

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

VERIDIANA DE FREITAS TOFIK

**Complexos de cobre com análogos de produtos naturais
encontrados em organismos marinhos com atividade
antitumoral**

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890
A original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Depósito na SPG em 04/09/2018

VERIDIANA DE FREITAS TOFIK

**Complexos de cobre com análogos de produtos naturais
encontrados em organismos marinhos com atividade
antitumoral**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências (Bioquímica).*

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Maria da Costa Ferreira

São Paulo

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

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

T644c Tofik, Veridiana de Freitas
Complexos de cobre com análogos de produtos naturais encontrados em organismos marinhos com atividade antitumoral / Veridiana de Freitas Tofik.
- São Paulo, 2018.
75 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Ferreira, Ana Maria da Costa

1. Complexos de cobre. 2. Isatina. 3. Antitumoral. I. T. II. Ferreira, Ana Maria da Costa, orientador.

*Dedico este trabalho aos meus pais
e ao meu namorado, Victor,
pelo carinho, apoio e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof.^a Ana Maria da Costa Ferreira pela preciosa orientação ao longo de todo o trabalho.

Ao Prof. Pio Colepicolo pela colaboração nos experimentos com células e toda a sua equipe que me auxiliou de alguma forma, especialmente à Dr.^a Erika Stein.

Agradeço à colaboração da Prof. Carla Columbano e ao auxílio crucial dos alunos Griselda Perona e Felipe Bagatelli nos experimentos com DNA.

Sou grata aos meus colegas de laboratório, muito dispostos a me auxiliar, principalmente ao Rodrigo Bernardi por me instruir nos experimentos com células, e ao Marcelo Portes pela obtenção dos espectros de EPR. Agradeço também ao Ricardo Alexandre Couto, sempre solícito, por ceder seu composto [Cu(*isaepy*)] para realização de testes comparativos de atividade biológica.

Por fim, agradeço às agências CAPES pela bolsa concedida e FAPESP pelo financiamento do laboratório.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

Carl Sagan

RESUMO

Tofik, V. F. **Complexos de cobre com análogos de produtos naturais encontrados em organismos marinhos com atividade antitumoral**. 2018. 73p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste trabalho foram sintetizados complexos de cobre(II) com derivados imínicos da isatina, incluindo isatinas bromadas semelhantes a compostos encontrados em gastrópodes, a fim de compará-los com o composto já produzido e investigado [Cu(*isaepy*)], complexo de cobre(II) com base de Schiff feita a partir da isatina e 2-aminoetilpiridina. A isatina é um oxindol produzido em algumas plantas, também encontrado no tecido de mamíferos, com propriedades antitumorais naturais. Isatinas bromadas foram previamente constatadas como mais citotóxicas frente a células tumorais do que a isatina sem substituições. O objetivo principal foi verificar se a presença de bromo nos compostos análogos ao [Cu(*isaepy*)] levaria a um aumento da atividade antitumoral, assim como maior interação com DNA, alvo usual de metalofármacos. Depois de sintetizados, os compostos foram caracterizados por análise elementar (CHN), espectroscopia no infravermelho, espectroscopia UV/Vis e EPR. Foram feitos testes de citotoxicidade pelo método MTT com células de sarcoma uterino (MES-SA e MES-AS/Dx5, esta última resistente a doxorrubicina), adenocarcinoma cervical (HeLa) e células não cancerosas de fibroblasto humano P4. Adicionalmente, foram feitos testes de interação com DNA por UV/Vis e dicroísmo circular, além de testes de clivagem de DNA plasmidial. De modo geral, foi demonstrado que a simetria tetragonal em torno do cobre, determinada pelo EPR, é importante para a citotoxicidade dos complexos, que dessa forma podem se intercalar ao DNA e impedir sua replicação, por acabar distorcendo a hélice, e pela habilidade de realizarem clivagem oxidativa das fitas. [Cu(*isaepy*)] e seus análogos bromados demonstraram uma atividade citotóxica muito parecida, assim como grau de interação e clivagem com DNA. Conclui-se que, embora a presença de bromo nos análogos de [Cu(*isaepy*)] não levem a um aumento de atividade antitumoral, como observado em ligantes correlatos livres, nossos estudos apontam para diferentes fontes naturais (animal ou vegetal) para obtenção de precursores de novos compostos antitumorais.

Palavras-chave: oxindóis; iminas; complexos de cobre; atividade antitumoral; DNA.

ABSTRACT

Tofik, V. F. **Copper complexes with analogues of natural products found in marine organisms with antitumor activity.** 2018. 73p. Master's Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In the present work, copper(II) complexes were synthesized with isatin derived imine ligands, including brominated oxindoles similar to compounds found in gastropods, in order to compare their reactivity with that of [Cu(*isaepy*)], a Schiff base-copper(II) complex already investigated, obtained with the precursors isatin and 2-aminoethylpyridine. Isatin is a natural oxindole extracted from plants, and also found in mammal tissue, with antitumor properties. Brominated isatins were previously described as much more cytotoxic, towards tumor cells, than unsubstituted isatin. The aim of this work was to verify if the presence of bromine in analogue [Cu(*isaepy*)] compounds would increase their antitumor activity, along with higher DNA interaction, an usual target for metallodrugs. The copper(II) complexes were synthesized and then characterized through elemental analyses (CHN), infrared, UV/Vis and EPR spectroscopies. Cytotoxicity tests were carried out using MTT assay with cells lines MES-SA e MES-SA/DX₅ (uterine sarcome, sensitive and resistant to doxorubicin), HeLa (cervical adenocarcinoma) and non-tumor cells, human fibroblast P4. Additionally, DNA interaction experiments were carried out through UV/Vis spectroscopy and circular dichroism, and at last, DNA cleavage experiments with the studied complexes. In general, it was shown that a tetragonal symmetry around copper, shown by EPR, is very important to the complexes toxicity, since in that way they are able to intercalate DNA, and prevent its replication, as a consequence of double helix distortion, and eventual oxidative cleavage. [Cu(*isaepy*)] and its brominated analogues demonstrated a very similar cytotoxicity towards cancer cells, as well as quite same level of DNA interaction and cleavage. Although the presence of bromine did not increase significantly their antitumor activity, as verified with the free isatin derivatives, our studies pointed to different natural sources to obtain precursors for such new antitumor compounds.

Keywords: oxindoles; imines; copper complexes; antitumor activity; DNA.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – HOMEOSTASE DO COBRE EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS	17
FIGURA 2 – EXEMPLOS DE QUELANTES DE COBRE.....	19
FIGURA 3 – PRINCIPAIS COMPLEXOS DE COBRE SINTETIZADOS EM NOSSO LABORATÓRIO	22
FIGURA 4 – ISATINA E SUAS FONTES NATURAIS.....	24
FIGURA 5 – COMPOSTOS DERIVADOS DE OXINDÓIS, COM PROPRIEDADES ANTITUMORAIS.....	25
FIGURA 6 – COMPOSTOS DERIVADOS DE OXINDÓIS ENCONTRADOS EM <i>DICATHAIS ORBITA</i> , RESPONSÁVEIS PELA SUA COLORAÇÃO.....	26
FIGURA 7 – DERIVADOS OXIMA DE INDIRUBINA.....	26
FIGURA 8 – PRECURSORES UTILIZADOS PARA AS SÍNTESES	30
FIGURA 9 – EQUILÍBRIO CETO-ENÓLICO DO COMPOSTO [Cu(<i>ISAHISTA</i>) ₂].....	35
FIGURA 10 – ESTRUTURAS PROPOSTAS DOS COMPLEXOS DE COBRE(II) SINTETIZADOS A PARTIR DE ISATINA OU SEUS ANÁLOGOS BROMADOS.....	37
FIGURA 11 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.	40
FIGURA 12 – ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO UV E LUZ VISÍVEL	42
FIGURA 13 – ESPECTROS DE EPR DOS COMPOSTOS EM SOLUÇÃO A 77K.....	46
FIGURA 14 – EXEMPLO DE EQUILÍBRIO CETO-ENÓLICO COM O [Cu(<i>5-BRISAEPY</i>)]	48
FIGURA 15 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DA TITULAÇÃO DOS COMPLEXOS COM DNA.....	52
FIGURA 16 – DICROÍSMO CIRCULAR DE CT-DNA LIVRE.....	55
FIGURA 17 – DICROÍSMO CIRCULAR DOS COMPOSTOS COM CT-DNA.....	56
FIGURA 18 – FORMAS DE DNA PLASMIDIAL.....	57
FIGURA 19 – RESULTADOS DA CLIVAGEM DE PBLUESCRIPT II PARA [Cu(<i>ISAHISTA</i>) ₂] (1)	58
FIGURA 20 – RESULTADOS DA CLIVAGEM DE PBLUESCRIPT II PARA [Cu(<i>ISATRP</i>)] (2).....	59
FIGURA 21 – RESULTADOS DA CLIVAGEM DE PBLUESCRIPT II PARA [Cu(<i>5-BRISAEPY</i>)] (3)	60
FIGURA 22 – RESULTADOS DA CLIVAGEM DE PBLUESCRIPT II PARA [Cu(<i>5,7-BRISAEPY</i>)] (4)	61
FIGURA 23 – RESULTADOS DA CLIVAGEM DE PBLUESCRIPT II PARA [Cu(<i>ISAEPY</i>)] (5)	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ELEMENTOS TRAÇOS DE DOIS GRUPOS, CONFORME KUO <i>ET AL</i>	18
TABELA 2 – RESULTADOS DA ANÁLISE ELEMENTAR DOS COMPOSTOS INDÓLICOS OBTIDOS	38
TABELA 3 – BANDAS CARACTERÍSTICAS NO ESPECTRO INFRAVERMELHO, EM CM^{-1} , DOS COMPOSTOS ESTUDADOS E SUAS CORRESPONDENTES ATRIBUIÇÕES.....	40
TABELA 4 – CARACTERIZAÇÃO DE BANDAS OBSERVADAS E RESPECTIVOS VALORES DE ABSORTIVIDADE MOLAR (ϵ) PARA CADA UM DOS COMPOSTOS.	44
TABELA 5 – VALORES DOS PARÂMETROS DO TENSOR G E DAS CONSTANTES HIPERFINAS, A, DOS COMPLEXOS EM SOLUÇÃO CONGELADA, A 77 K.....	48
TABELA 6 – VALORES DE IC_{50} DOS COMPLEXOS DE COBRE PARA AS LINHAGENS CELULARES TESTADAS	49
TABELA 7 – CONSTANTE DE INTERAÇÃO COM DNA (K _B) CALCULADA PARA OS COMPLEXOS DE COBRE.....	53

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 – ATIVIDADE DA CITOCROMO C OXIDASE	14
EQUAÇÃO 2 – ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE	14
EQUAÇÃO 3 – REAÇÕES NA ATIVIDADE TIROSINASE	14
EQUAÇÃO 4 – RELAÇÕES DA GLUTATIONA COM COBRE E ESPÉCIES REATIVAS FORMADAS NO CITOSOL.....	15
EQUAÇÃO 5 – REAÇÃO DO TIPO FENTON.....	15
EQUAÇÃO 6 – METALAÇÃO DA PROTEÍNA SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	16
EQUAÇÃO 7 – REAÇÃO DE HABER-WEISS	18
EQUAÇÃO 8 – FÓRMULA DA DIFERENÇA DE ENERGIA (ΔE) NO EPR.....	45
EQUAÇÃO 9 – PROCESSO DE INTERAÇÃO DOS COMPOSTOS COM DNA.	53
EQUAÇÃO 10 – EQUAÇÃO DE BENESI-HILDEBRAND	53
EQUAÇÃO 11 – CÁLCULO PARA AJUSTE DE ESPECTROS COM BASE EM CURVA DE CALIBRAÇÃO DO DNA.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ϵ	Absortividade molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda de absorção máxima
CD	Dicroísmo circular
CT	Calf Thymus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPR	Ressonância magnética eletrônica
epy	2-(2-aminoetilpiridina)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
hista	Histamina
isa	Isatina
K_b	Constante de interação com DNA
LMCT	Banda de transição ligante-metal
LT	Banda de transição interna do ligante
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
PBS	Solução tampão fosfato
trp	Triptofano
UV/Vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 O COBRE NO MEIO BIOLÓGICO	14
1.2 IMPLICAÇÕES DO COBRE NO CÂNCER.....	17
1.3 COMPLEXOS DE COBRE COMO METALOFÁRMACOS ANTITUMORAIS	20
1.4 ALVOS PREFERENCIAIS DOS COMPLEXOS DE COBRE.....	21
1.4.1 Apoptose por ligação e quebra de DNA	21
1.4.2 Apoptose por inibição de quinases, topoisomerases e via mitocondrial.....	22
1.5 COMPOSTOS INDÓLICOS COMO LIGANTES DE COMPLEXOS DE COBRE	23
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 MATERIAIS UTILIZADOS.....	28
3.1.1 Reagentes.....	28
3.1.2 Meios de cultura e soluções.....	28
3.1.3 Linhagens de células.....	29
3.2 SÍNTESES	30
3.2.1 $[Cu(isahista)_2](ClO_4)_2$ (1)	30
3.2.2 $[Cu(isatrp)(H_2O)](ClO_4)$ (2)	30
3.2.3 $[Cu(5-Brisaepy)(H_2O)]ClO_4$ (3).....	31
3.2.4 $[Cu(5,7-Brisaepy)H_2O](ClO_4)$ (4).....	31
3.2.5 $[Cu(isaepy)H_2O](ClO_4)$ (5)	32
3.3 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	32
3.3.1 Análise elementar	32
3.3.2 Espectroscopia no infravermelho	32
3.3.3 Espectroscopia na região do ultravioleta/luz visível.....	32
3.3.4 Ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....	33
3.4 TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	33
3.4.1 Ensaio MTT	33
3.4.2 Teste de interação com DNA através de espectroscopia na região do ultravioleta/luz visível	34
3.4.3 Teste de interação com DNA através de dicroísmo circular.....	34

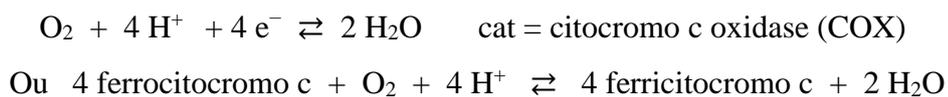
3.4.4	<i>Clivagem de DNA em presença dos complexos de cobre</i>	34
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	SÍNTESES	35
4.2	CARACTERIZAÇÃO	37
4.2.1	<i>Análise elementar</i>	38
4.2.2	<i>Espectroscopia na região do infravermelho</i>	38
4.2.3	<i>Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível</i>	41
4.2.4	<i>Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)</i>	44
4.3	TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	48
4.3.1	<i>Ensaio MTT</i>	49
4.3.2	<i>Teste de interação com DNA através de espectroscopia eletrônica</i>	50
4.3.3	<i>Teste de interação com DNA através de dicroísmo circular</i>	54
4.3.4	<i>Teste de clivagem de DNA</i>	57
5.	CONCLUSÕES	63
6.	REFERÊNCIAS	66
	APÊNDICES	73
	ANEXO	76

1. INTRODUÇÃO

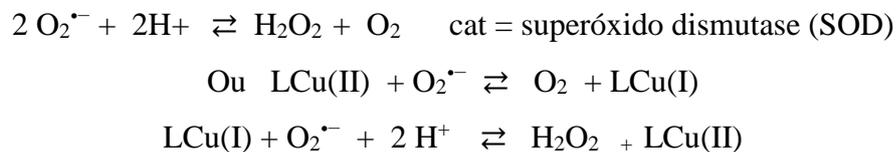
1.1 O cobre no meio biológico

O cobre é um micronutriente essencial para todas as formas de vida, estando envolvido em processos biológicos fundamentais que foram conservados ao longo da evolução dos seres vivos. Ele é requerido como cofator catalítico ou como componente estrutural de proteínas. Dada sua capacidade oxi-redutora, o cobre é um metal insubstituível para inúmeras proteínas e enzimas, antigamente denominadas “cuproproteínas”, existindo usualmente nos estados de oxidação I e II no meio biológico.¹

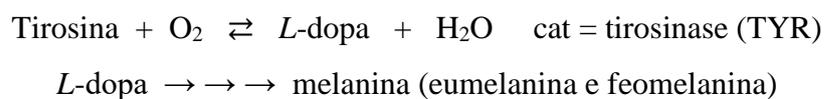
É vasta a quantidade de proteínas de cobre, que apresentam diversas características estruturais e desempenham papéis cruciais na manutenção da vida, participando do metabolismo do oxigênio, da oxidação ou redução de substratos biológicos importantes, da homeostase do metal ou ainda da atividade antioxidante.² Em seres humanos, exemplos de proteínas de cobre são a citocromo c oxidase (COX, EC 1.9.3.1, implicada no transporte de elétrons na membrana mitocondrial, **Equação 1**), superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1, que converte radicais superóxido a formas menos nocivas, **Equação 2**), e a tirosinase (TYR, EC 1.14.18.1, **Equação 3**) e proteínas relacionadas (TRP1 e TRP2), responsáveis pela síntese de melanina.



Equação 1 – Atividade da citocromo c oxidase



Equação 2 – Atividade da superóxido dismutase

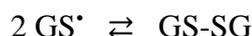
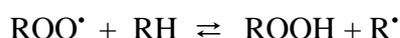
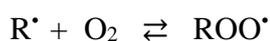
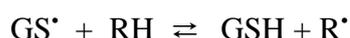


Equação 3 – Reações na atividade tirosinase

Ao mesmo tempo em que a atividade oxi-redutora de cobre representa um papel fundamental em processos essenciais, essa propriedade torna-o potencialmente tóxico, por poder gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), causando danos a proteínas, DNA, lipídeos e outras biomoléculas. Por isso, o cobre deve estar sempre complexado no citosol, e não na forma livre.^{3,4} A importância da homeostase do cobre já foi reportada em vários artigos de revisão na literatura,⁵ onde estratégias proteômicas foram fundamentais.⁶

O cobre adquirido pela dieta é absorvido pela mucosa intestinal e é levado pela albumina ao fígado, órgão responsável por regular sua distribuição por tecidos e plasma sanguíneo. A ceruloplasmina, uma multicobre-oxidase sintetizada e secretada em hepatócitos, é a principal proteína responsável pelo transporte do cobre. Ela leva íons Cu(II) a transportadores localizados na membrana celular e a redutases que convertem essa espécie a Cu(I), estado necessário para entrada do mesmo na célula, através da proteína Ctr1.⁷ O cobre deve estar nessa forma devido ao ambiente redutor no citosol: ao entrar na célula, Cu(II) será reduzido ganhando um elétron e formando um radical orgânico, o que pode levar à formação de EROs, num processo em cadeia.

Pode-se representar esse processo usando glutathione (GSH), um tripeptídeo presente intracelularmente em concentrações na faixa mM, como exemplo, num esquema de reações em cadeia:



Equação 4 – Relações da glutathione com cobre e espécies reativas formadas no citosol.

A glutathione coordena-se aos íons de cobre, formando espécies do tipo [Cu(GSH)] ou [Cu(GSSH)], nos dois estados de oxidação, modulando sua reatividade frente a reações redox, como na **Equação 5**:

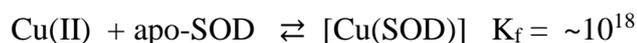


Equação 5 – Reação do tipo Fenton.

Radicais hidroxil são os mais reativos e uma vez formados reagem muito rapidamente, numa velocidade controlada por difusão (constante cinética k da ordem de $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), e causam danos oxidativos a diferentes biomoléculas e organelas. Portanto, essas espécies reativas são prejudiciais aos componentes celulares e estão relacionadas a estados patológicos, como neoplasias⁸ e processos inflamatórios.⁹

Uma vez dentro da célula, o cobre é ligado a metalochaperonas que o levam a destinos específicos, isto é, inserem-no seletivamente em determinadas proteínas. As chaperonas CCS, COX17 e ATOX1 são responsáveis por transferir o cobre à superóxido dismutase (SOD), citocromo c oxidase e as cobre-ATPases (ATP7A/ATP7B), respectivamente.³ Essas transferências se dão por interação direta proteína-proteína, de modo que o cobre não seja liberado (livre ou não-coordenado) no citosol em nenhum momento¹⁰. Estimou-se que existe, no máximo, um átomo de cobre livre por célula, com base em estudo feito com SOD, considerando-se a alta constante de estabilidade da proteína ativada por cobre.¹¹

Baseando-se na constante de metalação da Cu,Zn-SOD (**Equação 6**) e no volume aproximado de uma célula ($\sim 10^{-14} \text{ L}$), estimou-se a concentração intracelular de cobre “livre” (não-coordenado) em $[\text{Cu}^{2+}] = 10^{-9}$ íons/célula ou 10^{-33} mols/célula, ou ainda 10^{-18} mols/L.



Equação 6 – Metalação da proteína superóxido dismutase

As cobre-ATPases desempenham um papel importante na regulação fisiológica do cobre, levando o mesmo pela rede trans-Golgi afim de metalar várias cuproenzimas essenciais, e também têm como função exportar o excesso de cobre da célula. As doenças mais conhecidas relacionadas ao desbalanço de cobre vêm de mutações nos genes dessas proteínas. A doença de Wilson é causada por mutações no gene ATP7B e prejudica a excreção biliar de cobre, levando ao acúmulo do metal no fígado e morte celular.¹² A doença de Menkes é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X, em que a proteína ATP7A fica reduzida ou ausente e, dessa forma, impede a absorção intestinal de cobre. Como resultado, há acúmulo intestinal de cobre e deficiência sistêmica desse metal.¹³

Por todos estes fatores apresentados, alta reatividade e presença em inúmeras proteínas e enzimas, a homeostase do cobre é extremamente controlada intracelularmente *in vivo*, conforme mostrado na **Figura 1**, abaixo.

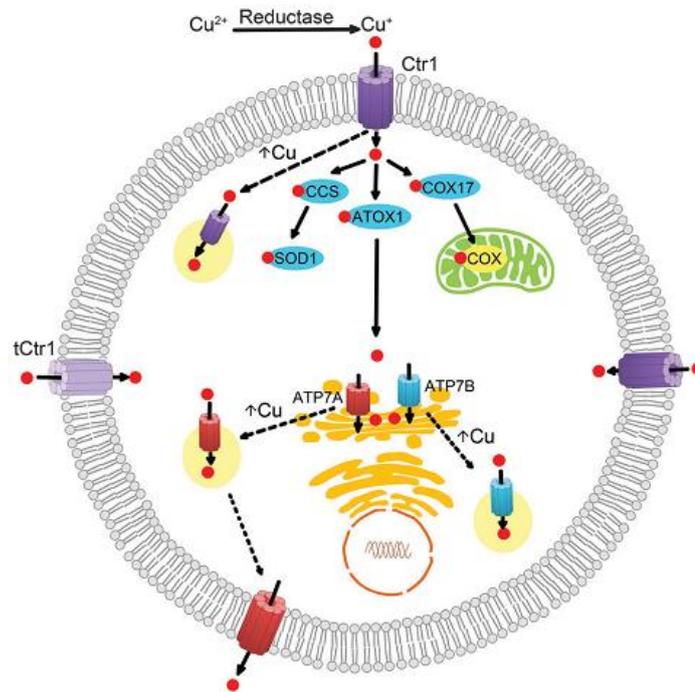


Figura 1 – Homeostase do cobre em células de mamíferos (conforme Denoyer *et al.*, 2015)³

1.2 Implicações do cobre no câncer

O envolvimento do cobre no câncer tem sido estudado por muitas décadas, em que diversos estudos relataram repetidas vezes que o cobre é encontrado em maiores quantidades em tecidos e plasma de pacientes com câncer.^{14,15,16,17}

No estudo de Kuo *et al.* (2002)¹⁸ foram determinadas as concentrações de quatro elementos-traço (cobre, selênio, zinco e ferro) em plasma sanguíneo. Constatou-se que enquanto zinco, selênio e ferro encontravam-se em concentrações menores ou iguais, os níveis de cobre aumentaram, comparando-se com amostras de pacientes normais (**Tabela 1**). Ainda, mostrou-se que as relações Cu/Zn, Cu/Se e Cu/Fe são usualmente mais altas em pacientes com câncer; essas relações pareceram ser indicadores mais confiáveis da presença de câncer do que os níveis de Cu, Zn, Se e Fe isoladamente.

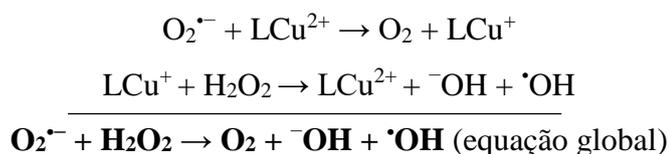
Tabela 1 – Concentração plasmática de elementos traços de dois grupos, em µg/L, conforme Kuo *et al.*

	Grupo Controle	Grupo câncer
Se	99,5	60,94
Zn	976,73	753,77
Fe	1040,38	1141,71
Cu	964,95	1252,2
Cu/Zn	0,99	1,7
Cu/Fe	0,94	1,11
Cu/Se	12,3	24,2

Muitos outros estudos demonstraram níveis de cobre elevados em vários tipos de neoplasia, como câncer de ovário, pulmão, estômago, câncer de mama e leucemia – os dois últimos tipos apresentando uma concentração ainda mais elevada de cobre nas células, sendo 3 e 4 vezes maior, respectivamente. As documentações foram feitas em pacientes com diferentes grupos de idade, sexo e localidade geográfica.¹⁹

Com esses estudos, pergunta-se se a desregulação do cobre nesses pacientes seria a causa ou a consequência do câncer. O cobre, por suas características, pode aumentar a produção de EROs, danificando biomoléculas, e levando ao estresse oxidativo e inflamação crônica, intrinsecamente relacionados ao câncer.²⁰ A reação do tipo Fenton, já demonstrada, está entre as mais importantes reações mediadas por metais, especialmente metais de transição, como Fe(II), Cu(II), Co(II) e Ni(II), e levam à produção do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), uma das espécies reativas de oxigênio mais danosas produzidas no corpo humano²¹.

A reação de Haber-Weiss (**Equação 7**) complementa a reação de Fenton, também levando à produção de radicais²², num processo modulado pelo ligante, porém o metal age apenas como catalisador do processo, e envolve o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$):

**Equação 7** – Reação de Haber-Weiss

Não se constatou ainda inequivocamente se o cobre é um fator de risco na carcinogênese, porém seu papel é conhecido no processo de angiogênese e metástase.

A angiogênese envolve a migração, proliferação e diferenciação de células endoteliais para formar novos vasos sanguíneos, e é controlada por fatores estimulantes como a angiogenina, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), algumas interleucinas (IL) e elementos traços como o cobre. Os inibidores incluem IL-10, IL-12 e angiotensina. Este processo é muito importante para o crescimento de um tumor, uma vez que esse não passa de 1 a 2 milímetros de diâmetro sem a formação de novos vasos.

O cobre liga-se à angiogenina, aumentando sua afinidade por células endoteliais, e pode regular a secreção de FGF e IL-1 α . Por fim, cobre é requerido para expressão de alguns fatores angiogênicos: na deficiência desse elemento, o fator de transcrição NF κ B é inibido e, conseqüentemente, cinco mediadores pró-angiogênicos (VEGF, bFGF, IL-1 α , IL-6 e IL-8) têm sua expressão reduzida.^{23,24} Essas descobertas inquestionavelmente colocam o cobre como um potente indutor do processo de angiogênese.

O cobre relaciona-se à metástase pelo fato desta depender do processo de angiogênese. No entanto, há evidências de que o cobre pode influenciar diretamente a metástase. Esse elemento é essencial para atividades das enzimas lisil-oxidase (LOX), envolvidas na ligação cruzada entre colágeno e elastina. Células cancerosas secretam LOX para remodelar a matriz extra-celular, assim criando o chamado “nicho pré-metastático”, onde células derivadas da medula óssea (BMDCs) são recrutadas antes do desenvolvimento da metástase. Estas células parecem criar um ambiente para a invasão subsequente e crescimento de células tumorais.²⁵

Com base nesses conhecimentos, passaram a ser desenvolvidas terapias focando na depleção de cobre biodisponível. Quelantes de cobre (**Figura 2**), antes estudados para tratar a doença de Wilson, foram testados frente a tumores para verificar diminuição de angiogênese e metástase.

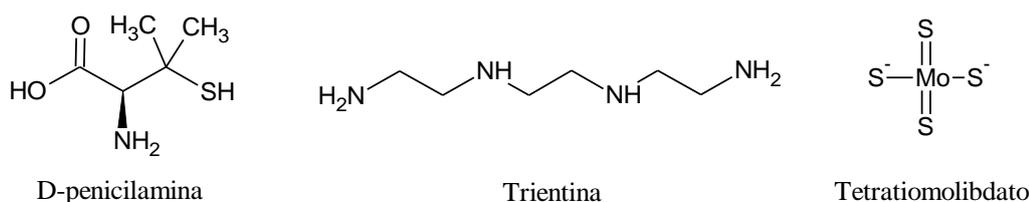


Figura 2 – Exemplos de quelantes de cobre.

Em um estudo, verificou-se que o tetratiomolibdato suprimiu o fator nuclear NFκB, impedindo a expressão de fatores pró-angiogênicos em murinos SUM149 (câncer de mama inflamatório).²⁶ Outros estudos mostraram, de forma semelhante, que a trientina (ou trietilenotetramina, $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$) reduziu a produção de IL-8 em carcinoma hepatocelular²⁷, e que a *d*-penicilamina inibiu a atividade de LOX, prejudicando a ligação cruzada de colágeno, além de reduzir a expressão de VEGF, resultando em progressão lenta de glioblastoma multiforma *in vivo*.²⁸ Porém, observou-se nesses estudos que os quelantes de cobre têm atividade mais citostática que citotóxica, isto é, inibe mais o crescimento ou reprodução das células do que as torna inviáveis.

1.3 Complexos de cobre como metalofármacos antitumorais

O sucesso clínico da cisplatina para tratar vários tipos de neoplasias²⁹ colocou a química de coordenação em destaque, levando ao desenvolvimento e teste de várias metalodrogas antitumorais.³⁰ Apesar de sua eficiência, a cisplatina tem efeitos colaterais tóxicos, o que limita sua dose, e ainda tem induzido resistência em tumores. Complexos de cobre foram propostos assumindo-se que esse metal seria menos tóxico, pelo fato de ser endógeno e o organismo ter a maquinaria necessária para lidar com ele. Contrariando a lógica dos quelantes de cobre, que tem como alvo terapêutico a remoção desse metal do meio, os complexos passaram a ser testados com um novo propósito: induzir apoptose em células tumorais.³¹

Para formular o complexo de cobre antitumoral, é essencial levar em conta a estrutura da molécula, o átomo doador do ligante e o arranjo dos ligantes ao redor do metal, pois isso modula as propriedades duras e moles do metal, assim como seu balanço lipo- e hidrofílico. O cobre forma uma grande variedade de complexos de coordenação predominantemente nos estados de oxidação Cu(I) e Cu(II), com muito mais exemplos deste último. Cu(I) prefere átomos doadores moles, como P, C, S tioéter e aminas aromáticas, e seus complexos costumam adotar uma geometria tetraédrica (pois o cobre costuma coordenar-se a quatro átomos). Ao contrário, Cu(II) é um íon de fronteira entre duro e mole e tem preferência por ligação a átomos de nitrogênio, numa geometria usualmente tetragonal. Por esse motivo, complexos de cobre(II) são preferencialmente utilizados por terem grande habilidade de ligação com o DNA, assunto explorado na próxima secção.

1.4 Alvos preferenciais dos complexos de cobre

Em nosso laboratório vimos estudando derivados oxindólicos, preparados a partir da isatina e respectivos complexos de metais essenciais já há algum tempo, tendo verificado suas propriedades como possíveis agentes antitumorais.^{32,33,34,35,36} Foram feitas investigações sobre seus prováveis mecanismos de ação e alvos, que incluíram ligação e clivagem de DNA, e interação com proteínas quinases e topoisomerasas, inibindo suas atividades.

1.4.1 Apoptose por ligação e quebra de DNA

Desde 1968, sabe-se que o cobre possui uma grande afinidade por DNA, superando a afinidade de metais como níquel, cobalto, zinco e magnésio.³⁷ Mais tarde, principalmente nos últimos dez anos, muitos estudos demonstraram que complexos de cobre promoviam a clivagem de plasmídeo em condições fisiológicas por um mecanismo oxidativo,^{38,39,40,41} sendo muitas vezes mostrado envolvimento do radical hidroxil. Acredita-se que ocorra reação do tipo Fenton para esse tipo de clivagem.

A habilidade de clivagem dos complexos de cobre é, antes de tudo, uma consequência da habilidade de ligação desses compostos ao DNA. Isso se deve muito ao arranjo da molécula, como dito anteriormente.

Existem três tipos de interação não covalente de complexos metálicos com o DNA: interação nas alças (ou *grooves*), interação eletrostática (quando há associação externa com os grupos fosfato), e intercalação. A intercalação consiste na inserção da droga entre pares de base vizinhos do DNA, dessa forma desenrolando as fitas para se encaixar no empilhamento π . Esse tipo de interação é o que leva a maior modificação da estrutura do DNA, consequentemente promovendo sua quebra e, assim, impedindo a replicação de uma célula cancerosa. Dessa forma, utilizam-se comumente ligantes planares para confecção dos complexos, por exemplo, a fenantrolina³⁹ e a cumarina.⁴⁰

Um de nossos compostos antitumorais mais ativos é o $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$, mostrado na **Figura 3a**. Esse complexo se demonstrou intercalante e clivou dupla-fita de DNA plasmidial, além de ter apresentado alta citotoxicidade contra células de neuroblastoma SH-SY5Y⁴². Resultados similares foram obtidos para o análogo com apenas um ligante, $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$, também tratado como $[\text{Cu}(\text{isaepy})]$ nesse texto, na Figura 3b. Ambas as espécies apresentam-se em equilíbrio, dependente do pH do meio, conforme foi demonstrado através de dados de espectrometria de massa.

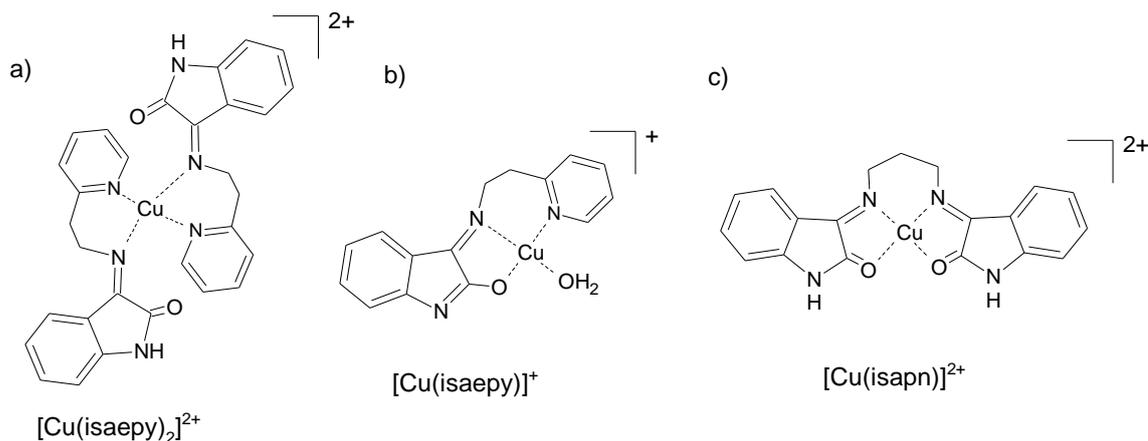


Figura 3 – Principais complexos de cobre sintetizados em nosso laboratório.

1.4.2 Apoptose por inibição de quinases, topoisomerases e via mitocondrial

As quinases são responsáveis por promover a fosforilação de proteínas através de transferência do γ -fosfato do ATP para resíduos específicos de proteínas. Em muitas doenças, inclusive câncer, foram verificadas alterações dessas quinases. Dessa forma, elas são outro importante alvo de metalodrogas. Recentemente, demonstrou-se que $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ (Figura 3c) inibem significativamente a CDK1⁴³, quinase envolvida no processo de divisão celular.

As topoisomerases são enzimas que catalisam mudanças topológicas no DNA durante sua replicação, transcrição e reparo, promovendo quebra e religação das fitas a fim de evitar o superenrolamento do DNA. As quebras temporárias podem ocorrer em uma fita de DNA, no caso da topoisomerase I, um monômero, ou em duas fitas, no caso da topoisomerase II, que é dimérica.⁴⁴ Sem essas enzimas, portanto, a replicação de DNA fica comprometida, e por isso são um ótimo alvo de terapias anticâncer. Inibidores catalíticos podem inibir a ligação da topoisomerase ao DNA, ou impedir a clivagem, e assim inibindo o relaxamento da fita.

Um estudo com o $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ demonstrou que esse complexo é capaz de inibir completamente a quebra das fitas de DNA pela topoisomerase IB (eucariótica humana) na concentração de 50 μM , impedindo assim o relaxamento do plasmídeo.⁴⁵ Em trabalho mais recente, a inibição por outros complexos correlatos, como o $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$, também foi verificada, constatando-se mais de um sítio de interação entre esses complexos e a proteína.⁴⁶

Além dos alvos citados, foram descritas na literatura outras funções e compartimentos celulares, assim como o microambiente das células cancerosas como alvos de drogas anticâncer.⁴⁷ Por exemplo, células cancerosas apresentam baixo nível de antioxidantes ou

sensibilidade redox alterada, o que pode ser uma ferramenta de indução seletiva de apoptose. O cobre, por suas propriedades, pode promover o ciclo catalítico redox com mais intensidade nessas células, levando à produção de EROs e conseqüentemente à morte celular. $[\text{Cu}(\text{isaepy})]^+$ e $[\text{Cu}(\text{isapn})]^{2+}$ têm habilidade de entrar na mitocôndria, veiculando o cobre para dentro da mesma e assim produzindo EROs, induzindo eficientemente a morte em células de neuroblastoma.³⁴

A carga positiva e a lipofilicidade desses compostos é o que lhes confere a habilidade de entrada na célula: eles agem como cátions lipofílicos delocalizados (DLCs), uma classe de compostos capazes de entrar na célula em resposta a um potencial de membrana negativo, principalmente na mitocôndria.³⁴ Foi demonstrado que $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2]^{2+}$ se concentra na mitocôndria, gerando EROs e danos oxidativos em proteínas de toda a organela. Com esse desbalanço, ocorre a perda de potencial de membrana e queda de produção de ATP, o que leva à ativação da AMPK (quinase ativada por monofosfato de adenosina), que por sua vez leva à apoptose.³³

É importante observar com esses dados que os metalofármacos estudados têm mais de um alvo, o que é esperado, uma vez que no meio biológico é virtualmente impossível ou muito pouco provável, atingir apenas um tipo de proteína, por exemplo.

1.5 Compostos indólicos como ligantes de complexos de cobre

Produtos naturais de maneira geral compõem grande parte dos fármacos usados contra doenças humanas. Particularmente, diversos produtos naturais isolados de diferentes organismos marinhos (esponjas, cianobactérias, algas, moluscos, fungos) têm despertado bastante interesse como possíveis agentes farmacológicos ou medicinais.^{48,49,50} Dentre estes, destacam-se os derivados indólicos com possível atividade antitumoral, como a isatina e a 6-bromoisatina.

A isatina (1H-indol-2,3-diona ou 2,3-dioxindol), é um alcaloide natural encontrado nas plantas *Isatis tinctoria* (Brassicaceae)⁵¹ e *Couropita guianensis* (Orchidaceae)⁵² (**Figura 4a,b**), que produzem outros oxindóis, como o índigo e a indirubina. A isatina é também encontrada em fluidos e tecidos de mamíferos como um metabólito do triptofano, em que esse aminoácido é convertido em indol por bactérias intestinais, que então é absorvido e convertido a isatina no fígado.⁵³

A isatina já teve suas propriedades biológicas descritas na literatura, assim como outros derivados oxindólicos similares.⁵⁴ Esse composto apresenta duas formas tautoméricas, ceto e enol, em relação à carbonila na posição α . A **Figura 4c** mostra uma carbonila lactâmica à esquerda, e a forma enólica à direita. A carbonila na posição β é uma ceto-carbonila.

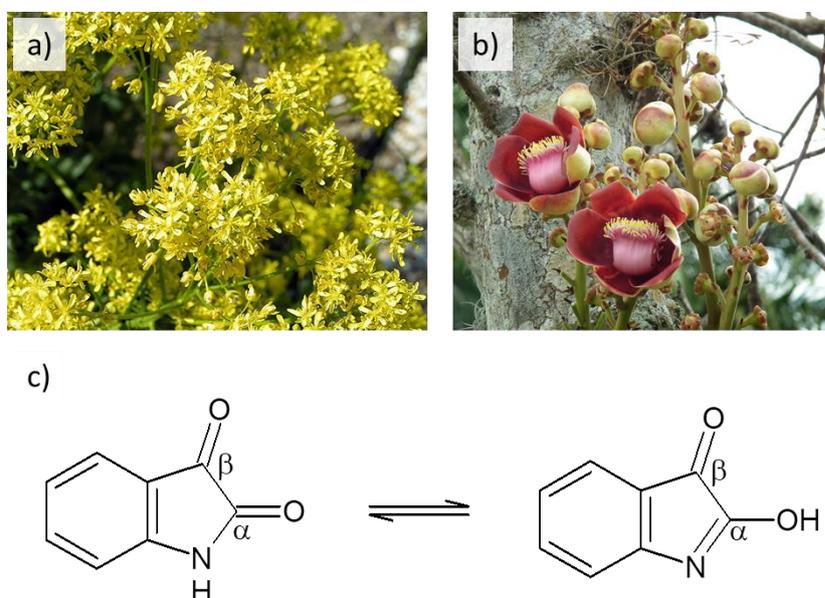


Figura 4 – Isatina e suas fontes naturais. a) *Isatis tinctoria*, b) *Couroupita guianensis*. c) formas tautoméricas da isatina.

As propriedades da isatina já descritas na literatura incluem ação antibacteriana, fungicida, anticonvulsão, antiviral e atividade antitumoral.⁵⁵ Diversos outros derivados de oxindóis já foram descritos como potentes inibidores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) capaz de estimular a angiogênese, um processo de desenvolvimento de microvasculatura por parte de tecidos tumorais.⁵⁶ Alguns derivados, conhecidos comercialmente como SU5416 (*semaxanib*) e SU6668 (*orantinib*), mostrados na **Figura 5**, inibiram o processo de angiogênese *in vitro* numa extensão > 86%, em concentração 10 $\mu\text{mol/L}$, e esta inibição já era significativa a 1 $\mu\text{mol/L}$. Ambos estes compostos já foram utilizados em testes clínicos para tratamento de câncer, segundo o NCI (*National Cancer Institute*).⁵⁷ Um outro composto desta série, SU9516, correspondente a uma indolinona 3-substituída, mostrou ser ativo na inibição da atividade quinase (CDKs ou quinases dependentes de ciclinas) de células de câncer de colon, da proliferação e progressão do ciclo celular, induzindo apoptose.⁵⁸

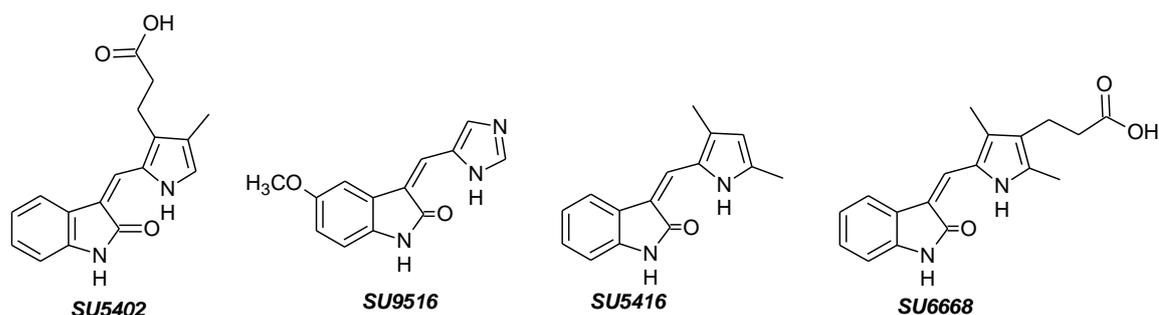


Figura 5 – Compostos derivados de oxindóis, com propriedades antitumorais.

Moluscos gastrópodes, como a *Dicathais orbita*, são organismos marinhos predatórios, da família Muricidae, encontrados na Austrália e que vêm sendo estudados já há 5 décadas.⁵⁹ Compostos como indóis bromados e ésteres colínicos foram isolados e identificados como precursores de *Tyrian purple*, um corante violáceo detectado nesses organismos, sendo sintetizados em suas glândulas hipobranquiais. Desde então sua biodistribuição e biossíntese vêm sendo estudadas, assim como vários de seus análogos estruturais. Os precursores indólicos geram o pigmento final através de uma série de reações enzimáticas, oxidativas e fotolíticas.

Sulfato de Tirindoxil (Figura 6) foi identificado como o último precursor do pigmento *Tyrian purple*, sendo obtido de extratos etanólicos das glândulas hipobranquiais da *D. orbita*. Outros precursores também foram identificados, como *6-bromoisatina*, um composto de cor amarela e insensível à luz, e *Tiriverdina*, um composto verde sensível a luz, com estrutura dimérica⁶⁰ e formado pela reação espontânea entre tirindoxil e tirindoleninona.⁶¹ *6-Bromoisatina (Figura 6)* é considerado um produto artefato, resultante de um processo de oxidação em etapas, sendo precursor do composto vermelho *6,6'-dibromoindirubina*, que é um isômero do pigmento *Tyrian purple*.

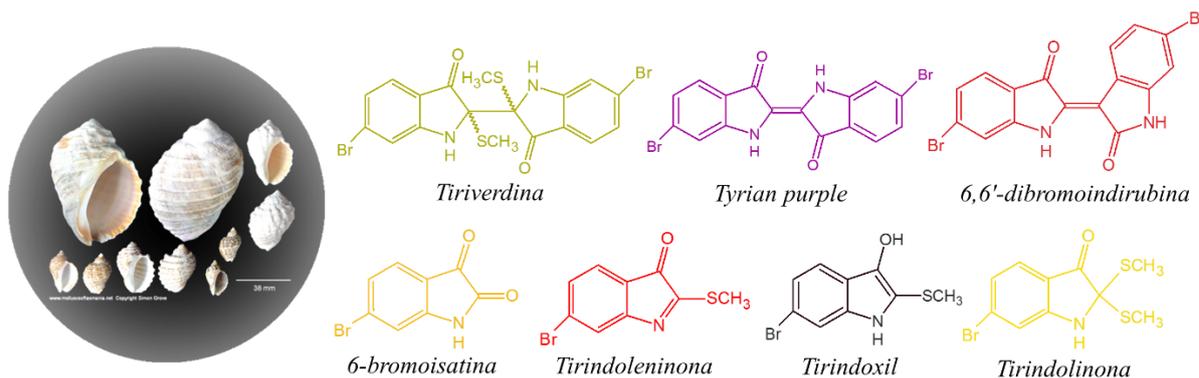
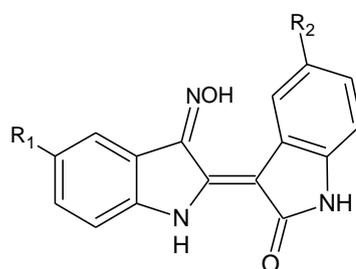


Figura 6 – Compostos derivados de oxindóis encontrados em *Dicathais orbita* (Austrália), responsáveis pela sua coloração (conforme Benkendorff⁵⁹).

Alguns desses compostos indólicos extraídos de gastrópodes mostraram ter atividade antitumoral, como *tirindoleninona* e principalmente *6-bromoisatina*, o mais ativo contra a proliferação de células de câncer de colon (HT29 e Caco-2), com IC₅₀ na faixa 100µM.^{62,63}

Derivados de indirubina (**Figura 7**), que também pode ser obtida de plantas (as mesmas da isatina), já foram descritos como potentes inibidores de quinases (CDK2/ciclina E), interagindo no sítio de ligação do ATP, e por esta razão sendo considerados promissores agentes antitumorais.⁶⁴



Indirubina-3'-oxima



Figura 7 – Derivados oxima de indirubina.

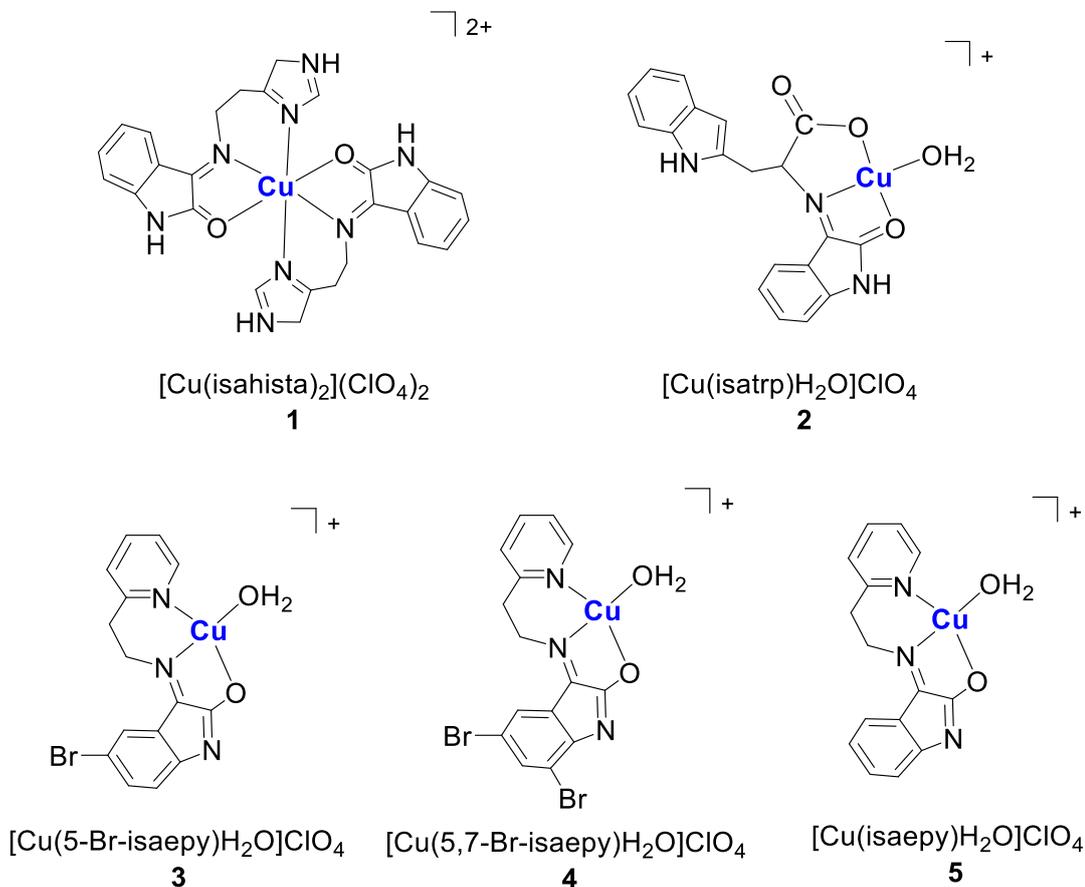
Sabendo-se que isatinas halogenadas têm função antitumoral, Vine *et al.* (2007)⁶⁵ fizeram um estudo citotóxico com células de linfoma histiocítico (U937), comparando a isatina a uma série de derivados com substituintes halogenados. O IC₅₀ da isatina é de 565µM para essa linhagem de células, e esse número cai drasticamente quando se adiciona um átomo de bromo nas posições 5, 6 ou 7, com IC₅₀ de 64,5, 74,8 e 83,0 µM respectivamente. A isatina tri-substituída, com bromo em C₅, C₆ e C₇, apresentou IC₅₀ de 6,8 µM. Deste modo, estes

dados pareciam indicar que a bromação da isatina poderia melhorar suas propriedades como agente antitumoral.

2. OBJETIVOS

Os objetivos principais deste projeto foram sintetizar e caracterizar potenciais compostos antitumorais de cobre, análogos ao complexo $[\text{Cu}(\text{isaepy})]$ **5**, que vem sendo extensivamente estudado em nosso laboratório, a partir de ligantes bromados de isatina e posteriormente metalados (complexos **3** e **4**), semelhantes aos isolados em organismos marinhos, a fim de verificar um possível aumento da atividade antitumoral. Complementando estas metas, investigou-se também um possível aumento em suas interações com DNA e em sua clivagem oxidativa.

Paralelamente, investigaram-se dois novos complexos de cobre derivados de isatina e histamina (**1**) ou triptofano (**2**), visando estudos comparativos mais amplos da reatividade desta classe de compostos.



3. MATERIAIS E MÉTODOS

As chamadas bases de Schiff constituem uma classe de compostos orgânicos apresentando o grupo imina ($RR'C=N-R''$), formado pela condensação do grupo amina primária de um precursor com o grupo aldeído ou cetona de outro. Ligantes imínicos formam muito facilmente compostos de coordenação estáveis com a maioria dos metais de transição, em diferentes estados de oxidação, e sua estabilidade térmica e termodinâmica possibilitam sua utilização em diversos processos bioinorgânicos de interesse.

Baseado em estudos similares realizados em nosso grupo⁶⁶ ou descritos na literatura,⁶⁷ foram desenvolvidos procedimentos, com modificações adequadas a cada caso, como controle de temperatura, solvente e pH, para obtenção dos diferentes complexos metálicos de cobre. O composto [Cu(*isaepy*)] aqui utilizado foi previamente sintetizado, caracterizado e gentilmente cedido pelo Dr. Ricardo Alexandre Couto.

Posteriormente, foram realizados experimentos de atividade biológica concomitantemente com [Cu(*isaepy*)] para verificar e comparar a citotoxicidade desses complexos frente a células tumorais, bem como experimentos de interação com DNA.

3.1 Materiais utilizados

3.1.1 Reagentes

Isatina (98%), 5-bromoisatina (90%), 5,7-dibromoisatina (97%), MTT (98%) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Perclorato de cobre hexahidratado (98%), 2-(2-aminoetil)piridina e DNA “Calf Thymus” em forma de sal de sódio foram adquiridos da Aldrich, L-triptofano (99%) foi adquirido da Synth, histamina diidrocloreto (99%) da Acros Organics e o plasmídeo pBlueScript foi obtido da Stratagene.

3.1.2 Meios de cultura e soluções

3.1.2.1 Meio McCoy's

Meio McCoy's 5A (Sigma).....	10,7 g
NaHCO ₃	2,2 g
Soro fetal bovino 10%.....	100 mL
Solução de antibiótico e antimicótico 100x (Sigma).....	10 mL

Completou-se o volume para um litro com água deionizada e filtrou-se em ambiente estéril.

3.1.2.2 Meio McCoy's com doxorubicina 0,5 μ M

Meio McCoy's 5A (Sigma)	10,7 g
NaHCO ₃	2,2 g
Soro fetal bovino 10%.....	100 mL
Solução de antibiótico e antimicótico 100x (Sigma)	10 mL
Doxorrubicina.....	0,27 mg

Completou-se o volume para um litro com água deionizada e filtrou-se em ambiente estéril.

3.1.2.3 Meio DMEM

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma).....1 L

Meio estéril pronto para uso.

3.1.2.4 Tampão fosfato (PBS) para ensaios em células

NaCl.....	8 g
KCl.....	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
NaH ₂ PO ₄	0,2 g

Completou-se o volume para 1 litro de água deionizada e submeteu-se a autoclave por 15 minutos, a 121°C.

3.1.2.5 Tampão fosfato (PBS) pH 7,4 para ensaios com DNA

NaOH (0,1 M)	39,1 mL
KH ₂ PO ₄ (0,1 M)	50 mL

Completou-se o volume para 100 mL com água deionizada e filtrou-se em ambiente estéril.

3.1.3 Linhagens de células

Foram utilizadas células tumorais MES-SA (ATCC CRL-1976), MES-SA/Dx5 (ATCC CRL-1977), HeLa e fibroblasto humano P4 (isolado clínico), disponíveis no laboratório do Prof. Pio Colepícolo.

3.2 Sínteses

A síntese dos complexos foi realizada por reação de condensação em catálise ácida. Os compostos podem conter o grupamento isatina tanto na forma enol quanto na forma ceto, dependendo do pH em que a síntese ocorreu. A **Figura 8** mostra os precursores utilizados na preparação dos complexos.

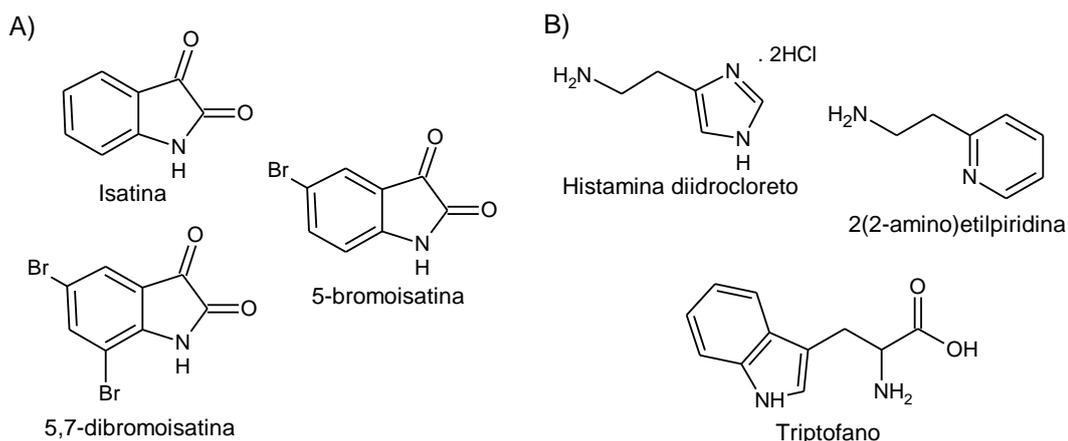


Figura 8 – Precursores utilizados para as sínteses. A) Isatina e seus derivados halogenados, B) Precursores contendo aminas primárias.

3.2.1 $[Cu(isahista)_2](ClO_4)_2$ (1)

Para síntese de $[Cu(isahista)_2]$, dissolveu-se 4 mmols de isatina (0,59 g) em 50 ml de etanol absoluto, e misturou-se com 4 mmols de histamina diidrocloreto (0,74 g) dissolvida em 5 ml de água deionizada. Após 1 hora de agitação à temperatura ambiente, foi adicionado à solução 1,11 ml (8 mmols) de trietilamina, ainda sob agitação constante. Por fim, foram adicionados lentamente 4 mmols de perclorato de cobre (1,48 g) dissolvidos em 10 ml de etanol, com ajuda de uma pipeta pasteur. Depois de 1h30 sob agitação, a solução mostrava uma aparência verde musgo, com um precipitado amarelo escuro. Após ficar a 4°C por uma noite, o composto foi filtrado a vácuo, lavado 2 vezes com etanol e água (aproximadamente v:v 10:1), e mais uma vez com etanol absoluto. Antes de secar, o complexo foi lavado com éter etílico resfriado. A massa final obtida foi de 1,18 g, equivalente a 1,55 mmol (rendimento de 38,8%, considerando a forma ceto pura) de um pó fino amarelo-mostarda.

3.2.2 $[Cu(isatrp)(H_2O)](ClO_4)$ (2)

Para a síntese de $[Cu(isatrp)]$, dissolveu-se 4 mmols de isatina (0,59 g) em 50 ml de etanol absoluto, e misturou-se a 20 ml de L-triptofano em etanol e água em uma proporção 2:1, aproximadamente. Foi utilizado o mesmo procedimento do composto 1 para adição de

base e perclorato de cobre. Ao fim da síntese, a solução, anteriormente de coloração alaranjada, tornou-se marrom escura e formou um precipitado da mesma cor.

O complexo foi então resfriado a 4°C por uma noite. Em seguida, foi filtrado a vácuo, lavado uma vez com etanol e um pouco de água, e então, secado e pesado. O rendimento do produto foi de 68,5% (1,09 g, 2,74 mmols) considerando-se que o complexo estava apenas na forma ceto.

3.2.3 *[Cu(5-Brisaepy)(H₂O)]ClO₄ (3)*

5-bromoisatina (4 mmols, 0,90 g) foi dissolvida em 50 ml de etanol absoluto, em seguida foi adicionada 2-(2-aminoetil)piridina (4 mmols, 0,48 ml). O pH aparente foi ajustado para 5,5 com algumas gotas de HCl concentrado e a solução foi mantida sob agitação, em refluxo, por 8 horas. Em seguida, foi adicionado lentamente o perclorato de cobre (4 mmols ou 1,48 g dissolvidos em 10 ml de etanol). Formou-se um precipitado marrom escuro, após o pH ter sido ajustado para 8,0 com trietilamina. A suspensão foi mantida sob agitação por mais 4 horas. O composto foi então mantido a 4°C por um dia, e depois filtrado, lavado com éter etílico e etanol resfriado, e secado. Foi obtido um pó marrom esverdeado com rendimento de 22% (0,462 g, 0,90 mmol), considerando-se o composto puro na forma enol.

3.2.4 *[Cu(5,7-Brisaepy)H₂O](ClO₄) (4)*

Dissolveram-se 3 mmols (0,91 g) de 5,7-dibromoisatina em 50 ml de etanol absoluto, sob agitação e aquecimento, e adicionou-se 2-aminoetilpiridina (3 mmols, 0,36 ml). O pH da solução foi então ajustado para 5,5 com HCl concentrado e a reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente durante 12 horas. Após esse período, foi adicionado, lentamente, o perclorado de cobre (1,11 g) dissolvido em 10 mL água, e em seguida o pH foi ajustado para 7,5-8,0 com trietilamina. Com a adição dessa base, formou-se um precipitado marrom esverdeado na solução, e a agitação foi mantida por mais 3 horas. Feito isso, o composto formado foi refrigerado a 4°C por 72 horas, para precipitação. A filtração a vácuo foi realizada, fazendo-se então duas lavagens do precipitado com etanol absoluto resfriado e uma lavagem com éter etílico resfriado. O complexo obtido, um pó fino marrom esverdeado, apresentou rendimento de 56,9% (1,00 g, 1,7 mmol), considerando-se o composto puro na forma enol.

3.2.5 *[Cu(isaepy)H₂O](ClO₄) (5)*

A síntese desse composto foi realizada pelo Dr. Ricardo Alexandre Couto, durante seu doutoramento. Dissolveram-se 5 mmols (0,73g) de isatina em 25 mL de etanol e foram lentamente adicionados 5 mmols (0,598 mL) de 2-aminoetilpiridina. Em seguida foi ajustado o pH para 5,5 adicionando-se lentamente HCl concentrado, e manteve-se a solução sob agitação por 24 horas. Após esse período foram lentamente adicionados 5 mmols (1,85 mL) de perclorato de cobre dissolvido em 1 mL de água deionizada. O pH da solução foi ajustado para 7,5 com 5 mmols (0,697 mL) de trietilamina. Foi obtido um fino precipitado verde musgo e a suspensão foi mantida sob agitação por 4 horas. Feito isso, a suspensão foi filtrada e o sólido foi lavado com etanol e éter etílico gelado. Secou-se o complexo sob pressão reduzida em dessecador. O complexo obtido apresentou rendimento de 76% (1,72 g, 3,84 mmols).

3.3 Métodos de caracterização

3.3.1 *Análise elementar*

A análise elementar foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da USP, utilizando um Analisador Elementar CNH Perkin-Elmer 2400, para determinação das porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos compostos. Resultados consistentes com os valores esperados, dentro de 0,5-1%, são considerados satisfatórios.

3.3.2 *Espectroscopia no infravermelho*

Os espectros vibracionais foram obtidos através de um espectrofotômetro infravermelho FT-IR da Bomem, modelo MB-102, na faixa de 400-4000 cm^{-1} . Os compostos foram macerados em KBr, previamente seco em estufa a 80°C, em uma razão de aproximadamente 1:100.

3.3.3 *Espectroscopia na região do ultravioleta/luz visível*

Os espectros eletrônicos na região do UV/Vis foram registrados em um espectrofotômetro da Shimadzu, modelo UV-1601PC, em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,000 cm. Foram utilizadas soluções com água MilliQ, metanol com DMSO 1% ou DMSO nas concentrações de 10^{-5} a 10^{-3} mol.L^{-1} .

A absorvidade molar, epsilon (ϵ , mol⁻¹ L cm⁻¹), foi obtida através do coeficiente angular em gráficos da absorbância em função da concentração do composto, para cada comprimento de onda máximo encontrado.

3.3.4 Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

Os espectros de EPR foram registrados num espectrômetro da Bruker, modelo EMX, operando na banda-X (9,5 GHz), utilizando tubos de quartzo a baixas temperaturas (77 K) para verificação da configuração e do estado de spin de espécies metálicas paramagnéticas, como no caso do cobre(II). As medidas foram realizadas em estado sólido e em soluções (etanol:água 2:1, ou etanol:DMSO 2:1).

3.4 Testes de atividade biológica

3.4.1 Ensaio MTT

A atividade citotóxica dos compostos isolados frente a algumas células tumorais foi verificada através de testes adequados já descritos na literatura, por exemplo, o MTT.^{68,69} Este ensaio permite a quantificação de células viáveis através da redução do MTT, um sal de tetrazólio, pela mitocôndria da célula. O produto, formazan, apresenta uma coloração roxa com absorção máxima em 570 nm e sua quantidade é proporcional ao número de células viáveis.

Para realização desse experimento foram utilizadas células de sarcoma uterino humano, linhagens MES-SA e MES-SA/Dx5, esta última resistente a doxorrubicina (0,5 μ M), células de adenocarcinoma cervical HeLa e células não-tumorais (fibroblasto humano P4). Foram calculadas, com ajuda de uma câmara de Neubauer, 10 mil células por poço com 200 μ l de meio de cultura para incubação em placas de 96 poços. Utilizaram-se os meios McCoy's para os sarcomas e DMEM para HeLa e fibroblastos.

Após incubação das células por 24 horas, a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, adicionaram-se os compostos em concentrações que variavam de 25 a 150 μ M, ou de 5 a 75 μ M, dependendo da atividade prevista para o composto. Novamente, as placas foram incubadas por 24 horas nas mesmas condições. Cada linhagem foi testada separadamente, sempre com controle negativo. No caso de compostos diluídos primeiramente em DMSO,

também foi feito um controle de células em meio McCoy's ou DMEM com DMSO na porcentagem correspondente (1 a 2,5%).

Após o período de ação das drogas, o meio de cultura foi retirado, os poços foram lavados com PBS, e adicionou-se às placas o MTT solubilizado em meio de cultura numa concentração final de 0,3 a 0,4 mg/ml. A incubação foi feita nas mesmas condições por 3 horas. Após isso, adicionou-se DMSO aos poços, para que as células se desprendessem do fundo. A leitura de absorbância a 570 nm foi realizada em um leitor de microplacas Infinite 200 PRO (Tecan), e o IC₅₀ pode ser encontrado trabalhando-se os dados no software OriginPro 8.5.0 (Origin Lab Corporation).

3.4.2 Teste de interação com DNA através de espectroscopia na região do ultravioleta/luz visível

Com intuito de verificar possíveis interações com o DNA, foi feita uma titulação dos complexos com DNA Calf-Thymus (CT-DNA). A concentração utilizada dos compostos variou entre 15 e 125 µM, e o volume de DNA primeiramente adicionado equivalia a metade da concentração do composto, e esse mesmo volume foi utilizado para o resto da titulação. Os espectros foram registrados nos comprimentos de onda entre 190 e 600 nm.

3.4.3 Teste de interação com DNA através de dicroísmo circular

Os espectros de dicroísmo circular foram registrados em um espectropolarímetro Jasco J-720 entre 300 e 200 nm. Utilizaram-se cubetas de 1 cm e tampão fosfato (PBS) como solvente. Os compostos solubilizados em DMSO foram testados na concentração 6 µM, e variou-se a concentração de DNA Calf-Thymus de 6 a 60 µM. Foi feita uma curva padrão de DNA para normalizar a intensidade dos espectros posteriormente. O composto [Cu(*isahista*)₂] foi testado entre as concentrações 50 e 140 µM, e o CT-DNA foi utilizado na concentração 50 µM.

3.4.4 Clivagem de DNA em presença dos complexos de cobre

Para verificar a clivagem do DNA, foi utilizado o plasmídeo pBlueScript II (Stratagene) de 2961 pares de bases. Bactérias transformadas (*E. coli* DH5- α) tiveram o plasmídeo extraído utilizando-se um kit de "mini prep" da Qiagen. A concentração final, lida em um NanoDrop, foi de 65,1 ng/µL. Os compostos foram incubados a 37°C em diferentes concentrações (1 a 50 µM) e diferentes intervalos de tempo (15 a 60 minutos) com 250 ng de DNA e 120 µM de H₂O₂, utilizando tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) como solvente. Também

foi verificado o possível dano de DNA utilizando-se somente H_2O_2 e DMSO. O volume final foi de 20 μL . Após a incubação, adicionaram-se 4 μL de *loading buffer* 6X e as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, a 100 V, durante uma hora.

Após captura das imagens de eletroforese, a intensidade relativa das bandas foi medida através do programa ImageJ (v. 1.50i, National Institutes of Health, USA), e foram feitos gráficos da abundância relativa entre as formas de DNA

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos sintetizados, similarmente aos obtidos a partir do precursor isatina, podem ser obtidos na forma ceto- ou enol-, dependendo do ajuste do pH na etapa de metalação. Um exemplo de equilíbrio ceto-enol é verificado na **Figura 9**:

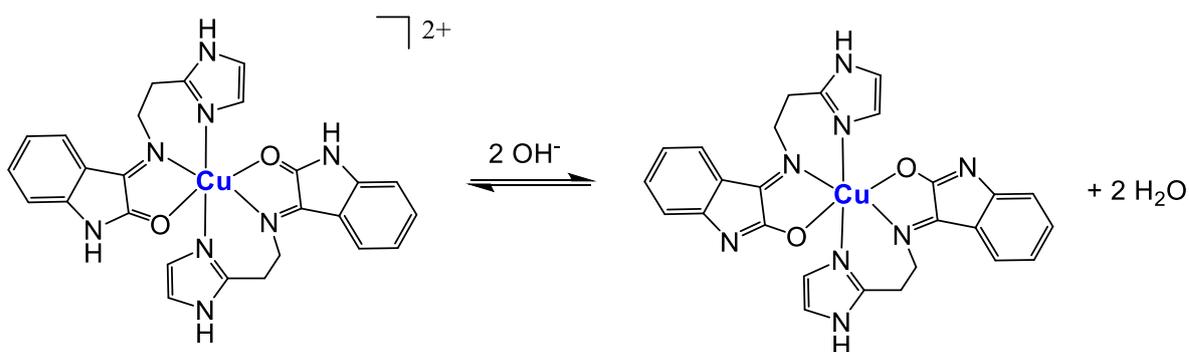


Figura 9 – Equilíbrio ceto-enólico do composto $[\text{Cu}(\text{isahista})_2]$.

4.1 Sínteses

Todos os compostos foram sintetizados em condições de catálise ácida, para favorecer a formação da imina, ou base de Schiff. O grupo carbonila da isatina, ao lado de um grupo amida, tem baixa reatividade e torna a reação de condensação difícil. Segundo a literatura⁷⁰, essa reatividade aumenta com a protonação do oxigênio, pois isso implica um aumento da eletronegatividade do mesmo. Dessa forma, a energia dos níveis de orbitais moleculares é diminuída na ligação $\text{C}=\text{O}$, o que a facilita o ataque nucleofílico do grupo amina a esse átomo de carbono. O pH aparente das soluções foi ajustado de acordo com estudos anteriores em nosso grupo⁵⁴. O procedimento padrão de reação catalítica é ajustar, em etanol, o pH aparente para 5,5 na preparação do ligante, e 7,5-8,0 para formar o complexo com o metal, após a adição do sal correspondente.

As sínteses foram feitas utilizando-se diidrocloreto de histamina (*hista*) ou triptofano (*trp*), condensando-os com isatina. A 2-(2-aminoetil)piridina (*epy*) foi condensada tanto com 5-bromo-isatina, quanto com 5,7-dibromoisatina, para obter ligantes análogos bromados. Considerou-se que as isatinas halogenadas podem seguir o protocolo de reações anteriores, pois os substituintes não interferem marcadamente nas propriedades da carbonila da molécula.

Nas primeiras sínteses, com *hista* (1) ou *trp* (2), não houve necessidade de se ajustar o pH para formação do ligante. Os ligantes não foram isolados, pois a reação com triptofano é particularmente complicada, já que o grupo amina sofre impedimento estérico do grupo indol de um lado da molécula, e do ácido carboxílico de outro (composto 2 da **Figura 10**). A própria adição do metal pode ajudar na formação da imina, por deslocar o equilíbrio da reação.

A ideia inicial do composto **1** era reproduzir o complexo $[\text{Cu}(\textit{isahist})]^{71}$, com cobre:ligante 1:1, porém a base adicionada não foi suficiente para favorecer a forma enol do ligante, que ficou na forma ceto e portanto bidentado. A análise elementar (**Tabela 2**) mostrou que dois ligantes se coordenaram a um único átomo de cobre(II), formando um complexo interessante.

Os compostos **3** e **4** também não tiveram os ligantes isolados, pois foram preparados afim de compará-los ao já conhecido $[\text{Cu}(\textit{isaepy})]$,⁷¹ cuja atividade biológica é a mais significativa dentre todos os compostos sintetizados a partir de isatina, em vários aspectos. O intuito é verificar se os átomos de bromo exerceriam um papel relevante que poderia aumentar essa atividade. Esses compostos são esperados na forma enol, assim como $[\text{Cu}(\textit{isaepy})]$, de modo que o cobre se coordene a três átomos do ligante (N,N,O) e a uma molécula de água.

As estruturas esperadas das moléculas sintetizadas encontram-se esquematizadas na **Figura 10**, bem como em anexo.

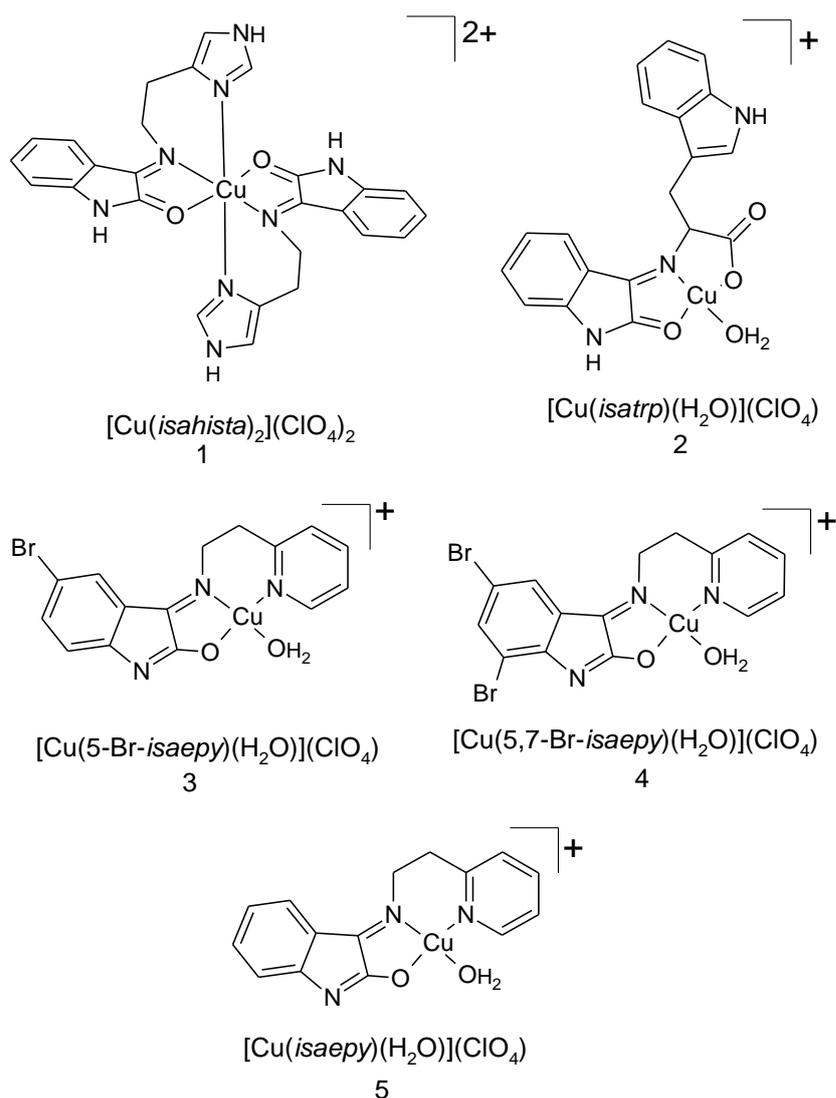


Figura 10 – Estruturas propostas dos complexos de cobre(II) sintetizados a partir de isatina ou seus análogos bromados.

Por fim, uma possível explicação para a diferença de rendimento nas sínteses dos compostos **3** e **4** é o fato do pH ser aparente, já que se utiliza etanol como solvente, e os indicadores de pH acabam mudando de cor à medida que secam, podendo ter uma interpretação errada. Na síntese do composto **4**, esses indicadores foram utilizados da forma mais correta – foi considerada a medição do indicador completamente seco.

4.2 Caracterização

Nesta secção, todos os dados do $[Cu(isaepy)]$, descritos em tabelas, foram extraídos da tese do Dr. Ricardo Alexandre Couto.

4.2.1 Análise elementar

Os compostos sintetizados demonstraram resultados satisfatórios para os estudos pretendidos, principalmente $[\text{Cu}(\text{isahista})_2]$, que foi obtido com alto grau de pureza, de acordo com a **Tabela 2**, considerando apenas a forma ceto. Os cálculos teóricos das porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram feitos com base nas fórmulas mínimas, descritas na tabela, que melhor se adaptaram aos dados experimentais.

Os compostos produzidos comumente apresentam moléculas de água não coordenadas, uma vez que são bastante higroscópicos, e podem também ficar com resíduos do solvente utilizado. Porém, o ideal é que os compostos apresentem, no máximo, duas moléculas de água.

Tabela 2 – Resultados da análise elementar dos compostos indólicos obtidos

Composto		C (%)	H (%)	N (%)	Fórmula mínima atribuída
$\text{Cu}(\text{isahista})_2$ (1)	Calc.	41,04	3,44	14,72	$[\text{Cu}(\text{isahista})_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	Exp.	41,02	3,46	14,80	$\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{CuN}_8\text{O}_{11}$
$\text{Cu}(\text{isatrp})$ (2)	Calc.	44,45	3,14	8,19	$[\text{Cu}(\text{isatrp})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$
	Exp.	44,62	4,20	8,90	$\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{ClCuN}_3\text{O}_8$
$\text{Cu}(5\text{-Brisaepy})$ (3)	Calc.	34,11	2,86	7,96	$[\text{Cu}(5\text{-Brisaepy})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	Exp.	34,28	3,05	7,13	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{BrClCuN}_3\text{O}_7$
$\text{Cu}(5,7\text{-Brisaepy})$ (4)	Calc.	32,15	2,86	6,62	$[\text{Cu}(5,7\text{-Brisaepy})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
	Exp.	31,37	2,71	6,68	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{Br}_2\text{ClCuN}_3\text{O}_7$
$\text{Cu}(\text{isaepy})$ (5)	Calc.	40,10	3,59	9,35	$[\text{Cu}(\text{isaepy})(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	Exp.	40,73	3,41	9,18	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClCuN}_3\text{O}_7$

4.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho

A caracterização espectroscópica na região do infravermelho demonstra o estiramento dos complexos. A radiação infravermelha absorvida é convertida em energia de vibração molecular por uma molécula orgânica entre 10.000 e 100 cm^{-1} e essa energia é quantizada. A frequência ou comprimento de onda de uma absorção depende da massa relativa dos átomos, das constantes de força de ligação e da geometria das moléculas.⁷²

Os espectros vibracionais foram registrados no intervalo $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ em espectrofotômetro com transformada de Fourier, e foi possível identificar os grupos característicos dos compostos obtidos.

A análise dos espectros mostrou que os compostos apresentam bandas características de estiramentos C=O, C=N, N-H e O-H, conforme mostrado na Figura 11 e resumido na Tabela 3. O estiramento C=N é o mais importante a ser verificado, pois é um indicativo de que a reação de condensação ocorreu. É possível visualizar duas bandas relativas a esse estiramento: uma do anel de isatina, e outra da base de Schiff, à qual tem sido atribuído um menor número de onda, por estar coordenada ao metal. O estiramento C=N contido em anéis dos ligantes (imidazol no composto **1**, piridina nos compostos **3** e **4**) usualmente se sobrepõe à banda do C=N na isatina.

Os compostos **1**, **2** e **3** apresentaram duas bandas de estiramento C=N próximas à região de 1600 cm^{-1} , conforme esperado (descrito na tabela). O composto **4** apresenta apenas uma banda relativa à imina nessa região (**Figura 11D**), sugerindo que as bandas do anel da isatina e da base de Schiff possam estar envelopadas.

Pode ser observado, em todos os compostos, uma banda indicando uma deformação angular C=C no plano, referente ao anel de isatina, em 1460 cm^{-1} nos compostos **1** e **2**, e 1440 cm^{-1} nos compostos **3** e **4**. Esses últimos têm número de onda menor possivelmente devido à presença dos átomos de bromo.

A banda referente ao estiramento C=O mostrou uma intensidade forte no composto **1**, em 1697 cm^{-1} , como esperado, e foi observada em regiões de número de onda maiores nos compostos **2**, **3** e **4**, com intensidade baixa. É possível que, nesses compostos, a forma enol predomine, deixando a carbonila em concentração menor.

Todos os complexos demonstraram a presença de ânions perclorato não coordenados na região em torno de 1100 cm^{-1} e 620 cm^{-1} .

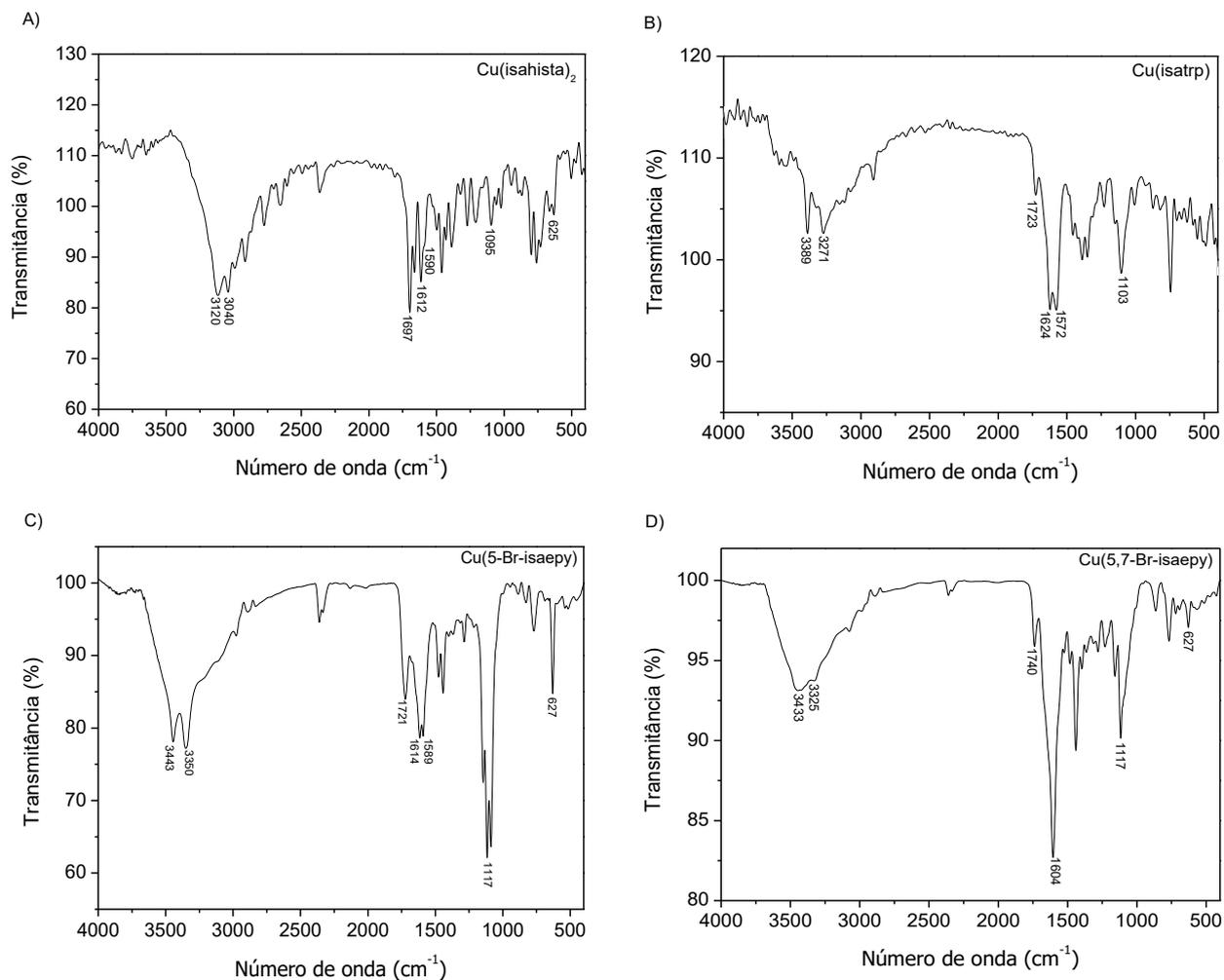


Figura 11 – Espectros na região do infravermelho. **A)** [Cu(*isahista*)₂] (composto **1**); **B)** [Cu(*isatrp*)] (composto **2**); **C)** [Cu(*5-Brisaepy*)] (composto **3**); **D)** [Cu(*5,7-Brisaepy*)] (composto **4**). Todas as amostras foram feitas em KBr com resolução 4 cm⁻¹, as duas primeiras em reflectância difusa e as duas últimas em pastilhas.

Tabela 3 – Bandas características no espectro infravermelho, em cm⁻¹, dos compostos estudados e suas correspondentes atribuições

Composto	vOH	vNH	vC=O	vC=N alifática	vC=N isatina/imidazol	vClO ₄ , δClO ₄
Cu(<i>isahista</i>) ₂ (1)	/	3120, 3040	1697	1590	1612	1095; 625
Cu(<i>isatrp</i>) (2)	3389	3271	1723	1572	1624	1103; 621
Cu(<i>5-Brisaepy</i>) (3)	3443	3350	1721	1589	1614	1117; 627
Cu(<i>5,7-Brisaepy</i>) (4)	3433	3325	1740	1604*	1604*	1117; 627
Cu(<i>isaepy</i>) (5)	-	-	1731	1579	1647	1091

v = deformação axial (estiramento); δ = deformação angular. *bandas sobrepostas.

Os compostos **3** e **4** demonstraram coerência com as atribuições feitas às bandas do análogo [Cu(*isaepy*)], conforme dados da tese do Dr. Ricardo Alexandre Couto.

4.2.3 Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível

A espectroscopia eletrônica ou UV/Vis permite observar bandas de absorção relacionadas a transições eletrônicas em um determinado composto. Nos complexos metálicos, basicamente há três tipos de transição eletrônica: as transições internas dos ligantes, LT ($n \rightarrow \pi$ e $\pi \rightarrow \pi^*$), em que n , π e π^* são os orbitais não ligante, ligante e anti-ligante, respectivamente, ocorrem na região do ultravioleta e são de alta energia. As transições de transferência de carga para o metal, LMCT ($\pi \rightarrow d\pi$), são observadas em bandas na região próxima do visível e são de intensidade um pouco menor. As bandas na região do visível, de intensidade ainda mais baixa, referem-se às transições do metal, d-d, que usualmente não são permitidas pelas regras de Laporte ou de spin.

Para os complexos de base Schiff, as transições LT são referentes aos grupos cromóforos C=N e C=C, e aparecem na região UV até cerca de 300 nm.⁷³ As bandas referentes à transição LMCT aparecem entre 320 e 450 nm, aproximadamente. As bandas d-d costumam aparecer entre 500 e 700 nm.

Para verificar as bandas relativas a esses dois tipos de transição, os complexos foram diluídos a concentrações da ordem de 10^{-5} M, em água, para o composto **1**, em DMSO no caso dos compostos **2** e **3**, e metanol com DMSO 1% para o composto **4**. Para verificar a banda associada à transição d-d, todos compostos foram diluídos a concentrações da ordem de 10^{-3} M em DMSO, com exceção do composto **1**, diluído em água. A observação dessa banda requer uma concentração maior por ser uma transição do tipo proibida de acordo com as regras de seleção (Laporte e spin), ao contrário das outras.

Os espectros foram registrados e plotados utilizando o Programa OriginPro 8.5.0 (OriginLab Corporation) conforme a **Figura 12**, e as medidas de absorvidade foram posteriormente determinadas para os comprimentos de onda encontrados, descritos na **Tabela 4**.

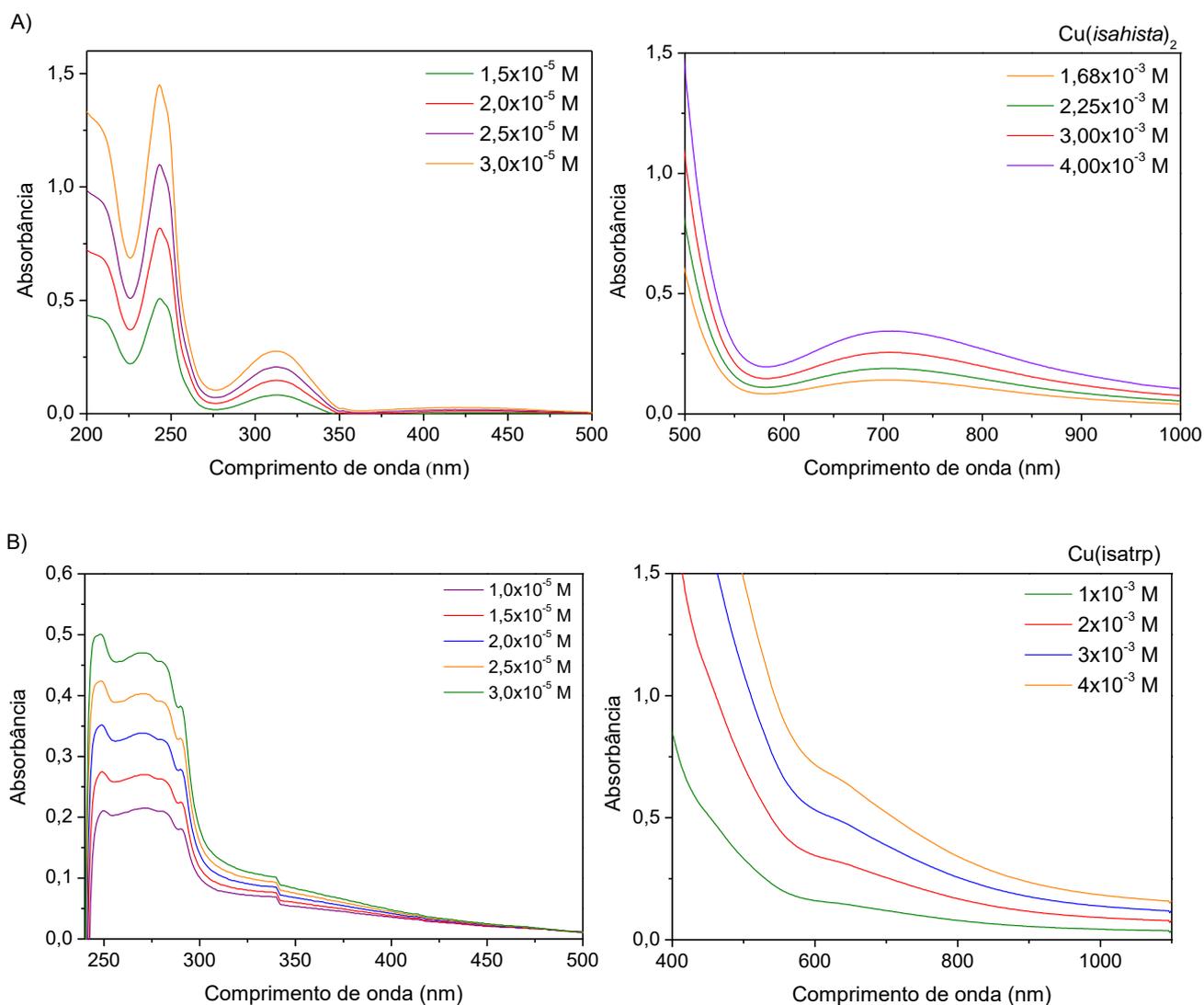


Figura 12 – Espectroscopia na região do UV e luz visível. **A)** [Cu(isahista)₂] (composto 1); **B)** [Cu(isatrp)] (composto 2); **C)** [Cu(5-Brisaepy)] (composto 3); **D)** [Cu(5,7-Brisaepy)] (composto 4). Os gráficos à direita mostram a banda referente à transição d-d.

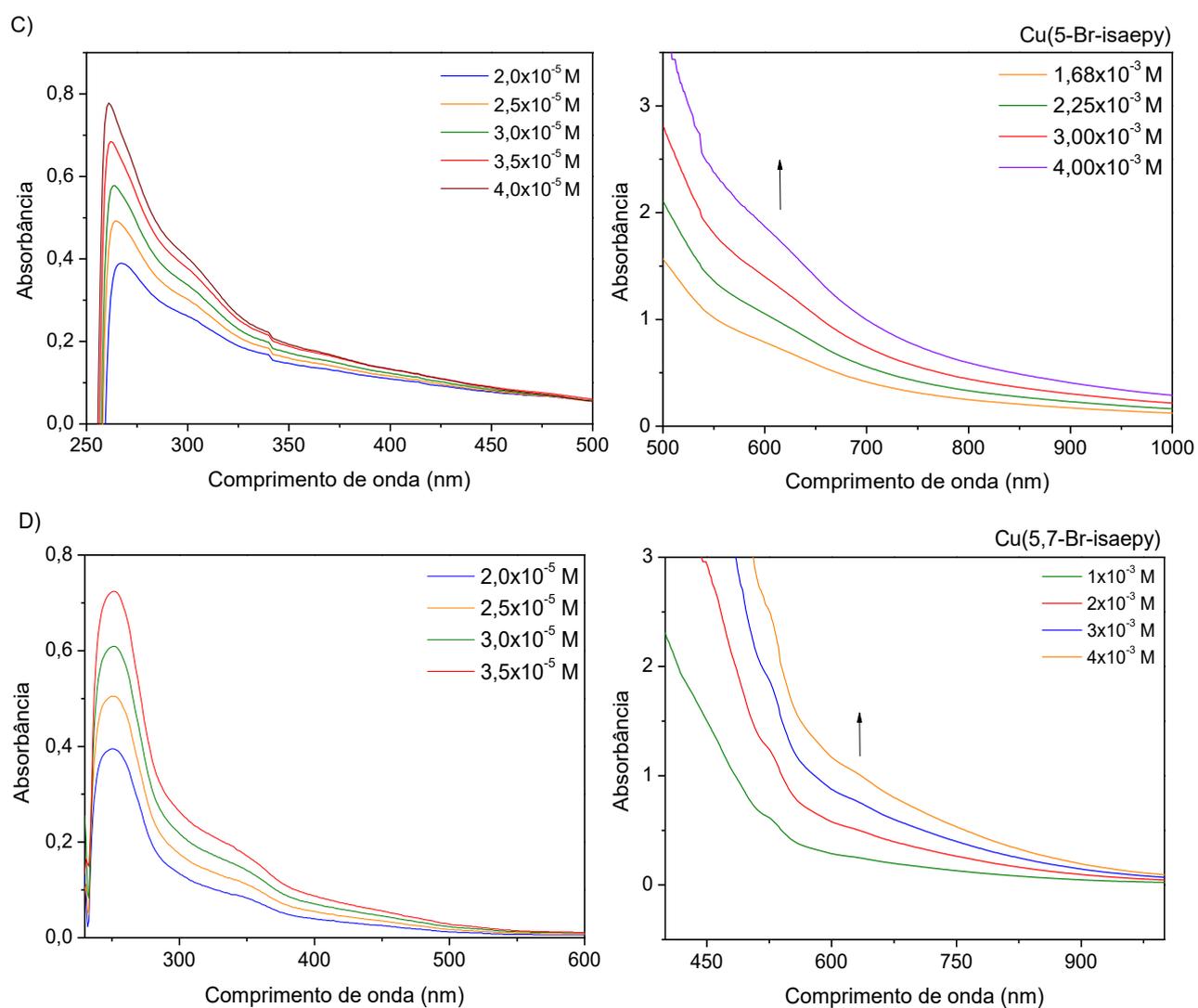


Figura 12 – Espectroscopia na região do UV e luz visível. **A)** $[\text{Cu}(\text{isahista})_2]$ (composto **1**); **B)** $[\text{Cu}(\text{isatrp})]$ (composto **2**); **C)** $[\text{Cu}(5\text{-Brisaepy})]$ (composto **3**); **D)** $[\text{Cu}(5,7\text{-Brisaepy})]$ (composto **4**). Os gráficos à direita mostram a banda referente à transição d-d.

Tabela 4 – Caracterização de bandas observadas (λ_{\max}) e respectivos valores de absorvidade molar (ϵ) para cada um dos compostos.

Composto	$\lambda_{\max}(\text{nm}) / \epsilon (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ das respectivas transições		
	LT	LMCT	d-d
Cu(<i>isahista</i>) ₂ (1)	242 / 6,16x10 ⁴	312 / 1,28x10 ³	706 / 88
Cu(<i>isatrp</i>) (2)	249 / 1,46x10 ⁴	359 / 460*	639 / 168
	270 / 1,29x10 ⁴		
	282 / 1,23x10 ⁴		
	290 / 1,02x10 ⁴		
Cu(5- <i>Brisaepy</i>) (3)	261 / 2,88x10 ⁴	304 / 7,12x10 ³	618 / 429
		372 / 2,9x10 ³ *	
Cu(5,7- <i>Brisaepy</i>) (4)	252 / 2,18x10 ⁴	351 / 5,80x10 ³	634 / 253
Cu(<i>isaepy</i>) (5)	242/1,90x10 ⁴	301/4,01x10 ³	-
	247/1,68x10 ⁴		
	260/8,39x10 ³		

Como esperado, todos os complexos apresentaram as bandas LT entre 200 e 300 nm na região do ultravioleta, com intensidade acima de 10³ M⁻¹ cm⁻¹. Essas bandas foram bem evidentes para os compostos, que contêm grupos aromáticos com iminas além da isatina. Os compostos **2** e **3** apresentaram banda LMCT quando foram caracterizados em meio biológico para teste de interação com DNA, na secção 4.3.2. Os outros compostos apresentaram essas bandas na região e com intensidade esperadas.

As bandas relacionadas às transições d-d apresentam, teoricamente, intensidade de 100 M⁻¹ cm⁻¹, ou menor. Isso foi observado apenas no composto **1**. O complexo **2** ultrapassou esse valor e os valores referentes aos compostos **3** e **4** ficaram muito altos. Os valores de ϵ maiores que 100 M⁻¹ cm⁻¹ indicam perda de centrossimetria da molécula.⁷⁴ A banda referente à transição d-d apareceu de forma sutil para estes compostos.

4.2.4 Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

A técnica de EPR tem capacidade de explorar estruturas com elétrons desemparelhados e é amplamente utilizada para estudar complexos organometálicos contendo íons de metais de transição d.⁷⁵ Essa técnica consiste na aplicação de um campo magnético β_0 que irá produzir uma diferença de energia entre os dois estados de spin eletrônico, $m_s = +1/2$ e $m_s = -1/2$. Essa diferença de energia é dada pela **Equação 8**:

$$\Delta E = g \mu \beta_0$$

Equação 8 – Fórmula da diferença de energia (ΔE) no EPR.

na qual g é a constante giromagnética (em Gauss) influenciada por μ , que é o momento magnético. O valor de g para o elétron livre é 2,0023 e esse valor é deslocado nos compostos devido ao acoplamento spin-orbital. Complexos com metais de transição d apresentam até 3 valores de g diferentes (g_{xx} , g_{yy} e g_{zz}), e isso depende da simetria de distribuição de spin (ou seja, da simetria do ambiente ligante), que irá influenciar o espectro. Os espectros podem indicar simetria isotrópica (valores iguais de g para os eixos x , y e z), axial (dois valores iguais e um diferente) ou rômbrica (todos os valores de g diferentes).⁷⁶

O desdobramento mais observado no espectro de EPR, no caso de complexos metálicos, é o do próprio íon metálico, denominado estrutura hiperfina, que contém uma constante A . Essa estrutura ocorre devido ao acoplamento de spin eletrônico e o spin nuclear. O núcleo com spin I divide-se em um número de linhas equivalentes a $2I + 1$ na mesma intensidade⁷⁶. O íon de cobre tem momento nuclear $I = 3/2$, portanto, em seu espectro cada linha poderá se desdobrar em 4 linhas.

A constante hiperfina, assim como g , pode ter até 3 valores distintos em A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} . Em alguns casos, os compostos apresentam um sistema molecular de simetria axial, portanto possuem 2 valores distinguíveis de A e g , designados paralelo ($//$) e perpendicular (\perp), em que: $g_{//} = g_{zz}$ e $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$. Analogamente, $A_{//} = A_{zz}$ e $A_{\perp} = A_{xx} = A_{yy}$. O valor de A_{\perp} é possível de ser determinado apenas a temperaturas mais baixas (He líquido ou 3K). A chamada estrutura superhiperfina indica desdobramentos devido a átomos no ligante com spin nuclear, por exemplo, N ($I=1$) ou H ($I=1/2$).

A razão empírica $g_{//}/A_{//}$, em cm, permite verificar distorções na geometria dos ligantes ao redor do metal. Estudos semi-empíricos descritos na literatura mostram uma correlação entre esse parâmetro $g_{//}/A_{//}$ e o grau de distorção tetraédrica numa estrutura tetragonal. Valores desta relação foram comparados para compostos simples, de geometria bem conhecida, com aqueles determinados em proteínas de cobre, e esse quociente se mostrou conveniente para tal designação.⁷⁷ Valores de $g_{//}/A_{//}$ mais baixos (entre 100 e 150) indicam geometria tetragonal ou quadrado planar, e com valores mais altos (até 250) a geometria é considerada cada vez mais tetraédrica, isto é, tem-se graus crescentes de distorção tetraédrica numa geometria tetragonal. Um valor intermediário sugere alguma distorção tetraédrica, em que o metal não faz coordenações exatamente no plano, e nem a 109° .

A relação $g_{\parallel}/A_{\parallel}$ tem sido então utilizada para caracterizar a geometria do íon cobre em compostos miméticos de proteínas, como a superóxido dismutase,⁷⁸ e permite verificar o grau de distorção tetraédrica num complexo de cobre com configuração tetragonal.⁷⁷ Isto decorre do fato de compostos de Cu(I) preferirem configuração tetraédrica, enquanto compostos de Cu(II) apresentarem preferencialmente configuração tetragonal ou quadrado planar.

Os espectros de EPR registrados a 77K, em solução congelada (etanol/água ou DMSO) estão mostrados abaixo, na **Figura 13**. Não foram incluídos os dados de EPR no estado sólido.

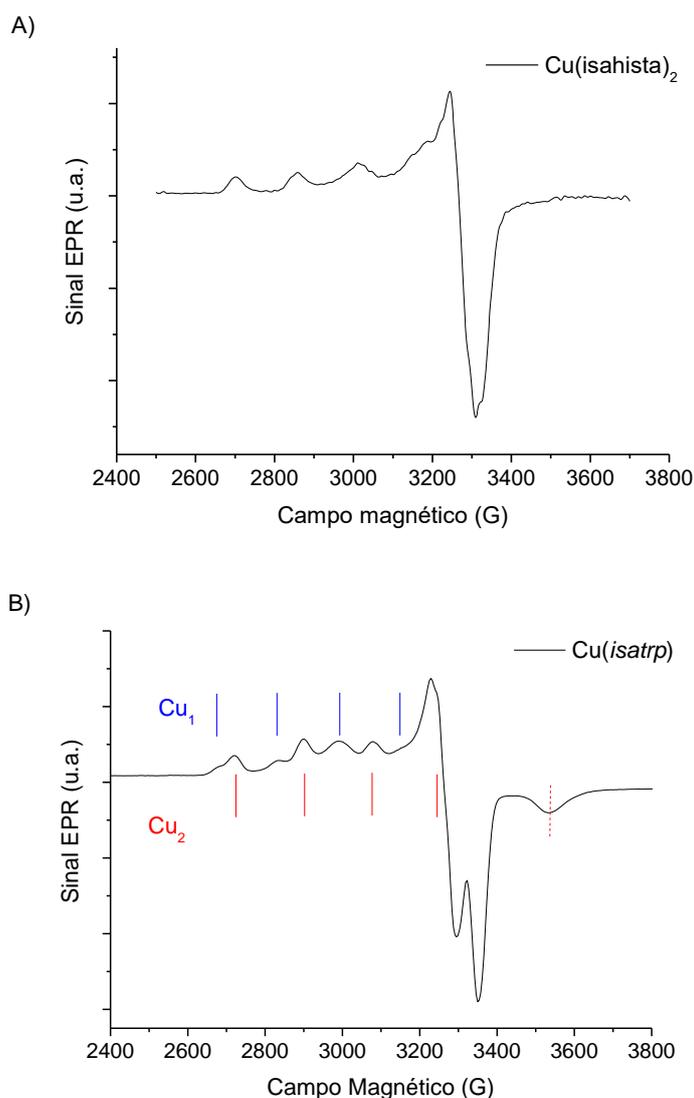


Figura 13 – Espectros de EPR dos compostos em solução a 77K. **A)** $[\text{Cu(isahista)}_2]$ (1) em água/etanol; **B)** $[\text{Cu(isatrp)}]$ (2) em DMSO/etanol; **C)** $[\text{Cu(5-Brisaepy)}]$ (3) em DMSO; **D)** $[\text{Cu(5,7-Brisaepy)}]$ (4) em DMSO.

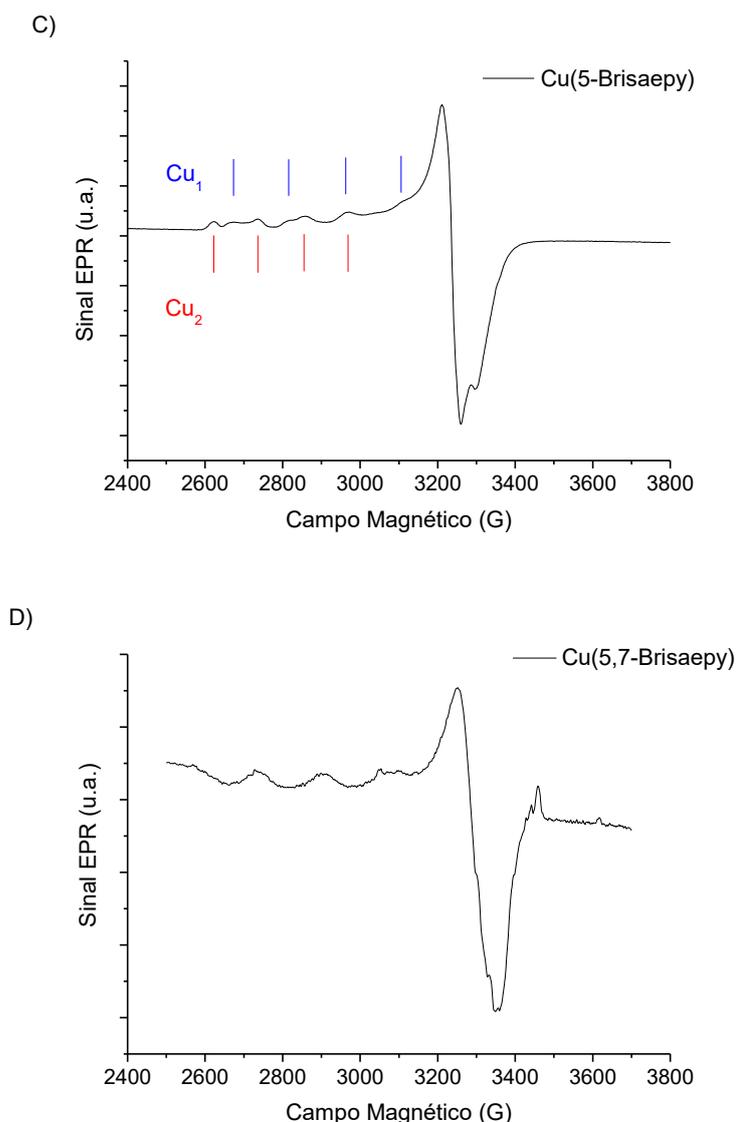


Figura 13 – Espectros de EPR dos compostos em solução a 77K. **A)** $[\text{Cu}(\text{isahista})_2]$ (**1**) em água/etanol; **B)** $[\text{Cu}(\text{isatrp})]$ (**2**) em DMSO/etanol; **C)** $[\text{Cu}(5\text{-Brisaepy})]$ (**3**) em DMSO; **D)** $[\text{Cu}(5,7\text{-Brisaepy})]$ (**4**) em DMSO.

Os espectros demonstram que todos os compostos apresentam simetria axial em solução, com valores de g_{\parallel} maiores que g_{\perp} , indicando que o elétron desemparelhado está localizado num orbital $d_{x^2-y^2}$. Os compostos **1**, **2** e **4**, assim como $[\text{Cu}(\text{isaepy})]$, apresentaram geometria tetragonal, com a relação $g_{\parallel}/A_{\parallel}$ menor que 150 cm, conforme a **Tabela 5**.

O composto **3**, com duas espécies de cobre, foi o único a demonstrar distorção tetraédrica mais significativa: uma das espécies encontra-se com uma pequena tendência a distorção tetraédrica ($g_{\parallel}/A_{\parallel} = 147$ cm), e outra se encontra em distorção tetraédrica mais acentuada ($g_{\parallel}/A_{\parallel} = 186$ cm). A presença de duas espécies de cobre também foi observada para o composto **2**, único a apresentar uma espécie de cobre com simetria rômbrica, apresentando um terceiro valor de $g_3 = 1,973$.

Tabela 5 – Valores dos parâmetros do tensor g e das constantes hiperfinas, A, dos complexos em solução congelada, a T = 77 K.

Composto	g_{\perp} (G)	g_{\parallel} (G)	A_{\parallel} (G)	$A_{\parallel} (\times 10^{-4} \text{cm}^{-1})$	g_3	$g_{\parallel} / A_{\parallel}$ (cm)
Cu(<i>isahista</i>) ₂ (1)	2,077	2,311	154	167	-	138
Cu(<i>isatrp</i>) (2) Cu₁ (enol)	2,077	2,265	180	190	-	119
Cu(<i>isatrp</i>) (2) Cu₂ (ceto)	2,077	2,335	154	168	1,973	139
Cu(5- <i>Brisaepy</i>) (3) Cu₁ (enol)	2,091	2,341	146	160	-	147
Cu(5- <i>Brisaepy</i>) (3) Cu₂ (ceto)	2,091	2,422	115	130	-	186
Cu(5,7- <i>Brisaepy</i>) (4)	2,061	2,272	165	175	-	130
Cu(<i>isaepy</i>) (5)	2,065	2,259	175	186	-	121

A presença de duas espécies reflete provavelmente o equilíbrio ceto-enólico envolvendo as formas tautoméricas do grupamento oxindólico (**Figura 14**). A forma enol deve ser a mais tetragonal e a forma ceto a que se apresenta com maior distorção tetraédrica.

Estas características estruturais terão influência na reatividade dos complexos frente a biomoléculas.

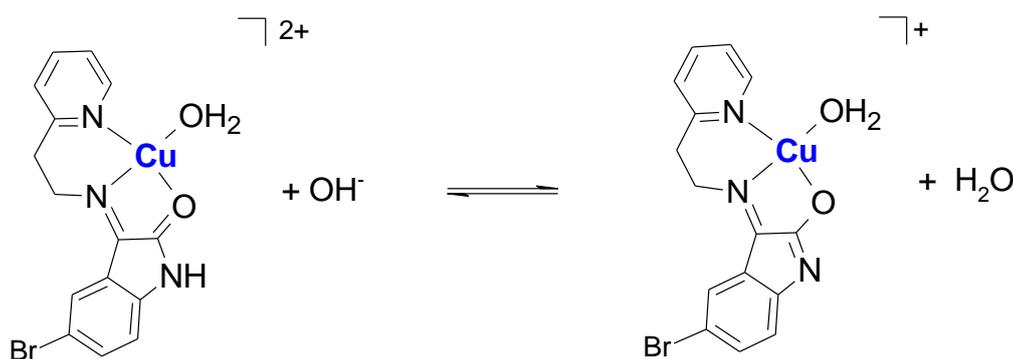


Figura 14 – Exemplo de equilíbrio ceto-enólico com o [Cu(5-*Brisaepy*)]

4.3 Testes de atividade biológica

Os testes de atividade biológica dos complexos produzidos foram realizados concomitantemente com [Cu(*isaepy*)].

4.3.1 Ensaio MTT

O ensaio MTT permitiu testar a toxicidade dos compostos sintetizados frente a células de sarcoma uterino de duas linhagens, sendo uma sensível à doxorrubicina (MES-SA), e outra, resistente (MES-SA/Dx5). Ainda, os compostos foram testados em células saudáveis (fibroblasto humano P4), para efeito de comparação com as linhagens tumorais. A doxorrubicina é uma droga antitumoral da classe das antraciclina, e seu principal mecanismo de ação é a intercalação com o DNA.⁷⁹ As células de sarcoma resistentes a essa droga apresentam superexpressão de P-glicoproteína, um transportador codificado pelo gene MDR1 (*multi drug resistance 1*) responsável por bombear para fora da célula a doxorrubicina e outras drogas com a mesma finalidade, tornando-a multirresistente a terapias antitumorais.⁸⁰ As células MES-SA/Dx5 foram obtidas a partir da linhagem sensível por meio de exposição prolongada dessas células à doxorrubicina (0,5 μM).⁸¹

Os compostos **1** e **2** foram testados entre 25 e 150 μM , em meio de cultura puro e DMSO 1%, respectivamente. Os compostos **3** e **4** foram testados junto ao análogo não bromado [Cu(*isaepy*)] em meio de cultura com DMSO 2,5% entre as concentrações 5 e 75 μM . Utilizou-se o meio McCoy's para as células de sarcoma e meio DMEM para os fibroblastos e células HeLa. Após a leitura das placas e o registro dos dados em Excel, foi extraída a média de células viáveis a cada concentração, em relação à média dos valores de controle, bem como seu desvio médio. A partir da equação de dose-resposta (função sigmoidal) foi determinado o IC₅₀ no programa OriginPro 8.5.0 (Origin Lab Corporation). Cada ensaio foi feito em triplicata, e a **Tabela 6** mostra a média dos resultados obtidos.

Tabela 6 – Valores de IC₅₀ (μM) dos complexos de cobre para as linhagens celulares testadas.

Composto	MES-SA	MES-SA/Dx5	Fibro P4	HeLa
Cu(<i>isahista</i>) ₂ (1)	52,2 ± 8,7	105,3 ± 1,6	85,6 ± 7,4	-
Cu(<i>isatrp</i>) (2)	> 150	> 150	-	-
Cu(5- <i>Brisaepy</i>) (3)	33,3 ± 7,3	21,3 ± 3,5	35,2 ± 0,6	-
Cu(5,7- <i>Brisaepy</i>) (4)	21,4 ± 2,7	11,5 ± 0,6	20,2 ± 1,9	33,4 ± 3,0
Cu(<i>isaepy</i>) (5)	19,7 ± 1,8	12,4 ± 0,4	36,7 ± 8,4	29,3 ± 6,9

O composto **1** mostrou uma diferença significativa entre as células sensíveis e resistentes à doxorrubicina (52,2 ± 8,7 e 105,3 ± 1,6 μM , respectivamente). Isso demonstra que o composto provavelmente foi bombeado para fora das células pela P-glicoproteína, ficando em menor concentração dentro da célula e, portanto, exigindo maior concentração

para efetuar o mesmo dano. Pode-se concluir que o composto **2** não apresenta atividade citotóxica mensurável, por não ter afetado nenhuma linhagem de células em 50%, nem na concentração mais elevada utilizada (>150 μM). Dessa forma, não foram realizados testes com outras linhagens de células.

Surpreendentemente, os complexos $[\text{Cu}(\textit{isaepy})]$ (composto **5**) e seus derivados bromados (compostos **3** e **4**) apresentaram toxicidade maior nas células resistentes a doxorrubicina (MES-SA/Dx5) que nas não-resistentes. Esse dado é um indicativo de que esses compostos não sofrem ação da P-glicoproteína e permanecem na célula. Isso se deve à possibilidade dessas linhagens não terem como diferença única e exclusiva a superexpressão da P-glicoproteína, pois em um processo de exposição à doxorrubicina para ganhar resistência, as células sofrem estresse, o que leva ao surgimento de mutações não intencionais. Esse comportamento tem se repetido em nossos estudos com diversos complexos de cobre com ligantes derivados de oxindóis. Como a resistência é induzida baseada em formação de EROs (com a doxorrubicina) e ataque oxidativo a biomoléculas, isto pode ser indicativo que o mecanismo principal de sua ação antitumoral é diferente ou que estes complexos atuam por diversos mecanismos.

A diferença mais significativa de citotoxicidade entre MES-SA e Fibroblasto P4 ocorreu para o composto **1**, podendo-se inferir que esse complexo poderia ser usado para células sensíveis a doxorrubicina. Os compostos **3** e **4** demonstraram ausência de seletividade entre essas duas linhagens, ao contrário do $[\text{Cu}(\textit{isaepy})]$, e também não demonstraram aumento significativo na atividade antitumoral ao serem bromados. Esse resultado é o contrário do esperado ao se comparar as isatinas com seus análogos de bromo, em que o IC_{50} cai ao menos 6,8 vezes.⁶⁵ Uma hipótese para esse fenômeno é o modo de ligação do composto ao DNA. Enquanto $[\text{Cu}(\textit{isaepy})]$ é intercalante,⁴²⁴² a isatina liga-se a cavidades.⁸² Portanto, para os complexos testados, a adição de halogênios ao ligante indólico não surte efeito significativo.

O composto **4** e o $[\text{Cu}(\textit{isaepy})]$, por apresentarem valores menores de IC_{50} , foram testados com células HeLa. Nota-se que $[\text{Cu}(\textit{isaepy})]$ ainda é o composto que apresenta praticamente o mesmo valor de IC_{50} para os fibroblastos e para as células HeLa.

4.3.2 *Teste de interação com DNA através de espectroscopia eletrônica*

O DNA comumente é o alvo farmacológico preferencial de muitas metalodrogas antitumorais, pois essas podem interagir com o DNA, prejudicando sua replicação e,

consequentemente, impedindo a divisão celular. Os complexos metálicos antitumorais podem apresentar interação covalente com o DNA, como a cisplatina, ou interação não covalente. Essa última tem sido considerada menos citotóxica e ocorre de formas distintas, como intercalação, ligação às alças (*grooves*) do DNA (regiões que permitem um maior número de conformações de ligação para um mesmo composto), ou interação eletrostática externa ao DNA.⁸³

Os agentes intercalantes são tipicamente compostos planares heterocíclicos, e têm como exemplos a doxorrubicina e o brometo de etídio. Na técnica de espectroscopia na região do UV/visível pode-se verificar esse tipo de interação através da titulação com DNA. Os espectros geralmente apresentam hipocromismo combinado com batocromismo (*red shift*) conforme a concentração de DNA aumenta, devido à forte interação causada pelo empilhamento entre os cromóforos e as bases de DNA.⁸⁴ O grau de hipocromismo é, geralmente, proporcional à força de interação na intercalação.⁸⁵

Compostos que se ligam às cavidades do DNA costumam gerar apenas hipocromismo, como no caso da isatina⁸⁶, precursor dos ligantes estudados.

A **Figura 15** mostra os espectros obtidos na titulação com DNA dos compostos sintetizados e do [Cu(*isaepy*)], para comparação.

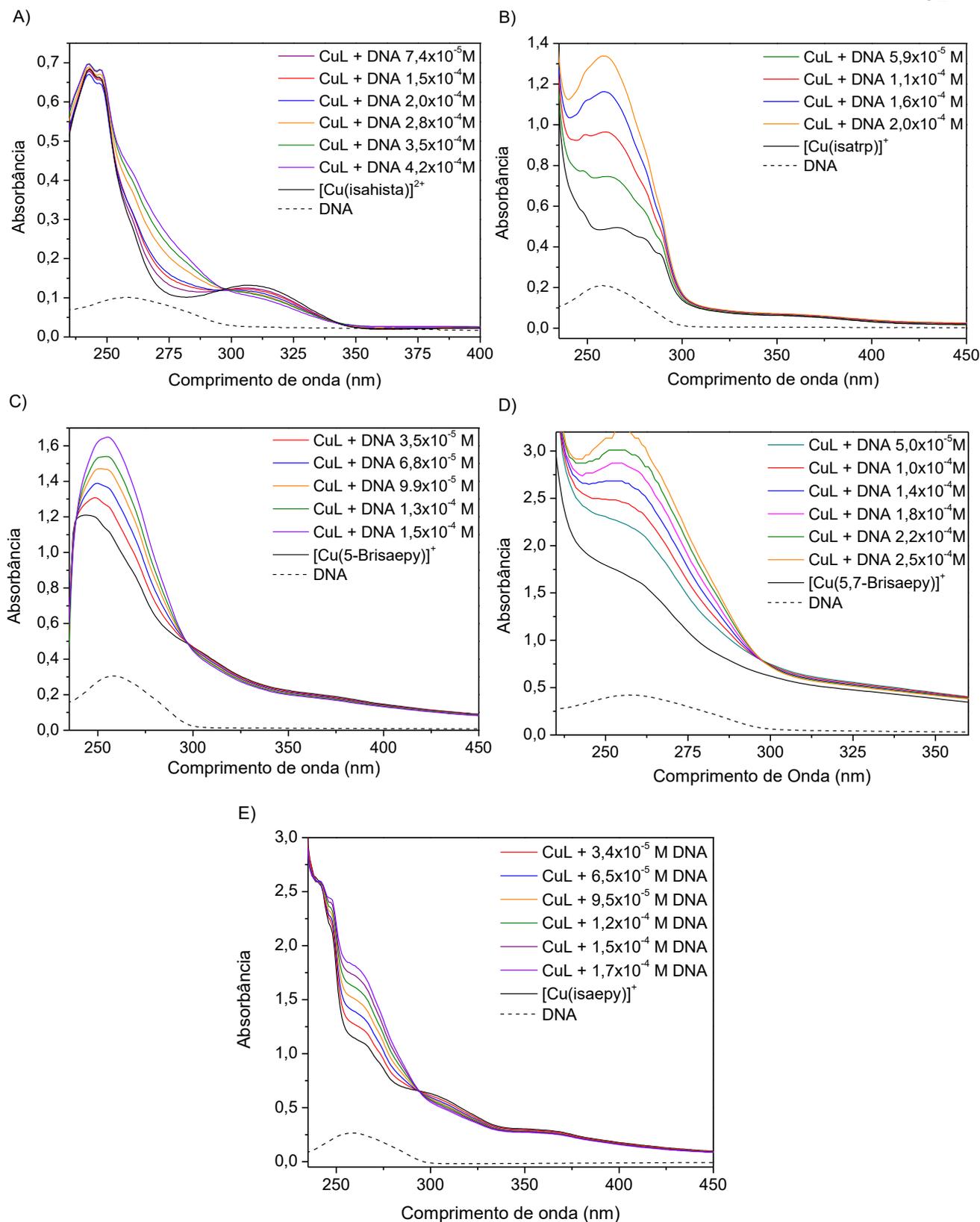
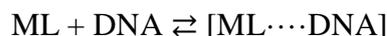


Figura 15 – Espectros de absorção da titulação dos complexos com DNA em PBS. A) $[Cu(isahista)_2]$ (1); B) $[Cu(isatrp)]$ (2); C) $[Cu(5-Brisaepy)]$ (3); D) $[Cu(5,7-Brisaepy)]$ (4). E) $[Cu(isaepy)]$ (5).

Nota-se nestes espectros a presença de pontos isobésticos, que demonstram a ocorrência de reações químicas, com formação de novas espécies:



Equação 9 – Processo de interação dos compostos com DNA.

Com exceção do composto **2**, os complexos apresentaram hipocromismo na região acima de 300 nm, aproximadamente, sendo um indicativo de intercalação ou interação nas cavidades do DNA. Uma explicação para o composto **2** ter demonstrado apenas hipercromismo é o estabelecimento de apenas uma interação eletrostática externamente à estrutura do DNA⁸³, provavelmente com os grupos fosfato.

A partir dos espectros registrados, pode-se determinar a constante de ligação do composto ao DNA, K_b , através da seguinte equação:

$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\varepsilon_a}{\varepsilon_f - \varepsilon_a} + \frac{\varepsilon_a}{\varepsilon_f - \varepsilon_a} \times \frac{1}{K_b [DNA]}$$

Equação 10 – Equação de Benesi-Hildebrand⁸⁷

na qual A_0 e A são as absorvâncias do complexo livre e com DNA, respectivamente, e ε_f e ε_a são os coeficientes de absorção da droga livre em água e a droga complexada com DNA, respectivamente. A constante K_b pode ser encontrada, então, construindo-se um gráfico $[DNA]$ vs. $[DNA]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ (cálculos demonstrados em apêndice) e encontrando-se a razão entre a declividade da reta e o coeficiente linear. As constantes calculadas encontram-se na **Tabela 7**:

Tabela 7 – Constante de interação com DNA calculada para os complexos de cobre

Composto	K_b (M^{-1})
Cu(<i>isahista</i>) ₂ (1)	$3,3 \times 10^5$
Cu(<i>isatrp</i>) (2)	$2,2 \times 10^3$
Cu(5- <i>Brisaepy</i>) (3)	$2,1 \times 10^4$
Cu(5,7- <i>Brisaepy</i>) (4)	$2,4 \times 10^4$
Cu(<i>isaepy</i>) (5)	$3,9 \times 10^4$

Como esperado, a série *isaepy* apresentou constantes de associação ao DNA muito próximas, da ordem de 10^4 . O composto **2** como previsto, foi o que apresentou a menor constante de interação. O composto **1** demonstrou o maior K_b , na ordem de 10^5 .

Pivetta e colaboradores recentemente desenvolveram complexos de cobre(II) com derivados de cumarina, e obtiveram espectros muito semelhantes quando titulados com CT-DNA – a presença de hipocromismo, sem *red shift*, e de um ponto isobéptico perto de 300 nm. Foi mostrado através de estudos de docking molecular que os complexos, de K_b em 10^5 , teriam interações com anéis das bases, mas não chegariam a intercalar.⁸⁸

Valores parecidos de constantes de interação têm sido observados também para compostos intercalantes: complexos de cobre com ligantes derivados de benzimidazol^{89,90} e terpiridina⁹¹ foram titulados com CT-DNA e apresentaram hipocromismo e *red shift* com uma constante de ligação da ordem de 10^4 a 10^5 . Esses ainda são números relativamente baixos, comparados a intercalantes clássicos como o brometo de etídeo ($K_b = 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$).⁹² É possível que esses compostos, assim como os sintetizados nesse trabalho, se intercalem ao DNA parcialmente, além de poderem interagir também nas alças (*grooves*). A técnica de dicroísmo circular, a seguir, é uma tentativa de elucidar essa questão.

4.3.3 *Teste de interação com DNA através de dicroísmo circular*

A espectroscopia do dicroísmo circular é uma técnica que mede a diferença de absorção entre as duas rotações de luz circularmente polarizada em uma molécula quiral. Desse modo, ela é útil no estudo da interação entre drogas e biomoléculas como proteínas e DNA.⁹³

Oligonucleotídeos de diferentes formas de DNA (A, B, ou Z-DNA) apresentam espectros diferentes de dicroísmo circular. No caso do CT-DNA, da forma B, forma-se uma banda positiva em torno de 275 nm, devido ao empilhamento das bases, e uma banda negativa em 245 nm, devido à helicidade.⁹⁴ Logo, mudanças no espectro de dicroísmo circular mostram que essas propriedades foram perturbadas.

Os compostos em estudo tiveram os espectros registrados em espectropolarímetro Jasco J-720 entre 300 e 200 nm. Os compostos, com boa solubilidade apenas em DMSO (exceto o composto **1**, solúvel em água) foram testados variando-se a concentração de DNA, ao invés dos complexos, para não saturar o polarímetro em maiores concentrações de DMSO.

Dessa forma, foi feita uma curva de calibração de CT-DNA (**Figura 16**), para que as intensidades das bandas fossem posteriormente corrigidas.

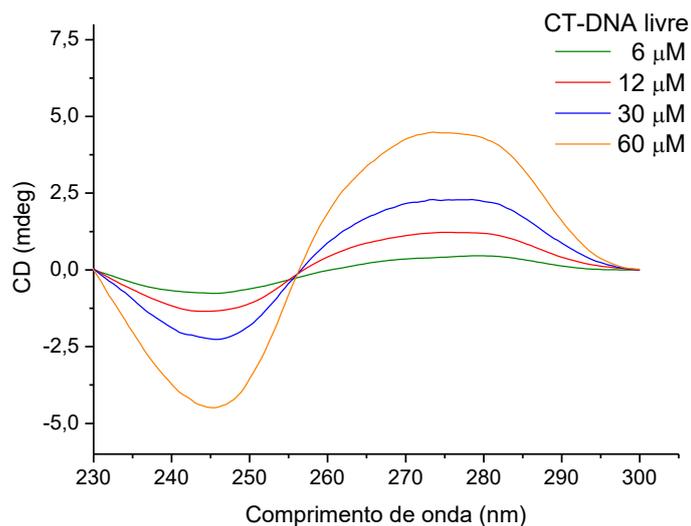


Figura 16 – Dicroísmo circular de CT-DNA livre em PBS.

Os espectros finais (E_f) foram determinados relacionando-se os valores dos espectros DNA-complexo (DNA_{co}) e DNA-calibração (DNA_{ca}) nas concentrações em que $x = 6, 12$ ou $30 \mu\text{M}$, e multiplicando-se pelos valores da curva de DNA livre na concentração de $60 \mu\text{M}$, conforme a equação abaixo:

$$E_f = \frac{DNA_{co_x}}{DNA_{ca_x}} \cdot DNA_{ca_{60}}$$

Equação 11 – Cálculo para ajuste de espectros com base em curva de calibração do DNA.

Os resultados se encontram na **Figura 17**, abaixo.

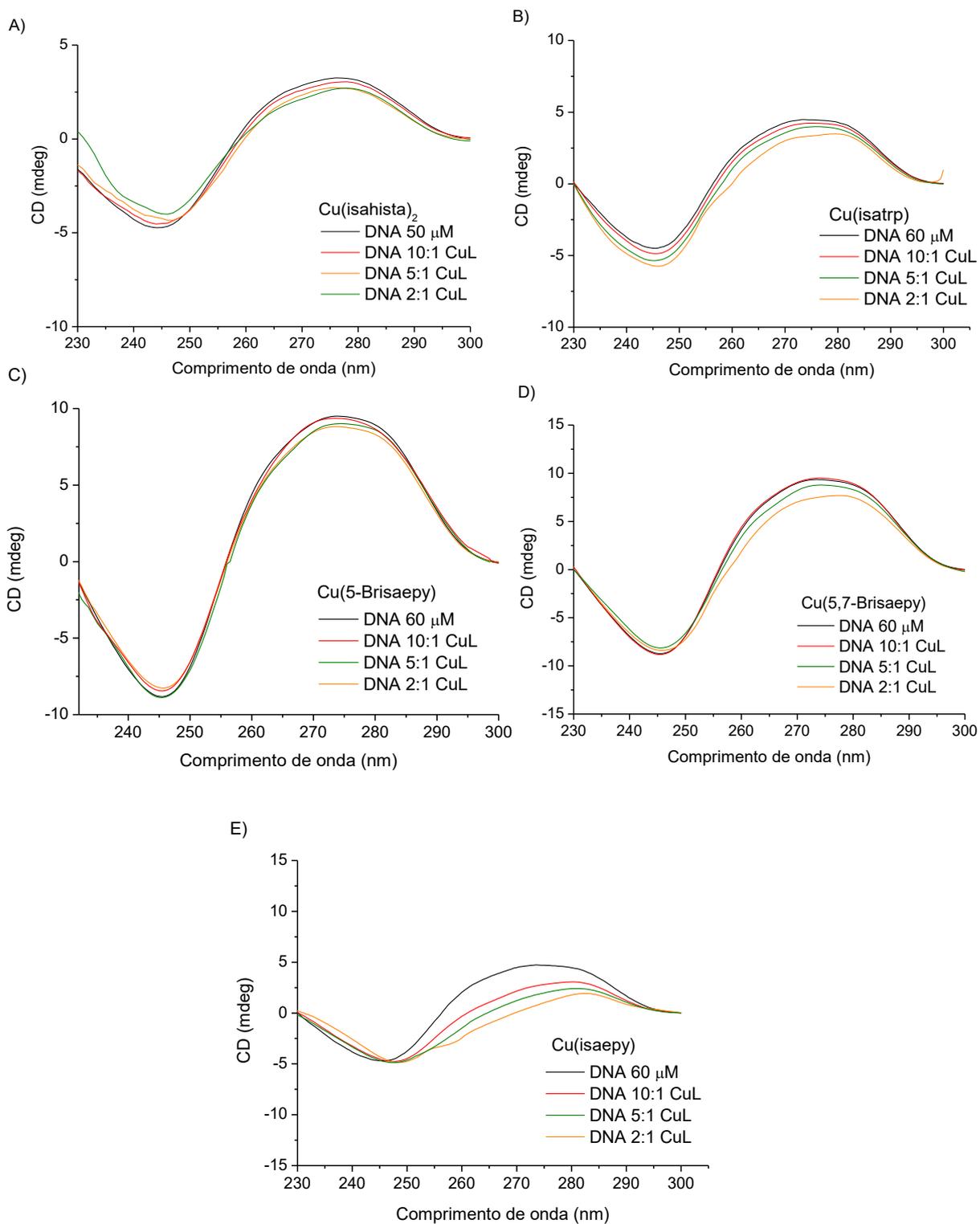


Figura 17 – Dicroísmo circular dos compostos com CT-DNA. **A)** $[\text{Cu}(\text{isahista})_2]$ (1); **B)** $[\text{Cu}(\text{isatrp})]$ (2); **C)** $[\text{Cu}(5\text{-Brisaepy})]$ (3); **D)** $[\text{Cu}(5,7\text{-Brisaepy})]$ (4). **E)** $[\text{Cu}(\text{isaepy})]$ (5). Os compostos foram solubilizados em DMSO e diluídos em PBS.

Observam-se poucas alterações nos espectros dos gráficos **A** a **C**, isso sugere que o modo de interação com o DNA seja eletrostática (com grupos fosfatos) ou nas cavidades. Moléculas que interagem nas cavidades do DNA tendem a diminuir as intensidades dos espectros em ambas as bandas, aproximando-se do nível zero, como no caso da própria isatina.⁸⁶

O complexo que mais altera a estrutura do DNA é o $[Cu(isaepy)]$ (**5**), que demonstra uma significativa diminuição da intensidade da banda positiva, ou seja, no empilhamento das bases, além de um *red shift* ocorrido na banda negativa (helicidade) quando houve adição de complexo. Além de diminuição no empilhamento, espectros em que houve um deslocamento de comprimento de onda são indicativos de intercalação.^{91,95}

4.3.4 Teste de clivagem de DNA

As bases de Schiff já estudadas têm como mecanismo de ação a clivagem oxidativa de DNA.⁴² Para que esses complexos ajam como “nucleases”, é necessária a utilização de um agente redutor no meio, como ascorbato ou peróxido de hidrogênio.

As bandas encontradas nas imagens de eletrofose se referem às diferentes formas de DNA plasmidial (**Figura 18**).

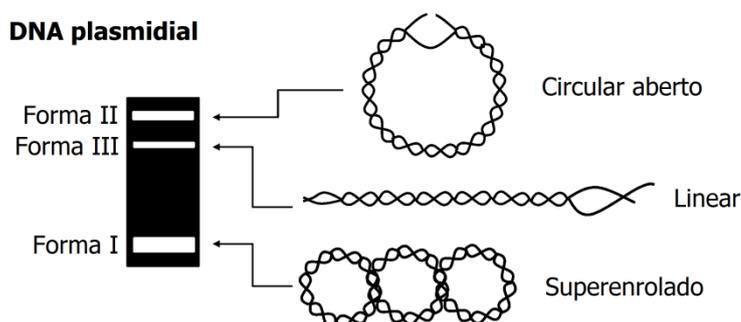


Figura 18 – Formas de DNA plasmidial

A forma I é referente ao DNA superenrolado, ou seja, o plasmídeo íntegro. A forma II, ou forma relaxada, ou circular aberta, ocorre quando uma das fitas do plasmídeo é clivada, fazendo com que a migração do DNA no gel seja mais demorada. A forma III, ou forma linear, é formada após clivagem da dupla fita, e aparece no gel entre as formas I e II.

Os resultados encontram-se nas **Figuras 19 a 23**.

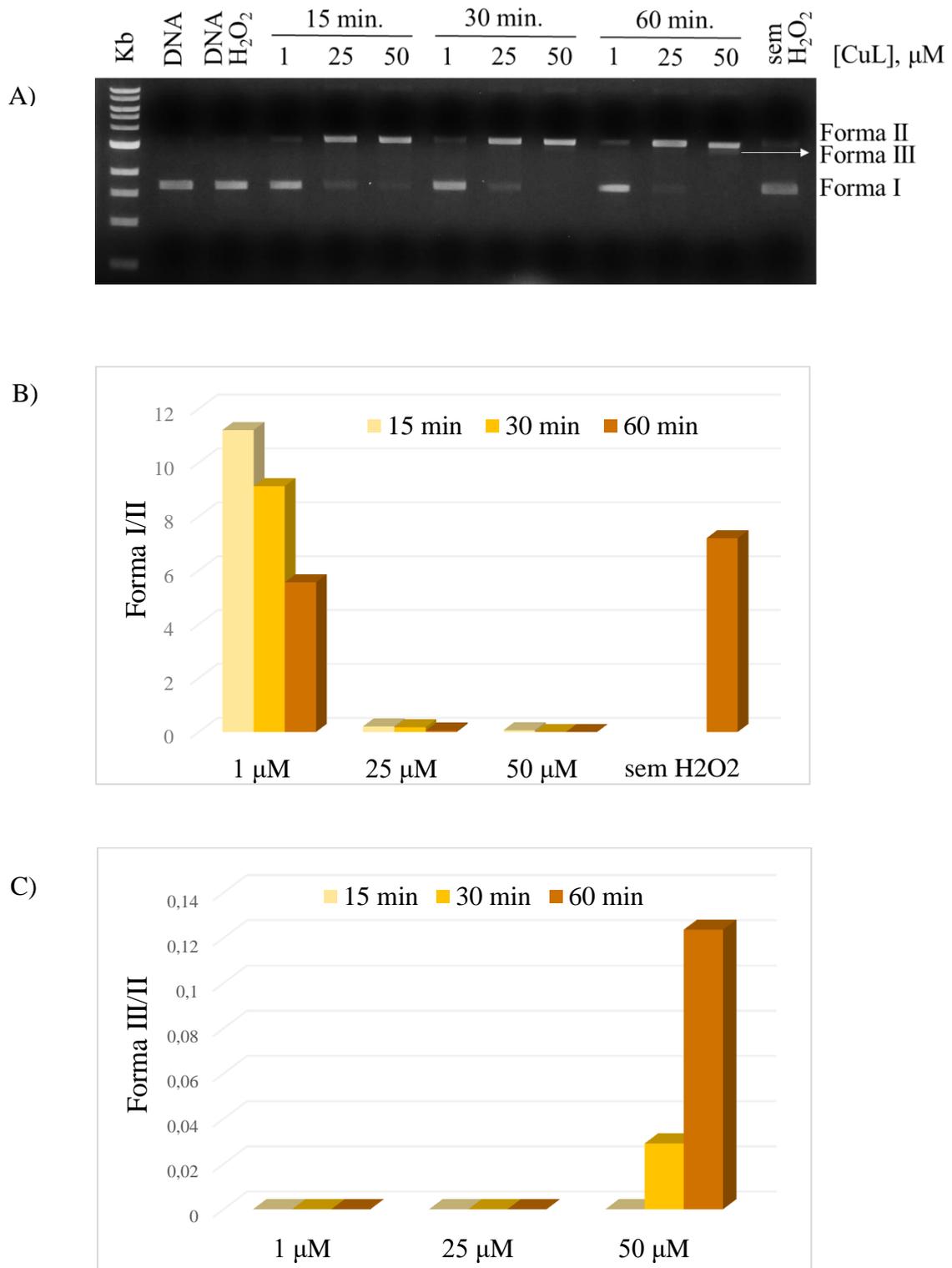


Figura 19 – Resultados da clivagem de pBlueScript II para o composto $[\text{Cu}(\text{isahista})_2]$ (1). A) Eletroforese em gel de agarose 1%. Canaletas: Marcador molecular (Kb), controle DNA plasmidial (DNA), DNA plasmidial com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) controle com incubação a $50\mu\text{M}$ por 60 minutos (sem H_2O_2). As concentrações de CuL e intervalos de tempo estão indicados na figura. B) Razão entre a forma I e a forma II do DNA, segundos as bandas do gel. C) Razão entre a forma III e a forma II do DNA.

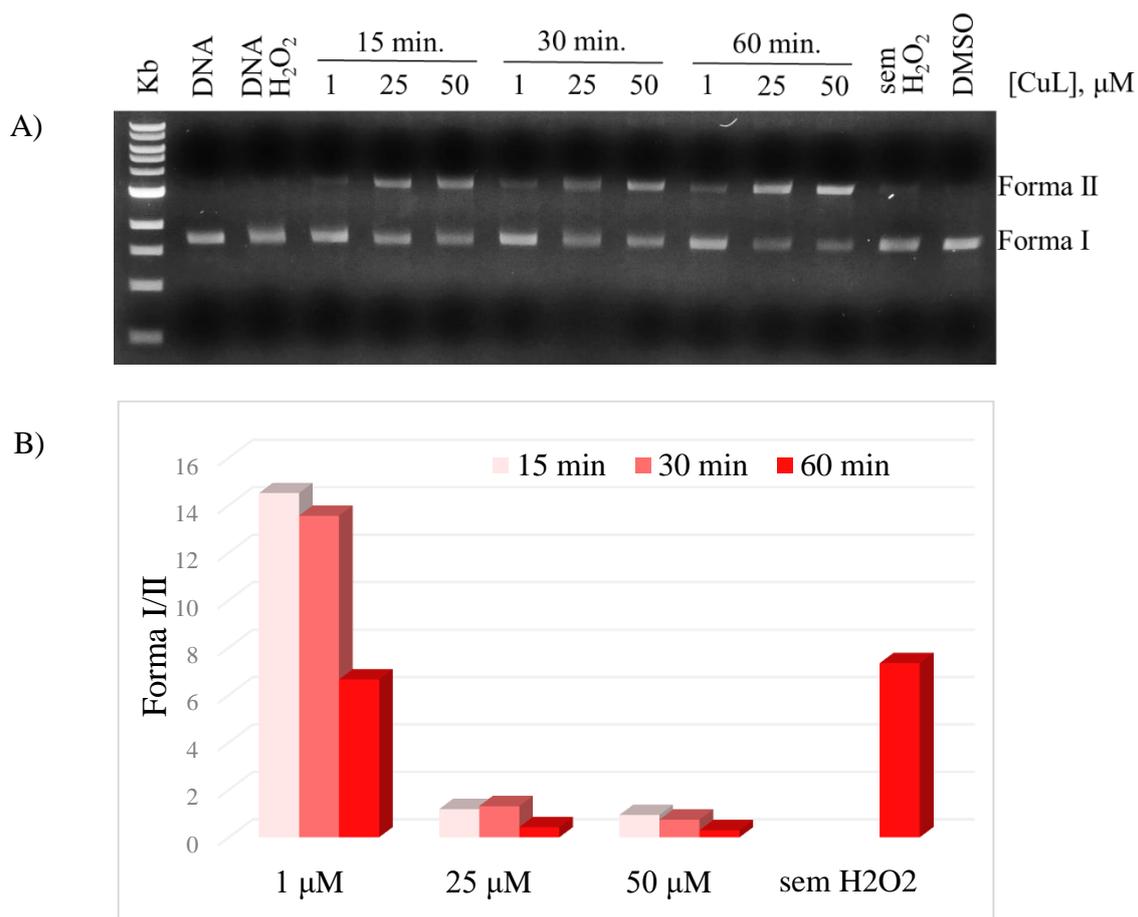


Figura 20 – Resultados da clivagem de pBlueScript II para o composto [Cu(*isatrp*)] (2). A) Eletroforese em gel de agarose 1%. Canaletas: Marcador molecular (Kb), controle DNA plasmidial (DNA), DNA plasmidial com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) controle com incubação a 50 μ M por 60 minutos (sem H₂O₂), controle DNA plasmidial com DMSO 5% (DMSO). As concentrações de CuL e intervalos de tempo estão indicados na figura. B) Razão entre a forma I e a forma II do DNA, segundos as bandas do gel.

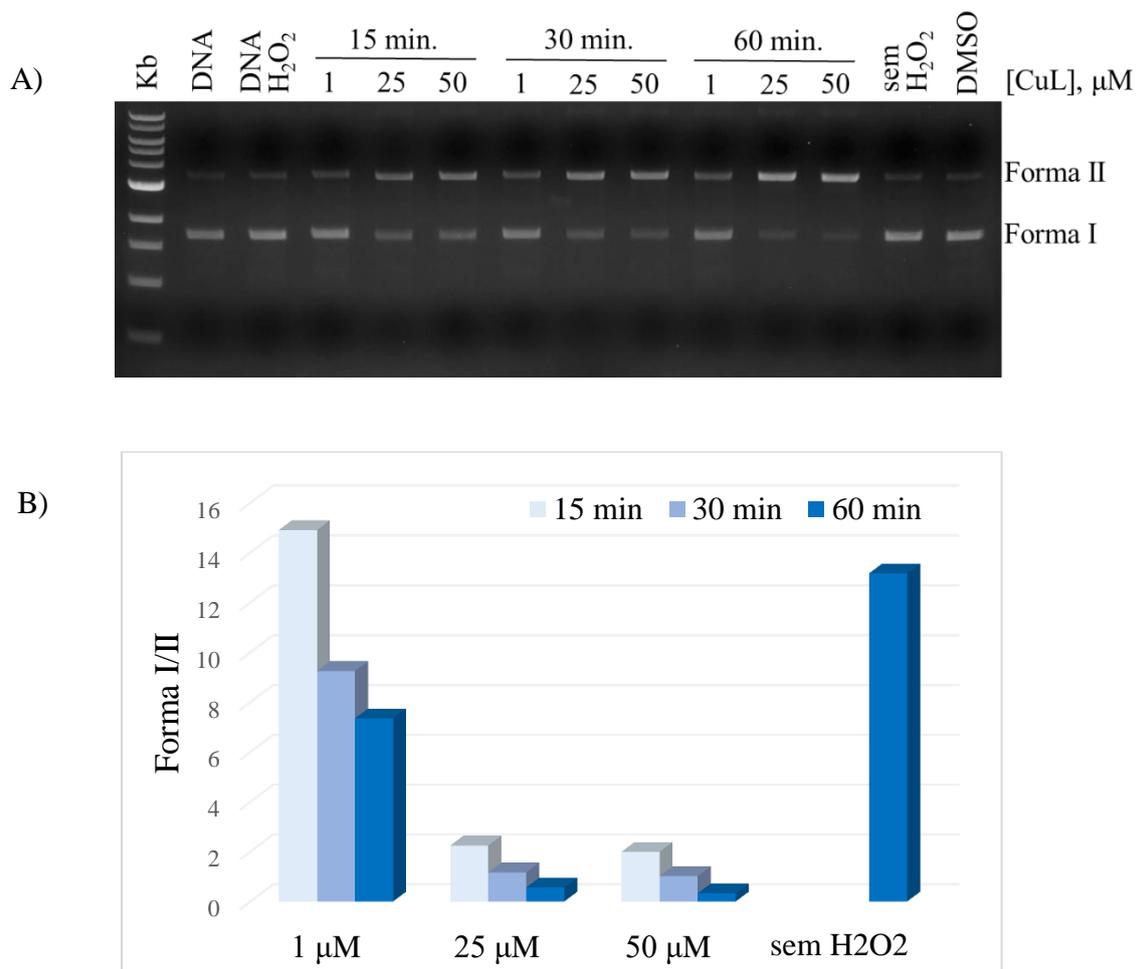


Figura 21 – Resultados da clivagem de pBlueScript II para o composto [Cu(5-Brisaepy)] (**3**). A) Eletroforese em gel de agarose 1%. Canaletas: Marcador molecular (Kb), controle DNA plasmidial (DNA), DNA plasmidial com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) controle com incubação a 50 μM por 60 minutos (sem H₂O₂), controle DNA plasmidial com DMSO 5% (DMSO). As concentrações de CuL e intervalos de tempo estão indicados na figura. B) Razão entre a forma I e a forma II do DNA, segundos as bandas do gel.

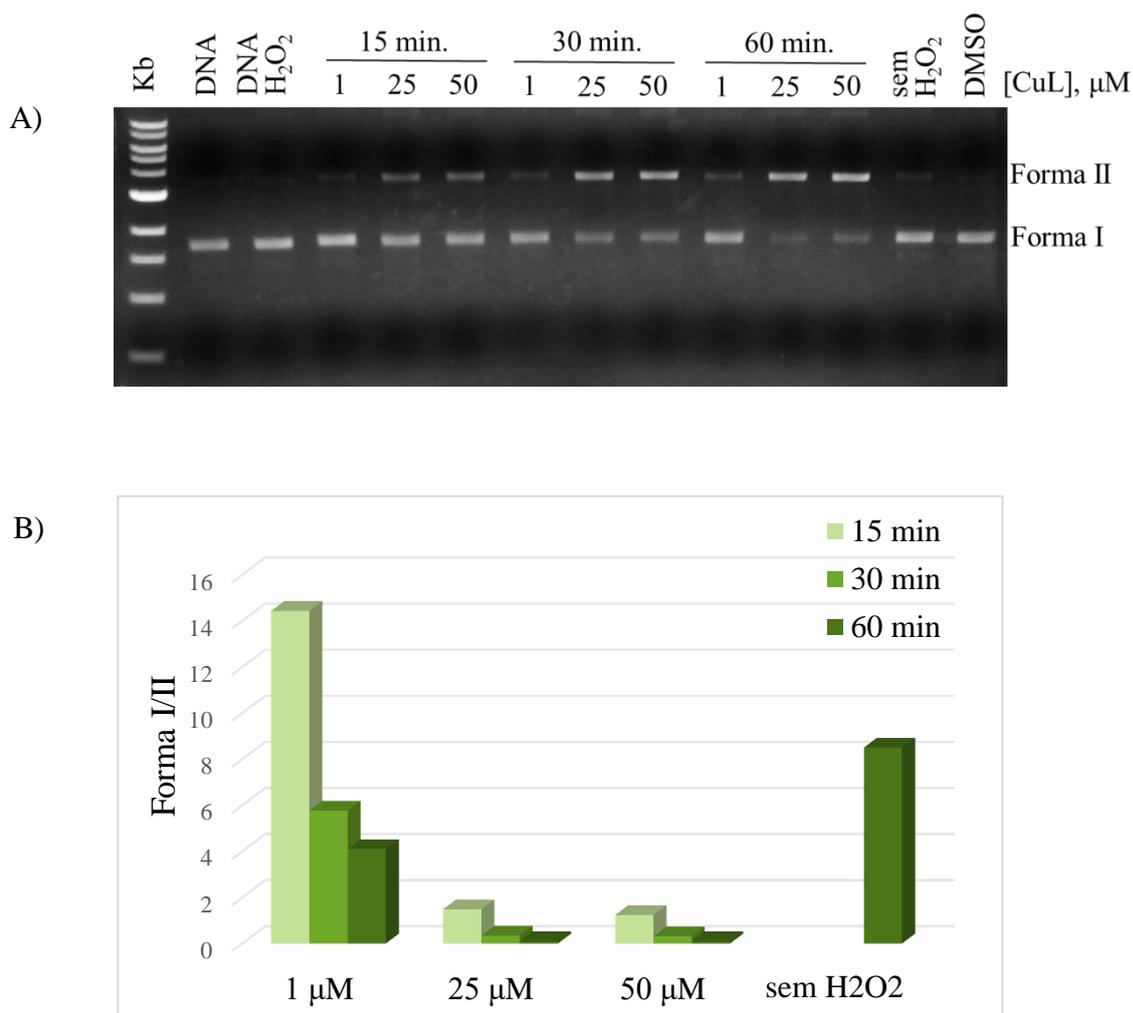


Figura 22 – Resultados da clivagem de pBlueScript II para o composto [Cu(5,7-*Brisaepy*)] (**4**). A) Eletroforese em gel de agarose 1%. Canaletas: Marcador molecular (Kb), controle DNA plasmidial (DNA), DNA plasmidial com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) controle com incubação a 50 μM por 60 minutos (sem H₂O₂), controle DNA plasmidial com DMSO 5% (DMSO). As concentrações de CuL e intervalos de tempo estão indicados na figura.

B) Razão entre a forma I e a forma II do DNA, segundos as bandas do gel.

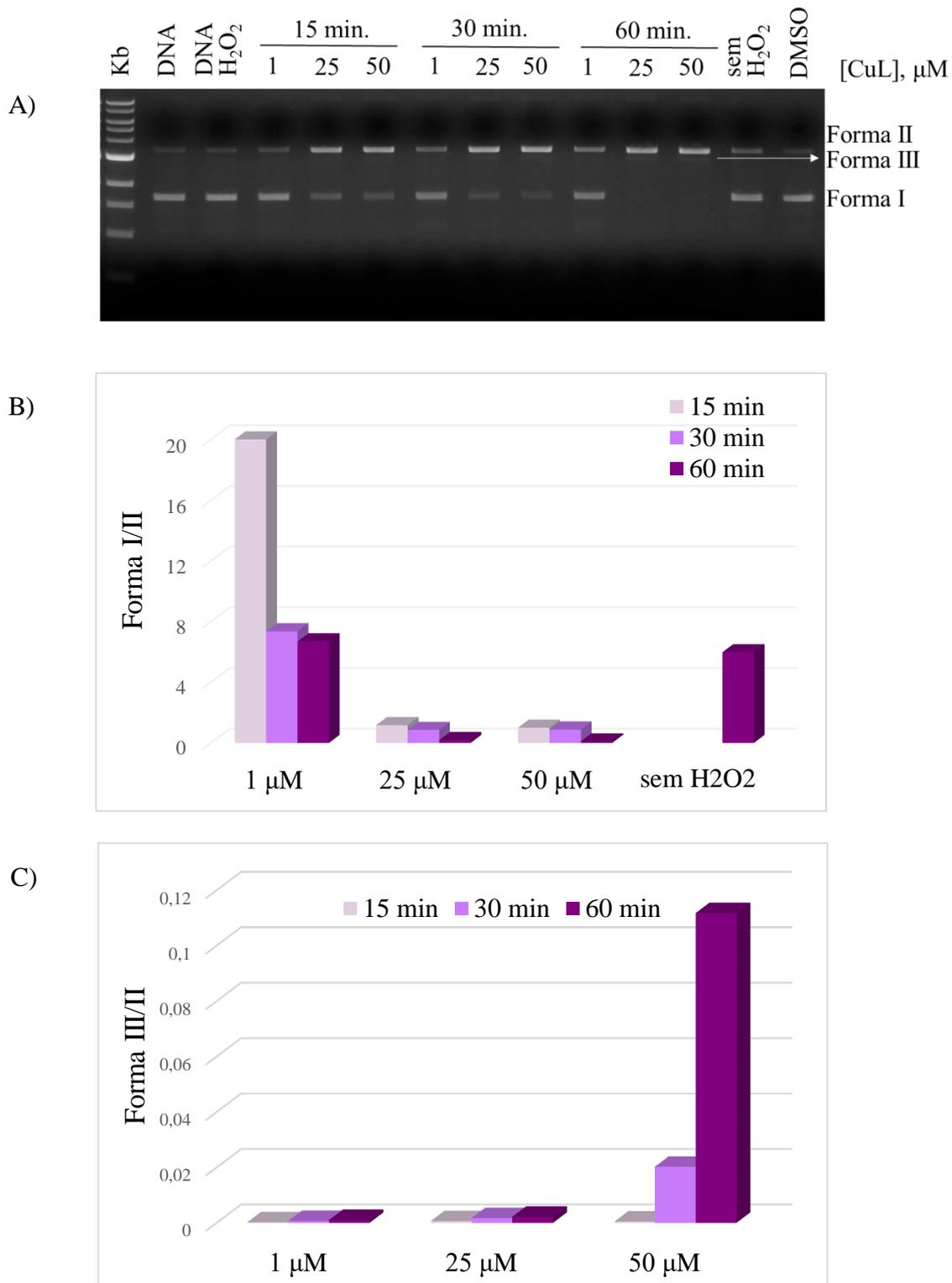


Figura 23 – Resultados da clivagem de pBlueScript II para o composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})]$ (5). A) Eletroforese em gel de agarose 1%. Canaletas: Marcador molecular (Kb), controle DNA plasmidial (DNA), DNA plasmidial com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) controle com incubação a $50\mu\text{M}$ por 60 minutos (sem H_2O_2), controle DNA plasmidial com DMSO 5% (DMSO). As concentrações de CuL e intervalos de tempo estão indicados na figura. B) Razão entre a forma I e a forma II do DNA, segundos as bandas do gel. C) Razão entre a forma III e a forma II do DNA.

Observa-se que todos os compostos tiveram habilidade de converter parte do plasmídeo na forma II, inclusive sem o peróxido de hidrogênio, mesmo que de forma sutil. Os compostos mais reativos foram o (1) e o (5). O [Cu(*isaepy*)] (5) teve a maior habilidade em clivar o DNA sem H₂O₂, além disso, apenas esse composto e o [Cu(*isahista*)₂] (1) conseguiram levar o plasmídeo à forma III, bem como extinguir a forma I em 60 minutos.

Os gráficos mostram que a eficiência de clivagem dos compostos apresenta-se na ordem [Cu(*isaepy*)] > [Cu(*isahista*)₂] > [Cu(5,7-*Brisaepy*)] > [Cu(*isatrp*)] > [Cu(5-*Brisaepy*)].

É importante ressaltar que os dois compostos com menor atividade nuclease são os que contêm mais de uma espécie de cobre em solução, conforme demonstrada no EPR (forma ceto e forma enol). De acordo com esses dados, dentre os compostos mais ativos frente à clivagem do DNA estão os que se apresentaram preferencialmente na forma enol (composto 4 e 5), juntamente ao [Cu(*isahista*)₂] (composto 1), que apesar de ter a forma ceto predominante, se mostrou bem simétrico na espectroscopia UV/Vis, e também quadrado planar no EPR.

O cobre provavelmente tem um papel essencial na clivagem, uma vez que esse metal se provou mais eficiente que outros. Recentemente, Ganji e colaboradores verificaram que complexos planares de cobre clivaram o DNA de forma mais eficiente que os análogos de níquel e cobalto.⁹⁶ Assim, espera-se que a forma enol (com maior grau de planaridade) seja mais eficiente na clivagem do DNA que a respectiva forma ceto, devido à sua maior facilidade em se intercalar ou interagir com a estrutura do DNA. Entretanto, vale lembrar que em pH 7,4 ambas as formas devem estar presentes em solução de todos os complexos estudados.

5. CONCLUSÕES

Interações entre biomoléculas e complexos metálicos com atividade biológica usualmente podem explicar a ordem de reatividade numa série deles. Como inicialmente previsto, observou-se que a geometria dos complexos de cobre estudados é de extrema importância para sua atividade citotóxica, uma vez que as características estruturais dos complexos influenciam na possibilidade de sua interação com DNA, seja por intercalação, interação nas alças ou atração eletrostática.

Comparando-se as atividades nuclease dos compostos estudados, parece que a forma enol destes complexos, levando a uma estrutura mais planar (ou tetragonal) ao redor do metal, favorece sua intercalação nas fitas de DNA e ocasiona maiores danos oxidativos, com simples e até dupla clivagem.

O complexo [Cu(*isaepy*)] **5** e seu análogo bromado [Cu(*5,7-Brisaepy*)] **4**, com geometria planar, conforme indicado pelos dados de espectroscopia EPR (vide Tabela 3), demonstraram praticamente o mesmo grau de atividade citotóxica (vide Tabela 6), que poderia advir de sua intercalação na estrutura do DNA. Também apresentaram maior toxicidade frente às células resistentes (MES-SA/Dx5), com valores menores de IC₅₀ que para as células não resistentes (MES-SA). Entretanto, o composto **4** não apresentou seletividade, isto é, os valores de IC₅₀ frente a fibroblastos foram os mesmos que para as células tumorais MES-SA. Ao contrário, o composto **5** apresentou valores maiores de IC₅₀ para os fibroblastos (menor toxicidade).

Nos experimentos através de espectroscopia eletrônica, os compostos **4** e **5** também apresentaram variações semelhantes nos espectros, indicando mesmo grau de interação com o DNA, com valores de K_b 2,4x10⁴ e 3,1x10⁴, respectivamente. Esses resultados, junto ao teste de clivagem de DNA plasmidial, sugerem que o composto **4** é bastante reativo, com valores de IC₅₀ próximos ao do complexo **5**, ainda que tenha apresentado uma constante de ligação com o DNA ligeiramente menor. Nos espectros de dicroísmo circular, o composto **4** apresentou menores variações espectrais, indicando menor perturbação nas fitas do DNA.

Já o composto [Cu(*5-Brisaepy*)] **3** mostrou um valor maior de IC₅₀ para as células tumorais estudadas, indicando citotoxicidade menor, se comparado aos compostos **4** e **5**, provavelmente por ter uma geometria mais distorcida, isto é, com maior distorção tetraédrica, conforme demonstrado pelos parâmetros espectroscópicos obtidos nos experimentos de EPR (Tabela 5). Através de dados de espectroscopia UV/Vis, observou-se interação com DNA um pouco menor que a verificada para os compostos **4** e **5**, com K_b = 2,1x10⁴. Este complexo **3** também teve um menor desempenho na clivagem de DNA plasmidial e não mostrou seletividade entre fibroblastos e sarcomas (MES-SA), com praticamente os mesmos valores determinados de IC₅₀.

A citotoxicidade dos compostos **4** e **5** também foram comparadas frente a células cervicais HeLa. Ambos parecem apresentar o mesmo grau de atividade, com IC₅₀ da ordem de 30 μM.

O composto [Cu(*isahista*)₂] **1**, embora tenha mostrado boa capacidade de interação e clivagem do DNA, teve uma menor resposta citotóxica, se comparado aos compostos **3**, **4** e **5**, indicando que este complexo se comporta de forma diferente, por exemplo, não se intercalando, mas se ligando às alças do DNA ou interagindo com outros alvos. Também apresentou atividade citotóxica menor frente às células resistentes MES-SA/Dx5, mostrando que ao contrário dos compostos **3**, **4** e **5**, é bombeado para fora dessas células pelas glicoproteínas presentes na membrana externa destas células, sendo responsáveis pelo efluxo de drogas. Este composto **1** surpreendentemente apresentou maior interação com DNA, nos experimentos de espectroscopia UV/Vis, com valor determinado de $K_b = 3,3 \times 10^5$.

O composto [Cu(*isatrp*)] **2**, que mostrou a menor interação com o DNA dentre os compostos estudados, com $K_b = 2,2 \times 10^3$, coerentemente não apresentou citotoxicidade significativa dentro de um intervalo aceitável (até a concentração de 150 μ M) para os complexos de cobre. É possível que haja menor entrada deste composto na célula, seja pela sua menor lipofilicidade ou por atuar por um mecanismo diferente, dirigindo-se a outros potenciais alvos citoplasmáticos.

De modo geral, conclui-se que os compostos bromados **3** e **4**, análogos ao composto [Cu(*isaepy*)] **5**, pouco ou nada diferem em relação à atividade antitumoral e interação com DNA, salvo diferenças em sua geometria. Embora o composto [Cu(*isaepy*)] **5** se mostre mais seletivo que os outros dois para células sarcomas (MES-SA), seria necessário fazer experimentos com outras linhagens de células, saudáveis ou tumorais, para chegar a um resultado mais conclusivo, quanto às vantagens ou não de se usar ligantes bromados.

Por último, vale ressaltar que nossos estudos demonstraram que os ligantes extraídos ou inspirados em uma fonte animal (organismos marinhos) tiveram desempenho bastante semelhante ao dos derivados não bromados de isatina, precursor obtido de fonte vegetal (plantas do índigo), embora com menor seletividade frente a sarcomas. Estes dados podem vir a ser de grande importância numa possível aplicação destes compostos, visando ampliar as possíveis fontes de sua obtenção.

6. REFERÊNCIAS

- ¹ A. K. Boal, A. C. Rosenzweig: Structural Biology of Copper Trafficking. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 4760–4779.
- ² L. Banci, I. Bertini, K. S. McGreevy, A. Rosato: Molecular recognition in copper trafficking. *Nat. Prod. Rep.*, **2010**, 27, 695–710.
- ³ D. Denoyer, S. Masaldan, S. La Fontaine, M. A. Cater: Targeting copper in cancer therapy: ‘Copper That Cancer’. *Metallomics*, **2015**; 7(11):1459-76.
- ⁴ A. V. Davis e T. V. O’Halloran: A place for thioether chemistry in cellular copper ion recognition and trafficking. *Nat Chem Biol.* **2008**; 4(3): 148–151.
- ⁵ K. L. Haas, K. J. Franz: Application of Metal Coordination Chemistry To Explore and Manipulate Cell Biology. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 4921–4960.
- ⁶ P. P. Kulkarni, Y. M. She, S. D. Smith, E. A. Roberts, B. Sarkar: Proteomics of Metal Transport and Metal-Associated Diseases. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 2410–2422.
- ⁷ S. Lutsenko: Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14, 211–217; b) H. Öhrvik, D. J. Thiele, How Copper Traverses Cellular Membranes Through the Mammalian Copper Transporter 1, *Ctrl. Ann. NY Acad. Sci.* **2014**, 1314, 32–41.
- ⁸ a) L. M. Gaetke, C. K. Chow: Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, **2003**, 189, 147-163; b) S. Kawanishi, S. Ohnishi, N. Ma, Y. Hiraku, M. Murata, Crosstalk between DNA Damage and Inflammation in the Multiple Steps of Carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 1808; doi:10.3390/ijms18081808
- ⁹ S. Reuter, S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi, B. B. Aggarwal: Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biol. Med.* **2010**, 49, 1603–1616.
- ¹⁰ A. C. Rosenzweig: Copper Delivery by Metallochaperone Proteins. *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 119-128.
- ¹¹ T. D. Rae, P. J. Schmidt, R. A. Pufahl, V. C. Culotta, T. V. O’Halloran: Undetectable Intracellular Free Copper: The Requirement of a Copper Chaperone for Superoxide Dismutase. *Science*, **1999**; 284, 805-808.
- ¹² J. D. Gitlin: Wilson Disease. *Gastroenterology* **2003**; 125,1868–1877.
- ¹³ Z. Tümer, L. B. Møller: Menkes disease. *Eur. J. Hum. Genet.* **2010**; 18(5):511-518.
- ¹⁴ X. L. Zuo, J. M. Chen, X. Zhou, X. Z. Li, G. Y. Mei: Levels of selenium, zinc, copper, and antioxidant enzyme activity in patients with leukemia. *Biol Trace Elem Res.* **2006** 114(1-3):41-53.
- ¹⁵ T. Golabek, B. Darewicz, M. Borawska, K. Socha, R. Markiewicz, J. Kudelski: Copper, zinc, and Cu/Zn ratio in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Int.* **2012**, 89(3):342-347. doi: 10.1159/000341976.
- ¹⁶ R. J. Coates, N. S. Weiss, J. R. Daling, R. L. Rettmer, G. R. Warnick: Cancer risk in relation to serum copper levels. *Cancer Res.* **1989** 49(15):4353-6.

-
- ¹⁷ M. Baharvand, S. Manifar, R. Akkafan, H. Mortazavi, S. Sabour: Serum levels of ferritin, copper, and zinc in patients with oral cancer. *Biomed J.* **2014** 37(5):331-336. doi: 10.4103/2319-4170.
- ¹⁸ H. W. Kuo, S. F. Chen, C. C. Wu, D. R. Chen and J. H. Lee: Serum and Tissue Trace Elements in Patients with Breast Cancer in Taiwan. *Biol. Trace Elem. Res.* **2002**; 89:1-11.
- ¹⁹ A. Gupte & R. J. Mumper: Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat. Rev.*, **2009**; 35, 32–46.
- ²⁰ V. Sosa, T. Moliné, R. Somoza, R. Paciucci, H. Kondoh, M. E. LLeonart: Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res. Rev.* **2013**, 12, 376–390.
- ²¹ a) V. I. Lushchak: Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem.-Biol. Interact.* **2014**, 224, 164–175; b) S. A. Aust, L. A. Morehouse, C. E. Thomas: Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Rad. Biol. Med.* **1985**; 1:3–25.
- ²² I. Bremner: Manifestations of copper excess. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**; 67, 1069S-1073S.
- ²³ J. Badet, F. Soncin, J. D. Guitton, O. Lamare, T. Cartwright and D. Barritault: Specific binding of angiogenin to calf pulmonary artery endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **1989**; 86(21):8427-31.
- ²⁴ Q. Pan, C. G. Kleer, K. L. van Golen, J. Irani, K. M. Bottema, C. Bias, M. De Carvalho, E. A. Mesri, D. M. Robins, R. D. Dick, G. J. Brewer and S. D. Merajver: Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res.* **2002**; 62(17):4854-9.
- ²⁵ J. T. Erler, K. L. Bennewith, T. R. Cox, G. Lang, D. Bird, A. Koong, Q. T. Le and A. J. Giaccia: Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the pre-metastatic niche. *Cancer Cell.* **2009**; 15(1): 35–44.
- ²⁶ Q. Pan, L. W. Bao and S. D. Merajver: Tetrathiomolybdate Inhibits Angiogenesis and Metastasis through Suppression of the NFκB Signaling Cascade. *Mol. Cancer Res.*, **2003**, 1, 701–706.
- ²⁷ M. Moriguchi, T. Nakajima, H. Kimura, T. Watanabe, H. Takashima, Y. Mitsumoto, T. Katagishi, T. Okanoue and K. Kagawa: The copper chelator trientine has an antiangiogenic effect against hepatocellular carcinoma, possibly through inhibition of interleukin-8 production *Int. J. Cancer*, **2002**, 102, 445–452.
- ²⁸ T. Mammoto, A. Jiang, E. Jiang, D. Panigrahy, M. W. Kieran and A. Mammoto: Role of collagen matrix in tumor angiogenesis and glioblastoma multiforme progression. *Am. J. Pathol.*, **2013**, 183, 1293–1305.
- ²⁹ X. Wang, X. Wang, Z. Guo: Functionalization of Platinum Complexes for Biomedical Applications. *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48, 2622 –2631
- ³⁰ a) Z. Yu, J. A. Cowan: Catalytic Metallodrugs: Substrate-Selective Metal Catalysts as Therapeutics. *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 14113-14127; b) L. Ronconi, P. J. Sadler: Using coordination chemistry to design new medicines. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, 251, 1633–1648
- ³¹ C. Santini M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano: Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem. Rev.*, **2014**; 114, 815-862.

- ³² V.C. da Silveira, H.Benezra, J. S.Luz, R.C. Georg, C. C. Oliveira A.M. da Costa Ferreira: Binding of Oxindole-Schiff Base Copper(II) Complexes to DNA and its modulation by the ligand. *J. Inorg. Biochem.* **2011**,105, 1692–1703.
- ³³ G. Filomeni, S. Piccirillo, I. Graziani, S. Cardaci, A.M.Da Costa Ferreira, G. Rotilio, M.R. Ciriolo: The isatin-Schiff base copper(II) complex [Cu(isaepy)₂] acts as delocalized lipophilic cation, yields wide spread mitochondrial oxidative damage and induces AMP-activated protein kinase-dependent apoptosis. *Carcinogenesis* **2009**, 30(7), 1115–1124
- ³⁴ G. Filomeni, G. Cerchiaro, A. M. da Costa Ferreira, A. De Martino, J. Z. Pedersen, G. Rotilio, M.R. Ciriolo: Pro-Apoptotic Activity of Novel Isatin-Schiff Base Copper(II) Complexes Depends on Oxidative Stress Induction and Organelle-Selective Damage. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (16) 12010-12021.
- ³⁵ A. M. da Costa Ferreira *et al.*, Patente **BR 2006 00985-A** "Complexos metálicos com compostos indólicos, oxindólicos e seus derivados imínicos, processos para sua obtenção, suas atividades farmacológicas como agentes antitumorais, uso desses complexos e derivados na formulação de medicamentos para o tratamento de tumores".
- ³⁶ G. Cerchiaro, K. Aquilano, G. Filomeni, G. Rotilio, M.R. Ciriolo, A. M. da Costa Ferreira: Isatin-Schiff base Copper(II) Complexes and their Influence on Cellular Viability. *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, 99(7), 1433-1440
- ³⁷ G. L. Eichhorn, Y. A. Shin: Interaction of Metal Ions with Polynucleotides and Related Compounds. XII. The Relative Effect of Various Metal Ions on DNA Helicity. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 7323-7328.
- ³⁸ S. Ramakrishnan, V. Rajendiran, M. Palaniandavar, V. S. Periasamy, B. S. Srinag, H. Krishnamurthy, M. A. Akbarsha: Induction of cell death by ternary copper(II) complexes of L-tyrosine and diimines: role of coligands on DNA binding and cleavage and anticancer activity. *Inorg Chem.* **2009**; 48(4):1309-22.
- ³⁹ A. M. Thomas, M. Nethaji, A. R. Chakravarty: Different modes of DNA cleavage activity of dihydroxo-bridged dicopper(II) complexes having phenanthroline bases. *J. Inorg. Biochem.* **2004**; 98(6):1087-94.
- ⁴⁰ S. Khan, A. M. Malla, A. Zafar, I. Naseem: Synthesis of novel coumarin nucleus-based DPA drug-like molecular entity: In vitro DNA/Cu(II) binding, DNA cleavage and pro-oxidant mechanism for anticancer action. *PLoS ONE*, **2017**; 12(8): e0181783.
- ⁴¹ P. P. Silva, W. Guerra, J. N. Silveira, A. M. C. Ferreira, T. Bortolotto, F. L. Fischer, H. Terenzi, A. Neves, and E. C. Pereira-Maia: Two New Ternary Complexes of Copper(II) with Tetracycline or Doxycycline and 1,10-Phenanthroline and Their Potential as Antitumoral: Cytotoxicity and DNA Cleavage. *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 6414–6424.
- ⁴² V.C. Silveira, J. P. Silva, C.C. Oliveira, I. Graziani, M.R. Ciriolo, A. M. da Costa Ferreira: Double-strand DNA Cleavage Induced by Oxindole-Schiff base Copper(II) Complexes with Potential Antitumor Activity. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, 102, 1090-1103.
- ⁴³ R. B. Miguel, P. A. D. Petersen, F. A. Gonzales-Zubiate, C. C. Oliveira, N. Kumar, R. R. do Nascimento, H. M. Petrilli, A. M. da Costa Ferreira, Inhibition of cyclin-dependent kinase CDK1 by oxindolimine ligands and corresponding copper and zinc complexes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2015**; 20:1205–1217.

-
- ⁴⁴ J. J. Champoux: DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, 70:369–413.
- ⁴⁵ P. Katkar, A. Coletta, S. Castelli, G. L. Sabino, R. A. Alves Couto, A. M. da Costa Ferreira, A. Desideri, Effect of oxindolimine copper(II) and zinc(II) complexes on human topoisomerase I activity. *Metallomics* **2014**, **6** (1), 117 – 125.
- ⁴⁶ S. Castelli, M. B. Gonçalves, P. Katkar, G. C. Stuchi, R. A. A. Couto, H. M. Petrilli, A. M. Da Costa Ferreira, Comparative studies of oxindolimine-metal complexes as inhibitors of human DNA topoisomerase IB. *J. Inorg. Biochem.* **2018**, 186, 85–94.
- ⁴⁷ M. V. Blagosklonny and A. B. Pardee: Exploiting Cancer Cell Cycling for Selective Protection of Normal Cells. *Cancer Res.* **2001**, 61, 4301–4305.
- ⁴⁸ B. Esmaelian, C. A. Abbott, R.K. Le Leu, K. Benkendorff, 6-Bromoisatin Found in Muricid Mollusc Extracts Inhibits Colon Cancer Cell Proliferation and Induces Apoptosis, Preventing Early Stage Tumor Formation in a Colorectal Cancer Rodent Model, *Mar. Drugs* **2014**, 12, 17-35.
- ⁴⁹ W. H. Gerwick , B. S. Moore, Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. *Chem. Biol.* **2012**, 19, 85-96.
- ⁵⁰ A. M.S. Mayer et al., The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective, *Trend. Pharmacol. Sci.* **2010**, 31, 255–265.
- ⁵¹ J. Zhou e F. Qu: Analysis of the Extracts of *Isatis Tinctoria* by New Analytical Approaches of HPLC, MS and NMR. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* **2011**; 8(5 Suppl): 33–45.
- ⁵² J. Bergman, J-O. Lindström e U. Tilstam: The structure and properties of some indolic constituents in *Couroupita guianensis* aubl. *Tetrahedron*, **1985**; 41(14), 2879-2881.
- ⁵³ A. E. Mendvedev, A. Clow, M. Sandler, V. Glover: Isatin: a link between natriuretic peptides and monoamines? *Biochem. Pharmacol.* **1996**, 52, 385.
- ⁵⁴ a) G. Cerchiaro, A.M. da Costa Ferreira, Oxindoles and Copper Complexes with Oxindole-Derivatives as Potential Pharmacological Agents, *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, 17, 1473-1485; b) J.F.M. Silva, S.J. Garden, A.C. Pinto, The Chemistry of Isatins: a Review from 1975 to 1999, *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, 12, 273-324.
- ⁵⁵ K. Vine, L. Matesic, J. Locke, M. Ranson, D. Skropeta, Cytotoxic and anticancer activities of isatin and its derivatives: A comprehensive review from 2000–2008. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2009**, 9, 397–414.
- ⁵⁶ J.L. Whatmore, E. Swann, P. Barraja, J.J. Newsome, M. Bunderson, H.D. Beall, J.E. Tooke, C.J. Moody, Comparative study of isoflavone, quinoxaline and oxindole families of anti-angiogenic agents, *Angiogenesis* **2002**, 5, 45-51.
- ⁵⁷ https://imaging.cancer.gov/programs_resources/reports_publications/reports_presentations/docs/AngiogenesisImagingMethodsforClinicalTrials.pdf, acessado em Agosto/2018.
- ⁵⁸ M.E. Lane, B. Yu, A. Rice, K.E. Lipson, C. Liang, L. Sun, C. Tang, G. MacMahon, R.G. Pestell, S. Wadler, A Novel cdk2-selective Inhibitor, SU9516, Induces Apoptosis in Colon Carcinoma Cells, *Cancer Res.* **2001**, 61, 6170-6177.

-
- ⁵⁹ K. Benkendorff, Natural product research in the Australian marine invertebrate *Dicathais orbita*, *Mar. Drugs* **2013**, 11, 1370-1398.
- ⁶⁰ C. Christophersen, F. Watjen, O. Buchardt, U. Anthoni: A revised structure of tyriverdin: the precursor to Tyrian purple. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 34, 2779–2781.
- ⁶¹ J. Baker, M. Sutherland, Pigments of marine animals VIII. Precursors of 6,6'-dibromoindigotin (Tyrian purple) from the mollusc *Dicathais orbita* (Gmelin). *Tetrahedron Lett.* **1968**, 1, 43–46.
- ⁶² T.F. Molinski, D.S. Dalisay, S.L. Lievens, J.P. Saludes: Drug development from marine natural products, *Nat. Rev Drug Discovery* **2009**, 8, 69-85.
- ⁶³ B. Esmaelian, K. Benkendorff, M.R. Johnston, C. A. Abbott: Purified Brominated Indole Derivatives from *Dicathais orbita* Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Colorectal Cancer Cell Lines, *Mar. Drugs* **2013**, 11, 3802-3822
- ⁶⁴ S-J. Choi, J-E. Lee, S-Y. Jeong, I. Im, S-D. Lee, E-J. Lee, S. K. Lee, S-M. Kwon, S-G. Ahn, J-H Yoon, S-Y. Han, J-I. Kim and Y-C. Kim: 5,5'-Substituted Indirubin-3'-oxime Derivatives as Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors with Anticancer Activity. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 3696–3706.
- ⁶⁵ K. L. Vine, J. M. Locke, M. Ranson, S. G. Pyne, J. B. Bremner: In vitro cytotoxicity evaluation of some substituted isatin derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 931–938.
- ⁶⁶ a) G. Cerchiaro, P. L. Saboya, D. M. Tomazela, M. N. Eberlin, A. M. da Costa Ferreira: Keto-Enolic Equilibria of an Isatin-Schiff Base Copper(II) Complex and its Reactivity toward Carbohydrate Oxidation *Transit. Met. Chem.* **2004**, 29, 495-504; b) G. Cerchiaro, G.A. Menicke, M.F.M. Tavares and A.M.D.C. Ferreira, Kinetic studies of carbohydrate oxidation catalyzed by novel isatin-Schiff base copper(II) complexes. *J. Mol. Catal. A:Chem.* **2004**, 221, 29-39.
- ⁶⁷ a) P.A. Vigato, S. Tamburini: The challenge of cyclic and acyclic schiff bases and related derivatives, *Coord. Chem. Rev.* **2004**, 248, 1717- 2128; b) P.G. Cozzi, Metal–Salen Schiff base complexes in catalysis: practical aspects, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 410-421.
- ⁶⁸ M.V. Berridge, A.S.Tan: Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys.* **1993**, 303(2), 474–482.
- ⁶⁹ T. L Riss *et al.* Cell Viability Assays, In: *Assays Guidance Manual*, p. 1-23. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/pdf/mttassays.pdf>.
- ⁷⁰ A. Rauk, “*Orbital Interaction Theory of Organic Chemistry*” 2^a Ed, John Wiley & Sons, Inc. (2001)
- ⁷¹ G. Cerchiaro, K. Aquilano, G. Filomeni, G. Rotilio, M.R. Ciriolo, A. M. Da Costa Ferreira: Isatin-Schiff base Copper(II) Complexes and their Influence on Cellular Viability. *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, 99(7), 1433-1440.
- ⁷² R. M. Silverstein, F. X. Webster, D. J. Kiemle, “*Spectrometric identification of organic compounds*” 7^a Ed, John Wiley & Sons, Inc. (2005)

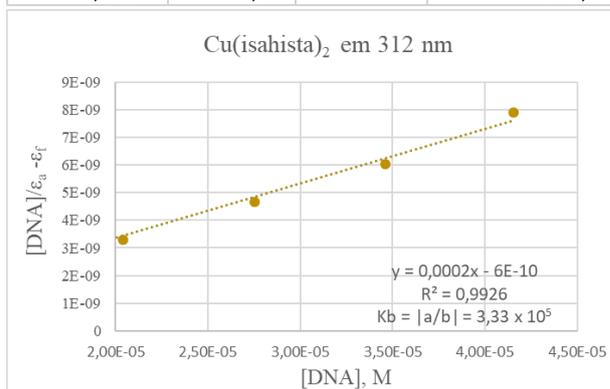
-
- ⁷³ M. Tümer, H. Köksal and S. Serin: Synthesis and Characterization of Mononuclear Copper(II), Cobalt(II) and Nickel(II) Chelates with New Bidentate Aromatic Schiff Bases, *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.*, **1997**, 27:5, 775-786, DOI: 10.1080/00945719708000226
- ⁷⁴ U. Mukhopadhyay, L. Govindasamy, K. Ravikumar, D. Velmurugan, D. Ray: Synthesis and structural characterization of a triply bridged copper(II)-zinc(II) Schiff base complex with N,O coordination, *Inorg. Chem. Commun.* **1998**, 1, 152-154.
- ⁷⁵ F. E. Mabbs: Some Aspects of the Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy of Transition Metal Compounds. *Chem. Soc. Rev.* **1993**, 22, 313.
- ⁷⁶ P.W. Atkins, T. L. Overton, J. P. Rourke, M.T. Weller, and F.A. Armstrong, *Shriver and Atkins' Inorganic Chemistry*, 5^a Ed, **2010**, Oxford University Press, 824p.
- ⁷⁷ U. Sakaguchi A. W. Addison: Spectroscopic and Redox Studies of Some Copper(II) Complexes with Biomimetic Donor Atoms: Implications for Protein Copper Centres. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1979**, 600.
- ⁷⁸ J. Muller, K. Felix, C. Maichle, E. Lengfelder, J. Strahle, U. Weser: Phenyl-substituted copper di-Schiff base, a potent Cu₂Zn₂, superoxide dismutase mimic surviving competitive biochelation. *Inorg. Chem. Acta.* **1995**, 233, 11.
- ⁷⁹ <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00997> acessado em setembro/2018.
- ⁸⁰ O. Wesolowska, M. Paprocka, J. Kozlak, N. Motohashi, D. Dus, and K. Michalak: Human Sarcoma Cell Lines MES-SA and MES-SA/Dx5 as a Model for Multidrug Resistance Modulators Screening. *Anticancer Res.* **2005**, 25, 383-390.
- ⁸¹ W. G. Harker and B.I. Sikic: Multidrug (pleiotropic) resistance in doxorubicin-selected variants of the human sarcoma cell line MES-SA. *Cancer Res.* **1985**, 45, 4091-4096.
- ⁸² P. Pakravan, S. Kashanian, M. M. Khodaei, F. J. Harding: Biochemical and pharmacological characterization of isatin and its derivatives: from structure to activity. *Pharmacological Reports* **2013**, 65, 313-335.
- ⁸³ M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah: Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *J. Photoch. Photobio. B.* **2013**, 124, 1–19.
- ⁸⁴ L. Tabrizi, M. Fooladivanda, H. Chiniforoshan: Copper(II), cobalt(II) and nickel(II) complexes of juglone:synthesis, structure, DNA interaction and enhanced cytotoxicity. *Biometals*, **2016**, doi:10.1007/s10534-016-9970-0.
- ⁸⁵ J. Liu, T. Zhang, T. Lu, L. Qu, H. Zhou, Q. Zhang , L. Ji: DNA-binding and cleavage studies of macrocyclic copper(II) complexes. *J. Inorg. Biochem* **2002**, 91, 269–276.
- ⁸⁶ S. Kashanian, M. M. Khodaei, P. Pakravan: Spectroscopic Studies on the Interaction of Isatin with Calf Thymus DNA. *DNA. Cell. Biol.* **2010**, 29(10), 639–646.
- ⁸⁷ H.A. Benesi, J.H. Hildebrand: Spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 2703–2707.
- ⁸⁸ T. Pivetta, E. Valletta, G. Ferino, F. Isaia, A. Pani, S. Vascellari, C. Castellano, F. Demartin, M. G. Cabiddu, E. Cadoni: Novel coumarins and related copper complexes with biological activity: DNA

-
- binding, molecular docking and in vitro antiproliferative activity. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *177*, 101–109.
- ⁸⁹ M. Sunita, B. Anupama, B. Ushaiah, C. Gyana Kumari: Synthesis, characterization, DNA binding and cleavage studies of mixed-ligand copper (II) complexes. *Arab. J. Chem.* **2014**, *10*, S3367–S3374.
- ⁹⁰ K. E. Prosser, S. W. Chang, F. Saraci, P. H. Le, C. J. Walsby: Anticancer copper pyridine benzimidazole complexes: ROS generation, biomolecule interactions, and cytotoxicity. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *167*, 89–99.
- ⁹¹ K. Tummalapalli, Vasavi C.S, P.Munusami, M. Pathak, Balamurali M.M.: Evaluation of DNA/Protein interactions and cytotoxic studies of copper(II) complexes incorporated with N, N donor ligands and terpyridine ligand. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *95*, 1254–1266.
- ⁹² F. Dimiza, A. N. Papadopoulos, V. Tangoulis, V. Psycharis, C. P. Raptopoulou, D. P. Kessissoglou, G. Psomas: Biological evaluation of cobalt(II) complexes with non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *107*, 54–64.
- ⁹³ Y.-M. Chang, C. K.-M. Chen, M.-H. Hou: Conformational Changes in DNA upon Ligand Binding Monitored by Circular Dichroism. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 3394-3413.
- ⁹⁴ S. Ramakrishnan and M. Palaniandavar: Mixed-ligand copper(II) complexes of dipicolylamine and 1,10-phenanthrolines: The role of diimines in the interaction of the complexes with DNA. *J. Chem. Sci.*, **2005**, *117*, 179–186.
- ⁹⁵ Q. Gan, C. Zhang, B. Wang, Y. Xiong, Y. Fu, Z. MAO and X. Le: Two new mixed copper(II)-dipeptide complexes of N,N-donor heterocycle ligands: studies on non-covalent DNA binding, chemical nuclease, antioxidant and anticancer activities. *RSC Adv.*, **2016**, DOI: 10.1039/C6RA01868H.
- ⁹⁶ N. Ganji, V. K. Chityala, P. K. Marri, R. Aveli, V. Narendrula, S. Daravath, Shivaraj: DNA incision evaluation, binding investigation and biocidal screening of Cu(II), Ni(II) and Co(II) complexes with isoxazole Schiff bases. *J. Photo. Biol.* **2017**, *175*, 132-140.

APÊNDICES

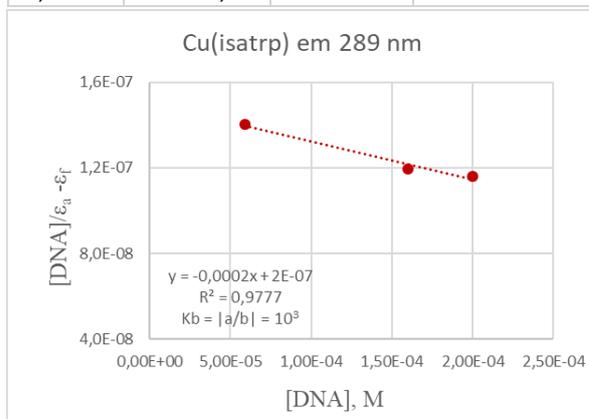
A1 - Cálculos para determinação da constante Kb de Cu(isahista)₂

Cu(isahista)₂						
[DNA]	Absorbância	[Composto]	$\epsilon a = A/[\text{composto}]$	ϵf (em 312 nm)	$\epsilon_a - \epsilon_f$	[DNA]/($\epsilon a - \epsilon f$)
		1,50E-05		1282		
7,44E-06	0,121		8066,67		6784,67	1,09659E-09
1,48E-05	0,117		7800,00		6518,00	2,26757E-09
2,04E-05	0,112		7466,67		6184,67	3,3001E-09
2,76E-05	0,108		7200,00		5918,00	4,65529E-09
3,46E-05	0,105		7000,00		5718,00	6,04932E-09
4,15E-05	0,098		6533,33		5251,33	7,90847E-09



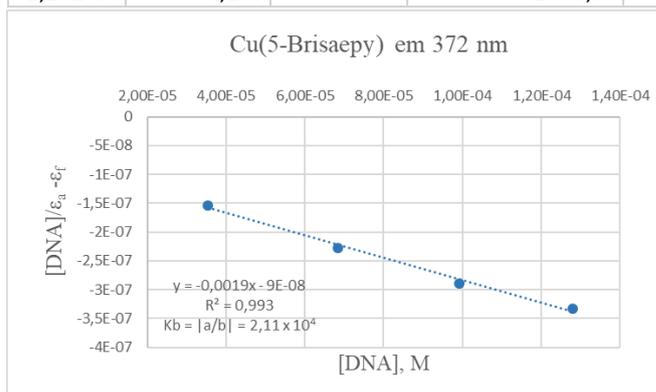
A2 - Cálculos para determinação da constante Kb de Cu(isatrp)

Cu(isatrp)						
[DNA]	Absorbância	[Composto]	$\epsilon a = A/[\text{composto}]$	ϵf (em 289 nm)	$\epsilon_a - \epsilon_f$	[DNA]/($\epsilon a - \epsilon f$)
		1,25E-04		3083		
5,90E-05	0,438		3504		421	1,40143E-07
1,60E-04	0,553		4424		1341	1,19314E-07
2,00E-04	0,601		4808		1725	1,15942E-07



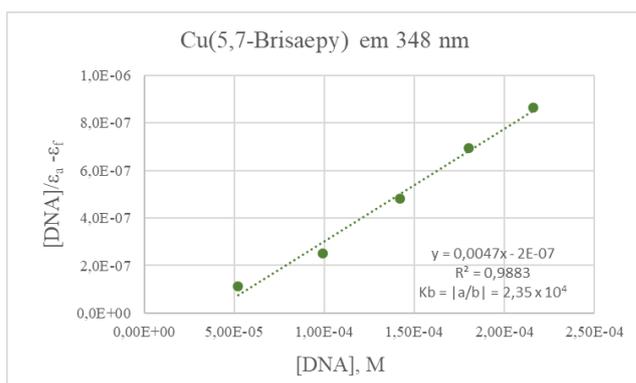
A3 - Cálculos para determinação da constante Kb de Cu(5-Brisaepy)

Cu(5-Brisaepy)						
[DNA]	Absorbância	[Composto]	$\epsilon a = A/[\text{composto}]$	ϵf (em 372 nm)	$\epsilon_a - \epsilon_f$	$[\text{DNA}]/(\epsilon a - \epsilon f)$
		7,14E-05		2863,9		
3,54E-05	0,188		2633,05		-230,85	-1,53348E-07
6,83E-05	0,183		2563,03		-300,87	-2,27005E-07
9,91E-05	0,18		2521,01		-342,89	-2,89013E-07
1,28E-04	0,177		2478,99		-384,91	-3,32547E-07



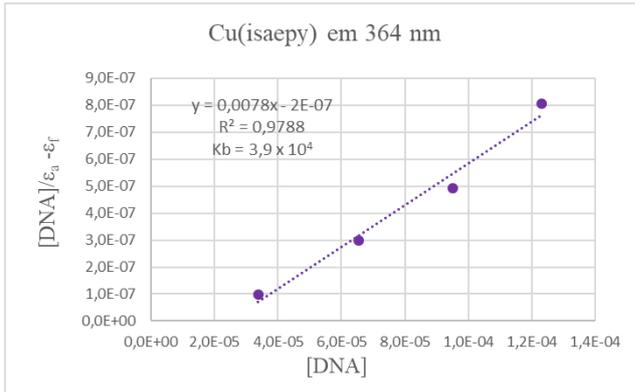
A4 - Cálculos para determinação da constante Kb de Cu(5,7-Brisaepy)

Cu(5,7-Brisaepy)						
[DNA]	Absorbância	[Composto]	$\epsilon a = A/[\text{composto}]$	ϵf (em 348 nm)	$\epsilon_a - \epsilon_f$	$[\text{DNA}]/(\epsilon a - \epsilon f)$
		1,10E-04		3686,98		
5,20E-05	0,456		4145,45		458,47	1,1342E-07
9,90E-05	0,449		4081,82		394,84	2,50736E-07
1,42E-04	0,438		3981,82		294,84	4,8162E-07
1,80E-04	0,434		3945,45		258,47	6,96394E-07
2,16E-04	0,433		3936,36		249,38	8,66135E-07
2,48E-04	0,424		3854,55		167,57	1,48002E-06



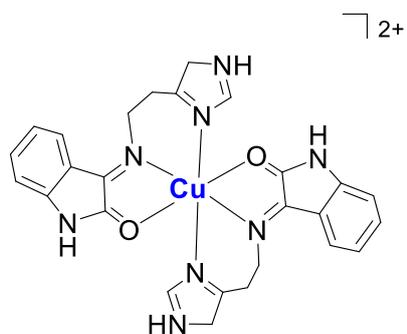
A5 - Cálculos para determinação da constante Kb de Cu(isaepy)

Cu(isaepy)						
[DNA]	Absorbância	[Composto]	$\epsilon a = A/[\text{composto}]$	ϵf (em 348 nm)	$\epsilon_a - \epsilon_f$	[DNA]/($\epsilon a - \epsilon f$)
		7,50E-05		3394,1		
3,38E-05	0,28		3733,333333		339,23333	9,96364E-08
6,54E-05	0,271		3613,333333		219,23333	2,98312E-07
9,50E-05	0,269		3586,666667		192,56667	4,93336E-07
1,23E-04	0,266		3546,666667		152,56667	8,06205E-07

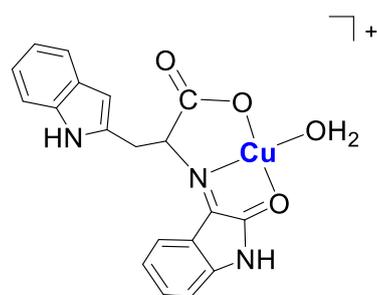


ANEXO

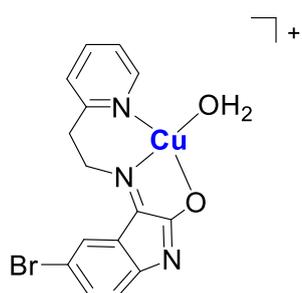
Estruturas dos complexos preparados e estudados



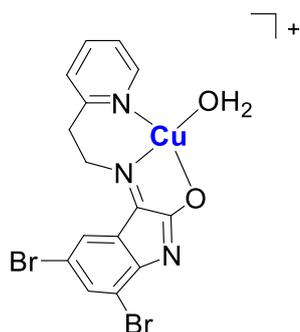
[Cu(isahista)₂](ClO₄)₂
1



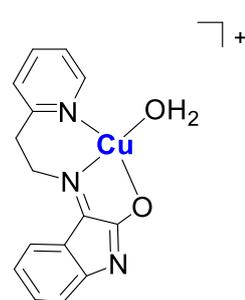
[Cu(isatrp)H₂O]ClO₄
2



[Cu(5-Br-isaepy)H₂O]ClO₄
3



[Cu(5,7-Br-isaepy)H₂O]ClO₄
4



[Cu(isaepy)H₂O]ClO₄
5

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Veridiana de Freitas Tofik

Local e data de nascimento: São Paulo, 30/03/1988

EDUCAÇÃO

Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2013.

Graduação (Ciências Biológicas)

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Mestrado em Bioquímica

ARTIGOS

J. D. S. Fernandes, K. Martho, V. Tofik, M. A. Vallim, and R. C. Pascon: The Role of Amino Acid Permeases and Tryptophan Biosynthesis in *Cryptococcus neoformans* Survival. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0132369.

V. F. Tofik, C. C. de Oliveira, A. M. Da Costa Ferreira: Cytotoxicity of copper complexes with brominated-indole derivatives, analogues of marine natural products. Manuscrito em preparação.