UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

SANDRA CRISTEL QUISPE MARTINEZ

ESTUDO DE UM METALOFÁRMACO DE DIRUTÊNIO(II,III) CONTENDO O ENANTIÔMERO (S)-IBUPROFENO E SUA INTERAÇÃO COM ALVOS BIOLÓGICOS

Versão corrigida da Dissertação/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: 25/07/2019

SANDRA CRISTEL QUISPE MARTÍNEZ

ESTUDO DE UM METALOFÁRMACO DE DIRUTÊNIO(II,III) CONTENDO O ENANTIÔMERO (S)-IBUPROFENO E SUA INTERAÇÃO COM ALVOS BIOLÓGICOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Química)

Orientadora: Profa. Dra. Denise de Oliveira Silva

São Paulo

2019

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

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

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

Quispe Martínez, Sandra Cristel

Q7e

Estudo de um metalofármaco de dirutênio (II, III) contendo o enantiômero (S)-ibuprofeno e sua interação com alvos biológicos. / Sandra Cristel Quispe Martínez. -- São Paulo, 2019. 88p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental. Orientadora: de Oliveira Silva, Denise

 Química bioinorgânica I. T. II. de Oliveira Silva, Denise, orientadora.

546.3 CDD

Para mi madre y hermano quienes siempre estuvieron tras bambalinas sin importar nada.

AGRADECIMENTOS

Começarei agradecendo a Deus pela oportunidade de estar aqui, e quantas coisas que aprendi não só profissionais, sobretudo de superação pessoal. Nas pessoas maravilhosas que achei neste caminho, e das quais não só sinto admiração, mas também uma imensa gratidão por tudo o que me ensinaram direta e indiretamente. Minha família que foi o motor em tudo o meu caminho.

Obrigada Profa. Dra. Denise de Oliveira Silva, pela oportunidade de trabalhar no seu grupo de pesquisa e por acreditar neste trabalho.

A minhas parceiras de laboratório: Julie, Samara, Barbara, que foram exemplo de persistência nos projeto de vida. A meus parceiros de laboratório: Marcus, Antonio, Luis, Jefferson, pelo apoio e amizade.

As amizades do CRUSP, que deram toda uma nova perspectiva de vida em coletivo e humanidade: Carolina, Raiza e Tatyane.

Aos mestres Vanessa, Daniel, ao doutor John, muito obrigada pela amizade e ajuda em diversas ocasiões.

Aos funcionários da central analítica, em especial ao Marcio, obrigada pelo trabalho realizado, confiança e amizade.

Aos técnicos de nosso laboratório, Maria Aparecida Paiva Lopes e Armando Henrique dos Santos por toda a colaboração.

Ao pessoal administrativo do Instituto de Química por estarem sempre dispostos a colaborar.

A Conselho nacional de desenvolvimento cientifico e tecnológico (CNPQ) pela bolsa de Mestrado (CNPQ PROEX processo 33002010191P0), e a Fundação de Amparo e Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento de pesquisa do nosso grupo.

"Como seres humanos, todos queremos ser felizes e livres da miséria, todos aprendemos que a chave para a felicidade é a paz interior"

Dalai Lama

RESUMO

Quispe, S. C. M. Estudo de um metalofármaco de dirutênio(II,III) contendo o enantiômero (S)-ibuprofeno e sua interação com alvos biológicos 2019. (ex: 88p).
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Compostos inorgânicos de rutênio têm demonstrado serem bons candidatos para a terapia contra o câncer. O nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido metalofármacos de dirutênio(II,III) de valência mista contendo como ligantes fármacos anti-inflamatórios não esteroides, os quais tem se mostrado promissores para tratamento de gliomas humanos. Visando a um melhor entendimento do modo de ação desses compostos, nesse trabalho foram realizados estudos de comparação do complexo de dirutênio(II,III)ibuprofeno contendo o ligante Ibp racêmico, [Ru₂(Ibp-Rac)₄Cl], com o seu análogo inédito contendo o isômero lpb-S, [Ru₂(lbp-S)₄Cl]. As interações desses dois compostos com biomoléculas alvo importantes (albumina de soro humano, HSA, e CT-DNA) foram investigadas. Foram também realizados estudos de comparação dos efeitos desses compostos sobre a viabilidade celular e a migração celular em células de glioma humano da linhagem U87MG in vitro. O complexo [Ru2(lbp-Rac)4Cl], foi re-preparado por metodologia conhecida do grupo e o complexo inédito [Ru₂(lbp-S)₄Cl] foi sintetizado nesse trabalho pela primeira vez. Ambos foram totalmente caracterizados por meio de diversas técnicas. Os estudos com albumina de soro humano e CT-DNA foram efetuados utilizando-se espectroscopia de absorção eletrônica no UV-Visível, espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular e investigação de desnaturalização. Os resultados mostraram que os dois complexos interagem com a HSA com a afinidades similares, sem indicações de enantioseletividade. Os dados de parâmetros termodinâmicos e de mudanças da estrutura secundária da albumina sugerem interação predominantemente hidrofóbica. As interações dos compostos com o CT-DNA também parecem envolver forças hidrofóbicas. Ambos os compostos apresentaram efeitos similares nos estudos de viabilidade celular frente às células U87MG. No entanto, os resultados dos estudos de migração celular mostraram diferenças significativas, o que poderia ser associado a mecanismos enantioseletivos envolvidos na interação com os compostos com as proteínas encarregadas da mobilidade celular.

Palavras chaves: diutênio, ibuprofeno, metalofármaco, albumina, DNA, anticâncer.

ABSTRACT

Quispe, S. C. M. Study of diruthenium(II,III) metallodrug containing the (S)ibuprofen enantiomer and its interaction with biological targets 2019. (ex. 88p.).. Master Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Inorganic ruthenium compounds have been shown as good candidates for cancer therapy. Our research group has developed mixed valence diruthenium(II,III) metallodrugs containing non-steroidal anti-inflammatory drug ligands, which are promising metallopharmaceuticals for the treatment of human gliomas. Aiming a better understanding of the mode of action of these compounds, in this work a comparative study between the diruthenium(II,III)-ibuprofen containing the lbp racemic ligand, [Ru₂(lbp-Rac)₄Cl], and its inedited analogue containing the lbp-S isomer, [Ru₂(lbp-S)₄Cl] has been performed. The interactions of these two compounds with important target biomolecules (human serum albumin, HSA, and CT-DNA) have been investigated. A comparative study of the effects of these compounds on the cellular viability and cell migration of U87MG human glioma cell line in vitro was also conducted. The [Ru2(lbp-Rac)4Cl] complex was reprepared by a methodology previously developed in our group, and the inedited complex [Ru₂(lbp-S)₄Cl] has been synthesized here for the first time. Both complexes have been fully characterized by several techniques. The studies with human serum albumin and CT-DNA were performed by UV-Visible electronic absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy, circular dichroism and denaturalization investigation. The results showed that both compounds interact with the HSA with similar affinity, without indications of enantioselectivity. The thermodynamic parameters and changes on the secondary structure of the albumin suggest predominant hydrophobic interactions. The interactions of the compounds with CT-DNA seems also to involve hydrophobic forces. Both compounds showed similar effects on the studies of cell viability against the U87MG cells. However, the findings from the cell migration studies revealed significant differences, what might be associated to enantioselective mechanisms involved in the interactions of the compounds with proteins responsible for the cell mobility.

Key words: diuthenium, ibuprofen, metallodrug, albumin, DNA, anticancer.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Hlbp-Rac	Ibuprofeno Racêmico					
Hlbp-S	Ibuprofeno enantiômero S					
lbp	Ibuprofenato, ânion derivado do Ibuprofeno					
Rulbp-Rac	Cloridotetraquis(ibuprofenato)dirutênio(II,III),					
	[Ru₂(Ibp-Rac)₄CI]					
Rulbp-S	Cloridotetraquis(S-ibuprofenato)dirutênio(II,III),					
	[Ru ₂ (lbp-S) ₄ Cl]					
HSA	Albumina de Soro Humano (Human Serum Albumin)					
DNA	Ácido desoxirribonucleico					
CT-DNA	Sal sódico Ácido desoxirribonucleico de Calf Thymus					
FAINE	Fármaco Anti-Inflamatório Não Esteroide					
Trp	Aminoácido Triptofano					
Tyr	Aminoácido Tirosina					
Phe	Aminoácido Fenilalanina					
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio					
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono					
ATR/FT-IR	Attenuated Total Reflection–Fourier Transform Infra-Red					
DC	Dicroísmo circular					
UV-Vis	Espectroscopia de absorção eletrônica no UV-Visível					

Índice de Figuras:

Figura 4 1Espectro eletrônico de absorcão do [Ru₂(OAc)₄Cl] em água. 1mmol.L ⁻¹	45
Figura 4 2 Espectro eletrônico de absorcão do [Ru ₂ (OAc) ₄ C]] em água, 1mmol.L ⁻¹	45
Figura 4 3 Espectro eletrônico de absorção do [Ru2(Ibp-S)4CI] em etanol,1mmol.L ⁻¹	45
Figura 4 4 Espectro vibracional no infravermelho do [Ru2(OAc)4Cl]	46
Figura 4 5 Espectro vibracional no infravermelho do [Ru2(lbp-Rac)4Cl]	47
Figura 4 6 Espectro vibracional no infravermelho do [Ru ₂ (lbp-S) ₄ C]]	49
Figura 4 7 Espectro de dicroísmo circular dos [Ru ₂ (lbp-Rac) ₄ Cl] e [Ru ₂ (lbp-S) ₄ Cl] e	-
Espectro de absorção UV-Vis (verde) [Ru ₂ (lbp) ₄ Cl], em etanol, 1mmol L ⁻¹ .	.50
Figura 4 8 Curvas TG/DTG do [Ru ₂ (lbp-Rac) ₄ Cl] sob atmosfera de ar comprimido	
Figura 4.9 Curvas TG/DTG do [Ru ₂ (lbp-S) ₄ C]] sob atmosfera de ar comprimido	.52
Figura 4 10 Curvas TG/DTG do Hlbp-S sob atmosfera de ar comprimido	.52
Figura 4 11 Curvas DSC dos compostos [Ru ₂ (Ibp-Rac) ₄ Cl] [Ru ₂ (Ibp-S) ₄ Cl] Hlbp-Rac e	.02
Hibp-S sob atmosfera de ar comprimido	53
Figura 4 12 Curvas DTG-Massa dos compostos [Ru ₂ (Ibp-Rac) ₄ CI] sob atmosfera de ar	.00
	53
Figure 4 13 Curves DTG-Massa dos compostos [Rua/Ibn-S)./CI] sob atmosfera de ar	.00
comprimido	54
Figura 4 14 Espectro da supressão da Eluorescância da HSA, cHSA: 2umol I ⁻¹ mudano	.0- 10
a_{1} as concentrações dos compostos a) Ruiba-Rac e b) Ruiba-S 0-10 umol 1^{-1} soluções	10
incubadas a 37° C nor 2/h Exc205nm	57
Figure 4 15 Créfice de Storn Volmer, eHSA: 2umol L ⁻¹ mudande as concentrações dos	.57
rigura 4 15 Granca de Stern-Volmer, CHSA. 2µmol.L., mudando as concentrações dos	lh
λ Even (205 m) λ Emilion (200 m)	FT.
NEXC. 2951111, NETT. 5591111	
Figura 4 16 Grandas de Stern Volmer, CHSA: 2µmol.L ⁻¹ , mudando as concentrações dos	5
to the sector of the sector o	_ 0
temperaturas 20,37,45°C por 24n. AEXC.:295nm, AEM:339nm	.58
Figura 4 17 Granica de $\log((FO-F)/F)$ vs $\log(1/([Q]-((FO-F)/FO)X[P]))$, CHSA: 2µmol.L ⁻¹ ,	
mudando as concentrações dos compostos a) Ruibp-Rac e b) Ruibp-S, 0-10 µmoi.L ⁻¹ ,	50
soluções incubadas a 37°C por 24n. AExc.:295nm, AEm:339nm	.58
Figura 4 18 Grafica de Vant Hoff CHSA: 2µmoi.L ²¹ , variando as concentrações dos	
compostos a) Ruibp-Rac e b) Ruibp-S, 0-10 µmol.L ⁻¹ m, soluções incubadas nas	
temperaturas 20,37,45°C por 24h λExc.:295nm, λEm:339nm	
Figura 4 19 Espectro de Dicroismo circular da HSA, cHSA: 15µmol.L ⁻¹ , mudando as	
concentrações dos compostos a) Ruíbp-Rac e b) Ruíbp-S, 0-75 µmol.L ⁻¹ , soluções	
incubadas a 37°C por 24h	.60
Figura 4 20 Espectro de Dicroísmo circular da HSA, cHSA: 15µmol.L ⁻¹ , mudando as	
concentrações do composto a) Hibp-Rac e b) Hibp-S, 0-300 µmol.L-1, soluções incubada	as
a 37⁰C por 24h	.61
Figura 4 21 Gráficas com as porcentagens da a) hélice-α, b) β-folha e c) porção randôm	ica
da estrutura secundaria da HSA, variando a concentração de composto Ruibp, 0-75	
µmol.L⁻¹, Hibp, 0-300 µmol.L⁻¹, soluções incubadas a 37ºC por 24h	.61
Figura 4 22 Gráfica de A/Ao vs número de agitações, a 221nm, com espaços de 8min	
depois da agitação, dos compostos Ruibp-S 20µmol.L-1, mudando as concentrações de	
CT-DNA:0,1,2,3,4,5,10 µmol.L ⁻¹	.62
Figura 4 23 Gráficas de Job em 310nm, dos compostos esquerda) Ruibp-Rac, direita)	
Ruibp-S. X: fracção molar do composto, Volume total: 3,0mL, c(CT-DNA)+c(Ruibp)=	
24µmol.L ⁻¹	.63
Figura 4 24 Espectros de Absorção na interação Ruibp e CT-DNA, c(composto): 30µmo	I.L ⁻
¹ , mudando as concentrações de CT-DNA, 0-80 µmol.L ⁻¹ . A 23ºC	.63
Figura 4 25 Gráficas das equações13,14,15,16 para a interação Ruibp-S e CT-DNA,	
c(composto): 30µmol.L ⁻¹ , mudando as concentrações de CT-DNA, 0-80 µmol.L ⁻¹ . A 23%	С
	.65

Figura 4 26 Gráficas de Ln(Kb) vs Ln [Na+], mudando a concentração de NaCl no meio, na titulação de Ruibn e CT-DNA Na temperatura 23ºC
Figura 4 27 Espectro de Dicroísmo circular do CT-DNA c(CT-DNA): 80umol L ⁻¹ mudando
as concentrações dos compostos a)Ruibn-Rac h)Ruibn-S 0-100 umol L ⁻¹
Figura 4 28 Espectro de Dicroísmo circular da interação com CT-DNA c(CT-DNA):
1 2mmol L ⁻¹ mudando as concentrações do Ruibp-Rac. 0-100 umol L ⁻¹
Figura 4 29 Gráfica de despaturalização do CT-DNA de 40-90ºC por absorção no LIV-Vis
c(CT-DNA): 120µmol L ⁻¹ concentração dos compostos Ruibo, 10 µmol L ⁻¹ soluções
incubadas a 37°C por 24h 70
Figura 4 30 Gráfica de desnaturalização do CT-DNA de 50-90°C por absorção no UV-Vis.
c(CT-DNA): 60umol.L ⁻¹ . concentração dos compostos Ruibp. 60 umol.L ⁻¹ . soluções
incubadas a 37°C por 24h
Figura 4 31 Espectro de fluorescência na interação Ruibp e CT-DNA, c(composto):
2µmol.L-1, mudando as concentrações de CT-DNA, 0-80 µmol.L-1
Figura 4 32 Espectro de fluorescência na interação Ruibp e CT-DNA-Hoechst 33342,
c(CT-DNA): 30µmol.L ⁻¹ , c(Hoechst 33342): 10µmol.L ⁻¹ , mudando as concentrações de
composto, 0-14 µmolL ⁻¹
Figura 4 33 Concentração celular (célula/mL) x tempo (h) para Rulbp(Rac) e Rulbp(S) por
ensaio de azul de tripano para U87MG. [* p < 0.05; ** p<0.01; *** p<0.001]
Figura 4 34 Imagens da Migração celular para U87MG para o controle, Rulbp(Rac) e
Rulbp(S) nos tempos 0 e 12h74
Figura 4 35 Ensaio de migração celular para U87MG. Gráfica das percentagens da
migração celular para o controle Rulbp(Rac) e Rulbp(S). [* p < 0.05 (em referência ao
controle); ** p<0.01 (em referência ao controle); * p<0.05 (entre ambos compostos)]75

Índice de Tabelas

Tabela 4 1 Resultados do Analise elementar para C e H	44
Tabela 4 2 Cálculos para a determinação da Susceptibilidade Magnética dos compostos	а
25°C	44
Tabela 4 3 Resultados do TG e Porcentagem de perda de massa por evento	52
Tabela 4 4 Resultados dos Log(P) dos compostos analisados	54
Tabela 4 5 Resultados das constantes de Supressão de Ster Volmer, AExc:280nm	58
Tabela 4 6 Resultados das constantes de Supressão de Ster Volmer, λExc:295nm,	
λ(Em.):339nm	58
Tabela 4 7 Resultados das constantes de ligação calculadas e números de ligação do	
supressor, λExc:280nm	59
Tabela 4 8 Resultados das constantes de ligação calculadas e números de ligação do	
supressor, λExc:295nm, λ(Em.):339nm	59
Tabela 4 9 Resultados das constantes de ligação do Ruibp-Rac calculadas a diferentes	
temperaturas, números de ligação do supressor, λExc:295nm, λEm:339nm	59
Tabela 4 10 Resultados das constantes de ligação do Ruibp-S calculadas a diferentes	
temperaturas, números de ligação do supressor, λExc:295nm, λEm:339nm	59
Tabela 4 11 Constante de ligação e coeficiente de extinção do produto formado a 23ºC,	
com o composto Ruibp-S	65
Tabela 4 12 Constante de ligação e coeficiente de extinção do produto formado a 23ºC,	
com o composto Ruibp-Rac	65
Tabela 4 13 Constante de ligação e coeficiente de extinção do produto formado a 18, 37	е
43°C, com os compostos	66
Tabela 4 14 Parâmetros termodinâmicos da interação da interação CT-DNA-Composto	66
Tabela 4 15 Viabilidade celular (%) para 200 □mol.L ⁻¹ Rulbp(Rac) e Rulbp(S) por ensaio	
de azul de tripano	73
Tabela 4 16 Migração celular (%) para 200 □mol.L ⁻¹ Rulbp(Rac) and Rulbp(S)	75

Conteúdo

RESUN	ло		9
ABSTR	ACT		10
1. INT	RODUÇÃO		16
1.1 M	etais em medicina		16
1.2 C	omposto de Rutênio com atividade anticâncer		17
1.3 C	omplexos de tetracarboxilatos de Rutênio		19
1.4 At	tividade farmacológica em drogas quirais		20
1.5 A	lbumina e interações com compostos anticâncer de Rutênio		22
1.6 D	NA e Rutênio		25
1.7 G	lioblastomas		28
2. OB	JETIVOS		29
3. PA	RTE EXPERIMENTAL		29
3.1	Reagentes e solventes		29
3.2	Técnicas usadas		30
3.3	Procedimentos Experimentais		32
3.3.1	Sínteses		32
3.3.2	Coeficiente de partição		33
3.3.3	Estudos com HSA		33
3.3.4	Estudos com CT-DNA		36
3.3.5	Estudos biológicos com células		41
4. RE	SULTADOS E DISCUSSÕES		43
4.1 C	ARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS		43
4.1	1 Analise elementar	44	
4.1	2 Medidas de Susceptibilidade Magnética	44	
4.1	4 Espectroscopia Vibracional no Infravermelho	46	
4.1	.5 Comportamento óptico em solução	49	
4.1	.6 Análise termogravimétrica dos compostos	50	
4.1	.7 Lipofilicidade dos compostos	54	
4.2 IN			55
4.2	1 Constantes de ligação	55	
4.2	2 Estudo da estrutura secundaria do HSA na interação	60	
4.3 IN	1 EKAÇAU CUM CI-DNA	60	62
4.3	2 Gráfica do Job	o∠	
4.3	2 Constantos do ligação	0Z	
4.3		03	

	4.3.4. Incrementando a força iônica	67
	4.3.5 Estudos de dicroismo na interação CT-DNA e compostos	
	4.3.6 Desnaturalização do CT-DNA	
	4.3.7 Efeitos fluorescentes como produto da interação	70
	4.3.8 Estudos de competição com o CT-DNA	71
	4.4 ESTUDOS IN VITRO	72
	4.4.1 Viabilidade celular	72
	4.4.2 Ensaio de migração celular	74
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
6.	REFERENCIAS	77
7.	ANEXO	86
A	NEXO- SÚMULA CURRICULAR	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metais em medicina

Os metais são uma essencial parte da vida, hoje em dia se conhecem 24 elementos entre metais e não metais que fazem parte da bioquímica dos mamíferos, além disso, se sabe que vários compostos inorgânicos fora dessa lista foram, são e serão usados na medicina, inclusive alguns metais que se consideram tóxicos como cromo, Cr³⁺tris(picolinato), como suplemento nutricional, como Alumínio, que se adiciona em algumas vacinas como adjuvante, como arsênico, As₂O₃, como droga no tratamento da leucemia, entre outros^[1]. Os maiores benefícios do uso dos metais ou complexos metálicos no desenho de agentes terapêuticos e diagnósticos são: capacidade complexante (com diversos números de coordenação, geometrias, estados de oxidação, tipos de ligantes), estabilidade térmica, estabilidade cinética, e outras características mais específicas. Por tudo exposto anteriormente, a química inorgânica medicinal é desenvolvida^[1,2], a figura 1.1 mostra as principais áreas de ação.



Figura 1.1 Principais áreas da química inorgânica medicinal [1]

A partir da introdução da cisplatina na medicina como agente para o tratamento de câncer em múltiplos órgãos (em 1960s, mas aprovada para uso clínico a partir de 1978) se começou a desenvolver e estudar mais complexos inorgânicos como agentes terapêuticos anticancerígenos. ^[1,2] A seguinte geração, a carboplatina, aprovada para uso clinico a partir de 1993, ou a oxaliplatina, com aprovação no 2002, têm os inconvenientes de: eles serem eficientes só em uma pequena variedade de cânceres, alguns tumores desenvolvem resistência e eles frequentemente causam efeitos colaterais como supressão da medula óssea e toxicidade renal. ^[3,5]

Existem inúmeros compostos alternativos à cisplatina e derivados. Pela similaridade entre Pt(II) e Pd(II) na química de coordenação, estudos em compostos de Pd(II) anticerígenos mostraram bons efeitos, mas a velocidade de intercambio dos ligantes tem entre 4 a 5 ordens de grandeza a mais que os análogos com Pt(II), o que aumenta a chance de reação muito antes de chegar ao alvo. Estudos posteriores mostraram que os ligantes escolhidos são realmente importantes para a estabilidade do composto. Complexos com Au(III) com atividade anticâncer apontam que o alvo desses compostos é o DNA. Os compostos de Ru(II) e Ru(III) também são conhecidos por apresentar uma boa afinidade por ligantes com nitrogênio e enxofre, além disso, muitos compostos de rutênio não são muito tóxicos e tem mostrado alta seletividade para células cancerígenas. Há a hipótese de que eles em alguns mecanismos podem ser miméticos ao ferro, incluindo as albuminas e transferrinas.^[3]

1.2 Composto de Rutênio com atividade anticâncer

Nos compostos mononucleares de rutênio, tem-se como principais [ImH]trans-[RuCl₄(Im)(dmso-S)], e representantes 0 NAMI-A, KP1019, [IndH]trans-[RuCl₄(Ind)₂], os quais alcançaram a fase de ensaio clínico. Estudos demostram que o NAMI-A, que apresenta atividade antiproliférica, interfere na regulação do ciclo celular е na matriz extracelular, prevenindo o desenvolvimento metastático do câncer^[3,22]. No caso do KP1019 causa apoptose celular a través da via mitocondrial intrínseca e a formação de espécies reativas de oxigênio^[22]. Tanto NAMI-A como KP1019 completaram a fase I do ensaio clinico em 2004 e em 2008, respectivamente. Para o KP1019 a hipótese é de mecanismo envolvendo redução in vivo, de Ru(III) a Ru(II), espécie mais reativa. Pelo lado dos compostos organometálicos, encontramos os representativos compostos RAPTA, [Ru(n⁶-areno)(en)Cl]⁺, eles não atuam sobre o tumor primário mas mostram atividade antimetastática, ligeiramente menos efetiva que o NAMI-A. O mecanismo proposto parte da capacidade do composto de inibir a enzima catepsina B, enzimas dessa família tem uma função importante em vários estágios da progressão do câncer. ^[3,5,6,22]

Nas últimas décadas tem crescido o interesse pelos complexos Ru-Polipiridil, com estruturas similares à cisplatina, onde há pelo menos uma coordenação com um bom grupo abandonador. Eles também podem-se coordenar às bases do DNA em processos de duas etapas, como a cisplatina: 1. Liberam o grupo abandonador para formar as aqua-espécies, 2. Ligam-se com as bases do DNA.



Figura 1.2 Estruturas dos compostos cisplatina, NAMI-A e KP-1019, e esquemas gerais dos compostos RAPTA, Ru-polipiridil, e CI-Rubb_n^[3]

Em compostos dinucleares, os compostos {Ru(tpy)Cl}₂{m-bb_n}]²⁺, bb_n=bis[4(4'metil-2,2'-bipiridil)]-1, n:#alcanos, n=7, 10, 12 e 14, Cl-Rubb_n, nota-se que os compostos dinucleares apresentam maior atividade que o composto mononuclear análogo. Estudos apontam a que a citotoxicidade do composto se deve a uma ligação covalente e reversível com o DNA.^[3]

1.3 Complexos de tetracarboxilatos de Rutênio

Os tetracarboxilatos de Ru₂⁵⁺ (figura 1.3) são estáveis, o rutênio dentro da gaiola tem valência mista Ru₂(II,III). Como os átomos são equivalentes se considera como núcleo de Ru₂⁵⁺. A estabilidade do estado de oxidação do núcleo de atribui ao fato dos orbitais moleculares de mais alta energia estarem semi-preenchidos e muito próximos de ser degenerados π^* e δ^* . Por este motivo ele tem uma configuração com 3 elétrons desemparelhados ($\pi^*\delta^*$)^{3 [4,7]} (figura 1.3).



Figura 1.3. Estrutura de tetracarboxilato de Rutênio^[4]

Dentre os complexos com núcleos de dirutênio, os compostos Ru(II,III) apresentam maior estabilidade termodinâmica em comparação aos Ru(II,II) e Ru(III,III), a relação de estabilidade entre eles é Ru(II,III) > Ru(II,II) > Ru(III,III).^[4]

A maioria das aplicações dos tetracarboxilatos de rutênio achados na literatura são: precursores de outros compostos^[4], catalisadores^[7,24], cristais líquidos^[4,7], materiais magnéticos^[4,7], e aplicações optoeletrônicas^[8]

O nosso grupo começou a desenvolver há mais de uma década compostos de tetracarboxilatos de dirutênio ligados aos FAINEs. Eles mostraram atividade anti-inflamatória in vivo com menor efeito ulcerogênico que os ligantes^[9],

atividade antiproliferativa in vitro^[10,11,12,13,14], in vivo^[13], interação com HSA^[14,15,17,18], interação com transferrinas e apo-transferrinas^[15].

Estudos que mostram que a reatividade do precursor com os aminoácidos glicina (gli), triptofano (trp), cisteína (cis) e histidina (his) segue a ordem: gli<trp<<cis<his, e com os agentes redutores glutationa(glu) e ácido ascórbico(HAsc), os quais seguem a ordem de reatividade glu>>HAsc^[16,18,19].

Os resultados in vitro dos complexos apresentaram atividade antiproliferativa tanto na linhagem K562 de células de leucemia^[14] e nas linhagens U87MG, U138MG e U251MG de células de glioma humano^[13].

1.4 Atividade farmacológica em drogas quirais

A maioria dos compostos relacionados com organismo vivos têm centros quirais ou tem funções enantioseletivas (DNA, enzimas, anticorpos, hormônios). Os enantiômeros de uma droga podem mostrar diferentes comportamentos nos sistemas vivos. Os efeitos farmacológicos das drogas enantioméricas podem ser categorizados da seguinte forma^[20]:

- Os dois enantiômeros agem sobre um mesmo alvo biológico, mas um isômero tem uma maior afinidade sobre o outro.
- Ambos enantiômeros agem sobre o mesmo alvo biológico, mas exercem atividades farmacológicas opostas.
- Os enantiômeros podem ter ação similar, mas não têm efeito sinérgico.
- Ambos enantiômeros têm efeitos independentes sobre diferentes alvos, como no exemplo mostrado na figura 1.4.



Figura 1.4. Estrutura do quinina (esquerda, usada no tratamento da malária) e quinidina (direita, usado como agente antiarrítmico classe 1A)

 Um ou dois enantiômeros têm os efeitos desejados, mas um deles pode causar efeitos colaterais. O enantiômero inativo pode remediar os efeitos colaterais da atividade da antípoda.

Uma das questões atualmente discutidas na área de patentes farmacológicas é a conversão quiral, pois, quando os fármacos racêmicos são metabolizados no corpo usualmente têm atividades diferentes (intensidade ou efeitos), inclusive podem ter efeitos colaterais prejudiciais. Exemplos destes fármacos como Levobupivacaina, Salbutamol, Omeprazol, Armodafinil entre outras, já estão patenteados e são comercializados como fármacos enantiomericamente puros^[21].

Dentro dos FAINEs, compostos com atividade anti-inflamatória, antipirética e analgésica de venda livre, sabe-se que o naproxeno-R inibe a atividade do seu antípoda, por isso, o naproxeno é vendido só como o enantiômero-S^[23]. No caso particular do ibuprofeno, o enantiômero-R, que não apresenta atividade farmacológica, sofre uma inversão metabólica unidirecional de configuração à forma do enantiômero ativo S. ^[20,23] Resultados clínicos confirmam que o ibuprofeno-S inibe a atividade das COX1 e COX2 igualitariamente, e o ibuprofeno-R inibe o COX1 com muita menor potência e não apresenta inibição da COX2^[23].

A enantioespecificidade da inversão (figura 1.5) é controlada pela enzima acilcoenzima A-sintetase que converte o R-ibuprofeno ao correspondente tioester coenzima-A, continua com a racemização e subseqüente hidrólise produzindo S-ibuprofeno. Em concorrência com a hidrólise, o intermediário tioester pode sofrer intercambio acil com outros triacilglicerois endógenos, podendo derivar na acumulação de resíduos de ibuprofeno no tecido adiposo, pois o enantiômero S não forma o tioester coenzima-A, e este não pode ser incorporado com o tecido adiposo. Os efeitos tóxicos da acumulação de ibuprofeno no tecido adiposo ainda são desconhecidos ^[20]. Estudos in vivo demostram que a inversão alcança entre 57-71% da dose ^[23].



Fig.1.5 Mecanismo de inversão metabólica do ibuprofeno (R) [23]

A inversão metabólica não é um fenômeno associado só ao ibuprofeno, outros profenos também sofrem inversão metabólica unidirecional, como fenoprofeno, benoxaprofeno, pranoprofeno ^[23].

1.5 Albumina e interações com compostos anticâncer de Rutênio

Albumina de soro humano (HSA) é a proteína carregadora mais versátil no plasma sanguíneo e possui múltiplas funções. Ela tem a habilidade de interagir com um sem-número de ligantes, incluindo componentes exógenos. Tem vários sítios de ligação localizados, os quais possuem diferentes subdomínios responsáveis pela ligação de componentes endógenos. O peso molecular da proteína é 66,5kDa e a concentração normal no sangue humano está entre 35 e 50g/L, sendo a proteína mais abundante no sangue^[25,26,27].

Possui uma vida média de 19 dias e é produzida principalmente no fígado humano, em média de ~0,2g de HSA por kg de peso corporal por dia. Dentre as funções da HSA está a de ser responsável pelo 80% da pressão osmótica coloidal sanguínea^[26,27].

Existem no plasma sanguíneo várias proteínas carregadoras, mas só a HSA é capaz de ligar-se reversivelmente com uma ampla diversidade de ligantes com

alta afinidade. Devido à circulação prolongada e pouca função imunológica, a HSA tem sido usada como agente estabilizante para melhorar o potencial das proteínas terapêuticas como o interferon, a interleucina-2, moléculas de anticorpos e fatores de crescimento endotelial vascular^[25].

A estrutura secundária da HSA é basicamente uma proteína helicoidal 67% α hélices com contribuições de β -folhas e randômica. Tem uma estrutura em forma de coração assimétrico com dimensões de 80x80x30Å. A estrutura tem 3 domínios homólogos α -hélice, I (resíduos 1-195), II (resíduos 196-383) e III (resíduos 384-585), que são estruturalmente similares, os 3 domínios consistem em 3 hélices antiparalelas que são divididas em 2 subdomínios: subdomínio A com 6 hélices (h1-h6) e subdomínio B com 4 hélices (h7-h10). A HSA contém principalmente 1 resíduo triptofano (W214), o qual está posicionado na cavidade hidrofóbica do subdomínio IIA, rodeando essa área se encontram dois sítios de ligação Sudlow I e II, o resíduo serve como sonda intrínseca em estudos espectrofotométricos^[25,26].

Os sítios de ligação aos ácidos graxos são de alta relevância pois aqui se acomodam uma diversidade de componentes endógenos e exógenos, incluindo uma grande variedade de drogas. Estes sítios demostram diferentes afinidades.



Fig.1.6 Estrutura tridimensional da HSA, se mostram os subdomínios: IA, amarelo, IB, laranja, IIA, azul, IIB, azul claro, IIIA, verde escuro, IIIB, verde. Também se mostram os sítios ligação de ácidos grassos (FA).^[25]

O sitio FA1, localizado no interior do subdomínio IB e rodeado por um cluster de 4 hélices, tem um amplo espaço para moléculas como indometacina.

O sitio FA2, localizado entre os subdomínios IA e IIA, é considerado o menor sitio de ligação, o sitio possui uma altíssima afinidade. Estudos sugerem que ele estabiliza a conformação B-HSA.^[26,27]

FA3 e FA4. As ligações em FA3 são via interação dos hidrogênios dos grupos frontais e hidrogênios presentes nos resíduos do sitio, entre subdomínio IIB e IIIA. As ligações em FA4 interagem de forma similar, quando um grupo carboxilato interage por ligação de hidrogênio encontrando o exterior do subdomínio IIIA. Estudos mostram que o sitio de Sudlow II consiste em duas regiões: FA3, de interação apolar e FA4, de interação polar com o grupo carboxilato.^[27,28]

O sitio FA7, sitio de Sudlow I, formada por uma cavidade hidrofóbica localizada no subdomínio IIA, preferivelmente se liga a aníons heterocíclicos. O exemplo mais relevante é a warfarina. Este sítio é menor comparado com o sítio de Sudlow II. Além disso, este sítio é considerado de baixa afinidade.^[27,28]

Estudos cristalográficos e de ESI-MS confirmam que 5 moles de cisplatina se ligam a 1 mol de HSA, onde 5 sítios foram identificados, a HSA se liga preferencialmente nos resíduos de metionina e histidina ^[26].

Resultados experimentais indicam que 98% do total de Ru que é administrado por via intravenosa está no plasma sanguíneo ligado com uma proteína, em consequência as drogas com base de rutênio poderiam interatuar com várias proteínas objetivo^[29].

Estudos eletroquímicos mostraram que o NAMI-A tem maior afinidade pelas proteínas séricas que pelo DNA ^[30].

Estudos entre KP1019 e HSA mostraram que tem uma alta afinidade pela ligação dos sítios I e II de Sudlow, com cinética relativamente rápida, toma lugar em alguns minutos, de forma não covalente nos sítios hidrofóbicos, mas em tempos de incubação prologados a interação muda à forma coordenada ^[34,37]. O composto não apresenta preferência pelo sitio de ligação. Por métodos espectrofluorométricos mostra uma constante de ligação 4,55x10⁵ M^{-1[31]}.

Outros estudos por eletroforese capilar mostram constantes de ligação de 9,9x10³ M⁻¹ e eletroforeses capilar acoplado com MS mostrou uma constante de 1, 06x10³ M^{-1[32]}. Estudos na estequiometria entre KP1019/HSA encontraram valores entre 0,3 e 0,5 ^[33].

Estudos baseados em analises de EPR demonstraram que comportamento similar ao KP1019 foi encontrado para as interações entre a HSA e NAMI-A, a forma coordenada só foi encontrada ao longo do tempo^[35,37]. Estudos na estequiometria entre NAMI-A /HSA estimaram que está entre 0,58 e 0,87 ^[36], já aplicado na corrente sanguínea.

Estudos em compostos organometálicos RAPTA-T, em análises de cromatografia de exclusão de tamanho ICP-MS e ESI-MS, mostraram que a relação estequiométrica com HSA estava ao redor de 0,64^[38].

1.6 DNA e Rutênio

O DNA preferentemente está associado em duplas fitas, onde cada fita é formada da combinação de 4 nucleotídeos adenina, timina, guanina e citosina. Dentro da fita os nucleotídeos são conectados a traves de ligações fosfodiester. As conformações mais comuns são: A, B e Z (figura 1.6), e dentro das sequências de DNA conhecidas a conformação B é a mais frequente (mais do 90%), as fitas são mantidas em hélices duplas antiparalelas, e são interligadas coaxialmente, devido à formação da hélice se obtém a presença de sulcos maiores e menores os quais proveem sítios expostos para a ligação/interação de moléculas pequenas^[40,41].



Fig.1.6 Esquemas idealizadas dos fragmentos das conformações A, B e Z do DNA [39]

Os sulcos diferem significativamente em tamanho, forma, hidratação, potencial eletrostático e posição das pontes de hidrogênio. As diferenças mais relevantes das três conformações são: 1. Sentido de rotação da hélice (figura 1.7): A e B, direito, Z, esquerdo, 2. Sulco menor: A, largo e raso, B, estreito e profundo, Z, estreito e profundo, 3. Sulco maior: A, profundo e estreito, B, profundo e largo, C, raso.^[39].



Fig.1.7 Espectros de dicroísmo das conformações (a) RNA, dupla forma A, (b) DNA de Micobacterium plei (dupla forma B, linha sólida) e E. coli (dupla forma B, linha tracejada), e (c) formas B (baixa força iônica na solução, linha tracejada) e forma Z (alta força iônica na solução, linha sólida) ^[39]

O DNA é um alvo crítico terapêutico para uma ampla variedade de interações intracelulares, sendo o principal objetivo da maioria das drogas antitumorais, assim como de muitos agentes antivirais e antibacterianos^[41]. Dependendo do

modo de interação estas drogas podem se classificar como intercalante, ligantes por sulcos, ligações covalentes e por quebra da cadeia de DNA. Eles podem distorcer a dupla hélice do DNA, alquilar ou clivar a estrutura de uma fita do DNA, inibir a replicação e transcrição do DNA ^[39].



Fig.1.8 Esquema da representação dos modos de ligação de complexos de rutênio ^[40] Na literatura se encontram diversas tipos de interações entre compostos de rutênio e DNA. Entre as importantes interações temos:

Dentro das típicas interações covalente (se refere a aquelas ligações covalentes irreversíveis, a traves da ligação direta do centro metálico às bases, resíduos de açúcar ou ligação fosfodiéster) temos as conhecidas dos complexos dimetilsulfóxido de Ru(II) e Ru(III), os adutos formados dos compostos trans-[Ru(II)((CH₃)₂SO)₄Cl₂] e DNA são capazes de inibir a síntese do RNA pois as RNA polimerases são dependentes do DNA, mas no caso dos adutos cis não mostraram a mesma resposta. Complexos heterocíclicos de rutênio (III) (HB)[Ru(III)B₂Cl₄], B: base heterocíclica, complexos de Ru(III) são menos reativos que os complexos de Ru(II), Os compostos KP1019, (HInd)[Ru(III)Cl₄(Ind)₂], são menos citotóxicos pois eles dependem da redução a traves de outras moléculas biologicamente relevantes.

O composto NAMI-A, (H₂Im)[trans-Ru(DMSO)Cl₄(Im)], e análogos, os quais mostram atividade antiproliferativa, mostraram que se ligam irreversivelmente ao DNA e consideravelmente mais rápido que com a cisplatina.

Complexos Ru-Arenos também mostram este tipo de interação os quais mostram inibição sobre o crescimento das células cancerígenas e formam adutos monofuncionais com o DNA, como o [(η⁶-p-cimeno)Ru(en)CI]PF₆ que mostrou se ligar seletiva às bases guanina do DNA. ^[40,41]

Por outro lado, as investigações em interações não covalentes também encontramos grandes avanços e vantagens. Os modos não covalentes pelos quais os complexos metálicos se ligam incluem: intercalação: complexos de Ru(II) polipiridil, mostram propriedades interessantes, pois apresentam uma alta seletividade, maior que a cisplatina, e interagem em múltiplos genomas em células cancerígenas^[42]. Interação pelos sulcos menores do DNA: compostos [Ru(tBu₂bpy)₂(2-appt)](PF₆)₂ tem mostrado maior afinidade pelas regiões timina-adenina, mostrando de moderada a severa toxicidade^[43]. Por condensação do DNA: compostos Ru(II)-arenos com imidazol ou bipiridil, tem sido explorados como agentes antitumor e antimicrobianos, ensaios in vitro mostram moderada atividade contra severas linhagens de câncer, em alguns casos a atividade é próxima à cisplatina^[44].

Analises termodinâmicas são um importante acompanhamento às análises estruturais para entender e/ou otimizar o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos. Perfis energéticos podem ser úteis na associação ou atribuição no discernimento do tipo de interação de sulcos menores e maiores^[45]

1.7 Glioblastomas

Os glioblastomas são tumores cerebrais com alto índice de mortalidade, menor a um ano, eles têm a particularidade de ser tumores malignos intrínsecos ao sistema nervoso central, e são caracterizados por ser altamente invasivos, e resistentes a qualquer tipo de tratamento.

A invasão tumoral compreende etapas complexas, dentro das quais, os mais relevantes são a adesão da célula tumoral e a migração celular. Ambos promovem a interação entre as células tumorais e os componentes ao redor da membrana extracelular (Ohnishi 1998)^[81].

2. OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo estudar um metalofármaco de dirutênio(II,III) contendo o enantiômero S-ibuprofeno como ligante e investigar suas interações com alvos biológicos e sua atividade anticancerígena frente a células de glioma humano. Todos os estudos foram realizados também para o metalofármaco contendo o ibuprofeno racêmico já investigado no grupo, para comparação dos efeitos.

As metas realizadas foram: síntese e caracterização do metalofármaco inédito de dirutênio(II,III)-ibuprofeno(S) e re-preparação do análogo de dirutênio(II,III)-ibuprofeno(Rac); determinação da lipofilicidade dos metalofármacos e dos ligantes FAINEs livres; investigação da interação com biomoléculas de interesse biológico como albumina de soro humano (HSA) e CT-DNA; realização de estudos de atividade biológica in vitro frente a células cancerígenas.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e solventes

- Ácido acético, grau de pureza P. A.- Merk.
- Ácido clorídrico, Synth
- Ácido desoxirribonucleico Calf Thymus Tipo I, fitas- Sigma Aldrich.
- Ácido (±)-2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoico, Hibp Ramus.
- Ácido(S)-(+)-2-(4-isobutilfenil)propanoico, Hibp-S Sigma Aldrich.
- Albumina sérica humana (HSA)-grau de pureza 98%-Sigma Aldrich.
- Anidrido acético, grau de pureza P.A.-Merck.
- Brometo de Etidio.-Sigma Aldrich
- Brometo de Potássio, P. Espectroscópica, Sigma Aldrich.
- Cloreto de Litio, 99% Sigma Aldrich.
- Cloreto de rutênio (III).xH₂O Sigma Aldrich.

- Cloreto de Sodio, grau de pureza P. A.
- Diclorometano, grau de pureza P.A. Synth.
- Etanol absoluto, grau de pureza P. A. –Merck.
- Gás nitrogênio, grau de pureza industrial White Martins.
- Gás oxigênio, grau de pureza medicinal White Martins.
- Hoechst 33258-Sigma Aldrich
- n-Octanol, grau de pureza P. A. Merck.
- Tris(hidroximetil)aminometano-Sigma Aldrich.

3.2 Técnicas usadas

Análise Elementar

As medidas foram efetuadas pelo laboratório da Central Analitica do IQ-USP, no equipamento Elementar Analyser CHN, modelo 2400, Perkin-Elmer.

Espectroscopia de Absorção Eletrônica

As amostras foram colocadas em cubetas de quarzo de caminho ótico de 1,0 cm e os espectros foram registrados em um espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-2600, com controle de temperatura.

Análises térmicas

As analises térmicas e calorimétricas foram feitas no equipamento de TG/DSC modelo STA PC Luxx, marca Netzsch, acoplado ao espectrômetro de massas QMS 403C Aeolos e um injetor de gases Pulse TA, marca Netzsch. As curvas foram feitas com uma velocidade de aquecimento de 10°C/min até 1000°C. As massas usadas para as análises foram sempre próximas a 8mg.

Espectroscopia de dicroísmo circular

As amostras foram colocadas em cubetas de 0,1 e 1,0 cm de caminho óptico e os espectros foram registrados no espectropolarímetro JASCO, modelo J-815, com controlador de temperatura Peltier.

Espectroscopia de Fluorescência

As amostras foram colocadas em cubetas de 1,0 cm de caminho óptico e os espectros de fluorescência foram registrados no fluorimetro Varian,

modelo Cary Eclipse, acoplado a um banho termostático LMP RP 845. Para as correções do efeito de filtro interno nos experimentos de fluorescência, foi utilizado um espectrofotômetro modelo UV-2600.

Susceptibilidade Magnética^[10]

As medidas de susceptibilidade magnética foram realizadas utilizando-se o método de Faraday, uma balança CAHN, modelo DTL 7500. O composto utilizado como padrão foi o Tetra(tiocianato)cobaltato(II) de mercúrio, Hg[Co(SCN)₄], que apresenta χ = 16,44x10-6 unidades CGS / Gauss, a 20°C, e θ = +10°. As medidas das massas das cápsulas vazias, do padrão e das amostras, na presença e ausência de campo magnético a 25°C.

$$\chi_a = \chi_P \times \left(\frac{\Delta_a - \delta_a}{\Delta_P - \delta_P}\right) \left(\frac{m_P}{m_a}\right)$$
 (Eq.1)

Sendo:

 χ_a e χ_p : susceptibilidade magnética por unidade de massa da amostra e do padrão.

ma e mP: massa da amostra e do padrão.

 Δ_a : diferença entre as massas da amostra (com campo – sem campo).

 Δ_P : diferença entre as massas do padrão (com campo – sem campo).

 δ_a : diferença entre as massas do porta-amostra da amostra (com campo – sem campo).

δ_P: diferença entre as massas do porta-amostra do padrão (com campo – sem campo).

Usando a equação 1, se pode calcular a susceptibilidade magnética da amostra, e com isso calcular a susceptibilidade magnética molar, χ_M , da equação 2 (onde **MM** é a massa molar):

$$\chi_M = \chi_a \times MM \tag{Eq.2}$$

Para achar a susceptibilidade do composto o valor deve ser corregido das contribuições diamagnéticas de ions e ligantes envolvidos na amostra, **X'**_M, usou-se as constantes de Pascal para esses fines:

$$\chi_M = \chi'_M + Correções Diamagneticas$$
 (Eq.3)

O momento efetivo, μ_{ef} , foi calculado com a equação, considerando a temperatura, **T**, de 298,15K:

$$\mu_{ef} = 2,84\sqrt{\chi'_M \times T} \tag{Eq.4}$$

Por conseguinte, o número de elétrons desemparelhados do composto, **n**, se calcula pela equação:

$$\mu_{ef} = \sqrt{n(n+2)} \tag{Eq.5}$$

3.3 Procedimentos Experimentais

3.3.1 Sínteses

SÍNTESE DO COMPLEXO [Ru₂(OAc)₄CI]

O complexo foi sintetizado de acordo com procedimento já descrito na literatura ^[10]. Em um balão de boca dupla foi adicionado 40 mL de ácido acético e 8 mL de anidrido acético. O balão foi aquecido em manta térmica e mantido sob refluxo por 1h em atmosfera de N₂.

Após a mistura ser resfriada, foi adicionado LiCI (1,05 g), deixando o sistema em agitação por 10 min. Em seguida, foi adicionado RuCl₃. nH₂O (1,02 g – 5 mmol). A mistura foi mantida sob agitação, aquecimento e fluxo lento de O₂ por 4h.

No término das 4h foi observada a formação do complexo marrom. O produto foi deixado na geladeira até o dia seguinte, filtrado e lavado com acetona. Por fim, o produto foi seco em dessecador sob vácuo com P₂O₅ e sílica gel.

O rendimento da reação foi de 66%.

SÍNTESE DOS COMPLEXOS [Ru₂(lbp)₄Cl] com lbp-Rac e lbp-S^[10]

Preparou-se uma suspensão contendo 0,3 g (0,6 mmol) de [Ru₂(OAc)₄Cl] em 200 mL de água deionizada. A mistura foi agitada por 30 min com agitador magnético e depois rotoevaporada a 40 mL. Em seguida, foram adicionados 40

mL de uma solução etanólica contendo 0,51 g (2,5 mmol) de ibuprofeno e uma solução de 0,36 g de LiCl dissolvido em 5 mL de água deionizada. O sistema foi mantido sob agitação, fluxo de N₂ e banho maria a uma temperatura entre 60 e 80 °C por 3h. Ao final das 3h, pode-se observar o produto marrom formado nas paredes do balão. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi lavado com água destilada. Em seguida, o produto foi redissolvido em etanol (cerca de 15 mL) e o solvente foi eliminado posteriormente sob fluxo de N₂. O produto foi colocado, por fim, em dessecador contendo P₂O₅ e sílica gel.

O rendimento da reação foi de 84% com Hlbp-Rac e 88% com Hlbp-S.

3.3.2 Coeficiente de partição

O método usado para determinar o coeficiente de partição dos compostos em comparação foi o método Shake flask. Seguindo a referência do método usado por Takahashi 2002 ^[46,47].

Pesou-se a quantidade necessária do composto para que na solução houvesse 1mmol/L em 10ml de solução e dissolveu-se aquela massa em 5ml de 1octanol, agitou-se a solução manualmente e com vortex até a completa dissolução do sólido. Por outro lado, 5ml de 1-octanol e 10ml de tampão buffer tris 50mmol/L foram agitados em um funil de vidro, saturou-se esta solução em agitação 120rpm, 25°C e manteve-se por 60min. Depois, saturou-se as fases e transferiu-se á solução octanólica com o composto. Posteriormente, a solução foi agitada por mais 1h nas mesmas condições de agitação. Por último, coletou-se uma alíquota de cada uma das fases para posterior diluição e leitura no UV-Vis.

No caso do RuAc, o sólido dissolveu-se em 5mL de buffer tris-HCI 50mmol/L pH 7,4, e a solução pré-saturada foi composta de 5mL de buffer com 10mL de octanol, mesmo procedimento anterior. Todas as análises foram feitas em triplicata.

3.3.3 Estudos com HSA

Nos estudos usou-se tampão Tris-HCl 50mmol.L⁻¹ pH 7,4. Pesou-se 0,606g de Tris, dissolveu-se em um pouco de agua e adicionou-se 2mL de solução HCl 2mol.L⁻¹ e completou-se o volume a 100mL com agua deionizada, resultando

em um pH muito próximo de 7,4, só foram necessários de 1 a 2 gotas da mesma solução do HCI.

As soluções de HSA foram preparadas calculando a concentração com o coeficiente de extinção da HSA a 280nm ε=35700 mol⁻¹.L.cm⁻¹.

As incubações foram mantidas nas temperaturas 37 e 45°C na incubadora Tecnal (modelo TE420). As amostras incubadas a 20°C foram mantidas no banho ultratermostático.

3.3.3.1 Determinação da constante de ligação com HSA

As constantes de ligação foram determinadas usando a propriedade fluorescente dos resíduos da HSA, nos comprimentos de excitação 280 e 295nm, no intervalo de emissão de 300-450nm, variando as concentrações dos compostos.

Fizeram-se as incubações de 24h nas temperaturas de 20, 37 e 45ºC.

As soluções incubadas foram preparadas em tampão 50mmol.L⁻¹ Tris-HCl pH 7,4, usando soluções de concentração 2,05 μ mol.L⁻¹, medindo a concentração usando o coeficiente de extinção da HSA ϵ_{280nm} =35700 mol⁻¹.L.cm⁻¹. Em paralelo, se preparou as soluções em etanol de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 e 1,0 mmol.L⁻¹ dos complexos (tabela 3.1). Por último, se misturaram 2940 μ L da solução de HSA e 60 μ L da solução etanólica e depois do tempo de incubação as leituras em fluorescência e absorbância, para corrigir a fluorescência, foram feitas.

Usou-se esta faixa de concentração, pois em proporções maiores de composto/HSA a interação perde a linearidade, provavelmente por efeitos de absorção da cubeta ou por agregação do composto.

As cubetas usadas nestes experimentos foram de 1cm de caminho ótico.

Devido a que o complexo absorbe tanto na região de excitação e emissão, foi necessário corrigir os resultados usando a equação de filtro inerte:

$$F_{corr} = F_{obs} \times 10^{\frac{A_{Ex} + A_{Em}}{2}}$$
(Eq.6)

Tabela 3 1 Volumes e concentrações das soluções da HSA e compostos usados nos experimentos para a determinação das constantes de ligação na interação entre os compostos e HSA

	Volume da	Concentraçã	Volume da	Concentraçõe
Composto	solução da	o da solução	alíquota da	s da solução
	HSA (mL)	HSA	solução do	do composto
		(µmol.L ⁻¹)	complexo (µL)	(mmol.L ⁻¹)
Ruibp-Rac	2,94	(μmol.L⁻¹) 2,05	complexo (μL) 60,0	(mmol.L ⁻¹) 0-1,0

3.3.3.2 Estudos de dicroísmo circular com HSA

As soluções foram incubadas a 37°C por 24h, mantendo fixa a concentração da HSA, 15 µmol.L⁻¹, variando as proporções entre proteína-composto de 1:0 a 1:5 (tabela 3.2). As medidas de dicroísmo foram realizadas no intervalo de 195 a 260nm, a 37°C, com velocidade de varredura de 100nm.min⁻¹, com 9 acumulações, largura da banda 1nm e DIT (data integration time), 0,5s.

Usou-se esta faixa de comprimento de onda para observar as mudanças nas bandas das conformações de alfa hélice e folha beta da albumina, bandas em comprimentos menores a 300nm.

Tabela 3 2 Volumes e concentrações das soluções da HSA e compostos usados nos experimentos para o estudo nas mudanças da estrutura secundaria da HSA na interação entre os compostos e HSA

	Volume da	Concentração	Volume da	Concentrações
Composto	solução da	da solução de	alíquota da	da solução do
	HSA (mL)	HSA (µmol.L ⁻¹)	solução do	composto
			complexo (µL)	(mmol.L ⁻¹)
Ruibp-Rac	2,94	15,4	60,0	0-3,75
Ruibp-S	2,94	15,4	60,0	0-3,75
Hibp-Rac	2,94	15,4	60,0	0-15,0
Hibp-S	2,94	15,4	60,0	0-15,0

As soluções a incubar foram preparadas em tampão Tris-HCl pH 7,4, usando soluções de concentração 15,4 µmol.L⁻¹. Em paralelo preparou-se as soluções em etanol de: 0,75, 1,50, 2,25, 3,00 e 3,75 mmol.L⁻¹ dos complexos e 3,0, 6,0,

9,0, 12,0 e 15,0 mmol.L⁻¹ dos ligantes. Por último, se misturaram 2940 μ L da solução de HSA e 60 μ L da solução etanólica.

As cubetas usadas nestes experimentos foram de 1mm de caminho ótico e o volume colocado nelas foi de 380 µL de solução.

Os espectros foram registrados nas unidades de milidegrees (mdeg), miligraus. Com o propósito de normalizar os resultados, eles foram transformados em termos de elipticidade molar residual com a equação seguinte:

$$[\theta]_{MRW,\lambda} = MRW \times \frac{\theta_{\lambda}}{10 \times d \times c}$$
 (Eq.7)^[17]

Sendo, $[\theta]_{MRW,\lambda}$, elipticidade molar residual no comprimento de onda λ , θ_{λ} , elipticidade no comprimento de onda λ , dado pelo aparelho; d, caminho óptico da cubeta, em cm; c, concentração da HSA, em mg.mL⁻¹; MRW, massa media residual, em Da, é calculado como:

$$MRW = \frac{M}{N-1}$$
(Eq.8)

Onde M, massa molecular da cadeia polipeptídica, em Da; N, número de aminoácidos da cadeia, e N-1, o número de ligações na cadeia.

Para achar a mudança em cada uma das frações da estrutura secundaria usou-se o programa betsel^[48]. O programa pedia a transformação dos resultados a unidades de elipticidade molar residual.

3.3.4 Estudos com CT-DNA

Nos estudos usou-se tampão Tris-HCl 50mmol.L⁻¹ pH 7,4. Pesou-se 0,606g de Tris, dissolveu-se em um pouco de agua e adicionou-se 2mL de solução HCl 2mol.L⁻¹ e completou-se o volume a 100mL com agua deionizada, dando um pH muito próximo de 7,4, precisou de 1 ou 2 gotas da mesma solução do HCl.

As soluções de CT-DNA foram preparadas calculando a concentração com o coeficiente de extinção da CT-DNA a 260nm, ε=6600mol⁻¹.L.cm⁻¹

3.3.4.1 Método de variações continuas
Para encontrar a relação estequiométrica entre o CT-DNA e os compostos usou-se o método de variações continuas (Método de Job).

Achou-se o coeficiente de extinção do complexo, em 260nm, no buffer 7,4 na temperatura de 23°C, em 2% de etanol na solução, entre a 0 e 24µmol.L⁻¹ (tabela 3.3).

Concentração do	Concentração do	
composto na solução	CT-DNA na solução	Fração molar
(µmol.L ⁻¹)	(µmol.L ⁻¹)	
0	24,0	0,0
2,4	21,6	0,1
4,8	19,2	0,2
7,2	16,8	0,3
9,6	14,4	0,4
12,0	12,0	0,5
14,4	9,6	0,6
16,8	7,2	0,7
19,2	4,8	0,8
21,6	2,4	0,9
24,0	0	1,0

Tabela 3 3 Concentrações das soluções de CT-DNA e compostos usados nos experimentos do método de variações continuas

3.3.4.2 Determinação da constante de ligação por UV-Vis

Com o fim de estimar se existia uma interação entre os compostos e o CT-DNA, realizaram-se titulações espectrofotométricas, mantendo a concentração de complexo na solução, 30,0 µmol.L⁻¹, e variando a concentração do CT-DNA nela, de 1:0 a 1:3 com incrementos de aproximadamente 10,0 µmol.L⁻¹ de CT-DNA (tabela 3.4). Os experimentos foram feitos em triplicata.

Um volume de 2,940mL de buffer Tris-HCl 50mmol.L⁻¹ pH 7,4, foi adicionado à uma cubeta de caminho óptico de 1cm e misturou-se com 60µL de 1,5 mmol.L⁻¹ da solução etanólica dos compostos, homogeneizou-se invertendo a cubeta com movimentos suaves dentro da cubeta, para evitar a aglomeração do composto.

Para temperaturas as temperaturas de 18, 37 e 43°C, a cubeta unicamente com buffer, foi colocada 10min para alcançar a temperatura do médio, depois, colocou-se o composto, homogeneizou-se e se esperou 10min, e registrou-se o espectro; as adições foram feitas com 10min de estabilização da temperatura depois de cada adição. Nestas proporciones evitou-se a agregação do composto.

Tabela 3 4 . Volumes e concentrações das soluções da CT-DNA e compostos usad	dos
nos experimentos de titulação na interação entre os compostos e CT-DNA	

	Volume da	Concentração	Volume da	Concentração
Composto	solução	do composto	alíquota da	das adições da
	(mL)	na solução	solução do	solução do CT-
		(µmol.L⁻¹)	CT-DNA (µL)	DNA (mol.L ⁻¹)
Ruibp-Rac	3,00	30	5	0,6
Ruibp-S	3,00	30	5	0,6

3.3.4.3 Estudos de competição com o CT-DNA por Fluorescência

Ensaios de competição por deslocamento do brometo de etídio, composto conhecido por se ligar ao DNA por intercalação, por técnicas de titulação é um método indireto de determinar as constantes de ligação aparentes de ligantes com interação não fluorescentes com DNA e os complexos, os estudos foram propostos originalmente por Morgan et. al. em 1979. Estes estudos envolvem soluções saturadas de DNA-brometo de etídio (10:12,6)^[74].

O estudo foi feito nas concentrações de 12µmol.L⁻¹ CT-DNA com 14µmol.L⁻¹ brometo de etídio, mudando as concentrações do composto 0-14µmol.L⁻¹.

Este tipo de estudo, baseado no deslocamento de um ligante de mecanismo conhecido, tem sido adaptado para outros compostos que interagem de forma diferente com o DNA, como no caso do Hoechst, composto que liga ao DNA pelos sulcos (*groove*) menores. O estudo foi feito em concentrações baixas do ligante *groove*, 175µmol.L⁻¹ CT-DNA com 0,25µmol.L⁻¹ de solução de Hoechst, mudando as concentrações dos compostos de 0-14µmol.L⁻¹ na solução. Em concentrações maiores do ligante, usou-se as concentrações de 30µmol.L⁻¹ CT-DNA com 10µmol.L⁻¹ com 0,25µmol.L⁻¹ de solução de Hoechst, mudando as concentrações do ligante, usou-se as concentrações de 30µmol.L⁻¹

3.3.4.4 Fluorescência dos compostos

De experimentos anteriores observou-se que o composto não é fluorescente por si só, mas, incrementando a quantidade do DNA na solução ele apresenta um incremento na fluorescência. Com o fim de estimar se existia uma interação, entre os compostos e o CT-DNA, ou possível uso como sonda fluorescente foram feitas as titulações medindo a fluorescência e absorbância das soluções, observando-se que a solução apresenta o máximo de emissão fluorescente nos comprimentos de onda λ ex 350nm e λ em 455nm se realizaram titulações medindo a fluorescência em paralelo, mantendo a concentração de complexo na solução, 2,0 µmol.L⁻¹, e variando a concentração do CT-DNA nela, de 1:0 a 1:40 com incrementos de 10,0 µmol.L⁻¹ de CT-DNA, os experimentos foram feitos em triplicata, controlando a temperatura a 23°C.

3.3.4.5 Estudos de dicroísmo circular na interação com o CT-DNA

A técnica de dicroísmo circular (DC) é muito sensível e reprodutível. No dicroísmo a solução de CT-DNA apresenta a forma de B-DNA com duas bandas positivas em 220 e 268nm e duas negativas em 210 e 246nm. O DC se usa normalmente para determinar os predominantes modos de interação. As intercalações de B-DNA levam tipicamente a incrementos nos sinais elípticas associadas com a banda em 246nm e interações de empilhamento nas bases pares, 268nm, mas, no caso de interações de sulco menor causam decrescimento no sinal elíptico associado com interrupções nas interações de ligação de hidrogênio entre os nucleotídeos, em 220nm (Kellet 2019)^[74].

As soluções foram incubadas a 37°C por 24h, mantendo fixa a concentração da CT-DNA, 15 µmol.L⁻¹, e variando as proporções entre DNA-composto de 1:0 a 1:5. As medidas de dicroísmo foram realizadas no intervalo de 220 a 300nm, a 37°C, com velocidade de varredura de 100nm.min⁻¹, com 9 acumulações de espectros, largura da banda 1nm e DIT (data integration time), 0,5s.

As soluções a incubar foram preparadas em tampão Tris-HCl pH 7,4, usando soluções de concentração 81,8 μ mol.L⁻¹ de CT-DNA, concentração calculada usando o coeficiente de extinção da CT-DNA ϵ_{260nm} =6600mol.L⁻¹, em paralelo

se preparou as soluções em etanol de 0, 1, 2, 3, 4, 5mmol.L⁻¹ dos complexos (tabela 3.5). Por último, se misturaram 2940µL da solução de CT-DNA e 60µL da solução etanólica. As cubetas usadas nestes experimentos foram de 1cm de caminho óptico.

Razão molar	Volume da solução da CT-DNA (mL)	Concentração da solução de CT-DNA (µmol.L ⁻¹)	Volume da alíquota da solução do complexo (µL)	Concentrações da solução do composto (mmol.L ⁻¹)
1:0	2,94	81,8	60,0	0
1:1	2,94	81,8	60,0	1
1:2	2,94	81,8	60,0	2
1:3	2,94	81,8	60,0	3
1:4	2,94	81,8	60,0	4
1:5	2,94	81,8	60,0	5

Tabela 3 5 Concentrações das soluções de CT-DNA e compostos usados nos experimentos de dicroísmo circular

3.3.4.6 Estudos de desnaturalização do CT-DNA [41]

A temperatura de desnaturalização T_M é definida como a temperatura na qual a metade das cadeias de DNA estão no estado de dupla hélice e a outra metade em estado de hélice simples. O processo é baseado na perdida das interações hidrofóbicas e as interações de empilhamento π - π devido à desnaturalização da dupla hélice^[74].

As soluções foram incubadas a 37°C por 24h, mantendo fixa a concentração da CT-DNA, as proporções entre CT-DNA-composto de 1:0, 1:0,5 e 1:1. As medidas espectrofotométricas foram realizadas no intervalo de temperatura 40-90°C, com velocidade de varredura de 0,4 °C.min⁻¹, no comprimento de onda 260nm, as soluções incubadas foram preparadas em tampão Tris-HCl pH 7,4, usando soluções de concentração 61,0 µmol.L⁻¹ de CT-DNA, calculando a concentração da solução com uso do coeficiente de extinção da CT-DNA ϵ_{260nm} =6600mol.L⁻¹, em paralelo se preparou as soluções em etanol de 0, 1,5 e 3,0 mmol.L⁻¹ dos complexos. Por último, se misturaram 2940µL da solução de

CT-DNA e 60µL da solução etanólica e uma solução que se preparou com buffer e 3,0 mmol.L⁻¹.

3.3.4.7 Efeitos fluorescentes como produto da interação

O DNA apresenta uma leve emissão intrínseca de fluorescência, numerosas sondas de emissão que espontaneamente se ligam ao DNA e mostram um elevado aumento na emissão, tais são os casos de Hochst e laranja de acridina. Outra classe de sondas com longos tempos de vida são os complexos de metais de transição, tipicamente achados para Ru(II), Re(I), e Os(II) com um ou mais ligantes diiminas, estes compostos apresentam fluorescência molecular da transferência de carga metal ao ligante^[57].

Complexos de rutênio (II) com ligantes polipiridil, [Ru(bpy)₂dppz]²⁺é um dos mais amplamente estudados, esse composto não apresenta fotoluminescência a temperatura ambiente mas na presença de DNA de dupla hélice mostra uma intensa fotoluminescência com um fator de melhor >10⁴. Este fenômeno é conhecido como efeito "Light-Switch" o qual tem um alto interesse na interação de complexos metal-polipiridil com o DNA^[78,79].

Nos experimentos ambos compostos mostraram aumentos na fluorescência, as titulações foram feitas partindo de 2µmol.L⁻¹, e com alíquotas de 5µL, mostrou incrementos de fluorescência onde alcançou o máximo com 80µmol.L⁻¹, comprimento de onda de excitação 350nm, com máximos de emissão em 455nm, os máximos não se deslocaram, não tem mudanças batocrômicas nem hipsocrômicas. Os resultados são mostrados na gráfica 4.31. Os experimentos foram feitos em triplicatas.

A fluorescência pode ser atribuída à hidrofobicidade do meio, como se encontra na literatura para compostos de Ru(II)-dipiridofenazinas, as quais não emitem em soluções aquosas mas, mostram forte luminescência em ambientes hidrofóbicos^[82,83].

3.3.5 Estudos biológicos com células

Esses estudos foram realizados em conjunto com a doutoranda Samara R. Alves, de nosso laboratório, no Laboratório de Metabolismo de Células Tumorais do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB) sob responsabilidade da Professora Alison Colquhoun.

Cultivo de células

Para os experimentos in vitro, foi usado a linhagem de células de glioma humano U87MG, as células foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) com 10% de soro bovino fetal, 50 U.mL⁻¹ penicilina, e 50 µg.mL⁻¹ estreptomicina. As células foram cultivadas em frascos em atmosfera umidificada com 5% CO₂, 95% ar, a 37°C. Depois de alcançar um considerável crescimento celular, as células foram lavadas com PBS (Tampão de fosfato salino) e colocou-se a solução de tripsina (tripsina 0.025 % / EDTA (2,2',2'',2'''- (ácido etano-1,2-dildinitrilo)tetraacético) 0.02%) para retirar as células do frasco e colocá-las na placa.

Viabilidade celular

As células foram incubadas em placas de 24 poços em uma densidade de $3x10^4$ células/poço a 37° C em 5% CO₂ e 95% ar umidificado, por 24h, tempo de adesão das células na placa. No dia de aplicação do composto prepararamse as soluções de concentração 5,10,15 e 20mmol.L⁻¹. Depois, as células foram expostas ao composto, 5uL (1%v/v) da solução etanólica e foram adicionados ao meio biológico (495µL), com concentrações finais: 0 (controle), 50, 100, 150 e 200µmol.L⁻¹ para cada placa com os tempos de incubação de 24, 48 e 72h, trocando o meio (495µL) e a solução etanólica (5 µL) cada 24h. Cumprido o tempo de incubação as células foram lavadas com PBS e removidas com tripsina (tripsina 0.025%/EDTA 0.02%) As células foram contadas usando a câmera de Neubauer, depois de colocar 10 µL de solução de azul de tripano, contando como viáveis as células que não absorveram o corante, com a seguinte equação:

#celulas/poço =
$$\frac{\#células (Contadas na câmera Neubauer) x Fator de diluição}{Volume da Câmera}$$
 (Eq.9)

Os experimentos foram realizados três vezes e cada um deles foi realizado em triplicata para cada concentração.

Ensaio de migração celular "Wound Healing"

As células de glioma humano foram incubadas em placas de 24 pocos em uma densidade de 7x10⁴ células/poço a 37°C em 5% CO₂ e 95% ar umidificado, por 24h. No dia de aplicação do composto, preparou-se as soluções de concentração 20mmol.L⁻¹. Depois, as células foram expostas ao composto, 5 µL (1%v/v) da solução etanólica foram adicionados ao meio biológico (495 µL), com concentrações finais: 0 (controle) e 200µmol.L⁻¹ para cada placa com o tempo final de incubação de 60h, trocando o meio (495µL) e a solução etanólica (5 µL) cada 24h. Cumprido o tempo de incubação, a ferida foi feita raspando delicadamente a placa em forma de uma cruz, com um tip para pipeta de 200µL, sobre a monocamada da confluência celular. As células foram lavadas com PBS, para retirar as células que estiveram boiando no meio, e tratadas novamente com meio (495µL) e a solução etanólica (5 µL). As células foram incubadas por um tempo de 12h, permitindo o tempo e o espaço livre para a migração celular em uma área livre de células. Depois das 12h, tirou-se uma foto de cada uma das placas no microscópio. A diferencia entre as áreas finais e inicias foi calculada usando o software Image J. Os experimentos foram feitos em triplicata.

Analise estatística de dados

Os resultados foram apresentados como a média e o desvio padrão de três resultados obtidos de três ensaios independentes. A significância estatística dos resultados foi testada pelo test de Student. Nos experimentos de viabilidade celular, a significância estatística foi comparada entre o controle e cada uma das concentrações. As diferenças foram consideradas com P<0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

Os complexos foram sintetizados de acorda com a literatura e caracterizados pelas técnicas de analise elementar, susceptibilidade magnética, espectroscopia vibracional no infravermelho, espectroscopia de absorção

eletrônica no UV-Visível em solução, espectroscopia de dicroísmo circular, e analise termogravimétrica.

4.1.1 Analise elementar

Os resultados dos analise elementar se encontram na tabela 4.1, os resultados foram coerentes com o calculado para as formulas propostas.

Composto	%C,	%C,	%H,	%H,
	calculado	experimental	calculado	experimental
[Ru ₂ (OAc) ₄ Cl]	20,2	20,3	2,6	2,6
[Ru₂(lbp-	59,1	59,6	6,5	6,4
Rac)₄Cl]				
[Ru₂(lbp-	59,1	59,7	6,5	6,5
S)₄CI]				

Tabela 4 1 Resultados do Analise elementar para C e H

4.1.2 Medidas de Susceptibilidade Magnética

Os resultados do momento magnético efetivo por unidade dimetálica [Ru₂]⁵⁺ calculado a partir dos dados de susceptibilidade magnética molar estão dentro do intervalo esperado 3,8 – 4,4 M.B. (tabela 4.2). Por conseguinte, são consistentes com a existência de três elétrons desemparelhados e com a configuração eletrônica de estado fundamental $\sigma^2 \pi^4 \delta^2 (\pi^* \delta^*)^{3[4,15]}$

Tabela 4 2 Cálculos para a determinação da Susceptibilidade Magnética dos compostos a 25°C

Composto	μ _{eff} (Μ.Β.)
[Ru ₂ (OAc) ₄ Cl]	4,1
[Ru ₂ (lbp-Rac) ₄ Cl]	3,9
[Ru ₂ (lbp-S) ₄ Cl]	3,9

4.1.3 Espectroscopia Eletrônica de Absorção UV-Visível

Os espectros eletrônicos dos compostos são apresentados nas figuras 4.1 a 4.3. Esses espectros estão de acordo com a literatura e trabalhos de nosso

grupo ^[4,7,10]. A principal banda na região do visível é atribuída à transição π (Ru-O, Ru₂) $\rightarrow \pi^*$ (Ru₂).



Figura 4 1Espectro eletrônico de absorção do [Ru2(OAc)4Cl] em água, 1mmol.L-1



Figura 4 2 Espectro eletrônico de absorção do [Ru₂(OAc)₄Cl] em água, 1mmol.L⁻¹



Figura 4 3 Espectro eletrônico de absorção do [Ru₂(Ibp-S)₄CI] em etanol, 1mmol.L⁻¹

Estudos teóricos e experimentais de espectroscopia eletrônica para os tetracarboxilatos de rutênio^[3,4,7] afirmam que eles apresentam uma banda na faixa de 420 – 480 nm (figuras 4.1, 4.2, 4.3) a qual é atribuída à transição π (Ru-O, Ru₂) $\rightarrow \pi^*$ (Ru₂). A qual está evidenciada nos experimentos.

4.1.4 Espectroscopia Vibracional no Infravermelho

O espectro do [Ru₂(OAc)₄Cl] (figura 4.4) apresenta bandas que estão de acordo com as bandas anteriormente atribuídas na literatura e em trabalhos de nosso grupo. A banda em 2936 cm⁻¹ corresponde ao estiramento simétrico de C-H do CH₃ e em 2853 cm⁻¹ corresponde ao estiramento assimétrico de C-H do CH₃ e em 2853 cm⁻¹ corresponde ao estiramento assimétrico de C-H do CH₃^[49]. As bandas em 1449 cm⁻¹ e 1394 cm⁻¹ correspondem aos modos de estiramento assimétrico e simétrico do grupo COO, respectivamente. A diferença de frequência dessas bandas tem uma peculiaridade que podem dar evidencias do tipo de ligação com o metal. No caso, $\Delta v = (v_a \cdot v_s) = 1449 \cdot 1394 = 55 \text{ cm}^{-1}$. Esse valor para carboxilatos dimetálicos de rutênio corresponde a um ligante carboxilato coordenado em ponte aos dois centros metálicos ^[50].



Figura 4 4 Espectro vibracional no infravermelho do [Ru₂(OAc)₄Cl]

O espectro do [Ru₂(lbp-Rac)₄Cl] (figura 4.5) apresenta bandas que estão de acordo com as bandas anteriormente atribuídas em trabalhos de nosso grupo. Na região de 2951 a 2846 cm⁻¹ observam-se as bandas de estiramento C-H^[49].

As frequências de estiramento do anel benzênico para-disubstituído aparecem em 1614, 1578, 1515 cm^{-1[49]}

As bandas em 1461 cm⁻¹ e 1408 cm⁻¹ correspondem aos modos de estiramento assimétrico e simétrico do grupo COO, respectivamente. A diferença de frequência dessas bandas, $\Delta v = (v_a - v_s) = 1461 - 1408 = 53 \text{ cm}^{-1}$, corresponde ao ligante ibuprofenato coordenado em ponte aos dois centros metálicos ^[50].

Em 1373 cm⁻¹ corresponde à freqüência da deformação simétrica do CH3, e as bandas nas regiões de 1300-1000 cm⁻¹ correspondem às deformações de CH do anel aromático no plano, embora, se encontram bandas características do anel em 1169, 1119, 1020 cm^{-1[49]}

As frequências 847 e 810 cm⁻¹ correspondem às deformações tipo wagging C-H com 2 hidrogênios adjacentes e em benzenos para–disubstituídos, respectivamente. ^[10,49]



Em 741 cm⁻¹ temos a banda de deformação do carboxilato (COO)^[49]

Figura 4 5 Espectro vibracional no infravermelho do [Ru2(Ibp-Rac)4CI]

O espectro vibracional no infravermelho do complexo inédito [Ru₂(lbp-S)₄Cl] (figura 4.6) é similar ao espectro do complexo análogo contendo ibuprofeno racêmico.

Em 2955 cm⁻¹ o estiramento simétrico de C-H do CH₃ e em 2864 cm⁻¹ corresponde ao estiramento assimétrico de C-H do CH₃. A banda em 2929 cm⁻¹ corresponde ao estiramento assimétrico de C-H do CH₂ e em 2846 cm⁻¹ corresponde ao estiramento assimétrico de C-H do CH₂. ^[49]

As frequências de estiramento do anel benzênico para-disubstituído aparecem em 1616, 1576, 1510 cm^{-1[49]}

As bandas em 1456 cm⁻¹ e 1409 cm⁻¹ correspondem aos modos de estiramento assimétrico e simétrico do grupo COO, respectivamente. A diferença de frequência dessas bandas $\Delta v = (v_a - v_s) = 1456 - 1409 = 57 \text{ cm}^{-1}$, corresponde ao ligante ibuprofenato coordenado em ponte aos dois centros metálicos. ^[10,50]

Em 1371 cm⁻¹ corresponde à frequência da deformação simétrica do CH3, e as bandas nas regiões de 1300-1000 cm⁻¹ correspondem à deformações de CH do anel aromático no plano, embora, se encontram bandas características do anel benzênico para-disubstituído em 1170, 1117, 1022 cm^{-1[10,49]}

As frequências 847 e 804 cm⁻¹ correspondem às deformações tipo wagging C-H com 2 hidrogênios adjacentes e em benzenos para–disubstituídos, respectivamente.^[49]

Em 740 cm⁻¹ temos a banda de deformação do carboxilato (COO)^[49]



Figura 4 6 Espectro vibracional no infravermelho do [Ru₂(Ibp-S)₄CI]

4.1.5 Comportamento óptico em solução

Em termos de dispersão de rotação de luz, quando nos acercamos a uma banda de absorção desde comprimentos de onda longos, o ângulo de rotação aumenta, passando por um máximo, é chamado efeito Cotton positivo. O efeito Cotton negativo acontece quando o ângulo de rotação se torna menor ao passar de comprimentos de onda longos aos mais curtos. Em dicroísmo circular, que estuda a variação do coeficiente de extinção molar respeito a um λ (comprimento de onda), frente a feixes de luz polarizada contrários (horário e anti-horário). Se $\varepsilon_{antihorario} - \varepsilon_{horario} > 0$, apresenta um máximo no comprimento de onda mais distante, apresenta efeito Cotton positivo, e se $\varepsilon_{antihorario} - \varepsilon_{horario} < 0$, apresenta um mínimo no comprimento de onda mais distante, se dize que tem efeito Cotton negativo ^[4].

Fizeram-se os espectros dos complexos para achar e/ou comparar as atividades ópticas: Pelo observado no espectro (figura 4.7) do [Ru₂(Ibp-Rac)₄CI], ele não apresente nenhum máximo ou mínimo na região de absorção (300-900nm), como se esperava, pois, seu ligante é uma mistura racêmica, que produzem complexos misturados [Ru₂(Ibp-S)_x(Ibp-R)_{4-x}CI]. No caso do complexo [Ru₂(Ibp-S)₄CI] segundo o observado no espectro de dicroísmo

circular (na figura 4.7), o complexo [Ru2(Ibp-S)4CI] apresenta efeito Cotton positivo.



Figura 4 7 Espectro de dicroísmo circular dos [Ru₂(lbp-Rac)₄Cl] e [Ru₂(lbp-S)₄Cl] em etanol, 1mmol.L⁻¹.

No espectro (fig. 4.7) três bandas são observadas para o composto [Ru₂(Ibp-S)₄CI], a banda em 333nm de acordo aos valores achados para o composto racêmico na tese de Sanches^[15] dos compostos em solução aquosa, pode-se atribuir por tentativa à transição π (CI) $\rightarrow \pi^*$ (Ru₂) e a banda em 436nm se pode atribuir π (Ru-O,Ru₂) $\rightarrow \pi^*$ (Ru-O), pois, são as mais próximas às transições no espectro de absorção no UV-Vis do composto, a transição π (Ru-O,Ru₂) $\rightarrow \sigma^*$ (Ru-O) é frequentemente observada no dicroísmo circular. A banda em 722nm não se encontra nas transições conhecidas, ela poderia ser uma transição permitida magneticamente σ (Ru₂) $\rightarrow \pi^*$ (Ru₂) como sugere Cotton nos tetracarboxilatos de dirutênio de ligantes enantiomericamente puros Ru₂(L-mandelato)₄.H₂O ^[4,52]

4.1.6 Análise termogravimétrica dos compostos

As curvas TG dos compostos são apresentadas nas figuras 4.8 e 4.9. Podemos observar que têm um padrão diferente de perda de massa; os experimentos foram feitos em triplicata confirmando o mesmo comportamento. Na tabela 4.3 se mostram os valores das perdas de massa para cada evento. No primeiro evento, se observa que o composto [Ru₂(lbp-Rac)₄Cl] tem uma perda de 19% equivalente à perda de 1 ibuprofenato, mas, o [Ru₂(lbp-S)₄Cl] tem uma perda de 36%, equivalente à perda de, aproximadamente, 2 ibuprofenatos. No segundo evento, o [Ru₂(lbp-Rac)₄Cl] perde 43%, equivalente a 2 moléculas de Ibuprofenato mais 1 ligante cloreto, e o [Ru₂(Ibp-S)₄Cl] perde 22% equivalente a, aproximadamente, 1 molécula de Ibuprofenato mais 1 ligante cloreto. No terceiro evento, os compostos [Ru2(lbp-Rac)4Cl] e [Ru2(lbp-S)₄Cl] perdem 18 e 17%, respectivamente, equivalente a, aproximadamente, 1 ibuprofenato para ambos casos. Do gráfico de DSC (fig. 4.11) se observa que a decomposição do ibuprofeno é um evento endotérmico (fig. 4.10), no intervalo entre 200 e 340°C se observa pequenos processos endotérmicos, atribuído à decomposição das moléculas de Ibuprofenato e, em paralelo entre 200 e 420°C, processos altamente exotérmicos, atribuídos à oxidação do rutênio, o oxigênio da atmosfera reage com o rutênio, formando Ru₂O ^[10,51,67], equivalente aos 20% e 25% de massa residual total dos [Ru₂(lbp-Rac)₄Cl] e [Ru₂(lbp-S)₄Cl], respectivamente. Das gráficas DTG (figuras 4.12 e 4.13) dos compostos, se observa que a massa m/z 44 atribuído à massa procedente da liberação de gás CO₂ é menor no intervalo do primeiro evento que no segundo para o [Ru₂(lbp-Rac)₄Cl] e no[Ru₂(lbp-S)₄Cl] acontece o contrário, resultados que concordam com as atribuições. Os resultados sugerem que nas estruturas de ligantes enantiomericamente mistos [Ru₂(lbp-S)_x(lbp-R)_{4-x}Cl] o composto apresenta uma maior estabilidade térmica que com ligantes enantiomericamente puros.



Figura 4 8 Curvas TG/DTG do [Ru2(Ibp-Rac)4CI] sob atmosfera de ar comprimido



.

Figura 4 9 Curvas TG/DTG do [Ru2(Ibp-S)4CI] sob atmosfera de ar comprimido



Figura 4 10 Curvas TG/DTG do HIbp-S sob atmosfera de ar comprimido

Tabela 4 3 Resultados do TG e Porcentagem de perda de massa por eve	ento
---	------

	1ro Evento	2do Evento	3ro Evento	%Massa
Composto	Intervalo (ºC) /	Intervalo (ºC)	Intervalo (ºC) /	Residual
	%Perda de	/ %Perda de	%Perda de	Total
	Massa	Massa	Massa	
[Ru ₂ (lbp-	200-270 / 19	270-308 / 43	308-400 / 18	20
Rac)₄Cl]				
[Ru ₂ (Ibp-S) ₄ CI]	200-270 / 36	270-308 / 22	308-400 / 17	25
Hlbp-Rac	160-240 / 100	-	-	0
Hlbp-S	160-240 / 100	-	-	0

52



Figura 4 11 Curvas DSC dos compostos [Ru₂(Ibp-Rac)₄Cl], [Ru₂(Ibp-S)₄Cl], HIbp-Rac e HIbp-S sob atmosfera de ar comprimido



Figura 4 12 Curvas DTG-Massa dos compostos [Ru₂(Ibp-Rac)₄CI] sob atmosfera de ar comprimido



Figura 4 13 Curvas DTG-Massa dos compostos [Ru₂(Ibp-S)₄CI] sob atmosfera de ar comprimido

4.1.7 Lipofilicidade dos compostos

Para a análise do coeficiente de partição dos compostos de [Ru₂(Ibp)₄CI] e o Hibp se construiu uma curva de calibração tomando uma alíquota de 200uL da amostra dissolvida em 1-octanol, levando para um balão volumétrico de 10mL completando o volume com metanol.

Para a análise do coeficiente de partição do composto de [Ru₂(Acetato)₄Cl] se construiu uma curva de calibração tomando uma alíquota de 2mL da amostra dissolvida em tampão buffer tris-HCl 50mmol/L pH 7,4 levando para um balão volumétrico de 10mL completando o volume com o mesmo buffer.

Composto	Log(P)	Desvio Padrão
RulbpRac,221nm	2,08	0,16
RulbpS,221nm	1,90	0,16
IbpRac,220nm	2,36	0,15
lbpS,221nm	2,34	0,10
RuAc*,428nm	-0,85	0,02

Tabela 4 4 Resultados dos Log(P) dos compostos analisados

*Alíquota tomada da fase aquosa

Comparando os resultados para o ibuprofeno com valores encontrados na literatura apresenta certa diferença, pois algumas das amostras foram tratadas com ácidos (Phillips 1995, logP=3,51)^[53], usando técnicas de determinação pH-métricas (Avdeef et al. 1998. logP= 2,48)^[54], usando cálculos teóricos (Stuer-Lauridsen 2000. logP=3,5)^[55], mudando a temperatura a 32°C por 24h (Takahashi 2002, logP=2,89)^[56], usando CG (SCHEYTT 2005. logP= 2,48)^[46], usando o método de shake-flask (Costa, logP= 2,35)^[47]

Tendo valores próximos de Log(P) do composto racêmico e o enantiômero S, as diferenças não são significativamente relevantes. Comparando com os resultados mostrados na tese de Costa ^[47], os resultados do composto racêmico são realmente próximos, -0,87 para o RuAc e 2,03 para o Ruibp, confirmando a robustez do método para estes complexos.

Os ligantes livres apresentam uma ligeiramente maior lipofilicidade em comparação com os compostos em gaiola, isto pode ser de benéfico pois tem um caráter relativamente mais hidrofílico em comparação com os fármacos livres, favorecendo o transporte no corpo.

4.2 INTERAÇÃO COM HSA

4.2.1 Constantes de ligação

Como já se descreveu anteriormente, a HSA tem resíduos com fluorescência intrínseca, com λexc em 280 e 295nm, na figura 4.14 se amostram a supressão da fluorescência no comprimento de onda de excitação de 295nm, onde a fluorescência intrínseca é exclusiva do resíduo de triptofano. Devido a que o composto absorve no UV-Vis os dados passam por um cálculo de correção de correção de filtro interno, onde a fluorescência aumenta, ^[57], além de que, por efeito de aumento na turbidez da solução como resultado da mistura em faixas maiores de concentrações, o intervalo de concentração usado é inferior à concentração da proteína.

Na figura 4.15 se mostram os gráficos de Stern-Volmer, com um comportamento linear, sem desvios óbvios no eixo Y, o que indica que os processos de supressão são predominantemente ou estáticos ou dinâmicos^[57,58]

Das gráficas de Stern-Volmer nas temperaturas 20, 37 e 45°C, figura 4.16, se mostra que com o aumento da temperatura aumenta o Ksv, coeficiente angular da reta, sugerindo que se tem um mecanismo de interação dinâmico, mas, os valores das constantes de supressão da macromolécula biológica, kq, foram calculados pela equação:

$$kq = \frac{Ksv}{\tau o} \tag{Eq. 10} [57]$$

Onde τ_o é o tempo de vida média da HSA sem o supressor, da literatura o valor é 10⁻⁸ s^[58]. Sabendo que em uma supressão dinâmica o supressor se difunde até o fluoróforo, e que o valor máximo possível é provocado pelo oxigênio ^[57] com kq=2x10¹⁰ L².mol⁻¹.s⁻¹, mas, os valores estão na ordem de 10¹² L².mol⁻¹.s⁻¹, o que indicaria que deve de ser um mecanismo estático, similares casos são vistos com composto de cobalto^[59] que apresentam interações hidrofóbicas com a HSA.

Para achar as constantes de ligação aparentes, resultados mostrados nas tabelas 4.7 e 4.8 usou-se a equação da constante aparente modificada:

$$log \frac{Fo-F}{F} = nlog K_A - nlog \left(\frac{1}{[D_t] - (Fo-F)[P_t]/Fo}\right)$$
 (Eq. 11)^[60]

Por outra parte, das gráficas de temperatura, gráfica 4.18, podemos observar que o processo é mais espontâneo com o aumento da temperatura, e, dos valores dos parâmetros termodinâmicos da equação de Van't Hoff:

$$lnKa = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{RT}$$
(Eq. 12)^[59]

As forças intermoleculares entre o ligante e a proteína podem ser por: ligação a múltiplos hidrogênios, forças eletrostáticas, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas que podem ser identificadas de acordo aos parâmetros termodinâmicos ^[62]. Dos resultados, tabelas 4.9 e 4.10, sabemos que Δ H>0, Δ S>0 e Δ G<0, o que indica que o processo é endotérmico, espontâneo, e das três características em conjunto, o tipo de interação é por interações hidrofóbicas. Esse resultado está em concordância com estudos feitos em drogas anti-inflamatórias não esteroides de ácidos arilpropionicos que sugerem que elas interagem com a HSA com forças hidrofóbicas.

Dos resultados podemos observar, que não se acharam diferenças significativas entre os complexos com ligantes de ibuprofeno racêmicos ou com o enantiômero tipo S, a interação entre a HSA e o complexo não é enantioseletiva. Dos resultados reportados no grupo, os resultados achados aqui são mais próximos aos reportados na tese de Renata dos Santos^[14] (1,4x10⁴) em comparação com os reportados na tese de Rodrigo Santos ^[18] (2,0x10⁴).



Figura 4 14 Espectro da supressão da Fluorescência da HSA, cHSA: 2μmol.L-1, mudando as concentrações dos compostos Ruibp-Rac (esquerda) e Ruibp-S (direita), 0-10 μmol.L⁻¹, soluções incubadas a 37°C por 24h.Exc295nm



Figura 4 15 Gráfica de Stern-Volmer, cHSA: 2µmol.L⁻¹, mudando as concentrações dos Ruibp-Rac (esquerda) e Ruibp-S (direita), 0-10 µmol.L⁻¹, soluções incubadas a 37°C por 24h. λ Exc.:295nm, λ Em:339nm



Figura 4 16 Gráficas de Stern Volmer, cHSA: 2μmol.L⁻¹, mudando as concentrações dos compostos Ruibp-Rac (esquerda) e Ruibp-S (direita), 0-10 μmol.L⁻¹, soluções



Figura 4 17 Gráfica de log((Fo-F)/F) vs log(1/([Q]-((Fo-F)/Fo)x[P])), cHSA: 2µmol.L⁻¹, mudando as concentrações dos compostos Ruibp-Rac(esquerda) e b) Ruibp-S (direita), 0-10 µmol.L⁻¹, soluções incubadas a 37°C por 24h. λ Exc.:295nm, λ Em:339nm

incubadas nas temperaturas 20,37,45°C por 24h. λExc.:295nm, λEm:339nm

Tabela 4 5 Resultados das constantes de Supressão de Ster Volmer, λ Exc:280nm a 310K

	Ksv	R ²	k _q (L².mol ⁻¹ .s ⁻¹)	R ²
Ruibp-Rac	1,0x10 ⁴ ±1,9 x10 ³	0,9842	1,0x10 ¹² ±1,9 x10 ¹¹	0,9842
Ruibp-S	9,9x10 ³ ±3,0 x10 ³	0,9753	9,9x10 ¹¹ ±3,0 x10 ¹¹	0,9753

Tabela 4 6 Resultados das constantes de Supressão de Ster Volmer, λ Exc:295nm, λ Em::339nm a 310K

	Ksv	R ²	k _q (L².mol ⁻¹ .s ⁻¹)	R ²
Ruibp-Rac	1,2x10 ⁴ ±1,4 x10 ³	0,9701	1,2x10 ¹² ±1,4 x10 ¹¹	0,9701
Ruibp-S	1,2x10 ⁴ ±9,2 x10 ²	0,9929	1,2x10 ¹² ±9,2 x10 ¹⁰	0,9929

Tabela 4 7 Resultados das constantes de ligação calculadas e números de ligação do supressor, λExc:280nm a 310K

	Kb(mol ⁻¹ .L)	n	R ²
Ruibp-Rac	1,1x10 ⁴ ±1,1 x10 ³	1	0,9908
Ruibp-S	1,1x10 ⁴ ±2,6 x10 ³	1	0,9888

Tabela 4 8 Resultados das constantes de ligação calculadas e números de ligação do supressor, $\lambda Exc:295nm$, $\lambda (Em.):339nm$ a 310K



Figura 4 18 Grafica de Van't Hoff cHSA: 2µmol.L⁻¹, variando as concentrações dos compostos Ruibp-Rac(esquerda) e b) Ruibp-S (direita), 0-10 µmol.L⁻¹, soluções incubadas nas temperaturas 20,37,45°C por 24h λExc.:295nm, λEm:339nm

Tabela 4 9 Resultados das constantes de ligação do Ruibp-Rac calculadas a diferentes temperaturas, números de ligação do supressor, λExc:295nm, λEm:339nm

Temper atura (K)	Kb (mol ⁻ ¹.L)	n	R²	ΔΗ (J.mol.L ⁻¹ .K ⁻¹)	ΔS (J.mol.L ⁻¹ .K ⁻¹)	ΔG (J.mol.L ⁻¹)
293	9,8x10 ³	1	0,9996			-2,2x10 ⁴
310	1,4x10 ⁴	1	0,9784	1,4x10 ⁴	1,3x10 ²	-2,5x10 ⁴
318	1,5x10 ⁴	1	0,9984	±1,1x10 ³	±3,5x10 ¹	-2,6x10 ⁴

Tabela 4 10 Resultados das constantes de ligação do Ruibp-S calculadas a diferentes temperaturas, números de ligação do supressor, $\lambda Exc:295nm$, $\lambda Em:339nm$.

Temper atura (K)	Kb (mol ⁻ ¹.L)	n	R ²	ΔΗ (J.mol.L ⁻¹ .K ⁻¹)	ΔS (J.mol.L ⁻¹ .K ⁻¹)	ΔG (J.mol.L ⁻ ¹)
293	9,1x10 ³	1	0,985 8	1,6x10 ⁴	1,3x10 ²	-2,2x10 ⁴
310	1,3x10 ⁴	1	0,990 7	±2,4x10 ³	±7,7	-2,4x10 ⁴
318	1,5x10 ⁴	1	0,995 6			-2,6x10 ⁴

4.2.2 Estudo da estrutura secundaria do HSA na interação

Os espectros são mostrados nas gráficas das figuras 4.19 e 4.20.

Os espectros de HSA mostram duas bandas negativas importantes no dicroísmo circular em 208nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e em 222nm ($n \rightarrow \pi^*$), as quais são caraterísticas da hélice alfa da proteína, as mudanças, em porcentagem, são mostradas nas gráficas 4.21 a, b, c, para a hélice-alfa, folha beta e o fragmento randômico, respectivamente.

Se observa a diminuição da porcentagem da hélice alfa, de 59 a 56%, e o aumento na folha beta,24 a 28%, este comportamento também é achado na literatura com outros compostos que apresentam interação hidrofóbicas as quais sinalam que, a proteína induz algum desdobramento dos polipeptídeos de HSA, o que leva ao aumento da exposição de algumas regiões hidrofóbicas profundas ^[59, 63]. Os resultados são coerentes com os resultados das outras teses de doutorado do nosso laboratório^[14,15,18], mas, não na quantificação.



Figura 4 19 Espectro de Dicroísmo circular da HSA, cHSA: 15μmol.L⁻¹, mudando as concentrações dos compostos Ruibp-Rac (esquerda) e Ruibp-S (direita), 0-75 μmol.L⁻¹, soluções incubadas a 37°C por 24h.



Figura 4 20 Espectro de Dicroísmo circular da HSA, cHSA: 15μmol.L⁻¹, mudando as concentrações do composto Hibp-Rac (esquerda) e Hibp-S (direita), 0-300 μmol.L⁻¹, soluções incubadas a 37°C por 24h



Figura 4 21 Gráficos das porcentagens da a) hélice- α , b) β -folha e c) porção randômica da estrutura secundaria da HSA, variando a concentração de composto Ruibp, 0-75 µmol.L⁻¹, Hibp, 0-300 µmol.L⁻¹, soluções incubadas a 37°C por 24h.

4.3 INTERAÇÃO COM CT-DNA

4.3.1 Estabilidade na solução com DNA

O composto em solução tampão não é estável sozinho, ele começa a precipitar, dependendo da concentração no que foi feita a solução, para 20µmol.L⁻¹, espectrofotometricamente se tem observado que demora mais de 1h, ainda assim, a precipitação acompanhada de agitação é muito mais rápida, em consequência não seria útil para titulações sem algum componente estabilizante. Por outro lado, se observou que o complexo é estável na solução de CT-DNA, mas depende da concentração da solução do DNA, mostrando, na figura 4.22, que a partir da concentração de 5µmol.L⁻¹ o composto permanece estável ainda agitando continuamente, quando se observa em 221nm uma diminuição da banda indica que o complexo esta precipitando, este resultado indica que a partir da proporção de 4:1 (composto:CT-DNA), a solução pode ser usada na titulação. Resultados idênticos se acharam para o Ruibp-Rac.



Figura 4 22 Gráfica de A/Ao vs número de agitações, a 221nm, com espaços de 8min depois da agitação, dos compostos Ruibp-S 20μmol.L⁻¹, mudando as concentrações de CT-DNA:0,1,2,3,4,5,10 μmol.L⁻¹

4.3.2 Gráfica de Job

Usando os resultados de coeficiente de extinção dos compostos da tabela A1 em anexos, se fez os cálculos para as gráficas de Job^[64], da qual se pode achar as relações estequiométricas onde o composto e o CT-DNA apresentam uma maior resposta espectrofotométrica usando o gráfico χ vs A_{obs}- ϵ_{310} DNAx(cDNA)- ϵ_{310} Compostox(cComposto), sendo $\chi=c(composto)/(c(composto)+c(DNA))$.



Figura 4 23 Gráficas de Job em 310nm, dos compostos esquerda) Ruibp-Rac, direita) Ruibp-S. X: fracção molar do composto, Volume total: 3,0mL, c(CT-DNA)+c(Ruibp)= 24µmol.L⁻¹

Das gráficas de Job se encontrou que os compostos e o CT-DNA têm uma relação estequiométrica de 4:1, para ambos compostos, ainda assim, dos resultados desse analise se pode ter noções da estequiometria, mas não afirmações da estequiometria pois na literatura se encontraram estudos sobre esse analise, onde os resultados podem mudar em concentrações totais diferentes, para certos compostos ^[65].

4.3.3 Constantes de ligação

Com o objetivo de quantificar as constantes de afinidade dos compostos e o CT-DNA fizeram-se as titulações das soluções, partindo do composto na solução e adicionando concentrações conhecidas, 10 µmol.L⁻¹, de CT-DNA.



Figura 4 24 Espectros de Absorção na interação Ruibp e CT-DNA, c(composto): 30μmol.L⁻¹, mudando as concentrações de CT-DNA, 0-80 μmol.L⁻¹. A 23°C.

Como se mostra na figura 4.24 com o incremento na concentração de CT-DNA se observa uma diminuição nas bandas, hipocromismo em 310nm foi 18% e em 450nm foi 11%, atribuídas aos complexos, comprimentos de onda maiores a 300nm, se fizeram as diferenças entre as curvas sem CT-DNA e com CT-DNA, onde não se achou deslocamento batocrômico (deslocamento para comprimentos de onda maiores), nem hipsocrômico (deslocamento para comprimentos de onda menores). Devido a que o ligante absorbe em faixas menores a 300nm e com o propósito de atribuir as mudanças de absorbância à interação com o complexo, se fizeram os cálculos para comprimentos de onda maiores a 300nm. Se escolheu 310nm, atribuída à interação como comprimento de absorção, pois apresentava uma maior diminuição da banda e estava dentro da faixa de uso da lei de Lambert-Beer em espectrofotometria.

Usou-se as equações para estimar as constantes:

$$\frac{1}{A-Ao} = \frac{1}{[C][DNA]\varepsilon_b K_b} + \frac{1}{[C]\varepsilon_b}$$
(Eq. 13)

$$[C] + [DNA] = \frac{\varepsilon_b[C][DNA]}{A - Ao} - \frac{1}{K_b}$$
(Eq. 14)

$$\frac{[DNA]}{A-Ao} = \frac{[DNA]}{[C]\varepsilon_b} + \frac{1}{[C]\varepsilon_b K_b}$$
(Eq. 15)

$$\frac{A-Ao}{[DNA]} = -K_b(A-Ao) + [C]\varepsilon_b K_b$$
 (Eq. 16)

Sendo, [DNA]: Concentração da adição do CT-DNA, [C]: Concentração do composto, ε_b: coeficiente de extinção do produto (composto- CT-DNA), e K_b: Constante de ligação calculada. Usou-se as equações de: Benesi-Hildebrand(13), Benesi-Hildebrand modificada(14), Scott(15), Scatchard(16). Todas as equações são usadas para interações estequiométricas de 1:1, e as curvas são mostradas na figura 4.25.

Todas as curvas mostram linearidade (figura 4.25), a interação sugere ter uma estequiometria 1:1. Os resultados das constantes de ligação e coeficientes de extinção do produto são mostrados na tabela 4.11 e 4.12.



Figura 4 25 Gráficas das equações 13,14,15,16 para a interação Ruibp-S e CT-DNA, c(composto): 30μmol.L⁻¹, mudando as concentrações de CT-DNA, 0-80 μmol.L⁻¹. A 23°C

Tabela 4 11 Constante de ligação e coeficiente de extinção do produto formado a 23ºC, com o composto Ruibp-S

K _b	3	R ²	Equação
1,13x10 ⁴	6,34x10 ³	0,9977	13
1,15x10 ⁴	7,30x10 ³	0,9837	14
8,35x10 ⁴	7,42x10 ³	0,9837	15
8,62x10 ⁴	7,25x10 ³	0,9633	16

Tabela 4 12 Constante de ligação e coeficiente de extinção do produto formado a 23ºC, com o composto Ruibp-Rac

Кь	3	R ²	Equação
1,16x10 ⁴	5,11x10 ³	0,9996	13
1,61x10 ⁴	5,36x10 ³	0,9881	14
1,07x10 ⁴	5,42x10 ³	0,9874	15
1,09x10 ⁴	5,34x10 ³	0,9813	16

Os resultados das constantes de ligação resultantes, ainda não sendo semelhantes, apresentam a mesma ordem de grandeza.

Fizeram-se os mesmos cálculos para as temperaturas de 18, 37 e 43ºC, com a equação 13, os resultados são apresentados na tabela 4.13.

Tabela 4 13 Constante de ligação e coeficiente de extinção do produto formado a 18, 37 e 43°C, com os compostos

T(K)/Composto	K _b	R ²	3
291 /Ruibp-Rac	8,79x10 ³	0,9843	4,00 x10 ³
291/Ruibp-S	8,51x10 ³	0,9658	4,01 x10 ³
310 Ruibp-Rac	2,58x10 ⁴	0,9824	2,33 x10 ³
310/Ruibp-S	2,49x10 ⁴	0,9961	2,58 x10 ³
316 Ruibp-Rac	3,19x10 ⁴	0,8536	1,89 x10 ³
316/Ruibp-S	3,06x10 ⁴	0,9136	1,92 x10 ³

Para o cálculo dos parâmetros termodinâmicos usou-se as equações (Tomando como referência os resultados na temperatura de 316K):

$$ln\frac{K_{a2}}{K_{a1}} = \frac{1}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \Delta H$$
 (Eq. 17)^[17]

$$\Delta G = -RT ln K_a = \Delta H - T \Delta S \tag{Eq. 18}^{[68]}$$

Tabela 4 14 Parâmetros termodinâmicos da interação da interação CT-DNA-Composto

	Т	ΔH (J.mol⁻¹)	ΔS (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	ΔG (J.mol ⁻¹)
	(K)			
	291	3,94x10 ⁴	1,05 x10 ²	-2,20x10 ⁴
Ruibp-Rac	296	3,92x10 ⁴	9,32 x10 ¹	-2,30x10 ⁴
	310	2,91x10 ⁴	1,08x10 ¹	-2,62x10 ⁴
	316	-	-	-2,72x10 ⁴
	291	3,92x10 ⁴	1,05x10 ²	-2,19x10 ⁴
Ruibp-S	296	3,88x10 ⁴	9,29x10 ¹	-2,30x10 ⁴
	310	2,78x10 ⁴	9,20	-2,61x10 ⁴
	316	-	-	-2,71x10 ⁴

Dos resultados da tabela 4.14 se resume que Δ H>0, Δ S>0 e Δ G<0, o processo é endotérmico, espontâneo, e as interações predominantes são hidrofóbicas

nas condições testadas, o qual tem o mesmo perfil termodinâmico o Hoechst ^[45,71], mas não os valores.



4.3.4. Incrementando a força iônica

Figura 4 26 Gráficas de Ln(Kb) vs Ln [Na+], mudando a concentração de NaCl no meio, na titulação de Ruibp e CT-DNA. Na temperatura 23°C

As constantes de ligação foram calculadas nas titulações em soluções tampão com diferentes concentrações de cloreto de sódio (40, 150, 250 µmol.L⁻¹), se observaram as diferencias: 1. Aumento da turbidez nas soluções, 2. Houve a necessidade de aumentar a concentração de partida da adição de CT-DNA de 10 a 20 µmol.L⁻¹, pois acontecia a mesma precipitação que na figura 4.22.

Na figura 4.26 pode-se observar um aumento na constante de ligação com o incremento da concentração de NaCI, no artigo de O'Brien et al. ^[66] encontraram o mesmo fenômeno em concentrações elevadas de sais, eles estudaram as interações entre a proteína de união ao TATA e o DNA, onde se explica que este fenômeno pode ser provocado por dois efeitos 1. Alto diferencial de desidratação na formação da interface do ligante-DNA. Onde propõe que ao aumentar a concentração do sal diminui a concentração efetiva de agua na fase bulk (solido estendido) e decresce a atividade da agua. A agua em contato de resíduos hidrófobos adoptam uma conformação ordenada. Dando como resultado que, nos sítios de ligação altamente hidrofóbicos do ligante livre ou DNA um grande número de moléculas de água serão restritos. No momento de formar a ligação se produz a liberação dessas aguas à fase bulk, com uma atividade de agua reduzida, isso, causa um aumento na entropia contribuindo favoravelmente para a energia livre do sistema^[68,69].

Por outro lado, se sabe que o composto é lipofílico e precipita em meio aquoso. Nos resultados se observa que com o aumento na concentração de cloreto de sódio, incrementa a constante de interação, isso pode ser explicado pelo efeito de salting out, que se base em que com o incremento na forca iônica da solução aumentam as interações hidrofóbicas entre solutos não polares.

Este teste foi feito como tentativa de analisar a natureza da ligação, pois em interações predominantemente eletrostáticos, o aumento de concentração de sais no meio leva a uma diminuição das forças eletrostáticas da ligação composto-DNA. Um efeito contrário se tem visto nas soluções testadas.

4.3.5 Estudos de dicroismo na interação CT-DNA e compostos

Dos resultados das curvas da figura 4.27, parece ser que produto da turbidez associada à solução se tem sinais parecidas ao ruído, porém, em um estudo sobre a interação DNA-Rodamina B, conhecido ligante por sulco menor, sinala a existência de pontos isoelipticos nos comprimentos de onda 256 e 287nm é característico em ligações por ligante ponte e de sulco menor^[72], no caso de nossos compostos são encontrados em 253 e 291nm (Figura 4.27).



Figura 4 27 Espectro de Dicroísmo circular do CT-DNA, c(CT-DNA): 80 μ mol.L⁻¹, mudando as concentrações dos compostos a)Ruibp-Rac b)Ruibp-S, 0-100 μ mol.L⁻¹

Por outra parte, nos comprimentos de onda próximos a 221nm o composto absorbe fortemente, por ser onde o anel do ibuprofenato absorbe, as perturbações maiores aos limites do aparelho HT>800V^[75], medida de saturação do multiplicador, e nas concentrações usadas as bandas são

realmente significativas, devido a isso, se fizeram as análises em cubetas de 1mm de caminho ótico, onde se achou o decrescimento na banda de 221nm(figura 4.28), banda atribuída a interação da ligação por pontes de hidrogênio entre os nucleotídeos, um decrescimento sinala uma alteração nesta região, típico de ligantes de sulco menor, mesmo perfil de comportamento da interação DNA-netropsina, de interação por sulcos menores [^{73,74}].



Figura 4 28 Espectro de Dicroísmo circular da interação com CT-DNA, c(CT-DNA): 1,2mmol.L⁻¹, mudando as concentrações do Ruibp-Rac, 0-100 μmol.L⁻¹

4.3.6 Desnaturalização do CT-DNA

Os resultados da figura 4.29, experimentos feitos em concentrações em relações baixas [Ru]/[DNA]máx. =0,1, mostram que as temperaturas de desnaturalização não mudam significativamente, em outras palavras, na presencia do composto o DNA não incrementa a capacidade de estabilizar a dupla hélice significativamente (nas interações intercalantes ao DNA, acontece o fenômeno contrário)^[76].

Dos resultados da figura 4.30, experimentos feitos em concentrações em relações altas [Ru]/[DNA]máx. =1, mostram que as temperaturas de desnaturalização mudam significativamente até 4%, em outras palavras, na presencia do composto o DNA aumenta a capacidade de estabilizar a dupla hélice significativamente ^[77]. O que apontam que nestas concentrações as interações mostram certo grau de intercalação.



Figura 4 29 Gráfica de desnaturalização do CT-DNA de 40-90°C por absorção no UV-Vis, c(CT-DNA): 120μmol.L⁻¹, concentração dos compostos Ruibp, 10 μmol.L⁻¹, soluções incubadas a 37°C por 24h



Figura 4 30 Gráfica de desnaturalização do CT-DNA de 50-90°C por absorção no UV-Vis, c(CT-DNA): 60μmol.L⁻¹, concentração dos compostos Ruibp, 60 μmol.L⁻¹, soluções incubadas a 37°C por 24h

4.3.7 Efeitos fluorescentes como produto da interação

Como experimento adicional, se adicionou de NaCl, 10umol.L⁻¹ na solução, depois de ter alcançado o máximo de emissão, se observou incrementos na fluorescência.

Isto pode ser explicado, nas interações predominantemente eletrostáticas, quando todos os sítios de ligação do DNA ao complexo foram preenchidos ao adicionar sais iônicas o cátion do sal (Na⁺) toma o lugar do cátion do complexo e as bandas de fluorescência apresentam um comportamento decrescente, quer dizer, que com aumento da força iônica no médio a fluorescência da interação diminui, pois, os grupos fosfatos do DNA trocam o cátion do complexo pelos cátions de sódio. O comportamento oposto foi observado nos

resultados, daqui se pode inferir que aumentos na força iônica no meio incrementam a hidrofobicidade da interação^[68].



Figura 4 31 Espectro de fluorescência na interação Ruibp e CT-DNA, c(composto): 2µmol.L⁻¹, mudando as concentrações de CT-DNA, 0-80 µmol.L⁻¹

4.3.8 Estudos de competição com o CT-DNA

Os estudos feitos seguindo o procedimento mostraram que a florescência não é diminuída nem aumentada em concentrações de 12µmol.L⁻¹ e 14µmol.L⁻¹, mudando as concentrações dos compostos de [Ru]/[DNA]=0-1,2, os resultados não são mostrados.

Ensaios com o mesmo princípio se encontram na literatura, mas pela competição de Hoechst, e são achados com diferentes proporções de [Hoechst]/[DNA], estudos encontrados na literatura sobre a interação de Hoechst e DNA, mostram que ele tem múltiplos sítios de interação e o número de sítios depende da razão entre eles [Hoechst]/[DNA], onde se encontrou que

com um incremento na concentração diminui o número de bases por sitio diminui, e decresce a constante de ligação de associação ^[64].

Nos resultados em razoes baixas de [Hoechst]/[DNA] não se acharam diferenças significativas na fluorescência. (Resultados não mostrados).

Nos resultados em razoes altas de [Hoechst]/[DNA], observou-se o perfil mostrado na figura 4.32, a fluorescência, este fenômeno somado à florescência presentada pelo composto com CT-DNA, se pode interpretar que apresenta interação com o DNA mas não se pode quantificar quanto foi o deslocamento do composto em competição com o Hoechst 33342. Os dois apresentam comprimentos de emissão e excitação máximos, muito próximos.



Figura 4 32 Espectro de fluorescência na interação Ruibp e CT-DNA-Hoechst 33342, c(CT-DNA): 30μmol.L⁻¹, c(Hoechst 33342): 10μmol.L⁻¹, mudando as concentrações de composto, 0-14 μmolL⁻¹

4.4 ESTUDOS IN VITRO

4.4.1 Viabilidade celular

Os estudos foram feitos in vitro em células de gliobastoma humano na linhagem celular U87MG, nas concentrações de 50 a 200µmol L⁻¹, vendo inicialmente que nas concentrações de 50 e 75µmol.L⁻¹ o composto não apresentaria diferença relevante na atividade celular, se apresentam os resultados no intervalo de 100 a 200µmol.L⁻¹. Com o propósito de comparar a atividade dos compostos os estudos foram testados nas mesmas condições (mesmo dia, solvente e manipulador).

Como se mostra na figura 4.33, a atividade do composto é dose-dependente, onde na maior concentração de 200µmol L⁻¹ ele apresenta maior atividade, e para todas as concentrações testadas do composto a concentração celular foi estatisticamente diferente em relação ao controle, e também o composto é mais efetivo quanto maior é o tempo de incubação, alcançando seu máximo em 72h. Porém, não se observaram diferenças significativas no número de células,
o qual indica que a quiralidade dos ligantes não afeta na citotoxicidade nem nas propriedades de antiproliferação celular do composto. Na figura 4.33, se mostra que em ambos compostos o decrescimento celular é só observado em 48 e 72h, período no qual se dá o incremento da concentração celular.

A atividade antiproliferativa é mostrada na tabela 4.15, devido a que não decresce a porcentagem de células viáveis (número de células viáveis per células totais), em consequência, a droga não provoca morte celular mas tem atividade antiproliferativa.



Figura 4 33 Concentração celular (célula/mL) x tempo (h) para Rulbp(Rac) e Rulbp(S) por ensaio de azul de tripano para U87MG. [* p < 0.05; ** p<0.01; *** p<0.001]

Viabilidade Celular (%) para 200 μ mol.L ⁻¹					
	24 h	48 h	72 h		
Rulbp(Rac)	93.1 ± 3.3	96.9 ± 1.2	96.3 ± 0.6		
Rulbp(S)	93.7 ± 2.9	96.6 ± 1.6	97.5 ± 0.8		

Tabela 4 15 Viabilidade celular (%) para 200 μmol.L⁻¹ Rulbp(Rac) e Rulbp(S) por ensaio de azul de tripano

4.4.2 Ensaio de migração celular

Os efeitos sobre o processo de migração na linhagem de células U87MG em contato com os compostos foi investigado Rulbp(Rac) e Rulbp(S). Pois como já se explicou, os gliomas são tumores altamente invasivos, com características de alta progressão e recorrência da doença nos pacientes. De anteriores estudos se sabe que o composto racêmico inibe a migração celular (Tese Freitas 2017), e nesse teste foi feito com fins comparativos. Na figura 4.34, se mostra a capacidade das células de fechar a "ferida" depois de estar exposta aos compostos por 6 e 12h, onde se observa que as células tratadas com o composto Rulbp(S) migraram menos que no composto Rulbp(Rac). Além disso, se observa a presença de pontos escuros, o que significa que na célula ou na superfície externa dela acumula uma grande parte dos compostos, como resultado peculiar parece ser que os pontos escuros são mais notáveis nas células tratadas com o Rulbp(Rac) que com o Rulbp(S). A porcentagem da área que "fechou" é mostrada na figura 4.35 e os dados na tabela 4.16, onde os resultados indicam que as células tratadas com Rulbp(S) migraram em menos que aquelas tratadas com Rulbp(Rac), com diferenças estatisticamente significativas(figura 4.35)



Figura 4 34 Imagens da Migração celular para U87MG para o controle, Rulbp(Rac) e Rulbp(S) nos tempos 0 e 12h.



Figura 4 35 Ensaio de migração celular para U87MG. Gráfica das percentagens da migração celular para o controle Rulbp(Rac) e Rulbp(S). [* p < 0.05 (em referência ao controle); ** p<0.01 (em referência ao controle); * p<0.05 (entre ambos compostos)]

	6h	12 h
Controle	51,4 ± 16,1	87,2 ± 2,2
Rulbp(Rac)	53,8 ± 17,7	80,4 ± 2,6
Rulbp(S)	53,1 ± 7,1	$68,3 \pm 5,8$

Migração Celular (%) para 200 μmol.L⁻¹

Tabela 4 16 Migração celular (%) para 200 mol.L-1 Rulbp(Rac) and Rulbp(S)

Os ensaios mostraram que os dois compostos têm atividade anti-proliférica sem diferenças estatísticas significas, isso, significa que os mecanismos de interação dos compostos com as células não são enantioseletivos. Os quais podem ser por interações eletrostáticas ou hidrofóbicas.

No entanto, na migração celular se achou diferenças significativas no tempo de migração de 12h, 80,4% a 68,3% (P<0,05), a diferença na migração, pode ser por mecanismos enantioseletivos que só estão envolvidos na interação entre as proteínas encarregadas da mobilidade celular com os compostos, como no caso do o,p'-diclorodifeniltricloroetano (DDT), pesticida organoclorado, que em células de câncer de mama MCF-7, mostrou propriedades de migração celular diferenciadas, explicadas pela indução de propriedades de adesão celular diferentes e porque um dos enantiômero promove maior invasão celular por ter

maior afinidade com um componente endógeno, promotor de crescimento de células cancerígenas de mama (He 2015)^[80].

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo principal do trabalho foi contribuir à linha de pesquisa de nosso grupo respeito ao desenvolvimento de conhecimentos relacionados com as interações com albumina de soro humano e o CT-DNA, para assim estudar possíveis mecanismos de ação, dos complexos de dirutênio com ligantes quirais ou racêmicos, derivados de FAINEs.

O complexo precursor e os complexos análogos foram sintetizados de acordo às metodologias desenvolvidas do grupo. As análises de caracterização confirmaram o produto formado. Analises comparativos das medições termogravimétricas foram feitos para ambos compostos.

Estudos termodinâmicos foram realizados para os compostos e a HSA, os quais indicaram que ambas interações são espontâneas Δ G<0 e endotérmicas Δ H>0, com Δ S>0, em resumo, apresentam contribuições principalmente hidrofóbicas. Fenômeno evidenciado também no analise das mudanças da estrutura secundarias da HSA em presença dos compostos. Os resultados mostraram que os dois complexos interagem com a albumina de soro com a mesma afinidade sem que fosse observado alguma enanteoseletividade.

Os resultados das interações com CT-DNA sinalam que os compostos têm uma boa afinidade com o CT-DNA Kb>10⁴ e dos resultados dos parâmetros termodinâmicos se sabe que as interações são principalmente hidrofóbicas, ambas interações são espontâneas Δ G<0 e endotérmicas Δ H>0, com Δ S>0, apresenta contribuições principalmente hidrofóbicas. As interações também foram analisadas no dicroísmo circular onde apresenta características de sulco menor, além disso analises de desnaturalização térmica mostram que só em altas razoes do composto/DNA ele apresenta características de intercalação ao CT-DNA.

Foi observada a fluorescência na interação com o CT-DNA, fenômeno que é reconhecido em compostos mononucleares de Ru(II).

Nos estudos de viabilidade celular não se achou atividade diferenciada entre os compostos. Porém, nos resultados dos estudos de migração celular se acharam diferencias significativas e isso pode ser devido a mecanismos enantioseletivos que só estão envolvidos na interação entre as proteínas encarregadas da mobilidade celular com os compostos.

6. REFERENCIAS

- 1. Alessio E., Bioinorganic Medicinal Chemistry, 1st Edition, 2011.
- 2. Dabrowiak J., Metals in medicine, 1stEdition, 2009.
- Lazarevi T., Rilak A., Zivadin D., Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives European Journal of Medicinal Chemistry 142, 8-31(2017)
- Cotton F. A., Murillo C., Walton R., Multiple bonds between metal atoms, 3st Edition, 2005
- Clarke M., Ruthenium metallopharmaceuticals, Coordination Chemistry Reviews Volume 232, Issues 1–2, pages 69-93, 2002.
- De Oliveira Silva D., D.Anti-CancerAgents in Medicinal Chemistry, 10, 312, 2010.
- Aquino M., Diruthenium and diosmium tetracarboxylates: synthesis, physical properties and applications. Coordination Chemistry Reviews, 170, 141–202, 1998.
- Aquino M., Recent developments in the synthesis and properties of diruthenium tetracarboxylates Coordination Chemistry Reviews 248 1025–1045(2004)
- 9. Andrade A., Namora S.F., Woisky R.G., Wiezel G., Najjar R., Sertie J.A.A., de Oliveira Silva D. Synthesis and characterization of a

diruthenium–ibuprofenato complex Comparing its anti-inflammatory activity with that of a copper(II)–ibuprofenato complex Journal of Inorganic Biochemistry 81 23–27(2000)

- Complexos de dirutênio com os fármacos ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, naproxeno, indometacina, e com ácido y-linolêncio: Síntese, caracterização, avaliação da ação antiproliferativa sobre células tumorais e estudo da interação da unidade dimetálica com adenina e adenosina, Geise Ribeiro, Tese de Doutorado, Instituto de Química USP, 2006
- Ribeiro G., Benadiba M., Colquhoun A., de Oliveira Silva D., Diruthenium(II, III) complexes of ibuprofen, aspirin, naproxeno and indomethacin non-steroidal anti-inflammatory drugs: Synthesis, characterization and their effects on tumor-cell proliferation. Polyhedron 27, 1131–1137 (2008)
- Santos R., Bergamo A., Sava G., de Oliveira Silva D., Synthesis and characterization of a diruthenium(II,III)–ketoprofen compound and study of the in vitro effects on CRC cells in comparison to the naproxen and ibuprofen derivatives. Polyhedron 42, 175–181(2012)
- Benadiba M., Costa I., Santos R., Oliveira Serachi F. D. de Oliveira Silva, Colquhoun A., Growth inhibitory effects of the Diruthenium-Ibuprofen compound, [Ru2Cl(Ibp)4], in human glioma cells in vitro and in the rat C6 orthotopic glioma in vivo, Biol. Inorg. Chem. 19, 1025–1035(2014)
- Metalofármacos de rutênio: síntese, caracterização, atividade frente à linhagem celular K562 e estudos de interação com albumina de soro humano (HSA) Renata Rolim Prudente dos Santos, Tese de Doutorado, Instituto de Química USP, 2009
- Estudo da interação de metalofármacos de dirutênio-anti-inflamatórios com as proteínas séricas transferrina e albumina, Rute Nazaré Fernandes Sanches, Tese de Doutorado, Instituto de Química USP, 2016

- Santos R., van Eldikb R., de Oliveira Silva D., Kinetic and mechanistic studies on reactions of diruthenium(II,III) with biologically relevant reducing agentes. Dalton Trans., 42, C, 16796-16805 (2013)
- Santos R., Sanches R., de Oliveira Silva D., Spectroscopic studies on interactions of the tetra kis(acetato)chloridodiruthenium(II,III) complex and the Ru2(II,III)-NSAID derived metallodrugs of ibuprofen and ketoprofen with human 1035(2014)
- Metalofármacos de rutênio: síntese, caracterização, atividade frente à linhagem celular K562 e estudos de interação com albumina de soro humano (HSA) Renata Rolim Prudente dos Santos, Tese de Doutorado, Instituto de Química USP, 2009
- Santos R., van Eldik R., de Oliveira Silva D., Thermodynamics of Axial Substitution and Kinetics of Reactions with Amino Acids for the Paddlewheel Complex Tetrakis(acetato)chloridodiruthenium(II,III). Inorg. Chem., 51, 12, 6615-6625 (2012)
- 20. Lin G., You Q., Cheng F., Chiral Drugs: Chemistry and Biological Action, First Edition, 2011
- 21. Graham P., An Introduction to Medicinal Chemistry 5th Edition, 2013.
- 22. Antonarakis E., Emadi A., Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? Cancer Chemother Pharmacol 66:1–9 (2010)
- 23. Wsól V., Skálová L., Szotáková B., Chiral Inversion of Drugs: Coincidence or Principle? Current Drug Metabolism, 5, 517-533 (2004)
- Thompson D., Barker J., Villalobos L., Ciclosi M., Elsby R., Liu B., Fanwick P., Ren T., Diruthenium(II,III) tetracarboxylates catalyzed H2O2 oxygenation of organic sulfides 424, 150-155 (2015)
- 25. Rabbani G., Nate S., Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo International Journal of Biological Macromolecules, 123, 979–990(2019)

- Massai L., Pratesia A., Gailer J., Marzo T., Messori L., The cisplatin/sérum albumin system: A reappraisal, Inorganica Chimica Acta 495 (2019)
- 27. Boldt J. Use of albumin: an update British Journal of Anaesthesia104 (3):276–84 (2010)
- Al-Harthi S., Lachowicz J., Nowakowskia M., Jaremko M., Jaremko Towards the functional high-resolution coordination chemistry of blood plasma human serum albumin Journal of Inorganic Biochemistry 198 110716(2019)
- Merlino A. Interactions between proteins and Ru compounds of medicinal interest: A structural perspective Coordination Chemistry Reviews 326 111–134(2016)
- M. Raveraa, S. Baraccoa, C. Cassinoa, D. Colangelob,G. Bagnic, G. Savad,e, D. Osellaa, Electrochemical measurements confirm the preferential bondingof the antimetastatic complex [ImH][RuCl4(DMSO)(Im)](NAMI-A) with proteins and the weak interaction with nucleobases, Journal of Inorganic Biochemistry 98 984–990(2004)
- O. Domotor, C. Hartinger, A. Bytzek, T. Kiss B. Keppler E. Enyedy Characterization of the binding sites of the anticancer ruthenium(III) complexes KP1019 and KP1339 on human serum albumin via competition studies J Biol Inorg Chem 18:9–17 (2013)
- 32. K. Polec-Pawlak1* J. Abramsk, O. Semenova, C. Hartinger, A. Timerbaev B. Keppler, M. Jarosz. Platinum group metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis inductively coupled plasma-mass spectrometry: A further insight into the reactivity of a novel antitumor ruthenium(III) complex toward human serum proteins Electrophoresis, 27, 1128–1135 (2006)
- Sulyok M., Hann S., Hartinger G., Keppler B., Stingedera G., Koellensperger G. , Two dimensional separation schemes for investigation of the interaction of an anticancer ruthenium(III) compound with plasma proteins, J. Anal. At. Spectrom., 20, 856–863(2005)

80

- Heffeter P., Böck K. Atil B., Reza M Körner W. Bartel C., Jungwirth U. Keppler B., Micksche M., Berger W., Koellensperger G. Intracellular protein binding patterns of the anticancer ruthenium drugs KP1019 and KP1339 J Biol Inorg Chem. (2010)
- Michael I. Webb and Charles J. Walsby Control of ligand-exchange processes and the oxidation state of the antimetastatic Ru(III) complex NAMI-A by interactions with human serum albumin Dalton Trans., 40, 132. (2011)
- Novohradský V¹, Bergamo A, Cocchietto M, Zajac J, Brabec V, Mestroni G, Sava G.Influence of the binding of reduced NAMI-A to human serum albumin on the pharmacokinetics and biological activity Dalton Trans. 28;44(4):1905-13. (2015)
- Alessio E., Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective Eur. J. Inorg. Chem., 1549–1560(2017)
- Groessl M, Tsybin YO, Hartinger CG, Keppler BK, Dyson PJ. Ruthenium versus platinum: interactions of anticancer metallodrugs with duplex oligonucleotides characterised by electrospray ionisation mass spectrometry. J Biol Inorg Chem. 15(5):677-88. (2010)
- Nakamoto K., Tsuboi M., Strahan G. DRUG–DNA INTERACTIONS STRUCTURES AND SPECTRA, Wiley. (2008)
- Brabec V., Kasparkova J., Ruthenium coordination compounds of biological and biomedical significance. DNA binding agents Coordination Chemistry Reviews 376 75–94(2018)
- 41. B. Pages, D. Wrightb ,J. Aldrich-Wright Metal complex interactions with DNA Dalton Trans., 44, 3505-3526(2015)
- 42. Gill MR, Jarman PJ, Halder S, Walker MG, Saeed HK, Thomas JA, Smythe C, Ramadan K, Vallis K.A three-in-one-bullet for oesophageal cancer: replication fork collapse, spindle attachment failure and enhanced radiosensitivity generated by a ruthenium(ii) metallointercalator Chem Sci. 16;9(4):841-849 2017

- Ma DL1, Che CM, Siu FM, Yang M, Wong KY. DNA binding and cytotoxicity of ruthenium(II) and rhenium(I) complexes of 2-amino-4phenylamino-6-(2-pyridyl)-1,3,5-triazine Inorg Chem. 5;46(3):740-9. 2007
- Kong Y, Chen F, Su Z, Qian Y, Wang FX, Wang X, Zhao J, Mao ZW, Liu HK6. Bioactive ruthenium(II)-arene complexes containing modified 18β-glycyrrhetinic acid ligands J Inorg Biochem ;182:194-199 2018
- Peter L. Privalov, A Dragan, C Crane-Robinson, Kenneth J. Breslauer, David P. Remeta2 and Conceição A. S. A. Minetti What Drives Proteins into the Major or Minor Grooves of DNA? J. Mol. Biol 365, 1–9. (2007)
- 46. Koichi Takahashi, Hitomi Sakano, Nanako Numata, Shiho Kuroda, Nobuyasu Mizuno Effect of Fatty Acid Diesters on Permeation of Antiinflammatory Drugs Through Rat Skin DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY Vol. 28, No. 10, pp. 1285–1294, 2002
- Estudo de propriedades físico-químicas de metalofármacos de dirutênio com anti-inflamatórios não esteroides, Iguatinã de Melo Costa, Tese de Doutorado, Instituto de Química USP, 2014
- Betsel, <u>http://bestsel.elte.hu</u> Programa K2d, último acesso setembro 2018
- 49. Colthup N., Daly L., Wiberley S., Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, 3rd Edition, 1990.
- Nakamoto K., Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry, 6th Edition, 2009.
- 51. M. Rusjan, E. Sileob, F. Cukiernika, Thermal stability of mixed-valent diruthenium (II,III) carboxylates Solid State Ionics 159 389– 396(2003)
- F. A. Cotton, Vincent M. Miskowski, Bianxiao Zhong Chemistry, Structure, and Bonding in Diruthenium(II) Tetracarboxylates J. Am. Chem. Soc., Vol. III, No. 16, 6177-6182 (1989)

- Phillips C, Michniak B Transdermal delivery of drugs with differing lipophilicities using azone analogs as dermal penetration enhancers J Pharm Sci;84(12):1427-33 (1995)
- A. AvdeefK. J. BoxJ. E. A. ComerC. HibbertK. Y. Tam pH-Metric logP 10. Determination of Liposomal Membrane-Water Partition Coefficients of lonizable Drugs Pharmaceutical Research 15, 2, 209–215(1998),
- Stuer-Lauridsen, Birkved M, Hansen LP, Lützhøft HC, Halling-Sørensen
 B. Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. Chemosphere;40(7):783-93. (2000)
- Scheytt T, Mersmann P, Lindstädt R, Heberer T ,1-Octanol/Water Partition Coefficients of 5 Pharmaceuticals from Human Medical Care: Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, and Propyphenazone Water, Air, and Soil Pollution 165, 1–4, 3–11(2005)
- 57. Joseph R. Lakowicz Principles of Fluorescence Spectroscopy Third Edition, Springer, 2006
- 58. J Takarada, A Guedes, R Corre, E Silveira-Lacerda, S Castellia, F lacovelli, V Deflond, A Azevedo Batist, A Desideria, Ru/Fe bimetallic complexes: Synthesis, characterization, cytotoxicity and study of their interactions with DNA/HSA and human topoisomerase IB Archives of Biochemistry and Biophysics 636 28–41 (2017)
- 59. S Veeralakshmi, G Sabapathi, S Nehru, P Venuvanalingam, S Arunachalam Surfactant-cobalt(III) complexes: The impact of hydrophobicity oninteraction with HSA and DNA – insights from experimental and theoretical approach Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 153 85–94 (2017)
- Y Wang, H Zhang, G Zhang, W Tao, S Tang, Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study Journal of Luminescence 126 211–218(2007)
- 61. L Deschamps-Labat, F Pehourcq, M Jagou, B Bannwarth Relationship between lipophilicity and binding to human serum albumin of

arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 16 223–229 (1997)

- Ross PD, Subramanian S, Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. Biochemistry. 26;20(11):3096-102. (1981)
- S Yasrebia, R Takjoo, G Riazi, HSA-interaction studies of uranyl complexes of alkyl substituted isothiosemicarbazone Journal of Molecular Structure 1193 53-61 (2019)
- 64. F. Loontiens, P Regenfuss, A Dumortier, R Clegg, Binding Characteristics of Hoechst 33258 with Calf Thymus DNA, Poly[d(A-T)], and d(CCGGAATTCCGG): Multiple Stoichiometries and Determination of Tight Binding with a Wide Spectrum of Site Affinities, Biochemistry, 29, 9029-9039 (1990)
- D. Hibberta, P Thordarson The death of the Job plot, transparency, open science and online tools, uncertainty estimation methods and other developments in supramolecular chemistry data analysis Chem. Commun., 52, 12792(2016)
- R O'Brien, B DeDecker, K. Fleming, P. Sigler, J. Ladbury, The Effects of Salt on the TATA Binding Protein-DNA Interaction from a Hyperthermophilic Archaeon J. Mol. Biol. 279, 117-125(1998)
- 67. H. Rehman, T. Freitas, R. Gomes, A. Colquhoun, D. de Oliveira Silva, Axially-modified paddlewheel diruthenium(II,III)-ibuprofenato metallodrugs and the influence of the structural modification on U87MG and A172 human glioma cell proliferation, apoptosis, mitosis and migration Volume 165, Pages 181-191(2016)
- N Kausar, A Shaheena, A Yaquba, F Perveena, S Sabahata, M Mumtaz, C Jacob, L Aicha, A. Mohammed, Flavonoid–DNA binding studies and thermodynamic parameters Spectrochimica Acta Part A 79 1600– 1604(2011)
- 69. S. Feketea, J Veutheya, A Beckb, D Guillarme Hydrophobic interaction chromatography for the characterization of monoclonal antibodies and

related products. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 130 3–18(2016)

- Adam N. Boynton, Lionel Marcelis, Anna J. McConnell, Jacqueline K. Barton A Ruthenium(II) Complex as a Luminescent Probe for DNA Mismatches and Abasic Sites Inorg. Chem., 56, 8381–8389 (2017)
- Chaires J. Energetics of Drug–DNA Interactions Biopolymers.;44(3):201-15 (1997)
- M. Islam, M Chakraborty, P Pandya, A Al Masum, N Gupta, S Mukhopadhyay Binding of DNA with Rhodamine B: Spectroscopic and molecular modeling studies Dyes and Pigments 99 412-422(2013)
- 73. C Gondeau, J C Maurizot, M Durand Circular dichroism and UV melting studies on formation of an intramolecular triplex containing parallel T*A:T and G*G:C triplets: netropsin complexation with the triplex Nucleic Acids Res. 1; 26(21): 4996–5003. (1998)
- A Kellett, Z Molphy, C Slator, V McKee N. Farrell Molecular methods for assessment of non-covalent metallodrug–DNA interactions Chem. Soc. Rev., 48, 971(2019)
- 75. L Zanphorlin, R. Ruller Uso da técnica de dicroísmo circular para avaliação de proteínas com aplicações biotecnológicas, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, Memorando Técnico (2016)
- 76. P Anitha, N Chitrapriya, Y Jang, P Viswanathamurthi, Synthesis, characterization, DNA interaction, antioxidantand anticancer activity of new ruthenium(II) complexesof thiosemicarbazone/ semicarbazone bearing9,10-phenanthrenequinone Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 129 (2013) 17–26
- 77. L Perdisatta, S Moqadasia, L O'Neillb, G Hessmanc, A Ghiond, M Qasim M Warraichd, A Caseyb, C O'Connor, Journal of Inorganic Biochemistry Synthesis, characterisation and DNA intercalation studies of regioisomers of ruthenium (II) polypyridyl complexes Journal of Inorganic Biochemistry 182 71–8272(2018)

- G Li, L Sun, L Ji, H Chao, Ruthenium(II) complexes with dppz: from molecular photoswitch to biological applications Dalton Trans., ,45, 13261-13276 (2016)
- I Haq, P Lincoln, D Suh, B Norden, B Chowdhry, J B. Chaires Interaction of - and - [Ru(phen)2DPPZ]2+ with DNA: A Calorimetric and Equilibrium Binding Study J. Am. Chem. Soc., 117, 4788-4796 (1995)
- X He, X Dong, D Zou, Y Yu, Q Fang, Q Zhang, M Zhao, Enantioselective Effects of o,p'-DDT on Cell Invasion and Adhesion of Breast Cancer Cells: Chirality in Cancer Development Environ. Sci. Technol., 49, 10028–10037 (2015).
- 81. T Ohnishi, S Hiraga, S Izumoto, H Matsumura, Y Kanemura, N Arita T Hayakawa Role of fibronectin-stimulated tumor cell migration in glioma invasion in vivo: clinical significance of fibronectin and fibronectin receptor expressed in human glioma tissues Clin. Exp. Metastasis, 16, 729–741 1998
- F. Svensson, M Abrahamsson, Niklas Stromberg, A. Ewing, P Lincoln Ruthenium(II) Complex Enantiomers as Cellular Probes for Diastereomeric Interactions in Confocal and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy e |J. Phys. Chem. Lett., 2, 397–401 2011
- F Svensson, M Matson, M Li, P Lincoln, Lipophilic ruthenium complexes with tuned cell membrane affinity and photoactivated uptake Biophysical Chemistry 149 102–106 (2010)

84. M Date B N. Dominy, Commun. Comput. Phys. Vol. 13, No. 1, pp. 90-106, (2013)

7. ANEXO

Tabela dos Coeficientes de extinção dos compostos em 310nm

Coeficiente de extinção dos compostos em 310nm				
	E ₃₁₀	R ²		
Rulbp(Rac)	14608,6± 1082,3	0,9977		
Rulbp(S)	14573,5± 1312,9	0,9851		

ANEXO- SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Sandra Cristel Quispe Martínez Nascimento: Lima-Lima, Perú.

EDUCAÇÃO ACADÊMICA

<u>MESTRADO</u>: Ciências (Química) – Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo, Perú, período, 08/2017 a 09/2019 <u>GRADUAÇÃO</u>: Químico – Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Perú,

período, 04/2009 a 05/2014

EXPERIECIA PROFESSIONAL E ATIVIDADES CIENTIFICAS

Instituto de Química da Universidade de São Paulo - Laboratório de Química Inorgânica Sintética e Estrutural, Bioinorgânica e Metalofármacos

Pesquisador – Bolsista de Pós-graduação de Química (Mestrando) – 2016 a 2019

- Desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado "
- Estágio do Programa de Aperfeiçoamento do Ensino na disciplina de química dos elementos, no curso de graduação de Química, 03/2017 a 06/2017;

<u>CERPER</u>

Lima-Perú, 2015-2016

• Analista químico de alimentos en el área de fisicoquímica.

B.C.S. Spices

Lima-Perú, 2014 a 2015

• Auxiliar del departamento de Calidad e inocuidad, y analista de laboratorio.

Universidad de Lima

Lima-Perú, 2013 a 2014

• Asistente del laboratorio de investigación de la facultad de ingeniería Industrial en proyecto CONCYTEC-Universidad de Lima.

BOLSAS DE ESTUDO

 <u>2016-2018</u>: Bolsa de Mestrado – A Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPQ), CNPQ PROEX processo 33002010191P0;

PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

A Ru(II)-p-cymene compound bearing naproxen-pyridineamide. Synthesis, spectroscopic studies, computational analysis and in vitro anticancer activity against lung cells compared to Ru(II)-p-cymene-naproxen and the corresponding drug ligands Julie Pauline Gaitan Tabares, Rodrigo Luis S.R. Santos, Jefferson Luiz Cassiano, Marcio H. Zaim, João Honorato, Alzir A. Batista, Sarah F. Teixeira, Adilson Kleber Ferreira, Rommel B. Viana, Sandra Quispe Martínez, Antonio Carlos Stábile, Denise de Oliveira Silva, Inorganica Chimica Acta 489 (2019) 27–38