UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

**Nanoencapsulamento de Metalofármacos Antitumorais de
Dirutênio(II,III) contendo Ibuprofeno e Naproxeno. Estudo de
um novo Metalofármaco Misto de μ -Oxo-Rutênio(III)-
Ibuprofeno-4-Aminopiridina**

Samara Rodrigues Alves

Versão Corrigida

SÃO PAULO

Data do Depósito na SPG:

04/11/2019

SAMARA RODRIGUES ALVES

**Nanoencapsulamento de Metalofármacos Antitumorais de
Dirutênio(II,III) contendo Ibuprofeno e Naproxeno. Estudo de
um novo Metalofármaco Misto de μ -Oxo-Rutênio(III)-
Ibuprofeno-4-Aminopiridina**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutora em Ciências (Química).

Orientadora: Profa. Dra. Denise de Oliveira Silva

SÃO PAULO

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

A474n	<p>Alves, Samara Rodrigues</p> <p>Nanoencapsulamento de metalofármacos antitumorais de dirutênio(II,III) contendo ibuprofeno e naproxeno. Estudo de um novo metalofármaco misto de μ-oxo-rutênio(III)-ibuprofeno - 4-aminopiridina / Samara Rodrigues Alves. -- São Paulo, 2019.</p> <p>170p.</p> <p>Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental. Orientador: de Oliveira Silva, Denise</p> <p>1. Química bioinorgânica 2. Compostos metálicos 3. Nanopartículas. I. T. II. de Oliveira Silva, Denise, orientador.</p> <p style="text-align: right;">564.3 CDD</p>
-------	---

- E aí doutora?
 - Papai, eu ainda não sou doutora!
 - Mas me diz, como é que anda o rutênio?
- Ah, eu peguei um passageiro hoje que é médico e eu conversei bastante de você e das suas nanopartículas (...).

Aos meus amados pais, Roberto Alves e Nanci Rodrigues de Q. Alves, nos quais o amor, o otimismo, a coragem, a força e a bravura deles me conduziram até aqui.

AGRADECIMENTOS

“Ninguém faz nada sozinho” e se não fossem pelos inúmeros ensinamentos, ajudas, interpretações ou mesmo motivação de outros, com certeza eu não teria conseguido. À todas as pessoas que passaram na minha vida nesses 5 anos de doutorado, muito obrigada por todo o suporte.

Inicialmente, agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Denise de Oliveira Silva, que nos quase 10 anos da nossa caminhada juntas me ensinou, me motivou, me aconselhou e me defendeu. Ela lutou por mim com braveza e me ensinou com doçura. Com todo o amor e carinho que sempre tive pela Sra., muito obrigada!

À minha família (Roberto, Nanci, Karina, Talita, Marcos e Lorenzo) que muito me amaram, se orgulharam, me suportaram e vibraram com cada conquista que eu tive. Em especial, obrigada aos meus pais, que tanto trabalharam e se esforçaram para que as filhas tivessem tanto. Vocês são a minha maior motivação!

Às minhas tão amadas amigas Thaluya, Daniele, Talita, Cibele, Priscila e Renata que me amaram, me acolheram, me suportaram e me empurraram para que eu continuasse caminhando com um sorriso no rosto e conseguisse seguir em frente, mesmo com tantas pedras no meio do caminho. Vocês deixaram meu coração aquecido em um inverno rigoroso. Ao Vítor por ter embelezado essa tese com lindas imagens, por todo o apoio, incentivo e suporte tão importantes na reta final. Ao Leandro pela empatia e companheirismo diário nesse último ano e por contribuir graficamente com essa tese.

Agradeço as minhas amigas de laboratório e parceiras de vida, Julie, Bárbara e Sandra pelo companheirismo até mesmo nas madrugadas de experimentos, pelos ensinamentos científicos (que foram muitos), pelo incentivo, risos e suporte de todos os momentos. Muito obrigada! Vocês tornaram minha caminhada muito melhor.

Aos meus amigos de laboratório Antônio, Jefferson, Marcus, Luís, Rodrigo, Rute, Iguatinã, Hanif, João, Douglas e Carol que me ensinaram e me suportaram em todos os momentos. Sem o companheirismo de vocês tudo teria sido muito mais difícil.

Também agradeço aos colegas da Universidade de Toronto, em especial, Vichi, Taksim e Abbasi e a Profa. Dra. Xiao Yu Wu que tão gentilmente me acolheram, me

ensinaram, e me deram muito suporte para que eu pudesse crescer. Agradeço também aos colegas do laboratório no ICB, em especial, Lucas, Jana, Laís, Felipe e Matthew e a Profa. Dra. Alison Colquhoun pelo suporte científico, ajuda com experimentos e a gentileza ao qual sempre fui recebida.

Aos diversos técnicos do Instituto e da Central Analítica, em especial, Cida, Armando, Alceu, Alfredo, Ricardo, Michele, Vânia, Giovanna e tantos outros que fizeram muita diferença com a gentileza da ajuda em experimentos por vezes tão difíceis e em momentos complicados. Ao Marcelo pela ajuda com o AFM e Thiago Selva pela ajuda com o experimento de voltametria, muito obrigada!

À FAPESP (Processos 2014/23481-7 e 2015/24252-4) e CAPES pelo suporte financeiro e me ajudar a realizar sonhos.

À Deus, pela graça e misericórdia de todos os dias, que mesmo que elas me bastem, Ele insiste em me amar e me abençoar com tantas alegrias.

“A coragem não é a ausência de medo, mas o triunfo sobre ele. O homem corajoso não é aquele que não sente medo, mas aquele que conquista por cima do medo”.

Nelson Mandela

RESUMO

Alves, S. R. **Nanoencapsulamento de metalofármacos antitumorais de dirutênio(II,III) contendo ibuprofeno e naproxeno. Estudo de um novo metalofármaco misto de μ -oxo-rutênio(III)-ibuprofeno-4-aminopiridina.** 2019 (170p). Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Química – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Metalofármacos de dirutênio (II,III) contendo fármacos anti-inflamatórios não esteroides investigados em nosso grupo de pesquisa apresentam atividade antitumoral. Em especial, o complexo Rulbp, $[\text{Ru}_2(\text{lbp})_4\text{Cl}]$, onde lbp = ânion derivado do Ibuprofeno, exibe atividade promissora *in vitro* e *in vivo* frente ao câncer cerebral do tipo glioblastoma. No presente trabalho, a interação desse complexo com a molécula biologicamente ativa 4-aminopiridina (4AP) foi investigada. Um novo composto de fórmula $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{lbp})_2(4\text{AP})_6]\text{Cl}_2$ contendo um centro dimetálico(III,III) com ponte μ -oxo (Ru-O-Ru) foi sintetizado e caracterizado por análise elementar, espectroscopia de absorção eletrônica, espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR), espectrometria de massas com ionização electrospray (ESI-MS), medidas de susceptibilidade magnética, medidas de condutividade e análise térmica. Estudos de reatividade indicaram troca reversível de ligantes 4AP por moléculas de água em equilíbrio de aquação / complexação. A atividade biológica do novo metalofármaco foi testada *in vitro* em células de glioma humano U87MG apresentando resultados promissores. Nesse trabalho também foram desenvolvidos sistemas lipídicos nanoparticulados nos quais os metalofármacos Rulbp e RuNpx, $[\text{Ru}_2(\text{Npx})_4\text{Cl}]$, onde Npx = ânion derivado do Naproxeno, foram encapsulados. Esses sistemas foram caracterizados por meio de medidas de tamanho e potencial zeta, espectroscopias de absorção eletrônica e FTIR, espectrometria de massas ESI-MS e microscopia eletrônica de transmissão (MET) ou microscopia de força atômica (AFM). Nanopartículas poliméricas lipídicas sólidas (SPLNs) contendo os metalofármacos Rulbp (Rulbp-SPLNs) e RuNpx (RuNpx-SPLNs) de formato aproximadamente esférico e boa estabilidade coloidal apresentaram tamanho ao redor de 120 nm, potencial zeta ~ -20 mV, drug loading ~ 15 %, eficiência de encapsulamento ~ 90 %. Os compostos encapsulados apresentaram atividades antiproliferativas *in vitro* melhores do que os complexos livres ou os fármacos orgânicos encapsulados em linhagens de células de câncer de mama (EMT-6 e MDA-MB-231) e próstata (DU145). Estudos de biodistribuição e bioacumulação *in vivo* e *ex vivo* por meio de microscopia de fluorescência mostraram boa acumulação das SPLNs no tumor. Nanopartículas terpoliméricas lipídicas (TPLNs) contendo os metalofármacos Rulbp (Rulbp-TPLNs) e RuNpx (RuNpx-TPLNs), particularmente desenvolvidas visando tratamento de câncer de cérebro, apresentaram formato aproximadamente esférico, boa estabilidade coloidal, tamanho ao redor de 130 nm, potencial zeta ~ 40 mV, drug loading ~ 12 % e eficiência de encapsulamento ~ 90 %. Os sistemas Rulbp-TPLNs e RuNpx-TPLNs apresentaram atividade anticancerígena superior as dos complexos livres e a do fármaco Ibuprofeno encapsulado *in vitro* nas células de glioma U87MG e T98G. As captações celulares das TPLNs e do Ru foram monitoradas por microscopia de fluorescência e espectrometria de emissão óptica (ICP-OES), respectivamente.

Palavras-chave: rutênio, FAINes, 4-aminopiridina, nanopartículas, câncer.

ABSTRACT

Alves, S. R. **Nanoencapsulation of diruthenium (II, III) antitumor metallodrugs containing ibuprofen and naproxen. Study of a novel μ -oxo-ruthenium(III)-ibuprofen-4-aminopyridine metallodrug.** 2019 (170p). PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Diruthenium(II,III) metallodrugs containing non-steroidal anti-inflammatory drugs investigated in our research group are reported to exhibit antitumor activity. In particular, the complex Rulbp, $[\text{Ru}_2(\text{lbp})_4\text{Cl}]$, where lbp = Ibuprofen anion, exhibits promising activity *in vitro* and *in vivo* against glioblastoma brain cancer. In the present work, the interaction of this compound with the 4-aminopyridine (4AP) biologically active molecule has been investigated. A new complex of formula $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{lbp})_2(4\text{AP})_6]\text{Cl}_2$ bearing a dimetallic (III,III) center with μ -oxo bridge (Ru-O-Ru) has been synthesized and characterized by elemental analysis, electronic absorption spectroscopy, infrared spectroscopy (FTIR), electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), magnetic susceptibility measurements, conductivity measurements and thermal analysis. Reactivity studies indicate reversible ligand replacement of 4AP by water molecules in an aqua / complexation equilibrium. The biological activity of the new complex was investigated *in vitro* in the U87MG human glioma cell line showing promising results. In this work, lipid nanoparticle systems in which the Rulbp and its analogue RuNpx $[\text{Ru}_2(\text{Npx})_4\text{Cl}]$, where Npx = Naproxen anion, have been encapsulated were also developed. These systems were characterized by size and zeta potential measurements, electronic absorption and FTIR spectroscopies, ESI-MS spectrometry and transmission electronic microscopy (TEM) or atomic force microscopy (AFM). Solid lipid polymeric nanoparticles (SPLNs) containing the metallodrugs Rulbp (Rulbp-SPLNs) and RuNpx (RuNpx-SPLNs) are nearly spherical, colloidally stable, with size around 120 nm, zeta potential ~ -20 mV, drug loading ~ 15 % and encapsulation efficiency ~ 90 %. The encapsulated compounds showed higher antiproliferative activity than the corresponding free complexes or the encapsulated organic drugs in breast cancer cells (EMT-6 and MDA-MB-231) and prostate cancer cells (DU145) *in vitro*. Studies on biodistribution and bioaccumulation *in vivo* and *ex vivo* by fluorescence microscopy showed good tumor accumulation of SPLNs. Terpolymer lipid nanoparticles (TPLNs) containing the metallodrugs Rulbp (Rulbp-TPLNs) and RuNpx (RuNpx-TPLNs), specially developed aiming the treatment of glioblastoma, showed nearly spherical shape, good colloidal stability, size around 130 nm, zeta potential ~ 40 mV, drug loading ~ 12 % and encapsulation efficiency ~ 90 %. The Rulbp-TPLNs and the RuNpx-TPLNs exhibited anticancer activity higher than the corresponding free complexes or the encapsulated organic Ibuprofen in the U87MG and the T98G glioma cell lines *in vitro*. The cell uptake of the TPLNs and the Ru were monitored by fluorescence microscopy and optical emission spectrometry (ICP-OES), respectively.

Keywords: ruthenium, NSAIDs, 4-aminopyridine, nanoparticles, cancer.

ABREVIATURAS

α -MEM	α -meio mínimo essencial
μ -oxo	Complexo que contém uma ponte de O entre os metais
4AP	4-aminopiridina
Ac	Acetato
AFM	Microscopia de Força Atômica
Água DI	Água deionizada
ATR	Refletância Total Atenuada – Técnica acoplada a FTIR
BBB	Barreira hemato-encefálica
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Termogravimetria diferencial (1ª derivada da curva TG)
EA	Etil araquidato
EDTA	Ácido tetra-acético etiledodiamino
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização eletrospray
EPR	Efeito de aumento de permeabilidade e retenção de nanopartículas no tumor
FAINEs	Fármacos Anti Inflamatórios Não Esteroides
FBS	Soro fetal bovino
FTIR	Espectroscopia vibracional com transformada de <i>Fourier</i> na região do infravermelho
HIbp	Ibuprofeno
HIIm	Imidazol
HIInd	Indazol
HNpx	Naproxeno
HAc	Ácido Acético
Ibp	Ibuprofenato
ICG	Indocianina verde
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente

IT139	(Na)trans-[RuCl ₄ (HInd) ₂]
I.V.	Injeção IntraVenosa
KP1019	(H ₂ Ind) trans-[RuCl ₄ (HInd) ₂]
KP418	(H ₂ Im) trans-[RuCl ₄ (HIm) ₂]
KPS	Persulfato de potássio
MAA	Ácido metacrílico
M.B.	Magnéton de Bohr
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MTT	Ensaio com brometo de [3-(4, 5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolio]
NAMI-A	(H ₂ Im)trans-[RuCl ₄ (DMSO)(HIm)]
Npx	Naproxenato
NPs	Nanopartículas
PBS	Tampão fosfato-salino
PEG	Polietilenoglicol
PEG-40	Estearato de polietilenoglicol 40
PEG-100	Estearato de polietilenoglicol 100
PS80	Polisorbato 80
PVA	Álcool polivinílico
RMN	Espectroscopia por ressonância magnética nuclear
Rulbp	[Ru ₂ (lbp) ₄ Cl]
RuNpx	[Ru ₂ (Npx) ₄ Cl]
RuNpxPF ₆	[Ru ₂ (Npx) ₄ (H ₂ O) ₂]PF ₆
RuAc	[Ru ₂ (Ac) ₄ Cl]
RuAcPF ₆	[Ru ₂ (Ac) ₄ (H ₂ O) ₂]PF ₆
RuAc(4AP)	[Ru ₂ (Ac) ₄ (4AP) ₂]PF ₆
RuOlbp(4AP)	[Ru ₂ O(lbp) ₂ (4AP) ₆]Cl ₂
SDS	Sulfato de dodecil de sódio
SPLNs	Nanopartículas Poliméricas Lipídicas Sólidas
TG	Termogravimetria
TPLNs	Nanopartículas Terpoliméricas-Lipídicas
UV-Vis	Espectroscopia eletrônica de absorção no ultravioleta-visível

SUMÁRIO

I	- INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	17
I. 1	INTRODUÇÃO	17
1.1.	OS METALOFÁRMACOS NA MEDICINA DO CÂNCER	17
1.2.	LIGANTES ORGÂNICOS VISANDO A ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS COMPLEXOS	20
1.3.	OS COMPOSTOS DE RUTÊNIO DO TIPO GAIOLA.....	24
1.4.	OS COMPOSTOS DE RUTÊNIO DO TIPO μ -OXO.....	31
1.4.	USO DE NANOPARTÍCULAS NO TRATAMENTO DE CÂNCER ...	33
1.5.	EFEITO EPR	34
1.6.	NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS	36
1.7.	NANOPARTÍCULAS COM POLÍMEROS.....	38
1.8.	NANOPARTÍCULAS CONTENDO METALOFÁRMACOS COMO ANTITUMORAIS.....	41
I. 2	OBJETIVOS GERAIS.....	43
2.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
II	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	44
II. 1	MATERIAIS.....	44
II. 2	TÉCNICAS EMPREGADAS.....	46
2.1.	ANÁLISE ELEMENTAR	46
2.2.	ANÁLISE TÉRMICA (TGA/DSC – DETECTOR DE MASSA)	46
2.3.	CONDUTIVIDADE.....	46
2.4.	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	46
2.5.	ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA (UV-vis)	47
2.6.	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO.....	47
2.7.	MEDIDAS DE TAMANHO E POTENCIAL ZETA	47

2.8.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	48
2.9.	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM).....	48
2.10.	SUSCEPTIBILIDADE MAGNÉTICA.....	48
II. 3	SÍNTESES DOS COMPLEXOS PRECURSORES.....	50
3.1.	SÍNTESE DO COMPLEXO $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4\text{Cl}]$	50
3.2.	SÍNTESE DO COMPLEXO $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$	50
3.3.	SÍNTESE DO COMPLEXO $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4\text{Cl}]$	51
3.4.	SÍNTESE DO COMPLEXO $[\text{Ru}_2(\text{Npx})_4\text{Cl}]$	51
II. 4	SÍNTESES DOS COMPLEXOS COM 4-AMINOPIRIDINA.....	52
4.1.	SÍNTESE DO COMPLEXO $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$	52
4.2.	SÍNTESE DO COMPLEXO $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{Ibp})_2(4\text{AP})_6]\text{Cl}_2$	52
II. 5	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (SPLNs).....	53
II. 6	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS TERPOLIMÉRICAS LIPÍDICAS (TPLNs).....	54
6.1.	SÍNTESE DO TERPOLÍMERO (PMAA-PS80-g-St).....	54
6.2.	SÍNTESE DAS TPLNs.....	54
II. 7	OUTROS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	55
7.1.	CÁLCULOS DE CARREGAMENTO DA DROGA: SPLNs.....	55
7.2.	CÁLCULOS DE CARREGAMENTO DA DROGA: TPLNs.....	55
7.3.	EXPERIMENTOS DE CINÉTICA DE TROCA DE LIGANTES: $\text{RuOIbp}(4\text{AP})$	56
II. 8	ENSAIOS BIOLÓGICOS: $\text{RuOIbp}(4\text{AP})$	57
8.1.	CULTURA CELULAR.....	57
8.2.	ESTUDOS DE VIABILIDADE CELULAR.....	58
II. 9	ENSAIOS BIOLÓGICOS: SPLNs.....	58
9.1.	CULTURA CELULAR.....	58
9.2.	ESTUDO DE CAPTAÇÃO CELULAR DAS NANOPARTÍCULAS....	59

9.3.	ESTUDOS DE VIABILIDADE CELULAR	60
9.4.	ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO E ACUMULAÇÃO NO TUMOR <i>IN VIVO</i> E <i>EX VIVO</i>	61
II. 10	ENSAIOS BIOLÓGICOS: TPLNs.....	62
10.1.	CULTURA CELULAR	62
10.2.	ESTUDOS DE CAPTAÇÃO CELULAR DAS NANOPARTÍCULAS	62
10.3.	ENSAIO DE CAPTAÇÃO CELULAR DE Ru	63
10.4.	ESTUDOS DE VIABILIDADE CELULAR	64
II. 11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
III	RESULTADOS: COMPLEXO $[Ru_2(Ac)_4(4AP)_2]PF_6$	65
III. 1	SÍNTESE $[Ru_2(Ac)_4(4AP)_2]PF_6$	66
III. 2	CARACTERIZAÇÃO $[Ru_2(Ac)_4(4AP)_2]PF_6$	67
2.1.	ANÁLISE ELEMENTAR (CHN)	67
2.2.	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO (ATR)	68
2.3.	ESPECTROMETRIA DE MASSAS (ESI-MS)	69
2.4.	ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA UV-vis (solução).....	71
2.5.	ANÁLISE TÉRMICA (TG/DTG/DSC).....	74
III. 3	CONCLUSÃO	76
IV	RESULTADOS: COMPLEXO $[Ru_2O(lbp)_2(4AP)_6]Cl_2$	77
IV. 1	SÍNTESE $[Ru_2O(lbp)_2(4AP)_6]Cl_2$	78
IV. 2	CARACTERIZAÇÃO $[Ru_2O(lbp)_2(4AP)_6]Cl_2$	81
2.1.	ANÁLISE ELEMENTAR (CHN, Cl, P e Ru).....	81
2.2.	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO.....	83
2.3.	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	84
2.4.	ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA UV-vis (solução).....	87
2.5.	ESTUDOS DE CONDUTIVIDADE	89

2.6.	ANÁLISE TÉRMICA TGA/DTG	90
2.7.	SUSCEPTIBILIDADE MAGNÉTICA	91
2.8.	EXPERIMENTOS DE CINÉTICA DE TROCA DE LIGANTES	92
2.9.	ENSAIOS BIOLÓGICOS – VIABILIDADE CELULAR	100
IV. 3	CONCLUSÃO	102
V	RESULTADOS – NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (SPLNs)	103
V. 1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO	104
1.1.	PRIMEIRAS TENTATIVAS DE SÍNTESE	104
1.2.	SÍNTESE, TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA	106
1.3.	DRUG LOADING	109
1.4.	ESPECTROSCOPIA UV-Vis	109
1.5.	ESPECTROSCOPIA FTIR-ATR	110
1.6.	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	112
V. 2	TESTES <i>IN VITRO</i>	113
2.1.	CAPTAÇÃO CELULAR <i>IN VITRO</i>	113
2.2.	VIABILIDADE CELULAR	116
V. 3	BIODISTRIBUIÇÃO E BIOACUMULAÇÃO DAS SPLNs <i>IN VIVO</i> E <i>EX VIVO</i> .	120
V. 4	CONCLUSÃO	123
VI	RESULTADOS – NANOPARTÍCULAS TERPOLIMERICAS LIPÍDICAS (TPLNs)	124
VI. 1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO	125
1.1.	PRIMEIRAS TENTATIVAS DE SÍNTESE	125
1.2.	SÍNTESE, TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA	126
1.3.	DRUG LOADING	128
1.4.	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)	129
1.5.	ESPECTROSCOPIA UV-Vis	130

1.6.	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO FTIR-ATR	131
1.7.	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	133
VI. 2	TESTES <i>IN VITRO</i>	135
2.1.	CAPTAÇÃO CELULAR DAS TPLNs <i>IN VITRO</i>	135
2.2.	CAPTAÇÃO CELULAR DE RUTÊNIO <i>IN VITRO</i>	137
2.3.	VIABILIDADE CELULAR.....	138
VI. 3	CONCLUSÃO	143
VII	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	145
VIII	APÊNDICE	147
VIII. 1	DRUG LOADING SPLNs.....	147
VIII. 2	CAPTAÇÃO CELULAR SPLNs	151
VIII. 3	DRUG LOADING TPLNs.....	154
IX	BIBLIOGRAFIA.....	155
X	SÚMULA CURRICULAR	167

INTRODUÇÃO E OBJETIVO

I. 1 INTRODUÇÃO

1.1. OS METALOFÁRMACOS NA MEDICINA DO CÂNCER

Apenas 5% das drogas desenvolvidas para câncer que entram em fase clínica 1 são aprovadas (1) e deve-se a uma droga inorgânica como a cisplatina, por exemplo, o aumento na taxa de 10 anos de sobrevivência dos pacientes com câncer testicular para 95 % (2). Hoje, ela é usada para tratamento de diversos tipos de câncer, como, cervical, bexiga, cabeça, pescoço, além do testicular (2).

O uso de metais na medicina é antigo. Sabe-se que os assírios, egípcios e chineses utilizavam compostos baseados em metais, como o sulfeto de mercúrio, no tratamento de doenças desde a antiguidade. Um dos estudos mais antigos de metais na medicina do câncer data de 1931 com a análise de vários sais de metais de transição (Cu, Pb, Cr, Mn, Fe, Ni, Co, Ru, Rh, e Os) no crescimento de tumor sólido de Ehrlich em ratos brancos (3). Nesse experimento de dose única, propriedades significativas de inibição tumoral foram observadas para compostos de Pb, $K_2Mn(SO_4)_2$ e $Cs_2[Ru^{IV}Cl_6]$. Nesse experimento, foi concluído também que a atividade antitumoral não era apenas devido a presença do metal, mas que os ligantes e o arranjo espacial tinham um papel fundamental na atividade (2). Mais tarde, em 1965, ocorreria o marco mais importante da química inorgânica na medicina do câncer. Rosenberg demonstrou que diversos compostos de Pt(IV) foram ativos no crescimento de *E. coli* (4) com interferência na divisão celular através da interação com o DNA. Em 1969, foram então publicados resultados *in vivo* de inibição de sarcoma e leucemia por compostos de platina como cis-[Pt^{IV}(NH₃)₂Cl₄], cis-[Pt^{II}(NH₃)₂Cl₂] (cisplatina), [Pt^{IV}Cl₄(en)] e [Pt^{II}Cl₂(en)], onde en = 1,2-etilenodiamina (5) e em 1978 a cisplatina foi aprovada para ensaios clínicos sendo já conhecido que o DNA era seu alvo celular (2,6,7).

Embora a cisplatina já seja consagrada como uma droga antitumoral, os seus efeitos colaterais são bem conhecidos e severos, enfrentando também problemas de resistência (2,7). Por isso, o desenvolvimento de drogas antitumorais baseadas em

metais foi ampliado para incluir outros metais além da platina e um grande número de complexos de rutênio começaram a ser estudados. Nesse contexto, as pesquisas com os complexos de rutênio perseguiram o objetivo de que eles pudessem mimetizar os complexos de platina, mas com a possibilidade de haver menores efeitos colaterais. Além disso, pelo fato do rutênio estar no mesmo grupo do Fe na Tabela Periódica, acreditava-se que a semelhança entre eles faria com que os complexos de rutênio se comportassem de maneira semelhante aos de ferro, principalmente no transporte pelo sangue realizado pelas proteínas transferrina e albumina (8). Acreditava-se também em uma baixa toxicidade associada ao rutênio e a hipótese de que seus potenciais de redução fossem acessíveis em meio biológico e, com isso, os complexos poderiam ser ativados por redução. Assim, o mecanismo de ação dos complexos de rutênio passaria por uma via de redução da droga administrada no estado de oxidação (III) para (II) no ambiente tumoral, que tende a ser redutor. Esses conceitos, entretanto, têm sido bastante discutidos e precisam ser avaliados para cada caso (9).

No entanto, já se sabe que os complexos de rutênio atuam por outros mecanismos, não tendo apenas o DNA como um alvo celular (2). Hoje o (Na)trans-[RuCl₄(HInd)₂], sendo HInd = indazol, IT-139 (antigo NKP-1339) é o único complexo de rutênio em fase clínica, tendo completado a fase I com dados promissores (10).

Na década de 70, complexos de rutênio similares a cisplatina, como o [Ru^{III}(NH₃)₅Cl]Cl₂ e outros contendo bases nitrogenadas, foram amplamente estudados e originaram a hipótese de mecanismo de ativação por redução (11,12,13). Essa hipótese está baseada no fato de que complexos de Ru(III) são mais inertes do que complexos de Ru(II) e, por isso, a redução do Ru(III) diminuiria a propriedade do metal de ser um aceptor- π , levando a labilização de um ligante π -doador, como os cloretos, facilitando a hidrólise e, assim, a ativação. Além disso, sabe-se que o ambiente tumoral é redutor por causa da hipóxia (menor disponibilidade de O₂ em comparação a tecidos saudáveis, devido ao fato de o tumor ter uma grande massa com pobre vascularização), o que levaria a alguma seletividade de ação desses complexos no ambiente tumoral. Para corroborar a ideia, descobriu-se mais tarde que a redução dos complexos pode ser catalisada por enzimas disponíveis no ambiente tumoral, como a glutatona (14). Dentre os complexos de rutênio estudados nos últimos anos há dois que se destacaram nas pesquisas, o atual IT-1339 e o NAMI-A.

Os estudos que levaram ao IT-139, começaram com um complexo de imidazol, o KP418, $(H_2Im) \text{ trans-}[RuCl_4(HIm)_2]$, sendo HIm = imidazol, (15) que demonstrou sucesso na inibição de câncer de coloretal em mais de 90 %, sendo a cisplatina inativa para esse tipo de câncer. No entanto, efeitos colaterais acompanhados de uma taxa de 10 % de mortalidade dos animais culminaram com a evolução dos estudos para um complexo com o indazol, o KP1019, $(H_2Ind) \text{ trans-}[RuCl_4(HInd)_2]$ que demonstrou uma melhor tolerabilidade (16). Esse complexo mostrou alta afinidade por proteínas do sangue como a albumina e a transferrina, sendo também descoberto a indução de apoptose pela via mitocondrial em câncer de coloretal (17,18). Problemas de solubilidade que culminavam com uma limitação de dose nos estudos clínicos, levaram a uma troca do contra-íon indazolio pelo sódio dando origem ao composto NKP-1339, ou atualmente chamado de IT-139, sendo esse 30 vezes mais solúvel do que o anterior (19). Mais recentemente, descobriu-se que o IT-139 está envolvido na diminuição da indução de uma chaperona, a GRP78, envolvida na progressão de metástases no microambiente tumoral no pulmão. Dessa forma, o IT-139 é promissor também para tratamento de progressão de metástases (20).

O NAMI-A foi o primeiro complexo de rutênio a entrar em fase clínica e os estudos da fase I foram finalizados em 2004 (21). Os estudos que levaram ao NAMI-A, $(H_2Im) \text{ trans-}[RuCl_4(DMSO)(HIm)]$ se iniciaram com o $[Ru^{II}Cl_2(DMSO)_4]$, um complexo que mostrou um grande efeito na diminuição de metástases de pulmão, embora tenha uma efetividade baixa em tumores primários. A instabilidade desse complexo em solução aquosa, no entanto, levou a evolução dos estudos para a substituição de alguns dos ligantes DMSO por cloreto e imidazol, formando o $(Na) \text{ trans-}[RuCl_4(DMSO)(HIm)]$, NAMI (22). Esse último possui maior estabilidade, boa solubilidade e é efetivo na inibição da formação e na progressão de metástases já existentes. As pesquisas, então, avançaram com a busca de uma maior estabilidade do composto em ar até a incorporação do indazolio, NAMI-A (23). Na atualidade, o NAMI-A encontra-se fora dos estudos clínicos porque ele não se mostrou tão eficaz em um tratamento combinado para o tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas (2,24).

1.2. LIGANTES ORGÂNICOS VISANDO A ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS COMPLEXOS

1.2.1. OS FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS

Medicamentos da classe dos fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (FAINEs) são conhecidos principalmente pelos seus mecanismos de inibição da síntese das prostaglandinas e inibição das enzimas ciclooxigenases (COX), importantes nos processos de dor e inflamação. Esses compostos podem ter diversas sub categorias, entre elas, a dos derivados do ácido propiônico (Profens). Todos eles consistem de um ácido carboxílico ligado a um anel aromático podendo ou não possuir um grupo polar ligado a um grupo lipofílico adicional. A relação estrutura-atividade dessas moléculas está nas seguintes características: o grupo COOH é essencial para a inibição da COX e através desse grupo ocorre a ligação com proteínas do plasma; os diferentes FAINEs tem lipofilicidades diferentes relacionados ao caráter lipofílico do grupo ligado ao anel aromático e substituintes; o substituinte $-\text{CH}_3$ dos derivados do ácido propiônico aumenta a atividade de inibição de COX e reduz a toxicidade dos profens. A estrutura geral dos FAINEs e dos derivados do ácido propiônico podem ser observadas na Figura 1 (25).

Figura 1: Estrutura geral dos FAINEs e dos derivados do ácido propiônico.

A estrutura geral de alguns FAINEs importantes, podem ser vistas na Figura 2 e nela pode-se perceber que o ibuprofeno, o naproxeno e o cetoprofeno possuem a estrutura geral dos derivados do ácido propiônico.

Figura 2: Estruturas de alguns FAINES: Ibuprofeno (Hibp), naproxeno (Hnpx), cetoprofeno (Hceto) e aspirina (Hasp).

Os FAINES exibem atividades farmacológicas anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas contra diversas condições fisiológicas ou patológicas. O ibuprofeno, juntamente com o ácido acetilsalicílico e o paracetamol, faz parte da lista de fármacos essenciais da Organização Mundial de Saúde. É muito utilizado para combater dor, inflamação, febre, e é aplicado em múltiplas situações como dismenorréia (dores menstruais), traumatismos com entorses, luxações, fraturas, dores de dentes e dores associadas a processos inflamatórios (26).

Como já mencionado, sabe-se que os FAINES atuam inibindo a atividade catalítica das duas formas da ciclooxygenase (COX), enzima limitante da velocidade na etapa de conversão do ácido araquidônico a prostaglandinas e tromboxanos. A ação anti-inflamatória dos FAINES é associada à inibição da COX-2 (induzida em processos inflamatórios) enquanto que alguns de seus efeitos adversos são atribuídos à inibição da COX-1 (expressa constitutivamente) (27) (28). Como demonstrado na Figura 3, a semelhança estrutural entre os FAINES e o ácido araquidônico, faz com que os fármacos se liguem a enzima COX impedindo que o ácido araquidônico se ligue a ela para ser convertido em prostaglandinas e tromboxanos.

Figura 3: Forma de ação da inibição da conversão do ácido araquidônico feita pela COX com a administração de FAINES (25).

Mais recentemente os anti-inflamatórios têm sido associados a câncer, uma vez que no microambiente tumoral há muitos componentes associados a inflamação que sustentam o tumor (29). Além disso, tem-se revelado que o uso prolongado dos FAINES pode reduzir o risco de tumores gástricos, câncer de cólon e de outros órgãos gastrointestinais, bem como cânceres de próstata, pulmões e pele (30). O uso prolongado de aspirina, por exemplo, reduz significativamente o risco de câncer gástrico e de cólon (31). A aspirina e outros FAINES como ibuprofeno, indometacina e sulindaco foram capazes de reduzir tumores gástricos induzidos em ratos (32). O efeito anticancerígeno dos FAINES, no entanto, só é alcançado com o seu uso contínuo, pois estudos mostram que o tumor volta a crescer se o fármaco tiver sua administração interrompida. O uso contínuo do ibuprofeno, por exemplo, é quimiopreventivo para câncer de cérebro (33). Dessa forma, os FAINES têm se mostrados relevantes nas atividades antitumorais, pois eles são capazes de inibir a proliferação de células e induzir apoptose em muitos tipos de câncer (34).

Os seus efeitos anticancerígenos podem estar relacionados a inibição da COX-2 que é expressa em diversos tipos de câncer e que tem sido associada à formação de tumores (35). Outros mecanismos de ação independentes de COX também podem estar associados aos FAINES e a indução de apoptose (31) (34). Através da transformação do ácido araquidônico na prostaglandina PGH_2 dá-se origem a várias outras prostaglandinas e tromboxano que mediam a inflamação e estão envolvidas em

processos de apoptoses, proliferação, angiogênese, invasão e metástase. Embora os FAINes apresentem atividades promissoras para tratamento de câncer, as altas doses necessárias são fatores limitantes para seu uso e os efeitos colaterais decorrentes do uso prolongado são motivos de preocupação. Um dos principais efeitos são as gastropatias induzidas por FAINes, além da erosão da mucosa estomacal que incluem esofagite, hemorragia digestiva e reativação de doença inflamatória intestinal (26). Esse efeito indesejável ocorre porque os FAINes atuam na inibição das prostaglandinas, que além de estarem associadas ao processo inflamatório, no estômago, são indutoras da síntese e secreção do muco protetor que impede a ação do ácido clorídrico e das enzimas proteolíticas sobre a parede estomacal (27). Estudos tem mostrado que a coordenação de FAINes a centros metálicos pode promover o aumento da atividade biológica e diminuir efeitos colaterais, em relação aos das drogas orgânicas não coordenadas. Como exemplo, um complexo de Cu(II) e indometacina está em uso clínico veterinário para tratar inflamação em cachorros e cavalos (36).

1.2.2. A 4-AMINOPIRIDINA

A 4-aminopiridina (4AP) (Figura 4) é uma molécula que pode ser associada aos complexos e potencializar seus usos como antitumorais. A 4AP já é utilizada medicinalmente no tratamento de doenças neurodegenerativas devido a sua capacidade de inibir os canais de K^+ . Contudo, estudos tem demonstrado que a inibição dos canais de K^+ também tem um importante papel na inibição de células tumorais, como também na indução de apoptose. A 4AP, por exemplo, já se mostrou ativa contra câncer de cérebro dos tipos glioma e astrocitoma, câncer de próstata, cólon e leucemia (37) (38) (39).

Figura 4: Estrutura da 4-aminopiridina

Estudos da literatura indicam que as aminopiridinas são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica inibindo o crescimento de células de câncer cerebral. Em especial, a 4-aminopiridina mostrou-se capaz de impedir a proliferação de células de glioma e induzi-las a sofrer apoptose (39). O seu comportamento tem sido associado aos canais de K^+ , que possuem papel permissivo na proliferação celular, no controle do volume da célula e, portanto, na concentração dos solutos intracelulares como o Na^+ (crítico na síntese do DNA) (40). Outros estudos indicaram que a 4AP pode alterar a expressão de miRNA em gliomas que possuem papel importante na proliferação celular e apoptose (41) e, por isso, estudos de inibição dos canais de K^+ podem ser promissores no tratamento de tumores.

1.3. OS COMPOSTOS DE RUTÊNIO DO TIPO GAIOLA

Os tetracarboxilatos dirutênio(II,III) consistem de dois átomos de rutênio em ligação metal-metal mantidos por quatro carboxilatos em ponte numa geometria em “gaiola” (Figura 5) (42). Além dos ligantes equatoriais, o complexo possui também dois sítios de coordenação axiais que podem ser ocupados por ligantes (normalmente uma base de Lewis), moléculas de solventes, ou podendo inclusive promover a polimerização das cadeias do complexo gerando cadeias poliméricas estendidas no estado sólido.

Figura 5: Estrutura em gaiola dos complexos do tipo $[Ru_2(O_2CR)_4]^+$.

Esses complexos com ligações metálicas múltiplas foram muito estudados por Stephenson, Wilkinson (43) e Cotton (44). A síntese dos tetracarboxilatos de dirutênio de valência mista (II,III) ou $[\text{Ru}_2]^{5+}$ foi primeiro realizada em 1966 (43) onde foi obtido o composto $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4]\text{Cl}$, sendo R= Me, Et, ou Pr^n , por meio de refluxo de $\text{RuCl}_3 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ numa mistura apropriada do ácido carboxílico / anidrido. Uma vez que os complexos com cloreto tenham sido sintetizados, os carboxilatos ligados em ponte podem ser trocados por refluxo em uma mistura de água / etanol com o ácido carboxílico desejado. Geralmente o $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4\text{Cl}]$ é utilizado como complexo de partida para a troca de ligantes equatoriais. A equação geral para esse processo é a seguinte:

O primeiro a resolver a configuração eletrônica dos tetracarboxilatos de Ru_2^{5+} foi Norman *et al.* (45) no final da década de 70 e seus estudos o levaram a propor a configuração eletrônica de orbitais dos complexos de Ru_2^{5+} como sendo $\sigma^2 \pi^4 \delta^2 \pi^{*2} \delta^{*1}$. Os complexos desse tipo possuem 3 elétrons desemparelhados devido a uma degenerescência próxima dos dois orbitais mais altos ocupados (o π^* e o δ^*), resultando uma configuração $\sigma^2 \pi^4 \delta^2 (\pi^* \delta^*)^3$. A configuração dessa forma é diferente da esperada onde o orbital δ^* possuiria menos energia do que o orbital π^* , como observado na Figura 6 que mostra um diagrama simplificado genérico mostrando o recobrimento dos orbitais d na formação de ligações múltiplas entre metais, em que o nível do orbital δ^* está abaixo do orbital π^* . Segundo Norman, a ordem $\delta^* < \pi^*$ só é esperada se a ligação metal-metal for pura e a única determinante na ordem dos orbitais. No caso desses complexos, entretanto, há 3 fatores que produzem a inversão de orbitais, sendo: 1) deslocamento para menor energia dos orbitais 4d relativamente aos níveis do ligante; 2) influência dos ligantes carboxilatos; 3) influência dos ligantes axiais. O ponto mais importante, porém, é que o orbital δ^* consegue interagir significativamente com os orbitais dos ligantes, o que o faz ter uma energia maior do que a do orbital π^* . A consequência de se ter uma degenerescência próxima dos orbitais parcialmente preenchidos π^* e δ^* é um ganho na estabilidade desses complexos de valência mista $\text{Ru}(\text{II,III})$, o que não é alcançado, por exemplo, para complexos de $\text{Ru}_2(\text{II,II})$ (42) e por esse motivo, é mais comum encontrar complexos dirutênio de valência mista $\text{Ru}_2(\text{II,III})$ do que $\text{Ru}_2(\text{II,II})$ ou $\text{Ru}_2(\text{III,III})$.

Figura 6: Diagrama simplificado dos recobrimentos dos orbitais d e níveis de energia na formação de ligações metal-metal múltiplas do tipo X₄M-MX₄ (46)

Esses complexos de valência mista (II,III) podem ter sua carga formal distribuída igualmente entre os dois centros metálicos podendo ser representados por Ru₂(II ½, II ½) ou [Ru₂]⁵⁺. Além disso, esses complexos possuem valores de momentos magnéticos incomuns (3.8 – 4.4 B.M.) devido ao paramagnetismo observado pela presença dos 3 elétrons desemparelhados (47).

O grupo da Profa. Dra. Denise de Oliveira Silva há anos tem realizado vários estudos com síntese e aplicações biológicas de complexos de cobre e de rutênio, sendo a maior parte dos estudos relacionadas a câncer. As pesquisas utilizaram moléculas bioativas, como o ácido γ -linolênico e FAINes para formar complexos em gaiola (47). Fármacos que possuem o grupamento R-COOH podem atuar como ligantes de metais de transição através das ligações do ânion derivado R-COO⁻, estabilizando a ligação dimetálica formando estruturas genéricas em gaiola do tipo [M₂(O₂CR)₄]. O primeiro trabalho do grupo nessa linha de pesquisa descreveu a síntese, caracterização e testes biológicos de dois complexos em gaiola com ibuprofeno, sendo que o centro dimetálico

de um deles era cobre, e o do outro rutênio. Os resultados foram promissores para continuar estudos biológicos com os complexos porque demonstraram que os compostos tinham propriedades anti-inflamatórias similares aos fármacos livres, mas com a vantagem de apresentarem menores efeitos colaterais medidos pela redução da ulceração gástrica *in vivo* (48).

As pesquisas para os complexos de cobre-FAINEs avançaram com a imobilização de um complexo de cobre-ibuprofeno em hidróxidos duplos lamelares (49) e de encapsulamento de um complexo de cobre-naproxeno em microesferas de quitosana (50). No caso dos complexos de rutênio as pesquisas se voltaram ao câncer. Dentre os vários complexos testados, o composto com ibuprofeno $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4\text{Cl}]$, Rulbp, é o que mais se destacou. As publicações referentes ao Rulbp desde o desenvolvimento da síntese podem ser melhor observadas pela linha do tempo da Figura 7. A seguir está uma síntese de cada um desses trabalhos:

- Em 2000 foi publicada a síntese e caracterização do Rulbp e este teve a sua atividade anti-inflamatória testada *in vivo* em comparação com um complexo análogo de cobre e ibuprofeno, Culbp. Os resultados indicaram que a administração oral de ambos os complexos inibiu a inflamação na pata do rato de maneira similar às drogas orgânicas. Contudo, os efeitos colaterais de irritação da mucosa gástrica foram menores no tratamento com os complexos do que com os fármacos livres (48).
- Em 2008 foi publicada a síntese e caracterização de diversos complexos de rutênio (II,III) em gaiola $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})_4$ contendo fármacos orgânicos importantes como aspirina, naproxeno, indometacina, além do ibuprofeno. Esses complexos foram testados em células de glioma C6 de rato, células de câncer de laringe Hep2 e de bexiga T24/83. Os resultados dos testes de viabilidade celular foram promissores nas células de glioma C6, principalmente para o Rulbp e o análogo com naproxeno (51).
- Em 2010 foram realizados vários estudos de mecanismo relacionados a atividade do Rulbp em células C6 de glioma de rato. Nesses estudos, concluiu-se que o complexo causa mudanças significativas de inibição na expressão de COX1, o que não ocorre com a COX2. Além disso, percebeu-se um importante efeito do

complexo nas expressões das proteínas p21 e p27, membros da família de inibidores de quinase dependente de ciclina (CDKI), que também são importantes na progressão do ciclo celular nas fases G1/S e G2/M. Na presença do Rulbp, as expressões do mRNA da p21 e da p27 foram rapidamente aumentadas além de haver aumento na expressão do mRNA da p53. As modificações na expressão do ciclo celular e das proteínas associadas a apoptose podem indicar que o complexo age em múltiplos alvos relacionados a inibição de proliferação e indução da morte celular (52).

- Em 2012 foi sintetizado um composto com cetoprofeno análogo ao Rulbp e este teve a sua atividade biológica comparada ao Rulbp e ao RuNpxPF₆. Os compostos foram testados em células de câncer de colón HT-29 e Caco-2 que diferem entre si quanto a expressão de COX2. Os complexos apresentaram baixa atividade antiproliferativa em ambas as linhas celulares com IC₅₀ acima de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os estudos também demonstraram que a atividade antiproliferativa das células tratadas com os complexos foi melhor nas células Caco-2 (expressa baixos níveis de COX2), o que nos leva a crer que a inibição da COX2 tem um efeito apenas parcial no papel biológico dos compostos (53).
- Em 2014 o Rulbp foi testado em células de glioma humano e também foi realizado teste *in vivo* por infusão por bomba osmótica de Alzet em rato apresentando modelo de glioma com células C6. Os resultados do teste *in vivo* mostraram inibição do crescimento da área tumoral de 41% sem efeitos tóxicos significativos embora tenha havido um decréscimo nos linfócitos. Nos testes *in vitro* em células de glioma humano (U251MG, U138MG e U87MG), aquelas que expressavam um tipo selvagem de p53 (U251MG e U87MG) foram mais sensíveis ao Rulbp, enquanto a U138MG foi a mais resistente. Esta última possui um tipo mutante de p53 e baixos níveis de COX1, corroborando com a ideia que a COX1 e a p53 estão envolvidas na atividade do complexo (54).
- Em 2015 foram realizados estudos da interação do Rulbp com albumina. Os resultados indicaram que o complexo interage com a albumina através de interações hidrofóbicas e induz mudanças conformacionais na estrutura secundária da proteína. Esses dados sugerem que a albumina pode ser um importante carregador do Rulbp no plasma sanguíneo (55).

- Em 2016 foram realizados estudos de modificação axial do Rulbp e as diferenças que a mudança estrutural pode ter causado *in vitro*. Para isso, foram sintetizados os compostos $[\text{Ru}_2(\text{lbp})_4(\text{CF}_3\text{SO}_3)]$ e $[\text{Ru}_2(\text{lbp})_4(\text{EtOH})_2]\text{PF}_6$ para serem comparados com o clássico Rulbp, $[\text{Ru}_2(\text{lbp})_4\text{Cl}]$. Os resultados indicaram que o cloreto na posição axial deve ter alguma influência positiva já que a sua atividade antiproliferativa foi melhor nas duas células de glioma humano testadas (U87MG e A172). Além disso, o complexo causou um aumento no número de células apoptóticas e diminuição do número de células mitóticas, sendo também capaz de inibir processos de migração celular (56).

Figura 7: Linha do tempo das publicações relacionadas ao complexo de dirutênio-ibuprofeno, RuIbp.

1.4. OS COMPOSTOS DE RUTÊNIO DO TIPO μ -OXO

Outra classe de complexos de rutênio com ligantes carboxilato é a dos complexos com pontes μ -oxo e μ -hidroxo. Os complexos do tipo μ -oxo possuem uma ponte de oxigênio entre os átomos metálicos e podem ser bi ou multinucleares. Em geral, compostos desse tipo com outros metais têm sido estudados como modelos estruturais rígidos e redox para sistemas biológicos, uma vez que lá podem ser encontradas estruturas binucleares semelhantes de ferro e manganês. Complexos desse tipo também têm sido utilizados na criação de materiais funcionalizados. Estes compostos possuem em sua estrutura dois ligantes carboxilatos e 6 ligantes que são geralmente derivados de piridinas e derivados do imidazol. A estrutura genérica desses compostos pode ser vista na Figura 8.

Figura 8: Estrutura genérica das compostos μ -oxo e μ -hidroxo.

O estudo dos complexos metálicos com esse tipo de ligação passou a ser estimulado depois que foram descobertos núcleos desse tipo em sítios ativos de diversas enzimas, como as metaloproteínas de ferro não-heme e, pelo menos duas enzimas contendo manganês (57). A hemeritina, por exemplo, é uma proteína responsável pelo transporte de O_2 através de uma ligação reversível com o oxigênio molecular, contendo um centro dimetálico de ferro (II) e uma ponte μ -oxo. Proteínas desse tipo têm sido encontradas não somente em humanos, mas também em plantas, bactérias, invertebrados marinhos, e parecem estar relacionadas a um grupo monofilético, ou seja, um ancestral comum que apareceu em um período de condições extremamente oxidantes. O complexo de ferro na hermeritina, possui 2 ligantes carboxilatos em ponte, um íon ferro hexacoordenado e o outro pentacoordenado. O O_2

liga-se então ao centro de Fe^{2+} pentacoordenado no sítio de coordenação vazio. Nesse caso, elétrons são transferidos do íon ferro para o gerar o complexo binuclear (III,III) e um peróxido (58) (59).

O método de síntese clássico para os complexos de rutênio do tipo μ -oxo é através do RuCl_3 com carboxilatos e ligantes nitrogenados. Um exemplo de complexo do tipo μ -oxo com FAINes encontrado na literatura, contém 2 ligantes ibuprofenatos ou cetoprofenatos e 6 piridinas, sendo PF_6^- o contra-íon. Esses complexos foram testados em relação ao seu potencial anti alergênico e os resultados indicaram que o complexo com cetoprofeno tem um potencial uso terapêutico para tratar ou prevenir doenças alérgicas (60). No entanto, a partir da estrutura dos tetracarboxilatos de rutênio em gaiola, pode-se favorecer a formação dos complexos do tipo μ -oxo quando são utilizados aminas aromáticas ou derivados do imidazol, pois suas características de ligantes π ácidos favoreceriam a quebra da ligação Ru-Ru (61) e a formação de uma ponte Ru-O-Ru ou Ru-OH-Ru. Na síntese inicial dos complexos do tipo gaiola $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4]\text{Cl}$ em 1976 (43) já havia sido reportado que esses complexos eram instáveis frente a ligantes doadores, como a piridina. Já foi relatado na literatura que o complexo em gaiola $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4]\text{Cl}$ em metanol, frente a uma base π doadora, como o imidazol, leva a formação de um μ -oxo de fórmula $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{Ac})_2(\text{Imidazol})_6](\text{PF}_6)_2$ (62), como mostrado na Figura 9. Além disso, os ligantes nitrogenados poderiam deslocar alguns ligantes carboxilatos, o que pode resultar em complexos de fórmulas diversas.

Figura 9: Reação onde há rearranjo da estrutura em gaiola com imidazol (62).

1.4. USO DE NANOPARTÍCULAS NO TRATAMENTO DE CÂNCER

O câncer é uma das doenças que mais preocupam a sociedade na atualidade. Os dados estatísticos mostram que em 2015 ela foi a segunda causa de morte nos Estados Unidos, correspondendo a 22% das mortes (63). Embora muitos tipos de câncer tenham tratamentos efetivos com altas taxas de sobrevivência, como câncer de mama, próstata e testicular, outros não tem as mesmas chances de sucesso, como câncer de pâncreas ou cérebro. Entre os problemas associados a falta de efetividade no tratamento de câncer, podemos citar (64):

- 1) Baixa eficácia das drogas;
- 2) Alta toxicidade das drogas utilizadas;
- 3) Falta de seletividade para células cancerígenas;
- 4) Rápida eliminação da circulação e não acumulação no tumor;
- 5) Resistência adquirida;
- 6) Barreiras que impedem a droga de chegar ao local de ação, como, por exemplo a Barreira Hemato-Encefálica (Blood Brain Barrier, BBB).

A partir dos problemas listados, entre outros, pode-se pensar em como a pesquisa hoje está orientada para que sejam alcançados tratamentos de quimioterapia mais eficientes, como, por exemplo:

- A) O desenvolvimento de novas drogas;
- B) Estudos de dose e toxicidade;
- C) Desenvolvimento de drogas ou sistemas de carregamento que possam interagir com receptores de células específicas;
- D) Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada com estudos de biodistribuição e bioacumulação;
- E) Uso de drogas e sistemas combinados a fim de se atingir alvos múltiplos e, com isso, diminuir a resistência;
- F) Desenvolvimento de sistemas de carregamento que possam passar especificamente pelas barreiras naturais.

Muitos dos problemas listados podem ser resolvidos com o uso da nanotecnologia que tem promovido a criação de estruturas de aproximadamente 100 nm, tamanho intermediário entre moléculas e células, e suas estruturas multifuncionais

podem ser entregues diretamente no tumor e erradicar o câncer de maneira seletiva (1) (65). A faixa de tamanho da nanotecnologia nos permite pensar em sistemas de entrega que possam circular livremente na corrente sanguínea e ainda entrar nas células para a liberação das drogas. Além disso, a possibilidade de se desenvolver sistemas com múltiplas características, ou “engenheirados” para melhorar a eficácia de drogas a baixas doses, aumentar a janela terapêutica e diminuir efeitos colaterais (1) (66), atrai ainda mais a nanotecnologia para a área médica, dando origem a nanomedicina.

As NPs mais comuns são as esféricas, mas elas podem possuir formas diversas como tubulares, cubicas, estelares e etc. Mesmo com a variação de geometria, pode-se pensar que as NPs são constituídas de um centro e uma superfície que pode ser funcionalizada e muitas vezes elas são híbridas na sua constituição. Tipicamente, os parâmetros físico-químicos como tamanho de partícula, forma, carga superficial, modificação da superfície com ligantes, entre outros, podem ser otimizados dependendo do alvo que se quer atingir e os problemas relacionados ao tratamento que se pretenda. Quando comparado a drogas livres em solução, as drogas encapsuladas em NPs exibem uma farmacocinética diferente com maior tempo de meia-vida, melhoram a chegada e acumulação no tumor e a biodisponibilidade no local de ação (67). Alguns sistemas nanoparticulados já foram aprovados para uso clínico. O Abraxane®, por exemplo, é feito de NPs de albumina ligada de modo hidrofóbico ao fármaco paclitaxel. Essa formulação melhorou a farmacocinética da droga comparado ao fármaco livre. Outro exemplo é o Doxil®, uma formulação de doxorubicina (DOX) com lipossomos e PEG que diminuiu muito a cardiotoxicidade dos tratamentos com DOX (67).

1.5. EFEITO EPR

Dentre as características dos tumores, a que mais favorece o uso de NPs para o tratamento de câncer é o efeito de aumento da permeabilidade e retenção dos vasos sanguíneos no ambiente tumoral (Enhanced Permeability and Retention Effect, efeito EPR). Esse efeito é o que relaciona os avanços da nanotecnologia com o maior entendimento da biologia da vasculatura do tumor e, assim, é considerado o “achado de ouro” no desenvolvimento de novos agentes antitumorais (68) (69).

Quando o tumor se estabelece, a rápida proliferação de células faz com que esse tumor cresça rapidamente, e à medida que ele vai crescendo, é necessário cada vez mais nutrientes e oxigênio para sustenta-lo. Assim, dá-se origem a um processo de crescimento desordenado dos vasos sanguíneos chamado angiogênese. Nesse processo, os vasos novos possuem muitas ramificações defeituosas e com vazamentos que permitem o extravasamento do conteúdo que circula pelos vasos para dentro do tumor. Além disso, há vários “espaços” pequenos e desordenados entre as células que podem alojar substâncias (69). A combinação do efeito dos vários vasos defeituosos formados com as vacâncias no tumor, criam um ambiente perfeito para que sistemas de tamanho nano, mais especificamente com tamanhos ao redor de 100 nm, possam entrar e acumular no tumor. Sabe-se que os rins são capazes de filtrar partículas de até 10 nm, enquanto que as maiores que 100 nm tem maiores chances de serem capturadas pelo fígado (68). Além disso, no tumor, o sistema linfático é falho devido ao crescimento de uma massa sólida desordenada, o que diminui a drenagem das NPs e favorece a retenção no tumor (70).

A combinação das características citadas faz com que as NPs sejam um sistema que pelo próprio tamanho já promete a acumulação e entrega do seu conteúdo no tumor, por mais que não haja nenhum ligante na superfície que oriente para uma entrega específica. Aos sistemas de NPs que confiam apenas no efeito EPR para a entrega, dá-se o nome de entrega passiva. Já as NPs que possuem ligantes em sua superfície que as oriente para um local no tumor ou para a membrana de células específicas, a entrega do conteúdo é classificada como uma entrega ativa. Sobre o efeito EPR, sabe-se também que sua extensão depende da densidade tumoral. Tumores de fígado e rins, por exemplo, manifestam uma alta densidade vascular, o que faz com que o efeito EPR seja bem significativo, assim como as terapias de NPs que contam com o efeito para a entrega passiva sejam mais efetivas. Câncer de próstata e pâncreas, no entanto, possuem uma baixa densidade vascular e tendem a captar e acumular menos NPs. Dessa forma, o sucesso das NPs também é menor para tratar metástases, visto que a densidade tumoral é menor nesse caso do que nos tumores primários (71). A Figura 10 a seguir mostra um esquema demonstrativo do efeito EPR. O esquema mostra que as NPs administradas entram no tumor e acumulam por entrega passiva devido ao efeito EPR, demonstrado através dos defeitos no vaso sanguíneo, disposição desordenada das células e vasculatura caótica e ramificada. Além disso, a

figura mostra que os vasos linfáticos não conseguem realizar a drenagem das NPs da massa tumoral, facilitando o acúmulo no tumor.

Figura 10: Esquema de demonstração do efeito EPR (68).

1.6. NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

O centro das NPs, ou a sua matriz, é, em geral, aonde vai estar localizado as substâncias que se quer carregar. As NPs podem ser formadas por vários materiais. As mais antigas usadas e aprovadas na medicina são as lipossômicas, mas, a partir delas, vários materiais têm sido empregados (64). A seguir é apresentado uma relação de diversos tipos de NPs e algumas características:

- Lipossômicas: São formadas por lipossomos, sendo assim, materiais em geral biodegradáveis e não tóxicos, mas muitas vezes instáveis em meio biológico.
- Poliméricas: São formadas por um polímero ou pela mistura deles. Podem ser biodegradáveis e, em geral, são estáveis em meio biológico.
- Inorgânicas: São formadas por um núcleo metálico que podem muitas vezes conferirem características magnéticas e de imagem, sendo muito empregadas em pesquisas relacionadas a diagnóstico. Geralmente relacionados a tratamentos associados a hipertermia e fotodinâmica.
- Lipídicas: São formadas por lipídeos saturados ou insaturados que podem interagir preferencialmente com drogas hidrofóbicas. Além disso, são biocompatíveis e biodegradáveis, podendo ser estáveis de acordo com a formulação.

Os lipídeos englobam um grande grupo de compostos orgânicos de papel fundamental na vida como conhecemos. Eles têm papéis diversos como o de estocar energia nos nossos corpos, de construção das membranas celulares, e em diversos processos fisiológicos e bioquímicos (72). Além disso, eles podem dissolver moléculas insolúveis em água, passar por membranas biológicas e sofrer digestão nas enzimas. Além disso, os lipídeos têm papel fundamental na indústria como veículo de formulações diversas e, principalmente, na formação de emulsões permitindo a administração de compostos não solúveis em água (72).

Sistemas baseados em nanopartículas lipídicas (system lipid-based nanoparticles, SLBNs) mostram muitas vantagens para seu uso, como biocompatibilidade, segurança, estabilidade física, proteção da droga contra degradação e modulação da liberação da droga (rápida ou sustentada) (73) (74) (75). A biocompatibilidade e segurança são asseguradas não só pela utilização de lipídios fisiológicos e por não necessitar de solventes orgânicos durante a preparação, mas também pelo tamanho mínimo (inferior a 1 μm) que reduz o risco de coagulação do sangue. A taxa de liberação da droga pode ser regulada de acordo com o tipo de lipídio e o agente tenso-ativo utilizado, o tamanho da partícula e a estrutura interna obtida por diferentes métodos de preparação. A primeira geração das SBNs são as nanopartículas lipídicas sólidas (solid lipid nanoparticles, SLNs) e a segunda geração são os transportadores lipídicos nanoestruturados (nanostructured lipid carriers, NLCs) (76).

As SLNs são emulsões do tipo óleo/água, em que o óleo é substituído por um lipídio que é sólido à temperatura ambiente e corporal, e são estabilizadas por um ou mais tenso-ativos, gerando nanopartículas com tamanho compreendido entre 50 e 1000 nm. As NLCs surgiram para superar algumas das desvantagens das SLNs, tais como a baixa eficiência de encapsulação e a expulsão do fármaco durante o armazenamento. Estas possuem lipídio líquido, o que promove uma estrutura mais desorganizada do que as obtidas pelas SLNs, permitindo incorporar maior quantidade de fármaco e, ao mesmo tempo, evitar a expulsão deste durante o período de armazenamento (76). Embora os sistemas de SLNs apresentem como desvantagem a expulsão do fármaco durante o armazenamento, um grupo de pesquisa do Canadá desenvolveu uma metodologia onde se tem conseguido evitar esse problema por meio da síntese de SLNs recobertas com PEG, que foram testadas como sistemas carregadores de drogas

mostrando resultados promissores em estudos *in vitro* e *in vivo* para câncer de mama (77).

1.7. NANOPARTÍCULAS COM POLÍMEROS

Apesar das vantagens do uso de nanopartículas como carregadores, há alguns desafios que esses sistemas precisam superar para uso *in vivo*. Um desses desafios é evitar o sequestro das nanopartículas pelo sistema reticuloendotelial (RES). Esse sistema é uma defesa natural do nosso organismo que se utiliza de macrófagos e monócitos circulantes, além dos vasos linfáticos (78). Se as NPs administradas forem reconhecidas pelo RES, elas podem ser rapidamente retiradas da circulação pelo fígado, baço ou medula óssea. Como consequência, as NPs injetadas seriam removidas da circulação e ao invés de chegarem e acumularem no tumor, elas poderiam ficar aprisionadas no fígado. Uma solução para o problema de reconhecimento pelo RES é adicionar polímeros na superfície das NPs, como o PEG (polietilenoglicol) (79). Nesse caso, estudos mostram que NPs recobertas com PEG acumulam 50 a 30% menos no fígado do que as não recobertas e contribuem para uma maior acumulação no tumor. Além disso, NPs hidrofóbicas são mais susceptíveis à serem reconhecidas pelo RES e o PEG as deixaria mais hidrofílicas. Por fim, o uso de PEG na superfície das NPs também contribui para dar estabilidade ao sistema, prevenindo agregação resultante da atração entre as partículas (78). Um sistema híbrido interessante que combina as propriedades de se ter nanopartículas lipídicas com polímeros na superfície é o das SPLNs (Nanopartículas Poliméricas Lipídicas Sólidas). O grupo da Dra. Wu desenvolveu um sistema de SPLNs que pode acomodar uma variedade de compostos, como drogas hidrofóbicas, íons metálicos, óxidos metálicos e quantum dots (80). Essas SPLNs contêm lipídeos, como o ácido mirístico, PEG na superfície, e apresentam tamanho adequado para serem utilizadas como nanocarregadores para entrega no tumor através do efeito EPR. Além disso, foi reportado que as SPLNs conseguem desviar transportadores de efluxo, como a glicoproteína-P, relacionada a resistência múltipla de drogas e, consequentemente, aumentar a captação celular e a citotoxicidade das drogas. Como exemplo, pode ser citado o encapsulamento da doxorrubicina em SPLNs onde a formulação mostrou-se essencial para aumentar a citotoxicidade, captação celular e retenção da droga (81).

Nas SPLNs é utilizado dois polímeros de diferentes tamanhos (estearato de PEG 40 e estearato de PEG 100) para que as nanopartículas fiquem da forma “brush”, com os polímeros de forma esticada, e não fiquem da forma “mushroom”, que é quando os polímeros dobram na estrutura (Figura 11). Nesse caso, o polímero menor (estearato de PEG 40) serve para dar sustentação ao polímero maior (estearato de PEG 100) evitando a dobra do polímero que levaria a formação da forma “mushroom”. Estudos indicam que as nanopartículas recobertas na forma “brush” são dificilmente reconhecidas pelo sistema reticuloendotelial e, com isso, permanecem mais tempo na circulação para atingir seu alvo (78).

Figura 11: Nanopartícula recoberta com PEG 40 e PEG 100 na forma “brush” (A) e na forma “mushroom” (B).

Um outro desafio que as nanopartículas precisam superar são as barreiras naturais, como é o caso da barreira hemato-encefálica, ou BBB (Blood Brain Barrier). Diversos estudos em áreas de problemas relacionados a cérebro como depressão, Parkinson, câncer, entre outros, demonstraram que o uso do surfactante polisorbato 80 (PS80 – Tween 80[®]) em formulação de NPs faz com que elas sejam efetivas em penetrar a BBB (82) (83) (84) (85). O grupo da Dra. Wu tem estudado e desenvolvido um novo sistema de nanopartículas baseado em um terpolímero de poli (ácido metacrílico)-polisorbato 80-amido (PMAA-PS 80-g-St), Figura 12, que além de mostrar um comportamento distinto de acordo com o pH, devido a presença do ácido poli metacrílico (86), também contém o PS80 e pode ser direcionado para liberação no cérebro. Todos os componentes do terpolímero são comumente utilizados em várias formulações farmacêuticas e aprovados por agências regulatórias para uso em humanos. A vantagem de se usar um polímero contendo PS80 ao invés de usá-lo livre como um surfactante, é a de que a ligação covalente não o tornaria susceptível a ser trocado por proteínas do sangue (86).

O grupo examinou a penetração na BBB utilizando dois agentes de imagem impermeáveis, gadolínio e Hoechst 33342, por imagem de ressonância magnética e microscopia de fluorescência confocal. A acumulação de nanopartículas carregadas com DOX em um modelo de metástase no cérebro de câncer de mama triplo negativo foi observada por imagem de fluorescência e bioluminescência. A localização das NPs e DOX foi verificada em tecido do cérebro usando microscopia de fluorescência, concluindo que as NPs foram capazes de entrar no cérebro. As NPs acumularam na parte intracranial rapidamente e liberaram DOX nas lesões metastáticas. Ao administrar DOX não encapsulada, os mesmos efeitos não foram observados. Além disso, pouca quantidade de DOX foi observada em tecido cerebral normal, indicando uma citotoxicidade específica ao tratamento. Esses resultados sugerem que as NPs feitas com o PMAA - PS 80-g-St são um sistema promissor para a entrega de drogas no cérebro (87).

Figura 12: Estrutura do terpolímero PMAA-PS 80-g-St.

1.8. NANOPARTÍCULAS CONTENDO METALOFÁRMACOS COMO ANTITUMORAIS

A versatilidade das NPs e estratégias de recobrimento tem levado ao desenvolvimento de sistemas nanoparticulados para o carregamento não só das drogas orgânicas comerciais, como também dos metalofármacos (88). Além disso, os efeitos colaterais severos ainda são problemas a serem resolvidos para muitos metalofármacos e a nanotecnologia pode ajudar a melhorar essa questão. Os materiais nanoestruturados podem agir como vetores para a entrega dos metalofármacos, resolver problemas de solubilidade ou apenas proteger o complexo para evitar a degradação em outros ambientes que não seja o tumoral (89). Um fator de diferenciação no desenvolvimento de nanoformulações para as drogas orgânicas e para os metalofármacos é que no caso do encapsulamento dos complexos deve-se

tomar especial cuidado com a reatividade do centro metálico frente aos componentes das nanopartículas.

Uma das formulações com metalofármacos que mais se destacam é a lipoplatina, que é constituída de nanopartículas de lipossomos para carregamento da cisplatina. A lipoplatina completou as fases I, II, e III de ensaios clínicos em humanos e seus resultados mostraram acumulação no tumor de cerca de 200 vezes mais do que a droga livre com redução de grande parte dos efeitos colaterais (90). Em relação aos complexos de rutênio, tem-se nanopartículas feitas de micelas contendo o RAPTA-C, um composto mononuclear de rutênio que limita o crescimento de metástases de tumores sólidos e induz apoptose. O encapsulamento melhorou a captação celular do complexo e mostrou um aumento de cerca de 10 vezes na toxicidade em células de câncer de ovário (91). Outro complexo de rutênio encapsulado foi o KP1019. Para ele, foi desenvolvida uma nanoformulação com ácido poli láctico estabilizados por PS80. Os resultados demonstraram um aumento na toxicidade em células de câncer de cólon em cerca de 20 vezes mais, mas também foi percebida uma mudança na estrutura do complexo decorrente do encapsulamento. A interação do Ru(III) com o PS80 levou à troca de um ligante cloreto e redução do Ru(III) para Ru(II) (92). É interessante observar que as interações existentes entre o complexo e o material da nanopartícula podem levar a uma mudança estrutural e ainda gerar um composto com propriedades farmacológicas potencializadas em relação a droga livre. Por isso, é importante considerar as possibilidades de trocas de ligantes e mudanças estruturais quando se deseja encapsular complexos metálicos.

I. 2 OBJETIVOS GERAIS

Com o desenvolvimento da Química Bioinorgânica, o campo dos metalofármacos tem ganhado destaque nas áreas farmacológica e medicinal. Nesse sentido, esse trabalho busca gerar uma contribuição significativa na área de bioinorgânica, mais especificamente no estudo dos complexos de rutênio contendo antiinflamatórios não esteroidais, seu encapsulamento em nanopartículas e o potencial dessas para melhorar a eficácia antitumoral dos metalofármacos.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estudar a interação dos complexos dimetálicos em gaiola contendo acetato, RuAc, e ibuprofeno, Rulbp, com a 4-aminopiridina e os produtos resultantes;
- 2) Desenvolver, caracterizar e testar sistemas de carregamento para os complexos já estudados pelo grupo, Rulbp e seu análogo com naproxeno $[Ru_2(Npx)_4Cl]$, RuNpx, utilizando nanopartículas poliméricas lipídicas sólidas (SPLNs) visando tratamento de tumores sólidos, como câncer de mama e próstata;
- 3) Desenvolver, caracterizar e testar sistemas de carregamento para os complexos já estudados pelo grupo, Rulbp e RuNpx utilizando nanopartículas terpoliméricas lipídicas (TPLNs) visando tratamento de câncer de cérebro do tipo glioblastoma.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

II. 1 MATERIAIS

A Tabela 1 mostra os reagentes e solventes utilizados com seus respectivos fornecedores.

Tabela 1: Lista de reagentes / solventes utilizados e seus fornecedores

Reagente / Solvente	Fornecedor
4-aminopiridina - $C_5H_6N_2$	Sigma Aldrich
α -meio mínimo essencial (α -MEM)	Gibco
Acetona - C_3H_6O	Synth
Ácido acético glacial - $C_2H_4O_2$	Merck
Ácido mirístico	Sigma-Aldrich
Álcool polivinílico (PVA)	Sigma-Aldrich
Anidrido acético - $(CH_3CO)_2$	Merck
Etil araquidato	Tokyo Kasei
Azul de tripano (0.4 %)	Gibco
Cloreto de Lítio - $LiCl$	Merck
Cloreto de Rutênio - $RuCl_3 \cdot nH_2O$	Sigma Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco
Estearato de polioxoetileno (100)	Spectrum Chemical
Estearato de polioxoetileno (40)	Sigma-Aldrich
Etanol - CH_3CH_2OH	Commercial Alcohols
Etanol - CH_3CH_2OH	Synth
Hexafluorofosfato de amônio - NH_4PF_6	Aldrich
Hexano	Synth
Hidróxido de sódio (NaOH)	Sigma-Aldrich
Hoechst 33342	Life technologies

Indocianina verde (ICG)	MP Biomedicals
Ibuprofeno - $C_{13}H_{18}O_2$	Rhamus
KPS (persulfato de potássio)	Sigma-Aldrich
MAA (ácido metacrílico)	Sigma-Aldrich
Maltodextrina	Sigma-Aldrich
MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium])	Sigma-Aldrich
Naproxeno - $C_{14}H_{14}O_3$	Rhamus
PBS (tampão fosfato-salino)	Gibco
Polisorbato 80 (PS80)	Croda
SDS (dodecil sulfato de sódio)	BioShop
Soro Fetal Bovino (FBS)	Gibco
STS (tiosulfato de sódio)	Sigma-Aldrich
Sulfato de prata – Ag_2SO_4	Merck
Vermelho Nilo (Nile Red)	Sigma-Aldrich

II. 2 TÉCNICAS EMPREGADAS

2.1. ANÁLISE ELEMENTAR

Os experimentos de Análises Elementares (CHN) foram realizados em um aparelho Perkin-Elmer CHN 2400. Os experimentos de Análise Elementar (Cl) foram realizados por análise volumétrica. Os experimentos de Análise Elementar (Ru e P) foram realizados utilizando um Espectrômetro Ótico de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES, Radial) em um aparelho Spectro Arcos. As medidas foram realizadas no laboratório da Central Analítica do IQ-USP.

2.2. ANÁLISE TÉRMICA (TGA/DSC – DETECTOR DE MASSA)

As análises térmicas das amostras sólidas foram realizadas usando-se um cadinho de alumina, em um aparelho NETZSCH STA 409, sob atmosfera de ar sintético (fluxo de 50 mL/min), no intervalo de 35 a 1000 °C (10 °C/min).

2.3. CONDUTIVIDADE

As medidas de condutividade foram realizadas em condutivímetro, modelo DM-31 – Digimed. Foi utilizado solução de cloreto de potássio com célula de constante $k = 0,1 \text{ cm}^{-1}$ e condutância específica de $146,9 \text{ }\mu\text{S/cm}$. As medidas foram realizadas em soluções com concentrações aproximadamente iguais a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ dos complexos em acetonitrila.

2.4. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os experimentos de Espectrometria de Massas dos complexos foram realizados por infusão direta em aparelho MICROTOF-TOF de alta resolução, na Central Analítica do IQ-USP. Para as medidas do complexo $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$ o solvente utilizado foi acetona e para o $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{Ibp})_2(4\text{AP})_6]\text{Cl}_2$ foi utilizado metanol. Os espectros de massas para as NPs (SPLNs e TPLNs) foram registrados em equipamento Agilent 6538 UHD na Universidade de Toronto, através da dissolução das amostras em uma solução 0,1 % ácido fórmico em metanol : água 1:1 (v/v).

2.5. ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA (UV-vis)

Os espectros eletrônicos de absorção dos complexos em solução foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu UV-VISÍVEL, modelo UV-2600, utilizando-se cubetas de quartzo de caminho óptico igual a 1,0 cm. Os espectros de absorção eletrônico das nanopartículas SPLNs e TPLNs foram registrados em espectrofotômetro Cary 8454, Agilent Technologies, na Universidade de Toronto. Para isso, foram utilizadas soluções etanólicas das SPLNs e TPLNs retidas em filtro 30 kDa Amicon® depois da ultracentrifugação a 4400 rpm por 15 min. Para os ensaios de cinética foi utilizado o equipamento Shimadzu UV-VISÍVEL, modelo UV-1650 PC equipado com banho termostático. Os experimentos foram realizados a 25 °C e cubeta de quartzo do tipo *Tandem* (com dois compartimentos para solventes e caminho óptico total de 1,0 cm). Os espectros eletrônicos de absorção das amostras no estado sólido foram obtidos em um espectrofotômetro Field Spec, modelo FS3 350-2500JR do Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do IQ-USP.

2.6. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO

Os espectros vibracionais dos complexos por ATR foram registrados na região do infravermelho, de 4000 a 600 cm^{-1} , utilizando espectrofotômetro Bruker Alpha, modelo 11801885. Os espectros vibracionais dos complexos dispersos em KBr foram registrados na região do infravermelho, de 4000 a 400 cm^{-1} , utilizando-se um espectrofotômetro FTIR ABB Bomem, mod. 120, com resolução de 4 cm^{-1} , com uma média de 64 varreduras por espectro. Esses espectros foram obtidos no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do IQ-USP. O espectro FTIR das nanopartículas SPLNs e TPLNs foram registrados em espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum One equipment com acessório de ATR, na Universidade de Toronto, utilizando amostras sólidas obtidas da ultracentrifugação das NPs a 43000 rpm por 2 h.

2.7. MEDIDAS DE TAMANHO E POTENCIAL ZETA

A distribuição de tamanho e carga superficial das NPs foram verificadas utilizando equipamento Malvern zeta sizer Nano-ZS na Universidade de Toronto,

Canadá. A estabilidade das SPLNs em meio de cultura foi avaliada observando a mudança no tamanho de partícula até 72 h a 37 °C.

2.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para observar a morfologia das SPLNs, uma gota da suspensão de NPs diluída em água foi colocada em um grid coberto de carbono e seco a temperatura ambiente. Os grids de MET foram então colocados em microscópio de transmissão eletrônica Hitachi H7000, na Universidade de Toronto, usando uma voltagem de aceleração de 100 kV.

2.9. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

As imagens de microscopia eletrônica de força atômica foram realizadas para observar a morfologia das TPLNs em equipamento FlexAFM (NanoSurf) operando no modo de contato intermitente usando cantilevers TAP 190 Al -G (Budget Sensors) com velocidade de varredura de 2s por linha, e com resolução de 256 a 512 pontos por linha. Para a preparação da amostra, 10uL da suspensão do material de partida foi diluído em 2mL de água deionizada. Em seguida, 5uL da amostra diluída foi depositada sobre a superfície da mica (Ted Pella Inc) previamente clivada, e seca ao ambiente aberto. As imagens foram obtidas no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do IQ-USP.

2.10. SUSCEPTIBILIDADE MAGNÉTICA

As medidas de susceptibilidade magnética foram realizadas utilizando-se o método de *Faraday* e uma balança CAHN, modelo DTL 7500. Foi utilizado como padrão o $\text{Hg}[\text{Co}(\text{SCN})_4]$ com valor de susceptibilidade (K) de $1,644 \cdot 10^{-5}$ unidades CGS/Gauss a 20 °C e $\theta \pm 10$ °C. Todas as medidas (porta-amostra, padrão e amostra) foram efetuadas em triplicata, na presença e ausência de campo magnético (1 Tesla) a 25 °C. A partir dos valores de massa da amostra e do padrão, determinou-se a susceptibilidade magnética por unidade de massa da amostra (K_a) de acordo com a Equação 1. Calculou-se então a susceptibilidade magnética molar da amostra pela

Equação 2 utilizando a massa molar M.M. $\text{RuO}(\text{lbp})(4\text{AP}) = \text{M.M. } [\text{Ru}_2\text{O}(\text{lbp})_2(4\text{AP})_6]\text{Cl}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O} = 1317,7 \text{ g/mol}$.

Equação 1: Determinação da susceptibilidade magnética por unidade de massa da amostra

$$K_a = K_p \times \frac{(\Delta a - \delta a) \times M_p}{(\Delta p - \delta p) \times M_a}$$

Equação 2: Cálculo da susceptibilidade magnética molar da amostra

$$KM = K_{amostra} \times MM$$

Onde,

K_a, K_p = susceptibilidade magnética por unidade de massa da amostra e do padrão, respectivamente.

M_a, M_p = massa da amostra e do padrão, respectivamente.

$\Delta a, \Delta p$ = diferença das massas com e sem campo magnético da amostra e do padrão, respectivamente.

$\delta a, \delta p$ = diferença das massas com e sem campo magnético, entre as massas do porta-amostra e da amostra, e entre as massas do porta-amostra e do padrão, respectivamente.

KM = susceptibilidade magnética molar da amostra

MM = massa molar da amostra

II. 3 SÍNTESES DOS COMPLEXOS PRECURSORES

3.1. SÍNTESE DO COMPLEXO $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4\text{Cl}]$

O complexo foi sintetizado e caracterizado de acordo com procedimento já descrito por nosso grupo de pesquisa (93). Em um balão de boca dupla foi adicionado 40 mL de ácido acético e 8 mL de anidrido acético. O balão foi aquecido em manta térmica e mantido sob refluxo por 1h em atmosfera de N_2 . Após a mistura ser resfriada, foi adicionado LiCl (1,05 g), deixando o sistema em agitação por 10 min. Em seguida, foi adicionado $\text{RuCl}_3 \cdot \text{nH}_2\text{O}$ (1,02 g – 5 mmol). A mistura foi mantida sob agitação, aquecimento e fluxo lento de O_2 por 4h. No término das 4h foi observada a formação do complexo marrom. O produto foi deixado na geladeira até o dia seguinte, filtrado e lavado com acetona. Por fim, o produto foi seco em dessecador sob vácuo com CaCl_2 e sílica gel. O rendimento da reação foi de 62%. Análise elementar (%) experimental / calculado: C 20,30 / 20,28; H 2,56 / 2,53.

3.2. SÍNTESE DO COMPLEXO $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$

O complexo foi sintetizado e caracterizado de acordo com procedimento já descrito pelo grupo (93). Preparou-se uma suspensão contendo 0,29 g (0,65 mmol) de $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4\text{Cl}]$ em 200 mL de água deionizada e após 30 min de agitação sob atmosfera de N_2 , a mistura foi submetida a filtração simples. Em seguida, adicionou-se ao filtrado 50 mL de uma solução aquosa contendo 0,21 g (0,67 mmol) de Ag_2SO_4 . O sistema foi mantido sob agitação e atmosfera de N_2 durante 50 min e, em seguida, o precipitado de AgCl foi filtrado por meio de filtração simples. Ao filtrado, foi adicionado 10 mL de uma solução aquosa contendo 0,51 g (3 mmol) de NH_4PF_6 e após 30 min de agitação sob atmosfera de N_2 , a mistura foi deixada na geladeira de um dia para o outro. Após esse período a solução teve o seu volume reduzido a 25 mL em um rotoevaporador e foi novamente deixada na geladeira por 5 dias. Com isso, houve precipitação de um sólido branco que corresponde ao excesso de NH_4PF_6 . Este foi separado da mistura por filtração simples. Em seguida, a solução obtida teve o seu volume reduzido de 25 mL para 7 mL em um rotoevaporador. A solução resultante foi deixada na geladeira por mais 5 dias a fim de que fosse obtido um precipitado laranja. Como após esse período

não se observou precipitado, foi adicionado cerca de 20 mL de dietiléter, onde observou-se a precipitação imediata do sólido laranja. O produto foi deixado na geladeira por mais 1 dia e depois filtrado. Por fim, o produto foi seco em dessecador sob vácuo com CaCl_2 e sílica gel. O rendimento da reação foi de 32%. Análise elementar (%) experimental / calculado: C 15,06 / 15,51; H 2,63 / 2,58.

3.3. SÍNTESE DO COMPLEXO $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4\text{Cl}]$

O complexo foi sintetizado e caracterizado de acordo com procedimento já descrito pelo grupo (51) (93). Preparou-se uma suspensão contendo 0,3 g (0,6 mmol) de $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4\text{Cl}]$ em 200 mL de água deionizada. A mistura foi agitada por 30 min com agitador magnético e depois rotoevaporada a 40 mL. Em seguida, foram adicionados 40 mL de uma solução etanólica contendo 0,51 g (2,5 mmol) de ibuprofeno e uma solução de 0,36 g de LiCl dissolvido em 5 mL de água deionizada. O sistema foi mantido sob agitação, fluxo de N_2 e banho maria a uma temperatura entre 60 e 80 °C por 3h. Ao final das 3h, pode-se observar o produto marrom formado nas paredes do balão. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi lavado com água destilada. Em seguida, o produto foi redissolvido em etanol (cerca de 15 mL) e o solvente foi eliminado posteriormente sob fluxo de N_2 . O produto foi colocado, por fim, em dessecador contendo CaCl_2 e sílica gel. O rendimento da reação foi de 84,6 %. Análise elementar (%) experimental / calculado: C 57,90 / 58,52; H 6,33 / 6,47.

3.4. SÍNTESE DO COMPLEXO $[\text{Ru}_2(\text{Npx})_4\text{Cl}]$

O complexo foi sintetizado e caracterizado de acordo com procedimento já descrito pelo grupo (93). Preparou-se uma suspensão contendo 0,3 g (0,6 mmol) de $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4\text{Cl}]$ em 200 mL de água deionizada. A mistura foi agitada por 30 min com agitador magnético e depois rotoevaporada a 50 mL. Em seguida, foram adicionados 35 mL de etanol, 50 mL de uma solução etanólica contendo 0,76 g (3,3 mmol) de naproxeno e uma solução de 0,3 g de LiCl dissolvido em 5 mL de água deionizada. O sistema foi mantido sob agitação, fluxo de N_2 e banho maria a uma temperatura de 60 °C por 2h. Ao final das 2h, pode-se observar a formação de um sólido marrom que foi separado por filtração a vácuo e lavado com água. O produto foi colocado, por fim, em

dessecador contendo CaCl_2 e sílica gel. O rendimento da reação foi de 88,42 %. Análise elementar (%) experimental / calculado: C 56,34 / 56,51; H 4,50 / 4,71.

II. 4 SÍNTESES DOS COMPLEXOS COM 4-AMINOPIRIDINA

4.1. SÍNTESE DO COMPLEXO $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$

Em um balão de 2 bocas foi adicionado 0,049 g (0,16 mmol) de $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$ em 10 mL de isopropanol sob fluxo de N_2 e agitação magnética. Após o complexo ter sido dissolvido, foi adicionado 0,030 g (0,32 mmol) de 4-aminopiridina (4AP). Ao adicionar a 4AP, percebeu-se uma mudança na coloração de laranja para marrom escuro. Percebeu-se também que foi formado um sólido que estava em suspensão. O produto foi filtrado à vácuo e, logo após, foi colocado para secar em dessecador à vácuo contendo CaCl_2 . O rendimento foi de 72 %.

4.2. SÍNTESE DO COMPLEXO $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{Ibp})_2(4\text{AP})_6]\text{Cl}_2$

Em um balão de 2 bocas com sistema de refluxo e aquecimento, foi adicionado 0,051 g (0,05 mmol) de $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4\text{Cl}]$ em 10 mL de etanol com agitação magnética. Após o complexo ter sido dissolvido, foi adicionado uma solução de 4-aminopiridina 0,060 g (0,65 mmol) em 10 mL de etanol. Com a adição, a coloração mudou imediatamente de marrom para marrom escuro esverdeado. O sistema foi mantido sob agitação por 2 h e após 30 min já se observou uma coloração esverdeada. Após as 2 h de agitação, a coloração resultante foi azul esverdeado. O composto foi colocado em rotaevaporador até que a solução fosse reduzida para cerca de 10 mL. Depois disso, foi adicionado uma solução aquosa de 40 mL contendo 0,1 g de NH_4PF_6 e a mistura foi deixada na geladeira por 2 h. Com a presença de precipitado verde, a mistura foi filtrada à vácuo e lavada com água. Na filtração, o material sólido adquiriu uma coloração mais azulada e o filtrado amarelado. O sólido foi colocado em dessecador a vácuo com CaCl_2 por 1 dia. Depois de seco, o material foi colocado em um béquer e foi adicionado cerca de 30 mL de hexano para a lavagem de iburofeno remanescente. O líquido foi removido com uma pipeta de Pasteur e o material foi seco novamente. Em testes cromatográficos, o material sólido mostrou ser uma mistura majoritariamente de um composto marrom e

outro azul. Por isso, a mistura foi separada via coluna cromatográfica de 50 mL de alumina neutra como fase estacionária e uma mistura de Clorofórmio / Etanol (2:1) como fase móvel. O composto marrom foi eluído primeiro da coluna, em seguida uma pequena quantidade de uma mistura de compostos amarelo e azul, e por fim, com boa separação e aumento da proporção de etanol na fase móvel, foi eluído o composto azul. Percebeu-se que um pouco do composto azul ficou retido na coluna. O composto azul obtido foi rotaevaporado até cerca de 10 mL e depois seco com gás N₂ e dessecador a vácuo com CaCl₂ por 1 dia. O rendimento foi de 32 %.

II. 5 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (SPLNs)

As NPs carregadas SPLNs foram preparadas através de uma emulsão óleo-água seguida da evaporação de solvente, de acordo com procedimento previamente descrito com algumas modificações (94). Uma solução aquosa de 0,5 % m/m PVA (100 µL) foi diluída com água (600 µL) em um tubo eppendorf de 5 mL que foi imerso em um banho de água a 64 °C **(a)**. Em paralelo, duas outras soluções foram preparadas em tubos de 1,5 mL: a primeira continha a droga (*i.e.*, Rulbp (2,8 mg), RuNpx (3,0 mg), Hlbp (2,1 mg) ou HNpx (2,4 mg)) e ácido mirístico (3 mg) dissolvido em clorofórmio (100 µL) **(b)**, e a segunda continha etil araquidato (7 mg), estearato de PEG 40 (1 mg) e estearato de PEG 100 (2 mg) em clorofórmio (50 µL) **(c)**. A solução **(b)** foi adicionada a **(a)** com sonicação (processador ultrassônico, 100 Hz, 5 mm de profundidade da sonda). Depois disso, a solução **(c)** foi imediatamente adicionada e a mistura resultante sonicada por 3 min (nas mesmas condições). A emulsão final foi adicionada rapidamente a água deionizada gelada (300 µL) que estava em um banho de gelo e o sistema foi mantido nesse banho por 5 min. Depois disso, a emulsão foi colocada no vácuo em uma câmara de vácuo por 10 min. A suspensão das NPs foi mantida posteriormente a 4 °C. Um procedimento similar, mas sem a droga, foi usada para preparar uma formulação sem a droga (blank-SPLNs). As NPs fluorescentes para experimentos de captação celular foram preparadas pelo mesmo procedimento que as blank-SPLNs, mas contendo 20 µL do corante vermelho Nilo em clorofórmio (5 mg mL⁻¹). As NPs fluorescentes para estudos de biodistribuição foram preparadas por procedimento similar ao utilizado para as blank-SPLNs, mas contendo 30 µL de uma solução do corante ICG em metanol (20 mg mL⁻¹).

II. 6 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS TERPOLIMÉRICAS LIPÍDICAS (TPLNs)

6.1. SÍNTESE DO TERPOLÍMERO (PMAA-PS80-g-St)

O terpolímero (TP) foi sintetizado usando método descrito previamente pelo grupo da Dra. Wu (86) através da polimerização por dispersão de radical livres. Para isso, 2 g de maltodextrina (4,0 – 7,0 equivalentes de dextrose) foi adicionado a 180 mL água DI em um balão de reação de boca dupla. O sistema foi imerso em um banho de água a 70 °C sob N₂ por 10 minutos. Depois, 0,15 g KPS e 0,18 g STS (iniciadores) foram adicionados e misturados por mais 10 min. Em um frasco de cintilação separado, 2,0 g PS80 e 0,25 g SDS foram misturados com 100 mL de água DI e adicionados ao sistema. Em outro frasco de cintilação, 1,5 g MAA foi adicionado em 10 mL água DI, misturados rapidamente, e adicionados ao sistema; foi observada opulência aproximadamente 8 min depois da adição de MAA. A reação foi deixada a 70°C por 8 h. Depois de aproximadamente 24 h, o sistema foi neutralizado para pH 7,4 com NaOH (1 mol.L⁻¹). Depois de neutralizado, a dispersão foi purificada por diálise em água DI, usando membrana de diálise (peso molecular cut-off 25 000 g.mol⁻¹) extensivamente por 48 h, com duas trocas de água. O polímero purificado foi então seco a 50 °C por 24 h, e estocado em dessecador para uso futuro.

6.2. SÍNTESE DAS TPLNs

As TPLNs carregadas foram preparadas através do método da emulsão óleo em água seguida de evaporação de solvente. Inicialmente, foram preparadas separadamente duas misturas (A e B). A mistura A contém EA (12 mg), TP (10 mg), clorofórmio (100 µL) e 0,5% m/m solução PVA (100 µL) em um tubo eppendorf que estava imerso em um banho de água a 64 °C e misturado por 20 min. A mistura B foi preparada dissolvendo a droga (Rulbp (2,8 mg), RuNpx (3,0 mg) ou Hlbp (2,2 mg)) em clorofórmio (100 µL) em um tubo eppendorf de 1,5 mL. Então, as misturas A e B foram adicionadas sob sonicação em água DI (500 µL) em um tubo eppendorf de 5 mL que foi sonicado por 3 min em um processador ultrassônico (100 Hz, 5 mm profundidade da sonda) sob nitrogênio, a temperatura ambiente. A mistura final foi adicionada

rapidamente a água DI gelada (400 μL). O sistema foi deixado em banho de gelo por 5 min e depois colocado em câmara de vácuo por 10 min. A suspensão das TPLNs carregadas (C) foi estocada em refrigerador. As TPLNs não carregadas, blank-TPLNs (*i.e.*, formulação sem a droga) foi preparada por procedimento similar, exceto que a mistura B foi trocada por clorofórmio. No caso das NPs fluorescentes blank-TPLNs, uma solução em clorofórmio do corante vermelho nilo (5 mg mL^{-1} , 20 μL) foi utilizada no lugar do clorofórmio.

II. 7 OUTROS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

7.1. CÁLCULOS DE CARREGAMENTO DA DROGA: SPLNs

A análise da quantidade de droga encapsulada foi feita da seguinte forma: 1 mL das NPs foram ultracentrifugadas usando filtro de 30 kDa Amicon® a 4400 rpm por 15 min, lavadas com ~ 0,5 mL de uma solução etanol : água (50:50 v/v), centrifugadas novamente, e o sobrenadante foi diluído em 3 mL de uma solução etanol : água (50:50 v/v). Curvas de calibração foram construídas para os metalofármacos Ru₂(FAINEs) e os FAINEs correspondentes em etanol : água (50:50 v/v) a λ / nm: 431 (RuIbp), 264 (HIbp), 316 (RuNpx), 317 (HNpx). Os espectros eletrônicos de absorção foram registrados em espectrofotômetro Cary 8454, Agilent Technologies.

7.2. CÁLCULOS DE CARREGAMENTO DA DROGA: TPLNs

A análise quantitativa de complexo nas TPLNs carregadas foi feita por determinação de Ru por ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) em um equipamento Spectro Arcos na Universidade de São Paulo. A determinação do HIbp foi feita através da técnica de espectroscopia de absorção UV-VIS em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2600 com a curva de calibração construída para a droga em 264 nm. Previamente a essas análises quantitativas, as TPLNs carregadas foram submetidas a ultracentrifugação em filtro de 30 kDa Amicon® a 4400 rpm por 15 min. No caso das Ru₂(FAINEs)-TPLNs, o conteúdo retido no filtro (de uma amostra de 1,0 mL) foi dissolvido em 5 mL de etanol para análise de ICP-OES. No caso

das Hlbp-TPLNs, a solução do ultrafiltrado foi diluída para 3,0 mL com uma solução etanol : água (50:50 v/v) para a análise de UV-vis.

7.3. EXPERIMENTOS DE CINÉTICA DE TROCA DE LIGANTES: RuOlbp(4AP)

Inicialmente foram analisadas as mudanças do pH de três soluções etanol / água do complexo RuOlbp(4AP) à 0,04 mmol.L⁻¹. As soluções variaram na proporção em volume de etanol / água, de acordo com o seguinte: a) EtOH:H₂O 50:50 (v/v); b) EtOH:H₂O 25:75 (v/v); e c) EtOH:H₂O 10:90 (v/v). Para realizar as medidas de pH, foi utilizado medidor de pH DM-20 – Digimed em tempos definidos de 0 a 24h.

Foi verificada a troca dos ligantes piridínicos do complexo por água em meio aquoso (**experimento de aquação**) em três condições experimentais (A, B e C) em que se variava a proporção em volume de etanol e água e a [RuOlbp(4AP)] foi fixada em 0,04 mmol.L⁻¹ para todos os experimentos. **Condição A** (EtOH:H₂O 50:50 (v/v)): foi transferido 400 µL de uma solução etanólica de [RuOlbp(4AP)] 0,32 mmol.L⁻¹ para um tubo falcon, adicionado 1,6 mL de EtOH, e, na sequência, 2,0 mL de água. O tubo foi agitado, a solução transferida para a cubeta, e os espectros eletrônicos começaram a ser registrados imediatamente. **Condição B** (EtOH:H₂O 25:75 (v/v)): foi transferido 400 µL de uma solução etanólica de [RuOlbp(4AP)] 0,32 mmol.L⁻¹ para um tubo falcon, adicionado 600 µL de EtOH, e, na sequência, adicionado 3,0 mL de água. O tubo foi agitado, a solução transferida para a cubeta, e os espectros eletrônicos começaram a ser registrados imediatamente. **Condição C** (EtOH:H₂O 10:90 (v/v)): foi transferido 400 µL de uma solução etanólica de [RuOlbp(4AP)] 0,32 mmol.L⁻¹ para um tubo falcon e adicionado 3,6 mL de água. O tubo foi agitado, a solução transferida para a cubeta, e os espectros foram registrados imediatamente e prosseguiu de acordo com a seguinte programação: medidas com intervalo de 5 min por 1h, e intervalo de 30 min por 23h. A temperatura durante os experimentos foi mantida em 25 °C.

Para verificar a reversibilidade da reação com os ligantes piridínicos depois do experimento de aquação, foi realizado um experimento com a solução de complexo depois de um tempo de aquação adicionando soluções de 4AP (**experimento de complexação**). A proporção de solventes utilizada foi EtOH:H₂O 50:50 (v/v). Inicialmente, foi preparada uma solução estoque de RuOlbp(4AP) 0,40 mmol.L⁻¹ em 5 mL de EtOH. Para preparar a solução RuOlbp(4AP)-aqua, 1,1 mL da solução estoque

foi transferida para um tubo falcon e foi adicionado 1,1 mL de água DI. Essa solução foi incubada por 24h. Para realizar medidas com várias concentrações de 4AP, foi necessário preparar 4 frascos da reação de aquação em diferentes tempos, sendo que cada frasco poderia ser utilizado para dois pontos de concentração de 4AP e a concentração da solução RuOlbp(4AP)-aqua final foi de 0,20 mmol.L⁻¹ em 50% de água. Além disso, foi preparada uma solução de 4AP 20 mmol.L⁻¹ em 50% EtOH/H₂O. As reações foram realizadas com concentrações de 4AP de 4, 6, 7, 8 e 10 mmol.L⁻¹ com o seguinte procedimento: foi colocado 1 mL da solução de RuOlbp(4AP)-aqua de um lado da cubeta *Tandem* e do outro lado a solução de 4AP (0,4, 0,6, 0,7, 0,8 ou 1 mL de acordo com a concentração final de 4, 6, 7, 8, e 10 mmol.L⁻¹, respectivamente) completando o volume de 1 mL com água DI. O espectro foi registrado e, logo após, as soluções foram misturadas agitando-se a cubeta e iniciando os registros de 90 espectros com intervalos de 120 segundos. A temperatura durante os experimentos foi mantida em 25 °C.

II. 8 ENSAIOS BIOLÓGICOS: RuOlbp(4AP)

8.1. CULTURA CELULAR

A linhagem celular utilizada nesse estudo foi a de glioma humano U87MG, obtidas pela ATCC. O meio de cultura utilizado foi o DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, (Gibco) complementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), antibióticos (penicilina e estreptomicina) (Gibco) e bicarbonato de sódio (Synth). Também foram utilizadas soluções de Azul de Trypan (Amresco); 0,1 mol.L⁻¹ de PBS (Phosphate Buffered Saline Solution); 0,025% de tripsina (Gibco) e 0,02% de EDTA (Merck). Os equipamentos utilizados foram Incubadora de CO₂ Memmert (modelo INCO2) e Microscópio Olympus Ix70 - com contraste de fase. As células foram cultivadas em frascos de cultura de poliestireno (75 cm²) em uma mistura de 5 % CO₂ e 95 % de ar umidificado a 37 °C, em meio de cultura DMEM suplementado com FBS e antibióticos, como previamente descrito. A cada 2-3 dias, as células foram movidas para outro frasco de cultura. Para isso, o meio de cultura foi descartado, as células fixas foram lavadas com PBS e então 2 mL de tripsina foi adicionado para desanexar as

células do frasco. Depois de alguns minutos, duas gotas da suspensão de células foram adicionadas a um novo frasco contendo cerca de 10 mL de meio.

8.2. ESTUDOS DE VIABILIDADE CELULAR

As células foram incubadas em placas de 24 poços a uma densidade de 3×10^4 células/poço a 37 °C em 5% CO₂, por 24 h. As soluções dos compostos foram preparadas como segue: 10 mmol L⁻¹ de solução etanólica de RuOlbp(4AP) (solução estoque de complexo 1) foi diluída em etanol para dar uma solução de 1 mmol L⁻¹ (solução estoque de complexo 2). 60 mmol L⁻¹ de solução etanólica de 4AP (solução estoque 4AP 1) foi diluída em etanol para dar uma solução de 6 mmol L⁻¹ (solução estoque 4AP 2). Para o Hlbp foi preparada uma solução estoque a 20 mmol L⁻¹. Depois do período de adesão das células de 24h, o meio biológico foi trocado e a quantidade de meio adicionada foi complementar a quantidade de solução do tratamento para resultar em 500 µL no total. Para o tratamento, foram adicionadas as soluções estoque no meio para se obter a concentração desejada, de forma que não excedesse 5 µL (1 %) de etanol. Depois de 24, 48 e 72h, as células foram lavadas com PBS, colhidas por tripsinização, centrifugadas por 3 min a 1400 rpm e contadas em câmara de Neubauer após troca do meio biológico e adição de azul de trypano. Para os períodos de 48h e 72h, o tratamento foi trocado a cada 24h. Os experimentos foram realizados três vezes.

II. 9 ENSAIOS BIOLÓGICOS: SPLNs

9.1. CULTURA CELULAR

Células de tumor mamário murino EMT6 (obtidas do laboratório do Dr. I. Tannock, Ontario Cancer Institute e mantidas no laboratório da Dr. X.Y. Wu), de tumor mamário humano MDA-MB-231 (American Type Culture Collection (ATCC)) e de câncer de próstata DU145 (ATCC) foram utilizadas e cultivadas de acordo com procedimento padrão de cultura celular, na Universidade de Toronto. As células cresceram em monocamadas em frasco de cultura de poliestireno de 75 cm² contendo meio de cultura (α-MEM com 10 % de FBS e 0,5 % de uma suspensão de penicilina / estreptomicina), em incubadora contendo 5 % CO₂ e 95 % de ar umidificado a 37 °C. A

cada 2-3 dias, as células foram movidas para outro frasco de cultura para evitar um supercrescimento. Para isso, o meio de crescimento é descartado, as células anexadas ao frasco são lavadas com tampão PBS e depois é adicionado cerca de 2-3 mL de uma solução de tripsina 0,05% para soltar as células do frasco. Depois de 5 min na incubadora, duas gotas de células com tripsina são adicionadas a um novo frasco contendo cerca de 10 mL de um novo meio celular.

9.2. ESTUDO DE CAPTAÇÃO CELULAR DAS NANOPARTÍCULAS

DEPENDENTE DO TEMPO

As células foram cultivadas a uma densidade de 3×10^4 células mL⁻¹ em placa de 96 poços contendo meio de cultura a 37 °C, sob atmosfera de 5% CO₂ por 24 h. No dia seguinte, o meio de cada poço foi aspirado e 0,2 mL de meio de cultura contendo NPs com corante fluorescente (1 mg mL⁻¹) foi adicionado. As células foram incubadas por 0,5; 1; 2; 3; 4; 6 e 24 h. Depois de cada tempo, as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS e a fluorescência celular foi medida em um leitor de placa SpectraMAX GeminiXS (Molecular Devices), na Universidade de Toronto, em um comprimento de onda de excitação de 540 nm e fluorescência medida a 630 nm.

DEPENDENTE DA TEMPERATURA

As células foram cultivadas em meio de cultura a uma densidade de 1×10^5 células mL⁻¹ em duas placas de petri e mantidas a 37 °C por 24 h sob atmosfera de 5 % CO₂ por 24 h. No dia seguinte, uma das placas foi colocada a 4°C por 1 h, enquanto que a outra foi mantida a 37 °C. Depois de 1h, o meio de cada placa foi aspirado e 2 mL de um novo meio contendo NPs com corante fluorescente (1 mg mL⁻¹) foi adicionado. As placas foram incubadas novamente a 37 °C ou 4°C por outras 2 h. Depois do tempo requerido, as células foram lavadas duas vezes com PBS, e o núcleo celular foi corado através da incubação das células com 2 mL de meio de cultura contendo o corante Hoechst33342 (0,5 µg mL⁻¹) a 37 °C, por 10 min. As células então foram lavadas duas vezes com meio de cultura, incubadas novamente com novo meio, e, então a captação celular foi observada utilizando microscópio fluorescente EVOS AMG, na Universidade de Toronto. A diferença quantitativa em intensidade de

fluorescência também foi verificada pelo mesmo procedimento em placa de 96 poços descrito para o experimento dependente do tempo. Nesse caso, uma placa com as NPs fluorescentes foi deixada a 4°C por 3 h e a outra a 37°C por 3 h.

ESTUDOS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONFOCAL

As células foram cultivadas em meio de cultura a uma densidade de 1×10^5 células mL⁻¹ em placas de petri pequenas feitas para microscopia confocal e mantidas a 37 °C por 24 h sob atmosfera de 5% CO₂. No dia seguinte, o meio de cada placa foi aspirado e trocado por 2 mL de um novo meio contendo NPs com corante fluorescente (1 mg mL⁻¹) e as células foram incubadas a 37 °C por 2 h. As células então foram lavadas duas vezes com tampão PBS e o núcleo celular foi corado através da incubação das células com 2 mL de meio de cultura contendo o corante Hoechst33342 (0,5 µg mL⁻¹) a 37 °C por 10 min. As células então foram lavadas duas vezes com meio de cultura e finalmente incubadas em novo meio de cultura. A internalização das NPs foi confirmada utilizando microscópio de escaneamento (CLSM) (Zeiss LSM 510) através do registro de imagens Z-stack até 10 µm de profundidade utilizando lente objetiva 40x.

9.3. ESTUDOS DE VIABILIDADE CELULAR

As viabilidades celulares *in vitro* das drogas (Hlbp, HNpx), dos compostos de rutênio (RuAc, Rulbp and RuNpx), das NPs carregadas (Hlbp-SPLNs, Rulbp-SPLNs, HNpx-SPLNs e RuNpx-SPLNs) e a biocompatibilidade das NPs não carregadas (blank-SPLNs) foram determinadas pelo ensaio do MTT em células de tumor de mama murino EMT6, mama humano MDA-MB-231 e de próstata humano DU145. As células foram incubadas a uma densidade de 1×10^4 células/poço em uma placa de 96 poços a 37 °C sob atmosfera de 5% CO₂, por 24 h. Soluções estoque dos compostos foram preparadas como segue: Hlbp ou HNpx, 80 mmol L⁻¹ em solução etanólica diluída para 800 µmol L⁻¹ com meio de cultura contendo PS80 (0,01%); Rulbp ou RuNpx, 20 mmol L⁻¹ em solução etanólica diluída para 200 µmol L⁻¹ com meio de cultura contendo PS80 (0,01%) (1% etanol na solução final), RuAc, 6,7 mmol L⁻¹ em água e diluído em meio de cultura. Suspensões das NPs Hlbp-SPLNs e HNpx-SPLNs a 10,4 mmol L⁻¹ de droga foram diluídas com meio de cultura para 800 µmol L⁻¹ de concentração de droga.

Suspensões das NPs RuIbp-SPLNs e RuNpx-SPLNs a $2,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de droga foram diluídas com meio de cultura para $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de concentração de droga. Suspensões de NPs sem a droga (blank-SPLNs) foram preparadas usando procedimento similar as correspondentes SPLNs carregadas. A solução estoque foi diluída com meio de cultura para concentrações na faixa $1 - 200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para os compostos de Ru ou $4 - 800 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para os fármacos FAINEs. Então, $0,2 \text{ mL}$ das suspensões em meio de cultura foram adicionadas a cada poço e as células foram incubadas por até 48 h . Depois de cada tempo, as células foram lavadas com tampão PBS e $0,1 \text{ mL}$ MTT (1 mg mL^{-1} em meio de cultura) foi adicionado e incubado por mais 4 h . Então, $100 \text{ } \mu\text{L}$ de SDS ($1,2 \text{ g}$ de SDS em 12 mL água DI e $122 \text{ } \mu\text{L}$ HCl (1 mol/L)) foi adicionada a cada poço. Depois de a placa ser incubada a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por uma noite, a absorbância foi medida a 572 nm usando leitor de placa SpectraMAX GeminiXS, na Universidade de Toronto. No tratamento com as drogas livres, foi observado um pouco de precipitação dos complexos que podia interferir na leitura a 572 nm . Para evitar erros, foi utilizado um controle com o complexo sem células e a absorção desses poços foi subtraída. Para as NPs, não foi observada nenhuma precipitação e não foi necessário descontar a absorção do complexo. Para cada concentração de droga e para as NPs, os experimentos foram realizados em pelo menos 3 poços em 3 ensaios independentes. Os experimentos também foram realizados para as NPs não carregadas para avaliar a biocompatibilidade do material.

9.4. ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO E ACUMULAÇÃO NO TUMOR *IN VIVO* E *EX VIVO*

Células de tumor mamário murino EMT6 (2×10^6 células em $30 \text{ } \mu\text{L}$ de meio de cultura) foram injetadas na gordura mamária de ratas de 8-12 semanas de idade do tipo BALB/c (Jakson, Canada). O crescimento do tumor foi medido usando pinças vernier. Todos os experimentos com os animais foram realizados de acordo com as diretrizes e regulação do Comitê de Cuidado Animal na University Health Network. Quando o volume do tumor chegou a $300\text{-}400 \text{ mm}^3$ em cerca de duas ou três semanas da data da implantação do tumor, $200 \text{ } \mu\text{L}$ de SPLNs carregadas com o corante fluorescente ICG foi injetado via veia da cauda. A biodistribuição *in vivo* e captação das SPLNs pelo tumor foram monitoradas de maneira não invasiva por até 24 h utilizando o sistema de imagem Xenogen IVIS Spectrum Imaging System (Caliper Life Sciences Inc.). Durante a

aquisição das imagens, os ratos foram anestesiados com isoflurano. Para todas as imagens, a intensidade de fluorescência foi equalizada para quantificar a distribuição das SPLNs em todo o corpo. Para verificar a acumulação *ex vivo* das SPLNs, os animais foram eutanasiados a 4 h e 24 h depois da injeção das blank-SPLNs via veia da calda. O tumor e demais órgãos (coração, pulmão, fígado, intestino e rins) foram coletados. Imagens fluorescentes *ex vivo* dos órgãos foram registrados e as intensidades de fluorescência medidas em termos de eficiência radiante média através da seleção manual da mesma área em regiões de interesse (ROI).

II. 10 ENSAIOS BIOLÓGICOS: TPLNs

10.1. CULTURA CELULAR

Células de glioma humano U87MG e T98G (American Type Culture Collection (ATCC)) foram utilizadas e cultivadas de acordo com procedimento padrão de cultura celular, no ICB-Universidade de São Paulo. As células cresceram em monocamadas em frasco de cultura de poliestireno de 75 cm² contendo meio de cultura (DMEM com 10 % de FBS e 0,5 % de uma suspensão de penicilina / estreptomicina), em incubadora contendo 5 % CO₂ e 95 % de ar umidificado a 37 °C. A cada 2-3 dias, as células foram movidas para outro frasco de cultura para evitar um supercrescimento. Para isso, o meio de crescimento é descartado, as células anexadas ao frasco são lavadas com tampão PBS e depois é adicionado cerca de 2-3 mL de uma solução de tripsina 0,05% para soltar as células do frasco. Depois de 5 min na incubadora, duas gotas de células com tripsina são adicionadas a um novo frasco contendo cerca de 10 mL de um novo meio celular.

10.2. ESTUDOS DE CAPTAÇÃO CELULAR DAS NANOPARTÍCULAS

DEPENDENTE DO TEMPO

As células foram cultivadas a uma densidade de 3×10^4 células mL⁻¹ em placa de 96 poços contendo meio de cultura a 37 °C, sob atmosfera de 5% CO₂ por 24 h. No dia seguinte, o meio de cada poço foi aspirado e 0,2 mL de meio de cultura contendo NPs com corante fluorescente (1 mg mL⁻¹) foi adicionado. As células foram incubadas

por 0,5; 1; 2; 3; 4; 6 e 24 h. Depois de cada tempo, as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS e a fluorescência celular foi medida em um leitor de placa SpectraMAX GeminiXS (Molecular Devices), na Universidade de Toronto, em um comprimento de onda de excitação de 540 nm e fluorescência medida a 630 nm.

DEPENDENTE DA TEMPERATURA

As células foram cultivadas em meio de cultura a uma densidade de 1×10^5 células mL^{-1} em duas placas de petri e mantidas a 37°C por 24 h sob atmosfera de 5 % CO_2 por 24 h. No dia seguinte, uma das placas foi colocada a 4°C por 1 h, enquanto que a outra foi mantida a 37°C . Depois de 1h, o meio de cada placa foi aspirado e 2 mL de um novo meio contendo NPs com corante fluorescente (1 mg mL^{-1}) foi adicionado. As placas foram incubadas novamente a 37°C ou 4°C por outras 2 h. Depois do tempo requerido, as células foram lavadas duas vezes com PBS, e o núcleo celular foi corado através da incubação das células com 2 mL de meio de cultura contendo o corante Hoechst33342 ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) a 37°C , por 10 min. As células então foram lavadas duas vezes com meio de cultura, incubadas novamente com novo meio, e, então a captação celular foi observada utilizando microscópio fluorescente EVOS AMG, na Universidade de Toronto. A diferença quantitativa em intensidade de fluorescência também foi verificada pelo mesmo procedimento em placa de 96 poços descrito para o experimento dependente do tempo. Para esse experimento, uma placa com as NPs fluorescentes foi deixada a 4°C por 3 h e a outra a 37°C por 3 h.

10.3. ENSAIO DE CAPTAÇÃO CELULAR DE Ru

As células foram incubadas em placas de 24 poços a uma densidade de 1×10^5 células/poço a 37°C em 5% CO_2 , por 24 h. Depois do período de adesão das células de 24h, o meio biológico foi trocado e a quantidade de meio adicionada foi complementar a quantidade de suspensão de Rulbp-TPLNs para 500 μL no total e concentração de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de complexo. Para cada tempo, foram utilizados 4 poços. Depois de cada tempo 1, 4, 8, 24, 48 e 72h, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS e colhidas com 0,3 mL de solução de tripsina. O conteúdo de cada poço de mesmo tempo foi somado (1,2 mL) e a suspensão foi enviada para análise de Ru via ICP-OES. O experimento foi realizado três vezes.

10.4. ESTUDOS DE VIABILIDADE CELULAR

As células foram incubadas em placas de 24 poços a uma densidade de 3×10^4 células/poço a 37°C em 5% CO_2 , por 24 h. As soluções dos compostos foram preparadas como segue: 20 mmol L^{-1} de solução etanólica de Rulbp ou RuNpx foram diluídas em etanol para dar soluções de 10 e 1 mmol L^{-1} . Depois do período de adesão das células de 24h, o meio biológico foi trocado e a quantidade de meio adicionada foi complementar a quantidade de solução do tratamento para $500 \mu\text{L}$ no total. Para o tratamento com os complexos livres, foi adicionada a solução do complexo no meio para se obter a concentração desejada, de forma que não excedesse $5 \mu\text{L}$ (1 %) de etanol. Com o tratamento utilizando as TPLNs, não houve a preocupação com o volume de suspensão adicionado, já que o meio era água. Nesse caso, as TPLNs foram adicionadas a placa após a adição de meio biológico em quantidade tal que resultasse na concentração de droga desejada. Depois de 24, 48 e 72h, as células foram lavadas com PBS, colhidas por tripsinização, centrifugadas por 3 min a 1400 rpm e contadas em câmara de Neubauer após troca do meio biológico e adição de azul de trypano. Para os períodos de 48h e 72h, o tratamento foi trocado a cada 24h. Os experimentos foram realizados três vezes.

II. 11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (SD) para os resultados obtidos em três experimentos independentes, a não ser que seja indicado de outra forma. A análise da significância estatística entre dois grupos foi feita com o teste t de Student e entre três grupos com análise da ANOVA. As diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

III

RESULTADOS:
COMPLEXO $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$

III. 1 SÍNTESE $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$

Produtos do tipo $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4\text{L}_2]\text{X}$, sendo $\text{L} = \sigma$ doador neutro e $\text{X} =$ contra íon, podem ser sintetizados a partir do composto $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4\text{Cl}]$ usando reações de troca de cátion, ou removendo o Cl^- como AgCl e deixando a posição axial aberta para a coordenação do ligante L . Esse processo pode ser representado pela seguinte equação:

Estudos encontrados na literatura com complexos $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4\text{L}_2]\text{PF}_6$ mostraram que não há mudanças significativas no momento magnético do complexo e que o comprimento da ligação Ru-Ru , assim como as transições eletrônicas, sofre pequenas variações, variando o ligante axial L neutro. Foram feitos alguns estudos com ligantes N -doadores e também não se percebeu mudança na degenerescência tão característica dos tetracarboxilatos de dirutênio (II,III) (61).

Nesse trabalho, foi pensado em obter um complexo contendo a estrutura em gaiola dos tetracarboxilatos de rutênio já trabalhados pelo grupo e com a 4-aminopiridina, a fim de serem obtidos compostos de atividade biológica combinada da estrutura em gaiola com o ligante 4AP. Para isso, inicialmente foi sintetizado o complexo $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$ a partir do precursor $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$ em solvente isopropanol em condições estequiométricas de 4AP, esperando-se favorecer a troca de ligantes H_2O por 4AP. É relatado na literatura que as reações dos complexos de dirutênio em gaiola com os ligantes N -doadores podem não resultar no produto esperado, e um excesso de ligante ou um tempo longo de reação podem levar a uma solução de cor púrpura, provavelmente devido a substituição equatorial dos carboxilatos pelos ligantes N -doadores (61). Por isso, nesse estudo, a obtenção do complexo foi favorecida pelo rápido tempo de reação (5 min) e uso de um solvente menos coordenante, como o isopropanol.

III. 2 CARACTERIZAÇÃO $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$

2.1. ANÁLISE ELEMENTAR (CHN)

A análise elementar CHN foi realizada para o complexo $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$ e os resultados das análises e a fórmula proposta estão na Tabela 2.

Tabela 2: Análise de CHN para o $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$ – resultado experimental e calculado.

Fórmula proposta	% C Exp	% C Calc	% H Exp	% H Calc	% N Exp	% N Calc
$[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	26,50	26,77	3,28	3,49	6,34	6,94

Ao comparar os resultados com a fórmula proposta na Tabela 2 para o complexo $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$, verifica-se que as posições axiais do complexo precursor em gaiola $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$, que eram ocupadas por duas moléculas de H_2O , foram trocadas por 2 moléculas de 4AP. Além disso, a porcentagem de CHN é coerente com 2 moléculas de água de hidratação na estrutura do complexo. Esse fato será discutido adiante na análise de termogravimetria. Com base nos resultados obtidos, pode-se propor a estrutura do complexo, como mostrado na Figura 13.

Figura 13: Estrutura sugerida para o complexo $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]^+$.

2.2. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO (ATR)

O espectro vibracional do composto $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$ pode ser visto na Figura 14 em comparação com o espectro da 4-aminopiridina e do complexo precursor $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$.

Figura 14: Espectro vibracional comparativo $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$ e 4AP.

O espectro FTIR dos tetracarboxilatos de rutênio é caracterizado principalmente pelas bandas que representam os estiramentos simétricos e antissimétricos dos carboxilatos. O $\nu_s(\text{CO}_2)$ usualmente ocorre na faixa $1330 - 1460 \text{ cm}^{-1}$ e o $\nu_a(\text{CO}_2)$ de $1440 - 1650 \text{ cm}^{-1}$. A menor separação ($\nu_a - \nu_s$) na maioria desses complexos sugere coordenação em ponte simétrica dos grupos carboxílicos (42). No espectro FTIR do complexo precursor $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$ são encontradas as bandas em 1460 e 1425 cm^{-1} , que são características, respectivamente, dos modos vibracionais de estiramentos anti-simétrico (ν_a) e simétrico (ν_s) do grupo COO^- do ligante acetato. A diferença $\Delta\nu = (\nu_a - \nu_s) = 1460 - 1425 = 35 \text{ cm}^{-1}$ é bem menor do que a diferença para o acetato iônico, o que indica característica de um complexo que apresenta ligantes carboxilatos em ponte. A banda em 638 cm^{-1} é atribuída ao bending do grupo O-C-O e ela é encontrada na literatura (95) em 646 cm^{-1} . A banda intensa em 844 cm^{-1} é característica do estiramento do grupo PF_6^- no complexo.

No espectro FTIR do complexo novo sintetizado $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$ é verificada a presença das bandas referentes aos estiramentos anti-simétrico (ν_a) e simétrico (ν_s) do grupo COO^- do ligante acetato em 1441 e 1399 cm^{-1} . Nesse caso a diferença $\Delta\nu = (\nu_a - \nu_s) = 1441 - 1399 = 42 \text{ cm}^{-1}$ pode dar indícios da manutenção dos acetatos nas posições equatoriais ligados ao centro dimetálico e as moléculas de 4AP ocupando as posições axiais. Em relação as bandas da 4-aminopiridina, percebe-se que a banda em 991 cm^{-1} da 4AP livre aparece deslocada no complexo em 1012 cm^{-1} . Essa é uma banda característica da 4-aminopiridina coordenada, já que não aparece no FTIR do precursor $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$. Na literatura, há indicação de que esse deslocamento de banda indica que o metal foi coordenado a partir do N aromático (96). Essa banda é muito sensível a coordenação da piridina pelo anel aromático. O deslocamento da banda por volta de 1508 cm^{-1} da 4AP para 1518 cm^{-1} no complexo, também concorda com o observado na literatura (97). Essa banda refere-se ao estiramento do anel piridínico, mas é sensível a coordenação da molécula. A banda intensa em 844 cm^{-1} é característica do estiramento do grupo PF_6^- no complexo, indicando que a presença do grupo PF_6^- como contra-íon.

2.3. ESPECTROMETRIA DE MASSAS (ESI-MS)

Na Figura 15 e na Figura 16 podem ser vistos os espectros simulado e experimental para o composto $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$. A Figura 15 mostra os espectros experimental e simulado referente fragmento contendo uma molécula de 4AP de fórmula molecular $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_1]^+$. No espectro, aparece o padrão isotópico de rutênio e percebe-se que o espectro simulado é muito semelhante ao experimental, o que confirma o fragmento sugerido. Na Figura 16 é mostrado o espectro referente fragmento $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4]^+$ em que ambas as moléculas de 4AP estão ausentes. O pico da figura refere-se ao fragmento do complexo de rutênio e acetato sem nenhum ligante axial, sugerindo que na espectrometria de massas o complexo inicialmente perde os ligantes de 4AP para depois sofrer uma maior fragmentação e perder a estrutura. Na análise do espectro, não foi observado o pico máximo do m/z referente ao fragmento contendo as duas moléculas de 4AP. Como será discutido adiante nas análises de espectroscopia eletrônica em solução, provavelmente esse composto não conseguiria

manter as duas moléculas de 4AP ligadas pela posição axial quando dissolvido, o que seria ainda mais difícil nas condições da espectrometria de massas.

Figura 15: Espectro de massas ESI-MS⁺ do $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$, fragmento de pico máximo em m/z 532,9154.

Figura 16: Espectro de massas ESI-MS⁺ do $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$, fragmento de pico máximo em m/z 438,8626.

2.4. ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA UV-vis (solução)

Nos espectros eletrônicos de absorção para os complexos de dirutênio em gaiola é esperada uma banda intensa na região do visível na faixa de 425-480 nm que indica a interação do centro dimetálico com os ligantes carboxilatos da estrutura em gaiola e refere-se a transição $\pi(\text{Ru-O}, \text{Ru}_2) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$. Outra banda característica, mas menos intensa para esses compostos, aparece na região do infravermelho próximo na faixa de 960-1100 nm e é atribuída a transição $\delta(\text{Ru}_2) \rightarrow \delta^*(\text{Ru}_2)$ (42).

O espectro eletrônico em solução de diclorometano do complexo $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$ é mostrado na Figura 17, onde pode ser observado um ombro em 425 nm indicando que, mesmo com a troca de ligantes axiais, ainda há um centro dimetálico que interage com os carboxilatos e que a estrutura em gaiola do complexo foi mantida. O espectro do complexo precursor $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$ na Figura 18 também mostra a banda característica da transição $\pi(\text{Ru-O}, \text{Ru}_2) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$ em 425 nm. Estudos indicam que essa banda é afetada principalmente pela natureza do ligante equatorial (a basicidade π) e muito pouco por diferentes ligantes axiais (61). Assim, a energia dos orbitais π^* e δ^* não é alterada com a substituição das moléculas do ligante H_2O no precursor por bases de Lewis, como a 4AP, na síntese do complexo $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$. Ao registrar o espectro do composto em outros solventes, como água, metanol e etanol, a banda na região 425-480 nm não foi observada. Isso pode indicar que nesses solventes a degradação do complexo pode ocorrer e a estrutura em gaiola do complexo não é mantida. Foi observado também um ombro em 550 nm em todos os solventes testados, o que pode dar indícios da formação de complexos com pontes μ -oxo, que possuem bandas características nessa região.

Figura 17: Espectro eletrônico $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$ em diclorometano a $0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Figura 18: Espectro eletrônico do complexo precursor $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$ em água.

No espectro em diclorometano da Figura 17 observam-se duas bandas em comprimentos de onda na região do visível, em 315 e 371 nm. Na literatura foi encontrado um estudo para um complexo em gaiola com ligantes axiais piridínicos de fórmula $[\text{Ru}_2(\mu\text{O}_2\text{CC}_6\text{H}_{11})_4(\text{py})_2]\text{BF}_4$ em que os espectros eletrônicos mostraram bandas em 300 e 352 nm, onde o atribui a transições envolvendo o ligante nitrogenado na posição axial e o centro dimetálico (98). Essas transições seriam de natureza π (ligante

axial) $\rightarrow \pi^*$ (Ru_2) e as bandas encontradas para o complexo $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$ nessa região podem ser referentes a transições envolvendo a 4AP e o centro dimetálico. O espectro eletrônico do complexo com acetato e 4AP no estado sólido (Figura 19), embora esteja no limite do registro do equipamento na região do visível, mostra também uma banda na região de 1100 nm no infravermelho próximo, que pode ser atribuída à transição δ (Ru_2) $\rightarrow \delta^*$ (Ru_2), conforme reportado na literatura (44). Percebe-se também um ombro na região de 600 nm que pode ser atribuído a possíveis transições ($\delta \rightarrow \pi^*$; δ^* , $\pi^* \rightarrow \sigma^*$ (Ru_2 e/ou Ru-L)) (99).

Figura 19: Espectro eletrônico do complexo $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$ no estado sólido.

2.5. ANÁLISE TÉRMICA (TG/DTG/DSC)

A curva de análise térmica do composto $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$ da Figura 20 foi feita não só para obter informações acerca da estabilidade térmica do complexo, mas também para confirmar a estequiometria proposta na análise elementar em relação as moléculas de H_2O de hidratação.

Figura 20: Curvas TG (linha azul), DTG (linha verde) e DSC (linha vermelha) para o composto $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$ obtidas em atmosfera de ar sintético e aquecimento até 1000 °C.

Analisando a Figura 20, percebe-se que há apenas um grande evento de perda de massa que inicia em cerca de 230°C, mas, no entanto, antes desse evento houve uma pequena perda de massa de cerca de 3,4% que iniciou em cerca de 150°C. Essa pequena perda de massa pode ser referente a moléculas de água de hidratação que estariam presentes no composto. Além disso, na fórmula molecular sugerida a partir das análises de CHN (Tabela 2), $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, a massa das duas moléculas de água de hidratação refere-se a cerca de 4% da massa do composto, o que é coerente com os 3,44% obtidos até 225°C. A curva mostra que durante a decomposição térmica há uma perda total de 65 % em massa do composto inicial. Estudos de decomposição térmica dos complexos de rutênio em gaiola mostram que,

em geral, há a oxidação do rutênio e formação de RuO_2 (93) como resíduo resultante. Para o $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$, a porcentagem em massa residual de 35 % corresponde a formação de 2 mol de RuO_2 para cada 1 mol do complexo, completando uma massa residual de 33,0 %. A curva mostra que o composto perde sua estabilidade em cerca de 225°C , pois é onde a maior perda de massa se inicia. De fato, um grande pico exotérmico é registrado pela curva DSC a $277,1^\circ\text{C}$ acompanhado de um pico na curva DTG que registra uma maior perda de massa a $271,9^\circ\text{C}$. Na literatura, é encontrado poucos estudos de análise térmica para os tetracarboxilatos de dirutênio, mas estudos sugerem que, em geral, apenas um evento seja observado devido à quebra da gaiola e decomposição dos ligantes. Um trabalho do grupo para o precursor $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$ mostra que a sua decomposição ocorre a cerca de 260°C (93). Com o complexo $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$, a estabilidade térmica é um pouco menor (decomposição em 225°C) e pode estar relacionada a uma maior facilidade da eliminação das moléculas de 4AP das posições axiais em relação as moléculas de H_2O no precursor, deixando o centro dimetálico mais susceptível para romper as ligações equatoriais e decompor-se termicamente.

III. 3 CONCLUSÃO

Os resultados mostrados nesse capítulo mostraram que na síntese realizada foi possível obter um complexo de rutênio e acetato com 4-aminopiridina, $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$, mantendo-se a estrutura em gaiola do complexo. Os estudos indicaram que as moléculas de 4AP substituíram as moléculas de H_2O do precursor $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$, sendo confirmado pelas técnicas de análise elementar e espectroscopias FTIR e UV-vis. Entretanto, o complexo mostrou uma certa instabilidade da estrutura em solução, discutido a partir dos espectros UV-vis e espectrometria de massas, principalmente em solventes próticos. O composto formado também possui estabilidade térmica ligeiramente menor, quando comparado com os outros complexos em gaiola já estudados pelo grupo. Por causa da baixa estabilidade em solução, não foram realizados estudos de aplicação, como, por exemplo, de atividade biológica.

IV

RESULTADOS: COMPLEXO $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{lbp})_2(4\text{AP})_6]\text{Cl}_2$

IV. 1 SÍNTESE $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{lbp})_2(4\text{AP})_6]\text{Cl}_2$

Inicialmente, o objetivo era obter complexos em gaiola contendo FAINes nas posições equatoriais e moléculas de 4-aminopiridina nas posições axiais para potencializar a atividade biológica dos complexos de rutênio-FAINes já estudados pelo grupo. A síntese foi pensada para ser feita da mesma maneira que a síntese do complexo $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$, partindo, entretanto, dos complexos $[\text{Ru}_2(\text{lbp})_4\text{Cl}]$ e $[\text{Ru}_2(\text{Npx})_4\text{Cl}]$. A síntese do complexo $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$ descrita no capítulo III foi realizada em isopropanol, em condições estequiométricas, e com a precipitação de um produto marrom-alaranjado sendo que as caracterizações realizadas confirmaram a estrutura do composto. Reações de ligantes axiais N-doadores com complexos onde o ligante carboxilato equatorial seja diferente do acetato, não é comum de se encontrar na literatura. É relatada, por exemplo, a síntese do complexo $[\text{Ru}_2(\mu\text{-O}_2\text{CC}_6\text{H}_4\text{-p-OMe})_4(2\text{-mimH})_2]\text{ClO}_4$, onde 2-mimH = 2-metilimidazol, mas também é discutido na literatura que as reações dos complexos em gaiola com ligantes N-doadores podem não resultar no produto esperado. Um excesso de ligante ou um tempo longo de reação levam a uma solução de cor púrpura, provavelmente devido a substituição equatorial dos carboxilatos pelos ligantes N-doadores (61), o que também poderia levar a formação de espécies com pontes μ -oxo.

Foram realizadas várias tentativas de síntese com o complexo $[\text{Ru}_2(\text{lbp})_4\text{Cl}]$ e o ligante 4-aminopiridina. A maioria das sínteses foi realizada em isopropanol e foi percebido a mudança de coloração na solução de marrom claro para marrom escuro quando se adicionava a 4AP. No entanto, não ocorria a precipitação do complexo e, pouco tempo depois, a mistura adquiria uma coloração púrpura e depois preta. Nos vários solventes testados, houve a formação de misturas com cores diferentes de acordo com o solvente utilizado na síntese: metanol – verde; etanol – verde azulado; diclorometano – azul; acetonitrila – roxo; isopropanol – marrom). Essas misturas foram submetidas a cromatografia (TLC – alumina) apresentando manchas com as seguintes cores nas placas: marrom, amarelo e azul, na reação em metanol; marrom e azul, na reação em etanol; rosa, lilás e azul, na reação em diclorometano; lilás e azul na reação em acetonitrila; e lilás, laranja, roxo e azul, na reação em isopropanol. Como já é conhecido que os complexos de rutênio com estruturas em gaiola são, em geral, marrons, e que complexos de rutênio com ligantes nitrogenados do tipo μ -oxo são, em

geral, azuis, decidiu-se investir no estudo da mistura formada em etanol, sua separação cromatográfica e caracterização. Na cromatografia em coluna da mistura obtida a partir da reação do RuIbp com a 4AP, o complexo azul foi chamado de RuOIbp(4AP) e este foi eluído por último (na foto da Figura 21 ele encontra-se no topo da coluna).

Figura 21: Cromatografia do complexo RuOIbp(4AP).

O composto azul RuOIbp(4AP) foi investigado acreditando-se ser um complexo com um centro dimetálico Ru-O-Ru, com uma ponte do tipo μ -oxo. Acredita-se que o complexo marrom RuOIbp(4AP)_marrom eluído primeiro na coluna seja um complexo intermediário entre o complexo gaiola e o μ -oxo porque, depois de isolado, com a adição de 4AP e pequeno aquecimento, a solução marrom fica verde e, se submetida a cromatografia, dá origem a um composto amarelo e um azul. Desse modo, acredita-se que os complexos com FAINES não são estáveis com a 4AP na posição axial e, por isso, sofrem um rearranjo para formar um complexo do tipo μ -oxo. Esse rearranjo já foi relatado na literatura para o complexo em gaiola $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4\text{Cl}]$ que frente a uma base π doadora, como o imidazol, e solvente metanol, forma um composto do tipo μ -oxo de fórmula $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{Ac})_2(\text{Imidazol})_6](\text{PF}_6)_2$ (62). Nessas reações de um complexo em gaiola para um μ -oxo, ocorre uma oxidação do centro $\text{Ru}_2(\text{II},\text{III})$ para um centro $\text{Ru}_2(\text{III},\text{III})$. Um esquema geral do rearranjo da estrutura genérica de um complexo $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4]^+$ para

um do tipo μ -oxo $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{O}_2\text{CR})_2(\text{L})_6]^{2+}$ frente a um ligante nitrogenado L, pode ser visto na Figura 22.

Figura 22: Reação onde há rearranjo de um complexo $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4]^+$ para um complexo $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{O}_2\text{CR})_2(\text{L})_6]^{2+}$ (62).

Em suma, só foi possível obter o complexo em gaiola com acetato e 4AP, relatado no capítulo III devido a precipitação do composto em um tempo rápido de reação (5 min) e, provavelmente, devido ao uso de um solvente menos coordenante, como o isopropanol. Já no caso dos complexos com FAINes, possivelmente o impedimento estérico tenha uma contribuição importante na desestabilização da estrutura em gaiola do complexo. A princípio, foram realizadas as sínteses a partir dos complexos RuIbp e RuNpx com a 4AP, e os resultados obtidos foram muito semelhantes para ambos os complexos. Os estudos de caracterização mostraram que foram obtidos complexos com ponte μ -oxo como os da Figura 22, sendo eles complexos Ru(III,III) de unidades $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{Ibp})_2(4\text{AP})_6]^{2+}$ e $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{Npx})_2(4\text{AP})_6]^{2+}$. As espectroscopias e análises elementares, no entanto, mostraram que havia um problema de contra-íon na síntese, já que aparecia tanto o PF_6^- , como o Cl^- nos resultados e era difícil determinar a fórmula do composto e pureza devido a mistura de contra-íons. O complexo formado nos primeiros procedimentos de síntese tinha PF_6^- como contra-íon e discutiu-se muito a presença de um Cl^- em uma mistura de contra-íons. Isso dificultou o ajuste da fórmula molecular para garantir a pureza do complexo, já que a proporção entre Cl^- e PF_6^- não necessariamente seria de números inteiros e uniformes no material. A síntese que era realizada, a princípio, ocorria pelo tempo de 24h à temperatura ambiente. Várias tentativas para melhorar o processo de síntese e purificação foram

realizadas para chegar no procedimento descrito aqui. Para isso, resolveu-se insistir na síntese do complexo apenas com o ibuprofeno dado a dificuldade do sistema e os melhores resultados já obtidos para o RuIbp pelo grupo, em relação ao RuNpx. A síntese foi definida então para ser realizada em aquecimento com refluxo por 2h. Além disso, foi adicionada uma etapa de lavagem com hexano para remover impurezas apolares, como o ibuprofeno. A síntese atual, entretanto, parece favorecer um complexo formado apenas com o Cl^- , o que é evidenciado adiante nas análises elementares para o composto, ausência das bandas de PF_6^- , e porcentagem de Cl^- . Acredita-se que o aquecimento utilizado nesse procedimento junto com o menor tempo de reação, favorece a permanência dos dois íons Cl^- na estrutura, e o PF_6^- tem apenas um papel aglutinador para auxiliar na precipitação da mistura. Pode-se pensar também, que o PF_6^- auxilia na precipitação de outros compostos na mistura e no momento da adição da solução aquosa de PF_6^- , a precipitação dos outros compostos favoreça a formação de precipitados maiores para a filtração, e, por isso, foi importante manter o NH_4PF_6 no procedimento de síntese.

IV. 2 CARACTERIZAÇÃO $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{Ibp})_2(4\text{AP})_6]\text{Cl}_2$

2.1. ANÁLISE ELEMENTAR (CHN, Cl, P e Ru)

As análises elementares de CHN e ICP-OES de Ru foram realizadas para determinar a composição e pureza do complexo. As análises de cloreto e fósforo serviram para a determinação dos contra íons presentes. Os resultados das análises e calculado para a fórmula propostas estão na Tabela 3.

Tabela 3: Valores experimentais e calculados das análises elementares de CHN, Cl, P e Ru.

Fórmula proposta	% C		% H		% N		% Cl		% P		% Ru	
	Exp	Calc	Exp	Calc	Exp	Calc	Exp	Calc	Exp	Calc	Exp	Calc
$[\text{Ru}_2\text{O}(\text{Ibp})_2(4\text{AP})_6]\text{Cl}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	50,6	51,0	5,4	5,7	12,4	12,7	6,0	5,4	0,0	0,0	16,0	15,4

Os resultados da análise elementar da Tabela 2 são coerentes com a fórmula de um complexo contendo 2 ligantes ibuprofenatos do complexo precursor, 6 ligantes nitrogenados 4AP, uma ponte μ -oxo, dois Cl^- como contra-íons e 3 moléculas de H_2O de hidratação. A ausência de P mostra que o PF_6^- utilizado na síntese não ficou como

contra-íon ou de alguma outra forma retido na estrutura do complexo. O cloreto, então, é o único contra íon presente, o que é confirmado pela alta porcentagem de Cl^- encontrada. Além disso, na literatura, foram encontrados alguns exemplos onde há afinidade entre hidrogênio ligados a anel de bipyridina com o Cl^- e ainda contendo o PF_6^- como contra-íon. Um primeiro exemplo, é um complexo mononuclear de rutênio (II) e bipyridina com Cl^- e PF_6^- sendo contra-íons do complexo; outro exemplo é um complexo de irídio com bipyridina, onde o autor sugere uma ligação do tipo eletrostática entre o H do anel e o Cl^- (100) (57). O que ocorre, é que o nitrogênio piridínico tem uma alta basicidade (pK_a 4-aminopiridina = 9) e com a coordenação e efeito indutivo, pode-se aumentar a carga parcial positiva dos hidrogênios do anel, fazendo com que eles tenham afinidade pelo Cl^- e sejam fracamente ligados a ele. Devido à grande quantidade de grupos NH_2 presentes na molécula, é muito provável que os ligantes possam se associar a moléculas de H_2O via ligações de hidrogênio nas etapas de precipitação com água. Ao comparar os resultados com a fórmula proposta na Tabela 3, verifica-se que as porcentagens experimentais correspondem às calculadas contendo apenas o Cl^- como contra íon e 3 moléculas de H_2O de hidratação, sendo portanto coerente a fórmula molecular proposta $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{Ibp})_2(4\text{AP})_6]\text{Cl}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$. A estrutura sugerida para o complexo sem os contra-íons é mostrada na Figura 23.

Figura 23: Estrutura sugerida para o complexo $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{Ibp})_2(4\text{AP})_6]\text{Cl}_2$, sendo R os complementos da estrutura do fármaco ibuprofeno.

2.2. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO

O espectro vibracional do composto $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{Ibp})_2(4\text{AP})_6]\text{Cl}_2$, $\text{RuOIbp}(4\text{AP})$, pode ser visto na Figura 24 em comparação com o espectro da 4-aminopiridina e do complexo precursor RuIbp .

Figura 24: Espectro vibracional comparativo – $\text{RuOIbp}(4\text{AP})$, RuIbp e 4-aminopiridina.

No espectro vibracional do complexo do tipo μ -oxo, $\text{RuOIbp}(4\text{AP})$, são verificadas as bandas referentes aos estiramentos anti-simétrico (ν_a) e simétrico (ν_s) do grupo COO^- em 1455 e 1398 cm^{-1} , do ligante ibuprofenato. Nesse caso, a diferença $\Delta\nu = \nu_a - \nu_s = 57$ também é característica de um complexo que apresenta ligantes carboxilatos em ponte. Essas bandas referentes a carboxilatos ligados em ponte também estão presentes no complexo precursor RuIbp em 1462 e 1408 cm^{-1} . Nos espectros dos complexos também é verificada a ausência da banda característica da carbonila do HIbp em 1722 cm^{-1} indicando que não há ibuprofeno livre. Em relação as bandas da 4AP, percebe-se que a banda em 991 cm^{-1} da 4-aminopiridina livre aparece deslocada para 1018 cm^{-1} no complexo com ibuprofeno. Essa é uma banda característica da 4-aminopiridina coordenada e muito sensível a coordenação da piridina pelo anel aromático. Na literatura, há a indicação de que esse deslocamento de banda mostra

que o metal foi coordenado ao N aromático (96). O deslocamento da banda por volta de 1508 cm^{-1} da 4AP para 1515 cm^{-1} no complexo, também concorda com o observado na literatura (97). Essa banda refere-se ao estiramento do anel piridinico, mas é sensível a coordenação da molécula. Não foi observada a banda em 840 cm^{-1} , característica do estiramento do grupo PF_6^- no $\text{RuO}(\text{lbp})(4\text{AP})$, o que confirma a ideia de que o NH_4PF_6 utilizado na síntese serviu apenas como um facilitador da precipitação do complexo, não sendo, portanto, um contra-íon.

2.3. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os espectros de massas experimental e simulado para o complexo $\text{RuO}(\text{lbp})(4\text{AP})$ podem ser vistos na Figura 25, Figura 26, Figura 27 e Figura 28.

Figura 25: Espectro de massas experimental e simulado do $\text{RuO}(\text{lbp})(4\text{AP})$, pico $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{lbp})_2(4\text{AP})_6]^{2+}$.

Pico $[Ru_2O(lbp)_2(4AP)_5]^{2+}$
EXPERIMENTAL

Pico $[Ru_2O(lbp)_2(4AP)_5]^{2+}$
SIMULADO

Figura 26: Espectro de massas experimental e simulado do $RuO(lbp)(4AP)$, pico $[Ru_2O(lbp)_2(4AP)_5]^{2+}$.

Pico $[Ru_2O(lbp)_2(4AP)_4]^{2+}$
EXPERIMENTAL

Pico $[Ru_2O(lbp)_2(4AP)_4]^{2+}$
SIMULADO

Figura 27: Espectro de massas experimental e simulado do $RuO(lbp)(4AP)$, pico $[Ru_2O(lbp)_2(4AP)_4]^{2+}$.

Figura 28: Espectro de massas experimental e simulado do $RuOibp(4AP)$, pico $[Ru_2O(ibp)_2(4AP)_3]^{2+}$.

Na Figura 25, Figura 26, Figura 27 e Figura 28 são mostrados os espectros experimental e simulado referentes aos fragmentos sem a presença de ambos os contra-íons Cl^- , e, portanto, com carga $2+$. O padrão espectral é condizente com a distribuição isotópica do rutênio, assim como a diferença de valores entre os picos confirma que os fragmentos possuem carga $2+$. No espectro experimental, os picos condizentes com carga $1+$ são de baixa intensidade o que mostra que na ionização provocada pela técnica de eletrospray os dois íons Cl^- são removidos com facilidade do complexo. Além disso, o espectro simulado da Figura 25 é muito próximo do espectro experimental, confirmando, portanto, a estrutura do complexo como sendo constituído de dois ibuprofenos, seis 4-aminopiridinas, dois rutênios e um oxigênio (ponte μ -oxo). Os demais espectros mostram a saída gradual da 4-aminopiridina. Os fragmentos com 5 e 4 ligantes 4AP (Figura 26 e Figura 27) condizem com os simulados e possuem a mesma intensidade. Esses dados podem indicar que a fragmentação do composto inicia com a perda de 2 moléculas de 4AP subsequentes. É mostrado também um fragmento com 3 ligantes 4AP que também condiz com o espectro experimental, cuja intensidade é 5 vezes maior que a dos espectros anteriores. A análise do espectro de massas do composto demonstra também que os ligantes ibuprofenatos são mais fortemente ligados ao centro dimetálico do que os ligantes de 4-aminopiridina, já que

não foram encontradas espécies sem os ibuprofenos contendo o centro e as moléculas de 4-aminopiridina.

2.4. ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA UV-vis (solução)

Os complexos do tipo μ -oxo não possuem uma ligação direta metal-metal devido a ponte com o oxigênio. Por isso, para a estrutura eletrônica desses complexos, é importante considerar os orbitais do metal com simetria apropriada para interagirem com os orbitais do oxigênio. Nesse caso, os orbitais d do metal seriam os dxz , dyz e dxy que formam orbitais π em combinação com os orbitais px e py do oxigênio. Um diagrama da ligação Ru-O-Ru pode ser visto na Figura 29. Nas interações Ru($d\pi$)-(μ -O $p\pi$)-Ru($d\pi$) são formados dois orbitais ligantes π^b , sendo um paralelo π_1^b e um perpendicular π_2^b ao plano de ligação Ru-O-Ru. É formado também dois orbitais não ligantes π^n , e dois orbitais antiligantes π^* . Com o centro dimetálico composto de íons Ru(III), o orbital π^* paralelo fica vazio (57). Para esses complexos, espera-se uma banda intensa ao redor de 600 nm atribuída a uma transição do orbital π^b para o orbital π^* desocupado, sendo, portanto, uma transição própria da interação do centro metálico com o oxigênio em ponte própria desses complexos. Também é esperado bandas intensas na região de 300 nm referentes a transição de carga metal-ligante do orbital Ru($d\pi$) para os orbitais π^* do ligante piridínico. Em comprimentos de onda menores do que 300 nm também são esperadas bandas intensas referentes a interações π - π^* internas do ligante piridínico (101). Os espectros eletrônicos de absorção para o complexo RuOibp(4AP) foram registrados em etanol e acetonitrila (Figura 30) e no estado sólido (Figura 31).

Figura 29: Diagrama de orbitais moleculares para a ligação Ru-O-Ru (57).

Figura 30: Espectro eletrônico RuOlbp(4AP) em a) etanol e b) acetonitrila

Figura 31: Espectro eletrônico RuOlbp(4AP) sólido

Os espectros apresentados na Figura 30 não mostram a banda característica dos tetracarboxilatos de rutênio com núcleo $\text{Ru}_2(\text{II,III})$ em cerca de 430 nm. A ausência dessa banda confirma o que já era esperado pela coloração azul do complexo, que indicava que a estrutura em gaiola não foi mantida. Estudos na síntese de complexos com pontes do tipo μ -oxo entre os átomos de rutênio mostram o mesmo perfil de espectro visto nessas figuras. Um complexo de $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{Ac})_2(\text{py})_6](\text{PF}_6)_2$ mostrou bandas em 584 nm, 322 nm e 242 nm (102). Considerando que os ligantes carboxilatos são diferentes, assim como o ligante piridínico, é razoável considerar a semelhança do perfil espectral. A banda de menor energia em 590 nm na Figura 30 em ambos os solventes pode ser atribuída a transição do orbital $d\pi$ do metal para o orbital $p\pi$ do oxigênio da ponte Ru-O-Ru (57). Além disso, não se percebeu um deslocamento significativo de bandas no espectro em acetonitrila em relação ao espectro em etanol porque possivelmente a solubilidade do complexo não envolve coordenação dos solventes. As bandas de maior energia desses espectros estão relatadas na literatura como sendo de transferência de carga metal-ligante (bandas entre 300 e 400 nm) e de transferência interna do ligante (abaixo de 300 nm). O espectro eletrônico no estado sólido da Figura 31, mostra a banda referente a transição do orbital $d\pi$ do metal para o orbital $p\pi$ do oxigênio da ponte Ru-O-Ru um pouco deslocada para um maior comprimento de onda, em relação aos espectros em solução (Figura 30). Além disso, observa-se a banda ao redor de 230 referente a transições do ligante. As demais bandas são de menor intensidade e não foram atribuídas para complexos do tipo μ -oxo encontrados na literatura.

2.5. ESTUDOS DE CONDUTIVIDADE

Os estudos de condutividade foram realizados para o complexo do tipo μ -oxo a fim de se elucidar a estrutura e carga do complexo. Pelos estudos encontrados na literatura de complexos dinucleares de rutênio com ponte μ -oxo obtidos a partir da gaiola, sabe-se que na reação o núcleo ($\text{II } \frac{1}{2}; \text{II } \frac{1}{2}$) é oxidado para (III,III) e 2 ligantes carboxilatos são substituídos por ligantes piridínicos, conforme a Figura 22. Nesse caso, o complexo teria carga $2+$, sendo eletrólito 1:2 em solução. As medidas de condutividade molar para complexos do tipo μ -oxo de dirutênio em acetonitrila encontradas na literatura mostram valores baixos, como $180 \text{ S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$, como

também valores altos em cerca de $300 \text{ S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$ (103). A média de valores geralmente classificados como eletrólitos 1:2 em acetonitrila encontra-se na faixa 220-300 $\text{S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$ (103). Para o RuOlbp(4AP) o valor de condutividade obtido foi 218 $\text{S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$ e pode-se considerar coerente com um eletrólito 1:2, como proposto.

2.6. ANÁLISE TÉRMICA TGA/DTG

A curva da análise térmica do composto RuOlbp(4AP) da Figura 32 foi feita para obter informações acerca da estabilidade térmica do complexo e também para confirmar a estequiometria proposta na análise elementar em relação as moléculas de H_2O de hidratação.

Figura 32: Curvas TG (linha preta) e DTG (linha azul) para o composto RuOlbp(4AP) obtidas em atmosfera de ar sintético e aquecimento até 1000 °C.

Analisando a curva da Figura 32, observa-se uma perda de 4% de massa entre 25 e 160 °C que pode ser referente a perda de 3 moléculas de água de hidratação no composto (calculado 4,1 %). Há uma segunda perda de massa de cerca de 24 % que corresponde ao evento mostrado na DTG á 207°C e que pode estar associada aos

ligantes ibuprofenatos. Os dois ligantes lbp⁻ presentes no complexo correspondem a cerca de 30 % em massa e os estudos para o complexo precursor mostraram que a dissociação e degradação desses ligantes ocorrem nessa faixa de temperatura (56). Durante a decomposição térmica há uma perda total de 80 % do composto inicial em massa. A massa final (20 %) corresponde a formação de RuO₂ como resíduo térmico (2 mol, calculado 20,2 %). Da análise termogravimétrica, pode-se perceber que o composto se decompõe majoritariamente por um grande evento de perda de massa que inicia em cerca de 270°C, com a curva DTG mostrando a máxima perda em 399 °C. Resultados anteriores para o complexo precursor RuIbp indicam uma maior perda de massa na faixa de 200-330 °C (56) e comparando com o resultado da DTG para o composto RuOIbp(4AP) em 399 °C, pode-se perceber um grande ganho de estabilidade térmica para o complexo. Esse fato pode ser explicado pela grande basicidade dos ligantes de 4AP, como já relatado na literatura. Estudos comparando complexos com diversos ligantes piridínicos mostraram que quanto maior a basicidade do ligante, maior a estabilidade térmica do complexo devido a ligações σ mais fortes entre o ligante e o metal. Um oxovanádio com o ligante 4-aminopiridina, cujo pK_b é 4,88 tem uma temperatura de decomposição máxima a 212,9 °C, enquanto que um complexo análogo com piridina não substituída, pK_b 8,87, tem essa temperatura a 108,2 °C (104). Desse modo, pode-se dizer que os 6 ligantes de 4-aminopiridina devem estar conferindo grande estabilidade térmica ao complexo.

2.7. SUSCEPTIBILIDADE MAGNÉTICA

O comportamento magnético do RuIbp(4AP) foi verificado a partir dos valores das massas obtidas na balança na ausência e presença de campo magnético e os dados obtidos a partir disso encontram-se na Tabela 4. Como pode ser visto, o valor de susceptibilidade magnética molar KM é negativo. Sabe-se que quando a susceptibilidade magnética é negativa o composto é considerado diamagnético, e, por isso, não há o que medir de momento magnético e elétrons desemparelhados. Esse resultado confirma que o complexo teve uma mudança no estado de oxidação na reação de síntese, passando de um centro com ligação metal-metal Ru₂(II ½; II ½) e 3 elétrons desemparelhados no precursor RuIbp (93), para um complexo de configuração diferente. No RuOIbp(4AP), a ligação metal-metal direta já não existe mais, pois, caso

contrário, haveriam 2 elétrons desemparelhados mesmo com o estado de oxidação (III, III). Como nos complexos novos há uma ponte de oxigênio entre os dois átomos de rutênio, é razoável acreditar que a distribuição eletrônica proposta para os complexos de rutênio do tipo μ -oxo mostrada na Figura 29 (onde não há elétrons desemparelhados) seja também aplicada para esse novo composto RuOlbp(4AP).

Tabela 4: Valores obtidos para as medidas de susceptibilidade magnética do RuOlbp(4AP).

<i>Composto</i>	<i>M (mg)</i>		<i>Δ (mg)</i>		<i>δ (mg)</i>		<i>KM 10⁻³ (CGSmol⁻¹)</i>
	<i>Ma</i>	<i>Mp</i>	<i>Δa</i>	<i>Δp</i>	<i>δa</i>	<i>δp</i>	
<i>RuIbp(4AP)</i>	18,8	22,7	0,2	2,0	0,2	0,2	- 0,8

(a) = amostra, (p) = padrão

2.8. EXPERIMENTOS DE CINÉTICA DE TROCA DE LIGANTES

Foram realizados estudos de cinética de troca dos ligantes de 4AP por moléculas de água em solução do composto RuOlbp(4AP). Na literatura, encontram-se evidências de que pode haver um equilíbrio de substituição dos ligantes nitrogenados e decidiu-se investigar o mesmo para o RuOlbp(4AP). Um estudo cinético com um complexo de dirutênio do tipo μ -oxo com piridinas, por exemplo, demonstrou que 2 moléculas de piridina em posição trans a ponte Ru-O-Ru podiam ser substituídas por ligantes de piridinas deuteradas (105). Esses estudos indicaram que a troca poderia ocorrer através de mecanismos dissociativos, já que o impedimento estérico na esfera de coordenação do complexo seria muito grande para que a troca fosse realizada por outros mecanismos. Foi concluído também que ligantes na posição cis à ponte μ -oxo com maior habilidade de serem σ -doadores aceleram essa reação de troca de ligantes. Outros estudos com as estruturas por raios X mostraram que as ligações trans a ponte μ -oxo são mais longas que as cis, sendo estas, portanto, mais lábeis. Foi sugerido ainda um deslocamento da banda para uma maior energia quando a substituição ocorre por moléculas de solvente, como água (106). Para estudar os efeitos da cinética de troca dos ligantes de 4AP no complexo RuOlbp(4AP), foram realizados estudos sobre a reação da troca do ligante 4AP por H₂O utilizando soluções EtOH:H₂O em diferentes proporções volumétricas (aquação) e depois foi verificado o equilíbrio reversível das moléculas de 4AP (complexação). Os espectros de absorção eletrônico com acompanhamento do tempo para as soluções de RuOlbp(4AP) foram registrados com

proporções de EtOH:H₂O de 50:50 (v/v) (Figura 33); 25:75 (v/v) (Figura 34) e 10:90 (v/v) (Figura 35).

Figura 33: Espectro eletrônico do RuOlbp(4AP) 0,04 mmol.L⁻¹ em EtOH:H₂O 50:50 (v/v) de 0-1440 min.

Figura 34: Espectro eletrônico do RuOlbp(4AP) 0,04 mmol.L⁻¹ em EtOH:H₂O 25:75 (v/v) a) de 0 a 300 min e b) de 300 a 2170 min.

Figura 35: Espectro eletrônico do RuOlbp(4AP) 0,04 mmol.L⁻¹ em EtOH:H₂O 10:90 (v/v) a) de 0 a 150 min e b) de 150 a 1440 min.

Pode-se observar nos espectros apresentados que para todas as proporções em volume de EtOH:H₂O, a banda da transição Ru-O-Ru já aparece deslocada de 590 nm para 585 nm. Provavelmente, a cinética da substituição da primeira molécula de 4AP ocorre assim que a solução é formada. Em seguida, há um deslocamento inicial da banda em cerca de 585 nm para menores comprimentos de onda, chegando a 572 nm. Esse deslocamento de banda refere-se a formação do complexo RuOlbp(4AP)_{aqua} que contém moléculas de H₂O em substituição a 4AP. Na mistura de EtOH:H₂O de 50:50 (v/v) (Figura 33) a reação de aquação ocorre com a formação de dois pontos isobéticos (280 e 385 nm) indicando que não há reações secundárias durante a conversão das espécies. Quando a reação de aquação ocorre com a proporção de EtOH:H₂O de 25:75 (v/v) ou de 10:90 (v/v), os deslocamentos de banda são mais rápidos indicando que velocidade da reação de aquação aumenta e uma nova banda acima de 600 nm é formada, sugerindo a ocorrência de uma reação consecutiva. No espectro da Figura 34a com proporção de EtOH:H₂O de 25:75 (v/v), é mostrado que o deslocamento e diminuição da intensidade da banda ocorreu até 300 min. Na Figura 34b é possível observar um outro momento de reação em que a banda em 573 nm diminui ainda mais de intensidade, mas é deslocada para 585 nm, provavelmente devido ao aumento da intensidade da banda em 673 nm. Com a proporção de EtOH:H₂O de 10:90 (v/v) o deslocamento de 585 pra 572 nm é ainda mais rápido (Figura 35a) e, nesse caso, ao aumentar a intensidade da banda em 650 nm, a banda em 570 nm tende a desaparecer (Figura 35b). Esta segunda reação não está associada à reação de substituição da 4AP pela água, uma vez que na presença do excesso do 4AP, essa nova banda não é suprimida (dados não apresentados). Essa segunda etapa

pode estar relacionada a uma reação de decomposição envolvendo a quebra da estrutura do complexo porque a banda em 570 nm, que é característica do μ -oxo, é fortemente reduzida com o aumento da proporção em volume de água em relação ao etanol (vide EtOH:H₂O 10:90 (v/v)). É interessante observar que essa segunda etapa parece não ocorrer na solução de proporção EtOH:H₂O 50:50 (v/v) já que em 24h de reação não foi observado o aumento na intensidade da banda em λ maiores que 600 nm. A constante de velocidade observada (k_{obs}) pode ser calculada para cada condição monitorando a redução da absorbância da banda (585 nm) em função do tempo. As curvas cinéticas (Figura 36) foram ajustadas a uma equação exponencial de primeira ordem, e o k_{obs} foi determinado a partir do tempo (t) como mostrado na Equação 3:

Equação 3: Cálculo do k_{obs}

$$k_{obs} = \frac{1}{t}$$

Os resultados estão mostrados na Tabela 5 onde pode ser observado que o valor de k_{obs} aumenta com maiores proporções de H₂O em relação ao etanol, indicando aumento da velocidade da reação de aquação, especialmente para a mudança de 25:75 (v/v) para EtOH:H₂O 10:90 (v/v).

Figura 36: Curva da variação da absorbância em 585 nm em função do tempo para o RuOlbp(4AP) em diferentes concentrações de etanol.

Tabela 5: Valores de k_{obs} para as reações de aquação do composto RuOlbp(4AP) nas diferentes proporções de etanol.

EtOH:H ₂ O (v/v)	$k_{\text{obs}} (\times 10^{-3} \text{ min}^{-1})$
50:50	$1,89 \pm 0,08$
25:75	$2,14 \pm 0,02$
10:90	$4,51 \pm 0,12$

Após os estudos de aquação, foram realizados estudos de complexação para avaliar o equilíbrio de aquação-complexação para o RuOlbp(4AP). Os testes foram realizados apenas para a solução de RuOlbp(4AP)_aqua na proporção de EtOH:H₂O de 50:50 (v/v) para evitar as reações de decomposição do complexo evidenciado pelo surgimento de bandas em comprimentos de onda acima de 600 nm. Os espectros da Figura 37 mostram que ao adicionar 4AP em excesso na solução de RuOlbp(4AP)_aqua, a banda em 575 nm foi deslocada para 590 nm com o aumento de intensidade. Essa banda, portanto, se refere ao equilíbrio de troca da molécula de H₂O substituída na reação de aquação (Figura 33) que agora é trocada pela molécula de 4AP. O deslocamento de cerca de 575 nm para 590 nm foi observado para todas as reações de complexação nas diferentes concentrações de 4AP (4, 6, 7, 8 e 1 mmol.L⁻¹). O equilíbrio com retorno ao comprimento de onda anterior a reação de aquação também foi observado na literatura para complexos similares devido a mudança de basicidade dos ligantes trocados no complexo (106).

Figura 37: Espectros eletrônicos para a reação de complexação do RuOlbp(4AP) 0,1 mmol.L⁻¹ para 4AP 4 mmol.L⁻¹ de 0 à 3h em medidas com intervalo de 120 s.

Com os espectros eletrônicos para as diferentes concentrações de 4AP, foi possível ajustar as curvas cinéticas usando uma equação exponencial de segunda ordem em $\lambda = 590$ nm e com coeficiente de correlação maior do que 0,99. A curva exponencial para a concentração de 4AP $4,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ referente aos espectros da Figura 37, de acordo com os diferentes tempos de medida, pode ser vista na Figura 38. As curvas cinéticas foram ajustadas para equações de segunda-ordem, porque além da reação de complexação pela 4AP, pode estar acontecendo uma reação paralela evidenciado pela não estabilidade da curva. A partir das curvas cinéticas de cada concentração de 4AP, foi possível determinar o tempo (t) e calcular a constante de velocidade observada pela Equação 3. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 6 e com os valores de k_{obs} foi possível construir o gráfico da Figura 39 no qual foi proposto uma lei da velocidade e constante de equilíbrio para as reações de aquação e complexação do complexo nessas condições.

Figura 38: Curva com ajuste da equação exponencial de segunda-ordem em 590 nm para $[4AP] = 4,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, referente espectros da Figura 37.

Tabela 6: Valores de k_{obs} para as reações de complexação do composto $\text{RuOlbp}(4AP)\text{-aqua}$ nas diferentes concentrações de 4AP.

4 AP (mmol L^{-1})	$k_{\text{obs}} (\times 10^{-3} \text{ min}^{-1})$
4,0	$59,9 \pm 2,7$
4,0	$55,9 \pm 1,8$
6,0	$76,8 \pm 2,2$
7,0	$84,7 \pm 1,6$
8,0	$96,2 \pm 1,6$
10,0	$110,1 \pm 1,7$

Figura 39: Gráfico de k_{obs} x $[4AP]$ a partir dos dados dos ajustes das curvas em diferentes concentrações de 4AP para a complexação do RuOlbp(4AP)-aqua.

O gráfico da Figura 39 mostra uma dependência linear do k_{obs} e da $[4AP]$ e, por isso, a reação tem uma dependência de primeira ordem em relação a $[4AP]$. O mecanismo das reações de complexação (reação direta) e de aquação (reação inversa), portanto, podem ser expressos pela equação abaixo e compreendem a lei da velocidade do mecanismo da Equação 4:

Equação 4: Lei da velocidade para o equilíbrio de aquação/complexação para o RuOlbp(4AP).

$$k_{obs} = k_1 [4AP] + k_{-1}$$

Com o coeficiente angular da equação da reta foi possível determinar a constante de velocidade de segunda ordem para a reação direta (complexação) ($k_1 = 8,9 \pm 0,4 \text{ mol}^{-1}\text{Lmin}^{-1}$), e a constante de velocidade de primeira ordem para reação inversa (aquação) ($k_{-1} = 0,023 \pm 0,003 \text{ min}^{-1}$). A constante de equilíbrio da reação nessas condições experimentais também foi calculada de acordo com o seguinte:

Equação 5: Cálculo da constante de equilíbrio de aquação/complexação para o RuOlbp(4AP).

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} = 390 \pm 70 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$$

Pelo alto valor de K , pode-se dizer que a reação direta é a predominante nessas condições em que há um grande excesso de 4AP no meio reacional em relação ao complexo, indicando uma supressão da reação de aquação. Em suma, o complexo RuOlbp(4AP) pode sofrer aquação, onde duas de suas moléculas de 4AP é substituída por H_2O , evidenciado através do deslocamento do comprimento de onda. Essa reação de substituição, no entanto, é um equilíbrio químico onde um excesso de 4AP promove a complexação, retornando a estrutura inicial do complexo. As reações desse equilíbrio foram ilustradas na Figura 40.

Figura 40: Esquema da aquação e complexação do RuOlbp(4AP).

2.9. ENSAIOS BIOLÓGICOS – VIABILIDADE CELULAR

O complexo $\text{RuO}(\text{lbp})(4\text{AP})$ foi investigado *in vitro* em células de glioma U87MG. Para efeito de comparação, os ligantes Hlbp e 4AP também foram investigados nas concentrações correspondentes aos ligantes no complexo. O Hlbp foi comparado ao complexo em uma concentração 2 vezes maior, e a 4AP numa concentração 6 vezes maior. Os resultados de número de células de acordo com as concentrações se encontram na Figura 41 para 24h, 48h e 72h.

Figura 41: Concentração de células (cell.mL⁻¹) x Concentração das drogas (μmol.L⁻¹) no tempo a) 24h; b) 48h e c) 72h. [* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001].

Comparando os gráficos da figura vemos que o efeito nas células referente ao tratamento com o complexo aumenta com o tempo. A melhor resposta ao complexo encontra-se no tempo 72h, onde se percebe uma grande diminuição no número de

células em relação ao controle. Nesse tempo (Figura 41c), em concentrações tão baixas quanto $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ há uma diferença estatisticamente significativa do número de células em relação ao controle ($p < 0,05$). O efeito do composto nas células se mostra ser dose-responsivo, uma vez que o número de células diminui bastante na medida em que aumenta a concentração da droga. Nos outros tempos de exposição das células ao complexo, 24 e 48h, o efeito começa a ocorrer na concentração de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, onde ocorre uma diferença estatisticamente significativa do número de células em relação ao controle. Ao verificar a ação dos ligantes Hlbp e 4AP nas mesmas concentrações em que elas se encontram no complexo, vemos que não há nenhum efeito de diminuição do número de células em relação ao controle nessa faixa de concentração em nenhum dos tempos estudados. Esse fato nos mostra que a ação do composto não está relacionada a ação desses ligantes separadamente, mas ao complexo como um todo. Comparando-se esses resultados com os obtidos para o complexo precursor Rulbp, vemos que o RuOlbp(4AP) tem uma atividade na U87MG em concentrações mais baixas. Para o Rulbp, a atividade nessas células começa em cerca de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (56) e a diminuição do número de células não chega a 50% mesmo no tempo de 72h. Para o RuOlbp(4AP) a atividade começa em $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ chegando a menos de 10% das células em relação ao controle no tempo de 72h. A Figura 42 nos mostra a % de viabilidade celular de acordo com a diferença de concentrações, o que pode nos dar mais informações sobre a forma de atividade do complexo. Pode ser observado que o composto fica mais citotóxico a medida em que se aumenta a concentração e o tempo de exposição chegando a um máximo de cerca de 50 % de viabilidade em 72h na concentração mais alta ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Esse dado nos mostra que o composto não só é antiproliferativo, mas também deve estar envolvido em mecanismos de morte celular, o que é diferente do complexo precursor Rulbp que não diminui a porcentagem de viabilidade celular com o tempo (56). Já as porcentagens de viabilidade celular para a 4AP e Hlbp nas concentrações utilizadas ficaram acima de 95 % e, por isso, não foram mostradas.

Figura 42: % Viabilidade celular x Concentração do complexo ($\mu mol.L^{-1}$) no tempo 72h.

IV. 3 CONCLUSÃO

Na tentativa de se obter um complexo contendo FAINES e 4AP, percebeu-se que os complexos em gaiola com FAINES sofrem um rearranjo frente ao ligante piridínico e levam a complexos do tipo μ -oxo. Uma explicação para isso pode ser a basicidade da 4AP, assim como o impedimento estérico dos FAINES, que podem levar a mudança de estrutura da gaiola. Foi sintetizado o complexo $RuOlb(4AP)$ e os resultados de análises elementares, espectroscopias, análise térmica, condutividade e susceptibilidade magnética indicam que o complexo sintetizado tem fórmula $[Ru_2O(lbp)_2(4AP)_6]Cl_2 \cdot 3 H_2O$. Foi demonstrada a labilidade da 4AP no complexo em relação a troca de ligantes pelos estudos de aquação e complexação com UV-vis, evidenciando também uma diferença na velocidade de troca de ligante em relação a proporção de água e etanol na solução. Os estudos indicaram um equilíbrio de troca de moléculas de 4AP e moléculas de H_2O . Por fim, o complexo mostrou resultados promissores *in vitro*, possuindo atividade antitumoral em concentrações muito mais baixas do que as de seu precursor $Rulbp$ tendo potencial para ser estudado como um possível metalofármaco antitumoral.

V

RESULTADOS: NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

$\text{Ru}_2(\text{NSAID})$ Metallodrug loaded – SPLNs for Cancer Therapy

**Solid Polymer-Lipid Nanoparticles
SPLNs**

In vitro, in vivo, ex vivo studies

$\text{Ru}_2(\text{NSAID})$ Metallodrug

Anticancer activity

*Breast
cells*

*Prostate
cells*

**$\text{Ru}_2(\text{NSAID})$ – SPLNs
Nanoformulation**

V. 1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

1.1. PRIMEIRAS TENTATIVAS DE SÍNTESE

A primeira tentativa para preparar a formulação de NPs para encapsular os complexos $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ foi baseada em um procedimento previamente reportado para uma formulação contendo o lipídio farmacêuticamente aceitável ácido mirístico (MyA, $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$) (107). Além disso, a síntese das NPs conta com PVA e estearatos de PEG 40 e 100. As massas utilizadas de lipídio e polímeros para essa síntese foram 8 mg de ácido mirístico, 1 mg de estearato de PEG-40, 2 mg de estearato de PEG-100 e 3 mg de complexo. O ácido mirístico é o agente estrutural formador das NPs, o PVA atua como o agente emulsificante e os estearatos de PEG 40 e 100 são necessários para dar estabilidade às NPs.

As primeiras NPs sintetizadas com ácido mirístico foram caracterizadas sendo que a microscopia eletrônica de transmissão (Figura 43) juntamente com a curva de distribuição de tamanho mostrou que a síntese precisava ser otimizada. Observando a microscopia da Figura 43 percebe-se que as NPs não tem um formato esférico definido, embora a análise EDS tenha mostrado que o RuIbp foi de fato encapsulado pois foi encontrado rutênio nos pontos A e B da imagem, ou seja, dentro das NPs.

Figura 43: Resultados das análises elementares EDS para os pontos A, B e C das NPs.

O tamanho médio das NPs, entretanto, era cerca de 200 nm com uma curva larga de distribuição estando uma grande parte das NPs acima do tamanho desejado para promover o efeito EPR e evitar a acumulação no fígado e no baço (84). Na tentativa de diminuir o tamanho de partícula, o MyA foi então trocado por outro lipídio, o éster etil araquidato (EA, $C_{22}H_{44}O_2$) que havia sido empregado previamente na produção de outros tipos de NPs lipídicas (77). A estrutura do ácido mirístico e do etil araquidato podem ser observadas na Figura 44. Embora a presença do EA gerou NPs de menor tamanho (cerca de 120 nm), o zeta potencial positivo (+ 30 mV) foi considerado não adequado para aplicação *i.v.* (devido à forte afinidade de ligação dessas partículas com proteínas e células negativamente carregadas) (94) (108). Assim, várias tentativas de síntese combinando os dois lipídios foram conduzidas até ser encontrada a proporção otimizada MyA : EA de 3:7 w/w para resultar em SPLNs com o tamanho de partícula e carga superficial apropriados.

Figura 44: Estruturas do etil araquidato e ácido mirístico.

1.2. SÍNTESE, TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA

Os experimentos com as NPs carregadas com Ru₂(FAINEs) (i.e., RuIbp-SPLNs e RuNpx-SPLNs) sugerem que o lipídio mais hidrofóbico EA pode contribuir para diminuir o tamanho da partícula, enquanto o MyA contribui para diminuir a carga superficial. A presença do EA pode também favorecer um maior carregamento de drogas insolúveis em água. As SPLNs carregadas com as drogas orgânicas FAINEs (i.e., HIbp (HIbp-SPLNs) e HNpx (HNpx-SPLNs)), assim como as NPs sem drogas blank-SPLNs e as fluorescentes-SPLNs (contendo um corante fluorescente no lugar da droga) foram preparadas

utilizando procedimento similar. Um diagrama esquemático da preparação das Ru₂(FAINEs)-SPLNs é mostrado na Figura 45 (109).

Figura 45: Diagrama esquemático da preparação das SPLNs.

A curva de distribuição de tamanho da Figura 46a mostra que a síntese foi bem-sucedida em produzir um material sem grande variação de tamanho, evidenciado pela curva estreita do gráfico de distribuição. Os parâmetros determinados para as SPLNs estão mostrados na Tabela 7. Considerando as medidas de desvio padrão, é possível considerar que a diferença de valores de tamanho de partícula (tamanho médio, nm) das Ru₂(FAINEs)-SPLNs (i.e., 120 ± 15 (RuIbp-SPLNs); 121 ± 12 (RuNpx-SPLNs)), FAINEs-SPLNs (145 ± 11 (HIbp-SPLNs); 136 ± 28 (HNpx-SPLNs) e blank-SPLNs (130 ± 5) não é muito significativa. A discussão sobre a diferença de tamanho não é trivial uma vez que o tamanho pode depender de um arranjo estrutural dos múltiplos componentes das NPs, que podem mudar na presença ou ausência das drogas. O índice de polidispersão (relacionado a distribuição de tamanho das partículas) ficou na faixa 0,2 – 0,4, concordando com dados previamente reportados para outras NPs poliméricas lipídicas (77). As análises por microscopia de transmissão eletrônica para as Ru₂(FAINEs)-SPLNs (Figura 46b) confirmaram os valores de diâmetro médio e adicionalmente mostraram uma forma aproximadamente esférica para ambas as NPs carregadas com os metalofármacos. Além disso, as Ru₂(FAINEs)-SPLNs mostraram boa estabilidade coloidal, uma vez que mudanças significativas não foram encontradas no tamanho de partícula quando essas foram mantidas em meio de cultura a 37 °C por até 3 dias (Figura 46c). O potencial zeta (ZP) das NPs foram todos negativos sendo que as

NPs carregadas mostraram valores na faixa de -17 a -24 mV, enquanto para as blank-SPLNs foi ao redor de -32 mV.

Figura 46: (a) Distribuição de tamanho de partícula para $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ -SPLNs. (b) imagem MET das $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ -SPLNs (70000x). (c) Tamanho de partícula para as $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ -SPLNs em meio de cultura a 37°C em função do tempo.

Tabela 7: Tamanho de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão, drug loading e eficiência de encapsulamento para as SPLNs. Os dados são mostrados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$).

Sistema de NPs	Tamanho de partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)	Índice de polidispersão (PDI)	Drug loading (%)	Eficiência de encapsulamento (%)
<i>RuIbp-SPLNs</i>	120 ± 15	$-24,2 \pm 0,98$	$0,300 \pm 0,101$	17	95
<i>RuNpx-SPLNs</i>	121 ± 12	$-21,8 \pm 0,50$	$0,381 \pm 0,015$	18	97
<i>HIbp-SPLNs</i>	145 ± 11	$-19,5 \pm 0,53$	$0,260 \pm 0,023$	12	88
<i>HNpx-SPLNs</i>	136 ± 28	$-17,5 \pm 0,65$	$0,263 \pm 0,024$	15	98
<i>blank-SPLNs</i>	130 ± 5	$-32,3 \pm 0,95$	$0,337 \pm 0,041$	-	-

1.3. DRUG LOADING

O conteúdo das drogas nas SPLNs carregadas foi determinado por espectroscopia UV-vis como descrito na parte experimental e os dados obtidos são mostrados na Tabela 7. As SPLNs mostraram um drug loading de cerca de 20% e 15% para Ru₂(FAINEs) e FAINEs, respectivamente. Os resultados mostraram que o sistema de NPs são capazes de carregar grande quantidade dessas drogas. A eficiência de encapsulamento foi muito perto de 100 % para todos os sistemas carregados, mostrando que o procedimento teve sucesso no encapsulamento dos fármacos e metalofármacos nas SPLNs. Os cálculos do drug loading e eficiência de encapsulamento foram feitos através das equações a seguir:

Equação 6: Cálculo do Drug Loading

$$\text{Drug loading} = \frac{\text{massa de droga nas NPs}}{\text{Massa MyA} + \text{EA} + \text{PEGs} + \text{droga nas NPs}}$$

Equação 7: Cálculo da eficiência de encapsulamento

$$\text{Eficiência de encapsulamento} = \frac{\text{massa de droga nas NPs}}{\text{massa de droga utilizada na síntese}}$$

As curvas de calibração e os espectros UV-vis para as soluções filtradas (não encapsulado) são mostrados no apêndice (Figura 67, Figura 68, Figura 69 e Figura 70).

1.4. ESPECTROSCOPIA UV-Vis

O espectro eletrônico de absorção em solução de etanol foi registrado para as Ru₂(FAINEs)-SPLNs dissolvidas depois de ultracentrifugação. Os espectros são mostrados na Figura 47 e mostram a banda em cerca de 430 nm, que é característica dos tetracarboxilatos de Ru₂(II,III), referente a transição $\pi(\text{Ru-O}, \text{Ru}_2) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$. Assim, esses dados sugerem a presença da estrutura em gaiola do complexo [Ru₂(FAINEs)₄].

Figura 47: Espectro de absorção eletrônica para $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})\text{-SPLNs}$.

1.5. ESPECTROSCOPIA FTIR-ATR

A Figura 48 mostra o espectro FTIR-ATR na região $2000\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ do Rulbp (a), Rulbp-SPLNs (b), blank-SPLNs (c), RuNpx-SPLNs (d) e RuNpx (e). As NPs sem drogas, blank-SPLNs (c), exibem uma banda forte em 1698 cm^{-1} acompanhada de um ombro a 1690 cm^{-1} que pode ser descrito como o modo de estiramento da carbonila $\nu(\text{C=O})$ (110), assim corroborando com a manutenção da forma ácida do ácido carboxílico do ácido mirístico. As bandas na região $1500\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ são relacionadas a contribuições do ácido mirístico, etil araquidato, estearatos de PEG e PVA. (111). O espectro dos metalofármacos Rulbp (a) e RuNpx (e) estão de acordo com os dados FTIR previamente reportados (48) (51) (56). O espectro do Rulbp-SPLNs (b) é similar ao RuNpx-SPLNs (d), mas ambos são significativamente distintos do espectro das blank-SPLNs. A banda forte em 1738 cm^{-1} (que é fraca no espectro das blank-SPLNs) pode ser atribuída principalmente ao estiramento do ester $\nu(\text{C=O})$ do etil araquidato, embora haja uma possível contribuição da banda de estiramento do ácido mirístico $\nu(\text{C=O})$ fazendo menos ligações de hidrogênio que os dímeros de ácidos graxos (110). A banda $\nu(\text{C=O})$ do ácido mirístico não é significativa no espectro de ambos $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})\text{-SPLNs}$ (uma banda fraca aparece em 1702 cm^{-1} para Rulbp-SPLNs, e RuNpx-SPLNs mostra apenas as bandas típicas dos ligantes naproxeno a 1634 e 1604 cm^{-1}). Curiosamente, entretanto, uma nova banda a frequências menores é observada a 1520 cm^{-1} para ambos $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})\text{-SPLNs}$. Ácido mirístico ionizado em miristato de sódio mostra o estiramento $\nu_a(\text{COO})$ a uma faixa de frequências mais altas $1550\text{-}1570\text{ cm}^{-1}$ (108) (112).

O deslocamento na banda $\nu(\text{COO})$ para frequências menores, comparado com o miristato iônico pode sugerir que uma coordenação axial do ânion do ácido graxo ao metalofármaco de uma maneira similar a um complexo dirutênio contendo longas cadeias de carboxilato como o dirutênio penta(miristato) (113). Portanto, é plausível sugerir que o ácido mirístico pode interagir com os metalofármacos $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ pela troca dos ânions cloreto na posição axial. A presença do cloreto na suspensão de $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ -SPLNs foi detectada pela adição de nitrato de prata, o que levou a precipitação de cloreto de prata. Além disso, o pH da suspensão de $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ -SPLNs é duas unidades mais baixo que o pH das blank-SPLNs, confirmando a desprotonação do ácido mirístico liberando os prótons na solução. A região de 1500-1400 cm^{-1} é difícil de se avaliar devido a sobreposição de bandas dos vários componentes das NPs, em particular, componentes do ácido mirístico e etil araquidato. Os modos de estiramentos dos ligantes orgânicos FAINEs nos metalofármacos $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ aparecem nessa região ($\nu_a(\text{COO})$, $\sim 1462 \text{ cm}^{-1}$, and $\nu_s(\text{COO})$, $\sim 1412 \text{ cm}^{-1}$), o que pode explicar parcialmente as diferenças nas intensidades relativas de bandas das $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ -SPLNs comparadas às nanopartículas blank-SPLNs.

Figura 48: Espectro ATR na região 2000-1000 cm^{-1} do RuIbp (a), RuIbp-SPLNs (b), blank-SPLNs (c), RuNpx-SPLNs (d) e RuNpx (e).

1.6. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Para identificar as espécies de rutênio, suspensões de $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})\text{-SPLNs}$ foram dissolvidas em metanol, centrifugadas, e o espectro de massa do sobrenadante foi analisado (Figura 49). O espectro ESI-MS(+) das RuIbp-SPLNs mostra quatro conjuntos de picos com o padrão isotópico de distribuição típico do rutênio. O primeiro pico em m/z 1024,28 é atribuído ao fragmento iônico $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4]^+$ com boa concordância do ESI-MS encontrado em estudos anteriores para o complexo (56), e também com o padrão simulado MS ($[\text{Ru}_2(\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_2)_4]^+$, calc. m/z , 1024,28). Os outros três conjuntos de picos podem ser atribuídos as espécies $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_{4-x}(\text{My})_x]^+$ em que o miristato (My , $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{O}_2^-$) substitui ânions ibuprofenatos ($\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_2^-$), i.e., $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4(\text{My})_1]^+$ (calc. 1046,37); $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_2(\text{My})_2]^+$ (calc. 1068,45); $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_1(\text{My})_3]^+$ (calc. 1068,45). O ESI-MS(+) para as RuNpx-SPLNs foi mais difícil de analisar devido a proximidade de massa molar entre Npx e My . Entretanto, uma inspeção detalhada mostrou que o espectro, de forma semelhante as RuIbp-SPLNs , também exibem quatro conjuntos de picos com a distribuição típica do padrão de rutênio. O pico no máximo m/z 1120,15 é atribuído ao fragmento iônico $[\text{Ru}_2(\text{Npx})_4]^+$, em boa concordância com o ESI-MS do complexo livre (93). Os outros três conjuntos de picos podem ser atribuídos as espécies $[\text{Ru}_2(\text{Npx})_{4-x}(\text{My})_x]^+$ em que o miristato (My , $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{O}_2^-$) substitui os ânions naproxenatos ($\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_3^-$), i.e., $[\text{Ru}_2(\text{Npx})_4(\text{My})_1]^+$ (calc. 1118,28); $[\text{Ru}_2(\text{Npx})_2(\text{My})_2]^+$ (calc. 1116,385); $[\text{Ru}_2(\text{Npx})_1(\text{My})_3]^+$ (calc. 1114,48). O experimento ESI-MS(+) foi feito em duplicata para cada síntese realizada e os dados foram reprodutíveis. Além disso, os experimentos foram feitos com os pellets isolados depois de centrifugação, resultando em espectro similar para ambas as formulações $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})\text{-SPLNs}$. Assim, esses resultados sugerem que a troca do ligante equatorial pode ocorrer durante a preparação das SPLNs. Curiosamente, a estrutura em gaiola $[\text{Ru}_2(\text{FAINEs})_4]^+$ não foi quebrada nesse processo e todas as espécies carregam os fármacos orgânicos embora em diferentes proporções molares $\text{FAINEs} : \text{My}$. Também vale mencionar que os resultados apontam para uma possibilidade de o My estabilizar o complexo na formação das $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})\text{-SPLNs}$.

Figura 49: ESI-MS(+) para as RuIbp-SPLNs e RuNPx-SPLNs (excerto, ESI-MS(+) do RuNPx). Fragmentos de $[\text{Ru}_2(\text{FAINEs})_{4-x}(\text{My})_x]^+$ são representados por (a): $[\text{Ru}_2(\text{FAINEs})_4]^+$; (b): $[\text{Ru}_2(\text{FAINEs})_3(\text{My})_3]^+$; (c): $[\text{Ru}_2(\text{FAINEs})_2(\text{My})_2]^+$; (d): $[\text{Ru}_2(\text{FAINEs})_1(\text{My})_3]^+$.

V. 2 TESTES *IN VITRO*

2.1. CAPTAÇÃO CELULAR *IN VITRO*

A captação celular das blank-SPLNs contendo o corante vermelho nilo foi analisada através de experimentos com dependência do tempo e da temperatura. O processo foi dependente do tempo para as três linhas celulares investigadas EMT6 (tumor mamário murino), MDA-MB-231 (tumor mamário humano) e DU145 (tumor de próstata humano). No entanto, no caso das células de tumor mamário murino, foi observado um rápido aumento na captação das NPs nas primeiras horas, de 0 até 6h, acompanhada de uma posterior estabilização (Figura 50a). As duas linhas celulares humanas, de mama e próstata, mostraram uma captação mais lenta das SPLNs no mesmo período. Para entender melhor o mecanismo de captação, as células foram

tratadas e incubadas em duas temperaturas diferentes, 4 °C e 37 °C. O processo de internalização das NPs pode envolver mecanismos dependentes de energia, como o processo de endocitose, ou mecanismos não dependentes de energia, como uma difusão passiva. Na temperatura mais baixa (4 °C) os mecanismos dependentes de energia são bloqueados, uma vez que as membranas celulares ficam rígidas e evitam a passagem de compostos por processos de difusão passiva, que não necessitam de energia. O resultado (Figura 50b) mostrou uma captação celular muito mais baixa (60 - 80% mais baixa) a 4°C do que a 37 °C, sugerindo que o processo de captação das blank-SPLNs é dependente de energia, provavelmente via endocitose, similarmente ao observado para outras NPs baseadas em polímeros (107) (114). Para estudar a localização intracelular das SPLNs, as NPs fluorescentes foram incubadas nas células EMT6 nas mesmas temperaturas, 4 °C e 37 °C, por 3 h. A imagem da Figura 50c mostra as SPLNs em vermelho e o núcleo das células corado em azul. A 37 °C a maior parte das NPs foram encontradas dentro da membrana celular (sinal fluorescente em vermelho). A falta de SPLNs no núcleo das células (ausência de sobreposição das cores azul e vermelha) sugere que elas estão principalmente localizadas no citoplasma. A ausência de um sinal vermelho intenso a 4 °C confirma a baixa captação celular em termos de intensidade de fluorescência a baixa temperatura, concordando com a proposição de um mecanismo de captação dependente de energia. As imagens do microscópio não permitem distinguir NPs internalizadas daquelas que podem estar abaixo ou acima do nível celular. Foi realizado então o escaneamento confocal z-stack para confirmar que as NPs estão localizadas intracelularmente ao invés de estarem apenas aderidas na superfície das células já que elas mostraram a fluorescência das SPLNs na profundidade que correspondia apenas as partes internas das células. O escaneamento de 4 a 14 µm na profundidade celular mostrou um aumento significativo no sinal de fluorescência na profundidade celular de 8 µm (Figura 51) comparado as outras profundidades investigadas. A coexistência de um sinal forte para o núcleo celular (azul) e as SPLNs (vermelho) na mesma profundidade (8 µm) confirma que as SPLNs estão localizadas dentro das células (especificamente no citoplasma). Estudos com as células MDA-MB-231 e DU145 mostraram resultados similares, assim confirmando a captação das SPLNs no citoplasma também pelas duas linhagens celulares humanas. As imagens para essas linhagens estão dispostas no apêndice (Figura 71, Figura 72 e Figura 73).

Figura 50: (a) Intensidade de fluorescência em função do tempo de incubação (captação das SPLNs) para as três linhas celulares; os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). (b) Intensidade de fluorescência das SPLNs a 4 °C e 37 °C; os dados são normalizados para a intensidade de fluorescência a 37 °C e mostrados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). (c) Imagens de microscopia por fluorescência das células EMT6 a 4 °C e 37 °C (2 h de incubação); imagens da esquerda para a direita são canal de luz de transmissão, canal de luz vermelha para as SPLNs coradas com o corante vermelho nilo, canal de luz azul para o núcleo corado e sobreposição das SPLNs e o núcleo da célula.

Figura 51: Imagem de microscopia confocal das EMT6 ilustrando a internalização das SPLNs depois de 2 h de incubação a 37 °C; a captação celular é visualizada através da sobreposição das imagens; da esquerda para a direita: canal de campo claro, canal de luz vermelha para as SPLNs, canal de luz azul para o núcleo corado e sobreposição das células. As imagens foram obtidas no modo z-stack com profundidade de 14 µm, 1 µm para cada corte. A escala corresponde a 10 µm.

2.2. VIABILIDADE CELULAR

O efeito dos metalofármacos $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ encapsulados nas SPLNs foi investigado em três diferentes linhas celulares, EMT6, MDA-MB-231 e DU145 *in vitro*. Os testes também foram feitos para o complexo precursor dos $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$, o RuAc, os fármacos livres Hlbp e HNpx, as correspondentes SPLNs carregadas e as NPs sem droga blank-SPLNs. Na Figura 52 são mostrados os gráficos da viabilidade celular dependente da dose para todos os sistemas nas três linhas celulares em comparação ao controle. A biocompatibilidade das blank-SPLNs é indicada pelo baixo efeito na

viabilidade celular quando ela foi testada nas três linhagens de células tumorais. Esse trabalho é o primeiro que testa a atividade dos metalofármacos $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ em células de câncer de mama e de próstata. Portanto, antes de discutir os sistemas de NPs, é interessante comparar o efeito dos metalofármacos $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ com os correspondentes fármacos orgânicos Hlbp e HNpx, e o precursor RuAc. Para manter a proporção molar existente no complexo de 1:4 Ru_2 :FAINEs da estrutura original em gaiola $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})_4$ que carrega quatro FAINEs por centro dimetálico, Hlbp e HNpx foram testados na concentração de quatro vezes a correspondente do complexo $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$. O RuIbp e o RuNpx mostraram maior atividade antitumoral que as respectivas drogas orgânicas, Hlbp e HNpx, para as três linhagens celulares. O complexo precursor RuAc mostrou a atividade mais baixa, assim demonstrando que a atividade antitumoral não está relacionada apenas ao centro de dirutênio sozinho. Os dados comparativos sugerem uma contribuição de um efeito sinérgico entre o metal e as drogas FAINEs para a atividade antitumoral dos metalofármacos $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$, em concordância com os estudos reportados para os efeitos do RuIbp e aqua-RuNpx nas células de glioma de rato C6 (51). No entanto, o efeito desses fármacos orgânicos ou metalofármacos administrados na forma livre é considerado muito baixo (mesmo na concentração mais alta testada nesse trabalho, $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$) e $800 \mu\text{mol L}^{-1}$ (FAINEs)) para ter utilidade prática na terapia anticâncer. A baixa solubilidade em meio de cultura, que afeta a bioviabilidade intracelular, pode ser um dos fatores que contribui para a baixa atividade antitumoral das drogas livres testadas. Curiosamente, a eficácia de ambos $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ e fármacos livres FAINEs foi grandemente aumentada após o encapsulamento nas SPLNs. No entanto, os valores de IC_{50} (Tabela 8) foram $60\text{-}100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (em concentração de droga) para as $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})\text{-SPLNs}$, enquanto que para as FAINEs-SPLNs eles estão todos acima do limite da concentração nas condições experimentais ($800 \mu\text{mol L}^{-1}$). Portanto, mesmo considerando que as FAINEs-SPLNs estão com a concentração de Hlbp e HNpx 4 vezes mais concentradas em concentração molar que as correspondentes $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})\text{-SPLNs}$, a atividade antitumoral das $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})\text{-SPLNs}$ foi muito maior que as correspondentes orgânicas em todas as células testadas. Esse resultado pode contribuir com a proposta de que há um efeito sinérgico entre o metal e os FAINEs que pode contribuir para a atividade antitumoral dos metalofármacos. No entanto, também deve ser considerado que aparentemente a formulação de SPLNs desenvolvida aqui pode ter promovido um

aumento na atividade antitumoral por carregar os metalofármacos nas células de câncer em diferentes espécies mistas de dirutênio-FAINEs-My. A resposta das duas linhagens diferentes de câncer de mama, i.e., EMT6 (Figura 52a e Figura 52d) e MDA-MB-231 (Figura 52b e Figura 52e), ao tratamento com as Ru₂(FAINEs)-SPLNs foi dose dependente na faixa de concentração de metalofármaco de 1-200 µmol L⁻¹.

Os valores de IC₅₀ (Tabela 8) nas diferentes linhagens celulares não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$) para cada formulação com os metalofármacos (RuNpx-SPLNs ou RuIbp-SPLNs). Além do mais, embora o comportamento aparente das RuIbp-SPLNs e RuNpx-SPLNs seja similar, os valores de IC₅₀ para as distintas formulações de metalofármacos foram estatisticamente diferentes nas linhagens celulares. A formulação das SPLNs com o RuIbp parece ser mais citotóxica que a formulação com RuNpx. Esse resultado sugere que a viabilidade celular pode depender das espécies na nanoformulação possivelmente associadas a natureza do ligante FAINEs no metalofármaco Ru₂(FAINEs). Comparativamente, a viabilidade celular nas células de câncer de próstata DU145 foi mais baixa que em ambas as células de câncer de mama depois do tratamento com as Ru₂(FAINEs)-SPLNs em doses similares administradas. Os valores de IC₅₀ não puderam ser determinados para as células de câncer de próstata porque, apesar de essas células serem sensíveis em doses baixas de NPs, a forma da curva de viabilidade celular indica uma resposta dose-independente na faixa de 1 - 200 µmol L⁻¹ relativa a concentração do metalofármaco (Figura 52c e Figura 52f). O comportamento distinto da dose-resposta das células DU145 aos metalofármacos comparados com as células de câncer de mama, pode estar associado ao modo de ação das drogas, possivelmente envolvendo diferentes expressões de COX por essas linhas celulares. É conhecido que as células DU145 não expressam COX-2 (115), e ligeiramente expressam COX-1 (115) (116). Estudos prévios do grupo mostraram que o RuIbp não causa mudanças significativas na expressão de COX-2 e mesmo assim foi efetivo em células que não expressam COX-2 (51) (52) (53). Em células de glioma, no entanto, a expressão de mRNA COX-1 e níveis proteicos foram significativamente aumentados depois da exposição ao complexo (52) (54). Além disso, as células DU145 tem grande expressão da prostaglandina microsomal E₂ sintase-1

(MPGES-1) e PGEs (115), que pode ser inibida pelo Rulbp como foi sugerido em estudos prévios com glioma (51).

Figura 52: Curvas de viabilidade celular (MTT) a 48h para (a) EMT6, (b) MDA-MB-231, e (c) DU145, tratadas com os compostos de rutênio, ibuprofeno e as correspondentes SPLNs; (d) EMT6, (e) MDA-MB-231, (f) DU145 tratadas com os compostos de rutênio, naproxeno e as correspondentes SPLNs. Os dados são mostrados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$).

Tabela 8: Valores de IC₅₀ para as Ru₂(FAINEs)-SPLNs. Os dados são mostrados como média ± desvio padrão (n=3).

Linhagem celular	Rulbp-SPLNs	RuNpx-SPLNs
	IC ₅₀ (μ mol L ⁻¹)	
EMT6	67,0 ± 7,7	95,6 ± 10,8
MDA-MB-231	70,3 ± 8,1	101,8 ± 6,7

$$p < 0,05$$

V. 3 BIODISTRIBUIÇÃO E BIOACUMULAÇÃO DAS SPLNs *IN VIVO* E *EX VIVO*.

A Figura 53a mostra as imagens fluorescentes do rato carregando tumor mamário murino EMT6 em diferentes tempos depois da injeção *i.v.* das SPLNs fluorescentes. Logo após a injeção das NPs, a intensidade de fluorescência aumentou rapidamente por todo o corpo do animal, e pouco depois, a acumulação das NPs foi observada na área tumoral e também em outros órgãos do corpo, incluindo a área da bexiga. O sinal fluorescente na área da bexiga pode sugerir eliminação renal das NPs. A diminuição significativa do sinal de fluorescência de 1 a 24 h em todo o corpo, excluindo a área tumoral, dá evidência para um tempo de retenção mais longo no tumor das SPLNs. A acumulação no tumor das SPLNs também foi confirmada por imagens de fluorescência *ex vivo* dos tecidos corporais. A Figura 53b mostra imagens ópticas dos órgãos e tumor *ex vivo* a 4 h e 24 h. De maneira similar, no experimento *ex vivo* a intensidade de fluorescência nos pulmões, fígado, coração, intestino e rins foi maior no tempo 4 h do que a 24 h. Uma diminuição drástica da fluorescência nos órgãos foi observada de 4 h para 24 h. Em contraste, a intensidade de fluorescência do tumor permaneceu no mesmo nível até 24 h depois da injeção, como observado durante as imagens de fluorescência *in vivo*. A intensidade de fluorescência nos diferentes órgãos do corpo e no tumor foi quantificada como eficiência radiante média usando o software Xenogen IVIS software, e os dados representados em unidade de área (para todos os órgãos e o tumor) estão mostrados na figura Figura 53c. É importante mencionar que a fluorescência alta nos pulmões não está relacionada a uma acumulação maior das NPs nesse órgão, já que o volume dos pulmões é pequeno quando comparado ao volume do tumor (ver o tamanho e acumulação das NPs nos pulmões e tumor na Figura

53a, depois de 24 h da injeção *i.v.*). A quantificação das imagens fluorescentes também confirmou uma rápida eliminação (*clearance*) das SPLNs nos diferentes órgãos. Um sinal de fluorescência mais alto nos pulmões e no fígado durante as primeiras horas sugere uma redistribuição precoce das NPs no espaço vascular. A alta fluorescência no intestino em 4 h indica que a primeira rota de eliminação das NPs seja possivelmente através do sistema hepatobiliar – via de fezes (117). Embora essa não seja uma rota comum para a eliminação de NPs seguidas de administração *i.v.*, para várias formulações de NPs tem sido reportadas a interação destas com hepatócitos no fígado e passagem para o intestino delgado através da árvore biliar (118). Por outro lado, a alta fluorescência dos rins no tempo 24 h depois da injeção sugere *clearance* das NPs principalmente pela rota renal. As porcentagens de NPs retidas em órgãos diferentes e no tumor foram determinadas de 4 a 24 h depois da injeção das NPs. A Figura 53d mostra a retenção das SPLNs nos diferentes tecidos. Pode-se dizer que com exceção do tumor, os órgãos tiveram um rápido *clearance* das NPs, incluindo os pulmões, onde foi encontrado uma quantidade considerável de NPs nas primeiras 4 h. A retenção das NPs na área tumoral é confirmada pela presença de quase 75 % das SPLNs no tumor depois das 24 h. A maior retenção das NPs no tumor pode estar associada ao efeito de aumento de permeabilidade e retenção (EPR) proveniente da vasculatura tumoral cheia de defeitos e pobre drenagem linfática, que pode facilitar a acumulação das SPLNs por períodos maiores (119).

Figura 53: (a) Biodistribuição *in vivo* das SPLNs coradas com ICG; (b) estudos *ex vivo* para determinar a distribuição das SPLNs em rato Balb-c carregando tumor de mama EMT6; (c) intensidade de fluorescência média para cada tecido a 4 h e 24 h; (d) retenção das NPs.

V. 4 CONCLUSÃO

Foram preparadas novas formulações contendo metalofármacos de dirutênio(II,III) de ibuprofeno ou naproxeno encapsulados em nanopartículas lipídicas sólidas. O material (Ru(FAINEs)-SPLNs) foi preparado com sucesso a partir de uma combinação selecionada de dois lipídios (ácido mirístico e etil araquidato). O drug loading e a eficiência de encapsulamento foram ambos altos. As NPs tem a forma aproximadamente esférica, mostrando valores adequados de tamanho de partícula, potencial zeta e boa estabilidade coloidal em meio de cultura na temperatura corporal. As Ru₂(FAINEs)-SPLNs mostraram um aumento de atividade antitumoral quando comparado com os metalofármacos correspondentes Ru₂(FAINEs) em células de câncer de mama (EMT6 e MDA-MB-231) e próstata (DU145) *in vitro*. Aparentemente, a formulação de SPLNs desenvolvida aqui promove um aumento na atividade através do carregamento dos metalofármacos nas células de câncer, também na forma de espécies mistas dirutênio-FAINEs-My. As SPLNs fluorescentes foram captadas pelas células de câncer por mecanismos dependentes da energia e do tempo, como analisado por imagens de microscopia confocal e espectroscopia de fluorescência. As imagens de fluorescência *in vivo* e *ex vivo* mostraram boa biodistribuição e alta acumulação no tumor das SPLNs fluorescentes seguidas de injeção *i.v.* em um modelo ortotópico de câncer de mama. A estabilidade coloidal das NPs (adequadas para injeção *i.v.*) e a captação celular delas podem ser as maiores vantagens para aumentar a atividade antitumoral das SPLNs carregadas com os metalofármacos. Os resultados também abrem a perspectiva de se utilizar compostos Ru₂(FAINEs) para tratar tumores em geral, como o câncer de mama e de próstata, que possuem altas incidências de afetar mulheres e homens. Os resultados desse trabalho encorajam testes de eficácia *in vivo* das Ru₂(FAINEs)-SPLNs para aplicação clínica no futuro.

VI

RESULTADOS: NANOPARTÍCULAS TERPOLIMÉRICAS LIPÍDICAS

Diruthenium-NSAID Terpolymer Lipid Nanoparticles

VI. 1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

1.1. PRIMEIRAS TENTATIVAS DE SÍNTESE

A metodologia de síntese para as nanoformulações carregando os metalofármacos Ru₂(FAINEs) foi cuidadosamente investigada de modo que as condições experimentais foram aperfeiçoadas até a preservação da estrutura do metalofármaco e se conseguir nanopartículas de tamanho adequado. Primeiramente, é importante destacar que o encapsulamento de drogas hidrofóbicas com o terpolímero hidrofílico PMAA-PS80-g-St requer a presença de um lipídeo e um surfactante. A primeira tentativa de síntese foi feita utilizando um procedimento previamente descrito na literatura baseado na sonicação da droga a 80 °C na presença do TP, o surfactante plurônico P68 e o ácido mirístico (MyA) (120). Essa primeira tentativa não foi bem-sucedida devido ao fato que o ácido mirístico poderia ocupar as posições dos ligantes orgânicos equatoriais nos complexos. O espectro ESI-MS(+) das Ru₂lbp-TPLNs (não mostrado) exibiu quatro grupos de picos atribuídos às espécies de fórmula [Ru₂(FAINEs)_{4-x}(My)_x]⁺ (My, C₁₄H₂₇O₂⁻; x = 0-3) onde o ânion de FAINEs é gradualmente substituído pelos ânions carboxilatos My do ácido mirístico (m/z 1024,3, [Ru₂(lbp)₄]⁺; m/z 1046,4, [Ru₂(lbp)₃(My)₁]⁺; m/z 1068,5, [Ru₂(lbp)₂(My)₂]⁺; m/z 1090,5, [Ru₂(lbp)₁(My)₃]⁺). Comportamento similar foi observado para o material previamente discutido Ru₂(FAINEs)-SPLNs (121). De fato, ácidos carboxílicos lipídicos são questionáveis para o uso com esses metalofármacos, uma vez que os ânions carboxilatos desprotonados podem substituir os ligantes carboxilatos equatoriais FAINEs. Levando em consideração o papel crucial da natureza do lipídeo, o procedimento foi conduzido com a troca do MyA pelo etil araquidato (EA), lipídeo já utilizado anteriormente com o terpolímero no encapsulamento do corante hidrofóbico Hoescht 33342 (87). Infelizmente, o procedimento falhou novamente quando no momento da ultrassonicação a mistura mudou de cor de marrom para verde, o que sugeriu uma quebra estrutural do complexo de dirutênio. Então, para evitar a degradação do metalofármaco, o procedimento foi conduzido a uma temperatura mais baixa (64 °C). No entanto, apesar da manutenção da integridade da estrutura do metalofármaco, o procedimento

resultou em nanopartículas de tamanho inapropriado para propósitos biológicos acompanhada de precipitação do complexo. Portanto, novas mudanças foram feitas no procedimento: o surfactante P68 foi substituído por PVA, e a solução de metalofármaco $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ foi preparada separadamente dos outros componentes das nanopartículas a temperatura ambiente, e depois adicionados a água DI (sob sonicação) com a mistura previamente aquecida de TP/EA/PVA.

1.2. SÍNTESE, TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA

A estratégia de síntese foi finalmente bem-sucedida em produzir nanopartículas de tamanho apropriado e carregando o metalofármaco com a estrutura em gaiola mantida. Os outros sistemas, i.e., Hlbp-TPLNs, as NPs não carregadas blank-TPLNs e as NPs fluorescentes foram preparadas utilizando procedimento sintético semelhante. Um diagrama esquemático da síntese das TPLNs é mostrado na Figura 54.

Figura 54: Diagrama esquemático das representando a preparação das $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ -TPLNs (RCOO^- = ânions do Ibuprofeno (Hlbp) e naproxeno (HNpx) FAINEs).

Os parâmetros de tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão encontram-se na Tabela 9 e a Figura 55 mostra os dados de caracterização dos sistemas de nanopartículas. O tamanho das partículas está na faixa de 130-150 nm e o diâmetro médio das TPLNs carregadas são um pouco mais baixos do que o das TPLNs não carregadas. Os índices de polidispersão que estão na faixa de 0,1-0,2 sugerem uma distribuição estreita de tamanho de partícula, que é evidenciada pelo gráfico da Figura 55a, de número de partículas *versus* tamanho de partícula. O tamanho de partícula das TPLNs carregando os metalofármacos em meio de cultura a 37 °C (cerca de 175 nm) cresceu quando comparado com o tamanho delas em água (cerca de 130 nm), mas permaneceu quase inalterado por até 5 dias (Figura 55b) sugerindo boa estabilidade coloidal das nanoformulações. Os valores de potencial zeta (ZP) das TPLNs carregadas estão ao redor de -40 mV, indicando boa estabilidade dos sistemas de nanopartículas.

Figura 55: (a) Distribuição de tamanho das Ru₂(FAINES)-TPLNs. (b) Tamanho das Ru₂(FAINES)-TPLNs em meio de cultura a 37°C em função do tempo.

Tabela 9: Tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, drug loading e eficiência de encapsulamento para as TPLNs. Os dados são mostrados como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Sistema de NPs	Tamanho de partícula (nm)	Índice de polidispersão (PDI)	Potencial Zeta (mV)	Eficiência de encapsulamento (%)	Drug Loading (%)
Rulbp-TPLNs	132,6 $\pm$ 3,5	0,204 $\pm$ 0,009	-45,2 $\pm$ 0,9	97	12
RuNpx-TPLNs	129,9 $\pm$ 11,0	0,255 $\pm$ 0,013	-42,6 $\pm$ 0,2	90	11
Hlbp-TPLNs	148,2 $\pm$ 22,0	0,229 $\pm$ 0,014	-43,8 $\pm$ 1,1	87	9
blank-TPLNs	150,2 $\pm$ 5,2	0,182 $\pm$ 0,006	-53,4 $\pm$ 1,3	-	-

1.3. DRUG LOADING

Para o cálculo da eficiência de encapsulamento do complexo, a suspensão de nanopartículas foi centrifugada em filtro de 30 kDa por 5 min á 4000 rpm. Para se determinar o drug loading das nanopartículas contendo os complexos de Ru, o procedimento utilizado foi o de dissolver as NPs isoladas e retidas no filtro em 5 mL de etanol e enviar para análise de ICP-OES para a quantificação de Ru. No caso das NPs com Hlbp, o procedimento foi o de utilizar o filtrado com a técnica de UV-vis para determinar a quantidade de Hlbp livre na solução. No caso das Rulbp-TPLNs e RuNpx-TPLNs, o resultado da análise de ICP para a NPs dissolvidas em etanol, o drug loading e a eficiência de encapsulamento, encontram-se na Tabela 9. As definições de eficiência de encapsulamento e drug loading são conforme as equações (1) e (2) abaixo.

Equação 8: Cálculo do drug loading

$$\text{Drug loading} = \frac{\text{massa de droga nas NPs}}{\text{Massa TP} + \text{EA} + \text{droga nas NPs}}$$

Equação 9: Cálculo da eficiência de encapsulamento

$$\text{Eficiência de encapsulamento} = \frac{\text{massa de droga nas NPs}}{\text{massa de droga utilizada na síntese}}$$

As TPLNs mostraram um drug loading de cerca de 10% e os resultados demonstraram que os sistemas de NPs são capazes de carregar grande quantidade dessas drogas. A eficiência de encapsulamento em cerca de 90 % mostra que o procedimento foi bem-sucedido no encapsulamento das drogas nas TPLNs. Para ambas as NPs, Rulbp-TPLNs e RuNpx-TPLNs, foi feita a análise de Ru depois de as

nanopartículas serem filtradas e dissolvidas em etanol para avaliar a quantidade de complexo carregada. Para as Hlbp-TPLNs, foi analisada a banda do ibuprofeno em 264 nm para a solução filtrada. As curvas de calibração e o espectro UV-vis da solução filtrada é mostrado na seção de apêndice (Figura 74).

1.4. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

A técnica de microscopia de força atômica foi utilizada para confirmar o tamanho das NPs e também para dar informações sobre sua forma. A partir das imagens AFM das Rulbp-TPLNs (Figura 56) pode-se perceber que as NPs são aproximadamente esféricas com certa deformação. O histograma de distribuição de tamanho pode ser visto na Figura 57a e na Figura 57b para Rulbp-TPLNs e RuNpx-TPLNs, respectivamente. Os valores observados estão próximos dos obtidos anteriormente por DLS. A partir das imagens obtidas, o valor médio do diâmetro das Rulbp-TPLNs está em 118 nm, e no histograma está em 134 nm. Para as RuNpx-TPLNs, o valor médio do diâmetro está em 134 nm, e no histograma está em 150 nm. Percebe-se que as NPs com RuNpx são um pouco maiores do que as NPs com Rulbp, o que pode ser justificado pelo tamanho do complexo RuNpx ser maior do que o do Rulbp.

Figura 56: a) AFM das Rulbp-TPLNs; b) AFM das RuNpx-TPLNs

Figura 57: a) Histograma de distribuição RuIbp-TPLNs; b) Histograma de distribuição RuNpx-TPLNs.

1.5. ESPECTROSCOPIA UV-Vis

O espectro eletrônico de absorção foi feito para as soluções etanólicas das NPs centrifugadas. Como pode ser visto na Figura 58, as $\text{Ru}_2(\text{FAINes})\text{-TPLNs}$ mostram a banda em cerca de 430 nm, referente a transição eletrônica $\pi(\text{Ru-O}) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$ dos complexos de valência mista e tetracarboxilatos de $\text{Ru}_2(\text{II,III})$. Assim, esses resultados sugerem a presença da estrutura em gaiola $[\text{Ru}_2(\text{FAINes})_4]^+$.

Figura 58: Espectro de absorção eletrônica para $\text{Ru}_2(\text{FAINes})\text{-TPLNs}$.

1.6. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO FTIR-ATR

O espectro ATR-FTIR das RuIbp-TPLNs, RuNpx-TPLNs, os correspondentes metalofármacos livres e as blank-TPLNs na região de 1800-1000 cm^{-1} são mostrados na Figura 59. As blank-TPLNs exibiram características de ambos os componentes, TP e EA. As bandas atribuídas principalmente ao TP são: a banda fraca em 1700 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})$ estiramento da carbonila do PMAA), a banda em 1558 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ estiramento assimétrico do carboxilato referente ao carboxilato iônico do parcialmente desprotonado PMAA), as bandas nas frequências 1110-1020 cm^{-1} que são associadas aos estiramentos $\nu(\text{CO})$ e $\nu(\text{CC})$ do anel de glicose no amido. As principais bandas atribuídas ao EA são: a banda em 1738 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})$ estiramento de éster), as bandas em 1472 e 1463 cm^{-1} (modos de deformação $\delta_{\text{a}}(\text{CH}_2)$ e $\delta_{\text{a}}(\text{CH}_3)$, respectivamente) e as bandas em 1200-1000 cm^{-1} ($\nu(\text{CO})$ modos de estiramento de éster). Essas bandas atribuídas ao TP e ao EA também aparecem para as nanopartículas carregadas Ru₂(FAINEs)-TPLNs. No entanto, podem ser observadas mudanças espectrais e bandas de vibração adicionais em relação as blank-TPLNs.

O espectro IR dos metalofármacos livres RuIbp e RuNpx são caracterizados pelos modos de estiramento $\nu(\text{COO})$ dos ligantes ânions carboxilatos ligados em ponte [em cm^{-1} : $\nu_{\text{a}}(\text{COO})$ a 1460 (RuIbp) e 1455 (RuNpx); $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$ a 1408 (RuIbp) e 1406 (RuNpx)], de acordo com os dados previamente reportados (51) (56) (121) (48). No caso das Ru₂(FAINEs)-TPLNs, essas bandas podem sobrepor com as intensidades das bandas do EA em 1472 e 1463 cm^{-1} e isso torna difícil a atribuição correta dos modos $\nu_{\text{a}}(\text{COO})$ dos FAINEs. No entanto, a presença de bandas novas relativamente intensas (em comparação com as blank-TPLNs) a 1409 (RuIbp-TPLNs) e 1405 (RuNpx-TPLNs) cm^{-1} , atribuída a $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$ dos FAINEs ligados em ponte, contribui com a proposição do encapsulamento dos metalofármacos. As bandas fracas em 1500-1520 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento do anel $\nu(\text{CC})$ dos ligantes FAINEs no espectro Ru₂(FAINEs)-TPLNs. Bandas típicas do ligante Npx são encontradas para o material RuNpx-TPLNs a 1633 ($\nu(\text{C}=\text{C})$ estiramento do anel) e 1605 (deformação CH). Além disso, a frequência de estiramento de éter $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ sofre um deslocamento de 1270 (RuNpx) para 1263 cm^{-1} (RuNpx-TPLNs), e isso pode sugerir a presença de pontes de hidrogênio com o TP nas nanopartículas. A banda em 1558 cm^{-1} atribuída ao $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ ao ácido carboxílico do PMAA parcialmente desprotonado para as blank-TPLNs

aparece em frequências mais baixas para ambos $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})\text{-TPLNs}$. Esse deslocamento pode sugerir alguma interação eletrostática desses grupos negativamente carregados COO^- com a carga positiva do $[\text{Ru}_2(\text{FAINEs})_4]^+$ se for considerado que o ligante pode perder o cloreto na posição axial. Uma coordenação na posição axial do carboxilato, como foi proposta para o miristato nas SPLNs (121), seria menos plausível nesse caso já que os grupos COO^- estão estericamente difíceis de serem acessados. Adicionalmente às bandas discutidas aqui, na região $4000\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ (Figura 60), são observadas bandas características do TP e do EA em (cm^{-1}): 3350, banda fraca e larga nas blank-TPLNs ($\nu(\text{OH})$ do TP); 2912, 2842 bandas intensas das blank-TPLNs; 2917, 2846 em RuIbp-TPLNs e 2917, 2846 em RuNpx-TPLNs (principalmente $\nu(\text{CH})$ do TP e EA);

Figura 59: Espectro ATR na região $1800\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ para RuIbp (a), RuIbp-TPLNs (b), blank-TPLNs (c), RuNpx-TPLNs (d) e RuNpx (e).

Figura 60: Espectro ATR na região 4000-1800 cm^{-1} para RuIbp (a), RuIbp-TPLNs (b), blank-TPLNs (c), RuNpx-TPLNs (d) e RuNpx (e).

1.7. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os espectros ESI-MS(+) são mostrados na Figura 61. A amostra isolada das RuIbp-TPLNs mostra os picos típicos da distribuição isotópica do rutênio. O m/z máximo em 1024,26 é atribuído ao fragmento iônico $[\text{Ru}_2(\text{lbp})_4]^+$ com boa concordância ao padrão MS simulado para $[\text{Ru}_2(\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_2)_4]^+$ (calc. m/z , 1024,3) (56). De modo similar, o pico observado para as RuNpx-TPLNs é típico para o padrão isotópico de rutênio. O máximo a m/z 1120,13 é atribuído ao fragmento iônico $[\text{Ru}_2(\text{Npx})_4]^+$ que concorda com o padrão MS do espectro simulado para $[\text{Ru}_2(\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_3)_4]^+$ (calc. m/z 1120,15) (121). Esses resultados contribuem para a proposição de que a estrutura em gaiola dos metalofármacos foi mantida e carrega os quatro ligantes FAINes por núcleo dimetálico. Foi encontrado um pico adicional MS para as $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})\text{-TPLNs}$ (com intensidade relativa de cerca de 15 vezes menor do que o pico principal) que exibe o padrão isotópico de rutênio. Os dados sugerem a presença de fragmentos de espécies mono

positivas da combinação dos metalofármacos RuIbp e RuNpx com o EA ($C_{22}H_{44}O_2$), m/z em 1364,64, RuIbp-TPLNs (calc. 1364,6 para $[Ru_2(C_{13}H_{17}O_2)_4]^+ + C_{22}H_{44}O_2$), e m/z em 1460,62, RuNpx-TPLNs (calc. 1460,5 para $[Ru_2(C_{14}H_{13}O_3)_4]^+ + C_{22}H_{44}O_2$). Esses dados sugerem uma interessante interação entre o etil araquidato com os metalofármacos, provavelmente através de interações hidrofóbicas fracas, sem que haja mudanças estruturais na estrutura em gaiola dos complexos. Assim, esses resultados reforçam a importância de se escolher um lipídeo adequado na preparação das nanoformulações contendo os metalofármacos Ru_2 (FAINEs) de modo a manter a estrutura do complexo preservada.

Figura 61: Espectro de massas ESI-MS(+) para RuIbp-TPLNs e RuNpx-TPLNs.

VI. 2 TESTES *IN VITRO*

2.1. CAPTAÇÃO CELULAR DAS TPLNs *IN VITRO*

Foi avaliada a captação celular das nanopartículas fluorescentes não carregadas blank-TPLNs na linha celular U87MG em experimentos dependentes do tempo e da temperatura. O processo mostrou-se ser dependente do tempo (Figura 62a) e um rápido crescimento na captação das NPs foi observado nas primeiras 6 h continuando a crescer de modo mais lento até 24h. Para entender melhor o mecanismo de captação, as células foram tratadas e incubadas em diferentes temperaturas, 4 °C e 37 °C. O processo de internalização das NPs pode envolver mecanismos dependentes de energia como processos de endocitose, ou não dependentes de energia como a difusão passiva. Na temperatura mais baixa (4 °C) os processos dependentes de energia são bloqueados porque a membrana celular fica mais rígida e processos de difusão passiva que não necessitam de energia ficam impedidos. Os resultados (Figura 62b) mostram uma captação das NPs muito mais baixa (cerca de 70% menor) a 4°C do que em 37 °C, sugerindo que o processo de captação celular das blank-TPLNs é dependente de energia, provavelmente via endocitose. Para analisar a localização intracelular das nanopartículas, as TPLNs fluorescentes foram incubadas com as células U87MG nas mesmas temperaturas, 4 °C e 37 °C, por 2 h. As imagens na Figura 63 permitem visualizar as TPLNs em vermelho e o núcleo corado em azul. Como mostrado na Figura 63a, a 37 °C a maioria das NPs foram encontradas dentro da membrana celular (sinal fluorescente vermelho), porém, quase não foi observada a presença das NPs no núcleo celular (ausência de sobreposição entre o sinal fluorescente vermelho e o azul). Esse resultado confirma que as TPLNs estão majoritariamente localizadas no citoplasma. A ausência de um sinal vermelho intenso a 4 °C (Figura 63b) confirma a baixa captação celular em termos de intensidade de fluorescência nessa temperatura, contribuindo com a ideia de um mecanismo de captação dependente de energia.

Figura 62: a) Captação celular das blank-TPLNs em intensidade de fluorescência para a U87MG; os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). b) Intensidade de fluorescência em % das blank-TPLNs a 4 °C e 37 °C; dados normalizados para a intensidade de fluorescência em % das blank-TPLNs a 4 °C e 37 °C; dados normalizados para a intensidade de fluorescência obtida a 37 °C. [* $p < 0,01$].

Figura 63: Microscopia de fluorescência para as células U87MG a 37 °C (a) e 4 °C (b) com 2 h incubação. Imagens da esquerda para direita são: canal de transmissão de luz, canal de luz vermelha para as TPLNs com o corante vermelho nilo, canal de luz azul para o núcleo, e sobreposição

2.2. CAPTAÇÃO CELULAR DE RUTÊNIO *IN VITRO*

As blank-TPLNs foram capazes de ser captadas pelas células, chegando ao citoplasma por um processo dependente de energia. Para complementar o estudo já realizado e verificar a captação do complexo das TPLNs, foi realizado a detecção de Ru nas células pelo teste de ICP-OES. O gráfico da Figura 64 mostra que a captação do Ru, e consequentemente das Rulbp-TPLNs, é dependente do tempo. A captação sobe rapidamente nas primeiras 24h e depois a inclinação da curva diminui, o que significa que a captação é mais lenta. Não há muita diferença na captação celular entre 48h e 72h, o que pode indicar o início de uma saturação na captação celular. Considerando a concentração de Ru no tempo máximo analisado (72h) e calculando-se a porcentagem de Ru em relação a quantidade de NPs administrada no tratamento, chega-se a cerca de 32 % de captação de Ru e, consequentemente, de captação das Rulbp-TPLNs. Esses resultados indicam que o nanoencapsulamento do complexo favorece a captação celular em cerca de 10 vezes em relação a estudos anteriores do grupo em que foi feita a administração da droga livre.

Figura 64: Captação de Ru pelas Rulbp-TPLNs na U87MG.

2.3. VIABILIDADE CELULAR

O estudo de viabilidade celular foi realizado em duas linhas celulares de glioma humano, U87MG e T98G. Essa última é conhecida por ser uma linhagem bem mais resistente a tratamentos do que a primeira. Na Figura 65 são mostrados os gráficos de número de células de acordo com a concentração dos tratamentos com Rulbp-TPLNs, RuNpx-TPLNs, blank-TPLNs e Hlbp-TPLNs testados na U87MG. Analisando os gráficos da Figura 65, pode-se perceber que o material Rulbp-TPLNs é mais efetivo no tratamento do que o material RuNpx-TPLNs, sugerindo um comportamento dose-dependente associado a inibição celular, principalmente no tempo 72h. Ambos os complexos livres, Rulbp e RuNpx, não apresentam atividade antitumoral na concentração de até $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Assim, percebe-se que o encapsulamento nas TPLNs potencializou muito a atividade dos complexos, pois uma grande atividade antiproliferativa já pode ser observada em concentrações muito baixas de complexo ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) no tempo 72h. A boa resposta ao tratamento provavelmente se deve ao fato de que as TPLNs ajudam a resolver o problema da baixa solubilidade dos complexos em meio de cultura já que os complexos sozinhos Rulbp e RuNpx apresentam atividade apenas em concentração 10 vezes maior, cerca de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Além disso, pode-se observar que o tratamento com as Rulbp-TPLNs e RuNpx-TPLNs não permitiu um aumento no número de células nas concentrações a partir de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Para avaliar a toxicidade das TPLNs sem o complexo, fez-se o teste de viabilidade celular com as blank-TPLNs (Figura 65d) e praticamente não se observa diminuição no número de células. Percebe-se que as blank-TPLNs só tem um efeito citotóxico pronunciado na concentração mais alta testada e em 72h de tratamento, mas ainda assim, o número de células é maior do que com Rulbp-TPLNs e RuNpx-TPLNs.

Como o Rulbp é um pouco mais efetivo do que o RuNpx, decidiu-se avaliar o efeito do Ru no complexo fazendo-se o teste das TPLNs carregando o fármaco orgânico livre Hlbp. Nesse caso, as concentrações testadas eram 4 vezes maiores do que as concentrações do Rulbp, já que cada mol de complexo contém 4 mols de Hlbp na estrutura $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4\text{Cl}]$. O gráfico da Figura 65c mostra que a atividade do material Hlbp-TPLNs só é pronunciada no tempo 72h, mas ainda assim, mesmo na concentração mais alta de droga (i.e., $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ Hlbp, o que corresponde a $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ Rulbp) a 72h o tratamento das células com as Hlbp-TPLNs causaram uma diminuição de apenas

30% no número de células em relação ao controle. Dessa forma, as Rulbp-TPLNs são mais efetivas já que nessa concentração e tempo houve uma diminuição de cerca de 80% no número de células em relação ao controle. Esses dados contribuem com os resultados previamente publicados pelo grupo confirmando que a estrutura do complexo Rulbp é importante na atividade antiproliferativa, uma vez que o núcleo de dirutênio faz diferença nos resultados, contribuindo para a ideia de que o complexo não age apenas como um carregador dos ligantes ibuprofenos (51) (52) (122) (54) (121).

Figura 65: Número de células U87MG em função do da concentração de droga (μmol L⁻¹) a 24, 48 e 72h para: (a) Rulbp-TPLNs, (b) RuNpx-TPLNs, (c) blank-TPLNs, e (d) Hlbp-TPLNs. Para as blank-TPLNs, volumes de NPs foram adicionados para corresponder ao equivalente da concentração de NPs das TPLNs carregadas [* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001].

Os bons resultados obtidos nos testes com a U87MG para as Rulbp-TPLNs nos encorajaram a realizar testes com uma linhagem celular de glioma mais resistente, a T98G. Vale ressaltar que o complexo Rulbp foi testado na linhagem T98G pela primeira vez nesse trabalho. Além de possuir uma menor atividade, os testes não foram realizados com o RuNpx porque esse complexo possui maiores problemas de solubilidade, mesmo em etanol, nas concentrações utilizadas. A curva de número de células *versus* concentração de droga mostra que o número de células diminui à medida que a concentração de droga aumenta tanto para o Rulbp administrado na forma livre como para as Rulbp-TPLNs. Os gráficos da Figura 66 mostram que a atividade do Rulbp foi potencializada com o encapsulamento nas TPLNs e que isso é mais pronunciado no tempo 72h. Assim, ao utilizar as NPs, o Rulbp se mostra mais efetivo, como pode ser visto na concentração de $200\ \mu\text{mol L}^{-1}$ em que depois do tratamento com as Rulbp-TPLNs só restaram cerca de 40% das células, enquanto que para o Rulbp havia 70%. Para avaliar a toxicidade das TPLNs sem o complexo, fez-se o teste de viabilidade celular com as blank-TPLNs (Figura 66d) e praticamente não se observa diminuição no número de células. Percebe-se que as blank-TPLNs só tem um efeito citotóxico pronunciado na concentração mais alta testada e a 72h. Ainda assim, o número de células é bem maior do que no mesmo tempo com as Rulbp-TPLNs.

Para comparar o efeito do metalofármaco encapsulado com o ibuprofeno encapsulado, foi investigada a atividade das Hlbp-TPLNs mantendo a taxa de quatro vezes maior a concentração do Hlbp em relação ao Rulbp nas TPLNs. O gráfico do número de células *versus* concentração de droga mostra que as Hlbp-TPLNs também são capazes de diminuir o número de células a 72h. No entanto, elas são altamente dose responsivas em concentrações de droga acima de $400\ \mu\text{mol L}^{-1}$ (correspondente a $100\ \mu\text{mol L}^{-1}$ de Rulbp), restando poucas células em $800\ \mu\text{mol L}^{-1}$ (correspondente a $200\ \mu\text{mol L}^{-1}$ de Rulbp). A diminuição do número de células a partir de $400\ \mu\text{mol L}^{-1}$ de Hlbp-TPLNs é muito expressiva nos tempos 48h e 72h. Percebe-se, assim, que o comportamento das Hlbp-TPLNs na T98G é bem diferente do que se observa na célula menos resistente U87MG, uma vez que o Hlbp encapsulado é citotóxico e capaz de matar as células T98G. A comparação da performance das Rulbp-TPLNs com Hlbp-TPLNs em ambas as células U87MG e T98G mostra que no caso da U87MG, que requer menos droga para um efeito antiproliferativo, o Rulbp é mais efetivo que o Hlbp. Com uma linhagem celular mais resistente como a T98G, no entanto, em que é

necessária uma maior quantidade de droga para se obter um efeito antitumoral, outros mecanismos de apoptose podem ser ativados com o uso do Hlbp. Em doses mais baixas, no entanto, as Rulbp-TPLNs foram mais efetivas do que as Hlbp-TPLNs em inibir a proliferação das células T98G, mostrando uma maior eficácia dos metalofármacos encapsulados em relação às drogas orgânicas.

Figura 66: Número de células T98G em função da concentração de droga (μmol L⁻¹) a 24, 48 e 72h para: (a) Rulbp-TPLNs, (b) RuNpx-TPLNs, (c) blank-TPLNs, e (d) Hlbp-TPLNs. Para as blank-TPLNs, volumes de NPs foram adicionados para corresponder ao equivalente da concentração de NPs das TPLNs carregadas. [* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001].

A Tabela 10 e a Tabela 11 mostram a porcentagem de viabilidade celular de todos os sistemas testados e mostrados nos gráficos anteriores. Para a U87MG (Tabela 10) percebe-se que há uma pequena diminuição na viabilidade celular do sistema Rulbp-TPLNs, principalmente na concentração de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, mas pode-se dizer que em linhas gerais a atividade observada em todos os sistemas é devido a característica antiproliferativa e não apoptótica dos complexos. Para a T98G (Tabela 11) percebe-se que também não há uma grande diminuição na viabilidade celular com os tratamentos e, portanto, pode-se dizer que a atividade antitumoral é devido a efeitos antiproliferativos. Apenas no sistema Hlbp-TPLNs observou-se uma diminuição maior na viabilidade celular, o que indica maior citotoxicidade do Hlbp em relação ao Rulbp nas concentrações mais altas utilizadas.

Tabela 10: Viabilidade celular da U87MG nos tratamentos com Rulbp-TPLNs, RuNpx-TPLNs, blank-TPLNs e Rulbp.

Viabilidade celular (n° células mortas / células totais) – U87MG					
$\mu\text{mol.L}^{-1}$	0	10	25	37	50
Rulbp-TPLNs 24h	97,6 $\pm$ 1,7	93,2 $\pm$ 5,0	89,3 $\pm$ 5,4	94,1 $\pm$ 1,0	89,2 $\pm$ 4,5
Rulbp-TPLNs 48h	98,9 $\pm$ 1,0	96,6 $\pm$ 2,0	85,3 $\pm$ 9,0	92,0 $\pm$ 1,0	82,0 $\pm$ 11,0
Rulbp-TPLNs 72h	98,8 $\pm$ 1,0	91,5 $\pm$ 3,0	83,8 $\pm$ 9,1	73,6 $\pm$ 4,5	70,5 $\pm$ 3,1
RuNpx-TPLNs 24h	93,7 $\pm$ 1,4	94,8 $\pm$ 1,2	91,8 $\pm$ 2,8	91,6 $\pm$ 1,0	92,1 $\pm$ 1,3
RuNpx-TPLNs 48h	97,2 $\pm$ 1,0	95,8 $\pm$ 1,0	93,1 $\pm$ 3,3	94,5 $\pm$ 2,5	91,2 $\pm$ 3,4
RuNpx-TPLNs 72h	97,5 $\pm$ 1,4	92,8 $\pm$ 4,8	89,4 $\pm$ 7,1	87,8 $\pm$ 2,9	88,1 $\pm$ 1,3
blank-TPLNs 24h	98,0 $\pm$ 1,1	97,6 $\pm$ 2,1	96,9 $\pm$ 1,7	96,1 $\pm$ 2,8	97,8 $\pm$ 1,0
blank-TPLNs 48h	98,8 $\pm$ 1,0	98,6 $\pm$ 1,0	98,5 $\pm$ 1,0	97,9 $\pm$ 0,9	97,7 $\pm$ 0,6
blank-TPLNs 72h	98,7 $\pm$ 0,9	98,2 $\pm$ 1,7	98,2 $\pm$ 1,2	98,0 $\pm$ 1,0	96,4 $\pm$ 3,8
$\mu\text{mol.L}^{-1}$	0	40	100	148	200
Hlbp-TPLNs 24h	92,8 $\pm$ 2,0	95,3 $\pm$ 2,3	93,2 $\pm$ 1,1	92,3 $\pm$ 1,6	92,0 $\pm$ 3,5
Hlbp-TPLNs 48h	97,7 $\pm$ 1,6	96,4 $\pm$ 1,2	93,3 $\pm$ 6,5	94,1 $\pm$ 4,8	88,0 $\pm$ 13,4
Hlbp-TPLNs 72h	98,0 $\pm$ 1,0	98,0 $\pm$ 1,0	97,7 $\pm$ 1,0	96,9 $\pm$ 1,0	97,4 $\pm$ 1,0

Tabela 11: Viabilidade celular da T98G nos tratamentos com Rulbp-TPLNs, Rulbp. blank-TPLNs e Hlbp-TPLNs.

Viabilidade celular (n° células mortas / células totais) – T98G						
$\mu\text{mol.L}^{-1}$	0	25	50	100	150	200
Rulbp-TPLNs 24h	96,8 $\pm$ 2,5	95,8 $\pm$ 2,1	95,0 $\pm$ 1,5	93,8 $\pm$ 5,9	93,5 $\pm$ 4,6	93,1 $\pm$ 1,0
Rulbp-TPLNs 48h	97,5 $\pm$ 1,0	96,3 $\pm$ 1,3	95,7 $\pm$ 2,9	96,4 $\pm$ 1,6	95,4 $\pm$ 1,6	92,5 $\pm$ 2,2
Rulbp-TPLNs 72h	97,0 $\pm$ 1,3	96,7 $\pm$ 2,1	95,2 $\pm$ 3,2	94,2 $\pm$ 4,4	93,5 $\pm$ 3,7	90,2 $\pm$ 4,7
Rulbp- 24h	95,4 $\pm$ 3,0	95,6 $\pm$ 1,0	96,5 $\pm$ 1,2	91,6 $\pm$ 2,0	94,9 $\pm$ 3,4	93,7 $\pm$ 1,1
Rulbp- 48h	97,5 $\pm$ 1,0	97,9 $\pm$ 1,0	97,0 $\pm$ 1,8	97,4 $\pm$ 1,0	98,2 $\pm$ 1,3	97,0 $\pm$ 2,8
Rulbp- 72h	98,1 $\pm$ 1,0	97,7 $\pm$ 1,0	97,5 $\pm$ 1,0	97,5 $\pm$ 1,7	95,4 $\pm$ 1,4	94,7 $\pm$ 1,6
blank-TPLNs 24h	96,2 $\pm$ 2,0	97,6 $\pm$ 1,0	96,5 $\pm$ 1,7	96,6 $\pm$ 1,7	95,8 $\pm$ 1,4	96,8 $\pm$ 2,2
blank-TPLNs 48h	97,6 $\pm$ 1,0	98,0 $\pm$ 1,0	98,1 $\pm$ 1,0	97,4 $\pm$ 2,1	98,0 $\pm$ 1,0	97,1 $\pm$ 2,2
blank-TPLNs 72h	97,1 $\pm$ 1,4	98,6 $\pm$ 1,0	97,2 $\pm$ 1,4	97,9 $\pm$ 1,0	97,7 $\pm$ 1,2	96,9 $\pm$ 2,6
$\mu\text{mol.L}^{-1}$	0	100	200	400	600	800
Hlbp-TPLNs 24h	97,9 $\pm$ 1,0	98,7 $\pm$ 1,0	95,9 $\pm$ 1,0	96,1 $\pm$ 2,2	96,5 $\pm$ 3,5	88,5 $\pm$ 4,4
Hlbp-TPLNs 48h	97,3 $\pm$ 1,0	96,0 $\pm$ 1,0	98,8 $\pm$ 1,5	97,7 $\pm$ 2,7	87,9 $\pm$ 2,1	80,3 $\pm$ 6,6
Hlbp-TPLNs 72h	97,4 $\pm$ 1,1	97,9 $\pm$ 1,3	97,7 $\pm$ 1,0	97,5 $\pm$ 1,9	81,9 $\pm$ 14,9	66,3 $\pm$ 14,6

VI. 3 CONCLUSÃO

Uma nova nanoformulação foi desenvolvida com sucesso para o encapsulamento dos metalofármacos de dirutênio(II,III)-FAINEs nas nanopartículas com o terpolímero, TPLNs, que são capazes de atingir o cérebro. Condições experimentais sintéticas foram cuidadosamente investigadas para que a estrutura do metalofármaco encapsulado pudesse ser preservada e de modo que fosse alcançada condições de tamanho, potencial zeta e estabilidade adequadas. As TPLNs carregadas com os metalofármacos tem forma aproximadamente esférica e valores de tamanho de partícula e potencial zeta adequados para a entrega em tumores. A estabilidade coloidal das TPLNs carregadas em meio de cultura celular, na temperatura fisiológica, é um ótimo pré-requisito para uma administração intravenosa. A integridade da estrutura em gaiola dos complexos $[\text{Ru}_2(\text{FAINEs})_4]$, em que os quatro carboxilatos dos fármacos orgânicos FAINEs estão ligados ao núcleo de dirutênio, foi confirmada por espectrometria de massas e outras técnicas espectroscópicas. O encapsulamento dos metalofármacos nas TPLNs promoveu o aumento do efeito antiproliferativo em relação

aos metalofármacos sozinhos em células humanas de glioblastoma. Um efeito antiproliferativo significativo para as $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})\text{-TPLNs}$ foi encontrado para concentração de droga de cerca de $10\ \mu\text{mol L}^{-1}$, o que é aproximadamente 10 vezes mais baixo do que o que é requerido para os metalofármacos livres $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ na linhagem celular U87MG. Os testes das RuIbp-TPLNs na linhagem celular T98G revelou uma atividade promissora desses metalofármacos para tratar essa linhagem de glioma humano altamente resistente. A comparação entre as atividades das RuIbp-TPLNs e HIbp-TPLNs corrobora com a vantagem de serem utilizados os metalofármacos em relação aos fármacos orgânicos, mesmo quando são encapsulados nas TPLNs. Os resultados suportam a relevância da estrutura do complexo $[\text{Ru}_2(\text{lbp})_4]$ no modo de ação dos metalofármacos e a importância do núcleo de dirutênio em que, ao invés de agir apenas como um carregador de ibuprofeno, tem papel fundamental na atividade antitumoral. A biocompatibilidade das NPs não carregadas blank-TPLNs foi verificada em ambas as linhagens celulares U87MG e T98G. A baixa citotoxicidade dos metalofármacos é suportada pelas altas porcentagens de viabilidade celular, sugerindo assim que a atividade antitumoral dos compostos $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ podem estar principalmente relacionadas a efeitos antiproliferativos. As células de glioma U87MG são capazes de internalizarem as TPLNs no citoplasma celular por um mecanismo dependente de energia. A captação celular das nanopartículas carregando metalofármacos RuIbp-TPLNs nessas células ocorrem de modo significativo nas primeiras 24h de incubação e o nanoencapsulamento favorece a captação celular em cerca de 10 vezes em relação a administração da droga livre. O desenvolvimento dessa nanoformulação dos metalofármacos aumenta a perspectiva de se utilizar os complexos dirutênio(II,III)-FAINEs, em particular o metalofármaco RuIbp , para a possibilidade de tratamento de câncer de cérebro do tipo glioblastoma incluindo os tumores mais resistentes. Os resultados demonstram o potencial do sistema $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})\text{-TPLNs}$ para serem utilizados em testes clínicos futuros.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho descrito nessa tese envolve a síntese de novos complexos, como também o nanoencapsulamento dos compostos já estudados pelo grupo. Ambos os objetivos contribuem para os estudos já realizados pelo grupo com foco em aplicação antitumoral. Na tentativa de se obter novos complexos de rutênio contendo FAINes e 4-aminopiridina na posição axial da estrutura em gaiola, percebeu-se que na utilização dos complexos em gaiola como precursores pode-se obter resultados distintos de acordo com os ligantes que estão nas posições equatoriais. Quando o ligante é o acetato, por esse método, a síntese do complexo com as moléculas de 4AP na posição axial é alcançada, dando origem ao complexo $[\text{Ru}_2(\text{Ac})_4(4\text{AP})_2]\text{PF}_6$. Esse complexo foi caracterizado pelas técnicas de análise elementar, espectroscopias, análise térmica, entre outras, e mostrou ser um complexo instável para que os estudos fossem aprofundados para aplicação biológica. Quando o ligante é um FAINE, como o ibuprofeno, nessa rota de síntese, provavelmente o efeito estérico não permite o arranjo com as moléculas de 4AP na posição axial. Assim, há um rearranjo na estrutura do complexo dando origem ao composto $[\text{Ru}_2\text{O}(\text{Ibp})_2(4\text{AP})_6]\text{Cl}_2$ que não possui uma ligação Ru-Ru como no caso do precursor RuIbp , mas contém uma ligação Ru-O-Ru que modifica todas as suas características. Esse composto azul foi caracterizado pelas técnicas de análise elementar, espectroscopias, análise térmica, além de ter sido estudado o seu comportamento em um equilíbrio de aquação/complexação. Foi verificado em diversas técnicas a possibilidade da labilização de uma das moléculas de 4AP na posição trans a ponte μ -oxo, o que pode conferir ao complexo possibilidades interessantes em meio biológico. O complexo novo, assim como seus ligantes, foram testados *in vitro* em células de glioma humano U87MG e os resultados foram promissores para estudos futuros, uma vez que o composto mostrou alta efetividade sendo ativo em concentrações tão baixas como $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em 72h.

Em relação ao nanoencapsulamento dos complexos já estudados pelo grupo, RuIbp e RuNpx , foram desenvolvidos dois diferentes grupos de materiais, $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ -SPLNs e $\text{Ru}_2(\text{FAINEs})$ -TPLNs. O primeiro grupo, RuIbp -SPLNs e RuNpx -SPLNs, foi

testado em células para câncer de mama e próstata. As NPs sintetizadas mostraram características adequadas para aplicação em tumor, sendo esféricas, com tamanho ao redor de 120 nm e potencial zeta -20 mV, alta eficiência de encapsulamento e estabilidade coloidal. Os complexos encapsulados também foram eficientes nas células testadas com um IC₅₀ entre 60-100 µmol.L⁻¹ em 72h, sendo mais efetivos do que as drogas livres ou os correspondentes fármacos orgânicos encapsulados, demonstrando assim a importância da estrutura em gaiola do complexo, ainda que os resultados de espectrometria de massas tenham mostrado algumas trocas de ligantes pelo ácido mirístico. A captação celular foi verificada por microscopias de fluorescência e foi constatada a boa acumulação das SPLNs no tumor por estudos *in vivo* e *ex vivo* de biodistribuição e bioacumulação por fluorescência. O segundo sistema desenvolvido de NPs, RuIbp-TPLNs e RuNpx-TPLNs, tinha por objetivo a entrega dos complexos em tumor de cérebro do tipo glioblastoma, sendo testado em células de glioma humano U87MG e T98G, sendo esta última a mais resistente. As NPs sintetizadas mostraram características adequadas para aplicação em tumor, sendo esféricas, com tamanho ao redor de 130 nm e potencial zeta -40 mV, alta eficiência de encapsulamento e estabilidade coloidal. As análises por espectroscopias mostraram que a estrutura dos complexos foi mantida na síntese. Os complexos encapsulados também foram eficientes nas células testadas sendo o RuIbp-TPLNs efetivo em concentrações tão baixas como 10 µmol.L⁻¹ em 72h na U87MG, e melhores que as drogas livres ou o correspondente fármaco orgânico encapsulado, demonstrando assim a importância da estrutura em gaiola do complexo. A captação celular foi verificada por microscopias de fluorescência, assim como foi verificada a captação de Ru pelas células.

Os resultados alcançados ajudaram no desenvolvimento da bioinorgânica dos complexos de rutênio para aplicação antitumoral e abrem perspectivas para que estudos mais aprofundados possam ser realizados. As NPs desenvolvidas possibilitam o tratamento das drogas inorgânicas insolúveis em água via administração *i.v.* e elevam as possibilidades de ensaios clínicos dos compostos desenvolvidos pelo grupo.

APÊNDICE

VIII. 1 DRUG LOADING SPLNs

- Rulbp-SPLNs

Figura 67: Esquerda: espectro UV-vis de soluções de Rulbp em várias concentrações. Direita: Curva de calibração para a solução de Rulbp em 431 nm. Meio: espectro UV-vis para a solução de Rulbp não encapsulado.

Concentração de Rulbp no filtrado (não encapsulado): 0,0519 mg.mL⁻¹

Máxima concentração: 1 mg.mL⁻¹

Eficiência de encapsulamento: 94,81 %

Figura 68: Esquerda: espectro UV-vis de soluções de RuNpx em várias concentrações. Meio: Curva de calibração para a solução de RuNpx em 316 nm. Direita: espectro UV-vis para a solução de RuNpx não encapsulado.

Concentração de RuNpx no filtrado (não encapsulado): 0,0338 mg.mL⁻¹

Máxima concentração: 1 mg.mL⁻¹

Eficiência de encapsulamento: 96,62 %

- Hlbp-SPLNs

Figura 69: Esquerda: espectro UV-vis de soluções de Hlbp em várias concentrações. Meio: Curva de calibração para a solução de Hlbp em 264 nm. Direita: espectro UV-vis para a solução de Hlbp não encapsulado.

Concentração de Hlbp no filtrado (não encapsulado): 0,0823 mg.mL⁻¹

Máxima concentração: 0,7 mg.mL⁻¹

Eficiência de encapsulamento: 88,24 %

- HNpx-SPLNs

Figura 70: Esquerda: espectro UV-vis de soluções de HNpx em várias concentrações. Meio: Curva de calibração para a solução de HNpx em 317 nm. Direita: espectro UV-vis para a solução de HNpx não encapsulado.

Concentração de HNpx no filtrado (não encapsulado): 0,0179 mg.mL⁻¹

Máxima concentração: 0,8 mg.mL⁻¹

Eficiência de encapsulamento: 97,76 %

VIII. 2 CAPTAÇÃO CELULAR SPLNs

Figura 71: Imagens de microscopia por fluorescência das células MDA-MB-231 e DU145. As células foram incubadas a 4 °C e 37 °C (2 h de incubação); imagens da esquerda para a direita são canal de luz de transmissão, canal de luz vermelha para as SPLNs coradas com vermelho nilo, canal de luz azul para o núcleo corado e sobreposição das SPLNs e o núcleo da célula.

Figura 72: Imagens de microscopia confocal da MDA-MB-231 mostrando a internalização das SPLNs depois de 2h de incubação a 37 °C. A captação celular pode ser evidenciada pela sobreposição das imagens. Imagens da esquerda para a direita: canal de campo claro, canal de luz vermelha para as SPLNs, canal de luz azul para o núcleo corado e sobreposição das células. As imagens foram obtidas no modo z-stack com profundidade de 14 μm , 1 μm para cada corte. A escala corresponde a 10 μm .

Figura 73: Imagens de microscopia confocal da DU145 mostrando a internalização das SPLNs depois de 2h de incubação a 37 °C. A captação celular pode ser evidenciada pela sobreposição das imagens. Imagens da esquerda para a direita: canal de campo claro, canal de luz vermelha para as SPLNs, canal de luz azul para o núcleo corado e sobreposição das células. As imagens foram obtidas no modo z-stack com profundidade de 14 μm , 1 μm para cada corte. A escala corresponde a 20 μm .

VIII. 3 DRUG LOADING TPLNs

Figura 74: Espectros UV-vis para a) Hlbp de 0,02 a 0,20 mg.mL⁻¹. b): Curva de calibração para Hlbp em 264 nm em 50% etanol. c) filtrado das Hlbp-TPLNs.

BIBLIOGRAFIA

- 1 ZAMBONI, W. C. et al. Best practices in cancer nanotechnology: perspective from NCI nanotechnology alliance. **Clin. Cancer Res.**, v. 18, p. 3229-3241, 2012.
- 2 MEIER-MENCHES, S. M. et al. Structure–activity relationships for ruthenium and osmium anticancer agents – towards clinical development. **Chem. Soc. Rev.**, v. 47, p. 909-928, 2018.
- 3 COLLIER, W. A.; KRAUSS, F. Zur experimentellen Therapie der Tumoren. **Z. Krebsforsch.**, v. 34, p. 525-530, 1931.
- 4 ROSERNBERG, B.; CAMP, L. V.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, v. 205, p. 698-699, 2005.
- 5 ROSENBERG, B. et al. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature**, v. 222, p. 385-386, 1969.
- 6 WATERS, M. D. et al. Toxicity of platinum (IV) salts for cells of pulmonary origin. **Environ. Health Perspect.**, v. 12, p. 45-56, 1975.
- 7 PRESTAYKO, A. W. et al. Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II). **Cancer Treat. Rev.**, v. 6, p. 17-39, 1979.
- 8 BARRY, N. P. E.; SADLER, P. J. Exploration of the medical periodic table: towards new targets. **Chem. Commun.**, v. 49, p. 5106-5131, 2013.
- 9 NIKOLAOU, S.; SILVA, C. F. N. Considerações sobre textos que tratam do desenvolvimento de metalofármacos de rutênio. **Quim. Nova**, v. 41, p. 833-838, 2018.
- 10 FUEREDER, T.; BERGER, W. Metal drugs become targeted. **ESMO Open**, v. 17, p. 2-3, 2017.
- 11 DURIG, J. R. et al. The induction of filamentous growth in *Escherichia coli* by ruthenium and palladium complexes. **Chem. Biol. Interact.**, v. 13, p. 287-294, 1976.

12 CLARKE, M. J. Electrochemistry, synthesis, and spectra of pentaammineruthenium(III) complexes of cytidine, adenosine, and related ligands. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 100, p. 5068-5075, 1978.

13 CLARKE, M. J. et al. Chemical Considerations in the Design of Ruthenium Anticancer Agents. **J. Clin. Hematol. Oncol**, v. 7, p. 274-288, 1977.

14 CLARKE, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coord. Chem. Rev**, v. 236, p. 209-233, 2003.

15 KEPPLER, B. K.; RUPP, W. Antitumor activity of imidazolium-bisimidazole-tetrachlororuthenate (III). **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 111, p. 166-168, 1986.

16 BERGER, M. R. et al. Efficacy of new ruthenium complexes against chemically induced autochthonous colorectal carcinoma in rats. **Anticancer Res.**, v. 9, p. 761-765, 1989.

17 TRYNDA-LEMIESZ, L. K. B. K.; KOZLOWSKI, H. Studies on the interactions between human serum albumin and imidazolium [trans-tetrachlorobis(imidazol)ruthenate(III)]. **J. Inorg. Biochem.**, v. 73, p. 123-128, 1999.

18 KAPITZA, S. et al. Heterocyclic complexes of ruthenium(III) induce apoptosis in colorectal carcinoma cells. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 131, p. 101-110, 2005.

19 TRONDL, R. et al. NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application. **Chem. Sci.**, v. 5, p. 2925-2932, 2014.

20 LIZARDO, M. M. et al. Upregulation of glucose-regulated protein 78 in metastatic cancer cells is necessary for lung metastasis progression. **Neoplasia**, v. 18, p. 699-710, 2016.

21 RADEMAKER-LAKHAI, J. M. et al. A phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. **Clin. Cancer Res.**, v. 10, p. 3717-3727, 2004.

22 SAVA, G. et al. Effects of the Ru(III) complexes [mer-RuCl₃(DMSO)₂Im]⁺ and Na[trans-RuCl₄(DMSO)Im] on solid mouse tumors. **Anti-Cancer Drugs**, v. 3, p. 25-31, 1992.

23 SAVA, G. et al. Comparison of the effects of the antimetastatic compound ImH[trans-RuCl₄(DMSO)Im] (NAMI-A) on the arthritic rat and on MCa mammary carcinoma in mice. **Pathol. Oncol. Res.**, v. 4, p. 30-36, 1998.

24 LEIJEN, S. et al. Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. **Invest. New Drugs**, v. 33, p. 201-214, 2015.

25 DERUITER, J. Non-steroidal antiinflammatory drugs (nsaids). **Principles of Drug Action**, v. 1, p. 26, 2002.

26 FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Principles of Medicinal Chemistry**. 4. ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 1995.

27 ROMANO, M.; CLÀRIA, J. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. **FASEB J.**, v. 17, p. 1986, 2003.

28 ZHA, S. et al. Cyclooxygenases in cancer: Progress and perspective. **Cancer Lett.**, v. 215, p. 1-20, 2004.

29 HUANG, Y. et al. Research Advances in the Intervention of Inflammation and Cancer by Active Ingredients of Traditional Chinese Medicine. **J. Pharm. Sci.**, v. 19, p. 114-126, 2016.

30 THUN, M. J.; HENLEY, S. J.; PATRONO, C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 94, p. 252, 2002.

31 DUBE, C. et al. The use of aspirin for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the U.S. Preventive Services Task Force. **Ann. Intern. Med.**, v. 146, p. 3, 2007.

32 HU, P. J. et al. Chemoprevention of gastric cancer by celecoxib in rats. **Gut**, v. 53, p. 195-200, 2004.

33 HARRIS, R. E.; KASBARI, S.; FARRAR, W. B. Prospective study of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer. **Oncol. Rep.**, v. 6, p. 71-73, 1999.

34 DAI, Y.; WANG, W. H. Non Steroidal anti-inflammatory drugs in prevention of gastric cancer. **World. J Gastroenterol**, v. 12, p. 2884-2889, 2006.

35 PEREG, D.; LISHNER, M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 94, p. 252-266, 2002.

36 WEDER, J. E. et al. Copper complexes of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: An opportunity yet to be realized. **Coord. Chem. Rev.**, v. 232, p. 95-126, 2002.

37 RU, Q. et al. Voltage-gated and ATP-sensitive K⁺ channels are associated with cell proliferation and tumorigenesis of human glioma. **Oncology Rep.**, v. 31, p. 842-848, 2014.

38 WANG, W. et al. 4-aminopyridine induces apoptosis of human acute myeloid leukemia cells via increasing [Ca²⁺]_i through P2X7 receptor pathway. **Cell. Physiol. Biochem.**, v. 28, p. 199-208, 2011.

39 CHIN, L. S. et al. 4-Aminopyridine Causes Apoptosis and Blocks an Outward Rectifier K₁ Channel in Malignant Astrocytoma Cell Lines. **J. M. J Neurosc. Res.**, v. 48, p. 122, 1997.

40 PARDO, A. L.; STUHMER, W. The roles of K⁺ channels in cancer. **Nat. Rev.**, v. 14, p. 39-48, 2014.

41 RU, Q. et al. Voltage-gated potassium channel blocker 4-aminopyridine induces glioma cell apoptosis by reducing expression of microRNA-10b-5p. **Mol. Biol. Cell**, v. 29, p. 1125-1136, 2018.

42 AQUINO, M. A. Diruthenium and diosmium tetracarboxylates: synthesis, physical properties and applications. **Coord. Chem. Rev.**, v. 170, p. 141-202, 1998.

43 STEPHENSON, T. A.; WILKINSON, G. New ruthenium carboxylate complexes. **J. Inorg. Nucl. Chem.**, v. 28, p. 2285-2281, 1966.

44 COTTON, F. A.; MURILLO, C. A.; WALTON, R. A. **Multiple bonds between metal atoms**. [S.l.]: Springer Science and Business Media, Inc., 2005.

45 NORMAN JR, J. G.; RENZONI, G. E.; CASE, D. A. Eletronic Structure of Ru₂(O₂CR)₄⁺ and Rh₂(O₂CR)₄⁺ Complexes, v. 101, p. 5256-5267, 1979.

46 DE OLIVEIRA SILVA, D. **Tetracarboxilatos dimetalados: Síntese, caracterização, propriedades e estudo de suas potencialidades para as áreas de metalofármacos e materiais**. Tese (Livre Docência) – Instituto de Química – Universidade de São Paulo. São Paulo. 2009.

47 DE OLIVEIRA SILVA, D. Perspectives for Novel Mixed Diruthenium-Organic Drugs as Metallopharmaceuticals in Cancer Therapy.. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 312–323, 2010.

48 ANDRADE, A. et al. Synthesis and characterization of a diruthenium–ibuprofenato complex Comparing its anti-inflammatory activity with that of a copper(II)–ibuprofenato complex. **J. Inorg. Biochem.**, v. 81, p. 23–27, 2000.

49 GORDIJO, C. R. et al. Immobilization of ibuprofen and copper-ibuprofen drugs on layered double hydroxides. **J. Pharm. Sci.**, v. 94, p. 1135-1148, 2005.

50 MARTINS, D. J. et al. Interaction of chitosan beads with a copper–naproxen metallodrug. **RSC Advances**, v. 5, p. 90184–90192, 2015.

51 RIBEIRO, G. et al. Diruthenium (II, III) complexes of ibuprofen, aspirin, naproxen and indomethacin non-steroidal anti-inflammatory drugs: synthesis, characterization and their effects on tumor-cell proliferation. **Polyhedron**, v. 27, p. 1131–1137, 2008.

52 BENADIBA, M. et al. Inhibition of C6 rat glioma proliferation by [Ru₂Cl(lbp)₄] depends on changes in p21, p27, Bax/Bcl2 ratio and mitochondrial membrane potential. **J. Inorg. Biochem.**, v. 104, p. 928–935, 2010.

53 SANTOS, R. L. S. R. et al. Synthesis and characterization of a diruthenium(II,III)-ketoprofen compound and study of the in vitro effects on CRC cells in comparison to the naproxen and ibuprofen derivatives. **Polyhedron**, v. 42, p. 175–181, 2012.

54 BENADIBA, M. et al. Growth inhibitory effects of the Diruthenium-Ibuprofen compound, [Ru₂Cl(lbp)₄], in human glioma cells in vitro and in the rat C6 orthotopic glioma in vivo. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 19, p. 1025–1035, 2014.

55 SANTOS, R. L. S. R.; SANCHES, R. N. F.; DE OLIVEIRA SILVA, D. Spectroscopic studies on interactions of the tetrakis(acetato)chloridiruthenium(II,III) complex and the Ru₂(II,III)-NSAID-derived metallodrugs of ibuprofen and ketoprofen with human serum albumin. **J. Coord. Chem.**, v. 68, p. 17-18, 2015.

56 HANIF-UR-REHMAN et al. Axially-modified paddlewheel diruthenium(II,III)-ibuprofenato metallodrugs and the influence of the structural modification on U87MG and A172 human glioma cell proliferation, apoptosis, mitosis and migration. **J. Inorg. Biochem.**, v. 165, p. 181–191, 2016.

57 NEUBOLD, P. et al. (mi-Hydroxo) bis(mi-carboxylato)diruthenium and (mi-Oxo) bis (mi-carboxylato) diruthenium Complexes Containing Weak Intramolecular Ru-Ru Interactions. **Inorg. Chem.**, v. 28, p. 459–467, 1989.

58 ALVAREZ-CARREÑO, C. et al. Structure, function and evolution of the hemerythrin-like domain superfamily. **Protein Sci.**, v. 27, p. 848-860, 2018.

59 FRIESNER, R. A. et al. How iron-containing proteins control dioxygen chemistry : a detailed atomic level description via accurate quantum chemical and mixed quantum mechanics / molecular mechanics calculations. **Coord. Chem. Rev.**, v. 239, p. 267-290, 2003.

60 SEUANES, G. C. et al. Novel binuclear μ -oxo diruthenium complexes combined with ibuprofen and ketoprofen: Interaction with relevant target biomolecules and anti-allergic potential. **J. Inorg. Biochem.**, v. 153, p. 178-185, 2015.

61 VAMVOUNIS, G. et al. Synthesis, structure and electrochemistry of nitrogen base adducts of tetraacetatodiruthenium(II,III): dependence of redox potential and Ru–Ru bond length on axial ligand donor strength. **Inorganica Chim. Acta**, v. 304, p. 87-98, 2000.

62 SUDHA, C.; MANDAL, S. K.; CHAKRAVARTY, A. R. Synthesis, X-ray structures, and spectroscopic and electrochemical properties of (μ -Oxo) bis (μ -carboxylato) diruthenium complexes having six imidazole bases as terminal ligands. **Inorg. Chem.**, v. 1669, p. 270–278, 1998.

63 SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2018. **CA: Cancer J. Clin.**, v. 68, p. 1-24, 2018.

64 SHI, J. et al. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. **Nat Rev Cancer**, v. 17, p. 20-37, 2017.

65 AVITABILE, E. et al. How can nanotechnology help the fight against breast cancer? **Nanoscale**, v. 10, p. 11719-11731, 2018.

66 VENTOLA, C. L. Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 42, p. 742-755, 2017.

67 ZHANG, R. X. et al. Importance of integrating nanotechnology with pharmacology and physiology for innovative drug delivery and therapy – an illustration with firsthand examples. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 39, p. 825–844, 2018.

68 ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect, v. 63, p. 170–183, 2011.

69 MAEDA, H. et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **J. Control Release**, v. 65, p. 271-284, 2000.

70 YIN, H.; LIAO, L.; FANG, J. Enhanced permeability and retention (EPR) effect based tumor targeting : The concept, application and prospect. **JSM Clin. Oncol. Res.**, v. 2, p. 1010, 2014.

71 MAEDA, H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 91, p. 3–6, 2015.

72 SVILENOV, H.; TZACHEV, C. Solid Lipid Nanoparticles – A Promising Drug Delivery System Hristo. **Nanomedicine**, v. 8, p. 187-237, 2009.

73 MUKHERJEE, S.; RAY, S.; THAKUR, R. S. Solid Lipid Nanoparticles: A Modern Formulation Approach in Drug Delivery System. **Indian J Pharm Sci.**, v. 71, p. 349-358, 2009.

74 MUHLEN, A. Z.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 45, p. 149-155, 1998.

75 MÜLLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 1, p. 161-177, 2000.

76 YOON, G.; PARK, J. W.; YOON, I. S. Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs): recent advances in drug delivery. **J. Pharm. Investig.**, v. 43, p. 353-362, 2013.

77 SHUHENDLER, A. J. et al. Synergistic nanoparticulate drug combination overcomes multidrug resistance, increases efficacy, and reduces cardiotoxicity in a nonimmunocompromised breast tumor model. **Mol. Pharm.**, v. 11, p. 2659–2674, 2014.

78 JOKERST, J. V. et al. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. **Nanomedicine (Lond.)**, v. 6, p. 715-728, 2011.

79 KNOP, K. et al. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. **Angew Chem.**, v. 36, p. 6288–6308, 2006.

80 ZHANG, R. X. et al. Design of nanocarriers for nanoscale drug delivery to enhance cancer treatment using hybrid polymer and lipid building blocks. **Nanoscale**, v. 9, p. 1334-1355, 2017.

81 WONG, H. L. et al. A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug-resistant human breast cancer cells. **Pharm. Res.**, v. 23, p. 1574-1585, 2006.

82 WOHLFART, S.; GELPERINA, S.; KREUTER, J. Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. **J. Control. Release**, v. 161, p. 264–273, 2012.

83 PETRI, B. et al. Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles : Revisiting the role of surfactants. **J. Control. Release**, v. 117, p. 51–58, 2007.

84 BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nat. Biotechnol.**, v. 33, p. 941–951, 2015.

85 YUSUF, M. et al. Depressant activity across BBB and envisaged biomolecular mechanism of action through a proposed pharmacophore model. **J. Microencapsul.**, v. 33, p. 646–655, 2016.

86 SHALVIRI, A. et al. Design of pH-responsive nanoparticles of terpolymer of poly(methacrylic acid), polysorbate 80 and starch for delivery of doxorubicin. **Colloids Surf. B**, v. 101, p. 405–413, 2013.

87 LI, J. et al. A multifunctional polymeric nanotheranostic system delivers doxorubicin and imaging agents across the blood-brain barrier targeting brain metastases of breast cancer. **ACS Nano**, v. 8, p. 9925–9940, 2014.

88 POURSHARIFI, M.; WLODARCZYK, M. T.; MIESZAWSKA, A. J. Nano-based systems and biomacromolecules as carriers for metallodrugs in anticancer therapy. **Inorganics**, v. 7, p. 2, 2019.

89 WANI, W. A. et al. Nanostructured materials functionalized with metal complexes : In search of alternatives for administering anticancer metallodrugs. **Coord. Chem. Rev.**, v. 312, p. 67–98, 2016.

90 STATHOPOULOS, G. P.; BOULIKAS, T. Lipoplatin formulation review article. **J. Drug Deliv.**, v. 581363, p. 1-10, 2012.

91 BLUNDEN, B. M.; LU, H.; STENZEL, M. H. Enhanced delivery of the RAPTA-C macromolecular chemotherapeutic by conjugation to degradable polymeric micelles. **Biomacromolecules**, v. 14, p. 4177–4188, 2013.

92 FISCHER, B. et al. Poly(lactic acid) nanoparticles of the Ilead anticancer ruthenium compound KP1019 and its surfactant-mediated activation. **Dalton Trans.**, v. 43, p. 1096–1104, 2014.

93 RIBEIRO, G. **Complexos de dirutênio com os fármacos ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, naproxeno, indometacina, e com ácido linolênico: Síntese, caracterização e avaliação da ação antiproliferativa sobre células tumorais e estudo da interação da unidade dimetálica co.** Tese de Doutorado - Instituto de Química – Universidade de São Paulo. São Paulo. 2006.

94 GORDIJO, C. R. et al. Design of hybrid MnO₂-Polymer-Lipid nanoparticles with tunable oxygen generation rates and tumor accumulation for cancer treatment. **Adv. Funct. Mater.**, v. 25, p. 1858-1872, 2015.

95 NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds.** New York: John Wiley & Sons. Inc., 1986.

96 BUYUKMURAT, Y.; AKYUZ, S. . J. Theoretical and experimental studies of IR spectra of 4-aminopyridine metal(II) complexes. **Mol. Struct.**, p. 533-539, 2003.

97 TOPACLI, A.; BAYARI, S. Normal coordinate analysis of 4-aminopyridine. Effect of substituent on pyridine ring in metal complexes of 4-substituted pyridines. **Spectrochim. Acta A**, v. 57, p. 1385–1391, 2001.

98 BARRAL, M. C. et al. Synthesis and characterization of new carboxylate dimers of ruthenium. **Polyhedron**, v. 9, p. 1723-1728, 1990.

99 SOLOMON, E. I.; LEVER, A. B. P. **Inorganic Electronic Structure and Spectroscopy.** [S.l.]: John Wiley & Sons, v. 2, 2006.

100 WARD, W. M. et al. Chloride ion-pairing with Ru(II) polypyridyl compounds in dichloromethane. **J. Phys. Chem. A**, v. 117, p. 8883–8894, 2013.

101 FUKUMOTO, T. et al. Preparation and properties of a series of (-oxo)di(-acetato) diruthenium (III) complexes, [Ru₂(μ-O)(μ-CH₃COO)₂(pyridine)₄(L)₂]+2 e , [Ru₂(μ-O)(μ-CH₃COO)₂(AA)₂(L)₂]+2, where AA is 2, 2'-bipyridine or 1,10-

phenanthroline, and L is a monodentate ligand. **Inorganica Chim. Acta**, v. 283, p. 151-159, 1998.

102 SASAKI, Y. et al. Preparation, structure, and properties of the Bis(mi-acetato)(mi-oxo)Ruthenium(III) Dimers $[\text{Ru}_2(\text{mi-CH}_3\text{COO})_2(\text{mi-O})(\text{py})_6]^{2+}$ and $[\text{Ru}_2(\text{mi-CH}_3\text{COO})_2(\text{mi-O})(\text{bpy})_2(\text{py})_2]^{2+}$. **Inorg. Chem.**, v. 30, p. 4903-4908, 1991.

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

104 LOZANO, R.; MARTINEZ, J.; LOPEZ, A. D. Thermal decomposition of oxovanadium (IV) complexes with substituted pyridines. **Polyhedron**, v. 2, p. 977-981, 1983.

105 ABE, M. et al. A kinetic study on pyridine exchange reactions at a bis(m-acetato)(m-oxo)diruthenium(III) center: effects of monodentate and bidentate N-heterocyclic ligands cis to the oxo bridge. **Inorganica Chim. Acta**, v. 331, p. 158–167, 2002.

106 HUSSAIN, A. et al. Substitution of trans ligands in mu-oxo-bis(mu-acetato)diruthenium(III) complexes: Synthesis and kinetic studies. **Inorganica. Chim. Acta.**, v. 362, p. 1101–1108, 2009.

107 ABBASI, A. Z. et al. Manganese oxide and docetaxel co-loaded fluorescent polymer nanoparticles for dual modal imaging and chemotherapy of cancer. **J. Control. Release**, v. 209, p. 186–196, 2015.

108 MOORE, T. L. et al. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. **Chem. Soc. Rev.**, v. 44, p. 6287–6305, 2015.

109 RICO, S. R. A. et al. Diruthenium(II,III) metallodrugs of ibuprofen and naproxen encapsulated in intravenously injectable polymer–lipid nanoparticles exhibit enhanced activity against breast and prostate cancer cells. **Nanoscale**, v. 30, p. 10701-10714, 2017.

110 WEN, X.; FRANCES, E. Effect of protonation on the solution and phase behavior of aqueous sodium myristate. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 231, p. 42–51, 2000.

111 SILVERSTEIN, R.; BASSLER, G.; MORRILL, T. **Spectroscopic Identification of Organic Compounds**. New York: John Wiley and Sons, v. 4, 1981.

112 ARNOULD, A. et al. Self-assembly of myristic acid in the presence of choline hydroxide: Effect of molar ratio and temperature. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 445, p. 285–293, 2015.

113 CUKIERNIK, F. D. et al. Mixed-Valent Diruthenium (II, III) Long-Chain Carboxylates. 1. Molecular Design of Columnar Liquid-Crystalline Order. **Chem. Mater.**, v. 10, p. 83–91, 1998.

114 VRANIC, S. et al. Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. **Part. Fibre Toxicol.**, v. 10, p. 2–16, 2013.

115 HANAKA, H. et al. Microsomal prostaglandin E synthase 1 determines tumor growth in vivo of prostate and lung cancer cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 106, p. 18757–18762, 2009.

116 SUBBARAYAN, V. et al. Differential expression of cyclooxygenase-2 and its regulation by tumor necrosis factor-alpha in normal and malignant prostate cells. **Cancer Res.**, v. 61, p. 2720–2726, 2001.

117 ZHAO, B. et al. Secretion of intestinal goblet cells: A novel excretion pathway of nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 10, p. 839–849, 2014.

118 ZHANG, Y. N. et al. Nanoparticle-liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. **J. Control. Release**, v. 240, p. 332–348, 2016.

119 SCHROEDER, A. et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology. **Nat. Rev. Cancer**, v. 12, p. 39–50, 2011.

120 HE, C. et al. Blood-brain barrier-penetrating amphiphilic polymer nanoparticles deliver docetaxel for the treatment of brain metastases of triple negative breast cancer. **J. Control. Release**, v. 246, p. 98–109, 2017.

121 ALVES RICO, S. R. et al. Diruthenium(II,III) metallodrugs of ibuprofen and naproxen encapsulated in intravenously injectable polymer-lipid nanoparticles exhibit enhanced activity against breast and prostate cancer cells. **Nanoscale**, v. 9, p. 10701–10714, 2017.

122 RIBEIRO, G. et al. The novel ruthenium- γ -linolenic complex $[\text{Ru}_2(\text{aGLA})_4\text{Cl}]$ inhibits C6 rat glioma cell proliferation and induces changes in mitochondrial membrane

potential, increased reactive oxygen species generation and apoptosis in vitro. **Cell Biochem. Funct.**, v. 28, p. 15-23, 2010.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Samara Rodrigues Alves

Nascimento: Guarulhos, 08 de Agosto de 1990.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

DOUTORADO: Ciências (Química) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), período 07/2014 a 12/2019.

BACHAREL: Química – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), período 01/2010 a 12/2014.

LICENCIATURA: Plena em Química – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), período 07/2012 a 12/2017.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL E ATIVIDADES CIENTÍFICAS

2015 – 2019: Instituto de Química da Universidade de São Paulo (SP) – Laboratório de Química Inorgânica Sintética e Estrutural - Bioinorgânica e Metalofármacos

Pesquisador: Bolsista de doutorado FAPESP (3 anos), CAPES (1 ano)

- Execução do Projeto: Estudo de Nanopartículas Baseadas em Lipídeos como Carregadores de Metalofármacos de Rutênio com Atividade Anticancer.

- Auxílio na orientação de alunos de iniciação científica

2016 – 2017: Leslie Dan Faculty of Pharmacy – University of Toronto (Canadá)

Pesquisador: Estágio complementar referente ao doutorado

- Execução do Projeto: Study of Lipid Based Nanoparticles as Carriers for Anticancer Ruthenium Metallodrugs

2014 – 2015: Instituto de Química da Universidade de São Paulo (SP) – Laboratório de Química Inorgânica Sintética e Estrutural - Bioinorgânica e Metalofármacos

Pesquisador: Bolsista de Iniciação Científica FAPESP

- Execução do Projeto: Estudo da Interação de Metalofármacos Antiinflamatórios de Cobre com Quitosana e Reticulantes.

2011 – 2013: Instituto de Química da Universidade de São Paulo (SP) – Laboratório de Química Inorgânica Sintética e Estrutural - Bioinorgânica e Metalofármacos

Pesquisador: Bolsista de Iniciação Científica CNPQ

- Execução do Projeto: Síntese e Caracterização de Metalofármacos Antiinflamatórios de Cobre e Estudo de sua Interação com Quitosana.

2010 – 2011: Instituto de Química da Universidade de São Paulo (SP) – Laboratório de Química Inorgânica Sintética e Estrutural - Bioinorgânica e Metalofármacos

Pesquisador: Bolsista de Iniciação Científica CNPQ

- Execução do Projeto: Síntese, Caracterização e Estudo da Viabilidade de Fármacos Antiinflamatórios de Cobre como Carregadores Intrínsecos.

BOLSAS DE ESTUDOS

2015 – 2019: Bolsa FAPESP de Doutorado Direto - DD2, DD3 e DD4 (Processo: 2014-23481-7)

2016 – 2017: Bolsa FAPESP de estágio de doutorado no exterior BEPE (Processo: 2015/24252-4)

2014 – 2015: Bolsa CAPES de Doutorado Direto (Processo: 33002010191P0)

2013 – 2014: Bolsa FAPESP de Iniciação Científica (Processo: 2013/03071-6)

2011 – 2013: Bolsa CNPq de Iniciação Científica

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

Artigos Completos Publicados em Periódicos

Alves, Samara R.; COLQUHOUN, ALISON; WU, XIAO YU; DE OLIVEIRA SILVA, DENISE. Synthesis of terpolymer-lipid encapsulated diruthenium(II,III)-anti-

inflammatory metallodrug nanoparticles to enhance activity against glioblastoma cancer cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 110984, 2019.

Alves Rico, Samara R.; ABBASI, AZHAR Z. ; RIBEIRO, GEISE ; AHMED, TAKSIM ; WU, XIAO YU ; DE OLIVEIRA SILVA, DENISE. Diruthenium(II,III) metallodrugs of ibuprofen and naproxen encapsulated in intravenously injectable polymer-lipid nanoparticles exhibit enhanced activity against breast and prostate cancer cells. *Nanoscale*, v. 9, p. 10701-10714, 2017.

DE J. MARTINS, DOUGLAS; HANIF-UR-REHMAN, HANIF-UR-REHMAN; Alves Rico, Samara R. ; DE M. COSTA, IGUATINÃ ; PIO SANTOS, ANDREA C. ; SZSZUDLOWSKI, RACHEL G. ; DE OLIVEIRA SILVA, DENISE . Interaction of chitosan beads with a copper-naproxen metallodrug. *RSC Advances: an international journal to further the chemical sciences*, v. 5, p. 90184-90192, 2015.

Resumos Publicados em Anais de Congressos

47th World Chemistry Congress of IUPAC. Distinct compounds resulting from the interaction of 4-aminopyridine with similarly paddlewheel structured diruthenium(II,III)-acetate and ibuprofenate tetracarboxylates. Paris / França, 2019.

47th World Chemistry Congress of IUPAC. Diruthenium(II,III)-ibuprofen anticancer metallodrug encapsulated into nano-sized chitosan targeting glioblastoma brain cancer.. Paris / França, 2019.

BRAZILIAN MEETING ON INORGANIC CHEMISTRY. Diruthenium(II,III)-Ibuprofen metallodrug encapsulated into terpolymer-lipid nanoparticles targeting glioblastoma cancer. Fortaleza / Brasil, 2018.

Simpósio Nacional de Nanobiotecnologia. Metalofármaco antitumoral de dirutênio(II,III)-naproxeno encapsulado em nanopartículas terpoliméricas-lipídicas tendo como alvo o câncer de cérebro glioblastoma. São Bernardo do Campo / Brasil, 2018.

American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Anual Meeting. Polymer-Lipid Based Nanoparticles of Anticancer Diruthenium-NSAID Metallodrugs for Treatment of Breast Cancer. Colorado / Estados Unidos, 2016.

21º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. Uso de biopolímeros para o encapsulamento de um metalofármaco anti-inflamatório de cobre-ibuprofeno.. São Paulo / Brasil, 2013.

20º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. Uso do tripolifosfato de sódio como agente reticulante de quitosana para o encapsulamento de um metalofármaco de cobre-ibuprofeno. São Paulo / Brasil, 2012.

19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. Estudos preliminares da interação entre um metalofármaco anti-inflamatório de cobre-ibuprofeno e o biopolímero quitosana. São Paulo / Brasil, 2011.

PRÊMIOS E RECONHECIMENTO

2019: Prêmio Destaque Publicação 2017, Instituto de Química - USP.

2012: Atribuição de Menção Honrosa pelo projeto apresentado no 20º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, Universidade de São Paulo.