

Universidade Federal de Juiz de Fora

Pós-Graduação em Química

Mestrado em Química

Glaucia Franco Teixeira

COMPLEXOS MONO E DINUCLEARES DE PLATINA(II) COM LIGANTES
AMINADOS *N*-ALQUILADOS DE CADEIA LONGA: SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO E INCORPORAÇÃO EM LIPOSSOMAS

Juiz de Fora

2011

UFJF	GLAUCIA FRANCO TEIXEIRA	Complexos mono dinucleares de platina(II) com ligantes aminados N-alquilados de cadeia longa: Síntese, caracterização e incorporação em lipossomas	2011
-------------	--------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------

Glaucia Franco Teixeira

**COMPLEXOS MONO E DINUCLEARES DE PLATINA(II) COM LIGANTES
AMINADOS *N*-ALQUILADOS DE CADEIA LONGA: SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO E INCORPORAÇÃO EM LIPOSSOMAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração: Química Inorgânica, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Soares Fontes

Co-Orientador: Prof. Dr. Frederic Jean Georges Frezard

Juiz de Fora

2011

Dedico esse trabalho aos meus exemplos de vida, Maria Luisa, Noé, Sr. Franco e Everton, família que sempre me apoiou e incentivou em tudo. Obrigada. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus, Nossa Senhora Aparecida e Santa Rita de Cássia, por serem minha luz, meus guia e minha força em todos os momentos de minha vida.

À minha orientadora Ana Paula, pela paciência, ensinamentos, respeito e incentivo, me fazendo amadurecer e crescer como ser humano. Obrigada pela oportunidade de ser sua aluna e eterna admiradora.

Ao professor Frézard, pelo apoio, confiança e ensinamentos dados, enriquecendo ainda mais o meu trabalho, com a oportunidade de aprender novos conhecimentos.

Aos professores do departamento de química da UFJF, em especial aos professores Richard e Mara Rubia pelos conselhos e dicas sempre valiosos e de grande crescimento para mim.

Aos colegas do NUPEQ, que fizeram e fazem parte de todo esse trabalho, me incentivando e me ajudando. Em especial também aos amigos do lab. 3, pelas conversas, incentivo e café todas as tardes.

Aos meus grandes amigos do Lab. 2, Danilo, Guilherme, Heveline, Knop, Luiz Guilherme e Marluce que em todos os momentos dessa jornada me animaram, ajudaram e fizeram desse laboratório um ambiente muito agradável. Em especial agradeço imensamente ao Arthur, Carol, Marcelo, Marinez e Tati, que além de amigos sempre presentes em meu trabalho, são amigos fora deste ambiente, me apoiando em todos os momentos da minha vida.

Ao Erly, que me ensinou e orientou em vários momentos me mostrando muitas vezes a direção a seguir. Aos demais companheiros do LabNano-UFMG, que sempre me apoiaram durante a realização deste trabalho. Em especial agradeço à Heveline pelos ensinamentos e paciência em ajudar, me possibilitando o conhecimento de novas técnicas e conceitos, agradeço também pela realização dos testes biológicos.

Às amigas Aline, Gilvânia e Juliana que são amigas para a vida toda e que estão junto comigo desde o início da faculdade, em todos os momentos, vitórias e frustrações ao longo desse tempo. Muito obrigada amigas.

Aos amigos Roberta, Nelson, Luana, Patrícia e Taís que também estiveram muito presentes em todo esse trabalho e também em tantas outras situações.

Aos meus pais Maria Luisa e Noé, verdadeiros mestres na arte de educar, ensinar e apoiar. Pela dedicação dispensada a mim, amor incondicional que foi capaz de entender toda a minha ausência do convívio familiar em prol de um futuro melhor. Amo vocês!

Ao meu avô Sr. Franco, que juntamente com meus pais e irmão formam a minha base sólida, meu alicerce, meu porto seguro. Meu avô é um grande incentivador dos meus estudos e também me apoia em tudo, dando seus sábios conselhos, graças à sua grande experiência de vida.

Ao meu irmão Everton, carinhoso, compreensivo, companheiro e amigo, que sempre entendeu meus estresses, quase sempre descontados nele. Desculpa e obrigada por existir.

Aos meus grandes amigos Juninho, Lucas, Vívian, Alieisha, Vítor, Néia, Levi, Valéria, Mônica, Jussara, Nilza, Tiago, Daniela, Thaissinha, Lays, Luiz Filipe e Priscila pelas conversas sinceras, momentos de descanso, incentivo e distração que me deram força para seguir em frente.

À minha madrinha Rita que me ensinou a ler e escrever em sua escolinha, me fazendo gostar de estudar e também pela confiança depositada em mim e no meu sucesso.

Aos meus tios e primos que presenciaram inúmeras vezes eu andando pra lá e pra cá estudando, lendo ou pesquisando alguma coisa e que compreenderam essa necessidade.

Aos meus queridos alunos que sempre curiosos e carinhosos me incentivaram com palavras de carinho e me fazendo rir em muitos momentos agradáveis.

Aos professores e amigos do Departamento de Metalurgia do IFET, que durante um ano e meio deste trabalho estavam presentes me apoiando e fortalecendo em cada etapa.

À Capes pela bolsa concedida por alguns meses.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente estiveram presentes nessa minha conquista.

Obrigada!!

“Não confie no caminho que não tem obstáculos, e seja cauteloso até com seus filhos.
Em tudo o que você faz, acredite em si mesmo, porque também isso é observar os
mandamentos do Senhor!” (Ecl, 32, 21-23)

RESUMO

O câncer, atualmente, é considerado um problema de saúde pública, sendo responsável por cerca de 12% de todas as causas de óbito no mundo. O tratamento desta doença pode ser realizado através da quimioterapia, uma alternativa muito importante. Desde a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina, a investigação a respeito do uso de complexos metálicos na quimioterapia do câncer cresceu de forma relevante, isto porque a cisplatina possui elevada atividade, mas em contrapartida, severos efeitos colaterais. Portanto, visando à melhoria do espectro de atividade antitumoral, diminuição dos efeitos colaterais e a resistência celular, a síntese de complexos de platina têm sido de grande interesse em pesquisas científicas. Neste cenário, o presente trabalho visa obter novos complexos de platina com potencial atividade biológica, sua incorporação em lipossomas, visando um aumento desta potencial atividade. Os complexos apresentam ligantes diaminais *N*-alquilados com cadeia carbônica longa. Uma série de complexos apresenta um grupo hidroxila terminal no ligante e a outra série consiste de complexos dinucleares de platina. Os compostos sintetizados foram caracterizados por espectroscopia na região do IV, RMN de ^1H , de ^{13}C e de ^{195}Pt e análise elementar e tiveram sua citotoxicidade investigada em células tumorais e células não tumorais. Tendo em vista que nosso grupo de pesquisa tem investigado complexos de platina com ligantes diaminais *N*-alquilados com cadeias carbônicas longas, nosso objetivo é estudar a atividade biológica destes novos compostos, já que a presença da hidroxila terminal poderá afetar a polaridade do complexo e, conseqüentemente, sua interação com biomoléculas e a membrana celular.

Palavras chave: Ligantes aminados. Complexos de Platina. Lipossomas. Agentes Antitumorais.

ABSTRACT

Cancer is considered a public health problem, accounting for about 12% of all causes of death around the world. The treatment of this disease can be achieved using chemotherapy, a very important alternative. Since the discovery of the antitumor activity of cisplatin, studies involving the use of metal complexes as drugs have grown substantially, since cisplatin shows high activity, but on the other hand, severe side effects. Therefore, aiming to improve the spectrum of antitumor activity, reduce these side effects and cellular resistance, the synthesis of platinum complexes have been of great interest in scientific research. Within this context, the principal objective of the present work is to obtain novel platinum complexes with potential biological activity, to incorporate these complexes into liposomes, and hoping for a potential increase in their biological activity. The complexes present long alkyl chain diamine as ligands. The first series of complexes incorporates a terminal hydroxyl substituent and the second series are constituted of dinuclear complexes. The synthesized complexes were characterized by IR, ^1H , ^{13}C and ^{195}Pt NMR spectroscopies, elemental analysis and their cytotoxicities have been investigated in both normal and tumor cells. Our research group has previously studied complexes employing long chain, *N*-alkyl derivatives of diamines as ligands. We are interested in investigating the impact of the new ligands on the activity of the complexes, considering that the presence of the hydroxyl group could affect the polarity of the complex and consequently, its interaction with biomolecules and the cellular membrane.

Keys-words: Diamines Ligands. Platinum Complexes. Liposomes. Antitumor Agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira.....	21
Figura 2	Transformação de uma célula normal em uma célula cancerosa.....	21
Figura 3	Compostos utilizados no tratamento contra o câncer - A: taxol e B: vimblastina.....	24
Figura 4	Compostos utilizados no tratamento contra o câncer - A: cisplatina e B: carboplatina.....	24
Figura 5	Estrutura da Nedaplatina.....	26
Figura 6	Estrutura da Lobaplatina.....	27
Figura 7	Estrutura da Oxaloplatina.....	27
Figura 8	Estrutura da Picoplatina.....	27
Figura 9	Hidrólise da Cisplatina.....	30
Figura 10	Mecanismo de ação da cisplatina, influxo e efluxo.....	31
Figura 11	Aduto intrafita entre cisplatina e as bases do DNA.....	32
Figura 12	Aduto interfita entre cisplatina e as bases do DNA.....	32
Figura 13	Estrutura da Iproplatina.....	33
Figura 14	Estrutura da Satraplatina.....	34
Figura 15	Estrutura da Tetraplatina.....	34
Figura 16	Complexo bis-platina (dinuclear).....	35
Figura 17	BBR3464 – trinuclear.....	35
Figura 18	AH78 – trinuclear.....	35
Figura 19	Evolução dos Lipossomas.....	36
Figura 20	Características estruturais dos lipossomas.....	38
Figura 21	Representação das várias utilizações dos lipossomas e inter-relação entre os diversos parâmetros que os caracterizam.....	38
Figura 22	Estrutura de um lipossoma do tipo MLV.....	39
Figura 23	Estrutura da Aroplatina.....	40
Figura 24	Estrutura da AP5346.....	40
Figura 25	Síntese dos Ligantes Diaminados <i>N</i> -alquilados de Cadeia Longa com Hidroxila Terminal.....	57
Figura 26	Espectros de IV para os compostos 1 e 2	58

Figura 27	Espectro de IV para um monomesilato.....	59
Figura 28	Espectro de RMN de ^1H para o composto 1.....	60
Figura 29	Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 1.....	60
Figura 30	Espectro de RMN de ^1H para o composto 2.....	61
Figura 31	Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 2.....	61
Figura 32	Síntese dos Ligantes Aminados <i>N</i> -alquilados de Cadeia Longa.....	63
Figura 33	Espectros de IV para os compostos 5 e 6.....	64
Figura 34	Espectro de IV para um ditosilato.....	65
Figura 35	Espectro de RMN de ^1H para o composto 6.....	66
Figura 36	Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 6.....	66
Figura 37	Espectro de RMN de ^1H para o composto 5.....	67
Figura 38	Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 5.....	67
Figura 39	Síntese dos Complexos de Platina(II) com Ligantes Diaminados <i>N</i> -alquilados de Cadeia Longa com Hidroxila Terminal.....	69
Figura 40	Espectros de IV para os compostos 3 e 4.....	69
Figura 41	Espectros de IV para os compostos 3, 4 e 2.....	70
Figura 42	Espectro de RMN de ^1H para o composto 3.....	71
Figura 43	Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 3.....	71
Figura 44	Espectro de RMN de ^1H para o composto 4.....	72
Figura 45	Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 4.....	72
Figura 46	Espectro de RMN de ^{195}Pt para o composto 3.....	73
Figura 47	Espectro de RMN de ^{195}Pt para o composto 4.....	73
Figura 48	Síntese dos Complexos Dinucleares de Platina(II).....	75
Figura 49	Espectros de IV para os compostos 7, 8 e 5.....	76
Figura 50	Espectro de RMN de ^1H para o composto 8.....	77
Figura 51	Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 8.....	77
Figura 52	Espectro de RMN de ^{195}Pt para o composto 8.....	78
Figura 53	Espectro de RMN de ^1H para o composto 7.....	78
Figura 54	Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 7.....	79
Figura 55	Espectro de RMN de ^{195}Pt para o composto 7.....	79
Figura 56	Etapas para preparação dos lipossomas do tipo MLV.....	82
Figura 57	Balço hidrofílico/hidrofóbico dos complexos de platina.....	88

Figura 58	Relação entre a taxa de incorporação dos complexos em lipossomas e o seu coeficiente de partição [P].....	89
Figura 59	Redução do MTT ao composto Formazan.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados de Caracterização dos Lipossomas.....	86
Tabela 2	Condições de uso do Espectrômetro de Absorção Atômica.....	87
Tabela 3	Coeficientes de Partição [<i>P</i>] octanol/água.....	88
Tabela 4	Citotoxicidade dos Complexos em Células Tumorais.....	95
Tabela 5	Citotoxicidade dos Complexos em Células Não Tumorais.....	97
Tabela 6	Citotoxicidade comparativa do Composto 4 Livre e Incorporado em Lipossomas.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CCDS	Cromatografia em camada delgada de sílica
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CH	Colesterol
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilssulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilssulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DSPC	1,2-Diestearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fostatidilcolina
DSPE-PEG-2000	1,2-Diestearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina- <i>N</i> [metoxi(polietileno glicol)-2000]
EAA-FG	Espectroscopia de Absorção Atômica por Forno de Grafite
EtOH	Etanol
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IV	Infravermelho
m	Multiplete
MHz	Megahertz
MLV	Vesículas Multilamelares
MTT mmol	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazol milimol
NEt ₃	Trietilamina
ppm	Partes por milhão
quint	Quinteto
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN de ¹⁹⁵ Pt	Ressonância Magnética Nuclear de Platina
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
sl	Simpleto
t	Triplete
THF	Tetraidrofurano

TMS	Tetrametilsilano
WST	Water soluble tetrazolium (tetrazólio solúvel em água)
XTT	2H-Hidróxi-2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-5- [(fenilamino)carbonil]tetrazólio
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	CÂNCER.....	19
1.2	COMPLEXOS DE PLATINA NO TRATAMENTO DO CÂNCER.....	24
1.3	RELAÇÃO ESTRUTURA E ATIVIDADE DOS COMPLEXOS DE PLATINA.....	28
1.4	REATIVIDADE E MECANISMO DE AÇÃO DA CISPLATINA.....	29
1.5	COMPLEXOS DE PLATINA(IV).....	33
1.6	COMPLEXOS POLINUCLEARES DE PLATINA(II).....	34
1.7	LIPOSSOMAS.....	36
1.8	LIPOSSOMAS E COMPLEXOS DE PLATINA.....	39
1.9	OBJETIVOS.....	41
2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES DIAMINADOS E AMINADOS N-ALQUILADOS DE CADEIA LONGA E SEUS RESPECTIVOS COMPLEXOS.....	42
2.1	REAGENTES.....	42
2.2	ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	42
2.3	FAIXA DE FUSÃO E DE DECOMPOSIÇÃO.....	43
2.4	ESPECTROS DE RMN DE ¹ H, ¹³ C E DE ¹⁹⁵ PT.....	43
2.5	ANÁLISE ELEMENTAR.....	43
2.6	SÍNTESE DE LIGANTES DIAMINADOS N-ALQUILADOS DE CADEIA LONGA COM HIDROXILA TERMINAL.....	44
2.7	DADOS E CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES DIAMINADOS N-ALQUILADOS DE CADEIA LONGA COM HIDROXILA TERMINAL.....	45
2.8	SÍNTESE DE LIGANTES AMINADOS N-ALQUILADOS DE CADEIA LONGA.....	47
2.9	DADOS E CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES AMINADOS N-ALQUILADOS DE CADEIA LONGA.....	48
2.10	SÍNTESE DOS COMPLEXOS DE PLATINA(II) COM LIGANTES DIAMINADOS N-ALQUILADOS DE CADEIA LONGA COM HIDROXILA TERMINAL.....	50

2.11	DADOS E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE PLATINA(II) COM LIGANTES DIAMINADOS <i>N</i> -ALQUILADOS DE CADEIA LONGA COM HIDROXILA TERMINAL.....	51
2.12	SÍNTESE DOS COMPLEXOS DINUCLEARES DE PLATINA(II).....	53
2.13	DADOS E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DINUCLEARES DE PLATINA(II).....	54
2.14	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
2.14.1	Ligantes Diaminados <i>N</i> -alquilados de Cadeia Longa com Hidroxila Terminal.....	56
2.14.2	Ligantes Aminados <i>N</i> -alquilados de Cadeia Longa.....	62
2.14.3	Complexos de Platina(II) com Ligantes Diaminados <i>N</i> -alquilados de Cadeia Longa com Hidroxila Terminal.....	68
2.14.4	Complexos Dinucleares de Platina(II).....	74
3	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS CONTENDO COMPLEXOS DE PLATINA(II).....	80
3.1	INTRODUÇÃO.....	80
3.2	PARTE EXPERIMENTAL.....	81
3.2.1	Reagentes e Métodos Instrumentais.....	81
3.2.2	Preparação dos Lipossomas contendo os Complexos de Platina(II).....	82
3.2.3	Calibração do Tamanho dos Lipossomas e Eliminação do Complexo não Incorporado.....	83
3.2.4	Caracterização das Formulações de Lipossomas contendo os Complexos de Platina(II).....	83
3.2.4.1	Medida de Distribuição de Tamanho das Vesículas.....	83
3.2.4.2	Determinação da Taxa de Encapsulação.....	83
3.2.5	Determinação do Coeficiente de Partição dos Complexos.....	83
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE COMPLEXOS DE PLATINA(II) E DE SUAS FORMULAÇÕES EM LIPOSSOMAS.....	90
4.1	INTRODUÇÃO.....	90
4.2	PARTE EXPERIMENTAL.....	91
4.2.1	Reagentes e Métodos Instrumentais.....	91
4.2.2	Linhagens.....	92

4.2.3	Preparação das Soluções de Complexo de Platina(II) e de Lipossomas contendo os Complexos.....	93
4.2.4	CI ₅₀ dos Complexos de Platina em Linhagens de Células Tumorais e Células Não Tumorais, Determinada pelo Método MTT.....	93
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
5	CONCLUSÕES.....	99
	REFERÊNCIAS.....	101

1 Introdução

1.1 Câncer

O câncer é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, o que representa cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo. Embora as maiores taxas de incidência de câncer sejam encontradas em países desenvolvidos, dos dez milhões de casos novos anuais de câncer, cinco milhões e meio são diagnosticados nos países em desenvolvimento (Guerra, Gallo, Azevedo, Mendonça, 2005).

A epidemiologia do câncer no Brasil nos mostra uma transição em andamento, envolvendo um aumento entre os tipos de câncer que normalmente estão associados ao alto status sócio-econômico, como por exemplo, o câncer de mama, próstata e cólon e reto e, simultaneamente, a presença de taxas de incidência relativamente elevadas de tumores normalmente associados à pobreza, como câncer de colo de útero, pênis, estômago e cavidade oral (Koifman, Koifman, 2003). Estes dados estão certamente ligados à exposição a um grande número de diferentes fatores de risco ambientais relacionados ao processo de industrialização – agentes químicos, físicos e biológicos - e de exposição a outros fatores ligados às desigualdades sociais.

O nome câncer é dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo, a chamada metástase (INCA, 2010). Estas células por se dividirem muito rapidamente determinam a formação de tumores, que são o acúmulo destas células cancerosas. Por outro lado, um tumor benigno significa uma massa localizada de células que se multiplicam e se assemelham ao seu tecido original, o que raramente consiste em risco de vida. As causas do câncer são diversas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas diretamente correlacionadas. As causas externas referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade ou indivíduo, sendo responsável por 80% a 90% de todos os casos de cânceres. Já as causas internas são, na sua grande maioria, geneticamente pré-determinadas, estando ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (INCA, 2010).

O câncer pode ser classificado de acordo com o órgão ou tipo de célula no qual ele iniciou, podendo ser agrupado por categorias, sendo que as principais incluem: carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma e mieloma, e glioma (Guerra, Gallo, Azevedo, Mendonça, 2005).

Sem dúvida o carcinoma é o tipo mais comum de câncer, originando-se de células que revestem o corpo, incluindo a pele e uma série de revestimentos internos, como os da boca, garganta, brônquios, esôfago, estômago, intestino, bexiga, útero e ovários, e os revestimentos dos dutos mamários, próstata e pâncreas. O sarcoma origina-se de tecidos de suporte, tais como ossos, tecido gorduroso, músculo e tecido fibroso de reforço, encontrados na maior parte do corpo. A leucemia está relacionada a células da medula óssea que produzem as células sanguíneas brancas. Linfoma e mieloma são cânceres que se originam das células do sistema imunológico. Por fim o glioma é um tipo de câncer que se origina a partir de células do tecido de suporte cerebral ou da medula espinhal (Guerra, Gallo, Azevedo, Mendonça, 2005).

A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (*World Cancer Report 2008*) em um recente relatório, estimou que ocorreriam 12,4 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. No Brasil, estima-se para os anos de 2010 e 2011, a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer, sendo os tipos mais incidentes, com exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino (INCA, 2010).

Em 2010, são esperados 236.240 casos novos para o sexo masculino e 253.030 para sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil) (INCA, 2010) (Figura 1).

Diante desse cenário, com cada vez mais novos casos sendo diagnosticados, fica nítida a necessidade de investimentos cada vez maiores no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação, como: na promoção da saúde, na detecção precoce, na assistência aos pacientes, na vigilância, na formação de recursos humanos, na comunicação e mobilização social, na pesquisa e na gestão do Sistema Único de Saúde (SUS) (INCA, 2010).

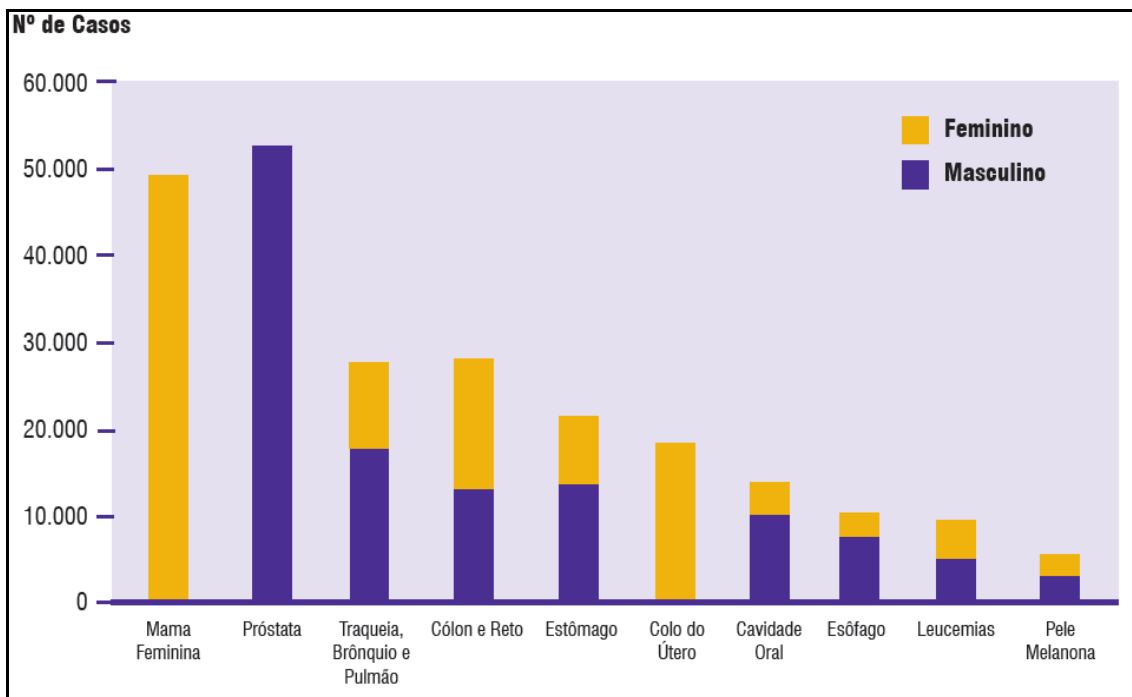


Figura 1: Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira (Fonte: Instituto Nacional de Câncer - INCA/ MS)

As alterações que geram as neoplasias podem ocorrer em genes especiais denominados protooncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quando ativados, esses genes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização (transformação) das células normais (Figura 2). Estas células diferentes são, então, denominadas cancerosas, ou melhor, tumorais (Almeida, Leitão, Reina, Montanari, Donnici, Lopes, 2005).

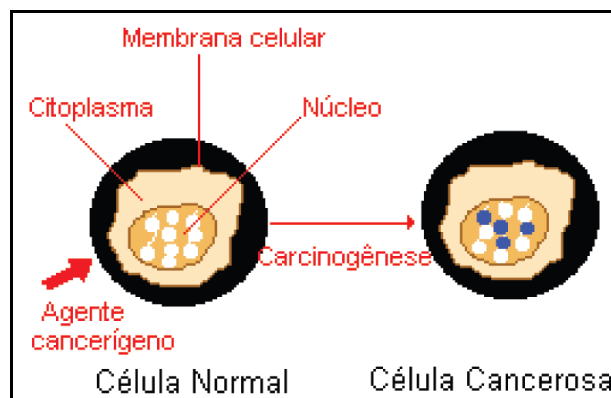


Figura 2: Transformação de uma célula normal em uma célula cancerosa

Essas células que se encontram alteradas passam a se comportar de forma anormal, multiplicando-se de maneira descontrolada. Devido a constante multiplicação celular, há a necessidade de que novos vasos sanguíneos sejam formados para que haja a nutrição destas células, em um processo denominado angiogênese. A manutenção e o acúmulo de massa dessas células formam os tumores malignos e elas também podem adquirir a capacidade de se desprenderem do tumor e de migrarem, invadindo inicialmente os tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através destes, disseminarem-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases (Almeida, Leitão, Reina, Montanari, Donnici, Lopes, 2005).

As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções que as suas correspondentes normais. Conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções; assim, por exemplo, a invasão neoplásica dos pulmões gera alterações respiratórias; com isto há a disfunção orgânica que pode levar à falência do órgão ou, em casos mais graves, leva à morte do paciente (Almeida, Leitão, Reina, Montanari, Donnici, Lopes, 2005).

Este processo de carcinogênese (INCA, 2005; Spence, Jonhston, 2001; Chabner, Longo, 1996; Foye, Sengupta, Lemke, Willians, 1996) geralmente ocorre lentamente, podendo até levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor detectável. Isso acontece, pois este processo passa por vários estágios antes de chegar ao tumor, que são: estágio de iniciação, de promoção e de progressão.

O primeiro estágio da carcinogênese é a iniciação, onde as células sofrem o efeito de um agente carcinogênico, oncoiniciador, que provoca modificações em alguns de seus genes. Nesta fase as células encontram-se geneticamente alteradas, porém ainda não é possível se detectar um tumor clinicamente (Spence, Jonhston, 2001; Chabner, Longo, 1996).

O segundo estágio é o de promoção, onde as células que já estão geneticamente alteradas sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. Esta célula é então transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que essa transformação ocorra, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato muitas vezes interrompe o processo nesse estágio (Spence, Jonhston, 2001; Chabner, Longo, 1996).

O último estágio é o de progressão, onde ocorre a multiplicação descontrolada, sendo um processo irreversível. Neste caso, o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença. Os fatores que promovem a iniciação ou progressão da carcinogênese são chamados de carcinógenos (Spence, Jonhston, 2001; Chabner, Longo, 1996). O fumo, por exemplo, é um agente carcinógeno completo, pois possui componentes que atuam nos três estágios da carcinogênese.

Hoje em dia, são considerados basicamente três tipos de tratamento no combate ao câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia (Foye, Sengupta, Lemke, Willians, 1996; Murad, Katz, 2000). No entanto, recentemente tem-se usado a terapia de fotorradiação com derivados hematoporfirínicos (Machado, 2000) e a imunoterapia (Salmonm, Katzung, 1998), sendo que o objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, normalmente por meio da terapia combinada, onde é associado mais que um tipo de tratamento.

A cirurgia pode levar à remoção de tumores com eficácia, caso não haja metástase, uma exceção é a leucemia, pois neste caso costuma ser necessário o uso de outros tipos de terapia (Murad, Katz, 2000), incluindo o transplante de medula. A radioterapia é usada geralmente em conjunto com a cirurgia, como alternativa para uma maior eficiência do tratamento, mas isoladamente, a radioterapia também pode diminuir tumores de grande tamanho, diminuir a recorrência e a chance de metástase, sendo, portanto uma metodologia antineoplásica muito usada; entretanto, o tratamento por radiação é sujeito a severas limitações, mesmo com a utilização de sensibilizadores, que servem para diminuir os efeitos colaterais (Murad, Katz, 2000).

No caso da quimioterapia, são utilizados fármacos que podem ser divididos nas seguintes categorias dentre os citotóxicos: a primeira categoria forma ligações covalentes com o DNA, conseqüentemente impedindo sua replicação, sendo um exemplo os complexos de platina; antimetabólitos que atuam bloqueando uma ou mais vias metabólicas envolvidas na síntese do DNA; antibióticos citotóxicos, que são substâncias de origem microbiana que evitam a divisão celular nos mamíferos e os derivados de plantas que podem ser alcalóides da vinca, taxanos e campotecinas (Rang, Dale, Ritter, Flower, 1997).

De acordo com as categorias de fármacos usados na quimioterapia citados acima, pode-se dividir ainda em compostos orgânicos e complexos metálicos, sendo alguns

exemplos ilustrados nas figuras 3 e 4, onde se observa o Taxol e Vimblastina (compostos orgânicos) (figura 3) e a Cisplatina e Carboplatina (complexos metálicos) (Fontes, César, Beraldo, 2005; Fontes, de Almeida, Nader, 1997) (figura 4).

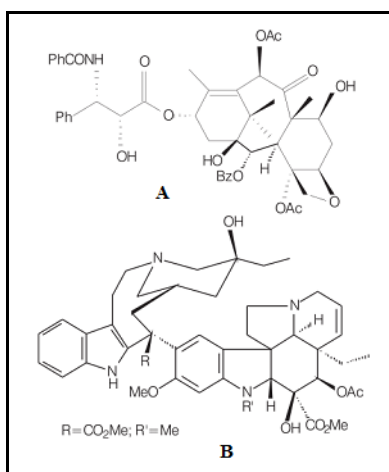


Figura 3: Compostos utilizados no tratamento contra o câncer - **A**: taxol e **B**: vimblastina.

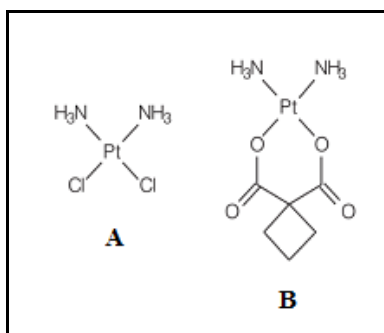


Figura 4: Compostos utilizados no tratamento contra o câncer - **A**: cisplatina e **B**: carboplatina

1.2 Complexos de Platina no Tratamento do Câncer

Na primeira metade do século passado houve um grande impulso no desenvolvimento da química orgânica. Quanto à química inorgânica, os estudos realizados nesta época estavam mais voltados ao estudo da toxicidade dos íons metálicos para o homem. No entanto, sabe-se que os íons metálicos desempenham papel crucial na vida dos seres vivos (Najjar, 1992; Orvig, Abrams, 1999), executando uma grande quantidade de tarefas no sistema biológico, como transportar oxigênio (ferro) e cobre, zinco, ferro e manganês que fazem parte de uma série de reações químicas fundamentais para a vida (Orvig, Abrams, 1999).

Alguns tipos de compostos inorgânicos também foram testados no combate a certas doenças, porém, esporadicamente e com pouco esclarecimento sobre as relações envolvendo estrutura-atividade. Os aspectos ligados aos mecanismos de ação, por outro lado, eram abordados muito raramente ou de modo bastante superficial (Birch, Sadler, 1979).

Os derivados metálicos não eram utilizados como medicamentos no combate ao câncer, no entanto, na década de 60, o físico Barnett Rosenberg (Rosenberg, Van Camp, Trosko, Mansour, 1969) descobriu acidentalmente a atividade inibitória ao crescimento de microorganismos do complexo de platina *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] (*cis*-[diaminodichloroplatina(II)] (figura 4 A), mais conhecido como cisplatina (Fontes, César, Beraldo, 2005; Fontes, de Almeida, Nader, 1997; Najjar, 1992; Orvig, Abrams, 1999; Wong, Giandomenico, 1999; Faggiani, Lippert, Lock, 1980). A eficácia da cisplatina no tratamento do câncer de pacientes humanos foi estabelecida em 1970, tendo sido aprovada para uso contra o câncer de testículos e bexiga em 1978 (Kelland, 2007).

Esse complexo foi primeiramente descrito por Reiset (complexo *cis*) no ano de 1844, e um ano após, Peyrone descreveu outro composto com mesma fórmula molecular (complexo *trans*), sendo que apenas em 1893 Werner propôs serem os dois compostos isômeros (Alderden, Hall, Hambley, 2006).

Rosenberg descobriu a atividade antitumoral da cisplatina quando estudava o efeito do campo elétrico em cultura de bactérias do tipo *Escherichia coli*. Ele observou que ocorria um crescimento dos filamentos de bactérias ao mesmo tempo em que a multiplicação dos microorganismos era inibida (Fontes, César, Beraldo, 2005; Najjar, 1992; CHEMICASES, 2010).

A partir desses resultados, uma série de complexos de platina foi sintetizada e submetida a testes em camundongos portadores de sarcoma-180, um modelo de tumor usado para ensaios farmacológicos. Os compostos que se mostraram mais eficazes eram todos neutros e de configuração *cis* e, dentre eles, o que apresentou maior atividade foi a cisplatina, que provocou a regressão total do tumor em 36 dias, enquanto o seu isômero transplatina se mostrou inativo (Fontes, César, Beraldo, 2005).

Apesar de sua eficácia, a cisplatina apresenta como inconvenientes o surgimento de resistência celular, baixa solubilidade em água e também severos efeitos colaterais, como elevação da pressão sanguínea, nefrotoxicidade, náuseas, vômitos,

neurotoxicidade e ototoxicidade. Estes efeitos adversos surgem principalmente devido à interação da cisplatina com proteínas e peptídeos, como a glutatona, o que leva ao seu acúmulo no organismo gerando toxicidade (Kelland, 2007; Hall, Mellor, Callaghan, Hambley, 2007; Bernard, Cleare, Hydes, 1986; Pasini, Zinino, 1987; Appleton, Connor, Hall, Prenzler, 1989; Van der Veer, Reedijk, 1988).

O grande sucesso da cisplatina ocorre principalmente no combate aos cânceres de testículo, ovário, pescoço e este composto representa também uma importante colaboração no tratamento da neoplasia em seio e pulmão (Squibb, Matthey, 1990; Loehner, Eighorn, 1984; Fiorentino, Ghiotto, 1987).

Após observação dessa excelente atividade apresentada pela cisplatina, novos compostos, principalmente seus análogos, foram e ainda são estudados, no entanto, poucos têm avançado até os testes clínicos, não tendo, portanto sua comercialização permitida. Podemos citar quatro compostos que foram estudados e que também são comercializados.

A CARBOPLATINA, [diamino(1,1-ciclobutanodicarboxilato)platina(II)] (figura 4B), que é menos citotóxica que a cisplatina, apresentando menor nefrotoxicidade, no entanto ela não atua em células que são resistentes à cisplatina (Cvitkovic, Sapulding, Bethune, Martin, Whitmore, 1977; De Lena, Larusso, Paradiso, Tommasi, 1987).

Um deles é a NEDAPLATINA, *cis*-[diaminoglicolatoplatina(II)] (figura 5), que apresenta excelentes resultados quando administrada com gemcitabina ou paclitaxel, e é utilizada contra tumores de cabeça, pescoço, ovário e pulmão, no Japão (Bolelikas, Vougiouka, 2003; Hirose, Horichi, Ohmori, Shirai, Sohma, Yamaoka, Ohnishi, Adachi, 2003).

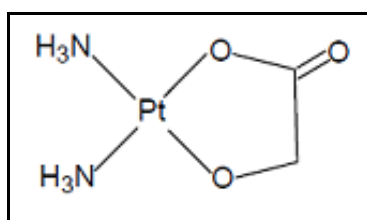


Figura 5: Estrutura da Nedaplatina

A LOBAPLATINA, *cis*-[1,2-diaminometilciclobutanolactatoplatina(II)] (figura 6), é usada na China para casos de câncer de ovário, cabeça, pescoço e pulmão (Gietema, Veldhuis, Guchelaar, Willemse, Uges, Cats, Boosntra, Van der Graaf, Sleijfer, Devuies,

Mulder, 1995; Fiebig, Heuss, Vonpawel, Gatzemeier, Manegold, Edler, Berdel, 1996) com resistência à cisplatina.

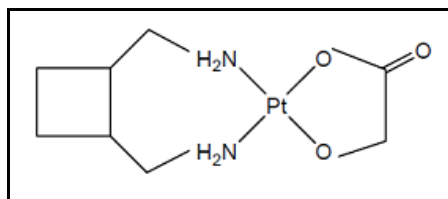


Figura 6: Estrutura da Lobaplatina

Por fim a OXALOPLATINA, *cis*-[1,2-diaminocicloexanooxalatoplatina(II)] (figura 7), é utilizada para o tratamento de câncer colo-retal, e também possui atividade para células resistentes à cisplatina (Fuertes, Alonso, Pérez, 2003; Kidani, Inagaki, Iigo, Hoshi, Kuretani, 1978; Raymond, Faivre, Chaney, Woynarowski, Cvitkovic, 2002).

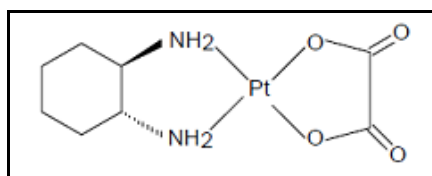


Figura 7: Estrutura da Oxaloplatina

Outro complexo bastante promissor, que está em estudo é a PICOPLATINA, *cis*-[PtCl₂(NH₃)(3-picolina)] (figura 8). Por enquanto nenhum efeito colateral comum à drogas com platina foi observado, além de apresentar atividade intermediária entre a cisplatina e carboplatina *in vitro* (Wheate, Collins, 2003; Kelland, Sharp, Neil, Raynaud, Beale, Judson, 1999; Perez, Kelland, Montero, Boxall, Fuertes, Alonso, Ranninger, 2003).

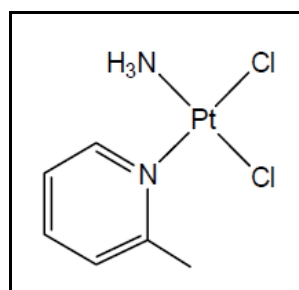


Figura 8: Estrutura da Picoplatina

1.3 Relação Estrutura e Atividade dos Complexos de Platina

Observando a atividade comprovada de alguns complexos de platina e também a atividade promissora de tantos outros análogos, é importante entender a relação entre a estrutura e a atividade desses compostos.

Vários artigos reportam requisitos fundamentais para a atividade dos complexos de platina (Fontes, de Almeida, Nader, 1997), podendo-se citar sua estrutura, carga, configuração e ligantes com alta afinidade pelo DNA (Fontes, de Almeida, Nader, 1997). É preciso ressaltar que essas regras, embora muito válidas para análogos da cisplatina, não se aplicam indistintamente para todos os complexos sintetizados.

O isômero geométrico da cisplatina, o composto *trans*, não apresenta atividade antitumoral. Apesar de alguns compostos com geometria *trans* apresentarem atividade biológica, a estrutura preferencial para tais compostos é a *cis* (Wong, Giandomenico, 1999; Pasini, Zinino, 1987; Van der Veer, Reedijk, 1988; Rosenberg, Van Camp, Grimley, Thomson, 1967; Lebwohl, Cannete, 1998; Weiss, Christian, 1993). Essa menor atividade dos complexos do tipo *trans* pode estar relacionada ao fato deles serem mais reativos, ou seja, reagem muito facilmente no meio biológico, além do fato de formarem *trans*-adutos com o DNA e destes serem facilmente reparados (Sherman, Lippard, 1987; Coluccia, Natile, 2001).

Outro fator relevante para estrutura e reatividade dos complexos é a carga, pois a maior parte dos compostos ativos são neutros. No entanto, há relatos de compostos catiônicos que também possui atividade ((Fontes, de Almeida, Nader, 1997; Bradner, Rose, Hyftalen, 1980). Os complexos neutros seriam mais eficazes do que os que apresentam carga, pois possuem baixa solubilidade e, conseqüentemente permanecem por um tempo maior no organismo, levando a uma maior probabilidade de a droga alcançar o alvo esperado (Adomat, Skov, Fontes, Farrel, 1991).

O grupo abandonador também está ligado à atividade anticancerígena, pois de acordo com sua natureza ele vai influenciar na reatividade do complexo (Bloemink, Reedijk, 1996), ou seja, deve possuir uma moderada labilidade, pois facilitará o mecanismo de hidrólise, que ocorre antes do complexo entrar na célula. Sem dúvida, o ligante mais empregado é o ânion cloreto (Cl^-) (Fontes, de Almeida, Nader, 1997; Bloemink, Reedijk, 1996). É preciso considerar que a labilidade deve ser realmente moderada, pois caso o ligante seja muito lábil, o complexo será muito reativo, podendo

ocorrer reações com outras biomoléculas, gerando toxicidade e ausência de atividade antitumoral (Gullotti, Pacchioni, Pasini, Ugo, 1982), por outro lado, complexos com ligantes fortemente coordenados são inativos, como é o caso do SCN^{-1} (Bloemink, Reedjik, 1996; Neidle, Ismael, Sadler, 1980).

O grupo não abandonador dos complexos de platina também possui papel fundamental, pois este permanece ligado à platina mesmo após sua ligação com o DNA, para isso ele deve ser relativamente inerte, como é o caso das aminas. Estas aminas podem ser mono ou bidentadas, sendo que as bidentadas, para que se forme um composto energeticamente favorável, devem formar com a platina anéis de cinco ou de seis membros (Gullotti, Pacchioni, Pasini, Ugo, 1982).

Os complexos de platina(IV) são considerados pró-droga, pois para que apresentem atividade antitumoral, é preciso que este seja reduzido a complexos de platina(II). Se compararmos os dois números de oxidação da platina, observaremos que os com $\text{nox} +4$ são menos ativos, pois ao passar pelas reações de substituição no organismo, isso se dá de forma mais lenta que os complexos com $\text{nox} +2$ (Bloemink, Reedjik, 1996; Talman, Kidani, Mohrmann, Reedjik, 1998).

1.4 Reatividade e Mecanismo de Ação da Cisplatina

Um dado importante a se considerar é que os complexos metálicos no organismo sofrem várias reações de substituição até entrarem na célula, sendo a reação mais importante a de hidrólise. No caso da cisplatina, tem-se um complexo neutro que possui baixa solubilidade em água (2,53 mg/mL a 25°C) sendo administrado por via intravenosa em solução salina.

Na figura a seguir (figura 9) está ilustrada o mecanismo de hidrólise da cisplatina (Fontes, César, Beraldo, 2005).

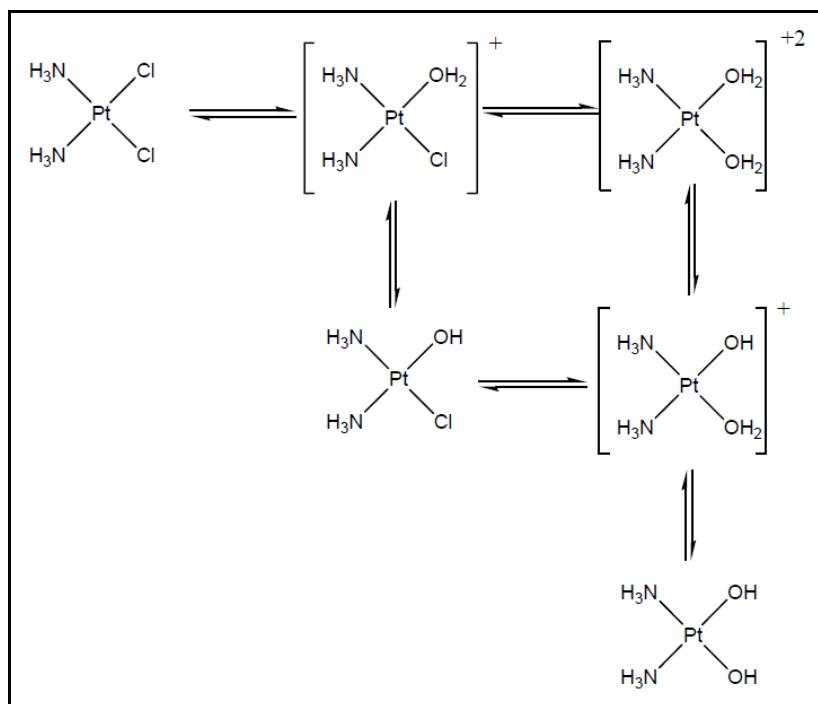


Figura 9: Hidrólise da cisplatina

Observa-se na figura 9 que, após a entrada da cisplatina na célula, em grande parte por difusão passiva, os ligantes cloretos (ligantes abandonadores), são substituídos por moléculas de água ou grupos hidroxila, dando origem a espécies carregadas positivamente, os íons *cis*-diaminoaquacloroplatina(II) e *cis*-diaminodiaquaplatina(II) (Green, Garner, Orton, 1992; Maia, Suillerot, 2003). Esta substituição é favorecida devido à diferença de concentração dos íons cloreto no plasma sanguíneo e citoplasma e também, devido à alta concentração de moléculas de água e hidroxila.

No caso da cisplatina, há um consenso de que seu principal alvo é o DNA (ácido desoxirribonucléico), que é uma macromolécula constituída por duas fitas, cada uma delas composta por uma seqüência de nucleotídeos, os quais por sua vez são formados por três diferentes tipos de moléculas: um açúcar, um grupo fosfato e uma base nitrogenada. A interação com o DNA é que propicia o efeito antitumoral, induzindo a morte programada da célula (Alderden, Hall, Hambley, 2006).

A ligação da platina com o DNA ocorre preferencialmente através de um dos átomos de nitrogênio de guanina ou de adenina. A interação mais estável é com o nitrogênio da guanina, em razão da possibilidade de formação de ligação de hidrogênio do grupo NH₃ da cisplatina com o oxigênio da guanina (Fontes, César, Beraldo, 2005; Fontes, de Almeida, Nader, 1997; Kelland, 2007; Burgeson, Kostie, 1991). Os demais

átomos de nitrogênio não estão disponíveis, seja por estarem envolvidos em ligações de hidrogênio entre as fitas do DNA, estericamente impedidos, ou por estarem envolvidos em ligações glicosídicas com o açúcar.

A cisplatina é polar e entra nas células lentamente em comparação a outras classes de pequenas moléculas de drogas contra o câncer. A absorção celular da cisplatina é influenciada por diversos fatores, tais como concentração de íons sódio e potássio, pH e a presença de agentes redutores (figura 10) (Kelland, 2007).

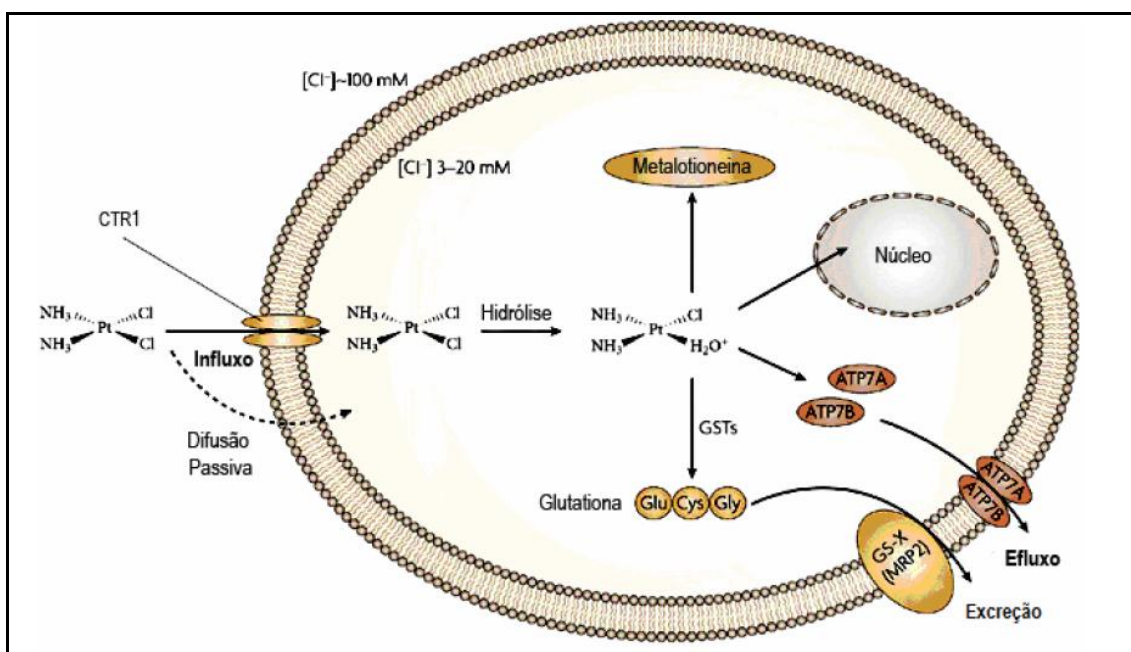


Figura 10: Mecanismo de ação da cisplatina, influxo e efluxo

Podemos observar que a cisplatina tem seu transporte até a célula envolvendo duas etapas. Primeiramente ocorre o transporte por difusão passiva. Em segundo lugar há a hidrólise da espécie dicloro, que é realizada em ambiente deficiente de íons cloreto no nível da membrana celular (Maia, Suillerot, 2003).

Podem ser formados vários tipos de adutos entre a cisplatina e o DNA, entre eles, os principais são os adutos monofuncionais, onde cada átomo de platina faz apenas uma ligação com o DNA, adutos bifuncionais, onde cada átomo de platina se liga a duas posições do DNA. Este tipo de ligação pode ocorrer de três formas distintas, intrafita (duas ligações na mesma fita) (figura 11), interfitas (ligações em fitas diferentes) (figura 12) ou intermolecular (uma ligação da platina é feita com o DNA e a outra com uma proteína ou aminoácido) (Fontes, César, Beraldo, 2005).

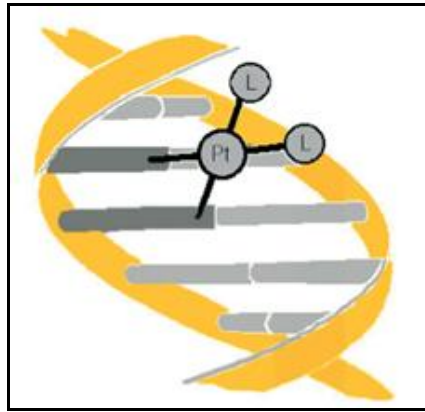


Figura 11: Aduto intrafito entre cisplatina e as bases do DNA

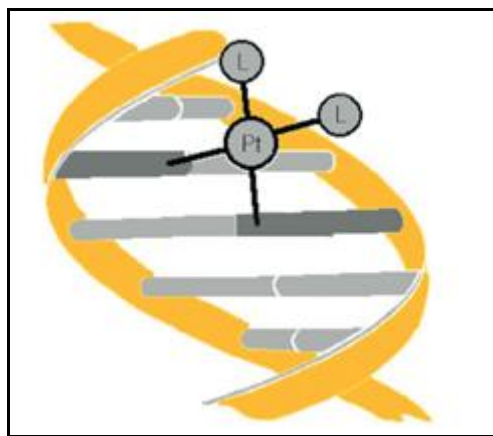


Figura 12: Aduto interfita entre cisplatina e as bases do DNA

Para a cisplatina, o aduto encontrado em maior quantidade é o que corresponde à ligação intrafito, envolvendo bases guaninas adjacentes, o que sugere ser a formação desse aduto o maior responsável pela sua atividade anticancerígena (Fontes, César, Beraldo, 2005; Liang, Shen, Gottesman, 2004; Takahara, Rosenweing, Frederick, Lippard, 1995).

A eficácia de complexos de platina como agente anticancerígeno pode ser comprometida pela síntese do DNA ou pela saturação da capacidade celular de formar adutos de platina com o DNA (Szymkowski, Yarema, Essigmann, 1992). Adutos *trans* são mais facilmente reparados que os adutos *cis* e, por esta razão, o intermediário diaquo de configuração *cis* é 30 vezes mais tóxico do que aquele de configuração *trans* (Mello, Lippard, Essigmann, 1995). A inibição da síntese e reparo do DNA pode resultar numa modificação da estrutura tridimensional do mesmo, induzida pelos adutos formados (Suo, Lippard, Johnson, 1999). Células com acentuada atividade de reparo do

DNA são resistentes à cisplatina confirmando a importância da inibição do reparo (Zamble, Lippard, 1995).

1.5 Complexos de Platina(IV)

Uma classe de compostos de muito interesse e estudo, são os complexos de platina(IV), que também foram estudados por Rosenberg. Há interesse por estes complexos, pois são mais solúveis em água e mais inertes, ou seja, isso faz com que haja uma maior resistência da droga no meio estomacal (ácido), levando a uma administração por via oral (Fontes, de Almeida, Nader, 1997; Alderden, Hall, Hambley, 2006; Farrell, 1989).

Outro interesse forte em novos compostos de platina, diz respeito a um menor efeito colateral aos pacientes submetidos à quimioterapia, que causa severos danos ao paciente.

Existem alguns complexos de platina(IV) que se mostraram promissores, por isso foram encaminhados para a triagem clínica, são os exemplos mostrados abaixo:

- IPROPLATINA: sua seleção se deu dentre uma série de complexos devido a sua alta solubilidade em água, porém não foi aprovada para uso clínico por ser menos ativa que a cisplatina (Gordon, Hollander, 1993) (figura 13).

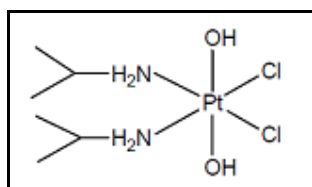


Figura 13: Estrutura da Iproplatina

- SATRAPLATINA (JM216): é uma droga que gerou muito entusiasmo, uma vez que possui potencial para ser administrada oralmente, pois é mais estável em meio ácido podendo resistir às condições do estômago, entretanto, possui baixa absorção celular (Groen, 1996; Fichtinger-Schepman, Reedijk, 1985), sua comercialização foi negada por não apresentar melhora significativa na sobrevivência de pacientes (figura 14).

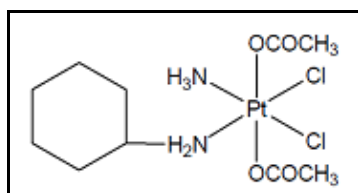


Figura 14: Estrutura da Satraplatina

- TETRAPLATINA: droga altamente promissora em estudos pré-clínicos, no entanto causou severos efeitos neurotóxicos no tratamento *in vivo* (pacientes) sendo, portanto descartada na triagem posterior (Christian, 1995) (figura 15).

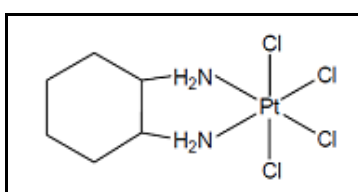


Figura 15: Estrutura da Tetraplatina

Até o momento, as triagens clínicas *in vivo* dos compostos de platina(IV) revelou menor atividade em pacientes do que a cisplatina, causando frustração, pois Kelland constatou que análogos do JM216 são 840 vezes mais ativos que o cisplatina nos ensaios *in vitro* (Kelland, Murrer, Abel, Giandomenico, Mistry, Harrap, 1992). Essa elevada atividade *in vitro* foi atribuída à grande apoptose observada, mas a redução do complexo de platina(IV) a platina(II) *in vivo* altera as propriedades farmacológicas e, portanto, a eficácia da droga.

1.6 Complexos Polinucleares de Platina

Os compostos polinucleares de platina têm sido amplamente investigados, consistindo em uma nova e importante classe de compostos anticancerígenos (Kasparkova, Zehnulova, Farrell, Brabec, 2002; Qu, Harris, Hegmans, Petz, Kabolizadeh, Penazova, Farrell, 2004; Kalayda, Zhang, Abraham, Tanke, Reedijk, 2005), caracterizada por possuir dois ou três núcleos de metálicos. Estes compostos possuem um modo de ação diferente da cisplatina, pois eles induzem uma alteração conformacional no DNA, que é parcialmente irreversível. Isso se deve a elevada carga presente nos complexos trinucleares, levando a uma maior estabilização do meio.

Nicholas Farrell foi o primeiro a introduzir essa classe de compostos e estes se mostram promissores, com atividade citotóxica comparável à cisplatina e até mesmo maior em células resistentes (Roberts, Houten, Qu, Farrell, 1989; Farrell, 1993). Os primeiros complexos sintetizados desta classe foram complexos dinucleares, designados bis(platina) (Farrell, 1993), como o complexo da figura 16, que foi descrito em 1988.

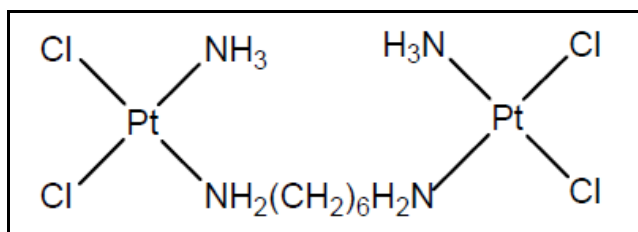


Figura 16: Complexo bis-platina (dinuclear)

Dentre os complexos polinucleares, destaca-se o composto **BBR-3464**, um derivado trinuclear de platina que consiste de duas unidades monofuncionais *trans*-[PtCl(NH₃)₂] ligadas através de uma unidade de platina tetra-amina *trans*-[Pt(NH₃)₂(NH₂(CH₂)₆NH₂)₂]²⁺ (figura 17). Pode-se citar ainda o composto AH78 (figura 18), que é um análogo ao BBR-3464 e possui carga +8 (Harris, Yang, Hegmans, Povirk, Ryan, Kelland, Farrell, 2005).

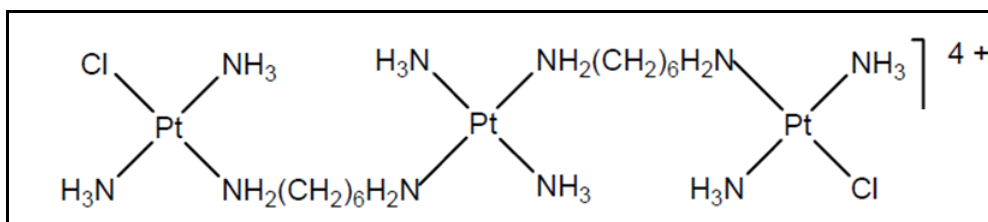


Figura 17: BBR3464 – trinuclear

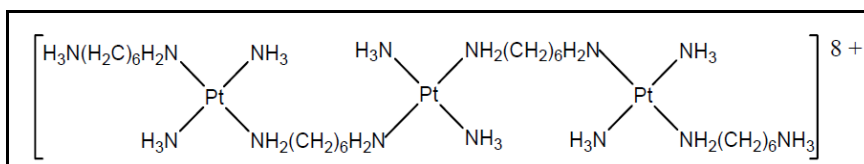


Figura 18: AH78 – trinuclear

O BBR-3464, depois de ensaios pré-clínicos bem sucedidos, alcançou a fase II de ensaios clínicos (Farrell, 2004). Este composto mostrou-se pelo menos 20 vezes mais

eficaz que a cisplatina em sistemas pré-clínicos tumorais, inclusive resistentes, além de ser solúvel em água, podendo ser administrado oralmente (Manzotti, Pratesi, Menta, Di Domenico, Cavalletti, Fiebig, Kelland, Farrell, Polizzi, Supino, Pezzoni, Zunino, 2000).

1.7 Lipossomas

Sabe-se que os complexos de platina possuem atividade antitumoral, no entanto há grande necessidade de buscar novos medicamentos neste ramo, pois a quimioterapia é dolorosa e oferece alta toxicidade aos pacientes que a ela se submetem, além de ser importante a busca por novos complexos com maior espectro de atividade.

Os carreadores biológicos são capazes de diminuir os efeitos colaterais de algumas drogas, pois reduzem a interação indesejada da droga no organismo, como é o caso dos lipossomas.

Na década de 60, Alec Bangham observou que os fosfolipídeos em solução aquosa e sistemas fechados podem formar estruturas de bicamadas, os lipossomas. Desde então, iniciou-se um longo caminho entre ser um objeto de mera pesquisa e um transportador farmacêutico de grandes aplicações. O desenvolvimento e avanço real desta área se deram nos últimos 20 anos, com a aplicação em drogas e produtos de alta tecnologia (figura 19) (Torchilin, 2005).

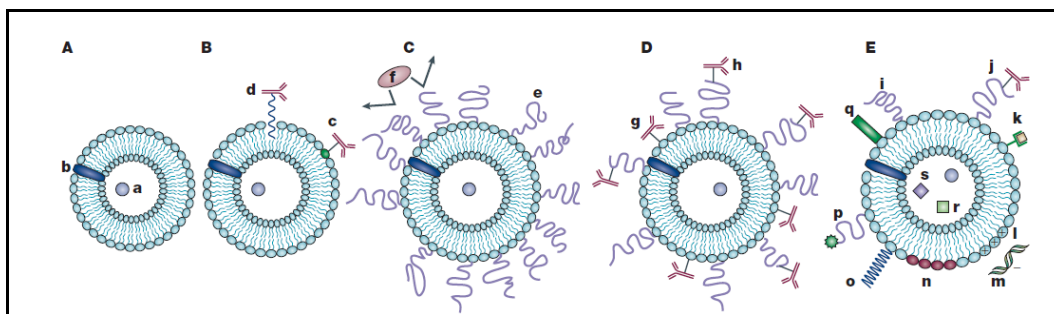


Figura 19: Evolução dos Lipossomas

Pode-se observar na figura 19A que os lipossomas podem incorporar compostos hidrofílicos no compartimento aquoso interno (simbolizado por **a**), ou então compostos hidrofóbicos na bicamada lipídica (simbolizado por **b**) (Torchilin, 2005).

Os lipossomas direcionados, com ligantes imobilizados na sua superfície, capazes de reconhecerem e se ligarem às células de interesse, tem sido bastante estudados, como na

figura 19 B, onde (c) está covalentemente ligado em fosfolipídios na membrana, ou então, hidrofobicamente ligado (d) dentro da membrana do lipossoma (Torchilin, 2005).

Lipossomas de longo tempo de circulação, compõem uma nova geração de lipossomas que possuem superfície de membrana alterada pela inclusão de polímeros biocompatíveis (e), figura 19 C, inertes como PEG (polietilenoglicol) de alto peso molecular. Esta alternativa protege a camada lipídica superficial do lipossoma de uma interação com proteínas opsonizantes (f), evitando a captura por macrófagos, o que resulta num maior tempo de circulação na corrente sanguínea (Torchilin, 2005).

Imunolipossomas de longa circulação (figura 19 D), têm simultaneamente polímeros de proteção e anticorpos, que podem ser fixados à superfície dos lipossomas (g) ou, preferencialmente, para a extremidade cadeia polimérica (h) (Torchilin, 2005).

Já nos lipossomas de nova geração, figura 19 E, a superfície está modificada de diferentes maneiras. Entre essas modificações podemos citar: um polímero de proteção (i) ou polímero de proteção e ligante alvo, como anticorpo (j), o acessório / incorporação de diagnóstico (k), a incorporação de lipídios carregados positivamente (l), permitindo a complexação com o DNA (m), a incorporação de lipídios estímulos sensíveis (n), polímero de estímulos sensíveis (o), células-penetrante do peptídeo (p), a incorporação de componentes virais (q). Além de uma droga, lipossomas podem ser carregados com partículas magnéticas (r) para sensores magnéticos de segmentação e / ou com ouro e partículas de prata (s) para microscopia eletrônica (Torchilin, 2005).

Os lipossomas são vesículas esféricas, constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídeos, que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo.

Uma grande vantagem dos lipossomas, com relação a outros sistemas transportadores de medicamento, é a sua elevada biocompatibilidade, especialmente quando estes são formados de lipídeos pertencentes às famílias de lipídeos naturais. Além disso, são sistemas altamente versáteis, cujo tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno podem ser manipulados em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos (figura 20) (Frézard, Schettini, Rocha, Demicheli, 2005).

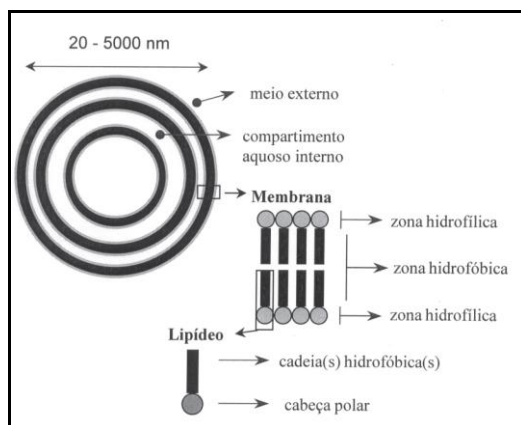


Figura 20: Características estruturais dos lipossomas

Outras importantes características dos lipossomas os fazem ser muito aplicados e visados pelos cientistas (Torchilin, 2005), como é o caso da capacidade de encapsular substâncias hidrofílicas em seu compartimento aquoso interno e substâncias hidrofóbicas dentro de sua membrana. As drogas incorporadas em lipossomas podem chegar direto ao alvo, não sofrendo interferência dos efeitos externos. As propriedades dos lipossomas podem ser facilmente alteradas pela adição de novos componentes na formulação lipídica, devido ao seu formato, carga e propriedades superficiais.

Os lipossomas podem ser classificados em termos de tamanho, número de lamelas (e sua posição relativa), constituição lipídica (o que também condiciona a sua carga), estabilidade e modo de preparação (figura 21) (Santos, Castanho, 2002).

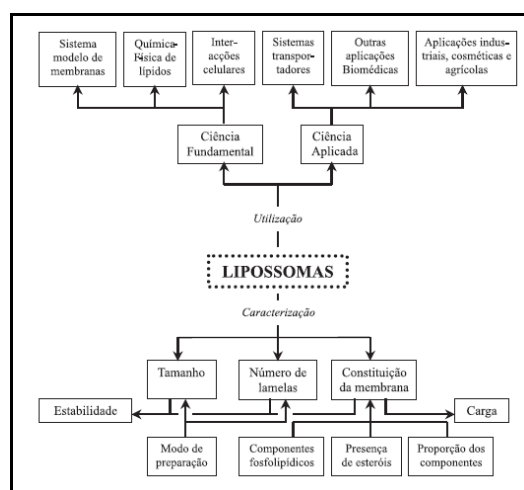


Figura 21: Representação das várias utilizações dos lipossomas e inter-relação entre os diversos parâmetros que os caracterizam

De acordo com a aplicação de determinado lipossoma é possível escolher um tipo de vesícula lipossomal. Esses diferentes tipos são obtidos através da variação dos métodos de preparação, normalmente apresentando diâmetro médio entre 20 e 5000 nm (Santos, Castanho, 2002; New, 1990). No caso deste trabalho, foram utilizados lipossomas do tipo MLV (multilamellar vesicles), com tamanhos superiores a 100 nm e que consiste de várias camadas concêntricas (figura 22).

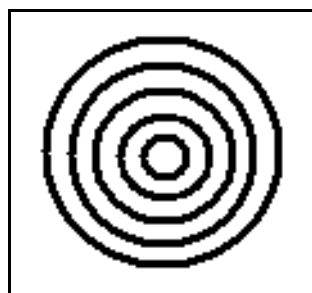


Figura 22: Estrutura de um lipossoma do tipo MLV

1.8 Lipossomas e Complexos de Platina

Como dito anteriormente, os compostos de platina, em especial a cisplatina, apresentam vários efeitos de toxicidade, por isso uma alternativa de diminuir esses efeitos é a encapsulação em lipossomas.

São conhecidas formulações que possibilitam a encapsulação de mais de 80% de cisplatina em lipossomas do tipo MLV (Newman, Colbern, Working, Engbers, Amantea, 1999). As taxas de encapsulação de drogas em lipossomas são bastante variáveis bem como a estabilidade dos mesmos (Xiao, Qi, Maitani, Nagai, 2004).

Um lipossoma que contém cisplatina é o **SPI-077**, é estável no plasma, e apresenta longo tempo de circulação. Eles exibem alta eficácia contra tumores e baixa toxicidade em comparação com a cisplatina livre (Zamboni, Gervais, Egorin, Schellens, Zuhowski, Pluim, Joseph, Hamburger, Working, Colbern, Tonda, Potter, Eiseman, 2004; White Lorigan, Margison, Margison, Martin, Thatcher, Anderson, Ranson, 2006).

No entanto, em testes clínicos de fase I e fase II, este lipossoma apresenta baixa eficácia antitumoral, o que reflete o desafio de se desenvolver não apenas um carreador da droga para o tumor numa forma relativamente inativa, mas também a necessidade de boa capacidade de liberação e ativação (Moreira, Almeida, Geraldês, Mmadeira, Costa, 1997).

A carboplatina é outro complexo que vem sendo encapsulado, mostrando atividade superior à da carboplatina livre (Fichtner, Reszka, Schutt, Rudolph, Becker, Lemm, Richter, Berges, 1993). Estudos sugerem a utilização de lipossomas com polissacarídeos aumentando a estabilidade do lipossoma e a especificidade da droga (Sarikapan, Vasant, 2004).

Na figura 23, podemos ver a AROPLATINA (DACH-L-NDDP), que é um complexo lipofílico que também já foi incorporado em lipossoma, *cis*-bis(neodecanoato)*trans*-(*R*-*R*-1,2-diaminociclohexano)platina(II), com adição de duas cadeias longas de nove carbonos no dicarboxilato. Foi observada grande eficácia na encapsulação e boa estabilidade. Formulações lipossomais com este complexo estão em fase II de testes clínicos em pacientes com câncer no pâncreas e colo-retal avançado (CLINICALTRIALS, 2010).

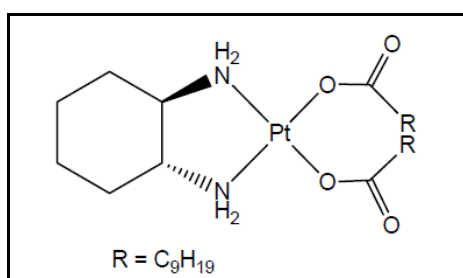


Figura 23: Estrutura da Aroplatina

Na figura 24, observa-se o complexo de platina AP5346, que também foi encapsulado em lipossomas (Fontes, de Almeida, Nader, 1997). Sua formulação lipossomal (ProLindac™) em estudos pré-clínicos mostrou atividade superior à oxaloplatina. Este composto encontra-se atualmente em triagem clínica contra tumores metastáticos e/ou recorrentes de ovário, cabeça e pescoço (CLINICALTRIALS, 2010).

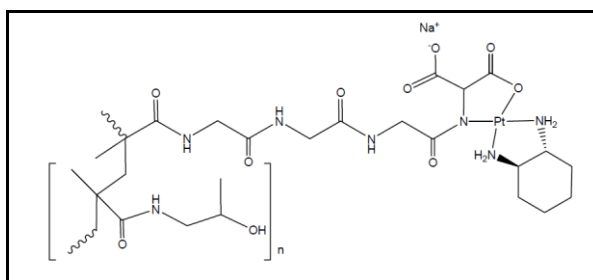


Figura 24: Estrutura da AP5346

1.9 Objetivos

Este trabalho visa à preparação de complexos mononucleares de platina(II) com novos ligantes diaminados *N*-alquilados de cadeia longa contendo grupo hidroxila terminal e de complexos dinucleares de platina(II) com ligantes aminados *N*-alquilados de cadeia longa. Os ligantes foram escolhidos pela possibilidade de comparação com outros desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, que possuíam hidroxila não terminal na cadeia e também outros ligantes que apresentam a cadeia carbônica sem o grupo hidroxila. Além disso, optou-se por estudar os compostos dinucleares, que são promissores em sua atividade biológica.

Após a caracterização dos complexos, foram feitas tentativas de incorporação dos mesmos em lipossomas.

Foram realizados ainda testes de atividade citotóxica dos complexos sintetizados, livres e encapsulados em lipossomas, contra linhagens de células tumorais e não tumorais.

2 Síntese e Caracterização dos Ligantes Diaminados e Aminados N-alkilados de cadeia longa e seus respectivos Complexos

2.1 Reagentes

1,2-etanodiamina (Vetec)
1,10-decanodiol (Aldrich)
1,12-dodecanodiol (Aldrich)
Cloreto de mesila (Aldrich)
Cloreto de tosila (Aldrich)
Clorofórmio (Merck)
Clorofórmio- d_1 (Spectrum)
Dimetilaminopiridina (Acros Organics)
Diclorometano (Quimex)
Dimetilsulfóxido- d_6 (Spectrum)
Etanol (Vetec)
Hexano (Quimex)
Metanol (Quimex)
Metanol- d_3 (Cambridge Isotope Laboratories, INC)
Sulfato de sódio anidro (Vetec)
Tetracloroplatinato(II) de potássio (Aldrich)
Tetraidrofurano (Vetec)
Trietilamina (Aldrich)

2.2 Espectros de Absorção na Região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho para os ligantes e para os complexos foram obtidos em um espectrofotômetro Bomem FT IR MB-102, no Departamento de Química da UFJF. Estes foram realizados na região de 4000 cm^{-1} a 300 cm^{-1} utilizando pastilhas de KBr previamente dessecado em mufla a $500\text{ }^\circ\text{C}$.

2.3 Faixa de Fusão e de Decomposição

As faixas de temperatura de fusão para os ligantes e de decomposição para os complexos foram determinadas em um aparelho digital MQAPF-Microquímica, no Departamento de Química da UFJF.

2.4 Espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e ^{195}Pt

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos dissolvendo-se os ligantes em CDCl_3 ou CD_3OD , e os complexos em $\text{DMSO-}d_6$ em espectrofotômetro Bruker (300 MHz para os espectros de RMN de ^1H , 75 MHz para os espectros de RMN de ^{13}C e 64 MHz para os espectros de RMN de ^{195}Pt) no Departamento de Química da UFJF. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm) a partir do padrão interno TMS (RMN de ^1H) e de uma solução de K_2PtCl_4 em D_2O (RMN de ^{195}Pt).

2.5 Análise Elementar

A análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos compostos obtidos foi realizada na central analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo–USP.

2.6 Síntese de Ligantes Diaminados *N*-alquilados de cadeia longa com Hidroxila Terminal

Solubilizou-se 50 mmol de cada álcool comercial em 130 mL de solvente THF e transferiu-se tal solução para um balão de reação de 1000 mL, sob agitação a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se a esta solução 1,2 equivalentes de NEt_3 e quantidade catalítica de DMAP. Preparou-se uma solução contendo 1,2 equivalentes de cloreto de metanossulfonila em aproximadamente 260 mL de THF. Adicionou-se a solução de cloreto de metanossulfonila previamente preparada, lentamente, utilizando um funil de adição. Terminada a adição, a reação permaneceu sob agitação magnética constante e temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas.

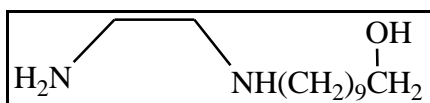
A reação foi acompanhada por CCDS, (ELUENTE: diclorometano - REVELADOR: iodo) e, após 24 horas observou-se que todo o álcool de partida havia sido consumido e a reação foi interrompida. Em seguida foram realizadas três extrações líquido-líquido, sendo que as duas primeiras foram realizadas utilizando THF/água como solventes, e na terceira foi utilizado THF/solução saturada de NaCl. Com sulfato de sódio anidro a fase orgânica remanescente foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida, originando o uma mistura de monomesilato e dimesilato. Para isolar o monomesilato, produto desejado, foi realizada cromatografia em coluna de sílica-gel (diclorometano/metanol).

Em seguida, a uma solução etanólica (25 mL) com excesso de 1,2-etanodiamina (10 equivalentes) sob agitação magnética constante, adicionou-se lentamente através de um funil de adição, uma solução também etanólica do monomesilato puro obtido anteriormente. Após aproximadamente 24 horas de reação a 70 °C, a formação do produto desejado foi evidenciada por CCDS (ELUENTE: diclorometano⁷/metanol³ – REVELADOR: iodo). O produto bruto foi concentrado sob pressão reduzida e logo em seguida foram realizadas quatro extrações consecutivas, nas duas primeiras utilizou-se como solvente diclorometano/água, na terceira diclorometano/solução de NaOH 10% e por último solução diclorometano/solução saturada de NaCl. A fase orgânica remanescente foi filtrada com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida, dando origem a uma mistura de produtos. Esta mistura foi então purificada em coluna cromatográfica em sílica-gel (diclorometano/metanol).

2.7 Dados e Caracterização dos Ligantes Diaminados *N*-alquilados de Cadeia Longa com Hidroxila Terminal

Os ligantes obtidos estão apresentados a seguir, com os dados de caracterização por RMN de ^1H , ^{13}C e espectroscopia na região do infravermelho (Silverstein, Webster, Kiemle, 2007).

Composto 1



Fórmula Molecular: $\text{C}_{12}\text{H}_{28}\text{ON}_2$

Massa Molecular: 216 g/mol

Característica Física: cera amarelada

Faixa de Fusão: 33,0 – 33,4°C

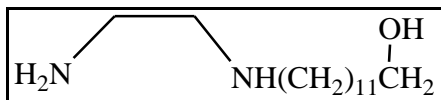
Rendimento: 60% (2,56 g)

I.V. ν (cm^{-1}) KBr: 3338, 2916, 2848, 1568, 1467, 1313, 1128, 1062, 723.

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1,26 (m, 12H, CH_2); 1,49 (m, 4H, CH_2); 1,83 (m, 4H, NH, NH_2 e OH); 2,55 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}$); 2,59; 2,65 (2 t, 4H, $\text{CH}_2\text{-NH}$ e $\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 3,57 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 25,79 a 32,85 (CH_2); 41,67 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 49,88; 52,48 (CH-NH); 62,60 ($\text{CH}_2\text{-OH}$)

Composto 2



Fórmula Molecular: $\text{C}_{14}\text{H}_{32}\text{ON}_2$

Massa Molecular: 244 g/mol

Característica Física: cera amarelada

Faixa de Fusão: 56,6 – 57,1°C

Rendimento: 53% (2,33 g)

I.V. ν (cm^{-1}) KBr: 3404, 2918, 2848, 1589, 1467, 1114, 1058, 721.

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1,24 (m, 16H, CH_2); 1,52 (m, 4H, CH_2); 1,88 (m, 4H, NH, NH_2 e OH); 2,56 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}$); 2,63; 2,77 (2 t, 4H, $\text{CH}_2\text{-NH}$ e $\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 3,57 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 26,19 a 33,22 (CH_2); 41,99 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 50,29; 52,80 (CH-NH); 63,02 ($\text{CH}_2\text{-OH}$)

2.8 Síntese de Ligantes Aminados *N*-alquilados de Cadeia Longa

Solubilizou-se 30 mmol de cada álcool comercial em 100 mL de solvente clorofórmio e transferiu-se tal solução para um balão de reação de 500 mL, sob agitação a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se a esta solução 2,2 equivalentes de NEt_3 e quantidade catalítica de DMAP. Preparou-se uma solução contendo 2,2 equivalentes de cloreto de tosila em aproximadamente 120 mL de clorofórmio.

Adicionou-se a solução de cloreto de tosila previamente preparada, aos poucos, ao balão de reação. Terminada a adição, a reação permaneceu sob agitação magnética constante e temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas.

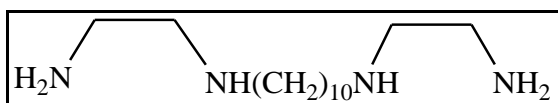
A reação foi acompanhada por CCDS, (ELUENTE: diclorometano - REVELADOR: iodo) e, após 24 horas observou-se que todo o álcool de partida havia sido consumido e a reação foi interrompida. Em seguida foram realizadas três extrações líquido-líquido, sendo que as duas primeiras foram realizadas utilizando clorofórmio/água como solventes, e na terceira foi utilizado clorofórmio/solução saturada de NaCl. A fase orgânica remanescente foi filtrada com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida, originando uma mistura de monotosilato e ditosilato, com maior quantidade do ditosilato. Para isolar o ditosilato, produto desejado, foi realizada cromatografia em coluna de sílica-gel (diclorometano/metanol).

Em seguida, a uma solução etanólica (25 mL) com excesso de 1,2-etanodiamina (20 equivalentes) sob agitação magnética constante, adicionou-se lentamente através de um funil de adição, uma solução também etanólica do ditosilato puro obtido anteriormente. Após aproximadamente 24 horas de reação a 70 °C, a formação do produto desejado foi evidenciada por CCDS (ELUENTE: diclorometano 7/metanol 3 – REVELADOR: iodo). O produto bruto foi concentrado sob pressão reduzida e logo em seguida foram realizadas cinco extrações líquido-líquido, sendo que as três primeiras foram realizadas utilizando clorofórmio/água como solventes, na quarta foi utilizado clorofórmio/solução NaOH 10%, e por último foi utilizado clorofórmio/solução saturada de cloreto de sódio (NaCl). A fase orgânica remanescente foi filtrada com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida.

2.9 Dados e Caracterização dos Ligantes Aminados *N*-alquilados de Cadeia Longa

Os ligantes obtidos estão apresentados a seguir, com os dados de caracterização por RMN de ^1H , ^{13}C e espectroscopia na região do infravermelho (Silverstein, Webster, Kiemle, 2007).

Composto 5



Fórmula Molecular: $\text{C}_{14}\text{H}_{34}\text{N}_4$

Massa Molecular: 258 g/mol

Característica Física: cera amarela

Faixa de Fusão: 190,0 – 190,4°C

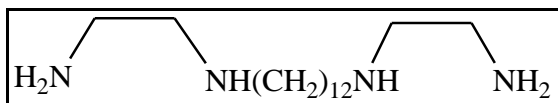
Rendimento: 57% (0,30 g)

I.V. ν (cm^{-1}) KBr: 3301, 2921, 2850, 1566, 1479, 1319, 1120, 935, 721.

RMN ^1H (MeOD) δ : 1,36 (m, 12H, CH_2); 1,55 (m, 4H, CH_2); 2,62 (t, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}$); 2,70; 2,77 (2 t, 8H, $\text{CH}_2\text{-NH}$ e $\text{CH}_2\text{-NH}_2$).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 28,65 a 30,89 (CH_2); 41,83 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 50,99 e 52,83 (CH_2 da etilenodiamina).

Composto 6



Fórmula Molecular: C₁₆H₃₈N₄

Massa Molecular: 286 g/mol

Característica Física: cera amarela

Faixa de Fusão: 290,0 – 290,6°C

Rendimento: 79% (0,44 g)

I.V. ν (cm⁻¹) KBr: 3292, 2920, 2848, 1575, 1467, 1317, 1124, 943, 721.

RMN ¹H (MeOD) δ : 1,34 (m, 16H, CH₂); 1,55 (m, 4H, CH₂); 2,62 (t, 4H, CH₂CH₂CH₂-NH); 2,70; 2,80 (2 t, 8H, CH₂-NH e CH₂-NH₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 28,99 a 31,31 (CH₂); 42,07 (CH₂-NH₂); 51,23 e 52,97 (CH₂ da etilenodiamina).

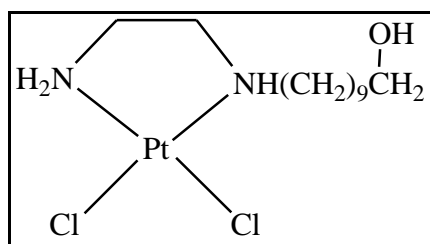
2.10 Síntese dos Complexos de Platina(II) com Ligantes Diaminados *N*-alquilados de Cadeia Longa com Hidroxila Terminal

Solubilizou-se 0,208 g (0,5 mmol) do sal de platina K_2PtCl_4 (tetracloro platinato(II) de potássio) em 3 mL de água e transferiu-se tal solução para um balão de reação de 25 mL. Adicionou-se gota a gota a este balão, durante aproximadamente 3 horas, os respectivos ligantes diaminados *N*-alquilados com hidroxila terminal (0,5 mmol) previamente sintetizados e solubilizados em uma mistura de água/metanol. Após a adição total do ligante, a reação foi deixada sob agitação magnética constante à temperatura ambiente por 24 horas. O precipitado obtido foi filtrado sob pressão reduzida e lavado com água e metanol.

2.11 Dados e Caracterização dos Complexos de Platina(II) com Ligantes Diaminados *N*-alquilados de Cadeia Longa com Hidroxila Terminal

Estes complexos foram devidamente caracterizados e estão apresentados a seguir com os dados de RMN de ^1H , ^{13}C e ^{195}Pt , espectroscopia na região do infravermelho (Silverstein, Webster, Kiemle, 2007) e análise elementar.

Composto 3



Fórmula Molecular: C₁₂H₂₈ON₂Cl₂Pt

Massa Molecular: 482 g/mol

Característica Física: sólido bege

Decomposição: 282°C

Rendimento: 60% (0,15 g)

I.V. v (cm⁻¹) KBr: 3456, 3207, 3134, 2923, 2852, 1589, 1461, 1051, 318.

RMN ^1H (DMSO-*d*₆) δ : 1,07 a 1,58 (m, 16H, CH₂); 2,12; 2,26; 2,55; 2,64 (4m, 6H, 2CH₂-NH e CH₂-NH₂); 3,19 (sl, 2H, CH₂-OH); 4,22 (sl, 1H, CH₂-OH); 5,10; 5,18 (2sl, 2H, NH₂); 6,01 (sl, 1H, NH).

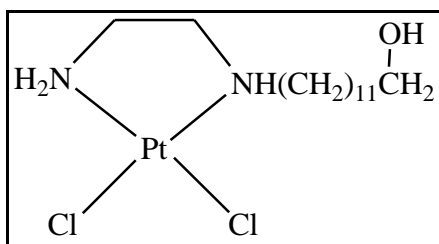
RMN ^{13}C (DMSO-*d*₆) δ : 25,13 a 32,15 (CH₂); 44,95 a 54,73 (CH₂-NH₂, CH₂-NH e CH₂); 60,36 (CH₂-OH).

RMN ^{195}Pt (DMSO-*d*₆) δ : -2354.

Análise Elementar (%): Calculada C, 29,87; H, 5,81; N, 5,81.

Encontrada C, 29,35; H, 5,63; N, 5,93.

Composto 4



Fórmula Molecular: C₁₄H₃₂ON₂Cl₂Pt

Massa Molecular: 510 g/mol

Característica Física: sólido bege

Decomposição: 285°C

Rendimento: 55% (0,15 g)

I.V. v (cm⁻¹) KBr: 3454, 3209, 3128, 2927, 2850, 1614, 1463, 1041, 318.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ: 1,14 a 1,65 (m, 20H, CH₂); 2,18; 2,32; 2,62; 2,73 (4m, 6H, 2CH₂-NH e CH₂-NH₂); 3,26 (sl, 2H, CH₂-OH); 4,24 (sl, 1H, CH₂-OH); 5,18; 5,26 (2sl, 2H, NH₂); 6,09 (sl, 1H, NH).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ: 25,46 a 32,49 (CH₂); 44,51 a 55,06 (CH₂-NH₂, CH₂-NH e CH₂); 60,66 (CH₂-OH).

RMN ¹⁹⁵Pt (DMSO-*d*₆) δ: -2351.

Análise Elementar (%): Calculada C, 32,94; H, 6,27; N, 5,49.

Encontrada C, 31,05; H, 5,98; N, 5,70.

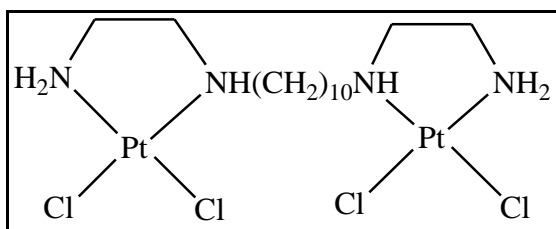
2.12 Síntese dos Complexos Dinucleares de Platina(II)

Solubilizou-se 0,208 g (0,5 mmol) do sal de platina K_2PtCl_4 (tetracloro platinato(II) de potássio) em 3 mL de água e transferiu-se tal solução para um balão de reação de 25 mL. Adicionou-se gota a gota a este balão, durante aproximadamente 3 horas, os respectivos ligantes aminados *N*-alquilados (0,5 mmol) previamente sintetizados e solubilizados em uma mistura de água/metanol. Após a adição total do ligante, a reação foi deixada sob agitação magnética constante à temperatura ambiente por 24 horas. O precipitado obtido foi filtrado sob pressão reduzida e lavado com água e metanol.

2.13 Dados e Caracterização dos Complexos Dinucleares de Platina(II)

Estes complexos foram devidamente caracterizados e estão apresentados a seguir com os dados de RMN de ^1H , ^{13}C e ^{195}Pt , espectroscopia na região do infravermelho (Silverstein, Webster, Kiemle, 2007) e análise elementar.

Composto 7



Fórmula Molecular: $\text{C}_{14}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{Cl}_4\text{Pt}_2 \cdot 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

Massa Molecular: 882 g/mol

Característica Física: sólido bege

Decomposição: $> 300^\circ\text{C}$

Rendimento: 45% (0,18 g)

I.V. v (cm^{-1}) KBr: 3496, 3193, 3134, 2925, 2852, 1595, 1460, 1373, 1288, 1091, 320.

RMN ^1H (DMSO- d_6) δ : 1,17 a 1,69 (m, 16H, CH_2); 2,22; 2,42; 2,60; 2,64 (4m, 12H, $2\text{CH}_2\text{-NH}$ e $\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 5,20 (2sl, 4H, NH_2); 6,10 (sl, 2H, NH).

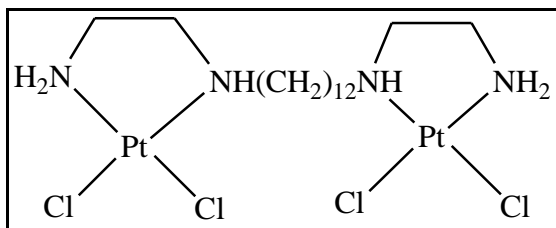
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 25,01 a 28,56 (CH_2); 44,59 a 68,99 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$, $\text{CH}_2\text{-NH}$ e CH_2).

RMN ^{195}Pt (DMSO- d_6) δ : -2354.

Análise Elementar (%): Calculada C, 24,49; H, 5,21; N, 6,35.

Encontrada C, 25,54; H, 4,91; N, 6,72.

Composto 8



Fórmula Molecular: C₁₆H₃₈N₄Cl₄Pt₂.3/2CH₃CH₂OH

Massa Molecular: 887 g/mol

Característica Física: sólido bege

Decomposição: > 300°C

Rendimento: 44% (0,19 g)

I.V. v (cm⁻¹) KBr: 3487, 3201, 3136, 2921, 2852, 1589, 1112, 318.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ: 1,19 a 1,69 (m, 20H, CH₂); 2,22; 2,44; 2,62; 2,66 (4m, 12H, 2CH₂-NH e CH₂-NH₂); 5,31 (2sl, 4H, NH₂); 6,13 (sl, 2H, NH).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ: 26,67 a 29,33 (CH₂); 47,05 a 55,53 (CH₂-NH₂, CH₂-NH e CH₂).

RMN ¹⁹⁵Pt (DMSO-*d*₆) δ: -2353.

Análise Elementar (%): Calculada C, 25,70; H, 5,29; N, 6,31.

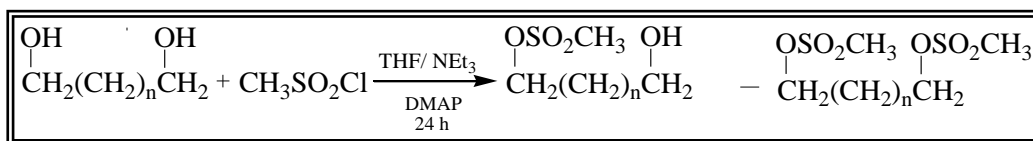
Encontrada C, 26,77; H, 5,01; N, 6,62.

2.14 Resultados e Discussão

2.14.1 Ligantes Diaminados *N*-alquilados de Cadeia Longa com Hidroxila Terminal

A obtenção dos ligantes foi feita em duas etapas, como pode ser observado na figura 25. Primeiramente foram obtidos os mesilatos de alquila, através da reação entre os alcoóis com cloreto de mesila. Esta etapa ocorre com rendimento excelente, por volta de 90 %. Em seguida, foram obtidas as diaminas *N*-alquiladas com hidroxila terminal, a partir da reação do correspondente mesilato de alquila com a 1,2-etanodiamina . O sólido resultante da segunda etapa foi submetido à extração líquido-líquido utilizando-se água e diclorometano a fim de eliminar o excesso de 1,2-etanodiamina, procedendo-se em seguida, à purificação de alguns ligantes por coluna cromatográfica.

Primeira Etapa:



Segunda Etapa:

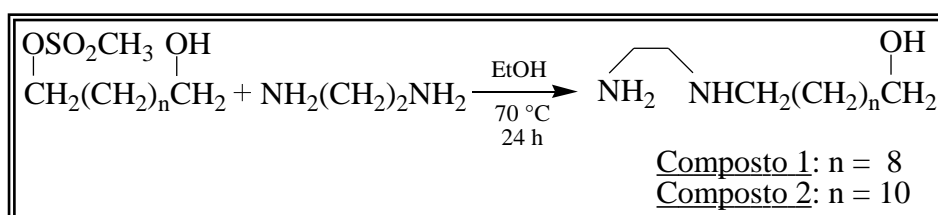


Figura 25: Síntese dos Ligantes Diaminados *N*-alquilados de Cadeia Longa com Hidroxila Terminal

Na figura 26 encontra-se o espectro de infravermelho para os compostos 1 e 2. Observa-se nos espectros a presença dos grupos hidroxila (estiramento O-H) e amino (estiramento N-H) e, que são evidenciados pela banda intensa na região de 3300 cm^{-1} . Na região de 2900 cm^{-1} aparecem bandas que são atribuídas ao estiramento simétrico e assimétrico dos grupos CH_2 alifático. Observam-se também bandas na região de 1560 cm^{-1} e 1460 cm^{-1} , referentes à deformação angular de N-H e deformação axial de C-H, respectivamente. Em 1313 cm^{-1} observa-se uma banda que pode ser atribuída à deformação axial da ligação C-N. Observa-se na região de 720 cm^{-1} , banda de deformação angular assimétrica do grupo CH_2 . É importante ressaltar que no espectro há ausência da banda em 1340 cm^{-1} , que corresponde ao grupo mesila ($\text{R-OSO}_2\text{R}$), o que evidencia que a reação de substituição do grupo mesila pela amina ocorreu. Podemos confirmar este fato observando na figura 27, que mostra o espectro de infravermelho do monomesilato de origem. É possível observar ainda que a banda na região de 3300 cm^{-1} aparece sobreposta para o estiramento de O-H e N-H nos ligantes, isso ocorre devido a possibilidade de interação de hidrogênio na molécula.

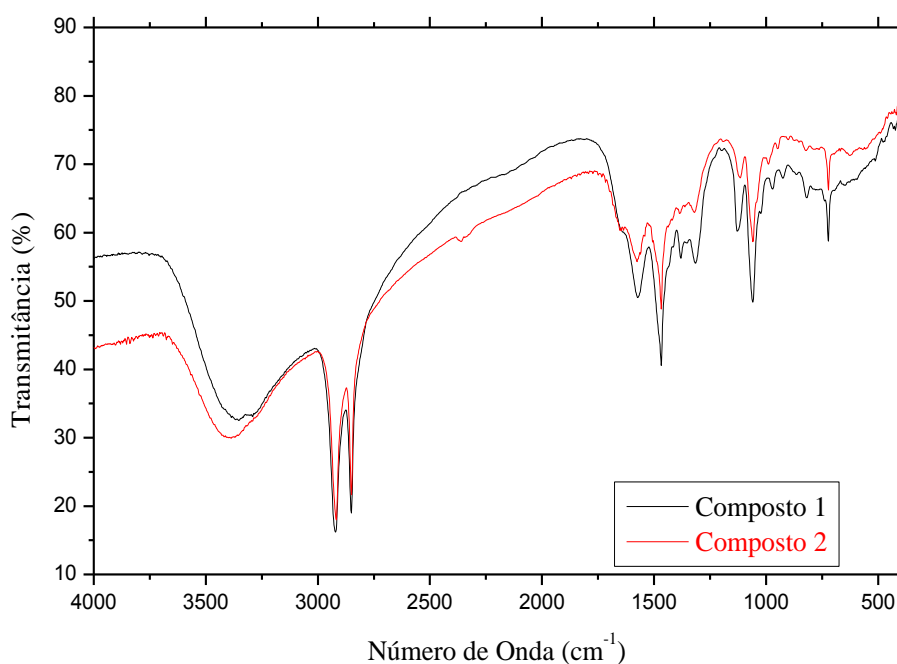


Figura 26: Espectros de IV para os compostos 1 e 2

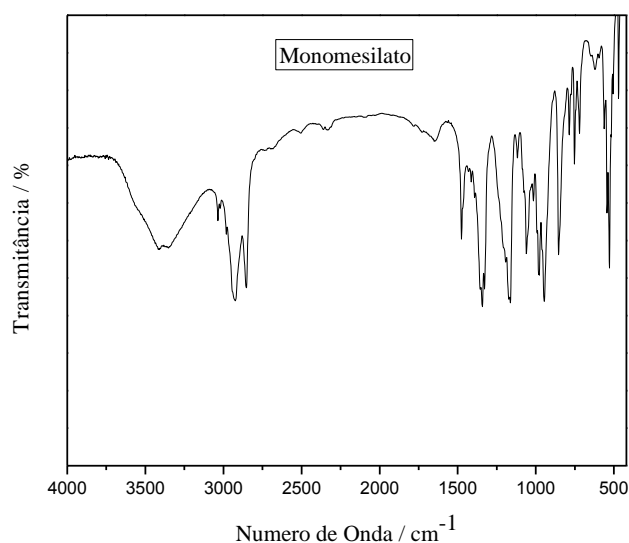


Figura 27: Espectro de IV para um monomesilato

Nas figuras 28 e 29 estão apresentados os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para o composto 1, que foram feitos em CDCl_3 . Os espectros do composto 2 encontram-se nas figuras 30 e 31. Como os espectros dos dois compostos são similares, apenas serão discutidos os espectros do composto 1.

Observa-se no espectro de RMN de ^1H do composto 1 um multipletto em δ 1,25 e em δ 1,52 atribuídos aos hidrogênios de grupos CH_2 da cadeia alifática do ligante, um multipletto em δ 1,83 referente aos hidrogênios da diamina e ao hidrogênio da hidroxila, três tripletos em δ 2,54, 2,65 e 2,79 referentes aos hidrogênios dos grupos CH_2 vizinhos a nitrogênio. Observa-se ainda um triplete em δ 3,57 referente ao hidrogênio do grupo CH ligado à hidroxila.

Observa-se no espectro de RMN de ^{13}C do composto 1 sinais entre δ 26,0 e δ 33,0 atribuídos aos carbonos metilênicos da cadeia alifática, um sinal em δ 41,9 referente ao carbono $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ vizinho a NH_2 , um sinal em δ 49,8 referente ao carbono vizinho a NH da diamina e outro sinal em δ 52,4 atribuído ao carbono da diamina, vizinho a NH , além de um sinal em δ 62,6 referente ao carbono ligado diretamente à hidroxila.

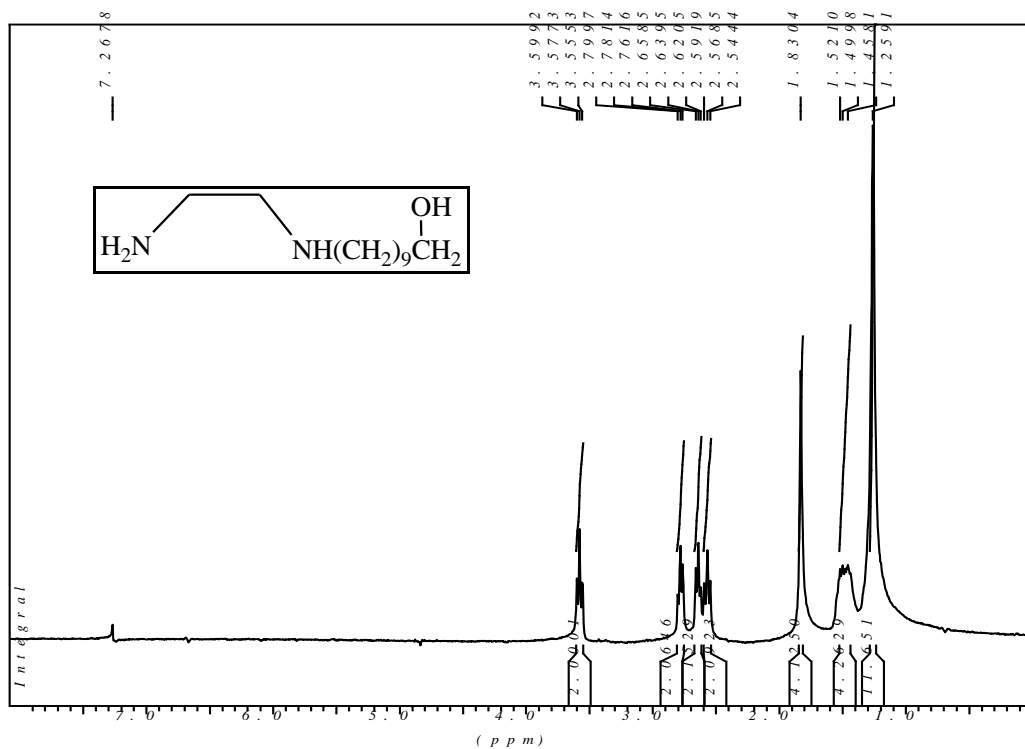


Figura 28: Espectro de RMN de ¹H para o composto 1

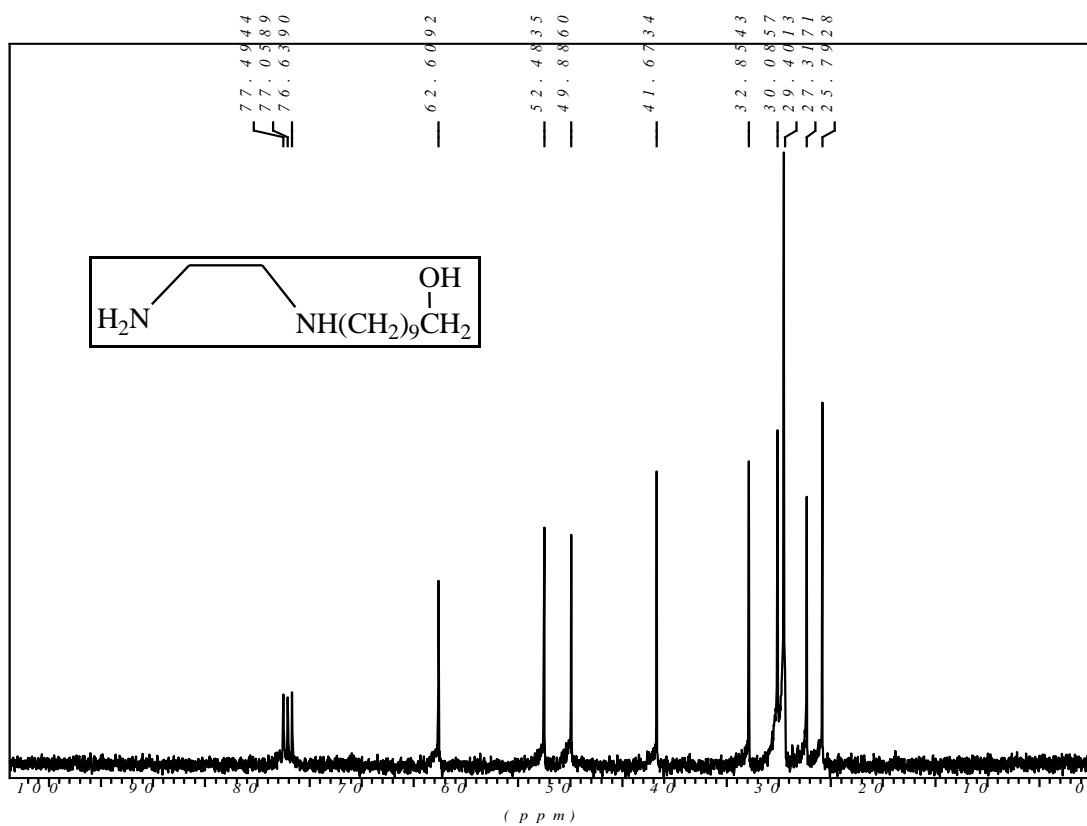


Figura 29: Espectro de RMN de ¹³C para o composto 1

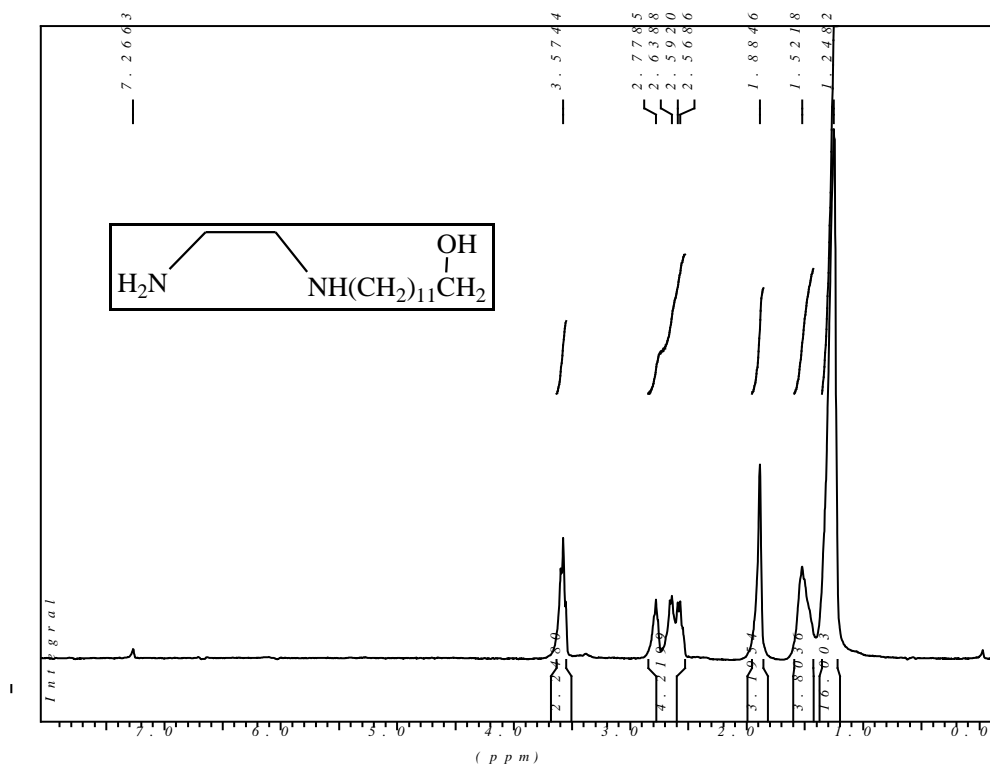


Figura 30: Espectro de RMN de ^1H para o composto 2

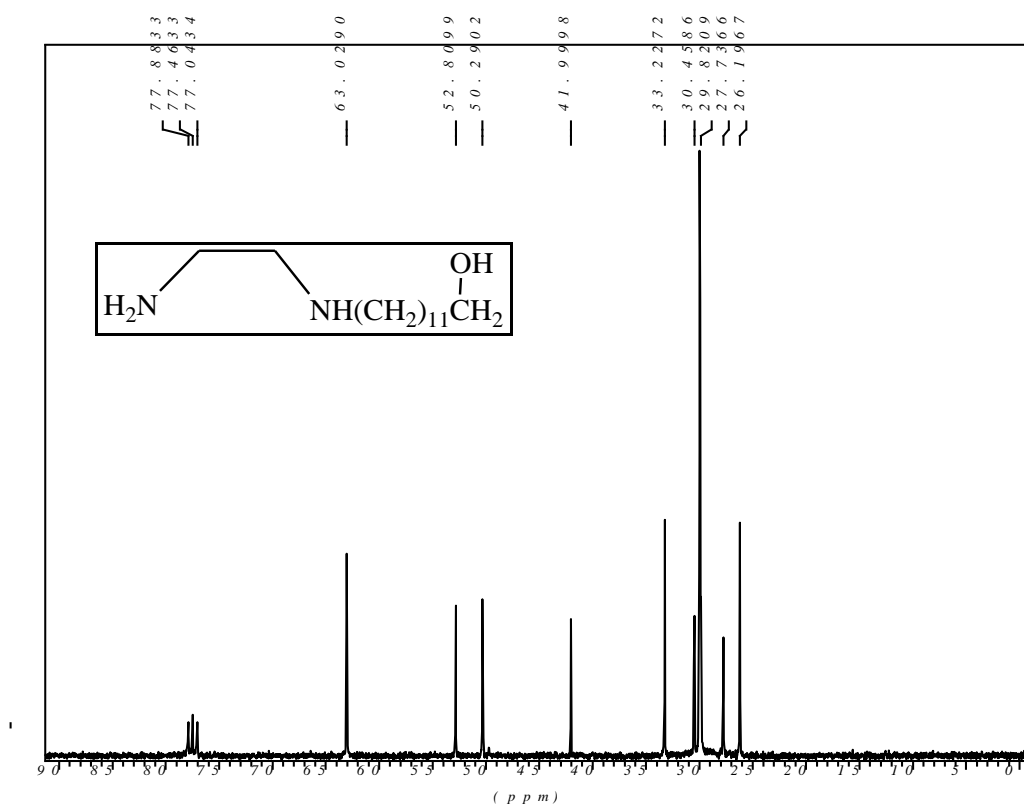
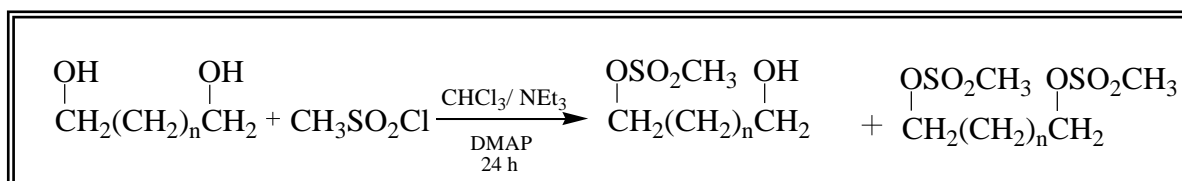


Figura 31: Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 2

2.14.2 Ligantes Aminados *N*-alquilados de Cadeia Longa

A obtenção dos ligantes foi feita em duas etapas, como pode ser observado na figura 32. Primeiramente foram obtidos os tosilatos de alquila, através da reação entre os alcoóis com cloreto de tosila. Esta etapa ocorre com rendimento excelente, por volta de 90 %. Em seguida, foram obtidas as aminas *N*-alquiladas, a partir da reação do correspondente tosilato de alquila com a 1,2-etanodiamina. A graxa resultante da segunda etapa foi submetida à extração líquido-líquido utilizando-se água e diclorometano a fim de eliminar o excesso de 1,2-etanodiamina. Os ligantes foram utilizados sem purificação posterior à síntese, devido à grande dificuldade desta etapa.

Primeira Etapa:



Segunda Etapa:

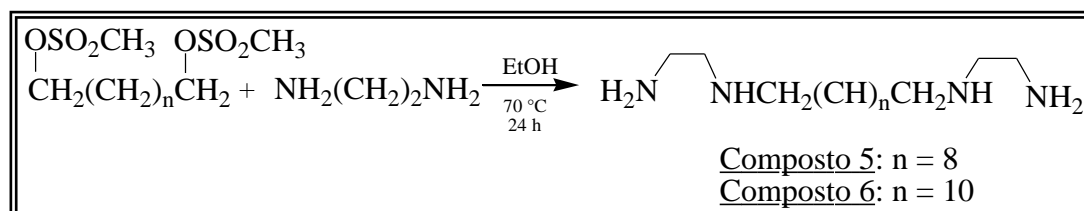


Figura 32: Síntese dos Ligantes Aminados *N*-alquilados de Cadeia Longa

Na figura 33 encontra-se os espectros de infravermelho para os composto 5 e 6. Observa-se no espectro, a presença de uma banda na região de 3360 cm^{-1} referente ao estiramento N-H do grupo amina, bandas na região de 2920 a 2850 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento simétrico e assimétrico dos grupos CH_2 alifáticos. Observa-se também bandas na região de 1560 cm^{-1} e 1460 cm^{-1} , referentes à deformação angular de N-H e deformação axial de C-H, respectivamente. Em 1309 cm^{-1} observa-se uma banda que pode ser atribuída à deformação axial da ligação C-N. É importante ressaltar que no espectro há ausência da banda em 1340 cm^{-1} , que corresponde ao grupo tosila - sulfonas ($\text{R-OSO}_2\text{R}$), o que evidencia que a reação de substituição entre o grupo tosila e a amina ocorreu, podemos confirmar este fato observando na figura 34, onde temos o espectro de infravermelho do ditosilato de origem. Uma evidência ainda mais clara da formação dos ligantes é a ausência das bandas características dos estiramentos do anel aromático, presente no grupo tosila. É possível observar ainda que a banda na região de 3300 cm^{-1} aparece sobreposta para o estiramento de O-H, referente a presença de resíduos de etanol utilizado como solvente na reação, e N-H nos ligantes, isso ocorre devido a possibilidade de interação de hidrogênio na molécula.

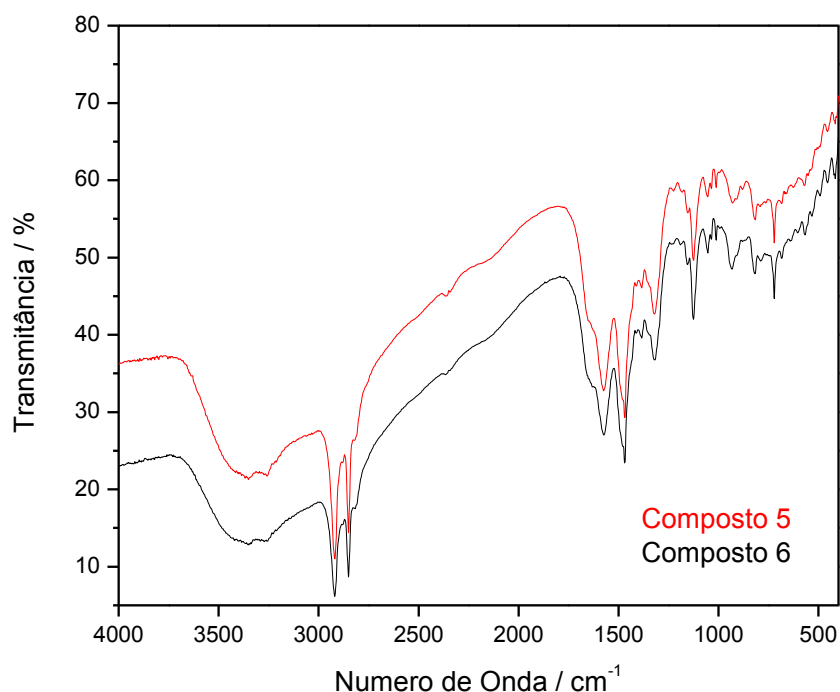


Figura 33: Espectros de IV para os compostos 5 e 6

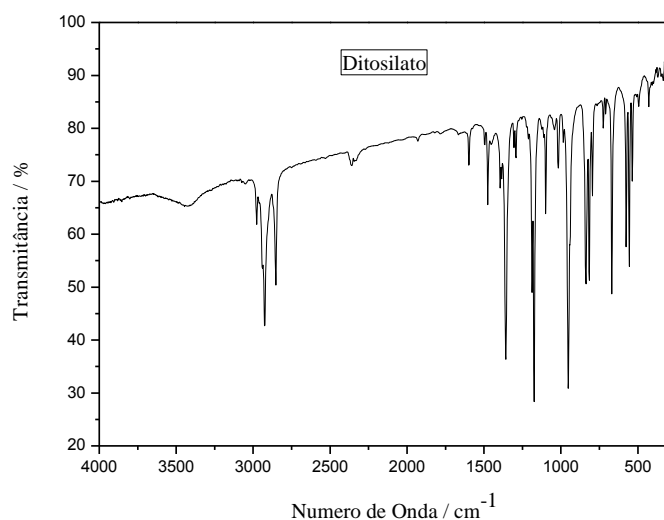


Figura 34: Espectro de IV para um ditosilato

Nas figuras 35 e 36 estão apresentados os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para o composto 6, que foi realizado em CD_3OD . Os espectros do composto 5 encontram-se nas figuras 37 e 38. Como os espectros dos dois compostos são similares, apenas serão discutidos os espectros do composto 6.

Observa-se no espectro de RMN de ^1H um multiplete em δ 1,3 e em δ 1,5 que podem ser atribuídos aos hidrogênios de grupos CH_2 da cadeia alifática do ligante e entre δ 2,62 e 2,8 observam-se tripletos referentes aos hidrogênios das diaminas e de CH_2 ligados ao nitrogênio.

Observa-se no espectro de RMN de ^{13}C do composto 6 sinais entre δ 28,9 e δ 31,3 atribuídos aos carbonos metilênicos da cadeia alifática, um sinal em δ 42,1 referente ao carbono CH_2 vizinho a NH_2 , um sinal em δ 51,2 referente ao carbono vizinho a NH do anel e outro sinal em δ 52,9 atribuído ao carbono da diamina, vizinho a NH .

Vale ressaltar que no espectro de RMN de ^1H observam-se sinais referentes ao etanol, utilizado na reação e que não foi possível sua retirada. Outra importante consideração é sobre a grande dificuldade de purificação destes compostos. A síntese foi feita utilizando cloreto de mesila e cloreto de tosila, sendo o mais eficiente resultado observado para o cloreto de tosila, pois a pureza final do ligante foi maior, evitando assim a necessidade de purificação, etapa extremamente laboriosa e que no final resultava em perda total do produto, pela decomposição do mesmo ou então, difícil retirada dos produtos da coluna cromatográfica.

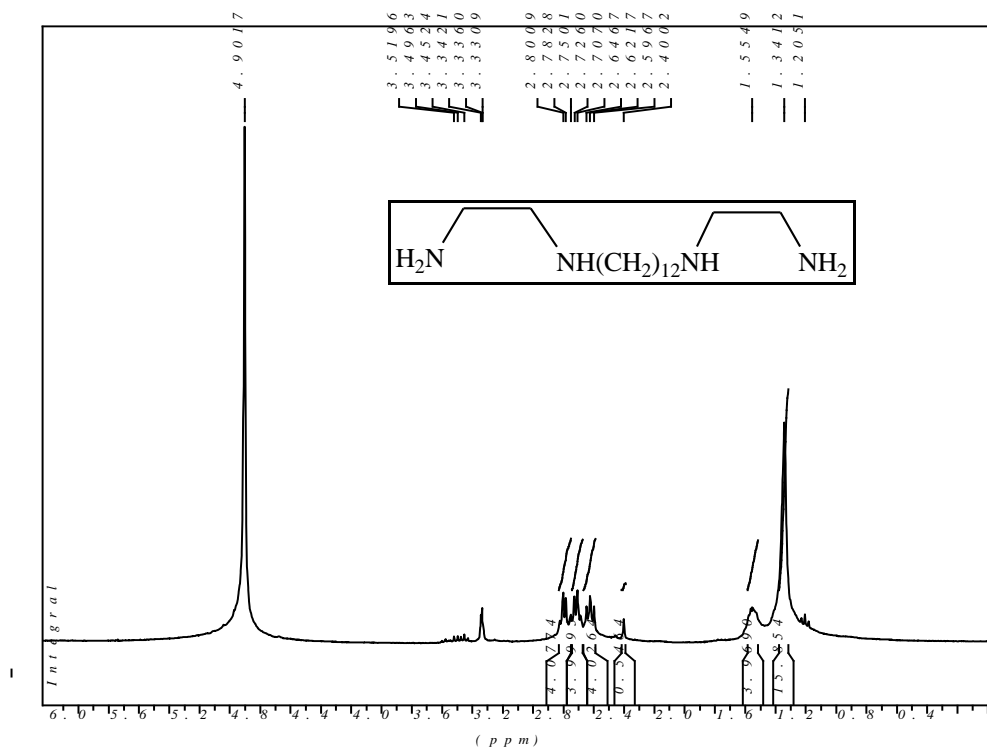


Figura 35: Espectro de RMN de ¹H para o composto 6

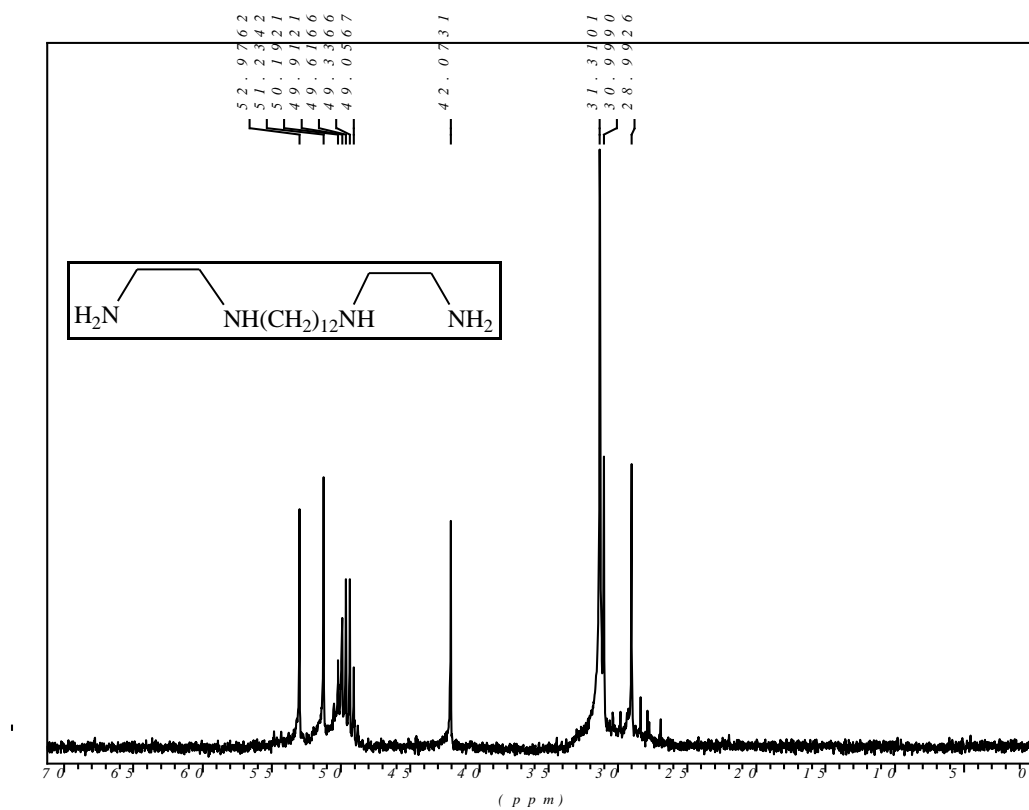


Figura 36: Espectro de RMN de ¹³C para o composto 6

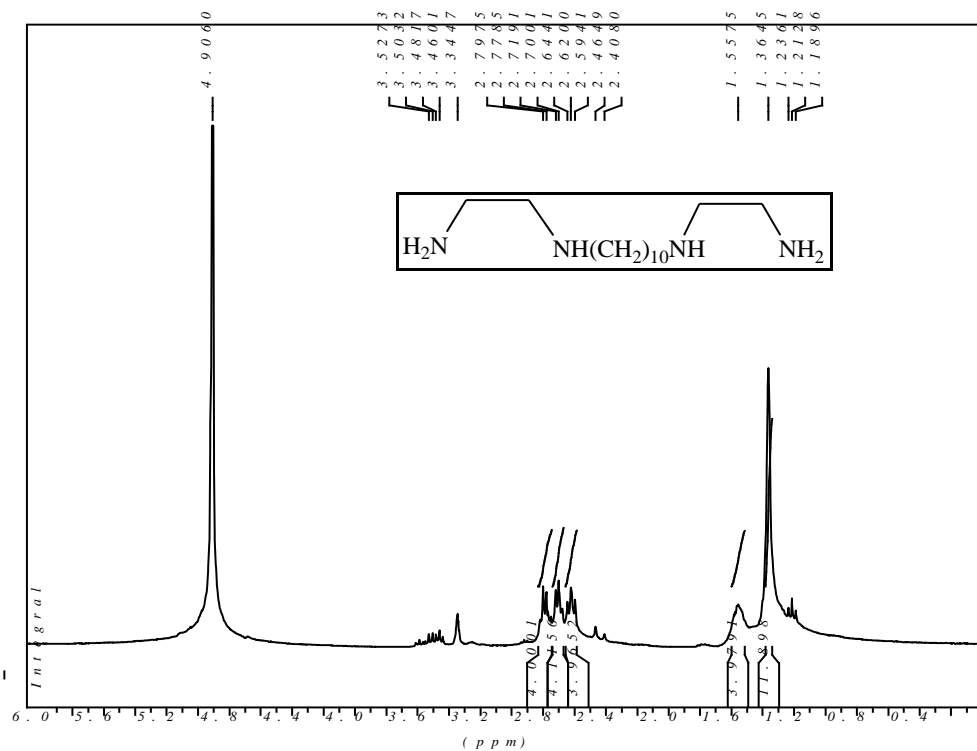


Figura 37: Espectro de RMN de ^1H para o composto 5

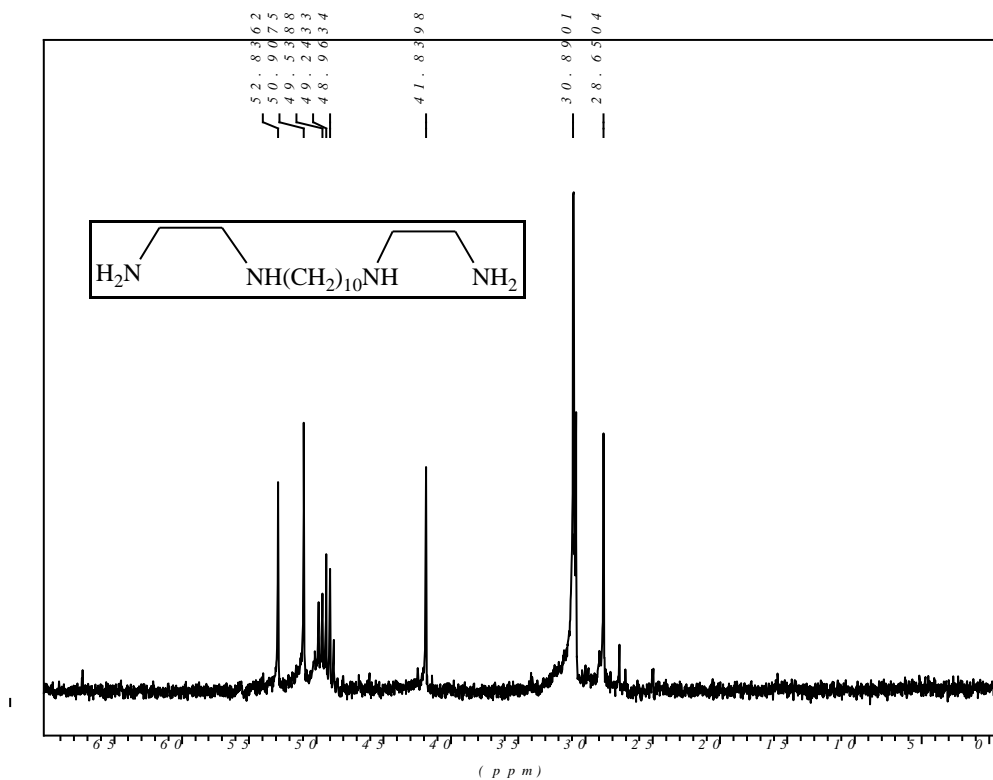


Figura 38: Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 5

2.14.3 Complexos de Platina(II) com Ligantes Diaminados *N*-alquilados de Cadeia Longa com Hidroxila Terminal

A obtenção dos complexos de platina(II) com hidroxila terminal em questão envolve reações de substituição do complexo quadrático plano onde dois ligantes do tetracloroplatinato(II) de potássio são deslocados por um ligante diaminado *N*-alquilado de cadeia longa com hidroxila terminal. A obtenção do complexo é favorecida pelo efeito trans dos cloretos e pela formação do quelato de 5 ou 6 membros formado entre o ligante diaminado e a platina.

Os complexos de platina(II) foram obtidos a partir do tetracloroplatinato(II) de potássio dissolvido em água e dos ligantes sintetizados, derivados da 1,2-etanodiamina, dissolvidos em uma mistura de água e metanol (figura 39). Os compostos foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear de próton (^1H), carbono (^{13}C) e platina (^{195}Pt) e análise elementar.

Complexos de Platina(II) com Ligantes Diaminados *N*-alquilados de Cadeia Longa com Hidroxila Terminal

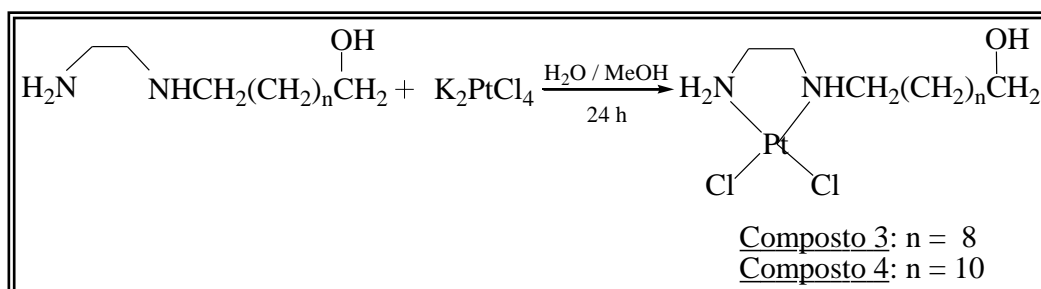


Figura39: Síntese dos Complexos de Platina(II) com Ligantes Diaminados *N*-alquilados de Cadeia Longa com Hidroxila Terminal

Na figura 40 encontram-se os espectros de infravermelho para os compostos 3 e 4, que foram realizados utilizando pastilhas de KBr, e analisados na região de 4000 cm^{-1} a 300 cm^{-1} .

Como pode ser visto nos espectros, os compostos apresentam banda na região de 3400 cm^{-1} referente ao modo de estiramento O-H e 3200 cm^{-1} referente ao modo de estiramento N-H. Nas regiões de aproximadamente 2920 e 2850 cm^{-1} observam-se bandas referentes ao estiramento simétrico dos grupos CH_2 . Na região de 1590 cm^{-1} ocorre uma banda referente à deformação angular de N-H. Observa-se também uma banda muito pouco intensa na região de 720 cm^{-1} referente à deformação angular assimétrica do grupo CH_2 , bem como uma banda na região de 570 cm^{-1} referente ao estiramento Pt-N e banda em 316 cm^{-1} que pode ser atribuída ao estiramento Pt-Cl.

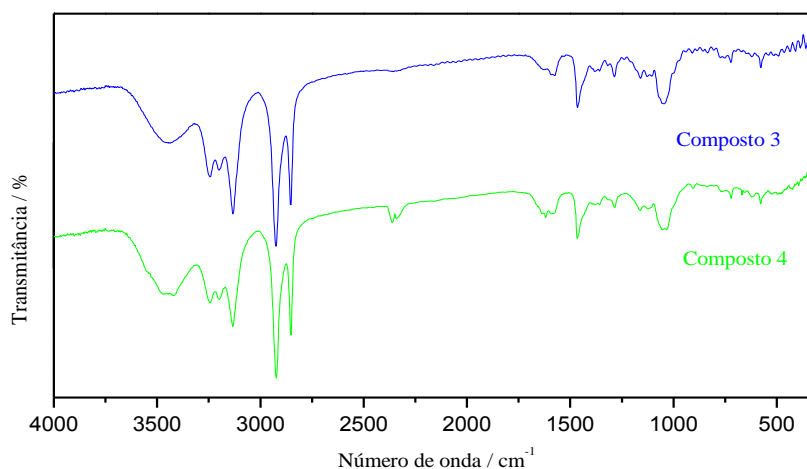


Figura 40: Espectros de IV para os compostos 3 e 4

Na figura 41 abaixo, podemos fazer uma comparação entre os espectros dos complexos e do ligante. Nota-se na região de 3300 cm^{-1} que nos complexos há uma melhor definição das bandas do estiramento O-H e N-H, isso porque diminuem as interações de hidrogênio, afinando as bandas. Observa-se também a banda em aproximadamente 320 cm^{-1} referente a ligação Pt-Cl, que não está presente no ligante de origem.

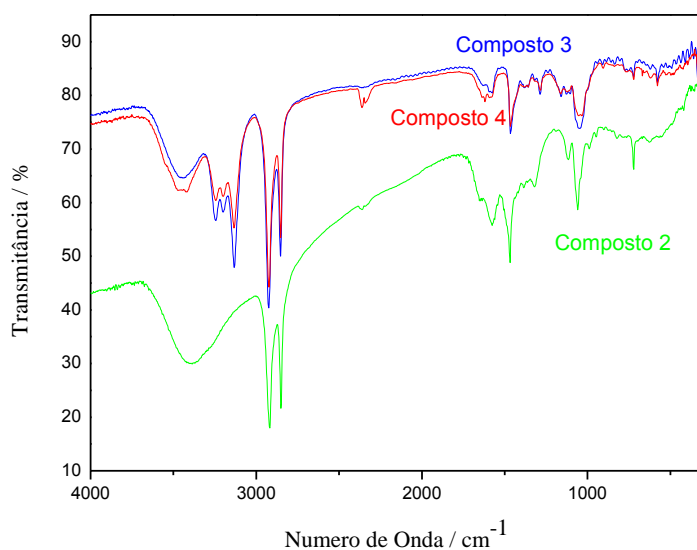


Figura 41: Espectros de IV para os compostos 3, 4 e 2

A análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de todos os complexos sintetizados foi realizada em $\text{DMSO-}d_6$. Os espectros do composto 4 encontram-se nas figuras 42 e 43. Como os espectros dos dois compostos são similares, apenas serão discutidos os espectros do composto 3.

Nas figuras 44 e 45 estão representados os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . Observa-se no RMN de ^1H três multipletos entre $\delta 1,07$ e $\delta 1,58$ que pode ser atribuído aos hidrogênios do grupo CH_2 da cadeia alifática. Entre $\delta 2,12$ e $2,64$ podem ser observados quatro multipletos referentes aos hidrogênios dos grupos CH_2 ligados diretamente a NH_2 e NH . Em $\delta 3,19$ pode ser observado um simpleto referente aos hidrogênios dos grupos CH_2 ligados a OH . Em $\delta 4,22$ há um sinal referente ao hidrogênio do grupo hidroxila. Para os hidrogênios de NH e NH_2 os espectros apresentam três simpletos largos entre $\delta 5,10$ e $\delta 6,01$.

O espectro de RMN de ^{13}C do composto 3 apresenta sinais entre δ 25,0 e 32,0 referentes aos carbonos da cadeia alifática. Entre δ 44,0 a 55,0 observam-se os sinais de carbonos vizinhos a nitrogênio de NH_2 e NH , além de sinal em δ 60,3 referente ao carbono ligado diretamente à hidroxila.

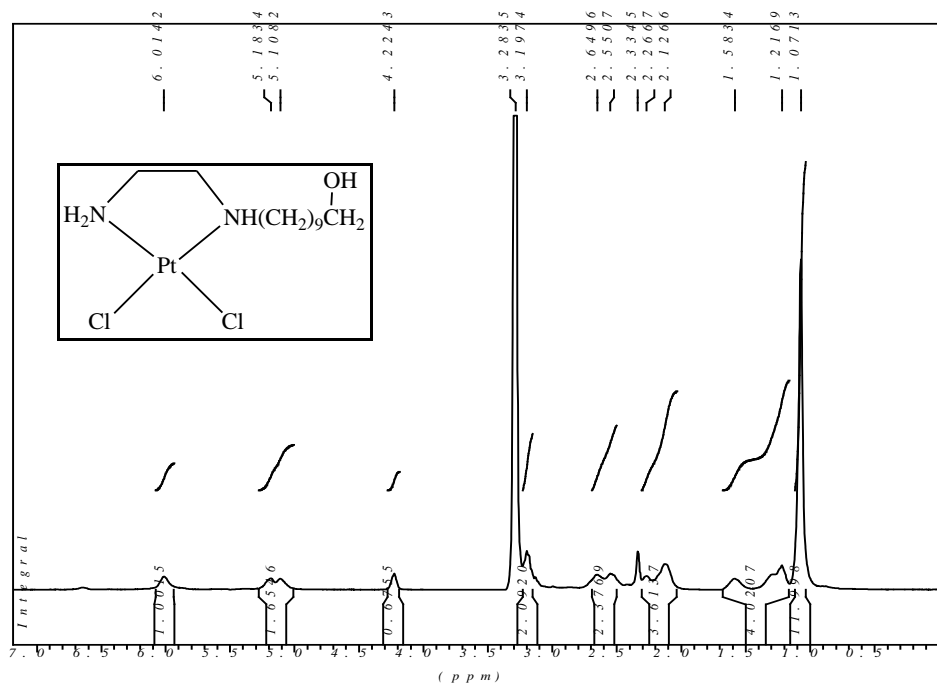


Figura 42: Espectro de RMN de ^1H para o composto 3

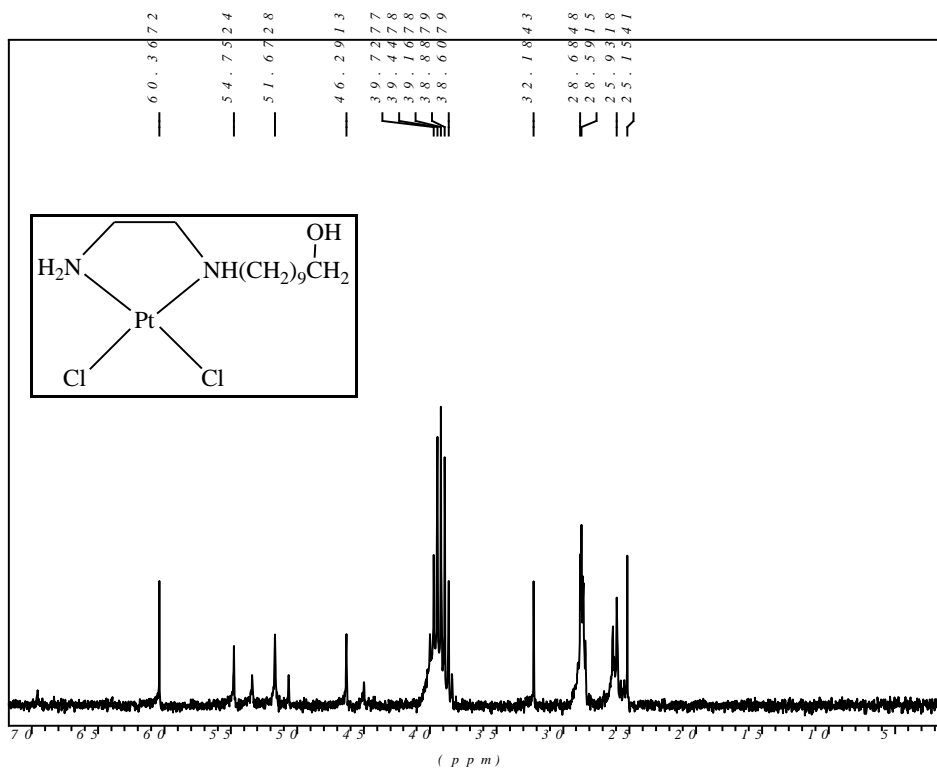


Figura 43: Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 3

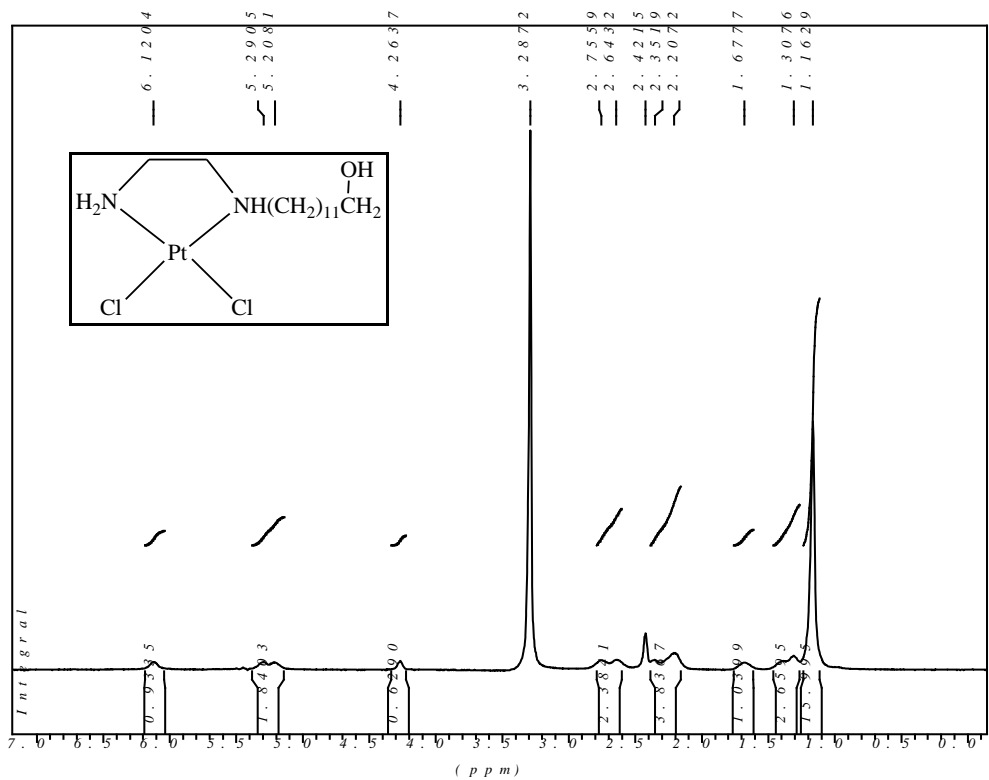


Figura 44: Espectro de RMN de ^1H para o composto 4

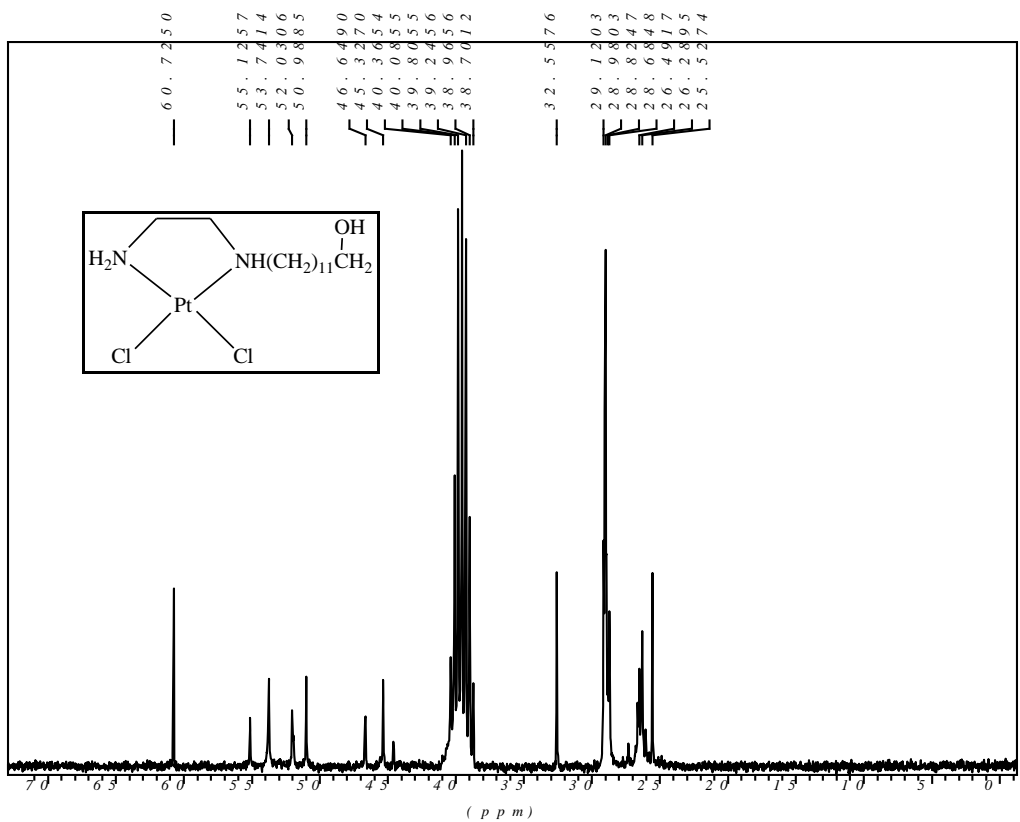


Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 4

Os espectros de RMN de ^{195}Pt feitos para os compostos 3 e 4 foram realizados em $\text{DMSO-}d_6$. Estes possuem na esfera de coordenação da platina, dois átomos de nitrogênio e dois átomos de cloro, gerando um sinal único na região de δ -2300. As figuras 46 e 47 ilustram os espectros de RMN de ^{195}Pt para os compostos 3 e 4, respectivamente.

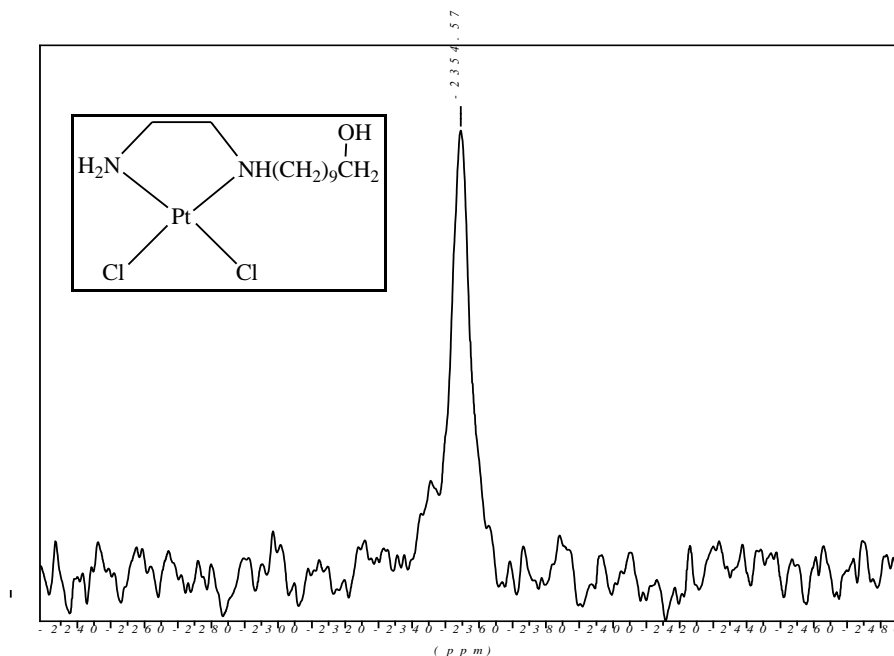


Figura 46: Espectro de RMN de ^{195}Pt para o composto 3

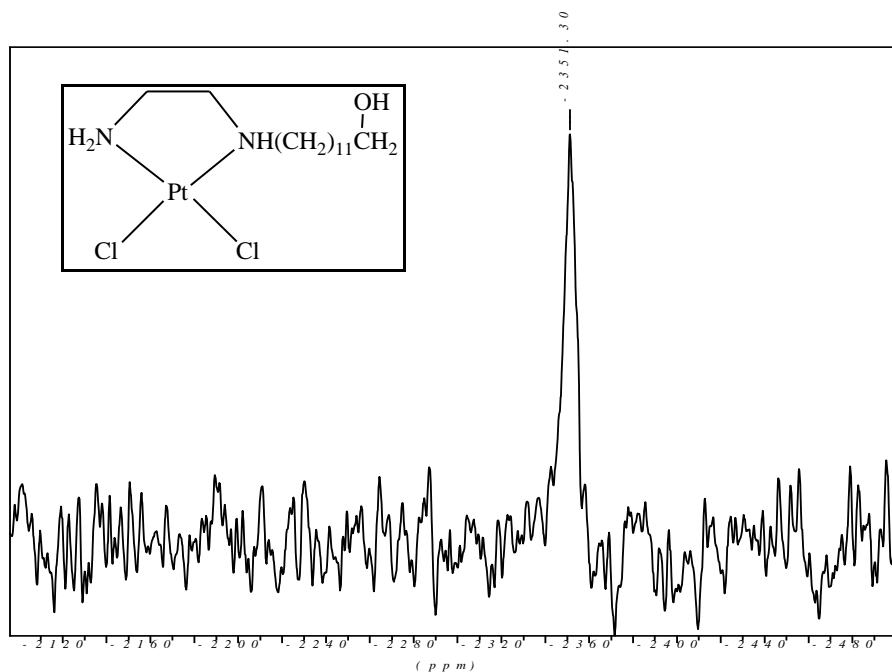


Figura 47: Espectro de RMN de ^{195}Pt para o composto 4

2.14.4 Complexos Dinucleares de Platina(II)

Os complexos dinucleares de platina(II) foram obtidos a partir do tetracloroplatinato(II) de potássio dissolvido em água e dos ligantes sintetizados, derivados da 1,2-etanodiamina, dissolvidos em uma mistura de água e metanol (figura 48). Os compostos foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear de próton (^1H), carbono (^{13}C) e platina (^{195}Pt) e análise elementar.

Complexos Dinucleares de Platina(II)

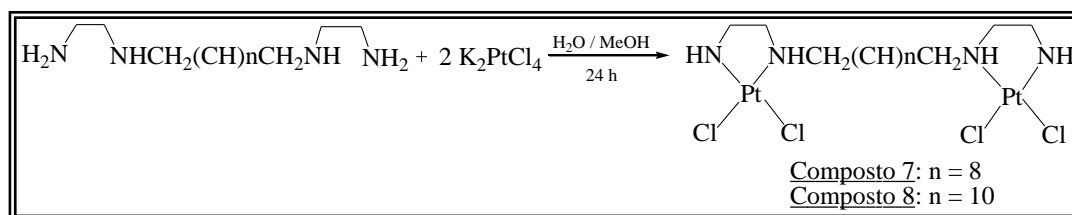


Figura 48: Síntese dos Complexos Dinucleares de Platina(II)

Na figura 49 encontram-se os espectros de infravermelho para os composto 7 e 8, que foram realizados utilizando pastilha de KBr, e analisados na região de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .

Como pode ser visto nos espectros, os compostos apresentam banda na região de 3490 cm^{-1} referente ao modo de estiramento O-H e na região de 3160 cm^{-1} referente ao modo de estiramento N-H. Nas regiões de aproximadamente 2920 e 2850 cm^{-1} observam-se bandas referentes ao estiramento simétrico dos grupos CH_2 . Em 1590 cm^{-1} ocorre uma banda referente à deformação angular de N-H. Observa-se também uma banda muito pouco intensa na região de 720 cm^{-1} referente à deformação angular assimétrica do grupo CH_2 , bem como uma banda na região de 570 cm^{-1} referente ao estiramento Pt-N e banda em 322 cm^{-1} que pode ser atribuída ao estiramento Pt-Cl.

Analisando estes resultados, podemos perceber a presença de bandas referentes ao modo de estiramento O-H, que não deveriam ser observadas, pois os compostos em questão não possuem esse grupo. No entanto, podemos explicar o aparecimento desta banda à presença do etanol, utilizado na reação de obtenção do ligante e que havia sido evidenciada nos espectros para os ligantes. A presença de etanol também é confirmada pelos dados de análise elementar dos compostos.

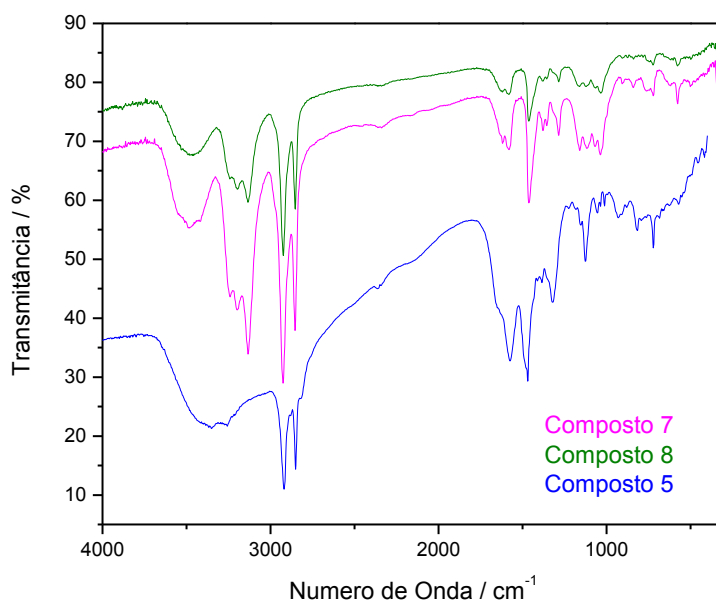


Figura 49: Espectros de IV para os compostos 7, 8 e 5

Nas figuras 50, 51 e 52 encontram-se os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e ^{195}Pt do composto 8, que foram realizados em DMSO-d_6 . Os espectros do composto 7 encontram-se nas figuras 53, 54 e 55. Como os espectros dos dois compostos são similares, apenas serão discutidos os espectros do composto 8.

Observa-se no RMN de ^1H multipletos entre δ 1,19 e δ 1,69 que pode ser atribuído aos hidrogênios do grupo CH_2 da cadeia alifática. Entre δ 2,22 e δ 2,66 podem ser observados quatro multipletos de hidrogênios dos grupos CH_2 ligados diretamente aos nitrogênios. Entre δ 5,31 e 6,13 podem ser observados simpletos largos referentes aos hidrogênios dos grupos NH e NH_2 .

O espectro de RMN de ^{13}C do composto 8 apresenta sinais entre δ 26,67 e 29,33 referentes aos carbonos da cadeia alifática. Entre δ 47,05 a 55,53 observam-se os sinais de carbonos vizinhos a nitrogênio de NH_2 e NH .

No espectro de RMN de ^{195}Pt do composto 8 observa-se um sinal na região de δ - 2.353, que é a região esperada para uma esfera de coordenação da platina com dois átomos de cloro e dois átomos de nitrogênio, evidenciando a formação do complexo com esta estrutura.

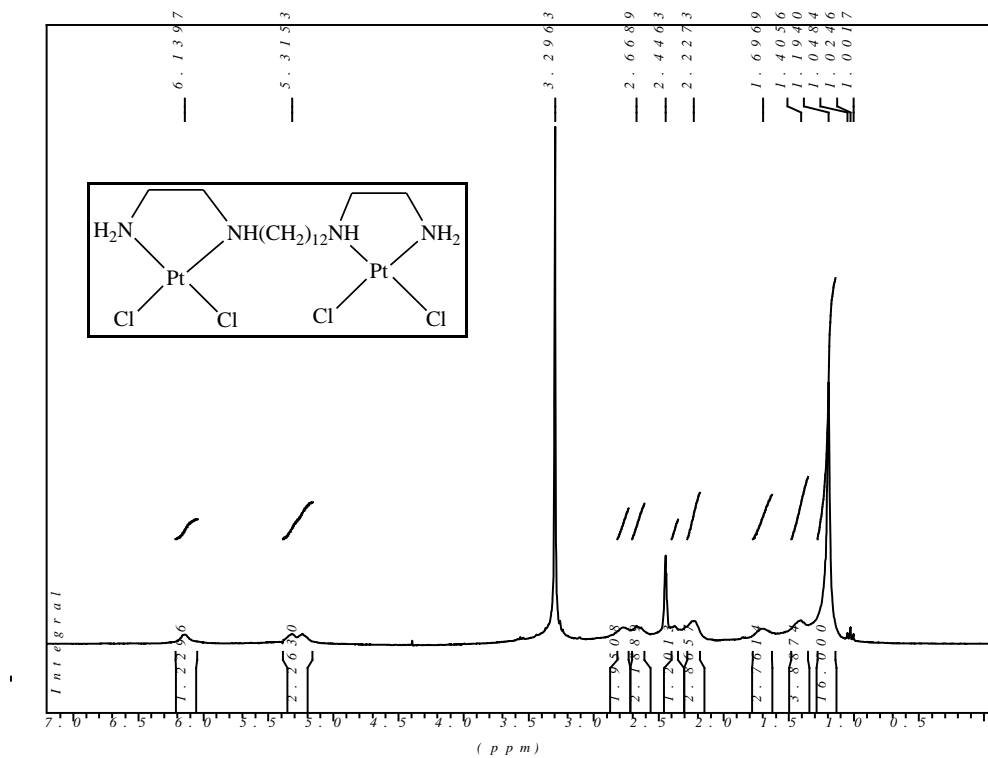


Figura 50: Espectro de RMN de ¹H para o composto 8

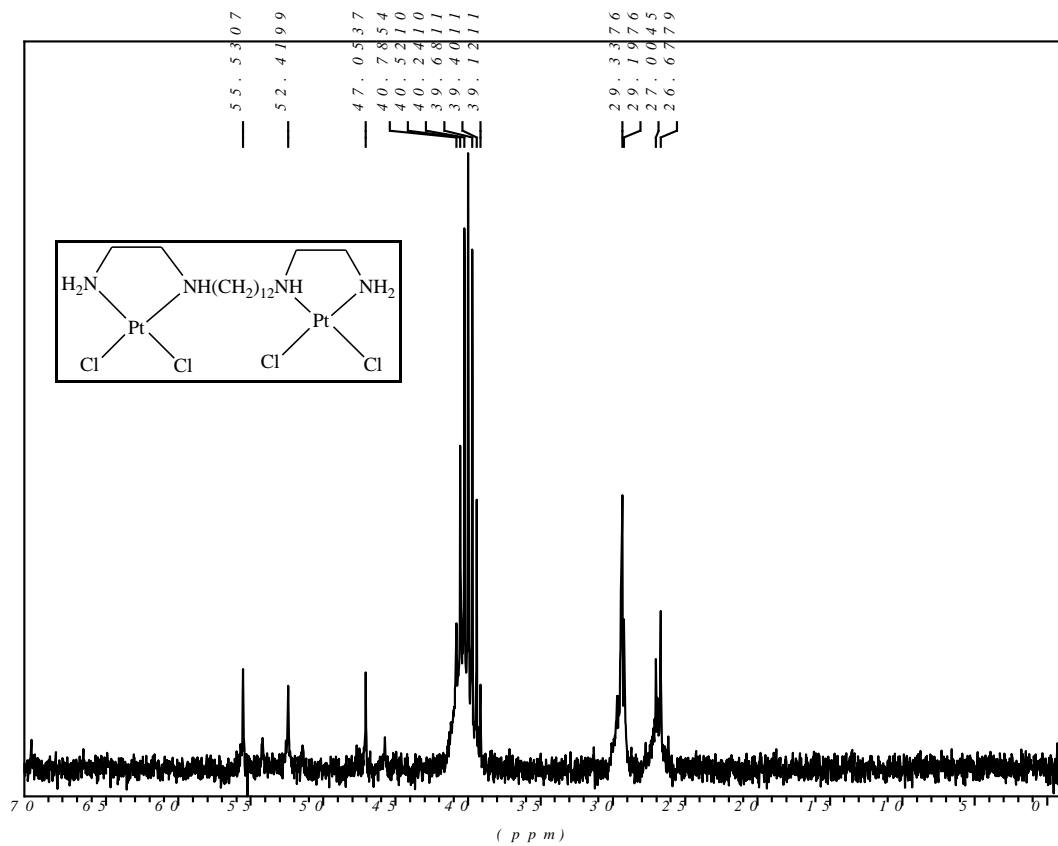


Figura 51: Espectro de RMN de ¹³C para o composto 8

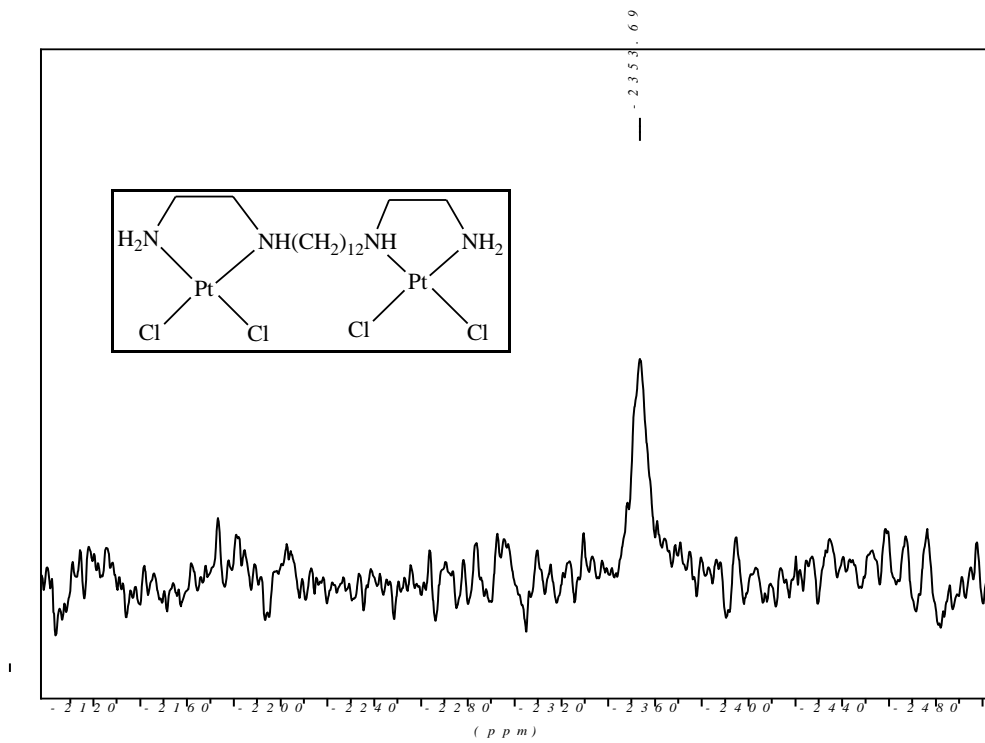


Figura 52: Espectro de RMN de ^{195}Pt para o composto 8

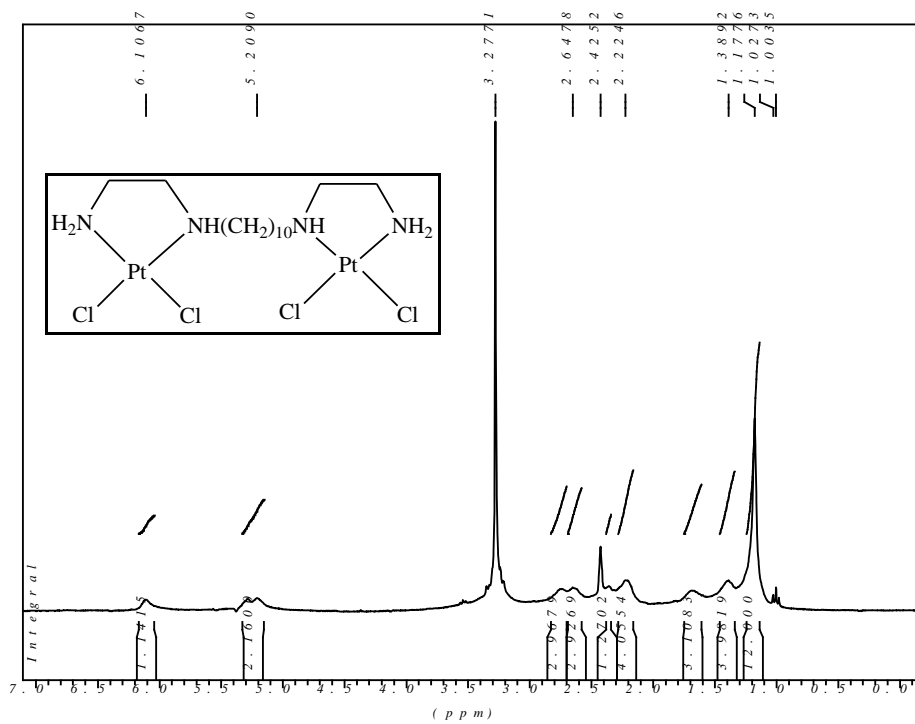


Figura 53: Espectro de RMN de ^1H para o composto 7

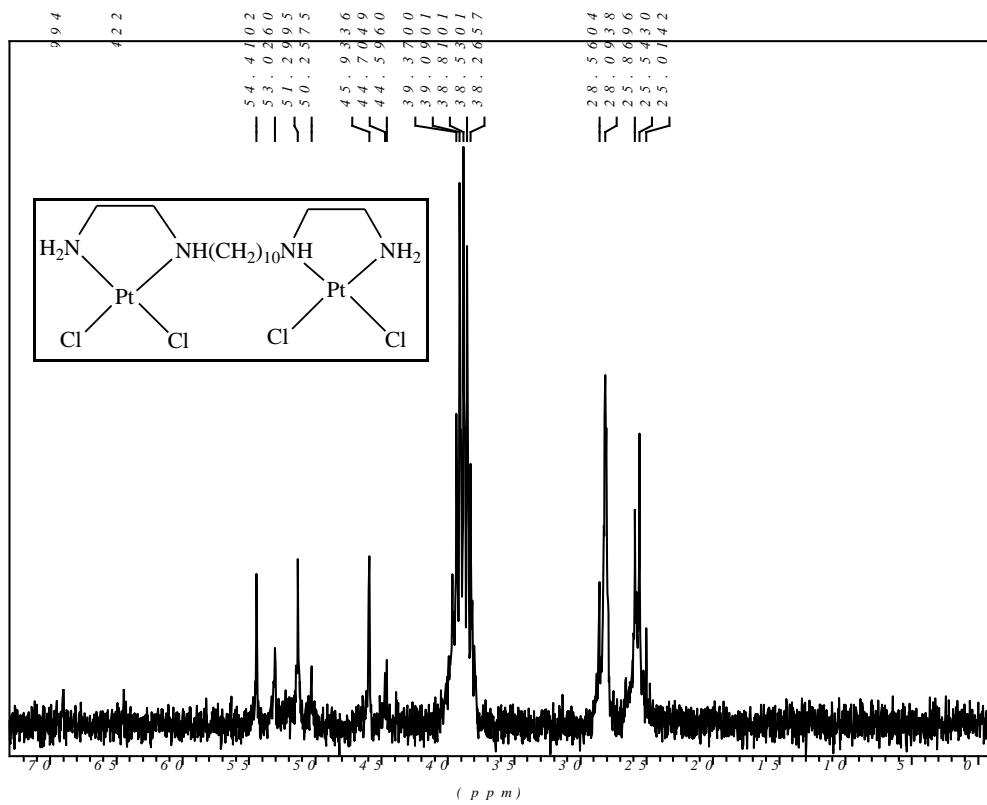


Figura 54: Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 7

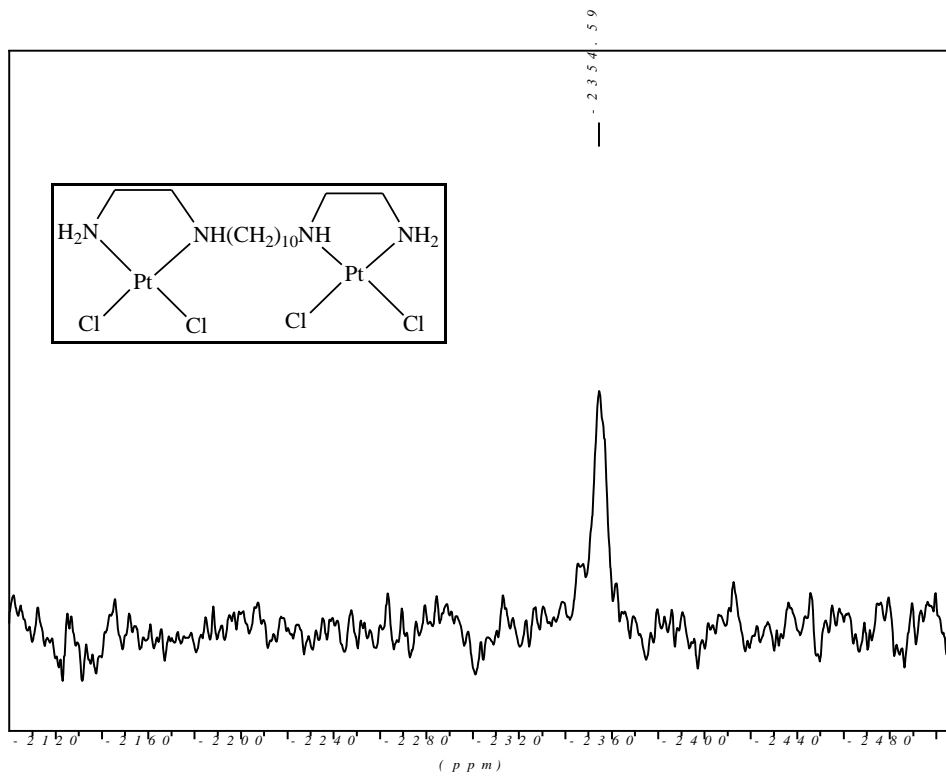


Figura 55: Espectro de RMN de ^{195}Pt para o composto 7

3 Preparação e Caracterização dos Lipossomas contendo Complexos de Platina(II)

3.1 Introdução

A literatura reporta que a utilização da maioria dos fármacos possui uma grande limitação que é a impossibilidade do aumento de sua concentração no sangue. O tempo de permanência do agente terapêutico na circulação, a baixa solubilidade e, em especial, os efeitos colaterais perniciosos inerentes às terapias com doses elevadas, podem dificultar a utilização da concentração necessária para o sucesso farmacoterapêutico. Em consequência disso, a obtenção de transportadores eficientes para fármacos tem sido, há longo tempo, um anseio de muitos pesquisadores (Machado, Gnoatto, Kluppel, 2007; Batista, Carvalho, Magalhães, 2007).

Durante o trajeto de uma substância com interesse farmacológico desde o seu local de absorção até aos locais onde a sua ação será exercida, é inevitável a passagem de variadas barreiras lipídicas formadas pelas membranas celulares, estruturalmente constituídas por uma bicamada de fosfolípidios, onde se encontram incrustadas proteínas, glicoproteínas e outros constituintes (Machado, Gnoatto, Kluppel, 2007).

O conhecimento exaustivo da interação entre os fármacos e as membranas lipídicas é crucial para a compreensão dos parâmetros de distribuição dessas moléculas no organismo, bem como para o estabelecimento das relações entre as suas propriedades físico-químicas e os parâmetros farmacológicos apresentados, relações importantes no estudo de novas moléculas farmacologicamente ativas. Adicionalmente, para determinados fármacos, a sua interação com os lípidios constituintes das membranas pode representar uma importante etapa para o estabelecimento do seu modo de ação (Machado, Gnoatto, Kluppel, 2007; Batista, Carvalho, Magalhães, 2007).

Dentro deste cenário, encontramos os lipossomas, como uma alternativa no sistema de liberação controlada de drogas. Não somente os lipossomas, como outros métodos tem sido alvo de pesquisas há pelo menos quatro décadas. Desde que foi sugerida sua aplicação na indústria farmacêutica, muitos resultados foram obtidos, especialmente na manipulação molecular de carreadores e no estudo de suas interações com as drogas encapsuladas.

3.2 Parte Experimental

3.2.1 Reagentes e Métodos Instrumentais

◆ Reagentes

DSPE-PEG-2000 = 1,2- diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-*N*-[metoxi(polietilenoglicol)-2000] (Avanti)

DSPC: 1,2-Diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (Avanti)

Ar = Argônio (Alphagaz Ar1)

NaCl = Cloreto de sódio (Aldrich)

CH = Colesterol (Aldrich)

Clorofórmio (Merck)

◆ Liofilização

O aparelho utilizado para liofilização foi do tipo Labconco, Freezone 4.5, pertencente ao Laboratório de Biofísica e Sistemas Nanoestruturados (Lab-Nano) ICB/UFMG.

◆ Homogeneização do tamanho dos lipossomas

A homogeneização do tamanho dos lipossomas foi realizada em extrusora Lipex Biomembrane Inc Canadá, no Lab-Nano ICB/UFMG.

◆ Medidas de tamanho dos lipossomas

A espectroscopia de correlação de fótons foi realizada em equipamento Zeta Sizer 3000Hs, Malvern instruments no Lab-Nano no Departamento de Fisiologia ICB/UFMG.

◆ Determinação e Quantificação de Platina

Utilizou-se um espectrômetro de Absorção Atômica de Forno de Grafite Perkin Elmer (B.3120080) Modelo Analyst 600 com forno THGA no Lab-Nano ICB/UFMG.

Sistema EAA-FG da Perkin Elmer, utilizando lâmpada de catodo oco para platina, que operou a 30 mA, argônio como gás de purga e tubos de grafite com aquecimento

transversal. As absorvâncias foram medidas no comprimento de onda 265,9 nm com largura de fenda de 0,7 nm e 20 μL de volume de amostra. O manual do equipamento sugere como referência o valor de absorvância de 0,14 para uma amostra padrão a 400 $\mu\text{g/L}$ de platina.

3.2.2 Preparação dos Lipossomas contendo os Complexos de Platina(II)

Para 3 mL de suspensão de lipossomas incorporando cada complexo foi usado 76,5 mg de DSPC (1,2-Diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina), 22,5 mg de CH (colesterol), 16,2 mg de DSPE-PEG-2000 (1,2- diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-*N*-[metoxi(polietilenoglicol)-2000]) e a massa respectiva de cada complexo (6,5 mmol/L). Os componentes foram solubilizados em aproximadamente 3 mL de clorofórmio. O solvente foi então evaporado em rotaevaporador com pérolas de vidro, para obtenção do filme lipídico. O filme lipídico passou por liofilização durante 24 h para garantir a eliminação do solvente. A hidratação do filme foi subsequente realizada com 3 mL de solução aquosa de NaCl (0,15 mol/L), sob agitação manual. Em seguida a solução foi deixada a 60 °C (temperatura de transição de fase do lipídio DSPC) no rotaevaporador por 45 minutos, para hidratação total. Após a hidratação, a solução lipossomal apresentou aspecto leitoso. Na figura 56, encontram-se as etapas realizadas para preparação dos lipossomas.

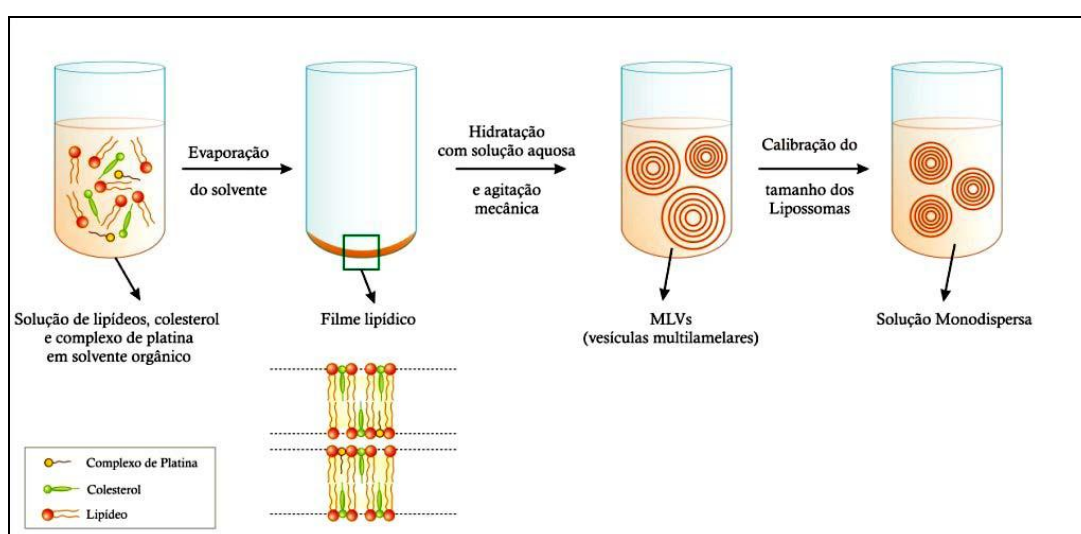


Figura 56: Etapas para preparação dos lipossomas do tipo MLV

3.2.3 Calibração do tamanho dos lipossomas e eliminação do complexo não incorporado

A suspensão de lipossomas foi submetida a filtrações repetidas, 5 repetições, através de membranas de policarbonato com poros de diâmetro de 200 nm para reduzir e homogeneizar o tamanho dos lipossomas a fim de obter uma solução coloidal monodispersa (figura 45). Esta etapa, chamada de extrusão, foi realizada sob alta pressão de argônio, a 60 °C, usando um sistema de extrusão.

3.2.4 Caracterização das Formulações de Lipossomas contendo os Complexos de Platina(II)

3.2.4.1 Medida de Distribuição de Tamanho das Vesículas

Para medir o tamanho dos lipossomas, foi utilizado espectroscopia de correlação de fótons, realizada a partir de uma dispersão de 5 µL de solução lipossomal em 2 mL de solução aquosa de NaCl (0,15 mol/L), sendo possível obter o diâmetro hidrodinâmico das vesículas.

A mesma técnica fornece informação sobre a homogeneidade da distribuição de tamanho das vesículas através do índice de poli-dispersão. As medidas foram feitas em triplicata e foi utilizada a média dos valores obtidos.

3.2.4.2 Determinação da Taxa de Encapsulação

Foi determinada a taxa de encapsulação que fornece a eficiência da incorporação dos complexos de platina(II) em lipossomas.

A dosagem de platina foi feita por absorção atômica forno de grafite, no Lab-Nano (ICB/UFMG), onde foram preparadas soluções de ácido nítrico 2% das amostras em balão volumétrico de 10 mL. A curva de calibração foi construída utilizando solução padrão de K₂PtCl₆ em diferentes concentrações.

3.2.5 Determinação do Coeficiente de Partição dos Complexos

Os coeficientes de partição dos complexos de platina foram determinados em sistema *n*-octanol/água. Cada complexo foi dissolvido em *n*-octanol e a um volume

igual de água com concentração final de 1×10^{-4} mol/L. A mistura foi agitada mecanicamente e mantida em repouso por 24 h para a distribuição das duas fases do sistema. Após separação, amostras das 2 fases foram diluídas quando necessário, e então a concentração de platina foi determinada por Absorção Atômica em Forno de Grafite. Os resultados são expressos pelo coeficiente de partição aparente (P), com a concentração de platina na fase orgânica dividida pela concentração de platina na fase aquosa.

3.3 Resultados e Discussão

Trabalhos desenvolvidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa (Silva, 2009; Silva, Fontes, Lopes, Frezard, 2010) determinaram que a formulação lipídica ideal para os complexos de cadeia carbônica longa consistia na utilização dos componentes DSPC, CH, o respectivo complexo e DSPE-PEG-2000, com uma razão de 5:3:1:0,3 respectivamente. Os componentes usados nessa formulação vão originar uma membrana rígida, pois a temperatura de transição dos fosfolídeos é superior a 55°C, além de proporcionar vesículas estáveis causadas por PEG-2000, que são polímeros de etilenoglicol que recobrem a superfície dos lipossomas, esse recobrimento da superfície dos lipossomas impede que haja a fusão das vesículas, permitindo assim um tempo de vida prolongado na circulação sanguínea (Torchilin, 2005; Frezard, Schettini, Rocha, Demicheli, 2005).

Após a preparação dos lipossomas com a formulação descrita anteriormente, foi feita a liofilização das amostras em um liofilizador, sendo que as mesmas foram deixadas por 24 horas para garantir que não haveria mais a presença de possíveis solventes da preparação.

Uma etapa subsequente de grande importância foi a calibração do tamanho dos lipossomas, bem como a eliminação do complexo não incorporado. Como se pode ver na figura 56, após a obtenção do filme lipídico, tem-se lipossomas de vários tamanhos. No entanto é preciso homogeneizar estes tamanhos e, no nosso caso, foi feita uma calibração utilizando uma extrusora com membranas de policarbonato com diâmetro dos poros igual a 200 nm. Esta etapa é fundamental para se obter uma solução coloidal monodispersa, além é claro, da homogeneização do tamanho dos lipossomas.

Feita a calibração, foi necessária a determinação da distribuição do tamanho das vesículas. Este é um parâmetro importante na caracterização de uma formulação, devido à grande influência deste na biodistribuição do fármaco encapsulado. Sabe-se que lipossomas relativamente grandes, com diâmetro médio maior que 200 nm, são rapidamente reconhecidos e capturados por macrófagos e retidos no fígado e outros tecidos do sistema monocítico fagocitário sendo desviados do percurso pretendido (Torchilin, 2005).

Além do tamanho das vesículas, durante a medição outro parâmetro também é dado, sendo igualmente importante, chamado de índice de polidispersão, que caracteriza quão

homogênea está a distribuição dos tamanhos das vesículas. Para analisar este valor, devemos considerar que valores menores que 0,2 indicam uma população monodispersa.

Na tabela 1 estão descritos os valores de diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas bem como o índice de polidispersão para os lipossomas preparados, onde se observa que os valores de diâmetro, após extrusão, estão entre 125,5 e 182,8 nm, ou seja, valores considerados bons, uma vez que a membrana utilizada foi igual a 200 nm. Ao se observar o índice de polidispersão, podemos considerar que os três lipossomas preparados mostram uma população monodispersa, pois os valores estão dentro dos limites aceitáveis.

Tabela 1: Dados de Caracterização dos Lipossomas

Lipossoma- Composto	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	Índice de polidispersão	Taxa de retenção de platina (%)
MLV- <u>3</u>	182,8	0,211	5,5
MLV- <u>4</u>	197,1	0,222	20,7
MLV- <u>8</u>	125,5	0,092	1,6

Na tabela 1 encontra-se também a taxa de retenção de platina, em porcentagem. Este valor é dado através da determinação da concentração final de platina na suspensão de lipossomas, onde se calcula a porcentagem através do valor teórico esperado. A determinação da concentração de platina foi realizada por absorção atômica por forno de grafite.

A otimização das condições de análise para a determinação de platina foi iniciada a partir das condições de operação do forno sugeridas no manual do equipamento, onde estão estabelecidas as temperaturas, o tempo das etapas de secagem, pirólise, atomização, limpeza e o fluxo do gás de purga, conforme mostra a tabela 2. As condições foram ajustadas através da obtenção das curvas de pirólise e atomização.

Tabela 2: Condições de uso do Espectrômetro de Absorção Atômica

Etapa	Temperatura (°C)	“ramp time” (s)	“hold time” (s)	Fluxo de Gás (mL/min)
Secagem	110	1	30	250
Secagem	130	15	30	250
Pirólise	1500	10	20	250
Atomização	2400	0	6	0
Limpeza	2500	1	3	250

Após otimizada as condições de análise, foram feitas as medidas para os três complexos incorporados em lipossomas. Os dados de concentração obtidos foram tratados e as quantidades de platina determinadas.

Os valores de taxa de encapsulação para os compostos com hidroxila terminal foi igual a 5,5%, para o composto 3 com cadeia alifática de 10 carbonos, e 20,7% para o composto 4 com cadeia alifática igual a 12 carbonos. Já para o composto dinuclear 8 o valor obtido foi igual a 1,6%.

Esses valores são considerados baixos, ou seja, a encapsulação é baixa. Isso se deve principalmente à grande dificuldade de solubilização dos complexos em clorofórmio, o que pode ser atribuído principalmente à presença do grupo hidroxila na molécula e também à presença dos dois centros metálicos nos complexos dinucleares, pois isso modifica o balanço hidrofílico/hidrofóbico. Esse problema é evidenciado ao se fazer a extrusão dos lipossomas, porque a parte que não é incorporada fica retida na membrana de policarbonato, sendo eliminada, e observou-se que boa parte do composto ficou realmente retida.

Os compostos sintetizados possuem caráter anfifílico, ou seja, provavelmente as moléculas tenham sido incorporadas nas bicamadas lipídicas entre a região hidrofóbica e hidrofílica, pois para os compostos com hidroxila terminal a taxa de incorporação aumentou com o aumento da cadeia carbônica, a parte apolar da molécula, no entanto a presença desta mesma hidroxila também diminui o caráter hidrofóbico, por alterar a polaridade desta. Já para o composto com dois centros metálicos, ocorre um problema similar, entretanto pode-se dizer que é ainda mais acentuado, pois a simetria apresentada pela molécula diminui ainda mais o caráter anfifílico desta, o que foi confirmado pela medida de coeficiente de partição que mostrou o seu caráter hidrofóbico. Devido a essa

dificuldade de incorporação dos compostos dinucleares, a encapsulação foi feita somente para o composto 8, pois devido ao tamanho da cadeia ser maior esperava-se obter uma maior encapsulação.

A tabela 3 mostra os valores do coeficiente de partição para os compostos.

Tabela 3: Coeficientes de Partição $[P]$ octanol/água

Compostos de Platina(II)	$[P]$
Composto 3	1,6
Composto 4	3,9
Composto 8	39,4

Sabe-se que o coeficiente de partição é utilizado para se determinar o balanço hidrofílico/hidrofóbico de moléculas. Analisando os valores de coeficiente de partição encontrados para os compostos, podemos perceber que o composto 3 é o mais hidrofílico de todos, pois possui um baixo valor de $[P]$. O composto 4 é mais hidrofóbico do que o composto 3 devido a cadeia carbônica ser maior (12 carbonos), o que também favoreceu uma maior taxa de encapsulação, o que foi realmente confirmado (figuras 57 e 58). Porém, para o composto 8, apesar de mais hidrofóbico, pelo alto valor de $[P]$ encontrado, sua incorporação não foi satisfatória, o que pode ser explicado pela sua estrutura não ser do tipo cabeça/cauda, como os lipídeos formadores de membrana.

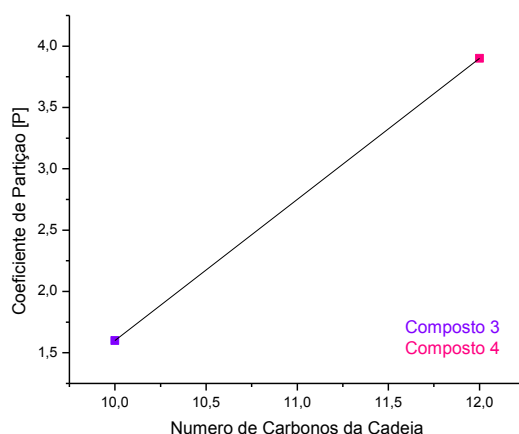


Figura 57: Balanço hidrofílico/hidrofóbico dos complexos de platina

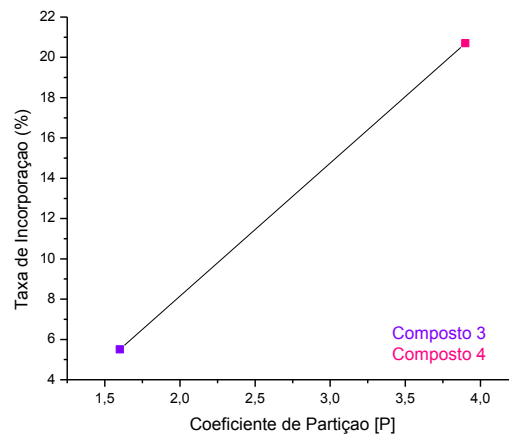


Figura 58: Relação entre a taxa de incorporação dos complexos em lipossomas e o seu coeficiente de partição [P]

É possível perceber através destes resultados que apesar da encapsulação ter sido baixa, os resultados seguem os padrões esperados, pois observamos que o balanço hidrofóbico/hidrofílico tende a melhorar quando a cadeia carbônica é maior. No entanto, a baixa encapsulação está ligada diretamente a presença da hidroxila terminal dos compostos 3 e 4, porque a cadeia carbônica apolar apresenta em sua extremidade um grupamento polar (hidroxila), o que desfavorece a interação com os lipídeos na preparação dos lipossomas.

4 Avaliação da Atividade Citotóxica de Complexos de Platina(II) e de suas Formulações em Lipossomas

4.1 Introdução

A avaliação da atividade citotóxica de novos complexos de platina constitui o primeiro passo na investigação de sua ação antitumoral (Jamieson, Lippard, 1999).

As culturas de células são empregadas como sistemas modelo em testes de citotoxicidade, além de serem usadas em virologia, produção de vacinas, proteínas e hormônios, na engenharia genética e, principalmente, na investigação e desenvolvimento de novos fármacos (Davis, 1994).

A citotoxicidade pode ser avaliada aplicando-se várias metodologias como, por exemplo, a citometria de fluxo que utiliza um equipamento de detecção óptico-eletrônico que, dentre várias aplicações, realiza a contagem de células viáveis (Weaver, 1997). Outras técnicas utilizadas são as colorimétricas e fluorimétricas que podem ser exemplificadas pela dosagem da lactase desidrogenase (LDH), que é baseada na integridade da membrana; o alamar blue (AB), que é metabolizado na mitocôndria das células produzindo um composto fluorescente; o CFDA-AM que também tem princípios fluorimétricos, baseado na integridade da membrana celular; e principalmente técnicas colorimétricas que usam sais de tetrazólio como o MTT, XTT e WST (Tominaga, Ishiyama, Ohseto, Sasamoto, Hamamoto, Suzuki, Watanabe, 1999).

A técnica do MTT é um ensaio colorimétrico amplamente utilizado para avaliação de citotoxicidade. A redução do sal de tetrazólio, brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), inicialmente amarelo, pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial gera o produto de cor violeta chamado Formazan, figura 59. Uma vez que a redução somente ocorre em células viáveis, a quantidade de formazan formado é diretamente proporcional à quantidade de células vivas (Mosmann, 1983).

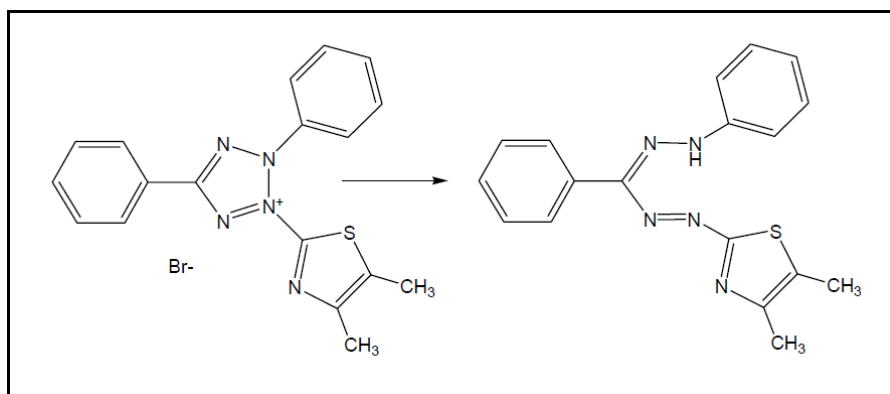


Figura 59: Redução do MTT ao composto Formazan

4.2 Parte Experimental

4.2.1 Reagentes e métodos instrumentais

MTT = Brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

Ampicilina (Sal de sódio – Sigma)

Anfotericina B (Cristália)

EDTA (Reagen Quimibras)

Dimetilsulfóxido (Vetec)

ATV (Associação Tripsina 0,2 % Versene EDTA 0,02 %)

FBS – Soro Fetal Bovino (Cultilab)

HEPES ácido 4-(2-hidroxietil)-1-(piperazinetanosulfônico) (Aldrich)

PBS – Tampão fosfato-salina: NaCl 0,14 mol/L; KCl 2,7 mmol/L; Na₂HPO₄ 8 mmol/L e KH₂PO₄ 2 mmol/L

RPMI 1640 (Aldrich)

Sulfato de Streptomicina (Sigma)

◆ Esterilização do material

O material plástico e as soluções utilizadas nos experimentos com células foram previamente esterilizados em auto-clave vertical Phoenix AV50 120 °C por 30 minutos no Laboratório de Substâncias Antitumorais ICB/UFMG.

◆ **Quantificação das células**

Para quantificação das células nos experimentos *in vivo* com MTT foi utilizado um espectrofotômetro na região do Visível Stat Fax 2100 próprio para microplacas com lâmpadas de 492 nm e filtro diferencial de 630 nm no Laboratório de Substâncias Antitumorais ICB/UFMG.

◆ **Manipulação das culturas de célula**

As culturas de célula foram manipuladas em ambiente estéril, em Capela Fluxo Laminar Veco com lâmpada germicida de radiação ultra-violeta no Laboratório de Substâncias Antitumorais ICB/UFMG.

◆ **Manutenção das culturas de célula**

Durante os experimentos as culturas de células foram mantidas em Estufa Sanyo Incu Safe com suplementação de 5 % de CO₂ a 37 °C no Laboratório de Substâncias Antitumorais ICB/UFMG.

◆ **Observação das células**

Para observação e contagem de células das culturas utilizadas nos experimentos *in vitro*, foram utilizados microscópios Olympus CK2 e Nikon-YS2 no Laboratório de Substâncias Antitumorais ICB/UFMG.

4.2.2 Linhagens

Neste trabalho foram utilizadas linhagens de células não tumorais e de células tumorais, sendo B16-F1, célula de melanoma murino não-metastático, B16-F10, célula de melanoma murino metastático e MDA-MB-231 adenocarcinoma de mama humano, cedidas por Ludwing Institute for Cancer Research – São Paulo. Ainda foram utilizadas a linhagem CT26WT, carcinoma de cólon, obtida do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro e as linhagens de células não tumorais, BHK-21, célula normal de rim de hamister e CHO, célula normal de ovário murino cedidas pelo Centro Pan-americano de Febre Aftosa – Rio de Janeiro.

As diferentes linhagens celulares utilizadas foram devidamente propagadas em meio de cultura RPMI 1640, pH 7,4, suplementado com soro fetal bovino (FBS-Fetal Bovine

Serum) 10% v/v, Hepes (4,0 mmol/L), NaHCO₃ (14,0 mmol/L), ampicilina (0,27 mmol/L) e estreptomicina (0,06 mmol/L) em garrafas de 25 mL, na temperatura de 37 °C em estufa com atmosfera úmida e contendo 5 % (v/v) de dióxido de carbono.

As células foram recolhidas da garrafa após serem lavadas com tampão PBS/EDTA pH 7,4 e desprendidas da superfície da garrafa de cultivo com solução de tripsina 0,02 % (v/v). A tripsina foi inativada com adição de 1,5 mL de meio de cultura (10% FBS).

4.2.3 Preparo das soluções de complexos de platina e de lipossomas contendo os complexos.

As soluções estoque (10^{-2} mol/L) dos complexos de platina(II) testados foram preparadas a cada experimento usando DMSO como solvente. Estas soluções foram adequadamente diluídas em meio de cultura, suplementado conforme descrito no item 4.2.2., para as concentrações 1, 5, 10, 50, 100 µmol/L evitando-se exceder 1 % de DMSO na solução de maior concentração testada (100 µmol/L).

Para as formulações de lipossomas, estes foram diretamente diluídos, da mesma maneira como descrito acima, para as concentrações 1, 5, 10, 50, 100 µmol/L do complexo. Os padrões de comparação utilizados foram cisplatina e carboplatina nas mesmas concentrações e condições experimentais.

4.2.4 CI₅₀ dos complexos de platina em linhagens de células tumorais e não tumorais, determinada pelo método MTT

Para a determinação da concentração inibitória de 50 % da viabilidade celular (CI₅₀), as células foram distribuídas em meio de cultura em densidades de 3×10^3 células/poço/100 µL numa placa com 96 poços e foram devidamente incubadas a 37 °C em atmosfera umedecida e 5 % CO₂ por 48 horas para ideal aderência.

Nos poços da placa contendo as células já aderidas, foram distribuídos 100 µL de concentrações decrescentes da substância a ser testada, em sextuplicatas. Para controle negativo, 100 µL de meio de cultura suplementado com 10% de FBS, foram adicionados a doze poços da placa. As células foram expostas aos compostos por 72 h nas devidas concentrações.

Após a exposição das células ao composto de investigação, as células foram incubadas com MTT (5µg/10µL/poço) durante 4 h. A seguir, todo o líquido sobrenadante foi removido por aspiração e foram adicionados 100 µL de DMSO/poço, sendo a viabilidade celular (proporcional à concentração dos sais de formazan) determinada pela medida de absorvância a 492 nm num espectrofotômetro de microplacas.

A concentração inibitória de 50 % da viabilidade celular (CI₅₀) para os 4 complexos de platina(II) aqui descritos foi determinada nas seis linhagens celulares distintas. Os dados obtidos foram normalizados considerando-se a viabilidade celular do controle negativo como 100%. As CI₅₀ foram calculadas usando regressão linear sobre os valores de concentração em escala logarítmica *versus* a porcentagem de viabilidade celular em cada concentração. Para tal foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0.

4.3 Resultados e Discussão

Observa-se na tabela 4 os valores de CI_{50} para os compostos de platina(II) 3,4, 7 e 8, determinados em diferentes linhagens celulares. Constatamos que o composto 7 apresenta citotoxicidade igual ($6,3 \pm 1,1 \mu\text{mol/L}$) a da carboplatina ($7,2 \pm 0,5 \mu\text{mol/L}$), considerando o desvio das medidas contra células de melanoma não-metastático (B16F1) e, o mesmo pode ser observado comparado à cisplatina ($5,4 \pm 0,5 \mu\text{mol/L}$). Para esta mesma linhagem celular, o composto 7 foi o único que apresentou melhores efeitos de citotoxicidade.

A citotoxicidade dos compostos 3 e 4 foi avaliada também em células de carcinoma de cólon (CT26). Estes compostos apresentaram maior citotoxicidade que a cisplatina e a carboplatina, sendo este um resultado interessante encontrado.

Para a linhagem celular de melanoma metastático (B16F10), a citotoxicidade apresentada pelos complexos foi bem menor que os padrões ($CI_{50} > 100$), sendo que apenas o composto 7 apresenta um melhor valor ($56,5 \pm 3,3 \mu\text{mol/L}$).

Tabela 4: Citotoxicidade dos Complexos em Células Tumorais

Complexos	IC ₅₀ em Células Tumorais ($\mu\text{mol/L} \pm \text{SD}$)*			
	B16F1	CT26	B16F10	MDA
Composto 3	$11,9 \pm 2,2$	$1,8 \pm 0,3$	>100	>100
Composto 4	$17,1 \pm 2,8$	$4,8 \pm 1,0$	>100	>100
Composto 7	$6,3 \pm 1,1$	-	$56,5 \pm 3,3$	>100
Composto 8	$14,2 \pm 2,1$	-	>100	>100
Cisplatina	$5,4 \pm 0,5$	$6,0 \pm 0,8$	$6,5 \pm 0,9$	$6,0 \pm 1,0$
Carboplatina	$7,2 \pm 0,5$	$8,5 \pm 0,7$	$12,0 \pm 1,0$	$16 \pm 2,0$

*SD (Desvio Padrão das medidas em triplicata de dois experimentos independentes)

Na tabela 5, estão os efeitos de citotoxicidade para os compostos em células não tumorais, onde podemos observar que todos os quatro compostos são menos tóxicos que a cisplatina ($4,8 \pm 0,5 \mu\text{mol/L}$) e a carboplatina ($52,0 \pm 1,5 \mu\text{mol/L}$) em células não tumorais de rim (BHK-21) e, em células não tumorais de ovário (CHO), onde os valores para cisplatina e carboplatina são iguais a $6,2 \pm 0,8 \mu\text{mol/L}$ e $10,7 \pm 2,0 \mu\text{mol/L}$, respectivamente.

A influência do tamanho da cadeia carbônica pode ser notada em algumas linhagens como, por exemplo, em se tratando dos complexos 3 e 4, o aumento da cadeia diminuiu a atividade citotóxica contra B16F1 e CT26. É provável que o aumento da massa molecular dos compostos possa interferir na habilidade de absorção celular dos mesmos.

Diversos complexos de platina estão descritos na literatura apresentando atividade citotóxica bastante variada, mas poucos apresentam maior atividade que a cisplatina e, muitos deles são melhores do que a carboplatina (Silva, Fontes, Lopes, Frezard, 2010). Para ilustrar essa colocação, podemos citar os compostos com carboxilatos de fórmula geral $[\text{PtA}_2(\text{OCOCH}_2\text{OR})_2]$ (A_2 = duas monoaminas ou uma diamina, R = grupo alquila) (Cui, Wang, Zhu, Gou, Liu, 2006) e compostos lipofílicos (Ye, Lou, Liu, Yu, Chen, Hou, Gao, Liu, 2007) derivados de salicilato que foram estudados contra células A₅₄₉ de carcinoma pulmonar.

Tabela 5: Citotoxicidade dos Complexos em Células Não Tumorais

Complexos	IC ₅₀ em Células Não Tumorais (µmol/L ± SD)*	
	CHO	BHK-21
Composto 3	>100	>100
Composto 4	>100	>100
Composto 7	>100	>100
Composto 8	>100	>100
Cisplatina	6,2 ± 0,8	4,8 ± 0,5
Carboplatina	10,7 ± 2,0	52,0 ± 1,5

*SD (Desvio Padrão das medidas em triplicata de dois experimentos independentes)

Os compostos 3, 7 e 8 apresentaram incorporação insatisfatória, e por isso foram testados apenas em sua forma livre. O composto 4 foi testado tanto na forma livre, quanto incorporado em lipossomas, em células B16F10 e MDA. Estas linhagens celulares foram escolhidas, pois para elas, ambos os compostos foram muito pouco citotóxicos. Na tabela 6 encontram-se estes resultados.

Observamos na tabela 6 que o lipossoma MLV-4 apresenta maior citotoxicidade em relação ao composto 4. Entretanto, sua citotoxicidade ainda não foi maior que a mostrada pela cisplatina e carboplatina. Já em células não tumorais não se observa modificações. Este resultado é bastante interessante já que mostra que a incorporação do complexo no lipossoma aumentou sua citotoxicidade em células tumorais sem, entretanto, torná-lo mais tóxico para as células não tumorais.

Tabela 6: Citotoxicidade comparativa do Composto 4 Livre e Incorporado em Lipossomas

Complexos	IC ₅₀ em Células Tumorais e Não Tumorais (μmol/L ± SD)*			
	B16F10	MDA	CHO	BHK-21
Composto 4	>100	>100	>100	>100
Liposoma MLV-4	47,1 ± 3,2	53,6 ± 4,3	>100	>100
Cisplatina	6,5 ± 0,9	6,0 ± 1,0	6,2 ± 0,8	4,8 ± 0,5
Carboplatina	12,0 ± 1,0	16 ± 2,0	10,7 ± 2,0	52,0 ± 1,5

*SD (Desvio Padrão das medidas em triplicata de dois experimentos independentes)

Em geral, a incorporação de complexos em lipossomas do tipo MLV tende a melhorar a atividade citotóxica de complexos de platina lipofílicos. Este aumento da atividade citotóxica varia, em média, entre 2 a 4 vezes em comparação ao composto livre, atingindo a eficácia da cisplatina (Han, Kim, Lee, Sung, Sonf, Sohn, 2003; Han, Jun, Kim, Kim, Sohn, 2002). No entanto, a comparação destes dados com os resultados obtidos por nós deve ser feita com cuidado, considerando a baixa taxa de encapsulação obtida para os nossos compostos.

5 Conclusões

O presente trabalho descreveu a síntese de dois ligantes diaminados *N*-alquilados de cadeia longa com hidroxila terminal e dois ligantes aminados *N*-alquilados de cadeia longa derivados da 1,2-etanodiamina, a partir dos quais foi possível obter quatro novos complexos de platina(II), que foram devidamente caracterizados.

Foi preparada uma formulação de lipossomas que apresentou características de tamanho favorável, entretanto a encapsulação e retenção não foram tão favoráveis. Essa baixa encapsulação se deu principalmente pela presença da hidroxila terminal na cadeia carbônica, que alterou a lipofilicidade da molécula, diminuindo a interação com os lipídeos. O modelo de lipossomas furtivos garante uma maior estabilidade física da formulação e permite esperar uma permanência mais prolongada na circulação sanguínea e um maior direcionamento para os sítios tumorais.

Os resultados mostraram que o tamanho da cadeia hidrofóbica influencia no balanço hidrofílico/hidrofóbico dos compostos, sendo que este determina as taxas de encapsulação e de retenção dos compostos nos lipossomas. Esse fato pode ainda ser comparado com outros resultados encontrados em nosso grupo de pesquisa, onde complexos com ligantes sem a presença da hidroxila terminal se mostraram mais facilmente encapsuláveis, isso devido ao fato de não haver a interferência de um grupo polar na extremidade, interrompendo o estrutura cabeça/calda que seria semelhante à dos lipídeos.

Também foram realizados os testes citotóxicos dos complexos livres e incorporados em lipossomas. Pode-se dizer que os compostos possuem maior atividade citotóxica em células de carcinoma de cólon CT26. Outro importante resultado foi obtido para o composto 4, que apresentou melhor atividade citotóxica encapsulado em lipossomas do que em sua forma livre, para células B16F10 e MDA. Vale ressaltar ainda que a atividade em células não tumorais foi muito menor que a da cisplatina e carboplatina. Comparando-se os complexos mononucleares desenvolvidos neste trabalho com outros complexos nos quais os ligantes não apresentavam hidroxila, preparados anteriormente por nosso grupo de pesquisa, conclui-se que a atividade citotóxica diminuiu, ou seja, a princípio a presença da hidroxila nos ligantes diminuiu a atividade dos complexos. Outros complexos preparados também em nossos laboratórios que apresentam a

hidroxila em posição não terminal ainda não tiveram seus estudos de atividade biológica concluídos, portanto, ainda não foi possível comparar com os resultados deste trabalho. Já os complexos dinucleares sintetizados apresentaram atividade biológica inferior aos mononucleares, sendo que apenas um deles apresentou atividade similar a da cisplatina e carboplatina para células de melanoma não metastático B16F1.

Este trabalho foi importante no que diz respeito à contribuição para a química inorgânica medicinal, e envolveu a síntese e caracterização de complexos de platina, bem como a encapsulação dos mesmos em lipossomas e a determinação da atividade biológica *in vitro* para os complexos livres e incorporados.

Referências

- ✓ Adomat, H.; Skov, K. A.; Fontes, A. P. S.; Farrel, N. P., *Anticancer Drug Design*, **1991**, 6, 233
- ✓ Alderden, R. A., Hall, M. D., Hambley, T. W., *J. Chem. Educ.* **2006**, 83, 728.
- ✓ Almeida, V.L.; Leitão, A.; Reina, L.C.B.; Montanari, C.A.; Donnici, C.L.; Lopes, M.T.P.; *Quim. Nova* **2005**, 28, 118.
- ✓ Appleton, T. G.; Connor, J. W.; Hall, J. R.; Prenzler, P. D.; *Inorg. Chem.* **1989**, 28, 2030.
- ✓ Barnard, C. F. J.; Cleare, M. J.; Hydes, P. C.; *Chem. In Britan*, **1986**, 22, 1001.
- ✓ Batista, C.M.; Carvalho, C.M.B.; Magalhães, N.S.S.; *Braz. J. Pharm. Sci.* **2007**, 2, 43.
- ✓ Birch, N.J.; Sadler, P.J.; *Inorganic Biochemistry*, ed. H.A.O. Hill, The Chemical Society, London, **1979**, 1, 407.
- ✓ Bloemink, M. J.; Reedijk, J.; *Metal Ions in Biological Systems*, Sigel, H., Ed.; Marcel Dekker, New Cork, **1996**, 32, 64.
- ✓ Bolelikas, T.; Vougiouka, M.; *Oncol. Reports* **2003**, 10, 1663.
- ✓ Bradner, W. T.; Rose, W. C.; Hyftalen, J. B.; *Cisplatin, Current Status and New Developments*, Prestayko, A. W.; Crooke, S. T.; Carter, S. K., Eds.; Academia Press, New York, **1980**, p.171.
- ✓ Burgeson, I.E.; Kostie, N.M; *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 4299.
- ✓ Chabner, B. A.; Longo, D. L. Em *Cancer chemotherapy and biotherapy*; 2a. ed., Lippincott-Raven: Filadélfia, 1996.
- ✓ Christian, M. C.; Abstracts of Seventh Internacional Symposium on Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy. **1995**, S128.
- ✓ Coluccia, M.; Natile, G.; *Coord. Chem. Rev.* **2001**, 216, 383.
- ✓ Cui, K.; Wang, L.; Zhu, H.; Gou, S.; Liu, Y.; *Bioorg. Med. Chem. Letters* **2006**, 16, 2937.
- ✓ Cvitkovic, E.; Sapulding, J.; Bethune, V.; Martin, J.; Whitmore, W. F.; *Cancer.* **1977**, 39, 1357.

- ✓ Davis, J. M.; *Basic Cell culture-A practical approach*, Oxford University press, New York, **1994**.
- ✓ De Lena, M.; Larusso, V.; Paradiso, A.; Tommasi, S.; *Inorg. Chim. Acta* **1987**, 137, 91.
- ✓ Faggiani, R.; Lippert, B.; Lock, C.J.L.; *Inorg. Chem.* **1980**,19, 295.
- ✓ Farrell N.; *Cancer Invest.* **1993**, 11, 578.
- ✓ Farrell N.; *Met. Ions Biol. Syst.* **2004**, 42, 251.
- ✓ Farrell, N. *Transition Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents*; Netherlands ed., **1989**.
- ✓ Fichtinger-Schepman, A. M. J.; Reedjik, J.; *Biochem.* **1985**, 24, 707.
- ✓ Fichtner, I.; Reszka, R.; Schütt, M.; Rudolph, M.; Becker, M.; Lemm, M.; Richter, J.; Berger, I.; *Oncol. Res.* **1993**, 5, 65.
- ✓ Fiebig, H. H.; Heuss, H.; Vonpawel, L.; Gatzemeier, U.; Manegold, C.; Edler, L.; Berdel, W.; *Onkologie* **1996**, 19, 328.
- ✓ Fiorentino, M. V.; Ghiotto, C.; *Inorg. Chim. Acta* **1987**, 59, 137.
- ✓ Fontes, A. P. S.; César, E. T.; Beraldo, H.; *Quím. Nova na Escola* (cadernos temáticos), **2005**, 6, 13.
- ✓ Fontes, A. P. S.; De Almeida, S. G.; Nader, L. A.; *Quím. Nova* **1997**, 20, 398.
- ✓ Foye, W. O.; Sengupta, S. K. Em *Principles of Medicinal Chemistry*; Foye, W. O.; Lemke, T. L.; Williams, D. A., eds.; Williams & Wilkins: Baltimore, 1996, p. 822-845.
- ✓ Frézard, F.; Schettini, D. A.; Rocha, O. G. F.; Demicheli, C.; *Quim. Nova.* **2005**, 28, 511.
- ✓ Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Pérez, J. M., *Chem. Rev.* **2003**, 103, 645.
- ✓ Gietema, J. A.; Veldhuis, G. J.; Guchelaar, H. J.; Willemse, P. H. B.; Uges, D. R. A.; Cats, A.; Boosntra, H.; Van der Graaf, W. T. A.; Sleijfer, D. T.; Devuies, E. G. E.; Mulder, N. H.; *Br. J. Cancer* **1995**, 71, 1302.
- ✓ Gordon, M.; Hollander, S.; *J. Med.* **1993**, 24, 209.
- ✓ Green, M.; Garner, M.; Orton, D. M.; *Trans. Met. Chem.* **1992**, 17, 164.
- ✓ Groen, H. J. M.; *Pro. Am. Soc. Clin. Oncol.* **1996**, 15, 378.
- ✓ Guerra, M.R.; Gallo, C.V.M; Azevedo, G; Mendonça, S; *Revista Brasileira de Oncologia* **2005**, 51, 227.
- ✓ Gullotti, M.; Pacchioni, G.; Pasini, A.; Ugo, R., *Inorg. Chem.*, **1982**, 21, 2006.

- ✓ Hall, M.D.; Mellor, H. R.; Callaghan, R.; Hambley, T.W.; *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 3403.
- ✓ Han I.; Jun, M. S.; Kim, M. K.; Kim J. C.; Sohn Y. S.; *Jpn. J. Cancer Res.* **2002**, 93, 1244.
- ✓ Han, I.; Kim, O. J.; Lee, G. Y.; Sung, Y. K.; Sonf, R., Sohn, Y. S.; *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 5443.
- ✓ Harris A. L., Yang X., Hegmans A., Povirk L., Ryan J. J., Kelland L., Farrell N. P.; *Inorg Chem. Comm.* **2005**, 44, 9598.
- ✓ Hirose, T.; Horichi, N.; Ohmori, T.; Shirai, T.; Sohma, S.; Yamaoka, T.; Ohnishi, T.; Adachi, M.; *Lung cancer* **2003**, 39, 91.
- ✓ <http://chemicases.com/cisplat> acessado em outubro de 2010.
- ✓ <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=AP5346> acessado em outubro de 2010.
- ✓ <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Aroplatin> acessado em outubro de 2010.
- ✓ <http://www.inca.gov.br/cancer> acessado em outubro de 2010.
- ✓ <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010> acessado em outubro de 2010.
- ✓ Jamieson, E. R.; Lippard, S. J.; *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2467.
- ✓ Kalayda, G.V.; Zhang, G.; Abraham, T.; Tanke, H.J.; Reedijk, J.; *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 5191
- ✓ Kasparkova, J.; Zehnulova, J.; Farrell, N.; Brabec, V.; *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 48076.
- ✓ Kelland, L. R.; Murrer, B. A.; Abel, G.; Giandomenico, C. M.; Mistry, P.; Harrap, K. R.; *Cancer Res.* **1992**, 52, 822.
- ✓ Kelland, L. R.; Sharp, S. Y.; O' Neil, C. F.; Raynaud, F. I.; Beale, P. J.; Judson, I. R.; *J. Inorg. Biochem.*, **1999**, 77, 111.
- ✓ Kelland, L.; *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, 7, 573.
- ✓ Kidani, Y.; Inagaki, K.; Iigo, M.; Hoshi, A.; Kuretani, K.; *J. Med. Chem.* **1978**, 21, 1315.
- ✓ Koifman, S.; Koifman, R.; *Mutat Res.* **2003**, 544, 305.
- ✓ Lebowhl, D.; Cannete, R.; *Eur. J. Cancer*, **1998**, 34, 1522
- ✓ Liang, X.; Shen, D.; Gottesman, M. M.; *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 1599.
- ✓ Loehrer, P. J.; Eingham, L. H.; *Am. Intern. Med.* **1984**, 100, 704.
- ✓ Machado, A. E. D.; *Quim. Nova* **2000**, 23, 237.
- ✓ Machado, L.C.; Gnoatto, S.A.; Klüppel, M.L.W.; *Biol. Studies* **2007**, 67, 215.

- ✓ Maia, E. P.; Suillerot, A. G.; *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, 8, 626.
- ✓ Manzotti C.; Pratesi G.; Menta E.; Di Domenico R.; Cavalletti E.; Fiebig H. H.; Kelland L. R.; Farrell N.; Polizzi D.; Supino R.; Pezzoni G.; Zunino F.; *Clin Cancer Res.* **2000**, 6, 2626.
- ✓ Mello, J. A.; Lippard, S. J.; Essigmann, J.M.; *Biochem.* **1995**, 34, 14782.
- ✓ Moreira, J. N.; Almeida, L. M.; Geraldés, C. F.; Madeira, V. M. C.; Costa, M. L.; *Int. J. Pharm.* **1997**, 147, 153.
- ✓ Mosmann, T.; *J. Immun. Meth.* **1983**, 65, 55.
- ✓ Murad, A.M.; Katz, A.; *Oncologia Bases Clínicas do Tratamento*; Guanabara; Rio de Janeiro, p. 41.
- ✓ Najjar, R.; *Quim. Nova* **1992**, 15, 323.
- ✓ Neidle, S.; Ismael, I. M.; Sadler, P. J.; *J. Inorg. Biochem.* **1980**, 13, 205.
- ✓ New, R. R. C. (Ed.). *Liposomes: a practical approach*. New York: IRL Press, **1990**, 301.
- ✓ Newman, M. S.; Colbern, G. T.; Working, P. K.; Engbers, C.; Amantea, M. A.; *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1999**, 43, 1.
- ✓ Orvig, C.; Abrams, M.J.; *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2201.
- ✓ Pasini, A.; Zunino, F.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1987**, 26, 616.
- ✓ Perez, J. M.; Kelland, L. R.; Montero, E. I.; Boxall, F. E.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Ranninger, C. N., *Mol. Pharmacol.*, **2003**, 63, 933.
- ✓ Qu, Y.; Harris, A.; Hegmans, A.; Petz, A.; Kabolizadeh, P.; Penazova, H.; Farrell, N.; *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 1591.
- ✓ Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Rang & Dale *Farmacologia*, 6ª Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, **1997**, 718-725.
- ✓ Raymond, E.; Faivre, S.; Chaney, S.; Woynarowski, J.; Cvitkovic E.; *Mol. Cancer Ther.* **2002**, 1, 227.
- ✓ Roberts, J. D.; Houten, B. V.; Qu, Y.; Farrel, N. P.; *Nucl. Ac. Res.* **1989**, 17, 9719.
- ✓ Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Grimley, E. B.; Thomson, A. J., *J. Biol. Chem.*, **1967**, 242, 1347.
- ✓ Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, H. V.; *Nature* **1969**, 222, 385.

- ✓ Salmonm, S.E. Em *Farmacología Básica & Clínica*, Katzung, B.G., ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, 1998, p. 629-655.
- ✓ Santos N. C.; Castanho, M. A. R. B.; *Quim. Nova* **2002**, 25, 1181.
- ✓ Sarikapan, W.; Vasant, L.; *Oncol.* **2004**, 67, 3.
- ✓ Sherman, S. E.; Lippard, S. J.; *Chem. Rev.* **1987**, 87, 1152.
- ✓ Silva, H. ; Fontes, A. P. S. ; Lopes, M. T. P. ; Frezard, F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, 21, 1861.
- ✓ SILVA, Heveline. **Complexos de platina com diaminas N-alkiladas de cadeia longa: síntese, inclusão em lipossomas, atividade citotóxica, antitumoral e estudos farmacocinéticos.** Juiz de Fora: UFJF, 2009, 196. Tese, Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.
- ✓ Silverstein, R.M.; Webster, F.X.; Kiemle, D.J.; Em *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*; 7 ed.; LTC: Rio de Janeiro, 2007.
- ✓ Spence, R. A. J.; Jonhston, P. G. Em *Oncology*; Jonhston, P. G., ed; Oxford University Press: Oxford, 2001, p. 1-14, 121-132.
- ✓ Squibb, B.M.; Matthey, J.; *Drugs of the Fut.* **1990**, 15, 739.
- ✓ Suo, Z.; Lippard, S. J.; Johnson, K. A.; *Biochem.* **1999**, 38, 715.
- ✓ Szymkowski, D. R.; Yarema, K.; Essigmann, J. M.; *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA.* **1992**, 89, 10772.
- ✓ Takahara, P. M.; Rosenweing, A. C.; Frederick, C. A.; Lippard, S. J.; *Nature.* **1995**, 649, 377.
- ✓ Talman, E. G.; Kidani, Y.; Mohrmann, L.; Reedijk, J., *Inorg. Chim. Acta*, **1998**, 283, 251.
- ✓ Tominaga, H.; Ishiyama, M.; Ohseto, F.; Sasamoto, K.; Hamamoto, T.; Suzuki, K.; Watanabe, M.; *Anal. Commun.* **1999**, 36, 47.
- ✓ Torchilin, V. P.; *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, 4, 145.
- ✓ Van der Veer, J. L.; Reedijk, J.; *Chem. In Britain* **1988**, 24, 775.
- ✓ Weaver, J. L.; *Metho. Mol. Biol.* **1997**, 91, 77.
- ✓ Weiss, R. B.; Christian, M. C., *Drugs*, **1993**, 46, 360.
- ✓ Wheate, N. J.; Collins, J. G., *Coord. Chem. Rev.*, **2003**, 241, 133.
- ✓ White, S. C.; Lorigan, P.; Margison, G. P.; Margison, J. M.; Martin, F; Thatcher, N.; Anderson, H.; Ranson, M.; *Br. J. Cancer.* **2006**, 95, 822.

- ✓ Wong, E.; Giandomenico, C.M.; *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2451
- ✓ Xiao, C.; Qi, X.; Maitani, Y.; Nagai, T.; *J. Pharm. Sci.* **2004**, 93, 1718.
- ✓ Ye, Q.; Lou, S.; Liu, W.; Yu, Y.; Chen, X.; Hou, S.; Gao, W.; Liu, Y; *Bioorg. Med. Chem. Letters* **2007**, 17, 2144.
- ✓ Zamble, D. B.; Lippard, S. J.; *Trends Biochem. Sci.* **1995**, 20, 435.
- ✓ Zamboni, W. C.; Gervais, A. C.; Egorin, M. J.; Schellens, J. H. M.; Zuhowski, E. G.; Pluim, D.; Joseph, E.; Hamburger, D. R.; Working, P. K.; Colbern, G.; Tonda, M. E.; Potter, D. M.; Eiseman, J. L.; *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2004**, 53, 329.