



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Complexos de ruténio com potencial
antineoplásico e estudos de encapsulamento
em cucurbiturilos**

Ana Sofia Dória Bota

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências

Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor João Paulo Gil Lourenço
e coorientação do Professor Doutor André Duarte Lopes

2017

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Complexos de ruténio com potencial
antineoplásico e estudos de encapsulamento
em cucurbiturilos**

Ana Sofia Dória Bota

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências

Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor João Paulo Gil Lourenço
e coorientação do Professor Doutor André Duarte Lopes

2017

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados nos textos e constam da listagem de referências incluída.

Ana Sofia Dória Bota

(Ana Sofia Dória Bota)

Copyright © 2017 Ana Sofia Dória Bota

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de reportórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*Complexos de ruténio com potencial
antineoplásico e estudos de encapsulamento em cucurbiturilos*

*Dedico este trabalho à família e, em especial, à minha avó Madalena,
que sempre me inspirou a ser alguém melhor
e me incentivou a ser curiosa.*

AGRADECIMENTOS

Passados 5 anos de uma longa caminhada chegou, finalmente, o momento de oficializar os meus mais sinceros agradecimentos a todos os que, de alguma forma, acompanharam o meu percurso académico e contribuíram para o tornar indiscutível.

Em primeiro lugar, gostaria de deixar um enorme agradecimento aos meus orientadores, ao Professor Doutor João Lourenço e ao Professor Doutor André Lopes pela confiança depositada no meu trabalho e dedicação e por todo o apoio prestado ao longo desta aventura experimental. Ao Professor Doutor João Lourenço pelo interesse que despertou em mim pela química inorgânica, desde a primeira aula de TLQ e ao professor Doutor André Lopes por todos os ensinamentos de prática laboratorial.

Assinalo o meu agradecimento ao Professor Doutor José Paulo da Silva pela sua disponibilidade e cooperação na caracterização dos compostos terpiridínicos de ruténio e dos estudos de encapsulamento em CB[7] e CB[8], por espectrometria de massa.

Quero deixar uma palavra de apreço a todos os docentes com quem tive a oportunidade de aprender e partilhar conhecimentos, em especial à Professora Doutora Isabel Ramalinho e à Professora Doutora Maria de Lurdes Cristiano pelo carinho e amizade.

Aos meus pais estou grata por todos os sacrifícios para que nunca me faltasse nada, pela liberdade para que pudesse crescer sem barreiras, pela infância e educação que me proporcionaram, pelos valores que me transmitiram e pelo apoio constante e incondicional ao longo dos últimos 5 anos. À minha irmã Beatriz, pela amizade eterna e pelo amparo nos momentos mais difíceis.

Às minhas companheiras de todas as horas, Alina Secrieru, Andreia Labaredas, Catarina Carrilho, Catarina Marreiros, Cláudia Reis, Inês Afonso, Jéssica Vairinhos, Maria Inês Pinho, Maria Romanciuc, Matilde Portada e Patrícia Silva por todos os momentos inesquecíveis, por todas as horas intermináveis de tricot, por toda a loucura partilhada na época de exames, por todos os jantares e arraiais de pura diversão, por toda a cumplicidade e compreensão através de um único olhar e por todas as boas memórias que levo deste curso. Obrigada por cada gargalhada e lágrima que partilhamos juntas!

Aos meus amigos, André Teixeira, Andreia Rocha, Joana Teigão, Luís Queimado e Pedro Leitão deixo o meu agradecimento pela paciência e compreensão por todos os cafés perdidos ao longo destes últimos 5 anos de curso.

Por último, mas não menos importante, agradeço ao Núcleo de Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve (NECiFarm) pelas competências e valores transmitidos, nos três anos dos quais fiz parte desta grande família, que muito contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

A todas as outras pessoas que, não estando diretamente mencionadas, caminharam ao meu lado nos últimos 5 anos e contribuíram para o sucesso desta jornada. Obrigada!

RESUMO

O cancro representa, atualmente, uma das maiores preocupações no que respeita à saúde, vitimando mais de 8 milhões de pessoas por ano, uma tendência que se estima estar a crescer. Desde a descoberta accidental da cisplatina como agente antitumoral, diversos grupos de investigação têm-se debruçado sobre o desenvolvimento de novos compostos de coordenação com potencial antineoplásico.

Os compostos de ruténio têm demonstrado beneficiar de características que os tornam promissores agentes antitumorais, pela riqueza das suas propriedades químicas, conquistando, atualmente, um papel de potenciais protagonistas no arsenal terapêutico contra o cancro. Estes compostos destacam-se pela reduzida toxicidade, boa tolerância *in vivo* e pelos diferentes mecanismos de ação pelos quais atuam.

De igual relevância é o estudo de novos métodos que permitam otimizar a eficácia terapêutica de fármacos já conhecidos. O encapsulamento de fármacos em contentores moleculares macrocíclicos (ciclodextrinas, calixarenos e cucurbiturilos) constitui um destes métodos.

Os cucurbiturilos (CB[n], n=5-8,10) são macromoléculas cíclicas constituídas por n unidades de glicolurilo ligados por 2n unidades metileno. Devido à sua estrutura, o interior da cavidade destes compostos é hidrofóbico, no entanto, a entrada das cavidades é polar e carregada negativamente devido à presença de grupos carbonilo. Este conjunto de características permite que se estabeleçam interações “*host-guest*” consideravelmente mais fortes do que as observadas com ciclodextrinas ou calixarenos.

Neste âmbito, o presente trabalho teve como objetivo principal a síntese de compostos terpiridínicos de Ru(II) e Ru(III), cuja atividade antitumoral foi estudada em linhas celulares do carcinoma do pulmão e do carcinoma do cólon, pelos estudos de Lazić *et al.* e avaliar a possibilidade de encapsulamento dos compostos sintetizados em CB[7] e CB[8].

Os compostos sintetizados foram caracterizados por espectroscopia de absorção no IV e no UV-Visível e por espetrometria de massa, tendo-se concluído que foram sintetizados com sucesso. Contudo, as tentativas de encapsulamento destes complexos em CB[7] e CB[8] não foram bem sucedidas.

Palavras – chave: atividade antitumoral, cancro, compostos de ruténio, cucurbiturilos, encapsulamento.

ABSTRACT

Cancer is currently a major health concern, affecting more than 8 million people a year, a trend estimated to be growing. Since the accidental discovery of cisplatin as an antitumor agent, several research groups have focused on the development of new coordination compounds with antineoplastic potential.

Ruthenium compounds have been shown to benefit from characteristics that make them promising antitumor agents due to their particular chemical properties, and are currently playing a leading role in metal-based anticancer drug research. These compounds exhibit reduced toxicity, good tolerance *in vivo* and may act by different mechanisms of action.

The optimization of the therapeutic efficacy of drugs already known is an alternative approach as important as the discovery of new active compounds. In this context, encapsulation of drugs in macrocyclic molecular containers (cyclodextrins, calixarenes and cucurbiturils) play an important role.

Cucurbiturils (CB [n], n=5-8,10) are cyclic macromolecules consisting of n glycoluril units attached by 2n methylene units. In this particular structure, the interior of the cavity is hydrophobic, however, the portals are polar and negatively charged due to the presence of carbonyl groups. This set of characteristics allows for considerably stronger host-guest interactions than those observed with cyclodextrins or calixarenes.

In this context, the main objective of the present work was the synthesis of Ru(II) and Ru(III) terpyridine compounds whose antitumor activity was studied in lung carcinoma and colon carcinoma cell lines by Lazić *et al.* and to evaluate the possibility of their encapsulation in CB[7] and CB[8].

The characterization of the various compounds by FTIR and UV-Visible spectroscopy and by mass spectrometry has shown that they were successfully synthesized. However, the attempts to encapsulate these complexes in CB [7] and CB [8] were not successful.

Keywords: antitumor activity, cancer, cucurbiturils, encapsulation, ruthenium compounds.

ÍNDICE REMISSIVO

ÍNDICE DE FIGURAS -----	VIII
ÍNDICE DE TABELAS -----	IX
ÍNDICE DE GRÁFICOS -----	IX
LISTA DE ABREVIATURAS -----	XI
I. INTRODUÇÃO -----	12
1.1. CANCRO-----	13
1.2. TERAPÊUTICAS ATUAIS-----	17
1.2.1. Complexos de Coordenação no Tratamento do Cancro-----	19
1.2.2. Novas Abordagens-----	24
1.2.2.1. Complexos de Ruténio-----	30
1.2.2.1.1. Principais Características e Propriedades do Ruténio-----	31
1.2.2.1.2. Os Complexos de Ruténio no Cancro-----	32
1.2.2.1.3. Relação Estrutura – Atividade-----	40
1.3. ENCAPSULAMENTO EM CONTENTORES MOLECULARES-----	41
1.3.1. Cucurbit[n]urilos-----	43
1.3.1.1. A Química dos Cucurbiturilos-----	44
1.3.1.2. A Aplicabilidade Médica dos Cucurbiturilos-----	48
II. OBJETIVOS DO TRABALHO -----	52
III. MATERIAIS E MÉTODOS -----	55
3.1. COMPOSTOS TERPIRIDÍNICOS DE RU(II) E RU(III)-----	55
3.1.1. Reagentes-----	55
3.1.2. Síntese dos compostos terpiridínicos de Ru(II) e Ru(III)-----	55
3.1.2.1. Procedimento de síntese do composto AB6-----	56
3.1.2.2. Procedimento de síntese do composto AB9-----	56
3.1.2.3. Procedimento de síntese do composto AB10-----	57
3.1.2.4. Procedimento de síntese do composto AB11-----	57
3.2. COMPLEXOS DE INCLUSÃO-----	58

3.2.1. Reagentes -----	58
3.2.2. Preparação dos complexos de inclusão -----	58
3.2.2.1. Procedimento dos complexos de inclusão com CB[7] -----	59
3.2.2.1. Procedimento dos complexos de inclusão com CB[8] -----	59
3.2.3. Soluções de controlo -----	59
3.3. MÉTODOS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS -----	59
3.3.1. Espectroscopia de absorção UV-Vis -----	59
3.3.2. Espectroscopia de absorção no Infravermelho -----	60
3.3.3. Espetrometria de massa -----	61
3.3.4. Análise gravimétrica -----	62
3.3.5. Desenho das estruturas químicas dos compostos sintetizados -----	62
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	63
4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ANTITUMORAIS DE RUTÉNIO -----	63
4.1.1. Interpretação dos espectros de absorção no UV-Vis -----	63
4.1.2. Interpretação dos espectros de absorção no Infravermelho -----	64
4.1.3. Interpretação dos espectros de massa -----	67
4.2. ESTUDO DO ENCAPSULAMENTO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO -----	72
4.2.1. Análise termogravimétrica -----	72
4.2.2. Interpretação dos espectros de absorção no UV-Vis -----	73
4.2.3. Interpretação dos espectros de massa -----	74
4.3. LIMITAÇÕES EXPERIMENTAIS -----	75
V. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS -----	77
VI. BIBLIOGRAFIA -----	79
VII. ANEXOS -----	87
7.1. ANÁLISE GRAVIMÉTRICA DO CB[8] -----	87
7.2. ESPETRO DE ABSORÇÃO NO UV-VIS DO CB[7] E DO CB[8] -----	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I-1. Mecanismo de carcinogénese -----	14
Figura I-2. Especificidade de atuação no ciclo celular das diferentes classes de agentes quimioterápicos -----	18
Figura I-3. Visão histórica dos complexos metálicos que foram aprovados ou entraram ou se encontram em fase de ensaios clínicos para o tratamento do cancro -----	21
Figura I-4. Estruturas químicas dos complexos de coordenação aprovados: cisplatina (a), carboplatina (b), oxaliplatina (c), trióxido de arsénio (d)-----	24
Figura I-5. Estruturas químicas dos complexos de coordenação em estudo: BBR3464 (e), auranofin (f), ferroceno (g), ião ferricínio (h), ferrocifeno (i)-----	30
Figura I-6. Possibilidade de derivatização e funcionalização da fórmula geral dos compostos RAPTA, com impacto na bioatividade, reatividade e solubilidade dos fármacos -----	38
Figura I-7. Estruturas químicas dos compostos de ruténio em estudo: NAMI-A (j), KP1019 (k), IT-139 (l), RAPTA (m), RAPTA-C (n), Rutenoceno (o), 2,2-bipiridina (p), 1,10-fenantrolina (q), 2,2':6'2"-terpiridina (r) -----	40
Figura I-8. Esquema genealógico dos compostos de ruténio antitumorais -----	41
Figura I-9. Estruturas químicas dos contentores moleculares macrocíclicos em estudo: α -, β -, e γ -Ciclodextrinas (s), calixarenos (t), pillarplexes (u), pillararenes (v) -----	42
Figura I-10. Estrutura cristalina em Raio-X dos CB[n] (n=5-8) -----	43
Figura I-11. Estruturas químicas do CT008 (w) e do Rubb ₅ (x) e modelo molecular do Rubb ₅ encapsulado pelo CB[10] (y) -----	50
Figura II-1. Estruturas químicas dos compostos [Ru(tpy)(bpy)Cl]Cl (AB9) e [Ru(tpy)(en)Cl]Cl (AB11) e outros dois compostos neutros [Ru(tpy)(pic)Cl] (AB10) e [Ru(tpy)Cl ₃] (AB6) -----	53
Figura III-1. Esquema de síntese dos compostos AB6 (a), AB9 (b), AB11(c) e AB10 (d)----	56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I-1. Parâmetros estruturais dos homólogos CB[n] -----44

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico I-1. Número estimado de mortes por cancro em 2013 e estimativa para 2030 ----16

Gráfico I-2. Incidência e mortalidade em números, de diversos tipos de cancro, para ambos os géneros e todas as idades -----17

Gráfico IV-1. Espectro de absorção no UV-Vis, em água, dos compostos terpiridínicos de ruténio (AB6, AB9, AB10 e AB11) -----64

Gráfico IV-2. Espectro de absorção na região do Infravermelho do composto AB6 -----65

Gráfico IV-3. Espectro de absorção na região do Infravermelho do composto AB11-----66

Gráfico IV-4. Espectro de absorção na região do Infravermelho do composto AB9 -----66

Gráfico IV-5. Espectro de absorção na região do Infravermelho do composto AB10-----67

Gráfico IV-6. Espectro de massa (ESI-MS) de uma solução aquosa do composto AB9 -----68

Gráfico IV-7. Distribuição isotópica do sinal observado a m/z 526-----68

Gráfico IV-8. Espectro de massa (ESI-MS) de uma solução do composto AB9, numa mistura etanol/água (1:1)-----69

Gráfico IV-9. Espectro de massa (ESI-MS) de uma solução do composto AB6, numa mistura etanol/água (1:1)-----70

Gráfico IV-10. Espectro de massa (ESI-MS) de uma solução do composto AB10, numa mistura etanol/água (1:1)-----70

Gráfico IV-11. Espectro de massa (ESI-MS) de uma solução do composto AB11, numa mistura etanol/água (1:1)-----71

Gráfico IV-12. Distribuição isotópica do sinal observado a m/z 284-----71

Gráfico IV-13. Representação gráfica da análise termogravimétrica o CB[7] -----72

Gráfico IV-14. Espectro de absorção no UV-Vis, em água, do CB[7] com os compostos sintetizados -----73

Gráfico IV-15. Espectros de absorção no UV-Vis, em água, do CB[8] com os compostos sintetizados -----74

Gráfico IV-16. *Espetro de massa (ESI-MS) da solução aquosa do CB[7] com o composto AB9*

-----74

Gráfico IV-17. *Espetro de massa (ESI-MS) da solução aquosa do CB[8] com o composto AB9*

-----75

LISTA DE ABREVIATURAS

5-GMP	Monofosfato de Guanosina
Bcl-2	Proteína do linfoma das células B
bpy	2,2-bipiridina
CB	Cucurbiturilo
CT	<i>Murine Colon Carcinoma</i> (Carcinoma do Colon do Rato)
DACH	1,2-diaminociclohexano
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
en	1,2-diaminoetano
ESI	Electrospray Ionization (Ionização por eletrospray)
e.v.	Endovenoso
ER(+)	Recetor Endócrino positivo
FTIR	Espetroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GSH	Glutationa
HCT	<i>Human Colorectal Tumor</i> (Tumor Colorretal Humano)
IC₅₀	50% da concentração máxima inibitória
IV	Infravermelho
MMP	Metaloprotease da Matriz
MS	Mass Spectrometry (Espetrometria de massa)
m/z	Razão massa/carga
phen	1,10-fenantrolina
pic	2-piridinacarboxilato
PTA	1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano
RE	Retículo Endoplasmático
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
SNS	Serviço Nacional de Saúde
TGFβ1	Fator de Crescimento Transformador β1
TOM	Teoria das Orbitais Moleculares
tpy	2,2':6'2''-terpiridina
UV-Vis	Ultravioleta -Visível
VIH/SIDA	Vírus da Imunodeficiência Humana/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

I. INTRODUÇÃO

O rápido progresso nos campos da biologia molecular e da genética estimulou o desenvolvimento de um conjunto de novos fármacos antitumorais. Atualmente, encontram-se em estudos pré-clínicos, aproximadamente, mil compostos antitumorais, um valor superior ao número de compostos em estudo para as doenças cardiovasculares e mentais ¹.

O conhecimento científico incorporado nos novos fármacos é extraordinário, no entanto, o progresso da ciência nem sempre foi acompanhado por melhores resultados na resposta à terapêutica ¹.

Uma das formas de avaliarmos o valor dos medicamentos no combate ao cancro é analisando a relação custo-eficácia, isto é, a relação entre o quanto uma terapia aumenta os custos em saúde e o quanto melhora os resultados em saúde. Muitos dos novos fármacos que integram o grupo das novas terapias dirigidas encontram-se aprovados para o tratamento de tumores com marcadores genéticos particulares. Pela elevada especificidade e custo associado à produção, estas novas terapias acarretam custos acrescidos para o SNS, o que se reflete, de uma forma geral, numa relação custo-eficácia inferior para os novos fármacos em comparação com os mais antigos do mercado ¹.

Em 2014, as terapêuticas oncológicas dispensadas em ambiente hospitalar custaram ao SNS mais de 390 milhões de euros. Quando comparado com o mesmo período de 2014 observou-se, em 2015, um aumento de 9,8% em custos, associado a um aumento apenas de 4,5% na quantidade de medicamentos dispensada ². Assim, torna-se urgente o desenvolvimento de terapêuticas com uma boa relação custo-eficácia e o planeamento de estratégias de maximização da eficácia terapêutica dos fármacos já existentes no mercado incluindo a diminuição dos problemas associados à sua administração. Neste contexto, o encapsulamento por contentores moleculares é uma das estratégias com elevado potencial e que poderá contribuir significativamente para o desenvolvimento de fármacos com seletividade acrescida.

Neste trabalho, será efetuada uma revisão dos compostos de coordenação antitumorais em estudo ou aprovados para uso clínico, com foco sobre os compostos de ruténio bem como uma revisão das estratégias de encapsulamento em cucurbiturilos com vista à melhoria das características físicas, químicas e farmacocinéticas dos fármacos antitumorais.

1.1. Cancro

O cancro, oriundo da palavra grega *karkinos* - caranguejo - é, de acordo com o National Cancer Institute, o termo usado para definir um conjunto de doenças relacionadas, caracterizadas por um crescimento descontrolado e exagerado das células, invasão de tecidos circundantes e metástase ³.

As primeiras evidências manuscritas sobre o cancro foram encontradas no antigo Egipto e remontam ao período entre 2000 e 3000 a.C. Contudo, a palavra cancro foi apenas empregue, pela primeira vez, por Hipócrates (460–370 a.C.), intitulado o “Pai da Medicina”, para descrever a formação de tumores, encarada como um acréscimo anormal de humores ^{4,5}.

O cancro não representa uma só doença. Na verdade, são conhecidos mais de 100 tipos de cancro, cujo nome é atribuído consoante o tecido ou órgão na origem do mesmo. Podem ser classificados como carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiplo, melanoma, tumores da espinal medula e cérebro e outros tipos de tumores. A maioria dos tumores humanos formam-se a partir dos tecidos epiteliais, dando origem ao carcinoma, o tipo mais comum de cancro ^{6,7}.

Os tumores, definidos como uma massa de tecido com propriedades anormais resultante de uma divisão celular monoclonal descontrolada associada a uma falha nos mecanismos de controlo que conduzem à sua eliminação por apoptose, podem ainda ser classificados em benignos ou malignos. São identificados como malignos os tumores que apresentem capacidade de se escaparem do seu local de origem, invadirem os tecidos circundantes e disseminarem-se para outras partes do organismo. Contrariamente, aqueles que se desenvolvem localmente, sem invasão dos tecidos adjacentes são denominados de benignos ^{8,9}.

Os diversos tipos de cancro podem ainda dividir-se em tumores sólidos ou líquidos. Os tumores sólidos, como por exemplo o carcinoma, sarcoma e linfoma, são massas de tecidos que se identificam pela ausência de quistos ou áreas líquidas. Por outro lado, as leucemias, os tumores com origem nas células sanguíneas, não formam, por regra, tumores sólidos ⁸.

Atualmente, existe um maior conhecimento sobre a etiologia do cancro e sabe-se que não é apenas uma sequela geneticamente determinada, mas sim uma manifestação comportamental imposta a uma suscetibilidade hereditária individual ⁷. Os fatores de risco incluem a exposição a agentes infecciosos e a compostos químicos, a adoção de determinados comportamentos, bem como a idade, o sexo e a história familiar. Curiosamente, estudos epidemiológicos mostraram que os determinantes exógenos, isto é, ambientais são os fatores

dominantes responsáveis pelas diferenças observadas nas taxas de incidência da doença oncológica, entre países ^{6,10,11}.

O mecanismo de transformação de uma célula normal numa outra com características neoplásicas, também entendido como carcinogênese, é um processo que compreende múltiplas etapas. O período entre a exposição a um determinado agente carcinogénico e o desenvolvimento de uma população de células neoplásicas abrange três etapas distintas: a iniciação, a promoção e a progressão (Figura I-1) ^{12,13}.

A exposição a agentes carcinogénicos com consequente lesão do DNA cromossómico de células normais, ausência de reparação da lesão, replicação e transmissão à descendência, traduz a etapa de iniciação. Esta é seguida da etapa de promoção, que assinala o momento em que as alterações genéticas das células sujeitas a carcinógenos e promotores da carcinogênese determinam a transformação neoplásica e o desenvolvimento de células com capacidade de crescimento autónomo. A última etapa, a progressão, é caracterizada por uma marcada malignidade como resultado da acumulação de modificações genéticas e epigenéticas. O tumor apresenta um elevado ritmo de proliferação e capacidade de invasão e metástase ¹³.

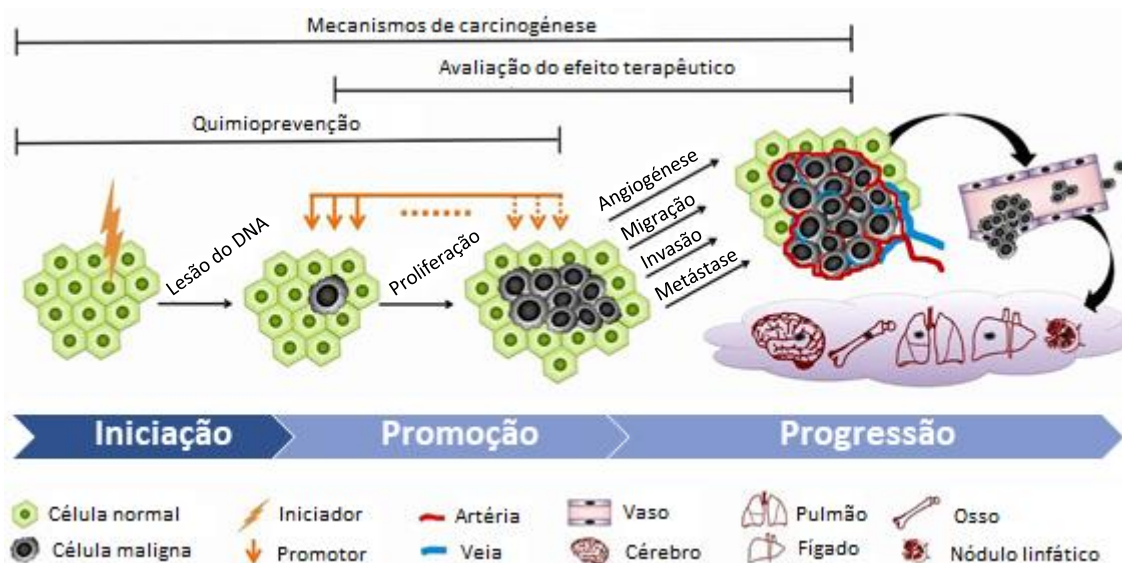


Figura I-1. Mecanismo de carcinogênese (adaptado de ¹⁴).

A par com as etapas acima enumeradas, três regras fundamentais têm de ser infringidas para o desenvolvimento de um tumor. As células apenas iniciam o processo de divisão celular quando estimuladas. Quando este primeiro princípio não é respeitado, as células arranjam forma de manter ativo o processo pela qual são estimuladas por uma hormona ou fator de crescimento.

A segunda premissa especifica que em condições impróprias para a replicação do DNA, as células ativam programas de morte celular com o objetivo de impedir a replicação do DNA lesado. Para escaparem aos programas de autodestruição, as células evitam os pontos de controlo, durante o ciclo celular. Os genes supressores de tumores desempenham um papel importante neste aspeto. Quando estes genes são alterados por mutação, perdem as suas funções e as células adquirem a capacidade de se dividem continuamente e escaparem à apoptose. A última regra determina que as células se dividem por um número limitado de vezes, devido a uma estrutura na posição terminal de cada cromossoma, o telómero. Cada vez que a célula se divide, a sequência de DNA constituída por pequenas repetições é encurtada. Após um número fixo de divisões, o encurtamento dos telómeros é incompatível com a continuidade da divisão celular, o que conduz à senescência e apoptose. As células neoplásicas, por outro lado, através da ativação da telomerase, enzima que promove a regeneração dos telómeros, adquirem uma característica que as torna “imortais”¹².

A infração conjunta destas três regras é a chave para uma célula se tornar tumoral. A complexidade da tumorigénese advém da aptidão da célula para operar todas estas modificações de uma forma coordenada. E é por este motivo que se acredita que o cancro depende simultaneamente de fatores genéticos e ambientais¹².

Ainda no que concerne ao processo de carcinogénese, as alterações genéticas mais comuns abrangem os proto-oncogenes, os genes supressores de tumor e os genes reparadores do DNA. Os proto-oncogenes codificam proteínas com funções no controlo do crescimento celular. Modificações na sua estrutura ou expressão podem desencadear a sua ativação em oncogenes. São assim designados porque promovem a proliferação celular. Contrariamente, alguns genes contribuem para o desenvolvimento de tumores quando são inativados. É o caso dos genes supressores de tumor que exercem igualmente funções na gestão do crescimento e proliferação celular. Uma mutação neste gene conduz à codificação de uma proteína disfuncional, incapaz de impedir a divisão celular quando necessário. Considera-se ainda uma terceira classe de genes, associada ao mecanismo de carcinogénese. Embora não estejam diretamente envolvidos, os genes responsáveis pelo processo de reparação do DNA quando inativados deixam a célula exposta ao desenvolvimento de mutações e conseqüentemente à ativação de oncogenes e inativação dos genes supressores de tumores^{12,15}.

Durante as últimas décadas, foram exploradas teorias alternativas tendo resultados experimentais recentes mostrado que a presença de mutações e fatores de crescimento não consegue

por si só explicar a indução da proliferação celular e que o microambiente em que a célula está inserida contribui ativamente para a iniciação da carcinogénese. A interação entre as células e o microambiente que as rodeia, com o envolvimento de fatores bioquímicos e biofísicos, impulsiona de forma determinante a emergência do cancro ¹⁶.

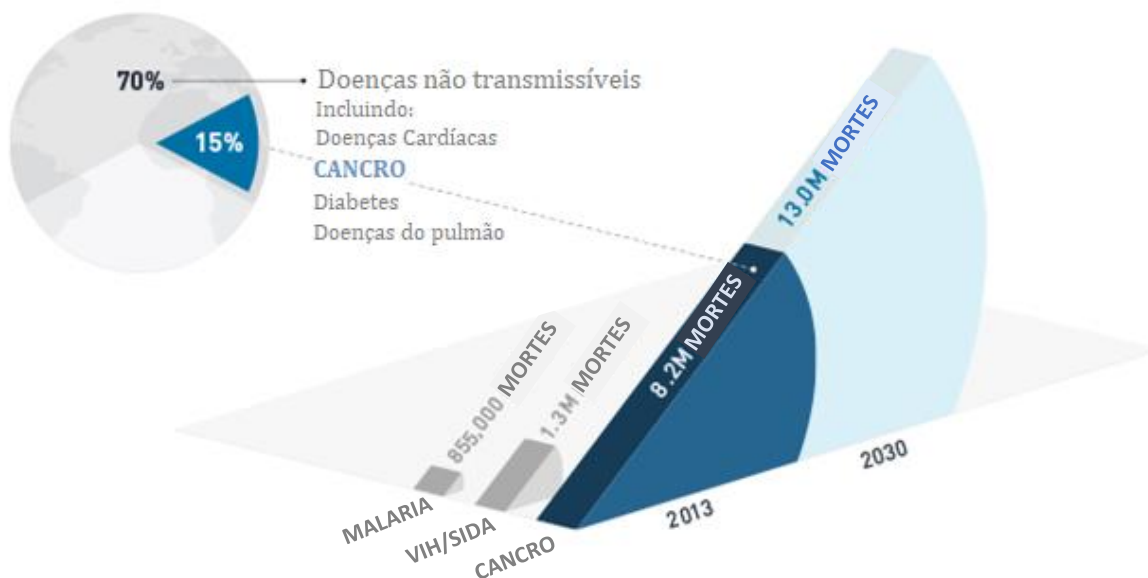


Gráfico I-1. Número estimado de mortes por cancro em 2013 e estimativa para 2030 (adaptado de ¹⁷).

Os estudos estatísticos mais recentes indicam que, em 2012, em todo o mundo, 14,1 milhões de novos casos de cancro foram diagnosticados, dos quais 7,4 milhões destes nos homens e 6,7 milhões nas mulheres. É espectacular que este número aumente para 24 milhões em 2035. No que respeita à mortalidade, registaram-se 8,2 milhões de mortes por cancro, em 2012 (Gráfico I-1) e estima-se que, em 2035, o cancro venha a vitimar, aproximadamente, 14,6 milhões de pessoas, por ano ¹⁸.

O cancro constitui, seguido das doenças cardiovasculares, a segunda causa de morte, nos EUA e na Europa. O cancro do pulmão foi registado como o mais comum, em todo o mundo, contribuindo com 13% do número total de novos casos diagnosticados em 2012. O cancro da mama foi identificado como o segundo tipo de cancro mais frequente, com, aproximadamente, 11,9% de novos casos, no mesmo ano. E o cancro colorretal ficou classificado como o terceiro tipo de cancro mais comum, representando uma parcela de 9,7% do número total de casos, em 2012 (Gráfico I-2) ^{19,20}.

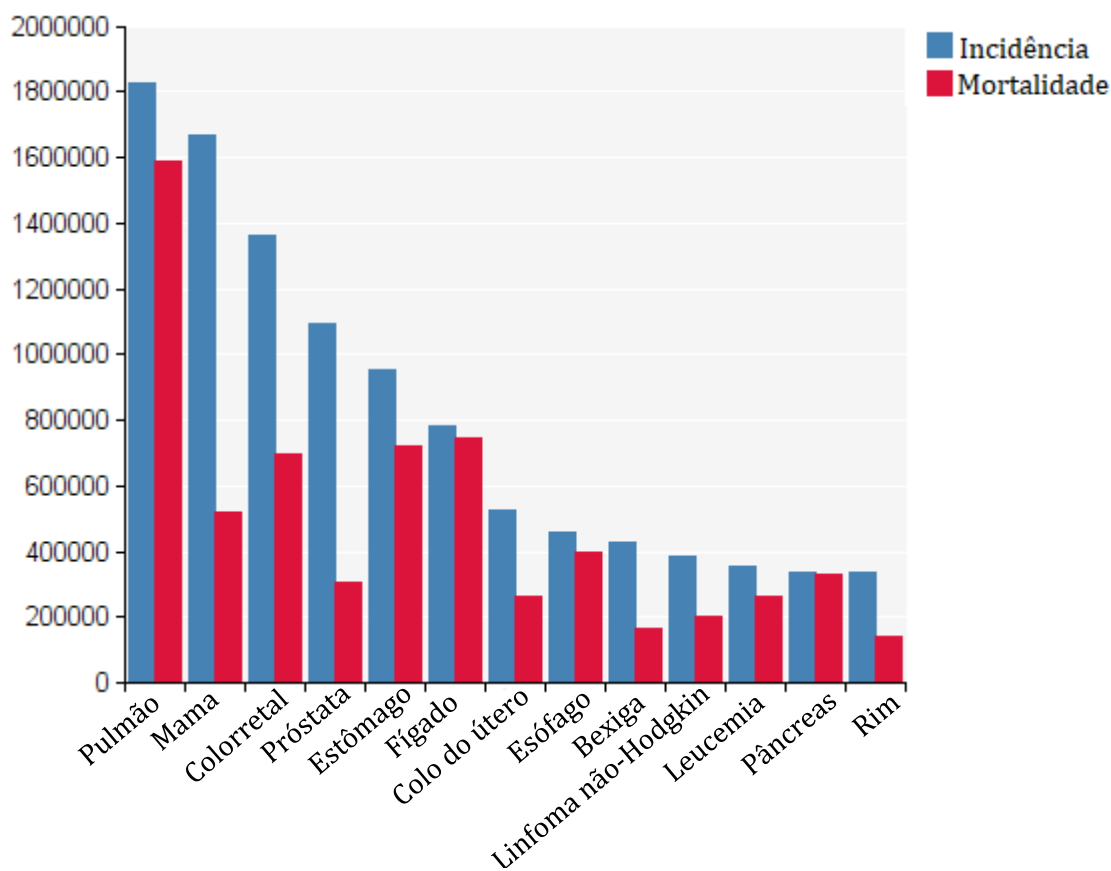


Gráfico I-2. Incidência e mortalidade em números, de diversos tipos de cancro, para ambos os géneros e todas as idades (adaptado de ¹⁸).

Ao longo dos anos, muita investigação na área da química tem sido direcionada para as aplicações médicas, quer em termos de diagnóstico, quer em termos de terapêutica, como forma de contrariar estes números. A investigação tem proporcionado um crescimento contínuo do nosso conhecimento acerca das causas do cancro, oferecendo a oportunidade de desenvolver estratégias de prevenção da doença, de deteção precoce e de intervenção na sua progressão ²¹.

1.2. Terapêuticas Atuais

O tratamento do cancro segue, hoje em dia, três abordagens diferentes: a cirurgia, a radioterapia e a terapia sistémica. Por terapia sistémica entende-se todos os tratamentos que incluem a terapia hormonal, a terapia dirigida e a quimioterapia. O regime de tratamento escolhido pelos clínicos depende do tipo de cancro do doente, assim como do estágio em que se encontra a doença. A combinação de modalidades terapêuticas é uma realidade comum, em muitos pacientes ^{22,23}.

A quimioterapia pode ser classificada de duas formas: segundo o espectro de atuação dos citotóxicos no ciclo celular ou de acordo com o seu mecanismo de ação. No que respeita à primeira classificação, os agentes quimioterápicos podem ser distinguidos em fase-específicos, ciclo-específicos e ciclo-inespecíficos, consoante a especificidade de atuação no ciclo celular (Figura I-2) ²³.

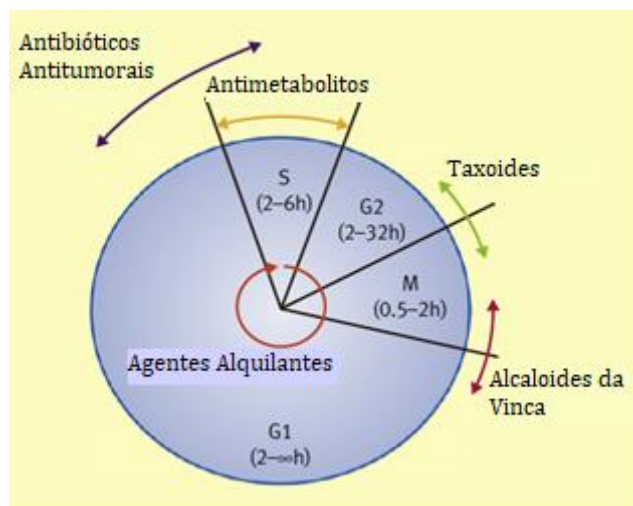


Figura I-2. Especificidade de atuação no ciclo celular das diferentes classes de agentes quimioterápicos (adaptado de ²³).

A segunda classificação varia de autor para autor, no entanto, ainda é a mais usada na prática clínica. De acordo com a classificação atribuída pelo International Manual of Oncology Practice os agentes citotóxicos estão categorizados em:

- Agentes Modificadores do DNA: operam através da sua interação com os ácidos nucleicos. Integram duas categorias de quimioterápicos:

- Agentes Alquilantes: atuam pela inibição das funções celulares, ao transferirem o seu grupo alquilo ($R-CH_2$) para os constituintes celulares e, desta forma, estabelecerem ligações covalentes com proteínas e com ácidos nucleicos (e. g. clorambucil, ciclofosfamida e dacarbazina) ^{24,25}.

- Complexos de Platina: a atividade antitumoral destes complexos é atribuída à sua ligação ao DNA, com formação de adutos que conduzem a modificações estruturais e, por consequência, inibição da síntese de DNA e indução da apoptose (e. g. cisplatina, oxaliplatina e carboplatina) ²⁴⁻²⁶.

- Antimetabolitos: são análogos estruturais de metabolitos naturais envolvidos na síntese de ácidos nucleicos. Exercem a sua atividade ao competirem com o substrato natural pelo sítio

ativo de enzimas com funções na biossíntese de RNA e DNA (e. g. 6-mercaptopurina, 5-fluoruracilo e gencitabina) ²³⁻²⁵.

- Antibióticos Antitumorais: atuam por intercalação no DNA em sequências específicas, com a formação de radicais livres e consequente interrupção das cadeias de DNA. As antraciclinas, produto do fungo *Streptomyces*, inibem, adicionalmente a ação das Topoisomerases I e II (e. g. bleomicina, daunorrubicina e doxorrubicina) ²³⁻²⁵.

- Inibidores da Topoisomerase: o mecanismo de ação destes compostos relaciona-se com a inibição da atividade das Topoisomerases I e II. Estas enzimas são responsáveis pela estrutura 3D do DNA, durante o processo de replicação (e. g. irinotecano, topotecano e etoposido) ²³⁻²⁵.

- Compostos Naturais: estes agentes, também denominados por “Venenos do Fuso Mitótico”, atuam por se ligarem à tubulina, o monómero funcional do microtúbulo. Integram na sua categoria:

- Alcaloides da Vinca: atuam por ligação à tubulina e, por conseguinte, inibição da formação do microtúbulo, componente extremamente importante no processo de mitose, assim como na estrutura da célula (e. g. vimblastina e vincristina) ²³⁻²⁵.

- Taxoides: estes compostos, por outro lado, impedem a desconstrução do microtúbulo, e assim, a função normal da célula (e. g. paclitaxel e docetaxel) ²³⁻²⁵.

1.2.1. Complexos de Coordenação no Tratamento do Cancro

Os íões metálicos são componentes celulares vitais em diversos mecanismos bioquímicos, indispensáveis ao normal funcionamento dos organismos vivos ²⁷. Os metais de transição como o cobre, o ferro e o manganês desempenham um papel essencial em múltiplos processos biológicos. Um desequilíbrio na concentração destes metais tem sido relacionado com o desenvolvimento de diversas patologias, incluindo o cancro ²⁸.

Curiosamente, ao longo da história da civilização humana, o uso de complexos de coordenação tem sido descrito como forma de tratamento de uma grande variedade de enfermidades ^{29,30}.

O crescimento da química inorgânica tem revelado um impacto significativo na química medicinal, tradicionalmente dominada pela química orgânica. E de facto, os complexos de coordenação têm ganho notoriedade enquanto ferramentas de diagnóstico e agentes anticancerígenos ³¹.

O seu interesse surgiu, em 1965, com a descoberta acidental das propriedades citotóxicas da cisplatina, por Rosenberg *et al.* ³². Desde então, uma vasta biblioteca de compostos inorgânicos e organometálicos, com diferentes mecanismos de ação, tem sido desenvolvida para diversas aplicações farmacológicas ^{23,26,33,34}.

O efeito citotóxico da cisplatina e de outros compostos de platina, contudo, induz o surgimento de efeitos adversos e resistência aos fármacos, o que constitui um obstáculo na aplicação clínica e efetividade terapêutica destes antineoplásicos. Este facto tem levado a que nas últimas décadas se tenham envidado esforços no sentido do desenvolvimento de complexos de metais de transição com maior eficácia e menor toxicidade ^{23,26,33,34}.

Os metais apresentam características únicas que os tornam promissores no *design* e desenvolvimento de fármacos para uso na terapêutica e no diagnóstico de patologias:

1- Os complexos metálicos podem apresentar-se como catiónicos, aniónicos ou neutros, dependendo da sua esfera de coordenação. Em soluções aquosas, os metais formam iões carregados positivamente, característica que os distingue da maioria dos compostos orgânicos. Dada a facilidade com que perdem eletrões e formam espécies catiónicas, os metais interagem com muitas moléculas biológicas, participando ativamente em diversos processos bioquímicos ^{27,35,36}.

2- Consoante a natureza do metal e dos seus ligandos, os compostos metálicos oferecem uma distinta variedade de estruturas moleculares que conferem um elevado espetro de geometrias e números de coordenação ^{35,37}.

3- O estado de oxidação do metal constitui igualmente uma parcela importante no *design* de compostos de coordenação com interesse medicinal, uma vez que permite a sua participação numa grande diversidade de reações redox ^{35,36}.

4- A complexidade de geometrias e as possibilidades de rearranjo molecular dos compostos de coordenação proporcionam a ocorrência de reações de troca de ligandos, o que oferece múltiplas oportunidades de interação e coordenação dos metais com moléculas biológicas ^{35,36,38}.

5- Contrariamente aos compostos orgânicos, alguns iões metálicos podem comportar-se como poderosos ácidos de Lewis e polarizar significativamente grupos com os quais estejam coordenados e, desta forma, promover reações de hidrólise ^{35,36}.

6- Para os metais de transição, as orbitais *d* parcialmente preenchidas concedem propriedades eletrônicas e magnéticas interessantes que podem ser vantajosas no desenvolvimento de novos fármacos^{35,36}.

Para além das propriedades químicas, também as características físicas dos íons metálicos como a radioatividade têm aplicações importantes na medicina de diagnóstico³⁶.

Apesar da extensa aposta no desenvolvimento e *design* de novos complexos metálicos, nas últimas décadas, poucos foram aqueles cuja aprovação foi obtida. Apenas a cisplatina, a carboplatina e a oxaliplatina se encontram aprovadas, em todo o mundo, para uso clínico (Figura I-3). Excepcionalmente, na Ásia, obtiveram também aprovação para o tratamento antitumoral a nedaplatina, a heptaplatina e a lobaplatina²⁶.

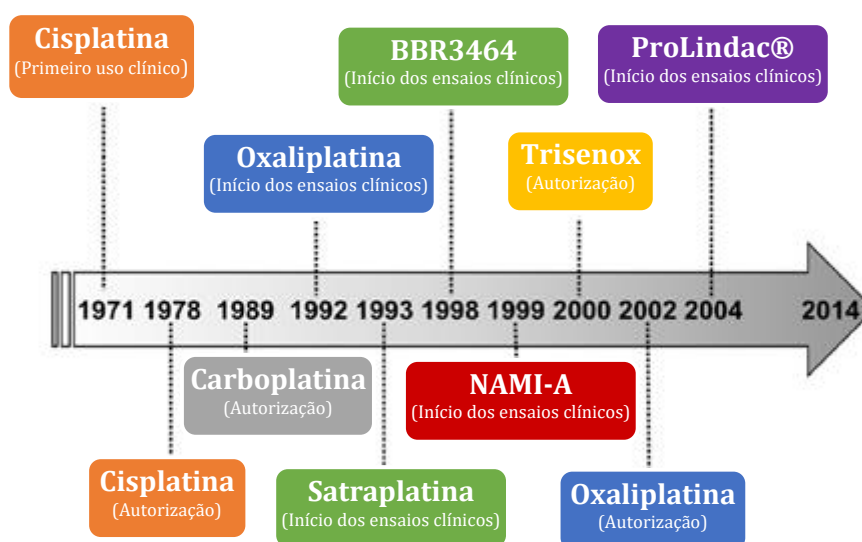


Figura I-3. Visão histórica dos complexos metálicos que foram aprovados ou entraram ou se encontram em fase de ensaios clínicos para o tratamento do cancro (adaptado de²⁶).

A cisplatina, quimicamente designada por cis-diaminodicloroplatina(II), é um complexo de geometria quadrangular plana, cujo aduto formado pela interação 1,2-intracadeia entre duas bases guanina adjacentes da cadeia de DNA parece ser o principal responsável pela sua atividade antitumoral²⁶.

Apesar de, ainda hoje, estar indicada, em regime de combinação, no tratamento de diversos tipos de cancro (ovário, testículo, cabeça e pescoço, tumor cervical e carcinoma do pulmão das células não pequenas) a cisplatina apresenta alguns aspetos condicionantes na sua utilização³⁶.

Em circulação, encontra-se predominantemente ligada a proteínas do plasma (e. g. albumina sérica humana, hemoglobina e transferrina). Adicionalmente, é distribuída, amplamente, pelo organismo humano, acumulando-se, em elevadas concentrações, nos rins, fígado e próstata. Em consequência, a cisplatina apresenta, como efeitos adversos, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade e anemia ^{26,33,39}.

Efeitos indesejados como distúrbios gastrointestinais, supressão da medula óssea e perda de cabelo parecem estar relacionados com a baixa seletividade da cisplatina para as células tumorais, lesando indiferenciadamente células neoplásicas e células saudáveis que apresentem um crescimento acelerado, como é o caso dos folículos capilares, do epitélio gastrointestinal e da medula óssea ^{26,33,39}.

Apesar do seu sucesso em alguns tipos de cancro, a eficácia da sua aplicação é limitada devido à resistência celular intrínseca ou adquirida. Os mecanismos que conduzem à resistência celular da cisplatina ainda não estão totalmente esclarecidos. No entanto, sabe-se que a resistência é multifatorial e na mesma célula tumoral é comum encontrar, simultaneamente, vários mecanismos de resistência ⁴⁰.

Os principais mecanismos sugeridos são cinco:

- Redução da acumulação intracelular da cisplatina: a causa desta redução em células resistentes pode ser atribuída a uma inibição da entrada da cisplatina na célula, a um aumento no efluxo ou ambos ⁴⁰.

- Inativação por moléculas contendo grupos tiol: no interior da célula, para além do DNA, a cisplatina interage com espécies nucleofílicas como a metionina, a GSH e outras proteínas ricas em cisteína, conduzindo à sua inativação ou eliminação da célula ⁴⁰.

- Aumento da reparação do DNA lesado: a estabilidade dos adutos cisplatina-DNA é essencial na promoção da apoptose celular. Como tal, um aumento na taxa de reparação do DNA está associado a uma diminuição da atividade citotóxica da cisplatina. A reparação por excisão do nucleótido é o principal meio de remoção dos adutos de platina e reparação do DNA ⁴⁰.

- Alteração na expressão de genes reguladores: modificações na expressão de oncogenes e genes supressores de tumores têm sido implicadas nos mecanismos de resistência. A relação entre o mecanismo subjacente à resistência e os efeitos pleiotrópicos destes genes reguladores ainda não é inteiramente compreendida ⁴¹.

- Tolerância aos adutos: idealmente, a reparação do DNA acontece antes da sua replicação. No entanto, as células resistentes à cisplatina adquirem a capacidade de se replicarem apesar da presença do aduto e iniciar a reparação após a replicação. Este mecanismo permite às células tolerarem a existência de adutos de DNA e, desta forma, escaparem, à apoptose^{41,42}.

A carboplatina, desenvolvida pela Johnson Matthey Technology, foi o primeiro derivado da cisplatina a obter aprovação para a introdução no mercado⁴³. O íon metálico da cis-diamino(1,1-ciclobutanodicarboxilato)-platina(II), como é designada segundo a nomenclatura, encontra-se coordenado com o ligando bidentado carboxilato, o que lhe atribui características de um complexo metálico menos reativo e com uma cinética de interação com os ácidos nucleicos mais lenta, como consequência de uma lenta abertura do anel e de uma lenta substituição nucleofílica do ligando dicarboxilato^{43,44}. Tais particularidades resultam em menor toxicidade do trato urinário e gastrointestinal, o que traz vantagens no prolongamento da duração do tratamento e no aumento da posologia administrada²⁶. Contudo, a supressão da medula óssea, em especial a trombocitopenia, e a resistência adquirida ao fármaco continuam a ser os principais fatores limitantes na prática clínica no que concerne à carboplatina^{26,45,46}.

A oxaliplatina, 1R,2R-dianimociclohexanooxalatoplatina(II), obteve a sua aprovação mais tarde, em 2002, com indicação no tratamento de tumores resistentes à cisplatina e à carboplatina, particularmente no tratamento do cancro colorretal. A oxaliplatina é administrada normalmente em combinação com outros fármacos anticancerígenos e o seu mecanismo de ação resulta da formação de ligações intra e intercadeia com o DNA, conduzindo, desta forma, à inibição da replicação e transcrição do DNA e ao início do mecanismo de apoptose celular²⁶. O centro metálico da oxaliplatina encontra-se coordenado com o ligando bidentado oxalato e o ligando bidentado 1,2-diaminociclohexano (DACH). Embora exiba menor toxicidade do que a cisplatina, o risco de manifestação de neuropatia sensorial periférica constitui o principal fator limitante da dose deste fármaco^{26,46}. Aparentemente não apresenta resistência adquirida uma vez que os adutos que estabelece com o DNA não são reconhecidos pelas proteínas de reparação. Para além disso, não interage com os transportadores de efluxo, o que permite evitar a sua expulsão das células tumorais^{26,46}.

Entre os complexos metálicos aprovados na terapêutica do cancro encontra-se também, desde o ano de 2000, o trióxido de arsénio, sob o nome comercial de TRISENOX®. Os compostos de arsénio têm sido usados ao longo da história da medicina no tratamento de

diversas doenças como a sífilis e o cancro. Contudo, o receio pela toxicidade, a falta de evidência que demonstrasse eficácia em modelos animais e o efeito carcinogênico do arsênio levou ao decaimento do seu uso enquanto agente quimioterápico ⁴⁷. Nos anos 90, novos estudos levados a cabo pela Harbin Medical University, na China, vieram demonstrar a eficácia de uma formulação de trióxido de arsênio em doentes com leucemia promielocítica aguda, um subtipo de leucemia mieloide aguda com traços clínicos, hematológicos e moleculares distintos ⁴⁸. Os mesmos estudos mostraram que a maioria dos doentes sujeitos ao tratamento apresentavam remissão completa da doença ²⁶. A sua atividade antitumoral advém da sua capacidade de interferir com uma miríade de mecanismos celulares. Modelos experimentais sugerem que atua pela indução da apoptose e pela inibição da proliferação celular e da angiogénese ⁴⁷. A cardiotoxicidade continuou, contudo, a ser reportada como efeito adverso ²⁶.

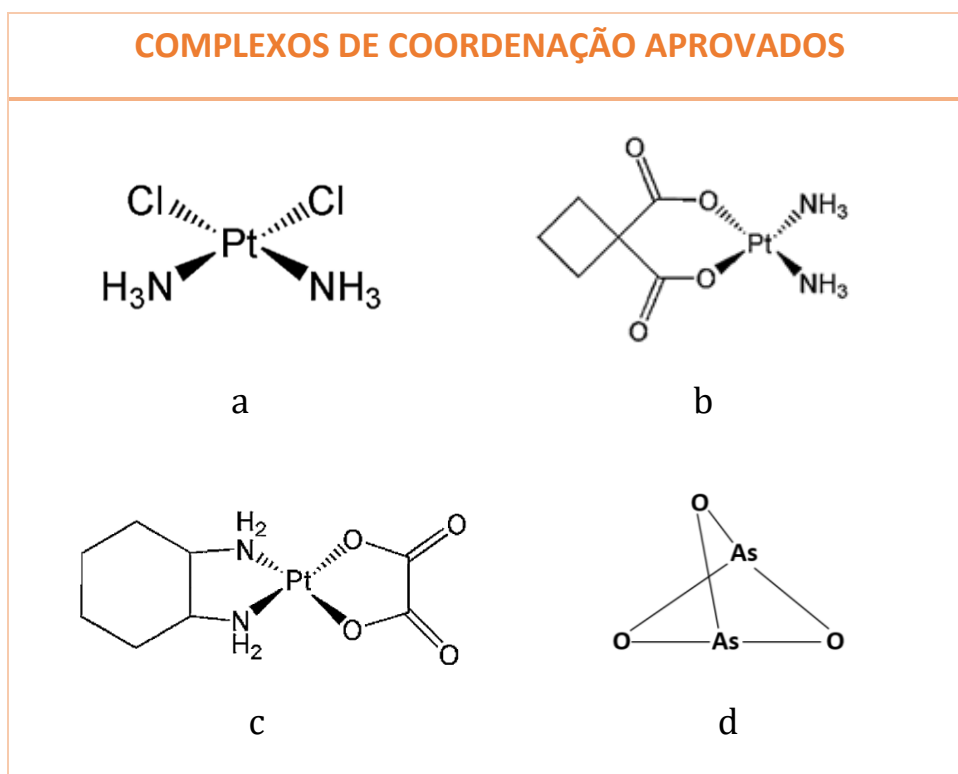


Figura I-4. Estruturas químicas dos complexos de coordenação aprovados: cisplatina (a), carboplatina (b), oxaliplatina (c), trióxido de arsênio (d) ^{26,49}.

1.2.2. Novas Abordagens

Os desenvolvimentos recentes na terapêutica do cancro envolvendo compostos de coordenação têm sido direcionados para o estudo de novos complexos metálicos, não só com

características farmacocinéticas mais favoráveis, mas também com novas abordagens de atuação. Têm sido observadas bioatividades promissoras em muitos novos complexos metálicos, apesar do seu modo de atuação não estar totalmente esclarecido. Para além do DNA, a interação com proteínas representa o principal modo de ação da maioria dos compostos, enquanto outros exibem modos de ação completamente novos e desconhecidos ^{26,39}.

Os complexos de platina continuam a ser um dos principais objetos de estudo no *design* de novos fármacos antitumorais. Em maior destaque encontram-se os complexos de Pt(IV), os complexos de platina fotoativados, os complexos de platina multinucleares e os complexos de platina lipossomais.

Os complexos de Pt(IV) são cineticamente mais inertes e termodinamicamente mais estáveis, quando comparados com os complexos de Pt(II). O ião metálico apresenta número de coordenação seis e os seus complexos uma geometria octaédrica ²⁶. A redução do seu estado de oxidação a Pt(II) por agentes biológicos redutores é necessária para que os complexos Pt(IV) manifestem a sua atividade citotóxica. Por esta razão podem ser considerados pró-fármacos ³³. Dependendo da natureza dos ligandos axiais, isto é, do potencial de redução do complexo Pt(IV), a ativação do mesmo pode acontecer na corrente sanguínea ao invés do interior da célula tumoral, o que pode levar ao aparecimento de toxicidade sistémica ⁵⁰. A captação celular destes complexos é facilitada pela lipofilicidade que apresentam, o que permite explicar a sua eficácia em linhas celulares neoplásicas resistentes à cisplatina ²⁶. Dada a estabilidade química destes complexos, têm sido feitos esforços significativos no sentido de desenvolver agentes antitumorais para administração oral. De momento, encontra-se em fase III de ensaios clínicos um fármaco oralmente ativo, a satraplatina, para o cancro da próstata refratário a hormonas ⁵¹.

Outro mecanismo interessante de ativação por redução é o que se retrata nos complexos de Pt(IV) fotoativados. Uma nova aplicação dos complexos Pt(IV) na terapêutica do cancro é o desenvolvimento de complexos fotossensíveis que atuem como pró-fármacos e possam ser ativados a complexos Pt(II) nas células tumorais, pela ação da radiação UV ou visível ⁵⁰. Duas classes de complexos Pt(IV) fotoativados têm sido descritas na literatura: diiodo-Pt(IV) e diazido-Pt(IV). A primeira classe de compostos baseia-se na utilização do ião iodeto enquanto ligando redutor. Contudo, o seu estudo foi abandonado uma vez que na presença de agentes biológicos portadores de grupos tiol (e. g. glutatona), estes complexos eram facilmente reduzidos a Pt(II), perdendo a sua potencialidade enquanto complexos fotoativados. Contrariamente à primeira classe, os complexos diazido-Pt(IV) são mais estáveis e resistem à

redução pela glutatona e, desta forma, apresentam uma baixa citotoxicidade na ausência de luz. Na presença de luz, esta segunda geração de compostos interage com o DNA, com a formação de adutos irreversíveis com o 5-GMP⁵².

Os complexos de platina multinucleares contêm dois ou mais centros metálicos, capazes de estabelecer um espectro de interações com o DNA completamente distinto daquele estabelecido pelos complexos anteriormente referidos. Ao contrário da cisplatina, os adutos formados por esta classe de complexos são flexíveis, não direcionais e maioritariamente intercadeia. Adicionalmente, tem sido proposto que as deformações induzidas por estes complexos não são reconhecidas pelas proteínas de reparação do DNA. O complexo de platina tri-nuclear, BBR3464, foi o primeiro destes a ser estudado em ensaios clínicos. Este complexo apresenta valores de IC₅₀ (0,6 mM) muito inferiores aos demonstrados pela cisplatina (27,8 mM), revelando ser ativo em linhas celulares resistentes a esta molécula e com especial interesse no tratamento do cancro do pulmão das células pequenas e não pequenas, do cancro gástrico, do cancro do ovário e possivelmente do cancro do pâncreas. Apesar do enorme potencial desta classe enquanto agentes anticancerígenos, tem sido descrita uma elevada toxicidade. No que concerne ao BBR3464, os ensaios clínicos revelaram uma dose máxima tolerável de 1,1 mg/m² e como principal efeito adverso a neutropenia, estando este diretamente relacionado com a dose⁴³. Mais recentemente, os estudos de fase II revelaram que a facilidade com que reage com as proteínas do plasma resulta em desativação do fármaco. Estes resultados manifestam a importância do estudo de novas moléculas promissoras²⁶.

Nos últimos anos, as nanopartículas têm inspirado o desenvolvimento de fármacos melhor tolerados e com uma eficácia terapêutica aperfeiçoada. Os lipossomas representam um dos sistemas de distribuição de fármacos mais bem-sucedidos. A cisplatina lipossomal e a oxaliplatina lipossomal, lipoplatin® e lipoxal®, respetivamente, constituem dois excelentes exemplos da aplicação da nanotecnologia ao serviço da medicina⁵³. O lipoplatin® é uma cisplatina lipossomal encapsulada em lipossomas de diâmetro médio de 110 nm. Em estudos de fase I, II e III, este fármaco demonstrou, significativamente, menor toxicidade renal, neuropatia periférica, ototoxicidade, supressão da medula óssea, náuseas e vômitos, com uma eficácia superior ou similar à cisplatina. Em tumores de vascularização elevada, o lipoplatin® demonstrou resultados promissores devido à capacidade das nanopartículas alcançarem o sistema vascular do tumor e chegarem até aos tumores primários e metástases, causando, deste modo, um maior dano ao tecido tumoral em comparação com o tecido normal⁵⁴. O lipoxal® é

uma oxaliplatina lipossomal com menores efeitos adversos comparativamente ao agente citotóxico e de igual eficácia. No ensaio de fase I, o lipoxal® demonstrou boa tolerabilidade, sem toxicidade gastrointestinal e hematológica significativa. O único efeito colateral que permaneceu sem qualquer alteração, isto é, qualquer redução, foi a nefrotoxicidade. No momento, este fármaco encontra-se em fase II de desenvolvimento ⁵⁵.

O ouro desempenha, desde há milhares de anos, um papel importante no tratamento de diversas patologias. Contudo, o interesse neste metal como agente quimioterápico surgiu apenas aquando da percepção de que, quando sujeitos ao tratamento com auranofin, os doentes com artrite reumatoide manifestavam taxas de malignidade inferiores às espectáveis ²⁶.

O auranofin é um complexo de Au(I), de administração oral, que respeita uma configuração eletrónica d^{10} e uma geometria linear que integra os ligandos hidreto de fósforo e tiolato ⁵⁶. A potencialidade do auranofin no tratamento de outras patologias como o cancro, as infeções bacterianas e parasitárias, as doenças neurodegenerativas e o VIH/SIDA tem sido alvo de grande atenção e estudo ⁵⁶. Como sequência, também o interesse sobre os complexos de Au(I) e Au(III) aumentou exponencialmente.

Ao contrário da cisplatina e dos seus similares, tem sido observado que as interações entre o DNA e os complexos de Au(I) são fracas, pelo que os investigadores têm sugerido que os ácidos nucleicos não representam o alvo primário destes compostos. Por outro lado, uma forte associação com o DNA tem sido demonstrada num número particular de complexos de Au(III). Na verdade, os compostos de Au(III) exibem uma configuração d^8 e uma geometria quadrangular plana, tal como acontece com os complexos de Pt(II), pelo que seria espectável modos de atuação semelhantes. Para os complexos de Au(III) com terpiridinas e a porfirinas como ligandos, o DNA representa o alvo biomolecular preferencial destes compostos, o que pode ser explicado pelas características intercalantes destes ligandos. Para os restantes complexos de Au(III) e Au(I), têm sido explorados diversos mecanismos de ação possíveis. Em especial, os seguintes processos aparentam desempenhar um papel importante no mecanismo de ação destes complexos: modificação do ciclo celular, alteração da função mitocondrial, inibição do proteassoma, modelação da proteína cinase C e indução da apoptose ⁵⁷.

As nanopartículas de ouro, no seu estado de oxidação 0, têm sido amplamente estudadas pelas suas características atrativas enquanto promissores agentes antitumorais ³³. *In vivo*, as nanopartículas conseguem alcançar as células tumorais, ao interagirem com muitas proteínas e serem ativamente direcionadas para as células tumorais. Nos tecidos tumorais tendem a

acumular-se. Alguns estudos mostraram que a citotoxicidade das preparações de nanopartículas de ouro relacionam-se com a produção de espécies reativas de oxigénio, toxicidade mitocondrial, libertação de citocinas, apoptose e necrose ⁵⁸.

A prata oferece inúmeras aplicações medicinais como agente antisséptico, antibacteriano, anti-inflamatório e mais recentemente, também as suas propriedades como agente anticancerígeno têm sido significativamente exploradas ⁵⁹. A baixa toxicidade dos compostos de prata representa uma vantagem ímpar na segurança da sua utilização pelo ser humano. Os mecanismos pelos quais exerce a sua ação antiproliferativa ainda são incertos, contudo, os estudos de investigação têm vindo a sugerir uma associação entre a sua ação antitumoral e a interação que estabelece com o DNA e com as proteínas portadoras de grupos tiol. Para além disso, esta interação com os ácidos nucleicos parece estar orientada preferencialmente para as bases do DNA em vez dos grupos fosfato ^{59,60}.

Presentemente, tem sido objeto de grande estudo e revisão, a atividade antiproliferativa dos complexos de Ag(I) com uma grande variedade de ligandos tais como os ácidos carboxílicos, os aminoácidos e os grupos doadores de azoto, fósforo e enxofre ^{26,60}. Apesar dos resultados da sua ação antiproliferativa e seletividade *in vitro* serem extraordinários, a falta de informação sobre a sua ação *in vivo* é uma realidade e uma preocupação, pelo que muito há ainda a saber acerca destes compostos ²⁶.

O ferro, por sua vez, é um dos metais com maior envolvimento nos mecanismos celulares como, por exemplo, no transporte de oxigénio, na síntese de DNA, na fosforilação oxidativa e na progressão do ciclo celular, processos estes com um papel crucial na carcinogénese. De salientar que o seu potencial como agente citotóxico ostenta estar relacionado com as reações de oxidação-redução entre as espécies Fe(II) e Fe(III), em ambiente fisiológico ²⁶.

A descoberta do ferroceno, (bis-ciclopentadienilo)ferro(II), um complexo organometálico de Fe(II) fez crescer o interesse pela química organometálica e a investigação sobre uma nova classe de compostos, de fórmula química $(C_5H_5)_2M$, os metallocenos. Estes compostos são também, frequentemente, referidos como “complexos sanduíche” uma vez que a sua estrutura consiste em dois anéis ciclopentadienilo ligados a um átomo metálico, numa geometria simétrica ⁶¹. Por si só, o ferroceno, não apresenta atividade citotóxica significativa, mas aparenta ser um excelente bloco de construção de moléculas biologicamente ativas dada a sua estrutura ímpar, as suas propriedades redox favoráveis e a sua baixa toxicidade ^{61,62}.

Os sais de ferro(III), os ferricínios, foram os primeiros compostos de ferro cuja atividade antiproliferativa foi demonstrada. Apesar de o mecanismo pela qual exercem a sua atividade ainda ser incerto, consideram-se como possíveis vias de ação o DNA nuclear, a membrana celular e a enzima Topoisomerase II, através da formação de espécies reativas de oxigênio e da indução da apoptose ^{61,62}.

Entre os derivados do ferroceno que têm demonstrado atividade antiproliferativa, o ferrocifeno é o que se encontra melhor caracterizado devido às suas propriedades antiproliferativas no tratamento do cancro da mama. O ferrocifeno é um complexo ferroceno substituído pelo 4-hidroxitamoxifeno, um metabolito ativo do tamoxifeno ⁶². Por sua vez, o tamoxifeno integra o tratamento de primeira linha no cancro da mama hormono-dependente ⁶¹. Acredita-se que a atividade deste composto no cancro da mama ER(+), isto é, no cancro suscetível a terapêutica hormonal, está relacionado com a capacidade do substituinte 4-hidroxitamoxifeno se ligar competitivamente ao subtipo α do recetor do estrogénio, reprimindo a transcrição de DNA mediado pelo estradiol nas células tumorais e, desta forma, o crescimento tumoral ^{61,62}. Uma segunda via de atuação tem sido proposta pelas propriedades redox do ferrocifeno ⁶¹.

Outros derivados do ferroceno têm sido objeto de investigação para as ciências médicas. De forma particular, o complexo ferroceno-acridina tem evidenciado elevado poder citotóxico em quatro linhas celulares tumorais. A atividade da acridina é atribuída à sua estrutura planar, capaz de intercalar o DNA e, desta forma, interferir com a maquinaria celular ^{61,62}.

Outros metais têm sido alvo de estudo no desenvolvimento e *design* de novos complexos metálicos que ofereçam diferentes abordagens de atuação no diagnóstico e tratamento da doença oncológica. O cobre, o gálio, o cobalto, o paládio e claro o ruténio, o qual é o objeto de foco deste trabalho, têm demonstrado resultados igualmente válidos e promissores que comprovam a potencialidade destes compostos e a importância da continuidade do estudo sobre os mesmos.

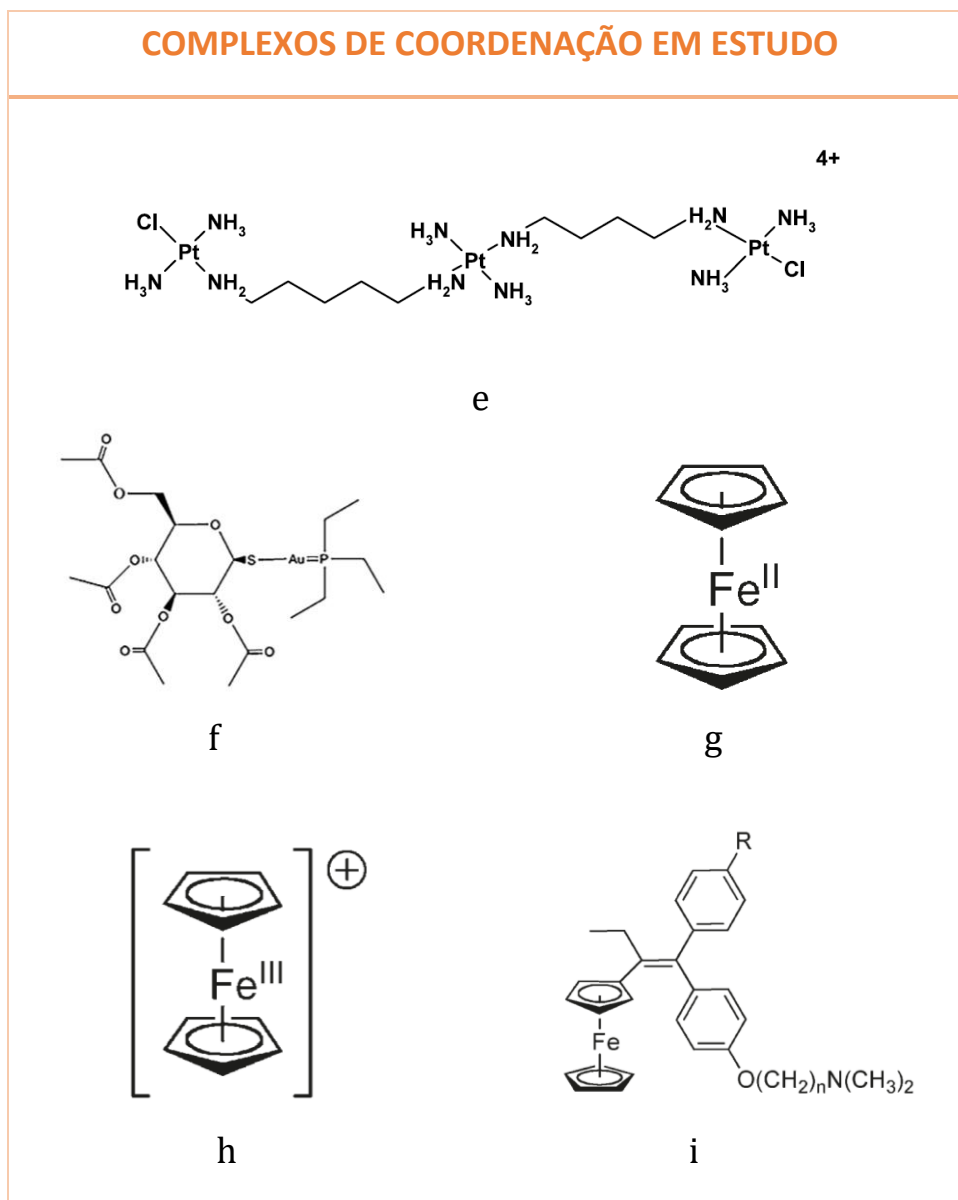


Figura I-5. Estruturas químicas dos complexos de coordenação em estudo: BBR3464 (e), auranofin (f), ferroceno (g), ião ferricínio (h), ferrocifeno ($R=H$, $n=2, 3, 4, 5, 8$) (i) ^{43,56,61}.

1.2.2.1. Complexos de Rutênio

O rutênio é atualmente um dos metais com grande protagonismo no universo da investigação, envolvendo complexos de metais de transição, com vista ao desenvolvimento de agentes terapêuticos. Tem sido estudada a sua atividade antibiótica, antivírica e antimalárica, mas é na investigação sobre o cancro que este metal reúne um maior número de artigos publicados ³³.

Durante os primeiros passos da investigação sobre o potencial do ruténio como agente quimioterápico, a sua atividade antitumoral era interpretada como o resultado da interação com o DNA, tal como havia sido demonstrado para os derivados da platina. Contudo, e apesar dos complexos de ruténio serem capazes de induzirem alterações conformacionais no DNA, alguns estudos relataram uma interação mais fraca e/ou uma ligação diferente ao DNA daquela observada pelos complexos de platina. Recentemente, novos desenvolvimentos sobre o modo de atuação dos compostos de ruténio têm revelado que o DNA não constitui o primeiro alvo do ruténio, tendo sido registada uma interação mais forte com as proteínas do que com os ácidos nucleicos^{61,63}.

1.2.2.1.1. Principais Características e Propriedades do Ruténio

O ruténio (Ru) é um metal de transição pertencente ao grupo 8, também designado como grupo do ferro, de número atómico 44, peso atómico 101,07 g/mol e configuração eletrónica [Kr] 4d⁷ 5s¹. Este metal, cuja descoberta foi atribuída a Karl Klaus, em 1844, é extremamente raro. Na forma pura, o ruténio tem uma consistência dura e quebradiça, uma coloração branca prateada e quatro formas cristalinas distintas. A sua posição na segunda linha dos metais de transição e a sua configuração eletrónica única na camada de valência conferem-lhe características singulares que diferem dos restantes metais do grupo do ferro. São conhecidos sete isótopos estáveis e trinta e quatro radioisótopos do ruténio⁶⁴.

Ao contrário dos complexos de Pt(II), os complexos de ruténio apresentam maioritariamente número de coordenação seis com geometria octaédrica. Os dois locais de coordenação adicionais permitem mecanismos de ação novos e distintos dos que ocorrem com complexos de platina⁶⁵.

A química do ruténio aproxima-se muito da química do ferro, à exceção de alguns sulfetos e fosforetos. O ruténio compreende uma variedade acessível de estados de oxidação, desde o -2 até ao +8. Em soluções aquosas e nos fluidos biológicos, os estados de oxidação mais comuns são +2, +3 e +4. Nestes estados de oxidação, os complexos de coordenação do ruténio sofrem facilmente reações oxidação/redução reversíveis, com formação de espécies com a mesma estrutura molecular, mas estados de oxidação diferentes⁶⁴.

A espécie [Ru(H₂O)₆]²⁺ é frequentemente usada como precursor para um variado número de complexos de ruténio. Os halogenetos de ruténio são igualmente sais com grande impacto

na síntese de compostos. Destes, o material de partida mais utilizado é o cloreto de Ru(III) hidratado ($\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$), um sólido vermelho, muito versátil quimicamente ⁶⁴.

A cinética de substituição do Ru(II) e Ru(III) assemelha-se à cinética dos complexos de Pt(II). A reação de troca de ligandos preconizada pelos complexos de Ru(II) e Ru(III) são lentas e próximas dos processos celulares, o que os torna elegíveis para aplicações biológicas. As reações de troca de ligandos representam um passo determinante na atividade biológica dos fármacos com ação anticancerígena uma vez que são poucos os complexos metálicos que alcançam o seu alvo biológico sem sofrerem modificações. Em condições fisiológicas, a interação entre o complexo metálico e os ácidos nucleicos, as proteínas, as moléculas ricas em enxofre e a água é importante para induzir o efeito terapêutico do fármaco ⁶⁶.

O ruténio oferece também boa tolerabilidade *in vivo* e reduzida toxicidade. Este fenómeno pode ser explicado pela ligação que estabelece com várias biomoléculas como a albumina sérica e a transferrina. A ligação à transferrina é favorecida pela similaridade do ruténio com o ferro. As células tumorais possuem uma maior necessidade de ferro e como tal expressam, na superfície da sua membrana celular, um maior número de recetores da transferrina. Assim, uma vez em circulação, o ruténio liga-se à transferrina, sendo conduzido até aos tecidos e sequestrado pelas células tumorais ^{64,67}. A possibilidade de obtenção de espécies de Ru(III), pouco reativas, que atuem como pró-fármacos pela ativação por redução em tecidos tumorais, onde o baixo teor de oxigénio cria um ambiente propício para a ocorrência de reações de redução, constitui outra elucidação para a baixa toxicidade sistémica que estes complexos de coordenação apresentam ⁶⁸.

Pelas suas propriedades únicas, o ruténio tem um amplo espetro de aplicações em diversas áreas. É usado como corante, na fotoquímica em células solares, em joalheria, em muitas reações químicas como catalisador e na medicina, enquanto agente de imagiologia, antitumoral, antiparasitário, entre outras aplicações ⁶⁴.

1.2.2.1.2. Os Complexos de Ruténio no Cancro

Até à data, apenas três complexos de ruténio, NAMI-A, KP1019 e NKP-1339 entraram em fase de ensaios clínicos ⁶⁹⁻⁷². Apesar de semelhantes estruturalmente, estes três complexos de Ru(III) apresentam mecanismos de ação muito distintos. Em estudos pré-clínicos, o composto NAMI-A demonstrou atuar pela inibição do desenvolvimento de metástases sem um efeito citotóxico significativo ⁷³. Pelo contrário, o KP1019 demonstrou uma elevada atividade

citotóxica numa ampla gama de tumores humanos, pela indução da apoptose⁷³. No que respeita ao NKP-1339, os estudos pré-clínicos demonstraram a sua utilidade como terapêutica coadjuvante no tratamento do cancro, dado que a sua atividade parece resultar num aumento da suscetibilidade das células tumorais para a terapêutica citotóxica⁷⁴.

O complexo imidazolium-*trans*-tetracloro(dimetilsulfóxido)-imidazole Ru(III) ou NAMI-A foi o primeiro complexo antitumoral de ruténio a entrar em fase de avaliação clínica. A designação pela qual é mais conhecido, NAMI-A, é o acrónimo para *Novel Antitumor Metastasis Inhibitor A*. Este composto é um sal de imidazole não higroscópico, com uma boa estabilidade no estado sólido e boa solubilidade em água⁷⁰.

O mecanismo exato pelo qual o NAMI-A atua ainda é desconhecido, contudo, estudos pré-clínicos demonstraram que a sua atividade aparenta ser independente do tipo de tumor primário, da fase de desenvolvimento do tumor e do tratamento a que já tenha sido sujeito⁷⁵. Embora o NAMI-A apresente uma atividade moderada sobre o tumor primário ao reduzir a capacidade metastática das células tumorais, são as metástases, aparentemente, o alvo preferencial deste complexo⁷⁶.

Relativamente à sua atividade antimetastática, vários mecanismos de ação foram estudados, *in vitro*, por Sava *et al.*:

- Modificação da estrutura do citoesqueleto da actina: esta modificação induz alterações na função das integrinas, o que resulta no aumento da adesão entre as células tumorais e consequentemente, na diminuição da locomoção das células e da capacidade de invasão de outros tecidos^{77,78}.

- Modificação da cápsula peritumoral: a ação do NAMI-A conduz ao aumento da matriz extracelular que rodeia o tumor, pela promoção de processos fibróticos, pela modelação da expressão de fatores de crescimento (TGFβ1) e pela ligação ao colagénio e estimulação da sua produção^{76,79}.

- Inibição da angiogénese: O NAMI-A demonstrou apresentar inibição da angiogénese, de forma dependente da dose, pela sua ação inibitória sobre o fator de crescimento endotelial vascular, sobre a quimiotaxia e sobre as enzimas de degradação da matriz extracelular (MMP-2 e MMP-9)⁸⁰.

Desta forma, o NAMI-A é capaz não só de evitar a formação de metástases, como também de inibir o seu crescimento quando já estabelecidas.

Adicionalmente, o complexo NAMI-A demonstrou ser capaz de bloquear, *in vitro*, a progressão do ciclo celular das células tumorais na fase G₂-M⁸¹.

Curiosamente, apesar do NAMI-A estabelecer ligações covalentes com os ácidos nucleicos e de estar demonstrado que a sua atividade citotóxica se relaciona com a interação que estabelece com o DNA, os poucos adutos intracadeia Ru-GG e Ru-GA que forma e a frequência esporádica com que estabelece ligações intercadeia poderão indicar uma forma de interação com o DNA diferente da cisplatina e justificar a razão pela qual apresenta uma atividade citotóxica pouco surpreendente, comparativamente aos complexos de platina⁸².

Os estudos de fase I, que sujeitaram 24 doentes com diferentes tipos de tumores sólidos a uma infusão endovenosa (e.v.) de NAMI-A durante três horas, por cinco dias, a cada três semanas, demonstraram que, de forma geral, o fármaco é bem tolerado. Os principais efeitos adversos observados foram vômitos, náuseas, reações de hipersensibilidade, flebites e a formação de bolhas dolorosas nas mãos e dedos. Os resultados do tratamento foram apenas avaliados em vinte dos 24 doentes que ingressaram no ensaio. Num doente (4%) com cancro do pulmão de células não pequenas verificou-se estabilização da doença por 21 semanas. Nos restantes 19 doentes (79%) observou-se progressão da doença⁶⁹.

Foram posteriormente realizados ensaios de fase I e fase II para o NAMI-A em combinação com a gencitabina, um fármaco da família dos antimetabolitos, em doentes com cancro do pulmão de células não pequenas tratados anteriormente com complexos de platina. O perfil de toxicidade observado foi consistente com o estudo anterior. Foram observadas, adicionalmente, nefrotoxicidade e neutropenia transientes, o que justificou, em alguns doentes, a interrupção do regime terapêutico. Entre os 27 doentes cuja resposta à combinação terapêutica foi avaliada, quinze (56%) mostraram beneficiar de atividade antitumoral, dez (37%) mantiveram a sua doença estabilizada por 6 a 8 semanas e apenas um doente (4%) demonstrou remissão parcial da doença quando tratado com 300 mg/m² de NAMI-A por 21 dias. Infelizmente, os resultados da eficácia do NAMI-A em monoterapia não foram promissores e a combinação com a gencitabina não demonstrou melhores resultados, pelo que os ensaios clínicos foram dados como terminados⁷⁰. Tal desfecho levou a que a continuidade da investigação no NAMI-A esteja a ser, no momento, repensada pelos investigadores que se têm dedicado exaustivamente ao seu estudo⁸³.

O complexo indazolium-*trans*-tetraclorobis(1H-indazole) ruténio(III) ou KP1019, tal como é conhecido, é um complexo de Ru(III), portador de dois heterociclos indazole

coordenados com o metal por via de duas ligações a átomos de azoto. Este composto é estável no estado sólido e moderadamente solúvel em água ⁷³.

Em ambiente fisiológico, o KP1019 reage rapidamente com as proteínas do plasma, sendo que, na corrente sanguínea, se liga preferencialmente à albumina sérica uma vez que a reação é termodinamicamente mais favorável, encontrando nesta proteína uma forma de “reservatório”. A transferrina, por sua vez, desempenha um papel importante no transporte do fármaco até aos tecidos tumorais ⁸⁴. Estudos pré-clínicos verificaram que a ativação do KP1019 não ocorre frequentemente na corrente sanguínea. Pelo contrário, é no interior das células tumorais que a redução de Ru(III) a Ru(II) acontece, favorecida pelo ambiente hipóxico intracelular. Os mesmos estudos demonstraram que esta redução é proporcionada pela glutatona que, ao se encontrar em maior concentração no interior das células, atua como agente redutor ^{84,85}. A glutatona, contudo, é também capaz de formar ligações de coordenação com o centro metálico do complexo, o que poderá afetar a atividade antitumoral do mesmo ⁸⁴.

Ao contrário do NAMI-A, o KP1019 possui atividade citotóxica direta, pela indução da apoptose num amplo espectro de modelos tumorais, incluindo linhas celulares resistentes à cisplatina. O mecanismo de promoção da apoptose parece estar relacionado com a despolarização das membranas mitocondriais, submodelação do fator antiapoptótico Bcl-2, ativação da caspase-3 e formação de espécies reativas de oxigénio ⁸⁶. Este processo aparenta ser independente da ação do p53, uma vez que a mutação do seu gene não impede a indução da apoptose nas células portadoras. Desta forma, os estudos pré-clínicos sugerem que a interação com o DNA não é o principal mecanismo de ação do KP1019 ⁸⁴.

No seguimento do NAMI-A, o KP1019 foi o segundo complexo de Ru(III) a ser avaliado clinicamente. No ensaio de fase I, foram selecionados sete doentes com diferentes tipos de tumores sólidos refratários à terapêutica de primeira linha. Os doentes foram tratados com uma infusão e.v. de 25 a 600 mg de KP1019, duas vezes por semana, num período de três semanas. Cinco de seis doentes que foram avaliados quanto à resposta à terapêutica experienciaram estabilização da doença por oito a dez semanas. Neste estudo, não foram mencionados efeitos adversos limitantes da dose ou de maior gravidade ^{71,87}.

O complexo sódio-*trans*-tetraclorobis(1H-indazole) Ru(III), NKP-1339 ou IT-139, de acordo com a nova designação, é o sal de sódio análogo do composto KP1019, de elevada solubilidade em água. Este complexo apresenta resultados promissores no cancro do pulmão de células não pequenas, no cancro colorretal e no cancro gastrointestinal neuroendócrino ^{74,88}.

A ligação às proteínas plasmáticas, o mecanismo de ativação por redução e restantes propriedades farmacocinéticas são, tal como seria de esperar, idênticas às do KP1019. Porém, o IT-139 não dispõe de atividade citotóxica ou antimetastática, como é o caso dos seus dois análogos KP1019 e NAMI-A. O mecanismo pelo qual se torna ativo é diferente de todos os outros até então propostos⁸⁸.

O IT-139 atua como agente coadjuvante na terapêutica do cancro pela modelação do stress oxidativo desencadeado pela GRP78, uma proteína *chaperone* do retículo endoplasmático (RE) com uma função chave na regulação do stress do RE, na autofagia, anti-apoptose e sobrevivência celular, com influência a nível da progressão tumoral e da resistência aos fármacos citotóxicos. Estudos pré-clínicos confirmaram a ação do IT-139 na regulação da concentração da GRP78 em resposta ao stress oxidativo das células tumorais. Em combinação com outros fármacos com ação citotóxica, a atividade do IT-139 mostrou bons resultados, aumentando a suscetibilidade das células tumorais ao tratamento e diminuindo a ocorrência de processos de resistência aos fármacos^{72,88}.

O IT-139 é o mais recente composto de Ru(III) cujos resultados dos ensaios clínicos foram publicados. O ensaio de fase I contou com 46 doentes com tumores sólidos refratários ao tratamento. Nesta fase, os doentes foram tratados com IT-139 em doses variáveis entre 20 e 780 mg/m². Adicionalmente, dezoito dos 46 doentes participaram numa coorte de expansão. Foram tratados com 625 mg/m², dose esta que foi determinada como sendo a dose máxima tolerável pelo estudo anterior. Efeitos adversos emergentes do tratamento foram registados em mais de 20% dos doentes. Estes incluíram náuseas, vômitos, fadiga, anemia e desidratação. Quinze doentes (33%) manifestaram reações adversas graves e cinco doentes (11%) abandonaram o estudo devido à ocorrência de efeitos adversos considerados graves como astenia, fibrilação arterial, dor nas costas, alteração do estado mental e pneumonia. Neste estudo, não foram registados sinais de toxicidade renal associada ao fármaco. Dos 38 doentes cuja eficácia da terapêutica foi avaliada, um obteve uma resposta parcial e nove obtiveram estabilização da doença por uma duração aproximada de nove semanas⁷².

O atual interesse no desenvolvimento de compostos organometálicos de Ru(II) com aplicações no tratamento antitumoral resultou na identificação de novas classes de compostos de coordenação com geometrias e mecanismos de ação distintos.

A família de hidrocarbonetos aromáticos de Ru(II) “*half-sandwich*” (RAPTA), de fórmula geral [Ru(η^6 -hidrocarboneto)(PTA)XY], PTA = 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano,

representa uma das classes de compostos organometálicos em maior crescimento. Esta classe de compostos é também, habitualmente, referida como “*piano-stool*” devido à sua geometria semelhante a um banco de três pernas. Nesta família de compostos, o Ru(II) encontra-se estabilizado por um ligando hidrocarboneto aromático, com o qual estabelece uma ligação coordenada η^6 em três dos locais de coordenação. Um outro local de coordenação encontra-se preenchido pelo ligando monodentado PTA. Este desempenha um papel importante na modulação da solubilidade do fármaco em água. Os restantes dois locais de coordenação são usualmente preenchidos por ligandos relativamente lábeis (X e Y, na fórmula geral), que são cruciais na modelação da reatividade do fármaco (Figura I-6) ⁸⁹. A fórmula geral dos compostos RAPTA oferece, assim, um grande número de oportunidades de funcionalização dos dois locais de coordenação disponíveis e derivatização do hidrocarboneto aromático, com impacto na bioatividade e reatividade dos fármacos (Figura I-6) ⁹⁰.

O modo de atuação dos compostos RAPTA aparenta ser independente do DNA. Alguns estudos com oligonucleótidos demonstraram que não existe uma correlação direta entre a ligação aos oligonucleótidos e a citotoxicidade apresentada por estes compostos. A sua atividade antitumoral parece estar, então, relacionada com a interação que estabelecem com duas proteínas, a catepsina B e a tioredoxina redutase. A catepsina B é responsável pela degradação dos componentes da matriz extracelular, com efeito na migração e invasão de muitos tumores humanos, enquanto a tioredoxina redutase desempenha um papel importante no estado de oxidação celular. Estudos pré-clínicos revelaram que os compostos RAPTA são potentes inibidores da catepsina B enquanto a inibição da tioredoxina redutase parece ser modesta e pouco relevante na sua atividade ⁹¹.

O primeiro composto da família RAPTA a ser descrito na literatura foi o complexo de fórmula $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}_2(\text{PTA})]$, mais tarde, abreviado para RAPTA-C ⁸⁹. Embora apresente baixa atividade *in vitro*, quando estudado *in vivo*, este composto, demonstrou atuar efetivamente na redução do número e tamanho de metástases pulmonares associado a uma boa tolerabilidade sistémica ⁹⁰.

Na sequência dos resultados promissores demonstrados pelos derivados do ferroceno, o estudo sobre o potencial antitumoral dos compostos organometálicos de Ru(II) de fórmula química $(\text{C}_5\text{H}_5)_2\text{Ru}$, os rutenocenos, têm-se intensificado. Alguns compostos desta família têm revelado atividades biológicas superiores aos complexos análogos de ferro e, inclusive, atividades citotóxicas superiores à cisplatina ^{92,93}.

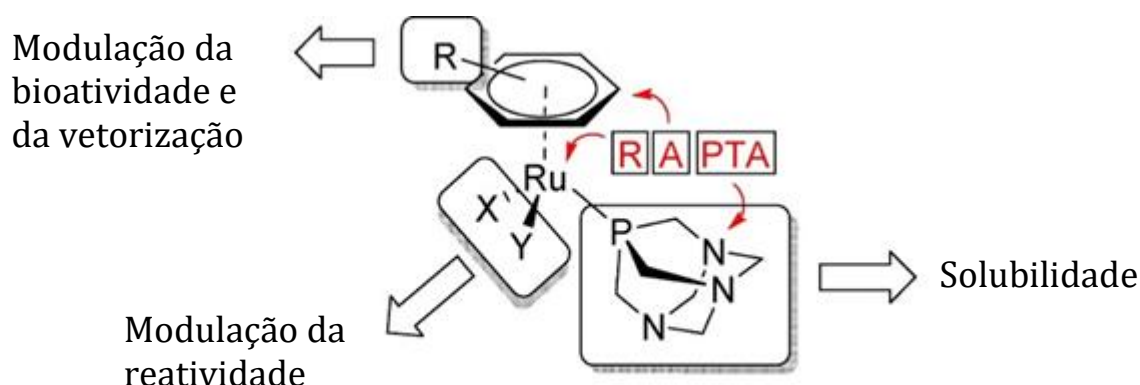
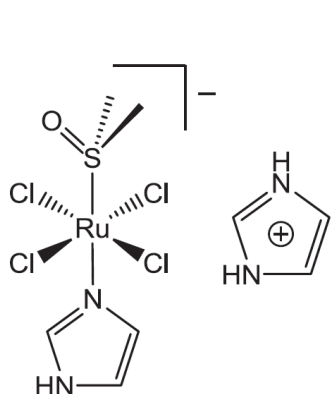


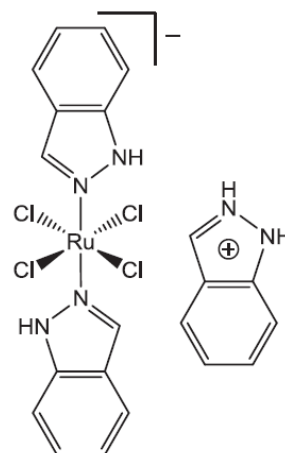
Figura I-6. Possibilidade de derivatização e funcionalização da fórmula geral dos compostos RAPTA, com impacto na bioatividade, reatividade e solubilidade dos fármacos (adaptado de ⁸⁹).

Os complexos de Ru(II) polipiridil representam uma outra classe de compostos muito explorada pelas propriedades fotoluminescentes e intercalantes atribuídas pelos seus ligandos. Esta família de compostos distingue-se pela sua aplicabilidade como sondas moleculares e agentes antitumorais. As polipiridinas são ligandos polidentados que conferem forma, quiralidade e fotoluminescência aos complexos de rutênio. As polipiridinas como a 2,2'-bipiridina (bpy), a 1,10-fenantrolina (phen) e a 2,2':6'2''-terpiridina (tpy) são também ligandos heteroaromáticos com atividade intercalante, o que explica a razão pela qual tem sido estudada a sua utilização na terapêutica do cancro ^{33,94,95}. A intercalação parece ser o modo de atuação contra as células tumorais mais provável para esta classe de compostos ^{96,97}. No entanto, outros mecanismos de ação têm sido discutidos na literatura e alguns estudos têm demonstrado que esta classe pode também atuar pela fotoclivagem do DNA ^{97,98}, pela ligação ao DNA ativada pela luz ⁹⁹ e pela indução da apoptose através da desregulação da expressão da proteína Bcl-2, com perda do potencial membranar mitocondrial e libertação de fatores apoptóticos e através da ativação da caspase-9 ¹⁰⁰.

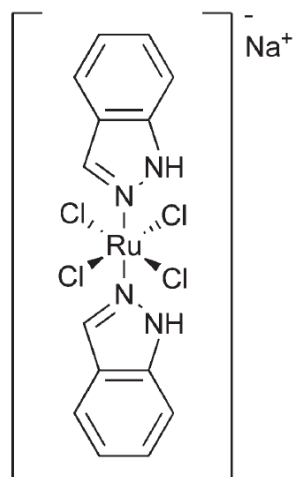
COMPOSTOS DE RUTÊNIO EM ESTUDO



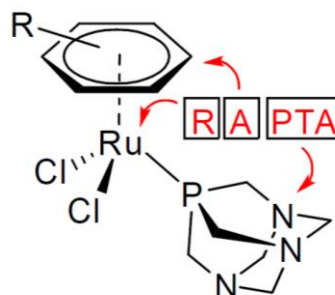
j



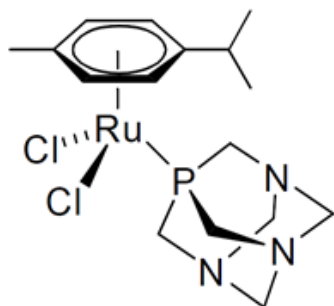
k



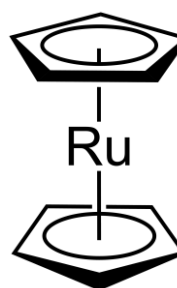
l



m



n



o

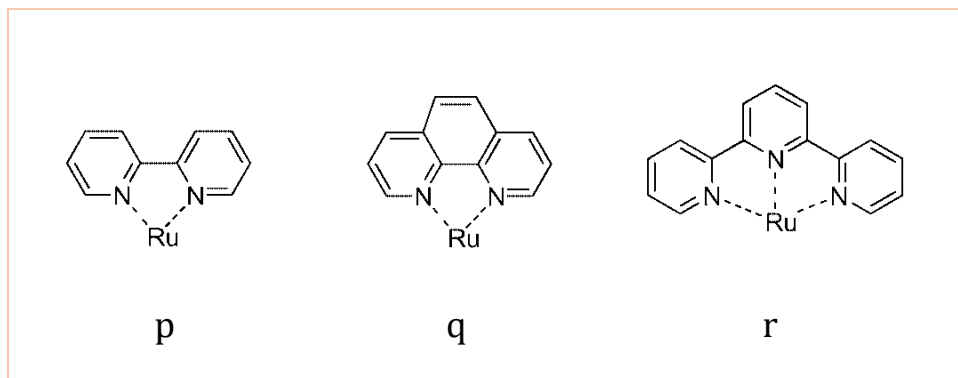


Figura I-7. Estruturas químicas dos compostos de rutênio em estudo: NAMI-A (j), KP1019 (k), IT-139 (l), RAPTA (m), RAPTA-C (n), Rutenoceno (o), 2,2-bipiridina (p), 1,10-fenantrolina (q), 2,2':6'2''-terpiridina (r)
68,94,101-103

1.2.2.1.3. Relação Estrutura – Atividade

Um dos aspetos negativos no desenvolvimento de compostos biologicamente ativos de rutênio é precisamente a falta de informação sobre a relação estrutura-atividade dos compostos em estudo e a complexidade inerente a esta temática. Ao contrário do que acontece com os compostos de natureza orgânica, na química do rutênio existem dezenas de famílias e centenas de compostos que diferem entre si no que concerne à sua estrutura e comportamento biológico, frequentemente sem uma relação clara. Um exemplo simples do ponto de vista que se apresenta é o caso da semelhança e, ao mesmo tempo, da diferença entre os compostos NAMI-A e KP418¹⁰⁴. Estruturalmente, distinguem-se apenas pela substituição de um ligando monodentado (Figura I-8). Um dos grupos imidazole presentes no composto KP418 encontra-se substituído pelo ligando dimetilsulfóxido na posição axial da estrutura do NAMI-A¹⁰⁵. Esta diferença resulta em atividades biológicas distintas. Enquanto o NAMI-A demonstrou ser ativo, *in vivo*, contra metástases, o KP418 apresentou apenas moderada atividade citotóxica *in vivo* devido à captação dificultada do fármaco pelas células, embora nunca comprovado¹⁰⁶. Apesar da significativa disparidade na atividade *in vivo* destes dois compostos, NAMI-A e KP418 partilham, curiosamente, os mesmos parâmetros farmacocinéticos em modelos animais, a mesma concentração sanguínea (na fração ligada e livre) e a mesma distribuição nos órgãos e tecidos⁸¹. Contudo, no que respeita à relação estrutura-atividade dos mesmos compostos, muito ainda há para conhecer. Neste sentido, a investigação deverá direccionar-se para o estudo quantitativo da relação estrutura-atividade, com o objetivo de perceber como é que a alteração de grupos funcionais influencia a atividade antitumoral destes compostos¹⁰⁷.

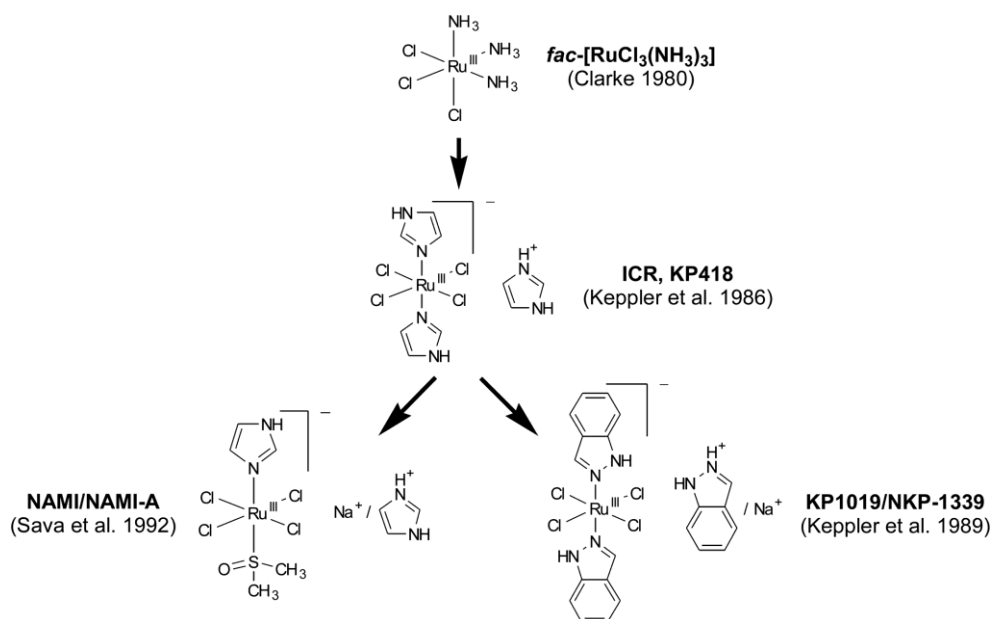


Figura I-8. Esquema genealógico dos compostos de rutênio antitumorais ⁷⁴.

1.3. Encapsulamento em Contentores Moleculares

A distribuição ou *drug delivery*, como é referida na literatura, é uma parte fundamental no *design* e desenvolvimento de novos fármacos. Idealmente, a distribuição de um fármaco deverá percorrer a corrente sanguínea e atingir o tecido ou órgão alvo, com o efeito farmacológico desejado e o mínimo de efeitos adversos possível. Para que este objetivo seja cumprido, o princípio ativo do fármaco deverá estar disponível em tempo útil e em quantidade no local de ação. A biodisponibilidade de um fármaco é afetada por propriedades como a solubilidade, a estabilidade na formulação e no organismo humano, a habilidade para atravessar membranas, a toxicidade e a forma como o fármaco é distribuído e metabolizado nos diversos órgãos ¹⁰⁸.

O encapsulamento em contentores moleculares macrocíclicos é um dos métodos em estudo para o aperfeiçoamento da biodisponibilidade, da distribuição direcionada para o alvo e, por consequência, da bioatividade dos fármacos ¹⁰⁹. Os macrociclos são moléculas que contêm uma sequência cíclica de, pelo menos, doze átomos e que, ao contrário de outras classes de veículos moleculares, são capazes de sequestrar os fármacos para o interior da sua cavidade e providenciar uma proteção física à degradação e desativação dos mesmos ^{109,110}. Os hospedeiros macrocíclicos como as ciclodextrinas, os calixarenos, os *pillarplexes* e os *pillararenes* têm sido alvo de muita investigação centrada no seu potencial enquanto veículos de transporte molecular,

muitas vezes, oferecendo melhor solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade ao fármaco ¹¹¹⁻¹¹⁵.

Uma jovem família de hospedeiros macrocíclicos, os cucurbiturilos (CB[n], n=5-8,10) tem sido objeto de grande atenção por parte da comunidade científica pelas suas propriedades químicas promissoras, com potencial de utilização como veículos moleculares no transporte e distribuição de fármacos ^{110,116}.

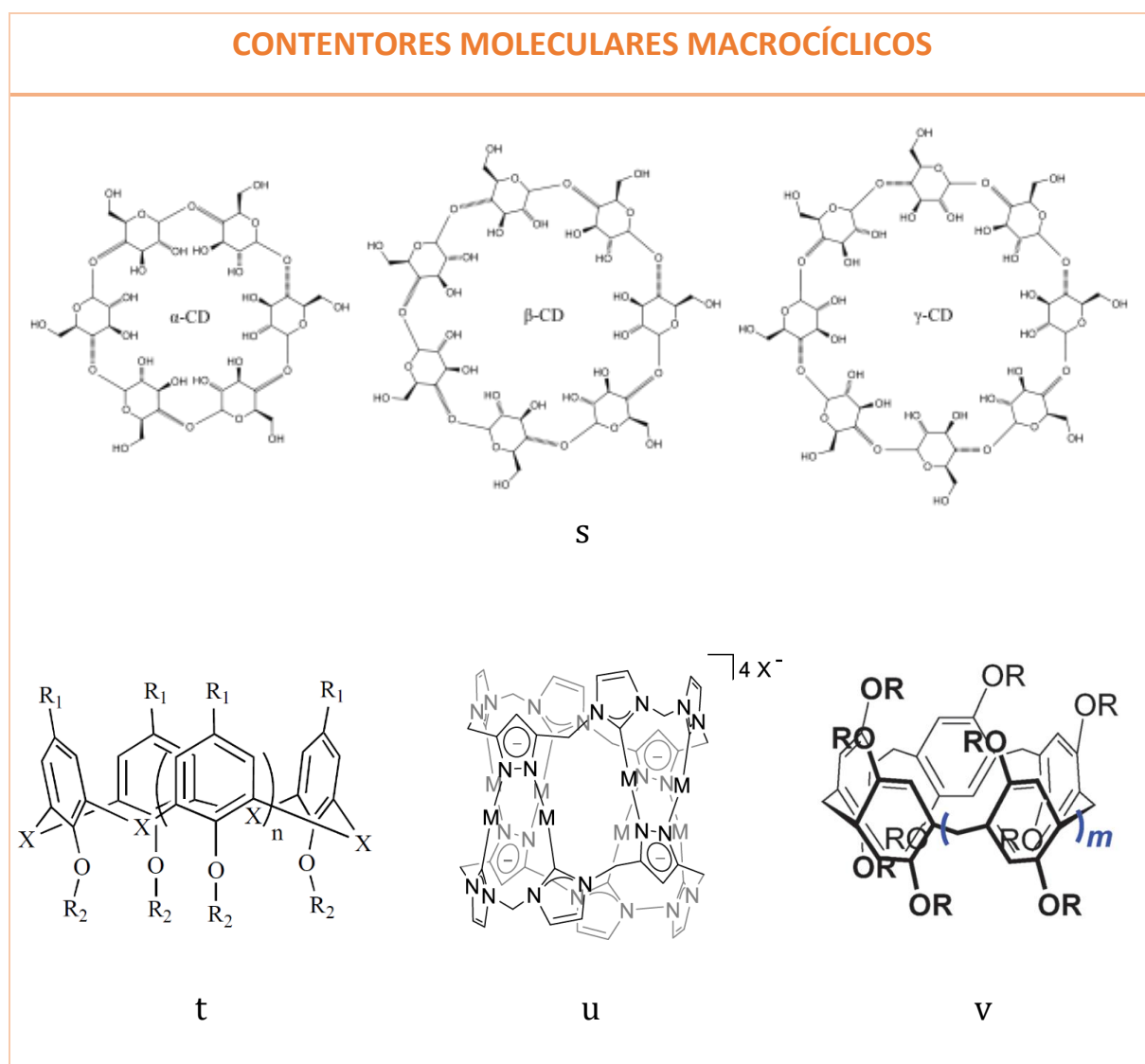


Figura I-9. Estruturas químicas dos contentores moleculares macrocíclicos em estudo: α -, β -, e γ -Ciclodextrinas (s), calixarenos (X=CH₂, S; n=1, 3, 5) (t), pillarplexes (M=Ag(I), Au(I); X=PF₆, OAc) (u), pillararenes (v) ^{111,112,114,115}.

1.3.1. Cucurbit[n]urilos

Os cucurbiturilos (CB[n], n=5-8,10) são macromoléculas cíclicas constituídas por n unidades de glicolurilo ligados por 2n unidades de metileno (Figura I-10). O produto da reação de condensação do glicolurilo com o formaldeído, catalisada em meio ácido, foi identificado, pela primeira vez, por Behrend, em 1905, como um material branco com boa solubilidade em água na presença de grupos ácidos. Anos mais tarde, em 1981, Mock e os seus colaboradores caracterizaram a estrutura do produto mistério como um hexâmero macrocíclico com uma geometria semelhante a uma abóbora. O seu grupo nomeou o produto que haviam identificado como “cucurbiturilo” em consideração ao nome botânico da família das abóboras (*Cucurbitaceae*)^{116,117}.

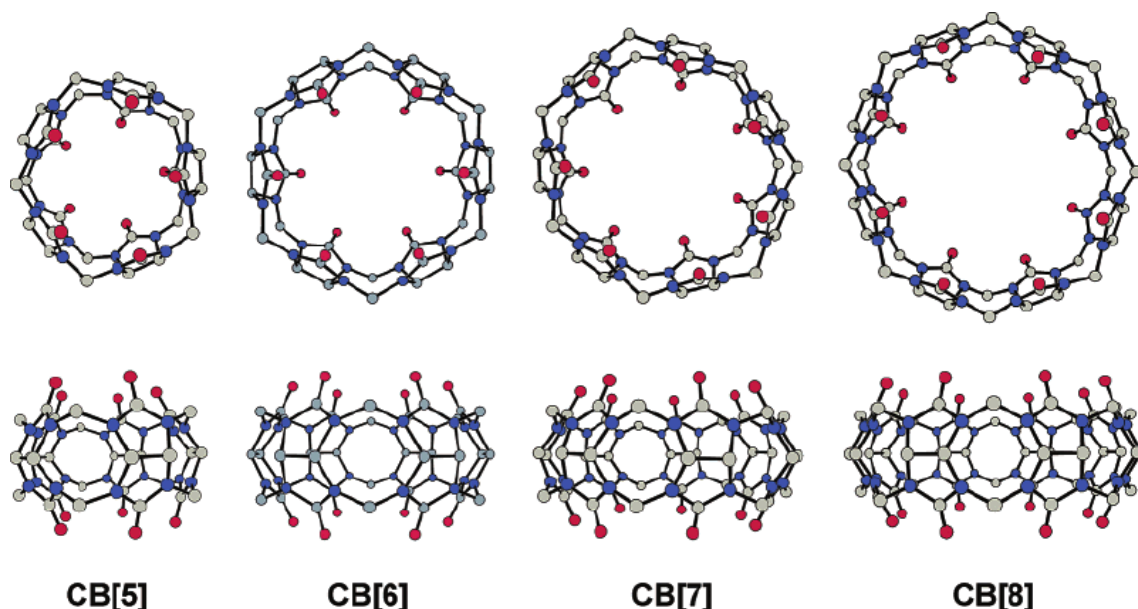


Figura I-10. Estrutura cristalina em Raio-X dos CB[n] (n=5-8). Código de cores: carbono (cinzento), azoto (azul); oxigênio (vermelho)¹¹⁸.

A síntese dos cucurbiturilos segue, ainda hoje, o protocolo original de Behrend com algumas variações nas condições da reação (80-100°C, HCl, 10-100h), que mostraram ser extremamente importantes para o sucesso da síntese e do isolamento dos cinco homólogos conhecidos, embora o CB[6] continue a ser o produto predominante da reação¹¹⁹.

Todos os macrociclos desta família apresentam a mesma altura (9.1 Å), contudo diferentes diâmetros do portal e da cavidade consoante o número de unidade glicolurilo que os

compõe (Tabela I-1). Quanto à sua estrutura, os cucurbiturilos diferem de muitos outros hospedeiros macrocíclicos por apresentarem uma geometria simétrica e um esqueleto bastante rígido^{110,119}.

O CB[6], o CB[7] e o CB[8] são os hospedeiros com a maior aplicabilidade no transporte e distribuição de fármacos uma vez que no caso do CB[5], a sua cavidade interna estreita impede a incorporação de fármacos e no caso do CB[10], o seu interior amplo dificulta, por vezes, a formação de ligações estáveis com o hóspede¹¹⁰.

Tabela I-1. Parâmetros estruturais dos homólogos CB[n] (adaptado de¹¹⁹).

	Diâmetro externo	Cavidade interna		Altura
		a	b	
CB5	13.1	4.4	2.4	9.1
CB6	14.4	5.8	3.9	9.1
CB7	16.0	7.3	5.4	9.1
CB8	17.5	8.8	6.9	9.1
CB10	20.0	11.7	10.0	9.1

a Valores do diâmetro interno do portal. b Valores do diâmetro do centro da cavidade interna.

Nos últimos anos, a literatura científica tem-nos apresentado com a encapsulação de diversas moléculas com interesse farmacológico em cucurbiturilos entre as quais se incluem agentes antitumorais de platina e metallocenos, vitamina B12, anestéticos locais, anticoagulantes e fármacos para o tratamento da tuberculose. A formação de complexos “*host-guest*” pode proporcionar muitos benefícios para o fármaco encapsulado como a estabilidade química e física, a solubilidade e a libertação controlada no órgão ou tecido alvo¹¹⁰.

1.3.1.1. A Química dos Cucurbiturilos

Os traços estruturais que melhor caracterizam esta família de contentores moleculares são a sua cavidade hidrofóbica e os portais carregados negativamente graças à presença de grupos carbonilo direcionados para o exterior. A elevada densidade eletrónica presente nos átomos de oxigénio dos grupos carbonilo proporcionam um elevado potencial electrostático, o que permite explicar a sua funcionalidade como recetores catiónicos. Por outro lado, a cavidade não dispõe de grupos funcionais nem pares de eletrões voltados para o interior, o que

impossibilita a formação de ligações de hidrogénio com os hóspedes. Este facto juntamente com o conhecimento da natureza apolar do cucurbiturilo fornecem uma justificação racional para a hidrofobicidade da cavidade. A natureza apolar da cavidade em conjunto com a natureza polar dos portais concede aos cucurbiturilos um elevado momento quadrupolar, que possibilita a formação de interações eletrostáticas de elevadas ordens de ligação ¹¹⁹. Este conjunto de características permite que se estabeleçam interações “*host-guest*” com afinidades superiores (10^3 - 10^{10} M⁻¹) às observadas com as ciclodextrinas e com os calixarenos ^{116,119}.

Adicionalmente, estudos sobre a cinética de formação e dissociação dos complexos de inclusão mostraram que a curvatura das unidades de glicolurilo resulta em portais mais estreitos do que a própria cavidade do cucurbiturilo, o que conduz a uma cinética de troca de hóspedes muito reduzida e uma ligação “*host-guest*” favorecida ¹²⁰.

Uma compreensão alargada sobre o microambiente físico da cavidade interna dos cucurbiturilos é fundamental no entendimento das ligações que o macrociclo estabelece com o hóspede. Quando o hóspede é encapsulado no interior da cavidade do cucurbiturilo, os seus espetros de absorção, fluorescência e RMN têm tendência a alterar-se. Tais alterações induzidas pela complexação sugerem mudanças no ambiente eletrónico e magnético circundante ^{116,119}.

Muitas das interações não covalentes que os fármacos empregam na ligação com os seus alvos biológicos podem ser observadas na complexação com os cucurbiturilos. Estas incluem interações hidrofóbicas, ligações de hidrogénio e interações ião-dipolo e dipolo-dipolo. As dimensões variadas da cavidade hidrofóbica dos diversos membros da família dos cucurbiturilos podem acomodar componentes hidrofóbicos do fármaco de tamanhos específicos. A presença dos grupos carbonilo nos portais do cucurbiturilo e a presença de grupos carregados positivamente no hóspede podem aumentar significativamente a estabilidade do complexo de inclusão ¹¹⁶. Da mesma forma, também a hidrofobicidade do hóspede desempenha um papel relevante na estabilidade do complexo de inclusão “*host-guest*” ¹¹⁹.

Com a intenção de prever a estabilidade dos complexos “*host-guest*”, um grupo de investigadores, Rebek e Mecozzi introduziu um indicador da viabilidade estereoquímica do ajuste dos complexos de inclusão, o coeficiente de empacotamento, que se traduz na razão entre o tamanho da molécula hóspede e o volume da cavidade do hospedeiro. A melhor afinidade de ligação para o complexo de inclusão resulta de uma razão de, aproximadamente, 55%. Valores superiores ou inferiores são indicativos de afinidades de ligação menores. O coeficiente de

empacotamento pode, desta forma, ser um bom método indicador na previsão da estabilidade dos complexos de inclusão ¹²¹.

A primeira molécula cujo encapsulamento em cucurbiturilos foi demonstrado experimentalmente foi a água, mais precisamente com o CB[6]. Por curiosidade, os cucurbiturilos podem hospedar, dependendo do volume da sua cavidade, entre duas (CB[5]) e 22 moléculas de água (CB[10]) ¹¹⁹.

Na última década foi publicado um número surpreendente de artigos referentes a interações entre cucurbiturilos e catiões metálicos com respetivos contra-íões. Os cucurbiturilos interagem com os catiões metálicos pelos seus dois portais carbonílicos. Porém, a maioria dos metais não se acomoda no centro do portal, interagindo apenas com uma fração dos átomos de oxigénio presentes nesses portais. No caso dos metais alcalinos e alcalinoterrosos vários catiões podem ocupar o mesmo portal. Pelo contrário, os metais de transição não interagem diretamente com os oxigénios dos portais. A ligação ocorre entre os grupos carbonilo e as moléculas de água coordenadas. A afinidade de ligação do metal ao cucurbiturilo é grandemente dependente do solvente, assim como da estequiometria da reação ¹²². A complexação de catiões metálicos com os portais dos cucurbiturilos tem sido muito explorada na catálise de reações organometálicas ¹¹⁹.

A encapsulação em cucurbiturilos pode ainda estabilizar a forma neutra ou aniónica de um fármaco pois para alguns hóspedes a ligação mostrou influenciar significativamente o pKa dos grupos funcionais. A direção da mudança do pKa depende da natureza dos hospedeiros e da sua preferência pela ligação da forma protonada ou da forma conjugada. Na complexação pelos cucurbiturilos, observa-se, geralmente um aumento no valor de pKa devido à preferência pela forma protonada. As alterações de pKa podem resultar em vários efeitos como o aumento da solubilidade dos fármacos e da sua captação celular ^{110,116}.

Tal como acontece com as ciclodextrinas e os calixarenos, a solubilidade em água de todos os análogos da família dos cucurbiturilos é relativamente baixa. Os cucurbiturilos de número ímpar de unidades de glicolurilo, CB[5] e CB[7], são moderadamente solúveis (aproximadamente, 3-4 mM), enquanto os cucurbiturilos de número par apresentam um solubilidade inferior a 50 µM, sendo a solubilidade do CB[8] consideravelmente inferior à do CB[6]. Surpreendentemente, a solubilidade destes macrociclos em meio fisiológico é muito superior ao expectável ¹¹⁰.

As elevadas concentrações salinas e acídicas dos meios biológicos possibilitam a solubilização dos cucurbiturilos e dos seus complexos de inclusão em concentrações terapêuticas. Porém, é importante lembrar que os catiões que enriquecem os fluidos biológicos são passíveis de se ligar aos portais dos cucurbiturilos, o que pode afetar a libertação dos fármacos e a sua interação com o contentor. Por outro lado, este efeito pode ser benéfico na medida em que, para fármacos de dimensões reduzidas e com dificuldade em encapsular na totalidade, os catiões podem funcionar como tampas, reduzindo ou evitando a libertação destes fármacos ^{110,123}.

Adicionalmente, em muitos complexos de inclusão, a solubilidade aquosa do cucurbiturilo pode ser melhorada pela interação com o fármaco ou, alternativamente, o cucurbiturilo pode ter um efeito positivo no aumento da solubilidade do fármaco. Por outro lado, a situação contrária também já foi observada. A formação de complexos de inclusão pode, noutras circunstâncias, diminuir significativamente a solubilidade do fármaco encapsulado ¹¹⁰.

Os fármacos hidrofóbicos podem beneficiar, particularmente, da complexação com os cucurbiturilos, uma vez que o seu encapsulamento reduz a probabilidade de ocorrência de agregação molecular ¹¹⁶

Perfis completos de toxicidade, farmacocinética e farmacodinâmica para os diversos macrociclos da classe dos cucurbiturilos ainda estão por determinar. No entanto, até ao presente, muitos estudos já demonstraram a segurança destes hospedeiros moleculares ¹¹⁰.

Ensaio *in vitro* com cucurbiturilos na forma livre e com alguns cucurbiturilos funcionalizados relataram, praticamente, ausência de citotoxicidade até concentrações milimolares ¹²⁴. Estes ensaios incluíram experiências com recurso a linhas celulares animais e humanas, tanto saudáveis como tumorais. Os cucurbiturilos demonstraram também ser inofensivos para algumas espécies bacterianas ¹²⁴. A técnica de marcação fluorescente com CB[7] e CB[8] demonstrou que os cucurbiturilos são capazes de atravessar as membranas celulares, tendo sido já demonstrada a internalização em linhas celulares de macrófagos ^{124,125}. A técnica de imagiologia determinou, pela atividade mitocondrial, que os cucurbiturilos aparentam não apresentar toxicidade para as células ¹²⁶. Estes dados ajudaram a comprovar que a ausência de toxicidade nas células de mamíferos e bactérias não está associada à falta de captação celular.

Ensaio *in vivo* também já foram realizados com cucurbiturilos, contudo apenas em ratos. Quando aplicado em administração e.v., o CB[7] demonstrou ser bem tolerado até à dose

máxima de 250 mg/kg. Por outro lado, uma mistura 1:1 de CB[7] e CB[8], quando administrada oralmente, mostrou ausência de efeitos adversos até à dose de 600 mg/kg. A ausência de toxicidade observada na administração oral permite concluir que a toxicidade por esta via é ainda mais baixa que por via e.v.¹²⁶.

1.3.1.2. A Aplicabilidade Médica dos Cucurbiturilos

A aplicação dos cucurbiturilos na distribuição e transporte de fármacos, como agentes promotores da estabilidade química é, de longe, o uso mais explorado e com maior potencial para esta família de contentores moleculares. Esta potencialidade é bem exemplificada pela sua ampla aplicação como veículos de fármacos antitumorais derivados da platina¹¹⁰.

O encapsulamento parcial ou total dos fármacos de platina no interior da cavidade do cucurbiturilo oferece uma excelente proteção física contra a degradação química provocada pelas reações entre estes compostos e os agentes biológicos nucleofílicos. Um dos desafios na utilização de fármacos antitumorais de platina é a redução da sua toxicidade sistémica e a prevenção da sua hidrólise e degradação por proteínas portadoras de grupos tiol, circulantes na corrente sanguínea e por agentes nucleofílicos, no interior das células. A complexação pelos cucurbiturilos é estabilizada por ligações de hidrogénio entre os grupos amina dos fármacos derivados da platina e os grupos carbonilo presentes nos portais dos cucurbiturilos. A ligação posiciona o centro metálico de platina entre a cavidade e o portal do macrociclo. Os grupos carbonilo atuam, assim, como um escudo físico que impede o ataque nucleofílico. O encapsulamento dos compostos de platina em macrociclos CB[7] e CB[8] reduz, consideravelmente, as interações que os fármacos estabelecem com a cisteína e a glutatona. Comparativamente, o CB[8] exibe uma maior proteção contra estes agentes do que o CB[7] uma vez que promove um melhor encapsulamento do centro metálico no interior dos portais. A menor taxa de reatividade resulta numa redução significativa da gravidade dos efeitos adversos dos compostos de platina. Curiosamente, o complexo cisplatina–CB[7] é ativo quando administrado oralmente, uma via de administração que era, até então, impensável para a cisplatina. A reduzida solubilidade do CB[6] pode constituir um elemento favorável na preparação de formulações de administração oral dada a facilidade com que forma partículas microcristalinas^{110,116}. Para além disso, a elevada solubilidade do CB[6] no fluído nasal torna este macrociclo um excelente candidato como veículo de fármacos em formulações de administração nasal¹¹⁰.

A complexação dos agentes de platina antitumorais pelos cucurbiturilos tem consequências variáveis no que respeita à sua citotoxicidade nas linhas celulares tumorais onde atuam. No caso da oxaliplatina, que se encontra aprovada para o tratamento do cancro colorretal, o complexo de inclusão com o CB[7] demonstrou quinze vezes menor eficácia na linha celular HCT-15 e mostrou semelhante perda de eficácia contra outras linhas ¹²⁷. Por outro lado, para o caso da cisplatina, o complexo de inclusão com o CB[7] é tão citotóxico nas linhas celulares do carcinoma do ovário, A2780, como na sua forma livre e nas linhas celulares resistentes à cisplatina A2789/cp70, o complexo cisplatina-CB[7] inibiu, significativamente, o crescimento tumoral, acontecimento que parece estar associado a efeitos farmacocinéticos, como o aumento da biodisponibilidade do fármaco ¹²⁸.

Se o encapsulamento dos compostos de platina em cucurbiturilos está amplamente estudado, o mesmo não acontece com os compostos antitumorais de ruténio, cujo estudo da complexação pelos cucurbiturilos se encontra em progressão e tem ainda um grande caminho a percorrer. O grupo de investigadores Pisani *et al.* estudou o encapsulamento pelo CB[10] de dois compostos dinucleares de Pt(II) e Ru(II), CT008 e Rubb₅, respetivamente. Os resultados do estudo indicaram que ambos os compostos são hospedados pelo CB[10], no entanto, o complexo de inclusão CB[10]-CT008 precipita a pH 7, o que é sugestivo de que este macrociclo não é, possivelmente, o veículo mais adequado para o transporte de compostos de platina. Por outro lado, o composto de Ru(II) dinuclear, Rubb₅, forma com o CB[10] um complexo de inclusão com elevada afinidade, estável e solúvel em água. A cadeia apolar de metileno é acomodada no interior da cavidade do cucurbiturilo, onde é estabilizada por interações de Van der Waals. O complexo de inclusão é, concomitantemente, estabilizado por interações eletrostáticas entre os centros metálicos do ruténio e os grupos carbonilo dos portais. Adicionalmente, o complexo CB[10]-Rubb₅ destaca-se por uma cinética de associação/dissociação lenta, característica que é de particular interesse no transporte e distribuição de fármacos. Concluindo, os resultados deste estudo demonstram que o CB[10] tem um enorme potencial como veículo molecular para compostos volumosos baseados nos complexos de Ru(II) polipiridil ¹²⁹.

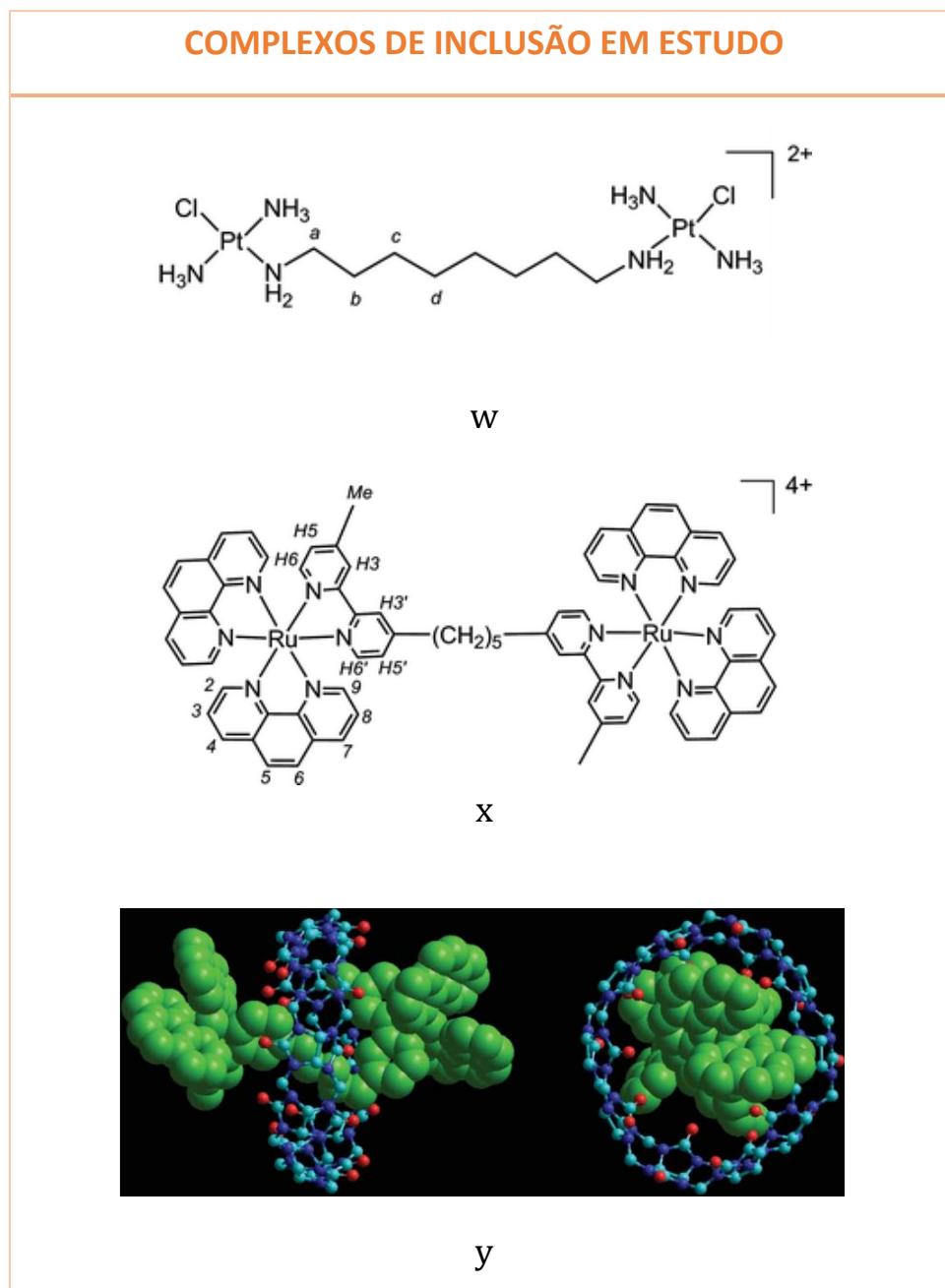


Figura I-11. Estruturas químicas do CT008 (*w*) e do Rubb₅ (*x*) e modelo molecular do Rubb₅ encapsulado pelo CB[10] (*y*)¹³⁰.

Adicionalmente, os cucurbiturilos podem potencialmente desempenhar um papel ativo como veículos de distribuição e transporte de nanopartículas desenhadas para a liberação controlada de fármacos. Os cucurbiturilos podem prestar um grande contributo neste âmbito visto que são capazes de mascarar a citotoxicidade inerente das nanopartículas, possibilitando, desta forma, uma administração segura de elevadas doses de fármaco. Uma vez no interior das

células tumorais a administração de adamantilamina, uma molécula com grande afinidade para os cucurbiturilos, promove a dissociação intracelular do complexo de inclusão com consequente libertação das nanopartículas e ativação *in situ* da sua citotoxicidade ¹³¹.

A funcionalização dos cucurbiturilos tem sido uma tendência atual, igualmente promissora, no transporte direcionado dos fármacos quimioterápicos às células tumorais. Algumas linhas celulares tumorais sobre expressam na superfície celular proteínas ou péptidos, como os recetores dos hidratos de carbono que medeiam a entrega direcionada intracelular de fármacos. Neste sentido, foram desenvolvidos derivados dos cucurbiturilos funcionalizados, portadores de hidratos de carbono ligados no centro do diâmetro externo dos macrociclos. Os cucurbiturilos funcionalizados são direcionados para os tecidos tumorais e captados para o interior das células. Comparativamente com os macrociclos simples, esta recente alternativa oferece vantagens, conseguindo uma absorção celular significativamente superior ^{132,133}.

Após um século desde a primeira síntese do CB[6] e após uma década do desenvolvimento de métodos de preparação dos restantes análogos, esta família de macrociclos tem provado, estudo após estudo, possuir um conjunto de características notáveis capazes de modificar, em soluções aquosas, as propriedades químicas, físicas e espectroscópicas de um amplo espectro de hóspedes moleculares. O futuro dos cucurbiturilos, no que concerne à distribuição dirigida e à libertação controlada de fármacos é, sem margem para dúvidas, deveras promissor ¹¹⁶.

II. OBJETIVOS DO TRABALHO

Com a incidência e a mortalidade por cancro a crescerem tendencialmente, torna-se urgente o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais e de novas estratégias para ultrapassar a resistência adquirida e os efeitos adversos associados às terapêuticas atuais.

Neste âmbito, o presente trabalho teve como objetivo principal sintetizar três compostos terpiridínicos de Ru(II) e um composto terpiridínico de Ru(III) já publicados, cuja atividade antitumoral foi estudada em linhas celulares do carcinoma do pulmão e do carcinoma do cólon, por Lazić *et al.*¹³⁴ e avaliar a possibilidade de encapsulamento dos compostos sintetizados nos contedores moleculares CB[7] e CB[8].

A escolha dos compostos que integraram este trabalho respeitou os critérios de atividade citotóxica testada em linhas celulares tumorais, de facilidade de síntese e de acesso aos reagentes necessários e de interesse para o estudo do encapsulamento em cucurbiturilos, pelas suas propriedades e dimensões.

Foram sintetizados dois compostos catiónicos [Ru(tpy)(bpy)Cl]Cl e [Ru(tpy)(en)Cl]Cl e outros dois compostos neutros [Ru(tpy)Cl₃] e [Ru(tpy)(pic)Cl]. Aos quatro compostos terpiridínicos de ruténio foram atribuídos números de série de acordo com a ordem de síntese dos mesmos. Neste caso, os complexos catiónicos, AB9 e AB11 e os complexos neutros, AB6 e AB10.

Grande parte dos compostos terpiridínicos de Ru(II) e Ru(III) primam pela sua capacidade de se ligarem covalentemente ao DNA, predominantemente pela substituição de um ligando lábil pelo N7 da guanina, com formação de adutos monofuncionais. O N7 da guanina aparenta ser o local de ligação preferido para se estabelecer a coordenação dado o seu carácter nucleofílico e pela estabilização adicional da ligação, concedida pelo carbonilo e pela amina primária da guanina¹³⁵. Os resultados dos estudos de Lazić *et al.* demonstram que os compostos terpiridínicos de ruténio estabelecem, em simultâneo, ligações não covalentes com o DNA, pela intercalação do ligando aromático planar terpiridina entre pares de bases adjacentes da hélice de DNA¹³⁴. Dados mais recentes sugerem que estes compostos têm múltiplos alvos, sendo provável a interação com proteínas importantes no desenvolvimento do cancro¹³⁴.

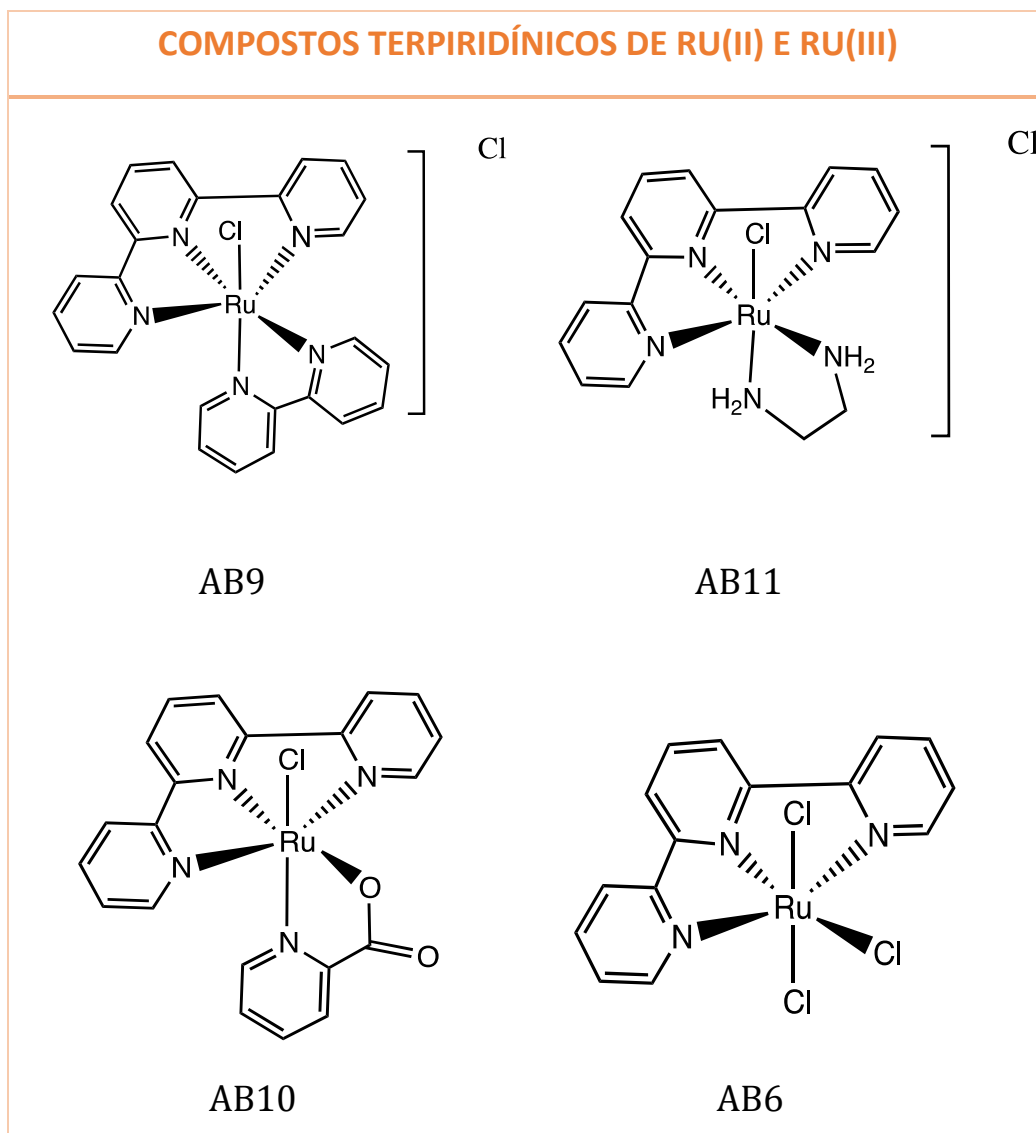


Figura II-1. Estruturas químicas dos compostos $[Ru(tpy)(bpy)Cl]Cl$ (AB9) e $[Ru(tpy)(en)Cl]Cl$ (AB11) e outros dois compostos neutros $[Ru(tpy)(pic)Cl]$ (AB10) e $[Ru(tpy)Cl_3]$ (AB6).

No mesmo estudo, a citotoxicidade dos compostos terpiridínicos de Ru(II) e Ru(III), sob análise no presente trabalho, foi avaliada em dois tipos de cancro dos três mais prevalentes no mundo, a saber, nas linhas celulares tumorais humanas do carcinoma do pulmão e do carcinoma do cólon, A549 e HCT116, respetivamente, e na linha celular do carcinoma do cólon de rato – CT26¹³⁴.

O composto AB11 revelou a maior atividade citotóxica entre os compostos em ensaio, com valores de IC_{50} entre 32,80 e 66,30 μM . Os valores de IC_{50} permitiram identificar o composto AB11 como moderadamente citotóxico e os restantes compostos como portadores de

uma atividade antitumoral pouco significativa. Os valores de IC₅₀ e, do mesmo modo, a atividade citotóxica dos compostos estudados, parecem estar relacionados com a taxa de hidrólise do ligando monodentado que, por sua vez, é dependente da natureza do ligando quelante. A perda de citotoxicidade observou-se quando o ligando etilenodiamina (en), doador- σ , no AB11, foi substituído por ligandos fortes aceitadores- π , N-N, bipyridina (bpy), no AB9, e N-O picolina (pic), no AB10. Estes resultados vão ao encontro dos dados apresentados sobre a taxa de hidrólise dos compostos – minutos para o AB11, horas para o AB9 e sem perspectiva de hidrólise para o AB10, após várias horas em observação, dada a sua baixa solubilidade em soluções aquosas¹³⁴.

Apesar da atividade citotóxica pouco significativa dos compostos AB9, AB10 e AB6, o interesse no seu estudo focou-se na possibilidade do encapsulamento em contentores moleculares do tipo cucurbiturilo modificar a dinâmica de hidrólise dos compostos e, desta forma, poder melhorar a atividade antitumoral dos mesmos.

Como objetivos específicos, este trabalho focou-se na síntese e caracterização dos compostos selecionados pelo seu interesse antitumoral e tendo em atenção a relação entre a estrutura química dos compostos e a atividade citotóxica proposta pelos grupos de investigação para as linhas celulares em ensaio bem como no estudo da estabilidade física e química dos complexos de inclusão “*host-guest*”.

Adicionalmente, considerou-se o estudo *in vitro* da atividade antitumoral dos complexos de inclusão, em linhas celulares tumorais. Contudo, os resultados dos estudos anteriores e a falta de disponibilidade impossibilitaram, infelizmente, o cumprimento deste objetivo.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo é destinado à descrição do trabalho realizado em laboratório no âmbito do projeto de investigação para a dissertação do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

3.1. Compostos terpiridínicos de Ru(II) e Ru(III)

3.1.1. Reagentes

Os reagentes 1,2-diaminoetano (en) e 2,2'-bipiridina (bpy) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich enquanto os reagentes 2,2':6',2''-terpiridina (tpy), 2-piridinacarboxilato (pic) e cloreto de Ru(III) hidratado ($\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) foram fornecidos pela Alfa Aesar. Os restantes reagentes e solventes foram adquiridos a partir da Sigma-Aldrich.

3.1.2. Síntese dos compostos terpiridínicos de Ru(II) e Ru(III)

O composto AB6 resulta da reação entre o composto precursor cloreto de Ru(III) hidratado ($\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) e o ligando quelante terpiridina (tpy).

A reação do composto neutro terpiridínico de Ru(III) (AB6) com os ligandos quelantes N-N, en ou bpy, e com o ligando N-O, pic, na presença de Et_3N como agente redutor e um excesso de LiCl, necessário para evitar a dissociação do ligando Cl^- do produto final e para proporcionar a sua precipitação, resulta na formação dos compostos catiónicos AB11 e AB9 e no composto neutro AB10, respetivamente.

Os quatro compostos terpiridínicos de rutênio foram sintetizados de acordo com os procedimentos publicados na literatura com algumas pequenas modificações que se encontram descritas no procedimento de síntese de cada composto^{134,136}.

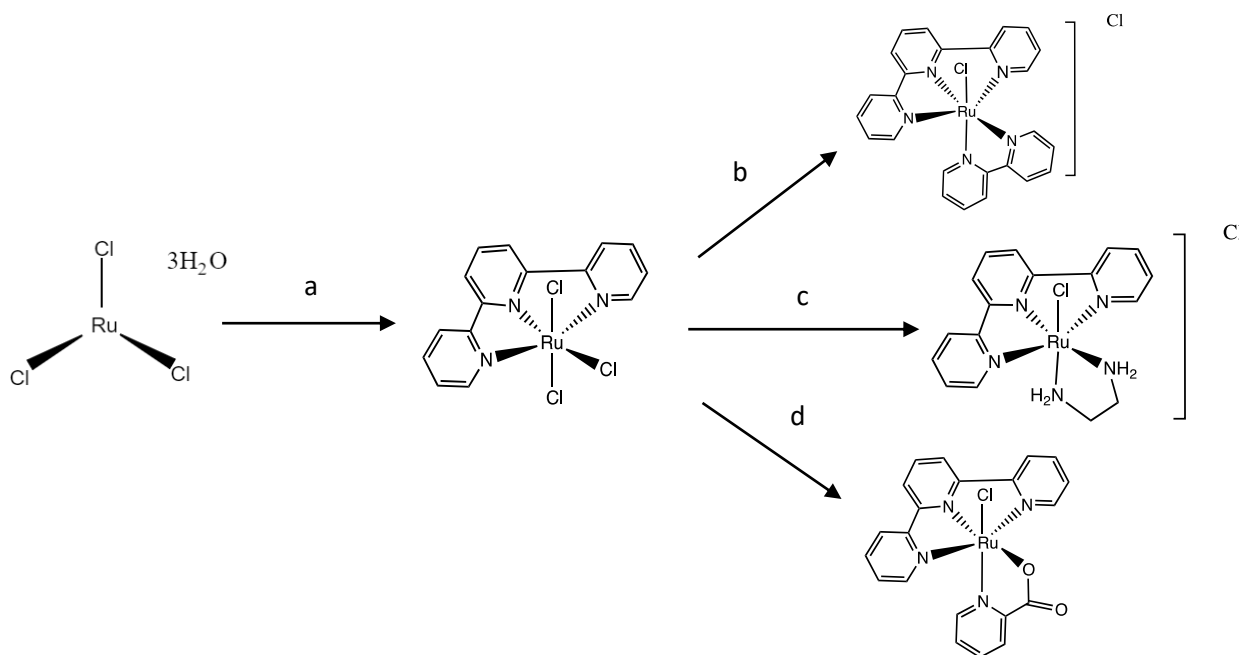


Figura III-1. Esquema de síntese dos compostos AB6 (a), AB9 (b), AB11(c) e AB10 (d). Reagentes e condições: (a) tpy (0,9 equiv), EtOH, refluxo; (b) bpy (1,2 equiv), etanol/água (3:1), Et₃N (3,0 equiv), LiCl (10,0 equiv), refluxo; (c) en (1,2 equiv), etanol/água (3:1), Et₃N (3,0 equiv), LiCl (10,0 equiv), refluxo; (d) pic (1,2 equiv), etanol/água (3:1), Et₃N (3,0 equiv), LiCl (10,0 equiv), refluxo.

3.1.2.1. Procedimento de síntese do composto AB6

Colocaram-se 303 mg de RuCl₃·xH₂O (1,16 mmol) e 35,0 mL de etanol num tubo de schlenk. O sistema reacional foi mantido em refluxo durante, aproximadamente, 2 horas. A solução obtida apresentava uma cor verde escura. À reação adicionaram-se 282 mg de tpy (1,05 mmol), tendo-se continuado o refluxo por mais 4 horas. Durante este período a cor da solução alterou-se para castanho avermelhado. Deixou-se arrefecer o sistema reacional à temperatura ambiente e colocou-se no frigorífico para precipitação completa do produto da reação. Este foi isolado por filtração em cânula e lavado com etanol e dietil éter. O sólido obtido foi seco em vácuo, recolhido e pesado. Rendimento: 470 mg (92%).

O composto AB6 é solúvel em dimetilsulfóxido e acetonitrilo, moderadamente solúvel em água, metanol e etanol e insolúvel em acetona, clorofórmio e diclorometano¹³⁶.

3.1.2.2. Procedimento de síntese do composto AB9

Colocaram-se 200 mg de [Ru(tpy)Cl₃] (0,454 mmol) e 20,0 mL de uma mistura etanol/água (3:1), num tubo de schlenk, com 192 mg de LiCl (4,54 mmol) e 190 µL de Et₃N

(1,36 mmol), como agente redutor. À suspensão anterior foram adicionados 85,0 mg de bpy (0,544 mmol), e o sistema reacional foi refluxado durante 3 horas, em agitação vigorosa. Filtrou-se a solução violeta arroxeadada a quente para remover impurezas e, de seguida, reduziu-se o seu volume para $\frac{1}{4}$ do inicial, num evaporador rotativo. Deixou-se arrefecer o sistema reacional à temperatura ambiente e colocou-se no frigorífico para precipitação completa do produto da reação. Este foi lavado com etanol e dietil éter e isolado por filtração a vácuo. O sólido obtido foi recolhido e pesado. Rendimento: 149 mg (58,5%).

O composto AB9 é solúvel em água, metanol, etanol, acetona, clorofórmio, diclorometano e nitrometano ¹³⁶.

3.1.2.3. Procedimento de síntese do composto AB10

Colocaram-se 200 mg de [Ru(tpy)Cl₃] (0,454 mmol) e 20,0 mL de uma mistura etanol/água (3:1), num tubo de schlenk, com 192 mg de LiCl (4,54 mmol) e 190 μ L de Et₃N (1,36 mmol), como agente redutor. À suspensão anterior foi adicionada uma quantidade de 67,0 mg de pic (0,544 mmol), e o sistema reacional foi refluxado durante 4 horas, em agitação vigorosa. Filtrou-se a solução violeta arroxeadada a quente para remover impurezas e, de seguida, reduziu-se o seu volume para $\frac{1}{4}$ do inicial, num evaporador rotativo. Deixou-se arrefecer o sistema reacional à temperatura ambiente e colocou-se no frigorífico para precipitação completa do produto da reação. Este foi lavado com acetona, etanol e dietil éter e isolado por filtração a vácuo. O sólido obtido foi recolhido e pesado. Rendimento: 206 mg (86%).

O composto AB10 é solúvel em diclorometano, nitrometano e acetonitrilo, parcialmente solúvel em água e metanol e insolúvel em etanol, acetona e clorofórmio ¹³⁴.

3.1.2.4. Procedimento de síntese do composto AB11

Colocaram-se 200 mg de [Ru(tpy)Cl₃] (0,454 mmol) e 20,0 mL de uma mistura etanol/água (3:1), num tubo de schlenk, com 192 mg de LiCl (4,54 mmol) e 190 μ L de Et₃N (1,36 mmol), como agente redutor. À suspensão anterior foi adicionada uma quantidade de 36 μ L de en (0,544 mmol), e o sistema reacional foi refluxado durante 4 horas, em agitação vigorosa. Filtrou-se a solução violeta arroxeadada a quente para remover impurezas e, de seguida, reduziu-se o seu volume para $\frac{1}{4}$ do inicial, num evaporador rotativo. Deixou-se arrefecer o sistema reacional à temperatura ambiente e colocou-se no frigorífico para precipitação completa

do produto da reação. Este foi lavado com acetona, etanol e dietil éter e isolado por filtração a vácuo. O sólido obtido foi recolhido e pesado. Rendimento: 183 mg (87%).

O composto AB11 é solúvel na água, metanol e etanol, moderadamente solúvel em acetona e nitrometano e insolúvel em clorofórmio e diclorometano ¹³⁶.

3.2. Complexos de Inclusão

O estudo do encapsulamento dos compostos terpiridínicos de ruténio em contentores moleculares do tipo cucurbiturilo focou-se nos hospedeiros macrocíclicos CB[7] e CB[8], dada a sua aplicabilidade amplamente estudada no transporte e distribuição de fármacos.

3.2.1. Reagentes

Os cucurbiturilos utilizados na encapsulação dos compostos antitumorais foram facultados pelo professor André Lopes e obtidos por síntese química, pela reação de condensação de glicolurilo com formaldeído, em meio ácido.

Para a determinação dos cucurbiturilos a utilizar de entre as várias amostras existentes foi feita uma análise por espetrometria de massa com o intuito de verificar o grau de pureza dos produtos de cada reação e, conseqüentemente, selecionar os produtos com o menor grau de impureza.

Adicionalmente, foi realizada uma análise de determinação da percentagem de água incorporada pelos cucurbiturilos selecionados. Quer o CB[7] quer o CB[8], ambos armazenados nas mesmas condições de temperatura e humidade, apresentam, aproximadamente, 22% de água adsorvida.

Os compostos terpiridínicos de ruténio utilizados no estudo do encapsulamento em cucurbiturilos foram sintetizados de acordo com os procedimentos indicados no ponto 3.1.2. do presente trabalho.

3.2.2. Preparação dos complexos de inclusão

Numa tentativa de preparação de complexos de inclusão entre os compostos terpiridínicos de ruténio e os cucurbiturilos referidos foram realizados oito ensaios, quatro com CB[7] e outros quatro com CB[8], numa relação de complexo/CB de 1:1.

3.2.2.1. Procedimento dos complexos de inclusão com CB[7]

Num balão, colocaram-se 150 mg de CB[7] (0,101 mmol), uma quantidade equimolar de cada um dos compostos de ruténio preparados (56,5 mg (AB9); 53,1 mg (AB10); 46,8 mg (AB11); 44,4 mg (AB6)) e 15,0 ml de água Elix®, acidificada com quatro gotas de uma solução de HCl a 2M. Deixou-se refluxar a mistura durante 24 horas.

3.2.2.1. Procedimento dos complexos de inclusão com CB[8]

Num balão, colocaram-se 150 mg de CB[8] (0,0880 mmol), uma quantidade equimolar de cada um dos compostos de ruténio preparados (49,5 mg (AB9); 46,5 mg (AB10); 41,0 mg (AB11); 38,8 mg (AB6)) e 15,0 ml de água Elix®, acidificada com quatro gotas de uma solução de HCl a 2M. Deixou-se refluxar a mistura durante 24 horas.

Em ambos os procedimentos a adição de HCl a 2M foi essencial para promover a desagregação dos cucurbiturilos que, tendencialmente, formam aglomerados e, desta forma, facilitar a dissolução dos cucurbiturilos e posterior encapsulação dos compostos antitumorais.

3.2.3. Soluções de controlo

As soluções de controlo foram preparadas após a análise dos complexos de inclusão por espectroscopia UV-Vis de forma a garantir que as eventuais alterações nas bandas do espectro UV-Vis dos complexos de inclusão relativamente aos espectros originais dos compostos de ruténio não eram devidas à degradação destes pelas condições da reação.

Na preparação das soluções de controlo, uma quantidade não pesada de cada um dos compostos terpiridínicos de ruténio foi adicionada a 15,0 ml de água Elix®, acidificada com quatro gotas de uma solução de HCl a 2M. Deixou-se refluxar a mistura durante 24 horas.

3.3. Métodos e equipamentos utilizados

3.3.1. Espectroscopia de absorção UV-Vis

A espectroscopia de absorção UV-Vis constituiu uma ferramenta fundamental na caracterização e avaliação da estabilidade dos compostos terpiridínicos de ruténio sintetizados e dos complexos de inclusão de CB[7] e CB[8].

Os compostos terpiridínicos de ruténio alvo deste trabalho experimental são complexos de geometria octaédrica, tal como foi referido anteriormente.

De acordo com a Teoria das Orbitais Moleculares (TOM), para duas orbitais atómicas coalescerem e darem origem a orbitais moleculares têm de apresentar energia adequada. Quando os lóbulos do mesmo sinal coalescem obtêm-se orbitais moleculares ligantes. Por outro lado, a coalescência de lóbulos de sinal contrário dá origem a orbitais moleculares antiligantes. Adicionalmente, orbitais que não apresentem simetria adequada para se combinarem dão origem a orbitais não ligantes. Num complexo octaédrico, a interação das orbitais d do elemento central e as orbitais de simetria apropriada dos ligandos conduz à perda da degenerescência das cinco orbitais d do metal. Passamos então a ter dois subgrupos de orbitais degeneradas e_g (formadas maioritariamente pelas orbitais d_z^2 e $d_{x^2-y^2}$) e t_{2g} (formadas maioritariamente pelas orbitais d_{xy} , d_{yz} e d_{xz}), separados por uma diferença energética Δ_{oct} . A diferença de energia Δ_{oct} é uma medida da intensidade da interação entre o elemento central e os ligandos: quanto maior for a coalescência das orbitais combinadas, maior será o valor de Δ_{oct} . No estudo dos compostos de coordenação dos metais de transição, tem particular interesse a análise dos espectros de absorção desses compostos na região do UV-Vis pela possibilidade de se registarem transições eletrónicas $d-d$ bem como transições eletrónicas que envolvam a transferência de carga (metal \rightarrow ligando ou ligando \rightarrow metal) entre as orbitais do metal e as orbitais dos ligandos e cuja energia corresponde à zona do visível^{137,138}.

A simplicidade, rapidez de execução, precisão e baixo custo associado a esta técnica tornam-na numa excelente ferramenta para a caracterização dos compostos terpiridínicos de ruténio e dos complexos de inclusão de CB[7] e CB[8].

Os espectros de absorção UV-Vis foram traçados com recurso a um espectrofotómetro de feixe duplo Varian Cary® 50 Bio e a cuvetes de quartzo (40 μ L).

3.3.2. Espectroscopia de absorção no Infravermelho

A espectroscopia de absorção no Infravermelho (IV) foi outro dos métodos escolhidos para a caracterização da estrutura molecular dos compostos terpiridínicos de ruténio sintetizados.

A absorção na região do Infravermelho é causada por movimentos vibracionais dos grupos e ligações químicas que constituem uma molécula. Esta técnica baseia-se no facto das ligações moleculares possuírem frequências de vibração específicas, as quais correspondem aos

níveis energéticos vibracionais da molécula. São considerados dois tipos fundamentais de vibrações: vibração por estiramento (*stretching*), na qual os átomos permanecem no mesmo eixo de ligação, porém a distância entre os átomos aumenta ou diminui, e a vibração angular (*bending*), onde as posições dos átomos mudam em relação ao seu eixo de ligação original. Apenas as vibrações que resultam numa alteração rítmica do momento dipolar da molécula são observadas no Infravermelho. Cada átomo apresenta três graus de liberdade de movimento correspondentes às coordenadas cartesianas (x, y e z). Assim, uma molécula de n átomos tem $3n$ graus de liberdade. Para moléculas não lineares, três destes graus equivalem a movimentos de rotação, outros três a movimento de translação e os restantes $3n-6$ correspondem a vibrações fundamentais. As vibrações fundamentais não envolvem a alteração do centro de gravidade de uma molécula ¹³⁹.

Para os compostos de coordenação, o estudo vibracional tem interesse na região de baixa energia espectral, onde se observam as vibrações metal-ligando.

As vantagens desta técnica sobre outros métodos incluem rapidez na obtenção de espectros, boa relação sinal-ruído, elevada resolução espectral, baixo custo da análise e boa reprodutibilidade.

Os espectros de absorção no Infravermelho foram traçados num espectrofotómetro Bruker FTIR – Tensor 27®.

3.3.3. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa associada a cromatografia líquida de alta eficiência foi o método escolhido para a identificação e avaliação da estabilidade e grau de pureza dos compostos terpiridínicos de ruténio sintetizados assim como do grau de pureza dos cucurbiturilos procedentes de diferentes reações de síntese. Este foi igualmente o método de eleição para o estudo do encapsulamento nos complexos de inclusão.

O conceito de espectrometria de massa é simples. Um composto é ionizado por um método de ionização, os iões são separados com base na razão massa/carga e o número de iões que representa cada unidade de massa/carga é registado num espectro. O método de ionização utilizado, chamado de ionização por eletrospray (ESI), consiste num sistema suave que utiliza a energia eléctrica para transferir os iões de uma solução para a fase gasosa antes de alcançarem o detetor e o resultado da análise ser registado na forma de um espectro de iões positivos que são separados segundo a sua razão massa/carga ¹⁴⁰.

O evento mais simples ocorre com a remoção de um único eletrão da molécula na fase gasosa, pelo feixe de eletrões, e a formação do ião molecular. Se o ião molecular se mantiver intacto até alcançar o detetor é possível observar, no espetro, o pico correspondente a este ião, que nos fornece um dado importante sobre o composto, o seu peso molecular. O espetro de massa de um composto não é mais do que uma apresentação dos fragmentos carregados positivamente *versus* a sua concentração relativa ¹⁴⁰.

A espetrometria de massa constitui uma técnica vantajosa no sentido em que se baseia num método robusto, simples e reprodutível, para além da extensa biblioteca de espetros que possibilita uma completa identificação e caracterização dos compostos em estudo ¹⁴⁰.

Os espetros de massa foram obtidos por um espectrofotómetro de massa ESI-MS Bruker Daltonik GmbH® HCT Ultra associado a um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent Technologies® 1200 series.

3.3.4. Análise gravimétrica

A análise gravimétrica constituiu um método importante no presente trabalho aquando da quantificação da percentagem de água presente no CB[7] e no CB[8].

A análise gravimétrica abrange todos os métodos analíticos que utilizam, como medida analítica, a massa ou a alteração da massa para calcular a quantidade ou concentração de um analito numa determinada amostra. Para a determinação da percentagem de água presente nos cucurbiturilos foi adotada a técnica de termogravimetria, segundo a qual a é feita a análise da variação da massa de uma amostra em função da variação da temperatura, numa atmosfera controlada de fluxo de ar ¹⁴¹.

A determinação da percentagem de água presente no CB[7] e no CB[8] foi obtida por termogravimetria num aparelho SETARAM® TGA 92, sob fluxo de ar, a uma velocidade de aquecimento de 10 °C/min.

3.3.5. Desenho das estruturas químicas dos compostos sintetizados

As estruturas químicas dos compostos sintetizados, presentes na Figura II-1, e restantes estruturas químicas referentes às reações, na Figura III-1 foram desenhadas com recurso ao *software* ChemDraw® 12.0.3.1216.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos compostos antitumorais de ruténio

Os compostos antitumorais portadores de ligandos polipiridil, sintetizados no âmbito deste projeto de investigação, encontram-se referenciados na literatura científica. Neste sentido, este capítulo servirá de meio de identificação e comparação dos compostos sintetizados em laboratório em relação ao que se encontra descrito na literatura.

Pelas razões enumeradas anteriormente no ponto 3.3. os métodos de escolha para a caracterização dos compostos terpiridínicos de ruténio foram a espectroscopia de absorção no UV-Vis, no Infravermelho e a espectrometria de massa.

4.1.1. Interpretação dos espectros de absorção no UV-Vis

Os espectros de absorção no UV-Vis dos compostos de ruténio apresentam um conjunto de bandas na região do UV ($200 < \lambda < 330$ nm), que podem ser atribuídas a transições eletrónicas entre orbitais dos ligandos tpy e bpy ($\pi \rightarrow \pi^*$). Por outro lado, as bandas exibidas na região do visível situadas numa gama de frequências entre 450 e 520 nm podem ser atribuídas a transições eletrónicas que envolvem a transferência de carga metal–ligando polipiridil ($d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*$)^{134,142–146}.

Os espectros obtidos mostram claramente a presença de um conjunto de bandas atribuídas a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (a aproximadamente 230, 272 e 315 nm) comum a todos eles e que deverão ter origem no ligando tpy. A banda a aproximadamente 287 nm (no composto AB9) tem sido observada em complexos contendo ligandos bpy, o que confirma a síntese efetuada¹⁴⁷. Já no que diz respeito às bandas de transferência de carga metal-ligando é de realçar a reduzida intensidade destas bandas no espectro do composto AB6, o que deverá estar relacionado com o facto de ser um complexo de Ru(III)¹⁴⁸.

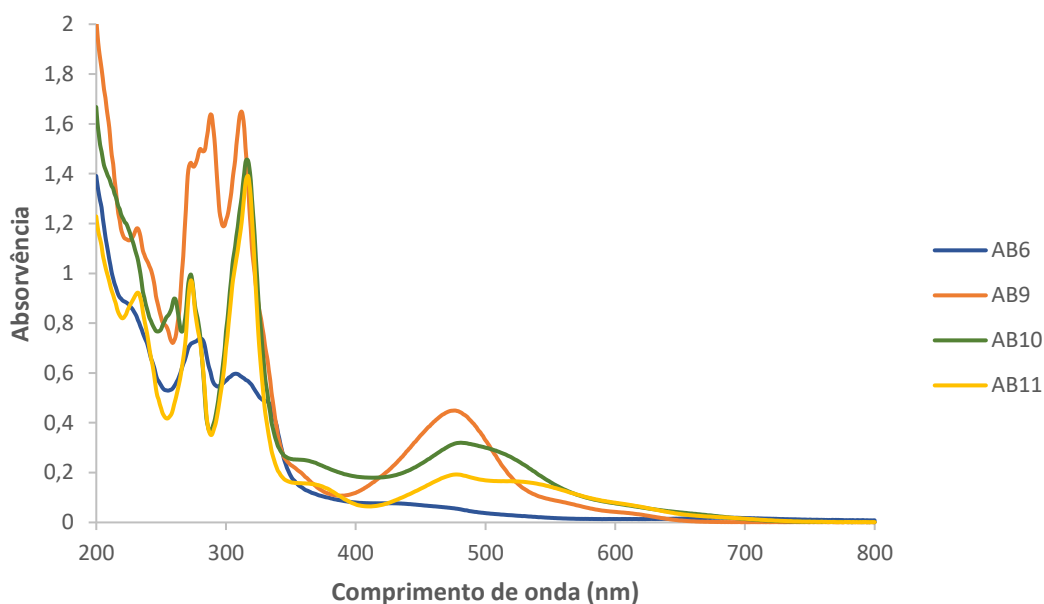


Gráfico IV-1. Espectro de absorção no UV-Vis, em água, dos compostos terpiridínicos de rutênio (AB6, AB9, AB10 e AB11).

4.1.2. Interpretação dos espectros de absorção no Infravermelho

Os espectros de absorção no IV dos compostos de rutênio apresentam um conjunto de bandas próprias do ligando tpy. A banda de maior intensidade, correspondente ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$ deste ligando, aparenta estar situada, a 1618, 1635, 1594 e a 1618 cm^{-1} , no espectro dos compostos AB6, AB9, AB10 e AB11, respetivamente. As bandas observadas encontram-se dentro dos valores esperados para estes compostos^{142,143}. A banda respeitante ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{C})$ dos anéis aromáticos do ligando tpy encontra-se a 1446 cm^{-1} nos compostos AB6 e AB9, e a 1447 cm^{-1} nos compostos AB10 e AB11, estando de acordo com os valores igualmente observados para estes compostos¹⁴⁹. A banda relativa ao estiramento $\nu(\text{C}-\text{H})$ do anel aromático do ligando tpy pode ser encontrada num número de onda próximo de 3060 cm^{-1} para todos os compostos, o que está igualmente de acordo com o que se encontra descrito na literatura¹⁴⁴. A presença de uma banda característica do estiramento $\nu(\text{Ru}-\text{N})$ seria de esperar entre 486 e 511 cm^{-1} enquanto a banda correspondente ao estiramento $\nu(\text{Ru}-\text{Cl})$ seria de esperar abaixo dos 400 cm^{-1} ¹⁴⁴. Neste caso não é possível observar a presença destas bandas uma vez que o número de onda a que encontram apresenta-se fora da gama de análise do espectrofotómetro.

No caso individual do composto AB9, o espectro de absorção no IV pode exibir ao longo da região entre 1400 e 1600 cm^{-1} um conjunto de bandas correspondentes aos ligandos tpy e bpy, atribuídas ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{C})$ e $\nu(\text{C}=\text{N})$ dos anéis aromáticos destes ligandos. A

presença dos dois ligandos polipiridil pode resultar numa sobreposição de bandas na região espectral indicada ¹⁴⁹.

No caso particular do composto AB10, o espectro de absorção no IV pode exibir, para além das bandas características do ligando tpy correspondentes ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$, duas bandas adicionais que podem ser atribuídas aos modos de estiramento simétrico e assimétrico do grupo carboxilato (COO^-) do ligando pic. No espectro de absorção no IV do composto AB10 sintetizado, é possível que as bandas relativas ao estiramento simétrico e assimétrico se encontrem a 1356 e a 1627 cm^{-1} , respetivamente ^{134,143}.

Com base nesta identificação, pode concluir-se que os compostos sintetizados correspondem aos descritos na literatura, tendo sido cumprido o primeiro objetivo deste trabalho.

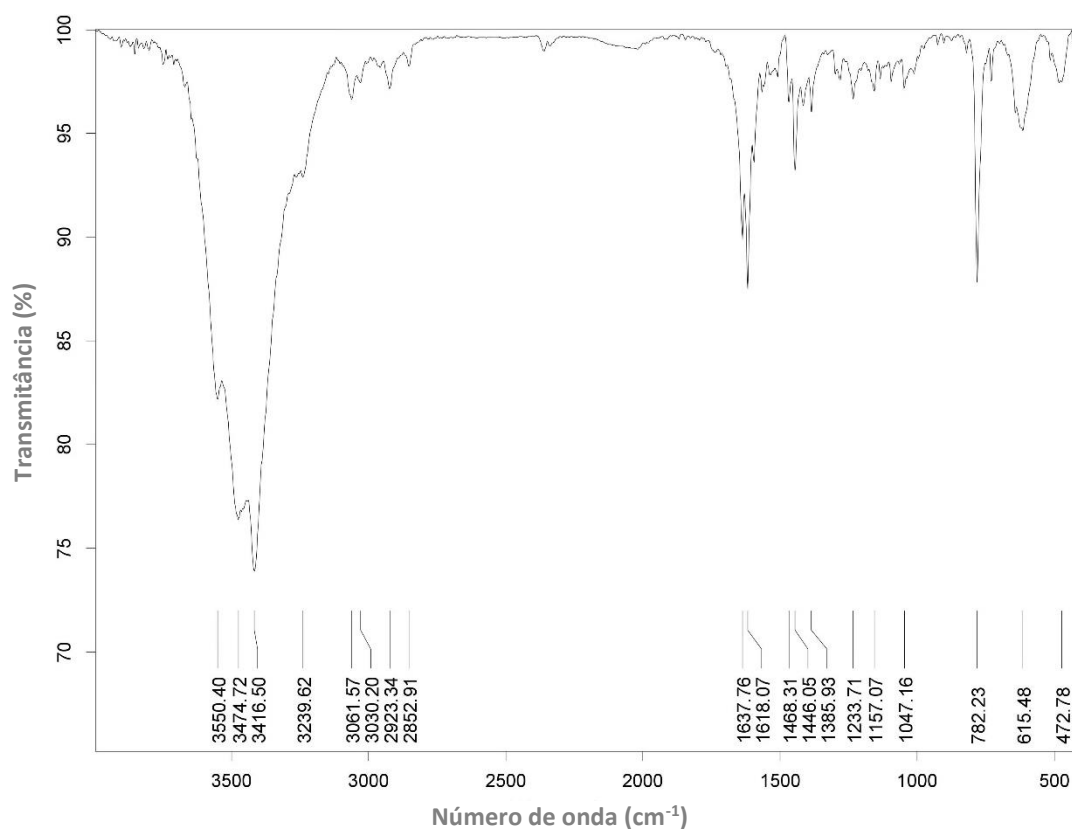


Gráfico IV-2. Espectro de absorção na região do Infravermelho do composto AB6.

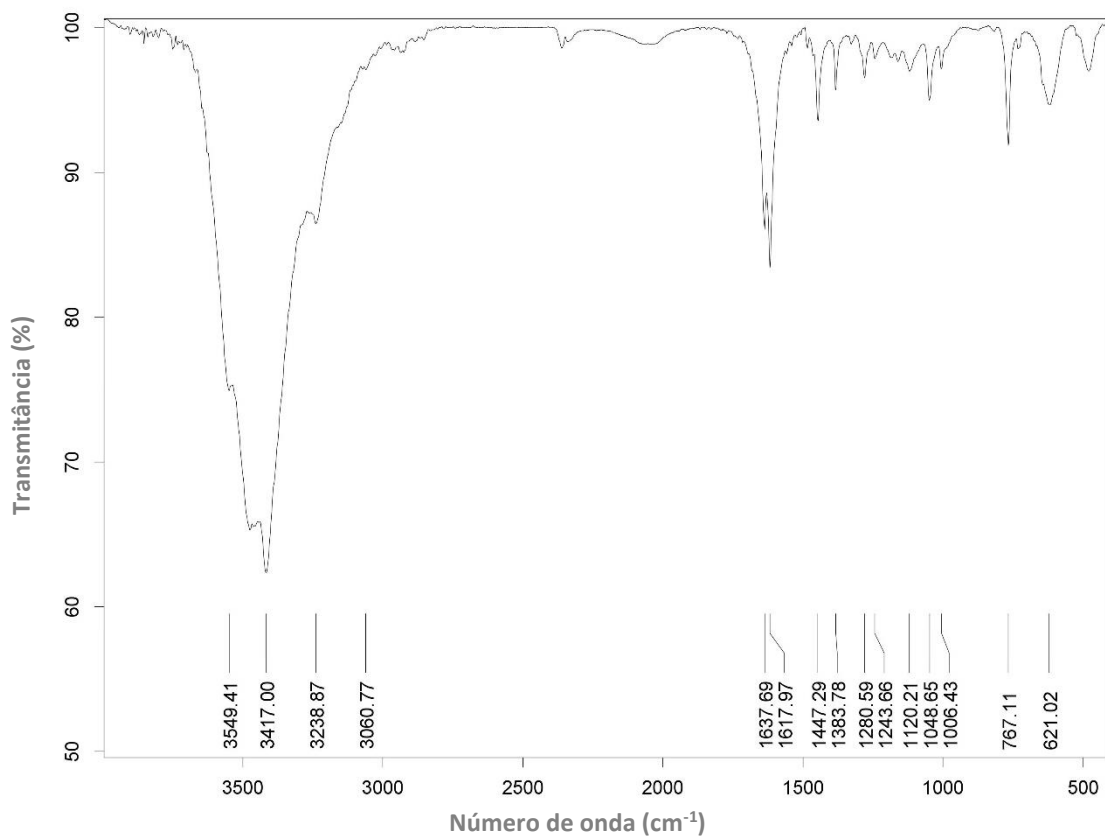


Gráfico IV-3. Espectro de absorção na região do Infravermelho do composto AB11.

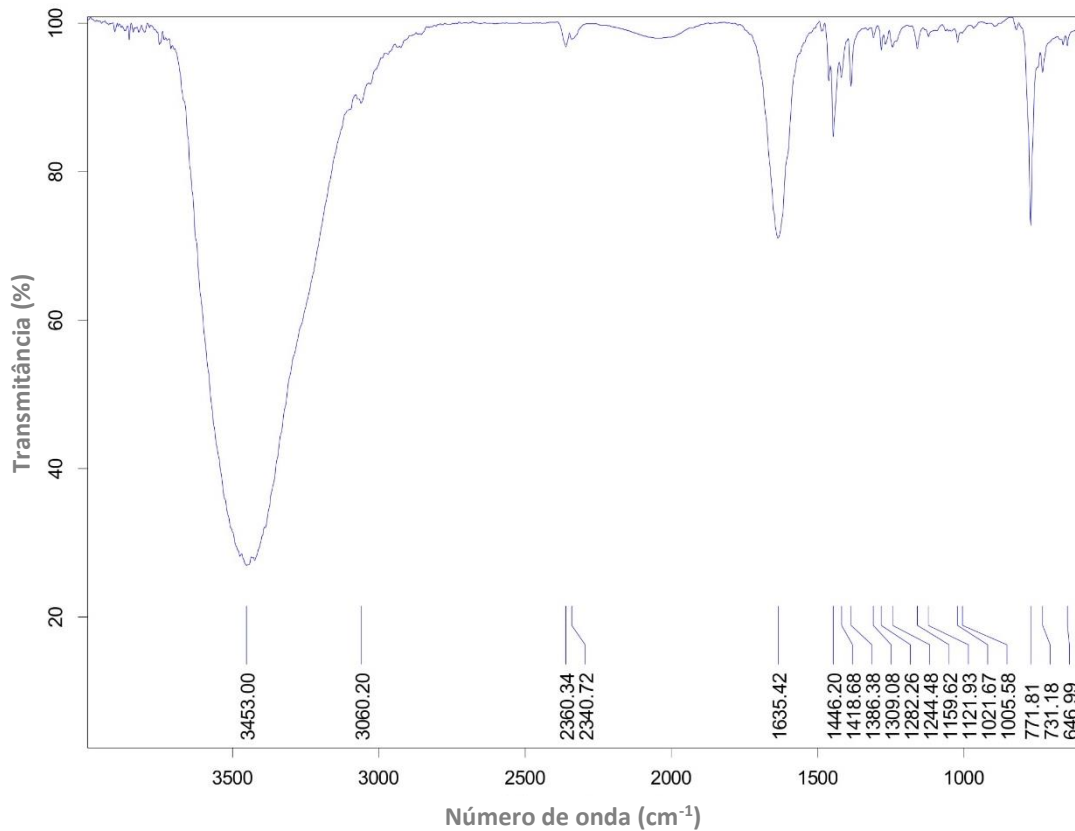


Gráfico IV-4. Espectro de absorção na região do Infravermelho do composto AB9.

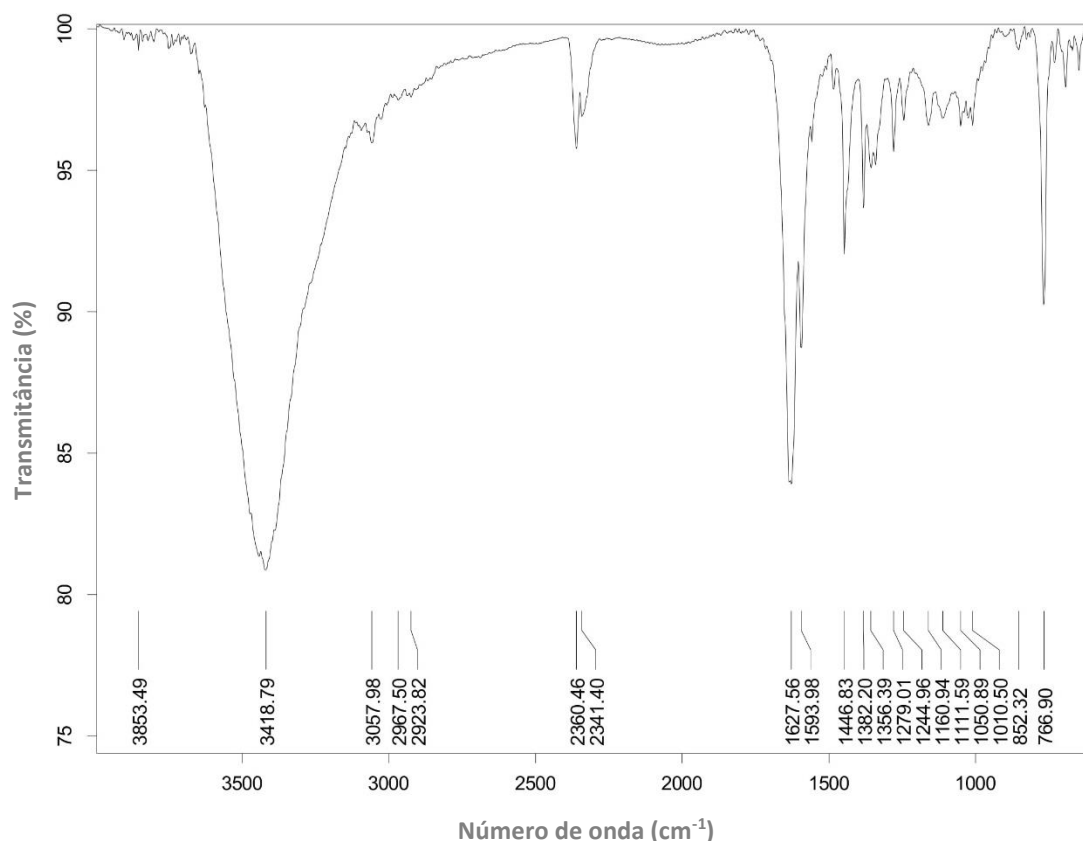


Gráfico IV-5. Espectro de absorção na região do Infravermelho do composto AB10.

4.1.3. Interpretação dos espectros de massa

O espectro de massa da solução de AB9 numa mistura etanol/água (1:1) revela um só sinal com razão massa/carga (m/z) 526 que foi atribuído ao ião molecular, $[AB9]^+$. Esta atribuição foi feita com base no valor de m/z e com a distribuição isotrópica (Gráfico IV-7) e está de acordo com a estrutura prevista para o composto na fase gasosa (Gráfico IV-6). A abundância do sinal correspondente ao ião positivo de AB9 indica que o composto é estável na solução utilizada (etanol/água, 1:1). Por outro lado, o espectro de massa da solução aquosa de AB9 é bastante diferente. Foram detetados sinais com m/z 246, 255, 284 e 598. Os dois primeiros sinais são mais intensos e a distribuição isotópica indica que apresentam duas cargas. O sinal com m/z 246 é compatível com a estrutura que resulta da perda de Cl^- , $[AB9-Cl]^{2+}$ enquanto o sinal com m/z 255 é compatível com a substituição de Cl^- por H_2O , $[AB9-Cl+H_2O]^{2+}$. Qualquer uma destas estruturas indica a degradação de AB9 em solução aquosa. O sinal com m/z 598 também só aparece em solução aquosa. Este sinal é compatível com a formação de um ião contendo duas moléculas de HCl, $[AB9+2HCl]^+$. Esta atribuição é

compatível com a presença de HCl em concentração relativamente elevada, 2M e com o facto de a ionização por ESI ser bastante suave. No entanto, esta atribuição necessita de confirmação, recorrendo por exemplo à fragmentação do sinal com m/z 598 associada a estudos de massa exata.

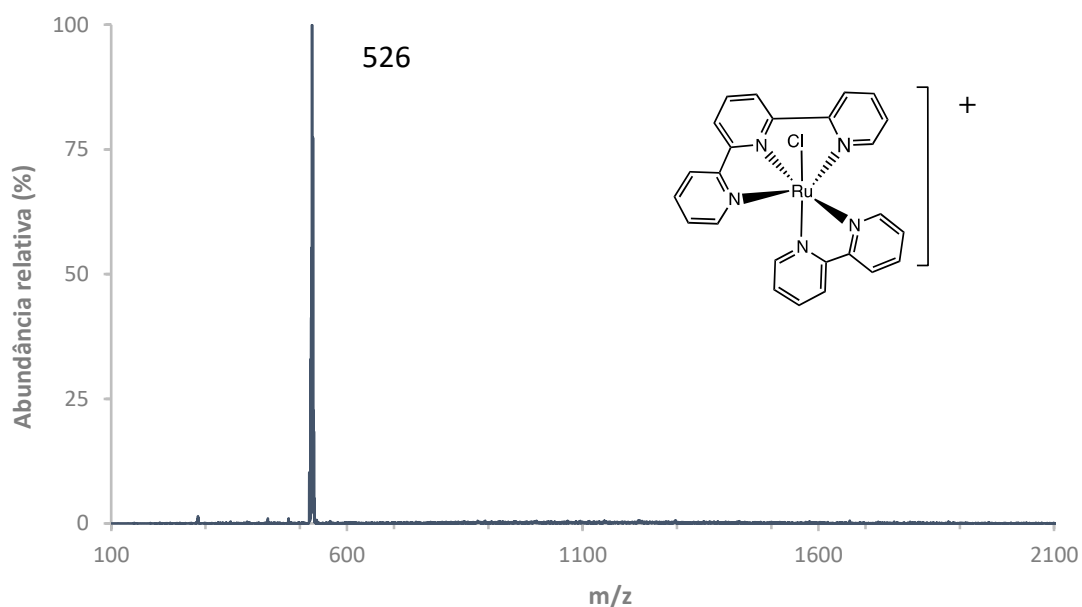


Gráfico IV-6. Espectro de massa (ESI-MS) de uma solução aquosa do composto AB9.

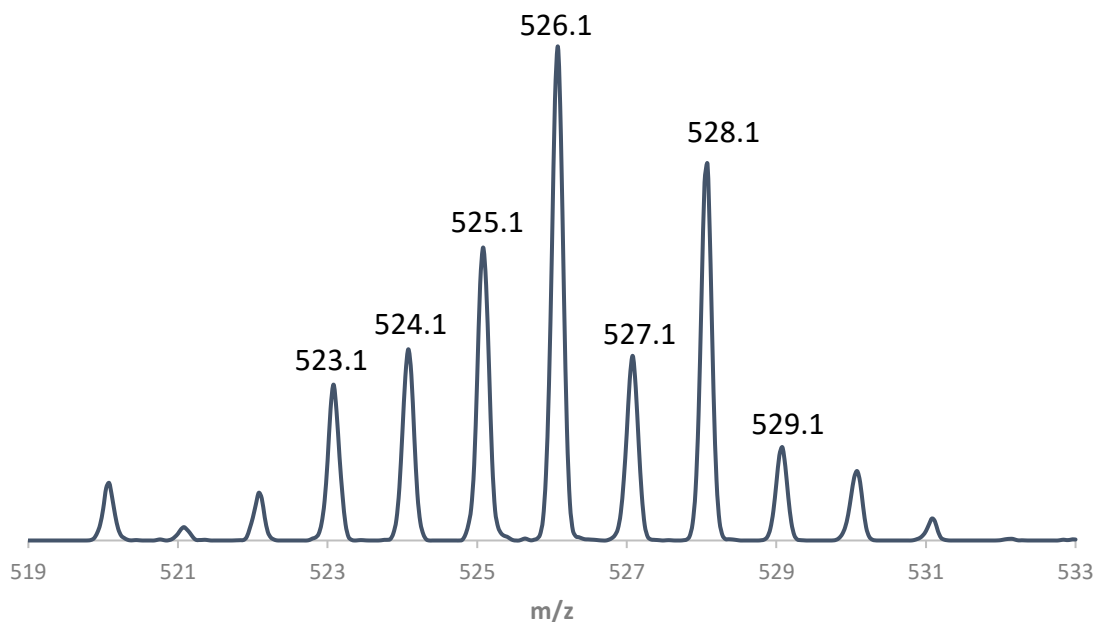


Gráfico IV-7. Distribuição isotópica do sinal observado a m/z 526.

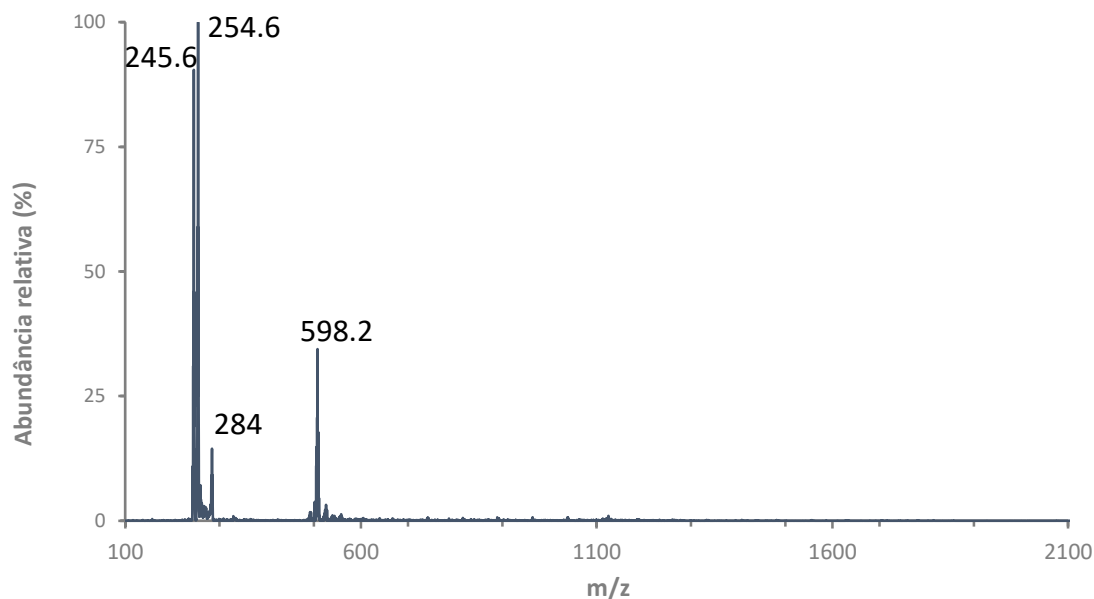


Gráfico IV-8. Espectro de massa (ESI-MS) de uma solução do composto AB9, numa mistura etanol/água (1:1).

Nos espectros de massa do AB6, AB10 e AB11 na mistura etanol/água (1:1) não foram observados os sinais correspondentes ao íon molecular, os equivalentes ao m/z 526 observado para [AB9]⁺. Foram observados outros sinais que necessitam de estudos adicionais para que se lhes possa atribuir uma estrutura. Estudos de fragmentação com determinação da massa exata dos fragmentes podem ajudar a clarificar os produtos formados. No entanto, este resultado sugere a degradação dos complexos logo na mistura etanol/água (1:1). Curiosamente, todos os espectros, incluindo o do AB9, em solução aquosa, apresentam um sinal com m/z 284. Este íon apresenta duas cargas (D m/z 0,5) como pode ser observado a partir da distribuição isotópica (Gráfico IV-12). Tal como para os produtos de degradação acima mencionados, a fragmentação deste sinal associada a massa exata poderá ajudar a clarificar a estrutura deste íon.

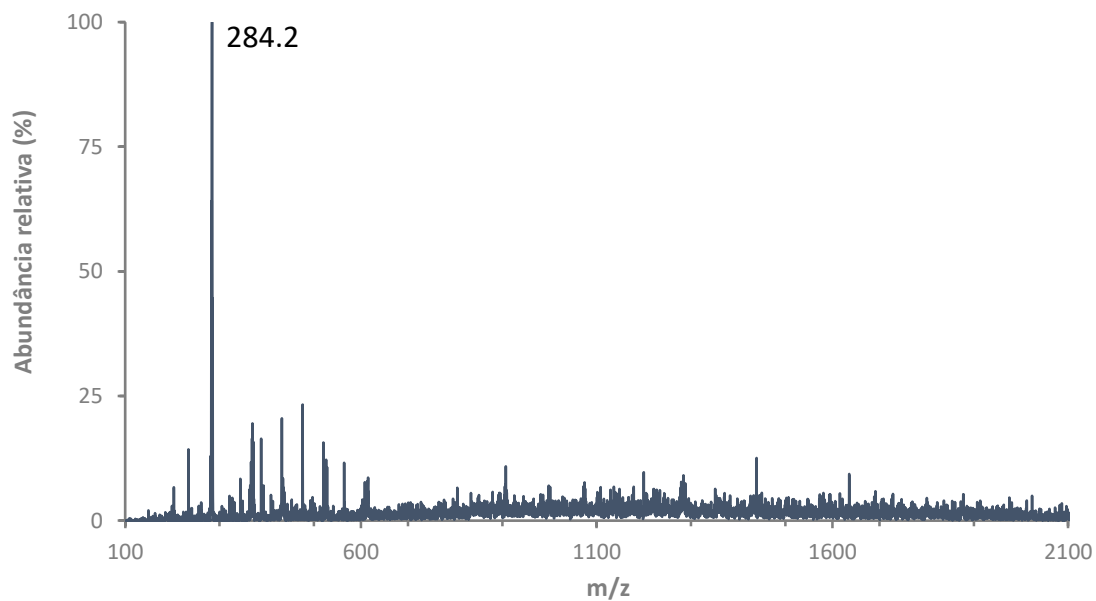


Gráfico IV-9. Espectro de massa (ESI-MS) de uma solução do composto AB6, numa mistura etanol/água (1:1).

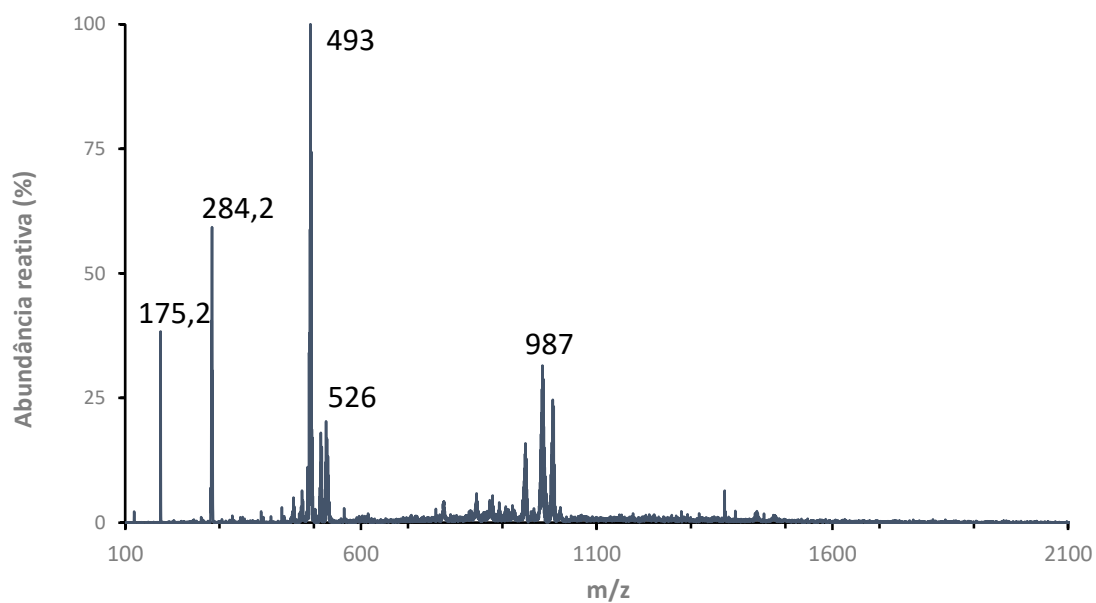


Gráfico IV-10. Espectro de massa (ESI-MS) de uma solução do composto AB10, numa mistura etanol/água (1:1).

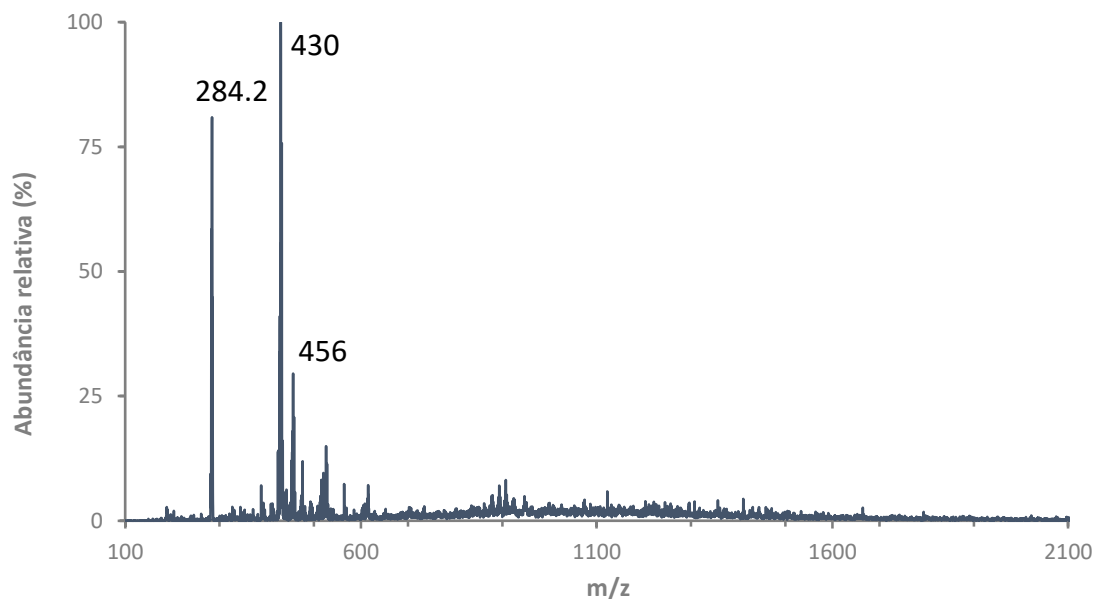


Gráfico IV-11. Espectro de massa (ESI-MS) de uma solução do composto AB11, numa mistura etanol/água (1:1).

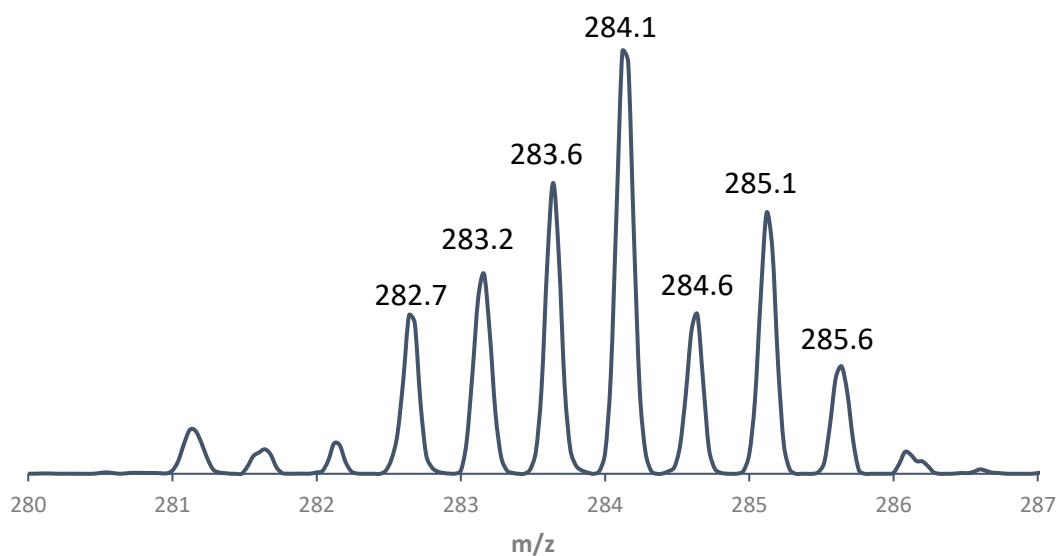


Gráfico IV-12. Distribuição isotópica do sinal observado a m/z 284.

No que respeita ao comportamento dos compostos sintetizados em soluções aquosas, os resultados obtidos não se encontram totalmente de acordo com os dados publicados na literatura e abordados no capítulo II deste trabalho. Os espectros de massa traçados sugerem que o composto com maior estabilidade numa mistura de etanol/água (1:1) é o AB9 enquanto os restantes compostos se degradam nas mesmas condições. De acordo com os estudos de Lazić

et al., seria o AB10 o composto com maior estabilidade devido à sua baixa solubilidade em água¹³⁴.

A rápida libertação de uma posição de coordenação no centro metálico de um dado composto de coordenação com potencial antineoplásico é um requisito importante, entre outros, para se observar atividade antitumoral, como consequência da formação de adutos com o DNA que conduzam à indução de modificações estruturais e, conseqüentemente, à inibição da síntese de DNA e indução da apoptose. Neste sentido, a perda do ligando monodentado, Cl⁻, pelos compostos em estudo é um passo essencial para a sua aplicabilidade enquanto agentes antitumorais.

4.2. Estudo do encapsulamento dos complexos de inclusão

Para o estudo do encapsulamento dos complexos de inclusão foram traçados os espectros de massa e de absorção no UV-Vis da mistura do CB[7] e do CB[8] com os compostos terpiridínicos de rutênio sintetizados, numa relação de 1:1.

4.2.1. Análise termogravimétrica

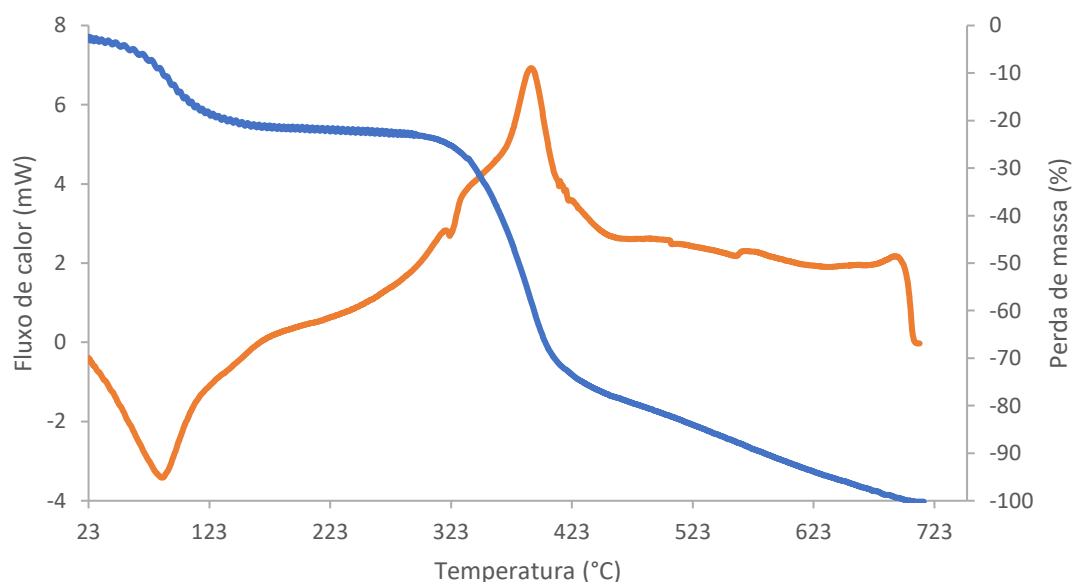


Gráfico IV-13. Representação gráfica da análise termogravimétrica do CB[7].

O gráfico ilustrado acima é uma representação da análise gravimétrica realizada para o CB[7]. No gráfico, a linha colorida a azul regista a variação da massa em função da temperatura

enquanto a linha colorida a laranja regista a variação do fluxo de calor em função da temperatura. O primeiro pico, endotérmico, que corresponde a uma perda de massa até aos 150°C, está associado à libertação das moléculas de água adsorvidas nos cucurbiturilos. Por outro lado, o segundo pico, exotérmico é característico de uma combustão e encontra-se normalmente associado à decomposição da própria amostra. A percentagem de água presente nos cucurbiturilos é determinada diretamente a partir do eixo do gráfico relativo à perda de massa. O gráfico permite-nos então concluir que o CB[7] apresenta, aproximadamente, 22% de água. O mesmo se verifica para o CB[8], cujo gráfico de termogravimetria pode ser consultado em anexo.

4.2.2. Interpretação dos espectros de absorção no UV-Vis

Os espectros de absorção no UV-Vis confirmam a existência de alterações na estrutura dos compostos AB6 e AB10 aquando da presença do CB[7] e do CB[8] devido ao aparecimento de uma nova banda próxima dos 700 nm. No caso particular do composto AB11, o aparecimento da nova banda apenas se observa aquando da adição de uma quantidade equimolar de CB[8]. É de realçar que os três compostos mantêm as bandas anteriormente descritas na fração individual, pelo que a presença de uma nova banda sugere a degradação dos compostos ou a interação dos mesmos com os cucurbiturilos. O composto AB9, por outro lado, mantém a identidade do seu espectro na presença dos cucurbiturilos, nas mesmas condições de reação.

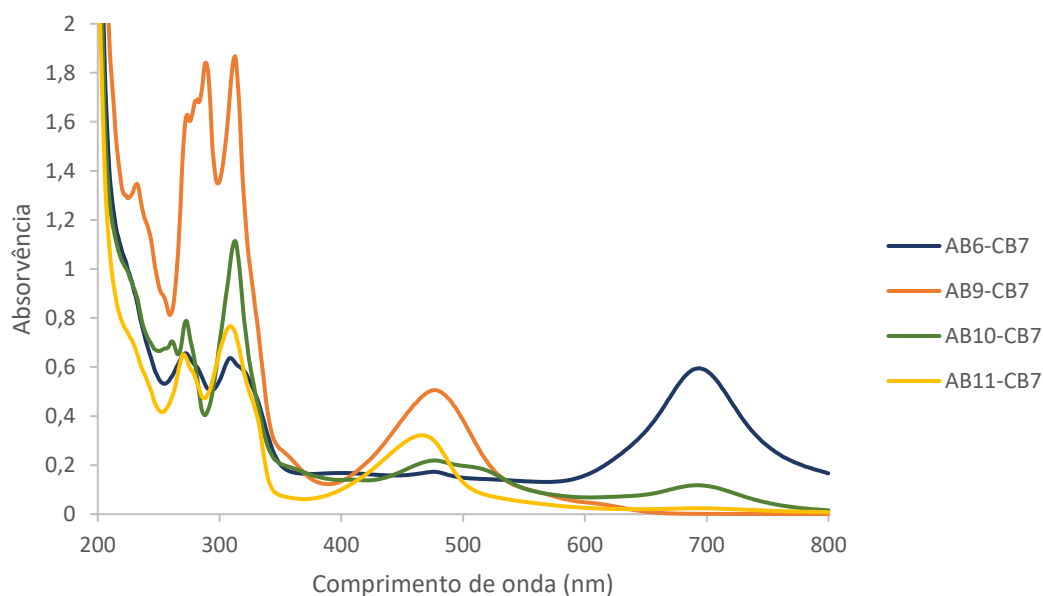


Gráfico IV-14. Espectro de absorção no UV-Vis, em água, do CB[7] com os compostos sintetizados.

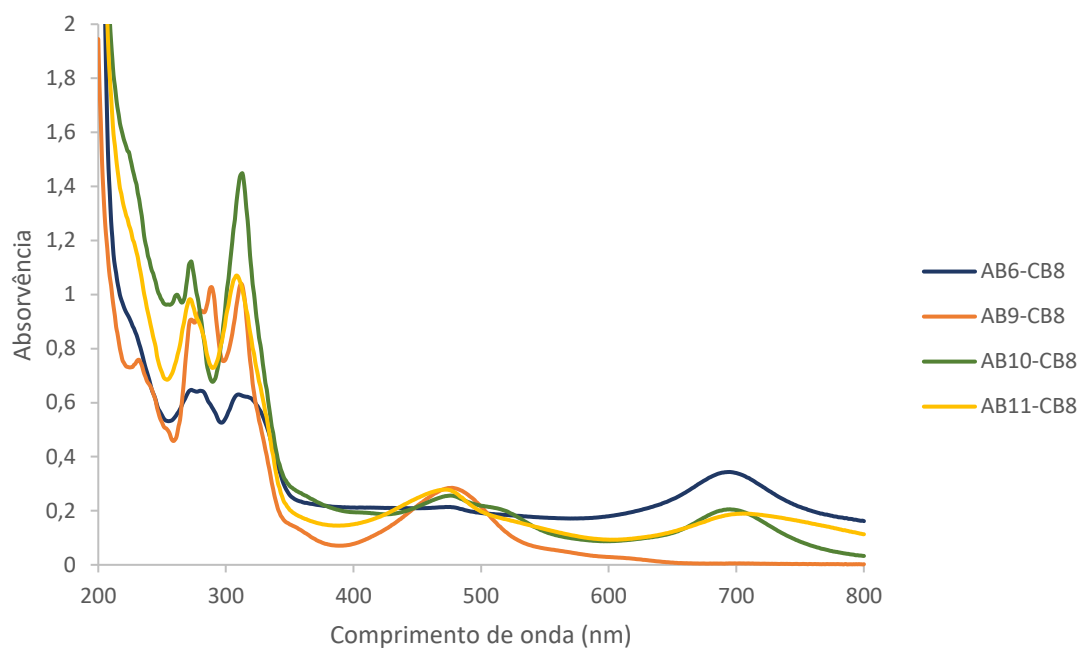


Gráfico IV-15. Espectros de absorção no UV-Vis, em água, do CB[8] com os compostos sintetizados.

Os espectros de absorção no UV-Vis traçados para o CB[7] e para o CB[8] mostram que estes macrociclos não absorvem na gama de comprimentos de onda da região do UV-Vis. Os espectros de absorção podem ser consultados em anexo.

4.2.3. Interpretação dos espectros de massa

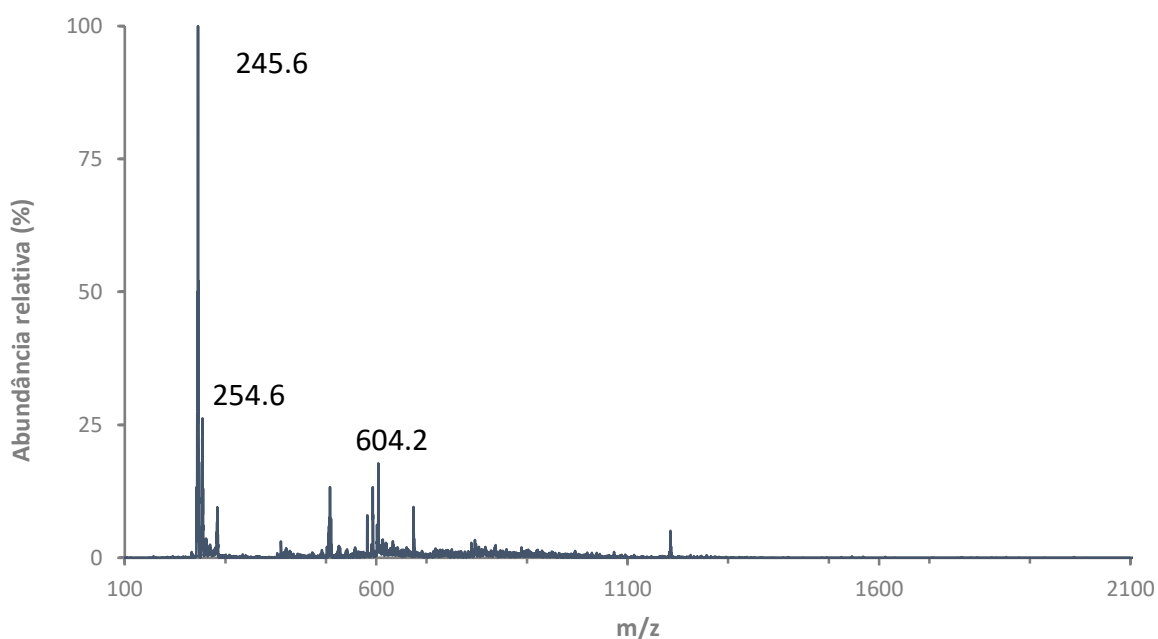


Gráfico IV-16. Espectro de massa (ESI-MS) da solução aquosa do CB[7] com o composto AB9.

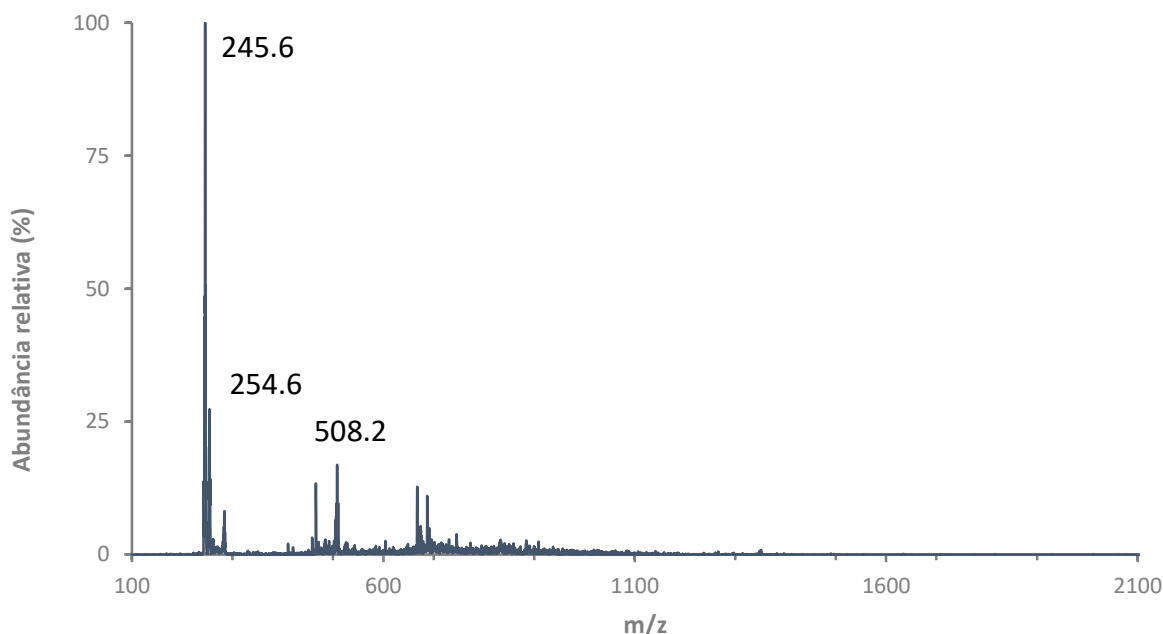


Gráfico IV-17. Espectro de massa (ESI-MS) da solução aquosa do CB[8] com o composto AB9.

Os espectros de massa das soluções aquosas de CB[7] e de CB[8] com o composto AB9 apresentam sinais de m/z 604 e 508 que correspondem, respectivamente, ao CB[7] livre e ao CB[8] livre. Os sinais de m/z 246 e 255 presentes no espectro de massa da solução aquosa do AB9 mantêm-se, no entanto não há evidência experimental da formação de complexos de inclusão para qualquer um dos compostos estudados dado que não é possível observar o sinal correspondente aos compostos encapsulados.

Embora tenham sido traçados os espectros de massa das soluções aquosas do CB[7] e do CB[8] com os compostos AB6, AB10 e AB11, os mesmos não são discutido neste ponto dada a complexidade de interpretação dos seus espectros de fragmentação.

4.3. Limitações experimentais

O presente trabalho experimental decorreu com algumas limitações inerentes à pouca informação disponível quanto à química de encapsulação, particularmente no que diz respeito ao tipo de compostos em estudo.

Com o decorrer do trabalho experimental surgiram algumas dificuldades que são importantes referir:

- O início do trabalho foi marcado por um contratempo na integridade do reagente de partida ($\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) que se encontrava degradado. As primeiras reações foram efetuadas com o reagente de partida disponível no laboratório, o que levou ao atraso no desenvolvimento do trabalho experimental. Uma nova quantidade de $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ teve de ser encomendada;

- O procedimento de isolamento dos compostos descritos na literatura não resultou imediatamente na formação dos produtos esperados pelo que parte do período destinado ao trabalho experimental foi investido na otimização das condições de isolamento dos compostos terpiridínicos de ruténio;

- A falta de acessibilidade a métodos de caracterização não disponíveis na Universidade do Algarve como a espectroscopia por RMN condicionou uma análise mais cuidada, informativa e necessária dos compostos terpiridínicos de ruténio e dos complexos de inclusão em CB[7] e CB[8];

- A degradação dos complexos de inclusão nas condições reacionais de encapsulamento pode ter constituído uma dificuldade na caracterização dos mesmos por espectrometria de massa;

- A falta de disponibilidade temporal impossibilitou a otimização do estudo dos complexos de inclusão e a continuação deste trabalho experimental.

V. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

O cancro representa, atualmente, uma das maiores preocupações no que respeita à saúde, vitimando mais de 8 milhões de pessoas por ano, uma tendência que se estima estar a crescer¹⁸. Neste sentido, uma melhor compreensão sobre a doença oncológica assim como a continuidade do trabalho de investigação para o desenvolvimento de novas terapêuticas com uma boa relação custo-eficácia e de estratégias de otimização da eficácia terapêutica dos fármacos já conhecidos, torna-se urgente.

Com base na pesquisa bibliográfica que suporta esta dissertação, é possível constatar que os compostos de ruténio oferecem uma excelente alternativa aos clássicos agentes antineoplásicos pelos diferentes mecanismos de ação pelos quais atuam e pelas diversas características que os tornam bastante promissores em aplicações biológicas.

O transporte dirigido dos agentes antineoplásicos aos alvos tumorais constitui um passo importante na procura por um tratamento mais seguro e eficaz para o doente. Os cucurbiturilos têm sido alvo de grande atenção pelas suas propriedades químicas e estruturais promissoras que constituem uma vantagem no transporte e distribuição de fármacos dada a estabilidade das interações “*host-guest*” que estabelecem com os seus hóspedes.

O trabalho realizado, no âmbito do projeto de investigação desta dissertação, teve como objetivo a síntese de três compostos terpiridínicos de Ru(II) e um composto terpiridínico de Ru(III), cuja atividade antitumoral havia sido anteriormente testada em linhas celulares do carcinoma do pulmão e do carcinoma do cólon, por Lazić *et al.*¹³⁴ e o estudo da possibilidade do encapsulamento dos compostos sintetizados em CB[7] e CB[8].

Os estudos conduzidos, no seguimento deste trabalho, por espectroscopia de absorção no IV e no UV-Vis e por espectrometria de massa permitem concluir que os compostos terpiridínicos de ruténio, obtidos de acordo com os procedimentos descritos na literatura com ligeiras modificações, foram sintetizados com sucesso. Os mesmos estudos sugerem que os compostos AB10, AB11 e AB6 apresentam baixa estabilidade em soluções de etanol/água (1:1), dado que mostraram ser facilmente hidrolisados com perda do cloro. O composto AB9, por outro lado, aparenta ser mais estável. Os estudos realizados para os complexos de inclusão sugerem não haver indícios de encapsulamento.

Como perspetivas futuras, a condução de estudos complementares sobre os complexos de inclusão deve ser considerada, de forma a uma melhor compreensão do processo de

encapsulamento e à adoção de estratégias que facilitem a encapsulação pelos cucurbiturilos dos compostos antitumorais de ruténio sintetizados. Da mesma forma seria pertinente a realização de estudos com macrociclos constituídos por portais e cavidades de maior diâmetro, como por exemplo o CB[10], de modo a facilitar o acesso dos complexos à região hidrofóbica do cucurbiturilo e conseqüentemente o encapsulamento. Estudos posteriores com novas abordagens estruturais com ligandos terpiridina que demonstrem maior estabilidade em soluções aquosas podem devolver resultados interessantes considerando as capacidades deste ligando para se ligar covalentemente ao DNA e intercalar os pares de bases adjacentes da hélice de DNA. Por fim, o estudo da atividade citotóxica dos complexos de inclusão em linhas celulares do carcinoma do pulmão e do carcinoma do cólon seria importante como elemento comparador para a compreensão do efeito do encapsulamento sobre a atividade citotóxica dos compostos antitumorais de ruténio.

VI. BIBLIOGRAFIA

- (1) Howard, D. H.; Bach, P. B.; Berndt, E. R.; Conti, R. M. *J. Econ. Perspect.* **2015**, 29 (1), 139–162.
- (2) Miranda, N.; Portugal, C. *Doenças Oncológicas em Números –2015*; Portugal, 2016; pp 1–66.
- (3) National Cancer Institute. NCI Dictionary of Cancer Terms <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=45333> (accessed Mar 23, 2017).
- (4) American Cancer Society. Early History of Cancer <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/what-is-cancer.html> (accessed Mar 23, 2017).
- (5) Benedek, T. G.; Kiple, K. F. In *The Cambridge World History of Human Disease*; Kiple, K. F., Ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 1993; pp 102–110.
- (6) Weinberg, R. A. In *The Biology of Cancer*; Garland Science: New York, 2007; pp 25–56.
- (7) National Cancer Institute. What Is Cancer? <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (accessed Mar 25, 2017).
- (8) National Cancer Institute. NCI Dictionary of Cancer Terms <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?search=tumor> (accessed Mar 25, 2017).
- (9) Rabaça, C. In *Fisiopatologia. Fundamentos e Aplicações*; Pinto, A. M., Ed.; Lidel - edições técnicas: Lisboa, 2013; pp 293–316.
- (10) Lichtenstein, A. *Biochem.* **2017**, 82 (1), 75–80.
- (11) Danaei, G.; Hoorn, S. Vander; Lopez, A. D.; Murray, C. J. L.; Ezzati, M. *Lancet* **2005**, 366, 1784–1793.
- (12) Boyle, P.; Levin, B. *Mechanisms of carcinogenesis*; Lyon, 2008.
- (13) Baba, A. I.; Câtoi, C. Carcinogenesis <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9552/> (accessed Mar 27, 2017).
- (14) Liu, Y.; Yin, T.; Feng, Y.; Cona, M. M.; Huang, G.; Liu, J.; Song, S.; Jiang, Y.; Xia, Q.; Swinnen, J. V; Bormans, G.; Himmelreich, U.; Oyen, R.; Ni, Y. *Quant. Imaging Med. Surg.* **2015**, 5 (5), 708–729.
- (15) Pierotti, M. A.; Schichman, S. A.; Sozzi, G.; Croce, C. M. Oncogenes <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20806/#A1032> (accessed Mar 27, 2017).
- (16) Bizzarri, M.; Cucina, A. *Biomed Res. Int.* **2014**, 2014, 1–9.
- (17) American Cancer Society. Infographic: Rising Global Cancer Epidemic <https://www.cancer.org/research/infographics-gallery/rising-global-cancer-epidemic.html> (accessed Mar 27, 2017).

- (18) International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide 2012 <http://globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx> (accessed Mar 27, 2017).
- (19) World Health Organization. The top 10 causes of death <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index2.html> (accessed Mar 27, 2017).
- (20) OECD. *Health at a Glance: Europe 2016*; 2016.
- (21) Arteaga, C. L.; Adamson, P. C.; Engelman, J. A.; Foti, M.; Gaynor, R. B.; Hilsenbeck, S. G.; Limburg, P. J. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20* (19), 1–166.
- (22) Corrie, P. G. *Medicine (Baltimore)*. **2011**, *39* (12), 717–722.
- (23) Caley, A.; Jones, R. *Surg.* **2012**, *30* (4), 186–190.
- (24) Payne, S.; Miles, D. In *Scott-Brown's Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery*; Gleeson, M., Ed.; 2008; pp 34–46.
- (25) Link, W. In *International Manual of Oncology Practice*; Mello, R. A., Tavares, Á., Mountzios, G., Eds.; Springer International Publishing, 2015; pp 81–94.
- (26) Trudu, F.; Amato, F.; Vanhara, P.; Pivetta, T.; Peña-Méndez, E. M.; Havel, J. *J. Appl. Biomed.* **2015**, *13* (2), 79–103.
- (27) Chen, D.; Milacic, V.; Frezza, M.; Dou, Q. P. *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15* (7), 777–791.
- (28) Yaman, M.; Kaya, G.; Yekeler, H. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13* (4), 612–618.
- (29) Miessler, G. L.; Tarr, D. A. In *Inorganic Chemistry*; Pearson Prentice Hall, 2003; pp 594–629.
- (30) Fricker, S. P. *R. Soc. Chem.* **2007**, 4903–4917.
- (31) Cohen, S. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 115–120.
- (32) Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. *Nature* **1965**, *205*, 698–699.
- (33) Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V. M.; Lachowicz, J. I.; Crisponi, G.; Zoroddu, M. A. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *284*, 329–350.
- (34) Muhammad, N.; Guo, Z. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 144–153.
- (35) Haas, K. L.; Franz, K. J. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (10), 4921–4960.
- (36) Jones, C.; Thornback, J. In *Medicinal Applications of Coordination Chemistry*; RSC Publishing: Cambridge, 2007; pp 1–14.
- (37) Miessler, G. L.; Tarr, D. A. In *Inorganic Chemistry*; Pearson Prentice Hall, 2003; pp 299–333.
- (38) Miessler, G. L.; Tarr, D. A. In *Inorganic Chemistry*; Pearson Prentice Hall, 2003; pp 412–450.
- (39) Frezza, M.; Hindo, S.; Chen, D.; Davenport, A.; Schemitt, S.; Tomco, D.; Dou, Q. P. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *16* (16), 1813–1825.

- (40) Siddik, Z. H. *Oncogene* **2003**, *22*, 7265–7279.
- (41) Kartalou, M.; Essigmann, J. M. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **2001**, *478* (1–2), 23–43.
- (42) Siddik, Z. H. In *Clinacally Relevant Resistance in Cancer Chemotherapy*; Borje Andersson, David Murray, Eds.; Springer Science + Business Media, LLC: New York, 2002; pp 263–277.
- (43) Wheate, N. J.; Collins, J. G. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *241*, 133–145.
- (44) Lippard, S. J. In *Bioinorganic Chemistry*; Bertini, I., Gray, H. B., Lippard, S. J., Valentine, J. S., Eds.; University Science Books: Mill Valley, 1994; pp 505–583.
- (45) Natile, G.; Coluccia, M. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *216–217*, 383–410.
- (46) Kelland, L. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 573–584.
- (47) Anderson, K.; Boise, L.; Louie, R.; Waxman, S. *Cancer J.* **2002**, *8* (1), 12–25.
- (48) Douer, D.; Hu, W.; Giralt, S.; Lill, M.; Dipersio, J. *Oncologist* **2003**, *8*, 132–140.
- (49) Pubchem. Oxyde Arsenieux
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/518740#section=2D-Structure> (accessed May 29, 2017).
- (50) Ronconi, L.; Sadler, P. J. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 1633–1648.
- (51) Sternber, C. N. ; Whelan, P.; Hetherington, J.; Paluchowska, B.; Slee, P. H.; Vekemans, K.; Van Erps, P.; Theodore, C.; Koriakine, O.; Oliver, T.; Ledwohl, D.; Debois, M.; Zurlo, A.; Collette, L. *Oncology* **2005**, *68*, 2–9.
- (52) Bednarski, P. J.; Mackay, F. S.; Sadler, P. J. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2007**, *7* (1), 75–93.
- (53) Fan, Y.; Zhang, Q. *Asian J. Pharm. Sci.* **2013**, *8*, 81–87.
- (54) Boulikas, T. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2009**, *18* (8), 1197–1218.
- (55) Stathopoulos, G. P.; Boulikas, T.; Kourvetaris, A.; Stathopoulos, J. *Anticancer Res.* **2006**, *26*, 1489–1493.
- (56) Roder, C.; Thomson, M. J. *Drugs R. D.* **2015**, *15* (1), 13–20.
- (57) Nobili, S.; Mini, E.; Landini, I.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Messori, L. *Med. Res. Rev.* **2010**, *30* (3), 550–580.
- (58) Jain, S.; Hirst, D. G.; O’Sullivan, J. M. *Br. J. Radiol.* **2012**, *85*, 101–113.
- (59) Banti, C. N.; Hadjikakou, S. K. *R. Soc. Chem.* **2013**, *5* (6), 569–596.
- (60) Medici, S.; Peana, M.; Crisponi, G.; Nurchi, V. M.; Lachowicz, J. I.; Remelli, M.; Antonietta, M. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *327–328*, 349–359.
- (61) Gasser, G.; Ott, I.; Metzler-Nolte, N. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (1), 3–25.
- (62) Mojžišová, G.; Mojžiš, J.; Vašková, J. *Acta Biochim. Pol.* **2014**, *61* (4), 651–654.

- (63) Sava, G.; Bergamo, A.; Dyson, P. J. *Dalt. Trans.* **2011**, *40*, 9069–9075.
- (64) Bullock, J. L.; Celestine, M. J.; Holder, A. A. In *Ruthenium: Synthesis, Physicochemical Properties And Applications*; Keeler, G. P., Ed.; Nova Science Publishers: New York, 2014; pp 3–11.
- (65) Clarke, M. j. In *Progress in Clinical and Biochemistry and Medicine*; Baulieu, E., Forman, Donald, T., Ingelman-Sundberg, M., Jaenicke, L., Kellen, J. A., Nagai, Y., Springer, G. F., Trager, L., Will-Shahab, L., Wittliff, J. L., Eds.; Springer-Verlag, 1989; Vol. 10, pp 26–27.
- (66) Reedijk, J. *Platin. Met. Rev.* **2008**, *52* (1), 2–11.
- (67) Sava, G. In *Metal Compounds in Cancer Therapy*; Fricker, S. P., Ed.; Springer Science + Business Media: Scarborough, 1994; pp 66–87.
- (68) Bergamo, A.; Gaiddon, C.; Schellens, J. H. M.; Beijnen, J. H.; Sava, G. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *106* (1), 90–99.
- (69) Rademaker-lakhai, J. M.; Bongard, D. Van Den; Pluim, D.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10* (11), 3717–3727.
- (70) Leijen, S.; Burgers, S. A.; Baas, P.; Pluim, D.; Tibben, M.; Werkhoven, E.; Alessio, E.; Sava, G.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. *Invest New Drugs* **2015**, *33* (1), 201–214.
- (71) Lentz, F.; Drescher, A.; Lindauer, A.; Henke, M.; Hilger, R. A.; Hartinger, C. G.; Scheulen, M. E.; Dittrich, C. *Anticancer. Drugs* **2000**, *20* (2), 97–103.
- (72) Burris, H. A.; Bakewell, S.; Bendell, J. C.; Infante, J.; Jones, S. F.; Spigel, D. R.; Weiss, G. J.; Ramanathan, R. K.; Ogden, A.; Hoff, D. Von. *ESMD Open Cancer Horizons* **2016**, *1*, 1–8.
- (73) Antonarakis, E.; Emadi, A. *Cancer Chemother Pharmacol* **2010**, *66* (1), 1–9.
- (74) Trondl, R.; Heffeter, P.; Kowol, C. R.; Jakupec, M. A.; Berger, W.; Keppler, B. K. *R. Soc. Chem.* **2014**, *5*, 2925–2932.
- (75) Bergamo, A.; Gagliardi, R.; Scarcia, V.; Furlani, A.; Alessio, E.; Mestroni, G.; Sava, G. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *289* (1), 559–564.
- (76) Sava, G.; Zorzet, S.; Turrin, C.; Vita, F.; Soranzo, M.; Zabucchi, G.; Cocchietto, M.; Bergamo, A.; Digiovine, S.; Pezzoni, G.; Sartor, L.; Spiridione, G. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9* (5), 1898–1905.
- (77) Sava, G.; Frausin, F.; Cocchietto, M.; Vita, F.; Podda, E.; Spessotto, P.; Furlani, A.; Scarcia, V.; Zabucchi, G. *Eur. J. Cancer* **2004**, *40* (9), 1383–1396.
- (78) Bergamo, A.; Sava, G. *R. Soc. Chem.* **2007**, *13* (13), 1267–1272.
- (79) Casarsa, C.; Mischis, M. T.; Sava, G. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98* (10), 1648–1654.
- (80) Vacca, A.; Bruno, M.; Boccarelli, A.; Coluccia, M.; Ribatti, D.; Bergamo, A.; Garbisa, S.; Sartor, L.; Sava, G. *Br. J. Cancer* **2002**, *86* (6), 993–998.
- (81) Zorzet, S.; Bergamo, A.; Cocchietto, M.; Sorc, A.; Gava, B.; Alessio, E.; Iengo, E.; Sava, G. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *295* (3), 927–933.

- (82) Plum, D.; Waardenburg, R. Van; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. *Cancer Chemother Pharmacol* **2004**, *54* (1), 71–78.
- (83) Alessio, E. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017* (12), 1549–1560.
- (84) Hartinger, C. G.; Zorbas-seifried, S.; Jakupec, M. A.; Kynast, B.; Zorbas, H.; Keppler, B. K. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100* (5–6), 891–904.
- (85) Schluga, P.; Hartinger, C. G.; Egger, A.; Reisner, E.; Galanski, M.; Jakupec, M. A.; Keppler, B. K. *R.* **2006**, 1796–1802.
- (86) Kapitza, S.; Pongratz, M.; Jakupec, M. A.; Heffeter, P.; Berger, W.; Lackinger, L.; Keppler, B. K.; Marian, B. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2005**, *131*, 101–110.
- (87) Hartinger, C. G.; Jakupec, M. A.; Zorbas-Seifried, S.; Groessl, M.; Egger, A.; Berger, W.; Zorbas, H.; Dyson, P. J.; Keppler, B. K. *Chem. Biodivers.* **2008**, *5* (10), 2140–2155.
- (88) Flocke, L. S.; Trondl, R.; Jakupec, M. A.; Keppler, B. K. *Invest New Drugs New Drugs* **2016**, *34* (3), 261–268.
- (89) Murray, B. S.; Babak, M. V.; Hartinger, C. G.; Dyson, P. J. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *306*, 86–114.
- (90) Dyson, P. J. *Chim. Int. J. Chem.* **2007**, *61* (11), 698–703.
- (91) Casini, A.; Gabbiani, C.; Sorrentino, F.; Rigobello, M. P.; Bindoli, A.; Geldbach, T. J.; Marrone, A.; Re, N.; Hartinger, C. G.; Dyson, P. J.; Messori, L. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (21), 6773–6781.
- (92) Skiba, J.; Kowalski, K.; Prochnicka, A.; Ott, I.; Solecka, J.; Rajnisz, A.; Therrien, B. *J. Organomet. Chem.* **2015**, *782*, 52–61.
- (93) Kemp, K. C.; Nell, M. J.; Rensburg, C.; Swarts, J. C. *Anticancer Res.* **2012**, *32* (7), 2915–2918.
- (94) Ang, W. H.; Dyson, P. J. *Eur. J. Cancer* **2006**, *2006* (20), 4003–4018.
- (95) Motswainyana, W. M.; Ajibade, P. A. *Adv. Chem.* **2015**, *2015*, 21.
- (96) Corral, E.; Hotze, A.; Dulk, H.; Leczkowska, A.; Rodger, A.; Hannon, M. J.; Reedijk, J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14* (3), 439–448.
- (97) Liu, Y.-J.; Zeng, C.-H.; Huang, H.-L.; He, L.-X.; Wu, F.-H. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (2), 564–571.
- (98) Knoll, J. D.; Albani, B. A.; Turro, C. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (42), 8777–8780.
- (99) Albani, B. A.; Peña, B.; Dunbar, K. R.; Turro, C. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13* (2), 272–280.
- (100) Chen, T.; Liu, Y.; Zheng, W. J.; Liu, J.; Wong, Y. S. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (14), 6366–6368.
- (101) Schmidlehner, M.; Flocke, L. S.; Roller, A.; Hejl, M.; Jakupec, M. A.; Kandioller, W.; Keppler, B. K. *R. Soc. Chem.* **2016**, *45* (2), 724–733.
- (102) Murray, B. S.; Babak, M. V.; Hartinger, C. G.; Dyson, P. J. *Coord. Chem. Rev.* **2016**,

306, 86–114.

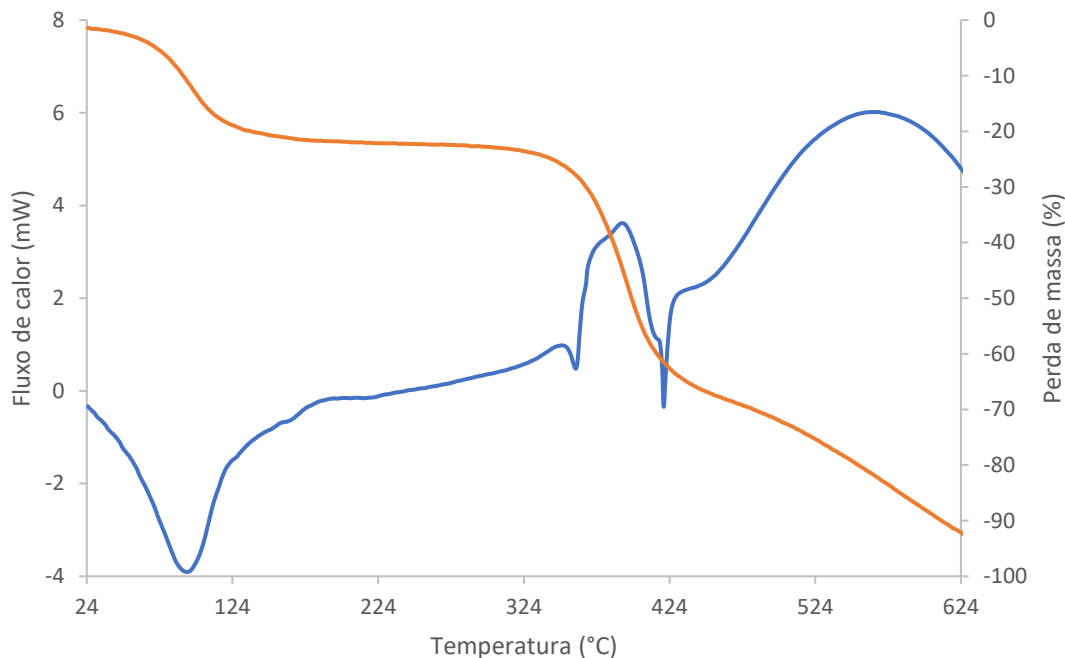
- (103) Wikimedia Commons. Ruthenocene
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ruthenocene.png> (accessed Jul 5, 2017).
- (104) Bergamo, A.; Sava, G. *R. Soc. Chem.* **2011**, *40* (31), 7817.
- (105) Keppler, B. K.; Rupp, W. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1986**, *111* (2), 166–168.
- (106) Hudej, R.; Miklavcic, D.; Cemazar, M.; Todorovic, V.; Sersa, G.; Bergamo, A.; Sava, G.; Martincic, A.; Scancar, J.; Keppler, B. K.; Turel, I. *J. Membr. Biol.* **2014**, *247* (12), 1239–1251.
- (107) Page, S. *Educ. Chem.* **2012**, 26–29.
- (108) Han, C.; Wang, B. In *Drug Delivery: Principles and Applications*; Wang, B., Hu, L., Siahaan, T. J., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, 2016; pp 1–18.
- (109) Yudin, A. K. *R. Soc. Chem.* **2015**, *6*, 30–49.
- (110) Walker, S.; Oun, R.; McInnes, F. J.; Wheate, N. J. *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 616–624.
- (111) Laza-Knoerr, A. L.; Gref, R.; Couvreur, P. *J. Drug Target.* **2010**, *18* (9), 645–656.
- (112) de Fátima, A.; Fernandes, S. A.; Sabino, A. A. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2009**, *6* (3), 1–20.
- (113) Yousaf, A.; Hamid, S. A.; Bunnori, N. M.; Ishola, A. A. *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, *9*, 2831–2838.
- (114) Altmann, P. J.; Pöthig, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (40), 13171–13174.
- (115) Li, C. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12420–12433.
- (116) Macartney, D. H. *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 600–615.
- (117) Nau, W. M.; Scherman, O. A. *Isr. J. Chem.* **2011**, *51* (5–6), 492–494.
- (118) Lee, J. W.; Samal, S.; Selvapalam, N.; Kim, H. J.; Kim, K. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36* (8), 621–630.
- (119) Assaf, K. I.; Nau, W. M. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (2), 394–418.
- (120) Marquez, C.; Nau, W. M. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2001**, *40* (17), 3155–3160.
- (121) Mecozi, S.; Rebek, J. *Chem. - A Eur. J.* **1998**, *4* (6), 1016–1022.
- (122) Masson, E.; Ling, X.; Joseph, R.; Kyeremeh-mensah, L.; Lu, X. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 1213–1247.
- (123) Márquez, C.; Hudgins, R. R.; Nau, W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (18), 5806–5816.
- (124) Hettiarachchi, G.; Nguyen, D.; Wu, J.; Lucas, D.; Ma, D.; Isaacs, L.; Briken, V. *PLoS One* **2010**, *5* (5), 1–11.
- (125) Montes-Navajas, P.; González-Béjar, M.; Scaiano, J. C.; García, H. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8* (12), 1743–1747.

- (126) Uzunova, V. D.; Cullinane, C.; Brix, K.; Nau, W. M.; Day, A. I. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8 (9), 2037–2042.
- (127) Jeon, Y. J.; Kim, S.-Y.; Ko, Y. H.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Kim, K. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3 (11), 2122–2125.
- (128) Plumb, J. A.; Venugopal, B.; Oun, R.; Gomez-Roman, N.; Kawazoe, Y.; Venkataramanan, N. S.; Wheate, N. J. *Metallomics* **2012**, 4 (6), 561–567.
- (129) Pisani, M. J.; Zhao, Y.; Wallace, L.; Woodward, C. E.; Keene, F. R.; Day, A. I.; Collins, J. G. *Dalt. Trans.* **2010**, 39 (8), 2078–2086.
- (130) Pisani, M. J.; Zhao, Y.; Wallace, L.; Woodward, C. E.; Keene, F. R.; Day, A. I.; Collins, J. G. .
- (131) Guo, D.; Uzunova, V. D.; Assaf, K. I.; Lazar, A. I.; Liu, Y.; Nau, W. M. *Supramol. Chem.* **2015**, 28 (5–6), 384–395.
- (132) Kim, J.; Ahn, Y.; Park, K. M.; Kim, Y.; Ko, Y. H.; Oh, D. H.; Kim, K. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, 46 (39), 7393–7395.
- (133) Park, K. M.; Lee, D. W.; Sarkar, B.; Jung, H.; Kim, J.; Ko, Y. H.; Lee, K. E.; Jeon, H.; Kim, K. *Small* **2010**, 6 (13), 1430–1441.
- (134) Lazić, D.; Arsenijević, A.; Puchta, R.; D. Bugarčić, Ž.; Rilak, A. *R. Soc. Chem.* **2016**, 45, 4633–4646.
- (135) Mulyana, Y.; Collins, G.; Keene, R. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2011**, 71 (3–4), 371–379.
- (136) Rilak, A.; Bratsos, I.; Zangrando, E.; Kljun, J.; Turel, I.; Alessio, E. *Inorg. Chem.* **2014**, 53, 6113–6126.
- (137) Romão Dias, A. In *Ligação Química*; Luís Filipe Coelho, Ed.; IST Press: Lisboa, 2009; pp 457–465.
- (138) Miessler, G. L.; Tarr, D. A. In *Inorganic Chemistry*; Pearson Prentice Hall, 2003; pp 379–409.
- (139) Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. In *Spectrometric Identification of Organic Compounds*; Brennan, D., Yee, J., Wolfman-Robichaud, S., Rigby, S., Eds.; John Wiley & Sons, Inc., 2005; pp 72–108.
- (140) Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. In *Spectrometric Identification of Organic Compounds*; Brennan, D., Yee, J., Wolfman-Robichaud, S., Rigby, S., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2005; pp 1–37.
- (141) Harvey, D. Gravimetric Methods [https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Analytical_Chemistry_2.0_\(Harvey\)/08%3A_Gravimetric_Methods](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/08%3A_Gravimetric_Methods) (accessed Aug 25, 2017).
- (142) Rilak, A.; Bratsos, I.; Zangrando, E.; Kljun, J.; Turel, I.; Bugarčić, Ž. D.; Alessio, E. *Inorg. Chem.* **2014**, 53 (12), 6113–6126.

- (143) Chatterjee, D.; Sengupta, A.; Mitra, A. *Polyhedron* **2007**, 26 (1), 178–183.
- (144) Patel, M. N.; Gandhi, D. S.; Parmar, P. A.; Joshi, H. N. *J. Coord. Chem.* **2012**, 65 (11), 1926–1936.
- (145) Root, M. J.; Deutsch, E. *Inorg. Chem.* **1985**, 25 (9), 1464–1471.
- (146) Gupta, N.; Grover, N.; Neyhart, G. A.; Shgh, P.; Thorp, H. *Inorg. Chem.* **1993**, 32 (3), 310–316.
- (147) Kalyanasundaram, K.; Nazeeruddin, M. K. *Inorg. Chem.* **1990**, 29 (10), 1888–1897.
- (148) Nazeeruddin, M. K.; Zakeeruddin, S. M.; Kalyanasundaram, K. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 9607–9612.
- (149) Papaefstathiou, G. S.; Sofetis, A.; Raptopoulou, C. P.; Terzis, A.; Spyroulias, G. A.; Zafiropoulos, T. F. *J. Mol. Struct.* **2007**, 837 (1–3), 5–14.

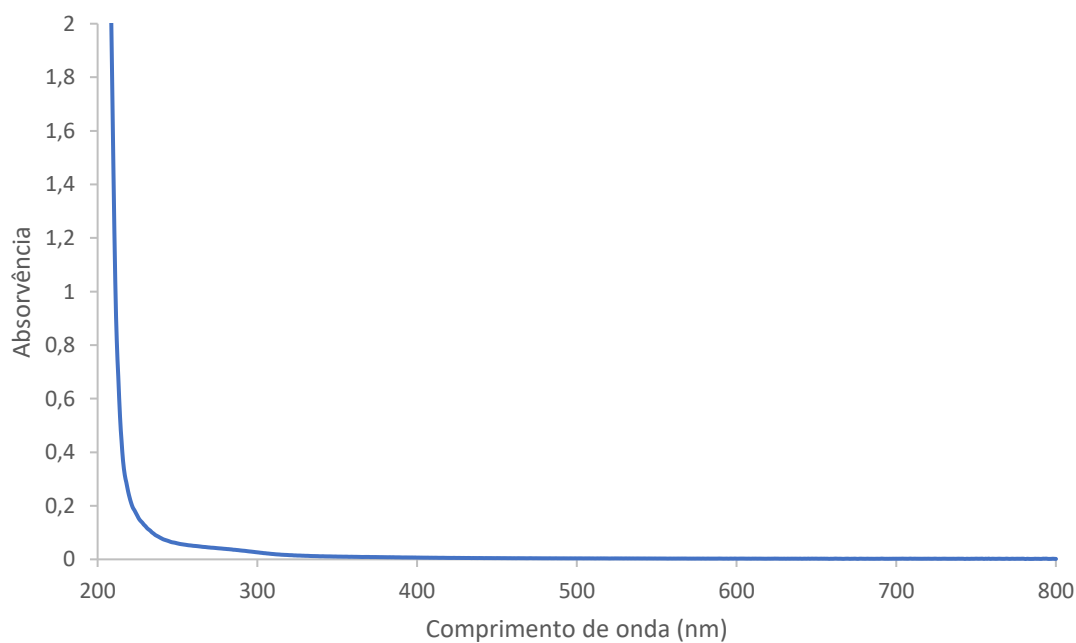
VII. ANEXOS

7.1. Análise gravimétrica do CB[8]



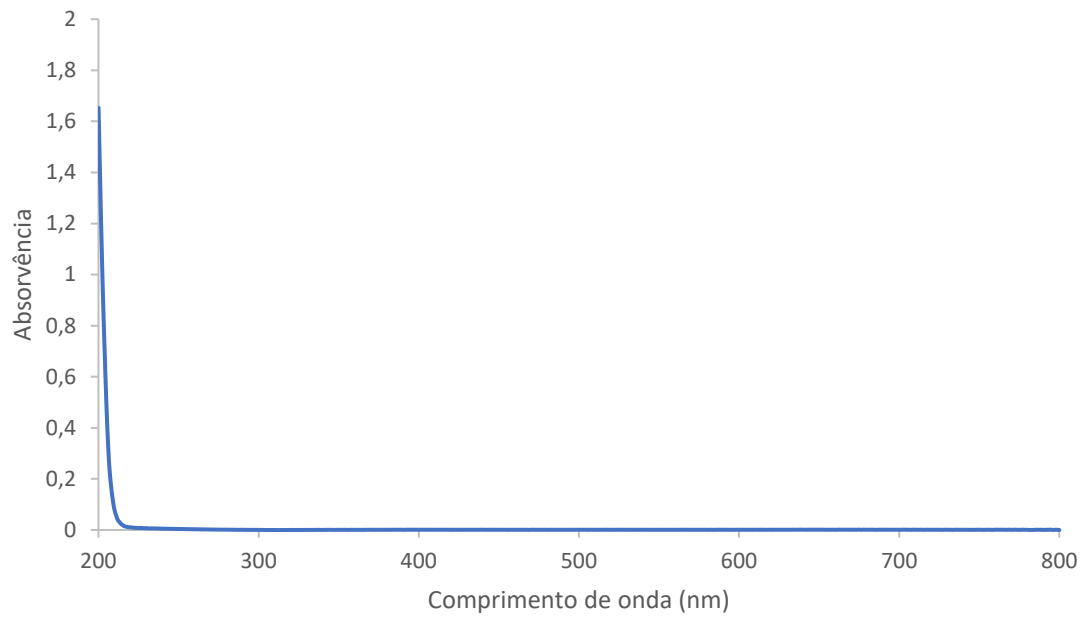
Representação gráfica da análise gravimétrica do CB[8].

7.2. Espectro de Absorção no UV-Vis do CB[7] e do CB[8]



Espectro de Absorção no UV-Vis do CB[7], em água.

Complexos de rutênio com potencial antineoplásico e estudos de encapsulamento em cucurbiturilos



Espetro de Absorção no UV-Vis do CB[8], em água.