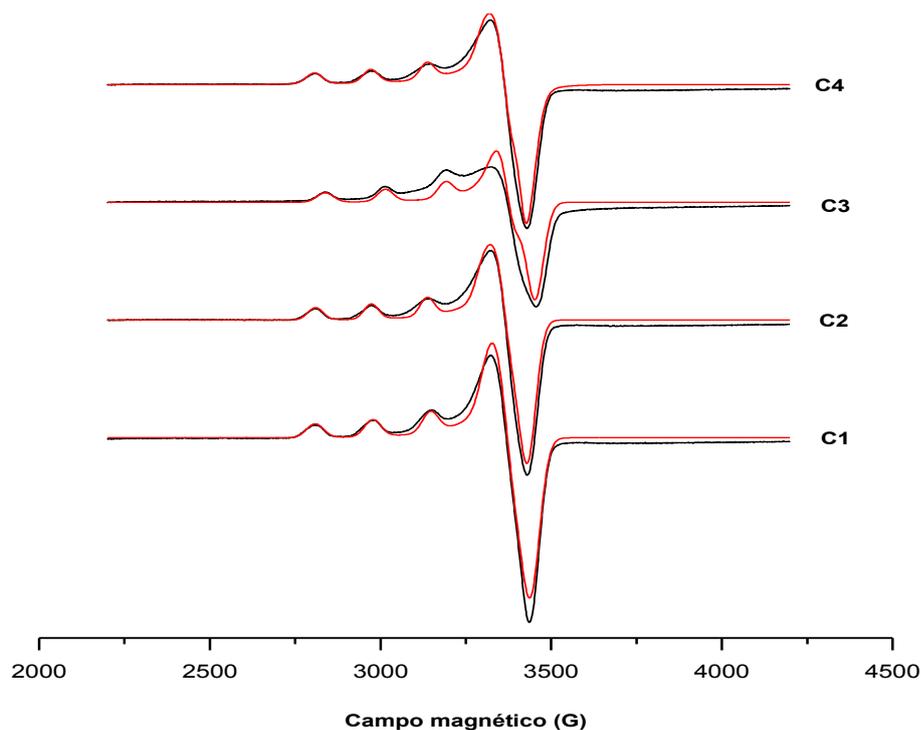


Figura 43. Espectros de ressonância paramagnética eletrônica para os complexos de cobre(II), C1-C4, em solução de DMSO, a 100 K, sendo linha preta para espectros experimentais e linha vermelha para espectros simulados.

Em íons de metais de transição que possuem um preenchimento do subnível d maior que o seu semi-preenchimento, como é o caso do íon Cu^{2+} , é esperado um valor do fator g_{\parallel} maior que aquele observado para um elétron livre ($g_{\parallel} = 2,0023$) (BRUSTOLON e GIAMELLO, 2009). De acordo com Kivelson e Nieman, o valor do g_{\parallel} está relacionado à natureza do ambiente químico. Um valor de g_{\parallel} maior que 2,3 indica natureza iônica da interação metal-ligante, enquanto que para um valor de g_{\parallel} menor que 2,3 sugere-se um ambiente de ligação covalente (KIVELSON e NIEMAN, 1961).

Os parâmetros Hamiltoniano de spin para os complexos C1-C4 foram obtidos por simulação dos espectros experimentais utilizando o programa Qpow (Tabela 20). Estas informações mostram as relações $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2,0023$ e $A_{\parallel} > A_{\perp}$, o que corresponde a íons Cu^{2+} localizados em centros octaédricos distorcidos (D_{4h}) alongados ao longo do eixo z , sendo o seu estado fundamental $d_{x^2-y^2}$ (ROMANOWSKI e MANGRICH, 2001; KALFAOGLU e KARABUTUT, 2011).

Tabela 20. Parâmetros Hamiltonianos de spin obtidos por simulação dos espectros experimentais para os complexos de cobre(II) (C1 a C4) utilizando o programa Qpow.

Complexo	C1	C2	C3	C4
$g_{//} (\pm 0,001)$	2,271	2,277	2,273	2,275
$g_{\perp} (\pm 0,004)$	2,066	2,063	2,065	2,063
$A_{//}(\text{MHz}) (\pm 5)$	530	510	520	520
$A_{\perp}(\text{MHz}) (\pm 5)$	25	27	30	20

Quando o íon Cu^{2+} , de configuração eletrônica $3d^9$ está isolado, todas as componentes do orbital d ($d_{x^2-y^2}$, d_{z^2} , d_{xy} , d_{xz} e d_{yz}) encontram-se degeneradas. No entanto, quando o íon Cu^{2+} encontra-se complexado, estará sujeito à um campo cristalino produzido por seus ligantes. O campo cristalino mais simples é o de simetria octaédrica (O_h), onde os orbitais d são desdobrados em t_{2g} (triplamente degenerado) e e_g (duplamente degenerado). Para complexos octaédricos de cobre(II) alongados no eixo z, chamados de simetria axial, o estado fundamental do íon correspondente é $d_{x^2-y^2}$, como é o caso dos complexos C1-C4 (SHRIVER e ATKINS, 2006).

Sugere-se que os complexos C1 e C2, pentacoordenados em estado sólido, e os complexos C3 e C4, diméricos em estado sólido e monomérico em solução, tornam-se hexacoordenados em solução de DMSO, com provável coordenação do solvente, o que está de acordo com os dados de condutividade que demonstram que o cloreto permanece como contra-íon quando em solução (Tabela 20).

A adição do grupo naftol aos complexos C3 e C4 não afeta a geometria do centro de Cu(II) em solução de DMSO, resultando em valores de interação hiperfina ($A_{//}$) semelhantes aos observados para os complexos sem o grupo naftol (C1 e C2). A maior distorção do centro de Cu(II) é atribuída ao complexo C2, já que possui o menor valor de interação hiperfina ($A_{//}$). Além disso, pode-se notar que os valores de interação hiperfina para os isômeros C3 e C4 são coincidentes, o que propõe que estes dois complexos possuem distorção geométrica similar do centro metálico, em concordância com os dados de difração de raios X para estes dois complexos (ROMANOWSKI e MANGRICH, 2001; FERNANDES et al., 2015).

5.3. Caracterização dos complexos de gálio(III) inéditos (C5-C8)

Nas reações empregando-se o sal de gálio foi observada a necessidade da adição de acetato de sódio para promover a desprotonação do fenol e facilitar a formação do composto de coordenação desejado. Entretanto, a desprotonação não foi observada quando empregou-se o ligante H₂L3. A adição do íon tetrafenilborato também é importante, pois leva à precipitação imediata dos compostos de gálio. Do contrário, os compostos não precipitam, levando à formação de material oleoso ou compostos com baixo rendimento mais baixos.

Para os compostos de gálio (Anexo 2c), que são inéditos, a caracterização é apresentada com mais detalhes.

5.3.1. Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros dos complexos de gálio(III) C5-C8, bem como dos seus respectivos ligantes, estão apresentados nas Figuras 44 a 47.

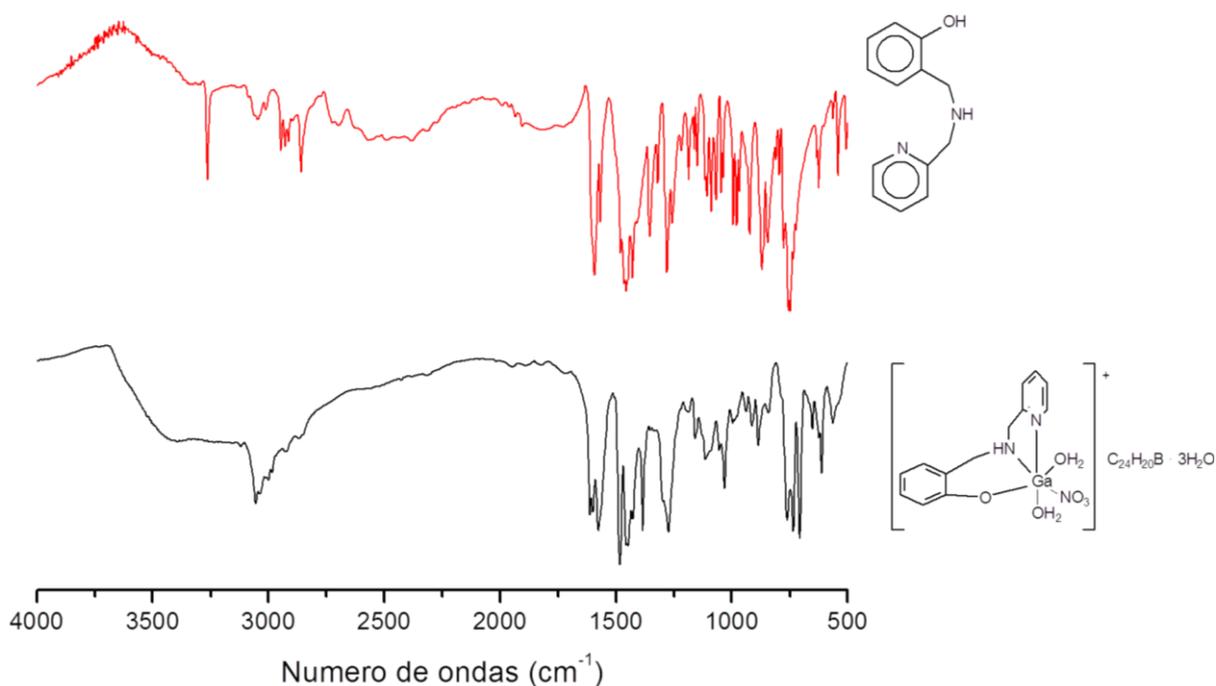


Figura 44. Espectros de infravermelho para o ligante HL1 e para o complexo C5, obtidos em pastilha de KBr.

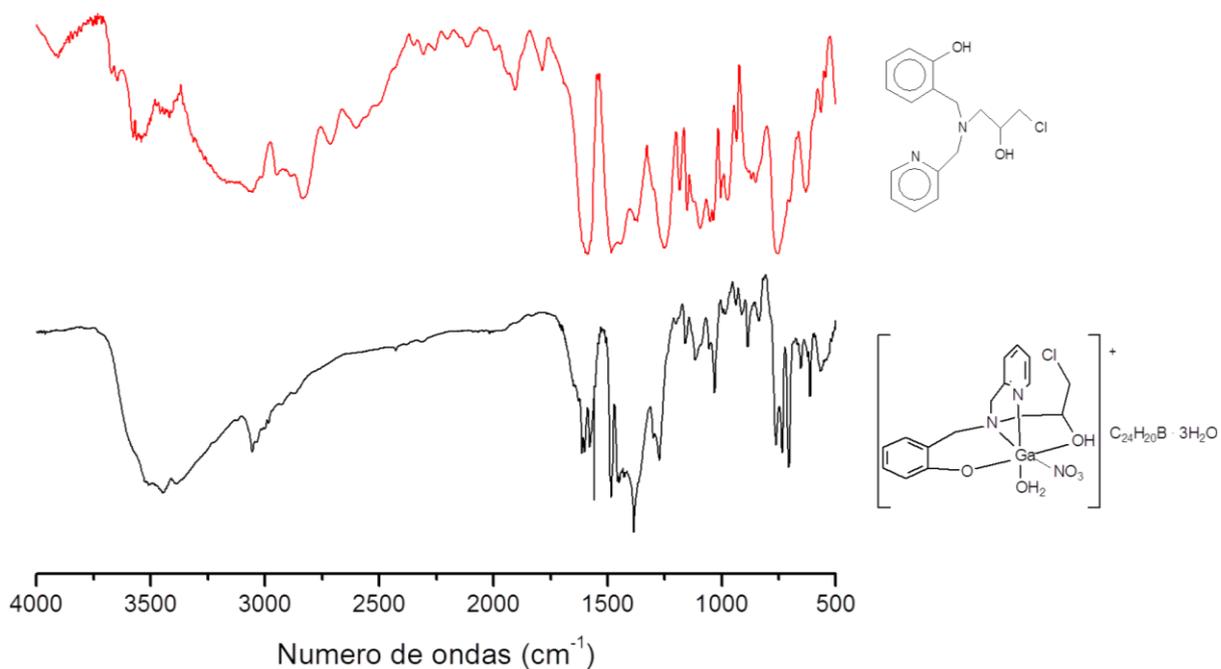


Figura 45. Espectros de infravermelho para o ligante H₂L2 e para o complexo C6, obtidos em filme sobre pastilha de KBr (para H₂L2) e em pastilha de KBr (C6).

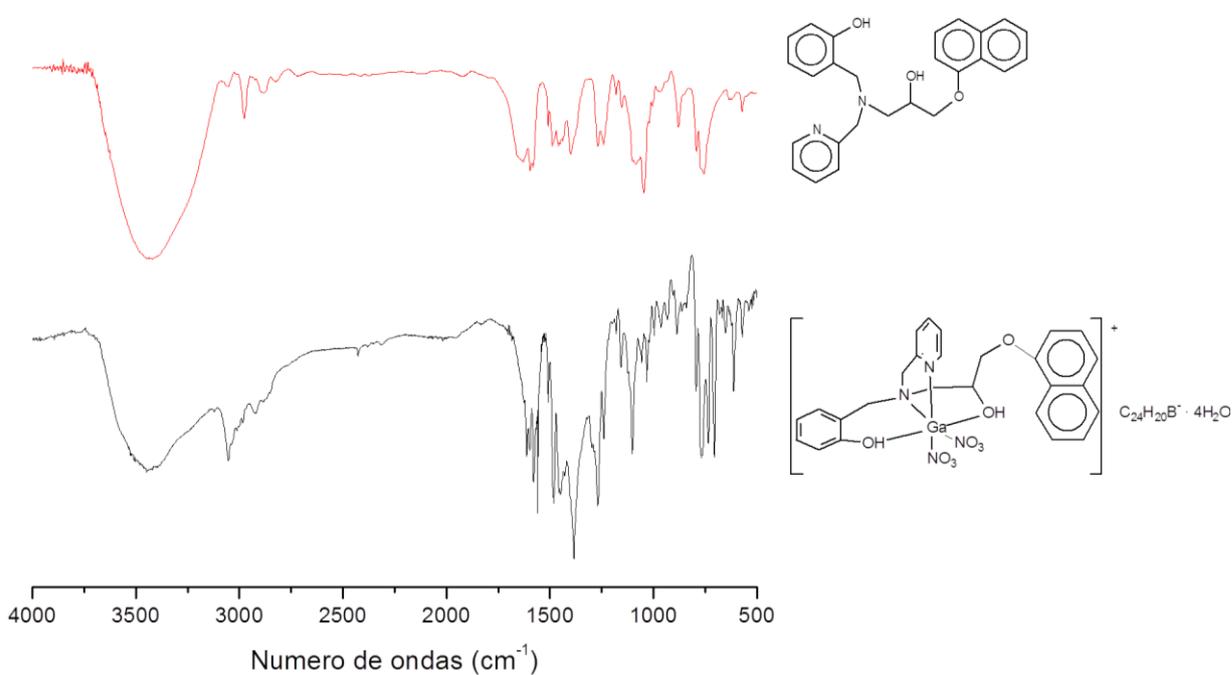


Figura 46. Espectros de infravermelho para o ligante H₂L3 e para o complexo C7, obtidos em filme sobre pastilha de KBr (para H₂L3) e em pastilha de KBr (C7).

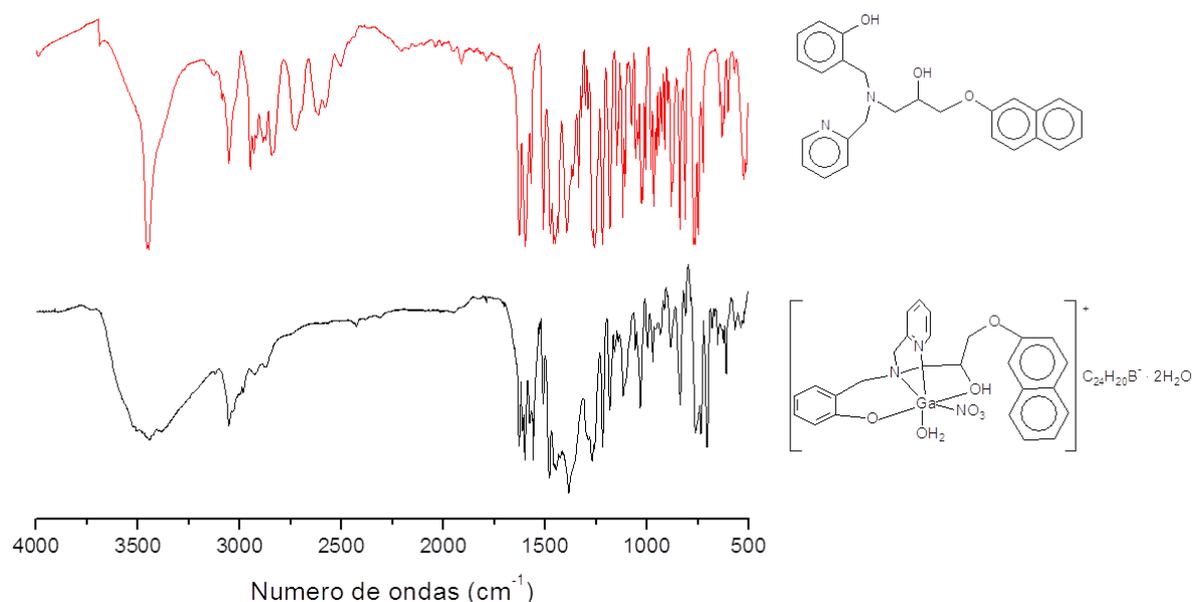


Figura 47. Espectros de infravermelho para o ligante H₂L4 e para complexo C8, obtidos em pastilha de KBr.

A análise dos resultados de espectroscopia de infravermelho mostrou que bandas de absorção referentes aos ligantes HL1-H₂L4 são encontradas nos espectros de infravermelho para os complexos C5-C8. Entretanto, as bandas dos complexos de gálio(III) apresentam variações no número de ondas em relação aos seus respectivos ligantes, o que demonstra modificações na geometria dos compostos orgânicos após as reações de complexação com o metal. As atribuições detalhadas das bandas observadas nos espectros de infravermelho estão descritas na Tabela 21.

Tabela 21. Principais bandas observadas nos espectros de infravermelho para os complexos C5-C8, obtidos em pastilha de KBr.

Absorção (cm ⁻¹)	C5	C6	C7	C8
ν OH	3500-3000	3500-3000	3500-3000	3443
ν NH	3055	-	-	-
ν CH _{Aromático}	3036; 2999	3055	3053	3053
ν CH ₂ ; ν CH ₃	2926	-	-	-
ν_{as} CH ₂ , ν_s CH ₂	-	-	2922	2930; 2872
ν C=C; ν C=N	1612, 1576, 1483	1601, 1558, 1483	1612, 1578, 1481	1612, 1578, 1481
NO ₃ ⁻	1385	1383	1383	1385
ν_{as} C-O-C	-	-	1294	1288
ν C-O _{fenol}	1270	1274	1270	1269
δ CH _{aromático}	1114	1112	1103	1116
ν C-N	1032	1031	1031	1031
γ -CH ^b , β -anel ^c	762	762	795; 769	795; 769
BPh ₄ ⁻	735; 706	735; 706	733; 706	733; 706
ν C-Cl	-	611	-	-

a= deformação axial de fenol; b= deformação C-H fora do plano de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos; c= deformação do anel de aromáticos polinucleares e heteroaromáticos.

Observam-se, em todos os espectros de infravermelho, sinais correspondentes à deformação axial C=C e C=N, deformação axial e angular no plano C-H aromático, os quais demonstram a presença do anel aromático. Entre 1385 e 1383 cm⁻¹, observa-se bandas típicas do ânion nitrato. Entre 795 e 762 cm⁻¹, verifica-se a presença de bandas características do anel 1,2-dissubstituído do grupo piridínico presente nos ligantes HL1-H₂L4. Além disso, observou-se, entre 735 e 706 cm⁻¹, bandas típicas do íon tetrafenilborato, evidenciando a presença desta espécie nos complexos C5-C8. A banda em 3055 cm⁻¹, presente apenas no espectro do complexo C5, refere-se à presença de uma amina secundária típica do ligante HL1. Encontramos, no espectro do complexo C6, uma banda em 611 cm⁻¹, correspondente a ν C-Cl proveniente do ligante H₂L2. A única diferença entre os complexos C7 e C8 se encontra na substituição do anel do grupo naftol. O complexo C7 apresenta um substituinte na posição α de seu ligante (H₂L3), enquanto que no

complexo C8, o substituinte do ligante (H_2L4) se encontra na posição β . Desta forma, os resultados obtidos via utilização de técnicas físico-químicas para estes complexos mostraram grande semelhança. O sinal de deformação axial de C-O-C, observado nos espectros dos complexos C7 e C8, indica a presença do éter alifático nestes compostos. A região alargada entre 3500 e 3000 cm^{-1} é atribuída à deformação axial de O-H de álcool em ligação de hidrogênio intermolecular ou a moléculas de água de hidratação presentes nas estruturas dos complexos, sendo confirmadas pela análise elementar (SILVERSTEIN E WEBSTER, 2000).

5.3.2. Análise elementar, condutivimetria e ponto de fusão

Os dados da análise elementar, condutivimetria e ponto de fusão para os complexos C5-C8 estão mostrados na Tabela 22.

Tabela 22. Dados de análise elementar (C, H e N), de condutivimetria, realizada na concentração de $1,0 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$, e ponto de fusão para os complexos C5-C8.

	Análise Elementar			Condutivimetria		Ponto de Fusão
	%C Exp. (Calc.)	%H Exp.(Calc.)	%N Exp. (Calc.)	Condutividade (DMF) $\mu\text{S cm}^{-1}$	Espécie de eletrólito ^a	$^{\circ}\text{C}$
C5	58,94 (58,92)	5,37 (5,75)	5,31 (5,57)	54,8	1:1	165
C6	58,27 (57,97)	5,23 (5,07)	4,91 (5,07)	46,7	1:1	169
C7	60,31 (60,08)	5,01 (5,45)	5,19 (5,61)	81,3	1:1	166
C8	65,53 (65,38)	5,38 (5,60)	4,15 (4,57)	98,0	1:1	158

^aFonte: GEARY, 1971.

As propostas de composição e estrutura para os complexos de gálio(III) foram feitas a partir dos dados de análise elementar, em conjunto com os valores de condutividade.

Os valores de condutividade demonstram que os complexos C5 – C8 são catiônicos em solução de DMF.

Os dados da análise elementar para o complexo $[\text{Ga}(\text{L}1)(\text{NO}_3)(\text{OH}_2)_2]\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{B} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (C5) são condizentes com um complexo formado por uma molécula do ligante desprotonado (L1), um ânion nitrato e duas moléculas de água

coordenados a um átomo de gálio(III), um íon tetrafenilborato como contra-íon, além de três moléculas de água de hidratação, resultando em um composto com peso molecular de 754,29 g/mol. O complexo $[Ga(HL2)(NO_3)(OH_2)]C_{24}H_{20}B \cdot 3H_2O$ (C6) apresentou dados de análise elementar que concordam com um composto formado por uma molécula do ligante desprotonado (HL2), um íon nitrato e uma molécula de água coordenados ao centro de gálio(III), além de um íon tetrafenilborato como contra-íon e três moléculas de água de hidratação, resultando em um composto com peso molecular de 827,23 g/mol. O complexo $[Ga(H_2L3)(NO_3)_2]C_{24}H_{20}B \cdot 4H_2O$ (C7) apresentou dados que indicam uma espécie formada por uma molécula do ligante H_2L3 e dois ânions nitrato coordenados ao centro metálico, um ânion tetrafenilborato como contra-íon e quatro moléculas de água de hidratação, resultando em um composto com peso molecular de 998,30g/mol. A partir dos dados da análise elementar para o complexo $[Ga(HL4)(NO_3)(OH_2)]C_{24}H_{20}B \cdot 2H_2O$ (C8), propomos que uma molécula do ligante desprotonado (HL4), um íon nitrato e uma molécula de água estejam coordenados a um átomo de gálio(III), enquanto que um ânion tetrafenilborato encontra-se como contra-íon, além de duas moléculas de água de hidratação, resultando em um composto com peso molecular de 917,30 g/mol.

Com base nos valores de condutividade, propõe-se que estes compostos apresentam centros de gálio(III) hexacoordenados.

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

As propostas para estas espécies observadas nos espectros de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS) para os complexos C5-C8 foram caracterizadas através da análise dos seus perfis isotópicos (Anexo 1). Pelos espectros de ESI(+)-MS/MS é possível analisar as fragmentações de alguns sinais de m/z .

A labilidade dos ligantes nitrato leva a formação de cátions que não mostram relação direta com o cátion observado no estado sólido, portanto as espécies observadas no espectro de ESI(+)-MS para os compostos de gálio(III) devem ser avaliadas como resultado da ionização.

Os espectros de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS) para o complexo C5 indicam que há pelo menos uma espécie mononuclear

de gálio(III) presente em solução água/metanol (1:1). De acordo com as espécies propostas na Figura 48 e Tabela 23, tem-se $[\text{Ga}(\text{L}1)_2]^+$, de m/z 485 formada a partir da coordenação do centro de gálio(III) a duas moléculas desprotonadas do ligante (L1). A espécie $[\text{H}_2\text{L}1]^+$ de m/z 215 é obtida pela protonação do ligante. Este cátion sofre fragmentação, resultando na espécie de m/z 109 indicando a ruptura do ligante HL1. Também foram identificadas espécies como $[\text{Na}_2(\text{BPh}_4)]^+$ (m/z 365), $[(\text{BPh}_4)(\text{H}_2\text{L}1)_2]^+$ (m/z 749) e $[(\text{BPh}_4)(\text{H}_2\text{L}1)_2(\text{OH}_2)_4]^+$ (m/z 822) que indicam a presença do íon tetrafenilborato no complexo C5. Nota-se que em virtude da ionização e do fato do composto C5 em estado sólido ser neutro, este não é detectado por esta técnica. Assim, as propostas para este composto indicam modificações da proposta observada em estado sólido, indicando uma possível modificação do comportamento quando em solução.

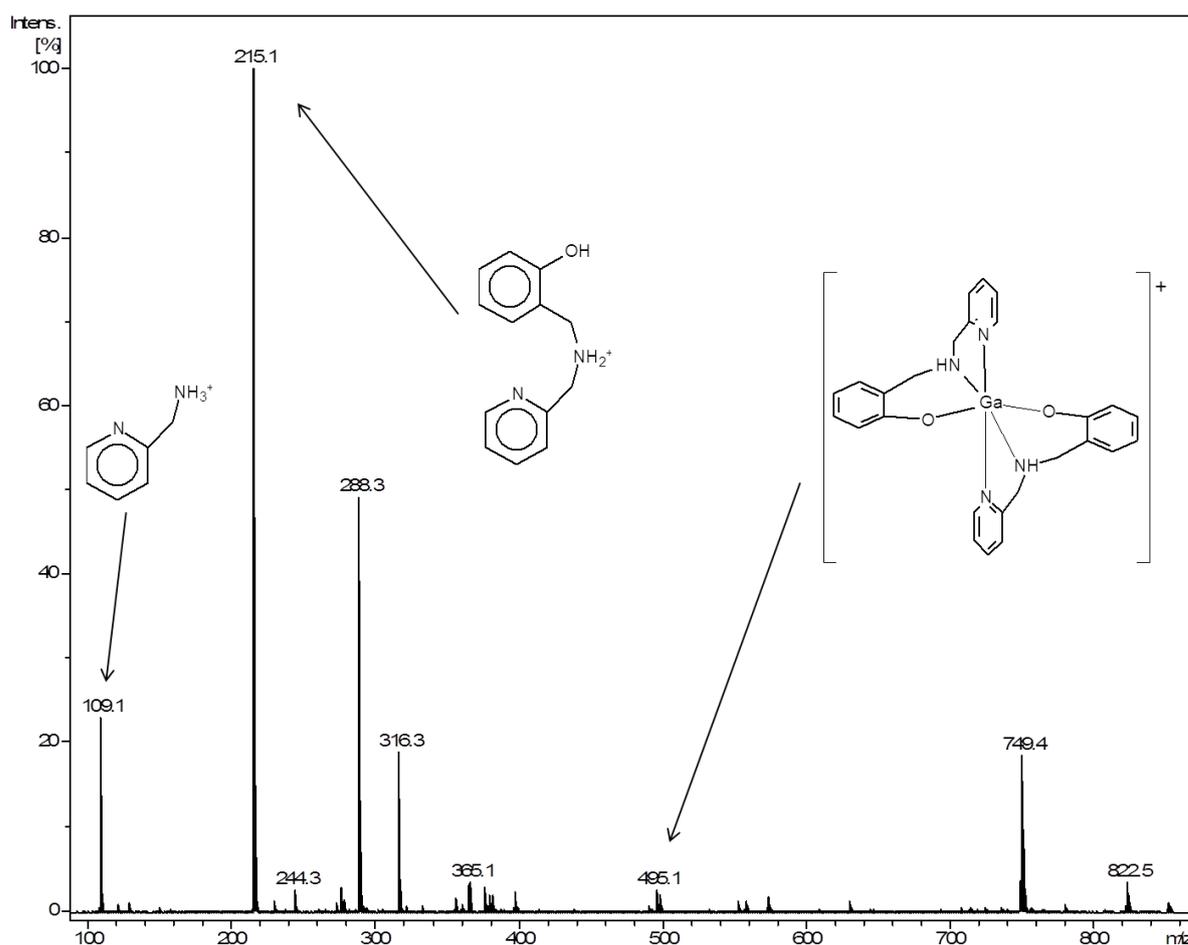


Figura 48. ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1) para o complexo C5.

Tabela 23. Principais m/z e respectivas espécies identificados no espectro de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS) para o complexo C5.

m/z	Espécie	Fórmula Molecular
109,1	$[\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_2]^+$	$\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_2$
215,1	$[\text{H}_2\text{L1}]^+$	$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$
288,3	$[(\text{H}_2\text{L1})(\text{OH}_2)_4]^+$	$\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$
316,3	$[(\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NO})(\text{CH}_3\text{OH})]^+$	$\text{C}_{13}\text{H}_{34}\text{NO}_7$
365,1	$[\text{Na}_2(\text{BPh}_4)]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{BNa}_2$
485,1	$[\text{Ga}(\text{L1})_2]^+$	$\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{GaN}_4\text{O}_2$
749,4	$[(\text{BPh}_4)(\text{H}_2\text{L1})_2]^+$	$\text{C}_{50}\text{H}_{50}\text{BN}_4\text{O}_2$
822,5	$[(\text{BPh}_4)(\text{H}_2\text{L1})_2(\text{OH}_2)_4]^+$	$\text{C}_{50}\text{H}_{59}\text{BN}_4\text{O}_6$

Os espectros de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS) para o complexo C6 (Figura 49) indicam que há pelo menos uma espécie dimérico e quatro espécies mononucleares presentes em solução água/metanol (1:1). De acordo com as espécies propostas na Tabela 24, tem-se a espécie dimérico $[(\text{L2})\text{Ga}(\mu\text{-OH})\text{Ga}(\text{L2})]^+$, de m/z 765, obtida a partir da coordenação de cada centro de gálio a uma molécula do ligante desprotonado (L2) e uma ponte hidroxio entre os centros metálicos. A fragmentação deste cátion resulta na espécie mononuclear $[\text{Ga}(\text{L2})(\text{OH}_2)]^+$ (m/z 393) contendo uma molécula do ligante desprotonado e a uma molécula de água coordenados ao íon de gálio(III). A fragmentação das espécies de m/z 765 e m/z 393 gera o cátion $[\text{Ga}(\text{L2})]^+$, a qual apresenta um átomo de gálio(III) coordenado a uma molécula do ligante desprotonado. A espécie $[\text{Ga}(\text{L1})(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ de m/z 319 é resultante da coordenação de um átomo de gálio(III) a duas moléculas de água e a uma molécula do ligante HL1 desprotonado, proveniente da ruptura do ligante $\text{H}_2\text{L2}$. Como já observado no composto anterior, o fato do composto C6 ser neutro no estado sólido, a ionização produz cátions que não têm relação direta com a estrutura proposta no estado sólido, entretanto são desta oriundas.

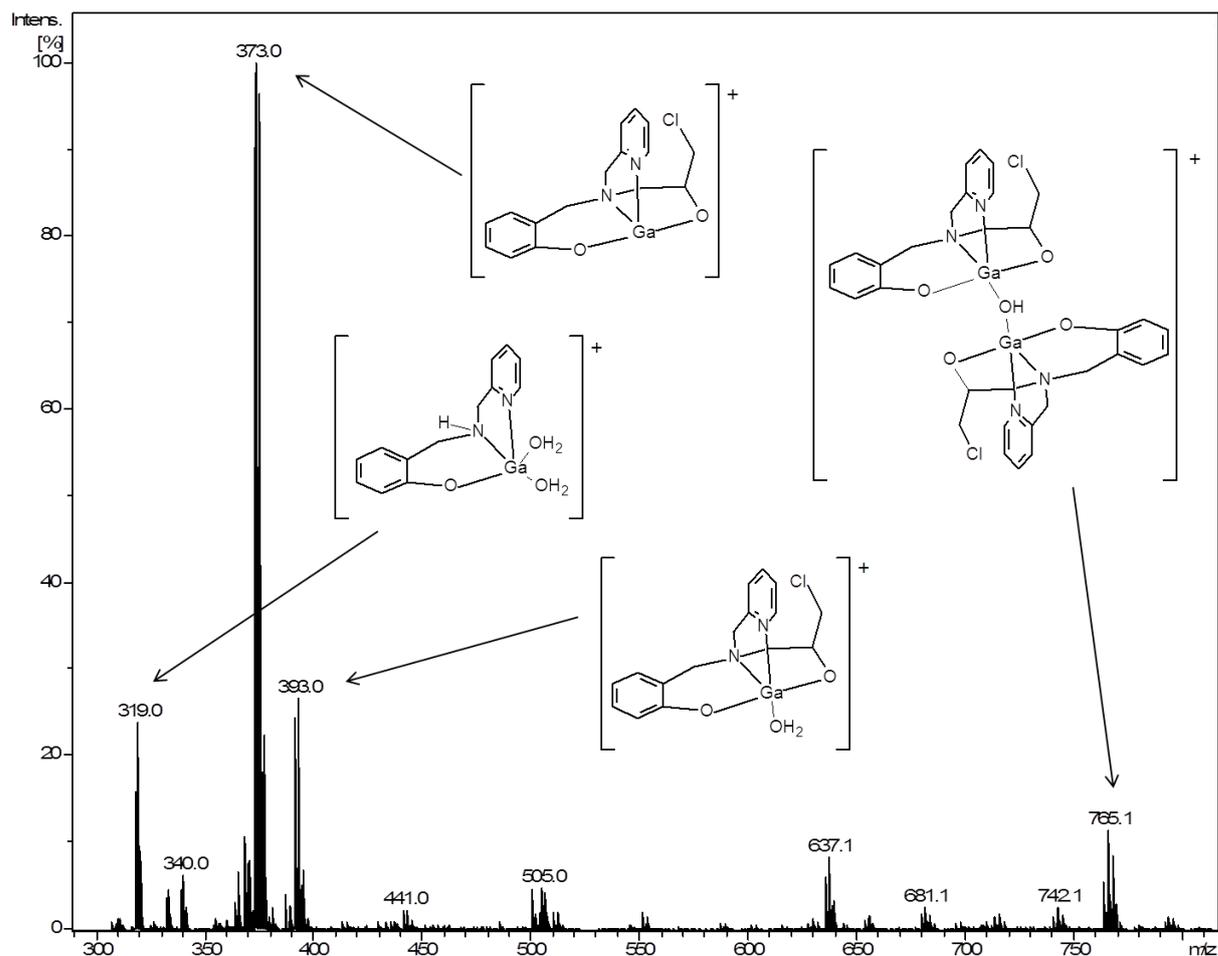


Figura 49. ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1) para o complexo C6.

Tabela 24. Principais m/z e respectivas espécies identificados no espectro de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS) para o complexo C6.

m/z	Espécie	Fórmula Molecular
319,0	$[Ga(L1)(OH_2)_2]^{2+}$	$C_{13}H_{17}GaN_2O_3$
373,0	$[Ga(L2)]^+$	$C_{16}H_{17}ClGaN_2O_2$
393,0	$[Ga(L2)(OH_2)]^+$	$C_{16}H_{19}ClGaN_2O_3$
637,1	$[Ga(H_2L2)(NO_3)_2(CH_3OH)_2(OH_2)_4]^+$	$C_{18}H_{35}ClGaN_4O_{14}$
765,1	$[(L2)Ga(\mu-OH)Ga(L2)]^+$	$C_{32}H_{35}Cl_2Ga_2N_4O_5$

O espectro de ESI(+)-MS para o complexo C7 apresenta pelo menos três espécies mononucleares de gálio(III) em solução metanol/água (1:1), cuja propostas são mostradas na Figura 50 e Tabela 25. O cátion $[Ga(L3)(OH_2)_3(CH_3OH)_5]^+$, de m/z 695, corresponde ao íon metálico coordenado a uma molécula de ligante

desprotonado, a três moléculas de água e a cinco moléculas de metanol, proveniente do solvente que o complexo foi dissolvido. A fragmentação desta espécie gera as espécies $[\text{Ga}(\text{L3})(\text{OH}_2)]^+$ e $[\text{Ga}(\text{L2})(\text{CH}_3\text{OH})]^+$. A espécie $[\text{Ga}(\text{L2})(\text{CH}_3\text{OH})]^+$, de m/z 387, apresenta um íon Ga^{3+} coordenado a uma molécula de metanol e a uma molécula do ligante $\text{H}_2\text{L2}$ desprotonado, proveniente da ruptura do ligante $\text{H}_3\text{L3}$. Já o cátion de m/z 415 ($[\text{H}_3\text{L3}]^+$) corresponde a uma molécula do ligante $\text{H}_3\text{L3}$ protonado. As espécies $[\text{Na}(\text{BPh}_4)(\text{H}_3\text{L2})(\text{OH}_2)_{10}]^+$, $[\text{Na}_2(\text{BPh}_4)(\text{OH}_2)_6]^+$ e $[\text{Na}_2(\text{BPh}_4)]^+$ confirmam a presença do íon tetrafenilborato, proposta pela análise elementar e espectroscopia de infravermelho do composto.

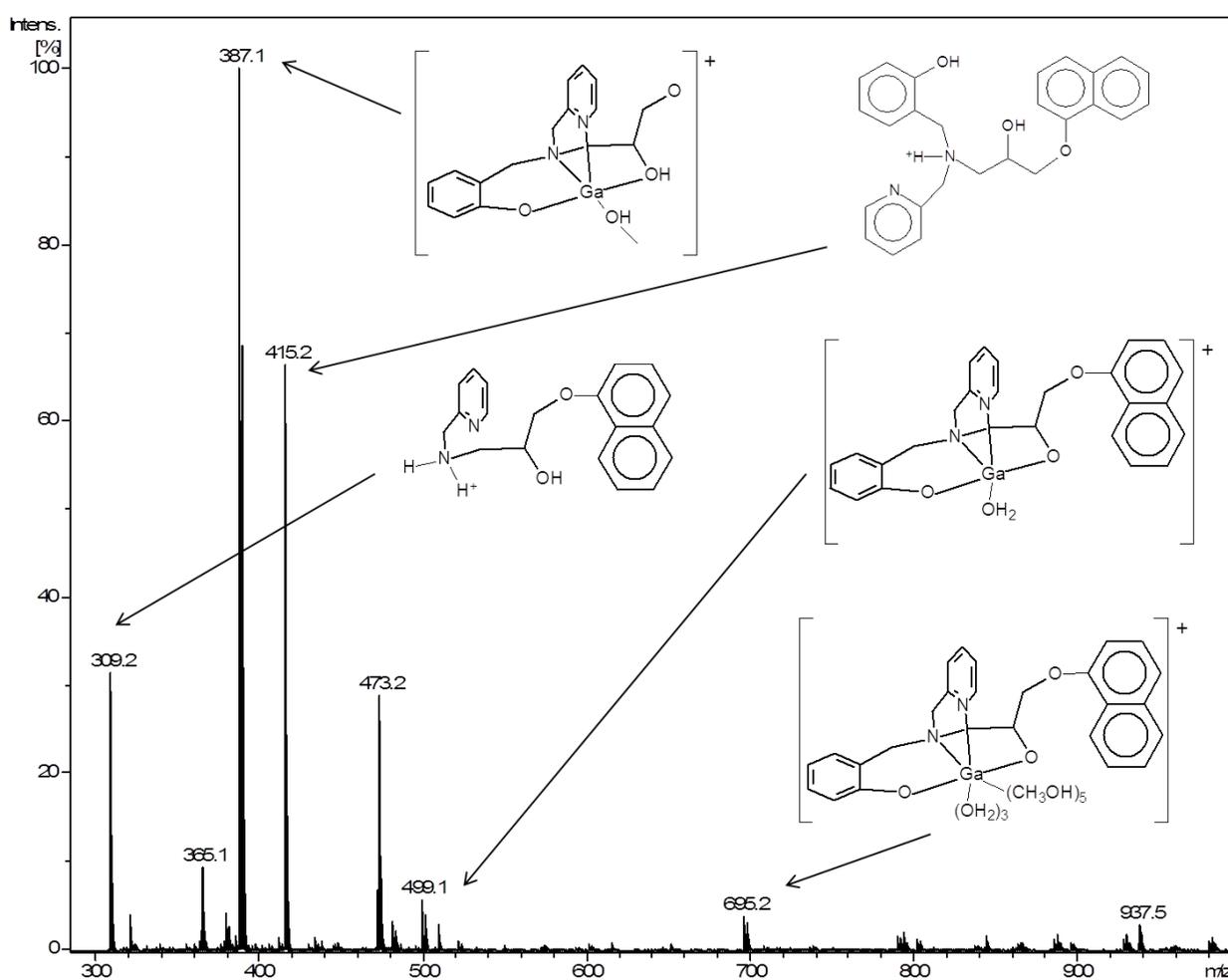


Figura 50. ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1) para o complexo C7.

Tabela 25. Principais m/z e respectivas espécies identificados no espectro de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS) para o complexo C7.

m/z	Espécie	Fórmula Molecular
309,2	$[C_{19}H_{21}N_2O_2]^+$	$C_{19}H_{21}N_2O_2$
365,1	$[Na_2(BPh_4)]^+$	$C_{24}H_{20}BNa_2$
387,1	$[Ga(L2)(CH_3OH)]^+$	$C_{17}H_{22}GaN_2O_4$
415,2	$[H_3L3]^+$	$C_{26}H_{27}N_2O_3$
473,2	$[Na_2(BPh_4)(OH_2)_6]^+$	$C_{24}H_{32}BNa_2O_6$
499,1	$[Ga(L3)(OH_2)]^+$	$C_{26}H_{26}GaN_2O_4$
695,2	$[Ga(L3)(OH_2)_3(CH_3OH)_5]^+$	$C_{31}H_{50}GaN_2O_{11}$
937,5	$[Na(BPh_4)(H_3L2)(OH_2)_{10}]^+$	$C_{50}H_{67}BN_2NaO_{13}$

No espectro de ESI(+)-MS para o complexo C8 foram identificadas oito espécies catiônicas (Figura 51 e Tabela 26). Os espectros dos complexos C7 e C8 apresentam três sinais em comum, m/z 499, m/z 415 e m/z 309. Isso ocorre já que os respectivos ligantes, H_2L3 e H_2L4 , são isômeros. O espectro para o complexo C8 apresenta pelo menos cinco espécies mononucleares de gálio(III). O sinal mais intenso de m/z 415 ($[H_3L4]^+$) corresponde à molécula do ligante H_2L4 protonado, resultando em um cátion. O sinal de m/z 499, $[Ga(L4)(H_2O)]^+$, refere-se a um cátion mononuclear, resultado da coordenação do gálio(III) a uma molécula do ligante desprotonado e a uma molécula de água. Existem várias espécies (m/z 483, m/z 449, m/z 377, m/z 343 e m/z 309), cujas propostas correspondem à ruptura da molécula do ligante H_2L4 . Estas propostas coincidem com a proposta feita com base nos dados de análise elementar e espectroscopia de infravermelho.

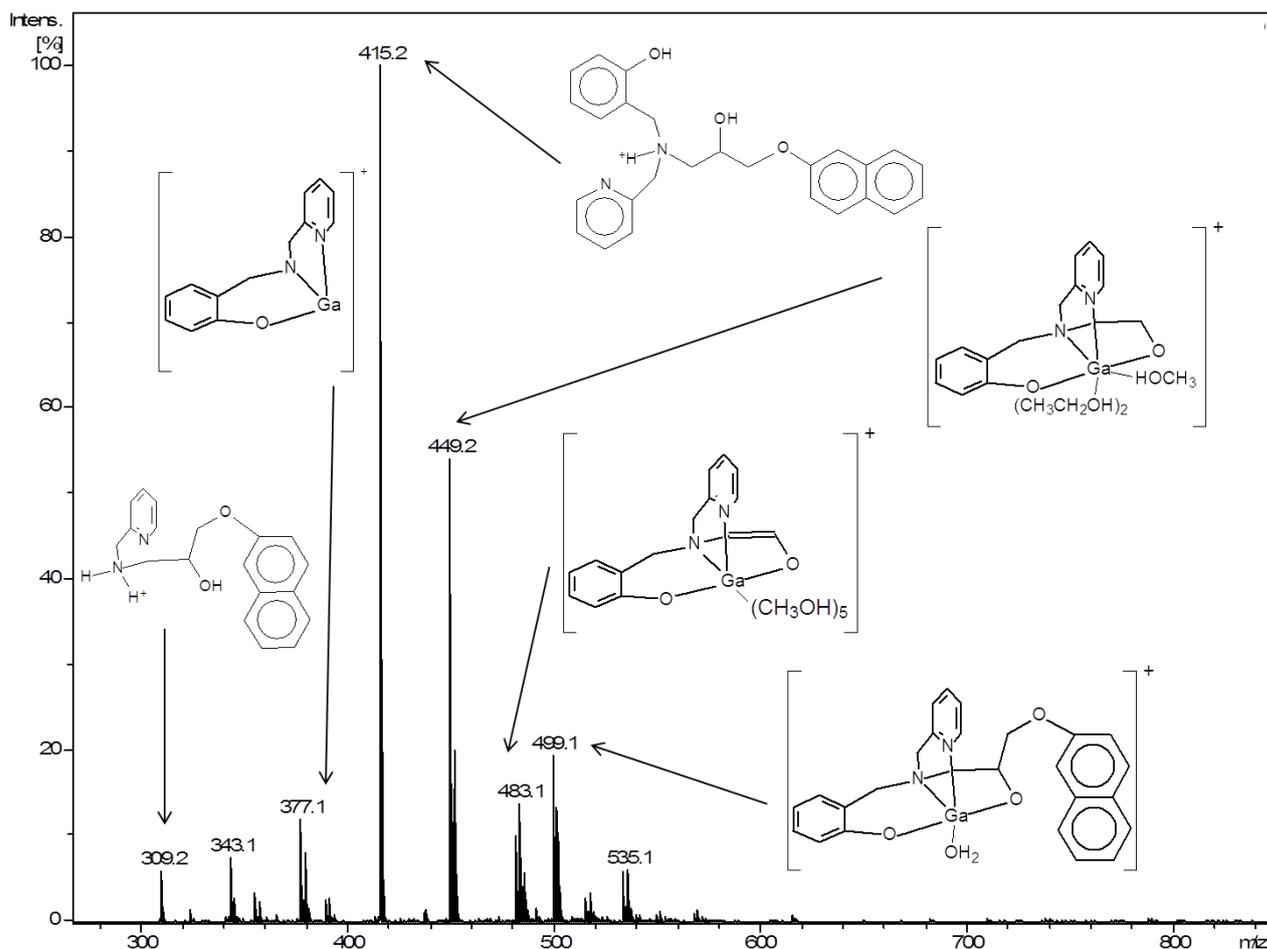


Figura 51. ESI(+)-MS em solução de água:metanol (1:1) para o complexo C8.

Tabela 26. Principais m/z e respectivas espécies identificados no espectro de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS) para o complexo C8.

m/z	Espécie	Fórmula Molecular
309,2	$[C_{19}H_{21}N_2O_2]^+$	$C_{19}H_{21}N_2O_2$
343,1	$[Ga(C_{15}H_{16}N_2O_2)(OH_2)]^+$	$C_{15}H_{18}GaN_2O_3$
377,1	$[Ga(C_{13}H_{12}N_2O)(CH_3OH)]^+$	$C_{16}H_{24}GaN_2O_4$
415,2	$[H_3L_4]^+$	$C_{26}H_{27}N_2O_3$
449,2	$[Ga(C_{15}H_{16}N_2O_2)(CH_3OH)(CH_3CH_2OH)_2]^+$	$C_{20}H_{32}GaN_2O_5$
483,1	$[Ga(C_{15}H_{14}N_2O_2)(CH_3OH)_5]^+$	$C_{20}H_{34}GaN_2O_7$
499,1	$[Ga(L_4)(OH_2)]^+$	$C_{26}H_{26}GaN_2O_4$
501,2	$[Li_3(L_4)(OH_2)_2(CH_3OH)]^+$	$C_{27}H_{32}Li_3N_2O_6$

5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

Os ensaios “*in vitro*” empregando-se células neoplásicas desempenham cada vez mais importância na descoberta de novos compostos com atividade anticancerígena. De maneira geral, uma patologia é caracterizada por alterações no metabolismo e em vias de sinalização essenciais à homeostasia celular. Ensaios com células podem oferecer uma representação destas alterações e fornecer relevantes modelos funcionais para avaliar a ação de uma determinada droga em potencial (ALBRECHT et al., 2004; ARJMAND et al., 2014).

Vale ressaltar que, apesar dos dados de raios X mostrarem que os complexos C2, C3 e C4 apresentam-se como diméricos em estado sólido, estes complexos apresentam-se como monoméricos em solução. Por este motivo, estes complexos foram considerados monoméricos no cálculo de concentração para a realização de ensaios biológicos. Para os compostos de gálio, empregaram-se as propostas feitas com base nos resultados das análises físico-químicas.

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

O ensaio de viabilidade celular foi realizado através de microensaio colorimétrico empregando-se o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tretazólico), o qual tem se mostrado promissor para a predição “*in vitro*” da atividade biológica de novos compostos contra as linhagens de células cancerígenas. Esta avaliação visa selecionar compostos com atividades antitumorais mais promissoras para a etapa de avaliação de morte celular.

Neste experimento, o MTT é reduzido pela succinato desidrogenase, encontrada na mitocôndria viável, formando cristais de coloração púrpura (formazam), na qual é quantificado por espectrofotometria. O resultado do experimento relaciona a população de células capazes de reduzir o MTT (metabolicamente ativas), o que é diretamente proporcional à viabilidade celular (ALBRECHT et al., 2004).

A fim de melhor comparar os valores da atividade entre os compostos, foi calculado o índice de citotoxicidade (IC_{50}) (Tabela 27), que corresponde à concentração capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% das células. Os valores

de IC_{50} foram determinados a partir de curvas dose-resposta, utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5.0.

Os resultados mostram que os compostos de coordenação de cobre(II) foram capazes de reduzir de maneira significativa a viabilidade celular de grande parte das linhagens de células tumorais testadas ($IC_{50} < 100\mu\text{mol L}^{-1}$). No entanto, isso não ocorre com os compostos de coordenação de gálio(III), já que estes são capazes de reduzir a viabilidade apenas das linhagens THP-1 (C5), U937 (C5 e C7) e Molt-4 (C6, C7 e C8). O ligante L3 também demonstrou atividade contra as linhagens (U937, THP-1 e Molt-4), enquanto que seu isômero apresentou atividade significativa contra apenas a linhagem Molt-4. O DMSO (dimetilsulfóxido), veículo utilizado para a dissolução dos compostos, não afetou a viabilidade celular das linhagens utilizadas. Os sais inorgânicos, utilizados nas sínteses dos complexos, também não demonstraram atividade na redução da viabilidade celular das linhagens testadas.

Pela Tabela 27, pode ser observado que todos os complexos de cobre(II) foram eficientes na redução da viabilidade celular contra a linhagem H460, com valores de IC_{50} inferiores à cisplatina, a qual foi utilizado como controle positivo. Os complexos de cobre(II), C3 e C4, e os complexos de gálio(III), C5 e C7, apresentaram atividade significativa contra a linhagem U937, sendo que o complexo C3, apresentou um valor de IC_{50} ($8,2\pm 1,0\mu\text{mol L}^{-1}$) inferior ao encontrado para a cisplatina. A linhagem celular Molt-4 teve sua viabilidade celular reduzida por seis dos oito complexos estudados (C1, C3, C4, C6, C7 e C8), obtendo valores de IC_{50} próximos ou inferiores ao da cisplatina para os complexos C3, C4, C7 e C8. Vale ressaltar que o complexo de gálio(III) C8, reduziu somente a viabilidade celular da linhagem Molt-4, o que sugere uma seletividade da atividade antitumoral deste composto contra esta linhagem.

Tabela 27. IC₅₀ (μmol L⁻¹) dos compostos sobre a viabilidade celular baseado no ensaio de citotoxicidade celular por MTT, após 36 horas de incubação.

COMPOSTOS	Colo205 [#]	H460 [#]	U937 [#]	THP-1 [#]	Molt-4 [#]	PBMC [#]
HL1	>100	> 100	>100	>100	>100	-
H₂L2	>100	> 100	>100	>100	>100	-
H₂L3	>100	> 100	31,1±1,0	67,0±1,1	43,1±1,0	>100
H₂L4	>100	> 100	>100	>100	41,2±1,1	>100
[Ga(NO₃)₃]-6H₂O	>100	>100	>100	>100	> 100	-
[CuCl₂]-2H₂O	>100	>100	>100	> 100	>100	-
[Na(BPh₄)]	>100	>100	>100	>100	>100	-
C1	> 100	56,1±1,0	>100	66,0±1,1	61,7±1,1	-
C2	> 100	58,7±1,1	>100	> 100	> 100	-
C3	31,6±1,1	31,3±1,0	8,2±1,0	11,3±1,1	15,9±1,1	15,7±1,1
C4	35,6±1,1	26,5±1,1	39,3±1,0	31,9±1,1	26,8±1,1	36,6±1,1
C5	> 100	> 100	68,5±1,1	79,4±1,1	>100	-
C6	> 100	> 100	>100	> 100	74,0±1,1	-
C7	> 100	> 100	40,3±1,0	>100	27,6±1,1	>100
C8	> 100	> 100	> 100	> 100	18,0±1,1	>100
Cisplatina	> 100	> 100	16,2±1,0	11,8±1,0	21,4±1,0	>100

[#]Colo205: adenocarcinoma colorretal; H460: carcinoma de pulmão; U937: linfoma histiocítico; THP-1: leucemia monocítica aguda; Molt-4: leucemia linfóide aguda; PBMC: células mononucleares do sangue periférico.

A fim de investigar a seletividade dos complexos mais promissores (C3, C4, C7 e C8) e seus respectivos ligantes (L3 e L4), contra as linhagens tumorais, foi realizado o estudo de viabilidade para as células normais PBMC (células mononucleares de sangue periférico), utilizando as mesmas condições de tempo (36 h) e concentração (6,25; 12,5; 25,0; 50,0 e 100 μmol L⁻¹) utilizadas para as linhagens tumorais. Neste estudo, podemos observar que os complexos de cobre, C3 e C4, apresentaram efeito citotóxico contra as células normais PBMC, com IC₅₀ de 15,7±1,1 e 36,6±1,1 μmol L⁻¹, respectivamente. Já os complexos de gálio(III), C7 e C8, não diminuem a viabilidade celular da linhagem de células normais PBMC de forma significativa (IC₅₀ >100μmol L⁻¹), indicando que estes complexos podem ser seletivos na atividade citotóxica contra as linhagens tumorais. O estudo mostrou também que os ligantes, L3 e L4, não apresentam efeito citotóxico contra as células

normais PBMC. No caso do PBMC, a repetição do experimento foi realizada a partir da coleta do sangue de dois voluntários distintos.

Pelo ensaio de viabilidade celular podemos constatar que a atividade citotóxica de um complexo é dependente dos seus ligantes e do seu centro metálico, já que apresentam diferentes valores de IC_{50} . Podemos verificar que a isomeria também interfere na atividade biológica dos compostos, pois os isômeros H_2L_3 e H_2L_4 e seus respectivos complexos (C3, C4, C7 e C8) apresentam atividade citotóxica diferente para algumas linhagens estudadas.

O estudo de viabilidade celular de complexos de cobalto(II), zinco(II) e platina(II) foram realizados contra as mesmas linhagens tumorais humanas por MORCELLI e colaboradores (2016) e MOREIRA (2015). Nesses estudos podemos observar que a citotoxicidade dos complexos contra as células tumorais é dependente do íon metálico e do ligante utilizados no complexo. Considerando os resultados dos complexos de Co(II), Zn(II) e Pt(II) contidos na Tabela 28, juntamente com resultados de Cu(II) e Ga(III) (Tabela 27) podemos observar que, de forma geral, a citotoxicidade dos ligantes nos complexos segue a seguinte ordem: $HL1 < H_2L2 < H_2L4 < H_2L3$, enquanto que a citotoxicidade dos complexos segue a ordem: $Zn(II) < Co(II) < Ga(III) < Cu(II) = Pt(II)$. Vale a pena salientar que os complexos contendo os metais Cu(II) e Pt(II), os quais apresentam maior citotoxicidade contra linhagens cancerígenas, também são os mais citotóxicos ($IC_{50} < 100 \mu\text{mol L}^{-1}$) contra a linhagem de células normais estudada (PBMC). Já os complexos de gálio(III) e cobalto(II) não causaram diminuição da viabilidade celular para as células normais (PBMC), o que sugere que estes complexos apresentam seletividade contra linhagens tumorais (MORCELLI et al., 2016; MOREIRA, 2015).

Tabela 28. Valores de IC₅₀ obtidos para os complexos de cobalto(III), zinco(II) e platina(II) contendo os ligantes HL1-H₂L4, através do ensaio de MTT.

COMPOSTO	IC ₅₀ (μmol.L ⁻¹)					
	Colo205	H460	U937	THP-1	Molt-4	PBMC
Co(HL2)Cl ^a	>400	>400	259±2	>400	>400	-
Co(HL3)Cl ^a	>400	176±2	32±1	34±1	51±1	>400
[Co(HL4)Cl]·0,5(CH ₃) ₂ CHOH ^a	90±2	147±2	36±2	54±2	65±1	>400
[Zn(HL1)(Cl ₂)] ^b	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	-
[Zn(HL2)Cl] ^b	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	-
[Zn(HL3)Cl] ^b	> 100	> 100	> 100	> 100	24 ± 1	-
[Zn(HL4)Cl] ^b	> 100	> 100	> 100	> 100	58 ± 2	-
[Pt(L1)Cl]·H ₂ O ^b	> 100	> 100	72 ± 2	> 100	> 100	-
[Pt(HL2)Cl]·H ₂ O ^b	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	-
[Pt(HL3)Cl]·H ₂ O ^b	30±2	51±1	11±1	6±1	9±1	22±1
[Pt(HL4)Cl]·H ₂ O ^b	38±2	78±1	15±2	20±1	11±2	42±1

[#]Colo205: adenocarcinoma colorretal; H460: carcinoma de pulmão; U937: linfoma histiocítico; THP-1: leucemia monocítica aguda; Molt-4: leucemia linfóide aguda; PBMC: células mononucleares do sangue periférico.

Fonte: ^aMORCELLI et al., 2016; ^bMOREIRA, 2015.

5.4.2. Avaliação do tipo de morte celular mediada pelos compostos

A avaliação do tipo de morte celular foi realizada através dos experimentos de marcação dupla com anexina V e iodeto de propídio (IP) e avaliação do ciclo celular (Sub-G1). Foram avaliados os compostos mais promissores, o complexo de cobre(II) C4, contra as linhagens H460 e U937, e o complexo de gálio(III) C8, contra a linhagem Molt-4. Dados prévios de estudos mecanísticos e da via apoptótica utilizada para os compostos de cobre C3 foram publicados recentemente (FERNANDES et al., 2015).

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

A fim de confirmar o tipo de morte celular das linhagens neoplásicas (H460, U937 e H460) provocado pelos complexos C4 e C8, foi realizado o experimento de marcação dupla com anexina V e iodeto de propídio (IP). Após o período de

incubação (24 e/ou 30h), foram adicionados os marcadores anexina V e iodeto de propídio às células, sendo estas analisadas em citômetro de fluxo. Para as células que estiverem em apoptose primária ocorre a externalização do fosfatidilserina, sendo identificada pelo marcador anexina V. Já as células que estiverem em necrose são marcadas com iodeto de propídio (IP). As células em apoptose tardia (apoptose-necrose) recebem marcação dupla (anexina V e iodeto de propídio), enquanto que as células que se mantiverem vivas não sofrem nenhum tipo de marcação. Os resultados dos experimentos de marcação com anexina V e iodeto de propídio (IP) estão reunidos na Tabela 29.

Tabela 29. Porcentagem de morte celular por apoptose induzida pelos complexos C4 e C8.

Linhagem	Composto	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$) 36h	Marcação com Anexina V e IP (apoptose + apoptose tardia)			
			24 h		30 h	
			1x IC ₅₀	2x IC ₅₀	1x IC ₅₀	2x IC ₅₀
U937	C4	39,3	-	91,54%	-	-
	Cisplatina*	16,2	-	22,59%	-	-
H460	C4	26,5	-	15,67%	19,6%	86,59%
	Cisplatina	200	-	-	29,06%	76,67%
Molt-4	C8	18,0	19,95%	55,80%	44,86%	86,08%
	Cisplatina	21,4	28,71%	40,61%	28,41%	45,99%

*Fonte: MORCELLI et al., 2016.

A Figura 52 mostra que, após 24 horas de incubação o complexo C4, na concentração de aproximadamente 2x IC₅₀ ($53,0\mu\text{mol L}^{-1}$), foi capaz de induzir apenas 15,67% de morte por apoptose da linhagem H460.

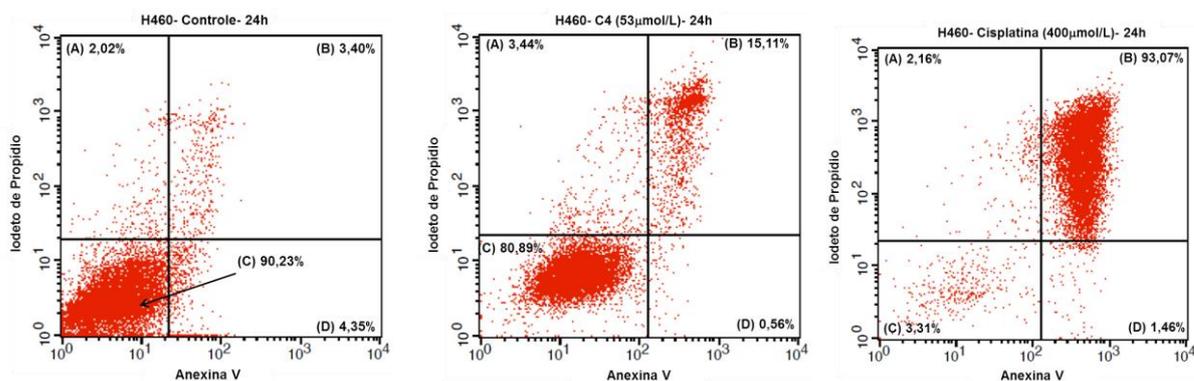


Figura 52. Porcentagem de morte celular por necrose (quadrante A), apoptose tardia (quadrante B), células vivas (quadrante C) e apoptose primária (quadrante D), após a incubação por 24 horas do complexo C4 ($53,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e cisplatina ($400,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) contra a linhagem de carcinoma de pulmão H460.

A fim de avaliar a cinética e o efeito da concentração na porcentagem de morte celular provocada pelo complexo C4, o mesmo experimento foi realizado com o tempo de incubação de 30 h e concentrações de $1x \text{IC}_{50}$ ($26,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $2x \text{IC}_{50}$ ($53,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Figura 53). Para a concentração de $1x \text{IC}_{50}$ o complexo induziu apenas 19,6% de apoptose, enquanto que para a concentração de $2x \text{IC}_{50}$ este valor subiu para 86,59%. A cisplatina ($1x \text{IC}_{50} = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $2x \text{IC}_{50} = 400 \mu\text{mol L}^{-1}$), usada como controle positivo para os experimentos de viabilidade celular induz de forma majoritária a apoptose (29% para $1x \text{IC}_{50}$ e 77% para $2x \text{IC}_{50}$) para a mesma linhagem celular e tempo de incubação de 30 h.

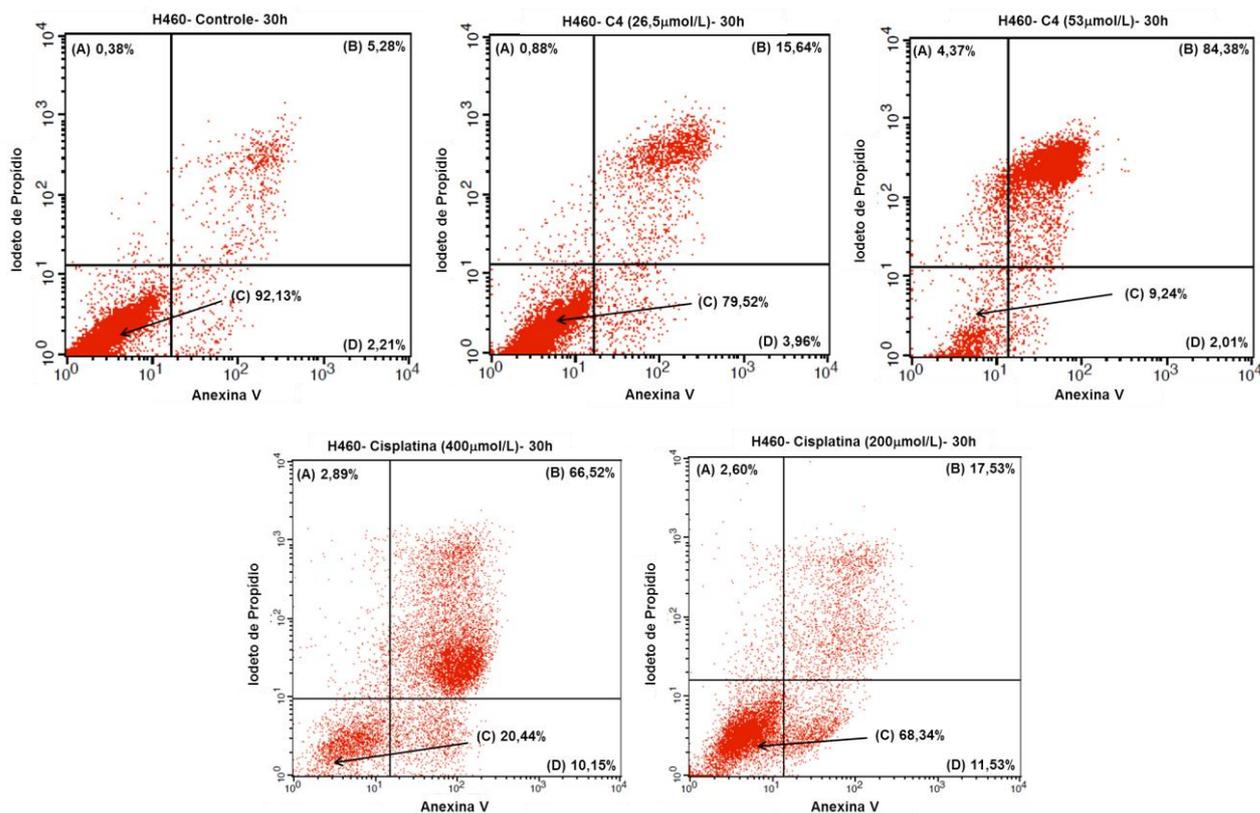


Figura 53. Porcentagem de morte celular por necrose (quadrante A), apoptose tardia (quadrante B), células vivas (quadrante C) e apoptose primária (quadrante D), após a incubação por 30 horas do complexo C4 ($26,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $53,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e da cisplatina ($200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $400,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) contra a linhagem de câncer de pulmão H460.

O complexo C4 também foi estudado contra a linhagem de linfoma histiocítico U937 (Figura 54). Após 24 h de incubação, na concentração de $2x \text{IC}_{50}$ ($80 \mu\text{mol L}^{-1}$), o complexo foi capaz de induzir mais de 90% de morte por apoptose da linhagem U937. Dados da literatura mostram que a cisplatina ($2x \text{IC}_{50} = 32 \mu\text{mol L}^{-1}$), usado como controle positivo para os experimentos de viabilidade celular, induz a apoptose de 22,6% das células U937 depois de 24 horas de incubação. Já o complexo C3 ($80 \mu\text{mol L}^{-1}$) induz de forma majoritária a apoptose (99%) para a mesma linhagem celular e com um tempo de incubação de 12 horas (FERNANDES et al., 2015; MORCELLI et al., 2016).

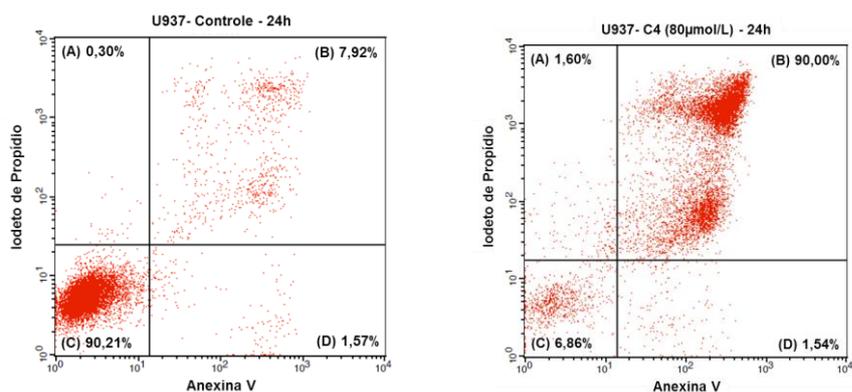


Figura 54. Porcentagem de morte celular por necrose (quadrante A), apoptose tardia (quadrante B), células vivas (quadrante C) e apoptose primária (quadrante D), após a incubação por 24 horas do complexo C4 ($80\mu\text{mol L}^{-1}$) contra a linhagem de linfoma histiocítico U937.

Já o complexo de gálio(III) C8, foi investigado contra a linhagem de leucemia linfóide aguda Molt-4, nas concentrações de $1x IC_{50}$ ($18,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $2x IC_{50}$ ($36,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), para os tempos de incubação de 24 e 30 horas (Figuras 55 e 56). Pela Tabela 29, podemos observar que a porcentagem de morte celular por apoptose induzida pelo complexo C8 é dependente da concentração e do tempo, chegando a mais de 86% para a concentração de $2x IC_{50}$ e tempo de incubação de 30 horas. A indução de apoptose para o controle positivo, cisplatina, mostrou-se dependente apenas da concentração, já que as porcentagens de morte não tiveram um grande aumento em relação ao tempo.

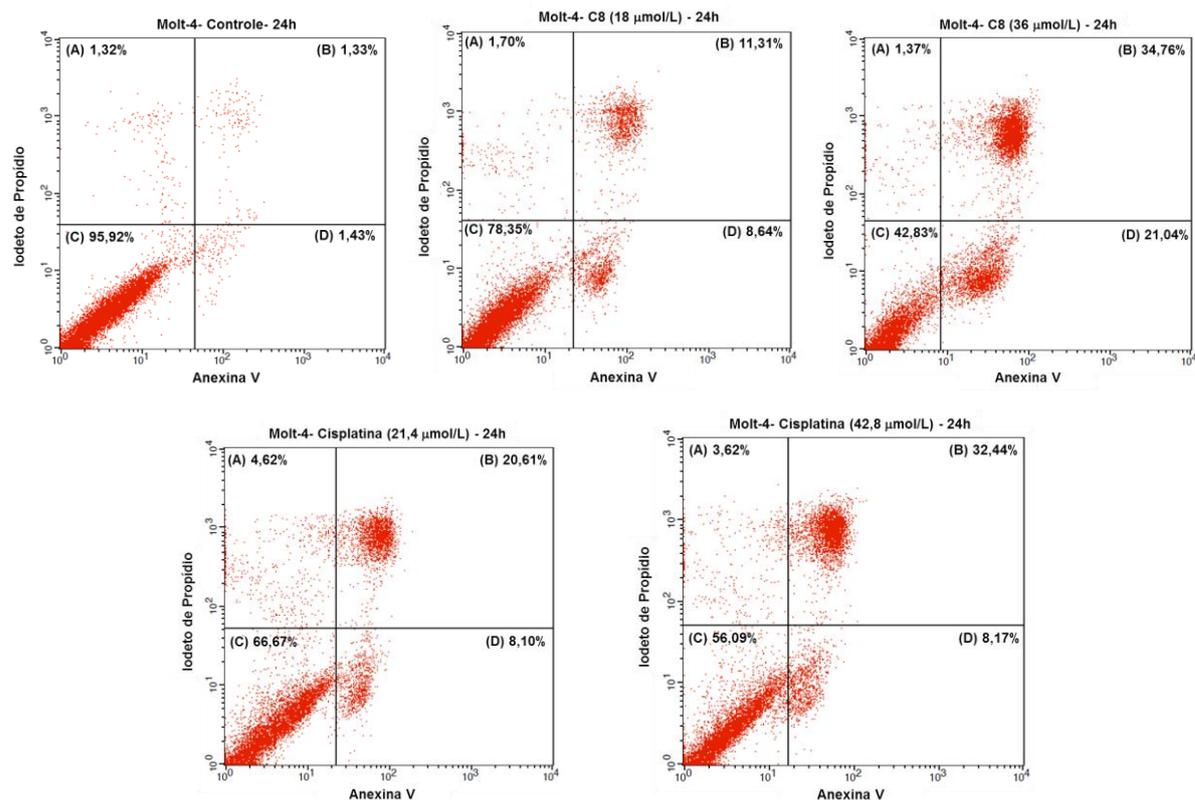


Figura 55. Porcentagem de morte celular por necrose (quadrante A), apoptose tardia (quadrante B), células vivas (quadrante C) e apoptose primária (quadrante D), após a incubação por 24 horas do complexo C8 (18,0 e 36,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e cisplatina (21,4 e 42,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$) contra a linhagem de leucemia linfoide aguda Molt-4.

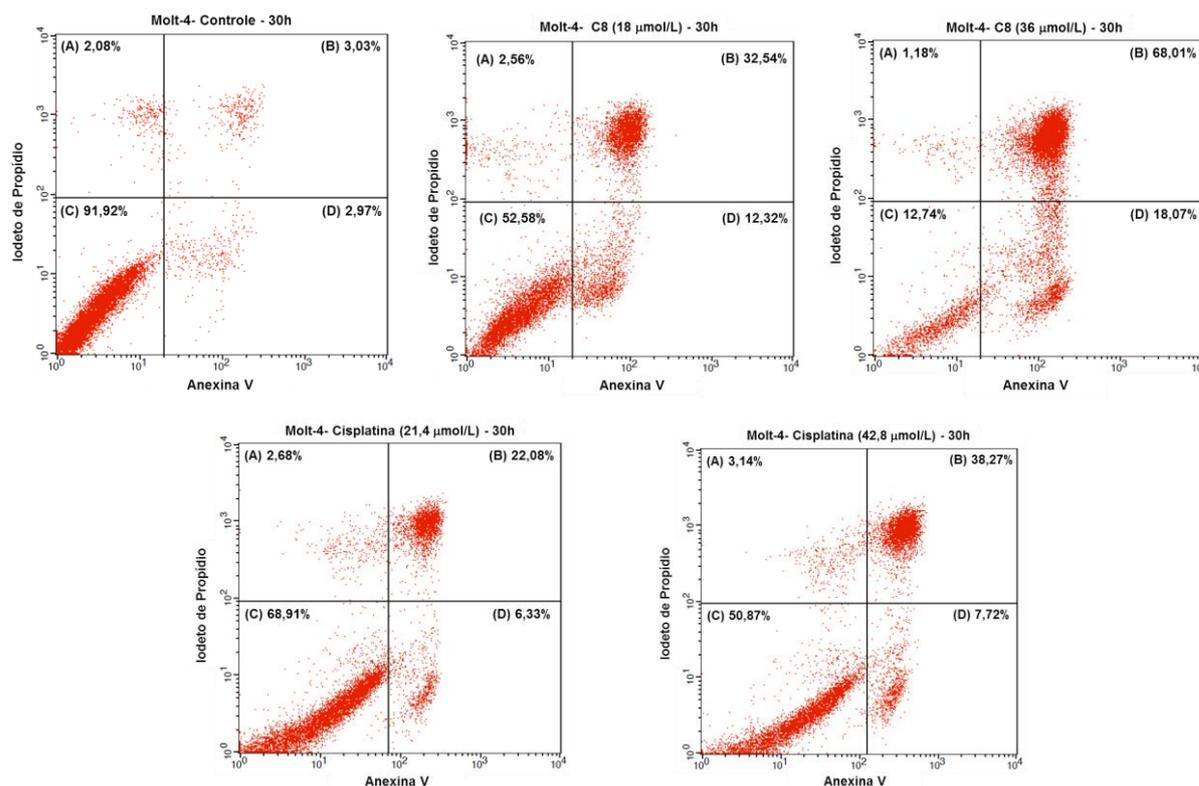


Figura 56. Porcentagem de morte celular por necrose (quadrante A), apoptose tardia (quadrante B), células vivas (quadrante C) e apoptose primária (quadrante D), após a incubação por 30 horas do complexo C8 (18,0 e 36,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e cisplatina (21,4 e 42,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$) contra a linhagem leucêmica Molt-4.

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

O tipo de morte celular (apoptose) também foi confirmado utilizando a citometria de fluxo para a identificação das células durante as fases do ciclo celular. As fases do ciclo são diferenciadas a partir da quantidade de DNA entre as fases G1 (crescimento 1), S (síntese) e G2/M (crescimento 2/mitose). As fases G2 (crescimento 2) e M (mitose) aparecem na mesma região do histograma por possuírem conteúdo de DNA semelhante (NUNEZ, 2001). Nos estágios tardios da morte celular por apoptose, o DNA é clivado por endonucleases em fragmentos de 200 pb (pares de bases) ou múltiplos. O processamento das amostras permite remover tais fragmentos de DNA, fazendo com que as células com baixo conteúdo de DNA apareçam na região Sub-G1 do histograma (GONG et al., 1994). A presença da população celular nesta fase do ciclo é considerado um indicativo de morte celular por apoptose.

A Figura 57 mostra os histogramas referentes à avaliação do ciclo celular da linhagem H460 após 30 horas de incubação com o complexo C4, nas concentrações de $1 \times IC_{50}$ ($26,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) e $2 \times IC_{50}$ ($53,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). Observa-se que o complexo promoveu um pequeno deslocamento da população celular H460 (15,27% para $1 \times IC_{50}$ e 21,24% para $2 \times IC_{50}$) para a região Sub-G1, o que evidencia a indução de apoptose na linhagem H460 pelo complexo C4. Já a cisplatina ($2 \times IC_{50} = 400,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) desloca 46,70% da população de células H460 para a região Sub-G1 após incubação por 30 horas.

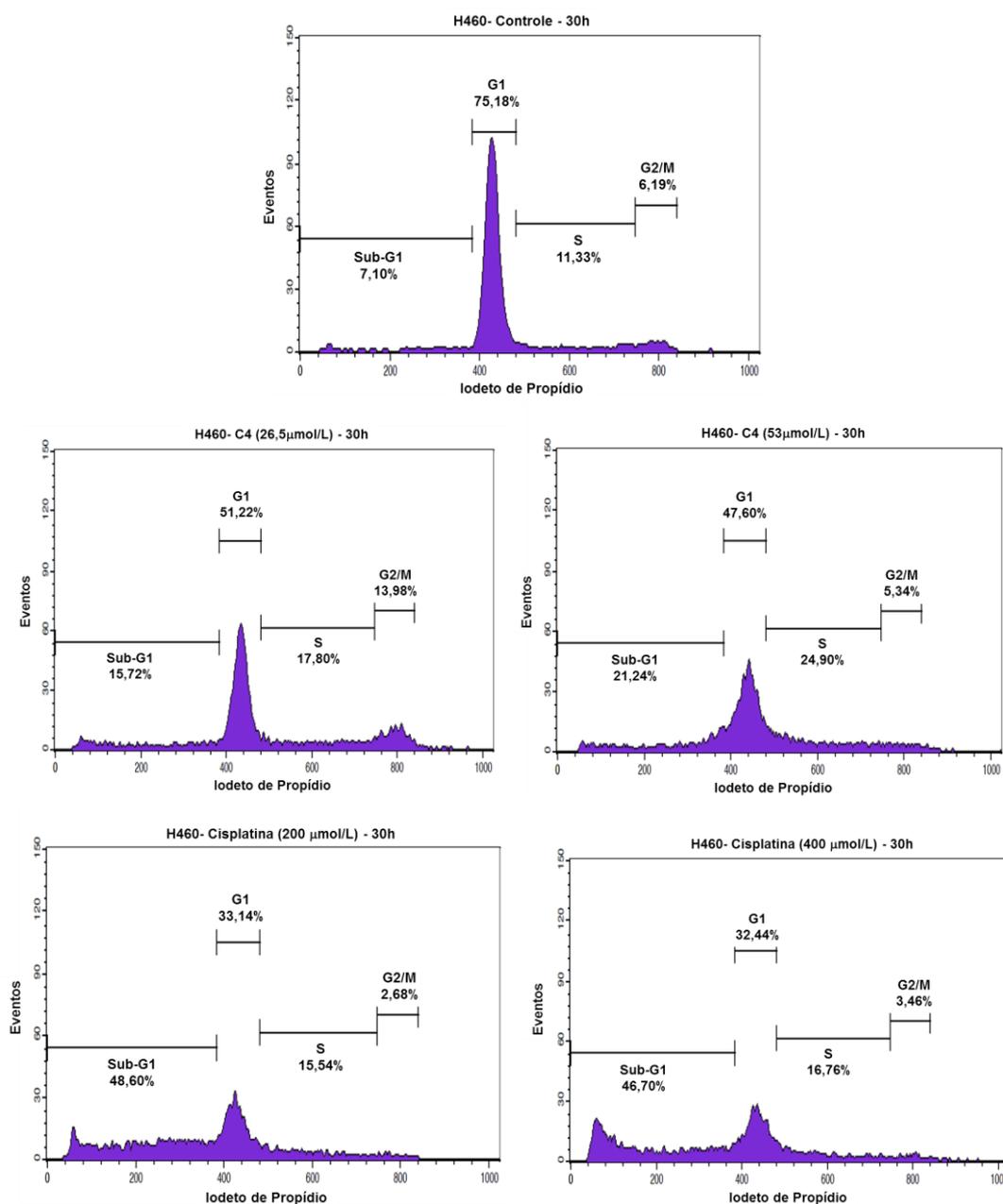


Figura 57. Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem de carcinoma de pulmão H460, após 30 horas de incubação com o complexo C4 ($26,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $53,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e com a cisplatina ($200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $400,0 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Foi observado que o complexo C4 ($80\mu\text{mol L}^{-1}$; 24 h de incubação) promoveu deslocamento da população das células U937 (54,38%) para a região Sub-G1 do ciclo celular (Figura 58). A presença de população celular na região Sub-G1 indica que o complexo C4 induz a morte celular por apoptose, corroborando com o resultado do experimento de marcação dupla com anexina V e IP.

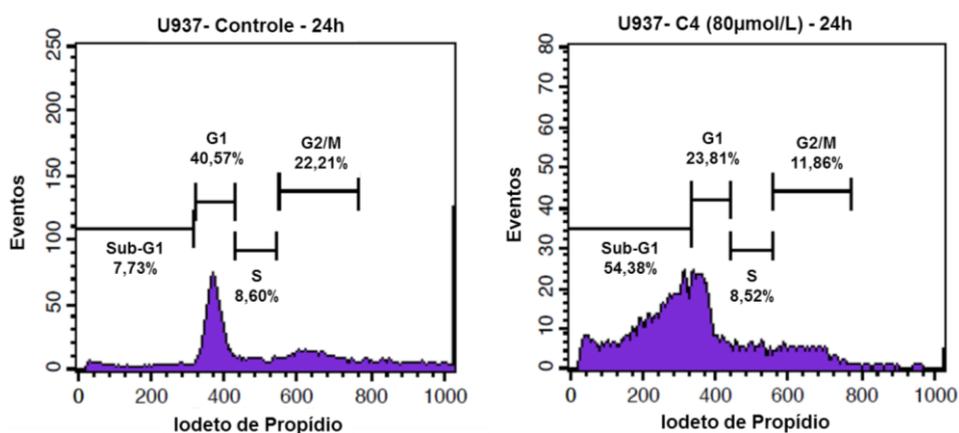


Figura 58. Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem de linfoma histiocítico, U937, após 24 horas de incubação com o complexo C4 ($80,0\mu\text{mol L}^{-1}$).

Estudos similares descritos na literatura indicam que a cisplatina ($100\mu\text{mol L}^{-1}$) também desloca a população celular da U937 (99,1%) para a região Sub-G1, após incubação por 24 horas (BORGES et al., 2013). Já o complexo C3 ($40\mu\text{mol L}^{-1}$) consegue deslocar 74,1% da população da linhagem U937 para a região Sub-G1, após 36 horas de incubação (FERNANDES et al., 2015).

Nos histogramas mostrados nas Figuras 59 e 60, observam-se que as células da linhagem Molt-4, quando incubadas por 24h e 30h com o complexo de gálio(III) C8 nas concentrações de $1x\text{IC}_{50}$ ($18,0\mu\text{mol L}^{-1}$) e $2x\text{IC}_{50}$ ($36,0\mu\text{mol L}^{-1}$), deslocam-se para a região Sub-G1 do ciclo celular. A maior porcentagem de deslocamento (67,48%) para a região Sub-G1 ocorreu na concentração de $2x\text{IC}_{50}$ e 30 horas de incubação. O mesmo estudo foi realizado para a cisplatina, onde observa-se o deslocamento de apenas cerca de 20,62% das células Molt-4 para a concentração de $2x\text{IC}_{50}$ e incubação de 30 h.

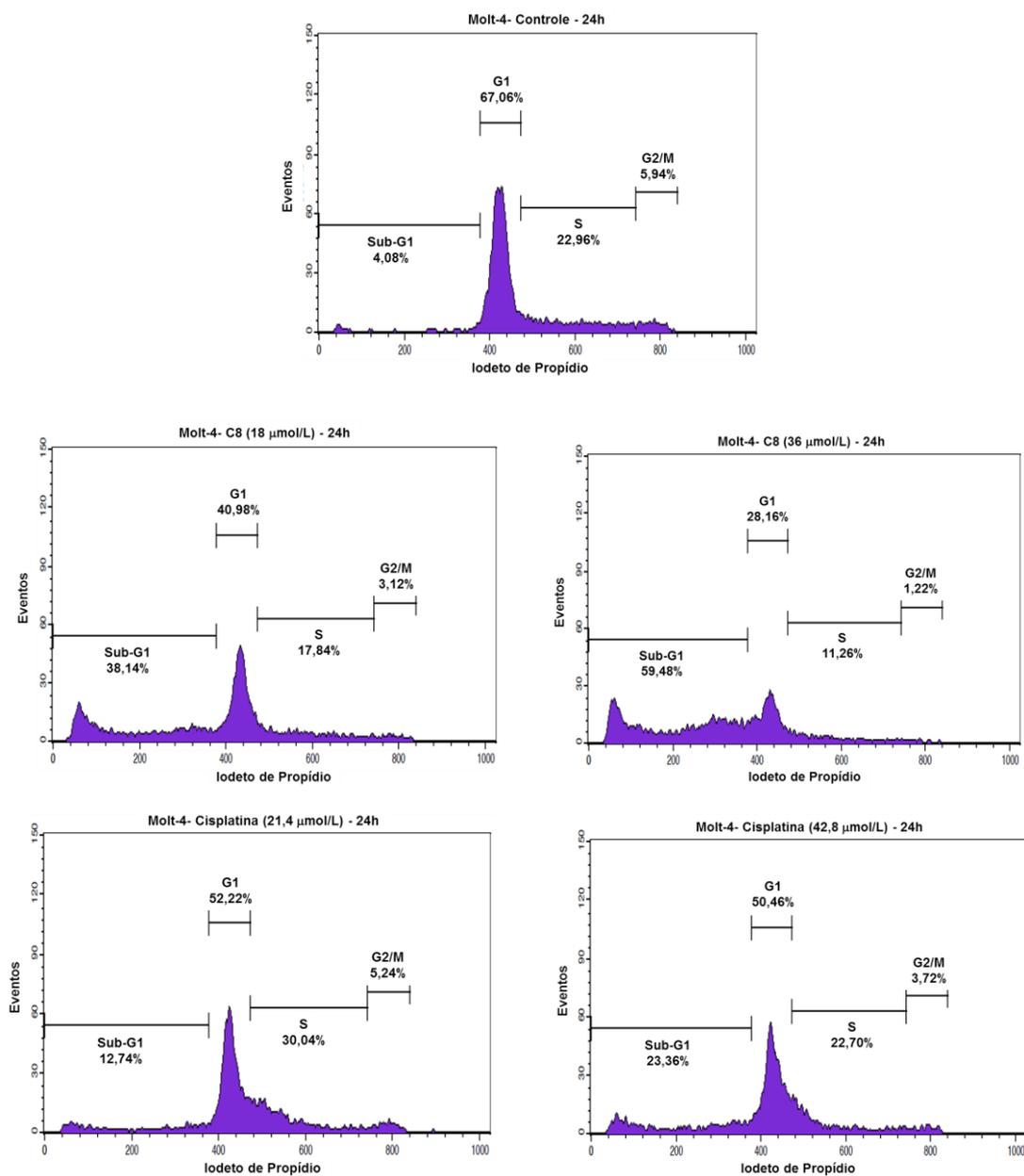


Figura 59. Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem de leucemia linfóide aguda Molt-4, após 24 horas de incubação com o complexo C8 (18,0 e 36,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e cisplatina (21,4 e 42,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

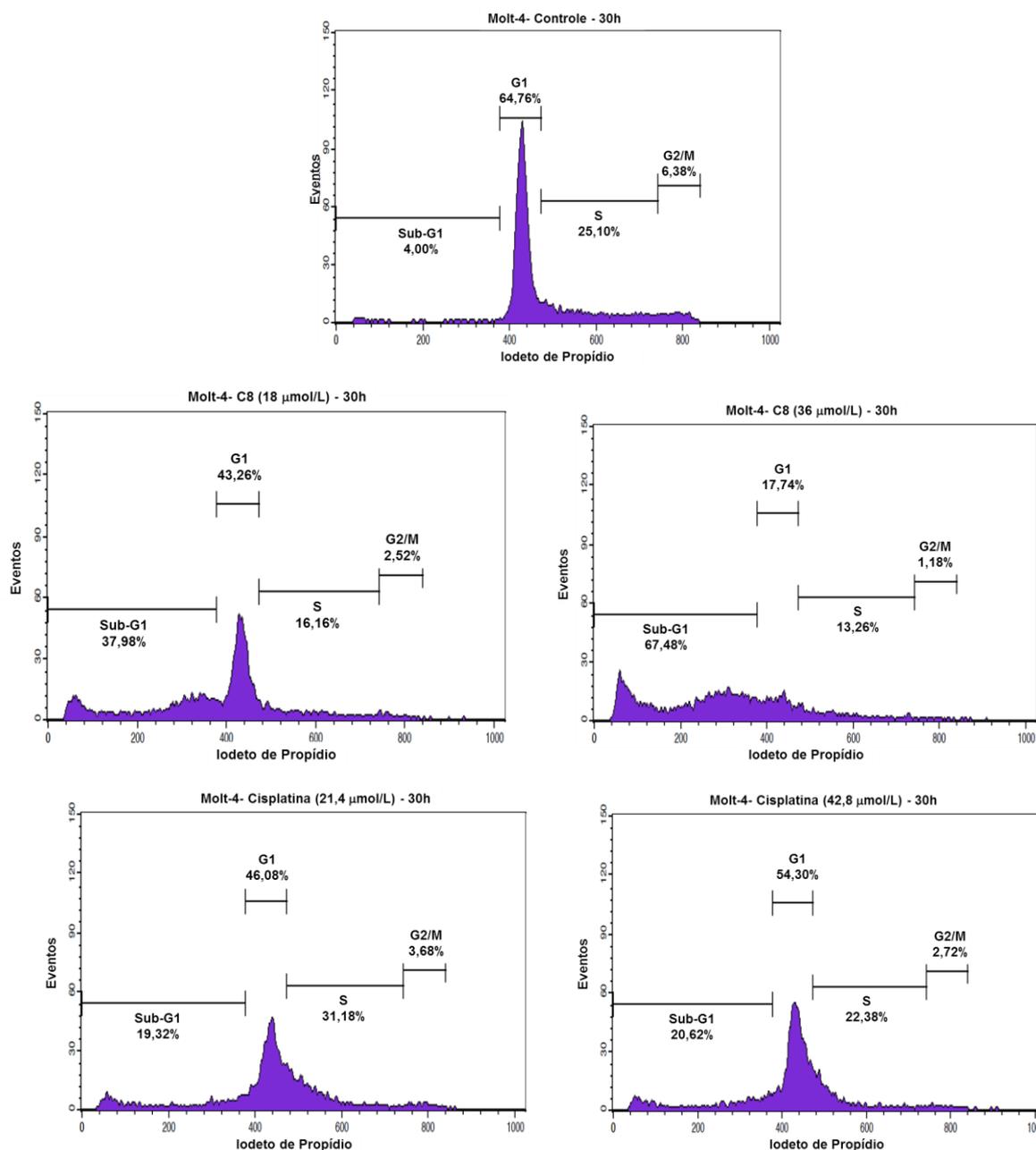


Figura 60. Histograma referente à análise do ciclo celular da linhagem de leucemia linfóide aguda Molt-4, após 30 horas de incubação com o complexo C8 (18,0 e 36,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e cisplatina (21,4 e 42,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

5.4.3. Avaliação da via apoptótica ativada pelos complexos

a) Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM)

Com o objetivo de analisar a via apoptótica de atuação do complexo C4 (contra as linhagens H460 e U937) e C8 (contra a linhagem Molt-4), foi realizada a avaliação do potencial da membrana mitocondrial, por citometria de fluxo.

A alteração do potencial de membrana é um passo importante na indução da morte celular apoptose pela via mitocondrial. 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). Nas mitocôndrias que apresentam potencial de membrana normal, observa-se que a carga residual negativa da matriz mitocondrial, gerada a partir do bombeamento de prótons para o espaço intermembranas, promove o acúmulo de JC-1 no interior da mitocôndria. Quando está em elevada concentração na matriz mitocondrial, o marcador JC-1 forma agregados que fluorescem na região do laranja. A formação de agregados de JC-1 não pode ser detectada nas mitocôndrias que apresentam perda do potencial de membrana. Neste caso, o fluorocromo JC-1 permanece na forma monomérica emitindo fluorescência na região do verde (SMILEY et al., 1991; COSSARIZZA et al., 1993). O citômetro de fluxo diferencia e quantifica as células que estão com mitocôndria com potencial de membrana normal daquelas com potencial de membrana alterado. Isso é realizado através dos detectores FL1 (fluorescência 1), que capta a luz na região do verde (510-527nm) e FL2 (fluorescência 2) que capta luz proveniente da região do laranja (585-590nm) (BORGES, 2013).

A avaliação do potencial da membrana mitocondrial para a linhagem H460 foi realizada após 30 horas de incubação do complexo C4, nas concentrações de 26,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($1 \times \text{IC}_{50}$) e 53,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($2 \times \text{IC}_{50}$) (Figura 61). Pode ser observado que no controle (células sem o tratamento com o complexo), ocorre o acúmulo da concentração celular no quadrante B (91,28%), correspondente a células que estão com o potencial de membrana intacto (FL2). Já no gráfico referente a células H460 tratadas com o complexo C4, podemos observar o deslocamento das células para o quadrante D (FL1), o que indica que as células apresentaram perda do potencial de membrana mitocondrial. O complexo C4, na concentração de aproximadamente $2 \times \text{IC}_{50}$ e incubação por 30 h, foi capaz de reduzir o potencial de ação da membrana mitocondrial em apenas 29,67% para a linhagem de carcinoma de pulmão H460, o que sugere que o complexo pode induzir a apoptose da linhagem H460 com modificações nas mitocôndrias. O controle positivo, cisplatina ($1 \times \text{IC}_{50} = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $2 \times \text{IC}_{50} = 400 \mu\text{mol L}^{-1}$), reduz o potencial de membrana mitocondrial de forma significativa ($> 37\%$ para $1 \times \text{IC}_{50}$ e $> 75\%$ para $2 \times \text{IC}_{50}$).

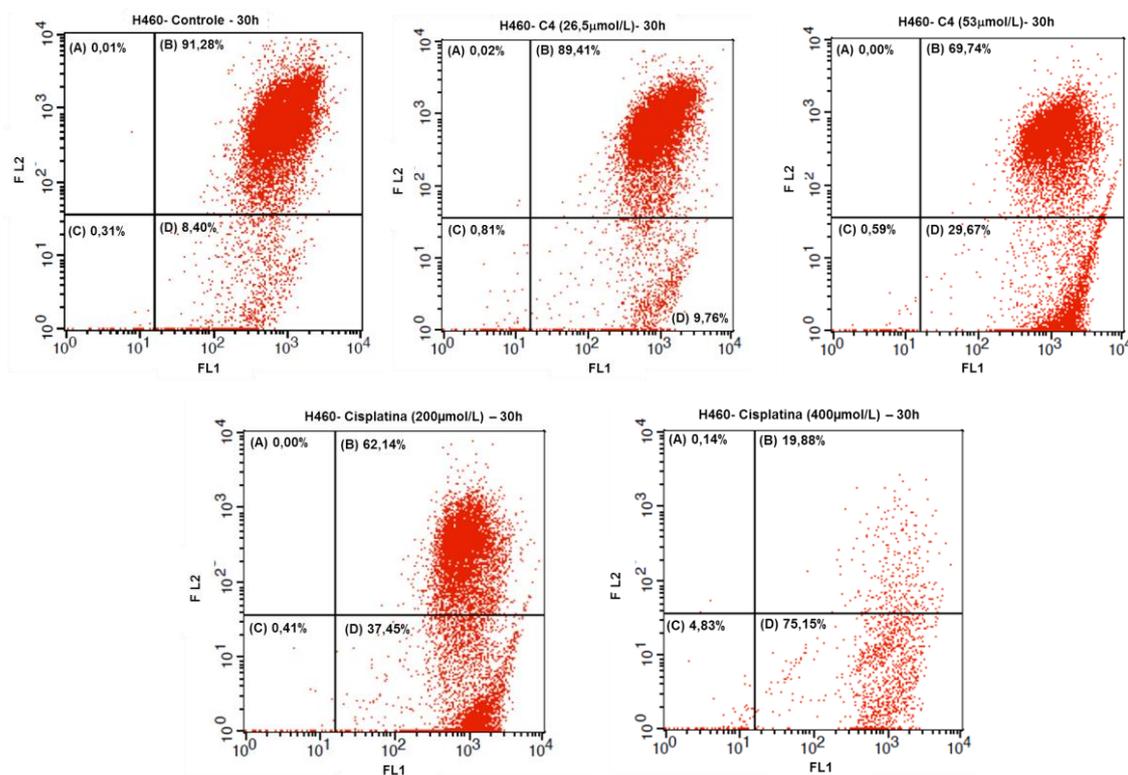


Figura 61. *Dot-plots* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para a linhagem de carcinoma de pulmão H460, submetidas à incubação por 30 horas com o complexo C4 ($26,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $53,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e com a cisplatina ($200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $400,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). Quadrante B: células com potencial de membrana mitocondrial normal; Quadrante D: células com perda do potencial de membrana mitocondrial.

A Figura 62 mostra o resultado na forma de gráficos *Dot-plots* para células da linhagem U937 incubadas com o complexo C4. Podemos observar que C4, na concentração de aproximadamente $2x \text{IC}_{50}$ ($80 \mu\text{mol L}^{-1}$) e incubação por 24 horas, promoveu o deslocamento das células para o quadrante D (FL1) em mais de 96%. Desta forma, podemos sugerir que o complexo C4 utiliza uma via de indução de morte celular por apoptose que diminui o potencial das membranas mitocondriais.

Dados da literatura indicam que a cisplatina ($2x \text{IC}_{50} = 32 \mu\text{mol L}^{-1}$) reduz o potencial da membrana mitocondrial em apenas 12,15% após incubação por 24 horas. (MORCELLI et al., 2016). Para o complexo C3 ($80 \mu\text{mol L}^{-1}$), com o tempo de incubação de 12 horas, o potencial da membrana mitocondrial das células U937 é reduzido em quase 98% (FERNANDES et al., 2015).

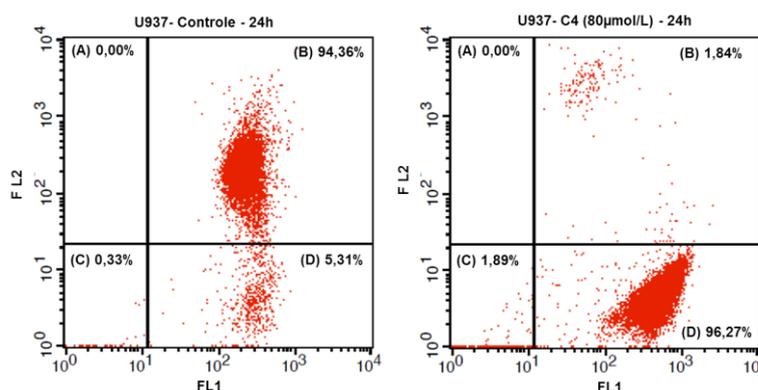


Figura 62. *Dot-plots* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para a linhagem de linfoma histiocítico U937 submetida à incubação por 24 horas com o complexo C4 ($80,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). Quadrante B: células com potencial de membrana mitocondrial normal; Quadrante D: células com perda do potencial de membrana mitocondrial.

A avaliação da perda do potencial da membrana mitocondrial induzida pelo complexo de gálio(III) C8, nas concentrações de $18,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($1x \text{IC}_{50}$) e $36,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($2x \text{IC}_{50}$), contra a linhagem Molt-4 foi realizada após 30 h de incubação. Como controle positivo foi utilizado a cisplatina, nas concentrações de $21,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($1x \text{IC}_{50}$) e $42,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($2x \text{IC}_{50}$). A perda do potencial de membrana mitocondrial é observada na maior parte das células Molt-4 ($94,20\%$) quando estas foram incubadas com C8 na concentração de $2x \text{IC}_{50}$, enquanto que a cisplatina ($2x \text{IC}_{50}$) causou a perda do potencial mitocondrial de $65,14\%$ das células. Com esta informação podemos sugerir que este complexo induz morte celular por apoptose da linhagem H460 com alterações nas mitocôndrias celulares. A cisplatina não reduz o potencial de membrana mitocondrial de forma significativa em relação ao controle, para as concentrações testadas e tempo de incubação de 30 h (Figura 63).

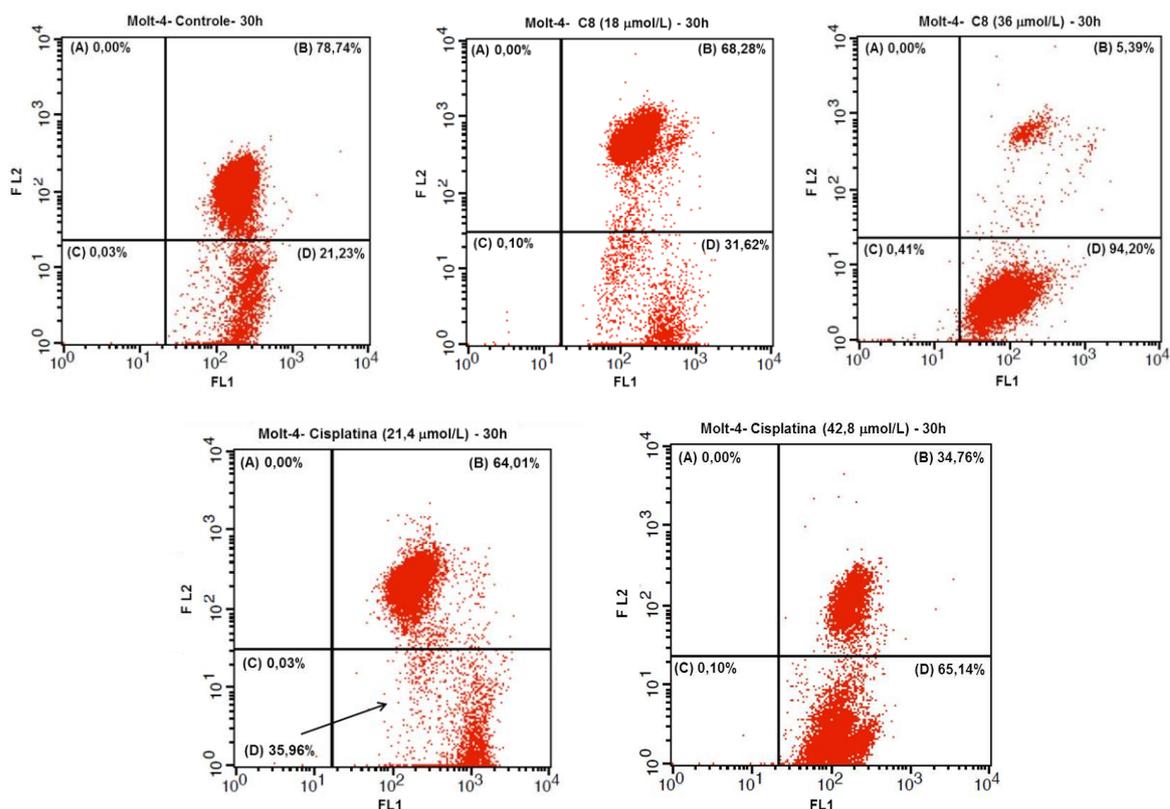


Figura 63. *Dot-plots* da análise do potencial de membrana mitocondrial, por citometria de fluxo, para a linhagem Molt-4 submetida à incubação por 30 horas com o complexo C8 (18,0 e 36,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e cisplatina (21,4 e 42,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Quadrante B: células com potencial de membrana mitocondrial normal; Quadrante D: células com perda do potencial de membrana mitocondrial.

b) Análise ultra-estrutural das mitocôndrias de células tumorais por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão é uma importante técnica na avaliação das organelas celulares, podendo demonstrar alterações morfológicas com precisão. As células (U937) foram tratadas com o complexo C4, nas concentrações de 0,5x IC_{50} (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e 1x IC_{50} (40 $\mu\text{mol L}^{-1}$), e incubadas por 4 e 8 horas. Após esse período, as amostras foram processadas e as células foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) (Figura 64 a 68).

A Figura 64 mostra a imagem de microscopia eletrônica de transmissão de uma célula de U937 não tratada (controle). Em (A) vemos a cromatina com distribuição homogênea e vários perfis de retículo (R) e mitocôndrias, característicos dessa célula. Em (B), vista geral mostrando citoplasma homogêneo e abundância de mitocôndrias (M) de aspecto normal.

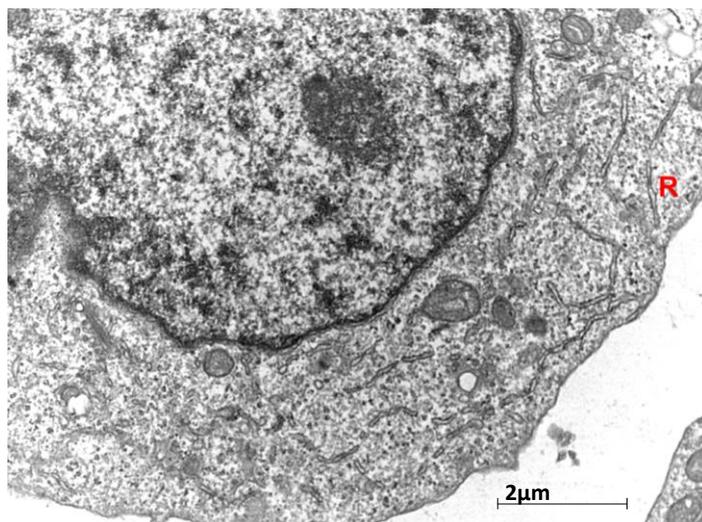
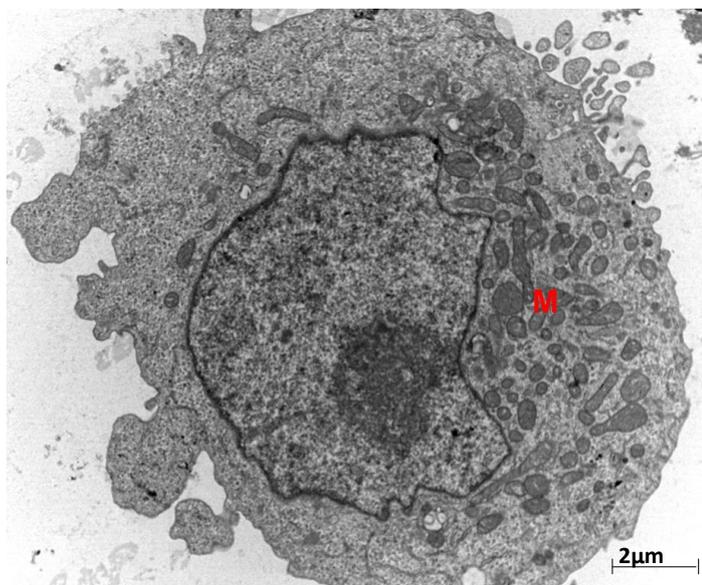
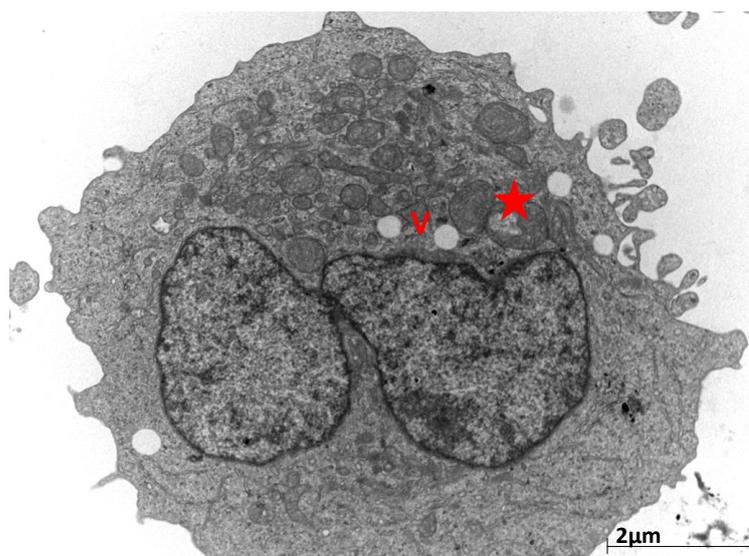
(A)**(B)**

Figura 64. Microscopia eletrônica de transmissão da linhagem de linfoma histiocítico U937.

Após incubação das células U937 com o complexo C4 ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$, por 4 horas), esta técnica relevou pequena vacuolização no citoplasma (V) e alterações em algumas mitocôndrias (M), apresentando um formato mais alargado e vacúolos internos (estrela) (Figura 65).

(A)



(B)

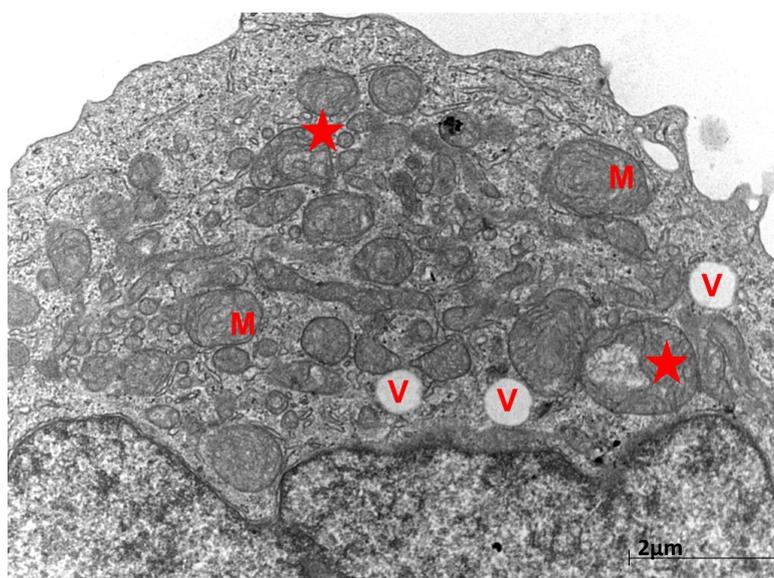
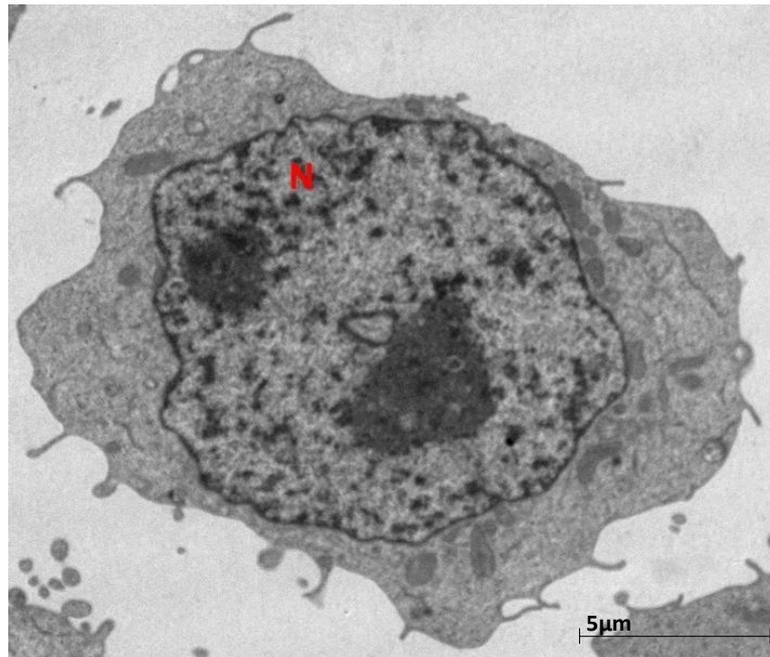


Figura 65. Microscopia eletrônica de transmissão após tratamento da linhagem de linfoma histiocítico U937 incubadas em C4 ($20\mu\text{mol L}^{-1}$) por 4 horas. Estrela: alterações morfológicas nas mitocôndrias; setas: esvaziamento do conteúdo mitocondrial e inchaço.

A Figura 66 (A) apresenta “spots” mais densos de DNA distribuídos na matriz mitocondrial (N). Já na Figura 66 (B), observamos uma segmentação na morfologia do núcleo (N) e mitocôndrias (M) mais alargadas, apresentando áreas eletrônicas em sua matriz (setas).

(A)



(B)

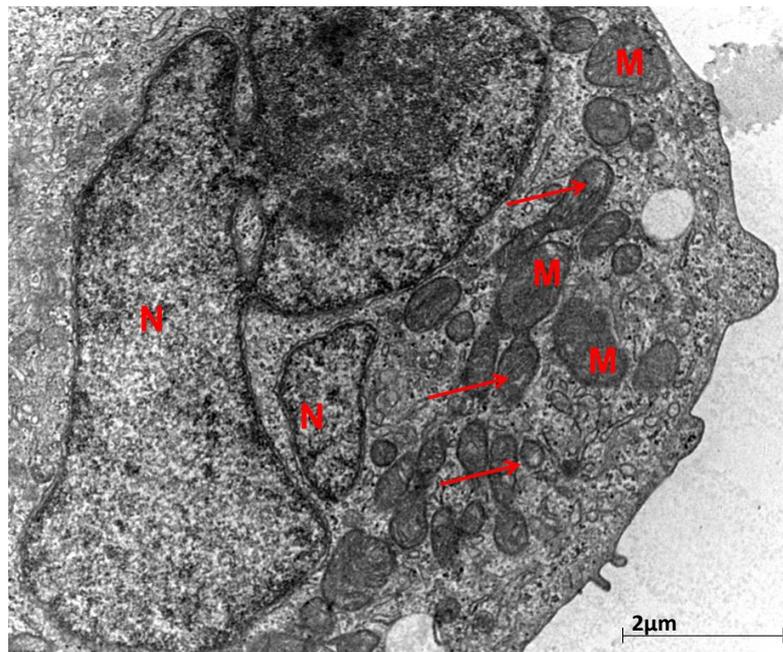
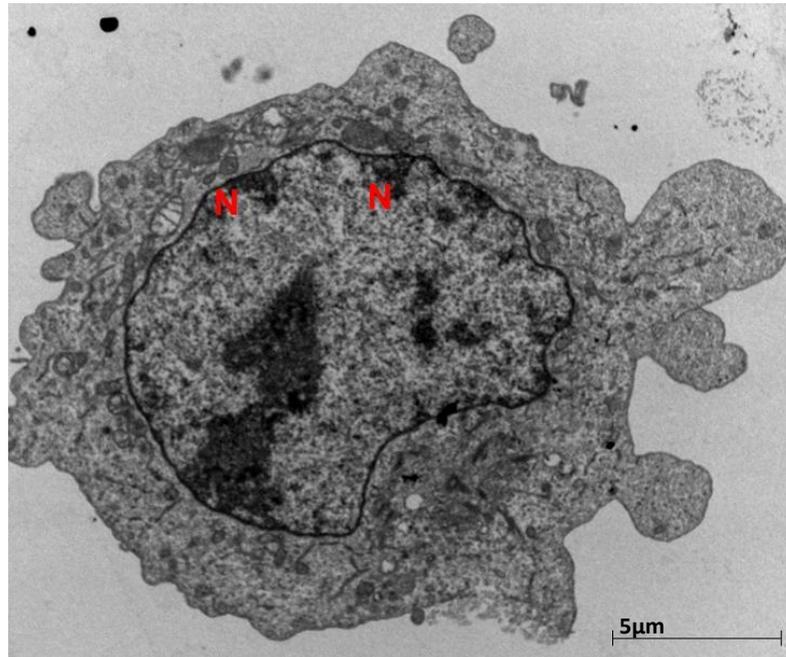


Figura 66. Microscopia eletrônica de transmissão após tratamento da linhagem de linfoma histiocítico U937 incubadas em C4 ($40\mu\text{mol L}^{-1}$) por 4 horas.

Na Figura 67 (A) vemos segregação de cromatina na periferia nuclear (N) e em (B) mitocôndrias apresentando vacuolização interna com o esvaziamento da matriz mitocondrial (seta).

(A)



(B)

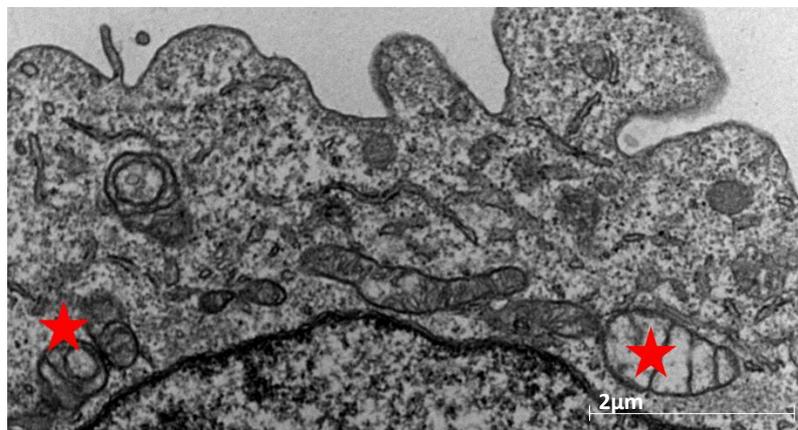
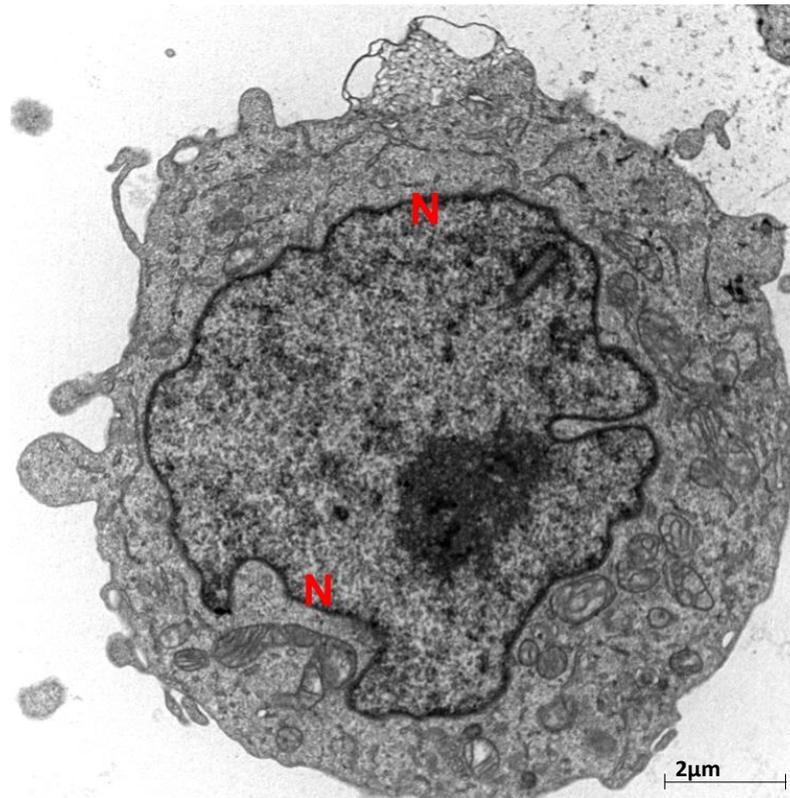


Figura 67. Microscopia eletrônica de transmissão após tratamento da linhagem de linfoma histiocítico U937 incubadas em C4 ($20\mu\text{mol L}^{-1}$) por 8 horas.

Na Figura 68 (A), temos a visão geral da célula mostrando condensação de cromatina em toda periferia do núcleo (N). Já em (B), detalhe das mitocôndrias mostrando uma aparente vacuolização interna (estrela), provavelmente decorrente da dilatação das cristas mitocondriais, com rarefação da matriz.

(A)



(B)

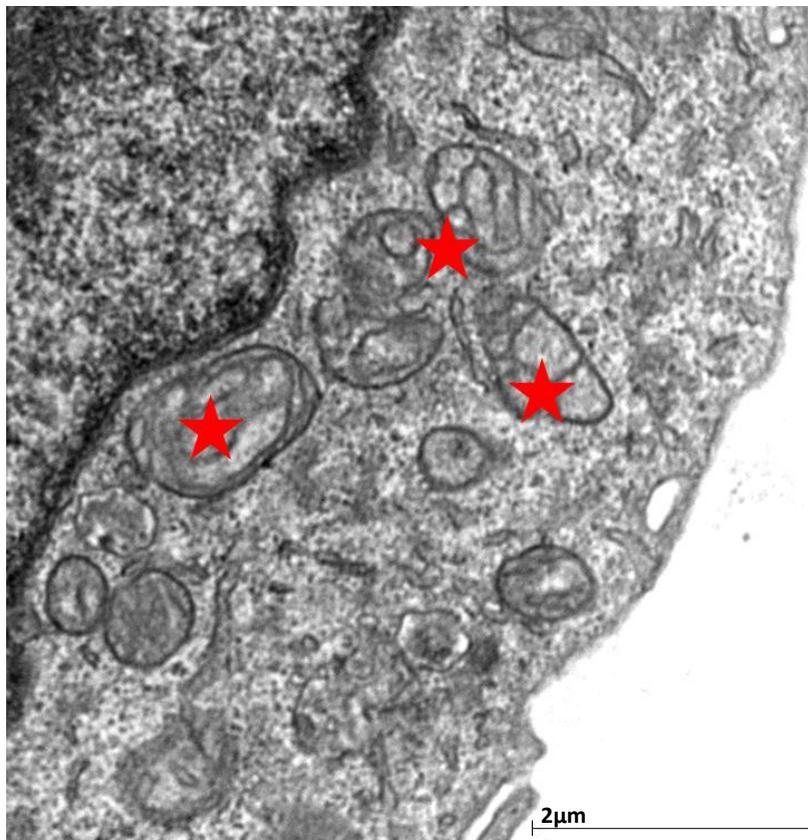


Figura 68. Microscopia eletrônica de transmissão após tratamento da linhagem de linfoma histiocítico U937 incubadas em C4 ($40\mu\text{mol L}^{-1}$) por 8 horas.

A partir destes resultados, juntamente com os dados do experimento de potencial de membrana mitocondrial, pode-se sugerir que as mitocôndrias estão relacionadas ao processo de morte celular programada por apoptose provocado pelo complexo C4 contra a linhagem U937.

5.5. INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS COM DNA PLASMIDIAL

Para os estudos de interação dos complexos com o DNA plasmidial foram selecionados os complexos de cobre(II) C3 e C4, e os complexos de gálio(III) C7 e C8, já que estes apresentam atividade citotóxica promissora contra as linhagens neoplásicas estudadas. Além disso, o complexo C1 também foi selecionado a fim de comparar a forma de interação entre compostos contendo o grupo planar naftol (C3, C4, C7 e C8) e um que não apresenta tal grupo (C1).

Os complexos metálicos podem interagir com o DNA de forma covalente (quando o complexo liga-se a uma base nitrogenada substituindo um ligante lábil) e/ou de forma não-covalente (ligação de fenda, ligação externa e intercalação). A intercalação de complexos com o DNA pode ser caracterizada pelo decréscimo da intensidade no espectro de absorção (hipocromismo) e simultâneo deslocamento da banda para a região do vermelho (batocromismo). A intensidade destes dois eventos está relacionada com a força de interação entre o complexo e o DNA. É importante ressaltar que complexos contendo interações não intercalativas podem apresentar apenas o efeito hipocrômico (RAGHEB et al., 2015). Desta forma, se faz necessário o uso de mais de uma técnica para elucidar a forma de interação dos complexos com o DNA.

5.5.1. Espectros de absorção

A avaliação das mudanças nos espectros de absorção de complexos metálicos através do método de titulação por absorção foi utilizada para a determinação das características gerais da interação de complexos metálicos com o DNA plasmidial.

Os espectros de absorção dos complexos C1, C3, C4, C7 e C8, na ausência e na presença do DNA plasmidial (incrementos até o término das mudanças no espectro) estão apresentados nas Figuras 69 a 73.

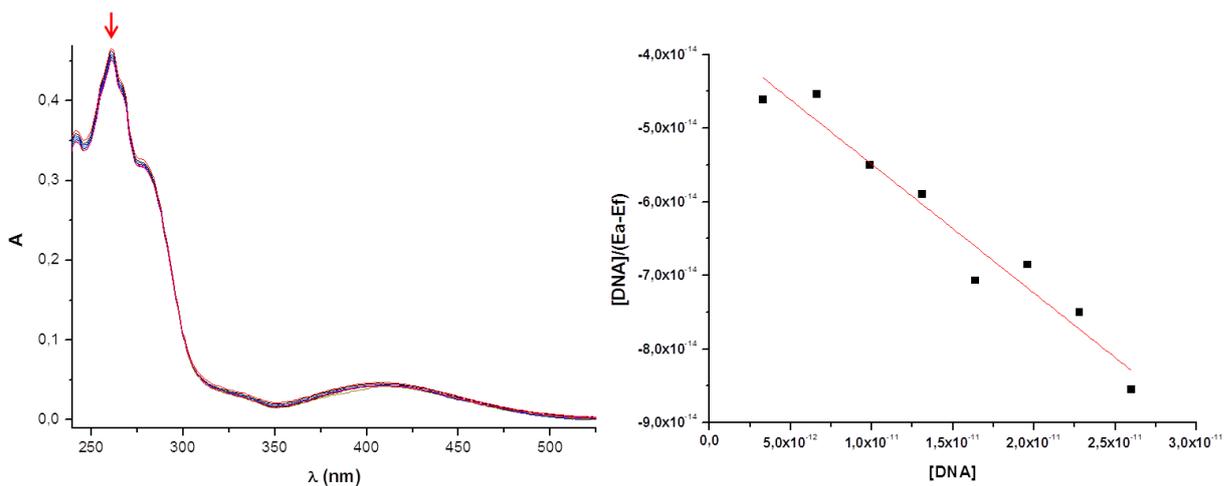


Figura 69. Espectros de absorção para complexo de cobre(II) C1.

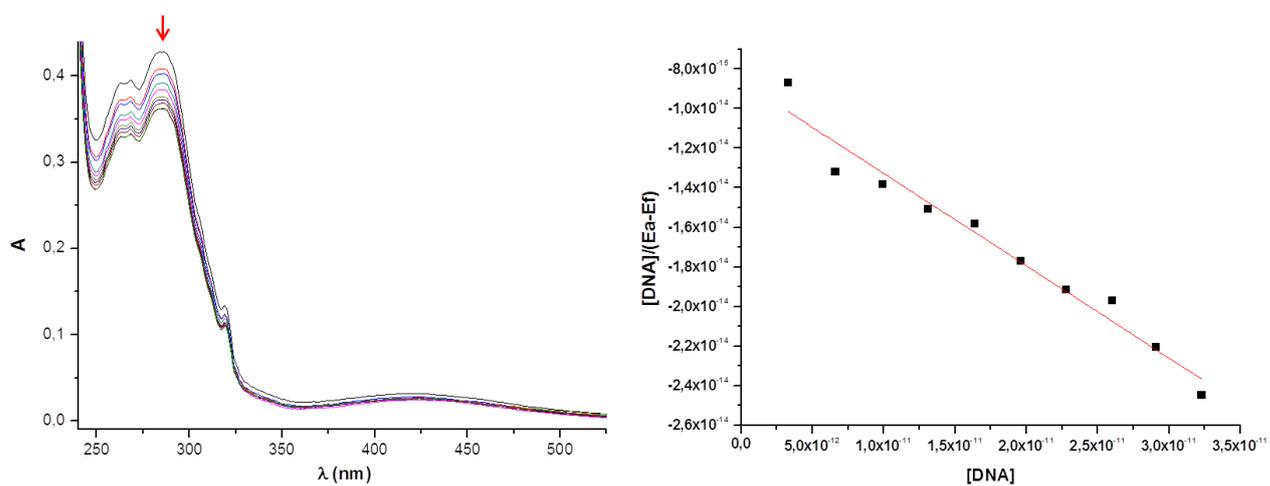


Figura 70. Espectros de absorção para complexo de cobre(II) C3.

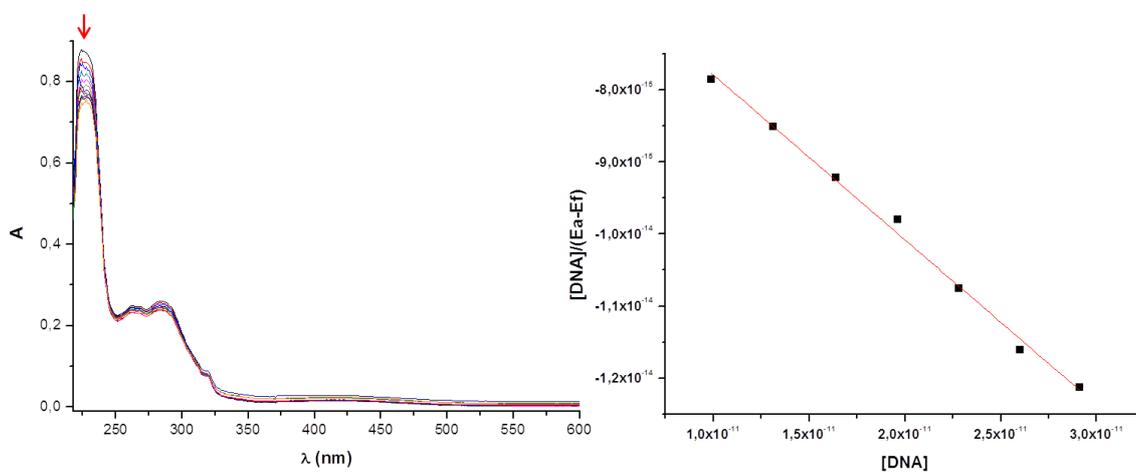


Figura 71. Espectros de absorção para complexo de cobre(II) C4.

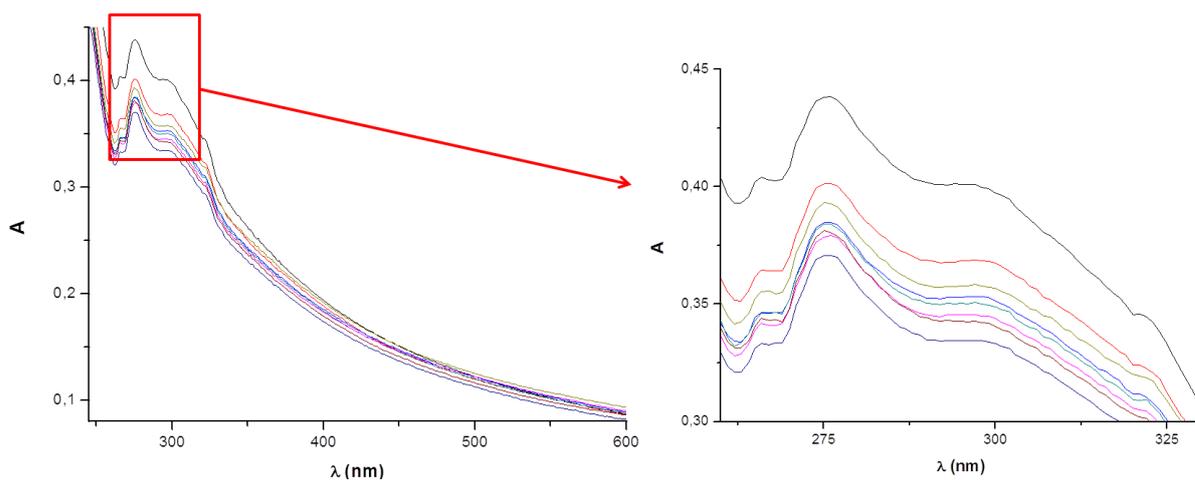


Figura 72. Espectros de absorção para complexo de gálio(III) C7.

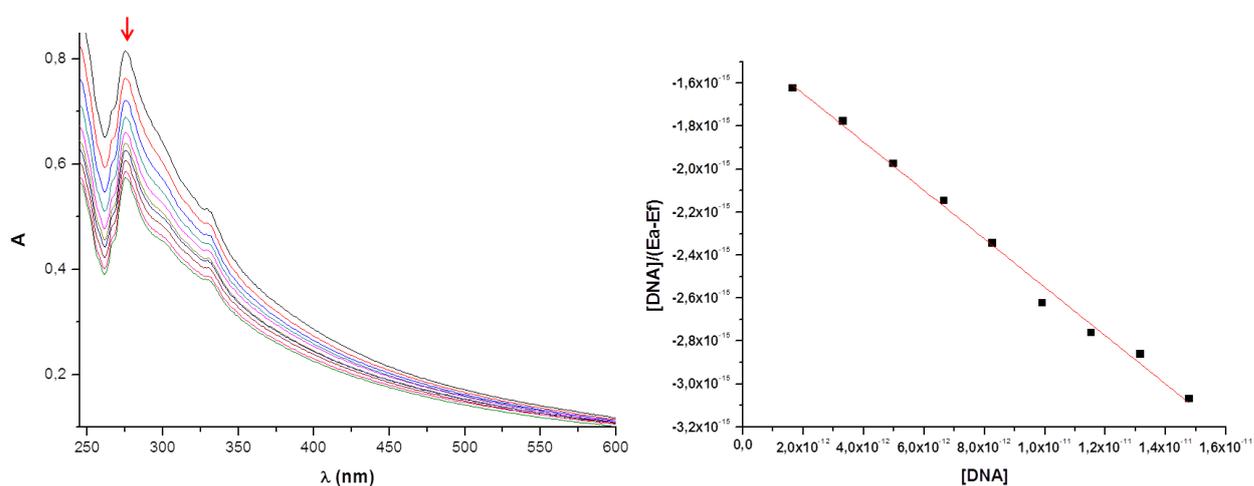


Figura 73. Espectros de absorção para complexo de gálio(III) C8.

Após adição de quantidades crescentes de DNA plasmidial, os espectros de absorção de todos os complexos apresentaram apenas efeito hipocrômico, o que indica algum tipo de interação com o DNA plasmidial. No entanto, não podemos afirmar que seja uma interação por intercalação.

A fim de comparar a afinidade de interação dos complexos com o DNA, foram calculadas as constantes de ligação (K_b) para os complexos, determinadas a partir da equação:

$$[\text{DNA}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f) = [\text{DNA}]/(\varepsilon_b - \varepsilon_f) + 1/K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)$$

Onde:

ϵ_a = absorção aparente (cada curva com incremento de DNA);

ϵ_f = coeficiente de extinção livre (complexo livre de DNA);

ϵ_b = coeficiente dos complexos totalmente ligados ( ltima medida).

Tabela 30. Valores das constantes de ligação (K_b) para os complexos, determinados a partir método de titulação por absorção.

Complexo	C1	C3	C4	C7	C8
K_b ($\text{mol}^{-1} \text{L}$)	$4,68 \times 10^{10}$	$3,56 \times 10^{10}$	$4,15 \times 10^{10}$	-	$7,9 \times 10^{10}$

Os valores de K_b calculados (Tabela 30) sugerem forte intera o entre os complexos C1, C3, C4 e C8 e a molécula de DNA plasmidial (BOGER et al., 2001). Apesar do complexo de gálio(III) C7, ter apresentado modifica es no seu espectro de absorção com o adi o de DNA plasmidial, não foi possível calcular a constante de ligação para este composto, já que as mudanças no espectro não ocorreram de forma linear. Embora os estudos de absorção confirmem que os complexos podem interagir com o DNA,   necessário experimentos complementares para provar o modo de intera o destes complexos com o DNA plasmidial. Além disso, também foi obtido o espectro de absorção da soluço de DNA livre na maior concentra o utilizada no experimento, não apresentando intensidade de absorção considerável. Os experimentos foram realizados em duplicata.

5.5.2. Espectros de emissão

Os estudos de intera o competitiva por espectroscopia de fluorescência, usando GelRed (GR) como o intercalador competitivo de DNA, teve por finalidade comprovar a forma de intera o entre os complexos (C1, C3, C4 e C8) e o DNA plasmidial, podendo esta ocorrer via intercala o. Este estudo não foi realizado para o complexo C7, pois não foi possível calcular a sua constante de ligação (K_b).

Quando livres, o DNA e o GR não apresentam intensidade de emissão de fluorescência considerável, mas o aduto DNA/GR apresenta forte intensidade de emissão em aproximadamente 590nm. Isso ocorre devido a forte intercala o apresentada entre o GR e os pares de bases nitrogenadas do DNA. A fluorescência conferida pelo aduto DNA/GR, pode ser revertida pela adi o de compostos que são

considerados competidores à intercalação do GR ao DNA (CHEN et al., 2013; LIU et al., 2013).

Comparado ao típico intercalador de DNA, brometo de etídio (EB), o Gel Red (GR) oferece menor toxicidade e maior estabilidade, o que justifica seu uso neste experimento. Também foram obtidos os espectros de emissão da solução dos complexos na maior concentração utilizada no experimento e da solução dos complexos com adição de GR, não apresentando, em nenhum caso, intensidade considerável.

Os espectros de emissão do aduto DNA/GR na ausência e com incremento dos complexos C1, C3, C4 e C8 ([DNA]:[GR]:[complexo] variando de 10:1:0 a 10:1:10) estão ilustrados nas Figuras 74 a 77.

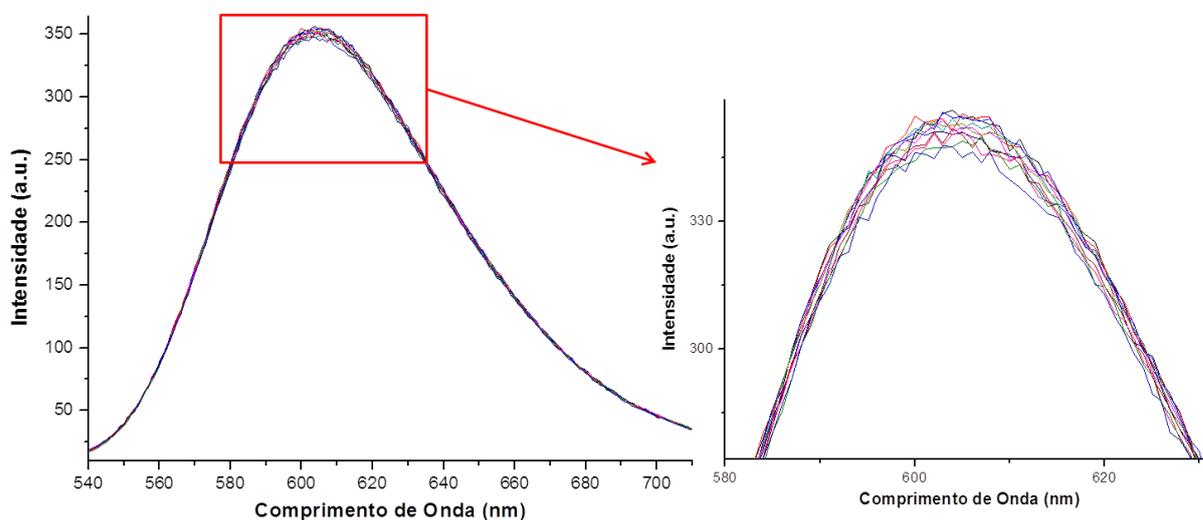


Figura 74. Espectros de emissão de fluorescência do GelRed intercalado com DNA plasmidial ([DNA]= 2.0×10^{-4} mol L⁻¹, [GelRed]= 2.0×10^{-5} mol L⁻¹), na ausência e presença do complexo de cobre(II) C1 com [DNA]:[GelRed]:[complexo] variando de 10:1:0 a 10:1:10.

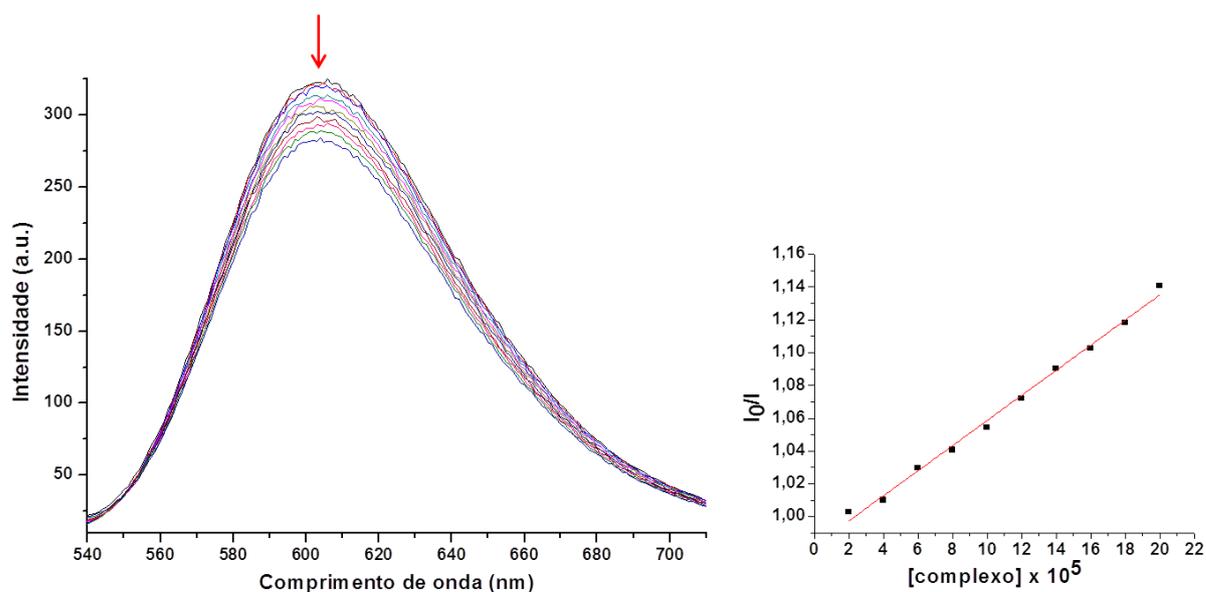


Figura 75. Espectros de emissão de fluorescência do GelRed intercalado com DNA plasmidial ($[DNA]= 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $[GelRed]= 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), na ausência e presença do complexo de cobre(II) C3 com $[DNA]:[GelRed]:[complexo]$ variando de 10:1:0 a 10:1:10.

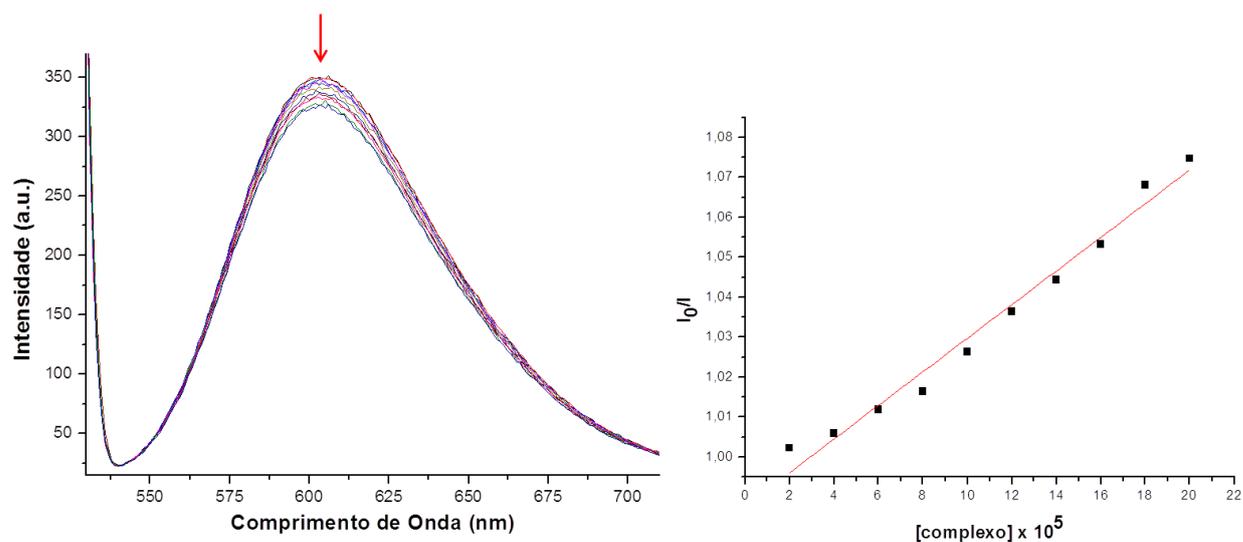


Figura 76. Espectros de emissão de fluorescência do GelRed intercalado com DNA plasmidial ($[DNA]= 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $[GelRed]= 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), na ausência e presença do complexo de cobre(II) C4 com $[DNA]:[GelRed]:[complexo]$ variando de 10:1:0 a 10:1:10.

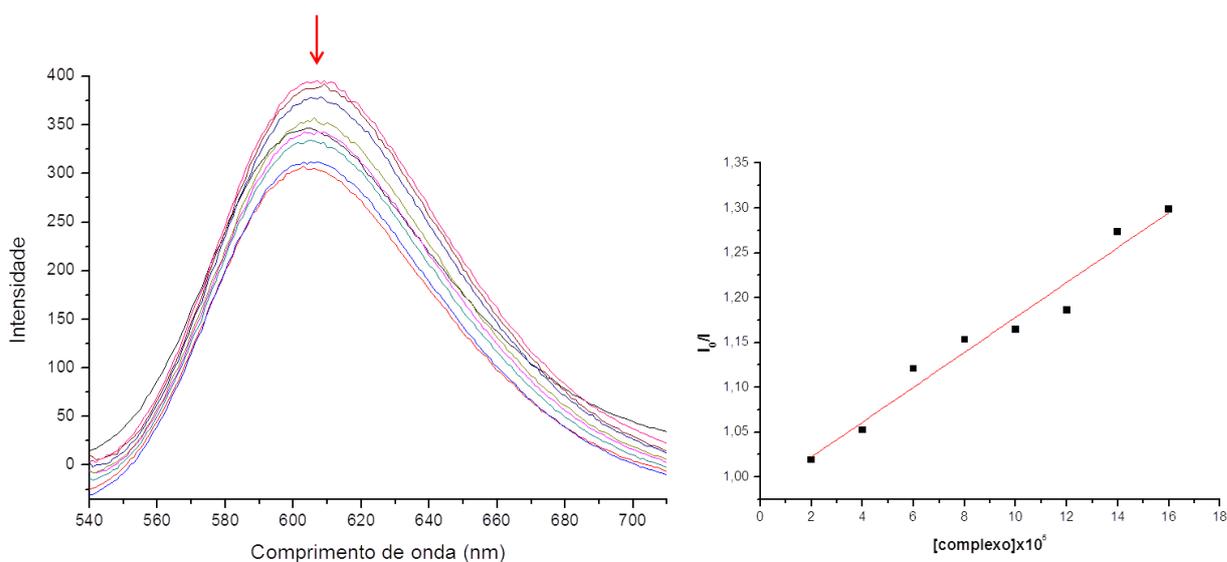


Figura 77. Espectros de emissão de fluorescência do GelRed intercalado com DNA plasmidial ($[DNA] = 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $[GelRed] = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), na ausência e presença do complexo de cobre(II) C8 com $[DNA]:[GelRed]:[complexo]$ variando de 10:1:0 a 10:1:10.

Pelos espectros de emissão observa-se que a solução do complexo C1 não causa nenhuma mudança significativa na intensidade de fluorescência nos espectros de emissão do aduto DNA/GR, indicando que este complexo não apresenta considerável intercalação com o DNA plasmidial. No entanto, a constante de intercalação pode ser calculada para os complexos C3, C4 e C8 pela equação de Stern-Volmer ($I_0/I = 1 + K_q \cdot [complexo]$), obtendo-se um valor de $0,8 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ para C3, $4,2 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ para C4, e $4,2 \times 10^2 \text{ mol L}^{-1}$ para C8, indicando que os complexos são fracos intercalantes com o DNA plasmidial (Tabela 31) (CHEN et al., 2013; LIU et al., 2013).

Tabela 31. Valores das constantes de intercalação (K_q) para os complexos, a partir equação de Stern-Volmer.

Complexo	C1	C3	C4	C8
$K_q \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$	-	$0,8 \times 10^3$	$4,2 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$

Segundo a literatura, os compostos que são capazes de interagir com o DNA por intercalação são caracterizados por possuírem grupos planares. Estes grupos interagem, de forma perpendicular, com os pares de bases do DNA sem a formação de ligações covalentes e sem a ruptura das ligações de hidrogênio existentes entre

as bases do DNA (SIRAJUDDIN et al., 2013; BARONE et al., 2013; RAGHEB et al., 2015). Os dados do experimento mostram que a ordem crescente de afinidade de interação por intercalação dos complexos com o DNA é $C1 < C8 < C3 < C4$, o que sugere que o grupo alfa-naftol presente no complexo C3 e beta-naftol presente nos complexos C4 e C8, podem estar relacionados à força de intercalação destes complexos com o DNA.

Observa-se ainda que os complexos de cobre(II) C3 e C4 apresentaram maiores afinidades com o DNA plasmidial que seus respectivos complexos de gálio(III) C7 e C8, o que indica que o centro metálico do complexo influencia sobre a interação dos complexos com o DNA.

Os experimentos foram realizados em duplicata.

6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as sínteses dos compostos orgânicos (precursores e ligantes) e inorgânicos (complexos metálicos), bem como a caracterização dos mesmos, foram realizadas com sucesso, já que foi possível propor suas estruturas. Foram sintetizados um total de quatro ligantes e oito complexos metálicos, sendo quatro complexos de cobre(II) previamente descritos na literatura e quatro complexos de gálio(III) inéditos.

O ensaio de viabilidade celular (MTT), mostrou que os complexos de cobre(II) C3 e C4 apresentam atividade citotóxica significativa ($< 100 \mu\text{mol L}^{-1}$) contra todas as linhagens tumorais estudadas. Já os complexos de gálio(III) mostraram-se mais seletivos contra algumas linhagens tumorais. A linhagem Molt-4 demonstrou maior sensibilidade quando em tratamento com os compostos de gálio(III), sendo que os complexos C6, C7 e C8 tiveram atividade significativa contra esta linhagem celular ($< 100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Além disso, os complexos de gálio não apresentaram efeito citotóxico contra as células normais (PBMC). Diante disso, podemos concluir que a atividade citotóxica dos compostos é dependente tanto da estrutura do ligante orgânico, como do centro metálico do complexo. Os resultados mostram que a isomeria entre os ligantes H_2L_3 e H_2L_4 interfere na atividade destes e de seus respectivos complexos de cobre(II) e gálio(III).

Os resultados de avaliação do tipo de morte celular (marcação com anexina V e IP e avaliação do ciclo celular) e avaliação da via apoptótica (avaliação do potencial de membrana mitocondrial) mostraram que os complexos C4 (contra H460 e U937) e C8 (contra Molt-4) são capazes de induzir a morte celular majoritariamente por apoptose, com comprometimento das mitocôndrias.

Os estudos de interação dos complexos C1, C3, C4, C7 e C8 com DNA plasmidial indicam que estes cinco compostos interagem com o DNA. No entanto, a interação com o complexo C7 não ocorreu de forma linear. Os experimentos de espectros de emissão sugerem a intercalação como uma das formas de interação dos complexos C3, C4 e C8 com o DNA plasmidial.

Diante destes estudos, podemos sugerir que os complexos C4 e C8 são compostos promissores para estudos *in vivo*, bem como contra outras linhagens de interesse, como mama e próstata, já que apresentam atividade antineoplásica relevante.

7. PERSPECTIVAS E DESDOBRAMENTOS DO TRABALHO

Diante dos resultados promissores de atividade antitumoral com os complexos apresentados, diagnosticados através dos experimentos de viabilidade celular e estudos de tipo e via de morte celular discutidos neste trabalho, podemos propor como perspectivas a continuação dos estudos de atividade antitumoral, com inclusão de novas linhagens tumorais e o aprofundamento dos estudos de mecanismos de ação dos compostos mais promissores, além da inclusão de estudos *in vivo* para estes complexos.

8. LITERATURA CITADA

ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**. v. 281, p. 1322-1326, 1998.

ADDISON, A. W.; RAO, T. N.; REEDIJK, J., RIJN, J. VAN, VERSCHOOR, G. C. Synthesis, structure, and spectroscopic properties of copper(II) compounds containing nitrogen-sulphur donor ligands: the crystal and molecular structure of aqua [1,7-bis(*N*-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane] copper(II) perchlorate. **Journal of the American Chemical Society Dalton Transitions**, v. 7, p. 1349-1356, 1984.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; RAFF, L.; WALTER, R. L. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 5 ed., p.1268, 2010.

ALBRECHT, H., BRODBECK-HUMMEL, D., HOEVER, M., NICKEL, B., REGENASS, U. Cellular Assays in Drug Discovery In: DINGERMANN, T., STEINHILBER, D., FOLKERS, G. **Molecular Biology in Medicinal Chemistry**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p. 3-39, 2004.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos, ciclo-celular específicos e ciclo celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**. v. 1, p. 118-129, 2005.

ANBU, S.; KAMALRAJ, S.; VARGHESE, B.; MUTHUMARY, J.; KANDASWAMY, M. A series of oxyimine-based macrocyclic dinuclear zinc(II) complexes enhances phosphate ester hydrolysis, DNA binding, DNA hydrolysis, and lactate dehydrogenases inhibition and induces apoptosis. **Inorganic Chemistry**. v. 51, p. 5580-5592, 2012.

ANTONSSON, B.; MONTESSUIT, S.; LAUPER, S.; ESKES, R.; MARTINOU, J.C. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. **Biochemical Journal**. v. 345, p. 271-278, 2000.

ARJMAND, F.; YOUSUF, I.; HADDA, T. B.; TOUPET, L. Synthesis, crystal structure and antiproliferative activity of Cu(II) nalidixic acid-DACH conjugate: Comparative in vitro DNA/RNA binding profile, cleavage activity and molecular docking studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 81, p. 76-88, 2014.

AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. **Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs**. Elsevier, p. 442, 2008.

BARONE, G.; TERENCE, A.; LAURIA, A.; ALMERICO, A. M.; LEAL, J. M.; BUSTO, N.; GARCIA, B. DNA-binding of nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes: Structure–affinity relationships. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 257, p. 2848-2862, 2013.

BARRY, N. P. E.; SADLER, P. J. Exploration of the medical periodic table: towards new targets. **Chemical Communications**. v. 49, p. 5106-5131, 2013.

BERNARDI, A.; JACQUES-SILVA, M. C.; LENZ, G. Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos anti-tumorais. **Infarma**, v. 15, p. 61-63, 2003.

BENNETT, S.; BREIT, S. N. Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 56, p. 236-240, 1994.

BOGER, D.; FINK, B. E.; BRUNETTE, S. R.; TSE, W. C.; HEDRICK, M. P. A Simple, High-Resolution Method for Establishing DNA Binding Affinity and Sequence Selectivity. **Journal of the American Chemical Society**. v. 123, p. 5878, 2001.

BOIM, M.A.; SCHOR, N.; SANTOS, O. F. P. **Medicina celular e molecular: Bases moleculares da biologia, da genética e da farmacologia**, São Paulo: Editora Atheneu, p. 382, 2003.

BORGES, F. V. **Síntese, Caracterização e Avaliação da Atividade Antineoplásica de Complexos de Cobre e Zinco Frente Células 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, 2013.

BORGES, L. H.; BULL, E. S.; FERNANDES, C; HORN JR, A.; AZEREDO, N. F.; RESENDE, J. A.; FREITAS, W. R.; CARVALHO, E. C.; LEMOS, L. S.; JERDY, H.; KANASHIRO, M. M. In vitro and in vivo studies of antineoplastic activity of copper(II) compounds against human leukemia THP-1 and murine melanoma B16-F10 cell lines. **Journal of Inorganic Biochemistry**, artigo aceito, 2016.

BRUSTOLON, M.; GIAMELLO, E. **Electron Paramagnetic Resonance. A practitioner's toolkit**, Wiley, 2009.

BURGESS, D. J. Apoptosis: Refined and lethal. **Nature Reviews Cancer**. v. 13, 2, p. 79, 2013.

CASSIDY, J.; BISSETT, D.; OBE, R. A. J. **Oxford Handbook of Oncology**: Oxford: Oxford University Press, p. 698, 2002.

CHEN, Z. F.; WEI, J. H.; LIU, Y. C.; LIU, M.; GU, Y. Q., HUANG, K. B.; WANG, M.; LIANG, H. High antitumor activity of 5,7-dihalo-8-quinolinolato cerium complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 68, p. 454-462, 2013.

CHEWA, S. T.; LO, K. M.; LEE, S. K.; HENG, M. P.; TEOH, W. Y.; SIM, K. S.; TAN, K. W. Copper complexes with phosphonium containing hydrazone ligand: Topoisomerase inhibition and cytotoxicity study. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 76, p. 397-407, 2014.

CHOI, K. Y.; RYU, H.; SUNG, N. D.; SUH, M. Synthesis, properties, and X-ray structure of [Cu(dpa)Cl₂] (dpa = di-(2-picoly)amine). **Journal of Chemical Crystallography**. v. 33, p. 947-950, 2003.

CORRÊA, C. M. Prática v.4-síntese do propranolol-synthesis of propranolol, **International Union of Pure and Applied Chemistry**, 2006. http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-V-4.pdf

COSSARIZZA, A.; BACCARANI-CONTRI, M.; KALASHNIKOVA, G.; FRANCESCHI, C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochemical Biophysical Research Communications**. v. 197, p. 40-45, 1993.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**. v. 740, p. 364-378, 2014.

DHIVYA, R.; JAIVIDHYA, P.; RIYASDEEN, A.; PALANIANDAVAR, M.; MATHAN, G.; AKBARSHA, M. A. In vitro antiproliferative and apoptosis-inducing properties of a mononuclear copper(II) complex with dppz ligand, in two genotypically different breast cancer cell lines. **Biometals**. v. 28, p. 929-943, 2015.

FERNANDES, C.; HORN JR., A.; 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. A.; RUSSELL, D. H. Synthesis, characterization and antibacterial activity of FeIII, CoII, CuII and ZnII complexes probed by transmission electron microscopy. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 104, p.1214-1223, 2010.

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. V.; BORGES, L. J. H.; FREITAS, W. R.; VISENTIN, L. C.; ALMEIDA, J. C. A., SCHENK, G. Synthesis, characterization, antibacterial and activities of mononuclear zinc complexes containing tridentate amine based ligands with N3 or N2O donor groups. **Inorganica Chimica Acta**. v. 416, p. 35-48, 2014.

FERNANDES, C.; HORN JR, A.; LOPES, B. F.; BULL, E. S.; AZEREDO, N. F. B.; KANASHIRO, M. M.; BORGES, F. V.; BORTOLUZZI, A. J.; SZPOGANICZ, B.; PIRES, A.; FRANCO, R. W. A.; ALMEIDA, J. C. A.; MACIEL, L. L. F.; RESENDE, J. A. L. C.; SCHENK, G. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by new copper(II) complexes containing naphthyl groups via interaction with death receptors. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 153, p. 68-87, 2015.

FISCHER, U.; SCHULZE-OSTHOFF, K. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. **Pharmacological Reviews**. v. 57, p. 187-215, 2005.

FISCHER-FODOR, E.; VALEAN, A. M.; VIRAG, P.; ILEA, P.; TATOMIR, C.; IMRE-LUCACI, F.; SCHREPLER, M. P.; KRAUSZ, L. T.; TUDORAN, L. B.; PRECUP, C. G.; LUPAN, I.; HEY-HAWKINS, E.; SILAGHI-DUMITRESCU, L. Gallium phosphinoarylthiolato complexes counteract drug resistance of cancer cells. **Metallomics**. v.6, p. 833-844, 2014.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, W. V.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.;KEPP, O.;

KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUNEZ, G.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D. C.; SHI, Y.; SIMON, H. U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**. v. 19, p. 107–120, 2012.

GEARY, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds. **Coord. Chem. Rev.**, v. 7, p. 81-122, 1971.

GÓMEZ-RUIZ, S.; GALLEGO, B.; KALUĐEROVIĆ, M.R.; KOMMERA, H.; HEY-HAWKINS, E.; PASCHKE, R. ; KALUĐEROVIĆ, G.N. Novel gallium(III) complexes containing phthaloyl derivatives of neutral aminoacids with apoptotic activity in cancer cells. **Journal of Organometallic Chemistry**. v. 694, p. 2191–2197, 2009.

GONG, J.; TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. **Analytical Biochemistry**. v. 218, p.314-319, 1994.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Editora McGraw Hill, 10 ed, p. 1647, 2005.

HANAHAN, D.; WEINBER, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**. v. 100, p. 57-70, 2000.

HORN A. Jr.; NEVES, A.; VENCATO, I.; ZUCCO, C.; MANGRICH, A. S.; BORTOLUZZI, A. J. A new dinucleating ligand (H₂BPCINOL) and the structural and magnetic properties of two diiron complexes with the di-m-alkoxo motif. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, p. 7-10, 2000.

HORN JR., A.; FERNANDES, C.; PARRILHA, G. L.; KANASHIRO, M. M.; BORGES, F. V.; MELO, E. J. T.; SCHENKD, G.; TERENCEZI, H.; PICH, C. T. Highly efficient synthetic iron-dependent nucleases activate both intrinsic and extrinsic apoptotic death pathways in leukemia cancer cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 128, p. 38-47, 2013.

INCA (2016) Estimativa 2064-2017: Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro, p. 118.

JAIVIDHYA, P.; DHIVYA, R.; AKBARSHA, M. A.; PALANIANDAVAR, M. Efficient DNA cleavage mediated by mononuclear mixed ligand copper (II) phenolate complexes: the role of coligand planarity on DNA binding and cleavage and anticancer activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 114, p. 94-105, 2012

JIANG, P.; DU, W.; WU, M, p53 and Bad: remote strangers become close friends. **Cell Research**. v. 17, p. 283-285, 2007.

JOHNSTONE, R. W; RUEFLI, A. A; LOWE, S. W. Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. **Cell**. v. 108, p. 153-164, 2002.

KALFAOGLU, E.; KARABUTUT, B. Theoretical investigation of EPR and molecular orbital coefficient parameters for $[\text{Cu}(\text{hsm})_2(\text{sac})_2]$ complex. **Chemical Physics Letters**. v. 505, p. 154-156, 2011.

KALUDEROVIC, M. R.; GÓMEZ-RUIZ, S.; GALLEGO, B.; HEY-HAWKINS, E.; PASCHKE, R.; KALUCEROVIC, G. N. Anticancer activity of dinuclear gallium(III) carboxylate complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, p. 519-525, 2010.

KALUDEROVIC, M. R.; KALUDEROVIC, G. N.; RUIZ, S. G.; PASCHKE, R.; HEMPRICH, A.; KÜHLING, J.; REMMERBACH, T. W. Organogallium(III) complexes as apoptosis promoting anticancer agents for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 105, p. 164-170, 2011.

KIVELSON, K.; NIEMAN, R. ESR studies on the bonding in copper complexes. **The Journal of Chemical Physics**. v. 35, p. 149-155, 1961.

KONARIKOVA, K.; ANDREZALOVA, L.; RAPTA, P.; SLOVAKOVA, M.; DURACKOVA, Z.; LAUBERTOVA, L.; GBELCOVA, H.; DANISOVIC, L. Effect of the Schiff base complex diaqua-(*N*-salicylidene-L-glutamato)copper(II) monohydrate on human tumor cells. **European Journal of Pharmacology**. v. 721, p. 178-184, 2013.

LEE, J. D. **Química Inorgânica não tão Concisa**, Tradução da 5ª edição inglesa. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 1999.

LI, R.; CUI, B.; LI, Y.; ZHAO, C.; JIA, N.; WANG, C.; WU, Y.; WEN, A. A new synthetic Cu(II) compound, $[\text{Cu}_3(\text{p-3-bmb})_2\text{Cl}_4.(\text{CH}_3\text{OH})_2]_n$, inhibits tumor growth *in vivo* and *in vitro*. **European Journal of Pharmacology**. v. 724, p. 77-85, 2014.

LIU, Y. C.; WEI, J. H.; CHEN, Z. F.; LIU, M.; GU, Y. Q.; HUANG, K. B.; LI, Z. Q.; LIANG, Z. Q. The antitumor activity of zinc(II) and copper(II) complexes with 5,7-dihalo-substituted-8-quinolinoline. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 69, p. 554-563, 2013.

LIU, W.; JIANG, J.; XU, Y.; HOU, S.; SUN, L.; YE, Q.; LOU, L. Design, synthesis and anticancer activity of diam(m)ine platinum(II) complexes bearing a small-molecular cell apoptosis inducer dichloroacetate. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 146, p. 14-18, 2015.

LOCKSLEY, R. M., KILLEEN, N., LENARDO, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, p. 487-501, 2001.

LODISH, L.; BERK, A.; MATSUDARIA, P.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; ZIPURISKY, L.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. Artmed, 5 ed, p. 973, 2005.

LOPES, B. F. **Síntese, Caracterização e Avaliação da Atividade Antiproliferativa de Compostos Orgânicos e 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, 2012.

LUBE, L. M. **Oxidação de Hidrocarbonetos Cíclicos Catalisada por Complexos de Ferro Modelos para a Metano Monoxigenase.** Tese – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2011.

MACHADO, I.; FERNÁNDEZ, M.; BECCO, L.; GARAT, B.; BRISSOS, R. F.; ZABARSKA, N.; GAMEZ, P.; MARQUES, F.; CORREIA, I.; PESSOA, J. C.; GAMBINO, D. New metal complexes of NNO tridentate ligands: Effect of metal center and co-ligand on biological activity. **Inorganica Chimica Acta.** v. 420, p. 39-46, 2014.

MEDICI, S., PEANAA, M., NURCHIB, V.M., LACHOWICZB, J. I., CRISPONI, G., ZORODDUA, M. A. Noble metals in medicine: Latest advances. **Coordination Chemistry Reviews.** v. 284, p. 329-350, 2015.

MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. **Chemical Reviews.** v. 114, p. 4540-4563, 2014.

MONTAGNER, D.; GANDIN, V.; MARZANO, C.; ERXLEBEN, A. DNA damage and induction of apoptosis in pancreatic cancer cells by a new dinuclear bis(triazacyclonane) copper complex. **Journal of Inorganic Biochemistry.** v. 145, p. 101-107, 2015.

MORCELLI, S. R. ; BULL, E. S.; TERRA, W. S.; MOREIRA, R. O.; BORGES, F. V.; KANASHIRO, M. M.; BORTOLUZZI, A. J.; MACIEL, L. L. F.; ALMEIDA, J. C. A.; HORN JÚNIOR, A.; FERNANDES, C. Synthesis, characterization and antitumoral activity of new cobalt(II) complexes: effect of the isomerism on the biological activity. **Journal of Inorganic Biochemistry.** In Press, Corrected Proof, Available online, 2016

MOREIRA, R. O. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade citotóxica de compostos de coordenação de platina e zinco.** Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods.** v. 16, p. 55-63, 1983.

NEVES, A.; LEVY, N. M.; FRANCO, C. V.; LARANJEIRA, M. C M. Synthesis characterization and electrochemical studies and nickel(ii) complexes of 2-(2-pyridylethyl)imino-3-butanone oxime (HDPE) and 2-(2-pyridylmethyl)imino-3-butanone oxime (HDPM). **Journal of the Brazilian Chemical Society.** v. 04, p. 54-60, 1993.

NOVÁK, B.; SIBLE, J. C.; TYSON, J. J. Checkpoints in the Cell Cycle. **Encyclopedia of life sciences**, p. 1-8, 2002.

NUNEZ, R. DNA Measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. **Current Issues in Molecular Biology**. v. 3, p. 67-70, 2001.

NUSSBAUM, R. L.; McINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson: Genética Médica**. Editora Guanabara Koogan, 6 ed., p. 387, 2002.

PETTINARI, C.; MARCHETTI, F.; LUPIDI, G.; QUASSINTI, L.; BRAMUCCI, M.; PETRELLI, D.; VITALI, L. A.; SILVA, M. F. C. G.; MARTINS, L. M. D. R. S.; SMOLENSKI, P. POMBEIRO, A. J. L. Synthesis, Antimicrobial and Antiproliferative Activity of Novel Silver(I) Tris(pyrazolyl)methanesulfonate and 1,3,5-Triaza-7-phosphadamantane Complexes. **Inorganic Chemistry**. v. 50, p. 11173-11183, 2011.

POOT, M.; KILLER, K. H. Distinct patterns of cell cycle disturbance elicited by compounds interfering with DNA topoisomerase I and II. **Experimental Cell Research**. v. 218, p. 326-330, 1995.

ORVIG, C.; ABRAMS, M. Medicinal inorganic chemistry: introduction. **Chemical Reviews**. v. 99, p. 2201-2204, 1999.

OYEWUMI, M. O.; ALAZIZI, A.; LIVA, S.; LIN, L.; GELDENHUYS, W. J. Screening and identification of novel compounds with potential anti-proliferative effects on gallium-resistant lung cancer through an AXL kinase pathway. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 24, p. 4553-4556, 2014.

QIU, L.; LV, G.; GUO, L.; CHEN, L.; LUO, S.; ZOU, M.; LIN, J. Synthesis, crystal structure and antitumor effect of a novel copper(II) complex bearing zoledronic acid derivative. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 89, p. 42-50, 2015.

RAGHEB, M. A.; ELDESOUKI, M. A.; MOHAMED, M. S. DNA binding, photo-induced DNA cleavage and cytotoxicity studies of lo mefloxacina and its transition metal complexes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 138, p. 585-595, 2015.

ROMANOWSKI, S. M. M.; MANGRICH, A. S.; NEVES, A. Síntese e caracterização de novos compostos de coordenação de cobre (ii) com ligantes não-simétricos n,o-doadores: contribuições para o sítio ativo da galactose oxidase. **Química Nova**. v. 24, 5, p. 592-598, 2001.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., MOORE, P. K. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5 ed., p.904, 2004.

RAO, T. G. V. M.; KUMAR, A. R.; CHAKRAVARTHI, C. K.; REDDY, M. R.; VEERIAH, N. Spectroscopical splitting of Cu ion energy levels in magnesium lead fluoro silicate glasses. **Physica B**. v. 407, p. 593-597, 2012.

ROSAS, M. S. L.; SILVA, B. N. M.; PINTO, R. G. M. P.; SILVA, B. V.; SILVA, R. A.; GUERRA, L. R.; SOARES G. C. M. T.; CASTRO, H. C.; LIONE, V. O. F. Incidência

do Câncer no Brasil e o Potencial Uso dos Derivados de Isatinas na Cancerologia Experimental. **Revista Virtual de Química**. v. 5, 2, p. 243-265, 2013.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**. v. 205, p. 698-699, 1965

ROSENBERG, B., VANCAMP, L.; GRIMLEY, E.B.; THOMSON, A. J. The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum (IV) complexes. **Journal of Biological Chemistry**. v. 242, p. 1347-1352, 1967.

ROSENBERG, B. Some Biological Effects of Platinum Compounds: New agents for the control of tumors. **Platinum Metals Review**. v. 15, p. 42-50, 1971.

ROSENBERG, B. Platinum complexes for the treatment of cancer: Why the search goes on, in Cisplatin. **Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug**. p. 3-27, 1999.

ROUVIER, E.; LUCIANI, M. F.; GOLSTEIN, P. Fas involvement in Ca^{2+} independent T cell-mediated cytotoxicity. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 177, p. 195-200, 1993.

SANTINI, C.; PELLEI, M.; PAPINI, G.; MORRESI, B.; GALASSI, R.; RICCI, S.; TISATO, F.; PORCHIA, M.; RIGOBELLO, M. P.; GANDIN, V.; MARZANO, C. In vitro antitumor activity of water soluble Cu(I), Ag(I) and Au(I) complexes supported by hydrophilic alkyl phosphine ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, p. 232-240, 2011.

SARIOGLU, O. F.; TEKINER-GURSACLI, R.; OZDEMIR, A.; TEKINAY, T. Comparison of Au(III) and Ga(III) Ions' Binding to Calf Thymus DNA: Spectroscopic Characterization and Thermal Analysis. **Biological Trace Element Research**. v. 160, p. 445-452, 2014.

SCHWIETERT, C. W.; MCCUE, J. P. Coordination compounds in medicinal chemistry. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 184, p. 67-89, 1999.

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 124, p. 1-19, 2013.

SHAO, J.; MA, Z. Y.; LI, A.; LIU, Y. H.; XIE, C. Z.; QIANG, Z. Y.; XU, J. Y. Thiosemicarbazone Cu(II) and Zn(II) complexes as potential anticancer agents: Synthesis, crystal structure, DNA cleavage, cytotoxicity and apoptosis induction activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 136, p. 13-23, 2014.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. tradução FARIA, R. B. **Química Inorgânica**. Bookman Editora. 4ª edição, 2006.

SILVA, J. G. D.; DESPAIGNE, A. A. R.; LOURO, S. R. W.; BANDEIRA, C. C.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; BERALDO, H. Cytotoxic activity, albumin and DNA

binding of new copper(II) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 65, p. 415-426, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 6ª Ed., Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, p. 460, 2000.

SMILEY, S. T., REERS, M., MOTTOLA-HARTSHORN, C., LIN, M., CHEN, A., SMITH, T. W., STEELE, G. D., CHEN, L.B. 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, 1991.

STEFAN, J.; SALVESEN, R.; SALVESEN, S. The apoptosome: signaling platform of cell death. **Natural Review**. v.8, p. 405-413, 2007.

STEINER, R. A.; FOREMAN, D.; LIN, H. X.; CARNEY, B. K.; FOX, K. M.; CASSIMERIS, L.; TANSKI, J. M.; TYLER, L. A. Synthesis, characterization, crystal structures and biological activity of set of Cu(II) benzothiazole complexes: Artificial nucleases with cytotoxic activities. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 137, p. 1-11, 2014.

SU, W.; TANG, Z.; XIAO, Q.; LI, P.; QIAN, Q.; LEI, X.; HUANG, S.; PENG, B.; CUI, J.; HUANG, C. Synthesis, structures, antiproliferative activity of a series of ruthenium(II) arene derivatives of thiosemicarbazones ligands. **Journal of Organometallic Chemistry**. v. 783, p. 10-16, 2015.

TAN, C. P.; LU, Y. T.; JI, L. N.; MAO, Z. W. Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds. **Metallomics**. v. 6, p. 978-995, 2014.

TOMASETTI, C.; VOGELSTEIN, B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. **Science**. v. 347, p. 78-81, 2015.

VERANI, C. N. Metal complexes as inhibitors of the 26S proteasome in tumor cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 106, p. 59-67, 2012.

VERMEULEN, K.; BOCKSTAEKE, D. R. V.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v.36, p. 131-149, 2003.

WAITZBERG, D. L.; NARDI, L. D.; HORIE, L. M. Nutrição em câncer. **Onco**. p. 34-37, 2011.

WARAD, I.; EFTAIHA, A. F.; AL-NURI, M. A.; HUSEIN, A. I.; ASSAL, M.; ABU-OBAID, A.; AL-ZAQRI, N.; HADDA, T. B.; HAMMOUTI, B. Metal ions as antitumor complexes- review. **Journal of Materials Environmental Science**. v. 4, p. 542-557, 2013.

WHO (2016). The World Health Organization; <http://www.who.int/topics/cancer/es/em> 04/01/2016.

WILLIAMS, C. J.; MORRIS, H.; SVOREC, J.; VALKOVA, M.; VALKO, M.; MONCOL, J.; MAZUR, M.; VALACH, F.; MELNIK, M. A study of copper(II) carboxylato complexes with the biological ligands nicotinamide and papaverine. **Journal of Molecular Structure**. v. 659, p. 53-60, 2003.

ZHANG, N.; TAI, Y.; LI, M.; MA, P.; ZHAO, J.; NIU, J. Main group bismuth(III), gallium(III) and diorganotin(IV) complexes derived from bis(2-acetylpyrazine)thiocarbonohydrazone: synthesis, crystal structures and biological evaluation. **Dalton Transactions**. v. 43, p. 5182-5189, 2014.

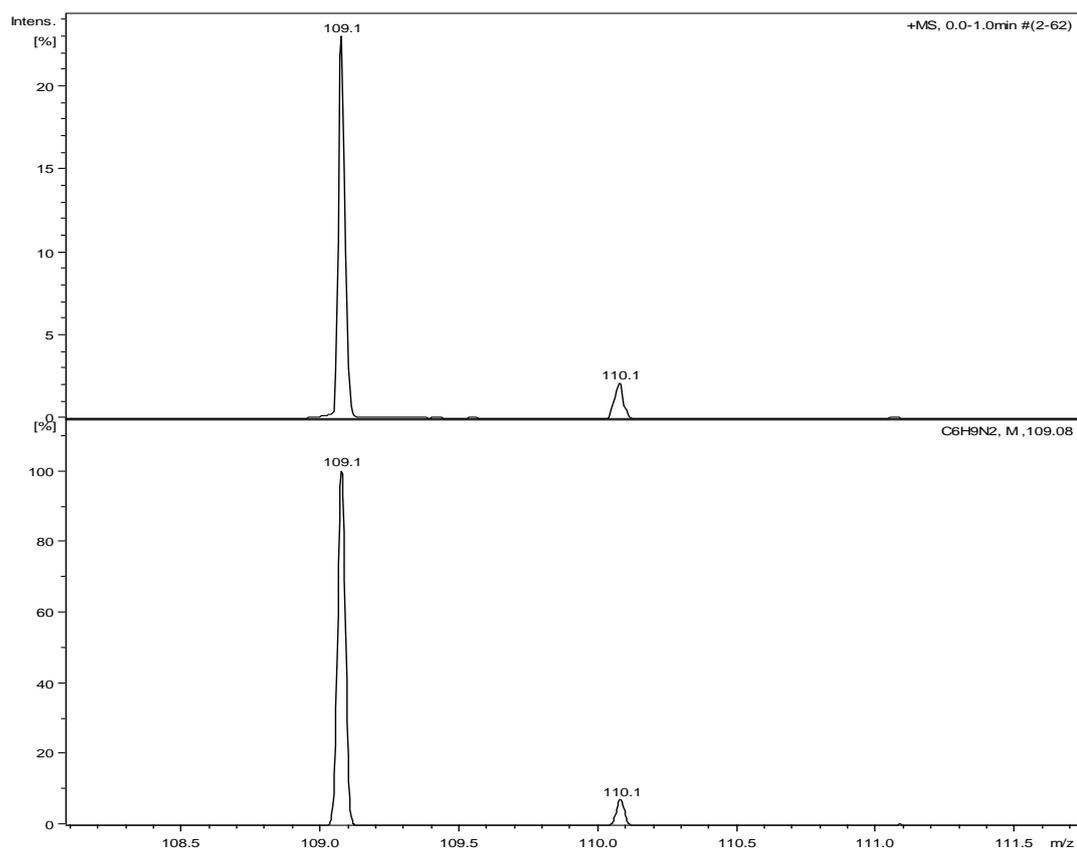
ZHAO, J.; LI, S.; ZHAO, D.; CHEN, S.; HU, J. Metal and structure tuned in vitro antitumor activity of benzimidazole-based copper and zinc complex. **Journal of Coordination Chemistry**. v. 9, p.1650-1660, 2013.

9. ANEXOS

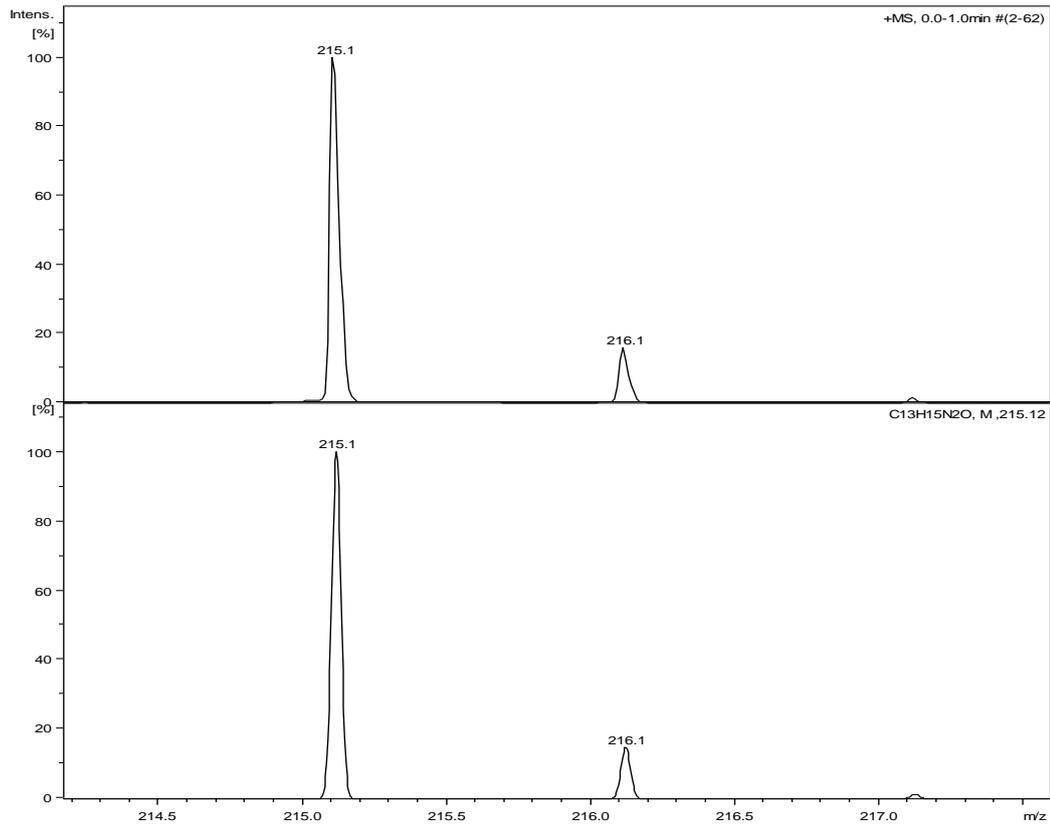
ANEXO 1

Perfis isotópicos das espécies selecionadas no espectro de massas com ionização por *electrospray*

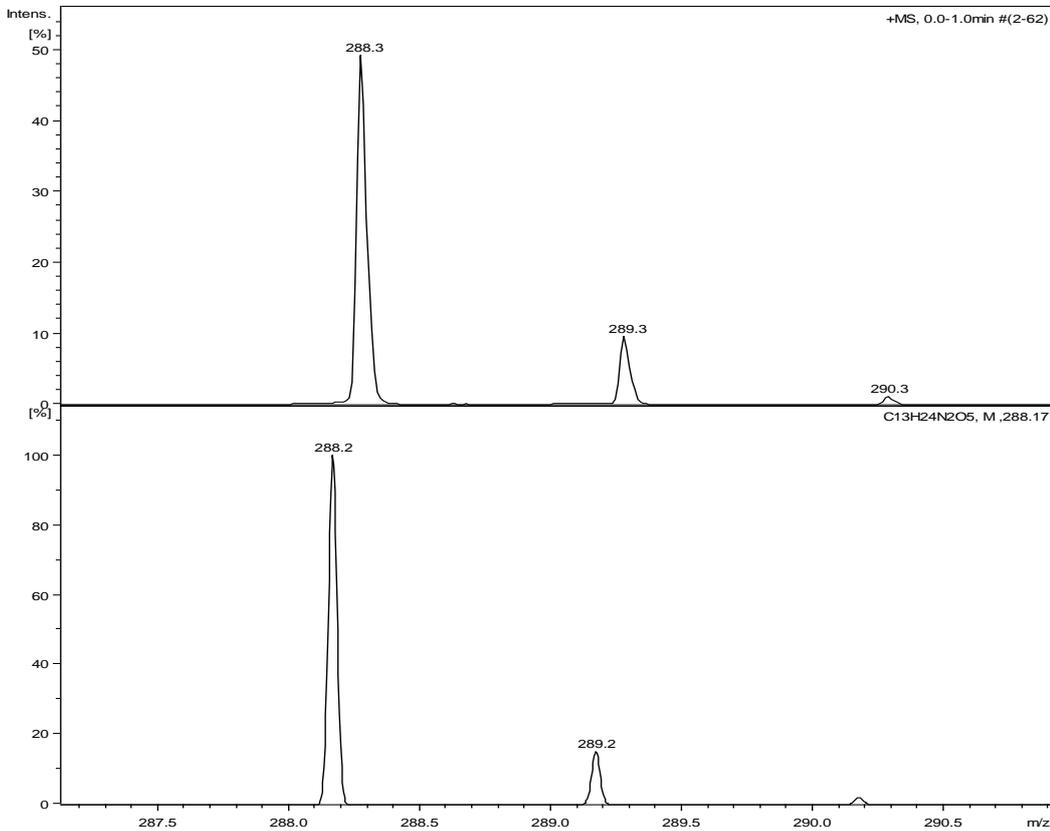
1. Complexo C5

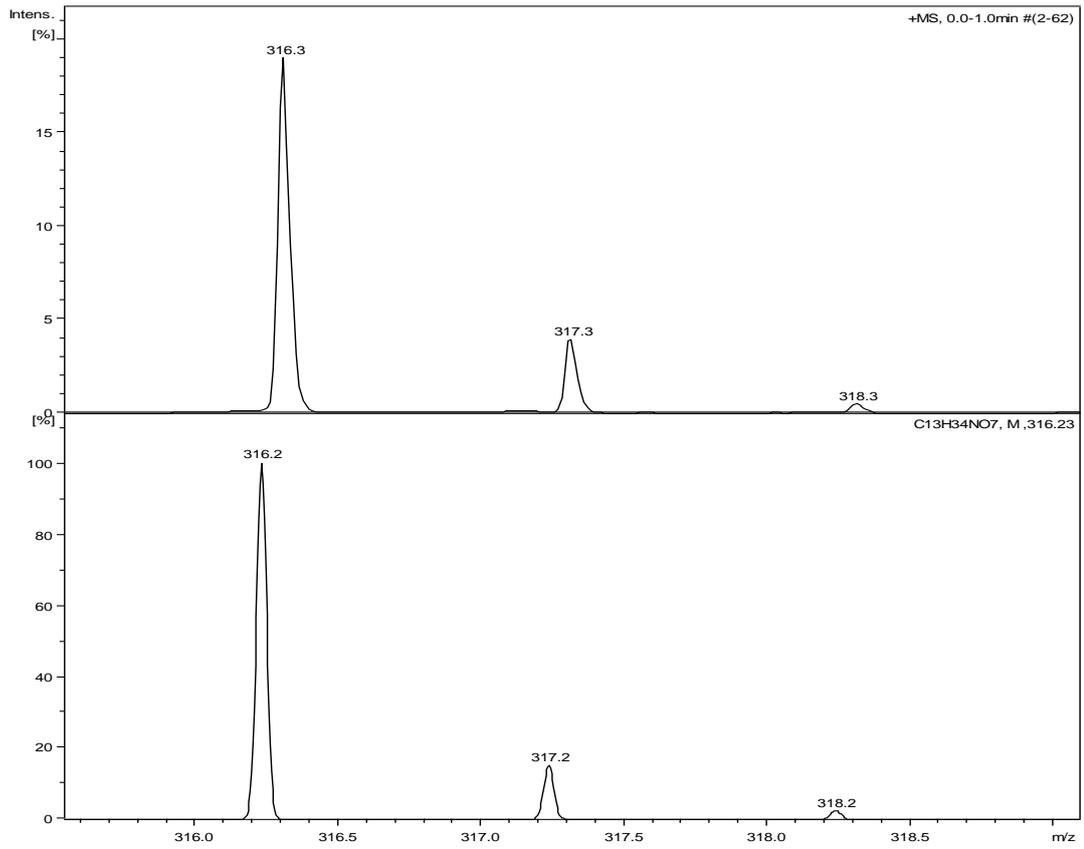
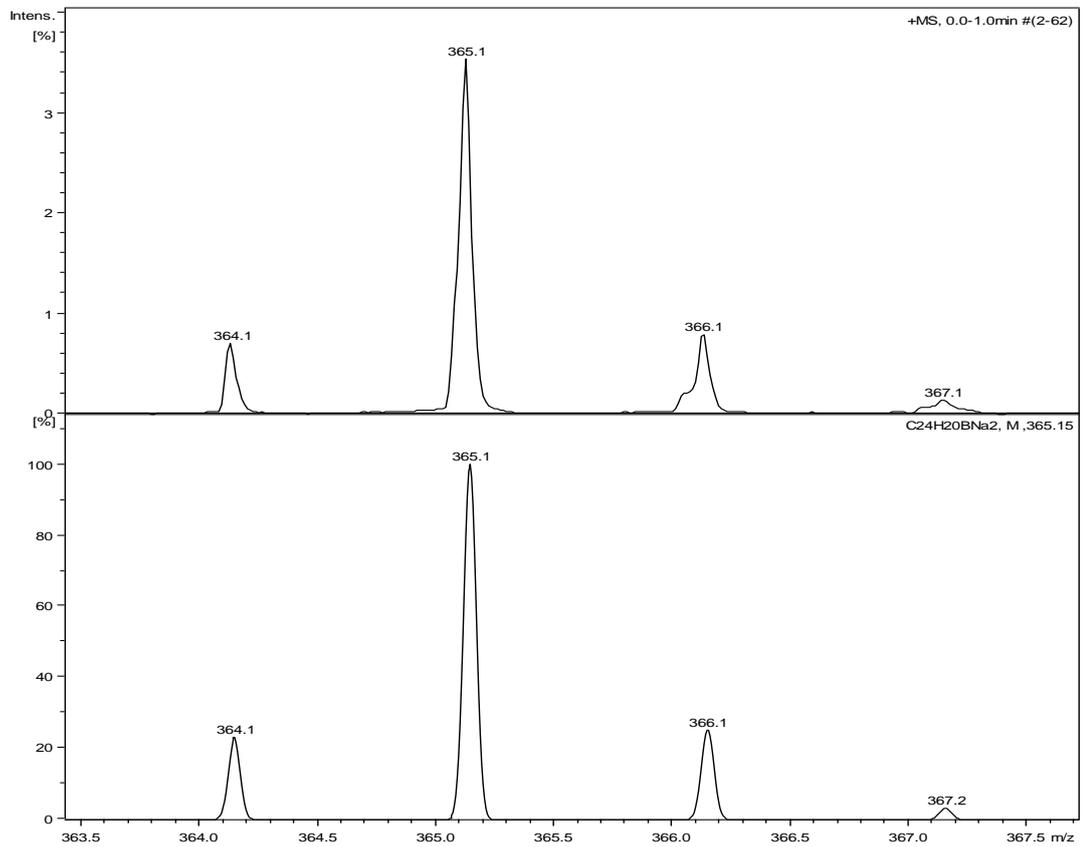
a) $m/z= 109,1$ 

b) $m/z=215,1$

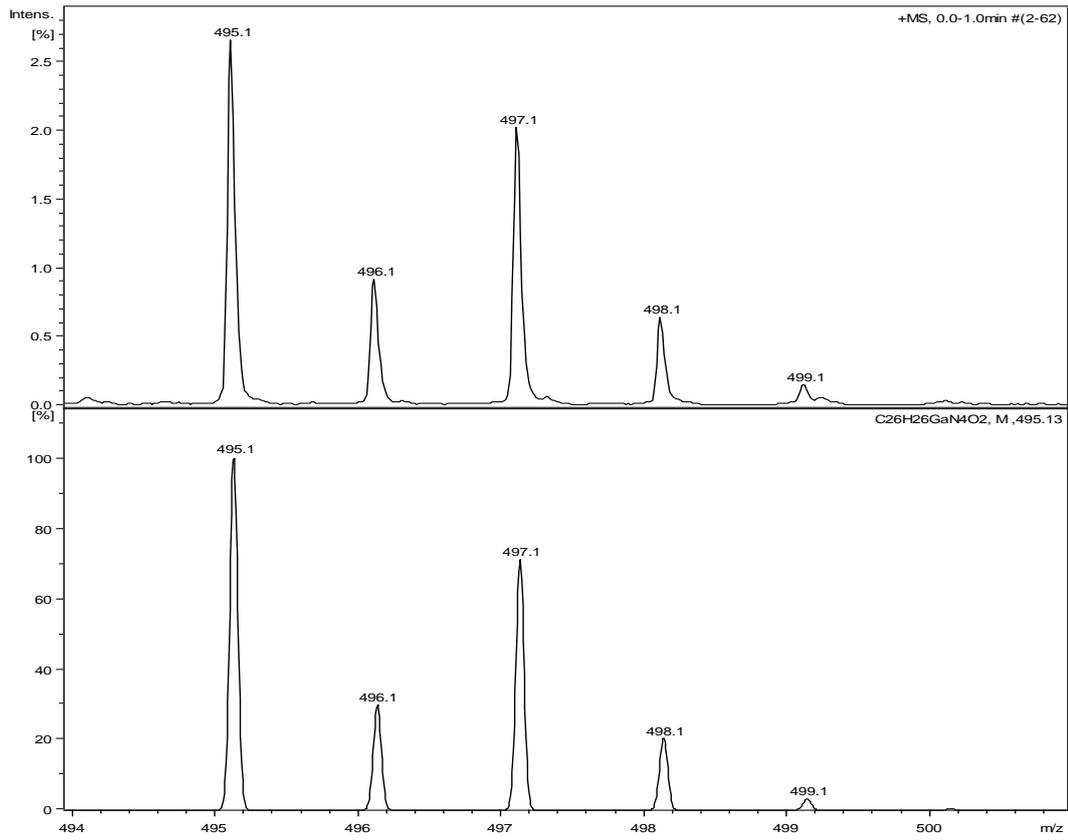


c) $m/z=288,3$

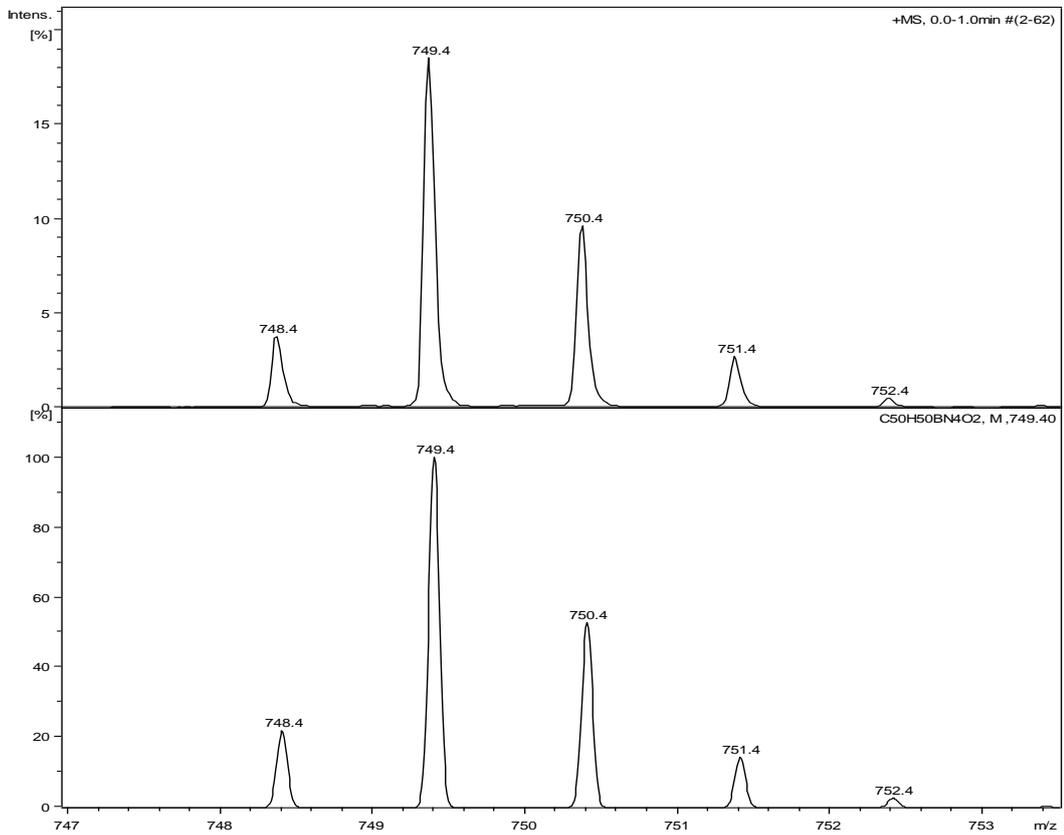


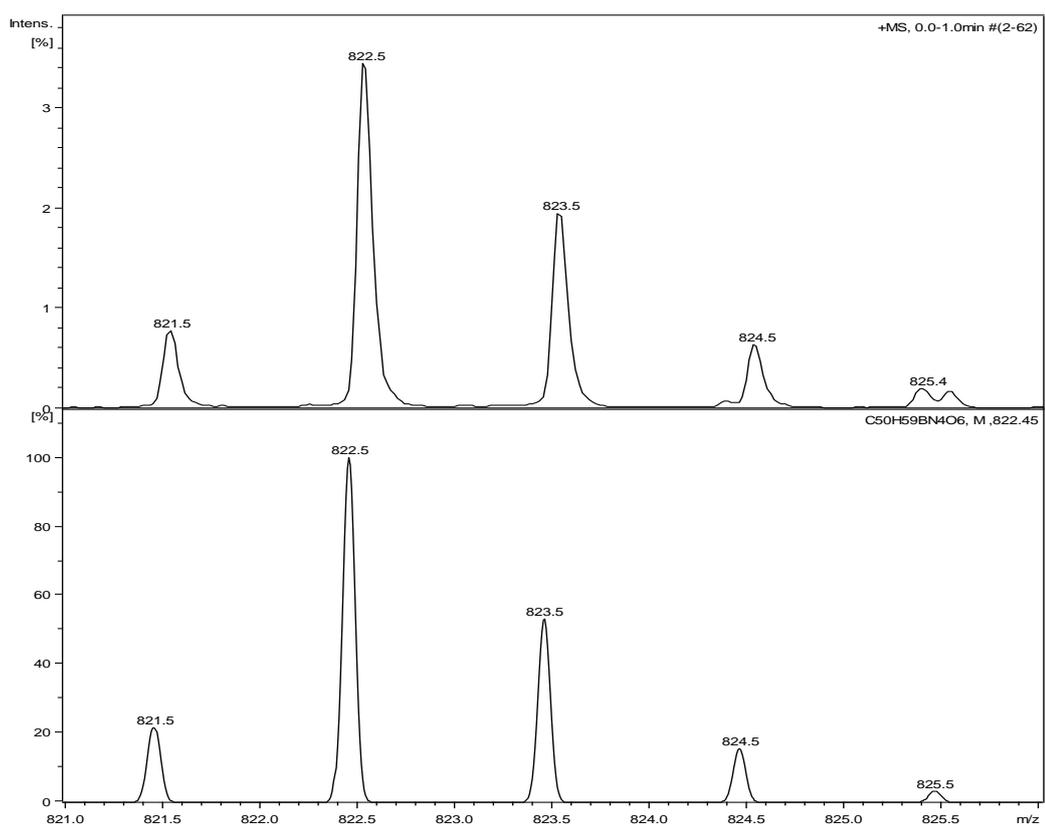
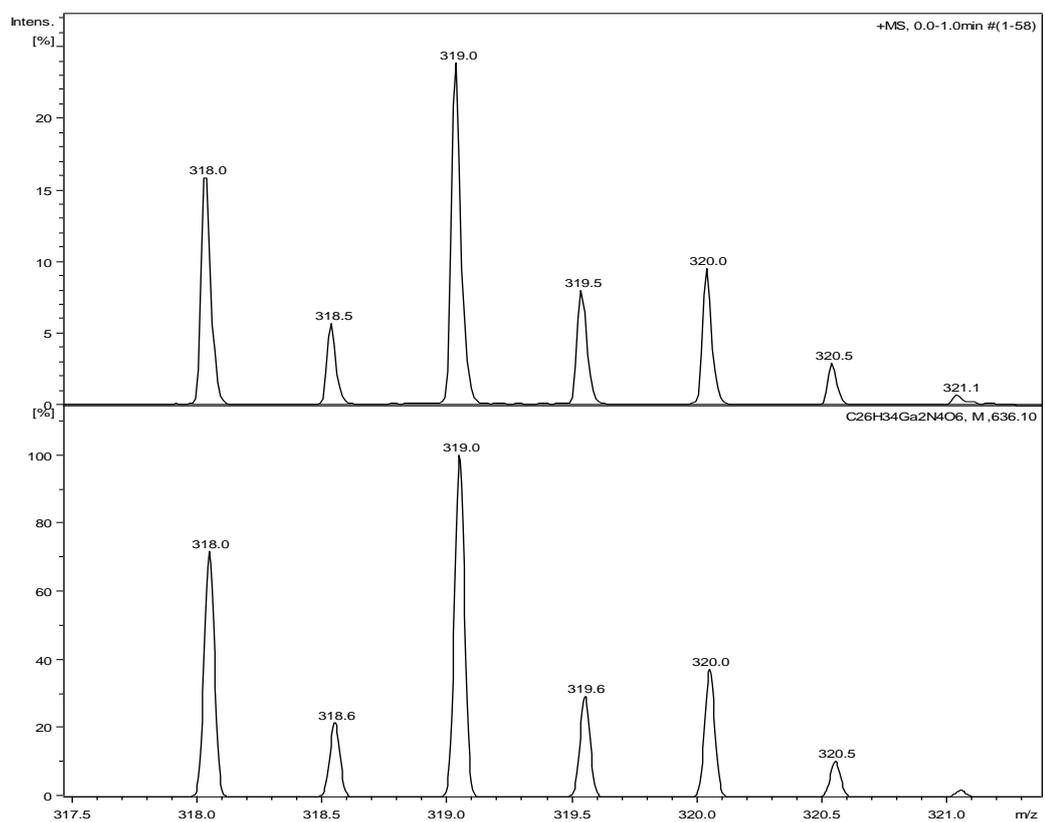
d) $m/z=316,3$ **e) $m/z=365,1$** 

f) $m/z = 495,1$

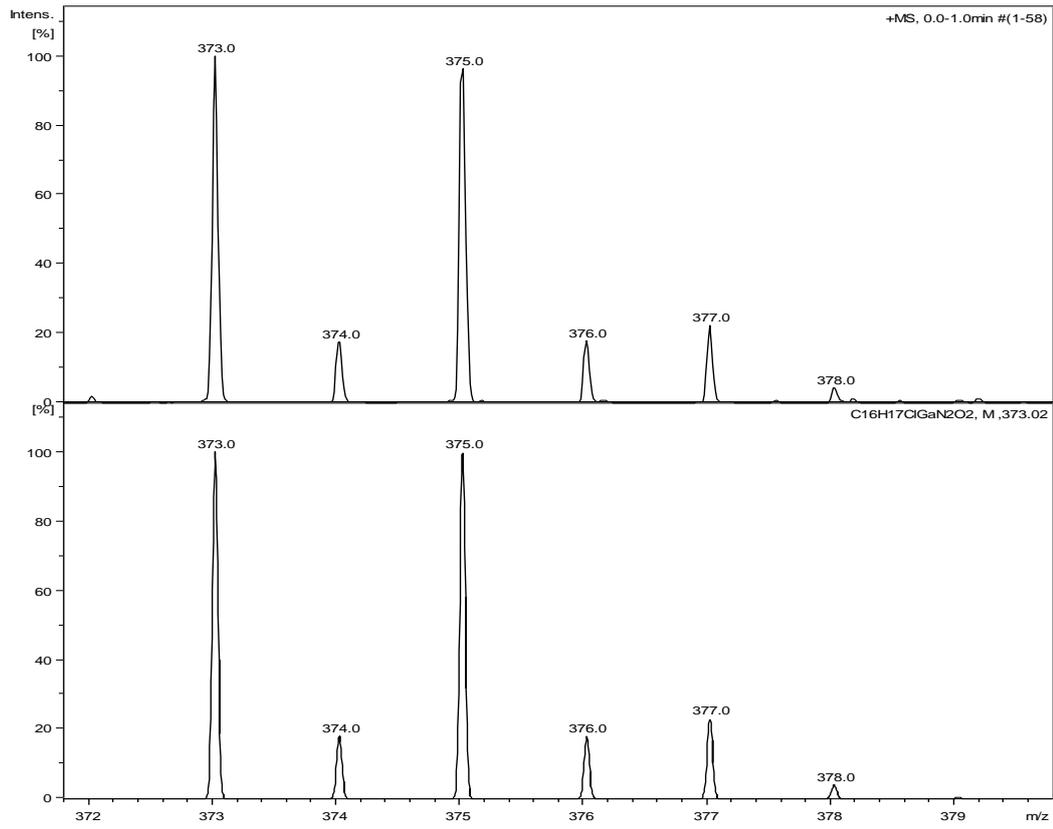


g) $m/z = 749,4$

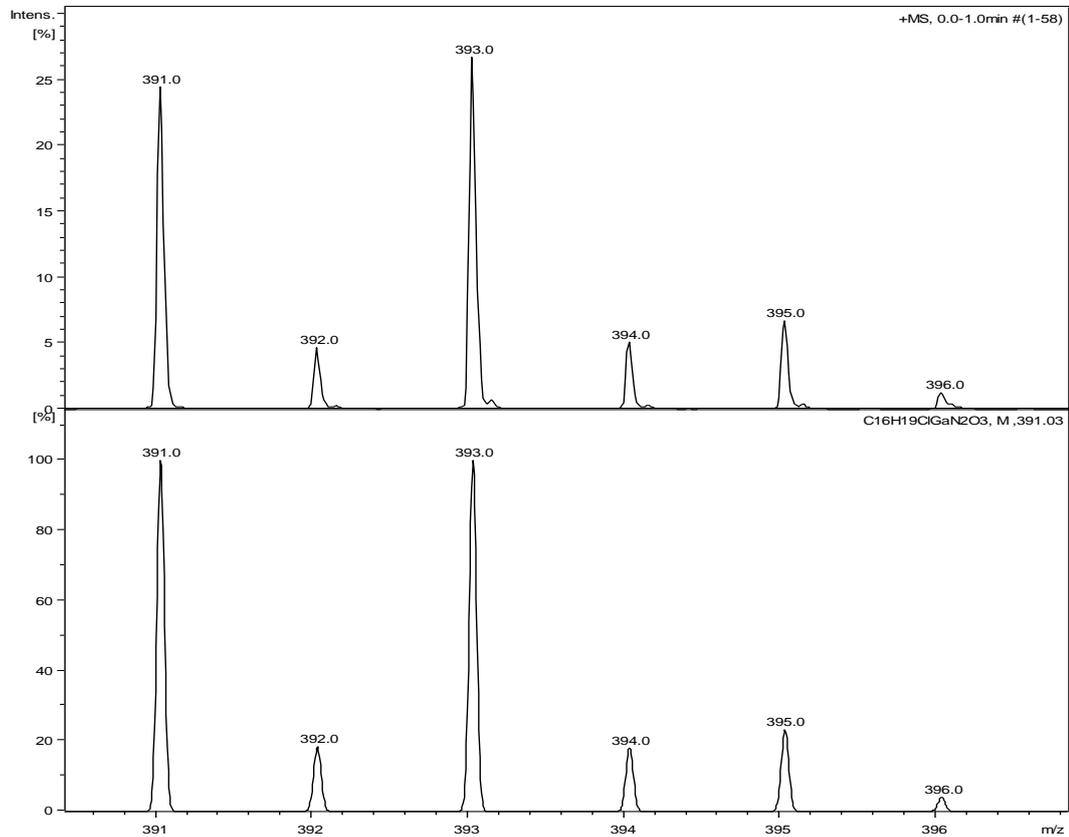


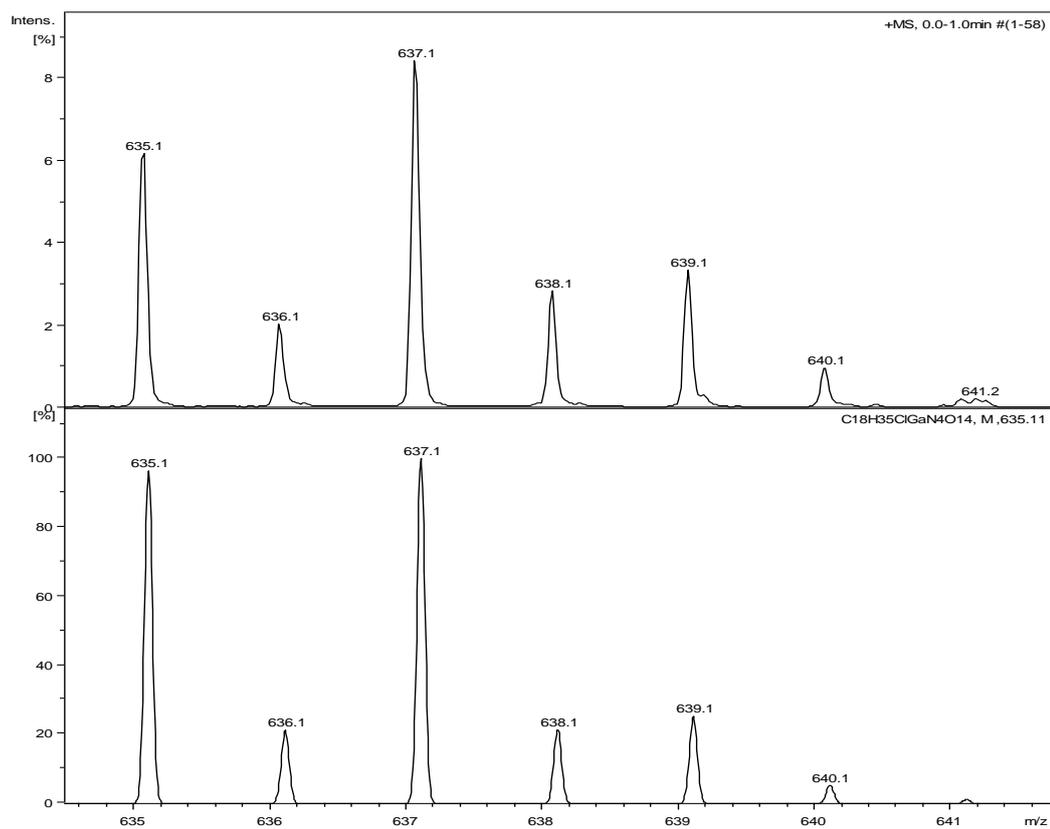
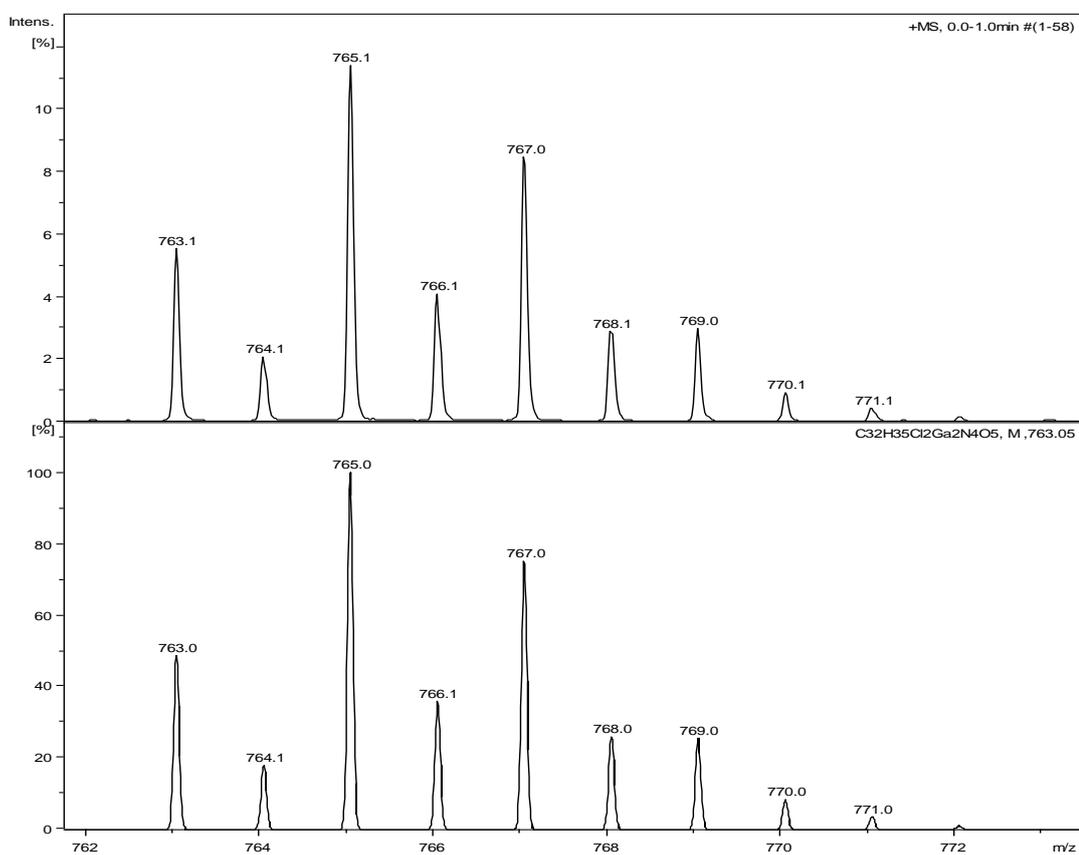
h) $m/z=822,5$ **2. Complexo C6****a) $m/z=319,0$** 

b) $m/z = 373,0$



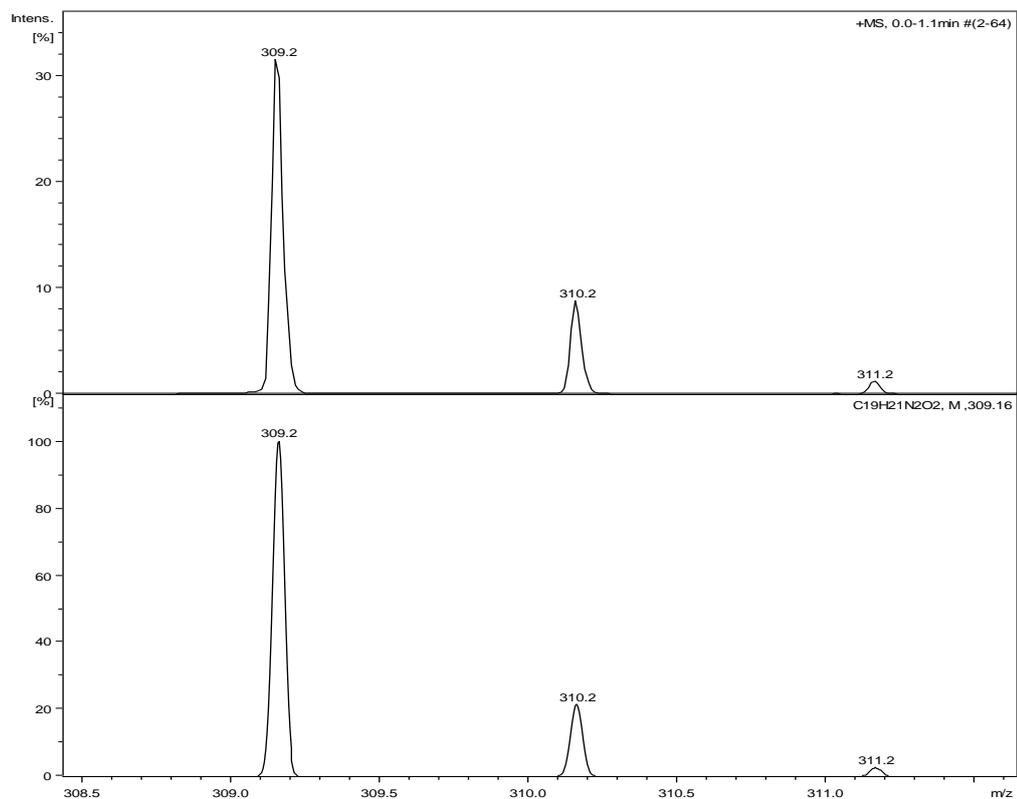
c) $m/z = 393,0$



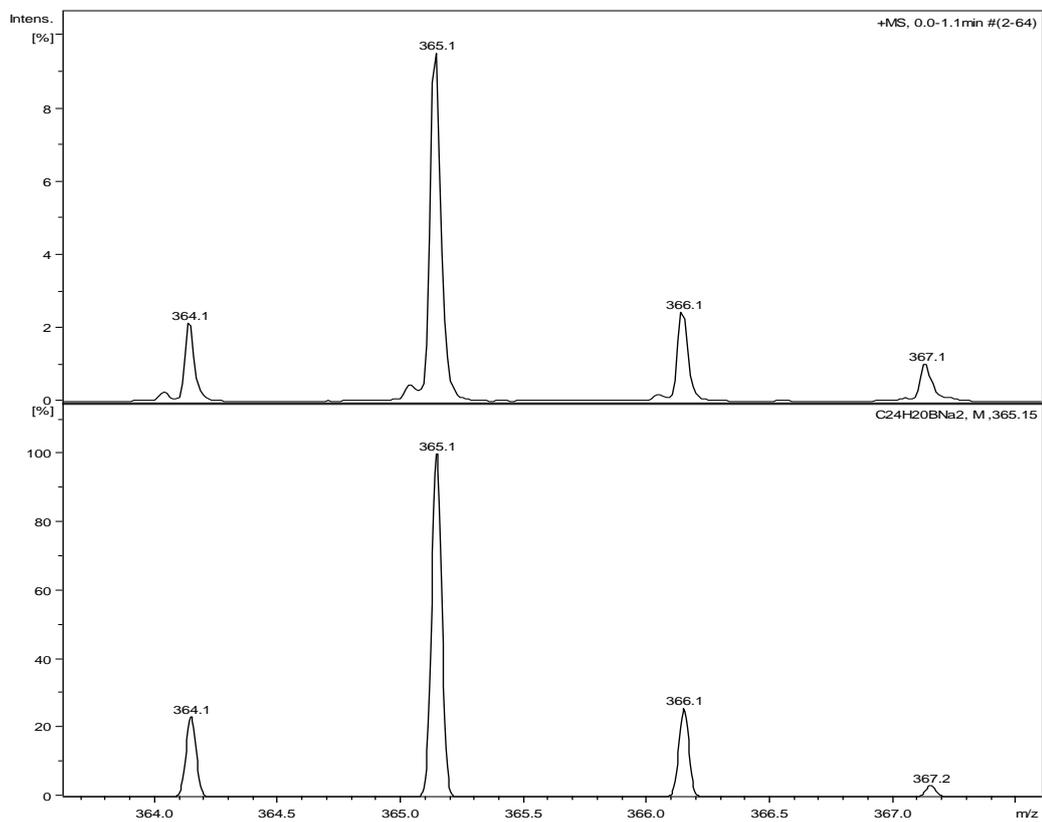
d) $m/z=637,1$ **e) $m/z=765,1$** 

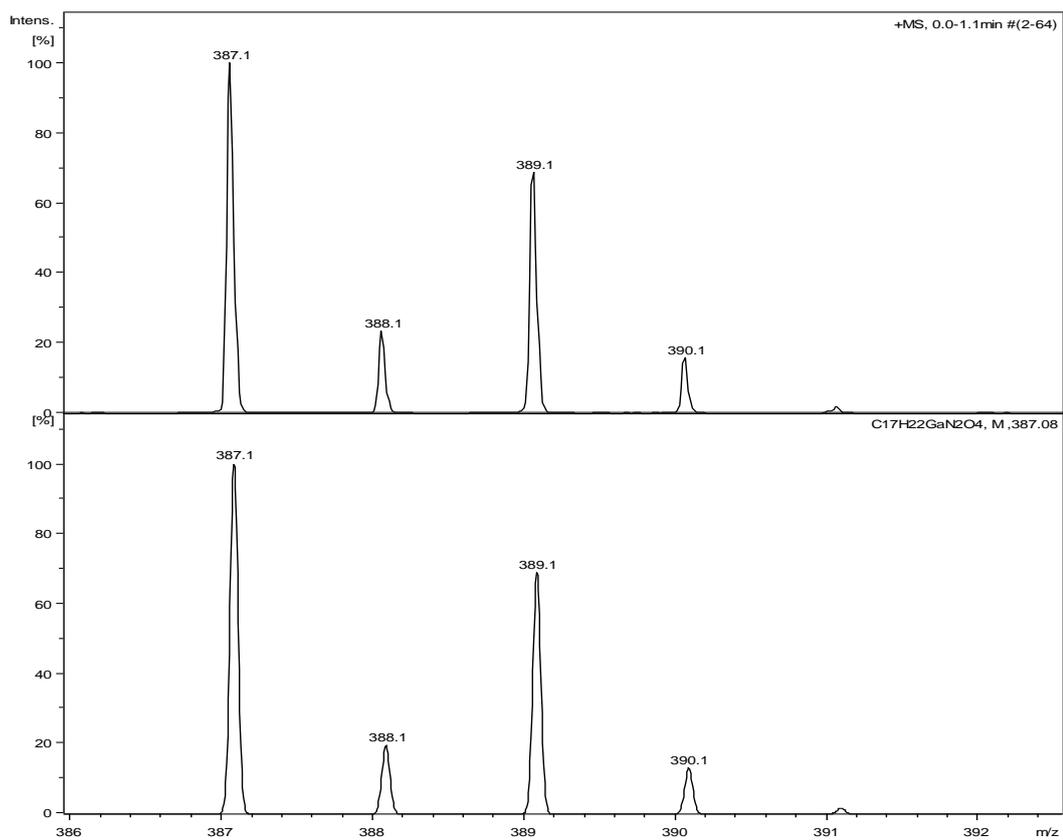
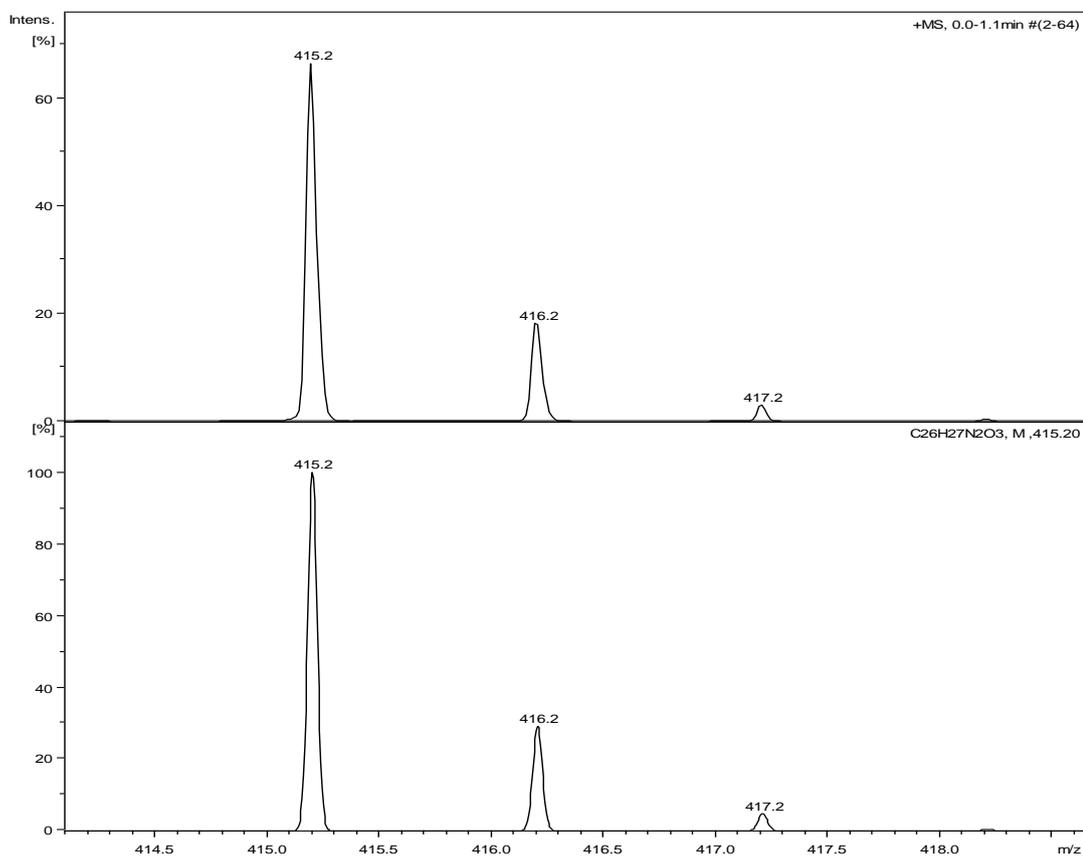
3. Complexo C7

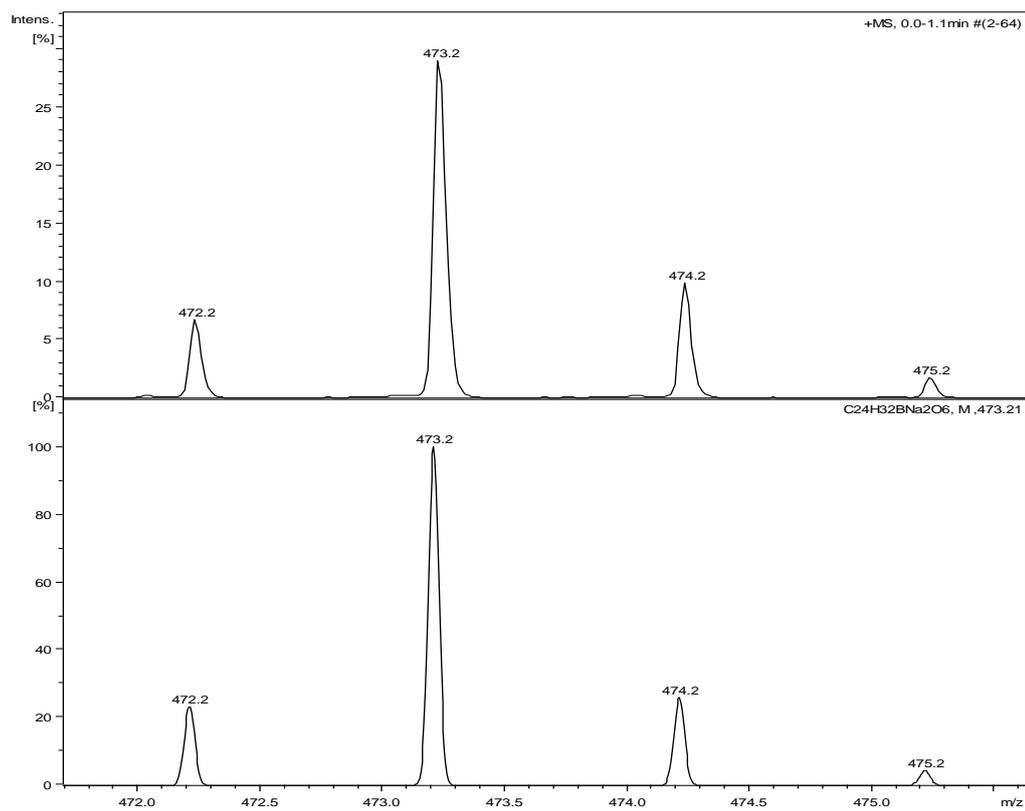
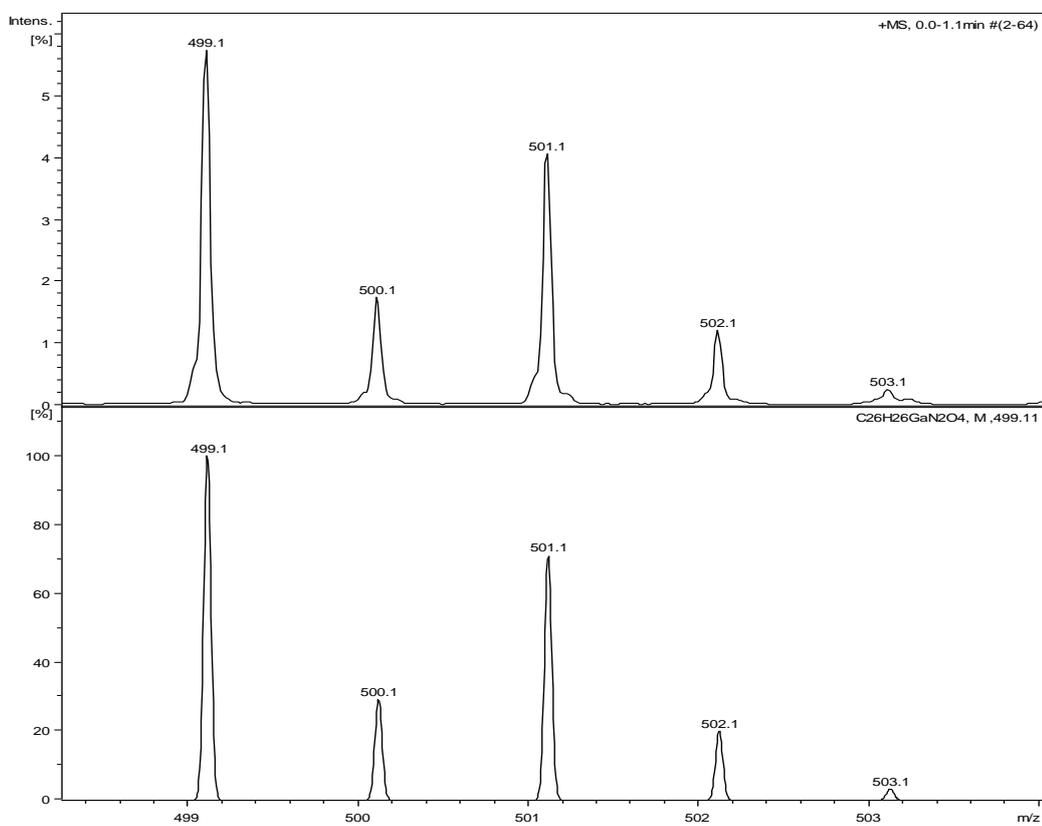
a) $m/z = 309,2$



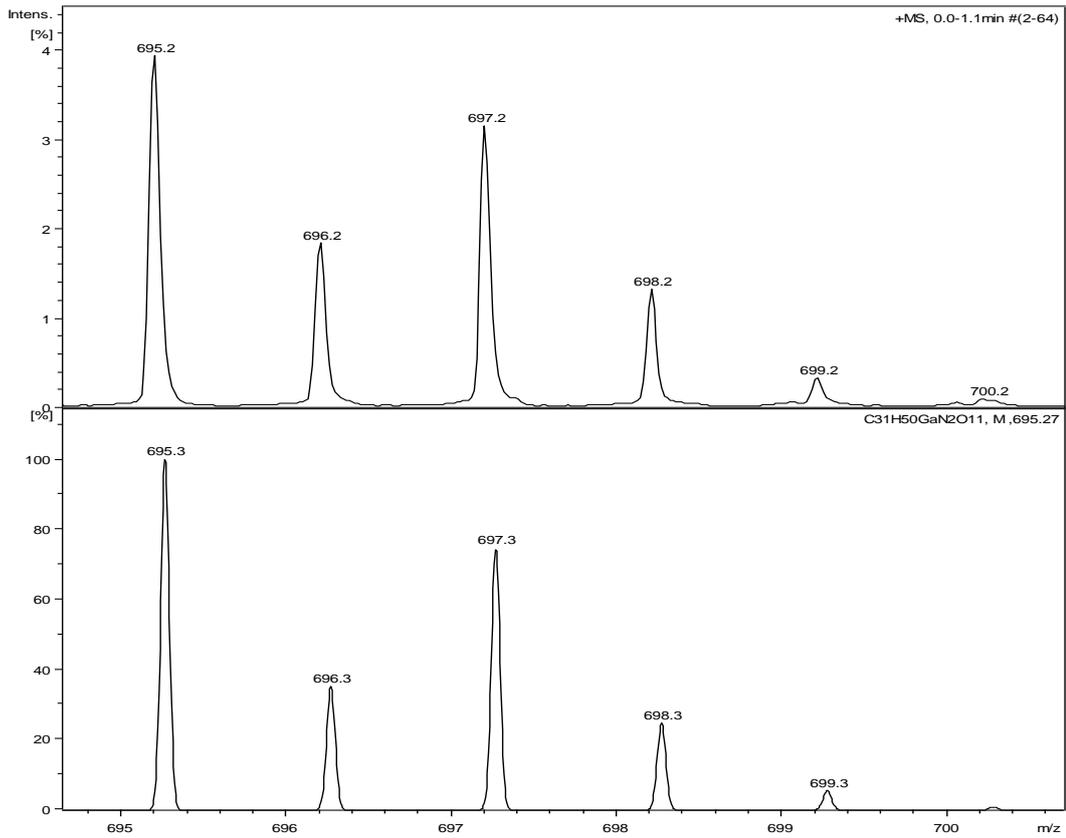
b) $m/z = 365,1$



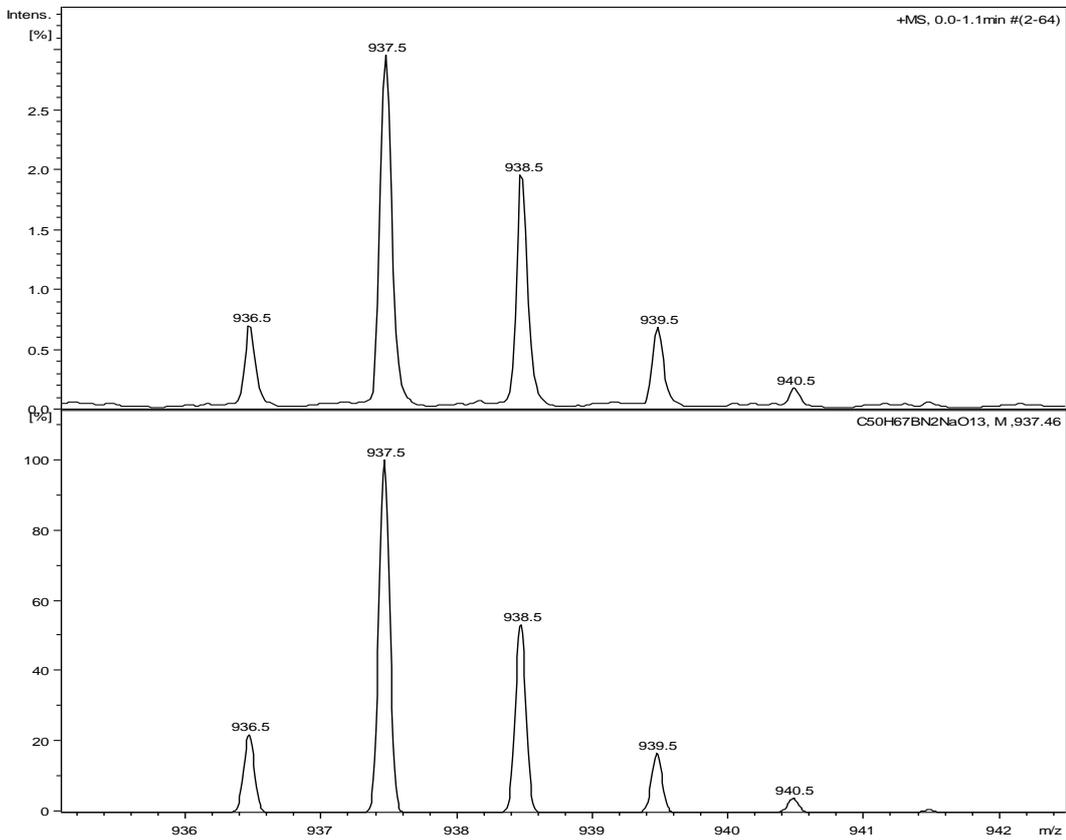
c) $m/z = 387,1$ d) $m/z = 415,2$ 

e) $m/z = 473,2$ f) $m/z = 499,1$ 

g) $m/z=695,2$

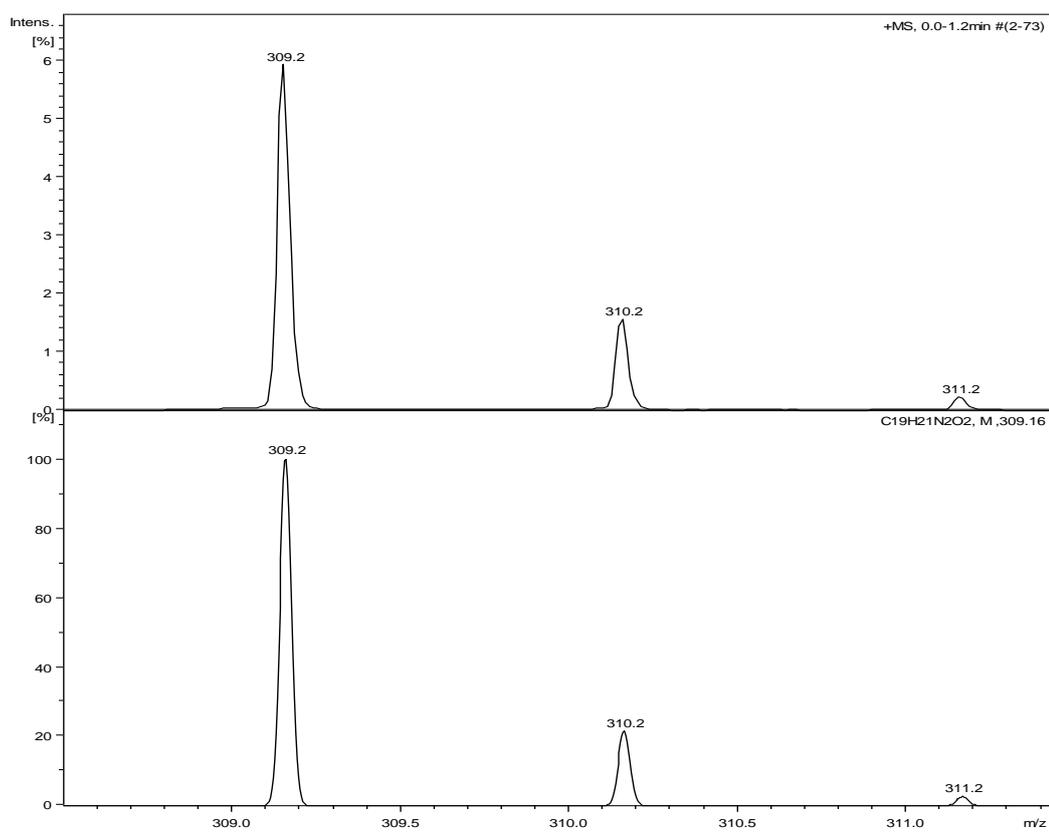


h) $m/z=937,5$

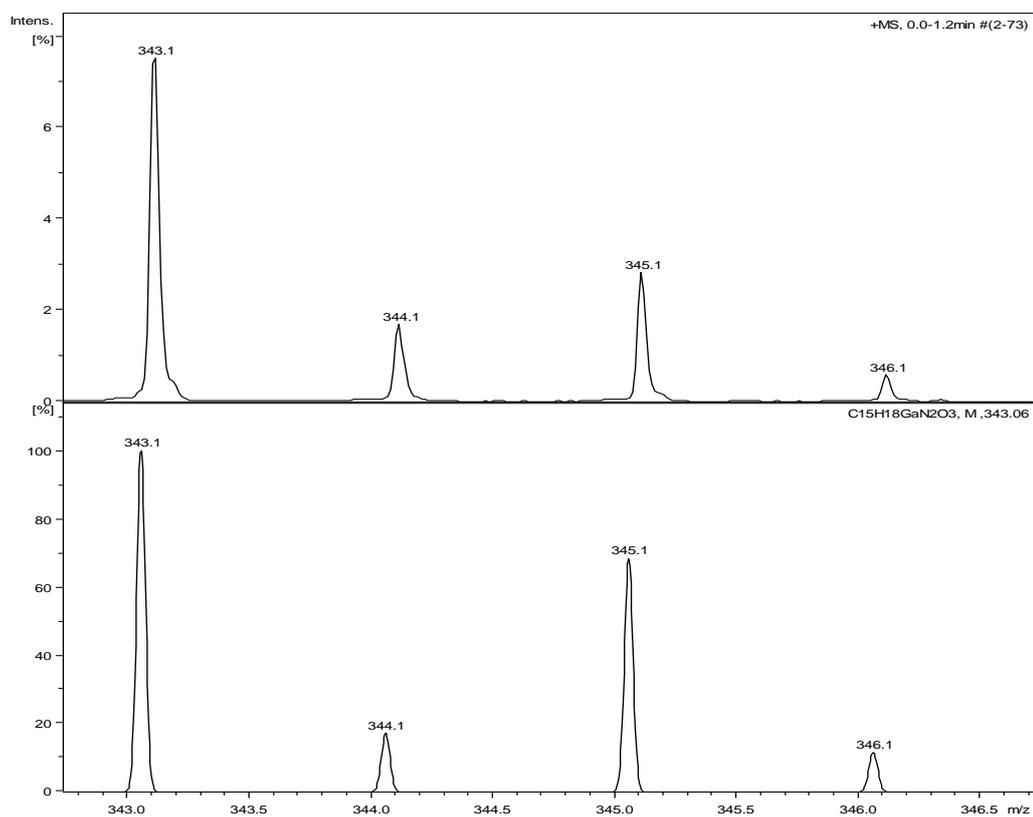


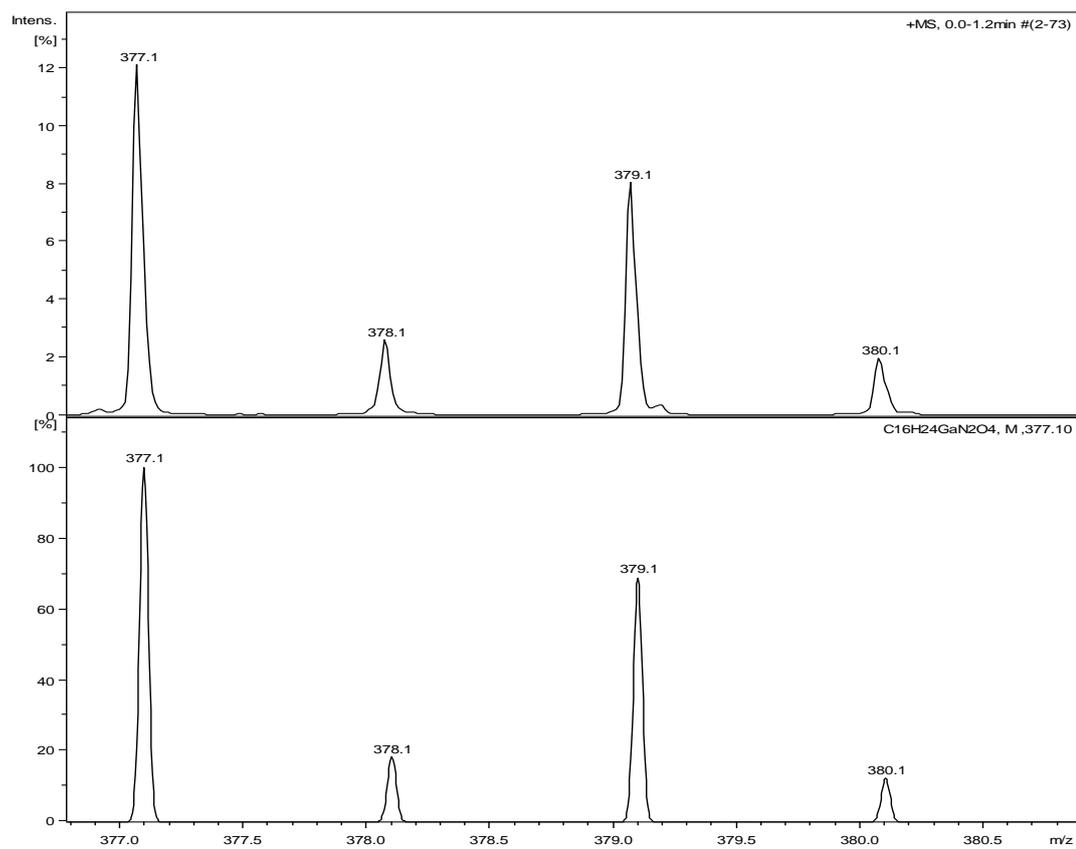
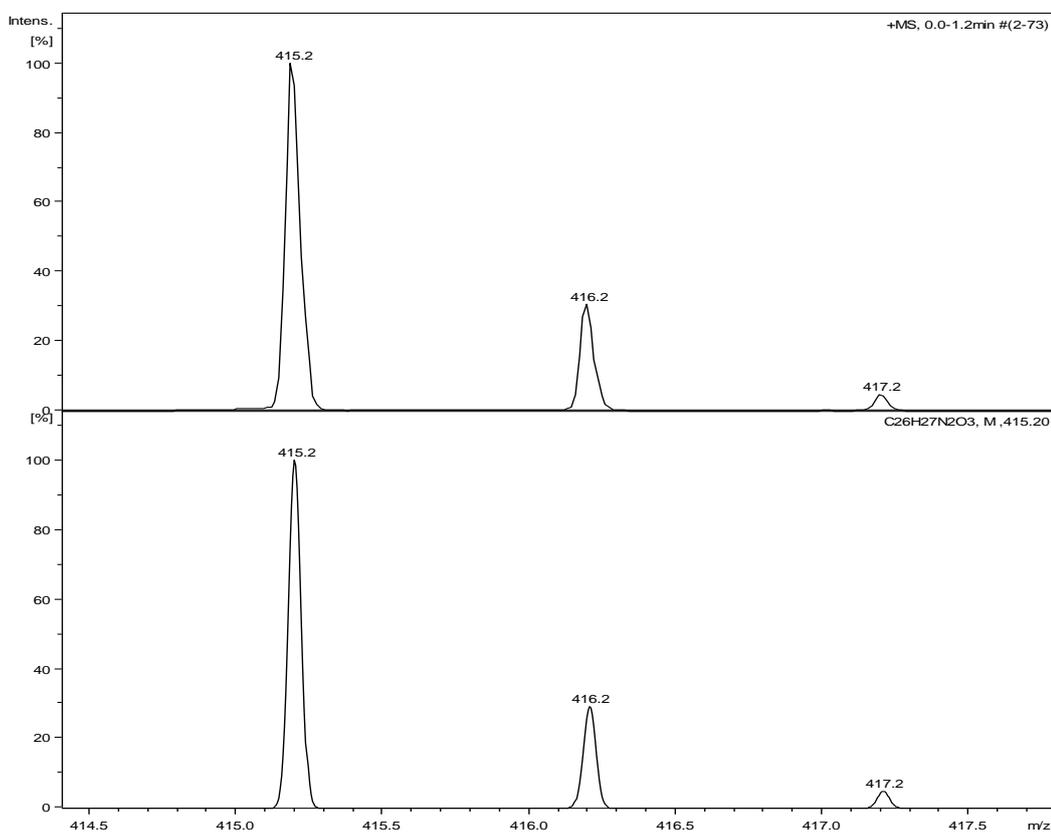
4. Complexo C8

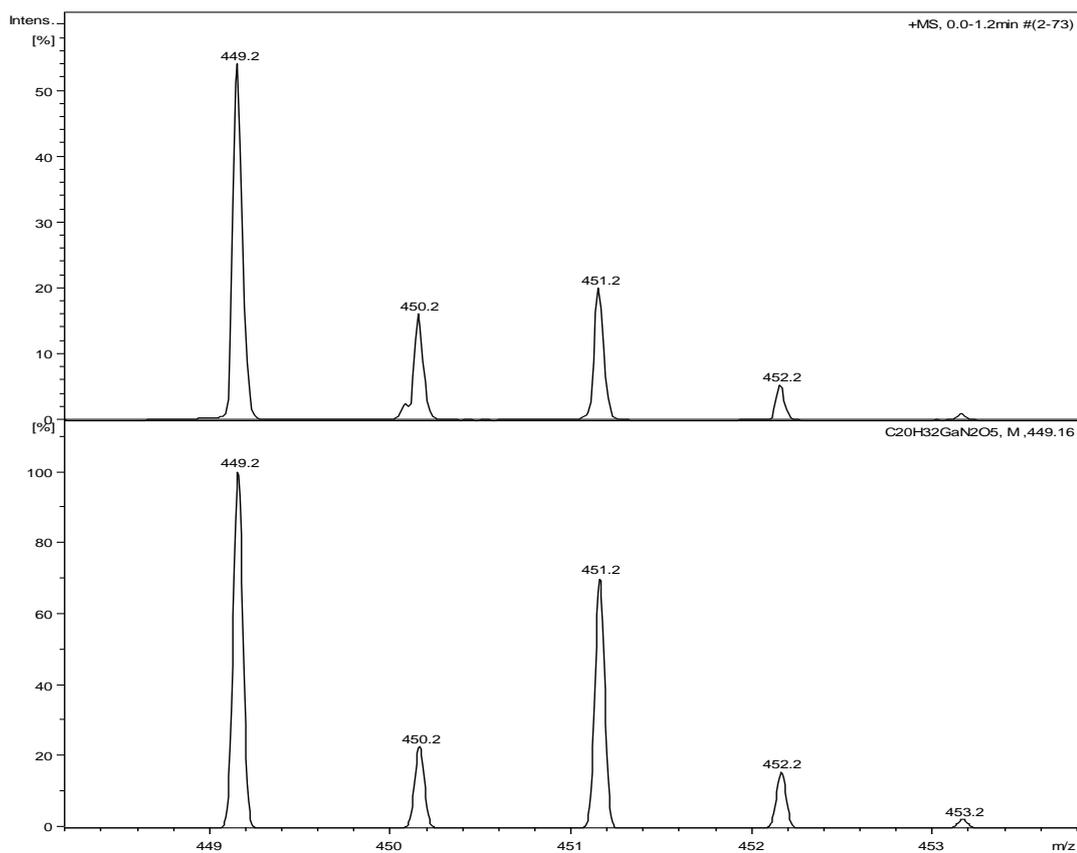
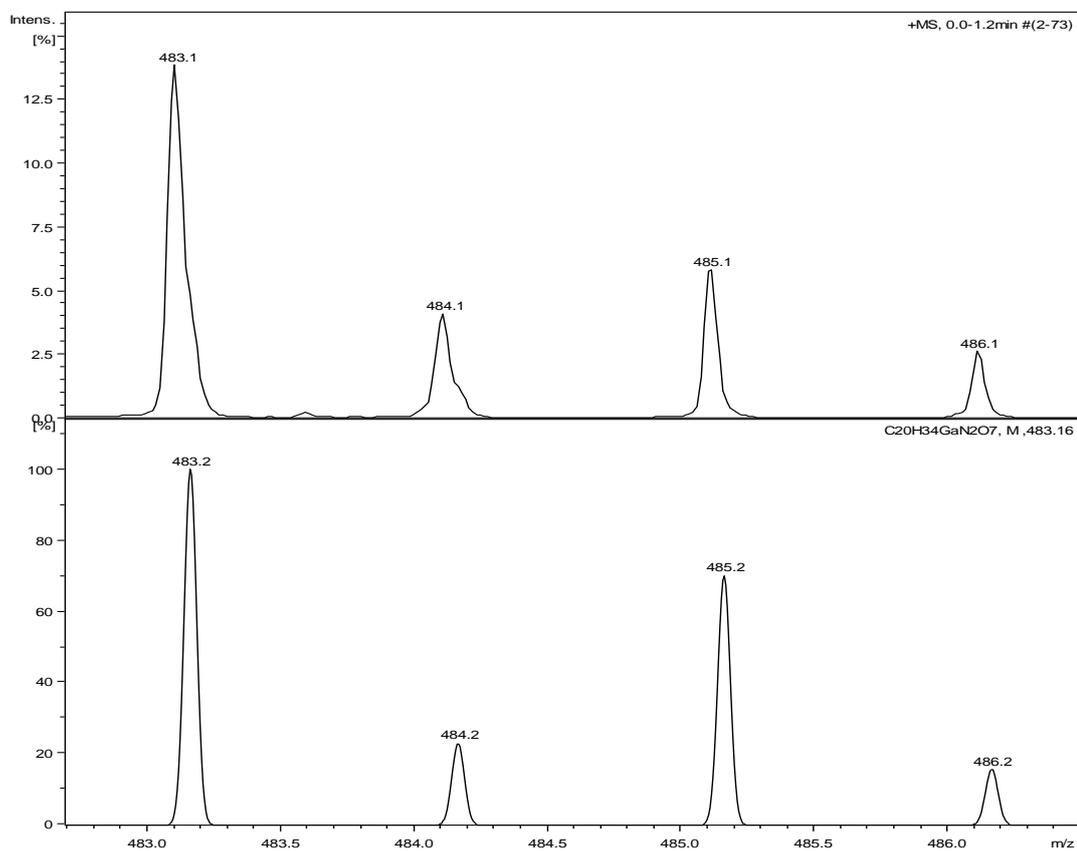
a) $m/z = 309,2$

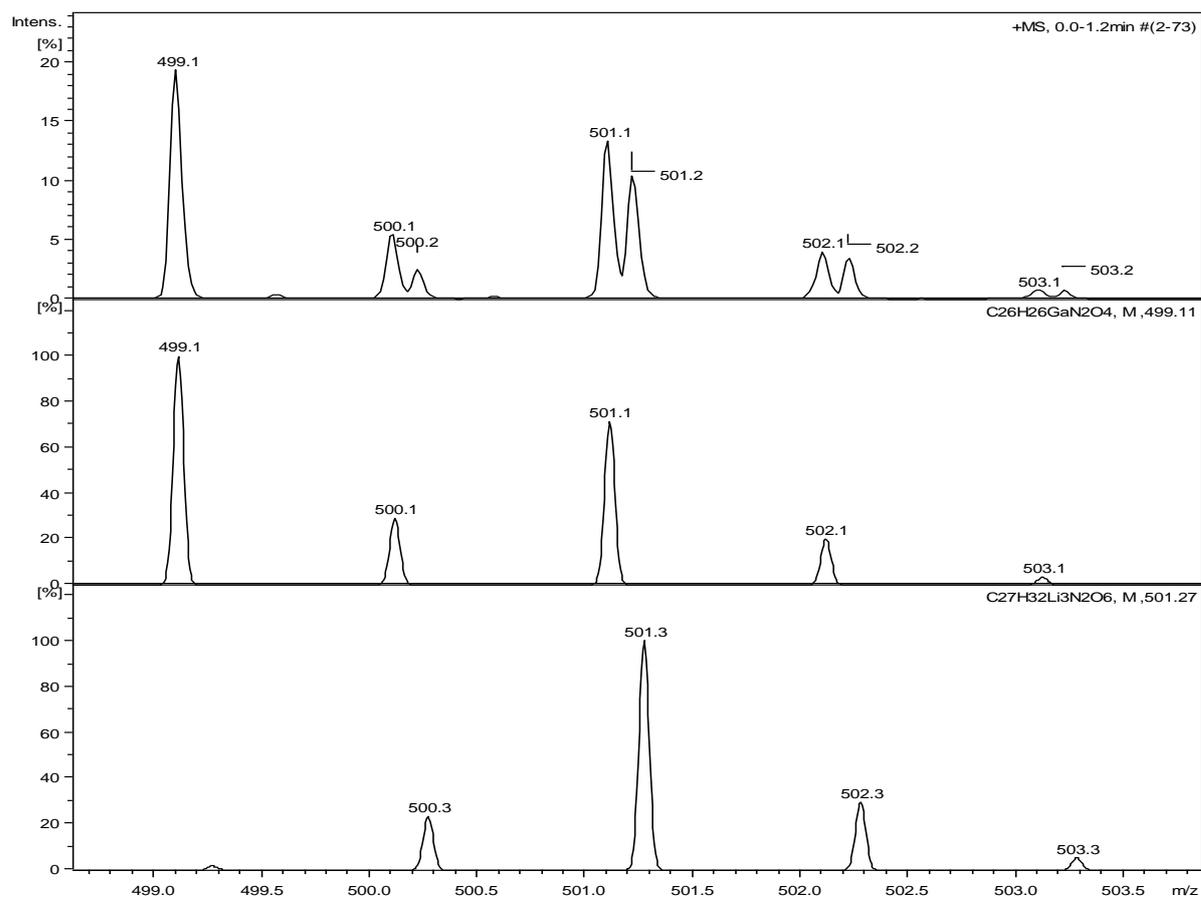


b) $m/z = 343,1$



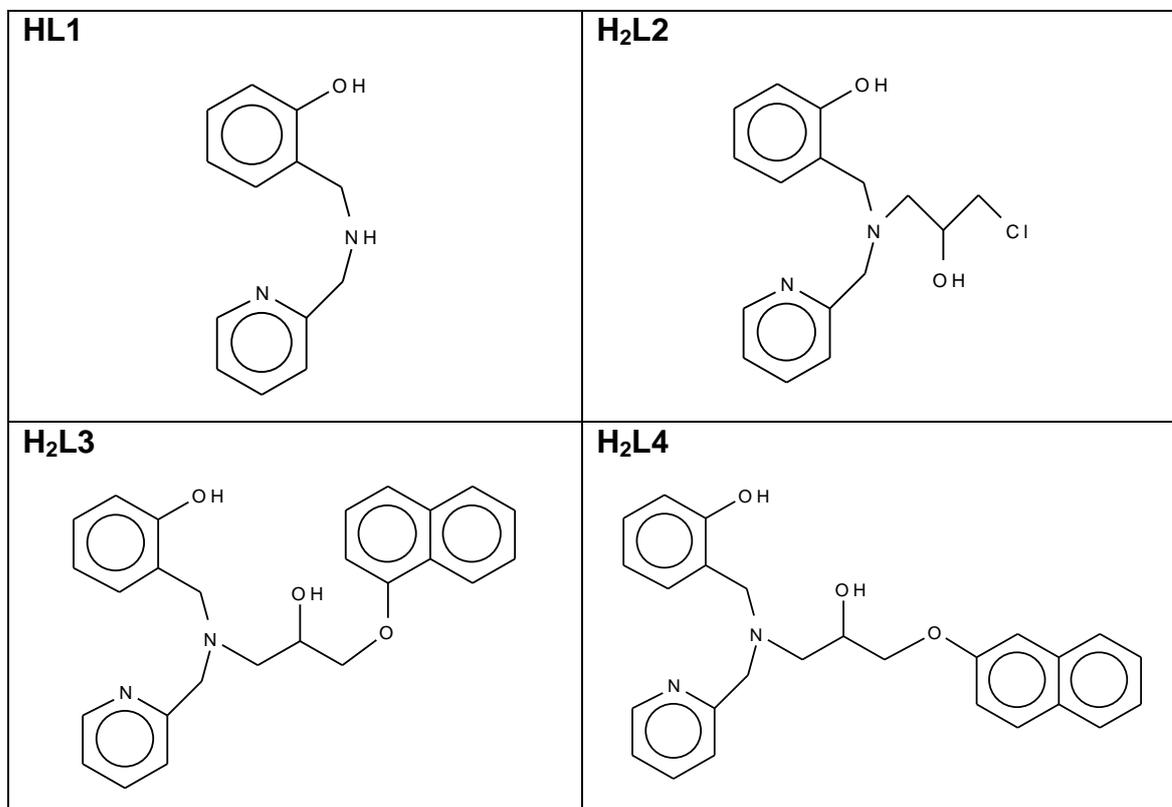
c) $m/z = 377,1$ d) $m/z = 415,2$ 

e) $m/z=449,2$ **f) $m/z=483,1$** 

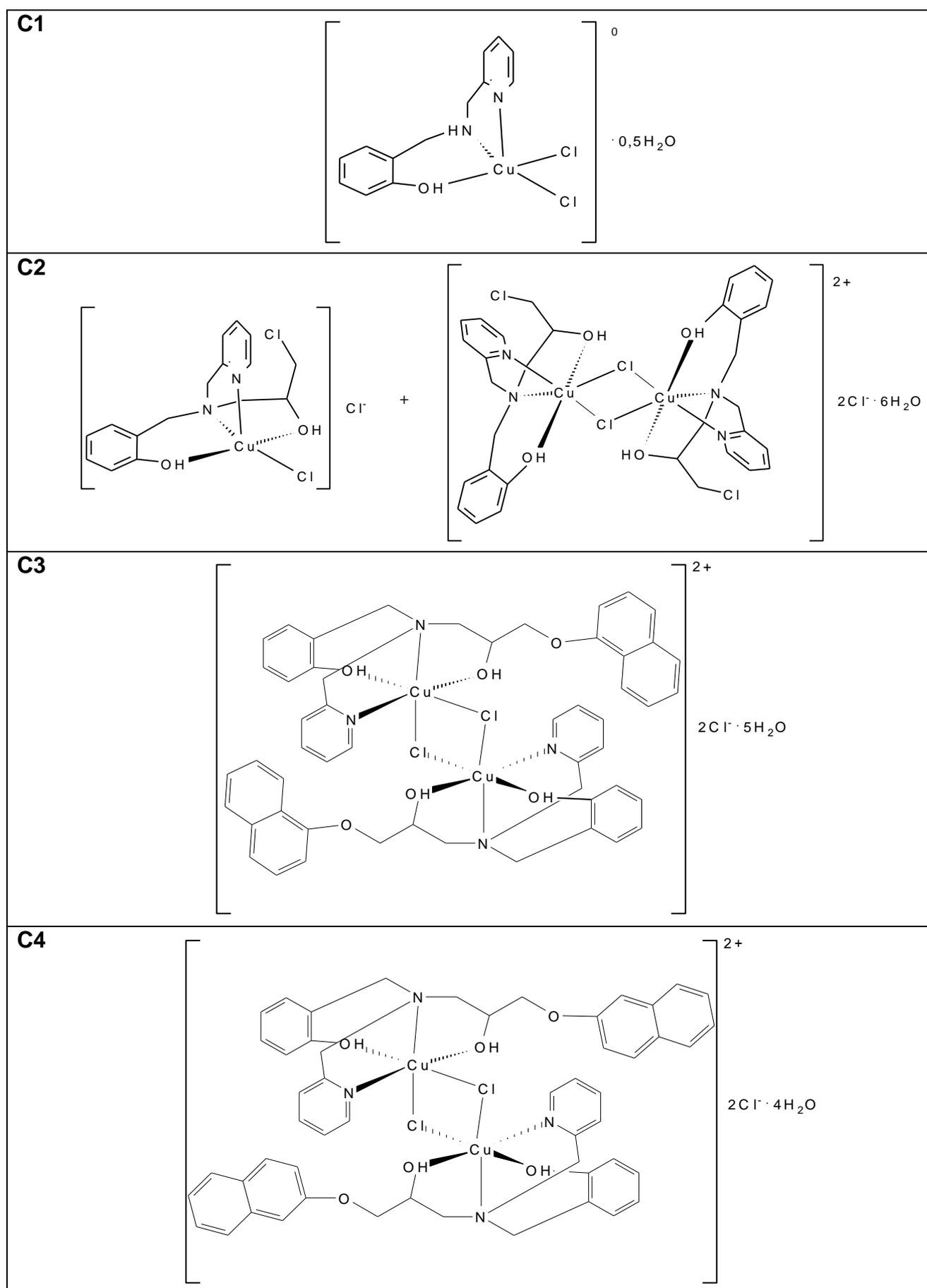
g) $m/z= 499,1$ e $m/z= 501,2$ 

ANEXO 2

Estruturas com compostos orgânicos e inorgânicos

a) Estruturas dos compostos orgânicos (HL1-H₂L4)

b) Estruturas dos complexos de cobre(II) (C1-C4)



c) Estruturas dos complexos de gálio(III) (C5-C8)

