



**UNIVERSIDADE DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO**

**COMPLEXOS ANTI-TUMORAIS DE COBRE E VANÁDIO CONTENDO
DERIVADOS DA VITAMINA B₆ E FENANTROLINAS**

Patrique Nelson Ramos Nunes

Orientadora: Doutora Maria Isabel Rodrigues Correia

Co-Orientador: Doutor João Emídio da Silva da Costa Pessoa

Tese aprovada em provas públicas para obtenção do Grau de Doutor em
Química

Qualificação atribuída pelo Júri: Aprovado



UNIVERSIDADE DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO

**COMPLEXOS ANTI-TUMORAIS DE COBRE E VANÁDIO CONTENDO
DERIVADOS DA VITAMINA B₆ E FENANTROLINAS**

Patrique Nelson Ramos Nunes

Orientadora: Doutora Maria Isabel Rodrigues Correia

Co-Orientador: Doutor João Emídio da Silva da Costa Pessoa

Tese aprovada em provas públicas para obtenção do Grau de Doutor em Química
Qualificação atribuída pelo Júri: Aprovado

Júri:

Presidente: Doutora Maria Teresa Nogueira Leal da Silva Duarte, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa.

Vogais:

Doutora Maria da Conceição Santos Silva Rangel Gonçalves, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto.

Doutora Maria de Fátima Costa Guedes da Silva, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa.

Doutora Isabel Maria Palma Antunes Cavaco, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve.

Doutora Maria Isabel Rodrigues Correia, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa.

Doutora Ana Isabel Antunes Tomaz Diniz, individualidade reconhecida na área científica em que se insere a tese.

Instituição financiadora: Fundação para a Ciência e Tecnologia

O trabalho apresentado nesta tese foi realizado no grupo de Química Bioinorgânica e de desenvolvimento de Fármacos (BIOIN) do Centro de Química Estrutural (CQE), no Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa. Com o suporte financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FTC) referência SFRH/BD/108743/2015.

À minha Esposa e Filha

Aos meus Familiares e Amigos

Agradecimentos

O trabalho apresentado nesta tese foi realizado nos laboratórios do grupo de Química Bioinorgânica e Desenvolvimento de Medicamentos (BIOIN) do Centro de Química Estrutural (CQE), no Instituto Superior Técnico sob a orientação da Doutora Isabel Correia e co-orientação do Professor João Costa Pessoa. Agradeço a utilização das instalações. Agradeço aos Centros Portugueses RMN e de Espectrometria de Massa IST-UL pelo acesso ao equipamento, à Ana Dias pelas medições.

Agradeço à Fundação para a Ciência e a tecnologia (FTC) a bolsa de doutoramento SFRH/BD/108743/2015.

O meu trabalho beneficiou muito de várias colaborações para ensaios baseados em células e gostaria de agradecer à Dra. Ceyda Acilan, Dra. Fernanda Marques e Dr. Ignacio Leon, e seus colegas de trabalho.

Gostaria de agradecer aos meus orientadores de doutoramento, à doutora Isabel Correia e ao professor João Pessoa pela sua orientação, todo apoio e paciência durante o meu doutoramento, bem como pelas suas valiosas sugestões e disponibilidade durante todo este tempo.

Um agradecimento também aos meus colegas de Gabinete, Centro de Química Estrutural (CQE), no Instituto Superior Técnico, nomeadamente à Doutora Marta Andrade e à bolseira Inês Santos.

A todos os meus amigos QA da Faculdade de Ciências e Tecnologia, que direta ou indiretamente melhoraram os meus dias, em especial, Sofia Martins, Raquel Teixeira, Joana Pais, Bárbara Chagas, Ricardo Melo, Luís Pinto, António Barata, Leonardo Mendes, Vitor Silva, André Costa, Catarina Custódio, Vanessa Nascimento, Ricardo Barata, Ana Lucena e João Lopes a maioria de vós grandes cientistas, obrigado a todos pela amizade e pelo companheirismo.

A todos aqueles com os quais me cruzei ao longo do meu percurso académico e que sempre se mostraram disponíveis para me orientar ou colaborar em todos os momentos.

Gostaria também de agradecer aos que sempre me apoiaram nos bastidores: aos meus pais, aos meus sogros, aos meus irmãos, aos meus

cunhados, e restante família de sangue e de coração, por todo o apoio e incentivo para que eu terminasse mais esta etapa.

Um agradecimento mais que especial à minha mulher, amiga, companheira e confidente, Cristina Oliveira, e à nossa filha Lara, que apesar de todas dificuldades e provações estiveram sempre lá. Vocês são a base da minha pirâmide, obrigada por tudo.

Resumo

Complexos antitumorais de cobre e vanádio contendo derivados da vitamina B₆ e 1,10-fenantrolinas

O trabalho apresentado abrange a síntese e caracterização de complexos de Cu(II) e V(IV)O com bases de Schiff derivados da vitamina B₆, contendo ou não co-ligandos heterocíclicos aromáticos do tipo N,N (tais como 1,10-fenantrolina e derivados), bem como a avaliação do potencial dos mesmos como candidatos a aplicação terapêutica antitumoral. Os ligandos usados envolvem a utilização de moléculas bioativas tais como derivados de cromonas, salicilato, 1,10-fenantrolinas e derivados, ou bipyridilos. A estabilidade dos complexos em meios aquosos tamponizados a pH fisiológico e em meios de incubação celular é avaliada de modo a permitir uma adequada compreensão da atividade biológica observada.

Nos **capítulos 3 e 4** foi estimado o potencial antioxidante dos complexos, obtendo-se alguns resultados comparáveis com o composto de referência. Tanto no **capítulo 4** como no **capítulo 5** verificou-se que os complexos de cobre revelaram ser mais citotóxicos que os complexos de vanádio em diversas linhas de células tumorais humanas estudadas. A introdução de phen nos centros metálicos de Cu(II) e V(IV)O afeta positivamente os valores de IC₅₀. A citotoxicidade determinada nestas séries de complexos encontra-se dentro dos valores observados para outros complexos candidatos a fármacos antitumorais. No entanto os complexos contendo as bases de Schiff derivados de cromonas (**capítulo 3**) apresentam baixa seletividade. A interação dos complexos com biomacromoléculas (BSA e o DNA) relevantes é avaliada por diversas técnicas espectroscópicas, e as constantes de associação determinadas, sendo também discutida a relação entre as características estruturais dos compostos com a atividade biológica observada. Os complexos revelarem interagirem com a BSA com formação de novas espécies com possível dissociação da phen, que poderá ter influência nas citotoxicidades observadas para as células tumorais.

No **capítulo 5** é também estudado o tipo de morte celular e ensaios preliminares acerca do mecanismo de ação, sendo observado um aumento da

externalização de fosfatidilserina acompanhado do aumento da permeabilidade membranar, dependendo da concentração do complexo adicionado, conclui-se que a morte celular seja por apoptose induzida pela produção de ROS intracelular.

Nos **capítulos 6 e 7** foram realizados estudos em meios de incubação celular com o intuito de determinar a especiação dos complexos de Cu(II) e V(IV) constituídos por ligandos lábeis do tipo N,N (tais como 1,10-fenantrolina e derivados), e avaliar o seu impacto na citotoxicidade e na compreensão dos mecanismos de morte celular para este tipo de complexos. Foram também realizados estudos compreendendo sistemas do tipo Cu^{II}-phen ou V^{IV}O-phen e biomoléculas presentes no plasma sanguíneo, como a albumina, recorrendo a técnicas espectroscópicas, de modo a esclarecer quais as espécies formadas e predominantes. Tendo sido também determinadas as suas constantes de ligação dos iões de Cu(II) à BSA e à phen assim como as constantes de formação de diversas espécies mais relevantes nesse sistema ternário. Concluiu-se também que os complexos de Cu^{II}-phen ou V^{IV}O-phen sofrem especiação nos meios de incubação celular que tem implicações na citotoxicidade observada, uma vez que a libertação da phen (biologicamente ativa) terá muito provavelmente um alvo distinto do ião metálico.

A distribuição e captação celular desta série de complexos foi estudada e a sua relação com a ação biológica discutida. Prepararam-se 31 compostos, dos quais 13 novos complexos de cobre, 4 novos complexos de vanádio e 7 novos pró-ligandos. Foram ainda preparados 7 compostos, 4 de zinco e 3 de ferro para efeitos de comparação.

Abstract

Anti-tumour complexes of copper and vanadium containing vitamin B₆ derivatives and 1,10-phenanthrolines

The work presented includes the synthesis and full characterization of Cu(II) and V(IV)O complexes with Schiff bases derived from vitamin B₆, containing or not heterocyclic aromatic N,N type moieties (such as 1,10-phenanthroline and derivatives) and the evaluation of their potential as candidates for antitumor therapy. The ligands developed include bioactive molecules such as chromone derivatives, salicylate, 1,10-phenanthroline and derivatives or bipyridyls. The stability of the complexes in buffered aqueous media at physiological pH, as well as in cell incubation media is evaluated to improve the understanding of the observed biological activity.

In **chapters 3** and **4** the antioxidant potential of the complexes has been estimated, with some results comparable with the reference compound. In both **chapters 4** and **5** it was found that Cu(II) complexes are globally more cytotoxic than V(IV) complexes against a broad range of human tumor cells studied. The inclusion of phen in Cu(II) and V(IV)O metal centers positively affects the IC₅₀ values. The cytotoxicity of these series of complexes is within the values observed for other previously tested antitumor metal-based drugs; however, the complexes containing the Schiff bases derived from chromones (**chapter 3**) show low selectivity. The interaction of the complexes with relevant biomolecules (BSA and DNA) is evaluated by several spectroscopic techniques and the corresponding binding constants are determined. The relationship between the structure of compounds and the observed biological activity is discussed. The complexes are shown to interact with BSA with the formation of new species with possible dissociation from the phen, which may have an influence on the cytotoxicity observed for tumor cells.

In **chapter 5** the type of cell death and preliminary tests on the mechanism of action are also studied and an increase in phosphatidylserine externalization accompanied by an increase in membrane permeability is observed, depending

on the concentration of the added complex, it is concluded that cell death is by apoptosis induced by intracellular ROS production.

In **chapters 6** and **7** studies were carried out in cell incubation media to improve our understanding of the impact of decomposition and speciation of Cu(II) and V(IV) complexes involving N,N-type labile ligands (such as 1,10-phenanthroline and derivatives) on cytotoxicity, as well as on the understanding of the mechanisms of cell death for this type of complexes. Studies on the interaction of Cu^{II}-phen or V^{IV}O-phen type compounds with serum biomolecules such as albumin, is carried out by spectrophotometric techniques to clarify which species are formed and predominate. The respective Cu(II) ion binding constants to BSA and phen have also been determined, as well as the formation constants of several relevant species in that ternary system. It was also concluded that Cu^{II}-phen or V^{IV}O-phen complexes undergo speciation in the cell incubation media which has implications for the observed cytotoxicity, since the release of the (biologically active) phen will most likely have a distinct target from the metal ion.

The distribution and cellular uptake of this series of complexes is evaluated and its relationship with the biological action discussed. 31 compounds were prepared, including 13 new copper complexes, 4 new vanadium complexes and 7 new ligands. In addition, 7 compounds were prepared, 4 of zinc and 3 of iron used only for comparison purposes.

Palavras-chave

Antitumoral
Complexos-Cobre(II)
Complexos-Vanadio(IV)
Especiação
Fenantrolinas
Citotoxicidade
Bases-Schiff
Cromonas
Piridoxal
Antioxidante
Albumina

Keywords

Antitumoral
Copper(II)-Complexes
Vanadium(IV)-Complexes
Speciation
Phenanthroline
Cytotoxicity
Schiff-bases
Chromones
Pyridoxal
Antioxidant
Albumin

Índice de Conteúdos

Agradecimentos	ix
Resumo	xi
Abstract	xiii
Palavras-chave.....	xv
Keywords.....	xv
Índice de Conteúdos	xvii
Índice de Figuras.....	xxiii
Índice de Esquemas.....	xxxv
Índice de Tabelas	xxxvii
Símbolos e Abreviaturas	xli
➤ Capítulo I - Introdução.....	1
1.1. Introdução	3
1.2. Quimioterapia e metalofármacos correntes	3
1.3. Vantagens dos complexos de íons de metal como potenciais fármacos antitumorais	5
1.3.1. Transporte dos íons de cobre nos meios biológicos	8
1.3.2. Albumina e sua importância como transportador de fármacos	9
1.4. Complexos de cobre com ligandos bioativos	11
1.4.1. Atividade antitumoral de complexos de cobre contendo bases de Schiff derivados da vitamina B ₆	15
1.5. Complexos de vanádio.....	18
1.5.1. Complexos de vanádio antitumorais.....	19
1.5.2. Atividade antitumoral de complexos de oxidovanádio(IV) contendo bases de Schiff derivados da vitamina B ₆	23
1.6. Referências.....	25
➤ Capítulo II - Objetivos.....	31
2.1. Objetivos propostos	33
➤ Capítulo III - Complexos de cobre com bases de Schiff derivados do piridoxal com potencial terapêutico.	35
3.1. Fundamentos	37
3.2. Complexos contendo ligandos tridentados do tipo ONO derivados da vitamina B ₆	37

3.3. Atividade da inibição da formação de radicais livres.....	46
3.4. Ensaio de citotoxicidade.....	47
3.5. Estudos de estabilidade.....	48
3.6. Interação com a BSA.....	50
3.6.1. Avaliação dos espectros de UV-Visível.....	51
3.6.2. Dicroísmo circular.....	53
3.6.3. Fluorescência.....	55
3.7. Estudos de ligação ao ADN.....	57
3.7.1. Espectroscopia de DC.....	57
3.7.2. Títulações por espectroscopia de absorção no UV-Vis.....	60
3.8. Conclusões.....	63
3.9. Referências.....	65
➤ Capítulo IV - Complexos de íons de metal constituídos por bases de Schiff de cromonas e piridoxal como potenciais agentes antitumorais.....	67
4.1. Fundamentos.....	69
4.2. Pró-ligandos tridentados ONO à base de piridoxal e 3-formil-cromonas substituídas.....	70
4.3. Complexos de Cu(II) e V(IV)O.....	72
4.3.1. Estabilidade hidrolítica.....	77
4.3.2. Atividade de inibição de formação de radicais.....	80
4.3.3. Estudos de citotoxicidade.....	81
4.3.4. Estudos de interação com o ADN.....	82
4.4. Interação com a BSA.....	84
4.4.1. Estudos de conformação da BSA.....	84
4.4.2. Estudos de interação com a BSA.....	87
4.4.3. Determinação da constante de ligação por extinção de fluorescência.....	90
4.5. Conclusões.....	91
4.6. Referências.....	93
➤ Capítulo V - Complexos de íons de metal com bases de Schiff derivados da vitamina B ₆	95
5.1. Fundamentos.....	97
5.2. Pró-ligando de base de Schiff derivado da vitamina B ₆ (H ₂ L7).....	98
5.3. Complexos Cu(II) e V(IV)O.....	99

5.4. Estabilidade hidrolítica	104
5.5. Viabilidade de células MG63 determinada pelo método MTT	105
5.6. Indução da produção de ROS em células MG63 em contacto com [Cu(L7)(phen)]•KCl.....	106
5.7. Estudos de morte celular pela determinação do efeito provocado por [Cu(L7)(phen)]•KCl na externalização de fosfatidilserina (PS).....	108
5.8. Conclusão	110
5.9. Referências	112
➤ Capítulo VI - Complexos de vanádio com 1,10-fenantrolina e derivados	115
6.1. Fundamentos	117
6.2. Caracterização dos complexos de V ^{IV} O-Xphen	119
6.3. Interação entre complexos de V ^{IV} O-phen e BSA	121
6.3.1. <i>Espetros de dicroísmo circular (e RPE) de V^{IV}OSO₄ + BSA.</i>	122
6.3.2. <i>Espetros de dicroísmo circular (e RPE) de V^{IV}OSO₄ + BSA + phen.</i>	123
6.4. Comportamento dos complexos de iões de metal em meios celulares...	128
6.5. Estudos realizados em células.....	132
6.5.1. <i>Ensaio de citotoxicidade.</i>	132
6.5.2. <i>Absorção e distribuição celular.</i>	134
6.5. Fatores que afetam a citotoxicidade devido aos complexos V ^{IV/V} O- Xphen	137
6.7. Conclusões	139
6.8. Referências	141
➤ Capítulo VII - Comportamento dos complexos do tipo [Cu(phen) ₂] ²⁺ em meios celulares e a sua influência na citotoxicidade	143
7.1. Fundamentos	145
7.2. Caracterização	148
7.3 Estabilidade nos meios celulares	150
7.4. Estudos de citotoxicidade	152
7.5. Estudos de absorção celular por ICP-MS	153
7.6. Microscopia eletrónica de transmissão (TEM)	155
7.7. Ensaio de citotoxicidade variando a % de FBS	156
7.8. Ligação de complexos de Cu à BSA.....	159

7.8.1. Determinação das constantes de ligação das espécies Cu(II)- e Cu-phen à BSA.....	160
7.8.2. Espécies a considerar no sistema Cu-BSA-phen	162
7.8.3. Especificação em meios de incubação celular e relevância para a citotoxicidade	162
7.8.3.1. Espectros de DC de soluções com albumina de soro bovino, Cu(II) e phen.....	166
7.9. Conclusões	171
7.10. Referências.....	173
➤ Capítulo VIII - Secção experimental.....	177
8.1. Materiais e equipamentos	179
8.1.1. Materiais	179
8.1.2. Equipamentos.....	179
8.2. Síntese de pró-ligandos e complexos	180
8.2.1. Pró-ligandos.....	180
8.2.2. Complexos.....	184
8.2.2.1. Procedimento geral para a síntese dos complexos do tipo [Cu(L1-3)X] em que X= Cl ou OH.....	184
8.2.2.2. Procedimento geral para a síntese dos complexos do tipo [Cu(L)(phen)].....	185
8.2.2.3. Procedimento geral para a síntese dos complexos do tipo [Cu(L6-8)].....	186
8.2.2.4. Procedimentos para a preparação dos complexos contendo o pró-ligando HL7	189
8.2.2.5. Procedimento geral para a síntese dos complexos do tipo [VO(Xphen) ₂] ²⁺	190
8.2.2.4. Procedimento geral para a síntese dos complexos do tipo [Cu(phen) ₂] ²⁺	192
8.3. Cromatografia aniónica	193
8.4. Estabilidade hidrolítica	193
8.5. Estudos de interação com o ADN	193
8.5.1 Espectroscopia Eletrónica de Absorção	194
8.5.2. Dicroísmo circular	194
8.6. Interação com a BSA.....	195
8.6.1. UV-Vis.....	195
8.6.2. Estudos de interação com os complexos.....	195
8.6.3. Estudos de estabilidade de espécies BSA/complexo formados	196
8.6.4. Estudos de conformação da BSA	196
8.6.5. Fluorescência	196
8.7. Atividade de inibição de formação de radicais (RAS)	197
8.8. Ensaio de viabilidade celular	198
8.9. Referências.....	198

➤	Capítulo IX - Considerações finais	201
	9.1. Considerações finais.....	203
➤	ANEXOS	1
	Anexo 1. Estruturas dos pró-ligandos e complexos	3
	Anexo 2. Determinação das constantes de ligação das espécies Cu(II)- e Cu-phen à BSA (e HSA)	6
	Anexo 3. Potenciais ligandos existentes nos meios de incubação de células de mamíferos.....	8
	Anexo 4. Estudos dos sistemas Cu+ BSA + phen por dicroísmo circular e RPE	10
	4.1. <i>Espetrofotometria de Dicroísmo Circular de Soluções com albumina de soro bovino e Cu(II)</i>	10
	4.2. <i>Soluções com albumina de soro bovino, Cu(II) e phen medidos por DC e RPE</i>	12
	Anexo 5. Espectros de RPE de soluções com complexos do tipo [V ^{VO} (Xphen) ₂] em diversos meios, medidos ao longo do tempo.....	18
	Anexo 6. Resultados de RMN de soluções com NH ₄ V ^{VO} O ₃ e 1,10- fenantrolina	22
	Anexo 7. Absorção de vanádio pelas células A2780	24
	Anexo 8. Especificação	25
	8.1. <i>Especificação nos sistemas V^{VO}O²⁺ + 1,10-fenantrolina e 4,7-metil- 1,10- fenantrolina</i>	25
	8.2. <i>Especificação no sistema V^{VO}O²⁺ + 1,10-fenantrolina + BSA</i>	28
	Anexo 9. Dados de cristalografia de [V ^{VO} (OSO ₃)(phen) ₂] (17).	31
	Anexo 10. Citotoxicidade dos compostos 12-16 e do respetivo ligado HL7 para a linha celular MG64	33
	Anexo 11 - Referências.....	34

Índice de Figuras

Figura 1.1. Complexos antitumorais derivados de platina.	4
Figura 1.2. Estruturas dos complexos antitumorais de rutênio em ensaios clínicos.	6
Figura 1.3. Estruturas do [Cu(Gly)(Me ₂ phen)]NO ₃ (Casiopéia-II-gly) e do Cu-gluconato.....	7
Figura 1.4. Estrutura da albumina humana (ou bovina) e principais locais de ligação para os íons metálicos. Imagem adaptada da literatura.[54].....	10
Figura 1.5. Tipos de interação mais frequentes entre compostos e ADN: a) interações eletrostáticas ou iônicas (essencialmente com grupos fosfato); b) ligações eletrostáticas ou iônicas com interações à superfície da hélice do ADN (sulco maior ou sulco menor; c) interações por intercalação entre aos pares de bases do ADN (interações hidrofóbicas).....	12
Figura 1.6. Estruturas de [Cu(phen)(H ₂ O)] ₂ (μ-P ₂ O ₇) e os respectivos produtos de hidrólise (espécies ativas).....	13
Figura 1.7. Complexos do tipo Cu(X)(phen), em que X são diversos aminoácidos e derivados, incluindo bases de Schiff: Tss , salicílico-aurina; Vhn , valina-2-hidroxi-1-naftaldeído; Mvs , L-metionina-o-vanilina.	14
Figura 1.8. Estruturas dos complexos [Cu(CH ₃ COO)(phen)] e [Cu(sal)(phen)], em que sal é o salicilato.	15
Figura 1.9. Complexos de coordenação derivados da família dos pró-ligandos SB obtidos pela conjugação entre o piridoxal e tiosemicarbazonas (PLTSC), com diferentes geometrias e centros de íons de metal.	17
Figura 1.10. Família de complexos de Cu(II) com ligandos do tipo N,O, derivados de SB do piridoxal com a incorporação de grupos aromáticos com diferentes substituintes halogenados.	18
Figura 1.11. Estruturas da família de complexos [VIVO(oda)] em que oda é oxodiacetato e phen é 1,10-fenantrolina e Bipy é 2,2'-bipiridina	20
Figura 1.12. Complexos de oxidovanádio(IV) constituídos por famílias de phen(s) substituídas com atividade citotóxica.	21
Figura 1.13. Estrutura química de [VO(pyr ₂ en)] com potencial atividade antitumoral.	23
Figura 1.14. Série de complexos de oxidovanádio(IV) derivados de pyr ₂ en.	23
Figura 3.1. Fórmulas moleculares propostas para os complexos Cu(II) preparados.	39
Figura 3.2. Espetro de RMN da experiência de HSQC de H₃L3CI em D ₂ O à temperatura ambiente. O gráfico inserido mostra a expansão da região aromática do espectro.	40
Figura 3.3. Espectros de absorção eletrônica dos: a) pró-ligandos precursores e b) complexos, obtidos em DMSO.	43
Figura 3.4. Espetro UV-Vis. medido em DMSO para soluções de: a) 1 com concentrações entre 1.1 × 10 ⁻⁵ a 1.2 × 10 ⁻³ M. b) 4 com concentrações entre 1.9 × 10 ⁻⁶ e 1.9 × 10 ⁻³ M	44
Figura 3.5. Espetro de RPE medido para 1 em DMSO (aprox. 3 mM) e respectivo espectro simulado que originou os parâmetros listados na Tabela 3.3	45

Figura 3.6. Espectro de RPE adquiridos a 77K para 4 dissolvido em DMSO (amarelo); 2 em DMSO (laranja); 3 em DMSO (verde); 1 em DMSO (azul) e 5 em DMF (cinzento).	45
Figura 3.7. Absorção a 517 nm (em %) em metanol e para várias concentrações dos compostos (1.4-83.5 μM). Onde $\text{H}_2\text{L1}$ (\bullet); $\text{H}_2\text{L2}$ (\blacksquare); $\text{H}_3\text{L3Cl}$ (\blacktriangle); 1 (\square); 2 (\circ); 3 (\diamond); 4 (\diamond); 5 (X).....	46
Figura 3.8. Espectros de ^1H -RMN medidos em PBS (10 mM, pH 7.4) / D_2O com a) $\text{H}_3\text{L3Cl}$ (4 mM) a diferentes tempos; b) I - 1 mM de $\text{H}_2\text{L2}$ a $t = 0$ min.; II - $\text{H}_2\text{L2}$ (1 mM) a $t = 10$ min.; III - 2-aminofenol (1 mM, 5% DMSO-d_6); IV - piridoxal (1 mM, 5% DMSO-d_6).....	49
Figura 3.9. Espectros de absorção electrónica do complexo 4 medido ao longo do tempo em: a) DMSO a 24 μM durante 24 h; b) "tampão" NH_4HCO_3 (25 μM , pH 7.4) com 2.3% DMSO a 25 μM , com o tempo total de 319 min; c) em tampão PBS (10 μM , pH 7.4) com 3.6% DMSO a 67 μM , durante 360 min. As setas indicam mudanças com o tempo.	50
Figura 3.10. Espectros de absorção no UV-Vis. de 2 (24 μM , 4.5% DMSO) com 24 μM de BSA adquirido em NH_4HCO_3 (25 μM , pH 7.4) com o tempo. As setas mostram as variações com o aumento do tempo.	52
Figura 3.11. Espectros de absorvância eletrónica de 1 (24.9 μM , 4.6 % DMSO v/v) com cerca de 25 μM de BSA adquiridos em PBS (10 mM, pH~7.4) ao longo do tempo. O gráfico inserido mostra a variação da absorvância com o tempo a $\lambda = 403$ nm (\blacksquare); 363 nm (\circ); 321 nm (\blacktriangle); 287 nm (\bullet); 270 nm (\square). As setas mostram variações de absorvância com o tempo.	52
Figura 3.12. Espectros de DC da titulação de BSA (388 μM) com uma solução de 1 (ca. 3.4 mM) em tampão PBS (pH 7.4, 10 mM, < 5% DMSO). As razões molares $1/\text{BSA}$ encontram-se indicadas na figura.	54
Figura 3.13. Espectros de DC da titulação de BSA (400 μM) com uma solução do complexo 4 (aprox. 8.9 mM) em tampão PBS (pH 7.4, 25 mM, < 5 % DMSO). As razões molares $4/\text{BSA}$ estão indicadas na figura. As setas mostram variações com o aumento da concentração de complexo.	54
Figura 3.14. Espectros de DC da titulação de BSA (ca. 388 μM) com aprox 3.3 mM de 2 em tampão PBS (pH 7.4, 10 mM, <2.3% DMSO). Os rácios molares $2/\text{BSA}$ estão indicados na figura. Para razões mais elevadas houve precipitação. As setas mostram variações com o aumento da concentração de complexo.	55
Figura 3.15. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 298$ nm) de BSA (0.7 μM) com concentrações crescentes de 1 (aprox. 0.2-13.9 μM) em tampão HEPES (10 mM, pH 7.4) com menos de 4 % de DMSO (v/v). O gráfico inserido mostra a variação de $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 340$ nm em função de $1/\text{BSA}$ em equivalentes molares. Os dados foram corrigidos para absorção e efeitos de filtro interno.[25].....	57
Figura 3.16. Espectros de dicroísmo circular (percurso ótico de 10 mm) de ADN (76.6 μM) em tampão HEPES (10 mM, pH 7.4) com adições de a) complexo 4 , b) complexo 5 ; c) variação do $\Delta\epsilon(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ com a razão molar do composto: ADN para 4 , 5 e phen.....	59
Figura 3.17. Espectros de absorção eletrónica de UV-Vis. adquiridos em tampão PBS (10 mM, pH 7.4) após adição de <i>ct</i> ADN ($[\text{ctADN}] = 2.4 \cdot 10^8$ μM) a uma solução de: a) 2 (36 μM) e b) 3 (16 μM). Os gráficos inseridos correspondem ao ajuste dos dados obtidos com o modelo de	

Scatchard para determinar as constantes de ligação dos complexos ao ADN. As setas mostram variações com o aumento da concentração de ADN.....	61
Figura 3.18. Titulação de 4 (aprox. 25 μM em tampão PBS, 25 mM, pH 7.4, 1.2 % de DMSO) com quantidades crescentes de ADN (3.3 mM em tampão PBS, 25 mM, pH 7.4). As razões molares ADN/ 4 são indicadas na figura.....	62
Figura 4.1. Fórmulas moleculares propostas para os complexos preparados	73
Figura 4.2. Espectro de UV-Visível dos a) pró-ligandos base de Schiff e b) complexos, obtidos em DMSO. Gráfico inserido: expansão da região visível de menor energia.....	75
Figura 4.3. Espectros de absorção eletrônica ao longo do tempo até às 24h de: a) 6 em tampão NH_4HCO_3 , (25 mM, pH~7.4) com 2.3% DMSO (v/v) a 25 μM ; b) 7 , em tampão PBS (10 mM, pH~7.4) com 4.8 % DMSO (v/v) a 91 μM ; c) 8 em tampão PBS (10 mM, pH~7.4) com 2.5 % DMSO (v/v) a 61 μM ; d) 10 em tampão PBS (10 mM, pH~7.4) com 2.4 % DMSO (v/v) a 120 μM , e) 9 em tampão PBS (10 mM, pH~7.4) com 1.8 % DMSO (v/v) a 61 μM e f) 11 tampão PBS (10 mM, pH~7.4): com 107 μM , 3.4 % DMSO durante 22h, com precipitação a ocorrer após cerca de 1h30. As setas indicam as alterações espectrais com o tempo.....	78
Figura 4.4. Espectros de absorção eletrônica de 9 a 25 μM com 0.8 % DMSO adquirido em a) meio celular durante 24h, b) mesmas condições com 10% de FBS. As setas indicam as alterações com o tempo.....	79
Figura 4.5. Espectros de absorção eletrônica de 6 (25 μM) obtidos em “tampão” a) NH_4HCO_3 (25 mM, pH=7.4, 2.3% DMSO) ao longo de 20 h e b) na presença de 25 μM de BSA.....	80
Figura 4.6. Diminuição (em percentagem) da absorção a 517 nm das soluções de DPPH em metanol obtidas com várias concentrações dos compostos estudados (1.4 – 83.5 μM).	80
Figura 4.7. Espectros de absorção eletrônica do complexo 9 (17.4 μM) em tampão PBS (10 mM, pH 7.4) e após adição de <i>ct</i> ADN ($[\text{ctADN}] = 2.6 - 64.7 \mu\text{M}$). Gráfico inserido: Expansão da região dos espectros entre 330 e 390 nm. As setas indicam o sentido das alterações com aumento da concentração de <i>ct</i> ADN.	83
Figura 4.8. Gráfico de Scatchard obtido dos dados experimentais da titulação de 9 com ADN, sendo a constante de ligação obtida pela relação $[\text{ADN}]/\Delta\epsilon_{\text{AP}}$ vs $[\text{ADN}]$	84
Figura 4.9. Espectros de absorção eletrônica de 11 (25,3 μM) em tampão PBS (10 mM, pH 7.4) e após adição de <i>ct</i> ADN ($[\text{ctADN}] = 2.6 - 77.3 \mu\text{M}$). As setas mostram as alterações nas bandas de absorção com o aumento da concentração de <i>ct</i> ADN.	84
Figura 4.10. Espectros de absorção eletrônica de uma solução de BSA (10 μM) em tampão PBS (10mM, pH=7.4) titulada com 9 , com concentrações compreendidas entre 2.4 e 40.9 μM e %DMSO entre 0.1 a e 1.3 %. Figuras inseridas: a) expansão da região dos espectros entre 273 e 285 nm; b) expansão da região dos espectros entre 295 e 400 nm. As setas indicam variações de absorção com o aumento da concentração do complexo.	85
Figura 4.11. Espectros de absorção eletrônica de BSA (9.7 μM) com 9 (9.7 μM) medidos ao longo do tempo (total de 21h), em meio celular com 0.3 % DMSO.....	86

Figura 4.12. Espectros de DC de BSA (1.4 μM) na ausência e presença de diversas concentrações de 9 , com razões molares BSA/ 9 de 0.3 a 0.6, medidos em tampão PBS (10mM, pH \approx 7.4) e metanol (< 0.7 % DMSO). As soluções foram medidas à temperatura ambiente e em célula de quartzo com percurso ótico de 0.2 cm. A seta indica a variação com a adição de 9 .	86
Figura 4.13. Espectros de DC adquiridos entre 430 e 780 nm de soluções com 476 μM de BSA em PBS (10 mM, pH \approx 7.4) e após adição de soluções de 9 (< 6 % DMSO). Os raios molares 9 :BSA encontram-se indicados na figura. O gráfico inserido correspondente à expansão entre 350 e 410 nm para as razões molares de 9 /BSA 0.5; 3.0; 3.8.	88
Figura 4.14. Espectros de absorção eletrônica de 9 (26 μM) titulado com BSA em PBS (10mM, pH=7.4) contendo aprox. 0.8 % de DMSO, com: a) concentração de proteína variável entre 3.81 e 23.84 μM (até 9 :BSA \approx 1:1). b) concentração de proteína variável entre 23.84 e 81.39 μM (correspondendo a 9 :BSA entre 1:1 a 1:4). As setas indicam as alterações na absorção com o aumento da concentração de BSA. A contribuição da absorção da BSA foi corrigida pela subtração dos seus espectros em cada adição.	89
Figura 4.15. Espectros de emissão de fluorescência de BSA (1 μM) com quantidades crescentes de 4 adquiridos à temperatura ambiente. A seta mostra a alteração da intensidade de emissão com o aumento da concentração do complexo. O gráfico inserido mostra a variação de da intensidade de fluorescência a 339nm em função de 4 /BSA. $\lambda_{\text{excitação}}^{\text{max}} = 292 \text{ nm}$	90
Figura 5.1. Estruturas dos complexos [VO(pyr ₂ en) ₂] (I) e seu derivado (II).	97
Figura 5.2. Espectro de ¹ H RMN de H₂L7 adquirido em DMSO-d ₆ a 400MHz.	99
Figura 5.3. Estrutura dos complexos de Cu(II) e V(IV) derivados de (H₂L7).	100
Figura 5.4. Espectros de absorção eletrônica dos complexos de Cu(II) e V(IV) assim como do pró-ligando precursor livre, obtidos em DMSO à temperatura ambiente. Gráfico inserido é a expansão da região as absorções das correspondentes às bandas d-d.	101
Figura 5.5. Primeira derivada da banda-X de espectros de RPE medidos a 77K, em MeOH para os complexos: a) 13 a 3.9 mM (laranja); 14 a 4.0 mM, e b) 15 a 2.6 mM (verde) e 16 a 3.5 mM (cinzento).	103
Figura 5.6. Espectro de RPE medido para 14 em DMSO (aprox. 5 mM) e respetivo espectro simulado que originou os parâmetros listados na Tabela 5.3	104
Figura 5.7. Espectros de absorção eletrônica de 12 (esquerda) e 13 (direita) adquiridos até 24 h em HEPES e PBS, respetivamente, à temperatura ambiente. A concentração dos compostos foi de 25 μM	105
Figura 5.7. Gráfico de barras com a identificação de quatro subpopulações: i) Roxo - vitais não afetadas (anexinaV negativo/PI negativo); ii) Verde – vitais em processo apoptótico inicial (anexinaV positivo/PI negativo), iii) Vermelho - necróticas ou em processo apoptótico final (anexinaV positivo/PI positivo) e iv) Azul - vitais danificadas mecanicamente (anexinaV negativo/PI positivo). Os resultados são expressos em percentagem de células reconhecidas com base na positividade de marcação para anexina V-FITC e IP em função da concentração de 13 incubada em células MG63. Ensaio realizado pelo Dr. Ignacio Leon da <i>National University of La Plata</i>	109

Figura 6.1. a) Espectros de absorção no UV-Vis. dos complexos de V ^{IV} O em DMSO: 17 = 47 μM, 18 = 41 μM, 17 = 24 μM. Gráfico inserido: Espectros no Visível em DMSO: 17 = 2.4 μM, 18 = 1.6 μM, 17 = 2.8 μM. b) primeira derivada dos espectros de RPE de soluções em MeOH adquiridos a 100 K (aprox. 3 mM).....	119
Figura 6.2. a) Diagrama ORTEP de 17 . Os átomos de hidrogénio e moléculas de água foram omitidos para uma melhor visualização espacial. b) Dímeros em posição antiparalela, onde são nítidas as interações π-π (mais relevantes no empacotamento cristalino). Todos os átomos são representados pelos seus elipsoides de probabilidade de 50%.	121
Figura 6.3. Estruturas moleculares dos compostos 17-19 no estado sólido. Em solução aquosa esperamos que o ligando SO ₄ ²⁻ seja substituído por uma molécula de água, sendo todos os complexos globalmente formulados como iões [V ^{IV} O(Xphen) ₂] ²⁺ . No entanto, cada um deles será sujeito a especiação uma vez dissolvido (ver abaixo).	121
Figura 6.4. Espectros de DC obtidos ao adicionar quantidades conhecidas com precisão de uma solução contendo [V ^{IV} O(ClO ₄) ₂] (37 mM) a uma solução de BSA (500 μM) em PBS a pH = 7.4, até uma razão molar BSA:V ^{IV} O de 1:5.....	122
Figura 6.5. Espectros de DC obtidos ao adicionar quantidades precisas de uma solução de Zn(NO ₃) ₂ (58,8 mM) à uma solução com razão molar BSA:V ^{IV} O de 1:5 considerada na Figura 6.4 , de modo a que se obtivessem as razões molares BSA:V ^{IV} O:Zn de 1:5:1 e 1:5:2.....	122
Figura 6.6. Primeira derivada de espectros de RPE de soluções congeladas (a 77 K) com BSA (530 μM) e V ^{IV} O(ClO ₄) ₂ com uma razão molar de 1:5, e após a adição de quantidades precisão de uma solução de Zn(NO ₃) ₂ (58,8 mM), de modo a obter uma solução com razão molar BSA:V ^{IV} O:Zn de 1:5:2.....	123
Figura 6.7. Espectros de DC de soluções com BSA e V ^{IV} O(ClO ₄) ₂ (760 μM cada) a pH 7.4, com uma razão molar BSA:V ^{IV} O de 1:1, e após a adição de uma solução de phen (63 mM). Após novas adições de phen os espectros de DC não exibiram praticamente alterações significativas, pelo menos até uma razão BSA:V ^{IV} O:phen molar de 1:1:4 (ver figura abaixo).....	124
Figura 6.8. Espectros de DC de soluções com BSA e [V ^{IV} O(ClO ₄) ₂] (760 μM cada) a pH 7.4, com uma razão BSA:V ^{IV} O molar de 1:1, e após a adição de uma solução de phen (63 mM).	124
Figura 6.9. Espectros de DC de soluções com BSA, [V ^{IV} O(ClO ₄) ₂] (≈0.76 mM cada) e phen a pH 7.4, com relação molar BSA:V ^{IV} O:phen de 1:1:4, e mediante adição de uma solução de Zn(NO ₃) ₂ (59 mM). As Figuras no Anexo 5 . mostram espectros de RPE de algumas destas soluções..	124
Figura 6.10. Espectros de DC de soluções contendo BSA (708 μM) e [V ^{IV} O(ClO ₄) ₂] a pH 7.4, com uma razão molar BSA:V ^{IV} O de 1:2, e mediante a adição de uma solução de phen (63 mM) até razões molares BSA:VO:phen de 1:2:6.	125
Figura 6.11. Espectros de DC de soluções com BSA, V ^{IV} O(ClO ₄) ₂ e phen a pH 7.4, com uma razão molar BSA:V ^{IV} O:phen de 1:2:6.....	126
Figura 6.12. Primeira derivada de espectros de RPE de soluções congeladas (a 77 K) com BSA, V ^{IV} O(ClO ₄) ₂ , phen e Zn(NO ₃) ₂ a pH 7.4, com os rácios molares BSA:V ^{IV} O:phen:Zn indicados na figura.....	126

Figura 6.13. Primeira derivada de espectros de RPE de soluções congeladas (a 77 K) com BSA, $V^{IV}(ClO_4)_2$, phen e $Zn(NO_3)_2$ a pH 7.4, com os rácios molares BSA: V^{IV} O:phen:Zn indicados na figura. Estes espectros foram medidos com as mesmas soluções usadas para registrar os espectros de DC das Figuras. 6.10 e 6.11.	127
Figura 6.14. Detalhes dos espectros de RPE de soluções congeladas (a 77 K) com BSA, $V^{IV}(ClO_4)_2$ e $Zn(NO_3)_2$ a pH 7.4, com os rácios molar BSA: V^{IV} O:phen indicados na figura. Os espectros são bastante ruidosos porem a adição da solução de $Zn(NO_3)_2$ induz algumas alterações nos espectros de RPE obtidos. Há ligeiras diminuições dos valores Az nos espectros  medida que o phen é adicionado. A adição de Zn^{2+} produz um aumento dos valores medidos de Az . Este fenmeno é devido a uma diminuição da quantidade relativa de phen coordenada aos centros de V^{IV}	128
Figura 6.15. Detalhes dos espectros de RPE de soluções congeladas (a 77 K) com BSA, $V^{IV}(ClO_4)_2$, phen e $Zn(NO_3)_2$ a pH 7.4, representados na Figura 6.14. , com os rácios molares BSA: V^{IV} O:phen:Zn indicados na figura. É evidente que o espectro, após a adição de Zn^{2+} (linha cinzenta), difere dos outros três espectros, nomeadamente do espectro com linha azul (Espectro da solução antes da adição de iões Zn^{2+}).	128
Figura 6.16. Primeira derivada da banda X de espectros de RPE obtidos a 77 K de amostras com $[V^{IV}(phen)_2]$ (ca. 0.50 mM) a pH = 7.0 em tampão PBS. Ao adicionar 17 ao tampão PBS, as soluções foram deixadas ao ar a cerca de 25 C. Os espectros das amostras a 0 h e 3 h têm aproximadamente a mesma intensidade. Os espectros a 24 e 48 h foram traçados com uma escala distinta, sendo a sua intensidade relativa muito mais baixa do que os de 0 ou 3 h.	130
Figura 6.17. Espectros de ^{51}V RMN no intervalo entre -470 e -610 ppm das várias soluções contendo $NH_4V^{VO}_3$ (1 mM) e phen (2 mM) em D_2O (5% MeOD- d_4) a vários pHs (ajustados com uma solução muito diluída de DCl/ D_2O). Os valores de pD são indicados na figura. Abaixo de pD 6 formam-se espécies de V^{IV} e os picos de ^{51}V RMN tornam-se muito mais largos. Tentativas de atribuição (ver texto e ref.[32]): V ₁ : monovanadato, V ₂ : divanadato; V ₄ : c-tetranadato; C ₁ : $[V^{VO}_2(phen)(OH)_n]$, o n aumenta  medida que o pH aumenta; C ₂ : provavelmente $[V^{VO}_2(phen)_2]^+$; C ₁ ⁺ : $[V^{VO}_2(phen)(H_2O)_2]^+$. Espectros adicionais de ^{51}V e 1H RMN para este sistema são apresentados nas Figuras A6.1. a A6.3. do Anexo 6.	131
Figura 6.18. Acumulação de vanádio (ng/ 10^6 células de A2780) nos componentes sub-celulares. As células foram expostas aos compostos 17 , 18 e 19 em concentrações equivalentes ao seu IC_{50} às 3 h. (A) ng de vanádio absorvido em cada componente/ 10^6 células; (B) % de vanádio total em cada componente.	135
Figura 6.19. Acumulação de vanádio (% do total V) nas frações sub-celulares A2780. As células foram expostas a complexos $[V^{IV}O(SalGly)(phen)]$ (I) (presente trabalho), $[V^{IV}O(BrSalGly)(phen)]$ (II),[34] $[V^{IV}O(BrSalGly)(bipy)]$ (III)[34] e $[V^{IV}O(acac)_2]$ (IV),[19] em concentrações equivalentes ao seu IC_{50} às 24 h.	136
Figura 7.1. Estruturas moleculares previstas para os complexos de Cu 21 , 22 e 23 . As estruturas moleculares de 21 e 22 foram previamente determinadas por DRX-CU.[32]	149

Figura 7.2. a) Espectros de absorção no UV-Vis. de 21-23 adquiridos em DMSO (aprox. 2.5-4 μM) e b) Espectros de RPE obtidos a partir de soluções congeladas em MeOH a 100 K (aprox. 3 mM).	150
Figura 7.3. Espectros de absorção eletrônica de soluções aquosas com 21 a aprox. 50 μM adquiridos ao longo do tempo (até 48h) em: a) tampão PBS, 10 mM, pH 7.4; b) meio celular MEM; c) meio celular MEM com 10 % FBS.	151
Figura 7.4. Primeira derivada da banda X de espectros de RPE medidos a ~ 100 K para soluções de 21 após 48 h da sua adição a PBS, ou a meios de cultura celular MEM na ausência e presença de 10% (v/v) de FBS; foram obtidos espectros muito semelhantes após 3 h e 24 h. Concentração do complexo ≈ 500 μM . O * indica as ressonâncias devidas às espécies dinucleares, que não foram detetadas nos espectros de soluções em meios celulares.	152
Figura 7.5. Efeito do tempo de incubação na atividade citotóxica dos complexos de Cu(II); 21-23 e da cisplatina, como fármaco de referência nas células A2780.	153
Figura 7.6. Absorção de Cu obtida em frações celulares de células A2780, medida por ICP-MS após 3 h de incubação. As células foram incubadas com 21 μM de 21 , 2.4 μM de 22 e 80 μM de 23 , sendo estas as concentrações correspondentes aos seus valores de IC_{50} às 3 h. a) Teor de cobre em ng de células Cu/ 10^6 A2780; b) Teor de cobre em percentagem da absorção total de Cu.	154
Figura 7.7. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de secções finas de células A2780 tratadas durante 24 h com 21 e 22 . CTR: controlo (sem tratamento); células tratadas com 22 que mostram alterações mitocondriais e bolhas apoptóticas mais evidentes do que 21 . Ensaio realizado pela Dra Teresa Pinheiro do Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa.	156
Figura 7.8. Efeito do teor de proteínas séricas no meio de incubação celular na atividade citotóxica de 21 , 22 e 23 , contra as células A2780, avaliado pela % de FBS adicionada ao meio de incubação. Os complexos foram avaliados numa concentração equivalente ao seu valor IC_{50} a 3 h de exposição no meio de cultura com 10 % de FBS (21 - 20 μM ; 22 - 2,4 μM e 23 - 80 μM). As concentrações totais de BSA, $[\text{BSA}]_{\text{total}}$, no meio de incubação variam na gama aprox. 4-80 μM , correspondentes a 1 - 20 % de FBS, respetivamente. Os dados obtidos são médias \pm DP de duas experiências independentes realizadas com pelo menos 6 réplicas por condição.	158
Figura 7.9. Diagrama de distribuição das espécies para o sistema Cu(II)-BSA-phen. Diagramas de espécies assumindo a formação de complexos $[\text{Cu}(\text{phen})_n]$ ($n = 1-3$), a formação de $[\text{Cu}_n(\text{BSA})]$ ($n = 1-3$) e de espécies de Cu-BSA-phen a pH = 7.4, em função da concentração total de Cu(II) (adicionado como $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$), no intervalo de concentrações: 1-40 μM . $[\text{BSA}]_{\text{total}} = 40$ μM , que corresponde aproximadamente a 10% de FBS nos meios de incubação. A figura representa a formação de a) espécies contendo Cu, e b) espécies contendo phen. A representação correspondente das espécies que contêm BSA está representada na Figura 7.10 . As constantes de formação utilizadas para cálculos com o programa HySS encontra-se na Tabela 7.3	163

Figura 7.10. Diagrama de distribuição das espécies considerando a formação de complexos $[\text{Cu}(\text{phen})_n]$ ($n = 1-3$), a formação de espécies $[\text{Cu}_n(\text{BSA})]$ ($n = 1-3$) e de espécies Cu-BSA-phen, em função da concentração de Cu(II) entre 1-40 μM , e $[\text{BSA}]_{\text{total}} = 40 \mu\text{M}$ (que corresponde aproximadamente a 10% de FBS nos meios de incubação celular).	164
Figura 7.11. Diagramas de distribuição das espécies considerando a formação dos complexos $[\text{Cu}(\text{phen})_n]$ ($n = 1-3$), a formação das espécies $[\text{Cu}_n(\text{BSA})]$ ($n = 1-3$) e Cu-BSA-phen, em função da concentração de BSA entre 4 e 80 μM , e $[\text{Cu}]_{\text{total}} = 20 \mu\text{M}$	164
Figura 7.12. Diagramas de distribuição das espécies considerando a formação dos complexos $[\text{Cu}(\text{phen})_n]$ ($n = 1-3$), a formação das espécies $[\text{Cu}_n(\text{BSA})]$ ($n = 1-3$) e Cu-BSA-phen, em função da concentração de BSA entre 4 e 80 μM , e $[\text{Cu}]_{\text{total}} = 20 \mu\text{M}$	165
Figura 7.13. Espectros de DC de soluções com 0.4 mM de BSA em PBS na região 350-800 nm, após adição de uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de modo a que a razão molar Cu:BSA fosse 1:1, seguida da adição de uma solução de phen até uma razão molar final de Cu:BSA:phen de 1:1:3.	167
Figura. 7.14. Espectros de DC de soluções contendo 0.4 mM de BSA em PBS, no intervalo 350-800 nm, após adição de uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de modo a que a razão molar Cu:BSA fosse 1:1, seguida da adição de uma solução de phen até uma razão molar final de Cu:BSA:phen de 1:1:3. Em seguida, uma solução de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ foi progressivamente adicionada.	168
Figura 7.15. Espectros de DC, no intervalo entre 350-800 nm, de soluções com 0.4 mM BSA em PBS a pH = 7.4, após adição de uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de modo a que os rácios molares Cu:BSA fossem 2:1, seguidos de adições de uma solução de phen até aos rácios molares Cu:BSA:phen indicados.	169
Figura 7.16. Espectros de DC de soluções com 0.40 mM de BSA em PBS, no intervalo entre 350-800 nm, após adição de uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de modo a que a razão molar Cu:BSA fosse 2:1, seguida da adição de uma solução de phen até uma razão molar final de Cu:BSA:phen de 2:1:4. Em seguida, foi progressivamente adicionada uma solução de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$. Razões molares Cu:BSA:phen:Zn de 2:1:0:0 (Preto); 2:1:3.5:0 (Vermelho); 2:1:4:0 (Azul claro); 2:1:4:1 (Azul) e 2:1:4:2 (verde)	170

ANEXOS

Figura A4.1. Espectros de DC, no intervalo entre 350-800 nm, para soluções 0.6 mM de BSA em PBS e após a adição de soluções de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de modo com os rácios molares Cu:BSA: 0.9 (cinzento), 2.0 (preto), 1.1 (verde claro), 2.3 (verde escuro), 3.5 (vermelho) e 4.3 (azul).....	10
Figura A4.2. Espectros de DC, no intervalo 350-750 nm, para soluções 0.4 mM de BSA em PBS e mediante a adição de soluções de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de acordo com os rácios molares Cu:BSA: 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1; 1.3; 1.6; 2; 2.5 e 3.0. Seguiu-se então a adição de uma solução de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, de modo a que os rácios molares BSA: Cu^{2+} : Zn^{2+} fossem: 1:3:1 e 1:3:2.....	11
Figura A4.3. Espectros de DC, das mesmas soluções para a obtenção da Figura A4.2. , com destaque para os rácios molares BSA: Cu^{2+} : Zn^{2+} :1:1:0; 1:2:0; 1:3:0; 1:3:1 e 1:3:2.	11
Figura A4.4. Espectros de DC, no intervalo entre 350-800 nm, de soluções 0.6 mM de BSA em PBS e após a adição de soluções de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de acordo com os rácios molares Cu:BSA: a)	

0.3; 0.6; 0.9; 1.1; 1.4; 1.7 e 2 e b) 1.7; 2; 2.5; 3.1 e 4.3. Em todos estes espectros de DC foi subtraído o “espectro” da solução de BSA livre à de cada solução.	12
Figura A4.5. Espectros de DC, no intervalo 350-800 nm, de soluções com 0.4 mM de BSA em PBS, após adição de uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de modo a que a razão molar Cu:BSA fosse 1.1, seguida da adição de uma solução de phen até uma razão molar final Cu:BSA:phen de 1:1:1. A $\lambda = 560 \text{ nm}$, $ \Delta\epsilon_{\text{max}} $ corresponde à razão de 1:1:0, ao adicionar phen, estes $ \Delta\epsilon $ valores diminuem continuamente.	13
Figura A4.6. Espectros de RPE a 77 K de soluções com 0.4 mM de BSA em PBS de soluções onde se encontram $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ e phen. Os rácios molares estão indicados na figura.	13
Figura A4.7. Espectros de RPE a 77 K de uma solução contendo 0.4 mM BSA em PBS, após adição de uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de modo a que os rácios molares Cu:BSA fossem 1.0, sucedendo-se as adições de uma solução de phen até um rácio molar final de Cu:BSA:phen na proporção 1:1:3. Seguidamente foi progressivamente adicionada uma solução de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$. Os rácios molares estão indicados na figura.	14
Figura A4.8. Espectros de RPE de soluções com 0.5 mM de BSA em PBS, após adição de uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de modo a que os rácios molares Cu:BSA fossem 2:1, seguidos da adição de uma solução de phen até um rácio molar final de Cu:BSA:phen de 2:1:8. Em seguida, foi adicionada progressivamente uma solução de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$	15
Figura A4.9. Espectros de RPE obtidos a 77 K de soluções contendo 400 μM de BSA e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ em tampão PBS, seguidos da adição de uma solução $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$. As amostras contêm 10% de etilenoglicol e os rácios molares são indicados na figura.	16
Figura A4.10. Espectros de RPE obtidos a 77 K de soluções com $[\text{BSA}] = 600 \mu\text{M}$, após adição de uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ até uma razão molar de Cu:BSA de 3:1, seguida de adição de uma solução de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ até razões molares de Cu:BSA:Zn de 3:1:3. As soluções contêm $\approx 10\%$ de etilenoglicol.	17
Figura A4.11. Espectros de RPE de uma solução com uma razão molar Cu:BSA de 2:1 e $[\text{BSA}] = 600 \mu\text{M}$, medida a 77 K, e o espectro simulado correspondente para a) espécies designadas como 1, e b) espécies designadas como 2; utilizando o programa de computador de Rockenbauer et al. A solução contém $\approx 10\%$ de etilenoglicol.	17
Figura A5.1. Espectros da primeira banda derivada da banda X de RPE medidos a 77 K para amostras com 17 (ca. 0.50 mM) a pH = 7.0 em meios de cultura de células MEM. Após adição de 17 aos meios, as soluções foram deixadas em repouso a cerca de 25 °C. Os espectros das amostras a 3, 24 e 48 h têm uma intensidade muito mais baixa do que a 0 h, e foram traçadas com uma escala distinta.	18
Figura A5.2. Espectros da primeira banda derivada da banda X de RPE medidos a 77 K para amostras contendo $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{phen})_2]$ (17) (ca. 0.50 mM) a pH = 7.0 em meios de cultura de células MEM. Após adição de 17 aos meios, as soluções foram deixadas em repouso a cerca de 25 °C. Os espectros das amostras a 3, 24 e 48 h têm uma intensidade muito mais baixa do que a 0 h. ...	18

Figura A5.3. Espectros da primeira derivada da banda X de RPE medidos a 77 K para amostras com $[V^{IV}O(Me_2phen)_2]$ (18) (ca. 0.50 mM) a pH = 7.0 em tampão PBS. Após a adição de 18 aos meios, as soluções foram deixadas em repouso a cerca de 25 °C. Os espectros das amostras a 24 e 48 h têm uma intensidade muito mais baixa que a 0 e 3 h, e foram desenhados com uma escala distinta.....	19
Figura A5.4. Espectros da primeira derivada da banda X de RPE medidos a 77 K para amostras contendo $[V^{IV}O(Me_2phen)_2]$ (18) (ca. 0.50 mM) a pH = 7.0 adicionados aos três meios distintos. As amostras foram congeladas pouco tempo após a adição de 2 aos meios. Após a adição de 18 ao meio, as soluções foram deixadas em repouso a cerca de 25 °C. O espectro da amostra adicionada ao meio MC+FBS tem menor intensidade.....	19
Figura A5.5. Espectros da primeira derivada da banda X de RPE medidos a 77 K. Após adição de 2 aos meios, as soluções foram deixadas em repouso a cerca de 25 °C e estas amostras foram inseridas em tubos de RPE e congeladas após ca. 3 h da sua preparação. O espectro da amostra adicionada ao meio PBS tem maior intensidade e foi traçada numa escala distinta (com menor amplificação). A intensidade dos espectros medidos em PBS 24 e 48 h diminui progressivamente a sua intensidade, mas o padrão típico para os complexos $V^{IV}O$ ainda é visível	20
Figura A5.6. Espectros da primeira derivada da banda X de RPE medidos a 77 K para amostras com $[V^{IV}O(amphen)_2]$ (19) (ca. 0.50 mM) a pH = 7.0 em tampão PBS. Após a adição de 3 aos meios, as soluções foram deixadas em repouso a cerca de 25 °C. Os espectros das amostras a 24 e 48 h têm uma intensidade muito mais baixa que a 0 e 3 h, e foram traçadas com uma escala distinta	20
Figura A5.8. Espectros da primeira derivada da banda X de RPE medidos a 77 K. Após adição de 19 aos meios, as soluções foram deixadas ao ar a cerca de 25 °C e estas amostras foram inseridas em tubos de RPE e congeladas após ca. 3 h da sua preparação. O espectro da amostra adicionada ao meio PBS tem maior intensidade e foi traçado numa escala diferente (menos amplificada).	21
Figura 5.9. Espectros de RPE adquiridos a 77 K para as amostras com $[V^{IV}O(bipy)_2]$ (20) (ca. 0.50 mM) a pH = 7.0 nos meios de cultura celular com 10% de FBS. As amostras foram congeladas breves momentos após a adição de 4 aos meios de cultura. Após a adição de 20 aos meios de cultura, as soluções foram deixadas ao ar a cerca de 25 °C. A escala utilizada para traçar o espectro do tempo 0 h foi alterada (com menor ampliação)	21
Figura A6.1. Espectros de ^{51}V RMN de soluções com NH_4VO_3 (1 mM) e phen (2 mM) em D_2O (5 % de $MeOD-d_4$) a vários valores de pH (ajustados com uma solução muito diluída de DCI/D_2O). Os valores de pD estão indicados na figura.	22
Figura A6.2. Espectros de 1H RMN de soluções com NH_4VO_3 (1 mM) e phen (2 mM) em D_2O (5 % de $MeOD-d_4$) a vários valores de pD (ajustados com uma solução muito diluída de DCI/D_2O). O espectro no topo da figura corresponde apenas a 1,10-fenantrolina (1 mM) a pD = 7.52. Os valores de pD estão indicados na figura.	22

Figura 6.3. Ampliação dos Espetros de ^1H RMN da Figura A6.3 (7.05 a 9.85 ppm). Os valores de pD estão indicados na figura.....	23
Figura A8.1. Diagrama de distribuição das espécies para o sistema $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}+\text{phen}$, A) para $C_{\text{VO}} = 1$ mM, e B) 20 μM , calculado utilizando o programa HySS[14]. Consiste em ter $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{phen})_2]^{2+}$ dissolvido em água com concentração total de 1 mM (A) ou de 20 μM (B). As constantes de formação das espécies de $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}-\text{phen}$ foram retiradas de [10] (ver acima), e as espécies hidrolíticas de: [13]	26
Figura A8.2. Diagrama de distribuição das espécies para o sistema $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}-\text{phen}$ com C_{VO} no intervalo: 1 a 100 μM , utilizando o programa HySS 6 a $\text{pH} = 7.0$ para o sistema $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}-\text{phen}$, considerando uma razão molar $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}:\text{phen}$ de 1:2. As concentrações das espécies dinucleares $[(\text{V}^{\text{IV}}\text{O})_2(\text{phen})_2(\text{OH})_2]^{2+}$ e $[(\text{V}^{\text{IV}}\text{O})_2(\text{phen})_2(\text{OH})_3]^+$ são praticamente coincidentes.	26
Figura A8.3. Diagrama de distribuição das espécies para o sistema $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}^{2+} + \text{Me}_2\text{phen}$ (1:2), calculado com base no programa HySS[14], tendo em consideração duas concentrações totais distintas de oxidovanádio(IV): (A): 1 mM; (B) 10 μM	27
Figura A8.4. Diagrama de distribuição de espécies para o sistema $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}^{2+} + \text{Me}_2\text{phen}$ (gama C_{VO} : 1 a 100 μM) elaborado utilizando o programa HySS ⁶ a $\text{pH} = 7$, considerando uma razão molar $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}:\text{Me}_2\text{phen}$ de 1:2.....	28
Figura A8.5. Diagramas de distribuição das espécies no sistema $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}^{2+} + \text{phen} + \text{BSA}$ (gama C_{VO} : 1 a 100 μM) calculados utilizando o programa HySS ⁶ a $\text{pH} = 7$ para o sistema $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}^{2+} + \text{phen}$, considerando uma razão molar $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}:\text{phen}$ of 1:2 e $[\text{BSA}] = 40 \mu\text{M}$. A ligação do phen à BSA é considerada com uma constante de ligação de 5.7×10^4 , ⁹ embora nestes diagramas a formação de espécies $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{phen})(\text{BSA})]$ não seja contemplada.	29
Figura A8.6. Diagramas de distribuição de espécies no sistema $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}-\text{phen}-\text{BSA}$ (C_{VO} : 1 a 100 μM) calculados usando o programa HySS a $\text{pH} = 7$ para o sistema $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}^{2+} + \text{phen}$, considerando uma razão molar $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}:\text{phen}$ de 1:2 e $[\text{BSA}] = 40 \mu\text{M}$. A ligação de phen à BSA é considerada com uma constante de ligação de 5.7×10^4 , ⁹ e a formação de espécies $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{phen})(\text{BSA})]$ com uma constante de estabilidade de 10^{14} (correspondendo a uma constante de ligação condicional, K^1_{BC} , de 10^8). Com este valor de constante de ligação K^1_{BC} , a importância relativa das espécies $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{phen})(\text{BSA})]$ é baixa (máximo ~5 % da concentração total de $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}$). Tal não explicaria satisfatoriamente os Espetros de DC obtidos. Para este efeito, seria necessário um valor de $\log K^1_{\text{BC}}$ de pelo menos 10^9 , sendo esse o valor assumido neste trabalho.....	30
Figura 9.1. Unidade assimétrica em $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{OSO}_3)(\text{phen})_2]$ (17). Os parâmetros da célula diferem dos do cristal publicado por Dong et al, (DOI:10.1016/S0162-0134(00)00060-X), ver unidade assimétrica à direita (célula: a: 14.2125(17) Å, b: 10.8628(13) Å, c: 20.143(2)Å, α : 90°, β : 102.569(2)°, γ : 90°). Os desenhos foram feitos com o programa de mercúrio 3.7 em modo “wireframe”.....	31
Figura 10.1. Citotoxicidade dos compostos 18-22 e do respetivo ligado HL7 para a linha celular MG64.....	33

Índice de Esquemas

Esquema 3.1. Esquema de reação para a síntese das SB (H₂L1 e H₂L2) e da SB reduzida (H₃L3Cl).	38
Esquema 4.1. Esquema de reação dos ligandos base de Schiff HL4-HL6 sintetizados.....	71
Esquema 5.1. Esquema reacional da síntese realizada para obter o pró-ligando de base de Schiff derivado da vitamina B ₆ (H₂L7).....	98
Esquema 7.1. Processos que ocorrem em soluções tampão que contêm BSA às quais é adicionado Cu(NO ₃) ₂ , seguido de adições de phen [e de Zn(NO ₃) ₂].	160
Esquema 7.2. Representação esquemática do tipo de espécies que se podem formar com a BSA em soluções de Cu(NO ₃) ₂ , BSA e phen. As espécies de BSA-phen (B4) são pouco visíveis nos espectros de DC,[27] mas a sua formação e constante de ligação foram determinadas por medições fluorimétricas.[42] Note-se que em T1 o íon de Cu e a molécula de phen se encontram ligados em locais diferentes, e o correspondente $\log \beta(\mathbf{T1}) \approx \log (\mathbf{B1}) + \log (\mathbf{B4})$	162

Índice de Tabelas

Tabela 3.1. Picos selecionados e as respectivas atribuições dos prótons e carbonos dos espectros de RMN (desvio químico / ppm).....	41
Tabela 3.2. Principais atribuições das bandas dos espectros de FTIR dos pró-ligandos e complexos Cu(II) sintetizados (cm ⁻¹).....	42
Tabela 3.3. Parâmetros do Hamiltoniano de spin obtidos a partir dos espectros de RPE dos complexos Cu(II) 1, 4 e 5	45
Tabela 3.4. Valores de EC ₅₀ (µM) da atividade de inibição de formação de radicais determinada pelo método de DPPH para os compostos sintetizados. Foram efetuadas 3 replicas para cada composto e o desvio padrão encontra-se incluído.....	47
Tabela 3.5. Citotoxicidade (IC ₅₀ em µM ± DP*) dos pró-ligandos e co-ligando precursores e complexos de cobre(II) em duas células neoplásicas humanas (A2780 e MCF7) após 24 h de incubação. Ensaio realizado pela Dra. Fernanda Marques do Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa. *Desvio padrão	48
Tabela 3.6. Constantes de ligação (K _{BC}) e Stern-Volmer (K _{SV}) dos complexos à BSA obtidas por ajuste dos dados experimentais com aos modelos de Scatchard e Stern-Volmer. Os resultados foram obtidos por ensaios de extinção de fluorescência.	56
Tabela 3.7. Constantes de ligação (K _{BC}) entre os compostos e o ADN obtidas por ajuste dos dados experimentais aos modelos de Scatchard e Kaminoh. Os resultados foram obtidos por ensaios de titulação monitorizados por UV-Vis.....	62
Tabela 4.1. Desvios químicos dos principais picos atribuídos aos prótons e carbonos dos pró-ligandos HL4 - HL6 . Os espectros de RMN foram adquiridos em metanol-d ₄ . ^a Desvios químicos de HL5 em DMSO-d ₆	72
Tabela 4.2. Bandas de FTIR selecionadas (cm ⁻¹) dos espectros dos pró-ligandos HL4 - HL6 e dos correspondentes complexos de íons de metal. Intensidade das bandas de FTIR: br-larga, sh-ombro, s-forte, m-medio e w-frac. ^a Banda emerge de uma banda larga.....	74
Tabela 4.3. Parâmetros do Hamiltoniano de spin obtidos a partir da simulação dos espectros de RPE dos complexos de Cu(II) e V(IV)O: 6, 7, 9, 10 e 11 . Os espectros foram calibrados de acordos com os espectros de DPPH medidos em paralelo.	77
Tabela 4.4. EC ₅₀ (µM) da atividade de inibir o DPPH para os compostos sintetizados. O controle positivo foi o ácido ascórbico (AC) e n.a. significa que o composto não tem atividade.	81
Tabela 4.5. Citotoxicidade (IC ₅₀ em µM ± DP) dos pró-ligandos e complexos em três linhas celulares tumorais humanas da cervical (HeLa), glioblastoma (LN229) e da mama (MDA-MB 231) e linha celular humana normal epitélio pigmentar da retina (EPR _{cel.}) após três diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72h). Em que l.c. significa linhas celulares e t. i. tempo de incubação. Ensaio realizado pela Dra. Ceyda Acilan da <i>School of Medicine, Koç University, Sariyer, Turkey</i>	82

Tabela 4.6. Número de locais de ligação e constantes de ligação de 9 à BSA, obtidos pela aplicação dos modelos Scatchard e Stern-Volmer à extinção da emissão de fluorescência.....	91
Tabela 5.1. Bandas de FTIR selecionadas e respectivas atribuições dos complexos e respetivo pró-ligando H₂L7 . Espectros obtidos em pastilhas de KBr (em cm ⁻¹).....	101
Tabela 5.2. Bandas de absorção eletrónicas dos complexos obtidos em DMSO à temperatura ambiente. Os valores de ϵ são apresentados em M ⁻¹ cm ⁻¹ . λ_{\max}/nm (ϵ).....	102
Tabela 5.3. Parâmetros do Hamiltoniano de spin obtidos a partir da simulação[13] dos espectros de RPE dos complexos de Cu(II) e V(IV)O 13-16	104
Tabela 5.4. Citotoxicidade (IC ₅₀ em μ M) dos complexos e respetivo pró-ligando realizado em células tumorais de osteossarcoma após 24 h de incubação. ^a Experiências realizadas em DMEM suplementado com 10 % de FBS com 24 h de incubação. Estudos realizados pelo Dr. Ignacio Leon da <i>National University of La Plata</i>	106
Tabela 5.5. % de ROS formada em células tumorais de osteossarcoma MG63 após incubação com várias concentrações de 13 durante 24h. Ensaios realizados pelo Dr. Ignacio Leon da <i>National University of La Plata</i>	108
Tabela 6.1. Parâmetros do Hamiltoniano de spin obtidos[22] para 17, 18, 19 e 20 dissolvido em MeOH.....	120
Tabela 6.2. Parâmetros do Hamiltoniano de spin obtidos[32] para 17 dissolvido em quatro meios distintos. MeOH; PBS; MC: meio de cultura celular MEM; MC + FBS: meio de cultura celular MEM com 10% de FBS.....	130
Tabela 6.3. A atividade citotóxica (valores de IC ₅₀) dos compostos nas células A2780, MCF7 e PC3 a vários tempos. Os valores são as médias \pm DP de duas ou mais experiências independentes feitas com pelo menos 6 réplicas por condição. Estudos realizados pela Dra. Fernanda Maques do Instituto Superior Técnico, Univeridade de Lisboa. ^a	133
Tabela 7.1. Atividade citotóxica dos compostos nas células A2780 medida a vários tempos de incubação. Os ligandos livres e os complexos correspondentes são comparados. Os dados são médias \pm DP de duas ou mais experiências independentes feitas com pelo menos 6 réplicas por condição. Estudos realizados pela Dra. Fernanda Maques do Instituto Superior Técnico, Univeridade de Lisboa.....	153
Tabela 7.2. Parâmetros do Hamiltoniano de spin obtidos para os complexos 21-23 por simulação das espécies monoméricas observadas. CM - meio de cultura celular: CM+FBS - meio de cultura celular + 10% (v/v) FBS.....	159
Tabela 7.3. Constantes de ligação condicional a pH 7.4 \pm 0.1 obtidas a partir de cálculos efetuados com HypSpec[56] baseados nos espectros de DC medidos para os sistemas Cu-BSA e Cu-BSA-phen. ^[a]	161
Tabela A4.1. Parâmetros de Spin Hamiltonian obtidos por simulação espectral[12] para espécies de Cu existentes em soluções aquosas a pH = 7.4 que contêm Cu(NO ₃) ₂ , BSA e phen (e Zn(NO ₃) ₂).....	14
Tabela A4.2. Parâmetros de Spin Hamiltonian obtidos por simulação espectral[12] para espécies de Cu existentes em soluções aquosas a pH = 7.4 que contêm Cu(NO ₃) ₂ , BSA e phen.	15

Tabela A4.3. Parâmetros de simulação dos parâmetros de spin Hamiltonian obtidos a partir dos espectros de RPE de soluções aquosas (PBS, 10 mM, pH ≈ 7.4) contendo BSA (400 μM) e Cu(II). As soluções consistem em: I) BSA (393 μM) e Cu(NO ₃) ₂ .3H ₂ O (383 μM) com 1.6 % MeOH, resultando numa razão molar BSA:Cu de ≈1:1; II) BSA (380 μM) com Cu(NO ₃) ₂ .3H ₂ O (1.14×10 ³ μM) com 4.8 % MeOH, obtendo uma razão molar BSA:Cu de 1:3.....	16
Tabela A9.1. pontes de hidrogénio em [V ^{IV} O(OSO ₃)(phen) ₂] (17).....	31
Table A9.2. Dados de Cristal e Refinamento de Estrutura para [V ^{IV} O(OSO ₃)(phen) ₂] (17).....	32

Símbolos e Abreviaturas

1

¹³C RMN: ressonância magnética nuclear de carbono ·

¹H RMN: ressonância magnética nuclear de próton ·

A

A2780/AD: linha celular humana tumoral do ovário ·

A375: linha celular de melanoma humano ·

A496: células tumorais do rim ·

A549: linha celular tumoral do pulmão humano ·

A745: células precursoras de leucemia de eritrócitos de ratos ·

AC: ácido ascórbico

acac: acetilacetato ·

ADN: ácido desoxirribonucleico ·

álc. álcool

amphen: 5-amina-1,10-fenantrolina ·

ARN: ácido ribonucleico ·

ATCC: *american type culture collection* ·

ATCUN: amino terminal Cu(II)- and Ni(II)-binding ·

ATOX 1: *antioxidante-1 copper chaperone* ·

ATP7A: Proteína transportadora ATPases ·

ATP7B: Proteína transportadora ATPases ·

ATPases: adenosinatrifosfatases ·

B

Bipy: 2,2'-bipiridina ·

BSA: albumina sérica bovina ·

BT-20: células do cancro da mama tri-negativo ·

C

Cav-1: caveolina-1 ·

CCO: citocromo c oxidase ·

CCS: *copper chaperone for superoxide dismutase* ·

citrH: citrato ·

COSY: espectroscopia de correlação homonuclear ·

Cox17: *cytochrome c oxidase copper chaperone* ·

CP: ceruloplasmina ·

ctADN: ADN do timo de bezerro ·

Ctr1: *High affinity copper uptake protein 1* ·

D

D₂O: água deuterada ·

DC: dicroísmo circular ·
DCI: sinal de dicroísmo circular induzido ·
DHR-123: dihidro-rodamina-123 ·
Dissulfiram: bis-N,N-dietilditiocarbamato ·
DMEM: *Dulbecco's modified eagle's medium* ·
dmg: α-dimetilglycina ·
DMSO-d₆: dimetil sulfoxido deuterado ·
DNP: 2,4-dinitrofenol ·
DP: desvio padrão ·
DPPH: 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil ·
DRX-CU: difração de raios-X de cristal único ·
DTT: ditioneitol ·
E
EC₅₀: metade da concentração da inibição radicalar máxima ·
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético ·
EPR: efeito de permeabilidade e retenção intensificada
ERK: do inglês *regulated kinase extracellular pathway*
ESI-MS: espectrometria de massas com ionização electrospray ·
F
FA: ácido fórmico ·
FBS: Soro Fetal de Bovino
FTIR: espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier ·
G
gly: glicina ·
GSH: glutationa reduzida ·
GSSG: glutationa oxidada (forma dimerizada da GSH) ·
H
η⁵-Cp: ciclopentadienil ·
HB: hemoglobina ·
HEPES: N-(2-hidroxi-1-etil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico) ·
Hep-G2: células tumorais hepatocelular · 16
HMBC: correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância ·
HMHCPE: 4-etoxicarbonil-2-metil-5-hidroxi-6-oxo-1-hidropirimidina ·
HSA: albumina sérica humana ·
HSQC: correlação heteronuclear de quantum-simples ·
hTf: transferrina ·
I
t. i. tempo de incubação
IC₅₀: metade da concentração inibitória máxima ·
IP: iodeto de propídio ·

ITSC: isotiosemi-carbazonas ·

K

K_{BC}: constante de ligação ·

kDa: kiloDalton ·

KP1019: *indazolium trans-[tetrachloridobis(1H-indazole)ruthenate(III)]* ·

KP1339: sódio trans-[tetrachloridobis(1H-indazole)ruthenate(III)] ·

K_{SV}: constante de Stern-Volmer ·

L

I.c. linha celular

L929: células precursoras de leucemia de eritrócitos de ratos ·

LMCT: transferência de carga do ligando para o metal ·

M

MBS: local de ligação multimetal ·

Me₂phen: 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina ·

metanol-d₄: metanol deuterado ·

MG63: linha celular de osteossarcoma humana ·

min.: minutos ·

MMP: potencial da membrana mitocondrial ·

MRE: elipticidade média dos resíduos de aminoácidos ·

MS: espectroscopia de massa ·

MTT: metil-tiazolil-tetrazólio ·

Mvs: base de Schiff entre a L-metionina e a vanilina ·

N

NAMI-A: *imidazolium trans-imidazoledimethylsulphoxidetrachlororuthenate* ·

NTS: N-terminal site ·

O

oda: oxodiacetato ·

OMS: organização mundial de saúde ·

P

PBS: tampão fosfato-salino ·

PC3: linha celular tumoral da próstata humana ·

Phe: fenilalanina ·

phen: 1,10-fenantrolina ·

PL: piridoxal ·

ppm: partes por milhão ·

PS: fosfatidilserina ·

PTK: proteína tirosina quinase ·

PTP: proteína tirosina fosfatase ·

pyr₂en: N,N'-etilenebis(piridoxilideneiminato) ·

R

Ras: recetor membranar ·

RAS: atividade de inibição de formação de radicais ·

ROS: espécies reativas de oxigénio ·

RPE: ressonância paramagnética eletrónica ·

RPE_{cel.}: epitélio pigmentar da retina ·

RPMI: *roswell park memorial institute* ·

S

sal: salicilato ·

SB: base de Schiff ·

SC: semi-carbazonas ·

SOD1: enzima superóxido dismutase ·

T

TEM: microscópia eletrónica de transmissão ·

TGA: ácido tioglicólico ·

Tryp: triptofano ·

TSC: tiosemi-carbazonas ·

Tss: base de Schiff entre o salicilaldeído e a taurina ·

U

UV-Vis.: espectroscopia de absorção eletrónica no ultravioleta/ visível ·

V

VFITC: isotiocianato de fluoresceína ·

Vhn: base de Schiff entre a valina e 2 hidróxi-1-naftaldeído ·

Símbologia

$\Delta\epsilon$: variação do coeficiente do coeficiente de extinção molar ·

λ : comprimento de onda ·

ν : vibração ·

➤ **Capítulo I - Introdução**

➤ **Capítulo II - Objetivos**

➤ **Capítulo III - Complexos de cobre com bases de Schiff derivados do piridoxal com potencial terapêutico.**

➤ **Capítulo IV – Complexos de iões de metal constituídos por bases de Schiff de cromonas e piridoxal como potenciais agentes antitumorais**

➤ **Capítulo V - Complexos de iões de metal com bases de Schiff derivados da vitamina B₆**

➤ **Capítulo VI - Complexos de vanádio com 1,10-fenantrolina e derivados**

➤ **Capítulo VII - Comportamento dos complexos do tipo [Cu(phen)₂]²⁺ em meios celulares e a sua influência na citotoxicidade**

➤ **Capítulo VIII - Secção experimental**

➤ **Capítulo IX - Considerações finais**

➤ **ANEXOS**

1.1. Introdução

O cancro é um dos principais problemas de saúde a nível mundial. A organização mundial de saúde (OMS) revelou que, em 1990, cerca de 45 milhões de pessoas possuíam algum tipo de cancro, sendo que atualmente este número aumentou para 100 milhões. Por outro lado, a incidência de novos tumores afetou mais de 18 milhões de indivíduos em 2018, com tendência para aumentar não apenas devido ao envelhecimento populacional, mas também a fatores de risco associados ao estilo de vida[1] e à poluição.[2] Sendo que estes, aliados ao fator genético, aumentam o risco de diagnóstico desta doença.[3][4]

No mundo uma em cada 6 mortes é provocada pelo cancro, tornando-o uma das principais causas de morte a nível mundial, com cerca de 9.6 milhões de indivíduos só no ano de 2018.[1] Em termos globais, o número total de mortes tem vindo a aumentar, no entanto, quando normalizado com o envelhecimento e com o aumento populacional, observa-se um decréscimo de cerca de 15 a 20% desde 1990.[5]

1.2. Quimioterapia e metalofármacos correntes

Um dos tratamentos mais usados no cancro é a quimioterapia. No entanto, os fármacos usados são de elevada toxicidade e baixa seletividade tumoral, ou seja, tanto danificam células malignas como benignas, o que se traduz num vasto conjunto de efeitos secundários, que aumenta o tempo de recuperação e reduz de forma significativa a qualidade de vida dos pacientes. A combinação de fármacos, a dosagem e a frequência da administração tem sucesso principalmente devido à associação de quatro fatores:

- a população de células normais é superior às tumorais;
- os tecidos normais recuperam totalmente mais rapidamente do que as células tumorais;
- as células tumorais têm um ciclo de vida celular mais acelerado;
- as substâncias químicas administradas interferem em funções bioquímicas celulares vitais numa ou várias fases do seu ciclo de vida.

Sabe-se que o mecanismo de ação de muitos compostos quimioterapêuticos incide em estruturas celulares envolvidas em diversas etapas do ciclo de divisão celular (fármacos de ciclo-celular específico), sendo possível explicar o motivo pelo

qual as células de proliferação rápida (como por exemplo células tumorais, cabelo, e as células do trato gástrico) são mais sensíveis à quimioterapia, o que obriga a suspensões cíclicas do tratamento para que paciente possa recuperar.

Na maioria dos tumores, a transformação de uma célula normal para uma célula tumoral ocorre numa das fases dos mecanismos associados ao ciclo de divisão celular.[6] Este é um dos motivos pelo qual os alvos celulares mais estudados no desenvolvimento de novos fármacos são os componentes nucleares, tais como: ADN, ARN, topoisomerases, entre outros.

As substâncias quimioterapêuticas mais antigas e mais usadas no tratamento de tumores são os agentes classificados como alquilantes. O seu sucesso passa por causar danos ao ADN em qualquer fase do ciclo celular e, portanto, não é essencial uma exposição prolongada ao fármaco. A cisplatina, com mais de 50 anos, foi o primeiro complexo de ião de metal a entrar no mercado para o tratamento do cancro como agente quimioterapêutico. Nas últimas décadas, muitos complexos à base de platina foram sintetizados como potenciais agentes antitumorais, mas destes, apenas dois (carboplatina e oxaliplatina) entraram em uso clínico em todo o mundo. Existem ainda mais três licenciados (nedaplatina, heptaplatina e lobaplatina) mas apenas em alguns países (**Figura 1.1**).

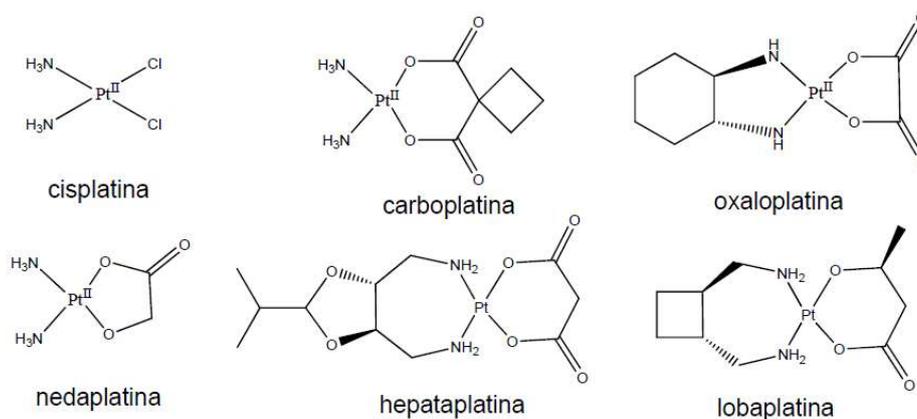


Figura 1.1. Complexos antitumorais derivados de platina.

Os fármacos de platina são eficazes, produzindo aductos no ADN que os mecanismos de reparação celular não conseguem reverter, levando assim à morte celular por apoptose. O seu mecanismo de ação está relacionado com a inibição da síntese do ADN, com a formação de ligações covalentes irreversíveis entre o centro de ião de metal e a posição N7 da adenosina e da guanosina, causando lesões no ADN com a formação de aductos. Essas lesões levam à inibição de enzimas

envolvidas na transcrição do ARN, na replicação do ADN e no alongamento da cadeia de polimerização do ADN.[7][8]

A utilização dos fármacos de platina é limitada devido aos efeitos secundários provocados pelos seus elevados níveis de toxicidade e baixo grau de seletividade, principalmente por interagirem com outras estruturas celulares como por exemplo enzimas e proteínas que contêm o grupo tiol. Para além dos seus efeitos secundários, as suas principais limitações são a resistência de alguns tumores a esta família de fármacos e o desenvolvimento de resistência que ocorre em algumas linhas celulares tumorais após o seu uso repetido.[9]

1.3. Vantagens dos complexos de iões de metal como potenciais fármacos antitumorais

Atualmente, mais de 100 agentes quimioterapêuticos são usados no tratamento de neoplasias malignas[10] sendo que apenas 3 deles são à base de metais (platina). Porém, quando comparado com todos os agentes quimioterapêuticos administrados a nível mundial, os fármacos à base de platina representam cerca de 50 %.[11] Estes indicadores, em conjunto com as limitações dos complexos à base de platina referidas acima, suscitam o interesse de investigadores e a necessidade de desenvolver novos complexos envolvendo outros centros de iões de metal para o tratamento de tumores.

Espera-se que ao serem utilizados complexos com iões de metal distintos da platina, estes possam fornecer perfis com atividades diferenciadas, uma vez que estes deverão apresentar mecanismos de ação distintos. Nesta abordagem, os complexos de ruténio estão entre os mais bem-sucedidos, sendo os mais investigados a seguir à platina. Outros metais como o cobre,[12][13] titânio[14][15] ou gálio[16][17] têm sido bastante estudados, com alguns destes complexos em ensaios clínicos.[18]

Os complexos de iões de metal de ruténio demonstraram ter tendência para interagirem com o ADN de forma reversível, o que pode reduzir os efeitos secundários quando comparado com os complexos de platina. No entanto, apesar de muitos demonstrarem ter atividade contra vários tumores, alguns destes complexos ligam-se e danificam o ADN resultando numa elevada toxicidade, ou promovem erros de réplica sem induzir apoptose. Dos estudos dos complexos de ruténio, os mais notáveis são o KP1019, KP1339 e NAMI-A (**Figura 1.2**), atualmente o NAMI-A foi suspenso dos ensaios clínicos, sendo que o composto evidencia propriedades notáveis anti-

angiogénicas e anti-invasivas, tornando-o particularmente ativo contra as metástases, em contraste com os fármacos de platina. [19][20][21] Esta característica pode estar relacionada com a especiação experienciada no meio extracelular onde os seus metabolitos podem interagir maioritariamente com a membrana celular, não sendo internalizados significativamente pelas células.[22][23] Em oposição, o KP1019 não possui propriedades anti-angiogénicas, sendo internalizado e, provavelmente, são formadas espécies intracelulares que têm como alvo o ADN e/ou proteínas, causando a morte celular. Uma vez que o KP1019 tem alguns problemas relacionados com a solubilidade, houve a necessidade de se sintetizar novos compostos, sendo o KP1339 o composto derivado substituído que obteve maior sucesso atualmente em ensaios clínicos.[21][24]

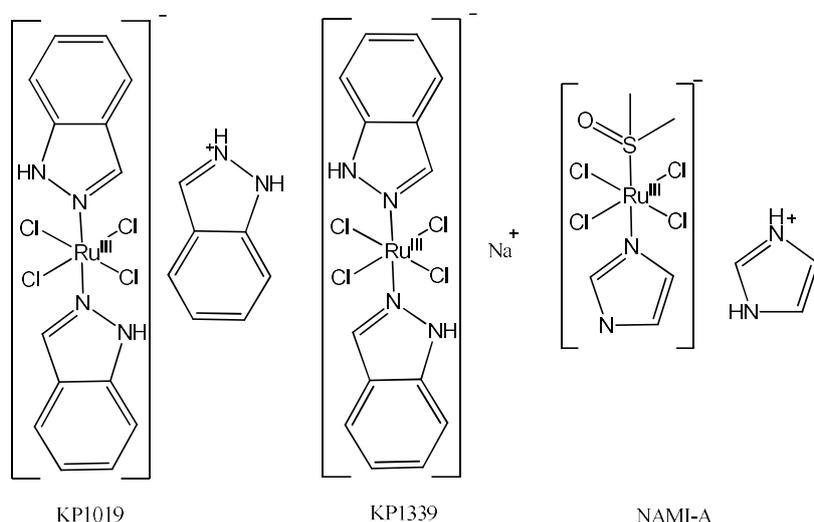


Figura 1.2. Estruturas dos complexos antitumorais de ruténio em ensaios clínicos.

Tanto os complexos de Pt como os de Ru tem tido resultados muito promissores como possíveis fármacos antitumorais. Porém, mais recentemente foram alvo de estudo complexos de outros centros de iões de metal intrinsecamente menos tóxicos, tais como metais de transição endógenos, sendo o complexo $[\text{Cu}(\text{Gly})(\text{Me}_2\text{phen})]\text{NO}_3$ (**Figura 1.3**), um dos complexos de cobre mais relevantes e que atualmente está em ensaios clínicos. Este complexo ternário pertence à classe das Casiopeínas®, sendo constituído por dois ligandos, em que um deles é um derivado da 1,10-fenantrolina (phen). Inúmeros estudos foram realizados de modo a elucidar o seu mecanismo de ação, sendo que atualmente só três são aceites, envolvendo a morte celular por apoptose:[25] a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) com oxidação e danificação do ADN;[26] o stress oxidativo com despolarização das membranas

metais, incluindo o cobre e o vanádio, foi observada em diversos tecidos tumorais (p.e. da mama), quando comparada com os tecidos normais. Excesso em teor de cobre, foi ainda encontrado em amostras tumorais da próstata, pulmão e cérebro,[40][41] sendo os mecanismos moleculares associados a esse fenómeno ainda pouco esclarecidos.

1.3.1. Transporte dos iões de cobre nos meios biológicos

No organismo, o cobre total presente não é muito citotóxico uma vez que o transporte de cobre nas células é rigorosamente controlado e estabilizado pelas proteínas de transporte.[42] Os iões de cobre não são encontrados no organismo sem estarem ligados a proteínas transportadoras na corrente sanguínea[43] ou a aminoácidos e a proteínas no interior das células.[44] Na corrente sanguínea, os iões de cobre são distribuídos por duas fases principais: inicialmente os iões de cobre entram no sangue maioritariamente ligados à albumina e também à transcupreína, sendo transportados para os rins e fígado; em seguida os iões de cobre voltam para a corrente sanguínea, desta vez ligados à ceruloplasmina (CP), e são distribuídos pelos restantes órgãos. Por sua vez, a internalização celular dos iões de cobre é efetuada principalmente pela proteína seletiva membranar Ctr1 (cerca de 70%)[44] e os iões são de seguida transferidos para proteínas específicas de cobre, chaperonas (Atox 1, Cox17 e CCS). A quantidade de cobre em excesso é transportada pela ATOX 1 e o cobre é transferido para as proteínas transportadoras ATPases (ATP7A e ATP7B) localizadas no complexo de Golgi, sendo o cobre expelido pela sua incorporação em vesículas contendo a CP. A mitocôndria é outro dos principais destinos dos iões de cobre transportados pelas chaperonas Cox17, uma vez que o cobre é necessário para a maturação do citocromo c oxidase (CCO), imprescindível para o processo de transporte eletrónico. Outro destino dos iões de Cu(I), transportados pelas chaperona CCS, é o enzima superóxido dismutase (SOD1), responsável por catalisar a reação de transformação do superóxido em oxigénio e peróxido de hidrogénio, sendo por isso um antioxidante crucial para o bom funcionamento celular.[44][45][46] O cobre está também envolvido noutros processos celulares relacionados com a atividade da lisil oxidase e da tirosinase.[45][47][48] Para além de desempenhar um papel decisivo no sistema nervoso, na modulação do sistema imunitário e na angiogénese. A deficiência em cobre no organismo leva a um aumento de ROS que geram danos em lípidos, em proteínas e em ADN. Em todo o caso, o excesso de cobre também provoca distúrbios fisiológicos graves que originam

diversas patologias (doença de Wilson, distúrbios hepáticos ou doenças neurodegenerativas).[46]

No desenvolvimento de novos fármacos à base de cobre, a utilização de quelantes que estabilizem os íons de cobre pode aumentar significativamente o transporte de cobre para as células tumorais de uma forma independente do transportador de cobre habitual (Ctr1).[47] Esses quelantes podem ser deslocados parcial ou totalmente do complexo original durante o transporte no sangue devido à existência de ligandos com afinidade para os íons de cobre tais como a transferrina, ceruloplasmina, albumina, ou bioligandos de baixo peso molecular como o citrato, o lactato e aminoácidos existentes no soro sanguíneo.[48] Assim, são de grande relevância os estudos da estabilidade dos complexos de íons de metal em meios que simulem os meios fisiológicos ou de incubação celular, assim como a sua interação com as principais moléculas com afinidade para o cobre. Esses estudos ajudam a compreender o tipo de espécies absorvidas pelas células, assim como auxiliam na interpretação dos resultados dos estudos de citotoxicidade e do modo de ação dos complexos. Essas informações podem ser úteis para a produção de novos fármacos com perfis farmacológicos melhorados.

Em concordância com essas descobertas e sabendo que das proteínas de transporte no sangue a albumina é a única frequentemente adicionada aos meios de incubação celular nos estudos *in vitro*, é relevante conhecer com maior detalhe o modo como a sua ligação aos íons metálicos ocorre, assim como é importante compreender a ação desta proteína no organismo, particularmente na transferência ou internalização de íons metálicos ao nível celular.

1.3.2. Albumina e sua importância como transportador de fármacos

A albumina sérica humana (HSA) é a proteína mais abundante no plasma do sangue (cerca de 60%) e devido às suas diversas capacidades de ligação, serve como proteína de transporte para moléculas endógenas e exógenas, incluindo diversos metais de transição; Pt(II), Au(I), Ni(II), Cd(II), V(IV)O, Zn(II) e Cu(II). A afinidade de íons de Cu(II) para a albumina é bem conhecida, sendo o local com maior afinidade conhecido por NTS (ATCUN ou local 1), formado por uma sequência de aminoácidos Asp-Ala-His, com a capacidade para formar um complexo planar com 4 átomos doadores de nitrogênio e com afinidade na ordem do picomolar (**Figura 1.4**). Outro local de grande afinidade para íons metálicos é conhecido por local de ligação

multimetálico (MBS).[49][50] Este local tem grande afinidade para íons de Zn(II) e Cd(II) e serve de segunda ligação para o Cu(II), Ni(II) e Co(II). O complexo de Zn(II) formado neste local é constituído pela sequência de aminoácidos His(N), Asn(O), His(N) e Asp(O), tendo sido observada também a coordenação de uma molécula de H₂O extra ao centro metálico.[51][52] Apesar de serem conhecidos outros locais de ligação para íons metálicos, no caso de íons de Cu(II), essas ligações não são suficientemente fortes para provocarem alterações espectrais importantes na espectroscopia de dicroísmo circular (DC), sendo mais relevantes para os íons de Pt ou Au.[53]

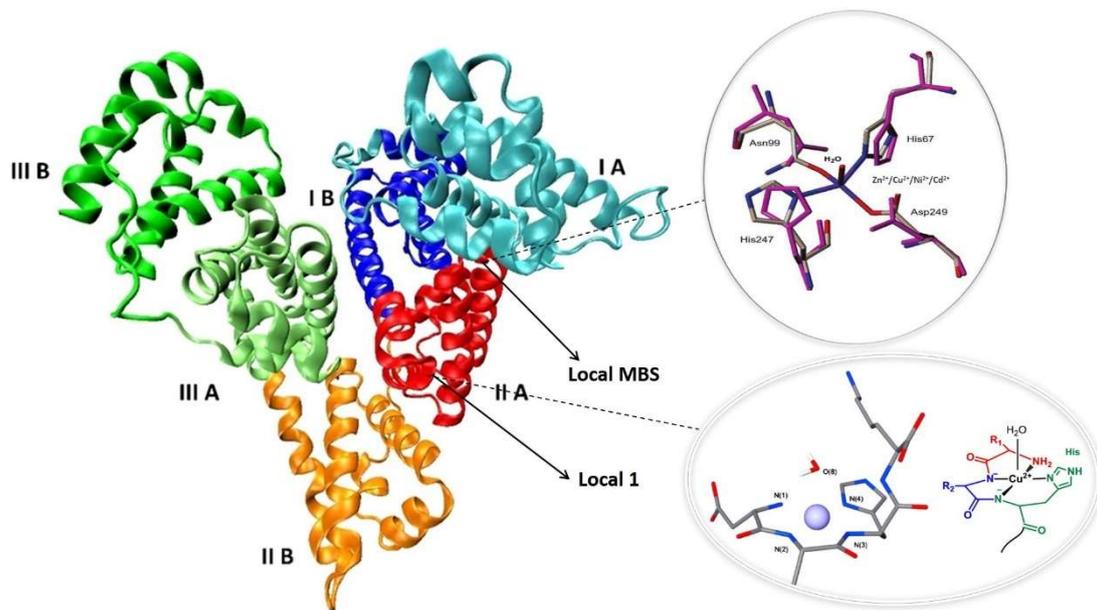


Figura 1.4. Estrutura da albumina humana (ou bovina) e principais locais de ligação para os íons metálicos. Imagem adaptada da literatura.[54]

Além da função associada ao transporte, a HSA é também uma das principais proteínas responsáveis pela regulação do pH,[55] e da pressão osmótica do sangue[56] tendo sido observada a sua acumulação no espaço intercelular tumoral. No tecido tumoral ocorre um fenómeno conhecido por EPR: “efeito de permeabilidade e retenção intensificada” do inglês: “*enhanced permeability and retention effect*”, que surge pela conjugação de dois fatores: a vasculatura tumoral ser altamente permeável com a abertura de lacunas intercelulares e crescimento deficiente dos vasos sanguíneos, e à drenagem linfática deficiente, provocada pela compressão e eventual colapso dos vasos linfáticos.[57] Consequentemente, moléculas de grandes dimensões, >40 kDa como a albumina, ficam retidas e acumuladas nos tecidos tumorais.[57][58][59] Sendo este fenómeno favorável para explorar o efeito citotóxico, é desejável que a albumina seja internalizada nas células tumorais transportando a(s)

espécie(s) terapêutica(s). De facto, são conhecidos vários recetores com afinidade para a albumina, que podem facilitar a sua internalização celular.[59] Por outro lado, foi observada a formação de vesículas de caveolina, na qual a albumina é absorvida pela invaginação da membrana citoplasmática, sendo este processo regulado pela proteína Cav-1, sobreexpressa em diversos tipos de tumores.[60][61][62] Foi também observado que certos tipos de células tumorais absorvem proteínas, como por exemplo a albumina, que é usada como fonte de aminoácidos suprimindo assim as suas necessidades metabólicas aceleradas. Esta absorção é ativada por um recetor membranar, Ras, sobreexpresso em algumas linhas de células tumorais.[62] Evidencia-se que esta proteína pode ter mais implicações na quimioterapia do cancro do que apenas a função de transportar o fármaco.

1.4. Complexos de cobre com ligandos bioativos

O desenvolvimento de complexos de cobre para o tratamento antitumoral pode parecer contrassensual, uma vez que o cobre é necessário na formação de novos vasos sanguíneos e o seu excesso pode originar um descontrolo da angiogénese, da proliferação celular e consequentemente das metástases. A existência de uma maior concentração de elementos metálicos em tecidos tumorais sugere uma necessidade acrescida das células neoplásicas por esses metais. Podendo, por isso, existir uma maior internalização celular de complexos com esses elementos.[63][50]

A principal vantagem dos complexos de iões de metal em relação às moléculas orgânicas é o acesso à sua química redox, uma vez que geralmente têm potenciais redox biologicamente acessíveis. O mecanismo de ação dos compostos de iões de metal pode, em princípio, ser modulado com uma escolha apropriada do metal de transição, estado de oxidação, modos de ligação e tipo de doadores/ligando(s).[9][64] Além disso, existe uma enorme variedade de metais e de ligandos com potencial ação biológica ou que podem originar complexos biologicamente ativos após coordenação ao metal.

Considerando o potencial sucesso do composto Casiopeína-II-gly, $[\text{Cu}(\text{Gly})(\text{Me}_2\text{phen})]\text{NO}_3$, foram realizados inúmeros estudos que mostraram o papel relevante que o ligando derivado da phen possui na atividade citotóxica. A phen é uma molécula heterocíclica aromática, bioativa, e muito usada em química de coordenação, formando complexos estáveis com vários metais. A conjugação das

ligações duplas nos anéis aromáticos faz com que as energias das transições $\pi-\pi^*$ sejam de relativamente baixa energia; conjugando essa característica com a sua rigidez molecular obtém-se uma restrição da relaxação vibracional, fazendo deste composto um sensor de fluorescência muito útil.[65] A planaridade originada pelos três anéis aromáticos conjugados permite também interações $\pi-\pi$, demonstrando capacidade de intercalar entre os pares de bases da dupla hélice do ADN.[66][67][68][69]

Um dos principais alvos biológicos de complexos de cobre com ligandos do tipo phen, e seus derivados, é frequentemente atribuído ao ADN. A interação desses compostos com o ADN pode promover modificações estruturais que podem suprimir a replicação de genes ou a sua transcrição e deste modo perturbar várias funções celulares. Por esta razão a capacidade de interação dos compostos com o ADN é considerada relevante na avaliação de potenciais agentes antitumorais. Os modos de interação desses agentes como com a dupla hélice do ADN mais comuns são: “stacking” exterior (ligações electrostáticas, iônicas – devido à presença dos grupos fosfato); ligação aos sulcos, sulco-maior ou sulco-menor (ligações electrostáticas, iônicas, interações $\pi-\pi$ ou hidrofóbicas – à superfície da hélice do ADN) e intercalação (interação hidrofóbica com os pares de bases do ADN) (**Figura 1.5.**). Além do tipo de ligação, a força de ligação é também um fator determinante para avaliar o potencial dos complexos em induzir deformações ou quebras no ADN.[70].

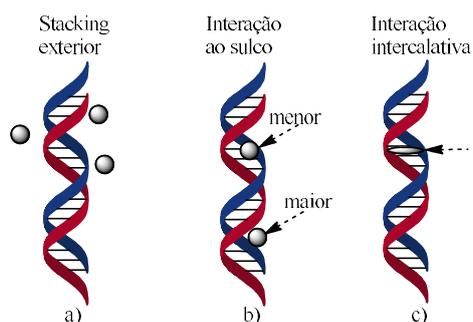


Figura 1.5. Tipos de interação mais frequentes entre compostos e ADN: **a)** interações eletrostáticas ou iônicas (essencialmente com grupos fosfato); **b)** ligações eletrostáticas ou iônicas com interações à superfície da hélice do ADN (sulco maior ou sulco menor; **c)** interações por intercalação entre aos pares de bases do ADN (interações hidrofóbicas).

São muitos os exemplos na literatura de complexos binários e ternários de cobre constituídos por phen e seus derivados. Em alguns os seus efeitos citotóxicos

em diversas linhas celulares são comparados, e os seus mecanismos de ação são propostos com base em estudos realizados *in vitro* da interação dos complexos com diversos potenciais alvos celulares: ADN; topoisomerases; atividade mimética da SOD; inibição do proteossoma ou estudos em células para avaliar a capacidade de produção de ROS. Sendo que no geral, o alvo principal postulado para esta classe de complexos de cobre é o ADN.[71][72][73][74][75] No entanto, existem muitos fatores a considerar antes de poder atribuir a citotoxicidade observada apenas à interação com o ADN, ou como sendo o principal modo de ação implicado na morte celular. Nomeadamente, a hipótese de o complexo não chegar ao núcleo, a existência de especiação nos meios extra- e intracelulares, assim como o estado de oxidação do centro metálico, e conseqüente química redox, entre outros. Estas e outras questões são abordadas e discutidas com maior detalhe nos capítulos VI e VII.

A atribuição de outros modos de ação que contribuem para a citotoxicidade foi sugerida para complexos binucleares com alguns metais, incluindo o Cu(II) (**Figura 1.6**).[72] A citotoxicidade exercida por um composto contendo Cu-phen e uma ponte de pirofosfato foi determinada em células de cancro de ovário A2780/AD com valores de IC₅₀ de 0.64 μM às 24h. A elevada citotoxicidade deste composto foi justificada pela variedade de especiação passível de ocorrer no interior da célula (incluindo os grupos acetatos, fosfatos, carbonatos e tiolatos que podem interagir com o centro metálico) com a formação de espécies de várias cargas, possibilitando assim vários mecanismos para a morte celular. O estudo sugeriu ainda que as espécies carregadas positivamente permitam a quebra da dupla hélice do ADN e a inibição enzimática, enquanto as espécies neutras e aniônicas podiam contribuir para o stress oxidativo.

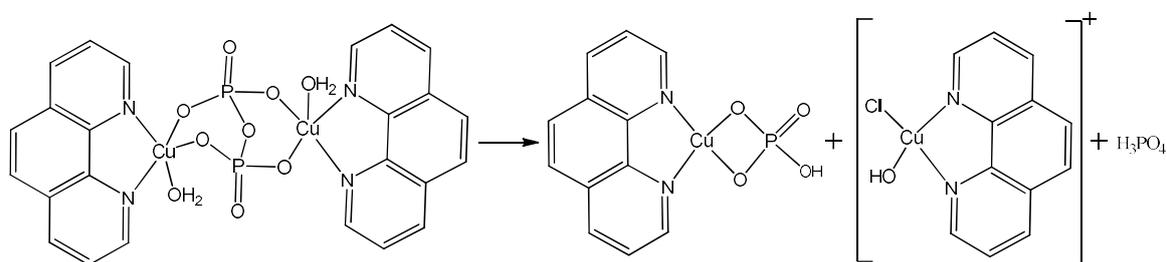


Figura 1.6. Estruturas de $[Cu(phen)(H_2O)]_2(\mu-P_2O_7)$ e os respetivos produtos de hidrólise (espécies ativas).

Apesar dos autores terem tido a preocupação de realizar estudos de estabilidade em meios celulares, com recurso a ensaios por espectroscopia de absorção eletrónica, não foi considerada a influencia da BSA presente nos meios

celulares dos ensaios de citotoxicidade ou de outras proteínas com afinidade para os íons de cobre existentes no meio extracelular. A obtenção de mais informações estruturais das espécies formadas intracelularmente, nomeadamente a possibilidade do ligando phen se manter ligado ao centro metálico são questões que permanecem por explorar.

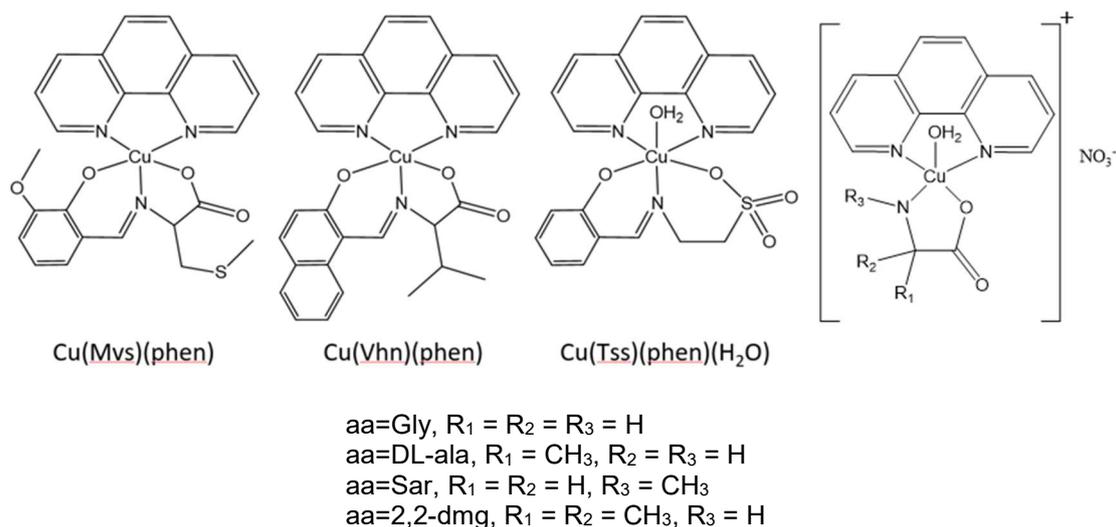


Figura 1.7. Complexos do tipo Cu(X)(phen) , em que X são diversos aminoácidos e derivados, incluindo bases de Schiff: **Tss**, salicílico-tyrosina; **Vhn**, valina-2-hidroxi-1-naftaldeído; **Mvs**, L-metionina-o-vanilina.

Outro modo de ação foi sugerido para os complexos mistos ternários apresentados na **Figura 1.7.**, constituídos por phen e bases de Schiff (SB) - formadas com base em aminoácidos - ou aminoácidos que revelaram possuir capacidade para inibir proteossomas, e induzir a apoptose em células tumorais.[76][77] O papel da phen revelou ser fundamental para a inibição proteossômica, uma vez que a substituição de phen pelo ligando homólogo 2,2'-bipiridilo (Bipy) resultou em atividade inibitória do proteossoma nula. Além disso, estudos de “docking” mostraram que existe um ajuste perfeito entre o composto $[\text{Cu(Mvs)(phen)}]$ e o local de ligação enzimático, contrariamente ao complexo formado com o Bipy.[78] A atividade antiproliferativa destes complexos foi avaliada em células neoplásicas mamárias e em células mamárias saudáveis, e verificou-se que o complexo que contém a glicina di-metilada $[\text{Cu(dmg)(phen)(H}_2\text{O)}]\text{NO}_3$ apresentou seletividade significativa para as células tumorais. Esta foi atribuída à capacidade deste complexo de gerar elevadas concentrações de ROS nas células tumorais, em contraste com as normais.[79]

A **Figura 1.8.** mostra dois exemplos de complexos constituídos por um ligando phen, que apresentaram citotóxicidade em células tumorais do rim (A496), pulmão

(A549) e hepatocelular (Hep-G2), com valores de IC₅₀ compreendidos entre 1 e 2.5 µM. Estes compostos revelaram possuir atividade mimética da SOD comparável à do composto de referência usado (MnTmPyP - Mn(III)tetraquis(1-metil-4-piridil)porfirina pentacloreto), no entanto não existiram evidências que a atividade antitumoral estivesse diretamente correlacionada com a atividade mimética da SOD.[80] Noutro estudo com [Cu(sal)(phen)] observou-se que a morte celular era induzida por apoptose, porém o seu mecanismo de ação ainda não está bem estabelecido, apesar de ter demonstrado possuir toxicidade para diversas linhas celulares humanas.[81] Estudos adicionais realizados *in vivo* em ratos e *in vitro* em diversas linhas celulares tumorais da mama evidenciaram a capacidade deste complexo em suprimir a progressão tumoral com valores relevantes para as células do cancro da mama tri-negativo BT-20. Apesar deste composto ter demonstrado alguma toxicidade a dose efetiva necessária para suprimir o crescimento tumoral foi bem tolerada.[82]

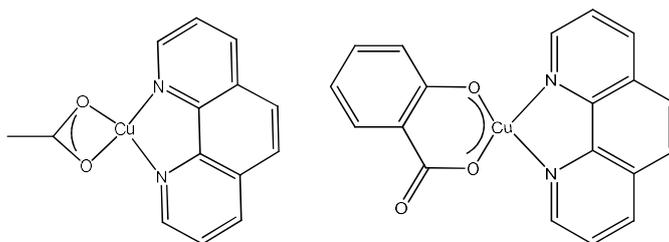


Figura 1.8. Estruturas dos complexos [Cu(CH₃COO)(phen)] e [Cu(sal)(phen)], em que sal é o salicilato.

De um modo geral, o modo de ação de complexos do tipo Cu-phen difere do da cisplatina; por exemplo, no caso do Cu-phen não há evidências da existência de ligação covalente ao ADN. A maioria dos complexos de cobre com phen(s), incluindo derivados, interagem com o ADN por intercalação ou por intercalação parcial,[83] sendo que, na presença de agentes oxidantes (ROS) é possível observar-se a sua clivagem.[84] Porém, é difícil avaliar se essa interação se deve ao ligando livre (phen) que tem propriedades demonstradas de interagir com o ADN ou a alguma espécie do tipo Cu-phen.

1.4.1. Atividade antitumoral de complexos de cobre contendo bases de Schiff derivados da vitamina B₆

As SB têm a vantagem de serem fáceis de sintetizar e de estabilizarem diferentes metais de transição em vários estados de oxidação. Estas permitem a

modulação das características químicas do ligando com a escolha apropriada de uma amina e de um aldeído ou cetona. A utilização de moléculas com atividade biológica para formar SB é uma estratégia amplamente usada no desenvolvimento de complexos de íons de metal terapêuticos. A vitamina B₆ atua como co-catalisador em numerosas reações bioquímicas relacionadas com processos metabólicos celulares.[85] Demonstrou-se ser possível mimetizar diversos sistemas modelo não enzimáticos com recurso ao piridoxal (PL), uma forma da vitamina B₆, e de íons metálicos através da formação de SB.[86] Foi também observado um efeito antiproliferativo em células humanas e de ratos neoplásicas quando incubadas com doses elevadas de PL,[87] que para além de possuir atividade antioxidante,[88] também tem potencial terapêutico em doenças como a artrite reumatoide[89] ou doença de Parkinson.[90] Um processo metabólico celular vital (associado à biossíntese de nucleótidos, assim como à metilação do ADN) dependente da vitamina B₆, envolve o enzima serina hidroximetiltransferase.[90][91] Esta enzima tem atividade mais elevada em células tumorais que proliferam rapidamente, resultando assim num aumento da necessidade de vitamina B₆ quando comparado com as células saudáveis.[92] Essa necessidade é satisfeita pela absorção celular por difusão facilitada através de diversos transportadores membranares.[93] Poderá ser então possível que os complexos de Cu(II) possuindo um ligando de SB com derivados da vitamina B₆ sejam mais facilmente internalizados e interferirem nos processos metabólicos da vitamina B₆.

A maioria dos complexos sintetizados com SB derivados da vitamina B₆ reportados na literatura são conjugados com semi-(SC), tiosemi-(TSC) e isotiosemi-carbazonas (ITSC), poliaminas ou aminoácidos,[94][95] no entanto, são poucos os exemplos com aplicações terapêuticas antitumorais. Apesar do escasso número, são apresentados a seguir alguns exemplos de complexos de cobre que demonstraram atividade antiproliferativa, antioxidante e capacidade para se ligar e quebrar o ADN, relacionados de alguma forma com os derivados da vitamina B₆ desenvolvidos neste trabalho.

O grupo de Belicchi Ferrari estudou a ação de complexos de Cu(II) e Co(III) contendo TSC conjugada com o PL (**Figura 1.9**) em células precursoras de leucemia de eritrócitos de ratos (A745 e L929). Os autores observaram que os complexos de cobre possuíam um efeito supressor da proliferação dessas células, ao contrário do complexo análogo de Co(III) e do respetivo ligando, que não apresentaram atividade.

Os autores fundamentaram estas observações com a natureza das espécies ativas, que no caso do cobre possuem posições de coordenação livres, enquanto a esfera de coordenação no complexo octaédrico de Co(III) estaria completamente preenchida.[96]

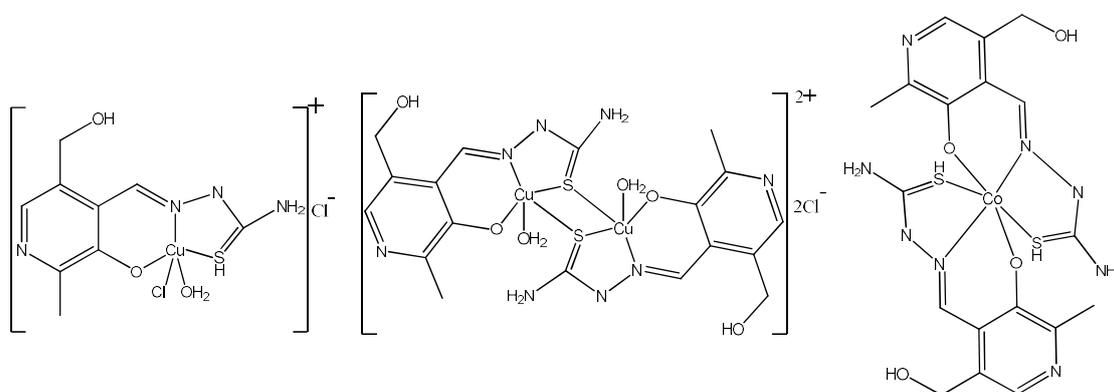


Figura 1.9. Complexos de coordenação derivados da família dos ligandos SB obtidos pela conjugação entre o piridoxal e tiosemicarbazonas (PLTSC), com diferentes geometrias e centros metálicos.

Recentemente, Back e seus colaboradores trouxeram a público uma série de complexos de Cu(II) com ligandos bidentados do tipo N,O, derivados do piridoxal contendo anéis aromáticos com diversos substituintes halogenados, originando complexos com geometria quadrangular plana (**Figura 1.10.**). Os complexos demonstraram ter capacidade de quebrar a dupla hélice do ADN plasmídeo, com a seguinte ordem de reatividades: $\text{Cu}(\text{SBPL})\text{F} \ll \text{Cu}(\text{SBPL}) \approx \text{Cu}(\text{SBPL})\text{Cl} \approx \text{Cu}(\text{SBPL})\text{Br} \ll \text{Cu}(\text{SBPL})\text{I}$. Dado que, a clivagem do ADN por ação de complexos de iões de metal pode ocorrer por intermédio de vários mecanismos: hidrolítico, ou oxidativo por geração de ROS ou oxidação direta do ADN, os autores realizaram uma série de ensaios, concluindo que os complexos são capazes de quebrar diretamente o ADN sem a geração de ROS. Por outro lado, ensaios miméticos para o enzima SOD revelaram que esta família de complexos apresenta a capacidade de mimetizar esta enzima, com particular destaque para o iodo-complexo que apresentou valores de IC_{50} de $0.4 \mu\text{M}$. [97]

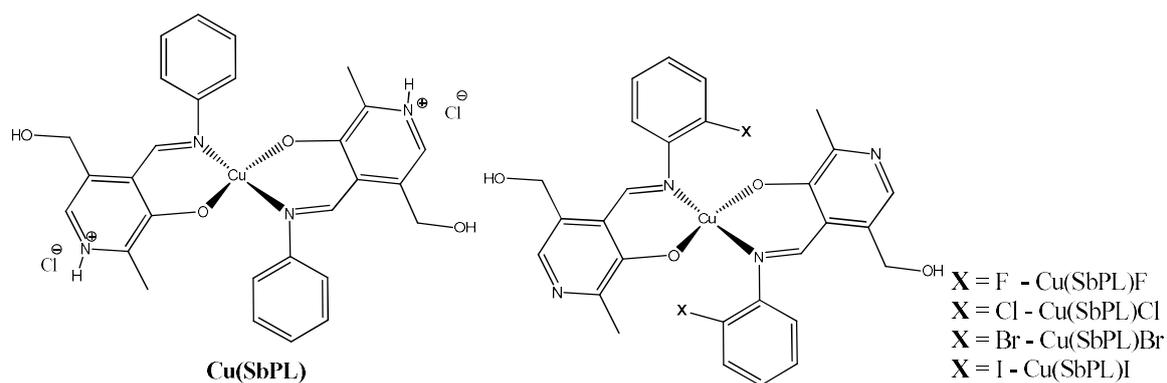


Figura 1.10. Família de complexos de Cu(II) com ligandos do tipo N,O, derivados de SB do piridoxal com a incorporação de grupos aromáticos com diferentes substituintes halogenados.

Os exemplos acima referidos são motivadores para o desenvolvimento de novos fármacos à base de cobre com SB derivados da vitamina B₆ para aplicação terapêutica. O facto de não existirem muitos relatos estando, no entanto, demonstrado que existem evidências do potencial deste tipo de complexos para revelarem atividades biológicas distintas, poderá significar que não foram suficientemente explorados pois possuem claramente elevando potencial terapêutico.

1.5. Complexos de vanádio

Em contraste com o cobre, o papel do vanádio enquanto elemento essencial nos humanos não está estabelecido. Apesar da abundância do vanádio no meio ambiente, solos, água doce, oceanos e inclusivamente no ar,[98] apenas foi encontrado em alguns organismos.[99][100] No entanto, são conhecidas alguns enzimas que usam o vanádio no seu centro ativo, tais como as nitrogenases presentes em azotobactérias[101][102] e as haloperoxidasas encontradas em algas, fungos, líquenes, bactérias *Streptomyces* e cianobactérias.[103] Algumas estruturas dessas haloperoxidasas foram caracterizadas por cristalografia de difracção de raios-X.[104] Curiosamente são estruturas semelhantes às obtidas para proteínas tirosina fosfatases e fosfatases ácidas.[105] Estas semelhanças, em conjunto com análises filogenéticas,[106] revelam que existe uma relação evolutiva entre fosfatases e haloperoxidasas.

1.5.1. Complexos de vanádio antitumorais

Nos últimos anos, o número de complexos de vanádio com propriedades antitumorais reportados tem aumentado, mas os mecanismos subjacentes a este efeito ainda não são bem compreendidos. Os principais alvos do vanádio no seu efeito antitumoral são a perturbação do metabolismo celular através da geração de ROS, e produção de alterações celulares em organelos como lisossomas e mitocôndrias, proteínas como a actina e a tubulina, e em algumas vias de transdução de sinal, ciclinas e caspases que por sua vez desempenham um papel na interrupção do ciclo celular e na apoptose. Além disso, alguns complexos inibem a proliferação celular,[107] sendo que essa proliferação pode ser perturbada pelos efeitos genotóxicos do vanádio exercidos nos núcleos das células e/ou danos no ADN.[108]

Alguns dos complexos de vanádio sintetizados com potencial antitumoral relevante são o complexo Metvan [$V^{IV}O(SO_4)(Me_2phen)_2$], o dicloreto de vanadoceno [$(\eta^5-Cp)_2V^{IV}Cl_2$], em que CP é o ciclopentadienilo e o [$VO(acac)_2$] em que acac é o acetilacetato.[109][110] Para além destes, foram estudados diversos grupos de complexos com resultados promissores, como por exemplo, complexos de oxidovanádio(IV) com flavonóides (quercetina, hesperidina, morina, silibinina, crisina). A coordenação ao metal demonstrou ter importantes implicações positivas tanto nas propriedades antioxidantes como no comportamento antitumoral dos flavonoides, para diversas linhas tumorais de rato e humanas, sendo o modo de ação proposto diverso e dependente do complexo e do tipo de tumor.[111][112][113] Por exemplo, com o complexo de morina com oxidovanádio(IV) não foi observada produção de ROS nem danos no ADN, mas verificou-se que a membrana plasmática foi danificada assim como o potencial da membrana mitocondrial (MMP) sofreu perturbações em células tumorais da mama.

Outro grupo de compostos de vanádio relevante é constituído por complexos de oxidovanádio(IV) com o ligando oxodiacetato (oda), que devido aos átomos doadores de oxigénio permite uma coordenação forte com o metal, podendo facilitar a sua absorção e transporte para o interior das células. Os complexos $V^{IV}O$ de oda, [$V^{IV}O(oda)$], bem como [$V^{IV}O(oda)(Bipy)$] e [$V^{IV}O(oda)(phen)$] (**Figura 1.11.**) foram testados em duas linhas celulares semelhantes de osteoblasto de rato (normal e tumoral). O [$V^{IV}O(oda)$] causou a inibição da proliferação celular em ambas as linhas celulares, mas a citotoxicidade foi superior nas células saudáveis com alterações morfológicas. Este composto provocou um aumento das concentrações de ROS

correlacionado com uma diminuição na relação GSH/GSSG (glutathiona reduzida e oxidada, respectivamente), assim como a perda do potencial da membrana mitocondrial. Observou-se também um elevado aumento da fosforilação das proteínas quinases (ERK), envolvidas na regulação da morte e sobrevivência celular, nas células saudáveis e tumorais.[114] Resultados semelhantes foram observados para o complexo [VO(oda)(phen)],[115] em oposição ao [VO(oda)(Bipy)] que demonstrou maior citotoxicidade nas células tumorais.[116] Quando estes complexos foram testados em células de osteossarcoma humano os resultados obtidos diferiram. Nomeadamente, a ação antiproliferativa de [V^{IV}O(oda)(phen)] pôde ser observada em todas as concentrações utilizadas (de 2.5 a 100 µM), enquanto que para o [V^{IV}O(oda)] e o [V^{IV}O(oda)(Bipy)] apenas foi observada diminuição da viabilidade celular para concentrações mais elevadas. A mesma ordem de reatividade foi obtida na concentração necessária para afetar o metabolismo mitocondrial e na concentração necessária para se observar um aumento de ROS produzidos. Além disso, a clivagem do ADN causada por [VO(oda)(Bipy)] e [VO(oda)] foi semelhante, com o [VO(oda)(phen)] a mostrar um efeito superior, sendo que apenas [VO(oda)(phen)] e [VO(oda)(Bipy)] desencadearam apoptose relevante. Estes resultados apresentaram uma correlação entre a bioatividade e a estrutura dos compostos, onde [VO(oda)(phen)] apresentou a mais potente ação antitumoral seguido do [VO(oda)(Bipy)] e depois do [VO(oda)], de acordo com o número de anéis heterocíclicos aromáticos com capacidade de intercalar com o ADN.[117] A capacidade destas diiminas aromáticas livres interagirem com o ADN já é conhecida, pelo que a possibilidade de se dissociarem do complexo e atuarem em separado, *per se*, não pode ser descartada. Diversos mecanismos e espécies podem ter a sua ação citotóxica.

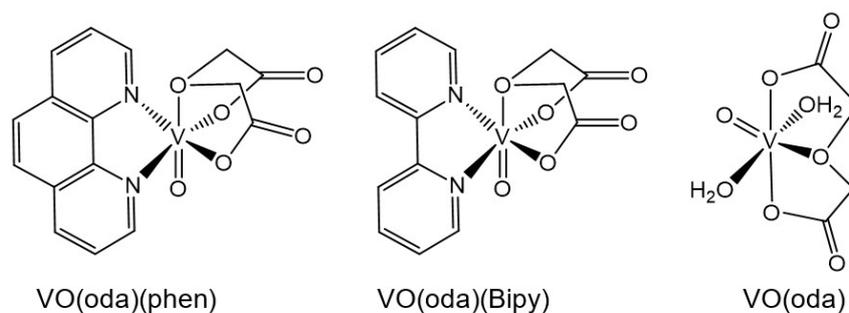


Figura 1.11. Estruturas da família de complexos [V^{IV}O(oda)] em que oda é oxodiacetato e phen é 1,10-fenantrolina e Bipy é 2,2'-bipiridina.

A capacidade de compostos de vanádio inibirem enzimas como a proteína tirosina quinase (PTK) ou a proteína tirosina fosfatase (PTP) é bastante conhecida e associada ao seu efeito insulino-mimético.[118] Os mecanismos associados à fosforilação/desfosforilação que promovem a ativação/desativação dos recetores específicos da insulina apresentam muitas semelhanças com os mecanismos intracelulares envolvidos na morte celular por apoptose. Algumas enzimas que regulam esses mecanismos de sinalização são por exemplo as proteínas PTK e as PTP. Alguns complexos de vanádio, mas também o vanadato, conseguem ligar-se fortemente às PTKs, promovendo o aumento da fosforilação dos resíduos de tirosina nas proteínas que ativam as vias de transdução de sinal que promovem a ativação da via extracelular quinase regulada (do inglês *regulated kinase extracellular pathway-ERK*) culminando na morte celular por apoptose.[119][120][121] Assim, um dos mecanismos possíveis exercido pelos complexos de vanádio para a morte celular poderá passar pela inibição enzimática.

No trabalho desenvolvido por Cruz e Uckun,[122] quinze complexos de vanádio, de diversos derivados de phen(s) (**Figura 1.12.**), foram estudados em 14 linhas tumorais diferentes de modo a identificar o agente antitumoral mais potente.

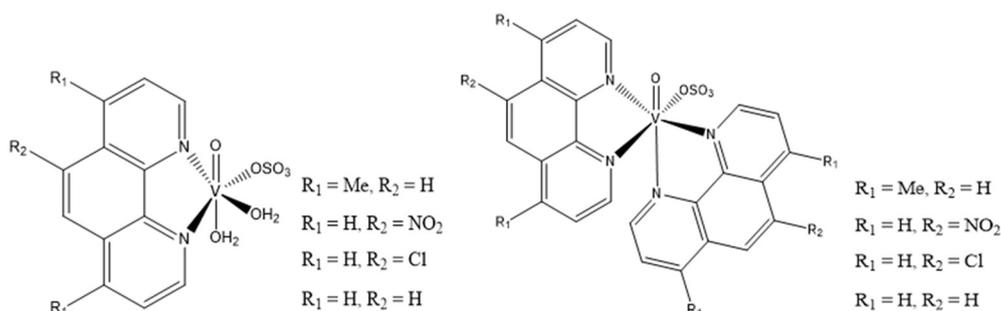


Figura 1.12. Complexos de oxidovanádio(IV) constituídos por famílias de phen(s) substituídas com atividade citotóxica.

Os autores verificaram que a atividade citotóxica era superior para os complexos com dois ligandos phen e os seus derivados, quando comparados com os complexos respectivos com apenas um ligando. Por outro lado, a natureza dos grupos substituintes foi determinante para a atividade observada na maioria das linhas celulares estudadas. Devido à sua potente atividade indutora de apoptose, com concentrações na ordem dos nano- e micromolar, o $[\text{VO}(\text{SO}_4)(\text{Me}_2\text{phen})_2]$ foi considerado o complexo de eleição. Este composto, conhecido como Metvan, é um dos complexos antitumorais de vanádio considerados mais promissores com atividade

indutora de apoptose a baixas concentrações (na ordem dos nanomolar), e com ação citotóxica num número alargado de células neoplásicas humanas.[109] Para além disso, é altamente eficaz em linhas celulares tumorais resistentes à cisplatina (p.e. células do ovário e do testículo). Por outro lado, foi observado um efeito antiproliferativo significativo em células tumorais da mama e cerebrais. Estudos farmacocinéticos revelaram resultados favoráveis para este composto e mostraram-no como um agente antitumoral promissor, alternativo aos fármacos de platina.[123] A sua ação tem sido associada à geração de ROS e à extinção da glutatona juntamente com a perda do potencial transmembrana mitocondrial. No entanto a especiação deste complexo em condições mimetizando o meio fisiológico e em meios de incubação celular foi estudada com maior detalhe num estudo de P. Lay.[124] e seus colaboradores. A estabilidade do complexo foi avaliada nos mesmos meios e revelou que em meio aquoso e a pH fisiológico o ião sulfato é substituído pelo grupo hidroxilo. No meio de cultura quando a concentração do complexo é superior a 50 μM , as espécies predominantes são $[\text{VO}(\text{Me}_2\text{phen})(\text{citrH}^{-1})]^{2-}$ e $\text{VO-Me}_2\text{phen-proteína}$, onde a espécie $[\text{VO}(\text{Me}_2\text{phen})_2(\text{OH})]^+$ perde um dos ligandos Me_2phen e a espécie resultante é transportada por uma proteína [albumina; transferrina ou hemoglobina (HB)], pela ligação à N-histidina, ou complexada com o citrato. Quando o estudo foi realizado com eritrócitos, o complexo mostrou a capacidade de atravessar a membrana formando a espécie $\text{VO-Me}_2\text{phen-HB}$. O mais interessante deve-se ao facto deste estudo mostrar que novas espécies podem formar-se nas concentrações usadas em ensaios biológicos. Quando a concentração de complexo Metvan inicial é inferior a 10 μM , os dois ligandos são perdidos e a espécie predominante é $\text{VO}(\text{hTf})$. Para além disso em meio de cultura celular, cerca de 60% do centro metálico é oxidado a V^{V} após 5 h. Estes estudos foram realizados também para o complexo homólogo $[\text{VO}(\text{SO}_4)(\text{phen})_2]$, tendo sido obtidos resultados similares.[125] Estas observações são muito relevantes sobretudo no estudo da atividade biológica de complexos de $\text{V}(\text{IV})$ ou $\text{V}(\text{V})$, particularmente se os ligandos usados forem bioativos e lábeis, tais como as diiminas aromáticas.

1.5.2. Atividade antitumoral de complexos de oxidovanádio(IV) contendo bases de Schiff derivados da vitamina B₆

Complexos de vanádio de SB formadas por vitamina B₆ com aplicação antitumoral são raros na literatura, no entanto foram reportados complexos com atividade mimética da insulina,[126][127] antioxidante,[128] ou citotoxicidade foto-induzida.[129]

Uma das inspirações para o desenvolvimento de complexos de vanádio com SB com piridoxal nesta tese foi o trabalho publicado pelo grupo de Pellecchia *et al.* onde avaliaram a atividade biológica do complexo de oxidovanádio(IV) com o ligando pyr₂en em linhas celulares tumorais e saudáveis humanas (**Figura 1.13.**).

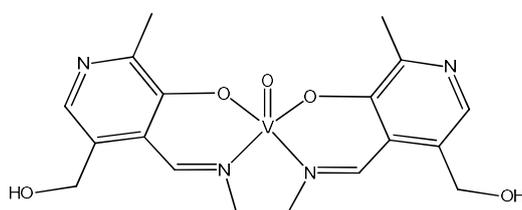


Figura 1.13. Estrutura química de [VO(pyr₂en)] com potencial atividade antitumoral.

Este complexo, inicialmente sintetizado por I. Correia *et al.*, [142] revelou bons resultados, demonstrando seletividade entre linhas tumorais e saudáveis, nomeadamente para as linhas celulares A375 (melanoma humano) e A549 (cancro do pulmão humano) com uma percentagem de mortalidade celular de 93 e 57 % respetivamente, quando comparado com a mortalidade em células normais, inferior a 24 %. O mecanismo de morte celular foi também avaliado, tendo-se observado um aumento de ROS que levou à despolarização da membrana mitocondrial.[130] A **Figura 1.14.** mostra dois complexos da mesma família que revelaram uma significativa regressão tumoral em tumores primários com perturbações no ciclo celular. Estes complexos revelaram ter grande aptidão para interagir com o ADN, causando danos na presença de agentes oxidantes.[131]

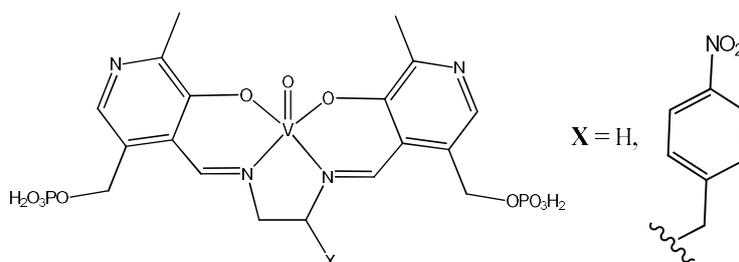


Figura 1.14. Série de complexos de oxidovanádio(IV) derivados de pyr₂en.

Globalmente, os resultados relativos às propriedades antitumorais do complexo de oxidovanádio(IV) são promissores no que diz respeito à sua possível utilização terapêutica devido ao seu baixo IC₅₀ (na ordem dos μM, dependendo da linha celular e do complexo), efeitos antiproliferativos e apoptóticos.

O facto de muitos compostos de vanádio serem capazes de modelar reações enzimáticas revelam a possibilidade de exercer os seus efeitos antitumorais através de diferentes mecanismos, tais como a indução da fosforilação dos resíduos de tirosina, principalmente inibindo proteínas tirosina fosfatases, que por sua vez promovem a ativação da via extracelular da quinase. Consequentemente, esta hipótese pode dar origem a complexos com propriedades antitumorais distintas das habitualmente encontradas em complexos com outros metais de transição.

1.6. Referências

- [1] **J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, C. Mathers, D.M. Parkin, M. Piñeros, A. Znaor e F. Bray.** Global Cancer Observatory. *Cancer Today*. [Online] 2018. [Consultada: 5 de Setembro de 2019.] <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>.
- [2] **X. Ma e H. Yu.** *Yale. J. Biol. Med.*, 2006, 79, pp. 85-94.
- [3] **R. L. Siegel, K. D. Miller e A. Jemal.** *CA Cancer J. Clin.*, 2019, 69, pp. 7-34.
- [4] **S. L. Klein e K. L. Flanagan.** *Nat. Rev. Immunology*, 2016, 16, pp. 626-638.
- [5] **M. Roser e H. Ritchie.** Our World in Data. *Cancer*, [Online] 2015. [Consultada: 27 de Setembro de 2019.] <https://ourworldindata.org/cancer>.
- [6] **W. C. Hahn e R. A. Weinberg.** *Nat. Rev. Cancer*, 2002, 2, pp. 331-341.
- [7] **A. G. Quiroga.** *J. Inorg. Biochem.*, 2012, 114, pp. 106–112.
- [8] **S. Dasari e P. B. Tchounwou.** *Eur. J. Pharmacol.*, 2014; 0, pp. 364–378.
- [9] **T.W. Hambley.** *Dalton Trans.*, 2007, 43, pp. 4929-4937.
- [10] National cancer institute. “Chemotherapy to Treat Cancer” [Online] 2015. [Consultada: 20 de Setembro de 2019.] <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/chemotherapy>.
- [11] **M. Galanski, M. a Jakupec, e B. K. Keppler.** *Curr. Med. Chem.*, 2005, 12, pp. 2075–2094.
- [12] **C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato e C. Marzano.** *Chem. Rev.*, 2014, 114, pp. 815–862.
- [13] **A. I. Abeer, H. Taghreed e A. Noor.** *Chem. Mat. Res.*, 2015, 7 pp. 11-19.
- [14] **E. Meléndez.** *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2002, 42, pp. 309-315.
- [15] **C. V. Christodoulou , D. R. Ferry , D. W. Fyfe , A. Young , J. Doran , T. M. Sheehan, A. Eliopoulos , K. Hale , J. Baumgart , G. Sass e D. J. Kerr.** *J. Clin. Oncol.*, 1998, 16, pp. 2761-2769.
- [16] **M. M. Hart, C.F. Smith, S.T. Yancey e R. H. Adamson.** *J. Natl. Cancer Inst.*, 1971, 47, pp.1121-1127.
- [17] **Y. Ellahioui, S. Prashar e S. Gomez-Ruiz.** *Inorganics*, 2017, 5, pp. 234-246.
- [18] **I.Ott e R.Gust,** *Arch. Pharm.*, 2007, 340, pp.117-26.
- [19] **V. Brabec e J. Kasparkova.** *Chem. Rev.*, 2018, 376, pp. 75-94.
- [20] **R. Sasanelli, A. Boccarelli, D. Giordano, M. Laforgia, F. Arnesano, G. Natile, C. Cardellicchio, M. A. M. Capozzi e M. Coluccia.** *J. Med. Chem.*, 2007, 50, pp. 3434-3441.
- [21] **A. Casini, C. Temperini, C. Gabbiani, C. T. Supuran e L. Messori.** *ChemMedChem.*, 2010, 5, pp. 1989-1994.
- [22] **E. Alessio,** *Eur. J. Inorg. Chem.* 2017, pp. 1549-1560.
- [23] **A. Bergamo e G. Sava.** *Chem. Soc. Rev.*, 2015, 44, pp. 8818-8835.
- [24] **C. Artner, H. U. Holtkamp, W. Kandioller, G. Hartinger, S. M. Meier-Menches e B. K. Keppler.** *Chem. Soc. Rev.*, 2018, 47, pp. 909-928.
- [25] **C. Campero-Peredo, M. E. Bravo-Gómez, S. L. Hernández-Ojedac, S. R. Olguin-Reyes, J. J.Espinosa-Aguirre e L. Ruiz-Azuar.** *Toxicol. In Vitro*, 2016, 33, pp. 16-22.
- [26] **R. Alemón-Medina, M. Breña-Valle, J. L. Muñoz-Sánchez, M. I. Gracia-Mora e L. Ruiz-Azuara.** *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2007, 60, pp. 219-228.

- [27] **R. Kachadouriana, H. M. Brechbuhla, L. Ruiz-Azuarab, I. Gracia-Morab e B. J. Day.** *Toxicology*, 2010, 268, pp.176-183.
- [28] **A. Rivero-Müller, A. De Vizcaya-Ruiz, N. Plant, L. Ruiz e M. Dobrota.** *Chem. Biol. Interact.*, 2007, 165, pp. 189-199.
- [29] **J. N. Boodram, I. J. Mcgregor, P. M. Bruno, P. B. Cressey, M. T. Hemann, e K. Suntharalingam.** *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2016, 55 8, pp. 2845-2850.
- [30] **D. Hedley, A. Shamas-Din, S. Chow, D. Sanfelice, A. C. Schuh, J. M. Brandwein, M. D. Seftel, V. Gupta, K. W. Yee e A. A. Schimmer.** *Leuk. Lymphoma*, 2016, 57, pp. 2437-2440.
- [31] **S. L. Rizk e H. H. Sky-Peck.** *Cancer Res.*, 1984, 44, pp. 5390-5394.
- [32] **K. Ketola, O. Kallioniemie e K. Iljin.** *PLoS ONE.*, 2012, 7, pp. 51470-51484.
- [33] **Y. Li, L.-H. Wang, H.-T. Zhang, Y.-T. Wang, S. Liu, W.-L. Zhou, X.-Z. Yuan, T.-Y. Li, C.-F. Wu e J.-Y. Yang.** *J. Cell Mol. Med.*, 2018, 22, pp. 439-451.
- [34] **D. Chen, Q. C. Cui, H. Yang e Q. P. Dou.** *Cancer Res.*, 2006, 66, pp. 10425-10433.
- [35] **X. Lun, J. C. Wells, N. Grinshtein, J. C. King, X. Hao, N.-H. Dang, X. Wang, A. Aman, D. Uehling, A. Datti, J. L. Wrana, J. C. Easaw, A. Luchman, S. Weiss, J. G. Cairncross, D. R. Kaplan, S. M. Robbins e D. L. Senger.** *Clin. Cancer Res.*, 2016, 22, pp. 1243-1256.
- [36] **L. Duan, H. Shen, G. Zhao, R. Yang, X. Cai, L. Zhang, C. Jin e Y. Huang.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2014, 446, pp. 1010-1016.
- [37] **S. H. Chen, S. H. Liu, Y. C. Liang, J. K. Lin, S. Y. Lin-Shiau.** *Eur. J. Pharmacol.*, 2001, 414, pp. 177-188.
- [38] **D. Cen, R. I. Gonzalez, J. A. Buckmeier, R. S. Kahlon, N. B. Tohidian e F. L. Meyskens.** *Mol. Cancer Ther.*, 2002, 1, pp. 197-204.
- [39] **A. V. Snezhkina, A. V. Kudryavtseva, O. L. Kardymon, M. V. Savvateeva, N. V. Melnikova, G. S. Krasnov e A. A. Dmitriev.** *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2019, 3, pp. 982-1002.
- [40] **M. Diez, M. Arroyo, M. Muñoz, F. J. Cerdà, M. A. Martín e J. L. Balibrea.** *Oncology*. 1989,46, pp.230-234.
- [41] **K. Geraki, M. J. Farquharson e D. A. Bradley.** *Phys. Med. Biol.*, 2002, 47, pp. 2327-2339.
- [42] **M.C. Linder e M. Hazegh-Azam.** *Am. J. Clin. Nutr.*, 1996; 63, pp. 797S-811S.
- [43] **T. D. Rae, P. J. Schmidt, R. A. Pufahl, V. C. Culotta e T. V. O'Halloran.** *Science*, 1999; 284, pp. 805-808.
- [44] **A.Gupta e S. Lutsenko.** *Future Med. Chem.*, 2009, 6, pp. 1125-1142.
- [45] **D. B. Milne.** *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998, 67, pp. 1041S-1045S.
- [46] **N. J. Robinson e D. R. Winge.** *Annu. Rev. Biochem.*, 2009, 79, 9, pp. 185-211.
- [47] **Z. Skrott e B. Cvek,** *Mini. Rev. Med. Chem.*, 2012, 12, pp. 1184-1192.
- [48] **D. Sanna, P. Buglyó, A. I. Tomaz, J. C. Pessoa, S. Borović, G. Micera e E. Garribba,** *Dalton Trans.*, 2012, 41, pp. 12824-12838.
- [49] **M. Sendzik, M. J. Pushie, E. Stefaniak e K. L. Haas.** *Inorg. Chem.*, 2017, 56, pp. 15057-15065.
- [50] **W. Bal, M. Sokółowska, E. Kurowska e P. Faller,** *Biochim. Biophys. Acta.*, 2013, 830, pp. 5444-5455.

- [51] **C. A. Blindauer, I. Harvey, K. E. Bunyan, A. J. Stewart, D. Sleep, D. J. Harrison, S. Berezenko e P. J. Sadler.** *J. Biol. Chem.*, 2009, 284, pp. 23116-23124.
- [52] **A. J. Stewart, C. A. Blindauer, S. Berezenko, D. Sleep e P. J. Sadler.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, 100, pp. 3701-3706.
- [53] **K. B. Handing, I. G. Shabalin, O. Kassar, S. Khazaipoul, C. A. Blindauer, A. J. Stewart, M. Chruszcz e W. Minor.** *Chem. Sci.* 2016, 7, pp. 6635-6648.
- [54] **R. Oliva, S. Banerjee, H. Cinar, C. Ehrhart e R. Winter,** *Chem. Comm.*, 2020, 56, pp. 395.
- [55] **N. Singh, D. Pagariya, S. Jain, S. Naik e N. Kishore.** *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2018, 36, pp. 2449-2462.
- [56] **E. L. Gelamo, C.H. T. P. Silva, H. Imasato e M. Tabak.** *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1594, pp. 84-99.
- [57] **P. Carmeliet e R. K. Jain.** *Nature*, 2000, 407, 249-257.
- [58] **Y. Matsumura e H. Maeda.** *Cancer Res.*, 1986, 46, pp. 6387- 6392.
- [59] **A. M. Merlot, D. S. Kalinowski e D. R. Richardson.** *Front. Physiol.*, 2014, 5, pp. 299.
- [60] **M. Suzuoki, M. Miyamoto, K. Kato, K. Hiraoka, T. Oshikiri, Y. Nakakubo, A. Fukunaga, T. Shichinohe, T. Shinohara, T. Itoh, S. Kondo e H. Katoh.** *Br. J. Cancer*, 2002, 87, pp.1140-1144.
- [61] **S. A. Tahir, G. Yang, S. Ebara, T. L. Timme, T. Satoh, L. Li, A. Goltsov, M. Ittmann, J. D. Morrisett e T. C. Thompson.** *Cancer Res*, 2001, 61, pp. 3882-3885.
- [62] **M. Chatterjee, E. Ben-Josef, R. Robb, M. Vedaie, S. Seum, K. Thirumorthy, K. Palanichamy, M. Harbrecht, A. Chakravarti e T. M. Williams.** *Cancer Res.*, 2017, 77, pp. 5925-5937.
- [63] **D. Glesne, S. Vogt, T. Fukai, e L. Finney.** *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2009, 36, pp. 88-94.
- [64] **P. C. Bruijninx e P. J. Sadler.** *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2008, 12, pp. 197-206.
- [65] **P. Alreja e N. Kaur.** *RSC Adv.*, 2016, 6, pp.23169-23217.
- [66] **A. Bencini e V. Lippolis.** *Coord. Chem. Rev.*, 2010, 254, pp. 2096-2180.
- [67] **R. Tabti, N. Tounsi, C. Gaidon, E. Bentouhami e L. Désaubry.** *Med. Chem.*, 2017, 7, pp. 875-879.
- [68] **F. Tisato, C. Marzano, M. Porchia, M. Pellei e C. Santini.** *Med. Res. Rev.*, 2010, 30, pp.708-749.
- [69] **N. S. Ng, M. J. Wu e J.R. Aldrich-Wright.** *J. Inorg. Biochem.*, 2018, 180, pp.61-68.
- [70] **N. K. Modukuru, K. J. Snow, B. S. Perrin Jr., J. Thota e C. V. Kumar.** *J. Phys. Chem. B.*, 2005, 109, pp.11810-11818.
- [71] **S. Roy, K. D. Hagen, P. U. Maheswari, M. Lutz, A. L. Spek, J. Reedijk e G. P. Wezel.** *ChemMedChem.*, 2008, 3, pp.1427-1434.
- [72] **O. F. Ikotun, E. M. Higbee, W. Ouellette e R. P. Doyle.** *J. Inorg. Biochem.*, 2009, 103, pp. 1254-1264.
- [73] **I. Correia, S. Borovic, I. Cavaco, C. P. Matos, S. Roy, H. M. Santos, L. Fernandes, J. L. Capelo, L. Ruiz-Azuara e J. C. Pessoa.** *J. Inorg. Biochem.*, 2017, 175, pp. 284-297.
- [74] **M. I. Pilo, G. Manca, M. A. Zoroddu e R. Seeber.** *Inorg. Chim. Acta*, 1991, 180, pp. 225-230.
- [75] **R. Mahalakshmi e N. Raman.** *Int. J. Curr. Pharm. Res.*, 2016, 8, pp.1-6.
- [76] **H. Yu, F. Wang, V. Milacic, X. Li, Q. C. Cui, B. Zhang, B. Yan e Q. P. Dou.** *Int. J. Mol. Med.*, 2007, 20, pp. 919-925.

- [77] **F. Wang, S. Zhai, X. Liu, L. Li, S. Wu, Q. P. Dou e B. Yan.** *Cancer Lett.*, 2011, 300, pp.87-95.
- [78] **J. Zuo, C. Bi, Y. Fan, D. Buac, C. Nardon, K.G.Daniel e Q. P. Dou.** *J. Inorg. Biochem.*, 2013, 118, pp. 8393.
- [79] **C. H. Ng, S. M.Kong, Y. L. Tiong, M. J. Maah, N. Sukram, M. Ahmade e A. S. B. Khoo.** *Metallomics*, 2014, 6, pp. 892-906.
- [80] **M. O'Connor, A. Kellett, M. McCann, G. Rosair, M. McNamara, O. Howe, B.S. Creaven, S. McClean, A. F. Kia e D. O'Shea.** *J. Med. Chem.*, 2012; 55, pp. 1957-1968.
- [81] **M. Devereux, D. O'Shea, M. O'Connor, H. Grehan, G. Connor, M. McCann, G. Rosair, F. Lyng, A. Kellett e M. Walsh.** *Polyhedron*, 2007, 26, pp. 4073-4084.
- [82] **L. Fan, M. Tian, Y. Liu, Y. Deng, Z. Liao e J. Xu.** *Oncotarget*, 2017, 8, pp. 29823-29832.
- [83] **I. Correia, S. Roy, C. P. Matos, S. Borovic, N. Butenko, I. Cavaco, F. Marques, J. Lorenzo, A. Rodriguez, V. Moreno e J. C. Pessoa.** *J. Inorg. Biochem.*, 2015, 147, pp. 134-146.
- [84] **S. Kashanian, M. M. Khodaei, H. Roshanfekar, N. Shahabadi, A. Rezvani e G. Mansouri.** *DNA Cell Biol.*, 2011, 30, pp. 287-296.
- [85] **M. Parra, S. Stahl, e H. Hellmann.** *Cells*, 2018, 7, pp. 84-112.
- [86] **A. E. Martell.** *Acc. Chem. Res.*, 1989, 22, pp.115-124.
- [87] **T. D. Shultz, D. Lee, D. R. Stickney e D. S. Gridley.** *Nut. Res.*, 1989, 9, pp. 133-151.
- [88] **J. M. Matxain, D. Padro, M. Ristilä, Å. Strid e L. A. Eriksson.** *J. Phys. Chem. B.*, 2009, 113, pp. 9629-9632.
- [89] **S. C. Huang, J. C. C. Wei, D. J. Wu e Y. C. Huang.** *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2010, 64, pp. 1007-1013.
- [90] **K. Murakami, Y. Miyake, S. Sasaki, K. Tanaka, W. Fukushima, C. Kiyohara, Y. Tsuboi, T. Yamada, T. Oeda, T. Miki, N. Kawamura, N. Sakae, H. Fukuyama, Y. Hirota e M. Nagai.** *Br. J. Nutr.*, 2010, 104, pp. 757-764.
- [91] **S. Mooney, J. E. Leuendorf, C. Hendrickson e H. Hellmann.** *Molecules*, 2009, 14, pp. 329-351.
- [92] **I. Correia, J. C. Pessoa, M. T. Duarte, R. T. Henriques, M. F. M. Piedade, L. F. Veiros, T. Jakusch, T. Kiss, A. Dörnyei, M. M. C. A. Castro, C. F. G. C. Geraldés e F. Avecilla.** *Chem. Eur. J.*, 2004, 10, pp. 2301-2317.
- [93] **S. Pandey, P. Garga, S. Lee, H.-W. Choung, Y-H Choung, P-H Choung e J. HoonChungae.** *Biomaterials*, 2014, 35, pp. 9332-9342.
- [94] **J. S. Casas, M. D. Couce e J. Sordo.** *Coord. Chem. Rev.*, 2012, 256, pp. 3036-3062.
- [95] **V. M. Leovac, V. S. Jevtović, L. S. Jovanović e G. A. Bogdanović.** *J. Serbian Chem. Soc.*, 2005, 70, pp. 393-422.
- [96] **M. B. Ferrari, G. G. Fava, P. Tarasconi, R. Albertini, S. Pinelli e R. Starcich.** *J. Inorg. Biochem.*, 1994, 53, pp. 13-25.
- [97] **M. B. Pereira, L. A. Fontana, J. D. Siqueira, B. L. Auras, M. P. Silva, A. Neves, P. Gabriel, H. Terenzi, B. A. Iglesias e D. F. Back.** *Inorg. Chim. Acta*, 2018, 469, pp. 561-575.
- [98] **J. C. Pessoa, E. Garribba, M. F. A. Santos e T. Santos-Silva,** *Coord. Chem. Rev.*, 2015, 301, pp. 49-86.
- [99] **H. Vitler.** *Phytochem.*, 1984, 23, pp. 387-1390.
- [100] **D. W. Hewson e L. P. Hager.** *J. Phycol.*, 1980, 16, pp. 340-345.

- [101] **J. N. Carter-Franklin e A. Butler.** *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, pp. 15060-15066.
- [102] **J. M. Winter e B. S. Moore.** *J. Biol. Chem.*, 2009, 284, pp 18577-18581.
- [103] **A. Frank, C. J. Seel, M. G. e T. Gulder.** *ChemBioChem.*, 2016, 17, pp. 2028-2032.
- [104] **A. Butler e J. N. Carter-Franklin,** *Nat. Prod. Rep.*, 2004, 21, pp.180-188.
- [105] **N. Tanaka, V. Dumay, Q. Liao, A. J. Lange e R. Wever.** *Eur. J. Biochem.*, 2002, 269, pp. 2162-2167.
- [106] **X. Che e K. H. V. Pée.** *Acta Biochim. Biophys.*, 2008, 40, pp.183-93.
- [107] **T. W. Hambley.** *Dalton Trans.*, 2007, 43, pp. 4929-4937.
- [108] **N. Yasumatsu, Y. Yoshikawa, Y. Adachi e H. Sakurai.** *Bioorganic. Med. Chem.*, 2007, 15, pp. 4917-4922.
- [109] **P. Köpf-Maier e P. Funke-Kaiser.** *Toxicology*, 1986, 38, pp.81-90.
- [110] **J. Benitez, L. Guggeri, I. Tomaz, J. C. Pessoa, V. Moreno, J. Lorenzo, F. X. Aviles, B. Garat e D. Gambino.** *J. Inorg. Biochem.*, 2009, 103, pp. 1386-1394.
- [111] **E. G. Ferrer, M. V. Salinas, M. J. Correa, L. Naso, D. A. Barrio, S. B. Etcheverry, L. Lezama, T. Rojo e P. A. M. Williams.** *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2006, 11, pp. 791-801.
- [112] **S. B. Etcheverry, E. G. Ferrer, L. Naso, J. Rivadeneira, V. Salinas e P. A. Williams.** *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2008, 13, pp. 435-437.
- [113] **C. S. Yang, J. M. Landau, M. T. Huang e H. L. Newmark,** *Annu. Rev. Nutr.*, 2001, 21, pp.381-406.
- [114] **I. E. Leon, S. B. Etcheverry, B. S. Parajon-Costa e E. J. Baran.** *Biol. Trace Elem. Res.*, 2012, 147, pp. 403-407.
- [115] **I. E. Leon, S. B. Etcheverry, B. S. Parajon-Costa e E. J. Baran.** *J. Mex. Chem. Soc.*, 2013, 57, 175-179.
- [116] **I. E. Leon, N. Butenko, A. L. Di Virgilio, C. I. Muglia, E. J. Baran, I. Cavaco e S. B. Etcheverry.** *J. Inorg. Biochem.*, 2014, 134, 106-117.
- [117] **M. Yodoshi, M. Odoko e N. Okabe.** *Chem. Pharm. Bull.*, 2007, 55, pp. 853-860.
- [118] **D. C. Crans, J. J. Smee, E. Gaidamauskas e L. Yang.** *Chem. Rev.*, 2004, 104, pp. 849-902.
- [119] **S. V. Kononova e M. A. Nesmeyanova,** *Biochemistry (Moscow)*, 2002, 67 pp. 184-195.
- [120] **M. J. Gresser e A. S. Tracey.** *in Vanadium in Biological Systems*, ed. N. D. Chasteen, Kluwer, Dordrecht, 1990, pp. 63-79.
- [121] **S. K. Pandey, J. F. Theberge, M. Bernier e A. K. Srivastava.** *Biochemistry*, 1999, 38, pp. 14667-14675.
- [122] **O. J. D’Cruz e F. M. Uckun.** *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2002, 11, pp.1829-1836.
- [123] **R. K. Narla, C. Chen, Y. Dong, S. Iv e F. M. Uckun.** *Clin. Cancer Res.*, 2001, 7, pp. 2124-2133.
- [124] **M. Le, O. Rathje, A. Levina e P.A. Lay.** *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2017, 22, pp. 663-672.
- [125] **D. Sanna, V. Ugone, G. Micera, P. Buglyó, L. Bíró e E. Garribba.** *Dalton Trans.*, 2017, 46, pp. 8950-8967.
- [126] **T. Mukherjee, J. C. Pessoa, A. Kumar e A. R. Sarkar.** *Inorg. Chem.*, 2011, 50, pp. 4349-4361.
- [127] **J. C. Pessoa, I. Tomaz e R. T. Henriques.** *Inorg. Chim. Acta*, 2003, 356, pp. 121-132.
- [128] **S. A. Elsayed, A. M. Noufal e A. M. El-Hendawy.** *J. Mol. Struct.*, 2017, 1144, pp. 120-128.

- [129] **A. Kumar, S. Banerjee, S. Mukherjee e A. R. Chakravarty.** Indian J. Chem., 2017, 56, pp. 805-813.
- [130] **I. Correia, J. C. Pessoa, M. T. Duarte, R. T. Henriques, M. F. M. Piedade, L. F. Veiros, T. Jakusch, T. Kiss, Á. Dörnyei, M. M. C. A. Castro, C. F. G. C. Geraldés e F. Avecilla.** Chem. Eur. J., 2004, 10, pp. 2301-2317.
- [131] **M. Strianese, A. Basile, A. Mazzone, S. Morello, M. C. Turco, e C. Pellecchia.** J. Cell. Physiol., 2013, 228, pp. 2202-2209.
- [132] **P. P. Hazari, A. K. Pandey, S. Chaturvedi, A. K. Tiwari, S. Chandna, B. S. Dwarakanath e A. K. Mishra.** Chem. Biol. Drug Des., 2012, 79, pp. 223-234.

- Capítulo I - Introdução
- **Capítulo II - Objetivos**
- Capítulo III - Complexos de cobre com bases de Schiff derivados do piridoxal com potencial terapêutico.
- Capítulo IV - Complexos de íons de metal constituídos por bases de Schiff de cromonas e piridoxal como potenciais agentes antitumorais
- Capítulo V - Complexos de íons de metal com bases de Schiff derivados da vitamina B₆
- Capítulo VI - Complexos de vanádio com 1,10-fenantrolina e derivados
- Capítulo VII - Comportamento dos complexos do tipo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ em meios celulares e a sua influência na citotoxicidade
- Capítulo VIII - Secção experimental
- Capítulo IX - Considerações finais
- ANEXOS

2.1. Objetivos propostos

Este trabalho tem por objetivo desenvolver novos de iões de metal de transição, para fins terapêuticos, mais eficazes e menos tóxicos para o tratamento do cancro. Uma das estratégias passou por desenvolver complexos de Cu(II) e V(IV)O contendo derivados da vitamina B₆, que é biologicamente relevante e pode interferir com múltiplas vias dos mecanismos celulares. Para isso o recurso à síntese de bases de Schiff permitiu a conjugação de piridoxal ou piridoxamina com outras moléculas biologicamente relevantes tais como cromonas, aldeídos ou outras.

Pretende-se avaliar os complexos de iões de metal como potenciais agentes antitumorais. Neste contexto, a estabilidade dos complexos em solução aquosa foi uma característica a considerar. A hidrólise em meios biológicos é muito frequente e extensa em vários complexos de iões de metal e precisou de ser avaliada para assegurar que o complexo de ião metálico atinge o seu alvo na forma pretendida, bem como minimizar a eventual toxicidade sistémica com os consequentes efeitos secundários que surgem da decomposição dos complexos em meios biológicos. As bases de Schiff são geralmente suscetíveis à hidrólise, no entanto, quando coordenadas a um centro metálico adquirem mais estabilidade. A introdução de um co-ligando bidentado nos complexos teve por objetivo aumentar o potencial citotóxico dos complexos sem comprometer a sua estabilidade.

Nos meios biológicos os complexos de iões de metal podem interagir com diversas macromoléculas, que podem ser cruciais para a atividade terapêutica. Sendo os co-ligandos selecionados, derivados da 1,10-fenantrolina, esperamos que tenham um papel relevante nestas interações, e por consequência, no modo de ação dos complexos. Para avaliar esta hipótese e obter-se mais informação sobre o possível mecanismo de ação, foi avaliada a interação dos complexos com biomoléculas relevantes, nomeadamente, a ligação de complexos de iões de metal às proteínas séricas, que podem ter impacto na sua absorção, transporte, metabolismo e excreção, assim como fornecer uma entrega seletiva às células tumorais, uma vez que as proteínas como a albumina do soro humano (HSA) podem acumular-se nos tecidos tumorais. Paralelamente, o ADN é um alvo típico de fármacos formados com iões de metal, pelo que o estudo da ligação dos complexos ao ADN também foi visado. As propriedades antioxidantes de compostos podem auxiliar na redução da toxicidade e consequentes efeitos colaterais provocados pelos agentes quimioterapêuticos, pelo

que a capacidade dos compostos em inibir a formação de radicais livres foi também avaliada.

Pretende-se avaliar a citotoxicidade dos complexos em relação a um grupo de linhas celulares tumorais humanas e comparar os resultados com linhas de células humanas saudáveis para se avaliar a sua toxicidade/seletividade. O tipo de morte celular induzido pelos complexos é um fator importante para determinar os mecanismos de ação, pelo que ensaios como a quantificação da externalização de fosfatidilserina e o aumento de espécies reativas de oxigénio em células tumorais humanas foram realizados.

Outro dos objetivos foi a compreensão dos efeitos da citotoxicidade e seletividade exercida pelos complexos de iões de metal homolépticos de ligandos lábeis, em particular, os heterocíclios aromáticos (usados como co-ligandos nos capítulos III, IV e V) em meio celular. Por conseguinte a avaliação da especiação destes complexos em meio aquoso e celular é de extrema relevância, pois os mecanismos de ação dependem das espécies absorvidas e/ou formadas no interior das células. Assim a estratégia de tentar correlacionar as informações obtidas dos estudos biológicos com a determinação de constantes de associação nos sistemas de albumina/heterocíclico aromático/metálico é também de grande relevância. O trabalho desenvolvido nesta área pretende avaliar o potencial desta família de compostos como agentes terapêuticos eficazes.

A atividade biológica de complexos de Cu/VO contendo bases de Schiff derivados da vitamina B₆ tem sido pouco explorada e este trabalho pode contribuir para a sua consolidação como potenciais fármacos formados com iões de metal.

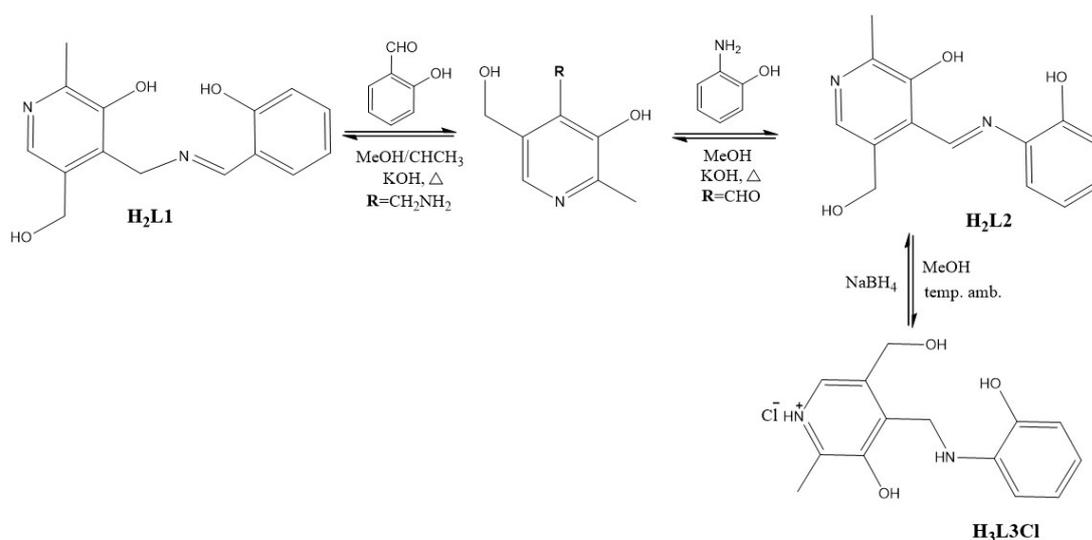
- Capítulo I - Introdução
- Capítulo II - Objetivos
- **Capítulo III - Complexos de cobre com bases de Schiff derivados do piridoxal com potencial terapêutico.**
- Capítulo IV - Complexos de íons de metal constituídos por bases de Schiff de cromonas e piridoxal como potenciais agentes antitumorais
- Capítulo V - Complexos de íons de metal com bases de Schiff derivados da vitamina B₆
- Capítulo VI - Complexos de vanádio com 1,10-fenantrolina e derivados
- Capítulo VII - Comportamento dos complexos do tipo [Cu(phen)₂]²⁺ em meios celulares e a sua influência na citotoxicidade
- Capítulo VIII - Secção experimental
- Capítulo IX - Considerações finais
- ANEXOS

3.1. Fundamentos

As propriedades dos complexos de íons de metal são determinadas pela natureza dos seus ligandos, que podem eles próprios serem bioativos. Foram desenvolvidos vários complexos Cu(II) com uma variedade de ligandos contendo N, S, ou O, demonstrando diferentes mecanismos para a sua atividade antitumoral.[1][2][3] Os ligandos neutralizam a carga positiva do íon de cobre e podem originar complexos capazes de atravessar a membrana celular. Complexos que envolvam a conjugação de salicilaldeído com piridoxamina podem exibir propriedades com interesse biológico relevante, com átomos coordenantes ONO. Neste âmbito, prepararam-se três complexos de Cu(II) com ligandos derivados da vitamina B₆, bem como dois complexos ternários com a introdução de 1,10-fenantrolina. Nesta secção, apresenta-se a síntese, caracterização e avaliação biológica desses novos complexos de cobre. Os compostos foram caracterizados em solução e no estado sólido, tendo a sua estabilidade sido avaliada, bem como realizados estudos de interação com a albumina e com o ADN. A citotoxicidade dos compostos foi determinada em duas linhas celulares tumorais humanas e a influência dos diferentes elementos estruturais destes compostos no desempenho biológico é aqui discutida.

3.2. Complexos contendo ligandos tridentados do tipo ONO derivados da vitamina B₆

Os pró-ligandos de SB **H₂L1** e **H₂L2** foram obtidos com bons rendimentos por condensação entre a piridoxamina e o salicilaldeído, ou o piridoxal e o 2-aminofenol (**Esquema 3.1.**). A base de Schiff reduzida **H₃L3Cl** foi obtida com rendimento moderado (40%) recorrendo à redução de **H₂L2** com NaBH₄. Todos os compostos foram caracterizados por análise elementar e pelas técnicas espectroscópicas usuais (ver secção experimental para mais detalhes), que confirmaram as estequiometrias e fórmulas propostas.



Esquema 3.1. Esquema de reação para a síntese das SB (**H₂L1** e **H₂L2**) e da SB reduzida (**H₃L3Cl**).

Os pró-ligandos percursos reagiram com CuCl_2 em metanol, produzindo os complexos de Cu(II) **1-3**, com rendimentos moderados. Nas reações em que foi adicionada fenantrolina, os complexos ternários $[\text{Cu(Ln)}(\text{phen})]$ (**4** e **5**, com $n = 1$ ou 3) foram também obtidos com rendimentos moderados. Todos os complexos são novos e foram caracterizados no estado sólido e em solução pelas técnicas espectroscópicas usuais, sendo esta caracterização discutida mais detalhadamente nas secções abaixo. As formulas propostas para os complexos encontra-se representada na **Figura 3.1**.

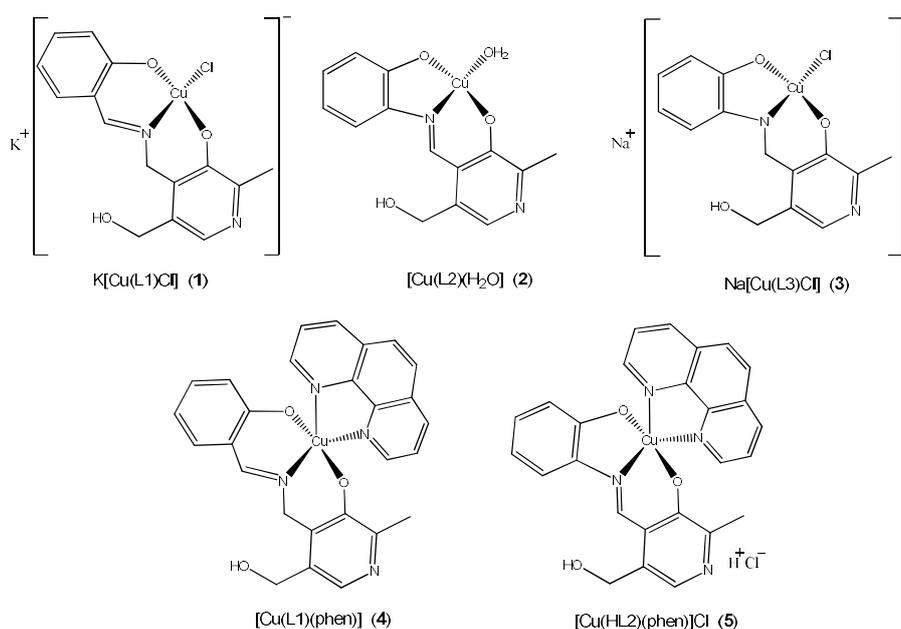


Figura 3.1. Fórmulas moleculares propostas para os complexos Cu(II) preparados.

Todos os compostos foram caracterizados por espectrometria de ESI-MS, tendo sido na maioria dos casos possível identificar os picos dos íões moleculares no modo positivo, $[L+H]^+$ ou $[M+H]^+$, ou no modo negativo, $[L-H]^-$ ou $[M-H]^-$, bem como o padrão isotópico de cobre típico nos aductos dos complexos. A presença de íões cloreto em complexos e pró-ligandos foi confirmada por cromatografia de troca aniônica. Para os complexos **1**, **3** e **5**, apenas um íão cloreto foi detetado, enquanto que dois íões Cl^- foram determinados para **H₃L3Cl**. Para os restantes complexos e precursores de ligando não foi possível fazer a determinação de cloretos devido à sua baixa solubilidade e, portanto, as estequiometrias e fórmulas foram propostas com base em análise elementar e espectrometria de massa.

Os espectros 1D e 2D de 1H RMN e ^{13}C RMN dos pró-ligandos foram obtidos à temperatura ambiente em DMSO- d_6 ou D_2O (**Tabela 3.1.**). O sinal do prótão da azometina para **H₂L1** aparece como um singleto a 8.61 ppm, enquanto que para **H₂L2** este prótão é muito mais desblindado, sendo observável a 9.30 ppm. Contudo, ao comparar o carbono azometina correspondente, o desvio químico do carbono **H₂L1** encontra-se mais blindado, possivelmente devido à conjugação adicional com o sistema aromático piridinico em **H₂L2**. Para **H₃L3Cl**, o sinal do prótão da azometina não é detetado, como esperado, assim como também não foi possível identificar a ressonância do do grupo amino alifático. Além disso, o aparecimento de um sinal a 4.79 ppm, atribuído ao CH_2 resultante da redução da azometina, foi difícil de distinguir no espectro 1H RMN devido à sobreposição com o sinal dos prótões da água residual. No entanto, esse sinal foi claramente identificado na experiência de HSQC (**Figura 3.2.**), que mostrou um pico cruzado a 4.79 ppm (1H RMN) e 45.03 ppm (^{13}C RMN).

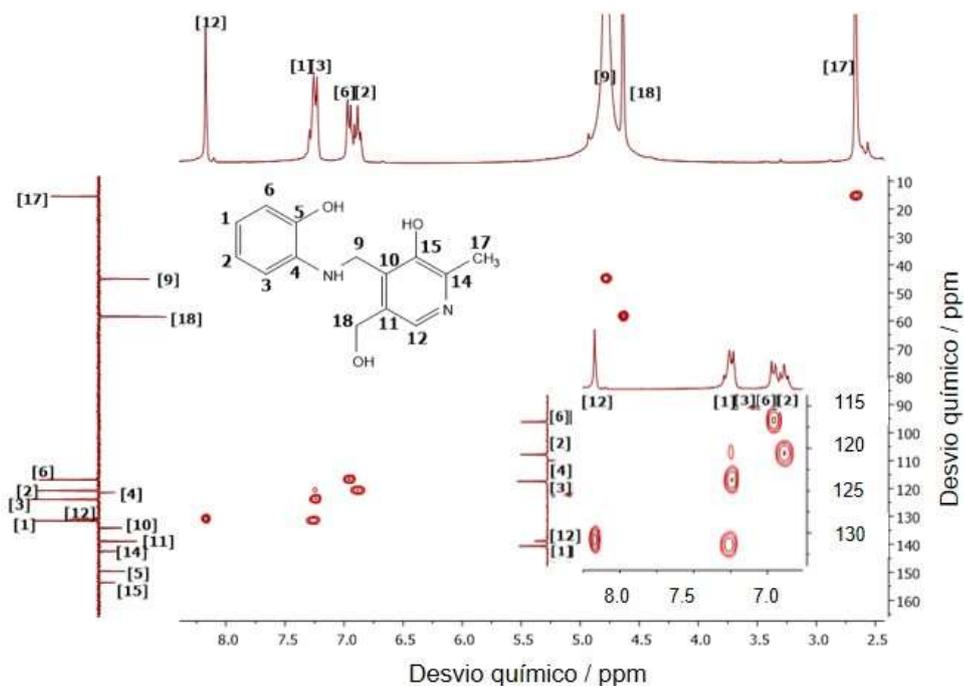


Figura 3.2. Espectro de RMN da experiência de HSQC de **H₃L3Cl** em D₂O à temperatura ambiente. O gráfico inserido mostra a expansão da região aromática do espectro.

Os sinais largos observados a campo baixo para os pró-ligandos em DMSO-d₆ (**H₂L1** e **H₂L2**) foram atribuídos aos prótons hidroxilo. Estes prótons permutáveis foram identificados pelo seu desaparecimento após a adição de pequenas quantidades de D₂O (dados não apresentados). Para **H₂L1** os dois sinais mais desblindados (~ 13.30 e 9.05 ppm) foram atribuídos aos prótons dos grupos hidroxilo dos anéis aromáticos, enquanto que o pico a 5.20 ppm foi atribuído ao próton do grupo hidroxilo alifático. No entanto, para **H₂L2** as ressonâncias dos prótons permutáveis desaparecem após a adição de uma gota de D₂O, seguida de hidrólise.

Tabela 3.1. Picos selecionados e as respectivas atribuições dos prótons e carbonos dos espectros de RMN (desvio químico / ppm).

Composto / solvente		CH=N	CH ₂ N	CH _{piridoxal}	CH ₃	H _{aromático}
H₂L1 / DMSO-d₆	¹ H	8.61	-	7.96	2.38	6.82-7.45
	¹³ C	166.14	-	139.68	19.87	116.53-149.46
H₂L2 / DMSO-d₆	¹ H	9.30	-	7.98	2.55	6.95-7.71
	¹³ C	156.28	-	129.43	16.15	116.82-151.98
H₃L3Cl / D₂O	¹ H	-	4.79	8.17	2.67	6.86-7.29
	¹³ C	-	45.03	130.95	15.42	116.86-153.63

As atribuições das bandas de FTIR dos compostos, apresentadas na **Tabela 3.2.**, foram estabelecidas com base em dados recolhidos da literatura[4] e pela comparação dos espectros dos complexos com os respetivos pró-ligandos precursores, com vista a determinar os grupos envolvidos na coordenação, uma vez que após a coordenação ao ião metálico, é esperada uma mudança na energia das vibrações e/ou na sua intensidade.

Todos os compostos apresentam bandas largas na região entre 2700-3500 cm⁻¹, correspondendo às bandas de absorção dos grupos O-H, às ligações vibracionais simétrica e assimétrica CH e às vibrações relacionadas com as bandas de absorção de N-H. Os espectros de FTIR das SB possuem a banda forte e característica $\nu(\text{C}=\text{N})$ em redor de 1643 e 1597 cm⁻¹, para **H₂L1** e **H₂L2**, respetivamente. Nos espectros dos complexos, as energias de absorção destas bandas $\nu(\text{C}=\text{N})$ são ligeiramente inferiores, indicando que o átomo de nitrogénio estará a formar uma ligação com o ião de cobre(II). Comportamento semelhante foi observado para as bandas atribuídas ao $\nu(\text{C-O})_{\text{fenolato}}$ (aprox. 1250 cm⁻¹), resultado que é compatível com o envolvimento desse grupo na coordenação ao Cu(II).[5] A vibração de estiramento dos grupos fenólicos $\nu(\text{O-H})$ das moléculas de piridoxal, salicilaldeído ou 2-aminofenol são observadas nos pró-ligandos livres entre 3140 e 3427 cm⁻¹. Com a complexação é esperado o desaparecimento da absorção associada à vibração de estiramento deste grupo, devido à desprotonação e coordenação ao centro metálico. No entanto, a presença do grupo O-H_{alifático} da fração do piridoxal, juntamente com a presença de moléculas de água nos complexos, dificulta o reconhecimento do envolvimento na coordenação dos ligandos pelo grupo do doador fenólico ao centro metálico. As duas bandas de absorção a 3220 e 3376 cm⁻¹ do **H₃L3Cl** podem ser atribuídas a vibração dos modos

de estiramento assimétrico e simétrico do $\nu(\text{N-H})$. [6] A banda a 3429 cm^{-1} (que aparece parcialmente sobreposta) pode ser associada a vibrações $\nu(\text{OH})$. Além disso, o pró-ligando **H₃L3CI** apresenta duas bandas fracas em torno de 2700 e 2600 cm^{-1} , associadas ao grupo funcional do sal de amina da base de Schiff reduzida, [4] o que corrobora com as estequiometrias e fórmulas proposta. Esses picos desaparecem quando o ligando coordena o Cu(II) .

Tabela 3.2. Principais atribuições das bandas dos espectros de FTIR dos pró-ligandos e complexos Cu(II) sintetizados (cm^{-1}).

Composto	$\nu(\text{O-H})$	$\nu(\text{C=N})_{\text{imina}}$	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C-O})_{\text{fenol/fenolato}}$	$\nu(\text{C-O})_{\text{álcool}}$
H₂L1	3422	1642	---	1235	1035
	3142				1023
H₂L2	3362	1597	---	1232	1032
					1010
H₃L3CI	3429	---	3376	1286	1039
			3220		1020
1	3340	1628	---	1241	1040
2	3341	1587	---	1241	1049
	3218				1019
3	3429	---	---	1298	1047
	3350				1017
4	3428	1635	---	1244	1031
	3164				
5	3447	1583	---	1223	1040
	3277				1014

A caracterização dos compostos por espectroscopia de absorção no UV-Vis. foi realizada através da obtenção de espectros em diferentes concentrações, em DMSO. A **Figura 3.3.** ilustra os espectros obtidos para todos os compostos.

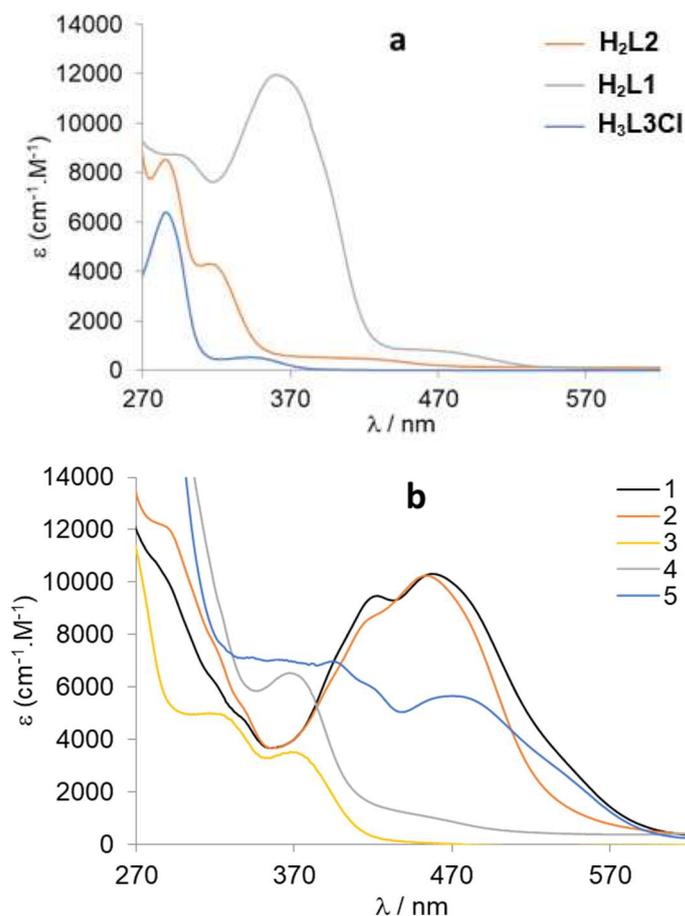


Figura 3.3. Espectros de absorção eletrônica dos: **a)** pró-ligandos precursores e **b)** complexos, obtidos em DMSO.

Para as bases de Schiff H_2L_1 e H_2L_2 , é observada uma banda forte entre 315 e 360 nm, que pode ser atribuída à transição $n-\pi^*$, associada à ligação da azometina, sendo que esta banda não é detetada no espectro da base de Schiff reduzida $\text{H}_3\text{L}_3\text{Cl}$. As bandas centradas a cerca de 285 nm, presentes nos espectros de todos os compostos, são devidas a transições intra-ligandos. Os complexos **4** e **5** apresentam bandas muito fortes na região UV devido à presença do ligando aromático N-heterociclo 1,10-fenantrolina. Os espectros dos complexos de Cu mostram a presença de bandas de transferência de carga do ligando para o metal (LMCT) a ca. de 450 nm, devido às transições do grupo fenolato para o centro metálico. Foram observadas bandas no visível para soluções dos complexos **1** e **4** por volta de 670 nm (**Figura 3.4.**), devido às transições d-d.[7][8]

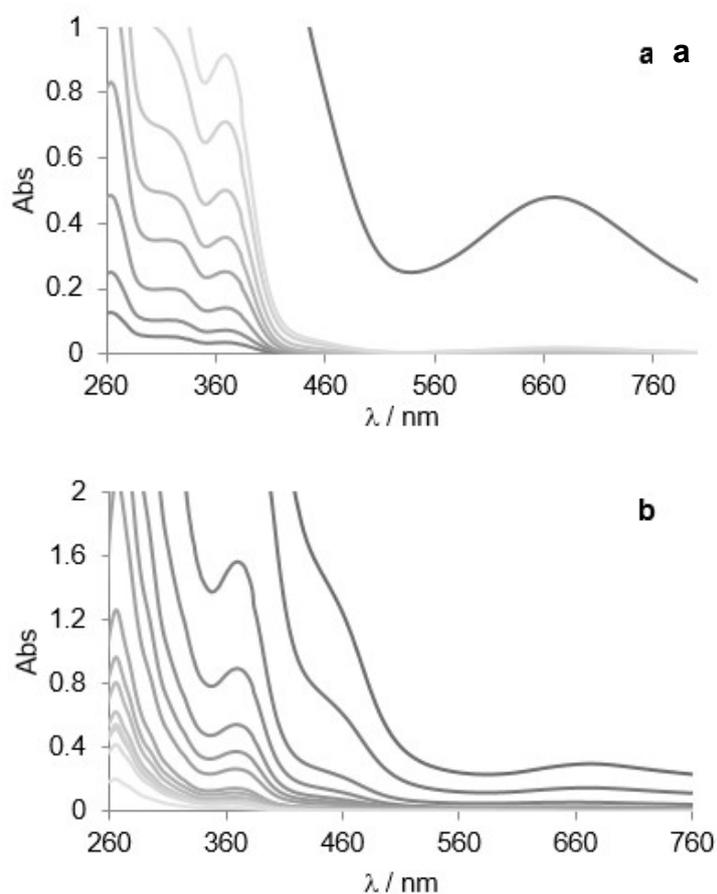


Figura 3.4. Espectro UV-Vis. medido em DMSO para soluções de: **a)** **1** com concentrações entre 1.1×10^{-5} a 4.2×10^{-3} M. **b)** **4** com concentrações entre 1.9×10^{-6} e 1.9×10^{-3} M.

Os espectros de RPE (banda X) dos complexos de Cu(II) foram obtidos a 77 K em DMSO, DMF ou MeOH. Apenas **1**, **4** e **5** apresentam espectros bem resolvidos, com simetria axial e quatro bandas de acoplamento hiperfino na região de campo alto e uma banda mais intensa a campo baixo com $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2.0$, indicando a presença de um estado fundamental $d_{x^2-y^2}$ localizado numa geometria de base quadrada. Nenhum acoplamento superhiperfino foi detetado nos espectros adquiridos. A **Figura 3.5** mostra o espectro do complexo **1** com a correspondente simulação obtida com recurso a um programa desenvolvido por Rockenbauer, *et al.*[9] que originou os parâmetros do Hamiltoniano de spin incluídos na **Tabela 3.3**. A razão g_z/A_z calculada para os complexos **1** e **5** é de 134 e 130 cm^{-1} , respetivamente, dentro do intervalo 100 - 135 cm^{-1} , que segundo Addison *et al.*,[10] indica a presença de pequenas distorções nas geometrias de coordenação de base quadrada.

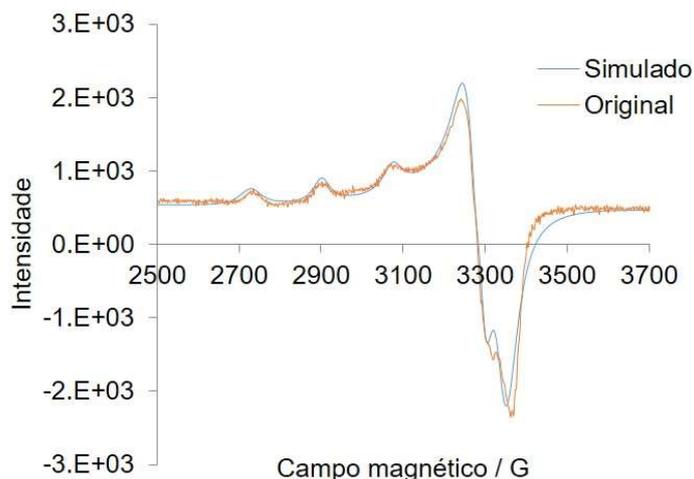


Figura 3.5. Espectro de RPE medido para **1** em DMSO (aprox. 3 mM) e respetivo espectro simulado que originou os parâmetros listados na **Tabela 3.3**. Os espectros foram calibrados para cada ensaio considerando os espectros de DPPH.

Tabela 3.3. Parâmetros do Hamiltoniano de spin obtidos a partir dos espectros de RPE dos complexos Cu(II) **1**, **4** e **5**.

Complex	g_{\parallel}	g_{\perp}	$A_{\parallel} (x10^4 \text{ cm}^{-1})$	$A_{\perp} (x10^4 \text{ cm}^{-1})$	$g_{\parallel}/A_{\parallel} (\text{cm})$	Solvent
1	2.280	2.071	180.7	16.5	134	DMSO
1	2.278	2.058	176.9	16.8	129	MeOH
4	2.268	2.080	167.9	36.9	135	MeOH
5	2.247	2.058	181.0	32.0	130	DMF

Os restantes complexos (**2**, **3** e **4**) apresentam bandas largas e espectros com baixa resolução e $g \sim 2.1$ (**Figura 3.6**), o que pode ser causado pela reduzida solubilidade ou formação de agregados e espécies oligoméricas.

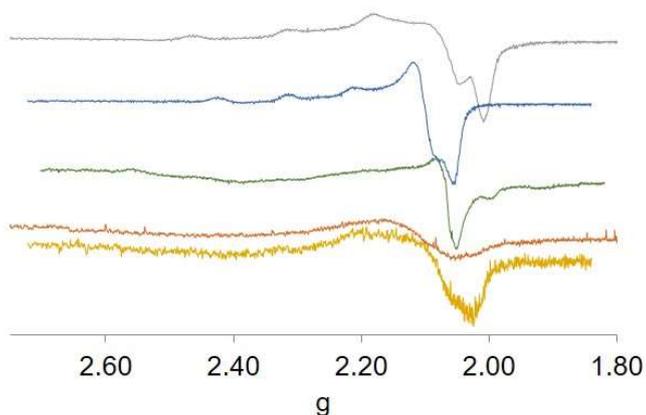


Figura 3.6. Espectro de RPE adquiridos a 77 K para **4** dissolvido em DMSO (amarelo); **2** em DMSO (laranja); **3** em DMSO (verde); **1** em DMSO (azul) e **5** em DMF (cinzento).

É razoável supor que a geometria molecular dos complexos **1**, **2** e **3** é quadrangulares planas, enquanto que os complexos **4** e **5** assumem uma geometria piramidal de base quadrada, em concordância com estruturas propostas para compostos similares.[11][12]

3.3. Atividade da inibição da formação de radicais livres

2,2-Difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) é um radical livre estável que tem um elétron desemparelhado deslocalizado. O radical produz soluções de cor púrpura intensa em solventes orgânicos ($\lambda_{\text{max}} \approx 517 \text{ nm}$) que, por reação com outros radicais, elétrons ou átomos de hidrogénio, conduzem à formação de uma espécie incolor. A monitorização da diminuição da absorvância a 517 nm das soluções preparadas com diferentes proporções de composto/DPPH permite a avaliação da sua capacidade para inibir a formação de radicais livres. Portanto, o ensaio DPPH foi realizado para avaliar o potencial antioxidante dos complexos e dos seus respetivos pró-ligandos precursores (**Figura 3.7**).

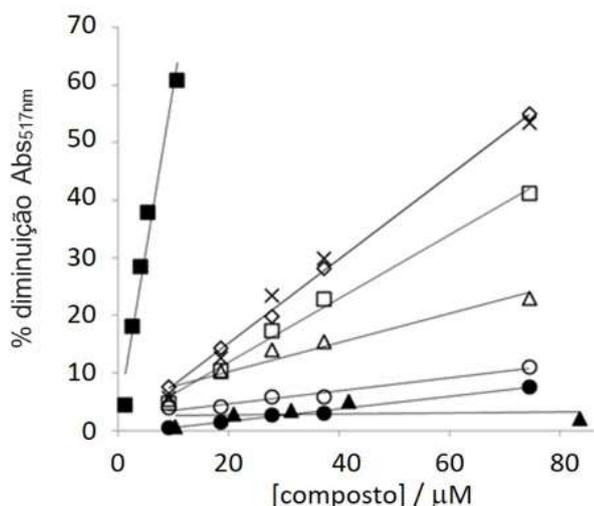


Figura 3.7. Absorção a 517 nm (em %) em metanol e para várias concentrações dos compostos (1.4-83.5 μM) e DPPH (12.4 μM). Onde H₂L1 (●); H₂L2 (■); H₃L3Cl (▲); 1 (□); 2 (Δ); 3 (○); 4 (◇); 5 (X).

A **Tabela 3.4.** mostra a concentração efetiva (EC_{50}) obtida para todos os compostos. Os complexos **1**, **4** e **5** apresentam atividade moderada, abaixo de 100 μM . O H₂L2 evidenciou, inesperadamente, uma capacidade de inibir a formação de radicais livres muito elevada, comparável com a atividade do controlo positivo, o ácido

ascórbico. No entanto, a redução da ligação C=N (em **H₃L3CI**) resultou na perda total da atividade de inibição de formação de radicais livres. Enquanto a coordenação de **H₂L1** com o Cu(II) leva a um aumento considerável da sua atividade (comparando os valores de EC₅₀ entre **H₂L1** e **4**), no caso de **H₂L2** e **H₃L3CI** o mesmo não se verificou, pois os dois respetivos compostos de Cu mostram escassa atividade antioxidante. Os complexos **4** e **5**, que contêm phen, apresentaram um potencial antioxidante superior ao dos complexos homólogos **1** e **2**, que não possuem os heterociclos aromáticos.

Tabela 3.4. Valores de EC₅₀ (μM) da atividade de inibição de formação de radicais determinada pelo método de DPPH para os compostos sintetizados. Foram efetuadas 3 replicas para cada composto e o desvio padrão encontra-se incluído.

Compostos	EC ₅₀ /μM
H₂L1	704±172
H₂L2	14±4
H₃L3CI	417±36
1	83±4
2	172±26
3	443±17
4	85±14
5	83±11
Ácido Ascórbico	11.6

3.4. Ensaio de citotoxicidade

A atividade citotóxica *in vitro* dos complexos e dos pró-ligandos precursores (**Tabela 3.5.**) foi avaliada em linhas celulares tumorais humanas do ovário (A2780) e da mama (MCF7), após 24 h de incubação. Os valores de IC₅₀ foram determinados pelo método MTT, que avalia a atividade da desidrogenase mitocondrial em células vivas.

Todos os complexos exibiram citotoxicidade contra ambas as linhas de células neoplásicas (com valores de IC₅₀ compreendidos entre 0.7 e 86 μM), enquanto os pró-ligandos precursores não demonstraram atividade (IC₅₀ > 100 μM) no tempo de incubação estudado, 24 h. A comparação entre tipos de células mostrou que os complexos com o ligando phen exibem maior citotoxicidade contra as células do cancro do ovário, enquanto os restantes complexos mostraram mais eficácia contra as células da mama. O complexo composto pela SB reduzida (**3**) revelou menor

atividade que o complexo homólogo com a SB (**2**), em ambas as linhas celulares. A atividade da maioria dos complexos é comparável, ou muito mais elevada do que a da cisplatina, que mostrou uma atividade moderada para estas células nas 24 h de incubação. Para ambas as células tumorais, os complexos ternários com phen, mostraram valores de IC₅₀ muito inferiores aos da cisplatina. Em geral, os dados mostram que há um aumento relevante da atividade antiproliferativa devido ao efeito sinérgico da combinação de Cu(II) e das SB, que é ainda reforçado pela presença de phen coordenada ao centro metálico, aumentando significativamente a citotoxicidade, particularmente na linha celular do cancro do ovário, com uma diminuição do IC₅₀ superior a 30 vezes.

Tabela 3.5. Citotoxicidade (IC₅₀ em $\mu\text{M} \pm \text{DP}^*$) dos pró-ligandos e co-ligando precursores e complexos de cobre(II) em duas células neoplásicas humanas (A2780 e MCF7) após 24 h de incubação. Ensaio realizado pela Dra. Fernanda Marques do Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa. *Desvio padrão

Compostos	A2780	MCF7
1	86 ± 38	34 ± 11
2	23 ± 8.5	6.8 ± 3.5
3	49 ± 18	19 ± 5.7
4	1.8 ± 0.6	9.3 ± 3.0
5	0.7 ± 0.1	2.6 ± 1.0
phen, H₂L1, H₂L2 and H₃L3Cl	>100	>100
[Cu(phen)₂]NO₃	0.4 ± 0.2	1.5 ± 0.4
cisplatina[12]	36±8.0	59 ±12

3.5. Estudos de estabilidade

A estabilidade das SB (**H₂L1** e **H₂L2**) foi avaliada com recurso a espectroscopia de absorção UV-Vis. e ¹H- RMN em meio aquoso tamponizado, uma vez que este tipo de pró-ligandos tipicamente hidrolisa na presença de solventes que contêm água. Os estudos confirmam que as SB **H₂L1** e **H₂L2** hidrolisam na presença de água (**Figura 3.8.**), em oposição à base de Schiff reduzida **H₃L3Cl** que não revelou qualquer sinal de hidrólise, como esperado.[13]

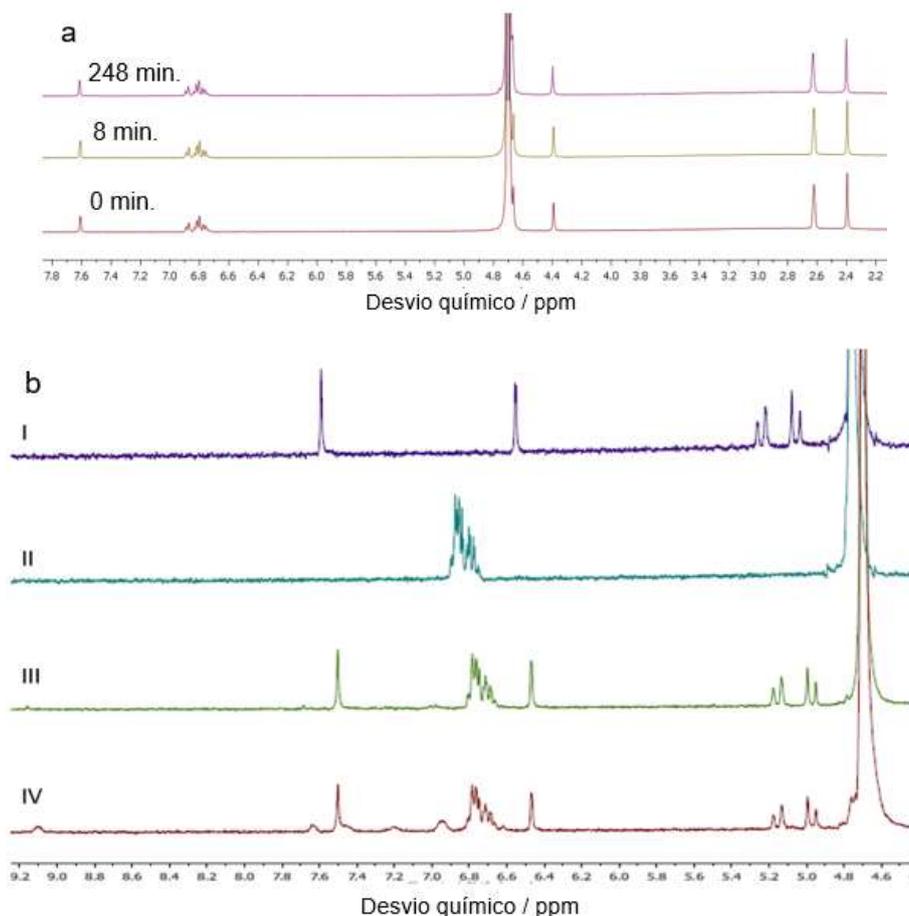


Figura 3.8. Espectros de ^1H -RMN medidos em PBS (10 mM, pH 7.4) / D_2O com **a)** $\text{H}_3\text{L3Cl}$ (4 mM) a diferentes tempos; **b)** **I** - piridoxal (1 mM, 5% DMSO-d_6 (v/v)); **II** - 2-aminofenol (1 mM, 5% DMSO-d_6 (v/v)); **III** - $\text{H}_2\text{L2}$ (1 mM) a $t = 10$ min.; **IV** - de $\text{H}_2\text{L2}$ (1 mM) a $t \approx 1$ min.

A estabilidade dos complexos em solventes orgânicos foi acompanhada também por espectroscopia de absorção no UV-visível em DMSO. Todos os complexos de Cu(II) são estáveis neste solvente, havendo conservação dos espectros originais, que apresentam apenas ligeiras alterações após cerca de 24 h. Para mimetizar condições fisiológicas, a estabilidade também foi avaliada em meio tampão a pH 7.4 (PBS ou NH_4HCO_3), contendo uma quantidade mínima de solvente orgânico. O comportamento dos compostos em solventes aquosos ao longo do tempo é muito semelhante para ambas as soluções tampão. Nas amostras com os complexos **2** e **3** observou-se precipitação após 30 minutos em concentrações de aprox. $25 \mu\text{M}$. Estes precipitados poderão ser atribuídos a hidróxidos dos metais. O mesmo problema de solubilidade ocorreu para **5** (após 2 h), com a diminuição dos valores de absorção, em praticamente todas a gama espectral, ao longo do tempo, mas sem mudanças

evidentes na posição das bandas de absorção. O complexo **1** é estável durante pelo menos 24 h e **4** apresenta apenas variações espectrais muito reduzidas ao longo do tempo (menos de 10 % de diminuição da absorvância a = 356 nm após 24 h) (**Figura 3.9.**). As alterações ligeiras observadas na maioria dos espectros podem dever-se simplesmente à troca de solventes (H₂O e DMSO) ou de iões.

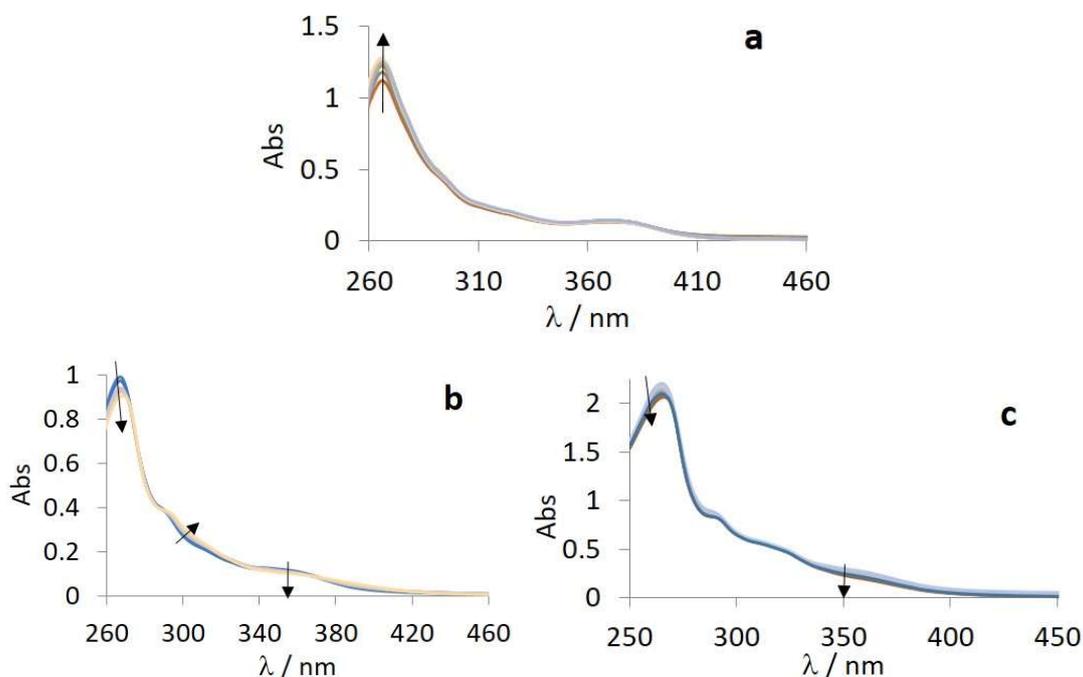


Figura 3.9. Espectros de absorção electrónica do complexo **4** medido ao longo do tempo em: **a)** DMSO a 24 μ M durante 24 h; **b)** "tampão" NH₄HCO₃ (25 μ M, pH 7.4) com 2.3% DMSO (v/v) a 25 μ M, com o tempo total de 319 min; **c)** em tampão PBS (10 μ M, pH 7.4) com 3.6% DMSO (v/v) a 67 μ M, durante 360 min. As setas indicam mudanças com o tempo.

Como conclusão geral, os pró-ligandos base de Schiff sofrem hidrólise em solução aquosa sob condições que mimetizam o meio fisiológico, embora a sua estabilidade aumente consideravelmente quando coordenados ao Cu(II). Os complexos mantiveram a sua estrutura durante o período de tempo geralmente necessário para a realização de estudos de interações com biomoléculas.

3.6. Interação com a BSA

As albuminas séricas são as proteínas mais abundantes no sangue. A albumina sérica humana (HSA) representa cerca de 60% do plasma e está envolvida no transporte de substâncias para as células.[14] É geralmente aceite que a força de ligação entre um fármaco e a albumina pode influenciar a sua absorção, distribuição,

metabolismo e excreção, o que pode levar à perda ou ao aumento da eficácia do fármaco.[12][15] Nos estudos que se seguem, a BSA (albumina sérica bovina) foi escolhida como proteína modelo, devido à sua semelhança estrutural com a homóloga HSA,[16] e à sua importância nos ensaios em meios de cultura celular com células de mamíferos, uma vez que esta proteína está presente em concentrações relativamente elevadas. Em ensaios de citotoxicidade *in vitro* a capacidade das células em internalizar os complexos pode também depender da força de ligação entre o composto e a BSA e/ou outras espécies complexas formadas em solução, que podem apresentar diferentes afinidades com essa proteína. Além disso, vários receptores celulares específicos para a albumina foram reportados na literatura[12][17], o que pode facilitar a entrada de complexos nas células. Logo, entender a interação entre esta proteína e os novos complexos é extremamente relevante para avaliar adequadamente o seu potencial terapêutico. Sabe-se ainda, que a albumina desempenha um papel importante no transporte do cobre livre na corrente sanguínea[18][19].

Para além de possuírem uma posição de coordenação ocupada por uma molécula lábil, os complexos **1-3** têm outras posições de coordenação que podem ser utilizadas para formar espécies ternárias do tipo $[Cu(Ln)(BSA)]$. Nos complexos **4 e 5**, a coordenação à BSA, caso se venha a verificar, pode ocorrer na posição livre apical, com formação de uma espécie octaédrica, $[Cu(Ln)(phen)(BSA)]$, ou por perda de um dos ligandos formando $[Cu(Ln)(BSA)]$ ou $[Cu(phen)(BSA)]$. Outra possibilidade, para todos os complexos, é a perda de todos os ligandos e a ligação sob a forma de $[Cu(BSA)]$ e $[Cu_2(BSA)]$, já que o Cu(II) tem muita afinidade para a BSA. Assim, foram realizados diferentes estudos espectroscópicos com o objetivo de compreender a ligação entre os complexos preparados e a BSA.

3.6.1. Avaliação dos espectros de UV-Visível

Como a estabilidade hidrolítica dos complexos pode aumentar pela ligação à albumina, esta foi avaliada na presença de BSA, sob as mesmas condições experimentais utilizadas na sua ausência. Em nenhum caso se observou precipitação a olho nú, porém os espectros obtidos nos sistemas com **2 e 3** mostram evidências de precipitação, tais como valores de intensidade de absorção inferiores registados ao longo do tempo (**Figura 3.10.**).

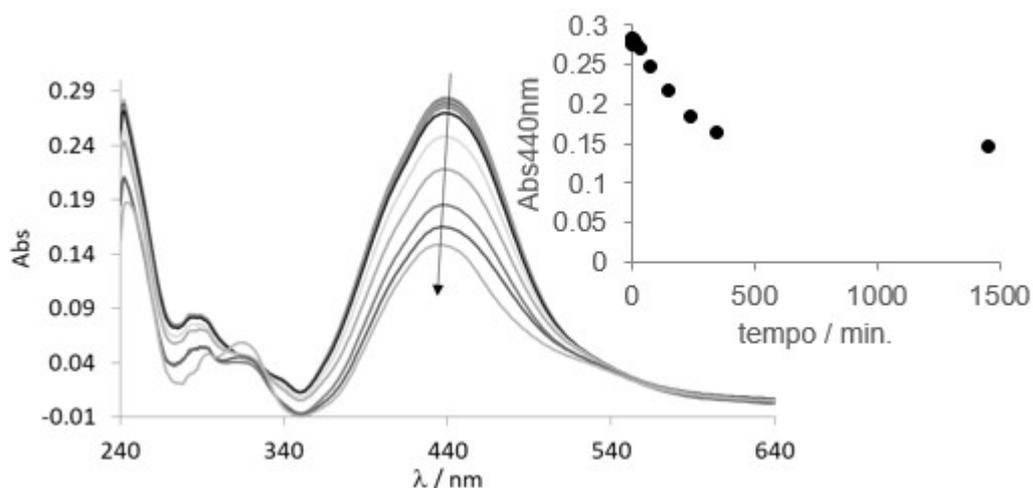


Figura 3.10. Espectros de absorção no UV-Vis. de **2** (24 μM , 4.5% DMSO (v/v)) com 24 μM de BSA adquirido em NH_4HCO_3 (25 μM , pH 7.4) com o tempo. As setas mostram as variações com o aumento do tempo. O gráfico inserido mostra a variação da absorbância a $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$ em função do tempo.

Todos os complexos revelaram alterações espectrais na presença de BSA. Para o complexo **1** (**Figura 3.11.**) foi necessário cerca de 1 h para que o sistema atingisse o equilíbrio; algumas bandas apresentaram desvios para valores de energia mais baixos, surgiram novas bandas e observaram-se pontos isobésticos a 310, 340 e 395 nm. Todas estas observações são consistentes com a transformação do complexo original $[\text{Cu}(\text{L1})\text{Cl}]^-$ numa nova espécie, possivelmente $[\text{Cu}(\text{L1})(\text{BSA})]$.

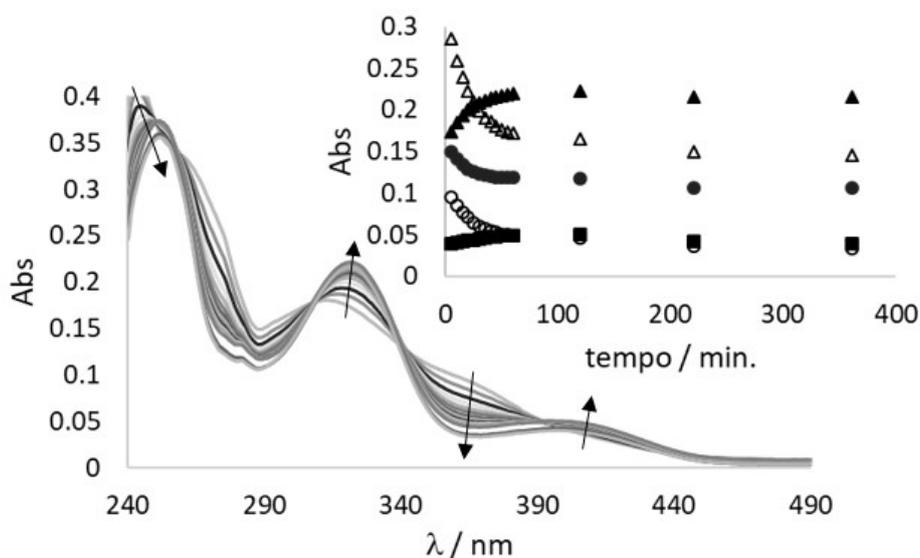


Figura 3.11. Espectros de absorvância eletrônica de **1** (24.9 μM , 4.6 % DMSO (v/v)) com cerca de 25 μM de BSA adquiridos em PBS (10 mM, pH~7.4) ao longo do tempo. O gráfico inserido mostra a variação da absorvância com o tempo a $\lambda = 403$

nm (■); 363 nm (○); 321 nm (▲); 287 nm (●); 270 nm (□). As setas mostram variações de absorvância com o tempo.

O complexo **3** mantém o espectro original por pelo menos 3 h, na presença de BSA, sem sinais de interação, hidrólise ou precipitação, sendo que após este tempo a absorção diminui ligeiramente. O complexo **4** manifesta um desvio hipocrómico da banda centrada a 267 nm de aprox. 3 nm, após 24 horas, com o aparecimento de dois pontos isobésticos a 337 e 383 nm, indicando que o complexo interage com a BSA, ocorrendo a formação de uma nova espécie. Curiosamente, existem algumas semelhanças nos espectros de absorção electrónica finais obtidos para os complexos **1** e **4** na presença de um equivalente molar de BSA, como o aparecimento de novas bandas em torno de 320 e 410 nm. Isto indica a formação hipotética do mesmo tipo de espécie, (p.e. [Cu(L1)(BSA)]), embora não se consiga afirmar com certeza, apenas com base em experiências de absorção no UV-Vis.

No caso do complexo **5**, observam-se apenas alterações mínimas nos primeiros 100 min.; p.e., a banda situada a 440 nm diminui de intensidade e um ponto isobéstico está presente a 336 nm. Estas alterações são consistentes com a formação de uma nova espécie, embora o ligando phen deva permanecer na esfera de coordenação do ião metálico, uma vez que não se observam alterações na banda a 267 nm.

3.6.2. Dicroísmo circular

Uma vez que os complexos de Cu(II) **1-3** sintetizados não são quirais (**3** e **4** podem ser considerados misturas racémicas com quiralidade no centro metálico), as soluções destes complexos não exibem bandas nos espectros de dicroísmo circular (DC). Após a ligação a uma molécula quiral, como a BSA, pode ocorrer a transferência de quiralidade entre a biomolécula e o complexo de Cu(II). As transições d-d de cobre são particularmente interessantes, pois podem aparecer nos espectros de DC e fornecer informações úteis sobre o ambiente de coordenação do ião metálico.

Os espectros de DC da BSA (388 µM) após a adição de quantidades crescentes de **1** são apresentados na **Figura 3.12**. O complexo **1** não é opticamente ativo, e a BSA não apresenta bandas de absorção na região do visível; portanto, as bandas de DC induzidas observadas na **Figura 3.12** são uma prova clara da ligação do complexo próximo aos grupos quirais da BSA. A banda positiva em torno de 490 nm e a banda

negativa a cerca de 560 nm, assemelham-se às bandas de DC presentes nos espectros da BSA quando é adicionado Cu^{2+} livre (ver **Figura A4.2.** em anexo). No entanto, a presença de uma nova banda negativa a aprox. 400 nm, confirma que esta é uma nova espécie, provavelmente $[\text{Cu}(\text{L1})(\text{BSA})]$. Para razões molares complexo/BSA mais elevadas ocorre precipitação, o que impede a observação de novas espécies de Cu-BSA para proporções superiores.

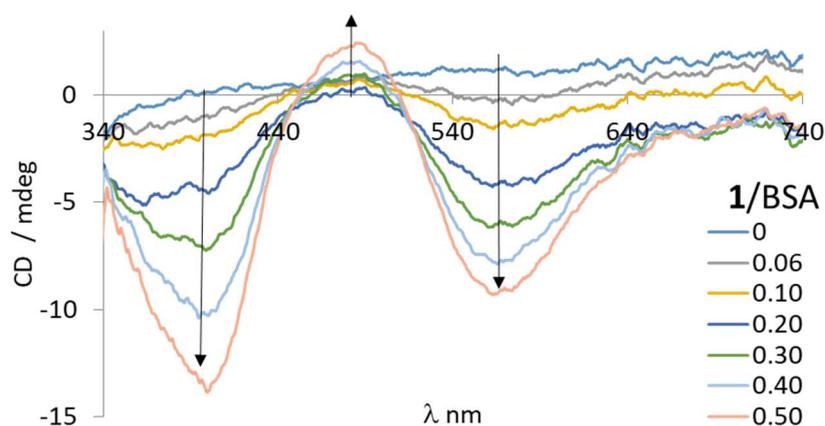


Figura 3.12. Espectros de DC da titulação de BSA ($388 \mu\text{M}$) com uma solução de **1** (ca. 3.4 mM) em tampão PBS (pH 7.4, 10 mM , $< 5\%$ DMSO). As razões molares $1/\text{BSA}$ encontram-se indicadas na figura.

Para uma solução de complexo **1** e BSA com uma razão molar de aprox. 0.5 não se observaram alterações espectrais relevantes ao longo do tempo (até 22 h).

Espectros de DC muito semelhantes, com a mesma forma e intensidades análogas, foram observados quando o complexo **4** foi adicionado à BSA (**Figura 3.13**), indicando que as espécies de BSA-**4** formadas provavelmente partilham do mesmo tipo de ligação, quando comparadas com **1** e sugerindo que ambas as espécies ativas no DC são idênticas.

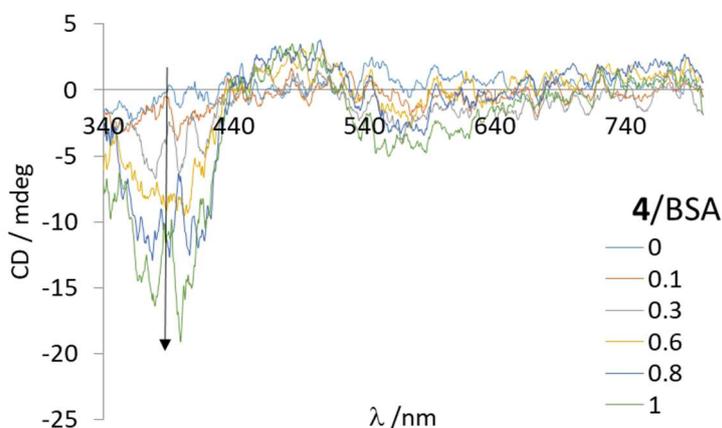


Figura 3.13. Espectros de DC da titulação de BSA ($400 \mu\text{M}$) com uma solução do complexo **4** (aprox. 8.9 mM) em tampão PBS (pH 7.4, 25 mM , $< 5\%$ DMSO). As

razões molares **4**/BSA estão indicadas na figura. As setas mostram variações com o aumento da concentração de complexo.

Para **2**, apenas uma banda positiva a 420 nm surgiu após a adição de pequenas quantidades do complexo (**Figura 3.14.**). No entanto, a precipitação para proporções superiores a 0.2 não permitiu a realização de um estudo completo.

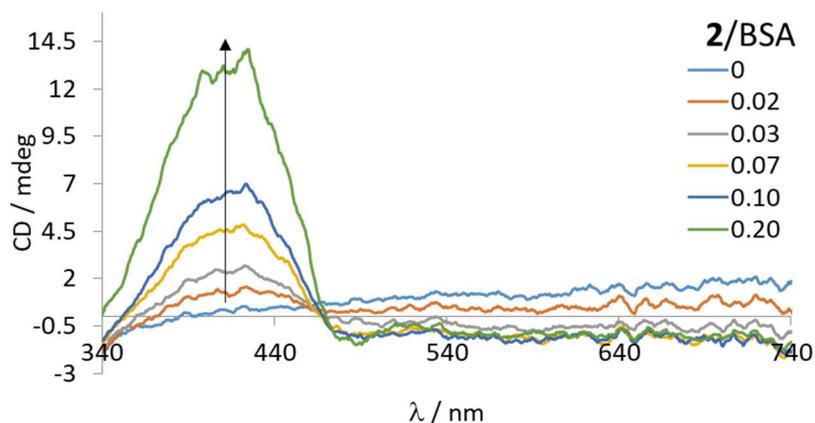


Figura 3.14. Espectros de DC da titulação de BSA (ca. 388 μ M) com aprox 3.3 mM de **2** em tampão PBS (pH 7.4, 10 mM, < 2.3 % DMSO (v/v)). Os rácios molares **2**/BSA estão indicados na figura. Para razões mais elevadas houve precipita o. As setas mostram varia es com o aumento da concentra o de complexo.

3.6.3. Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência   uma técnica muito usada para avaliar o papel da BSA no transporte de fármacos, uma vez que a BSA possui fluorescência intrínseca, devido   presença de aminoácidos fluorescentes, sendo que a principal contribui o para a fluorescência da proteína   atribuída a dois triptofanos localizados nas posi es 134 e 212.[20] Trp-134 localiza-se   superfície da albumina no subdomínio IB e o Trp-212 encontra-se posicionado no interior de uma bolsa hidrofóbica no subdomínio IIA.[21]

Quando a BSA   excitada a 295 nm surge uma banda de emissão com um máximo a aprox. 340 nm. Nas mesmas condi es, **1** possui fluorescência intrínseca e exibe uma banda com um máximo centrado em 401 nm. Assim, os dados obtidos nas experiências de extin o da fluorescência foram corrigidos com a subtra o dos espectros do complexo. A intensidade da emissão diminui com a adi o de **1**   BSA (**Figura 3.15.**), indicando altera es conformacionais da proteína ou uma liga o entre a proteína e o complexo.[20] O aumento da concentra o do complexo de ião de metal leva   extin o progressiva da intensidade de emissão da fluorescência a 340 nm, até

64%, e simultaneamente ao aparecimento da emissão do complexo a 401 nm, formando um ponto isoemissivo a 379 nm. Além disso, é observado um pequeno desvio para o azul de cerca de 3 nm. Essa mudança de energia pode indicar que a polaridade no local de ligação próxima do triptofano diminuiu[21], sugerindo que fica localizado num ambiente mais hidrofóbico. Um desvio energético semelhante foi observado na presença de outros complexos de cobre, como por exemplo o 2,4-dinitrofenol (DNP). Esta alteração foi atribuída à ligação do DNP à proteína no local I, no subdomínio IIA.[21]

A determinação das constantes de ligação é muito importante no desenvolvimento de um novo fármaco, uma vez que a maioria dos fármacos no mercado ligam-se reversivelmente e com afinidades moderadas à albumina (as constantes de ligação encontram-se geralmente entre o intervalo $(1-15) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$).[22] No caso particular de **1**, as constantes foram calculadas pela aplicação dos modelos de Stern-Volmer (eq. 8.6) e de Scatchard (eq. 8.7) (ver capítulo 8 - secção 8.6.5. Fluorescência)". Foi obtido um gráfico linear de Stern-Volmer sugerindo um mecanismo único de extinção estático.[23] As constantes determinadas mostram que a ligação entre **1** e a BSA é moderada: $K_{SV} = 9.9 \times 10^4$ e $K_{Sch} = 9.2 \times 10^4$. Ao comparar a força de ligação entre a BSA e os complexos do tipo $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L}^n)]$ não foram encontradas diferenças significativas (**Tabela 3.6.**). Contudo, quando o co-ligando phen se encontra coordenado ao centro metálico, a afinidade de ligação aumenta 3 a 4 vezes. Sabe-se que a planaridade dos ligandos coordenados ao centro metálico desempenha um papel importante em termos da afinidade de ligação à BSA.[24] Os complexos com maior afinidade pela albumina são os compostos **4** e **5**, o que pode ser explicado pela planaridade intrínseca dos ligandos phen.

Tabela 3.6. Constantes de ligação (K_{BC}) e Stern-Volmer (K_{SV}) dos complexos à BSA obtidas por ajuste dos dados experimentais com aos modelos de Scatchard e Stern-Volmer. Os resultados foram obtidos por ensaios de extinção de fluorescência.

	Scatchard	Stern-Volmer
Complexo	$K_{BC} (\times 10^{-4})$	$K_{SV} (\times 10^{-4})$
1	9.3	9.9
2	9.7	7.9
3	8.1	8.0
4	37.1	13.5
5	30.2	34.1

Como a BSA é um dos principais componentes do meio celular utilizado nos ensaios de citotoxicidade e sabendo que, no sangue, a albumina é o segundo maior transportador de íons de Cu(II), esses resultados indicam que a ligação entre **1** e a BSA é reversível e que o complexo **1** é passível de ser transportado pela proteína

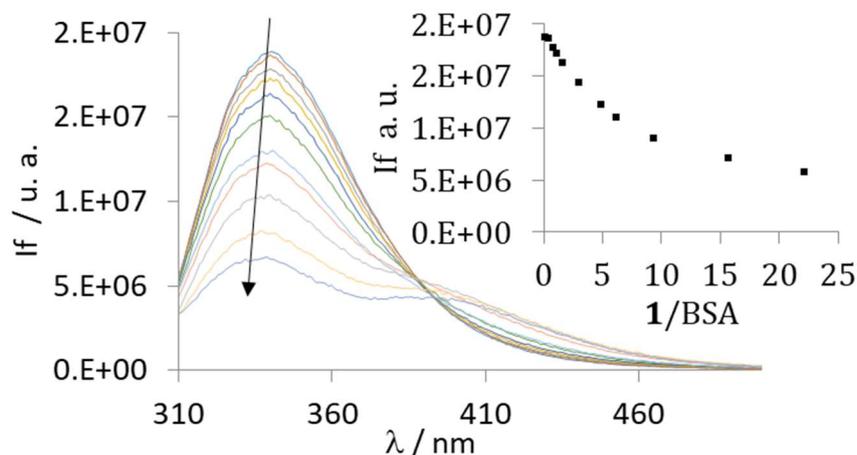


Figura 3.15. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{ex} = 298$ nm) de BSA ($0.7 \mu\text{M}$) com concentrações crescentes de **1** (aprox. $0.2\text{-}13.9 \mu\text{M}$) em tampão HEPES (10 mM, pH 7.4) com menos de 4% de DMSO (v/v). O gráfico inserido mostra a variação de $\lambda_{em}^{max} = 340$ nm em função de $1/BSA$ em equivalentes molares. Os dados foram corrigidos para absorção e efeitos de filtro interno.[25]

3.7. Estudos de ligação ao ADN

A avaliação das interações dos complexos com o ADN foi feita recorrendo a titulações que foram seguidas por espectroscopia de absorção no UV-Vis. e dicroísmo circular. A **Tabela 3.7** mostra as constantes de ligação ao ADN obtidas após ajustar os dados experimentais ao modelo de Scatchard. Em geral, concluiu-se que os complexos interagem com o ADN.

3.7.1. Espectroscopia de DC

Beneficiando da sua quiralidade, é possível obter informações relevantes sobre alterações estruturais do ADN por espectroscopia de DC, tais como: conformação, possível clivagem e danos. O espectro de DC do ADN, na sua forma B, mostra uma banda positiva ($\lambda_{max.} = 275$ nm) correspondente ao empilhamento das suas bases e uma banda de absorção negativa centrada no a 245 nm atribuída à helicidade no sentido dos ponteiros do relógio. É de salientar que os complexos em estudo não apresentam quaisquer espectros de DC, o que significa que qualquer alteração nos

espectros de DC, que ocorram ao longo da titulação estará relacionada com a interação do complexo estudado com o ADN.

A interação do ADN com os complexos Cu(II) ternários (contendo phen e H₂L1,2) **4** e **5** foi avaliada por espectroscopia de DC. Uma solução de ADN em tampão HEPES foi titulada com pequenas alíquotas dos complexos **4** ou **5** (~1 mM em DMSO) de forma a obter os rácios molares de Cu(II)/ADN 0.02 e 1. Os espectros de DC resultantes são apresentados na **Figura 3.16**.

As alterações espectrais observadas em ambos os sistemas (**4** e **5**) são semelhantes, com o aparecimento de duas bandas positivas de sinal de DC induzido (DCI) a $\lambda_{\text{max.}} = 279$ e 300 nm (ombro) após a primeira adição do complexo ao ADN, seguida de um aumento de intensidade após as adições seguintes. O aumento é observado até rácios molares complexo/ADN de cerca de 0.5 e 1 para os complexos **4** e **5**, respetivamente. Na região da banda negativa do ADN (aprox $\lambda_{\text{max.}} = 245$ nm) as alterações não são tão evidentes, particularmente quando comparadas com o sinal positivo de DCI, que é muito intenso. O aumento da intensidade indica que os complexos se ligam ao ADN de tal forma que a hélice do ADN se expande. Resultados semelhantes foram obtidos ao titular ADN com o co-ligando phen.[24] Essas alterações são atribuídas à intercalação dos anéis aromáticos entre os pares de bases do ADN. Para **4** e **5**, o $\Delta\epsilon$ para o rácio Cu(II)/ADN de 0.5 foi cerca de 6 e 12 M⁻¹cm⁻¹, respetivamente, enquanto que para a phen o valor obtido foi de cerca de 6 M⁻¹cm⁻¹. Assim, a interação de **5** com o ADN parece ser mais forte (efetuando uma apreciação exclusivamente com base na intensidade das bandas do DCI).

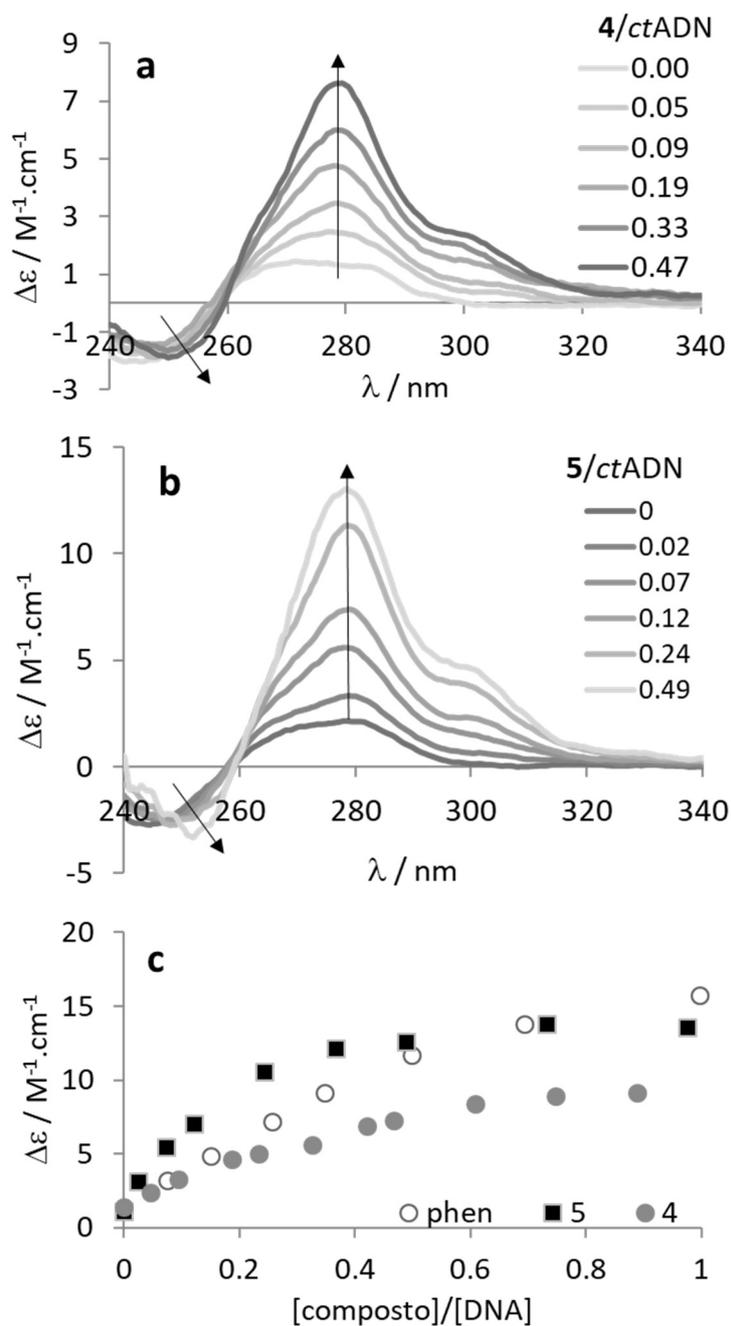


Figura 3.16. Espectros de dicroísmo circular (percurso óptico de 10 mm) de ADN (76.6 μM) em tampão HEPES (10 mM, pH 7.4) com adições de **a**) complexo **4**, **b**) complexo **5**; **c**) variação do $\Delta\epsilon (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ com a razão molar do composto: ADN para **4**, **5** e phen.

A comparação dos espectros de DC dos sistemas contendo **4** e **5** com $[\text{Zn}(\text{phen})_2]$ incubado com ADN[24] mostra semelhanças na forma, intensidade, máximos e na razão molar após a qual não são detetadas mais alterações, sugerindo que, muito provavelmente, a ligação ao ADN é através do co-ligando phen.

3.7.2. Titulações por espectroscopia de absorção no UV-Vis.

Como todos os complexos são estáveis pelo menos durante uma hora em meio aquoso, as titulações foram também seguidas por espectroscopia de UV-Vis., uma técnica simples e adequada para estudar a interação entre compostos e o ADN. A mesma quantidade de ADN foi adicionada na amostra e na célula de referência e, portanto, as alterações observadas são resultantes exclusivamente das interações entre os complexos e o ADN.

Os complexos **2** e **3** apresentam comportamentos semelhantes quando titulados com ADN (**Figura 3.17.a** e **3.17.b**), respetivamente). A titulação de **3** apresenta um efeito de hipocromismo (desvio de 5 nm para a região do vermelho no $\lambda_{\text{max.}} = 283$ nm), enquanto que **2** apresenta uma diminuição das intensidades de absorção associadas a um desvio para menor energia de 5 nm a $\lambda_{\text{max.}} = 283$ nm e de 7 nm a $\lambda_{\text{max.}} = 445$ nm. O hipocromismo e o desvio das bandas para a região do vermelho são geralmente associados ao modo de ligação por intercalação, devido às interações $\pi-\pi$ entre grupos aromáticos planares com os pares de bases do ADN.[26] Assim, podemos concluir que as alterações observadas são características da ligação intercalativa do complexo à dupla hélice do ADN.[27]

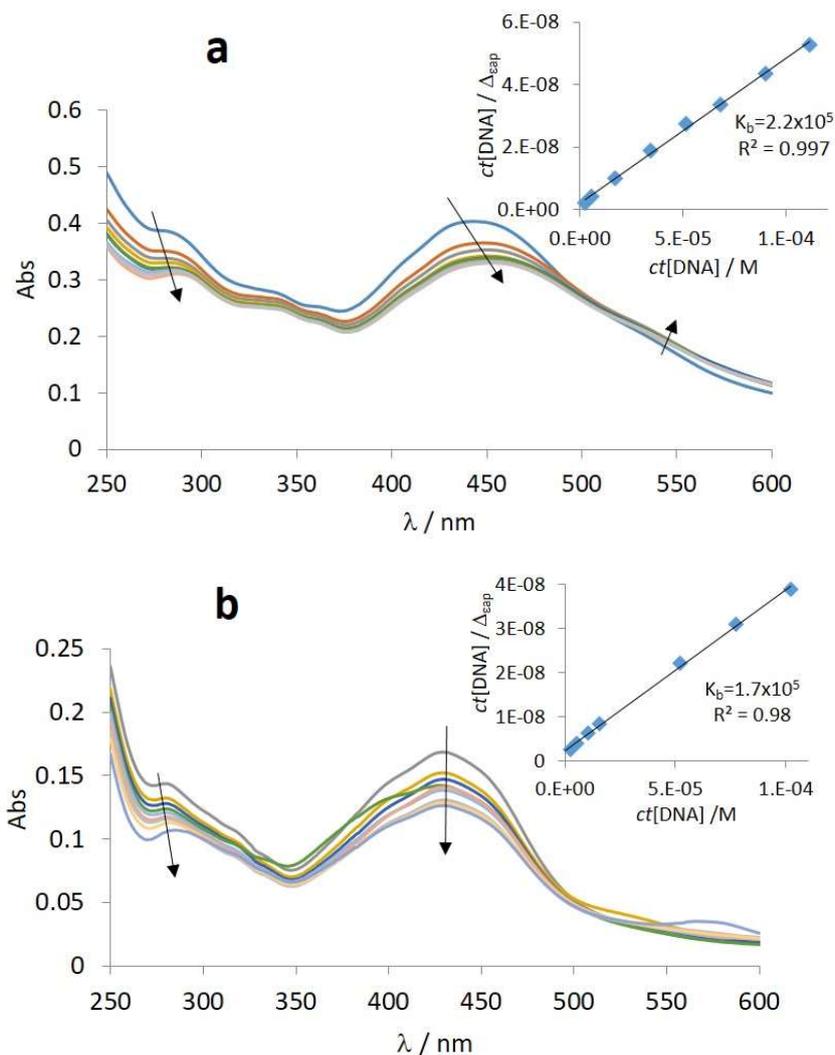


Figura 3.17. Espectros de absorção eletrônica de UV-Vis. adquiridos em tampão PBS (10 mM, pH 7.4) após adição de ADN ([ADN] = 2.4 - 10 μ M) a uma solução de: **a)** **2** (36 μ M) e **b)** **3** (16 μ M). Os gráficos inseridos correspondem ao ajuste dos dados obtidos com o modelo de Scatchard para determinar as constantes de ligação dos complexos ao ADN. As setas mostram variações com o aumento da concentração de ADN.

A **Figura 3.18** mostra o resultado da titulação de **4** com ADN monitorizada por espectroscopia de absorção UV-Vis. A diminuição gradual da intensidade da absorção (hipocromismo) a $\lambda = 266, 290$ e 360 nm; o aumento da intensidade de absorção em torno de 320 nm; bem como a presença de dois pontos isobésticos a 300 e 341 nm estão muito provavelmente associados ao co-ligando phen, já que o complexo **1** não apresenta qualquer alteração no espectro de absorção com a adição de ADN.

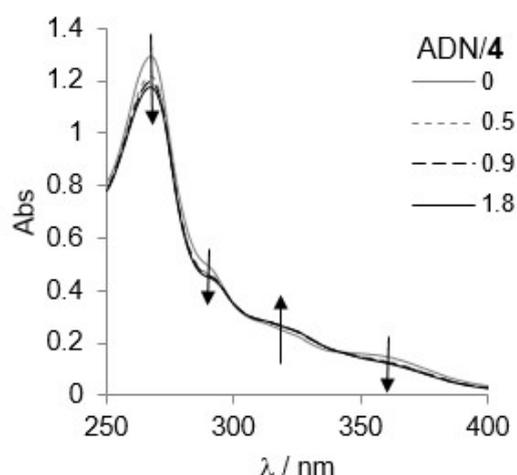


Figura 3.18. Titulação de **4** (aprox. 25 μM em tampão PBS, 25 mM, pH 7.4, 1.2 % de DMSO) com quantidades crescentes de ADN (3.3 mM em tampão PBS, 25 mM, pH 7.4). As razões molares ADN/4 são indicadas na figura.

Os valores das constantes de ligação (K_{BC}) incluídos na **Tabela 3.7.** mostram afinidades semelhantes pelo ADN para todos os complexos, sem diferenças significativas entre complexos com ligandos mistos (que contêm phen) e complexos do tipo $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Ln})]$. Assumindo a formação de um complexo com estequiometria 1:1 (entre ADN e composto), a constante de ligação entre **4** e o ADN foi avaliada através do ajuste dos dados da absorvidade molar a dois comprimentos de onda selecionados ao modelo de Scatchard de acordo com as equações na secção experimental 8.5.1. O valor obtido foi de 9.3×10^5 , que é da mesma ordem de grandeza das constantes calculadas por outros métodos mostrados na **Tabela 3.7.**

Tabela 3.7. Constantes de ligação (K_{BC}) entre os compostos e o ADN obtidas por ajuste dos dados experimentais aos modelos de Scatchard e Kaminoh. Os resultados foram obtidos por ensaios de titulação monitorizados por UV-Vis.

	Scatchard	Kaminoh
Complexo	$K_{BC} (\times 10^{-5})$	$K_{BC} (\times 10^{-5})$
1	Sem interação	Sem interação
2	2.2 ± 0.7	4.2 ± 0.8
3	1.5 ± 0.3	1.7 ± 0.6
4	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.3
5*	26 ± 3.1	-----

*valor de constante de ligação sem significado devido à dispersão da radiação observada imediatamente após a adição de ADN.

3.8. Conclusões

Foram sintetizados e caracterizados por técnicas analíticas e espectroscópicas cinco novos complexos de Cu(II), obtidos com rendimentos moderados. Estes complexos são formados por SB (**H₂L1** e **H₂L2**) e uma base de Schiff reduzida (**H₃L3CI**), derivados de piridoxal. Estudos espectroscópicos mostraram que as bases Schiff **H₂L1** e **H₂L2** são suscetíveis à hidrólise em solventes aquosos, enquanto que a versão reduzida **H₃L3CI** é muito mais estável em meios aquosos, bem como os complexos Cu(II) obtidos, que são estáveis por pelo menos 1 h. Um dos pró-ligandos precursores **H₂L²**, apresentou uma atividade de inibição de formação de radicais livres excepcionalmente alta, avaliada pelo ensaio de DPPH, comparável ao controle positivo (ácido ascórbico), enquanto que a versão reduzida do pró-ligando **H₃L3CI** não revelou atividade significativa.

Os compostos de Cu(II) correspondem a complexos tetra- (**1-3**) ou penta-coordenados (**4** e **5**) em geometrias de base quadrada. **H₂L1** e **H₂L2** são bastante semelhantes em termos de átomos de doadores, formando quelatos tridentados ONO, no entanto, **H₂L1** forma um sistema de quelato (6+6) enquanto **H₂L2** forma um quelato com tensão superior (6+5).

Em relação à atividade biológica, os complexos **2** e **5**, constituídos por **H₂L2**, apresentaram maior potencial antioxidante, maior citotoxicidade em relação às duas linhas celulares oncológicas testadas e maior capacidade de ligação ao ADN, quando comparados com **1** e **4**, respetivamente. O complexo **2**, apresenta maior potencial antioxidante que **3**, que envolve uma versão da base de Schiff reduzida (**3**). Curiosamente, **3** tem maior atividade antiproliferativa, pelo menos duas vezes superior, do que o **2**. Considerando a semelhança estrutural existente entre os pró-ligandos, tais diferenças podem ser explicadas pela lipofílicidade dos compostos. Espera-se que **H₂L2** seja mais lipofílico que **H₂L1**, sendo a ordem de $\log P$ **H₂L2** > **H₂L1** > **H₃L3CI**, [27] e desta forma, uma ordem semelhante é esperada para os seus complexos de cobre. Os complexos **4** e **5** que contêm os heterociclos aromáticos como co-ligando apresentam atividade antioxidante moderada e semelhante (mas maior que a observada para os complexos **1-3**) e os melhores desempenhos em termos de citotoxicidade, com valores de $IC_{50} < 10 \mu M$, sendo notavelmente baixo contra células tumorais do ovário para **5**, com valores de $IC_{50} = 0.7 \pm 0.1 \mu M$. Destaca-se ainda que este composto é o que apresenta maior capacidade de ligação ao ADN.

3.9. Referências

- [1] **C. Trejo-Solís, D. Jimenez-Farfan, S. Rodriguez-Enriquez, F. Fernandez-Valverde, A. Cruz-Salgado, L. Ruiz-Azuara e J. Sotelo.** BMC Cancer., 2012, 12, pp. 156-164.
- [2] **A. Maroń, K. Czerwińska, B. Machura, L. Raposo, C. Roma-Rodrigues, A. R. Fernandes, J. G. Małecki, A. Szlapa-Kula, S. Kula e S. Krompiec.** Dalton Trans., 2018, 47 pp. 6444-6463.
- [3] **M. Sutradhar, Rajeshwari, T. R. Barman, A. R. Fernandes, F. Paradinha, C. Roma-Rodrigues, M. F. C. G. Silva e A. J.L. Pombeiro.** J. Inorg. Biochem., 2017, 117, pp. 267-275.
- [4] **L.J. Bellamy.** *The infrared spectra of complex molecules*, 3^a ed., Chapman and Hall Ltd., London, 1975.
- [5] **B. Annaraj e M. A. Neelakantan.** Eur. J. Med. Chem., 2015, 102, pp. 1-8.
- [6] **D. Lin-Vien, N. Colthup, W. Fateley e J. Grasselli.** *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, 1^a ed., Elsevier, 1991.
- [7] **A.B.P. Lever.** *Inorganic Electronic Spectroscopy*, Elsevier, New York, 1984.
- [8] **E.N. Sathyanarayana.** *Electronic Absorption Spectroscopy and Related Techniques* University Press Limited, India, 2001.
- [9] **A. Rockenbauer e L. Korecz.** Appl. Magn. Reson., 1996, 10, pp. 29-43.
- [10] **U. Sakaguchi e A. W. Addison.** J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1979, 4, pp. 600-608.
- [11] **N. Mukherjee, S. Podder, K. Mitra, S. Majumdar, D. Nandi e A. R. Chakravarty.** Dalton Trans., 2018, 47, pp. 823-835.
- [12] **G. Scalese, I. Correia, J. Benítez, S. Rostán, F. Marques, F. Mendes, A. P. Matos, J. C. Pessoa e D. Gambino.** J. Inorg. Biochem., 2017, 166, pp. 162-172.
- [13] **M. B. Pereira, L. A. Fontana, J. D. Siqueira, B. L. Auras, M. P. da Silva, A. Neves, P. Gabriel, H. Terenzi, B. A. Iglesias e D. F. Back.** Inorg. Chim. Acta, 2018, 469, pp. 561-575.
- [14] **A. O. Pedersen K. L. D Mensberg e U. Kragh-Hansen.** Eur. J. Biochem., 1995, 233, pp. 395-405.
- [15] **V. Y. Tyurin, A. A. Moiseeva, D. B. Shpakovsky e E. R. Milaeva.** J. Electroanal. Chem., 2015, 756, pp. 212-221.
- [16] **A. Ricci, G. P. Parpinello, N. Teslic, P. A. Kilmartin e A. Versari.** Molecules, 2019, 24, pp. 2925-2935.
- [17] **M. Baranowska, K. Suliborska, W. Chrzanowski, B. Kuszniereicz, J. Namiesnik e A. Bartoszek.** Redox Biol., 2018, 17, pp. 355-366.
- [18] **J. Flarakos, L. K. Morand e P. Vouros.** Anal. Chem., 2005, 77, pp. 1345-1353.
- [19] **C. Tan, J. Liu, H. Li, W. Zheng, S. Shi, L. Chen e L. Ji.** J. Inorg. Biochem., 2008, 102, pp. 347-358.
- [20] **Y. Q. Wang, H.-M. Zhang, G.-C. Zhang, W.-H. Tao e S.-H. Tang.** J. Lumin., 2007, 126, pp. 211-218.
- [21] **W. Bal, J. Christodoulou, P. J. Sadler e A. Tucker.** J. Inorg. Biochem., 1998, 70, pp. 33-39.
- [22] **C. Dufour e O. Dangles.** Biochim. Biophys. Acta, 2005, 1721, pp. 164-173.

- [23] **A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacovazzo e A. Guagliardi.** J. Appl. Cryst., 1993, 26, pp. 343-350.
- [24] **C. P. Matos, Y. Addis, P. Nunes, S. Barroso, I. Alho, M. Martins, A. P. A. Matos, F. Marques, I. cavaco, J. C. Pessoa e I. Correia.** J. Inorg. Biochem., 2019, 198, pp. 110727-110735.
- [25] **A. Coutinho e M. Prieto.** J. Chem. Edu., 1993, 70, pp. 425-428.
- [26] **Q. L. Zhang, J. G. Liu, H. Chao, G. Q. Xue e L. N. Ji.** J. Inorg. Biochem., 2001, 83, pp. 49-55.
- [27] **D. S. Raja, Bhuvanesh, N. S. P. e Natarajan, K.** Eur. J. Med. Chem., 2012, 47, pp 73-85.

- Capítulo I - Introdução
- Capítulo II - Objetivos
- Capítulo III - Complexos de cobre com bases de Schiff derivados do piridoxal com potencial terapêutico.
- **Capítulo IV - Complexos de iões de metal constituídos por bases de Schiff de cromonas e piridoxal como potenciais agentes antitumorais**
- Capítulo V - Complexos de iões de metal com bases de Schiff derivados da vitamina B₆
- Capítulo VI - Complexos de vanádio com 1,10-fenantrolina e derivados
- Capítulo VII - Comportamento dos complexos do tipo [Cu(phen)₂]²⁺ em meios celulares e a sua influência na citotoxicidade
- Capítulo VIII - Secção experimental
- Capítulo IX - Considerações finais
- ANEXOS

4.1. Fundamentos

Cromonas são compostos da família da benzopirona que apresentam diversas atividades biológicas e farmacológicas tais como: antioxidantes, antimicrobianas, antimicrobacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e antitumorais.[1]-[3] Alguns compostos derivados das cromonas demonstraram ter propriedades antioxidantes, uma vez que são agentes quelantes de íons metálicos envolvidos na produção de espécies reativas de oxigênio ou são capazes de reagir diretamente com radicais livres.[2] As SB derivados de 3-formil-cromona demonstraram atividade inibitória da timidina fosforilase[4] e da ADN topoisomerase II α . [5] Este facto é pertinente uma vez que a timidina fosforilase é sobreexpressa em vários distúrbios patológicos e foi identificada como um alvo potencial para fármacos antitumorais.[4] Estes compostos evidenciaram ainda forte atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo*[3] e citotoxicidade significativa contra células tumorais da próstata (PC3) quando comparadas com o fármaco de referência.[5]

Os complexos de íons de metal de cromonas e seus derivados têm sido pouco explorados, apesar das interessantes atividades antimicrobianas e anticancerígenas relatadas. Os ligandos derivados de 3-formil cromona hidrazona e os correspondentes complexos de níquel(II), cobre(II) e zinco(II) foram testados para avaliar a sua atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, exibindo elevada inibição microbiana contra todos os microrganismos testados.[6] Os complexos de cobre(II) contendo 7-hidroxi-4-oxo-4H-cromeno tiosemicarbazonas também mostraram atividade inibitória significativa contra várias bactérias patogênicas e fungos. Estes complexos tal como os seus ligandos exibiram potencial atividade antitumoral contra as linhas celulares neoplásicas A549 e MCF7, sendo que os complexos apresentaram melhor performance que os ligandos[7]. Um complexo de Cu(II) contendo cromona semicarbazona apresentou atividade biológica *in vitro* superior à cisplatina, nas mesmas linhas de células tumorais, além de boa atividade antimicrobiana em agentes patogênicos bacterianos e fúngicos[8]. Outros complexos de íons de metal com diferentes derivados de cromonas foram preparados, caracterizados[9]-[16] e testados quanto às suas propriedades antioxidantes[13][14] [16], antimicrobianas[12][15][16] e antitumorais[15].

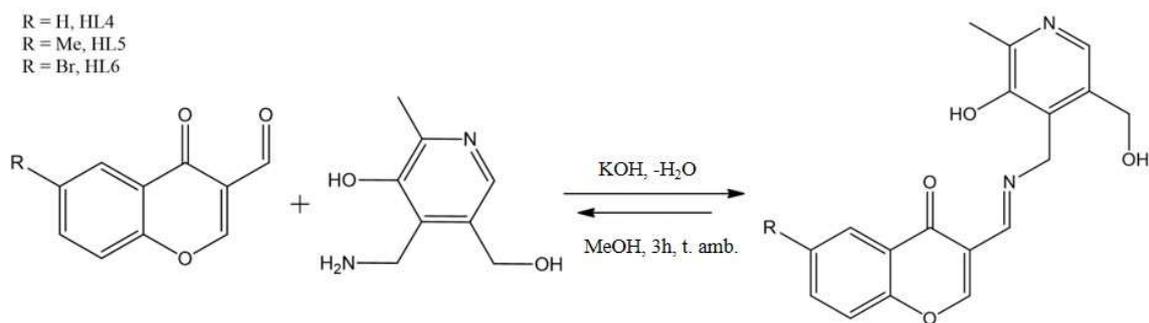
Considerando a sua elevada relevância biológica, neste capítulo serão apresentadas as sínteses e caracterizações de três SB obtidas a partir da

condensação de piridoxal e 3-formil cromonas substituídas na posição 6, assim como os correspondentes complexos de Cu(II). Para a SB derivado da 3-formil-6-metil-cromona, o complexo de oxidovanádio(IV) foi também preparado, assim como os complexos Cu^{II} e V^{IV}O ternários com o co-ligando phen. Os compostos sintetizados foram submetidos a testes da capacidade antioxidante *in vitro* usando o ensaio de DPPH; ensaios de ligação ADN/proteína e determinação da atividade antitumoral testando os compostos contra várias células tumorais e saudáveis.

4.2. Pró-ligandos tridentados ONO à base de piridoxal e 3-formil-cromonas substituídas

Um dos métodos mais comuns e diretos para a conjugação de moléculas bioativas é recorrendo à formação de SB, sendo necessário para isso uma amina e um grupo cetónico ou aldeído. Não existem muitos derivados de cromonas disponíveis comercialmente que possam ser usados diretamente para este tipo de reação, com a finalidade de obter um ligando tridentado para posterior complexação. Escolheram-se derivados da 3-formilcromona, que contém o grupo aldeído bem posicionado, com diferentes substituintes para condensar com a piridoxamina. A escolha dos grupos substituintes pode ser crucial para a reatividade biológica dos complexos formados (tais como as propriedades redox), uma vez que a densidade eletrónica em redor do centro metálico pode ser moduladas com a inserção de diferentes grupos doadores/eletroatratores nos ligandos. Para além disso os grupos substituintes poderão ter características que permitem interações com biomoléculas.

Três novos pró-ligandos de SB foram sintetizados em meio básico e solvente alcoólico através da condensação de quantidades equimolares de piridoxamina e três 3-formilcromonas substituídas na posição 6 (**HL4-HL6**). Os ligandos foram obtidos com bons rendimentos e as suas formulas estruturais foram determinada com base nos resultados obtidos por análises elementares, FTIR, MS, UV-Vis. e RMN. As análises elementares assim como a identificação dos iões moleculares sustentam as fórmulas estruturais dos ligandos apresentadas (ver secção experimental 8.2.1.).



Esquema 4.1. Esquema de reação dos ligandos base de Schiff **HL4-HL6** sintetizados.

As estruturas moleculares propostas para os pró-ligandos (**HL4-HL6**) foram confirmadas pelas informações obtidas a partir das experiências de 1D-RMN (^1H RMN e ^{13}C RMN) e 2D RMN (HSQC e HMBC) em soluções de metanol- d_4 ou DMSO- d_6 . Os desvios químicos de picos selecionados, assim como as suas atribuições encontram-se listados na **Tabela 4.1**, enquanto dados mais detalhados são fornecidos na secção experimental - 8.2.1. Nos espectros de ^1H -RMN, os picos dos prótons da azometina (HC=N) para **HL4**, **HL5** e **HL6** foram encontrados a campo baixo como singuletos, entre 7.45 e 7.49 ppm, enquanto que nos espectros de ^{13}C RMN estes picos apareceram entre 153.2 e 156.5 ppm, indicando claramente a formação das SB. O carbono ligado ao próton aromático no anel piridinico foi difícil de identificar nos espectros ^{13}C -RMN para **HL6**, mas a sua presença foi detetada no espectro de HSQC, com um pico cruzado a 7.87 ppm (^1H -RMN) e 137.7 ppm (^{13}C -RMN). Os prótons hidroxilos não aparecem no solvente metanol- d_4 devido à troca rápida com os deutérios, por ação de formação de pontes de hidrogênio, porém quando **HL4** e **HL5** foram dissolvidos em DMSO- d_6 , os seus espectros de ^1H -RMN exibiram dois sinais largos em torno de 9.35-9.36 ppm e 10.47-10.29 ppm atribuídos aos prótons hidroxilos (dados não apresentados).

Tabela 4.1. Desvios químicos dos principais picos atribuídos aos prótons e carbonos dos pró-ligandos **HL4** - **HL6**. Os espectros de RMN foram adquiridos em metanol-d₄. ^aDesvios químicos de **HL5** em DMSO-d₆.

pró-ligando	δ HC=N		δ HC-O _{crom.}		δ CH _{pir.}		δ CH ₃		δ Ar-H	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C		
HL4	7.45	156.2	5.62	103.1	7.88	135.7	2.47	18.8	¹ H	6.98-8.08
							----	----	¹³ C	118.8-156.2
HL5	7.44	153.9 ^a	5.58	101.5 ^a	7.88	139.9 ^a	2.47	19.9 ^a	¹ H	6.87-7.88
							2.30	20.3 ^a	¹³ C	117.4-153.9 ^a
HL6	7.49	156.5	5.64	103.3	7.87	137.7	2.47	18.8	¹ H	6.93-7.87
							----	----	¹³ C	115.1-156.5

Os espectros de FTIR dos pró-ligandos apresentam bandas largas características das vibrações dos grupos $\nu(\text{O-H})$ em redor de 3360 e 3242 cm^{-1} , sendo que estas bandas aparecem com alguma sobreposição. Entre 3100-2900 cm^{-1} , é possível identificar as bandas típicas associadas ao estiramento C-H dos grupos alifáticos e aromáticos. A formação das SB foi também confirmada por esta técnica, com a identificação das bandas entre 1600-1617 cm^{-1} associadas às iminas. Na **Tabela 4.2** é possível ver a atribuição das restantes bandas mais relevantes.

Em resumo, os pró-ligandos foram sintetizados com bons rendimentos, elevada pureza e caracterizados em estado sólido e solução. Estes pró-ligandos foram utilizados para sintetizar os respetivos complexos de iões de metal apresentados de seguida.

4.3. Complexos de Cu(II) e V(IV)O

Quatro novos complexos com estequiometrias do tipo $[\text{M}(\text{Ln})]$ e dois $[\text{M}(\text{Ln})(\text{phen})]$ (com $n = 4$ a 6) foram obtidos com rendimentos entre moderados e bons, pela reação dos pró-ligandos desprotonados com quantidades estequiométricas de VOSO_4 ou CuCl_2 em metanol à temperatura ambiente. Os complexos **9** e **11**, que contêm o co-ligando phen, foram sintetizados em condições experimentais semelhantes, seguidos da adição de phen e foram isolados com rendimentos razoáveis a bons. Os complexos foram caracterizados no estado sólido e em solução utilizando técnicas analíticas e espectroscópicas, incluindo análise elementar, espectrometria de massa, espectroscopia de UV-Visível, espectroscopia de FTIR, RPE e

fluorescência para os complexos **9** e **11**. A **Figura 4.1** mostra as suas estequiometrias e fórmulas estruturais.

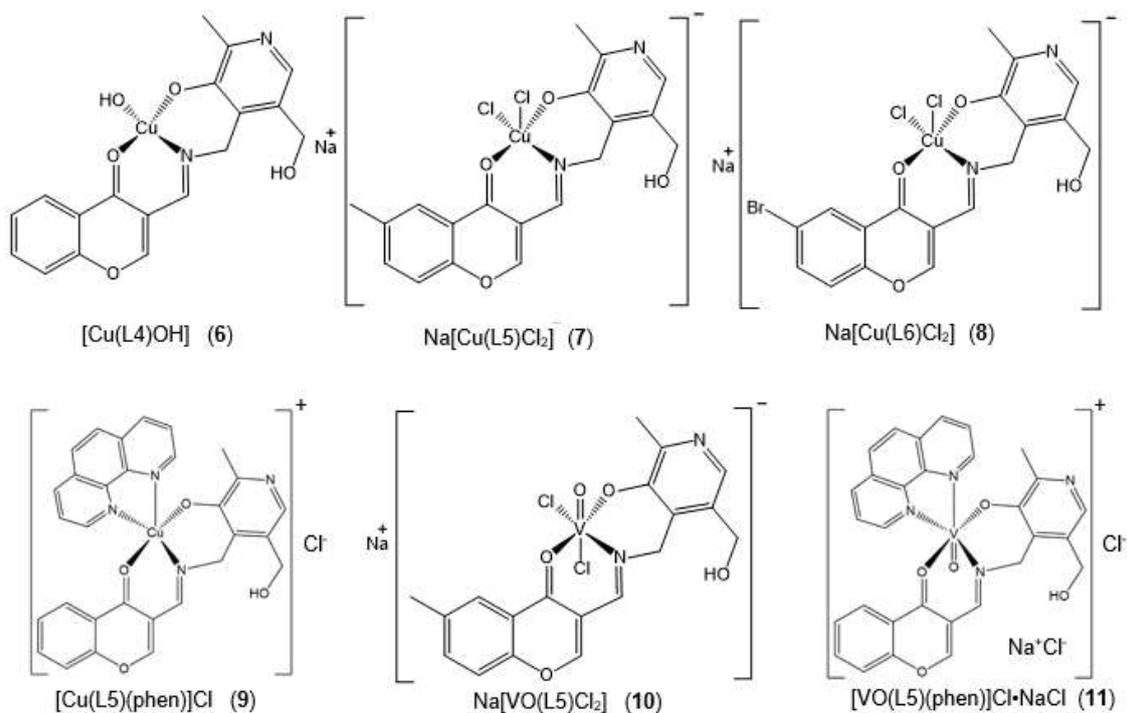


Figura 4.1. Fórmulas moleculares propostas para os complexos preparados

Os compostos foram caracterizados por espectrometria ESI-MS. Na maioria dos casos foi possível identificar os picos dos iões moleculares no modo positivo, $[M+H]^+$, ou no modo negativo, $[M-H]^-$, bem como o padrão isotópico de cobre típico nos adutos dos complexos. A presença de iões cloreto nos complexos foi confirmada por estudos efetuados com cromatografia de troca aniônica. Para os complexos **7**, **8** e **10**, foram detetados dois iões Cl^- , enquanto que **6** não apresentou a presença de cloretos. Para os restantes complexos e pró-ligandos precursores não foi possível fazer a determinação da quantidade de cloreto devido à sua baixa solubilidade em meio aquoso e/ou dificuldade na sua hidrólise, portanto, as estequiometrias e fórmulas foram propostas com base em análise elementar, técnicas espectroscópicas e dados de espectrometria de massa.

A comparação dos espectros de FTIR dos complexos com o respetivo pró-ligando livre permite confirmar a estrutura do complexo de ião metálico, principalmente em relação ao modo de coordenação do ligando. As frequências de vibração mais relevantes foram atribuídas por comparação com outros complexos semelhantes

constituídos por ligandos de base de Schiff derivados de piridoxal ou de cromonas (Tabela 4.2).[17]-[24]

Tabela 4.2. Bandas de FTIR selecionadas (cm^{-1}) dos espectros dos pró-ligandos **HL4** - **HL6** e dos correspondentes complexos de íons de metal. Intensidade das bandas de FTIR: br-larga, sh-ombro, s-forte, m-medio e w-frac. ^aBanda emerge de uma banda larga.

Composto	$\nu(\text{O-H})_{\text{fen./\acute{a}gua}}$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C=N})_{\text{imina}}$	$\nu(\text{C-O})_{\text{fenolato}}$	$\nu(\text{C-O})_{\text{\acute{a}lc.}}$	$\nu(\text{C=N})_{\text{Pirim.}}$	$\nu(\text{V=O})$
HL4	3371 br, sh 3242 br	1649 s	1609 s	1235 m	1063 m	1386 m	-----
HL5	3353 br, sh 3240 br	1649 s	1617 s	1232 m	1067 m	1382 m	-----
HL6	3373 br, sh 3242 br	1649 s	1600 s	1286 m	1069 m	1385 m	-----
6	3328 br ^a	1626 m	1605 s	1241 m	1062 w	1385 m	-----
7	3373 br ^a	1628 m	1610 s	1241 m	1061 w	1384 m	-----
8	3397 br ^a	1621 m	1596 s	1298 m	1058 w	1384 m	-----
9	3402 br ^a	1626 w	1606 s	1244 m	1059 w	1384 s	-----
10	3397 br ^a	1632 m	1614 s	1223 m	1042 w	1385 m	957 s
11	3381 br ^a	1615 m	1603 s	1235 m	1052 w	1387 s	977 s

As bandas características que aparecem na região entre $1600\text{-}1617\text{ cm}^{-1}$ nos espectros de FTIR dos pró-ligandos foram atribuídas à $\nu(\text{C=N})$ do grupo azometina. Essas bandas aparecem desviadas de $2\text{-}14\text{ cm}^{-1}$ para frequências inferiores nos complexos V(IV)O e Cu(II) , indicando que o nitrogênio da imina participa na coordenação. As bandas fortes e características (V=O) a aprox. 957 e 977 cm^{-1} , confirmam a presença de complexos de mono-oxidovanádio(IV).

As bandas fortes observadas em todos os pró-ligandos em redor de 1649 cm^{-1} são consistentes com a banda de estiramento de $\nu(\text{C=O})$ pertencente às cromonas. Nos complexos esta banda diminui de intensidade e em número de onda, apresentando um desvio entre 21 e 34 cm^{-1} . Estas observações estão relacionadas com a diminuição da densidade de eletrônica, enfraquecendo a ligação C=O após complexação, demonstrando que o grupo carbonílo se encontra envolvido na coordenação. A banda larga forte em torno de $3240\text{-}3242\text{ cm}^{-1}$ nos pró-ligandos livres é atribuída a $\nu(\text{O-H})_{\text{fenolato}}$, que não aparece nos complexos. Além disso, a diminuição da intensidade dessas bandas em todos os complexos torna mais visível uma nova

banda na região entre 3328-3402 cm^{-1} , atribuída ao $\nu(\text{O-H})_{\text{álcool}}$ do anel piridinico. Além disso, o desvio para frequências maiores ou menores (3-12 cm^{-1}) da banda de estiramento de $\nu(\text{C-O})_{\text{fenolato}}$ nos complexos confirma a participação do átomo de oxigênio do O-H fenólico na coordenação com o íon metálico. A presença de phen nos complexos **9** e **11** foi confirmada pela sobreposição das bandas de 727 e 846 cm^{-1} e bandas características na região dos espectros de FTIR entre 1400 e 1600 cm^{-1} . [23][24]

A espectroscopia de absorção UV-Vis. é uma técnica útil para avaliar informações estruturais obtidas por outras técnicas analíticas, pois as diferenças entre os espectros pró-ligando e complexo ajudam a avaliar quais os grupos funcionais envolvidos na quelação. Os desvios das bandas de energia do pró-ligando livre após complexação, juntamente com a observação de bandas emergentes associadas à transferência de carga que ocorre entre o metal e o ligando, são algumas evidências do modo de coordenação do ligando.

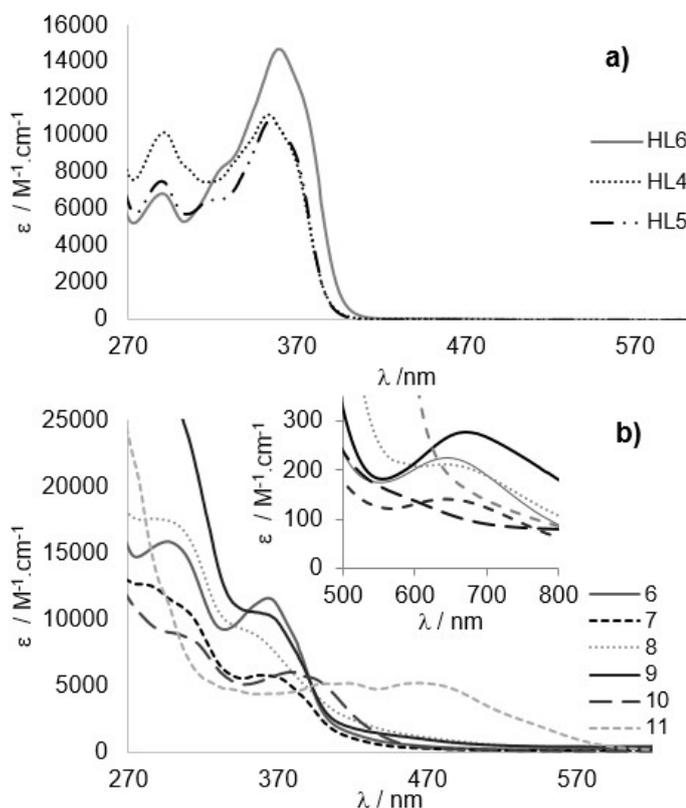


Figura 4.2. Espectro de UV-Visível dos a) pró-ligandos base de Schiff e b) complexos, obtidos em DMSO. Gráfico inserido: expansão da região visível de menor energia.

Os espectros de absorção eletrônica dos pró-ligandos e complexos foram medidos à temperatura ambiente em DMSO (**Figura 4.2**). Todos os pró-ligandos

exibiram uma banda UV de alta energia em torno de 290-292 nm, atribuída às transições $\pi\text{-}\pi^*$ dos anéis aromáticos. As duas bandas fortes que aparecem em parte sobrepostas em torno de 354 e 366 nm são frequentemente atribuídas a transições $n \rightarrow \pi^*$ do grupo azometina e a transições $n \rightarrow \pi^*$ associado ao oxigênio dos grupos fenólicos.[21][25] Estas bandas encontram-se ligeiramente desviadas para energias mais baixas em **HL6** devido ao carácter electroatrator do halogéneo, enquanto que as propriedades doadoras do grupo metilo não afetam o hiato energético da transição eletrónica associada a estas bandas. Nos complexos de cobre estas bandas sofrem um desvio para o vermelho de cerca de 10 nm, que se sobrepõe à banda associada às transições de transferência de carga do ligando para o centro metálico (LMCT). Enquanto que para **10** e **11**, os desvios das bandas associados às transições LMCT são mais distintas, com estas a desviarem para valores de energia mais baixos (388 e 470 nm, respetivamente), assim como as bandas atribuídas às transições $n\text{-}\pi^*$. Os grupos substituintes na posição 6 das cromonas não mostram influência na energia das bandas LMCT, em concordância com os resultados obtidos por espectrometria de RMN. Porém, quando comparada com a banda a 388 nm, atribuída à transição LMCT de **10**, a coordenação do co-ligando phen em **11** resulta num forte desvio para frequências mais baixas (aprox. 470 nm). Os dois compostos que contêm phen exibem uma banda intensa em torno de 260-270 nm, devido a transições $\pi\text{-}\pi^*$ dos anéis aromáticos da molécula de phen. As bandas largas observadas na região visível em torno de 641 e 680 nm correspondem à transição d-d do Cu(II), previsível para a configuração d^9 .

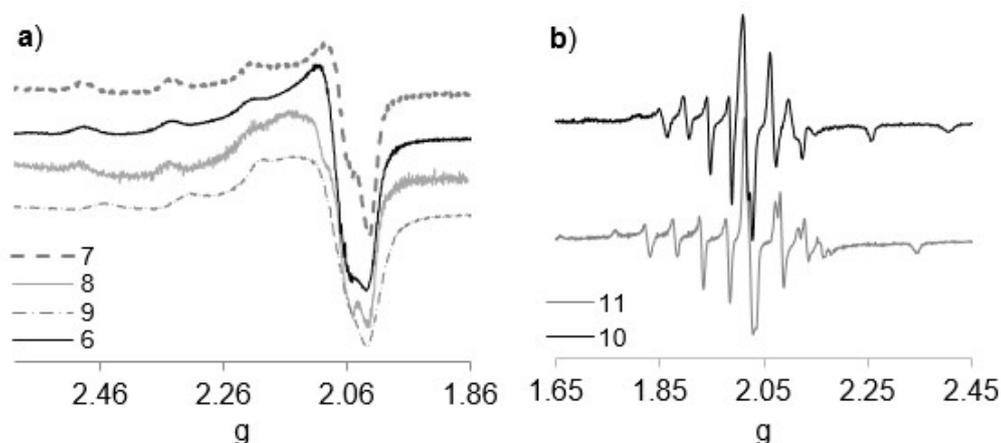


Figura 4.3. Espectros de RPE de 1ª derivada à frequência da banda X medido a 77K, em DMSO para os complexos: a) **6** a 3.1 mM; **7** a 3.0 mM; **8** a 3.0 mM e **9** a 2.9 mM e b) **10** a 3.1 mM e **11** a 3.0 mM.

Os espectros de RPE (banda X) dos complexos de Cu(II) e V(IV) foram obtidos a 77 K em DMSO. Com a excessão do complexo **8**, todos os restantes complexos apresentaram espectros bem resolvidos. Os complexos de Cu(II) indicaram a presença de um estado fundamental $d_{x^2-y^2}$ localizado numa geometria de base quadrada uma vez que os espectros revelaram quatro bandas de acoplamento hiperfino na região de campo alto e uma banda mais intensa a campo baixo com $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2.0$. Não foi observado nenhum acoplamento superhiperfino como se pode observar na **Figura 4.3**. Em relação aos espectros de V(IV)O, estes apresentam estrutura hiperfina com simetria axial e os espectros de **6, 7, 8, 10 e 11** foram simulados usando o programa desenvolvido por Rockenbauer *et al.*, [26] que originou os parâmetros do Hamiltoniano de spin incluídos na **Tabela 4.3**. A razão g_z/A_z calculada para os complexos **6, 7 e 9** encontra-se dentro do intervalo intervalo 100 - 135 cm^{-1} , que segundo Addison *et al.*, [27] indica a presença de pequenas distorções nas geometrias de coordenação de base quadrada. Apesar do espectro **8** não ter resolução suficiente para ser simulado é de esperar que tenha a mesma geometria devido a similaridade com os restantes espectros de Cu(II).

Tabela 4.3. Parâmetros do Hamiltoniano de spin obtidos a partir da simulação dos espectros de RPE dos complexos de Cu(II) e V(IV)O: **6, 7, 9, 10 e 11**. Os espectros foram calibrados de acordos com os espectros de DPPH medidos em paralelo.

Complexo	g	$g_{x,y}$	Az ($\times 10^4 \text{ cm}^{-1}$)	$A_{x,y}$ ($\times 10^4 \text{ cm}^{-1}$)	$g_{x,y}/ Az $ (cm)
6	2.268	2.056	176	17	129
7	2.254	2.04	169	24	133
9	2.259	2.042	168	19	134
10	1.972	1.989	167	63	-----
11	1.974	1.983	163	59	-----

4.3.1. Estabilidade hidrolítica

A estabilidade dos complexos em meio aquoso é uma característica importante que necessita ser avaliada, uma vez que a interação entre os complexos e biomoléculas, bem como a sua atividade citotóxica, serão avaliadas em meio aquoso.

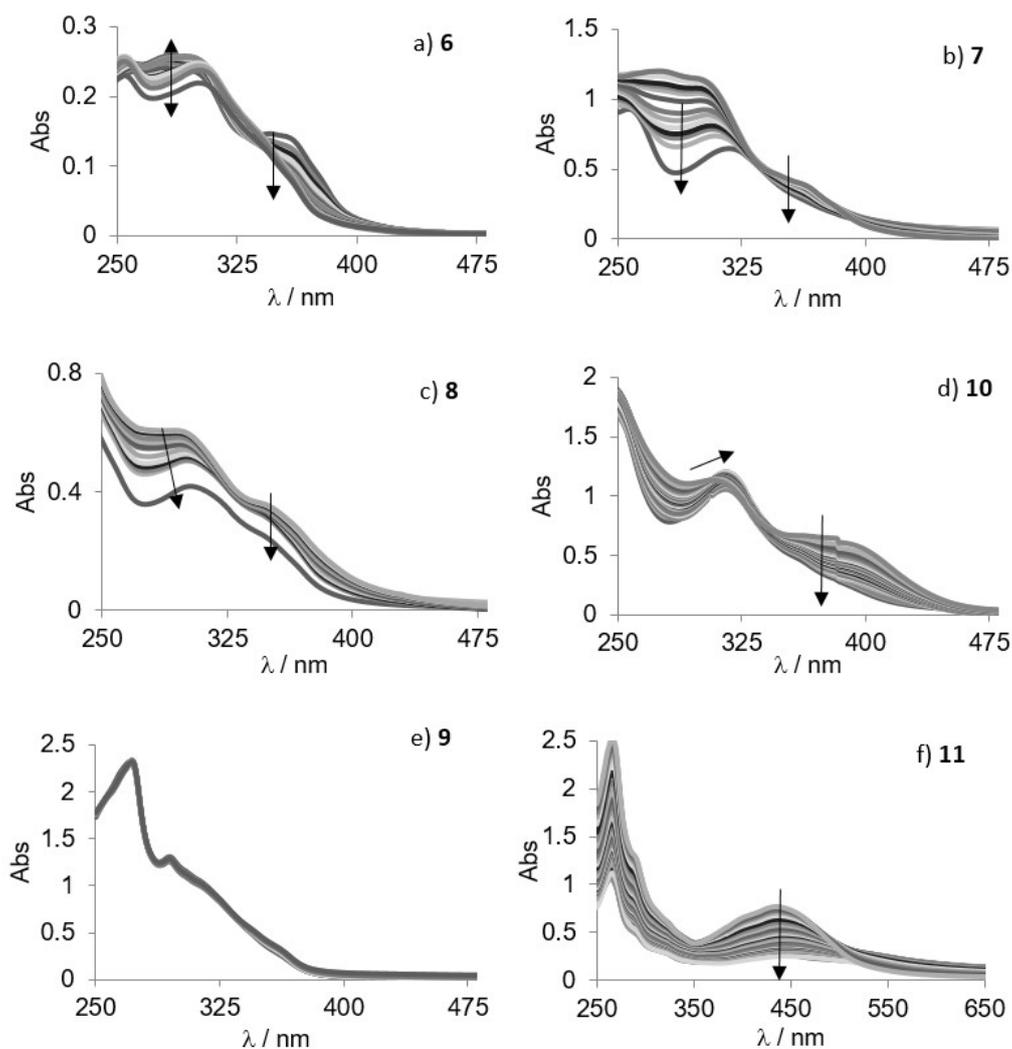


Figura 4.4. Espectros de absorção eletrônica ao longo do tempo até às 24h de: **a) 6** em tampão NH_4HCO_3 , (25 mM, $\text{pH}\sim 7.4$) com 2.3% DMSO (v/v) a 25 μM ; **b) 7**, em tampão PBS (10 mM, $\text{pH}\sim 7.4$) com 4.8 % DMSO (v/v) a 91 μM ; **c) 8** em tampão PBS (10 mM, $\text{pH}\sim 7.4$) com 2.5 % DMSO (v/v) a 61 μM ; **d) 10** em tampão PBS (10 mM, $\text{pH}\sim 7.4$) com 2.4 % DMSO (v/v) a 120 μM , **e) 9** em tampão PBS (10 mM, $\text{pH}\sim 7.4$) com 1.8 % DMSO (v/v) a 61 μM e **f) 11** tampão PBS (10 mM, $\text{pH}\sim 7.4$): com 107 μM , 3.4 % DMSO durante 22h, com precipitação a ocorrer após cerca de 1h30. As setas indicam as alterações espectrais com o tempo.

Foram realizados estudos por espectroscopia de UV-Vis. com soluções dos complexos em meio aquoso tamponizado a $\text{pH} 7.4$ para avaliar a sua estabilidade ao longo do tempo. Em geral, os complexos que contêm o co-ligando phen mostraram ser mais estáveis, uma vez que apenas pequenas alterações foram observadas. No entanto, os complexos do tipo $[\text{Cu}(\text{L}1-3)]^+$, exibiram mudanças com o decorrer do tempo. Para os complexos de cobre as bandas a cerca de 285 nm são as mais afetadas, mostrando uma diminuição da intensidade entre 17 e 40 %, enquanto que a

diminuição da absorvância a 360 nm varia cerca entre 26 e 35 %. Além disso, as bandas em torno de 302 e 306 nm exibem um desvio para o vermelho enquanto as bandas de LMTC não sofrem alterações significativas. Em relação ao complexo de vanadilo **10**, foram observadas alterações semelhantes, incluindo uma diminuição na intensidade da banda LMTC e um desvio para menores energias de 8 nm a 307 nm (**Figura 4.4**). Em contrapartida, o complexo de cobre **9**, que contém o phen é mais estável, sem nenhuma modificação significativa nos espectros adquiridos em PBS durante pelo menos 24h, ocorrendo apenas alguma precipitação após cerca de 1h30 em meio de cultura celular (**Figura 4.4e**). Desta forma a sua estabilidade foi avaliada na presença de BSA em quantidades equimolares em meio celular e em meio aquoso tamponado a pH 7.4 e não se observou precipitação nem alterações significativas. Resultados semelhantes foram observados quando o complexo **9** foi estudado em meio celular contendo 10% de FBS (**Figura 4.5**).

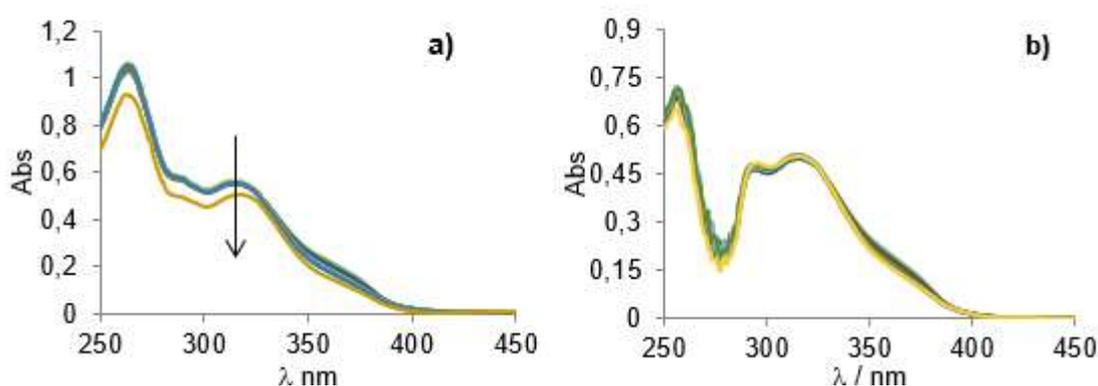


Figura 4.5. Espectros de absorção eletrônica de **9** a 25 μ M com 0.8 % DMSO adquirido em **a)** meio celular durante 24h, **b)** mesmas condições com 10% de FBS. As setas indicam as alterações com o tempo.

Estudos complementares foram também realizados para avaliar a estabilidade de **6** em meio aquoso tamponizado a pH 7.4 na presença de BSA em quantidade equimolar. Verificou-se que neste sistema as alterações nos espectros diminuíram na presença da albumina (**Figura 4.6**). Verificou-se também a existência de pontos isobásticos a 298 e 351 nm, que comprovam a interação entre BSA e **6** sendo este equilíbrio é atingido após cerca de 30 min. Estas observações indicam claramente a formação de uma nova espécie entre **6** e BSA, provavelmente com a estequiometria BSA:**6** ou BSA:Cu.

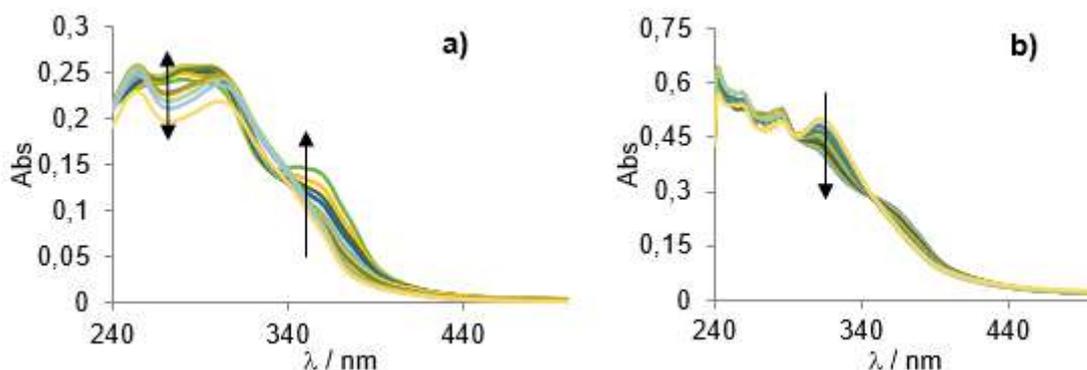


Figura 4.6. Espectros de absorção eletrônica de **6** (25 μ M) obtidos em “tampão” a) NH_4HCO_3 (25 mM, pH=7.4, 2.3% DMSO (v/v)) ao longo de 20 h e b) na presença de 25 μ M de BSA.

4.3.2. Atividade de inibição de formação de radicais

A capacidade de inibição da formação dos radicais livres por parte dos pró-ligandos e dos complexos foi avaliada através da aplicação do método do radical de DPPH (**Figura 4.7**), já apresentado no capítulo anterior.

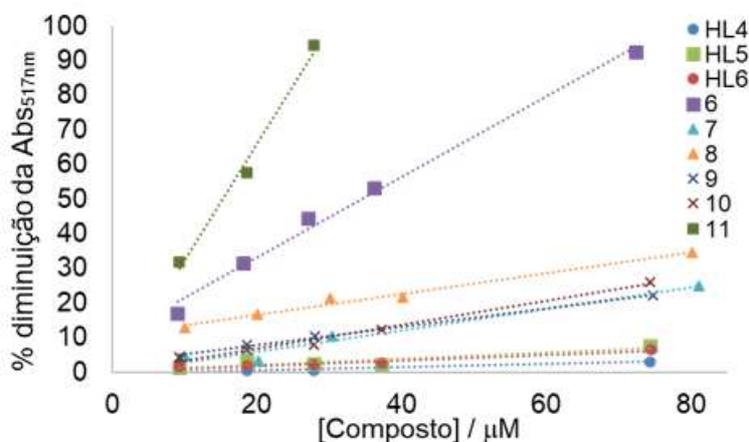


Figura 4.7. Diminuição (em percentagem) da absorção a 517 nm das soluções de DPPH em metanol obtidas com várias concentrações dos compostos estudados (1.4 – 83.5 μ M).

Os pró-ligandos livres não exibem capacidade para inibir o radical de DPPH, porém após a complexação essa atividade aumenta significativamente para todos os complexos (**Tabela 4.4**). Os complexos **7-10** (complexos que contêm a cromona substituída) apresentaram valores de IC_{50} semelhantes e moderados. No entanto, o complexo **6**, demonstrou capacidade de inibir o radical DPPH com valores de IC_{50} aproximadamente 4 vezes superior aos restantes complexos do tipo $[\text{M}(\text{L}^n)]^+$,

sugerindo que pequenas diferenças na densidade eletrônica (grupos funcionais eletrodoadores ou aceitadores) podem ter grande influência na capacidade antioxidante. Comparando **7** e **9**, não foram observadas diferenças significativas nos valores de EC_{50} , no entanto, a introdução de phen nos centros metálicos de Cu(II) e V(IV)O (complexos **9** e **11**, respetivamente) originou um aumento na sua atividade de inibição de formação de radicais livres sendo este aumento de aproximadamente uma ordem de grandeza para **11**, com valores muito próximos do controlo positivo: ácido ascórbico.

Tabela 4.4. EC_{50} (μM) da atividade de inibir o DPPH para os compostos sintetizados. O controle positivo foi o ácido ascórbico (AC) e n.a. significa que o composto não tem atividade.

	HL4-6	6	7	8	9	10	11	AC
IC_{50} (μM)	n.a.	35.3	162.8	131.1	179.0	145.7	16.6	11.6

4.3.3. Estudos de citotoxicidade

A estabilidade dos compostos é relevante para evitar efeitos tóxicos provocados pela sua decomposição precoce (antes de serem internalizados pela célula) e de modo a avaliar corretamente os resultados obtidos nos ensaios biológicos. Com base nos estudos de estabilidade hidrolítica, **9**, **10** e **11** revelaram ter estabilidade suficiente para prosseguir os ensaios, apesar de **10** mostrar alguns indícios de especiação, a sua extensão não é considerável. Semelhante afirmação pode ser atribuída para **8**, sendo que as maiores alterações podem dever-se a agregações, pela observação da diminuição global dos espectros de absorbância ao longo do tempo. Desta forma os complexos e respetivos pró-ligandos foram incubados em três linhas celulares humanas tumorais diferentes: (HeLa-cervical, LN229-glioblastoma e da MDA-MB 231-mama) e uma linha celular saudável (EPR_{cel.})- epitélio pigmentar da retina) para avaliar sua citotoxicidade (**Tabela 4.5**). Em geral, os complexos são mais citotóxicos do que os respetivos pró-ligandos, apesar dos pró-ligandos também apresentarem atividade citotóxica, principalmente para tempos de incubação mais elevados. Os complexos apresentaram praticamente a mesma atividade às 48 e 72 horas, com exceção do **8**, que é menos ativo em todas as linhagens celulares. O complexo **9** mostrou ser o complexo mais ativo contra todas as linhas celulares.

Esta família de complexos demonstrou maior atividade citotóxica para a linha celular MDA-MB 231, revelando a falta de seletividade. Às 24h quase todos os complexos e pró-ligandos têm atividade citotóxica em todas as linhas celulares com a exceção dos pró-ligandos e do complexo **8** para a linha celular normal (EPR_{cel.}) e do complexo **11** para a linha celular Hela e dos pró-ligandos para a linha celular LN229, revelando ter alguma seletividade para este período de incubação. No entanto esta seletividade às 24h é patente para todos os complexos com exceção do complexo **9**, que é de facto muito citotóxico quando comparado aos outros complexos. A introdução do co-ligando phen nos complexos aumenta a atividade biológica em todas as linhas celulares.

Tabela 4.5. Citotoxicidade (IC₅₀ em $\mu\text{M} \pm \text{DP}$) dos pró-ligandos e complexos em três linhas celulares tumorais humanas da cervical (HeLa), glioblastoma (LN229) e da mama (MDA-MB 231) e linha celular humana normal epitélio pigmentar da retina (EPR_{cel.}) após três diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72h). Em que l.c. significa linhas celulares e t. i. tempo de incubação. Ensaio realizado pela Dra. Ceyda Acilan da *School of Medicine, Koç University, Sariyer, Turkey*.

l. c.	t. i. (h)	HL5	HL6	8	9	10	11
HeLa	24	33.12±1.08	32.61±5.32	41.29±5.63	3.99±0.96	41.17±12.7	>50
	48	10.85±0.53	12.31±0.81	29.76±8.23	1.88±0.03	4.57±0.30	2.93±0.42
	72	11.93±2.64	11.41±1.66	10.35±0.17	2.15±0.04	4.28±0.30	2.92±0.66
LN229	24	>50	47.87±1.56	41.34±4.70	7.42±0.49	20.48±4.95	12.30±0.40
	48	41.69±1.36	36.85±4.19	42.23±9.54	4.62±0.07	7.54±1.10	4.22±0.34
	72	36.85±4.19	30.71±4.48	46.39±5.28	3.43±0.16	6.09±0.30	3.43±0.28
MDA-MB 231	24	21.39±1.39	15.86±1.03	12.64±1.64	2.82±0.18	14.68±2.17	8.82±0.72
	48	13.50±0.88	11.63±0.95	8.30±1.75	1.97±0.10	7.27±0.95	4.12±0.20
	72	14.62±0.24	11.79±0.80	15.22±8.03	2.32±0.27	6.94±0.91	3.85±0.31
RPE	24	>50	>50	>50	4.96±1.51	41.6±0.00	31.65±2.06
	48	28.01±4.09	17.38±0.57	32.39±2.11	1.21±0.01	4.74±1.81	3.59±0.06
	72	33.33±5.4	14.9±4.07	27.31±3.11	1.07±0.05	2.41±0.47	1.60±0.04

4.3.4. Estudos de interação com o ADN

A avaliação da interação dos complexos com o ADN foi realizada por espectroscopia de absorção no UV-Vis., incluindo a determinação da constante de ligação para **9**, uma vez que este complexo possui maior citotoxicidade contra as linhas de células tumorais estudadas e mostrou ser o composto mais estável em meio aquoso tamponizado a pH fisiológico.

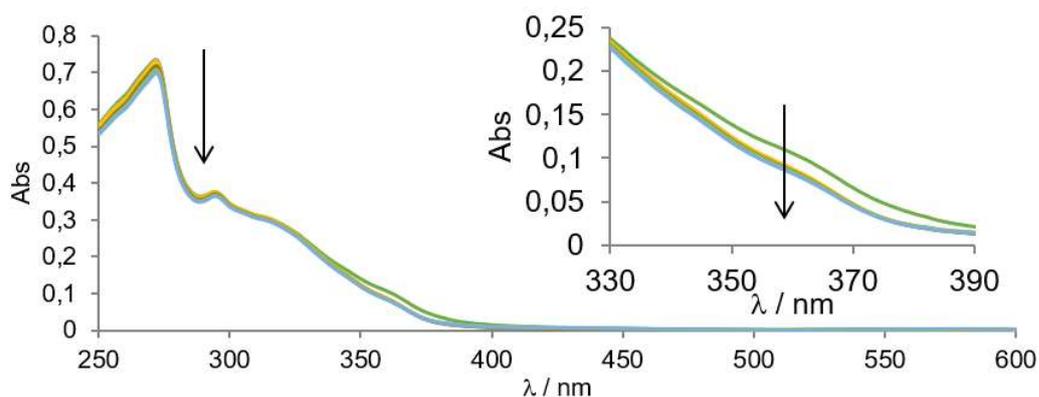


Figura 4.8. Espectros de absorção electrónica do complexo **9** (17.4 μM) em tampão PBS (10 mM, pH 7.4) e após adição de ADN ($[\text{ADN}] = 2.6 - 64.7 \mu\text{M}$). Gráfico inserido: Expansão da região dos espectros entre 330 e 390 nm. As setas indicam o sentido das alterações com aumento da concentração de ADN.

O aumento da concentração de ADN numa solução contendo **9** origina a diminuição da absorvância em todas as bandas de transição associadas ao complexo (**Figura 4.8**), mas é mais perceptível na região em torno de $\lambda = 360 \text{ nm}$ (aprox. 23% de diminuição da intensidade da absorvância) associada à banda LMCT de carga. A constante de ligação entre o ADN e **9** foi calculada de acordo com o modelo de Scatchard (**Figura 4.9**) obtendo-se um valor elevado ($5.2 \pm 3.4 \times 10^5$). Embora não se tenha observado nenhum efeito de hipocromismo em nenhum dos sistemas complexo:ADN, o efeito batocrómico foi observado para os complexos **7** e **11**. Como **7** apresentou um efeito semelhante quando estudado em meio aquoso ao longo do tempo, é difícil distinguir qual a influência do ADN. O complexo **11** apresenta claramente um desvio para a região do vermelho do espectro eletromagnético com aumento da concentração de ADN (**Figura 4.10**), sendo esse desvio de cerca de 5 e 2 nm para as bandas a 264 e 291 nm, respetivamente.

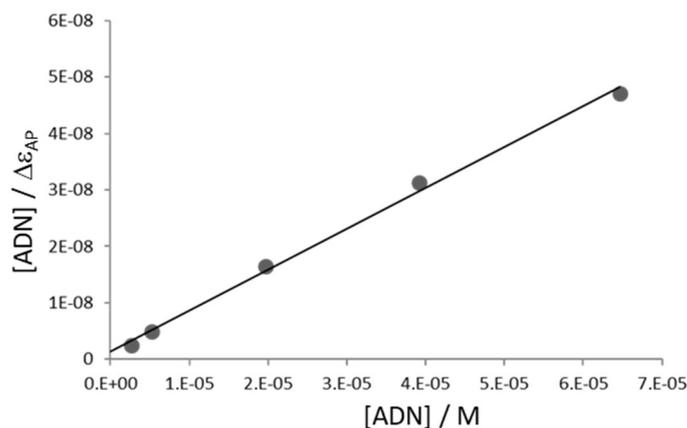


Figura 4.9. Gráfico de Scatchard obtido dos dados experimentais da titulação de **9** com ADN, sendo a constante de ligação obtida pela relação $[ADN]/\Delta\epsilon_{AP}$ vs $[ADN]$.

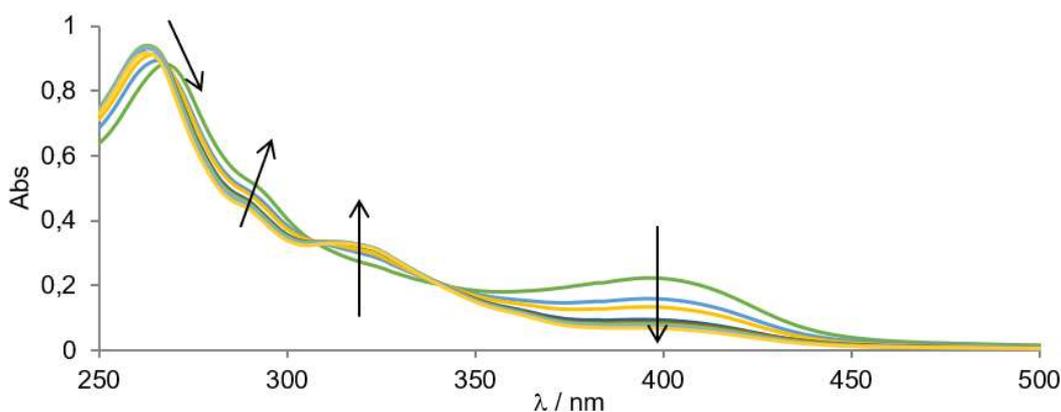


Figura 4.10. Espectros de absorção eletrônica de **11** (25,3 μ M) em tampão PBS (10 mM, pH 7.4) e após adição de ADN ($[ADN] = 2.6 - 77.3 \mu$ M). As setas mostram as alterações nas bandas de absorção com o aumento da concentração de ADN.

4.4. Interação com a BSA

4.4.1. Estudos de conformação da BSA

A medição da absorção UV-Vis. é um método simples e pertinente que é frequentemente usado para investigar mudanças estruturais da proteína. É relevante compreender o comportamento dos complexos no meio de incubação celular e em especial as possíveis interações com as macromoléculas nele existente. Tendo em conta a afinidade da BSA (existente nos meios de incubação celular) por alguns iões metálicos, incluído de cobre, realizaram-se ensaios para apreciar a interação de **9** à proteína.

As alterações de conformação da BSA foram investigadas por análise dos espectros de UV-Vis. e DC da BSA isolada e após adição de **9**. Os espectros de

absorção no UV-Vis. da proteína mostraram um pequeno desvio em torno de 278 nm para o vermelho após adição de **9** (Figura. 4.11). Este está relacionado com perturbações no microambiente dos resíduos de aminoácidos aromáticos.[28][29] Também foi observado um desvio da banda de absorção a cerca de 220 nm, que indica distúrbios do microambiente das ligações das amidas do "backbone" da BSA. Uma vez que a contribuição dos espectros de absorção de **9** foi eliminada por adição de iguais quantidades de complexo na célula da amostra e na de referência, as bandas que aparecem a aproximadamente 328 e 373 nm podem ser atribuídas a transições LMCT do novo complexo BSA:**9** formado.

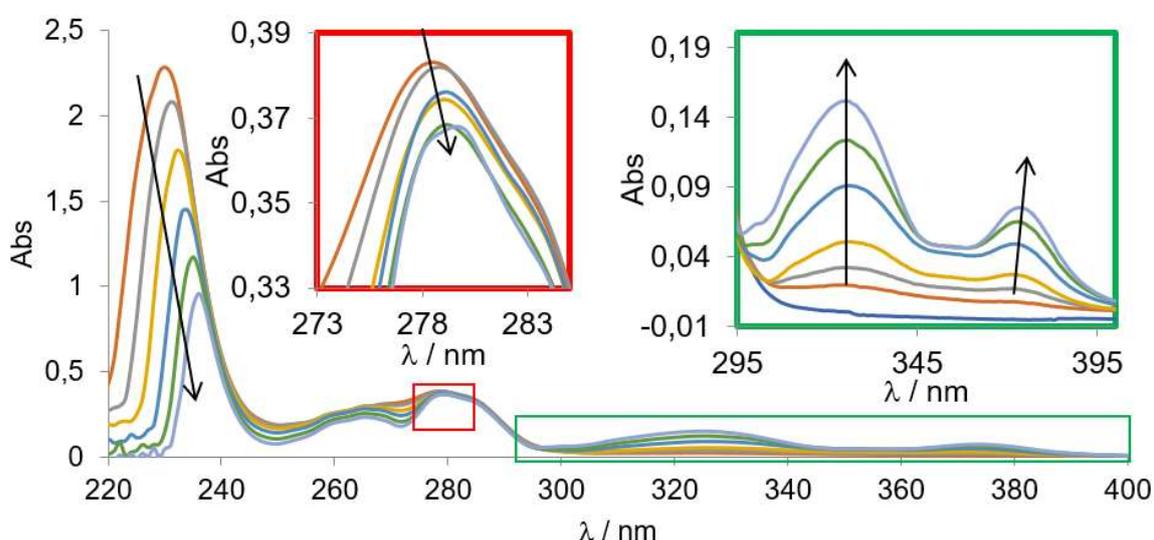


Figura 4.11. Espectros de absorção eletrônica de uma solução de BSA (10 μM) em tampão PBS (10mM, pH=7.4) titulada com **9**, com concentrações compreendidas entre 2.4 e 40.9 μM e %DMSO entre 0.1 a e 1.3 %. Figuras inseridas: **a)** expansão da região dos espectros entre 273 e 285 nm; **b)** expansão da região dos espectros entre 295 e 400 nm. As setas indicam variações de absorção com o aumento da concentração do complexo.

Além disso, não foram observadas alterações espectrais quando quantidades equimolares de BSA e **9** foram avaliadas ao longo do tempo (Figura 4.12), indicando que o complexo formado de BSA:**9** é estável e é formado de imediato.

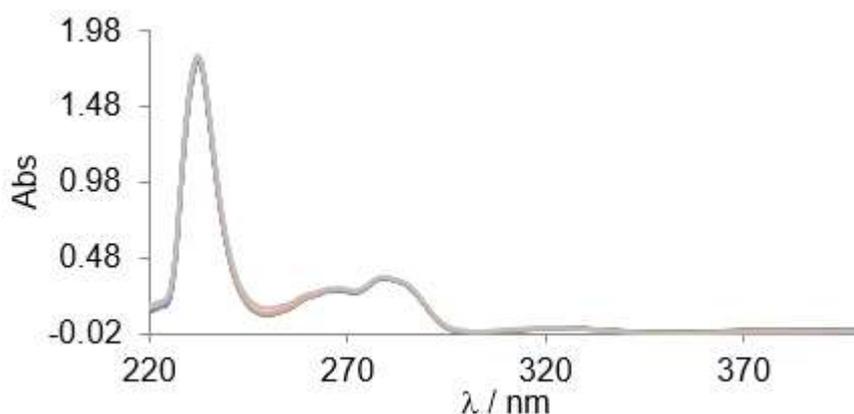


Figura 4.12. Espectros de absorção eletrónica de BSA (9.7 μM) com **9** (9.7 μM) medidos ao longo do tempo (total de 21h), em meio celular com 0.3 % DMSO.

Esses resultados indicam a existência de interações entre **9** e BSA. Estas foram investigadas com maior profundidade recorrendo a ensaios de dicroísmo circular (DC), que é uma técnica normalmente usada na avaliação de alterações de conformação das proteínas. O espectro de DC abaixo de 240 nm contém informações acerca das absorções das ligações dos peptídeos da estrutura secundária da proteína. Proteínas com elevada % de estruturas α -helicoidais exibem espectros de DC característicos, com duas bandas negativas a 208 e 222 nm. A solução de BSA tem claramente os dois mínimos a 208nm e 222 nm, correspondendo a 61.2 e 63.8% de hélice- α respetivamente, o que indica que a BSA no estado nativo tem elevada % de hélice- α quando comparado com valores da literatura de 54%. [29]

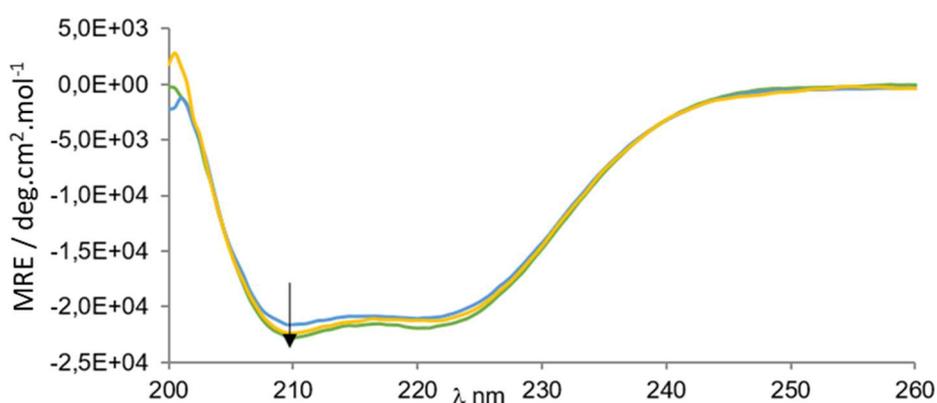


Figura 4.13. Espectros de DC de BSA (1.4 μM) na ausência e presença de diversas concentrações de **9**, com razões molares BSA/**9** de 0.3 a 0.6, medidos em tampão PBS (10mM, pH \approx 7.4) e metanol (< 0.7 % DMSO). As soluções foram medidas à temperatura ambiente e em célula de quartzo com percurso ótico de 0.2 cm. A seta indica a variação com a adição de **9**.

Para soluções contendo BSA e quantidades crescentes de **9**, existe um distúrbio na estrutura secundária de BSA, uma ligeira diminuição de cerca de 1.2 % na estrutura helicoidal (**Figura 4.13**). Os dados de DC obtidos a partir dos diferentes rácios de **9**/BSA foram analisados através da conversão das unidades de DC em miligráus de cada espectro para a correspondente elipticidade média dos resíduos de aminoácidos (MRE), para a previsão da estrutura secundária, de acordo com as equações apresentadas na secção experimental (8.6.4.)

4.4.2. Estudos de interação com a BSA

O estudo das interações entre complexos e proteínas na região visível do DC também pode fornecer informações relevantes. Um fenómeno conhecido resultado da interação entre moléculas quirais e aquirais que podem originar um sinal de DCI pelas substancias quirais. Para isso é necessário que a espécie resultante absorva na região eletromagnética em estudo. Ou seja, complexos oticamente inativos rodeados de um microambiente quiral (local de ligação da proteína) originam um DCI se houver absorção na região em estudo. Portanto é de esperar um DCI na região do visível caso haja interação entre os complexos e a proteína, isto porque os complexos absorvem na região visível (devido às transições d-d) e a BSA é quiral e não tem absorção nesta região do espectro eletromagnético.

A adição de uma solução de **9** à solução de BSA em tampão PBS, originou duas novas bandas nos espectros de DC (**Figura 4.14**). Uma negativa e outra positiva, com máximos a ca. de 480 e 560 nm, respetivamente. Estas bandas de DCI devem-se à absorção do cobre que adquire quiralidade após ligação à proteína. O aumento da razão molar Cu:BSA até 3 provoca a um aumento dos valores $|\Delta\epsilon|$, mas para razões molares superiores estes valores tendem a estabilizar. Os espectros obtidos são semelhantes aos espectros obtidos quando iões de Cu^{2+} são misturados com BSA, em que são observadas bandas a 480 e 560 nm, atribuídas ao ião metálico de cobre ligado ao BSA, provavelmente ao terminal N do local 1 da BSA.[30][31] Portanto é possível que os ligandos ião cloreto e phen se dissociassem de **9** e a espécie observada nos espectros de DC fosse Cu:BSA. No entanto, a ausência da formação de bandas na região $\lambda > 750$ nm e entre 350 e 400 nm, indica que o local 1 da proteína ainda não se encontra saturado, mesmo para razões **9**:BSA de 3.8. Esta observação sugere a presença de espécies silenciosas em solução, ou seja a coexistência do

complexo na sua estequiometria e formula original com uma espécie Cu(L5):BSA. Por outro lado, a falta da banda negativa a ca. 380nm com a adição de **9** sugere que phen não esteja ligado ao centro metálico-BSA, uma vez que esta banda pode ser atribuída ao ligando phen (ver capítulo VII para melhor compreensão). Nesse caso, à medida que a espécie Cu(L5):BSA aumenta o co-ligando phen em solução pode ter um alvo distinto. No meio de incubação celular a concentração de BSA é de cerca de 40 μ M (correspondente a 10% de FBS) correspondendo a um excesso em relação a composto **9** considerando a concentração de IC₅₀.

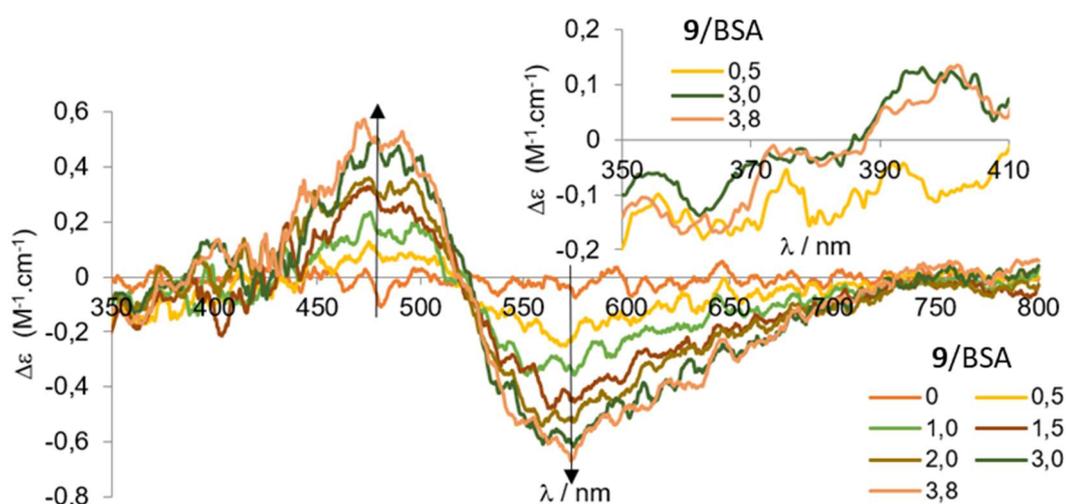


Figura 4.14. Espectros de DC adquiridos entre 430 e 780 nm de soluções com 476 μ M de BSA em PBS (10 mM, pH \approx 7.4) e após adição de soluções de **9** (< 6 % DMSO). Os rácios molares **9**:BSA encontram-se indicados na figura. O gráfico inserido correspondente à expansão entre 350 e 410 nm para as razões molares de **9**/BSA 0.5; 3.0; 3.8.

Para além do estudo das interações entre complexos e proteínas por DC, a avaliação dos espectros de absorção eletrónica destes sistemas é um procedimento simples e usual na exploração da formação de complexos entre pequenas moléculas e biomoléculas.[28]

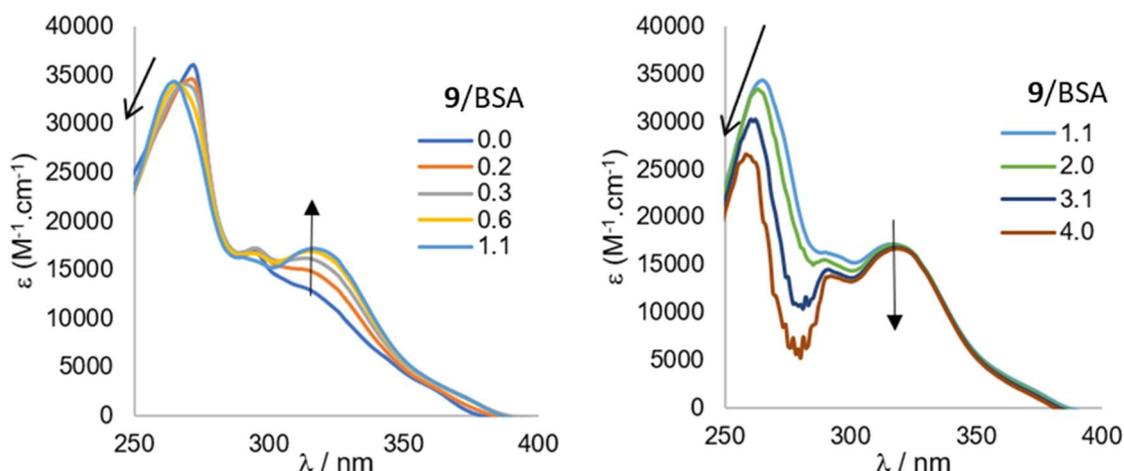


Figura 4.15. Espectros de absorção eletrônica de **9** ($26 \mu\text{M}$) titulado com BSA em PBS (10mM , $\text{pH}=7.4$) contendo aprox. 0.8% de DMSO, com: **a)** concentração de proteína variável entre 3.81 e $23.84 \mu\text{M}$ (até **9**:BSA $\approx 1:1$). **b)** concentração de proteína variável entre 23.84 e $81.39 \mu\text{M}$ (correspondendo a **9**:BSA entre $1:1$ a $1:4$). As setas indicam as alterações na absorção com o aumento da concentração de BSA. A contribuição da absorção da BSA foi corrigida pela subtração dos seus espectros em cada adição.

A **Figura 4.15** mostra os espectros da solução de **9** em tampão PBS e pH fisiológico e com quantidade crescente de BSA. Após a adição de BSA a absorvância a 317 nm aumenta até à razão molar BSA:**9** de $1:1$, indicando que existe a formação de um complexo do tipo [**9**:BSA] ou [BSA:Cu]. Para razões molares de BSA:**9** superiores a 1.1 os valores de absorvância a 317 nm estabiliza indicando que não existe espécies entre Cu^{2+} e BSA a serem formadas, pelo menos com força de ligação suficientemente forte para provocarem alterações espectrais. No entanto, a banda a 265 nm , atribuída a absorção $\pi\text{-}\pi^*$ dos anéis aromáticos, desvia para valores de maior energia que poderá indicar novas interações do complexo para outros locais, eventualmente nos locais mais hidrofóbicos da proteína com interação com os resíduos de Phe, Tryp, etc. Não obstante, nesta região existe a contribuição da absorção do DMSO.

4.4.3. Determinação da constante de ligação por extinção de fluorescência.

Estudos de extinção da fluorescência têm sido extensivamente utilizados para investigar interações entre proteínas e fármacos. A emissão de fluorescência intrínseca da BSA é atribuída aos resíduos de triptofano.[32] A intensidade da emissão de fluorescência de BSA a cerca de 339 nm diminuiu progressivamente com o aumento da concentração da solução de **9** sem ocorrência de desvios do máximo de emissão (**Figura 4.16**). Significando que o complexo **9** possui a capacidade de interagir com BSA, mas essa ligação não altera a polaridade do microambiente dos cromóforos fluorescentes. A adição de **9** a uma solução contendo BSA aumenta gradualmente a saturação dos locais de ligação à BSA. Assim, é possível obter informação sobre a constante de ligação e o número de locais de ligação usando os dados de extinção da emissão de fluorescência (após subtração da contribuição da emissão de fluorescência do complexo).

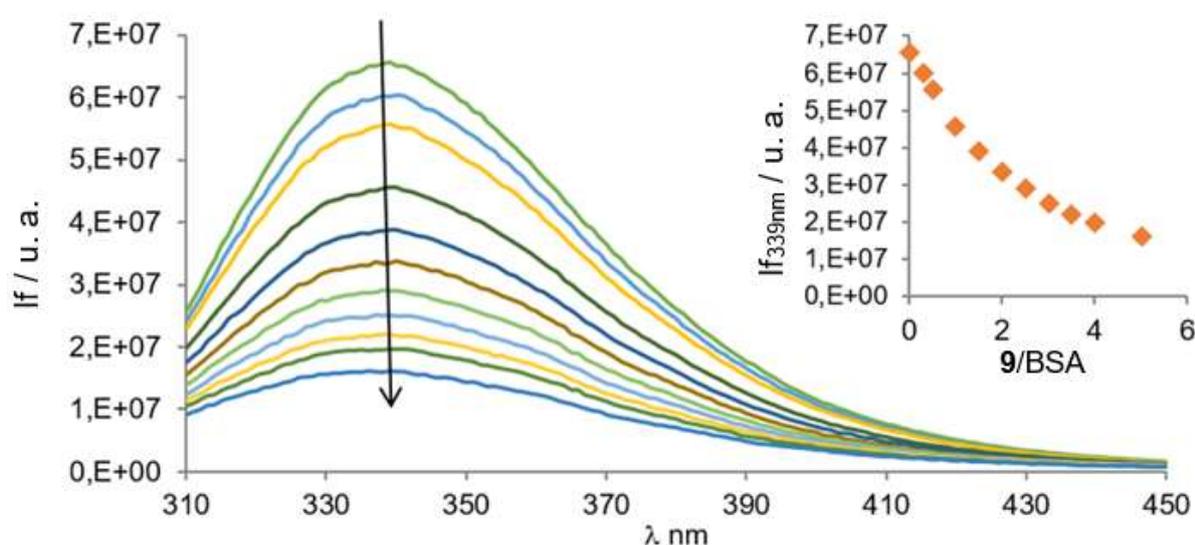


Figura 4.16. Espectros de emissão de fluorescência de BSA (1 μ M) com quantidades crescentes de **9** adquiridos à temperatura ambiente. A seta mostra a alteração da intensidade de emissão com o aumento da concentração do complexo. O gráfico inserido mostra a variação de da intensidade de fluorescência a 339nm em função de **9**/BSA. $\lambda_{\text{excitação}}^{\text{max}} = 292 \text{ nm}$.

O número dos locais de ligação foi obtido recorrendo ao ajuste dos dados experimentais com o modelo matemático de Scatchard. Este número de ligação foi de $n \approx 1.3$, que se encontra em concordância com a razão molar de 1:1 para o complexo BSA:**9** obtida nos ensaios de titulação analisados por DC. A constante de Stern-

Volmer foi também determinada (**Tabela 4.6**). A constante de ligação determinada entre BSA e **9**, usando o modelo de Scatchard foi de $K_{BC} = 2.6 \times 10^5$ enquanto a constante de Stern-Volmer tem um valor de 4.2×10^5 , que correspondem a uma afinidade elevada.

Tabela 4.6. Número de locais de ligação e constantes de ligação de **9** à BSA, obtidos pela aplicação dos modelos Scatchard e Stern-Volmer à extinção da emissão de fluorescência.

	Número de locais de ligação	Scatchard	Stern-Volmer
Complexo	n	$K_{BC} (\times 10^{-5})$	$K_{SV} (\times 10^{-5})$
9	1.3	2.6	4.2

Os dados de extinção da emissão de fluorescência podem também fornecer informações sobre o mecanismo de extinção. A extinção de fluorescência requer o contacto entre o fluoróforo e o agente de extinção, sendo geralmente aceites dois mecanismos: a extinção dinâmica e a extinção estática.[32] A colisão entre o fluoróforo e o agente de extinção resulta no mecanismo de extinção dinâmica, enquanto que a extinção estática resulta na formação de um aducto entre o complexo e a proteína que não é fluorescente. A linearidade observada no gráfico de Stern-Volmer obtido a partir dos dados experimentais da extinção da emissão de fluorescência sugere um mecanismo de extinção possivelmente estático.[33]

4.5. Conclusões

No presente trabalho, seis novos complexos foram sintetizados e caracterizados por diversas técnicas analíticas. A estabilidade dos complexos foi avaliada em ambiente fisiológico, e a sua citotoxicidade foi avaliada em linhas celulares tumorais e normais. Os complexos **6** e **7** sofrem especiação em meio aquoso e é observada a existência de precipitação para os restantes (possivelmente pela formação de hidróxidos dos metais) ou sofrem alterações ligeiras que podem ser atribuídas a trocas de iões com o meio. A BSA contribui para solubilizar os complexos e, eventualmente, interage com pelos menos os complexos de cobre. Em meios celulares, **9** interage com a BSA, como evidenciado pela alteração da estrutura secundária da proteína, apesar de muito ligeira. O complexo forma uma nova espécie com estequiometria equimolar de forma imediata e estável ao longo do tempo. Essa

interação foi explorada recorrendo a técnicas de espectroscopia de absorção e DC demonstrando que a ligação é no local 1 e a constante de associação entre **9** e BSA elevada (aprox. 3×10^5). Para que essa ligação ocorra é necessário que o íon de cobre se dissocie de possivelmente a phen. Essa especiação terá influencia na citotoxicidade observada para as células tumorais, uma vez que a phen e as espécies de cobre formadas podem atuar em alvos distintos com poder citotóxico diferenciado. A especiação sofrida no meio celular pode também aumentar a toxicidade no organismo, uma vez que podem interagir com outras biomoléculas existentes na corrente sanguínea.

A citotoxicidade dos complexos **9**, **10** e **11**, mais estáveis nos meios aquosos, foi avaliada em 3 linhas celulares humanas tumorais (HeLa, LN229 e MDA-MB 231) uma linha celular saudável (RPE_{cel.}). Em geral, os complexos são mais citotóxicos do que os pró-ligandos livres e para tempos de incubação elevados (48 e 72h), todos os complexos apresentaram boa citotoxicidade, mas baixa seletividade. O único período onde há evidencia de seletividade é após 24h de incubação, com a exceção de **9** que é bastante citotóxico em todos os ensaios realizados. A presença da phen revelou ser muito mais citotóxica quando coordenada com Cu(II) do que para V(IV)O, sobretudo para períodos de incubação curtos. No entanto, na presença de BSA os complexos podem não se encontrar na sua fórmula original, pelo que a ação citotóxica poderá dever-se, em parte, à ação da phen e da espécie resultante em separado, não descartando a influencia dos pró-ligandos estudados que também mostraram afetar a viabilidade celular. Sabendo que **9** contendo phen é estável em meio aquoso, sem a presença de albumina, estudou-se a sua interação com o ADN. O complexo demonstrou capacidade para interagir com o ADN, com uma constante de ligação elevada ($5.2 \pm 3.4 \times 10^5$).

A capacidade de inibir a formação de radicais livres foi também apreciada relevando que a complexação aumenta a atividade em todos os pró-ligandos. A introdução de grupos funcionais influencia a capacidade de inibir o radical DPPH dos complexos do tipo $[M(L^n)]^+$. Podendo este facto estar relacionado com a influencia na densidade eletrónica induzida por eles. A introdução de phen nos centros metálicos de Cu(II) e V(IV)O é diferenciada, afetando positivamente mais o complexo de oxidovanádio(IV), com valores muito próximos do ácido ascórbico.

4.6. Referências

- [1] **L. T. A. Hoang, T. C. Nguyen, H. Y. Pham, X. N. Nguyen, H. T. Bui, T. T. Do, H. N. Nguyen, M. C. Van, K. P. Van e H. K. Young.** *Letf. Drug Des. Discov.*, 2015, 12, pp. 385-392.
- [2] **A. Gaspar, M. J. Matos, J. Garrido, E. Uriarte e F. Borges.** *Chem. Rev.*, 2014, 114, pp. 4960-4992.
- [3] **K. M. Khan, N. Ambreen, U. R. Mughal, S. Jalil, S. Perveen e M. I. Choudhary.** *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, 45, pp. 4058-4064.
- [4] **K. M. Khan, N. Ambreen, S. Hussain, S. Perveen e M. I. Choudhary.** *Bioorgan. Med. Chem.*, 2009, 17, pp. 2983-2988.
- [5] **S. Singh, A. T. Baviskar, V. Jain, N. Mishra, U. C. Banerjee, P. V. Bharatam, K. Tikoo e M. P. S. Ishar.** *Med. Chem. Commun.*, 2013, 4, pp. 1257-1266.
- [6] **J. E. Philip, S. A. Antony, S. J. Eeettinilkunnathil, M. R. P. Kurup e M. P. Velayudhan.** *Inorg. Chim. Acta*, 2018, 469, pp. 87-97.
- [7] **G. Kalaiarasi, S. R. J. Rajkumar, S. Dharani, N. P. Rath e R. Prabhakaran.** *Polyhedron*, 2019, 173, pp. 114125-114133.
- [8] **G. Kalaiarasi, S. R. J. Rajkumar, S. Dharani, N. P. Rath e R. Prabhakaran.** *J. Photoch. Photobio. B*, 2018, 180, pp. 77-88.
- [9] **K. A. Myannik, V. N. Yarovenko, E. K. Beloglazkina, A. A. Moiseeva e M. M. Krayushkin.** *Polyhedron*, 2018, 139, pp. 208-214.
- [10] **F. Arjmand, F. Sayeed e M. Muddassir.** *J. Photoch. Photobio. B*, 2011, 103, pp. 166-179.
- [11] **N. H. Kolhe e S. S. Jadhav.** *Res. Chem. Intermediat.*, 2019, 45, pp. 973-996.
- [12] **D. C. Ilies, E. Pahontu, S. Shova, R. Georgescu, N. Stanica, R. Olar, A. Gulea e T. Rosu.** *Polyhedron*, 2014, 81, pp. 123-131.
- [13] **Y. Li, Z. Y. Yang, Z. C. Liao, Z. C. Han e Z. C. Liu.** *Inorg. Chem. Commun.*, 2010, 13, pp. 1213-1216.
- [14] **Z. C. Liu, B. D. Wang, B. Li, Q. Wang, Z. Y. Yang, T. R. Li e Y. Li,** *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, 45, pp. 5353-5361.
- [15] **G. Kalaiarasi, S. R. J. Rajkumar, S. Dharani, V. M. Lynch e R. Prabhakaran,** *Inorg. Chim. Acta*, 2018, 471, pp. 759-776.
- [16] **P. Kavitha, M. Saritha e K. L. Reddy.** *Spectrochim. Acta A*, 2013, 102, pp. 159-168.
- [17] **M. Saif, H. F. El-Shafiy, M. M. Mashaly, M. F. Eid, A. I. Nabeel e R. Fouad.** *J. Mol. Struct.*, 2016, 1118, pp. 75-82.
- [18] **T. Anand, A. S. K. Kumar e S. K. Sahoo,** *Photoch. Photobio. Sci.*, 2018, 17, pp. 414-422.
- [19] **T. Rosu, E. Pahontu, M. Reka-Stefana, D. C. Ilies, R. Georgescu, S. Shova e A. Gulea.** *Polyhedron*, 2012, 31, pp. 352-360.
- [20] **M. Gaber, N. El-Wakiel, K. El-Baradie e S. Hafez.** *J. Iran. Chem. Soc.*, 2019, 16, pp. 169-182.
- [21] **T. P. Gerasimova e S. A. Katsyuba.** *Dalton Trans.*, 2013, 42, pp. 1787-1797.
- [22] **S. S. Singh.** *Z. Naturforsch.*, 1969, 24, pp. 2015-2028.

- [23] **C. P. Matos, Z. Adiguzel, Y. Yildizhan, B. Cevatemre, T. B. Onder, O. Cevik, P. Nunes, L. P. Ferreira, M. D. Carvalho, D. L. Campos, F. R. Pavan, J. C. Pessoa, M. H. Garcia, A. I. Tomaz, I. Correia e C. Acilan**, *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, 176, pp. 492-512.
- [24] **C. D. A. Leon, L. A. R. Guerrero, P. M. B. Valladares, G. A. Echeverria, O. E. Piro, S. E. Ulic, J. L. Jios e P. Langer**. *Monatsh. Chem.*, 2019, 150, pp. 1929-1940.
- [25] **H. L. Xu, N. N. Yao, H. R. Xu, T. S. Wang, G. Y. Li e Z. Q. Li**. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, 14, pp. 14185-14203.
- [26] **A. Rockenbauer e L. Korecz**. *Appl. Magn. Reson.*, 1996, 10, pp. 29-43.
- [27] **U. Sakaguchi e A. W. Addison**. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1979, 4, pp. 600-608.
- [28] **W. Bal, J. Christodoulou, P.J. Sadler e A. Tucker**. *J. Inorg. Biochem.*, 1998, 70, pp. 33-39.
- [29] **I. Correia, T. Jakusch, E. Cobbinna, S. Mehtab, I. Tomaz, N. V. Nagy, A. Rockenbauer, J.C. Pessoa e T. Kiss**. *Dalton Trans.*, 2012, 41, pp. 6477-6487.
- [30] **O. P. Sharma e T. K. Bhat**. *Food Chem.*, 2009, 113, pp. 1202-1205.
- [31] **D. J. Li, M. Zhu, C. Xu, J. J. Chen e B. M. Ji**. *Spectrochim. Acta A*, 2011, 78, pp. 74-79.
- [32] **J. I. Gowda e S. T. Nandibewoor**. *Spectrochim. Acta A*, 2014, 124, pp. 397-403.
- [33] **J. V. Goodpaster e V. L. McGuffin**. *Appl. Spectrosc.*, 1999, 53, pp. 1000-1008.

- Capítulo I - Introdução
- Capítulo II - Objetivos
- Capítulo III - Complexos de cobre com bases de Schiff derivados do piridoxal com potencial terapêutico.
- Capítulo IV - Complexos de íões de metal constituídos por bases de Schiff de cromonas e piridoxal como potenciais agentes antitumorais
- **Capítulo V - Complexos de íões de metal com bases de Schiff derivados da vitamina B₆**
- Capítulo VI - Complexos de vanádio com 1,10-fenantrolina e derivados
- Capítulo VII - Comportamento dos complexos do tipo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ em meios celulares e a sua influência na citotoxicidade
- Capítulo VIII - Secção experimental
- Capítulo IX - Considerações finais
- ANEXOS

5.1. Fundamentos

O número de complexos de íons de metal de cobre ou vanádio constituídos por SB derivados da vitamina B₆ em que tenham sido feitos estudos de aplicação terapêutica antitumoral reportados na literatura é muito baixo. Sendo os de cobre,[1]-[7] mais relevantes, geralmente constituídos por uma unidade derivado da vitamina B₆ e a outra por semi-(SC), tiosemi-(TSC) e isotiosemicarbazonas (ITSC), poliaminas ou aminoácidos. Porém, alguns desses estudos, como por exemplo o descrito por Back e colaboradores, em que os complexos de Cu(II)[7] foram avaliados em relação ao seu potencial impacto na atividade da catecolase, biomimética de SOD (SOD-1) e interação com ADN plasmídeo, não foram suportados por ensaios em células de modo a permitir direcionar os estudos e perceber quais os efeitos provocados por esses complexos. Complexos de vanádio constituídos por ligandos dessa natureza são ainda menos descritos na literatura.[8]-[10] Não obstante, a atividade biológica do complexo de V(IV) com pyr₂en (**Figura 5.1**) foi avaliada, e este mostrou possuir boa seletividade entre células neoplásicas e normais, além de possuir a capacidade de induzir a morte celular por apoptose, com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), conjugado com a despolarização da membrana mitocondrial, numa vasta série de linhas celulares tumorais.[11] Além disso, o complexo homólogo (**II**) revelou possuir boa capacidade de inibir a progressão tumoral em modelos *in vivo*, assim como atividade antitumoral em diversas linhas de células humanas, com capacidade de induzir danos oxidativos no ADN.[12]

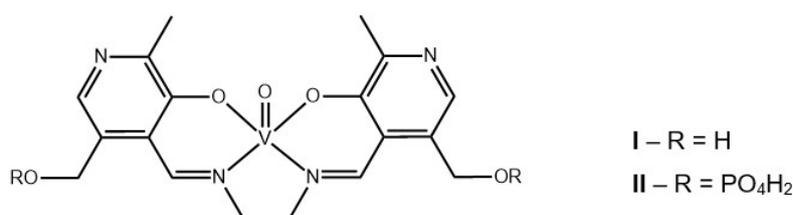


Figura 5.1. Estruturas dos complexos [VO(pyr₂en)₂] (I) e seu derivado (II).

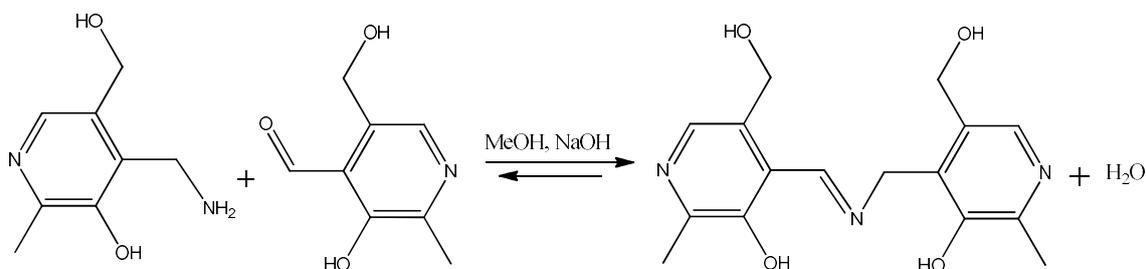
Inspirados nestes estudos, e de modo a complementar os resultados obtidos e apresentados nos capítulos III e IV, fazia sentido estudar complexos constituídos por um ligando de uma base de Schiff obtida pela condensação de apenas duas unidades derivados da vitamina B₆.

Assim, sintetizaram-se cinco complexos de Cu(II) e V^{IV}O com o pró-ligando **H₂L7** (**Figura 5.2**) e phen ou 5-amina-1,10-fenantrolina (amphen) como co-ligandos.

Os complexos e o pró-ligando precursor **H₂L7** foram caracterizados pelas técnicas habituais e a estabilidade dos complexos foi avaliada em meio tamponizado com PBS a pH 7.4, com o propósito de mimetizar os meios fisiológicos. Foram também realizados ensaios biológicos para avaliar a citotoxicidade dos complexos sintetizados e do respetivo pró-ligando livre, **H₂L7**, em células de osteossarcoma MG63, uma forma agressiva de cancro ósseo. Adicionalmente, foram realizados ensaios preliminares, *in vitro*, na tentativa de compreender o modo de ação de **13**. Para isso, foi avaliada a sua capacidade em induzir a produção de ROS, na mesma linha celular, assim como o perfil de morte celular, alcançado pela quantificação da externalização da fosfatidilserina (PS) induzida através da marcação da anexina.

5.2. Pró-ligando de base de Schiff derivado da vitamina B₆ (**H₂L7**)

O pró-ligando **H₂L7** foi sintetizado em metanol com catálise básica, a partir da reação da piridoxamina com o piridoxal com a obtenção de um sólido amarelo (**Esquema 5.1**). O produto foi caracterizado por análise elementar, espectrometria de massa, e espectroscopias de RMN, absorção no UV-Vis. e FTIR. A análise elementar confirma a fórmula proposta e o ião molecular foi identificado por espectrometria de massa em ambos os modos (positivo e negativo).



Esquema 5.1. Esquema reacional da síntese realizada para obter o pró-ligando de base de Schiff derivado da vitamina B₆ (**H₂L7**).

O espectro de ¹H-RMN de **H₂L7** (**Figura 5.2**) foi adquirido em DMSO-d₆ e todos os picos foram atribuídos com base em experiências de 2D-RMN, tais como HSQC, HMBC e COSY. Apesar das duas unidades constituintes do pró-ligando conterem muitas semelhanças estruturais, os espectros apresentaram sensibilidade e resolução suficiente para distinguir e atribuir todos os sinais. O sucesso da síntese deste pró-ligando foi confirmado pela presença do sinal a 9.0 ppm atribuído ao próton da imina formada. O pico extremamente desblindado a 14.3 ppm deve-se à formação de pontes

de hidrogénio entre o protão fenólico H⁸ e a imina (este apresenta um pico cruzado com um protão a 9.0 ppm atribuído à imina em experiência de COSY-RMN).

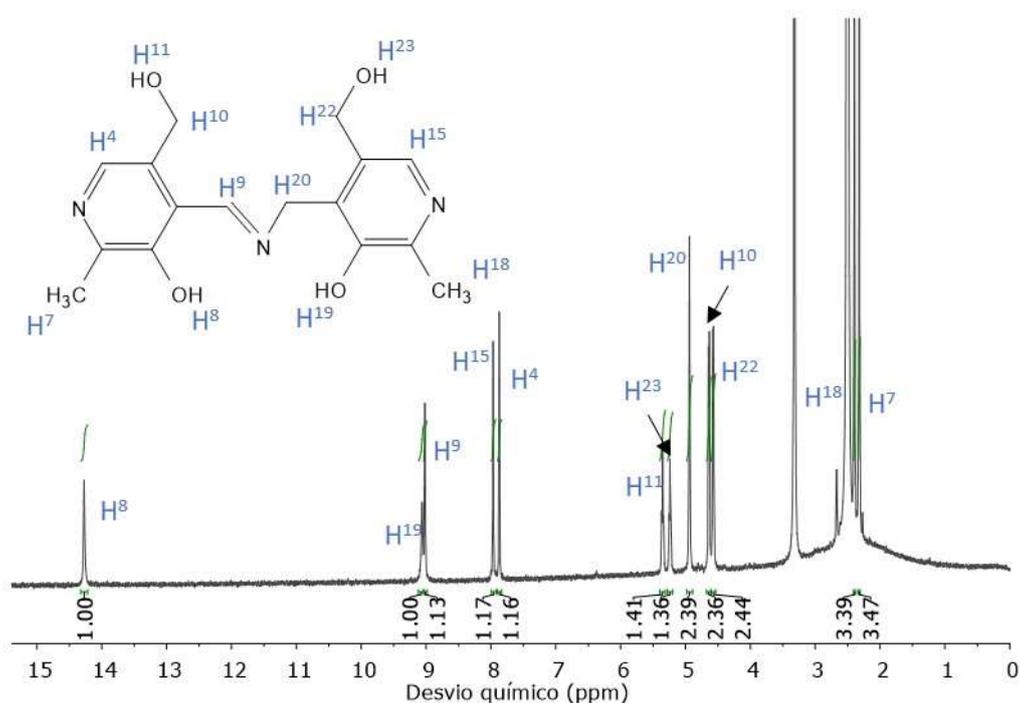


Figura 5.2. Espectro de ¹H RMN de H₂L7 adquirido em DMSO-d₆ a 400MHz.

O espectro de FTIR do H₂L7 no estado sólido apresenta uma banda larga a 3342 cm⁻¹ que corresponde a ν(O-H) dos grupos fenólicos, provavelmente sobreposta com ν(O-H) dos grupos álcool alifáticos. As bandas ν(C-H)_{aromático} e ν(C-H)_{alifático} foram observadas a 3158 cm⁻¹ e 2914 cm⁻¹ respetivamente, sendo que a banda a 2760 cm⁻¹ pode ser atribuída à ν(C-H)_{alifático} dos grupos metileno. A banda forte correspondente a ν(C-N)_{imina} foi identificada a 1631 cm⁻¹.

De um modo geral, os resultados da caracterização do pró-ligando H₂L7 confirmam a fórmula proposta. É de esperar que este pró-ligando coordene com metais divalentes, uma vez que os grupos fenólicos podem facilmente desprotonar originando um quelato do tipo ONO de 6+6 membros.

5.3. Complexos Cu(II) e V(IV)O

A síntese dos complexos de Cu^{II} e V^{IV}O, apresentados na **Figura 5.3**, foi efetuada de acordo com os procedimentos usados nos capítulos anteriores (ver também a secção experimental - 8.2.2.4.).

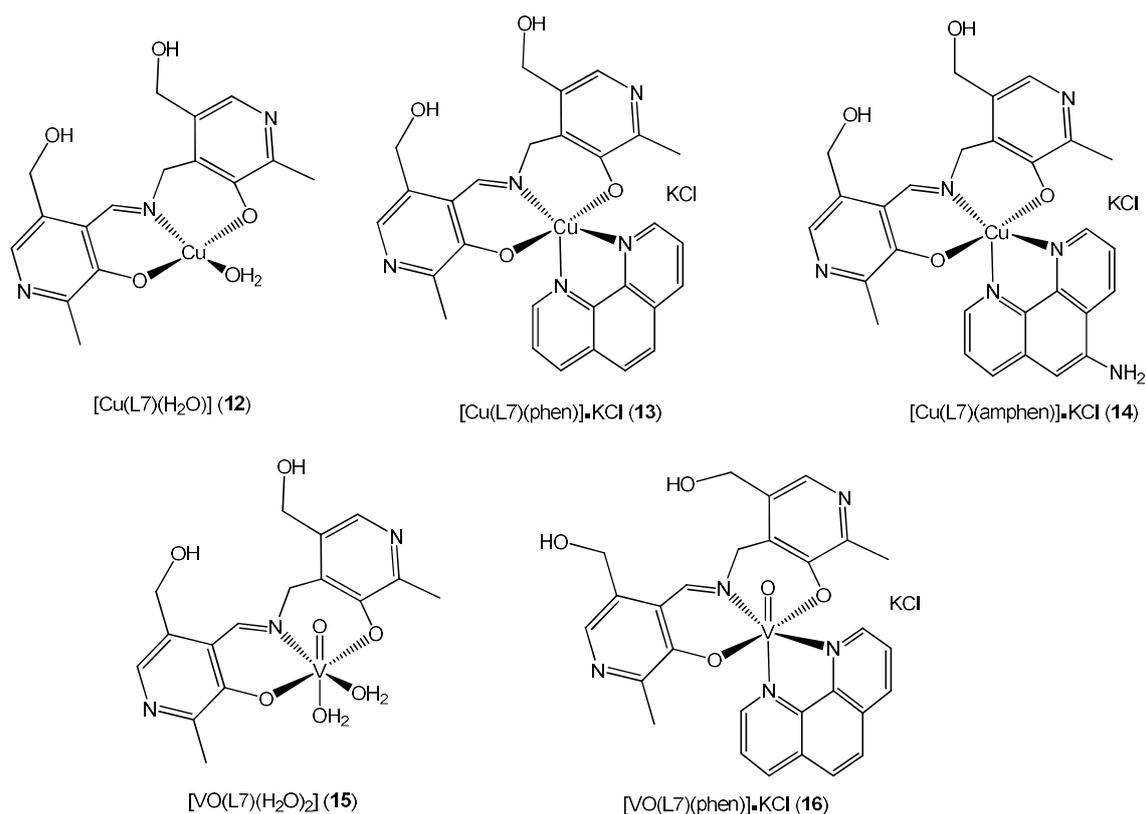


Figura 5.3. Estrutura dos complexos de Cu(II) e V(IV).

Os complexos foram obtidos com a adição do precursor metálico (CuCl_2 ou $\text{V}^{\text{IV}}\text{OSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a uma solução do pró-ligando **H₂L7** em metanol, seguida da adição de uma solução de base (NaOH ou KOH). Os complexos **13**, **14** e **16** resultaram da adição do co-ligando num segundo passo. As estequiometrias e fórmulas propostas para os complexos foram essencialmente efetuadas com base nos resultados obtidos através de análises elementares e confirmadas por espectrometria de massa, FTIR e UV-Vis. A maioria dos complexos foi obtida com rendimentos razoáveis.

Os espectros de FTIR dos complexos no estado sólido mostraram uma banda larga na região $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ devido à presença de grupos hidroxilo ou moléculas de água coordenadas nos complexos ou na estrutura tridimensional da amostra. Mesmo assim, foi possível distinguir uma banda nos espectros dos complexos entre $3252\text{--}3242\text{ cm}^{-1}$, atribuída a $\nu(\text{O-H})$ da cadeia lateral do piridoxal. Porém, esta banda não foi observada para **14**, devido à sobreposição da banda $\nu(\text{N-H})$ a 3212 cm^{-1} proveniente do co-ligando amphen. A banda acentuada a 3342 cm^{-1} , atribuída ao alongamento $\nu(\text{OH})$ do pró-ligando livre **H₂L7**, não foi detetada nos espectros dos complexos devido ao envolvimento do oxigénio fenólico na coordenação ao ião metálico. A $\nu(\text{C-N})_{\text{imina}}$ nos complexos sofreu um desvio para menores números de

onda entre 2-16 cm^{-1} devido à ligação do átomo de nitrogénio ao centro metálico (**Tabela 5.1**).

Tabela 5.1. Bandas de FTIR selecionadas e respetivas atribuições dos complexos e respetivo pró-ligando **H₂L7**. Espectros obtidos em pastilhas de KBr (em cm^{-1}).

Composto	$\nu(\text{O-H})_{\text{fenol./\acute{a}gua}}$	$\nu(\text{O-H})_{\text{alifat.}}$	$\nu(\text{C=N})_{\text{imina}}$	$\nu(\text{C-O})_{\text{fenol.}}$
H₂L7	3342	3244	1631	1262
12	3395	3242	1627	1264
13	3398	3249	1629	1262
14	3397	----	1619	1259
15	3400	3252	1615	1261
16	3404	3246	1628	1261

Os espectros de absorção eletrónica dos complexos, assim como do pró-ligando precursor, foram adquiridos em DMSO à temperatura ambiente (ver **Figura 5.4** e **Tabela 5.2**). As bandas na região entre 268-295 nm são as de maior intensidade incluindo no pró-ligando livre (**H₂L7**), pelo que podem ser atribuídas a transições $\pi-\pi^*$ do pró-ligando. As bandas observadas nesta região aumentam de intensidade para os complexos que contêm o co-ligando phen e derivados, atribuídas às transições $\pi-\pi^*$ dos anéis aromáticos.

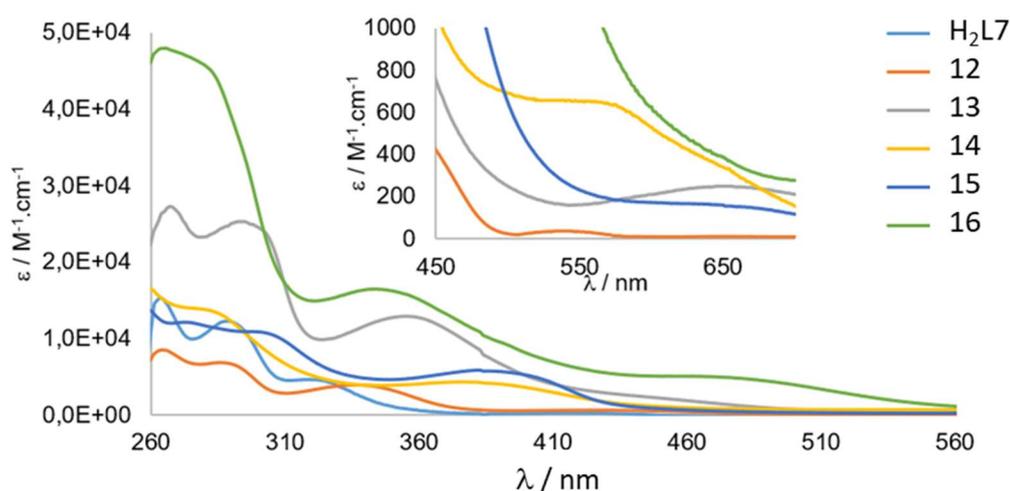


Figura 5.4. Espectros de absorção eletrónica dos complexos de Cu(II) e V(IV) assim como do pró-ligando precursor livre, obtidos em DMSO à temperatura ambiente. Gráfico inserido é a expansão da região as absorções das correspondentes às bandas d-d.

A banda intensa, com o máximo de absorção a $\lambda_{\text{max.}} = 325$ nm observada no espectro do pró-ligando **H₂L7** é atribuída à imina. Após a coordenação com os íons metálicos esta banda sofre um desvio para menor energia em todos os complexos, sendo que para **14** e **15** a banda LMTC se sobrepõe (**Tabela 5.2**). Comparando **12** com **13** verifica-se que o desvio da banda atribuída à imina é superior dado que a phen introduz alguma densidade de carga negativa adicional ao centro metálico e desta forma o efeito sobre as transições eletrônicas da imina são menores. São observadas bandas de LMTC em todos os complexos atribuído às transições dos grupos fenolatos para o centro metálico.

Tabela 5.2. Bandas de absorção eletrônicas dos complexos obtidos em DMSO à temperatura ambiente. Os valores de ϵ são apresentados em $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. $\lambda_{\text{max/nm}} (\epsilon)$

Complexo	Intra-ligando		LMTC		Metal (d-d)
H₂L7	291 (11957)	325 (4639)	-----	-----	----
12	267 (8450)	290 (6664)	459 (552)	340 (3845)	543 (36)
13	266 (29098)	298 (25143)	446 (2285)	355 (12906)	652 (248)
14	261 (14671)	280 (14142)	379 (3585) (Sobreposta)		562 (601)
15	273 (12182)	299 (10975)	386 (5674) (Sobreposta)		----
16	278 (43962)	278 (43962)	464 (5047)	348 (14461)	----

A geometria adotada pelos compostos foi determinada com recurso à técnica de espectroscopia de RPE (banda-X). Curiosamente, o composto **12** não é suficientemente solúvel em metanol de modo a poder obter um espectro com qualidade suficiente para ser simulado. Os compostos foram dissolvidos em metanol e adquiridos a 77 K. Não foi observado nenhum acoplamento superhiperfino e na região de $g \approx 2.07$. A banda mais intensa com $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2.0$, implica a existência de um estado fundamental $d_{x^2-y^2}$ situado numa geometria de base quadrada. A simulação dos espectros da **Figura 5.5a** foi efetuada com o programa de simulação da literatura[13] após calibração de acordo com os espectros de DPPH que permitiu obter os parâmetros do Hamiltoniano de spin (**Tabela 5.3.**). De acordo com o gráfico de Peisach-Blumberg,[14] os átomos coordenados ao metal situam-se dentro da linha de tendência O_4/N_2O_2 , de acordo com a estrutura formulada (NO_3). O índice de distorção ($g_z/|A_z|$) dos complexos **13** e **14** é 128 e 131 cm que se enquadra na geometria de coordenação de base quadrada, assim é possível que as geometrias sejam a piramidal quadrangular para **13** e **14**. [15]

Em relação aos espectros de V(IV)O, estes apresentam estrutura hiperfina com simetria axial. Os espectros das bandas X de RPE obtidos estão representados na **Figura 5.5b** e um exemplo do espectro de **14** incluindo a sua simulação na **Figura 5.6**. A regra da aditividade[16] permite a previsão da constante de acoplamento hiperfino $|Az|$, que está relacionada com o número e tipos de ligandos ligados ao centro metálico no plano equatorial, sendo que essa constante também depende do grau da distorção da geometria.[17] Assim, foram consideradas para a formação das ligações ao metal as contribuições de dois átomos O_{fenolato} ($38.9 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$), N_{imina} ($44.4 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) e O_{H₂O} ($45.7 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) para obter o valor de $167.9 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ estimado para $|Az|$ de **15**. Para o complexo **16** considerou-se que os átomos piridínicos da phen se encontram coordenados na posição axial e equatorial - N_{phen} $39 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ - com o V^{IV} e o ligando **L7** na posição equatorial. Desta forma o valor de $|Az|_{\text{estimado}}$ é de $161.2 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ e a geometria octaédrica distorcida poderá ser a geometria adotada para os complexos **15** e **16**. São várias as estruturas com ligandos semelhantes em que as bases Schiff apresentam um modo de ligação equatorial e os heterociclos aromáticos N,N doadores se ligam nas posições "axiais-equatoriais".[18]-[20]

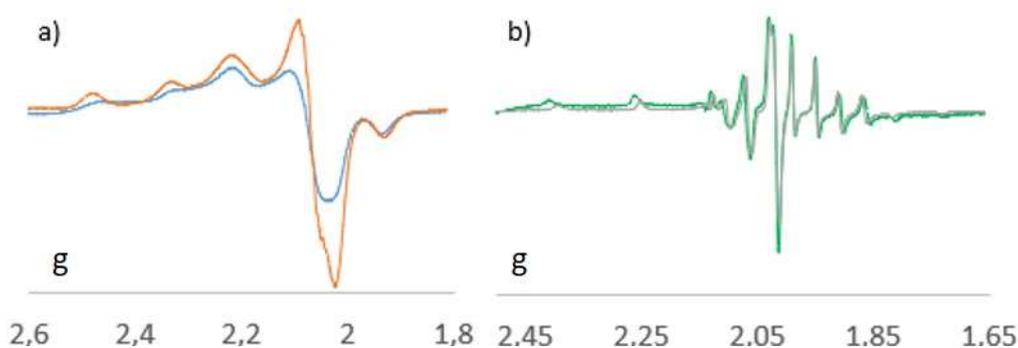


Figura 5.5. Espectros de RPE de 1ª derivada à frequência da banda X medido a 77K, em MeOH para os complexos: **a)** **13** a 3.9 mM (laranja); **14** a 4.0 mM, e **b)** **15** a 2.6 mM (verde) e **16** a 3.5 mM (cinzento).

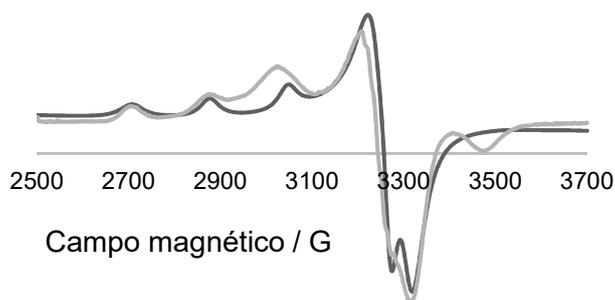


Figura 5.6. Espectro de RPE medido para **14** em DMSO (aprox. 5 mM) e respetivo espectro simulado obtido pelo programa ROKI[13] que originou os parâmetros listados na **Tabela 5.3**. A calibração foi efetuada tendo em consideração os espectros de DPPH para cada medição.

Tabela 5.3. Parâmetros do Hamiltoniano de spin obtidos a partir da simulação[13] dos espectros de RPE dos complexos de Cu(II) e V(IV)O **13-16**.

Complexo	g	$g_{x,y}$	Az ($\times 10^4 \text{ cm}^{-1}$)	$A_{x,y}$ ($\times 10^4 \text{ cm}^{-1}$)	$g_{x,y}/ Az $ (cm)	Az _{estimado} ($\times 10^4 \text{ cm}^{-1}$)
13	2.295	2.088	181	12	128	---
14	2.262	2.063	172	9	131	---
15	1.970	1.989	167	69	---	168
16	1.974	1.987	159	59	---	161

Os resultados obtidos com as várias técnicas experimentais indicam que os complexos mononucleares possuem uma unidade do ligando base de Schiff e moléculas de água, coordenados ao centro metálico. Os dados obtidos por espectrometria de massa indicaram a presença dos iões moleculares e a coordenação ao centro metálico foi confirmada pela observação das bandas de transferência de carga do ligando para o metal com a participação da imina. A existência dos co-ligandos foi confirmada pela observação de bandas intensas na região entre 260 e 300 nm nos espectros de absorção eletrónica. As geometrias de coordenação de base quadrada para os complexos de Cu(II) e octaédrica para os complexos de V(IV)O foram deduzidas pelas experiências de RPE.

5.4. Estabilidade hidrolítica

A estabilidade dos complexos **12** e **13** em meio aquoso tamponizado a pH 7.4 foi estudada à temperatura ambiente com quantidades de DMSO inferiores a 1% (v/v). Os resultados são apresentados na **Figura 5.7**.

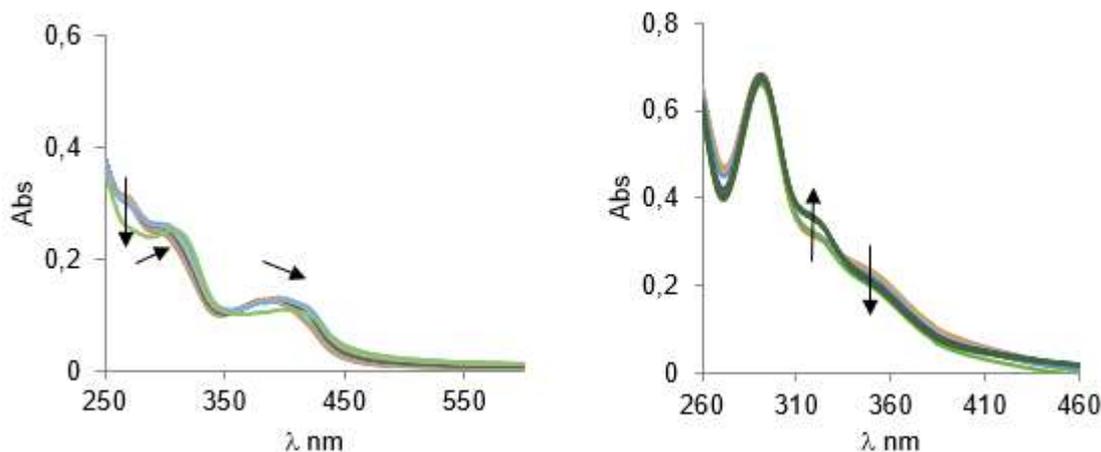


Figura 5.7. Espectros de absorção eletrônica de **12** (esquerda) e **13** (direita) adquiridos até 24 h em HEPES e PBS, respectivamente, à temperatura ambiente. A concentração dos compostos foi de 25 μM .

São observadas ligeiras alterações para ambos os complexos ao longo do tempo, principalmente para tempos mais longos. À semelhança dos resultados obtidos e apresentados previamente nas outras séries de complexos (capítulos III e IV), a introdução da phen estabiliza os complexos de Cu(II). Apesar de serem identificados pontos isobésticos, as alterações observadas não afetam dramaticamente o espectro, estas alterações podem ser resultado da dissociação das espécies dinucleares e/ou troca iônica no centro metálico e não devido à hidrólise dos complexos em meio aquoso.

5.5. Viabilidade de células MG63 determinada pelo método MTT

A citotoxicidade dos complexos **12** a **16** e do pró-ligando precursor **H₂L7**, foi avaliada após 24 h de incubação em células tumorais de osteossarcoma MG63 e está apresentada, em valores de IC₅₀, na **Tabela 5.4**. Estes estudos foram efetuados pelo grupo do Dr. Ignacio Leon na *Facultad de Ciencias Exatas da Universidade Nacional de La Plata*. Para efeitos de comparação incluiu-se o valor de IC₅₀ da cisplatina obtido em condições de incubação semelhantes.[21] Globalmente, as atividades citotóxicas dos compostos seguem a ordem decrescente de citotoxicidade: **13** > **14** > **16** > **12** > **15** >> **H₂L7**. Todos os complexos apresentaram citotoxicidade, com valores de IC₅₀ compreendidos entre 3.7 μM a 87.8 μM , contrariamente ao pró-ligando livre que não demonstrou ter atividade citotóxica (IC₅₀ > 100 μM) às 24 h de incubação. Torna-se assim evidente a influência da ação dos iões metálicos nos complexos para o

mecanismo de morte celular. Os resultados revelam, também, que os complexos de Cu^{II} são, mais citotóxicos que os complexos homólogos de V^{IV}O correspondentes. É evidente que a inclusão dos co-ligandos nos complexos de íons de metal tem influencia na atividade citotóxica celular, tanto nos complexos de Cu^{II} como nos de V^{IV}O, sendo este efeito mais significativo para os compostos de Cu^{II}. Para os complexos de Cu^{II}, a incorporação do co-ligando phen ou amphen no complexo **12** aumenta a sua citotoxicidade em cerca de 13 e 7 vezes respetivamente, enquanto que a citotoxicidade de **16** é cerca de 4.6 vezes superior a **15** (complexo de V^{IV}O sem co-ligando). A influência destes co-ligandos nos complexos é também diferenciada para o tipo de metal usado, uma vez que a atividade citotóxica de **12** e **15** (é cerca de 2 vezes superior para o complexo de Cu^{II}), enquanto que a mesma comparação para os complexos homólogos contendo a phen: **13** e **16** é cerca de 5 vezes superior para o complexo de Cu^{II}. No que respeita à citotoxicidade dos complexos estudados que contêm co-ligandos, a phen revelou ser o co-ligando mais relevante para a série de complexos de Cu^{II}, sendo o complexo com maior citotoxicidade o **13**. Por outro lado, em condições experimentais semelhantes, a maioria dos complexos aqui estudados revelaram ter mais atividade citotóxica que a cisplatina (complexo de íão metálico de referência), com a exceção para os complexos sem co-ligando, com valores de IC₅₀ semelhante e superior para **12** e **15**, respetivamente.

Tabela 5.4. Citotoxicidade (IC₅₀ em µM) dos complexos e respetivo pró-ligando realizado em células tumorais de osteossarcoma após 24 h de incubação. ^aExperiências realizadas em DMEM suplementado com 10 % de FBS com 24 h de incubação. Estudos realizados pelo Dr. Ignacio Leon da *National University of La Plata*.

Complexo	H ₂ L7	12	13	14	15	16	Cisplatina[21]
IC ₅₀	283.3	48.51	3.7	7.2	87.84	19.14	58.0 ^a

5.6. Indução da produção de ROS em células MG63 em contacto com [Cu(L7)(phen)]•KCl

Com base nos resultados da viabilidade das células tumorais de osteossarcoma acima estudadas, selecionou-se o complexo **13**, com o valor de IC₅₀ mais baixo, para realizar ensaios que permitam avaliar a produção de ROS. Geralmente, são considerados bons candidatos para o desenvolvimento de novos

fármacos antitumorais os complexos mais citotóxicos e mais seletivos, uma vez que, deste modo, será necessária uma quantidade mais baixa do fármaco administrado e conseqüentemente será menos tóxico para o organismo. Contudo este fator não é determinante, considerando o exemplo da cisplatina, com um IC₅₀ de 58.0±0.5, e há que ter em conta outras propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas requeridas.[22]

A determinação de ROS intracelular produzida pelo efeito provocado pelo contacto das células de MG63 com o complexo **13** foi alcançada após incubação por um período de 24 h. De seguida, as células foram tratadas com Dihidro-rodamina-123 (DHR-123) que é oxidado, originando um produto fluorescente, a rodamina (ver secção experimental). Esta sonda foi então quantificada por espectroscopia de fluorescência que, indiretamente, permite avaliar as quantidades de intermediários ROS tais como peroxinitrito, H₂O₂ e o radical hidroxilo ·OH.[23]

A **Tabela 5.5** mostra a % de ROS produzida quando células MG63 são incubadas com diferentes concentrações de **13** durante 24 h. É notório o aumento da quantidade de ROS produzida no interior da célula quando a concentração do complexo **13** atinge os 2.5 µM (próximo do valor de IC₅₀ obtido nos ensaios de viabilidade celular). Este aumento significativo de formação de ROS intracelular é concordante com a significativa redução da viabilidade das células tumorais quando incubadas com **13** (**Figura 10.1** do **Anexo-10**). Apesar de se esperar um aumento mais gradual da formação de ROS à medida que a concentração de **13** aumenta, se observarmos o erro associada para cada ensaio, verifica-se que, tanto para concentrações de 1.5 µM como para 2.5 µM, o erro é de cerca de 30%.

Apesar de existir uma boa correlação entre o aumento da produção de ROS intracelular e a diminuição da viabilidade celular, não se pode atribuir inequivocamente o processo de morte celular à produção de ROS induzida pelo contacto das células com **13**, uma vez que podem existir outros mecanismos em paralelo que até podem ser mais relevantes. Seriam necessários ensaios controlo tal como a adição de antioxidantes antes de incubar o complexo nas células tumorais e observar se a viabilidade celular se mantêm, ou se diminui, com o risco de obter resultados inconclusivos, caso os antioxidantes não sejam capazes de suprimir o ataque de ROS.[24][25] Dada a semelhança estrutural entre **13** e **14**, e talvez de **12**, se assumirmos que o metal se dissocie do co-ligando para o meio de incubação celular

ou para o interior da célula, é possível que o modo de ação dos complexos de Cu(II) seja, no mínimo, similar.

Tabela 5.5. % de ROS formada em células tumorais de osteossarcoma MG63 após incubação com várias concentrações de **13** durante 24h. Ensaios realizados pelo Dr. Ignacio Leon da *National University of La Plata*.

[13] / μM	2.5	2	1.5	1	0.5	DMSO
% ROS	898.38 \pm	91.73	122.24	82.51	85.73 \pm	100.88
	308.73	\pm 8.40	\pm 31.96	\pm 7.47	10.59	\pm 10.13
% ERRO	34.4	9.2	26.1	9.1	12.4	10

5.7. Estudos de morte celular pela determinação do efeito provocado por [Cu(L7)(phen)]•KCl na externalização de fosfatidilserina (PS)

Sabendo que a morte celular ocorre, na generalidade, por apoptose ou necrose (entre outros) e esses processos são dependentes, em parte, da natureza do sinal que a desencadeia,[26] realizaram-se ensaios capazes de detetar a PS, que no exterior da membrana plasmática atua como sinal de reconhecimento para os macrófagos, que por sua vez promovem a eliminação das células apoptóticas. A PS é deslocada do interior para a superfície membranar em células que se encontram em processo apoptótico ou necrótico.

Desta forma, o método aqui usado consiste na deteção da PS existente no exterior da membrana plasmática através da ligação à proteína anexina V, que é marcada com um fluoróforo (VFITC) e em simultaneamente é adicionado iodeto de propídio (IP) que, ao intercalar na dupla hélice do ADN, emite fluorescência.[27] Desta forma, a utilização da citometria de fluxo para detetar as marcações descritas acima possibilita a distinção entre a apoptose e a necrose. A marcação da PS com a anexina V/ VFITC permite a quantificação das células em apoptose, assim como a adição de IP permite a quantificação das células em processo final de apoptose e de necrose, uma vez que o IP apenas consegue atravessar a membrana plasmática se existir perda da sua integridade. Consequentemente, os resultados obtidos com este método podem ser agrupados em quatro grupos distintos: **i)** células viáveis– onde as células não são marcadas nem pela anexina V/VFITC nem pelo IP (Vital). **ii)** células em apoptose inicial – células são identificadas pela anexina V/VFITC (An V+). **iii)** células em apoptose tardia ou necrose – células são identificadas pela anexina V/VFITC e pelo IP (An V+/IP+). **iv)** células em necrose – células identificadas pelo IP (IP+).

Para quantificar o efeito dos complexos na externalização membranar da PS escolheu-se o complexo **13** pelos mesmos motivos apresentados no estudo anterior. A **Figura 5.7** mostra os resultados obtidos após a incubação de **13** em células MG63 durante 24h com concentrações 1.5, 2.0 e 2.5 μM .

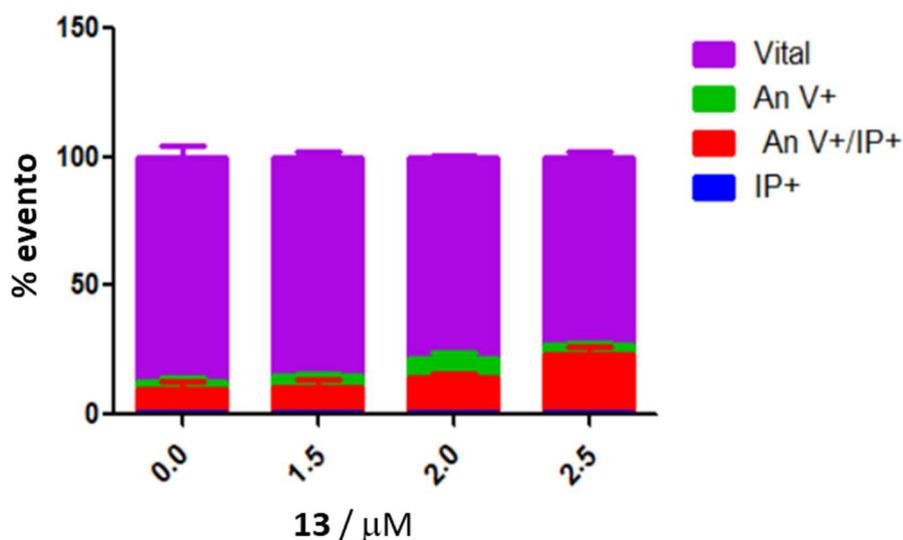


Figura 5.7. Gráfico de barras com a identificação de quatro subpopulações: i) Roxo - vitais não afetadas (anexinaV negativo/PI negativo); ii) Verde – vitais em processo apoptótico inicial (anexinaV positivo/PI negativo), iii) Vermelho - necróticas ou em processo apoptótico final (anexinaV positivo/PI positivo) e iv) Azul - vitais danificadas mecanicamente (anexinaV negativo/PI positivo). Os resultados são expressos em porcentagem de células reconhecidas com base na positividade de marcação para anexina V-FITC e IP em função da concentração de **13** incubada em células MG63. Ensaio realizado pelo Dr. Ignacio Leon da *National University of La Plata*.

Verifica-se que a população de células que perderam a sua integridade membranar (permeável ao IP), sem que se tenha desenvolvido a externalização de PS é insignificante, o que significa que não existe outro processo de morte celular para além apoptose. Os resultados obtidos demonstram uma exposição significativa da PS em células MG63 tratadas com **13** durante 24 h. É notório que a PS à superfície da membrana citoplasmática aumenta de acordo com a concentração do complexo **13**, à semelhança do aumento da produção de ROS e da redução da viabilidade celular

para concentrações crescentes de **13** (próximas de IC_{50}). Por outro lado, a permeabilização da membrana acompanha esse crescimento, indicando que o processo apoptótico final ocorre com a adição do agente agressor **13**, levando conseqüentemente à morte celular. Até à concentração de 2.5 μM cerca de 25% das células perde a sua viabilidade, pelo que é presumível que para a concentração de 3.7 μM , valor de IC_{50} obtido nos estudos de citotoxicidade, atinga os 50%. Desta forma, é razoável assumir que o processo de morte celular seja por apoptose provavelmente originada por alterações da estrutura celular, nomeadamente, a perda da integridade membranar e que este efeito possa ser provocado pela produção de ROS após contacto das células MG63 com **13**. No entanto, é de salientar novamente, que podem existir outros modos de ação a ocorrerem no interior da célula, sendo evidente a existência de um aumento na produção de ROS provocada pelos complexos de Cu(II) estudados, pelo menos do complexo **13**.

5.8. Conclusão

Cinco complexos de Cu(II) e $V^{IV}O$ de bases de Schiff derivados da vitamina B₆ e derivados da 1,10-fenantrolina foram sintetizados e caracterizados pelas técnicas usuais. As estequiometrias e fórmulas dos complexos proposta com base nos resultados de análise elementar foram confirmadas por espectroscopia de FTIR e absorção no UV-Vis., bem como espectrometria de massa. A coordenação do ligando pelos grupos fenolato e imina foi confirmada por alterações vibracionais destes grupos após complexação. A espectroscopia de UV-Vis. suportou que a coordenação do ligando ao centro metálico é efetuada pelo grupo imina devido aos desvios observados nos complexos quando comparados com o pró-ligando livre. A coordenação da phen foi também confirmada pelo aumento da intensidade das bandas de absorção na região entre 260 e 290 nm. O aparecimento de bandas LMCT são também indicação que o ligando se encontra coordenado aos iões metálicos. As geometrias dos complexos de Cu(II) e $V^{IV}O$ foram determinadas por espectroscopia de RPE (banda X), sendo eventualmente atribuída a geometria octaédrica distorcida para os complexos de $V^{IV}O$ e piramidal quadrangular para **13** e **14**.

Os estudos preliminares de estabilidade em meio aquoso tamponizado, efetuados com dois complexos revelaram que apesar de se observarem ligeiras alterações espectrais, que sugerem pequenas alterações estruturais, exibem potencial

para prosseguir para os estudos biológicos ou de interação com biomoléculas, uma vez que as modificações observadas ocorrem principalmente a tempos longos.

Estudos biológicos foram realizados em células agressivas de cancro ósseo, designadas por osteossarcoma MG63. Verificou-se um aumento da produção de ROS intracelular após o contacto com **13** e dependente da sua concentração, que se relaciona com a redução de viabilidade celular. Apesar de não se poder atribuir de forma inequívoca a morte celular à produção de ROS, esta não pode ser descartada. Foi também observado um aumento da externalização de PS, sinalizador de apoptose, acompanhado do aumento da permeabilidade membranar, dependente da concentração de **13** adicionada. Pelo que é razoável assumir que a morte celular seja por apoptose e possivelmente induzida, pelo menos em parte, pela produção de ROS induzida pelo complexo citotóxico **13**. No entanto, seriam necessários mais estudos de modo a esclarecer alguns destes aspetos.

5.9. Referências

- [1] **K. Murakami, Y. Miyake, S. Sasaki, K. Tanaka, W. Fukushima, C. Kiyohara, Y. Tsuboi, T. Yamada, T. Oeda, T. Miki, N. Kawamura, N. Sakae, H. Fukuyama, Y. Hirota e M. Nagai.** Br. J. Nutr., 2010, 104, pp. 757-764.
- [2] **S. Mooney, J. E. Leuendorf, C. Hendrickson e H. Hellmann.** Molecules, 2009, 14, pp. 329-351.
- [3] **J. S. Casas, M. D. Couce e J. Sordo.** Coord. Chem. Rev., 2012, 256, pp. 3036-3062.
- [4] **V. M. Leovac, V. S. Jevtović, L. S. Jovanović e G. A. Bogdanović.** J. Serbian. Chem. Soc., 2005, 70, pp. 393-422.
- [5] **M. B. Ferrari, G. G. Fava, P. Tarasconi, R. Albertini, S. Pinelli e R. Starcich.** J. Inorg. Biochem., 1994, 53, pp. 13-25.
- [6] **F. Bisceglie, M. Tavone, F. Mussi, S. Azzoni, S. Montalbano, S. Franzoni, P. Tarasconi, A. Buschini e G. Pelosi.** J. Inorg. Biochem., 2018, 179, pp. 60-70.
- [7] **M. B. Pereira, L. A. Fontana, J. D. Siqueira, B. L. Auras, M. P. Silva, A. Neves, P. Gabriel, H. Terenzi, B. A. Iglesias e D. F. Back.** Inorg. Chim. Acta, 2018, 469, pp. 561-575.
- [8] **J. D. Siqueira, A. C. O. Menegatti, H. Terenzi, M. B. Pereira, D. Roman, E. F. Rosso, P. C. Piquini, B. A. Iglesias e D. F. Back.** Polyhedron, 2017, 130, pp. 184-194.
- [9] **I. Correia, J. C. Pessoa, M. T. Duarte, R. T. Henriques, M. F. M. Piedade, L. F. Veiros, T. Jakusch, T. Kiss, A. Dörnyei, M. M. C. A. Castro, C. F. G. C. Geraldes e F. Avecilla.** Chem. Eur. J., 2004, 10, pp. 2301-2317.
- [10] **P. P. Hazari, A. K. Pandey, S. Chaturvedi, A. K. Tiwari, S. Chandna, B. S. Dwarakanath e A. K. Mishra.** Chem. Biol. Drug Des., 2012, 79, pp. 223-234.
- [11] **M. Strianese, A. Basile, A. Mazzone, S. Morello, M. C. Turco, e C. Pellicchia.** J. Cell. Physiol., 2013, 228, pp. 2202-2209.
- [12] **P. P. Hazari, A. K. Pandey, S. Chaturvedi, A. K. Tiwari, S. Chandna, B. S. Dwarakanath e A. K. Mishra.** Chem. Biol. Drug Des., 2012, 79, pp. 223-234.
- [13] **A. Rockenbauer e L. Korecz.** Appl. Magn. Res., 1996, 10, 29-43.
- [14] **W. E. Blumberg.** Arch. Biochem. Biophys., 1974, 165, pp. 691-708.
- [15] **U. Sakaguchi e A. W. Addison.** J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1979, 4, pp. 600-608.
- [16] **D. N. Chasteen.** *Biological Magnetic Resonance*, Eds. J. Reuben (Eds.), 1981 pp. 53.
- [17] **T. S. Smith II, R. LoBrutto e V. L. Pecoraro.** Coord. Chem. Rev., 2002, 228, pp. 1-18.
- [18] **J. Szklarzewicz, A. Jurowska, M. Hodorowicz e R. Gryboś.** Sci. Tech., 2019, 4, pp. 1-8.
- [19] **M. Sutradhara, L. M. D. R. S. Martinsa, M. F. C. G. Silva e A. J. L. Pombeiro.** Appl. Catal. A., 2015, 493, pp. 50-57.
- [20] **A. Banerjee, S. P. Dash, M. Mohanty, D. Sanna, G. Sciortino, V. Ugone, E. Garribba, H. Reuter, W. Kaminsky.** J. Inorg. Biochem., 2019, 199, pp. 110786-1107801.

- [21] **M. Altaf, N. Casagrande, E. Mariotto, N. Baig, A.-N. Kawde, G. Corona, R. Larcher, C. Borghese, C. Pavan, A. A. Seliman, D. Aldinucci e A. A. Isab.** *Cancers*, 2019, 11, pp. 474-488.
- [22] **D. G. Pereira.** *The importance of metabolism in drug design*. Ed. Quim. Nova, 2007, Vol. 30, N° 1, pp.171-177.
- [23] **J. A. Royall e H. Ischiropoulos.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993, 302, pp. 348-55.
- [24] **V. Scalcon, A. Bindoli e M. P. Rigobello.** *Free Radic. Biol. Med.*, 2018, 127, pp. 62-79.
- [25] **J. F. Cadavid-Vargas, P. M. Arnal, R. D. M. Sepúlveda, A. Rizzo, D. B. Soria e A. L. Di Virgilio.** *Biometals.*, 2019, 32, pp. 21-32.
- [26] **C. Burz, I. Berindan-Neagoe, O. Balacescu e A. Irimie.** *Acta Oncol.*, 2009, 48, pp. 811-821.
- [27] **G. D. Demetri, S. Antonia, R. S. Benjamin, M. M. Bui, E. S. Casper, E. U. Conrad, T. F. DeLaney, K. N. Ganjoo, M. J. Heslin, R. J. Hutchinson, J. M. Kane, G. D. Letson, S. V. McGarry, R. J. O'Donnell, I. B. Paz, John D. Pfeifer, R. E. Pollock, R. L. Randall, R. F. Riedel, K. D. Schupak, H. S. Schwartz, K. Thornton, M. V. Mehren e J. Wayne.** *J. Natl. Compr. Canc. Netw.*, 2010, 8, pp. 630-674.

- Capítulo I - Introdução
- Capítulo II - Objetivos
- Capítulo III - Complexos de cobre com bases de Schiff derivados do piridoxal com potencial terapêutico.
- Capítulo IV - Complexos de iões de metal constituídos por bases de Schiff de cromonas e piridoxal como potenciais agentes antitumorais
- Capítulo V -Complexos de iões de metal com bases de Schiff derivados da vitamina B₆
- **Capítulo VI - Complexos de vanádio com 1,10-fenantrolina e derivados**
- Capítulo VII - Comportamento dos complexos do tipo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ em meios celulares e a sua influência na citotoxicidade
- Capítulo VIII - Secção experimental
- Capítulo IX - Considerações finais

6.1. Fundamentos

Os compostos de vanádio exibem múltiplos efeitos biológicos. Nomeadamente, os íons de vanadato(V) podem atuar como inibidores da fosfatase,[1][2] exibindo efeitos semelhantes aos da insulina. Como consequência, a utilização de compostos de vanádio para o tratamento da diabetes tem sido frequentemente considerada uma aplicação promissora na área da medicina.[3][4]

Os complexos de vanádio podem facilmente sofrer reações redox,[1] sendo que alguns podem interagir com o ADN e/ou atuar como nucleases.[5][6] Outros compostos foram também testados como espermicidas,[7][8] anti-virais,[9] anti-HIV,[10] anti-tuberculose,[11] além de serem ativos na inibição e desagregação dos fibrilos de amiloides.[12]

Estudos mais recentes têm-se centrado no seu potencial antitumoral e efeitos contra parasitas, nomeadamente vários complexos de V(IV)-polipiridilo, assim como complexos mistos contendo ligandos de polipiridilo foram avaliados para este efeito.[5][13] Em particular, o $[V^{IV}O(OSO_3)(Me_2phen)_2]$, frequentemente designado por Metvan, e alguns análogos, foram considerados compostos com potencial aplicação antitumoral, mostrando propriedades citotóxicas e anti-invasivas.[14][15] Adicionalmente, a sua capacidade anti-proliferativa, citotóxica e de induzir apoptose foi testada e comparada com a da cisplatina, exibindo geralmente atividades superiores. Foram discutidos possíveis alvos biológicos e mecanismos de ação dos compostos de V-phen, de modo que a interação com o ADN (inativando o ADN e inibindo a proliferação celular) tem sido tipicamente considerado como sendo um dos mecanismos possíveis.[13] Foi também sugerida a capacidade de produção de ROS (com a depleção da glutathione, bem como a despolarização do potencial transmembranar da mitocôndria), inibição das proteínas tirosina fosfatases, atividade inibidora de metaloproteinases-matriz e efeitos sobre o metabolismo das mitocôndrias.[13][14]

As reações dos complexos de íons de metal com elementos dos meios de cultura celular são cruciais para avaliar a sua atividade biológica *in vitro*. [16] Os compostos de $V^{IV}O$ são muito suscetíveis à hidrólise[17][18] e os compostos de $V^{IV}O$ com ligandos de polipiridilo hidrolisam e/ou alteram muito mais a sua composição a baixa concentração (μM) quando comparados com concentrações superiores (mM).[19] A decomposição dos complexos de $V^{IV}O$ com ligandos de polipiridilo conduz

à libertação dos ligandos, que são por si só biologicamente ativos e citotóxicos.[20] Recentemente, o papel dos ligandos na citotoxicidade de $[V^{IV}O(OSO_3)(Me_2phen)_2]$ (Metvan) e de alguns outros complexos de $V^{IV}O$ semelhantes foram investigados com ensaios de estabilidade dos complexos em soluções aquosas neutras e em meios de cultura celular, em conjunto com ensaios de citotoxicidade em células tumorais do pulmão humano A549.[21] A principal conclusão resultante deste trabalho foi que a elevada citotoxicidade dos complexos $V^{IV}O$ testados com phen e derivados é causada pelo ligando polipiridilo livre após decomposição do complexo no meio de cultura celular, em oposição aos complexos de vanádio correspondentes. Contudo, neste estudo, as citotoxicidades só foram medidas após 72 h de incubação, e o estudo foi realizado apenas com a linha celular A549 e usando 2% de FBS. Com um tempo de incubação tão elevado, espera-se que a maioria dos complexos de $V^{IV}O$ oxidem em soluções deixadas ao ar; além disso, sabe-se que os efeitos citotóxicos são espectáveis dentro de tempos de incubação muito mais curtos. Por outro lado, mesmo que os compostos de $V^{IV}O$ -phen sejam hidrolisados a baixa concentração, podem sofrer alterações parciais ou totais após a ligação às membranas celulares, muito menos hidrofílicas. Curiosamente, na maioria dos estudos que determinam a distribuição do vanádio no interior das células, após a incubação com vários complexos de vanádio distintos, constatou-se que o vanádio se encontrava maioritariamente nas membranas celulares.[19]

Tal como já referido, os meios de cultura celular geralmente utilizados em estudos de citotoxicidade com células de mamíferos contêm frequentemente quantidades significativas de albumina de soro bovino, principalmente devido à adição de soro fetal bovino.[16] Foi estudada a ligação de sais e complexos de vanádio a proteínas, particularmente no que respeita aos compostos de vanádio como inibidores de fosfatase[1][2] e ao seu transporte no sangue.[4][21]

Neste capítulo, apresentamos novas experiências que visam esclarecer vários aspetos associados à citotoxicidade dos complexos de vanádio-phen. Três complexos de $V^{IV}O$ formulados como $[V^{IV}O(OSO_3)(phen)_2]$ (**17**), $[V^{IV}O(OSO_3)(Me_2phen)_2]$ (**18**) e $[V^{IV}O(OSO_3)(amphen)_2]$ (**19**), bem como $[V^{IV}O(OSO_3)(Bipy)_2]$ (**20**) foram preparados. Serão apresentados diagramas de distribuição das espécies modelando as ligações do oxidovanádio(IV) e do phen em meios de cultura celular. Adicionalmente, para esclarecer se a citotoxicidade de $V^{IV}O$ - com phen e ligandos derivados se deve ao ligando polipiridilo livre ou se existem outros efeitos (sinérgicos ou outros), realizámos

testes de citotoxicidade com as linhas celulares A2780, MCF7 e PC3 a vários tempos de incubação até às 72 h, bem como determinações de distribuição celular de V.

6.2. Caracterização dos complexos de V^{IV}O-Xphen

Três complexos de V^{IV}O-Xphen distintos foram preparados e caracterizados (ver secção experimental - 8.2.2.5.): [V^{IV}O(OSO₃)(phen)₂] (**17**), [V^{IV}O(OSO₃)(Me₂phen)₂] (**18**) e [V^{IV}O(OSO₃)(amphen)₂] (**19**). De entre todos, apenas [V^{IV}O(amphen)₂] não foi já previamente publicado. [V^{IV}O(Bipy)₂] (**20**) também foi sintetizado para efeitos de comparação. A preparação dos complexos de V^{IV}O foi realizada mediante a reação de V^{IV}OSO₄.5H₂O com dois equivalentes molares do respetivo ligando: 1,10-fenantrolina ou os seus derivados: 5-amino e 4,7-dimetil. As estequiometrias e fórmulas sugeridas para estes complexos (**Figura 6.3**) foram confirmadas com recurso a análises elementares e às técnicas espectroscópicas usuais (ver secção experimental - 8.2.2.5.).

Todos os complexos mostram uma banda de transição d-d na região do visível entre 680 e 710 nm (**Figura 6.1a**). Os espectros de RPE adquiridos a cerca de 100 K (**Figura 6.1b**) foram simulados[22] e os parâmetros do Hamiltoniano de spin determinados (**Tabela 6.1**).

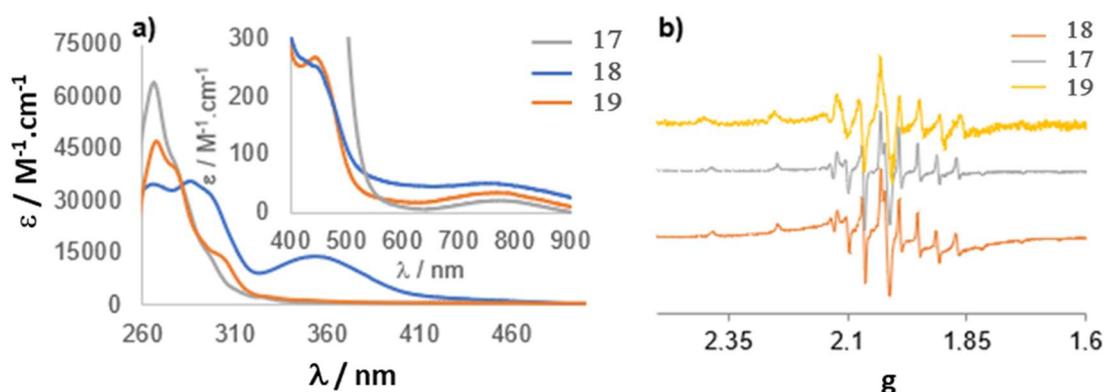


Figura 6.1. a) Espectros de absorção no UV-Vis. dos complexos de V^{IV}O em DMSO com concentrações a variar entre 24 e 47 μM. Gráfico inserido: Espectros na região atribuída às transições d-d. b) Espectros de RPE de 1^a derivada à frequência da banda X medidos a 77K de soluções em MeOH adquiridos a 100 K (aprox. 3 mM).

Tabela 6.1. Parâmetros do Hamiltoniano de spin obtidos[22] para **17**, **18**, **19** e **20** dissolvido em MeOH.

complexo	g_x, g_y	g_z	$ A_x , A_y \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$	$ A_z \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$
17	1.988	1.955	62	164
18	1.984	1.951	58	164
19	1.983	1.950	58	165
20	1.991	1.960	68	160

O composto $[V^{IV}O(OSO_3)(phen)_2]$, foi previamente caracterizado por difração de raios-X de cristal único (DRX-CU).[14] Também obtivemos cristais únicos deste complexo que foram usados para análise de DRX, sendo que os nossos resultados diferem ligeiramente dos publicados.

O diagrama ORTEP de **17** encontra-se na **Figura 6.2**, assim como mais detalhes são fornecidos na secção experimental (**Tabela-A9.1 e A9.2 do Anexo 9**). Uma estrutura semelhante foi publicada[14] com o mesmo ambiente de coordenação em torno do centro do vanádio, mas a estrutura que obtivemos tem várias diferenças importantes. O ligando SO_4^{2-} encontra-se virado para baixo considerando o plano equatorial formado pelos átomos N(1)-N(3)-N(4)-O(4) [desvio médio da planaridade, 0.0301(23) Å]. Adicionalmente, as interações estabelecidas no empacotamento cristalino são por interações π - π (ver **Figura 6.2B**) entre duas espécies enantioméricas. As nuvens eletrónicas π - π dos anéis phen interagem fortemente, embora de forma ligeiramente distorcidas lateralmente ($\approx 3,5$ Å). Na estrutura anteriormente publicada,[14] as pontes de hidrogénio são as interações predominantes e estas determinam a célula unitária. Na estrutura apresentada neste trabalho as ligações de hidrogénio também são importantes embora envolvam os dímeros, sendo que a distância entre a nuvem π de dois átomos de carbono e os anéis seguintes é idêntica, com a formação de dímeros em posição antiparalela entre cada duas moléculas por célula unitária.

Alguns complexos relacionados e caracterizados por DRX-CU são $[V^{IV}O(Cl)_2(MeOH)(phen)]$,[23] $cis-[V^{IV}O(OH)(bipy)_2]BF_4$,[24] $cis-[V^{IV}O(OH)(phen)_2]BF_4 \cdot H_2O$,[24] $[V^{IV}O_2(phen)_2]6H_2O$ [25] e $[V^{IV}O_2(bipy)_2](H_2BO_3)3H_2O$. [25] Em todos estes casos, os dois ligandos de polipiridina coordenam ao vanádio com um dos ligandos ligado de forma equatorial-axial. Assim, iremos considerar que **17-19** correspondem a geometrias de coordenação semelhantes.

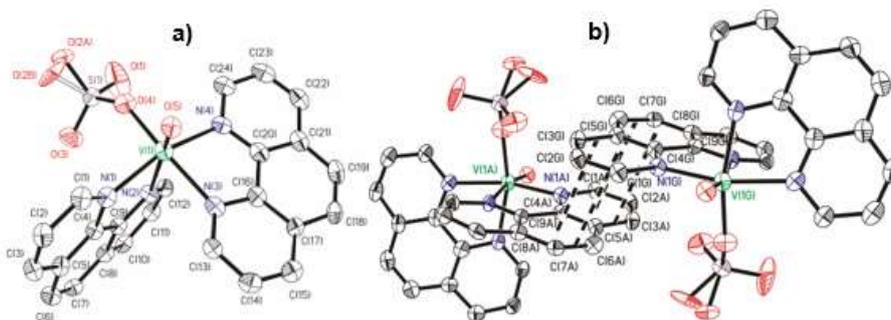


Figura 6.2. a) Diagrama ORTEP de **17**. Os átomos de hidrogénio e moléculas de água foram omitidos para uma melhor visualização espacial. b) Dímeros em posição antiparalela, onde são nítidas as interações π - π (mais relevantes no empacotamento cristalino). Todos os átomos são representados pelos seus elipsoides de probabilidade de 50%. (a **Figura A9.1** do **Anexo 9** mostra a célula unitária).

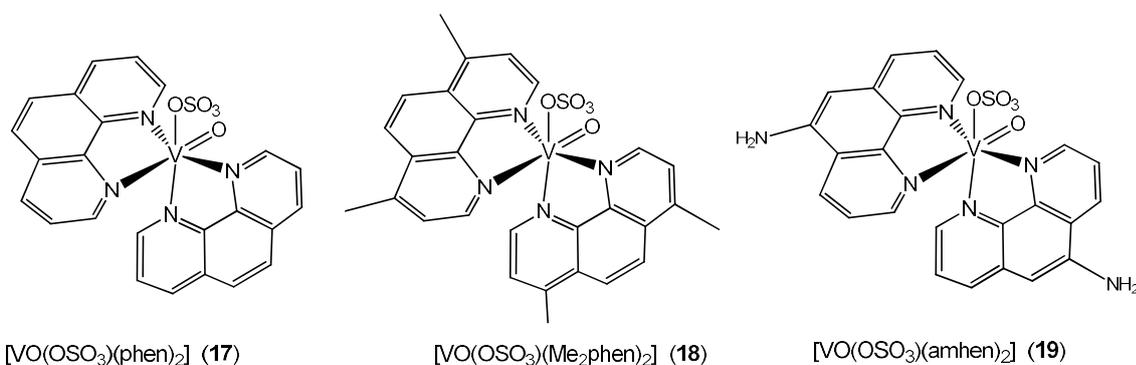


Figura 6.3. Estruturas moleculares dos compostos **17-19** no estado sólido. Em solução aquosa esperamos que o ligando SO₄²⁻ seja substituído por uma molécula de água, sendo todos os complexos globalmente formulados como iões [V^{IV}O(Xphen)₂]²⁺. No entanto, cada um deles será sujeito a especiação uma vez dissolvido (ver abaixo).

6.3. Interação entre complexos de V^{IV}O-phen e BSA

Está bem estabelecido que os iões oxidovanádio(IV) se ligam à HSA e à BSA,[26] e que os complexos V^{IV}O-phen se ligam à HSA.[27] Os espectros de dicroísmo circular na região do visível, 350-800 nm, podem ser utilizados para confirmar a ligação dos complexos V^{IV}O às proteínas. Sabendo que as proteínas, como a BSA, não absorvem radiação na região do visível, se forem obtidos valores não nulos, este facto só pode ser atribuído à ligação da espécie V^{IV}O aos átomos de dadores quirais da proteína. As alterações espectrais de DC de BSA após adições de V^{IV}O²⁺ ou de complexos de V^{IV}O-phen podem fornecer informações sobre as várias espécies de proteína-V^{IV}O que se formam em solução.[28]

6.3.1. Espectros de dicroísmo circular (e RPE) de $V^{IV}OSO_4$ + BSA.

A **Figura 6.4** mostra os espectros de DC de soluções de BSA após adição de quantidades crescentes de um sal de $V^{IV}O$. Os espectros de DC medidos são fracos e com muito ruído, mas é evidente que os valores obtidos não são nulos, pelo que podemos depreender que os iões $V^{IV}O^{2+}$ se ligam à BSA. Sinais fracos em espectros de DC foram igualmente obtidos em soluções de $V^{IV}O$ e HSA.[29]

Sabe-se que os iões de $Zn(II)$ se ligam fortemente à HSA e à BSA no local MBS, sendo essas ligações mais fortes do que o $V^{IV}O^{2+}$. [29] Adições de $Zn(II)$ à solução de VO-BSA (1:5) das **Figura 6.4-6.6** não alteram os espectros de DC ou RPE medidos, o que significa que os iões $V^{IV}O^{2+}$ se ligam à BSA em locais distintos dos iões $Zn(II)$.

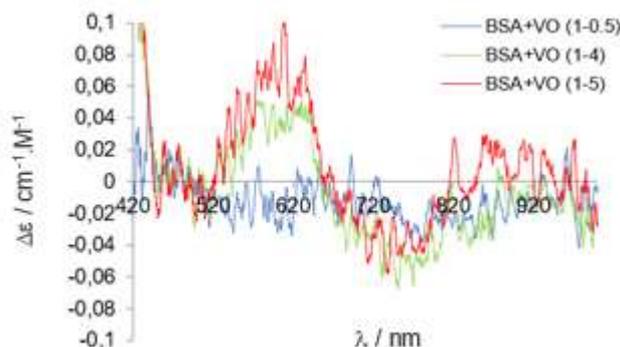


Figura 6.4. Espectros de DC obtidos ao adicionar quantidades conhecidas com precisão de uma solução contendo $[V^{IV}O(\text{ClO}_4)_2]$ (37 mM) a uma solução de BSA (500 μM) em PBS a $\text{pH} = 7.4$, até uma razão molar BSA: $V^{IV}O$ de 1:5.

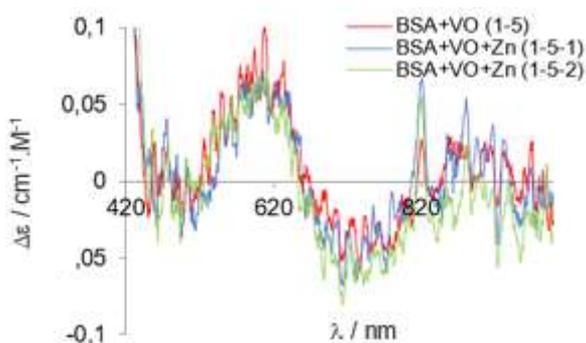


Figura 6.5. Espectros de DC obtidos ao adicionar quantidades precisas de uma solução de $Zn(\text{NO}_3)_2$ (58.8 mM) à uma solução com razão molar BSA: $V^{IV}O$ de 1:5 considerada na **Figura 6.4**, de modo a que se obtivessem as razões molares BSA: $V^{IV}O$:Zn de 1:5:1 e 1:5:2.

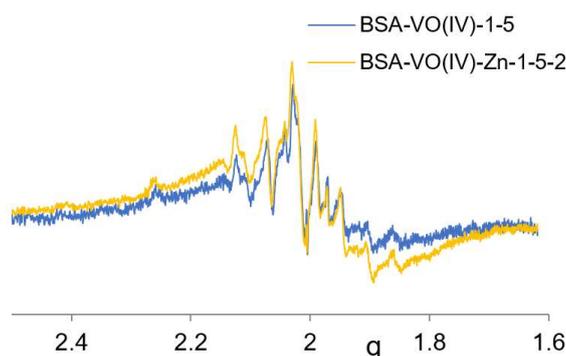


Figura 6.6. Espetros de RPE de 1ª derivada à frequência da banda X medidos a 77K com BSA (530 μ M) e $V^{IV}O(ClO_4)_2$ com uma razão molar de 1:5, e após a adição de quantidades precisão de uma solução de $Zn(NO_3)_2$ (58.8 mM), de modo a obter uma solução com razão molar BSA: $V^{IV}O$:Zn de 1:5:2.

6.3.2. Espetros de dicroísmo circular (e RPE) de $V^{IV}OSO_4$ + BSA + phen.

As **Figuras 6.7 a 6.9** apresentam os espectros de DC de soluções de BSA e $V^{IV}O(ClO_4)_2$ a pH 7.4, com uma razão molar BSA: $V^{IV}O$ de 1:1, assim como a adição de uma solução de phen até uma razão molar BSA: $V^{IV}O$:phen de 1:1:2. Os espectros de DC medidos após mais duas adições de phen, correspondentes a proporções molares de 1:1:3 e 1:1:4, praticamente coincidem com o espectro com a proporção molar de 1:1:2. Ao adicionar uma solução de $Zn(NO_3)_2$ (59 mM) à solução com razões molares 1:1:4 (BSA: $V^{IV}O$:phen), até uma razão molar BSA: $V^{IV}O$:phen:Zn de 1:1:4:5 (**Figura 6.9.**), observa-se que os valores de $\Delta\epsilon$ na região do visível foram diminuindo progressivamente e os espectros de DC aproximaram-se dos espectros das soluções que continham BSA e iões de $V^{IV}O^{2+}$. O ligando phen pode ligar-se ao Zn(II) (as constantes de formação dos complexos $[Zn(phen)_n]^{2+}$ [30] são ligeiramente superiores às de $[V^{IV}O(phen)_n]^{2+}$ [27]), assim os iões de Zn(II) competem com os iões de $V^{IV}O^{2+}$ para a ligação à phen. A adição de iões de Zn(II) capta assim progressivamente os ligandos phen, formando espécies $[Zn(phen)_n]^{2+}$ na solução.

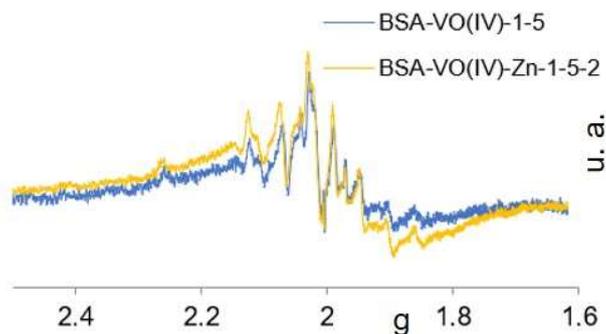


Figura 6.7. Espectro de RPE de 1ª derivada à frequência da banda X medido a 77K de soluções com BSA e $V^{IV}(ClO_4)_2$ (760 μ M cada) a pH 7.4, com uma razão molar BSA: V^{IV} de 1:1, e após a adição de uma solução de phen (63 mM). Após novas adições de phen os espectros de RPE não exibiram praticamente alterações significativas, pelo menos até uma razão BSA: V^{IV} :phen molar de 1:1:4 (ver figura abaixo).

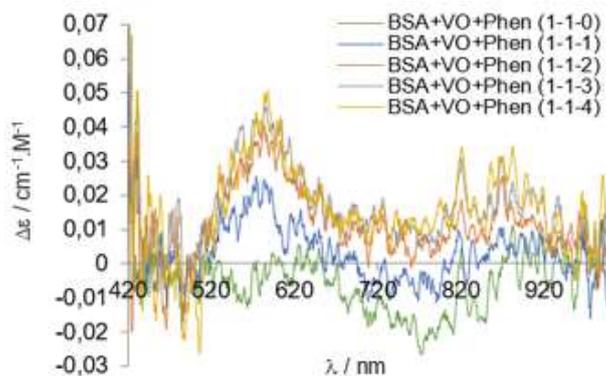


Figura 6.8. Espectros de DC de soluções com BSA e $[V^{IV}(ClO_4)_2]$ (760 μ M cada) a pH 7.4, com uma razão BSA: V^{IV} molar de 1:1, e após a adição de uma solução de phen (63 mM).

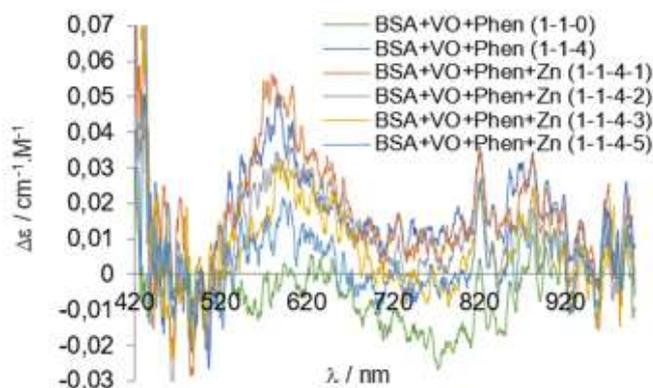


Figura 6.9. Espectros de DC de soluções com BSA, $[V^{IV}(ClO_4)_2]$ (\approx 0.76 mM cada) e phen a pH 7.4, com relação molar BSA: V^{IV} :phen de 1:1:4, e mediante adição de uma solução de $Zn(NO_3)_2$ (59 mM). As **Figuras** no **Anexo 5.** mostram espectros de RPE de algumas destas soluções.

A **Figura 6.10** exibe os espectros de DC de soluções com BSA e $[V^{IV}O(CIO_4)_2]$ a pH 7.4, com uma razão BSA: $V^{IV}O$ molar de 1:2, e após a adição de uma solução de phen. Os espectros de DC medidos na região do visível para a razão molar BSA: $V^{IV}O$:phen de 1:2:2 diferem da razão molar 1:2:0; significando que as espécies $[(V^{IV}O)_p(BSA)(phen)_n]$ se formam em solução, assemelhando-se (porém sendo distintas) às formadas na solução correspondente aos espectros da **Figura 6.7**. Após adições sucessivas de phen até aos rácios molares BSA: $V^{IV}O$:phen de 1:2:4 e 1:2:6 não se observaram mais alterações nos espectros de DC adquiridos, significando que a concentração e o tipo das espécies $[(V^{IV}O)_p(BSA)(phen)_n]$ formadas (com phen ligado à $V^{IV}O$) não se alteram. Não obstante, a quantidade de moléculas de phen ligadas à BSA noutros locais pode ter aumentado, embora tal não produza qualquer banda nos espectros de DC medidos na região do visível. É de facto sabido que a phen se liga à BSA, tendo as constantes de ligação correspondentes sido determinadas.[31]

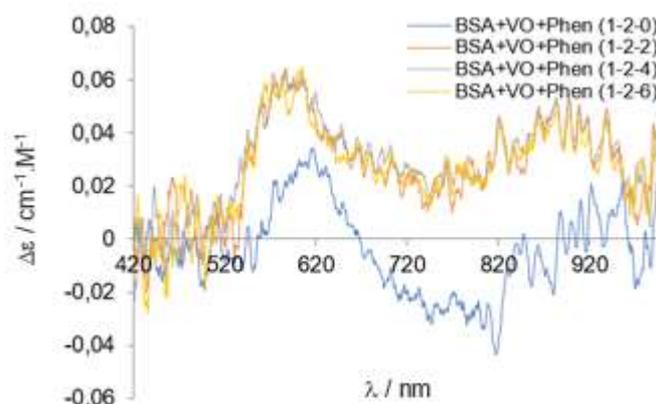


Figura 6.10. Espectros de DC de soluções contendo BSA (708 μM) e $[V^{IV}O(CIO_4)_2]$ a pH 7.4, com uma razão molar BSA: $V^{IV}O$ de 1:2, e mediante a adição de uma solução de phen (63 mM) até razões molares BSA:VO:phen de 1:2:6.

Ao adicionar uma solução de $Zn(NO_3)_2$ (59 mM) à solução com rácios molares 1:2:6 (BSA: $V^{IV}O$:phen), ver **Figura 6.11**, observa-se inicialmente um aumento dos valores de $\Delta\epsilon$ da banda com $\lambda_{\text{max}} \approx 600$ nm até um rácio molar BSA: $V^{IV}O$:phen:Zn de 1:1:4:2. Após a adição da solução de $Zn(NO_3)_2$, os valores de $|\Delta\epsilon|$ na região do visível diminuem progressivamente e os espectros de DC tornam-se semelhantes aos das soluções que contêm iões BSA e $V^{IV}O^{2+}$. A adição de iões Zn^{2+} consegue assim captar progressivamente os ligandos phen, formando espécies $[Zn(phen)_n]^{2+}$ em solução.

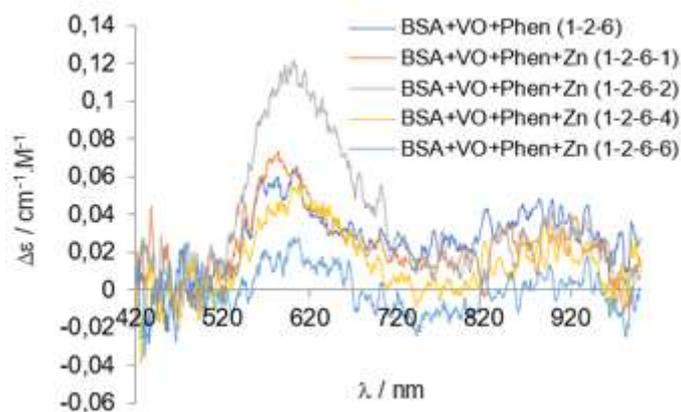


Figura 6.11. Espectros de DC de soluções com BSA, $V^{IV}O(CIO_4)_2$ e phen a pH 7.4, com uma razão molar BSA: $V^{IV}O$:phen de 1:2:6.

As figuras **Figura 6.12** a **6.14** mostram espectros de RPE de várias destas soluções. Existem algumas alterações dos espectros medidos das soluções congeladas que contêm BSA e $V^{IV}O^{2+}$ ao adicionar phen, que corroboram com a ligação das espécies de $V^{IV}O$ -phen à BSA. Além disso, a adição de Zn(II) produz alterações nos espectros de RPE (ver, por exemplo, **Figura 6.14**) que podem ser tidas em conta para apoiar as conclusões acima descritas.

Globalmente, nesta secção concluímos que as espécies que contêm complexos $[V^{IV}O(phen)_n]^{2+}$ ligam-se à BSA, as **Figuras 6.8** e **6.10** indicando que estes complexos correspondem a uma razão molar $V^{IV}O$:phen:BSA de 1:1:1.

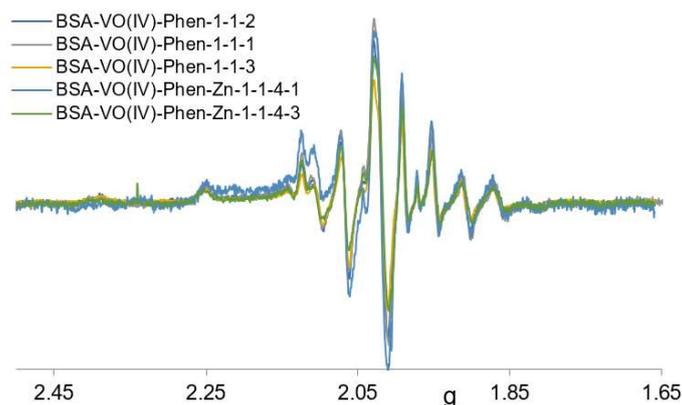


Figura 6.12. Espectros de RPE de 1ª derivada à frequência da banda X medidos a 77K BSA, $V^{IV}O(CIO_4)_2$, phen e $Zn(NO_3)_2$ a pH 7.4, com os rácios molares BSA: $V^{IV}O$:phen:Zn indicados na figura.

Os espectros apresentam bastante ruído, mas verifica-se que a adição da solução de $Zn(NO_3)_2$ não produz alterações de relevo nos espectros de RPE obtidos (exceto no que respeita ao espectro da solução com a relação molar 1:1:3 que apresenta uma ligeira diminuição do valor $|Az|$).

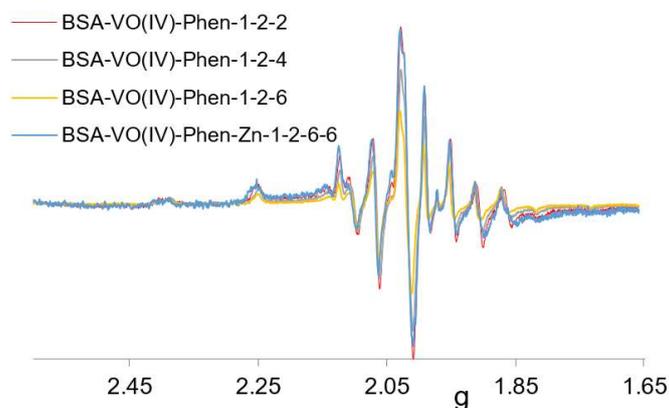


Figura 6.13. Espectros de RPE de 1ª derivada à frequência da banda X medidos a 77K BSA, $V^{IV}O(CIO_4)_2$, phen e $Zn(NO_3)_2$ a pH 7.4, com os rácios molares BSA: $V^{IV}O$:phen:Zn indicados na figura. Estes espectros foram medidos com as mesmas soluções usadas para registar os espectros de DC das **Figuras 6.10 e 6.11**.

Os detalhes dos espectros da **Figura 6.13** nos intervalos de campo alto e baixo estão representados na **Figura 6.14 e 6.15**. Os espectros são bastante ruidosos, porém existem ligeiras alterações à medida que o phen é adicionado, sendo detetadas duas espécies distintas para rácios molares de 1:2:2 e 1:2:6. Além disso, a adição da solução de $Zn(NO_3)_2$ origina algumas alterações nos espectros RPE recolhidos, nomeadamente uma ligeira diminuição do valor $|Az|$ no espectro da solução com razão molar de 1:2:6:6 quando comparado com os outros espectros incluídos.

A adição de Zn^{2+} produz um aumento dos valores $|Az|$ medidos. Este facto deve-se a uma diminuição da quantidade relativa de phen coordenada com os centros de V^{IV} .

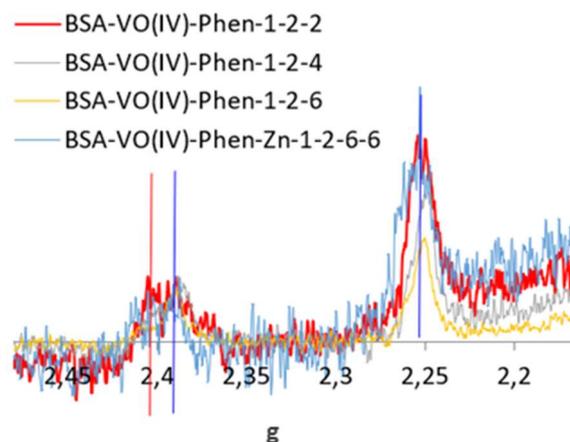


Figura 6.14. Detalhes dos espectros de RPE de soluções congeladas (a 77 K) com BSA, $V^{IV}(ClO_4)_2$ e $Zn(NO_3)_2$ a pH 7.4, com os rários molar BSA: V^{IV} :phen indicados na figura. Os espectros são bastante ruidosos porem a adição da solução de $Zn(NO_3)_2$ induz algumas alterações nos espectros de RPE obtidos. Há ligeiras diminuições dos valores $|Az|$ nos espectros à medida que o phen é adicionado. A adição de Zn^{2+} produz um aumento dos valores medidos de $|Az|$. Este fenómeno é devido a uma diminuição da quantidade relativa de phen coordenada aos centros de V^{IV} .

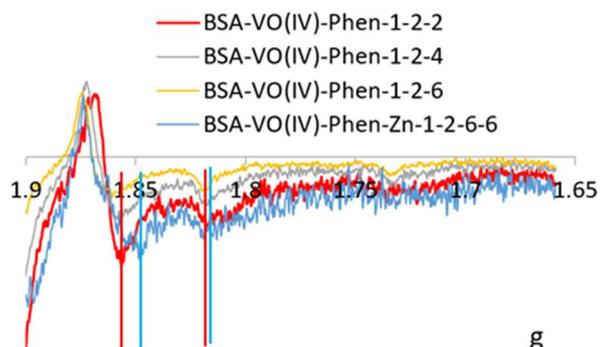


Figura 6.15. Detalhes dos espectros de RPE de soluções congeladas (a 77 K) com BSA, $V^{IV}(ClO_4)_2$, phen e $Zn(NO_3)_2$ a pH 7.4, representados na **Figura 6.14.**, com os rários molares BSA: V^{IV} :phen:Zn indicados na figura. É evidente que o espectro, após a adição de Zn^{2+} (linha azul), difere dos outros três espectros, nomeadamente do espectro com linha amarela (espectro da solução antes da adição de iões Zn^{2+}).

6.4. Comportamento dos complexos de iões de metal em meios celulares

É importante compreender se os complexos de iões de metal testados são estáveis nos tampões e meios de incubação utilizados nas experiências *in vitro*, particularmente a baixas concentrações, μM , e durante tempos de incubação relativamente longos (até 72 h) geralmente usados nas experiências de citotoxicidade.

Lay e colaboradores[21] reportaram que quando $[V^{IV}O(phen)_2]$, $[V^{IV}O(Me_2phen)_2]$ ou $[V^{IV}O(bipy)_2]$, são adicionados aos meios de incubação celular, todos estes complexos de V(IV) sofrem uma oxidação rápida originando as espécies de V(V) correspondentes ($cis-[V^{VO}_2L_2]^+$), seguida da libertação dos ligandos. Estes estudos foram baseados em experiências de ESI-MS com soluções de 10 μ M de complexos em solução padrão MeOH:H₂O (1:1).

Espetros de RPE de soluções de $[V^{IV}O(bipy)_2]$ e $[V^{IV}O(Xphen)_2]$ (Xphen = phen, Me₂phen e amphen), com concentrações de cerca de 0.50 mM, foram medidos ao longo do tempo em soluções aquosas (contendo 5% DMSO) a pH \approx 7.0: (a) tampão PBS, (b) meios de incubação MEM e (c) meios MEM + 10% FBS. Estas condições não simulam adequadamente os meios em contacto com as células, uma vez que a concentração de complexos é muito superior, pelo que os rácios de [complexo]/[ligandos] é significativamente diferente, nomeadamente o rácio [complexo]/[BSA].

Verificou-se que a intensidade de todos os espetros de RPE diminui progressivamente com o tempo, principalmente devido à oxidação das espécies de V^{IV}O presentes. Após 3 h de permanência ao ar a cerca de 25 °C, observou-se alguma precipitação em todas as amostras, pelo que a diminuição da intensidade não se deveu apenas à oxidação dos complexos V^{IV}O. Curiosamente, a diminuição de intensidade dos espetros da RPE ocorreu mais rapidamente nas amostras contendo meios de incubação (com ou sem 10% FBS), do que no caso dos complexos adicionados ao tampão PBS. A taxa de diminuição da intensidade dos espetros de RPE seguiu globalmente a ordem: $[V^{IV}O(bipy)_2] > [V^{IV}O(amphen)_2] \geq [V^{IV}O(phen)_2] >> [V^{IV}O(Me_2phen)_2]$. A **Figura 6.16** apresenta exemplos de espetros medidos com o tempo para amostras de $[V^{IV}O(phen)_2]$ em tampão PBS e no **Anexo 5** apresentam-se exemplos de espetros de RPE medidos com o tempo para os complexos **18**, **19** e **20** nos vários meios utilizados. A **Tabela 6.2** apresenta os parâmetros do Hamiltoniano de spin obtidos nos diferentes meios com amostras congeladas ao fim de \approx 5-10 min. (tempo = 0 h) após adição de soluções dos complexos em DMSO aos vários meios (% final de DMSO \approx 5 %).

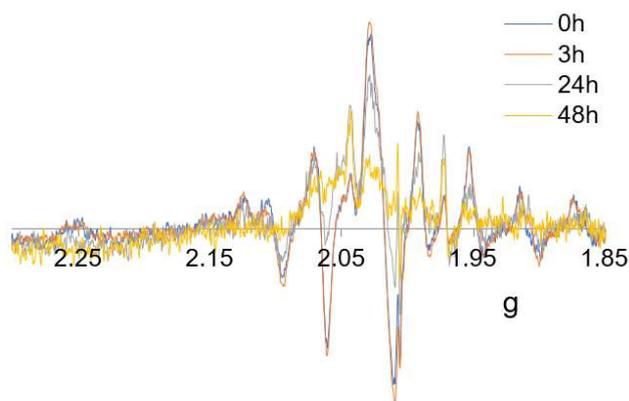


Figura 6.16. Espetros de RPE de 1ª derivada à frequência da banda X medidos a 77K de amostras com $[V^{IV}O(phen)_2]$ (ca. 0.50 mM) a pH = 7.0 em tampão PBS. Ao adicionar **17** ao tampão PBS, as soluções foram deixadas ao ar a cerca de 25 °C. Os espectros das amostras a 0 h e 3 h têm aproximadamente a mesma intensidade. Os espectros a 24 e 48 h foram traçados com uma escala distinta, sendo a sua intensidade relativa muito mais baixa do que os de 0 ou 3 h.

Tabela 6.2. Parâmetros do Hamiltoniano de spin obtidos[32] para **17** dissolvido em quatro meios distintos. MeOH; PBS; MC: meio de cultura celular MEM; MC + FBS: meio de cultura celular MEM com 10% de FBS.

Meio	g_x, g_y	g_z	$ A_x , A_y \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$	$ A_z \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$
MC	1.985	1.957	56.4	160.1
PBS	1.984	1.952	58.4	164.1
MC+FBS	1.983	1.952	57.3	162.3
MeOH	1.988	1.955	62.0	163.8

Foram também medidos espectros de RPE de soluções contendo NH_4VO_3 (1 mM) e phen (2 mM) ou amphen (2 mM) em D_2O (tampão NH_4CO_3): (95%)/MeOD (5%), ao qual foi adicionado etilenoglicol (correspondente a 10% final (v/v)) antes de congelar as soluções em azoto líquido. Não foi detetado nenhum sinal de RPE na região entre 2500 e 4500 Gauss.

Mediram-se espectros de ^{51}V RMN de soluções contendo NH_4VO_3 (1 mM) e phen a diversos pHs (**Figura 6.17**). Foram detetados pelo menos dois complexos de V^V -phen, **C₁** e **C₂**, em que **C₂** corresponde provavelmente a $[V^VO_2(phen)_2]^+$ e **C₁** a $[V^VO_2(phen)(OH)_n]$. Neste último caso, o grau de protonação (ligandos: H_2O ou HO^-) varia com o pH, pelo que o δ_V registado também se desvia em conformidade. Assim, a pH 7 e $[V^V]_{total} \approx 1 \text{ mM}$, a maioria do V^V encontra-se sob a forma de espécies V^V -hidrolíticas, sendo o principal complexo de V^V -phen existente na forma de

$[V^VO_2(phen)(OH)]$. A importância relativa deste complexo diminui à medida que a concentração total de vanádio em solução vai diminuindo.

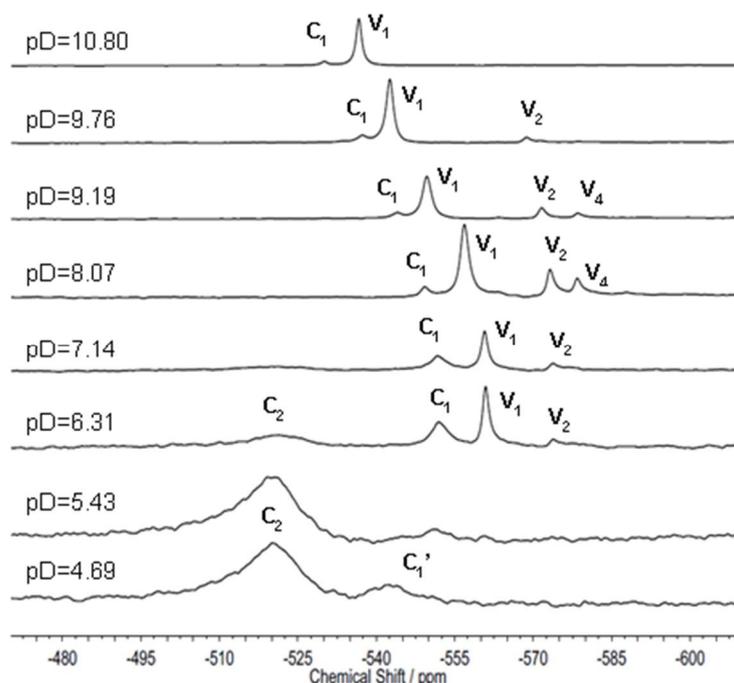


Figura 6.17. Espectros de ^{51}V RMN no intervalo entre -470 e -610 ppm das várias soluções contendo NH_4VO_3 (1 mM) e phen (2 mM) em D_2O (5% MeOD- d_4) a vários pHs (ajustados com uma solução muito diluída de DCl/ D_2O). Os valores de pD são indicados na figura. Abaixo de pD 6 formam-se espécies de V^{IV} e os picos de ^{51}V RMN tornam-se muito mais largos. Tentativas de atribuição (ver texto e ref.[33]): V_1 : monovanadato, V_2 : divanadato; V_4 : c-tetrvanadato; C_1 : $[V^VO_2(phen)(OH)]_n$, o n aumenta à medida que o pH aumenta; C_2 : provavelmente $[V^VO_2(phen)_2]^+$; C_1' : $[V^VO_2(phen)(H_2O)_2]^+$. Espectros adicionais de ^{51}V e 1H RMN para este sistema são apresentados nas **Figuras A6.1. a A6.3.** do **Anexo 6.**

À medida que o pH aumenta, a concentração de C_1 diminui devido à sua decomposição progressiva, e as espécies livres de V^V (V_n , $n = 1, 2, 4$) são as principais espécies presentes em solução a pH elevado. Abaixo de pH 6, a intensidade do sinal de C_1 diminui, até se extinguir a pH 4.69. A ressonância designada por C_1' , também devida a um complexo 1:1, surge num desvio químico semelhante e aumenta de intensidade a pH inferior a ≈ 5.4 , provavelmente correspondente à formação de $[V^VO_2(phen)(H_2O)_2]^+$ por protonação de todos os ligandos OH^- coordenados, um processo que se espera causar um pequeno desvio químico de ^{51}V para valores negativos. Estes resultados são semelhantes aos obtidos com o sistema V V-MHCPE (HMHCPE = 4-etoxicarbonil-2-metil-5-hidroxi-6-oxo-1-hidropirimidina).[34]

6.5. Estudos realizados em células

6.5.1. Ensaio de citotoxicidade.

A atividade citotóxica dos ligandos de 1,10-fenantrolina livre e dos complexos correspondentes foi avaliada em células A2780, MCF7 e PC3 após a incubação dos compostos durante 3, 24, 48 e 72 h. A cisplatina foi incluída como controlo positivo e apreciada apenas às 48 h de incubação. Todos os compostos e a maioria dos ligandos precursores são mais citotóxicos do que a cisplatina em todas as linhas celulares após 48 h de incubação (**Tabela 6.3**).

A partir dos resultados obtidos relativamente a todos os tipos de células, pode concluir-se que para os tempos de incubação mais curtos e biologicamente mais relevantes de 3 e 24 h, as diferenças entre os valores IC_{50} dos complexos $V^{IV}O$ e os ligandos livres são evidentes na maioria dos casos. Por exemplo, às 24 h, no caso do composto **17** nas células A2780 o $IC_{50} = 5.4 \pm 1.3 \mu M$, enquanto que para a phen o $IC_{50} > 100 \mu M$, resultados semelhantes se observam para os restantes complexos: **18**, **19** e **20**. Às 48 h nas células A2780, os valores de IC_{50} diminuem consideravelmente, em particular para phen ($IC_{50} = 5.8 \pm 2.3 \mu M$), onde algumas diferenças entre os valores de IC_{50} de $V^{IV}O$ -phen e ligando livre são significativas. Após 72 h de incubação, todos os compostos, $V^{IV}O$ -X-phen e ligandos livres, apresentam aproximadamente os mesmos valores de IC_{50} , na gama de concentrações 0.2 a 6 μM , com o bipy e os seus complexos os compostos com menor atividade para todas as células.

Como salientado por Scalese *et al.*,[35] os efeitos citotóxicos de $V^{IV}OSO_4$ descritos para várias linhas celulares correspondem normalmente a valores de IC_{50} superiores a 100 μM para 24 e 48 h, devido tanto a vanadato(V) como a espécies de $V^{IV}O$ presentes nas soluções de incubação. Da mesma forma, os valores de IC_{50} encontrados para $Na_3V^{IV}O_4$ e $V^{IV}OSO_4$ às 24 h para células A2780 também foram superiores a 100 μM ($156 \pm 20 \mu M$ e $254 \pm 27 \mu M$, respetivamente).[35] Em conclusão, a citotoxicidade em células A2780 dos complexos $V^{IV}O$ -phen testados neste trabalho, para tempos de incubação de 24 h, é muito superior aos dos correspondentes iões $V(IV)$ e $V(V)$ ou ligandos livres. Globalmente, podem ser tiradas ou previstas conclusões semelhantes para as células MCF7 e PC3.

Tabela 6.3. A atividade citotóxica (valores de IC₅₀) dos compostos nas células A2780, MCF7 e PC3 a vários tempos. Os valores são as médias ± DP de duas ou mais experiências independentes feitas com pelo menos 6 réplicas por condição. Estudos realizados pela Dra. Fernanda Maques do Instituto Superior Técnico, Univeridade de Lisboa.^a

Compostos	3 h	24 h	48 h	72 h
IC₅₀ / μM – Células A2780				
phen	> 100	> 100	5.8 ± 2.3	1.7 ± 0.6
amphen	> 100	41 ± 29	1.8 ± 0.6	0.3 ± 0.1
Me ₂ phen	37 ± 8.1	14 ± 5.1	1.4 ± 0.4	0.2 ± 0.1
bipy	> 100	> 100	52 ± 25	51 ± 13
[VO(OSO ₃)(phen) ₂] (17)	>100	5.4 ± 1.2	0.9 ± 0.3	0.4 ± 0.1
[VO(OSO ₃)(Me ₂ phen) ₂] (18)	43 ± 13	1.8 ± 0.6	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.05
[VO(OSO ₃)(amphen) ₂] (19)	>100	3.8 ± 2.3	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.1
[VO(OSO ₃)(bipy) ₂] (20)	>100	20 ± 7.3	0.9 ± 0.1	1.7 ± 0.6
Cisplatina			3.6 ± 1.3	
IC₅₀ / μM - Células MCF7				
phen	>100	>100	6.2 ± 2.2	1.9 ± 2.2
amphen	>100	50 ± 19	4.4 ± 2.8	1.8 ± 0.8
Me ₂ phen	>100	12 ± 3.1	3.8 ± 0.9	0.9 ± 0.4
bipy	>100	>100	51 ± 21	52 ± 19
[VO(OSO ₃)(phen) ₂] (17)	>100	22 ± 5.9	11 ± 2.5	2.1 ± 0.5
[VO(OSO ₃)(Me ₂ phen) ₂] (18)	26 ± 12	17 ± 16	0.7 ± 0.2	0.3 ± 0.1
[VO(OSO ₃)(amphen) ₂] (19)	57 ± 30	26 ± 8.0	4.3 ± 2.0	0.6 ± 0.1
[VO(OSO ₃)(bipy) ₂] (20)	>100	57 ± 27	33 ± 9.2	5.5 ± 1.7
Cisplatina			20 ± 6.3	
IC₅₀ / μM - Células PC3				
phen	> 100	> 100	16 ± 3.5	6.3 ± 1.4
amphen	> 100	82 ± 18	38 ± 12	2.1 ± 1.0
Me ₂ phen	> 100	28 ± 8.1	4.4 ± 1.4	0.5 ± 0.1
bipy	> 100	> 100	83 ± 18	23 ± 5.3
[VO(OSO ₃)(phen) ₂] (17)	> 100	72 ± 25	5.9 ± 2.4	2.0 ± 0.7
[VO(OSO ₃)(Me ₂ phen) ₂] (18)	50 ± 22	17 ± 3.5	2.6 ± 1.1	0.4 ± 0.1
[VO(OSO ₃)(amphen) ₂] (19)	32 ± 10	9.2 ± 5.5	2.0 ± 0.9	0.5 ± 0.1
[VO(OSO ₃)(bipy) ₂] (20)	>100	>100	14 ± 5.7	2.6 ± 0.7
Cisplatina			57 ± 10	

^a De notar que ao comparar as citotoxicidades dos complexos de V e correspondentes ligandos livres, devemos ter em conta que cada complexo tem dois ligandos de polipiridilo.

Como realçado por Lay e colaboradores,[21] é necessária uma cuidadosa consideração da estabilidade dos complexos V(IV) e V(V) nos meios biológicos para se poder explicar a sua atividade biológica, particularmente quando estão envolvidos ligandos bioativos. Os dados de citotoxicidade de **17** e **18** contra a linha de células A549, medida após 72 h de incubação, levaram Lay e colaboradores[21] a concluir que a citotoxicidade dos complexos de V^{IV}O testados é devida aos ligandos polipiridílicos livres após a decomposição dos complexos em meio de cultura celular, e não aos complexos de vanádio correspondentes. Em termos gerais, esta conclusão

é provavelmente correta, mas os dados obtidos neste capítulo com várias linhas celulares de mamíferos indicam que a citotoxicidade para tempos de incubação mais curtos difere para os complexos e ligandos. Além disso, verificámos que após 72 h de incubação, a citotoxicidade dos complexos $[M(Xphen)_2]$ ($M = Cu(II)$, [37] $Zn(II)$, [38] $Fe(III)$ [39] e agora $V^{IV}O$) e ligandos correspondentes ($Xphen = phen, Me_2phen$ e $amphen$) são todos aproximadamente iguais. Portanto, a interpretação dos dados de citotoxicidade para os compostos $[V^{IV}O(Xphen)_2]$ é mais complexa do que anteriormente previsto, e afirmar que tal se deve simplesmente aos ligandos livres é demasiado simplista.

Além dos compostos $[V^{IV}O(Xphen)_2]$ sofrerem especiação nos meios de incubação, a especiação também muda com o tempo, tanto devido à oxidação do ião metálico como à alteração da concentração total das espécies de oxidovanádio e dos ligandos, uma vez que estes são absorvidos pelas células.

Quanto maior for a quantidade de complexo $[V^{IV}O(phen)_2]$ adicionada, maior será a concentração relativa das espécies mais relevantes de V^{IV} -phen presentes: $[V^{IV}O(OH)(phen)_2]^+$ (**Ver Anexo-8.2.** para informação detalhada). Nas experiências com tempos de incubação mais curtos, 3 e 24 h, este complexo, bem como o $[V^{IV}O_2(phen)(OH)_n]$ (**C₁**), na gama dos valores de IC_{50} estão assim presentes em concentrações mais elevadas; sendo espécies moderadamente hidrofóbicas, estas podem penetrar na membrana celular, sendo captadas com uma eficácia razoável. Isto pode explicar porque os complexos possuem valores de IC_{50} mais baixos que os ligandos livres, quando avaliados a tempos de incubação mais curtos.

6.5.2. Absorção e distribuição celular.

Foram efetuados estudos de absorção celular para avaliar a distribuição e localização de V dentro das células A2780 após incubação com os complexos **17-19**, bem como com $[V^{IV}O(SalGly)(phen)]$ (**I**). Os resultados são também comparados com os anteriormente publicados para $[V^{IV}O(BrSalGly)(phen)]$ (**II**), $[V^{IV}O(BrSalGly)(bipy)]$ (**III**) ($BrSalGly = N$ -5-bromosalicilideno-glicinato) [34] e $[V^{IV}O(acac)_2]$ ($acac =$ acetilacetato) (**IV**). [19] As células A2780 foram incubadas durante 3 h a 37 °C com **17-19** e 24 h com **I-IV**. Na maioria dos casos, as células foram incubadas em concentrações equivalentes aos seus valores de IC_{50} , nos tempos de incubação considerados, respetivamente 100, 50, 50, 10, 10, 20 e 66 μM para os compostos **17, 18, 19, I, II, III** e **IV**. Estas experiências foram realizadas para comparar os padrões de

absorção destes complexos de vanádio, e para avaliar os seus potenciais alvos celulares (ver **Figuras 6.18 e 6.19**).

Para os complexos **17-19**, a quantidade total absorvida por 10^6 células (6.4, 8.0 e 8.6 ng para **17**, **18** e **19**, respetivamente), não é muito diferente, sendo porém inferior para **17**, apesar da sua concentração no meio de incubação ser o dobro da de **18** ou **19**. Curiosamente, quando se compara a absorção de V pelas células A2780 para complexos semelhantes em experiências equivalentes, a quantidade de vanádio absorvido é bastante menor do que a observada para os complexos de Cu ou Zn correspondentes. Para os compostos $[V^{IV}O(phen)_2]^{2+}$, $[Cu(phen)_2]^{2+}$ [6] e $[Zn(phen)_2]^{2+}$ [38] a quantidade de vanádio absorvida por 10^6 células é cerca de 10 vezes inferior à do Cu ou Zn. Além disso, para $[V^{IV}O(SalGly)(phen)]$ (**I**) ($IC_{50}(24\text{ h}) = 20.5\ \mu\text{M}$), $[Cu(SalGly)(phen)]$ ($IC_{50}(3\text{ h}) = 26.5\ \mu\text{M}$)[36] e $[Zn(SalGly)(phen)]$ ($IC_{50}(24\text{ h}) = 55.7\ \mu\text{M}$)[38] a quantidade de vanádio absorvida é cerca de 10 vezes inferior ao Cu e 15 vezes inferior ao Zn.

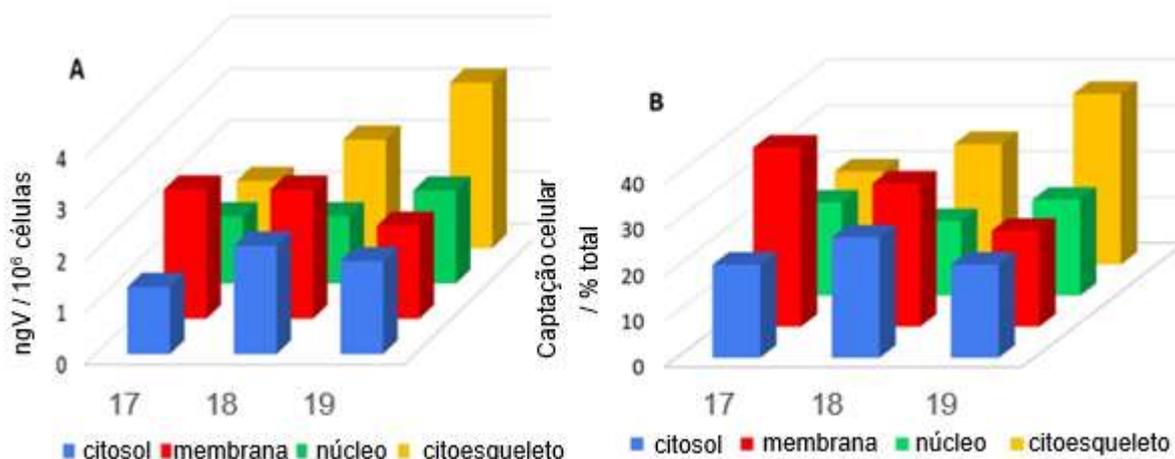


Figura 6.18. Acumulação de vanádio (ng/ 10^6 células de A2780) nos componentes sub-celulares. As células foram expostas aos compostos **17**, **18** e **19** em concentrações equivalentes ao seu IC_{50} às 3 h. (A) ng de vanádio absorvido em cada componente/ 10^6 células; (B) % de vanádio total em cada componente. Estudos realizados pela Dra. Fernanda Maques do Instituto Superior Técnico, Univeridade de Lisboa

Deve evidenciar-se que entre os compostos **17-19**, ou considerando também **I-IV**, o padrão e a absorção total do vanádio pelas células A2780 depende do complexo considerado.

Em geral, o vanádio entra nas células e acumula-se preferencialmente nas membranas. Esta fração também inclui todos os organelos ligadas à membrana

(retículo endoplasmático, Golgi e mitocôndria).[40] É relevante mencionar que enquanto que para **17** e **18** o V encontrado nas membranas é mais elevado do que nas outras frações (sendo o dobro no caso de **17**), nos complexos **I**, **III** e **IV** a quantidade encontrada nas membranas é cerca de três vezes superior do que em cada uma das restantes frações. Curiosamente, para (**19**) e especialmente no caso de $[V^{IV}O(BrSalGly)(phen)]$ (**II**),[35] as quantidades de V encontradas na fração do citoesqueleto são muito mais elevadas do que em cada uma das outras frações.

Particularmente para **19**, a acumulação preferencial no citoesqueleto pode indicar um possível efeito neste componente. Foi sugerido que os efeitos biológicos do vanádio, poderiam ser explicados, em parte, pela sua capacidade de induzir alterações nos filamentos da actina pertencente ao citoesqueleto, responsável por uma cascata de eventos que levam à morte celular. Estes efeitos poderiam ser induzidos através da inibição das proteínas tirosina fosfatases (PTPases), ou eventualmente através da formação de ROS, podendo a actina constituir um potencial alvo celular.

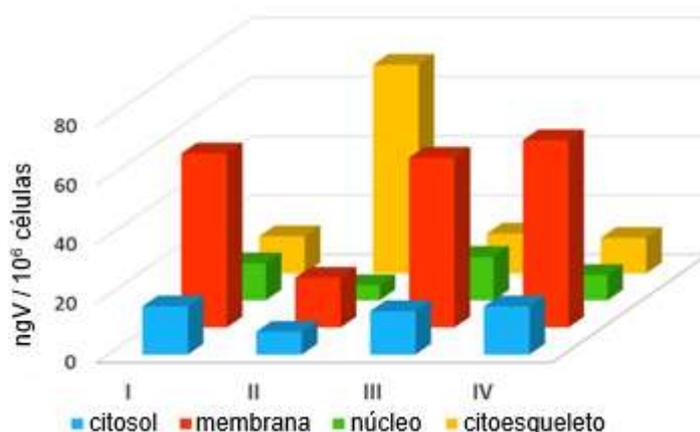


Figura 6.19. Acumulação de vanádio (% do total V) nas frações sub-celulares A2780. As células foram expostas a complexos $[V^{IV}O(SalGly)(phen)]$ (**I**) (presente trabalho), $[V^{IV}O(BrSalGly)(phen)]$ (**II**),[34] $[V^{IV}O(BrSalGly)(bipy)]$ (**III**)[35] e $[V^{IV}O(acac)_2]$ (**IV**),[19] em concentrações equivalentes ao seu IC_{50} às 24 h. Estudos realizados pela Dra. Fernanda Maques do Instituto Superior Técnico, Univeridade de Lisboa.

Para todos os complexos testados, a presença no núcleo não é negligenciável, cerca de 20% para **17-19** e 5-15% para **I-IV**, mas fica clara a possibilidade do vanádio alcançar diferentes componentes celulares para além do ADN, pelo menos até 24 h de tempo de incubação. É importante destacar que, para os complexos **17-19**, após 3

h de incubação, a quantidade total de vanádio é reduzida, pelo que a sua ação citotóxica direta não se espera ser relevante e a toxicidade deve ser principalmente atribuída às moléculas de polipiridina. Não obstante, a presença de vanádio nos compostos **17-19** é importante para a citotoxicidade, particularmente nos tempos de incubação mais curtos, como claramente demonstrado pelos dados da **Tabela 6.3**. Assim, particularmente para tempos de incubação mais curtos (3 e 24 h), a absorção de complexos de V-phen é relevante tanto para a entrada de espécies de vanádio como de Xphen.

6.5. Fatores que afetam a citotoxicidade devido aos complexos $V^{IV}O$ -Xphen

Nas condições de pH dos meios de incubação em estudos de citotoxicidade com células de mamíferos, há indícios de extensa hidrólise dos complexos $V^{IV}O$ -Xphen (apoiados por estudos de especiação, ver **Anexo 8**); portanto, as razões pelas quais, para tempos de incubação mais curtos, os valores IC_{50} dos complexos $V^{IV}O$ **17, 18, 19 e 20** são significativamente inferiores aos dos ligandos livres correspondentes, devem ser esclarecidas.

Os sais de $V^{IV}O$ ou vanadato(V) apresentam valores bastante elevados de IC_{50} relativamente a diferentes linhas de células tumorais, tipicamente superiores a 80 μM , [35] pelo que não se espera que as espécies hidrolisadas de vanádio tenham uma contribuição relevante para a citotoxicidade observada na maioria das nossas experiências. Na maioria das condições, particularmente para concentrações relativamente baixas de vanádio, as moléculas de phen livres são provavelmente as espécies ativas relevantes.

Foi demonstrado acima que, uma vez adicionados compostos $[V^{IV}O(Xphen)_2]$ **17-19** aos meios de incubação, estes não mantêm a sua integridade. Os meios celulares típicos contêm $\approx 40 \mu M$ de albumina, e, como demonstrado para o complexo **17**, uma quantidade significativa de $V^{IV}O^{2+}$ estará ligada à BSA, e uma quantidade não elevada, mas relevante, de espécies 1:1 V:phen associa-se à BSA. Nas nossas experiências antecipamos que a phen e/ou a espécie contendo V ligada à BSA pode(m) ter menor absorção pelas células, em oposição a uma entrada facilitada. As experiências realizadas com o complexo **17** variando a % FBS, conseqüentemente a concentração de BSA, corroboram esta afirmação (**Figura 7.1. no Anexo 7.**).

As concentrações de outras espécies de V-phen presentes, $[V^{IV}O(OH)(phen)_2]^+$ ou $[V^{VO}_2(OH)(phen)]$, são muito baixas para $C_{VO} < 30 \mu M$ (justificado com diagramas de especiação no **Anexo 8.**), mas aumentam progressivamente quando quantidades mais elevadas de **17** são adicionadas ao meio celular. Assim, nas experiências realizadas aos tempos de incubação de 3 ou 24 h, nas quais a gama de concentrações em que se observa toxicidade é muito superior às 48 ou 72 h, a importância relativa de $[V^{IV}O(OH)(phen)_2]^+$ ou $[V^{VO}_2(OH)(phen)]$ presente nos meios celulares é muito superior. Tal corresponde às situações em que a citotoxicidade dos complexos e ligandos livres difere significativamente. É possível que estas espécies de V-phen sejam mais eficientemente absorvidas do que a phen livre (ou phen ligado à BSA), o que justifica a maior citotoxicidade medida para os complexos de V-phen em comparação com os ligandos livres. Além disso, em concentrações elevadas de C_{VO} , as espécies hidrolíticas de $V^{IV}O$ podem também contribuir de alguma forma para a citotoxicidade.

Mesmo nas situações em que os complexos de V-phen são absorvidos, uma vez dentro das células existem diversos potenciais ligandos de V(IV) ou V(V), as moléculas de phen podem também ligar-se mais fortemente a iões metálicos endógenos, tais como Cu e Zn.[16][41] Portanto, quando o vanádio e a phen são absorvidos, muito provavelmente visam componentes distintos no interior das células.

Ao longo deste capítulo não se obteve uma indicação da ação de concentrações vestigiais de outros iões metálicos como Zn(II), Fe(III) ou Cu(II) em meios de incubação, o que pode ter impacto nos dados de citotoxicidade.[16] O meio RPMI contém quantidades baixas ou muito baixas de sais inorgânicos de cobre ou zinco na sua formulação basal (Cu: $\approx 5 \times 10^{-9} M$, Zn: $\approx 5 \times 10^{-6} M$),[42] e não contém ferro. A principal fonte de Cu e Zn em meio celular deve-se ao soro fetal bovino adicionado a 10%, que fornece nutrientes suficientes para o crescimento e sobrevivência celular. Nestes meios celulares, estas baixas quantidades de Cu ($\approx 1.5 \mu M$)[43] e Zn ($\approx 3 \mu M$)[44] estão na sua maioria ligadas à BSA. Estes devem afetar de forma semelhante tanto as células incubadas com os complexos como os controlos, pelo que não se espera impacto nos valores determinados de IC_{50} .

6.7. Conclusões

Os compostos de vanádio demonstraram definitivamente propriedades promissoras relacionadas com as suas aplicações para o tratamento de uma série de doenças humanas. Relativamente ao seu potencial antitumoral, muitos estudos reportaram a ação anti-proliferativa dos compostos de vanádio, nomeadamente testando complexos de oxidovanádio(IV) contendo ligandos do tipo 1,10-fenantrolina em diversos tipos de células tumorais humanas. Contudo, publicações recentes demonstram que os complexos de vanádio sofrem especiação em meio biológico, libertando espécies de vanádio e os respetivos ligandos. Tanto quanto sabemos, são muito poucos os estudos que têm abordado a especiação dos complexos ao serem adicionados aos meios de incubação celular. Neste capítulo preparam-se três complexos: $V^{IV}O(OSO_3)(phen)_2$ (**17**), $[V^{IV}O(OSO_3)(Me_2phen)_2]$ (**18**) e $[V^{IV}O(OSO_3)(amphen)_2]$ (**19**) (assim como $[V^{IV}O(OSO_3)(bipy)_2]$ (**20**)), foi testada a sua citotoxicidade a vários tempos de incubação contra três tipos de células tumorais diferentes, e determinou-se a sua absorção e distribuição do vanádio celular. Concluiu-se que assim que os complexos são adicionados ao meio de incubação celular, que contém $\approx 40 \mu M$ BSA, decompõem-se, deixando de estar presentes como espécie $[V^{IV}O(Xphen)_2]^{2+}$. São apresentados diagramas de especiação que modelam a ligação do oxidovanádio(IV) e da phen em meios de cultura celular no **Anexo 8**. A decomposição dos complexos $V^{IV}O$ -phen conduz à libertação dos ligandos livres, que são por si só biologicamente ativos e citotóxicos, [20][41] sendo muito provavelmente as principais espécies responsáveis pela citotoxicidade observada, como anteriormente sugerido.[21]

Após 72 h de incubação com as células tumorais, a citotoxicidade de todos os compostos, complexos e ligandos, é aproximadamente igual, mas em tempos de incubação mais curtos, onde os valores de IC_{50} medidos são mais elevados, os complexos são mais ativos do que os ligandos. Tal está provavelmente associado à especiação que ocorre nos meios celulares, e à maior quantidade relativa de espécies de V-phen, nomeadamente $[V^{IV}O(OH)(phen)_2]^+$ e $[V^{IV}O_2(OH)(phen)]$ para tempos mais curtos. O tipo de espécies existente nos meios celulares depende da quantidade de complexo adicionado, pelo que a especiação difere nas condições presentes nas experiências a vários períodos de incubação; por conseguinte, os principais

mecanismos de ação que atuam nas concentrações de IC₅₀ correspondentes serão muito provavelmente também distintos.

Extrapolando as conclusões deste trabalho para outros sistemas onde o metal é lábil, é evidente que para determinar qual a espécie ativa e/ou propor mecanismos de ação, é essencial determinar a especiação do metalo-fármaco em estudo nos meios de incubação de células, e de preferência realizar também testes a vários períodos de incubação.

6.8. Referências

- [1] **D. C. Crans, J. J. Smee, E. Gaidamauskas e L. Yang.** *Chem. Rev.*, 2004, 104, pp. 849-902.
- [2] **D. C. Crans, M. L. Tarlton e C. C. McLauchlan.** *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2014, 24, pp. 4450-4468.
- [3] **K. H. Thompson e C. Orvig.** *Coord. Chem. Rev.*, 2001, 219, pp. 1033-1053.
- [4] **K. H. Thompson, J. Chiles, V. G. Yuen, J. Tse, J.H. McNeill e C. Orvig,** *J. Inorg. Biochem.*, 2004, 98, pp. 683-690.
- [5] **D. C. Crans, B. Zhang, E. Gaidamauskas, A. D. Keramidas, G. R. Willsky e C. R. Roberts.** *Inorg. Chem.*, 2010, 49, pp. 4245-4256.
- [6] **J. Benitez, L. Guggeri, I. Tomaz, J. C. Pessoa, V. Moreno, J. Lorenzo, F. X. Aviles, B. Garat e D. Gambino.** *J. Inorg. Biochem.*, 2009, 103, pp. 1386-1394.
- [7] **M. A. Fik, A. Gorczynski, M. Kubicki, Z. Hnatejko, A. Wadas, P. J. Kulesza, A. Lewinska, M. Giel-Pietraszuk, E. Wyszko e V. Patroniak.** *Polyhedron*, 2015, 97, pp. 83-93.
- [8] **P. Ghosh, O. J. D'Cruz, D. D. DuMez, J. Peitersen e F. M. Uckun.** *J. Inorg. Biochem.*, 1999, 75, pp. 135-143.
- [9] **O. J. D'Cruz, B. Waurzyniak e F. M. Uckun.** *Toxicology*, 2002, 170, pp 31-43.
- [10] **J. Honziccek e J. Vinklárék.** *Inorg. Chim. Acta*, 2015, 437, pp. 87-94.
- [11] **O. J. D'Cruz e F.M. Uckun.** *Toxicol. Pathol.*, 2007, 35, pp. 910-927.
- [12] **O. J. D'Cruz, Y.H. Dong e F.M. Uckun.** *Biochem. Bioph. Res. Commun.*, 2003, 302, pp. 253-264.
- [13] **S. Y. Wong, R. W. Y. Sun, N. P. Y. Chung, C. L. Lin e C. M. Che.** *Chem. Commun.*, 2005, pp. 3544-3546.
- [14] **M. R. Maurya, A. A. Khan, A. Azam, A. Kumar, S. Ranjan, N. Mondal e J. C. Pessoa.** *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2009, 31, pp. 5377-5390.
- [15] **M. R. Maurya, A. A. Khan, A. Azam, S. Ranjan, N. Mondal, A. Kumar, F. Avecilla e J.C. Pessoa.** *Dalton Trans.*, 2010, 39, pp. 1345-1360.
- [16] **R. K. Narla, Y. H. Dong e F. M. Uckun.** *Leuk. Lymphoma*, 2001, 41, pp. 625-634.
- [17] **M. L. Cacicedo, M. C. Ruiz, S. Scioli-Montoto, M. E. M. E. Ruiz, M. A. Fernández, R. M. Torres-Sanchez, E. J. Baran, G. R. Castro e I. E. León.** *New J. Chem.*, 2019, 43, pp. 17726-17734.
- [18] **I. E. Leon, M. C. Ruiz, C. A. Franca, B. S. Parajon-Costa e E. J. Baran.** *Biol. Trace Elem. Res.*, 2019, 191, pp. 81-87.
- [19] **J. C. Pessoa.** *J. Inorg. Biochem.*, 2015, 147, pp. 4-24.
- [20] **J. C. Pessoa, L. F. V. Boas, R. D. Gillard e R. J. Lancashire.** *Polyhedron*, 1988, 7, pp. 1245-1262.
- [21] **A. Levina, D. C. Crans e P. A. Lay.** *Coord. Chem. Rev.*, 2017, 352, pp. 473-498.
- [22] **A. Rockenbauer e L. Korecz.** *Appl. Magn. Res.*, 1996, 10, 29-43.
- [23] **N. Ribeiro, S. Roy, N. Butenko, I. Cavaco, T. Pinheiro, I. Alho, F. Marques, F. Avecilla, J.C. Pessoa e I. Correia.** *J. Inorg. Biochem.*, 2017, 174, pp. 63-75.

- [24] **R. M. Godinho, M. T. Cabrita, L. C. Alves e T. Pinheiro.** *Metallomics*, 2014, 6, pp. 1626-1631.
- [25] **N. Tuccori, T. Pinheiro, L. C. Alves, T. Peña, M. J. Botelho, J. Raimundo e C.- Vale.** *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B*, 2019, 451, pp. 127-134.
- [26] **D. Sanna, G. Micera e E. Garribba,** *Inorg. Chem.*, 2013, 52, pp. 11975-11985.
- [27] **T. Jakusch, J. C. Pessoa e T. Kiss.** *Coord. Chem. Rev.*, 2011, 255, pp. 2218-2226.
- [28] **A. J. Tasiopoulos, A. N. Troganis, A. Evangelou, C. P. Raptopoulou, A. Terzis, Y. Deligiannakis e T. A. Kabanos.** *Chem. Eur. J.*, 1999, 5, pp. 910-921.
- [29] **E. J. Tolis, M. J. Manos, A. J. Tasiopoulos, C. P. Raptopoulou, A. Terzis, M. P. Sigalas, Y. Deligiannakis e T. A. Kabanos.** *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, 41, pp. 2797-2813.
- [30] **J. C. Pessoa, I. Correia, G. Gonçalves e I. Tomaz.** *J. Arg. Chem. Soc.*, 2009, 97, pp. 151-165.
- [31] **D. Sanna, E. Garribba e G. Micera.** *J. Inorg. Biochem.*, 2009, 103, pp. 648-655.
- [32] **D. Sanna, P. Buglyo, A. I. Tomaz, J. C. Pessoa, S. Borovic, G. Micera e E. Garribba.** *Dalton Trans.*, 2012, 41, pp. 12824-12838.
- [33] **R. M. Smith e A. M. Martell,** *Critical Stability Constants*, Vol. 6, 2^o Suppl., Plenum Press, New York, 1989.
- [34] **D. Sanna, P. Buglyó, G. Micera e E. Garribba.** *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2010, 15, pp. 825-839.
- [35] **C. Deegan, B. Coyle, M. McCann, M. Devereux e D. A. Egan.** *Chem. Biol. Interact.*, 2006, 164, pp. 115-125.
- [36] **G. Sciortino, D. Sanna, G. Lubinu, J.-D. Maréchal e E. Garribba.** *Chem. Eur. J.*, 2020, 20, pp.1492-1502.
- [37] **P. Nunes, I. Correia, F. Marques, A. P. Matos, M. M. C. C. Santos, C. G. Azevedo, J. L. Capelo, H. M. Santos, S. Gama, T. Pinheiro, I. Cavaco e J.C. Pessoa.** *Inorg. Chem.*, 2020, 59, pp. 9116-9134.
- [38] **C. V. Banks e R. I. Bystroff,** *J. Am. Chem. Soc.*, 1959, 81, pp. 6153-6158.
- [39] **Correia, S. Borovic, I. Cavaco, C.P. Matos, S. Roy, H.M. Santos, L. Fernandes, J.L. Capelo, L. Ruiz-Azuara e J.C. Pessoa.** *J. Inorg. Biochem.*, 2017, 175, pp. 284-297.
- [40] **C. P. Matos, Y. Addis, P. Nunes, S. Barroso, I. Alho, M. Martins, A. P. A. Matos, F. Marques, I. Cavaco, J. C. Pessoa e I. Correia.** *J. Inorg. Biochem.*, 2019, 198, pp. 122-137.
- [41] **M. Le, O. Rathje, A. Levina e P. A. Lay,** *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2017, 22, pp. 663-672.
- [42] **C. P. Matos, Z. Adiguzel, Y. Yildizhan, B. Cevatemre, T. B. Onder, O. Cevik, P. Nunes, L. P. Ferreira, M. D. Carvalho, D. L. Campos, F. R. Pavan, J. C. Pessa, M. H. Garcia, A. I. Tomaz, I. Correia e C. Acilan.** *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, 176, pp. 492-512.
- [43] **L. G. Naso, M. V. Valcarcel, M. Roura-Ferrer, D. Kortazar, C. Salado, L. Lezama, T. Rojo, A. C. González-Baró, P. A. M. Williams e E. G. Ferrer.** *J. Inorg. Biochem.*, 2014, 135, pp. 86-99.
- [44] **M. S. Islas, L. G. Naso, L. Lezama, M. Valcarcel, C. Salado, M. Roura-Ferrer, E. G. Ferrer e P. A. M. Williams.** *J. Inorg. Biochem.*, 2015, 149, pp. 12-24.

- Capítulo I - Introdução
- Capítulo II - Objetivos
- Capítulo III - Complexos de cobre com bases de Schiff derivados do piridoxal com potencial terapêutico.
- Capítulo IV - Complexos de iões de metal constituídos por bases de Schiff de cromonas e piridoxal como potenciais agentes antitumorais
- Capítulo V - Complexos de iões de metal com bases de Schiff derivados da vitamina B₆
- Capítulo VI - Complexos de vanádio com 1,10-fenantrolina e derivados
- **Capítulo VII - Comportamento dos complexos do tipo [Cu(phen)₂]²⁺ em meios celulares e a sua influência na citotoxicidade**
- Capítulo VIII - Secção experimental
- Capítulo IX - Considerações finais
- ANEXOS

7.1. Fundamentos

A 1,10-fenantrolina (phen) é uma molécula bioativa e muito versátil para a produção de outros fármacos, que enquanto ligando origina complexos com características biológicas e fisiológicas de grande relevância.[1] A phen e os seus derivados têm sido uma classe de compostos extensivamente utilizados na química inorgânica medicinal e os seus complexos de iões de metal têm também demonstrado grande potencial na sua utilização como sondas fluorescentes, com capacidade de se ligar ao ADN.[2][3] cobre, como elemento natural e essencial, tem sido considerado atrativo nas práticas medicinais. As propriedades biológicas dos seus complexos dependem do seu estado de oxidação, da estrutura do complexo e da natureza dos seus ligandos.[4] Por outro lado, os iões de Cu estimulam a proliferação, migração de células endoteliais e são necessários para a libertação de vários fatores angiogénicos pelas células tumorais que induzem a formação de novos vasos sanguíneos, permitindo o crescimento tumoral, invasão e metástase. É de realçar que foi também demonstrado que a quelação do cobre afeta a ação de muitos destes fatores.[6]

A maioria dos compostos de Cu desenvolvidos com potencial antitumoral e/ou como agentes antimicrobianos são espécies mononucleares,[6][7] sendo o seu modo de ação diversificado e diferente do da cisplatina. Os mecanismos sugeridos incluem essencialmente a interação com o ADN, a diminuição da atividade mitocondrial, a inibição do proteossoma e a geração de espécies reativas de oxigénio (ROS).[7][8] Uma grande variedade de complexos de Cu foram testados como agentes citotóxicos tendo mostrado atividade antitumoral em vários testes *in vitro* e em algumas experiências *in vivo*,[8][9] nomeadamente com complexos com 2,2'-bipiridilo e 1,10-fenantrolina.[10][11] Destaca-se um complexo de Cu, $[\text{Cu}(\text{Gly})(\text{Me}_2\text{phen})]\text{NO}_3$, que contém o co-ligando 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina (Me_2phen) do grupo de compostos designado por Casiopeinas, que se encontra atualmente em ensaios clínicos.[12] Poucos são os complexo de Cu que conseguiram alcançar os ensaios clínicos,[2][11][12] por exemplo o Cu-gluconato co-administrado com disulfiram.[13]

Alguns compostos binários e ternários que contêm phen foram reportados como sendo capazes de se ligar ao ADN através de interações intercalativas e não-intercalativas, quer como ligandos livres, quer incluídos em complexos de iões de metal.[6][14] No geral, foram propostos como agentes capazes de se ligar, quebrar e provocar danos oxidativos no ADN,[10][15] sendo que a maioria apresenta atividade

citotóxica em várias células oncológicas e saudáveis.[6][16] O ADN tem sido frequentemente sugerido como um dos principais alvos biológicos para esta classe de complexos de Cu(II). Foram sugeridos mecanismos envolvendo oxidação das bases dos nucleótidos, aumento da quantidade de espécies oxidativas, ativação da ligação C-H da desoxirribose e/ou hidrólise de ligações de ésteres do grupo fosfato.[6][15] Como exemplo, Sigman e os seus colaboradores descreveram um mecanismo em que uma espécie do tipo Cu(II)-phen é reduzida, formando um complexo de Cu(I) que por sua vez se liga, de forma não covalente, ao ADN no sulco menor, sendo este oxidado por H₂O₂ para produzir uma fração de óxido de Cu(II) que é responsável pela cisão do ADN. Contudo, para que tais mecanismos possam efetivamente funcionar, a espécie Cu-phen tem de alcançar o núcleo da célula, sendo isso uma ocorrência questionável. De facto, a maioria dos estudos da atividade nucleica não foi realizada em células, mas apenas com os complexos de Cu-phen em contacto direto com soluções nas quais se encontram moléculas de ADN.[17] No interior das células, o Cu(II) é muito provavelmente reduzido a Cu(I); uma vez que estão disponíveis concentrações relativamente elevadas de potenciais ligandos que contêm N e S, pelo que o ligando phen é provavelmente libertado e complexos de Cu(I) são formados. A atividade biológica resultará provavelmente da ação separada destas duas espécies: Cu(I) e moléculas de phen. Poucos são os trabalhos publicados a sugerir esta possibilidade.[18][19]

As atividades de phen, [Cu(phen)₂]²⁺ e CuCl₂ relacionadas com a atividade antiproliferativa em células tumorais, a sua permeabilidade membranar e a atividade na quebra da dupla hélice do ADN foram comparadas num trabalho relevante realizado por Byrnes e colaboradores.[20] Em células incubadas com [Cu(phen)₂]²⁺ e CuCl₂, observou-se uma semelhança dos espetros extracelulares de RPE de Cu com os de complexos de Cu-histidina, o que levou os autores a concluir que ocorrem reações de substituição de ligandos entre as espécies de Cu(II) e um ligando semelhante à histidina de modo a gerar uma espécie comum, presumivelmente: [Cu(His)₂], sugerida como sendo a espécie captada pelas células. Foram também observadas lesões no ADN assim como citotoxicidade em células tratadas com [Cu(phen)₂]²⁺, possivelmente devido a múltiplos mecanismos de danos oxidativos. Após a utilização de sequestradores de radicais, Byrnes e os seus colaboradores[20] concluíram também que o O₂ e o H₂O₂ são necessários para a cisão da cadeia simples de ADN.

Tem-se tornado evidente que os complexos de Cu podem atuar por diversos mecanismos para além da ligação ao ADN; nomeadamente, a atividade mimética da superóxido dismutase (SOD) tem sido atribuída a alguns complexos, bem como a capacidade de interferir em processos redox intracelulares e modulação de ROS.[21] A topoisomerase e o proteossoma são também alvos prováveis para os complexos de Cu.[21] A inibição da atividade do proteossoma e a indução da apoptose foram também identificadas para complexos de Cu-phen.[21] A inibição do proteossoma ou interações com proteínas envolvidas no ciclo celular foram reportadas, nomeadamente com a tubulina, ou na formação de citoesqueleto, como a integrina, ou as proteínas presentes no meio extracelular, como a fibronectina.[22] Complexos de Cu demonstraram também ter a capacidade de gerar ROS podendo perturbar as vias enzimáticas e induzir alterações estruturais em proteínas.[22]

De modo a expandir e consolidar a nossa compreensão acerca destes compostos biologicamente ativos, são aqui considerados três complexos Cu(II) com derivados de phen. $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2$ (**21**), $[\text{Cu}(\text{Me}_2\text{phen})_2(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)$ (**22**) e $[\text{Cu}(\text{amphen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2$ (**23**), foram sintetizados e caracterizados, assim como foi também avaliada a sua estabilidade no meio de incubação celular. Para esclarecer se a citotoxicidade dos complexos de Cu(II) com phen e ligandos derivados se deve unicamente ao ligando polipiridilo livre ou se existem outros efeitos (sinérgicos ou outros), foram realizados estudos de estabilidade e especiação em meios de incubação celular e estudos em linhas celulares A2780 a vários tempos de incubação, assim como foi também determinada a absorção/distribuição celular do Cu. As propriedades antitumorais destes complexos assim como a forma como as diferenças nos ligandos podem alterar a sua atividade são também discutidas com base em dados de espectrometria de massa e abordagem microanalítica (microscopia eletrónica). O objetivo da escolha das células tumorais A2780 para avaliar a captação e distribuição celular por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e as alterações microestruturais induzidas pelos complexos de Cu por microscopia eletrónica de transmissão (TEM), foi o de permitir a comparação dos nossos resultados com os obtidos anteriormente com outros complexos de iões de metal relacionados e sintetizados no nosso grupo.[24]

Embora alguns destes complexos tenham sido estudados anteriormente, existindo uma série de complexos cujas estruturas foram determinadas por difração de raios X de cristal único (DRX-CU) - $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2$ [25] e

[Cu(Me₂phen)₂(NO₃)](NO₃)[26] - a sua especiação em meios de incubação celular e consequente influência na sua captação pelas células não foi tida em conta e, portanto, não permite a correta compreensão dos seus mecanismos de ação. De facto, os mecanismos subjacentes que afetam as propriedades antitumorais da maioria dos complexos de Cu-phen permanecem de um modo geral desconhecidos ou, pelo menos, insuficientemente explorados.[23] Nomeadamente, a possibilidade de ocorrer a decomposição dos complexos de Cu e/ou especiação antes de entrarem nas células, na maioria das experiências *in vitro* em que estes complexos são adicionados aos meios de incubação celular, por norma, não é avaliada. Não obstante, é evidente que para compreender os mecanismos de ação de qualquer complexo de iões de metal em experiências *in vitro* é essencial saber que espécies se encontram presentes nos meios de incubação.

Para avaliar a especiação de complexos de Cu-phen nos meios de incubação habitualmente utilizados em estudos com células de mamíferos, é importante clarificar o comportamento dos sistemas binários envolvendo Cu(II) e phen (incluindo os seus derivados), particularmente a relevância da ligação das várias espécies de Cu presentes à albumina de soro bovino (BSA), a proteína mais abundante presente nos meios de incubação com células de mamíferos. Considerando estudos *in vivo*, no sangue o Cu(II) é transportado principalmente por ceruloplasmina, mas também pela albumina de soro humano (HSA).[27] A HSA é um transportador muito versátil e é conhecida por se ligar a complexos de Cu-phen.[22] Tanto quanto sabemos, apenas existe um artigo que aborda a ligação de complexos de [Cu(phen)₂] à BSA,[28] e a clarificação das espécies que se formam no sistema de Cu-phen-BSA assim como a determinação das correspondentes constantes de ligação é também um dos objetivos deste capítulo.

7.2. Caracterização

Três complexos de Cu(II) foram sintetizados mediante a reação de Cu(NO₃)₂ com phen e os seus derivados: amphen e Me₂phen de acordo com procedimentos obtidos da literatura.[29][30] Os complexos foram caracterizados por análise elementar e técnicas espectroscópicas (ver secção experimental 8.2.2.4.). A estrutura molecular de [Cu(phen)₂(H₂O)](NO₃)₂ (**21**) foi determinada por difração de raios X de mono-cristal (DRX-CU), e a sua estrutura é esquematicamente apresentada na **Figura**

7.1.[31] A estrutura cristalina de $[\text{Cu}(\text{Me}_2\text{phen})_2(\text{NO}_3)]\text{NO}_3$ (**22**) foi também previamente determinada.[32] Alguns outros complexos semelhantes foram também caracterizados estruturalmente, nomeadamente $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{X})]\text{C}(\text{CN})_3$ ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{MeCOO}$),[33] vários $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{OOCMe})](\text{X})_2$, ($\text{X} = \text{NO}_3, \text{ClO}_4, \text{BF}_4$) com estruturas CuN_4O_2 [34][35] e $[\text{Cu}(\text{bipy})_2(\text{NO}_3)]\text{NO}_3$. [36] Prevemos que o complexo **23** no estado sólido tenha ou um ião NO_3^- coordenado como em **22**, ou uma molécula de água tal como em **21**. Todos os complexos mostram uma transição d-d na região do visível a 680-710 nm e espectros RPE a 100 K que puderam ser simulados assumindo simetria axial (**Figura 7.2 e Tabela 7.2** para detalhes). Tanto quanto sabemos, o complexo **23**, que contém a amphen, é novo.

Neste capítulo, quando forem referidos globalmente os compostos phen, e não um em particular, iremos designá-los como Xphen; do mesmo modo, iremos representar complexos **21-23** em solução, quer como $[\text{Cu}(\text{Xphen})_2]^{2+}$ ou como $[\text{Cu}(\text{Xphen})_2]$.

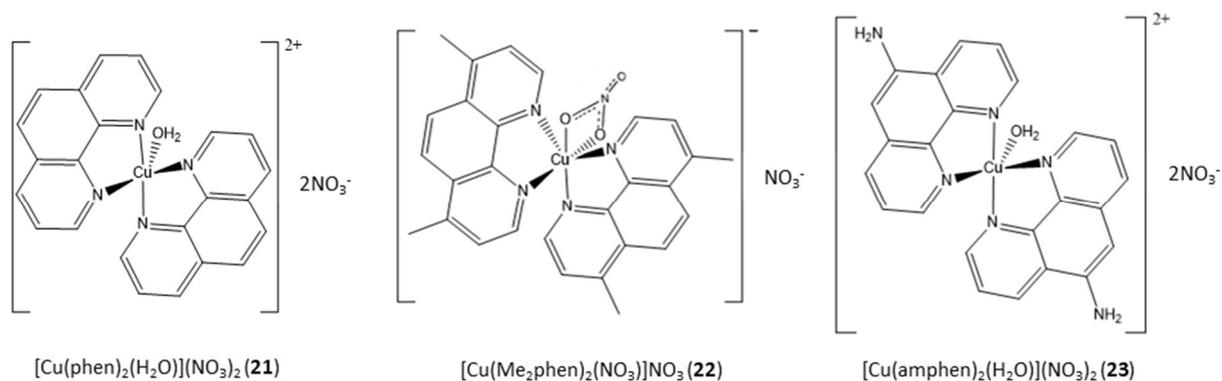


Figura 7.1. Estruturas moleculares previstas para os complexos de Cu **21**, **22** e **23**. As estruturas moleculares de **21** e **22** foram previamente determinadas por DRX-CU.[32]

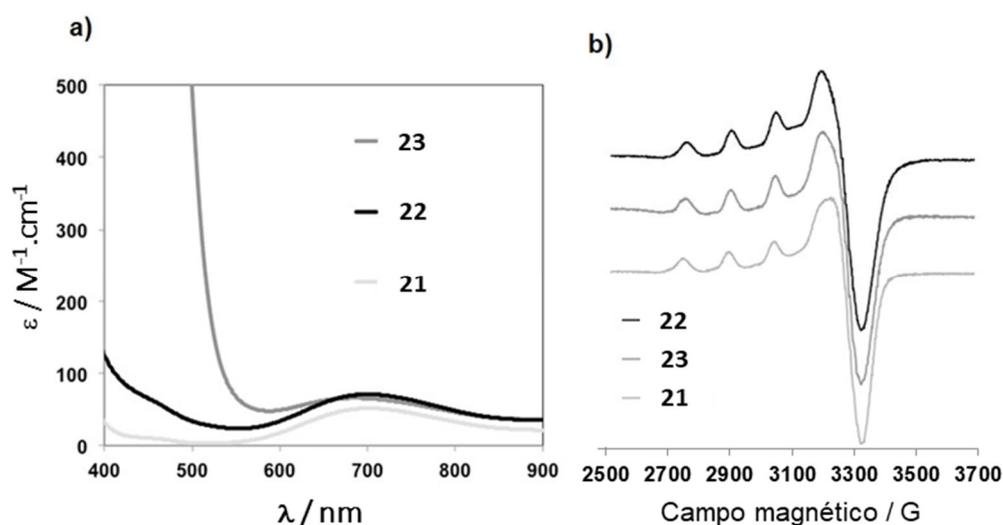


Figura 7.2. a) Espectros de absorção no UV-Vis. de **21-23** adquiridos em DMSO (aprox. 2.5-4 μM) e b) Espectros de RPE obtidos a partir de soluções congeladas em MeOH a 100 K (aprox. 3 mM).

7.3 Estabilidade nos meios celulares

Uma vez que os compostos **21-23** foram testados *in vitro* até 72 h, é importante compreender se são estáveis em meios aquosos. Para isso foram medidos os seus espectros de absorção de UV-Vis. e RPE em: (i) tampão PBS (pH 7.4), e em meios de cultura de células MEM (CM) (iia) na ausência e (iib) presença de soro fetal bovino (FBS) (10% v/v). Na região do UV não foram observadas variações por espectroscopia de absorção, mas na realidade a concentração era demasiado baixa (cerca de 50 μM) para detetar alterações nas transições d-d de cobre na região do Visível (**Figura. 7.3**). Contudo, ocorreu precipitação após 48 h nos meios de cultura celular.

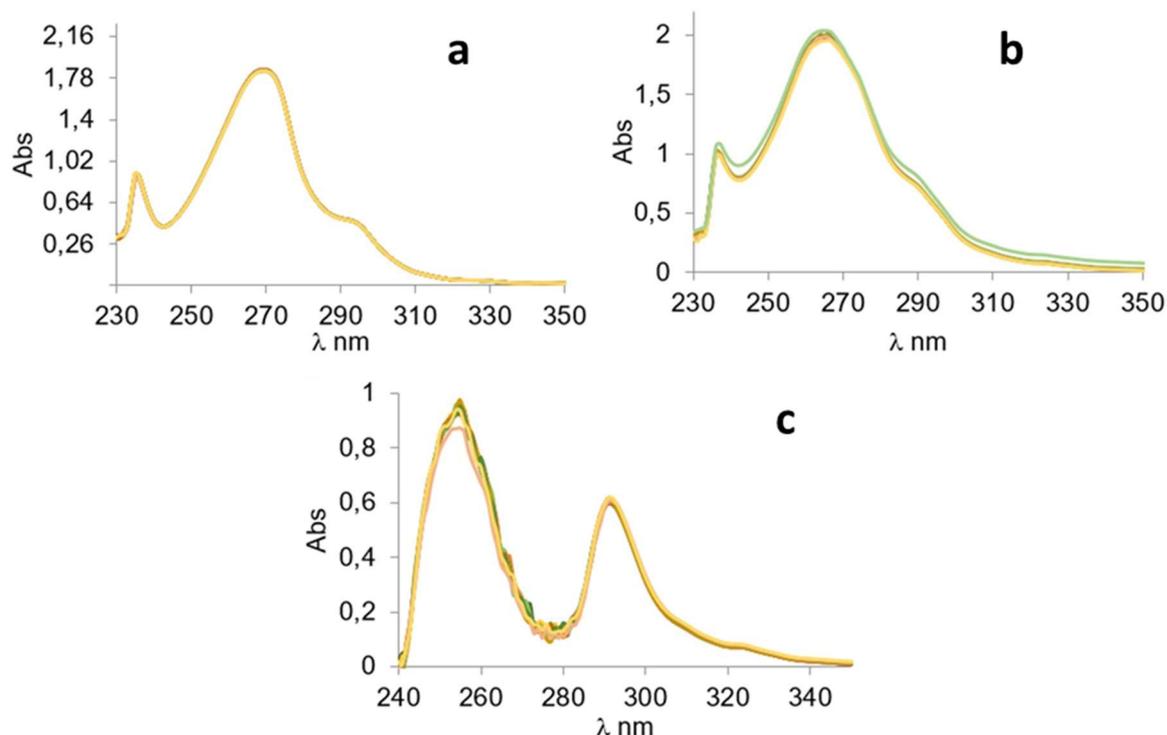


Figura 7.3. Espectros de absorção eletrônica de soluções aquosas com **21** a aprox. 50 μ M adquiridos ao longo do tempo (até 48h) em: **a)** tampão PBS, 10 mM, pH 7.4; **b)** meio celular MEM; **c)** meio celular MEM com 10 % FBS.

Para os estudos de RPE foram preparadas soluções com 500 μ M de complexos de Cu, apesar de serem demasiado elevadas para abordar corretamente as correlações com os dados de citotoxicidade, uma vez que concentrações mais baixas não permitiriam conclusões relevantes relativamente a alterações com o tempo. Os espectros mostraram simetria axial com $g_z > g_{x,y} > 2,0023$ (ver **Tabela 7.2** e **Figura 7.4**) e não foram observadas alterações ao longo do tempo em nenhum dos meios estudados. Porém, os espectros diferem quando comparados em PBS e nos meios celulares. Em PBS os espectros mostraram a presença de um sinal atribuível a uma espécie dinuclear; este também está presente nos meios celulares, embora numa extensão muito inferior. As espécies dinucleares, $[\text{Cu}(\text{bipy})(\text{OH})]_2^{2+}$, foram previamente identificadas em sistemas contendo Cu(II) e 2,2'-bipiridilo no intervalo de pHs 8-10 e nos sistemas Cu(II)-bipy e Cu(II)-phen.[37][38] Os parâmetros do Hamiltoniano de spin para as espécies monoméricas foram obtidos por simulação dos espectros[39] e estão incluídos na **Tabela 7.2**. Em PBS, devido à presença das espécies dinucleares, os espectros não foram simulados, mas pela observação direta é aceitável considerar que o monómero tenha parâmetros semelhantes aos

encontrados nos meios de cultura celular. Os parâmetros dos complexos dissolvidos em MeOH diferem, e o índice de distorção (g_z/A_z) indica que nos meios de cultura celular os complexos de Cu se encontram num ambiente com geometria quadrangular plana com ligeiras distorções ($125 < g_z/A_z < 135$), enquanto que em MeOH, como g_z/A_z , [14] os complexos sofrem distorções tetragonais. [40]

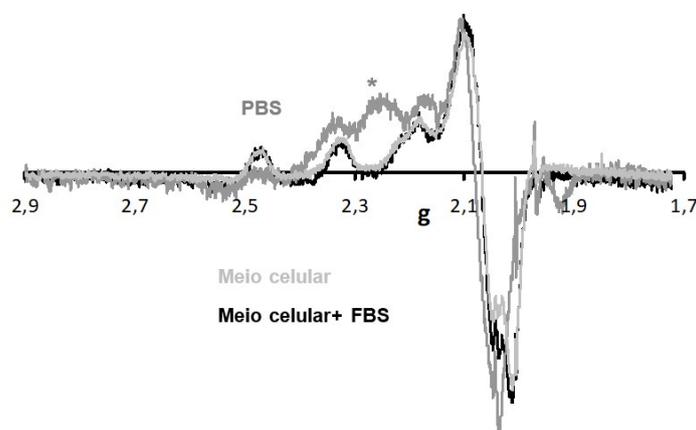


Figura 7.4. Espectros de RPE de 1ª derivada à frequência da banda X medidos a 100K para soluções de **21** após 48 h da sua adição a PBS, ou a meios de cultura celular MEM na ausência e presença de 10% (v/v) de FBS; foram obtidos espectros muito semelhantes após 3 h e 24 h. Concentração do complexo $\approx 500 \mu\text{M}$. O * indica as ressonâncias devidas às espécies dinucleares, que não foram detetadas nos espectros de soluções em meios celulares.

7.4. Estudos de citotoxicidade

A atividade citotóxica de **21-23** contra as células A2780, expressa pelos seus valores de IC_{50} , é apresentada na **Figura 7.5** e na **Tabela 7.1**. De notar, que enquanto após 3 h de incubação, a phen e a amphen não apresentam citotoxicidade relevante ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$), a Me_2phen representa uma atividade moderada ($IC_{50}, 37 \pm 8 \mu\text{M}$). Pode ser observado que os valores de IC_{50} dos complexos e ligandos correspondentes dependem do tempo de incubação. Às 3 h quase todos diferem, mas às 48 e 72 h são todos aproximadamente iguais (exceto o bipy) e a maioria deles estão na gama de concentrações sub-micromolares. De destacar ainda que, às 72 h todos os valores de IC_{50} são também iguais aos dos complexos de phen, amphen e Me_2phen com $Zn(II)$ [42] e com $Fe(III)$. [43] Os valores de IC_{50} a 3 e 24 h para **21-23** diferem dos respetivos ligandos livres, e estas diferenças não podem ser atribuídas unicamente à presença de duas moléculas de polipiridina em cada complexo. A cisplatina, utilizada para comparação, tem um perfil citotóxico diferente, em particular

para tempos de exposição superiores a 3 h. O aumento da atividade de $[\text{Cu}(\text{phen})_2]$ em comparação com o respetivo ligando livre foi reportado anteriormente com diferentes sistemas de células tumorais.[21]

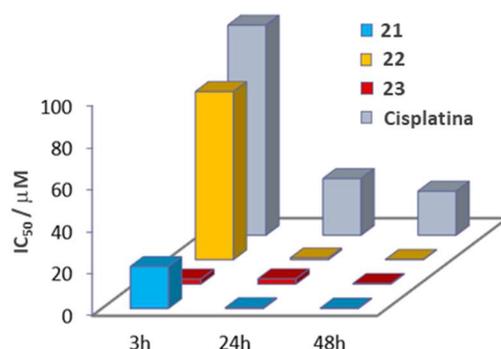


Figura 7.5. Efeito do tempo de incubação na atividade citotóxica dos complexos de $\text{Cu}(\text{II})$; **21-23** e da cisplatina, como fármaco de referência nas células A2780. Estudos realizados pela Dra. Fernanda Maques do Instituto Superior Técnico, Univeridade de Lisboa.

Tabela 7.1. Atividade citotóxica dos compostos nas células A2780 medida a vários tempos de incubação. Os ligandos livres e os complexos correspondentes são comparados. Os dados são médias \pm DP de duas ou mais experiências independentes feitas com pelo menos 6 réplicas por condição. Estudos realizados pela Dra. Fernanda Maques do Instituto Superior Técnico, Univeridade de Lisboa.

$\text{IC}_{50} / \mu\text{M} - \text{A2780}$	3 h	24 h	48 h	72 h
bipy	> 100	> 100	52 ± 25	---
$[\text{Cu}(\text{bipy})_2]$	> 100	3.8 ± 2.2	0.27 ± 0.12	---
phen	> 100	134 ± 62	5.8 ± 2.3	1.7 ± 0.6
21	20.9 ± 4.6	0.4 ± 0.15	0.19 ± 0.07	0.08 ± 0.03
Me_2phen	37 ± 8	14 ± 5	1.4 ± 0.4	0.19 ± 0.13
22	2.4 ± 1.3	2.5 ± 1.0	0.26 ± 0.04	0.09 ± 0.02
amphen	> 100	41 ± 29	1.8 ± 0.6	0.26 ± 0.11
23	80 ± 32	0.87 ± 0.27	0.08 ± 0.03	0.05 ± 0.03

7.5. Estudos de absorção celular por ICP-MS

O ICP-MS é uma técnica extremamente sensível aplicável a uma vasta gama de elementos que pode fornecer informações quantitativas sobre a sua localização subcelular.[44] A **Figura 7.6** mostra os resultados obtidos para a quantidade de Cu encontrada nas frações citosol, membranas, núcleo e citoesqueleto das células A2780 em $\text{ng Cu} / 10^6$ células A2780, bem como em % do Cu total em cada componente

celular. Em termos de % da captação total pelas células, os complexos apresentam um perfil semelhante e uma grande retenção no citoesqueleto.

Salientamos que às 3 h de tempo de incubação, a quantidade de Cu absorvida não está correlacionada com a quantidade de Cu total no meio de incubação celular, sendo dependente do ligando em questão. É evidente na **Figura 7.6A** que embora as quantidades totais no meio de incubação celular fossem de 21 μM (para **21**) e 80 μM (para **23**), a quantidade de Cu absorvido era muito maior no caso do complexo **21** do que no caso do complexo **23**. Além disso, as quantidades de Cu absorvidas nos casos de **22** e **23** são semelhantes, contudo as suas concentrações no meio de incubação celular foram bastante diferentes: 2.4 μM (para **22**) e 80 μM (para **23**). É também interessante comparar $[\text{Cu}(\text{phen})_2]$ (**21**) com o complexo ternário $[\text{Cu}(\text{sal-Gly})(\text{phen})]$ (sal-Gly = N-salicilidenoglicinato), que foi anteriormente reportado.[45] A diferença entre **21** e $[\text{Cu}(\text{sal-Gly})(\text{phen})]$ é a presença de um Sal-Gly em vez do ligando phen. Nas células A2780, a citotoxicidade de ambos os complexos difere para os tempos de incubação curtos e longos; de facto, para 3 h, os valores de IC_{50} são 2.4 μM vs. 26 μM e para 72 h, 80 nM vs. 3 μM para **21** e $[\text{Cu}(\text{sal-Gly})(\text{phen})]$, respetivamente. O ligando phen adicional, que é por si só bioativo, altera a atividade do complexo, mas de uma forma que não pode ser facilmente prevista. Uma das diferenças mais notáveis é que a distribuição celular do Cu difere (**Figura 7.6.**), ou seja, ao ser incubado com **21**, o Cu encontra-se principalmente no citoesqueleto (45%), seguido das membranas (29%), enquanto que ao ser incubado com $[\text{Cu}(\text{sal-Gly})(\text{phen})]$ o Cu encontra-se principalmente nas membranas (48%), seguido pelo citoesqueleto (24%).

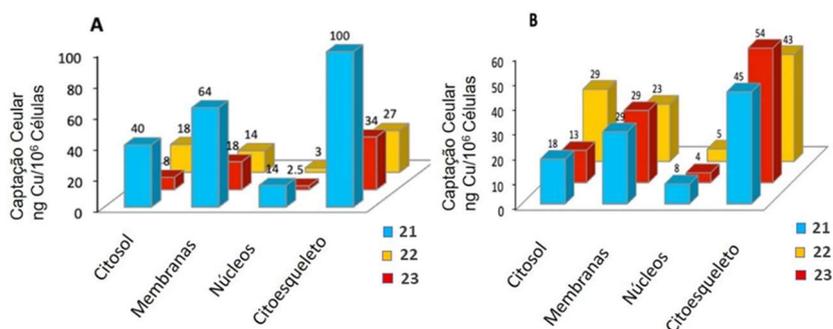


Figura 7.6. Absorção de Cu obtida em frações celulares de células A2780, medida por ICP-MS após 3 h de incubação. As células foram incubadas com 21 μM de **21**, 2.4 μM de **22** e 80 μM de **23**, sendo estas as concentrações correspondentes aos seus valores de IC_{50} às 3 h. **a)** Teor de cobre em ng de células Cu/10⁶ A2780; **b)** Teor de cobre em percentagem da absorção total de Cu. Estudos realizados pela Dra. Fernanda Maques do Instituto Superior Técnico, Univeridade de Lisboa

Outro ponto importante refere-se ao facto de a absorção celular de Cu não estar correlacionada com a atividade citotóxica. A absorção de Cu após 3 h de incubação com **22** e **23** é a mesma (62 ng Cu/10⁶ células), mas **22** é globalmente mais ativo, embora a respetiva absorção de Cu seja inferior; o complexo **22** também tem um IC₅₀ muito inferior a **23** (2.4 vs 80 μM). A maior absorção de Cu com **21** (218 ng Cu/10⁶ células) não originou uma maior atividade; um comentário semelhante pode ser feito para [Cu(sal-Gly)(phen)], com uma absorção total de Cu de 221 ng Cu/10⁶ células).

Com base nestes resultados e outros descritos na literatura com resultados semelhantes,[45] diferentes alvos celulares devem ser considerados para os diferentes complexos de Cu. Uma evidência importante entre os complexos **21-23** está relacionada com a elevada quantidade de Cu encontrada no citoesqueleto, aproximadamente 50% da absorção total de Cu a 3 h de incubação, independentemente da concentração utilizada nos ensaios (que era uma concentração equivalente ao IC₅₀ às 3 h de incubação). Este é um resultado notável se considerarmos o papel central das proteínas citoesqueléticas na migração de células tumorais, metástases e quimiorresistência.[46] O ADN tem sido considerado um alvo para este tipo de compostos, uma vez que têm propriedades de intercalação. No entanto, estes estudos de captação e distribuição celular mostram que os iões Cu não atingem facilmente os componentes nucleares.

7.6. Microscopia eletrónica de transmissão (TEM)

A microscopia eletrónica permite a visualização da localização subcelular de compostos de iões de metal, permitindo observar ao mesmo tempo a integridade estrutural da célula. Esta técnica microscópica tem a vantagem de proporcionar uma resolução espacial que é de quase três ordens de magnitude superior à microscopia convencional de luz, permitindo a resolução dos detalhes estruturais à escala nanométrica.

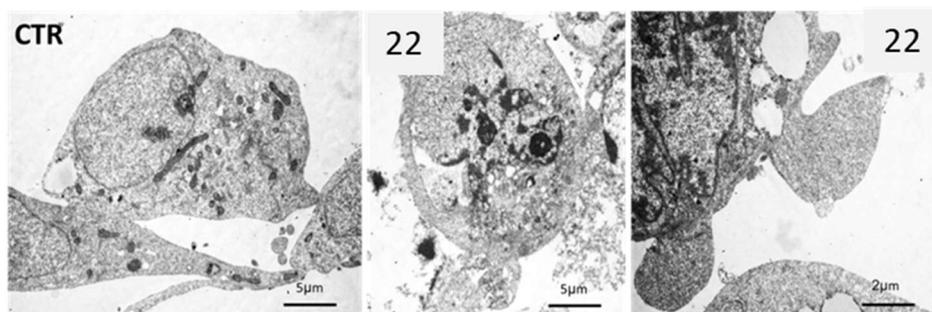


Figura 7.7. Imagens de microscopia eletrónica de transmissão de secções finas de células A2780 tratadas durante 24 h com **21** e **22**. CTR: controlo (sem tratamento); células tratadas com **22** que mostram alterações mitocondriais e bolhas apoptóticas mais evidentes do que **21**. Ensaio realizado pela Dra. Teresa Pinheiro do Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa.

A microscopia eletrónica de transmissão (TEM) foi utilizada para avaliar os efeitos ao nível dos organelos celulares em células A2780 após tratamento com **21** e **22** numa concentração equivalente aos seus valores de IC₅₀ às 24 h: 0.4 e 2.5 µM, respetivamente. Os estudos de TEM confirmam efeitos citotóxicos mais elevados para **22** quando comparados com **21**. Foram observadas alterações degenerativas celulares resultando em células multinucleadas com rutura da membrana nuclear para ambos os complexos, embora mais frequentemente para **22**. Foram também observadas alterações mitocondriais e a formação de gotas lipídicas. Bolhas apoptóticas, embora presentes em todas as amostras com tratamento, foram também mais evidentes em **22** (**Figura 7.7.**). Alguns destes efeitos, nomeadamente alterações mitocondriais que induzem a morte celular por apoptose, foram também descritos para o fármaco de referência cisplatina. De facto, e utilizando análise microscópica ótica, estudos anteriores indicaram que a cisplatina se acumula rapidamente na mitocôndria, deteriorando a estrutura mitocondrial e a função metabólica, levando à morte celular.[47]

7.7. Ensaio de citotoxicidade variando a % de FBS

É importante salientar que, devido à presença de vários potenciais ligandos para o Cu nos meios de incubação, uma vez adicionados os complexos [Cu(Xphen)₂] **21**, **22** ou **23** nesses meios, estes deixarão de estar presentes na sua estequiometria e fórmula original. Em meios de incubação típicos para células de mamíferos, por exemplo, “*Advanced Dulbecco's Modified Eagle's Medium*” (“*Advanced*” DMEM) ou RPMI utilizados neste estudo, existem vários potenciais ligandos de baixo peso molecular para iões metálicos, tais como cloreto (100-110 mM), glucose (10-25 mM), piruvato (aprox. 1 mM), aminoácidos (aprox. 0.01 a 1 mM), vitaminas e mediadores redox (aprox. 1 a 40 µM cada).[48] A relevância de cada um destes compostos depende do ião metálico considerado e da gama de concentração do complexo de iões de metal a ser avaliado.

Em relação aos potenciais ligandos de elevado peso molecular, as albuminas são os principais compostos a considerar. O soro fetal bovino (FBS) pode conter até cerca de 360 g/L ($\approx 540 \mu\text{M}$) de BSA, bem como outras proteínas; está tipicamente presente em meios de incubação celular na gama de 2 a 10 % e é a principal fonte de albumina em contacto com as células. O FBS utilizado nos nossos estudos de citotoxicidade continha ≈ 26 g/L de BSA. Tendo sido adicionado em proporção de 10%, portanto, o meio de incubação utilizado continha quantidades significativas de albumina de soro bovino (aprox. $40 \mu\text{M}$).

No **Anexo 3**, foi considerada a importância dos vários potenciais ligandos presentes no meio de incubação. Para além das fenantrolinas, o principal potencial ligando de Cu(II) é a BSA, particularmente nas experiências com concentrações de complexos de Cu-phen mais baixas.

Para verificar o efeito da BSA na atividade citotóxica, foram realizadas experiências com a variação da quantidade de FBS adicionada ao meio de incubação entre 1 e 20 % (**Figura 7.8**). Para este efeito, os complexos foram avaliados numa concentração equivalente ao seu valor de IC_{50} a 3 h de exposição no meio contendo 10 % de FBS. Como se pode observar na **Figura 7.8**, a atividade do **23** contra as células A2780 não é muito afetada pela alteração da % em FBS. Em contraste, as atividades de **22** e particularmente de **21** são afetadas pela presença de BSA nos meios celulares, que é principalmente imposta pelo FBS. Mesmo para períodos de incubação mais reduzidos, foi observado um ligeiro aumento da atividade citotóxica para percentagens de FBS inferiores aos 10 %, recomendadas como suplemento do meio de cultura.

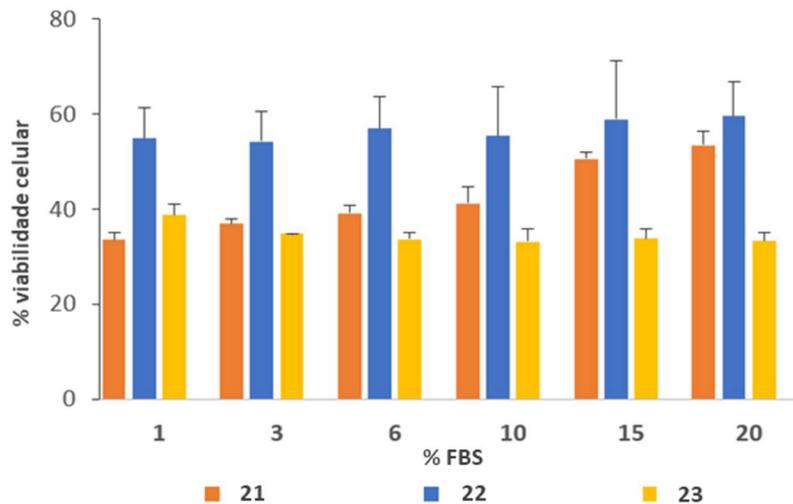


Figura 7.8. Efeito do teor de proteínas séricas no meio de incubação celular na atividade citotóxica de **21**, **22** e **23**, contra as células A2780, avaliado pela % de FBS adicionada ao meio de incubação. Os complexos foram avaliados numa concentração equivalente ao seu valor IC_{50} a 3 h de exposição no meio de cultura com 10 % de FBS (**21** - 20 μ M; **22** - 2,4 μ M e **23** - 80 μ M). As concentrações totais de BSA, $[BSA]_{total}$, no meio de incubação variam na gama aprox. 4-80 μ M, correspondentes a 1 - 20 % de FBS, respetivamente. Os dados obtidos são médias \pm DP de duas experiências independentes realizadas com pelo menos 6 réplicas por condição. Estudos realizados pela Dra. Fernanda Maques do Instituto Superior Técnico, Univeridade de Lisboa

Um resultado significativo resultante destas experiências (**Figura 7.8**) reside no facto da viabilidade das células poder depender da quantidade de FBS, portanto da $[BSA]$ presente no meio de incubação. A insensibilidade contrastante de **23** à variação da % de FBS quando comparada com **21** (e **22**) pode ser justificada pela concentração muito superior deste complexo-Cu utilizada nestes ensaios. Efetivamente, as concentrações foram de 20 μ M para **21** e 2.4 μ M para **22**, enquanto que para **23** foi de 80 μ M, correspondendo aos valores de IC_{50} a 3 h de incubação. Portanto, nos ensaios com diferentes % de FBS, a concentração total de $[Cu(amphen)_2]$ é sempre superior quando comparada com as concentrações de albumina, o que provavelmente explica a não dependência da viabilidade da célula com a variação da % de FBS.

Estes ensaios mostram claramente que a presença de BSA tem implicações sobre a atividade citotóxica. Por conseguinte, propusemo-nos a avaliar a ligação da BSA a $[Cu(Xphen)_2]$ através de várias metodologias, primeiro (a) qualitativamente confirmando a sua ligação utilizando técnicas espectroscópicas [RPE e dicroísmo

circular (DC)], e depois (b) quantitativamente utilizando medições de DC. A maioria destes dados são apresentada ou no final deste capítulo, ou em no **Anexo 4**.

7.8. Ligação de complexos de Cu à BSA

Foram obtidos espectros de RPE dos complexos em meios de incubação celular (CM) na presença e ausência de FBS (10% v/v). A **Tabela 7.2** inclui os parâmetros do Hamiltoniano de spin determinados por simulação (**ver anexo 4**, para mais detalhes). Os valores de g_z e $|A_z|$ determinados para **21-23** em MeOH diferem significativamente dos valores em meios celulares contendo ou não FBS.

Tabela 7.2. Parâmetros do Hamiltoniano de spin obtidos para os complexos **21-23** por simulação das espécies monoméricas observadas. CM - meio de cultura celular; CM+FBS - meio de cultura celular + 10% (v/v) FBS.

	$g_{x,y}$	g_z	$ A_x , A_y $ ($\times 10^4 \text{ cm}^{-1}$)	$ A_z $ ($\times 10^4 \text{ cm}^{-1}$)	$g_z/ A_z $ ($\times 10^4 \text{ cm}$)
[Cu(phen) ₂ (H ₂ O)](NO ₃) ₂ (21)					
MeOH	2.074	2.296	21	153	149
CM	2.059	2.262	18	173	131
CM + FBS	2.058	2.262	19	173	131
[Cu(Me ₂ phen) ₂ (NO ₃) ₂](NO ₃) ₂ (22)					
MeOH	2.074	2.292	24	150	150
CM	2.059	2.262	20	167	135
CM + FBS	2.060	2.264	23	166	136
[Cu(amphen) ₂ (H ₂ O)](NO ₃) ₂ (23)					
MeOH	2.074	2.296	21	153	150
CM	2.062	2.264	16	171	131
CM + FBS	2.060	2.265	18	169	134

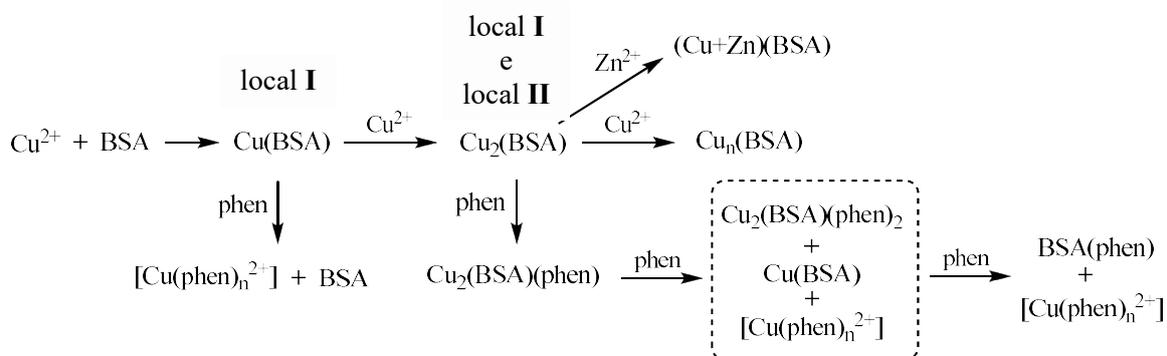
Sabe-se que a BSA tem um local com grande afinidade para os íons de Cu(II) sendo os parâmetros do Hamiltoniano de spin para as espécies [Cu^{II}(BSA)] os seguintes: $g_x = g_y = 2.055$; $g_z = 2.177$; $|A_x|, |A_y| = 16 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, $|A_z| = 217 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$. [49] Os parâmetros do Hamiltoniano de spin obtidos para os complexos **21-23** nos meios celulares que contêm ou não FBS, mostram algumas diferenças muito subtis sendo os espectros bastante semelhantes. Contudo, diferem significativamente dos medidos para [Cu^{II}(BSA)] e para os complexos dissolvidos em MeOH. Portanto, a ligação dos complexos de Cu-phen a biomoléculas como, por exemplo, BSA nos meios de incubação, não pode ser excluída. Nas experiências correspondentes aos dados apresentados na **Tabela 7.2**, a concentração de BSA nos meios de cultura celular + 10% de ensaios FBS foi de cerca de 40 μM , representando assim cerca de uma ordem de grandeza inferior à concentração total do composto de Cu-phen inicialmente

dissolvido (cerca de 500 μM ; para concentrações significativamente mais baixas, os espectros de RPE seriam demasiado fracos). Por outro lado, os parâmetros do Hamiltoniano de spin esperados para a espécie ternária BSA-Cu-phen, que presumivelmente também se pode formar nestas amostras, deverão ser semelhantes aos medidos para os complexos HSA-Cu-phen.[27] Por conseguinte, não foi possível distinguir/detetar quantidades significativas de espécies Cu-BSA ou Cu-BSA-phen nas condições utilizadas, mas a sua formação não pode ser excluída.

7.8.1. Determinação das constantes de ligação das espécies Cu(II)- e Cu-phen à BSA.

Os meios de incubação celular (CM) são soluções muito complexas e contêm muitos potenciais ligandos para o Cu(II). A albumina de soro bovino está presente em concentração relativamente elevada (cerca de 40 μM quando se adiciona 10 % de FBS), e pode ligar-se aos iões Cu(II).[28][29][27] Além disso, das experiências acima descritas, e de outras medições de RPE e DC efetuadas (ver abaixo), é evidente que as espécies de Cu-phen se podem ligar a BSA. Considerando a composição dos meios celulares utilizados,[48] é previsível que phen e BSA são potenciais ligandos para os iões de Cu(II) e que todos os componentes de baixo peso molecular terão menor importância.

Para determinar as constantes de ligação das espécies de Cu-phen à BSA, foram efetuados um grande número de medições de espectros de DC, descritos no **Anexo 4**. O **Esquema 7.1** resume os processos que ocorrem em soluções com Cu(II), BSA e phen mais relevantes nestes sistemas.



Esquema 7.1. Processos que ocorrem em soluções tampão que contêm BSA às quais é adicionado $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, seguido de adições de phen [e de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$].

Para a determinação quantitativa das constantes condicionais de ligação relevantes foi utilizado o programa HypSpec,[56] considerando os muitos espectros de DC medidos para os sistemas Cu-BSA e Cu-BSA-phen. Estes cálculos foram efetuados pela Dr^a Sofia Gama em colaboração com os meus orientadores, (**Anexo 2**). Os complexos de $[Cu_n(BSA)]$ com $n = 21-23$ e $[(Cu)_p(phen)_q(BSA)]$ foram aqueles com constantes de ligação condicional (β) a serem determinadas, sendo estas definidas no **equilíbrio I**. A **Tabela 7.3** apresenta o conjunto de valores de $\log \beta$ obtidos nos cálculos, e a **Esquema 7.2**. resume o tipo de espécies possíveis de se formar com a BSA.

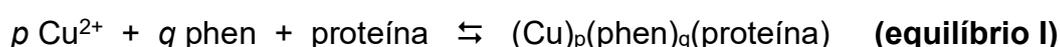


Tabela 7.3. Constantes de ligação condicional a $pH 7.4 \pm 0.1$ obtidas a partir de cálculos efetuados com HypSpec[56] baseados nos espectros de DC medidos para os sistemas Cu-BSA e Cu-BSA-phen.^[a]

Espécies	$\log \beta$ ^[b]	$\log K$
B1: Cu(BSA)	12.5 ± 0.5	12.5
B2: Cu ₂ (BSA)	21.5 ± 2.0	9.0
B3: Cu ₃ (BSA)	25.4 ± 2.0	3.9
T1: Cu(BSA)(phen)	17.9 ± 1.5	5.4
T2: Cu ₂ (BSA)(phen)	29.0 ± 1.5	7.5
T3: Cu ₂ (BSA)(phen) ₂	32.5 ± 1.0	3.5

^[a] As seguintes constantes de estabilidade foram assumidas para complexos $[Cu(phen)_n]^{2+}$: $\log \beta_1 = 9.1$, $\log \beta_2 = 15.85$ e $\log \beta_3 = 20.9$ [51] ($\log \beta_n$ definido pela eq. 5 no **Anexo 2**) e $Cu(OH)^+$ ($\log = -6.5$).[52]

^[b] Os valores DP incluídos não foram os obtidos a partir de cálculos individuais, mas foram estabelecidos considerando a gama de valores calculados e considerados razoáveis para cada constante de ligação.

^[c] Os valores K correspondem às constantes de ligação parciais (ver **Anexo 2**).

$[\text{Cu}(\text{phen})_q]$ ($q = 1$ a 3) e $[\text{Cu}_n(\text{BSA})]$ ($n = 1$ a 3) e $[\text{Cu}_p(\text{phen})_q(\text{BSA})]$ com constantes de ligação, como se mostra na **Tabela 7.3**.

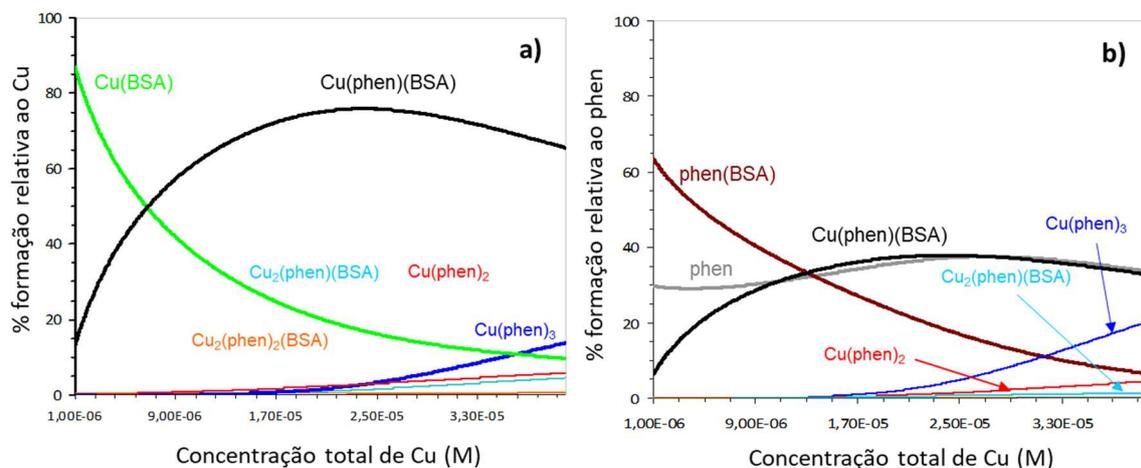


Figura 7.9. Diagrama de distribuição das espécies para o sistema Cu(II)-BSA-phen. Diagramas de espécies assumindo a formação de complexos $[\text{Cu}(\text{phen})_n]$ ($n = 1-3$), a formação de $[\text{Cu}_n(\text{BSA})]$ ($n = 1-3$) e de espécies de Cu-BSA-phen a pH = 7.4, em função da concentração total de Cu(II) (adicionado como $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$), no intervalo de concentrações: 1-40 μM . $[\text{BSA}]_{\text{total}} = 40 \mu\text{M}$, que corresponde aproximadamente a 10% de FBS nos meios de incubação. A figura representa a formação de **a)** espécies contendo Cu, e **b)** espécies contendo phen. A representação correspondente das espécies que contêm BSA está representada na **Figura 7.10**. As constantes de formação utilizadas para cálculos com o programa HySS encontra-se na **Tabela 7.3**.

Em relação às espécies que contêm Cu, verifica-se que até uma concentração total de Cu(II) $\approx 25 \mu\text{M}$, a maior parte do Cu(II) está sob a forma de complexos $[\text{Cu}(\text{BSA})]$ e $[\text{Cu}(\text{BSA})(\text{phen})]$. De assinalar que as espécies $[\text{Cu}(\text{phen})_n]$ ($n = 0-3$) não estão presentes em concentrações muito relevantes neste meio de incubação celular, exceto para $[\text{Cu}]_{\text{total}} > 25 \mu\text{M}$, muito superior aos valores de IC_{50} para o complexo **21** a 24, 48 e 72 h. A importância relativa de $[\text{Cu}(\text{BSA})(\text{phen})]$ (**T1** na **Figura 7.9**) aumenta progressivamente até $\approx 75 \%$, quando $[\text{Cu}]_{\text{total}} \approx 25 \mu\text{M}$ (superior ao valor de IC_{50}), e a $[\text{Cu}_2(\text{BSA})(\text{phen})_2]$ nunca se apresenta como espécie relevante. Em relação às espécies contendo phen, até um total de $[\text{Cu}] \approx 40 \mu\text{M}$, (phen)BSA, phen livre e $[\text{Cu}(\text{BSA})(\text{phen})]$ são dominantes. Nomeadamente, $[\text{Cu}(\text{BSA})(\text{phen})]$ corresponde a cerca de 30-38 % do total de phen no intervalo de $[\text{Cu}]_{\text{total}} 10-40 \mu\text{M}$. Relativamente às espécies contendo BSA até um total de $[\text{Cu}]_{\text{total}} \approx 40 \mu\text{M}$, BSA, $[\text{Cu}(\text{BSA})]$, (phen)BSA e $[\text{Cu}(\text{BSA})(\text{phen})]$ são as espécies mais relevantes.

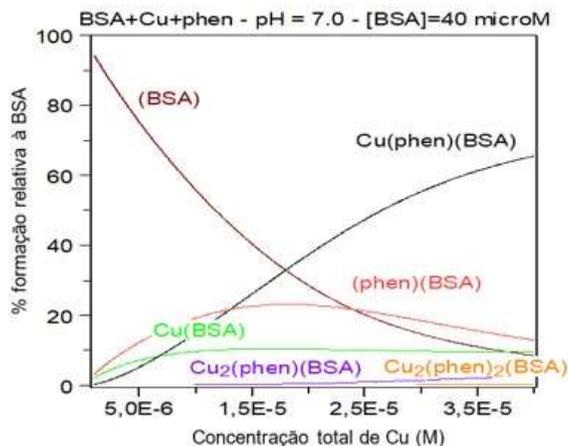


Figura 7.10. Diagrama de distribuição das espécies considerando a formação de complexos $[Cu(phen)_n]$ ($n = 1-3$), a formação de espécies $[Cu_n(BSA)]$ ($n = 1-3$) e de espécies Cu-BSA-phen, em função da concentração de Cu(II) entre 1-40 μM , e $[BSA]_{\text{total}} = 40 \mu\text{M}$ (que corresponde aproximadamente a 10% de FBS nos meios de incubação celular).

Globalmente, à medida que a quantidade total de BSA aumenta nos meios de incubação, a % relativa de espécies de Cu ligadas à BSA também aumenta, enquanto que as espécies Cu-phen diminuem. A **Figura 7.11.** mostra diagramas de especiação com $[BSA]_{\text{total}}$ de 20 μM , e a **Figura 7.12.** mostra a importância relativa das várias espécies, uma vez que a $[BSA]_{\text{total}}$ varia na gama de 4 a 80 μM para $[Cu(phen)_2]_{\text{total}} = \text{constante} = 20 \mu\text{M}$.

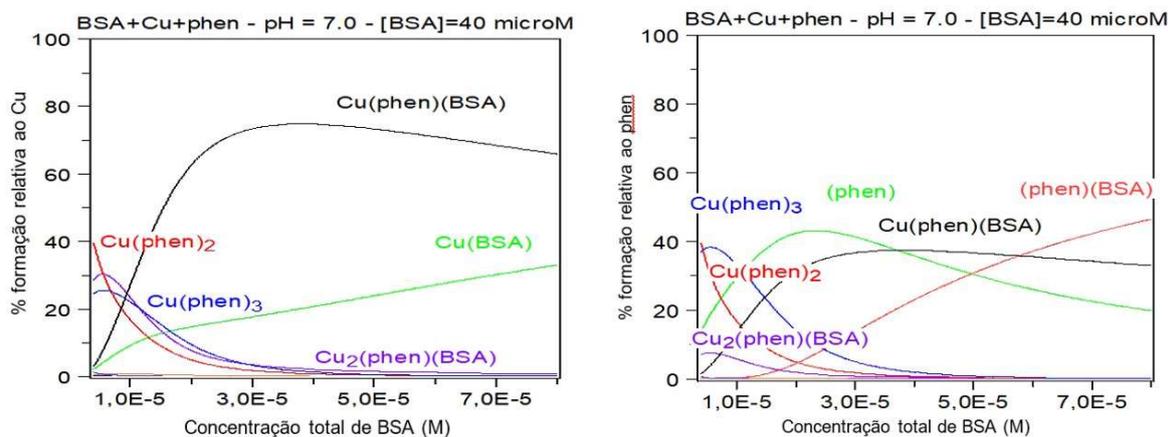


Figura 7.11. Diagramas de distribuição das espécies considerando a formação dos complexos $[Cu(phen)_n]$ ($n = 1-3$), a formação das espécies $[Cu_n(BSA)]$ ($n = 1-3$) e Cu-BSA-phen, em função da concentração de BSA entre 4 e 80 μM , e $[Cu]_{\text{total}} = 20 \mu\text{M}$.

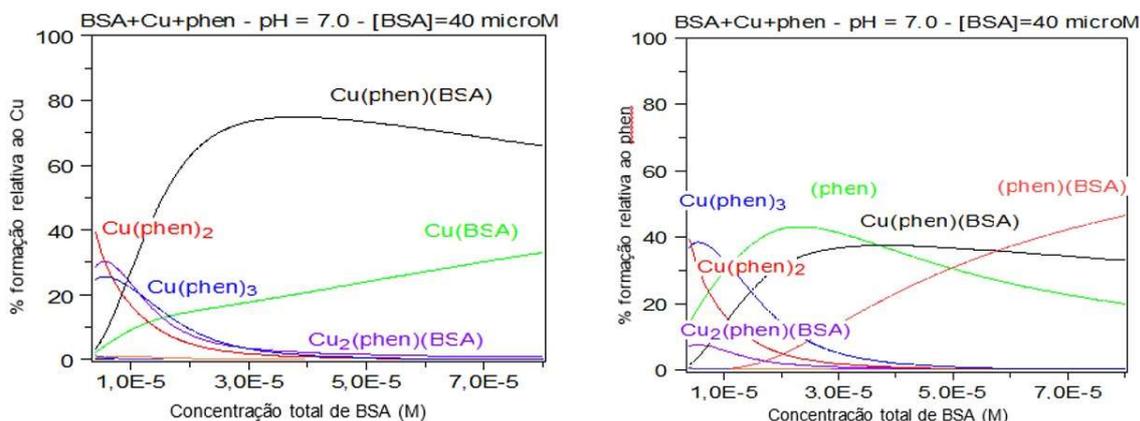


Figura 7.12. Diagramas de distribuição das espécies considerando a formação dos complexos $[Cu(phen)_n]$ ($n = 1-3$), a formação das espécies $[Cu_n(BSA)]$ ($n = 1-3$) e Cu-BSA-phen, em função da concentração de BSA entre 4 e 80 μM , e $[Cu]_{total} = 20 \mu M$.

Globalmente a viabilidade celular, representada na **Figura 7.8** para $[Cu(phen)_2]$ (**21**), aumenta à medida que a importância relativa de Cu-phen e phen diminuem, e $[Cu(BSA)]$ e (phen)BSA aumentam.

É evidente que uma vez adicionados os complexos $[Cu(Xphen)_2]$ **21-23** aos meios de incubação celular, os complexos dissolvidos deixarão de estar presentes na sua forma original, pelo que a simples atribuição de quais as espécies ativas não é possível. Esta observação não tem sido habitualmente considerada na maioria das publicações que abordam a citotoxicidade dos complexos de Cu com ligandos lábeis.

Salientámos que a citotoxicidade, particularmente para tempos de incubação mais curtos, difere para a phen e o $[Cu(phen)_2]$. A absorção celular de Cu depende do ligando, como claramente demonstrado anteriormente, pelo que a adição de complexos $[Cu(Xphen)_2]$, em vez de sais de Cu(II) ou moléculas de Xphen, afeta ligeiramente a eficiência da absorção de iões de Cu(II) e de moléculas de Xphen pelas células. Isto foi previamente sugerido no caso da 2,7-dimetil-1,10-fenantrolina.[53]

Embora nesta fase não seja possível atribuir a citotoxicidade de **21** a uma determinada espécie, muito provavelmente não é devida a $[Cu(phen)]^{2+}$ ou $[Cu(phen)_2]^{2+}$; além destas espécies não serem muito relevantes nos meios de incubação, a BSA na espécie: $[Cu(BSA)(phen)]$ tem o Cu(II) e o ligando phen ligados em locais distintos (**Figura 7.9**). Assim, a citotoxicidade será muito provavelmente devida à ação separada dos iões Cu e das moléculas de phen. Para o Cobre, os

estudos de ICP-MS nas células tumorais do ovário A2780 indicam que o citoesqueleto é um alvo plausível, uma vez que o cobre se acumula sobretudo nesse componente após a incubação de células com o complexo **21**.

O cobre é um elemento essencial para mamíferos e em condições fisiológicas os iões Cu entram nas células por transportadores específicos, quer como Cu(I) ou como Cu(II). Uma vez adquirido o Cu(II) é reduzido a Cu(I) e este ião é estritamente controlado dentro das células, de tal forma que praticamente não existem iões de Cu livres.[54][55] De facto, as células têm chaperonas específicas de Cu(I) que fornecem Cu a proteínas, e a concentração intracelular de cobre é rigorosamente controlada de modo a que seja apenas fornecido às enzimas essenciais.[56] Assim, uma vez dentro das células e estando presente como Cu(I), este liga-se a ligandos fortes, tais como proteínas contendo sequências adequadas de peptídeos, e/ou pequenas moléculas como o GSH.[57][58][59]

Portanto, mesmo que algumas espécies de Cu-phen entrem nas células, o ligando phen será libertado e, à escala global, o ião metálico e a phen irão provavelmente visar locais distintos nas células, com uma atividade biológica que resultará principalmente da ação separada tanto das espécies de Cu(I) formadas como das moléculas phen. São poucos os estudos publicados a sugerirem esta possibilidade.[53][58]

A adição de iões Cu(II) aos meios de incubação celular foi reportada no sentido de aumentar a citotoxicidade de, por exemplo, 2,9-Me₂phen[61] e de phen.[60] No caso do 2,9-Me₂phen, este facto foi atribuído à elevada estabilidade do respetivo complexo de Cu(I) [Cu^I(2,9-Me₂phen)₂], que tem uma constante de formação superior à do [Cu^I(phen)₂][59] de $\approx 10^{3.3}$. Assim, enquanto os complexos com ligandos que se ligam fortemente ao Cu(I), como o 2,9-Me₂phen, podem permanecer parcialmente intactos no interior das células, para [Cu^I(phen)_n] (n = 1 ou 2) tal não é plausível.

7.8.3.1. Espectros de DC de soluções com albumina de soro bovino, Cu(II) e phen.

O sistema Cu(II)+BSA+phen foi estudado pela aquisição de espectros de DC na região do visível[27] para determinar as espécies formadas e as constantes de ligação correspondentes. Considerando as constantes de ligação β_{pq} definidas na eq. 5 no **anexo 2**, vários conjuntos de espectros de DC (e RPE) foram adquiridos a pH = 7.4 para os sistemas Cu(II)+BSA e Cu(II)+BSA+phen, a vários rácios molares. A maioria

destes dados está incluída nesta secção. A **Figura 7.13** realça alguns aspetos pertinentes, observados para soluções com rácios Cu:BSA:phen molar de 1:1:n.

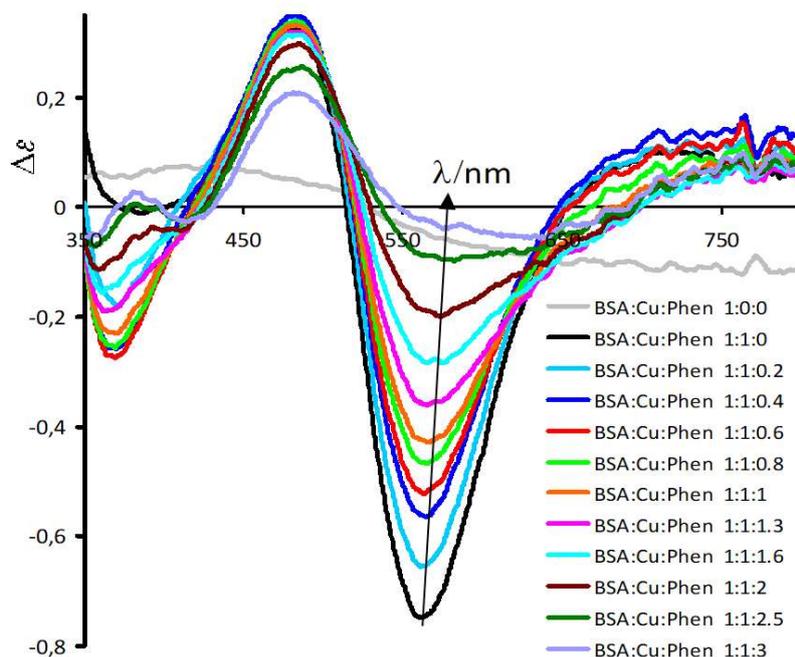


Figura 7.13. Espectros de DC de soluções com 0.4 mM de BSA em PBS na região 350-800 nm, após adição de uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de modo a que a razão molar Cu:BSA fosse 1:1, seguida da adição de uma solução de phen até uma razão molar final de Cu:BSA:phen de 1:1:3.

Quando $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ é adicionado à BSA até uma razão molar de 1:1, o Cu(II) liga-se no local 1 e o espectro de DC representa o espectro típico correspondente, com bandas negativas a ≈ 365 e ≈ 560 nm, e uma banda positiva a ≈ 480 nm. Na **Figura 7.13** surge uma banda positiva a 700-740 nm, indicando que uma quantidade significativa de $[\text{Cu}_2(\text{BSA})]$ também se formou. De um modo geral, a adição de phen provoca a diminuição dos valores de $|\Delta\epsilon|$ na região 350-750nm, significando que o íão de Cu(II) está a ser progressivamente removido da BSA pelo ligando competidor phen, formando principalmente espécies $[\text{Cu}(\text{phen})_n]^{2+}$ na solução, que são silenciosas em DC. Algumas observações mais detalhadas podem também ser formuladas: (i) a banda com o $\lambda_{\text{máx}}$ a 560 nm diminui continuamente de intensidade ao adicionar a phen (e o $\lambda_{\text{máx}}$ desloca-se ligeiramente para comprimentos de onda mais elevados), (ii) a aprox. 365 nm, não há uma banda distintamente visível para a solução 1:1:0 (de BSA:Cu:phen); à medida que se adiciona phen, há um aumento da intensidade (negativa) até 1:1:0.6 (de BSA:Cu:phen), verifica-se então uma diminuição da intensidade, aparentemente devido à formação de outra banda positiva a aprox. 380

nm; (iii) na região a aprox. 650-850 nm, a banda observada a ≈ 720 nm, devida à ligação de Cu(II) à BSA, tem algumas variações, nomeadamente, surge uma banda positiva com dois máximos: $\lambda_{\text{máx.}}$ a 760 nm, e a ≈ 690 nm, e os seus valores de $\Delta\epsilon$ diminuem.

A **Figura 7.14** apresenta espectros de DC de algumas das soluções correspondentes aos espectros da **Figura 7.13** e após adições progressivas de uma solução de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ até Cu:BSA:phen:Zn relações molares de 1:1:3:4. Globalmente, a adição de iões Zn(II), que competem com Cu(II) pela ligação a phen, origina um aumento dos valores $|\Delta\epsilon|$ no intervalo 350-750nm, uma vez que a espécie Cu(II) (de $[\text{Cu}(\text{phen})_n^{2+}]$ na solução é progressivamente “libertada” pela phen e liga-se no local 1 da BSA.

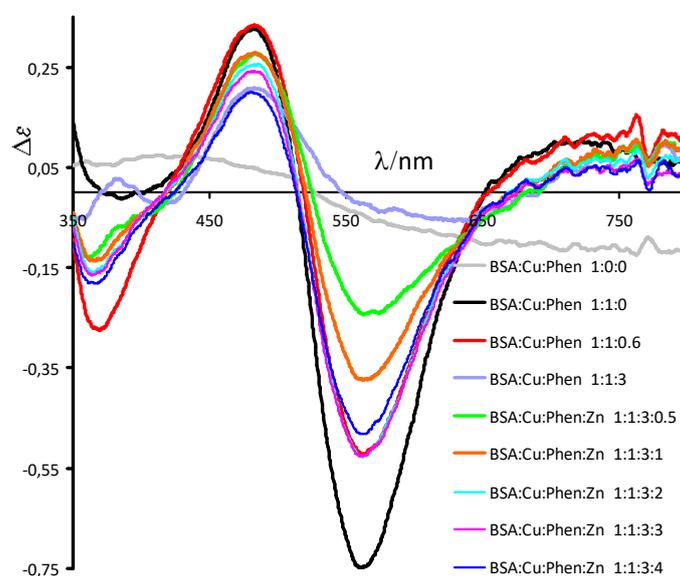


Figura. 7.14. Espectros de DC de soluções contendo 0.4 mM de BSA em PBS, no intervalo 350-800 nm, após adição de uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de modo a que a razão molar Cu:BSA fosse 1:1, seguida da adição de uma solução de phen até uma razão molar final de Cu:BSA:phen de 1:1:3. Em seguida, uma solução de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ foi progressivamente adicionada.

A **Figura 7.15** mostra alguns aspetos relevantes para soluções com rácios Cu:BSA:phen molares de 1:2:n. É evidente que quando a phen é adicionado à solução de $[\text{Cu}_2(\text{BSA})]$, os valores $|\Delta\epsilon|$ a ≈ 365 nm aumentam significativamente; justificada pela formação progressiva de uma espécie $[\text{Cu}_2(\text{BSA})(\text{phen})]$ (por exemplo **T2**, **Figura 7.9**), esta banda correspondente a uma banda de transição de carga do ligando para o metal. As bandas a ≈ 475 e ≈ 562 nm permanecem sem grandes alterações, o que significa que o Cu(II) ligado no local 1 da BSA não está a ser afetado. A banda a aprox.

660-800 nm diminui de intensidade, o que indica que o ligando phen adicionado está ligado aos íons Cu(II) ligados no local 2. Na **Figura 7.15B** é evidente que a banda a ≈ 365 nm diminui a sua intensidade, a banda a aprox. 475 nm não é muito afetada, e a banda a ≈ 562 nm diminui a intensidade provavelmente devido à formação de uma banda com $\Delta\varepsilon > 0$ a aprox. 700 nm, devido à presença de um complexo Cu(II)-BSA-phen, distinto do inicialmente formado $[\text{Cu}_2(\text{BSA})(\text{phen})]$. Uma estequiometria possível para esta espécie é $[\text{Cu}_2(\text{BSA})(\text{phen})_2]$; esta estequiometria pode corresponder a mais do que uma espécie (ver por exemplo **T3**, **T3A** na **Figura 7.9**). Acrescidas adições de phen até uma razão molar Cu:BSA:phen de 2:1:10.6 diminuem globalmente os valores $|\Delta\varepsilon|$, e à medida que mais phen é adicionado à solução, mais íons Cu(II) são deslocados da BSA para a solução, formando a espécie $[\text{Cu}(\text{phen})_n]^{2+}$ silenciosa em

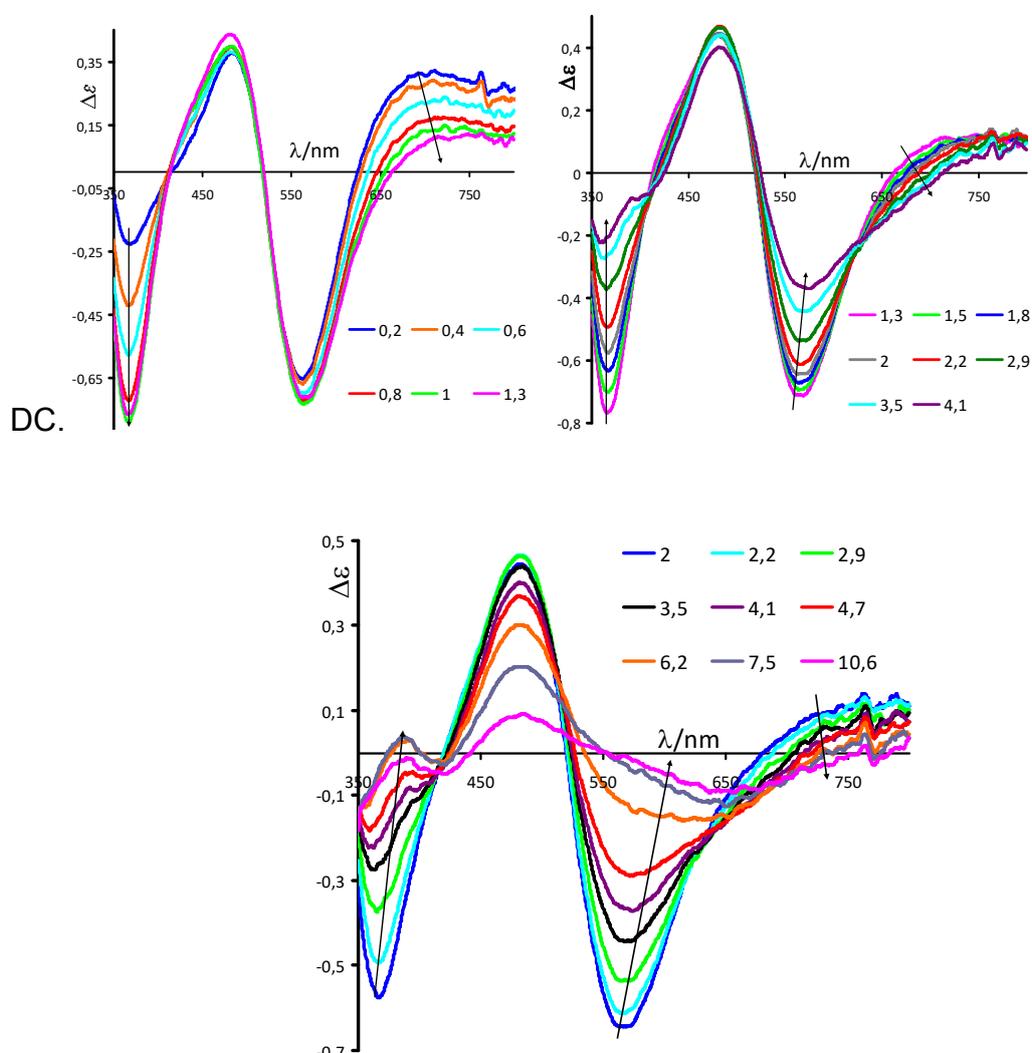


Figura 7.15. Espectros de DC, no intervalo entre 350-800 nm, de soluções com 0.4 mM BSA em PBS a pH = 7.4, após adição de uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de modo a que os rácios molares Cu:BSA fossem 2:1, seguidos de adições de uma solução de phen até aos rácios molares Cu:BSA:phen indicados.

A **Figura 7.16** mostra o espectro de DC de uma solução contendo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ e BSA na razão molar Cu:BSA de 2:1 a pH 7.4, e após adições de phen até uma razão molar Cu:BSA:phen de 2:1:4. Seguiu-se a adição de uma solução de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$. Enquanto a adição de phen diminui globalmente os valores $|\Delta\varepsilon|$, devido à remoção parcial de Cu(II) do local 1 (devido à formação de complexos $[\text{Cu}(\text{phen})_n^{2+}]$ na solução), após a adição de íons Zn(II), que competem com o Cu^{2+} na ligação à phen, globalmente os valores $|\Delta\varepsilon|$ na região do visível aumentam. A **Figura 7.16** mostra os espectros de RPE numa experiência semelhante: após adição de uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, os raios molares Cu:BSA foram de 2:1, seguidos de adições de uma solução de phen até um raio molar final de Cu:BSA:phen de 2:1:8. Em seguida, uma solução de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ foi progressivamente adicionada até uma razão molar Cu:BSA:phen:Zn de 2:1:8:3. Este último espectro é muito semelhante ao espectro com a razão molar de 2:1:1:0, sugerindo que o íon Zn(II), além de competir com Cu(II) para a ligação ao local MBS de BSA, também compete com Cu(II) para a ligação a phen, formando complexos $[\text{Zn}(\text{phen})_n^{2+}]$ na solução.

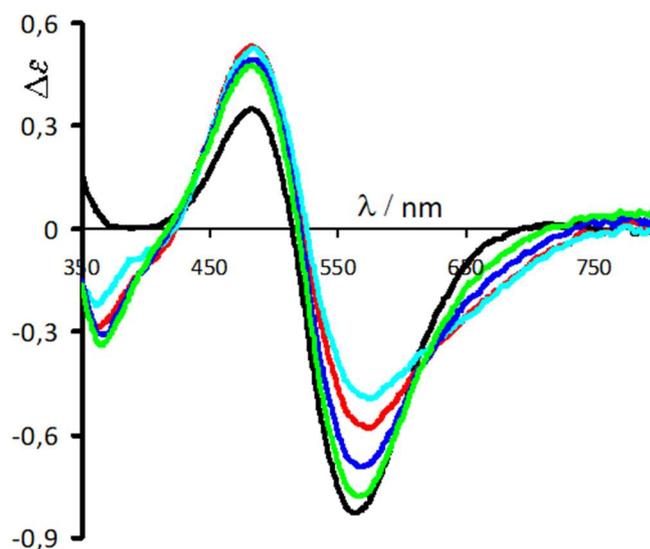


Figura 7.16. Espectros de DC de soluções com 0.40 mM de BSA em PBS, no intervalo entre 350-800 nm, após adição de uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de modo a que a razão molar Cu:BSA fosse 2:1, seguida da adição de uma solução de phen até uma razão molar final de Cu:BSA:phen de 2:1:4. Em seguida, foi progressivamente adicionada uma solução de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$. Razões molares Cu:BSA:phen:Zn de 2:1:0:0 (Preto); 2:1:3.5:0 (Vermelho); 2:1:4:0 (Azul claro); 2:1:4:1 (Azul) e 2:1:4:2 (verde).

7.9. Conclusões

Neste capítulo apresentaram-se os estudos de três complexos de Cu(II), $[\text{Cu}(\text{Xphen})_2]^{2+}$, com três derivados da 1,10-fenantrolina distintos, para avaliar a sua estabilidade em meios fisiológicos, bem como a sua atividade citotóxica em função do tempo de incubação e da presença de concentrações variáveis de albumina de soro bovino. A sua absorção e efeitos celulares nas células tumorais do ovário A2780 foram também avaliados.

Após 3 h de incubação com complexos **21-23**, a absorção celular mostrou uma tendência comum para os três complexos, com um perfil de distribuição de cobre semelhante e com elevada acumulação no citoesqueleto. Até às 24 h de incubação a atividade citotóxica divergiu para os complexos e correspondentes ligandos. O complexo **22** é o mais ativo, mas este efeito não está correlacionado com captação celular, uma vez que a maior absorção foi verificada para **21**. Ao nível dos organelos celulares, estudos de TEM mostraram ruptura da membrana nuclear e bolhas apoptóticas em células ovarianas tratadas com **21**, embora fossem mais pronunciadas para **22**, o complexo mais citotóxico, confirmando os efeitos citotóxicos superiores de **22** quando comparados com **21**. Foram observadas alterações degenerativas celulares resultando em células multinucleadas para células tratadas com ambos os complexos, embora mais frequentemente com **22**.

Entre as principais conclusões destacamos o facto dos complexos Cu-fenantrolina **21-23** sofrerem especiação assim que são adicionados ao meio de incubação celular, deixando de estar presentes as principais espécies $[\text{Cu}(\text{Xphen})_2]$. Além disso, uma vez absorvidos e dentro das células, os complexos de Cu-fenantrolina também já não existem como tal e muito provavelmente o ligando e o ião metálico são dirigidos para alvos distintos. Não obstante, nos períodos de incubação até 24 h, os complexos $[\text{Cu}(\text{Xphen})_2]$ adicionados são mais citotóxicos do que os correspondentes ligandos livres, enquanto que nos períodos de 48 e 72 h de incubação todos os complexos e ligandos apresentam uma citotoxicidade idêntica e elevada.

Para avaliar a especiação de $[\text{Cu}(\text{phen})_2]$ (**21**) em meio de incubação celular, foram utilizados vários estudos espectroscópicos, cujo objetivo foi determinar quais as espécies relevantes que contêm Cu e phen. Com base na medição de espectros de

DC de soluções contendo BSA e Cu(II) e/ou phen, foram determinadas as constantes de ligação das espécies relevantes de Cu-BSA e Cu-BSA-phen. Para baixas concentrações de Cu(II)_{totais}, aprox. < 30 µM, a BSA foi considerada o seu ligando principal no meio de incubação celular, sendo o ligando phen relevante apenas quando os rários molares BSA:Cu(II) são baixos. Os outros potenciais ligandos presentes, ou não são suficientemente fortes, ou estão presentes em concentrações muito baixas.

Neste capítulo apresentámos e discutimos dados que realçam a relevância de avaliar a especiação dos complexos de Cu no meio celular, para que os mecanismos da morte celular possam ser compreendidos. Realçamos a influência que a composição do meio de incubação celular, nomeadamente a quantidade de albumina de soro bovino, pode ter na viabilidade celular quando se avaliam potenciais fármacos de base metálica, particularmente em complexos com ligandos lábeis e de iões metálicos que se ligam fortemente às albuminas, como é o caso do Cu(II). Salientamos também que a ligação do ião Cu(II) e dos complexos de Cu-phen à BSA pode afetar os valores de IC₅₀ determinados.

A maioria dos estudos que investigam a ação biológica dos complexos de Cu-phen em alvos específicos foram realizados com sistemas sem células. Embora não possam ser definitivamente excluídos, não é provável que os mecanismos de morte celular envolvam a interação de complexos de Cu-phen com ADN. A utilização de complexos de Cu-phen pode produzir uma absorção mais eficiente de Cu e phen, sendo que relativamente à morte celular os mecanismos mais plausíveis devem envolver a ação separada de iões de Cu e moléculas de phen. Possíveis exceções são os ligandos de 1,10-fenantrolina em que o respetivo complexo Cu(I)-Xphen é muito estável, como é o caso de [Cu^I(2,9-Me₂phen)₂], que podem ser capazes de competir com os ligandos com forte afinidade para o Cu existentes nos meios intracelulares. Em geral, estes resultados constituem uma contribuição valiosa para futuros estudos sobre a citotoxicidade de complexos de cobre e para a avaliação dos seus mecanismos de ação.

7.10. Referências

- [1] **C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato e C. Santini.** *Med. Chem.*, 2009, 9, pp. 185–211.
- [2] **R. Tabti, N. Tounsi, C. Gaiddon, E. Bentouhami e L. Désaubry.** *Med. Chem.*, 2017, 7, pp. 875–879.
- [3] **Tisato, F. Marzano, C. Porchia, M. Pellei e M. Santini.** *C. Med. Res. Rev.*, 2009, 30, pp. 708–749.
- [4] **R. L. Huang, A. Wallqvist e D. G. Covell.** *Biochem. Pharmacol.*, 2005, 69 (7), 1009–1039.
- [5] **L. Ruiz-Azuar e M. E. Bravo-Gomez.** *Curr. Med. Chem.*, 2010, 17, pp. 3606–3615.
- [6] **D. Felder, J. F. Nierengarten, F. Barigelletti, B. Ventura e N. J. Armaroli.** *Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, pp. 6291–6299.
- [7] **I. Correia, S. Roy, C. P. Matos, S. Borovic, N. Butenko, I. Cavaco, F. Marques, J. Lorenzo, A. Rodriguez, V. Moreno e J. C. Pessoa.** *J. Inorg. Biochem.*, 2015, 147, pp. 134–146.
- [8] **C. Deegan, B. Coyle, M. McCann, M. Devereux e D. A. Egan.** *Chem. Biol. Interact.*, 2006, 164, pp. 115–125.
- [9] **M. E. Bravo-Gomez, J. C. Garcia-Ramos, I. Gracia-Mora e L. Ruiz- Azuara.** *J. Inorg. Biochem.*, 2009, 103, pp. 299–309.
- [10] **S. Roy, K. D. Hagen, P. U. Maheswari, M. Lutz, A. L. Spek, J. Reedijk e G. P. van Wezel.** *ChemMedChem.*, 2008, 3, pp.1427–1434.
- [11] **M. F. Primik, S. Goschl, M. A. Jakupec, A. Roller, B. K. Keppler e V. B. Arion.** *Inorg. Chem.*, 2010, 49, pp. 11084–11095.
- [12] **D. Hedley, A. Shamas-Din, S. Chow, D. Sanfelice, A. C. Schuh, J. M. Brandwein, M. D. Seftel, V. Gupta, K. W. Yee e A. D. A. Schimmer.** *Leuk. Lymphoma*, 2016, 57, pp. 2437–2440.
- [13] **A. W. Y. Leung, M. Anantha, W. H. Dragowska, M. Wehbe e M. B. Bally.** *J. Control. Rel.*, 2018, 286, pp. 1–9.
- [14] **C. H. Ng, S. M. Kong, Y. L. Tiong, M. J. Maah, N. Sukram, M. Ahmad e A. S. B. Khoo.** *Metallomics*, 2014, 6, pp. 892–906.
- [15] **M. I. Pilo, G. Manca, M. A. Zoroddu e R. Seeber.** *Inorg. Chim. Acta*, 1991, 180, pp. 225–230.
- [16] **N. F. Zuin, Z. Molphy, C. Slator, G. Menounou, G. Toniolo, G. Mitrikas, V. McKee, C. Chatgililoglu e D. Kellett.** *Chem. - Eur. J.*, 2019, 25, pp. 221–237.
- [17] **D. S. Sigman.** *Acc. Chem. Res.* 1986, 19, pp. 180–186.
- [18] **I. Naletova, C. Satriano, A. Curci, N. Margiotta, G. Natile, G. Arena, D. La Mendola, V. G. Nicoletti e E. Rizzarelli.** *Oncotarget.*, 2018, 9, pp. 36289–36316.
- [19] **C. M. Saporito-Magrina, R. N. Musacco-Sebio, G. Andrieux, L. Kook, M. T. Orrego, M. V. Tuttolomondo, M. F. Desimone, M. Boerries e C. Borner, M. G. Repetto.** *Metallomics*, 2018, 10, pp. 1743-1752.
- [20] **R. W. Byrnes, W. E. Antholine e D. H. Petering.** *Free Rad. Biol. Med.*, 1992, 12, pp. 457-469.
- [21] **Z. Zhang, C. F. Bi, S. M. Schmitt, Y. H. Fan, L. L. Dong, J. Zuo e Q. P. Dou.** *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2012, 17, pp. 1257-1267
- [22] **D. Sanna, P. Buglyo, A. I. Tomaz, J. C. Pessoa, S. Borovic, G. Micera e E. Garribba.** *Dalton Trans.*, 2012, 41, pp. 12824-12838.

- [23] **T. J. P. McGivern, S. Afsharpour e C. J. Marmion.** *Inorg. Chim. Acta*, 2018, 472, pp. 12-39.
- [24] **F. Marques, A. P. Matos, C. P. Matos, I. Correia, J. C. Pessoa e M. P. Campello.** *Ultrastr. Pathol.*, 2017, 41, pp.128-129
- [25] **H. Nakai e Y. Deguchi.** *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1975, 48, pp. 2557-2560.
- [26] **D. Inci, R. Aydin, D. Yilmaz, H. M. Genckal, O. Vatan, N. Cinkilic e Y. Zorlu.** *Spectrochim. Acta A-Mol. Biomol. Spectr.*, 2015, 136, pp. 761-770.
- [27] **W. Bal, J. Christodoulou, P. J. Sadler e A. Tucker.** *J. Inorg. Biochem.*, 1998, 70, pp. 33-39.
- [28] **A. Prisecaru, V. McKee, O. Howe, G. Rochford, M. McCann, J. Colleran, M. Pour, N. Barron, N. Gathergood e A. Kellett.** *J. Med. Chem.*, 2013, 56, pp. 8599-8615.
- [29] **M. I. Pilo, G. Manca, M. A. Zoroddu e R. Seeber.** *Inorg. Chim. Acta*, 1991, 180, pp. 225-230.
- [30] **G. Sanna, M. I. Pilo, M. A. Zoroddu, R. Seeber e S. Mosca.** *Inorg. Chim. Acta*, 1993, 208, pp. 153-158
- [31] **P. Gans, A. Sabatini e A. Vacca.** *Talanta*, 1996, 43, pp. 1739-1753.
- [32] **D. Inci, R. Aydin, O. Vatan, D. Yilmaz, H. M. Genckal, Y. Zorlu e T. Cavas.** *Spectrochim. Acta A-Mol. Biomol. Spectr.*, 2015, 145, pp. 313-324.
- [33] **A. Rockenbauer e L. Korecz.** *Appl. Magn. Res.*, 1996, 10, 29-43.
- [34] **O. P. Anderson.** *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1973, pp.1237-1241.
- [35] **K. Petrovic, I. Potocnak, K. Raczova, E. Cizmar e M. Petrovic.** *Trans. Met. Chem.*, 2015, 40, pp. 541-553.
- [36] **W. Fitzgerald, B. Hathaway e C. J. Simmons.** *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1985, 141-149.
- [37] **C. P. Matos, Z. Adiguzel, Y. Yildizhan, B. Cevatemre, T. B. Onder, O. Cevik, P. Nunes, L. P. Ferreira, M. D. Carvalho, D. L. Campos, F. R. Pavan, J. C. Pessa, M. H. Garcia, A. I. Tomaz, I. Correia e C. Acilan.** *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, 176, pp. 492-512.
- [38] **C. P. Matos, Y. Yildizhan, Z. Adiguzel, F. R. Pavan, D. L. Campos, J. C. Pessoa, L. P. Ferreira, A. I. Tomaz, I. Correia e C. Acilan.** *Dalton Trans.*, 2019, 48, pp. 8702-8716.
- [39] **A. Bencini e V. Lippolis.** *Coord. Chem. Rev.*, 2010, 254, pp. 2096-2180.
- [40] **R. Mahalakshmi e N. Raman.** *Int. J. Curr. Pharm. Res.*, 2016, 8, pp. 1-6.
- [41] **S. Roy, K. D. Hagen, P. U. Maheswari, M. Lutz, A. L. Spek, J. Reedijk e G. P. van Wezel.** *ChemMedChem.*, 2008, 3, pp. 1427-1434.
- [42] **A. I. Tomaz, T. Jakusch, T. S. Morais, F. Marques, R. F. M. de Almeida, F. Mendes, E. A. Enyedy, I. Santos, J. C. Pessoa, T. Kiss e M. H. Garcia.** *J. Inorg. Biochem.*, 2012, 117, pp. 261-269.
- [43] **T. Pivetta, F. Trudu, E. Valletta, F. Isaia, C. Castellano, F. Demartin, R. Tuveri, S. Vascellari e A. Pani.** *J. Inorg. Biochem.*, 2014, 141, pp. 103-113.
- [44] **A. Mohindru, J. M. Fisher e M. Rabinovitz.** *Biochem. Pharmac.*, 1983, 32, pp. 3627-3632.
- [45] **C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato e C. Santini.** *Anti-Canc. Ag. Med. Chem.*, 2009, 9, pp. 185-211.
- [46] **K. M. Dean, Y. Qin e A. E. Palmer.** *Bioch. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, 2012, 1823, pp. 1406-1415.
- [47] **S. K. Martin, M. Kamelgarn e N. Kyprianou.** *Am. J. Clin. Exp. Urol.*, 2014, 2, pp. 15-26.

- [48] **A. Rebillard, D. Lagadic-Gossmann e M. T. Dimanche-Boitrel.** *Curr. Med. Chem.* 2008, 15, pp. 2656-2663.
- [49] **A. Levina, D. C. Crans e P. A. Lay.** *Coord. Chem. Rev.*, 2017, 352, pp. 473-498.
- [50] **G. Rakhit, W. E. Antholine, W. Froncisz, J. S. Hyde, J. R. Pilbrow, G. R. Sinclair e B. Sarkar,** *J. Inorg. Biochem.*, 1985, 25, pp. 217-224.
- [51] **P. J. Sadler, A. Tucker e J. H. Viles.** *Eur. J. Biochem.*, 1994, 220, pp. 193-200.
- [52] **M. T. Stankovich e A. J. Bard.** *J. Electroan. Chem.*, 1978, 86, pp. 189-199.
- [53] **A. Zgirski e E. Frieden.** *J. Inorg. Biochem.*, 1990, 39, pp. 137-148.
- [54] **Q. Feng, N. Q. Li e Y. Y. Jiang.** *Anal. Chim. Acta*, 1997, 344, pp. 97-104.
- [55] **R. M. Smith e A. E. Martell.** *Critical Stability Constants*, Plenum Press, New York, 1975.
- [56] **P. Gans, A. Sabatini e A. Vacca.** *Talanta*, 1996, 43, pp. 1739-1753.
- [57] **D. A. Skoog, D. M. West e F. J. Holler.** *Fundamentals of analytical chemistry*, Saunders College, 1996.
- [58] **L. Alderighi, P. Gans, A. Ienco, D. Peters, A. Sabatini e A. Vacca.** *Coord. Chem. Rev.*, 1999, 184, pp. 311-318.
- [59] **F. Tisato, V. Peruzzo, G. Zanchetta, S. Tamburini, P. Traldi e M. Porchia.** *Eur. J. Mass Spectr.*, 2016, 22, pp. 275-287.
- [60] **P. Rousselot-Pailley, O. Seneque, C. Lebrun, S. Crouzy, D. Boturyn, P. Dumy, M. Ferrand e P. Delangle.** *Inorg. Chem.*, 2006, 45, pp. 5510-5520.
- [61] **S. Chandrasekhar e K. H. Reddy.** *Intern. J. Pharm. Sci. Res.*, 2016, 7, pp. 4204-4213.
- [62] **M. McCann, A. L. S. Santos, B. A. da Silva, M. T. V. Romanos, A. S. Pyrrho, M. Devereux, K. Kavanagh, I. Fichtner e A. Kellett.** *Toxicol. Res.*, 2012, 1, pp. 47-54.

- Capítulo I - Introdução
- Capítulo II - Objetivos
- Capítulo III - Complexos de cobre com bases de Schiff derivados do piridoxal com potencial terapêutico.
- Capítulo IV - Complexos de iões de metal constituídos por bases de Schiff de cromonas e piridoxal como potenciais agentes antitumorais
- Capítulo V - Complexos de iões de metal com bases de Schiff derivados da vitamina B₆
- Capítulo VI - Complexos de vanádio com 1,10-fenantrolina e derivados
- Capítulo VII - Comportamento dos complexos do tipo [Cu(phen)₂]²⁺ em meios celulares e a sua influência na citotoxicidade
- **Capítulo VIII - Secção experimental**
- Capítulo IX - Considerações finais
- ANEXOS

8.1. Materiais e equipamentos

8.1.1. Materiais

1,10-fenantrolina e 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina foram adquiridos na Alfa Aesar e 5-amino-1,10-fenantrolina de Fluorochem. $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ teve origem na May & Baker. O dicloridrato de piridoxamina e cloridrato de piridoxal foram adquiridos à Merck, 2-aminofenol à Reidel-de-Haen, salicilaldeído à Acros, borohidreto de sódio à Alfa Aesar, DPPH e os compostos derivados da 3-formilcromona à Sigma-Aldrich. Todos os materiais utilizados foram p.a. ou grau de reagente. A solução salina tamponizada com fosfato (PBS) e HEPES foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Para as experiências biológicas, o meio RPMI-1640 (RPMI = Roswell Park Memorial Institute), bem como soro fetal bovino, mistura de penicilina/estreptomicina, tripsina/EDTA, PBS foram adquiridos da Gibco, Thermo Fisher Scientific. As células tumorais A2780 (ovariano) foram adquiridas da ATCC (American Type Culture Collection).

8.1.2. Equipamentos

As análises elementares de C, H e N foram realizadas pelo Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico obtidas com o aparelho FISIONS EA 1108 CHNS-O. Os espectros de infravermelho foram coletados num espectrofotômetro JASCO FT/IR 4100 em KBr e os espectros de absorção UV-Visível foram registrados num espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 35 UV-Vis. com cuvetes de quartzo de 0.5; 1; 2 ou 10.0 mm. Os espectros de RMN foram obtidos nos espectrômetros Bruker Avance+ 400 MHz e 300 MHz e os desvios químicos de ^1H e ^{13}C são expressos em ppm em relação ao pico residual do solvente deuterado. Espectros de RPE de 1ª derivada à frequência da banda X das soluções congeladas a ~ 100 K foram registados nos espectrômetros Bruker ESP 300E ou Bruker Elexys III E580. Os mesmos foram obtidos a ~ 9.51 GHz com uma modulação de frequência de 100 kHz e calibrados em relação aos espectros de DPPH medidos em paralelo. Os parâmetros do Hamiltoniano de spin foram obtidos por simulação dos espectros recorrendo a um programa desenvolvido por Rockenbauer, *et al.*[1] Um sistema de cromatografia de iões DIONEX ICS-1500, equipado com uma coluna analítica IonPac® AS14A de 4 mm (4

x 250 mm) e uma condutividade supressora em 10 μ SFS ASRS®-ULTRA AutoSuppression® Sistema de detecção do modo de reciclagem foi utilizado para a determinação do cloreto. As medidas do dicroísmo circular foram realizadas com um espectrofotometro Jasco 720 Spectropolarímetro, com o detetor UV-Vis. Um espectrômetro de massa de 500-MS Varian Ion Trap foi utilizado para medir os espectros de massa de ionização por eletroprojeção (espectros ESI-MS) de soluções metanólicas dos complexos em ambos os modos, positivo e negativo. As medições de fluorescência foram realizadas num espectrofluorímetro SPEX® Fluorolog® (Horiba Jobin Yvon) com uma configuração FL3-11, equipado com uma lâmpada de Xenon. Os espectros de RPE foram registados nos espectrômetros Bruker ESP 300E ou Bruker Elexys III E580. Estes foram operados a ~ 9,51 GHz com uma modulação de frequência de 100 KHz. As experiências de fluorescência foram monitoradas usando um espectrofluorímetro SPEX® Fluorolog (Horiba Jobin Yvon) em uma configuração FL3-11, equipado com uma lâmpada de Xenon. As medições espectroscópicas de fluorescência em estado estacionário foram realizadas à temperatura ambiente.

8.2. Síntese de pró-ligandos e complexos

8.2.1. Pró-ligandos

4-(((2-hidroxiienzilideno)amino)metil)-5-(hidroximetil)-2-metilpiridin-3-ol (H₂L1)

O **H₂L1** foi preparado adicionando uma solução de dicloridrato de piridoxamina (0.482 g, 2.00 mmol) a 10 mL de metanol com KOH a pH ca. 9.0. Após 30 minutos, o sólido branco (KCl) foi filtrado e salicilaldeído (0.213 mL, 2.00 mmol) dissolvido em 6.5 mL de metanol: CHCl₃ (8%v/v) foi adicionado à solução. A mistura reacional foi levada a refluxo a 50 °C por 3 h, sob agitação. Após arrefecimento, o pH foi ajustado para cerca de 7.0 com HCl metanólico e o volume de reação foi reduzido sob vácuo até a induzir precipitação. A mistura foi mantida a 4 °C durante a noite e o sólido amarelo formado foi filtrado, lavado com água, metanol frio e éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 91%; 0.412 g. MM (C₁₅H₁₆N₂O₃) = 272.3 g/mol. Análise elementar: Calc. para C₁₅H₁₆N₂O₃.0.5H₂O: C, 64.04; H, 6.09; N, 9.96; Obtido: C, 63.8; H, 6.1; N, 9.9.

ESI-MS: m/z [Obtido (Calcd)]: 271.9 (271.3) (25%) [L-H]⁻; 543.2 (543.6) (100%) [2LH]⁻; 273.1 (273.3) (100%) [L+H]⁺. UV-Vis. em DMSO, λ_{\max}/nm ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 285 (7965), 315 (3782), 413 (183); ¹H RMN (DMSO-d₆, δ/ppm): 2.38 (s, 3H, H¹⁹); 4.55 (s, 2H, H¹⁶); 4.88 (s, 2H, H⁹); 6.82-6.89 (m, 2H, H² e H⁶); 7.30 (t, 1H, H¹); 7.43 (d, 1H, H³); 7.96 (s, 1H, H¹²); 8.61 (s, 1H, H⁷); 5.20 (s, 1H, R-OH); 9.05 (s, 1H, Ar-OH) e 13.30 (s, 1H, Ar-OH). ¹³C RMN (DMSO-d₆, δ/ppm): 19.87 (C₁₉); 52.33 (C₉); 58.95 (C₁₆); 116.53 (C₆); 118.53 (C₂); 118.76 (C₄); 130.20 (C₁₁); 131.54 (C₃); 132.40 (C₁); 134.11 (C₁₀); 139.68 (C₁₂); 146.23 (C₁₄); 149.46 (C₁₅); 160.51 (C₅); 166.14 (C₇).

5-(hidroximetil)-4-(((2-hidroxifenil)imino)metil)-2-metilpiridin-3-ol (H₂L₂)

O **H₂L₂** foi preparado com dissolvendo 2-aminofenol (0.218 g, 2.00 mmol) numa solução com 6 mL de metanol/KOH pH ca. 9.0 e cloridrato piridoxal (0,407 g, 2.00 mmol) em 8 mL de metanol, à temperatura ambiente por 3 h. A mistura foi mantida a 4 °C durante a noite e o sólido laranja foi filtrado, lavado com água, metanol frio e éter dietílico e seco sob vácuo. Rendimento: 85%; 0.390 g. MM (C₁₄H₁₄N₂O₃) = 258.3 g/mol. Análise elementar: Calc. para C₁₄H₁₄N₂O₃: C, 65.11; H, 5.46; N, 10.85; Obtido: C, 64.9; H, 5.7; N, 10.7. ESI-MS: m/z [Obtido (Calcd)]: 259.15 (259.3) (100%) [L+H]⁺; 257.11 (257.29) (100%) [L-H]⁻. UV-Vis. em DMSO, λ_{\max}/nm ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 295 (8282), 360 (11601), 463 (421); ¹H RMN (DMSO-d₆, δ/ppm): 2.55 (s, 3H, H¹⁷); 4.89 (s, 2H, H¹⁸); 6.97 (t, 1H, H²); 7.07 (d, 1H, H⁶); 7.28 (t, 1H, H¹); 7.69 (d, 1H, H³); 7.98 (s, 1H, H¹²); 9.30 (s, 1H, H⁹); 5.63 (s, 1H, R-OH); 10.45 (s, 1H, Ar-OH). ¹³C RMN (DMSO-d₆, δ/ppm): 16.15 (C₁₇); 57.83 (C₁₈); 116.82 (C₆); 119.64 (C₂); 119.73 (C₃); 121.82 (C₁₁); 129.43 (C₁₂); 130.45 (C₁); 131.30 (C₄); 136.82 (C₁₀); 147.13 (C₁₄); 151.98 (C₁₅); 156.28 (C₉); 157.82 (C₅).

5-(hidroximetil)-4-(((2-hidroxifenil)amino)metil)-2-metilpiridin-3-ol (H₃L₃CI)

O **H₃L₃CI** foi obtido pela redução do **H₂L₂** (0.250 g, 0.970 mmol) com excesso de NaBH₄ na presença de KOH em MeOH à temperatura ambiente durante 48 h. Foi

obtido um sólido de cor bege, lavado com água e éter dietílico e seco sob vácuo. Rendimento: 40%; 0.100 g. MM ($C_{14}H_{17}Cl_2NaN_2O_3$) = 355.1 g/mol. Análise elementar: Calc. para $C_{14}H_{17}N_2O_3NaCl_2 \cdot 2.5H_2O$: C, 42.02; H, 5.54; N, 7.00; Obtido: C, 42.2; H, 5.4; N, 6.8. ESI MS: m/z [Obtido (Calcd)]: 259.61 (259.11) (10%) [L-H]⁻; 295.17 (295.1) (100%) [L+Cl]⁻; 297.02 (297.07) (25%) [L+K-2H]⁻. UV-Vis. em DMSO, λ_{max}/nm ($\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$): 285 (744), 342 (159); ¹H RMN (D_2O , δ/ppm): 2.67 (s, 3H, H¹⁷); 4.64 (s, 2H, H¹⁸); 4.79 (s, 2H, H⁹); 6.89 (t, 1H, H²); 6.97 (d, 1H, H⁶); 7.23-7.29 (m, 2H, H¹ e H³); 8.17 (s, 1H, H¹²); ¹³C RMN (D_2O , δ/ppm): 15.4 (C¹⁷); 45.03 (C⁹); 58.49 (C¹⁸); 116.86 (C⁶); 120.74 (C²); 121.42 (C⁴); 123.89 (C³); 130.95 (C¹²); 131.55 (C¹); 134.06 (C¹⁰); 138.90 (C¹¹) 142.46 (C¹⁴); 149.62 (C⁵); 153.63 (C¹⁵).

Síntese genérica dos pró-ligandos **HL4-HL6**

Os pró-ligandos de base Schiff foram obtidos por reação de condensação da piridoxamina (ca. 1 mmol) com quantidades equimolares da 3-formilcromona desejada em metanol. A piridoxamina foi dissolvida em metanol (3 ml) e adicionaram-se algumas gotas de NaOH saturado numa solução de metanol até se obter um pH de ca. 8.0. A solução foi filtrada, e o filtrado foi adicionado a uma solução contendo a 3-formilcromona selecionada, previamente dissolvida em $CHCl_3$. A solução foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 2 h e conservada a 4°C durante a noite. O sólido amarelo obtido foi filtrado, lavado com H_2O , $CHCl_3$ e Et_2O e seco sob vácuo.

(E)-3-(((3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metilpiridin-4-il)metil)imino)metil)-4H-cromen-4-one (**HL4**)

Rendimento: 92%; 0.280 g. MM ($C_{18}H_{16}N_2O_4$) = 324.3 g/mol. Análise elementar: Calc. para $C_{18}H_{16}N_2O_4 \cdot H_2O$: C, 63.22; H, 5.30; N, 8.18; Obtido: C, 63.3; H, 5.6; N, 7.7. ESI-MS: m/z [Obtido (Calcd)]: 325.07 (325.12) (100%) [L+H]⁺. UV-Vis. em DMSO λ_{max}/nm ($\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$): 292 (9.4×10^3), 354 (1.0×10^4), 365 (8.8×10^3). ¹H-RMN (metanol- d_4 , δ/ppm): 2.47 (s, 3H, H²⁴); 4.69 (s, 2H, H¹⁴) 4.71 (s, 2H, H²¹); 5.62 (s, 1H, H⁸) 7.0 (d, 1H, H³) 7.04 (t, 1H, H¹) 7.41 (t, 1H, H²) 7.45 (s, 1H, H¹¹) 7.79 (d, 1H, H⁶); 7.88 (s, 1H, H¹⁷). ¹³C-RMN (metanol- d_4 , δ/ppm): 18.8 (C²⁴); 45,3 (C¹⁴); 60.9 (C²¹); 101,4 (C⁹); 103.1

(C⁸); 118.8 (C³); 122.8 (C¹); 124,3 (C⁵); 126.6 (C⁶); 134.8 (C²); 135.3 (C¹⁵); 135.7 (C¹⁷); 147.3 (C¹⁹); 153.1 (C¹⁶); 156.2 (C¹¹); 156.9 (C⁴); 181.1 (C¹⁰). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, δ/ppm): 19.9 (C²⁴); 43.9 (C¹⁴); 59.3 (C²¹); 99.6 (C⁹); 101.6 (C⁸); 117.7 (C³); 121.6 (C¹); 123.2 (C⁵); 125.3 (C⁶); 130.7 (C¹⁵); 133.4 (C²); 133.7 (C²⁰); 140.0 (C¹⁷); 146.5 (C¹⁹); 149.6 (C¹⁶); 154.2 (C¹¹); 155.0 (C⁴); 178.1 (C¹⁰).

(E)-3-(((3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metilpiridin-4-il)metil)imino)metil)-6-metil-4H-cromen-4-one (**HL5**)

Rendimento: 85%, 0.360g. MM (C₁₉H₁₈N₂O₄) = 338.4 g/mol. Análise elementar: Calc. para C₁₉H₁₈N₂O₄.H₂O: C, 64.04; H, 5.66; N, 7.86; Obtido: C, 64.2; H, 5.9; N, 7.5. ESI-MS: *m/z* [Obtido (Calcd)]: 339.09 (339.35) (100%) [L+H]⁺; 337.37 (337.34) (15%) [L-H]⁻. UV-Vis. em DMSO λ_{max}/nm (ε/M⁻¹cm⁻¹): 290 (7.5×10³), 316 (6.5×10³), 355 (1.1×10⁴), 365 (1.0×10⁴). ¹H-RMN (metanol-d₄, δ/ppm): 2.30 (s, 3H, H²⁵); 2.47 (s, 3H, H²⁴); 4.68 (s, 2H, H¹⁴); 4.71 (s, 2H; H²¹); 5.58 (s, 1H, H⁸); 6.87 (d, 1H, H³); 7.22 (d, 1H, H²); 7.44 (s, 1H, H¹¹); 7.58 (s, 1H, H⁶); 7.88 (s, 1H, H¹⁷). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, δ/ppm): 19.9 (C²⁴); 20.3 (C²⁵); 43.8 (C¹⁴); 59.2 (C²¹); 99.7 (C⁹); 101.5 (C⁸); 117.4 (C³); 122.9 (C⁵); 125.2 (C⁶); 130.4 (C¹); 130.7 (C¹⁵); 133.7 (C²⁰); 134.0 (C²); 139.9 (C¹⁷); 146.4 (C¹⁹); 149.5 (C¹⁶); 152.9 (C⁴); 153.9 (C¹¹); 178.3 (C¹⁰).

(E)-6-bromo-3-(((3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metilpiridin-4-il)metil)imino)metil)-4H-cromen-4-one (**HL6**)

Rendimento: 92%, 0.310g. MM (C₁₈H₁₅N₂O₄Br) = 403.23 g/mol. Análise elementar: Calc. para C₁₈H₁₅N₂O₄Br.3H₂O: C, 47.28; H, 4.63; N, 6.12; Obtido: C, 47.7; H, 4.3; N, 5.8. ESI-MS: *m/z* [Obtido (Calcd)]: 403.01 (403.03) (100%) [L+H]⁺. UV-Vis. em DMSO λ_{max}/nm (ε/M⁻¹cm⁻¹): 289 (6.9×10³), 325 (8.3×10³), 358 (1.5×10⁴), 370 (1.3×10⁴). ¹H-RMN (metanol-d₄, δ/ppm): 2.47 (s, 3H, H²⁴); 4.70 (s, 2H, H¹⁴); 4.71 (s, 2H, H²¹); 5.64 (s, 1H, H⁸); 6.93 (d, 1H, H³); 7.49 (m, 1H, H¹¹); 7.50 (m, 1H, H²); 7.87 (s, 2H, H⁶ e H¹⁷). ¹³C-RMN (metanol-d₄, δ/ppm): 18.8 (C²⁴); 45.5 (C¹⁴); 60.9 (C²¹); 101.0 (C⁹); 103.3 (C⁸); 115.1 (C⁵); 121.0 (C³); 126.1 (C¹); 129.1 (C⁶); 135.5 (C¹⁵); 137.1 (C²); 137.7 (C¹⁷); 147.4 (C¹⁹); 155.8 (C⁴); 156.5 (C¹¹); 179.2 (C¹⁰).

(E)-4-((((3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metilpiridin-4-il)metil)imino)metil)-5-(hidroximetil -2-metilpiridin-3-ol (**HL7**))

O **H₂L7** foi preparado adicionando umas gotas de uma solução de KOH metanólica a dicloridrato de piridoxamina (0.482 g, 2.00 mmol) dissolvido em 6 mL de metanol, obtendo-se um pH ca. 9.0. Após 30 minutos, o sólido branco (KCl) foi filtrado e a mistura foi adicionada a uma solução contendo cloridrato piridoxal (0.407 g, 2.00 mmol) em 5 mL de metanol. A solução foi levada à temperatura de ebulição por 1 h. Após arrefecimento, o pH foi ajustado para cerca de 7.0 com HCl metanólico, obtendo-se um precipitado que foi filtrado, lavado com água, metanol frio e éter etílico e seco sob vácuo. Rendimento: 36.5%, 0.038g. MM (C₁₆H₁₉N₃O₄) = 317.34 g/mol. Análise elementar: Calc. para C₁₆H₁₉N₃O₄.H₂O: C, 57.5; H, 5.75; N, 12.5; Obtido: C, 57.3; H, 6.31; N, 12.53. ESI MS: *m/z* [Obtido (Calcd)]: 318.0 (318.1) (100%) [L+H]⁺; 168.9 (168.1) (35%) [L+H+NH₄]²⁺; 632.9 (633.3) (100%) [2L-H]⁻; 351.9 (352.1) (28%) [L+Cl]⁻; 316.1 (316.1) (23%) [L-H]⁻. UV-Vis. em DMSO λ_{max}/nm (ε/M⁻¹cm⁻¹): 291 (6.9×10³), 337 (43.9×10³), 431 (5.5×10²). ¹H-RMN (metanol-d₄, δ/ppm): 2.3 (s, 3H, H⁷); 2.4 (s, 1H, H¹⁸); 4.58 (dd, 2H, H²²); 4.64 (dd, 2H, H¹⁰); 4.9 (s, 2H, H²⁰); 5.24(t, 1H, H²³); 5.36(t, 1H, H¹¹); 7.8(s, 1H, H⁴); 8.0(s, 1H, H¹⁵); 9.0 (s, 1H, H⁹); 9.06(s, 1H, H¹⁹). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, δ/ppm): 154.0 (C¹); 148.2 (C²); 137.0 (C⁴); 119.3 (C⁵); 132.5; (C⁶); 18.6 (C⁷); 164.4 (C⁹); 58.3 (C¹⁰); 149 (C¹²); 146(C¹³); 139.4 (C¹⁵); 129.6 (C¹⁶); 133.7 (C¹⁷); 19.8 (C¹⁸); 52.3 (C²⁰); 58.9 (C²²).

8.2.2. Complexos

8.2.2.1. Procedimento geral para a síntese dos complexos do tipo [Cu(L1-3)X] em que X= Cl ou OH

Os complexos de cobre (II) **1-3** foram obtidos pela adição em gotas de 1 mL de CuCl₂ (1.00 mmol) em metanol a uma solução contendo o pró-ligando precursor apropriado (1.00 mmol) em metanol (7-10 mL) sob constante agitação seguida pela adição de algumas gotas de KOH ou NaOH em metanol para ajustar o pH em ca. 7.5-8.0. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante ~4 h e mantida no frigorífico durante a noite. Os sólidos formados foram separados por filtração, lavados com água,

uma pequena quantidade de metanol frio ou acetona e éter dietílico e secos sob vácuo.

$K[Cu^{II}(L1)Cl]$ (**1**) – Um sólido verde escuro foi obtido com rendimento de 24%, 0.042 g. Análise elementar: Calc. para $[C_{15}H_{14}N_2O_3ClCu]K \cdot 0.5H_2O$: C, 43.16; H, 3.62; N, 6.71; Cl, 8.49; Obtido: C, 43.1; H, 3.4; N, 6.5; Cl, 8.9. ESI-MS: m/z [Obtido (Calcd)]: 368.04 (368.00) (20%) $[M+Cl]^-$; 378.2 (378.0) (57%) $[M+FA-H]^-$; considerando M o complexo neutro sem íons cloreto e potássio; FA é o ácido fórmico. UV-Vis. em DMSO, λ_{max}/nm ($\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$): 266 (11447), 320 (4718), 370 (3498) e 670 (113).

$[Cu^{II}(L2)(H_2O)]$ (**2**) – Um sólido vermelho escuro foi obtido com rendimento de 0.210 g. MM ($C_{14}H_{14}N_2O_4Cu$) = 337.8 g/mol. Análise elementar: Calc. para $C_{14}H_{14}CuN_2O_4$: C, 49.78; H, 4.18; N, 8.29; Obtido: C, 49.5; H, 3.7; N, 8.1. ESI-MS: m/z [Obtido (Calcd)]: 179.74 (178.48) (45%) $[M+H+K]^{2+}$, 397.77 (398.09) (10%) $[M+H_2O+IsoProp+H]^+$, 364.38 (364.0) (100%) $[M+FA-H]^-$, 683.35 (683.0) (60%) $[2M+FA-H]^-$, Considerando M o complexo neutro sem H_2O . UV-Vis. em DMSO, λ_{max}/nm ($\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$): 281 (10251), 420 (9391) and 457 (10818).

$Na[Cu^{II}(L3)Cl]$ (**3**) – Um sólido vermelho escuro foi obtido com rendimento de 57%; 0.062 g. Análise elementar: Calc. para $[C_{14}H_{14}N_2O_3ClCu]Na \cdot 0.5H_2O$: C, 43.21; H, 3.88; N, 7.20; Cl, 9.11; Obtido: C, 43.5; H, 3.4; N, 7.0; Cl, 9.5. ESI-MS [Obtido (Calcd)]: 356.54 (356.00) (90%) $[M+Cl]^-$, 366.41 (366.03) (90%) $[M+FA-H]^-$, 397.82 (397.95) (100) $[M+2K-H]^+$, Considerando M o complexo neutro sem o íon Cl^- . UV-Vis. em DMSO, λ_{max}/nm ($\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$): 286 (11540), 422 (8804), 454 (10282).

8.2.2.2. Procedimento geral para a síntese dos complexos do tipo $[Cu(L)(phen)]$

Os complexos de cobre (II) foram preparados pela adição gota a gota de 1 mL de $CuCl_2$ (1.00 mmol) em metanol a uma solução contendo o precursor pró-ligando

apropriado (1.00 mmol) dissolvido em cerca de 7-10 mL de metanol. De seguida adicionaram-se algumas gotas de KOH em metanol para ajustar o pH a ca. 7.5-8.0. A mistura ficou sob agitação à temperatura ambiente por 15 min. e uma solução contendo phen ou os seus derivados em metanol ou etanol (1.00 mmol) foi também adicionada gota a gota. A mistura ficou em agitação por mais 4 horas e mantida no frigorífico durante a noite. O sólido resultante foi filtrado e lavado com água, etanol frio ou metanol e éter etílico, seco sob vácuo e recristalizado com metanol, quando necessário.

[Cu^{II}(L1)(phen)] (**4**) – Um sólido verde foi obtido com rendimento de 66%, 0.210 g. MM (C₂₇H₂₂CuN₄O₃) = 514.07 g/mol. Análise elementar: Calc. [C₂₇H₂₂CuN₄O₃]•0.5H₂O: C, 62.00; H, 4.43; N, 10.71; Obtido: C, 62.1; H, 4.2; N, 10.7. ESI-MS: m/z [Obtido (Calcd)]: 514.02 (514.1) (100%) [M+H]⁺. 178.72 (179.37) (23%) [M+2H+Na]³⁺. UV-Vis. em DMSO, λ_{max}/nm (ε/M⁻¹cm⁻¹): 275 (49367), 293 (21402), 371 (4833), 450 (744) e 672 (159).

[Cu^{II}(HL2)(phen)]Cl (**5**) – Um sólido laranja foi obtido com rendimento de 55 %, 0.136 g; MM (C₂₆H₂₀N₄O₃Cu) = 500.02 g/mol. Análise elementar: Calc. para [C₂₆H₂₁N₄O₃ClCu]•1.5H₂O: C, 55.42; H, 4.29; N, 9.94; Obtido: C, 55.8; H, 4.2; N, 9.8. ESI-MS: m/z [Obtido (Calcd)]: 500.08 (499.97) (75%) [M+H]⁺; 999.16 (1000.4) (28%) [2M+H]⁺; 498.07 (497.27) (45%) [M-H]⁻, considerando M o complexo neutro sem o ião Cl⁻ e desprotonado. UV-Vis. em DMSO, λ_{max}/nm (ε/M⁻¹ cm⁻¹): 295 (17357), 400 (6811) e 467 (6620).

8.2.2.3. Procedimento geral para a síntese dos complexos do tipo [Cu(L6-8)]

A síntese de complexos de cobre (**6-8**) foi realizada pela adição lenta de 1 mmol de CuCl₂ dissolvido em metanol a uma solução de 5-7 mL de metanol contendo a base de Schiff apropriada (1 mmol), seguida pela adição de algumas gotas de NaOH em metanol de modo a obter um pH aproximado de 7.5-8.0. A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante ~4 h e colocada a 4°C durante a noite. Os

sólidos formados foram isolados por filtração, lavados com H₂O, metanol frio, éter dietílico e secos sob vácuo.

[Cu^{II}(L4)OH] (**6**) Um sólido verde escuro foi obtido com rendimento de: 72%, 0.080 g. MM (C₁₈H₁₆N₂O₅Cu) = 403.88 g/mol. Análise elementar: Calc. para C₁₈H₁₆N₂O₅Cu•0.5H₂O: C, 52.36; H, 4.15; N, 6.78; Obtido: C, 51.9; H, 4.2; N, 6.3. Não foi detectado nenhum íon cloreto. ESI-MS: *m/z* [Obtido (Calcd)]: 438.31 (438.00) [M+Cl]⁻ (100%); 448.38 (448.04) [M+FA-H]⁻ (47%). 552.17 (552.00) [M+HCl+TFA-H]⁻ (25%). UV-Vis. em DMSO, λ_{max}/nm (ε/M⁻¹cm⁻¹): 265 (1.7×10⁴), 295 (1.6×10⁴), 364 (1.2×10⁴), 650 (235).

Na[Cu^{II}(L5)Cl₂] (**7**) Um sólido verde escuro foi obtido com rendimento de: 75%, 0.230 g. MM ([C₁₉H₁₇N₂O₄Cl₂Cu]Na) = 494.79 g/mol. Análise elementar: Calc. para ([C₁₉H₁₇N₂O₄Cl₂Cu]Na•0.5H₂O: C, 45.31; H, 3.60; N, 5.56; Cl, 14,08; Obtido: C, 45.1; H, 3.6; N, 5.2; Cl, 13.9. ESI-MS: *m/z* [Obtido (Calcd)]: 452.59 (452.02) [M-H]⁻ (100%); 566.21 (566.02) [M+TFA-H]⁻ (15%). Considerando uma molécula de água coordenada ao centro de íon de metal sem um íon Cl⁻. UV-Vis. em DMSO, λ_{max}/nm (ε/M⁻¹cm⁻¹): 280 (1.4×10⁴), 304 (1.2×10⁴), 360 (6.0×10³), 648 (137).

Na[Cu^{II}(L6)Cl₂] (**8**) Um sólido vermelho esverdeado foi obtido com rendimento de 72%, 0.110g. MM ([C₁₈H₁₄N₂O₄Cl₂BrCu]Na) = 559.66 g/mol. Análise elementar: Calc. para ([C₁₈H₁₄N₂O₄Cl₂BrCu]Na: C, 38.64; H, 2.52; N, 5.01; Cl, 12.67; Obtido: C, 38.8; H, 2.9; N, 5.4; Cl, 12.3. ESI-MS: *m/z* [Obtido (Calcd)]: 518.07 (518.22) (100%) [M-H]⁻; 554.09 (554.20) (15%) [M+Cl]⁻; 556.04 (556.18) (20%) [M+K-2H]⁻. Considerando uma molécula de água coordenada ao centro de íon de metal sem um íon Cl⁻. UV-Vis. em DMSO, λ_{max}/nm (ε/M⁻¹cm⁻¹): 296 (1.7×10⁴), 350 (9.1×10³), 650 (193).

[Cu^{II}(L5)(phen)Cl] (**9**) A adição gota-a-gota de 1 mL de CuCl₂ (1 mmol) em metanol a uma solução de HL2 dissolvida em metanol (1 mmol) seguida pela adição de algumas gotas de KOH em metanol para ajustar o pH a cerca de 7.5-8.0. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 15 min e adicionou-se 1,10-fenantrolina (1 mmol). A mistura foi deixada sob agitação durante mais 4 h e mantida no frigorífico durante a noite. O sólido resultante foi filtrado e lavado com água, metanol frio e éter

etílico, e seco sob vácuo. Foi obtido um sólido verde com rendimento de 68%, 0.342g. MM ($C_{31}H_{25}N_4O_4ClCu$) = 559.66 g/mol. Análise elementar: Calc. para ($C_{31}H_{25}N_4O_4ClCu$): C, 60.39; H, 4.09; N, 9.09; Obtido: C, 60.0; H, 4.4; N, 8.7. ESI-MS: m/z [Obtido (Calcd)]: 580.0 (580.12) (16%) $[M]^+$; 612.0 (612.1) (100 %) $[M+MeOH]^+$; 625.9 (625.0) (46%) $[M+2Na]^+$; 656,5 (656.1) ($[M+ACN]^+$). Considerando o complex sem um ião cloreto. O acetonitrile é representado por ACN. UV-Vis. em DMSO, λ_{max}/nm ($\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$): 296 (1.7×10^4), 350 (9.1×10^3), 650 (193). Não foi possível hidrolisar o complexo e, portanto, o conteúdo de cloreto na fórmula não foi confirmado.

$Na[V^{IV}O(L5)Cl_2]$ (**10**) Os solventes e soluções utilizados na síntese de 5 foram desaerados com N_2 . O complexo 5 foi sintetizado adicionando 1.5 mL de $VOSO_4$ (1 mmol) em metanol a uma solução de HL2 em metanol (7 mL, 1 mmol), seguido da adição de algumas gotas de KOH em metanol para ajustar o pH a ca. 7.5-8.0. Um sólido verde acastanhado precipitado imediatamente, a mistura permaneceu sob atmosfera inerte e sob agitação durante ca. 3 h e após o isolamento do sólido foi lavado com água, éter etílico e seco sob vácuo. Yield: 27.3%, 0.068g; MM ($[C_{19}H_{17}N_2O_5Cl_2V]Na$) = 498.19 g/mol. Análise elementar: Calc. para ($[C_{19}H_{17}N_2O_5Cl_2V]Na \cdot H_2O$): C, 44.21; H, 3.71; N, 5.43; Cl, 13.74; Obtido: C, 44.4; H, 3.9; N, 4.9; Cl, 14.2. ESI-MS: m/z [Obtido (Calcd)]: 513.8 (514.0) (24%) $[M+K]^+$; 519.9 (520.0) (28%) $[M+2Na-H]^+$. Considerando o complexo neutro protonado. UV-Vis. em DMSO, λ_{max}/nm ($\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$): 310 (8.6×10^3), 388 (5.8×10^3), 600 (139).

$[V^{IV}O(L5)(phen)Cl] \cdot NaCl$ (**11**) O procedimento foi semelhante ao utilizado para **10** sendo também foi adicionado 1,10-fenantrolina (1 mmol) após cerca de 15 minutos de reação. O sólido foi lavado com água, éter etílico e seco sob vácuo. Foi obtido um sólido castanho claro com rendimento de 25.4%, 0.079 g. MM ($C_{31}H_{25}N_4O_5ClV$) = 619.95 g/mol. Análise elementar: Calc. para ($[C_{31}H_{25}N_4O_5ClV]NaCl \cdot 2.5H_2O$): C, 51.47; H, 4.18; N, 7.75; Obtido: C, 51.2; H, 3.9; N, 7.5. ESI-MS: m/z [Obtido (Calcd)]: 584.1 (584.1) (7%) $[M]^+$; 616.0 (616.2) (40%) $[M+MeOH]^+$. Considerando o complex sem o ião cloreto como sendo a molécula ionizada. UV-Vis. em DMSO, λ_{max}/nm ($\epsilon/ M^{-1}cm^{-1}$): 274 (2.2×10^4), 294 (1.2×10^4), 396 (5.1×10^3), 417 (5.6×10^3), 460 (6.2×10^3). Não foi possível hidrolisar o complexo e, portanto, o conteúdo de cloreto na fórmula não foi confirmado.

8.2.2.4. Procedimentos para a preparação dos complexos contendo o pró-ligando HL7

[Cu^{II}(L7)(H₂O)] (**12**) A adição gota-a-gota de 1 mL de CuCl₂ (0.5 mmol) em metanol a uma suspensão de HL7 em 25 ml em metanol (0.0785, 0.5 mmol) formou uma solução de coloração verde límpida. De seguida foram adicionadas algumas gotas de KOH em metanol para ajustar o pH a cerca de 7.5-8.0. Deixou-se a mistura sob agitação à temperatura ambiente durante cerca de 4h com a obtenção de um sólido que foi isolado por filtração durante 2 minutos a 6000RPM e lavado com H₂O e metanol a frio, seguido de éter etílico, e seco sob vácuo. Redissolveu-se o complexo em isopropanol filtrou-se e evaporou-se o solvente sob vácuo à secura. Foi obtido um sólido verde tropa com rendimento de 36.8%, 0.0382mg. Análise elementar: Calc. para ([C₁₆H₁₉N₃O₅Cu]H₂O): C, 46.32; H, 5.10; N, 10.13; Obtido: C, 46.41; H, 4.50; N, 9.95. ESI-MS: Modo positivo: m/z [Obtido (Calcd)]: 279.19 (279.06) (97%) [M+H]⁺. Considerando o complexo sem a molécula de água. UV-Vis. em DMSO, λ_{max}/nm (ε/ M⁻¹cm⁻¹): 273 (12182), 299 (10975), 386 (5675), 668 (194).

[Cu^{II}(L7)(phen)]•KCl (**13**) O procedimento foi semelhante ao utilizado para **12** sendo que foi adicionado 1,10-fenantrolina (0.5 mmol) após cerca de 15 minutos de reação. O isolamento e purificação foi efetuado da mesma forma. Foi obtido um sólido verde amarelado com rendimento de 26.7%, 0.046 mg. Análise elementar: Calc. para ([C₂₈H₂₅N₅O₄Cu]KCl•2H₂O): C, 50.22; H, 4.36; N, 10.46; Obtido: C, 50.29; H, 3.87; N, 10.68. ESI-MS: Modo positivo: m/z [Obtido (Calcd)]: 558.12 (559.6) (4%) [M+H]⁺. UV-Vis. em DMSO, λ_{max}/nm (ε/ M⁻¹cm⁻¹): 266 (29098), 298 (25143), 446 (2285), 355 (12906), 652 (248)

[Cu^{II}(L7)(amphen)]•KCl (**14**) Realizou-se o mesmo procedimento do **13** com a obtenção de um sólido verde escuro com rendimento de 31.6%, 0,0316 g. Análise elementar: Calc. para ([C₂₈H₂₆N₆O₄Cu]KCl•H₂O): C, 50.45; H, 4.23; N, 12.61; Obtido: C, 50.90; H, 4.32; N, 12.54. Não foi possível observar o pico de m/z do ião molecular nem de nenhum dos aductos habitualmente formados no modo positivo ou negativo. Apenas se considerarmos a perda de uma unidade de piridoxal, resultando num complexo neutro com amphen e piridoxal coordenados ao centro de ião de metal: ESI-

MS: Modo positivo: m/z [Obtido (Calcd)]: 423.17 (424.06 (100%)). UV-Vis. em DMSO, λ_{\max}/nm ($\epsilon/ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 261 (14671), 280 (14142), 379 (3585) (larga), 562 (601)

$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{L7})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**15**) O procedimento adotado foi o mesmo do complexo **13** com o cuidado de ter um fluxo contínuo de N_2 durante a reação e nos passos de purificação sendo que o processo de centrifugação foi realizado apenas 30 segundos com o recipiente selado com N_2 no seu interior. Foi obtido um sólido verde com rendimento de 54.6%, 0.0576 g. Análise elementar: Calc. para $[\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_7\text{V}]\cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$: C, 44.97; H, 5.19; N, 9.83; Obtido: C, 45.1; H, 4.58, N, 9.66. ESI-MS: Modo positivo: m/z [Obtido (Calcd)]: 414.13 (415.09) (100%) $[\text{M}+\text{MeOH}+\text{H}]^+$. Considerando o complexo a perda de uma molécula de água. UV-Vis. em DMSO, λ_{\max}/nm ($\epsilon/ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 280 (14142), 379 (3585), 562 (601.6).

$[\text{V}^{\text{VO}}(\text{L7})(\text{phen})]\cdot \text{KCl}$ (**16**) Efetuou-se o mesmo procedimento para a obtenção do complexo **15** com a adição de 1,10-fenantrolina (0.5 mmol) após cerca de 15 minutos de reação. Foi obtido um sólido castanho com rendimento de 45.8%, 0.0796 g Análise elementar: Calc. para $[\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_5\text{V}]\text{KCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 49.97; H, 4.34; N, 10.41; Obtido: C, 50.23; H, 4.05; N, 10.25. Modo positivo: m/z [Obtido (Calcd)]: 563.04 (563.14) (10%) $[\text{M}+\text{H}]^+$ UV-Vis. em DMSO, λ_{\max}/nm ($\epsilon/ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 278 (43962), 278 (43962), 464 (5047), 348 (14461)

8.2.2.5. Procedimento geral para a síntese dos complexos do tipo $[\text{VO}(\text{Xphen})_2]^{2+}$

A síntese dos complexos de vanádio foi realizada com base em protocolos da literatura.[2][3][4] Dissolveu-se 0.5 mmol de $\text{VOSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 1 ml de H_2O -Miliq com agitação à temperatura ambiente numa atmosfera inerte (N_2), seguido da adição gota a gota de 1.5 ml de uma solução etanólica contendo 1 mmol da 1,10-fenantrolina pretendida. Após aproximadamente 30 minutos, um sólido foi-se formando e a mistura foi mantida em agitação durante cerca de 3 horas. O precipitado foi isolado por filtração e lavado com H_2O frio seguido de etanol frio e seco sob vácuo. Os solventes foram purgados com gás de nitrogénio antes de serem utilizados e a mistura de reação foi mantida sob fluxo N_2 .

$[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{OSO}_3)(\text{phen})_2]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**17**). Foi obtido um sólido castanho claro com rendimento de 73%, 209 mg. Análise elementar: Calc. para ($\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_8\text{SV}$): Calc. C, 49.92; H, 3.84; N, 9.70; S, 5.55; Obtido: C, 50.0; H, 4.5; N, 9.7; S, 5.8. ESI-MS (metanol): Modo positivo: m/z [Obtido (Calcd)]: 457.98 (458.09) (100%) $[\text{VO}(\text{OMe})(\text{phen})_2]^+$. Foi obtido e determinada a estrutura por cristalografia de raio-x de cristal único. As condições experimentais para permitir a formação do cristal foram realizadas de acordo com a literatura.[5] O sólido $[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{OSO}_3)(\text{phen})_2]$ foi colocado num frasco e dissolvido numa quantidade mínima de dimetilformamida, seguido pela adição de aproximadamente 1:10 parte H_2O -Miliq. e algumas gotas de éter dietílico. O frasco foi então mantido fechado à temperatura de 4°C durante pelo menos uma semana. Número de deposição 2015213.

$[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{OSO}_3)(\text{Me}_2\text{phen})_2]\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (**18**). Foi obtido um sólido castanho claro com rendimento de 66.9%, 224mg. Análise elementar: Calc. para ($\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{SV}$): Calc. C, 50.23; H, 5.12; N, 8.37; S, 4.79; Obtido: C, 50.2; H, 4.8; N, 8.2; S, 5.3. ESI-MS (metanol): Modo positivo: m/z [Obtido (Calcd)]: 514.05 (514.16) (100%) $[\text{VO}(\text{OMe})(\text{Me}_2\text{phen})_2]^+$.

$[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{OSO}_3)(\text{amphen})_2]\cdot 3\text{H}_2\text{O}\cdot 0.5\text{EtOH}$ (**19**). Foi obtido um sólido vermelho tijolo com rendimento de 62.2%, 196mg. Análise elementar: Calc. para ($\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_{8.5}\text{SV}$): Calc. C, 47.62; H, 4.32; N, 13.33; S, 5.08; Obtido: C, 48.0; H, 4.1; N, 13.4; S, 4.6. ESI-MS (metanol): Modo positivo: m/z [Obtido (Calcd)]: 553.83 (554.05) (20%) $[\text{VO}(\text{OSO}_3)(\text{amphen})_2+\text{H}]^+$; 487.99 (488.12) (100%) $[\text{VO}(\text{OMe})(\text{amphen})_2]^+$.

$[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{OSO}_3)(\text{bipy})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**20**). Foi obtido um sólido castanho escuro com rendimento de (79 %) 64 mg. $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5\text{SV}$: Calc. C, 46.97; H, 3.94; N, 10.96; S, 6.27; Obtido: C, 46.7; H, 4.1; N, 10.8; S, 6.5. ESI-MS (metanol): Modo positivo: m/z [Obtido (Calcd)]: 409.88 (410.09) (15%) $[\text{VO}(\text{OMe})(\text{bipy})_2]^+$; 475.82 (476.04) (5%) $[\text{VO}(\text{OSO}_3)(\text{bipy})_2+\text{H}]^+$; 538.76 (539.05) (7%) $[\text{VO}(\text{OSO}_3)(\text{bipy})_2+\text{ACN}+\text{Na}]^+$.

8.2.2.4. Procedimento geral para a síntese dos complexos do tipo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$

A síntese dos complexos de cobre **21-23** foi efetuada de acordo com a literatura,[6][7] pela dissolução de 0.121 g de nitrato de cobre(II) tri-hidratado (0.5 mmol) em 1 mL de etanol seguido da adição de 2 mL de uma solução etanólica ou metanólica contendo 1 mmol do derivado 1,10-fenantrolina. As soluções foram deixadas em agitação à temperatura ambiente durante 30-60 min, com a formação de um precipitado que foi isolado por filtração, lavado com água, metanol frio e éter dietílico e seco sob vácuo.

$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2$ (**21**): Um sólido verde claro foi obtido com rendimento de 75.4%, 217 mg. Análise elementar: Calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_7\text{Cu}\cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$: C, 50.13; H, 3.33; N, 14.62; Obtido: C, 50.1; H, 3.4; N, 14.5%. ESI-MS m/z [Obtido (Calcd)]: 484.78 (485.05) (17%) $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{NO}_3)]^+$; 211.74 (211.54) (100%) $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$. ATR-FTIR (cm^{-1}): 3060 (C-Aromático); 1609 (C=N); 1521 (C=C); 1430 (C-C); 1305 (C-N); 855 (deformação de anel). UV-Vis. [DMSO, $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ ($\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 700 (5.16×10^1), 345 (1.12×10^3), 327 (3.01×10^3), 295 (2.14×10^4), 273 (5.92×10^4).

$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Me}_2\text{phen})_2(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)\cdot \text{H}_2\text{O}$ (**22**): Um sólido verde acinzentado foi obtido com um rendimento de 75.1%, 234mg. Análise elementar: Calc. para $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_6\text{Cu}\cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 54.06; H, 4.21; N, 13.51%; Obtido: C, 54.5; H, 4.3; N, 13.2%. ESI-MS m/z [Obtido (Calcd)]: 540.8 (541.1) (15%) $[\text{Cu}(\text{Me}_2\text{phen})_2(\text{NO}_3)]^+$; 239.8 (239.6) (100%) $[\text{Cu}(\text{Me}_2\text{phen})_2]^{2+}$. ATR-FTIR (cm^{-1}): 3068-3061 (C-Haromatic); 2979-2921 (C-H-aliphatic); 1622 (C=N); 1517 (C=C); 1450 (C-C); 1353 (C-N); 844 (deformação de anel). UV-Vis. [DMSO, $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ ($\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 697 (6.45×10^1), 345 (1.94×10^3), 328 (3.90×10^3), 294 (2.13×10^4), 275 (7.51×10^4).

$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{amphen})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2$ (**23**): Um sólido verde acastanhado foi obtido com um rendimento de 73.7%, 220 mg. Análise elementar: Calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{CuN}_8\text{O}_6\cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 48.37; H, 3.38; N, 18.80%; Obtido: C, 48.1; H, 3.2; N, 18.8%. ESI-MS m/z [Obtido (Calcd)]: 514.8 (515.1) (15%) $[\text{Cu}(\text{amphen})_2(\text{NO}_3)]^+$; 226.8 (226.5) (100%) $[\text{Cu}(\text{amphen})_2]^{2+}$. ATR-FTIR: (cm^{-1}): 3411-3340 (N-H); 3061 (C-Haromatic); 1642-1622 (C=N); 1522 (C=C); 1463 (C-C); 1316 (C-N); 862 (deformação de anel). UV-Vis.

[DMSO, $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ ($\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 695 (5.57×10^1), 440 (2.74×10^3), 365 (1.47×10^4), 295 (4.14×10^4), 270 (3.96×10^4).

8.3. Cromatografia aniônica

Os complexos foram dissolvidos em DMSO (ca. 4mM) e hidrolisados com uma solução de 0.1 M de H_2SO_4 , agitando à temperatura ambiente durante a noite. As soluções resultantes foram diluídas em água Millipore para que a concentração prevista de Cl estivesse dentro do intervalo da curva de calibração obtida. A curva de calibração foi obtida com cinco soluções de KCl, preparadas a partir de uma solução concentrada rigorosa de 500 ppm em água Millipore, com concentrações que variavam entre 2 a 25 ppm. As soluções diluídas e hidrolisadas dos complexos foram injetadas, e a concentração de cloreto foi determinada.

8.4. Estabilidade hidrolítica

Soluções padrão de complexos e pró-ligandos foram preparadas em DMSO com concentrações que variam de 1.0 a 4.0 mM e diluídas em DMSO, NH_4CO_3 (25 mM, $\text{pH} \sim 7.4$), PBS (10 mM, $\text{pH} = 7.4$), ou meio de incubação celular para obter concentrações que variam de 25 a 120 μM com concentração de DMSO inferior a < 5%. Os espectros de absorção das soluções diluídas foram monitorizados entre 250 e 800 nm ao longo do tempo.

8.5. Estudos de interação com o ADN

Em todas as experiências foi utilizada água Millipore e soluções tampão Hepes (10 mM, $\text{pH} = 7.4$) ou PBS (10 mM, $\text{pH} = 7.4$). As soluções padrão dos complexos foram preparadas em DMSO. As soluções de estudo foram preparadas por diluição da solução padrão em DMSO em tampão Hepes ou PBS. A quantidade de solvente orgânico foi mantida abaixo dos 5% (v/v). O ADN do timo de bezerro – (*ctADN*) - foi adquirido à Sigma. As soluções de *ctADN* foram preparadas por dissolução em solução tampão e mantidas a 4°C cerca de 48h para hidratar completamente a biomolécula. A concentração de *ctADN* foi determinada por absorvância UV usando o coeficiente de extinção por nucleótido $\epsilon_{260} = 6600 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. [8] A relação de absorção

(A260/A280) da solução de *ctADN* encontrava-se compreendida entre os valores de 1.8 e 1.9, indicando que o *ctADN* estava suficientemente livre de proteínas.

8.5.1 Espectroscopia Eletrônica de Absorção

As titulações de absorção foram realizadas adicionando diferentes quantidades de *ctADN* a uma solução dos complexos com concentração de DMSO < 5% (v/v). Os espectros de absorção foram medidos 5 min após a adição e uma quantidade igual de *ctADN* foi adicionada tanto à amostra como à célula de referência para eliminar a contribuição de *ctADN*. As constantes de associação foram estimadas ajustando a absorção aos comprimentos de onda pretendidos para a equação de Kaminoh.[9]

$$Abs = \frac{A_0 + K[ADN]A_{Sat}}{1 + K[ADN]} \quad (\text{eq. 8.1})$$

onde A_{Sat} é a absorvância em condições de saturação, A_0 é a absorvância do complexo, K é a constante de Kaminoh determinada a partir da curva de Abs vs. [*ctADN*].

As constantes (K_{BC}) também foram obtidas ajustando os dados de absorção à equação do modelo matemático Scatchard[10]:

$$\frac{[ctDNA]}{\Delta\epsilon_{ap}} = \frac{[ctDNA]}{\Delta\epsilon} + \frac{1}{\Delta\epsilon K_{BC}} \quad (\text{eq. 8.2})$$

Onde $\Delta\epsilon_{ap} = [\epsilon_a - \epsilon_f]$; $\Delta\epsilon = [\epsilon_b - \epsilon_f]$; ϵ_a ; a é a razão entre a absorção medida e a concentração do complexo ($Abs/[complexo]$); b e f são os coeficientes de extinção do composto ligado ao *ctADN* e livre em solução, respetivamente; [*ctADN*] é a concentração de *ctADN* (em pares de bases) e K_{BC} é a constante intrínseca de ligação calculada pelo gráfico de [*ctADN*]/ $\Delta\epsilon_{ap}$ vs. [*ctADN*]. Em todos os ensaios de *ctADN* foi utilizada uma célula de quartzo de 10 mm de comprimento de percurso ótico.

8.5.2 Dicroísmo circular

Titulações de dicroísmo circular de complexos, que contêm 1,10-fenantolina como co-ligando, com *ctADN* foram feitas mantendo constante a concentração de *ctADN* enquanto se variava a concentração dos complexos. As soluções de *ctADN* foram tituladas adicionando pequenas quantidades dos complexos dissolvidos em DMSO para obter rácios molares complexos/ADN variando de 0.02 a 1.5. Os ensaios foram realizados diretamente na cuvete de quartzo de 10 mm e os espectros de DC foram recolhidos entre 230 a 600 nm com 1nm de largura de banda, utilizando um

fotomultiplicador UV. Os espectros em branco foram medidos sem *ctADN* e subtraídos da amostra correspondente.

8.6. Interação com a BSA

A ligação de complexos de íons de metal à BSA (albumina de soro bovino) foi avaliada por medições espectrais de UV-Visível e DC. Foram obtidas soluções padrão de BSA dissolvendo a proteína em tampão PBS (10 mM, pH~7.4), ou HEPES (10 mM, pH~7.4) que foi mantida a 4 °C durante pelo menos 3 h para hidratar completamente. A concentração de albumina foi determinada pela medição da absorvância a 279 nm, considerando o coeficiente de extinção molar $44309 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. [11] As soluções padrão concentradas de complexos de íons de metal foram preparadas em DMSO e diluídas com tampão PBS, devido à sua solubilidade limitada em meio aquoso; a quantidade de DMSO nas amostras era inferior a 5%.

8.6.1. UV-Vis.

A espectroscopia de absorção eletrônica foi utilizada para monitorizar (até 24 h) a estabilidade dos compostos e também as interações com BSA. Foram preparadas amostras contendo BSA (ca. 25 μM) e cada complexo na proporção desejada garantindo que a concentração de DMSO fosse inferior a <5 % (v/v). Todos os espectros foram registrados em células de quartzo de 10 mm de percurso ótico (240-700 nm). A mesma quantidade de BSA foi adicionada à célula de referência para cancelar a contribuição do espectro da albumina.

8.6.2. Estudos de interação com os complexos

As titulações de BSA em tampão foram efetuadas adicionando uma solução em DMSO para obter concentrações finais de forma que a quantidade de DMSO fosse inferior a 5%(v/v). Outro ensaio foi realizado adicionando a solução padrão de BSA à amostra contendo o complexo em tampão PBS (com DMSO >5 %, v/v). Todas as soluções de trabalho foram medidas à temperatura ambiente com uma cuvete de quartzo de 10 mm de percurso ótico.

8.6.3. Estudos de estabilidade de espécies BSA/complexo formados

A solução de BSA em tampão PBS foi titulada com soluções dos complexos dissolvidos em DMSO para obter concentrações de DMSO <5 (%). Os espectros DC das soluções foram medidos e a vários raios de complexo/BSA e as soluções de cada proporção medida periodicamente sempre que seja adequado ao estudo. Foram medidos ensaios em branco para cada espectro DC com a mesma concentração de ambos os complexos e DMSO sem a proteína.

8.6.4. Estudos de conformação da BSA

As soluções padrão dos complexos foram preparadas em metanol e utilizadas em poucas horas. As amostras de misturas de proteínas e complexos-proteína foram preparadas individualmente por diluição de quantidades adequadas e medidas após um tempo de equilíbrio de 8-10 minutos para cada amostra. A quantidade de solvente orgânico mantida abaixo de 5 (v/v) em cada amostra. As linhas de base foram registradas e subtraídas de cada espectro de amostra. Os dados obtidos foram tratados utilizando a seguinte relação de conversão.[18]

$$MRE = \frac{\theta_{Obs}}{C_p \times n \times l \times 10} \quad (\text{eq. 8.4})$$

Onde θ_{Obs} é o sinal de DC observado em mili-graus, n é o número de resíduos de aminoácidos (585), l é o comprimento do percurso ótico em cm e C_p é a concentração da proteína BSA em molaridade. As alterações a nível das hélices- α da estrutura secundária da BSA foram calculadas utilizando a seguinte equação:[18]

$$\alpha\text{-helical (\%)} = \frac{-MRE_{208} - 4000}{33000 - 4000} \times 100 \quad (\text{eq. 8.5})$$

8.6.5. Fluorescência

Adições sucessivas de soluções padrão dos complexos em DMSO foram diretamente introduzidos na cuvete contendo BSA (ca. 0.68 μ M) em tampão HEPES (pH 7.4, 10 mM) para obter uma concentração de DMSO inferior a <4% (v/v). Os espectros de emissão de fluorescência foram registrados utilizando os seguintes parâmetros: λ abertura de fenda com largura de banda entre 3 e 5 nm. Foram medidos

os ensaios branco para cada amostra. Os dados foram corrigidos em relação à absorção e aos efeitos do filtro interno.[12][13]

Os dados de extinção por fluorescência foram ajustados com a equação de Stern-Volmer:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (\text{eq. 8.6})$$

onde I_0 e I são as intensidades relativas de fluorescência da proteína BSA na ausência e presença do supressor, respetivamente. $[Q]$ é a concentração do supressor e K_{SV} é a constante de extinção de Stern-Volmer. As constantes de K_{SV} foram obtidas a partir da regressão linear da parcela de I_0/I vs. $[Q]$. As constantes de ligação foram determinadas utilizando a equação Scatchard.[14]

$$\frac{\Delta I/I_0}{[Q]} = nK_{Sch} - K_{Sch} \frac{\Delta I}{I_0} \quad (\text{eq. 8.7})$$

onde K_{Sch} representa a constante de ligação obtida a partir do declive do gráfico obtido pela equação:

$$\frac{\Delta I/I_0}{[Q]} \text{ vs } \frac{\Delta I}{I_0} \quad (\text{eq. 8.8})$$

e n é o número de locais de ligação por molécula de proteína.

8.7. Atividade de inibição de formação de radicais (RAS)

1.25 mL de uma solução de DPPH (50 μM) em metanol foi misturado com cinco soluções contendo o composto selecionado em diferentes concentrações, dissolvido no mesmo solvente. O volume final foi ajustado para 3.5 mL com metanol. O controlo continha apenas DPPH. As amostras foram agitadas e deixadas durante 30 min protegidas da luz à temperatura ambiente e os espetros de absorção foram registados entre 300 e 700 nm. A percentagem de RAS foi determinada medindo a absorvância da DPPH a 517 nm de acordo com a seguinte equação:

$$\%RAS = \frac{Abs_{padr\tilde{a}o} - Ab_{amostra}}{Abs_{padr\tilde{a}o}} \times 100 \quad (\text{eq. 8.9})$$

onde Abs_{amostra} é a absorção de soluções de DPPH contendo o composto a testar e $Abs_{\text{padrão}}$ é a absorção de DPPH em metanol. O ácido ascórbico foi escolhido como controlo positivo.

8.8. Ensaios de viabilidade celular

Os ensaios biológicos foram realizados no Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares (C²TN), Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa pela Dra. Fernanda Marujo Marques e seus colaboradores. Na *University Research Center for Translational Medicine (KUTTAM)* em Sariyer, Istanbul, Turquia, pelo grupo liderado pela Dra. Ceyda Acilan e no pelo Dr. Ignacio E. León pertencente ao grupo CONICET do Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR), da *Universidad Nacional de La Plata* (UNLP), Buenos Aires, Argentina.

Como exemplo, para testar a viabilidade celular induzida pelos compostos do capítulo V, foi usado o ensaio MTT que resumidamente consiste em deixar em manter as células em crescimento numa placa com 96 poços por 24h seguido do tratamento com os compostos durante outras 24 h. A viabilidade celular foi analisada usando um leitor de placas para obter as absorvâncias selecionadas. Esses dados foram analisados em Graphpad Prism (V5,01) para obter o IC₅₀ de cada composto e o DMSO usado como controlo.

Informação mais detalhadas dos procedimentos adotados podem ser obtidos na literatura.[15][16][17][18]

8.9. Referências

- [1] **A. Rockenbauer e L. Korecz.** Appl. Magn. Reson., 1996, 10, pp. 29–43
- [2] **M. Le, O. Rathje, A. Levina e P.A. Lay.** J. Biol. Inorg. Chem., 2017, 22, pp. 663-672.
- [3] **H. Sakurai, H. Tamura e K. Okatami.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 1995, 206, pp. 133-137.
- [4] **R. K. Narla, Y. Dong, O. J. D'Cruz, C. Navara e F. M. Uckun.** Clin. Cancer Res., 2000, 6, pp.1546-1556.
- [5] **Y. Dong, Rama K. Narla, E. Sudbeck e F. M. Uckun.** J. Inorg. Biochem., 2000, 78, pp. 321-330.
- [6] a) **G. Sanna, M. I. Pilo, M. A. Zoroddu, R. Seeber e S. Mosca.** Inorg. Chim. Acta, 1993, 208, pp.153-158. b) **M. A. Zoroddu, S. Zanetti, R. Pogni e R. Basosi.** J. Inorg. Biochem., 1996, 63, pp. 291-300.
- [7] **S. Chandrasekhar e K. H. Reddy.** Intern. J. Pharm. Sci. Res., 2016, 7, pp. 4204-4213.

- [8] **S. R. Gallagher, F.A. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith e K. Struhl.** *Current Protocols in Molecular Biology*, Eds. John Wiley & Sons, 1989.
- [9] **N. C. Santos, M. Prieto e M. A. R. B. Castanho.** *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, 1612, pp.123-135.
- [10] **C. V. Kumar, E. H. Punzalan e W. B. Tan.** *Tetrahedron*, 2000, 56, pp. 7027-7040.
- [11] **Jr. T. Peters.** *Serum albumin. In The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control*, Ed. F. W. Putnam, 1975, pp. 133-181.
- [12] **B. Valeur e M. N. Berberan-Santos,** *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2^a ed., Wiley, 2012.
- [13] **Coutinho e M. Prieto.** *J. Chem. Edu.*, 1993, 70, pp.425-428.
- [14] **Altomare, G. Cascarano, C. Giacobozzo e A. Guagliardi.** *J. Appl. Cryst.*, 1993, 26, pp. 343-350.
- [15] **P. Nunes, I. Correia, F. Marques, I. Cavaco e J. C. Pessoa.** *Inorg. Chem.*, 2020, 59, pp. 9116-9134.
- [16] **P. Nunes, F-Marques, I Cavaco, J. C. Pessoa e I. Correia.** *Inorg. Chimi. Acta*, 2020, 507, pp.119558-119571.
- [17] **P. Matos, Y. Addis, P. Nunes, S. Barroso, I. Alho, M. Martins, A. P. A. Matos, F. Marques, I. Cavaco, J. C. Pessoa e I. Correia.** *J. Inorg. Biochem.*, 2019, 198, pp. 110727-110745.
- [18] **P. Matos., Z. Adiguzel, Y. Yildizhan, B. Cevatemre, T. B. Onder, O. Cevik, P. Nunes, L. P. Ferreira, M. D. Carvalho, D. L. Campos, F. R. Pavan, J. C. Pessoa, M. H. Garcia, A. I. Tomaz, I. Correia e C. Acilan.** *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, 176, pp. 492-512.

- Capítulo I - Introdução
- Capítulo II - Objetivos
- Capítulo III - Complexos de cobre com bases de Schiff derivados do piridoxal com potencial terapêutico.
- Capítulo IV - Complexos de iões de metal constituídos por bases de Schiff de cromonas e piridoxal como potenciais agentes antitumorais
- Capítulo V - Complexos de iões de metal com bases de Schiff derivados da vitamina B₆
- Capítulo VI - Complexos de vanádio com 1,10-fenantrolina e derivados
- Capítulo VII - Comportamento dos complexos do tipo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ em meios celulares e a sua influência na citotoxicidade
- Capítulo VIII - Secção experimental
- **Capítulo IX - Considerações finais**
- ANEXOS

9.1. Considerações finais

Este trabalho teve como objetivo preparar e avaliar o potencial antitumoral de complexos Cu^{II} e V^{VO} com ligandos bioativos derivados da vitamina B_6 e co-ligandos heterocíclicos aromáticos com atividade biológica. Pretendia-se também avaliar a especiação de complexos de Cu e VO em meios fisiológicos de modo a ter uma visão mais abrangente dos mecanismos da morte celular envolvidos para este tipo de complexos. Os resultados foram discutidos de uma forma integrada ao longo do texto em cada capítulo, pelo que serão aqui apresentadas apenas algumas reflexões finais sobre o trabalho desenvolvido.

O piridoxal e a piridoxamina foram selecionados não só pela facilidade na preparação de bases de Schiff mas também devido à enorme versatilidade e abrangência de possibilidades em conjugá-los com outras aminas, aldeídos ou cetonas com relevância biológica. Outro motivo está relacionado com a capacidade das bases de Schiff formarem complexos estáveis com a maioria dos metais de transição. A simplicidade sintética e a purificação dos potenciais fármacos preparados, são fatores importantes para aplicações futuras na indústria farmacêutica. Prepararam-se então, sete novos pró-ligandos usando procedimentos sintéticos simples com bons rendimentos, e a partir destes, obtiveram-se 13 novos complexos de cobre e 4 novos complexos de vanádio.

A estabilidade dos complexos foi avaliada em meio aquoso, previamente aos estudos de citotoxicidade e interação com biomoléculas, por forma a podermos avaliar corretamente estes resultados. À exceção dos complexos constituídos pelas bases de Schiff formadas com as cromonas do tipo $[\text{M}(\text{L}_n)]$, todos os restantes complexos mostraram ser estáveis o suficiente para se realizarem os ensaios biológicos. A utilização dos co-ligandos heterocíclicos aromáticos, visou aumentar a atividade citotóxica; é expectável que isto também contribua para direcionar o modo de ação dos complexos para a interação com o ADN. Todos os complexos que os continham demonstraram também melhorias na sua estabilidade em meio aquoso. De facto, foi verificado que os complexos com estes co-ligandos apresentaram maior citotoxicidade e maior capacidade de ligação ao ADN, com perfis de ligação diferenciada dependentes do substituinte usado no anel heterocíclico.

A atividade antioxidante foi também avaliada com a obtenção de pró-ligandos com destaque para o **H₂L2**, que apresentou uma atividade de inibição de formação de

radicais livres excepcionalmente alta, superior até à atividade do ácido ascórbico, controlo positivo. O complexo **6** também apresentou valores próximos do composto de referência.

No geral, é notável que os co-ligandos heterocíclios melhoram o perfil farmacológico tanto para os complexos de Cu(II) como para os de V(IV)O. Um resultado interessante foi obtido para o composto **9** que evidenciou interagir com a BSA com a formação de outras espécies diferentes do complexo original. Estes estudos indicam a necessidade de se estudar a especiação em meio celular, assim como a interação com biomoléculas existentes no meio celular, que tenham afinidade para o centro de iões de metal dos complexos em estudo (principalmente para complexos constituídos por ligandos lábeis, tais como diiminas aromáticas). Estes resultados motivaram a produção e purificação de outros 7 complexos binários de Cu(II) e V(IV)O constituídos apenas por ligandos phen e seus derivados para explorar esse tema. Foram também sintetizados e purificados outros 7 homólogos de Fe(III) e Zn(II) para comparação.

Os complexos do tipo $M(Xphen)_2$ são mais citotóxicos que os respetivos ligandos para tempos de incubação até às 24 h, após o qual os valores tendem a igualar. Este facto está relacionado com a especiação imediata sofrida em meio fisiológico, originando diferentes espécies. Para além destes equilíbrios a concentração de albumina de soro bovino também pode afetar os valores de IC_{50} , uma vez que a competição da BSA e da phen pelos iões metálicos origina diferentes tipos de espécies com proporções dependentes da concentração de complexos inicialmente adicionados e da quantidade de albumina existente. Deste modo os mecanismos de ação serão distintos mediante as condições experimentais dos ensaios de citotoxicidade, por exemplo a vários períodos de incubação, ou com diferentes concentrações de albumina. Em relação aos mecanismos de morte celular, uma vez entrando nas células muito provavelmente os iões metálicos e as moléculas de phen devem ter ação separada alvos distintos.

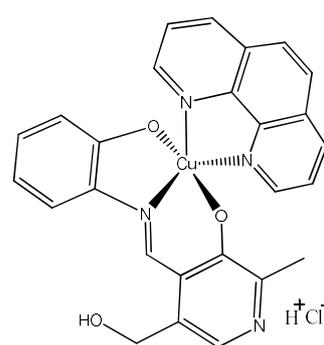
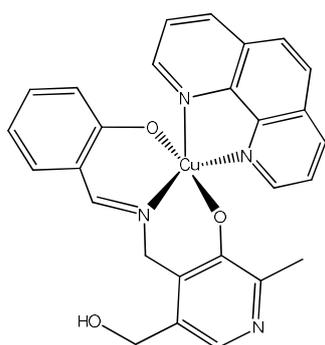
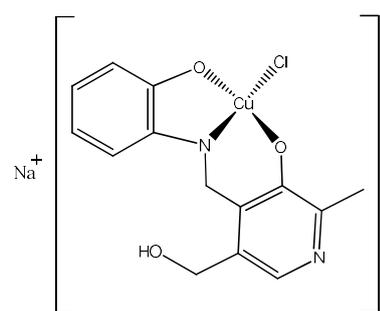
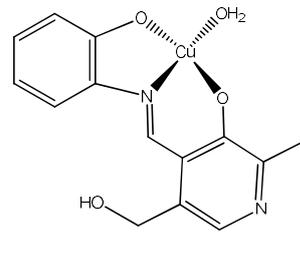
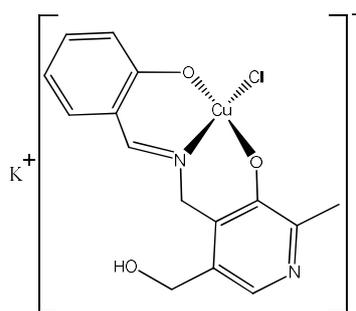
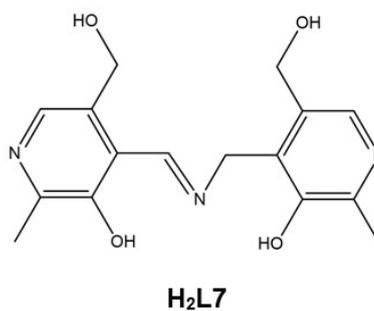
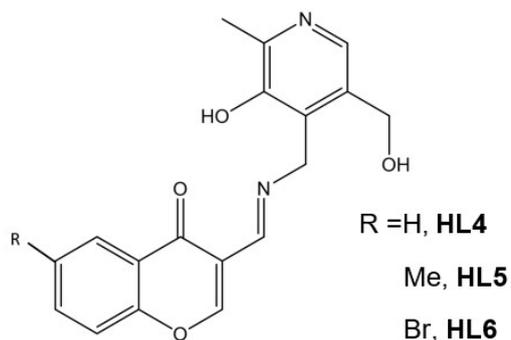
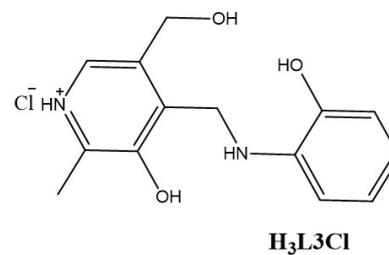
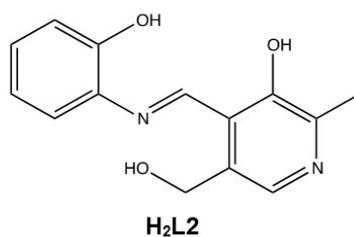
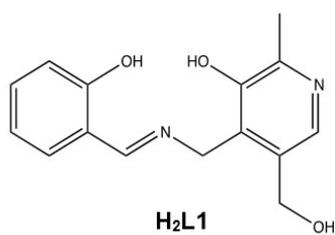
Em conclusão os complexos de Cu(II) e V(IV)O com ligandos de bases de Schiff derivados da vitamina B₆ desenvolvidos nesta tese, cumpriram o objetivo de combinar estabilidade e atividade biológica, apresentando características interessantes que valerá a pena explorar como novas famílias com potencial terapêutico para o cancro. Assim como os estudos realizados e discutidos nos capítulos VI e VII podem ter

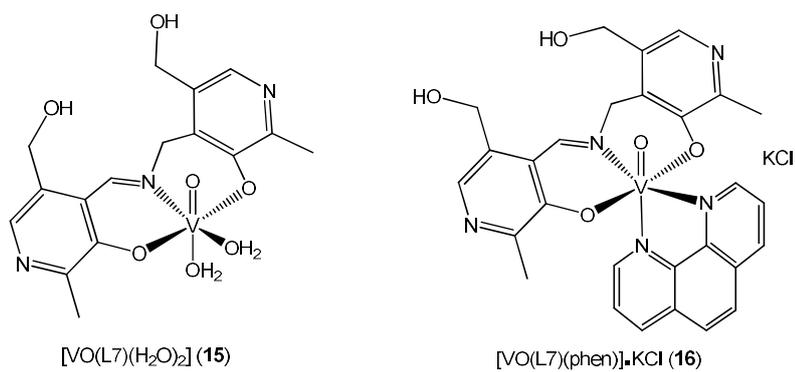
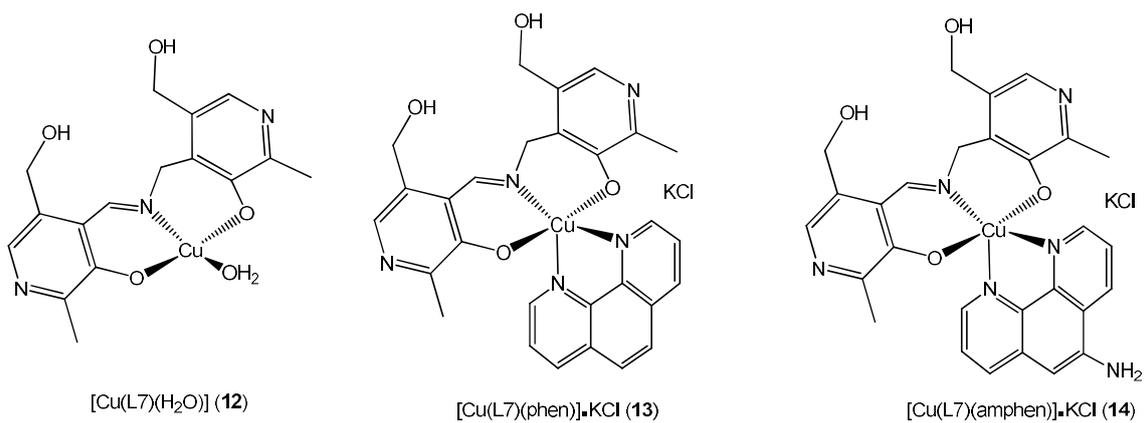
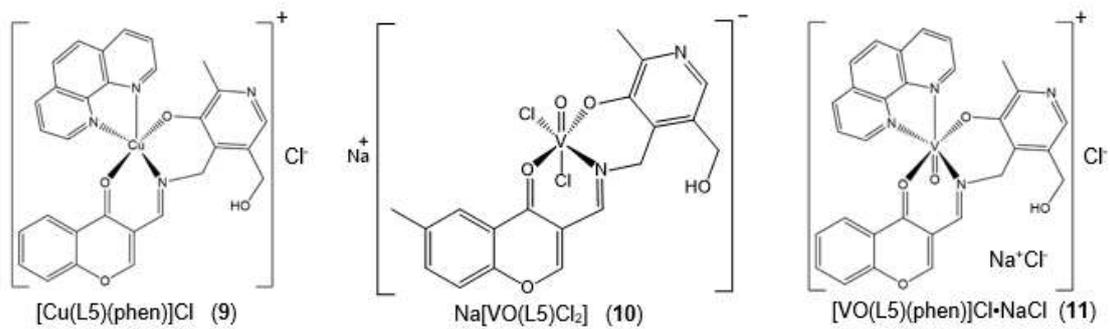
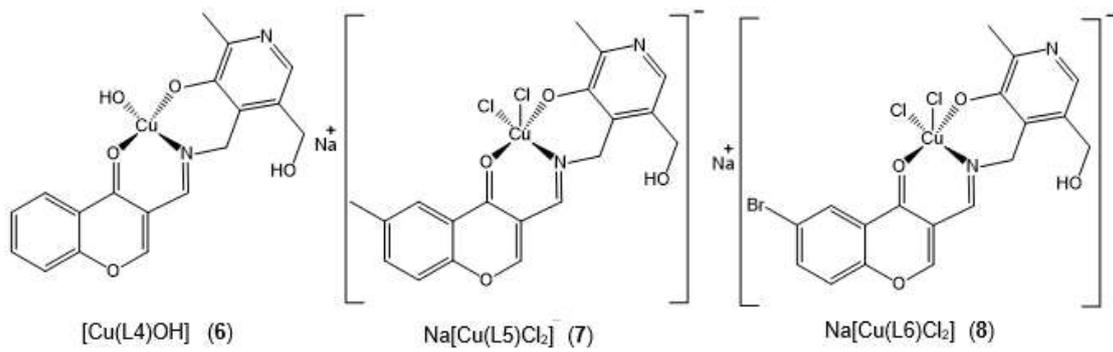
grande impacto na avaliação dos ensaios de citotoxicidade de complexos de íons de metal, tais como Cu(II) ou V(IV)O que contenham diaminas aromáticas.

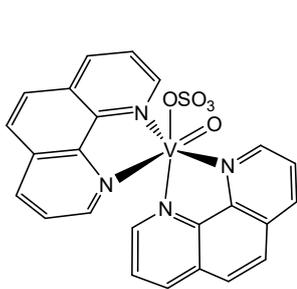
- Capítulo I - Introdução
- Capítulo II - Objetivos
- Capítulo III - Complexos de cobre com bases de Schiff derivados do piridoxal com potencial terapêutico.
- Capítulo IV - Complexos de iões de metal constituídos por bases de Schiff de cromonas e piridoxal como potenciais agentes antitumorais
- Capítulo V -Complexos de iões de metal com bases de Schiff derivados da vitamina B₆
- Capítulo VI - Complexos de vanádio com 1,10-fenantrolina e derivados
- Capítulo VII - Comportamento dos complexos do tipo [Cu(phen)₂]²⁺ em meios celulares e a sua influência na citotoxicidade
- Capítulo VIII - Secção experimental
- Capítulo IX - Considerações finais

- **ANEXOS**

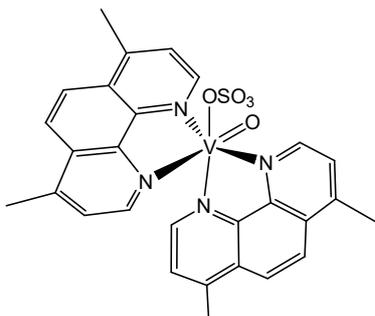
Anexo 1. Estruturas dos pró-ligandos e complexos



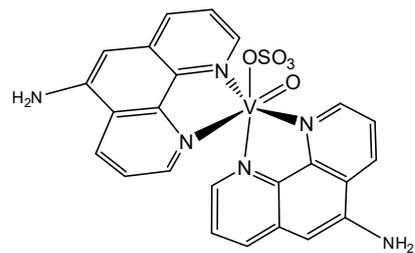




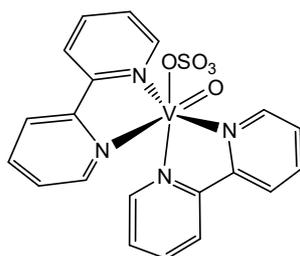
[VO(OSO₃)(phen)₂] (17)



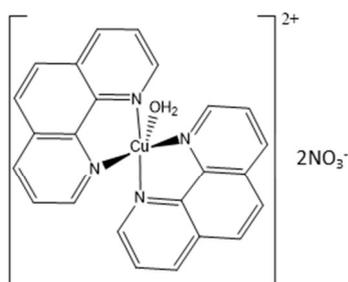
[VO(OSO₃)(Me₂phen)₂] (18)



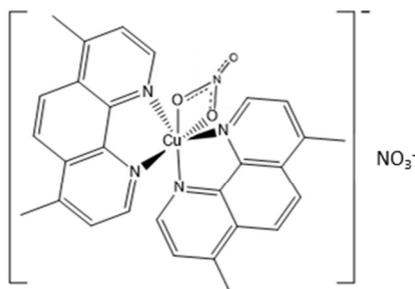
[VO(OSO₃)(amphen)₂] (19)



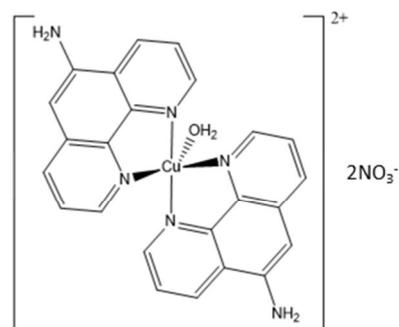
[VO(OSO₃)(bipy)₂] (20)



[Cu(phen)₂(H₂O)](NO₃)₂ (21)



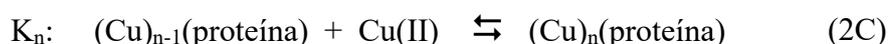
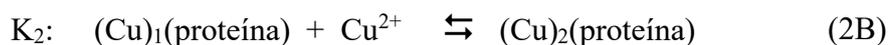
[Cu(Me₂phen)₂(NO₃)]NO₃ (22)



[Cu(amphen)₂(H₂O)](NO₃)₂ (23)

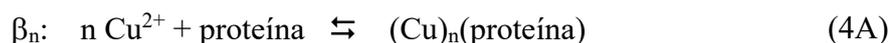
Anexo 2. Determinação das constantes de ligação das espécies Cu(II)- e Cu-phen à BSA (e HSA)

Como já foi referido, estas constantes foram determinadas através de cálculos efetuados pela Dr.^a Sofia Gama em colaboração com o Professor João Pessoa e a Dr.^a Isabel Correia. Começou-se por definir as constantes condicionais parciais (K_n) e globais (β_n) da ligação de Cu(II) com estas proteínas a pH constante como:



$$K_1 = \frac{[(\text{Cu}^{2+})_1(\text{proteína})]}{[\text{Cu}^{2+}][\text{proteína}]} \quad (3A)$$

$$K_2 = \frac{[(\text{Cu}^{2+})_2(\text{proteína})]}{[(\text{Cu}^{2+})_1(\text{proteína})][\text{Cu}^{2+}]} \quad (3B)$$



$$\beta_1 = \frac{[(\text{Cu})_n(\text{proteína})]}{[\text{Cu}^{2+}]^n[\text{proteína}]} \quad (4B)$$

Para o sistema que também inclui phen, as constantes de ligação β_{pq} foram definidas pelo **equilíbrio I** (ver texto principal capítulo VII) e correspondem a:

$$\beta_{pq} = \frac{[(\text{Cu}^{2+})_p(\text{Phen})_q(\text{proteína})]}{[\text{Cu}^{2+}]^p[\text{Phen}]^q[\text{proteína}]} \quad (5)$$

Os valores K_n , β_n e β_{pq} dependem do pH e da natureza do tampão.

A albumina de soro humano e bovino contêm um local primário de ligação forte para o Cu(II), o local N-terminal (local 1, que envolve resíduos Asp1, Ala2, His3)[1] e um local secundário, o local de ligação multimetal (MBS ou local 2) localizado na interface entre os domínios I e II da HSA. O MBS é o local primário de ligação dos iões de Zn(II).[1] Como as ligações covalentes são estabelecidas entre os átomos doadores de BSA (ou HSA) e os iões Cu(II), a quiralidade dos aminoácidos proteicos é transferida para o cobre(II) e o dicroísmo circular pode ser observado para as bandas centradas no metal na região do visível devido às transições d-d. A ligação no local 1 é muito mais forte do que no local 2 e constantes de ligação condicional (ver eqs. 2-

4) a pH = 7.4 foram determinadas a partir de dados de DC para HSA como $\log \beta_1(\text{local } 1) = 12.0 \pm 0.5$ e $\log \beta_2(\text{local } 1+2) = 18.0 \pm 1.0$ (constante de ligação parcial: $\log K_2(\text{local } 2) \approx 6$);[1][2] Na albumina de soro de bovino, o local de ligação 1 é também muito mais forte do que o local 2 e foram reportadas constantes de ligação condicional para Cu(II) a pH = 7.4 no intervalo: (a) $\log \beta_1$ (Local1) 11-13.5 e (b) $\log K_2$ (Local 2) no intervalo 6-7.[1][3][4] Outros locais de ligação mais fracos com $\log K_n \approx 5-7$ ($n \geq 3$) foram também determinados.[3][4]

Anexo 3. Potenciais ligandos existentes nos meios de incubação de células de mamíferos.

Nos meios de incubação habituais para as células de mamíferos utilizados, existem vários potenciais ligandos de baixo peso molecular para iões metálicos, tais como cloreto (100-110 mM), glucose (10 a 25 mM), piruvato (aprox. 1 mM), aminoácidos (aprox. 0.01 a 0.1 mM), vitaminas e mediadores redox (aprox. 1 a 40 μM cada).[5] A importância de cada um destes ligandos depende do ião metálico considerado e do intervalo de concentração do complexo de ião metálico a ser analisado. Por exemplo, a concentração de glutathiona reduzida (GSH) nos meios de cultura celular está tipicamente presente a $\approx 3\text{-}4 \mu\text{M}$. [5] Na presença de complexos de Cu(II), com concentrações superiores a $\sim 20 \mu\text{M}$, provavelmente não será um potencial ligando, podendo, no entanto, ser relevante caso a concentração de Cu(II) seja de $1\text{-}3 \mu\text{M}$ (o intervalo de vários valores de IC_{50} de complexos de Cu(II)-phen). A GSH poderá reduzir o Cu(II) a Cu(I), formando glutathiona oxidada (GSSG), no entanto o Cu(I) na presença de oxigénio, será provavelmente oxidado a Cu(II) num período de tempo relativamente curto.

Quanto aos ligandos de elevado peso molecular, as principais proteínas a considerar são as albuminas. Os meios de incubação de células de mamíferos podem conter BSA a baixas concentrações (μM), por exemplo $\approx 6 \mu\text{M}$ no meio de cultura: *Advanced Dulbecco's Modified Eagle's Medium*. [5][6] O soro fetal de bovino (FBS) contém até cerca de 36 g/L ($\approx 540 \mu\text{M}$) de BSA, bem como outras proteínas. O FBS está tipicamente presente nos meios de incubação num intervalo entre 1 e 10 %, sendo a principal fonte de albumina presente em contacto com células.

O FBS utilizado nas medições de citotoxicidade realizadas contém 25.8 g/L de BSA. Por conseguinte, o meio de incubação utilizado contém quantidades significativas de albumina de soro bovino (aprox. $3.9 \times 10^{-5} \text{ M}$). Assim, de entre os potenciais ligandos existentes nos meios celulares que podem competir com os ligandos phen para os iões de Cu(II), a BSA é a mais relevante. As quantidades médias de BSA em contacto com células em experiências *in vitro* são assim $\approx 20\text{-}40 \mu\text{M}$, correspondendo à adição de 5-10 % de FBS, sendo este potencialmente o principal ligando para os complexos de Cu(II).

No sistema de Cu(II)-phen, não considerando a possibilidade de redução de Cu(II) a Cu(I) (por exemplo pela GSH), várias espécies de Cu podem ser

consideradas: Cu^{2+} , $\text{Cu}(\text{OH})^+$ ($\log \beta = -6,5$)[7], $[\text{Cu}(\text{phen})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{phen})_3]^{2+}$ ($\log \beta_1 = 9.1$; $\log \beta_2 = 15.85$; $\log \beta_3 = 20.9$).[8]

Dos vários ligandos presentes no meio de incubação utilizado, todos os aminoácidos são potenciais ligandos para o $\text{Cu}(\text{II})$ e a sua concentração total em *Adv. DMEM* ou *RPMI-1640* está no intervalo 100-800 μM . [5][6] (para o meio *RPMI-1640*). Os mais relevantes são Arg, Gln, Ile, Leu, Lys, Thr, Val, Gly, Ser, (sendo Phe, Tyr, Met, Cistine, e outros menos importantes). Para avaliar a relevância dos aminoácidos na coordenação ao Cu, foi considerada a concentração de 600 μM (como média) e as constantes de formação da glicina, considerando apenas as espécies CuL e CuL_2 ($\log \beta_1 = 8.1$, $\log \beta_2 = 15.0$ $\text{pK}_{a1} = 9.56$, $\text{pK}_{a2} = 2.36$ [9]). Foram realizados vários tipos de cálculos de especiação pelo Professor João Pessoa, que, considerando os vários potenciais ligandos (grupos fosfato, cloreto) e a maioria das constantes de ligação apresentadas por Martell, *et al.*[9] concluiu que, além da phen, o principal potencial ligando de $\text{Cu}(\text{II})$ é a BSA. A exceção é, como mencionado acima, a GSH. Deste modo, foi assumido que a GSH pode reduzir $\text{Cu}(\text{II})$ a $\text{Cu}(\text{I})$ e após todo o GSH ser transformado em GSSG, o $\text{Cu}(\text{I})$ formado seria oxidado a $\text{Cu}(\text{II})$ pelo oxigênio.

Anexo 4. Estudos dos sistemas Cu+ BSA + phen por dicroísmo circular e RPE

4.1. Espectrofotometria de Dicroísmo Circular de Soluções com albumina de soro bovino e Cu(II)

O sistema Cu(II)-HSA foi previamente estudado por espectrofotometria de DC.[10][11] Neste anexo apresentam-se os resultados sobre o sistema Cu(II)-BSA a pH=7.4. Os espectros de dicroísmo circular e RPE foram medidos com soluções que continham $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ e BSA a várias razões molares de Cu:BSA, a maioria desses dados estão incluídos abaixo. A BSA não absorve na região do visível, pelo que as bandas observadas entre 350-800 nm correspondem a bandas de dicroísmo circular induzido (DCI), que só podem ser visíveis se ocorrerem interações razoavelmente fortes de complexos de Cu(II) com moléculas quirais (ou partes quirais de moléculas), como é o caso da BSA. Após a adição de uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ à solução de BSA em tampão PBS, são observadas alterações em várias regiões distintas (**Figuras A4.1 a A4.4**, onde $\Delta\varepsilon$ está em $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

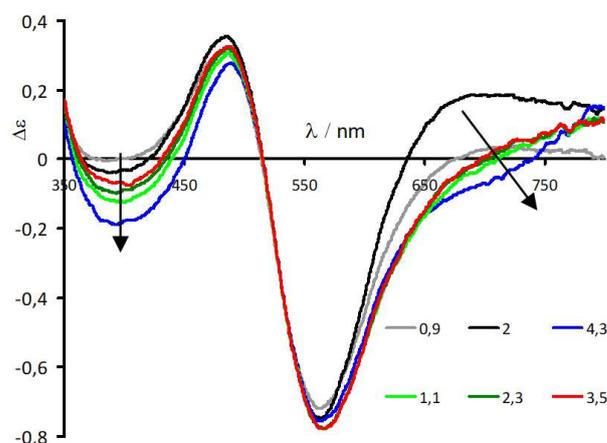


Figura A4.1. Espectros de DC, no intervalo entre 350-800 nm, para soluções 0,6 mM de BSA em PBS e após a adição de soluções de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de modo com os rácios molares Cu:BSA: 0,9 (cinzento), 2,0 (preto), 1,1 (verde claro), 2,3 (verde escuro), 3,5 (vermelho) e 4,3 (azul).

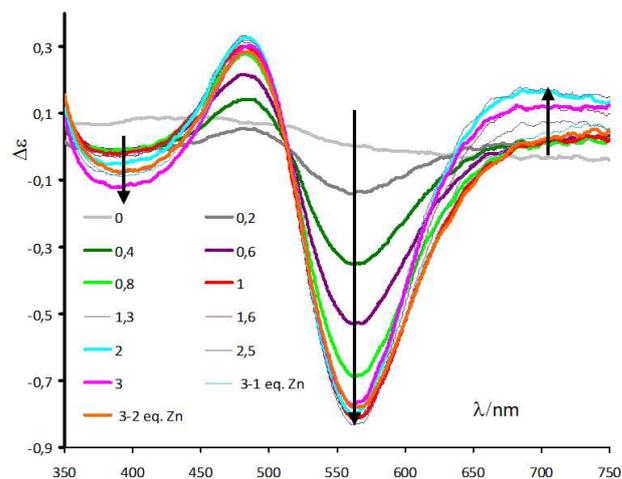


Figura A4.2. Espectros de DC, no intervalo 350-750 nm, para soluções 0.4 mM de BSA em PBS e mediante a adição de soluções de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de acordo com os rácios molares $\text{Cu}:\text{BSA}$: 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1; 1.3; 1.6; 2; 2.5 e 3.0. Seguiu-se então a adição de uma solução de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, de modo a que os rácios molares $\text{BSA}:\text{Cu}^{2+}:\text{Zn}^{2+}$ fossem: 1:3:1 e 1:3:2.

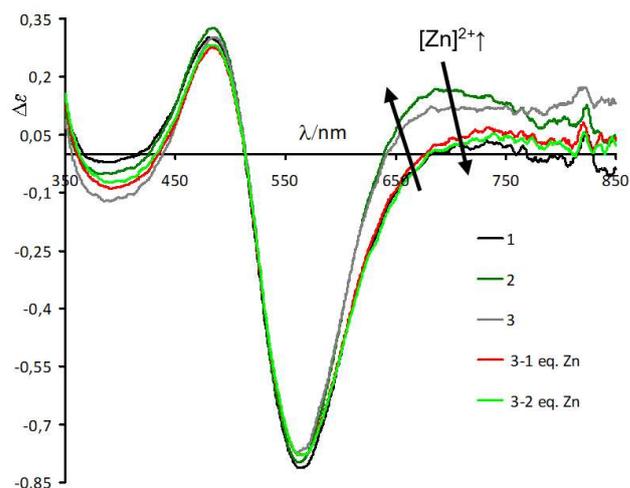


Figura A4.3. Espectros de DC, das mesmas soluções para a obtenção da **Figura A4.2.**, com destaque para os rácios molares $\text{BSA}:\text{Cu}^{2+}:\text{Zn}^{2+}$: 1:1:0; 1:2:0; 1:3:0; 1:3:1 e 1:3:2.

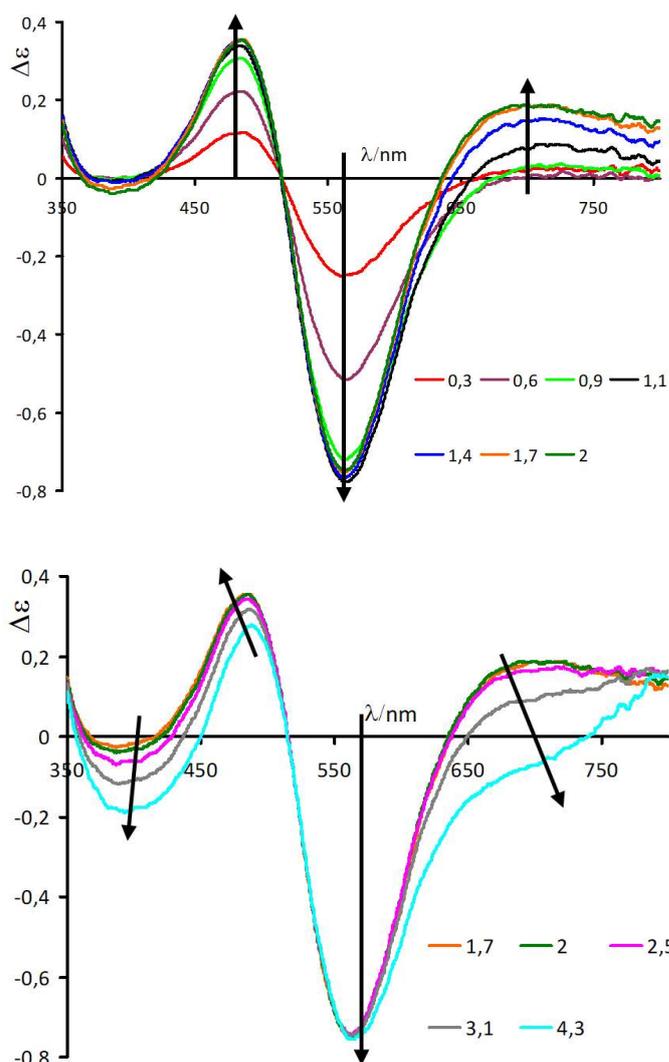


Figura A4.4. Espectros de DC, no intervalo entre 350-800 nm, de soluções 0.6 mM de BSA em PBS e após a adição de soluções de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de acordo com os rácios molares Cu:BSA: **a)** 0.3; 0.6; 0.9; 1.1; 1.4; 1.7 e 2 e **b)** 1.7; 2; 2.5; 3.1 e 4.3. Em todos estes espectros de DC foi subtraído o “espectro” da solução de BSA livre à de cada solução.

4.2. Soluções com albumina de soro bovino, Cu(II) e phen medidos por DC e RPE

O sistema $\text{Cu}(\text{II})+\text{BSA}+\text{phen}$ foi estudado pela aquisição de espectros de DC na região do visível para determinar as espécies formadas e as constantes de ligação correspondentes. Considerando as constantes de ligação β_{pq} definidas na equação 5, vários conjuntos de espectros de DC (e RPE) foram adquiridos a $\text{pH} = 7.4$ para os sistemas $\text{BSA}+\text{Cu}(\text{II})$ e $\text{BSA}+\text{Cu}(\text{II})+\text{phen}$, a diversos rácios molares. Alguns destes dados estão incluídos nesta secção. As Figuras abaixo foram preparadas para vários razões BSA:Cu:phen de $1:n_{\text{Cu}}:n_{\text{phen}}$ (em molar).

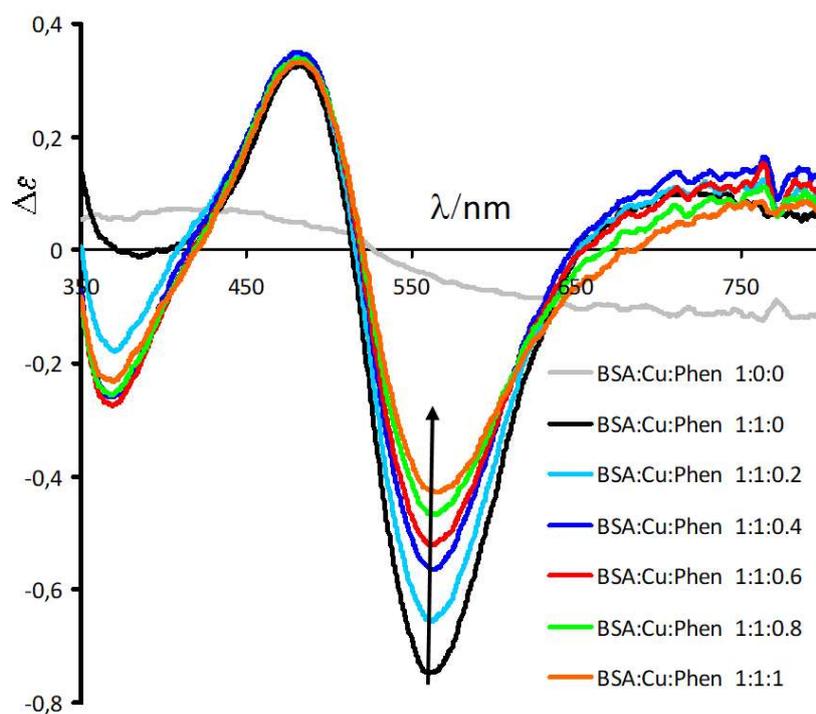


Figura A4.5. Espectros de DC, no intervalo 350-800 nm, de soluções com 0.4 mM de BSA em PBS, após adição de uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de modo a que a razão molar Cu:BSA fosse 1.1, seguida da adição de uma solução de phen até uma razão molar final Cu:BSA:phen de 1:1:1. A $\lambda = 560$ nm, $|\Delta\epsilon_{\text{max}}|$ corresponde à razão de 1:1:0, ao adicionar phen, estes $|\Delta\epsilon|$ valores diminuem continuamente.

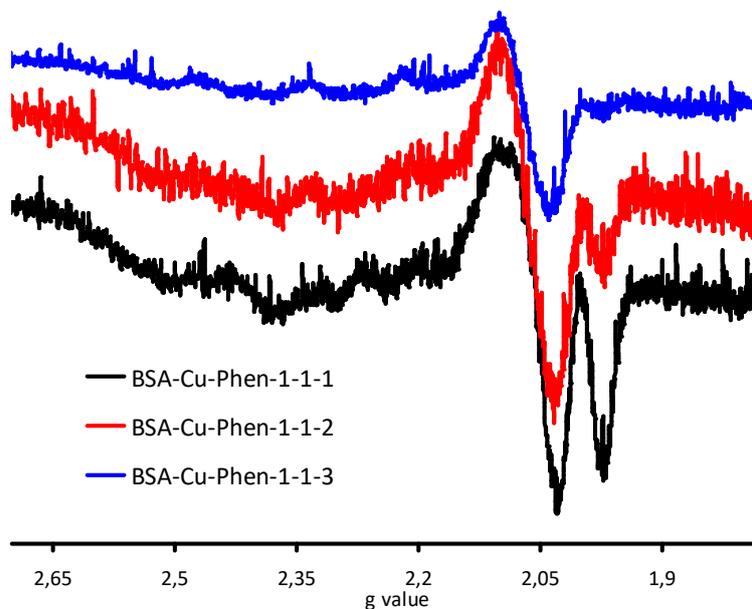


Figura A4.6. Espectros de RPE a 77 K de soluções com 0.4 mM de BSA em PBS de soluções onde se encontram $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ e phen. Os rácios molares estão indicados na figura.

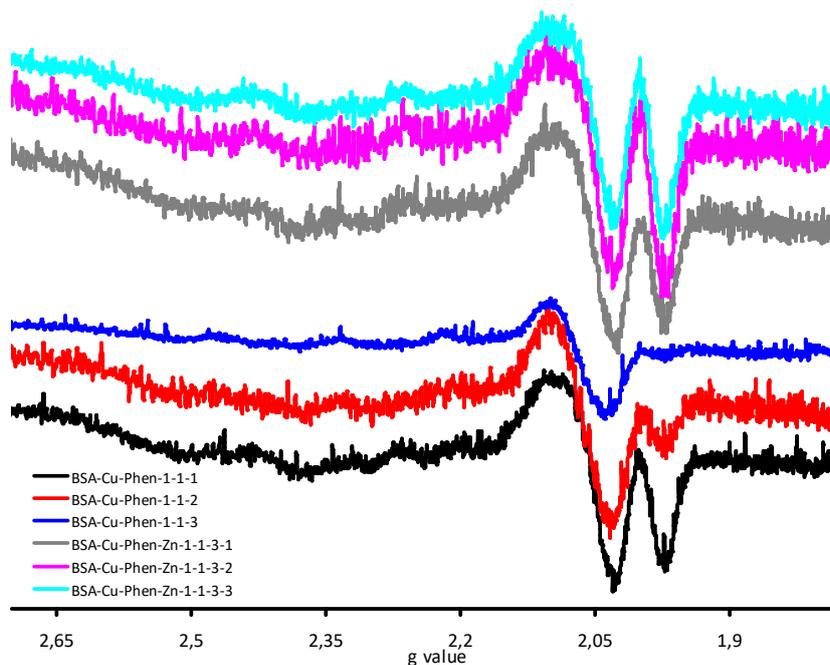


Figura A4.7. Espectros de RPE a 77 K de uma solução contendo 0.4 mM BSA em PBS, após adição de uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de modo a que os rácios molares Cu:BSA fossem 1.0, sucedendo-se as adições de uma solução de phen até um rácio molar final de Cu:BSA:phen na proporção 1:1:3. Seguidamente foi progressivamente adicionada uma solução de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$. Os rácios molares estão indicados na figura.

Tabela A4.1. Parâmetros de Spin Hamiltonian obtidos por simulação espectral[12] para espécies de Cu existentes em soluções aquosas a pH = 7.4 que contêm $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, BSA e phen (e $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$).

BSA:Cu:phen:(Zn) (concentração de BSA)	g_x, g_y	g_z	$ A_x , A_y $ $/(\times 10^4 \text{ cm}^{-1})$	$ A_z $ $/(\times 10^4 \text{ cm}^{-1})$
(500 μM)				
1:1:1	2.040	2.189	15.7	204.5
1:1:1	2.048	2.266	25.3	182.0
(400 μM)				
1:1:3	2.025	2.200	12.4	184.9
1:1:3	2.064	2.275	11.6	165.8
(500 μM)				
1:1:3	2.045	2.274	22.5	160.2
1:1:3	2.066	2.182	19.8	209.6
(400 μM)				
1:1:3:(3)	2.046	2.191	8.4	207.5
1:1:3:(3)	1.988	2.150	13.9	156.6

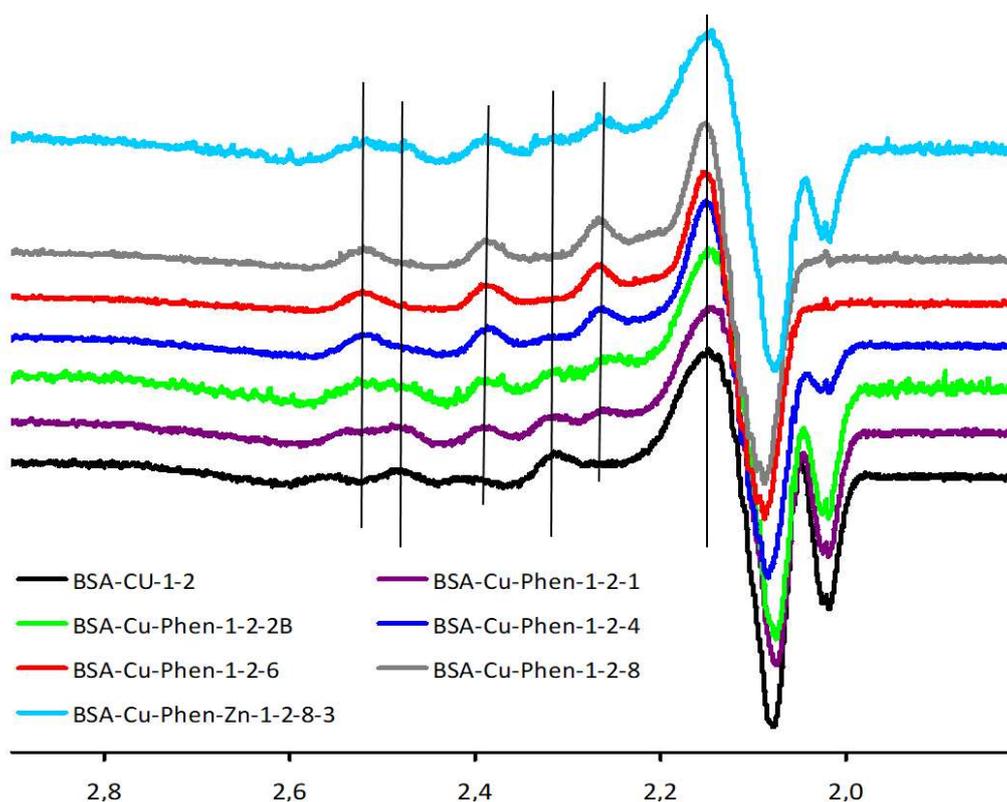


Figura A4.8. Espectros de RPE de soluções com 0.5 mM de BSA em PBS, após adição de uma solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, de modo a que os rácios molares Cu:BSA fossem 2:1, seguidos da adição de uma solução de phen até um rácio molar final de Cu:BSA:phen de 2:1:8. Em seguida, foi adicionada progressivamente uma solução de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$.

Tabela A4.2. Parâmetros de Spin Hamiltonian obtidos por simulação espectral[12] para espécies de Cu existentes em soluções aquosas a pH = 7.4 que contêm $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, BSA e phen.

BSA:Cu:phen (concentração de BSA)	g_x, g_y	g_z	$ A_x , A_y $ / ($\times 10^4 \text{ cm}^{-1}$)	$ A_z $ / ($\times 10^4 \text{ cm}^{-1}$)
(500 μM)				
1:2:4	2.050	2.188	17.7	207.3
1:2:4	2.059	2.270	21.9	167.0

Estudos espectroscópicos Soluções com albumina de soro bovino e Cu(II) por RPE.

Vários espectros de RPE foram recolhidos de soluções com Cu(II) e BSA e estão representados nas **Figuras A4.9 e A4.10**, onde foram detetadas até 3 espécies diferentes. Os parâmetros do hamiltoniano de spin obtidos dos espectros por simulação[12] estão incluídos na **Tabela A4.3**: espécie I: $g_z = 2.188$, $|A_z| = 207 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$

¹ e espécie II: $g_z = 2.31 \times 10^4$, $|A_z| = 168 \text{ cm}^{-1}$ coincidem com os descritos para Cu(II) ligados no local 1 e 2, respectivamente.^{11, 25} Para as soluções envolvendo rácios molares de Cu:BSA mais elevados, os parâmetros do hamiltoniano de spin são $g_z \approx 2.12$, $|A_z| \approx 200 \text{ cm}^{-1}$, embora sejam mais difícil de obter com rigor.

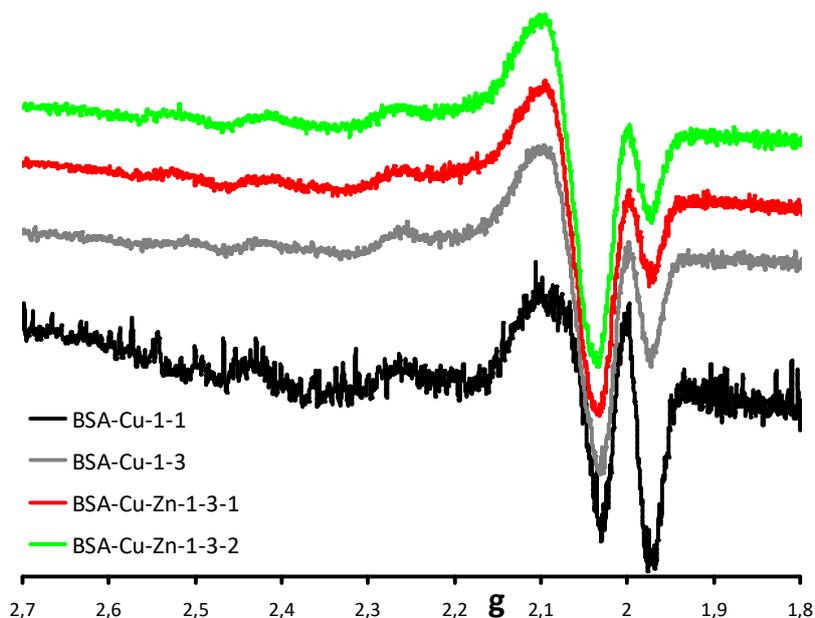


Figura A4.9. Espectros de RPE obtidos a 77 K de solu es contendo $400 \mu\text{M}$ de BSA e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ em tampão PBS, seguidos da adi o de uma soluço $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$. As amostras cont m 10% de etilenoglicol e os rácios molares são indicados na figura.

Tabela A4.3. Parâmetros de simula o dos parâmetros de spin Hamiltonian obtidos a partir dos espectros de RPE de solu es aquosas (PBS, 10 mM, $\text{pH} \approx 7.4$) contendo BSA ($400 \mu\text{M}$) e Cu(II). As solu es consistem em: I) BSA ($393 \mu\text{M}$) e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($383 \mu\text{M}$) com 1.6 % MeOH, resultando numa razão molar BSA:Cu de $\approx 1:1$; II) BSA ($380 \mu\text{M}$) com $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($1.14 \times 10^3 \mu\text{M}$) com 4.8 % MeOH, obtendo uma razão molar BSA:Cu de 1:3.

Condi�es experimentais	g_x, g_y	g_z	$ A_x , A_y $ $/(\times 10^4 \text{ cm}^{-1})$	BSA:Cu	$ A_z $ $/(\times 10^4 \text{ cm}^{-1})$
I	2.045	2.192	8.4	1:1	207.5
II	2.053	2.185	9.9	1:3 (espécie 1)	204.3
	1.988	2.300	37.4	1:3 (espécie 2)	167.6

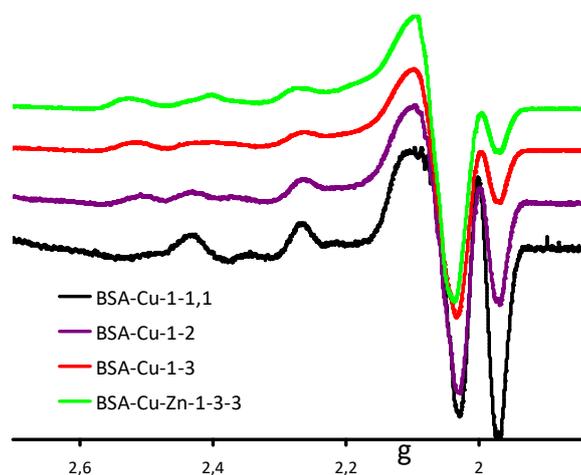


Figura A4.10. Espetros de RPE obtidos a 77 K de soluções com $[BSA] = 600 \mu M$, após adição de uma solução de $Cu(NO_3)_2$ até uma razão molar de Cu:BSA de 3:1, seguida de adição de uma solução de $Zn(NO_3)_2$ até razões molares de Cu:BSA:Zn de 3:1:3. As soluções contêm $\approx 10\%$ de etilenoglicol.

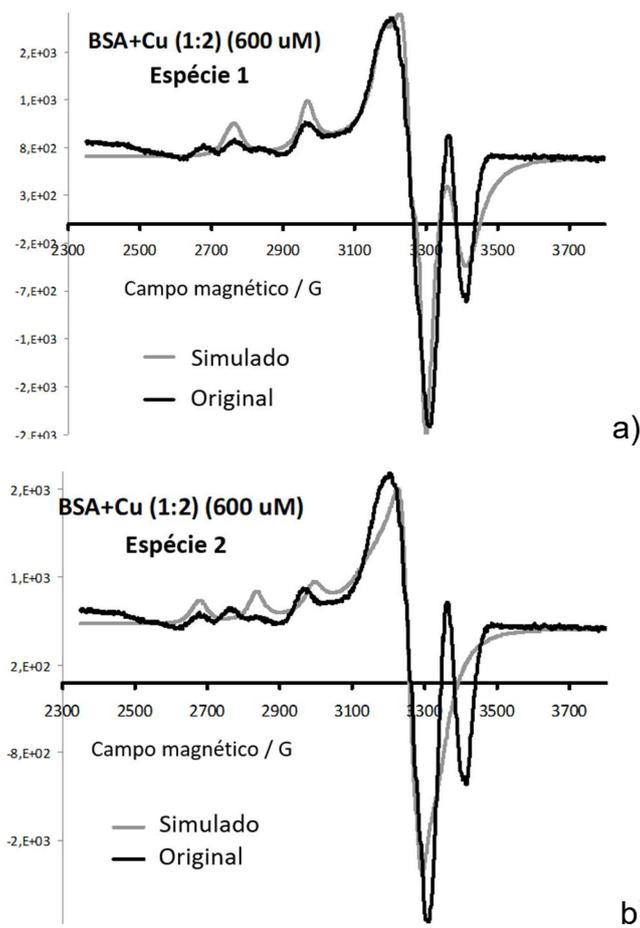


Figura A4.11. Espetros de RPE de uma solução com uma razão molar Cu:BSA de 2:1 e $[BSA] = 600 \mu M$, medida a 77 K, e o espectro simulado correspondente para **a)** espécies designadas como 1, e **b)** espécies designadas como 2; utilizando o programa de computador de Rockenbauer et al. ¹² A solução contém $\approx 10\%$ de etilenoglicol.

Anexo 5. Espectros de RPE de soluções com complexos do tipo $[V^{IV}O(Xphen)_2]$ em diversos meios, medidos ao longo do tempo

PBS: Tampão PBS a pH = 7.0

MC: Meios de cultura de células *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM)

MC + FBS: Meios de cultura de células MEM com adição de 10% de FBS.

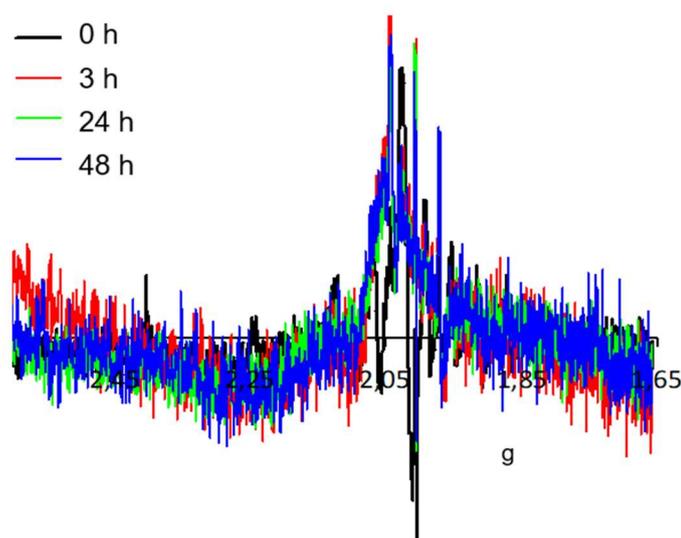


Figura A5.1. Espectros de RPE de 1ª derivada à frequência da banda X medidos a 77K para amostras com **17** (ca. 0.50 mM) a pH = 7.0 em meios de cultura de células MEM. Após adição de **17** aos meios, as soluções foram deixadas em repouso a cerca de 25 °C. Os espectros das amostras a 3, 24 e 48 h têm uma intensidade muito mais baixa do que a 0 h, e foram traçadas com uma escala distinta.

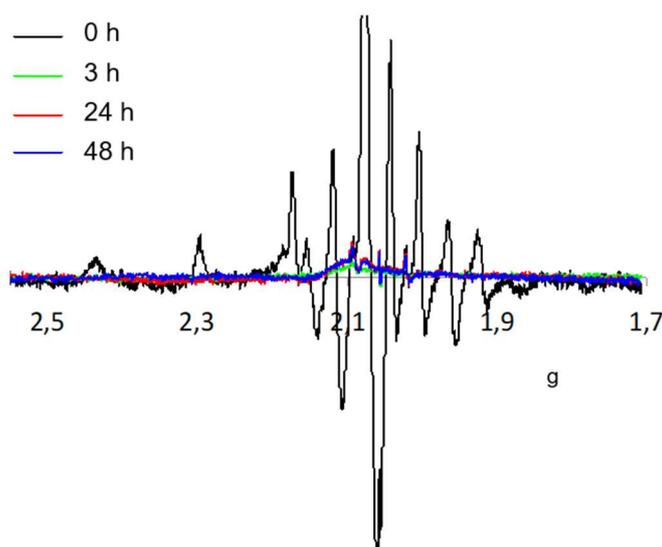


Figura A5.2. Espectros de RPE de 1ª derivada à frequência da banda X medidos a 77K para amostras contendo $[V^{IV}O(phen)_2]$ (**17**) (ca. 0.50 mM) a pH = 7.0 em meios de cultura de células MEM. Após adição de **17** aos meios, as soluções foram

deixadas em repouso a cerca de 25 °C. Os espectros das amostras a 3, 24 e 48 h têm uma intensidade muito mais baixa do que a 0 h.

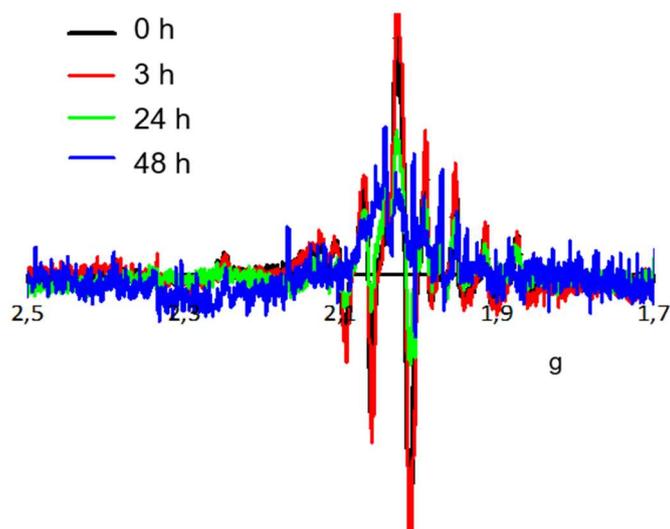


Figura A5.3. Espectros de RPE de 1ª derivada à frequência da banda X medidos a 77K para amostras com $[V^{IV}O(Me_2phen)_2]$ (**18**) (ca. 0.50 mM) a pH = 7.0 em tampão PBS. Após a adição de **18** aos meios, as soluções foram deixadas em repouso a cerca de 25 °C. Os espectros das amostras a 24 e 48 h têm uma intensidade muito mais baixa que a 0 e 3 h, e foram desenhados com uma escala distinta

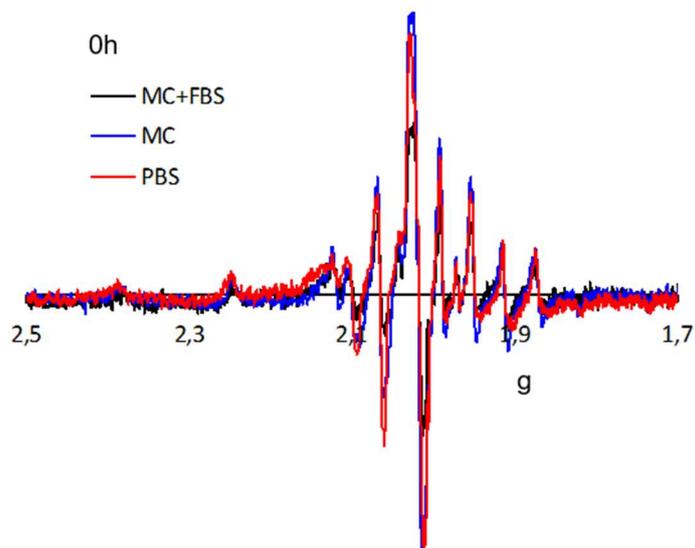


Figura A5.4. Espectros de RPE de 1ª derivada à frequência da banda X medidos a 77K para amostras contendo $[V^{IV}O(Me_2phen)_2]$ (**18**) (ca. 0.50 mM) a pH = 7.0 adicionados aos três meios distintos. As amostras foram congeladas pouco tempo após a adição de **18** aos meios. Após a adição de **18** ao meio, as soluções foram

deixadas em repouso a cerca de 25 °C. O espectro da amostra adicionada ao meio MC+FBS tem menor intensidade.

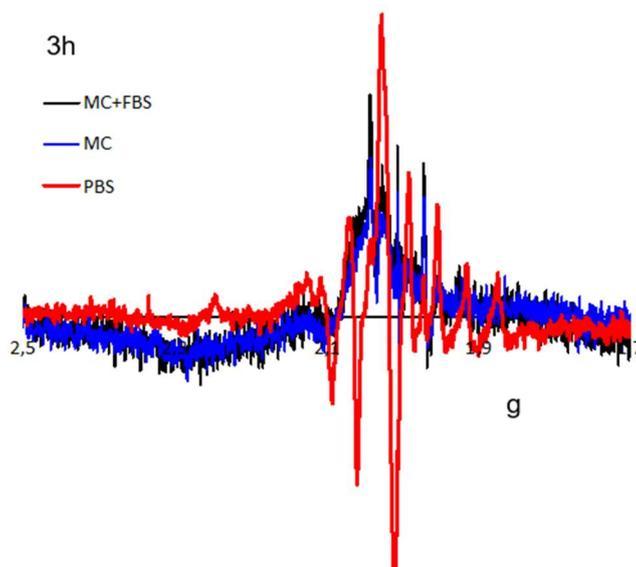


Figura A5.5. Espectros de RPE de 1ª derivada à frequência da banda X medidos a 77K. Após adição de **19** aos meios, as soluções foram deixadas em repouso a cerca de 25 °C e estas amostras foram inseridas em tubos de RPE e congeladas após ca. 3 h da sua preparação. O espectro da amostra adicionada ao meio PBS tem maior intensidade e foi traçada numa escala distinta (com menor amplificação). A intensidade dos espectros medidos em PBS 24 e 48 h diminui progressivamente a sua intensidade, mas o padrão típico para os complexos $V^{IV}O$ ainda é visível

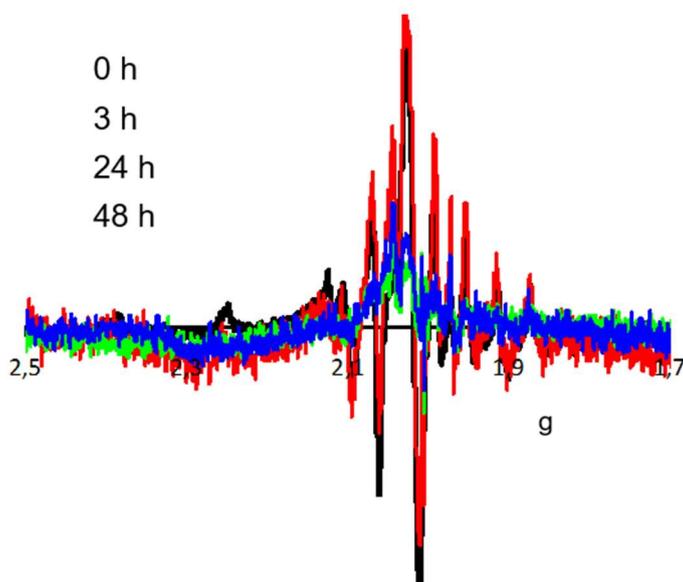


Figura A5.6. Espectros de RPE de 1ª derivada à frequência da banda X medidos a 77K para amostras com $[V^{IV}O(\text{amphen})_2]$ (**19**) (ca. 0.50 mM) a pH = 7.0 em tampão PBS. Após a adição de **19** aos meios, as soluções foram deixadas em repouso a cerca de 25 °C. Os espectros das amostras a 24 e 48 h têm uma intensidade muito mais baixa que a 0 e 3 h, e foram traçadas com uma escala distinta

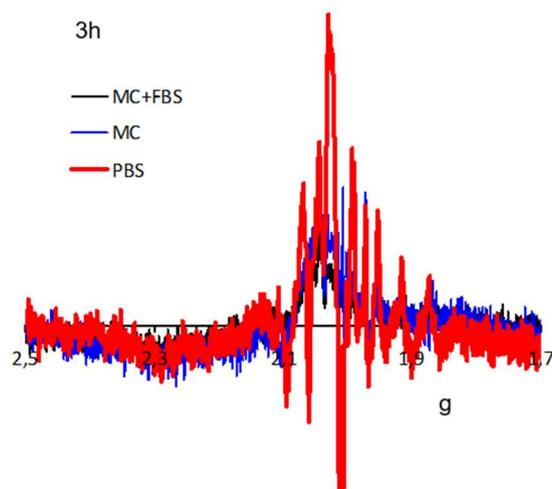


Figura A5.7. Espectros de RPE de 1ª derivada à frequência da banda X medidos a 77K. Após adição de **19** aos meios, as soluções foram deixadas ao ar a cerca de 25 °C e estas amostras foram inseridas em tubos de RPE e congeladas após ca. 3 h da sua preparação. O espectro da amostra adicionada ao meio PBS tem maior intensidade e foi traçado numa escala diferente (menos amplificada).

Contrariamente ao que foi observado para os $[V^{IV}O(\text{phen})_2]$ (**17**), $[V^{IV}O(\text{Me}_2\text{phen})_2]$ (**18**) e $[V^{IV}O(\text{amphen})_2]$ (**19**), nas experiências com $[V^{IV}O(\text{bipy})_2]$ (**20**) no tempo 0 h os espectros são menos intensos em meio PBS quando comparado com os meios CM e CM + FBS. No entanto, a oxidação da $V^{IV}O$ progride mais rapidamente com o complexo **20** e às ≈ 3 h o perfil característico dos compostos da $V^{IV}O$ torna-se pouco visível.

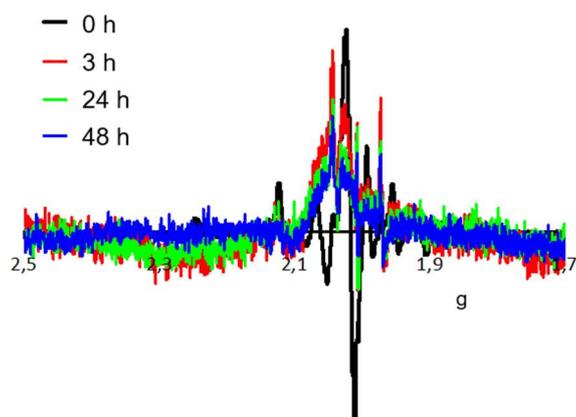


Figura A5.8. Espectros de RPE adquiridos a 77 K para as amostras com $[V^{IV}O(\text{bipy})_2]$ (**20**) (ca. 0.50 mM) a pH = 7.0 nos meios de cultura celular com 10% de FBS. As amostras foram congeladas breves momentos após a adição de **4** aos meios de cultura. Após a adição de **20** aos meios de cultura, as soluções foram deixadas ao ar a cerca de 25 °C. A escala utilizada para traçar o espectro do tempo 0 h foi alterada (com menor ampliação)

Anexo 6. Resultados de RMN de soluções com $\text{NH}_4\text{V}^{\text{VO}}_3$ e 1,10-fenantrolina

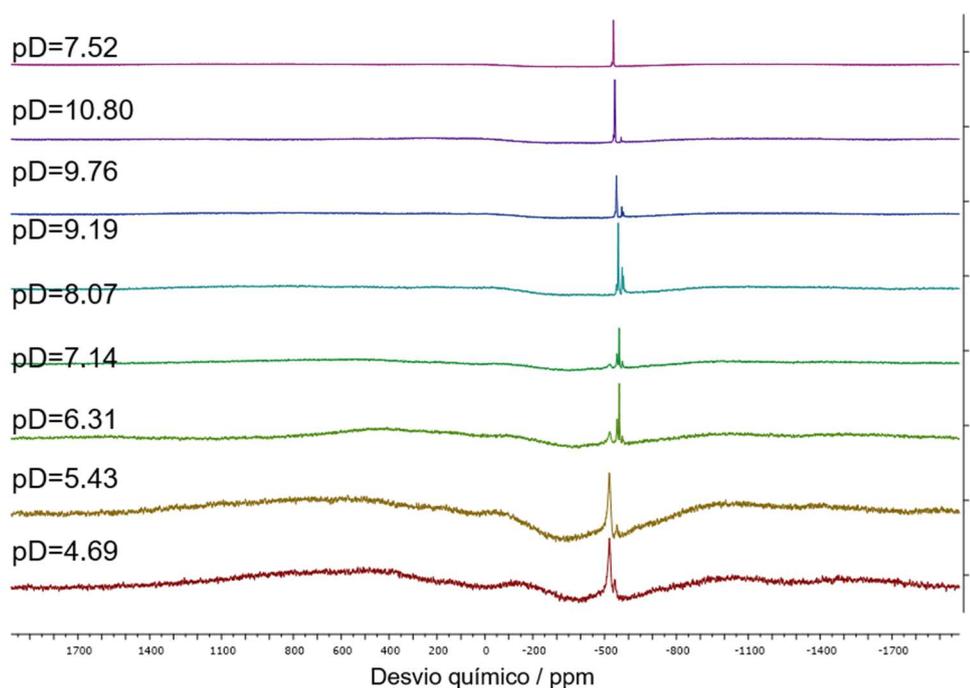


Figura A6.1. Espectros de ^{51}V RMN de soluções com NH_4VO_3 (1 mM) e phen (2 mM) em D_2O (5 % de MeOD-d_4) a vários valores de pH (ajustados com uma solução muito diluída de $\text{DCI/D}_2\text{O}$). Os valores de pD estão indicados na figura.

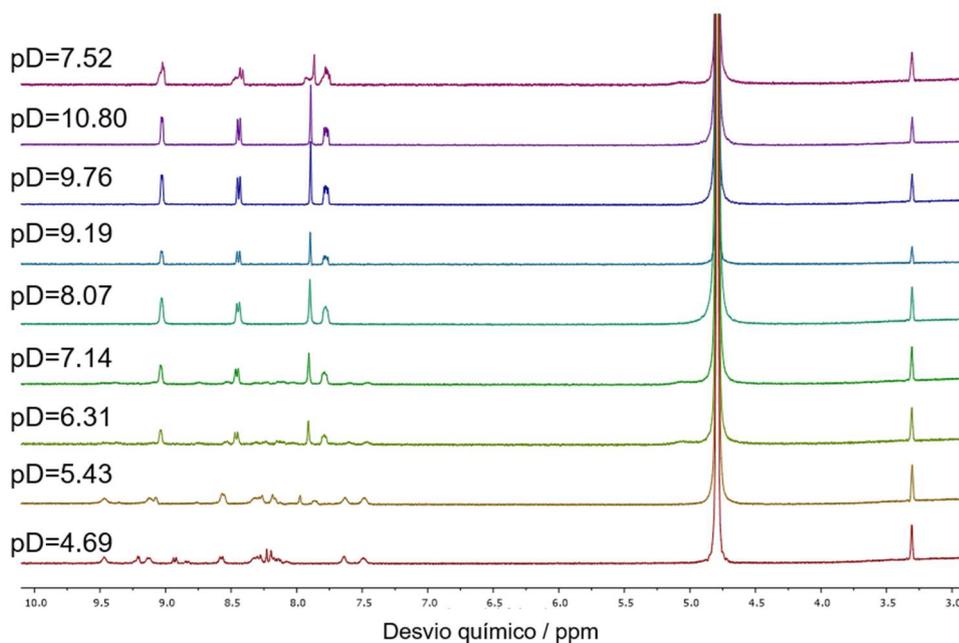


Figura A6.2. Espectros de ^1H RMN de soluções com NH_4VO_3 (1 mM) e phen (2 mM) em D_2O (5 % de MeOD-d_4) a vários valores de pD (ajustados com uma solução muito diluída de $\text{DCI/D}_2\text{O}$). O espectro no topo da figura corresponde apenas a 1,10-fenantrolina (1 mM) a pD = 7.52. Os valores de pD estão indicados na figura.

A **Figura A6.3.** representa uma expansão dos espectros da **Figura A6.2.** na região atribuída aos prótons aromáticos.

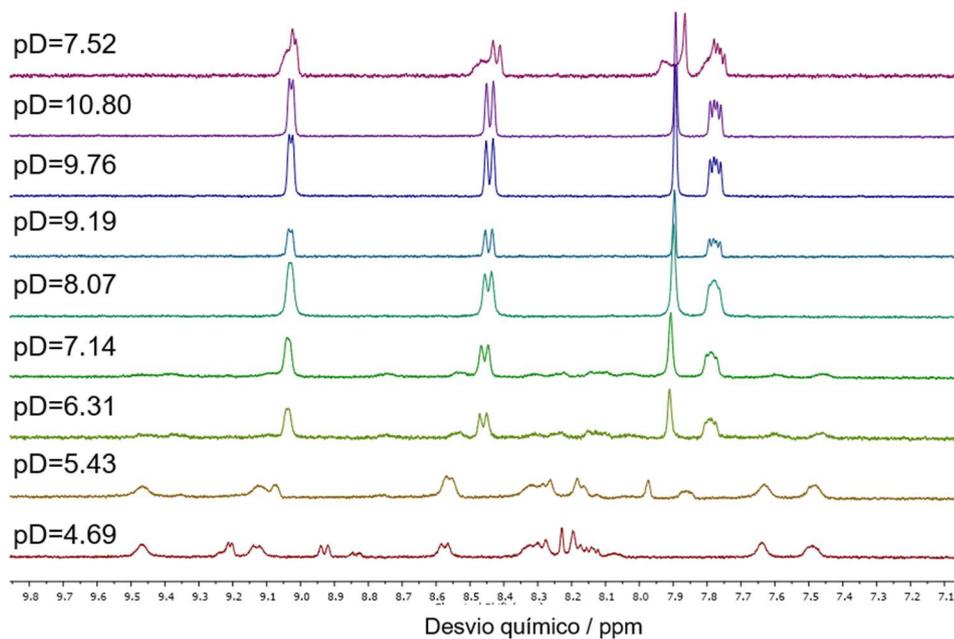


Figura A6.3. Ampliação dos Espectros de ¹H RMN da **Figura A6.3** (7.05 a 9.85 ppm). Os valores de pD estão indicados na figura.

Anexo 7. Absorção de vanádio pelas células A2780

Para avaliar o efeito do BSA na atividade citotóxica, as células A2780 foram incubadas em meios com quantidades de FBS distintas e o complexo **17** em concentrações equivalentes aos valores de IC₅₀ encontrados a 3, 24 e 48 h. Os dados relativos à viabilidade celular estão representados na abaixo.

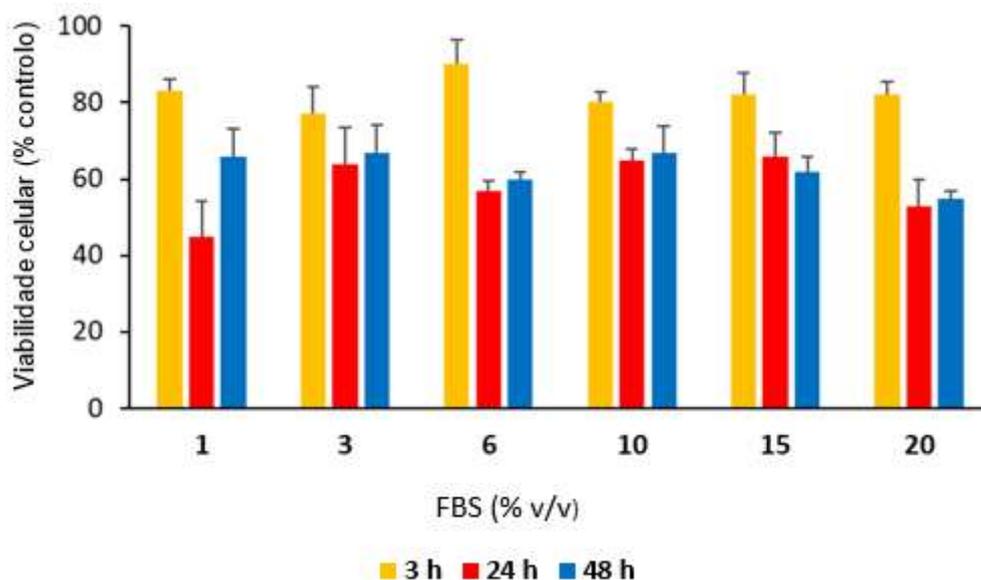
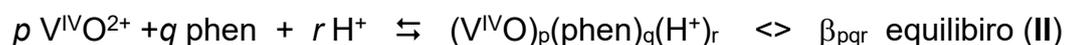


Figura A7.1. O efeito do teor das proteínas séricas no meio de incubação da célula na atividade citotóxica de [V^{IV}O(phen)₂] (**17**) medida pela % de FBS adicionada ao meio de incubação. O complexo foi avaliado numa concentração equivalente ao seu IC₅₀ em condições padrão (3, 24 e 48 h de exposição, meio contendo 10% de FBS): 3 h: 100 μM, 24 h: 5 μM e 48 h: 1 μM. As concentrações totais de BSA, nos meios de incubação, variam no intervalo aproximadamente 4 - 80 μM, correspondendo a 1-20 % de FBS, respetivamente. Os dados são as médias ± DP de duas experiências independentes realizadas com pelo menos 6 réplicas por condição.

Anexo 8. Especificação

8.1. Especificação nos sistemas $V^{IV}O^{2+}$ + 1,10-fenantrolina e 4,7-metil-1,10- fenantrolina

Considerando a reação:



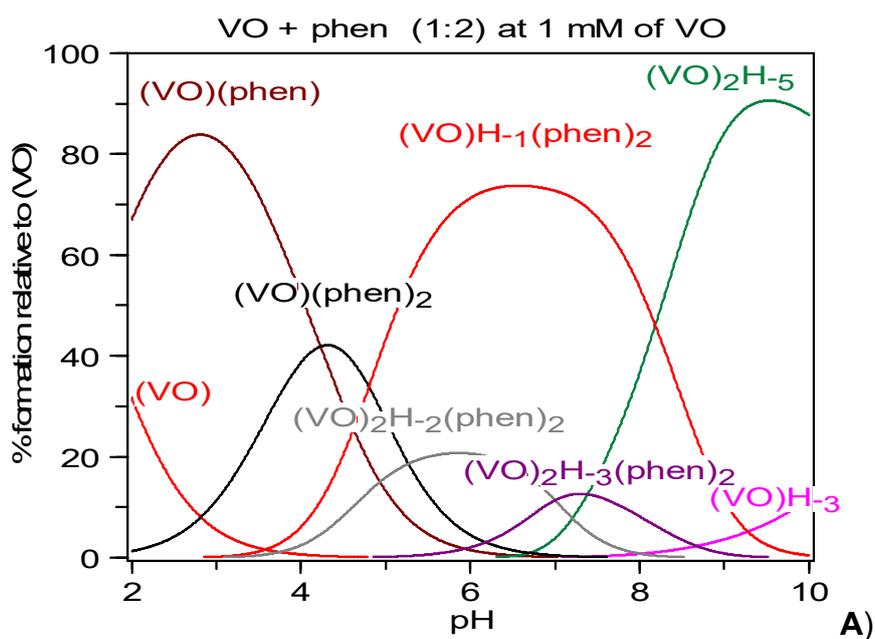
A partir de [10], as constantes de formação das espécies de $V^{IV}O$ -phen são:

$\log \beta_{110} = 6.13$; $\log \beta_{120} = 10.28$; $\log \beta_{12-1} = 5.53$; $\log \beta_{22-2} = 7.02$; $\log \beta_{22-3} = 1.56$

as espécies dinucleares foram retiradas de [10] mas com $\log \beta_{22-2} = 6.0$; $\log \beta_{22-3} = -1.0$

Assumindo $[V^{IV}O(OH)]^{2+}$ (-5.94), $[(V^{IV}O)_2(OH)_2]^{2+}$ (-6.95), $[(V^{IV}O)_2(OH)_5]^-$ (-22.5) and (-18.5) obtidas da literatura. [13]

Considerando $[V^{IV}O(\text{phen})_2]^{2+}$ dissolvido em água com as concentrações totais de oxidovanádio(IV) (C_{VO}) de 1 mM ou 20 μM , considerando as constantes de formação das espécies $V^{IV}O$ -phen acima, obtém-se os diagramas de especificação na gama de pH 2-10:



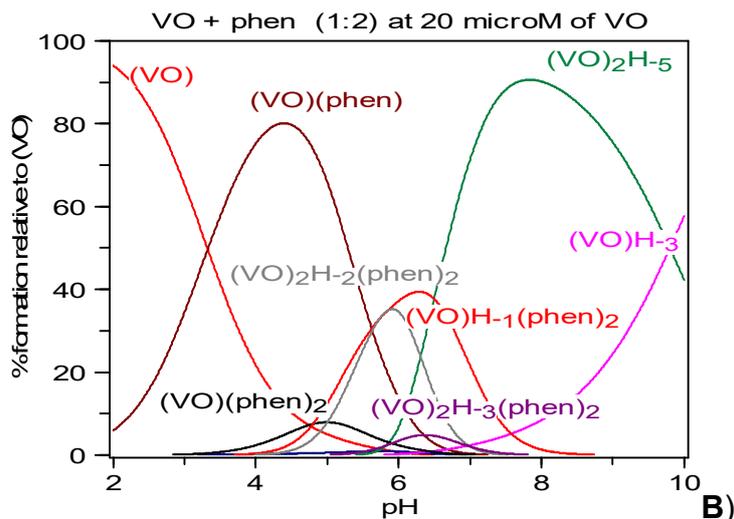


Figura A8.1. Diagrama de distribuição das espécies para o sistema $V^{IV}O+phen$, **A)** para $C_{VO} = 1 \text{ mM}$, e **B)** $20 \mu\text{M}$, calculado utilizando o programa HySS[14]. Consiste em ter $[V^{IV}O(phen)_2]^{2+}$ dissolvido em água com concentração total de 1 mM (**A**) ou de $20 \mu\text{M}$ (**B**). As constantes de formação das espécies de $V^{IV}O-phen$ foram retiradas de[10] (ver acima), e as espécies hidrolíticas de:[13]

Considerando as mesmas constantes de formação, compreendidas entre $C_{VO} = 1 \times 10^{-6}$ e $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ e a pH constante = 7, a especiação é:

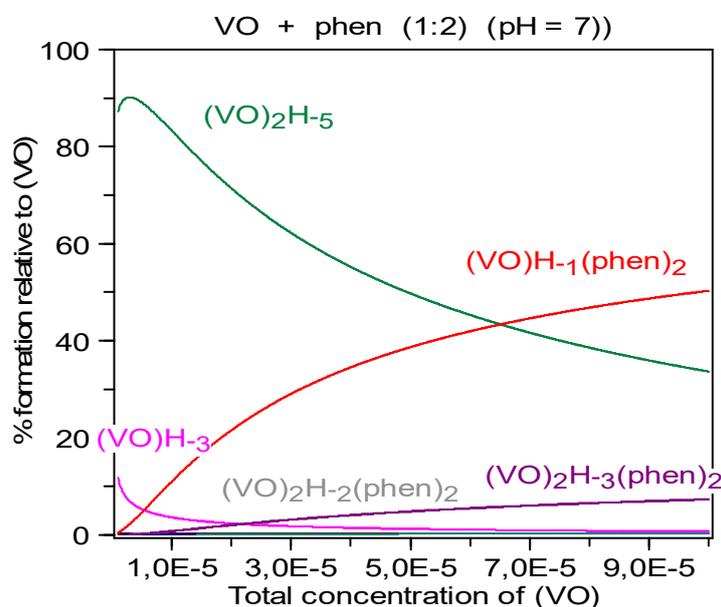


Figura A8.2. Diagrama de distribuição das espécies para o sistema $V^{IV}O-phen$ com C_{VO} no intervalo: 1 a $100 \mu\text{M}$, utilizando o programa HySS a $\text{pH} = 7.0$ para o sistema $V^{IV}O-phen$, considerando uma razão molar $V^{IV}O:phen$ de $1:2$. As concentrações das espécies dinucleares $[(V^{IV}O)_2(phen)_2(OH)_2]^{2+}$ e $[(V^{IV}O)_2(phen)_2(OH)_3]^+$ são praticamente coincidentes.

A principal espécie existente do tipo $V^{IV}O$ -phen em solução a $pH = 7$ é $[V^{IV}O(OH)(phen)_2]^+$ (representada como: $(VO)H_{-1}(phen)_2$). À medida que a quantidade total de $[V^{IV}O(phen)_2]^{2+}$ hipotético aumenta, todas as espécies que contêm $V^{IV}O$ -phen também se tornam progressivamente mais significativas.

Em solução aquosa, os complexos $V^{IV}O$ -Me₂phen formados são significativamente mais estáveis do que os formados no sistema $V^{IV}O$ -phen:

$$\log \beta_{110} = 6.91; \log \beta_{120} = 11.74; \log \beta_{12-1} = 6.45; \log \beta_{22-2} = 7.0; pK_a = 6.01[15]$$

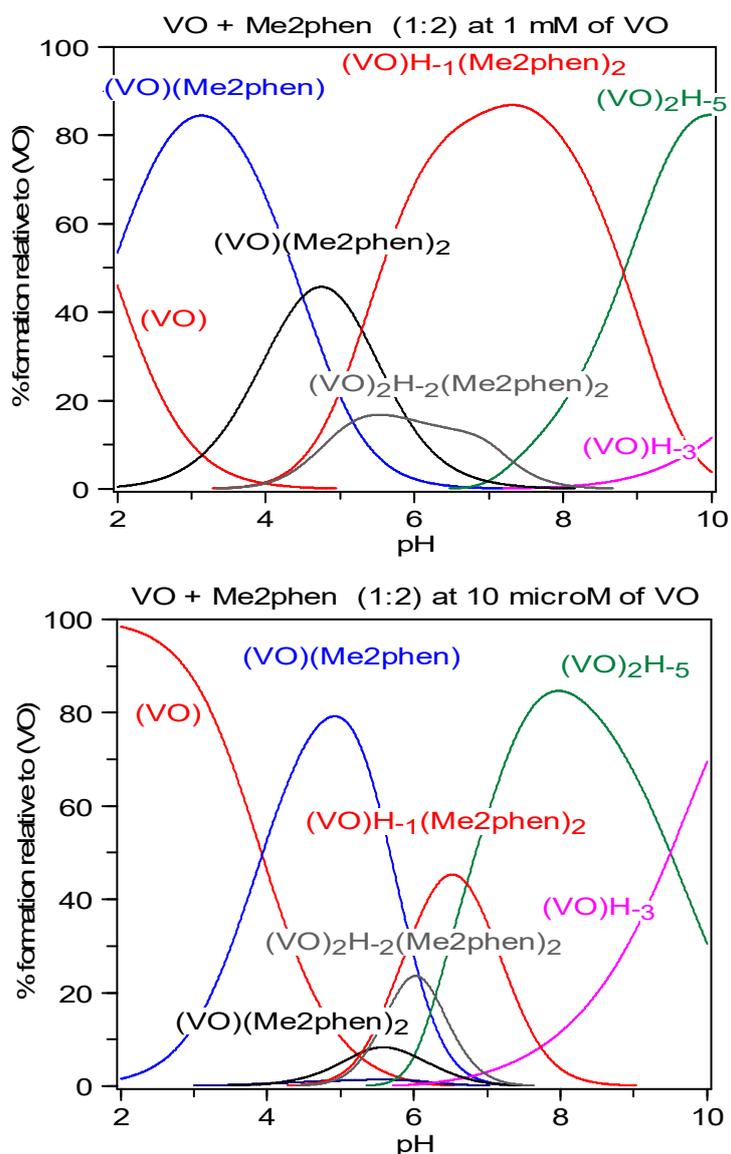


Figura A8.3. Diagrama de distribuição das espécies para o sistema $V^{IV}O^{2+} + Me_2phen$ (1:2), calculado com base no programa HySS,[14] tendo em consideração duas concentrações totais distintas de oxidovanádio(IV): (A): 1 mM; (B) 10 μ M.

Assumindo as mesmas constantes de formação, para um valor de V(IV) total compreendido entre 1×10^{-6} and 1×10^{-4} M e a pH = 7.0:

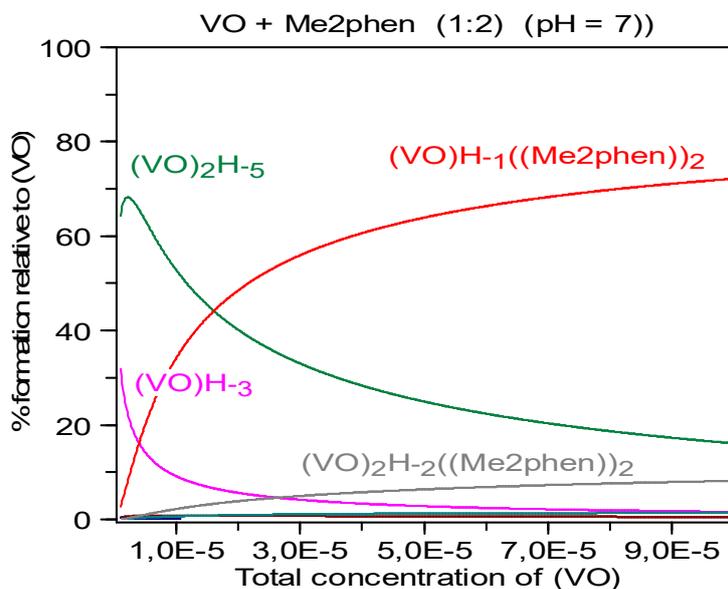
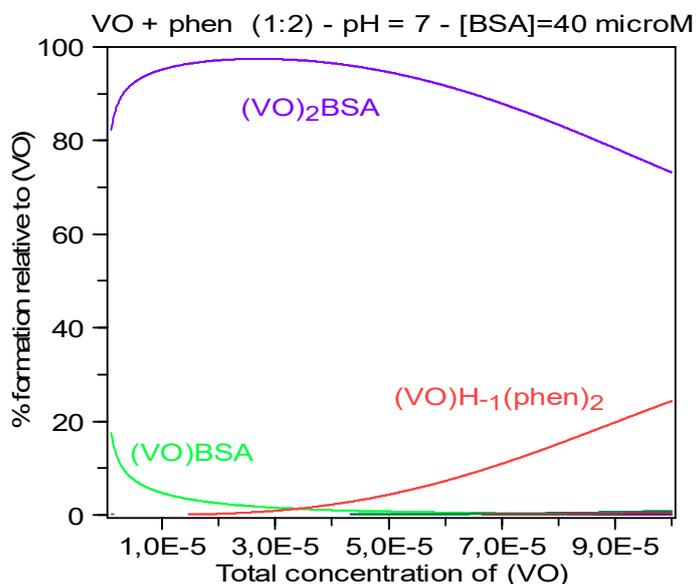


Figura A8.4. Diagrama de distribuição de espécies para o sistema $V^{IV}O^{2+}$ + Me₂phen (gama C_{vo}: 1 a 100 μ M) elaborado utilizando o programa HySS a pH = 7, considerando uma razão molar $V^{IV}O:Me_2phen$ de 1:2.

8.2. Especiação no sistema $V^{IV}O^{2+}$ + 1,10-fenantrolina + BSA

Pressupondo que as espécies formadas são do mesmo tipo, e que as constantes de ligação de $V^{IV}O^{2+}$ a BSA são iguais às de HSA, a pH 7.4: (VO)HSA ($\log \beta_{11} = 9.1 \pm 1.0$) e $(VO)_2^D HSA$ ($\log \beta_{12} = 20.9 \pm 1.0$). Uma vez que a $V^{IV}O$ se liga predominantemente à albumina. Apenas para concentrações mais elevadas de vanádio, quando não há BSA suficiente para ligar o íon metálico, as espécies que contêm $V^{IV}O$ -phen começam a ser mais relevantes.



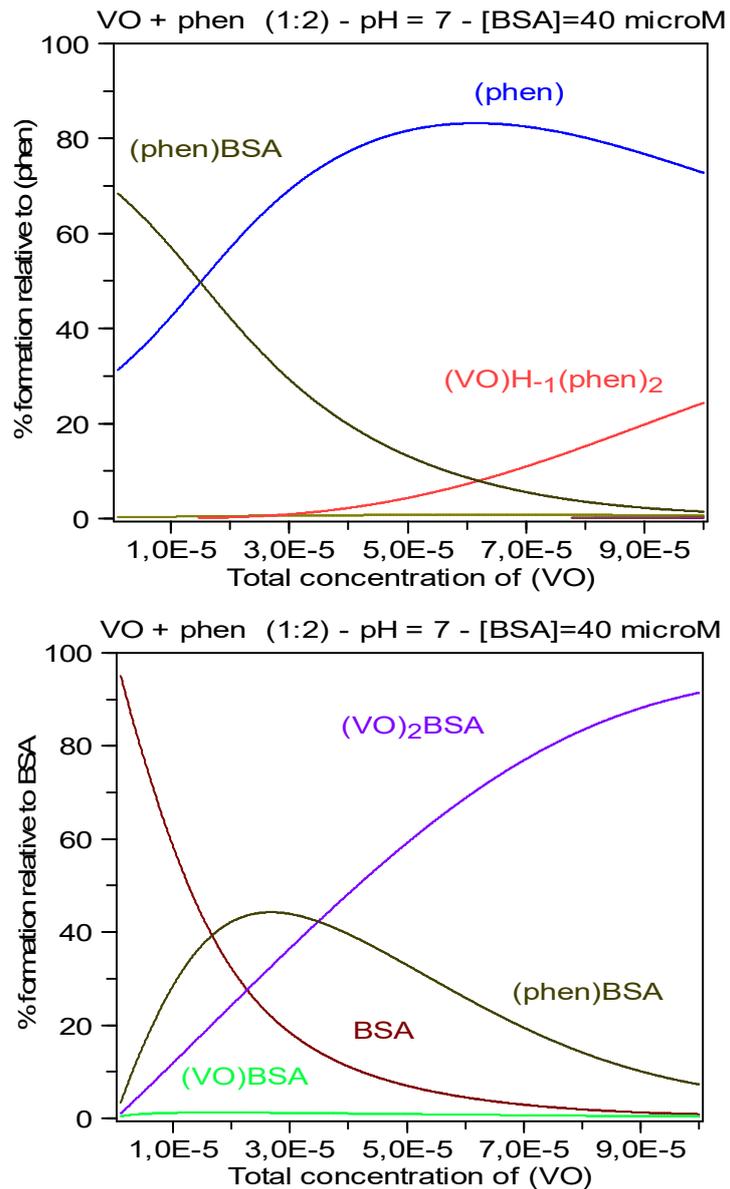


Figura A8.5. Diagramas de distribuição das espécies no sistema $V^{IVO^{2+}}$ + phen + BSA (gama C_{VO} : 1 a 100 μM) calculados utilizando o programa HySS a pH = 7 para o sistema $V^{IVO^{2+}}$ + phen, considerando uma razão molar $V^{IVO^{2+}}$:phen of 1:2 e $[BSA] = 40 \mu M$. A ligação do phen à BSA é considerada com uma constante de ligação de 5.7×10^4 , embora nestes diagramas a formação de espécies $[V^{IVO}(phen)(BSA)]$ não seja contemplada.

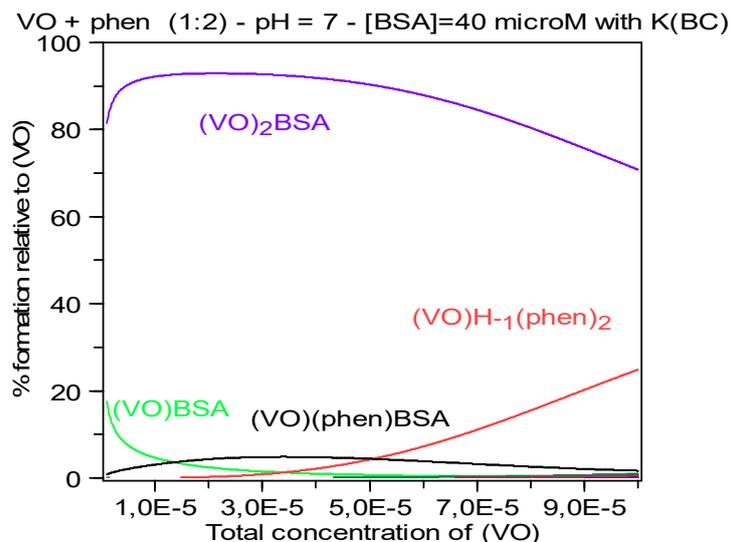


Figura A8.6. Diagramas de distribuição de espécies no sistema $V^{IV}O$ -phen-BSA (C_{VO} : 1 a 100 μM) calculados usando o programa HySS a pH = 7 para o sistema $V^{IV}O^{2+}$ + phen, considerando uma razão molar $V^{IV}O$:phen de 1:2 e $[BSA] = 40 \mu M$. A ligação de phen à BSA é considerada com uma constante de ligação de 5.7×10^4 e a formação de espécies $[V^{IV}O(phen)(BSA)]$ com uma constante de estabilidade de 10^{14} (correspondendo a uma constante de ligação condicional, K_{BC}^1 , de 10^8). Com este valor de constante de ligação K_{BC}^1 , a importância relativa das espécies $[V^{IV}O(phen)(BSA)]$ é baixa (máximo ~5 % da concentração total de $V^{IV}O$). Tal não explicaria satisfatoriamente os espectros de DC obtidos. Para este efeito, seria necessário um valor de $\log K_{BC}^1$ de pelo menos 10^9 , sendo esse o valor assumido neste trabalho.

Anexo 9. Dados de cristalografia de $[V^{IV}O(OSO_3)(phen)_2]$ (17).

Figura A9.1. Unidade assimétrica em $[V^{IV}O(OSO_3)(phen)_2]$ (17). Os parâmetros da célula diferem dos do cristal publicado por Dong et al, (DOI:10.1016/S0162-0134(00)00060-X), ver unidade assimétrica à direita (célula: a: 14.2125(17) Å, b: 10.8628(13) Å, c: 20.143(2)Å, α : 90°, β : 102.569(2)°, γ : 90°). Os desenhos foram feitos com o programa de mercúrio 3.7 em modo “wireframe”.

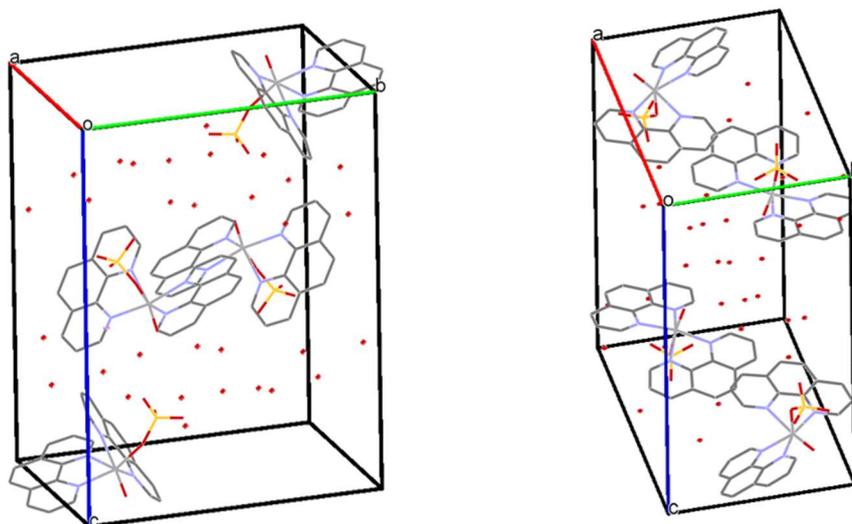


Tabela A9.1. pontes de hidrogénio em $[V^{IV}O(OSO_3)(phen)_2]$ (17).

D-H...A	d(D-H) / [Å]	d(H...A) / [Å]	d(D...A) / [Å]	$\angle(DHA)$
O(1W)-H(1WA)...O(2A)	0.85	2.01	2.86(2)	178.7
O(2W)-H(2WA)...O(2B)	0.85	1.96	2.70(2)	145.7
O(2W)-H(2WA)...O(2A)	0.85	2.21	2.807(17)	126.8
O(1W)-H(1WA)...O(1)	0.85	2.56	3.095(10)	122.0
O(1W)-H(1WA)...S(1)	0.85	2.89	3.658(5)	151.0
O(1W)-H(1WB)...O(6W)	0.85	1.94	2.787(7)	179.4
O(2W)-H(2WA)...S(1)	0.85	3.00	3.647(6)	134.5
O(2W)-H(2WB)...O(4W)#10.85	2.37	3.181(8)	160.5	
O(3W)-H(3WA)...O(4W)#20.85	1.95	2.801(8)	179.4	
O(3W)-H(3WB)...O(7W)	0.85	1.92	2.767(7)	179.5
O(4W)-H(4WA)...O(5)#3	0.85	2.59	3.440(7)	179.9
O(5W)-H(5WA)...O(1W)	0.85	2.14	2.761(8)	129.7
O(5W)-H(5WB)...O(2W)#40.85	1.92	2.747(8)	162.9	

Transformações de simetria utilizadas para gerar átomos equivalentes:

#1 -x,-y+1,-z #2 x+1/2,-y+3/2,z+1/2 #3 x-1,y,z #4 -x+3/2,y+1/2,-z+1/2

Table A9.2. Dados de Cristal e Refinamento de Estrutura para $[V^{IV}O(OSO_3)(phen)_2]$ (17).

Parametros	17
Formula	$C_{24} H_{30} N_4 O_{12} S V$
Peso molecular	649.52
T, K	100(2)
Comprimento de onda, Å	0.71073
Sistema de cristais	Monoclinic
Grupo espacial	$P2_1/n$
a/Å	8.560(2)
b/Å	15.981(4)
c/Å	20.429(5)
$\beta/^\circ$	100.420(4)
$V/\text{Å}^3$	2748.6(12)
Z	4
F_{000}	1348
$D_{\text{calc}}/\text{g cm}^{-3}$	1.570
μ/mm^{-1}	0.509
$\theta/^\circ$	1.63 to 28.47
R_{int}	0.1529
Tamanho do cristal/ mm^3	0.36 x 0.10 x 0.09
“Goodness-of-fit on” F^2	1.040
$R_1[I > 2\sigma(I)]^a$	0.0910
wR_2^b	0.3015
$^a R_1 = \frac{\sum F_o - F_c }{\sum F_o }$ $^b wR_2 = \left\{ \frac{\sum [w(F_o ^2 - F_c ^2)]}{\sum [w(F_o^2)]} \right\}^{1/2}$	

Anexo 10. Citotoxicidade dos compostos 12-16 e do respetivo ligado HL7 para a linha celular MG64

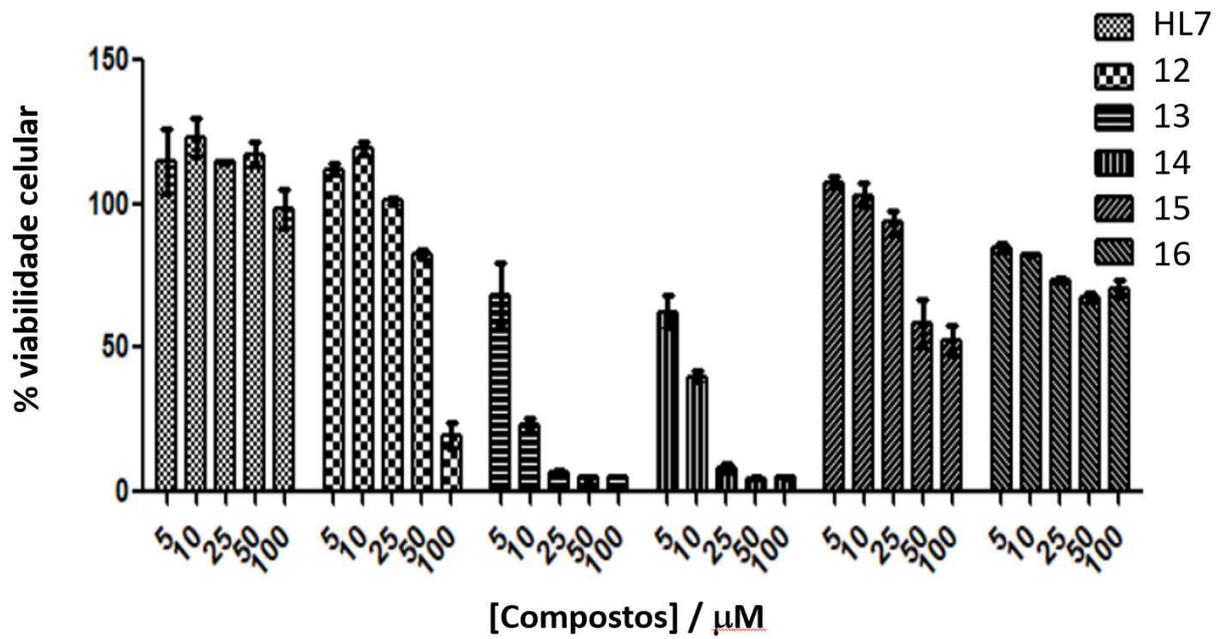


Figura 10.1. Citotoxicidade dos compostos 12-16 e do respetivo ligado HL7 para a linha celular MG64.

Anexo 11 - Referências

- [1] **W. Bal, J. Christodoulou, P. J. Sadler e A. Tucker.** J. Inorg. Biochem., 1998, 70, pp. 33–39.
- [2] **D. Sanna, P. Buglyo, A. I Tomaz, J. C. Pessoa, S. Borovic, G. Micera e E. Garribba.** Dalton Trans., 2012, 41, pp. 12824–12838.
- [3] **A. Zgirski e E. Frieden.** J. Inorg. Biochem., 1990, 39, pp. 137–148.
- [4] **C. Syvertsen, R. Gaustad, K. Schroder e T. Ljones.** J. Inorg. Biochem., 1986, 26, pp. 63–76.
- [5] **A. Levina, D. C. Crans e P. A. Lay.** Coord. Chem. Rev., 2017, 352, pp. 473-498.
- [6] Advanced DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), T. F. S., Cat. No. 12491, 2017.
- [7] **D. A. Skoog, D. M. West e F. J. Holler.** *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7^a Ed., Thompson Learning, New York, 1996.
- [8] **C. V. Banks e R. I. Bystrhoff.** J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, pp. 6153-6158.
- [9] **R. M. Smith e A. M. Martell.** *Critical Stability Constants*, Vol. 6, 2^o Suppl., Plenum Press, New York, 1989.
- [10] **D. Sanna, P. Buglyo, A. I. Tomaz, J. C. Pessoa, S. Borovic, G. Micera e E. Garribba.** Dalton Trans., 2012, 41, pp. 12824-12838.
- [11] **W. Bal, J. Christodoulou, P. J. Sadler e A. Tucker.** J. Inorg. Biochem., 1998, 70, pp. 33-39.
- [12] **A. Rockenbauer e L. Korecz.** L. Appl. Magn. Reson., 1996, 10, pp. 29-43.
- [13] **L. F. V. Boas e J. C. Pessoa.** *Vanadium. In Comprehensive Coordination Chemistry*, Ed. Pergamon Press: Oxford, Vol. 3, 1987, pp 453-583.
- [14] **L. Alderighi, P. Gans, A. Ienco, D. Peters, A. Sabatini e A. Vacca.** Coordin. Chem. Rev., 1999, 184, pp. 311-318.
- [15] **D. Sanna, V. Ugone, G. Micera, P. Buglyo, L. Biro e E. Garribba.** Dalton trans. 2017, 46, pp. 8950-8967.