
TESE DE DOUTORADO

**“COMPLEXOS DE PLATINA COM DIAMINAS *N*-ALQUILADAS DE CADEIA
LONGA: SÍNTESE, INCLUSÃO EM LIPOSSOMAS, ATIVIDADE
CITOTÓXICA, ANTITUMORAL E ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS”**

Heveline Silva

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Paula Soares Fontes
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Frederic Jean Georges Frezard/UFMG

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Juiz de Fora – Março de 2009

“O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e a sua recreação, entre o seu amor e a sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Ele acha que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente.”

Texto Budista

AGRADECIMENTOS

À Professora Ana Paula, pela orientação todos esses anos, pelos ensinamentos, pela paciência, respeito e principalmente por acreditar em mim e sempre me apoiar e incentivar.

Ao Professor Frézard, pela orientação em caminhos tão diferentes da minha formação, pela paciência, confiança e por todos os ensinamentos durante estes anos que estive em seu laboratório.

À Professora Miriam, pela colaboração e orientação, por me acolher em seu laboratório permitindo que eu me sentisse como um de seus alunos.

A todos os colegas do Nupeq/UFJF, que de alguma forma, fizeram parte destes anos de trabalho e pela amizade nas muitas horas dentro do laboratório. Em especial, à Carolina e ao Guilherme pela ajuda na síntese dos compostos e à Cristiane, Simone e Roberta, que acompanharam e participaram da síntese dos ligantes. À Adriana, Gustavo, Maurício, Charlane, Maria Vanda, Fernando, Sílvia, Daniela, Bruno e Cadú, pelo apoio desde a graduação. À Lígia, Tati, Fillipe Marinez, Marcelo, Gláucia, Fernanda e Marluce pela amizade e convivência no Laboratório 2/Nupeq.

Aos professores do departamento de química da UFJF em especial ao professor Mauro pelo apoio e principalmente pela orientação na síntese dos ligantes. Ao professor Elói pelos ensinamentos no laboratório. Ao professor Marcone pelo incentivo. Ao professor Richard pelas idéias e colaborações.

Aos colegas, companheiros e acima de tudo, verdadeiros amigos do LSAT (Laboratório de Substâncias Antitumorais - UFMG) por tudo que me ensinaram, pelos mutirões nos experimentos, inclusive aos domingos ou até altas horas da noite. À Luciana, pela ajuda constante com as culturas de células e pela amizade sincera e enorme carinho comigo. A vocês, Ana Cândida, Fernanda, Cinthia, Sandra, Ana Cristina, Dalton, Celso, Luiz Felipe, Imaculada, Flávia, Kátia, Rogério e seus respectivos por todos os momentos que passamos juntos, dentro e fora do laboratório, o meu especial e sincero agradecimento.

Aos colegas do LabNano (Laboratório de biofísica de sistemas nanoestruturados – UFMG), Ana Paula, Millen, Fernanda, Bruna, Larissa, Raul, Cláudio, Weverson, Warley, Vicente, Erly, Flaviana e em especial ao Rubens pela intensa ajuda com o espectrômetro de absorção atômica, carinho e companheirismo.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional constante em todos os momentos da minha vida, apoiando minhas decisões e acreditando sempre em mim. Agradeço a paciência e carinho principalmente nos momentos mais difíceis, meu refúgio e minha base.

À minha irmã pela amizade única, pelas conversas francas, pelo carinho e incentivo. Ao meu cunhado Sergio, exemplo de dedicação e sede de conhecimento.

Aos meus avós, que construíram com dignidade uma família maravilhosa, exemplo de amor e união, a verdadeira escola da vida.

A todos os tios e primos que torceram por mim e comemoram cada conquista, agradeço o carinho. Em especial à Graziela pela ajuda com as figuras.

Às amigas Juliana Fedoce e Liza, por acompanharem diversos momentos definitivos da minha vida, entre as idas e vindas de Juiz de Fora e Belo Horizonte, pelo carinho, incentivo, apoio e amizade.

Às amigas, Érica, Dani Fontes, Cláudia e Dani Moutinho pela sincera amizade, carinho e companheirismo debaixo do mesmo teto. Por acompanharem vários momentos decisivos dessa fase da minha vida e por conquistarem espaço importante no meu coração e pra sempre na minha memória.

À Capes e FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

E, sobretudo a Deus por colocar todas essas pessoas em meu caminho, acompanhando meus passos que são sempre guiados por Ele.

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	iii
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - Câncer e Quimioterapia.....	1
1.2 – Complexos de platina no tratamento do câncer.....	3
1.2.1 – Cisplatina e seus derivados.....	3
1.2.2 – Complexos de platina(IV).....	6
1.2.3 – Complexos polinucleares de platina.....	8
1.3 – Relação entre estrutura e atividade.....	10
1.4 – Reatividade e mecanismo de ação.....	13
1.5 – Lipossomas.....	18
1.5.1 – Propriedades físico-químicas.....	19
1.5.2 – Lipossomas e complexos de platina.....	25
1.6 – Ensaio Biológico	27
1.7 – Considerações finais.....	28
1.8 – Objetivos deste trabalho.....	29
CAPÍTULO 2 – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES N-ALQUILADOS, DE CADEIA LONGA DERIVADOS DA 1,2-ETANODIAMINA E DA 1,3-PROPANODIAMINA E DE SEUS RESPECTIVOS COMPLEXOS DE PLATINA(II) E PLATINA(IV)	30
2.1 – Introdução.....	30
2.2 – Parte experimental.....	31
2.2.1 – Reagentes e métodos instrumentais.....	31
2.2.2 – Síntese dos ligantes.....	33
2.2.3 – Dados de caracterização dos ligantes.....	34
2.2.4 – Síntese dos complexos de platina(II)	44
2.2.5 – Dados de caracterização dos complexos de platina(II).....	44
2.2.6 – Síntese dos complexos de platina(IV) com hidroxilas.....	55

2.2.7 – Dados de caracterização dos complexos de platina(IV) com hidroxilas.....	55
2.2.8 - Síntese dos complexos de platina(IV) com cloretos.....	66
2.2.9 – Dados de caracterização dos complexos de platina(IV) com cloretos.....	66
2.3 – Resultados e Discussão.....	77
2.3.1 – Ligantes.....	77
2.3.2 – Complexos de platina(II).....	83
2.3.3 – Complexos de platina(IV) com hidroxilas.....	91
2.3.4 – Complexos de platina(IV) com cloretos.....	99
2.4 – Conclusão.....	107

CAPÍTULO 3 – PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS CONTENDO OS COMPLEXOS DE PLATINA.....	108
3.1 – Introdução.....	108
3.2 – Parte Experimental.....	109
3.2.1 – Reagentes e métodos instrumentais.....	109
3.2.2 – Preparação dos lipossomas contendo os complexos de platina(II) e complexos de platina(IV) com hidroxilas.....	110
3.2.3 – Calibração do tamanho dos lipossomas e eliminação do complexo não incorporado.....	110
3.2.4 – Caracterização das formulações de lipossomas contendo os complexos de platina.....	111
3.2.4.1 – Medida de distribuição de tamanho das vesículas.....	111
3.2.4.2 – Determinação da taxa de encapsulação e estabilidade da formulação.....	112
3.2.5 – Determinação do coeficiente de partição dos complexos.....	113
3.3 – Resultados e discussão.....	114
3.3.1 – Preparação e seleção das formulações de lipossomas contendo os complexos.....	114
3.3.2 – Distribuição de tamanho das formulações de lipossomas.....	115
3.3.3 – Determinação da taxa de incorporação e estabilidade da formulação.....	116

3.3.4 – Coeficiente de partição dos complexos.....	118
3.4 – Conclusão.....	121

CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE COMPLEXOS DE PLATINA(II) E PLATINA(IV) E DE SUAS FORMULAÇÕES EM LIPOSSOMAS..... 122

4.1 – Introdução.....	122
4.2 – Parte Experimental.....	124
4.2.1 – Reagentes e métodos instrumentais.....	124
4.2.2 – Linhagens celulares.....	125
4.2.3 – Preparo das soluções de complexo de platina e de lipossomas contendo os complexos.....	126
4.2.4 – Cl_{50} dos complexos de platina em linhagens de células tumorais e células normais, determinada pelo método MTT.....	126
4.3 – Resultados e discussão.....	128
4.4 – Conclusão.....	137

CAPÍTULO 5 – ATIVIDADE ANTITUMORAL E FARMACOCINÉTICA DO COMPLEXO 18 E DE SUA FORMULAÇÃO EM LIPOSSOMAS (MLV-18).... 138

5.1 – Introdução.....	138
5.2 – Parte Experimental.....	139
5.2.1 – Reagentes e métodos instrumentais.....	139
5.2.2 – Animais de experimentação e soluções utilizadas.....	140
5.2.3 – Toxicidade aguda.....	140
5.2.4 – Atividade antitumoral – variação da massa corporal e tumoral	141
5.2.5 – Estudos farmacocinéticos	142
5.2.5.1 – Estudos farmacocinéticos por via parenteral.....	142
5.2.5.2 – Estudos farmacocinéticos por via oral.....	142
5.3 – Resultados e discussão.....	143
5.3.1 - Toxicidade aguda.....	143
5.3.2 – Atividade antitumoral.....	145
5.3.2.1 – Determinação da variação da massa tumoral.....	145
5.3.2.2 – Determinação da variação de massa corporal.....	149

5.3.3 – Estudos farmacocinéticos	150
5.3.3.1 – Estudos farmacocinéticos por via parenteral.....	150
5.3.3.2 - Estudos farmacocinéticos por via oral.....	156
5.4 – Conclusão.....	158

CAPÍTULO 6 – DETERMINAÇÃO DE PLATINA EM PLASMA E TECIDOS DE CAMUNDONGOS POR ABSORÇÃO ATÔMICA DE FORNO DE GRAFITE	159
6.1 – Introdução.....	159
6.2 – Parte experimental.....	160
6.2.1- Reagentes e métodos instrumentais.....	160
6.2.2 – Amostras de plasma e tecidos para determinação da concentração de platina – Abertura da amostra.....	160
6.2.3 – Espectrômetro de Absorção Atômica de Forno de Grafite.....	161
6.2.4 – Temperatura de pirólise e atomização.....	162
6.2.5 – Padronização.....	163
6.3 – Resultados e Discussão.....	164
6.3.1 – Temperatura de pirólise e atomização.....	164
6.3.2 – Linearidade.....	166
6.3.3 – Precisão e exatidão.....	168
6.3.4 - Limite de detecção e quantificação.....	170
6.4 – Conclusão.....	171
CONCLUSÕES FINAIS.....	172
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	173
PUBLICAÇÕES REFERENTES A ESTE TRABALHO.....	181

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de óbito em todo o mundo, sendo a quimioterapia uma alternativa valiosa para o tratamento desta doença. O desenvolvimento de novos compostos mais ativos contra o câncer e menos tóxicos, que possam vir a ser utilizados como medicamentos antitumorais, constitui uma área de pesquisa de grande relevância. O uso da nanobiotecnologia representa uma alternativa inteligente que auxilia no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas disponibilizando outras vias de administração mais favoráveis à qualidade de vida dos pacientes.

Complexos de platina são agentes antitumorais bem estabelecidos no uso clínico, sendo a cisplatina o composto mais amplamente utilizado desta classe.

O presente trabalho mostra a obtenção de novos complexos de platina(II) e platina(IV) com ligantes *N*-alquilados de cadeia longa derivados da 1,2-etanodiamina e da 1,3-propanodiamina. Estes complexos foram devidamente caracterizados por espectroscopia na região do IV, RMN de ^1H , de ^{13}C e de ^{195}Pt e análise elementar e tiveram sua citotoxicidade investigada em células tumorais e células normais.

Tendo em vista as propriedades anfifílicas dos complexos devido a presença da cadeia carbônica longa, alguns deles foram incorporados em lipossomas furtivos e apresentaram boas taxas de encapsulação.

Um dos complexos, que se mostrou mais promissor do ponto de vista de obtenção, rendimento e taxa de incorporação em lipossomas, foi selecionado para testes *in vivo* visando a avaliação da sua atividade antitumoral em camundongos com melanoma induzido, em comparação com a cisplatina. Também foi investigada a farmacocinética deste complexo livre e incorporado em lipossomas. Para tal estudo foi feita a adaptação da metodologia de determinação de platina em plasma e tecidos de camundongos por absorção atômica em forno de grafite. Os parâmetros farmacocinéticos mostraram níveis de concentração plasmática elevados para a formulação do complexo incorporado em lipossomas. Esta formulação também apresentou maior atividade antitumoral e menor toxicidade em comparação com o complexo livre.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death in the world, with chemotherapy being a valuable tool for the treatment of the disease. The development of novel compounds which are more active and less toxic and which could become eventual anti-tumor drugs constitutes a research area of great relevance. The use of nanobiotechnology represents an intelligent alternative to assist in the development of new pharmaceutical formulations which may permit other administration routes thereby elevating the quality of life of cancer patients.

Platinum complexes are well established anti-tumor agents in clinical use, with cisplatin being the most widely used compound of this class.

The present work demonstrates the preparation of novel platinum(II) and platinum(IV) complexes employing long chain, *N*-alkyl derivatives of 1,2-ethanediamine and 1,3-propanediamine as ligands. These complexes were characterized by IR, ^1H , ^{13}C and ^{195}Pt NMR spectroscopies, elemental analysis and had their cytotoxicities investigated in both normal and tumor cells.

Considering the ambiphilic properties of the complexes due to the presence of the long carbon chain, several of them were incorporated into furtive liposomes and presented a good degree of encapsulation.

One of the complexes, which showed the most promise in terms of both ease of preparation and degree of incorporation into liposomes, was selected for *in vivo* testing and evaluation as an anti-tumor agent against induced melanoma in mice using cisplatin as a reference. The pharmacokinetics of the liposomes prepared with this complex were also investigated. For this study, an adaptation of methodology for the determination of platinum in plasma and tissue samples from the test mice by graphite furnace atomic absorption spectroscopy was employed. The pharmacokinetic parameters showed elevated plasma concentrations for the liposomal formulation. This formulation also presented greater anti-tumor activity and reduced toxicity relative to the free complex.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A2780	Linhagem celular de carcinoma de ovário humano
A549	Linhagem celular tumoral de pulmão humano
AB	Alamar Blue
AUC	Area under curve – Área sob a curva
B16-F1	Linhagem celular tumoral de melanoma não metastático de camundongo
B16-F10	Linhagem celular tumoral de melanoma metastático de camundongo
BHK-21	Linhagem celular normal de rim de hamster
C26	Linhagem celular tumoral de cólon de camundongo
C57-BL6	Raça de camundongo com melanina
CCDS	Cromatografia em camada delgada de sílica
CFDA-AM	5-Carboxifluorisceína diacetato-[acetoximetilester].
CH	Colesterol
CHO	Linhagem celular normal de ovário murino
Cl ₅₀	Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular
CL	“Clearance”
CTR1	Transportador de cobre plasma-membrana
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DCP	Dihexadecilfosfato
DSPC	1,2-Diestearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fostatidilcolina
DSPE-PEG-2000	1,2-Diestearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina- <i>N</i> -[metoxi(polietileno glicol)-2000]
E39	Linhagem celular de carcinoma de rim humano
EAA-FG	Espectroscopia de Absorção Atômica por Forno de Grafite

EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
E _p	Potencial de redução
FBS	SFB - Soro Fetal Bovino
HEPES	Ácido-4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfônico
<i>i.m.</i>	intra muscular
<i>i.p.</i>	intra peritoneal
<i>i.v.</i>	intra venoso
IV	Espectroscopia na região do infravermelho
LDH	Lactase Desidrogenase
LUV	Vesículas unilamelares grandes
M	Multiplete
M96	Linhagem celular de melanoma humano
MDA-MB-231	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano
MLV	Vesículas Multilamelares
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazol
MVV	Vesículas Multivesiculares
NSCLC-N6	Linhagem de carcinoma de pulmão humano
OR/DMSO	Óleo de Rícino/Dimetilsulfóxido
PBS	Solução tampão fosfato
Quint	Quinteto
PC	L- α -fostatidilcolina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
SI	Simpleto largo
SD	Standard Deviation – Desvio Padrão
SPE-PEG-2000	Fosfatidiletanolamina[metoxi(polietilenoglicol)-2000]
SUV	Vesículas Unilamelares Pequenas
T	Triplete
T/M	Total de animais / número de mortes
THF	Tetrahidrofurano

$T_{1/2}$	Tempo de meia-vida
t.a.	Temperatura ambiente
T_t	Temperatura de transição de fase
V_d	Volume de distribuição
WST	Water Soluble Tetrazolium (tetrazólio solúvel em água)
XTT	2 <i>H</i> -Hidróxi-2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-5- [(fenilamino)carbonil] tetrazólio
ν	Frequência
δ	Deslocamento químico

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER E QUIMIOTERAPIA

O câncer é uma doença caracterizada pela multiplicação e disseminação descontroladas de formas anômalas de células do próprio corpo¹. Tumor ou neoplasia, que significa “novo crescimento”, pode ser caracterizado como benigno ou maligno. Câncer, tumor maligno e neoplasia maligna são sinônimos. Os tumores benignos ou malignos manifestam proliferação descontrolada, mas os últimos distinguem-se pela sua capacidade de manter a proliferação, diferenciação, invasão e metástase (difusão para outras partes do corpo).

Trata-se de uma das principais causas de óbito no mundo todo. Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Os principais tipos de câncer com maior mortalidade foram: pulmão, estômago, fígado, cólon e mama. Estima-se que em 2020 o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões. No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009 apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (115.000 casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, estômago, pulmão e colo do útero dentre outros mostrados na tabela 1.1.

Diante deste cenário fica clara a necessidade de continuidade em investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação, como: na detecção precoce, na formação de recursos humanos, na comunicação e mobilização social visando à prevenção, na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos².

Tabela 1.1. Estimativa de novos casos de câncer para 2008.

Localização Primária	Incidências*	Percentual em incidências totais. (%)
Próstata	49530	10,8
Mama Feminina	49400	10,6
Cólon e Reto	26990	5,8
Estômago	21800	4,8
Traquéia, Brônquio e Pulmão	21620	4,7
Colo do Útero	18680	4,1
Cavidade Oral	14160	3,2
Esôfago	10550	2,4
Leucemias	9540	2,1
Pele (melanoma)	5920	1,4
Pele (não melanoma)	115010	24,7
Outras Localizações	117880	25,4
TOTAL	466730	100

Fonte: INCA (*)Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Existem três formas estabelecidas do tratamento do câncer: a excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia pode ser usada como monoterapia ou como adjunta a outras formas de terapia. O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais. Isto explica a maior parte dos

efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções³.

Os fármacos usados na quimioterapia do câncer podem ser divididos nas seguintes categorias dentre os citotóxicos: agentes alquilantes e substâncias relacionadas que formam ligações covalentes com o DNA e assim impedem sua replicação, como os complexos de platina; antimetabólitos que bloqueiam ou subvertem uma ou mais vias metabólicas envolvidas na síntese do DNA; antibióticos citotóxicos, ou seja, substâncias de origem microbiana que evitam a divisão celular nos mamíferos e os derivados de plantas que podem ser alcalóides da vinca, taxanos e campotecinas¹.

1.2. COMPLEXOS DE PLATINA NO TRATAMENTO DO CÂNCER

1.2.1. Cisplatina e seus derivados

O estudo do potencial anticancerígeno de complexos metálicos tem sido mais difundido desde o fim dos anos 60 do século XX, quando Barnett Rosenberg⁴ descobriu acidentalmente a atividade inibitória do complexo de platina *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], chamado cisplatina, na divisão da *Escherichia coli*. Até então, compostos contendo metais eram estudados biologicamente a fim de se reconhecer seu potencial carcinogênico e não seu potencial anticancerígeno⁵. A eficácia da cisplatina em câncer de pacientes humanos foi estabelecida em 1970, tendo sido aprovada para uso contra o câncer de testículos e bexiga em 1978⁶.

A **cisplatina**, *cis*-diaminodicloroplatina(II), (figura 1.1), apresenta grande sucesso no combate ao câncer de testículo, ovário, pescoço e importante colaboração no tratamento da neoplasia em seio e pulmão⁷⁻⁹.

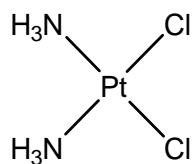


Figura 1.1. Cisplatina

No entanto, a cisplatina apresenta alguns inconvenientes como o surgimento de resistência celular, baixa solubilidade em água, além de graves efeitos colaterais. Os mais comuns são: ototoxicidade, nome dado à toxicidade no ouvido interno, em que o paciente sofre de deficiência auditiva e vertigem; neurotoxicidade na forma de depressão, sonolência, dormência nas extremidades e diminuição dos reflexos; nefrotoxicidade identificada pela diminuição da produção de urina, aumento do nível plasmático de uréia e perda de proteínas pela urina; toxicidade no trato intestinal, que se manifesta através de náuseas e vômitos intensos^{10, 11}. Estes efeitos adversos surgem principalmente devido à interação da cisplatina com proteínas e peptídeos, como a glutathione, o que leva ao seu acúmulo no organismo gerando toxicidade^{12,13}.

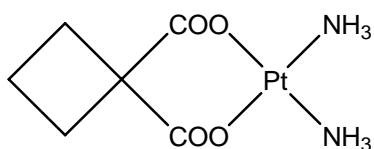
Dos análogos posteriormente obtidos, poucos têm avançado até os testes clínicos. Além da cisplatina, apenas alguns compostos têm sua comercialização autorizada.

A **carboplatina**, [diamino(1,1-ciclobutanodicarboxilato)platina(II)], (figura 1.2a), aprovada para uso contra o câncer de ovário em 1989, vem sendo usada em todo o mundo. Apesar de não atuar em células resistentes à cisplatina e ser menos citotóxica, a carboplatina apresenta menor nefrotoxicidade (toxicidade renal)^{14,15}, mas pode apresentar mielo-supressão, principalmente trombocitopenia (diminuição do número de plaquetas no sangue).

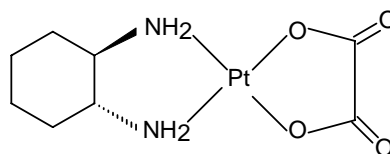
A **oxaloplatina**, *cis*-[1,2-diaminocicloexanooxalatoplatina(II)], (figura 1.2b), originalmente descrita no fim dos anos 70, entrou em testes clínicos em 1992 e foi aprovada pelo FDA para uso contra o câncer colo-retal em 2002 em associação com 5-fluorouracila. A oxaloplatina demonstra atividade antitumoral contra células resistentes à cisplatina¹⁶⁻¹⁸.

A **nedaplatina**, *cis*-[diaminoglicolatoplatina(II)], (figura 1.2c), é utilizada no Japão contra tumores de cabeça, pescoço, ovário e pulmão. Apresenta resultados promissores quando administrada juntamente com gemcitabina ou paclitaxel^{19, 20}.

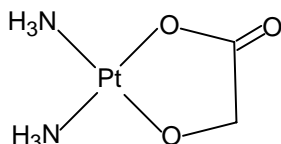
A **lobaplatina**, *cis*-[1,2-diaminometilciclobutanolactatoplatina(II)], (figura 1.2d), tem seu uso clínico aprovado na China para alguns casos de câncer de ovário, cabeça, pescoço e pulmão^{21,22} com resistência à cisplatina, mas causa trombocitopenia²³.



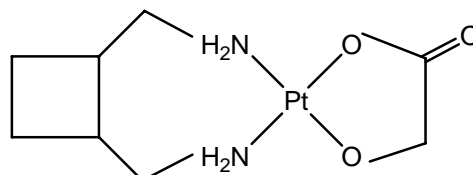
(a) Carboplatina



(b) Oxaloplatina



(c) Nedaplatina



(d) Lobaplatina

Figura 1.2. Análogos da cisplatina comercializados.

A **picoplatina (JM473)**, *cis*-[PtCl₂(NH₃)(3-picolina)], (figura 1.3), está na fase de testes clínicos em administração por via venosa e oral em diversas associações⁵ e apresenta atividade intermediária à da cisplatina e carboplatina *in vitro*²⁴. Este complexo é ativo em tumores resistentes a cisplatina e oxaloplatina, mostrando-se mais estável em presença de glutationa. O fato de nenhum dos efeitos colaterais comumente apresentados por estas drogas ter sido observado, torna-o bastante promissor^{25,26}.

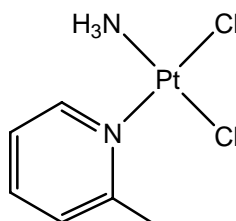


Figura 1.3. Picoplatina (JM473)

1.2.2. Complexos de Platina(IV)

Além dos complexos de platina(II), os complexos de platina(IV) constituem outra linha de compostos de grande interesse, devido a sua melhor solubilidade em água e ao fato de serem mais inertes, o que os torna mais resistentes à acidez do estômago podendo vir a ser administrado oralmente⁵. Como a maior atenção hoje está voltada para a qualidade de vida do paciente, a quimioterapia oralmente administrada tem sido bastante investigada.

A atividade anticancerígena de complexos de platina(IV) como *cis*-[PtCl₄(NH₃)₂] é conhecida desde a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina^{4, 27}. Vários complexos de platina(IV) têm se mostrado suficientemente promissores para a triagem clínica, como discutimos a seguir.

Satraplatina (JM216), (figura 1.4a), é uma droga racionalmente formulada, mais estável em meio ácido, podendo resistir às condições apresentadas pelo estômago^{28, 29}. Estudos pré-clínicos mostraram boa atividade antitumoral contra câncer de ovário quando administrado por via oral, comparado à cisplatina e carboplatina administrada por via endovenosa³⁰. A satraplatina mostrou atividade clínica promissora em combinação com prednisona, mas teve sua comercialização negada pelo FDA em 2007 por não apresentar melhora significativa na sobrevida dos pacientes.

Iproplatina, (figura 1.4b), foi selecionada dentre uma série de complexos sintetizados por Tobe³¹ por sua alta solubilidade em água, porém é menos ativa que a cisplatina e não foi aprovada para uso clínico³².

Tetraplatina, (figura 1.4c), mostrou-se altamente promissora em estudos pré-clínicos, mas causou severos efeitos neurotóxicos no tratamento com pacientes e foi abandonada na triagem subsequente³³.

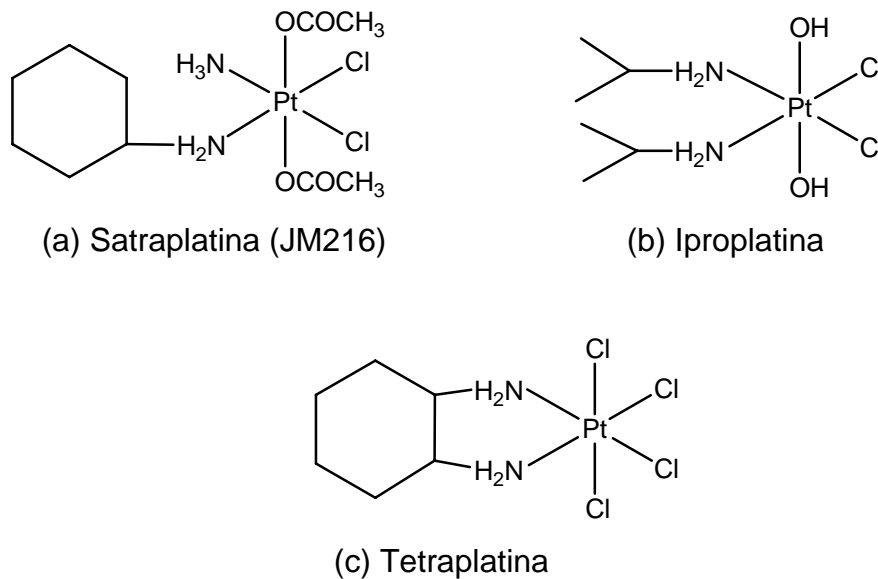


Figura 1.4. Complexos de Platina(IV)

Nenhuma das triagens clínicas *in vivo* dos compostos de platina(IV) tem revelado maior atividade significativa em humanos do que a cisplatina e isto é particularmente decepcionante diante do fato reportado por Kelland de que análogos do JM216 são 840 vezes mais ativos que a cisplatina nos ensaios *in vitro*³⁴.

A alta atividade *in vitro* foi atribuída à grande apoptose observada, mas a redução do complexo de platina(IV) a platina(II) *in vivo* altera as propriedades farmacológicas e, portanto, a eficácia da droga.

Complexos de platina(IV) têm enorme potencial como agente anticancerígeno em termos de alta atividade e baixa toxicidade, mas este potencial não tem sido observado nas drogas investigadas até o momento, provavelmente porque elas são reduzidas rapidamente na corrente sanguínea.

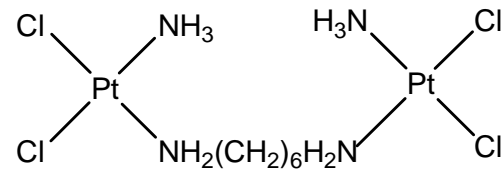
A principal vantagem dos complexos de platina(IV) é a sua baixa reatividade que pode diminuir a perda da droga ativa e também a incidência de reações paralelas indesejadas que geram efeitos colaterais tóxicos³⁵.

1.2.3. Complexos Polinucleares de Platina

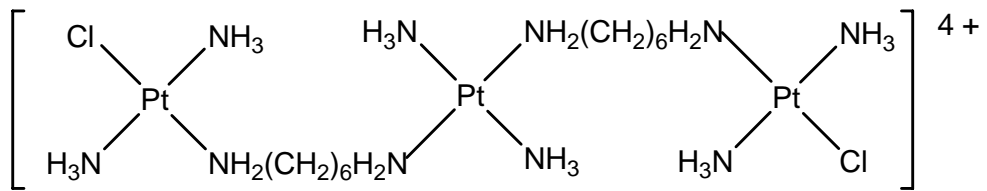
Outra linha de compostos de platina que vem sendo investigada é a dos compostos polinucleares, onde o complexo possui dois ou três núcleos metálicos.

Os compostos polinucleares de platina foram introduzidos por Farrell e se mostram promissores, com atividade citotóxica comparável à cisplatina e até mesmo maior em células resistentes³⁶. Os primeiros complexos desenvolvidos dentro desta classe foram complexos dinucleares, designados bis(platina)³⁷. O complexo representado na figura 1.5a foi reportado em 1988. Dentre os complexos polinucleares, destaca-se o composto **BBR-3464**, um derivado trinuclear de platina que consiste de duas unidades monofuncionais *trans*-[PtCl(NH₃)₂] ligadas através de uma unidade de platina tetra-amina *trans*-[Pt(NH₃)₂(NH₂(CH₂)₆NH₂)₂]²⁺, figura 1.5b. Podemos citar ainda o complexo trinuclear **AH78**, (figura 1.5c), análogo ao BBR-3464, que possui carga 8+, se diferenciando do primeiro pela substituição dos cloretos por uma hexanodiamina³⁸.

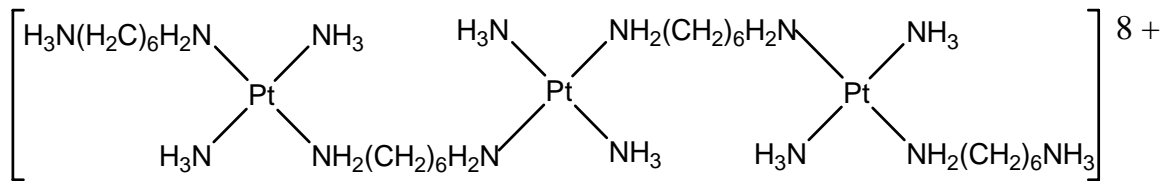
O BBR-3464, depois de ensaios pré-clínicos bem sucedidos, alcançou a fase II de ensaios clínicos³⁹. Vale ressaltar que este composto mostrou-se pelo menos 20 vezes mais eficaz que a cisplatina em sistemas pré-clínicos tumorais, inclusive resistentes, além de ser solúvel em água, podendo ser administrado oralmente⁴⁰. Este complexo ainda está em testes clínicos e existem intensas investigações sobre as diferenças no seu mecanismo de ação, reatividade, transporte, efluxo e influxo em comparação a cisplatina.



(a) Complexo dinuclear (bis-platina)



(b) BBR3464



(b) AH78

Figura 1.5. Complexos polinucleares de platina.

1.3. RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA E ATIVIDADE

A literatura apresenta estudos que sugerem requisitos importantes para a atividade destes complexos⁵, como sua estrutura, configuração, carga e ligantes que contribuam para um aumento da afinidade pelo DNA, principal sítio de ação destes complexos no meio biológico, conforme discutiremos mais adiante. Estas regras são antigas e aplicam-se principalmente para análogos da cisplatina. Hoje, outros compostos estruturalmente distintos e ativos são conhecidos e não obedecem a essas regras.

Apesar de a literatura apresentar alguns complexos *trans* com atividade biológica, os complexos *cis* são ainda os mais visados. Uma das razões para isto pode ser o fato de complexos *trans* formarem *trans*-adutos com o DNA e destes serem facilmente reparados. A ligação ao DNA gera tais lesões que são determinantes na atividade da droga⁴¹. Outra razão pode estar no fato de complexos *trans* serem mais reativos e por isso reagirem rapidamente com outras biomoléculas antes mesmo de atingirem o alvo farmacológico⁴².

Nos anos 70, ao se comparar os complexos de platina com atividade, cerca de 97% deles eram neutros⁴³. Apesar desta evidência da importância da neutralidade para atividade biológica, há exemplos na literatura de complexos catiônicos ou sais complexos que apresentam atividade, como os complexos polinucleares citados no item 1.2.3.

A natureza do grupo abandonador está diretamente ligada à atividade anticancerígena dos compostos de platina, devido a sua influência na reatividade do complexo⁴⁴. Este grupo deve ter uma labilidade moderada, sendo o cloreto (Cl⁻) o mais amplamente utilizado⁵. Isto está relacionado ao mecanismo de hidrólise do complexo. A hidrólise ocorre antes que o complexo entre na célula pela dissociação dos ligantes abandonadores, conforme discutiremos mais adiante. Complexos com ligantes fortemente coordenados, como NO₂⁻ ou SCN⁻ são inativos⁴⁴. Complexos com ligantes muito lábeis, tornam-se muito reativos, podendo então ocorrer reações com outras biomoléculas antes de atingir o alvo (o DNA no interior da célula), gerando alta toxicidade e nenhuma atividade antitumoral⁴⁴.

Os complexos que contém ligantes bidentados dicarboxilatos são menos lábeis e, portanto, menos reativos. Por exemplo, a carboplatina (figura 1.2a) também mostra excelente atividade e devido à sua menor reatividade, causa menos efeitos colaterais⁴⁵.

A vasta maioria dos complexos de platina ativos possui como grupo não-abandonador, ou seja, aquele grupo de ligantes que permanece ligado à platina mesmo após sua interação com o DNA, ligantes aminados que podem ser mono ou bidentados, estes últimos devendo formar com o núcleo de platina, anéis energeticamente favoráveis de cinco ou seis membros.

A possibilidade de formação de ligações de hidrogênio entre o grupo amino e os grupos polares do DNA⁴⁶ pode explicar o fato de complexos com aminas substituídas serem menos ativos.

Os ligantes não abandonadores podem interferir na atividade da droga como no caso de grupos intercaladores que têm essa denominação devido à capacidade de se intercalar entre dois pares de bases vizinhos do DNA (figura 1.6). Isto gera uma deformação na estrutura tridimensional do DNA, causando um diferente número de voltas helicoidais⁴⁷. Complexos com o grupo não abandonador de cadeias longas, como é o caso dos compostos apresentados neste trabalho, podem apresentar poder surfactante. Esta característica pode contribuir para o aumento da afinidade dos complexos pela membrana celular, facilitando sua entrada na célula⁴⁸.

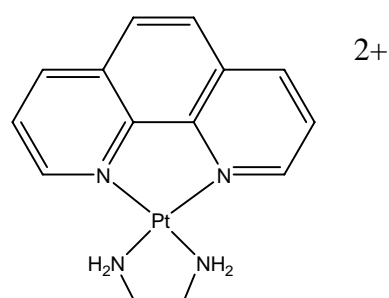


Figura 1.6. Complexo de Platina com ligante intercalador.

Para os complexos de platina(IV), sua redução a complexos de platina(II) parece ser essencial para a atividade anticancerígena⁴⁹⁻⁵¹ e por isto eles são considerados uma pró-droga.

O potencial de redução dos diaminocomplexos de platina(IV) é dependente da natureza dos ligantes axiais e equatoriais, mas os ligantes axiais geralmente exercem uma maior influência⁵².

A redução ocorre mais rapidamente quando o ligante axial é cloro, menos rapidamente quando é o ligante hidróxido e é intermediária quando se trata de ligantes carboxilato^{53,54}, como mostrado na tabela 1.2.

A facilidade de um complexo de platina(IV) ser reduzido pode influenciar na atividade biológica. A inércia cinética dos complexos de platina(IV) aumenta a oportunidade do complexo chegar intacto no alvo celular.

Tabela 1.2. Potencial de redução com variação dos ligantes axiais para o complexo genérico mostrado.

Ligante X	E _p (mV)	Estrutura genérica
Cl	-4	
OC(O)CH ₃	-326	
OC(O)CH ₂ CH ₃	-301	
OC(O)CH ₂ CH ₂ CH ₃	-173	
OH	-664	

1.4. REATIVIDADE E MECANISMO DE AÇÃO

Um grande banco de dados sugere que a reatividade dos complexos de platina passa por um mecanismo de hidrólise resultando em compostos com água ou grupos OH⁻ coordenados, que produzem metabólitos ativos⁵⁵.

A reação de hidrólise ocorre inicialmente com substituição dos ligantes abandonadores, no caso da cisplatina os ligantes cloro^{57,58}, por moléculas de água originando espécies carregadas positivamente (figura 1.7). Esta substituição é favorecida devido à diferença de concentração de íons cloreto⁵ (de 103 mM no plasma sanguíneo para 4 mM no citoplasma) e da alta concentração de moléculas de água.

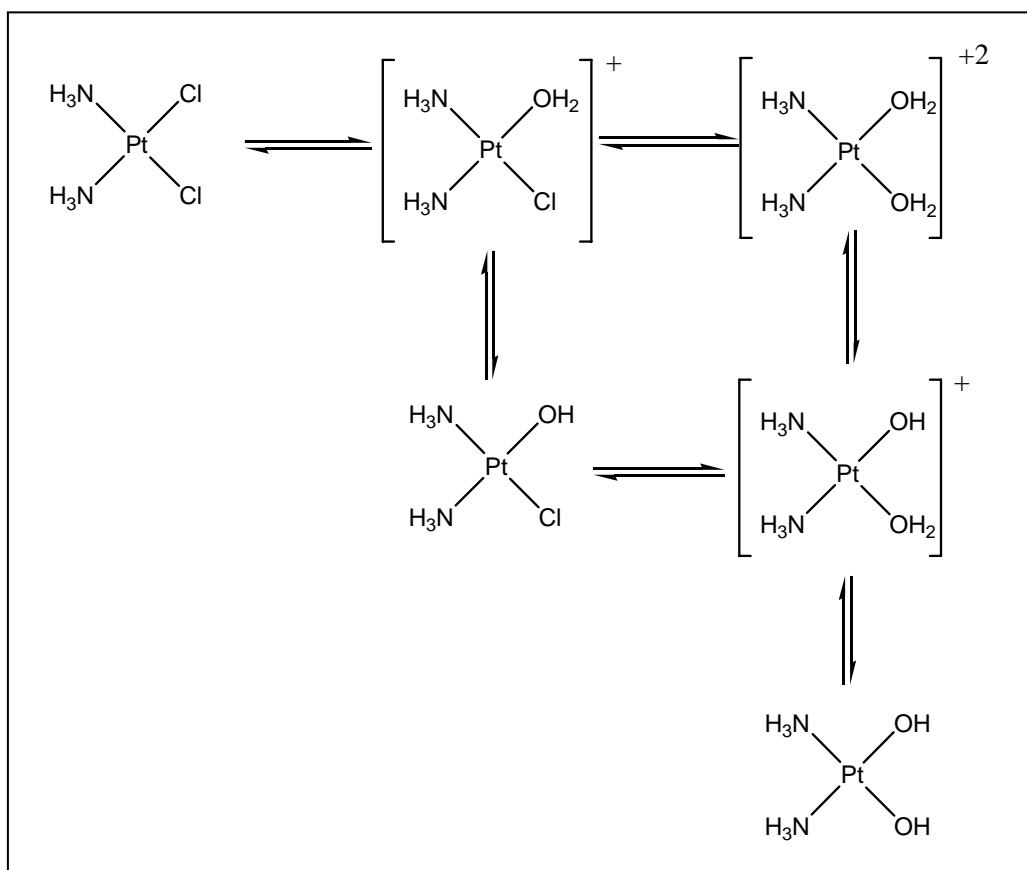


Figura 1.7. Hidrólise da Cisplatina

Este mecanismo de hidrólise está envolvido no mecanismo de transporte da droga (figura 1.8). Para a cisplatina este transporte envolve dois passos: (1) a hidrólise da espécie dicloro em ambiente deficiente em Cl⁻ no nível da membrana

plasmática; (2) o transporte por difusão passiva, porém existem trabalhos que relatam o transporte ativo da espécie aquo⁵⁸.

A absorção celular da cisplatina é influenciada por fatores como a concentração de íons sódio e potássio, pH e a presença de agentes redutores. Mais recentemente, em adição à difusão passiva, foi mostrada a influência de transportadores de cobre, CTR1, e sistemas de efluxo (transportador de ATP) diretamente relacionados ao acúmulo celular da cisplatina⁵⁹. Em células resistentes à cisplatina o transporte transmembrana é ineficiente e a regulação do transportador CTR1 é diminuída.

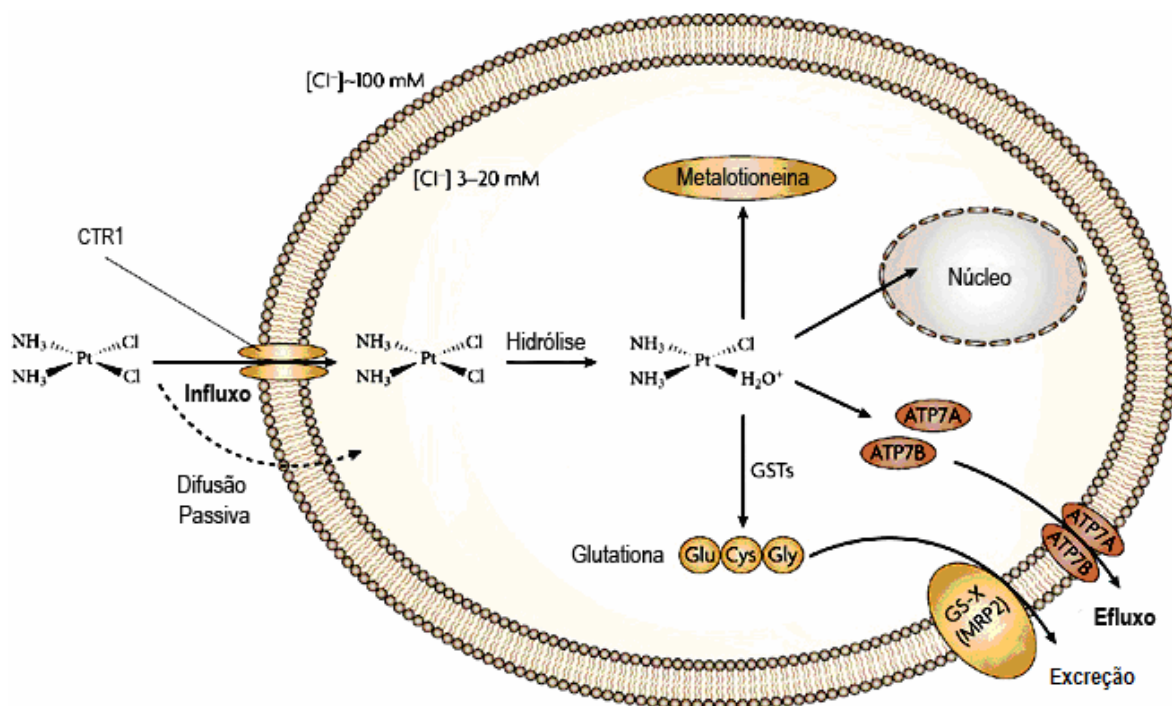


Figura 1.8. Mecanismo de ação da cisplatina, influxo e efluxo.

Os metabólitos diaquo podem reagir com outras moléculas além do DNA, como RNA e proteínas⁶⁰. Estes metabólitos têm grande afinidade por moléculas contendo o grupo tiol, como a cisteína, glutationa reduzida, metionina, metalotioneína e tioredoxina. Isto pode ser explicado pelo fato da platina ser um metal macio, tendo grande afinidade por átomos de enxofre. A ligação destas moléculas à glutationa, que ocorre em altas concentrações na célula⁶¹, cerca de 0,5 a 10 mM, pode ser um dos fatores responsáveis pela resistência adquirida da

droga⁶². Quando as espécies de platina estão ligadas a estas biomoléculas, a excreção da droga é dificultada, o que aumenta a incidência de efeitos colaterais.

Como já mencionado brevemente, a ação citotóxica de compostos de platina deve-se à formação de adutos com o DNA celular, o que pode não apenas inibir a transcrição e replicação do DNA, como também induzir a morte da célula.

O ácido desoxirribonucléico, DNA, é um oligonucleotídeo no qual cada unidade monomérica é constituída basicamente por três tipos de estruturas: uma molécula de açúcar, a 2-desoxi-D-ribose, um grupo fosfato e uma base nitrogenada, que pode ser púrica (guanina, G e a adenina, A) ou pirimídica (citosina, C e a timina, T) mostradas na figura 1.9.

Estes nucleotídeos se organizam estruturalmente em duas fitas através de ligações glicosídicas entre os açúcares e as bases. As bases nitrogenadas adjacentes ainda contribuem para a manutenção da estabilidade estrutural da dupla hélice do DNA, pois propiciam a formação de ligações de hidrogênio em toda a biomolécula (ligações de Watson e Crick)⁶¹.

Os complexos Pt-DNA que são formados envolvem principalmente os átomos de nitrogênio das bases nitrogenadas, mais especificamente os átomos designados N7 das bases púricas (guanina e adenina) que estão estruturalmente mais disponíveis para a coordenação. Os outros átomos de nitrogênio estão envolvidos em ligações de hidrogênio inter e intramoleculares e são responsáveis pela manutenção estrutural do DNA e pelas ligações glicosídicas com as unidades de ribose.

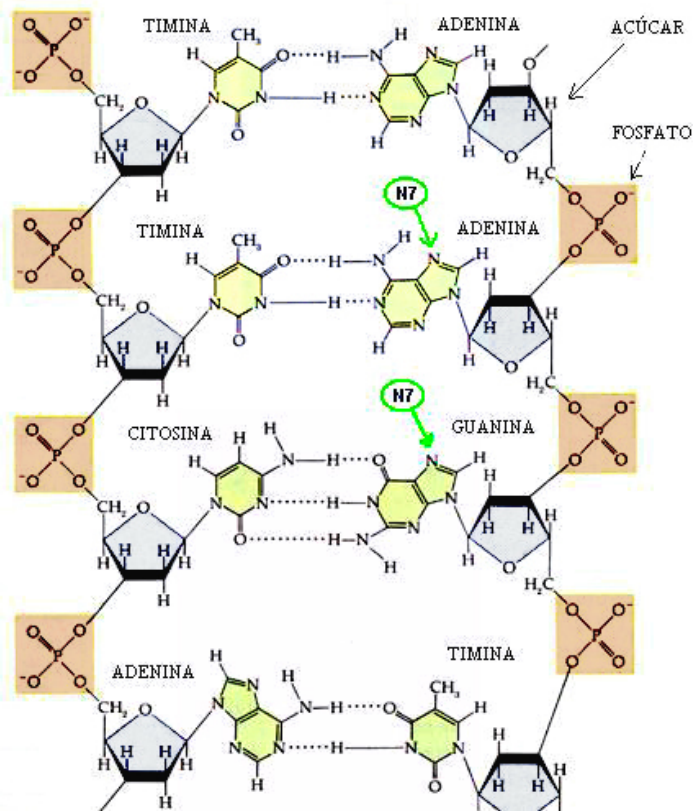


Figura 1.9. Estrutura do DNA: grupos fosfatos, açúcares, bases nitrogenadas e suas ligações de hidrogênio.

As espécies aquo-platina ligando-se às bases do DNA formam os chamados adutos (figura 1.10) que podem ocorrer na mesma fita do DNA, chamados de intrafitas, ou em fitas opostas, chamados de interfitas^{63,64}.

Em alguns casos estudados, a formação dos adutos leva a célula a gerar sistemas de difícil reparação do DNA modificado. Uma vez percebida a ineficácia do mecanismo de reparação, a célula morre de forma “programada”. Este falecimento da célula é chamado de *Apoptosis*^{16,65} (“suicídio celular”). Outro mecanismo de extinção celular observado é a necrose celular.

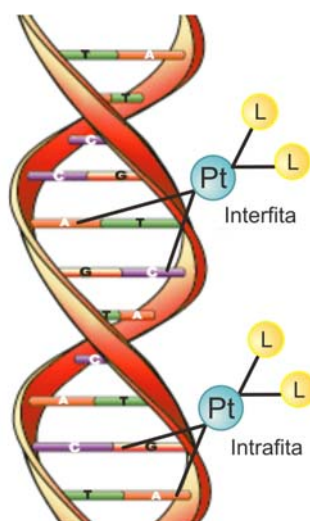


Figura 1.10. Representação dos modos de interação da platina com o DNA.

A eficácia de complexos de platina contra células cancerígenas pode ser comprometida pela síntese do DNA ou pela saturação da capacidade celular de formar adutos de platina com o DNA⁶⁶. Adutos *trans* são mais facilmente reparados que os adutos *cis* e, por esta razão, o intermediário diaquo de configuração *cis* é 30 vezes mais tóxico do que aquele de configuração *trans*⁶⁷. A inibição da síntese e reparo do DNA pode resultar numa modificação da estrutura tridimensional do mesmo, induzida pelos adutos formados⁶⁸. Células com acentuada atividade de reparo do DNA são resistentes à cisplatina confirmando a importância da inibição do reparo⁶⁹.

1.5. LIPOSSOMAS

Tendo conhecimento do modo de ação dos complexos de platina e das necessidades atuais de novos medicamentos para a quimioterapia do câncer, mais ativos e menos tóxicos, diversas alternativas são propostas e investigadas como o uso de carreadores biológicos capazes de reduzir a interação indesejada no organismo antes que a droga atinja o alvo desejado como é o caso dos lipossomas.

Há 40 anos, Alec Bangham⁷⁰ acidentalmente observou que determinados lipídeos em meio aquoso podem se organizar espontaneamente em bicamadas formando estruturas esféricas circundando uma cavidade aquosa interna e um meio aquoso externo, semelhante às membranas biológicas. Estas estruturas, a partir de então, são utilizadas como modelo de membrana ou carreadores e são chamadas de lipossomas⁷¹.

As aplicações práticas dos lipossomas⁷² são bastante conhecidas e altamente visadas por diversos cientistas a fim de verificar sua potencialidade terapêutica explorando características interessantes, tais como:

- Biocompatibilidade.
- Capacidade de encapsular substâncias hidrofílicas em seu compartimento aquoso interno e substâncias hidrofóbicas dentro de sua membrana.
- Compostos incorporados em lipossomas são protegidos de efeitos externos e não atacam sítios de reação indesejáveis.
- Fornecem a oportunidade de distribuição seletiva dentro da célula ou dentro de compartimentos celulares.
- Formato, carga e propriedades superficiais dos lipossomas podem ser facilmente alterados pela adição de novos componentes na formulação lipídica antes da preparação dos lipossomas e/ou por variação de métodos de preparação.

1.5.1. Propriedades Físico-Químicas

Lipossomas são estruturas esféricas fechadas e podem ser formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas ou não, com compartimentos aquosos interno, externo e entre as bicamadas lipídicas. Os lipossomas têm chamado bastante atenção dos pesquisadores devido à diversidade de utilização destas estruturas. São formados por componentes com características anfifílicas, ou seja, que apresentem uma cabeça polar e uma cauda apolar (figura 1.11), em geral combinados com fosfolipídios, tendo afinidade por meios hidrofílicos e hidrofóbicos.

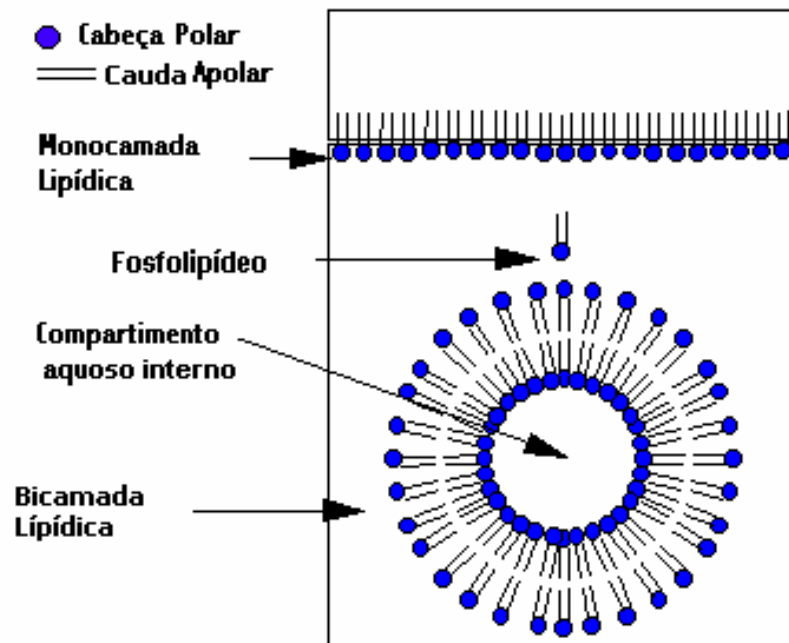


Figura 1.11. Representação das unidades formadoras de um lipossoma.

Existem vários tipos de vesículas lipossomais, que são escolhidas de acordo com o objetivo de aplicação. Estes diferentes modelos de lipossomas são obtidos variando-se os métodos de preparação e normalmente apresentam diâmetro médio entre 20 e 5000 nm. Podem ser classificados⁷³⁻⁷⁴ (figura 1.12) como:

- SUV – Small unilamellar vesicles: com tamanho entre 20 e 100 nm e formada por uma única bicamada.
- LUV – Large unilamellar vesicles: com tamanhos entre 100 e 1000 nm formadas por uma única bicamada.
- MLV – Multilamellar vesicles: com tamanhos superiores a 100 nm e consiste de várias bicamadas concêntricas.
- MVV – Multivesicular vesicles: vesículas não concêntricas com tamanhos superiores a 100 nm.

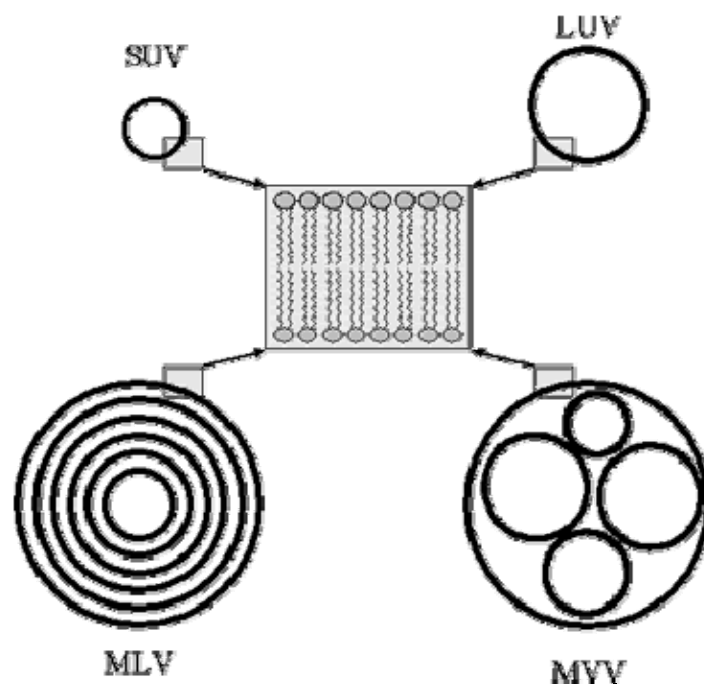


Figura 1.12. Diferentes disposições das bicamadas lipídicas nos lipossomas

Os lipossomas são compostos formados geralmente pelo glicerofosfolípido, fosfatidilcolina (PC) e suas variações⁷¹ (figura 1.13). Quando formados de lipídeos que apresentam temperatura de transição de fase (T_t) menor que a temperatura do meio estudado, a membrana dos lipossomas se encontra na fase cristal-líquido ou “fluida” e os lipídeos e suas cadeias de hidrocarboneto têm grande liberdade de movimento. Quando formados de lipídeos com T_t maior que a temperatura do meio estudado, a membrana dos lipossomas se encontra na fase gel ou “rígida” e os lipídeos têm movimento restrito e suas cadeias de

hidrocarboneto apresentam conformação “*trans*” (Figura 1.14). Vesículas formadas de diestearoilfosfatidilcolina (DSPC - $T_t = 55\text{ }^\circ\text{C}$) representam um exemplo deste tipo de lipossoma rígido sendo este o lipídeo base deste trabalho (figura 1.13).

Um componente lipídico importante, que entra muitas vezes na composição dos lipossomas, é o colesterol (Figura 1.13). Este aumenta a rigidez das membranas no estado “cristal-líquido” e reduz a rigidez e os defeitos estruturais das membranas no estado “gel” (Figura 1.14).

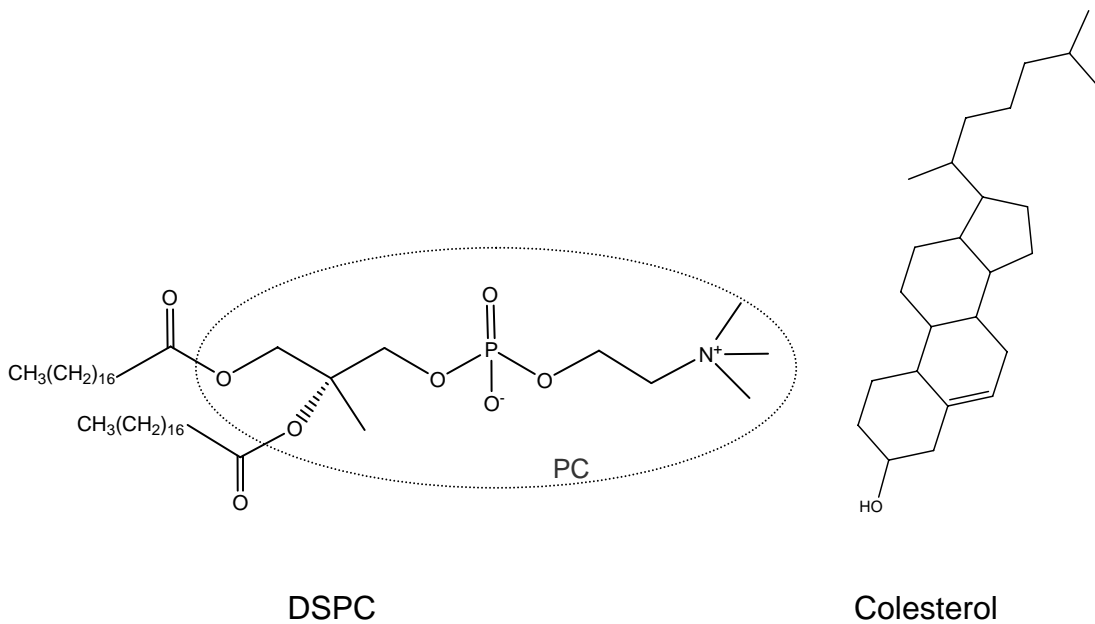


Figura 1.13. Estrutura molecular de componentes de membrana dos lipossomas

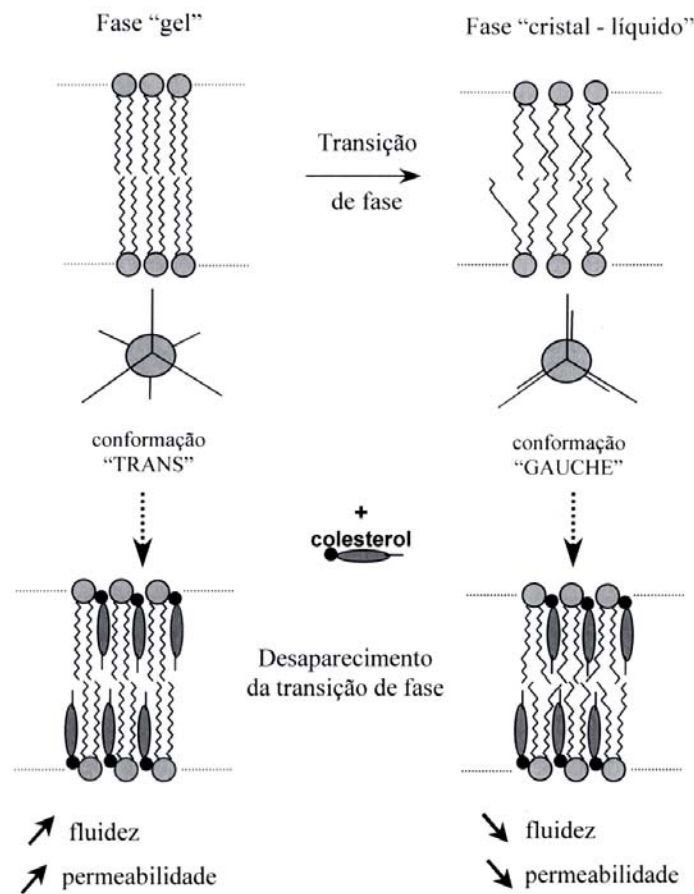


Figura 1.14. Transição de fase das membranas lipídicas e efeito do colesterol

Os **lipossomas convencionais** ou **clássicos** são sistemas simples geralmente compostos por fosfolípeos naturais ou derivados deles e que, como ilustrado na figura 1.15A, podem incorporar um composto hidrofílico (a) no compartimento aquoso interno, ou um composto hidrofóbico (b) incorporado na bicamada lipídica. Este tipo de lipossoma apresenta algumas desvantagens como a rápida eliminação do sangue (depuração ou *clearance*) provavelmente resultante da opsonização no sistema circulatório que facilita o reconhecimento e captura pelos macrófagos do sistema fagocitário mononuclear, particularmente no fígado, baço e medula óssea⁷⁵⁻⁷⁷.

Os lipossomas direcionados, com ligantes imobilizados na sua superfície, capazes de reconhecerem e se ligarem às células de interesse tem sido bastante estudados, (figura 1.15B), onde (c) está covalentemente ligado em fosfolipídios na

membrana, ou então, hidrofobicamente ligado (d) dentro da membrana do lipossoma⁷⁸.

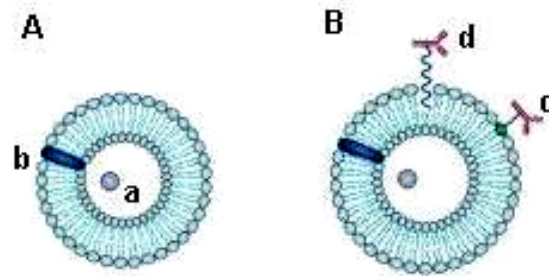


Figura 1.15. Lipossomas convencionais

Entretanto, esses lipossomas são também rapidamente eliminados da circulação pelos macrófagos do sistema fagocitário mononuclear. A partir dos anos 90, as pesquisas envolvendo lipossomas tinham como objetivo reduzir a captura dos lipossomas convencionais pelo sistema fagocitário e permitir um maior tempo de circulação na corrente sanguínea.

Lipossomas de longo tempo de circulação⁷⁸, também chamados **furtivos**, registrados pela Liposome Technology Inc como *Stealth®*, compõem uma nova geração de lipossomas que possuem superfície de membrana alterada pela inclusão de polímeros biocompatíveis (e) (figura 1.16) inertes como PEG (polietilenoglicol) de alto peso molecular. Esta alternativa protege a camada lipídica superficial do lipossoma de uma interação com proteínas opsonizantes (f), evitando a captura por macrófagos, o que resulta num maior tempo de circulação na corrente sanguínea.

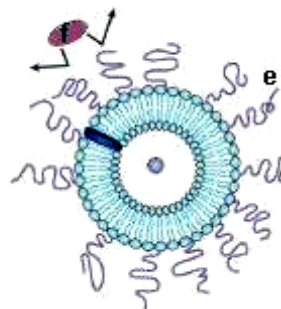


Figura 1.16. Lipossomas com polímeros protetores

Um exemplo é o DSPE-PEG2000, utilizado neste trabalho, que é composto de um fosfolípídeo de fosfatidiletanolamina ligada ao polietilenoglicol de 2000 Daltons (figura 1.17).

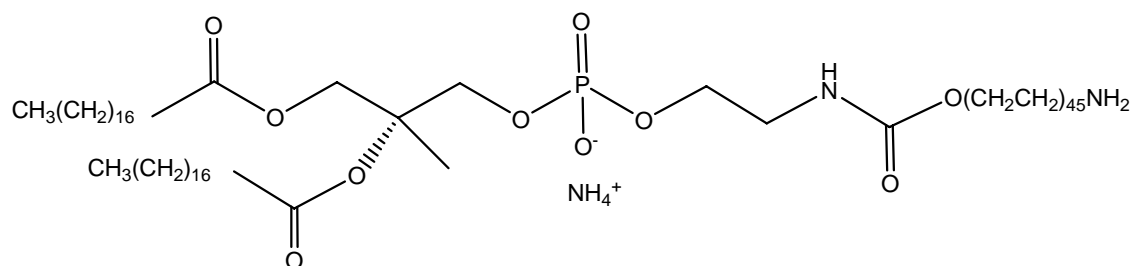


Figura 1.17. Fórmula estrutural DSPE-PEG2000.

Há um contínuo interesse no uso de lipossomas de longa circulação como carreadores e a evolução destas estruturas promove diferentes possibilidades de variação, o que leva a uma nova geração de lipossomas, que pode ser modificada (separada ou simultaneamente) de diversas maneiras.

Uma das principais áreas de interesse para aplicação dos lipossomas é em quimioterapia do câncer, além de diversas outras utilizações, como por exemplo, carreadores de agentes de imagem (lipossomas radiomarcados - suplemento no diagnóstico de infecções), anticorpos (imunolipossomas), proteínas, peptídeos e genes (vacinas), proteínas virais (virossomas), material ferro-magnético (lipossomas magnéticos – direcionados por campo magnético Tesla) e agentes foto sensíveis (terapia fotodinâmica de tumores superficiais)⁷⁸.

As diversas aplicações dos lipossomas são realizadas por diferentes vias que influenciam a biodistribuição e farmacocinética, como transdérmica, nasal, pulmonar, oral e, principalmente, intravenosa. O tamanho da vesícula, a composição, balanço hidrofílico/hidrofóbico e a capacidade de encapsulação são fatores limitantes dessas vias^{79,80}.

1.5.2. Lipossomas e Complexos de Platina

A cisplatina, apesar do largo espectro de atividade, apresenta sérios problemas de toxicidade. Na tentativa de driblar estes problemas, diversas formulações lipossomais que encapsulem melhor a cisplatina têm sido testadas.

São conhecidas formulações que possibilitam a encapsulação de mais de 80% de cisplatina em lipossomas do tipo MLV⁸¹. As taxas de encapsulação de drogas em lipossomas são bastante variáveis bem como a estabilidade dos mesmos⁸².

Os lipossomas **SPI-077** contêm cisplatina, são estáveis no plasma, e apresentam longo tempo de circulação. Eles exibem alta eficácia contra tumores e baixa toxicidade em comparação com a cisplatina livre^{83,84}. Entretanto, em testes clínicos de fase I e fase II, tem apresentado baixa eficácia antitumoral, o que reflete o desafio de se desenvolver não apenas um carreador da droga para o tumor numa forma relativamente inativa, mas também a necessidade de boa capacidade de liberação e ativação⁸⁵.

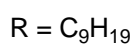
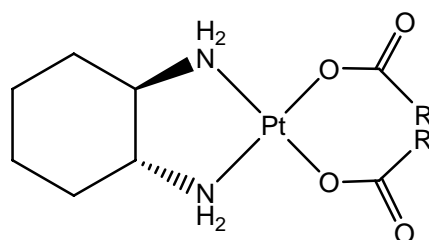
Além da cisplatina, a carboplatina também tem sido encapsulada, e mostra atividade superior à da carboplatina livre⁸⁶. Estudos sugerem a utilização de lipossomas com polissacarídeos aumentando a estabilidade do lipossoma e a especificidade da droga⁸⁷.

Diversas outras drogas⁷⁸, como a doxorubicina, são encapsuladas em lipossomas e têm sido continuamente testadas e os resultados são bastante promissores, especialmente administrados em associação com carboplatina⁸⁸.

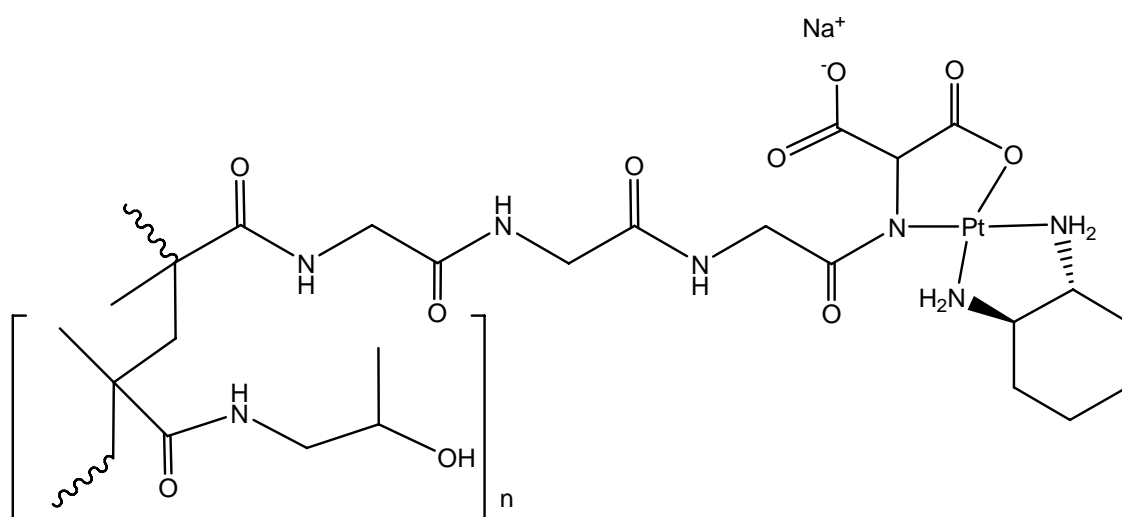
Aroplatina (DACH-L-NDDP) (figura 1.18a) é uma formulação de lipossoma contendo o complexo de platina lipofílico, *cis*-bis(neodecanoato)*trans*-(R-R-1,2-diaminociclohexano)platina(II), com adição de duas cadeias longas de nove carbonos no dicarboxilato. Foi observada grande eficácia na encapsulação e boa estabilidade. Formulações lipossomais com este complexo estão em fase II de testes clínicos em pacientes com câncer no pâncreas e colo-retal avançado⁸⁹.

AP5346, figura 1.18b, é um complexo de platina encapsulado em lipossomas⁵, que contem o ligante diaminocicloexano (DACH) e o polímero biocompatível hidroxipropilmetacrilamida (HPMA), explorando o caráter EPR (enhanced permeability and retention) dessa macromolécula em tumores. Sua

formulação lipossomal (ProLindac™) em estudos pré-clínicos mostrou atividade superior à oxaloplatina. Este composto encontra-se atualmente em triagem clínica contra tumores metastáticos e/ou recorrentes de ovário, cabeça e pescoço⁹⁰.



(a) Aroplatin



(b) AP5346 (Prolindac™)

Figura 1.18. Complexos de platina incorporados em lipossomas atualmente em testes clínicos.

1.6. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Ensaio biológico é a determinação da potência de um fármaco desconhecido a partir da magnitude do efeito biológico que ele produz, normalmente em comparação a um fármaco de ação conhecida⁹¹.

O planejamento e desenvolvimento de novos compostos com atividade biológica requerem investigações à cerca do meio biológico ao qual se pretende empregá-lo. No caso de novas drogas, essas investigações podem ser divididas em etapas que consistem desde a síntese e caracterização físico-química de novas moléculas, passando por testes biológicos *in vitro* e *in vivo* até chegar a testes com seres humanos⁹².

Os testes *in vitro* são testes de citotoxicidade em culturas celulares isoladas de tecidos de animais ou seres humanos, mantidas sob condições especiais em laboratório. Esta etapa precede estudos considerados pré-clínicos, que são estudos *in vivo* onde são verificadas a toxicidade, farmacocinética e biodistribuição da droga em cobaias como camundongos, ratos e coelhos. Finalmente, os estudos envolvendo seres humanos são realizados, com alto rigor, a princípio em pacientes em fase terminal da doença investigada.

A literatura apresenta grande diversidade de testes biológicos que envolvem os complexos de platina que estão em desenvolvimento na atualidade para o tratamento do câncer. Estes testes são realizados em comparação aos três compostos de platina aprovados mundialmente para uso clínico (cisplatina, carboplatina e oxaloplatina) e serão citados no decorrer da discussão deste trabalho. Os principais testes *in vitro* realizados são testes de citotoxicidade contra linhagens celulares de diversos tumores e também células normais (não tumorais), estudos de acúmulo celular, principalmente a absorção celular, influxo e efluxo da droga e a interação com DNA e proteínas, dentre outros componentes importantes nas células. Os testes *in vivo* de primeira necessidade são testes de toxicidade aguda para determinação da dose letal, variação comportamental e efeitos indesejáveis; ensaios de sobrevivência, onde se avalia a capacidade de prolongar o tempo de vida do animal acometido pela doença em questão; atividade antitumoral específica, como inibição do crescimento do tumor; estudos

de biodistribuição para determinação do acúmulo e efeito sobre os tecidos do organismo e a farmacocinética da droga que visa determinar a capacidade de absorção e velocidade de liberação, essencial para o entendimento da relação droga/organismo.

1.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer assusta a cada dia devido ao grande número de pessoas que atinge sem distinção de raça ou poder sócio-econômico. A quimioterapia do câncer ainda apresenta grandes inconvenientes, como os efeitos adversos apresentados pela droga, comprometendo a qualidade de vida do paciente.

Muitos esforços se concentram no desenvolvimento de novas drogas de platina com o objetivo de melhorar a terapia a base de cisplatina, em particular, diminuindo ou eliminando a nefrotoxicidade severa e promovendo a biodisponibilidade oral.

O conhecimento do mecanismo de ação da cisplatina e, mais importante ainda, como se desenvolve a resistência à droga, renovou o otimismo e interesse pelas novas gerações de complexos de platina. Uma das alternativas mais interessantes para driblar os inconvenientes desse tipo de anticancerígeno é a encapsulação em lipossomas. Um dos motivos que não permitiu que a cisplatina encapsulada (SPI-077) fosse aprovada é a baixa solubilidade em água e a baixa lipofilicidade que torna a incorporação menos eficiente.

Diante disso, é importante a síntese de novos compostos lipofílicos de platina e a investigação de sua atividade antitumoral, principalmente influenciada por sistemas nanoestruturados que modificam esta atividade.

1.8. OBJETIVOS DESTA TRABALHO

Este trabalho tem como objetivos:

- A síntese e caracterização de complexos de platina(II) contendo ligantes *N*-alquilados de cadeia longa, derivados da 1,2-etanodiamina e 1,3-propanodiamina, e os respectivos complexos de platina (IV) com hidroxilas e cloretos nas posições axiais.
- A preparação e caracterização de lipossomas de longo tempo de circulação na corrente sanguínea contendo os complexos de platina.
- A realização dos testes *in vitro* da atividade citotóxica dos complexos sintetizados, livres e encapsulados em lipossomas, contra linhagens de células tumorais e normais.
- A escolha de um composto promissor para testes *in vivo* de atividade antitumoral, toxicidade e farmacocinética comparada à formulação encapsulada em lipossomas.

CAPÍTULO 2

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS LIGANTES N-ALQUILADOS DE CADEIA LONGA DERIVADOS DA 1,2-ETANODIAMINA E DA 1,3-PROPANODIAMINA E DE SEUS RESPECTIVOS COMPLEXOS DE PLATINA(II) E PLATINA(IV)

2.1. INTRODUÇÃO

O primeiro trabalho publicado descrevendo a presença de compostos poliaminados em tecidos de câncer foi em 1958 no Japão⁹³. Desde então diversas moléculas poliaminadas foram encontradas em todas as formas de vida e exercem múltiplas funções essenciais, como a proliferação celular, diferenciação e replicação do DNA^{94,95}. Além disso, tem sido observado que combinações de certas poliaminas com agentes citotóxicos, como a cisplatina, apresentam sinergismo contra células de câncer de mama⁹⁶.

Ligantes diaminados *N*-alquilados de cadeia longa foram utilizados recentemente para obtenção de complexos de platina e apresentaram atividade antitumoral⁹⁷. A obtenção deste tipo de complexo se mostra bastante interessante visto que apresenta caráter anfifílico devido à lipofilia causada pela longa cadeia carbônica e hidrofília gerada pelo núcleo de platina. Esta característica permite a utilização destes complexos em sistemas de incorporação e biodistribuição como os lipossomas⁹⁸.

Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com complexos de platina com ligantes diaminados *N*-benzilados com cloretos ou carboxilatos, além de complexos dinucleares de platina que têm mostrado atividade citotóxica em diversas linhagens tumorais⁹⁹. Neste capítulo, apresentamos a síntese e a caracterização de 10 ligantes *N*-alquilados diaminados, derivados da 1,2-etanodiamina e da 1,3-propanodiamina, com cadeias carbônicas de 8, 10, 12, 14 e 16 carbonos. A partir destes ligantes, sintetizamos 10 complexos de platina(II) e 20 complexos de platina(IV) com hidroxilas ou cloretos nas posições axiais.

2.2. PARTE EXPERIMENTAL

2.2.1. Reagentes e Métodos Instrumentais

1,2-etanodiamina (Vetec)
1,3-propanodiamina (Fluka)
1-decanol (Aldrich)
1-dodecanol (Aldrich)
1-hexadecanol (Vetec)
1-octanol (Vetec)
1-tetradecanol (Aldrich)
Cloreto de mesila (Aldrich)
Iodo (Vetec)
Ninidrina (Vetec)
Piridina (Vetec)
Solução de peróxido de hidrogênio a 30% (Vetec)
Tetracloroplatinato(II) de potássio (Aldrich)
Acetato de etila (Quimex)
Clorofórmio (Merck)
Clorofórmio- d_1 (Spectrum)
Diclorometano (Quimex)
Dimetilsulfóxido- d_6 (Spectrum)
Hexano (Quimex)
Metanol (Quimex)
Ácido Clorídrico (Merck)

- ***Espectros de Absorção na Região do Infravermelho***

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos num espectrofotômetro Bomem FT IR MB-102, no Departamento de Química da UFJF.

Para os ligantes, os espectros foram obtidos em discos de Csl, na região de 4000 a 300 cm^{-1} .

Para os complexos, os espectros foram obtidos em pastilhas de KBr, na região de 4000 a 300 cm^{-1} e em nujol e pastilhas de KRS-5 de 600 a 300 cm^{-1} .

- **Espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , ^{195}Pt**

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos dissolvendo-se os ligantes em CDCl_3 e os complexos em $\text{DMSO-}d_6$ em espectrofotômetro Bruker (300 MHz para os espectros de RMN de ^1H , 75 MHz para os espectros de RMN de ^{13}C e 64 MHz para os espectros de RMN de ^{195}Pt) no Departamento de Química da UFJF. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm). Para RMN de ^{195}Pt foi utilizado como referência uma solução de K_2PtCl_6 em D_2O ($\delta = 0$).

- **Análise Elementar**

A análise elementar de C, H e N dos compostos foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo – USP.

- **Faixas de decomposição**

As faixas de temperatura de decomposição foram determinadas em um aparelho digital MQAPF-Microquímica, no Departamento de Química da UFJF.

2.2.2. Síntese dos ligantes

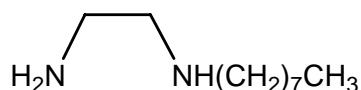
A uma solução de 100 mmol de cada álcool em 30 mL de CH₂Cl₂ adicionou-se lentamente excesso de cloreto de mesila (120 mmol) sob agitação a 0 °C. Adicionou-se a seguir 10 mL de piridina gota a gota. Após aproximadamente 24 horas, o consumo completo do álcool de partida foi evidenciado por CCDS (eluente: hexano/acetato de etila 9:1; revelador iodo). Após evaporação do solvente em rotaevaporador, foi realizada uma extração líquido-líquido em hexano e água e a fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida conduzindo aos mesilatos desejados que foram usados sem prévia purificação.

A seguir, a uma solução etanólica (40 mL) com excesso de 1,2-etanodiamina ou 1,3-propanodiamina (100 mmol) sob agitação e refluxo, adicionou-se lentamente o alquilmesilato (50 mmol). Após aproximadamente 24 horas, a formação do produto desejado (ligante) foi evidenciada por CCDS (eluente: diclorometano/metanol 9:1 e duas gotas de hidróxido de amônio; revelador iodo/ninidrina). O solvente foi evaporado e o excesso da diamina de partida foi eliminado por extração com diclorometano e água. Em seguida, a fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida e o resíduo purificado em coluna cromatográfica em Sílica Gel 60 (0,063 – 0,200 mm Merck) utilizando-se uma mistura de metanol e diclorometano como eluentes e iodo e ninidrina como reveladores.

2.2.3. Dados de caracterização dos ligantes

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

1



Fórmula Molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_{24}\text{N}_2$

Massa Molar: 172 g/mol

Características Físicas: óleo, incolor

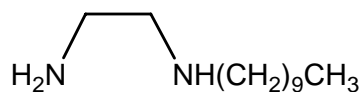
Rendimento: 41 % (7,05 g)

I.V. v KBr (cm^{-1}): 3369, 2951, 2922, 2851, 1566, 1469, 1321, 817, 722.

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 0,92 (t, 3H, $J = 6,0$ Hz, CH_3); 1,27 (m, 12H, CH_2); 1,60 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}$); 2,28 (s, 3H, NH e NH_2); 2,65 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}$); 2,81; 2,92 (2 t, 4H, $J = 7,0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH}$ e $\text{CH}_2\text{-NH}_2$).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 13,8 (CH_3); 22,5 a 31,6 (CH_2); 41,4 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 49,6; 51,3 ($\text{CH}_2\text{-NH}$).

2



Fórmula Molecular: C₁₂H₂₈N₂

Massa Molar: 200 g/mol

Características Físicas: óleo, incolor

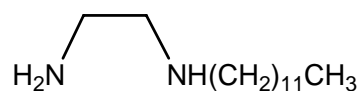
Rendimento: 46 % (9,2 g)

I.V. ν KBr (cm⁻¹): 3385, 2955, 2923, 2853, 1565, 1469, 1316, 819, 722.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,79 (t, 3H, J = 7,0 Hz, CH₃); 1,17 (m, 16H, CH₂); 1,39 (m, 5H, NH, NH₂ e CH₂CH₂CH₂-NH); 2,50 (t, J = 7,0 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂-NH); 2,56; 2,70 (2 t, 4H, J = 5,0 Hz, CH₂-NH e CH₂-NH₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 13,9 (CH₃); 22,5 a 31,7 (CH₂); 41,6 (CH₂-NH₂); 49,8; 52,4 (CH₂-NH).

3



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

Massa Molar: 228 g/mol

Características Físicas: sólido, branco

Ponto de Fusão: 36 - 40°C

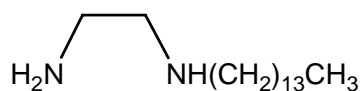
Rendimento: 39 % (8,9 g)

I.V. ν KBr (cm^{-1}): 3373, 2955, 2922, 2853, 1568, 1468, 1321, 820, 721.

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 0,83 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3); 1,21 (m, 20H, CH_2); 1,44 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}$); 2,02 (s, 3H, NH e NH_2); 2,55 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}$); 2,63; 2,76 (2 t, 4H, $J = 5,0; 5,0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH}$ e $\text{CH}_2\text{-NH}_2$).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 13,9 (CH_3); 22,5 a 31,7 (CH_2); 41,1 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 49,6; 51,7 ($\text{CH}_2\text{-NH}$).

4



Fórmula Molecular: C₁₆H₃₆N₂

Massa Molar: 256 g/mol

Características Físicas: sólido, branco

Ponto de Fusão: 53 -57 °C

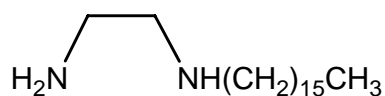
Rendimento: 36 % (9,2 g)

I.V. ν KBr (cm⁻¹): 3376, 2956, 2919, 2850, 1573, 1468, 1318, 820, 720.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,86 (t, 3H, J = 6,8 Hz, CH₃); 1,24 (m, 24H, CH₂); 1,48 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂-NH); 2,44 (sl, 2H, NH₂); 2,59 (t, 2H, J = 7,0 Hz, CH₂CH₂CH₂-NH); 2,66; 2,80 (2 t, 4H, J = 6,0; 6,0 Hz, CH₂-NH e CH₂-NH₂); 3,41 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 14,2 (CH₃); 22,8 a 32,0 (CH₂); 41,5 (CH₂-NH₂); 49,9; 52,2 (CH₂-NH).

5



Fórmula Molecular: $\text{C}_{18}\text{H}_{40}\text{N}_2$

Massa Molar: 284 g/mol

Características Físicas: sólido, branco

Ponto de Fusão: 58 - 60 °C

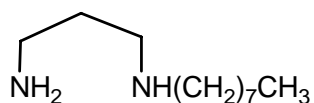
Rendimento : 55 % (15,6 g)

I.V. v KBr (cm^{-1}): 3358, 2917, 2850, 1560, 1467, 821, 721.

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 0,85 (sl, 3H, CH_3); 1,23 (m, 28H, CH_2); 1,46 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}$); 2,01 (sl, 3H, NH, NH_2); 2,57 (sl, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}$); 2,63; 2,78 (2 sl, 4H, $\text{CH}_2\text{-NH}$ e $\text{CH}_2\text{-NH}_2$).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 14,3 (CH_3); 22,8 a 32,1 (CH_2); 41,1 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 49,8; 51,8 ($\text{CH}_2\text{-NH}$).

6



Fórmula Molecular: C₁₁H₂₆N₂

Massa Molar: 186 g/mol

Características Físicas: óleo, incolor

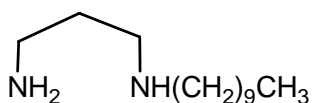
Rendimento: 44 % (8,2 g)

I.V. v KBr (cm⁻¹): 3386, 2929, 2858, 1634, 1563, 1468, 1121, 722.

RMN ¹H (CDCl₃) δ: 0,87 (t, 3H, CH₃); 1,27 (m, 12H, CH₂); 1,49 (m, 2H -CH₂-CH₂-NH); 1,68 (quint., 2H, N-CH₂-CH₂-CH₂-N); 2,60 (t, 2H, J = 7,0; CH₂-NH₂); 2,69; 2,79 (2t 4H, J = 7,0, CH₂-NH) 3,10; 3,39 (2s, NH e NH₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 14,3 (CH₃); 22,8 a 33,1; (CH₂); 40,4 (CH₂-NH₂); 47,9; 50,2 (CH₂-NH).

7



Fórmula Molecular: C₁₃H₃₀N₂

Massa Molar: 214 g/mol

Características Físicas: óleo, incolor

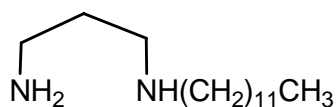
Rendimento: 39 % (8,3 g)

I.V. v KBr (cm⁻¹): 3369, 2923, 2852, 1634, 1568, 1468, 1112, 721.

RMN ¹H (CDCl₃) δ: 0,85 (t, 3H, J = 7,0 Hz, CH₃); 1,23 (m, 16H, CH₂); 1,44 (m, 2H - CH₂-CH₂-NH); 1,63 (quint, 2H, J = 7,0; 7,0 Hz, N-CH₂-CH₂-CH₂-N); 2,56 (t, 2H, J = 6,7 Hz, CH₂-NH₂); 2,64; 2,74 (2 t, 4H, J = 6,7 Hz, CH₂-NH); 2,93 (s, 3H, NH e NH₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ: 14,3 (CH₃); 22,8 a 39,4 (CH₂); 40,5 (CH₂-NH₂); 47,9; 50,2 (CH₂-NH).

8



Fórmula Molecular: C₁₅H₃₄N₂

Massa Molar: 242 g/mol

Características Físicas: sólido, branco

Ponto de Fusão: 45 - 48 °C

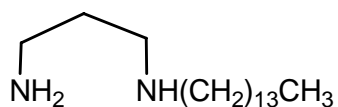
Rendimento: 45 % (10,9 g)

I.V. ν KBr (cm⁻¹): 3400, 2923, 2852, 1633, 1564, 1467, 1113, 721.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,84 (t, 3H, J = 7,0 Hz, CH₃); 1,21 (m, 20H, CH₂); 1,47 (m, 2H - CH₂-CH₂-NH); 1,66 (quint, 2H, J = 6,8; 7,0 Hz, N-CH₂-CH₂-CH₂-N); 2,57 (t, 2H, J = 7,0 Hz, CH₂-NH₂); 2,67; 2,77 (2 t, 4H, J = 6,8; 7,0 Hz, CH₂-NH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 14,2 (CH₃); 22,7 a 32,5 (CH₂); 40,4 (CH₂-NH₂); 47,9; 49,9 (CH₂-NH).

9



Fórmula Molecular: C₁₇H₃₈N₂

Massa Molar: 270 g/mol

Características Físicas: sólido, branco

Ponto de Fusão: 47 - 52 °C

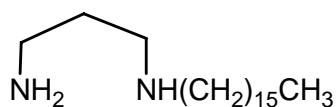
Rendimento: 38% (10,3 g)

I.V. ν KBr (cm⁻¹): 3455, 2917, 2849, 1638, 1566, 1468, 1116, 721.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,86 (t, 3H, J = 7,0 Hz, CH₃); 1,23 (m, 24H, CH₂); 1,46 (m, 2H - CH₂-CH₂-NH); 1,66 (quint, 2H, J = 7,0 Hz, N-CH₂-CH₂-CH₂-N); 2,57 (t, 2H, J = 7,2 Hz, CH₂-NH₂); 2,65 (t, 2H, J = 7,2 Hz, CH₂-NH); 2,75 (m, 2H, CH₂-NH e sl, 3H, NH e NH₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 14,3 (CH₃); 22,8 a 33,4 (CH₂); 40,5 (CH₂-NH₂); 47,9; 50,2 (CH₂-NH).

10



Fórmula Molecular: C₁₉H₄₂N₂

Massa Molar: 298 g/mol

Características Físicas: sólido, branco

Ponto de Fusão: 72 - 75 °C

Rendimento: 42 % (12,5 g)

I.V. ν KBr (cm⁻¹): 3450, 2917, 2850, 1640, 1561, 1468, 1111, 721.

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 0,87 (t, 3H, J = 7,0 Hz, CH₃); 1,25 (m, 28H, CH₂); 1,49 (sl, 2H - CH₂-CH₂-NH); 1,67 (quint, 2H, J = 7,0 Hz, N-CH₂-CH₂-N); 1,86 (sl, 3H, NH e NH₂); 2,61 (t, 2H, J = 7,0 Hz, CH₂-NH₂); 2,71; 2,79 (2 t, 4H, J = 6,8 Hz, CH₂-NH).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 14,3 (CH₃); 22,8 a 33,4 (CH₂); 40,5 (CH₂-NH₂); 47,9; 50,2 (CH₂-NH).

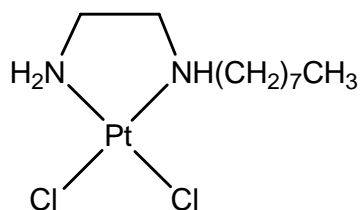
2.2.4. Síntese dos complexos de platina(II)

A uma solução com 0,415 g (1 mmol) de K_2PtCl_4 em 5 mL de água, sob agitação e temperatura ambiente, foi adicionada uma solução do respectivo ligante (1mmol) em 5 mL de água/metanol. A adição do ligante ao sal de platina é feita de forma lenta, gota a gota por 4 horas. Para a obtenção do complexo **20** foi utilizado THF (tetraidrofurano) e água como solventes da reação. Ao término da adição do ligante, a reação permaneceu sob agitação por 24 horas. O precipitado obtido foi então filtrado sob pressão reduzida e lavado com água e metanol.

2.2.5. Dados de caracterização dos complexos de platina(II)

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

11



Fórmula Molecular: $C_{10}H_{24}N_2Cl_2Pt$

Massa Molar: 438 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 184 – 259 °C

Rendimento: 84 % (0,368 g)

I.V. ν KBr (cm^{-1}): 3257, 3188, 2958, 2927, 2858, 1575, 1463, 1384, 769, 576, 318, 316.

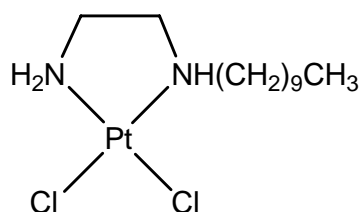
RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 0,85 (t, 3H, CH_3); 1,24 (m, 10H, CH_2); 1,47; 1,75 (2m, 2H, \underline{CH}_2-CH_2-NH); 2,27; 2,42; 2,72; 2,82 (4m, 6H, $2\underline{CH}_2-NH$ e \underline{CH}_2-NH_2); 5,30; 5,37 (2sl, 2H, NH_2); 6,19 (sl, 1H, NH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 14,3 (CH_3); 22,4 a 31,6 (CH_2); 46,9 (CH_2-NH_2); 52,3; 55,4 (CH_2-NH).

RMN ^{195}Pt (DMSO- d_6) δ : -2334.

Análise Elementar (%): Calculado	C, 27,40; H, 5,48; N, 6,39
Encontrado	C, 27,76; H, 5,34; N, 6,19

12



Fórmula Molecular: $C_{12}H_{28}N_2Cl_2Pt$

Massa Molar: 466 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 178 – 266 °C

Rendimento: 79 % (0,368 g)

I.V. ν KBr (cm^{-1}): 3243, 3200, 3133, 2957, 2922, 2853, 1574, 1466, 1378, 770, 721, 577, 321, 318.

RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 0,84 (t, 3H, CH_3); 1,23 (m, 14H, CH_2); 1,45; 1,74 (2m, 2H, CH_2-CH_2-NH); 2,27; 2,43; 2,71; 2,82 (4m, 6H, $2CH_2-NH$ e CH_2-NH_2); 5,28; 5,35 (2sl, 2H, NH_2); 6,19 (sl, 1H, NH).

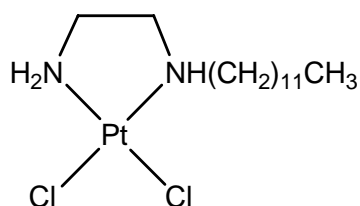
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 13,9 (CH_3); 22,1 a 31,3 (CH_2); 46,7 (CH_2-NH_2); 52,0; 55,1(CH_2-NH).

RMN ^{195}Pt (DMSO- d_6) δ : -2353.

Análise Elementar (%): Calculada C, 30,90; H, 6,01; N, 6,01.

Encontrada C, 30,70; H, 5,85; N, 6,02.

13



Fórmula Molecular: $C_{14}H_{32}N_2Cl_2Pt$

Massa Molar: 494 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 181 – 262 °C

Rendimento: 81 % (0,400 g)

I.V. ν KBr (cm^{-1}): 3245, 3196, 3133, 2957, 2922, 2852, 1578, 1466, 1378, 721, 577, 322, 321.

RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 0,86 (t, 3H, CH_3); 1,25 (m, 18H, CH_2); 1,47; 1,76 (2m, 2H, \underline{CH}_2 - CH_2 -NH); 2,29; 2,45; 2,74; 2,84 (4m, 6H, 2 \underline{CH}_2 -NH e \underline{CH}_2 -NH $_2$); 5,31; 5,38 (2sl, 2H, NH $_2$); 6,20 (sl, 1H, NH).

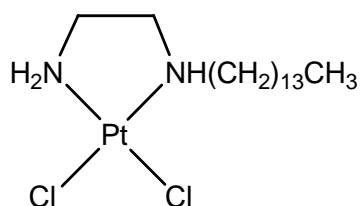
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 13,6 (CH_3); 21,7 a 30,9 (CH_2); 46,3 (CH_2 -NH $_2$); 51,6; 54,7 (CH_2 -NH).

RMN ^{195}Pt (DMSO- d_6) δ : -2353.

Análise Elementar (%): Calculado C, 34,00; H, 6,48; N, 5,67.

Encontrado C, 34,61; H, 6,45; N, 5,78.

14



Fórmula Molecular: C₁₆H₃₆N₂Cl₂Pt

Massa Molar: 522 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 186 – 263 °C

Rendimento: 80,6 % (0,421 g)

I.V. ν KBr (cm⁻¹): 3243, 3198, 3134, 2956, 2920, 2851, 1467, 721, 578, 315, 313.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 0,84 (t, 3H, CH₃); 1,23 (m, 22H, CH₂); 1,47; 1,74 (2m, 2H, CH₂-CH₂-NH); 2,27; 2,43; 2,71; 2,82 (4m, 6H, 2CH₂-NH e CH₂-NH₂); 5,29; 5,36 (2sl, 2H, NH₂); 6,19 (sl, 1H, NH).

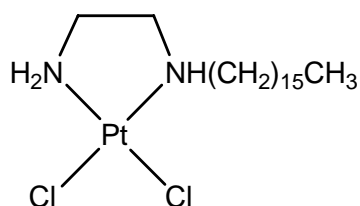
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 13,9 (CH₃); 22,1 a 31,3 (CH₂); 46,6 (CH₂-NH₂); 52,0; 55,1 (CH₂-NH).

RMN ¹⁹⁵Pt (DMSO-*d*₆) δ : -2353.

Análise Elementar (%): Calculado C, 36,78; H, 6,90; N, 5,36.

Encontrado C, 37,65; H, 6,84; N, 5,51.

15



Fórmula Molecular: C₁₈H₄₀N₂Cl₂Pt

Massa Molar: 550 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 181 – 252 °C

Rendimento: 62,2 % (0,342 g)

I.V. ν KBr (cm⁻¹): 3134, 2955, 2918, 2851, 1660, 1467, 1378, 721, 576, 325, 322.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 0,84 (t, 3H, CH₃); 1,23 (m, 26H, CH₂); 1,48; 1,74 (2m, 2H, CH₂-CH₂-NH); 2,08; 2,26; 2,71; 2,83 (4m, 6H, 2CH₂-NH e CH₂-NH₂); 5,26; 5,35 (2sl, 2H, NH₂); 6,16 (sl, 1H, NH).

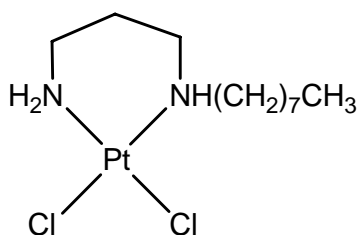
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 13,9 (CH₃); 22,1 a 31,3 (CH₂); 45,4 (CH₂-NH₂); 51,0; 56,1 (CH₂-NH).

RMN ¹⁹⁵Pt (DMSO-*d*₆) δ : - 2353.

Análise Elementar (%): Calculado C, 39,27; H, 7,27; N, 5,09.

Encontrado C, 41,98; H, 7,30; N, 4,91.

16



Fórmula Molecular: C₁₁H₂₆N₂Cl₂Pt

Massa Molecular: 452 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 189 – 263 °C

Rendimento: 73,0 % (0,329g)

I.V. ν KBr (cm⁻¹): 3206, 3142, 2955, 2923, 2853, 1599, 1456, 722, 333, 317.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 0,85 (m, 3H, CH₃); 1,26 (m, 10H, CH₂); 1,67; 1,98 (2m, 4H, 2CH₂-CH₂-NH); 2,37; 2,69; 2,85; 3,00 (4m, 6H, 2CH₂-NH e CH₂-NH₂); 4,81; 5,08 (2m, 2H, NH₂); 5,73 (sl, 1H, NH).

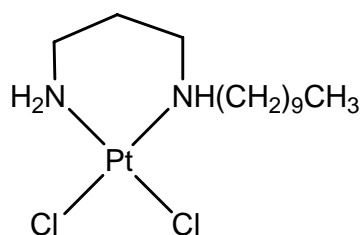
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 14,1 (CH₃); 22,1 a 31,2 (CH₂ e N-CH₂-CH₂-N); 42,8 (CH₂-NH₂); 50,5; 53,3 (CH₂-NH).

RMN ¹⁹⁵Pt (DMSO-*d*₆) δ : -2248.

Análise Elementar (%): Calculado C, 29,20; H, 5,75; N, 6,19.

Encontrado C, 28,60; H, 5,46; N, 6,01.

17



Fórmula Molecular: C₁₃H₃₀N₂Cl₂Pt

Massa Molecular: 480 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 170 – 232° C

Rendimento: 69,7 % (0,335g)

I.V. ν KBr (cm⁻¹): 3206, 3142, 2955, 2922, 2853, 1599, 1455, 722, 331, 317.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 0,88 (m, 3H, CH₃); 1,28 (m, 14H, CH₂); 1,71; 1,88; 2,01 (3m, 4H, 2CH₂-CH₂-NH); 2,39; 2,73; 2,88; 3,03 (4m, 6H, 2CH₂-NH e CH₂-NH₂); 4,86; 5,08 (2m, 2H, NH₂); 5,75 (sl, 1H, NH).

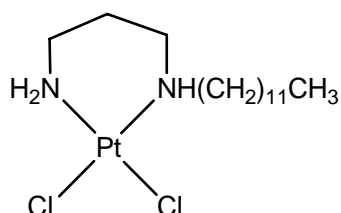
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 13,9 (CH₃); 22,1 a 31,2 (CH₂ e N-CH₂-CH₂-N); 42,8 (CH₂-NH₂); 50,3; 53,3 (CH₂-NH).

RMN ¹⁹⁵Pt (DMSO-*d*₆) δ : -2252.

Análise Elementar (%): Calculado C, 32,50; H, 6,25; N, 5,83.

Encontrado C, 32,34; H, 5,99; N, 5,53.

18



Fórmula Molecular: C₁₅H₃₄N₂Cl₂Pt

Massa Molar: 508 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 201 – 244 °C

Rendimento: 65,8 % (0,334 g)

I.V. ν KBr (cm⁻¹): 3205, 3140, 2955, 2922, 2851, 1599, 1466, 722, 321, 317.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 0,84 (m, 3H, CH₃); 1,23 (m, 18H, CH₂); 1,61; 1,68; 1,96 (3m, 4H, 2CH₂-CH₂-NH); 2,39; 2,70; 2,86; 2,97 (4m, 6H, 2CH₂-NH e CH₂-NH₂); 4,85; 5,02 (2m, 2H, NH₂); 5,72 (sl, 1H, NH).

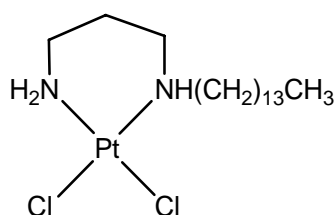
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 13,9 (CH₃); 22,1 a 31,3 (CH₂ e N-CH₂-CH₂-N); 42,8 (CH₂-NH₂); 50,4; 53,3 (CH₂-NH).

RMN ¹⁹⁵Pt (DMSO-*d*₆) δ : -2252.

Análise Elementar (%): Calculado C, 35,43; H, 6,69; N, 5,51.

Encontrado C, 35,52; H, 6,65; N, 5,40.

19



Fórmula Molecular: C₁₇H₃₈N₂Cl₂Pt

Massa Molar: 536 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 171 – 253 °C

Rendimento: 74,7 % (0,400g)

I.V. v KBr (cm⁻¹): 3206, 2955, 2922, 2852, 1598, 1466, 721, 321, 318.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ: 0,80 (m, 3H, CH₃); 1,19 (m, 22H, CH₂); 1,64; 1,95 (2m, 4H, 2CH₂-CH₂-NH); 2,35; 2,69; 2,82; 2,96 (4m, 6H, 2CH₂-NH e CH₂-NH₂); 4,78; 5,04 (2m, 2H, NH₂); 5,69 (sl, 1H, NH).

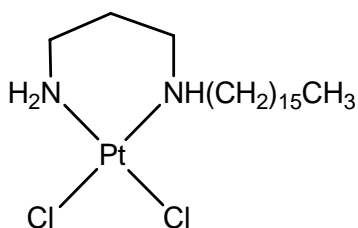
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ: 13,9 (CH₃); 22,1 a 31,3 (CH₂ e N-CH₂-CH₂-N); 42,8 (CH₂-NH₂); 50,4; 53,3 (CH₂-NH).

RMN ¹⁹⁵Pt (DMSO-*d*₆) δ: - 2252.

Análise Elementar (%): Calculado C, 38,06; H, 7,09; N, 5,22.

Encontrado C, 38,26; H, 7,18; N, 5,08.

20



Fórmula Molecular: C₁₉H₄₂N₂Cl₂Pt

Massa Molar: 564 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 172 – 230°C

Rendimento: 70,4 % (0,396 g)

I.V. ν KBr (cm⁻¹): 3204, 3132, 2920, 2851, 1617, 1466, 721, 333, 327.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 0,85 (m, 3H, CH₃); 1,23 (m, 26H, CH₂); 1,59; 1,68; 1,85; 1,98 (4m, 4H, 2CH₂-CH₂-NH); 2,38; 2,86; 2,97; 3,11 (4m, 6H, 2CH₂-NH e CH₂-NH₂); 5,03; 5,24 (2m, 2H, NH₂); 5,72 (sl, 1H, NH).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 13,9 (CH₃); 22,1 a 31,2 (CH₂ e N-CH₂-CH₂-N); 42,8 (CH₂-NH₂); 50,4; 53,3 (CH₂-NH).

RMN ¹⁹⁵Pt (DMSO-*d*₆) δ : -2251.

Análise Elementar (%): Calculado C, 40,43; H, 7,45; N, 4,96

Encontrado C, 40,15; H, 7,14; N, 4,91

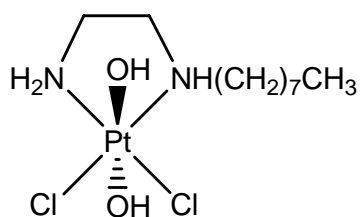
2.2.6. Síntese dos complexos de platina(IV) com hidroxilas

Em um balão de 50 mL foi feita uma suspensão com 1 mmol do respectivo complexo de platina(II) precursor em 5 mL de água. Adicionou-se em seguida, durante 30 minutos, a 50°C, 5 mL de solução de H₂O₂ a 30%. Após a adição de peróxido, o aquecimento foi desligado e a reação permaneceu sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente. O precipitado obtido foi então filtrado sob pressão reduzida e lavado com água.

2.2.7. Dados de caracterização dos complexos de platina(IV) com hidroxilas

Estes complexos foram devidamente caracterizados e estão apresentados a seguir com os dados de RMN de ¹H, ¹³C e ¹⁹⁵Pt, espectroscopia na região do infravermelho e análise elementar.

21



Fórmula Molecular: C₁₀H₂₆N₂Cl₂O₂Pt

Massa Molar: 472 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 164 – 230°C

Rendimento: 62,7 % (0,296 g)

I.V. v KBr (cm⁻¹): 3479, 3191, 2960, 2929, 2860, 1637, 1458, 1054, 547, 339, 335.

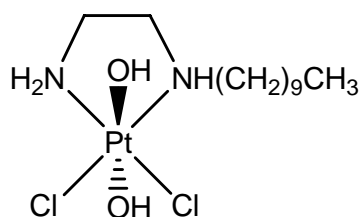
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ: 0,86 (t, 3H, CH₃); 1,25 (m, 10H, CH₂); 1,68; (m, 2H, CH₂-CH₂-NH); 2,20 a 2,90 (m, 6H, 2CH₂-NH e CH₂-NH₂).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ: 13,9 (CH₃); 22,1 a 31,2 (CH₂); 45,3 (CH₂-NH₂); 50,9 (CH₂-NH).

RMN ¹⁹⁵Pt (DMSO-*d*₆) δ: + 789.

Análise Elementar (%):	Calculado	C, 25,42; H, 5,51; N, 5,93
	Encontrado	C, 25,46; H, 4,91; N, 5,46

22



Fórmula Molecular: $C_{12}H_{30}N_2Cl_2O_2Pt$

Massa Molar: 500 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo

Faixa de decomposição: 168 – 256 °C

Rendimento: 82,5 % (0,413 g)

I.V. v KBr (cm^{-1}): 3479, 3166, 2922, 2852, 1617, 1466, 1034, 561, 337, 332.

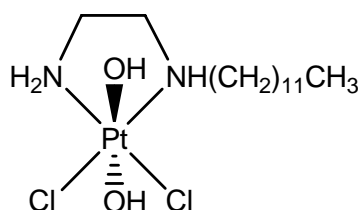
RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 0,79 (sl, 3H, CH_3); 1,19 (m, 14H, CH_2); 1,63 (m, 2H, \underline{CH}_2 - CH_2 -NH); 2,20 a 2,90 (m, 6H, 2 \underline{CH}_2 -NH e \underline{CH}_2 - NH_2).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 14,4 (CH_3); 22,5 a 31,7 (CH_2);

Análise Elementar (%): Calculado C, 28,80; H, 6,00; N, 5,60.

Encontrado C, 29,93; H, 5,41; N, 5,60.

23



Fórmula Molecular: C₁₄H₃₄N₂Cl₂O₂Pt

Massa Molar: 528 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo

Faixa de decomposição: 168 – 258 °C

Rendimento: 94,7 % (0,500 g)

I.V. ν KBr (cm⁻¹): 3482, 3166, 2921, 2853, 1634, 1466, 1040, 557, 334, 329.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 0,81 (t, 3H, CH₃); 1,20 (m, 18H, CH₂); 1,63 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH); 2,20 a 2,90 (m, 6H, 2CH₂-NH e CH₂-NH₂).

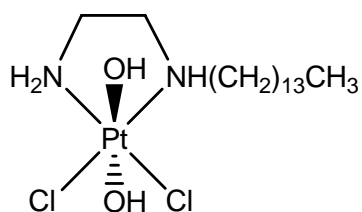
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 13,7 (CH₃); 22,5 a 31,1 (CH₂); 45,1 (CH₂-NH₂); 50,8; 53,5 (CH₂-NH).

RMN ¹⁹⁵Pt (DMSO-*d*₆) δ : + 788

Análise Elementar (%): Calculado C, 31,82; H, 6,44; N, 5,30.

Encontrado C, 31,87; H, 5,73; N, 5,21.

24



Fórmula Molecular: C₁₆H₃₈N₂Cl₂O₂Pt

Massa Molar: 556 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo

Faixa de decomposição: 172 – 275 °C

Rendimento: 78,1 % (0,434 g)

I.V. v KBr (cm⁻¹): 3480, 3169, 2920, 2851, 1636, 1466, 1061, 555, 335, 331.

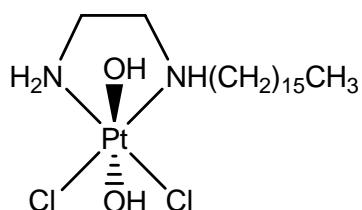
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ: 0,81 (t, 3H, CH₃); 1,20 (m, 22H, CH₂); 1,65 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH); 2,20 a 2,90 (m, 6H, 2CH₂-NH e CH₂-NH₂).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ: 14,0 (CH₃); 22,1 a 31,3 (CH₂).

Análise Elementar (%): Calculado C, 34,53; H, 6,83; N, 5,04.

Encontrado C, 33,52; H, 5,91; N, 4,63.

25



Fórmula Molecular: C₁₈H₄₂N₂Cl₂O₂Pt

Massa Molar: 584 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo

Faixa de decomposição: 167 – 247 °C

Rendimento: 68,8 % (0,402 g)

I.V. ν KBr (cm⁻¹): 3468, 3171, 2920, 2851, 1637, 1467, 1039, 720, 559, 337, 335.

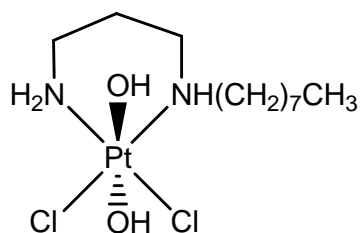
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 0,81 (t, 3H, CH₃); 1,20 (m, 25H, CH₂); 1,65 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH); 2,20 a 2,90 (m, 6H, 2CH₂-NH e CH₂-NH₂).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 13,9 (CH₃); 22,1 a 31,3 (CH₂).

Análise Elementar (%): Calculado C, 36,99; H, 7,19; N, 4,79.

Encontrado C, 40,29; H, 7,15; N, 4,81.

26



Fórmula Molecular: $C_{11}H_{28}N_2Cl_2O_2Pt$

Massa Molar: 486 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 169 – 245 °C

Rendimento: 72,5 % (0,352 g)

I.V. ν KBr (cm^{-1}): 3492, 3191, 2960, 2927, 2858, 1631, 1461, 1018, 552, 335, 333.

RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 0,81 (t, 3H, CH_3); 1,25 (m, 10H, CH_2); 1,67; 1,81 (2m, 4H, $2\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$); 2,20 a 2,90 (m, 6H, $2\text{CH}_2\text{-NH}$ e $\text{CH}_2\text{-NH}_2$).

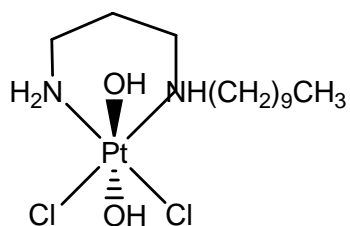
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 13,9 (CH_3); 22,1 a 31,3 (CH_2).

RMN ^{195}Pt (DMSO- d_6) δ : + 885

Análise Elementar (%): Calculado C, 27,16; H, 5,76; N, 5,76

Encontrado C, 25,38; H, 5,21; N, 5,11

27



Fórmula Molecular: $C_{13}H_{32}N_2Cl_2O_2Pt$

Massa Molar: 514 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 146 – 230°C

Rendimento: 77,6 % (0,399 g)

I.V. v KBr (cm^{-1}): 3485, 3142, 2914, 2850, 1628, 1470, 1047, 550, 333, 327.

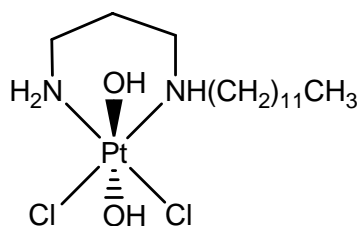
RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 0,85 (t, 3H, CH_3); 1,24 (m, 14H, CH_2); 1,66; 1,83 (2m, 4H, $2CH_2-CH_2-NH$); 2,20 a 2,90 (m, 6H, $2CH_2-NH$ e CH_2-NH_2).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 13,9 (CH_3); 22,1 a 31,3 (CH_2).

RMN ^{195}Pt (DMSO- d_6) δ : + 901

Análise Elementar (%): Calculado C, 30,35; H, 6,23; N, 5,45
Encontrado C, 29,75; H, 5,63; N, 4,85

28



Fórmula Molecular: $C_{15}H_{36}N_2Cl_2O_2Pt$

Massa Molar: 542 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo

Faixa de decomposição: 144 - 239 °C

Rendimento: 81,5 % (0,442 g)

I.V. v KBr (cm^{-1}): 3484, 3416, 3134, 2921, 2849, 1618, 1471, 1053, 553, 335, 333.

RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 0,86 (sl, 3H, CH_3); 1,25 (m, 18 H, CH_2); 1,68; 1,85 (2m, 4H, $2CH_2-CH_2-NH$); 2,20 a 2,90 (2m, 6H, $2CH_2-NH$ e CH_2-NH_2).

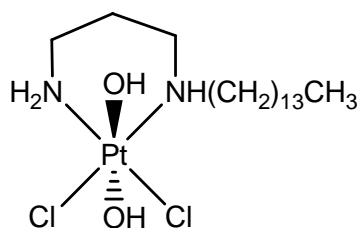
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 13,9 (CH_3); 22,1 a 31,3 (CH_2).

RMN ^{195}Pt (DMSO- d_6) δ : + 815

Análise Elementar (%): Calculado C, 33,21; H, 6,64; N, 5,17.

Encontrado C, 33,18; H, 6,45; N, 4,96.

29



Fórmula Molecular: $C_{17}H_{40}N_2Cl_2O_2Pt$

Massa Molar: 570 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo

Faixa de decomposição: 143 – 241 °C

Rendimento: 82,6 % (0,471 g)

I.V. v KBr (cm^{-1}): 3482, 3203, 2922, 2851, 1619, 1468, 1055, 561, 335, 332.

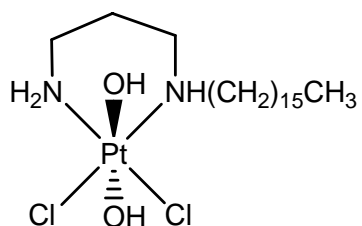
RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 0,85 (sl, 3H, CH_3); 1,24 (m, 22 H, CH_2); 1,69; 1,85 (m, 4H, $2CH_2-CH_2-NH$); 2,20 a 2,90 (m, 6H, $2CH_2-NH$ e CH_2-NH_2).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 13,9 (CH_3); 22,1 a 31,3 (CH_2).

Análise Elementar(%) : Calculado C, 35,79; H, 7,02; N, 4,91.

Encontrado C, 32,10; H, 6,28; N, 4,15.

30



Fórmula Molecular: $C_{19}H_{44}N_2Cl_2O_2Pt$

Massa Molar: 598 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 142 – 235°C

Rendimento: 84,5 % (0,505 g)

I.V. ν KBr (cm^{-1}): 3446, 3143, 2922, 2852, 1620, 1468, 1062, 567, 340, 336.

Análise Elementar(%) : Calculado C, 38,13; H, 7,36; N, 4,68

Encontrado C, 36,20; H, 6,81; N, 4,80

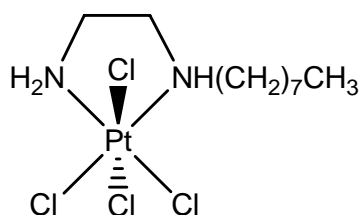
2.2.8. Síntese dos complexos de platina(IV) com cloretos

Em um balão de 50 mL, sob agitação magnética, foi feita uma suspensão com 1 mmol do respectivo complexo platina(IV) precursor com hidroxilas em 5 mL de água. Adicionou-se, em seguida, durante 30 minutos, a 50 °C, 5 mL de solução de HCl a 0,1 mol/L. Após a adição do ácido clorídrico, a reação permaneceu sob agitação e aquecimento por 24 horas. O precipitado obtido foi então filtrado sob pressão reduzida e lavado com água.

2.2.9. Dados de caracterização dos complexos de platina(IV) com cloretos

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

31



Fórmula Molecular: C₁₀H₂₄N₂Cl₄Pt

Massa Molar: 509 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 186 – 203 °C

Rendimento: 92,5 % (0,471 g)

I.V. v KBr (cm⁻¹): 3205, 3083, 2930, 2860, 1614, 1460, 1032, 343, 341.

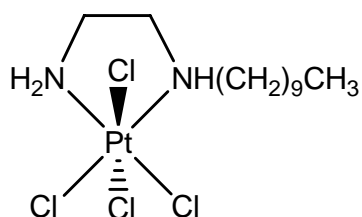
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ: 0,87 (t, 3H, CH₃); 1,26 (m, 10H, CH₂); 1,73 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH); 2,75; 2,86, 2,99 (3m, 6H, 2CH₂-NH e CH₂-NH₂).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ: 13,9 (CH₃); 22,1 a 31,2 (CH₂); 47,2 (CH₂-NH₂); 52,9; 55,9 (CH₂-NH).

RMN ¹⁹⁵Pt (DMSO-*d*₆) δ: -268

Análise Elementar (%): Calculado C, 23,58; H, 4,72; N, 5,50

Encontrado C, 25,27; H, 4,69; N, 4,95



Fórmula Molecular: $C_{12}H_{28}N_2Cl_4Pt$

Massa Molar: 537 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 187 – 211°C

Rendimento: 88,6 % (0,476 g)

I.V. ν KBr (cm^{-1}): 3159, 2924, 2854, 1632, 1456, 1034, 347, 337.

RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 0,86 (t, 3H, CH_3); 1,25 (m, 14H, CH_2); 1,73 (m, 2H, \underline{CH}_2 - CH_2 -NH); 2,73; 2,86, 2,97 (3m, 6H, 2 \underline{CH}_2 -NH e \underline{CH}_2 -NH $_2$).

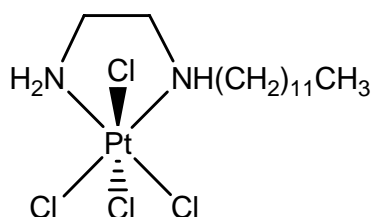
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 14,1 (CH_3); 22,2 a 31,4 (CH_2); 47,2 (CH_2 -NH $_2$); 53,1; 55,9 (CH_2 -NH).

RMN ^{195}Pt (DMSO- d_6) δ : - 270

Análise Elementar (%): Calculado C, 26,82; H, 5,21; N, 5,21

Encontrado C, 28,25; H, 4,17; N, 5,13

33



Fórmula Molecular: C₁₄H₃₂N₂Cl₄Pt

Massa Molar: 565 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 186 – 210°C

Rendimento: 63,2 % (0,357 g)

I.V. ν KBr (cm⁻¹): 3159, 2924, 2853, 1620, 1466, 1036, 347, 337.

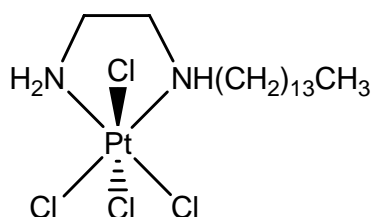
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 0,85 (t, 3H, CH₃); 1,24 (m, 18H, CH₂); 1,72 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH); 2,73; 2,83, 2,99, (3m, 6H, 2CH₂-NH e CH₂-NH₂).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 13,9 (CH₃); 22,1 a 31,3 (CH₂); 47,1 (CH₂-NH₂); 52,9; 55,8 (CH₂-NH).

RMN ¹⁹⁵Pt (DMSO-*d*₆) δ : -269

Análise Elementar (%):	Calculado	C, 29,73; H, 5,66; N, 4,96
	Encontrado	C, 29,74; H, 5,54; N, 4,87

34



Fórmula Molecular: $C_{16}H_{36}N_2Cl_4Pt$

Massa Molar: 593 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 147 – 215°C

Rendimento: 88,4 % (0,524 g)

I.V. ν KBr (cm^{-1}): 3159, 2922, 2853, 1632, 1468, 1030, 347, 341.

RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 0,79 (t, 3H, CH_3); 1,18 (m, 22H, CH_2); 1,63 (m, 2H, \underline{CH}_2 - CH_2 -NH); 2,67; 2,78, 2,98 (3m, 6H, 2 \underline{CH}_2 -NH e \underline{CH}_2 -NH $_2$);

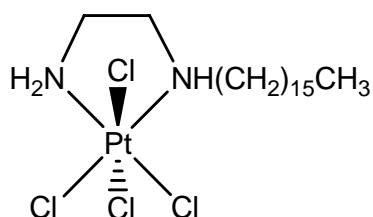
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 14,0 (CH_3); 22,1 a 31,3 (CH_2); 47,1 (CH_2 -NH $_2$); 52,9; 55,9 (CH_2 -NH).

RMN ^{195}Pt (DMSO- d_6) δ : - 270

Análise Elementar (%): Calculado C, 32,38; H, 6,07; N, 4,72

Encontrado C, 33,28; H, 6,03; N, 4,70

35



Fórmula Molecular: C₁₈H₄₀N₂Cl₄Pt

Massa Molar: 621 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 185 – 205 °C

Rendimento: 83,2 % (0,517 g)

I.V. ν KBr (cm⁻¹): 3159, 2922, 2853, 1630, 1468, 1034, 347, 341.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 0,79 (t, 3H, CH₃); 1,18 (m, 26H, CH₂); 1,60 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH₂); 2,67; 2,76, 2,99 (3m, 6H, 2CH₂-NH e CH₂-NH₂).

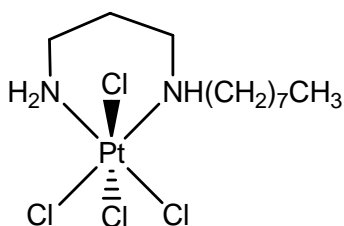
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 14,0 (CH₃); 22,1 a 31,3 (CH₂); 47,2 (CH₂-NH₂); 52,9; 55,9 (CH₂-NH).

RMN ¹⁹⁵Pt (DMSO-*d*₆) δ : - 269

Análise Elementar (%): Calculado C, 34,78; H, 6,44; N, 4,51

Encontrado C, 36,08; H, 6,63; N, 4,59

36



Fórmula Molecular: $C_{11}H_{26}N_2Cl_4Pt$

Massa Molar: 523 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 177 – 202°C

Rendimento: 81,1 % (0,424 g)

I.V. ν KBr (cm^{-1}): 3199, 2924, 2854, 1578, 1468, 1192, 343, 335.

RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 0,86 (m, 3H, CH_3); 1,25 (m, 10H, CH_2); 1,69; 1,87 (2m, 4H, $2\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$); 2,2 a 2,9 (m, 6H, $2\text{CH}_2\text{-NH}$ e $\text{CH}_2\text{-NH}_2$).

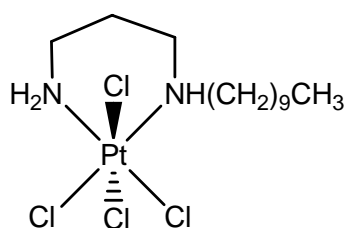
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 14,0 (CH_3); 22,1 a 31,2 (CH_2 e $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$); 46,2 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 54,3 ($\text{CH}_2\text{-NH}$).

RMN ^{195}Pt (DMSO- d_6) δ : -75

Análise Elementar (%): Calculado C, 25,24; H, 4,97; N, 5,35

Encontrado C, 26,07; H, 5,15; N, 5,36

37



Fórmula Molecular: C₁₃H₃₀N₂Cl₄Pt

Massa Molar: 551 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 178 – 207 °C

Rendimento: 66,2 % (0,365 g)

I.V. v KBr (cm⁻¹): 3198, 2924, 2854, 1622, 1465, 1192, 339, 329.

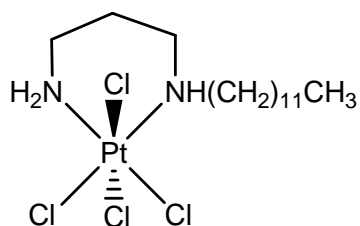
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ: 0,84 (m, 3H, CH₃); 1,23 (m, 14H, CH₂); 1,68; 1,84 (2m, 4H, 2CH₂-CH₂-NH); 2,2 a 2,9 (m, 6H, CH₂-NH e CH₂-NH₂).

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ: 14,0 (CH₃); 22,1 a 31,3 (CH₂ e N-CH₂-CH₂-CH₂-N); 46,2 (CH₂-NH₂); 54,3 (CH₂-NH).

RMN ¹⁹⁵Pt (DMSO-*d*₆) δ: -74

Análise Elementar (%): Calculado C, 28,31; H, 5,44; N, 5,08

Encontrado C, 30,01; H, 5,64; N, 5,19



Fórmula Molecular: $C_{15}H_{34}N_2Cl_4Pt$

Massa Molar: 579 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 174 – 203°C

Rendimento: 90,3 % (0,523 g)

I.V. v KBr (cm^{-1}): 3191, 2923, 2852, 1629, 1466, 1068, 343, 337.

RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 0,83 (m, 3H, CH_3); 1,24 (m, 18H, CH_2); 1,69; 1,86 (2m, 4H, $2CH_2-CH_2-NH$); 2,2 a 2,9 (m, 6H, $2CH_2-NH$ e CH_2-NH_2).

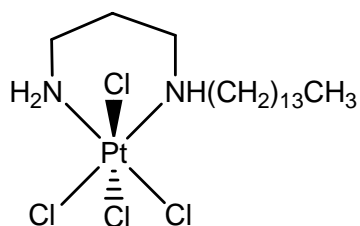
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 13,8 (CH_3); 21,9 a 31,1 (CH_2 e $N-CH_2-CH_2-N$); 46,0 (CH_2-NH_2); 54,1 (CH_2-NH).

RMN ^{195}Pt (DMSO- d_6) δ : - 75

Análise Elementar (%): Calculado C, 31,09; H, 5,87; N, 4,84

Encontrado C, 33,70; H, 6,19; N, 4,80

39



Fórmula Molecular: $C_{17}H_{38}N_2Cl_4Pt$

Massa Molar: 607 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 181 – 200 °C

Rendimento: 76 % (0,461 g)

I.V. ν KBr (cm^{-1}): 3205, 3140, 2922, 2853, 1599, 1466, 331, 324.

RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 0,86 (m, 3H, CH_3); 1,24 (m, 22H, CH_2); 1,70; 1,85 (2m, 4H, $2\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$); 2,2 a 2,9 (m, 6H, $2\text{CH}_2\text{-NH}$ e $\text{CH}_2\text{-NH}_2$).

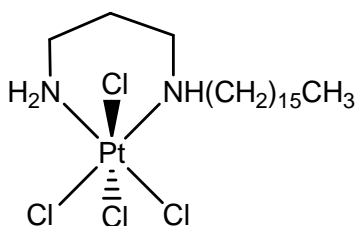
RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 13,8 (CH_3); 21,9 a 31,1 (CH_2 e $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$); 46,0 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$); 54,1 ($\text{CH}_2\text{-NH}$).

RMN ^{195}Pt (DMSO- d_6) δ : -73

Análise Elementar (%): Calculado C, 33,61; H, 6,26; N, 4,61

Encontrado C, 34,29; H, 6,31; N, 4,58

40



Fórmula Molecular: $C_{19}H_{42}N_2Cl_4Pt$

Massa Molar: 635 g/mol

Características Físicas: sólido amarelo pálido

Faixa de decomposição: 170 – 200°C

Rendimento: 77,5 % (0,492 g)

I.V. v KBr (cm^{-1}): 3188, 2922, 2850, 1620, 1468, 343, 335.

RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 0,86 (m, 3H, CH_3); 1,24 (m, 26H, CH_2); 1,69; 1,85 (2m, 4H, $2CH_2-CH_2-N$); 2,6 a 2,9 (m, 6H, $2CH_2-NH$ e CH_2-NH_2).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 13,8 (CH_3); 21,9 a 31,1 (CH_2 e $N-CH_2-CH_2-CH_2-N$); 46,1 (CH_2-NH_2); 54,3 (CH_2-NH).

RMN ^{195}Pt (DMSO- d_6) δ : -75

Análise Elementar (%): Calculado C, 35,91; H, 6,61; N, 4,41

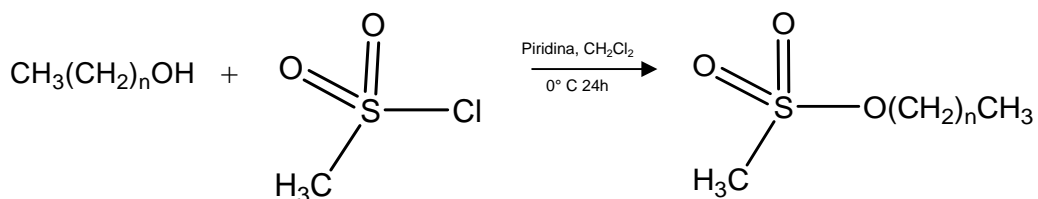
Encontrado C, 37,59; H, 6,72; N, 4,17

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

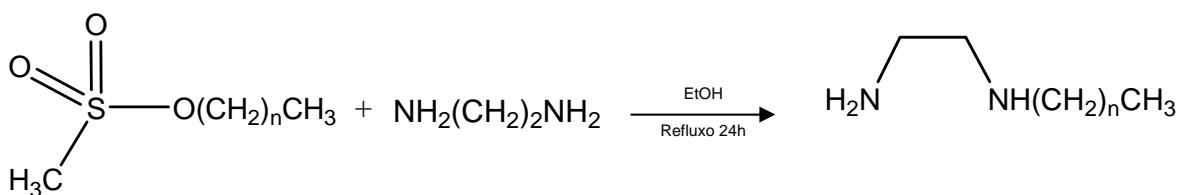
2.3.1. Ligantes

Os ligantes foram obtidos em duas etapas. A primeira etapa consiste na obtenção de um mesilato de alquila, que é feita pela reação dos respectivos álcoois com cloreto de mesila. Esta etapa ocorre com rendimento excelente, por volta de 95 %. Na etapa subsequente foram obtidas as diaminas *N*-alquiladas, a partir da reação do correspondente mesilato de alquila com a 1,2-etanodiamina ou 1,3-propanodiamina (Figura 2.1). O óleo resultante da segunda etapa foi submetido à extração líquida utilizando-se água e diclorometano a fim de eliminar o excesso de 1,2-etanodiamina ou 1,3-propanodiamina, procedendo-se em seguida, à purificação dos ligantes por coluna cromatográfica.

Primeira Etapa:

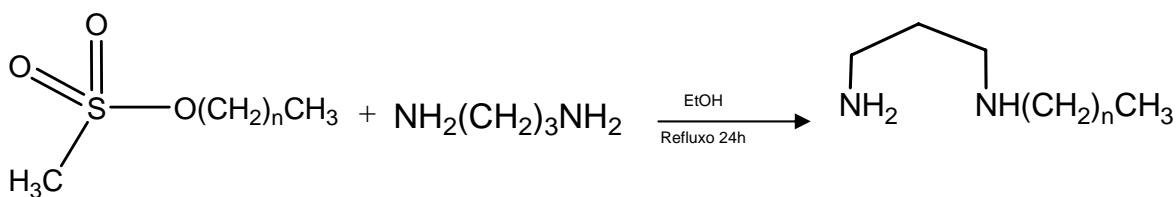


Segunda Etapa (derivados da 1,2-etanodiamina):



- | | |
|----------|--------|
| <u>1</u> | n = 7 |
| <u>2</u> | n = 9 |
| <u>3</u> | n = 11 |
| <u>4</u> | n = 13 |
| <u>5</u> | n = 15 |

Segunda Etapa (derivados da 1,3-propanodiamina):



- | | |
|-----------|--------|
| <u>6</u> | n = 7 |
| <u>7</u> | n = 9 |
| <u>8</u> | n = 11 |
| <u>9</u> | n = 13 |
| <u>10</u> | n = 15 |

Figura 2.1. Esquema de síntese dos ligantes derivados da 1,2-etanodiamina e da 1,3-propanodiamina

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em discos de Csl, na região de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} e podemos observar bandas largas na região entre 3400 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} referentes à deformação axial do grupo N-H. Entre 2990 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} ocorrem bandas atribuídas ao estiramento simétrico e assimétrico dos grupos CH_2 e CH_3 . Notam-se também bandas na região de 1650 cm^{-1} a 1450 cm^{-1} , referentes à deformação angular de N-H e deformação axial de C-H respectivamente. Em 1300 cm^{-1} observa-se uma banda atribuível à deformação axial da ligação C-N. Observa-se na região de 720 cm^{-1} , banda de deformação angular assimétrica do grupo CH_2 . A figura 2.2 apresenta o espectro de infravermelho de um dos ligantes.

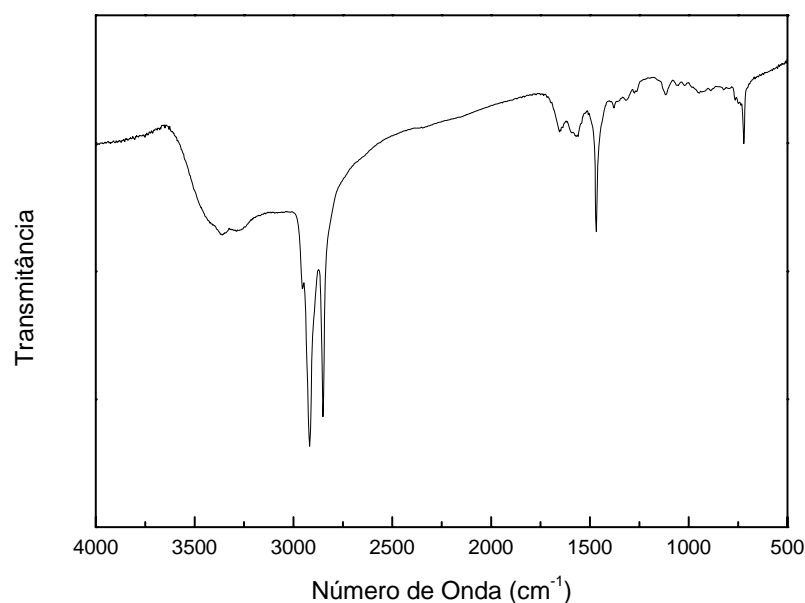


Figura 2.2. Espectro na região do Infravermelho para o ligante 2 derivado da 1,2-etanodiamina.

A figura 2.3 mostra os espectros de RMN de ^1H , que foram obtidos em CDCl_3 , para os ligantes **2** e **6** que serão discutidos a seguir. Os demais ligantes apresentaram espectros semelhantes.

O espectro do ligante **2** apresenta sinal em δ 0,79 na forma de um tripleto, que se refere aos 3 hidrogênios do grupo CH_3 . Em δ 1,17, um multiplete pode ser atribuído aos hidrogênios de grupos CH_2 da cadeia lateral. Em δ 1,39 observamos um multiplete referente a hidrogênios de $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ e também aos hidrogênios de NH e NH_2 . Para os hidrogênios do $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, o espectro mostra um tripleto em δ 2,50 e dois tripletos em δ 2,56 e 2,70 são atribuídos aos hidrogênios de CH_2 da etilenodiamina. Para os demais ligantes observamos simpletos largos referentes aos hidrogênios de NH e NH_2 que variam entre δ 1,30 a δ 4,50. Para o ligante **6**, derivado da 1,3-propanodiamina, podemos observar um quinteto em δ 1,68 que se refere aos hidrogênios do segundo carbono da 1,3-propanodiamina.

A figura 2.4 mostra os espectros de RMN de ^{13}C para os ligantes **2** e **6**. O espectro de RMN de ^{13}C do ligante **2**, derivado da 1,2-etanodiamina, apresenta sinais em δ 14 referente ao carbono do grupo CH_3 e entre δ 20 a 39 referentes aos carbonos da cadeia lateral. Entre δ 40 e 53, observam-se os sinais de carbonos vizinhos aos nitrogênios de NH_2 e NH .

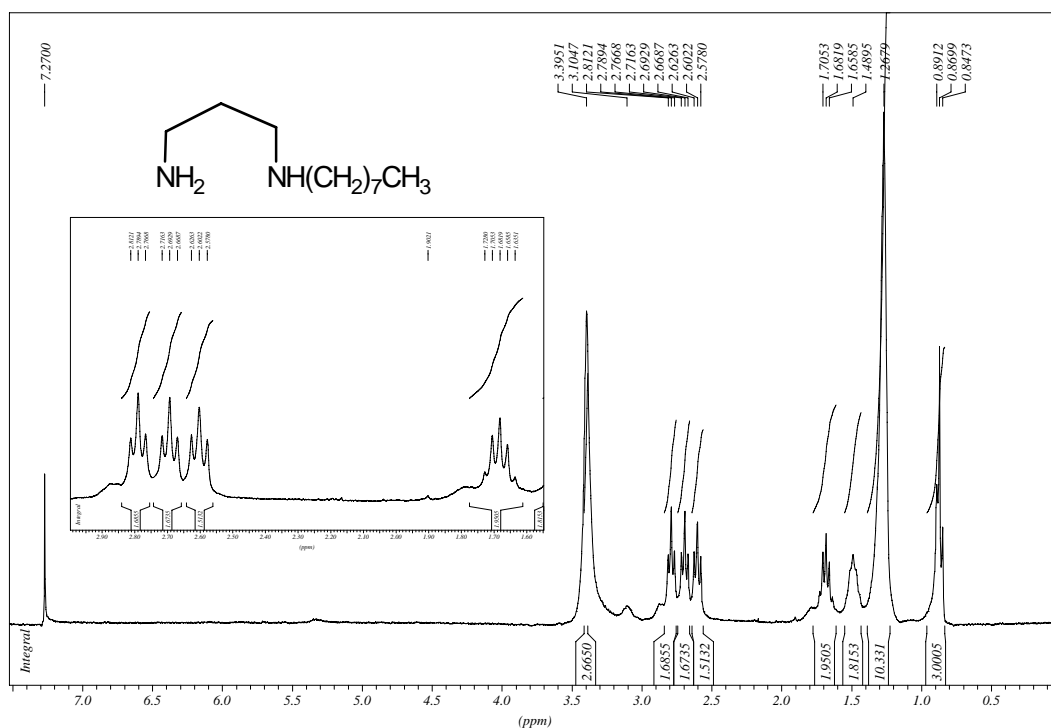
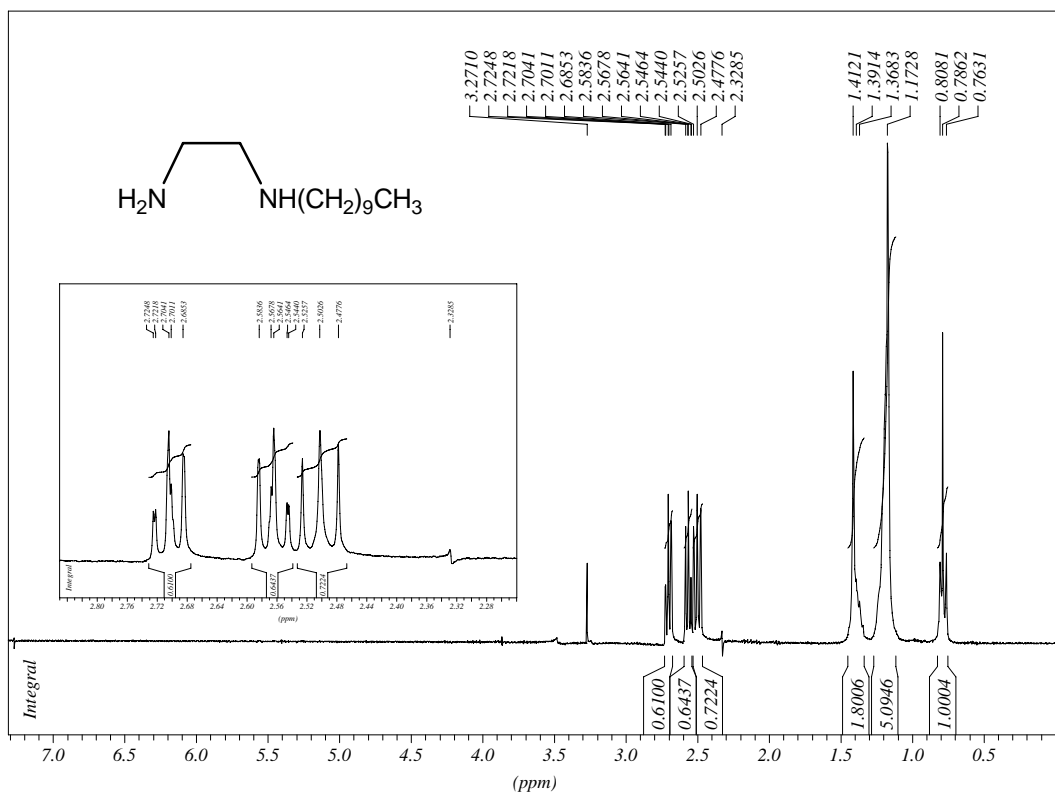


Figura 2.3. Espectros de RMN de ^1H dos ligantes 2 e 6.

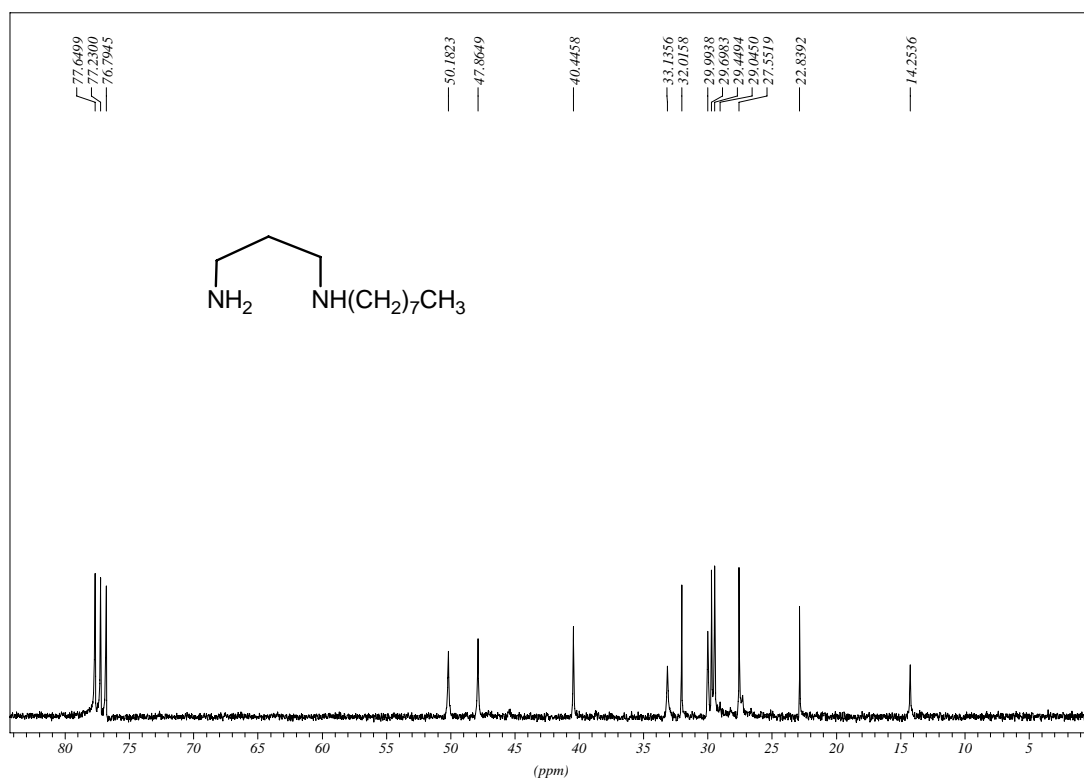
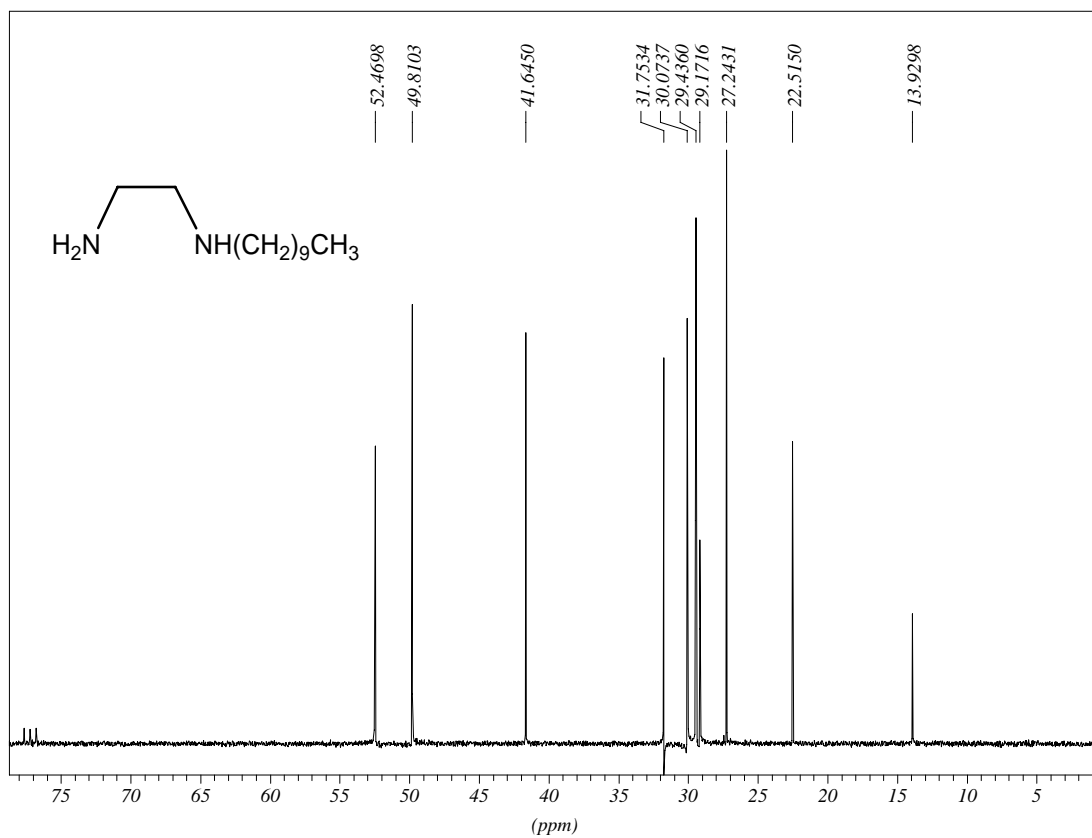


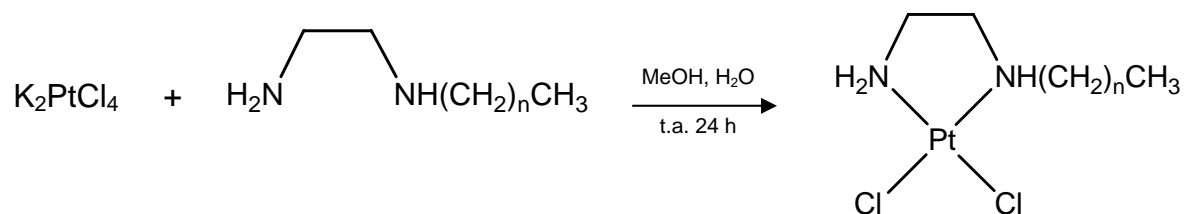
Figura 2.4. Espectros de RMN de ^{13}C dos ligantes **2 e **6**.**

2.3.2. Complexos de platina(II)

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

Os complexos de platina(II) foram obtidos a partir do tetracloroplatinato(II) de potássio dissolvido em água e dos ligantes sintetizados, derivados da 1,2-etanodiamina e 1,3-propanodiamina, dissolvidos em uma mistura de água e metanol (Figura 2.5). Para o complexo **20** foi necessário utilizar THF e água como solventes devido à dificuldade em manter a homogeneidade do meio reacional nas condições antes descritas, visto que o ligante com 16 carbonos na cadeia lateral, derivado da 1,3-propanodiamina, é muito apolar, não permanecendo solúvel nessa mistura. O precipitado amarelo resultante foi separado por filtração e os complexos foram devidamente caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho, RMN de ^1H , ^{13}C e ^{195}Pt , e análise elementar de C, H e N.

Derivados da 1,2-etanodiamina:



11 n = 7

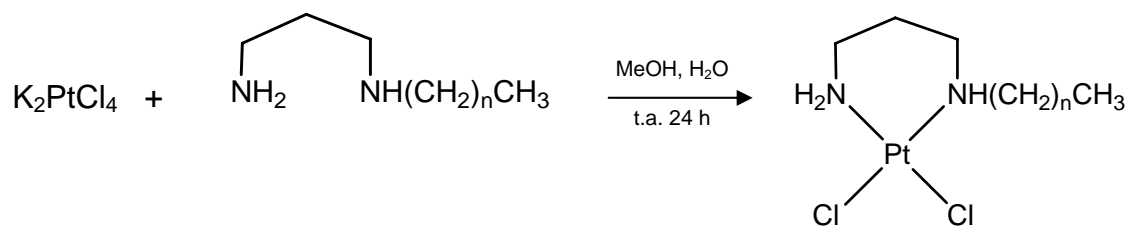
12 n = 9

13 n = 11

14 n = 13

15 n = 15

Derivados da 1,3-propanodiamina:



16 n = 7

17 n = 9

18 n = 11

19 n = 13

20 n = 15

Figura 2.5. Esquema de síntese dos complexos de platina (II)

O espectro de infravermelho do complexo **14** está apresentado na figura 2.6. Os espectros de infravermelho de todos os complexos sintetizados apresentam bandas entre 3250 e 3100 cm^{-1} referentes à deformação axial do grupo N-H. Nas regiões próximas de 2959, 2927, 2872 e 2859 cm^{-1} temos bandas referentes ao estiramento simétrico dos grupos CH_2 e CH_3 e estiramento assimétrico dos grupos CH_2 e CH_3 , respectivamente. Nota-se também uma banda na região de 1620 cm^{-1} referente à deformação angular de N-H, característica de cadeias carbônicas longas. Em 1300 cm^{-1} ocorre uma banda de deformação axial da ligação C-N. Observa-se também na região de 720 cm^{-1} uma banda de deformação angular assimétrica do grupo CH_2 . O espectro apresenta ainda banda na região de 570 cm^{-1} referente ao estiramento Pt-N e bandas na região de 320-315 cm^{-1} atribuídas ao estiramento Pt-Cl que aparecem de forma larga ou desdobrada, característica da configuração *cis* dos complexos.

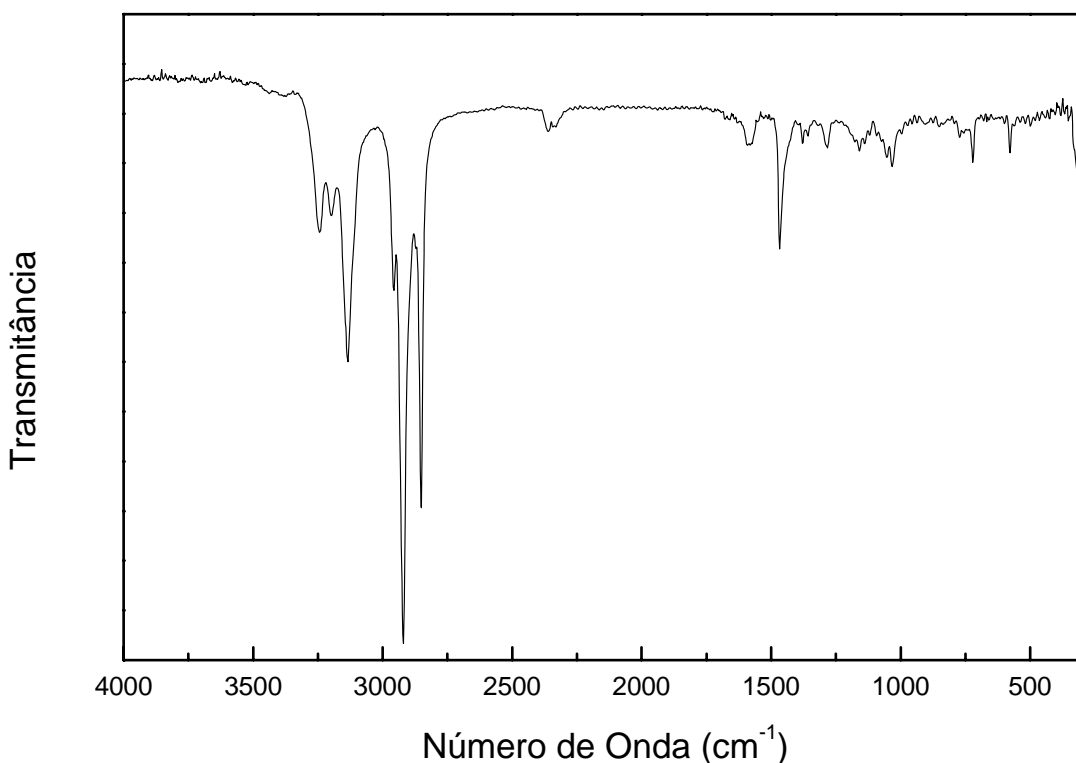


Figura 2.6. Espectro de Infravermelho do complexo 14.

A figura 2.7 mostra os espectros de RMN ^1H para os complexos **11** e **17** que foram obtidos em solvente $\text{DMSO-}d_6$. Estes e os demais complexos possuem espectros semelhantes e apresentam um sinal em torno de δ 0,85 na forma de tripleto referente aos três hidrogênios do grupo CH_3 . Em δ 1,24, aproximadamente, ocorre um multipletto atribuível aos hidrogênios de grupos CH_2 da cadeia lateral. Entre δ 1,3 e 2,2 podem ser observados dois multipletos de hidrogênios do grupo CH_2 ligado a CH_2NH . Entre δ 2,2 e 3,2 podem ser observados quatro multipletos referentes a hidrogênios dos grupos CH_2 ligados a NH e NH_2 . Para os hidrogênios de NH e NH_2 os espectros apresentam três simpletos largos entre δ 4,8 a 6,2.

Os espectros de RMN de ^{13}C dos complexos apresentam sinais em δ 14 aproximadamente, referente ao carbono CH_3 e sinais entre δ 20 a 32 referentes aos carbonos da cadeia lateral. Entre δ 42 a 55 observam-se os sinais de carbonos vizinhos a nitrogênio de NH_2 e NH . A figura 2.8 mostra os espectros de RMN de ^{13}C para os complexos **11** e **17**.

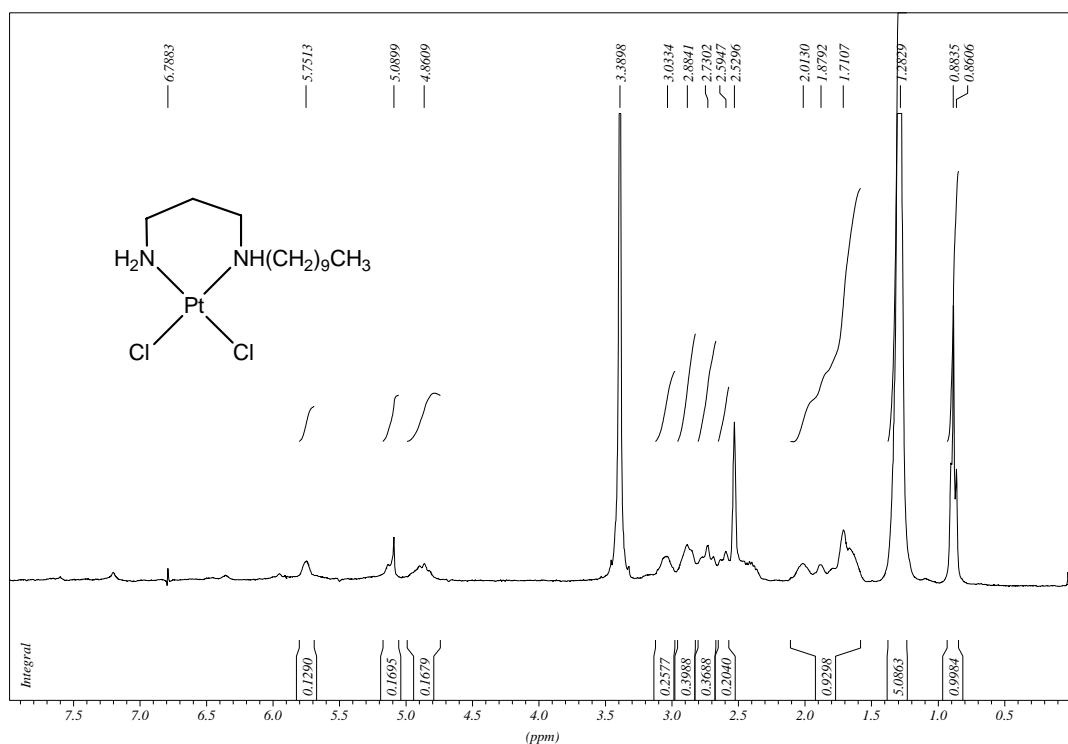
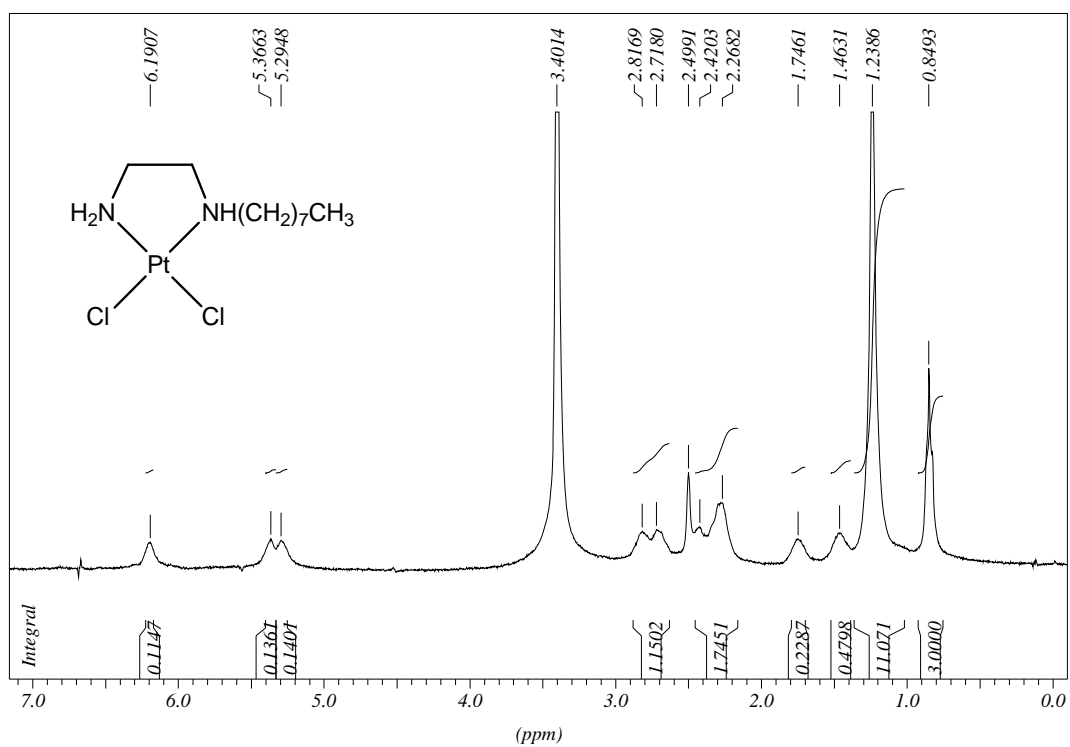
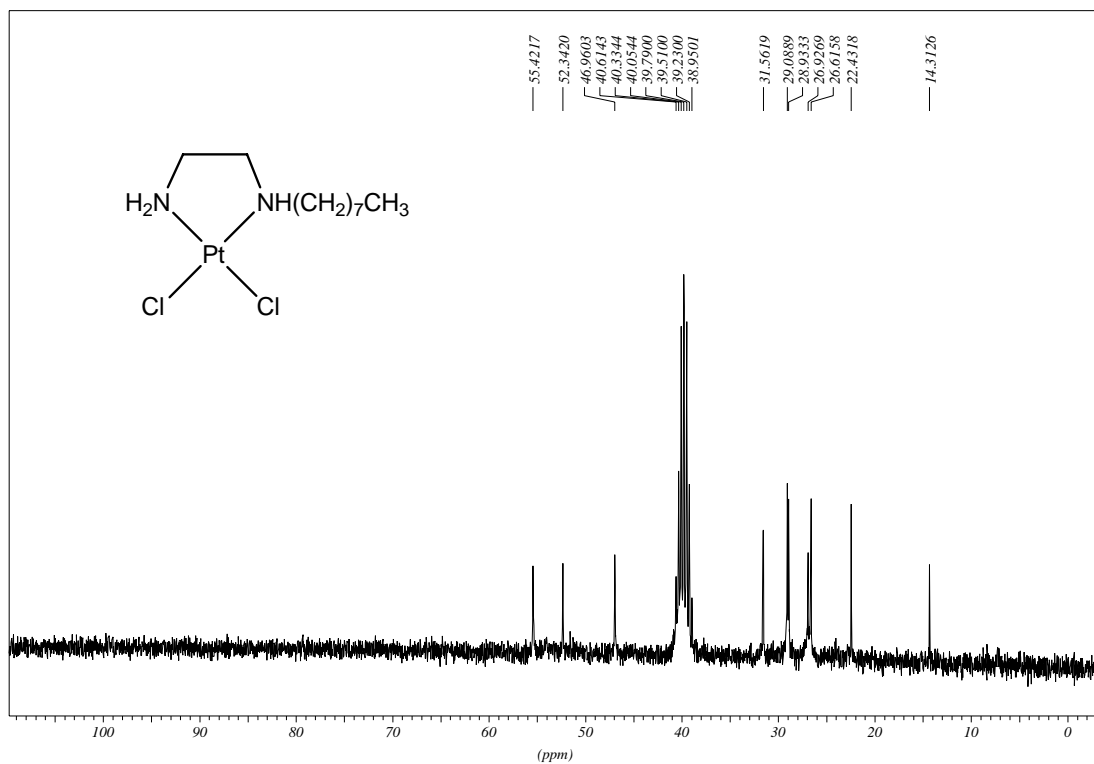


Figura 2.7: Espectros de RMN ¹H para os complexos 11 e 17.

SIL2



SIL2

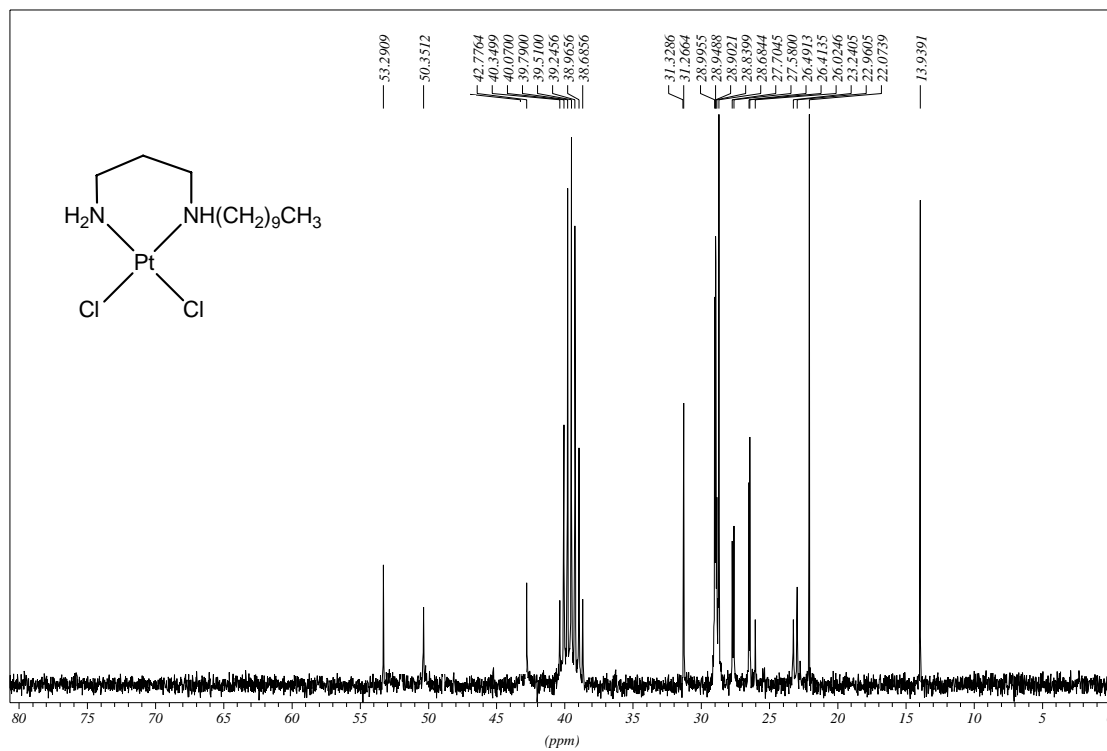


Figura 2.8. Espectros de RMN de ^{13}C para os complexos 11 e 17.

Espectros de RMN de ^{195}Pt foram realizados para os complexos de platina(II). Estes possuem na esfera de coordenação da platina, dois átomos de nitrogênio e dois átomos de cloro, gerando um sinal único na região de δ -2300, o que está de acordo com dados da literatura para este tipo de esfera de coordenação. Por exemplo, para a cisplatina o sinal ocorre em -2097 ppm e para o composto análogo com etilenodiamina ocorre em -2345 ppm^{99,100}.

Os valores de deslocamento químico para estes complexos estão apresentados na tabela 2.1. A figura 2.9 mostra os espectros de RMN de ^{195}Pt para os complexos **11** e **17**.

Tabela 2.1. Deslocamentos químicos em RMN de ^{195}Pt dos complexos de platina(II) em DMSO.

Complexo	δ, RMN de ^{195}Pt
<u>11</u>	-2353
<u>12</u>	-2353
<u>13</u>	-2353
<u>14</u>	-2353
<u>15</u>	- 2353
<u>16</u>	-2248
<u>17</u>	- 2252
<u>18</u>	- 2252
<u>19</u>	- 2252
<u>20</u>	- 2251

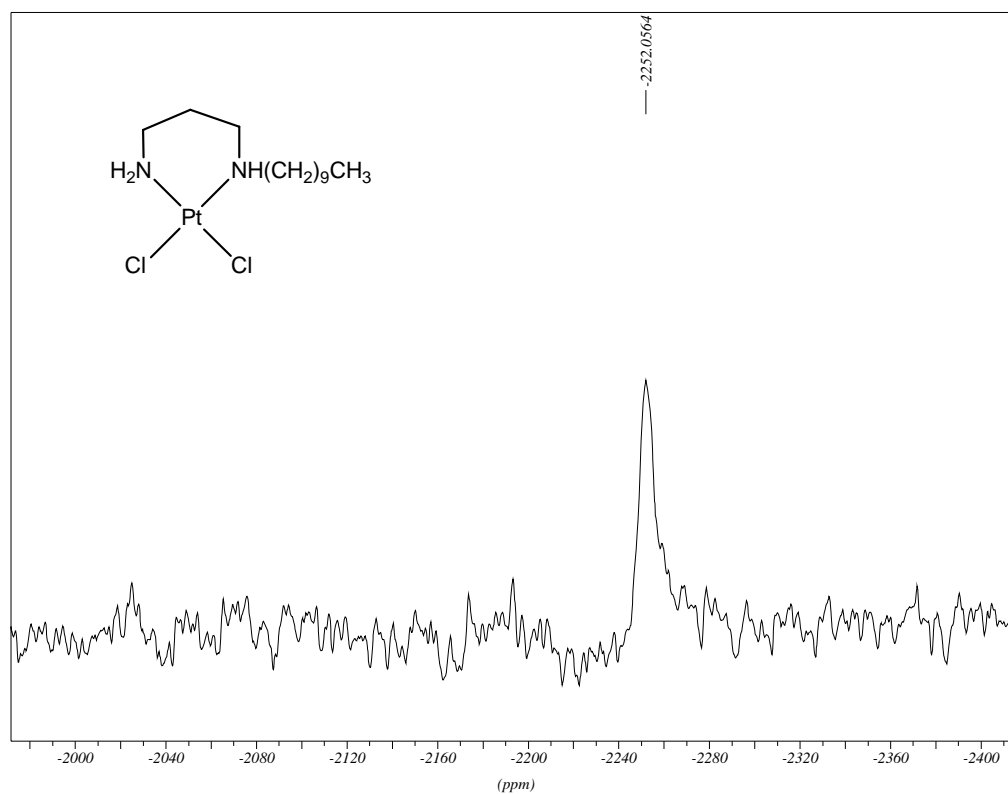
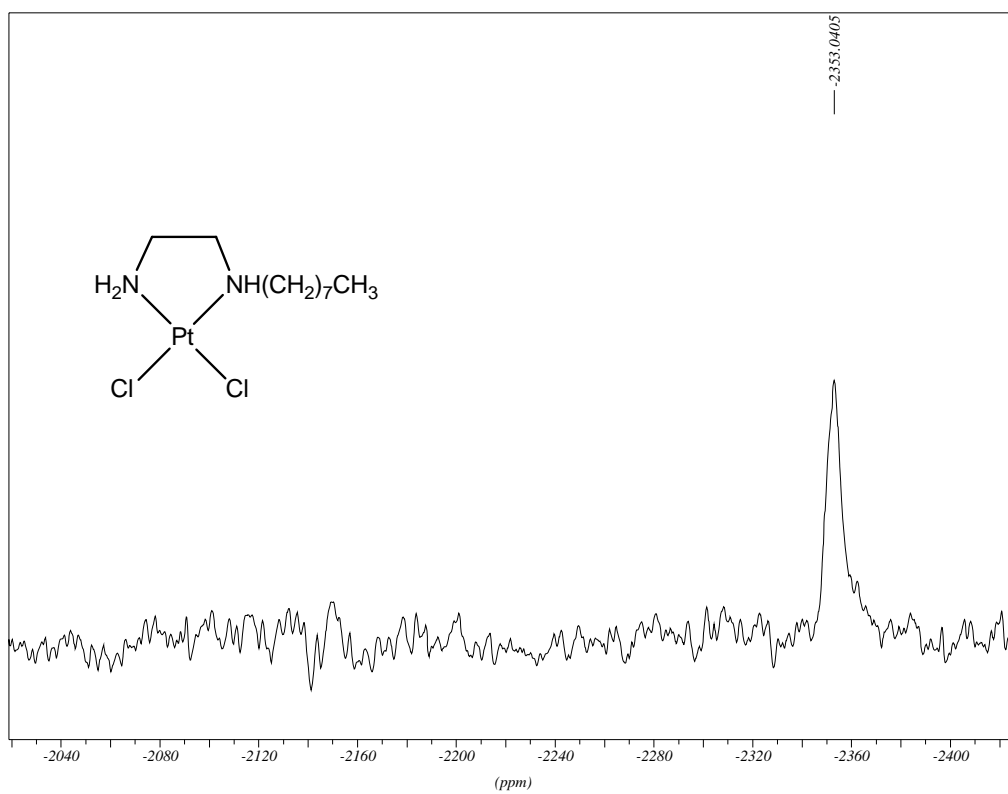


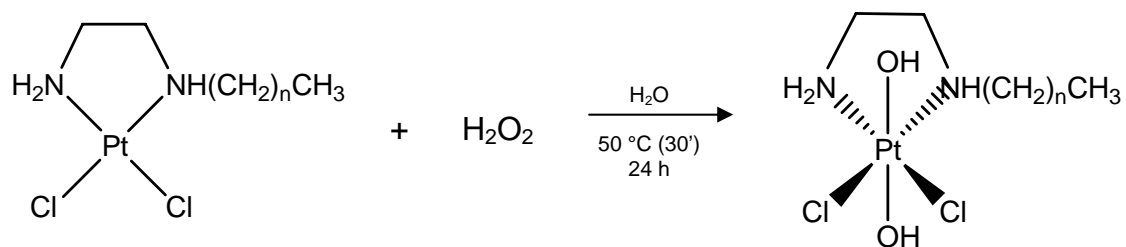
Figura 2.9. Espectros de RMN de ^{195}Pt para os complexos **11 e **17**.**

2.3.3. Complexos de platina(IV) com hidroxilas.

A reação de obtenção dos complexos de platina(IV) com hidroxilas são reações de adição oxidativa de peróxido de hidrogênio, onde dois ligantes hidroxila são inseridos ao complexo quadrático plano de platina(II) resultando em um complexo de geometria octaédrica. O peróxido de hidrogênio promove a oxidação da platina de 2+ para 4+.

Os complexos de platina(IV) foram obtidos a partir dos correspondentes análogos de platina(II) sintetizados, pela oxidação destes com solução de peróxido de hidrogênio a 30% (Figura 2.10). Os complexos obtidos, de coloração amarela mais intensa, foram separados por filtração e devidamente caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho, RMN de ^1H , ^{13}C e ^{195}Pt , e análise elementar de C, H e N.

Derivados da 1,2-etanodiamina:



21 n = 7

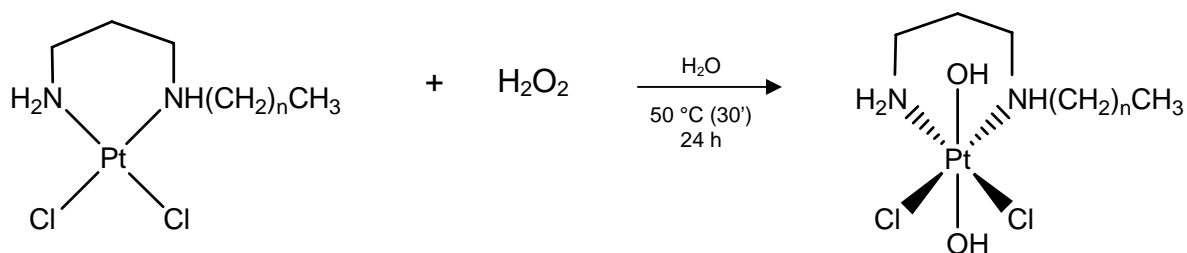
22 n = 9

23 n = 11

24 n = 13

25 n = 15

Derivados da 1,3-propanodiamina:



26 n = 7

27 n = 9

28 n = 11

29 n = 13

30 n = 15

Figura 2.10. Esquema de síntese dos complexos de platina(IV) com hidroxilas

Nos espectros de infravermelho dos complexos de platina(IV) podemos notar uma significativa diferença em relação aos espectros dos análogos de platina(II). Observa-se o aparecimento de uma banda intensa na região de 3400 cm^{-1} que corresponde ao estiramento axial da ligação O-H, além de uma banda relativa ao estiramento da ligação Pt-O na região de 550 cm^{-1} .

Os espectros do complexo de platina(IV) com hidroxilas (**24**) e do seu respectivo análogo de platina(II) (**14**), estão apresentados na figura 2.11. As principais absorções na região do infravermelho para os complexos de platina(IV) com hidroxilas sintetizados encontram-se na tabela 2.2.

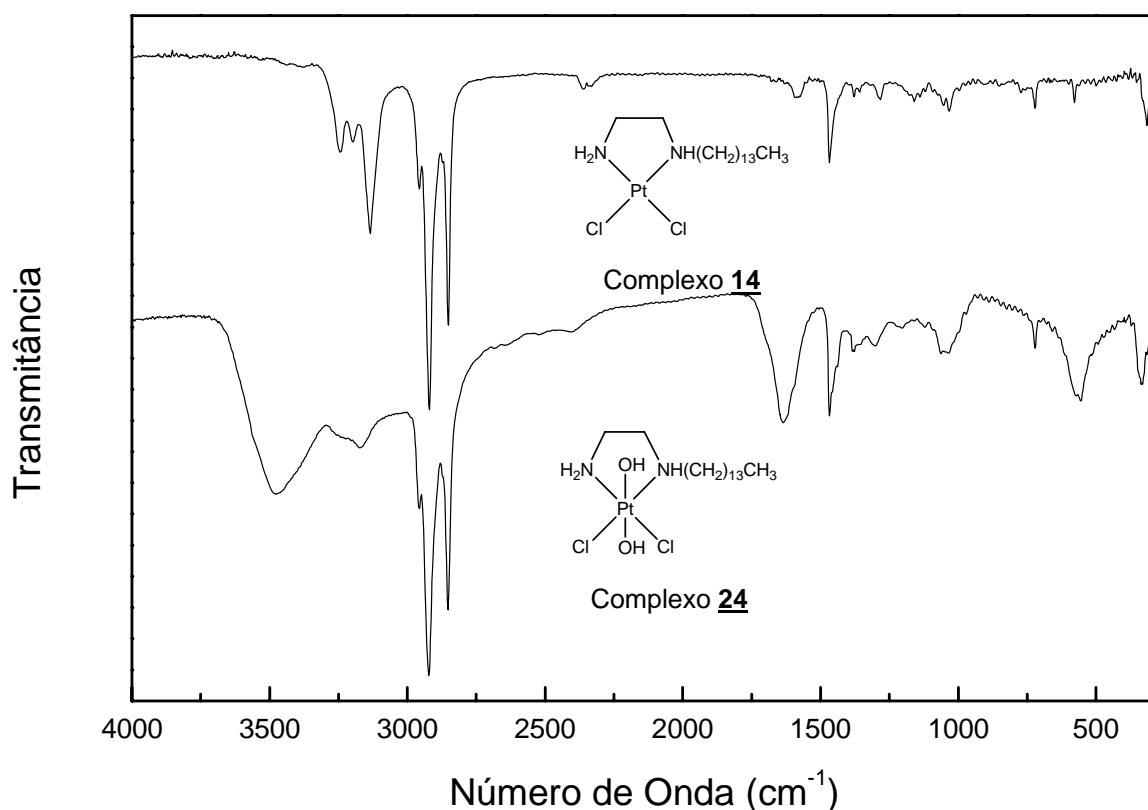


Figura 2.11. Espectros de Infravermelho para os complexos 14 e 24

Tabela 2.2: Principais absorções na região do I.V. dos complexos de paltina(IV) com hidroxilas.

Complexo	V_{O-H}	V_{N-H}	V_{C-H}	V_{Pt-O}	V_{Pt-Cl}
<u>21</u>	3479	3191	2860	547	339; 335
<u>22</u>	3479	3166	2852	561	337; 332
<u>23</u>	3482	3166	2921	557	334; 329
<u>24</u>	3480	3169	2920	555	335; 331
<u>25</u>	3468	3171	2920	559	337; 335
<u>26</u>	3492	3191	2960	552	335; 333
<u>27</u>	3485	3142	2914	550	333; 327
<u>28</u>	3484	3134	2921	553	335; 333
<u>29</u>	3482	3203	2922	561	335; 332
<u>30</u>	3446	3143	2922	567	340; 336

A figura 2.12 mostra o espectro de RMN ¹H para o complexo **21**. Os espectros foram obtidos em solvente deuterado DMSO-*d*₆, são semelhantes para os demais complexos dessa série e apresentam um sinal em torno de δ 0,80 na forma de tripleto referente aos três hidrogênios do grupo CH₃. Em δ 1,20, aproximadamente, ocorre um multipletto atribuível aos hidrogênios de grupos CH₂ da cadeia lateral. Na região de δ 1,6 podem ser observados multiplettos de hidrogênios do grupo CH₂ ligados a CH₂NH. Para os derivados da 1,3-propanodiamina observamos também um multipletto em torno de 1,9 referente aos hidrogênios do CH₂ da propanodiamina ligado a CH₂NH. Entre δ 2,0 e 2,9 podem ser observados três multiplettos referentes a hidrogênios dos grupos CH₂ ligados a NH e NH₂. Os hidrogênios diretamente ligados a nitrogênio e oxigênio destes compostos não puderam ser observados nos espectros obtidos.

Os espectros de RMN de ¹³C dos complexos apresentam sinais em δ 14 aproximadamente, referente ao carbono CH₃ e sinais entre δ 20 a 32 referentes aos carbonos da cadeia lateral. Os sinais dos carbonos vizinhos a NH e NH₂ não

puderam ser observados, possivelmente por apresentarem tempo de relaxação superior aos demais carbonos neste tipo de complexo. Para os complexos **21** e **23** realizou-se os espectros utilizando RD (tempo de relaxação) duas vezes maior e assim foi possível observar os sinais na região entre δ 40 e 55. A figura 2.13 mostra o espectro de RMN de ^{13}C para o complexo **21** que foi obtido nessas condições.

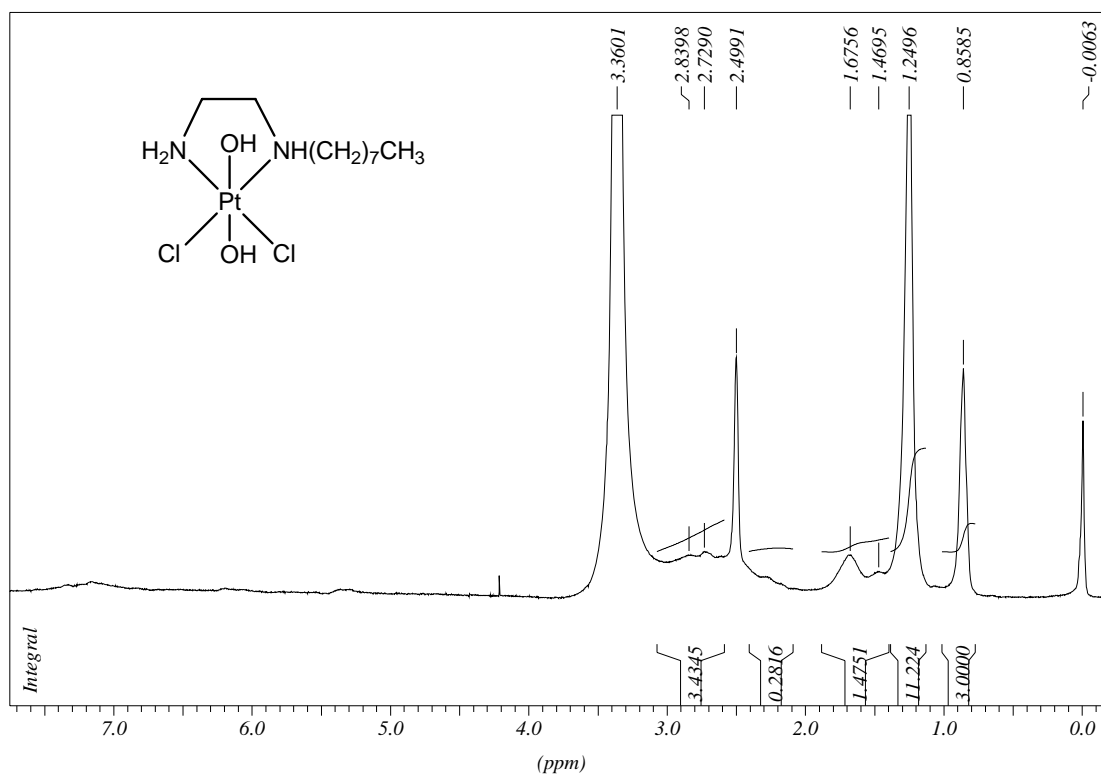


Figura 2.12. Espectro de RMN ^1H para o complexo 21

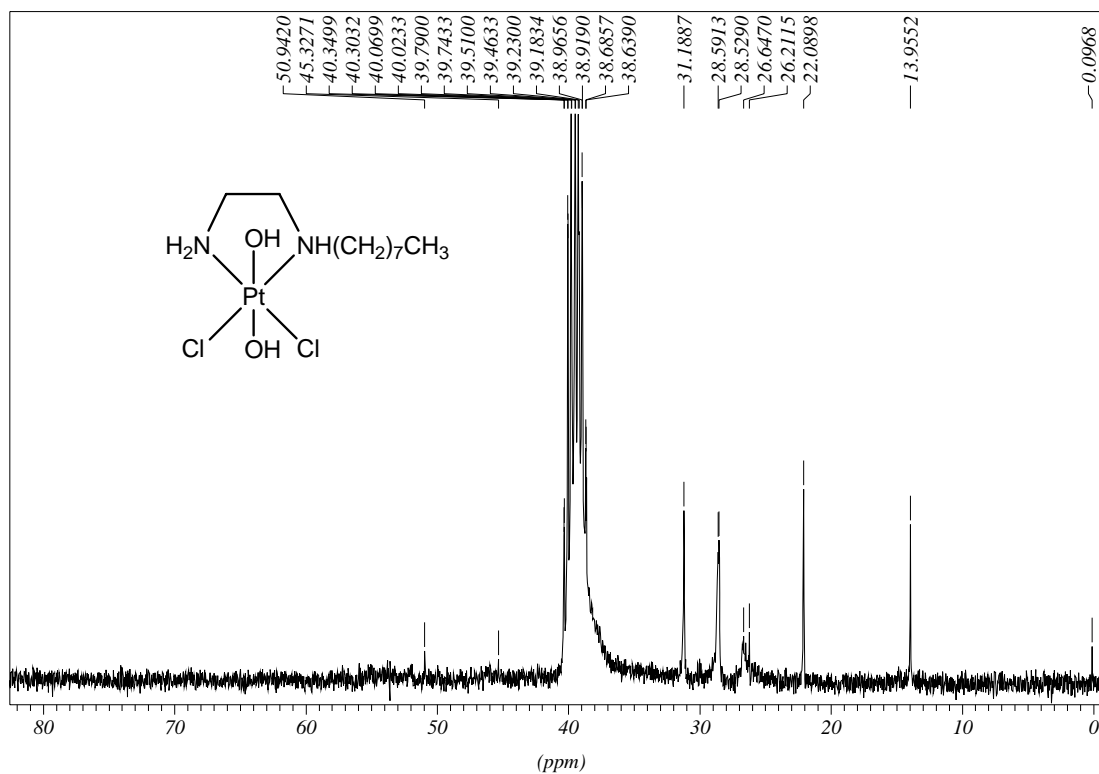


Figura 2.13. Espectro de RMN de ^{13}C para o complexo 21

Os espectros de RMN de ^{195}Pt foram obtidos em $\text{DMSO-}d_6$. Estes complexos possuem na esfera de coordenação da platina, dois átomos de nitrogênio, dois átomos de cloro e dois átomos de oxigênio, tendo sido observados sinais na região de δ 800, o que está de acordo com dados da literatura¹⁰⁰. Os valores de deslocamento químico para estes complexos estão apresentados na tabela 2.3 e a figura 2.14 mostra o espectro de RMN de ^{195}Pt para o complexo **26**. Os espectros de RMN de ^{195}Pt para estes complexos também são de difícil aquisição, provavelmente também pelo maior tempo de relaxação. Diante disso, não foi possível obter os espectros para todos os complexos.

Tabela 2.3. Deslocamentos químicos em RMN de ^{195}Pt dos complexos de platina(IV) com hidroxilas em DMSO.

Complexo	δ, RMN de ^{195}Pt
<u>21</u>	+ 789
<u>23</u>	+ 788
<u>26</u>	+ 885
<u>27</u>	+ 901
<u>28</u>	+ 815

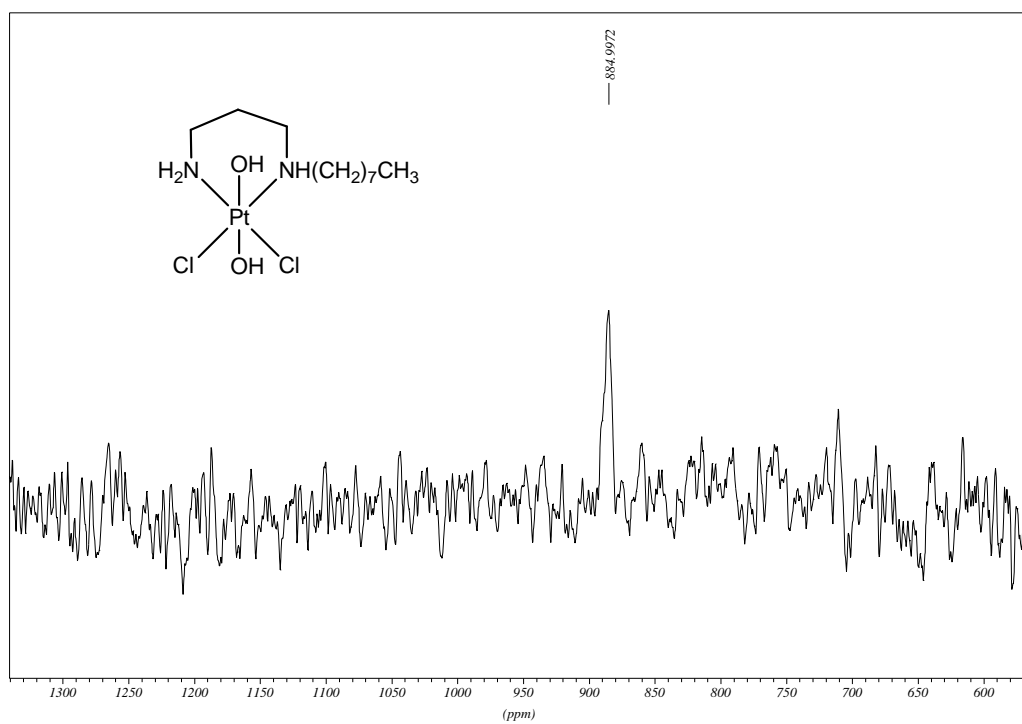


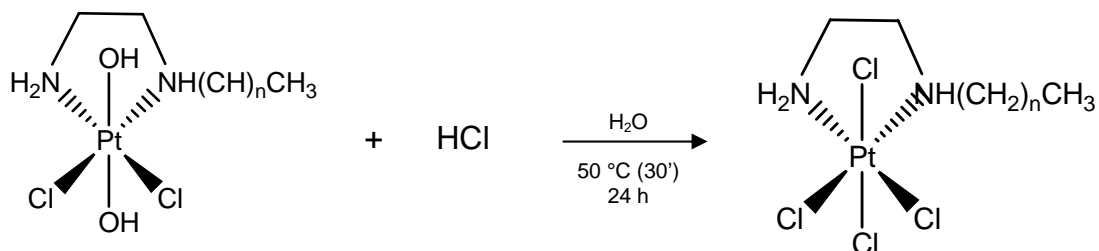
Figura 2.14: Espectro de RMN de ^{195}Pt para o complexo **26**.

2.3.4. Complexos de platina(IV) com cloretos

A reação de obtenção dos complexos de platina(IV) com cloretos é uma reação de substituição na qual as hidroxilas são substituídas por cloretos provenientes do ácido clorídrico preservando o número de oxidação do metal e a geometria octaédrica do complexo.

Os complexos de platina(IV) com cloretos foram obtidos a partir dos análogos de platina(IV) com hidroxilas, pela adição de ácido clorídrico à suspensão destes (figura 2.15). Os complexos obtidos foram separados por filtração e devidamente caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho, RMN de ^1H , ^{13}C e ^{195}Pt , e análise elementar de C, H e N.

Derivados da 1,2-etanodiamina:



31 n = 7

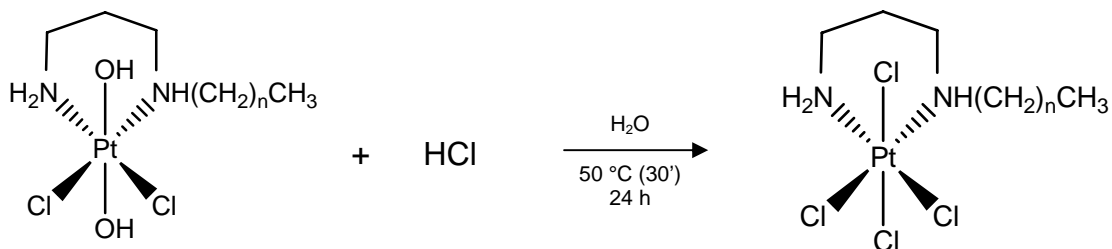
32 n = 9

33 n = 11

34 n = 13

35 n = 15

Derivados da 1,3-propanodiamina:



36 n = 7

37 n = 9

38 n = 11

39 n = 13

40 n = 15

Figura 2.15. Esquema de síntese dos complexos de platina(IV) com cloretos

Os espectros de infravermelho dos complexos de platina(IV) com cloretos se diferem dos espectros dos precursores análogos de platina(IV) com hidroxilas pela ausência das bandas referentes ao estiramento O-H e Pt-O e se diferem dos análogos de platina(II) quanto à banda Pt-Cl, que ocorre de forma mais intensa, devido à presença de 4 ligações Pt-Cl. Esta banda é deslocada de aproximadamente 316 cm^{-1} para até 347 cm^{-1} .

A Figura 2.16 mostra os espectros de três complexos análogos, onde o complexo **11** é um complexo de platina(II), o complexo **21** é um complexo de platina(IV) com hidroxilas e o complexo **31** é um complexo de platina(IV) com cloretos. As principais absorções na região do infravermelho para os complexos de platina(IV) com cloretos estão apresentadas na tabela 2.4.

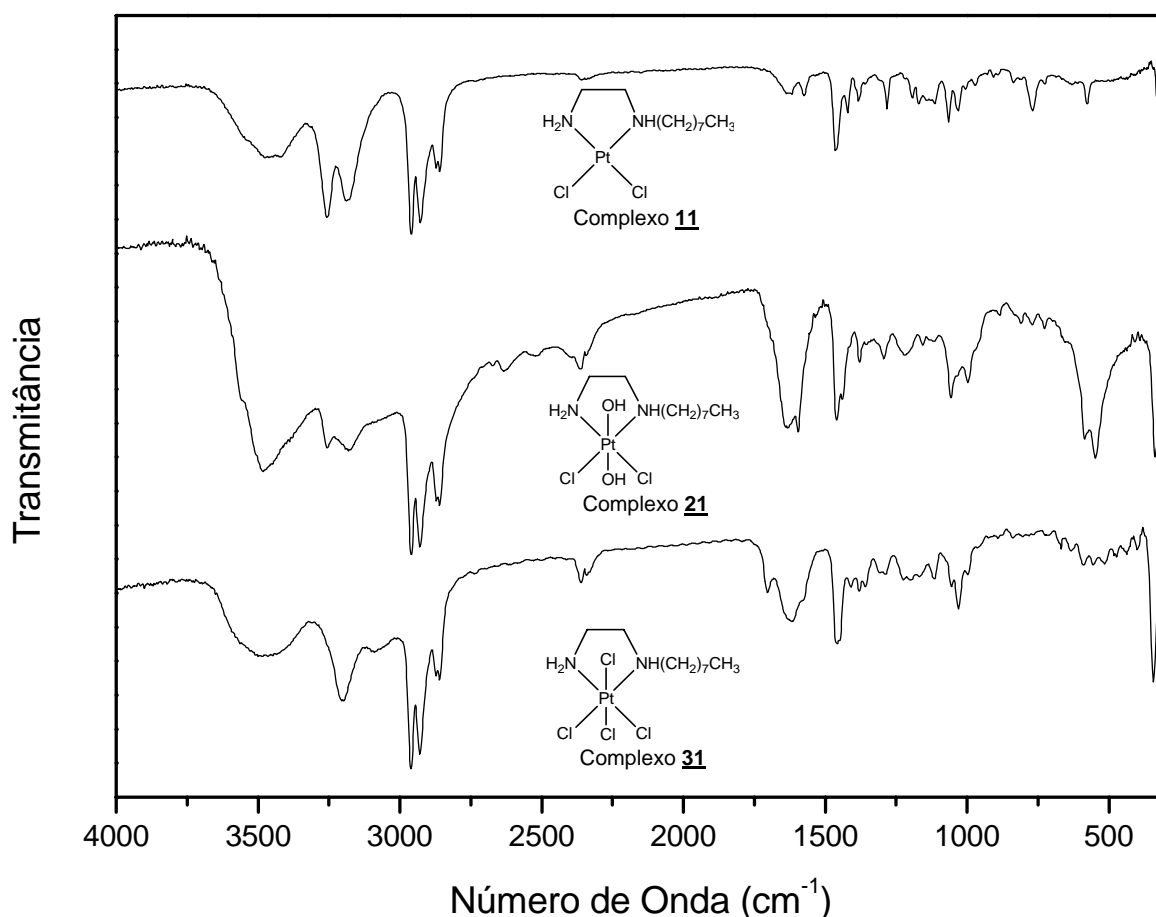


Figura 2.16. Espectros de Infravermelho dos complexos 11, 21 e 31.

Tabela 2.4. Principais absorções na região do I.V. dos complexos de platina(IV) com cloretos

Complexo	V_{N-H}	V_{C-H}	V_{Pt-Cl}
<u>31</u>	3205	2930	343; 341
<u>32</u>	3159	2924	347; 337
<u>33</u>	3159	2924	347; 337
<u>34</u>	3159	2922	347; 341
<u>35</u>	3159	2922	347; 341
<u>36</u>	3199	2924	343; 335
<u>37</u>	3198	2924	339; 329
<u>38</u>	3191	2923	343; 337
<u>39</u>	3205	2922	331; 324
<u>40</u>	3188	2922	343; 335

A figura 2.17 mostra os espectros de RMN ¹H para os complexos **33** e **36** que foram obtidos em solvente DMSO-*d*₆ e são semelhantes para os demais complexos. Os espectros apresentam um sinal em torno de δ 0,85 na forma de simpleto largo referente aos 3 hidrogênios do grupo CH₃. Em δ 1,22 aproximadamente, ocorre um multipeto atribuível aos hidrogênios de grupos CH₂ da cadeia lateral. Entre δ 1,5 e 1,9 podem ser observados dois multipletos referentes a hidrogênios do grupo CH₂ ligado a CH₂NH. Entre δ 2,2 e 2,9 observa-se multipletos correspondentes a hidrogênios dos grupos CH₂ ligados a NH e NH₂. Os sinais dos hidrogênios diretamente ligados a nitrogênio não puderam ser observados nos espectros obtidos.

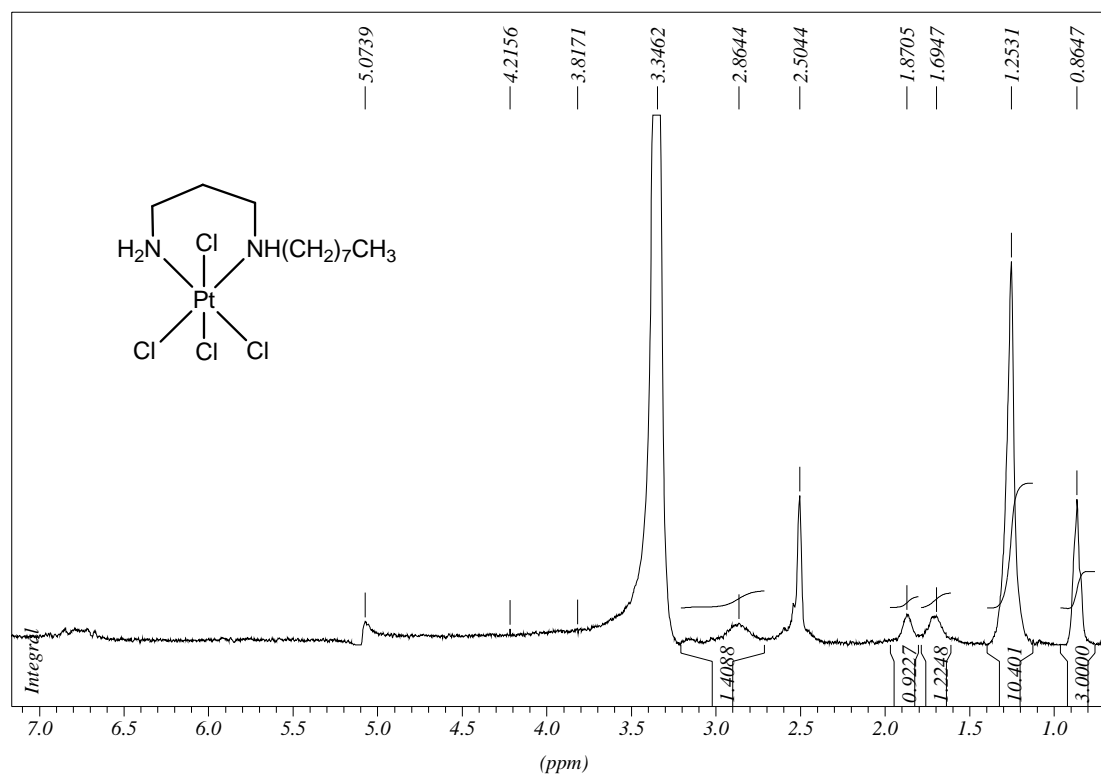
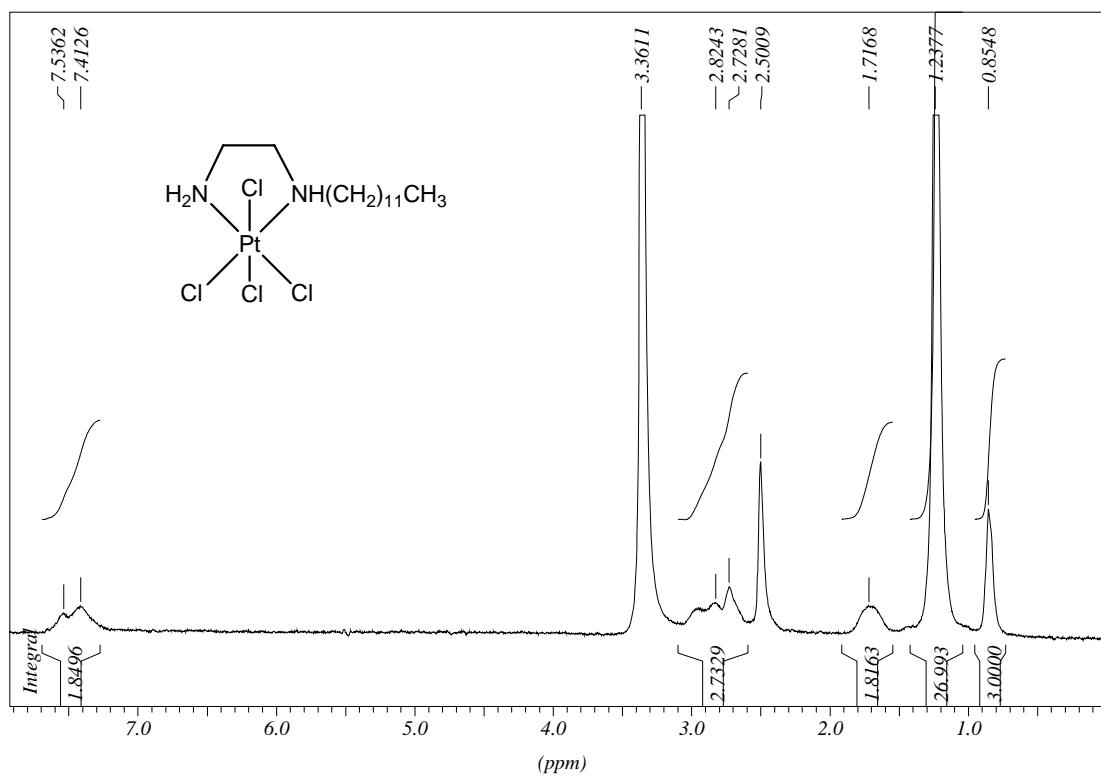


Figura 2.17. Espectros de RMN de ^1H para os complexos **33 e **36**.**

Os espectros de RMN de ^{13}C dos complexos apresentam sinais em δ 14 aproximadamente, referente ao carbono CH_3 e sinais entre δ 20 a 32 referentes aos carbonos da cadeia lateral. Entre δ 45 a 56 observam-se os sinais de carbono vizinho a nitrogênio de NH_2 e NH . A figura 2.18 mostra os espectros de RMN de ^{13}C para os complexos **33** e **36**.

Os espectros de RMN de ^{195}Pt foram obtidos para os complexos de platina(IV) em $\text{DMSO-}d_6$. Estes complexos contêm na esfera de coordenação dois átomos de nitrogênio e quatro átomos de cloro e foram observados sinais na região de δ -200 para derivados da 1,2-etanodiamina e na região de δ -70 para derivados da 1,3-propanodiamina, o que está de acordo com dados da literatura¹⁰⁰. Os valores de deslocamento químico para estes complexos estão representados na tabela 2.5 e a figura 2.19 mostra o espectro de RMN de ^{195}Pt para os complexos **33** e **36**.

Tabela 2.5. Deslocamentos químicos em RMN de ^{195}Pt dos complexos de platina(IV) com cloretos em DMSO.

Complexo	δ , RMN de ^{195}Pt
31	- 268
32	- 270
33	- 269
34	- 270
35	- 269
36	- 75
37	- 74
38	-75
39	-73
40	- 75

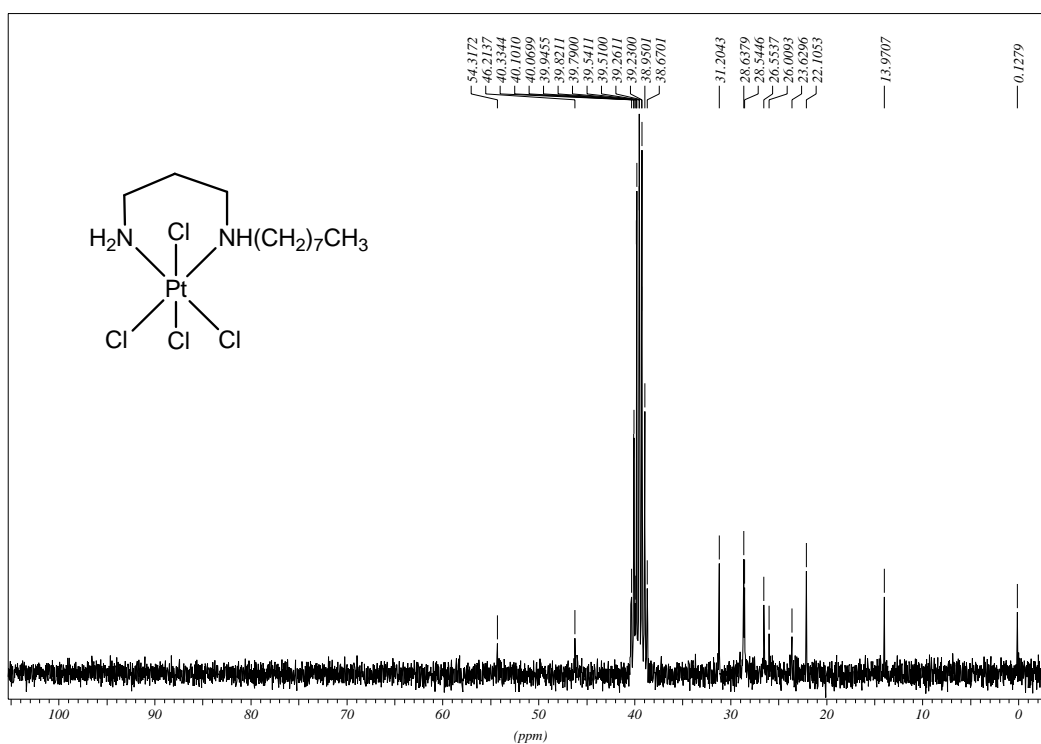
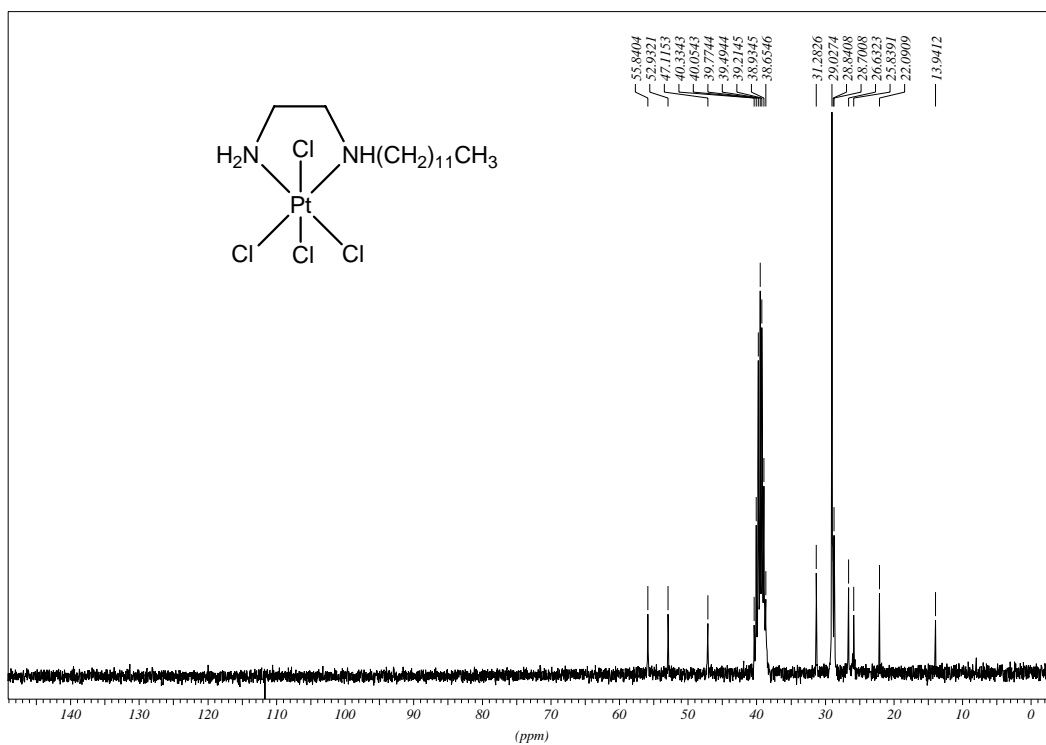


Figura 2.18. Espectros de RMN de ^{13}C para os complexos **33** e **36**

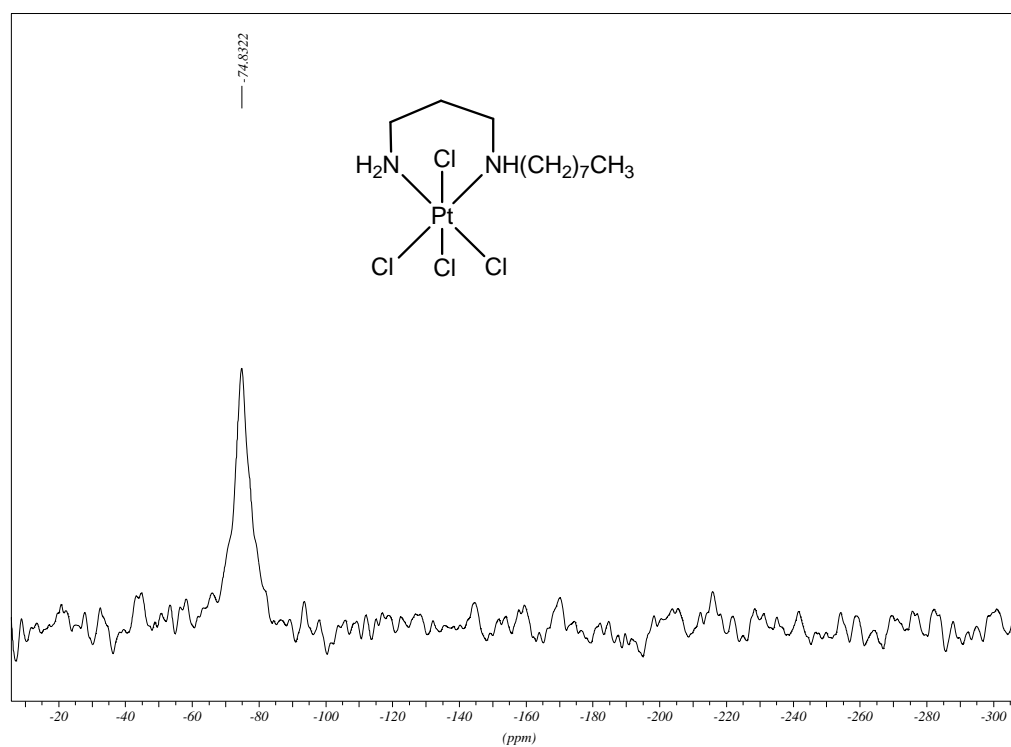
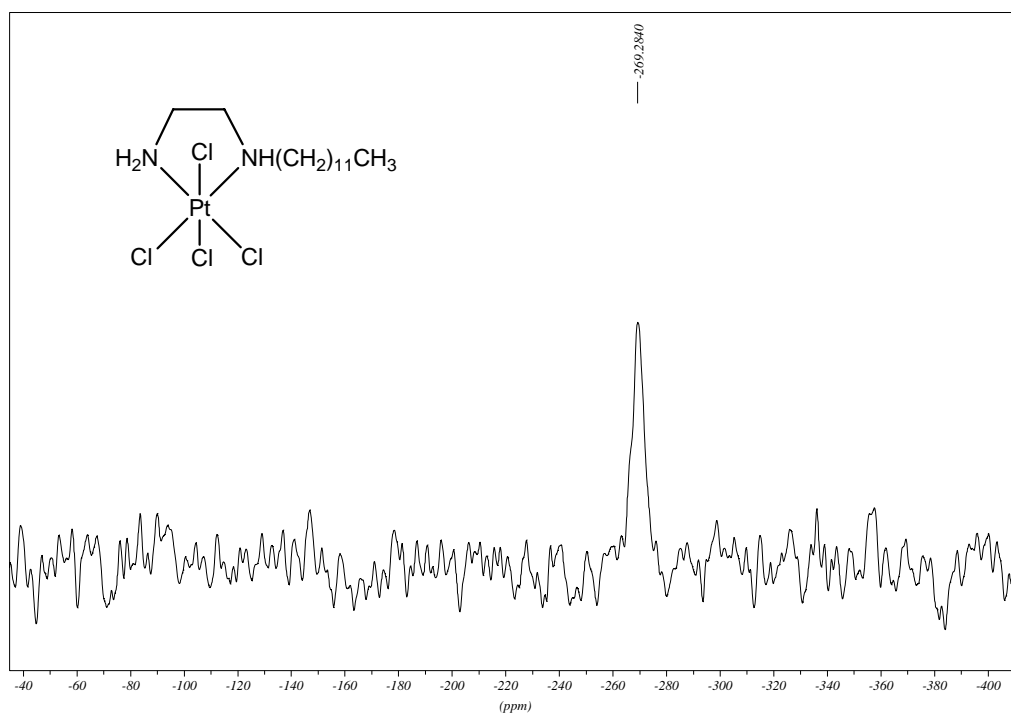


Figura 2.19. Espectros de RMN de ^{195}Pt para os complexos **33 e **36**.**

2.4. CONCLUSÃO

Os ligantes diaminados *N*-alquilados foram sintetizados através da reação do respectivo álcool e cloreto de mesila, quando se obtém o mesilato de alquila. Posteriormente, a reação do mesilato com a diamina em questão resultou nos compostos desejados. Foi realizada purificação através de extração líquido-líquido e colunas de cromatografia. Os rendimentos variaram entre 36 e 55 %. Os ligantes obtidos foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

Os complexos de platina(II) foram sintetizados pela adição do ligante diaminado ao sal de K_2PtCl_4 com rendimentos entre 62 e 84 %. Os complexos de platina(IV) com hidroxilas foram obtidos através da reação de oxidação do precursor platina(II) com peróxido de hidrogênio. Os rendimentos variaram entre 62 e 95 %. Os complexos de platina(IV) com cloretos foram obtidos a partir dos complexos precursores através da reação de substituição das hidroxilas com adição de ácido clorídrico. Os rendimentos variaram entre 63 e 93 %. Os resultados de caracterização por espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e ^{195}Pt , além de microanálise de C, H e N comprovam a obtenção destes compostos.

CAPÍTULO 3

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS CONTENDO OS COMPLEXOS DE PLATINA

3.1. INTRODUÇÃO

A lipofilicidade de agentes antitumorais pode ser um fator determinante na absorção celular e na distribuição celular e tecidual (habilidade de atravessar membranas). Entretanto, a baixa solubilidade dos compostos em água dificulta sua administração por via endovenosa, o que impede muitas vezes sua aprovação dentre os anticancerígenos atualmente utilizados. Diante disso, diversos grupos de pesquisa têm investigado o uso de lipossomas como carreador de drogas anticancerígenas como a cisplatina e a adriamicina⁹⁸. O uso de lipossomas como carreadores de agentes antitumorais lipofílicos tem sido uma estratégia bastante promissora para melhorar a ação de drogas na quimioterapia do câncer.

Os maiores benefícios dos carreadores de drogas são o aumento da solubilidade, o longo tempo de exposição, o direcionamento seletivo ao sítio de ação, o aumento do índice terapêutico e a diminuição da resistência de agentes anticancerígenos. A farmacocinética desses carreadores depende das características físico-químicas como tamanho, carga superficial, lipídios formadores de membrana, biopolímeros estabilizadores, dose e via de administração¹⁰¹.

Neste intuito, mostramos a preparação de diversas formulações de lipossomas incorporando os complexos lipofílicos de platina sintetizados no decorrer deste trabalho e sua viabilidade que depende da estrutura molecular dos complexos, principalmente pela variação do balanço hidrofílico/hidrofóbico.

As características estruturais dos complexos de platina unidas às características das formulações lipossomais escolhidas viabilizam sua preparação e utilização em sistemas biológicos principalmente *in vivo*.

3.2. PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1. Reagentes e métodos instrumentais

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

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

Argônio (Alphagaz Ar1)

Cloreto de sódio (Aldrich)

Colesterol (Aldrich)

Clorofórmio (Merck)

DCP: dihexadecilfosfato (Sigma)

SPE-PEG-2000: Fosfatidiletanolamina[metoxi(polietilenoglicol)-2000] (Lipoid)

- **Liofilização**

A liofilização foi realizada em um aparelho Labconco, Freezone 4.5, no Laboratório de Biofísica e Sistemas Nanoestruturados (Lab-Nano) ICB/UFMG.

- **Homogeneização do tamanho dos lipossomas**

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

- **Medidas de tamanho dos lipossomas**

A espectroscopia de correlação de fótons foi realizada em equipamento Zeta Sizer 3000Hs, Malvern instruments na Escola de Farmácia/UFMG.

- **Determinação e Quantificação de Platina**

Espectrômetro de Absorção Atômica de Forno de Grafite Perkin Elmer (B.3120080) Modelo Analyst 600 com forno THGA no Lab-Nano ICB/UFMG.
Espectrômetro de Absorção Atômica de chama Hitachi 8200 no DQ/UFMG.

3.2.2. Preparação dos lipossomas contendo complexos de platina(II) e complexos de platina(IV) com hidroxilas

Para 4 mL de suspensão de lipossomas incorporando cada complexo foi usado 102 mg de DSPC (32,3 mmol/L), 30 mg de CH (19,3 mmol/L), 21,2 mg de DSPE-PEG-2000 (1,9 mmol/L) e a massa respectiva de cada complexo (6,5 mmol/L). Os componentes foram solubilizados em aproximadamente 4 mL de clorofórmio. O solvente foi então evaporado em rotaevaporador com pérolas de vidro, para obtenção do filme lipídico. O filme lipídico passou por liofilização durante 24 h para garantir a eliminação do solvente. A hidratação do filme foi subsequente realizada com 4 mL de solução aquosa de NaCl (0,15 mol/L), sob agitação mecânica em vortex e aquecimento a 55 °C (temperatura de transição de fase do lipídio DSPC). Após a hidratação, a solução lipossomal apresentou aspecto leitoso. As etapas de preparação estão ilustradas na figura 3.1.

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

A suspensão de lipossomas foi submetida a filtrações repetidas (pelo menos 5 vezes), através de membranas de policarbonato com poros de diâmetro de 200 nm para reduzir e homogeneizar o tamanho dos lipossomas a fim de obter uma solução coloidal monodispersa (figura 3.1). Esta etapa, chamada de extrusão, foi realizada sob alta pressão de argônio (800 psi), a 60 °C, usando um sistema de extrusão (Lipex Biomembrane Inc. Canada).

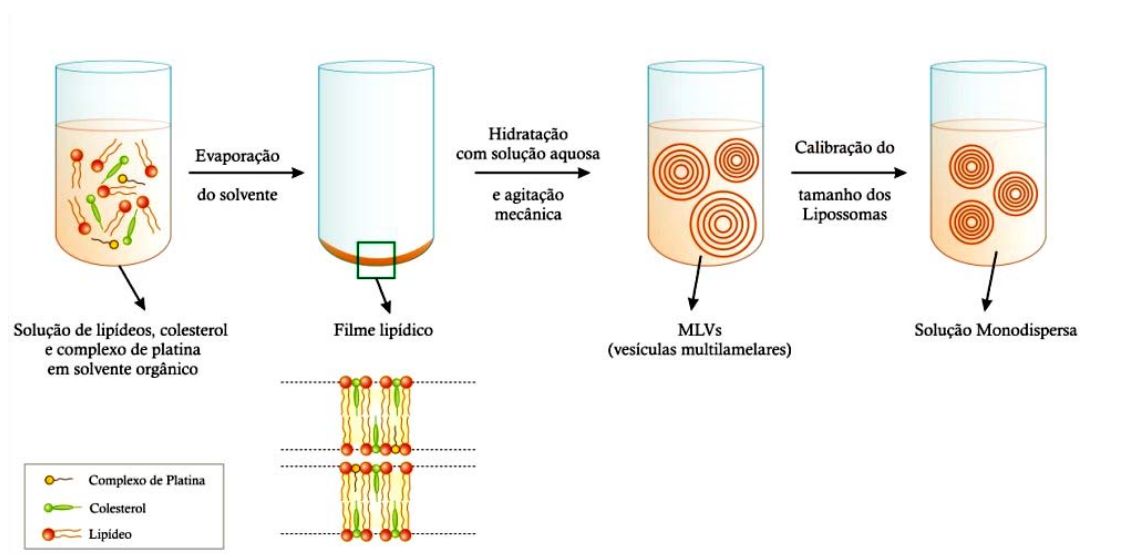


Figura 3.1. Preparação e calibração da solução de lipossomas e representação da possível forma de incorporação dos complexos.

3.2.4. Caracterização das formulações de lipossomas contendo os complexos de platina

3.2.4.1. Medida de distribuição de tamanho das vesículas

Para medir o tamanho dos lipossomas, foi utilizado espectroscopia de correlação de fótons, realizada a partir de uma dispersão de 5 μL de solução lipossomal em 1 mL de solução aquosa de NaCl (0,15 mol/L), sendo possível obter o diâmetro hidrodinâmico das vesículas.

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

3.2.4.2. Determinação da Taxa de Encapsulação e Estabilidade da Formulação

Foram determinados dois parâmetros característicos das formulações dos complexos em lipossomas: taxa de encapsulação, que nos fornece a eficiência de incorporação do complexo nos lipossomas e a porcentagem complexo liberado em condição de diálise, que informa sobre a habilidade da formulação de reter o complexo de platina encapsulado. A quantificação da concentração de platina na formulação exige alguns procedimentos prévios como diálise, liofilização e abertura da amostra para a dosagem final por absorção atômica de chama.

- **Diálise e Liofilização**

A diálise nesta etapa nos permite avaliar a estabilidade da incorporação dos complexos nos lipossomas, onde verificamos a possível liberação dos complexos em solução salina fisiológica.

A diálise foi realizada com aproximadamente 1 mL das amostras de solução lipossomal. Estas soluções foram colocadas em membranas de celulose (Spectra/Por[®] Biotech, MSCO:15000 Daltons), devidamente lacradas, imersas em 1 litro de solução aquosa de NaCl (0,15 mol/L), em recipientes distintos, por 48 horas, sob agitação mecânica, à temperatura ambiente, com três trocas desta solução a cada 12 horas.

A liofilização consiste em eliminar a água da formulação de lipossomas por sublimação sem afetar a composição química da formulação para posterior quantificação de platina. A liofilização foi realizada de um dia para o outro após prévio congelamento (nitrogênio líquido) de amostras das soluções lipossomais dialisadas e não dialisadas.

- **Abertura da Amostra e Dosagem de Platina**

A abertura da amostra foi feita pela queima da matéria orgânica a 700° C em mufla por 2 horas. Após a queima, foi feita dissolução da platina em água régia a 60 °C. Para tal foi usado aproximadamente 40 mg de cada amostra liofilizada.

A dosagem de platina foi feita por absorção atômica de chama em colaboração com o Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais onde foram preparadas soluções aquosas das amostras tratadas em balão volumétrico de 50 mL. A curva de calibração foi construída utilizando solução padrão de K_2PtCl_6 em diferentes concentrações e as medidas foram feitas em duplicata, tendo sido utilizada a média dos valores obtidos.

3.2.5. Determinação do Coeficiente de Partição dos Complexos

Os coeficientes de partição dos complexos de platina foram determinados em duplicata em sistema *n*-octanol/água. Cada complexo foi dissolvido em *n*-octanol e a um volume igual de água com concentração final de 1×10^{-4} mol/L. A mistura foi agitada mecanicamente e mantida em repouso por 24 h para a distribuição das duas fases do sistema. Após separação, amostras das 2 fases foram diluídas entre 5 e 100 vezes dependendo do complexo, e então a concentração de platina foi determinada por Absorção Atômica em Forno de Grafite. Os resultados são expressos pelo coeficiente de partição aparente (*P*), com a concentração de platina na fase orgânica dividida pela concentração de platina na fase aquosa.

3.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Preparação e seleção das formulações de lipossomas contendo os complexos.

Diferentes formulações lipídicas contendo os complexos de platina foram investigadas com diferentes características quanto à composição lipídica, a fluidez da membrana e a presença de componentes poliméricos capazes de influenciar a interação entre vesículas e seu destino *in vivo*. Foram observadas a viabilidade do processo de preparo e a estabilidade macroscópica da suspensão coloidal, com finalidade de selecionar a formulação que apresentasse as características mais favoráveis. As diferentes formulações avaliadas estão apresentadas na tabela 3.1.

O processo de preparo consistiu na etapa de hidratação do filme lipídico seguida da etapa de extrusão visando a calibração e uniformização do tamanho das partículas. Nesta última etapa também foi possível eliminar o complexo não incluso que apresenta insolubilidade em meio aquoso.

A formulação lipídica ideal dos complexos foi obtida usando os componentes DSPC, CH, o complexo em questão e DSPE-PEG-2000, na razão (5:3:1:0,3). Essa composição lipídica resulta em membrana rígida (fosfolídeos de temperatura de transição de fase superior a 55 °C) e em vesículas estabilizadas estericamente devido a presença de polímeros de etilenoglicol na superfície dos lipossomas (PEG-2000)^{71,102}. O recobrimento da superfície dos lipossomas com o PEG-2000 impede a fusão das vesículas e garante uma maior estabilidade física da suspensão, além de permitir um tempo de vida prolongado na circulação sanguínea^{72,102}.

Com o método de preparo e a composição lipídica escolhidos, obtem-se uma suspensão de vesículas multilamelares com diâmetro médio inferior a 200 nm, distribuição de tamanho homogênea, elevada estabilidade física e elevada taxa de encapsulação do complexo, o que será mostrado no item 3.3.3.

Este experimento foi realizado com os complexos de platina(II) **16**, **17**, **18**, **19** e os complexos de platina(IV) **26**, **27**, **28**, **29**.

Tabela 3.1. Características das diferentes formulações lipídicas investigadas.

Composição lipídica (razão molar)	Característica da formulação	Viabilidade do processo
Complexo/CH (7:3)	Complexo (base da formulação)	Hidratação do filme lipídico ineficiente
Complexo/CH/DCP (5:3:2)	Complexo (base da formulação) associado a fosfolipídeos carregados	Hidratação do filme lipídico ineficiente
SPC/CH/Complexo (3:5:1)	Lipossomas fluidos	Formação de agregados impedindo o processo de extrusão
SPC/CH/Complexo/ SPE-PEG-2000 (5:3:1:0,3)	Lipossomas fluidos e furtivos	Formação de agregados impedindo o processo de extrusão
DSPC/CH/Complexo (5:3:1:0,3)	Lipossomas rígidos	Dispersão coloidal instável
DSPC/CH/Complexo/ DSPE-PEG-2000 (5:3:1:0,3)	Lipossomas rígidos e furtivos	Dispersão coloidal estável

3.3.2. Distribuição de tamanho das formulações de lipossomas

A distribuição do tamanho das vesículas é um parâmetro importante na caracterização de uma formulação baseada em lipossomas, devido à sua grande influência na biodistribuição do fármaco encapsulado. Lipossomas relativamente grandes (diâmetro médio maior que 200 nm) são rapidamente reconhecidos e capturados por macrófagos e retidos no fígado e outros tecidos do sistema monocítico fagocitário sendo desviados do percurso pretendido⁷¹.

A tabela 3.2. mostra os valores de diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas e do índice de polidispersão determinados para as diferentes formulações.

O índice de polidispersão da suspensão reflete a homogeneidade da distribuição de tamanho das vesículas, sendo que valores inferiores a 0,2 correspondem a uma população monodispersa.

As suspensões de lipossomas mostraram distribuição de tamanho bastante homogênea com exceção das formulações dos complexos **17** e **27**. Os diâmetros hidrodinâmicos médios foram menores que 160 nm para os complexos de platina(II) e entre 179 e 248 nm para os complexos de platina(IV) com hidroxilas. O tamanho dos lipossomas foi novamente aferido após 30 dias da preparação da formulação e não foi observada variação significativa, confirmando a estabilidade da formulação em função do tempo.

3.3.3. Determinação da Taxa de Incorporação e Estabilidade da Formulação

A taxa de incorporação dos complexos de platina nos lipossomas foi obtida através da determinação da concentração final de platina na suspensão de lipossomas, previamente desidratados por liofilização e tratados com ácido nítrico concentrado para abertura da amostra e queima da matéria orgânica. A determinação da concentração de platina foi realizada por Absorção Atômica por chama e os resultados obtidos encontram-se na tabela 3.2. Os valores de taxa de encapsulação ficaram entre 18,5 e 86,3 % para os complexos de platina(II) e 17,8 e 37,1 % para os complexos de platina(IV). Estes valores são comparáveis a formulações já existentes de outras drogas na literatura¹⁰³.

Da quantidade inicial de complexo utilizada, uma parte não incorporada nos lipossomas precipita e fica retida na membrana de policarbonato durante o processo de extrusão sendo assim eliminada. A diferença de solubilidade dos complexos provavelmente devido à diferença de tamanho da cadeia carbônica ou no caso dos complexos de platina(IV), devido à presença das hidroxilas, mudam o balanço hidrofílico/hidrofóbico e justificam a perda de material e a incorporação

incompleta durante o preparo da formulação. Considerando o caráter anfifílico dos compostos estudados é provável que as moléculas do complexo incorporam-se nas bicamadas lipídicas na interface entre a região hidrofílica e a hidrofóbica. Observa-se um aumento da faixa de incorporação com o aumento do tamanho da cadeia hidrofóbica (com exceção do complexo **29**).

O efeito do estado de oxidação da platina e do comprimento da cadeia hidrofóbica na taxa de incorporação pode ser explicado pela influência desses parâmetros no balanço hidrofílico/hidrofóbico dos complexos, portanto, os complexos mais hidrofóbicos apresentam taxas de incorporação mais elevadas.

Tabela 3.2. Dados de Caracterização dos Lipossomas.

Lipossoma-Complexo	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	Índice de poli-dispersão	Taxa de retenção de platina (%)	Taxa de retenção de platina após diálise* (%)
MLV – 16	157	0,084	18,5	7,1
MLV – 17	158	0,260	46,0	39,5
MLV – 18	159	0,045	82,4	71,0
MLV – 19	157	0,047	86,3	72,0
MLV – 26	179	0,123	21,3	
MLV – 27	233	0,265	29,3	
MLV – 28	248	0,090	37,1	
MLV – 29	195	0,092	17,8	

* 48 h à temperatura ambiente contra NaCl 0,15 mol/L (troca a cada 12h).

A correlação entre a taxa de incorporação e o balanço hidrofílico/hidrofóbico dos complexos é discutida no item 3.3.4. através da determinação do coeficiente de partição.

A estabilidade da formulação foi investigada através da diálise da suspensão lipossomal em solução NaCl 0,9% v/v (concentração fisiológica) por 48 horas à temperatura ambiente, com trocas da solução externa a cada 12 horas e observamos a possível liberação do complexo pelos lipossomas. Dessa forma, foi

determinada a concentração de platina por Absorção Atômica de chama nas amostras dialisadas. Os resultados, apresentados na tabela 3.2, são bastante favoráveis, com elevadas taxas de retenção (maior que 30%). Pode-se observar um aumento da taxa de retenção com o aumento do tamanho da cadeia hidrofóbica. A explicação mais provável para este resultado é que complexos de cadeia mais longa apresentam uma menor solubilidade na fase aquosa e maior partição na membrana dos lipossomas.

3.3.4. Coeficiente de Partição dos complexos

O coeficiente de partição entre água e octanol $[P]$ é frequentemente usado para determinar o balanço hidrofílico/hidrofóbico de fármacos. Compostos hidrofóbicos possuem alto valor de $[P]$ enquanto compostos hidrofílicos possuem baixo valor de $[P]$. Nós podemos observar pelos valores mostrados (figura 3.2 e tabela 3.3) que os complexos de platina possuem diferentes valores de $[P]$ que aumentam com o aumento da cadeia carbônica o que lhes confere maior caráter hidrofóbico.

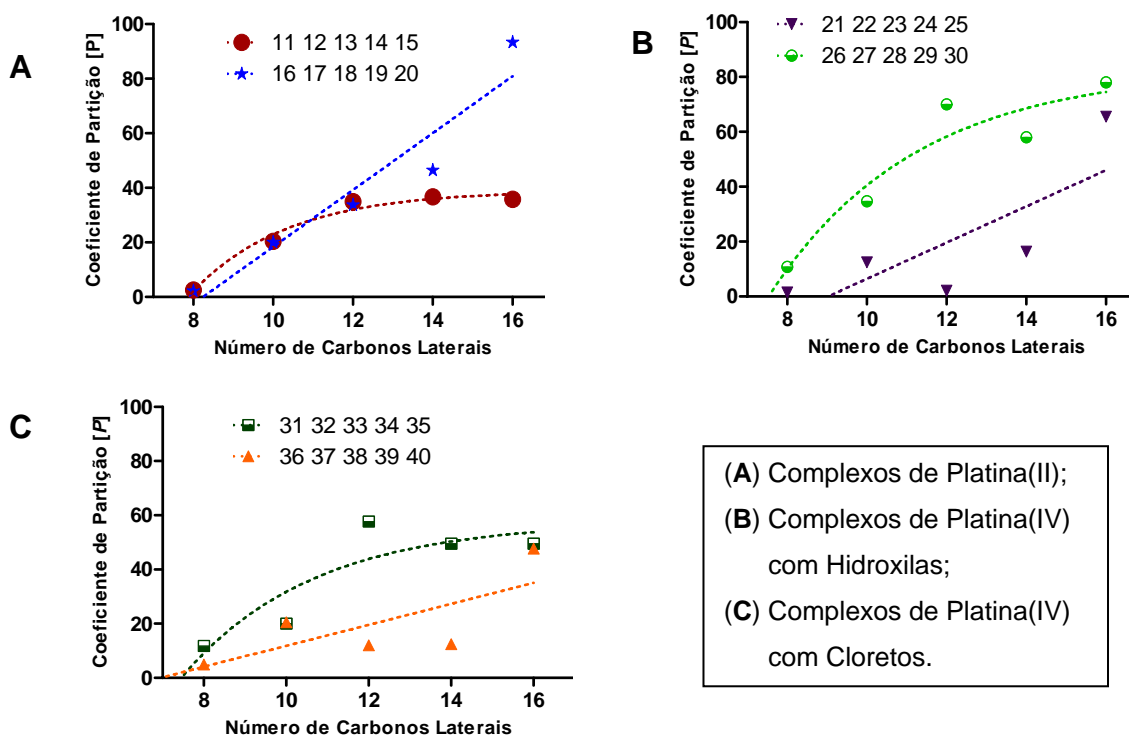


Figura 3.2. Balanço hidrofílico/hidrofóbico dos complexos de platina.

Tabela 3.3. Coeficientes de Partição [P] água/octanol

Cadeia carbônica (nº de carbonos)	Complexos de platina(II)	[P]	Complexos de platina(IV) com OH	[P]	Complexos de platina(IV) com Cl	[P]
8	<u>11</u>	2,53	<u>21</u>	1,44	<u>31</u>	11,79
10	<u>12</u>	20,40	<u>22</u>	12,47	<u>32</u>	20,04
12	<u>13</u>	34,97	<u>23</u>	2,14	<u>33</u>	57,72
14	<u>14</u>	36,69	<u>24</u>	16,38	<u>34</u>	49,56
16	<u>15</u>	35,83	<u>25</u>	65,50	<u>35</u>	49,50
8	<u>16</u>	2,21	<u>26</u>	10,83	<u>36</u>	4,92
10	<u>17</u>	20,05	<u>27</u>	34,72	<u>37</u>	20,57
12	<u>18</u>	33,70	<u>28</u>	70,44	<u>38</u>	12,03
14	<u>19</u>	46,42	<u>29</u>	58,02	<u>39</u>	12,49
16	<u>20</u>	93,35	<u>30</u>	78,17	<u>40</u>	47,67

O coeficiente de partição explica a diferença nas taxas de incorporação dos complexos de platina(II) nas formulações de lipossomas. Os compostos mais hidrofóbicos tiveram maior taxa de incorporação e esta tendência pode ser visualizada na figura 3.3. Essa característica sugere que os compostos estejam alocados nas membranas formadoras dos lipossomas, região de maior filia por compostos hidrofóbicos, favorecida pela presença de membranas multilamelares do tipo de formulação escolhida. Para os complexos de platina(IV), apesar do caráter hidrofóbico, a taxa de incorporação não acompanha esta característica e isto pode ser devido à presença de duas hidroxilas na esfera de coordenação de platina que altera a carga e conseqüentemente o tamanho da região polar do complexo alterando a estabilidade da membrana e impedindo sua incorporação.

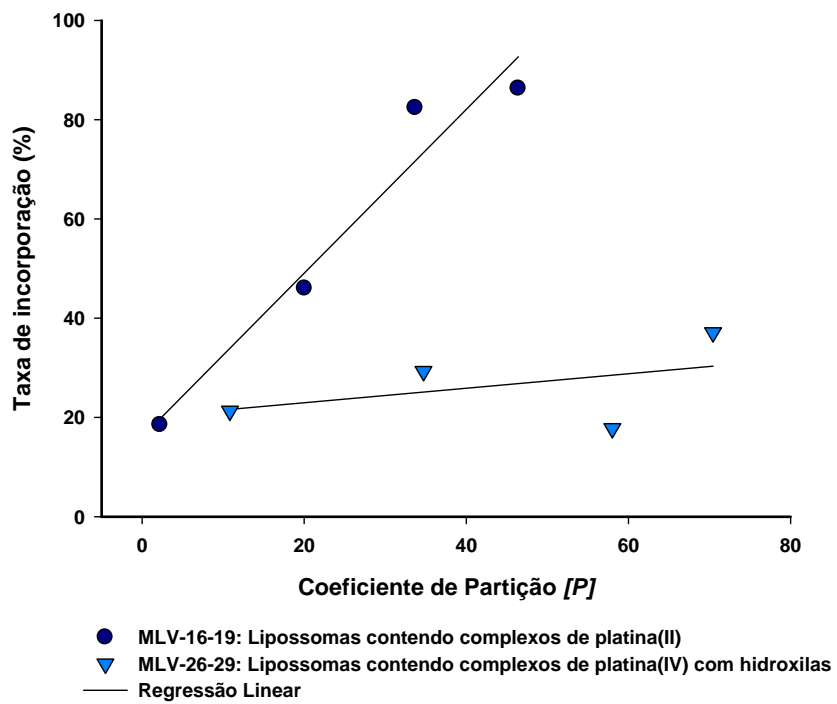


Figura 3.3. Relação entre a taxa de incorporação dos complexos em lipossomas e o seu coeficiente de partição [P].

3.4. CONCLUSÃO

Diferentes formulações de lipossomas incorporando os complexos de platina, que são alvo deste estudo, foram preparadas e foi determinada a formulação que apresentou características de tamanho, encapsulação e retenção mais favoráveis. O modelo de lipossomas furtivos garante uma maior estabilidade física da formulação e permite esperar uma permanência mais prolongada na circulação sanguínea e um maior direcionamento para os sítios tumorais.

Demonstramos que o tamanho da cadeia hidrofóbica e o estado de oxidação da platina influenciam no balanço hidrofílico/hidrofóbico do complexo e sugerimos que este último parâmetro determina as taxas de encapsulação e de retenção dos complexos nos lipossomas.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE COMPLEXOS DE PLATINA(II) E PLATINA(IV) E DE SUAS FORMULAÇÕES EM LIPOSSOMAS

4.1. INTRODUÇÃO

Os compostos de platina atualmente utilizados no tratamento do câncer atuam de forma citotóxica, tendo como mecanismo de ação principal a ligação às bases do DNA com conseqüente dano irreversível à célula. A avaliação da atividade citotóxica de novos complexos de platina é o primeiro passo na investigação de sua ação antitumoral⁶⁰.

As culturas de células são empregadas como sistemas modelo em testes de citotoxicidade, além de serem usadas em virologia, produção de vacinas, proteínas e hormônios, na engenharia genética e, principalmente, na investigação e desenvolvimento de novos fármacos¹⁰⁴.

A citotoxicidade pode ser avaliada aplicando-se várias metodologias como, por exemplo, a citometria de fluxo que utiliza um aparelho de detecção óptico-eletrônico que, dentre várias aplicações, realiza a contagem de células viáveis¹⁰⁵. Outras técnicas utilizadas são as colorimétricas e fluorimétricas que podem ser exemplificadas pela dosagem da lactase desidrogenase (LDH), que é baseada na integridade da membrana; o alamar blue (AB), que é metabolizado na mitocôndria das células produzindo um composto fluorescente; o CFDA-AM que também tem princípios fluorimétricos, baseado na integridade da membrana celular; e principalmente técnicas colorimétricas que usam sais de tetrazólio como o MTT, XTT e WST¹⁰⁶.

A técnica do MTT é um ensaio colorimétrico amplamente utilizado para avaliação de citotoxicidade. A redução do sal de tetrazólio, brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), inicialmente amarelo, pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial gera o produto de cor violeta chamado Formazan, figura 4.1. Uma vez que a redução somente ocorre em

células viáveis, a quantidade de formazan formado é diretamente proporcional à quantidade de células vivas ¹⁰⁷.

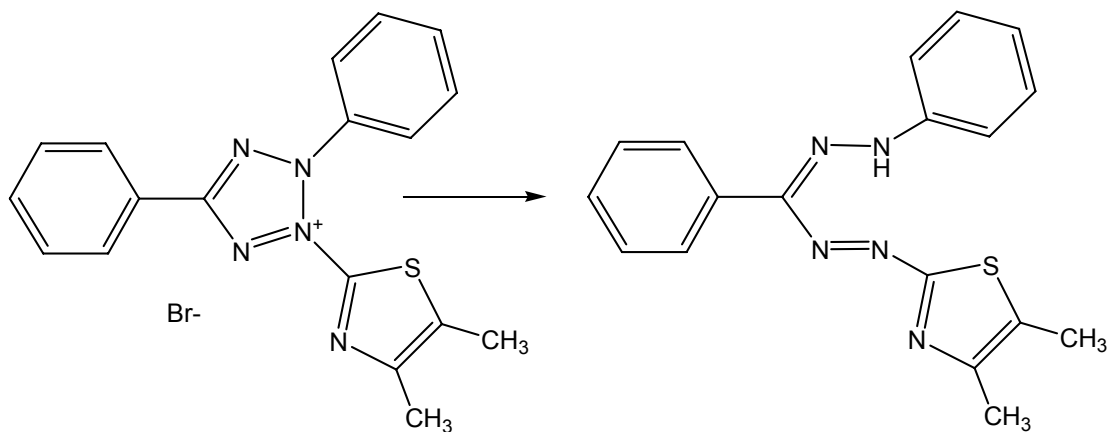


Figura 4.1. Redução do MTT ao composto Formazan.

4.2 PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1. Reagentes e métodos instrumentais

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

Ampicilina (Sal de sódio – Sigma)

Anfotericina B (Cristália)

EDTA (Reagen Quimibras)

Dimetilsulfóxido (Vetec)

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

FBS – Soro Fetal Bovino (Cultilab)

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

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

Na₂HPO₄ 8 mmol/L e KH₂PO₄ 2 mmol/L

RPMI 1640 (Aldrich)

Sulfato de Streptomicina (Sigma)

- **Esterilização do material**

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

- **Quantificação das células**

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

- **Manipulação das culturas de célula**

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

- **Manutenção das culturas de célula**

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

- **Observação das células**

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

4.2.2. Linhagens Celulares

Neste trabalho foram utilizadas linhagens de células não tumorais e de células tumorais, sendo B16-F1, célula de melanoma murino não-metastático, B16-F10, célula de melanoma murino metastático e MDA-MB-231 adenocarcinoma de mama humano, cedidas por Ludwig Institute for Cancer Research – São Paulo. Ainda foram utilizadas a linhagem A549, carcinoma de pulmão humano, obtida do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro e as linhagens de células não tumorais, BHK-21, célula normal de rim de hamster e CHO, célula normal de ovário murino cedidas pelo Centro Pan-americano de Febre Aftosa – Rio de Janeiro.

As diferentes linhagens celulares utilizadas foram devidamente propagadas em meio de cultura RPMI 1640, pH 7,4, suplementado com soro fetal bovino (FBS-Fetal Bovine Serum) 10% v/v, Hepes (4,0 mmol/L), NaHCO₃ (14,0 mmol/L), ampicilina (0,27 mmol/L) e estreptomicina (0,06 mmol/L) em garrafas de 25 mL, na temperatura de 37 °C em estufa com atmosfera úmida e contendo 5 % (v/v) de dióxido de carbono.

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

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

As soluções estoque (10^{-2} mol/L) dos 30 complexos de platina(II) e platina(IV) testados foram preparadas a cada experimento usando DMSO como solvente. Estas soluções foram adequadamente diluídas em meio de cultura, suplementado conforme descrito no item 4.2.2., para as concentrações 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} mol/L evitando-se exceder 1 % de DMSO na solução de maior concentração testada (10^{-4} mol/L).

Para as formulações de lipossomas, estes foram diretamente diluídos, da mesma maneira como descrito acima, para as concentrações 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} mol/L do complexo. Os padrões de comparação utilizados foram cisplatina e carboplatina nas mesmas concentrações e condições experimentais.

4.2.4. CI_{50} dos complexos de platina em linhagens de células tumorais e não tumorais, determinada pelo método MTT

Para a determinação da concentração inibitória de 50 % da viabilidade celular (CI_{50}), as células foram distribuídas em meio de cultura em densidades que variaram conforme a linhagem celular entre $0,5 \times 10^3$ e 2×10^3 células/poço/100 μ L numa placa com 96 poços e foram devidamente incubadas a 37 °C em atmosfera umedecida e 5 % CO_2 por 48 horas para ideal aderência.

Nos poços da placa contendo as células já aderidas, foram distribuídos 100 μ L de concentrações decrescentes da substância a ser testada, em sextuplicatas. Para controle negativo, 100 μ L de meio de cultura suplementado com 10% de FBS, foram adicionados a doze poços da placa. As células foram expostas aos compostos por 120 h sendo realizada uma troca do meio de cultura após as primeiras 48 h, contendo 10 % v/v de FBS e os compostos testados nas devidas concentrações.

Após a exposição das células ao composto de investigação, as células foram incubadas com MTT (5 μ g/10 μ L/poço) durante 4 h. A seguir, todo o líquido sobrenadante foi removido por aspiração e foram adicionados 100 μ L de

DMSO/poço, sendo a viabilidade celular (proporcional à concentração dos sais de formazan) determinada pela medida de absorvância a 492 nm num espectrofotômetro de microplacas.

A concentração inibitória de 50 % da viabilidade celular (CI_{50}) para os 30 complexos de platina(II) e platina(IV) aqui descritos foi determinada nas seis linhagens celulares distintas. Os dados obtidos foram normalizados considerando-se a viabilidade celular do controle negativo como 100%. As CI_{50} foram calculadas usando regressão linear sobre os valores de concentração em escala logarítmica *versus* a porcentagem de viabilidade celular em cada concentração. Para tal foi utilizado o programa Sigma Plot 10.0.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A representação gráfica da determinação da CI_{50} está mostrada na figura 4.2., onde podemos observar a diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração do composto **15**, por exemplo, e a regressão linear.

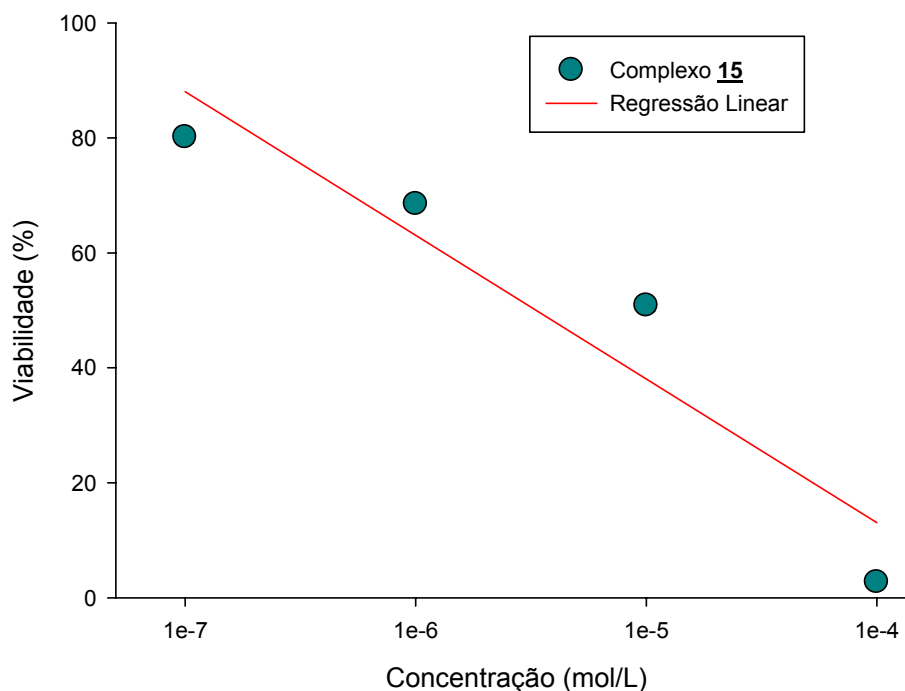


Figura 4.2. Perfil citotóxico representativo dos complexos de platina(II). Viabilidade celular (%) versus as concentrações (mol/L) do complexo em escala logarítmica. Este gráfico se refere à determinação da CI_{50} do complexo 15 sobre a linhagem B16-F10.

Na tabela 4.1 estão apresentados os valores de CI_{50} dos compostos de platina(II) determinados sobre as diferentes linhagens celulares. Podemos observar que os compostos **13**, **14** e **15** apresentam maior ou igual citotoxicidade (3,1 a 4,2 $\mu\text{mol/L}$) que a cisplatina (4,2 $\mu\text{mol/L}$) contra células de melanoma metastático (B16-F10). Em outras linhagens estes compostos não apresentaram maior citotoxicidade do que a cisplatina.

Em relação à atividade citotóxica da carboplatina podemos observar que os complexos **13**, **15**, **18**, **19** e **20** apresentam maior citotoxicidade contra células B16-F1, melanoma não metastático (4,1 a 5,5 $\mu\text{mol/L}$), que a carboplatina (6,3 $\mu\text{mol/L}$). Todos os compostos desta série são até 4 vezes mais tóxicos (4,6 a 16,6 $\mu\text{mol/L}$) que a carboplatina (20,1 $\mu\text{mol/L}$) em células tumorais de pulmão (A549). Quanto à linhagem celular de tumor de mama (MDA-MB-231) apenas os compostos **15** (7,2 $\mu\text{mol/L}$) e **18** (4,2 $\mu\text{mol/L}$), apresentaram citotoxicidade maior que a carboplatina (8,3 $\mu\text{mol/L}$). É importante observar que o complexo **18** foi mais citotóxico nas 4 linhagens tumorais testadas.

Tabela 4.1. CI_{50} * ($\mu\text{mol/L}$) dos Complexos de Platina(II).

Complexos	Células Tumorais				Células Não tumorais	
	B16-F1	B16-F10	MDA	A549	BHK-21	CHO
11	25,1	6,3 ^{α}	28,8	10,9 ^{α}	12,6 ^{α}	25,1
12	9,6	6,3 ^{α}	38,0	16,6 ^{α}	19,1 ^{α}	9,6 ^{α}
13	5,5 ^{α}	4,2 ^{α#}	16,6	5,5 ^{α}	10,9 ^{α}	2,6 ^{α#}
14	12,6	3,6 ^{α#}	28,8	12,6 ^{α}	5,5 ^{α}	2,4 ^{α#}
15	4,8 ^{α}	3,1 ^{α#}	7,2 ^{α}	14,5 ^{α}	3,1 ^{α#}	2,4 ^{α#}
16	7,2	19,1	20,8	10,9 ^{α}	4,2 ^{α}	1,8 ^{α#}
17	16,5	15,8	16,5	16,5 ^{α}	12,5 ^{α}	9,5 ^{α}
18	4,1 ^{α}	6,3 ^{α}	4,2 ^{α}	15,8 ^{α}	7,6 ^{α}	6,3 ^{α}
19	5,1 ^{α}	8,3	8,5	4,6 ^{α}	5,5 ^{α}	5,2 ^{α#}
20	5,4 ^{α}	15,1	20,9	8,7 ^{α}	16,2 ^{α}	10,9
Cis-Pt	3,5	4,2	1,4	2,7	3,6	5,5
Carbo-Pt	6,3	6,3	8,3	20,1	50,6	9,8

* Todos os valores de CI_{50} estão representados como média (SD<10% do valor da média)

^{α} CI_{50} menor ou igual à carboplatina

[#] CI_{50} menor ou igual à cisplatina

Todos os compostos desta série, exceto o composto **15**, são menos tóxicos que a cisplatina (3,6 $\mu\text{mol/L}$) em células não tumorais de rim (BHK-21), porém, todos são mais tóxicos que a carboplatina (50,6 $\mu\text{mol/L}$). Em células não tumorais de ovário (CHO) 50 % dos compostos foram menos tóxicos (6,3 a 25,1 $\mu\text{mol/L}$) que a cisplatina (5,5 $\mu\text{mol/L}$).

A influência do tamanho da cadeia carbônica pode ser notada em algumas linhagens como, por exemplo, em se tratando dos complexos **11**, **12** e **13**, o aumento da cadeia aumenta a atividade citotóxica contra B16-F1 e CHO. Para os complexos **16**, **17** e **18**, esta influência é observada em células B16-F10 e MDA. Esta característica não é observada em todas as linhagens e nem ao longo de toda série. Em um trabalho em colaboração, os complexos **16**, **17**, **18** e **19** foram estudados quanto à influência do comprimento da cadeia carbônica na entrada na célula¹⁰⁸. Foi possível observar que o aumento da cadeia carbônica lateral favorece a absorção do composto pela célula e aumenta a sua citotoxicidade na linhagem GLC4 (câncer de pulmão) e K562 (leucemia mielogênica). Esta tendência deixou de ser observada para os complexos com ligantes de cadeias carbônicas maior, provavelmente porque a grande massa molecular pode interferir estericamente na habilidade de absorção celular do composto.

Diversos complexos de platina estão descritos na literatura apresentando atividade citotóxica bastante variada, mas poucos apresentam maior atividade que a cisplatina e, muitos deles são melhores do que a carboplatina. Para ilustrar essa colocação, podemos citar os compostos com carboxilatos de fórmula geral $[\text{PtA}_2(\text{OCOCH}_2\text{OR})_2]$ (A_2 = duas monoaminas ou uma diamina, R = grupo alquila)¹⁰⁹ e compostos lipofílicos¹¹⁰ derivados de salicilato que foram estudados contra células A549.

Um composto bastante similar aos descritos aqui, que possui uma cadeia lateral longa ligada ao carbono da diamina, foi investigado em células de rim (E39), pulmão (NSCLC-N6), e melanoma (M96) e apresentou maior citotoxicidade nas células de melanoma e também se mostrou mais citotóxico quando comparado a compostos análogos com duas cadeias alifáticas laterais¹¹¹.

Para os complexos de platina(IV) com hidroxilas, de acordo com os resultados de CI_{50} apresentados na tabela 4.2, podemos observar maior citotoxicidade dos compostos **21**, **27** e **29** (2,4 a 4,2 $\mu\text{mol/L}$) em relação à cisplatina (4,2 $\mu\text{mol/L}$) contra células de melanoma metastático (B16-F10) e para o composto **26** contra células de melanoma, tanto metastático (2,9 $\mu\text{mol/L}$) quanto não metastático (2,8 $\mu\text{mol/L}$) (B16-F1).

Tabela 4.2. CI_{50}^* ($\mu\text{mol/L}$) dos Complexos de Platina(IV) com Hidroxilas.

Complexos	Células Tumorais				Células Não tumorais	
	B16-F1	B16-F10	MDA	A549	BHK-21	CHO
21	8,51	2,4 ^{α#}	16,6	12,0 ^{α}	15,8 ^{α}	12,6
22	10,7	5,3 ^{α}	14,5	11,5 ^{α}	13,8 ^{α}	9,6 ^{α}
23	13,2	6,3 ^{α}	14,8	12,6 ^{α}	20,4 ^{α}	7,6 ^{α}
24	6,3 ^{α}	6,3 ^{α}	19,1	28,8	28,8 ^{α}	14,5
25	7,6	4,2 ^{α}	21,9	16,6 ^{α}	25,1 ^{α}	12,6
26	2,8 ^{α#}	2,9 ^{α#}	3,9 ^{α}	3,2 ^{α}	4,2 ^{α}	2,8 ^{α#}
27	3,6 ^{α}	3,9 ^{α#}	4,5 ^{α}	3,6 ^{α}	2,4 ^{α#}	2,8 ^{α#}
28	15,5	7,2	9,6	5,5 ^{α}	1,4 ^{α#}	2,8 ^{α#}
29	8,5	4,2 ^{α#}	9,6	7,2 ^{α}	6,3 ^{α}	2,4 ^{α#}
30	7,2	6,3 ^{α}	14,5	16,6 ^{α}	19,5 ^{α}	8,7 ^{α}
Cis-Pt	3,5	4,2	1,4	2,7	3,6	5,5
Carbo-Pt	6,3	6,3	8,3	20,1	50,6	9,8

* Todos os valores de CI_{50} estão representados como média (SD<10% do valor da média)

^{α} CI_{50} menor ou igual à carboplatina

[#] CI_{50} menor ou igual à cisplatina

Em relação à carboplatina, praticamente todos os compostos apresentaram maior citotoxicidade em linhagem celular B16-F10 ($<6,3 \mu\text{mol/L}$) e linhagem celular A549 ($<20,1 \mu\text{mol/L}$). Apenas os compostos **26** ($3,9 \mu\text{mol/L}$) e **27** ($4,5 \mu\text{mol/L}$) apresentaram melhor citotoxicidade contra linhagem celular de câncer de mama (MDA-MB-231) do que a carboplatina ($8,3 \mu\text{mol/L}$).

Apesar da maior citotoxicidade de alguns complexos nas linhagens celulares de tumor testadas, os mesmos também apresentaram maior citotoxicidade às células não tumorais de ovário, porém, apenas os compostos **27** e **28** foram mais tóxicos que a cisplatina em células não tumorais de rim.

Alguns complexos de platina(IV), citados na literatura, foram submetidos a testes citotóxicos em células A549 e MDA-MB-231 e mostraram atividade melhor que a cisplatina e a carboplatina e outros não foram ativos contra este tipo de linhagem celular¹¹².

É importante ressaltar que os valores de referência para cisplatina e carboplatina, determinados neste trabalho, diferem dos encontrados em alguns trabalhos na literatura devido a diferenças metodológicas de avaliação da citotoxicidade, o que é bastante usual. Por exemplo, no trabalho de Kwon¹¹² foram encontrados os valores de CI_{50} para a cisplatina (A549 = $4,6 \mu\text{mol/L}$; MDA = $13,9 \mu\text{mol/L}$) e para a carboplatina (A549 = $40,8 \mu\text{mol/L}$; MDA = $68,3 \mu\text{mol/L}$), diferentes também do valor encontrado por Marzano¹¹³ para a cisplatina (A549 = $34,3 \mu\text{mol/L}$).

Os resultados de CI_{50} para os complexos de platina(IV) com cloretos estão apresentados na tabela 4.3, onde observamos que os compostos **33** (4,2 $\mu\text{mol/L}$) e **34** (3,3 $\mu\text{mol/L}$) têm citotoxicidade igual ou maior que a cisplatina (4,2 $\mu\text{mol/L}$) em linhagem celular de melanoma metastático (B16-F10) enquanto os compostos **38**, **39** e **40** (1,7 a 2,8 $\mu\text{mol/L}$) são mais citotóxicos que a cisplatina (3,5 $\mu\text{mol/L}$) em células de melanoma não metastático (B16-F1).

Tabela 4.3. CI_{50} * ($\mu\text{mol/L}$) dos Complexos de Platina(IV) com cloretos.

Complexos	Células Tumorais				Células Não tumorais	
	B16-F1	B16-F10	MDA	A549	BHK-21	CHO
31	4,8 ^{α}	9,6	12,6	12,6 ^{α}	16,6 ^{α}	10,9
32	6,3 ^{α}	9,6	11,0	5,5 ^{α}	11,0 ^{α}	5,9 ^{α}
33	8,3	4,2 ^{α#}	13,2	9,6 ^{α}	11,0 ^{α}	18,6
34	7,2	3,3 ^{α#}	21,9	9,8 ^{α}	14,5 ^{α}	19,1
35	12,6	8,3	16,6	14,8 ^{α}	11,0 ^{α}	5,5
36	4,7 ^{α}	4,5 ^{α}	12,6	9,8 ^{α}	6,3 ^{α}	3,9
37	3,6 ^{α}	12,6	21,9	12,2 ^{α}	6,3 ^{α}	3,3
38	2,8 ^{α#}	6,3 ^{α}	27,5	14,4 ^{α}	8,3 ^{α}	4,8
39	1,7 ^{α#}	8,3	20,9	10,9 ^{α}	19,1 ^{α}	10,5
40	2,8 ^{α#}	6,0 ^{α}	14,5	19,1 ^{α}	25,1 ^{α}	8,3 ^{α}
Cis-Pt	3,5	4,2	1,4	2,7	3,6	5,5
Carbo-Pt	6,3	6,3	8,3	20,1	50,6	9,8

* Todos os valores de CI_{50} estão representados como média (SD<10% do valor da média)

^{α} CI_{50} menor ou igual à carboplatina

CI_{50} menor ou igual à cisplatina

Em comparação à carboplatina (20,1 $\mu\text{mol/L}$), todos os compostos sintetizados desta série são mais citotóxicos (5,5 a 19,1 $\mu\text{mol/L}$) em linhagem tumoral de pulmão (A549), mas não foram mais citotóxicos em células de câncer de mama (MDA-MB-231). Os compostos **36**, **38** e **40** (4,5 a 6,3 $\mu\text{mol/L}$) apresentaram toxicidade maior ou igual comparada à carboplatina (6,3 $\mu\text{mol/L}$) em células de melanoma metastático.

Todos os compostos desta série foram menos tóxicos que a cisplatina em células não tumorais de rim (BHK-21), mas a carboplatina ainda apresenta menor citotoxicidade em células renais. Quanto às células não tumorais de ovário (CHO) os compostos **36**, **37** e **38** foram mais tóxicos que a cisplatina (5,5 $\mu\text{mol/L}$) e os compostos **31**, **33**, **34** e **39** (10,5 a 19,1 $\mu\text{mol/L}$) tiveram menor citotoxicidade que cisplatina e que a carboplatina (9,8 $\mu\text{mol/L}$).

De forma geral, podemos notar que os complexos de platina(II) e platina(IV) aqui investigados se mostraram mais ativos em linhagens celulares de melanoma do que em células de câncer de mama e pulmão. Esta observação é bastante interessante do ponto de vista da grande dificuldade em conseguir um tratamento quimioterápico eficiente para este tipo de tumor que, hoje em dia, é contornado por intervenção cirúrgica como primeira escolha terapêutica¹⁴. Além disso, estes complexos foram menos citotóxicos em células não tumorais de rim, sugerindo que possa haver *in vivo* uma possível diminuição da nefrotoxicidade que é apresentada de forma severa pela cisplatina^{10,11}.

Os resultados de Cl_{50} para os complexos **17**, **18** e **19** livres e incorporados em lipossomas (**MLV-17**, **MLV-18** e **MLV-19**) estão apresentados na tabela 4.4. A formulação de **MLV-17** apresentou maior citotoxicidade em relação ao composto **17**, mas não foi maior que o mostrado pela cisplatina, além disso, teve citotoxicidade comparável à carboplatina sobre a linhagem de melanoma metastático. A formulação **MLV-18** apresenta maior citotoxicidade contra células de melanoma metastático (B16-F10) e não metastático (B16-F1) comparada à cisplatina e foi menos tóxica que esta em células não tumorais de rim. A formulação de **MLV-19** teve sua citotoxicidade diminuída e não teve resultados melhores que a cisplatina ou carboplatina em nenhuma das linhagens tumorais testadas.

Tabela 4.4. Cl_{50} * ($\mu\text{mol/L}$) dos Lipossomas MLV contendo complexos de Platina(II)

Formulações	Células Tumorais				Células Não tumorais	
	B16-F1	B16-F10	MDA	A549	BHK-21	CHO
17	16,5	15,8	16,5	16,5 ^{α}	12,5 ^{α}	9,5 ^{α}
MLV-17	14,4	6,3 ^{α}	25,1	14,4 ^{α}	22,9 ^{α}	3,6 ^{α#}
18	4,1 ^{α}	6,3 ^{α}	4,2 ^{α}	15,8 ^{α}	7,6 ^{α}	6,3 ^{α}
MLV-18	2,7 ^{α#}	4,2 ^{α#}	3,9 ^{α}	4,2 ^{α}	7,2 ^{α}	3,9 ^{α#}
19	5,1 ^{α}	8,3	8,5	4,6 ^{α}	5,5 ^{α}	5,2 ^{α#}
MLV-19	14,5	9,8	15,9	19,1 ^{α}	19,0 ^{α}	6,2 ^{α}
Cis-Pt	3,5	4,2	1,4	2,7	3,6	5,5
Carbo-Pt	6,3	6,3	8,3	20,1	50,6	9,8

* Todos os valores de Cl_{50} estão representados como média(SD<10% do valor da média)

^{α} Cl_{50} menor ou igual à carboplatina

[#] Cl_{50} menor ou igual à cisplatina

A formulação **MLV-18** promoveu maior citotoxicidade comparada ao composto **18** nas quatro linhagens tumorais testadas, ressaltando uma diferença maior em células de câncer de pulmão (A549). Mesmo promovendo aumento da citotoxicidade em células tumorais, a formulação de lipossomas **MLV-18** não aumentou a toxicidade em células renais não tumorais.

Os lipossomas têm mostrado melhora na atividade citotóxica de complexos de platina lipofílicos especialmente contra células A2780 (carcinoma de cólon). Este aumento da atividade citotóxica varia entre 2 a 4 vezes em comparação ao composto livre, atingindo a eficácia da cisplatina^{103,115}. Outras formulações de lipossomas contendo cisplatina mostraram aumento da atividade citotóxica em células A₄₃₁ sem aumentar a toxicidade a células não tumorais de rim (BHK-21)¹¹⁶. Este perfil de atividade corresponde ao observado em nossos resultados, onde o complexo **18** tem sua atividade citotóxica aumentada pela formulação **MLV-18** atingindo níveis comparáveis aos da cisplatina.

4.4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos podemos concluir, de modo geral, que os compostos testados apresentam maior atividade citotóxica contra células de melanoma metastático em comparação com as demais linhagens e menor atividade citotóxica em células não tumorais de rim, sugerindo que possam ter uma menor nefrotoxicidade, quando comparados à cisplatina. Quando comparados à carboplatina, os compostos aqui investigados se mostraram mais ativos em células de câncer de pulmão humano, além das linhagens de melanoma. Os complexos quando inclusos em lipossomas mostraram atividade citotóxica pouco maior, sem aumentar sua toxicidade em células não tumorais de rim. Observou-se em alguns casos que esta citotoxicidade sofreu influência relacionada ao tamanho da cadeia carbônica dos ligantes devido ao aumento da lipofilicidade que favorece a interação destes com a membrana celular e facilita a entrada na célula.

CAPÍTULO 5

ATIVIDADE ANTITUMORAL E FARMACOCINÉTICA DO COMPLEXO 18 E DE SUA FORMULAÇÃO EM LIPOSSOMAS (MLV-18)

5.1. INTRODUÇÃO

Este capítulo trata da atividade antitumoral do complexo 18 e sua formulação em lipossomas (MLV-18) em camundongos com melanoma não metastático induzido. O complexo 18 foi escolhido porque reúne características favoráveis, como bom rendimento na síntese de obtenção (capítulo 2) e boa taxa de incorporação em lipossomas multilamelares furtivos (capítulo 3). Este composto apresentou, também, maior citotoxicidade em comparação à carboplatina nas quatro linhagens tumorais testadas, inclusive quando incorporado em lipossomas (MLV-18) (capítulo 4). O modelo de tumor escolhido utiliza camundongos C57BL/6 e linhagem celular B16-F1, é descrito na literatura e comumente utilizado na investigação da atividade antitumoral e farmacocinética de diversos compostos potenciais para a quimioterapia do câncer^{83,103,114}.

A investigação da atividade antitumoral envolve vários estudos, dentre os quais destacamos os principais. (1) A determinação da dose letal mínima, através da administração de dose única em diferentes concentrações, onde se observa inclusive o comportamento sintomático após a administração do composto em investigação¹¹⁶. (2) O estudo da inibição do crescimento do tumor através da medida comparativa da massa tumoral de animais tratados e não tratados e também em referência a animais tratados pelo fármaco atualmente utilizado em clínica. (3) A avaliação da perda ou ganho de massa corporal dos animais, que receberam ou não o tratamento, devido à administração dos compostos e formulações em estudo como forma de avaliar além da atividade antitumoral, a sua toxicidade¹¹⁷. (4) Estudos farmacocinéticos através da determinação da concentração de platina no plasma e tecidos de camundongos, em diferentes tempos após administração das formulações, para avaliação da absorção, eliminação e biodisponibilidade, além de sua implicação na atividade antitumoral.

5.2. PARTE EXPERIMENTAL

5.2.1. Reagentes e métodos instrumentais

Heparina sódica 5.000 U.I. (Roche)

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

Na₂HPO₄ e 2 mmol/L KH₂PO₄

Cloridrato de xilazina (Colier S.A.)

Cloridrato de quetamina (Vetbrands)

Dimetilsulfóxido (Vetec)

Óleo de rícino (Farmax)

Cloreto de sódio (Aldrich)

- **Separação do plasma**

Para a separação do plasma nos experimentos de biodistribuição, foi utilizada centrífuga Jouan MR23i no Laboratório de Biofísica e Sistemas Nanoestruturados ICB/UFMG.

- **Esterilização do material**

O material plástico, bem como as soluções e instrumentos cirúrgicos utilizados nos experimentos *in vitro* e *in vivo* foram previamente esterilizados em auto-clave vertical Phoenix AV50 120 °C por 30 minutos no Laboratório de Substâncias Antitumorais ICB/UFMG.

5.2.2. Animais de Experimentação e Soluções Utilizadas

Nos experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos machos C57BL/6 adquiridos do CEBIO/UFMG, com idade entre 6 e 8 semanas, que foram previamente adaptados ao ambiente por 7 dias e mantidos em ciclo claro/escuro de 12 h com alimentação de sólidos e líquidos à vontade por todo o experimento.

As soluções do complexo **18** foram utilizadas em óleo de rícino e 2% v/v de DMSO como diluente. A formulação de lipossomas MLV-**18** e as soluções de cisplatina foram preparadas com solução de NaCl (0,15 mol/L) como diluente.

Quando houve a necessidade de anestesia, os animais receberam xilazina (15 mg/Kg) e quetamina (40 mg/Kg) por via intramuscular (*i.m.*) (aproximadamente 20 μ L).

Os experimentos *in vivo* estão de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG) sob os protocolos nº 103/2007 e nº 236/2008.

5.2.3. Toxicidade Aguda

A toxicidade aguda foi analisada e comparada entre o complexo **18** e o complexo **18** incorporado em lipossomas (MLV-**18**). Os animais utilizados foram distribuídos em oito grupos ($n = 40$; 5/grupo), sendo dois grupos controle que receberam óleo de rícino 2% DMSO v/v (veículo utilizado na administração do complexo) ou solução NaCl 0,15 mol/L (veículo utilizado na formulação MLV-**18**) e outros seis grupos que receberam doses de 10, 25 e 50 mg/Kg de animal das duas formulações. Estes animais foram mantidos em jejum por 4 h após a administração por via intraperitoneal (*i.p.*) e observados durante as primeiras 8 h e em intervalos de 12 h até 14 dias. O comportamento sintomático que consiste na alteração da locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, convulsões, hiperexcitabilidade, contorções abdominais, dentre outros eventos, foi observado, além da variação de massa corporal e a dose letal, comparados ao grupo controle.

5.2.4. Atividade Antitumoral - Variação da Massa Corporal e Tumoral

As células de melanoma não metastático (B16-F1) utilizadas para inóculo nos animais foram previamente cultivadas como descrito no item 4.2.2. Os animais (n = 50) foram anestesiados e receberam o inóculo das células B16-F1, e inoculadas por via subcutânea (s.c.) na porção direita do flanco dos camundongos, na densidade de 1×10^6 células/100 μ L de meio de cultura. O complexo **18** foi administrado *i.p.* nas doses de 1, 5 e 10 mg/Kg (n = 30; 10/grupo) nos dias 1, 5 e 9. Outros dois grupos foram utilizados como controle, onde estes animais receberam solução de NaCl 0,15 mol/L ou óleo de rícino 2% DMSO como grupo controle negativo (n = 10) e cisplatina em dose de 5 mg/Kg (n = 10) como grupo controle positivo.

Outros animais (n = 50) receberam por via *i.p.*, o complexo **18** em dose de 5 mg/Kg (n = 8), a formulação MLV-**18** nas doses de 1, 5 e 10 mg/Kg (n = 24; 8/grupo). Outros dois grupos foram utilizados como controle, onde estes animais receberam solução de lipossomas sem o complexo **18** (n = 5) ou óleo de rícino com 2 % DMSO (n = 5) como grupo controle negativo e cisplatina em dose de 5 mg/Kg (n = 8) como grupo controle positivo. Os animais foram observados até o 15º dia do inóculo.

A massa corporal de cada animal foi aferida individualmente a cada 2 dias, e comparada ao longo de 15 dias a contar do dia 0, quando os camundongos foram devidamente sacrificados em câmara de CO₂ para posterior extração do tumor. As massas dos tumores foram mensuradas utilizando-se balança analítica.

5.2.5. Estudos Farmacocinéticos

5.2.5.1. Estudos farmacocinéticos por via parenteral

Os animais (n = 45) foram anestesiados e receberam o inóculo das células B16-F1. Após 2 semanas, quando os tumores apresentavam tamanho de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro, o complexo **18** (n = 15), a formulação de lipossomas MLV-**18** (n = 15) ou a cisplatina (n = 15), todos em 5 mg/Kg de animal, foram administrados via *i.v.* (exceto o composto **18** em óleo de rícino que foi administrado *i.p.*) em dose única. Após 10 e 30 min, 2, 8 e 24 h amostras de sangue foram coletadas da artéria braqueal com seringas heparinizadas estando os animais sob anestesia. O sangue foi centrifugado a 12.000 x g por 4 min a 4 °C para a separação do plasma. Em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Tumor, fígado, rins e baço foram extraídos, tiveram sua massa medida e foram homogeneizados em solução de PBS numa proporção 1:2 (g de tecido: mL de PBS) e armazenados a -80 °C para posterior digestão e determinação da concentração de platina por Espectroscopia de Absorção Atômica com Forno de Grafite (EAA-FG) (descrito no capítulo 6).

5.2.5.2. Estudos farmacocinéticos por via oral

Os animais (n = 36) foram mantidos sob jejum de líquidos e sólidos 3 h antes e depois da administração oral do complexo **18** (n = 18) ou da formulação de lipossomas MLV-**18** (n = 18) em doses de 10 mg/Kg de animal. A administração foi realizada por gavagem, diretamente no esôfago de cada animal. Os animais foram anestesiados e amostras de sangue foram coletadas da artéria braqueal com seringas heparinizadas após 10 e 30 min, 1, 2, 8 e 24 h. Em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. O sangue foi centrifugado a 12.000 g por 4 min a 4 °C para a separação do plasma. A concentração de platina no plasma foi determinada após diluição 1:50 em HNO₃ 0,2 % (v/v) por EAA-FG (descrito no capítulo 6).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Toxicidade Aguda

O ensaio de toxicidade aguda nos permitiu observar a dose letal do complexo **18**, administrado via *i.p.* e da formulação MLV-**18** em camundongos, estando os resultados observados apresentados na tabela 5.1. Constatamos a morte de 100% dos animais dos grupos nas primeiras 24 h após terem recebido as duas maiores doses (25 e 50 mg/Kg) do complexo **18**, enquanto que para a formulação de lipossomas MLV-**18**, a morte de 100% dos animais só ocorreu para a maior dose (50 mg/Kg). Esses animais apresentaram intensas contorções abdominais, dificuldade de locomoção, prostração e isolamento entre eles. Observamos a pelagem arrepiada (piloereção) decorrente também da toxicidade dos compostos. Esses sintomas perduraram por até 8 h nas doses de 50 mg/Kg e por até 4 h nas doses de 25 mg/Kg e após estes períodos os sintomas persistiram em menor intensidade até a morte dos animais.

Notamos tolerância dos animais à dose intermediária (25 mg/Kg) de MLV-**18**. Essa melhora é constatada pela diferença de intensidade dos eventos típicos de toxicidade e, principalmente, pela ausência da ocorrência de mortes de todos os animais do grupo no tempo de observação, comparado à mesma dose do composto **18** que, como já mencionado, causou a morte de 100% dos animais do grupo. Observamos tolerância a menor dose (5 mg/kg) em ambas formulações administradas, onde os animais apresentaram contorções abdominais apenas nas 2 primeiras horas. A observação dos animais dos grupos controle não mostrou comportamento sintomático característico de toxicidade.

Os animais seguiram sob observação diária durante 14 dias, tendo sido medida a variação de massa corporal (tabela 5.1), que foi caracterizada pelo ganho de massa no grupo controle (+3%), pela leve perda nos grupos tratados com a menor dose (-1,5% a -3%) e maior perda de massa do grupo MLV-**18**; 25mg/Kg (-10 %).

De modo similar ao resultado obtido neste estudo, a literatura mostra que a formulação lipossomal AP5346 que deriva da oxaloplatina, citada no item 1.5.2,

foi estudada a cerca da sua atividade antitumoral no modelo animal de B16 e apresentou menor efeito tóxico, possibilitando a administração de doses mais elevadas em comparação à dose máxima tolerável de oxaloplatina¹¹⁸.

Tabela 5.1. Avaliação comportamental como medida de toxicidade aguda do complexo 18 e MLV-18.

Formulação (Dose mg/Kg)	T/M*	Varição da massa corporal	Período de observação dos sinais	Sinais de toxicidade observados (intensidade)
Controle NaCl 0,9%	5/0	+ 3%	-	(-)
Controle OR- DMSO 2%	5/0	+ 3%	-	(-)
<u>18</u> (5)	5/0	- 1,5 %	2 h	Contorções abdominais (+)
<u>18</u> (25)	5/5	-	4 h	Contorções abdominais, piloereção, dificuldade de locomoção, prostração, isolamento. (++)
<u>18</u> (50)	5/5	-	8 h	Contorções abdominais, piloereção, dificuldade de locomoção, prostração, isolamento. (+++)
MLV- <u>18</u> (5)	5/0	- 3 %	2 h	Contorções abdominais (+)
MLV- <u>18</u> (25)	5/0	-10 %	4 h	Contorções abdominais, piloereção, dificuldade de locomoção, prostração, isolamento. (+)
MLV- <u>18</u> (50)	5/5	-	8 h	Contorções abdominais, piloereção, dificuldade de locomoção, prostração, isolamento. (++)

* T/M = número de animais / número de mortes

5.3.2. Atividade Antitumoral

5.3.2.1. Determinação da variação da massa tumoral

A variação da massa tumoral de camundongos que receberam tratamento com o complexo **18** está representada na figura 5.1, onde podemos observar diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos tratados com cisplatina na dose de 5 mg/kg ($0,108 \pm 0,04$) e com o complexo **18** em dose de 10 mg/kg ($0,004 \pm 0,002$). Com o último tratamento mencionado, observa-se uma redução de 99% ($p < 0,004$) da massa tumoral em relação ao controle, mostrando uma eficácia bastante favorável na inibição do crescimento do tumor enquanto a cisplatina reduziu 73 % ($p < 0,02$). Porém, nas doses de 1 e 5 mg/Kg não houve diferença estatística em relação ao grupo controle.

Outros trabalhos descrevem resultados para compostos de platina, também em outros modelos tumorais, como câncer de pulmão, onde é necessária dose 5 vezes maior que a cisplatina para atingir o mesmo efeito mostrado por ela¹¹⁶.

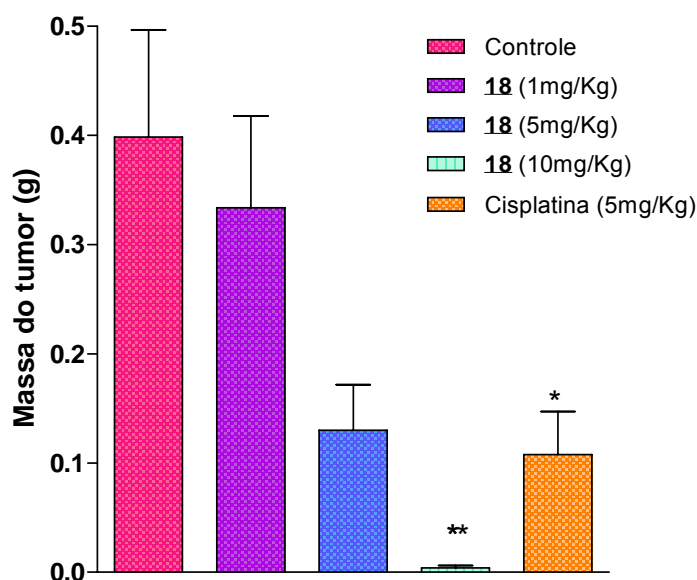


Figura 5.1 Massa do tumor de camundongos tratados com complexo **18**.

Análise estatística: One way ANOVA/Bonferroni; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Os resultados obtidos para variação da massa tumoral de camundongos tratados com a formulação **MLV-18** estão representados na figura 5.2, bem como as imagens dos mesmos tumores extraídos estão na figura 5.3.

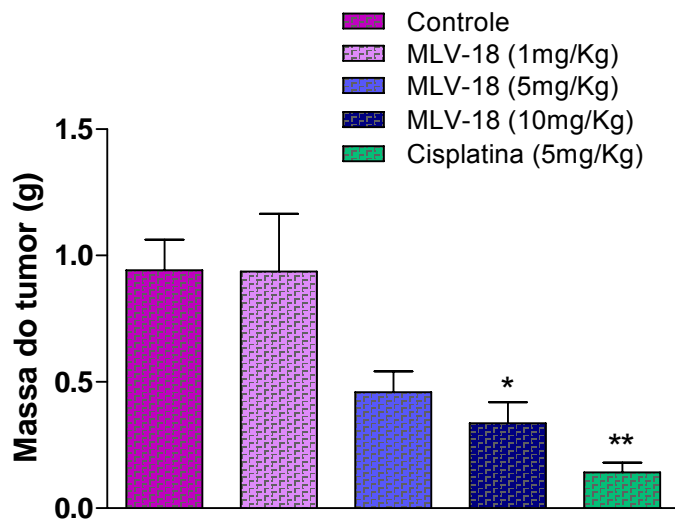


Figura 5.2. Massa do tumor de camundongos tratados com MLV-18. Análise estatística: One way ANOVA/Bonferroni; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

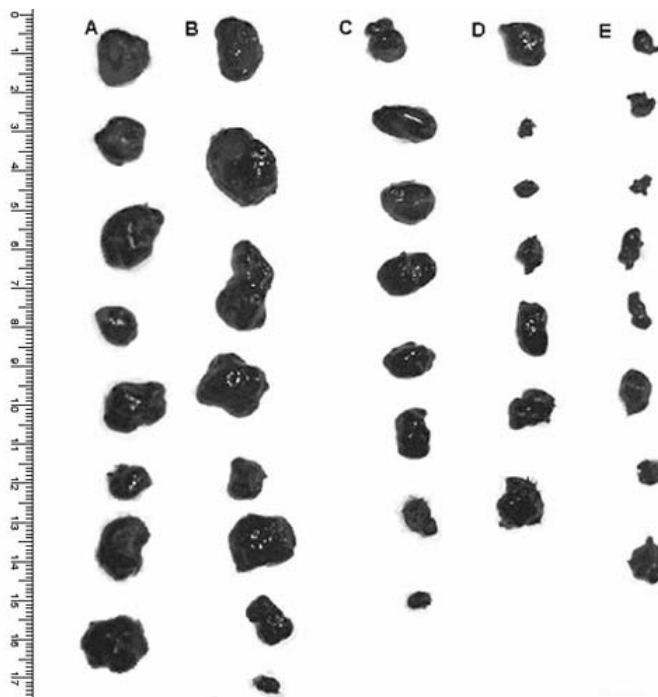


Figura 5.3. Imagem dos tumores extraídos dos animais. (A) Controle; (B) **MLV-18** 1mg/Kg; (C) **MLV-18** 5mg/Kg; (D) **MLV-18** 10mg/Kg; (E) Cisplatina 5mg/Kg

É interessante observar que a formulação MLV-**18** apresenta uma ação antitumoral dose dependente com redução da massa tumoral de 3,9, 43,8 % (p=0,02) e 58,7 % (p<0,006) para 1, 5 e 10 mg/kg, respectivamente . A cisplatina reduziu 78,2 % (p<0,001) da massa tumoral sendo a mais eficiente para este modelo tumoral.

Na figura 5.4, mostramos a comparação realizada dentro do mesmo ensaio, onde foi avaliada a capacidade de inibição do crescimento do tumor para as formulações MLV-**18**, complexo **18** e cisplatina, por via *i.p.* na mesma dose de 5 mg/Kg em comparação ao grupo controle negativo.

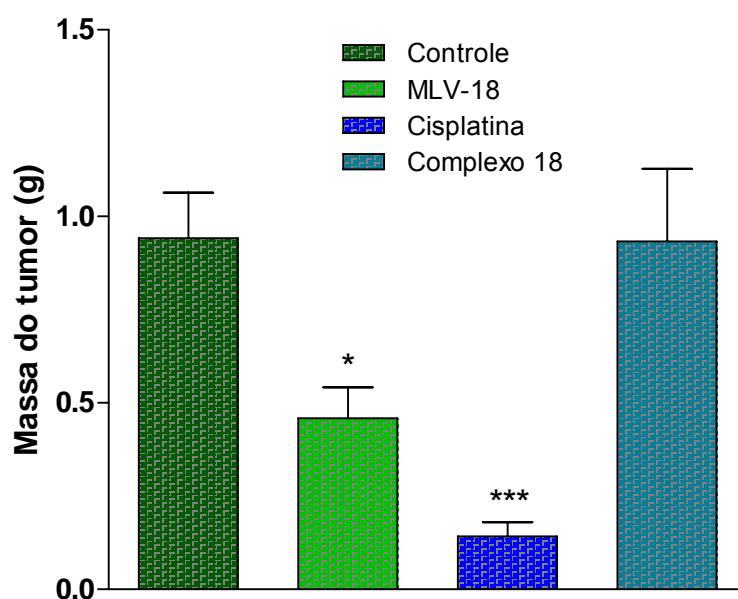


Figura 5.4. Massa do tumor (B16) de camundongos C57BL/6, tratados por via *i.p.* com as formulações: MLV-18**, cisplatina, e o complexo **18** na dose de 5 mg/Kg. Análise estatística: One way ANOVA/Bonferroni; *p<0,05; *** p<0,001.**

Como podemos observar, a formulação de lipossomas MLV-**18** aumentou em torno de 51% ($p < 0,05$) a atividade antitumoral do composto **18** que foi administrado na forma livre em óleo de rícino sob a mesma via (*i.p.*) e dose (5mg/Kg).

Na literatura consta a diferença de atividade antitumoral da cisplatina e de sua formulação incorporada em lipossomas (SPI-077) em modelos tumorais de cólon (C26) mostrando resultados parecidos com o observado em nossos estudos. A formulação SPI-077 reduziu pouco mais da metade do tamanho médio dos tumores de animais tratados em comparação ao grupo tratado com a cisplatina em solução de NaCl 0,15 mol/L⁸². Outro exemplo de formulação de lipossomas contendo complexos de platina que consta na literatura é o AP5346 que contém oxaloplatina. Esta formulação apresentou maior variação de massa tumoral quando estudada no modelo melanoma B16-F10 e inibiu o crescimento do tumor em comparação aos que receberam apenas oxaloplatina¹¹⁸.

5.3.2.2. Determinação da variação da massa corporal

A avaliação de variação de massa corporal dos camundongos com tumor durante o tratamento nos permite observar a ação tóxica gerada pela administração das formulações em investigação. Nessa avaliação desconsideramos a massa do tumor, levando em conta apenas a massa do animal que é aferida no primeiro dia do experimento e no último dia. Os animais tratados com cisplatina (5mg/Kg) tiveram perda da massa corporal de 25,4 % e os animais tratados com o complexo **18**, na mesma dose, perderam aproximadamente 14,5 %, enquanto que os grupos tratados com MLV-**18** (5 e 10 mg/Kg) tiveram perda da massa corporal de 1,03 % e 18,94 %, respectivamente. Os grupos controle e MLV-**18** (1 mg/kg), tiveram aumento da massa corporal de 4,04 e 8,85 %, respectivamente, como mostrado na tabela 5.2.

Diversos estudos analisam esse parâmetro como um dos principais fatores da toxicidade de novas drogas em estudos pré-clínicos^{119, 120}.

Diante desses resultados, notamos que a formulação de lipossomas, além de aumentar a ação antitumoral do composto **18**, não aumentou sua toxicidade no que diz respeito à massa corporal, correspondendo às expectativas de diminuir os efeitos tóxicos do composto em investigação.

Tabela 5.2. Variação da massa corporal de camundongos tratados com complexo **18 e MLV-**18** comparada à cisplatina.**

Formulação	Dose (mg/Kg)	Variação de massa corporal (%)
	1	+ 8,85
MLV – 18	5	- 1,03
	10	- 18,94
Complexo 18	5	-14,49
Cisplatina	5	- 25,44
Controle	-	+ 4,04

5.3.3. Estudos Farmacocinéticos

5.3.3.1. Estudos farmacocinéticos por via parenteral

Visando interpretar os resultados obtidos no estudo de atividade antitumoral das diferentes formulações contendo platina, foram realizados estudos farmacocinéticos a partir das mesmas.

O estudo farmacocinético foi realizado em camundongos C57BL/6 com a formulação MLV-**18** e a cisplatina em administração *i.v.*, sendo que o complexo **18**, solúvel em OR/DMSO foi administrado via *i.p.*, todos em 5 mg/Kg. No estudo de farmacocinética, utiliza-se o modelo de compartimento, onde consideramos um compartimento único bem homogeneizado de volume de distribuição V_d onde uma quantidade do fármaco é introduzida e pode ter a concentração diminuída por metabolismo ou eliminação. Um modelo mais complexo é o modelo de dois compartimentos onde um compartimento “periférico” representando os tecidos em comunicação com o compartimento plasmático “central” se aproxima da situação real. A determinação do melhor modelo depende da cinética de absorção e eliminação de cada droga em cada situação¹²¹.

A figura 5.5 mostra as curvas de concentração de platina em plasma de camundongos em função do tempo a partir de diferentes formulações: MLV-**18** (*i.v.*), Cisplatina (*i.v.*) e Complexo **18** (*i.p.*) administradas na dose de 5 mg/Kg de massa corporal. Podemos notar, após a administração de MLV-**18**, um pico na concentração plasmática de Pt (28,3 $\mu\text{g/mL}$) em 0,16 h que decresce até a metade da concentração em 4,6 h (tempo de meia vida - $t_{1/2}$). Para a cisplatina, observa-se um pico na concentração plasmática de Pt (6,6 $\mu\text{g/mL}$, coerente com a literatura^{122,123}) em 0,16 h e $t_{1/2}$ de 0,55 h, o que nos mostra a maior permanência na corrente sanguínea do complexo de Pt encapsulado em lipossomas furtivos¹²⁴ (MLV-**18**). O complexo **18**, administrado por via *i.p.*, diferentemente dos demais, nos fornece um perfil de absorção lenta que é mostrado na figura 5.5, e não de eliminação.

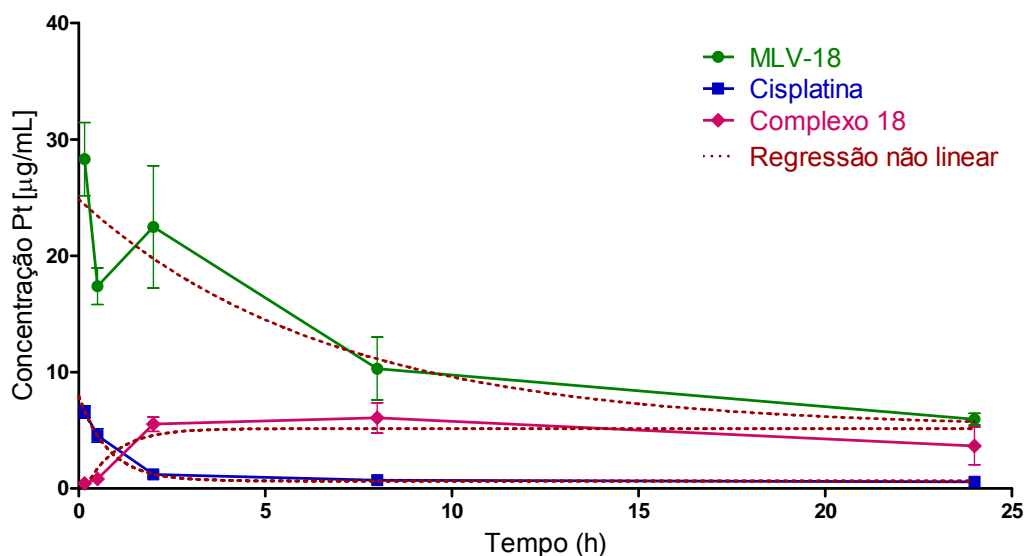


Figura 5.5. Curva de concentração plasmática de Pt em camundongos C57BL/6 para as diferentes formulações em função do tempo: MLV-**18** (*i.v.*), Cisplatina (*i.v.*) e Complexo **18** (*i.p.*) administradas na dose de 5 mg/Kg. Os valores mostrados correspondem à média \pm SD ($n = 3$).

Através da avaliação da concentração plasmática em relação à quantidade do fármaco administrado é possível calcular o volume de distribuição aparente, V_d que é definido como o volume líquido necessário para conter a quantidade total do fármaco na mesma concentração. O volume de distribuição é influenciado pelo caráter lipofílico da droga, bem como a capacidade de se ligar às proteínas do plasma. Uma passagem rápida pela membrana plasmática (favorável para compostos lipofílicos) causa um aumento do volume de distribuição aparente¹²². O volume de distribuição (V_d) da formulação MLV-**18** foi de 0,20 L (tabela 5.3), o que indica uma distribuição preferencial no compartimento vascular, reduzindo a disponibilidade da droga para o “compartimento periférico”, enquanto a cisplatina nessas condições apresentou V_d 3 vezes maior (0,63 L). O maior valor de V_d indica que a distribuição não fica restrita ao compartimento vascular.

Outro parâmetro farmacocinético importante é a depuração total (“Clearance” – CL) que é definido como o volume de plasma contendo a quantidade total do fármaco que é removida do organismo na unidade de tempo.

Quanto menor o clearance maior o tempo gasto pelo organismo para eliminar a droga por excreção renal. Na tabela 5.3, podemos observar o valor de CL para a formulação de MLV-**18** que é 11 vezes menor que o valor de CL da cisplatina.

A área sob a curva (Area Under the Curve – AUC) é um parâmetro importante, usado para auxiliar na determinação da dose, posologia e toxicodinâmica de drogas¹¹⁷. A AUC nos informa quanto, e por quanto tempo a droga permanece na circulação sanguínea e em tecidos. Essa medida produz um importante parâmetro de comparação entre fármacos e também nos fornece a biodisponibilidade em diferentes formulações ou vias de administração. Os resultados apresentados na figura 5.5 e na tabela 5.3 nos mostram que a formulação MLV-**18** apresenta AUC plasmática aproximadamente 12 vezes maior (266,2 µg/mL.h) em comparação à cisplatina (22,5 µg/mL.h) e pouco mais que o dobro do complexo **18** (117,6 µg/mL.h).

O conjunto desses resultados indica níveis mais elevados e mais prolongados do complexo de platina na circulação sanguínea quando administrado na forma encapsulada em lipossomas furtivos (MLV-**18**).

Tabela 5.3. Parâmetros* farmacocinéticos de biodistribuição plasmática e tecidual de Pt para o complexo **18, MLV-**18** e cisplatina em camundongos na dose de 5 mg/Kg**

Formulação	AUC _{0-24h}					T _{1/2} (h)	CL (mL/h)	V _d (L)
	Plasma (µg/mL).h	Tumor (µg/g).h	Baço (µg/g).h	Fígado (µg/g).h	Rim (µg/g).h			
MLV-18 (i.v.)	266,2	34,1	2.609	608,3	447,8	4,63	18,8	0,20
Cisplatina (i.v.)	22,5	27,6	147,3	174,3	215,1	0,55	222,2	0,63
Complexo18 (i.p.)	117,6	21,6	100,8	6,1	1,6	-	-	-

*AUC = (Área Under the Curve – área sob a curva)

T_{1/2} = Tempo de meia vida

CL = Clearance

V_d = Volume de distribuição

A figura 5.6 mostra as curvas de farmacocinética tecidual (baço, fígado e rim) de Pt em camundongos após a administração em dose de 5mg/Kg de MLV-**18** (*i.v.*), Cisplatina (*i.v.*) e Complexo **18** (*i.p.*). Os parâmetros farmacocinéticos relacionados são mostrados na tabela 5.3.

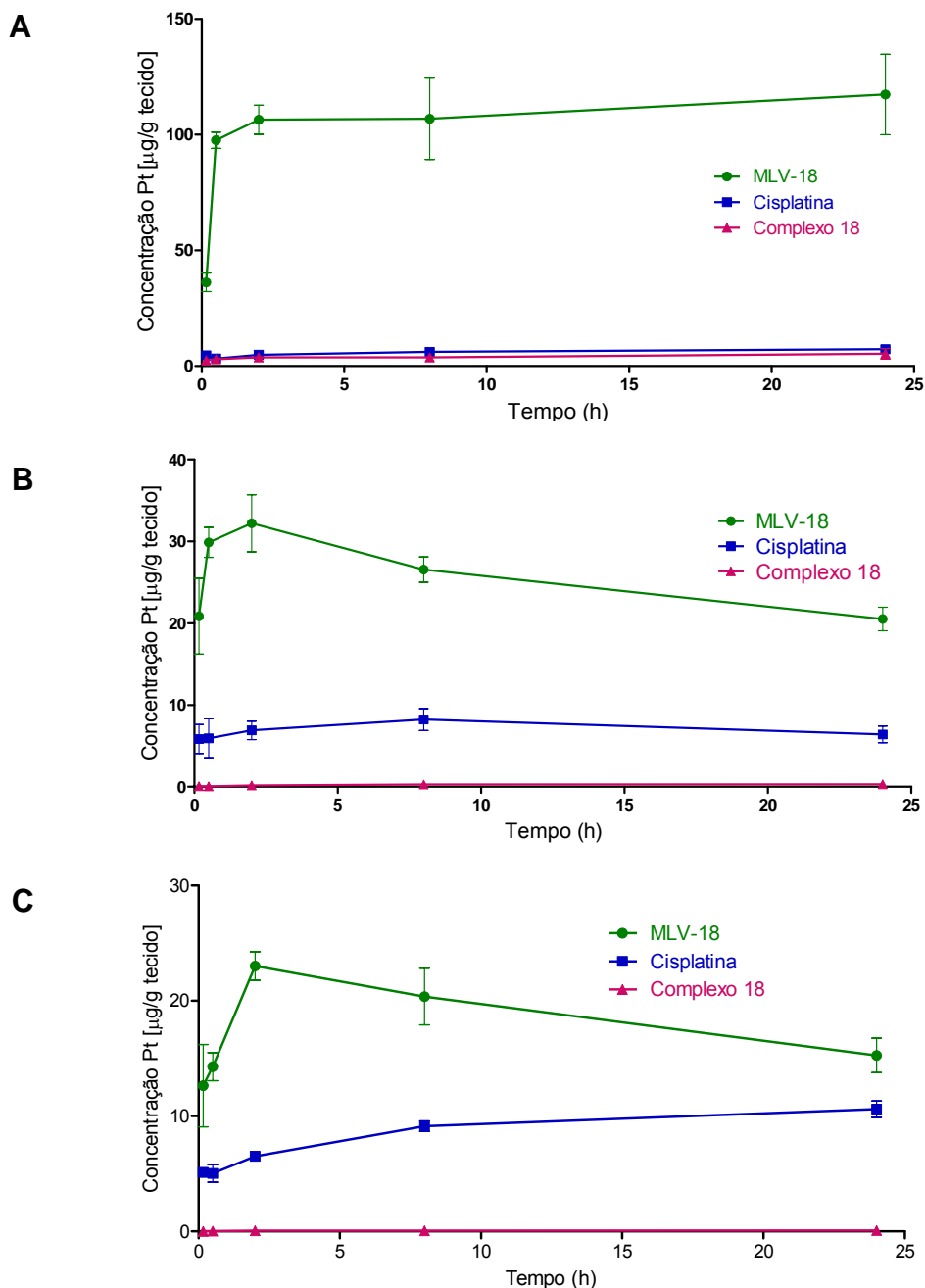


Figura 5.6. Curvas da concentração tecidual de platina em camundongos C57BL/6 em função do tempo. (A)baço, (B)fígado e (C) rim, após administração em dose de 5 mg/Kg de MLV-**18** (*i.v.*), Cisplatina (*i.v.*) e Complexo **18** (*i.p.*). O valores mostrados correspondem à média \pm SD (n = 3).

Podemos observar diferenças quantitativas no parâmetro AUC teciduais entre as formulações investigadas. Observam-se maiores valores em todos os tecidos quando o fármaco em investigação foi administrado na forma encapsulada em lipossomas furtivos (MLV-**18**). Vale ressaltar que, no caso complexo de platina administrado da forma livre por via *i.p.* a distribuição tecidual foi reduzida.

Perfis de distribuição tecidual diferentes são também observados entre as diferentes formulações, sendo que o complexo encapsulado (MLV-**18**) apresenta uma distribuição preferencial no baço e fígado e a cisplatina mostra maior distribuição nos rins. Provavelmente esta diferença é causada pela captura dos lipossomas pelos macrófagos do sistema mononuclear fagocitário que se acumulam no baço e no fígado redirecionando o acúmulo tecidual. Uma diferença de distribuição tecidual semelhante foi relatada previamente no caso da formulação SPI-077 que consiste de cisplatina encapsulada em lipossomas furtivos (citado no item 1.5.2)^{82,83}.

Outro resultado importante deste estudo está representado na figura 5.7 que mostra as curvas de farmacocinética de Pt em tumor (melanoma B16) de camundongos para as diferentes formulações investigadas.

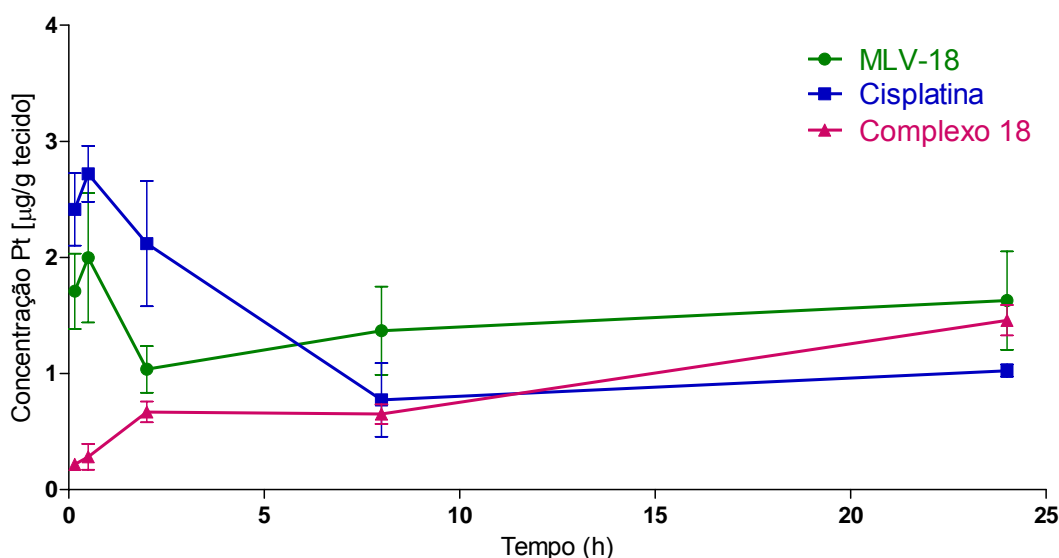


Figura 5.7. Farmacocinética tumoral de Pt em camundongos C57BL/6 para as diferentes formulações: MLV-18** (*i.v.*), Cisplatina (*i.v.*) e Complexo **18** (*i.p.*) administradas na dose de 5 mg/Kg. Os valores mostrados correspondem à média \pm SD (n = 3).**

O perfil das curvas mostra a rápida diminuição da concentração de platina no tumor em função do tempo no caso da cisplatina, o que não ocorre com o MLV-**18** para o qual a concentração tende a se manter constante ao longo do tempo (segundo análise estatística, One-way ANOVA, verifica-se que a concentração não varia com o tempo). A comparação dos valores médios de concentração de platina entre os diferentes grupos mostra níveis significativamente maiores nos grupos que receberam MLV-**18** e cisplatina, quando comparados àquele que recebeu o complexo **18** ($P < 0,05$ nos tempos de 0,16 e 0,5 h, Two-way ANOVA, com Bonferroni post test). Por outro lado, não foi encontrada diferença significativa nos níveis de platina entre os grupos que receberam MLV-**18** e cisplatina. Os valores de AUC, mostrados na Tabela 5.3, indicaram a seguinte seqüência: AUC (MLV-**18**) > AUC (cisplatina) > AUC (complexo **18**).

Podemos concluir que há uma boa correlação entre os resultados do estudo de atividade antitumoral (figura 5.4) e aqueles do estudo farmacocinético no tumor (figura 5.7), sendo que as formulações mais eficazes são aquelas que promoveram os maiores níveis de platina no tumor. Os parâmetros farmacocinéticos determinados nesse trabalho indicam também que os elevados níveis alcançados no tumor a partir da formulação MLV-**18** são resultado dos níveis plasmáticos elevados e mantidos por tempo prolongado pela forma lipossomal.

5.3.3.2. Estudos farmacocinéticos por via oral

A administração oral de quimioterápicos no tratamento do câncer é um dos maiores desafios no desenvolvimento de novas drogas. Já é bem estabelecido que fármacos pouco solúveis em água, tais como o complexo em estudo, apresentam muitas vezes baixa biodisponibilidade por via oral, sendo necessário o desenvolvimento de sistema carreador para aumentar sua solubilidade aparente em água¹²⁵. Os lipossomas, além de melhorar a atividade antitumoral e diminuir os efeitos tóxicos das drogas, podem incorporar na sua membrana fármacos pouco solúveis em água e favorecer assim outras vias de administração como a oral, transdérmica, nasal e pulmonar⁷². Neste contexto, avaliamos o impacto da encapsulação do complexo MLV-18 em lipossomas sobre a biodisponibilidade por via oral.

A figura 5.8 mostra as curvas de farmacocinética obtidas após administração do complexo **18** por via oral, seja na forma livre ou na forma encapsulada como MLV-**18**. No caso da formulação MLV-**18**, observamos um pico de absorção após 1 h de administração que é mantido por até 2 h na maior concentração no plasma, o que não ocorre para o composto **18**.

Com base nos valores de AUC, podemos inferir ainda que a encapsulação em lipossomas (MLV-**18**) proporcionou um aumento da biodisponibilidade do complexo na ordem 5,6 vezes.

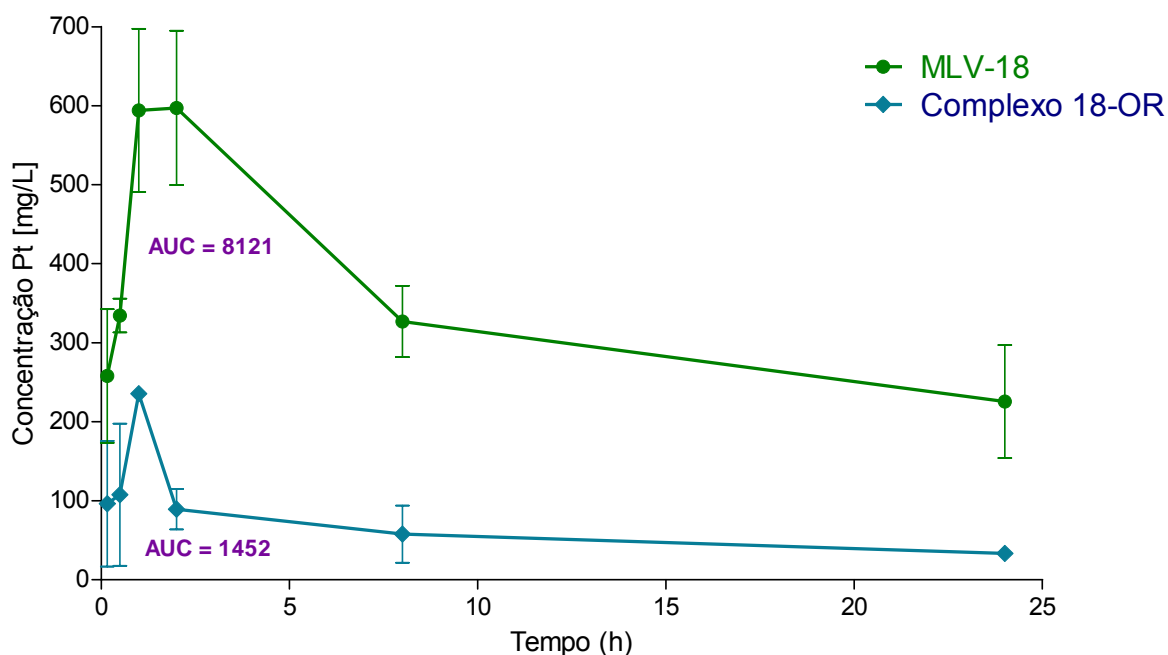


Figura 5.8. Farmacocinética plasmática de Pt em camundongos após administração oral das seguintes formulações: MLV-18 e Complexo 18 na dose de 10 mg/Kg. Os valores mostrados correspondem à média \pm SD (n = 3).

Através dos valores obtidos de AUC no plasma para a formulação MLV-18 administrado por via endovenosa (266,2 μ g/L, tabela 5.3) e administrado por via oral (8,121 μ g/L, figura 5.8), calculamos a biodisponibilidade (F) da formulação na dose (d), onde $F = d \cdot AUC_{\text{oral}} / d \cdot AUC_{\text{i.v.}}$, expresso em porcentagem. Esta análise nos forneceu o seguinte resultado: $F_{\text{MLV-18}} = 6,10 \%$. Estes dados mostram a habilidade da formulação em lipossomas de aumentar a biodisponibilidade da droga administrada pela via oral apesar de ainda ser mais viável a via endovenosa.

5.4. CONCLUSÃO

A partir dos estudos *in vivo*, o complexo **18** na forma encapsulada em lipossomas (MLV-**18**) mostrou resultados bastante favoráveis, apresentando menor efeito tóxico e possibilitando a administração de doses mais elevadas em comparação ao complexo administrado na forma livre. Através da avaliação do crescimento do tumor (B16) induzido em camundongos (C57BL/6), concluímos que a formulação MLV-**18** aumentou a atividade do complexo **18** cerca de 51% quando administrados pela mesma via (*i.p.*) e mesma dose (5 mg/Kg). Observa-se também uma diminuição da toxicidade de MLV-**18** comprovada pela diminuição da perda de massa corporal do animal, correspondendo às expectativas de diminuir os efeitos tóxicos do composto em investigação.

Dentre as vantagens apresentadas, o lipossoma permitiu a administração por via *i.v.* do complexo lipofílico, a princípio impossibilitada pela baixa solubilidade, e melhorou a biodisponibilidade da via oral que é mais favorável à qualidade de vida do paciente. Os resultados obtidos com o estudo de farmacocinética por essas duas vias mostraram um maior tempo de permanência do complexo de platina na formulação MLV-**18** na corrente sanguínea quando comparada ao composto livre e à cisplatina, corroborando com as observações apresentadas, de que a formulação MLV-**18** tem maior atividade antitumoral do que o complexo **18**.

CAPÍTULO 6

DETERMINAÇÃO DE PLATINA EM PLASMA E TECIDOS DE CAMUNDONGOS POR ABSORÇÃO ATÔMICA DE FORNO DE GRAFITE

6.1. INTRODUÇÃO

Para garantir que um método analítico forneça dados confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma validação. Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”¹²⁶.

Para a implementação de um método com um determinado equipamento em um determinado laboratório é preciso estabelecer alguns parâmetros de desempenho analítico tais como: linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação que serão discutidos ao longo deste capítulo.

A determinação quantitativa de fármacos em amostras clínicas é um pré-requisito para determinação da farmacocinética dos compostos baseados em platina. A Espectroscopia de Absorção Atômica por Forno de Grafite (EAA-FG) é uma das técnicas espectroscópicas mais amplamente utilizadas para a determinação de elementos, inclusive platina, em materiais biológicos. A EAA-FG tem mostrado boa sensibilidade e necessita de apenas 20 µL de amostra¹²⁷. Métodos em EAA-FG têm sido desenvolvidos e validados para a determinação de platina em fluidos biológicos de pacientes que receberam cisplatina^{128,129} e cisplatina incorporada em lipossomas (SPI-077)¹³⁰.

6.2. PARTE EXPERIMENTAL

6.2.1. Reagentes e métodos instrumentais

Padrão hexacloroplatinato de potássio 1000 µg/mL (K_2PtCl_6 - Perkin Elmer)

Ácido Nítrico concentrado (Merck) purificado por sub-ebulição.

Peróxido de Hidrogênio (30% v/v)

Argônio 99,997% (Alphagaz Ar1)

- **Determinação e Quantificação de Platina**

Espectrômetro de Absorção Atômica de Forno de Grafite Perkin Elmer (B.3120080) Modelo Analyst 600 com forno THGA no Laboratório de Biofísica e Sistemas Nanoestruturados ICB/UFMG.

- **Digestão da amostra**

Em uma das etapas de digestão da amostra foi utilizado bloco digestor para tubos de ensaio DryBlock modelo MA 400425DQO, no Laboratório de Biofísica e Sistemas Nanoestruturados ICB/UFMG.

6.2.2. Amostras de plasma e tecidos para determinação da concentração de Platina – Abertura da amostra

As amostras de plasma recolhidas foram diluídas na proporção 1:50 em HNO_3 0,2 % v/v sem tratamento prévio e levadas diretamente ao Espectrômetro de Absorção Atômica de Forno de Grafite.

As amostras de tecidos passaram por digestão prévia realizada com alíquotas de 0,15 g do homogeneizado de cada amostra de tecido seguida da adição de 1 mL de HNO_3 concentrado, previamente purificado por sub-ebulição. As amostras foram

mantidas em tubos de ensaio individuais à temperatura de 70° C por 2 horas em bloco digestor. A seguir realizou-se o resfriamento à temperatura ambiente (aproximadamente 27° C), seguido da adição de 200 µL de H₂O₂ e aquecimento por 2 horas a 70° C. As condições ideais foram determinadas variando-se cada parâmetro, temperatura, quantidade de amostra, concentração do ácido, tempo de aquecimento, volume de peróxido, até a obtenção de uma solução visualmente límpida e translúcida.

O volume de cada amostra foi então completado para 10 mL em balão volumétrico e a determinação direta da concentração de platina foi feita por Espectrometria de Absorção Atômica de Forno de Grafite.

6.2.3. Espectrômetro de Absorção Atômica de Forno de Grafite

O sistema EAA-FG da Perkin Elmer foi utilizado com lâmpada de catodo oco para Platina (Perkin Elmer), que operou a 30 mA, argônio como gás de purga e tubos de grafite com aquecimento transversal (THGA-Perkin Elmer). As absorvâncias foram medidas no comprimento de onda 265,9 nm com largura de fenda de 0,7 nm e 20 µL de volume de amostra. O manual do equipamento sugere como referência o valor de absorvância de 0,14 para uma amostra padrão a 400 µg/L de platina.

A otimização das condições de análise para a determinação de platina foi iniciada a partir das condições de operação do forno sugeridas no manual do equipamento, onde estão estabelecidas as temperaturas, o tempo das etapas de secagem, pirólise, atomização, limpeza e o fluxo do gás de purga, conforme mostra a tabela 6.1. As condições foram ajustadas através da obtenção das curvas de pirólise e atomização.

Tabela 6.1. Condições de uso do Espectrômetro de Absorção Atômica

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

6.2.4. Temperatura de Pirólise e Atomização

As curvas de temperatura de pirólise e atomização foram realizadas com as amostras de plasma de camundongo C57-BL/6, na razão de 1:50 em HNO₃ 0,2% v/v, adicionadas do padrão, tendo concentração final de 400 µg/L de Pt.

A curva de pirólise foi realizada com valores de temperatura variando de 1000 °C a 1900 °C com intervalos de 100 °C. A temperatura de atomização foi mantida a 2200 °C.

A curva de atomização foi realizada com intervalos de 100 °C entre as temperaturas de 1900 °C a 2700 °C mantendo-se a temperatura de pirólise em 1300 °C. As temperaturas de pirólise e atomização otimizadas foram utilizadas para os demais experimentos considerando a faixa linear de trabalho.

6.2.5. Padronização

As curvas de calibração foram construídas em dexaplicata, nas concentrações de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 $\mu\text{g Pt/L}$ de plasma de camundongo (1:50) em HNO_3 0,2% v/v. Estas soluções foram diluídas a partir da solução estoque do padrão de K_2PtCl_6 400 $\mu\text{g/L}$ preparada nas mesmas condições de diluição da matriz.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. Temperatura de Pirólise e Atomização

A temperatura ideal de pirólise foi selecionada buscando uma alta temperatura que garanta a queima total da matéria orgânica sem perder a detecção do sinal de absorvância. De acordo com o gráfico apresentado na figura 6.1, podemos observar a constância do valor de absorvância entre as temperaturas de 1000 e 1600 °C bem como a sua diminuição a partir de 1700 °C até 1900 °C. A temperatura escolhida, 1500 °C apresenta boa margem de segurança dentro da faixa de absorvância constante e é satisfatória para a queima da matéria orgânica.

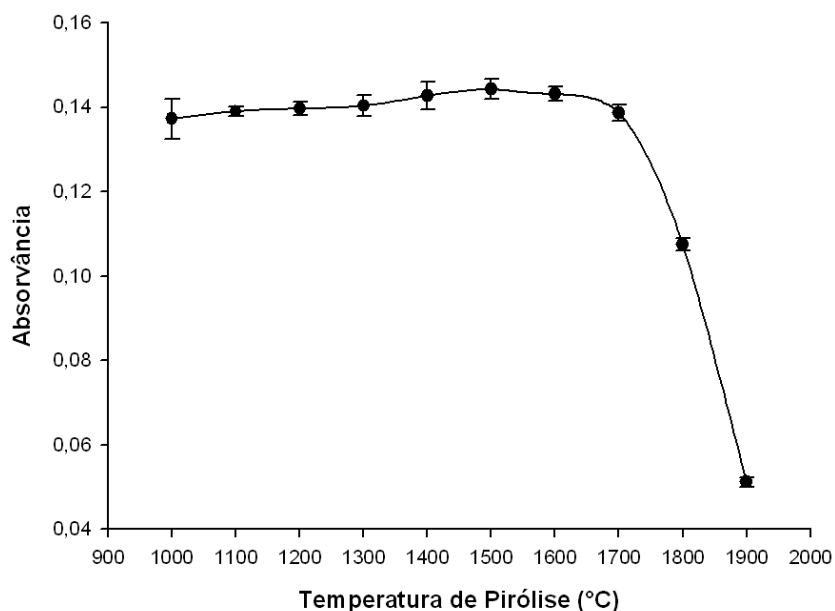


Figura 6.1. Gráfico de Absorvância x Temperatura de Pirólise.

Obtido através do padrão de K_2PtCl_6 (400 μ g/L em HNO_3 0,2 %).

A temperatura ideal de atomização, 2400°C, é aquela capaz de atomizar o elemento em questão com eficiência de detecção e foi selecionada observando as

temperaturas mais altas capazes de atingir um platô de absorvância mantendo um comportamento estável (2200 a 2600 °C) do valor de absorvância medido. Como mostra o gráfico da figura 6.2, observamos uma crescente determinação da absorvância entre 1900 e 2200 onde inicia-se um platô de constância relativa da absorvância entre as temperaturas de 2200°C e 2600°C. A temperatura de atomização de 2400 °C satisfaz a necessidade de atomização preservando a integridade do forno de grafite e mantendo o maior nível de absorvância detectado.

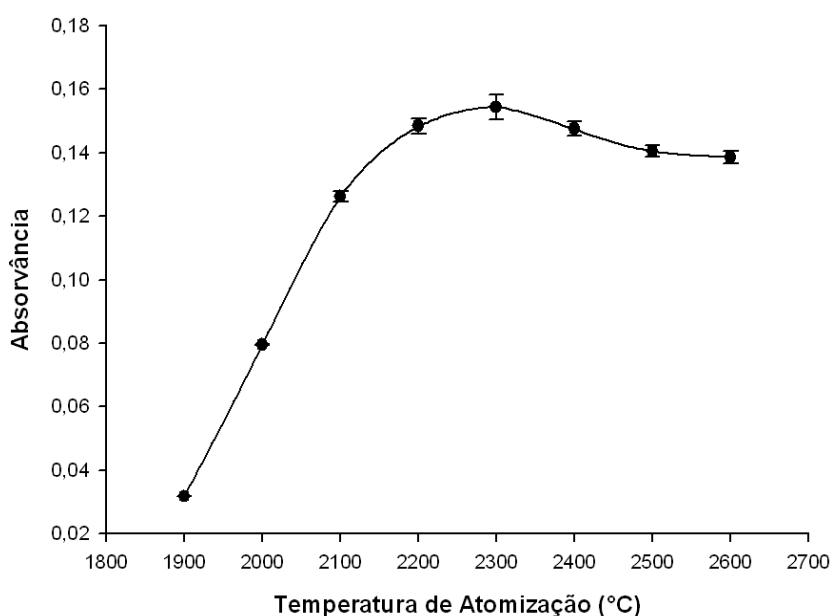


Figura 6.2. Gráfico de Temperatura de Atomização x Absorvância.

Obtido através do padrão de K_2PtCl_6 (400 μ g/L em HNO_3 0,2 %).

6.3.2. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma faixa de aplicação^{131,132}. A linearidade do método foi avaliada através da determinação dos coeficientes de correlação (r) da curva de calibração mostrada na figura 6.3(A). Outro método utilizado para verificar se todos os pontos da curva estão inseridos numa faixa linear dinâmica corresponde à resposta relativa. Neste caso a absorvância medida é dividida por sua respectiva concentração fornecendo respostas relativas. Um gráfico é construído com as respostas relativas no eixo dos Y e as concentrações correspondentes no eixo x. A linearidade abrange os pontos que estiverem entre 95 % e 105 % da linha da faixa linear¹³².

Os resultados de linearidade calculados através do r e da resposta relativa estão apresentados na figura 6.3(B) e mostram linearidade satisfatória e dentro de uma estreita faixa entre 98,1 % e 101,4 % superando a linearidade mínima (95 - 105%).

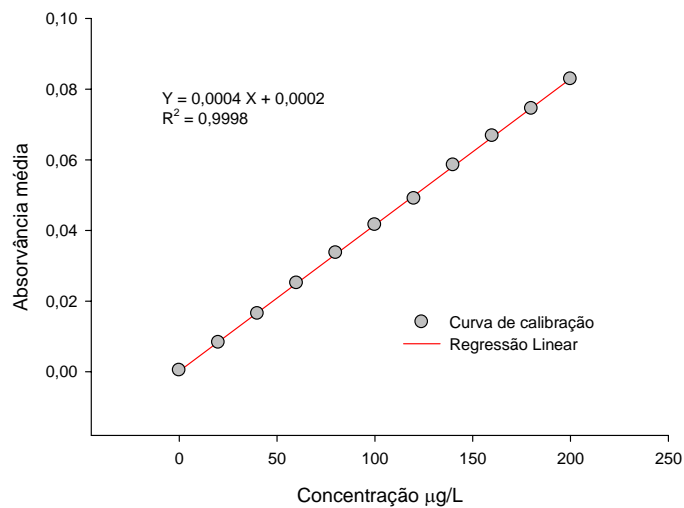
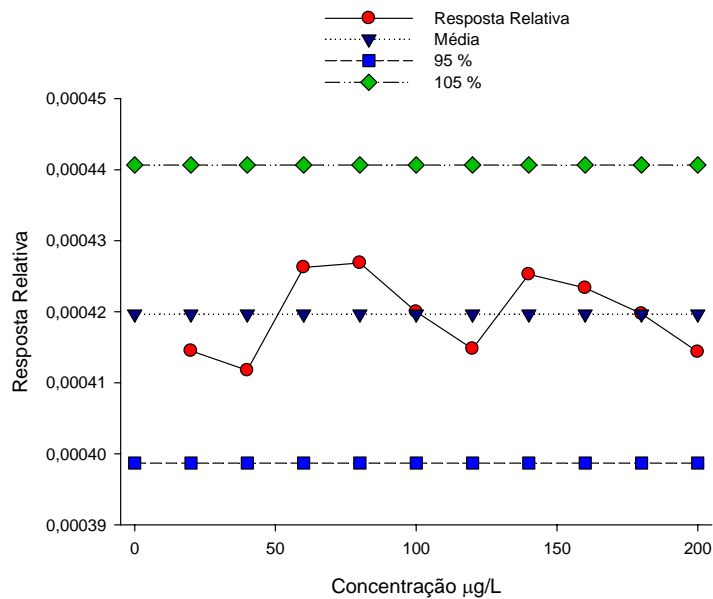
A**B**

Figura 6.3. Determinação Gráfica das curvas de linearidade. (A) Curva analítica clássica; (B) Gráfico da resposta relativa (razão/concentração) x concentração. Dados obtidos das leituras das diferentes concentrações dos padrões de K_2PtCl_6 em plasma de camundongo (1:50) em HNO_3 0,2 %.

6.3.3. Precisão e Exatidão

A **precisão** representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas^{131,132}. A precisão foi determinada através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV) (equação 6.1) onde S é o desvio padrão e X é a concentração média determinada. Foram realizadas 10 medidas para cada nível de concentração, os resultados estão apresentados na tabela 6.2.

$$\text{Equação 6.1.} \quad \text{RSD(\%)} \text{ ou } \text{CV(\%)} = \frac{S}{X} \times 100$$

Tabela 6.2. Determinação do desvio padrão relativo para cada ponto da curva analítica

Concentração Média	Desvio Padrão	% CV
0,5625	0,5907	105
20,875	0,7772	4
43,31	0,2500	0,6
65,75	1,1365	1,7
85,13	1,2332	1,4
105,06	1,8413	1,8
130,63	0,1443	0,1
153,44	1,4343	0,9
176,25	1,8819	1,1
193,5	1,6955	0,9

A **exatidão** é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada como na equação 6.2^{131,132}. A exatidão foi determinada através de ensaios de recuperação. Para as amostras analisadas são considerados aceitáveis valores entre 80 e 120%¹³³ e os resultados estão apresentados na tabela 6.3. O percentual de recuperação encontrado variou entre 101,56 e 109,80 %, o que está dentro da faixa aceitável, mostrando a exatidão do método.

Equação 6.2.
$$\% \text{ Recuperação} = \left(\frac{C_{\text{encontrada}} - C_{\text{amostra}}}{C_{\text{adicionada}}} \right) \times 100$$

Tabela 6.3. Porcentagem de recuperação através da adição de analito à matriz.

Concentração adicionada (µg/L)	Concentração média (µg/L)	Concentração média subtraída do branco	% recuperação
0	0,56	-	-
20	20,87	20,31	101,56
40	42,75	42,19	105,47
60	65,75	65,19	108,65
80	85,12	84,56	105,70
100	105,06	104,5	104,50
120	129,91	129,35	107,79
140	153,43	152,88	109,19
160	176,25	175,69	109,80
180	193,5	192,94	107,18
200	219,5	218,94	109,47

6.3.4. Limite de Detecção e Quantificação

O Limite de Detecção (LD) representa a menor concentração de platina que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada^{131,132}.

O LD foi calculado (equação 6.3) baseado na estimativa do desvio padrão da resposta (S) que foi determinado através de 10 leituras do branco do padrão na matriz que estão mostrados na tabela 6.4 abaixo.

$$\text{Equação 6.3.} \quad LD = 3,3 \cdot S = 3 \cdot 0,639 = 2,11$$

Tabela 6.4. Leituras do branco do padrão e Desvio padrão

Replicatas ($\mu\text{g/L}$)										Concentração média ($\mu\text{g/L}$)	Desvio Padrão (S)
-0,25	0,5	1,0	1,0	0,75	1,0	0,0	0,25	-0,5	1,5	0,53	0,639

O Limite de Quantificação (LQ) representa a menor concentração de platina que pode ser medida^{131,132}. LQ também pode ser calculado através dos parâmetros da curva analítica pela equação 6.4. Utilizamos o valor de LD acima calculado, obtivemos valores de LD e LQ iguais a 2,11 e 6,33 $\mu\text{g/L}$ respectivamente.

$$\text{Equação 6.4.} \quad LQ = 3 \cdot LD = 3 \cdot 2,11 = 6,33$$

6.4. CONCLUSÃO

Os parâmetros de validação do método avaliado obedeceram aos limites de variação permitidos pelos órgãos de controle como a Anvisa. O método proposto pode ser utilizado para a determinação da concentração de Pt em amostras de plasma e tecidos (rim, fígado, baço e tumor) dos camundongos C57BL/6 submetidos aos experimentos de farmacocinética (descritos no capítulo 5).

CONCLUSÕES FINAIS

Este trabalho descreveu a síntese de dez ligantes *N*-alquilados de cadeia longa derivados da 1,2-etanodiamina e da 1,3-propanodiamina. As reações de obtenção destes ligantes foram realizadas em condições brandas e sua purificação e rendimento foram bastante eficientes. A partir dos ligantes sintetizados foi possível obter novos complexos de platina(II), cujas sínteses tiveram rendimentos satisfatórios. A oxidação destes complexos com peróxido de hidrogênio resultou nos respectivos complexos de platina(IV) com hidroxilas, que por sua vez foram precursores para a síntese dos complexos de platina(IV) com cloretos, obtidos através da adição de ácido clorídrico. Os compostos preparados foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho, RMN de ^1H , de ^{13}C e de ^{195}Pt , além de análise elementar de C, H e N.

Alguns destes complexos de platina, submetidos à encapsulação em lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico, apresentaram tamanhos uniformes e inferiores a 200 nm. As taxas de incorporação se mostraram dependentes do número de oxidação e da lipofilicidade. Todos os complexos obtidos foram submetidos a testes de citotoxicidade em células tumorais e células normais. Alguns dos compostos testados apresentaram citotoxicidade comparável ou melhor do que a da cisplatina, principalmente em linhagens de melanoma. Em comparação à carboplatina, os compostos se mostraram mais ativos em células de câncer de pulmão, além das linhagens de melanoma. O complexo **18** foi selecionado e passou por testes pré-clínicos *in vivo* onde foi possível verificar o aumento da tolerância da dose, aumento da atividade antitumoral e a diferença da biodistribuição plasmática e tecidual da formulação em lipossomas quando comparada à formulação não incorporada.

Este trabalho apresentou importante contribuição para a química inorgânica medicinal, tratando desde a síntese e caracterização de complexos de platina bem como o desenvolvimento de novas formulações para os mesmos através da encapsulação em lipossomas e a determinação da atividade biológica *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Rang & Dale Farmacologia, 6ª Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, **1997**, 718-725.
- 2- <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/> acessado em janeiro de 2009.
- 3- De Almeida, V. L.; Leitão, A.; Reina, L. C. B.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L.; Lopes, M. T. P.; *Quim. Nova* **2005**, 28, 118.
- 4- Rosemberg, B.; Van Camp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, H. V.; *Nature* **1969**, 222, 385.
- 5- Fontes, A. P. S.; De Almeida, S. G.; Nader, L. A.; *Quím. Nova* **1997**, 20, 398
- 6- Kelland, L.; *Nature Rev.* **2007**, 7, 573.
- 7- Bristol Myers Squibb & Johnson Matthey; *Drugs of the Fut.* **1990**, 15, 739.
- 8- Loehrer, P. J.; Eingham, L. H.; *Am. Intern. Med.* **1984**, 100, 704.
- 9- Fiorentino, M. V.; Ghiotto, C.; *Inorg. Chim. Acta* **1987**, 59, 137.
- 10- Barnard, C. F. J.; Cleare, M. J.; Hydes, P. C.; *Chem. In Britain* **1986**, 22, 1001.
- 11- Pasini, A.; Zunino, F.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, 26, 615.
- 12- Appleton, T. G.; Connor, J. W.; Hall, J. R.; Prenzler, P. D.; *Inorg. Chem.* **1989**, 28, 2030.
- 13- Van der Veer, J. L.; Reedijk, J.; *Chem. In Britain* **1988**, 24, 775.
- 14- Cvitkovic, E.; Sapulding, J.; Bethune, V.; Martin, J.; Whitmore, W. F.; *Cancer.* **1977**, 39, 1357.
- 15- De Lena, M.; Lorusso, V.; Paradiso, A.; Tommasi, S.; *Inorg. Chim. Acta* **1987**, 137, 91.
- 16- Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Pérez, J. M., *Chem. Rev.* **2003**, 103, 645.
- 17- Kidani, Y.; Inagaki, K.; Iigo, M.; Hoshi, A.; Kuretani, K.; *J. Med. Chem.* **1978**, 21, 1315.
- 18- Raymond, E.; Faivre, S.; Chaney, S.; Woynarowski, J.; Cvitkovic E.; *Mol. Cancer Ther.* **2002**, 1, 227.
- 19- Bolelikas, T.; Vougiouka, M.; *Oncol. Reports* **2003**, 10, 1663.
- 20- Hirose, T.; Horichi, N.; Ohmori, T.; Shirai, T.; Sohma, S.; Yamaoka, T.; Ohnishi, T.; Adachi, M.; *Lung cancer* **2003**, 39, 91.

- 21- Gietema, J. A.; Veldhuis, G. J.; Guchelaar, H. J.; Willemse, P. H. B.; Uges, D. R. A.; Cats, A.; Boosntra, H.; Van der Graaf, W. T. A.; Sleijfer, D. T.; Devuies, E. G. E.; Mulder, N. H.; *Br. J. Cancer* **1995**, *71*, 1302.
- 22- Fiebig, H. H.; Heuss, H.; Vonpawel, L.; Gatzemeier, U.; Manegold, C.; Edler, L.; Berdel, W.; *Onkologie* **1996**, *19*, 328.
- 23- Barefoot, R. R.; *J. Chromatogr. B* **2001**, *751*, 205.
- 24- Wheate, N. J.; Collins, J. G.; *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *241*, 133.
- 25- Kelland, L. R.; Sharp, S. Y.; O'Neil, C. F.; Raynaud, F. I.; Beale, P. J.; Judson, I. R.; *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 111.
- 26- Perez, J. M.; Kelland, L. R.; Montero, E. I.; Boxall, F. E.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Ranninger, C. N.; *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 933.
- 27- Rosemberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T.; *Nature* **1965**, *205*, 698.
- 28- Groen, H. J. M.; *Pro. Am. Soc. Clin. Oncol.* **1996**, *15*, 378.
- 29- Fichtinger-Schepman, A. M. J.; Reedjik, J.; *Biochem.* **1985**, *24*, 707.
- 30- Kelland, L.; Abel, G.; McKeage, M. J.; Jones, M.; Goddard, P. M.; Valenti, M.; Murrer, B. A.; Harrap, K. R.; *Cancer Res.* **1993**, *53*, 2581.
- 31- Braddock, P. D.; Connors, T. A.; Jones, M.; Khokhar, A. R.; Melzack, D. H.; Tobe, M. L.; *Chem. Biol. Interact.* **1975**, *11*, 145.
- 32- Gordon, M.; Hollander, S.; *J. Med.* **1993**, *24*, 209.
- 33- Christian, M. C.; Abstracts of Seventh Internacional Symposium on Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy. **1995**, S128.
- 34- Kelland, L. R.; Murrer, B. A.; Abel, G.; Giandomenico, C. M.; Mistry, P.; Harrap, K. R.; *Cancer Res.* **1992**, *52*, 822.
- 35- Hall, M. D.; Hambley, T. W.; *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 49.
- 36- Roberts, J. D.; Houten, B. V.; Qu, Y.; Farrel, N. P.; *Nucl. Ac. Res.* **1989**, *17*, 9719.
- 37- Farrell N.; *Cancer Invest.* **1993**, *11*, 578.
- 38- Harris A. L., Yang X., Hegmans A., Povirk L., Ryan J. J., Kelland L., Farrell N. P.; *Inorg Chem. Comm.* **2005**, *44*, 9598.
- 39- Farrell N.; *Met. Ions Biol. Syst.* **2004**, *42*, 251.

- 40- Manzotti C.; Pratesi G.; Menta E.; Di Domenico R.; Cavalletti E.; Fiebig H. H.; Kelland L. R.; Farrell N.; Polizzi D.; Supino R.; Pezzoni G.; Zunino F.; *Clin Cancer Res.* **2000**, *6*, 2626.
- 41- Sherman, S. E.; Lippard, S. J.; *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1152.
- 42- Coluccia, M.; Natile, G.; *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *216*, 383.
- 43- Bradner, W. T.; Rose, W. C.; Hyftalen, J. B.; *Cisplatin, Current Status and New Developments*, Prestayko, A. W.; Crooke, S. T.; Carter, S. K., Eds.; Academia Press, New York, **1980**, p.171.
- 44- Bloemink, M. J.; Reedijk, J.; *Metal Ions in Biological Systems*, Sigel, H., Ed.; Marcel Dekker, New Cork, **1996**, *32*, 64.
- 45- Neidle, S.; Ismael, I. M.; Sadler, P. J.; *J. Inorg. Biochem.* **1980**, *13*, 205.
- 46- Gullotti, M.; Pacchioni, F.; Pasini, A.; Ugo, R.; *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 2006.
- 47- Farrell, N.; *Transition Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents*; Kluwer Academia Publishers, Vermont, **1989**, *11*, 19, 68.
- 48- Schreier, S.; Malheiros, S. V. P.; de Paula, E.; *Biochim. Biophys. Acta.* **2000**, *1508*, 210.
- 49- Talman, E. G.; Kidani, Y.; Mohrmann, L.; Reedijk, J.; *Inorg. Chim. Acta.* **1998**, *283*, 251.
- 50- Wong, E.; Giandomenico, C. M.; *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2451.
- 51- Johnson, N. P.; Butour, J. L.; Villani, G.; Wimmer, F. L.; Defais, M.; Pierson, V.; Brabec, V.; *Prog. Clin. Biochem. Med.* **1989**, *1*, 10.
- 52- Hambley, T. W.; Battle, A. R.; Deacon, G. B.; Lawrenz, E. T.; Fallon, G. D.; Gatehouse, B. M.; Webster, L. K.; Rainone, S.; *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 3.
- 53- Ellis, L. T.; Er, H. M.; Hambley, T. W.; *Aust. J. Chem.* **1995**, *48*, 793.
- 54- Choi, S.; Filotto, C.; Bisanzo, M.; Delaney, S.; Lagasse, D.; Whitworth, J. L.; Jusko, A.; Li, C.; Wood, N. A.; Willingham, J.; Schwenker, A.; Spaulding, K.; *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 2500.
- 55- Desoize, B.; Madoulet, C.; *Oncology Hematology*, **2002**, *42*, 317.
- 56- Howe-Grant, M. E.; Lippard, S. J.; *Metal Ions in Biological Systems*, Rigel, H., Ed.; Marcel Dekker, New Cork, **1980**, *11*, 63.
- 57- Green, M.; Garner, M.; Orton, D. M.; *Trans. Met. Chem.* **1992**, *17*, 164.
- 58- Maia, E. P.; Suillerot, A. G.; *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8*, 626.
- 59- Lippard, S. J.; Wang, D.; *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 307.

- 60- Jamieson, E. R.; Lippard, S. J.; *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467.
- 61- Pérez, R. P.; *Eur. J. Câncer* **1998**, *34*, 1535.
- 62- Wozniak, K.; Blasiak, J.; *Acta Biochim. Polon.* **2002**, *49*, 583.
- 63- Liang, X.; Shen, D.; Gottesman, M. M.; *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1599.
- 64- Takahara, P. M.; Rosenweing, A. C.; Frederick, C. A.; Lippard, S. J.; *Nature.* **1995**, *649*, 377.
- 65- Barry, M. A.; Benhke, C. A.; Eastman, A.; *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 2353.
- 66- Szymkowski, D. R.; Yarema, K.; Essigmann, J. M.; *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA.* **1992**, *89*, 10772.
- 67- Mello, J. A.; Lippard, S. J.; Essigmann, J.M.; *Biochem.* **1995**, *34*, 14782.
- 68- Suo, Z.; Lippard, S. J.; Johnson, K. A.; *Biochem.* **1999**, *38*, 715.
- 69- Zamble, D. B.; Lippard, S. J.; *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 435.
- 70- Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C.; *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 238.
- 71-Frézard, F.; Schettini, D. A.; Rocha, O. G. F.; Demicheli, C.; *Quim. Nova.* **2005**, *28*, 511.
- 72- Torchilin, V. P.; *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 145.
- 73- New, R. R. C. (Ed.). *Liposomes: a pratical approach*. New York: IRL Press, **1990**, 301.
- 74- Santos N. C.; Castanho, M. A. R. B.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 1181.
- 75- Allen, T. M.; Hansen, C.; *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1068*, 133.
- 76- Senior, J.; Alving, C. R.; *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst.* **1987**, *3*, 123.
- 77- Patel, H. M.; *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst.* **1992**, *9*, 39-90.
- 78- Boerman, O. C.; Laverman P.; Oyen W. J. G.; Corstens F. H. M.; Storm G.; *Prog. Lipid Res.* **2000**, *39*, 461.
- 79- Oussoren, C.; Zuidema J; Crommelin D. J; Storm G; *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1328*, 261.
- 80- Freise, J.; Mueller, W. H.; Magerstedt, P.; Schmoll, H. J.; *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **1982**, *23*, 319.
- 81- Newman, M. S.; Colbern, G. T.; Working, P. K.; Engbers, C.; Amantea, M. A.; *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1999**, *43*, 1.
- 82- Xiao, C.; Qi, X.; Maitani, Y.; Nagai, T.; *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 1718.

- 83- Zamboni, W. C.; Gervais, A. C.; Egorin, M. J.; Schellens, J. H. M.; Zuhowski, E. G.; Pluim, D.; Joseph, E.; Hamburger, D. R.; Working, P. K.; Colbern, G.; Tonda, M. E.; Potter, D. M.; Eiseman, J. L.; *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2004**, *53*, 329.
- 84- White, S. C.; Lorigan, P.; Margison, G. P.; Margison, J. M.; Martin, F.; Thatcher, N.; Anderson, H.; Ranson, M.; *Br. J. Cancer.* **2006**, *95*, 822.
- 85- Moreira, J. N.; Almeida, L. M.; Geraldles, C. F.; Madeira, V. M. C.; Costa, M. L.; *Int. J. Pharm.* **1997**, *147*, 153.
- 86- Fichtner, I.; Reszka, R.; Schütt, M.; Rudolph, M.; Becker, M.; Lemm, M.; Richter, J.; Berger, I.; *Oncol. Res.* **1993**, *5*, 65.
- 87- Sarikapan, W.; Vasant, L.; *Oncol.* **2004**, *67*, 3.
- 88- Dragovich, T.; Mendelson, D.; Kurtin, S.; Richardson, K.; Von Hoff, D.; Hoos, A.; *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *58*, 759.
- 89- <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Aroplatin> acessado em janeiro de 2009.
- 90- <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=AP5346> acessado em janeiro de 2009.
- 91- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Rang & Dale Farmacologia, 6ª Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, **1997**, 87.
- 92- <http://www.fda.gov/CDER/HANDBOOK/DEVELOP.HTM> acessado em janeiro de 2009.
- 93- Kosaki, T.; Saka, T.; *Proc. Natl. Acad. of Japan* **1958**, *34*, 295.
- 94- Criss, W. E.; *Turk. J. Med. Sci.* **2003**, *33*, 195.
- 95- Alvarez-Valdés, A.; Pérez, J. M.; López-Solera, I.; Lannegrand, R.; Continente, J. M.; Amo-Ochoa, P.; Camazón, M. J.; Solans, X.; Font-Bardiá, M.; Navarro-Ranninger, C.; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1835.
- 96- Hahm, H. A.; Dunn, V. R.; Butash, K. A.; Deveraux, W. L.; Woster, P. M.; Casero, R. A.; Davidson, N. E.; *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 391.
- 97- Miller, B.; Wild, S.; Zorbas, H.; Beck, W.; *Inorg. Chim. Acta.* **1999**, *290*, 237.
- 98- Perez-Soler, R.; Khokhar, A. R.; Priebe, W.; Krakoff, I. H.; *Liposomes in Drug Delivery*, **1993**, *2*, 1.
- 99- A) De Almeida, M. V.; Cesar, E. T.; Felício, E. C. A.; Fontes, A. P. S.; *J Braz. Chem. Soc.* **2000**, *11*, 154. B) De Almeida, M. V.; Cesar, E. T., Felício E. C. A.; Fontes, A. P. S.; Berg, R. N.; Filho, J. D. S.; *Molecules*, **2002**, *7*, 405. C) Cesar,

- E. T.; De Almeida, M. V.; Fontes, A. P. S.; Pereira-Maia, E. C.; Garnier-Suillerot, A.; Couri, M. R. C.; Felício, E. C. A.; *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *95*, 297.
- D) De Almeida, M. V.; Chaves J. D. S.; Fontes, A. P. S.; Cesar, E. T.; Gielen, M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 1266. E) Couri, M. R.; De Almeida, M. V.; Fontes, A. P. S.; Chaves, J. D. S.; Cesar, E. T.; Alves, R. J.; Pereira-Maia, E. C.; Garnier-Suillerot, A.; *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2006**, *9*, 1868. F) Cesar, E. T.; Berg, R. N.; Fontes, A. P. S.; Silva, H.; Saraiva, M. F.; Guerra, W.; De Almeida M. V.; *Bull. Korean. Chem. Soc.* **2007**, *28*, 295.
- 100- Gabano, E.; Marengo, E.; Bobba, M.; Robotti, E.; Cassino, C.; Botta, M.; Osella, D.; *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 2158.
- 101- Zamboni, W. C.; *The Oncologist* **2008**, *13*, 248.
- 102- Drummond, D. C.; Meyer, O.; Hong, K.; Kirpotin, D. B.; Papahadjopoulos, D.; *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51*, 691.
- 103- Han, I.; Kim, O. J.; Lee, G. Y.; Sung, Y. K.; Sonf, R., Sohn, Y. S.; *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 5443.
- 104- Davis, J. M.; Basic Cell culture-A practical approach, Oxford University press, New York, **1994**.
- 105- Weaver, J. L.; *Metho. Mol. Biol.* **1997**, *91*, 77.
- 106- Tominaga, H.; Ishiyama, M.; Ohseto, F.; Sasamoto, K.; Hamamoto, T.; Suzuki, K.; Watanabe, M.; *Anal. Commun.* **1999**, *36*, 47.
- 107- Mosmann, T.; *J. Immun. Meth.* **1983**, *65*, 55.
- 108- Silva, H.; Barra, C. V.; Costa, C. F.; De Almeida, M. V.; Cesar, E. T.; Silveira, J. N.; Garnier-Suillerot, A.; Paula, F. C. S.; Pereira-Maia, E. C.; Fontes, A. P. S.; *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 767.
- 109- Cui, K.; Wang, L.; Zhu, H.; Gou, S.; Liu, Y.; *Bioorg. Med. Chem. Letters* **2006**, *16*, 2937.
- 110- Ye, Q.; Lou, S.; Liu, W.; Yu, Y.; Chen, X.; Hou, S.; Gao, W.; Liu, Y; *Bioorg. Med. Chem. Letters* **2007**, *17*, 2144.
- 111- Kokotos, G.; Theodorou, V.; Constantinou-Kokotou, V.; Gibbons, W. A.; Roussakis, C.; *Bioorg. Med. Chem. Letters* **1998**, *8*, 1525.
- 112- Kwon, Y.; Whang, K.; Park, Y.; Kim, K. H.; *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 1669.

- 113- Marzano, C; Frazia, B.; Baccichetti, F.; Trevisan, A.; Giovagnini, L.; Fregona, D.; *Chemico-Biol. Inter.* **2004**, *148*, 37.
- 114- Coates, A. S.; *World J. Surgery* **1992**, *16*, 277.
- 115- Han I.; Jun, M. S.; Kim, M. K.; Kim J. C.; Sohn Y. S.; *Jpn. J. Cancer Res.* **2002**, *93*, 1244.
- 116- Carvalho Junior, A. D.; Vieira, F. P.; de Melo, V. J.; Lopes, M. T. P.; Silveira, J. N.; Ramaldes, G. A.; Garnier-Suillerot, A.; Pereira-Maia, E. C.; De oliveira, M. C.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2007**, *40*, 1149.
- 117- Ratain, M. J.; Schilsky, R. L.; Conley, B. A.; Egorin, M. J.; *J. Clin. Oncol.* **1990**, *8*, 1739.
- 118- Rice, J. R.; Gerberich, J. L.; Nowotnik, D. P.; Howell, S. B.; *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 2248.
- 119- Sbovata, S. M.; Bettio, F.; Mozzon, M.; Bertani, R.; Venzo, A.; Benetollo, F.; Michelin, R. A.; Gandin, V.; Marzano, C.; *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4775.
- 120- Coluccia, M.; Nassi, A.; Boccarelli, A.; Giordano, D.; Cardellicchio, N.; Locker, D.; Leng, M.; Sivo, M.; Ontini, F. P.; Natile, G.; *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 31.
- 121- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Rang & Dale Farmacologia, 6ª Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, **1997**, 121-124.
- 122- Wang, X., Au-Yeung, S. C. F., Ho, Y., *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 909.
- 123- Zamboni, C. W.; Gervais, A. C., Egorin, M. J.; Schellens, J. H. M.; Hamburger, D. R.; Delauter, B. J.; Grim, A.; Zuhowski, E. G.; Joseph, E.; Pluim, D.; Potter, D. M.; Eiseman, J. L.; *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 2992.
- 124- Allen T. M., Hanse, C. B.; Lopes de Menezes, D. E.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **1995**, *16*, 267.
- 125- Fahr, A.; Van Hoogevest, P.; Kuntsche, J.; Leigh, M. L. S.; *J. Liposome Res.* **2006**, *16*, 281.
- 126- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº899, de 29/05/2003.
- 127- Tibben, M. M.; Rademaker-Lakhai, J. M.; Rice, J. R.; Stewart, D. R.; Schellens, J. H. M.; Beijen J. H.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *373*, 233.
- 128- Milacic, R.; Cemazar, M.; Sersa, G.; *J. Pharmacol. Biomed. Anal.* **1997**, *16*, 343.

- 129- LeRoy, A. F.; Wehling, M. L.; Sponseller, H. L.; Friauf, W. S.; Solomon, R. E.; Dedrick, R. L.; Litterst, C. L.; Gram, T. E.; Guarino, A. M.; Becker, D. A.; *Biochem. Med.* **1977**, *18*, 184.
- 130- Meerum Terwogt J. M.; Tibben, M. M.; Welbank, H.; Schellens, J. H. M.; Beijnen, J. H.; *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2000**, *366*, 298.
- 131- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº475, de 19/03/2002.
- 132- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, E. C. S. F.; Melo, L. F. C. M.; *Quim. Nova.* **2004**, *27*, 771.
- 133- Grenn, J. M.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, A305.

PUBLICAÇÕES REFERENTES A ESTE TRABALHO

Resumos Apresentados em Anais de Congressos

Silva, H.; Lopes, M. T. P.; Siqueira, L. M. S.; Frezard, F.; Fontes, A. P. S.

Antitumor activity of new platinum complex with long carbon chain diamine ligands. The 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2008, Porto de Galinhas-PE.

Silva, H.; Barra, C. V.; Rocha, F. V.; Siqueira, L. M. S.; Lopes, M. T. P.; Fontes, A. P. S.

Effect of leaving group on cytotoxic activity of long aliphatic chain diamine platinum complexes.

I Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry, 2008, Foz do Iguaçu - PR

Silva, H.; Lopes, M. T. P.; Frezard, F.; Fontes, A. P. S.

Estudo comparativo da Atividade Citotóxica de complexos de Platina(II) livres e incorporados em lipossomas

XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia - SP.

Barra, C. V.; Rocha, F. V.; Silva, H.; Fontes, A. P. S.

Novos Complexos de Platina(II) contendo ligantes *N*-alquilados de cadeia longa derivados da etilenodiamina e oxalato.

XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia - SP

Pereira, G. A.; Silva, H.; Fontes, A. P. S.

Novos Complexos de Platina(IV) com ligantes diamina *N*-alquilados de cadeia longa e cloro nas posições axiais.

XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia - SP.

Pereira, G. A.; Tavares, T. T.; Silva, H.; Fontes, A. P. S.

Synthesis and Characterization of Platinum(IV) Complexes with *N*-alkyl-propanediamine ligands.

XIV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2008, Foz do Iguaçu - PR.

Silva, H.; Fontes, A. P. S.; Cesar, E. T.; De Almeida, M. V.; Frezard, F.

Preparation, Characterization of Platinum Complexes Incorporated in Liposomes.

XIII Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2006, Fortaleza - CE.

Silva, H.; Pereira-Maia, E.; Cesar, E. T.; De Almeida, M. V.; Fontes, A. P. S.

Synthesis, Characterization and Antitumor Activity of New Platinum Complexes with *N*-alkyl-propanediamine ligands.

XIII Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2006, Fortaleza - CE.

Silva, H.; Costa, C. F.; Oda, S. C.; De Almeida, M. V.; Fontes, A. P. S.

Síntese de Derivados *N*-alquilados da 1,3-propanodiamina com Cadeias Longas

XIX Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Ouro Preto - MG.

Silva, H.; Barra, C. V.; Cesar, E. T.; De Almeida, M. V.; Costa, C. F.; Oda, S. C.; Fontes, A. P. S.

Síntese e caracterização de complexos de platina(IV) com ligantes *N*-alquilados de cadeia longa derivados da etilenodiamina.

XIX Encontro Regional da sociedade Brasileira de Química, 2005, Ouro Preto - MG.

Silva, H.; De Almeida, M. V.; Cesar, E. T.; Barra, C. V.; Fontes, A. P. S.

Síntese e caracterização de complexos de platina(II) com ligantes *N*-alquilados de cadeia longa derivados da etilenodiamina.

28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas - MG.

Artigo publicado

Silva, H.; Barra, C. V.; Costa, C. F.; De Almeida, M. V.; Cesar, E. T.; Silveira, J. N.; Garnier-Suillerot, A.; Paula, F. C. S.; Pereira-Maia, E. C.; Fontes, A. P. S. Impact of the carbon chain length of novel platinum complexes derived from *N*-alkyl-propanediamines on their cytotoxic activity and cellular uptake. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 767.

Artigos em preparação

Silva, H.; Barra, C. V.; Rocha, F. V.; Lopes, M. T. P.; Fontes, A. P. S. Novel platinum(II) complexes of long chain aliphatic diamine ligands with oxalato as the leaving group. Comparative cytotoxic activity relative to chloride precursors.

Silva, H.; Fontes, A. P. S.; Lopes, M. T. P.; Frezard, F. Synthesis and characterization of lipophilic platinum(IV) with *N*-alkyl long chain diamines and cytotoxicity studies.

Silva, H.; Do Monte Neto, R. L.; Fontes, A. P. S.; Lopes, M. T. P.; Frezard, F. Antitumor activity and pharmacokinetic studies of a lipophilic platinum complex derived from *N*-alkyl -1,3-propanediamine encapsulated in liposomes.

Silva H.; Do Monte Neto, R. L.; Fontes A. P. S., Oliveira, M. A. L.; Frezard, F. Quantification of a lipophilic platinum(II) complex in plasma and mice tissues by FG-AAS.