UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

CLÉIA JUSTINO NUNES

"Avaliação da potencialidade e dos mecanismos de ação de complexos dinucleares de cobre como agentes terapêuticos antitumorais"

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890

O Original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

04/06/2018

CLÉIA JUSTINO NUNES

"Avaliação da potencialidade e dos mecanismos de ação de complexos dinucleares de cobre como agentes terapêuticos antitumorais"

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Orientador (a): Prof (a). Dr (a). Ana Maria Da Costa Ferreira

São Paulo

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

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a 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

Nunes, Cléia Justino

N972a Avaliação da potencialidade e dos mecanismos de ação de complexos dinucleares de cobre como agentes terapêuticos antitumorais / Cléia Justino Nunes. - São Paulo, 2018.

141 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Ferreira, Ana Maria Da Costa

1. Cobre. 2. Miméticos da tirosinase. 3. Melanomas. 4. Citotoxicidade . 5. Autofagia. I. T. II. Ferreira, Ana Maria Da Costa , orientador.

À minha mãe, sem a qual este projeto não teria sido realizado de maneira alguma, à minha família e à minha querida Lívia presente especial, que me fortifica e enche minha vida de desafios, objetivos e alegrias. Todos os dias........

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que, com sua infinita misericórdia, permitiu que esse trabalho fosse desenvolvido e concluído, me renovando a força que em muitos momentos perdi. Ao meu Bom Jesus de Pirapora, que me trouxe a fé necessária para não me perder no caminho, e a minha mãe Nossa Senhora Aparecida.

À querida Prof^a Ana Maria da Costa Ferreira, pela orientação, amizade e companheirismo, por ter aceitado me orientar de bom coração desde o primeiro contato, e me auxiliar com sua experiência e motivação. Além de compreender quando as coisas pareciam não fluir.

Ao Prof. Marius Réglier, por sua experiência.

Ao Dr. Roger Chammas, e suas colaboradoras Dra. Andréia Otake e Dra. Silvina Bustos do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP (Faculdade de Medicina da USP), por seu auxílio, experimentações no instituto, pelos comentários, discussões, esclarecimentos e sugestões, sem as quais esse trabalho não teria rendido os bons frutos que rendeu, e principalmente pela oportunidade de aprender a manusear e entender melhor o mundo das células e a rotina de trabalho dentro desta tão importante instituição.

Aos Professores Dra. Vera Regina Constantino, Dra. Helena Petrilli, Dr. Breno Espósito aos seus alunos pelas discussões, que até mesmo informais puderam auxiliar o meu trabalho.

Aos amigos funcionários Ricardo Couto pelo auxilio e ajuda na realização de experimentos e utilização dos equipamentos do laboratório, à Maria Aparecida Paiva Lopes por sempre ser tão prestativa e amiga, companheira e carinhosa, não apenas comigo, à Cristiane Landim, uma pessoa muito profissional e gentil.

Aos amigos do grupo e fora dele Camila, Adriana, Marcelo, Rodrigos, Veri, Nathália, Maurício que deveria ter sido meu IC, Elaine, Fradi, ao Edu que chegou por último conquistando seu lugar e Ale, a IC que me "tomaram" que, no entanto, se tornou uma grande amiga, à Gabi que não foi apenas a IC do lab, mas uma verdadeira amiga e companheira, a Esther, Saulo, à querida amiga Queite que faz falta, ao Jânio muito atento e prestativo, e a todos pelas ótimas discussões científicas e não científicas.

As meninas da Etec Bárbara Morales Passos, Bruna Mirabella Tonarque, Fernanda de Britto Junqueira e Isabela Emerick Codagnola, que vieram estagiar e deixaram sua amizade,

sintetizaram compostos comigo, e me ouviram dizer e provar que 5 sortes são sempre melhores do que uma.

Ao Pessoal da Secretaria de PG sempre muito prestativo.

À querida amiga Mayara, por toda ajuda tanto científica quanto pessoal, ao amigo Kassio, a minha amiga Rita de tempos antigos, presente e futuro, a Carol Luz pela boa amizade e companhia desde a graduação, ao Manu e à querida Ana Paula Mangoni sem a qual muito da minha motivação não existiria.... "já fez a cinética".

À Dona Maria do lado, por observar um momento difícil e me auxiliar.

À minha mãe por todo apoio, por saber que ela viveu meus sentimentos, tanto os bons quanto os ruins e por estar sempre presente, me dando todo o suporte para enfrentar essa empreitada, por cuidar com tanto carinho do meu bem mais precioso, ao meu querido pai por sempre confiar em mim, e mostrar que com ele sempre poderei contar, a minha irmã por todo amor e carinho, por me dar um presentinho dos céus, o pequeno Enzo e ao meu cunhado por estar sempre presente, agradeço por ter essa família linda.

Ao João Vitor por ter me dado o melhor de mim, aquilo que deu sentido à minha vida...... a minha filhinha Lívia, meu anjo, meu objetivo, minha alegria....meu ar! Que me cobrava atenção, que sentava no meu colo enquanto eu trabalhava, que me esperava chegar tarde depois de um dia de trabalho, que tinha paciência, ou não, na maioria das vezes, que cuidava da mamãe quando ela estava doente, e deitava ao meu lado quando eu dizia que estava cansada para brincar, a ela também o meu muito obrigada.

À CAPES pelo auxílio financeiro e bolsa.

À Fapesp pelo financiamento de reagentes e equipamentos dentro do projeto temático.

À rede INCT e depois CEPID Redoxoma pelo auxílio financeiro de reagentes para a realização de diversos experimentos que compuseram essa Tese.

E a todos que direta e indiretamente participaram da realização deste trabalho, que torceram e torcem por mim, e se agradam das minhas vitórias, que eu possa retribuir sempre as boas vibrações que meus amigos depositam sobre mim.

RESUMO

Nunes, C. J. - Avaliação da potencialidade e dos mecanismos de ação de complexos dinucleares de cobre como agentes terapêuticos antitumorais. 2018. 141p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Uma série de três complexos de cobre(II) dinucleares, contendo ligantes nitrogenados e grupos aromáticos (compostos 2, 4 e 6), foi sintetizada e caracterizada por diversas técnicas espectroscópicas (UV/Vis, IV e EPR). Esses compostos tiveram sua atividade tirosinase avaliada à temperatura ambiente, através da oxidação de L-di-hidroxifenilalanina (L-dopa), e sua citotoxicidade investigada frente a células melanomas, comparada às de complexos análogos de cobre(II) mononucleares (compostos 1, 3 e 5). A influência da luz UVB, que estimula a melanogênese, também foi verificada. A exposição das células à radiação de intensidade (13 ± 2) mJ/cm² aumentou os danos causados, principalmente em presença das espécies dinucleares. A citotoxicidade dos diferentes complexos foi determinada frente a duas linhagens de melanomas humanos (SKMEL-05 e SKMEL-147), após 24 e 48h de incubação. Células com maior teor de melanina foram mais sensíveis aos efeitos dos complexos. Verificou-se um aumento na porcentagem de células na fase sub-G1 do ciclo celular após tratamento por 24 ou 48h com estes complexos, ao contrário do verificado frente a queratinócitos não tumorais. Testes clonogênicos também indicaram maior atividade do composto (2) contendo dois centros de cobre em sua estrutura, com diminuição significativa no número de células sobreviventes após tratamento. Ensaios complementares mostraram a redução dos íons de cobre(II) nos compostos (1) e (2) em presença de melanina e a formação de espécies reativas de oxigênio (radicais hidroxil e ânions superóxido), através de espectroscopia EPR ou do uso de sondas fluorescentes. Adicionalmente, foi constatado um aumento no nível de vacúolos citoplasmáticos após tratamento com o complexo (2), indicando indução à autofagia, corroborada pelo monitoramento das proteínas LC3 e tubulina, implicadas neste processo de morte celular. Os resultados apontam para a ocorrência de pelo menos dois mecanismos de ação dos complexos frente aos melanomas, por processo apoptótico e autofágico. Indicam ainda que esta reatividade frente a melanomas é fortemente dependente da estrutura dos complexos de cobre, sendo mais significativa para os dinucleares.

Palavras-chave: Cobre, miméticos de tirosinase, melanomas, citotoxicidade, autofagia.

ABSTRACT

Nunes, C. J. - Evaluation of the potentiality and the mechanisms of action of dinuclear copper(II) complexes as anticancer therapeutics. 2018. 141p. Ph. D. Thesis — Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A series of dinuclear copper(II) complexes containing nitrogen ligands and aromatic groups (compounds 2, 4 and 6), were synthesized and characterized by various spectroscopic methods (UV/Vis, IR and EPR). These complexes had their tyrosinase activity evaluated at room temperature, through the oxidation of L-di-hidroxyphenylalanine (L-dopa), and its cytotoxicity toward melanoma cells investigated, in comparison with the toxicity of the corresponding mononuclear complexes (compounds 1, 3 and 5). The influence of UVB light, that stimulates melanogenesis, was also verified. The exposition of the cells to radiation of intensity (13 ± 2) mJ/cm², increased the caused damage, especially in the presence of dinuclear species. The cytotoxicity of the different complexes was determined toward two cell lines of human melanomas (SKMEL-05 e SKMEL-147), after 24 and 48h incubation. Cells containing higher levels of melanin were more sensitive to the effects of the complexes. An increasing in the percentage of cells in the sub-G1 phase of cellular cycle was verified after treatment for 24 or 48h with these complexes. On the contrary, this effect was not observed with non-tumor keratinocytes. Clonogenic tests also indicated higher activity of compound 2 containing two copper centers in its structure, with a significant decrease in the number of survival cells after the treatment. Complementary assays show the reduction of copper(II) ions in complexes (1) and (2), in the presence of melanin, as well as the formation of reactive oxygen species (hydroxyl radicals and superoxide anions) via EPR spectroscopy or the use of fluorescent labels. Further, an increase in the level of cytoplasmatic vacuoles was verified after treatment with complex (2), indicating induction to autophagy, which was corroborated by monitoring the proteins LC3 and tubulin, implicated in this process of cell death. The results pointed to the occurrence of at least two mechanisms of action of these complexes toward melanomas, apoptotic and autophagic processes. Also, they indicated that the reactivity of the studied compounds is strongly dependent on its structural features, being more remarkable to the dinuclear ones.

Keywords: Copper, mimics of tyrosinase, melanomas, cytotoxicity, autophagy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1. Estruturas dos complexos de cobre estudados.
- **Figura 1.2.** Estruturas moleculares dos principais monômeros da melanina (A) feomelanina e (B) eumelanina [68].
- **Figura 1.3.** Espectros UV/Vis e Raman dos principais tipos de coordenação de oxigênio aos núcleos de cobre e, por último, a TYR em seu sítio ativo, com coordenação do tipo: $\mu \eta^2$: η^2 -O₂ [42].
- **Figura 1.4.** Mecanismo de ação da tirosinase, mostrando seus 3 estados no ciclo catalítico da enzima, forma oxi-Cu(II), forma deoxi-Cu(I), forma met-Cu(II), referência adaptada [45].
 - Figura 1.5. Modelos de progressões de metástases [59].
- **Figura 1.6.** Processo de autofagia simplificado, formação do autofagossomo, e associação com o lisossomo, com posterior reciclagem dos componentes [91].
 - Figura 5.1. Espectro no Infravermelho do complexo [Cu(bzampyCl]Cl (3).
 - Figura 5.2. Espectro no Infravermelho do complexo [Cu₂(ftampy)(ampy)₂](ClO₄)₂ (4).
 - **Figura 5.3.** Espectro no Infravermelho do complexo [Cu(isadab)Cl]Cl.H₂O (5).
 - Figura 5.4. Espectro no Infravermelho do complexo [Cu₂(isadbz)Cl₂]Cl₂ (6).
- Figura 5.5. Espectros de EPR dos complexos no estado sólido, a 77K. $[Cu(bzampy)(H_2O)_2]Cl_2$ (3); $[Cu_2(ftampy)(ampy)_2](ClO_4)_4$ (4); $[Cu(isadab)Cl]Cl.H_2O$ (5) e $[Cu_2(isadbz)Cl_2]Cl_2$ (6).
- **Figura 5.6.** Espectros de EPR dos complexos em solução saturada, a 77K. $[Cu(bzampy)(H_2O)_2]Cl_2$ **3** em metanol; $[Cu_2(ftampy)(ampy)_2](ClO_4)_4$ **(4)** em acetonitrila; $[Cu(isadab)Cl]Cl^2H_2O$ **(5)** em DMSO; $[Cu_2(isadbz)Cl_2]Cl_2$ **6** em metanol.
- **Figura 5.7.** Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo [Cu(bzampy)Cl]Cl **(3)** em acetonitrila e respectiva banda d-d em DMSO.
- **Figura 5.8**. Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo $[Cu_2(ftampy)(ampy)_2](CIO_4)_4$ (4) e respectiva banda d-d em acetonitrila.
 - Figura 5.9. Espectros eletrônicos no UV/Vis dos complexos [Cu(isadab)Cl]Cl·H₂O (5) em DMSO.
 - Figura 5.10. Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo [Cu₂(isadbz)Cl₂]Cl₂ (6).
- **Figura 6.1.** (**A**) Representação do sítio ativo da enzima tirosinase e do tipo de coordenação da molécula de dioxigênio aos íons cobre. (**B**) Reações referentes a atividade tirosinase (L-Tirosina à L-Dopa e L-Dopa à L-dopaquinona).
- Figura 6.2. Curvas de oxidação da *L*-Dopa variando-se a concentração do complexo [Cu(bzampy)Cl]⁺ (3).
- **Figura 6.3.** Dependência da velocidade inicial de oxidação da L-dopa em função da concentração do complexo [Cu(bzampy)C] $^{+}$ (3); [L-Dopa]= 8mM, em tampão fosfato pH 7,0 e T = 25° C.

- Figura 6.4. Curvas de oxidação da *L*-Dopa variando-se a concentração do complexo $[Cu(ftampy)(ampy)_2]^{4+}$ (4), em função do tempo, em tampão fosfato pH 7,0 e T = 25°C.
- **Figura 6.5.** Dependência da velocidade inicial de oxidação da *L*-dopa em função da concentração do complexo $[Cu_2(ftampy)(ampy)_2]^{4+}$ (4); [L-Dopa]= 8mM, em tampão fosfato pH 7,0 e T = 25°C.
- **Figura 6.6.** Curvas de oxidação da *L*-Dopa com o complexo [Cu(bzampy)Cl] $^+$ (3) em função do tempo, em tampão fosfato pH 7,0 e T = 25 $^{\circ}$ C.
- **Figura 6.7.** Curva da velocidade inicial da oxidação da *L*-dopa em função da concentração do substrato, catalisada pelo complexo [Cu(bzampy)Cl]⁺ (3) a 320μM; [L-Dopa]= 4-8mM, tampão fosfato pH 7,00.
- Figura 6.8. Curvas de oxidação da L-Dopa com o complexo $[Cu_2(ftampy)(ampy)2]^{4+}$ (4) em função do tempo, em tampão fosfato pH 7,0 e T = 25°C.
- **Figura 6.9.** Curva da velocidade inicial da oxidação da *L*-dopa em função da concentração do substrato, catalisada pelo complexo $[Cu_2(ftampy)(ampy)_2CI]^{4+}$ (4) a 320μM; [*L*-Dopa]= 4-8mM, tampão fosfato pH 7,00.
- **Figura 6.10.** Comparação entre as curvas cinéticas dos compostos mono **(3)** e dinuclear **(4)**. Atividade catalítica na oxidação da L-Dopa em função do tempo, substrato [8,0 mM], complexo mononuclear [400 μ M] e complexo dinuclear [200 μ M].
- **Figura 6.11.** Velocidades obtidas em função das concentrações dos complexos utilizados, descrevendo os dados determinados para a dependência com a concentração do catalisador: Vi = k_{obs} [CuL].
- Figura 6.12. Formação de espécies reativas de oxigênio, monitorada por espectroscopia EPR, utilizando DMPO como captador de spin (100 mM), em soluções de H_2O_2 (250 μM), complexo (1) 100 μM e complexo (2) 100 μM, em tampão fosfato (pH = 7,0) e temperatura ambiente (25 °C). * sinais do DMPO-OH; * sinais do DMPO-CH₃.
- Figura 6.13. Formação de espécies reativas de oxigênio, monitorada por espectroscopia EPR, utilizando DMPO como captador de spin (100 mM), em soluções de H_2O_2 (250 mM), complexos (3) 100 μM e complexos (4) 100 μM, em pH 7,0 e temperatura ambiente (25 °C).
- Figura 6.14. Formação de espécies reativas de oxigênio, monitorada por espectroscopia EPR, utilizando DMPO como captador de spin (100 mM), em soluções de H_2O_2 (250 mM), complexos (5) 100 μM e complexos (6) 100 μM, em temperatura ambiente (25 °C).
- **Figura 6.15.** Espectros da titulação dos complexos pela melanina (solubilizada em solução de NaOH 250 mM) à temperatura ambiente. As concentrações estão expostas na figura.
- **Figura 6.16.** Absorbância medida em função da concentração de melanina adicionada, em tampão fosfato pH 7,4 (50 mM) à temperatura ambiente.
- Figura 6.17. Espectros de EPR, à temperatura ambiente, mostrando a interação da melanina com os complexos $[Cu(apyhist)H_2O]^{2+}(1)$ e $[Cu_2(apyhist)_2dpam]^{4+}(2)$. As proporções de complexos e melanina estão definidos no gráfico, concentração de melanina 1,0mg/mL, concentração de complexos: (1) = 1 mM a 4 mM, (2) = 0,45 a 1,8 mM.

- Figura 6.18. Espectros de EPR, à temperatura ambiente, mostrando a interação da melanina com os complexos $[Cu(apyhist)H_2O]^{2+}$ (1) e $[Cu_2(apyhist)_2dpam]^{4+}$ (2). As proporções de complexos e melanina estão definidos na figura; [melanina] = 2 mg/mL a 0,50 mg/mL, concentração de complexos: $[Cu(apyhist)H_2O]^{2+}$ 2mM e $[Cu_2(apyhist)_2dpam]^{4+}$ 0,9 mM.
- **Figura 6.19.** Espectros de EPR, à temperatura ambiente, mostrando a interação da melanina com o sal de cobre(II). As proporções de [Cu(aqua)] e melanina estão definidos na figura; [melanina] variou de 2 mg/mL a 0,50 mg/mL; [cobre(II)] = 0,9 mM.
- **Figura 6.20.** Espectros de EPR, à temperatura ambiente, mostrando a interação da melanina com o complexo $[Cu(apyhist)H_2O]^{2+}$ (1). As proporções de complexo e melanina estão definidos na figura; [melanina] variada de 2 mg/mL a 0,50 mg/mL; [CuL] = 2mM.
- **Figura 6.21.** Espectros de EPR, registrados à temperatura ambiente, mostrando a interação da melanina com o complexo [Cu₂(apyhist)₂dpam]⁴⁺ (2), análise em proporções de complexos e melanina estão definidos na figura, concentração de melanina de 2 mg/mL à 0,50 mg/mL, concentração do complexo em 0,9 mM. Temperatura ambiente.
- **Figura 6.22**. Variação do Sinal de EPR (sinal integrado) com a razão crescente entre melanina e complexo de cobre, [melanina]/[CuL].
- **Figura 6.23.** (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo [Cu(bzampy)Cl]⁺ (3) por 15, 30 e 60 min, com peróxido de hidrogênio. As concentrações de CuL em μM, e os tempos de incubação em min estão indicadas no gel. Canaletas: 1Kb marcador; DNA+DMSO, H_2O_2 , DNA + H_2O_2 (125μM); DNA + CuL (50 μM 60 min); DNA plasmidial (300ng/μL). (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A), utilizando o programa *ImageJ* 1.46 para a quantificação.
- **Figura 6.24.** (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo [Cu(ftampy)Cl₂]²⁺ (4) por 15, 30 e 60 min, com peróxido de hidrogênio. As concentrações de CuL em μM, e os tempos de incubação em min estão indicadas no gel. Canaletas: 1Kb marcador; DNA +DMSO, H_2O_2 , DNA + H_2O_2 (125μM); DNA + CuL (50 μM 60 min); DNA plasmidial (300ng/μL). (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A), utilizando o programa *ImageJ* 1.46 para a quantificação.
- **Figura 6.25.** (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo [Cu(isadab)Cl]⁺ (5) por 15, 30 e 60 min, com peróxido de hidrogênio. As concentrações de CuL em μM, e os tempos de incubação em min estão indicadas no gel. Canaletas: 1Kb marcador; DNA +DMSO, H_2O_2 , DNA + H_2O_2 (125μM); DNA + CuL (50 μM 60 min); DNA plasmidial (300ng/μL). (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A), utilizando o programa *ImageJ 1.46* para a quantificação.
- **Figura 6.26.** (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo [Cu(isadbz)Cl₂]²⁺ (6) por 15, 30 e 60 min, com peróxido de hidrogênio. As concentrações de CuL em μM e os tempos de incubação em min estão indicadas no gel. Canaletas: 1Kb marcador; DNA +DMSO, H_2O_2 , DNA + H_2O_2 (125μM); DNA + CuL (50 μM 60 min); DNA plasmidial (300ng/μL). (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A), utilizando o programa *ImageJ* 1.46 para a quantificação.

- **Figura 6.27.** Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo [Cu(apyhist)H₂O]²⁺ (1) por 10, 20 e 40 min, com peróxido de hidrogênio. Canaletas: 1Kb marcador; DNA, DNA plasmidial (36ng/μL); H_2O_2 , DNA + H_2O_2 (125μM); As concentrações de CuL, e os tempos de incubação estão indicadas no gel. (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A) [30].
- **Figura 6.28.** (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo [Cu₂(apyhist)₂dpam]⁴⁺ (2) por 10, 20 e 40 min, com peróxido de hidrogênio. Canaletas: 1Kb marcador; DNA, DNA plasmidial (36ng/μL); H₂O₂, DNA + H₂O₂ (125μM); As concentrações de CuL, e os tempos de incubação estão indicadas no gel. (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A) [30].
- Figura 7.1. Ensaios de viabilidade celular de melanomas murinos TM1, TM5 e células não tumorogênicas murinas Melan-a, após tratamento por 48h com os complexos [Cu(apyhist)H₂O)²⁺ (1) e [Cu₂(apyhist)₂dpam]⁴⁺ (2), em concentrações 5, 10 e 20 μM.
- Figura 7.2. Ensaio de morte celular de células TM1, TM5 e Melan-a após tratamento com os complexos [Cu(apyhist)H₂O)²⁺ (1) e [Cu₂(apyhist)₂dpam]⁴⁺ (2), por contagem em citômetro de fluxo, com incorporação de iodeto de propídio para indicar a porcentagem de células em fase Sub-G1 (DNA fragmentado). Ensaio de 48 h de tratamento com os complexos em concentrações indicadas na figura.
- **Figura 7.3.** Viabilidade celular de melanomas humanos SKMEL-05 (A) e SKMEL-147 (B), avaliada por ensaio de MTT. Ensaios com tratamento durante 24 h com os complexos **(1)** e **(2)**, em concentrações indicadas na figura, em condições de cultura. A primeira barra é representativa do controle com DMSO.
- **Figura 7.4.** Viabilidade celular de melanomas humanos SKMEL-05 (A) e SKMEL-147 (B), avaliada por ensaio de MTT. Ensaios com tratamento durante 24 h com os complexos **(3)** e **(4)**, em concentrações indicadas na figura em condições de cultura, a primeira barra é representativa do controle com DMSO.
- **Figura 7.5.** Viabilidade celular de melanomas humanos SKMEL- 05 (A) e SKMEL- 147 (B), avaliada por ensaio de MTT. Ensaios com tratamento durante 24 h com os complexos **(5)** e **(6)**, em concentrações indicadas na figura em condições de cultura, a primeira barra é representativa do controle com DMSO.
 - Figura 7.6. Representação da curva utilizada para cálculo de IC₅₀ dos complexos.
- **Figura 7.7.** Viabilidade de células de melanomas humanos SKMEL-05 e SKMEL-147 tratadas com o complexo **(1)**, durante 24 h (A, C) ou 48 h (B, D), previamente irradiadas (13,9 mJ/cm²). População da fase Sub-G1 monitorada por incorporação de iodeto de propídio em citômetro de fluxo.
- Figura 7.8. Viabilidade de células de melanomas humanos SKMEL- 05 e SKMEL- 147 tratadas com o complexo (2), durante 24 h (A, C) ou 48 h (B, D), previamente irradiadas (13,6 mJ/cm²). População da fase Sub-G1 monitorada por incorporação de iodeto de propídio em citômetro de fluxo.

- **Figura 7.9.** Citotoxicidade observada em células SKMEL-05 e SKMEL-147 tratadas com diferentes concentrações dos complexos [Cu(bzampy)Cl] $^{+}$ (3) 20 μM e [Cu(ftampy)] $^{4+}$ (4) 1 μM, 5 μM e 10 μM, em ensaios com e sem exposição à radiação UVB (12 mJ/cm2) durante 24 h (A, C) ou 48 h (B, D) de tratamento. Monitoração de fase Sub-G1 por citometria de fluxo.
- **Figura 7.10.** Ensaios de permeabilização de membrana de células SKMEL-05 e SKMEL-147 tratadas com diferentes concentrações dos complexos [Cu(bzampy)Cl] $^{+}$ (3) 20 μM e [Cu(ftampy)] $^{4+}$ (4) 1 μM, 5 μM e 10 μM, com e sem exposição à radiação UVB (12 mJ/cm2), durante 24 h (A, C) ou 48 h (B, D) de tratamento.
- Figura 7.11. Efeito da radiação UVB (13,6 mJ/cm²) na citotoxicidade dos complexos (1) e (2), nas concentrações indicadas na figura, após tratamento de 48 h, nas linhagens SKMEL-05 e SKMEL-147. População de células em fase Sub-G1 monitorada por incorporação de iodeto de propídio por citometria de fluxo.
- Figura 7.12. Células melanomas sensíveis ao tratamento com complexo (2) após irradiação UVB prévia. Células SKMEL-05 e SKMEL-147 tratadas com os complexos (1) na concentração de 20 μ M, e com o complexo (2) nas concentrações de 5 μ M e 10 μ M, durante 48 h. As setas em branco indicam a acumulação de vacúolos citoplasmáticos na linhagem SKMEL-05, após tratamento com o composto dinuclear (2).
- **Figura 7.13**. Ampliação da imagem com as setas que indicam a acumulação de vacúolos citoplasmáticos na linhagem SKMEL-05, após tratamento com o composto dinuclear **(2)**.
- **Figura 7.14**. Viabilidade celular de melanomas SKMEL-05 e SKMEL-147, tratadas com cisplatina, por 48 h, na concentração de 10 μM, avaliada com incorporação de iodeto de propídio e contagem da fase Sub-G1 em citômetro de fluxo.
- Figura 7.15. Conteúdo de melanina em células murinas, Ma: Melan-a não tumorogênica, TM1 e TM5 melanomas, avaliado através de medidas da absorbância em 475 nm, após o lise das células em solução de NaOH (1 M).
- **Figura 7.16.** Conteúdo de melanina em células de melanoma humanos SKMEL-37, SKMEL- 05 SKMEL-147, irradiadas (13, 2mJ/cm²) e não irradiadas, avaliado através de medidas da absorbância em 475 nm, após lise das células em solução de NaOH (1 M).
- **Figura 7.17**. Conteúdo de melanina em células de melanoma humano SKMEL-05 SKMEL-147, irradiadas (13, 2mJ/cm²) e não irradiadas, avaliado pela medida da absorbância em 475 nm. Células tratadas com os complexos **(1)** e **(2)** nas concentrações indicadas na figura.
- Figura 7.18. Conteúdo de melanina em células de melanoma humano SKMEL- 05 SKMEL-147, tratadas com os complexos (1) na concentração de 20 μ M, e complexo (2) na concentração de 5 e 10 μ M, avaliado através de medidas da absorbância em 475 nm, após lise das células em solução de NaOH (1 M).
- **Figura 7.19.** Ensaios de morte celular. A) Células da linhagem SKMEL-37 incubadas por 48 h, a 37 °C, sob atmosfera de 5 % de CO₂, com exposição prévia a radiação UVB, tratadas com concentrações, indicadas na figura, do complexo **(2)** dinuclear. B) Linhagem SKMEL-37 incubada por 48 h, a 37 °C, em 5 % de CO₂, com exposição a radiação UVB em presença do complexo **(2)**, nas concentrações indicadas na figura.

- **Figura 7.20.** Viabilidade celular e influência da radiação UVB em linhagens humanas tumorogênicas, CHL- 01 e UACC, tratadas com o complexo dinuclear **(2)** nas concentrações indicadas na figura, durante 48 h, após exposição prévia a radiação (14,1 mJ/cm²).
- **Figura 7.21.** Linhagem celular de queratinócitos (HaCat) incubada com composto **(2)**, nas concentrações indicadas na figura, com exposição prévia à radiação (14,0 mJ/cm²). Na figura sobreposta: ensaio com exposição à radiação em presença do complexo. Ensaios de 48h, a 37 °C e sob atmosfera com 5% de CO₂
- **Figura 7.22.** Formação de íon superóxido na mitocôndria de células SKMEL-05 e SKMEL- 147, previamente irradiadas (12,8 mJ/cm²) e tratadas com os complexos nas concentrações indicadas na figura, durante 24 h (A, B) ou 48 h (C, D). Monitoramento por medidas de fluorescência, usando MitoSoxRed como indicador.
- **Figura 7.23.** Medidas de massa mitocondrial de células SKMEL-05 e SKMEL-147, previamente irradiadas e tratadas com os complexos nas concentrações indicadas na figura, durante 24 h (A, B; 13,8 mJ/cm²) ou 48 h (C, D; 15,4 mJ/cm²). Monitoramento por medidas de fluorescência, usando MitoTrackerGreen como indicador.
- Figura 7.24. A) Placas dos ensaios clonogênicos para as células SKMEL-05, com exposição prévia à radiação (14,1 mJ/cm²) e posterior tratamento com os complexos (1) e (2), nas concentrações de 20 μM e 10 μM, respectivamente. B) Ensaio de morte celular com tratamento de 48 h com os complexos, quantificando-se as células em fase Sub-G1. C) Fração de sobrevivência das células tratadas com os complexos, avaliada pela formação de clones.
- Figura 7.25. A) Placas dos ensaios clonogênicos para as células SKMEL- 147, com exposição prévia à radiação (13,9 mJ/cm²), e posterior tratamento com os complexos (1) e (2), nas concentrações de 20 μM e 10 μM, respectivamente. B) Ensaio de morte celular com tratamento de 48 h com os complexos, quantificando as células em Sub-G1. C) Fração de sobrevivência das células tratadas com os complexos, avaliada pela formação de clones.
- **Figura 7.26.** Ensaios de autofagia monitorados pela intensidade da porcentagem de fluorescência laranja, em linhagens SKMEL-05 e SKMEL-147, com e sem exposição prévia a radiação (12,9 mJ/cm²), tratadas com os complexos (1) 20 μ M e (2) 5 μ M e 10 μ M, por 48 h.
- Figura 7.27. Ensaios de autofagia monitorados pela intensidade da porcentagem de fluorescência laranja, em linhagens SKMEL-05 e SKMEL-147, tratadas com os complexos (1) 20 μM e (2) 10 μM, durante 24 h. Células incubadas com cloroquina na concentração de 5 μM, durante 16 h em estufa, com posterior tratamento com laranja de acridina.
- **Figura 7.28.** Ensaios de autofagia monitorados pela intensidade da porcentagem de fluorescência laranja, em linhagens SKMEL-05 e SKMEL-147, tratadas com os complexos **(1)** 20 μM e **(2)** 10 μM, durante 24 h, com exposição a radiação (12,4 mJ/cm²). Células incubadas com cloroquina na concentração de 5 μM durante 16 h em estufa.
- Figura 7.29. Células SKMEL- 05, tratadas com os complexos (1) 20 μM, e (2) 5μM e 10 μM, durante 24 h, expostas à radiação (12,4 mJ/cm²), incubadas posteriormente com cloroquina (5 μM), durante 16 h em estufa. Ensaios de autofagia com indicação de vacúolos citoplasmáticos por laranja de acridina.

Figura 7.30. Células SKMEL- 147, tratadas com os complexos (1) 20 μ M e (2) 10 μ M durante 24 h, expostas à radiação (12,4 mJ/cm²), incubadas posteriormente com cloroquina (5 μ M), durante 16 h em estufa. Ensaios de autofagia com indicação de vacúolos citoplasmáticos por laranja de acridina.

Figura 7.31. Análise da quantificação de proteínas LC3, tubulina e tirosinase por Western Blot, em células SKMEL-05 e SKMEL-147, tratadas com os complexos **(1)** 20 μ M e **(2)** 10 μ M, durante 6 horas, sem irradiação ou após serem irradiadas com UVB (14, 3 mJ/cm²).

LISTA DE TABELAS

- **Tabela 5.1** Valores experimentais de análises elementares para os complexos de cobre(II) preparados. Entre parênteses, são indicados os valores calculados.
 - **Tabela 5.2.** Bandas de FTIR observadas nos espectros dos complexos estudados.
- **Tabela 5.3.** Valores dos parâmetros de g_{\perp} e $g_{//}$ dos complexos sintetizados, no estado sólido, a 77K.
- **Tabela 5.4.** Valores do parâmetro g e das constantes hiperfinas (A) dos compostos sintetizados, em solução congelada a77K.
- **Tabela 5.5.** Caracterização das bandas observadas ($\lambda_{máx}$) e respectivos valores de absortividade molar (ϵ) nos espectros eletrônicos dos complexos (3), (4), (5) e (6).
- **Tabela 6.1.** Valores das velocidades iniciais da oxidação da *L*-Dopa, em diferentes concentrações do complexo **(3)**, obtidos pela curva da absorbância em função do tempo, sem variação do substrato [*L*-Dopa] = 8,0 mM, em pH 7,00 e T = 25° C.
- **Tabela 6.2.** Valores das velocidades iniciais da oxidação da *L*-Dopa, em diferentes concentrações do Complexo **(4)**, obtidos pela curva da absorbância em função do tempo, sem variação do substrato [*L*-Dopa] = 8,0 mM, em pH 7,00 e T = 25° C.
- **Tabela 6.3.** Velocidade inicial para diferentes concentrações de *L*-Dopa, na reação catalisada pelo complexo **(3)** na concentração de 320μM.
- **Tabela 6.4.** Velocidade inicial para diferentes concentrações de *L*-Dopa, na reação catalisada pelo complexo **(4)** na concentração de 320μM.
- **Tabela 6.5.** Resumo dos valores encontrados para a constante de pseudo- 1° ordem da cinética catalítica dos compostos. [L-dopa] = 8,0 mM.
- **Tabela 7.1.** Valores de IC_{50} para a citotoxicidade de complexos de cobre, frente a melanomas SKMEL-05 e SKMEL-147, após 24h de incubação a T = 37° C.

Estrutura dos Complexos

SUMÁRIO

_				
R	es	ш	m	0
1.	CJ	ч		v

_		_		_
Δ	ho	:tr	a	ct

1. Introdução	20
1.1. Objetivos	37
2. Parte Experimental I – Síntese	38
2.1. Reagentes e Soluções	38
2.2. Sínteses dos Complexos	38
2.3. Métodos de Caracterização e Instrumentação	43
3. Parte Experimental II – Reatividade e Interações com Biomoléculas	44
3.1. Verificação da Atividade Tirosinase, Catálise da Oxidação da <i>L</i> -Dopa	44
3.2. Monitoramento da Geração de Radicais por Espectroscopia EPR	44
3.3. Interação com Melanina Monitorada por espectroscopia UV/Vis	45
3.4. Interação com Melanina Monitorada por Espectroscopia EPR	45
3.5. Reatividade Frente ao DNA: Experimentos de Atividade Nuclease	46
4. Parte Experimental III – Ensaios celulares	47
4.1. Avaliação de Viabilidade Celular por MTT de Linhagens de Melanomas Murinos: Melan-a, Tm1, Tm5 por Tratamento com os Complexos (1) e (2)	47
4.2. Ensaios de Morte Celular de Linhagens de Melanomas Murinos: Melan-a, Tm1, Tm5 por Tratamento com os Complexos (1) e (2) - Avaliadas por Citometria de Fluxo	48
4.3. Viabilidade por MTT de Melanomas Humanos SKMEL-05 e SKMEL-147 após Tratamento com os Compostos em Estudo	49
4.4. Ensaios de Morte Celular em Melanomas Humanos SKMEL-05 e SKEML-147 com Exposição Previa à Radiação UVB e Tratamento com os Complexos (1), (2), (3) e (4)	49
4.5. Ensaios de Quantificação de Melanina	50
4.6. Ensaios de Morte Celular em Melanomas Humanos SKMEL-37, UACC, CHL01, Tratadas com o Complexo (2) com Exposição à Radiação UVB.	51
4.7. Viabilidade Célular de Queratinócitos com Exposição Prévia e Posterior ao Tratamento com o Complexo Dinuclear (2)	51
4.8. Avaliação da Quantidade de Superóxido Produzido na Mitocôndria e Massa Mitocondrial Celular Posterior ao Tratamento com os Complexos (1) e (2)	52
4.9. Ensaios Clonogênicos: Quantificação da Fração de Sobrevivência das Células SKMEL- 05 e SKMEL-147 após Tratamento com os Complexos (1) e (2)	52
4.10. Ensaios de Autofagia Induzida pelos Complexos em Células de Melanoma SKMEL-05 e SKMEL-147 após Tratamento com o os Complexos (1) e (2)	53

4.11. Ensaios de Quantificação de Proteínas Autofágicas e Tirosinase por Western Blot	53
5. Resultados e Discussões I – Caracterização	54
5.1. Análises Elementares e ICP	54
5.2. Espectros na Região do Infravermelho	55
5.3. Espectros de Ressonância Paramagnética	60
5.4. Espectroscopia Eletrônica	64
6. Resultados e Discussões II – Reatividade e Interações com Biomoléculas	68
6.1. Verificação da Atividade Tirosinase, Catálise da Oxidação da <i>L</i> -Dopa	68
6.2. Monitoramento da Geração de Radicais por Espectroscopia EPR	78
6.3. Interação com Melanina Monitorada por espectroscopia UV/Vis	82
6.4. Interação com Melanina Monitorada por Espectroscopia EPR	83
6.5. Reatividade Frente ao DNA: Experimentos de Atividade Nuclease	89
7. Resultados e Discussões III – Ensaios Celulares	97
7.1. Avaliação da Viabilidade Celular por MTT de Linhagens de melanomas Murinos: melan-a, TM1, TM5 por tratamento com os compostos (1) e (2)	97
7.2. Ensaios de Morte Celular de Linhagens de Melanomas Murinos: Melan-a, Tm1, Tm5 por Tratamento com os Complexos, (1) e (2) - Avaliadas por Citometria de Fluxo	98
7.3. Viabilidade por MTT de Melanomas Humanos Skmel-05 e Skmel-147 após Tratamento com os Compostos em Estudo	99
7.4. Ensaios de Morte Celular em Melanomas Humanos SKmel-05 e SKmel-147 com Exposição Prévia à Radiação UVB e Tratamento com os Complexos (1), (2), (3) e (4)	103
7.5. Ensaios de Quantificação de Melanina	110
7.6. Ensaios de Morte Celular em Melanomas Humanos SKmel-37, UACC, CHL01, Tratadas com o complexo (2) com Exposição à Radiação UVB	113
7.7. Viabilidade Celular de Queratinócitos Humanos com Exposição Prévia e Posterior ao Tratamento com o Complexo Dinuclear (2)	115
7.8. Avaliação da Quantidade de Superóxido Produzido na Mitocôndria e Massa Mitocondrial Celular Posterior ao Tratamento com os Complexos (1) e (2)	116
7.9. Ensaios Clonogênicos: Quantificação da Fração de Sobrevivência das Células Skmel-05 e Skmel-147 após Tratamento com os Complexos (1) e (2)	119
7.10. Ensaios de Autofagia Induzida em Células de Melanoma Skmel-05 e Skmel-147 após Tratamento com os Complexos (1) e (2)	122
7.11. Ensaios de Quantificação de Proteínas Autofágicas e Tirosinase por Western Blot	127
8. Conclusões	130
9. Referências	134
Súmula Curricular	140

1. Introdução

1.1 Cobre e Melanoma

A Química do cobre é bastante vasta e variada, incluindo compostos com diferentes ligantes e geometrias, preparados para diversas finalidades: catalisadores de processos de oxidação, miméticos de proteínas e enzimas, potenciais metalofármacos e novos materiais com propriedades interessantes.

Em nosso laboratório, temos planejado e isolado complexos de cobre há já algum tempo. Inicialmente preparamos compostos capazes de gerar espécies reativas de oxigênio [1,2], com interesse catalítico ou ambiental [3], além de compostos de cobre(II) capaz de catalisar processos oxidativos em compostos aromáticos, e outros compostos orgânicos provenientes de efluentes petroquímicos [4]. Em seguida, investigamos miméticos de algumas proteínas de cobre, como a tirosinase [5,6], superóxido dismutase, Cu,Zn-SOD [7] ou a citocromo c oxidase [8]. Mais recentemente, planejamos, preparamos e investigamos a reatividade de diversos complexos de cobre com propriedades pró-apoptóticas, que parecem poder atuar como metalofármacos promissores [9,10,11,12,13]. Finalmente, estamos estudando complexos de cobre como possíveis armazenadores de gases, com estrutura polimérica ou do tipo MOF (metal organic framework) [14].

Neste trabalho estamos interessados no desenvolvimento de possíveis metalofármacos baseados em cobre com foco em melanomas. Compostos antitumorais têm merecido extensos estudos, devido à alta incidência do câncer como doença e causa de inúmeras mortes. Em 2018, espera-se ainda uma grande incidência de câncer em todo o mundo, devendo afetar 9,6 milhões de pessoas. Para os homens, os tipos mais comuns de câncer são pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado. Para as mulheres, são mais comuns o câncer de mama, colorretal, pulmão, cervical (colo do útero) e estômago. Apenas em 2010, os gastos com essa doença atingiram 1,6 trilhão de dólares [15].

Diferentes metais têm sido utilizados para preparar estes compostos, baseados em diferentes íons metálicos, como platina, rutênio, paládio e ouro [16, 17, 18]. Os únicos metalofármacos aprovados para uso clínico contra câncer pela FDA (Food Drug Administration) nos EUA são de platina [19,20]. Devido à resistência adquirida pelas células observada no tratamento com estes complexos de platina, fármacos alternativos têm sido desenvolvidos e dentre os compostos mais estudados, se destacam os de cobre [21, 22].

Os complexos de Cobre têm sido alvo de estudos em terapia anticâncer principalmente por ser o cobre um metal essencial. Seres humanos apresentam concentrações de cobre em torno de 1,7 mg/kg corpóreo. Sua reposição é realizada através da alimentação e sua homeostase é bem controlada [23]. Problemas devido a excesso ou falta de cobre no organismo, ocorrem em casos de má alimentação, com uso insuficiente de nutrientes que contenham cobre, ou desordens genéticas, como na doença de Menkes ou doença de Wilson. Na doença de Menkes, a via responsável pela incorporação de cobre às células e à sua excreção é prejudicada por desordens e deficiências na proteína ATP7A (presente na membrana celular), que leva à diminuição de níveis de cobre no organismo, podendo causar problemas na incorporação de ferro ou até mesmo danos cerebrais. Na doença de Wilson, a via responsável pela incorporação do cobre à ceruloplasmina, proteína associada ao transporte e distribuição do cobre, é afetada a partir de mutações no gene ATP7B, que provocam o acúmulo de cobre em certas partes do organismo, causando toxicidade e levando principalmente à problemas no fígado e cérebro [24]. Sendo assim, a regulação da absorção, transporte, armazenamento, distribuição e excreção do cobre deve funcionar de modo bastante eficiente. Em experimento realizado através da constante de incorporação de íons cobre na proteína superóxido dismutase Cu,Zn-SOD, foi estimado em 10⁻¹⁸ mol/L a quantidade de cobre "livre" intracelular, isto é, íons disponíveis para se ligar a proteínas e outras biomoléculas com grupos nitrogenados (ligantes duros), quando no estado oxidado Cu(II), ou com grupos contendo enxofre (ligantes moles-intermediários), quando reduzido à Cu(I) [25].

Sendo assim, verifica-se a necessidade essencial deste metal num organismo vivo. Porém a capacidade redox do cobre, o torna muito reativo e apto a gerar danos a biomoléculas, através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), em reações do tipo-Fenton, mostradas no Esquema 1 [26]. O chamado estresse oxidativo é modulado pelos ligantes coordenados, que podem alterar a geometria imposta ao íon metálico, mudando assim, seu potencial de redução [27].

$$LCu^{+} + H_{2}O_{2} \rightarrow LCu^{2+} + {}^{\bullet}OH + OH^{-}$$
 Esquema 1 $LCu^{2+} + H_{2}O_{2} \rightarrow LCu^{+} + O_{2}^{\bullet-} + 2H^{+}$

Em nossos estudos, utilizamos ligantes imínicos capazes de estabilizar ambos os estados de oxidação do cobre presentes no meio biológico, cobre(I) e cobre(II), especialmente ligantes derivados do oxindol isatina [28], além de grupamentos nitrogenados, como piridina ou imidazol. Dessa forma, esses complexos de cobre usualmente atuam como centros redox, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), capazes de causar danos oxidativos a biomoléculas cruciais, como ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos ou lipídeos, e organelas. Potencialmente, estes complexos podem alterar o status redox de uma célula, iniciando processos de transferência de elétrons.

Para uma célula se tornar tumoral uma série de alterações complexas devem ocorrer, em decorrência de uma cascata de sinais de transdução alterados [29]. A chamada sinalização redox parece estar envolvida na regulação de proteínas e as cascatas de sinalização desempenham papel crucial no câncer. Desta maneira, a geração alterada de EROs pode induzir apoptose em células tumorais e compostos capazes de causar danos significativos através desses EROs constituem agentes promissores na ação contra tumores.

Em estudos anteriores [30], verificamos que alguns complexos dinucleares de cobre(II) eram bem mais reativos frente a melanomas que seus análogos mononucleares, com os mesmos ligantes. Todos esses complexos tinham como alvo o DNA, sendo capazes de causar clivagens simples e duplas nas fitas, através de um mecanismo oxidativo. Estes estudos também indicaram que havia uma correlação entre o teor de melanina nas células e sua sensibilidade aos complexos imínicos de cobre, especialmente aos complexos dinucleares. Verificou-se que melanomas com alto teor de melanina, como B16F10, eram mais susceptíveis que melanomas Tm1, com teores baixos ou desprezíveis de melanina. Assim, iniciamos estudos mais aprofundados sobre a citotoxicidade de complexos dinucleares de cobre em relação a melanomas, em comparação com a reatividade de compostos análogos mononucleares, na tentativa de elucidar melhor diferenças em seus modos de ação.

Foram então preparados 3 pares de complexos de cobre(II) com ligantes imínicos, mostrados na Figura 1.1, e suas reatividades frente a diferentes melanomas foram investigadas. Estes estudos foram realizados em colaboração com o grupo do Prof. Roger Chammas, do Instituto do Câncer, da Faculdade de Medicina da USP (ICESP), envolvendo particularmente as Dras. Andréia H. Otake e Silvina Bustos.

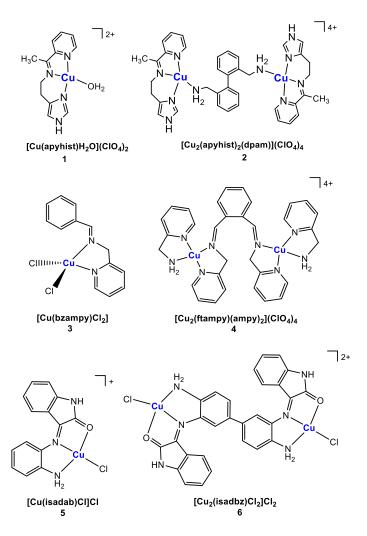


Figura 1.1. Estruturas dos complexos de cobre estudados.

Melanomas

Melanomas são um tipo de câncer muito agressivo e metastático, com altos índices de fatalidade quando diagnosticado tardiamente. Frequentemente, melanomas são resistentes a terapias usuais conforme indicado em muitos trabalhos relatados na literatura [31, 32, 33].

Transformações malignas em melanócitos, células normais responsáveis pela síntese da melanina, levam à formação de melanomas, que podem surgir de melanócitos congênitos (pintas, sinais de nascença ou verrugas, sem sinais de hereditariedade) ou displásicos (nevos atípicos, com importante fundo hereditário). Melanomas podem ser formados usualmente na pele, ou em outros sítios anatômicos, dentre eles o sistema gastrointestinal, os olhos, meninges, o trato urinário e o sistema reprodutivo. Dessa forma, temos o melamona cutâneo, sendo o mais comum, que é proveniente de melanócitos da epiderme, o melanoma

mucoso, de melanócitos das membranas mucosas e o melanoma uveal, que residem no estroma ocular [34].

Esses tumores são bastante agressivos, em parte por sua habilidade em invadir outros tecidos. Estudos in vitro demonstraram que diferenças entre melanócitos e melanomas, residem principalmente em proteínas associadas à capacidade de sobrevivência em diferentes ambientes. As mudanças se relacionam a adesão célula-célula de tecidos epiteliais. O melanoma apresenta proteínas de adesão em tecidos conjuntivos, podendo assim, se desprender do controle negativo presente nos queratinócitos e se difundir para outros ambientes, dessa forma atingindo um crescimento vertical. Frequentemente, apresentam metástase em nódulos linfáticos, no fígado, nos pulmões e no cérebro, levando rapidamente à morte, são responsáveis por 80% das mortes por câncer de pele, mesmo sendo um dos cânceres de pele de menor incidência, equivalente a 2 % do total. Em estágios iniciais de desenvolvimento (fase de crescimento radial) são curáveis, possíveis de serem removidos por cirurgia. Entretanto, aqueles já em estágio metastásico apresentam sobrevida de apenas 5 anos, com chances de 12% de sobrevivência [35,36]. Nos Estados Unidos, estimou-se uma incidência de 91.270 casos de melanoma em 2018, sendo em média 55.150 homens, e 36.120 mulheres, com faixa de morte em 9.320 pessoas [37]. No Brasil, os valores são menores, com a estimativa de 6.260 novos casos em 2018, sendo 2.920 casos em homens, e 3.340 em mulheres. As mortes associadas, remetem ao ano de 2013 com números de 1.547 mortes, sendo 903 homens e 566 mulheres [38]. No geral, o diagnóstico de melanoma vem aumentando em todo mundo, com estimativa de 48.000 mortes por ano [39].

A incidência de melanomas está correlacionada a vários fatores: etnia (cor da pele), exposição solar, fatores genéticos, entre outros. Diferente de outros tipos de câncer, melanomas não estão ligado diretamente à idade, podendo ocorrer com frequência em pessoas idosas, porém pode também ocorrer em jovens e adultos de meia idade. Suas causas podem ser associadas tanto a fatores ambientais quanto genéticos, pessoas de pele branca, com pouca pigmentação (Caucasianas) são mais suscetíveis ao desenvolvimento de melanomas, do que pessoas de pele mais escura, com mais pigmento (Africanos, pessoas do Leste da Ásia e Hispânicos). Em pessoas negras ocorrem principalmente melanomas do tipo acral (solas dos pés e das mãos). Pode-se associar a incidência de melanomas também à

localização geográfica, sendo que a maior incidência ocorre na Austrália e a menor no Sul da Ásia Central. Com a proximidade do Equador, há um maior número de casos relatados, o que associa o fator da exposição solar, além da maior incidência de melanomas em áreas do corpo expostas a radiação. Pessoas com histórico familiar de melanoma são também mais propensas a desenvolverem melanomas. Nevos atípicos correm maior risco de evoluir para um tumor, bem como a maior quantidade de pintas (nevos) predispõe a pessoa a desenvolver melanomas. Melanomas lentigos podem estar associados a lesões causadas pela exposição crônica à radiação solar, ocorrendo com mais frequência em idosos. Uma associação a pessoas com comorbidades também foi apontada como risco, como ocorre em pós-transplantados [34, 40].

A melanina é um produto polimérico formado na oxidação do aminoácido tirosina, através de diversas etapas, levando à pigmentação da pele, olhos e cabelos. Em geral, maior teor de melanina leva a uma maior proteção da pele contra os efeitos nocivos da radiação UV. Entretanto, a melanina pode ter também um efeito adverso, já que apresenta diversos grupos coordenantes em sua estrutura (vide Figura 1.2) que podem ligar diferentes íons metálicos, em especial ferro e cobre [41]. Detalhes serão abordados mais adiante, relacionando as principais atuações e funcionamento dual da melanina.

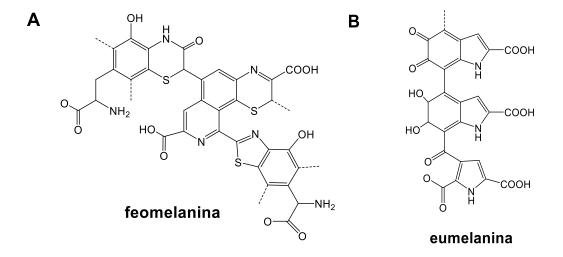


Figura 1.2. Estruturas moleculares dos principais monômeros da melanina (A) feomelanina e (B) eumelanina [68].

Tirosinases

A proteína tirosinase está implicada em etapas da melanogênese, isto é, da síntese da melanina. Esta proteína faz parte das enzimas de cobre do tipo III, apresentando espectros UV/Vis característicos, com forte absorção em torno de 330 nm (transições de transferência de carga), e espectros Raman com banda em 756 cm⁻¹. Esses espectros da proteína na forma oxigenada indicam um tipo especial de coordenação do oxigênio aos átomos de cobre, na forma $\mu - \eta^2$: η^2 que pode ser visualizada no quadro TYR na Figura 1.3. Apresentam também sinal de EPR silencioso, na forma oxi [42]. Dessa maneira, além da atividade fenolase (oxidação de fenóis a catecóis) possui também a atividade catecolase (oxidação de catecóis a quinonas) [43, 44].

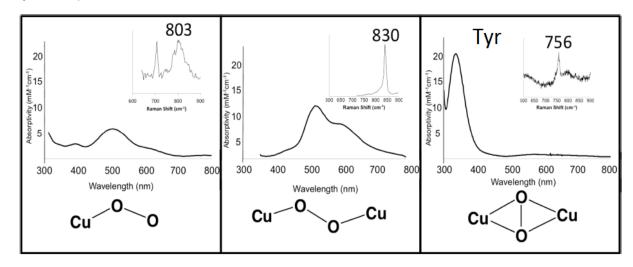


Figura 1.3. Espectros UV/Vis e Raman dos principais tipos de coordenação de oxigênio aos núcleos de cobre e, por último, a TYR em seu sítio ativo, com coordenação do tipo: $\mu - \eta^2$: η^2 -O₂ [42].

Em seu mecanismo de ação, o centro ativo da enzima, contendo dois íons de cobre coordenados a grupos imidazólicos de resíduos de histidina, parece passar por vários estados de oxidação. Seguindo o ciclo catalítico, podemos acompanhar o estado redox do íon metálico, Cu(I) na forma deoxi, que ao se coordenar com o oxigênio vai ao estado oxidado Cu(II), sendo a partir daí capaz de oxidar o monofenol à respectiva quinona, com a transferência de 4 elétrons. Também, a partir do estado Cu(II) na forma oxi, é capaz de oxidar o o-difenol (catecol), passando pela etapa de formação do intermediário (forma met), ainda no estado Cu(II), que pode oxidar outro catecol a correspondente quinona, transferindo dois elétrons para voltar ao estado deoxi, conforme pode ser visto na Figura 1.4. [45].

Figura 1.4. Mecanismo de ação da tirosinase, mostrando seus 3 estados no ciclo catalítico da enzima, forma oxi-Cu(II), forma deoxi-Cu(I), forma met-Cu(II), referência adaptada [45].

Por outro lado, a melanogênese ou síntese da melanina envolve, além da tirosinase, proteínas a ela relacionadas, TRP-1 e TRP-2, e já foi demonstrada uma atividade tirosinase elevada em células melanomas malignos, comparada à atividade em células saudáveis [46]. Estudos indicam valores de 17.000 a 19.500 unidades de atividade tirosinase/mg em tecido fresco de melanomas (metastáticos, de homem negro de 38 anos) e apenas 24 a 95 unidades de atividade tirosinase/mg na pele em tecido fresco de pele saudável (de vários tecidos sadios semelhantes aos metastáticos) [47].

Assim, alguns potenciais pró-fármacos para terapia contra melanomas têm sido relatados na literatura, que seriam ativados pela tirosinase, num processo em que moléculas com baixa toxicidade, após sofrerem oxidação catalítica são ativadas, tornando-se potencialmente tóxicas [46,48]. Porém, estes estudos exigem uma estrutura mais seletiva, que possa ser ativada apenas pelas enzimas tirosinases, evitando que essas moléculas sejam oxidadas por outras enzimas, como por exemplo, as monoaminas oxigenases do plasma [49].

Outros estudos utilizam a enzima tirosinase como alvo de inibição [50], observando que, na progressão de melanomas há uma superexpressão desta enzima, indicando que sua função é vital para a oxidação de substratos na massa tumoral [46].

Terapias antimelanoma

Uma série de terapias antimelanoma têm sido desenvolvidas e utilizadas. Os quimioterápicos mais recomendados ainda são a dacarbazina e seu análogo temolozomida, além Nab-paclitaxel, paclitaxel e Vinblastina. Porém o prognóstico ainda é adverso e a resposta positiva ao tratamento é observada em poucos pacientes [51], em alguns casos ainda é recomendado o tratamento com cisplatina, ou carboplatina que, no entanto, possui como característica provocar nas células sobreviventes um aumento na resistência ao tratamento, além de intensos efeitos colaterais, como toxicidade aos rins e neurotoxicidade. Assim, a quimioterapia pode ser indicada em estágios mais avançados da doença [52].

A radioterapia tem seu uso limitado, pois a melanina por ser fotoprotetora diminui os efeitos da terapia, que pode ser indicada apenas em estágios mais avançados da doença. Tem efeito paliativo no alívio dos sintomas ou no intuito de prolongar o tempo de vida dos pacientes, podendo ser indicada também após cirurgia, com bons resultados em mucosas nasais [53].

Recentemente alguns fármacos foram aprovados para o tratamento de melanomas em terapias auto-imunes, que podem ou não serem usadas em conjunto com quimioterápicos, na premissa de melhorar a eficiência dos medicamentos. Os mais indicados são interferon-α (proteínas produzidas pelos leucócitos do sistema imune), administradas aos pacientes e aumentando, assim, a resposta imune ao tumor e interleucina-2 (produzidas também por células do sistema imune, com finalidade de ativá-lo). São utilizados também anticorpos humanizados *Pembrolizumab* e *Nivolumab*, que agem como inibidor de PD_1 (proteína de morte programada em células tumorais), e *Ipilimumab* como inibidor CTLA-4 (molécula moduladora do sistema imune, que geralmente atenua da atividade de células T). As terapias com anticorpos e inibidores específicos têm por finalidade manter as células do sistema imunológico ativas por muito mais tempo, combatendo com maior eficácia o tumor [54, 55].

São consideradas também as terapias-alvo, que podem ser usadas como terapia auxiliar, aumentando a eficácia dos tratamentos. Neste caso, utilizam-se fármacos desenvolvidos com seletividade, a partir de moléculas inibidoras de proteínas especificas, como por exemplo, o *Vemurafenib*, um dos poucos fármacos aprovados pela FDA, como inibidor do oncogene BRAF [56].

O proto-oncogene BRAF (mutações associadas ao gene BRAF) está relacionado ao fator de crescimento dos sinais de transdução da família das quinases RAF (RAF - oncogene retroviral). As quinases constituem uma classe de várias enzimas responsáveis pela fosforilação de proteínas, transferindo um grupo fosfato do ATP, num processo que geralmente provoca estímulos intra- extracelulares. Na cascata de sinalização normal, ocorre a recepção do sinal dos fatores de crescimento, como as tirosina-quinases, que a partir daí se ligam ao receptor (transmembrana) que é dimerizado e fosforilado, podendo assim, ativar a via NRAS (do gene RAS que codifica proteínas ligadoras de GTP, com funções de sinalização intracelular, controle de crescimento, proliferação e apoptose), ativando na sequência o fator da via de sinalização BRAF, MEK (*Mitogen-activated ERK kinase*, quinase capaz de fosforilar resíduos de tirosina, serina/treonina) e assim a ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*) que se transloca para o núcleo e ativa fatores de transcrição, importantes na tradução de sinais para RNAs mensageiros, que então iniciam processos de divisão celular, crescimento, entre outros [57].

Quando há mutações no gene BRAF, sendo a mais comum BRAF V600E (substituição de uma valina (V) por um ácido glutâmico (E), adjacente ao centro de fosforilação), esta via passa a ativar aceleradamente a via ERK, permitindo o crescimento e a proliferação celular descontrolada, além de ser um supressor imunológico, o que facilita ainda mais o crescimento de células mutantes, auxiliando sua proliferação e proteção as células tumorais. Sua inibição em terapia alvo pode inibir a fosforilação da ERK, levando as células à morte programada. Estima-se que esta mutação esteja presente em cerca de 50 a 60 % dos melanomas, sendo assim, as mutações em BRAF acabam sendo usadas como um alvo em terapias, embora apresentem efeitos colaterais, como náuseas, fadiga, erupção cutânea, artralgia e alopecia, além da resistência secundária que pode ser adquirida [58].

Mesmo quando retirados cirurgicamente, os tumores primários levam 44% dos pacientes à morte por complicações metastáticas posteriores [51, 59]. Os melanomas podem progredir de várias formas, em exemplo como pode ser visualizado na Figura 1.5.



Figura 1.5. Modelos de progressões de metástases [59].

Além da progressão associada a metástase do melanoma, as células tumorais possuem também o agravante de após o tratamento com alguns fármacos, para o controle e tratamento da doença, as células sobreviventes adquirirem resistência ao fármaco utilizado [56], além de apresentarem sub-populações, o que proporciona ao tumor uma resistência relacionada às diferenciações das suas células [60]. Assim, a crescente toxicidade dos tratamentos, o desenvolvimento de resistência aos fármacos e a radioterapia, os efeitos colaterais de terapias alvo e imunoterapia (hepatotoxicidade e erupções cutâneas), demonstram a necessidade de buscar novos fármacos ou novos protocolos quimioterapêuticos entre outros, que garantam maior eficiência e menor toxicidade. Caminhos diferenciados buscam o desenvolvimento de metalofármacos utilizados na terapia anticâncer que, dentro das considerações sobre as características do melanoma, poderiam ter influência em sua viabilidade pontuando, por exemplo, a sensibilidade do mesmo à espécies reativas de oxigênio (EROs) [61], que podem ser formadas facilmente quando expostas a metais com potencial redox, como no caso de íons de cobre.

Pesquisas antimelanoma, sensibilidade a espécies reativas

A partir do momento em que se observou a sensibilidade do melanoma (ou de qualquer célula tumoral) frente às espécies reativas de oxigênio (EROs), abriu-se um caminho para esses compostos serem testados na quimioterapia de melanomas [62], complexos de cobre poderiam constituir possíveis fármacos, capazes de gerar EROs e/ou

atuar como cátions lipofílicos delocalizados, que poderiam também induzir a apoptose de melanomas. Estudos da viabilidade de melanócitos e de melanomas em presença de complexos de cobre ou de zinco com ditiocarbamatos, que são bons complexantes para ambos, já foram descritos na literatura e indicaram que os melanomas apresentam uma sensibilidade maior à oxidação [63,64,65,66]. Estudos com células de diferentes linhagens, expostas ao estresse extracelular, demonstraram diferenças entre melanócitos e melanomas em mediar o estresse oxidativo [67]. Melanomas são menos resistentes ao estresse, provavelmente devido à habilidade da melanina em coordenar íons metálicos, como Fe²⁺ ou Cu²⁺. Tanto feomelaninas como eumelaninas podem levar à clivagem das fitas do DNA, independentemente de serem irradiadas (mesmo em ausência de luz). Como são capazes de coordenar íons metálicos, como ferro ou cobre, devido à presença de grupos coordenantes como carboxilatos, catecolatos ou aminas em sua estrutura (vide Figura 1.2), podem participar de reações do tipo-Fenton gerando espécies reativas ou, ao contrário, capturandoas. Outros estudos na literatura mostram reatividade nuclease significativa de melaninas em que íons de cobre ou ferro foram inseridos, coordenados a grupos quelantes [68]. Além disso, as melaninas podem se associar às alças menores do DNA prevenindo o acesso de enzimas de reparo. Desta forma, melaninas têm um comportamento dual, Isto é, apresenta função protetiva chegando, por exemplo, a proteger alguns fungos e bactérias do ataque de radicais nitrogenados ou oxigenados em macrófagos de hospedeiros [69], mas em excesso ela pode gerar danos ao DNA. Podem assim, ter papel pró- ou anti-oxidantes [70].

Complexos de cobre na terapia anticâncer

Além do mais, diferentes mecanismos de ação têm sido identificados, em estudos envolvendo compostos dinucleares de cobre com boa atividade nuclease (ligação e clivagem do DNA) e atividade citotóxica frente a outros tipos de células (neuroblastomas, leucemia, câncer colo-retais). Esses estudos comparam a reatividade de complexos mono-, di- e trinucleares de cobre com ligantes derivados de terpiridina. Em particular, descrevem a alta atividade citotóxica de composto trinuclear frente a células de leucemia MOLT-4, resistentes à cisplatina [71]. Este composto é capaz de clivar DNA plasmidial pUC19 após 24 h de incubação, na concentração de 100 μM. Um outro artigo descreve dois complexos dinucleares de cobre com ligante macrocíclico, que coordenam a molécula de óxido nítrico,

NO, com constantes de estabilidade 1.71×10³ M⁻¹ e 2.0×10³ M⁻¹, em tampão fosfato 0,2 M (PBS) e em condições anaeróbicas. Essas espécies formadas poderiam potencialmente ser responsáveis pela regulação de NO in vivo [72].

Complexos com ligantes mistos, como fenantrolina e derivados octanodionatos, dinucleares de cobre(II) e manganês(II), mostraram citotoxicidade muito alta (em concentrações nM e pM) *in vitro*, frente a células humanas tumorais colo-retais (HT29, SW480 e SW620) em comparação com células normais, não-cancerígenas, humanas (HaCaT). Estes complexos mostraram-se bons geradores de espécies reativas de oxigênio intracelularmente, sendo o complexo de cobre capaz de clivar DNA super-enrolado pUC18 e causar danos à deoxi-ribose [73].

Há algum tempo, dois complexos dinucleares de cobre enantioméricos foram isolados com ligantes tridentados (do tipo ONO), conforme indicado por espectroscopia EPR, UV/Vis e determinação cristalográfica, no caso do R-enantiômero, sua estrutura seria piramidal quadrada ao redor de cada centro metálico. Esses complexos se ligam ao DNA por coordenação covalente ou ligação à alça menor, detectadas por monitoramento através de fluorescência e CD. Estes complexos mostraram-se capazes de clivar o DNA por mecanismo oxidativo, através da formação de radicais hidroxil, superóxido e oxigênio singleto [74].

Complexos de Cobre antimelanoma

A reatividade de diferentes complexos de cobre em geral, contendo grupos piridina, tiosemicarbazona, imidazol ou pirazol, ou seja, com ligantes nitrogenados, frente a células melanomas já foi verificada [75,76,77]. Valores de IC_{50} obtidos no tratamento de culturas de células melanomas B16F10, para os complexos de cobre com derivados de purina ou de imidazol, foram bem menores que os correspondentes valores para íons de cobre ou os ligantes livres, indicando que são mais eficientes como agentes antitumorais. Nestes estudos, dois fatos foram citados como principais responsáveis pela atividade antitumoral desses complexos, primeiro a redução do cobre, e sua posterior interação com grupos tióis de proteínas.

Ensaios com complexos de cobre de fórmula geral [CuLCl₂] e [CuLCl₂]₂, onde L = derivados de pirazol, mostraram atividade citotóxica frente a células melanomas de pele humana WM-115 em concentrações menores que a da cisplatina ou de análogos de platina,

com os mesmos ligantes. Nestes estudos, as espécies dinucleares continham ponte cloreto, que em solução aquosa são muito lábeis, sendo substituídas por moléculas do solvente. Apenas um dos compostos, de estrutura mononuclear, apresentou IC_{50} baixo (8,0 μ M) frente às células melanomas com atividade maior do que a da cisplatina, usada como padrão, e essa atividade foi atribuída à presença de centros metálicos com atividade redox [78,79].

Mecanismos de ação antitumoral

A maioria dos metalofármacos baseados em cobre e descritos na literatura têm DNA como alvo principal. Entretanto, outros alvos e mecanismos alternativos para explicar sua ação antitumoral têm sido discutidos.

Embora a formação de EROs devido à atividade redox dos íons de cobre possa explicar sua atividade oxidativa no meio biológico, alguns pró-fármacos baseados em cobre ou outros metais podem ser ativados no ambiente redutor encontrado em células cancerígenas, sendo mais citotóxicos sob hipóxia que em condições aeróbicas [80].

Em nossos estudos com complexos de cobre(II) antitumorais, identificamos topoisomerase IB (topo I) [81, 82] e quinases dependentes de ciclinas (CDK1 e CDK2) como possíveis alvos [83], além de ácidos nucleicos. Outras proteínas já foram descritas como potenciais alvos, como a proteasoma 26S, em estudos de complexos de cobre(I) com ligantes derivados de tris(pirazolil)borato. Estes complexos atuariam como inibidores desta proteína, associados a um estresse do retículo endoplasmático, através de um mecanismo de paraptose [84].

Entretanto, a maioria destes estudos referem-se a compostos mononucleares, com centros de cobre capazes de realizar ciclos catalíticos de transferências monoeletrônicas. Compostos dinucleares, ou de maior nuclearidade, parecem ser capazes de outros modos de atuação. Embora alguns compostos dinucleares, como por exemplo, com ligantes tiosemicarbazonas, tenham sido descritos como agentes geradores de EROs e tendo como alvo a mitocôndria [85], outros complexos de cobre foram reportados como atuantes por mecanismo hidrolítico, isto é, hidrolisando as ligações fosfato do DNA e agindo como miméticos das chamadas nucleases metaladas [86, 87].

Em outros estudos, novos complexos dinucleares de valência mista, Cu(I,II), com ligantes derivados de imidazolin-4-onas, mostraram atividade contra diferentes células tumorais, atuando como inibidores de telomerase humana, transcriptase reversa HIV, e outras polimerases, e não por intercalação no DNA ou através de clivagens no DNA [88].

Adicionalmente, alguns complexos dinucleares com ligantes derivados de naftalenodióis foram racionalmente planejados para se ligar irreversivelmente a grupos fosfatos adjacentes na estrutura do DNA [89]. Seus modos de ação parecem envolver o bloqueio da síntese do DNA, em vez de hidrolisar ligações fosfato. Portanto, a nuclearidade dos complexos de cobre pode ser um fator determinante de sua reatividade.

Principais processos de morte celular

Os processos que podem levar à morte celular consideram danos irreversíveis, que programam a célula para a morte, e dentre estes são considerados a apoptose, a necrose e a autofagia. Dessas formas de morte celular, podemos destacar como a mais desejada ou conveniente a apoptose, pois nela a célula sofre uma série de modificações programadas, num processo em cascata, e se destrói sem liberar conteúdos inflamatórios em células ou tecidos adjacentes. É diferente da necrose, no qual a morte celular ocorre com a associação a processos inflamatórios; nela a membrana celular é danificada distribuindo seu conteúdo intracelular no plasma e em tecidos adjacentes. Não é um tipo de morte desejada quando se trata de compostos antitumorais. Além das duas já citadas, a autofagia é reconhecida por manter a homeostase celular e pode, em processos intensos, levar a célula à morte programada, tendo atraído bastante atenção na literatura [90]. A autofagia é um processo catabólico que ocorre em todas as células. Geralmente é ativada em situações na qual há exigência de reciclagem dos componentes celulares, por escassez de nutrientes, situações de hipóxia, estresse oxidativo, infecções, ação de quimioterápicos, entre outros, apresentando o que chamamos de vacúolos autofágicos ou acídicos [91].

A autofagia pode ocorrer de três formas, a macroautofagia (autofagia), com a formação de autofagossomo, vesícula de dupla membrana que se associa ao lisossomo, no qual ocorre a degradação por hidrolases ácidas (vide Figura 1.6), a microautofagia, na qual ocorre a invaginação da membrana do lisossomo para englobar os corpos celulares a serem

degradados, e por último a autofagia com mediação do processo através de chaperonas, que auxiliam na translocação direta dos componentes pela membrana do lisossomo.

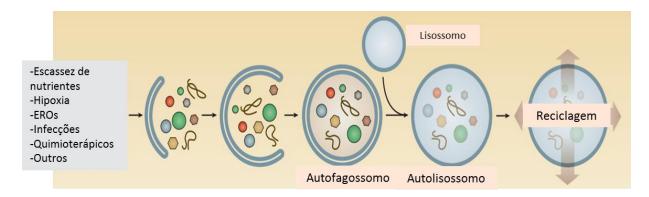


Figura 1.6. Processo de autofagia simplificado, com formação do autofagossomo, e associação com o lisossomo, e posterior reciclagem dos componentes [91].

Para a formação do autofagossomo (macroautofagia) é necessário que ocorra a nucleação, que necessita da participação de vários complexos. Posteriormente, vem a fase de alongamento dessa vesícula, que precisa de dois sistemas conjugados, um deles envolvendo a proteína Map1-LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*). Essa proteína é sintetizada e clivada em sua forma citosólica LC3-I, e quando ocorre o sinal de autofagia ela se conjuga formando a LC3-II, auxiliando na formação do autofagossomo. Ela se associa a ele na fase de alongamento e permanece ligada até a sua total fusão ao lisossomo; neste momento os microtúbulos são também necessários, pois parece que o conjugado LC3-II autofagossomo caminha ao longo do microtúbulo. Por esta ligação específica da LC3-II ao autofagossomo, a proteína se torna um marcador eficiente para verificar processos autofágicos, apresentando níveis elevados durante a ativação desta da via [92].

O processo de manutenção, no qual a autofagia é ativada, pode ocorrer por falta de oxigênio, de nutrientes, por infecções ou a ação de fármacos, regulando os níveis energéticos nas células.

Esta via pode estar associada com a geração de metástases, pois ela é ativada auxiliando a célula quando esta perde o contato com a matriz extracelular, o que geralmente a levaria à morte. Há a hipótese de que a função citoprotetora da autofagia atue quando as células estão expostas a condições extremas (medicamentos, ou danos), na tentativa de

manter a célula viva; porém devido ao intenso estresse provocado, sinaliza outras vias de morte. A autofagia pode apresentar processo dual no controle da toxicidade relativa de fármacos a células tumorais, reciclando componentes no auxílio à sobrevivência das células. Porém quando o processo autofágico é intenso, as células são induzidas à morte [93].

1.2 Objetivos

Neste trabalho pretendeu-se estudar a influência das características estruturais de complexos de cobre dinucleares, com ligantes imínicos, comparadas a de seus análogos mononucleares, na sua reatividade frente a melanomas, para elucidar melhor o papel da melanogênese neste processo.

Objetivos específicos:

Para tanto, foram preparados 3 pares destes compostos (complexo dinuclear e correspondente complexo mononuclear) cujas propriedades estruturais e espectroscópicas foram investigadas, através de diferentes técnicas, correlacionando-as com a atividade biológica apresentada.

- a) Planejar e preparar compostos de cobre(II) com ligantes imínicos, mono- e dinucleares;
- b) Caracterizar estes complexos através de diferentes técnicas (espectroscopias UV/Vis, IV, EPR);
- c) Verificar suas possíveis interações com biomoléculas (DNA e melanina);
- d) Avaliar a atividade tirosinase dos complexos dinucleares;
- e) Investigar a reatividade dos complexos frente a duas linhagens de melanomas humanos;
- e) Verificar a influência da melanogênese nessa reatividade;
- f) Avaliar a toxicidade dos complexos, através de testes clonogênicos com melanomas;
- g) Investigar possíveis mecanismos de ação dos compostos dinucleares, em comparação com os análogos mononucleares.

2. Parte Experimental I - Sínteses e Caracterizações

2.1. Reagentes e Soluções

A água para preparo de todas as soluções foi deionizada, utilizando o purificador de água da linha 'OS LXE', o qual possui um sistema com quatro etapas de purificação. Possui um pré-filtro para retenção de partículas sólidas, carvão ativado para adsorção do cloro adicionado pelas redes de distribuição, sistema de osmose reversa para remoção de mais de 90% dos sais dissolvidos, resina de troca iônica, disposta em leito misto, para retenção final dos íons dissolvidos e filtro microbiológico.

Os reagentes: 2- aminometilpiridina (99%), benzaldeido (99%), cloreto de cobre(II) (99%), perclorato de cobre(II) (99%), isatina (99%), 1,2 diaminobenzeno (99%), carboxaldeído ftálico (97%), 3,3 diaminabenzidina (99%), trietilamina (>99%) foram de procedência da Aldrich Chemical Co. Os solventes: etanol (96%), etanol absoluto (99%), metanol absoluto (99%), éter dietílico (99%), diclorometano (99%) e dimetilssulfóxido (DMSO P.A.) utilizados foram de procedência Merck Chemical Co., assim como os reagentes: ácido *p*-toluenosulfônico monohidratado, ácido clorídrico e hidróxido de sódio.

2.2 Sínteses dos Complexos

As sínteses neste trabalho foram realizadas no intuito de otimizar as condições experimentais (solvente, controle de pH, temperatura) necessárias às novas espécies a serem preparadas, na busca de melhores rendimentos.

Foram estudados 6 complexos de cobre(II), sendo 3 deles espécies dinucleares e outros 3 correspondentes a seus análogos mononucleares. Dois deles, complexos $[Cu(apyhist)(H_2O)](ClO_4)_2$ (1) e $[Cu_2(apyhist)_2(dpam)](ClO_4)_4$ (2) já tinham sido preparados anteriormente e descritos na literatura [94].

<u>Planejamento dos ligantes</u>: A busca por ligantes com átomos doadores N e O é feita muitas vezes para mimetizar sítios de ligação de enzimas de cobre ou zinco [95]. Ligantes bases de Schiff têm sido bastante utilizados por serem versáteis e possibilitarem em seus correspondentes complexos metálicos (especialmente de cobre ou ferro) a ligação reversível com o oxigênio. Com o intuito de aumentar a atividade biológica de um dado complexo, é

comum o uso de ligantes biologicamente ativos. Muitas vezes o ligante sozinho não apresenta uma ação eficiente e, dessa maneira, a formação do complexo pode atingir o resultado pretendido [96]. Grupos aromáticos parecem possuir maior influência sobre a inibição do crescimento de células tumorais do que grupos alifáticos, e assim esses grupos foram explorados neste trabalho [97]. No caso de proteínas de cobre, um grupamento presente no sítio ativo de muitas delas é o imidazol, como ocorre na superóxido dismutase (SOD1) e tirosinase. Assim, para obter miméticos da tirosinase, é fundamental que os complexos possuam nitrogênios doadores e uma estrutura dinuclear.

Complexo $[Cu(apyhist)(H_2O)](ClO_4)_2$ (1)

 $[Cu(apyhist)H_2O](CIO_4)_2$

Este complexo foi sintetizado e caracterizado anteriormente, conforme já publicado [30]. A formação da imina se dá pela reação de condensação entre 2-(acetil)piridina e histamina, seguida pela sua metalação, formando um sólido verde. Rendimento: 84%. Cálculos para a molécula C₁₂H₁₆N₄CuCl₂O₉ (MM: 494,73 g/mol): C 29,14; H 3,26; N 11,33; Cu 12,83%; Valores experimentais: C 29,26; H 3,50; N 11,30; Cu 12,63%.

Complexo $[Cu_2(apyhist)_2(dpam)](ClO_4)_4$ (2)

$$H_3C$$
 N
 N
 H_2
 N
 Cu
 N
 Cu
 N
 CH_3

[Cu₂(apyhist)₂(dpam)](ClO₄)₄

Também este complexo já havia sido sintetizado e caracterizado anteriormente [30]. Em resumo, o precursor $[Cu(apyhist)(H_2O)](ClO_4)_2$ foi preparado, e posteriormente ainda *in* situ foi adicionado a ele um ligante ponte diamina, 2,2'-bis(aminometil)bifenila (*dpam*), preparada de acordo com procedimento da literatura [98] e doada pelo grupo do Prof. Marius Réglier, com quem tivemos colaboração [Projeto CAPESP-USP/COFECUB (2008.1.818.46.0), 2009-2010]. Cristais marrons foram então obtidos, lavados com metanol gelado e seco em dessecador, a pressão reduzida. Rendimento: 69 %. Cálculos para a molécula C₃₈H₄₄N₁₀Cu₂Cl₄O₁₆ (MM: 1165,72 g/mol): C 39,15; H 3,80; N 12,02; Cu 10,90%; Valores experimentais: C 39,45; H 3,83; N 11,48; Cu 11,09%.

Complexo [Cu(bzampy)Cl₂] (3)

Em 15 mL de etanol, previamente seco sob refluxo com iodo e raspas de magnésio, foram diluídos 500 μL de benzaldeído (4,0 mmol, em leve excesso), sendo então adicionados, sob aquecimento brando (40°C) e agitação, 420 μL (4,0 mmol) de 2-aminometilpiridina, diluídos em 10 mL de etanol (seco). Essa adição foi realizada em porções rápidas à solução, seguida da adição de 27 mg de ácido *p*-toluenosulfônico. A solução foi deixada sob refluxo por 4,5h e sua coloração passou de incolor para amarelo claro. O refluxo foi interrompido e a reação ficou sob agitação por mais 12h, quando a coloração passou a amarelo intenso. Ao meio reacional foram adicionados 30 μL de trietilamina, e em seguida 0,695 g (4,0 mmol, com leve excesso) de cloreto de cobre diluído em 5 mL de etanol seco foi adicionado lentamente, tornando a solução verde. Um sólido verde claro se formou, que foi lavado com etanol gelado e filtrado a vácuo. Rendimento: 84,8%. Cálculos para a molécula $C_{13}H_{12}N_2CuCl_2$ (MM: 330,70 g/mol): C 47,22; H 3,66; N 8,47; Cu 19,22%; Valores experimentais: C 47,25; H 4,04; N 8,14; Cu 19,61%.

Complexo - $[Cu_2(ftampy)(ampy)_2](ClO_4)_4$ (4)

Em 40 mL de etanol pré-aquecidos (~40 °C), foram solubilizados 0,544g de carboxaldeído ftálico (4,0 mmol), e em seguida foi adicionado, gota a gota, 1,2 mL (12,0 mmol) de 2-aminometilpiridina à solução, que se tornou amarelo intensa. O pH aparente era 8 e a solução foi mantida sob refluxo (78°C) durante 40 minutos. Ao final, a solução tinha coloração marrom escuro. Sob agitação e aquecimento brando (~45 °C), 2,968g (8,0 mmol) de percloratoto de cobre solubilizados em 10 mL etanol (solução azul) foram adicionados lentamente à solução da imina, ficando em reação por mais 40 minutos. Ao final, a solução tinha coloração verde musgo e foi colocada em geladeira. Após 2 dias havia se formado um precipitado verde escuro, que foi filtrado e lavado com éter e etanol gelados. Posteriormente o sólido obtido foi seco e mantido em dessecador a vácuo. Rendimento: 42%. Cálculos para a molécula C₃₂H₃₂N₈Cu₂Cl₄O₁₆ (MM: 1053,54 g/mol): C 36,48; H 3,06; N 10,64; Cu 12,06%; Valores experimentais: C 36,86; H 3,62; N 10,24; Cu 12,10%.

Complexo [Cu(isadab)Cl]Cl (5)

Inicialmente foram reagidos o precursor isatina (0,588g, 4,0 mmol), e 1,2 diaminobenzeno (0,4432g, 4,1 mmol) em 40 mL de etanol, para formação da base de Schiff correspondente. Após 5 minutos sob agitação e aquecimento (50°C), o pH aparente foi ajustado em 5, com pequenas adições de solução de HCl. A reação foi mantida por 2h em refluxo, até mudança de coloração para vinho, quando o aquecimento foi interrompido, mantendo-se ainda a mistura em leve agitação. Posteriormente, a solução de imina teve seu

pH aparente ajustado em aproximadamente 7, utilizando algumas gotas de NaOH concentrado, sendo em seguida metalada com 0,682 g (4,0 mmol) de cloreto de cobre dissolvido em 15 mL de etanol. A agitação foi mantida por mais 10 minutos e a coloração da solução final estava marrom. A solução foi deixada em repouso por 3 dias, formando-se um sólido marrom, que foi lavado com etanol gelado e filtrado a vácuo, deixado posteriormente em dessecador. Rendimento: 67%. Cálculos para a molécula C₁₄H₁₃N₃CuCl₂O (MM: 373,71 g/mol): C 44,99; H 3,50; N 11,24; Cu 17,53%; Valores experimentais: C 44,57; H 3,25; N 10,99; Cu 17,80%.

Complexo $[Cu_2(isadbz)Cl_2]Cl_2$ (6)

Foram solubilizados 1,071 g de 3,3'-diaminabenzidina (5,0 mmol) em 30 mL de metanol, e a mistura foi aquecida sob refluxo (65°C). Em seguida, em outro balão, 1,47 g (10,0 mmol) de isatina foram solubilizados em 30 mL de metanol e mantida sob aquecimento a ~60°C. A solução de isatina foi então adicionada gota a gota à outra solução. Com a adição da isatina, a coloração mudou para marrom e a solução se tornou mais límpida. O sistema foi deixado por 2 h sob refluxo, e depois mantido sob agitação e aquecimento brando (~40 °C) por mais 1 h, quando 1,704 g (10,0 mmol) de cloreto de cobre, solubilizados em 10 mL metanol (solução verde), foram adicionados lentamente à solução da imina. Essa adição provocou uma aparente formação de precipitado escuro, mantendo-se a mistura em reação por mais 1 h, quando a solução se tornou marrom e foi deixada em geladeira por um dia. Após 24 h havia um precipitado pastoso, ao qual se adicionou 30 mL de acetona e 10 mL de metanol, solubilizando-o novamente. Após 48 h, o sólido formado foi filtrado, lavado com éter e metanol gelados, parecendo reter ainda bastante água. Procedeu-se à sua secagem a pressão reduzida e o sólido marrom foi deixado por 10 dias em dessecador a vácuo. Rendimento: 75%. Cálculos para a molécula C₂₈H₂₀N₆Cu₂Cl₄O₂ (MM:

741,40 g/mol): C 45,36; H 2,72; N 11,34; Cu 17,14%; Valores experimentais: C 46,04; H 3,08; N 11,34; Cu ND%.

2.3. Métodos de Caracterização e Instrumentação

Análises elementares (CNH) de todos os complexos sintetizados foram feitas na Central Analítica do Instituto de Química, usando um Analisador Elementar CNH Perkin-Elmer 2400, que permite a determinação de porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio com precisão de 0,01%. Resultados com reprodutibilidade dentro de 0,5 a 1% foram considerados aceitáveis.

As análises de cobre por *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy* (**ICP-OES**) foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química, usando um equipamento ICP-OES, modelo Arcos-FHS12, marca Spectro.

Os espectros no Infravermelho foram obtidos no espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Frontier, em experimentos realizados na Central Analítica, por reflectância difusa na faixa de 400 – 4000 cm-¹, sendo as amostras maceradas com KBr, previamente seco a 120 °C.

Os espectros na região de Ultravioleta/Visível (UV/Vis) foram registrados em espectrofotômetro modelo UV-1650PC da Shimadzu, utilizando cubetas de quartzo de caminho óptico de 1cm e soluções dos vários complexos na faixa de 10⁻⁴ a 10⁻³ mol/L. A absortividade molar (ε, mol⁻¹ L cm⁻¹) característica de cada uma das bandas dos vários compostos foi obtida a partir dos coeficientes angulares dos gráficos de absorção *versus* concentração da espécie, para cada uma das bandas (máximo de absorção) observadas.

Os espectros de EPR foram registrados em espectrômetro da BRUKER, modelo EMX, operando na banda X (v= 9,33 GHz) com potência de 20 mW, utilizando Dewar para baixas temperaturas, com nitrogênio líquido (77K) e tubos de quartzo, da marca Wilmad, de 4mm de diâmetro interno, em celas chatas de quartzo do tipo "flat", ou em tubinhos de polietileno, também com 4mm de diâmetro interno. As medidas foram feitas em sólido e em solução de metanol, acetonitrila ou DMSO. O DPPH foi usado como calibrador de frequência (g = 2,0036).

3. Parte Experimental II - Reatividade e Interações com Biomoléculas

Neste capítulo serão descritos os experimentos realizados para a verificação da reatividade dos complexos de cobre(II) estudados frente a biomoléculas ou relacionadas ao meio biológico.

3.1. Verificação da atividade Tirosinase: Catálise da Oxidação da *L*-Dopa

A verificação da atividade tirosinase, para os complexos (3) e (4), foi realizada através de experimentos cinéticos, com acompanhamento da oxidação de $\it L$ -dihidroxidofenilalanina (L-dopa). Os complexos estudados (com solubilidade adequada em tampão, acima de 160 μΜ) tiveram sua atividade catalítica avaliada, frente à oxidação do substrato L-dopa (um catecol), à correspondente quinona, verificada através do aumento na intensidade da banda em 475 nm, com ε = 3600 M⁻¹.cm⁻¹, relacionada à formação do produto. Nesses ensaios, foi utilizado um espectrofotômetro modelo UV-1650PC da Shimadzu, e cubetas de acrílico descartáveis (utilizadas devido ao escurecimento verificado na oxidação do substrato em cubetas de quartzo), de caminho óptico de 1,00 cm e temperatura de 25°C. Soluções iniciais de 10mM de L-dopa, em tampão fosfato (50mM, pH 7,00), e 2mM de cada um dos complexos em DMSO foram utilizadas. Os ensaios foram realizados primeiramente para verificar a dependência cinética com a concentração do catalisador, variando-se a concentração dos complexos, na faixa 160 a 400µM, e mantendo-se constante a concentração inicial de L-dopa (8mM), num volume final da cubeta de 2,5 mL. Em seguida, verificou-se a dependência da velocidade inicial de reação com a concentração do substrato, variando-se a concentração da L-dopa de 4 a 8mM, com concentração constante dos complexos (320µM), num volume final de 2,5 mL.

3.2. Monitoramento da Geração de Radicais por Espectroscopia EPR

Ensaios de geração de radicais hidroxil ${}^{\bullet}$ OH, catalisada pelos complexos estudados, foram realizados através de espectroscopia EPR. Os experimentos foram conduzidos utilizando espectrômetro da BRUKER, modelo EMX, operando na banda X (v= 9,33 GHz), com potência de 20,17 mW, com 100 mHz de amplitude de frequência e 1G de amplitude de modulação, em celas chatas de quartzo, à temperatura ambiente. As medidas foram

realizadas com soluções preparadas inicialmente com concentrações de 1 mM de cada complexo em DMSO e depois diluídas com tampão fosfato até a concentração desejada. O captador de spin utilizado foi o DMPO (2,2'-dimetilpirrolidina-N-óxido) em concentração inicial de 2mM e a concentração de H_2O_2 na solução mãe foi de 2,5 mM, em tampão fosfato 50mM e pH 7,40. O composto tempol foi usado como padrão para estimar as concentrações de espécies radicalares formadas. Cada ensaio foi conduzido com volume final de 1 mL, no qual as concentrações foram ajustadas com tampão pH 7,4 em: 100 mM de DMPO, 100 μ M dos complexos em DMSO, e 250 μ M de H_2O_2 . Cada espectro foi registrado no momento inicial da reação.

3.3. Interação com Melanina Monitorada por Espectroscopia UV/Vis.

Inicialmente foram realizados experimentos de verificação de interação dos complexos com melanina (Melnin Synthetic Sigma-Aldrich). Estes experimentos foram conduzidos em espectrofotômetro modelo UV-1650PC da Shimadzu, e cubetas de acrílico descartáveis (utilizadas devido ao escurecimento verificado pela adição de melanina em cubetas de quartzo), de caminho óptico de 1,00 cm. As soluções mães foram preparadas na concentração de 5 mg/mL de melanina, preparada em 250 mM de NaOH, e 1 mM para os complexos em água ou solução-tampão. A interação foi acompanhada pela titulação da solução do complexo (1), (2), (3) e (4) de concentração inicial na cubeta 16 μM, 33 μM, 160 μM e 248 μM, respectivamente. Os espectros foram registrados após cada adição de melanina, em alíquotas de 10 μL a 50 μL (40ng/μL a 200 ng/μL), à temperatura de 25°C. Os complexos com baixa solubilidade não tiveram seus ensaios realizados.

3.4. Interação com Melanina Monitorada por espectroscopia EPR

As interações dos complexos (1) e (2) com a melanina (Melanin Synthetic Sigma-Aldrich), foram monitoradas em espectrômetro da BRUKER, modelo EMX, operando na banda X (v= 9,33 GHz) com potência de 20 mW, em celas de quartzo chatas, do tipo "flat. Nestas medidas, tivemos o auxílio do aluno de doutorado Rodrigo Boni Fazzi. A partir de soluções-mãe: 5 mg/mL de melanina, preparada em solução de 250 mM de NaOH e soluções dos complexos, 10 mM para complexo (1) e 4,5 mM para o complexo (2), contendo 20% em

volume de DMSO, foram preparadas soluções de diferentes relações de massa [melanina]/[complexo]. Estes ensaios foram realizados primeiramente avaliando-se os espectros dos compostos e da melanina independentemente, e em seguida mantendo a concentração de melanina constante em 1 μg/μL, variando a concentração dos complexos de 1mM a 4mM para o complexo (1) e de 0,45mM a 1,8mM para o complexo (2). Posteriormente os ensaios foram realizados com as mesmas soluções-mães, porém desta vez, a concentração do complexo foi mantida constante em 2 mM para o complexo (1) e 0,9 mM para o complexo (2), variando-se a concentração de melanina de 0,5 μg/μL a 2,0 μg/μL.

3.5. Reatividade Frente ao DNA: Experimentos de Atividade Nuclease

Os ensaios de atividade nuclease foram realizados com a colaboração dos alunos de doutorado Felipe Franco de Melo Bagatelli e Maria Griselda Perona, do laboratório da Dra. Carla Columbano de Oliveira, no Instituto de Química USP. Para estes experimentos utilizouse o plasmídeo pBluescript II, de 2961 pares de bases (Stratagene), replicado na bactéria E. colli para obter o DNA plasmidial. Plasmídeos são moléculas circulares duplas de DNA, capazes de se reproduzir independentemente do DNA cromossômico, embora usando a mesma maquinaria celular de replicação. Após esta etapa, o DNA plasmidial foi extraído e purificado, usando um "kit" de purificação da Qiagen. A concentração de DNA plasmidial obtida foi de aproximadamente 300 ng/μL, que foi determinada pela intensidade de absorção em 260 nm, com valor de coeficiente de absortividade molar conhecida, ε = 6600 M⁻¹ cm⁻¹, utilizando o equipamento *nanodrop*, no qual é adicionado um volume de 2μL e efetuando-se em seguida a medida de absorbância [99]. As amostras reacionais (25 μL volume total) contendo 36 ng de DNA superenrolado (Forma I), em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4), em presença ou ausência de 125 μM de H₂O₂ e com diferentes concentrações de complexos de cobre(II), na faixa de 1 a 50 μM, foram incubadas a 37°C, variando-se o tempo de incubação de 15 min a 1 h. Após essa incubação, adicionaram-se 4 μL de tampão contendo revelador, sendo então as amostras submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%), em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X, a 100 V, por 1 h. Para quantificação das imagens (intensidade das bandas) foi utilizado o programa ImageJ 1.46, disponível online.

4. Parte Experimental III - Ensaios Celulares

Culturas Celulares

As células murinas Melan-a, TM1 e Tm5 foram cultivadas em meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), com 5 % SBF (soro fetal bovino) + 200 nM de PMA (forbol-1,2-miristato-1,3-acetato). Já as células humanas pigmentadas SKMEL-05 (com expressão de gene B-Raf mutado), SKMEL-147 (WT), foram cultivadas em DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle Medium) contendo 10 % de SFB, bem como as outras linhagens humanas utilizadas, UACC, CH0L1, HaCat. Os meios foram também suplementados com 2 mM de glutamina, 100 μg/mL de penicilina, 100 μg/mL de estreptomicina, e mantidos a 37 °C em atmosfera com 5 % de CO₂ em cultura.

A maior parte dos ensaios aqui apresentados foi realizada com a colaboração das Dras. Andréia H. Otake e <u>Silvina Bustos</u>, do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), sendo os experimentos celulares realizados nas dependências do ICESP.

4.1. Avaliação da Viabilidade Celular por MTT de Linhagens de Melanomas Murinos: Melan-a, Tm1, Tm5 por Tratamento com os Complexos (1) e (2)

Nestes ensaios foram utilizadas linhagens de células murinas Melan-a (não tumorogênica), TM1 e TM5, melanomas não pigmentado e pigmentado, respectivamente, utilizadas de formas similares com as descritas na literatura [100]. As células foram cultivadas em meio RPMI, como descritas anteriormente. O repique celular foi realizado 3 vezes por semana, numa proporção de 1:3 Melan-a, 1:5 para as TM1 e TM5, em garrafas médias. As células foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ e umidade controlada.

O plaqueamento das células foi realizado em placas de 96 poços, com $1x10^4$ células/poço, em meio, deixadas na estufa a 37 °C por 24 horas, para que aderissem. O meio de cultura das células foi substituído por outro contendo os compostos de cobre em estudo ou com os controles, nas concentrações de 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, deixadas por mais 48 horas na estufa a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂.

Após esse tempo de tratamento, as células foram submetidas ao ensaio de MTT (metiltiazotetrazólio) da seguinte maneira [101]: o meio foi aspirado e 200 μl de uma solução 0,3 mg/ml de MTT (preparada em meio de cultura) foram adicionados a cada poço. As células foram incubadas em estufa de CO₂ a 37° C durante 3 horas. O meio contendo MTT foi cuidadosamente retirado e 200 μl de DMSO (Merck) foram adicionados em cada poço. O conteúdo de cada poço foi lido espectrofotometricamente em Tecan, utilizando a leitura de DMSO como branco para subtração de valores. Esses ensaios foram realizados em triplicatas para cada condição de experimento, em 3 experimentos independentes.

4.2. Ensaios de Morte Celular de Linhagens de Melanomas Murinos: Melan-a, Tm1, Tm5 por Tratamento com os Complexos (1) e (2) - Avaliadas por Citometria de Fluxo

As células murinas foram plaqueadas em placas de 12 poços, com $5x10^4$ células/poço, em meio específico e deixadas na estufa a 37 °C por 24 horas, para que aderissem. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e tratadas com os complexos nas concentrações de 50 μ M para o complexo (1), 10 μ M para o complexo (2). Posteriormente ao tratamento as células foram deixadas por mais 48 horas na estufa a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO_2 para período de incubação.

Após esse tempo de tratamento, as células foram submetidas ao ensaio com incorporação de iodeto de propídio ao DNA, seguindo-se o protocolo adaptado [101,102]. As células foram tripsinizadas e fixadas em etanol 70%, e mantidas à -20 °C, até ser procedida a análise por citômetro de fluxo. O ensaio foi avaliado por marcação com iodeto de propídio, adicionando 200 μg/mL de RNAse A e 1% de Triton-X100.

Dessa forma, foi possível verificar e quantificar as células em cada fase de seu ciclo celular, que em processo de morte celular, será definida por porcentagem de células hipodiplóides, ou Sub-G1 (células com quantidades de DNA menor que 2n) que estão com seu DNA se fragmentando.

Esses ensaios foram realizados em triplicatas para cada condição de experimento, em 3 experimentos independentes para cada um dos complexos.

4.3. Viabilidade por MTT de Melanomas Humanos SKMEL-05 e SKMEL-147 após Tratamento com os Compostos em Estudo

Nestes ensaios foram utilizadas linhagens de células melanoma humano SKMEL-05 e SKEML-147 gentilmente cedidas pelo grupo do Dr. Roger Chammas do Instituto do Câncer. Esses ensaios foram realizados no laboratório do Professor Dr. Pio Colepicolo do Instituto de Química da USP.

As células SKMEL-05 e SKMEL-147 são melanomas humanos pigmentados, utilizadas de formas similares com as descritas na literatura [100]. O repique celular foi realizado 3 vezes por semana, numa proporção de 1:10 para SKMEL-05 e 1:4 para a SKMEL-147, em garrafas médias. As células foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ e umidade controlada.

As células SKMEL-05 e SKMEL-147 foram plaqueadas em placas de 96 poços, com $1x10^4$ células/poço, em meio específico, e deixadas na estufa a 37 °C por 24 horas, para que aderissem. O meio de cultura das células foi substituído por outro contendo os compostos de cobre em estudo ou os controles, nas concentrações de 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M, ou 100 μ M, e deixadas por mais 24 horas na estufa a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO_2 .

Após esse tempo de tratamento, os procedimentos para revelação com MTT, foram os mesmos do item 4.1. Os ensaios foram realizados em triplicatas para cada condição de experimento, em 3 ou 5 experimentos independentes.

4.4. Ensaios de Morte Celular em Melanomas Humanos SKMEL-05 e SKEML-147 com Exposição Prévia à Radiação UVB e Tratamento com os Complexos (1), (2), (3) e (4)

As células SKMEL-05 e SKMEL-147 foram plaqueadas em placas de 12 poços, com $5x10^4$ células/poço, em meio específico, e deixadas na estufa a 37 °C por 24 horas, para que aderissem. O meio de cultura das células foi substituído em metade das placas por tampão PBS, e assim elas foram levadas para a capela, na qual foram expostas a radiação com doses entre 12 e 15 mJ/cm², em seguida o tampão e o meio da outra metade das placas foram substituídos por outro com os compostos de cobre em estudo, ou com os controles, nas

concentrações de 20 μ M para os complexos mononucleares e geralemte 10 μ M ou 5 μ M para os complexos dinucleres. Nesse caso, realizou-se também um ensaio para as duas células utilizando cisplatina na concentração de 10 μ M. Posteriormente ao tratamento, as células foram deixadas por mais 48 horas na estufa a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂ para período de incubação.

Após esse tempo de tratamento, as células foram submetidas ao ensaio com incorporação de iodeto de propídio ao DNA, seguindo-se o protocolo adaptado [101,102], utilizando o mesmo procedimento para leitura em citometro de fluxo do item 4.2.

Esses ensaios foram realizados em triplicatas para cada condição de experimento, em 6 experimentos independentes para os complexos.

Para os complexos (3) e (4) também foram realizados ensaios de permeabilização de membrana, avaliada após incubação com 10 μg/mL de iodeto de propídio por 5 min. O valor total de células foi calculado pela aquisição de 50 μL de suspensão celular contadas em citômetro de fluxo.

4.5 Ensaios de Quantificação de Melanina

O conteúdo de melanina foi medido de acordo com dados descritos na literatura [103]. Para esses ensaios foram plaqueadas as linhagens celulares, aderidas por 24h. Após esse período as células melanomas foram lavadas com HBSS (Hank's balanced salt solution), e expostas à radiação UVB (13 \pm 2 mJ/cm²), em seguida foram tratadas com diferentes concentrações dos complexos, geralmente 20 μ M de complexo (1) e 5 μ M ou 10 μ M do complexo (2), além dos controles utilizados, durante 24 ou 48 h. As células tratadas foram então soltas e 1 x 10 7 células coletadas passando pelo processo de lise, em solução de NaOH 1M contendo 10 % de DMSO. As amostras ficaram em reação por 1 h, em seguida as absorbâncias dos sobrenadantes foram medidas, e comparadas com a curva padrão de melanina (Sigma) em solução de NaOH 1M [104].

4.6. Ensaios de Morte Celular em Melanomas Humanos SKMEL-37, UACC, CHL01, Tratadas com o Complexo (2) com Exposição à Radiação UVB.

Ensaios similares aos descritos nos itens 4.3 e 4.4 foram realizados, utilizando outras linhagens de melanomas humanos, para avaliar se o comportamento se repete. Com a linhagem SKMEL-37 foram também realizados ensaios com exposição à radiação UVB, na presença do complexo (2) dinuclear.

4.7. Viabilidade Célular de Queratinócitos Humanos (HaCat, não tumorogênicos) com Exposição Prévia e Posterior ao Tratamento com o Complexo Dinuclear (2)

As células Queratinócitos (HaCat) foram plaqueadas em placas de 12 poços, com $5x10^4$ células/poço, em meio específico, e deixadas na estufa a 37 °C por 24 horas, para que aderissem. O meio de cultura das células foi substituído em metade das placas por tampão PBS, e assim elas foram levadas para a capela, na qual foram expostas a radiação com doses entre 12 e 15 mJ/cm², em seguida o tampão e o meio da outra metade das placas foram substituídos por outro com o complexo, ou com os controles, concentrações de 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M para o complexo (2). Neste caso, realizou-se também um ensaio no qual as placas foram expostas à radiação após serem adicionados os complexos, ou seja, na presença dos compostos. Posteriormente ao tratamento, as células foram deixadas por mais 48 horas na estufa a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂ para período de incubação.

Após esse tempo de tratamento, as células foram submetidas ao ensaio com incorporação de iodeto de propídio ao DNA, seguindo-se o protocolo adaptado [101,102]. Utilizando o mesmo procedimento para leitura em citometro de fluxo do item 4.2.

Esses ensaios foram realizados em triplicatas para cada condição de experimento, em 3 experimentos independentes para o complexo.

4.8. Avaliação da Quantidade de Superóxido Produzido na Mitocôndria e Massa Mitocondrial Celular Posterior ao Tratamento com os Complexos (1) e (2)

A parte experimental de tratamento das células com ou sem a irradiação, com os compostos em estudo foi realizada da mesma forma já descrita anteriormente.

Assim, procedeu-se a análise da quantificação da geração de ânion superóxido na mitocôndria, para isso utilizou-se um corante fluorogênico seletivo para o superóxido, conhecido como MitoSOX Red (Invitrogen). Foi preparado uma solução com a dissolução de 50 μg do indicador de superóxido mitocondrial (MitoSOX™) em 13 μL de dimetilsulfóxido, concentração estoque de 5 mM do reagente. O ensaio foi realizado a partir das células coletadas e incubadas por 30 minutos em uma solução de HBSS com 3 μM de MitoSOX Red em estufa à 37 °C. Em seguida as células foram lavadas e tripsinizadas para análise em citômetro de fluxo com excitação em 488 nm e emissão em 580 nm [105]. Para quantificar a massa mitocondrial utilizou-se o reagente MitoTracker em ensaio semelhante [106].

4.9. Ensaios Clonogênicos, Quantificação da Fração de Sobrevivência das Células SKMEL-05 e SKMEL-147 após Tratamento com os Complexos (1) e (2)

Para quantificar a fração de células sobreviventes capazes de formar clones, foi avaliada a formação de clones, após o tratamento celular com os complexos (1) e (2), durante 48 horas, com e sem exposição à radiação. Após tratamento, as células foram lavadas com PBS, soltas e contadas. Posteriormente, cerca de 200 células (21 células/cm²) foram semeadas em placas de 60 mm em condições de cultura, durante 10 dias. Depois, as células foram lavadas com PBS por 2 vezes, e fixadas com formaldeído 3,7% por 15 minutos, seguido de lavagem com PBS por mais 2 vezes. Finalmente, as células foram coradas com 0,1% de violeta de cristal, sendo o excesso de corante retirado por lavagem, e o número de clones contados [107].

4.10. Ensaios de Autofagia Induzida em Células de Melanoma SKMEL-05 e SKMEL-147 após Tratamento com os Complexos (1) e (2)

Esse experimento foi realizado em células SKMEL-05 e SKMEL-147, após o tratamento com os complexos (1) e (2) por 24 ou 48 horas, sem e com radiação, de acordo com dados já descritos. As células em cultura foram lavadas e contadas. Posteriormente, 1 x 10^4 células foram incubadas com laranja de acridina, na concentração de 5 μ g/mL, por 30 minutos em estufa (5 % de CO_2 e 37 °C), medindo-se a fluorescência laranja em citômetro de fluxo (Attune) [108].

Para o tratamento com cloroquina (inibidor farmacológico de autofagia), após as 24h de tratamento com os complexos, o meio foi retirado, as células lavadas e tratadas com cloroquina na concentração de 5 μ M, durante 16 h. Após o tratamento, 1 x 10⁴ células foram incubadas por 30 minutos com laranja de acridina na concentração de 5 μ g/mL em PBS, a 37 °C e 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram soltas, ressuspendidas em PBS, e mediu-se a fluorescência laranja em citômetro de fluxo (Attune).

4.11. Ensaios de Quantificação de Proteínas Autofágicas e Tirosinase por Western Blot

Para quantificar as proteínas de interesse, as células SKMEL-05 e SKMEL-147 foram plaqueadas em 1 x 10^6 células/poço, e após aderirem, seguiu-se com a exposição à radiação UVB ($14,31\pm0,28$ mJ/cm²) como já descrito, sendo então, tratadas com os complexos, nas concentrações de 20 μ M para o complexo (1) e 5 μ M ou 10 μ M para o complexo (2), respectivamente, durante 6 h. Depois, o meio foi aspirado e as células lavadas por duas vezes com PBS. O extrato das proteínas foi obtido a partir do lisado em tampão contendo 0,1 M Tris, pH 7,5 contendo 150 mM de NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF e 2 μ g/mL de aprotinina, seguido de centrifugação a 13.000 rpm, por 15 minutos. Para quantificar os níveis de proteína LC3 as células foram tratadas com 30 μ M cloroquina (CQ, Sigma-Aldrich) por 60 minutos, antes e no final do experimento.

Para as análises de Western blot utilizou-se o lisado de células inteiras, as quais foram separadas por eletroforese em gel de SDS-policrilamida e transferidas para uma membrana

de PVDF. A membrana foi bloqueada com 5 % de leite desnatado em tampão-Tris salino e incubada, de um dia para o outro, a 4 °C, com os anticorpos primários contra: LC3 e β-actin (1:4000, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA, AC-74), tirosinase (1:2000, Santa Crus Biotecnologia, sc-7833, e tubulina (1:1000, Calbiochem, USA, DM1A). Os *blots* foram desenvolvidos com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase e as proteínas foram visualizadas por sistema aprimorado de detecção de quimioluminescência (GEHealthcare). As quantificações das densidades das bandas foram feitas utilizando o programa *ImageJ*.

5. Resultados e Discussões I – Síntese e Caracterizações

A seguir são apresentados os resultados de caracterização dos vários compostos que foram sintetizados para este trabalho.

5.1. Análises Elementares e de ICP

As análises elementares e de metal são importantes, pois informam a porcentagem em massa determinada experimentalmente de cada elemento, relativa a cada complexo preparado. Esses valores, quando em concordância com os resultados esperados (calculados a partir da fórmula mínima atribuída a cada composto), indicam a obtenção provável do composto pretendido, embora outras técnicas de caracterização devam ser utilizadas para corroborar e complementar esses resultados.

Os resultados experimentais, comparados aos valores calculados, baseados nas fórmulas esperadas, indicam que provavelmente os complexos pretendidos foram obtidos, já que esses valores ficaram dentro do erro aceitável.

Os resultados de análise elementar foram obtidos após os compostos sofrerem um processo rigoroso de secagem. O composto (6) é muito insolúvel na maioria dos solventes. Outras técnicas foram posteriormente utilizadas para comprovar a estrutura de cada um dos complexos.

Na <u>Tabela 5.1</u> a seguir são mostrados os resultados das análises elementares para todos os compostos em estudo.

Tabela 5.1 – Valores experimentais de análises elementares para os complexos de cobre(II) preparados. Entre parênteses, são indicados os valores calculados.

Complexos	% C	% H	% N	% Cu
[Cu(apyhist)(H ₂ O)](ClO ₄) ₂ (1) * Fórmula: C ₁₂ H ₁₆ N ₄ Cu(ClO ₄) ₂	29,26	3,50	11,30	12,63
MM: 494,73 g/mol	(29,14)	(3,26)	(11,33)	(12,83)
[Cu ₂ (apyhist) ₂ (dpam)](ClO ₄) ₄ (2) * Fórmula: C ₃₈ H ₄₄ N ₁₀ Cu ₂ (ClO ₄) ₄	39,45	3,83	11,48	11,09
MM: 1165,72 g/mol	(39,15)	(3,80)	(12,00)	(10,90)
[Cu(bzampy)Cl ₂] (3) Fórmula: C ₁₃ H ₁₂ N ₂ CuCl ₂	47,25	4,04	8,14	19,61
MM: 330,70 g/mol	(47,22)	(3,66)	(8,47)	(19,22)
[Cu ₂ (ftampy)(ampy) ₂](ClO ₄) ₄ (4) Fórmula: C ₃₂ H ₃₂ N ₈ Cu ₂ Cl ₄ O ₁₆	36,86	3,62	10,24	12,10
MM: 1053,54 g/mol	(36,48)	(3,06)	(10,64)	(12,06)
[Cu(isadab)Cl]Cl.H ₂ O (5) Fórmula (forma Ceto): C ₁₄ H ₁₃ N ₃ CuCl ₂ O	44,57	3,25	10,99	17,80
MM: 373,71 g/mol	(44,99)	(3,50)	(11,24)	(17,53)
[Cu ₂ (isadbz)(Cl) ₂]Cl ₂ (6) Fórmula: C ₂₈ H ₂₀ N ₆ Cu ₂ Cl ₄ O ₂	46,04	3,08	11,41	ND
MM: 741,40 g/mol	(45,36)	(2,72)	(11,34)	(17,14)

^{*} Dados anteriores [30]; Valores calculados entre parênteses.

5.2. Espectros na Região do Infravermelho

Os espectros no infravermelho registrados para cada um dos compostos indicaram a presença de bandas típicas dos grupos presentes nos mesmos, permitindo assim sua caracterização. Todos os espectros foram obtidos em forma de pastilha, após maceração dos complexos (10-20 mg) com KBr (200 mg) previamente seco.

Os compostos (1) e (2) já haviam sido caracterizados, anteriormente [30].

Os espectros mostrados nas Figuras 5.1 e 5.2, correspondem aos complexos [Cu(bzampyCl]Cl (3) e $[Cu_2(ftampy)(ampy)_2](ClO_4)_2$ (4), contendo anel aromático e piridina com ligação imina entre eles.

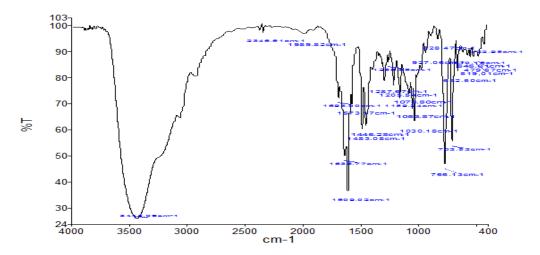


Figura 5.1. Espectro no Infravermelho do complexo [Cu(bzampyCl]Cl (3).

O espectro infravermelho para este complexo (3) indica bandas de estiramento em 1608 cm^{-1} , atribuídas à formação de imina alifática, v(C=N), além das bandas em 1434 cm^{-1} , características de estiramento de C=N no grupamento piridina. A banda correspondente ao grupo carbonila foi observada como traço, com intensidade não significativa em comparação ao precursor, o que pode indicar pequenas impurezas do reagente no composto. As bandas observadas em torno de 3500 cm^{-1} podem ser associadas a estiramentos de moléculas de H_2O , que podem estar associadas a moléculas de hidratação [109].

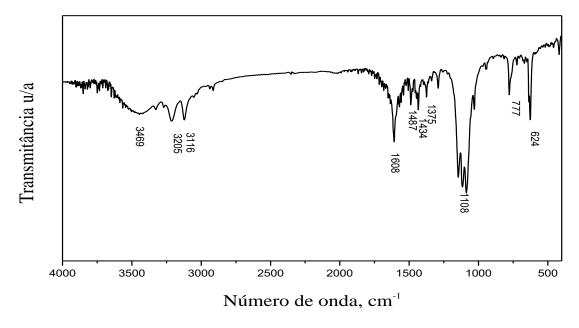


Figura 5.2. Espectro no Infravermelho do complexo [Cu₂(ftampy)(ampy)₂](ClO₄)₂ (4).

Também para este complexo **(4)** observaram-se bandas de estiramento em 1608 cm⁻¹, que podem ser atribuídas à formação de imina alifática, v(C=N), além das bandas em 1434 cm⁻¹, características de estiramento de C=N no grupamento piridina. Observa-se que a banda correspondente ao grupo carbonila, presente no precursor, que é esperada em torno de 1740 cm⁻¹, não pôde ser visualizada, o que indica a condensação do grupo formando a imina. A banda atribuída ao grupo amina foi visualizada em 3205 e 3116 cm⁻¹ para o complexo. As bandas de estiramento típicas do ânion perclorato foram observadas entre 1121 e 1088 cm⁻¹, como também a banda de deformação, em torno de 624 cm⁻¹, indicando ânion perclorato não-coordenado. As bandas observadas em torno de 3500 cm⁻¹ podem ser associadas a estiramentos de moléculas de H₂O [109].

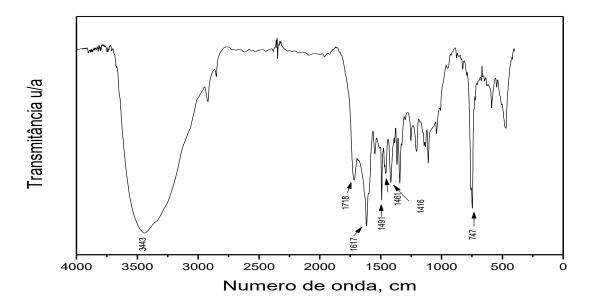


Figura 5.3. Espectro no Infravermelho do complexo [Cu(isadab)Cl]Cl.H₂O (5).

As bandas características deste espectro infravermelho mostram a formação de imina, através de estiramento v(C=N), observado em 1617 cm⁻¹. Observa-se também o deslocamento da banda de estiramento da C=O da isatina (em torno de 1747 cm⁻¹), que foi observada em 1718 cm⁻¹ para esse complexo. Estas bandas corroboram a estrutura proposta para o composto, em que se tem um ligante imínico coordenado ao metal. Observa-se também uma banda larga em torno de 3441-3443 cm⁻¹, que pode estar associada a águas de hidratação.

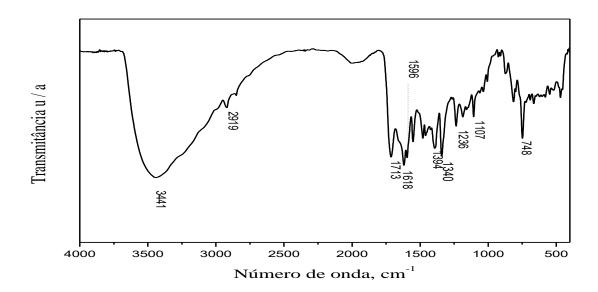


Figura 5.4. Espectro no Infravermelho do complexo [Cu₂(isadbz)Cl₂]Cl₂ (6).

As bandas características observadas no espectro infravermelho para este complexo (6) mostram a formação de imina, através de estiramento v(C=N), em 1618 cm⁻¹. Observa-se também o deslocamento da banda de estiramento da C=O da isatina (em torno de 1747cm⁻¹) que foi observada em 1713 cm⁻¹ para esse complexo. Observou-se ainda uma banda larga em torno de 3444 cm⁻¹que indica a presença de H_2O nos compostos. Pode-se notar a grande similaridade dos grupos presentes entre os dois complexos (mono 5 e dinuclear 6), resultando em espectros bastante parecidos.

A relação das principais bandas observadas, correspondentes a cada transição indicada, é mostrada na <u>Tabela 5.2</u>.

Tabela 5.2. Bandas de FTIR observadas nos espectros dos complexos estudados.

Bandas no IR					
Complexo	vH₂O vOH	νC=0	νC=N (imina)	vC=C	$VCIO_4$ δCIO_4
1*	3597	-	1624	1487/781	1099 621
2*	-	-	1597	1481/766	1090 623
3	3444	-	1609	1483/766	-
4	3469	-	1608	1487/777	1108 624
5	3444	1718	1617	1475/763	-
6	3443	1713	1618	1491/747	-

^{*}os valores expostos foram obtidos em trabalho anterior [94]

Os espectros no infravermelho registrados auxiliaram bastante na identificação de grupamentos presentes nos vários compostos. Aliados a outras técnicas, permitiram identificar características estruturais dos complexos.

5.3. Espectros de Ressonância Paramagnética

Os espectros de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) de complexos metálicos permitem verificar, além da presença de elétrons desemparelhados, o estado de oxidação do metal e as características estruturais ao redor do íon metálico (geometria tetragonal ou tetraédrica, ligante de campo forte ou fraco, etc.). No caso de complexos de cobre, eles apresentam em solução congelada (77°C) as estruturas hiperfinas, resultantes de acoplamentos entre spin eletrônico e spin nuclear. Para o íon cobre(II), com I = 3/2, cada sinal pode se desdobrar em 4 linhas (n = 2I+1), distanciadas pelo parâmetro $A_{1/2}$. Já no estado sólido, a 77K, em geral apresentam duas linhas, devido a sua geometria axial ($g_x=g_y\neq g_z$). Os espectros dos complexos estudados neste trabalho se encontram na Figura 5.5, no estado sólido, e na Figura 5.6, registrados em solução congelada a 77 K.

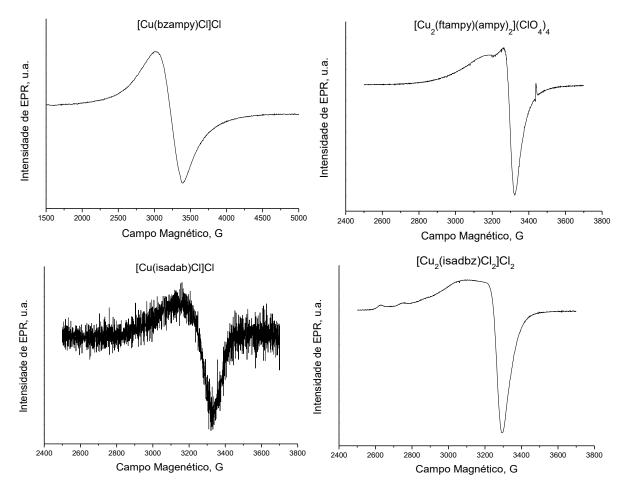


Figura 5.5. Espectros de EPR dos complexos estado sólido, a 77K. $[Cu(bzampy)(H_2O)_2]Cl_2$ (3); $[Cu_2(ftampy)(ampy)_2](ClO_4)_4$ (4); $[Cu(isadab)Cl]Cl.H_2O$ (5) e $[Cu_2(isadbz)Cl_2]Cl_2$ (6).

Os parâmetros espectroscópicos correspondentes, determinados no estado sólido, a partir desses espectros, são mostrados na <u>Tabela 5.3.</u>

Tabela 5.3. Valores dos parâmetros de g_{\perp} e $g_{//}$ dos complexos sintetizados, no estado sólido, a 77K.

Complexo	g⊥	g//
1*	2,060	2,208
2*	2,061	2,206
3	2,171 (g _{iso})	-
4	2.062	2,145
5	2,087 (g _{iso})	-
6	2,088	2,414

^{*}os valores expostos foram obtidos em trabalho anterior [30].

Os parâmetros de EPR no estado sólido indicam íons de Cu^{2+} , com linhas superpostas e alargadas. Os complexos no geral apresentaram simetria axial, na qual o ambiente ao redor do íon cobre no eixo z é diferente do ambiente nos eixos x e y. Observou-se que o parâmetro $g_{//}$ tem maior valor do que o g_{\perp} , indicando que o elétron desemparelhado está situado num orbital d_{x2-y2} . Apenas os complexos (3) e (5) apresentaram um único valor de g no estado sólido, chamado de isotrópico, g_{iso} , não permitindo a visualização da estrutura hiperfina, conforme mostrado na Tabela 5.3.

Os espectros seguintes foram obtidos de soluções congeladas dos complexos em nitrogênio líquido (77°C), tendo sido registrados com 3 varreduras. Os solventes utilizados foram geralmente aqueles nos quais os complexos são mais solúveis, ou em DMSO quando estes são pouco solúveis.

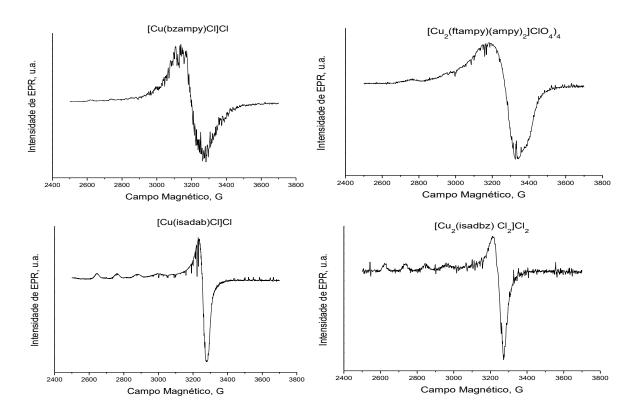


Figura 5.6. Espectros de EPR dos complexos em solução saturada, a 77K. [Cu(bzampy)Cl]Cl **(3)** em metanol; $[Cu_2(ftampy)(ampy)_2](ClO_4)_4$ **(4)** em acetonitrila; $[Cu(isadab)Cl]Cl H_2O$ **(5)** em DMSO; $[Cu_2(isadbz)Cl_2]Cl_2$ **(6)** em metanol.

A <u>Tabela 5.4</u> apresenta os parâmetros correspondentes, medidos nos espectros de EPR obtidos com soluções dos vários compostos sintetizados e do aqua-complexo, $[Cu(H_2O)_4]^{2+}$ (como perclorato de cobre(II)), usado como controle.

Tabela 5.4. Valores do parâmetro g e das constantes hiperfinas (A) dos compostos sintetizados, em solução congelada a77K.

Composto	g ⊥	g//	A _{//} (x 10 ⁻⁴ cm ⁻¹)	g _{//} / A _{//} (cm)
1*	2,062	2,262	176	128
2*	2,081	2,225	182	122
3	2,103	2,420	118	204
4	2,074	2,219	204	108
5	2,083	2,406	130	185
6	2,092	2,425	127	191
[Cu(H ₂ O) ₄] ²⁺	2,075	2,361	154	153

^{*}os valores expostos foram obtidos em trabalho anterior [30].

Os valores de parâmetros obtidos indicam características importantes dos complexos. Todos eles apresentam um $\mathbf{g}_{//}$ maior do que o \mathbf{g}_{\perp} , indicando assim, uma simetria axial em solução, ou seja, o ambiente ao redor do íon cobre no eixo z é diferente do ambiente nos eixos x e y, que são iguais. Isso também implica que o elétron desemparelhado se encontra no nível dx²-y². Um valor de $\mathbf{g}_{//}$ menor do que o \mathbf{g}_{\perp} indicaria, ao contrário, que o elétron está no nível dz².

A relação empírica $\mathbf{g}_{//}$ / $\mathbf{A}_{//}$ (cm) tem sido utilizada para identificar a geometria ao redor do íon cobre(II), estimando uma distorção tetraédrica em um ambiente tetragonal, em miméticos de várias proteínas ou de sítios específicos do metal [110]. Valores mais baixos dessa relação, entre 100-150 cm descrevem geometrias mais próximas de tetragonal ou quadrado planar; já razões maiores (170-250 cm), são verificadas em compostos com uma geometria mais tetraédrica [110, 111]. Uma relação de valores obtidos para comparação dos espectros dos complexos registrados pode ser observada na Tabela 5.4.

Nos complexos (1) e (2), estudados anteriormente, pôde ser observado um ambiente próximo ao tetragonal, com relações $\mathbf{g}_{I/}/\mathbf{A}_{I/}$ de 128 e 122 cm, respectivamente, o que indica que ambos possuem uma geometria quadrado planar, com pequena distorção tetraédrica ao redor do íon metálico, sendo então, muito similares neste aspecto.

O complexo (3) se diferente dos outros complexos por possuir uma geometria bastante distorcida com a maior razão g_{II}/A_{II} 204 cm (tetraédrica). Esse fato pode ser explicado por haver na estrutura um ligante bidentado e dois ligantes cloreto, que permitem a geometria preferencial ao cobre(II), estrutura tetragonal. São ligantes lábeis, e por serem monodentados permitem a mudança de geometria quando há necessidade (nas mudanças de estado redox, já que o cobre(I) tem preferencialmente geometria tetraédrica).

O complexo (4) tem uma geometria que pode ser definida como quadrado planar, com relação $\mathbf{g}_{II}/\mathbf{A}_{II}$ 108 cm. Esse parâmetro indica que a estrutura ao redor dos dois íons de cobre é a mesma (não se observando outros sinais que pudessem indicar centros diferentes de cobre). Assim, a observação principal é de que a estrutura do complexo seja simétrica.

Os espectros dos outros complexos (5) e (6) mostram estruturas definidas por um único ambiente ao redor do íon cobre, também muito similares entre si. Neste caso, os

parâmetros definem uma grande distorção tetraédrica para esses complexos, com valores de $\mathbf{g}_{II}/\mathbf{A}_{II}$ correspondentes a 185 e 191 cm, respectivamente.

Todos os complexos apresentaram parâmetros únicos, indicando que não há outros ligantes coordenados aos íons cobre, mostrando que estes se encontram puros em solução.

5.4. Espectroscopia Eletrônica

As principais bandas de absorção observadas nos espectros UV/Vis para complexos metálicos, ocorrem na região do ultravioleta, de alta energia, e podem ser relacionadas com as transições internas dos ligantes (LT) (n \rightarrow π e π \rightarrow π^*), onde n é orbital não-ligante, π é orbital ligante e π^* é orbital antiligante. Outras bandas se apresentam na região do ultravioleta próximo ou no visível e são atribuídas geralmente a transições de transferência de carga, metal ligante (TCML, d π \rightarrow π^*) ou ligante metal TCLM, (π \rightarrow d π). Este tipo de transição é mais frequentemente observada em complexos com ligantes que possuem orbitais π^* semipreenchidos, especialmente ligantes aromáticos. O outro tipo de transição observada na região do visível é a chamada transição d-d, de menor intensidade (ϵ ϵ 10 a ϵ 10 mol ϵ 1 c cm ϵ 1), por ser proibida pela regra de Laport, que ocorre entre orbitais preferencialmente centrados no metal [112], observadas também em complexos de cobre(II). Os espectros UV/Vis são bastante característicos de cada complexo, com bandas que apresentam coeficientes de absortividade molar (ϵ) próprios, determinados pela equação de Lambert-Beer.

Para os ligantes orgânicos do tipo bases de Schiff, as transições LT ($\pi \to \pi^*$), referentes aos grupos cromóforos C=N, C=C, são registradas na literatura, em geral na região entre 196 – 313 nm, com coeficiente de absortividade molar (ϵ) maior que $10^4~{\rm M}^{-1}~{\rm cm}^{-1}$, indicando transições completamente permitidas pelas regras de seleção (Laporte e Spin) [113]. Nos correspondentes complexos, estas bandas podem sofrer deslocamentos devido à coordenação ao íon metálico. As bandas referentes às transições LMCT ($\pi \to d\pi$) aparecem na região de 320 – 450 nm, com valores de ϵ característicos em torno de $10^3~{\rm M}^{-1}~{\rm cm}^{-1}$. Estas bandas também são permitidas pelas regras de seleção e se caracterizam por intensas absorções na região do visível e UV próximo [112].

As Figuras 5.7, 5.8, 5.9. e 5.10 referem-se aos espectros eletrônicos obtidos para os complexos sintetizados.

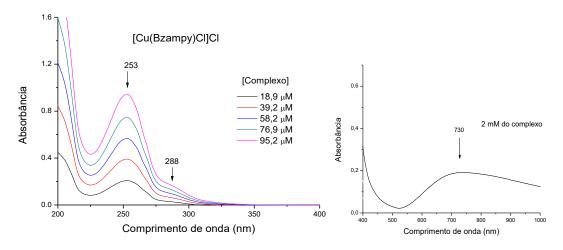


Figura 5.7. Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo [Cu(bzampy)Cl]Cl **(3)** em acetonitrila e respectiva banda d-d em DMSO.

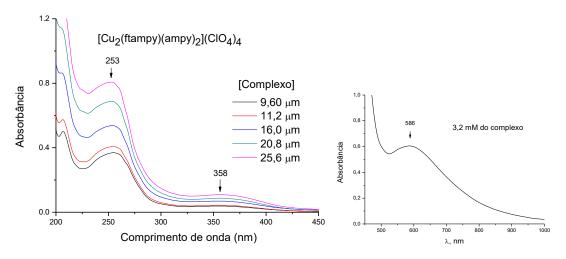


Figura 5.8. Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo $[Cu_2(ftampy)(ampy)_2](ClO_4)_4$ (4) e respectiva banda d-d em acetonitrila.

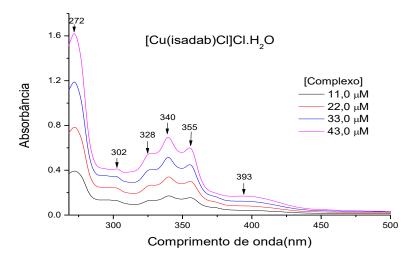


Figura 5.9. Espectros eletrônicos no UV/Vis dos complexos [Cu(isadab)Cl]Cl.H₂O **(5)** em DMSO.

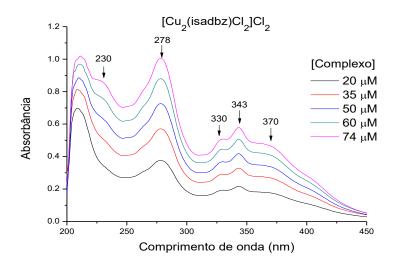


Figura 5.10. Espectros eletrônicos no UV/Vis do complexo [Cu₂(isadbz)Cl₂]Cl₂ (6).

As bandas apresentadas pelos complexos estão na faixa de transições dos ligantes em LT ($\pi \to \pi^*$), e bandas de TCLM, além das bandas correspondentes às transições d–d (transições internas do metal), que nos complexos (5) e (6) não puderam ser visualizadas na faixa de concentrações utilizadas, por serem pouco solúveis.

Os valores característicos de $\lambda_{m\acute{a}x}$ e respectivas absortividades molar (ϵ) estão dispostos na <u>Tabela 5.5</u>.

Tabela 5.5. Caracterização das bandas observadas ($\lambda_{máx}$) e respectivos valores de absortividade molar (ϵ) nos espectros eletrônicos dos complexos (3), (4), (5) e (6).

Complexo	λ _{máx,} nm	ε, M ⁻¹ cm ⁻¹	Transição
[Cu(bzampy)Cl]Cl (3)	253	1,7 x 10 ⁴	LT $(\pi \to \pi^*)$
	288	1,5 x 10 ⁴	LT $(\pi \to \pi^*)$
	730	125	d – d
	207	5,3 x 10 ⁴	LT $(\pi \to \pi^*)$
[Cu ₂ (ftampy)(ampy) ₂](ClO ₄) ₄	253	2,6 x 10 ⁴	LT $(\pi \to \pi^*)$
(4)	358	3,1 x 10 ³	LMCT
	586	189	d – d
	272	3,9 x 10 ⁴	LT $(\pi \to \pi^*)$
	302	9,1 x 10 ³	LT $(\pi \to \pi^*)$
	328	1,3 x 10 ⁴	LMCT
[Cu(isadab)Cl]Cl·H ₂ O (5)	340	1,7 x 10 ⁴	LMCT
[ca(cassaye)]er (2c (c)	355	1,4 x 10 ⁴	LMCT
	393	4,1 x 10 ³	LMCT
	479	1,3 x 10 ³	LMCT
	230	5,8 x 10 ³	LT $(\pi \rightarrow \pi^*)$
Cu ₂ (isadbz)Cl ₂]Cl ₂ (6)	278	1,1 x 10 ⁴	LT $(\pi \to \pi^*)$
	330 (om)	5,6 x 10 ³	LMCT
	343	6,5 x 10 ³	LMCT
	370 (om)	5,2 x 10 ³	LMCT
	406	2,8 x 10 ³	LMCT

6. Resultados e Discussões II – Reatividade e Interações com Biomoléculas

A seguir serão apresentados os ensaios de reatividade e investigações da interação com biomoléculas dos complexos estudados. Alguns experimentos foram realizados apenas para os complexos que se apresentaram solúveis, na concentração padrão utilizada nos experimentos, ou aqueles com resultados relevantes em análises complementares (reatividades apresentadas).

6.1. Verificação da atividade Tirosinase: Catálise da Oxidação da L-Dopa

No intuito de verificar se os complexos sintetizados possuem atividade tirosinase, foram realizados ensaios cinéticos, monitorando-se a atividade catalítica dos compostos frente à oxidação do substrato *L*-Dopa (di-hidroxifenilalanina), levando à formação da *L*-dopaquinona, em tampão fosfato pH 7,00 e T = 25 °C. Esse monitoramento foi realizado observando-se o aumento da respectiva banda da quinona em 475 nm.

A tirosinase apresenta um sítio ativo com dois centros de cobre, acoplados magneticamente, coordenados a grupos imidazólicos de histidina. Entre os centros de cobre se insere a molécula de oxigênio, conforme mostrado Figura 6.1. Dessa forma, a enzima é capaz de oxidar fenóis a catecóis (ou *o*-dihidroxibenzenos) e estes às correspondentes quinonas.

A)

B)

$$N = 0$$
 $N = 0$
 N

Figura 6.1. (A) Representação do sítio ativo da enzima tirosinase e do tipo de coordenação da molécula de dioxigênio aos íons cobre. (B) Reações referentes a atividade tirosinase (L-Tirosina à L-Dopa e L-Dopa à L-dopaquinona).

Assim, quando os compostos são capazes de oxidar o substrato à sua correspondente quinona, são chamados de miméticos funcionais da enzima.

a) Variação da concentração dos complexos

Nesses ensaios avaliou-se a influência do catalisador, variando-se a concentração dos complexos, com a concentração do substrato constante, [L-Dopa] (8,0 mM), em pH 7,00 (tampão fosfato 50 mM) e T = 25 °C.

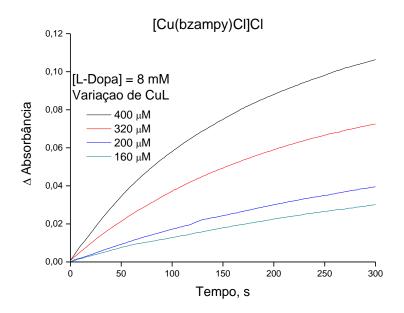


Figura 6.2. Curvas de oxidação da L-Dopa variando-se a concentração do complexo $[Cu(bzampy)Cl]^+$ (3).

A partir das curvas catalíticas, com os valores de absorbância em função do tempo, podem ser calculadas as velocidades iniciais para cada valor de concentração do complexo, a ser verificadas na <u>Tabela 6.1.</u>

Tabela 6.1. Valores das velocidades iniciais da oxidação da *L*-Dopa, em diferentes concentrações do complexo **(3)**, obtidos pela curva da absorbância em função do tempo, sem variação do substrato [*L*-Dopa] = 8,0 mM, em pH 7,00 e T = 25° C.

[Cu(bzampy)Cl] ⁺ , μM	Vi, 10 ⁻⁵ s ⁻¹
0,0	0,00
160,0	14,79
200,0	18,17
320,0	41,38
400,0	67,22

A curva a seguir mostra uma dependência de pseudo-primeira ordem da velocidade de reação em função da concentração do complexo [Cu(bzampy)CI]⁺ (3).

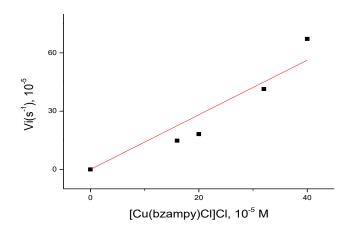


Figura 6.3. Dependência da velocidade inicial de oxidação da *L*-dopa em função da concentração do complexo $[Cu(bzampy)C]^{+}(3)$; [L-Dopa]= 8mM, em tampão fosfato pH 7,0 e $T = 25^{\circ}C$.

A partir destes dados, estimou-se então uma constante de velocidade igual a $k_{obs} = 1,40 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, para o complexo em estudo.

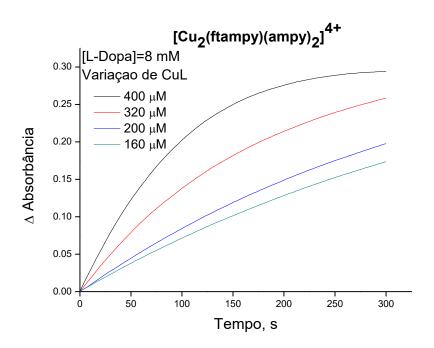


Figura 6.4. Curvas de oxidação da *L*-Dopa variando-se a concentração do complexo $[Cu(ftampy)(ampy)_2]^{4+}$ (4), em função do tempo, em tampão fosfato pH 7,0 e T = 25°C.

Com os valores de absorbância em função do tempo, a partir das curvas catalíticas, foram calculadas as velocidades iniciais para cada valor de concentração do complexo, a ser verificadas na <u>Tabela 6.2.</u>, a seguir.

Tabela 6.2. Valores das velocidades iniciais da oxidação da *L*-Dopa, em diferentes concentrações do Complexo **(4)**, obtidos pela curva da absorbância em função do tempo, sem variação do substrato [*L*-Dopa] = 8,0 mM, em pH 7,00 e T = 25° C.

[Cu₂(ftampy)(ampy)₂] ⁴⁺ , μM	Vi, 10 ⁻⁵ s ⁻¹
0,0	0,00
160,0	77,07
200,0	90,46
320,0	163,00
400,0	257,00

A curva a seguir mostra uma dependência de pseudo-primeira ordem da velocidade de reação em função da concentração do complexo $[Cu_2(ftampy)(ampy)_2]^{4+}$ (4).

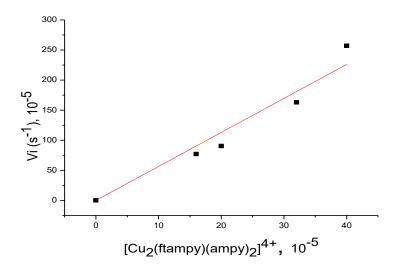


Figura 6.5. Dependência da velocidade inicial de oxidação da *L*-dopa em função da concentração do complexo $[Cu_2(ftampy)(ampy)_2]^{4+}$ (4); [L-Dopa]= 8mM, em tampão fosfato pH 7,0 e T = 25°C.

A partir destes dados, estimou-se então uma constante de velocidade igual a $k_{obs} = 5,65 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, para o complexo em estudo.

b) Variação da concentração do substrato

Nos próximos ensaios foi verificada a influência da concentração do substrato na reação catalisada. Dessa forma, variou-se a concentração da *L*-Dopa nos valores de 4 a 8 mM, mantendo-se a concentração dos diferentes complexos constante, [CuL] = 320μM.

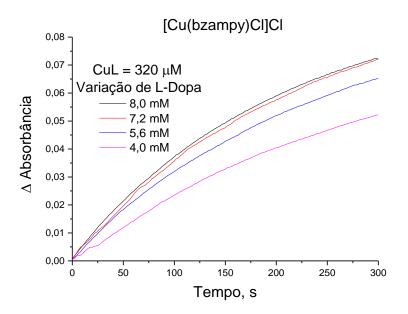


Figura 6.6. Curvas de oxidação da L-Dopa com o complexo [Cu(bzampy)Cl]⁺ (3) em função do tempo, em tampão fosfato pH 7,0 e T = 25° C.

Com os dados obtidos pode-se calcular as velocidades iniciais para a reação catalisada pelo complexo [Cu(bzampy)Cl]⁺ (3), como mostra a <u>Tabela 6.3</u>.

Tabela 6.3. Velocidade inicial para diferentes concentrações de *L*-Dopa, na concentração de 320μM do complexo (3).

[L-Dopa] x 10 ⁻³ M	Vi, 10 ⁻⁵ s ⁻¹	
0,0	0,0	
4,0	22,63	
5,6	38,11	
7,2	40,64	
8,0	45,08	

A curva a seguir mostra uma dependência de pseudo-primeira ordem com relação à concentração de substrato, para a reação catalisada pelo complexo [Cu(bzampy)Cl]⁺ (3).

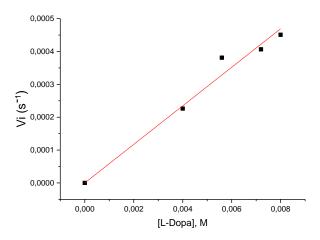


Figura 6.7. Curva da velocidade inicial da oxidação da *L*-Dopa em função da concentração do substrato, catalisada pelo complexo $[Cu(bzampy)CI]^{+}$ (3) a 320µM; [L-Dopa]= 4-8mM, tampão fosfato pH 7,00.

Através do gráfico obtido, pode-se estimar uma constante de velocidade inicial igual a $k'_{obs} = 0,058 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ para o complexo (3) em estudo.}$

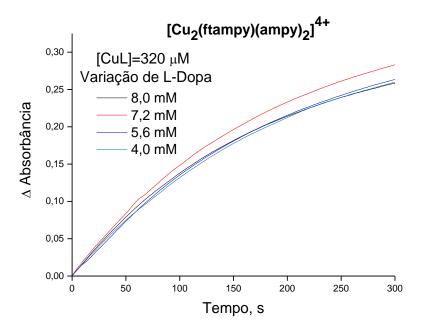


Figura 6.8. Curvas de oxidação da L-Dopa com o complexo $[Cu_2(ftampy)(ampy)2]^{4+}$ (4) em função do tempo, em tampão fosfato pH 7,0 e T = 25°C.

Analogamente, os dados obtidos foram expressos pelas velocidades iniciais para a reação catalisada pelo complexo [Cu₂(ftampy)(ampy)2]⁴⁺ (4), que estão descritos na <u>Tabela</u> 6.4.

Tabela 6.4. Velocidade inicial para diferentes concentrações de *L*-Dopa, na reação catalisada pelo complexo **(4)** na concentração de 320μM.

[<i>L</i> -Dopa] x 10 ⁻³ M	Vi, 10 ⁻⁵ s ⁻¹	
0,0	0,0	
4,0	154,0	
5,6	147,0	
7,2	173,0	
8,0	163,0	

A curva abaixo mostra uma tendência à saturação, na qual há apenas uma pequena variação da velocidade inicial com diferentes concentrações do substrato utilizado, quando catalisada pelo complexo [Cu₂(ftampy)(ampy)₂Cl]⁴⁺ (4).

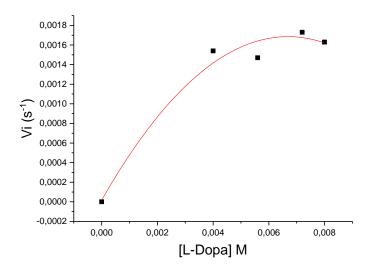


Figura 6.9. Curva da velocidade inicial da oxidação da L-dopa em função da concentração do substrato, catalisada pelo complexo $[Cu_2(ftampy)(ampy)_2Cl]^{4+}$ (4) a 320 μ M; [L-Dopa]= 4-8mM, tampão fosfato pH 7,00.

Considerando apenas a parte inicial do gráfico, pode-se estimar uma constante de velocidade inicial igual a $k'_{obs} = 0,244 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para o complexo (4) em estudo.

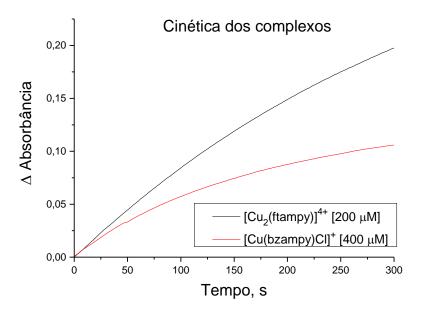


Figura 6.10. Comparação entre as curvas cinéticas dos compostos mono **(3)** e dinuclear **(4)**. Atividade catalítica na oxidação da L-Dopa em função do tempo, substrato [8,0 mM], complexo mononuclear [400 μ M] e complexo dinuclear [200 μ M].

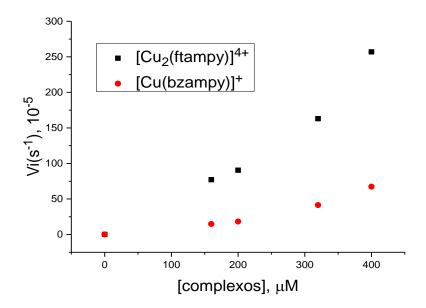


Figura 6.11. Velocidades obtidas em função das concentrações dos complexos utilizados, descrevendo os dados determinados para a dependência com a concentração do catalisador: $Vi = k_{obs}[CuL]$.

Tabela 6.5. Resumo dos valores encontrados para a constante de pseudo 1^a ordem da cinética catalítica dos compostos. [L-dopa] = 8,0 mM.

Complexo de Cobre	k _{obs} (dep. com catalisador)	k' _{obs} (dep. com substrato)	Constante cinética (pseudo-primeira ordem)
	M ⁻¹ s ⁻¹	M ⁻¹ s ⁻¹	k, 10 ⁻² s ⁻¹
[Cu(bzampy)Cl] ⁺ (3)	1,40	0,058	1,7 ± 0,1
[Cu ₂ (ftampy)(ampy) ₂] ⁴⁺ (4)	5,65	0,244	7,1 ± 0,5

Considerando a dependência da velocidade inicial de oxidação da *L*-dopa, tanto com a concentração do catalisador como do substrato:

Deste modo, constata-se que o complexo dinuclear, $[Cu_2(ftampy)(ampy)_2]^{4+}$ (4), é melhor catalisador do que o correspondente mononuclear na oxidação da L-dopa. Este resultado já era esperado, uma vez que compostos dinucleares são capazes de mimetizar melhor o sítio ativo das enzimas tirosinases. Porém, verifica-se que o composto dinuclear em estudo possui uma estrutura mais rígida, o que poderia torná-lo pior catalisador do que o complexo (2), para o qual foi anteriormente determinado o valor de k_{obs} = 2,38 10^{-2} s⁻¹ e k_{obs} = 1,91 M⁻¹ s⁻¹, que apresenta uma estrutura mais maleável [30].

Os ensaios análogos referentes aos complexos (5) e (6) não foram realizados, pois os compostos precipitavam quando eram adicionados à cubeta contendo o tampão, ou mesmo em água na concentração exigida para o ensaio (160 μ M a 400 μ M), devido à sua baixa solubilidade.

6.2. Monitoramento da Geração de Radicais por Espectroscopia EPR

Ensaios de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em presença dos complexos foram realizados. Afinal, complexos contendo cobre possuem um sítio redox, podendo ser essencial para sua reatividade frente a biomoléculas. Essa reatividade pode indicar uma via de ação dos complexos em estudo frente a células tumorais. Esses estudos foram realizados em presença de H_2O_2 , como agente ativador que reduz os íons de Cu(II) iniciando o ciclo catalítico, e DMPO como captador de spin. Os correspondentes espectros podem ser observados na Figura 6.12, 6.13 e 6.14. As características dos espectros de EPR relacionados ao adulto DMPO-OH formado mostram 4 linhas, com constantes de interação hiperfina $a_H = A_N = 14,9$. Para o aduto DMPO-CH₃ observam-se 6 linhas, com constantes $A_H = 23,4$ G e $A_N = 16,3$ G. O radical metil foi gerado pela reação de radicais $^{\bullet}$ OH com o dimetilsulfóxido, utilizado na preparação das soluções dos complexos (1 % de DMSO no meio reacional) Esquema 2.

$$LCu^{2+} + H_2O_2 \rightarrow LCu^{+} + O_2^{-} + 2H^{+}$$

 $LCu^{+} + H_2O_2 \rightarrow LCu^{2+} + OH + OH^{-}$

Esquema 2

DMPO(aq) + OH(aq)
$$\rightarrow$$
 DMPO-OH(aq) $A_H = A_N = 14$,
DMPO(aq) + CH₃(aq) \rightarrow DMPO-CH₃ $A_H = 23.4$ G; $A_N = 16.3$ G

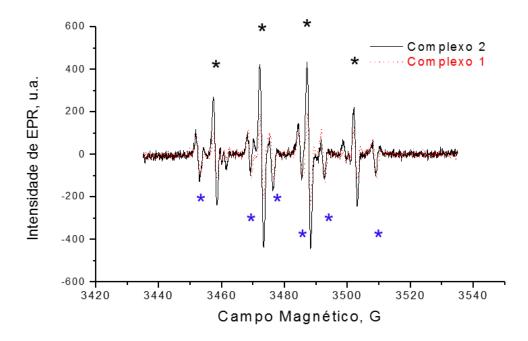


Figura 6.12. Formação de espécies reativas de oxigênio, monitorada por espectroscopia EPR, utilizando DMPO como captador de spin (100 mM), em soluções de H_2O_2 (250 μM), complexo (1) 100 μM e complexo (2) 100 μM, em tampão fosfato (pH = 7,0) e temperatura ambiente (25 °C). * sinais do DMPO-OH; * sinais do DMPO-CH₃.

Como pode ser observado, há um aumento na quantidade de espécies reativas geradas para o complexo dinuclear (2), em relação ao complexo (1). Essa geração de radicais hidroxil, em ambos os casos, é capaz de causar danos a várias biomoléculas, e pode ser associada aos danos que os complexos causam nas células.

Na Figura 6.13. são apresentados os espectros EPR registrados em presença dos complexos (3) e (4). Também neste caso podemos observar a formação dos radicais hidroxil e metil. Surpreendentemente, comparando-se os dois complexos (3) e (4), não são observadas diferenças significativas na geração de radicais.

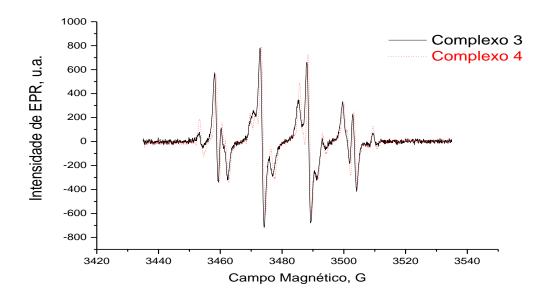


Figura 6.13. Formação de espécies reativas de oxigênio, monitorada por espectroscopia EPR, utilizando DMPO como captador de spin (100 mM), em soluções de H_2O_2 (250 mM), complexos **(3)** 100 μ M e complexos **(4)** 100 μ M, em pH 7,0 e temperatura ambiente (25 °C).

Para os complexos (5) e (6) os espectros mostrados na Figura 6.14. a seguir indicam que estes compostos também são capazes de gerar radicais nas mesmas condições experimentais.

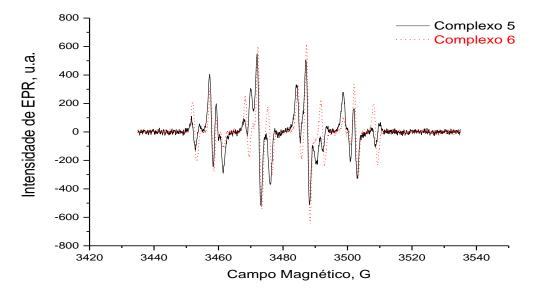


Figura 6.14. Formação de espécies reativas de oxigênio, monitorada por espectroscopia EPR, utilizando DMPO como captador de spin (100 mM), em soluções de H_2O_2 (250 μM), complexos **(5)** – 100 μM e complexos **(6)** – 100 μM, em temperatura ambiente (25 °C).

Principalmente no caso do complexo **(5)**, essa habilidade pode explicar os danos oxidativos verificados nos ensaios utilizando DNA plasmidial superenovelado (clivagem em DNA) quando incubado com esse complexo.

Entretanto, os complexos (5) e (6) não se apresentaram ativos frente às linhagens celulares de melanomas, conforme ensaios descritos a seguir. Isto pode estar associado mais uma vez a sua baixa solubilidade em soluções aquosas, limitando assim sua reatividade.

Dessa forma, para quantificar a intensidade do sinal de EPR, foi realizado o cálculo da integral dupla desses sinais nos espectros, utilizando o programa WINEPR. Os valores foram calculados através da soma dos 4 sinais para DMPO-OH, com $A_H = A_N = 14,9$ G e dos 6 sinais atribuídos a DMPO-CH₃, com $A_H = 23,4$ G e $A_N = 16,3$ G.

Para o complexo (1) os valores das integrais foram 2,69 x 10^{-3} (DMPO-OH) e 3,88 x 10^{-3} (DMPO-CH₃). O complexo (2) apresentou valores do sinal dos adutos próximos ao dobro dos resultados encontrados para o complexo mononuclear, isto é, 5,06 x 10^{-3} (DMPO-OH) e 4,08 x 10^{-3} (DMPO-CH₃), indicando que a geração de radicais está associada ao número de íons cobre presente na estrutura.

Nos complexos (3) e (4) os valores encontrados para a integral dupla foram $1,41 \times 10^{-2}$ (DMPO-OH), $9,47 \times 10^{-3}$ (DMPO-CH₃) e $1,06 \times 10^{-2}$ (DMPO-OH) e $1,84 \times 10^{-2}$ (DMPO-CH₃), respectivamente, mostrando uma geração maior de radicais na presença desses complexos.

Os valores apresentados pela integral dupla dos espectros dos complexos (5) e (6) foram de $8,00 \times 10^{-3}$ (DMPO-OH), $1,17 \times 10^{-2}$ (DMPO-CH₃) e $1,32 \times 10^{-3}$ (DMPO-OH) e $7,56 \times 10^{-3}$ (DMPO-CH₃), respectivamente, indicando uma geração maior de radicais na presença do complexo mononuclear, o qual possui uma solubilidade um pouco maior no meio reacional.

Esses resultados, quando comparados, indicam que os compostos (3) e (4) parecem ser mais ativos na geração de espécies reativas de oxigênio, o que pode corroborar sua atividade antitumoral, analisada em ensaios de MTT, que serão apresentados posteriormente.

6.3. Interação com Melanina Monitorada por Espectroscopia UV/Vis.

Ensaios de interação dos complexos de cobre com a melanina foram conduzidos no intuito de verificar sua possível influência na toxicidade observada frente a melanomas. Estes ensaios foram realizados através de monitoração das variações espectrais ao adicionar quantidades crescentes de melanina a cada um dos complexos.

Na Figura 6.15. abaixo são mostradas as bandas características dos complexos, e podemos observar um aumento na absorbância medida ao adicionar a melanina.

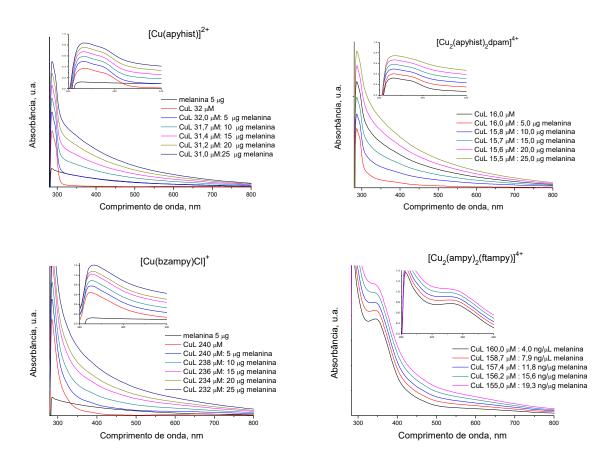


Figura 6.15. Espectros da titulação dos complexos pela melanina (solubilizada em solução de NaOH 250 mM) à temperatura ambiente. As concentrações estão expostas na figura.

Entretanto, esse experimento se mostrou inconclusivo, devido à intensa coloração da melanina. As adições de melanina não ocasionaram variações e sim, apenas uma adição das absorbâncias das espécies em solução. Interações geralmente são acompanhadas de aumento ou diminuição acentuadas das intensidades das bandas e deslocamentos máximos

(hiper ou hipocromismo), que levariam ao aparecimento de pontos isosbésticos, ou alterações nos comprimentos de onda (batocromismo) [114].

A reta da Figura 6.16 foi calculada para todas as curvas experimentais, não indicando variações que pudessem ser consideradas como interações.

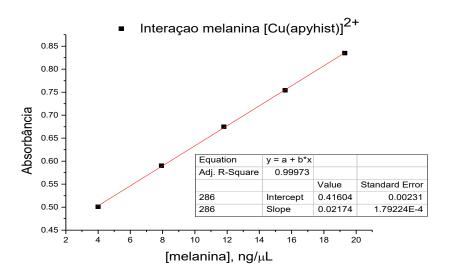


Figura 6.16. Absorbância medida em função da concentração de melanina adicionada, em tampão fosfato pH 7,4 (50 mM) à temperatura ambiente.

6.4. Interação com Melanina Monitorada por Espectroscopia EPR

No intuito de complementar esses estudos de interação, foram realizados ensaios monitorados por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR). Nestes experimentos buscou-se verificar como os complexos comportavam-se na presença da melanina. Estes ensaios foram realizados para os complexos (1) e (2), à temperatura ambiente.

Inicialmente, os experimentos foram realizados utilizando soluções-mãe preparadas por relação massa/massa de complexo e melanina. Estas soluções continham 5 mg/mL de melanina, no caso das soluções de complexos, foi preparada também uma solução de sail de cobre correspondente à maior concentração de cobre do complexo utilizado em mol/L. Em cada experimento os valores de concentrações de melanina foram fixados, variando-se a concentração dos complexos de cobre, conforme mostrado na Figura 6.17. A análise desses espectros indica que há uma interação entre os complexos e a melanina. Isto também foi

observado no experimento adicionando sal de cobre, o aqua-complexo $[Cu(H_2O)_4]^{2^+}$, utilizado como controle. Porém a interação se mostra mais acentuada com o complexo (2) dinuclear.

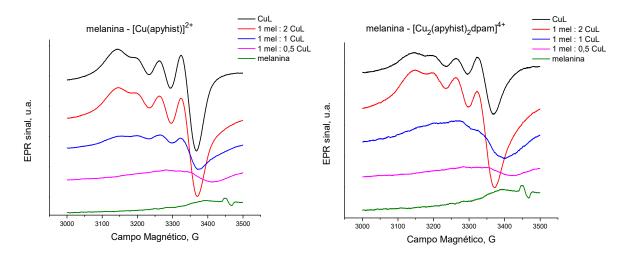


Figura 6.17. Espectros de EPR, à temperatura ambiente, mostrando a interação da melanina com os complexos [Cu(apyhist)H₂O]²⁺ (1) e [Cu₂(apyhist)₂dpam]⁴⁺ (2). As proporções de complexos e melanina estão definidos no gráfico, concentração de melanina 1,0mg/mL, concentração de complexos: (1) = 1 mM a 4 mM, (2) = 0,45 a 1,8 mM.

Nessa primeira análise, foi observada alteração significativa no espectro para o complexo (2) na proporção de 1:1 (melanina:complexo). Uma alteração semelhante foi observada na proporção de 1:0,5 (melanina:complexo) para o complexo (1).

Um segundo ensaio foi então realizado para acompanhar a interação complexomelanina, usando proporções intermediárias. Neste experimento avaliou-se os parâmetros de EPR, com ensaios em que foi usada uma concentração fixa dos complexos, 2 mM para (1) e 0,9 mM para (2), variando-se a concentração de melanina de 0,50 mg/mL a 2 mg/mL.

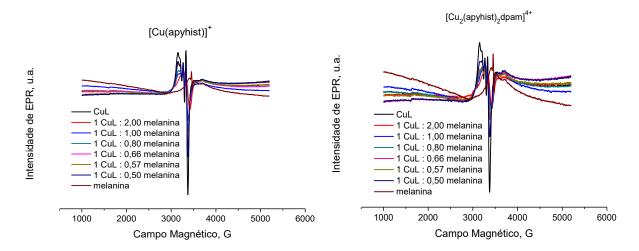


Figura 6.18. Espectros de EPR, à temperatura ambiente, mostrando a interação da melanina com os complexos [Cu(apyhist)H₂O]²⁺ (1) e [Cu₂(apyhist)₂dpam]⁴⁺ (2). As proporções de complexos e melanina estão definidos na figura; [melanina] = 2 mg/mL a 0,50 mg/mL, concentração de complexos: [Cu(apyhist)H₂O]²⁺ 2mM e [Cu₂(apyhist)₂dpam]⁴⁺ 0,9 mM.

Os espectros foram registrados em uma janela maior de campo magnético, para verificar possíveis interações em valores de campo mais baixo, porém não foram observadas alterações de sinais.

Nas Figuras a seguir, pode-se avaliar as variações espectrais observadas com proporções crescentes de melanina adicionadas a cada complexo de cobre. Inicialmente tem-se os espectros para o aqua-complexo (Figura 6.19.).

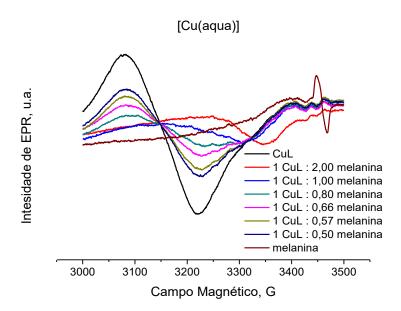


Figura 6.19. Espectros de EPR, à temperatura ambiente, mostrando a interação da melanina com o sal de cobre(II). As proporções de [Cu(aqua)] e melanina estão definidos na figura; [melanina] variou de 2 mg/mL a 0,50 mg/mL; [cobre(II)] = 0,9 mM.

Como podemos observar, há uma redução do sinal de cobre com o aumento da quantidade de melanina, bem como o desaparecimento do sinal de radical livre (g=2.003) característico da melanina pura (sem adição de metal). Esse fenômeno pode indicar uma redução do metal para Cu⁺, que apresenta características diamagnéticas, fazendo com que o espectro fique silencioso para o EPR.

Analisando esses espectros do [Cu(aqua)], foi verificado uma mudança nos parâmetros, que inicialmente são de g_{iso} = 2,189 para todas as proporções, variando para g_{iso} = 2,097, na proporção de 1:2 com melanina. Esse comportamento indica que o sal de cobre(II) interage com a melanina de acordo com sua concentração relativa, do modo descrito acima, no qual há uma supressão do sinal de radical com uma possível redução do íon cobre.

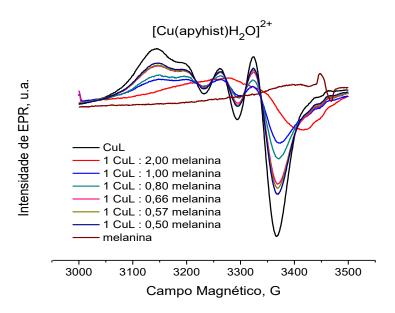


Figura 6.20. Espectros de EPR, à temperatura ambiente, mostrando a interação da melanina com o complexo $[Cu(apyhist)H_2O]^{2+}$ (1). As proporções de complexo e melanina estão definidos na figura; [melanina] variada de 2 mg/mL a 0,50 mg/mL; [CuL] = 2mM.

Fazendo estudos análogos, utilizando o complexo [Cu(apyhist)H₂O]²⁺ (1), resultados visualizados na Figura 6.20. foram obtidos. Podemos determinar o mesmo padrão de redução de sinal ocorrido com o cobre aqua, ou seja, a diminuição do sinal de acordo com a adição de melanina no sistema. Isso indica que o complexo interage com a melanina, ocorrendo a redução do cobre(II) a cobre(I).

O espectro do composto na proporção de 1:2 de melanina apresenta sinal com parâmetros g_{iso} = 2,106, g_L = 2,060, $g_{//}$ = 2,197 e $A_{//}$ = 66 G. Os espectros nas outras razões de complexo e melanina apresentam um parâmetro de g_{iso} = 2,102 e $A_{//}$ = 60 G. Dessa forma, obtém-se valores de g_{iso} e $A_{//}$ que são similares, o que indica que os espectros são da mesma espécie química.

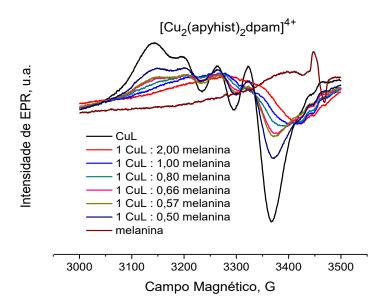


Figura 6.21. Espectros de EPR, registrados à temperatura ambiente, mostrando a interação da melanina com o complexo [Cu₂(apyhist)₂dpam]⁴⁺ (2), análise em proporções de complexos e melanina estão definidos na figura, concentração de melanina de 2 mg/mL à 0,50 mg/mL, concentração do complexo em 0,9 mM. Temperatura ambiente.

Analogamente, foi obtida a Figura 6.21. para o composto dinuclear (2). Analisando esses espectros, observa-se um comportamento similar ao do complexo mononuclear (1), porém, podemos notar uma diminuição significativa do sinal EPR já em proporções 1:0,57 (complexo:melanina). Para o complexo [Cu(apyhist)H₂O]²⁺ (1), essa diminuição do sinal só ocorreu na proporção 1:2 melanina, o que sugere uma interação muito mais efetiva entre a melanina e o complexo (2) dinuclear, o que pode explicar sua forte influência frente a células melanomas pigmentadas, em ensaios descritos a seguir.

Os parâmetros para o composto dinuclear são g_{iso} = 2.100 e A_{iso} =58G, similares aos obtidos com o complexo mononuclear, o que faz sentido, já que as ligações com o ligante em ambos os compostos são similares.

Para comparar a redução do cobre com cada complexo, foi construída a Figura 6.22, com a variação da dupla integral do sinal de EPR em função da razão em massa [melanina]/[CuL].

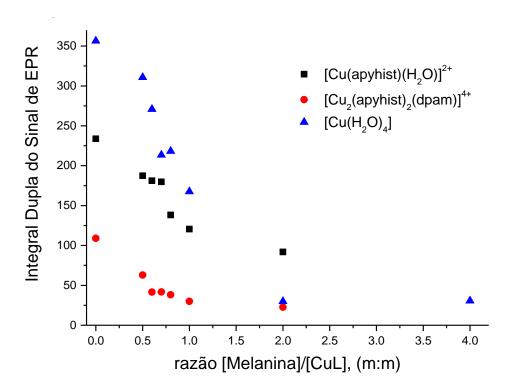


Figura 6.22. Variação do Sinal de EPR (sinal integrado) com a razão crescente entre melanina e complexo de cobre, [melanina]/[CuL].

Verificou-se que aumentando a concentração de melanina, diminui o sinal de cobre devido a sua redução: cobre(I) é silencioso no EPR devido a sua configuração eletrônica d¹⁰.

O complexo dinuclear **2** é mais eficientemente reduzido pela melanina que o complexo mononuclear **1** ou o aqua-complexo. Isto faz com que o complexo **2** gere mais EROs através de um ciclo catalítico, do que o complexo **1**, sensibilizando mais eficientemente as células com maior conteúdo de melanina.

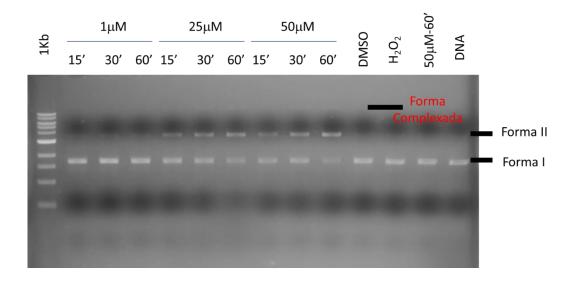
6.5. Reatividade frente ao DNA: Experimentos de Atividade Nuclease

Ensaios de clivagem em DNA foram realizados para observar possíveis alterações que pudessem explicar a citotoxicidade dos complexos estudados, prejudicando o desenvolvimento das células. Ensaios utilizando eletroforese em gel de agarose foram conduzidos para observar a clivagem do DNA plasmidial superenovelado. Esses ensaios foram realizados para observar uma possível atividade nuclease dos complexos, ou seja, sua capacidade em clivar as hélices do DNA. Os experimentos foram realizados com a incubação dos complexos em diferentes concentrações e tempos com o DNA plasmidial, utilizando os controles: DNA com DMSO, DNA incubado com peróxido de hidrogênio, DNA incubado com cada complexo em sua maior concentração, e somente o DNA.

Esses estudos são de grande importância no desenvolvimento de metalofármacos, uma vez que o DNA é um dos alvos usual no combate a certas doenças, como câncer. A atividade nuclease de clivagem da fita de DNA pode levar a uma série de reações em cadeia, chegando até a morte celular por apoptose. Alguns compostos são capazes de clivar as fitas de dupla hélice de DNA (superenovelado, **forma I**), por clivagem simples (**forma II**) ou clivagem dupla (**forma III**), sendo a dupla cisão mais desejada para quimioterápicos, por ser de difícil reparo [115].

Relatamos aqui os ensaios realizados com os compostos $[Cu(bzampy)Cl]^+$ (3), $[Cu(ftampy)Cl_2]^{2+}$ (4), $[Cu(isadab)Cl]^+$ (5) e $[Cu(isadbz)Cl_2]^{2+}$ (6). Ensaios análogos já haviam sido realizados com os compostos (1) e (2) Figura 27 e 28, em estudos anteriores [30].

Os ensaios foram realizados nas concentrações de 1, 25 e 50µM para cada um dos complexos, e com tempos de incubação de 15, 30 e 60 minutos.



(B)

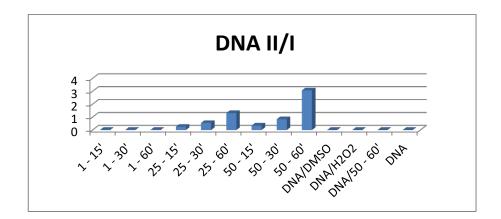
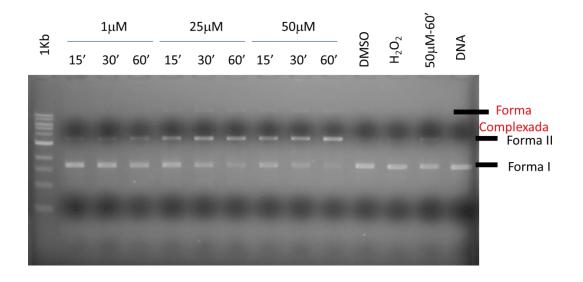


Figura 6.23. (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo [Cu(bzampy)Cl]⁺ (3) por 15, 30 e 60 min, com peróxido de hidrogênio. As concentrações de CuL em μ M, e os tempos de incubação em min estão indicadas no gel. Canaletas: 1Kb marcador; DNA+DMSO, DNA + H₂O₂ (125 μ M); DNA + CuL (50 μ M – 60 min); DNA plasmidial (300ng/ μ L). (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A), utilizando o programa *ImageJ 1.46* para a quantificação.

Nestas condições experimentais, na ausência de peróxido de hidrogênio, pode-se observar que o complexo (3) não clivou as fitas de DNA, em concentração de 50 μM após 60 min de incubação. Porém, em concentração de 1 μM no tempo de 60 min, foi possível verificar a quebra da simples fita, em presença do peróxido.



(B)

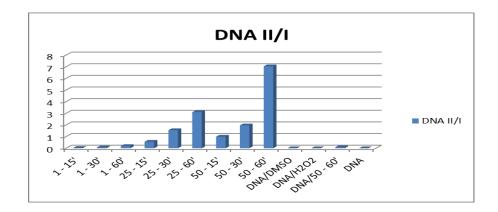
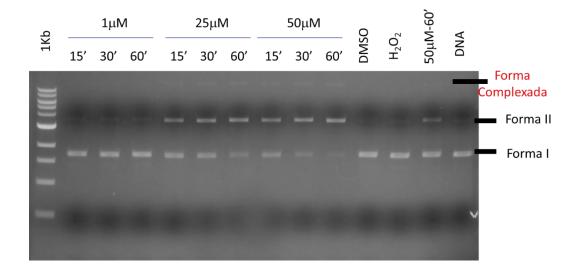


Figura 6.24. (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo [Cu(ftampy)Cl₂]²⁺ (4) por 15, 30 e 60 min, com peróxido de hidrogênio. As concentrações de CuL em μM, e os tempos de incubação em min estão indicadas no gel. Canaletas: 1Kb marcador; DNA +DMSO, DNA + H_2O_2 (125μM); DNA + CuL (50 μM – 60 min); DNA plasmidial (300ng/μL). (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A), utilizando o programa *ImageJ 1.46* para a quantificação.

Esses resultados experimentais mostram que na ausência de peróxido de hidrogênio, o complexo (4) foi capaz de clivar uma das fitas de DNA, mesmo sem o auxílio de agente ativador redox, em concentração de 50 μM após 60 min de incubação. Além disso, esse complexo foi capaz de clivar a fita simples na menor concentração utilizada, de 1 μM, no menor tempo (15 min), em presença do peróxido, porém não foi capaz de fazer a dupla clivagem, indicando assim reatividade razoável na clivagem do DNA plasmidial. Portanto, este composto (4) mostrou melhor atividade do que o composto (3), porém, foi menos

reativo que o complexo **(2)**, que apresentava clivagem dupla no DNA na concentração de 50 μMem 20 minutos com o desaparecimento total da **forma I** vide Figura 6.28.

(A)



(B)

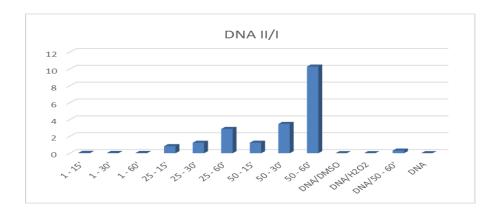
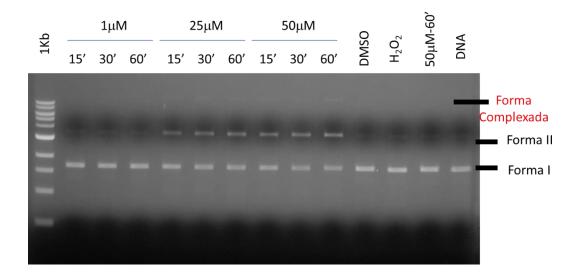


Figura 6.25. (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo [Cu(isadab)Cl] $^+$ (5) por 15, 30 e 60 min, com peróxido de hidrogênio. As concentrações de CuL em μM, e os tempos de incubação em min estão indicadas no gel. Canaletas: 1Kb marcador; DNA +DMSO, DNA + H_2O_2 (125μM); DNA + CuL (50 μM – 60 min); DNA plasmidial (300ng/μL). (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A), utilizando o programa *ImageJ 1.46* para a quantificação.

A análise desse experimento indicou que o complexo **(5)**, também foi capaz de clivar uma das fitas de DNA, mesmo sem o auxílio de agente ativador redox, peróxido de hidrogênio. Pôde clivar a fita simples a partir da concentração de 25 μM no menor tempo para essa concentração (15 min), porém não foi capaz de fazer a dupla clivagem, em nenhuma das concentrações analisadas.



(B)

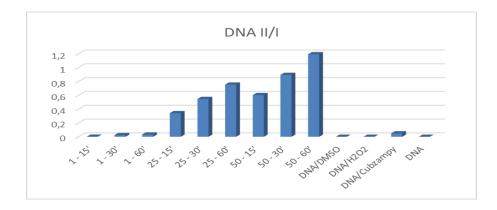
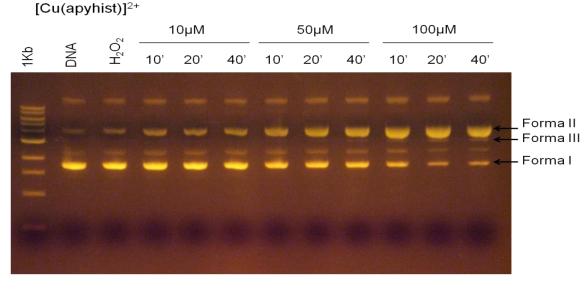


Figura 6.26. (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo $[Cu(isadbz)Cl_2]^{2+}$ (6) por 15, 30 e 60 min, com peróxido de hidrogênio. As concentrações de CuL em μM e os tempos de incubação em min estão indicadas no gel. Canaletas: 1Kb marcador; DNA +DMSO, DNA + H_2O_2 (125μM); DNA + CuL (50 μM – 60 min); DNA plasmidial (300ng/μL). (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A), utilizando o programa *ImageJ 1.46* para a quantificação.

Observando-se os resultados para o complexo (6), percebe-se que este composto também foi capaz de clivar uma das fitas de DNA, mesmo na ausência de peróxido de hidrogênio. Mostrou que pode também clivar a fita simples a partir da concentração de 25 µM após 15 min de incubação, porém não foi capaz de fazer a dupla clivagem. Além disso, apresentou dentro da série de complexos estudados a pior reatividade na clivagem do DNA plasmidial, o que pode ser observado na razão entre as formas clivadas e superenovelada.



(B)

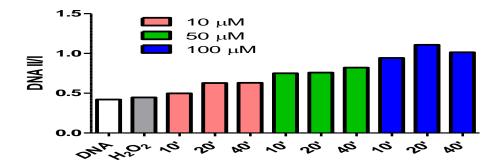
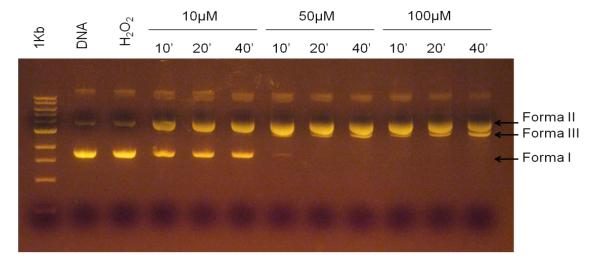


Figura 6.27. (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo $[Cu(apyhist)H_2O]^{2+}$ (1) por 10, 20 e 40 min, com peróxido de hidrogênio. Canaletas: 1Kb marcador; DNA, DNA plasmidial (36ng/ μ L); H_2O_2 , DNA + H_2O_2 (125 μ M); As concentrações de CuL, e os tempos de incubação estão indicadas no gel. (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte [30].





(B)

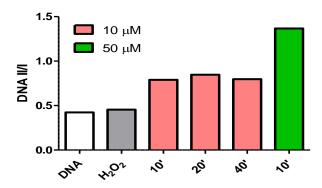


Figura 6.28. (A) Gel de agarose do plasmídio de DNA pBluescript II KS(+/-), incubado com o complexo $[Cu_2(apyhist)_2dpam]^{4+}$ (2) por 10, 20 e 40 min, com peróxido de hidrogênio. Canaletas: 1Kb marcador; DNA, DNA plasmidial (36ng/ μ L); H_2O_2 , DNA + H_2O_2 (125 μ M); As concentrações de CuL, e os tempos de incubação estão indicadas no gel. (B) Razão da Forma II/Forma I do DNA determinado das bandas do gel de eletroforese na parte (A) [30].

Dentre os complexos estudados nestes ensaios e os anteriores podemos estabelecer uma ordem de reatividade para a capacidade dos vários complexos de clivar a dupla hélice do DNA. Em ordem decrescente de reatividade temos: complexo (2) capaz de clivar a dupla fita, porém com a necessidade de agente redox; complexo (5) com valores de razão de clivagem significativo nas concentrações 50 µM e pequena reatividade mesmo sem a adição de peróxido de hidrogênio; complexo (4) com boa reatividade e início de clivagem de

simples fita na concentração 25 μM, seguido do complexo (3) com reatividade razoável, o composto (6) que teve uma reatividade muito pouco significativa, e o composto (1) sem reatividade nas concentrações avaliadas, estudado anteriormente.

Dessa forma, dentre os complexos apresentados, observa-se que para (3) mono e (4) dinuclear, o complexo (4) é o mais reativo, como esperado e como foi também observado para os complexos (1) e (2). Porém, para os complexos (5) mono e (6) dinuclear, a reatividade não seguiu o menos conceito dos outros pares, indicando uma maior reatividade para o composto mononuclear. Isto pode ser devido a um fator estrutural adicional. Enquanto nos compostos dinucleares (2) e (4) os dois centros de cobre podem de certa forma se aproximar e interagir entre si, já que os ligantes são mais flexíveis, isto não é possível para o composto (6), com uma estrutura muito mais rígida.

Outro fator, observado nestes experimentos, foi o aparecimento de uma banda com maior peso molecular, que pode ser observada sutilmente, com maior intensidade para o composto (4), com mobilidade mais lenta. Esta banda pode indicar uma possível interação do complexo com o DNA, que poderia ser confirmada possivelmente com outra técnica de monitoramento de interação com o DNA.

7. Resultados e Discussão III – Ensaios Celulares

7.1. Avaliação da Viabilidade Celular por MTT de Linhagens de Melanomas Murinos: Melan-a, Tm1, Tm5 por Tratamento com os Complexos (1) e (2)

Os ensaios foram iniciados avaliando-se a viabilidade celular das linhagens murinas TM1 e TM5 de melanomas, além da linhagem de Melan-a não tumorogênica, frente à ação dos complexos (1) e (2) já estudados, com foco no composto dinuclear, que se mostrou bastante promissor [30].

A Figura 7.1. mostra resultados dos ensaios de MTT, comparando-se a atividade dos complexos (1) e (2). Nela podemos observar que a viabilidade das linhagens tratadas com o composto dinuclear (2) é inferior àquelas tratadas com o seu análogo mononuclear (1).

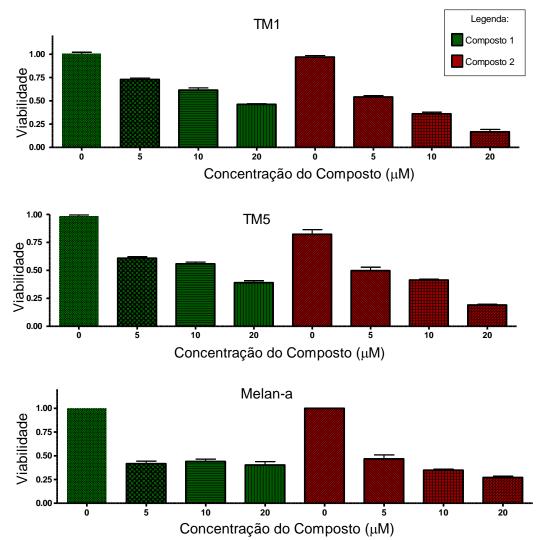


Figura 7.1. Ensaios de viabilidade celular de melanomas murinos TM1, TM5 e células não tumorogênicas murinas Melan-a, após tratamento por 48h com os complexos $[Cu(apyhist)H_2O)^{2+}(1)$ e $[Cu_2(apyhist)_2dpam]^{4+}(2)$, em concentrações 5, 10 e 20 μ M.

Na análise dos dados de viabilidade é possível verificar que o composto dinuclear é mais citotóxico que o mononuclear para todas as linhagens avaliadas, incluindo a linhagem não tumorogênica. Isso prejudicaria a performance do complexo em estudo, porém para uma melhor conclusão em relação à citotoxicidade do composto foram realizados experimentos de morte celular monitorados por citometria de fluxo, no intuito de comprovar melhor os resultados obtidos.

7.2. Ensaios de Morte Celular de Linhagens de Melanomas Murinos: Melan-a, Tm1, Tm5 por Tratamento com os Complexos (1) e (2) - Avaliadas por Citometria de Fluxo

As linhagens murinas foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade dos compostos (1) e (2), sendo as células contadas em citômetro de fluxo, usando iodeto de propídio. Como esperado, os resultados indicaram uma maior sensibilização das células tratadas com o complexo dinuclear, que se mostrou mais citotóxico em comparação ao análogo mononuclear, que neste ensaio estava com concentração 10 vezes maior. Mesmo com essa diferença, não foi observado morte acentuada no experimento, das células tratadas com o composto (1), como pode ser observado na Figura 7.2.

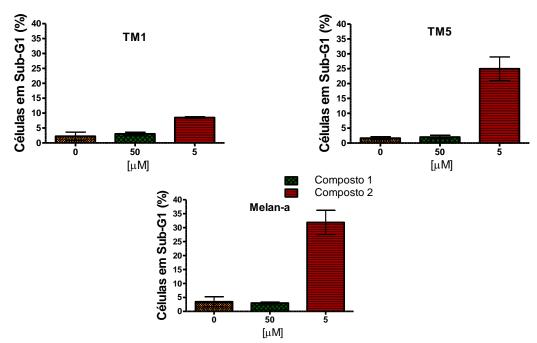


Figura 7.2. Ensaio de morte celular de células TM1, TM5 e Melan-a após tratamento com os complexos $[Cu(apyhist)H_2O)^{2+}$ (1) e $[Cu_2(apyhist)_2dpam]^{4+}$ (2), por contagem em citômetro de fluxo, com incorporação de iodeto de propídio para indicar a porcentagem de células em fase Sub-G1 (DNA fragmentado). Ensaio de 48 h de tratamento com os complexos em concentrações indicadas na figura.

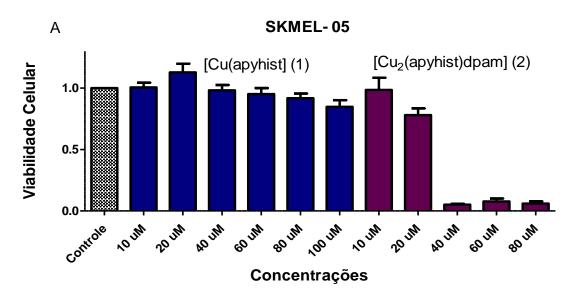
Esses ensaios indicam claramente uma maior porcentagem de células em dano quando tratadas com o complexo dinuclear (2). Porém, como observado anteriormente, o dano se estende também para a linhagem não tumorogênica (Melan-a). Com esses resultados observou-se com maior precisão a influência do conteúdo de melanina, pois as duas linhagens pigmentadas, TM5 e Melan-a, foram mais sensibilizadas do que a linhagem não pigmentada, TM1.

7.3. Viabilidade por MTT de Melanomas Humanos SKMEL-05 e SKMEL-147 após Tratamento com os Compostos em Estudo

No intuito de aprofundar os estudos e verificar uma maior eficácia no tratamento de melanomas, estes ensaios foram realizados utilizando linhagens de células melanoma humanos, com foco em duas linhagens específicas SKMEL-05 e SKEML-147. A primeira tem expressão de um gene B-Raf mutado, que pode proporcionar à célula uma maior resistência a tratamentos, devido a desregulação da via associada ao crescimento celular e sua proliferação, e a outra é selvagem para esta mutação, ambas contendo melanina.

Experimentos foram realizados tratando as duas linhagens celulares por 24 h, utilizando todos os complexos em estudo. Desta forma, verificou-se comparativamente a citotoxicidade dos compostos [Cu(apyhist)H₂O]²⁺ (1), [Cu₂(apyhist)₂dpam]⁴⁺ (2), [Cu(bzampy)Cl]⁺ (3), [Cu₂(ftmapy)(ampy)₂]⁴⁺ (4), [Cu(isadab)Cl]⁺ (5) e [Cu₂(isadbz)Cl₂]²⁺ (6) em ensaios avaliados por MTT.

Baseado nos resultados obtidos nestes ensaios, podemos estabelecer faixas de concentrações biologicamente ativas para os complexos com melhor atividade citotóxica, além de definir quais complexos possuem valores de dose-atividade aceitáveis para experimentos futuros. As **Figuras** a seguir mostram os respectivos histogramas de viabilidade celular para as duas linhagens de melanomas acima descritas.



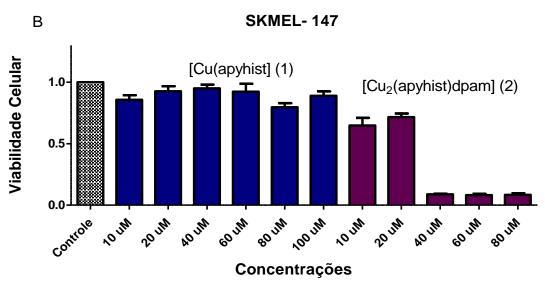
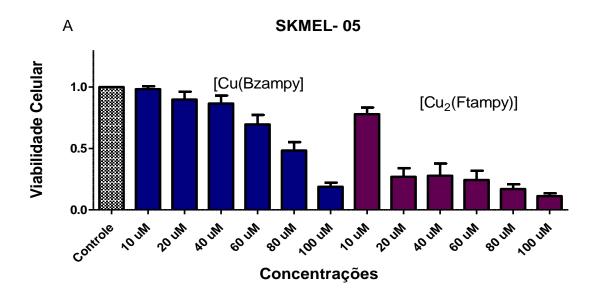


Figura 7.3. Viabilidade celular de melanomas humanos SKMEL-05 (A) e SKMEL-147 (B), avaliada por ensaio de MTT. Ensaios com tratamento durante 24 h com os complexos (1) e (2), em concentrações indicadas na figura, em condições de cultura. A primeira barra é representativa do controle com DMSO.

A avaliação da viabilidade das células tratadas com os complexos (1) e (2), utilizados também em estudos anteriores, mostram uma atividade muito maior para o complexo dinuclear (2), comparada à atividade de seu análogo mononuclear em concentrações bem superiores. Os resultados indicam que a estrutura dinuclear é favorável à maior citotoxicidade apresentada frente a células melanomas de ambas as linhagens (mutada ou não mutada).



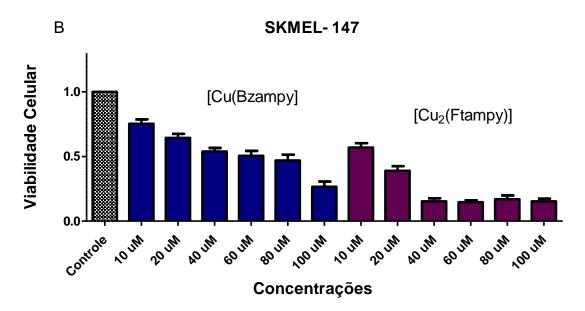


Figura 7.4. Viabilidade celular de melanomas humanos SKMEL-05 (A) e SKMEL-147 (B), avaliada por ensaio de MTT. Ensaios com tratamento durante 24 h com os complexos (3) e (4), em concentrações indicadas na figura em condições de cultura, a primeira barra é representativa do controle com DMSO.

Para os complexos (3) e (4), verificou-se também uma alta citotoxicidade dos complexos, novamente com viabilidades menores encontradas para o complexo dinuclear (4), em comparação ao análogo mononuclear (3), que também se mostrou citotóxico. O valor de concentração utilizado para se comparar a viabilidade das células tratadas com o complexo dinuclear é em torno de 7 vezes menor do que aquela para o complexo mono (3) o que indica mais uma vez a melhora da atividade do complexo quando este possui dois íons de cobre em sua estrutura.

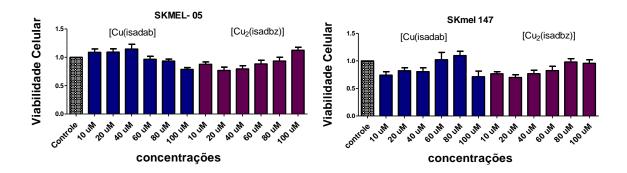


Figura 7.5. Viabilidade celular de melanomas humanos SKMEL- 05 (A) e SKMEL- 147 (B), avaliada por ensaio de MTT. Ensaios com tratamento durante 24 h com os complexos (5) e (6), em concentrações indicadas na figura em condições de cultura, a primeira barra é representativa do controle com DMSO.

No entanto, as linhagens SKMEL-05 e SKMEL-147 tratadas com os complexos (5) e (6), não tiveram morte celular acentuada. Uma das principais causas para este fato é a baixa solubilidade destes complexos em meio de cultura, observada principalmente para o complexo dinuclear (6). Isto pode impedir a entrada dos complexos nas células, evitando assim os danos que poderiam causar. Dessa forma, os experimentos para estes complexos foram limitados, devido à baixa solubilidade apresentada.

O cálculo de IC₅₀ foi realizado através do programa Origin utilizando a curva de dose resposta, com a seguinte curva e fórmula:

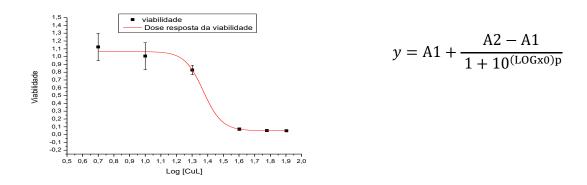


Figura 7.6. Representação da curva utilizada para cálculo de IC₅₀ dos complexos.

Para o complexo [Cu(apyhist)]²⁺ (1) utilizando concentrações de até 100 μM não foi possível encontrar o valor de IC₅₀, em nenhuma das linhagens utilizadas nos ensaios. Os complexos [Cu(isadab)Cl]⁺ (5) e o [Cu₂(isadbz)Cl₂]²⁺ (6), não puderam ser avaliados devido a sua atividade não significativa, como pode ser observado na Figura 7.5.

Para os complexos (2), (3) e (4) os valores de IC₅₀ obtidos nos ensaios de viabilidade, para as linhagens de melanoma humano, estão apresentados nas Tabelas a seguir.

Tabela 7.1. – Valores de IC_{50} para a citotoxicidade de complexos de cobre, frente a melanomas SKMEL-05 e SKMEL-147, após 24h de incubação a T = 37° C.

SKMEL- 05				
Composto	IC ₅₀	Erro		
[Cu(apyhist)] ²⁺ (1)	>100			
[Cu₂(apyhist)₂dpam] ⁴⁺ (2)	22,3	<u>+</u> 1,9		
[Cu(bzampy)Cl] [†] (3)	80,9	±18,3		
[Cu ₂ (ftampy)(ampy) ₂] ⁴⁺ (4)	12,8	<u>±</u> 1,8		

SKMEL- 147				
Composto	IC ₅₀	Erro		
[Cu(apyhist)] ²⁺ (1)	>100			
[Cu₂(apyhist)₂dpam] ⁴⁺ (2)	20,0	<u>±</u> 7,0		
[Cu(bzampy)Cl] [†] (3)	90,2	±20,9		
[Cu ₂ (ftampy)(ampy) ₂] ⁴⁺ (4)	12,4	<u>±</u> 7,0		

Como pôde ser observado, tanto para as linhagens de melanoma humanos SKMEL-05 quanto para a SKMEL-147, o complexo mais reativo foi o dinuclear (4), com menor valor de IC₅₀ após 24h de incubação, seguido do complexo (2) também dinuclear. Seus análogos mononucleares apresentaram atividade citotóxica aproximadamente 8 vezes menor, ou pouco significativa, respectivamente.

7.4. Ensaios de Morte Celular em Melanomas Humanos SKMEL-05 e SKEML-147 com Exposição Previa à Radiação UVB e Tratamento com Complexos (1), (2), (3) e (4)

A observação de que as células pigmentadas (com conteúdo significativo de melanina) eram mais sensibilizadas ao tratamento com o complexo (2), levou aos ensaios com exposição à radiação UVB. Quando as células são expostas à radiação ocorre, além de outros mecanismos, um aumento na produção de melanina, ou seja, um aumento na melanogênese [116]. Esse aumento na melanogênese parece interferir na citotoxicidade do complexo. Assim, foram realizados outros experimentos, conforme descrito na parte

experimental, avaliando-se a morte celular induzida após tratamento com os complexos de células expostas à radiação.

Os experimentos foram realizados com o tratamento das células SKMEL-05 e SKMEL-147 com os complexos (1) e (2), e também com os complexos (3) e (4) para as duas linhagens, já que os dois últimos complexos também apresentaram no ensaio de MTT, um efeito citotóxico em concentrações baixas, principalmente utilizando o complexo (4) dinuclear.

Nas células tratadas com os complexos (1) e (2), conforme mostrado nas Figuras 7.7 e 7.8., podemos observar diferenças na intensidade de sensibilização entre os ensaios de 24 h e 48 h. Os ensaios de 48 h parecem representar melhor o efeito citotóxico causado pelo complexo (2).

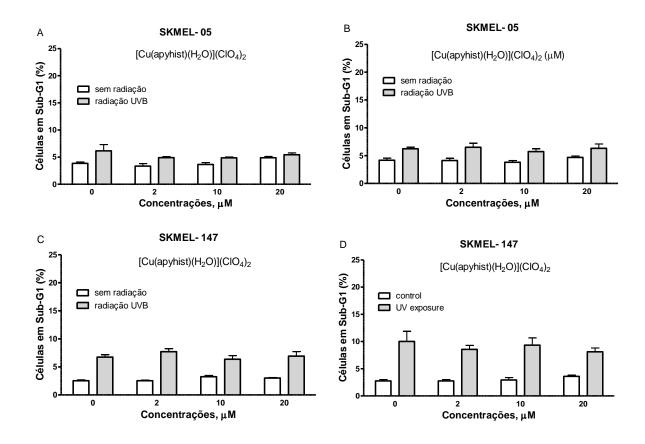


Figura 7.7. Viabilidade de células de melanomas humanos SKMEL-05 e SKMEL-147 tratadas com o complexo **(1)**, durante 24 h (A, C) ou 48 h (B, D), previamente irradiadas (13,9 mJ/cm²). População da fase Sub-G1 monitorada por incorporação de iodeto de propídio em citômetro de fluxo.

O efeito nas células na fase Sub-G1 tratadas com o complexo (1) parece insignificante, mesmo utilizado um valor de concentração duas vezes maior do que a utilizada no complexo

dinuclear, tanto para os ensaios de 24 h quanto para os ensaios de 48 h, corroborando assim, com os resultados de MTT para o complexo (1) mononuclear.

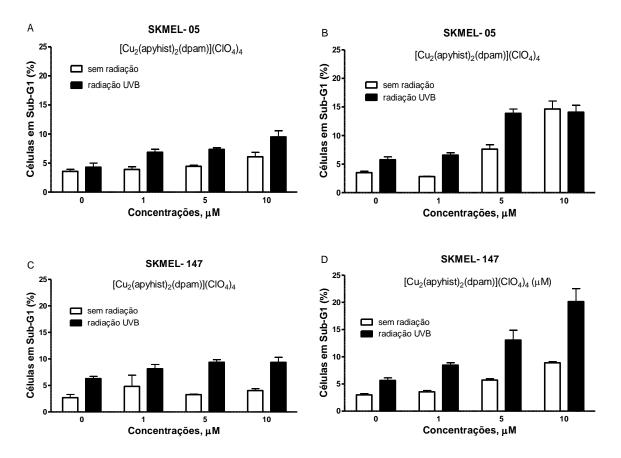


Figura 7.8. Viabilidade de células de melanomas humanos SKMEL- 05 e SKMEL- 147 tratadas com o complexo **(2)**, durante 24 h (A, C) ou 48 h (B, D), previamente irradiadas (13,6 mJ/cm²). População da fase Sub-G1 monitorada por incorporação de iodeto de propídio em citômetro de fluxo.

O experimento de morte celular, observando o tratamento das células com o complexo (2), indica uma correlação entre o aumento da reatividade do complexo (sensibilização da célula) com o aumento da melanogênese (pós-radiação). Supõe-se assim que, quando há um maior conteúdo de melanina, as células parecem ficar mais suscetíveis à ação citotóxica do composto.

Ensaios similares, foram realizados para os complexos (3) e (4), como podem ser analisados a seguir, porém, esses complexos parecem não possuírem mecanismos semelhantes ao observado para o complexo (2).

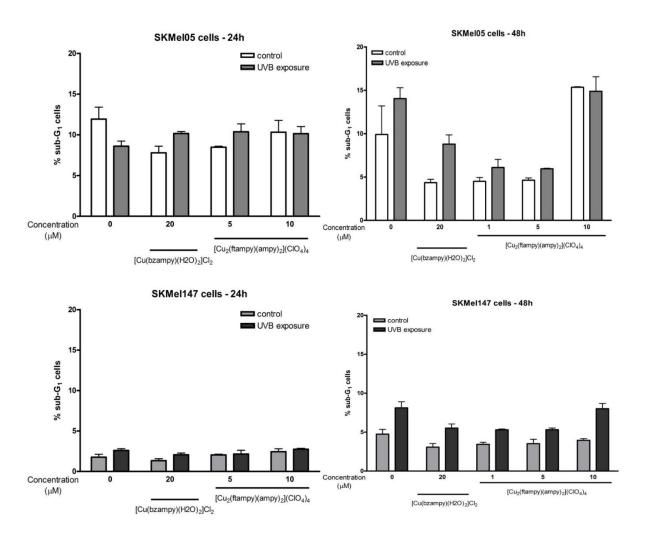


Figura 7.9. Citotoxicidade observada em células SKMEL-05 e SKMEL-147 tratadas com diferentes concentrações dos complexos $[Cu(bzampy)CI]^+$ (3) 20 μM e $[Cu(ftampy)]^{4+}$ (4) 1 μM, 5 μM e 10 μM, em ensaios com e sem exposição à radiação UVB (12 mJ/cm²) durante 24 h (A, C) ou 48 h (B, D) de tratamento. Monitoração de fase Sub-G1 por citometria de fluxo.

O ensaio com efeito da luz nas células tratadas com o complexo (4) dinuclear, mostrou que sua reatividade, avaliada pela análise da fase Sub-G1, foi bem menor ou desprezível, comparada ao complexo (2). O complexo (3) mostrou atividade semelhante ao complexo (1) também mononuclear, considerada também desprezível em causar morte celular nas concentrações e condições utilizadas.

Além desses ensaios, foram realizados também ensaios de permeabilização de membrana, por incorporação de iodeto de propídio, para verificar se as células tratadas com os complexos (3) e (4), conforme Figura 7.10., permaneciam intactas após o tratamento.

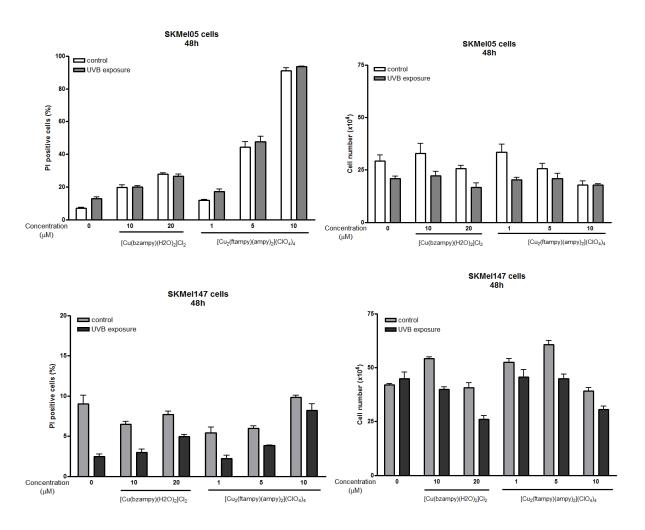


Figura 7.10. Ensaios de permeabilização de membrana de células SKMEL-05 e SKMEL-147 tratadas com diferentes concentrações dos complexos [**Cu(bzampy)CI**]⁺ (**3)** 20 μM e [**Cu(ftampy)**]⁴⁺ (**4)** 1 μM, 5 μM e 10 μM, com e sem exposição à radiação UVB (12 mJ/cm2), durante 24 h (A, C) ou 48 h (B, D) de tratamento.

Estes resultados sugerem que o mecanismo de ação para esses compostos é diferente, pois na avaliação da incorporação do iodeto de propídio na fase Sub-G1, os mesmos não tiveram suas reatividades influenciadas pelo efeito da luz, embora pareçam também danificar a membrana celular.

Essa diferença observada na reatividade dos complexos dinucleares, após exposição UVB, pode ser relacionada à estrutura dos compostos. No complexo (4) os centros de cobre estão posicionados com uma maior distância entre eles, enquanto no caso do complexo (2) existe uma possibilidade de interação entre os centros de cobre do complexo, devido ao ligante ponte (*dpam*) presente neste composto e que é flexível, permitindo essa aproximação, o que não ocorre nos outros complexos dinucleares (4 e 6).

Dessa forma, parece ser crucial para a maior sensibilização das células melanomas que no complexo dinuclear os dois centros metálicos atuem em conjunto (talvez proporcionando uma transferência eletrônica concertada de dois elétrons), podendo assim ter seu efeito citotóxico intensificado, com o uso de radiação prévia ao tratamento. Afinal, nos complexos mononucleares, com uma reatividade citotóxica menor e sem efeito em relação à ação da luz, a transferência é monoeletrônica, não ocorrendo sincronização entre os íons metálicos do composto.

Sendo assim, experimentos complementares foram realizados para o complexo $[Cu_2(apyhist)dpam]^{4+}$ (2) e seu análogo mononuclear (1) buscando elucidar melhor seus mecanismos em relação à influência da luz no aumento de sua citotoxicidade.

No ensaio seguinte, avaliaram-se fotos adicionais do experimento, visualizadas na Figura 7.12., e os seus histogramas correspondentes (Figura 7.11.), indicando a população de células na fase Sub-G1.

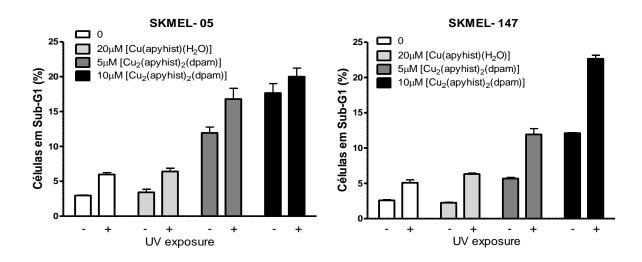


Figura 7.11. Efeito da radiação UVB (13,6 mJ/cm²) na citotoxicidade dos complexos **(1)** e **(2)**, nas concentrações indicadas na figura, após tratamento de 48 h, nas linhagens SKMEL-05 e SKMEL-147. População de células em fase Sub-G1 monitorada por incorporação de iodeto de propídio por citometria de fluxo.

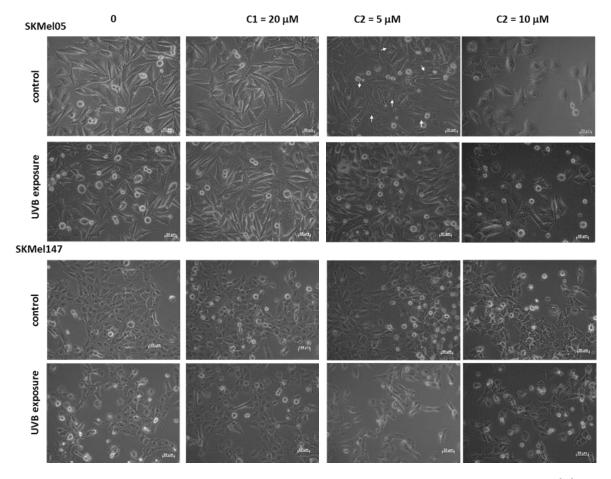


Figura 7.12. Células melanomas sensíveis ao tratamento com complexo (2) após irradiação UVB prévia. Células SKMEL-05 e SKMEL-147 tratadas com os complexos (1) na concentração de 20 μ M, e com o complexo (2) nas concentrações de 5 μ M e 10 μ M, durante 48 h. As setas em branco indicam a acumulação de vacúolos citoplasmáticos na linhagem SKMEL-05, após tratamento com o composto dinuclear (2).

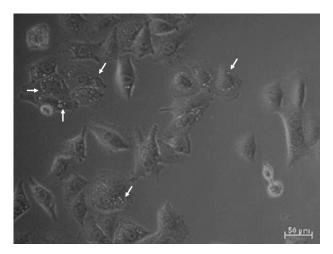


Figura 7.13. Ampliação da imagem com as setas que indicam a acumulação de vacúolos citoplasmáticos na linhagem SKMEL-05, após tratamento com o composto dinuclear **(2)**.

Cisplatina

10 μM

A partir desses resultados, foi proposta a possibilidade do complexo estar causando um acúmulo de vacúolos citoplasmáticos, o que pode indicar uma indução de autofagia nas células, e que poderia estar levando as células à morte por esta via programada.

Para comparação, foi também realizado um tratamento por cisplatina das linhagens SKMEL-05 e SKMEL-147. Esse breve ensaio foi articulado, devido ao uso da cisplatina como única metafármaco indicada no tratamento de melanomas. No entanto, a cisplatina apresenta vários fatores que prejudicam seu uso, sendo o principal deles a alta toxicidade do composto, seguida do aumento da resistência do tumor (células sobreviventes) à droga, entre outros [52]. Os ensaios foram realizados de maneira semelhante ao ensaio não irradiado, utilizando para tanto a concentração de 10 μM de cisplatina, semelhante à concentração geralmente utilizada para o complexo (2).

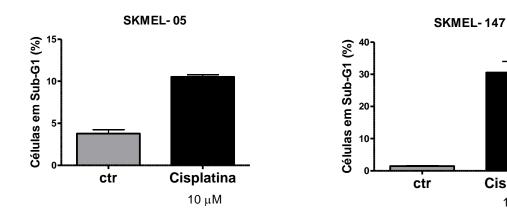


Figura 7.14. Viabilidade celular de melanomas SKMEL-05 e SKMEL-147, tratadas com cisplatina, por 48 h, na concentração de 10 μM, avaliada com incorporação de iodeto de propídio e contagem da fase Sub-G1 em citômetro de fluxo.

Esses ensaios mostram de maneira preliminar que o composto (2) parece apresentar citotoxicidade maior que a cisplatina, frente à linhagem SKMEL-05, e um pouco inferior à apresentada para a linhagem SKMEL-147, indicando assim, possibilidades promissoras de seu uso como agente antitumoral.

7.5. Ensaios de Quantificação de Melanina

Para uma melhor associação do conteúdo de melanina com a sensibilização das células ao complexo (2), foram realizados ensaios de quantificação da mesma. Os experimentos

foram realizados seguindo os procedimentos descritos na parte experimental, com a monitoração da absorbância em 475 nm, após digestão da amostra em NaOH 1 M.

Nos primeiros ensaios foi quantificado o conteúdo basal de melanina em linhagens murinas, sem o tratamento com os complexos, conforme mostrado na Figura 7.15.

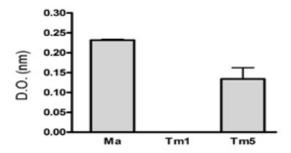


Figura 7.15. Conteúdo de melanina em células murinas, Ma: Melan-a não tumorogênica, TM1 e TM5 melanomas, avaliado através de medidas da absorbância em 475 nm, após o lise das células em solução de NaOH (1 M).

A linhagem com maior conteúdo de melanina foi a não tumorogênica, seguida da TM5, ambas apresentaram maior sensibilização após o tratamento com o complexo (2). Já as células TM1, que não apresentam melanina, tiveram uma menor indução à morte após o tratamento com o complexo. Assim, o dano celular causado pelo composto parece estar correlacionado ao maior conteúdo de melanina.

Na sequência, foram realizados ensaios para quantificar melanina em linhagens de melanoma humano utilizados nos estudos, SKMEL-37, SKMEL-05 e SKMEL-147, comparandose seus conteúdos basais e após exposição à radiação (Figura 7.16.).

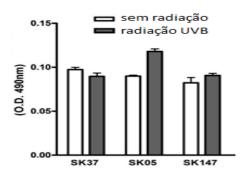


Figura 7.16. Conteúdo de melanina em células de melanoma humanos SKMEL-37, SKMEL- 05 SKMEL-147, irradiadas (13, 2mJ/cm²) e não irradiadas, avaliado através de medidas da absorbância em 475 nm, após lise das células em solução de NaOH (1 M).

Essa avaliação de melanina indica que as três linhagens possuem conteúdo significativo de melanina, e assim, podem ser influenciadas pela exposição à radiação. No caso da linhagem SKMEL-05 a mesma parece sofrer maior influência da luz, com aumento em seu conteúdo de melanina maior do que o observado para as outras duas linhagens. As outras linhagens apresentaram pouca influência da luz.

Nos ensaios posteriores, foram escolhidas duas linhagens para os experimentos, SKMEL-05 e SKMEL-147. Dessa forma, buscou-se comparar seus conteúdos de melanina, e como as células podem ser influenciadas pelo efeito da luz, como também pelo tratamento com os complexos.

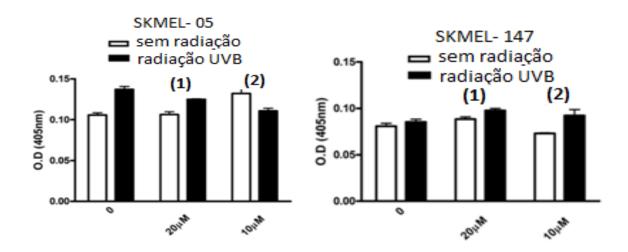


Figura 7.17. Conteúdo de melanina em células de melanoma humano SKMEL-05 SKMEL-147, irradiadas (13, 2mJ/cm²) e não irradiadas, avaliado pela medida da absorbância em 475 nm. Células tratadas com os complexos (1) e (2) nas concentrações indicadas na figura.

Os ensaios indicam que a linhagem SKMEL-05 sofre maior influência da radiação do que a linhagem SKMEL-147. Com relação ao efeito do tratamento com o complexo, há uma diminuição da quantidade de melanina quando exposta a radiação e tratada com o complexo (2). Isso pode ocorrer devido à sensibilização da linhagem, pois as células podem entrar em processo de morte, e dessa forma não produzir um aumento no conteúdo de melanina apropriado. Já para a linhagem SKMEL-147, tanto o complexo quanto a radiação parecem não influenciar com grande intensidade o conteúdo de melanina das células.

Para avaliar apenas a influência dos complexos sobre o conteúdo de melanina, realizou-se o experimento das linhagens tratadas com os complexos durante 48h, que pode ser observado na Figura 7.18.

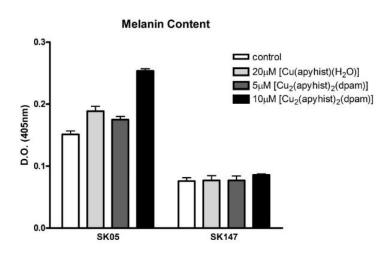


Figura 7.18. Conteúdo de melanina em células de melanoma humano SKMEL- 05 SKMEL-147, tratadas com os complexos (1) na concentração de 20 μ M, e complexo (2) na concentração de 5 e 10 μ M, avaliado através de medidas da absorbância em 475 nm, após lise das células em solução de NaOH (1 M).

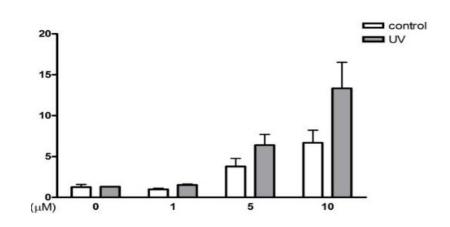
Neste ensaio, claramente se observa que a linhagem SKMEL- 05 é mais suscetível à influência do tratamento com os complexos em relação ao conteúdo de melanina, indicando que o próprio composto provoca nessas células um aumento na melanogênese. Ao contrário, as células SKMEL- 147 não parecem sofrer influência direta em seu conteúdo de melanina sob ação dos mesmos complexos.

7.6. Ensaios de Morte Celular em Melanomas Humanos SKMEL-37, UACC, CHL01, Tratadas com o Complexo (2) com Exposição à Radiação UVB.

Os ensaios de morte celular foram também realizados utilizando outras linhagens tumorais. O intuito dessa seleção de células foi verificar se o complexo (2) mantinha sua reatividade ou comportamento diante de outras linhagens tumorais humanas.

Na Figura 7.19 abaixo, podemos observar a ação do complexo frente ao melanoma SKMEL-37. Estes ensaios foram conduzidos com exposição prévia à radiação UVB e também com exposição à radiação na presença do complexo.





B)

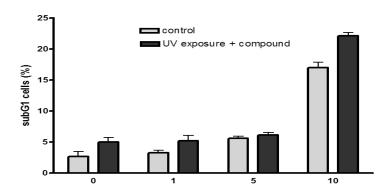


Figura 7.19. Ensaios de morte celular. A) Células da linhagem SKMEL-37 incubadas por 48 h, a 37 °C, sob atmosfera de 5 % de CO₂, com exposição prévia a radiação UVB, tratadas com concentrações, indicadas na figura, do complexo **(2)** dinuclear. B) Linhagem SKMEL-37 incubada por 48 h, a 37 °C, em 5 % de CO₂, com exposição a radiação UVB em presença do complexo **(2)**, nas concentrações indicadas na figura.

Os histogramas do complexo dinuclear (2) indicam que há um aumento da sensibilização das células quando expostas à radiação. Sua comparação ao controle não exposto mostra um aumento expressivo de células em fase Sub-G1, isto é, que sofreram danos.

Pôde-se observar que as células expostas à radiação antes da adição do composto se sensibilizam menos do que as expostas durante a incubação com o complexo. Porém essa

diferença não se mostra tão significativa, ou dê indicação de que o complexo possa apresentar algum efeito fotoquímico. Assim, os ensaios posteriores foram realizados com exposição prévia das células à radiação UVB, seguida do tratamento com os complexos.

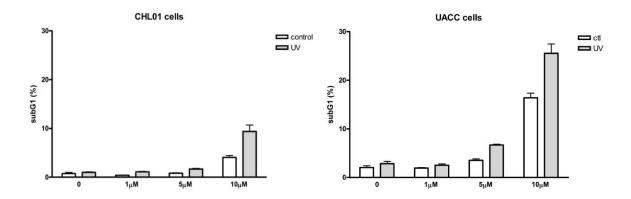


Figura 7.20. Viabilidade celular e influência da radiação UVB em linhagens humanas tumorogênicas, CHL- 01 e UACC, tratadas com o complexo dinuclear **(2)** nas concentrações indicadas na figura, durante 48 h, após exposição prévia a radiação (14,1 mJ/cm²).

Analisando os experimentos, podemos afirmar que para essas linhagens o comportamento do complexo (2) se mostra semelhante em todas elas, confirmando a suposição da sua alta reatividade. Com os resultados encontrados, verifica-se um aumento na citotoxicidade do complexo frente às linhagens de melanoma após a irradiação das células por UVB, o que correlaciona mais uma vez a melanogênese ao processo de sensibilização das linhagens celulares, para o complexo (2) dinuclear, mimético da enzima tirosinase, em comparação a seu análogo mononuclear (1).

7.7. Viabilidade Celular de Queratinócitos Humanos com Exposição Prévia e Posterior ao Tratamento com o Complexo Dinuclear (2)

No intuito de avaliar o efeito tóxico, ou seletivo do complexo (2), foram realizados ensaios de morte com células queratinócitos (linhagem HaCat não tumorogênica), que são células basais da pele, nos quais estão localizados os melanócitos (responsáveis pelos melanossomos onde ocorre a síntese de melanina) [116]. Para tanto, realizou-se os experimentos com o tratamento das células como descrito anteriormente na parte experimental.

Os ensaios foram realizados com prévia exposição à radiação UVB das células HaCat, e também com exposição das células à radiação em presença do composto.

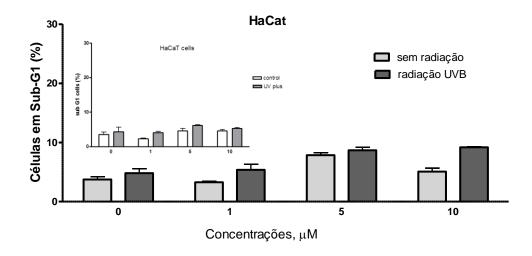


Figura 7.21. Linhagem celular de queratinócitos (HaCat) incubada com composto **(2)**, nas concentrações indicadas na figura, com exposição prévia à radiação (14,0 mJ/cm²). Na figura sobreposta: ensaio com exposição à radiação em presença do complexo. Ensaios de 48h, a 37 °C e sob atmosfera com 5% de CO₂.

Os resultados indicam que o complexo é bem menos citotóxico para a linhagem HaCat, observando-se populações em fase Sub-G1 bastante semelhantes às encontradas nos controles, mesmo expostas à radiação prévia ou na presença do complexo. Em comparação às linhagens tumorogênicas, o complexo se mostrou mais seletivo, causando mais danos nas linhagens melanomas, ou naquelas que possuem melanina.

7.8. Avaliação da Quantidade de Superóxido Produzido na Mitocôndria e Massa Mitocondrial Celular Posterior ao Tratamento com os Complexos (1) e (2)

Um dos mecanismos usuais de dano celular envolve a produção de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs) ou de nitrogênio (ERNs). Espécies radicalares são bastante nocivas às células, devido a sua alta reatividade, fazendo com que interajam com biomoléculas, danificando-as [68]. Anteriormente, verificamos que os complexos de cobre(II) possuem um centro com capacidade redox e, na presença de um ativador, são capazes de gerar radicais, o que pode explicar a citotoxicidade desses complexos frente às diferentes linhagens, bem como sua habilidade em danificar o DNA, oxidativamente. Assim, processos patológicos são iniciados e muitas vezes levam a danos irreparáveis, causando morte celular.

Através de experimentos com sondas específicas (MitoSoxRed), monitoradas por citometria de fluxo, em procedimento já descrito, pôde-se avaliar a geração de ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$) na mitocôndria. Além disso, foi feita a quantificação da massa mitocondrial utilizando a sonda MitoTrackerGreen, nas linhagens SKMEL-05 e SKMEL-147 quando tratadas com os complexos (1) e (2).

Os resultados mostraram um aumento na intensidade de produção do ânion O_2^{\bullet} , indicando que ambas as linhagens celulares sofrem estresse oxidativo quando tratadas como o complexo (2) por 24 ou 48 h, como mostrado na Figura 7.22. Deste modo, os complexos danificam as mitocôndrias.

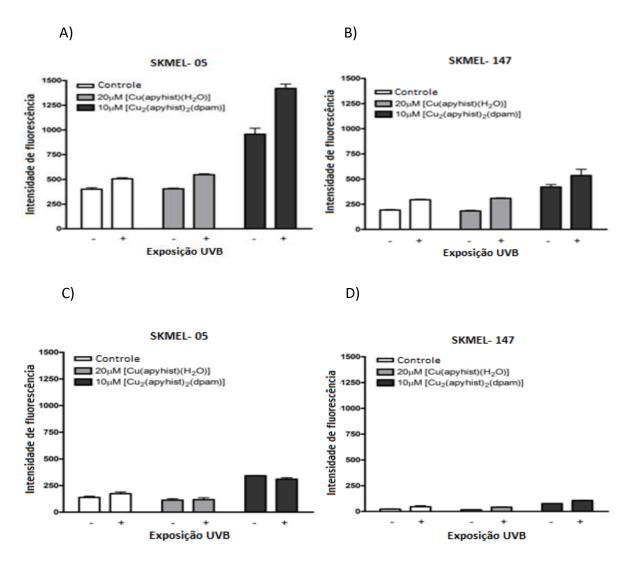


Figura 7.22. Formação de íon superóxido na mitocôndria de células SKMEL-05 e SKMEL- 147, previamente irradiadas (12,8 mJ/cm²) e tratadas com os complexos nas concentrações indicadas na figura, durante 24 h (A, B) ou 48 h (C, D). Monitoramento por medidas de fluorescência, usando MitoSoxRed como indicador.

Comparando as duas linhagens, observa-se uma geração de $O_2^{\bullet-}$ mais pronunciada para as células SKMEL-05, indicando um mecanismo oxidativo para essa espécie. Quando há adicionalmente a exposição das células à radiação (12.8mJ/cm²), ambos os complexos se tornam mais reativos na geração de $O_2^{\bullet-}$, porém o complexo (1) se mostra bem menos reativo, comparando-se ao controle, sem tratamento.

A diminuição da fluorescência observada após 48 h de tratamento, em comparação ao valor obtido no ensaio de 24 h, sugere que as células estão sofrendo danos que levam à morte celular, principalmente para o tratamento com o complexo (2).

Ensaios complementares foram realizados para monitorar a massa mitocondrial das linhagens, irradiadas ou não, e tratadas com os complexos (1) e (2), durante 24 ou 48 h, mostrados na Figura 7.23. Para esses ensaios usou-se a sonda MitoTrackerGreen, monitorada por medidas de fluorescência em citômetro de fluxo.

Analisando os resultados deste experimento, pudemos confirmar o aumento do estresse oxidativo para a linhagem SKMEL-05, pois monitorando sua massa mitocondrial, verifica-se que a mesma não se alterou significativamente em relação ao controle, nem para o tratamento de 24 h ou 48 h.

Já para a linhagem SKMEL-147 há um aumento considerável em sua massa mitocondrial, quando tratada com o complexo (2), avaliando-se o ensaio de 24 h. Neste caso, considera-se que o aumento de ânion superóxido acompanha o aumento em quantidade de mitocôndrias para essa linhagem, que parece sofrer menos danos oxidativos que a outra linhagem.

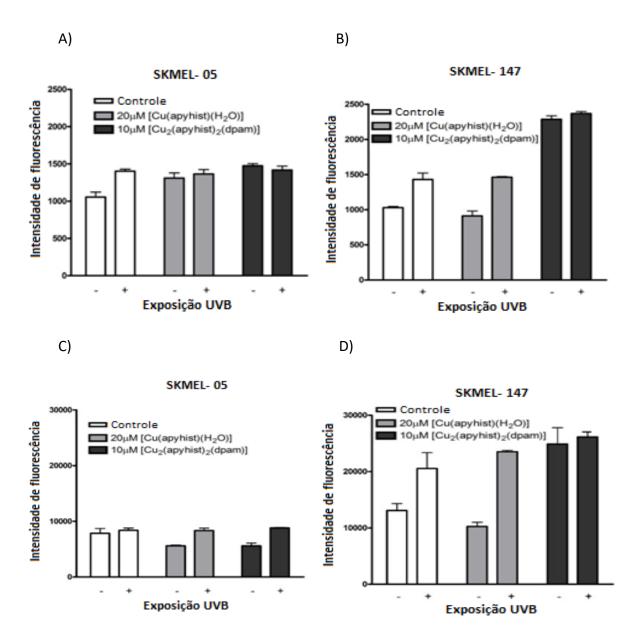


Figura 7.23. Medidas de massa mitocondrial de células SKMEL-05 e SKMEL-147, previamente irradiadas e tratadas com os complexos nas concentrações indicadas na figura, durante 24 h (A, B; 13,8 mJ/cm²) ou 48 h (C, D; 15,4 mJ/cm²). Monitoramento por medidas de fluorescência, usando MitoTrackerGreen como indicador.

7.9. Ensaios Clonogênicos: Quantificação da Fração de Sobrevivência das Células SKMEL- 05 e SKMEL-147 após Tratamento com os Complexos (1) e (2)

No intuito de verificar a fração de sobrevivência das células após tratamento com os complexos, as linhagens SKMEL-05 e SKMEL-147 foram tratadas com os complexos após exposição prévia a radiação, conforme descrito anteriormente, e submetidas ao ensaio de

clonogenicidade, no qual se verificou a capacidade de células sobreviventes ao tratamento formarem clones.

Primeiramente avaliou-se a linhagem SKMEL-05, irradiadas e tratadas com os complexos (1) e (2), em ensaios com 48 h de incubação, e sua posterior formação de clones em 10 dias, mostrado na Figura 7.24.

com exposição a radiação UVB A) sem radiação 60%±5.3 12.3%±1.5 B) SKMEL-05 C) SKMEL-05 2.0 [Cu(apyhist)(H₂O)](ClO₄)₂ **—** 0 Fração de sobrevivência Células em Sub-G1 (%) [Cu₂(apyhist)₂(dpam)](ClO₄)₄ 20μM [Cu(apyhist)(H₂O)] 10μM [Cu₂(apyhist)₂(dpam)] Exposição UVB Exposição UVB

Figura 7.24. A) Placas dos ensaios clonogênicos para as células SKMEL-05, com exposição prévia à radiação (14,1 mJ/cm²) e posterior tratamento com os complexos (1) e (2), nas concentrações de 20 μM e 10 μM, respectivamente. B) Ensaio de morte celular com tratamento de 48 h com os complexos, quantificando-se as células em fase Sub-G1. C) Fração de sobrevivência das células tratadas com os complexos, avaliada pela formação de clones.

Nestes ensaios foi observado um aumento de células em dano, quando tratadas com o complexo (2) dinuclear, durante 48 h, com exposição prévia a radiação. Ao contrário, o complexo (1) mononuclear apresentou comportamento muito similar ao controle sem tratamento.

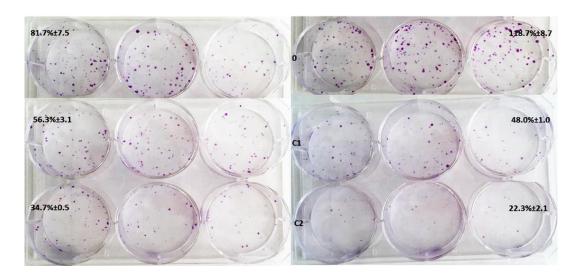
Na avaliação da fração de sobrevivência, há uma diminuição na formação de clones para as células que foram expostas a radiação, tanto para as tratados com os complexos, quanto para o controle, em comparação àquelas não expostas. No entanto, foi verificado um aumento de sobrevivência das células que foram tratadas com o complexo (1), em relação ao controle. Já nas células tratadas com o complexo (2), foi observado um decréscimo na sobrevivência das células, com valor de (29,7±3,2) % para células não irradiadas, e de (12,3±1,5) % para células que foram previamente irradiadas.

Para a linhagem SKMEL-147 foram realizados ensaios semelhantes aos realizados para a linhagem SKMEL-05, e as informações do experimento com os histogramas estão expostos na Figura 7.25. Neste ensaio, as células não parecem sofrer danos relacionados à exposição a radiação. Diferentemente da linhagem anterior, as células SKMEL-147 irradiadas apresentaram um aumento de sobrevivência, indicando que os danos sofridos apresentam maior correlação ao complexo usado do que em relação à radiação UVB.

Os resultados com as células SKMEL-147 tratadas com o complexo (2) são semelhantes aos encontrados para a linhagem SKMEL-05, com grande população de células em fase Sub-G1, para as células não irradiadas. Os danos se intensificam nas células expostas à radiação, mostrando mais uma vez este composto é muito mais reativo que seu análogo mononuclear (1). As frações em porcentagem de sobrevivência das células tratadas com o complexo (2) foram de (34,7± 0,5) %, para células não irradiadas, e de (22,3 ± 2,1) % para células que foram previamente irradiadas.

A) sem radiação

com exposição a radiação UVB



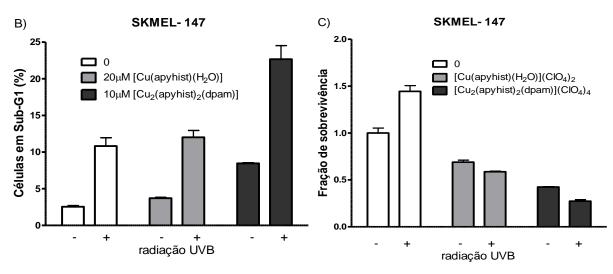


Figura 7.25. A) Placas dos ensaios clonogênicos para as células SKMEL- 147, com exposição prévia à radiação (13,9 mJ/cm²), e posterior tratamento com os complexos (1) e (2), nas concentrações de 20 μ M e 10 μ M, respectivamente. B) Ensaio de morte celular com tratamento de 48 h com os complexos, quantificando as células em Sub-G1. C) Fração de sobrevivência das células tratadas com os complexos, avaliada pela formação de clones.

7.10. Ensaios de Autofagia Induzida em Células de Melanoma SKMEL- 05 e SKMEL- 147 após Tratamento com os Complexos (1) e (2)

No estudo de compostos antitumorais, buscam-se atividades que danifiquem funções importantes na célula, que sejam capazes de fazê-la sofrer uma morte celular programada. Alguns mecanismos que podem levar à morte celular são autofagia, necrose e apoptose. Dos tipos principais de morte celular, a mais desejada é a apoptose, pois nela a célula sofre uma

série de modificações programadas, num processo em cascata, e se destrói sem liberar conteúdos inflamatórios em células adjacentes [117].

Estudos recentes indicam processos autofágicos de morte, na qual as células com dano rigoroso iniciam o processo de autofagia intenso, a autofagia considerada uma via que leva à morte programada, na qual ocorre englobamento de proteínas e organelas em vesículas, os autofagossomos, que degradam os conteúdos por proteases lisossomais [118]. Existem algumas evidências de um controle atípico da autofagia no câncer, isto é, capaz de suprimir o crescimento do tumor em estágios iniciais, promovendo, porém, seu crescimento em estágios avançados [119]. Além disso, a autofagia desempenha um papel na melanogênese, regulando a degradação do melanossomo e sua biogênese nos melanócitos [120]. Portanto, o controle da modulação da autofagia poderia ser utilizado como ferramenta terapêutica para o tratamento de cânceres em estágios avançados, como ocorre com frequência em melanomas.

Nos ensaios anteriores verificou-se a formação de vacúolos citoplasmáticos após o tratamento com os complexos, principalmente para o composto (2), mostrado nas Figuras 7.12 e 7.13. Dessa forma, foram realizados experimentos mais precisos, no intuito de verificar se as células são induzidas a autofagia com o tratamento dos compostos. Os ensaios foram realizados como descritos anteriormente na parte experimental, utilizando laranja de acridina como marcador de vacúolos acídicos, após tratamento com os complexos em células irradiadas e não irradiadas, mostrados na Figura 7.26.

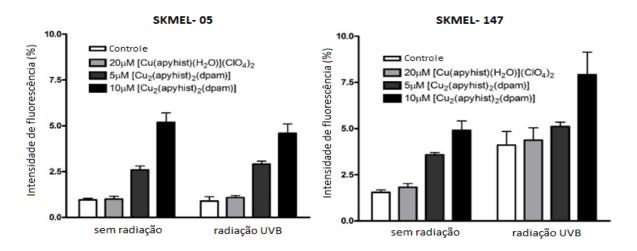


Figura 7.26. Ensaios de autofagia monitorados pela intensidade da porcentagem de fluorescência laranja, em linhagens SKMEL-05 e SKMEL-147, com e sem exposição prévia a radiação (12,9 mJ/cm²), tratadas com os complexos (1) 20 μM e (2) 5 μM e 10 μM, por 48 h.

Os resultados mostram a intensidade de fluorescência do laranja de acridina, tanto nas células não irradiadas quanto nas irradiadas com luz UVB, tanto na presença como na ausência de cada um dos complexos. Percebe-se na Figura 7.26 que para a linhagem SKMEL-05, os níveis de vacúolos citoplasmáticos detectados não se alteram significativamente, quando se comparam as células controle com aquelas em presença do complexo (1), irradiadas e não-irradiadas. Porém, houve aumento considerável de vacúolos em presença do complexo (2), com dependência da concentração. Entretanto, com ambos os complexos não ocorreu influência da luz para esta linhagem, isto é, o nível de vacúolos foi o mesmo para as células irradiadas ou não-irradiadas. Entretanto, avaliando-se a linhagem SKMEL-147, podemos observar um aumento significativo de vacúolos em presença de luz, tanto na ausência como na presença de cada um dos complexos. O efeito do tratamento com o complexo (2) na concentração de 10 µM foi bem mais marcante, com um aumento na fluorescência laranja nas células não irradiadas, e também nas células com exposição prévia à radiação UVB, enquanto a influência do complexo (1) foi desprezível, muito semelhante ao controle.

Como consequência desses ensaios, fica claro que os complexos possuem comportamentos diferenciados, mostrando que o complexo (2) dinuclear, além de ser mais reativo, parece induzir em ambas as células o processo de autofagia e, no caso da linhagem SKMEL-147, ainda ser favorecido pelo efeito da luz.

Para complementar os ensaios autofágicos, foi utilizada a cloroquina (CQN), que é um inibidor farmacológico de autofagia. Esse inibidor atua em estágios mais tardios da autofagia, após a formação da vesícula lisossomal; na forma protonada ela se difunde no lisossomo e lá se desprotona, alterando o pH do meio e inibindo assim a ação de protease ácida no lisossomo [121]. Dessa forma, os experimentos foram realizados com o tratamento dos complexos durante 24 h, com posterior tratamento com cloroquina, conforme apresentado na Figura 7.27. Assim, pode-se observar que o tratamento com a cloroquina leva a um aumento considerável de fluorescência, indicando um aumento de vacúolos acídicos para ambas as linhagens de melanoma testadas. Quando tratadas com o complexo (1) os valores são comparáveis aos controles para ambas as linhagens celulares, enquanto para o complexo (2) observa-se um aumento de fluorescência laranja, em relação ao controle, ao se avaliar a linhagem SKMEL-05. Já para a linhagem SKMEL-147 esse aumento

de vacúolos foi ainda mais pronunciado. Estes dados parecem indicar que o mecanismo de ação do complexo (1) não envolve autofagia, mas no caso do complexo (2) há evidências da ocorrência desse mecanismo de morte celular.

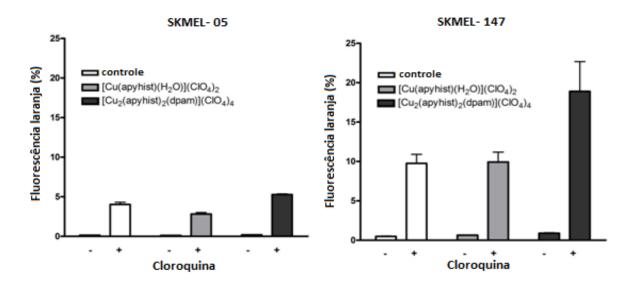


Figura 7.27. Ensaios de autofagia monitorados pela intensidade da porcentagem de fluorescência laranja, em linhagens SKMEL-05 e SKMEL-147, tratadas com os complexos (1) 20 μ M e (2) 10 μ M, durante 24 h. Células incubadas com cloroquina na concentração de 5 μ M, durante 16 h em estufa, com posterior tratamento com laranja de acridina.

Nos ensaios com exposição prévia à radiação UVB, tratamento com os complexos e posterior incubação com cloroquina, podemos observar na Figura 7.28 que o efeito do tratamento com o complexo (1), se mostra insignificante para ambas as linhagens.

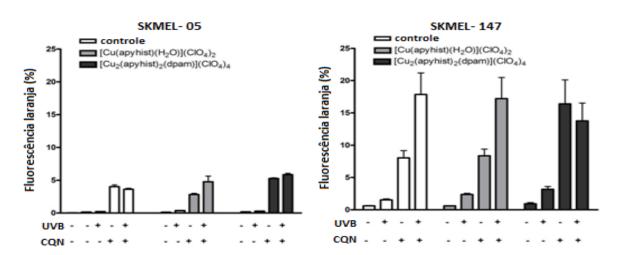


Figura 7.28. Ensaios de autofagia monitorados pela intensidade da porcentagem de fluorescência laranja, em linhagens SKMEL-05 e SKMEL-147, tratadas com os complexos **(1)** 20 μ M e **(2)** 10 μ M, durante 24 h, com exposição a radiação (12,4 mJ/cm²). Células incubadas com cloroquina na concentração de 5 μ M durante 16 h em estufa.

Porém, quando se avalia as células tratadas com o complexo (2), podemos observar que há um efeito decrescente perceptível, apresentado apenas para a linhagem SKMEL-147, no tratamento pós-radiação. Na linhagem SKMEL-05 irradiada ocorre um pequeno aumento na fluorescência laranja. Estes resultados indicam que parece estar ocorrendo um efeito inibitório da cloroquina apenas no caso do tratamento pelo complexo (2), sendo mais pronunciado nas células SKMEL-147 irradiadas.

Fotos complementares das células tratadas nesses experimentos de autofagia são exibidas nas Figuras 7.29 e 7.30, nas quais podemos observar os efeitos do tratamento dos complexos nas linhagens SKMEL-05 e SKMEL-147, respectivamente.

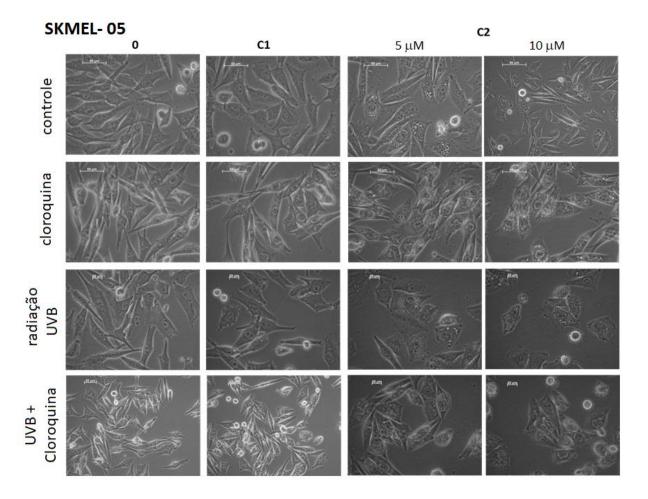


Figura 7.29. Células SKMEL- 05, tratadas com os complexos (1) 20 μM, e (2) 5μM e 10 μM, durante 24 h, expostas à radiação (12,4 mJ/cm²), incubadas posteriormente com cloroquina (5 \mathbb{Q} M), durante 16 h em estufa. Ensaios de autofagia com indicação de vacúolos citoplasmáticos por laranja de acridina.

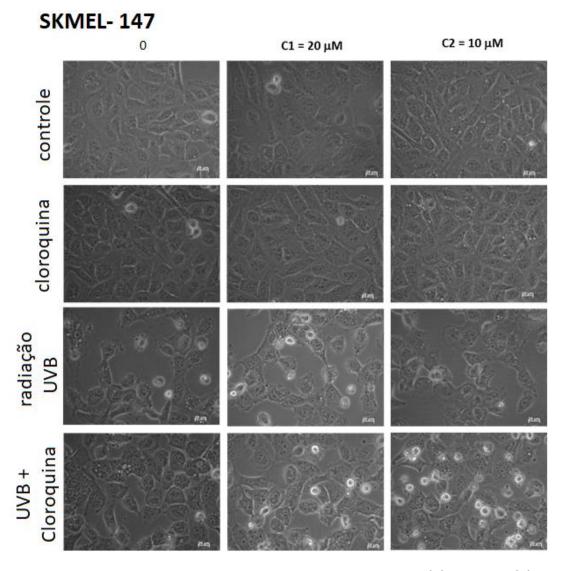


Figura 7.30. Células SKMEL- 147, tratadas com os complexos (1) 20 μM e (2) 10 μM durante 24 h, expostas à radiação (12,4 mJ/cm 2), incubadas posteriormente com cloroquina (5 μM), durante 16 h em estufa. Ensaios de autofagia com indicação de vacúolos citoplasmáticos por laranja de acridina.

7.11. Ensaios de Quantificação de Proteínas Autofágicas e Tirosinase por Western Blot

As proteínas são expressas ou suprimidas em etapas de desenvolvimento das células. Algumas são específicas para alguns processos e, neste caso, podem ser avaliadas proteínas típicas envolvidas em processos autofágicos, no intuito de elucidar mais adequadamente o mecanismo de ação dos complexos. Para isso, resolveu-se quantificar duas proteínas relacionadas à autofagia, LC3 (cadeia leve 3 da proteína 1 associada aos microtúbulos) e tubulina, além da tirosinase, relacionada ao desenvolvimento de melanomas pigmentados,

da qual os complexos dinucleares são miméticos. As proteínas foram quantificadas em ensaios após 6 h de tratamento com os complexos metálicos (1) e (2), com e sem exposição à radiação UVB (14, 3 mJ/cm²). A função da proteína LC3 está relacionada à formação de autofagossomos e sua junção aos lisossomos, que formam os autolisossomos, facilitando dessa forma a autofagia [122, 123].

Os resultados apresentados na Figura 7.31 indicam um aumento na quantidade da enzima tirosinase, observada para a linhagem SKMEL-05 sob efeito da luz, o que corrobora os ensaios anteriores, nos quais a linhagem responde com um aumento de melanina após exposição à radiação. Na linhagem SKMEL-147 a exposição à luz parece não afetar a quantificação da enzima, reproduzindo o resultado esperado, de não alterar o conteúdo de melanina com a exposição à radiação. A quantificação da proteína LC3 e da tubulina indica que elas não são significativamente influenciadas pela ação da radiação, em ambas as linhagens utilizadas.

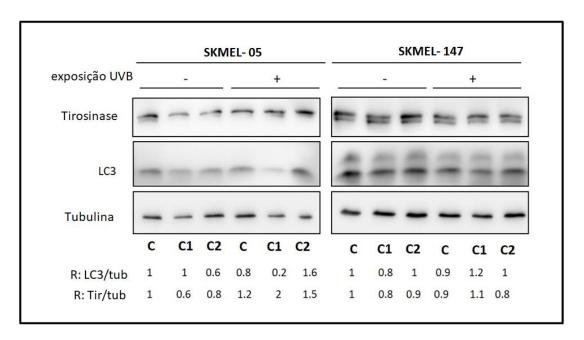


Figura 7.31. Análise da quantificação de proteínas LC3, tubulina e tirosinase por Western Blot, em células SKMEL-05 e SKMEL-147, tratadas com os complexos (1) 20 μM e (2) 10 μM, durante 6 horas, sem irradiação ou após serem irradiadas com UVB (14, 3 mJ/cm²).

Em relação à ação dos complexos (1) e (2) para a quantificação da tirosinase, podemos observar que não há grande influência para nenhuma das linhagens, nem quando as células são irradiadas. No entanto, os complexos influenciaram significativamente o nível de LC3 nas células SKMEL-05. O complexo (1) diminuiu a quantidade de proteína principalmente nas

células irradiadas, o que pode ser observado na relação [LC3]/[Tubulina] = 0,2 em comparação com o valor 0,8 encontrado no controle. Já para as quantificações das proteínas nas células tratadas com o complexo (2), verificou-se que para essa linhagem, há um aumento de proteína tanto nas células irradiadas quando nas não irradiadas, com razões de [LC3]/[Tubulina] = 0,6 para as células sem radiação e 1,6 nas irradiadas. Dessa forma, há variações na quantidade de LC3 e também na relação [Tirosinase/Tubulina] na presença dos complexos, variando de 0,6 a 2 na presença do complexo (1) (20 μM) e de 0,8 para 1,5 na presença do complexo (2) (10 μM), considerando as células não expostas e expostas à radiação, respectivamente.

Em contraste com os resultados obtidos com as células SKMEL-05, a linhagem SKMEL-147 não mostrou variações expressivas nas quantificações das proteínas LC3 e tubulina, quando tratada com ambos os complexos de cobre, apesar de gerar uma grande quantidade de vacúolos acídicos quando tratadas com o complexo (2) dinuclear.

Portanto, nos ensaios de autofagia, o aumento de vacúolos citoplasmáticos ácidos verificados nas células SKMEL-05, tratadas com o complexo (2) dinuclear, pode ser confirmado pelo efeito notável observado no aumento da quantidade de proteína LC3, indicando que o processo autofágico está operando neste caso.

8. Conclusões

Neste trabalho, foram realizadas quatro sínteses bem sucedidas de complexos de cobre(II), [Cu(bzampy)Cl]Cl (3) e [Cu(isadab]Cl]Cl·H₂O (5) mononucleares, e os análogos dinucleares correspondentes [Cu₂(ftampy)(ampy)₂](ClO₄)₄ (4) e [Cu₂(isadbz)Cl₂]Cl₂ (6). Esses complexos foram caracterizados por análise elementar de CHN e metal por ICP-OES, além de técnicas espectroscópicas (IV, EPR, UV/Vis), que juntas serviram para determinar as estruturas propostas. Esses compostos foram comparados tanto estruturalmente como em suas reatividades a dois outros, [Cu(apyhist)(H₂O)](ClO₄)₂ (1) e [Cu₂(apyhist)₂(dpam)](ClO₄)₄ (2), que já haviam sido preparados e caracterizados em estudo anterior [30].

Os compostos estudados foram avaliados em suas habilidades como miméticos funcionais da enzima tirosinase. Os complexos (3) e (4), mostraram-se miméticos funcionais, analogamente ao que já havia sido observado para os compostos (1) e (2), os compostos dinucleares apresentaram maior atividade que os correspondentes mononucleares.

Baseado nos resultados de EPR, na ausência de melanina, verificou-se a capacidade desses compostos de gerar radicais hidroxil, além de espécies metil, provenientes do uso de dimetil-sulfóxido na solubilização dos complexos. Nestes ensaios o peróxido de hidrogênio atuava como agente redutor do cobre. Através da integração dupla dos sinais nos espectros, pode-se comparar quantitativamente a extensão da geração de radicais. Os resultados indicaram que os complexos dinucleares não se apresentaram mais reativos que os correspondentes mononucleares. Seus valores mais intensos correspondem à quantidade de cobre presente nos complexos, já que nos dinucleares há o dobro de cobre em relação aos mononucleares.

Já em ensaios avaliando-se a geração de radicais na mitocôndria as duas linhagens celulares parecem gerar uma quantidade muito maior de espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido - O_2^{\bullet}) durante as primeiras 24h de tratamento com o complexo (2), com maior intensidade para a linhagem SKMEL-05, mostrando que ambas sofrem estresse oxidativo, e sofrem danos na presença do complexo.

Entretanto, devido a maior interação com a melanina (conteúdo de melanina presente nos melanomas) os compostos dinucleares foram mais eficientes em causar danos às células, através de estresse oxidativo, por serem reduzidos mais facilmente, participando

mais ativamente do ciclo catalítico, relacionando o conteúdo de melanina a sensibilização da célula a ação do complexo (2).

A atividade nuclease em DNA plasmidial dos complexos, mostrou que todos são capazes de danificar o DNA, causando o aparecimento da banda característica de clivagem simples ou dupla, em gel de agarose. Nestes ensaios, a ordem de reatividade dos complexos mostra o composto (5) como o mais reativo dentre os mononucleares, seguido dos complexos (3) e (1). Dentre os dinucleares, o mais reativo foi o composto (2) seguido do (4) e por último, com baixa reatividade, o complexo (6). Comparando-se os pares, uma atividade nuclease insignificante foi observada para o complexo (1), enquanto o complexo (2) mostrou uma reatividade muito mais acentuada, sendo capaz de clivar duplamente as fitas do DNA, em função da concentração e do tempo de tratamento. Entretanto, no caso do par (5) e (6), o composto mono- foi mais reativo que o análogo dinuclear. Isto pode ser explicado pela baixa solubilidade do composto (6).

Os ensaios de citotoxicidade avaliados por MTT indicaram que os complexos (2) e (4) foram muito reativos, já o complexo (3) teve uma citotoxicidade menor. O complexo (1) apresentou citotoxicidade pouco significativa, seguida daquela apresentada pelos complexos (5) e (6) que, frente às linhagens melanoma, pareceram não ter efeito tóxico, possivelmente devido à baixa solubilidade destes complexos, mesmo sendo capazes de gerar danos ao DNA. Esses resultados possibilitaram o prosseguimento de estudos de viabilidade e ensaios de morte para os complexos (2) e (4) dinucleares, nitidamente mais reativos do que seus análogos mononucleares que, entretanto, também foram analisados para efeito de comparação.

Ensaios de morte celular, avaliada pela incorporação de iodeto de propídio, mostraram a porcentagem de células em fase Sub-G1 (em dano). Em teste comparativo com cisplatina e o complexo (2), pode-se verificar que o complexo provoca um aumento na porcentagem de células em Sub-G1 maior em relação a cisplatina na linhagem SKMEL-05. Entretanto, observou-se que ele apresentou reatividade relativamente menor do que a cisplatina na linhagem SKMEL-147. Esses resultados indicam que o complexo (2) pode ser bastante promissor como agente antitumoral.

O efeito da irradiação com luz UVB provocou um aumento considerável na porcentagem de células em fase Sub-G1, apenas com o complexo (2), para todas as linhagens testadas, especialmente para SKMEL-05 e SKMEL-147. Ao contrário, a luz não alterou a reatividade do complexo (1) mononuclear. Os complexos (3) e (4) não mostraram aumento significativo de suas citotoxicidades sob influência da luz, porém parecem danificar a membrana das células, explicando a baixa viabilidade das células observada no ensaio de MTT. Estes complexos provavelmente atuam preferencialmente por mecanismo oxidativo, através de etapas monoeletrônicas, com geração de EROs.

Estes dados parecem indicar que o mecanismo de ação do complexo dinuclear (2), é diferente daquele dos complexos análogos mononucleares. Isto pode ser indicativo de um mecanismo envolvendo transferências dieletrônicas, como nas enzimas tirosinases, requisitando os dois íons de cobre numa reação concertada, em vez de transferências monoeletrônicas, como em compostos mononucleares.

Uma possível explicação para as diferenças observadas entre os compostos dinucleares, é também devida a um fator estrutural. O complexo (2) possui uma distância menor entre os centros de cobre, dada a flexibilidade do ligante ponte, *dpam*. Já para os complexos (4) e (6) uma maior aproximação entre os íons de cobre parece mais difícil, ou mesmo impossível. Este fato provoca um efeito diferenciado nas suas reatividades frente às linhagens de melanoma.

O potencial de proliferação ou formação de clones das células sobreviventes ao tratamento indicaram pouca sobrevivência das células, notadamente após tratamento com o complexo (2).

Baseado nos resultados, as duas linhagens parecem gerar uma quantidade muito maior de espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido - O_2^{\bullet}) na mitocôndria, durante as primeiras 24h de tratamento com o complexo (2). Observou-se maior efeito para a linhagem SKMEL-05, embora ambas as linhagens sofram estresse oxidativo e danos na presença desse complexo.

Testes de autofagia mostraram que esta é também uma possível via de morte celular para a ação citotóxica do composto (2), principalmente para a linhagem SKMEL-147, evidenciado pelo aumento acentuado na porcentagem de vacúolos formados. Ensaios

complementares de quantificação de proteínas específicas associadas ao processo autofágico (LC3) mostraram um processo autofágico mais proeminente para a linhagem SKMEL-05 quando tratada com o complexo (2), em presença de luz. Para a linhagem SKMEL-147 não se observaram alterações significativas no conteúdo dessas proteínas.

O efeito citotóxico dos compostos (1) e (2) frente a uma linhagem não tumorogênica, os queratinócitos (HaCat), também foi avaliado em termos de células em fase Sub-G1 e mostrou-se insignificante. Assim, os complexos não provocam danos mensuráveis nesta linhagem em ensaio semelhante ao dos melanomas, mostrando certa seletividade para células tumorais pigmentadas.

A reatividade apresentada pelo complexo (2), frente ao DNA, nas linhagens celulares testadas (com gene B-Raf mutado e não mutado) e aos queratinócitos, o classificam como tendo um alto potencial antitumoral, sendo bastante promissor como possível agente terapêutico no tratamento de melanomas pigmentados.

9. Referências

1. A.M. Da Costa Ferreira, H.E. Toma, J. Coord. Chem. 18 (1998) 351-356.

- 2. M.L.P. dos Santos, A. Faljoni-Alário, A.S. Mangrich, A.M. Da Costa Ferreira, *J. Inorg. Biochem.* 71 (1998) 71-78.
- 3. M.A. Bizeto, W.A. Alves, C.A.S. Barbosa, A.M. Da Costa Ferreira, V.R.L. Constantino, *Inorg. Chem.* 45 (2006) 6214-6221.
- 4. S. A. Almeida Filho, *Processos oxidativos com hidroperóxidos, persulfatos ou perácidos, catalisados por espécies de cobre e de ferro com potencial aplicação em química ambiental,* Tese de Doutorado, Junho/2015. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brasil.
- 5. W.A. Alves, I.A. Bagatin, A.M. Da Costa Ferreira, Inorg. Chim. Acta 321 (2001) 11-21.
- 6. W.A. Alves, S.A. de Almeida-Filho, M.V. de Almeida, A. Paduan-Filho. C.C. Becerra, A.M. Da Costa Ferreira, *J. Mol. Catal. A:Chem.* 198 (2003) 63-75.
- 7. M.L.P. Santos, I.A. Bagatin, E.M. Pereira, A.M. Da Costa Ferreira, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2001) 838-844.
- 8. C. DallaCosta, W. A. Alves, A.M. Da Costa Ferreira, E. Monzani, L. Casella, *J. Chem. Soc. Dalton Trans*. (2007) 2197-2206.
- 9. G. Cerchiaro, K. Aquilano, G. Filomeni, G. Rotilio, M.R. Ciriolo, A.M. Da Costa Ferreira, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 1433–1440.
- 10. G. Filomeni , G. Cerchiaro, A.M. Da Costa Ferreira, A. De Martino, J. Z. Pedersen, G. Rotilio, M. R. Ciriolo, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 12010-12021.
- 11. P. P. Silva, W. Guerra, J. N. Silveira, A.M. Da Costa Ferreira, T. Bortolotto, F. L. Fischer, H. Terenzi, A. Neves, E. C. Pereira-Maia, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 6414-6424.
- 12. V. C. da Silveira, H. Benezra, J. S. Luz, R. C. Georg, C. C. Oliveira, A.M. Da Costa Ferreira, J. *Inorg. Biochem.* 105 (2011) 1692–1703.
- 13. E. E. Aranda, T. A. Matias, K.Araki, A. P. Vieira, E.A. de Mattos, P. Colepicolo, C.P. Luz, F. L. N. Marques, A.M. Da Costa Ferreira, *J. Inorg. Biochem.* 165 (2016) 108-118.
- 14. R. B. Fazzi, R. D. Freitas Sá, A.M. Da Costa Ferreira, manuscrito em preparação.
- 15. http://www.who.int/cancer/en/ acessado em Agosto/2018.
- 16. N. P. E. Barry, P.J. Sadler, Chem. Commun. 49 (2013) 5106-5131.
- 17. E. Alessio, Eur. J. Inorg. Chem. (2017) 1549–1560.
- 18. J-X. Liang, H.-J. Zhong, G. Yang, K. Vellaisamy, D.-L. Ma, C.-H Leung, *J. Inorg. Biochem* (2017) in press, http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.06.002.
- 19. C. P. Tan, Y.Y. Lu, L.N. Ji, Z.W. Mao, *Metallomics* 6 (2014) 978-95.
- 20. G. Housman, S. Byler, S. Heerboth, K. Lapinska, M. Longacre, N. Snyder, S. Sarkar, *Cancers* 2014, 6 (2014) 1769-1792.
- 21. C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano, Chem. Rev. 114 (2014) 815-862.
- 22. M. Wehbe, A. W. Y. Leung, M. J. Abrams, C. Orvig, M. B. Bally, *Dalton Trans*. 46 (2017) 10758-10773.

- 23. V. Desai, S. G. Kaler, Am. J. Clin. Nutri. (2008) 855S-8558S.
- 24. G. Crisponi, V. M. Nurchi D. Fanni, C. Gerosa, S. Nemolato, G. Faa, *Coordination Chemistry Reviews*. 254 (2010) 876-889.
- 25. T. D. Rae, P. J. Schmidt, R. A. Pufahl, V. C. Culotta, T. V. O'Halloran, Science. 284 (1999) 805-808.
- 26. R. H. Holm, P. Kennepohl e E. I. Solomon, Chem, Rev. 96 (1996) 2239-2314.
- 27. G. Rotilio, M. T. Carrí, L. Rossi, M. R. Ciriolo, *IUBMB Life 50* (2000) 309-314; b) M. E. Letelier, A. M. Lepe, M. Fáundez, J. Salazar, R. Marín, P. Aracena, H. Speisky, *Chem. Biol. Interact.* 151 (2005) 71-82.
- 28. G. Cerchiaro, A.M. Da Costa Ferreira, J. Braz. Chem. Soc. 17 (2006) 1473-1485.
- 29. M. Hornsveld, T. B. Dansen, *Antioxid. Redox Signal*. 25 (2016) 300–325.
- 30. C. J. Nunes, B. E. Borges, L. S. Nakao, E. Peyroux, R. Hardré, B. Faure, M. Réglier, M. Giorgi, M. B. Prieto, C. C. Oliveira, A.M. Da Costa Ferreira, *J. Inorg. Biochem.* 149 (2015) 49-58.
- 31. R. J. Sullivan, M. B. Atkins, Expert Rev. Anticancer Ther. 9 (2009) 567-81.
- 32. A. N. Houghton, D. Polsky, Cancer Cell. 2 (2002) 275-278.
- 33. M. Rastrelli, S. Tropea, C. R. Rossi, M. Alaibac, In Vivo. 28 (2014) 1005-1012.
- 34. Z. Ali, N. Yousaf, j. Larkin, EJC. Supplements. 11 (2013) 81-91.
- 35. S. Kuphal, A. Bosserhoff, J. Pathol. 219 (2009) 400-409.
- 36. G. A. de Souza, L. M. Godoy, V. R. Teixeira, A. H. Otake, A. Sabino A, J. C. Rosa, A. R. Dinarte, D. G. Pinheiro, W. A. Silva Jr, M. N. Eberlin, R. Chammas, *Proteomics*. 6 (2006)1460-70.
- 37. http://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer.html acessado em 24/maio/18
- 38. http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma acessado em 25/maio/18.
- 39. L. Zhao, J.-C. Kim, M. -J. Paik, W. Lee, J.-S. Hur, Molecules. 26:22(1) (2017) 1-14.
- 40. A. N. Houghton, D. Polsky, Cancer Cell. 2 (2002) 275-278.
- 41. A. A. Suzukawa, A. Vieira, S. M. B. Winnischofer, A. C. Scalfo, P. Di Mascio, A.M. D. C. Ferreira, J.-L. Ravanat, D. L. Martins, M. E. M. Rocha, G. R. Martinez, *Free Rad. Biol. Med.* 52 (2012) 1945-1953.
- 42. E. I. Solomon, D. E. Heppner, E. M. Johnston, J. W. Ginsbach, J. Cirera, M. Qayyum, M. T. Kieber-Emmons, C. H. Kjaergaard, R. G. Hadt, L. Tian, *Chem. Rev.* 114 (2014) 3659-3853.
- 43. M. Kanteev, M. Goldfeder, A. Fishman, Protein Sci. 24 (2015) 1360-1369.
- 44. A. Sanchez-Ferrer, J. N. Rodriguez-Lopez, F. Garcia-Canovas, F. Garcia-Carmona, *Biochim Biophys Acta*. 22 (1995) 1–11.
- 45. C. A. Ramsden, P. A. Riley, Bioorg. Med. Chem. 22 (2014) 2388-2395.
- 46. A. J. Vargas, S. Sittadjody, T. Thangasamy, E. E. Mendoza, K. H. Limesand, R. Burd, *Integr. Cancer. Ther.* 10(4) (2011) 328-340.
- 47 . Y. M. Chen, W. Chvin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145(2) (1974) 695-698.
- 48. E. Buitrago, R. Hardré, R. Haudecoeur, H. Jamet, C. Belle, A. Boumendjel, L. Bubacco, M. Réglier, *Curr. Top. Med. Chem.* 16 (2016) 3033-3047.

- 49. S. Jawaid, T. H. Khan, H. M. I. Osborn, N. A. O. Williams, *Anti-Cancer Ag. Med. Chem. 9 (2009)* 717-727.
- 50. A. T. Slominski, B. Zbytek, R. Slominski, Int J Cancer. 124 (2009) 1470-1477.
- 51. K. Naliwaiko, A.C. Luvizon, L. Donatti, R. Chammas, A. F. Mercadante, S. M. Zanata, L.S. Nakao, *Chem. Biol. Interact.* 173 (2008) 122-128.
- 52. W. Li, D.W. Melton, Oncogene. 31 (2012) 2412-2422.
- 53. A. Testori, P. Rutkowski, J. Marsden, L. Bastholt, V. Chiarion-Sileni, A. Hauschild, A.M.A. Eggermont, *Ann Oncol*, 2009, 20, vi22-vi29.
- 54. J. Green, C. Ariyan, Surg. Oncol. Clin. N. Am. 24 (2015) 337-346.
- 55 . L. Chin, L. A. Garraway, D.E. Fisher, Genes Dev. 20 (2006) 2149-2182.
- 56. S. J. Moschos, R. Pinnamaneni, Surg. Oncol. Clin. N. Am. 24 (2015) 347–358.
- 57. J. McCain, *Pharmacy and Therapeutics*. 38(2) (2013) 96-98, 105-108.
- 58. P. Bhatia, P. Friedlander, E. A. Zakaria, E. Kandil, Ann Transl Med. 24; 3(2) (2015) 1-7.
- 59. A. Irelande, M. Millward, R. Pearce, M. Lee, M. Ziman, Clin Exp Metastasis. 28 (2011) 327-336.
- 60. A. Roesch, Oncogene. 34 (2015) 2951-2957.
- 61 . B. E. Borges, V. R. Teixeira, M. H. Appel, C. A. Steclan, F. Rigo, F. Filipak Neto, A.M. Da Costa Ferreira, R. Chammas, L. S. Nakao, *Chem. Biol. Interact*. 206 (2013) 37-46.
- 62. K. Jimbow, T. Iwashina, F. Alena, K. Yamada, J. Pankovich, T. Uemura, *J.Invest. Dermatol.* 100 (1993) S231-S238.
- 63. P. J. Farmer, S. Gidanian, B. Shahandeh, A. J. Di Bilio, N. Tohidian, F. L. Meyskens Jr., *Pigment Cell Res.* 16 (2003) 273-279.
- 64. S. Orrenius, C. S. I. Nobel, D. J. Bandendobbelsteen, M. J. Burkit, A. F. G. Slater, *Biochem. Soc. Trans.* 24 (1996) 1032-1038.
- 65. W. Earl, C. Weber, G.K. Hansson, Am. J. Phys. Cell Phys. 278 (2000) C1116-C1125.
- 66. C. S. I. Nobel, M. Kimland, B. Lind, S. Orrenius, A. F. G. Slater, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 26202-26208.
- 67. F. L. Meyskens, S. E. MacNulty, J. A. Buckmeier, N. B. Tohidian, T. J. Spillane, R. S. Kahlon, R. I. Gonzalez, *Free Rad. Biol. Med.* 31 (2001) 799-808.
- 68. A. A. Suzukawa, A. Vieira, S. M. B. Winnischofer, A. C. Scalfo, P. Di Mascio, A.M. Da Costa Ferreira, J.-L. Ravanat, D. de L. Martins, M. E. M. Rocha, G. R. Martinez, *Free Rad. Biol. Med.* 52 (2012) 1945-1953.
- 69. J. D. Nosanchuk, A. Casadevall, Antimicrob. Agents Chemother. 50, 11 (2006) 3519-3528.
- 70. S. Premi, S. Wallisch, C. M. Mano, A. B. Weiner, A. Bacchiocchi, K. Wakamatsu, E. J. H. Bechara, R. Halaban, T. Douki, D. E. Brash, *Science*. 347, 6224 (2015) 842-847.
- 71. K. Suntharalingam, D.J. Hunt, A. A. Duarte, A. J. P. White, D. J. Mann, R. Vilar, *Chem. Eur. J.* 18 (2012) 15133 15141
- 72. Y. Chen, H. Song, J. Mao, M. Liu, C. Ding, Z. Pan, Design and synthesis of two macrocyclic dinuclear copper(II) complexes with reversible binding of nitric oxide, *Inorg. Chem. Commun.* 27 (2013) 131–137.

- 73. A. Kellett et al., Med. Chem. Commun. 7 (2011) 579-584.
- 74. F. Arjmand, M. Muddassir, Y. Zaidi, D. Ray, Med. Chem. Commun. 4 (2013) 394-405.
- 75. M. Malon, Z. Travnicek, M. Marysko, J. Marek, K. Dolezal, J. Rolcík, M. Strnad, *Transit. Met. Chem.* 27 (2002) 580-586.
- 76. M. Collins, D. Ewing, G. Mackenzie, E. Sinn, U. Sandbhor, S. Padhye, S. Padhye, *Inorg. Chem. Comm.* 3 (2000) 453-457.
- 77. U. Sandbhor, P. Kulkarni, S. Padhye, G. Kundu, G. Mackenzie, R. Pritchard, *Biorg. Med. Chem.* 14 (2004) 2877-2882.
- 78. E. Budzisz, I.-P. Lorenz, P. Mayer, P. Paneth, L. Szatkowski, U. Krajewska, M. Rozalski, M. Miernicka, *New J. Chem.* 32 (2008) 2238-2244.
- 79. E. Budzisz, M. Miernicka, I.-P. Lorenz, P. Mayer, U. Krajewska, M. Rozalski, *Polyhedron*. 28 (2009) 637-645.
- 80. N. Graf, S. J. Lippard, Adv. Drug Deliv. Rev. 64 (2012) 993-1004.
- 81. P. Katkar, A. Coletta, S. Castelli, G. L. Sabino, R. A. Alves Couto, A.M. Da Costa Ferreira, A. Desideri, *Metallomics*, **6 (2014) 117-125.**
- 82. S. Castelli, M.B. Gonçalves, P. Katkar, G.C. Stuchi, R.A.A. Couto, H.M. Petrilli, A.M. D. C. Ferreira, *J. Inorg. Biochem*. (2018), in press.
- 83. R. B. Miguel, P. A. D. Petersen, N. Kumar, F. A. Gonzales-Zubiate, C. C. de Oliveira, R. R. do Nascimento, H. M. Petrilli, A.M. D. C. Ferreira, *J. Biol. Inorg. Chem.* 20 (2015) 1205-1217.
- 84. V. Gandim, F, Tisato, A. Dolmella, M. Pellei, C. Santini, M. Giorgetti, C. Marzano, M. Porchia, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 4745–4760.
- 85. J. Qi, S. Liang, Y. Gou, Z. Zhang, Z. Zhou, F. Yang, H. Liang, Eur. J. Med. Chem. 96 (2015) 360-368.
- 86. D. Desbouis, I. P. Troitsky, M. J. Belousoff, L. Spiccia, B. Graham, *Coord. Chem. Rev.* 256 (2012) 897-937.
- 87. D. Montagner, V. Gandin, C. Marzano, A. Erxleben, J. Inorg. Biochem. 145 (2015) 101–107.
- 88. A. G. Majouga, M. I. Zvereva, M. P. Rubtsova, D. A. Skvortsov, A. V. Mironov, D. M. Azhibek, O. O. Krasnovskaya, V. M. Gerasimov, A. V. Udina, N. I. Vorozhtsov, E. K. Beloglazkina, L. Agron, L. V. Mikhina, A. V. Tretyakova, N. V. Zyk, N. S. Zefirov, A. V. Kabanov, O. A. Dontsova, *J. Med. Chem.* **57** (2014) 6252-6258.
- 89. T. Jany, A. Moreth, C. Gruschka, A. Sischka, A. Spiering, M. Dieding, Y. Wang, S. H. Samo, A. Stammler, H. Bögge, G. F. von Mollard, D. Anselmetti, T. Glaser, *Inorg. Chem.* 54 (2015) 2679-2690.
- 90. F. Radogna, M. Dicato, M. Diederich, Biochem. Pharmacol. 94 (2015) 1-11.
- 91. P. Boya, P. Codogno, Tocris Bioscience Scientifc Review Series, (2012) 1-12.
- 92. Xie, S. Nguyen, W. L. Mckeehan, L. Liu, BCM Cell Biology. 11;89 (2010) 1-12.
- 93. <u>S. S</u>hen, O. <u>Kepp,</u> G. <u>Kroemer</u>, *Autophagy*. 8(1) (2012) 1-3.
- 94 . C. J. Nunes, *Investigação da reatividade de miméticos da tirosinase na viabilidade celular de melanomas*. Dissertação de Mestrado, 2013, Instituto de Química, USP, SP, Brasil.

- 95. P. Mukherjee, M. G. B. Drew, A. Ghosh, Anion-Directed Template Synthesis and Hydrolysis of Mono-Condensed Schiff Base of 1,3-Pentanediamine and *o*-Hydroxyacetophenone in NiII and Cull Complexes, *Eur. J. Inorg. Chem.* 21 (2008) 3372-3381.
- 96. I. Iakovidis, I. Delimaris, S. M. Piperakis, Mol. Biol. Intern. (2011) 1-13.
- 97. Z. Li, H. Yan, G. Chang, M. Hong, J. Dou, M. Niu, J. Photochem. Photobiol. B. 163 (2016) 403-412.
- 98 . G.-K. Wang, Q.L. Mi, L.Y. Zhao, J.J. Hu, L.E. Guo, X.J. Zou, B. Liu, X.G. Xie, J.F. Zhang, Q.H. Zhao, Y. Zhou, *Chem. Asian J.* 9 (2014) 744–748.
- 99. M. E. Reichmann, S. A. Rice, C. A. Thomas, P. Doty. J. Am. Chem. Soc. 76 (1954) 3047-3053.
- 100. C. S. Novais, *Caracterização estrutural por difração de raios x e estudo de atividade citotóxica de complexos de platina*. Dissertação de Mestrado, 2009, Instituto de Química, UFU, MG, Brasil.
- 101. A. H. Otake, Papel de dissialogangliosídios na proliferação e morte celular induzida de melanócitos e melanomas in vitro, Tese de Doutorado, 2005, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
- 102. N. I. Leaves, J. Z. Jordens, Short Protocols in Molecular Biology, F. Ausube et al (eds.), 3th edition, (1995) Wiley and Sons, Chichester.
- 103. M. S. Eller, K. Ostrom, B. A. Gilchrest, Proc. Natl. Acad. Sci. 93 (1996) 1087-1092.
- 104. D.-N. Hu, Photochem. *Photobiol.* 84 (2008) 645-649.
- 105. B. M. Polster, D. G. Nicholls, S. X. Ge, B. A. Relofs, *Methods Enzymol.* 547 (2014) 225-250.
- 106. P. Mukhopadhyaya, M. Rajesha, K. Yoshihirob, G. Haskóc, P. Pachera, *Biochem Biophys Res Commun*. 22; 348(1) (2007) 203-208.
- 107. N. A. P. Franken, H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, C, van Bree, *Nature Protocol*. 1 (2006) 2315-2319.
- 108. G. Triola, Autophagy: Assays and Small-Molecule Modulators, In: Concepts and Case Studies in Chemical Biology, H. Waldmann, P. Janning (eds.), First Edition, (2014), Wiley-VCH Verlag.
- 109. F. Benetollo, P Di Bernardo, P., Tamburini, S., Vigato, P. a. & Zanonato, P. Mononuclear and polynuclear complexes with a side-off compartmental Schiff base. *Inorg. Chem. Commun.* 11 (2008) 246–251.
- 110. J. Muller, K. Felix, C. Maichle, E. Langfelder, J. Strachle, F. U. Weser, *Inorg. Chim. Acta* 233 (1995) 11.
- 111. U. Sakaguchi, A. W. Addison, J.C. Dalton, (1979) 800-608.
- 112. D. F Shriver, P.W. Atkins, *Química Inorgânica*, (2003), Bookman, 816p.

- 113. M. Tumer, H. Koksal, S. Serin, Synth. React. Inorg. Met. Org. Chem. 27(5) (1997) 775-786.
- 114. M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 124 (2013) 1-19.
- 115. P. U. Maheswari, K. Lappalainen, M. Sfregola, S, Barends, P. Gamez, U. Turpeinen, I.Mutikainen, G. P. van Wezel, J. Reedijk, *Dalton Trans*. 33 (2007) 3676-3683.
- 116 . I. F. D. S. Videira, D. F. L. Moura, S. Magina, An Bras Dermatol. 88(1) (2013) 76-83.
- 117. F. Radogna, M. Dicato, M. Diederich, Biochem. Pharmacol. 94 (2015) 1-11.
- 118. V. Nikoletopoulou, M. Markaki, K. Palikaras, N. Tavernarakis, *Biochim. Biophys. Acta* 1833 (2013) 3448–3459.
- 119. M. Corazzari, G. M. Fimia, P. Lovat, M. Piacentini, Seminars Cancer Biol. 23 (2013) 337–343.
- 120. W.J. Yun, E.-Y. Kim, J.-E. Park, S.Y. Jo, S.H. Bang, E.-J. Chang, S. E. Chang, Sci. Rep 6 (2016) 19914; DOI: 10.1038/srep19914
- 121. M. Redmann, G. A. Benavides, T. F. Berryhill, W. Y. Wani, X. Ouyang, M. S. Johnson, S. Ravi, S. Barnes, V. M. Darley-Usmar, J. Zhang, *Redox Biol*. 11 (2017) 73-81.
- 122. I. Tanida, T. Ueno, E. Kominami, *Methods Mol. Biol.* 445 (2008) 77-88.
- 123. E. Shvets, Z. Elazar, Methods Enzymol. 452 (2009) 131-141.

Súmula Curricular

<u>Dados pessoais</u>:

Cléia Justino Nunes, nascida em 23 de Julho de 1984, na cidade de São Paulo, capital.

Possui graduação em Bacharelado e Licenciatura pelo Centro Universitário FIEO -Fundação Instituto de Ensino para Osasco (2008). Mestrado em Ciências (Química Inorgânica-subárea Química Bioinorgânica) em 2013 pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo e atualmente é doutoranda pela mesma instituição.

Formação:

Graduação em Química Bacharelado e Licenciatura. (2008)

Centro Universitário FIEO - Fundação Instituto de Ensino para Osasco, Brasil.

Mestrado em Ciências no Programa de Química.

Instituto de Química da USP, Brasil.

Título: Investigação da reatividade de miméticos de tirosinase na viabilidade celular de melanomas. Ano de obtenção 2013.

Orientadora: Ana Maria da Costa Ferreira

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Doutorado em andamento no Programa de Química.

Instituto de Química da USP, Brasil.

Título: Avaliação da potencialidade e dos mecanismos de ação de complexos dinucleares de cobre como agentes terapêuticos antitumorais.

Orientadora: Ana Maria da Costa Ferreira

Bolsista do: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Publicações:

- 1. C. J. Nunes, B. E. Borges, L. S. Nakao, E. Peyroux, R. Hardré, B. Faure, M. Réglier, M. Giorgi, M. B. Pietro, C. C. Oliveira, A.M. Da Costa Ferreira, Reactivity of dinuclear copper (II) complexes towards melanoma cells: Correlation with its stability, tyrosinase mimicking and nuclease activity, *J. Inorg. Biochem.* 149 (2015) 49-58.
- 2. C. J. Nunes, A.H. Otake, S. Bustos, R.B. Fazzi, C.C. Oliveira, R. Chammas, A.M. Da Costa Ferreira, Toxicity of dinuclear imine-copper(II) complexes toward melanomas: melanogenesis and structural features influence, *manuscrito em preparação*.