



**Metalodendrimeros de Baixa Geração
Utilizando Dendrimeros Poli(Alquilideno Imina)
Funcionalizados com Nitrilos**
Estudos de citotoxicidade

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marisol Fátima Sánchez de Gouveia
MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

setembro | 2014

**Metalodendrimeros de Baixa Geração
Utilizando Dendrimeros Poli(Alquilideno Imina)
Funcionalizados com Nitrilos**
Estudos de citotoxicidade

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marisol Fátima Sánchez de Gouveia

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTADOR

João Manuel Cunha Rodrigues

CO-ORIENTADOR

Helena Maria Pires Gaspar Tomás



**METALODENDRÍMEROS DE BAIXA GERAÇÃO UTILIZANDO
DENDRÍMEROS POLI(ALQUILIDENO IMINA) FUNCIONALIZADOS COM
NITRILOS: ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE**

**Dissertação submetida à UNIVERSIDADE DA MADEIRA para obtenção do grau de mestre
em Bioquímica Aplicada**

Marisol Fátima Sánchez de Gouveia

Orientador: Professor Doutor João Manuel Cunha Rodrigues

Co-orientador: Professora Doutora Helena Maria Pires Gaspar Tomás

Centro de Competências de Ciências Exactas e da Engenharia
Centro de Química da Madeira
Campus Universitário da Penteada 9000-390, Funchal – Portugal

Setembro 2014

Agradecimentos

Ao Professor Doutor João Rodrigues por me dar a oportunidade de desenvolver o presente projecto de mestrado no grupo de investigação em Materiais Moleculares (MMRG) do CQM, pela forma empenhada com que me supervisionou, pelos conhecimentos científicos transmitidos, por toda a ajuda disponibilizada na concretização dos objectivos propostos, pelo incentivo, entusiasmo e paciência demonstrados, bem como pela revisão do trabalho escrito.

À Professora Doutora Helena Tomás pela oportunidade de realizar os ensaios de citotoxicidade no laboratório de Bioquímica e Cultura Celular do CQM e pela forma empenhada, prática, clara e encorajadora com que orientou o meu trabalho. Agradeço também todo o apoio prestado no esclarecimento de dúvidas e pelo tempo dispendido na revisão do presente trabalho.

Ao Manuel Jardim, aluno de doutoramento do MMRG, pela sua colaboração e conhecimentos transmitidos na parte da síntese dos compostos, pela ajuda na análise dos espectros obtidos por RMN e por espectrometria de massa e por me ter gentilmente cedido o dendrímero *N,N,N',N'*-[tetraquis(cianoetoxipropil)hexametilenodiamina].

Ao João Figueira, ex-aluno de doutoramento do MMRG, pela amabilidade na partilha de conhecimentos, pelo bom humor e simpatia demonstrados no dia-a-dia, pelo apoio e colaboração nas sínteses e nos estudos de estabilidade realizados. Agradeço também a dedicação e clareza demonstradas no esclarecimento de dúvidas associadas à interpretação dos dados obtidos por espectroscopia de RMN e pela análise elementar.

À Rita Castro, aluna de doutoramento do MMRG, pela simpatia, ajuda, disponibilidade e sugestões valiosas transmitidas na realização dos ensaios de citotoxicidade.

Às colegas Nilsa Oliveira, Carla Miguel e Cláudia Camacho, investigadoras do CQM e do MMRG, pelas palavras amigas e encorajadoras para que eu levasse a bom porto o presente trabalho.

Ao Hospital Dr. Nélio Mendonça (Funchal), em particular ao serviço de ortopedia, pela obtenção do osso trabecular humano de onde foi retirada a medula óssea.

Às técnicas de laboratório, Paula Temtem e Paula Vieira, pela simpatia e a disponibilização de diversos reagentes e de material de vidro.

Ao Centro de Química da Madeira e à Universidade da Madeira pelas condições disponibilizadas para o desenvolvimento do presente projecto de investigação.

Agradeço também à Universidade de Jyväskylä, Finlândia, na pessoa do Professor Kari Rissanen pelo apoio na realização dos espectros de massa e as análises elementares dos meus compostos.

Aos meus pais e irmãos por todo o carinho, compreensão, por acreditarem nas minhas potencialidades, pela motivação, incentivo e apoio incondicional para que eu conclui-se este ciclo.

Um MUITO OBRIGADA especialíssimo ao meu namorado, Tiago Fernandes, por todo o amor, carinho, compreensão, incentivo e motivação demonstrados diariamente. Obrigada por seres um excelente ouvinte, pela simplicidade, honestidade, humildade e generosidade que te caracterizam. Obrigada por acreditares nas minhas capacidades, pelo empenho, dedicação e determinação incomensuráveis e permanentes para que eu alcançasse as minhas e as nossas metas. Obrigada pelas conversas construtivas, pela partilha de ideias, pelas correcções propostas no trabalho escrito. Agradeço profundamente por me acompanhares em todo este percurso de vida.

Lista de publicações/apresentações

Parte dos resultados obtidos no presente trabalho foram publicados/apresentados nas seguintes formas:

Artigo

• Rodrigues J, Jardim MG, Figueira J, Gouveia M, Tomás H, Rissanen K. Poly(alkylidenamines) dendrimers as scaffolds for the preparation of low-generation ruthenium based metallodendrimers. *New J. Chem.* 2011;35:1938-1943.

Comunicação oral

• Gouveia M, Tomás H, Rodrigues J; Preparation of low-generation metallodendrimers using nitrile-functionalized poly(alkylidenamines) dendrimers: cytotoxicity studies in cancer cell lines; 7th Materials Group Meeting/CQM, 27 de Janeiro, Funchal, Portugal, 2012.

• Rodrigues J, Jardim M, Figueira J, Gouveia M, Tomás H, Rissanen K; Low-generation ruthenium based metallodendrimers for biomedical applications; *Biodendrimers 2012 – 3rd International Symposium on Biological Applications of Dendrimers*, 5 a 8 de Setembro, Toledo, Spain, 2012.

• Rodrigues J, Jardim M, Gouveia M, Figueira J, Tomás H, Rissanen K; Ruthenium poly(alkylidenamine) nitrile dendrimers – a new family of biometallodendrimers; *XXV International Conference on Organometallic Chemistry (XXV ICOMC)*, 2 a 7 de Setembro, Lisboa, 2012.

• Gouveia M, Tomás H, Rodrigues J; Preparation of low-generation metallodendrimers using nitrile-functionalized poly(alkylidenamines) dendrimers: cytotoxicity studies in cancer cell lines; 8th Materials Group Meeting/CQM, 25 de Janeiro, Funchal, Portugal, 2013.

Resumo

Os metalodendrimeros têm surgido como fortes candidatos a agentes anticancerígenos devido à conjugação das propriedades dos dendrimeros (*e.g.* multifuncionalidade, baixa polidispersidade, acumulação preferencial nos tumores) com as dos complexos organometálicos (*e.g.* diversidade estrutural e múltiplos estados redox).

Nesta dissertação, prepararam-se metalodendrimeros de ruténio (II) de baixa geração baseados em estruturas dendríticas de poli(alquilideno imina) funcionalizadas perifericamente com grupos nitrilo. A partir da reacção do dendrimeros $[N\equiv C(CH_2)_2]_2N(CH_2)_6N[(CH_2)_2C\equiv N]_2$ (**3**) ou do dendrimeros $[N\equiv C(CH_2)_2O(CH_2)_3]_2N(CH_2)_6N[(CH_2)_3O(CH_2)_2C\equiv N]_2$ (**6**) com o complexo organometálico $[(\eta^5-C_5H_5)Ru(PPh_3)_2Cl]$, na presença do $AgCF_3SO_3$ como abstractor de cloretos, obteve-se os metalodendrimeros $\{[(\eta^5-C_5H_5)(PPh_3)_2Ru]_4\}[(CF_3SO_3)_4]$ (**7**) e $\{[(\eta^5-C_5H_5)(PPh_3)_2Ru]_4\}[(CF_3SO_3)_4]$ (**8**) com rendimentos de 35 e 25%, respectivamente. Estes compostos foram caracterizados por diversas técnicas analíticas, nomeadamente por espectroscopia de RMN (1H , ^{31}P e ^{19}F) e de infravermelho (FT-IR), espectrometria de massa (MS) e análise elementar.

O efeito citotóxico dos dendrimeros **3** e **6**, dos metalodendrimeros **7** e **8** e dos complexos $[(\eta^5-C_5H_5)Ru(PPh_3)_2Cl]$ e cisplatina foram determinados, através do ensaio do MTT, em células de origem neoplásica (linhas celulares Caco-2, CAL-72, MCF-7, A2780 e A2780cisR) e em células estaminais mesenquimais humanas saudáveis de origem não-neoplásica (MSCs). Os resultados obtidos de actividade metabólica foram considerados como uma medida directa de viabilidade celular e expressos em função da concentração. A partir destes gráficos foram estimados os valores de IC_{50} para cada composto nos diferentes tipos de células estudadas. Os metalodendrimeros **7** e **8** apresentaram um efeito inibitório, por molécula, significativo no crescimento da série de células cancerígenas estudadas com valores de IC_{50} situados entre 0,1 e 3,4 μM . Estes compostos demonstraram uma actividade antiproliferativa, por molécula, superior aos restantes compostos analisados. A citotoxicidade por centro metálico destes metalodendrimeros foi superior à actividade da cisplatina para as células MCF-7, A2780, A2780cisR e para as MSCs.

Os promissores resultados obtidos neste trabalho, permite-nos inferir que uma avaliação biológica padronizada combinada com uma entrega direccionada para os tumores destes metalodendrimeros será crucial para uma aplicação bem-sucedida.

Palavras-chave: complexos de ruténio (II), poli(alquilideno imina), metalodendrimeros, fármacos anticancerígenos, química organometálica, ensaio do MTT.

Abstract

Metallodendrimers have emerged as strong candidates for the design of anticancer drugs due to the conjugation of the dendrimer properties (*e.g.* multifunctionality, low polydispersity, preferential accumulation in tumors) with the characteristics of organometallic complexes (*e.g.* structural diversity and multiple redox states).

In this dissertation, low generation ruthenium(II) metallodendrimers were prepared based on poly(alkylideneimine) dendritic structures peripherally functionalized with nitrile groups. From the reaction of the $[\text{N}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{N}]_2$ (**3**) dendrimer or the $[\text{N}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{N}]_2$ (**6**) dendrimer with the organometallic complex $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$, in the presence of AgCF_3SO_3 , as chloride abstractor, we describe the successful preparation of the following metallodendrimers $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}]_4(\mathbf{3})[\text{CF}_3\text{SO}_4]_4$ (**7**) and $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}]_4(\mathbf{6})[\text{CF}_3\text{SO}_4]_4$ (**8**) with yields of 35 and 25%, respectively. These compounds were characterized by several analytical techniques, namely NMR (^1H , ^{31}P and ^{19}F) and infrared spectroscopy (FT-IR), mass spectrometry (MS) and elemental analysis.

The cytotoxicity effect of the dendrimers **3** and **6**, along with the metallodendrimers **7** and **8**, the complexes $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ and cisplatin were determined by the MTT assay in neoplastic cells (Caco-2, CAL-72, MCF-7, A2780 and A2780cisR cell lines) and in healthy mesenchymal stem cells of non-neoplastic origin. The metabolic activity results were considered as a direct measure of cell viability and expressed against the concentration. From these plots the IC_{50} values were determined for each compound regarding each cell type studied. The metallodendrimers **7** and **8** displayed a significant inhibitory effect per molecule in all cancer cell types evaluated in this work with IC_{50} values lying between 0.1 and 3.4 μM . These compounds have shown a superior antiproliferative activity, per molecule, when compared with the dendrimer/complex alone. The cytotoxicity per metallic center of the synthesized metallodendrimers was higher than the activity of cisplatin in MCF-7, A2780, A2780cisR cells and in MSCs. The promising results obtained in this work allows us to infer that a standardized biological evaluation along with a target delivery of these metallodendrimers will be crucial for its successful applications.

Keywords: ruthenium (II) complexes, poly(alkylideneimine), metallodendrimers, anticancer drugs, organometallic chemistry, MTT assay.

Índice geral

Agradecimentos	i
Lista de publicações/apresentações.....	iii
Resumo	v
Abstract.....	vii
Índice geral.....	ix
Índice de figuras.....	xiii
Índice de tabelas.....	xix
Índice de símbolos, abreviaturas e siglas	xxi
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1. Biologia do Cancro.....	3
1.1.1. Definição de cancro	3
1.1.2. Epidemiologia do cancro	6
1.1.3. Causas do cancro.....	8
1.1.4. Carcinogénese	11
1.1.5. Tratamento do cancro.....	13
1.2. Complexos metálicos como agentes anticancerígenos.....	18
1.2.1. Complexos de platina - Modo de actuação da cisplatina.....	20
1.2.1.1. Resistência celular aos complexos de platina e estratégias para otimizar a sua eficiência.....	25
1.2.2. Complexos de ruténio - Modo de actuação dos complexos de ruténio.....	28
1.2.2.1. Complexos de ruténio(III) presentes nos ensaios clínicos: NAMI-A e KP1019	31
1.2.2.2. Complexos de ruténio (II) com ligandos areno	34
1.2.2.3. Complexos de ruténio (II) com ligandos ciclopentadienilo	40
1.2.2.4. Complexos polinucleares de ruténio(II)-areno.....	45
1.3. Metalodendrímeros como agentes anticancerígenos.....	46
1.3.1. Dendrímeros como sistemas de entrega de fármacos.....	47
1.3.1.1. Propriedades dos dendrímeros como sistemas de entrega	49
1.3.2. Metalodendrímeros	50
1.4. Objectivos do trabalho	55
Capítulo 2 – Resultados e discussão	57
2.1. Preparação e caracterização dos compostos.....	59

2.1.1. Preparação dos complexos organometálicos	59
2.1.1.1. Preparação do $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (1)	59
2.1.1.2. Preparação do $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{dppe})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (2)	61
2.1.2. Preparação dos dendrímeros	65
2.1.2.1. Preparação do $[\text{N}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{N}]_2$ (6)	65
2.1.3. Preparação dos metalodendrímeros	69
2.1.3.1. Preparação do $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ (7)	69
2.1.3.2. Preparação do $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(6)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ (8)	72
2.1.3.3. Preparação do $[\{(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{en})\text{Ru}\}_4(3)][\text{PF}_6]_8$ (9)	75
2.1.3.4. Preparação do $[\{(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{en})\text{Ru}\}_4(6)][\text{PF}_6]_8$ (10)	77
2.2. Estabilidade dos metalodendrímeros	79
2.3. Avaliação da actividade biológica <i>in vitro</i>	82
Capítulo 3 – Conclusões e perspectivas futuras	93
Capítulo 4 – Componente experimental	99
4.1. Solventes e reagentes	101
4.2. Equipamentos	102
4.3. Sínteses	102
4.3.1. Síntese dos compostos organometálicos	102
4.3.1.1. Síntese do $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (1)	102
4.3.1.2. Síntese do $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{NCCH}_3)_2\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (2a)	103
4.3.1.3. Síntese do $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{dppe})\text{Cl}][\text{Cl}]$ (2b)	103
4.3.2. Síntese dos dendrímeros	104
4.3.2.1. Síntese do $[\text{OH}(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{OH}]_2$ (5)	104
4.3.2.2. Síntese do $[\text{N}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{N}]_2$ (6)	104
4.3.3. Síntese dos metalodendrímeros	104
4.3.3.1. Síntese do $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ (7)	104
4.3.3.2. Síntese do $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(6)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ (8)	105
4.3.3.3. Síntese do $[\{(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{en})\text{Ru}\}_4(3)][\text{PF}_6]_8$ (9)	106
4.3.3.4. Síntese do $[\{(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{en})\text{Ru}\}_4(6)][\text{PF}_6]_8$ (10)	106
4.4. Estudos de estabilidade	107
4.5. Estudos de citotoxicidade	107
4.5.1. Linhas celulares e cultura de células	107
4.5.2. Ensaio da viabilidade celular com o teste do MTT	108
Referências Bibliográficas	111

Anexos	129
Anexo I.....	131
I. Datos espectroscópicos.....	131
Anexo II.....	139
II. Microfotografías das células	139

Índice de figuras

Figura 1 - As etapas principais do processo de invasão e metastização do cancro: a) transformação celular e crescimento do tumor primário; b) angiogénese promovida pela síntese e secreção de factores angiogénicos; c) invasão para os vasos sanguíneos ou linfáticos; d) circulação das células cancerígenas no sistema circulatório e interação com os componentes do sangue com acesso aos nutrientes. As células que sobrevivem à circulação ficam retidas/aderentes nos capilares sanguíneos de diversos órgãos (<i>e.g.</i> pulmão, cérebro); e) extravasação: saída das células cancerígenas dos capilares para o parênquima, o tecido residente no exterior dos vasos e da membrana basal capilar, ocorrendo a formação de micrometástases e f) a proliferação celular e a angiogénese nas micrometástases favorecem o seu crescimento e o aparecimento de metástases adicionais (adaptado da referência [9]).	4
Figura 2 - Mortalidade por tipo de cancro registada no mundo em 2012 (adaptado da referência [20]).	6
Figura 3 - Mortalidade e incidência dos principais tipos de cancros na Europa em 2010 e respectivas previsões para 2020 (adaptado da referência [21]).	7
Figura 4 - Óbitos segundo as principais causas de morte, por 100 mil habitantes, registados em Portugal desde 1970 a 2012 [25].	8
Figura 5 - Estrutura secundária da molécula de ADN ilustrando os seus centros nucleofílicos, onde as bases nucleotídicas estão representadas pelas letras T - timina, A - adenina, C - citosina e G - guanina (adaptado da referência [27]).	9
Figura 6 - Efeito da radiação na molécula de ADN (adaptado da referência [28]).	10
Figura 7 - Processo multifásico da carcinogénese (adaptado da referência [33]).	12
Figura 8 - Ressecção de um tumor presente no pâncreas envolvendo o corte e a reconstrução da confluência estabelecida entre as veias porta e mesentérica superior (PV-SMV) (adaptado da referência [35]).	13
Figura 9 - Estrutura de alguns fármacos anticancerígenos que pertencem à família dos agentes alquilantes (adaptado das referências [4, 37]).	15
Figura 10 - Estrutura de alguns fármacos anticancerígenos que pertencem à família dos antimetabólitos (adaptado da referência [4]). Os nomes comuns seguidos da marca comercial do fármaco, utilizado na quimioterapia, encontram-se entre parêntesis (**genérico descontinuado).	16

Figura 11 - Estrutura de alguns fármacos anticancerígenos que pertencem à família dos inibidores mitóticos (adaptado da referência [38]), onde a marca comercial do fármaco administrado na quimioterapia é mencionada entre parêntesis (*genérico).....	17
Figura 12 - Estrutura do topotecano, inibidor da topoisomerase I (adaptado da referência [38])......	17
Figura 13 - Estrutura de alguns antibióticos anticancerígenos (adaptado da referência [38]), onde a marca comercial do fármaco administrado na quimioterapia é mencionada entre parêntesis (*genérico).	18
Figura 14 - Estrutura dos principais compostos presentes no Salvarsan® (adaptado da referência [51]).	19
Figura 15 - Estrutura da cisplatina, carboplatina e oxaliplatina (adaptado da referência [59])......	20
Figura 16 - Diagrama dos mecanismos que afectam e controlam a acumulação celular dos quimioterapêuticos de platina, exemplificado para a cisplatina (adaptado das referências [63, 65]).	22
Figura 17 - Representação esquemática da hidrólise da cisplatina em solução aquosa. Na tabela encontra-se registado as percentagens de cada espécie a pH 7,4 e a diferentes concentrações de iões de cloro, nomeadamente $[Cl^-] = 100 \text{ mM}$ e 4 mM (adaptado da referência [65])......	23
Figura 18 - Interação da cisplatina com as bases nucleotídicas do ADN: (A) ligação cruzada intracadeia, (B) ligação cruzada intercadeia, (C) aducto monofuncional e (D) complexo proteína-cisplatina-ADN. O principal local de ataque da cisplatina ao ADN é a posição N7 da guanina, representado no centro da imagem (adaptado da referência [67])......	23
Figura 19 - Estrutura do ADN contendo diferentes tipos de aductos de cisplatina: a) ligação cruzada 1,2- intracadeia; b) ligação cruzada 1,3- intracadeia e c) ligação cruzada intercadeia [70].	24
Figura 20 - Estrutura de alguns complexos polinucleares de platina [40]......	25
Figura 21 - Conjugação de um complexo de platina com a hormona estradiol (a) e encapsulamento da cisplatina num lipossoma funcionalizado à superfície com o polímero polietileno glicol (PEG, b) (adaptado da referência [61])......	26
Figura 22 - Eliminação redutiva dos ligandos axiais (X) de um complexo de platina (IV) para a cisplatina (II) (adaptado das referências [76, 78, 81]).	26
Figura 23 - Estrutura geral dos complexos de platina activados pela luz: a) diiodoplatina (IV) e b) diazidoplatina (IV) (adaptado da referência [81]).	27
Figura 24 - Taxas de permuta de ligandos, por segundo, de diversos metais (adaptado da referência [93])......	28
Figura 25 - Mecanismo geral a partir do qual os complexos de ruténio podem ser transportados, via transferrina, para o interior das células (adaptado da referência [93]).	30

Figura 26 - Estrutura química do <i>trans</i> -[tetracloro(dimetilsulfóxido)rutenato(III) de imidazol] (NAMI-A) [100].	31
Figura 27 - Representação esquemática do tratamento selectivo das metástases com o fármaco NAMI-A, onde se visualiza a remoção quase total das células metastizadas com impacto reduzido no tumor primário (adaptado da referência [101]).	31
Figura 28 - Estrutura química do <i>trans</i> -[tetracloro-bis(1H-indazol)rutenato(III)] (KP1019) [100].	32
Figura 29 - Representação esquemática do modo de acção hipotético do KP1019 (adaptado da referência [94]).	33
Figura 30 - Estrutura do primeiro composto organometálico de ruténio com ligando areno a ser testado pelas suas propriedades anticancerígenas [110].	34
Figura 31 - Estrutura geral dos complexos ruténio(II)-areno “meia sandwich” (adaptado da referência [114]).	35
Figura 32 - Estrutura dos complexos organometálicos de ruténio: a) RM175 e b) RAPTA-C [116].	35
Figura 33 - Reactividade geral dos complexos ruténio(II)-areno, onde a hidrólise da ligação Ru-X origina espécies aquosas mais reactivas. As diferentes estruturas estão exemplificadas para a reactividade do $[Ru(\eta^6\text{-bip})Cl(en)]^+$ com $X = Cl$, onde bip = bifenil e en = etilenodiamina (adaptado da referência [91]).	37
Figura 34 - Interações entre o complexo $\{(\eta^6\text{-areno})Ru(en)\}^{2+}$ com o nucleótido guanina (G) e com o nucleótido adenina (A). Na estrutura da direita, o areno e o anel de etilenodiamina foram omitidos para simplificação (adaptado da referência [120]).	38
Figura 35 - Complexo $[Ru(\eta^6\text{-dha})(en)(9\text{-EtG})]^+$ onde se observa a) uma forte ligação estereoespecífica de hidrogénio entre o grupo carbonilo ($C6=O$) do ligando 9-EtG e o NH da etilenodiamina e b) uma forte interacção $\pi\text{-}\pi$ areno-guanina responsável pela elevada preferência por esta base sobre a adenina nestes complexos ruténio com ligandos areno [91].	39
Figura 36 - Estrutura química da staurosporina e dos compostos de ruténio baseados nesta molécula (adaptado da referência [46]).	41
Figura 37 - Estruturas de raios-X da co-cristalização do composto (<i>R</i>)-DW12 com a cinase PAK-1 (a); e correspondência da estrutura molecular entre o sítio activo da proteína cinase PAK-1 e a esfera de coordenação do complexo (<i>R</i>)-DW12 (b) (adaptado da referência [125]).	41
Figura 38 - Estrutura dos complexos organometálicos (S_{Ru})- 1 e (R_{Ru})- 2 [134].	42
Figura 39 - Estrutura de alguns complexos com fórmula geral $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)Ru(PP)L]$, onde PP = 2 PPh_3 ou dppe (adaptado das referências [128, 135-138]).	43
Figura 40 - Estrutura do complexo organometálico de ruténio RuPMC [139].	44

Figura 41 - Estrutura de alguns complexos de monociclopentadienilo de rutênio (II) com ligandos <i>N,O</i> -heterocíclicos (adaptado da referência [128]).	45
Figura 42 - Exemplos de complexos polinucleares de rutênio(II)-areno [109].	46
Figura 43 - Estrutura geral dos dendrímeros (adaptado da referência [144]).	47
Figura 44 - Estruturas químicas de alguns dos dendrímeros mais comumente utilizados na medicina (adaptado da referência [148]).	48
Figura 45 - Representação esquemática das metodologias mais utilizadas para a preparação dos dendrímeros, nomeadamente a divergente e a convergente (adaptado da referência [144]).	48
Figura 46 - Representação esquemática de metalodendrímeros com fragmentos metálicos (representado pela letra M) em diversas posições [166].	50
Figura 47 - Metalodendrímeros com fórmula geral a) $DAB(PA-trans-Pt-Cl)_4$ e b) $(m-4F-PtDMSO)_4DAB(PA)_4$ [167].	51
Figura 48 - Metalodendrímeros funcionalizados com fragmentos metálicos de platina (a) e com entidades metálicas de cobre (b) [167].	52
Figura 49 - Metalodendrímeros funcionalizados com fragmentos metálicos de (a) M = platina ou paládio, (b) ouro e (c) tungstênio (c) [167].	53
Figura 50 - Estruturas dendríticas tetra e octonuclear funcionalizadas com quatro ou oito complexos rutênio(II)-areno, respectivamente [158].	54
Figura 51 - Metalodendrímeros baseados na estrutura dendrítica de diaminobutanopoli(propilenoimina) funcionalizada com fragmentos <i>N,N</i> - ou <i>N,O</i> -rutênio(II)-areno (areno = <i>p</i> -cimeno ou hexametilbenzeno) [159].	54
Figura 52 - Metalodendrímeros baseados no dendrímero 1,4-diaminobutanopoli(propilenoimina) funcionalizado com fragmentos <i>N,O</i> -rutênio(II)-areno-PTA [159].	55
Figura 53 - Estrutura geral dos metalodendrímeros em estudo.	56
Figura 54 - Esquema geral da preparação do complexo $[(\eta^6-p-cimeno)Ru(en)Cl][PF_6]$ (1).	60
Figura 55 - Espectro de 1H -RMN do complexo $[(\eta^6-p-cimeno)Ru(en)Cl][PF_6]$ (1) em $DMSO-d_6$ ($(CD_3)_2SO$).	61
Figura 56 - Esquemática das estratégias adoptadas para preparar o complexo $[(\eta^6-p-cimeno)Ru(dppe)Cl][PF_6]$ (2) ou o $[(\eta^6-p-cimeno)Ru(dppe)Cl][Cl]$ (2b).	61
Figura 57 - Espectro de 1H -RMN da mistura obtida na preparação do complexo $[(\eta^6-p-cimeno)Ru(NCCH_3)_2Cl][PF_6]$ (2a) em $CDCl_3$.	62
Figura 58 - Espectro de 1H -RMN do produto resultante da precipitação com o sistema de solventes diclorometano/éter, em $CDCl_3$.	63
Figura 59 - Espectro de 1H -RMN do composto $[(\eta^6-p-cimeno)Ru(dppe)Cl][Cl]$ (2b) em $CDCl_3$.	64

Figura 60 - Espectro de ^{31}P -RMN do complexo $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{dppe})\text{Cl}]\text{Cl}$ (2b) em CDCl_3	64
Figura 61 - Esquema geral para a preparação do dendrímero $[\text{N}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{N}]_2$ (6), onde a) redução do éster 4 e b) O-alkilação do tetrol 5	65
Figura 62 - Mecanismo da redução de um éster em dois álcoois (adaptado das referências [185, 188]).	66
Figura 63 - Espectro do ^1H -RMN do composto $[\text{OH}(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{OH}]_2$ (5), em CDCl_3	67
Figura 64 - Mecanismo geral da adição de Michael (adaptado da referência [192]).	68
Figura 65 - Espectros de ^1H -RMN do produto $[\text{N}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{N}]_2$ (6) antes e após purificação em CDCl_3	68
Figura 66 - Esquema geral da preparação do metalodendrímero $\{[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}]_4(\mathbf{3})\}[\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ (7).	70
Figura 67 - Espectro de ^1H -RMN do metalodendrímero $\{[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}]_4(\mathbf{3})\}[\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ (7) em CDCl_3	70
Figura 68 - Espectro de ^{31}P -RMN do metalodendrímero $\{[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}]_4(\mathbf{3})\}[\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ (7) em CDCl_3	71
Figura 69 - Espectro de ^{19}F -RMN do metalodendrímero $\{[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}]_4(\mathbf{3})\}[\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ (7) em CDCl_3	71
Figura 70 - Esquema geral da preparação do metalodendrímero $\{[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}]_4(\mathbf{6})\}[\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ (8).	73
Figura 71 - Espectro de ^1H -RMN do metalodendrímero $\{[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}]_4(\mathbf{6})\}[\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ (8) em CDCl_3	73
Figura 72 - Espectro de ^{31}P -RMN do metalodendrímero $\{[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}]_4(\mathbf{6})\}[\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ (8) em CDCl_3	74
Figura 73 - Espectro de ^{19}F -RMN do metalodendrímero $\{[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}]_4(\mathbf{6})\}[\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ (8) em CDCl_3	74
Figura 74 - Esquema geral da preparação do metalodendrímero $\{[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{en})\text{Ru}]_4(\mathbf{3})\}[\text{PF}_6]_8$ (9).	75
Figura 75 - Espectro de ^1H -RMN do composto obtido na tentativa de preparação do metalodendrímero $\{[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{en})\text{Ru}]_4(\mathbf{3})\}[\text{PF}_6]_8$ (9) em $\text{DMSO-}d_6$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$).	76
Figura 76 - Espectro de ^{31}P -RMN do composto obtido na tentativa de preparação do composto $\{[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{en})\text{Ru}]_4(\mathbf{3})\}[\text{PF}_6]_8$ (9) em $\text{DMSO-}d_6$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$).	77

Figura 77 - Espectro de massa do dendrímero 3 com apenas um grupo nitrilo funcionalizado com o complexo $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{en})]^+$	77
Figura 78 - Esquema geral da preparação do metalodendrímero $[\{(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{en})\text{Ru}\}_4(\mathbf{6})][\text{PF}_6]_8$ (10).....	78
Figura 79 - Espectro de ^1H -RMN obtido do composto proveniente da tentativa de preparação do metalodendrímero $[\{(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{en})\text{Ru}\}_4(\mathbf{6})][\text{PF}_6]_8$ (10) em $\text{DMSO-}d_6$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$).....	78
Figura 80 - Espectros de ^{31}P -RMN dos metalodendrímeros $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{3}$ ou $\mathbf{6})][\text{PF}_6]_4$ (11 ou 12), em $\text{DMSO-}d_6$, a 25°C e sua evolução ao longo de diferentes períodos de incubação a 37°C [172].....	79
Figura 81 - Espectros de ^{31}P -RMN do complexo $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ a) em $\text{DMSO-}d_6$, b) numa mistura de $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ c) após 16 horas numa mistura de $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ (o pico aos $-0,00$ ppm corresponde ao sinal do ácido fosfórico, H_3PO_3 , utilizado como referência externa) e d) após 32 horas numa mistura de $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$	80
Figura 82 - Espectro de ^{31}P -RMN da trifenilfosfina numa mistura de $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$	81
Figura 83 - Esquematização da dissociação do complexo $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{RuCl}_2(\text{L})]$ em DMSO , onde L = diferentes ligandos N-heterocíclicos [197].	82
Figura 84 - Representação esquemática da conversão do MTT em formazano (adaptado da referência [200]).....	83
Figura 85 - Representação gráfica do efeito dos dendrímeros 3 e 6 sobre a viabilidade das linhas celulares Caco-2, CAL-72, MCF-7, A2780, A2780cisR e das MSCs, onde o controlo corresponde às células em meio de cultura completo com 0,5% de DMSO . Cada coluna representa a média de seis replicatas de um ensaio independente e a barra de erro corresponde ao desvio padrão relativo respectivo.	85
Figura 86 - Representação gráfica da acção dos compostos RuCp , PPh_3 , dos metalodendrímeros 7 e 8 e da CisPt na viabilidade das linhas celulares Caco-2, Cal-72, MCF-7, A2780, A2780cisR e nas MSCs. O controlo corresponde as células em meio de cultura completo com 0,5% de DMSO e cada coluna representa a média de seis réplicas com a barra de erro a corresponder ao desvio padrão relativo. As concentrações $\geq 25 \mu\text{M}$ do composto RuCp e dos metalodendrímeros 7 e 8 são desconhecidas.	87
Figura 87 - Determinação do IC_{50} (valor do x), exemplificado para o metalodendrímero 7 nas células Caco-2.....	109

Índice de tabelas

Tabela 1 - Nomenclatura de alguns tumores.....	5
Tabela 2 - Valores teóricos e experimentais das percentagens de C, H e N obtidos para o metalodendrímtero 7	72
Tabela 3 - Valores teóricos e experimentais das percentagens de C, H e N obtidos para o metalodendrímtero 8	75
Tabela 4 - Fórmula molecular dos compostos testados e respectivas identificações usadas nos ensaios de citotoxicidade. As concentrações testadas para cada composto nos diferentes tipos celulares também se encontram discriminadas (n.d. = não determinado).	84
Tabela 5 - Valores de IC ₅₀ (em µM) dos dendrímeros 3 e 6 , do complexo monometálico RuCp, da PPh ₃ , dos metalodendrímeros 7 e 8 e da cisplatina nas linhas celulares Caco-2, CAL-72, MCF-7, A2780, A2780cisR e nas MSCs após 72 horas de exposição (n.d. = não detectado dentro do intervalo de concentrações testado).	88
Tabela 6 - Valores de IC ₅₀ (µM) reportados na literatura para diversos metalodendrímeros em diferentes linhas celulares.	91
Tabela 7 - Processos de secagem ou desarejamento dos solventes utilizados.	101

Índice de símbolos, abreviaturas e siglas

%	percentagem
°C	grau Celcius
m/z	razão massa/carga
δ	desvio químico
η	hapticidade
μL	microlitro
μM	micromolar
v	modo de vibração de alongação
J	constante de acoplamento
br.	largo, do inglês <i>broad</i> (RMN)
d	duplete (RMN)
g	grama
Hz	hertz
kDa	kiloDalton
m	multiplete (RMN)
M⁺	pico do ião molecular (MS)
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
mmol	milimol
nm	nanometro
pH	potencial de hidrogénio iónico, do latim <i>pondus hydrogenii</i>
pKa	constante de dissociação acídica na escala logarítmica
ppm	partes por milhão
s	singleto (RMN)
sept.	septeto (RMN)
t	tripleto (RMN)
¹H-RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Protão
3T3	linha celular fibroblástica de rato
9-EtG	9-etilguanina
¹⁹F-RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Fluór

³¹P-RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo
A2780	linha celular de carcinoma de ovário
A2780cisR	linha celular de carcinoma de ovário, resistente à cisplatina
A498	linha celular de carcinoma renal
AE	análise elementar
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
bip	bifenil
bis-MPA	ácido poli(2,2-bis(hidroximetil)propanóico
bpyPLA	<i>2,2'-bipyridine-4,4'-D-glucose end-capped polylactide</i>
Caco-2	linha celular de adenocarcinoma colorrectal
CAL-72	linha celular de osteossarcoma
cGMP	guanosina monofosfato cíclico
Cp	η^5 -ciclopentadienilo
CTR1	transportadores de cobre 1
DCM	diclorometano
dha	dihidroantraceno
DMEM	meio Eagle com modificações Dulbecco, do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
dppe	1,2-bis(difenilfosfino)etano
e.g.	por exemplo, do latim <i>exempli gratia</i>
en	etilenodiamina
EPR	permeabilidade e retenção aumentada, do inglês <i>Enhanced Permeability and Retention</i>
eq	equivalente
ESI	ionização por electrospray, do inglês <i>electrospray ionization</i>
et al.	e outros, do latim <i>et alii</i>
EVSA-T	linha celular de adenocarcinoma da mama
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT-IR	espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform Infrared</i>
GSH	glutathiona

GS-Pt	complexo glutationa-platina
IARC	Agência Internacional de Investigação do Cancro, do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC₅₀	Concentração de composto que inibe 50% da viabilidade celular
IGROV	linha celular de carcinoma de ovário
Im	Imidazole
In	indazole
INE	Instituto Nacional de Estatística
KP1019	<i>trans</i> -[tetracloro-bis (1H-indazol)rutenato(III)]
L1210/2	linhas celulares leucémicas de rato
MCF-7	linha celular de adenocarcinoma da mama
MDA-MB-231	linha celular de adenocarcinoma da mama, independente de estrogénio
MEM	meio essencial mínimo de Eagle, do inglês <i>Minimum Essential Medium</i>
MeOH	metanol
MOLT-4	linha celular de leucemia linfoblástica aguda de células T
MRP	proteínas associadas à resistência a múltiplos fármacos, do inglês <i>Multidrug Resistance-associated Proteins</i>
MS	espectrometria de massa, do inglês <i>mass spectrometry</i>
MSCs	células estaminais mesenquimais, do inglês <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
MT	metalotioneínas
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NAMI-A	<i>New Anti-tumour Metastasis Inhibitor-A</i> (<i>trans</i> -[tetracloro(dimetilsulfóxido) rutenato(III) de imidazol])
OCT	transportadores de catiões orgânicos, do inglês <i>Organic cation transporters</i>
p-	<i>para</i>
PAMAM	poli(amidoamina)
PARP-1	poli(ADP-ribose)polimerase 1
PEG	polietileno glicol
PGLSA-OH	poliéster
PLL	poli(L-lisina)
PPI	poli(propilenoimina)
pta	1,3,5-triaza-7-fosfatriciclo[3.3.1.1]decano
PV-SMV	veias porta e mesentérica superior

RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Park Institute</i>
SBF	Soro Fetal Bovino
SLC	transportadores de soluto, do inglês <i>Solute Carrier</i>
THF	tetrahidrofurano
TOF-MS	espectrometria de massa de tempo de voo, do inglês <i>Time-of-flight mass spectrometry</i>
UV	ultravioleta
WIDR	linha celular de adenocarcinoma do cólon

Capítulo 1 – Introdução

Capítulo 1 – Introdução

1.1. Biologia do Cancro

1.1.1. Definição de cancro

O cancro é um grupo vasto e complexo de doenças, existindo mais de 200 tipos de cancro identificados com diferentes causas e sintomas [1, 2]. Apesar da heterogeneidade das doenças oncológicas, uma das características que apresentam em comum é o crescimento anormal e descontrolado das células, o qual é desencadeado pela acumulação de múltiplas alterações genéticas [2, 3]. A alteração da informação genética conduz a perturbações nos mecanismos de regulação da divisão e diferenciação celular que consequentemente provocam o desequilíbrio entre as taxas de proliferação e de morte celular. A perda do controlo do crescimento celular favorece o desenvolvimento de um conjunto de células transformadas com multiplicação ilimitada, conhecido como tumor [3, 4].

De acordo com as características exibidas, os tumores podem ser diferenciados em benignos ou malignos. Geralmente, nos tumores benignos as células crescem por expansão de uma forma lenta e circunscrita com um perímetro bem definido. Estas células não invadem os tecidos adjacentes e assemelham-se às células que lhes deram origem. No entanto, os tumores benignos podem colocar a vida do hospedeiro em risco através da compressão dos nervos ou dos vasos sanguíneos ou da segregação de substâncias (*e.g.* hormonas) que alterem os mecanismos homeostáticos [3, 5, 6].

O cancro é um tumor maligno que se caracteriza normalmente pela expansão das células de uma forma rápida e desorganizada. Estas células invadem e danificam as estruturas circundantes e podem apresentar diferentes graus de diferenciação, com tendência a sofrer dediferenciação com perda da função e estrutura [7, 8].

Além disso, nos tumores malignos, as células cancerígenas¹ podem libertar-se do tumor primário (primitivo) e migrar através dos vasos sanguíneos ou linfáticos para outros locais do organismo (figura 1), onde se multiplicam e dão origem a tumores secundários (metástases) [1, 5, 6]. As metástases são responsáveis por 99% das mortes provocadas pelo cancro [1, 4].

¹ Ao longo do presente trabalho utiliza-se, a expressão “células cancerígenas” para fazer referência às células que favorecem o desenvolvimento do cancro, bem como às células que possuem natureza cancerosa (*i.e.* que tem cancro), o que é passível de correcção.

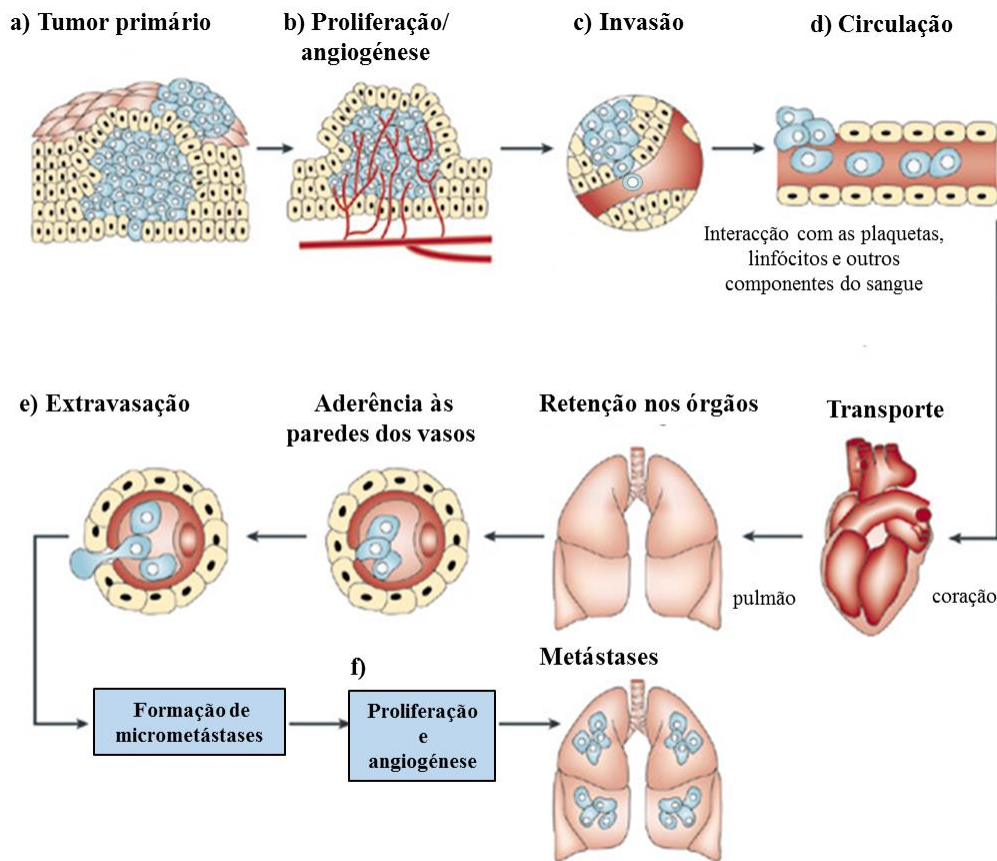


Figura 1 - As etapas principais do processo de invasão e metastização do cancro: **a)** transformação celular e crescimento do tumor primário; **b)** angiogénese promovida pela síntese e secreção de factores angiogénicos; **c)** invasão para os vasos sanguíneos ou linfáticos; **d)** circulação das células cancerígenas no sistema circulatório e interacção com os componentes do sangue com acesso aos nutrientes. As células que sobrevivem à circulação ficam retidas/aderentes nos capilares sanguíneos de diversos órgãos (*e.g.* pulmão, cérebro); **e)** extravasação: saída das células cancerígenas dos capilares para o parênquima, o tecido residente no exterior dos vasos e da membrana basal capilar, ocorrendo a formação de micrometástases e **f)** a proliferação celular e a angiogénese nas micrometástases favorecem o seu crescimento e o aparecimento de metástases adicionais (adaptado da referência [9]).

A nomenclatura dos tumores pode ser baseada no tecido/local de origem e no seu comportamento (benigno ou maligno), como exemplificado na tabela 1. Normalmente, os tumores benignos são classificados através da adição do sufixo *-oma* ao nome do tecido de origem. Deste modo, um tumor benigno com origem no tecido fibroso é classificado de fibroma. A classificação dos tumores malignos também se inicia com o tipo de tecido a partir do qual surgiram, porém são utilizados outros sufixos como, por exemplo, *-carcinoma* para os tumores malignos de origem epitelial e *-sarcomas*

para os que provêm dos tecidos mesenquimais. Assim, um tumor maligno proveniente do tecido glandular designa-se de adenocarcinoma enquanto o tumor com origem no tecido fibroso é denominado de fibrossarcoma. No entanto, alguns tumores malignos não seguem estas regras como, por exemplo, as leucemias que derivam do tecido hematopoiético. Além disso, existem tumores que são constituídos por mais do que um tipo de célula/tecido, como é o caso do teratoma (deriva das células germinativas primitivas) e do carcinossarcoma [7, 8, 10-13].

Tabela 1 - Nomenclatura de alguns tumores.

Tipo de tecido	Benigno	Maligno
Epitelial		
Epiderme	Papiloma	Carcinoma
Revestimento epitelial das glândulas	Adenoma	Adenocarcinoma
Conjuntivo		
Fibroso	Fibroma	Fibrossarcoma
Osso	Osteoma	Osteossarcoma
Cartilagem	Condroma	Condrossarcoma
Nervoso		
Células nervosas	Neuroma	Neuroblastoma
Tecido glial	Glioma	Glioblastoma
Hematológico		
Hematopoiético		Leucemias
Linfóide		Linfomas
Músculo		
Liso	Leiomioma	Leiomiossarcoma
Estriado	Rabdomioma	Rabdomiossarcoma

De mencionar que os tumores podem ser agrupados em tumores sólidos ou tumores líquidos. Os tumores sólidos (*e.g.* carcinoma ou sarcoma) são formados por um conjunto individualizado de células neoplásicas com origem em células epiteliais ou mesenquimais que são normalmente imóveis. Por outro lado, os tumores líquidos (*e.g.* leucemia) são constituídos por células neoplásicas cujos precursores são normalmente células móveis, tais como as células hematopoéticas [14-16]. Note-se que os linfomas originam, geralmente, tumores sólidos nos gânglios linfáticos, no entanto são frequentemente denominados de tumores líquidos pois derivam de células hematopoéticas [16].

1.1.2. Epidemiologia do cancro

Segundo as últimas estimativas da Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC), ocorreram, em 2012, 8,2 milhões de mortes atribuídos ao cancro. Os cancros mais frequentes foram os do pulmão, fígado, estômago e o colorrectal, os quais contribuíram com mais de 50% do total das mortes por cancro (figura 2) [17, 18].

A incidência do cancro a nível mundial está prevista aumentar 75% até 2030, traduzindo-se assim no surgimento de 22,2 milhões de novos cancros diagnosticados. Prevê-se que este panorama seja ainda mais acentuado nos países em desenvolvimento [19].

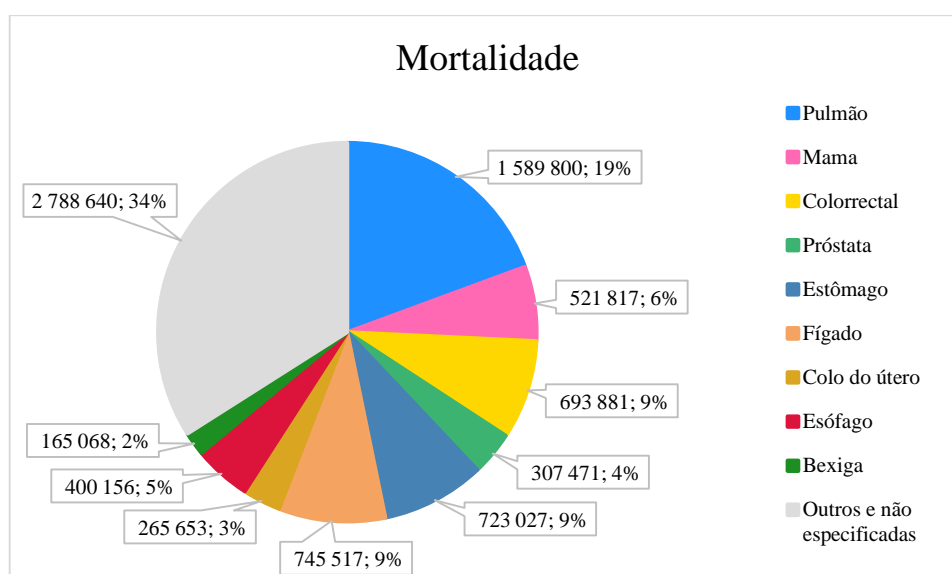


Figura 2 - Mortalidade por tipo de cancro registada no mundo em 2012 (adaptado da referência [20]).

Na Europa, o cancro é a segunda causa principal de mortalidade surgindo logo a seguir às doenças associadas ao sistema circulatório. A incidência e a mortalidade variam com o tipo de cancro, sendo que o cancro do pulmão e do cólon apresentam uma maior taxa de mortalidade (figura 3) [21].

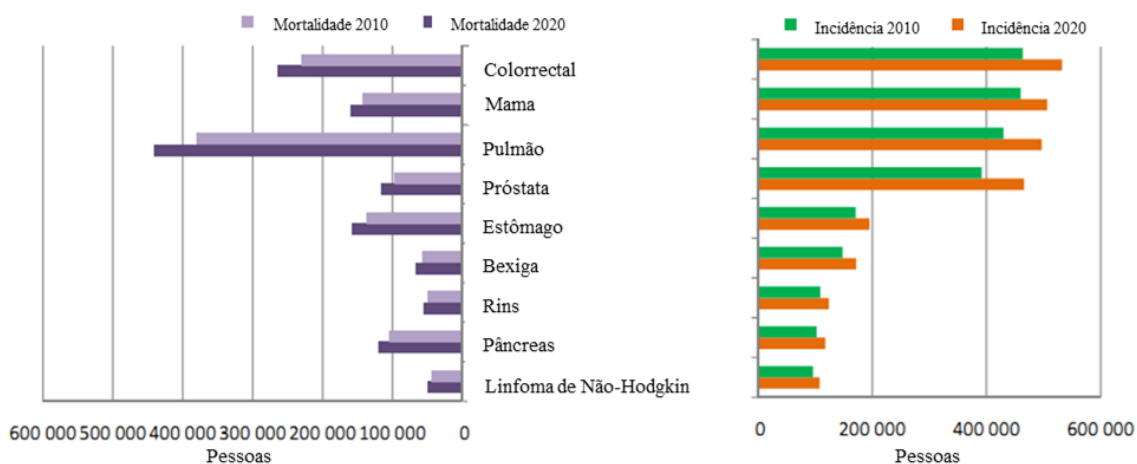


Figura 3 - Mortalidade e incidência dos principais tipos de cancros na Europa em 2010 e respectivas previsões para 2020 (adaptado da referência [21]).

Na Europa, a incidência do cancro aumentou 32% desde meados de 1980 até 2011 devido à redução da mortalidade por doenças do sistema circulatório e ao aumento da esperança média de vida. A incidência do cancro é maior no pulmão, no cólon, na próstata e na mama (sexo feminino) com uma previsão crescente para 2020. Para além do mais, verificou-se que a mortalidade sofreu uma redução em 15% entre 1990 e 2009. Nos homens, os tumores malignos localizados nos pulmões, cólon, estômago e na próstata são os mais frequentes, sendo responsáveis por 50% das mortes resultantes desta patologia. Ao passo que, nas mulheres, 60% das mortes por cancro devem-se a tumores malignos localizados na mama, no pulmão, no estômago, no cólon, no colo do útero e no ovário. No que concerne às idades, as taxas de mortalidade por cancro são superiores em idades acima dos trinta anos, sendo que os homens apresentam de uma forma geral taxas mais altas que as mulheres [21].

Em Portugal, segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE), registaram-se cerca de 107 969 óbitos em 2012, tendo como principais causas de morte as doenças do sistema circulatório (30,4%), os tumores malignos (23,9 %) e as doenças do sistema respiratório (12,9%) [22-24].

No período compreendido entre 1980 e 2012, o número de óbitos causados por doenças do aparelho circulatório registou um decréscimo enquanto que o número de óbitos motivado por tumores malignos e por doenças do aparelho respiratório aumentou (figura 4) [25]. De referir que a taxa bruta de mortalidade por tumores malignos registada em 2012 foi de 245 óbitos por 100 mil habitantes, o que representa um aumento de 14,1% comparativamente ao valor observado em 2002 [24].

Os cancros responsáveis por mais óbitos em Portugal no ano de 2012 foram os seguintes: laringe, traqueia, brônquios e pulmão (4012 óbitos), cólon (2691 óbitos), estômago (2376 óbitos), tecido linfático/hematopoético (2152 óbitos), próstata (1814 óbitos) e o da mama (1787 óbitos) [23].

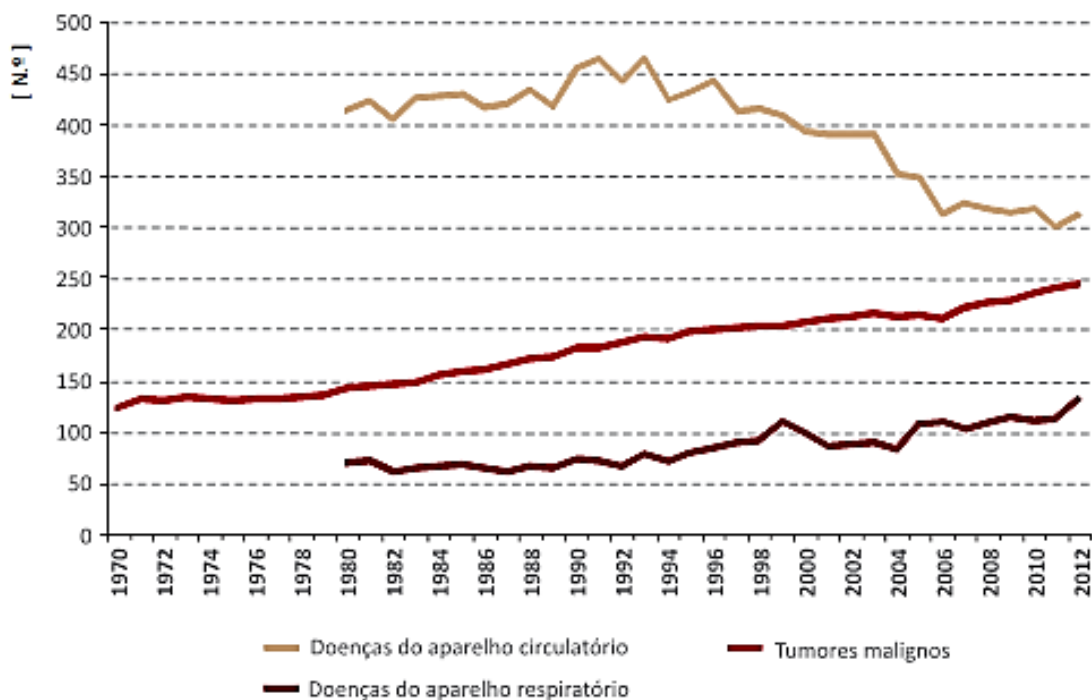


Figura 4 - Óbitos segundo as principais causas de morte, por 100 mil habitantes, registados em Portugal desde 1970 a 2012 [25].

1.1.3. Causas do cancro

A génese do cancro é um processo multifactorial uma vez que envolve um conjunto complexo de acontecimentos. Estes podem ser agrupados em duas categorias, nomeadamente em factores externos e internos e são os responsáveis pelas mutações induzidas e espontâneas, respectivamente.

As mutações promovidas pelos factores exógenos e endógenos divergem na origem mas causam danos semelhantes no ácido desoxirribonucleico (ADN), tais como modificação das bases nucleotídicas, formação de aductos que distorcem as suas hélices e rupturas intra e intercadeias. Caso estas lesões não sejam reparadas podem resultar em diversas mutações no ADN [3, 4, 26].

Os principais factores externos que promovem mutações no ADN são os agentes químicos, a radiação e os microrganismos [1, 7].

✓ Agentes químicos: O ser humano é exposto constantemente a diversos agentes químicos provenientes do ambiente, da dieta, do estilo de vida (*e.g.* fumar e consumir bebidas alcoólicas) e do trabalho, os quais podem alterar os processos celulares [1]. Os químicos carcinogénicos ou os respectivos derivados são electrófilos (espécies deficientes em electrões) muito reactivos que podem reagir com os nucleófilos (espécies ricas em electrões) presentes nas estruturas celulares. No caso da molécula de ácido desoxirribonucleico (figura 5), os centros nucleofílicos (*e.g.* átomos de oxigénio e

de azoto localizados nos anéis de purina ou pirimidina) que a compõem são susceptíveis ao estabelecimento de ligações covalentes com agentes químicos, formando-se aductos [3, 6].

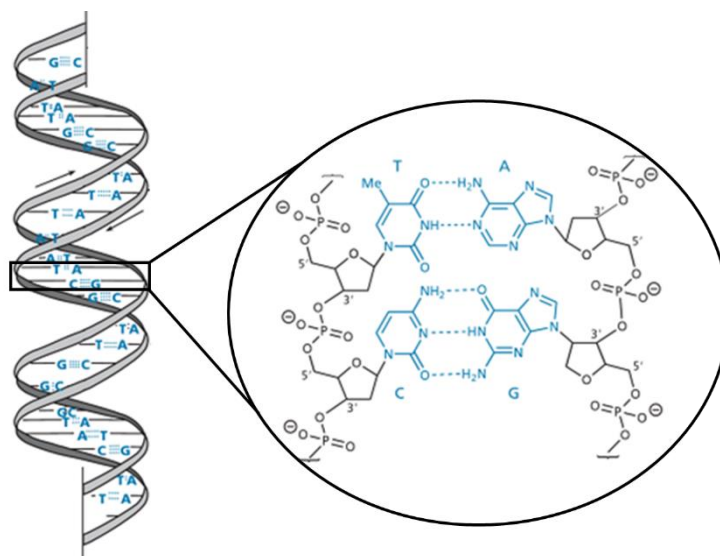


Figura 5 - Estrutura secundária da molécula de ADN ilustrando os seus centros nucleofílicos, onde as bases nucleotídicas estão representadas pelas letras T - timina, A - adenina, C - citosina e G - guanina (adaptado da referência [27]).

✓ **Radiação:** a radiação ultravioleta (UV) induz maioritariamente ao estabelecimento de ligações intracadeia entre pirimidinas adjacentes (normalmente timinas), originando-se dímeros de pirimidina. Estes dímeros criam distorções na hélice do ADN e podem bloquear a sua transcrição ou replicação. Por outro lado, os raios X e os raios gama são mais energéticos do que a radiação UV e danificam a molécula de ADN através da formação de radicais livres que, por sua vez, podem modificar as bases nucleotídicas ou fragmentar as cadeias de ADN [4]. A figura 6 ilustra os danos induzidos pela radiação na molécula de ADN.

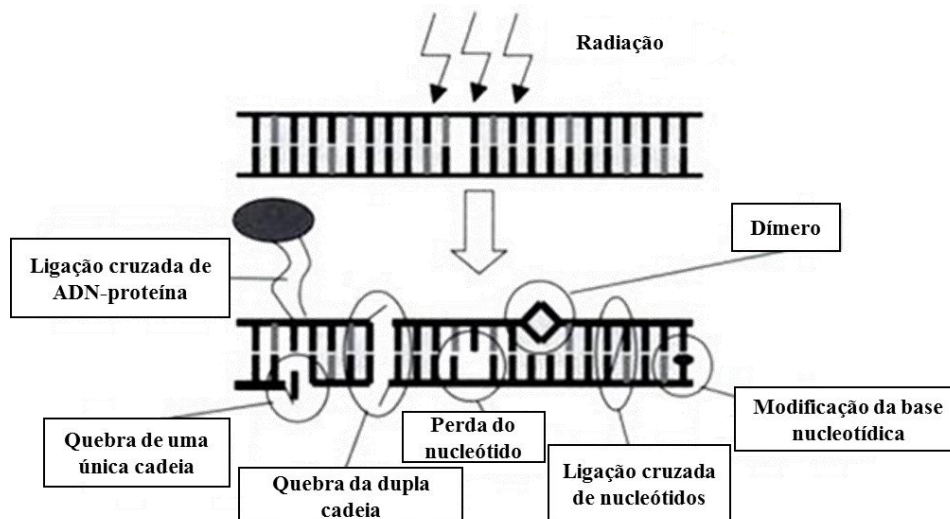


Figura 6 - Efeito da radiação na molécula de ADN (adaptado da referência [28]).

✓ Microorganismos: As infecções causadas por bactérias, vírus, parasitas ou outros microorganismos promovem o desenvolvimento do cancro, actuando através da inflamação crónica ou da transformação directa das células. Os processos inflamatórios promovem a formação de espécies reactivas de oxigénio e azoto, o aumento da divisão e proliferação celular, o bloqueio da diferenciação celular e o aumento da morte celular necrótica (não programada). Este cenário pode contribuir para o aumento da taxa de mutações genéticas e, conseqüentemente, potenciar o risco de desenvolvimento do cancro. Além disso, os agentes infecciosos podem alterar o ciclo celular das células hospedeiras através da inserção de oncogenes activos, da inactivação dos genes supressores de tumor ou da mimetização de factores de crescimento [1].

Os factores internos ou endógenos referem-se à predisposição genética e às mutações espontâneas:

✓ Mutações hereditárias: A predisposição genética resulta de mutações que ocorreram nas células da linha germinativa (oócitos e os espermatozóides) e que, ao não serem corrigidas ou reparadas são transmitidas à descendência. O risco de desenvolvimento de cancro varia de acordo com a mutação herdada. No entanto, estas mutações não determinam, por si só, o aparecimento do cancro, sendo necessária a acumulação de mutações adicionais no organismo [1, 4].

✓ Mutações espontâneas: As mutações que não apresentam um padrão hereditário designam-se de mutações espontâneas e provêm de alterações nas células somáticas. Estima-se que 90 a 95% dos cancros diagnosticados devem-se a mutações espontâneas adquiridas durante a vida do indivíduo. [1, 4]. Apesar do cancro surgir em indivíduos de qualquer faixa etária, a incidência global

da maioria dos tumores malignos aumenta drasticamente com a idade, onde a idade média para o seu diagnóstico é de 65 anos [1, 4, 29]. Por conseguinte, o envelhecimento populacional é um factor que aumenta a susceptibilidade para o desenvolvimento do cancro, o qual poderá estar associado à acumulação de células com mutações genéticas aleatórias e à redução da eficiência dos mecanismos de protecção e reparação das mesmas [29-31].

As fontes endógenas responsáveis pelas mutações espontâneas advêm maioritariamente dos subprodutos do metabolismo normal das células e dos erros inerentes ao processamento do ADN (*e.g.* reparação e replicação). O metabolismo normal das células geram intermediários oxidativos como é o caso das espécies reactivas de oxigénio (*e.g.* anião superóxido, radical hidroxilo e o peróxido de hidrogénio) que provêm, por exemplo, da respiração aeróbica e da resposta inflamatória. A concentração destas espécies é controlada pelos mecanismos antioxidantes das próprias células, sendo que em concentrações baixas contribuem para os processos de regulação e sinalização celular. No entanto, o aumento excessivo destes radicais, devido ao desequilíbrio entre a sua produção e eliminação, conduz a oxidação das estruturas celulares (*e.g.* ADN) comprometendo as suas funções [1, 4].

A maquinaria utilizada no processamento do ADN é de extrema precisão no entanto, a inserção de erros nesta molécula pode ocorrer durante, por exemplo, a sua replicação. Para além disso, as alterações epigenéticas podem contribuir para o aparecimento do cancro. O genoma contém dois tipos de informação nomeadamente a genética e a epigenética. Enquanto que a primeira determina a produção de proteínas requeridas pelo organismo, a segunda dita quando e onde esta expressão de informação genética ocorrerá. As modificações epigenéticas (*e.g.* metilações ou acetilações nas bases do ADN) podem influenciar os processos da regulação da cromatina, da repressão transcricional, da reparação do ADN, da estabilidade genómica, entre outros [4].

1.1.4. Carcinogénese

A formação do cancro ou carcinogénese é um processo genético e epigenético que envolve várias mutações no genoma [32]. Estas mutações podem ocorrer em diversos genes contudo, apenas as alterações em determinados genes conduzem à perda dos mecanismos de regulação do crescimento e da morte celular, contribuindo para o desenvolvimento de um fenótipo maligno. Estes genes que potenciam o surgimento do cancro podem ser agrupados em três categorias: a) proto-oncogenes que codificam os componentes das vias de sinalização responsáveis pela regulação da proliferação celular, quando mutados designam-se de oncogenes; b) genes supressores de tumores, que quando mutados conduzem à desregulação da progressão do ciclo celular, da degradação de proteínas e da adesão e

movilidade celular; c) genes que codificam as enzimas reparadoras do ADN, que quando mutados conduzem à perda das suas funções com promoção da instabilidade do genoma [26].

A carcinogénese pode ser caracterizada por três etapas sequenciais, nomeadamente a iniciação, promoção e progressão com transformação maligna (figura 7).

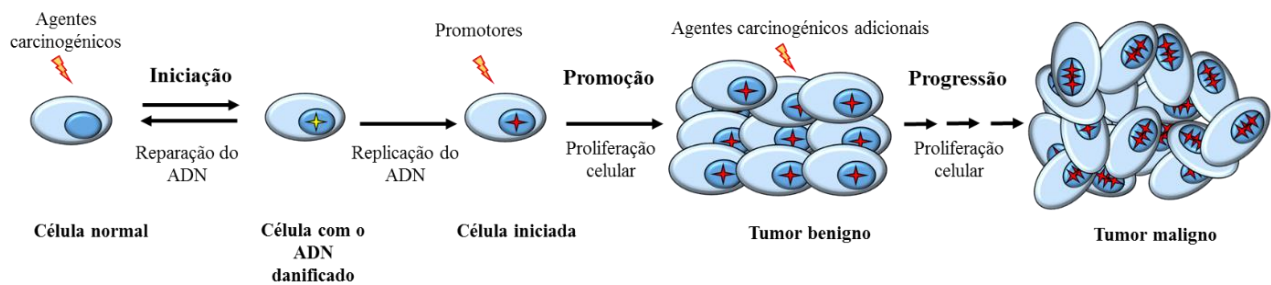


Figura 7 - Processo multifásico da carcinogénese (adaptado da referência [33]).

A fase da iniciação resulta da interacção dos agentes carcinogénicos com o ADN, despoletando rupturas na cadeia desta molécula ou, mais frequentemente, originando nucleótidos alterados. Na replicação do ADN alterado, a não reparação destas lesões pelas ADN polimerases leva à sua fixação no genoma [3, 32]. Na maioria das vezes, estes erros são inócuos para a célula uma vez que não envolvem os genes de susceptibilidade para o cancro. Todavia, por exemplo, se a mutação ocorrer na sequência de um gene codificante de uma proteína reguladora do crescimento, sob determinadas circunstâncias, a célula pode adquirir uma vantagem de crescimento selectivo. Estas circunstâncias incluem a exposição a uma classe de elementos denominadas de promotores (*e.g.* hormonas, inflamação crónica).

Na etapa da promoção, julga-se que os promotores seleccionam ou estimulam preferencialmente a proliferação das células iniciadas, levando à formação de múltiplos tumores benignos. O efeito da promoção é completamente reversível e a ausência do agente promotor limita a proliferação das células tumorais. Por conseguinte, os promotores são agentes mitogénicos (*i.e.* induzem a mitose) que aumentam o crescimento celular através de um mecanismo epigenético, envolvendo a regulação do gene ao nível transcricional ou pós-transcricional. Os promotores são indutores fracos da transformação maligna [32].

Finalmente, a fase da progressão representa o período mais longo na carcinogénese, no qual os tumores benignos transformam-se em malignos. Esta transformação pode resultar da exposição a agentes carcinogénicos adicionais ou da instabilidade genómica induzida pelas mutações da etapa da iniciação [32]. Como resultado, as células adquirem alterações irreversíveis que lhes conferem um

fenótipo maligno. Este fenótipo fornece um novo leque de propriedades a uma dada população celular, incluindo: auto-suficiência de factores de crescimento; insensibilidade a sinais inibidores de crescimento; evasão à apoptose; potencial replicativo ilimitado; angiogénese (capacidade de formação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes) sustentada; capacidade de invasão de tecidos e de formação de metástases; capacidade de reprogramar o metabolismo celular e evasão ao sistema imunitário [32, 34].

1.1.5. Tratamento do cancro

Geralmente, o tratamento do cancro engloba mais do que uma abordagem sendo a sua selecção condicionada pela natureza, localização e o estado de desenvolvimento do cancro [1, 4].

As principais metodologias utilizadas nos pacientes com cancro são a cirurgia, radioterapia e a quimioterapia. A terapia fotodinâmica, abordagens relacionadas com anticorpos e vacinas bem como a terapia genética correspondem a outras estratégias que se encontram em sério desenvolvimento [4].

A **cirurgia** de ressecção é utilizada na remoção dos tumores de pequenas dimensões ou que se encontrem bem definidos (figura 8). Este procedimento pode ser acompanhado com a remoção de tecido circundante saudável para prevenir o reaparecimento da neoplasia.

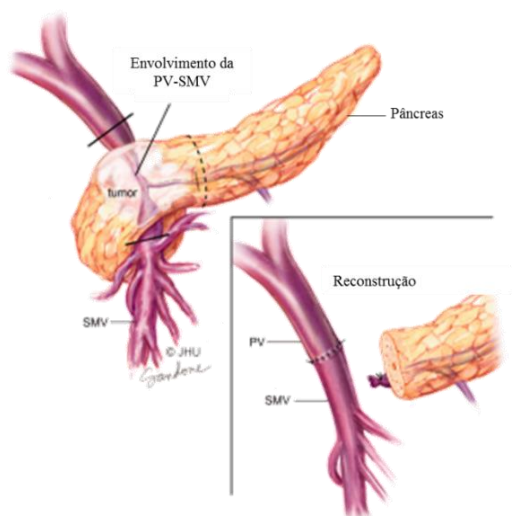


Figura 8 - Ressecção de um tumor presente no pâncreas envolvendo o corte e a reconstrução da confluência estabelecida entre as veias porta e mesentérica superior (PV-SMV) (adaptado da referência [35]).

Note-se que a quimioterapia ou a radioterapia são frequentemente administrados antes da cirurgia para reduzir o tumor e/ou depois da cirurgia de modo a assegurar a eliminação das células cancerígenas que possam ter permanecido no local ou que possam ter metastizado. As técnicas

cirúrgicas têm vindo a sofrer um grande avanço tecnológico permitindo a remoção eficaz dos tumores de uma forma menos invasiva e com poucos efeitos secundários ou complicações [4, 5, 8].

A **radioterapia** é uma terapia localizada que envolve a utilização de radiação ionizante para eliminar as células cancerígenas. Este tipo de radiação interfere directamente com a estrutura do ADN ou induz a formação de radicais livres que danificam o ADN. Por conseguinte, a não reparação do ADN conduz ao bloqueio da divisão e proliferação celular e, conseqüentemente, à morte celular. A radiação ionizante afecta as células normais e as cancerígenas. O principal objectivo da radioterapia é maximizar a dose de radiação nos tecidos cancerígenos e minimizar a exposição das células saudáveis, o qual tem sido alcançado com novas técnicas de imagiologia e de entrega da radiação [1, 4, 8].

A **quimioterapia** assenta na utilização de agentes químicos para destruir ou inibir o crescimento das células cancerígenas [4, 5]. De acordo com o tipo de cancro e o seu estado de desenvolvimento, a quimioterapia pode ser utilizada para: a) erradicar todas as células cancerígenas até completa cura do paciente; b) prevenir a reincidência do cancro ou o desenvolvimento de metástases depois de uma cirurgia; c) aumentar o tempo de vida do paciente nos cancros incuráveis através da redução do tumor ou prevenindo o seu crescimento e a formação de metástases e d) melhorar a qualidade de vida dos pacientes em estado terminal [5].

Ao contrário da cirurgia e da radioterapia, onde o tratamento do cancro é localizado, a quimioterapia é realizada de forma sistémica. Esta consiste na distribuição dos medicamentos de baixo peso molecular pela maioria dos tecidos do corpo através do sistema circulatório, permitindo a sua acção nas células cancerígenas localizadas em áreas protegidas (*e.g.* o cérebro) e nas micrometástases [4, 5].

A distribuição sistémica dos agentes terapêuticos citotóxicos conduz a mais efeitos secundários comparativamente à radiação e à cirurgia [36]. Os efeitos secundários devem-se, com algumas excepções, à não especificidade dos agentes quimioterapêuticos que afectam não só as células cancerígenas bem como as células saudáveis. Deste modo os principais efeitos colaterais são a supressão da medula óssea, lesões no tracto gastrointestinal, perda de cabelo, náuseas, infertilidade e o rápido desenvolvimento de resistência clínica [4, 5].

No actual estado da arte, os agentes anticancerígenos apresentam uma baixa especificidade pois não possuem um alvo celular que os torne mais selectivos e eficazes contra as células cancerígenas. Por exemplo, a actuação dos medicamentos baseados na velocidade de divisão celular poderá não ser eficaz uma vez que as taxas de proliferação das células cancerígenas variam nos diferentes tipos de tumores. Além disso, as células saudáveis poderão apresentar, em alguns casos, uma taxa de divisão semelhante às células cancerígenas, tornando este método pouco selectivo. Por conseguinte, o desenho de medicamentos contra o cancro tem-se focado na produção de agentes tóxicos que se liguem a

proteínas exclusivas ou predominantes na superfície das células cancerígenas ou que actuem nas principais vias de sinalização que contribuem para o desenvolvimento do cancro. Estas estratégias aumentam a especificidade dos medicamentos e reduzem os seus efeitos colaterais [26].

A combinação de medicamentos também tem sido utilizada com o objectivo de atingir vários alvos presentes nas células cancerígenas. Além disso, a radioterapia e a cirurgia também podem ser utilizadas como métodos complementares de tratamento [1, 5, 26].

A classificação dos medicamentos anticancerígenos é efectuada de acordo com a forma como danificam ou interferem com a função do ADN, com o tipo de processo celular afectado ou com as fontes a partir das quais derivam [5]. As principais categorias de medicamentos antineoplásicos são:

✓ Agentes alquilantes modificam as bases do ADN através da introdução de grupos alquilo, promovendo assim rupturas na cadeia e a formação de ligações cruzadas nesta molécula. Estes efeitos resultam na apoptose ou na interrupção do crescimento celular. Os agentes alquilantes também podem estabelecer ligação com o ácido ribonucleico (ARN) e com as proteínas celulares. Estes agentes podem ser agrupados nas seguintes categorias (figura 9): bis(cloroetil) amina e derivados, alquil sulfonatos (*e.g.* bussulfano), nitrosouréias (*e.g.* carmustina), aziridinas (*e.g.* tiotepa), sais metálicos (*e.g.* cisplatina) e tetrazinas (*e.g.* dacarbazina) [4, 10, 37].

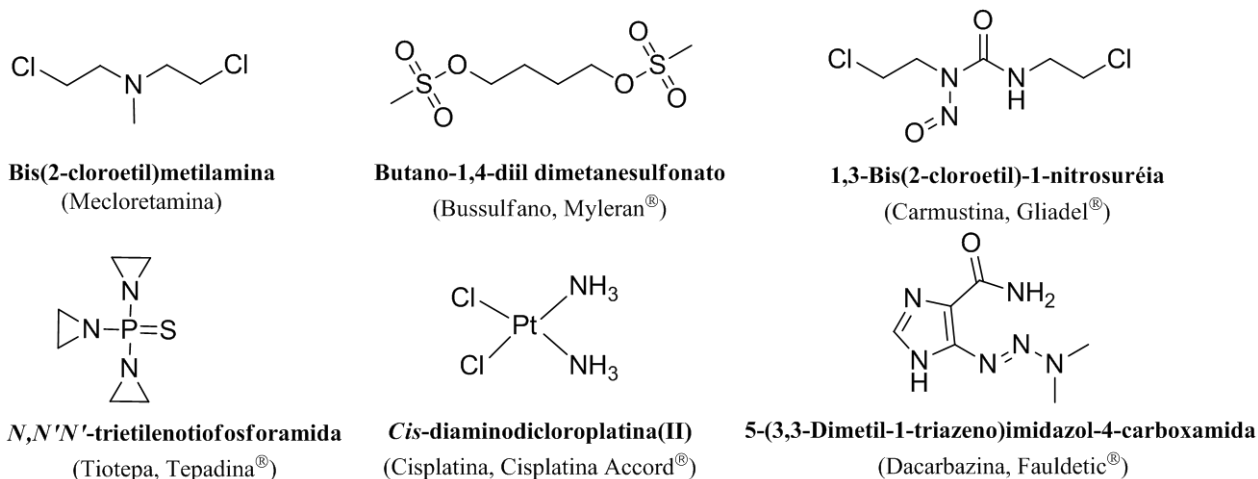


Figura 9 - Estrutura de alguns fármacos anticancerígenos que pertencem à família dos agentes alquilantes (adaptado das referências [4, 37])².

² Os nomes que se encontram entre parêntesis referem-se ao nome comum e à marca comercial do fármaco utilizado na quimioterapia.

✓ Antimetabólitos são substâncias estruturalmente semelhantes a moléculas presentes naturalmente no organismo que bloqueiam as vias metabólicas cruciais para o crescimento celular (*e.g.* inibem enzimas essenciais para a síntese ou reparação do ADN). Estes agentes actuam nas células que apresentam elevadas taxas de proliferação, pelo que as células cancerígenas e as células saudáveis que crescem mais rápido são afectadas. No entanto, tumores sólidos mais avançados possuem uma pequena fracção de células com crescimento activo e, por isso, apenas algumas células respondem à medicação. Os antimetabólitos incluem, por exemplo, os análogos do ácido fólico (*e.g.* metotrexato) e os análogos das purinas e pirimidinas (figura 10) [4, 5, 10].

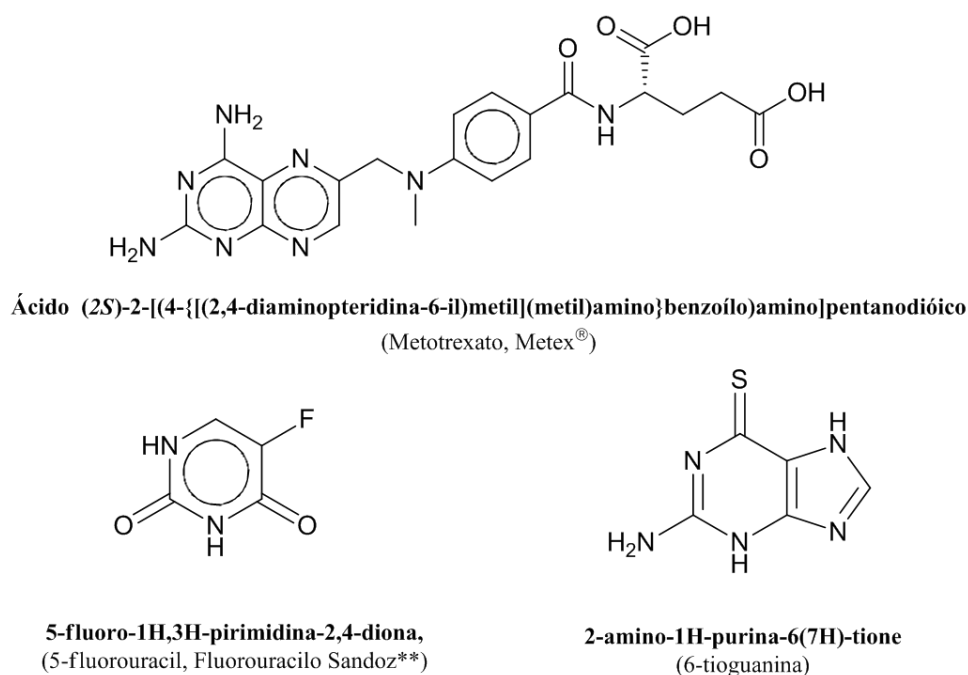


Figura 10 - Estrutura de alguns fármacos anticancerígenos que pertencem à família dos antimetabólitos (adaptado da referência [4]). Os nomes comuns seguidos da marca comercial do fármaco, utilizado na quimioterapia, encontram-se entre parêntesis (**genérico descontinuado).

✓ Inibidores mitóticos ou agentes anti-tubulina incluem os alcalóides da Vinca, obtidos inicialmente da planta *Catharantus roseus* (conhecida comumente como pervinca de Madagáscar) e os taxanos, extraídos inicialmente das plantas do género *Taxus*. Estes dois grupos de agentes interferem com a dinâmica (montagem e desmontagem) dos microtúbulos de tubulina nas células, bloqueando a mitose e conduzindo à morte celular. Os alcalóides da Vinca, como por exemplo a vincristina e a vinblastina (figura 11), ligam-se à tubulina e previnem a montagem do fuso mitótico requerido para a segregação dos cromossomas na mitose. Os taxanos, como o paclitaxel e o docetaxel, activam a montagem do fuso mitótico mas inibem a sua desmontagem [4, 10].

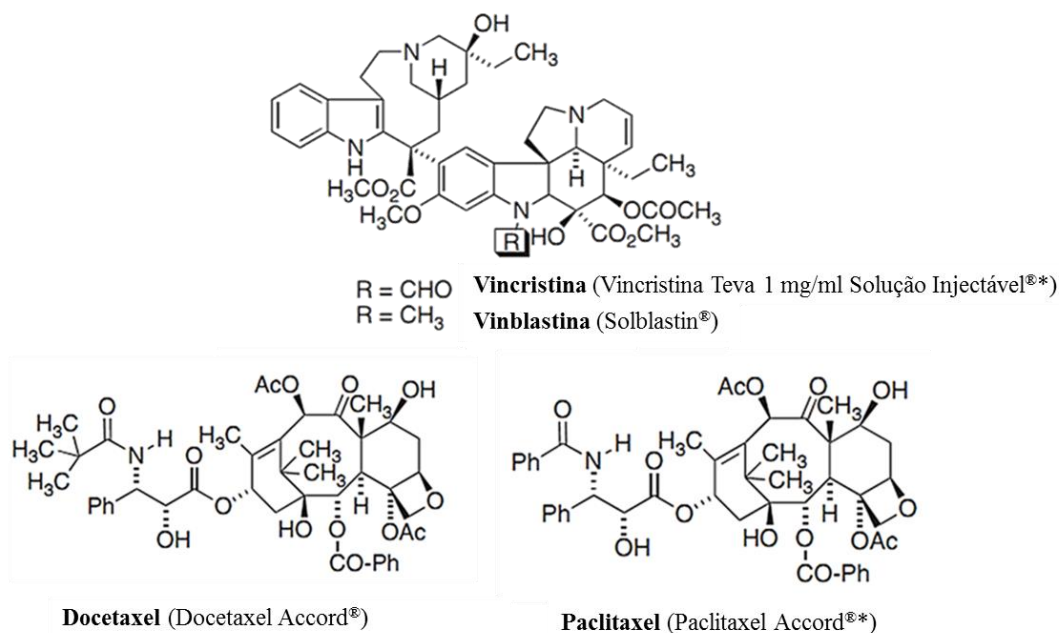


Figura 11 - Estrutura de alguns fármacos anticancerígenos que pertencem à família dos inibidores mitóticos (adaptado da referência [38]), onde a marca comercial do fármaco administrado na quimioterapia é mencionada entre parêntesis (*genérico).

✓ Inibidores das topoisomerases afectam as enzimas topoisomerases, as quais são responsáveis pelo controlo do enrolamento e desenrolamento da molécula de ADN. Estas enzimas são fundamentais na replicação do ADN onde a inibição das suas funções interfere com a capacidade das células em reparar e reconstruir as rupturas na dupla hélice do ADN, impedindo a divisão celular e conduzindo à morte celular [4, 10, 37]. Um dos exemplos de fármacos que actua como inibidor das topoisomerases I é o topotecano (figura 12).

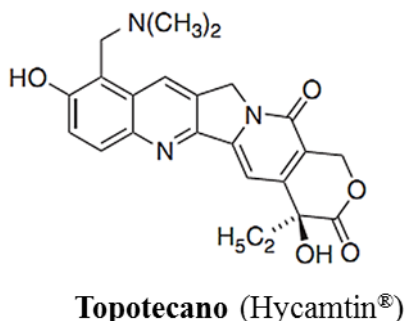


Figura 12 - Estrutura do topotecano, inibidor da topoisomerase I (adaptado da referência [38]).

✓ Antibióticos antitumorais podem actuar como agentes alquilantes, agentes intercalantes do ADN e inibidores da topoisomerase II. Além disso, podem gerar radicais livres que oxidam as proteínas presentes na célula inibindo as suas funções. Estes agentes compreendem as antraciclina (*e.g.* doxorubicina, daunorrubicina) e os antibióticos (*e.g.* actinomicina D) ilustrados na figura 13[10, 37].

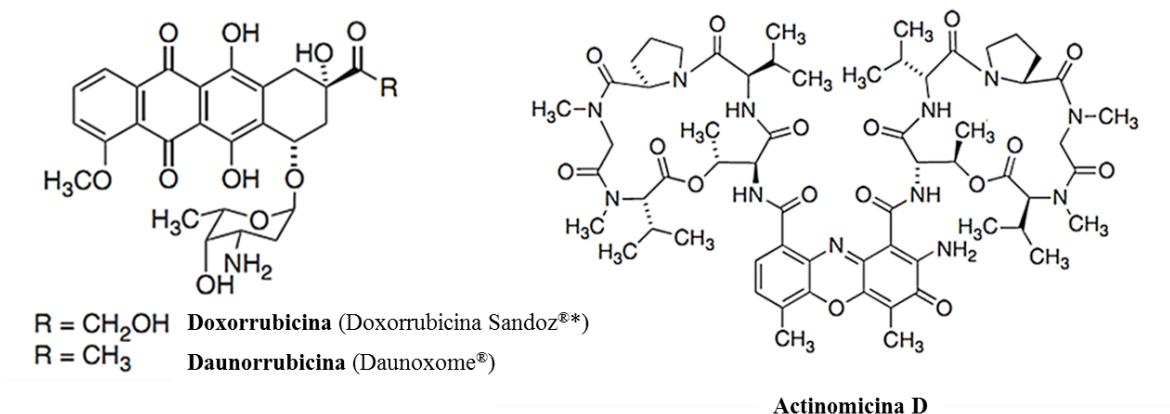


Figura 13 - Estrutura de alguns antibióticos anticancerígenos (adaptado da referência [38]), onde a marca comercial do fármaco administrado na quimioterapia é mencionada entre parêntesis (*genérico).

1.2. Complexos metálicos como agentes anticancerígenos

Os iões metálicos estão envolvidos em processos biológicos essenciais, onde os centros metálicos poderão estar sujeitos a variações no seu estado de oxidação (*e.g.* $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ no grupo heme) de modo a controlar a ligação reversível de moléculas pequenas (*e.g.* O_2) e promover mudanças estruturais [39-41].

Os complexos metálicos possuem um espectro amplo de números e geometrias de coordenação, estados redox acessíveis e a possibilidade de ajustar a termodinâmica e cinética da permuta dos ligandos que os compõem. Estas propriedades tornam os complexos metálicos alvo de grande interesse para o desenho de um vasto número de agentes terapêuticos com mecanismos de acção que não estão presentes nos fármacos baseados em compostos orgânicos. No entanto, o grande desafio reside no controlo destas propriedades quando os complexos se encontram no organismo [42-44].

O estudo da actividade dos iões metálicos essenciais bem como do genoma do organismo é fundamental para compreender a forma como são seleccionados, captados e distribuídos nas células. A natureza do ião metálico, o seu estado de oxidação e a natureza e o número de ligandos podem contribuir significativamente para a actividade biológica dos complexos metálicos [39].

A utilização de compostos contendo metais para fins terapêuticos é praticada há mais de 5000 anos mas de uma forma, maioritariamente, empírica com poucas tentativas de formulação de medicamentos e com um conhecimento escasso ou inexistente acerca do mecanismo de actuação dos mesmos [45-47]. Apenas no início do século XX, a investigação e o desenvolvimento de fármacos com metais emergiu com a descoberta das propriedades terapêuticas do Salvarsan® (ou arsfenamina) por Paul Ehrlich. Este composto apresenta arsénio na sua constituição e demonstrou ser eficaz no tratamento da sífilis, tendo sido utilizado até o ano de 1945 para o combate desta patologia [48-50]. A estrutura química do Salvarsan® apenas foi determinada correctamente em 2005 por Lloyd *et al.* [51], a qual consistia numa mistura de compostos, onde o trímero e o pentâmero de arsénio eram as estruturas dominantes (figura 14) [51].

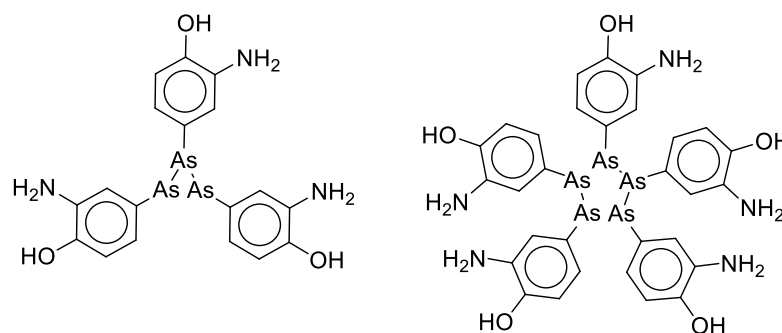


Figura 14 - Estrutura dos principais compostos presentes no Salvarsan® (adaptado da referência [51]).

Outro marco importante no campo dos metais para o uso medicinal foi a descoberta das propriedades anticancerígenas da *cis*-diaminodicloroplatina(II) (cisplatina, figura 15) em 1969 por Barnett Rosenberg [52] bem como a sua aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o uso clínico em 1978. Este evento incentivou a exploração intensiva do potencial anticancerígeno dos complexos metálicos de platina [39, 40, 46].

Apesar de um grande número de compostos de platina terem sido sintetizados e testados nos ensaios clínicos, devido à sua baixa eficácia, elevada toxicidade e/ou à baixa solubilidade, apenas mais dois compostos de platina (II) foram aprovados pela FDA como medicamentos anticancerígenos e são actualmente utilizados em todo o mundo. Estes compostos referem-se à *cis*-diamino(ciclobutanodicarboxilato)platina(II) ou carboplatina (aprovado 1993) e à (1*R*,2*R*-diaminociclohexano)oxalato)platina(II) ou oxaliplatina (aprovado em 2002), os quais encontram-se representados figura 15. Os fármacos de platina (II) são utilizados no tratamento de

tumores malignos presentes no testículo, ovário, bexiga, cabeça e pescoço, esôfago, pulmão, mama, colo do útero, estômago, próstata, pâncreas, colorrectal bem como na terapêutica dos neuroblastomas, sarcomas, mielomas múltiplos, linfomas e melanomas. A administração dos complexos de platina pode ser efectuada individualmente ou em combinação com outros medicamentos [39, 40, 53-58].

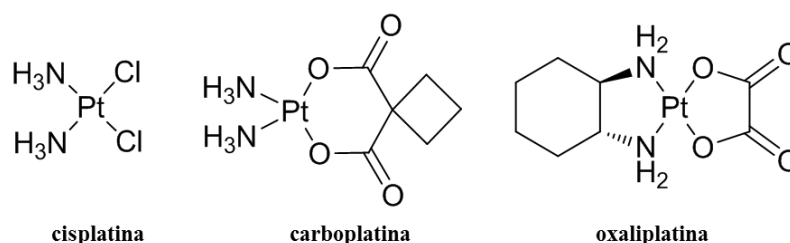


Figura 15 - Estrutura da cisplatina, carboplatina e oxaliplatina (adaptado da referência [59]).

Todavia, o tratamento do cancro com os fármacos de platina (II) apresenta efeitos secundários adversos que limitam a dose de administração dos mesmos. Estes efeitos colaterais incluem náuseas e vómitos, decréscimo na produção de células sanguíneas e de plaquetas pela medula óssea, supressão do sistema imunitário, danos nos rins e nas células nervosas e perda de cabelo. Além disso, os tumores malignos exibem resistência à terapia limitando o espectro de actividade dos complexos de platina [55, 58].

Por conseguinte, a incorporação de ligandos que aumentem a actividade e a selectividade dos complexos de platina (II), bem como o estudo da actividade terapêutica de complexos com platina (IV) ou com outros centros metálicos têm sido alvo de investigação intensiva [60, 61]. Os principais complexos metálicos em estudo como possíveis agentes anticancerígenos são os que possuem os metais: paládio (II), ouro (I) e (III), ruténio (II) e (III), bismuto (III), rénio (I) e cobre (II), derivados de gálio (III) e os de estanho (IV) [60].

Neste trabalho serão abordadas as propriedades anticancerígenas dos complexos à base de ruténio. Primeiramente, será introduzido de uma forma breve, o mecanismo de acção da cisplatina, uma vez que este composto é considerado como padrão de comparação para avaliar a actividade anticancerígena de outros complexos metálicos [62]. Uma visão geral das estratégias adoptadas para otimizar a actividade dos complexos com platina também será igualmente apresentada.

1.2.1. Complexos de platina - Modo de actuação da cisplatina

A cisplatina é um complexo inorgânico neutro constituído por um centro metálico de platina (II) que possui na sua esfera de coordenação duas aminas e dois cloros numa configuração *cis*

(figura 15). Este composto possui uma geometria quadrangular plana e foi sintetizado primeiramente por Peyrone em 1844 [62-64]. O mecanismo de acção da cisplatina é um processo que envolve: a) captação e acumulação pelas células e b) activação e interacção com os constituintes intracelulares [40].

a) Captação e acumulação da cisplatina na célula

No meio extracelular, a cisplatina é inerte devido à elevada concentração de iões de cloro, aproximadamente 100 mM, pelo que a hidrólise deste complexo é maioritariamente suprimida. Contudo, mesmo nestas condições, estudos demonstraram que a hidrólise da cisplatina poderá ocorrer conduzindo à presença de espécies como $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{ClOH}]$ e $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ (figuras 16A e 17). Para além do mais, alguns trabalhos também evidenciaram a existência de complexos de platina coordenados com as proteínas extracelulares (*e.g.* albumina) (figura 16A) [40, 56, 65]. Especula-se que as espécies neutras de platina (*e.g.* $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ e $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{ClOH}]$) possam entrar na célula através do transporte passivo (*e.g.* difusão simples ou facilitada) ou transporte activo (*e.g.* endocitose) como exemplificado na figura 16B [63, 65].

O tipo de transporte que medeia a captação dos complexos de platina para o interior da célula é condicionado pela sua concentração. Deste modo, em elevadas concentrações, a cisplatina é maioritariamente transportada através da membrana celular por difusão passiva. Em situações de baixas concentrações, a captação do complexo metálico pelas células é geralmente mediada por transporte activo [63, 65].

Os principais transportadores membranares associados à captação da cisplatina são os transportadores de catiões orgânicos (OCT1-3), os transportadores de cobre (CTR1) e os transportadores dependentes de sódio não identificados (figura 16B) [63, 65].

Os transportadores de catiões orgânicos (OCT) são membros da família de proteínas transportadores de soluto (SLC), mais concretamente à subfamília SLC22, e localizam-se na membrana plasmática. Estes transportadores estão normalmente envolvidos na absorção e excreção de compostos endógenos e exógenos em diversos órgãos (*e.g.* fígado, intestino, cérebro, pulmões, coração e medula óssea) [65].

Os transportadores de cobre 1 (CTR1) pertencem à subfamília SLC31 e são os principais transportadores de cobre nos mamíferos. No ser humano, o transportador de cobre 1 (*hCTR1*) é expresso em todos os tecidos e é fundamental na regulação dos níveis do cobre intracelular [65].

A enzima $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ ou bomba de sódio e potássio é responsável por manter o gradiente de Na^+/K^+ através da membrana plasmática, hidrolisando para o efeito a adenosina trifosfato (ATP) enquanto bombeia sódio para o exterior e potássio para o interior das células animais. Existem

transportadores que dependem deste gradiente para o seu funcionamento. A cisplatina não é um substrato para a bomba de sódio, no entanto a inibição deste transportador reduz o gradiente de Na^+ que atravessa a membrana afectando o transporte activo ou facilitado da cisplatina [63, 65].

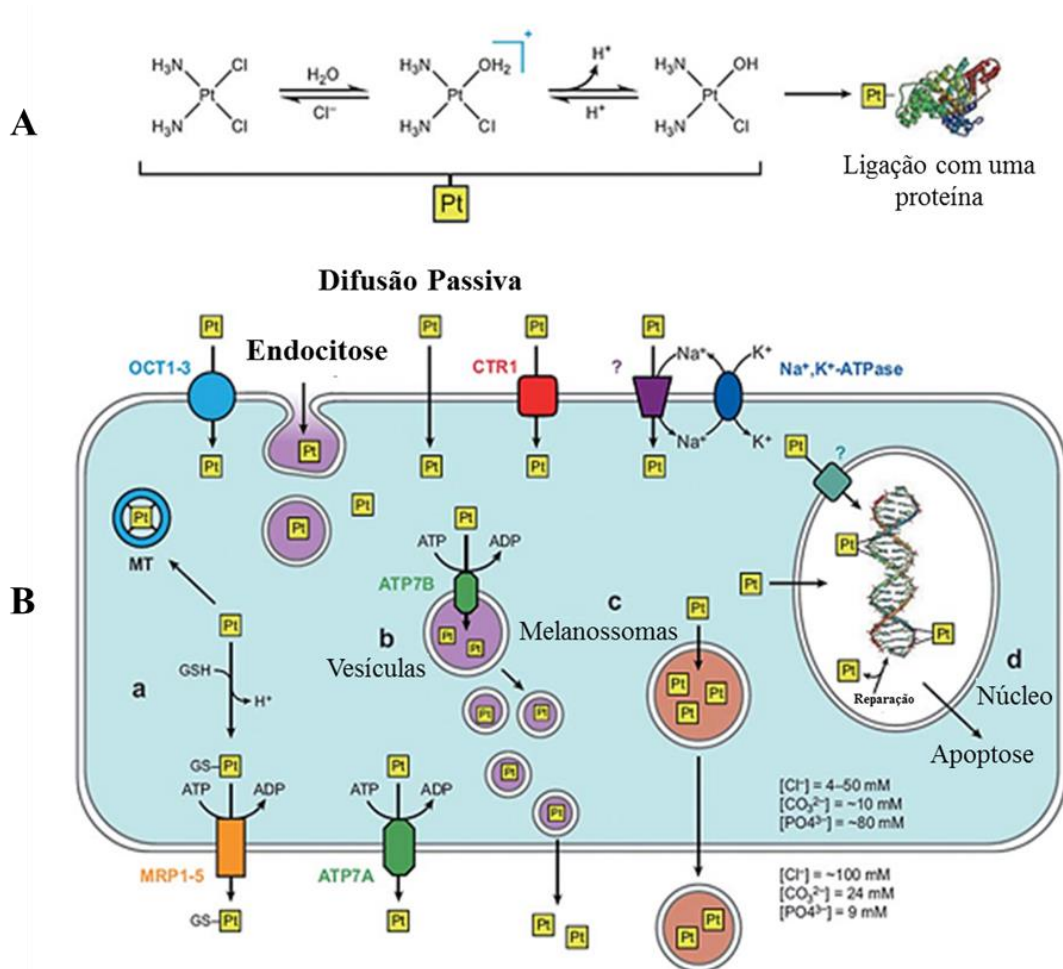


Figura 16 - Diagrama dos mecanismos que afectam e controlam a acumulação celular dos quimioterapêuticos de platina, exemplificado para a cisplatina (adaptado das referências [63, 65]).

b) Activação e interacção da cisplatina com as estruturas celulares

Uma vez no interior da célula a cisplatina também será sujeita, em maior proporção, ao conjunto de reacções espontâneas de hidrólise representadas na figura 17. A baixa concentração de cloro (4 a 50 mM) no citoplasma favorece a perda de um ou dos dois ligandos de cloro da cisplatina [40, 63, 66]. As formas catiónicas de platina resultantes são muito reactivas e podem interagir com o ADN ou com estruturas celulares presentes no citoplasma [66].

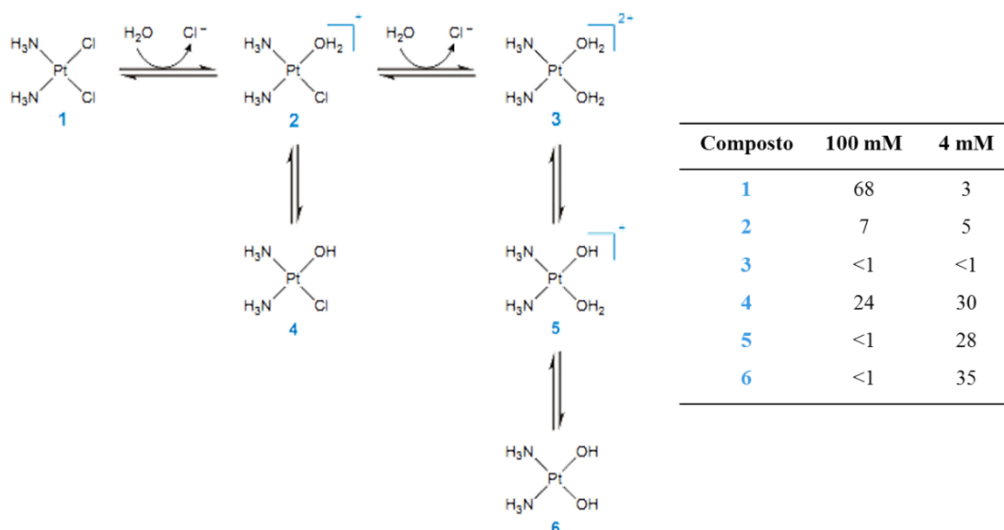


Figura 17 - Representação esquemática da hidrólise da cisplatina em solução aquosa. Na tabela encontra-se registado as percentagens de cada espécie a pH 7,4 e a diferentes concentrações de iões de cloro, nomeadamente $[Cl^-] = 100 \text{ mM}$ e 4 mM (adaptado da referência [65]).

De referir que apenas 5 a 10% de cisplatina presente no interior das células interage com o ADN enquanto 75 a 85% deste composto liga-se às regiões nucleofílicas dos constituintes intracelulares (*e.g.* proteínas) [67, 68]. Os complexos activados de platina interagem com as bases nucleotídicas do ADN, maioritariamente na posição N7 da guanina, originando aductos estruturalmente diferentes (figura 18) [40, 67].

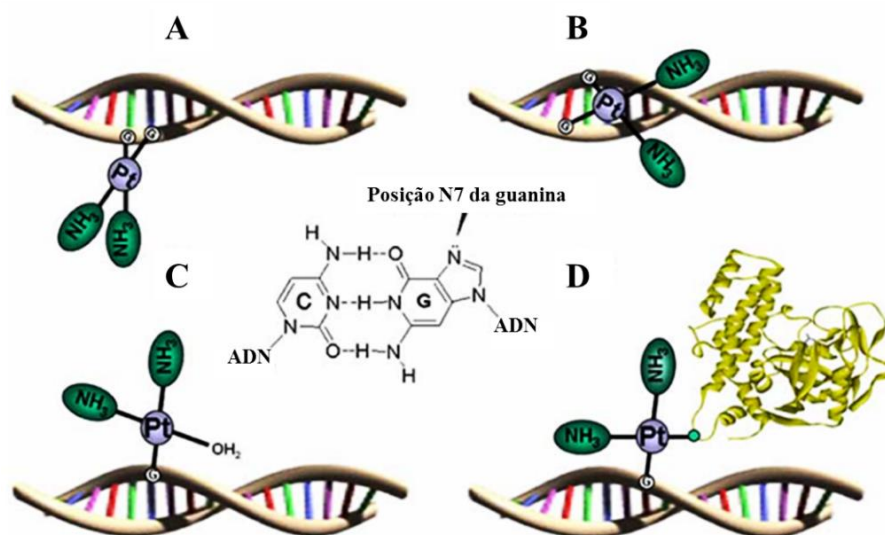


Figura 18 - Interação da cisplatina com as bases nucleotídicas do ADN: (A) ligação cruzada intracadeia, (B) ligação cruzada intercadeia, (C) aducto monofuncional e (D) complexo proteína-cisplatina-ADN. O principal local de ataque da cisplatina ao ADN é a posição N7 da guanina, representado no centro da imagem (adaptado da referência [67]).

Os aductos de cisplatina-ADN produzidos com maior frequência são os que resultam das ligações cruzadas intracadeia entre guaninas adjacentes (65% de todas as lesões no ADN) ou entre uma guanina e uma adenina (25% das lesões) e das ligações cruzadas intercadeia de duas guaninas [68, 69]. No entanto, também poderá ocorrer a ligação da cisplatina numa única base nucleotídica (aducto monofuncional) ou a formação do complexo proteína-cisplatina-ADN [67, 68]. Os aductos promovidos pela cisplatina conduzem a distorções significativas na molécula do ADN (figura 19) que inibem a sua replicação e a transcrição, ocorrendo a activação da via apoptótica [56, 59].

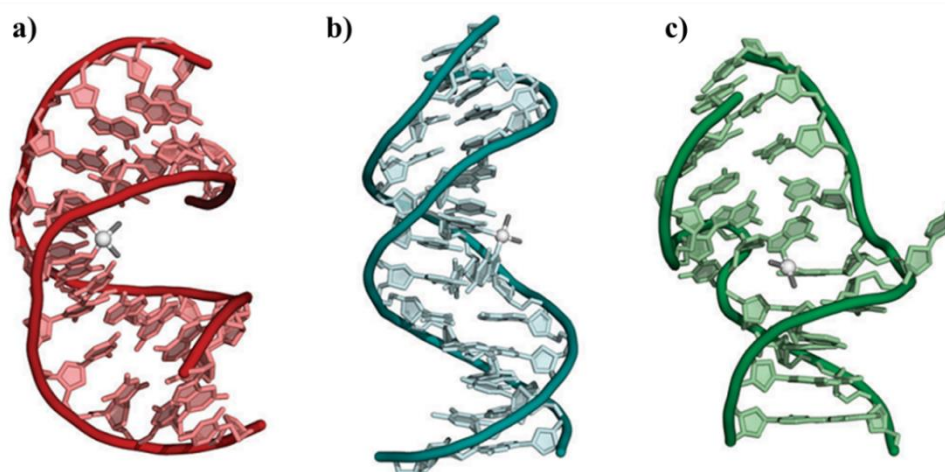


Figura 19 - Estrutura do ADN contendo diferentes tipos de aductos de cisplatina: a) ligação cruzada 1,2- intracadeia; b) ligação cruzada 1,3- intracadeia e c) ligação cruzada intercadeia [70].

A interacção da cisplatina com outras estruturas celulares diferentes do ADN pode conduzir à sua desactivação e eliminação através da:

i. ligação com moléculas que possuam o grupo tiol (R-SH) na sua estrutura, como a proteína metalotioneína (MT) e o tripéptido glutatona (γ -glutamil-L-cisteinilglicina, GSH) impedindo a interacção do complexo de platina com o ADN (figura 16B). Além disso, o conjugado resultante da interacção da cisplatina com a glutatona é removido da célula através da bomba de efluxo glutatona-S-conjugada (GS-X). As bombas GS-X, conhecidas também como proteínas associadas à resistência a múltiplos fármacos (MRP), são transportadoras de aniões orgânicos dependentes de ATP que pertencem à superfamília “*ATP-binding cassette*” (ABC) [65, 71].

ii. remoção mediada por transportadores de efluxo do cobre dependentes de ATP (figura 16B), os quais pertencem à família ATPase 7. No ser humano, existem dois tipos de isoformas destas enzimas, nomeadamente as ATPases 7A e 7B que diferem nos níveis de distribuição nos tecidos. A ATP7A, com a excepção do fígado, é expressa no epitélio intestinal e noutros tecidos. Por outro lado, a ATP7B é expressa maioritariamente no fígado e em determinadas áreas do cérebro. Quando a

concentração do cobre é baixa ou normal, estas ATPases situam-se normalmente na rede Trans do complexo de Golgi, onde são responsáveis por entregar o cobre para ser incorporado nas enzimas dependentes de cobre. No entanto, nas situações de elevadas concentrações de cobre intracelular, a ATP7A desloca-se para a membrana plasmática de modo a conduzir o efluxo de cobre. Por outro lado, a enzima ATP7B é também responsável por redistribuir o excesso de cobre por vesículas citoplasmáticas que serão eliminadas por exocitose [63, 65, 72, 73].

iii. retenção nos melanossomas presentes nos melanócitos, os quais são subsequentemente exportadas para o meio extracelular (figura 16B). Nestes organelos ocorre a síntese, o armazenamento e o transporte da melanina [65].

1.2.1.1. Resistência celular aos complexos de platina e estratégias para otimizar a sua eficiência

Normalmente, os doentes oncológicos apresentam uma boa resposta inicial à quimioterapia com cisplatina, porém o seu efeito clínico é reduzido ao longo do tempo devido ao desenvolvimento de resistência adquirida. No entanto, outros doentes apresentam resistência ao fármaco logo no início do tratamento (resistência intrínseca). Os estudos realizados em cultura de tecidos sugerem que o processo de resistência celular à cisplatina é um processo multifactorial, os quais incluem, por exemplo, as alterações anteriormente referidas nos sistemas de captação e excreção; aumento dos processos de detoxificação do fármaco através do aumento dos níveis celulares dos compostos com grupos tióis; o aumento da capacidade da célula para reparar ou tolerar o ADN danificado e alteração da regulação da transcrição [40, 54, 55, 66]. Deste modo, diversas estratégias têm sido estudadas para combater a baixa selectividade, elevada toxicidade e a resistência celular para os complexos de platina (II), tais como [61]:

i. construção de complexos de platina com diferentes modos de ligação ao ADN, como por exemplo, os complexos polinucleares (possuem mais do que um centro metálico, figura 20) [61, 74];

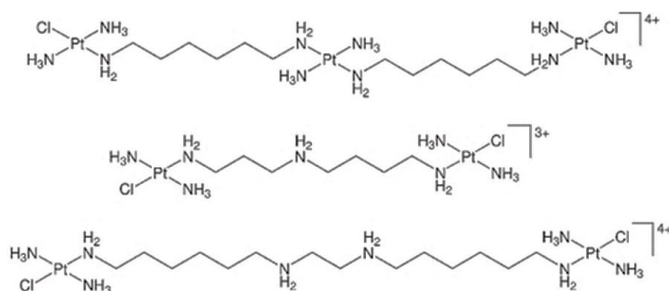


Figura 20 - Estrutura de alguns complexos polinucleares de platina [40].

ii. aumento da acumulação selectiva dos complexos de platina no local do tumor através da sua conjugação com substâncias bioactivas (*e.g.* hormonas, carbohidratos) ou com polímeros ou nanopartículas (*e.g.* dendrímeros, lipossomas), como representado na figura 21 [61, 75];

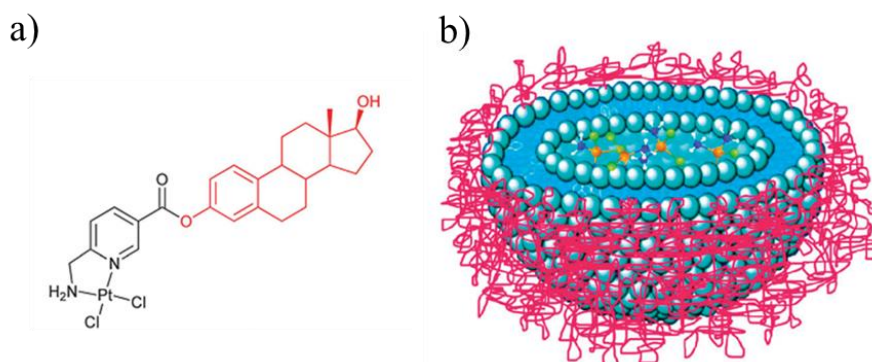


Figura 21 - Conjugação de um complexo de platina com a hormona estradiol (a) e encapsulamento da cisplatina num lipossoma funcionalizado à superfície com o polímero polietileno glicol (PEG, b) (adaptado da referência [61]).

iii. exploração de complexos de platina que actuem como pró-fármacos, ou seja, que sejam administrados na forma inerte e, posteriormente, activados através dos processos celulares do organismo [61, 74, 76-80]. Os complexos de platina (IV) são bons exemplos de pró-fármacos, uma vez que podem ser suficientemente estáveis e inertes que lhes permite ser transportados por todo o organismo até alcançarem os tumores sem sofrer muitas alterações na sua estrutura. Estes complexos ao serem expostos ao ambiente redutor dos tumores podem sofrer eliminação redutiva dos seus ligandos axiais (figura 22), sendo convertidos na forma quadrangular planar com estado de oxidação II (forma citotóxica) [61, 81-83].

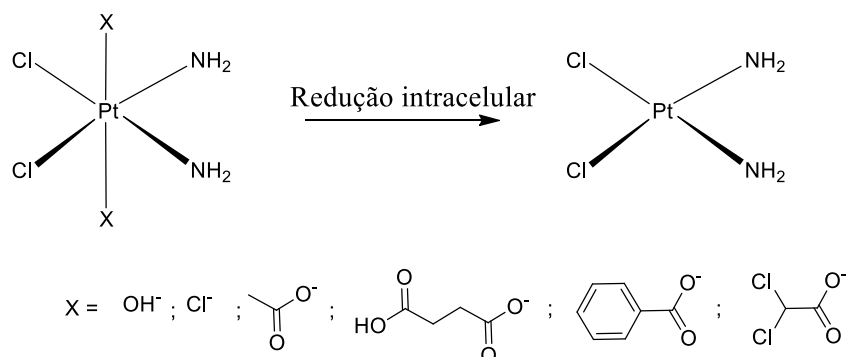


Figura 22 - Eliminação redutiva dos ligandos axiais (X) de um complexo de platina (IV) para a cisplatina (II) (adaptado das referências [76, 78, 81]).

Por conseguinte, os complexos de platina (IV) têm uma geometria octaédrica e apresentam diversas vantagens relativamente aos complexos de platina (II), tais como:

i. elevada inércia cinética à substituição dos ligandos contribuindo para uma baixa reactividade do complexo;

ii. efeitos secundários reduzidos devido à elevada estabilidade do complexo;

iii. maior possibilidade de modificações estruturais devido à presença de dois ligandos adicionais nas posições axiais (*e.g.* lipofilicidade) [81-85];

i.v. novas propriedades farmacodinâmicas tais como toxicidade adicional conferida pela possibilidade de incorporar dois ligandos axiais biologicamente activos (*e.g.* fármacos, inibidores enzimáticos), que podem ser libertados após a redução do complexo. Os ligandos libertados e o complexo reduzido resultante podem actuar em conjunto para eliminar as células cancerígenas [40, 82-84].

De acordo com a natureza dos ligandos coordenados ao metal, a redução química dos complexos de platina (IV) pode ser desencadeada por diversos vias, como por exemplo, através de enzimas ou de factores específicos presentes em determinadas áreas do organismo (*e.g.* o baixo pH presente nos tumores) [81].

No entanto, a redução química dos complexos Pt(IV) poderá ocorrer em qualquer parte do organismo que apresente um ambiente redutor, pois estes compostos apresentam uma baixa selectividade para as células cancerígenas. Uma das estratégias para aumentar a selectividade dos complexos de Pt(IV) é através da incorporação, na sua estrutura, de ligandos sensíveis à luz (fotoactivação). Deste modo, a incidência de luz (*e.g.* por laser) na zona dos tumores permite que apenas os complexos de Pt(IV) presentes neste local sejam activados [81, 86]. A classe de composto de platina (IV) em estudo susceptíveis de sofrer fotoactivação assenta em complexos diodoplatina (IV) e diazidoplatina (IV), figura 23 [81].

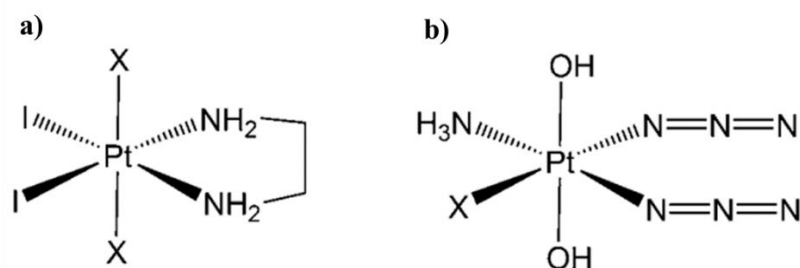


Figura 23 - Estrutura geral dos complexos de platina activados pela luz: a) diiodoplatina (IV) e b) diazidoplatina (IV) (adaptado da referência [81]).

1.2.2. Complexos de ruténio - Modo de actuação dos complexos de ruténio

As propriedades anticancerígenas dos complexos de ruténio foram primeiramente reconhecidas pela investigação conduzida por Dwyer e colaboradores na década de 50 do século XX [87-89]. No entanto, só após a descoberta do efeito terapêutico da cisplatina é que os estudos se aprofundaram para complexos com outros metais, tais como o ruténio [87].

O ruténio é um metal de transição localizado, como a platina, no grupo 8 da tabela periódica. Os complexos de ruténio representam uma classe de compostos com um grande potencial para o desenvolvimento de agentes anticancerígenos [90]. As principais propriedades que parecem estar associadas com a actividade biológica do ruténio são as seguintes:

✓ Cinética de permuta dos ligandos lenta, semelhante a dos complexos de platina. No geral, para os iões metálicos Pt(II), Ru(II) e Ru(III), a substituição dos pequenos ligandos demora várias horas imitando a escala de tempo para muitos processos celulares (figura 24). Deste modo, estes metais apresentam uma elevada estabilidade cinética. A escala de tempo para ocorrer a substituição dos ligandos do complexo metálico é determinante na sua actividade biológica visto que este processo deverá ser suficientemente longo para permitir que o medicamento atinja o alvo biológico antes de ser activado. No entanto, a activação do complexo metálico deverá ocorrer antes da sua excreção pelo organismo. É de mencionar que existem poucos medicamentos metálicos que alcancem o alvo biológico sem sofrerem modificações. Apesar de algumas reacções de permutas serem fundamentais para induzir as propriedades terapêuticas pretendidas, outras conduzem à desactivação e eliminação do medicamento. Para além das características do metal, a natureza e a disposição espacial dos ligandos coordenados ao metal afectam as taxas de permuta dos ligandos e podem ser utilizados para otimizar as propriedades do complexo metálico [90-92].

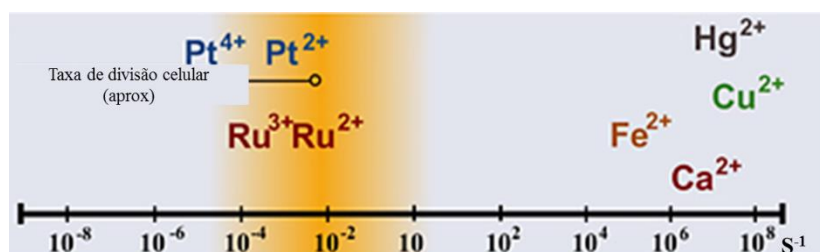


Figura 24 - Taxas de permuta de ligandos, por segundo, de diversos metais (adaptado da referência [93]).

✓ Múltiplos estados de oxidação acessíveis no meio fisiológico, nomeadamente II, III e IV, onde o ruténio é predominantemente hexacoordenado com geometria octaédrica. Além disso, a energia necessária para ocorrer a interconversão entre estes estados de oxidação é relativamente baixa, o que facilita a sua ocorrência nos fluídos fisiológicos. No entanto, a natureza da esfera de coordenação do ruténio é fundamental para a estabilização do estado de oxidação do metal, determinando as suas propriedades redox. Deste modo, apesar da acessibilidade dos estados de oxidação, os complexos de ruténio possuem ligandos com taxas de substituição relativamente baixas em meio aquoso [90, 93].

✓ Activação por redução é uma hipótese demonstrada apenas *in vitro* que assenta na activação do complexo de ruténio através da modificação do seu potencial redox promovido pelo ambiente redutor dos tumores sólidos. Isto contribui para o aumento da selectividade do medicamento e minimiza os possíveis efeitos negativos nas células normais. O ambiente extremamente redutor presente nas células cancerígenas surge devido à elevada taxa metabólica que estas células exibem que, associado com o fornecimento insuficiente de oxigénio, conduz a uma maior dependência da via metabólica da glicólise para a obtenção de energia (em vez do ciclo de Krebs). A utilização preferencial da glicólise conduz à formação de um excesso de ácido láctico, ocorrendo a diminuição do pH do meio nos tecidos circundantes. Para além disso, a presença dos agentes redutores nas células (*e.g.* glutathione) favorece a redução dos complexos de ruténio. Deste modo, teoricamente, os fármacos de ruténio administrados, por exemplo, no estado de oxidação III, relativamente inertes, poderão ser activados por redução em ruténio (II) nos tecidos malignos. Se no caso dos complexos reactivos de Ru(II) deixarem de estar sob exposição do ambiente hipóxico, estes serão novamente convertidos em Ru(III) por uma diversidade de agentes oxidantes biológicos (*i.e.* tornando-se menos activo) [90, 93, 94].

✓ Mimetização da ligação do ferro a moléculas biológicas como as proteínas séricas transferrina e albumina. Estas proteínas são as responsáveis pelo transporte e solubilização do ferro no plasma [90, 95]. O ferro é um micronutriente essencial para as funções celulares sendo requerido em diversos processos metabólicos, tais como no transporte de oxigénio, na síntese do ADN (como co-factor da ribonucleotide reductase), na produção de energia e na proliferação celular [96]. Contudo, o excesso de ferro é tóxico devido à sua capacidade de catalisar a formação de radicais livres que, por sua vez, conduzem à danificação química da maioria dos componentes celulares [97].

As células que apresentam uma taxa de divisão rápida, incluindo as células cancerígenas, requerem grandes quantidades de ferro pelo que expressam um maior número de receptores de transferrina na membrana celular permitindo uma maior captação de transferrina. De acordo com o tipo celular, estudos *in vivo* demonstram que nas células cancerígenas poderá ocorrer um aumento na

concentração de ruténio de duas a doze vezes mais comparativamente às células normais. O ruténio pode ser transportado para as células por mecanismos dependentes de transferrina e independentes da transferrina [90]. Nos humanos, a transferrina encontra-se a uma concentração de 3 mg/mL no sangue e, normalmente, a cerca de 30% de saturação de ferro (III), o qual permite a ligação e o transporte de outros iões metálicos [98].

Os complexos de ruténio ligam-se à apotransferrina formando conjugados estáveis que não alteram as interacções da proteína com o receptor da transferrina (figura 25). No entanto, apenas a transferrina com ferro coordenado (holotransferrina) é captada pela célula. Embora seja um assunto em discussão, pensa-se que apenas o ruténio coordenado à holotransferrina é efectivamente captado pelas células. Porém, após a entrada do ruténio na célula, mediada pela transferrina, o destino dos conjugados de ruténio ainda é desconhecido. Contudo, os complexos de ruténio que não estão fortemente ligados à holotransferrina podem dissociar-se desta. Esta dissociação poderá ser favorecida através da alteração das condições fisiológicas como, por exemplo, através da redução do pH que por sua vez terá um efeito sobre o estado de oxidação do ruténio [97].

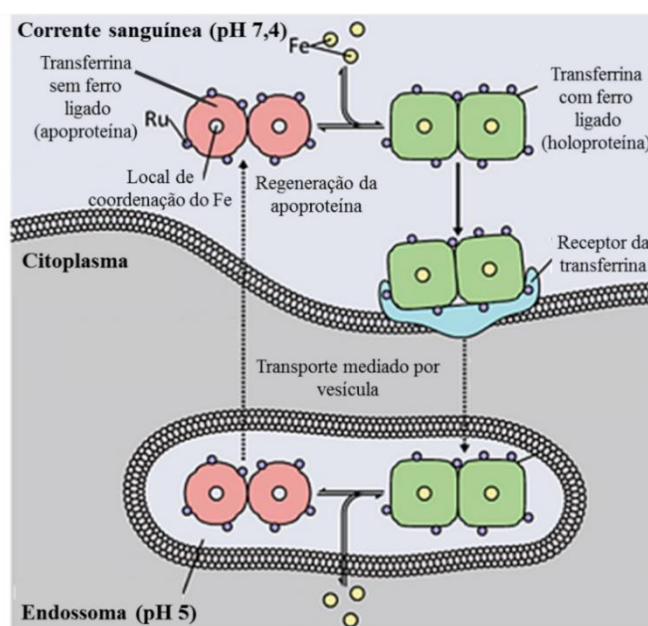


Figura 25 - Mecanismo geral a partir do qual os complexos de ruténio podem ser transportados, via transferrina, para o interior das células (adaptado da referência [93]).

Uma grande diversidade de complexos de ruténio têm sido alvo de estudo para o tratamento do cancro. Actualmente, o composto NAMI-A (*New Anti-tumour Metastasis Inhibitor-A*, *trans*-[tetracloro(dimetilsulfóxido) rutenato(III) de imidazol]) e o composto KP1019 ou FFC14A (*trans*-[tetracloro-bis(1H-indazol)rutenato(III)]) encontram-se em ensaios clínicos [40, 62, 99].

Nos pontos seguintes serão abordados os complexos de rutênio (III), nomeadamente os complexos NAMI-A e o KP1019, e a família de compostos de rutênio (II) com ligandos areno e de ciclopentadienilo como potenciais fármacos anticancerígenos.

1.2.2.1. Complexos de rutênio(III) presentes nos ensaios clínicos: NAMI-A e KP1019

O NAMI-A, com fórmula geral $[\text{ImH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})]$ (Im = imidazole e DMSO = dimetilsulfóxido), foi o primeiro fármaco de rutênio a ser testado em humanos (figura 26), tendo já completado a fase I dos ensaios clínicos para o tratamento de metástases [40, 62].

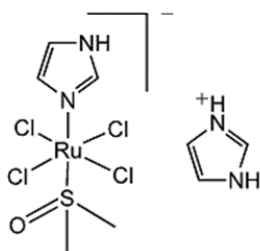


Figura 26 - Estrutura química do *trans*-[tetrachloro(dimetilsulfóxido)rutenato(III) de imidazol] (NAMI-A) [100].

Apesar do complexo NAMI-A reduzir a formação de metástases e aparentar inibir o seu crescimento, este composto detém um efeito menos pronunciado nos tumores primários em modelos animais (figura 27).

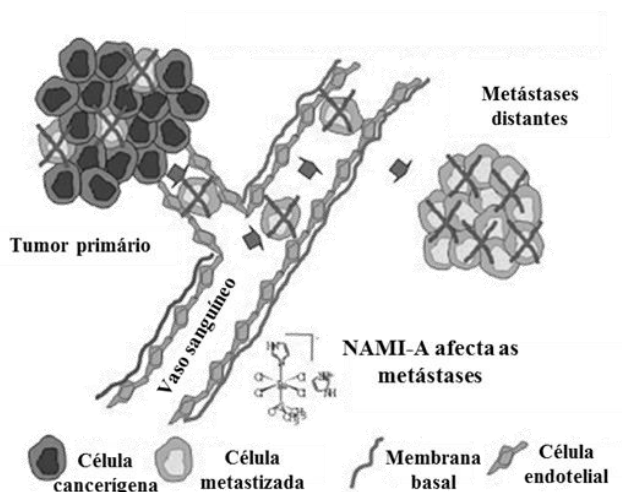


Figura 27 - Representação esquemática do tratamento selectivo das metástases com o fármaco NAMI-A, onde se visualiza a remoção quase total das células metastizadas com impacto reduzido no tumor primário (adaptado da referência [101]).

Todavia, tem sido sugerida a hipótese do composto NAMI-A eliminar selectivamente as células cancerígenas com capacidade de metastização presentes no tumor primário permitindo a redução do seu tamanho e, conseqüentemente, possibilitando a sua remoção cirúrgica [40, 62, 100].

O composto NAMI-A apresenta características químicas e biológicas promissoras, tais como uma boa actividade antimetástica, baixa toxicidade, uma preparação fácil e reprodutível e uma boa estabilidade no estado sólido [40]. Contudo, este composto apresenta uma estabilidade hidrolítica reduzida em tampão fosfato a um pH de 7,4 e a 37°C, o que limita a sua administração [102].

O mecanismo exacto pelo qual o NAMI-A exhibe o seu efeito antimetástico permanece desconhecido. Contudo a sua actividade tem sido maioritariamente atribuída às múltiplas interacções que estabelece com os componentes presentes no exterior e interior das células [99, 100]. Algumas das características relevantes para a actividade terapêutica do NAMI-A são:

- i. capacidade de alterar as interacções que as células cancerígenas estabelecem com a matriz extracelular, promovendo o aumento da adesão celular dependente de actina, a inibição da degradação da matriz por metaloproteínas e, conseqüentemente, inibindo a invasão e migração celular [95, 100];
- ii. efeitos anti-angiogénicos [40, 99];
- iii. forte interacção com proteínas, incluindo albumina, transferrina e integrinas [95];
- iv. capacidade de bloquear a progressão do ciclo celular na fase pré-mitótica (fase G2) [40];
- v. entre outros.

É de salientar que o complexo NAMI-A estabelece ligações com o ADN mais fracas do que os derivados de platina pelo que a sua actividade anticancerígena deve-se, provavelmente, à forte interacção com as proteínas [59].

O composto KP1019, $[\text{InH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{In})_2]$ (In = indazole), foi sintetizado por Keppler e colaboradores (figura 28). Este composto é um análogo do NAMI-A que utiliza bases de indazole em vez de imidazole e é extremamente activo contra certos tipos de cancro (*e.g.* colorrectal), tendo recentemente completado a fase I dos ensaios clínicos [62, 99, 103, 104].

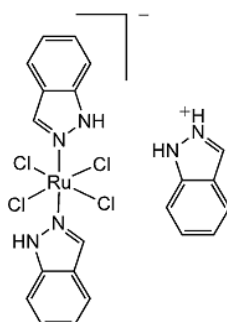


Figura 28 - Estrutura química do *trans*-[tetrachloro-bis(1H-indazol)rutenato(III)] (KP1019) [100].

O modo exacto de acção do complexo KP1019 nas células cancerígenas também é pouco conhecido (figura 29) [97].

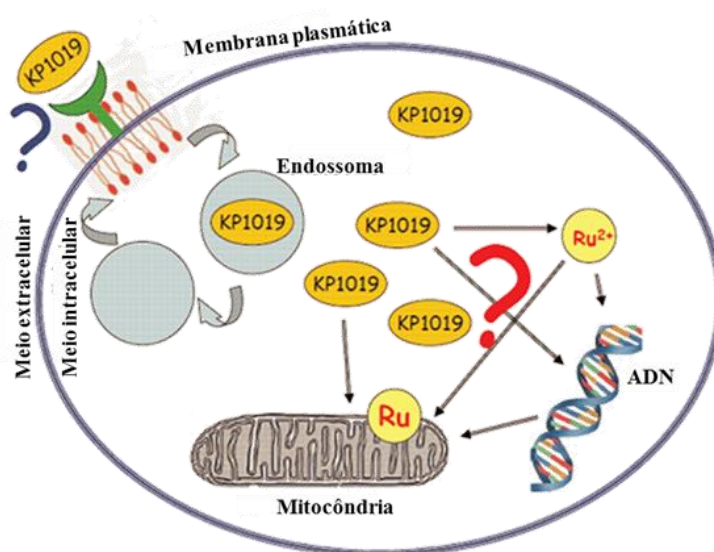


Figura 29 - Representação esquemática do modo de acção hipotético do KP1019 (adaptado da referência [94]).

Seguindo o perfil dos metais de transição, o KP1019 exhibe uma elevada afinidade para os átomos doadores de electrões presentes nas estruturas celulares (*e.g.* proteínas e o ADN) [40]. Deste modo, o complexo KP1019 liga-se à proteína transferrina sendo transportado para o interior das células cancerígenas [40, 97, 100]. Uma vez no interior das células, pensa-se que a libertação das unidades de ruténio do complexo KP1019 ocorre essencialmente nos endossomas, onde os reduzidos valores de pH favorecem a sua dissociação [100]. Além disso, os complexos de KP1019 podem ser activados por redução promovida, por exemplo, pela glutatona (0,5 - 10 mM na célula) ou pelo ácido ascórbico (11 - 79 μ M no plasma sanguíneo) originando as espécies reactivas correspondentes de Ru(II) [40].

Ao contrário do composto NAMI-A, especula-se que o complexo KP1019 exhibe uma citotoxicidade directa nas células cancerígenas através da indução da apoptose. Esta poderá ser induzida por uma via intrínseca das mitocôndrias ou poderá ser despoleta pela ligação do ruténio ao ADN [62, 100]. As interacções entre o composto KP1019 e o ADN são semelhantes às que a cisplatina estabelece com esta biomolécula. Contudo, este complexo de ruténio apresenta uma menor intensidade e eficiência na formação de aductos com o ADN e com um menor grau de distorção da sua estrutura secundária [99]. De qualquer forma, o complexo KP1019 apresenta um comportamento terapêutico diferente ao da cisplatina, o qual poderá trazer algumas vantagens terapêuticas no futuro, especialmente para certos tipos de cancro [40].

1.2.2.2. Complexos de rutênio (II) com ligandos areno

A instabilidade química e o mecanismo complicado de permuta de ligandos nos complexos de coordenação de rutênio (III) constituem um dos problemas principais nos ensaios clínicos. Por conseguinte, o aumento da estabilidade dos complexos organometálicos de rutênio poderá melhorar o perfil terapêutico destes como agentes anticancerígenos [105].

Os complexos de rutênio(II)-areno são muito atractivos para este efeito uma vez que possuem um ligando aromático normalmente inerte às reacções de substituição nas condições fisiológicas. Deste modo, este ligando confere estabilidade e protecção ao rutênio (II), prevenindo a sua oxidação para rutênio (III) [62, 106-108].

A ideia de utilizar os compostos rutênio(II)-areno como agentes anticancerígenos foi primeiramente introduzida por Tocher *et al.* em 1992. Este grupo de investigação observou que a coordenação do agente anticancerígeno 1-β-(hidroxietil)-2-metil-5-nitro-imidazole (metronidazolo) ao fragmento ($\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6$)RuCl₂ (figura 30) aumentou a sua citotoxicidade comparativamente à exibida pelo ligando livre [108-110]. O estudo da actividade antineoplásica e antimetastática desta classe de complexos tem sido principalmente desenvolvido nos grupos de investigação liderados por Dyson e Sadler [105, 109, 111, 112].

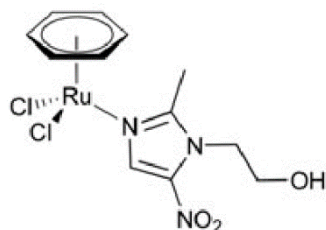


Figura 30 - Estrutura do primeiro composto organometálico de rutênio com ligando areno a ser testado pelas suas propriedades anticancerígenas [110].

Os complexos de rutênio(II)-areno são conhecidos como complexos em “meia sandwich” com a fórmula geral $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{X})(\text{Y})(\text{Z})]^{n+}$. Estes complexos apresentam uma estrutura característica em “banco piano” onde o ligando areno ocupa três locais de coordenação do complexo (formando o assento) e os ligandos X, Y e Z ocupam as restantes posições (representando as pernas do banco de piano) [40, 47, 113]. De acordo com as ligações estabelecidas entre os ligandos X, Y e Z e o rutênio poderemos ter apenas ligandos monodentados (X=Y=Z), um monodentado (X) e um bidentado (Y-Z) ou um ligando tridentado (X-Y-Z), figura 31[114].

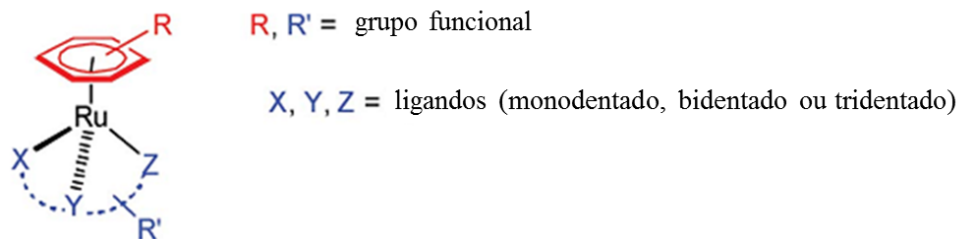


Figura 31 - Estrutura geral dos complexos rutênio(II)-areno “meia sandwich” (adaptado da referência [114]).

A estrutura geral dos complexos organometálicos de rutênio(II)-areno permite a modificação do estado de oxidação do metal e da natureza dos ligandos que o compõe de modo a controlar a sua reactividade química (*e.g.* reacções redox, substituição do ligando, solubilidade em água) [40, 47, 113].

Por conseguinte, uma grande variedade de ligandos podem ser incorporados nesta classe de compostos de rutênio (II) para otimizar as suas propriedades farmacológicas tais como a captação celular, distribuição, interacção com biomoléculas e os efeitos secundários tóxicos [113].

Existem diversas famílias de complexos de rutênio com o fragmento $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru(II)}]$ em estudo para o combate do cancro, onde as que possuem os ligandos 1,3,5-triaza-7-fosfatriciclo[3.3.1.1]decano (pta) ou etilenodiamina (en) têm sido mais especificamente explorados [115]. Os complexos $[(\eta^6\text{-bifenil})\text{Ru(en)}][\text{PF}_6^-]$ (RM175) e o $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{RuCl}_2(\text{pta})]$ (RAPTA-C) representam alguns dos exemplos com propriedades anti-tumorais promissoras (figura 32) [40, 116].

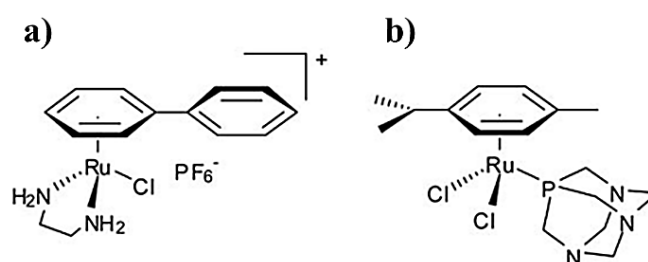


Figura 32 - Estrutura dos complexos organometálicos de rutênio: a) RM175 e b) RAPTA-C [116].

1.2.2.2.1. Reactividade química dos complexos de areno

A compreensão do modo como os constituintes (*e.g.* areno, ligandos e carga) dos complexos ruténio(II)-areno afectam a sua actividade biológica, é importante para o desenho de fármacos mais eficazes e com poucos efeitos secundários [113].

✓ Hidrofobicidade do ligando areno

A hidrofobicidade é uma característica farmacológica importante nos complexos metálicos uma vez que esta condiciona fortemente o fluxo dos fármacos, através das membranas celulares, para o interior e o exterior da célula. Além disso, as interacções hidrofóbicas são importantes no estabelecimento de ligações com certas biomoléculas (*e.g.* ADN e proteínas) [62, 91, 113].

A actividade biológica dos complexos de ruténio(II)-areno, nomeadamente os que possuem a fórmula geral $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$, tem demonstrado ser condicionada pela natureza do areno. Nesta família de complexos, o aumento da hidrofobicidade do areno coordenado através, por exemplo, do aumento do seu tamanho com substituintes apolares contribui para o aumento da citotoxicidade destes compostos [113]. Deste modo, complexos de ruténio (II) com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, como o tetrahydroantraceno, têm demonstrado uma boa actividade anticancerígena [91, 117].

O aumento da actividade biológica com o aumento da hidrofobicidade pensa-se que esteja relacionado com a capacidade do areno substituído intercalar no ADN, provocando maior distorção na estrutura desta molécula. Além disso, estudos revelaram que os complexos contendo este tipo de arenos ligam-se mais rapidamente à guanosina monofosfato cíclico (cGMP) do que os complexos que possuem um areno não substituído (*e.g.* benzeno). Isto sugere que a ligação é promovida pelas interacções hidrofóbicas entre o areno e a purina [113].

✓ Hidrólise do grupo abandonante (X)

O grupo abandonante ocupa a posição a partir da qual o metal central estabelece a ligação com as biomoléculas. Deste modo, pensa-se que a hidrólise do grupo abandonante seja o passo de activação para a classe dos complexos de ruténio (II) em “meia sandwich” [109, 113].

Na família de complexos com fórmula geral $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{YZ})\text{X}]^{n+}$, a taxa de hidrólise do grupo abandonante (X) afecta a citotoxicidade destes complexos nas células cancerígenas na medida em que os complexos que hidrolisam mais rapidamente apresentam uma actividade superior (*e.g.* X = haleto) enquanto os que não hidrolisam (*e.g.* X = piridina) apresentam uma baixa actividade ou encontram-se inactivos [91, 113, 118]. A substituição do grupo abandonante (normalmente é um cloreto) por uma molécula de água conduz à formação de um complexo mais reactivo (figura 33). Esta

espécie reage mais rapidamente com as biomoléculas (*e.g.* ADN) do que o seu precursor pelo que é responsável pelo efeito farmacológico do complexo [91].

Todavia, a reactividade química dos complexos $[\eta^6\text{-areno}]\text{Ru}(\text{YZ})\text{X}]^{n+}$ por hidrólise é condicionada não só pela natureza do grupo abandonante mas também pelas características dos restantes ligandos coordenados ao metal, sendo que a presença de grupos electroextractores diminui a taxa de hidrólise do grupo abandonante [91].

Para além da taxa de hidrólise do grupo abandonante, o valor do pKa da molécula de água coordenada ao complexo resultante da hidrólise representa outro parâmetro importante. Esta informação permite determinar a presença das espécies aquosas $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})(\text{OH}_2)]^+$ ou $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})(\text{OH})]^{2+}$ que possuem reactividades variáveis em pH fisiológico (figura 33). De salientar que o complexo $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})(\text{OH})]^{2+}$ é menos susceptível de sofrer substituição pelo que provavelmente será menos reactivo perante alvos biomoleculares [109, 113].

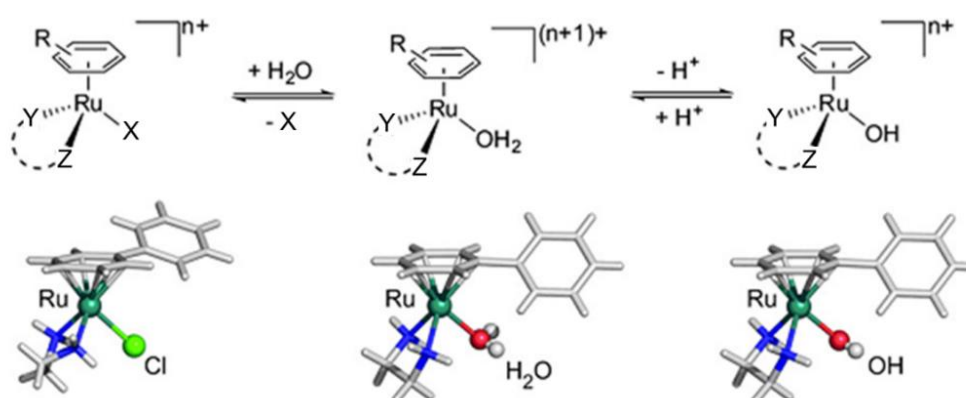


Figura 33 - Reactividade geral dos complexos ruténio(II)-areno, onde a hidrólise da ligação Ru-X origina espécies aquosas mais reactivas. As diferentes estruturas estão exemplificadas para a reactividade do $[\text{Ru}(\eta^6\text{-bip})\text{Cl}(\text{en})]^+$ com $\text{X} = \text{Cl}$, onde bip = bifenil e en = etilenodiamina (adaptado da referência [91]).

Normalmente, os complexos com valores de pKa (da molécula de água coordenada) superior a 7 são activos enquanto os que apresentam o pKa inferior ao pH fisiológico são inactivos uma vez que a forma hidroxó predomina no meio celular. Na maioria dos complexos ruténio(II)-areno, os valores de pKa (da água coordenada) situam-se por volta dos 8. O pKa é condicionado pela natureza dos ligandos presentes no complexo, uma vez que, por exemplo, grupos electroextractores removem densidade electrónica ao metal, tornando-o deficiente em carga negativa e a molécula de água coordenada adquire um carácter mais ácido (diminuição do pKa) [119]. Por conseguinte, através da natureza dos três blocos de construção do complexo (*e.g.* areno coordenado, grupo abandonante e o

ligando quelante), a sua reactividade química pode ser controlada de modo a que o fármaco alcance e reaja com alvo terapêutico, minimizando interacções com outros componentes celulares [91].

✓ Ligando quelante (YZ)

O ligando quelante pode auxiliar no controlo da estabilidade e cinética da permuta de ligandos nos complexos $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{YZ})\text{Cl}]^{n+}$ afectando a sua reactividade [113, 120]. Isto porque os complexos quelantes são, normalmente, mais estáveis às reacções de substituição comparativamente aos ligandos monodentados. Estes últimos, por sua vez, reagem presumivelmente mais rapidamente com os componentes celulares sendo desactivados antes de alcançar o seu alvo [59, 118].

Para além do ligando quelante afectar a taxa de hidrólise do grupo abandonante, também afecta a taxa de ligação e selectividade dos complexos às bases nucleotídicas do ADN. Deste modo, quando o ligando quelante é um doador de hidrogénio como a etilenodiamina, a ligação do complexo de ruténio ao ADN ocorre preferencialmente na posição do azoto N7 da guanina ou N3 da timina. Este comportamento parece estar relacionado com as ligações de hidrogénio favoráveis entre os protões NH da etilenodiamina com o átomo de oxigénio exocíclico C6O da guanina. Por outro lado, a ligação dos átomos NH da etilenodiamina nas posições N3 da citosina ou N7 da adenina são desfavorecidas devido ao efeito estérico entre o grupo C6NH₂ da adenina e o grupo NH da etilenodiamina (figura 34) [118, 120].

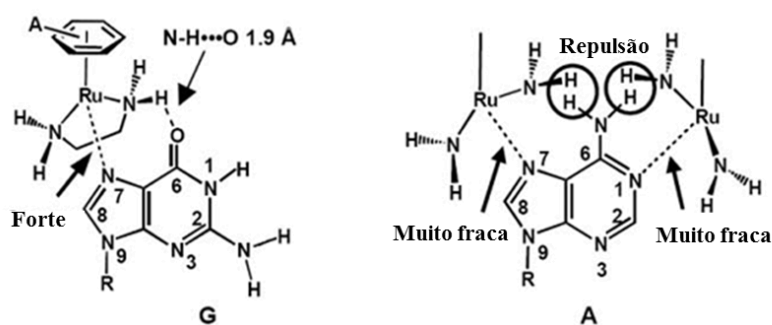


Figura 34 - Interacções entre o complexo $\{(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})\}^{2+}$ com o nucleótido guanina (G) e com o nucleótido adenina (A). Na estrutura da direita, o areno e o anel de etilenodiamina foram omitidos para simplificação (adaptado da referência [120]).

✓ Carga

A carga geral nos complexos $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{YZ})\text{Cl}]^{n+}$ é determinada pelo ligando quelante YZ e pelo grupo abandonante X. Os complexos carregados positivamente serão provavelmente atraídos electrostaticamente pela carga negativa do ADN. Contudo, uma elevada carga negativa pode dificultar a passagem através das membranas celulares (repulsão). Os complexos de ruténio(II)-areno neutros

podem atravessar a membrana celular mais rapidamente e adquirirem carga positiva no interior da célula, através da substituição do ligando cloreto, carregado negativamente, por uma molécula de água neutra. O complexo resultante é atraído electrostaticamente para o ADN [113].

✓ Modo de actuação/alvo dos compostos

Os mecanismos de acção de que resultam efeitos antitumorais nos compostos areno de ruténio ainda estão, na sua totalidade, por clarificar. No entanto, até agora os esforços para investigar a acção destes compostos têm-se focado essencialmente na interacção com o ADN e as proteínas [62].

Deste modo, a activação dos complexos de ruténio em “banco piano” *in vivo* parece estar relacionada com a rápida hidrólise da ligação Ru-Cl e subsequente formação do metabólito activo Ru-OH₂ (figura 33). Esta hidrólise pensa-se que, tal como para a cisplatina, seja maioritariamente suprimida pela elevada concentração de cloro extracelular, mas torna-se possível no interior das células, onde a concentração de iões Cl⁻ é muito mais baixa [40, 42].

O principal alvo dos complexos Ru-OH₂ especula-se que seja o ADN das células, onde se liga preferencialmente à posição N7 da base nucleotídica guanina. Apesar do complexo apresentar um único sítio reactivo, local de saída do grupo abandonante, o composto pode formar ligações não covalentes adicionais resultante da intercalação do areno com as bases nucleotídicas do ADN, bem como através do estabelecimento de ligações de hidrogénio entre o ligando quelante do complexo e o grupo C6O da guanina. A existência destas ligações foi demonstrada experimentalmente, por exemplo, para a coordenação dos complexo [Ru(η⁶-areno)Cl(en)]⁺ (areno =dha, dihidroantraceno) com a 9-etilguanina (9-EtG, derivado da guanina), conforme ilustrada na figura 35 [40, 91].

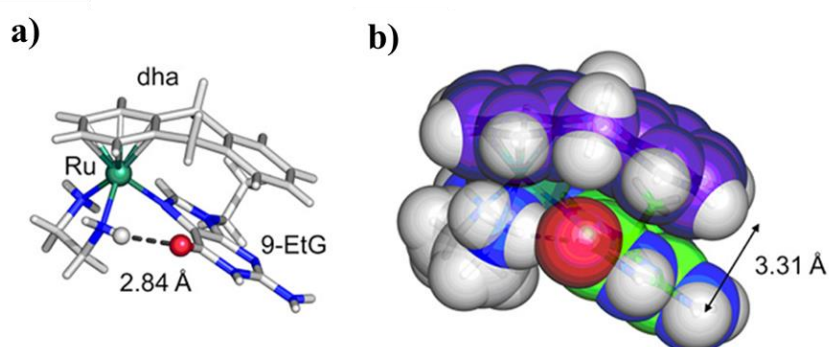


Figura 35 - Complexo [Ru(η⁶-dha)(en)(9-EtG)]⁺ onde se observa a) uma forte ligação estereoespecífica de hidrogénio entre o grupo carbonilo (C6=O) do ligando 9-EtG e o NH da etilendiamina e b) uma forte interacção π-π areno-guanina responsável pela elevada preferência por esta base sobre a adenina nestes complexos ruténio com ligandos areno [91].

As interacções adicionais entre o complexo metálico e o ADN resultam em modos de ligação únicos, conduzindo a distorções estruturais desta biomolécula, diferentes daquelas provocadas pela cisplatina [40, 42, 62]. Para além disso, a possível formação dos aductos monofuncionais e as interacções não covalentes (*i.e.* intercalação e ligação de hidrogénio estereoespecífica) dos complexos de ruténio(II)-areno poderão ser fundamentais para otimizar o reconhecimento do ADN e, conseqüentemente, o seu potencial anticancerígeno [40, 91].

De um modo geral, comparativamente ao ADN, os aminoácidos e as proteínas parecem ter uma baixa afinidade com os complexos areno de ruténio [120]. No entanto, a acção destas biomoléculas tem vindo a ser estudada uma vez que poderão desempenhar um papel importante na farmacocinética desta classe de complexos [62, 120]. Particularmente, as reacções dos complexos de Ru(II)-areno com os aminoácidos cisteína e metionina contendo enxofre são de grande interesse devido à forte influência destes aminoácidos na química intracelular dos complexos de platina (*e.g.* mecanismos de resistência e destoxicação) [120].

1.2.2.3. Complexos de ruténio (II) com ligandos ciclopentadienilo

A actividade anticancerígena da família de complexos derivados do fragmento $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}]$ encontra-se ainda pouco estudada. No entanto, nesta família de compostos, resultados promissores têm vindo a ser observados. Alguns potenciais do fragmento $(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}$ são os seguintes [121, 122]:

✓ Complexos de ruténio coordenados com inibidores de proteína cinases

As cinases catalisam a transferência de grupos fosfatos (*e.g.* adenosina trifosfato, ATP) para diversos substratos, controlando assim diversos processos celulares importantes. A mutação e desregulação das cinases estão na base de muitas doenças, incluindo o cancro, pelo que constituem um dos alvos dos fármacos [40, 123, 124]. Estas enzimas possuem mais de 500 membros de proteínas com domínios de ligação ao ATP altamente conservados [125].

A staurosporina é uma biomolécula que apresenta uma elevada afinidade para o local de ligação do ATP nas proteínas cinases, impedindo a ligação do ATP e inibindo a função da cinase [123, 124]. Todavia, esta biomolécula apresenta uma selectividade limitada [124] e uma estrutura tridimensional com uma conformação e orientação espacial específica que são difíceis de sintetizar [123].

Eric Meggers explorou a facilidade de sintetizar compostos organometálicos de ruténio com uma conformação específica para mimetizar a staurosporina [123, 126]. Deste modo, a substituição do açúcar presente na estrutura da staurosporina pelo ruténio coordenado com substituintes resultou numa família de produtos com uma elevada afinidade para as enzimas cinases (figura 36). Para além disso,

ao contrário da staurosporina, através da variação do tamanho e da forma do complexo metálico, uma especificidade acrescida para determinadas cinases poderá ser observada [99, 124, 127, 128].

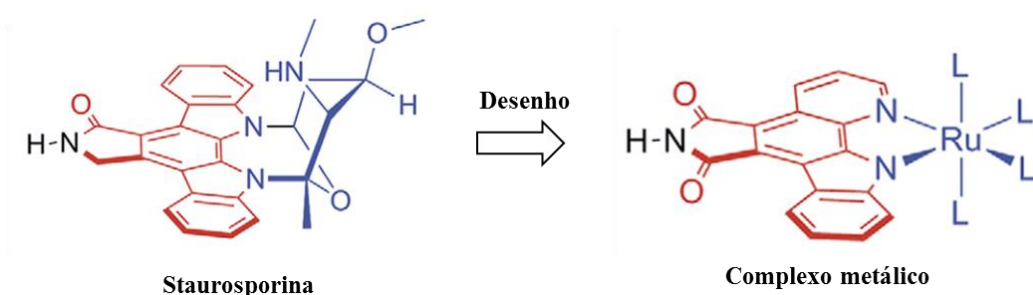


Figura 36 - Estrutura química da staurosporina e dos compostos de rutênio baseados nesta molécula (adaptado da referência [46]).

Os complexos de rutênio com ligandos ciclopentadienilo têm demonstrado resultados promissores como inibidores das enzimas cinases [126, 129-131], como é o caso do composto (*R,S*)-DW12. Na figura 37 encontra-se ilustrado a ligação do enantiômero (*R*)-DW12 no local de ligação do ATP na cinase PAK-1 [125, 126, 132].

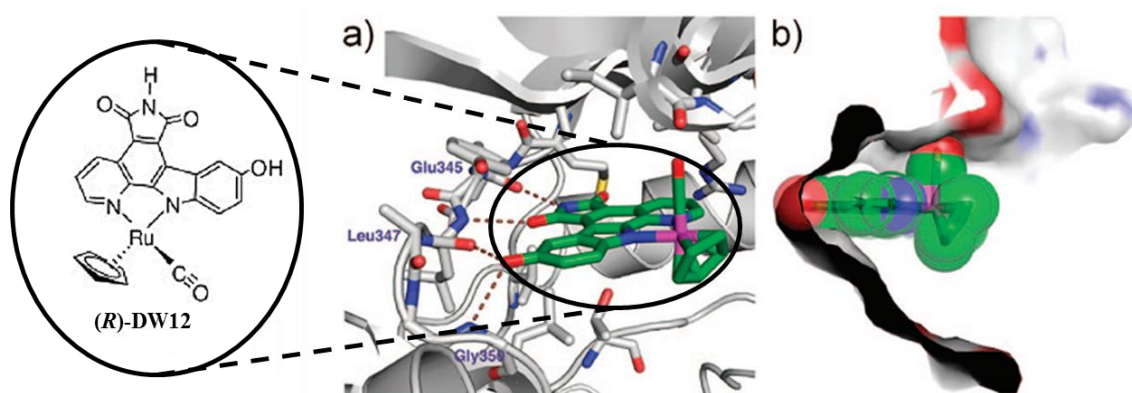


Figura 37 - Estruturas de raios-X da co-cristalização do composto (*R*)-DW12 com a cinase PAK-1 (a); e correspondência da estrutura molecular entre o sítio ativo da proteína cinase PAK-1 e a esfera de coordenação do complexo (*R*)-DW12 (b) (adaptado da referência [125]).

O composto (*S,R*)-DW12 tem-se revelado um potencial agente anticancerígeno uma vez que demonstrou exibir actividade contra as linhas celulares de melanoma na ordem de grandeza do nanomolar [114]. Além disso, este composto é um inibidor eficaz da cinase Pim-1, a qual se encontra sobreexpressa nas células cancerígenas humanas da próstata [123, 124]. Estudos indicaram que o

composto (*S,R*)-DW12 não interage com o ADN e o seu efeito citotóxico deve-se à sua capacidade de inibir as enzimas cinases [133];

De referir que a derivatização do ligando ciclopentadienilo do complexo de ruténio também tem sido explorada com o intuito de aumentar a sua eficiência de inibição e selectividade para com as enzimas cinases [131, 134]. Esta estratégia conduziu, por exemplo, a obtenção dos compostos (*S*_{Ru})-**1** e (*R*_{Ru})-**2** (figura 38), os quais demonstraram não só uma efeito inibitório acrescido bem como uma maior selectividade para com as cinases Pim-1 e GSK-3, respectivamente [134].

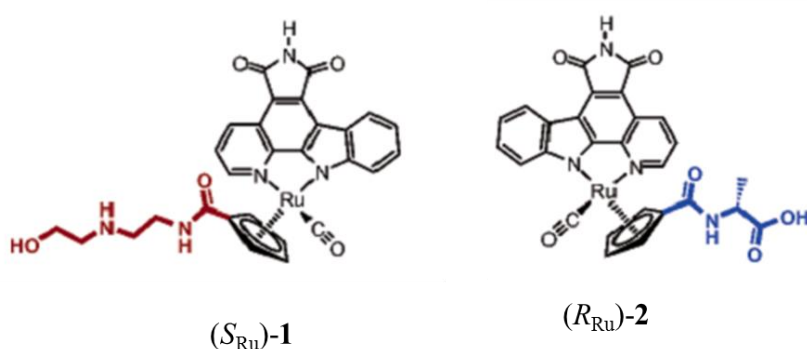


Figura 38 - Estrutura dos complexos organometálicos (*S*_{Ru})-**1** e (*R*_{Ru})-**2** [134].

✓ Complexos de ruténio com fórmula geral $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{P-P})\text{L}]^+$

Recentemente, o grupo de Química Organometálica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (CCMM/FCUL) desenvolveu complexos de monociclopentadienilo de ruténio com propriedades anticancerígenas muito interessantes [71, 121, 128, 135-140]. Um exemplo é a classe de compostos com fórmula geral $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{P-P})\text{L}]^+$, onde P-P= 1,2-bis(difenilfosfino)etano (dppe) ou trifenilfosfina (PPh₃) e L= ligando monodentado ou bidentado. Segundo a natureza do ligando L, os complexos pertencentes à família $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{P-P})\text{L}]^+$ podem ser agrupados em:

a) complexos com ligandos baseados em heterociclos monodentados (doador de um átomo de azoto) ou bidentado (doador de dois átomos de azoto) ou com ligandos ciano (doador de um átomo de azoto)

No geral, estes complexos (figura 39) demonstraram actividades anticancerígenas de relevo contra diversas linhas celulares tumorais com um efeito na ordem de grandeza do nanomolar e com valores de IC₅₀ (concentração requerida para inibir 50% do crescimento celular) inferiores ao da cisplatina [128, 135, 137, 138, 141].

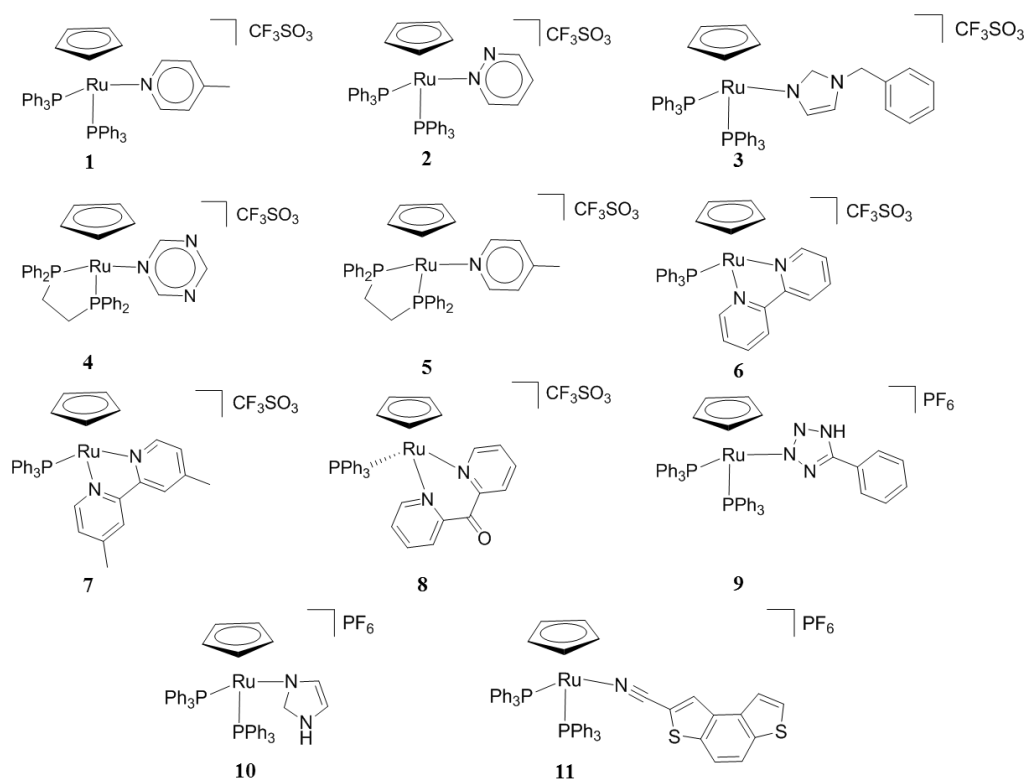


Figura 39 - Estrutura de alguns complexos com fórmula geral $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PP})\text{L}]$, onde $\text{PP} = 2 \text{ PPh}_3$ ou dppe (adaptado das referências [128, 135-138]).

De entre os complexos mais potentes, destaca-se os que possuem o ligando bipyridil (bipy) como o $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(2,2'\text{-bipy})(\text{PPh}_3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]$, conhecido também por TM34 (figura 39, estrutura **6**) [71, 121]. Este complexo apresenta um vasto espectro de actividade contra as células cancerígenas, ultrapassando consideravelmente a eficiência da cisplatina. Algumas das propriedades físico-químicas observadas para este complexo foram:

i. capacidade de estabelecer ligação com a albumina, indicando que poderá ser transportado na corrente sanguínea por esta proteína. Além disso, esta interacção não parece afectar a actividade citotóxica do composto [121];

ii. estável em meio aquoso e apresenta uma toxicidade reduzida para com as linhas celulares não cancerígenas [121];

iii. forte inibidor da poli(ADP-ribose)polimerase 1 (PARP-1), a qual se encontra envolvida nos mecanismos de reparação do ADN e nas vias da apoptose [121];

iv. ensaios realizados nas linhas celulares humanas provenientes de adenocarcinoma do ovário (A2780) e da glândula mamária (MDA-MB-231, independente de estrogénio) revelaram que o composto apresenta [71]:

- rápido efeito anti-proliferativo (mesmo em tempos de incubação curtos);

- localização preferencial na membrana celular e no citosol, sendo que apenas uma pequena percentagem de composto foi observado no núcleo;
- actividade celular por um processo dependente de temperatura, provavelmente o complexo entra na célula por um mecanismo dependente de energia (*e.g.* endocitose, macropinocitose);
- capacidade de inibir a enzima fosfatase ácida dos lisossomas.

Estes resultados foram essenciais para elucidar os mecanismos de acção dos complexos baseados no fragmento $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}]$ [71].

Recentemente, com o intuito de aumentar a selectividade do complexo TM34 para as células cancerígenas foi reportado, pelo mesmo grupo de investigação, a preparação do composto $[\text{CpRu}(\text{PPh}_3)(\text{bpyPLA})]^+$, onde *bpyPLA* = 2,2'-bipyridine-4,4'-*D*-glucose end-capped polylactide (RuPMC, figura 40) [139].

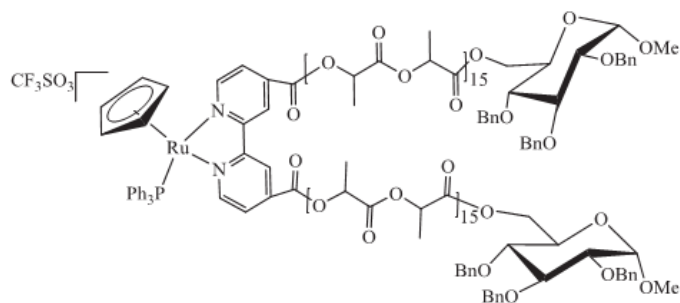


Figura 40 - Estrutura do complexo organometálico de ruténio RuPMC [139].

O composto RuPMC apresentou actividade contra duas linhas celulares de adenocarcinoma humano da mama, nomeadamente a MDA-MB-231 e a MCF-7, e a linha celular A2780. Apesar do complexo de ruténio ter apresentado uma maior citotoxicidade na linha celular MCF-7 comparativamente à cisplatina, o composto revelou uma menor toxicidade relativamente ao complexo de ruténio TM34 para todas as linhas celulares testadas. No entanto, o tempo de permanência superior do complexo RuPMC no local do tumor poderá melhorar consideravelmente a sua eficácia terapêutica reduzindo a dose necessária para o tratamento. Além disso, o composto RuPMC apresentou uma maior actividade anti-proliferativa relativamente a alguns polímeros de cisplatina e ruténio reportados [139].

b) Complexos coordenados com ligandos *N,O*-heterocíclicos

Os complexos catiónicos de ruténio (II) com ligandos *N,O*-heteroaromáticos bidentados (figura 41) apresentam uma boa estabilidade ao ar e à humidade. Recentemente, um estudo demonstrou que estes complexos organometálicos possuem uma excelente actividade anti-proliferativa em diversas

linhas celulares cancerígenas humanas com valores de IC₅₀ significativamente inferiores ao da cisplatina [128].

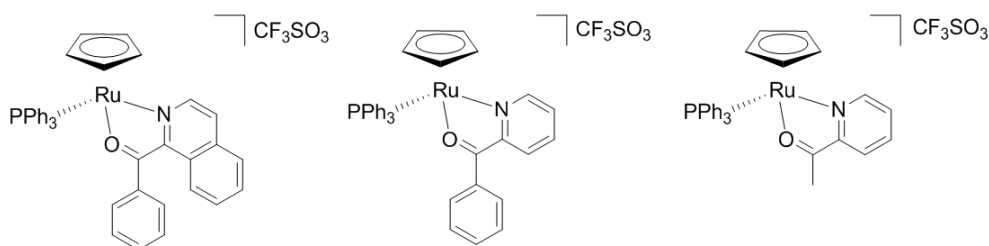


Figura 41 - Estrutura de alguns complexos de monociclopentadienilo de rutênio (II) com ligandos *N,O*-heterocíclicos (adaptado da referência [128]).

1.2.2.4. Complexos polinucleares de rutênio(II)-areno

De modo a melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas dos complexos metálicos como agentes anticancerígenos, têm sido adoptadas diversas estratégias. Uma delas baseia-se na preparação de compostos polinucleares, ou seja, complexos que possuem mais do que um metal na sua constituição [114, 142]. A incorporação de metais afecta a carga geral, propriedades redox, cinética de hidrólise e a reactividade específica do composto final [142].

Os primeiros complexos polinucleares com actividade anticancerígena a serem desenvolvidos basearam-se no metal platina, posteriormente o conceito da multinuclearidade também foi aplicado para outros metais, incluindo o rutênio [109].

Os complexos polinucleares de rutênio(II)-areno têm surgido como possíveis candidatos a fármacos anticancerígenos e apresentam, em geral, actividade biológica superior aos análogos mononucleares [109]. Deste modo, derivados dinucleares, trinucleares, tetranucleares, hexanucleares e octanucleares (figura 42) encontram-se reportados na literatura com diferentes perfis de actividade e selectividade em diversas células cancerígenas [109, 114].

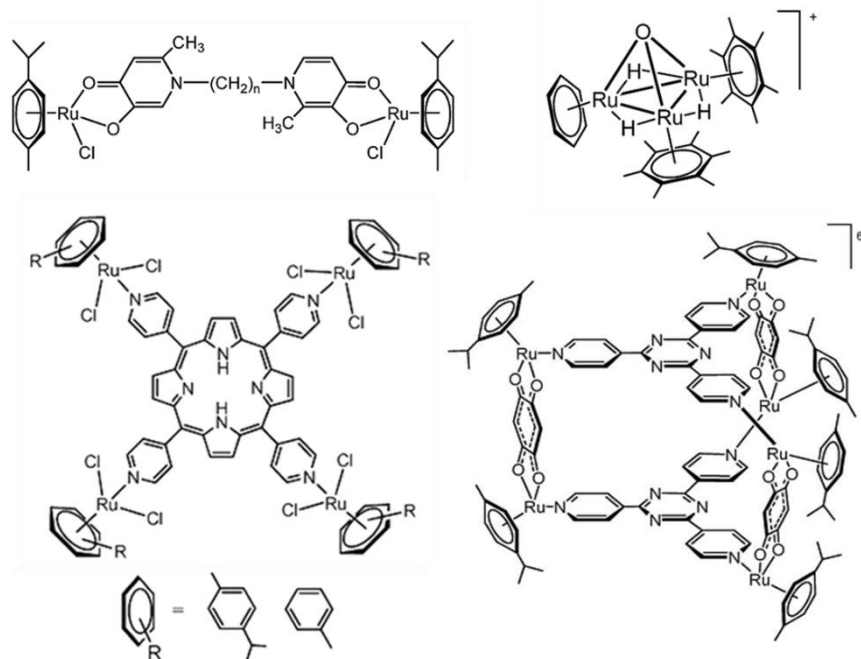


Figura 42 - Exemplos de complexos polinucleares de rutênio(II)-areno [109].

1.3. Metalodendrimeros como agentes anticancerígenos

O interesse crescente no desenho dos fármacos com metais na sua composição é acompanhado por certas limitações tais como a baixa solubilidade em água, toxicidade sistêmica e entrega não específica nos tumores devido à reduzida selectividade [44].

Apesar dos grandes avanços no desenho de pró-fármacos e ligandos, alguns inconvenientes subsistem [44]. De modo a fazer face a estas limitações, novos sistemas de entrega de fármacos têm vindo a ser desenvolvidos e implementados [44]. Idealmente, os sistemas de entrega não são tóxicos e apresentam características (*e.g.* propriedades de solubilização) que asseguram o transporte do fármaco ao local desejado. Esta estratégia previne uma antecipada eliminação e degradação *in vivo* do fármaco, que poderá ser desencadeada por interações não específicas à medida que este circula no organismo. Até à data, os transportadores à escala nano (nanotransportadores, 10^{-9} m) parecem ser os sistemas mais avançados capazes de preencher estes requisitos [44].

Ao longo das últimas décadas, com o grande progresso da nanotecnologia, têm sido desenvolvidos diversos tipos de nanotransportadores, como é o caso dos lipossomas e dos dendrimeros [44, 143].

1.3.1. Dendrímeros como sistemas de entrega de fármacos

Os dendrímeros (do grego “*dendron*” que significa “árvore ou ramo” e “*meros*” de “parte de”) são macromoléculas poliméricas sintéticas que apresentam uma estrutura hiperamificada, globular e bem definida com dimensões à escala nanométrica (10^{-9} m) [144-146].

O primeiro composto semelhante a um dendrímero foi sintetizado em 1978 por Vöglet *et al.* [147] tendo ficado conhecido como “moléculas em cascata” [145, 148]. No entanto, dificuldades nos procedimentos experimentais resultaram apenas em compostos de baixa geração. Apenas nos anos 80 [148], dendrímeros de geração superior com estruturas bem definidas foram preparados por Newkome *et al.* [149] e Tomalia *et al.* [150].

A estrutura dendrítica baseia-se em três componentes básicos (figura 43) [151], nomeadamente um núcleo central multifuncional [151, 152], as camadas interiores (denominadas de “gerações”) constituídas por unidades repetidas que emanam do núcleo central [151, 152] e os grupos periféricos funcionais [148, 153]. Estes blocos de construção do dendrímero encontram-se ligados e interligados afectando a sua estrutura (*e.g.* tamanho, forma, flexibilidade e funcionalidade da periferia) pelo que podem ser optimizados para serem aplicados em diferentes campos, tais como na medicina, na electrónica e na biologia [151, 152, 154, 155].

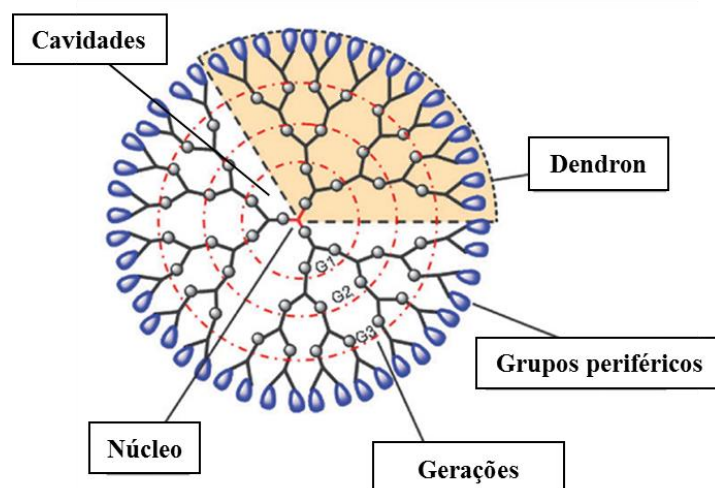


Figura 43 - Estrutura geral dos dendrímeros (adaptado da referência [144]).

Apesar da existência de uma grande diversidade de dendrímeros, os mais comumente referenciados para possíveis aplicações biomédicas são os: poli(amidoamina) (PAMAM), ácido poli(2,2-bis(hidroximetil)propanóico (bis-MPA), poli(propilenoimina) (PPI), poliéster (PGLSA-OH) e poli(*L*-lisina) (PLL) (figura 44) [148, 156].

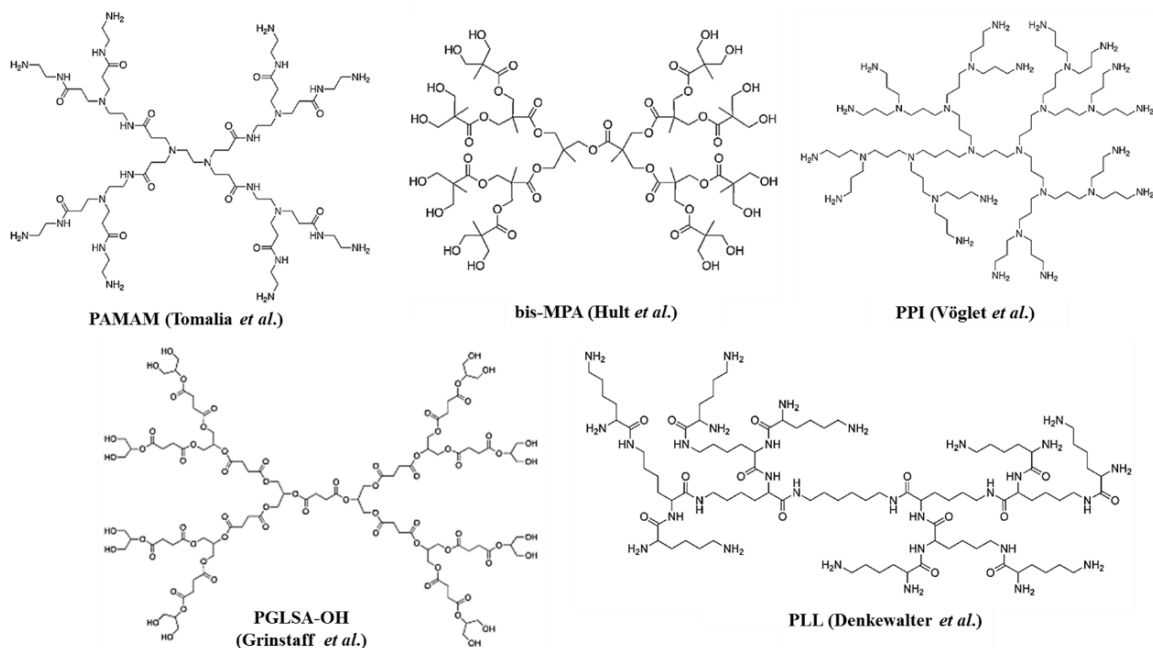
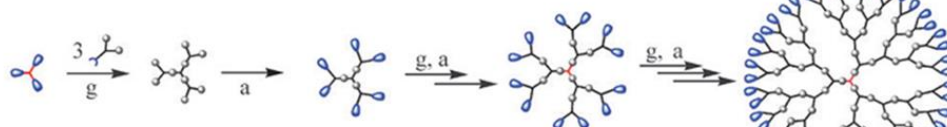


Figura 44 - Estruturas químicas de alguns dos dendrímeros mais comumente utilizados na medicina (adaptado da referência [148]).

A construção dos dendrímeros pode ser efectuada através de duas estratégias principais (figura 45), nomeadamente o método convergente (processa-se da periferia para o centro) e o método divergente (inicia-se do centro para a periferia) [36, 148, 153].

Estratégia divergente



- g. Crescimento dendrítico
- a. Activação dos grupos terminais
- a.* Activação do núcleo

Estratégia convergente

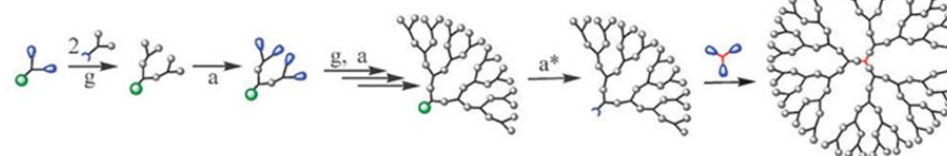


Figura 45 - Representação esquemática das metodologias mais utilizadas para a preparação dos dendrímeros, nomeadamente a divergente e a convergente (adaptado da referência [144]).

1.3.1.1. Propriedades dos dendrímeros como sistemas de entrega

Os dendrímeros têm demonstrado ser excelentes transportadores de fármacos devido às suas propriedades peculiares [146], a saber:

i. capacidade de transportar quantidades superiores de fármaco através do seu encapsulamento nas cavidades internas ou através da conjugação covalente dos agentes terapêuticos à sua superfície [143, 156, 157];

ii. possibilidade de prepará-los com número pré-definido de monómeros, ramos poliméricos e grupos funcionais [143, 154];

iii. possuem um grande número de grupos funcionais à superfície que aumentam exponencialmente em cada geração. Esta propriedade fornece uma superfície multifuncional, o que permite não só a rápida fixação de múltiplos agentes anticancerígenos como também aumenta as interações entre o conjugado dendrímero-fármaco e os múltiplos receptores do alvo terapêutico, melhorando a sua selectividade [36, 158-160];

iv. possuem uma baixa polidispersidade, ou seja, todos os dendrímeros apresentam uma massa molecular dentro de um intervalo estreito, o que torna o seu comportamento extremamente reprodutível [36];

v. capacidade de aumentar a solubilidade dos fármacos em meio aquoso [145], através do seu encapsulamento, contribuindo para uma maior eficiência do seu transporte e para a prevenção de interações não específicas, reduzindo os efeitos secundários negativos do fármaco [143, 146].

A entrega dos fármacos mediada pelos dendrímeros pode ser efectuada de forma passiva ou activa. A estratégia passiva explora a acumulação preferencial dos dendrímeros nas células cancerígenas comparativamente às células saudáveis, o qual é promovido pelo efeito de “permeabilidade e retenção aumentada” (*EPR* sigla inglesa, *Enhanced Permeability and Retention*) [139, 158, 161]. Este fenómeno baseia-se no padrão patofisiológico da maioria dos tumores sólidos, os quais apresentam uma neovasculatura anormal com vasos finos permeáveis (constituído por poros com diâmetros compreendidos entre 100 a 1200 nm). Esta característica resulta de uma angiogénese intensiva nestas células, bem como na presença de um sistema de drenagem linfática ineficiente [36, 145, 162, 163]. Por conseguinte, nestes locais, poderá ocorrer um aumento na permeabilidade vascular, resultando na difusão passiva de moléculas de grandes dimensões (> 40 kDa) e favorecendo a sua retenção por períodos de tempo superiores [158, 164]. Nos tecidos saudáveis, a camada endotelial dos vasos sanguíneos possui poros com diâmetros tipicamente inferiores a 2 nm, os quais restringem a difusão das moléculas de maiores dimensões presentes no sistema circulatório [158, 161, 164]. Deste modo, a concentração do fármaco no tumor pode ser 10 a 100 vezes superior à

quantidade presente no sangue, aumentando assim a disponibilidade do medicamento no local necessário e reduzindo os seus efeitos secundários [139, 159].

Contudo, esta estratégia tem limitações significativas uma vez que o efeito *EPR* poderá não ser homogêneo em todos os casos [117, 163]. O microambiente do tecido cancerígeno (*e.g.* presença de uma matriz extensiva a circundar os tumores, elevada pressão de fluido intra tumoral [117]) poderá afectar a permeabilidade vascular de certas macromoléculas limitando deste modo a sua acumulação no local do tumor [165].

Por outro lado, a estratégia de entrega activa do conjugado dendrímero-fármaco consiste na colocação à periferia da estrutura dendrítica de ligandos com afinidade específica (*e.g.* proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas) para receptores sobreexpressos à superfície das células cancerígenas. Esta abordagem resulta na endocitose e internalização de todo o conjunto, favorecendo assim uma entrega mais direccionada do fármaco [157, 165].

Todavia, a combinação destas abordagens de entrega, passiva e activa, permite não só um aumento na eficácia terapêutica mas também uma redução dos efeitos secundários [36].

1.3.2. Metalodendrímeros

Os metalodendrímeros resultam da incorporação de metais na estrutura dos dendrímeros, a qual pode ser realizada em diferentes locais como ilustrado na figura 46 [159, 166]. Estas macromoléculas possuem propriedades que as tornam atractivas em diversas áreas como seja por exemplo na catálise, na medicina e na biologia [158].

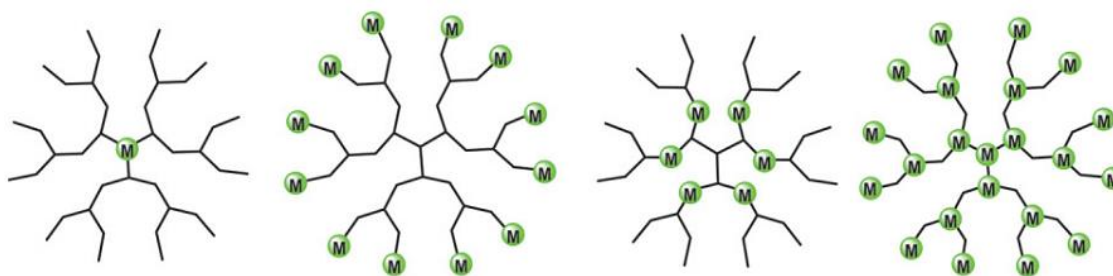


Figura 46 - Representação esquemática de metalodendrímeros com fragmentos metálicos (representado pela letra M) em diversas posições [166].

O desenvolvimento de fármacos baseados em metalodendrímeros permite usufruir das vantagens dos dendrímeros puramente orgânicos como nanotransportadores e, das propriedades anticancerígenas dos complexos com metais de transição e dos compostos organometálicos [167].

Todavia, e como a seguir se refere existem poucos exemplos de metalodendrímeros reportados na literatura para o combate dos diferentes tipos de cancro [158, 159].

Os primeiros metalodendrímeros avaliados pelas suas propriedades anticancerígenas foram os funcionalizados com complexos de platina [159, 167], como é o caso do composto tetranuclear DAB(PA-*trans*-Pt-Cl)₄. Este composto, sintetizado por Jansen *et al.* [168], consistiu no dendrímero de primeira geração [1,4-diaminobutanopoli(propilenoimina)] substituído perifericamente com fragmentos de *trans*-diaminocloroplatina [159, 167, 168] (figura 47a). O composto DAB(PA-*trans*-Pt-Cl)₄ demonstrou uma acção anti-proliferativa moderada em duas linhas celulares leucémicas do rato, nomeadamente a L1210/0 (IC₅₀ = 12,4 µM) e a L1210/2 (IC₅₀ = 9,3 µM) e em diversas linhas celulares cancerígenas humanas, nomeadamente nas linhas celulares provenientes de adenocarcinoma da mama (MCF-7 e EVSA-T), de adenocarcinoma do cólon (WIDR), de adenocarcinoma do ovário (IGROV), de melanoma (M19) e de carcinoma renal (A498) com valores de IC₅₀ > 9 µM [167, 168].

Um outro exemplo é o metalodendrímero tetranuclear (*m*-4F-PtDMSO)₄DAB(PA)₄, o qual se baseia na primeira geração do dendrímero PPI funcionalizado perifericamente com fragmentos metálicos de {1,2-bis(4-fluorofenil)etilenodiamina}platina(II) (figura 47b). Este composto demonstrou uma citotoxicidade (IC₅₀ = 5 µM) comparável com a cisplatina (IC₅₀ = 2 µM) na linha celular de adenocarcinoma humano da mama (MCF-7) [158, 167].

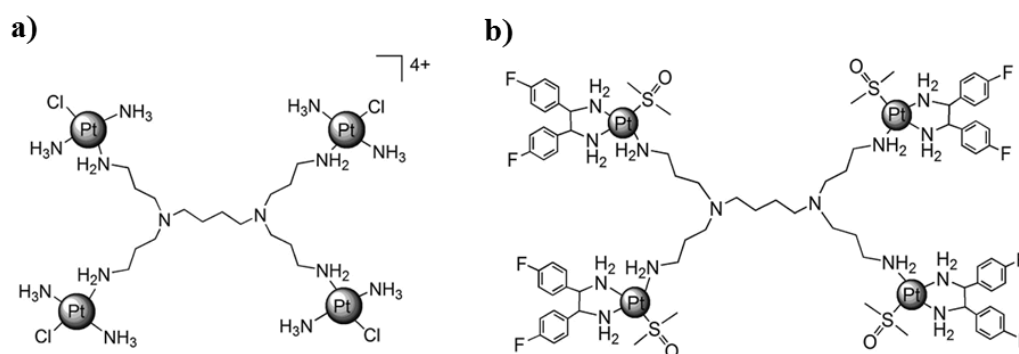


Figura 47 - Metalodendrímeros com fórmula geral a) DAB(PA-*trans*-Pt-Cl)₄ e b) (*m*-4F-PtDMSO)₄DAB(PA)₄ [167].

Zhao *et al.* prepararam dois metalodendrímeros baseados na primeira geração de dendrímeros PAMAM, nomeadamente um composto tetranuclear de platina e um composto polinuclear de cobre (figura 48) [160, 167]. O metalodendrímero de platina apresentou um IC₅₀ superior a 100 µM na linha

celular de leucemia linfoblástica aguda de células T (MOLT-4) e foi essencialmente inerte para a linha celular MCF-7. Os autores defenderam que esta eficácia mais reduzida deveu-se essencialmente à baixa solubilidade do composto. Por outro lado, o metalodendrímico de cobre apresentou um melhor perfil de citotoxicidade com valores de IC_{50} de 11,1 e 10,2 μM para as linhas celulares MOLT-4 e MCF-7, respectivamente. Este comportamento deveu-se ao aumento do número de complexos metálicos com $CuCl_2$ coordenados ao dendrímico ou ao aumento das ligações cruzadas intercadeia entre o ADN e os fragmentos de cobre [167].

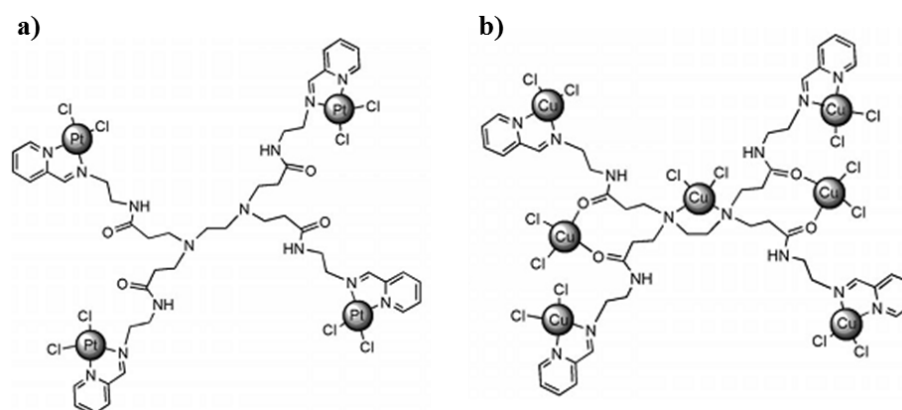


Figura 48 - Metalodendrímicos funcionalizados com fragmentos metálicos de platina (a) e com entidades metálicas de cobre (b) [167].

Metalodendrímicos de platina (II) e paládio (II) baseados em dendrímicos de primeira (G_1) e segunda (G_2) geração de poliamida com terminações aminas aromáticas, $[PAD-(NH_2)_n]$ ($n = 6$ para G_1 e 12 para G_2), foram também avaliados como possíveis agentes terapêuticos (figura 49a). Estes metalodendrímicos revelaram um efeito citotóxico moderado (complexo de PtG_1 , $IC_{50} = 30 \mu M$ e complexo de PdG_2 , $IC_{50} = 50 \mu M$) comparativamente à cisplatina ($IC_{50} = 2 \mu M$) na linha celular MCF-7 [167, 169].

Robilotto *et al.* descreveram a síntese de metalodendrímicos funcionalizados à superfície com ouro (I). O metalodendrímico com apenas dois átomos de ouro (figura 49b) demonstrou ser citotóxico contra a linha celular fibroblástica de rato (3T3) e induzir apoptose a uma concentração de 1-10 μM num período de exposição de 6 horas [167, 170].

Metalodendrímicos funcionalizados com tricarbonilciclopentadienilmetiltungsténio (figura 49c) com fórmula geral $[CpW(CO)_3CH_3]_n-DAB-Am-n$, onde $n = 4, 8, 16$ (DAB-Am-n = diaminobutano-amina) revelaram capacidade para clivar a dupla cadeia do ADN plasmídico [158, 171].

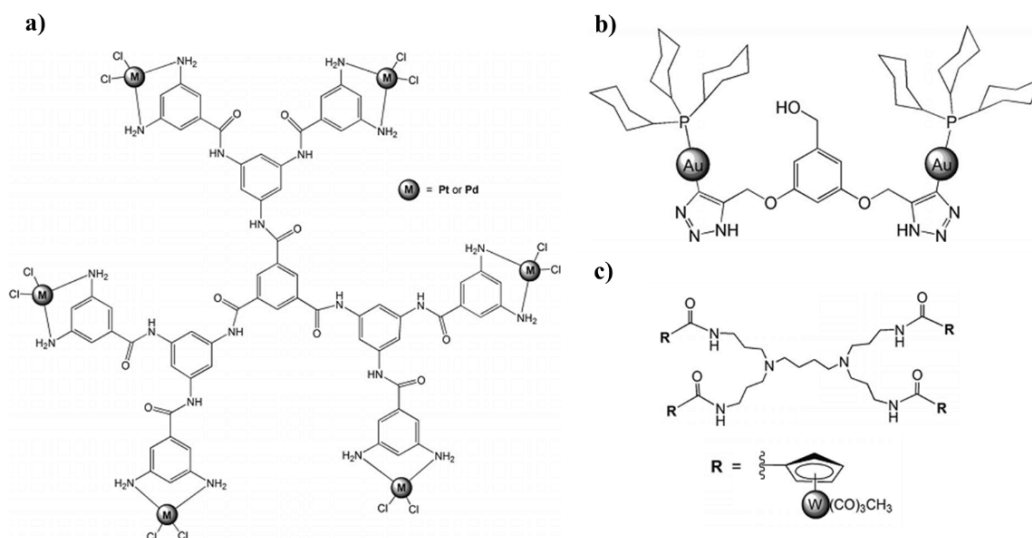


Figura 49 - Metalodendrímeros funcionalizados com fragmentos metálicos de (a) M = platina ou paládio, (b) ouro e (c) tungstênio (c) [167].

Relativamente aos metalodendrímeros de rutênio, alguns exemplos baseados na estrutura dendrítica 1,4-diaminobutanopoli(propilenoimina) (DAB(PA)₄) funcionalizada perifericamente com complexos organometálicos de rutênio(II)-areno foram publicados por Govender *et al.*, nomeadamente:

a) metalodendrímeros funcionalizados nas terminações da estrutura dendrítica com complexos de rutênio(II)-areno (areno = *p*-cimeno ou hexametilbenzeno) monodentados (figura 50) [106, 158, 167]. Estes metalodendrímeros demonstraram uma actividade anticancerígena moderada (entre 20 - 40 μM) relativamente à cisplatina (1,5 μM) contra a linha celular do cancro do ovário (A2780) [167]. Além disso foi observado uma correlação entre o tamanho do complexo e a citotoxicidade na linha celular A2780 [106, 158], sendo que os metalodendrímeros catiónicos com oito fragmentos metálicos foram os mais citotóxicos [158];

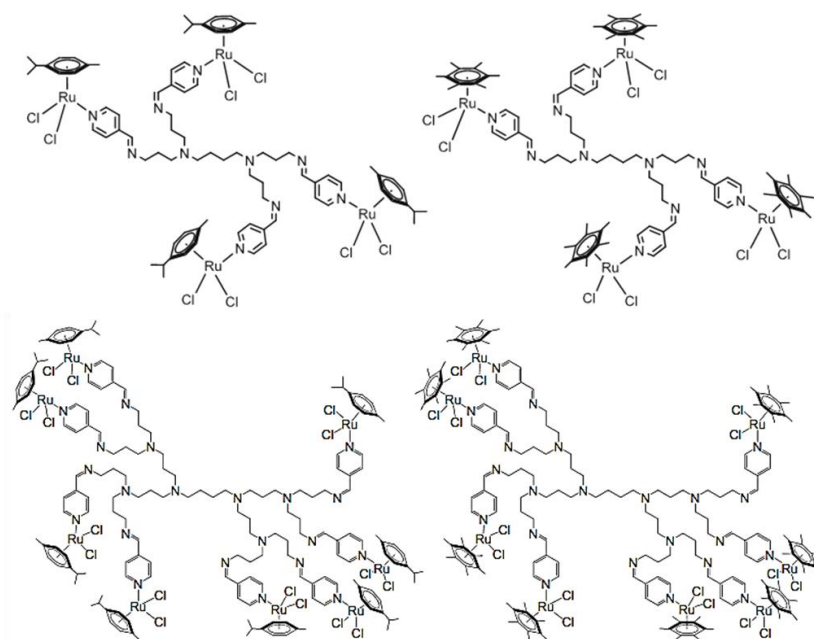


Figura 50 - Estruturas dendríticas tetra e octonuclear funcionalizadas com quatro ou oito complexos rutênio(II)-areno, respectivamente [158].

b) dendrímeros coordenados periféricamente com complexos de *N,N*- e *N,O*-rutênio(II)-areno quelantes (areno = *p*-cimeno ou hexametilbenzeno) (figura 51) foram testados nas linhas celulares do cancro do ovário A2780 e A2780cisR (resistente à cisplatina) [106]. Estes dendrímeros também apresentaram uma correlação entre o tamanho do metalodendrímero e a sua citotoxicidade [106, 167].

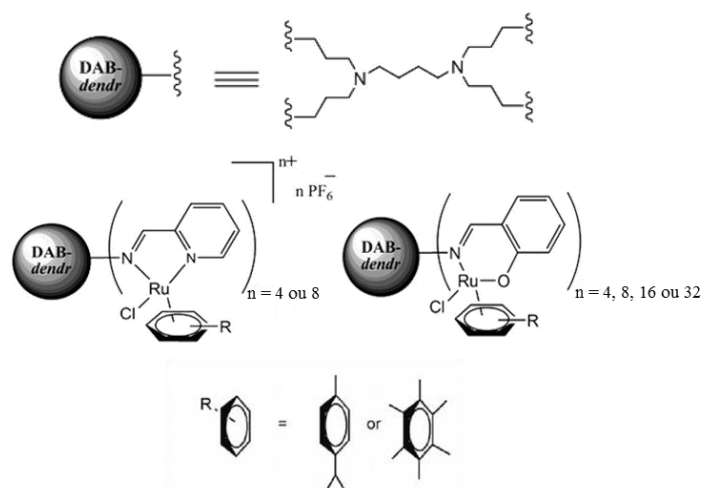


Figura 51 - Metalodendrímeros baseados na estrutura dendrítica de diaminobutanopoli(propilenoimina) funcionalizada com fragmentos *N,N*- ou *N,O*-rutênio(II)-areno (areno = *p*-cimeno ou hexametilbenzeno) [159].

Para além disso, no geral, os metalodendrimeros funcionalizados com complexos quelantes de ruténio demonstraram uma actividade anticancerígena superior à dos metalodendrimeros com complexos monodentados de ruténio [106];

c) metalodendrimeros catiónicos da primeira à quarta geração com complexos metálicos quelantes de *N,O*-ruténio(II)-areno-PTA (PTA=1,3,5-triaza-7-fosfatriciclo[3.3.1]decano), os quais encontram-se representados na figura 52. O perfil de citotoxicidade destes compostos nas células A2780 e A2780cisR demonstrou uma excelente correlação entre o tamanho do metalodendrimeros e a actividade anti-proliferativa, onde os metalodendrimeros de 4ª geração foram os mais tóxicos. O ligando PTA parece melhorar as propriedades farmacológicas dos metalodendrimeros, conduzindo a uma maior citotoxicidade [159].

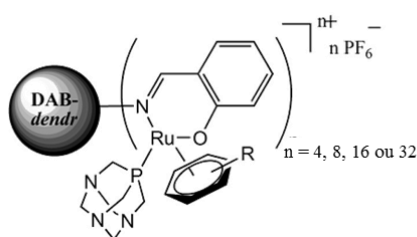


Figura 52 - Metalodendrimeros baseados no dendrimeros 1,4-diaminobutanopoli(propilenoimina) funcionalizado com fragmentos *N,O*-ruténio(II)-areno-PTA [159].

Apesar dos resultados promissores dos metalodendrimeros como agentes anticancerígenos, estudos sobre o mecanismo de acção destas nanoestruturas são necessários, pois permitirão eventualmente melhorar as suas propriedades farmacológicas [44]. Deste modo, é importante esclarecer, por exemplo, se o fragmento organometálico tem de se dissociar do dendrimeros para ser activo ou se o metalodendrimeros actua como única entidade terapêutica. Além disso, é importante prever o perfil de biodistribuição do metalodendrimeros, ou seja, as interacções que este composto estabelece com os órgãos responsáveis pela eliminação de agentes estranhos uma vez que estas poderão comprometer a eficácia do agente terapêutico [44].

1.4. Objectivos do trabalho

No presente trabalho pretendeu-se explorar o potencial anticancerígeno de metalodendrimeros catiónicos com complexos de ruténio (II) baseados em dendrimeros da primeira geração de poli(alquilideno imina) funcionalizados perifericamente com grupos nitrilo (figura 53). A presença dos

grupos nitrilo na estrutura dendrítica permite a estabilização de diferentes estados de oxidação de uma grande diversidade de metais de transição, incluindo o rutênio [172, 173].

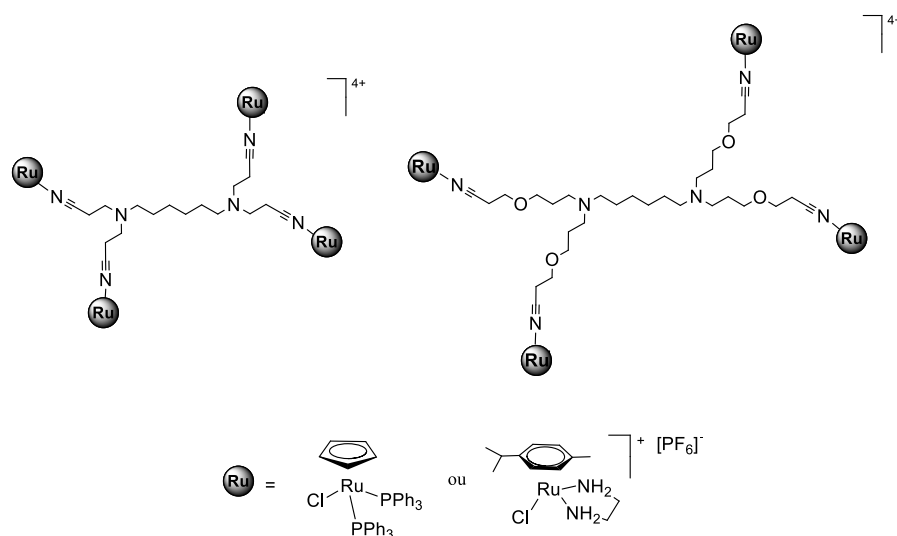


Figura 53 - Estrutura geral dos metalodendrimeros em estudo.

Este tema surge na sequência do trabalho [172-175] desenvolvido pelo grupo de Investigação em Materiais Moleculares do Centro de Química da Madeira na preparação e caracterização físico-química deste tipo de metalodendrimeros associado com as seguintes características atractivas no campo medicina:

- i. devido à sua carga positiva, possuem a capacidade de interagir facilmente com a superfície da membrana celular, onde são captados por endocitose e alcançam o citoplasma e o núcleo num período de tempo reduzido [176];
- ii. apresentam diversas vantagens relativamente aos dendrimeros de geração superiores tais como: a) requerem a utilização de técnicas de síntese e purificação menos exigentes com baixos custos de produção; b) apresentam um baixo nível de defeitos estruturais, mantendo o elevado grau de funcionalidade; c) possuem um tempo de circulação na corrente sanguínea reduzido e d) são facilmente eliminados por excreção renal [172];

De modo a alcançar a meta proposta traçaram-se os seguintes objectivos específicos:

- i. preparar e caracterizar as estruturas dendríticas de poli(alquilideno imina) com grupos nitrilos periféricos;
- ii. sintetizar e caracterizar os complexos organometálicos de ruténio (II);
- iii. funcionalizar os dendrimeros com os compostos de ruténio (II) e proceder à sua caracterização;
- iv. avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos metalodendrimeros em diversas linhas celulares cancerígenas através do teste do brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).

Capítulo 2 – Resultados e discussão

Capítulo 2 – Resultados e discussão

O primeiro ponto do presente capítulo debruça-se sobre a preparação e caracterização dos complexos organometálicos de ruténio (II), das estruturas dendríticas e dos metalodendrimeros. O comportamento do complexo organometálico $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ e da trifenilfosfina em $\text{DMSO-}d_6$ e numa mistura de água deuterada (D_2O) e $\text{DMSO-}d_6$ é abordada no ponto 2.2.

Por fim, o ponto 2.3 foca-se no efeito da exposição *in vitro* dos metalodendrimeros $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{3})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ e $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{6})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ em diversas linhas celulares.

2.1. Preparação e caracterização dos compostos

Na caracterização dos compostos foram utilizadas as seguintes técnicas: espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), espectrometria de massa de tempo de voo (TOF-MS) e a análise elementar (AE).

2.1.1. Preparação dos complexos organometálicos

Os complexos de ruténio (II) que se pretenderam sintetizar foram o $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ e o $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{dppe})\text{Cl}][\text{PF}_6]$. No entanto, apenas o primeiro composto foi preparado com sucesso e em quantidade suficiente para ser utilizado na funcionalização dos dendrimeros de poli(alquilideno imina). Nos pontos seguintes são discutidos as metodologias adoptadas para a obtenção dos complexos organometálicos.

2.1.1.1. Preparação do $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (1)

A preparação do complexo $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (1) baseou-se nos procedimentos descritos por Morris *et al.* [177] e Smith *et al.* [178], os quais consistem na reacção do dímero $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{RuCl}_2]_2$ com o ligando etilenodiamina e o abstractor de cloreto hexafluorofosfato de sódio (NaPF_6) em metanol (figura 54).

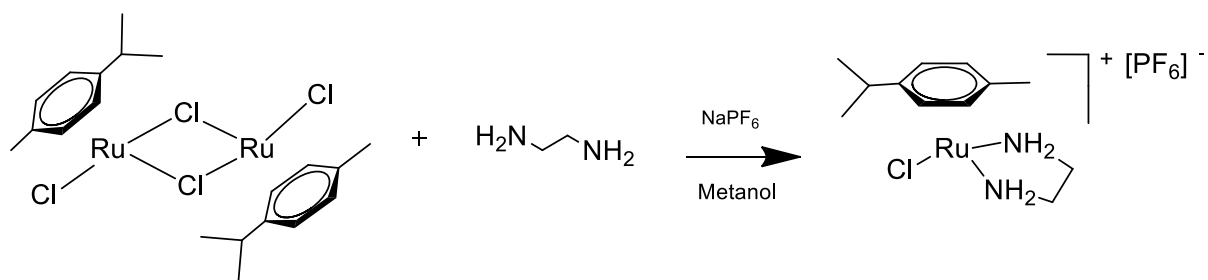


Figura 54 - Esquema geral da preparação do complexo $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (**1**).

Esta reacção baseia-se no facto dos dímeros $[(\eta^6\text{-areno})\text{RuCl}_2]_2$ reagirem rapidamente com outros ligandos originando produtos mononucleares que retêm o ligando areno e incorporam o novo ligando na sua estrutura. A variação não só do ligando areno presente no dímero de Ru(II) bem como da natureza do ligando que irá ser introduzido permite a obtenção de diversos complexos mono arenos de Ru(II) [62, 178]. Esta reacção também é promovida pela polaridade do metanol que facilita a dissociação do ligando cloro [179]. A formação do complexo pretendido foi confirmada pelo espectro de $^1\text{H-RMN}$, o qual se encontra de acordo com o reportado na literatura [177, 178].

Deste modo, no espectro de $^1\text{H-RMN}$ do complexo $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (figura 55) observa-se a presença de dois dupletos localizados por volta dos 5,5 ppm, os quais confirmam a coordenação do anel aromático na estrutura do complexo uma vez que estes prótons surgem a 7,0 ppm no ligando livre. Esta diferença no desvio químico entre o ligando coordenado e o livre deve-se à redução do efeito de desblindagem no anel aromático promovida pelo aumento da sua densidade electrónica devido as interacções do tipo π que estabelece com o ruténio (II) [178, 180].

No caso da etilenodiamina, o padrão de divisão dos prótons dos grupos metilo ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$) é indicativo da sua coordenação ao centro metálico. Deste modo, os dois multipletos que surgem por volta dos 2,3 ppm referem-se aos prótons dos grupos metilo da etilenodiamina coordenada uma vez que estes quatro prótons ocorrem na forma de um único singuleto no ligando livre. A etilenodiamina coordena-se ao ruténio sob a forma de quelato e sob o efeito de um ambiente assimétrico, pelo que a rotação da ligação C-C é impedida conduzindo a dois prótons com orientações diferentes no complexo [178].

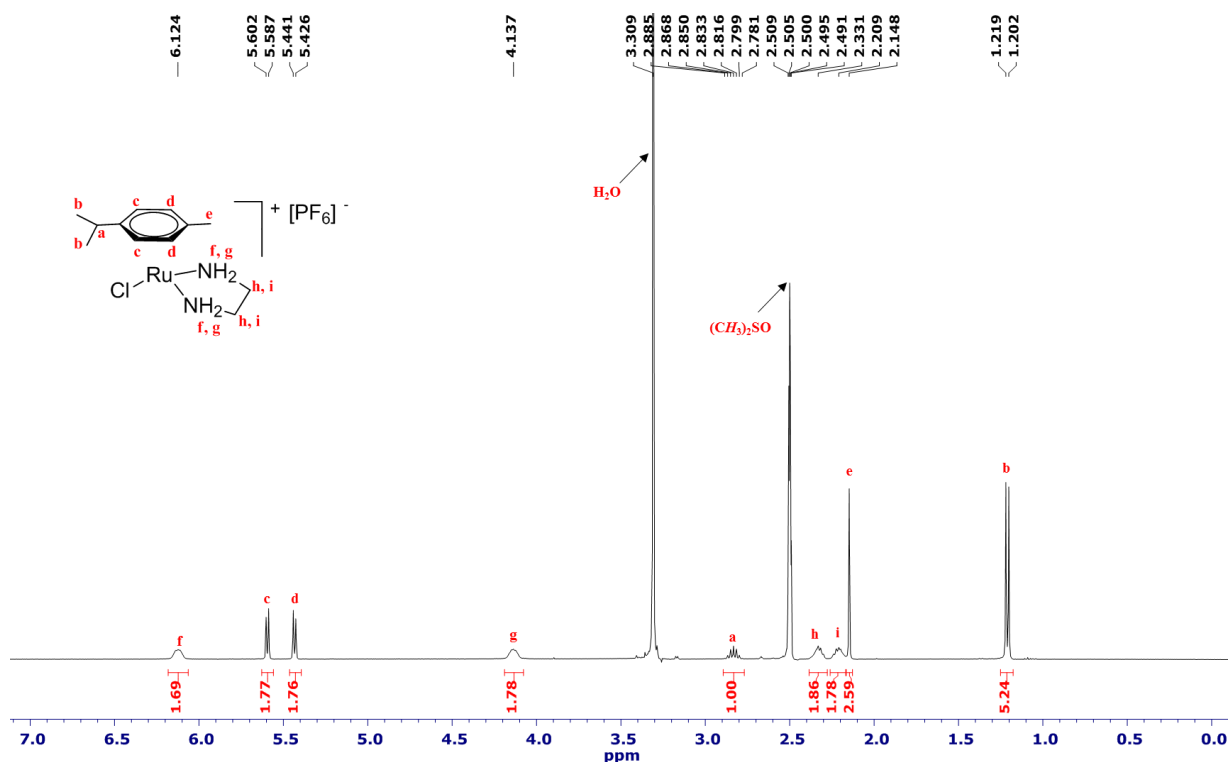


Figura 55 - Espectro de ^1H -RMN do complexo $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (**1**) em $\text{DMSO-}d_6$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$).

2.1.1.2. Preparação do $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{dppe})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (**2**)

Para obter o complexo **2** seguiu-se as duas estratégias que se encontram esquematizadas na figura 56.

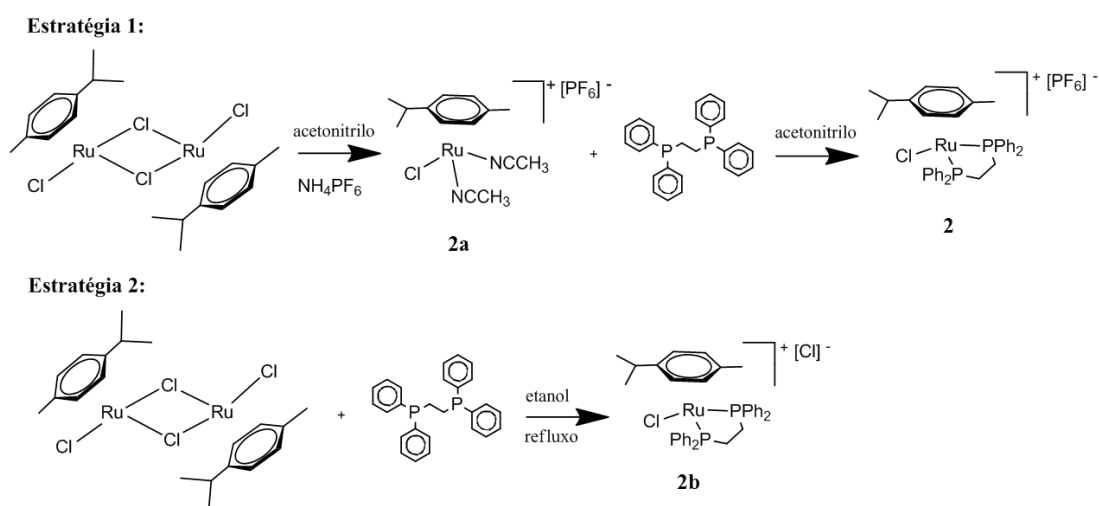


Figura 56 - Esquematização das estratégias adoptadas para preparar o complexo $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{dppe})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (**2**) ou o $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{dppe})\text{Cl}][\text{Cl}]$ (**2b**).

a) Estratégia 1

Esta estratégia visou a preparação do composto $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{dppe})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ segundo a metodologia reportada por Jensen *et al.* [181], a qual consiste na obtenção do intermediário $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{NCCH}_3)_2\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (**2a**) através da substituição dos ligandos de cloro presentes na ponte do dímero $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{RuCl}_2]_2$ pelo acetonitrilo. Posteriormente, procede-se à substituição dos ligandos acetonitrilo do intermediário pelo composto 1,2-bis(difenilfosfino)etano (dppe) obtendo-se o complexo pretendido.

No entanto, apenas foi possível ensaiar o primeiro passo reaccional uma vez que, segundo o espectro de ^1H -RMN (figura 57), obteve-se uma mistura com o material de partida $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{RuCl}_2]_2$ (presente em grande quantidade) e um outro composto. Pensa-se que este último seja o $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{NCCH}_3)_2\text{Cl}][\text{PF}_6]$ uma vez que, segundo o espectro de FT-IR (figura I.I - anexo I), visualiza-se a presença de duas bandas a 2325 e 2304 cm^{-1} que poderão corresponder à vibração do nitrilo (CN) [181]. Além disso, a banda presente aos 836 cm^{-1} poderá advir da vibração do $[\text{PF}_6]^-$ como contra-íão.

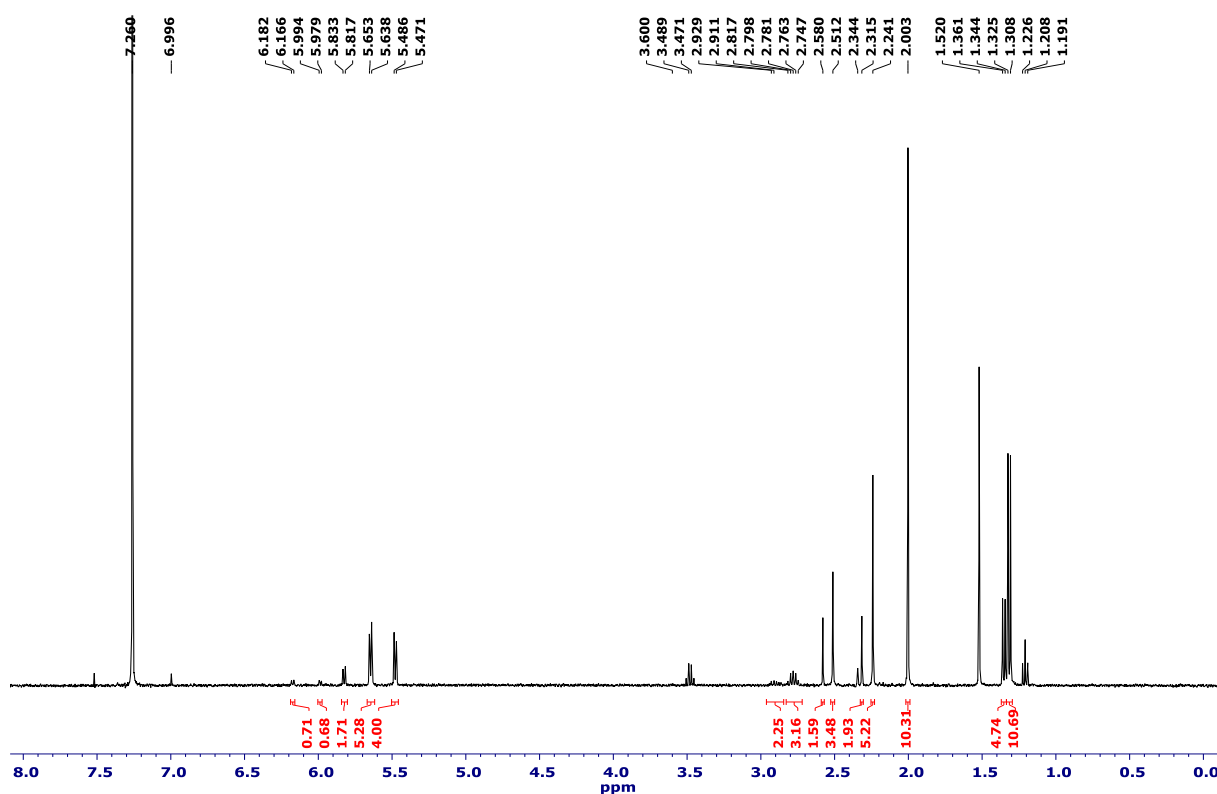


Figura 57 - Espectro de ^1H -RMN da mistura obtida na preparação do complexo $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{NCCH}_3)_2\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (**2a**) em CDCl_3 .

De modo a isolar o novo composto, ensaiou-se uma precipitação em diclorometano e éter. No entanto, o espectro de ^1H -RMN (figura 58) do produto precipitado indicou a presença do material de partida em excesso pelo que poderá ter ocorrido a reversão da reacção promovida pelo diclorometano, o qual constitui uma boa fonte de cloro. Por conseguinte, sugere-se a repetição da reacção com um abstractor de cloreto mais forte.

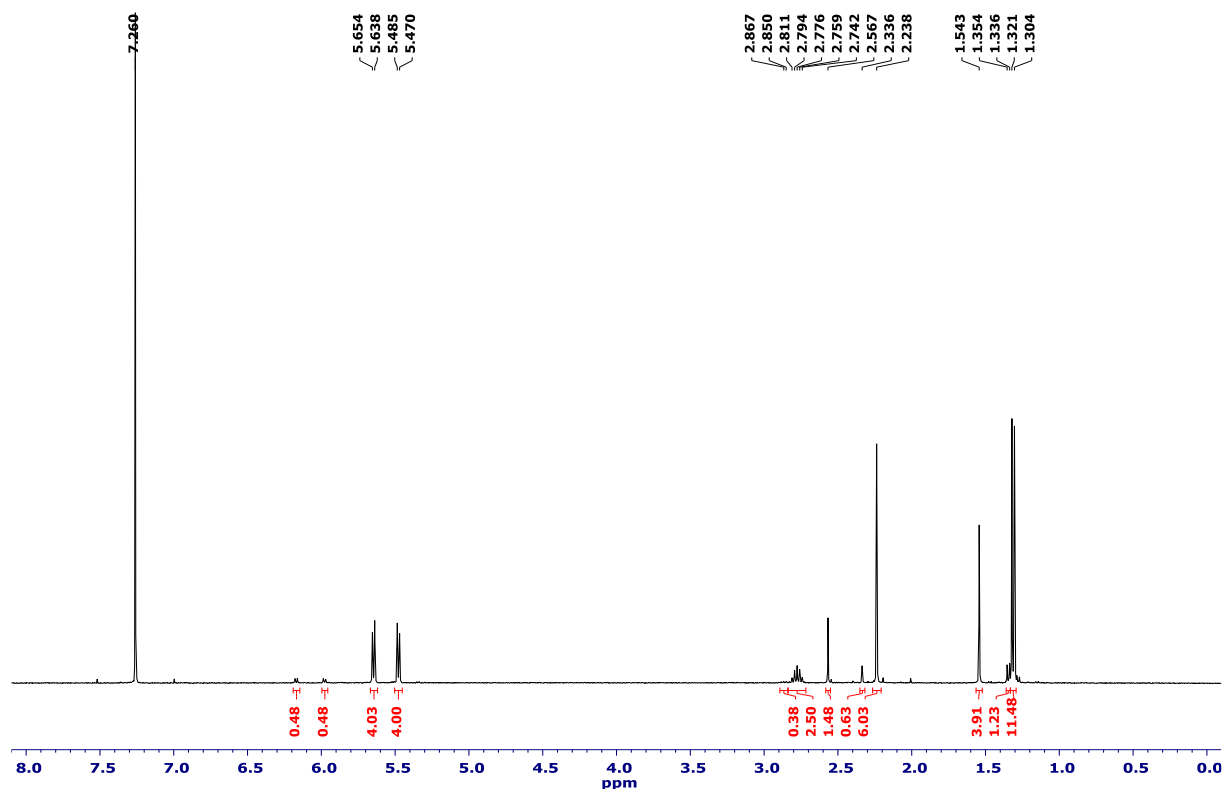


Figura 58 - Espectro de ^1H -RMN do produto resultante da precipitação com o sistema de solventes diclorometano/éter, em CDCl_3 .

b) Estratégia 2

Face aos resultados obtidos na estratégia anterior optou-se por ensaiar a síntese do complexo $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{dppe})\text{Cl}][\text{Cl}]^-$. Para o efeito, utilizou-se o procedimento descrito por Dagueneit e Dyson [182], o qual envolve a clivagem da ponte de hidrogénio do composto $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{RuCl}_2]_2$ directamente com a bis(difenilfosfino)etano (dppe) em etanol e sob refluxo (estratégia 2, figura 56).

No espectro de ^1H -RMN do composto $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{dppe})\text{Cl}][\text{Cl}]^-$ (**2b**, figura 59), evidencia-se a presença de três multipletos entre os 7,7 e 7,3 ppm correspondentes aos prótons dos anéis da dppe coordenada. No caso dos prótons metilénicos da dppe, estes surgem como dois sinais largos situados a 2,96 e 2,49 ppm.

É de notar que após a coordenação da dppe ao centro metálico de rutênio, os sinais dos prótons no anel *p*-cimeno surgem como dois conjuntos de dupletos a 6,23 e a 6,08 ppm, encontrando-se desblindados comparativamente com os do $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{RuCl}_2]_2$.

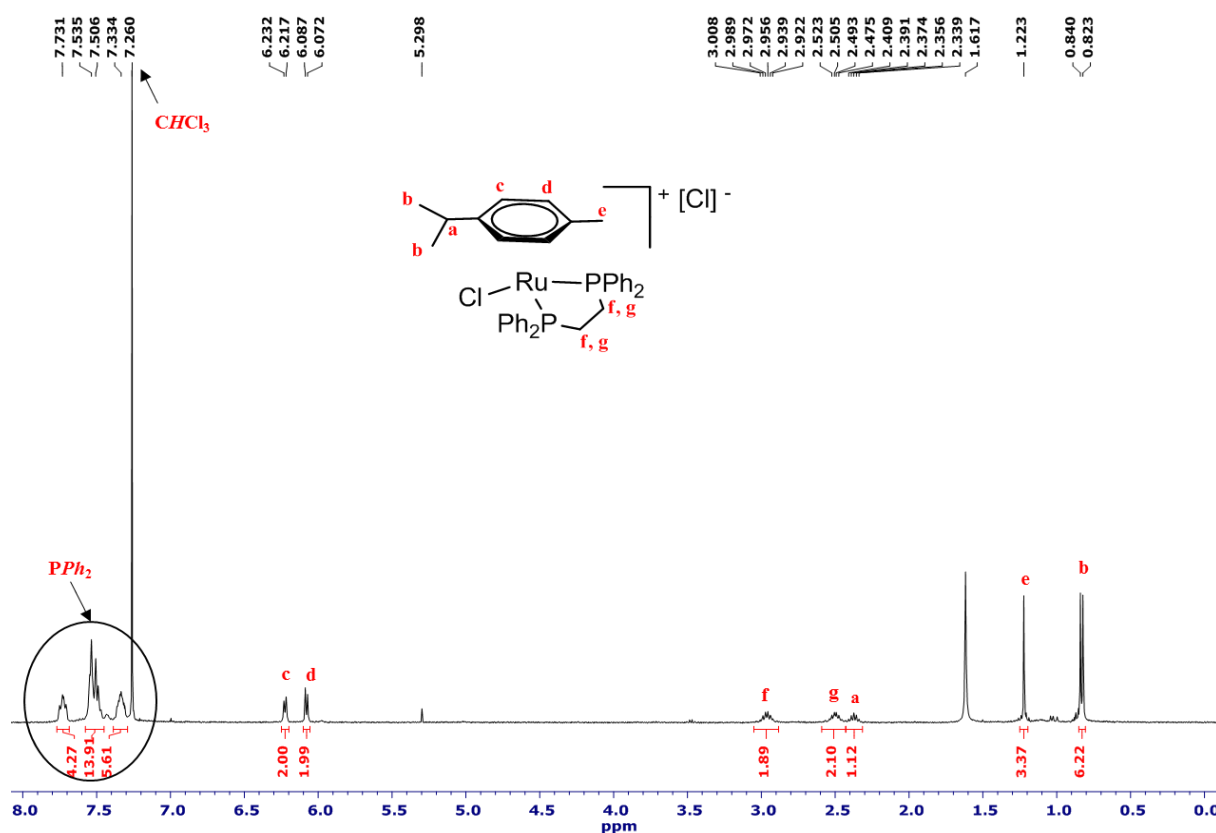


Figura 59 - Espectro de ^1H -RMN do composto $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{dppe})\text{Cl}][\text{Cl}]$ (**2b**) em CDCl_3 .

Relativamente ao espectro de ^{31}P -RMN, a presença de um único singuleto, a 70,91 ppm, é atribuído aos dois átomos de fósforo equivalentes do ligando dppe (figura 60).

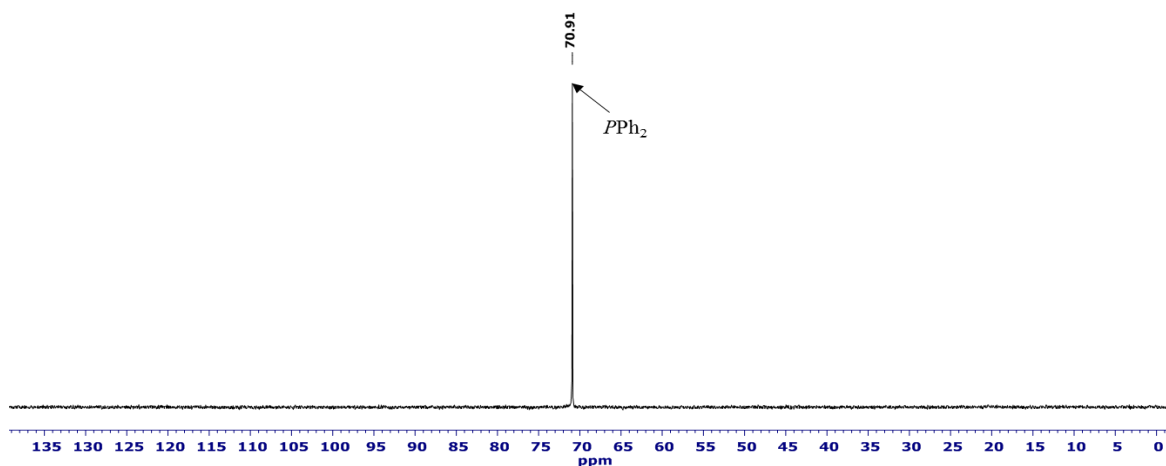


Figura 60 - Espectro de ^{31}P -RMN do complexo $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{dppe})\text{Cl}][\text{Cl}]$ (**2b**) em CDCl_3 .

Apesar de se ter obtido o complexo $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{dppe})\text{Cl}][\text{Cl}]$, a quantidade obtida de produto não foi suficiente para a continuação do trabalho. Segundo o reportado na literatura, o procedimento adoptado conduz à formação do produto secundário $[\text{RuCl}_2(\text{dppe})_2]$, conduzindo a um rendimento de 50%. Assim, sugere-se a repetição deste procedimento com a alteração da temperatura da mistura reaccional, ou seja, optar por utilizar 50°C ao invés do refluxo de modo a prevenir a perda do anel de *p*-cimeno como proposto por Daguinet *et al.* na referência [183], onde o rendimento reportado é de 73%. Uma outra sugestão seria a preparação do $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{dppe})\text{Cl}][\text{PF}_6]$, num único passo, através do procedimento publicado por Hodson e Simpson [184].

2.1.2. Preparação dos dendrímeros

Os dendrímeros utilizados foram o *N,N,N',N'*-[tetraquis(cianoetil)hexametilenodiamina] (**3**), o *N,N,N',N'*-[tetraquis(*tert*-butilpropanoato)hexametilenodiamina] (**4**), o *N,N,N',N'*-[tetraquis(propanol)hexametilenodiamina] (**5**) e o *N,N,N',N'*-[tetraquis(cianoetoxipropil)hexametilenodiamina] (**6**). A construção destes dendrímeros foi baseada na metodologia desenvolvida no grupo de investigação em Materiais Moleculares do Centro de Química da Madeira (MMRG) [172, 174, 175]. No desenvolvimento do presente projecto apenas as sínteses dos compostos **5** e **6** foram ensaiadas, as quais se encontram seguidamente descritas.

2.1.2.1. Preparação do $[\text{N}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{N}]_2$ (**6**)

A preparação do dendrímero **6** foi baseada em duas reacções, nomeadamente a redução de um éster e a O-alkilação do tetrol por adição de Michael (figura 61).

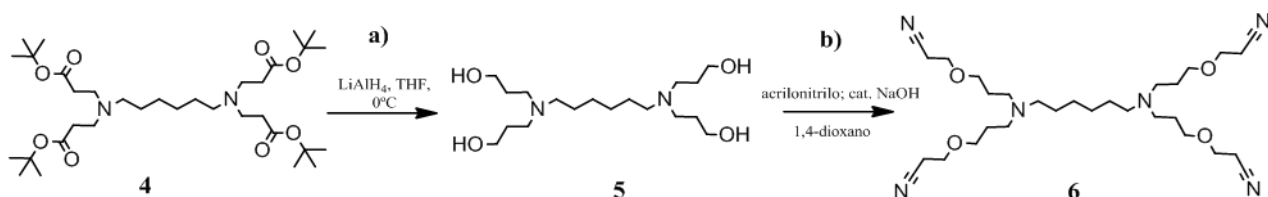


Figura 61 - Esquema geral para a preparação do dendrímero $[\text{N}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{N}]_2$ (**6**), onde a) redução do éster **4** e b) O-alkilação do tetrol **5**.

2.1.2.1.1. Redução do éster [OtBu(C=O)(CH₂)₂]₂N(CH₂)₆N[(CH₂)₂(C=O)OtBu]₂ (4) a [OH(CH₂)₃]₂N(CH₂)₆N[(CH₂)₃OH]₂ (5)

A redução do éster [OtBu(C=O)(CH₂)₂]₂N(CH₂)₆N[(CH₂)₂(C=O)OtBu]₂ no álcool [OH(CH₂)₃]₂N(CH₂)₆N[(CH₂)₃OH]₂ (figura 61a) foi executada com o agente redutor hidreto de alumínio e lítio (LiAlH₄).

Esta reacção consiste numa substituição acílica nucleofílica seguida de uma adição nucleofílica (figura 62). Deste modo, primeiramente ocorre a adição de um ião hidreto, proveniente do agente redutor LiAlH₄, no grupo carbonilo do éster com formação de um intermediário aniónico tetraédrico. Este intermediário complexa com o hidreto de alumínio, na forma AlH₃, conduzindo à perda do grupo abandonante sob a forma de alcóxido (OR⁻), e à regeneração do grupo carbonilo com formação de um aldeído [185]. Atendendo que o aldeído é extremamente instável, este reage rapidamente com o alcóxido de alumínio AlH₃ORLi, resultante da complexação do LiAlH₃ com o grupo OR⁻, ou com o agente redutor LiAlH₄. Por conseguinte, ocorre uma adição nucleofílica de um segundo ião hidreto no carbonilo do aldeído, originando-se um composto tetraédrico. Por fim, o tratamento deste intermediário com uma fonte de protões (*e.g.* H₂O) gera dois álcoois, resultante da protonação do grupo acilo e do grupo abandonante [185-187].

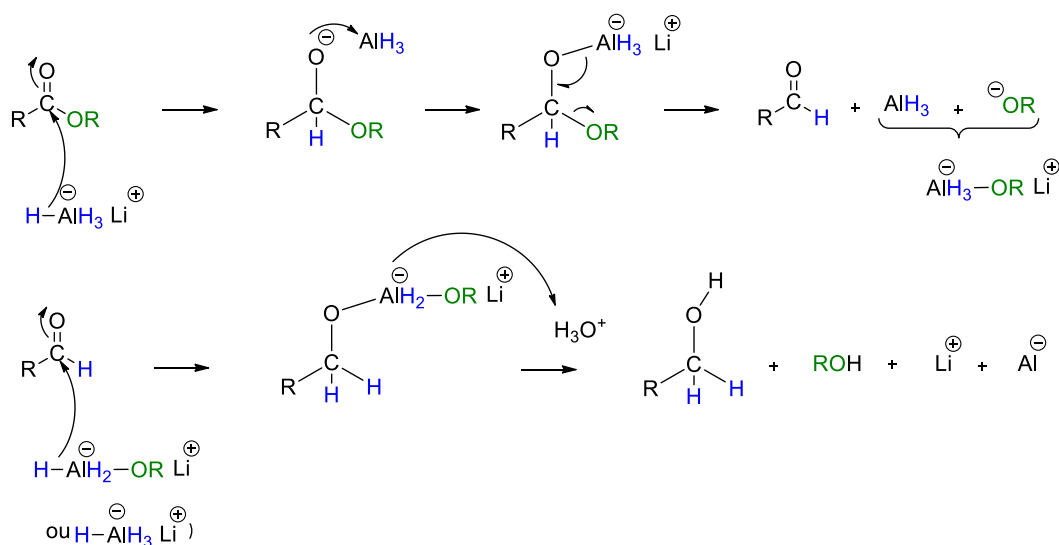


Figura 62 - Mecanismo da redução de um éster em dois álcoois (adaptado das referências [185, 188]).

O espectro de ¹H-RMN do tetrol [OH(CH₂)₃]₂N(CH₂)₆N[(CH₂)₃OH]₂ (figura 63) comparativamente ao éster 4 apresenta, como esperado, alterações nos protões das terminações dendríticas [175]. Deste modo, observa-se o surgimento de um singuleto largo referente ao grupo

funcional OH e um tripleto a 3,71 ppm relativo aos prótons do $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ bem como a blindagem dos prótons dos carbonos adjacentes.

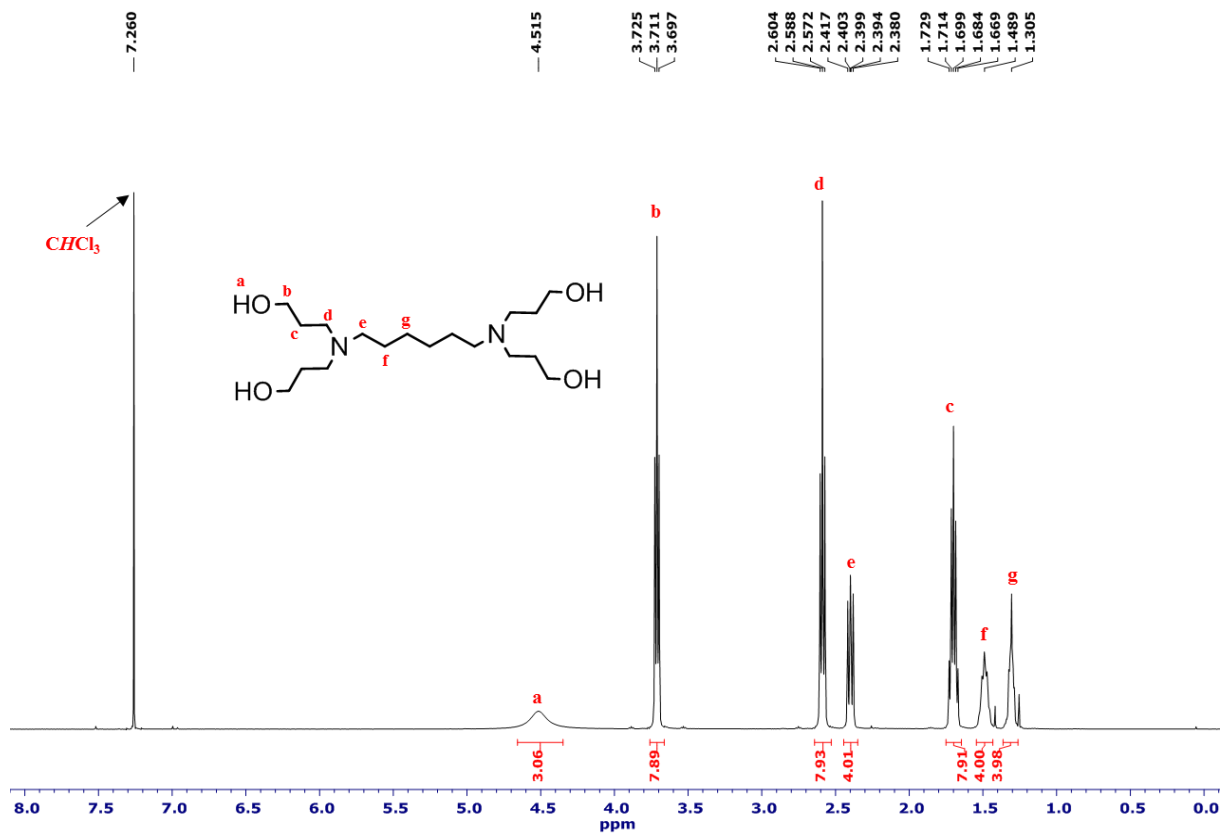


Figura 63 - Espectro do ^1H -RMN do composto $[\text{OH}(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{OH}]_2$ (**5**), em CDCl_3 .

2.1.2.1.2. O-alkilação, por adição de Michael, do $[\text{OH}(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{OH}]_2$ (**5**) a $[\text{N}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{N}]_2$ (**6**)

A segunda reacção para a obtenção da estrutura dendrítica **6** foi processada através de uma O-alkilação, por reacção de Michael, dos grupos hidroxilo do composto **5** com o acrilonitrilo, na presença da base NaOH. A reacção de Michael consiste na adição de um nucleófilo, denominado de “doador de Michael”, num alceno activado por um grupo electroextractor forte, o “aceitador de Michael” (electrófilo), originando o “aducto de Michael” [189, 190]. Neste caso o “doador de Michael” é o tetrol e o acrilonitrilo é o “aceitador de Michael”. É de referir que o grupo nitrilo é um extractor de electrões forte, pelo que o carbono β do acrilonitrilo é relativamente positivo e a porção do nitrilo da molécula é relativamente negativa. Por esta razão, o nucleófilo ataca a posição β da molécula do acrilonitrilo [191]. O mecanismo geral simplificado da O-alkilação do álcool com acrilonitrilo encontra-se esquematizado na figura 64.

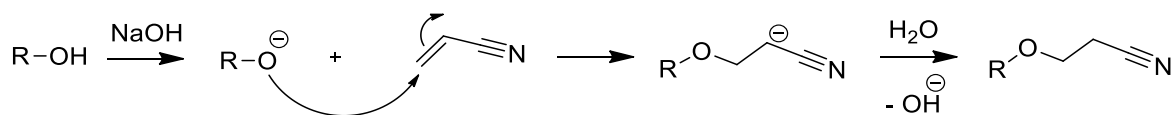


Figura 64 - Mecanismo geral da adição de Michael (adaptado da referência [192]).

Deste modo, a reacção inicia-se com remoção dos hidrogénios lábeis do dendrímero **5** pela base NaOH (catalisador), formando-se um intermediário, o anião alcóxido (agente nucleofílico, “doador de Michael”) [193]. Este, por sua vez, ataca a dupla ligação do acrilonitrilo produzindo um anião diferente. A protonação deste anião origina o dendrímero **6** e a regeneração da base (NaOH) [190].

Pela análise do espectro de ^1H -RMN do composto bruto (figura 65) observa-se o aparecimento de dois novos picos, nomeadamente um tripleto a 3,63 ppm relativo aos protões $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ e um outro tripleto a 2,47 ppm atribuído aos protões $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, confirmando o crescimento do dendrímero. No entanto, a completa purificação do composto ainda não foi atingida no presente trabalho (figura 65).

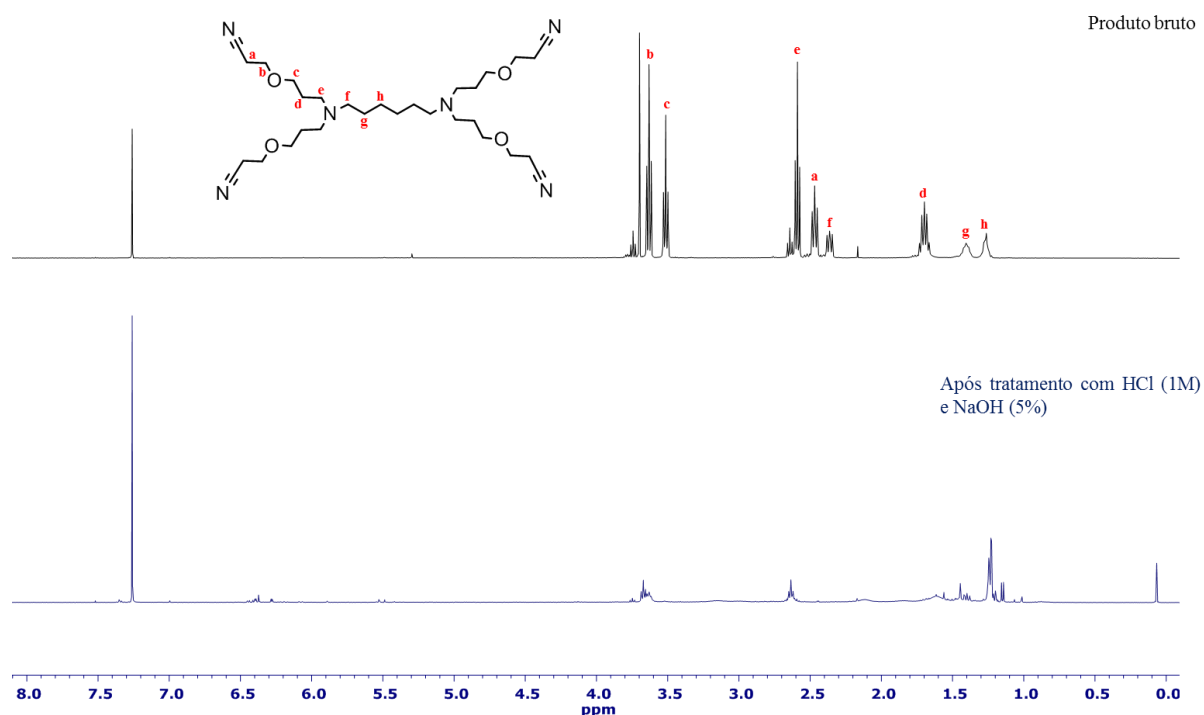


Figura 65 - Espectros de ^1H -RMN do produto $[\text{N}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{N}]_2$ (**6**) antes e após purificação em CDCl_3 .

Sugere-se a purificação da mistura bruta através da cromatografia em coluna, utilizando para o efeito alumina neutra com a eluição em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ como reportado nas referências [194, 195]. De

referir que alguns dos produtos secundários surgem devido ao excesso de acrilonitrilo, tais como o composto 2-cianoetil éter ($\text{N}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{N}$) e polímeros intractáveis [194].

Por conseguinte, dendrímero **6** utilizado na preparação dos metalodendrímeros e nos ensaios de citotoxicidade corresponde ao preparado pelo aluno de doutoramento Manuel Jardim, elemento do Grupo de Materiais do CQM.

2.1.3. Preparação dos metalodendrímeros

A síntese dos metalodendrímeros com fórmula $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}]_4(\mathbf{3} \text{ ou } \mathbf{6})[\text{PF}_6]_4$ encontram-se reportados na literatura por Jardim *et al.* [175]. No entanto, é importante salientar que, no corrente trabalho, uma estratégia alternativa foi seguida para a preparação destes metalodendrímeros. Deste modo, aqui reporta-se a utilização do agente abstractor de cloreto trifluorometanosulfonato de prata (AgCF_3SO_3) em vez do hexafluorofosfato de tálio (TlPF_6) utilizado no procedimento publicado na literatura. Esta estratégia é mais indicada uma vez que a presença de resíduos de tálio, após o processo de purificação, no metalodendrímero limita a avaliação anticancerígena deste durante os ensaios biológicos.

Para além da funcionalização dos dendrímeros $[\text{N}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{N}]_2$ (**3**) e $[\text{N}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{N}]_2$ (**6**) com o complexo $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$, ensaiou-se a coordenação destas estruturas dendríticas com o complexo $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$.

Os resultados da funcionalização dos dendrímeros de poli(alquilideno imina) com os complexos organometálicos de ruténio são referidos nos pontos seguintes, sendo que os procedimentos seguidos assentam no trabalho desenvolvido pelo grupo de MMRG do CQM [172, 174, 175].

De salientar que os metalodendrímero **7** e **8** apresentam uma estabilidade moderada em solventes orgânicos, a qual é acentuada nos solventes halogenados, impossibilitando a aquisição do espectro de ^{13}C -RMN para estes compostos.

2.1.3.1. Preparação do $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}]_4(\mathbf{3})[\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ (**7**)

O metalodendrímero $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}]_4(\mathbf{3})[\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ foi obtido através da reacção, à temperatura ambiente, de 1 equivalente do dendrímero $[\text{N}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{N}]_2$ (**3**), com 4,1 equivalentes do complexo organometálico $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ e 5,4 equivalentes de AgCF_3SO_3 em metanol (figura 66). O metalodendrímero resultante foi isolado por precipitação em diclorometano/éter etílico, obtendo-se um pó verde. O rendimento da reacção foi reduzido, cerca de 35%, provavelmente devido à decomposição do composto em diclorometano.

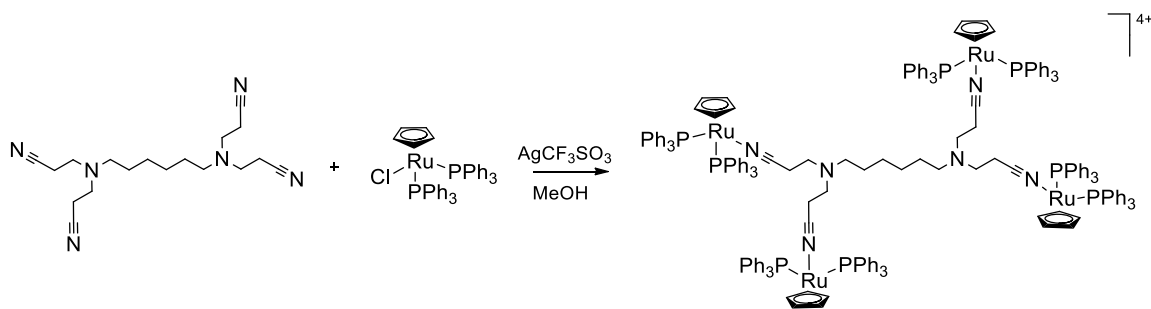


Figura 66 - Esquema geral da preparação do metalodendrímico $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{3})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4 (\mathbf{7})$.

De acordo com espectro de ^1H -RMN (figura 67) observa-se a presença de um único singuleto a 4,48 ppm relativo à ressonância dos prótons do ligando ciclopentadienilo, indicando que estes são equivalentes.

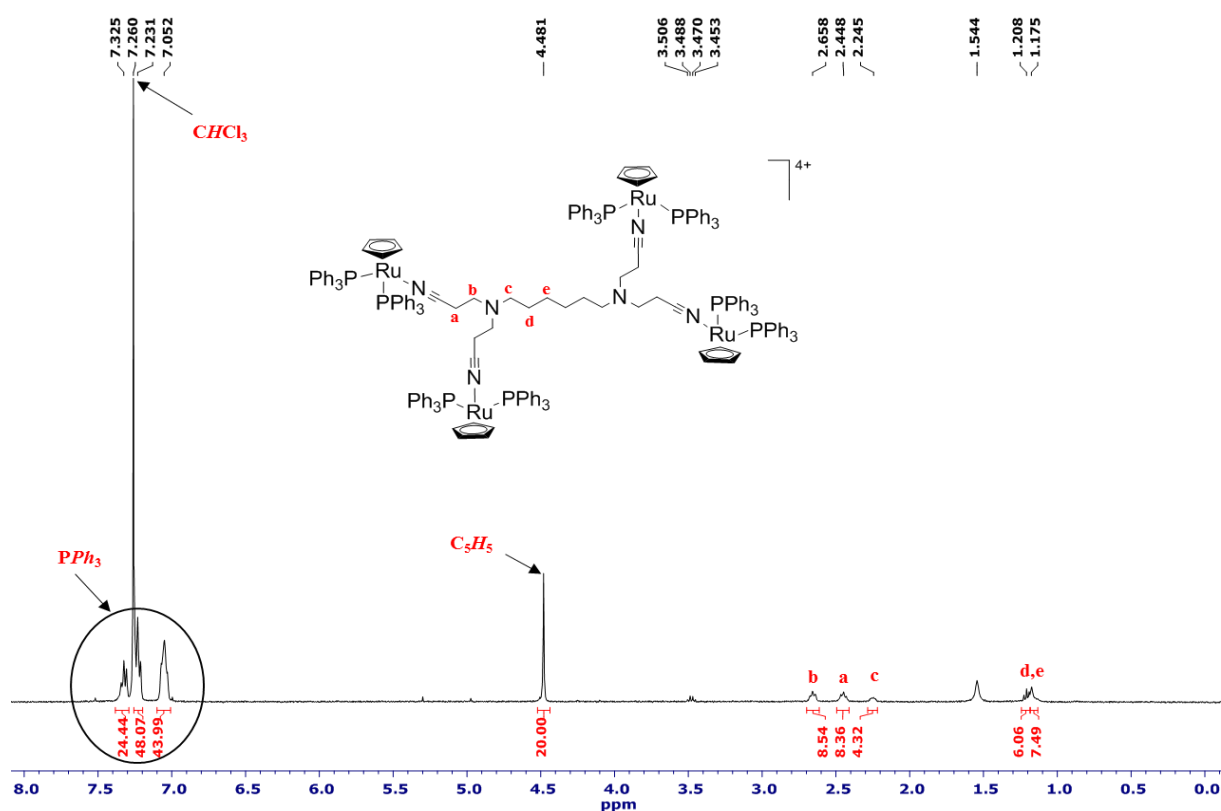


Figura 67 - Espectro de ^1H -RMN do metalodendrímico $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{3})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4 (\mathbf{7})$ em CDCl_3 .

Além disso, o sinal a 4,48 ppm surge desblindado relativamente ao sinal resultante da ressonância dos prótons do ciclopentadienilo do produto de partida $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ com um

desvio químico de 0,38 ppm. Por outro lado, os prótons dos anéis aromáticos da trifenilfosfina bem como os prótons alifáticos do dendrímero sofreram um efeito de blindagem comparativamente aos respectivos análogos livres (antes da coordenação).

O espectro de ^{31}P -RMN (figura 68) também apresenta um único singuleto a 41,89 ppm confirmando a equivalência dos átomos de fósforo do ligando fosfina, surgindo desblindado relativamente ao complexo de rutênio descoordenado que surge a 38,83 ppm.

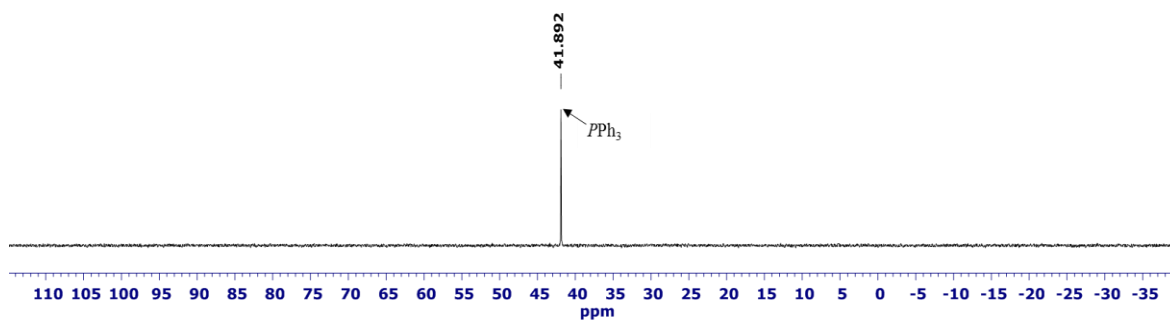


Figura 68 - Espectro de ^{31}P -RMN do metalodendrímero $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{3})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4(\mathbf{7})$ em CDCl_3 .

Deste modo, a presença de um único sinal do próton para o ligando ciclopentadienilo e de um único pico para os átomos de fósforo do ligando PPh_3 indica que os fragmentos de rutênio encontram-se coordenados de forma simétrica (equivalente) nas terminações dendríticas, confirmando a tetracoordenação.

O espectro de ^{19}F -RMN (figura 69) apresenta um singuleto a - 81,78 ppm atribuído aos átomos de fluór provenientes do $[\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$ como contra-íão.

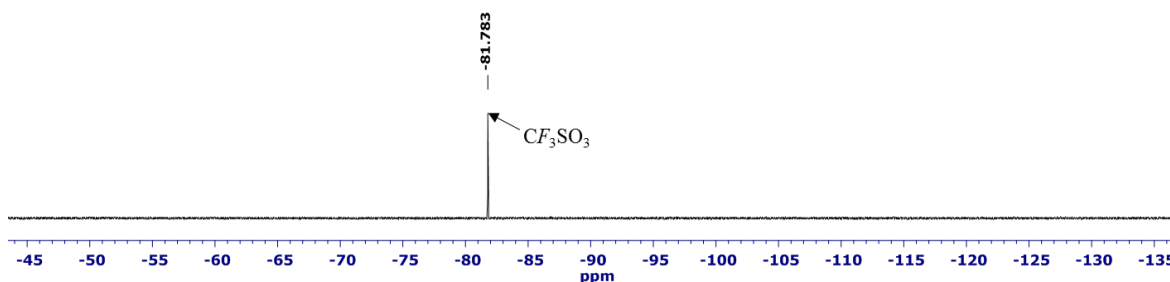


Figura 69 - Espectro de ^{19}F -RMN do metalodendrímero $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{3})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4(\mathbf{7})$ em CDCl_3 .

Relativamente ao espectro de FT-IR do metalodendrímtero **7** (figura I.II do anexo I), observa-se a presença da banda a 2271 cm^{-1} relativa ao nitrilo coordenado confirmando a funcionalização completa do dendrímtero **3**. Neste espectro também se visualiza a banda de vibração característica do contra-íão $[\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$, nomeadamente a 1274 cm^{-1} .

O estudo do metalodendrímtero **7** por espectrometria de massa, também confirmou a tetracoordenação do dendrímtero **3** devido à presença do padrão de fragmentação consistente com a perda de dois contra-íões, a $m/z = 1694,5096$ ($[\text{M}-2\text{CF}_3\text{SO}_3]^{2+}$) e de três contra-íões, a $m/z = 1081,0131$ ($[\text{M}-3\text{CF}_3\text{SO}_3]^{3+}$), figura I.III do anexo I.

Os dados obtidos da análise elementar encontram-se registados na tabela 2. Note-se que os valores teóricos foram calculados tendo em conta a adição de moléculas de diclorometano uma vez que se observa a sua presença no espectro de ^1H -RMN do composto (figura 67). Esta situação surge devido ao isolamento do composto por precipitação ocorrendo a inclusão de moléculas de solvente na sua estrutura dendrítica.

Tabela 2 - Valores teóricos e experimentais das percentagens de C, H e N obtidos para o metalodendrímtero **7**.

Átomos	C	H	N
Teórico (%)	59,23	4,53	2,21
Experimental (%)	59,21	4,54	2,20

Pela análise elementar observa-se que os valores teóricos apresentam uma excelente concordância com os valores experimentais, confirmando a pureza do composto **7**.

2.1.3.2. Preparação do $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}]_4(\mathbf{6})[\text{CF}_3\text{SO}_3]_4(\mathbf{8})$

A mistura de um 1 equivalente de dendrímtero **6** com 4,7 equivalentes de $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ e 4,9 equivalentes de AgCF_3SO_3 , em metanol, permitiu obter o metalodendrímtero **8** (figura 70). O produto foi purificado por precipitação em diclorometano/éter obtendo-se um pó verde com cerca de 25% de rendimento. O rendimento reduzido encontra-se associado à sua instabilidade em solventes halogenados, decompondo-se rapidamente.

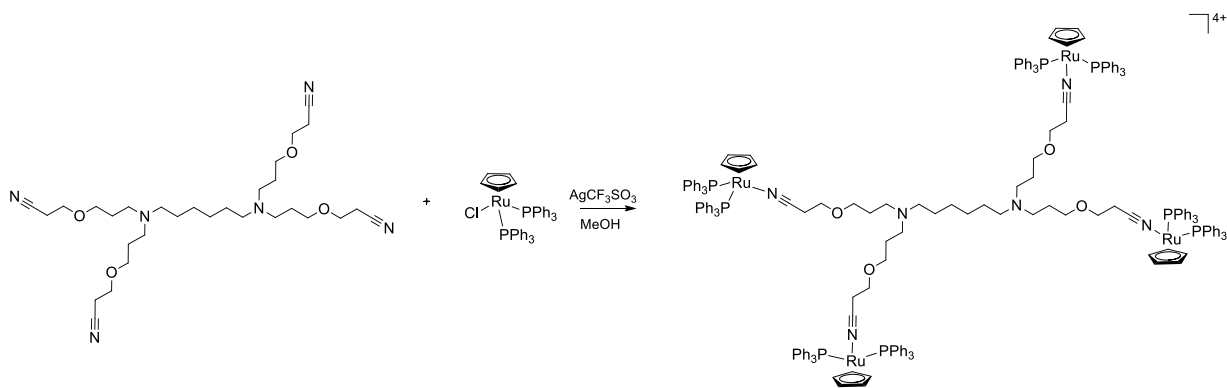


Figura 70 - Esquema geral da preparação do metalodendrímtero $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{6})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4(\mathbf{8})$.

No espectro de $^1\text{H-RMN}$ do metalodendrímtero **8**, os prótons do ciclopentadienilo coordenado surgem como um singuleto a 4,44 ppm e desblindado comparativamente aos prótons do complexo de rutênio $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}\}]$. Os prótons alifáticos do core dendrítico encontram-se como picos largos e desblindados comparativamente ao composto inicial (figura 71).

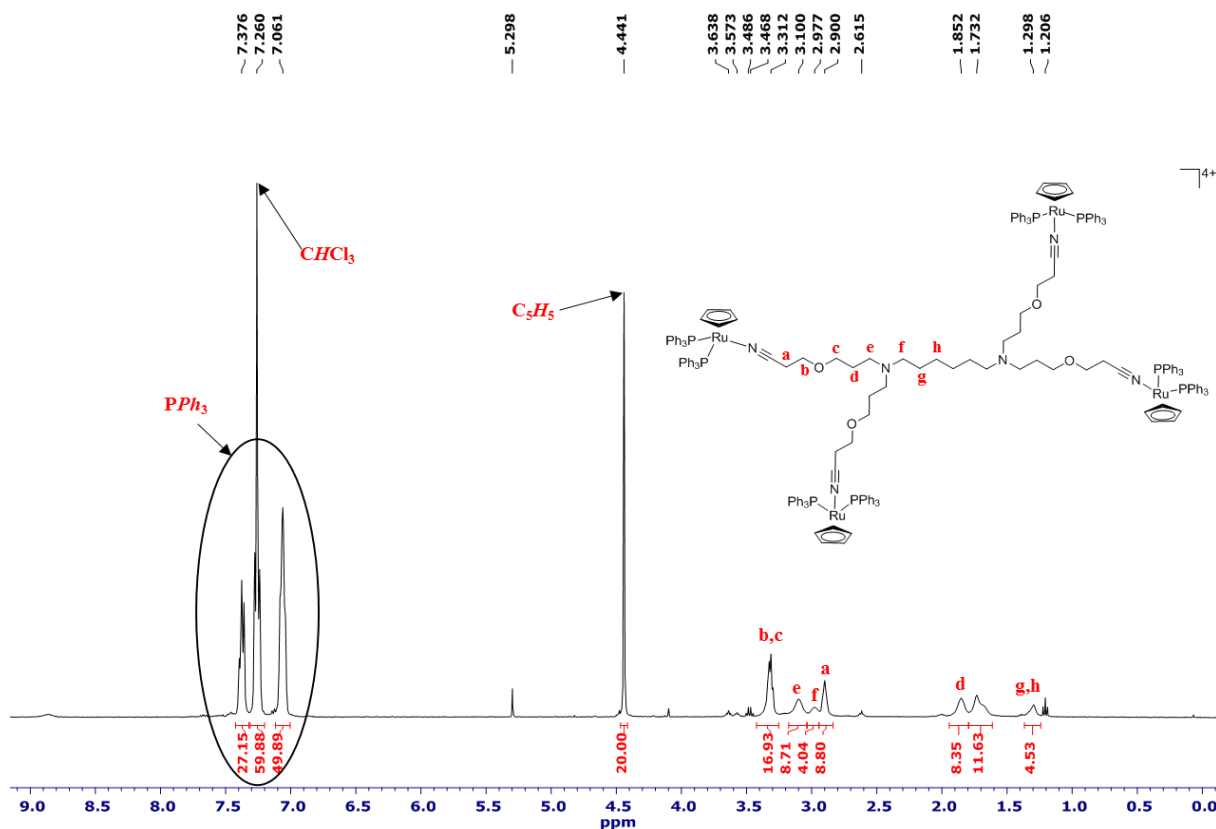


Figura 71 - Espectro de $^1\text{H-RMN}$ do metalodendrímtero $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{6})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4(\mathbf{8})$ em CDCl_3 .

De acordo com o espectro de ^{31}P -RMN (figura 72), o pico a 41,60 ppm refere-se aos átomos de fósforo dos ligandos PPh_3 , surgindo desblindado relativamente ao complexo análogo de partida.

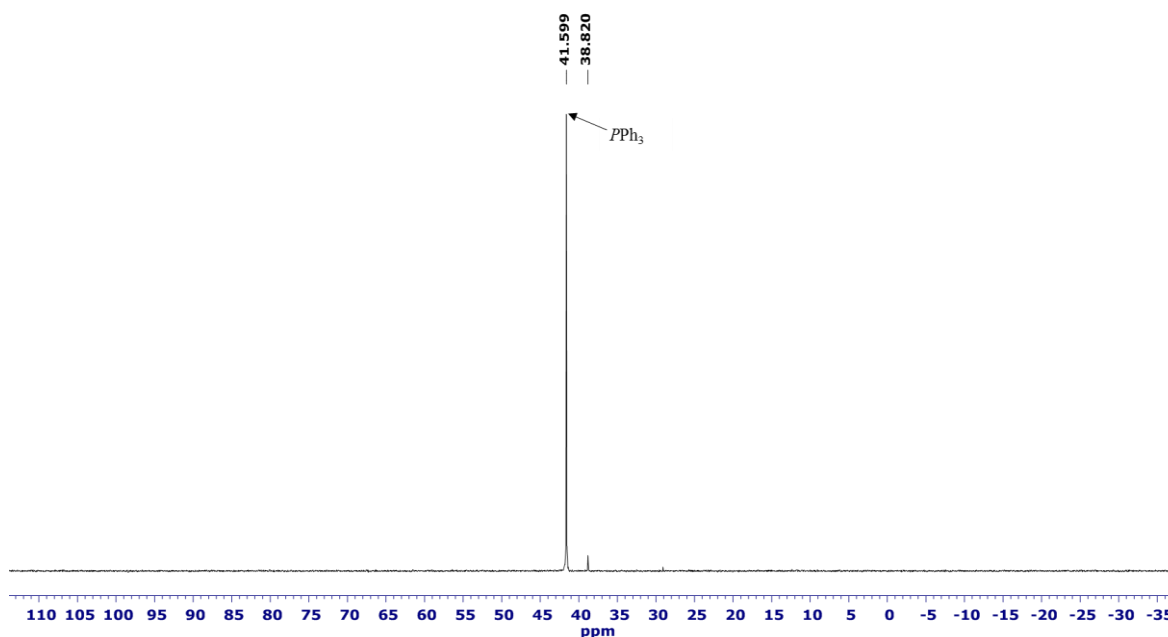


Figura 72 - Espectro de ^{31}P -RMN do metalodendrímico $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{6})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4(\mathbf{8})$ em CDCl_3 .

Deste modo, os dados de ^1H - e ^{31}P -RMN indicam a equivalência de todas as entidades de ruténio coordenadas ao dendrímico **6** pelo que a funcionalização completa foi alcançada. No caso do espectro de ^{19}F -RMN (figura 73) do composto **8**, visualiza-se um singuleto a - 81,95 ppm correspondente ao contra-íão $[\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$.

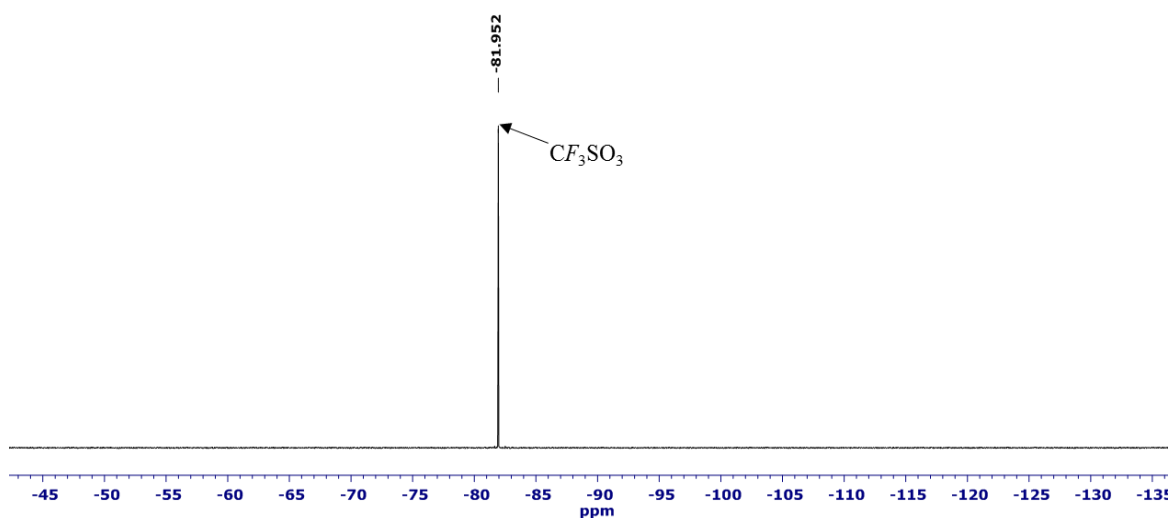


Figura 73 - Espectro de ^{19}F -RMN do metalodendrímico $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{6})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4(\mathbf{8})$ em CDCl_3 .

No espectro de FT-IR para o composto **8** (figura I.IV - anexo I), observa-se uma banda a 2269 cm^{-1} relativo à vibração do nitrilo coordenado ao centro metálico, confirmando a funcionalização completa uma vez que não se visualiza a vibração do nitrilo livre. As bandas de vibração características do contra-íon $[\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$ foram identificadas a 1286 e 697 cm^{-1} .

A funcionalização completa do dendrímero **6** com as entidades de rutênio também foi suportada pela espectrometria de massa. Deste modo, no espectro de MS (figura I.V - anexo I) detectou-se a distribuição isotópica esperada para o $[\text{M}-2\text{CF}_3\text{SO}_3]^{2+}$, a $m/z = 1810,9692$ e para o $[\text{M}-3\text{CF}_3\text{SO}_3]^{3+}$ a $m/z = 1157,9568$.

Relativamente a análise elementar do metalodendrímero, foi necessário também determinar os valores teóricos tendo em conta a presença de diclorometano. Este é visível através do espectro de ^1H -RMN a 5,30 ppm (figura 71).

Tabela 3 - Valores teóricos e experimentais das percentagens de C, H e N obtidos para o metalodendrímero **8**.

Átomos	C	H	N
Teórico (%)	57,83	4,78	2,01
Experimental (%)	57,79	4,79	2,04

Por conseguinte, observa-se na tabela 3 que os valores teóricos (incluindo 3 moléculas de DCM) e os valores experimentais das percentagens atômicas do composto **8** apresentam uma concordância elevada indicativo da pureza da amostra.

2.1.3.3. Preparação do $[\{(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{en})\text{Ru}\}_4(\mathbf{3})][\text{PF}_6]_8$ (**9**)

A síntese do composto **9** foi ensaiada através da mistura de 1 equivalente de dendrímero **3**, 4,1 equivalentes de $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ e 10,2 equivalentes de NH_4PF_6 em metanol (figura 74).

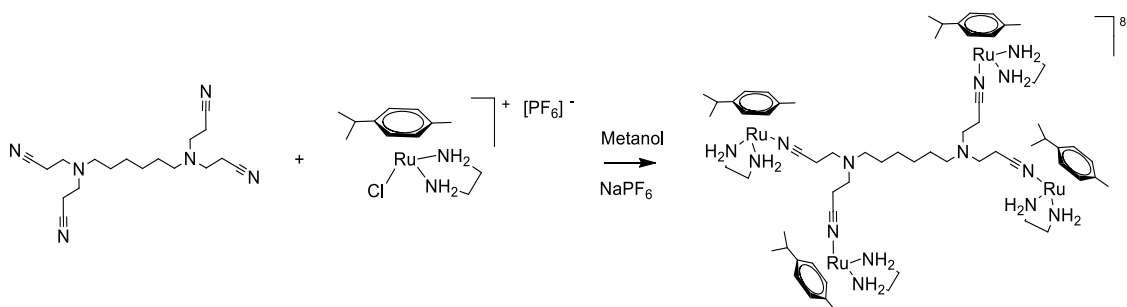


Figura 74 - Esquema geral da preparação do metalodendrímero $[\{(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{en})\text{Ru}\}_4(\mathbf{3})][\text{PF}_6]_8$ (**9**).

De acordo com o espectro de ^1H -RMN obtido (figura 75), após a reacção de funcionalização, não se observa alterações nos desvios químicos dos prótons do complexo de ruténio. No caso da ressonância dos prótons do dendrímero **3**, estes surgem como picos de baixa intensidade dificultando a sua identificação. No espectro de ^{31}P -RMN (figura 76) visualiza-se um multipletto a $-144,19$ ppm referente ao átomo de fósforo do contra-íão $[\text{PF}_6]^-$. No entanto, tais dados não foram suficientes para confirmar a funcionalização completa por RMN.

Por outro lado, de acordo com o espectro de FT-IR (figura I.VI - anexo I), observou-se uma banda a 2244 cm^{-1} relativa à vibração do ligando livre e uma outra banda a 835 cm^{-1} correspondente à vibração do $[\text{PF}_6]^-$.

Por fim, os dados obtidos por espectrometria de massa (MS) confirmaram a funcionalização incompleta do dendrímero **3**. Assim, no espectro de MS apenas identificou-se o padrão isotópico referente à coordenação de um dos braços do dendrímero com um complexo organometálico (figura 77).

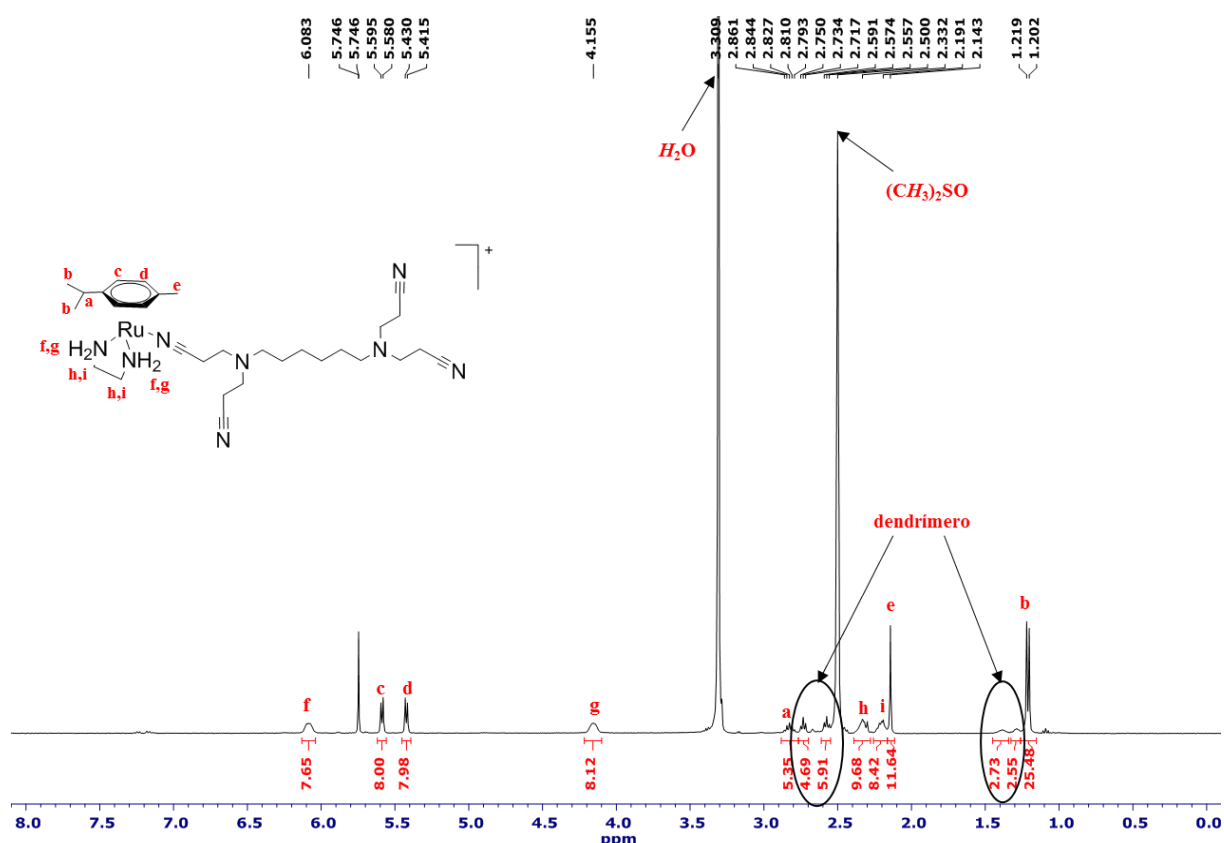


Figura 75 - Espectro de ^1H -RMN do composto obtido na tentativa de preparação do metalodendrímero $[\{\eta^6\text{-}p\text{-cimeno}\}(\text{en})\text{Ru}]_4(\mathbf{3})$ em $\text{DMSO-}d_6$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$).

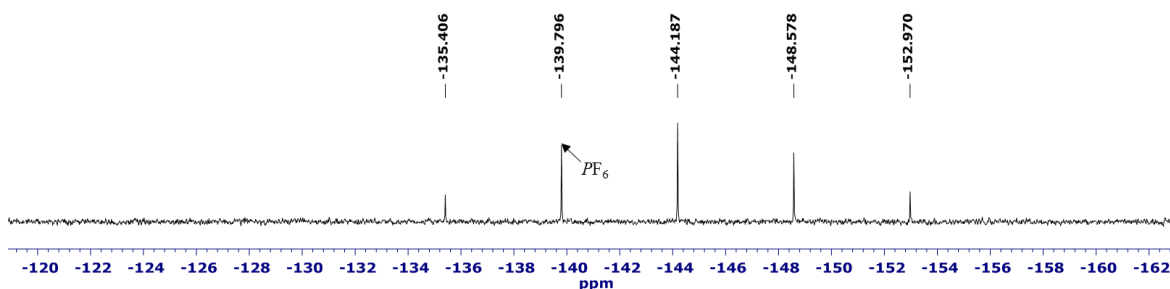


Figura 76 - Espectro de ^{31}P -RMN do composto obtido na tentativa de preparação do composto $[\{(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{en})\text{Ru}\}_4(\mathbf{3})][\text{PF}_6]_8 (\mathbf{9})$ em $\text{DMSO-}d_6 ((\text{CD}_3)_2\text{SO})$.

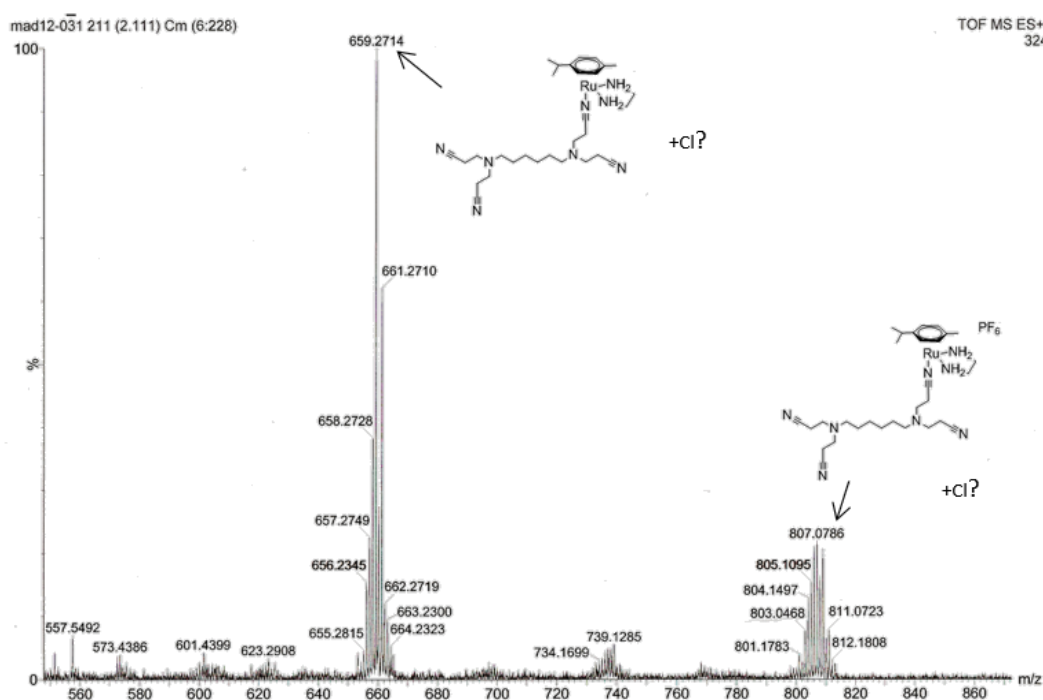


Figura 77 - Espectro de massa do dendrímero **3** com apenas um grupo nitrilo funcionalizado com o complexo $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{en})]^+$.

2.1.3.4. Preparação do $[\{(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{en})\text{Ru}\}_4(\mathbf{6})][\text{PF}_6]_8 (\mathbf{10})$

A síntese do composto **10** foi ensaiada através da mistura de 1 equivalente do composto **6** com 4,5 equivalentes do complexo $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ e 4,5 equivalente de NH_4PF_6 em metanol (figura 78).

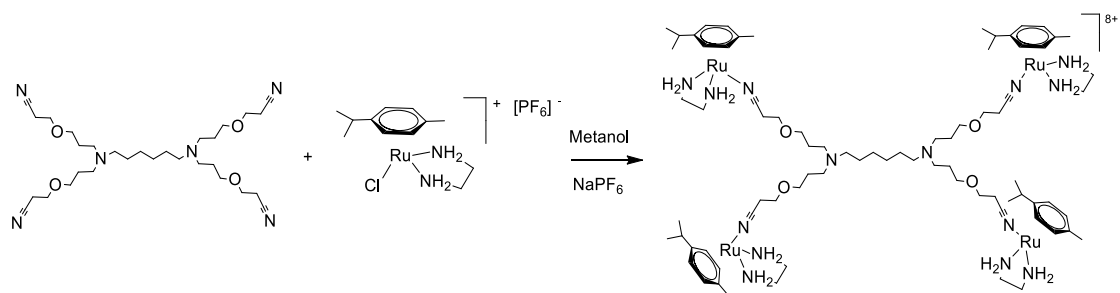


Figura 78 - Esquema geral da preparação do metalodendrímero $[\{(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{en})\text{Ru}\}_4(\mathbf{6})][\text{PF}_6]_8(\mathbf{10})$.

Desta reacção obteve-se uns cristais laranja que foram caracterizados por RMN e FT-IR. De acordo com o ^1H -RMN (figura 79), não se observaram diferenças no desvio químico dos prótons do produto relativamente aos prótons do complexo de partida, sugerindo a não coordenação do complexo.

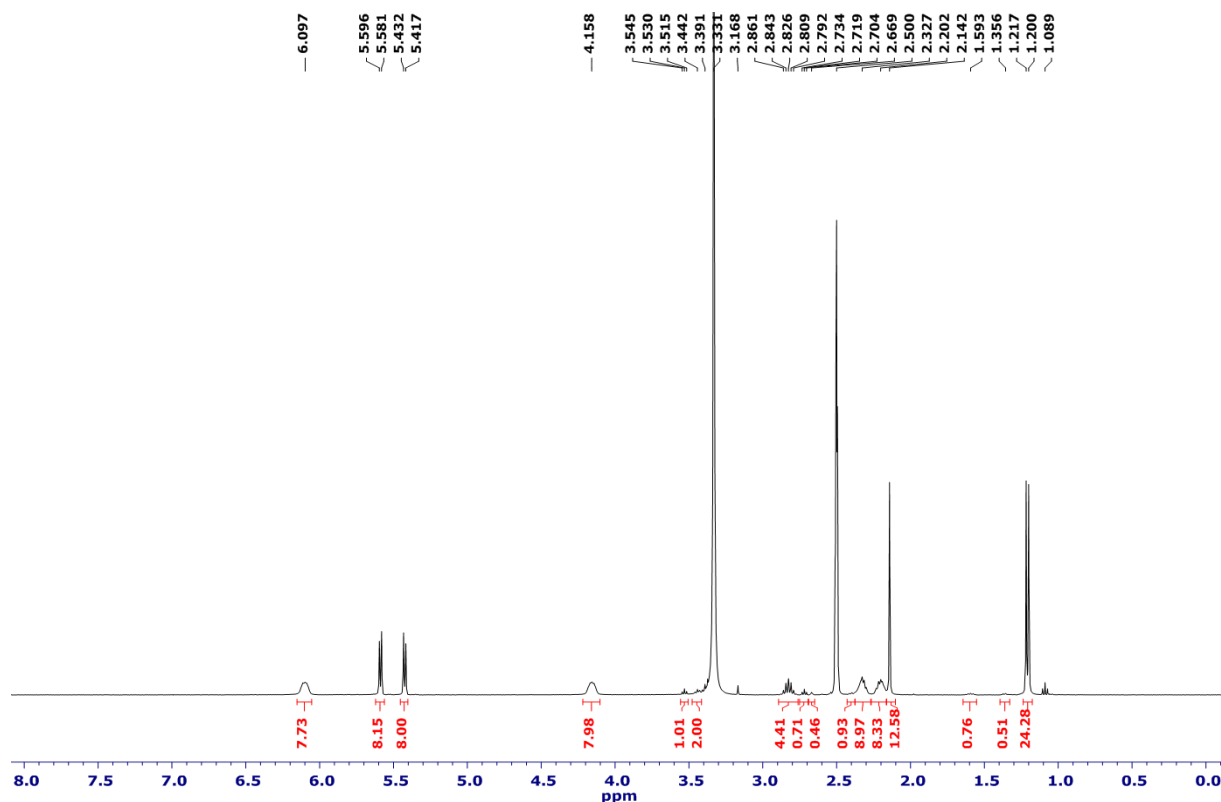


Figura 79 - Espectro de ^1H -RMN obtido do composto proveniente da tentativa de preparação do metalodendrímero $[\{(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{en})\text{Ru}\}_4(\mathbf{6})][\text{PF}_6]_8(\mathbf{10})$ em $\text{DMSO-}d_6$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$).

A análise por FT-IR (figura I.VII - anexo I) indicou a presença de uma banda a 2254 cm^{-1} que corresponde à zona de vibração do nitrilo descoordenado. Deste modo, a funcionalização do dendrímero **6** com o complexo $\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}(\text{en})[\text{PF}_6]$ não foi alcançada.

2.2. Estabilidade dos metalodendrímeros

O conhecimento da estabilidade dos potenciais fármacos e da identidade dos produtos resultantes da sua degradação é fundamental na optimização do seu efeito terapêutico [113, 172, 196].

O grupo MMRG do CQM reportou a estabilidade, ao longo do tempo, dos metalodendrímeros $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{3})][\text{PF}_6]_4$ (**11**) e $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{6})][\text{PF}_6]_4$ (**12**) com o contra-íão $[\text{PF}_6]^-$ em dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) através da técnica de espectroscopia de ^{31}P -RMN (figura 80) [172].

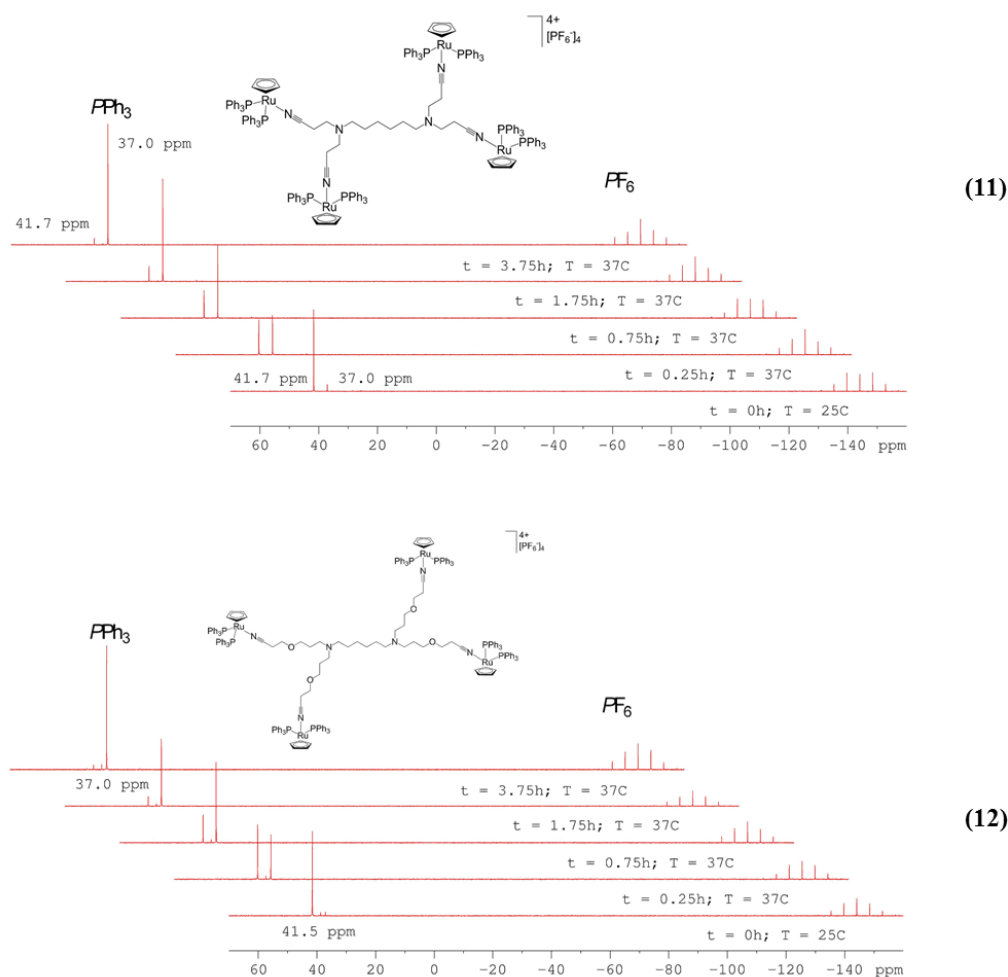


Figura 80 - Espectros de ^{31}P -RMN dos metalodendrímeros $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{3}$ ou $\mathbf{6})][\text{PF}_6]_4$ (**11** ou **12**), em $\text{DMSO-}d_6$, a 25°C e sua evolução ao longo de diferentes períodos de incubação a 37°C [172].

Para este efeito, soluções de cada um dos metalodendrimeros foram preparadas em DMSO- d_6 , a uma concentração de 0,019 mg/ μ L e a 25°C, e os respectivos espectros de ^{31}P -RMN foram traçados. Posteriormente, estas soluções foram incubadas num banho de água a 37°C e a estabilidade das mesmas foi monitorizada ao longo de diferentes períodos de tempo por RMN. Segundo os espectros de ^{31}P -RMN, após 25 minutos de incubação a 37°C, ambos os metalodendrimeros demonstraram ser instáveis em DMSO- d_6 . Este comportamento foi visível pela redução do pico característico da ressonância dos átomos de fósforo provenientes do fragmento $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2]^+$ coordenado e pelo surgimento de um novo pico, a 37 ppm. Ao fim de cerca de 4 horas, observou-se que a decomposição dos metalodendrimeros ocorreu quase na totalidade.

De modo a identificar, por espectroscopia de RMN, o produto resultante da decomposição dos metalodendrimeros funcionalizados com $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2]^+$ em DMSO- d_6 e a prever o seu comportamento em meio fisiológico, optou-se por traçar não só os espectros de ^{31}P -RMN, a 25°C, para o complexo organometálico $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$, em DMSO- d_6 e numa mistura de DMSO- d_6 /D $_2$ O (figura 81), bem como da trifenilfosfina, em DMSO- d_6 /D $_2$ O (figura 82).

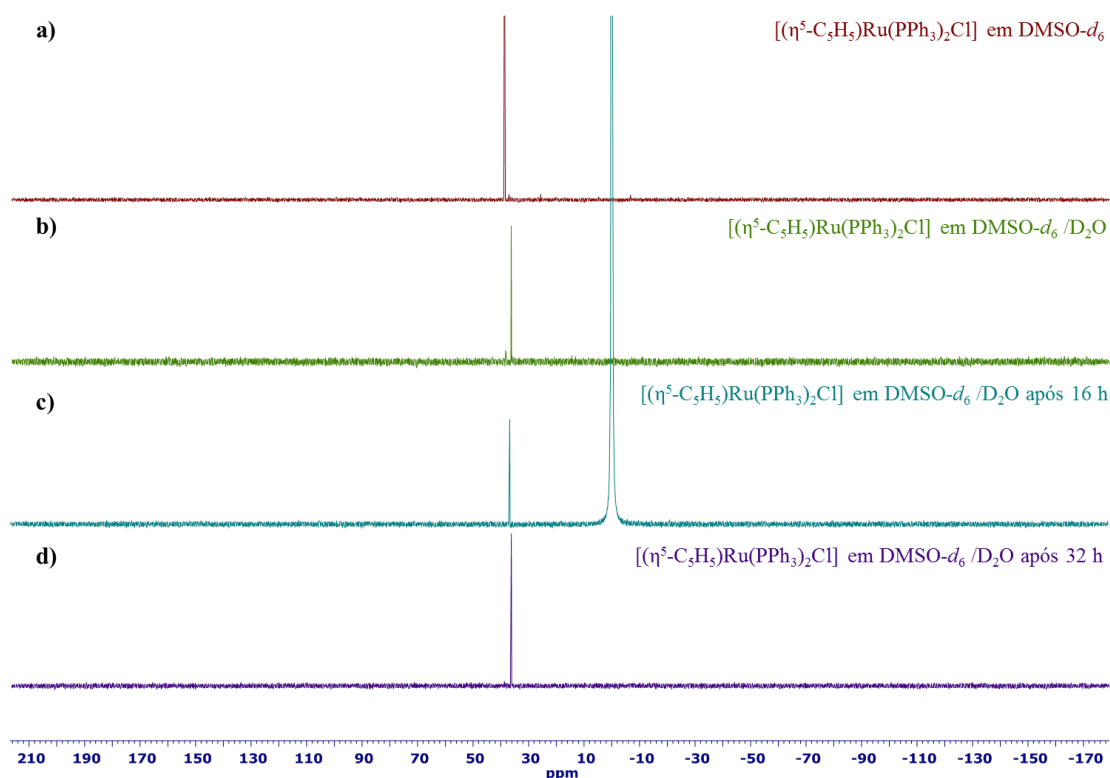


Figura 81 - Espectros de ^{31}P -RMN do complexo $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ a) em DMSO- d_6 , b) numa mistura de DMSO- d_6 /D $_2$ O c) após 16 horas numa mistura de DMSO- d_6 /D $_2$ O (o pico aos - 0,00 ppm corresponde ao sinal do ácido fosfórico, H_3PO_3 , utilizado como referência externa) e d) após 32 horas numa mistura de DMSO- d_6 /D $_2$ O.

No que diz respeito ao espectro de ^{31}P -RMN do complexo $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ em $\text{DMSO-}d_6$, observou-se a presença de um pico localizado a 38,71 ppm referente aos átomos de fósforo dos ligandos de trifenilfosfina coordenados (figura 81a). A adição de água deuterada à solução anterior conduziu à formação imediata de uma suspensão, a qual apresentou um pico de baixa intensidade a 38,26 ppm, atribuído ao composto inicial, e um pico novo de maior intensidade a 36,25 ppm indicativo da decomposição do complexo organometálico (figura 81b). Após 16 horas, verificou-se o desaparecimento da suspensão inicial e a presença de um único pico no espectro de ^{31}P -RMN a 36,78 ppm (figura 81c). Este pico manteve-se na mesma zona do espectro, a 36,21 ppm, ao fim de 32 horas (figura 81d).

O produto resultante da decomposição do complexo organometálico $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ em $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ a aproximadamente a 36 ppm (figuras 81b,c,d), não corresponde à perda dos ligandos PPh_3 uma vez que a ressonância dos átomos de fósforo da PPh_3 descoordenada ocorre a - 6,85 ppm (figura 82).

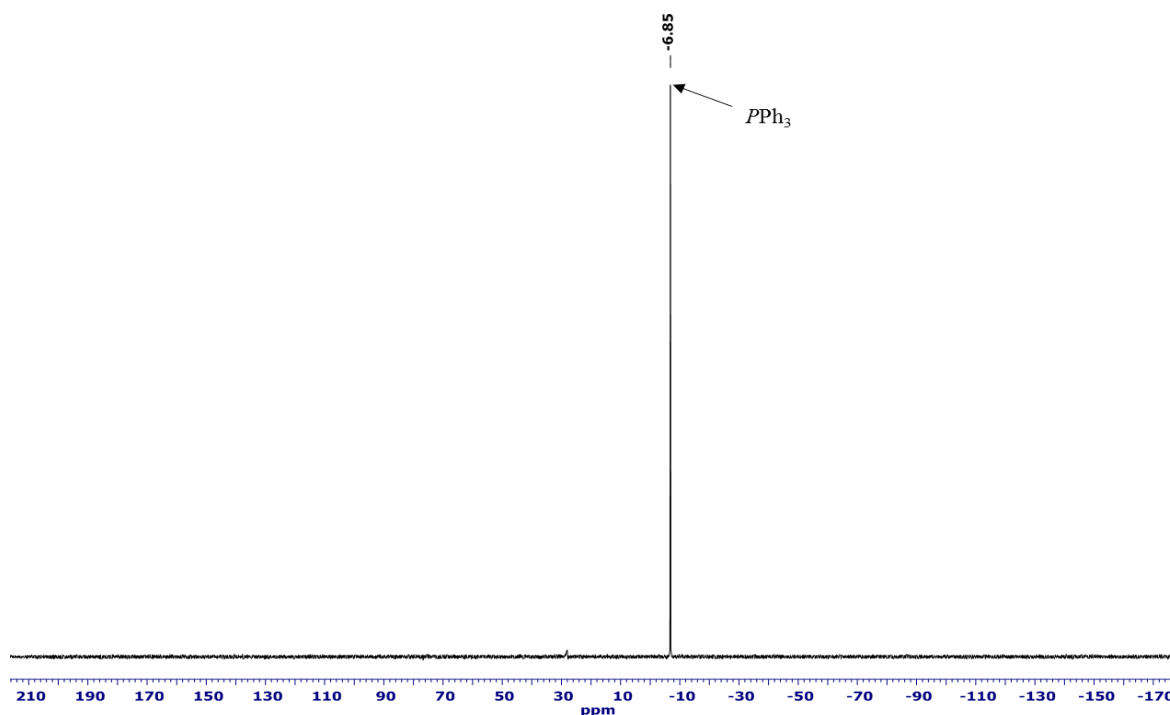


Figura 82 - Espectro de ^{31}P -RMN da trifenilfosfina numa mistura de $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$.

Provavelmente, a decomposição do complexo organometálico $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ é mediada pela substituição do ligando cloro por uma molécula de água ou de DMSO , formando-se assim os complexos $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2(\text{OH}_2)]\text{Cl}$ ou $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2(\text{DMSO})]\text{Cl}$.

Face aos resultados obtidos para o complexo $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ em $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ (figura 81b,c,d), defende-se que o produto resultante da degradação dos metalodendrímeros $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{3}$ ou $\mathbf{6})][\text{PF}_6]_4$ ($\mathbf{11}$ ou $\mathbf{12}$) em $\text{DMSO-}d_6$ (figura 80) poderá corresponder à libertação do fragmento organometálico $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2]^+$, o qual poderá ter sido mediado pela introdução de uma molécula de DMSO ou de H_2O (presente em quantidade residual no solvente DMSO).

De referir que estudos espectroscópicos de $^1\text{H-RMN}$ demonstraram que os complexos de ruténio, com fórmula geral $[(\eta^6\text{-areno})\text{RuCl}_2(\text{L})]$ (onde L = diferentes ligandos *N*-heterocíclicos), quando dissolvidos em DMSO, ocorre a permuta do ligando L com o DMSO (figura 83) [197].

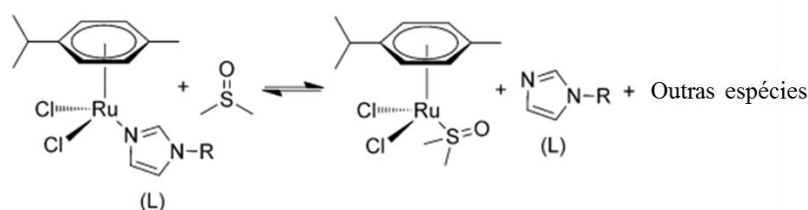


Figura 83 - Esquemática da dissociação do complexo $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{RuCl}_2(\text{L})]$ em DMSO, onde L = diferentes ligandos *N*-heterocíclicos [197].

Dado que os metalodendrímeros em estudo decompõem-se num curto período de tempo, é crítico o estudo do seu mecanismo de degradação e o isolamento e caracterização dos produtos resultantes deste processo visto que estas entidades poderão estar envolvidas na actividade biológica/anticancerígena. Por conseguinte, sugere-se um estudo mais aprofundado do comportamento dos metalodendrímeros $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{3}$ ou $\mathbf{6})]$ e do complexo monometálico de $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ não só nas condições analisadas (100% de $\text{DMSO-}d_6$ e em $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$), bem como em soluções representativas das condições presentes nos fluidos biológicos (*e.g.* diferentes concentrações de NaCl e de valores de pH). Estes estudos irão permitir o conhecimento da(s) identidade(s) que alcança(m) as células e a optimização da reactividade química dos metalodendrímeros em solução.

2.3. Avaliação da actividade biológica *in vitro*

O potencial anticancerígeno dos metalodendrímeros $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{3})][\text{CF}_3\text{SO}_4]$ e $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{6})][\text{CF}_3\text{SO}_4]$ foi avaliado *in vitro* nas linhas cancerígenas humanas Caco-2

(adenocarcinoma colorrectal), CAL-72 (osteossarcoma), MCF-7 (adenocarcinoma da mama), A2780 (carcinoma do ovário) e A2780cisR (carcinoma do ovário, resistente à cisplatina). Para além destas células, estudou-se também a citotoxicidade dos compostos em células saudáveis, nomeadamente em células estaminais mesenquimais humanas (MSCs).

Na determinação do efeito da exposição dos compostos nas linhas celulares referidas, utilizou-se o ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este teste colorimétrico é utilizado frequentemente na determinação da viabilidade celular e baseia-se na redução do sal amarelo de tetrazólio (MTT), pela enzima mitocondrial desidrogenase succínica das células viáveis, em cristais de formazano de cor azul-púrpura (figura 84). Estes cristais são solubilizados (*e.g.* DMSO) e quantificados por espectrofotometria, onde a absorvância registada é directamente proporcional à concentração de formazano produzida e que, por sua vez, é directamente proporcional ao número de células metabolicamente activas [198, 199].

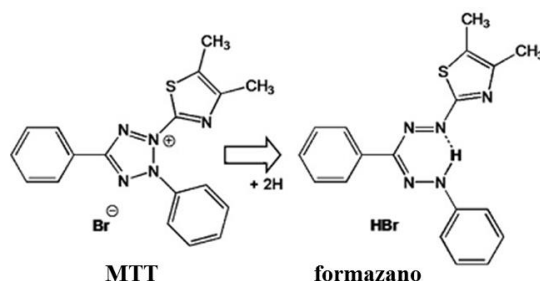


Figura 84 - Representação esquemática da conversão do MTT em formazano (adaptado da referência [200]).

Para fins comparativos, para além da exposição dos metalodendrimeros **7** e **8** determinou-se, também, o efeito da exposição *in vitro* dos dendrimeros **3** e **6**, do complexo monometálico $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$, da trifenilfosfina e da cisplatina na proliferação das linhas celulares anteriormente referidas. Assim, na tabela 4 encontram-se discriminados os compostos testados e as respectivas designações adoptadas nos resultados de citotoxicidade.

Tabela 4 - Fórmula molecular dos compostos testados e respectivas identificações usadas nos ensaios de citotoxicidade. As concentrações testadas para cada composto nos diferentes tipos celulares também se encontram discriminadas (n.d. = não determinado).

Compostos	Designação	Concentrações (µM)	Células
$[N\equiv C(CH_2)_2]_2N(CH_2)_6N[(CH_2)_2C\equiv N]_2$	3	0,05 - 500	Caco-2, CAL-72, MCF-7, A2780, A2780cisR e MSCs
$[N\equiv C(CH_2)_2O(CH_2)_3]_2N(CH_2)_6N[(CH_2)_3O(CH_2)_2C\equiv N]_2$	6	0,05 - 500	Caco-2, CAL-72, MCF-7, A2780, A2780cisR e MSCs
$[(\eta^5-C_5H_5)Ru(PPh_3)_2Cl]$	RuCp	0,05 - 5 e > 5 a n.d.	Caco-2, CAL-72, MCF-7, A2780, A2780cisR e MSCs
PPh_3	PPh_3	0,05 - 500	Caco-2, CAL-72, MCF-7, A2780, A2780cisR e MSCs
$\{[(\eta^5-C_5H_5)(PPh_3)_2Ru]_4(3)\}[CF_3SO_3]_4$	7	0,05 - 50	Caco-2, CAL-72, MCF-7, A2780, A2780cisR e MSCs
$\{[(\eta^5-C_5H_5)(PPh_3)_2Ru]_4(6)\}[CF_3SO_3]_4$	8	0,05 - 50 0,05 - 500	A2780, A2780cisR, MSCs Caco-2, CAL-72, MCF-7
$Cis-[Pt(NH_3)_2Cl_2]$	CisPt	0,05 - 500	A2780, A2780cisR, MSCs

Como apresentado na tabela 4, todos os compostos foram incubados com os diferentes tipos celulares num intervalo de concentrações entre 0,05 a 500 µM ou 0,05 a 50 µM. No entanto, devido à baixa solubilidade do composto monometálico $[(\eta^5-C_5H_5)Ru(PPh_3)_2Cl]$ (RuCp) em DMSO, as concentrações absolutas pretendidas acima de 5 µM não puderam ser exactamente determinadas.

Para além disso, desconhece-se também as concentrações testadas nas células superiores a 5 µM dos metalodendrimeros **7** e **8** uma vez que as soluções em DMSO destes compostos precipitaram em meio de cultura.

Ao fim de 72 horas de exposição contínua dos compostos nas células, fotografou-se primeiramente um poço representativo de cada condição testada com um microscópio de campo claro e, de seguida, realizou-se o ensaio do MTT. As observações registadas no microscópio (figuras II.I a II.XII - anexo II) mostraram a redução drástica do número de células bem como a perda da morfologia característica das células para algumas das condições analisadas (*e.g.* em concentrações superiores a 0,05 µM para os metalodendrimeros **7** e **8**). Além disso, nas situações onde os compostos não se dissolveram na totalidade visualizou-se o composto insolúvel nas imagens recolhidas.

No que concerne ao ensaio do MTT, a partir dos valores de absorvância obtidos determinou-se as percentagens da viabilidade celular em função das respectivas concentrações para os diferentes compostos. De modo a realçar a baixa toxicidade observada para os dendrimeros **3** e **6** na maioria das linhas celulares testadas, agrupou-se as diferentes linhas celulares em função da exposição de cada um destes compostos (figura 85).

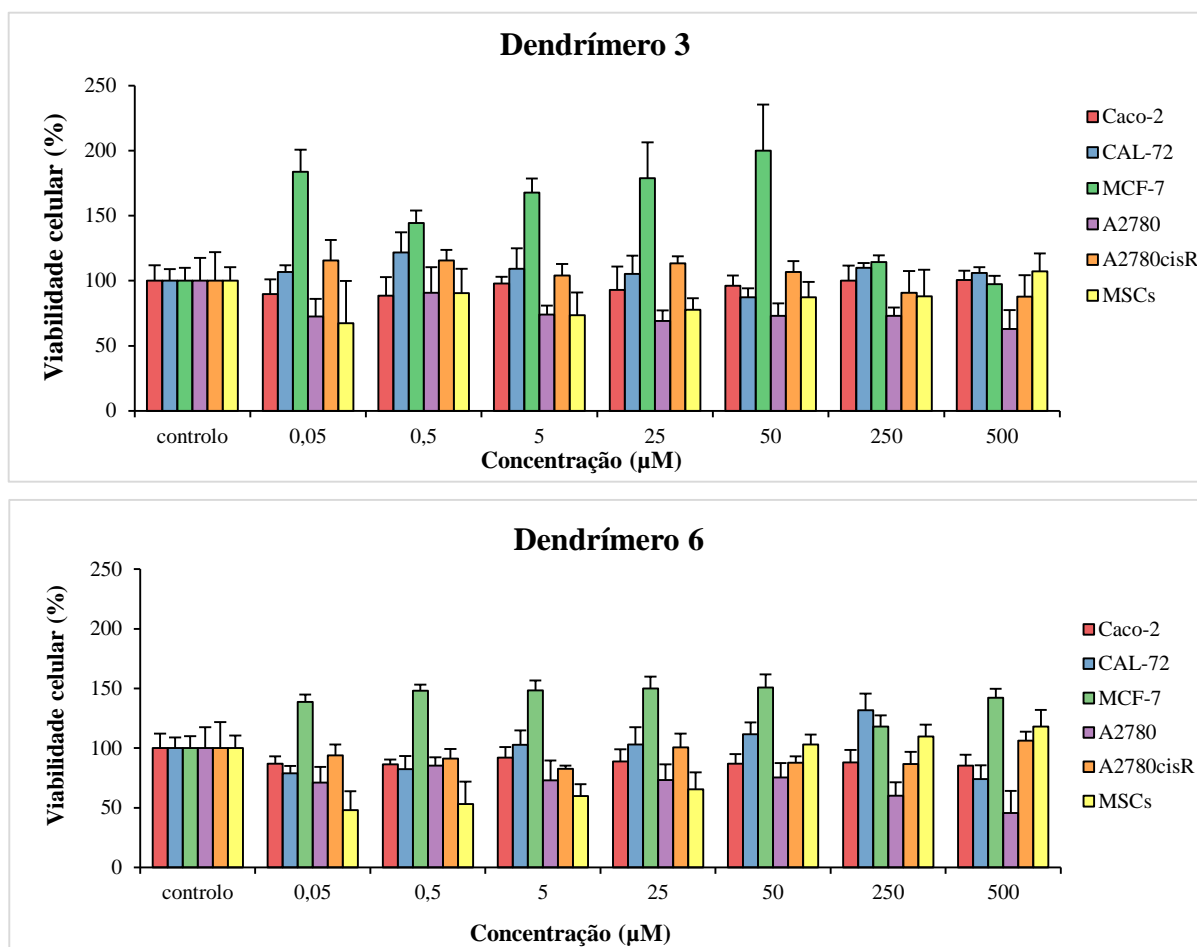
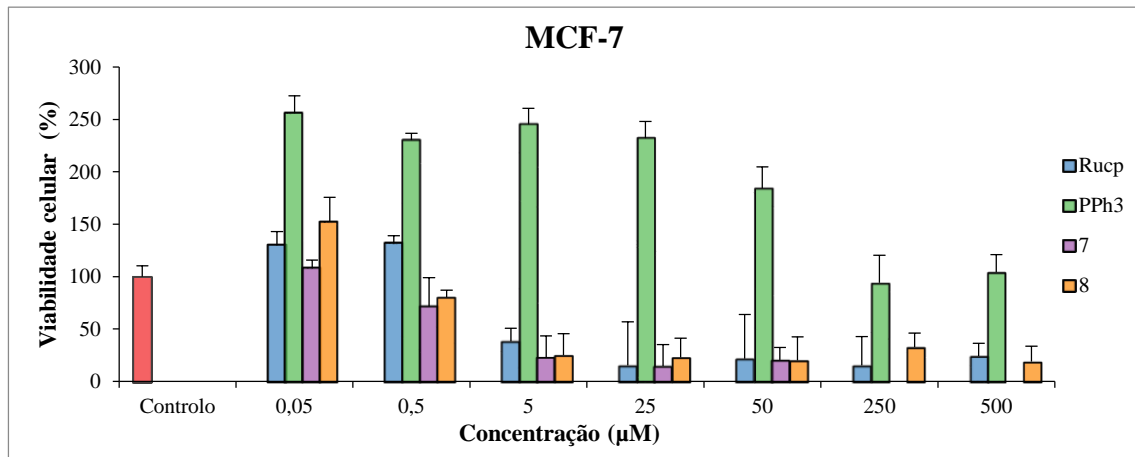
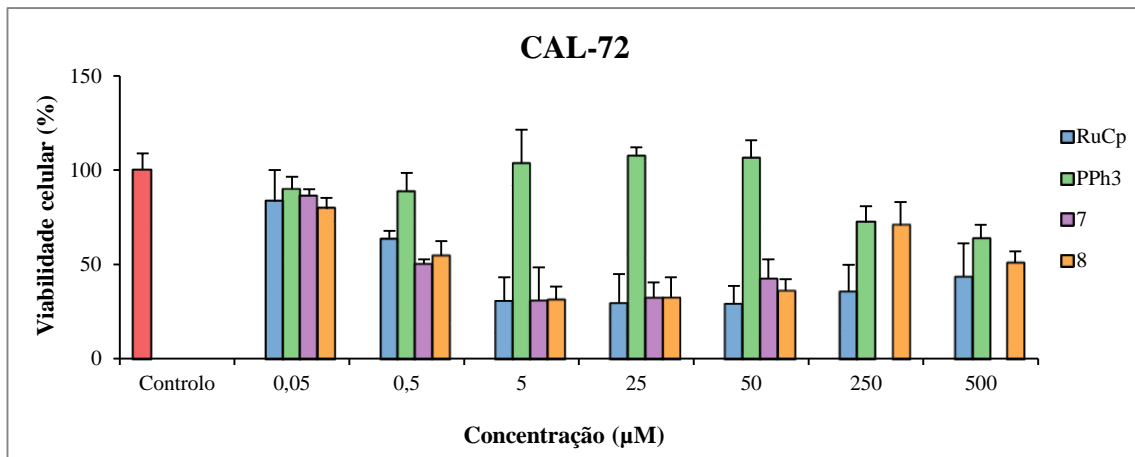
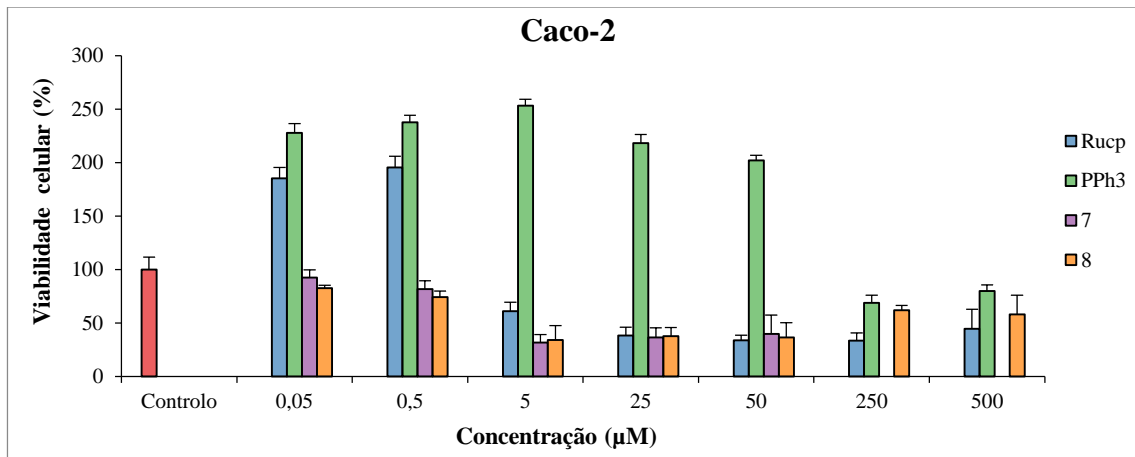


Figura 85 - Representação gráfica do efeito dos dendrímeros **3** e **6** sobre a viabilidade das linhas celulares Caco-2, CAL-72, MCF-7, A2780, A2780cisR e das MSCs, onde o controlo corresponde às células em meio de cultura completo com 0,5% de DMSO. Cada coluna representa a média de seis replicatas de um ensaio independente e a barra de erro corresponde ao desvio padrão relativo respectivo.

Por outro lado, de modo a visualizar em simultâneo, o possível efeito anticancerígeno do RuCp, da PPh₃, da CisPt e dos metalodendrímeros **7** e **8**, optou-se por agrupar os referidos compostos por linha celular avaliada (figura 86).



(continuação na página seguinte)

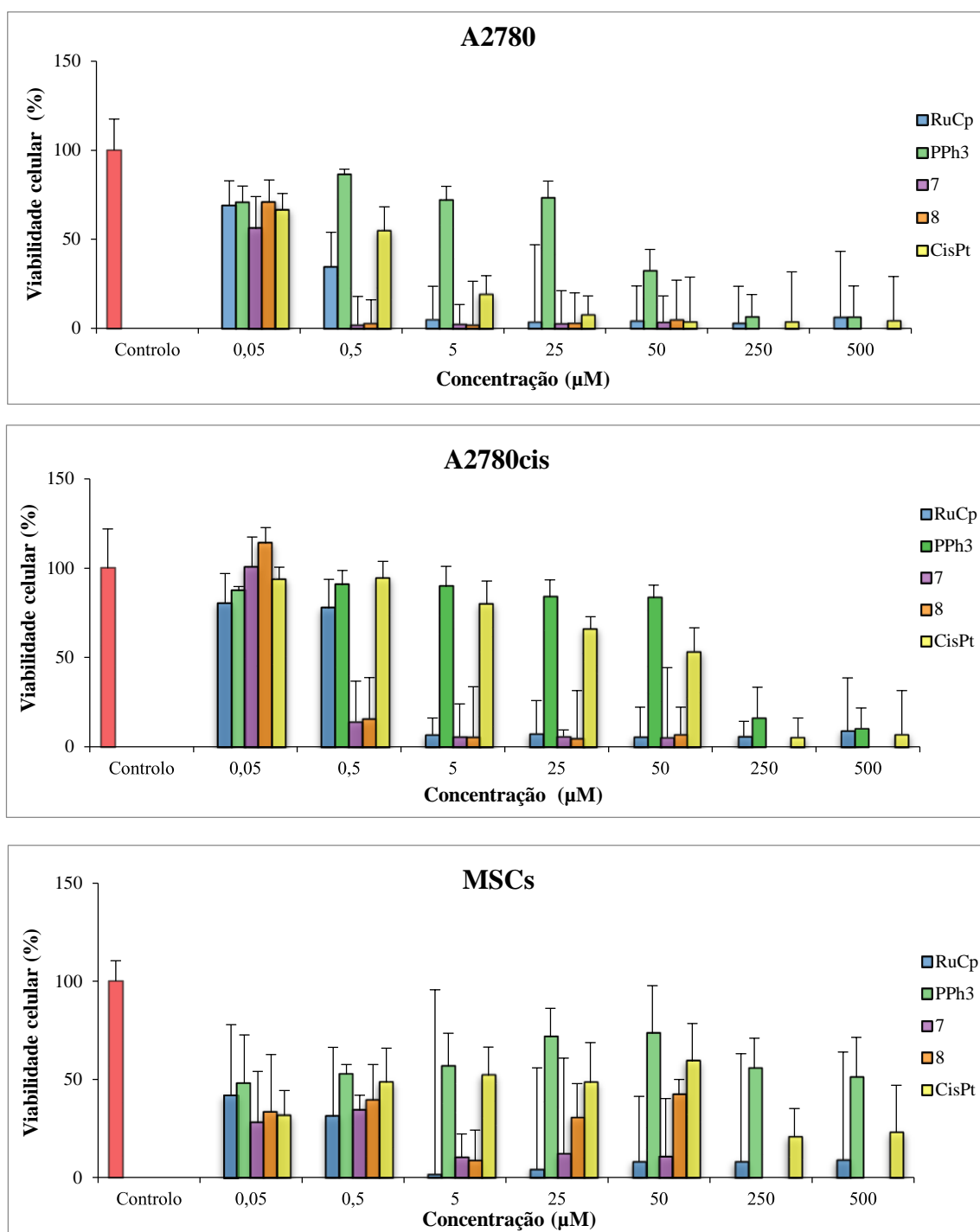


Figura 86 - Representação gráfica da acção dos compostos RuCp, PPh₃, dos metalodendrimeros **7** e **8** e da CisPt na viabilidade das linhas celulares Caco-2, Cal-72, MCF-7, A2780, A2780cisR e nas MSCs. O controlo corresponde as células em meio de cultura completo com 0,5% de DMSO e cada coluna representa a média de seis réplicas com a barra de erro a corresponder ao desvio padrão relativo. As concentrações $\geq 25 \mu\text{M}$ do composto RuCp e dos metalodendrimeros **7** e **8** são desconhecidas.

Os gráficos ilustrados na figura 86 apresentam valores de desvio padrão relativo acentuados, indicando que há uma variabilidade significativa entre as replicatas realizadas. Este fenómeno é principalmente visível nas células A2780, A2780cisR e nas MSCs. Deste modo, sugere-se que a discrepância verificada poderá estar associada a algum problema de carácter experimental (*e.g.* distribuição variável do número de células por poço). Em função dos dados apresentados, propõe-se a repetição destes ensaios de forma a se obter dados mais consistentes entre replicatas.

Dado que também se observaram valores de absorvância inferiores a 0,75 nos poços com apenas células e meio de cultura completo (controlo do crescimento celular) e, sendo o intervalo de absorvância recomendado de 0,72 a 1,25 [201, 202], propõe-se também o aumento do número de células semeadas.

Para além disso, um outro aspecto a destacar são as percentagens de viabilidade celular superiores a 100% (figuras 85 e 86). Este fenómeno está normalmente associado a mecanismos de defesa celular que ocorrem quando as células são expostas a baixas concentrações de substâncias tóxicas. Sabe-se que estes mecanismos poderão envolver um aumento da actividade enzimática/metabólica das células resultando numa redução do MTT superior. Este aumento da actividade enzimática contribui para o aumento da absorvância registada provocando percentagens de viabilidade celular superior em relação ao controlo sem qualquer tipo de composto [203].

Todavia, a partir dos gráficos da viabilidade celular estimou-se para os compostos testados a concentração requerida para inibir 50% da viabilidade celular (IC₅₀) contra os diversos tipos de células analisadas, onde os resultados encontram-se sumarizados na tabela 5.

Tabela 5 - Valores de IC₅₀ (em µM) dos dendrímeros **3** e **6**, do complexo monometálico RuCp, da PPh₃, dos metalodendrímeros **7** e **8** e da cisplatina nas linhas celulares Caco-2, CAL-72, MCF-7, A2780, A2780cisR e nas MSCs após 72 horas de exposição (n.d. = não detectado dentro do intervalo de concentrações testado).

Compostos	Caco-2		CAL-72		MCF-7		A2780		A2780cisR		MSCs	
	IC ₅₀ por molécula	IC ₅₀ por centro metálico	IC ₅₀ por molécula	IC ₅₀ por centro metálico	IC ₅₀ por molécula	IC ₅₀ por centro metálico	IC ₅₀ por molécula	IC ₅₀ por centro metálico	IC ₅₀ por molécula	IC ₅₀ por centro metálico	IC ₅₀ por molécula	IC ₅₀ por centro metálico
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	423,1	-	n.d.	n.d.	0,2	-
RuCp	14,7	14,7	2,4	2,4	4,4	4,4	0,3	0,3	2,3	2,3	n.d.	n.d.
PPh₃	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	39,2	-	149,2	-	0,2	-
7	3,4	13,6	0,6	2,4	2,5	10,0	0,1	0,4	0,3	1,2	n.d.	n.d.
8	3,2	12,8	1,4	5,6	3,0	12,0	0,2	0,8	0,3	1,2	n.d.	n.d.
CisPt	8,9*	8,9*	-	-	13**	13**	1,1	1,1	63,3	63,3	2,5	2,5

* reportado no artigo [204]; ** reportado no artigo [205].

Note-se que para alguns compostos não foi possível determinar o IC₅₀ uma vez que, no intervalo de concentrações de trabalho, a percentagem de viabilidade celular não atingiu ou foi sempre superior a 50%.

De acordo com os resultados obtidos (figura 85 e tabela 5), observou-se que os dendrímeros **3** e **6** apresentaram uma baixa actividade citotóxica na maioria das linhas celulares estudadas. Apenas o dendrímero **6** apresentou valores de IC₅₀, nomeadamente 423,1 e 0,2 µM nas células A2780 e nas MSCs, respectivamente.

No que diz respeito aos ensaios com o complexo organometálico [(η⁵-C₅H₅)Ru(PPh₃)₂Cl], verificou-se que este composto exibiu uma acção inibitória significativa no crescimento de todas as células testadas, tendo apresentando uma maior citotoxicidade nas MSCs, figura 86 e tabela 5. Comparativamente aos resultados da cisplatina, evidenciou-se que, à excepção das células Caco-2, o complexo monometálico de ruténio (RuCp) apresentou uma actividade antiproliferativa superior.

Relativamente ao perfil citotóxico da trifenilfosfina (PPh₃), constatou-se que, dentro da gama de concentrações de trabalho, este composto apresentou um potencial citotóxico reduzido nas linhas celulares Caco-2, CAL-72 e MCF-7. Para as restantes linhas celulares, verificou-se que a trifenilfosfina exibiu um efeito citotóxico moderado nas células A2780 (IC₅₀ = 39,2 µM) e A2780cisR (IC₅₀ = 49,2 µM) e uma elevada citotoxicidade nas MSCs (IC₅₀ = 0,2 µM). De notar que o complexo [(η⁵-C₅H₅)Ru(PPh₃)₂Cl] mostrou uma actividade inibitória da proliferação das células muito superior à da PPh₃.

No caso dos metalodendrímeros **7** e **8**, evidenciou-se que a citotoxicidade por molécula nestes compostos foi superior à do fragmento monometálico [(η⁵-C₅H₅)Ru(PPh₃)₂Cl] (RuCp, tabela 5). Estes metalodendrímeros revelaram perfis de citotoxicidade muito similares, com uma forte actividade citotóxica contra o painel de células estudado comparativamente ao efeito inibitório da cisplatina. Contudo, as células menos afectadas pela actividade dos metalodendrímeros estudados foram as Caco-2 e as MCF-7, com valores de IC₅₀ de 2,5 a 3,4 µM, respectivamente. As MSCs foram as mais afectadas por estes compostos com uma percentagem de viabilidade celular inferior a 35% para a concentração mais baixa testada (0,05 µM), seguido das linhas celulares provenientes do cancro dos ovários (A2780 e A2780 cis) com valores de IC₅₀ situados entre 0,1 a 0,3 µM, inclusive.

Em termos de citotoxicidade por centro metálico, observou-se que os metalodendrímeros **7** e **8** apresentaram um potencial inibitório superior à do complexo [(η⁵-C₅H₅)Ru(PPh₃)₂Cl] (RuCp) para as células Caco-2 e A2780cisR. Em comparação com a cisplatina, os metalodendrímeros exibiram uma toxicidade por centro metálico superior nas células MCF-7, A2780, A2780cisR e nas MSCs, sendo que não foi possível estabelecer esta comparação para a linha celular CAL-72, uma vez que a

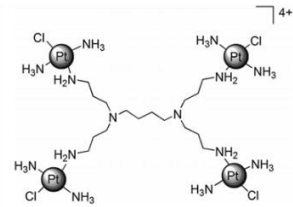
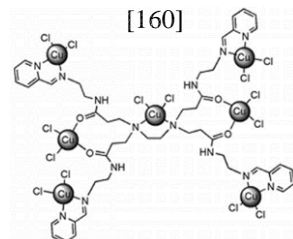
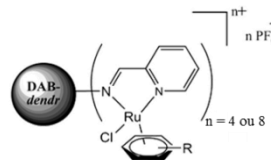
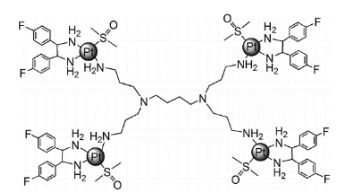
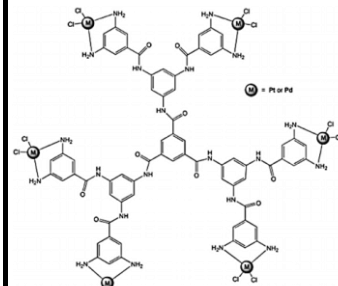
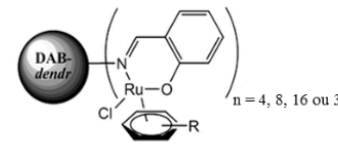
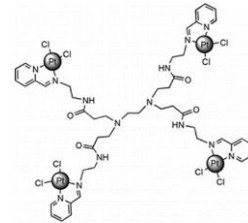
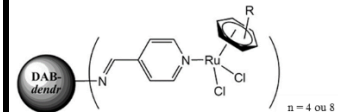
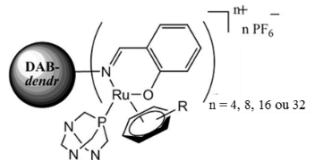
citotoxicidade da cisplatina para estas células ainda não foi determinada e não se encontra reportada na literatura consultada.

Em suma, os metalodendrimeros **7** e **8** preparados demonstraram um potencial citotóxico promissor, o qual foi superior ao registado para as estruturas dendríticas dos compostos **3** e **6** e para o complexo $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$. No entanto, com a excepção do dendrimer **3**, todos os restantes compostos testados inibiram significativamente o crescimento das células estaminais mesenquimais (MSCs). Por conseguinte, torna-se imprescindível a optimização da estrutura dos metalodendrimeros para os direccionar selectivamente para as células cancerígenas.

Para além disso, na repetição dos ensaios sugere-se a selecção de um intervalo de concentrações mais próximo dos valores de IC_{50} registados com vista a obtenção de uma melhor relação entre o crescimento celular em função do aumento da concentração, permitindo assim uma melhor compreensão dos dados e a determinação mais precisa do valor de IC_{50} .

Relativamente à actividade citotóxica dos metalodendrimeros reportados na literatura [106, 158, 159, 167-169, 206, 207], os valores de IC_{50} de alguns compostos são mencionados na tabela 6.

Tabela 6 - Valores de IC₅₀ (μM) reportados na literatura para diversos metalodendrímeros em diferentes linhas celulares.

Metalodendrímeros [ref]	Linha celular	IC ₅₀ (μM)	Metalodendrímeros [ref]	Linha celular	IC ₅₀ (μM)	Metalodendrímeros [ref]	Linha celular	IC ₅₀ (μM)
DAB(PA- <i>trans</i> -Pt-Cl) ₄ [168] 	L1210/0	12,4	Poli(amidoamina) de cobre [160] 	MOLT-4	11,1	Poli(propilenoimina) com complexos quelantes de <i>N,N</i> -rutênio(II)-areno [106] 	A2780	> 32 (n = 4)
	L1210/2	9,3		MCF-7	10,2		A2780cisR	> 4 (n = 8)
<i>m</i> -4F-(PtDMSO) ₄ DAB(PA) ₄ [206] 	MCF-7	5	Poliamida de platina (II) e paládio (II) [167, 169] 	MCF-7	≥ 30	Poli(propilenoimina) com complexos quelantes de <i>N,O</i> -rutênio(II)-areno [159] 	A2780	> 25 (n = 4)
							A2780cisR	> 1,6 (n > 4)
Poli(amidoamina) de platina [160] 	MOLT-4	≥ 100	Poli(propilenoimina) com complexos monodentados de rutênio(II)-areno[158] 	A2780	> 40 (n = 4)	Poli(propilenoimina) com complexos quelantes de <i>N,O</i> -rutênio(II)-areno-PTA[159] 	A2780	> 8,9 (n = 4)
	MCF-7	≈ inerte			> 20 (n = 8)		A2780cisR	> 0,8 (n > 4)

Conforme os dados apresentados na tabela 6, é possível verificar que os metalodendrimeros preparados no corrente trabalho, demonstraram valores de IC_{50} inferiores relativamente a outros compostos similares independentemente da geração. De salientar que os valores de IC_{50} obtidos para os metalodendrimeros **7** e **8** são mais baixos do que os valores reportados para compostos semelhantes de gerações superiores.

No entanto, é de frisar que esta comparação não pode ser efectuada de forma directa uma vez que existem diversos parâmetros que contribuem para a variabilidade de resultados entre trabalhos experimentais (*e.g.* diferenças no número de células semeadas, tempo de exposição dos compostos, tipo e condições do ensaio de citotoxicidade utilizado). Recomenda-se deste modo, uma futura avaliação dos diversos metalodendrimeros sob condições semelhantes de forma a se compreender o seu verdadeiro potencial.

Capítulo 3 – Conclusões e perspectivas futuras

Capítulo 3 – Conclusões e perspectivas futuras

No presente trabalho, ensaiou-se a incorporação de complexos organometálicos de ruténio (II) na periferia dos dendrímeros de poli(alquilideno imina) com terminais nitrilo. Na preparação destes metalodendrímeros utilizaram-se os dendrímeros $[N\equiv C(CH_2)_2]_2N(CH_2)_6N[(CH_2)_2C\equiv N]_2$ (**3**) e $[N\equiv C(CH_2)_2O(CH_2)_3]_2N(CH_2)_6N[(CH_2)_3O(CH_2)_2C\equiv N]_2$ (**6**) e os complexos organometálicos $[(\eta^5-C_5H_5)Ru(PPh_3)_2Cl]$ e o $[(\eta^6-p\text{-cimeno})Ru(en)Cl][PF_6]$.

Da reacção dos dendrímeros **3** e **6** com o $[(\eta^5-C_5H_5)Ru(PPh_3)_2Cl]$, na presença do $AgCF_3SO_3$, obteve-se os metalodendrímeros $\{[(\eta^5-C_5H_5)(PPh_3)_2Ru]_4\} [CF_3SO_3]_4$ (**7**) e $\{[(\eta^5-C_5H_5)(PPh_3)_2Ru]_4\} [CF_3SO_3]_4$ (**8**). De acordo com os dados obtidos da espectroscopia de RMN (1H , ^{31}P , ^{19}F) e de infravermelho, da espectrometria de massa e da análise elementar, constatou-se a funcionalização completa dos dendrímeros **3** e **6** com fragmentos de Ru(II).

No entanto, os metalodendrímeros **7** e **8** foram obtidos com baixos rendimentos, nomeadamente 35 e 25%, respectivamente. Provavelmente, tais rendimentos deveram-se aos processos de purificação utilizados (extracção e precipitação), pois na presença de diclorometano os compostos apresentam uma estabilidade reduzida. Deste modo, sugere-se o aperfeiçoamento dos métodos de purificação de forma a aumentar os rendimentos finais. Para o efeito, algumas sugestões passam por a) adaptar determinados parâmetros reaccionais (*e.g.* colocar primeiramente o complexo de ruténio a agitar com o abstractor de cloreto e depois adicionar o dendrímero gota-a-gota); e b) estudar outros sistemas de solventes para extrair e precipitar o composto.

No caso da reacção do dendrímero **3** com o complexo $[(\eta^6-p\text{-cimeno})Ru(en)Cl][PF_6]$, segundo o RMN, o FT-IR e a espectrometria de massa, ocorreu a funcionalização de apenas um dos braços do dendrímero. A funcionalização do dendrímero **6** com o complexo $[(\eta^6-p\text{-cimeno})Ru(en)Cl][PF_6]$ também não foi alcançada, a qual foi confirmada por RMN e FT-IR.

Nos estudos de estabilidade do complexo $[(\eta^5-C_5H_5)Ru(PPh_3)_2Cl]$, observou-se que este complexo decompõe-se em $DMSO-d_6/D_2O$, onde o produto resultante propõe-se que seja um dos seguintes complexos $[(\eta^5-C_5H_5)Ru(PPh_3)_2(OH_2)]Cl$ / $[(\eta^5-C_5H_5)Ru(PPh_3)_2(DMSO)]Cl$. Para além disso, especula-se que uma destas espécies corresponda ao produto resultante da degradação dos metalodendrímeros $\{[(\eta^5-C_5H_5)(PPh_3)_2Ru]_4\}$ (**3** ou **6**) em $DMSO-d_6$. Todavia, mais estudos são requeridos para isolar e caracterizar os compostos resultantes da decomposição destes metalodendrímeros. Por essa razão, propõe-se um estudo mais detalhado das propriedades físico-químicas destes compostos em condições fisiológicas de forma a se compreender a sua reactividade química e estabelecer uma relação entre a estrutura química e a actividade biológica.

Nos ensaios biológicos *in vitro*, observou-se que os metalodendrímeros **7** e **8** apresentaram uma citotoxicidade por molécula significativa nas linhas celulares cancerígenas Caco-2, CAL-72, MCF-7, A2780, A2780cisR, com valores de IC₅₀ compreendidos entre 0,1 e 3,4 µM. Estes valores foram superiores aos registados para os dendrímeros **3** e **6** e para os complexos $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ e *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ (cisplatina). Em termos da citotoxicidade por centro metálico, os metalodendrímeros foram mais citotóxicos do que o complexo $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ para as células Caco-2 e A2780cisR do que a cisplatina para as células MCF-7, A2780, A2780cisR e nas MSCs.

Deste modo, verificou-se que os metalodendrímeros **7** e **8** apresentaram valores de IC₅₀ mais baixos, o que poderá ser indicativo de um potencial anticancerígeno superior quando comparado com outras drogas convencionais (*e.g.* cisplatina).

De uma forma geral, os estudos preliminares de citotoxicidade apresentaram resultados satisfatórios, no entanto, diversos aspectos deverão ser tidos em consideração futuramente:

i. a variabilidade acentuada entre as réplicas para algumas situações, resultou em desvios padrão relativos acentuados. É assim recomendado o aprimoramento de alguns parâmetros experimentais de forma a se obter resultados mais consistentes;

ii. as células estaminais mesenquimais humanas (MSCs) foram as mais afectadas pelos metalodendrímeros **7** e **8**, pelo que é importante investigar formas de aumentar a selectividade destes compostos para as células cancerígenas. Tal estratégia poderá passar por:

- utilizar fragmentos organometálicos de ruténio com ligandos que interajam com proteínas exclusivas das células cancerígenas ou que actuem exclusivamente nas principais vias de sinalização do desenvolvimento do cancro;
- modificar e aplicar os compostos na forma inerte para que sejam apenas activados nos tumores;
- determinar para estes metalodendrímeros as entidades químicas associadas ao seu efeito citotóxico e explorar formas de atingir uma activação selectiva dos agentes bioactivos nas células alvo;
- explorar uma possível acumulação preferencial nos tumores através do efeito *EPR*.
- maximizar a solubilidade dos metalodendrímeros **7** e **8** em água explorando a utilização de diferentes contra-íões.

Para além da importância dos pontos anteriores, uma análise mais completa da citotoxicidade destes metalodendrímeros é requerida, de modo a conhecer e compreender a sua captação e distribuição celular; alvos de acção e os mecanismos de acção. De forma a se atingir conclusões mais concretas relativamente a estas questões, sugere-se:

i. o estudo dos mecanismos de internalização celular e o possível efeito sobre as vias metabólicas. Desta forma, a monitorização do percurso e o destino biológico são elementos importantes de modo a identificar os possíveis mecanismos de acção destes metalodendrimeros;

ii. a identificação e quantificação das interacções com biomoléculas relevantes (*e.g.* ADN, albumina, transferrina); torna-se assim importante a investigação dos genes que são silenciados ou activados na presença do fármaco e o respectivo efeito sobre a sobrevivência e proliferação celular;

iii. uma análise conjunta de diversos ensaios bioquímicos que permitam elucidar o efeito dos metalodendrimeros sobre a proteómica e mecanismos de morte celular (*i.e.* apoptose vs necrose). Tais estudos poderão fornecer informações importantes relativamente ao efeito dos metalodendrimeros sobre proteínas intervenientes em processos biológicos chave e assim elucidar possíveis mecanismos de acção (*e.g.* identificar possíveis mecanismos de resistência e citotoxicidade).

A elucidação do alvo ou alvos de acção dos fármacos, o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos nesta actividade bem como o estabelecimento de uma relação entre a estrutura e a sua acção definem-se como elementos importantes a considerar para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes. Torna-se claro que a descoberta de tais parâmetros poderá conduzir ao desenvolvimento de fármacos mais específicos e selectivos para o cancro, minimizando assim os possíveis efeitos secundários e permitindo uma possível previsão dos mecanismos de resistência celular que se possam vir a manifestar.

Assim sendo, avista-se um longo mas promissor caminho para a optimização da estrutura dos metalodendrimeros assim como na investigação das suas propriedades farmacológicas para o combate ao cancro.

Capítulo 4 – Componente experimental

Capítulo 4 – Componente experimental

4.1. Solventes e reagentes

À excepção da preparação do composto $[\text{N}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{N}]_2$, todas as reacções foram efectuadas sob atmosfera inerte, recorrendo a técnicas de Schlenk usuais [208, 209].

Para as reacções e purificações executadas sob atmosfera inerte, os solventes foram sujeitos a agentes de secagem ou desarejados sob fluxo de azoto (tabela 7). É de referir que o sistema de purificação de solventes mBRAUN MB SPS-800 também foi utilizado na secagem do diclorometano, do éter etílico e do tetrahidrofurano.

Tabela 7 - Processos de secagem ou desarejamento dos solventes utilizados.

Solvente	Pré-secagem	Refluxo	Outro
Metanol	CaH ₂	Destilação	-
Éter etílico	Fio de sódio	Fio de sódio/Benzofenona	mBRAUN MB SPS-800
Diclorometano	CaH ₂	CaH ₂	mBRAUN MB SPS-800
Tetrahidrofurano	CaH ₂	Fio de sódio/Benzofenona	mBRAUN MB SPS-800
Acetonitrilo			Desarajamento com N ₂
Etanol	-	-	Desarajamento com N ₂
Éter Petróleo	-	-	mBRAUN MB SPS-800 ou Desarajamento com N ₂
Benzeno	-	-	Desarajamento com N ₂

Os reagentes foram adquiridos à Acros Organics ($[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{RuCl}_2]_2$, NaPF₆, NH₄PF₆, LiAlH₄, H₂C=CHCN e o AgCF₃SO₃), à Fisher Scientific (NaOH e o HCl), à Lab-Scan (CH₃CN) e à Merck-Schuchardt (NH₂CH₂CH₂NH₂). Apenas o NaPF₆ e a NH₂CH₂CH₂NH₂ foram previamente purificados, respectivamente, por recristalização em acetonitrilo e por destilação.

4.2. Equipamentos

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{31}P e ^{19}F foram obtidos num espectrómetro Bruker Avance II⁺ 400 a 299 ± 5 K (temperatura da sonda). O desvio químico foi reportado em partes por milhão (ppm), utilizando como referência interna os sinais dos solventes residuais para o próton (CDCl_3 : ^1H δ 7,26; $\text{DMSO}-d_6$: ^1H δ 2,50 ppm). Nos espectros de RMN de ^{31}P e ^{19}F utilizaram-se respectivamente soluções aquosas de H_3PO_4 a 85% e de KF a 0,5 M como referências externas.

Os espectros de infravermelho foram obtidos nos espectrómetros Nicolet Avatar 360 ou Bruker Alfa em pastilhas de KBr , sendo que apenas as bandas significativas são referidas ao longo do texto.

Os espectros de massa (TOF-MS) foram registados num espectrómetro Micro-mass LCT na Universidade de Jyväskylä, Finlândia, pela técnica Mirja Lahtiperä.

As análises elementares foram realizadas com o equipamento Variol El da Elementar na Universidade de Jyväskylä, Finlândia.

4.3. Sínteses

Os procedimentos adoptados na preparação dos compostos em estudo encontram-se subdivididos em três categorias, a saber: síntese dos compostos organometálicos, síntese dos dendrímeros e síntese dos metalodendrímeros.

4.3.1. Síntese dos compostos organometálicos

4.3.1.1. Síntese do $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (**1**)

Primeiramente, dissolveu-se o dímero $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{RuCl}_2]_2$ (0,52 g, 0,85 mmol, 1 eq) em 77 mL de metanol desarejado. Seguidamente, adicionou-se a etilenodiamina (0,18 mL, 2,69 mmol, 3,2 eq) verificando-se a alteração da cor da solução de vermelho para laranja. Deixou-se a mistura reaccional sob agitação, protegida da luz e à temperatura ambiente durante 5 horas. Filtrou-se a solução e adicionou-se o NaPF_6 (0,31 g, 1,82 mmol, 2,1 eq). Concentrou-se a solução, adicionou-se éter etílico e colocou-se em repouso a -20°C , ocorrendo a formação de cristais laranja. Recolheu-se o produto e lavou-se várias vezes com éter etílico. Obteve-se cerca de 0,40 g (50% de rendimento) de composto **1**.

Caracterização

^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 6,12 (br., 2H), 5,59 (d, $J_{\text{H,H}} = 6$ Hz, 2H), 5,43 (d, $J_{\text{H,H}} = 6$ Hz, 2H), 4,14 (br., 2H), 2,82 (sept., 1H), 2,33 (br., 2H), 2,22 (br., 2H), 2,15 (s, 3H) e 1,21 (d, $J_{\text{H,H}} = 6,8$ Hz, 6H) ppm.

4.3.1.2. Síntese do $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{NCCH}_3)_2\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (**2a**)

Inicialmente preparou-se uma suspensão do dímero $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{RuCl}_2]_2$ (0,35 g, 0,57 mmol, 1 eq) e NH_4PF_6 (0,20 g, 1,22 mmol, 2,1 eq) em 9 mL de acetonitrilo desarejado. Deixou-se a mistura resultante sob agitação e à temperatura ambiente durante 50 horas. Ao fim desse tempo, filtrou-se a solução laranja para remover o sal de NH_4Cl formado na reacção e evaporou-se o solvente sob vácuo, obtendo-se um óleo laranja. Este foi arrefecido a -20°C em éter e “triturado”, obtendo-se um sólido pulverulento de cor laranja. Removeu-se o solvente e lavou-se o resíduo repetidas vezes com éter etílico. Dado que o espectro de ^1H -RMN do produto resultante apresentava uma mistura de compostos, nomeadamente o complexo de ruténio de partida e o composto pretendido, optou-se por proceder ao seu isolamento através da precipitação em diclorometano e éter. No entanto, o composto precipitado correspondeu maioritariamente ao dímero $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{RuCl}_2]_2$.

4.3.1.3. Síntese do $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{dppe})\text{Cl}][\text{Cl}]$ (**2b**)

Esta síntese foi efectuada de acordo com o trabalho descrito por Daguinet e Dyson [182]. Adicionou-se a suspensão de $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{RuCl}_2]_2$ (0,20 g, 0,33 mmol, 1 eq) em 60 mL de etanol à suspensão de 1,2-bis(difenilfosfino)etano (dppe, 0,54 g, 1,36 mmol, 4,2 eq) em 60 mL de etanol. Colocou-se a suspensão resultante de cor laranja sob refluxo (82°C) durante 17 horas. No tratamento do produto bruto, inicialmente colocou-se a mistura reaccional a -20°C para precipitar o composto secundário $[\text{Ru}(\text{dppe})_2\text{Cl}_2]$, no entanto apenas uma quantidade reduzida de composto amarelo precipitou. Seguidamente, filtrou-se a solução e concentrou-se até ocorrer a precipitação de mais composto amarelo e do excesso de fosfina. Filtrou-se novamente a solução, removeu-se o solvente e lavou-se o sólido repetidas vezes com éter etílico. Dado que o espectro de ^1H -RMN do composto obtido encontrava-se impuro optou-se por cristalizar o composto em diclorometano/éter petróleo, -20°C . Obteve-se uma pequena quantidade de cristais laranja, os quais foram lavados com éter etílico e secos sob vácuo. Este produto foi caracterizado por ^1H -RMN indicando ser o complexo **2b**.

Caracterização:

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,8 - 7,2$ (m, 20H, Ph), 6,22 (d, $J_{\text{H,H}} = 6,0$ Hz, 2H), 6,08 (d, $J_{\text{H,H}} = 6,0$ Hz, 2H), 2,96 (m, 2H), 2,49 (m, 2H), 2,37 (sept, 1H), 1,22 (s, 3H), 0,83 (d, $J_{\text{H,H}} = 6,8$ Hz, 2H) ppm. ^{31}P -RMN (161 MHz, CDCl_3): $\delta = 70,91$ (s) ppm.

4.3.2. Síntese dos dendrímeros

4.3.2.1. Síntese do $[\text{OH}(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{OH}]_2$ (**5**)

A uma suspensão de LiAlH_4 (1,02 g, 26,96 mmol, 4,8 eq) em THF (20 mL) adicionou-se, a 0°C e gota a gota, o composto $[\text{OtBu}(\text{C}=\text{O})(\text{CH}_2)_2]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_2(\text{C}=\text{O})\text{OtBu}]_2$ (**4**) (3,54 g, 5,63 mmol, 1 eq) dissolvido em THF (16 mL). Deixou-se a mistura resultante sob agitação e a 0°C , durante 1 hora. Seguidamente, colocou-se a mistura anterior à temperatura ambiente, durante 20 horas. Arrefeceu-se a mistura até aos 0°C e adicionou-se, gota a gota, água fria até à obtenção de um sólido branco. Após filtrar a solução através de celite, evaporou-se o solvente sob vácuo, obtendo-se 0,94 g de um óleo incolor (48% de rendimento). A caracterização deste composto por ^1H -RMN indicou ser o composto **5**.

Caracterização

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 3,71$ (t, 8H), 2,59 (t, 8H), 2,40 (t, 4H), 1,70 (m, 8H), 1,49 (br, 4H) e 1,31 (br, 4H).

4.3.2.2. Síntese do $[\text{N}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_3]_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}\equiv\text{N}]_2$ (**6**)

À mistura do composto **5** (0,72 g, 2,03 mmol, 1 eq) com 0,08 mL NaOH (40%) em 2,5 mL de 1,4-dioxano, adicionou-se o acrilonitrilo (0,68 mL, 10,38 mmol, 5,1 eq). Colocou-se a solução resultante sob agitação e à temperatura ambiente, durante 22 horas. Removeu-se o solvente sob vácuo, obtendo-se um líquido castanho. Adicionou-se 14 mL de clorofórmio e 15 mL de HCl (1 M) ao líquido anterior. Removeu-se a fase aquosa e adicionou-se NaOH a 5%. Dado que não se obteve o composto puro, decidiu-se repetir o processo de lavagem anterior diversas vezes, sem sucesso.

4.3.3. Síntese dos metalodendrímeros

Os compostos $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ e o dendrímero **6** utilizados nas reacções seguintes foram sintetizados anteriormente no MMRG por Inês Sousa e Manuel Jardim respectivamente.

4.3.3.1. Síntese do $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{3})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ (**7**)

O metalodendrímero **7** foi preparado por reacção de $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ (0,32 g, 0,44 mmol, 4,1 eq) com o composto **3** (0,04 g, 0,11 mmol, 1eq) e o AgCF_3SO_3 (0,15 g, 0,58 mmol, 5,4 eq) em metanol (59 mL). Deixou-se a suspensão amarela esverdeada a agitar, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, durante 76 horas. Ao fim desse tempo, filtrou-se a suspensão castanha e o resíduo da filtração foi extraído com diclorometano. Precipitou-se o composto com a adição de éter etílico à

solução anterior. Seguidamente, removeu-se o solvente e lavou-se o sólido várias vezes com éter etílico. Obteve-se 0,14 g de um pó com coloração verde pálido (35% de rendimento) que, segundo os dados obtidos por RMN (^1H , ^{31}P , ^{19}F), FT-IR, MS e AE, corresponde ao metalodendrímero **7**.

Caracterização:

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,40 - 6,90$ (m, 24H + 48H + 48H, PPh_3), 4,48 (s, 20H, C_5H_5), 2,66 (br, 8H), 2,45 (br., 8H), 2,24 (br., 4H), 1,18 (br, 8H) ppm. ^{31}P RMN (161 MHz, CDCl_3): $\delta = 41,89$ (s, PPh_3) ppm. ^{19}F RMN (376 MHz, CDCl_3): $\delta = -81,78$ ppm.

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu} = 2271$ (ν_{CN}) e 1274 ($\nu_{\text{CF}_3\text{SO}_3}$) cm^{-1} .

TOF-MS (ESI+): $m/z = 1694,5096$ [$\text{M}-2\text{CF}_3\text{SO}_3$] $^{2+}$ e 1081,0131 [$\text{M}-3\text{CF}_3\text{SO}_3$] $^{3+}$.

Análise elementar: $\text{C}_{186}\text{H}_{168}\text{F}_{12}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{P}_8\text{Ru}_4\text{S}_4 \cdot 1,3\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (3797,7): calculado C 59,23, H 4,53, N 2,21; experimental C 59,21, H 4,54, N 2,20.

4.3.3.2. Síntese do $\{[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}]_4(\mathbf{6})\}[\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ (**8**)

A síntese deste metalodendrímero foi realizada através da reacção do $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ (0,46 g, 0,63 mmol, 4,7 eq) com o dendrímero **6** (0,07 g, 0,13 mmol, 1 eq) e o AgCF_3SO_3 (0,17 g, 0,66 mmol, 4,9 eq) em metanol (42 mL). Colocou-se a suspensão castanha resultante a agitar, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, durante 66 horas. Filtrou-se a mistura reaccional e procedeu-se à evaporação do solvente. Extraíu-se o sólido com diclorometano, removeu-se o solvente e lavou-se com éter etílico e benzeno. Redissolveu-se o composto verde-escuro em diclorometano, filtrou-se a solução e procedeu-se à sua concentração sob vácuo. Adicionou-se éter verificando-se a formação de um óleo verde-escuro. Removeu-se a solução e lavou-se o óleo repetidas vezes com éter seco, originando-se 0,13 g de um pó verde brilhante (25% de rendimento). Este composto foi caracterizado por RMN (^1H , ^{31}P , ^{19}F), FT-IR, MS e AE confirmando a pureza do composto **8**.

Caracterização:

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,50-7,00$ (m, 24H + 48H + 48 H, PPh_3), 4,44 (s, 20H, C_5H_5), 3,31 (br., 8H + 8H), 3,10 (br., 8H), 2,98 (br., 4H), 2,90 (br., 8H), 1,85 (br., 8H), 1,30 (br., 4H + 4H) ppm. ^{31}P -RMN (161 MHz, CDCl_3): $\delta = 41,60$ (s, PPh_3) ppm. ^{19}F -RMN (376 MHz, CDCl_3): $\delta = -81,95$ ppm.

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu} = 2269$ (ν_{CN}), 1286 e 697 ($\nu_{\text{CF}_3\text{SO}_3}$) cm^{-1} .

TOF-MS (ESI+): $m/z=1810,9692$ [$\text{M}-2\text{CF}_3\text{SO}_3$] $^{2+}$ e 1157,9568 [$\text{M}-3\text{CF}_3\text{SO}_3$] $^{3+}$.

Análise elementar: $\text{C}_{198}\text{H}_{192}\text{F}_{12}\text{N}_6\text{O}_{16}\text{P}_8\text{Ru}_4\text{S}_4 \cdot 3\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (4174,8): calculado C 57,83, H 4,78, N 2,01; experimental C 57,79, H 4,79, N 2,04.

4.3.3.3. Síntese do $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{en})\text{Ru}]_4(\mathbf{3})[\text{PF}_6]_8$ (**9**)

A funcionalização do dendrímero **3** com o complexo organometálico $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ foi ensaiada por reacção do $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (0,15 g, 0,31 mmol, 4,1 eq) com o composto **3** (0,03 g, 0,08 mmol, 1 eq) e o NH_4PF_6 (0,13 g, 0,77 mmol, 10,2 eq) em metanol (25 mL). Deixou-se a reacção sob agitação, à temperatura ambiente, durante 10 horas e 30 minutos. Retirou-se uma alíquota da mistura reacional e traçou-se o espectro de RMN para o protão.

De acordo com o espectro obtido, não foi possível aferir a ocorrência da funcionalização uma vez que os desvios químicos do protão referentes ao complexo de ruténio permaneceram na mesma posição que a do material de partida e a zona dos picos do tetranitrilo apresentava uma baixa intensidade dificultando a sua identificação. Deste modo, optou-se por tentar extrair o composto pretendido com DCM através de celite. A solução filtrada foi levada à secura e o sólido resultante foi lavado várias vezes com éter. Obteve-se uma pequena quantidade de composto, o qual foi analisado por RMN (^1H , ^{31}P), FT-IR e MS. O espectro de RMN do protão não apresentou alterações significativas comparativamente ao espectro do produto bruto. O espectro ^{31}P -RMN apresentou um múltiplo a - 144,19 ppm atribuído ao sinal do $[\text{PF}_6]^-$. De acordo com os dados do FT-IR observa-se a banda correspondente à vibração do nitrilo livre (2244 cm^{-1}) bem como a banda relativa a um dos modos de vibração do contra-ião $[\text{PF}_6]^-$ (835 cm^{-1}). No entanto, os valores obtidos por espectrometria de massa indicam que ocorreu a funcionalização de pelo menos um dos ramos do dendrímero.

4.3.3.4. Síntese do $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{en})\text{Ru}]_4(\mathbf{6})[\text{PF}_6]_8$ (**10**)

A síntese deste composto foi ensaiada por reacção do $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (0,20 g, 0,43 mmol, 4,5 eq) com o composto **6** (0,05 g, 0,09 mmol, 1 eq) e o NH_4PF_6 (0,07 g, 0,43 mmol, 4,5 eq) em 45 mL de metanol. Colocou-se a mistura reaccional sob agitação e à temperatura ambiente, durante 94 horas. Filtrou-se a solução, adicionou-se éter e colocou-se a -20°C . Observou-se a formação de uma pequena quantidade de cristais laranja (0,07 mg), os quais foram lavados repetidas vezes com éter e secos sob vácuo. A partir da análise do espectro de RMN do protão do composto obtido não foi possível avaliar a obtenção deste composto uma vez que não se observou diferenças nos desvios químicos do produto obtido comparativamente ao complexo de partida. Segundo o espectro de FT-IR, observa-se uma banda a 2254 cm^{-1} que corresponde à frequência de vibração do nitrilo livre, indicando que não ocorreu funcionalização do mesmo.

4.4. Estudos de estabilidade

O estudo do comportamento do complexo organometálico $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ em $\text{DMSO-}d_6$ e numa mistura de $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$ foi realizada através dos seguintes passos: a) preparou-se uma suspensão deste composto a $0,033 \text{ mg}/\mu\text{L}$ em $\text{DMSO-}d_6$; b) filtrou-se a suspensão anterior e traçou-se o espectro de ^{31}P -RMN, a 25°C ; c) adicionou-se $400 \mu\text{L}$ de água deuterada à solução anterior de $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}]$ e analisou-se o seu espectro de ^{31}P -RMN ao fim de vários períodos de tempo (0, 16 e 32 horas).

4.5. Estudos de citotoxicidade

4.5.1. Linhas celulares e cultura de células

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em células cancerígenas provenientes de cinco linhas celulares humanas diferentes e em células estaminais mesenquimais humanas (MSCs).

As linhagens celulares tumorais testadas foram a linha celular de adenocarcinoma colorrectal (Caco-2), a linha celular de osteossarcoma (CAL-72), a linha celular de adenocarcinoma da mama (MCF-7) adquiridas à *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (DSMZ) e as linhas celulares de carcinoma do ovário (A2780 e A2780cisR) obtidas da *European Collection of Cell Cultures*. As células estaminais mesenquimais (MSCs) utilizadas foram obtidas a partir de amostras de osso trabecular humano recolhidas em cirurgias realizadas no Hospital Dr Nélio Mendonça (Funchal, Madeira), após eventos traumáticos. Note-se que, apenas com a aprovação da Comissão de Ética do Hospital, utilizou-se apenas o tecido ósseo que seria descartado. De referir que o isolamento das MSCs foi realizado pelos investigadores do laboratório de Bioquímica e Cultura Celular do CQM, os quais seguiram os seguintes passos: a) colocaram e mantiveram o osso trabecular, rico em medula óssea, em tubos esterilizados e refrigerados com meio α -MEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico-antimicótico (AA), durante 3 a 4 horas; b) prepararam as culturas primárias através da agitação gentil dos tubos anteriores, obtendo uma suspensão de células que foi distribuída por placas de cultura celular; c) após 1 dia, mudaram o meio de cultura destas placas de modo a remover as células hematopóéticas não aderentes, sendo que continuaram a mudar o meio de cultura duas vezes por semana até as células alcançarem a confluência e d) sub-cultivaram e/ou criopreservaram as culturas celulares.

O cultivo e manutenção das linhas celulares criopreservadas foram efectuados nos seguintes meios:

- Caco-2: meio essencial mínimo de Eagle (MEM, GIBCO) suplementado com 20% de soro bovino fetal, 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de antibiótico-antimicótico.

- CAL-72: meio Eagle com modificações Dulbecco (DMEM, GIBCO) enriquecido com 10% de soro bovino fetal, 1% de *insulina-transferrina-sódio selenite*, 2 mM de L-glutamina e 1% de antibiótico-antimicótico (AA).

- MCF-7: meio Roswell Park Memorial Park Institute (RPMI) 1640 suplementado com 20% de soro bovino fetal, 1% de aminoácidos não essenciais, 1 mM de piruvato de sódio, 3,3 µg/mL de insulina humana e 1% de antibiótico-antimicótico.

- A2780 e A2780cisR: meio RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro bovino fetal, 2 mM de L-glutamina e 1% de antibiótico-antimicótico. Na linha celular A2780cisR, para que as células mantivessem a resistência à cisplatina, adicionou-se 1 µM deste complexo metálico a cada 2 passagens.

- MSCs: meio α -MEM suplementado com 10% de soro bovino e 1% de antibiótico-antimicótico.

Todas as linhas celulares foram mantidas a 37°C numa incubadora sob uma atmosfera humidificada com 5% de CO₂.

4.5.2. Ensaio da viabilidade celular com o teste do MTT

O efeito da exposição dos dendrímeros **3** e **6**, do RuCp, da PPh₃, dos metalodendrímeros **7** e **8** e da cisplatina no crescimento das células foi determinado pelo ensaio colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).

De modo a aplicar o ensaio de MTT, semeou-se as células em placas de 96 poços através da adição de 100 µL/poço de uma suspensão de células nas seguintes concentrações: 2×10^3 (Caco-2 e CAL-72) e $4,2 \times 10^3$ (MCF-7), 5×10^3 (A2780 e A2780cisR) e $4,8 \times 10^3$ (MSCs) por poço. As placas foram pré-incubadas durante 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Os compostos testados foram preparados em soluções stock de DMSO e diluídos em série no mesmo solvente. Por fim, as soluções anteriores foram diluídas em meio de cultura completo, obtendo-se as concentrações apropriadas em 0,5% (v/v) de DMSO.

Aspirou-se o meio de cultura e adicionou-se 100 µL/poço de cada uma das soluções preparadas para cada composto. Em todos os ensaios efectuou-se um controlo do crescimento celular contendo meio de cultura completo e um controlo do solvente constituído por meio de cultura completo com 0,5% (v/v) de DMSO. Todas as condições testadas foram efectuadas em réplicas de oito. Incubou-se as placas durante 72 horas a 37°C e 5% de CO₂. Ao fim desse tempo, primeiramente seleccionou-se um poço representativo de cada condição testada, sendo as culturas observadas por microscopia de

campo claro (Nikon Eclipse TE2000-E). Por fim, aspirou-se o meio de cultura e adicionou-se às células 100 µL/poço de uma solução de meio de cultura com 10% (v/v) de MTT (de solução stock a 5 mg/mL). Após 3 a 4 horas de incubação das placas com o MTT, aspirou-se o meio de cultura e adicionou-se DMSO para dissolver os cristais de formazano formados. Procedeu-se à leitura da absorvância num leitor de microplacas (modelo Victor³ 1420, Perkin Elmer). A viabilidade celular foi calculada com a equação seguinte, onde o branco corresponde à absorvância do DMSO ou do meio de cultura:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)})}{(\text{Abs (controle solvente)} - \text{Abs (branco)})} \times 100\%$$

A partir dos valores da viabilidade celular determinou-se a concentração de composto que inibe o crescimento celular em 50% (IC₅₀). Este parâmetro foi calculado por interpolação linear entre os dois pontos experimentais mais próximos do ponto com viabilidade celular de 50%, o qual corresponde à concentração x (IC₅₀). Este cálculo encontra-se exemplificado na figura 87 para o metalodendrímico 7 nas células Caco-2. Conforme a figura 87, dado que 50% de inibição é observado entre 0,5 e 5 µM, calculou-se o valor de IC₅₀ tendo em conta os valores de viabilidade celular para cada uma destas concentrações.

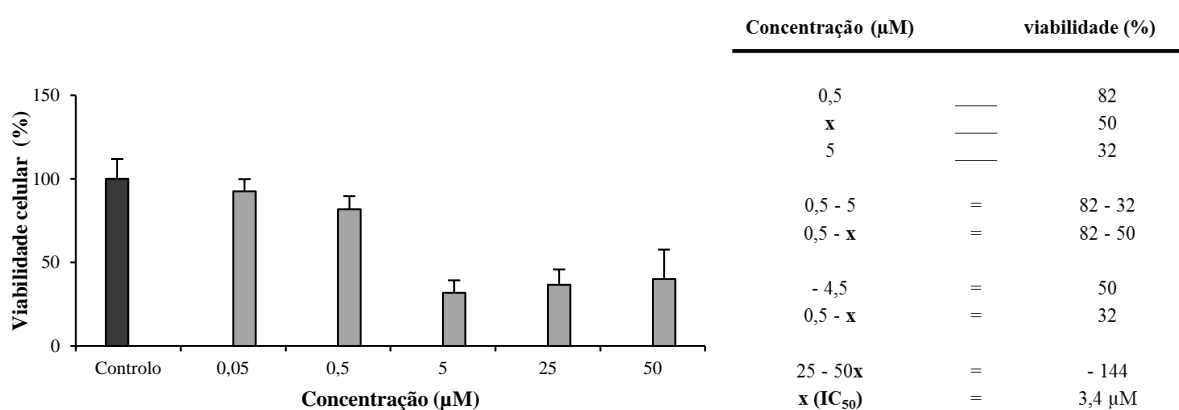


Figura 87 - Determinação do IC₅₀ (valor do x), exemplificado para o metalodendrímico 7 nas células Caco-2.

Referências bibliográficas

Referências Bibliográficas

- [1] Pardee AB, Stein GS, editors. The Biology and Treatment of Cancer: Understanding Cancer. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2009.
- [2] Pecorino L. Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics. Oxford: Oxford University Press, 2012.
- [3] Ruddon RW. Cancer Biology. New York: Oxford University Press, 2007.
- [4] Thurston DE. Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- [5] Almeida CA, Barry SA. Cancer: Basic Science and Clinical Aspects. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010.
- [6] Malarkey DE, Hoenerhoff M, Maronpot RR. Chapter 5 - Carcinogenesis: Mechanisms and Manifestations. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Walling MA, Bolon B, Ochoa R, editors. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. Boston: Academic Press, 2013. p. 107-146.
- [7] Wahl CE. Hardcore Pathology. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- [8] Airley R. Cancer Chemotherapy: Basic Science to the Clinic. Chichester: Wiley-Blackwell, 2009.
- [9] Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. Nat. Rev. Cancer 2003;3:453-458.
- [10] Pelengaris S, Khan M, editors. The Molecular Biology of Cancer. Chichester: Wiley-Blackwell, 2006.
- [11] National Cancer Institute (USA). Cancer Classification. Acedido a 6 de Junho de 2013, em: <http://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html#leukemia>.
- [12] Dark GG. Oncology at a Glance. Chichester:Wiley-Blackwell, 2013.
- [13] Bower M, Waxman J. Lecture Notes: Oncology. Chichester:Wiley-Blackwell, 2010.
- [14] Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. Nat. Med. 2004;10:789-799
- [15] Pelengaris S, Khan M, editors. The Molecular Biology of Cancer: A Bridge from Bench to Bedside. Wiley-Blackwell, 2013.
- [16] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. Science 2013;339:1546-1558.
- [17] World Health Organization. Cancer Fact Sheet No 297. Acedido a 21 de Agosto de 2014, em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.

- [18] World Health Organization. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 (Cancer fact sheets). Acedido a 21 de Agosto de 2014, em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
- [19] Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *Lancet Oncol.* 2012;13:790-801.
- [20] World Health Organization. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 (Population fact sheets). Acedido a 21 de Agosto de 2014, em http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.
- [21] World Health Organization. The European health report 2012: charting the way to well-being. Copenhagen. Acedido a 5 de Julho de 2013, em: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0003/184161/The-European-Health-Report-2012,-FULL-REPORT-w-cover.pdf.
- [22] Instituto Nacional de Estatística. Risco de Morrer 2012. Acedido a 16 de Junho de 2014, em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_destaquas&DESTAQUESdest_boui=217437129&DESTAQUESmodo=2.
- [23] Instituto Nacional de Estatística. Boletim Mensal de Estatística 2014 (Abril de 2014). Acedido a 16 de Junho de 2014, em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=143263&PUBLICACOESmodo=2.
- [24] Instituto Nacional de Estatística. Dia Mundial da Saúde - 7 de abril 2014. Acedido a 16 de Junho de 2014, em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_destaquas&DESTAQUESdest_boui=215806720&DESTAQUESmodo=2.
- [25] Instituto Nacional de Estatística. 25 de Abril - 40 anos de estatísticas. Acedido a 16 de Junho de 2014, em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=216384128&PUBLICACOESmodo=2.
- [26] Hesketh R. *Introduction to Cancer Biology*. New York: Cambridge University Press, 2013.
- [27] Patrick GL. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. Oxford: Oxford University Press, 2013.
- [28] Kausch H, editor. *Radiation Effects on Polymers for Biological Use*. Springer, 2003.
- [29] Pallis AG, Hatse S, Brouwers B, Pawelec G, Falandry C, Wedding U, Dal Lago L, Repetto L, Ring A, Wildiers H. Evaluating the physiological reserves of older patients with cancer: The value of potential biomarkers of aging? *J.Geriatr. Oncol.* 2014;5:204-218.
- [30] Bunz F. *Principles of Cancer Genetics*. Springer, 2008.
- [31] Huidobro C, Fernandez AF, Fraga MF. Aging epigenetics: Causes and consequences. *Mol. Asp. Med.* 2013;34:765-781.
- [32] Perantoni AO. Carcinogenesis. In: McKinnell RG, Parchment RE, Perantoni AO, Damjanov I, Pierce GB, editors. *The Biological Basis of Cancer*. New York: Cambridge University Press, 2006.

- [33] Camacho J, editor. *Molecular Oncology Principles and Recent Advances*: Bentham Science Publishers, 2012.
- [34] Floor SL, Dumont JE, Maenhaut C, Raspe E. Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? *Trends Mol. Med.* 2012;18:509-515.
- [35] Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, Hruban RH. Recent progress in pancreatic cancer. *CA-Cancer J. Clin.* 2013;63:318-348.
- [36] Kumar C, editor. *Nanomaterials for cancer therapy*. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.
- [37] Matray-Devoti J. *Cancer Drugs*. New York: Chelsea House Publishers, 2006.
- [38] Avendaño C, Menéndez JC. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. Oxford: Elsevier Science, 2008.
- [39] Jaouen G (editor). *Bioorganometallics*. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.
- [40] Alessio E (editor). *Bioinorganic Medicinal Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH, 2011.
- [41] Lippert B. *Uses of Metal Compounds in Medicine*. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2013.
- [42] van Rijt SH, Sadler PJ. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discov. Today* 2009;14:1089-1097.
- [43] Gasser G, Metzler-Nolte N. The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2012;16:84-91.
- [44] Lainé AL, Passirani C. Novel metal-based anticancer drugs: a new challenge in drug delivery. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2012;12:420-426.
- [45] Wang Y, Chiu J-F. Proteomic Approaches in Understanding Action Mechanisms of Metal-Based Anticancer Drugs. *Met. Based Drugs* 2008;2008:1-9.
- [46] Bruijninx PCA, Sadler PJ. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2008;12:197-206.
- [47] Ronconi L, Sadler PJ. Using coordination chemistry to design new medicines. *Coord. Chem. Rev.* 2007;251:1633-1648.
- [48] Thompson KH. *Medicinal Inorganic Chemistry: Metallotherapeutics for Chronic Diseases*. In *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*. John Wiley & Sons, 2011.
- [49] Fricker SP. Metal based drugs: from serendipity to design. *Dalton Trans.* 2007:4903-4917.
- [50] Agnew J. *Medicine in the Old West: A History, 1850-1900*. McFarland, 2010.
- [51] Lloyd NC, Morgan HW, Nicholson BK, Ronimus RS. The Composition of Ehrlich's Salvarsan: Resolution of a Century-Old Debate. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005;44:941-944.
- [52] Rosenberg B, Vancamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature* 1969;222:385-386.

- [53] Wexselblatt E, Yavin E, Gibson D. Cellular interactions of platinum drugs. *Inorg. Chim. Acta* 2012;393:75-83.
- [54] Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol. Rev.* 2012;64:706-721.
- [55] Florea A-M, Büsselberg D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers* 2011;3:1351-1371.
- [56] Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans.* 2010;39:8113-8127.
- [57] Kasherman Y, Sturup S, Gibson D. Is Glutathione the Major Cellular Target of Cisplatin? A Study of the Interactions of Cisplatin with Cancer Cell Extracts. *J. Med. Chem.* 2009;52:4319-4328.
- [58] Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* 2014;740:364-378.
- [59] Moucheron C. From cisplatin to photoreactive Ru complexes: targeting DNA for biomedical applications. *New J. Chem.* 2009;33:235-245.
- [60] Marques MPM. Platinum and Palladium Polyamine Complexes as Anticancer Agents: The Structural Factor. *ISRN Spectroscopy* 2013;2013:1-29.
- [61] Wang X, Guo Z. Targeting and delivery of platinum-based anticancer drugs. *Chem. Soc. Rev.* 2013;42:202-224.
- [62] Dabrowiak JC. *Metals in Medicine*. Chichester: Wiley, 2009.
- [63] Arnesano F, Losacco M, Natile G. An Updated View of Cisplatin Transport. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2013;2013:2701-2711.
- [64] Peyrone M. Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1844;51:1-29.
- [65] Hall MD, Okabe M, Shen DW, Liang XJ, Gottesman MM. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2008;48:495-535.
- [66] Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2012;31:1869-1883.
- [67] Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti-cancer Agents Med. Chem.* 2007;7:3-18.
- [68] Gómez-Ruiz S, Maksimović-Ivanić D, Mijatović S, Kaluderović GN. On the Discovery, Biological Effects, and Use of Cisplatin and Metallocenes in Anticancer Chemotherapy. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2012;2012:1-14.

- [69] Köberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta-Rev. Cancer* 2010;1806:172-182.
- [70] Todd RC, Lippard SJ. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics* 2009;1:280-291.
- [71] Côte-Real L, Matos AP, Alho I, Morais TS, Tomaz AI, Garcia MH, Santos I, Bicho MP, Marques F. Cellular Uptake Mechanisms of an Antitumor Ruthenium Compound: The Endosomal/Lysosomal System as a Target for Anticancer Metal-Based Drugs. *Microsc. Microanal.* 2013;19:1122-1130.
- [72] La Fontaine S, Mercer JFB. Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: Role in copper homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.* 2007;463:149-167.
- [73] Preedy VR, Watson RR, Martin CR, editors. *Handbook of Behavior, Food and Nutrition*. New York: Springer, 2011.
- [74] Muhammad N, Guo Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2014;19:144-153.
- [75] Oberoi HS, Nukolova NV, Kabanov AV, Bronich TK. Nanocarriers for delivery of platinum anticancer drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013;65:1667-1685.
- [76] Butler JS, Sadler PJ. Targeted delivery of platinum-based anticancer complexes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2013;17:175-188.
- [77] Graf N, Lippard SJ. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012;64:993-1004.
- [78] Montagner D, Yap SQ, Ang WH. A fluorescent probe for investigating the activation of anticancer platinum(IV) prodrugs based on the cisplatin scaffold. *Angew. Chem. Int. Ed. (English)* 2013;52:11785-11789.
- [79] Shi Y, Liu S-A, Kerwood DJ, Goodisman J, Dabrowiak JC. Pt(IV) complexes as prodrugs for cisplatin. *J. Inorg. Biochem.* 2012;107:6-14.
- [80] Wong DYQ, Yeo CHF, Ang WH. Immuno-Chemotherapeutic Platinum(IV) Prodrugs of Cisplatin as Multimodal Anticancer Agents. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014;53:6752-6756.
- [81] Harper BW, Krause-Heuer AM, Grant MP, Manohar M, Garbutcheon-Singh KB, Aldrich-Wright JR. Advances in platinum chemotherapeutics. *Chem. -Eur. J.* 2010;16:7064-7077.
- [82] Wexselblatt E, Gibson D. What do we know about the reduction of Pt(IV) pro-drugs? *J. Inorg. Biochem.* 2012;117:220-229.
- [83] Johnstone TC, Kulak N, Pridgen EM, Farokhzad OC, Langer R, Lippard SJ. Nanoparticle Encapsulation of Mitaplatin and the Effect Thereof on In Vivo Properties. *ACS Nano* 2013;7:5675-5683.

- [84] Hall MD, Mellor HR, Callaghan R, Hambley TW. Basis for design and development of platinum(IV) anticancer complexes. *J. Med. Chem.* 2007;50:3403-3411.
- [85] Gramatica P, Papa E, Luini M, Monti E, Gariboldi MB, Ravera M, Gabano E, Gaviglio L, Osella D. Antiproliferative Pt(IV) complexes: synthesis, biological activity, and quantitative structure-activity relationship modeling. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2010;15:1157-1169.
- [86] Bednarski PJ, Korpis K, Westendorf AF, Perfahl S, Grünert R. Effects of light-activated diazido-Pt^{IV} complexes on cancer cells in vitro. *Philos. Trans. R. Soc. A-Math. Phys. Eng. Sci.* 2013;371:1-15.
- [87] Levina A, Mitra A, Lay PA. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. *Metallomics.* 2009;1:458-470.
- [88] Dwyer FP, Gyarfás EC, Rogers WP, Koch JH. Biological Activity of Complex Ions. *Nature* 1952;170:190-191.
- [89] Dwyer FP, Mayhew E, Roe EM, Shulman A. Inhibition of Landschütz Ascites Tumour Growth by Metal Chelates Derived from 3,4,7,8-Tetramethyl-1,10-phenanthroline. *Br. J. Cancer* 1965;19:195-199.
- [90] Antonarakis ES, Emadi A. Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2010;66:1-9.
- [91] Bruijninx PCA, Sadler PJ. Controlling platinum, ruthenium, and osmium reactivity for anticancer drug design. In: Rudi van E, Colin DH, editors. *Advances in Inorganic Chemistry*. Academic Press, 2009. p. 1-62.
- [92] Reedijk J. Metal-Ligand Exchange Kinetics in Platinum and Ruthenium Complexes. *Platin. Met. Rev.* 2008;52:2-11.
- [93] Page S. Ruthenium compounds as anticancer agents. *Education in Chemistry* 2012;49:26-29.
- [94] Bergamo A, Sava G. Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs. *Dalton Trans.* 2011;40:7817-7823.
- [95] Bratsos L, Jedner S, Gianferrara T, Alessio E. Ruthenium anticancer compounds: Challenges and expectations. *Chimia* 2007;61:692-697.
- [96] Chepelev NL, Willmore WG. Regulation of iron pathways in response to hypoxia. *Free Radic. Biol. Med.* 2011;50:645-666.
- [97] Page SM, Boss SR, Barker PD. Tuning heavy metal compounds for anti-tumor activity: is diversity the key to ruthenium's success? *Future Med. Chem.* 2009;1:541-559.
- [98] Vincent JB, Love S. The binding and transport of alternative metals by transferrin. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* 2012;1820:362-378.

- [99] Bergamo A, Gaiddon C, Schellens JHM, Beijnen JH, Sava G. Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. *J. Inorg. Biochem.* 2012;106:90-99.
- [100] Jakupec MA, Galanski M, Arion VB, Hartinger CG, Keppler BK. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Trans.* 2008:183-194.
- [101] Bergamo A, Sava G. Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy. *Dalton Trans.* 2007:1267-1272.
- [102] Blunden BM, Rawal A, Lu H, Stenzel MH. Superior Chemotherapeutic Benefits from the Ruthenium-Based Anti-Metastatic Drug NAMI-A through Conjugation to Polymeric Micelles. *Macromolecules* 2014;47:1646-1655.
- [103] Hartinger CG, Jakupec MA, Zorbas-Seifried S, Groessl M, Egger A, Berger W, Zorbas H, Dyson PJ, Keppler BK. KP1019, A New Redox-Active Anticancer Agent – Preclinical Development and Results of a Clinical Phase I Study in Tumor Patients. *Chem. Biodivers.* 2008;5:2140-2155.
- [104] Hartinger CG, Zorbas-Seifried S, Jakupec MA, Kynast B, Zorbas H, Keppler BK. From bench to bedside – preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium *trans*-[tetrachlorobis(1*H*-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). *J. Inorg. Biochem.* 2006;100:891-904.
- [105] Allardyce CS, Dorcier A, Scolaro C, Dyson PJ. Development of organometallic (organo-transition metal) pharmaceuticals. *Appl. Organomet. Chem.* 2005;19:1-10.
- [106] Govender P, Renfrew AK, Clavel CM, Dyson PJ, Therrien B, Smith GS. Antiproliferative – activity of chelating N,O- and N,N-ruthenium(II) arene functionalised poly(propyleneimine) dendrimer scaffolds. *Dalton Trans.* 2011;40:1158-1167.
- [107] Nazarov AA, Hartinger CG, Dyson PJ. Opening the lid on piano-stool complexes: An account of ruthenium(II)–arene complexes with medicinal applications. *J. Organomet. Chem.* 2014;751:251-260.
- [108] Süß-Fink G. Water-soluble arene ruthenium complexes: From serendipity to catalysis and drug design. *J. Organomet. Chem.* 2014;751:2-19.
- [109] Süß-Fink G. Arene ruthenium complexes as anticancer agents. *Dalton Trans.* 2010;39:1673-1688.
- [110] Dale LD, Tocher JH, Dyson TM, Edwards DI, Tocher DA. Studies on DNA damage and induction of SOS repair by novel multifunctional bio-reducible compounds. II. A metronidazole adduct of a ruthenium-arene compound. *Anti-Cancer Drug Des.* 1992;7:3-14.
- [111] Gasser G, Ott I, Metzler-Nolte N. Organometallic Anticancer Compounds. *J. Med. Chem.* 2011;54:3-25.

- [112] Dougan SJ, Sadler PJ. The Design of Organometallic Ruthenium Arene Anticancer Agents. *Chimia* 2007;61:704-715.
- [113] Peacock AFA, Sadler PJ. Medicinal Organometallic Chemistry: Designing Metal Arene Complexes as Anticancer Agents. *Chem.-Asian J.* 2008;3:1890-1899.
- [114] Smith GS, Therrien B. Targeted and multifunctional arene ruthenium chemotherapeutics. *Dalton Trans.* 2011;40:10793-10800.
- [115] Mendoza-Ferri MG, Hartinger CG, Mendoza MA, Groessl M, Egger AE, Eichinger RE, Mangrum JB, Farrel NP, Maruszak M, Bednarski PJ, Klein F, Jakupec MA, Nazarov AA, Severin K, Keppler BK. Transferring the Concept of Multinuclearity to Ruthenium Complexes for Improvement of Anticancer Activity. *J. Med. Chem.* 2009;52:916-925.
- [116] Gianferrara T, Bratsos I, Iengo E, Milani B, Oštrić A, Spagnul C, Zangrando E, Alessio E. Synthetic strategies towards ruthenium-porphyrin conjugates for anticancer activity. *Dalton Trans.* 2009:10742-10756.
- [117] Warad I, Eftaiha AF, Al-Nuri MA, Husein AI, Assal M, Abu-Obaid A, Al-Zaqri N, Hadda TB, Hammouti B. Metal ions as Antitumor Complexes-Review. *J. Mater. Environ. Sci.* 2013;4:542-557.
- [118] Noffke AL, Habtemariam A, Pizarro AM, Sadler PJ. Designing organometallic compounds for catalysis and therapy. *Chem. Commun.* 2012;48:5219-5246.
- [119] Pizarro AM, Habtemariam A, Sadler PJ. Activation Mechanisms for Organometallic Anticancer Complexes. In: Jaouen G, Metzler-Nolte N, editors. *Medicinal Organometallic Chemistry*. Springer, 2010. p. 21-56.
- [120] Yan YK, Melchart M, Habtemariam A, Sadler PJ. Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. *Chem. Commun.* 2005:4764-4776.
- [121] Tomaz AI, Jakusch T, Morais TS, Marques F, de Almeida RFM, Mendes F, Enyedy EA, Santos I, Pessoa JC, Kiss T, Garcia MH. $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{bipy})(\text{PPh}_3)]^+$, a promising large spectrum antitumor agent: Cytotoxic activity and interaction with human serum albumin. *J. Inorg. Biochem.* 2012;117:261-269.
- [122] Mavrynsky D, Rahkila J, Bandarra D, Martins S, Meireles M, Calhorda MJ, Kovács IJ, Zupkó I, Hänninen MM, Leino R Cytotoxicities of Polysubstituted Chlorodicarbonyl(cyclopentadienyl) and (Indenyl)ruthenium Complexes. *Organometallics* 2013;32:3012-3017.
- [123] Hartinger CG, Dyson PJ. Bioorganometallic chemistry-from teaching paradigms to medicinal applications. *Chem. Soc. Rev.* 2009;38:391-401.
- [124] Hartinger CG, Metzler-Nolte N, Dyson PJ. Challenges and Opportunities in the Development of Organometallic Anticancer Drugs. *Organometallics*. 2012;31:5677-5685.

- [125] Maksimoska J, Feng L, Harms K, Yi C, Kissil J, Marmorstein R, Meggers E. Targeting Large Kinase Active Site with Rigid, Bulky Octahedral Ruthenium Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 2008;130:15764-15765.
- [126] Debreczeni JÉ, Bullock AN, Atilla GE, Williams DS, Bregman H, Knapp S, Meggers E. Ruthenium Half-Sandwich Complexes Bound to Protein Kinase Pim-1. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006;45:1580-1585.
- [127] Meggers E. Targeting proteins with metal complexes. *Chem. Commun.* 2009:1001-1010.
- [128] Morais TS, Silva TJJ, Marques F, Robalo MP, Avecilla F, Madeira PJA, Mendes PJG, Santos I, Garcia MH. Synthesis of organometallic ruthenium(II) complexes with strong activity against several human cancer cell lines. *J. Inorg. Biochem.* 2012;114:65-74.
- [129] Atilla-Gokcumen GE, Pagano N, Streu C, Maksimoska J, Filippakopoulos P, Knapp S, Meggers E. Extremely Tight Binding of a Ruthenium Complex to Glycogen Synthase Kinase 3. *ChemBioChem* 2008;9:2933-2936.
- [130] Atilla-Gokcumen GE, Williams DS, Bregman H, Pagano N, Meggers E. Organometallic Compounds with Biological Activity: A Very Selective and Highly Potent Cellular Inhibitor for Glycogen Synthase Kinase 3. *ChemBioChem* 2006;7:1443-1450.
- [131] Pagano N, Maksimoska J, Bregman H, Williams DS, Webster RD, Xue F, Meggers E. Ruthenium half-sandwich complexes as protein kinase inhibitors: derivatization of the pyridocarbazole pharmacophore ligand. *Org. Biomol. Chem.* 2007;5:1218-1227.
- [132] Smalley KS, Contractor R, Haass NK, Kulp AN, Atilla-Gokcumen GE, Williams DS, Bregman H, Flaherty KT, Soengas MS, Meggers E. An organometallic protein kinase inhibitor pharmacologically activates p53 and induces apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Res.* 2007;67:209-217.
- [133] Meggers E, Atilla-Gokcumen GE, Gründler K, Frias C, Prokop A. Inert ruthenium half-sandwich complexes with anticancer activity. *Dalton Trans.* 2009:10882-10888.
- [134] Bregman H, Meggers E. Ruthenium Half-Sandwich Complexes as Protein Kinase Inhibitors: An N-Succinimidyl Ester for Rapid Derivatizations of the Cyclopentadienyl Moiety. *Org. Lett.* 2006;8:5465-5468.
- [135] Helena Garcia M, Morais TS, Florindo P, Piedade MF, Moreno V, Ciudad C, Noe V. Inhibition of cancer cell growth by ruthenium(II) cyclopentadienyl derivative complexes with heteroaromatic ligands. *J. Inorg. Biochem.* 2009;103:354-361.
- [136] Morais TS, Santos F, Côrte-Real L, Marques F, Robalo MP, Madeira PJ, Garcia MH. Biological activity and cellular uptake of $[\text{Ru}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)(\text{Me}_2\text{bpy})][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ complex. *J. Inorg. Biochem.* 2013;122:8-17.

- [137] Moreno V, Font-Bardia M, Calvet T, Lorenzo J, Avilés FX, Garcia MH, Morais TS, Valente A, Robalo MP. DNA interaction and cytotoxicity studies of new ruthenium(II) cyclopentadienyl derivative complexes containing heteroaromatic ligands. *J. Inorg. Biochem.* 2011;105:241-249.
- [138] Moreno V, Lorenzo J, Aviles FX, Garcia MH, Ribeiro JP, Morais TS, Florindo P, Robalo MP. Studies of the Antiproliferative Activity of Ruthenium (II) Cyclopentadienyl-Derived Complexes with Nitrogen Coordinated Ligands. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2010;2010:1-11.
- [139] Valente A, Garcia MH, Marques F, Miao Y, Rousseau C, Zinck P. First polymer "ruthenium-cyclopentadienyl" complex as potential anticancer agent. *J. Inorg. Biochem.* 2013;127:79-81.
- [140] Florindo P, Marques IJ, Nunes CD, Fernandes AC. Synthesis, characterization and cytotoxicity of cyclopentadienyl ruthenium(II) complexes containing carbohydrate-derived ligands. *J. Organomet. Chem.* 2014;760:240-247.
- [141] Morais TS, Santos FC, Jorge TF, Côrte-Real L, Madeira PJA, Marques F, Robalo MP, Matos A, Santos I, Garcia MH. New water-soluble ruthenium(II) cytotoxic complex: Biological activity and cellular distribution. *J. Inorg. Biochem.* 2014;130:1-14.
- [142] Wenzel M, Bertrand B, Eymin M-J, Comte V, Harvey JA, Richard P, Groessl M, Zava O, Amrouche H, Harvey PD, Le Gendre P, Picquet M, Casini A. Multinuclear Cytotoxic Metallodrugs: Physicochemical Characterization and Biological Properties of Novel Heteronuclear Gold–Titanium Complexes. *Inorg. Chem.* 2011;50:9472-9480.
- [143] Sopczynski BP. A New Anti-Tumor Drug Delivery System: Dendrimers. *MMG 445 Basic Biotechnology eJournal* 2008;2:87-92 (Michigan State University).
- [144] Carlmark A, Hawker C, Hult A, Malkoch M. New methodologies in the construction of dendritic materials. *Chem. Soc. Rev.* 2009;38:352-362.
- [145] Fréchet JMJ. Dendrimers and supramolecular chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002;99:4782-4787.
- [146] Jain K, Kesharwani P, Gupta U, Jain NK. Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. *Int. J. Pharm.* 2010;394:122-142.
- [147] Buhleier E, Wehner W, Vögtle F. "Cascade"- and "Nonskid-Chain-like" Syntheses of Molecular Cavity Topologies. *Synthesis* 1978;1978:155-158.
- [148] Mintzer MA, Grinstaff MW. Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. *Chem. Soc. Rev.* 2011;40:173-190.
- [149] Newkome GR, Yao Z, Baker GR, Gupta VK. Micelles. Part 1. Cascade molecules: a new approach to micelles. A [27]-arborol. *J. Org. Chem.* 1985;50:2003-2004.

- [150] Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, Roeck J, Ryder J, Smith P. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polym. J.* 1985;17:117-132.
- [151] Oliveira JM, Salgado AJ, Sousa N, Mano JF, Reis RL. Dendrimers and derivatives as a potential therapeutic tool in regenerative medicine strategies—A review. *Prog. Polym. Sci.* 2010;35:1163-1194.
- [152] Rolland O, Turrin C-O, Caminade A-M, Majoral J-P. Dendrimers and nanomedicine: multivalency in action. *New J. Chem.* 2009;33:1809-1824.
- [153] Tomalia DA, Christensen JB, Boas U. *Dendrimers, Dendrons, and Dendritic Polymers: Discovery, Applications, and the Future.* New York: Cambridge University Press, 2012.
- [154] Svenson S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009;71:445-462.
- [155] Svenson S, Tomalia DA. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012;64:102-115.
- [156] Mignani S, El Kazzouli S, Bousmina M, Majoral J-P. Expand classical drug administration ways by emerging routes using dendrimer drug delivery systems: A concise overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013;65:1316-1330.
- [157] Medina SH, El-Sayed MEH. Dendrimers as carriers for delivery of chemotherapeutic agents. *Chem. Rev.* 2009;109:3141-3157.
- [158] Govender P, Antonels NC, Mattsson J, Renfrew AK, Dyson PJ, Moss JR, Therrien B, Smith GS. Anticancer activity of multinuclear arene ruthenium complexes coordinated to dendritic polypyridyl scaffolds. *J. Organomet. Chem.* 2009;694:3470-3476.
- [159] Govender P, Sudding LC, Clavel CM, Dyson PJ, Therrien B, Smith GS. The influence of RAPTA moieties on the antiproliferative activity of peripheral-functionalised poly(salicylaldiminato) metallodendrimers. *Dalton Trans.* 2013;42:1267-1277.
- [160] Zhao X, Loo SCJ, Lee PP-F, Tan TTY, Chu CK. Synthesis and cytotoxic activities of chloropyridylimineplatinum(II) and chloropyridyliminecopper(II) surface-functionalized poly(amidoamine) dendrimers. *J. Inorg. Biochem.* 2010;104:105-110.
- [161] Payne R, Govender P, Therrien B, Clavel CM, Dyson PJ, Smith GS. Neutral and cationic multinuclear half-sandwich rhodium and iridium complexes coordinated to poly(propyleneimine) dendritic scaffolds: Synthesis and cytotoxicity. *J. Organomet. Chem.* 2013;729:20-27.
- [162] Greish K. Enhanced permeability and retention effect for selective targeting of anticancer nanomedicine: are we there yet? *Drug Discov. Today Technol.* 2012;9:e161-e166.
- [163] Dawidczyk CM, Kim C, Park JH, Russell LM, Lee KH, Pomper MG, Searson PC. State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines. *J. Control. Release* 2014;187:133-144.

- [164] Pisani MJ, Wheate NJ, Keene FR, Aldrich-Wright JR, Collins JG. Anionic PAMAM dendrimers as drug delivery vehicles for transition metal-based anticancer drugs. *J. Inorg. Biochem.* 2009;103:373-380.
- [165] Maldonado CR, Salassa L, Gomez-Blanco N, Mareque-Rivas JC. Nano-functionalization of metal complexes for molecular imaging and anticancer therapy. *Coord. Chem. Rev.* 2013;257:2668-2688.
- [166] Vögtle F, Richardt G, Werner N, Rackstraw AJ. *Dendrimer Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH, 2009.
- [167] Govender P, Therrien B, Smith GS. Bio-Metallodendrimers – Emerging Strategies in Metal-Based Drug Design. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012;2012:2853-2862.
- [168] Jansen BA, van der Zwan J, Reedijk J, den Dulk H, Brouwer J. A Tetranuclear Platinum Compound Designed to Overcome Cisplatin Resistance. *Eur. J. Inorg. Chem.* 1999;1999:1429-1433.
- [169] Ahamad T, Mapolie SF, Alshehri S. Synthesis and characterization of polyamide metallodendrimers and their anti-bacterial and anti-tumor activities. *Med. Chem. Res.* 2012;21:2023-2031.
- [170] Robilotto TJ, Alt DS, von Recum HA, Gray TG. Cytotoxic gold(I)-bearing dendrimers from alkyne precursors. *Dalton Trans.* 2011;40:8083-8085.
- [171] Hurley AL, Mohler DL. Organometallic Photonucleases: Synthesis and DNA-Cleavage Studies of Cyclopentadienyl Metal-Substituted Dendrimers Designed To Increase Double-Strand Scission. *Org. Lett.* 2000;2:2745-2748.
- [172] Rodrigues J, Jardim MG, Figueira J, Gouveia M, Tomas H, Rissanen K. Poly(alkylidenamines) dendrimers as scaffolds for the preparation of low-generation ruthenium based metallodendrimers. *New J. Chem.* 2011;35:1938-1943.
- [173] Bonniard L, Kahlal S, Diallo AK, Ornelas C, Roisnel T, Manca G, Rodrigues J, Ruiz J, Astruc D, Saillard J-Y. How Do Nitriles Compare with Isoelectronic Alkynyl Groups in the Electronic Communication between Iron Centers Bridged by Phenylenebis- and -tris(nitrile) Ligands? An Electronic and Crystal-Structure Study. *Inorg. Chem.* 2011;50:114-124.
- [174] Ornelas C, Vertlib V, Rodrigues J, Rissanen K. Ruthenium Metallodendrimers Based on Nitrile-Functionalized Poly(alkylidene imine)s. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2006;2006:47-50.
- [175] Jardim MG, Rissanen K, Rodrigues J. Preparation and Characterization of Novel Poly(alkylidenamine) Nitrile Ruthenium Metallodendrimers. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2010;2010:1729-1735.
- [176] Al-Jamal KT, Ruenraroengsak P, Hartell N, Florence AT. An intrinsically fluorescent dendrimer as a nanoprobe of cell transport. *J. Drug Target.* 2006;14:405-412.

- [177] Morris RE, Aird RE, del Socorro Murdoch P, Chen H, Cummings J, Hughes ND, Parsons S, Parkin A, Boyd G, Jodrell DI, Sadler PJ. Inhibition of Cancer Cell Growth by Ruthenium(II) Arene Complexes. *J. Med. Chem.* 2001;44:3616-3621.
- [178] Smith MR, McAllister R, Newkirk K, Basing A, Wang L. Development of an Interdisciplinary Experimental Series for the Laboratory Courses of Cell and Molecular Biology and Advance Inorganic Chemistry. *J. Chem. Educ.* 2012;89:150-155.
- [179] Crabtree RH, Pearman JA. Arene—ruthenium complexes containing nitrogen donor ligands. *J. Organomet. Chem.* 1977;141:325-330.
- [180] Paim LA, Dias FM, Siebald HGL, Ellena J, Ardisson JD, da Silva MM, Batista AA. Synthesis and characterization of $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_{10}\text{H}_{14})(\text{dppf})\text{X}][\text{PF}_6]$ ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}, \text{SnF}_3$) compounds: The X-ray structure of $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_{10}\text{H}_{14})(\text{dppf})\text{Cl}][\text{SnCl}_3]\cdot 0.45\text{CH}_2\text{Cl}_2$. *Polyhedron* 2012;42:110-117.
- [181] Jensen SB, Rodger SJ, Spicer MD. Facile preparation of η^6 -p-cymene ruthenium diphosphine complexes. Crystal structure of $[(\eta^6\text{-p-cymene})\text{Ru}(\text{dppf})\text{Cl}]\text{PF}_6$. *J. Organomet. Chem.* 1998;556:151-158.
- [182] Daguene C, Dyson PJ. The effect of pH on the hydrogenation of benzene in an aqueous biphasic using a ruthenium catalyst. *Catal. Commun.* 2003;4:153-157.
- [183] Daguene C, Scopelliti R, Dyson PJ. Mechanistic Investigations on the Hydrogenation of Alkenes Using Ruthenium(II)-arene Diphosphine Complexes. *Organometallics* 2004;23:4849-4857.
- [184] Hodson E, Simpson SJ. Synthesis and characterisation of $[(\eta^6\text{-cymene})\text{Ru}(\text{L})\text{X}_2]$ compounds: single crystal X-ray structure of $[(\eta^6\text{-cymene})\text{Ru}(\text{P}\{\text{OPh}\}_3)\text{Cl}_2]$ at 203K. *Polyhedron* 2004;23:2695-2707.
- [185] Dewick PM. *Essentials of Organic Chemistry: For Students of Pharmacy, Medicinal Chemistry and Biological Chemistry*. Chichester: Wiley, 2013.
- [186] Patrick G. *Instant Notes in Organic Chemistry*. New York: Garland Science, 2012.
- [187] McMurry J. *Fundamentals of Organic Chemistry*. Brooks/Cole, 2011.
- [188] Fox MA, Whitesell JK. *Organic Chemistry*. Boston: Jones and Bartlett, 1997.
- [189] Mather BD, Viswanathan K, Miller KM, Long TE. Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies. *Prog. Polym. Sci.* 2006;31:487-531.
- [190] Nising CF, Bräse S. Recent developments in the field of oxa-Michael reactions. *Chem. Soc. Rev.* 2012;41:988-999.
- [191] Rajasekaran A, Murugesan PPT. Cyanoethylation: A Vital Reaction in the Synthesis of Biologically Active Heterocycles. *Asian J. Chem.* 2004;16:1-8.
- [192] Gonera A. *Aminofunctional Starch Derivatives: Synthesis, Analysis, and Application*. Göttingen: Cuvillier Verlag, 2004.

- [193] Jenner G. Effect of pressure on sterically congested cyanoalkylation reactions of alcohols. *Tetrahedron* 2002;58:4311-4317.
- [194] Jayamurugan G, Jayaraman N. Synthesis of large generation poly(propyl ether imine) (PETIM) dendrimers. *Tetrahedron* 2006;62:9582-9588.
- [195] Krishna TR, Jain S, Tatu US, Jayaraman N. Synthesis and biological evaluation of 3-amino-propan-1-ol based poly(ether imine) dendrimers. *Tetrahedron* 2005;61:4281-4288.
- [196] Scolaro C, Bergamo A, Brescacin L, Delfino R, Cocchietto M, Laurenczy G, Geldbach T, Sava G, Dyson P. In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes. *J. Med. Chem.* 2005;48:4161-4171.
- [197] Patra M, Joshi T, Pierroz V, Ingram K, Kaiser M, Ferrari S, Spingler B, Keiser J, Gasser G. DMSO-Mediated Ligand Dissociation: Renaissance for Biological Activity of N-Heterocyclic-[Ru(η^6 -arene)Cl₂] Drug Candidates. *Chem. - Eur. J.* 2013;19:14768-14772.
- [198] Hughes D, Mehmet H, editors. *Cell Proliferation and Apoptosis*. BIOS Scientific, 2003.
- [199] Satyanarayanajois SD. *Drug Design and Discovery: Methods and Protocols*. Humana Press 2011.
- [200] Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 2012;114:785-796.
- [201] TACS® MTT Cell Proliferation Assays. Acedido a 20 de Maio de 2014, em: http://www.trevigen.com/docs/protocol_4890-XX-K.pdf.
- [202] MTT Cell Proliferation Assay. Acedido a 20 de Maio de 2014, em: <http://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx>.
- [203] Measuring Cell Viability/Cytotoxicity. Acedido a 20 de Maio de 2014, em: http://www.dojindo.com/Protocol/Cell_Proliferation_Protocol_Colorimetric.pdf.
- [204] van Geelen CM, de Vries EG, Le TK, van Weeghel RP, de Jong S. Differential modulation of the TRAIL receptors and the CD95 receptor in colon carcinoma cell lines. *Brit. J. Cancer.* 2003;89:363-373.
- [205] Dhar S, Lippard SJ. Mitaplatin, a potent fusion of cisplatin and the orphan drug dichloroacetate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009;106:22199-22204.
- [206] Kapp T, Dullin A, Gust R. Mono- and Polynuclear [Alkylamine]platinum(II) Complexes of [1,2-Bis(4-fluorophenyl)ethylenediamine]platinum(II): Synthesis and Investigations on Cytotoxicity, Cellular Distribution, and DNA and Protein Binding. *J. Med. Chem.* 2006;49:1182-1190.
- [207] Valente A, Garcia M. Syntheses of Macromolecular Ruthenium Compounds: A New Approach for the Search of Anticancer Drugs. *Inorganics* 2014;2:96-114.

[208] Errington RJ. Advanced practical inorganic and metalorganic chemistry. London: Blackie Academic & Professional, 1997.

[209] Shriver DF, Drezdson MA. The Manipulation of Air-Sensitive Compounds. Wiley, 1986.

Anexos

Anexo I

I. Datos espectroscópicos

I.I. Composto $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{NCCH}_3)_2\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (**2a**)

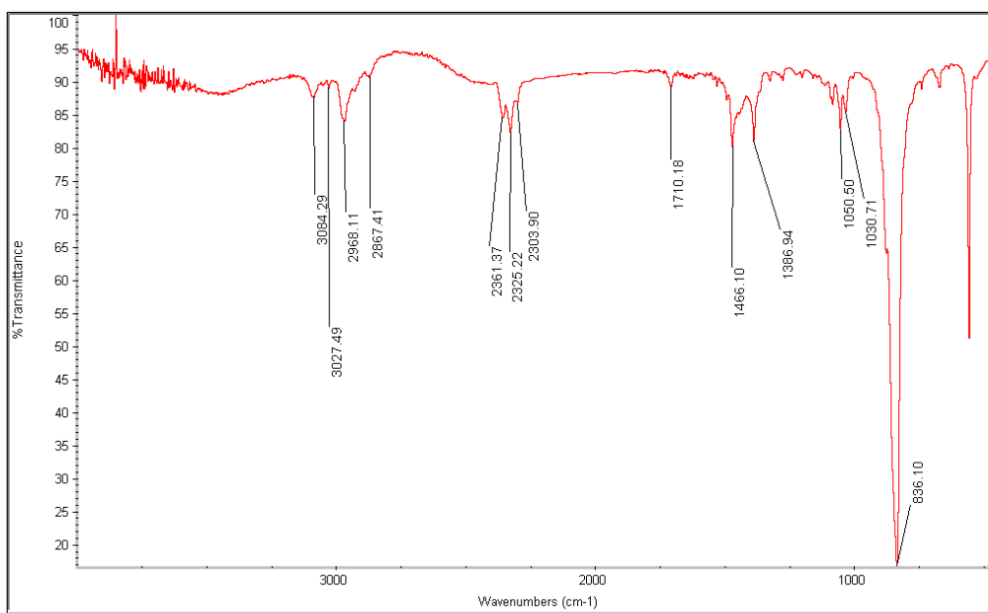


Figura I.I - Espectro de FT-IR obtido na preparação do composto $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{NCCH}_3)_2\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (**2a**) em KBr.

I.II. Composto $\{[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}]_4\}[\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ (**3**) (**7**)

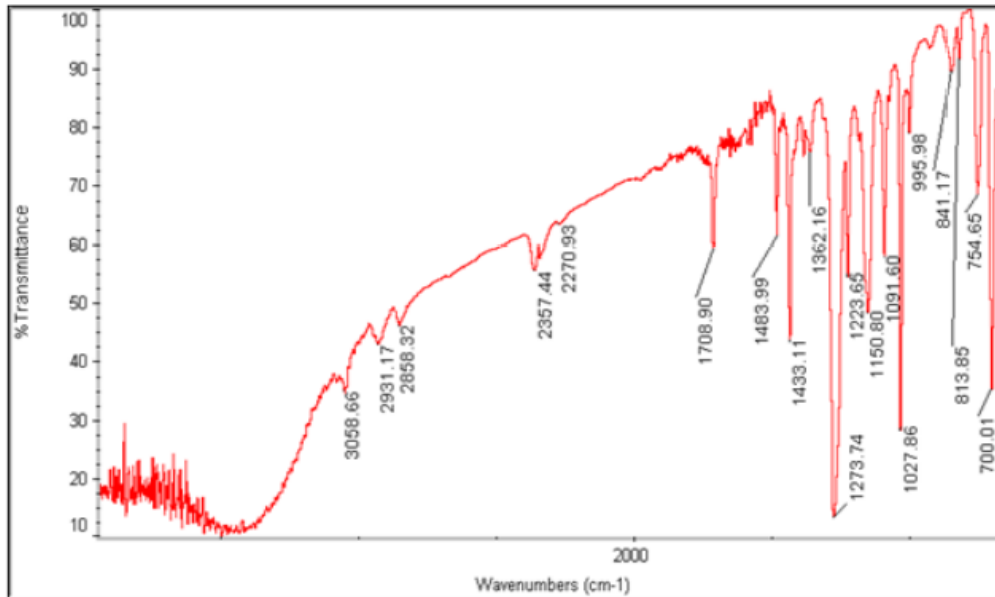


Figura I.II - Espectro de FT-IR do metalodendrímtero $\{[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}]_4\}[\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$ (**3**) (**7**) em KBr.

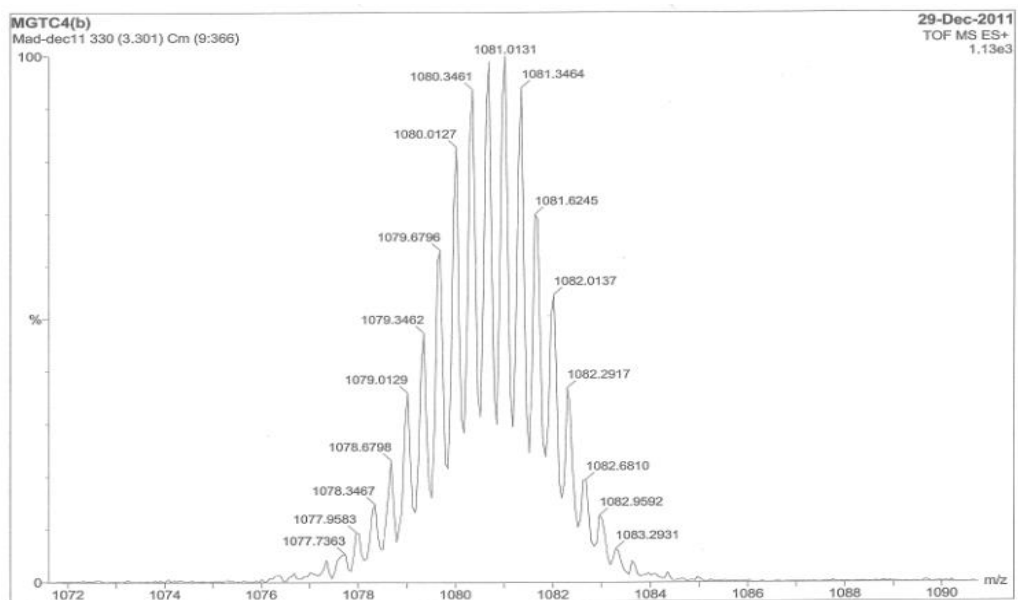
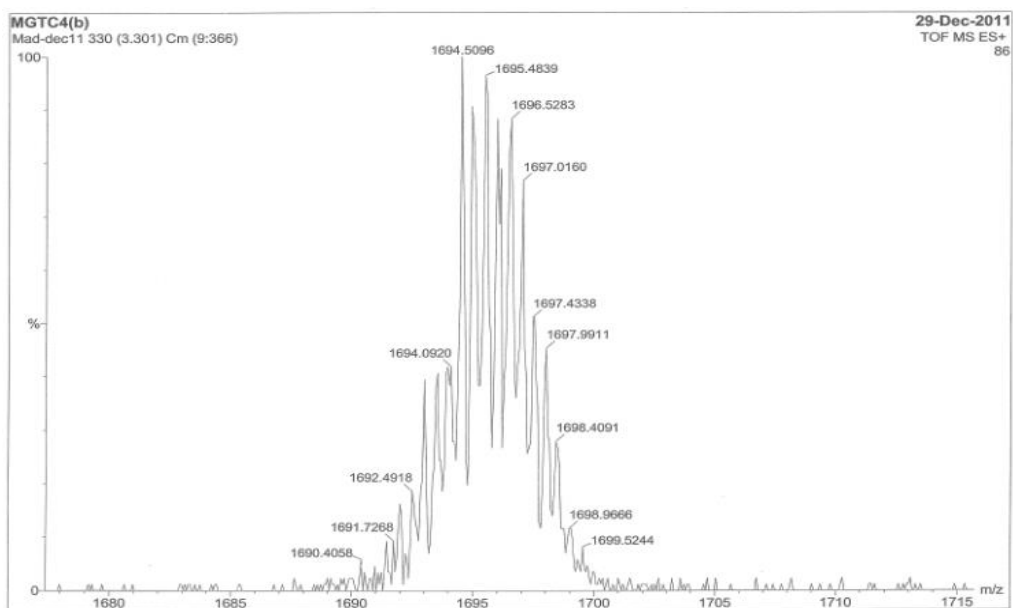


Figura I.III - Espectros de massa do metalodendrímtero $\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{3})\text{[CF}_3\text{SO}_3\text{]}_4$
(7).

I.III. Composto $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{6})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4(\mathbf{8})$

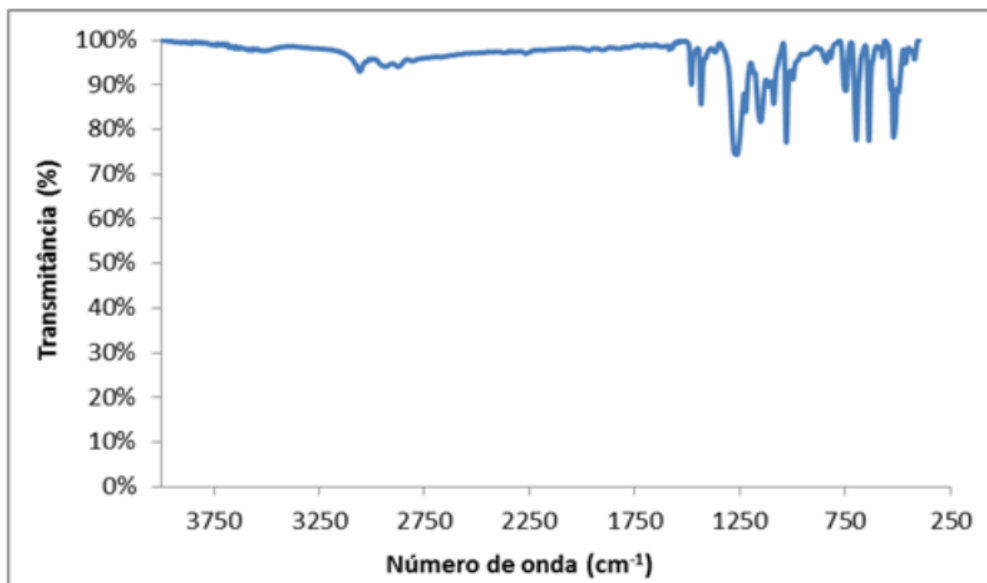


Figura I.IV - Espectro de FT-IR do metalodendrímico $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{6})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4(\mathbf{8})$ em KBr.

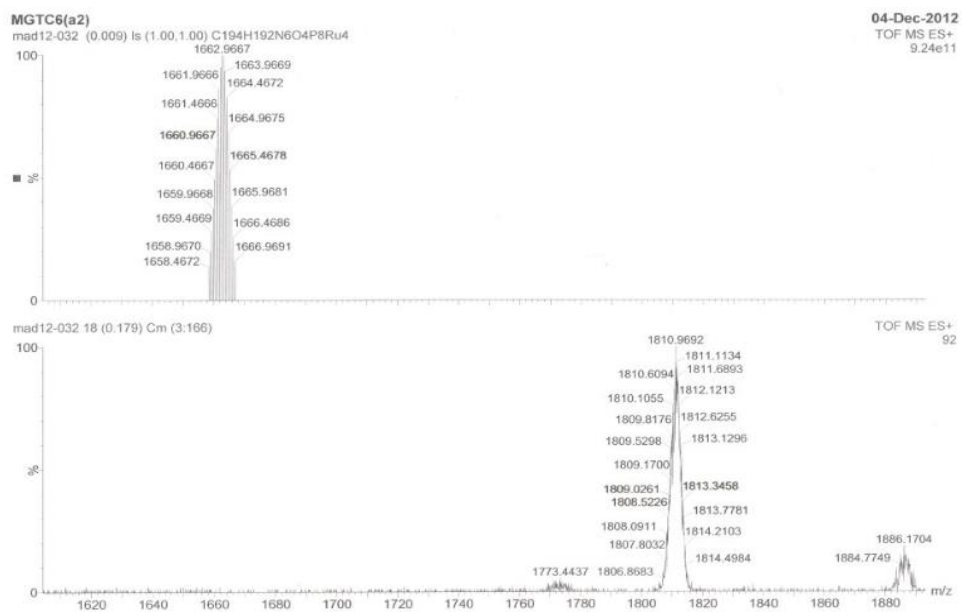
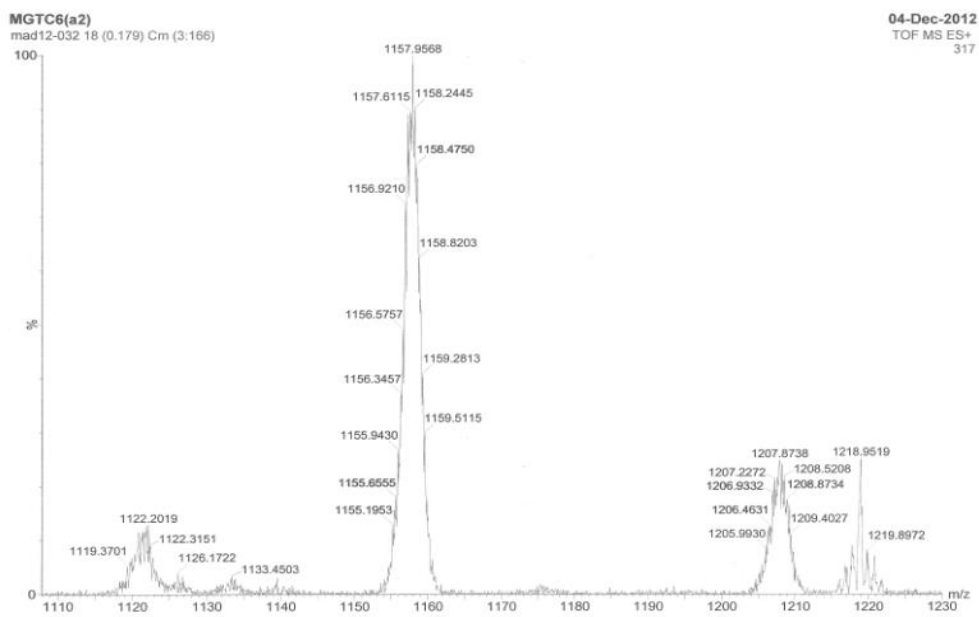


Figura I.V - Espectros de massa do metalodendrímero $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{6})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4$
(8).

I.IV. Composto $[\{(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)(\text{PPh}_3)_2\text{Ru}\}_4(\mathbf{3})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_4(\mathbf{9})$

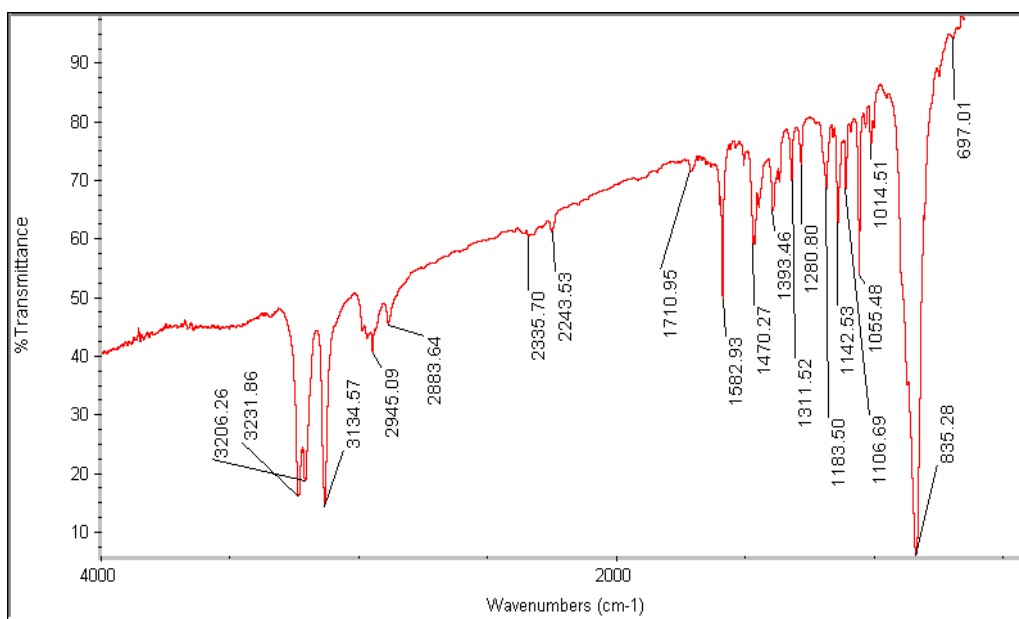


Figura I.VI - Espectro de FT-IR obtido na preparação do composto $[\{(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{en})\text{Ru}\}_4(\mathbf{3})][\text{PF}_6]_8(\mathbf{9})$, em KBr.

I.V. Composto $[\{(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{en})\text{Ru}\}_4(\mathbf{6})][\text{PF}_6]_8(\mathbf{10})$

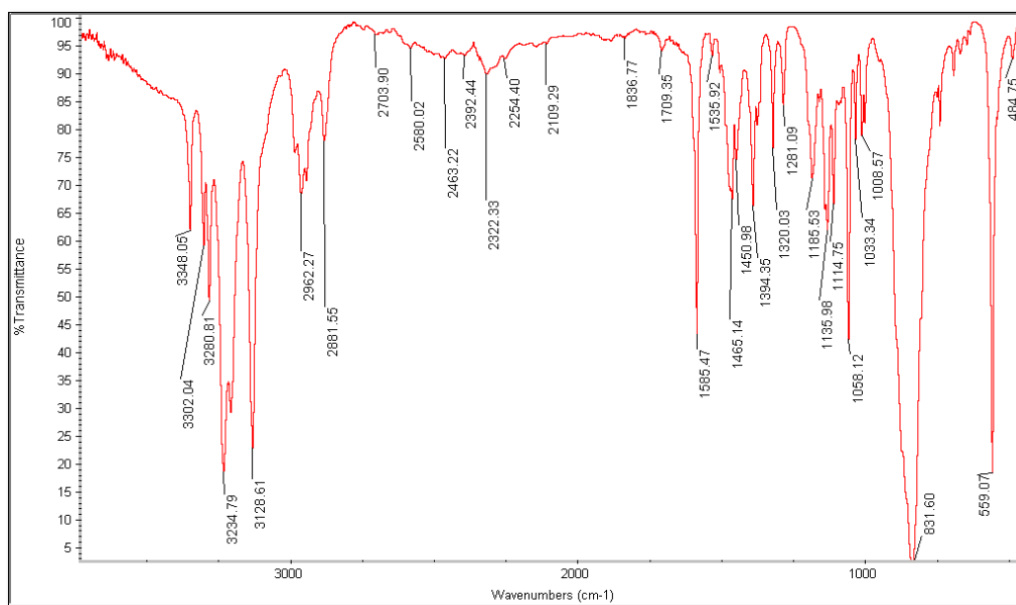


Figura I.VII - Espectro de FT-IR obtido na preparação do composto $[\{(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})(\text{en})\text{Ru}\}_4(\mathbf{6})][\text{PF}_6]_8(\mathbf{10})$, em KBr.

Anexo II

II. Microfotografias das células

II.I. Linha celular Caco-2

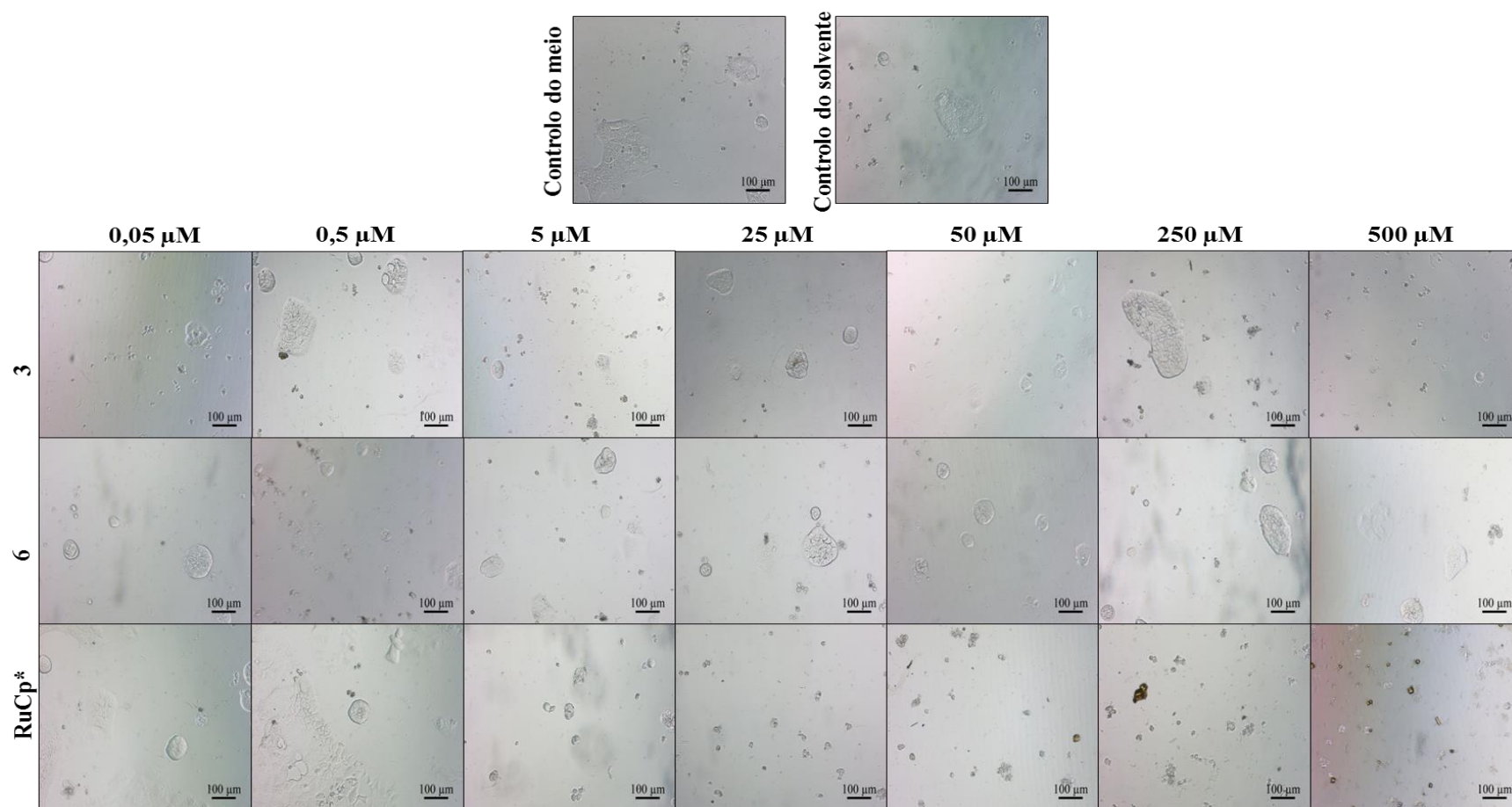


Figura II.I - Micrografias em campo claro das células Caco-2 após 72 horas de incubação com os dendrímeros **3** e **6** e o complexo RuCp a diferentes concentrações, com uma ampliação de 200x (*concentrações $\geq 25 \mu\text{M}$ do RuCp são desconhecidas).

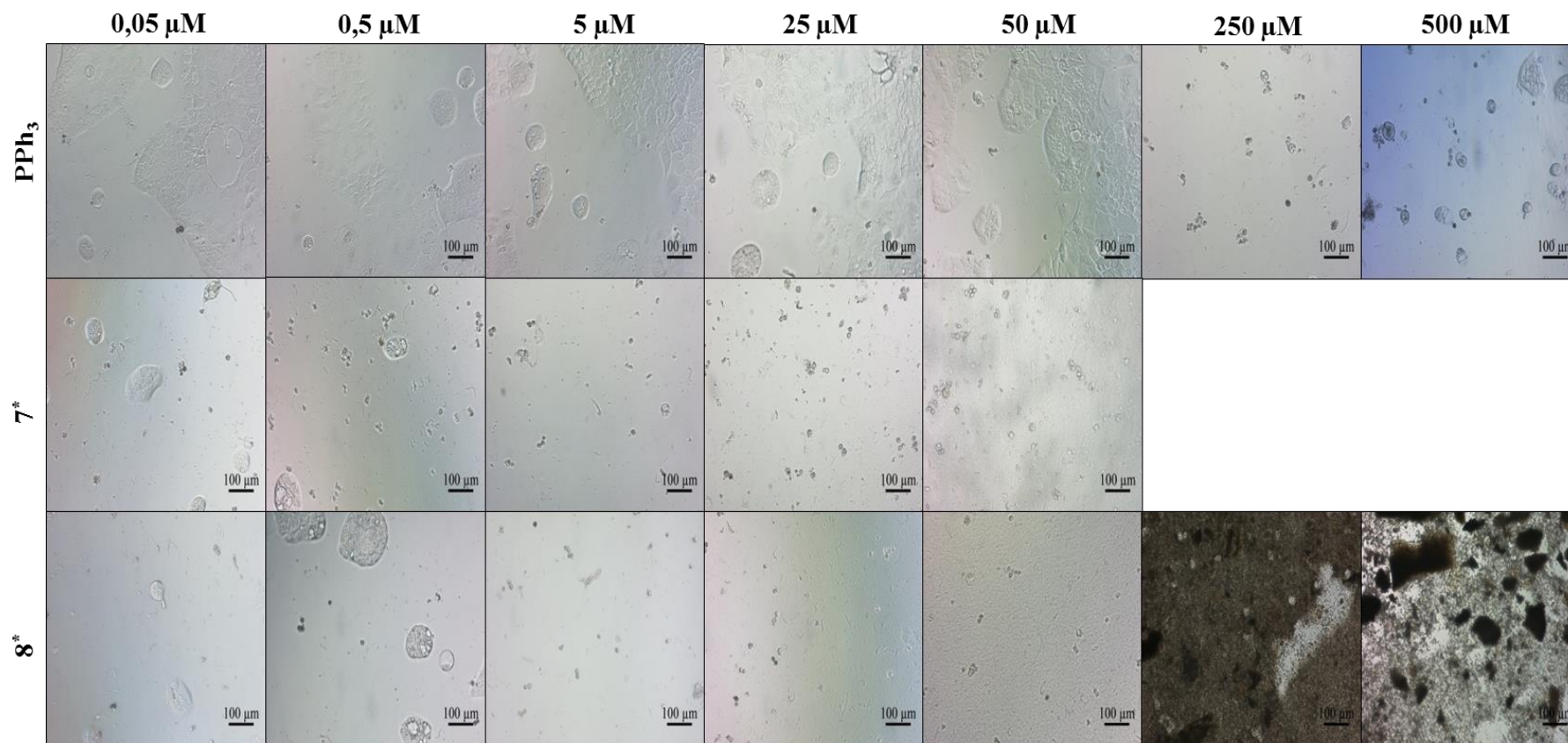


Figura II.II - Micrografias de campo claro das células Caco-2 após 72 horas de incubação com a PPh₃ e os metalodendrimeros **7** e **8** a diferentes concentrações, com uma ampliação de 200x (*para concentrações $\geq 25 \mu\text{M}$ os compostos **7** e **8** precipitaram).

II.II. Linha celular CAL-72

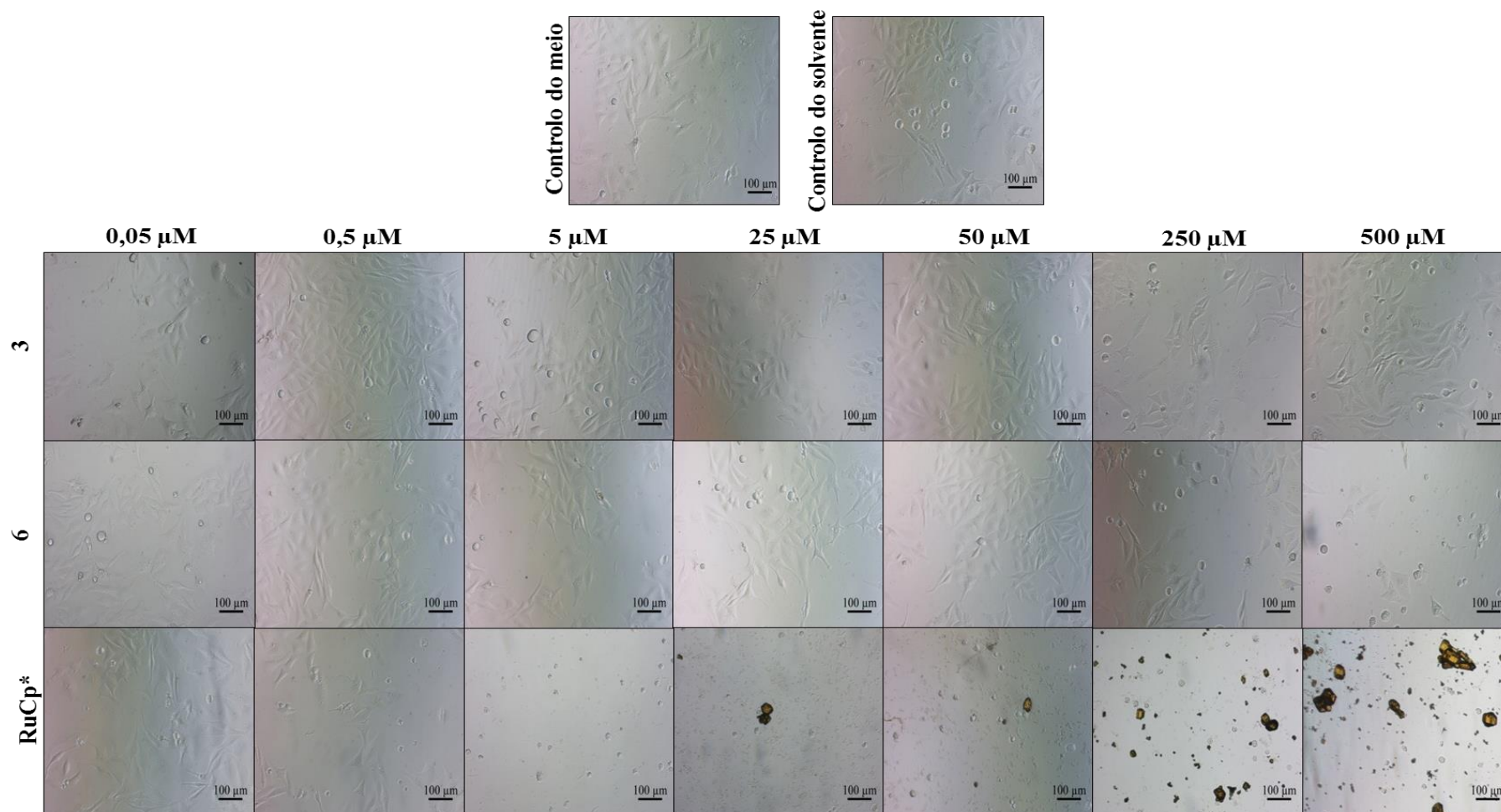


Figura II.III - Micrografias de campo claro das células CAL-72 após 72 horas de incubação com os dendrímeros **3** e **6** e o complexo RuCp a diferentes concentrações, com uma ampliação de 200x (*concentrações $\geq 25 \mu\text{M}$ do RuCp são desconhecidas).

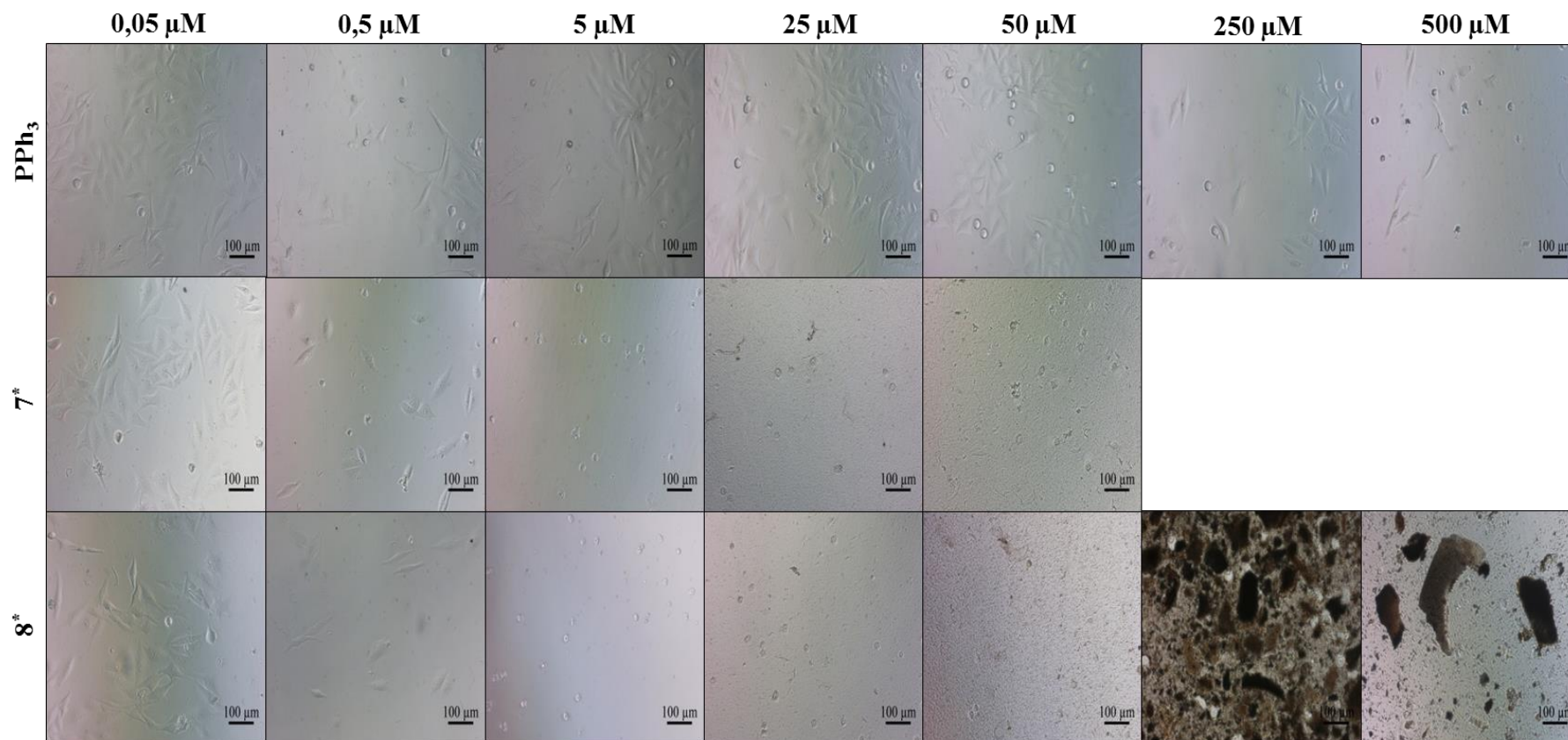


Figura II.IV - Micrografias de campo claro das células CAL-72 após 72 horas de incubação com a PPh₃ e os metalodendrímeros **7** e **8** a diferentes concentrações (*para concentrações $\geq 25 \mu\text{M}$ os compostos **7** e **8** precipitaram).

II.III. Linha celular MCF-7

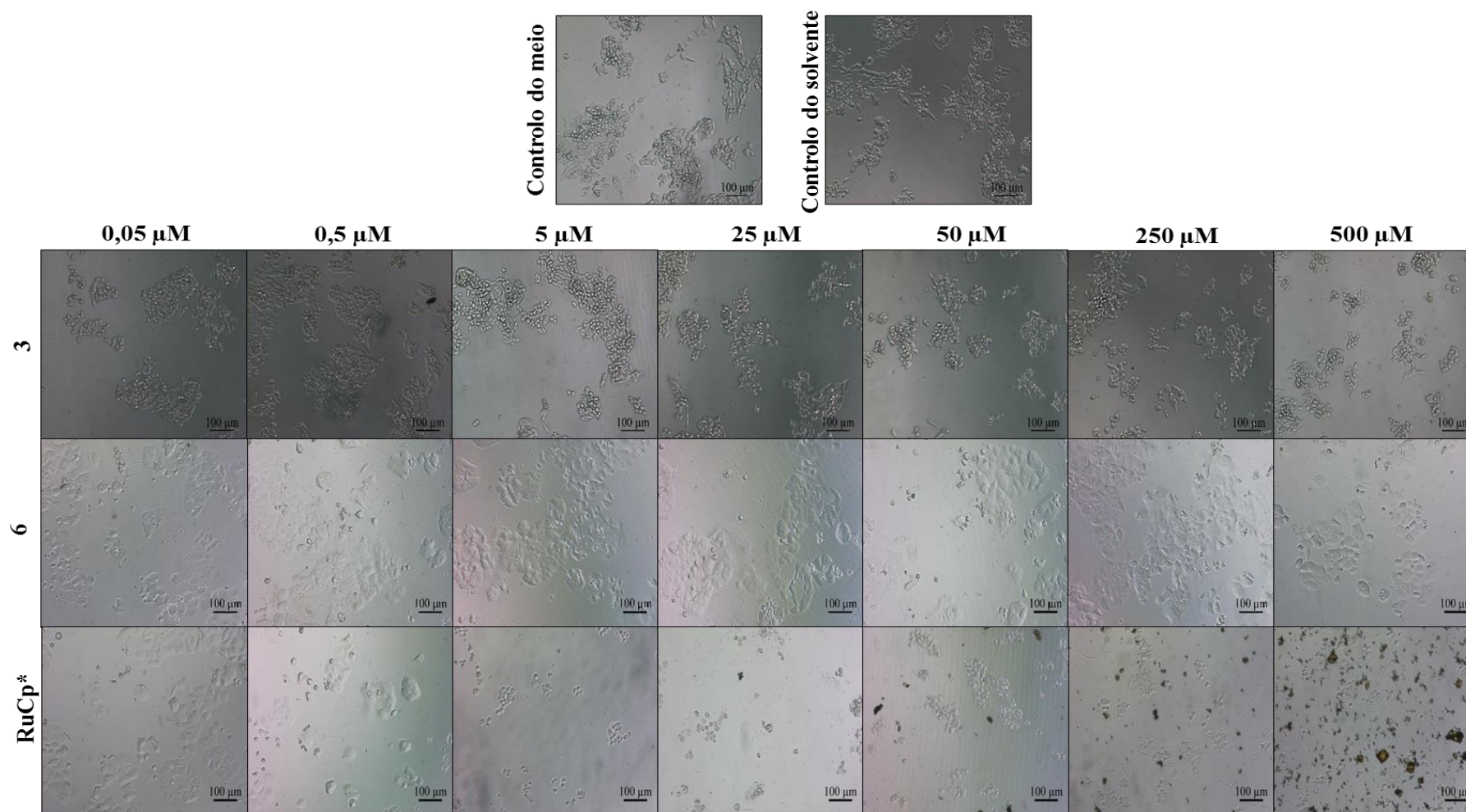


Figura II.V - Micrografias de campo claro das células MCF-7 após 72 horas de incubação com os dendrímeros **3** e **6** e o complexo RuCp a diferentes concentrações, com uma ampliação de 200x (*concentrações $\geq 25 \mu\text{M}$ do RuCp são desconhecidas).

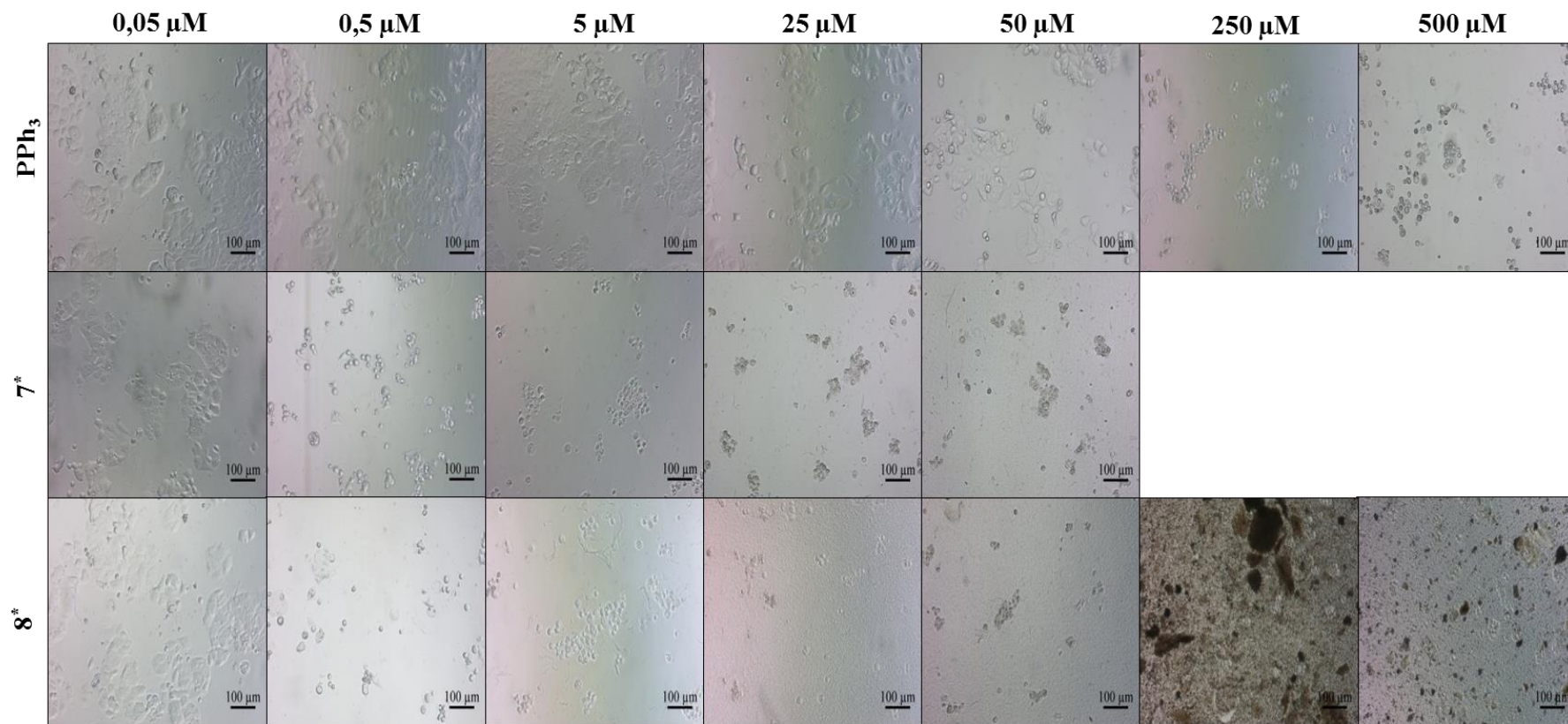


Figura II.VI - Micrografias de campo claro das células MCF-7 após 72 horas de incubação com a PPh₃ e os metalodendrímeros **7** e **8** a diferentes concentrações (*para concentrações $\geq 25 \mu\text{M}$ os compostos **7** e **8** precipitaram).

II.IV. Linha celular A2780

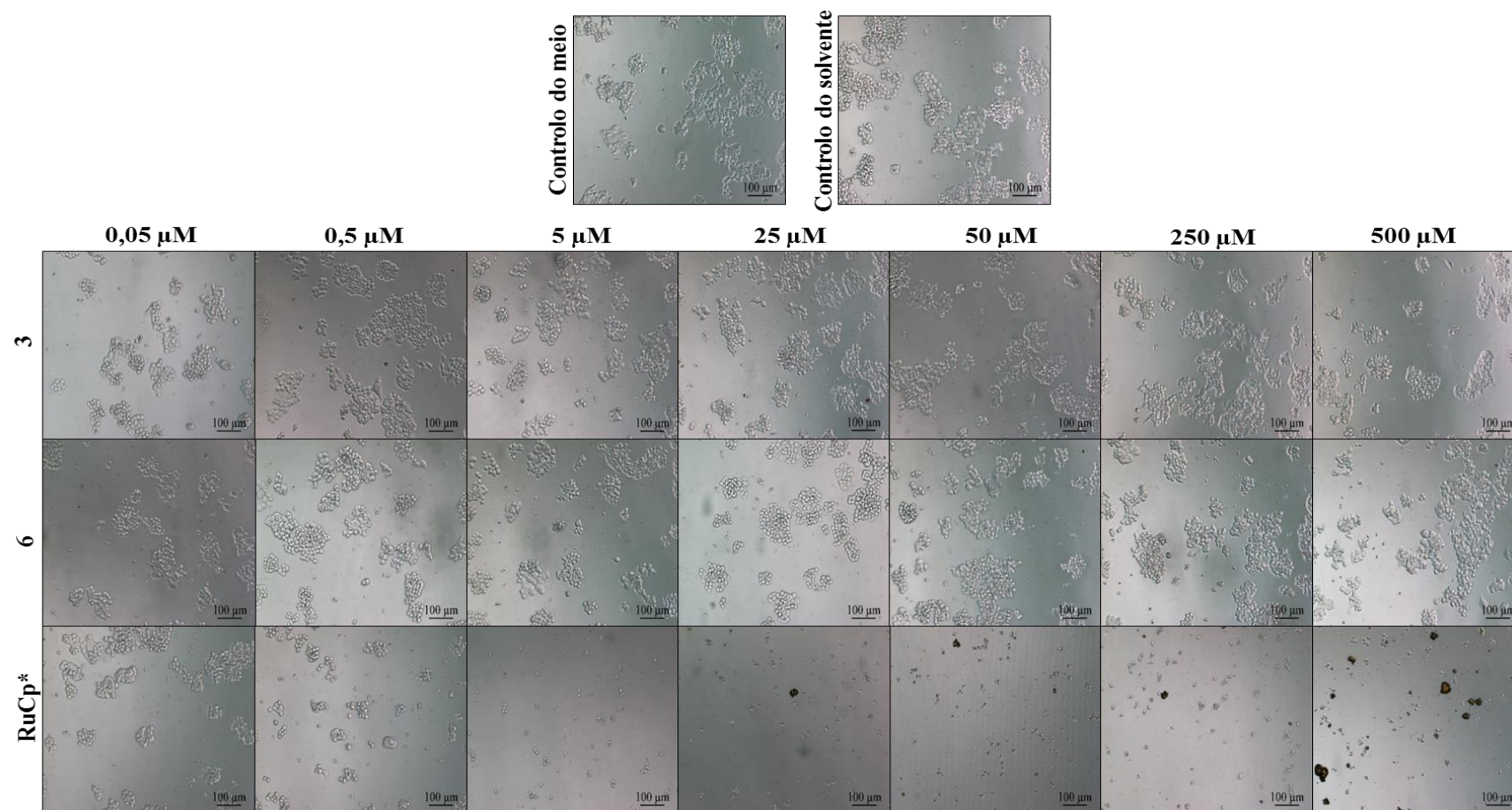


Figura II.VII - Micrografias de campo claro das células A2780 após 72 horas de incubação com os dendrímeros **3** e **6** e o complexo RuCp a diferentes concentrações, com uma ampliação de 200x (*concentrações $\geq 25 \mu\text{M}$ do RuCp são desconhecidas).

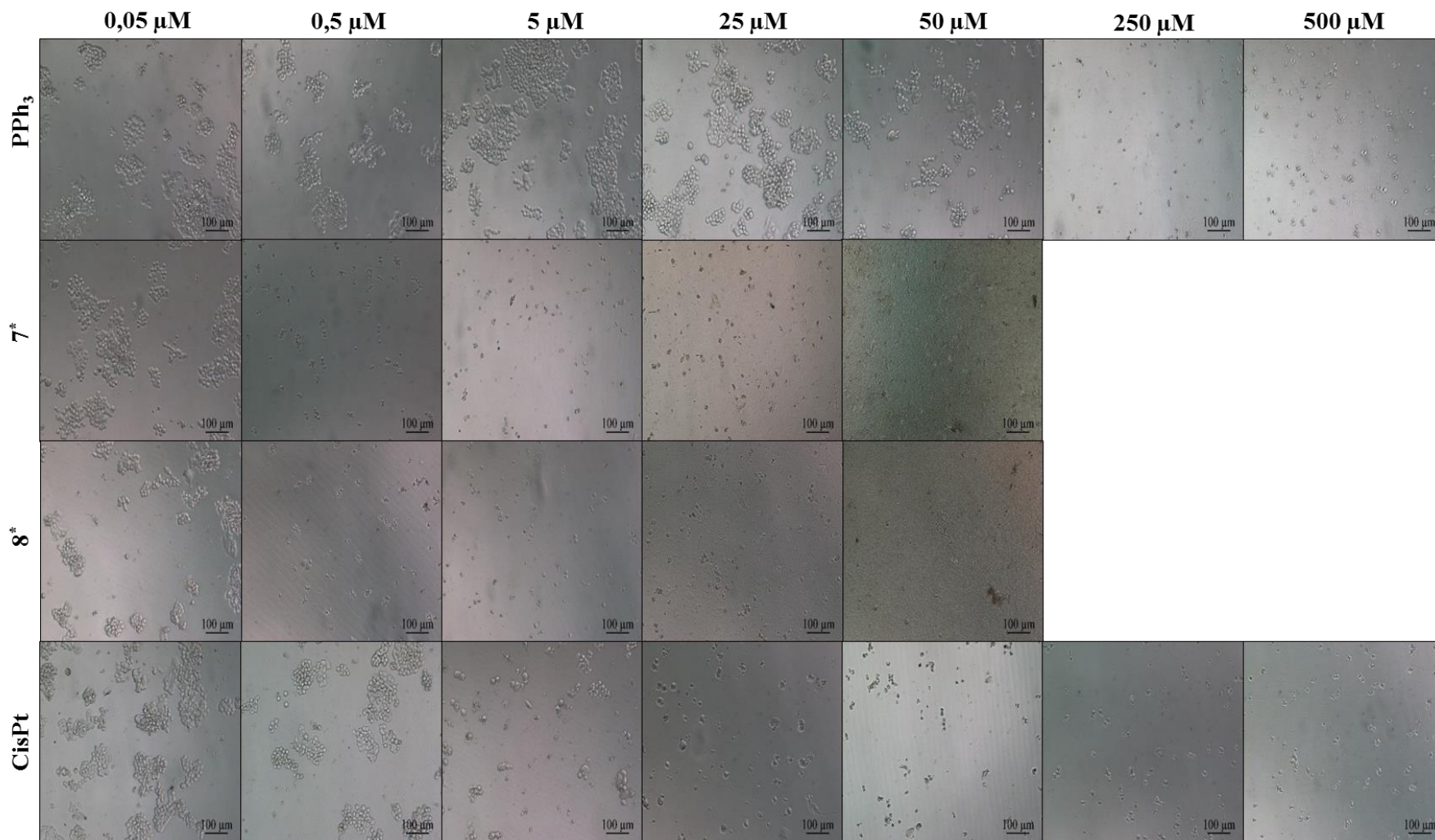


Figura II.VIII - Micrografias de campo claro das células A2780 após 72 horas de incubação com a PPh₃ e os metalodendrimeros **7** e **8** a diferentes concentrações (*para concentrações $\geq 25 \mu\text{M}$ os compostos **7** e **8** precipitaram).

II.V. Linha celular A2780cisR

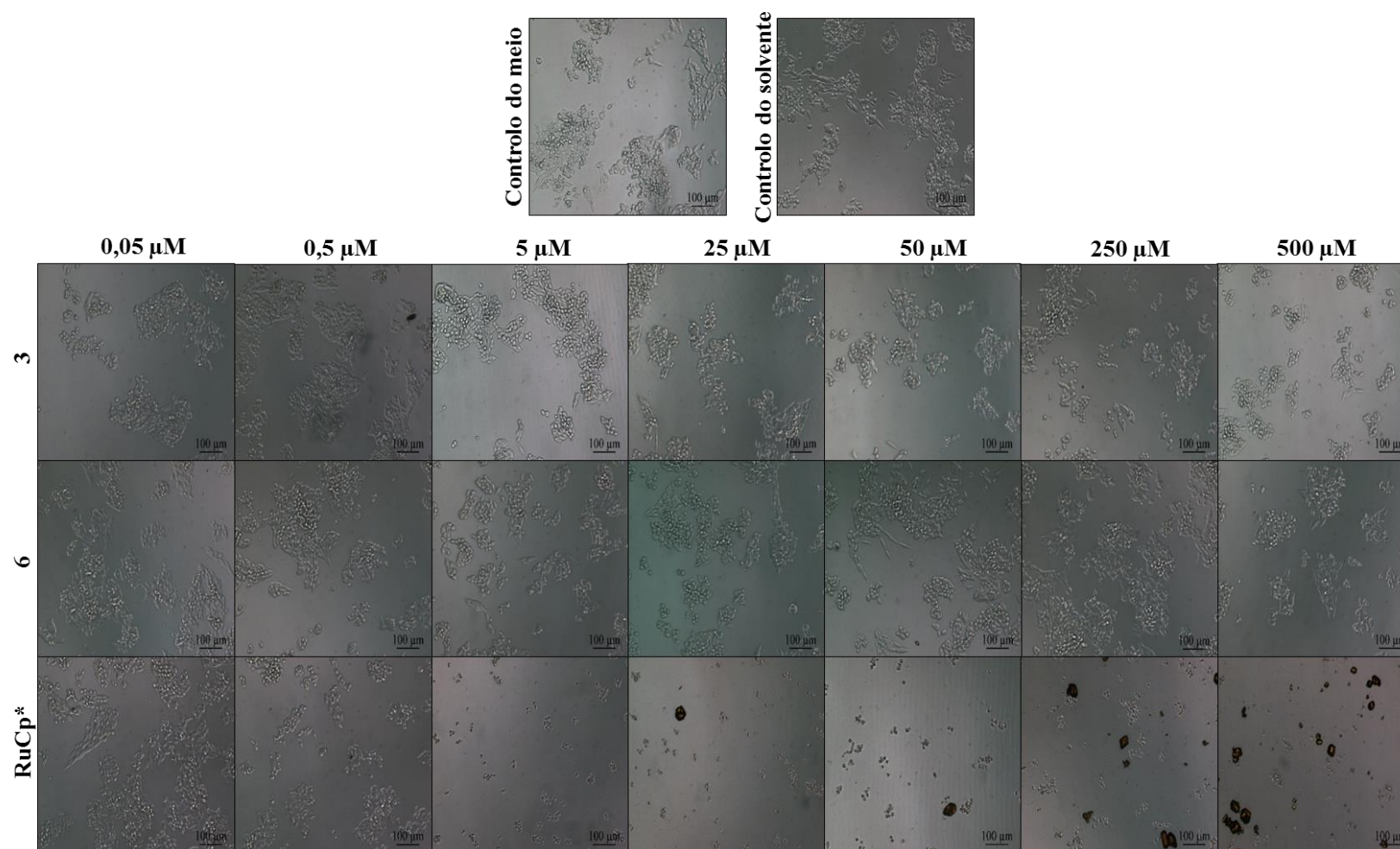


Figura II.IX - Micrografias de campo claro das células A2780cisR após 72 horas de incubação com os dendrímeros **3** e **6** e o complexo RuCp a diferentes concentrações, com uma ampliação de 200x (*concentrações $\geq 25 \mu\text{M}$ do RuCp são desconhecidas).

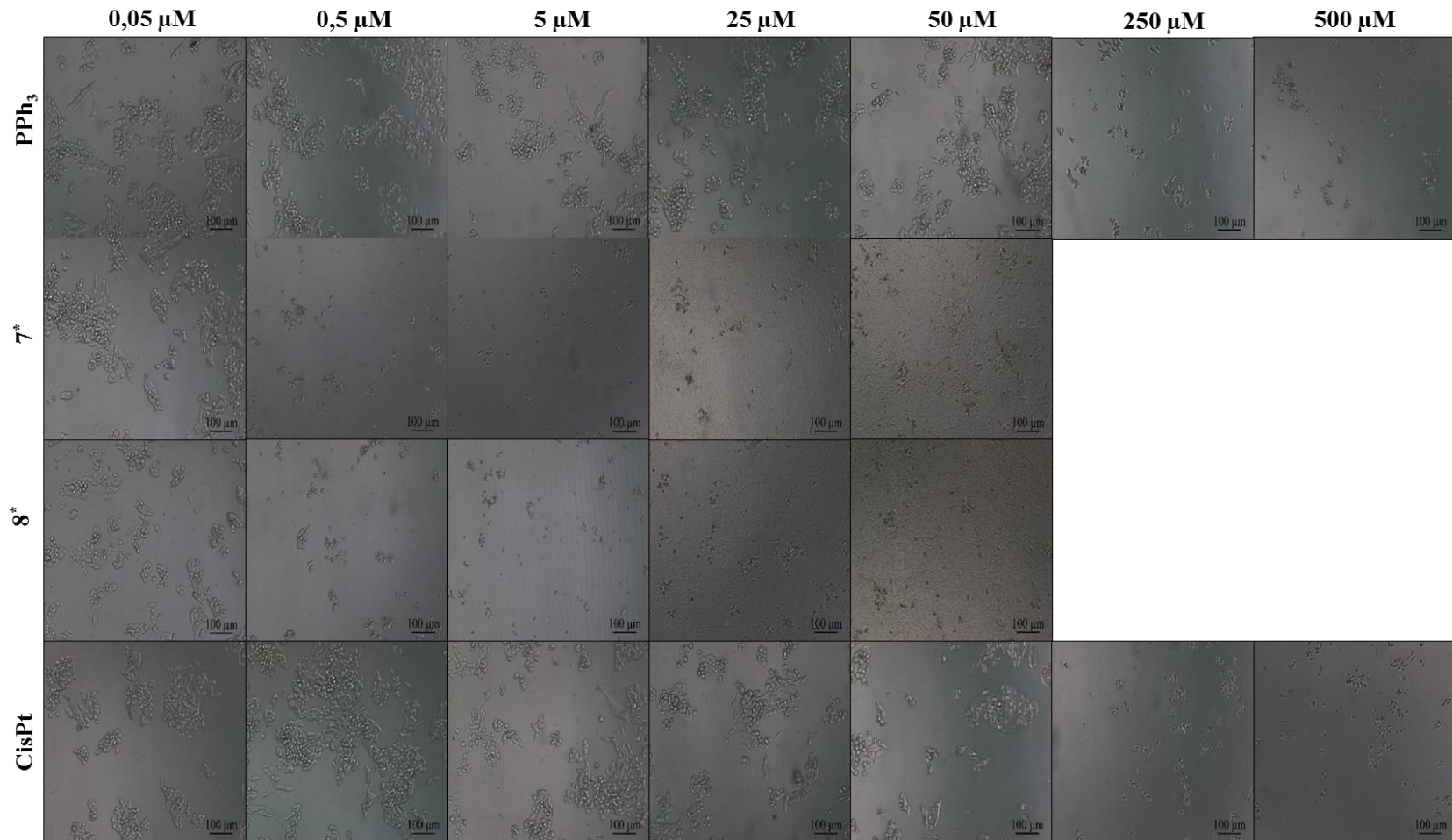


Figura II.X - Micrografias de campo claro das células A2780cisR após 72 horas de incubação com a PPh₃ e os metalodendrímeros **7** e **8** a diferentes concentrações (*para concentrações $\geq 25 \mu\text{M}$ os compostos **7** e **8** precipitaram).

II.VI. MSCs

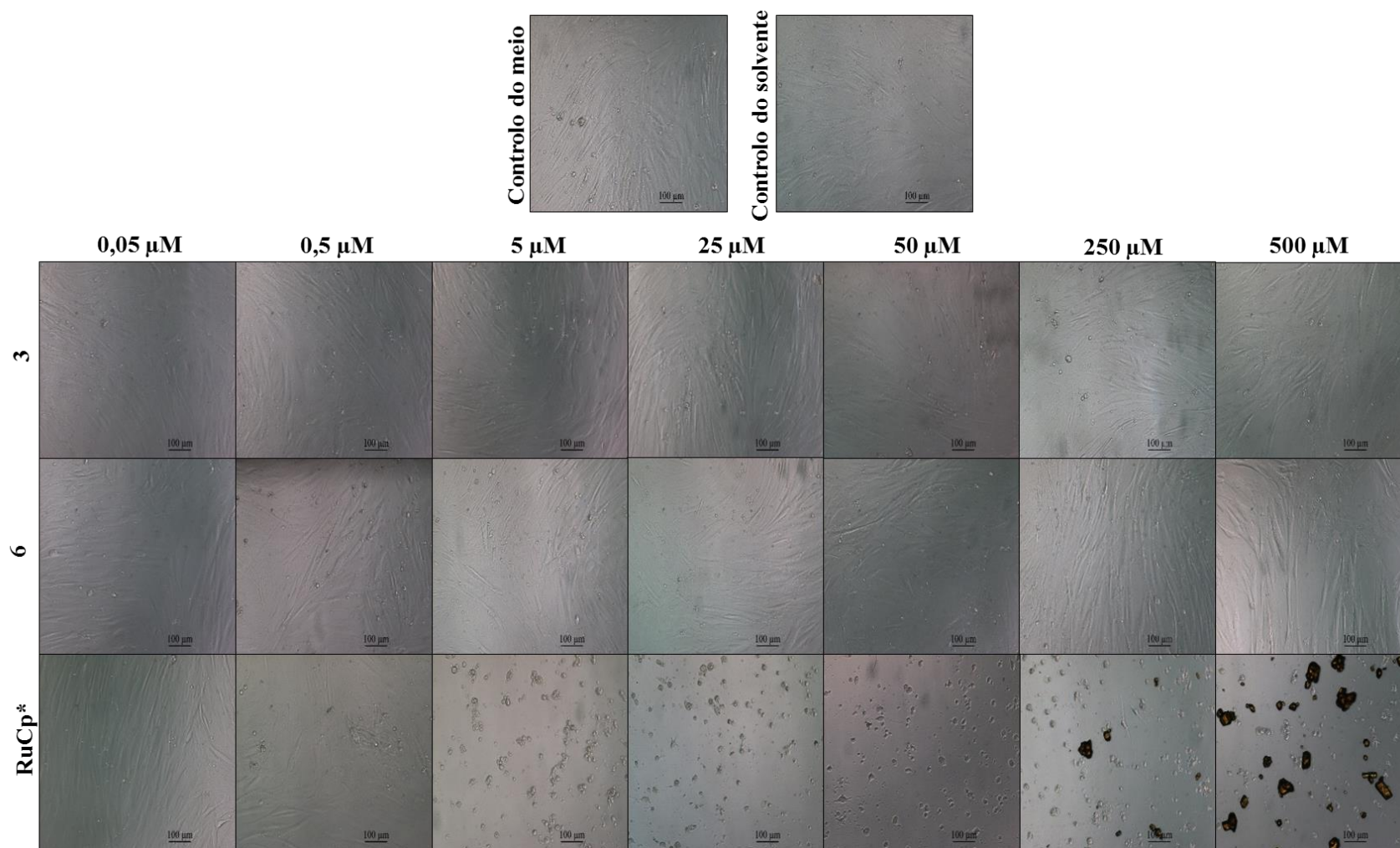


Figura II. XI - Micrografias de campo claro das MSCs após 72 horas de incubação com os dendrímeros **3** e **6** e o complexo RuCp a diferentes concentrações, com uma ampliação de 200x (*concentrações $\geq 25 \mu\text{M}$ do RuCp são desconhecidas).

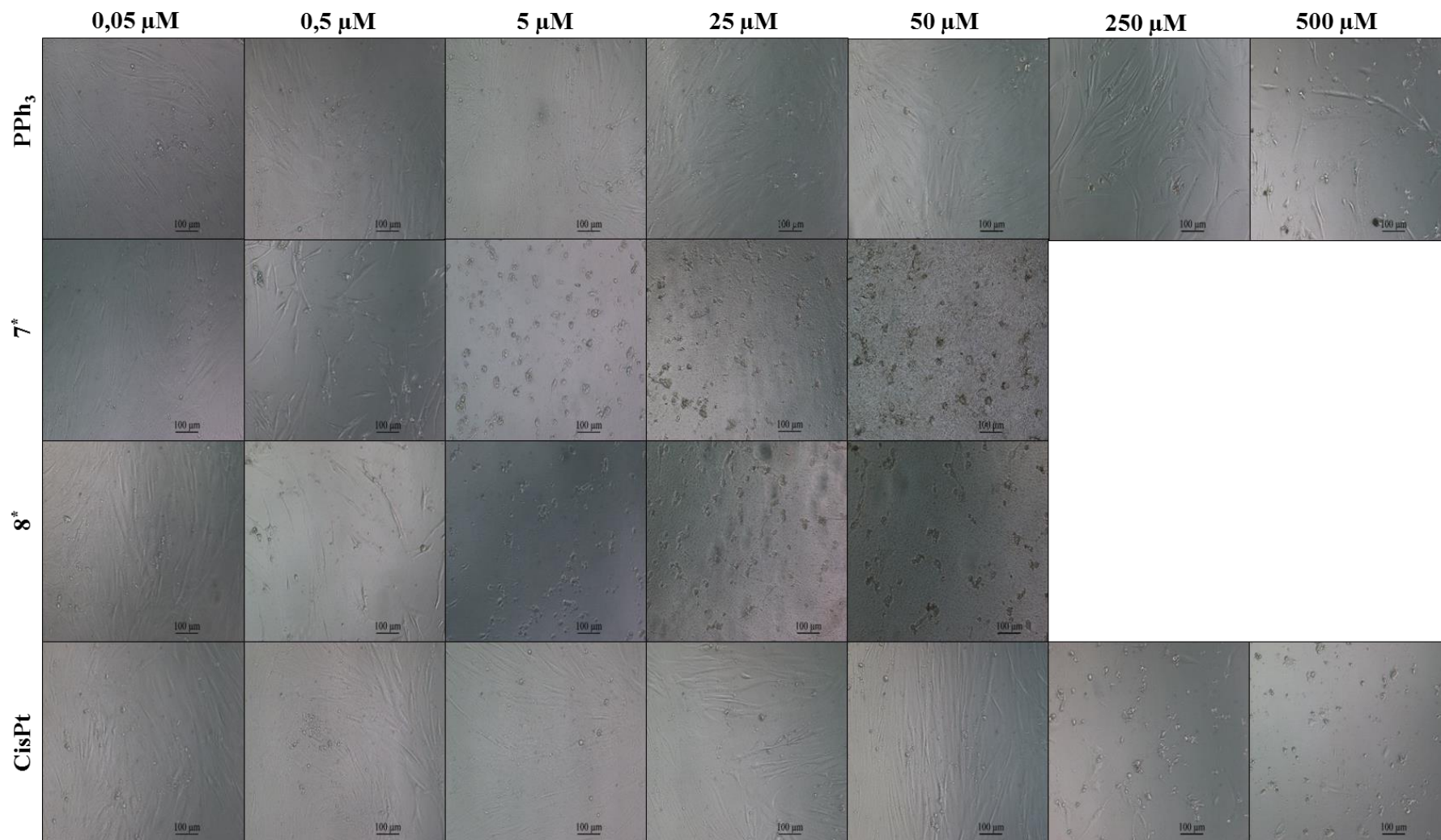


Figura II.XII - Micrografias de campo claro das MSCs após 72 horas de incubação com a PPh₃ e os metalodendrímeros **7** e **8** a diferentes concentrações (*para concentrações $\geq 25 \mu\text{M}$ os compostos **7** e **8** precipitaram).



FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA

