

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA**

***Screening* da atividade antiproliferativa e investigação toxicológica *in vitro* e *in vivo* de compostos de coordenação.**

ÉERICA DE OLIVEIRA LOPES

Araraquara - SP

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA**

***Screening* da atividade antiproliferativa e investigação toxicológica *in vitro* e *in vivo* de compostos de coordenação.**

ÉRICA DE OLIVEIRA LOPES

Dissertação de Mestrado apresentado a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

**Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan
Orientador**

**Araraquara - SP
2015**

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

L864s Lopes, Érica de Oliveira
Screening da atividade antiproliferativa e investigação toxicológica *in vitro* e *in vivo* de compostos de coordenação / Érica de Oliveira Lopes – Araraquara, 2015
86 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e
Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Fernando Rogério Pavan

1. Compostos de coordenação. 2. Câncer. 3. Atividade antiproliferativa. 4. Toxicidade aguda. 5. Biodisponibilidade oral. I. Pavan, Fernando Rogério, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

Aos meus pais Osvaldo e Janice que me deram a vida, principalmente a minha amada mãe que sempre esteve ao meu lado, nunca mediu esforços para que todos os meus objetivos fossem alcançados. Uma mulher guerreira, assim posso te definir... Não há palavras que expressem o quanto és importante em minha vida. Amo vocês!

*A minha irmã e melhor amiga Thaís, por estar presente em todos os momentos da minha vida, sempre me incentivando e me apoiando até mesmo em algumas loucuras.
Amo você, Tata!*

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora do Carmo por sempre iluminar e guiar meus passos e caminhos;

Aos meus pais e minha irmã pelo apoio e incentivo para que eu seguisse em frente em busca dos meus sonhos e objetivos;

Aos meus avós maternos que são o alicerce da nossa família, obrigada por serem essas pessoas maravilhosas e por tudo o que já fizeram e fazem por mim. Amo vocês!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan, por acreditar em mim desde a primeira conversa e por ter me dado a oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa. Meu muito obrigada, pela paciência, dedicação, sabedoria e amizade durante esses anos;

Ao Prof. Dr. Victor Marcelo Defflon e a doutoranda Carolina Gonçalves de Oliveira pela colaboração, confiança e por sempre me ajudarem com as informações necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

A Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda pela colaboração nos ensaios de Ames e por ter cedido à linhagem celular;

Ao Prof. Dr. Amauri Antonio Menegário, o mestrando Carlos Eduardo Eismann e o pós-doutorando Carlos Alfredo Suárez pela parceria para o uso do equipamento na quantificação. Obrigada pela paciência, pelas explicações e atenção durante os dias em que estive no laboratório.

Aos meus amigos de laboratório pelo companheirismo, incentivo, sabedoria, momentos de risadas (que não foram poucos) e por toda experiência compartilhada;

Aos meus amigos e irmãos de coração Rone e Flávia pela paciência em dias de choro, pela amizade verdadeira, por estarem sempre ao meu lado quando precisei;

A pós-doutoranda Patrícia Bento da Silva que se tornou uma grande e verdadeira amiga, muito obrigada por me ajudar em várias etapas do meu trabalho, pelos conselhos, por me ouvir, por sempre me apoiar e pelo ombro amigo;

*Ao meu namorado Marquinho que esteve ao meu lado na etapa final deste trabalho me ajudando no que era preciso, me incentivando e sempre me apoiando e aconselhando para que eu pudesse alcançar meus objetivos.
Amo você!*

A Capes pela bolsa de mestrado concedida;

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Unesp.

O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende com a vida e com os humildes.

Cora Coralina

No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.

Albert Einstein

RESUMO

O câncer é um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento celular desordenado que invade os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase). Uma série de mudanças genéticas e epigenéticas, que são associadas ao DNA que influenciam a expressão genética, ocasionam o câncer. Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial, sendo uma das principais causas de morte no mundo. O desenvolvimento de fármacos para o tratamento do câncer é possível de forma expressiva através da triagem de moléculas utilizando linhagens celulares tumorais ou métodos alternativos que reduzam o número de animais de experimentação. Em uma segunda etapa, ensaios *in vivo* em modelo convencional deverão garantir a segurança toxicológica e confirmar a biodisponibilidade da molécula. Desta forma, este estudo tem como objetivo, avaliar a atividade proliferativa frente às linhagens tumorais (HepG2, HeLa, MDA-MB-231, K-562, DU 145), o perfil mutagênico, a toxicidade em linhagem celular normal (MRC-5), pelo método alternativo (*Artemia salina* L.) e em camundongos BALB/c e a biodisponibilidade oral *in vivo* de compostos de coordenação (Mn, Co e Zn). Embora, todas as moléculas estudadas tenham apresentado efeito sobre as linhagens tumorais, os complexos de cobalto [Co(atc-Et)₂]Cl e [Co(atc-Ph)₂]Cl apresentaram os melhores Índices de Seletividade (IS). No ensaio de toxicidade aguda em *Artemia salina* L. apenas os três complexos [Mn(atc)₂], [Mn(atc-Me)₂] e [Co(atc-Ph)₂]Cl se mostraram tóxicos para o microcústáceo, enquanto que na toxicidade aguda em camundongos apenas um complexo [Mn(atc-Me)₂]. Os parâmetros bioquímicos analisados (enzimas ALT e AST), bem como o peso relativo dos órgãos dos animais, não mostraram diferença estatística significativa. No teste de Ames foi observado mutagenicidade apenas de três complexos de manganês [Mn(atc-Me)₂], [Mn(atc-Ch)₂] e [Mn(atc-Ph)₂]. No que diz respeito a quantificação via ICP-OES da biodisponibilidade oral do plasma obtido dos camundongos, foi possível quantificar os complexos de zinco [Zn(atc-Et)₂] e [Zn(atc-Ph)₂] devido a concentração desse metal ser superior ao LD.

Palavras-chave: Câncer, compostos de coordenação, atividade antiproliferativa, métodos alternativos, toxicidade aguda e biodisponibilidade oral.

ABSTRACT

Cancer is a group of diseases that have in common the uncontrolled cell growth that invades the tissues and organs and can spread to other parts of the body (metastasis). A number of genetic and epigenetic changes, that are associated with DNA and influence gene expression, cause cancer. In the last decades, cancer has gained a bigger dimension becoming an evident problem of global public health and is one of the leading cause of death worldwide. The development of drugs for the treatment of cancer is possible through screening of molecules using tumor cell lines or alternative methods that reduce the number of experimental animals. In a second step, *in vivo* assays in conventional model should ensure toxicological safety and confirm the bioavailability of the molecule. Thus, this study aims to evaluate the antiproliferative activity against the tumor cell lines (HepG2, HeLa, MDA-MB-231, K-562, DU 145), the mutagenic profile, toxicity in normal cell line (MRC-5) through the alternative method (*Artemia salina L.*) and BALB/c mice, and also, the coordination compound (Mn, Co and Zn) *in vivo* oral bioavailability. Although all the molecules studied have presented effect on tumor cell lines, and the cobalt complexes [Co(atc-Et)₂]Cl and [Co(atc-Ph)₂]Cl showed the best selectivity index (SI). In the acute toxicity test in *Artemia salina L.* only three complexes [Mn(atc)₂], [Mn(atc-Me)₂] and [Co(atc-Ph)₂]Cl proved to be toxic to the microcrustacean, while that the acute toxicity in mice only one complex ([Mn(atc-Me)₂]) presented toxic effect. Quantitative biochemical parameters (ALT and AST), as well as the relative weight of the organs of the animals showed no statistical difference. In the Ames test mutagenicity was observed only in three manganese complexes [Mn(atc-Me)₂], [Mn(atc-Ch)₂] and [Mn(atc-Ph)₂]. As regards the quantification of the via ICP-OES oral bioavailability of plasma derived from mice, it was possible to quantify the zinc complex [Zn(atc-Et)₂] and [Zn(atc-Ph)₂] due to concentration this metal exceed the LD.

Keywords: Cancer, coordination compound, antiproliferative activity, alternative methods, acute toxicity and oral bioavailability.

Lista de Figuras

Figura 1.	Dosagem (mg/dose) de um elemento essencial (Fe) pela resposta do organismo	20
Figura 2.	Fórmula geral das Tiossemicarbazonas	21
Figura 3.	Tiossemicarbazonas derivadas da 2-acetilpiridina utilizadas nesse trabalho, onde R =- hidrogênio, -metil, -etil, -fenil e- ciclohexil	21
Figura 4.	Ciclo de vida da <i>Artemia salina</i> L.	26
Figura 5.	Representação Esquemática da microplaca no ensaio de citotoxicidade	37
Figura 6.	Administração via gavage	41
Figura 7.	Coleta pela veia submandibular	41
Figura 8.	Retirada dos órgãos após eutanásia	41
Figura 9.	Órgãos dos animais	41
Gráfico 1.	Porcentagem de sobrevivência dos camundongos BALB/c durante 14 dias na concentração de 1.000 mg/Kg de peso corpóreo	55
Gráfico 2.	Porcentagem de sobrevivência dos camundongos BALB/c durante 14 dias na concentração de 500 mg/Kg de peso corpóreo	56
Gráfico 3.	Peso relativo (razão média do peso dos órgãos / peso corporal dos camundongos BALB/c) e desvio padrão	58
Gráfico 4.	Quantificação das enzimas AST e ALT no soro dos camundongos BALB/c	59
Gráfico 5.	Perfil do tempo-concentração no plasma dos complexos de zinco, após uma única administração via gavage na dose de 300 mg/Kg de peso corpóreo	60

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Complexos de Manganês (II) (siglas, fórmulas e estruturas)	30
Tabela 2.	Precursor $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e Complexos de Cobalto (III) (siglas, fórmulas e estruturas)	31
Tabela 3.	Complexos de Zinco (siglas, fórmulas e estruturas)	31
Tabela 4.	Ligantes (fórmulas/siglas e estruturas)	32
Tabela 5.	Cisplatina (sigla, fórmula e estrutura)	33
Tabela 6.	Resultados da atividade biológica dos complexos de Manganês (II) frente às linhagens celulares	49
Tabela 7.	Resultados da atividade biológica do $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e de complexos de Cobalto (III) frente às linhagens celulares	49
Tabela 8.	Resultados da atividade biológica dos complexos de Zinco frente às linhagens celulares	50
Tabela 9.	Resultados da atividade biológica da Cisplatina frente às linhagens celulares	50
Tabela 10.	Resultados da atividade biológica dos Ligantes frente às linhagens celulares	50
Tabela 11.	Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e IM (em parênteses) das cepas TA98 , TA100 , TA102 e TA97a de <i>Salmonella typhimurium</i> expostas à diferentes concentrações do complexo 3Mn , com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica	51
Tabela 12.	Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e IM (em parênteses) das cepas TA98 , TA100 , TA102 e TA97a de <i>Salmonella typhimurium</i> expostas à diferentes concentrações do complexo 4Mn , com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica	52
Tabela 13.	Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e IM (em parênteses) das cepas TA98 , TA100 , TA102 e TA97a de <i>Salmonella typhimurium</i> expostas à diferentes concentrações do complexo 5Mn , com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica	53
Tabela 14.	CL_{50} dos complexos de Manganês (II) frente à <i>Artemia salina</i> L.	54
Tabela 15.	CL_{50} dos complexos de Cobalto (III) frente à <i>Artemia salina</i> L.	54
Tabela 16.	CL_{50} dos complexos de Zinco frente à <i>Artemia salina</i> L.	54
Tabela 17.	CL_{50} da Cisplatina frente à <i>Artemia salina</i> L.	54

Lista de Abreviaturas e Siglas

ALT - Alanina Aminotransferase

AST - Aspartato Aminotransferase

Cis - Cisplatina

Co - Cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

1Co - $[\text{Co}(\text{atc})_2]\text{Cl}$

2Co - $[\text{Co}(\text{atc-Et})_2]\text{Cl}$

3Co - $[\text{Co}(\text{atc-Me})_2]\text{Cl}$

4Co - $[\text{Co}(\text{atc-Ch})_2]\text{Cl}$

5Co - $[\text{Co}(\text{atc-Ph})_2]\text{Cl}$

CL₅₀ - Concentração Letal mediana (Sigla em inglês: LC₅₀)

DL₅₀ - Dose Letal (Sigla em inglês: LD₅₀)

DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

Hatc - 2-acetilpiridina tiossemicarbazona

Hatc-Et - 2-acetilpiridina N(4) etiltiossemicarbazona

Hatc-Me - 2-acetilpiridina N(4) metiltiossemicarbazona

Hatc-Ch - 2-acetilpiridina N(4) ciclohexiltiossemicarbazona

Hatc-Ph - 2-acetilpiridina N(4) feniltiossemicarbazona

ICP-MS - Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente

ICP-OES - Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente

IC₅₀ - *Inhibitory Concentration*

IM - Índice de Mutagenicidade

IS - Índice de Seletividade (Sigla em inglês: SI)

LC₅₀ - *Median Lethal Concentration*

LD₅₀ - *Lethal Dose*

Mn - Manganês (MnCl₂·2H₂O)

1Mn - [Mn(atc)₂]

2Mn - [Mn(atc-Et)₂]

3Mn - [Mn(atc-Me)₂]

4Mn - [Mn(atc-Ch)₂]

5Mn - [Mn(atc-Ph)₂]

OG - Óleo de Girassol

RPMI-1640 - *Roswell Park Memorial Institute medium*

3R's - *Reduction, Refinement e Replacement*

SFB - Soro Fetal Bovino

SI - *Selectivity Index*

TSCs - Tiossemicarbazonas

Zn - Zinco (ZnCl₂)

2Zn - [Zn(atc-Et)₂]

5Zn - [Zn(atc-Ph)₂]

Sumário

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 O Câncer	15
1.2 Tipos de Tratamentos	16
1.2.1 Cirúrgico	16
1.2.2 Transplante de medula óssea.....	17
1.2.3 Radioterápico.....	17
1.2.4 Quimioterápico.....	18
1.3 Química Inorgânica no Tratamento do Câncer	19
1.4 Metais de transição: Mn, Co e Zn	19
1.5 Tiossemicarbazonas como ligante.....	21
1.6 Métodos Alternativos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de <i>screening</i>	22
1.6.1 Teórico e Experimental	22
1.6.1.1 <i>In silico</i>	22
1.6.2 <i>In vitro</i>	22
1.6.2.1 Células.....	22
1.6.2.2 Bactérias.....	23
1.6.3 <i>In vivo</i>	24
1.6.3.1 Zebrafish.....	24
1.6.3.2 <i>Galleria mellonella</i>	24
1.6.3.3 <i>Caenorhabditus elegans</i>	25
1.6.3.4 <i>Drosophila melanogaster</i>	25
1.6.3.5 <i>Artemia salina</i> L.	25
1.6.4 Ensaios <i>in vivo</i> de modelos convencionais.....	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Geral.....	28
2.2 Específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Complexos.....	29
3.2 Fármaco de Referência	32

3.3 Solventes	33
3.4 Solução Reveladora.....	33
3.5 Linhagens Celulares	34
3.6 <i>Artemia salina</i> L.	34
3.7 Animais.....	34
3.8 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	35
3.8.1 Linhagens celulares aderentes HepG2, HeLa, MDA-MB-231, DU 145 e MRC-5	35
3.8.2 Linhagem celular em suspensão K-562.....	35
3.9 Determinação do Índice de Seletividade (IS).....	36
3.10 Atividade mutagênica pelo teste de Ames em cepas TA98, TA100, TA102 e TA97a de <i>Salmonella typhimurium</i>	37
3.10.1 Preparo da mistura S9	38
3.10.2 Controles	38
3.10.3 Análise dos resultados	39
3.11 Avaliação da toxicidade dos compostos de coordenação frente à <i>Artemia salina</i> L.	39
3.12 Avaliação da toxicidade aguda em camundongos BALB/c.....	40
3.13 Quantificação das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no soro dos camundongos BALB/c	42
3.14 Avaliação da biodisponibilidade oral <i>in vivo</i>	42
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO	44
4.1 Avaliação da citotoxicidade frente às linhagens celulares tumorais HepG2, HeLa, MDA-MB-231, K-562, DU 145 e a linhagem normal MRC-5.....	44
4.2 Atividade mutagênica pelo teste de Ames em cepas TA98, TA100, TA102 e TA97a de <i>Salmonella typhimurium</i>	46
4.3 Avaliação da toxicidade dos compostos de coordenação frente à <i>Artemia salina</i> L.	54
4.4 Avaliação da toxicidade aguda em camundongos BALB/c.....	55
4.5 Quantificação das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no soro dos camundongos BALB/c	59
4.6 Avaliação da biodisponibilidade oral <i>in vivo</i>	59
5. CONCLUSÕES.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

CAPÍTULO II

Produção Bibliográfica.....	70
-----------------------------	----

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento celular desordenado que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase) (INCA, 2015). Uma série de mudanças genéticas e epigenéticas, que são associadas ao DNA que influenciam a expressão genética, ocasionam o câncer (NCI, 2015).

Estas células que sofreram mutações dividem-se rapidamente e tendem a ser muito agressivas, determinando a formação de tumores ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor pode ser benigno, quando é caracterizado por uma massa localizada de células que se multiplica vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original (INCA, 2015). Para que ocorra o desenvolvimento de um tumor maligno, acredita-se que é necessário acontecer de 4 a 6 alterações genéticas em diferentes genes (Kowalski *et al.*, 2003) (Brentani *et al.*, 2003).

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Sua classificação é dada de acordo com o tipo de célula normal que o originou. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais como a pele ou mucosas é denominado carcinoma, se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo e cartilagem é chamado de sarcoma (INCA, 2015).

As células tumorais apresentam características morfológicas que as diferenciam como: alterações ultraestruturais do citoesqueleto, núcleo maior, mitocôndrias pouco funcionais, maior produção de energia anaeróbica, variação na diferença de potencial transmembrana, entre outras (Alonso *et al.*, 2004).

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. Resumidamente, os fatores de riscos podem ser de natureza ambiental, hábitos alimentares, hábitos sexuais, fatores ocupacionais, medicamentos, tabagismo, alcoolismo, exposições a radiações ou de origem constitucional (moleculares, hereditários e suscetibilidade genética) (Brentani *et al.*, 2003).

Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial da saúde (OMS) o câncer é uma das principais causas de morte no mundo e, em 2012,

houve 14,1 milhões de casos novos e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer. Espera-se que o número de novos casos anuais aumente de 14 milhões para 22 milhões nas próximas duas décadas (WHO, 2015). Mundialmente, em 2030, estima-se 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA, 2014).

No Brasil, a estimativa para o ano de 2015, aponta a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a extensão do problema do câncer no país. Deste modo, os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma (182 mil novos), próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil). Sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma, estima-se um total de 395 mil casos novos de câncer, 204 mil para o sexo masculino e 190 mil para o sexo feminino (INCA, 2014).

1.2 Tipos de Tratamentos

Os tipos de tratamentos mais comumente utilizados para o câncer serão definidos e abordados neste subitem, segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer – José Alencar Gomes da Silva). Com o diagnóstico confirmado, o médico irá definir qual o tratamento mais indicado de acordo com o tipo de câncer e o estágio da doença.

1.2.1 Cirúrgico

No tratamento cirúrgico, o câncer, em sua fase inicial, pode ser controlado e/ou curado. E pode ser aplicado com finalidade curativa ou paliativa. É considerado curativo quando indicado nos casos iniciais da maioria dos tumores sólidos. E, paliativo quando têm a finalidade de reduzir as células tumorais ou controlar sintomas que colocam em risco a vida do paciente ou comprometem sua qualidade de vida.

É um tratamento radical, que compreende a remoção do tumor primário com margem de segurança e, se indicada, a retirada dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão-sede do tumor.

A margem de segurança varia de acordo com a localização e o tipo histológico do tumor. No tumor benigno a margem de segurança é o seu limite macroscópico, já o tumor maligno por ter um caráter de invasão microscópica, exige ressecção mais ampla. Quando têm-se dúvidas sobre a margem de segurança da peça retirada, é necessária a biópsia das suas bordas e o exame histopatológico.

1.2.2 Transplante de medula óssea

Esse tipo de tratamento é proposto para uma variedade de doenças que afetam as células sanguíneas, como por exemplo: Leucemia Aguda; Leucemia Mieloide Crônica; Leucemia Mielomonocítica Crônica; Linfomas; Anemias Graves; Anemias Congênitas; Hemoglobinopatias; Imunodeficiências Congênitas; Mieloma Múltiplo, entre outras.

O transplante consiste na substituição de uma medula óssea doente ou deficitária por células normais, com o objetivo de reconstituição de uma medula saudável. Ele pode ser autogênico, quando a medula vem do próprio paciente ou alogênico, quando a medula vem de um doador, sendo necessário que haja total compatibilidade entre doador e receptor. E também pode ser realizado a partir de células precursoras de medula óssea, obtidas do sangue circulante de um doador ou do sangue de cordão umbilical.

1.2.3 Radioterápico

É um tratamento no qual se utilizam radiações para eliminar um tumor ou impedir o aumento do crescimento celular. A radioterapia pode ser usada em combinação com a quimioterapia (antes, durante ou após o tratamento) e com a cirurgia (pré e pós-operatória).

Está cada vez mais sendo utilizado, pois se apresenta eficaz para muitos pacientes, fazendo com que o tumor desapareça e a doença fique controlada, ou até mesmo alcançam a cura. As aplicações podem ser: remissivas - diminuem o tamanho do tumor; paliativa – reduzem hemorragias, dores e outros sintomas, proporcionando alívio aos pacientes; profilática - quando se trata a doença em fase subclínica, isto é, não há volume tumoral presente, mas possíveis células neoplásicas dispersas.

Para definir o número de aplicações necessárias, a extensão e a localização do tumor, os resultados dos exames e o estado do paciente são levados em consideração. O tratamento é programado utilizando um aparelho chamado simulador. Por meio de

radiografias, o médico delimita a área a ser tratada, marcando a pele do paciente, para que a radiação atinja somente aquela região. O paciente ficará deitado sob o aparelho, que estará direcionado para a região delimitada. Recomendam-se protetores de chumbo entre o aparelho e algumas partes do corpo para proteger os tecidos e órgãos sadios.

De acordo com a localização do tumor, a radioterapia é feita de duas formas:

- Teleterapia ou Radioterapia Externa, quando os aparelhos ficam afastados dos pacientes.

- Braquiterapia ou Radioterapia de Contato, quando os aparelhos ficam em contato com o organismo do paciente. Tumores de cabeça, do pescoço, das mamas, do útero, da tireoide e da próstata, são tratados com essa terapia. As aplicações podem ser feitas em ambulatório.

Os efeitos indesejáveis mais frequentes são: cansaço, perda de apetite e dificuldade para ingerir os alimentos e a reação na pele (coceira, vermelhidão, irritação, ficar queimada ou bronzeada, seca e escamosa).

1.2.4 Quimioterápico

A quimioterapia é realizada com a aplicação de um ou mais quimioterápicos. A monoquimioterapia (uso de um fármaco) mostrou-se ineficaz na indução de respostas completas ou parciais significativas, na maioria dos tumores, sendo atualmente de uso muito restrito. A poliquimioterapia (associação de mais de um fármaco) é de eficácia comprovada e tem como objetivos atingir massas celulares em diferentes fases do ciclo celular, utilizar a ação sinérgica dos fármacos, diminuir o desenvolvimento de resistência aos fármacos e promover maior resposta por dose administrada.

Pode ser um tratamento único ou associado à cirurgia e/ou radioterapia. De acordo com as suas finalidades, é classificada em: curativa – quando é usada com o objetivo de se conseguir o controle completo do tumor; adjuvante – pós-operatório, tendo por objetivo eliminar células residuais locais ou circulantes e diminuir a incidência de metástases; neoadjuvante ou prévia - quando indicada para se obter a redução parcial do tumor, visando permitir uma complementação terapêutica com a cirurgia e/ou radioterapia; paliativa - usada com a finalidade de melhorar a qualidade da sobrevivência do paciente.

A administração é feita por profissionais especializados e é realizada pelas seguintes vias: via oral, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intracranial e tópica.

Nessa terapia, os efeitos colaterais são intensos e variados, tais como: fraqueza, diarreia, perda de peso, aumento de peso, feridas na boca, queda de cabelos e outros pêlos do corpo, enjoo, vômitos e tonturas.

1.3 Química Inorgânica no Tratamento do Câncer

A cisplatina representa um dos mais marcantes avanços no tratamento de vários tipos de câncer com alta incidência na sociedade. Em 1971, iniciou-se os testes clínicos de fase I e desde a sua aprovação pela *FDA (U.S Food and Drug Administration)* em 1978, tem sido amplamente utilizada para o tratamento de uma variedade de tumores sólidos e hematológicos (Shermann e Lippard).

Estudos sobre seu mecanismo de ação apontam que, ocorre uma ligação covalente com o DNA, formando adutos intra ou interfitas, que interferem nos processos de transcrição e replicação celular, e assim leva a apoptose (Kelland, 2007).

O seu efeito poderia ser significativamente aumentado com o escalonamento da dose (Cvitkovic, 1998) (Hanigan e Devarajan), no entanto, existem problemas associados ao seu uso, pois caracteriza-se por possuir baixo índice terapêutico e elevado potencial tóxico, sendo que dentre os efeitos adversos, a nefrotoxicidade constitui a maior causa da morbidade e de mortalidade (Cvitkovic, 1998) (Faurkov e Bjerregaard) (Kintzel, 2001) (Lee *et al.*, 2001).

Utilizando a suposição de que a atividade antiproliferativa requer um complexo de labilidade química intermediária, a química de coordenação pode ajudar a postular os sistemas que possuem boas possibilidades de sucesso, podendo assim, se estudar complexos relativamente simples dos metais de transição que possuam as principais propriedades cinéticas e termodinâmicas da cisplatina (Dreher, 2004) (Golfeto, 2008), ou que sejam adequadas para serem utilizadas como quimioterápicos.

1.4 Metais de transição: Mn, Co e Zn

Segundo Roat-Malone (2002), determinados metais de transição participam de algumas reações no sistema biológico, sendo fundamentais para o organismo e fazendo parte de várias metaloenzimas. Metais como manganês e cobalto são considerados elementos micro traços, enquanto o zinco é classificado como um elemento traço no corpo humano.

Manganês possui número atômico 25, massa molar de $54,95 \text{ g mol}^{-1}$, é um elemento químico simbolizado por Mn. Sua química é notável por ser um elemento que apresenta 11 estados de oxidação (alguns bastante incomuns), de -3 até +7, o +2 é o mais estável. É o terceiro metal de transição mais importante em nossa dieta (após o ferro e o zinco). Em média, um ser humano adulto contém 10 mg (Rocha e Afonso, 2012).

Cobalto é considerado um metal de transição, apresenta número atômico 27, massa molar $58,933 \text{ g mol}^{-1}$ e é simbolizado por Co. Os estados de oxidação mais frequentes são +2 e +3, alguns complexos importantes apresentam o estado de oxidação +1 e o menos comum é o +4. Os seres humanos apresentam uma grande dependência por íons Co^{+3} , uma vez que a vitamina B12 apresenta esse íon no centro de sua estrutura e esta participa de alguns processos bioquímicos importantes, tais como: a síntese de aminoácidos e ácidos nucleicos e a formação de eritrócitos (Medeiros, 2013).

Zinco é um metal, simbolizado por Zn, possui número atômico 30, massa molar $65,392 \text{ g mol}^{-1}$. Apresenta estados de oxidação +2,+1 e 0, sendo que +2 é o mais frequente. Biologicamente, é um dos metais mais importantes que há, sendo necessário para quase todas as formas de vida. Em todo corpo humano adulto, estão distribuídos cerca de apenas 2g, presentes em diversas enzimas. Além de estar presente em várias enzimas é importante para o bom funcionamento do sistema imunológico (Medeiros, 2012).

Os metais citados anteriormente são considerados essenciais para o organismo, porém em quantidades adequadas. Como qualquer substância, o efeito prejudicial é dependente da dosagem. Na **Figura 1**, é possível verificar que existe uma faixa de concentração ideal, já que baixas e elevadas concentrações podem ser prejudiciais ao organismo. Contudo, estes fatos mostram que a utilização de metais no desenvolvimento de fármacos é possível, desde que esteja na dosagem ideal, podendo assim evitar quaisquer consequências indesejadas.

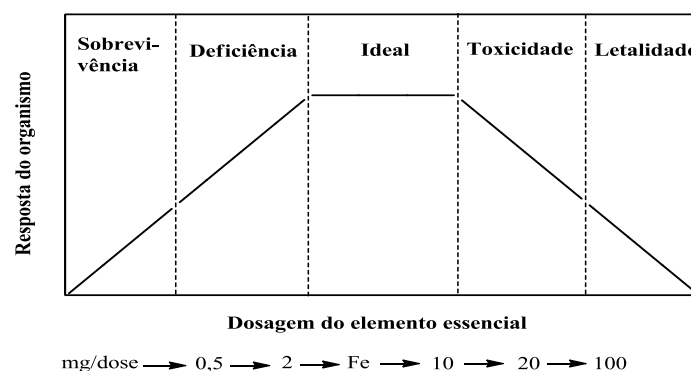
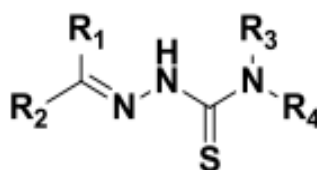


Figura 1. Dosagem (mg/dose) de um elemento essencial (Fe) pela resposta do organismo (Adaptado de Roat-Malone, 2002).

1.5 Tiossemicarbazonas como ligante

Tiossemicarbazonas (TSCs) (**Figura 2**) e seus complexos metálicos constituem uma classe importante e estão cada vez mais sendo estudados devido a uma série de aplicações farmacológicas já descritas na literatura, tais como: atividade antiviral (Pelosi *et al.*, 2010); atividade antibacteriana (Maia *et al.*, 2009) e atividade antiproliferativa (Stefani *et al.*, 2011).



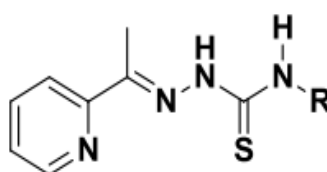
Fonte: (Oliveira, 2013)

Figura 2. Fórmula geral das Tiossemicarbazonas

Elas formam quelatos com diferentes íons metálicos, incluindo Mn, Co e Zn, resultando em complexos biologicamente ativos e suas propriedades biológicas são normalmente aumentadas após a complexação (Zhao *et al.*, 2012).

As características dos complexos são geralmente dependentes dos ligantes coordenados, que variam conforme os substituintes presentes nos mesmos. Por isso, os ligantes devem ser eficientes e flexíveis para que assim possam ser modificados em determinadas partes da sua estrutura, de preferência, na sua periferia.

Neste trabalho, foram feitas alterações nos grupos ligados ao nitrogênio N4 das TSCs, por grupos -hidrogênio, -metil, -etil, -fenil e -ciclohexil (**Figura 3**), para proporcionar um estudo estrutural sistemático de uma série de complexos.



Hatc-R

Fonte: (Oliveira, 2013)

Figura 3. Tiossemicarbazonas derivadas da 2-acetilpiridina utilizadas nesse trabalho, onde R = -hidrogênio, -metil, -etil, -fenil e -ciclohexil.

1.6 Métodos Alternativos *in vitro* e *in vivo* de *screening*

Visando a segurança toxicológica e a busca de novas moléculas na terapia de diversas doenças, métodos alternativos *in vitro* e *in vivo* estão cada vez mais sendo utilizados como *screening*. São ensaios relativamente econômicos, rápidos e que permitem uma correlação com os ensaios *in vivo* de modelos convencionais, além de reduzir o uso de animais em experimentos, evitando questões éticas e morais.

1.6.1 Teórico e Experimental

1.6.1.1 *In silico*

Métodos *in silico* são simulações computacionais que permitem previsões. Utiliza as informações já disponíveis em bancos de dados públicos ou privados. Existem dois tipos: o Docking – afinidade pelo alvo e o QSAR – que estuda a relação estrutura-atividade (Ambure e Roy, 2014).

1.6.2 *In vitro*

1.6.2.1 Células

A cultura de células *in vitro* permite estudar o crescimento, diferenciação e morte celular, além de possibilitar manipulações genéticas necessárias ao perfeito conhecimento da estrutura e funções dos genes (Alberts *et al.*, 2010). Com o aperfeiçoamento da cultura de células foi possível selecionar linhagens celulares oriundas de tumores humanos que viabilizaram o desenvolvimento da metodologia para triagem *in vitro* (ATCC, 2015).

Estudos *in vitro* realizados para pesquisa da transformação celular induzida por carcinógenos químicos podem auxiliar no esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos neste processo, além de serem aplicáveis ao desenvolvimento de estratégias quimiopreventivas ou quimioterapêuticas para o uso humano (Zhu e Gooderham, 2002).

Células primárias possuem as características do tecido de origem e podem crescer em cultura por um determinado período de tempo (Guimarães *et al.*, 2010). Células contínuas à medida que a cultura é repicada, as células com uma maior capacidade de proliferação irão predominar na garrafa de cultivo em detrimento das células que não se adaptaram bem ao cultivo. É muito utilizada em pesquisa, pois pode ser mantida em cultura por um grande período de tempo (quando comparado com as células primárias), guardam grande parte das características do tecido original e possuem alta capacidade de proliferação. Um exemplo destas células é a linhagem HeLa, cultivada em 1951 por George Gey (Guimarães *et al.*, 2010). Células transformadas, são linhagens que tiveram suas características genéticas modificadas, deixaram de ser semelhantes morfológica e geneticamente ao tecido original. Tais células podem ser transformadas em cultura utilizando-se substâncias químicas, vírus ou agentes físicos como a luz ultravioleta. No caso, a linhagem VERO oriunda de um tecido normal - rim de macaco-verde (*Cercopithecus aethiops*) é uma linhagem transformada por vírus, sendo um excelente modelo e utilizada amplamente na produção de vacinas (Sheets, 2000).

1.6.2.2 Bactérias

O teste para a avaliação da mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (*Salmonella enterica* serovar *typhimurium*), também conhecido como Teste de Ames é um método que emprega linhagens de *S. typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (His-), apresentando diferentes mutações no operon deste aminoácido, sendo desenvolvidas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) ou substituições de bases no DNA (Maron e Ames, 1983) (Mortelmans e Zeiger, 2000).

Essas linhagens são incapazes de sintetizar o aminoácido histidina (histidina dependentes) e, portanto, são incapazes de crescer e formar colônias na sua ausência. Novas mutações no local dessas mutações pré-existentes, ou nas proximidades dos genes, podem restaurar a função do gene e permitir que as células sintetizem histidina. Estas células recém-mutadas podem crescer na ausência de histidina e formar colônias. Por esta razão, o teste é muitas vezes referido como um "ensaio de reversão". O número de revertentes é facilmente medido pela contagem de uma população de bactérias à amostra a ser testada (Mortelmans e Zeiger, 2000) (Zeiger, 2001).

As linhagens bacterianas não apresentam enzimas de metabolização, o que impossibilita sua capacidade para identificação de agentes mutagênicos de ação indireta. Para superar essa dificuldade, adiciona-se às culturas durante os ensaios a chamada fração S9, que contém enzimas de metabolização de xenobióticos e é obtida a partir do fígado de ratos (Maron e Ames, 1983). Todas essas características conferem ao Teste de Ames uma grande capacidade de identificação e caracterização de diferentes agentes mutagênicos, com grande eficiência e sensibilidade (Santos *et al.*, 2006).

1.6.3 *In vivo*

1.6.3.1 Zebrafish

O Zebrafish é um pequeno peixe que se apresenta na fase de larva com 1-4 milímetros de comprimento ou adulta com 3 centímetros de comprimento. Alguns órgãos e tecidos demonstram semelhança aos de mamíferos, anatomicamente, fisiologicamente e em níveis moleculares.

Devido a uma série de vantagens está cada vez mais sendo estudado, pois auxilia em diversas pesquisas como no tratamento de infecções causadas por diversos micro-organismos patogênicos (van der Sar *et al.*, 2004), na infecção de eucariotos (Brothers e Wheeler, 2012), na imunologia (Shan *et al.*, 2015), em análises genéticas (Kim *et al.*, 2015). E, em ensaios de toxicidade, permitindo analisar novas substâncias pela exposição da larva. E assim, vários tempos de estudos são possíveis, pois sobrevivem durante 7 dias em placas de microdiluição de 96 poços (McGrath e Li, 2008).

1.6.3.2 *Galleria mellonella*

Galleria mellonella, é classificada como um inseto, sua manipulação e armazenamento são fáceis. É utilizada em pesquisas na fase larval tendo de 2-3 centímetros de comprimento. Este invertebrado tem um sistema imune funcionalmente semelhante ao sistema imune inato dos mamíferos. Assim, permite o estudo de patogenicidade e virulência de diversos patógenos humanos e são susceptíveis a uma ampla variedade desses micro-organismos, aplicando-se na descoberta de novas moléculas antifúngicas (Fuchs *et al.*, 2010). Em análises toxicológicas, uma grande

variedade de fármacos e compostos podem ser estudados, o teste é simples e rápido (durante 7 dias), a administração dos compostos é feita na última pró-pata da larva e diariamente as larvas são inspecionadas, observando sua mobilidade e a melanização (Desbois e Coote, 2012).

1.6.3.3 *Caenorhabditis elegans*

O nematódeo *Caenorhabditis elegans*, mede cerca de 1 milímetro, está sendo estudado na identificação de novos agentes antifúngicos especialmente aqueles que podem exercer sua atividade nas respostas imune do hospedeiro. É um ensaio barato, fácil, utilizado como uma ferramenta na triagem de novos compostos (Anastassopoulou, Fuchs e Mylonakis, 2011).

1.6.3.4 *Drosophila melanogaster*

Drosófilas são insetos dípteros, com duas mil espécies descritas no gênero. A *Drosophila melanogaster* está entre os primeiros organismos utilizados em análise genética, e hoje, é um dos organismos eucariotos mais conhecidos geneticamente. Seu cultivo é de baixo custo, requer poucos equipamentos para a sua manipulação, é de fácil crescimento (tempo de geração de 10 dias) e sua morfologia é de fácil identificação (Ferreira e Allard, 2015).

1.6.3.5 *Artemia salina* L.

A espécie *Artemia salina* L., pertence à família Artemiidae, é classificada como um microcrústaceo e é popularmente conhecida como camarão de água salgada. É um invertebrado da fauna dos ecossistemas aquáticos e marinhos (Sánchez-Fortún, Sanz-Barrera e Barahona-Gomariz, 1995). Seu ciclo de vida é de 20-21 dias como mostrado na **Figura 4**. O cultivo, a manutenção, a manipulação e o ensaio são simples, barato e fácil sendo utilizada no *screening* de novas substâncias entre outros estudos. O ensaio é realizado em laboratório a fim de determinar a toxicidade por meio da estimativa da concentração letal média (CL₅₀) (Meyer *et al.*, 1982). Este método é uma ferramenta útil para a avaliação preliminar da toxicidade de novos compostos (Solis *et al.*, 1993).

Permitindo uma futura correlação com outros testes *in vivo* e um direcionamento de possíveis atividades biológicas. Em nosso estudo, esse foi o modelo escolhido.

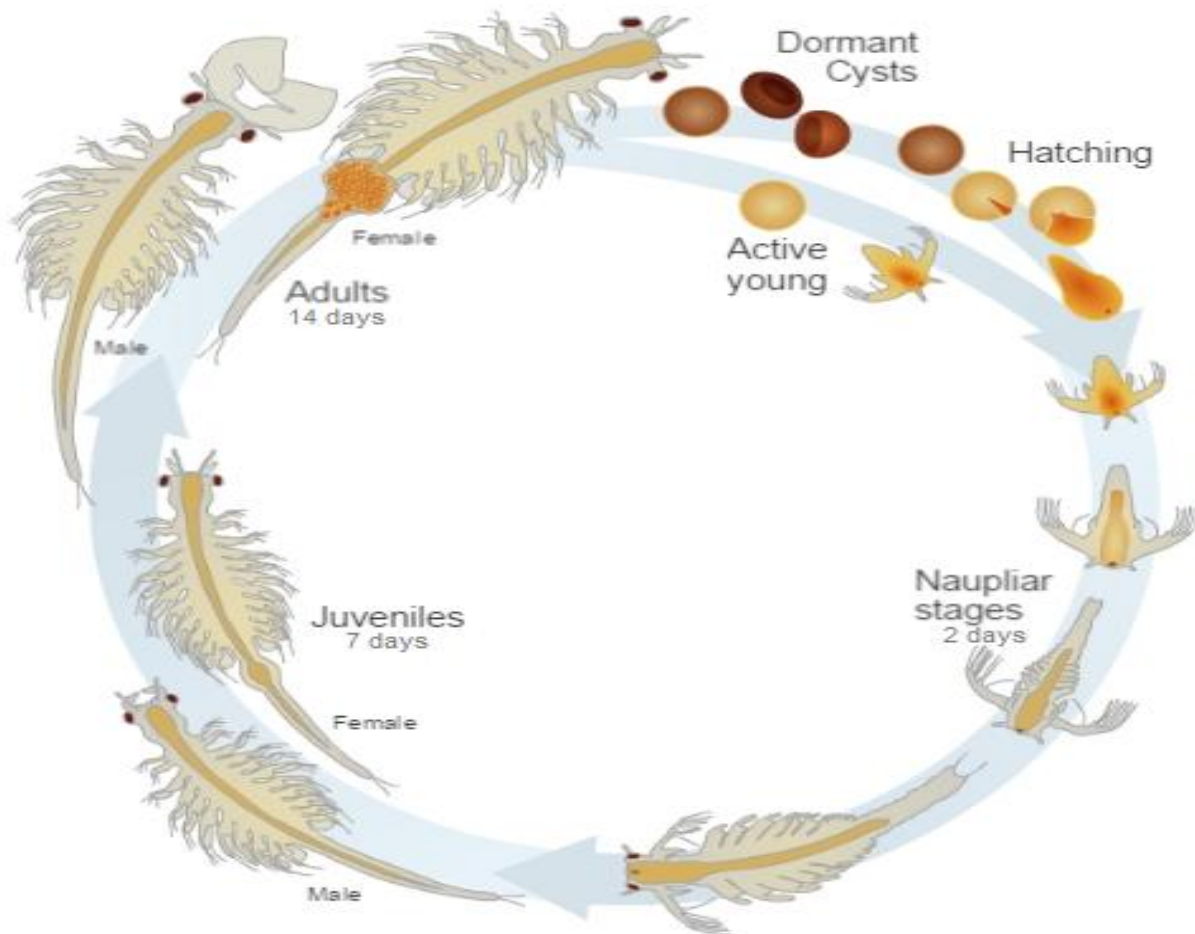


Figura 4. Ciclo de vida da *Artemia salina* L.

Adaptado de Genetic Science Learning Center (<http://learn.genetics.utah.edu/content/gsl/artemia>)

1.6.4 Ensaios *in vivo* de modelos convencionais

Os ensaios *in vivo* estão cada vez mais sendo criticados, devido ao grande número de animais usados nas pesquisas e do sofrimento causado aos mesmos por determinados ensaios. Visando o bem estar animal antes e durante os experimentos e a redução do uso dos mesmos, indústria, órgãos de fomento, órgãos governamentais estão sob crescente pressão para que ocorra substituição dos ensaios *in vivo* por métodos alternativos. Porém, o uso de animais nos experimentos é um assunto amplamente discutido (Bednarczuk *et al.*, 2010).

Diante deste cenário e de vários fatores que podem influenciar nos experimentos como: idade, peso corpóreo, temperatura, fatores genéticos, estados nutricionais e

patológicos, concentração da amostra testada. Os ensaios *in vivo* ainda não podem ser completamente substituídos (Cazarin, Corrêa e Zambrone, 2004). No entanto, os ensaios *in vivo* devem respeitar o programa 3R's, descrito na tabela abaixo:

Ações e metas fundamentais para o cumprimento dos objetivos do programa 3R's.

Reduction	Refinement	Replacement
<ul style="list-style-type: none"> -Desenvolver novos protocolos com a utilização de menor número de animais por experimento. -Evitar a replicação dos estudos conduzidos <i>in vivo</i>. -Priorizar estudos com relevância e que possam ser extrapolados para espécie humana. -Desenvolver novas metodologias e modelos de triagem. -Aperfeiçoar a qualidade técnica dos ensaios. -Diminuir o número de animais em testes retirando do ensaio o maior número de informações possíveis. 	<ul style="list-style-type: none"> -Valorizar os avanços científicos empregando as novas metodologias. -Preocupar-se com o bem estar dos animais, reduzindo o sofrimento dos mesmos. 	<ul style="list-style-type: none"> -Desenvolver novas metodologias que possam substituir os <i>ensaios in vivo</i>. -Métodos <i>in vitro</i> e alternativos, assim como aqueles que se utilizam de células humanas devem ser priorizados.

Fonte: (Cazarin, Corrêa e Zambrone, 2004)

Dessa maneira, em nossos estudos o uso dos 3R's é priorizado. Como descrito acima, na fase de *screening* utilizamos linhagens celulares humanas normais e tumorais, um procarioto - a *Salmonella typhimurium* nos ensaios *in vitro* e adotamos um método alternativo *in vivo*, a *Artemia salina* L. e nos ensaios *in vivo* com camundongos procuramos reduzir o número de animais e enfatizamos o seu bem-estar.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro*, o perfil mutagênico, a toxicidade aguda pelo método alternativo – *Artemia salina* L. e em camundongos BALB/c e a biodisponibilidade oral *in vivo* de compostos de coordenação (Mn, Co e Zn).

2.2 Específicos

- Determinar a atividade antiproliferativa dos compostos de coordenação por meio de testes de citotoxicidade nas linhagens celulares HepG2, HeLa, MDA-MB-231, K-562, DU 145 e MRC-5.
- Avaliar o perfil mutagênico de três complexos de manganês pelo teste de Ames em cepas TA98, TA100, TA102 e TA97a de *Salmonella typhimurium*.
- Avaliar a toxicidade aguda dos compostos de coordenação utilizando o método alternativo *in vivo*, *Artemia salina* L.
- Avaliar a toxicidade aguda e parâmetros bioquímicos (enzimas AST e ALT) dos compostos de coordenação *in vivo* em camundongos BALB/c.
- Avaliar a biodisponibilidade oral *in vivo* dos compostos de coordenação em camundongos BALB/c por quantificação via ICP-OES.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Complexos

Os compostos de coordenação (**Tabelas 1-4**) foram sintetizados e caracterizados pela aluna de pós-graduação Carolina Gonçalves Oliveira sob a orientação do Prof. Dr. Victor Marcelo Deflon, do Departamento de Química da Universidade de São Paulo – USP/ São Carlos.

As soluções foram preparadas em diferentes concentrações conforme preconizadas e descritas nas metodologias a seguir, onde, nos testes de citotoxicidade foi de 10 mg/mL, nos ensaios de toxicidade aguda com *Artemia salina* L foi de 15 mg/mL. E para os ensaios com os camundongos BALB/c na toxicidade aguda foi de 1.000 mg/Kg peso de corpóreo e, quando preciso, essa concentração foi diminuída e na biodisponibilidade oral foi de 300 mg/Kg peso de corpóreo.

Tabela 1. Complexos de Manganês (II) (siglas, fórmulas e estruturas)

Siglas	Fórmulas	Estruturas	Siglas	Fórmulas	Estruturas
Mn	$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		3Mn	$[\text{Mn}(\text{atc-Me})_2]$	
1Mn	$[\text{Mn}(\text{atc})_2]$		4Mn	$[\text{Mn}(\text{atc-Ch})_2]$	
2Mn	$[\text{Mn}(\text{atc-Et})_2]$		5Mn	$[\text{Mn}(\text{atc-Ph})_2]$	

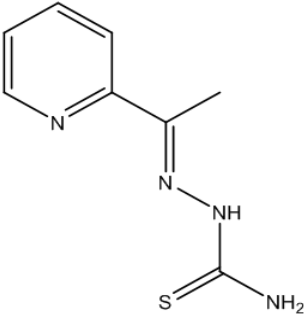
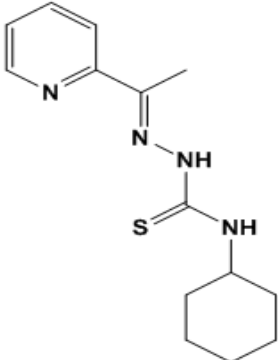
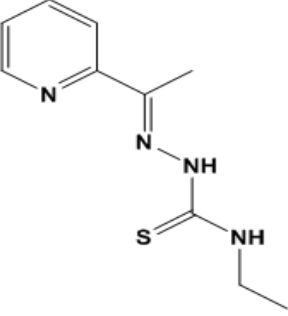
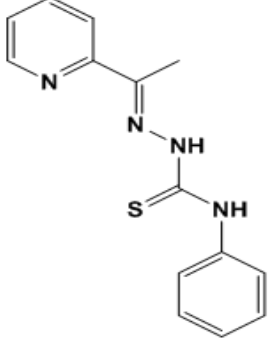
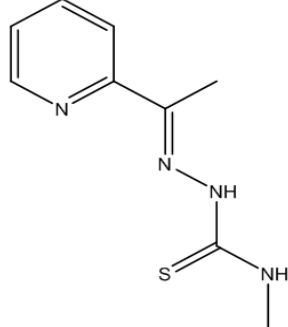
Tabela 2. Precursor $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e Complexos de Cobalto (III) (siglas, fórmulas e estruturas)

Siglas	Fórmulas	Estruturas	Siglas	Fórmulas	Estruturas
Co	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		3Co	$[\text{Co}(\text{atc-Me})_2]\text{Cl}$	
1Co	$[\text{Co}(\text{atc})_2]\text{Cl}$		4Co	$[\text{Co}(\text{atc-Ch})_2]\text{Cl}$	
2Co	$[\text{Co}(\text{atc-Et})_2]\text{Cl}$		5Co	$[\text{Co}(\text{atc-Ph})_2]\text{Cl}$	

Tabela 3. Complexos de Zinco (siglas, fórmulas e estruturas)

Siglas	Fórmulas	Estruturas	Siglas	Fórmulas	Estruturas
Zn	ZnCl_2		2Zn	$[\text{Zn}(\text{atc-Ph})_2]$	
1Zn	$[\text{Zn}(\text{atc-Et})_2]$				

Tabela 4. Ligantes (fórmulas/siglas e estruturas)

Fórmulas/Siglas	Estruturas	Fórmulas/Siglas	Estruturas
Hatc		Hatc-Ch	
Hatc-Et		Hatc-Ph	
Hatc-Me			

3.2 Fármaco de Referência

A cisplatina (Sigma-Aldrich) (**Tabela 5**) foi utilizada como fármaco referência em todos os ensaios e as concentrações foram às mesmas utilizadas para os complexos, conforme descritas no item anterior.

Tabela 5. Cisplatina (sigla, fórmula e estrutura)

Sigla	Fórmula	Estrutura
Cis	$[Pt(NH_3)_2Cl_2]$	<p>The structure shows a central Pt atom with four bonds. Two bonds go to Cl atoms (top-left and top-right), and two bonds go to NH₃ groups (bottom-left and bottom-right). The Cl and NH₃ groups are on the same side of the Pt atom, representing the cis isomer.</p>

3.3 Solventes

DMSO (Sigma-Aldrich) a 5% e 2%, foi utilizado como solvente para os complexos de manganês, cobalto, zinco e para os ligantes nos ensaios de citotoxicidade nas linhagens celulares e nos testes com a *Artemia salina L.*, respectivamente, exceto os complexos 2Co e 5Co e os precursores Mn, Co e Zn, os quais foram solubilizados em água destilada estéril. Sendo que, em todos os experimentos realizados foi feito um controle do solvente DMSO.

Nos ensaios com os camundongos BALB/c tanto na toxicidade aguda quanto na biodisponibilidade oral o solvente utilizado foi o óleo de girassol (OG), onde os complexos foram solubilizados utilizando um volume final de 0,6 mL e também foi realizado um controle do mesmo.

Para a quantificação via ICP-OES foi utilizado o tensoativo Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e o solvente ácido nítrico (HNO₃) (Merck).

3.4 Solução Reveladora

No ensaio de Citotoxicidade (IC₅₀), foi utilizado como substância reveladora a Resazurina (Sigma-Aldrich) na concentração de 0,01% em água destilada estéril, que possui potencial REDOX (Óxido-Redução), com mudança colorimétrica e um indicador de fluorescência em resposta ao metabolismo celular.

3.5 Linhagens Celulares

Foram utilizadas cinco linhagens celulares neoplásicas e uma linhagem celular normal que foram mantidas congeladas à -70 °C até o momento de uso:

- HepG2 (ATCC HB-8065), carcinoma hepatocelular humano;
- HeLa (ATCC CCI-2), adenocarcinoma cervical humano;
- MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), adenocarcinoma mamário humano;
- K-562 (ATCC CCL-243), leucemia mielóide crônica (LMC);
- DU 145 (ATCC HTB-81), carcinoma de próstata.
- MRC-5 (ATCC CCL-171), fibroblasto normal de pulmão humano. Gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara– UNESP do Departamento de Ciências Biológicas.

3.6 *Artemia salina* L.

Os cistos de *Artemia salina* L. foram adquiridos do Rio Grande do Norte – Natal pelo produtor Flagner Soares de Souza. Os cistos são selecionados e embalados a vácuo, tendo a embalagem um peso líquido de 500 g (total de cistos por grama 280.000) e a mesma é mantida a uma temperatura de 8 a 10 °C para a conservação dos cistos.

3.7 Animais

Para o ensaio de biodisponibilidade oral foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, com idade de 4-8 semanas, com peso médio de 15-20 gramas, procedentes do CEMIB/UNICAMP (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório - CEMIB). O experimento teve aprovação prévia do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP (Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 08/2014).

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado dois meses após o ensaio de biodisponibilidade oral, pois foram utilizados os mesmos camundongos, no entanto, com idade entre 16-20 semanas e peso médio de 24-26 gramas. O manuseio dos animais teve

aprovação prévia Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP, conforme Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 07/2014).

3.8 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

3.8.1 Linhagens celulares aderentes HepG2, HeLa, MDA-MB-231, DU 145 e MRC-5

As células foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ em garrafas com uma área de superfície de 75 cm², em 10 mL de DMEM (Vitrocell®, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L).

Esta técnica consistiu em recolher as células utilizando uma solução de tripsina/EDTA (Vitrocell®), centrifugação (252 g por 5 minutos), e contagem do número de células em câmara New Bauer, utilizando a solução azul de trypan a 0,4% (Sigma-Aldrich), que cora as células não viáveis, em seguida, ajusta-se a concentração para 7,5x10⁴ células/mL em DMEM. Em seguida, 200 µL da suspensão foram depositadas em cada poço de uma microplaca de 96 poços obtendo uma concentração celular de 1,5x10⁴ células/poço e incubou-se a 37 °C numa atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 horas para permitir a aderência celular (O'Brien *et al.*, 2000). As diluições dos complexos foram preparadas para se obter concentrações de 500-1,95 µg/mL e incubadas por mais 24 horas. Retirou-se todo o meio de cultura e adicionou 30 µL de resazurina (**item 3.4**) e após 2 horas de incubação a fluorescência foi detectada. A leitura foi realizada no leitor Synergy H1 (BioTek®) usando filtros de excitação e de emissão em comprimentos de onda de 530 e 590 nm, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em três ensaios independentes.

3.8.2 Linhagem celular em suspensão K-562

As células foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ em garrafas com uma área de superfície de 75 cm², em 50 mL de RPMI-1640 (Vitrocell®, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de SFB, sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L).

Essa metodologia consiste em centrifugação (252 g por 5 minutos), e contagem do número de células em câmara New Bauer, utilizando a solução azul de trypan a 0,4% (Sigma-Aldrich) que cora as células não viáveis, em seguida, ajusta-se a concentração para 2×10^5 células/mL em RPMI-1640. Em seguida, 100 μ L de suspensão foram depositadas em cada poço de uma microplaca de 96 poços obtendo uma concentração celular de 2×10^6 células/poço (Akhtar *et al.*, 2013). As diluições dos compostos de ensaio foram preparadas para se obter concentrações de 500-1,95 μ g/mL e incubadas por mais 24 horas. Adicionou-se 30 μ L de resazurina (**item 3.4**) e após 5 horas de incubação a fluorescência foi detectada. A leitura foi realizada no leitor Synergy H1 (BioTek®) usando filtros de excitação e de emissão em comprimentos de onda de 530 e 590 nm, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em três ensaios independentes.

A citotoxicidade celular foi determinada pelo IC₅₀ (*inhibitory concentration*) que de acordo com *US Food and Administration* (FDA) representa a concentração requerida do fármaco capaz de inibir 50% do crescimento celular. Portanto, quando determinamos a citotoxicidade de linhagens celulares normais definimos o IC₅₀ como a maior concentração do composto capaz de viabilizar 50% das células e já para as linhagens celulares tumorais definimos como a menor concentração do composto capaz de inviabilizar 50% das células.

A porcentagem de viabilidade celular foi determinada aplicando-se a fórmula a seguir, considerando **a** igual à média da leitura dos orifícios controle positivo (orifícios apenas com células e meio de cultura) e **b** o resultado de cada orifício com a respectiva diluição do composto analisado.

$$\frac{(100 \times b)}{a} = \% \text{ de Viabilidade Celular}$$

3.9 Determinação do Índice de Seletividade (IS)

O índice de seletividade dos complexos foi calculado a partir da razão dos valores de IC₅₀ encontrado para células sadias MRC-5 sobre o IC₅₀ das células tumorais. Quanto maior o valor de IS, o agente analisado é mais ativo contra a célula tumoral e menos

citotóxico para a célula normal do hospedeiro. É considerado um valor promissor, substâncias com $IS > 3$ (Chelopo *et al.*, 2013).

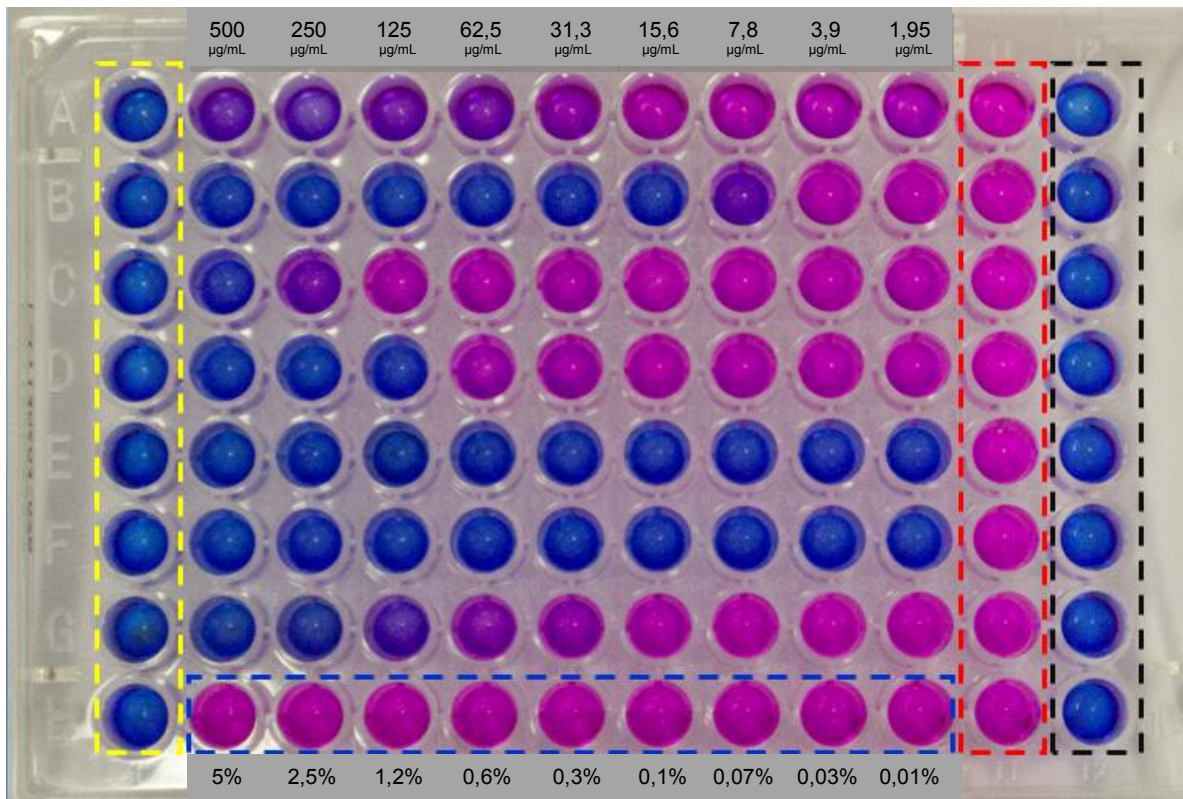


Figura 5. Representação Esquemática da microplaca no ensaio de citotoxicidade

- Controle positivo (meio de cultura + células)
- Controle Negativo (meio de cultura)
- Controle de esterilidade do complexo (meio de cultura + complexo)
- Controle do solvente (meio de cultura + DMSO)

3.10 Atividade mutagênica pelo teste de Ames em cepas TA98, TA100, TA102 e TA97a de *Salmonella typhimurium*.

O teste de Ames foi realizado em colaboração com o Laboratório de Mutagênese da Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda e desenvolvido juntamente com o aluno de graduação e pós-graduação Rone Aparecido De Grandis.

De acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983), o teste foi realizado com cinco diferentes concentrações dos complexos 3Mn, 4Mn e 5Mn dissolvidos em DMSO. As concentrações variaram de 3,12 – 50µg por placa. Essas concentrações foram selecionadas com base em testes preliminares de toxicidade.

Foram adicionados às concentrações dos complexos, 0,5 mL de tampão fosfato 0,2M ou 0,5 mL da mistura S9 e 0,1 mL de cultura de bactérias, e então incubados a 37 °C por 20-30 minutos. Em seguida, foram adicionados à mistura 2 mL de *top ágar* (Oxoid™) suplementado com traços de histidina e biotina (Sigma-Aldrich). Homogeneizou-se levemente e plaqueou-se em meio mínimo glicosado. Após solidificação do *top ágar*, as placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. E após esse período, as colônias revertentes foram contadas com o auxílio do contador de colônias Synbiosis ProtoCOL. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.10.1 Preparo da mistura S9

Para realização dos experimentos com ativação metabólica, foi utilizada a fração microsomal S9 homogeneizada de fígado de rato *Sprague Dawley* (fração pós-mitocondrial, suplementada com co-fatores (sais de magnésio e potássio), preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas, Aroclor 1254-500 mg/Kg), comercialmente obtida pela Molecular Toxicology, Inc., USA. A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. O sistema de ativação metabólica consistiu de 4% de fração S9, 1% de 0,4M de cloreto de magnésio, 1% de 1,65M de cloreto de potássio, 0,5% de 1M de glicose-6-fosfato e 4% de 0,1M de b-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato 0,1M, além de 50% de 0,2M de tampão fosfato pH 7,4 e 39,5% de água MilliQ estéril (Maron e Ames, 1983). Essa mistura foi mantida em banho de gelo durante todo o ensaio. Todas as soluções foram recém-preparadas e utilizadas num período máximo de 3 horas.

3.10.2 Controles

O controle negativo foi realizado com DMSO, o solvente dos complexos. Para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa foram utilizados como controles positivos, em ensaios sem ativação metabólica, o 4-nitrofenilenodiamina (NPD) (10 µg/placa) para as cepas TA98 e TA97a, azida sódica (1,25 µg/placa) para a cepa TA100 e mitomicina C (0,5 µg/placa) para a cepa TA102. Em ensaios com ativação metabólica, foram usados 2-aminoantraceno (1,25 µg/placa) para todas as cepas.

3.10.3 Análise dos resultados

Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (*U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA*), adotando o modelo de (Bernstein *et al.*, 1982). Os dados (revertentes/placa) foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguido de uma regressão linear. O índice de mutagenicidade (IM) também foi calculado para cada concentração testada, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{número de revertentes por placa (composto-teste)}}{\text{número de revertentes por placa (controle negativo)}}$$

A amostra foi considerada mutagênica quando houve uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos e/ou quando o IM foi maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas (Mortelmans e Zeiger, 2000).

3.11 Avaliação da toxicidade dos compostos de coordenação frente à *Artemia salina* L.

De acordo com Logarto Parra *et al.* (2001) para determinar a toxicidade dos complexos metálicos 25 mg de cistos de *Artemia salina* L. foram incubados em um béquer (2.000 mL) com água salgada artificial a temperatura de 20 a 30 °C. A água salina artificial consistiu de 23 g NaCl, 11 g MgCl₂·6H₂O, 4 g Na₂SO₄, 1,3 g CaCl₂·H₂O, 0,7 g KCl e foram dissolvidos em 1.000 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 9,0 usando NaOH 5N para evitar o risco de morte da *Artemia larvae* (náuplios) por diminuição do pH durante a incubação.

Após 24 horas, 0,6 g de *Saccharomyces cerevisiae* para cada litro de água salgada foi adicionado ao béquer, de modo a alimentar os náuplios; 48 horas após os cistos serem incubados, os náuplios foram extraídos para o experimento. Uma suspensão de náuplios (10-15 organismos), num volume de 120 µL, foi adicionada a cada poço da microplaca de 96 orifícios, incluindo o grupo controle. Em uma microplaca de 96 orifícios separada, realizou-se a diluição seriada dos compostos, os mesmos foram transferidos para a microplaca de náuplios obtendo as concentrações finais de 1.500-5,85 µg/mL e 2%

DMSO. Após 24 horas de incubação, a placa foi então examinada sob uma lupa binocular (x3,0) e o número de náuplios vivos em cada poço foi contado e a concentração letal mediana (CL₅₀) foi calculada.

De acordo com FDA, a concentração letal mediana (CL₅₀) é definida como: concentração do material que os organismos são expostos que é estimado ser letal para 50% dos organismos testados. A CL₅₀ é geralmente expressa como uma variável tempo-dependente (por exemplo, 24 horas CL₅₀).

A fórmula a seguir, aplica-se para a determinação da porcentagem de náuplios viáveis, considerando **a** igual à média da leitura dos orifícios controle positivo (orifícios apenas com náuplios e solução salina) e **b** o resultado de cada orifício com a respectiva diluição do complexo analisado. Todos os ensaios de citotoxicidade foram realizados em triplicata biológica.

$$\frac{(100 \times b)}{a} = \% \text{ de Náuplios Viáveis}$$

3.12 Avaliação da toxicidade aguda em camundongos BALB/c

O perfil de segurança dos complexos foi avaliado pelo método clássico do ensaio de toxicidade aguda (DL₅₀) em camundongos BALB/c de acordo com a OECD (*Organization for Economic Cooperation Development*), com modificações (O.E.C.D, 2001) (**item 3.7**).

Cada complexo teve como veículo óleo de girassol, e o mesmo foi utilizado como controle (grupo controle). Os complexos foram administrados em dose única oral (via gavagem) (**Figura 6**) na concentração de 1.000 mg/Kg de peso corpóreo (n = 6 animais/complexo). Quando algum complexo apresentou perda acidental de mais de 50% dos animais; doses de 500, 300 mg/Kg de peso corpóreo foram administradas. Os animais foram monitorados por 14 dias e avaliou-se os parâmetros comportamentais (*screening* hipocrático).

Ao final do experimento os animais foram pesados, o sangue coletado via veia submandibular (**Figura 7**), eutanasiados em câmaras de CO₂ e seus órgãos (coração, pulmão, rins, baço e fígado) retirados cirurgicamente (**Figuras 8 e 9**), pesados e analisados macroscopicamente. A análise estatística foi realizada pelo software

GraphPad Prism Version 5.01, por meio da análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Dunnett's estabelecendo $P < 0,05$ como nível de significância.



Figura 6. Administração via gavage

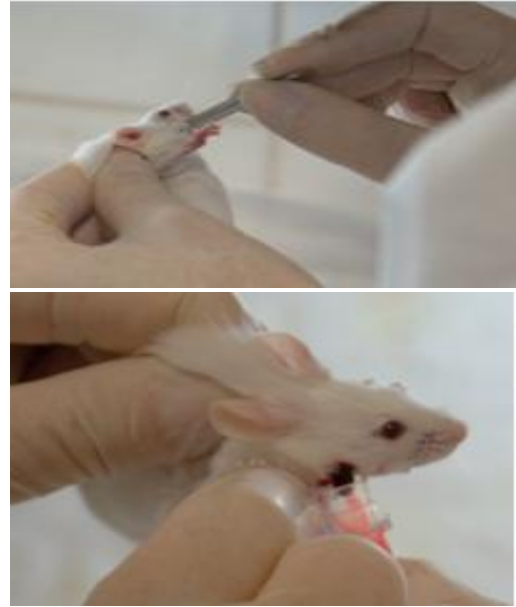


Figura 7. Coleta pela veia submandibular



Figura 8. Retirada dos órgãos após eutanásia

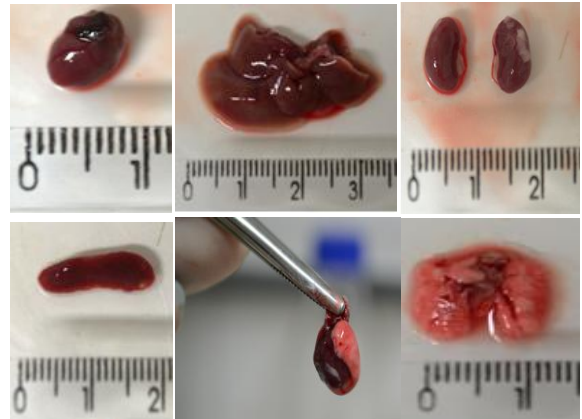


Figura 9. Órgãos dos animais

Fotos: Débora Leite Campos

3.13 Quantificação das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no soro dos camundongos BALB/c

Com o intuito de analisar se houve alguma alteração bioquímica no fígado dos animais foi realizada a quantificação das enzimas AST e a ALT no soro dos camundongos após a administração dos complexos (via gavagem) antes de sacrificá-los como descrito no **item 3.12**. Foi realizada uma coleta de 500 µL de sangue via veia submandibular. As amostras de sangue foram colocadas em tubos coletores, centrifugadas a 1097,6 g por 15 minutos para separar o soro e depois foram armazenadas a -70 °C e analisadas no dia seguinte da coleta.

A quantificação das enzimas foi realizada utilizando os kits bioquímicos da Labtest Diagnóstica SA.

A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism Version 5.01, por meio da análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Dunnett's estabelecendo $P < 0,05$ como nível de significância.

3.14 Avaliação da biodisponibilidade oral *in vivo*

A determinação da biodisponibilidade oral dos complexos foi realizada de acordo com a metodologia sugerida por Gruppo *et al.* (2006). Os animais foram separados em grupos, $n = 2$ animais/complexo e receberam uma dose oral (via gavagem) (**Figura 6**) de cada complexo (300 mg/Kg de peso corpóreo). Cada complexo teve como veículo óleo de girassol, e o mesmo foi utilizado como controle (grupo controle de 2 animais). Nos tempos de 20 minutos, 1, 2 e 4 horas realizou-se a coleta sanguínea via veia submandibular de acordo com Golde, Gollobin e Rodriguez (2005). O plasma foi separado e armazenado a -70°C para a quantificação. O experimento foi realizado em duplicata.

A quantificação foi realizada no Centro de Estudos Ambientais localizado no Campus da Unesp de Rio Claro sob supervisão do Prof. Dr. Amauri Antonio Menegário desenvolvido juntamente com o mestrando Carlos Eduardo Eismann e o pós-doutorando Carlos Alfredo Suárez.

Os íons metálicos (Mn, Co e Zn) foram quantificados usando o Espectrômetro de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) da Thermo Scientific modelo 6300.

As amostras (50 μ L) foram digeridas utilizando uma solução diluente de ácido nítrico a 0,5% (v/v) e Triton X-100 a 0,01% (v/v), resultando em uma diluição de 1:100. Para a calibração, foi utilizada uma solução do padrão multi-elementar nas concentrações de 1, 2,5, 10, 25 e 50 ppb e um branco (solução diluente) e assim, construída uma curva analítica (Batista *et al.*, 2009).

Durante o experimento realizou-se o teste de recuperação de validação do método, o qual obteve-se um resultado de 94-104%.

A determinação do limite de detecção (LD) do método foi feita lendo-se o branco da curva, com dez replicatas, e aplicando-se a equação a seguir:

$$LD = 3 \times (\text{Desvio Padrão do branco})$$

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da citotoxicidade frente às linhagens celulares tumorais HepG2, HeLa, MDA-MB-231, K-562, DU 145 e a linhagem normal MRC-5.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* utilizando cultura de células é uma importante ferramenta para a avaliação de novas moléculas, podem ser utilizados como um método alternativo aos testes farmacológicos (Hamburguer e Hostettmann, 1991) (Cingi *et al.*, 1991). O potencial de citotoxicidade *in vitro* dos compostos é avaliado em linhagens celulares ditas normais, porém são células transformadas/imortalizadas por substâncias químicas, vírus ou agentes físicos e linhagens celulares tumorais, assim tais efeitos são certificados por parâmetros que incluem desde a morte celular até a alteração de seu metabolismo (Keawpradub *et al.*, 1999) (Freshney, 2005).

A busca por novas moléculas que apresentam seletividade entre uma célula normal/sadia e uma célula tumoral é um dos grandes desafios nas pesquisas de medicamentos antineoplásicos (Stefani *et al.*, 2013). Neste trabalho buscamos novos compostos que apresentam $IS > 3$, substâncias que na concentração ativa contra a célula tumoral é 3 vezes menos agressiva para uma célula normal (Chelopo *et al.*, 2013).

Nas tabelas a seguir (**Tabela 6-10**), são apresentados os resultados da atividade biológica dos compostos de coordenação frente às linhagens celulares HepG2, HeLa, MDA-MB-231, K-562, DU 145 e MRC-5.

Como visão geral, temos a seguinte peculiaridade entre os sais precursores, ligantes livres e compostos de coordenação: Os sais precursores e os ligantes livres, interessantemente, mostraram-se mais citotóxico para a linhagem celular normal MRC-5 e menos para todas as tumorais, exceto na célula K-562 o $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ apresentou atividade similar a normal. Em outras palavras, houve a necessidade de uma menor concentração dos sais e dos ligantes para inibir 50% da célula normal e uma maior concentração para atingir o mesmo índice nas tumorais.

Entretanto, quando coordenados aos centros metálicos, todos os complexos mostraram um perfil invertido. Podemos levantar algumas hipóteses a esse fato: 1.) as células tumorais já possuem uma resistência intrínseca impedindo que os sais e os ligantes permeiem a membrana plasmática e atinjam o alvo e quando coordenados, os metais funcionariam como carreadores do ligante livre até o sítio ativo; 2.) as células

tumorais não expressam ou expressam em baixa concentração o alvo dos ligantes livres e quando esse é coordenado seu mecanismo de ação muda completamente.

É descrito que as células naturalmente expressam diferentes proteínas de membrana específicas para o transporte de componentes inorgânicos no interior das células (Paulsen e Saier, 1997).

As proteínas Nramp1 e 2, estão sendo amplamente estudadas em células procariotas e eucariotas e relacionadas com o transporte de íons metálicos como ferro, manganês e cobalto (Forbes e Gros, 2003).

A proteína Nramp2, presente em células eucarióticas apresenta isoformas I e II. O estudo de Picard *et al.* (2000) sugere que a expressão das isoformas pode ser diferente entre as células tumorais e normais, e essa diferença pode contribuir para as diversas respostas intrínsecas observadas nos tratamentos de uma grande variedade de linhagens celulares normais e tumorais com íons e complexos metálicos.

Outro fato que podemos levar em conta é que acisplatina, como discutido, tem como mecanismo de ação a ligação covalente ao DNA da célula o que a caracteriza como pouco seletiva. Quando olhamos para os complexos, vimos que a atividade é dependente de cada tipo celular e de cada complexo. Esse fato nos sugere que o mecanismo de ação é diferente do mecanismo da cisplatina. Fortalecendo essa hipótese, vemos que em algumas situações os complexos foram pouco citotóxicos frente à linhagem normal.

Dentre os complexos de Mn (II) analisados o que contém o ligante Hatc-Et apresentou seletividade para a célula HepG2 (IS 5) e excelente IS (41) para a linhagem celular DU-145 e para a célula DU-145 o complexo 3Mn com o substituinte -metil demonstrou seletividade de 7,5.

Considerando o precursor de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), podemos observar que a atividade biológica diante das linhagens celulares foi igual ao $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Os complexos iônicos de cobalto $[\text{Co}(\text{atc-Et})_2]\text{Cl}$ e $[\text{Co}(\text{atc-Me})_2]\text{Cl}$ contendo os ligantes -etil e -metil, respectivamente, apresentaram os melhores IS para todas as linhagens celulares testadas, exceto para a HeLa.

O precursor ZnCl_2 apresentou baixo IS para as células estudadas da mesma forma que os precursores de manganês e cobalto. Os complexos 2Zn e 5Zn que contêm os substituintes -etil e -fenil na periferia do ligante apresentaram $\text{IS} > 3$ para as linhagens celulares MDA-MB-231 e HepG2, respectivamente.

O ligante Hatc contendo o substituinte -etil apresentou resultados de IS para quase todas as células testadas quando coordenado ao íon Co (III) e já para aos centros

metálicos de manganês e zinco a seletividade foi apenas em duas ou uma linhagem celular, respectivamente.

No que diz respeito ao substituinte -fenil no ligante Hatc os complexos de cobalto demonstraram alta seletividade para todas as linhagens celulares, exceto para HeLa e o complexo de zinco apresentou IS (3,6) apenas para a célula HepG2.

Para os complexos com o substituinte -metil apenas o complexo 3Mn apresentou para a linhagem celular DU-145 ótima seletividade de 7,5.

Estes fatos evidenciam cada vez mais que alterações na estrutura dos ligantes e a presença dos metais (Mn, Co e Zn), podem influenciar na atividade biológica dos complexos (Maia *et al.*, 2009) (Li *et al.*, 2010).

A química inorgânica, nos últimos anos, tem demonstrado sua eficácia no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Os compostos orgânicos usados na medicina podem ser ativados por um íon metálico ou metaloenzimas (Oliveira *et al.*, 2013).

Platts *et al.* (2012) relatam que, os íons metálicos coordenados podem dar origem a um fármaco mais ativo e potente, e por alterar a lipofilicidade do mesmo, facilita sua própria entrada na célula, ou seja, viabiliza o transporte do fármaco, alterando sua via metabólica normal. No entanto, os metais podem desempenhar um papel significativo, como no caso da cisplatina.

Diante dos resultados obtidos observa-se que os complexos metálicos de manganês, cobalto e zinco estudados neste trabalho apresentam IS melhores quando comparados à cisplatina que foi utilizada como fármaco de referência, pois é um exemplo clássico de fármacos à base de metais, sendo um dos medicamentos antineoplásicos mais utilizados na terapia (Favero Caires, 2007). Como é visto, ela apresenta-se citotóxica em todas as linhagens celulares apresentadas, inclusive na linhagem normal MRC-5, apresentando conseqüentemente baixa seletividade entre uma célula normal e uma célula tumoral.

4.2 Atividade mutagênica pelo teste de Ames em cepas TA98, TA100, TA102 e TA97a de *Salmonella typhimurium*.

O teste de Ames com *Salmonella typhimurium* é amplamente aceito pela comunidade científica e pelas agências e corporações governamentais como um ensaio utilizado para identificar substâncias puras, em misturas e em amostras ambientais que

podem produzir danos genéticos que levam a mutações genéticas (Mortelmans & Zeiger, 2000) (Zeiger, 2001).

O complexo 3Mn (**Tabela 11**) apresentou atividade mutagênica em sistemas com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica nas cepas TA98 e TA100; na linhagem TA97a apenas após metabolização e na cepa TA102 não foi identificado aumento no número de revertentes. Desta forma, considera-se um composto capaz de causar mutações diretas e indiretas, do tipo *frameshift* (TA98 e TA97a) e por substituição de bases (TA100).

Conforme mostrado na **Tabela 12**, o complexo 4Mn apresentou atividade mutagênica apenas em sistemas com (+S9) ativação metabólica nas cepas TA98, TA100 e TA97a. Desta forma, considera-se um composto capaz de causar mutações indiretas, do tipo *frameshift* (TA98 e TA97a) e por substituição de bases (TA100).

Na **Tabela 13**, o complexo 5Mn apresentou mutagenicidade apenas em sistemas com (+S9) ativação metabólica nas cepas TA98, TA100 e TA97a. Desta forma, considera-se um composto capaz de causar mutações indiretas, do tipo *frameshift* (TA98 e TA97a) e por substituição de bases (TA100).

Segundo Jennette (1981) íons de manganês em determinadas concentrações apresentam efeitos que podem contribuir para a sua mutagenicidade e carcinogenicidade. Eles podem substituir íons essenciais tais como cálcio, magnésio e zinco; alterar funções enzimáticas e de membrana; ser metabolizados a agentes mais tóxicos e ligar-se a macro ou micromoléculas e alterar sua atividade normal na célula. E interferir na síntese de DNA (Dube e Loeb, 1975).

Gerber, Leonard e Hantson (2002) relatam que o manganês exibe um comportamento original no que diz respeito a sua toxicidade. Doses elevadas do metal exibem um perfil mutagênico em testes com células de mamíferos e não demonstram esse perfil em bactérias. E discutem que mesmo que alguns trabalhos apontam a forte correlação entre resultados positivos para mutagenicidade e carcinogenicidade, neste estudo a carcinogenicidade não foi observada. Explicam que esse efeito pode ser esperado, uma vez que a mutação é apenas um dos vários eventos que levam a formação de um câncer.

Um estudo recente que analisou o perfil genotóxico de compostos de manganês e de cobalto por um novo biomarcador relata que os complexos de manganês podem interagir mais com o DNA do que os de cobalto. Porém, é improvável que a variação observada na genotoxicidade poderia ser atribuída ao tipo de metal nos compostos, uma vez que íons de manganês estão presentes no interior das células e são necessários para a atividade de várias enzimas (Esmadi *et al.*, 2015).

Quando analisamos os resultados obtidos com os complexos de manganês e comparamos com a cisplatina que é amplamente citada e descrita na literatura, observamos que a mutagenicidade encontrada nas cepas TA98, TA100 e TA97a é uma característica de agentes antineoplásicos como relatado por Hannan *et al.* (1989) e De Pascali *et al.* (2011).

Apesar de suas implicações genotóxicas em longo prazo, fármacos sabidamente mutagênicos desempenham um papel estabelecido na terapia contra o câncer. Portanto, é essencial um rigoroso monitoramento dos pacientes que utilizam os vários tipos de quimioterapia e que regulamentações de mutagenicidade sejam cumpridas no desenvolvimento de novos fármacos como agentes antineoplásicos (Ferguson e Pearson, 1996).

Tabela 6. Resultados da atividade biológica dos complexos de Manganês (II) frente às linhagens celulares

Siglas	Complexos	IC ₅₀ MRC-5 ¹ μM	IC ₅₀ HepG2 ² μM	IS*	IC ₅₀ HeLa ² μM	IS*	IC ₅₀ MDA-MB-231 ² μM	IS*	IC ₅₀ K-562 ² μM	IS*	IC ₅₀ DU 145 ² μM	IS*
Mn	MnCl ₂ ·2H ₂ O	171,5 ± 9,5	2500,6 ± 77,8	0,1	1627,7 ± 49,8	0,1	2916,0 ± 44,1	0	3088,7 ± 0	0	826,3 ± 74,0	0,2
1Mn	[Mn(atc) ₂]	223,9 ± 42,1	654,8 ± 44,2	0,3	186,9 ± 15,7	1,2	232,4 ± 10,5	1,0	408,2 ± 14,1	0,5	730,1 ± 3,8	0,3
2Mn	[Mn(atc-Et) ₂]	205,4 ± 12,8	40,7 ± 9,1	5,0	578,2 ± 23,6	0,3	621,8 ± 44,1	0,3	151,0 ± 4,1	1,3	5,0 ± 1,4	41,0
3Mn	[Mn(atc-Me) ₂]	31,7 ± 5,4	13,9 ± 1,7	2,3	31,5 ± 4,3	1,0	78,2 ± 13,8	0,4	148,1 ± 22,5	0,2	4,3 ± 0	7,5
4Mn	[Mn(atc-Ch) ₂]	3,2 ± 0	3,2 ± 0	1,0	17,4 ± 7,4	0,2	21,9 ± 0,6	0,1	35,5 ± 6,8	0	64,4 ± 2,9	0
5Mn	[Mn(atc-Ph) ₂]	158,3 ± 6,5	189,5 ± 4,7	0,8	77,5 ± 19,6	2,0	84,1 ± 23,4	1,9	68,2 ± 22,4	2,3	63,6 ± 16,7	2,5

*O IS dos complexos foi calculado a partir da razão dos valores de IC₅₀ MRC-5¹ / IC₅₀ das células tumorais². É considerado um valor promissor, substâncias com IS > 3.

Tabela 7. Resultados da atividade biológica do CoCl₂·6H₂O e de complexos de Cobalto (III) frente às linhagens celulares

Siglas	Complexos	IC ₅₀ MRC-5 ¹ μM	IC ₅₀ HepG2 ² μM	IS*	IC ₅₀ HeLa ² μM	IS*	IC ₅₀ MDA-MB-231 ² μM	IS*	IC ₅₀ K-562 ² μM	IS*	IC ₅₀ DU 145 ² μM	IS*
Co	CoCl ₂ ·6H ₂ O	338,4 ± 6,9	2101,4 ± 0	0,2	911,4 ± 66,9	0,4	776,7 ± 5,4	0,4	291,8 ± 7,4	1,1	1864,7 ± 29,6	0,2
1Co	[Co(atc) ₂]Cl	261,8 ± 12,4	780,0 ± 19,9	0,3	112,0 ± 4,3	2,3	1031,8 ± 11,4	0,3	461,8 ± 16,5	0,6	858,0 ± 19,8	0,3
2Co	[Co(atc-Et) ₂]Cl	931,1 ± 0	189,1 ± 17	4,9	363,6 ± 8,0	2,5	234,4 ± 23,5	4,0	40,7 ± 17,8	22,9	126,9 ± 31,0	7,3
3Co	[Co(atc-Me) ₂]Cl	354,1 ± 39,3	857,7 ± 69,8	0,4	278,1 ± 59,8	1,3	481,2 ± 31,1	0,7	602,6 ± 11,7	0,6	706,5 ± 15,8	0,5
4Co	[Co(atc-Ch) ₂]Cl	3,0 ± 0	17,0 ± 0,3	0,2	12,2 ± 1,6	0,2	8,1 ± 0,1	0,4	3,0 ± 0	1,0	9,6 ± 1,7	0,3
5Co	[Co(atc-Ph) ₂]Cl	199,8 ± 21,9	27,6 ± 6,5	7,2	79,9 ± 1,7	2,5	25,7 ± 1,3	7,8	35,7 ± 0	5,6	60,4 ± 0,5	3,3

*O IS dos complexos foi calculado a partir da razão dos valores de IC₅₀ MRC-5¹ / IC₅₀ das células tumorais². É considerado um valor promissor, substâncias com IS > 3.

Tabela 8. Resultados da atividade biológica dos complexos de Zinco frente às linhagens celulares

Siglas	Complexos	IC ₅₀ MRC-5 ¹ μM	IC ₅₀ HepG2 ² μM	IS*	IC ₅₀ HeLa ² μM	IS*	IC ₅₀ MDA-MB-231 ² μM	IS*	IC ₅₀ K-562 ² μM	IS*	IC ₅₀ DU 145 ² μM	IS*
Zn	ZnCl ₂	239,9 ± 16,8	698,4 ± 10,9	0,3	864,5 ± 14,0	0,3	475,4 ± 64,3	0,5	1088,7 ± 73,8	0,2	382,9 ± 7,8	0,6
2Zn	[Zn(atc-Et) ₂]	12,1 ± 4,0	7,1 ± 3,7	1,7	102,0 ± 17,6	0,1	3,9 ± 0	3,1	52,0 ± 8,6	0,2	9,4 ± 3,4	1,3
5Zn	[Zn(atc-Ph) ₂]	12,1 ± 3,0	3,3 ± 0	3,6	325,0 ± 58,4	0	5,5 ± 3,1	2,2	14,1 ± 3,8	1,0	34,1 ± 7,0	0,3

*O IS dos complexos foi calculado a partir da razão dos valores de IC₅₀ MRC-5¹ / IC₅₀ das células tumorais². É considerado um valor promissor, substâncias com IS > 3.

Tabela 9. Resultados da atividade biológica da Cisplatina frente às linhagens celulares

Sigla	Complexo	IC ₅₀ MRC-5 ¹ μM	IC ₅₀ HepG2 ² μM	IS*	IC ₅₀ HeLa ² μM	IS*	IC ₅₀ MDA-MB-231 ² μM	IS*	IC ₅₀ K-562 ² μM	IS*	IC ₅₀ DU 145 ² μM	IS*
Cis	[Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂]	46,2 ± 4,9	60,3 ± 15,1	0,8	85,0 ± 10,1	0,5	143,3 ± 3,3	0,3	75,4 ± 6,0	0,6	56,5 ± 6,8	0,8

*O IS dos complexos foi calculado a partir da razão dos valores de IC₅₀ MRC-5¹ / IC₅₀ das células tumorais². É considerado um valor promissor, substâncias com IS > 3.

Tabela 10. Resultados da atividade biológica dos Ligantes frente às linhagens celulares

Ligantes	IC ₅₀ MRC-5 ¹ μM	IC ₅₀ HepG2 ² μM	IS*	IC ₅₀ HeLa ² μM	IS*	IC ₅₀ MDA-MB-231 ² μM	IS*	IC ₅₀ K-562 ² μM	IS*	IC ₅₀ DU 145 ² μM	IS*
Hatc	110,5 ± 3,7	722,7 ± 50,8	0,2	874,9 ± 0,4	0,1	1189,4 ± 54,2	0,1	836,4 ± 13,4	0,1	1153,1 ± 78,5	0,1
Hatc-Et	9,0 ± 0	552,8 ± 45,0	0	746,0 ± 23,2	0	903,5 ± 65,3	0	420,3 ± 3,7	0	531,5 ± 12,6	0
Hatc-Me	95,2 ± 8,2	821,6 ± 32,8	0,1	841,2 ± 28,5	0,1	999,1 ± 34,6	0,1	1161,0 ± 0,1	0	1024,9 ± 58,9	0
Hatc-Ch	7,2 ± 0	222,4 ± 4,7	0	260,2 ± 4,2	0	860,9 ± 35,1	0	802,1 ± 13,4	0	48,6 ± 6,2	0,1
Hatc-Ph	7,4 ± 0	36,3 ± 1,5	0,2	25,0 ± 0,2	0,3	24,3 ± 5,0	0,3	11,1 ± 0,6	0,7	15,1 ± 2,1	0,5

*O IS dos complexos foi calculado a partir da razão dos valores de IC₅₀ MRC-5¹ / IC₅₀ das células tumorais². É considerado um valor promissor, substâncias com IS > 3.

Tabela 11. – Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e IM (em parênteses) das cepas **TA98, TA100, TA102 e TA97a** de *Salmonella typhimurium* expostas à diferentes concentrações do complexo **3Mn**, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica

Tratamentos	Número de revertentes (M ± DP) / placa e IM							
	TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
µg/placa	- S9	+S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
0,00^a	131 ± 18	131 ± 18	131 ± 18	109 ± 5	258 ± 1	351 ± 3	146 ± 1	144 ± 25
3,12	177 ± 3 (1,3)	177 ± 3 (1,3)	177 ± 3 (1,3)	185 ± 15 (1,7)	285 ± 28 (1,1)	432 ± 2 (1,2)	153 ± 9 (1,0)	229 ± 22 (1,6)
6,25	199 ± 15 (1,5)	199 ± 15 (1,5)	199 ± 15 (1,5)	216 ± 12 (2,0)*	350 ± 11 (1,4)	461 ± 1 (1,3)	166 ± 21 (1,1)	271 ± 33 (1,9)
12,5	257 ± 4 (2,0)*	257 ± 4 (2,0)*	257 ± 4 (2,0)*	218 ± 28 (2,0)*	303 ± 3 (1,2)	541 ± 7 (1,5)	183 ± 24 (1,3)	314 ± 3 (2,2)*
25,0	183 ± 32 (1,4)	183 ± 32 (1,4)	183 ± 32 (1,4)	237 ± 7 (2,2)*	294 ± 21 (1,1)	466 ± 49 (1,3)	175 ± 43 (1,2)	272 ± 1 (1,9)
50,0	213 ± 17 (1,6)	213 ± 17 (1,6)	213 ± 17 (1,6)	156 ± 1 (1,4)	309 ± 7 (1,2)	459 ± 12 (1,3)	183 ± 5 (1,3)	146 ± 8 (1,0)
C+	2242 ± 22 ^b	2242 ± 22 ^e	2242 ± 22 ^c	1549 ± 26 ^e	1052 ± 19 ^d	884 ± 8 ^f	567 ± 1 ^b	2054 ± 54 ^e

Modelo de *Bernstein** $p < 0,05$ (ANOVA) ^aControle Negativo: dimetilsulfoxido (DMSO - 100 µL/placa); C+ = Controle Positivo: ^b 4 -nitro-o-phenylenediamine (NPD - 10,0 µg/ placa - TA98, TA97a); ^c Azida sódica (1,25 µg/ placa - TA100); ^d Mitomicina (0,5 µg/placa - TA102), em ausência de S9 e ^e2-anthramine (1,25 µg/placa - TA97a, TA98, TA100) e ^f 2-aminofluorene (10,0 µg/ placa - TA102), em presença de S9.

Tabela 12. – Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e IM (em parênteses) das cepas **TA98, TA100, TA102 e TA97a** de *Salmonella typhimurium* expostas à diferentes concentrações do complexo **4Mn**, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica

Tratamentos	Número de revertentes (M ± DP) / placa e IM							
	TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
	- S9	+S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
µg/placa								
0,00^a	45 ± 7	41 ± 9	131 ± 18	109 ± 5	258 ± 1	351 ± 3	146 ± 1	144 ± 25
3,12	71 ± 6 (1,6)	115 ± 13 (2,8) *	185 ± 26 (1,4)	190 ± 18 (1,7)	295 ± 2 (1,1)	458 ± 18 (1,1)	174 ± 10 (1,2)	289 ± 23 (2,0) *
6,25	70 ± 33 (1,6)	105 ± 25 (2,5) *	197 ± 43 (1,5)	255 ± 23 (2,3) *	296 ± 17 (1,1)	441 ± 36 (1,1)	180 ± 20 (1,2)	263 ± 50 (1,8)
12,5	71 ± 15 (1,6)	97 ± 10 (2,3) *	185 ± 2 (1,4)	222 ± 30 (2,0) *	246 ± 1 (1,0)	436 ± 27 (1,1)	258 ± 11 (1,8)	249 ± 31 (1,7)
25,0	70 ± 18 (1,5)	65 ± 11 (1,6)	203 ± 7 (1,5)	184 ± 41 (1,7)	293 ± 19 (1,1)	408 ± 2 (1,1)	259 ± 53 (1,8)	240 ± 11 (1,7)
50,0	57 ± 11 (1,3)	62 ± 22 (1,5)	136 ± 9 (1,0)	158 ± 10 (1,4)	254 ± 41 (1,0)	398 ± 4 (1,0)	148 ± 27 (1,0)	242 ± 50 (1,7)
C+	2242 ± 22 ^b	2242 ± 22 ^e	2242 ± 22 ^c	1549 ± 26 ^e	1052 ± 19 ^d	884 ± 8 ^f	567 ± 1 ^b	2054 ± 54 ^e

Modelo de *Bernstein* * $p < 0,05$ (ANOVA) ^aControle Negativo: dimetilsulfoxido (DMSO - 100 µL/placa); C+ = Controle Positivo: ^b 4-nitro-o-phenylenediamine (NPD - 10,0 µg/ placa - TA98, TA97a); ^c Azida sódica (1,25 µg/ placa - TA100); ^d Mitomicina (0,5 µg/placa - TA102), em ausência de S9 e ^e2-anthramine (1,25 µg/placa - TA97a, TA98, TA100) e ^f2-aminofluorene (10,0 µg/ placa - TA102), em presença de S9.

Tabela 13. – Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e IM (em parênteses) das cepas **TA98, TA100, TA102 e TA97a** de *Salmonella typhimurium* expostas à diferentes concentrações do complexo **5Mn**, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica

Tratamentos	Número de revertentes (M ± DP) / placa e IM							
	TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
	- S9	+S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
µg/placa								
0,00^a	45 ± 7	41 ± 9	131 ± 18	109 ± 5	258 ± 1	351 ± 3	146 ± 1	144 ± 25
3,12	73 ± 9 (1,6)	102 ± 20 (2,5) *	147 ± 13 (1,1)	167 ± 9 (1,5)	290 ± 16 (1,1)	337 ± 43 (1,0)	179 ± 3 (1,2)	243 ± 7 (1,7)
6,25	73 ± 6 (1,6)	195 ± 20 (2,3) *	231 ± 43 (1,8)	172 ± 16 (1,6)	367 ± 13 (1,4)	439 ± 24 (1,2)	175 ± 22 (1,2)	269 ± 7 (1,9)
12,5	82 ± 6 (1,8)	72 ± 21 (1,7)	255 ± 15 (1,9)	316 ± 17 (2,9) *	386 ± 7 (1,5)	413 ± 21 (1,2)	215 ± 34 (1,5)	337 ± 35 (2,3) *
25,0	68 ± 12 (1,5)	80 ± 19 (1,9)	234 ± 9 (1,8)	214 ± 10 (2,0) *	291 ± 19 (1,1)	404 ± 10 (1,1)	175 ± 9 (1,2)	274 ± 10 (1,9)
50,0	66 ± 7 (1,5)	56 ± 30 (1,3)	157 ± 13 (1,2)	195 ± 25 (1,8)	293 ± 32 (1,1)	395 ± 7 (1,1)	149 ± 9 (1,0)	267 ± 13 (1,9)
C+	2242 ± 22 ^b	2242 ± 22 ^e	2242 ± 22 ^c	1549 ± 26 ^e	1052 ± 19 ^d	884 ± 8 ^f	567 ± 1 ^b	2054 ± 54 ^e

Modelo de *Bernstein* * $p < 0,05$ (ANOVA) ^aControle Negativo: dimetilsulfoxido (DMSO - 100 µL/placa); C+ = Controle Positivo: ^b 4 -nitro-o-phenylenediamine (NPD - 10,0 µg/ placa - TA98, TA97a); ^c Azida sódica (1,25 µg/ placa - TA100); ^d Mitomicina (0,5 µg/placa - TA102), em ausência de S9 e ^e 2-anthramine (1,25 µg/placa - TA97a, TA98, TA100) e ^f 2-aminofluorene (10,0 µg/ placa - TA102), em presença de S9

4.3 Avaliação da toxicidade dos compostos de coordenação frente à *Artemia salina* L.

Nas tabelas a seguir (**Tabelas 14-17**), são apresentados os resultados da Concentração letal mediana (CL₅₀) dos compostos de coordenação frente ao método alternativo, *Artemia salina* L.

Tabela 14. CL₅₀ dos complexos de Manganês (II) frente à *Artemia salina* L.

Siglas	Complexos	CL ₅₀ (µM)
1Mn	[Mn(atc) ₂]	<13,1 ± 0
2Mn	[Mn(atc-Et) ₂]	567,1 ± 28,0
3Mn	[Mn(atc-Me) ₂]	<12,3 ± 0
4Mn	[Mn(atc-Ch) ₂]	1021,7 ± 32,8
5Mn	[Mn(atc-Ph) ₂]	2526,8 ± 0

Tabela 15. CL₅₀ dos complexos de Cobalto (III) frente à *Artemia salina* L.

Siglas	Complexos	CL ₅₀ (µM)
2Co	[Co(atc-Et) ₂]Cl	246,3 ± 46,0
5Co	[Co(atc-Ph) ₂]Cl	15,1 ± 2,9

Tabela 16. CL₅₀ dos complexos de Zinco frente à *Artemia salina* L.

Siglas	Complexos	CL ₅₀ (µM)
2Zn	[Zn(atc-Et) ₂]	962,6 ± 19,2
5Zn	[Zn(atc-Ph) ₂]	1672,7 ± 15,0

Tabela 17. CL₅₀ da Cisplatina frente à *Artemia salina* L.

Sigla	Complexos	CL ₅₀ (µM)
Cis	[Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂]	295,1 ± 35,1

Para o complexo de manganês contendo o ligante Hatc foi observada uma alta toxicidade para o microcrústaceo. E quando este complexo foi coordenado com os substituintes -etil, -ciclohexil e -fenil esta toxicidade foi extremamente diminuída, exceto no substituinte -metil.

Os complexos de cobalto 2Co e 5Co apresentaram uma CL_{50} de $246,3 \pm 46,0$ e $15,1 \pm 2,9 \mu\text{M}$, respectivamente.

E para os complexos contendo zinco na esfera de coordenação não observou-se toxicidade frente ao organismo *Artemia salina* L.

Comparando os resultados de CL_{50} para os complexos estudados e a cisplatina é visto que os complexos 2Mn, 4Mn, 5Mn, 2Zn e 5Zn foram menos tóxicos do que o fármaco referência ($295,1 \pm 35,1 \mu\text{M}$).

Existem poucos relatos na literatura que utilizam *Artemia salina* L., para a determinação da toxicidade em novas moléculas, os estudos mais propostos até o momento são realizados em extratos de plantas. Segundo Meyer *et al.* (1982) é possível estabelecer uma correlação entre linhagens celulares e o microcrústaceo, Solis *et al.* (1992) estabelecem uma correlação entre linhagens celulares, parasitas e o microcrústaceo e Parra *et al.* (2001) vai mais adiante demonstrando em seus estudos que essa correlação também é possível entre a *Artemia salina* L. e camundongos Swiss.

Porém, com o decorrer dos anos e a necessidade de utilizar métodos alternativos novos estudos de toxicidade em moléculas orgânicas e inorgânicas utilizando o microcrústaceo estão surgindo como mostrado por Ferraz *et al.* (2009) e Krstic *et al.* (2014).

4.4 Avaliação da toxicidade aguda em camundongos BALB/c

Nos **Gráficos 1 e 2** são apresentadas as concentrações administradas e as porcentagens de sobrevivência dos animais.

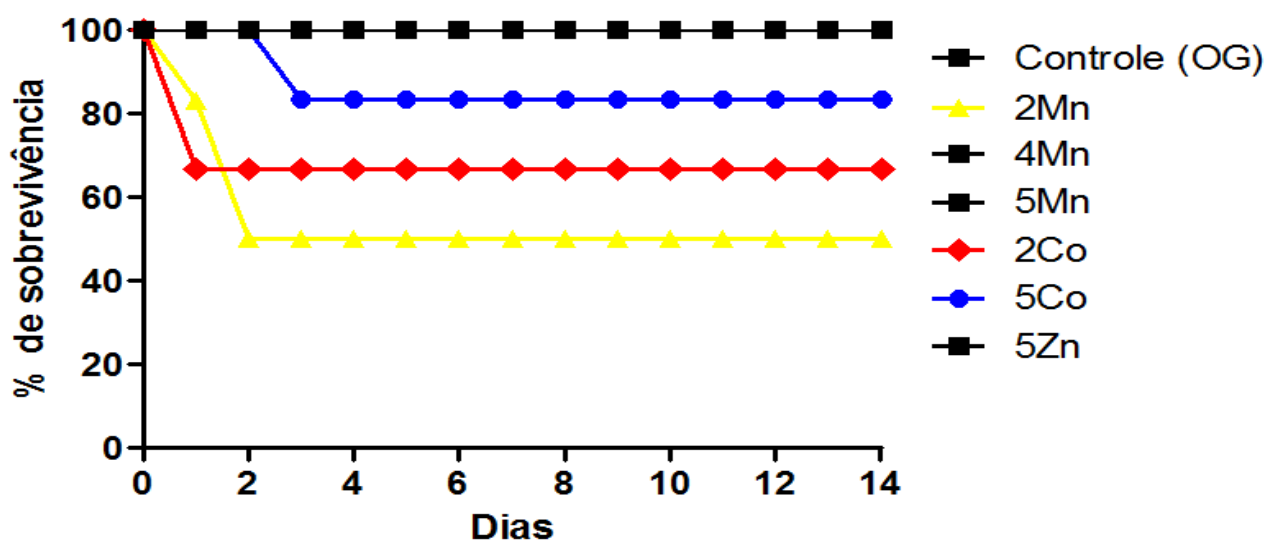


Gráfico 1. Porcentagem de sobrevivência dos camundongos BALB/c durante 14 dias na concentração de 1.000 mg/Kg de peso corpóreo.

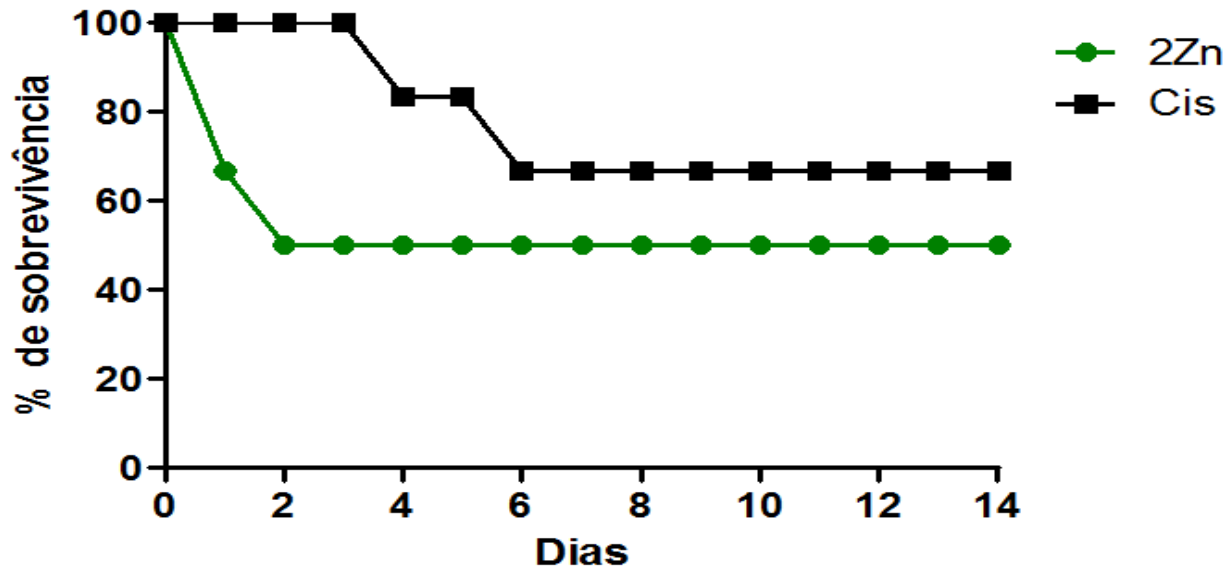


Gráfico 2. Porcentagem de sobrevivência dos camundongos BALB/c durante 14 dias na concentração de 500 mg/Kg de peso corpóreo.

A análise da toxicidade aguda foi classificada no método de categorias como descrito pelo manual OECD, 2001 e segundo a GHS (*Globally Harmonized System Classification*) de 2004.

Os agentes tóxicos via oral são classificados como:

- Categoria 1 ($DL_{50} \leq 5$ mg/Kg), Perigo - fatal se ingerido;
- Categoria 2 ($DL_{50} > 5$ mg/Kg ≤ 50 mg/Kg), Perigo - fatal se ingerido;
- Categoria 3 ($DL_{50} > 50$ mg/Kg ≤ 300 mg/Kg), Perigo - tóxico se ingerido;
- Categoria 4 ($DL_{50} > 300$ mg/Kg ≤ 2.000 mg/Kg), Atenção - nocivo se ingerido e,
- Categoria 5 ($DL_{50} > 2.000$ mg/Kg ≤ 5.000 mg/Kg), Atenção – pode ser perigoso se ingerido.

A seguir são discutidos os dados obtidos de cada composto de coordenação:

2Mn – Quando administrada a concentração de 1.000 mg/Kg peso corpóreo apresentou perda de 50% dos animais. Nas primeiras 24 horas todos os animais apresentaram piloereção, tremores, lacrimação e houve perda de um animal, 48 horas depois houve perda de mais dois animais e os três animais restantes ainda apresentaram os mesmos sintomas.

3Mn – Não foi determinada a DL_{50} nas concentrações de 1.000 e 500 mg/Kg de peso corpóreo, pois na concentração 300 mg/Kg de peso corpóreo já apresentou perda de 100% dos camundongos em 24 horas, demonstrando que o complexo é tóxico e se classifica como categoria 3.

4Mn – Apresentou sobrevivência de 100% dos animais na concentração de 1.000 mg/Kg de peso corpóreo. Em 24 e 48 horas os animais demonstraram piloereção.

5Mn – Na concentração de 1.000 mg/Kg de peso corpóreo não houve perda de nenhum animal. E nenhum sintoma foi visto no grupo.

2Co – 24 horas após a administração do complexo na dose de 1.000 mg/Kg de peso corpóreo, houve perda de dois camundongos e os mesmos apresentaram sangramento nos olhos e nos focinhos. Os outros quatro animais sobreviventes apresentaram piloereção até 48 horas depois da administração.

5Co – Administrou-se a concentração de 1.000 mg/Kg de peso corpóreo e em 24 e 48 horas todos os animais apresentaram piloereção e o camundongo 3 além deste sintoma não apresentou resposta ao toque. Após 72 horas o houve perda de um animal (camundongo 3).

2Zn – Quando administrada a dose de 1.000 mg/Kg de peso corpóreo todos os camundongos morreram. Assim, administrou 500 mg/Kg de peso corpóreo, onde em 24 horas houve perda de dois animais e outros animais não respondiam ao toque e apresentaram piloereção. E após 48 horas mais um animal foi perdido. Ocorrendo a perda de 50% dos animais.

5Zn – O complexo não apresentou perda de nenhum animal (100% de sobrevivência) na concentração de 1.000 mg/Kg de peso corpóreo, porém foi visto os comportamentos de contorção, tremores e piloereção.

Cis – Para o fármaco cisplatina não foi determinada a DL_{50} dos animais na concentração de 1.000 mg/Kg de peso corpóreo, pois o mesmo já apresenta-se tóxico em concentrações menores como descrito na literatura (Muscella *et al.*, 2014). Portanto, foi administrado a dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, em 72 horas (3 dias) todos

animais apresentaram piloereção. Houve perda de um animal em 96 horas (4 dias) e os outros continuaram apresentando piloereção. E, em 144 horas (6 dias) houve perda de mais um animal e nos outros animais não foi mais observado piloereção e nenhum outro tipo de comportamento.

No entanto, os compostos de coordenação (manganês, cobalto e zinco) apresentaram-se menos tóxicos frente aos camundongos BALB/c do que a cisplatina, exceto o complexo 2Zn que demonstrou toxicidade igual e o complexo 3Mn que apresentou-se mais tóxico.

A análise macroscópica dos órgãos não apresentou alterações morfológicas e não foi observada diferença estatística na razão média do peso dos órgãos / peso corporal dos animais quando comparados ao grupo controle (**Gráfico 3**) em nenhum dos grupos dos determinados complexos descritos anteriormente.

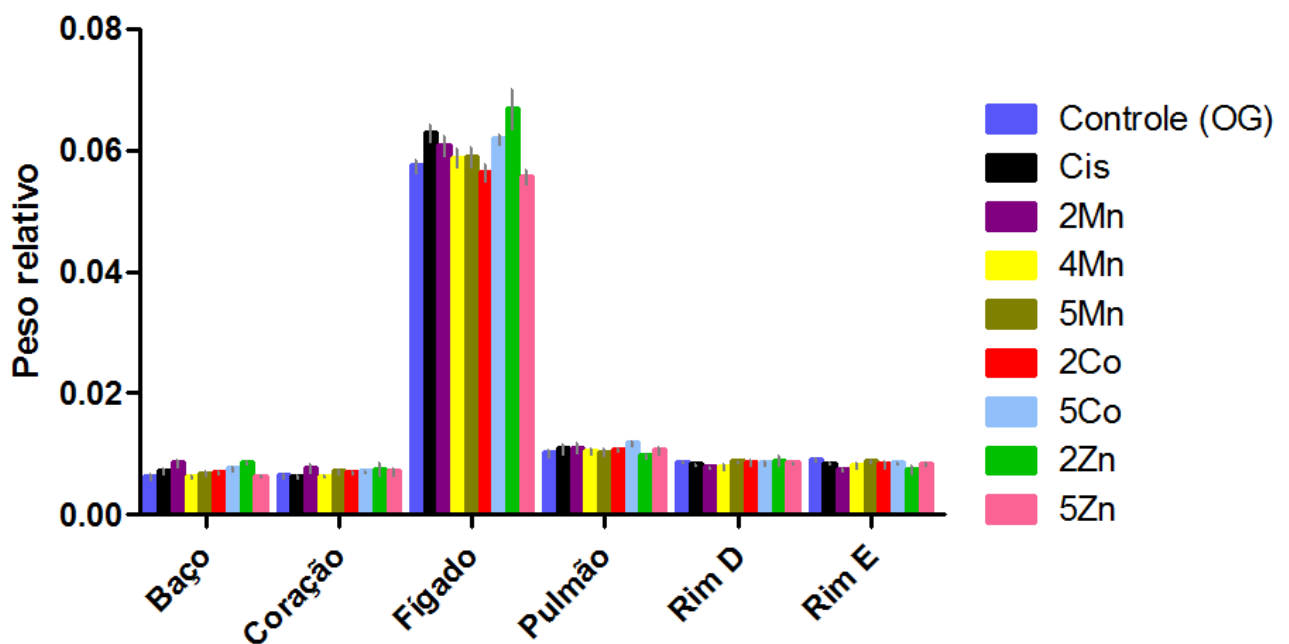


Gráfico 3. Peso relativo (razão média do peso dos órgãos / peso corporal dos camundongos BALB/c) e desvio padrão.

4.5 Quantificação das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no soro dos camundongos BALB/c

Nas quantificações enzimáticas (AST e ALT) no soro dos camundongos não foi observada diferença estatística quando os grupos dos compostos de coordenação foram comparados ao grupo controle, como visto no **Gráfico 4** e demonstrado no estudo de (Araujo *et al.*, 2014).

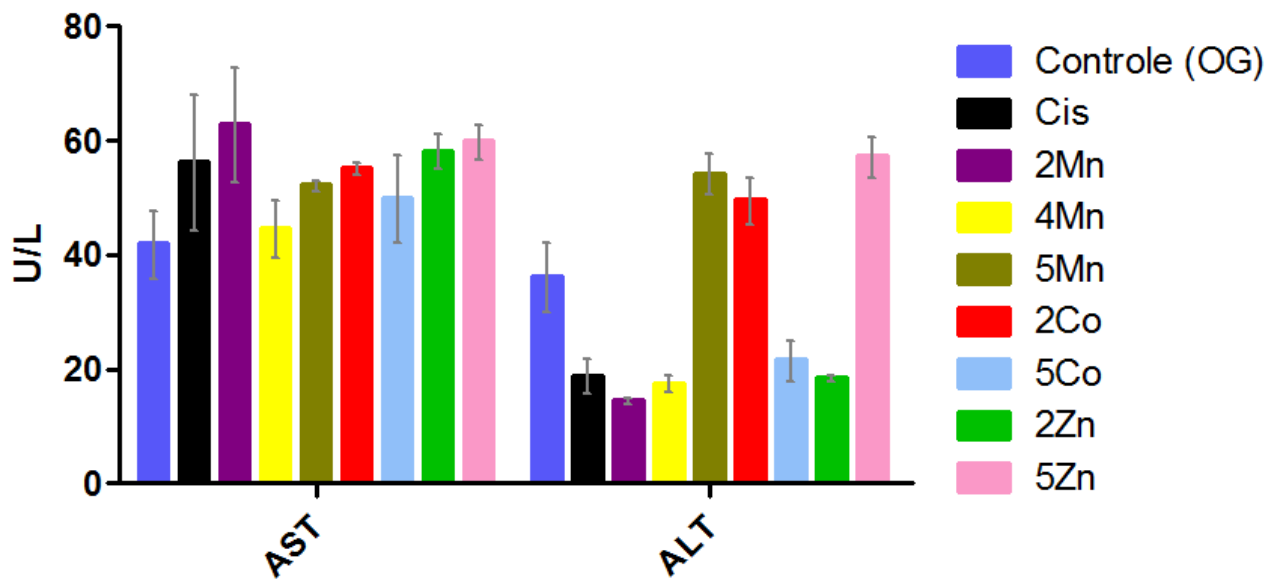


Gráfico 4. Quantificação das enzimas AST e ALT no soro dos camundongos BALB/c.

4.6 Avaliação da biodisponibilidade oral *in vivo*

Nesta metodologia, não são avaliados parâmetros farmacocinéticos e farmacológicos como a absorção, a distribuição, o metabolismo e a excreção (ADME). Esse ensaio é um *screening* rápido que revela se complexo ou seu produto final foi absorvido ou não quando presente na corrente sanguínea.

A quantificação estima em mg/L a concentração ativa dos complexos no plasma em relação ao administrado no animal. No entanto, os resultados são apresentados em mg/mL pois foram calculados levando em consideração o volume sanguíneo de um camundongo.

As curvas analíticas utilizadas para quantificação das amostras de plasma apresentaram coeficientes de correlação R^2 de 0,999853 (Co), 0,999894 (Mn) e

0,999436 (Zn). O limite de detecção foi determinado conforme a Metodologia, resultando em LD = 0,0000007 mg/mL (Co); LD = 0,00000014 mg/mL (Mn) e LD = 0,00000048 mg/mL (Zn).

As concentrações dos metais Co e Mn nas amostras provavelmente estão abaixo do LD determinado no experimento. Sendo assim, as seguintes hipóteses podem ser levantadas: os metais podem não estar sendo absorvidos e foram excretados; os metais foram metabolizados rapidamente, em um tempo menor do que o utilizado no experimento. Entretanto, para uma melhor resposta no atual experimento às amostras devem ser quantificadas novamente via ICP-MS (Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente) devido a uma maior sensibilidade desse equipamento. E testes futuros para a metodologia aplicada com outras moléculas devem coletar urina, fezes e até mesmo sangue total para que assim todas as questões das moléculas estudadas possam ser respondidas e analisadas.

No que diz respeito às amostras de zinco $[Zn(atc-Et)_2]$ e $[Zn(atc-Ph)_2]$, 2Zn e 5Zn, respectivamente, a concentração do metal foi superior ao LD, sendo possível a sua quantificação via ICP-OES. O **Gráfico 5** apresenta o perfil do tempo–concentração no plasma dos complexos 2Zn e 5Zn. Os valores observados no gráfico estão calculados levando em consideração a amostra controle, uma vez que no próprio organismo têm-se uma concentração inicial de zinco.

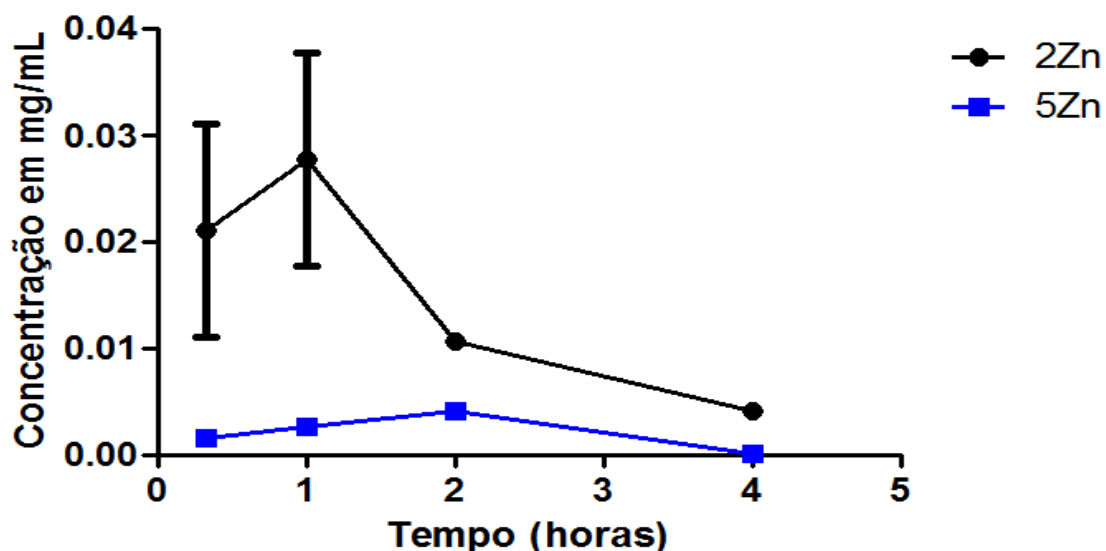


Gráfico 5. Perfil do tempo-concentração no plasma dos complexos de zinco, após uma única administração via gavagem na dose de 300 mg/Kg de peso corpóreo.

2Zn - As concentrações encontradas foram 0,0211 mg/mL, 0,0278 mg/mL, 0,0107 mg/mL e 0,0042 mg/mL, para os respectivos tempos de 20 minutos, 1 hora, 2 horas e 4 horas de coleta. Observando-se que a concentração do complexo no tempo de 20 minutos foi elevada, em 1 hora obteve-se o pico da concentração e em seguida observa-se o decaimento da mesma no plasma dos camundongos.

5Zn - As concentrações encontradas foram 0,0016 mg/mL, 0,0027 mg/mL, 0,0041 mg/mL e 0,0002 mg/mL, para os respectivos tempos de 20 minutos, 1 hora, 2 horas e 4 horas de coleta. Para este complexo observou-se o pico da concentração no plasma dos camundongos em 2 horas seguida do decaimento.

A concentração administrada foi de 300 mg/Kg de peso corpóreo de acordo com a metodologia descrita (**item 3.14**) que corresponde a uma concentração de zinco de 0,77 mg/animal (20g) para o complexo 2Zn e 0,65 mg/animal (20g) para o 5Zn. Essas doses correspondem a uma concentração de 0,416 mg/mL e 0,315 mg/mL para os complexos 2Zn e 5Zn, respectivamente.

Os perfis do tempo-concentração de ambos os complexos estão de acordo com o estudo de Zhang *et al.* (2014). Os diferentes perfis dos complexos de zinco (2Zn e 5Zn) provavelmente estão relacionados com as suas respectivas estruturas devido à presença de diferentes substituintes nos ligantes coordenados ao centro metálico.

5. CONCLUSÕES

Cada linhagem celular tem sua peculiaridade, se comportando diferente mediante aos sais precursores, os complexos e os ligantes livres. Assim, é possível concluir que diferentes metais podem influenciar na atividade biológica e estudos mais detalhados são necessários para verificar as hipóteses levantadas. Os compostos de coordenação apresentaram excelentes IS para determinadas linhagens celulares, sendo que esse perfil não é visto para o fármaco referência (cisplatina).

Por meio dos resultados obtidos não foi possível estabelecer uma correlação entre os três modelos de toxicidade, a linhagem celular normal (MRC-5), o método alternativo (*Artemia salina* L.) e os camundongos BALB/c. Porém, o método alternativo demonstrou-se ser um modelo reprodutível para alguns complexos quando correlacionado aos camundongos.

No ensaio de biodisponibilidade oral a quantificação foi possível para o metal zinco nas amostras de plasma dos camundongos nos tempos determinados.

Encontrar novos fármacos representa um grande desafio. O *screening* de novas moléculas antitumorais auxilia na redução do índice de mortalidade, contribui no tratamento e nos estudos de diversos fármacos já existentes, reduzindo os efeitos colaterais, as interações farmacológicas e toxicológicas. Além de prognosticar a segurança e eficácia na utilização pela indústria farmacêutica, bem como, no benefício para a saúde humana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akhtar, M. N. et al. Total synthesis, cytotoxic effects of damnacanthal, nordamnacanthal and related anthraquinone analogues. In: (Ed.). **Molecules**. Switzerland, v. 18, p. 10042-55, 2013. ISBN 1420-3049.

Alberts, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5ª. Artes Médicas, Porto Alegre. 2010. ISBN 978-0-8153-4105-5.

Alonso, S. R. et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. In: (Ed.). **Am J Pathol**. United States, v. 164, p. 193-203, 2004. ISBN 0002-9440.

Ambure, P.; Roy, K. Exploring structural requirements of leads for improving activity and selectivity against CDK5/p25 in Alzheimer's disease: an in silico approach. **Royal Society of Chemistry**, 2014.

Anastassopoulou, C. G.; Fuchs, B. B.; Mylonakis, E. Caenorhabditis elegans-based model systems for antifungal drug discovery. In: (Ed.). **Curr Pharm Des**. Netherlands, v. 17, p. 1225-33, 2011. ISBN 1873-4286.

Araujo, R. C. et al. Evaluation of the anti-mycobacterium tuberculosis activity and in vivo acute toxicity of Annona sylvatic. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, p. 209, 2014. ISSN 1472-6882.

ATCC. AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. 2015. Disponível em: <http://www.atcc.org/en/About/About_ATCC/Who_We_Are.aspx>. Acesso em: 06 de abril de 2015.

Batista, B. L. et al. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. **Anal Chim Acta**, v. 639, n. 1-2, p. 13-8, Apr 20 2009. ISSN 0003-2670.

Bednarczuk, V. O. et al. **Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais**. . Curitiba. 2010.

Bernstein, L. et al. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. In: (Ed.). **Mutat Res**. Netherlands, v. 97, p. 267-81, 1982. ISBN 0027-5107.

Brentani, H. et al. The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 23, p. 13418-13423, Nov 11 2003. ISSN 0027-8424.

Brothers, K. M.; Wheeler, R. T. Non-invasive imaging of disseminated candidiasis in zebrafish larvae. **J Vis Exp**, n. 65, 2012. ISSN 1940-087X.

Cazarin, K. C. C.; Corrêa, C. L.; Zambrone, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 2004.

Chelopo, M. P. et al. Anticancer activity of ruthenium(II) arene complexes bearing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline amino alcohol ligands. **Eur J Med Chem**, v. 66, p. 407-14, Aug 2013. ISSN 0223-5234.

Cingi, M. R. et al. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach, v. 5, p. 119-125, 1991.

Cvitkovic, E. Cumulative toxicities from cisplatin therapy and current cytoprotective measures. **Cancer Treatment Reviews**, v. 24, n. 4, p. 265-281, Aug 1998. ISSN 0305-7372.

De Pascali, S. A. et al. Mutagenic Tests Confirm That New Acetylacetonate Pt(II) Complexes Induce Apoptosis in Cancer Cells Interacting with Nongenomic Biological Targets. **Met Based Drugs**, v. 2011, p. 763436, 2011. ISSN 0793-0291.

Desbois, A. P.; Coote, P. J. Utility of Greater Wax Moth Larva (*Galleria mellonella*) for Evaluating the Toxicity and Efficacy of New Antimicrobial Agents. In: (Ed.). **Adv Appl Microbiol**. United States: 2012 Elsevier Inc, v. 78, p. 25-53, 2012. ISBN 0065-2164.

Dreher, S. **Síntese e Aplicação de Paladaciclos Contendo o Ligante 1,2-Bis (difenílfosfina) etano como Agentes Antitumorais**. p. 160. 2004. Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) - Biotecnologia, Mogi das Cruzes, 2004.

Dube, D. K.; Loeb, L. A. Manganese as a mutagenic agent during in vitro DNA synthesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 67, n. 3, p. 1041-1046, 1975. ISSN 0006-291X.

Esmadi, F. T. et al. Synthesis, characterization and biological activity of some unsymmetrical Schiff base transition metal complexes. **Drug Chem Toxicol**, p. 1-7, Mar 20 2015. ISSN 0148-0545.

Faurkov, B.; Bjerregaard, H. F. Effect of cisplatin on transepithelial resistance and ion transport in the A6 renal epithelial cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 13, n. 4-5, p. 611-617, Aug-Oct 1999. ISSN 0887-2333.

Favero Caires, A. C. Recent advances involving palladium (II) complexes for the cancer therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 5, p. 484-491, Sep 2007. ISSN 1871-5206.

Ferguson, L. R.; Pearson, A. E. The clinical use of mutagenic anticancer drugs. In: (Ed.). **Mutat Res**. Netherlands, v. 355, p. 1-12, 1996. ISBN 0027-5107.

Ferraz, K. O. et al. Copper(II) complexes with 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones: spectral studies and toxicity against *Artemia salina*. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 73, n. 1, p. 140-5, Jul 2009. ISSN 1386-1425.

Ferreira, D. W.; Allard, P. - Models of germ cell development and their application for toxicity studies. 2015.

Forbes, J. R.; Gros, P. Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. **Blood**, v. 102, n. 5, p. 1884-92, Sep 1 2003. ISSN 0006-4971.

Freshney, I. R. **Culture of animal cells. A manual of Basic Technique**. 5ª edição. 2005.

Fuchs, B. B. et al. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. In: (Ed.). **Virulence**. United States, v. 1, p. 475-82, 2010. ISBN 2150-5608.

Gerber, G. B.; Leonard, A.; Hantson, P. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 42, n. 1, p. 25-34, Apr 2002. ISSN 1040-8428

Golde, W. T.; Gollobin, P.; Rodriguez, L. L. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. In: (Ed.). **Lab Anim (NY)**. United States, v. 34, p. 39-43, 2005. ISBN 0093-7355.

Golfeto, C. C. **Nitrosilo Complexos de Rutênio: Síntese, Caracterização e Avaliação de suas potencialidades citotóxicas**. p. 102. 2008. Química – UFsCar, São Carlos, 2008.

Gruppo, V. et al. Rapid microbiologic and pharmacologic evaluation of experimental compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1245-1250, Apr 2006. ISSN 0066-4804.

Guimarães, A. C. R. et al. Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de Saúde. 2010.

Hamburguer, M.; Hostettmann, K. Bioactivity in Plants - The link between Phytochemistry and Medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991. ISSN 0031-9422.

Hanigan, M. H.; Devarajan, P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. **Cancer Ther**, v. 1, p. 47-61, 2003.

Hannan, M. A. et al. Mutagenicity of cisplatin and carboplatin used alone and in combination with four other anticancer drugs. **Toxicology**, v. 55, n. 1-2, p. 183-91, Apr 1989. ISSN 0300-483X.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Ministério da Saúde: Estimativa 2014 - Incidência do Câncer no Brasil 2014**.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. 2015. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 06 de abril de 2015.

Jennette, K. W. The role of metals in carcinogenesis: biochemistry and metabolism. **Environ Health Perspect**, v. 40, p. 233-52, Aug 1981. ISSN 0091-6765.

Keawpradub, N. et al. Cytotoxic activity of indole alkaloids from *Alstonia macrophylla*. **Planta Medica**, v. 65, n. 4, p. 311-315, May 1999. ISSN 0032-0943.

Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 8, p. 573-584, Aug 2007. ISSN 1474-175X.

Kim, S. H. et al. A post-developmental genetic screen for zebrafish models of inherited liver disease. In: (Ed.). **PLoS One**. United States, v. 10, p. 1-13, 2015. ISBN 1932-6203.

Kintzel, P. E. Anticancer drug-induced kidney disorders - Incidence, prevention and management. **Drug Safety**, v. 24, n. 1, p. 19-38, 2001. ISSN 0114-5916.

Kowalski, L. P. et al. Long-term survival rates in young patients with thyroid carcinoma. **Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery**, v. 129, n. 7, p. 746-749, Jul 2003. ISSN 0886-4470.

Krstic, N. M. et al. Steroid dimers-in vitro cytotoxic and antimicrobial activities. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 143, p. 365-75, Sep 2014. ISSN 0960-0760.

Lee, R. H. et al. Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, n. 8, p. 1013-1023, Oct 15 2001. ISSN 0006-2952.

Li, M. X. et al. Mn(II), Co(II) and Zn(II) complexes with heterocyclic substituted thiosemicarbazones: synthesis, characterization, X-ray crystal structures and antitumor comparison. In: (Ed.). **Eur J Med Chem**. France: 2010 Elsevier Masson SAS, v. 45, p. 3169-77, 2010. ISBN 1768-3254.

Logarto Parra, A. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, Sep 2001. ISSN 0944-7113.

Maia, P. I. d. S. et al. Vanadium complexes with thiosemicarbazones: Synthesis, characterization, crystal structures and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. **Polyhedron**, v. 28, n. 2, p. 398-406, Feb 3 2009. ISSN 0277-5387.

Maron, D. M.; Ames, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. In: (Ed.). **Mutat Res**. Netherlands, v. 113, p. 173-215, 1983. ISBN 0027-5107.

McGrath, P.; Li, C. Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. In: (Ed.). **Drug Discov Today**. England, v. 13, p. 394-401, 2008. ISBN 1359-6446.

Medeiros, M. A. Zinco. **Química Nova na Escola**, v. 34, p. 159-160. 2012.

Medeiros, M. A. Cobalto. **Química Nova na Escola**, v. 35, p. 220-221. 2013.

Meyer, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med**, v. 45, n. 5, p. 31-4, May 1982. ISSN 0032-0943.

Mortelmans, K.; Zeiger, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. In: (Ed.). **Mutat Res**. Netherlands, v. 455, p. 29-60, 2000. ISBN 0027-5107.

Muscella, A. et al. Antitumor activity of [Pt(O,O'-acac)(gamma-acac)(DMS)] in mouse xenograft model of breast cancer. In: (Ed.). **Cell Death Dis**. England, v. 5, p. 1014, 2014. ISBN 2041-4889.

NCI. National Cancer Institute. 2015. Disponível em: <www.cancer.gov>. Acesso em: 06 de abril de 2015.

O'Brien, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, Sep 2000. ISSN 0014-2956.

O.E.C.D. Guideline 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. Paris: Head of Publications Service, 2001. Disponível em: <http://www.oecd.org/publications>. Acesso em: 18 de outubro de 2014.

Oliveira, C. G. **Síntese e Caracterização de Complexos de Metais da Primeira Série do Bloco d com Tiosemicarbazonas para Investigar seu Potencial contra *Mycobacterium tuberculosis***, p. 133. 2013. Instituto de Química de São Carlos, USP. 2013.

Oliveira, C. G. et al. Manganese(II) complexes with thiosemicarbazones as potential anti-*Mycobacterium tuberculosis* agents. **J Inorg Biochem**, Oct 25 2013. ISSN 0162-0134.

Paulsen, I. T.; Saier, M. H., Jr. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. **J Membr Biol**, v. 156, n. 2, p. 99-103, Mar 15 1997. ISSN 0022-2631.

Pelosi, G. et al. Antiretroviral activity of thiosemicarbazone metal complexes. **J Med Chem**, v. 53, n. 24, p. 8765-9, Dec 23 2010. ISSN 1520-4804.

Picard, V. et al. Nramp 2 (DCT1/DMT1) expressed at the plasma membrane transports iron and other divalent cations into a calcein-accessible cytoplasmic pool. **J Biol Chem**, v. 275, n. 46, p. 35738-45, Nov 17 2000. ISSN 0021-9258.

Platts, J. A. et al. Solvolysis of a Series of Cisplatin-Like Complexes - Comparison between DNA-Biosensor and Conductivity Data. **European Journal of Inorganic Chemistry**, n. 34, p. 5625-5631, Dec 2012. ISSN 1434-1948.

Rocha, R. A.; Afonso, J. C. Manganês. **Química Nova na Escola**, v. 34, p. 103-105, 2012.

Roat-Malone, R. S. **Bioinorganic Chemistry: A Short Course**. Canadá. 2002. ISBN 0-471-15976-X.

Santos, F. V. et al. Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. In: (Ed.). **Food Chem Toxicol**. England, v. 44, p. 1585-9, 2006. ISBN 0278-6915.

Shan, Y. et al. Immersion infection of germ-free zebrafish with *Listeria monocytogenes* induces transient expression of innate immune response genes. **Front Microbiol**, v. 6, p. 373, 2015. ISSN 1664-302X.

Sheets, R. **History and Characterization of the Vero Cell Line**, p. 12, 2000.

Shermann, S. E.; Lippard, S. J. Structural Aspects of Platinum Anticancer Drug-Interactions with DNA. **Chemical Reviews**, v. 87, n. 5, p. 1153-1181, Oct 1987. ISSN 0009-2665.

Solis, P. N. et al. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). **Planta Med**, v. 59, n. 3, p. 250-2, Jun 1993. ISSN 0032-0943.

Stefani, C. et al. Alkyl substituted 2'-benzoylpyridine thiosemicarbazone chelators with potent and selective anti-neoplastic activity: novel ligands that limit methemoglobin formation. **J Med Chem**, v. 56, n. 1, p. 357-70, Jan 10 2013. ISSN 0022-2623.

Stefani, C. et al. Halogenated 2'-benzoylpyridine thiosemicarbazone (XBpT) chelators with potent and selective anti-neoplastic activity: relationship to intracellular redox activity. **J Med Chem**, v. 54, n. 19, p. 6936-48, Oct 13 2011. ISSN 1520-4804.

Sánchez-Fortún, S.; Sanz-Barrera, F.; Barahona-Gomariz, M. V. Acute toxicities of selected insecticides to the aquatic arthropod *Artemia salina*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 1, p. 76-82, 1995. ISSN 0007-4861.

van der Sar, A. M. et al. A star with stripes: zebrafish as an infection model. In: (Ed.). **Trends Microbiol.** England, v. 12, p. 451-7, 2004. ISBN 0966-842X.

WHO. World Health Organization. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>>. Acesso em: 06 de abril de 2015.

Zeiger, E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or faulty tests? In: (Ed.). **Mutat Res.** Netherlands, v. 492, p. 29-38, 2001. ISBN 0027-5107.

Zhang, S. et al. Pharmacokinetics and biodistribution of zinc-enriched yeast in rats. **ScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 217142, 2014. ISSN 1537-744X.

Zhao, Z. et al. Microwave-assisted synthesis and in vitro antibacterial activity of novel steroidal thiosemicarbazone derivatives. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 22, n. 24, p. 7730-4, Dec 15 2012. ISSN 1464-3405.

Zhu, H.; Gooderham, N. Neoplastic transformation of human lung fibroblast MRC-5 SV2 cells induced by benzo[α]pyrene and confluence culture. **Cancer Res.** 2002.

CAPÍTULO II

Zinc(II) complexes [Zn(atc-Et)₂] and [Zn(atc-Ph)₂]: *In vitro* antiproliferative, *in vivo* oral bioavailability and toxicity evaluation

E.O. Lopes ^a, G.O. Carolina ^b, P.B. Silva ^c, C.E. Eismann ^d, C.A. Suárez ^d, A.A. Menegário ^d, V.M. Deflon ^b, C.Q.F. Leite ^a, FR. Pavan ^{a*}

^a UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus Araraquara, Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo, Brazil

^b USP – Univ São Paulo, Campus São Carlos, Chemistry Institute, São Paulo, Brazil

^c UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus Araraquara, Department of Drugs and Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo, Brazil

^d UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus Rio Claro, Environmental Studies Center, São Paulo, Brazil

Corresponding author. Tel./Fax: + 55 16 3301 4667. E-mail address: fernandopavan@fcar.unesp.br (F.R. Pavan).

ABSTRACT

Zn^{II} complexes [Zn(atc-Et)₂] and [Zn(atc-Ph)₂] were tested in HepG2, HeLa, MDA-MB-231, K-562, DU 145 and MRC-5 cell lines were active antiproliferative for MDA-MB-231 and HepG2 cells demonstrating a significant SI (3.1 and 3.6, respectively) compared to the MRC-5 normal cell. For toxicity studies *in vivo* low toxicity was observed for the two models used the alternative method (*Artemia salina* L.) and BALB/c mice. Oral bioavailability *in vivo* the maximum plasma concentration values were 0.0278 mg/mL and 0.0041 mg/mL, respectively.

Keywords: zinc complexes, antiproliferative activity, oral bioavailability, toxicity.

1. Introduction

Cancer is a complex group of diseases that have in common the uncontrolled cell growth that invades the tissues and organs, and may spread to other regions of the body (metastasis). The mutated cells divide rapidly and tend to be too aggressive, causing the formation of tumors or malignancies [1]. This clearly is a public health problem. Today, it is responsible for one in eight deaths worldwide - more than HIV / AIDS, tuberculosis and malaria combined. Cancer is growing at an alarming rate, in 2030 approximately 21.7 million new cases and 13.0 million deaths are expected, simply due to the growth and aging of the world population [2]. The types of treatments for cancer are: surgery, chemotherapy, radiation therapy, transplantation, targeted therapy, immune therapy, photodynamic therapy, among others. Chemotherapy is an important therapy in

the treatment of cancer. Its main problem is the non-selectivity of the administered cytotoxic agent, because it acts both in tumor cells (target) as in normal cells [3].

Cisplatin is one of the most significant advances in the treatment of various cancers. Since its approval in 1978 by the *US Food and Drug Administration* (FDA) has been widely used to treat a variety of solid and hematological tumors. However, there are problems associated with its use as a low therapeutic index and high potential toxic to the kidneys (nephrotoxicity) and the gastro intestinal tract [4-5].

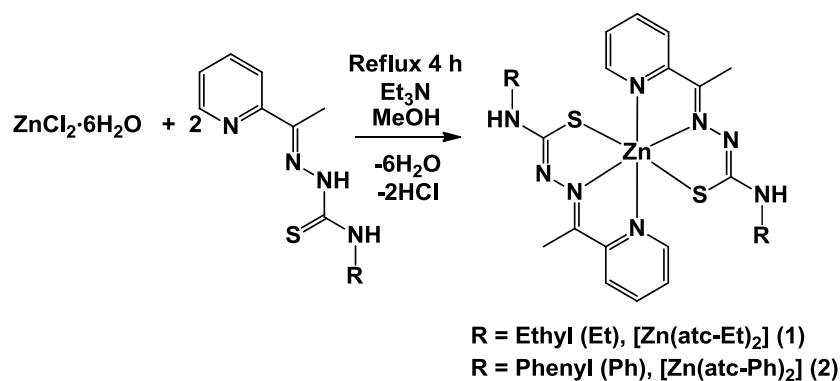
The inorganic chemistry in recent years has demonstrated its effectiveness in the development of new therapeutic agents. Drugs based on metals are enhancing stressing and increasing its importance in cancer therapy and other diseases [6-9]. It is known that some metals such as zinc a trace element in the human body participate in various reactions in biological systems, also making part of metalloenzymes fundamental for our body [10]. Zinc complexes exhibit antiproliferative activity in different tumor cell lines, being well studied and were more active than their free ligands [11].

The aim of this study was to evaluate the antiproliferative activity *in vitro* analyzing the toxicological safety through the alternate method (*Artemia salina* L.) and BALB/c mice and evaluate the oral bioavailability *in vivo* through rapid screening.

2. Results and Discussion

2.1. Chemistry

Reactions of Hatc-Et or Hatc-Ph with zinc salt ($\text{ZnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in the presence of Et_3N under reflux in MeOH provided pure yellow precipitates of the zinc complexes in good yields (**Scheme 1**). The complex **1** is quite soluble in CH_2Cl_2 but less soluble in methanol or ethanol. On the other hand, the complex **2** is soluble only in DMSO. Elemental analyses and molar conductivity values are in accordance with the formation of neutral complexes of the type $[\text{Zn}(\text{atc-R})_2]$.



Scheme 1. Synthesis of the complexes.

The IR and ^1H NMR spectra of the complexes are consistent with the N,N,S -coordination of the monoanionic ligands to the Zn^{II} metal center. The crystalline structure obtained for both complexes confirm the proposed structures (**Figure 1**). **Table 1** summarizes selected bond lengths and angles for the two Zn^{II} complexes. In each zinc(II) complex, two thiosemicarbazone ligands coordinate to the metal ion through two nitrogen atoms from pyridine ring, N1 and N1', two azomethine nitrogen atoms, N2 and N2' and two sulfur atoms, S1 and S1', to form the 6-coordinate zinc(II) complex. In the asymmetric unit of complex **2** only half molecule is found, being the other generated by symmetry. According to the deprotonation of the ligands, the coordination atoms form four chelate rings with the metal center Zn^{II} . In both complexes, the tridentate ligands are nearly planar, almost perpendicular to each other, with $\text{N}(1)\text{-Zn-N}(1')$ angle very close to 90° .

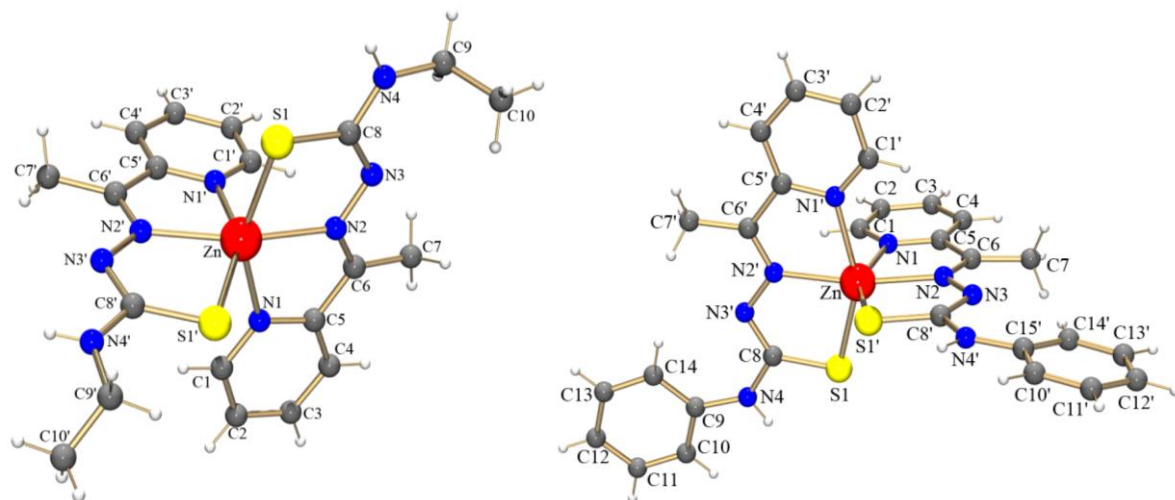


Figure 1. Molecular structure of $[\text{Zn}(\text{atc-Et})_2]$ (**1**) (left) and $[\text{Zn}(\text{atc-Ph})_2]$ (**2**) (right) with atom labels.

The bond lengths for $\text{Zn}(1)\text{-N}(1)$ and $\text{Zn}(1)\text{-N}(2)$ are 2.200(2) and 2.164(2) Å, respectively for complex **1**, while the same bonds for complex **2** are not very discrepant, with values 2.2139(18) and 2.1549(17) Å, respectively. The $\text{Zn}(1)\text{-S}(1)$ bonds distance values for **1** and **2** [in the range 2.4452(6) – 2.4547(7) Å] are quite close to those observed for similar complexes in the literature [12]. On the other hand, the values of bond lengths involving the complexes with zinc as metal center, $[\text{Zn}(\text{atc-Et})_2]$ and $[\text{Zn}(\text{atc-Ph})_2]$, are slightly shorter, compared to the its analogous $[\text{Mn}(\text{atc-Et})_2]$, which is in agreement with the small ionic radius of Zn^{II} when compared with the Mn^{II} [13]. Remarkably, Co^{III} complexes with the same ligand, atc-Et^- , are evidently characterized by the smaller bond lengths compared to Mn^{II} $[\text{Mn}(\text{atc-Et})_2]$ complex previously reported and Zn^{II} $[\text{Zn}(\text{atc-Et})_2]$ presented here. Thus, comparing the distances, $\text{Co}(1)\text{-N}(1) = 1.952(3)$, $\text{Zn}(1)\text{-N}(1) = 2.200(2)$ and $\text{Mn-N}(1) = 2.2806(15)$, it's possible to observe the lowest oxidation state and the smaller ionic radius lead to a larger attraction of the electrons from the donor atoms of the ligands [14]. The coordination sphere surrounding the Zn^{II} atom is better described as a distorted octahedral geometry, as can be seen by the angles values $\text{N}(2')\text{-Zn}(1)\text{-N}(2)$ 161,09(7) (for **1**) and 169,60(9) (for **2**).

Table 1. Selected bond lengths (Å) and angles (°) for **1** and **2**.

	1	2
Bond Lengths		
Zn(1)-N(2) / Zn(1)-N(2')	2,164(2) / 2,152(2)	2,1549(17) / 2,1549(17)
Zn(1)-N(1) / Zn(1)-N(1')	2,200(2) / 2,249(2)	2,2139(18) / 2,2139(18)
Zn(1)-S(1) / Zn(1)-S(1')	2,4547(7) / 2,4443(7)	2,4452(6) / 2,4452(6)
S(1)-C(8) / S(1')-C(8')	1,738(3) / 1,719(3)	1,729(2) / 1,729(2)
N(3)-C(8)	1,323(3)	1,323(3)
Angles		
N(2')-Zn(1)-N(2)	161,09(7)	169,60(9)
N(2')-Zn(1)-N(1)	104,90(8)	98,88(6)
N(2')-Zn(1)-N(1)	73,87(8)	73,62(7)
N(2')-Zn(1)-N(1')	73,65(8)	73,62(7)
N(2)-Zn(1)-N(1')	87,44(8)	98,88(6)
N(1)-Zn(1)-N(1')	88,10(8)	90,55(9)
N(2')-Zn(1)-S(1')	79,28(5)	79,08(5)
C(8)-S(1)-Zn(1)	96,29(9)	95,93(7)
C(1)-N(1)-C(5)	118,6(2)	118,59(19)

2.2. Cytotoxic Activity for cell lines MRC-5, HepG2, HeLa, MDA-MB-231, K-562 and DU-145

The search for new molecules that exhibit selectivity between a normal cell and a tumor cell is a major challenge in the research of anticancer drugs [15]. In this we are seeking new complexes which show selectivity index greater than three, active substances in concentrations against the tumor cell is three times less aggressive for normal cell [16]. IC₅₀ values (the concentration that inhibited in 50% the cellular proliferation) are presented in **Table 2**. For comparison purposes, the cytotoxicity of cisplatin, a standard antitumor drug, was also evaluated under the same conditions.

The Hatc-ethyl free and ZnCl₂ precursor salt proved to be cytotoxic to MRC-5 normal cells and showed no response to tumor cell lines and are considered non-selective and inactive. But the Hatc-phenyl free presented active for tumor cell lines, but showed up cytotoxic to MRC-5 showing low selectivity. However, in two cases, coordination of these ligands on zinc center resulted in higher antiproliferative activities. The complex (**1**) presented to cytotoxic to the MDA-MB-231 cell line showing SI (3.1) and complex (**2**) showing IS (3.6) to the HepG2 cell, a comparable effect of complexes **1** and **2** with cisplatin show that the complexes are more active against tumor cells and have better SI.

2.3. *Artemia salina* L. Toxicity

Complexes **1** and **2** showed no toxicity to the microcrustacean and when compared with cisplatin observe a positive result because it is more toxic to *Artemia salina* L. than complexes. LC₅₀ values (the LC₅₀ is the concentration of material to which organisms are exposed that is estimated to be lethal to 50 percent of the test organisms) are presented in **Table 3**.

There are few reports in the literature using *Artemia salina* L., for determining the toxicity of novel molecules, most studies so far are conducted in plant extracts [17-19]. However, over the years and the need to use alternative methods new toxicity studies in organic and inorganic molecules using microcrustacean are emerging [20-21].

Table 3. Letal concentration (LC₅₀) the complexes 1-2 and cisplatin against the *Artemia salina* L.

Complexes	LC ₅₀ (μM) ± SD
[Zn(atc-Et) ₂] (1)	962.6 ± 19.2
[Zn(atc-Ph) ₂] (2)	1672.7 ± 15.0
Cisplatin	295.1 ± 35.1

2.4. *In vivo* Acute Toxicity

Complex **1** at a dose of 1.000 mg/kg body weight showed the loss of all BALB/c mice during the experiment, being necessary to administer via gavage a dose of 500 mg/kg body weight. So this concentration was determined to LD₅₀ this complex (**Figure 2**). The control and complex **2** showed no loss of any animal in the concentration of 1.000 mg/kg body weight as shown in **Figure 3**. The cisplatin lost two animals when administered the dose 500 mg/kg body weight, higher concentration was not were administered as there are already reports in the literature of *in vivo* toxicity [22].

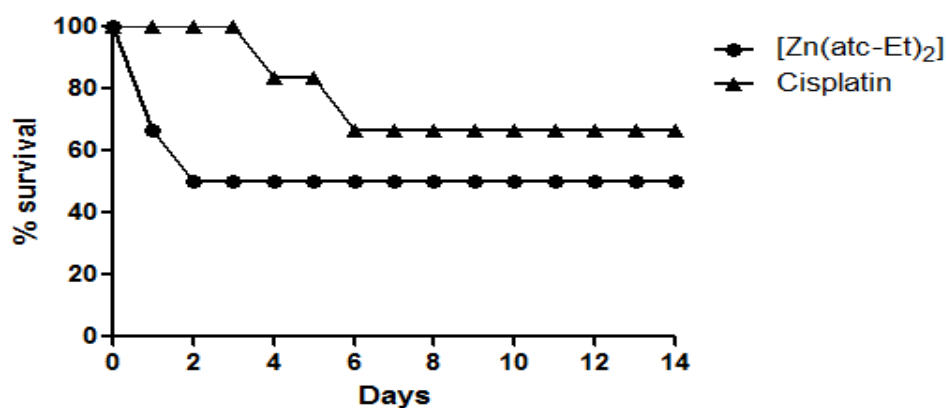


Figure 2. Percentage survival of BALB/c mice for 14 days at the concentration of 500 mg/Kg body weight.

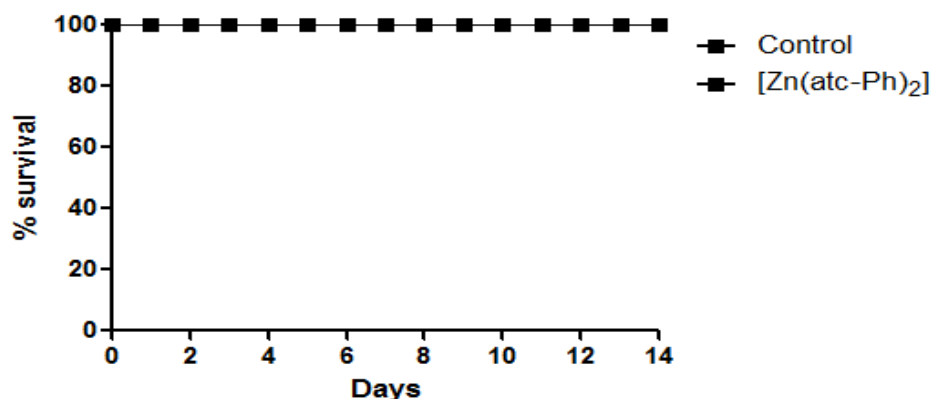


Figure 3. Percent survival of BALB/c mice for 14 days at the concentration of 1.000 mg/Kg body weight.

The macroscopic analysis of the organs showed no morphological changes and found no statistically significant difference in the mean ratio of organ weight to body weight of the animals compared to the control group (**Figure 3**) in any of the complexes and cisplatin.

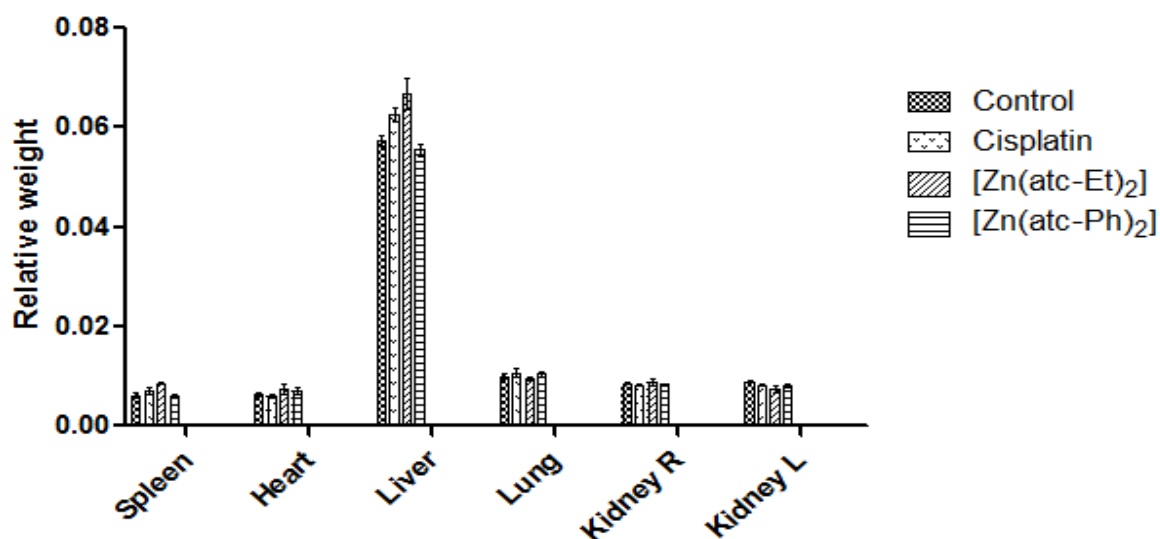


Figure 3. Relative weight (mean ratio of the weight of the organs / body weight of BALB/c) and standard deviation.

2.5. Quantification of the enzymes aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels in the serum of BALB/c mice

In the enzymatic quantification (AST and ALT) in serum of mice was no statistical difference when the complexes and cisplatin were compared with the control group, as seen in **Figure 4** and shown in another study [23]. This result it ensures that no change and liver toxicity in BALB/c mice.

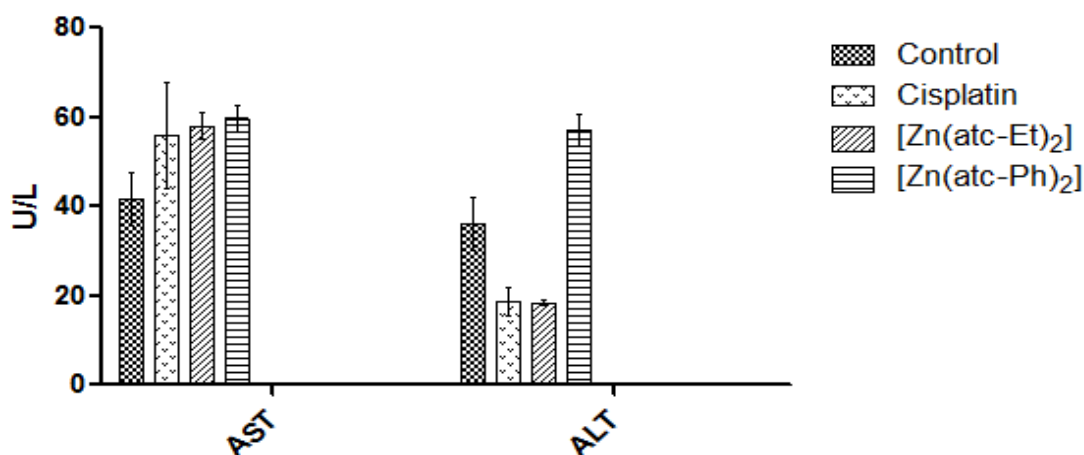


Figure 4. Quantification of AST and ALT in the serum of BALB/c mice.

2.6. Oral bioavailability *in vivo*

In this methodology, they are not evaluated pharmacokinetic and pharmacological parameters. This is a rapid screening test that reveals whether or complex the final product was present or not when absorbed into the bloodstream.

The calibration curve used for quantitation of plasma samples showed R^2 correlation coefficient of 0.999436 and the detection limit (DL) for zinc metal was 0.00000048 mg/mL.

Figure 5 shows the time-concentration profile in plasma of complexes **1** and **2**. The values observed in the figure are calculated taking into consideration the control sample, since the body itself to have an initial concentration of zinc.

The concentrations to complex **1** found were 0.0211 mg/mL, 0.0278 mg/mL, 0.0107 mg/mL and 0.0042 mg/mL, for respective times of 20 minutes, 1 hour, 2 hours and 4 hours of collection. Observing that the concentration of the complex at time 20 minutes was already in 1 hour the C_{max} was observed. As for complex **2** concentrations found were 0.0016 mg/mL, 0.0027 mg/mL, 0.0041 mg/mL and 0.0002 mg/mL, for respective sampling times. To this complex C_{max} observed in the plasma of mice for 2 hours then decay.

The concentration was administered 300 mg/Kg body weight according to the described methodology (3.1.8. item) corresponding to a zinc concentration of 0.77 mg/animal (20 g) for complex **1** and 0.65 mg/animal (20 g) for complex **2**. These doses correspond to a concentration of 0.416 mg/mL and 0.315 mg/mL for complexes **1** and **2**, respectively.

The time-profiles of the concentration of both complexes are in agreement with another study [24]. The different profiles of zinc complexes (**1** and **2**) are probably related to their respective structures due to the presence of different substituents on the ligands coordinated to the metal center.

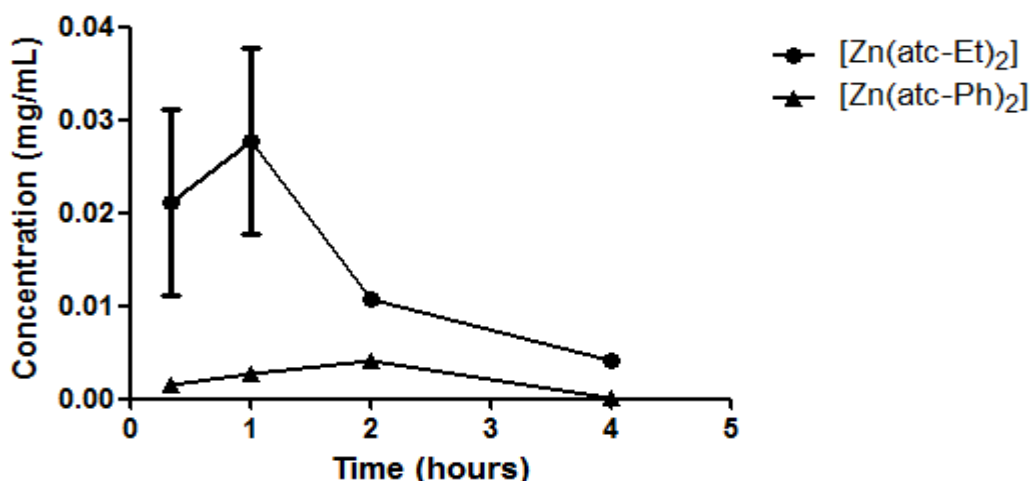


Figure 5. Profile time-plasma concentration of zinc complexes, after a single administration via oral gavage at a dose of 300 mg/Kg body weight.

3. Conclusion

In conclusion, the results indicated that Zn^{II} complexes [Zn(atc-Et)₂] and [Zn(atc-Ph)₂] might be a promising source of new metal-based antitumor agents. The complexes proven to be safe to BALB/c mice in the investigated toxicity parameters when orally administered in the doses used in this study. Also, it was possible to observe the complex 1 C_{max} at 1 hour, and for the complex 2, at 2 hours both after oral gavage administration.

4.1. Experimental Protocols

4.1.1. Inorganic Complexes

2-Acetylpyridine, 4-ethyl-3-thiosemicarbazide, 4-phenyl-3-thiosemicarbazide, ZnCl₂·2H₂O and solvents were obtained commercially and used without further purification. The ligands Hatc-Et and Hatc-Ph, were prepared as reported before [13-14]. FTIR spectra were measured as KBr pellets on a Shimadzu IR Prestige-21 spectrophotometer between 400 and 4000cm⁻¹. Elemental analyses were determined using a Perkin-Elmer CHN 2400 equipment. The conductivities of the complexes were measured in CH₂Cl₂ solutions using an Orion Star Series conductometer. UV-visible (UV-vis) spectra were measured with a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer in DMSO solutions. Yellow crystals were grown by slow evaporation of the mother solution of the two zinc(II) complexes at room temperature. The data collection was performed using Mo-K α radiation (λ = 71.073 pm) on a BRUKER APEX II Duo diffractometer. Standard procedures were applied for data reduction and absorption correction. The structures were solved with SHELXS97 using direct methods and all non-hydrogen atoms were refined with

anisotropic displacement parameters with SHELXL97. The hydrogen atoms were calculated at idealized positions using the riding model option of SHELXL97 [25-26]. **Table 4** presents more detailed information about the structure determination.

Table 4. X-ray structure data collection and refinement parameters.

	1	2
Formula	C ₂₀ H ₂₆ N ₈ S ₂ Zn	C ₂₈ H ₂₆ N ₈ S ₂ Zn
<i>F</i> _w	507.98	604.06
System	Monoclinic	Monoclinic
Space group	P2 ₁	C2/c
<i>a</i> (Å)	8.8919(2)	13.4421(10)
<i>b</i> (Å)	14.7383(4)	18.9640(14)
<i>c</i> (Å)	9.2485(3)	10.9390(8)
α (°)	90	90
β (°)	103.9170(10)	95.5940(10)
γ (°)	90	90
<i>V</i> (Å ³)	1176.45(6)	2775.2(4)
<i>Z</i>	2	4
ρ _{calcd} (Mg.m ⁻³)	1.434	1.446
μ (mm ⁻¹)	1.246	1.069
Θ range	2.36 to 25.12	1.86 to 25.07
Indices	-10← <i>h</i> ←10, 17← <i>k</i> ←17, -11← <i>l</i> ←9	-16← <i>h</i> ←16, -20← <i>k</i> ←22, -12← <i>l</i> ←13
Reflections	8001	8543
Unique/R _{int}	3904/0.0161	2445/0.0227
Abs. Corr.	Integration	Integration
R ₁ [<i>I</i> >2σ(<i>I</i>)]	0.0231	0.0296
wR ₂ [<i>I</i> >2σ(<i>I</i>)]	0.0609	0.0677
GOF in F ²	1.039	1.038

4.1.2. Synthesis of the complexes

The ligands The Zn(II) complexes were synthesized by adding one equivalent (0.25 mmol) of ZnCl₂·2H₂O to solutions of double the amount (0.5 mmol) of the ligands Hatc-R in 15 mL of MeOH containing 3 drops of Et₃N. The resulting solutions were stirred for 4 h under reflux. After this time, the yellow precipitated formed during this time were filtered off, washed with cold methanol, hexane and dried under vacuum. By slow evaporation of the mother solution of both complexes, yellow crystals suitable for X-ray diffraction analysis were obtained.

[Zn(atc-Et)₂] (**1**): Color: Yellow. Yield 0.078 g (61%). Analysis: Found: C, 46.74; H, 5.15; N, 23.05 %. Calc. for C₂₀H₂₆N₈S₂Zn: C, 47.29; H, 5.16; N, 22.06 %. IR (ν_{max}/cm⁻¹): 3216 ν(NH), 1594, 1555 ν(C=N) + ν(C=C), 1053 ν(N-N), 781 ν(C-S). ¹H NMR (DMSO, 399.8 MHz): δ 1.14 (t, J = 8 Hz,

CH_3CH_2 , 6H), 2.45 (s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{N}$, 6H), 3.43 (q, $J = 8$ Hz, CH_2CH_3 , 4H), 7.44 (s, NHCH_2 , 2H), 7.58 (t, $J = 6$ Hz, Py, 2H), 7.83 (d, $J = 8$ Hz, Py, 2H), 8.09 (t, $J = 8$ Hz, Py, 2H), 8.65 (d, $J = 8$ Hz, Py, 2H), UV-Vis in 2.16×10^{-5} M DMSO solution [λ_{max} (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 398.00 nm (3611), 310.00 nm (3141)]. Molar conductivity (1×10^{-3} M dichloromethane): $0.10 \mu\text{Scm}^{-1}$.

[Zn(atc-Ph)₂] (**2**): Color: Yellow. Yield 0.078 g (%). Analysis: Found: C, 54.73; H, 4.33; N, 18.23 %. Calc. for $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{S}_2\text{Zn}$: C, 55.67; H, 4.34; N, 18.55 %. IR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3255 $\nu(\text{NH})$, 1596, 1548 $\nu(\text{C}=\text{N}) + \nu(\text{C}=\text{C})$, 1084 $\nu(\text{N}-\text{N})$, 781 $\nu(\text{C}-\text{S})$. ¹H NMR (DMSO, 399.8 MHz): δ 2.72 (s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{N}$, 6H), 6.94 (t, $J = 8$ Hz, Ph, 2H), 7.28 (t, $J = 8$ Hz, Ph, 4H), 7.38 (t, $J = 8$ Hz, Py, 2H), 7.87 – 7.96 (m, Py + Ph, 10H), 9.29 (s, NHPh , 2H). UV-Vis in 2.15×10^{-5} M DMSO solution [λ_{max} (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 396.50 nm (3265)]. Molar conductivity (1×10^{-3} M dichloromethane): $0.13 \mu\text{Scm}^{-1}$.

4.1.3. Cytotoxic Activity for adherent cell lines MRC-5 (ATCC CCL-171), HepG2 (ATCC HB-8065), HeLa (ATCC CCL-2), MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) and DU-145 (ATCC HTB-81)

The cells were incubated at 37 °C with 5% CO₂ on plates with a surface area of 75 cm² in 10 mL DMEM (Vitrocell®, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum, gentamicin sulfate (50 mg/L) and amphotericin B (2 mg/L). This technique consists of collecting the cells using a solution of trypsin/EDTA (Vitrocell®), centrifuging (252 g for 5 min), counting the number of cells in a Newbauer chamber, non-viable using a *trypan blue* solution 0.4% (Sigma-Aldrich) which excludes cells and then adjusting the concentration to 7.5×10^4 cells/mL in DMEM for tumor cells and MRC-5 cells. Next, 200 μL suspension was deposited into each well of a 96-well microplate obtaining a cell concentration of 1.5×10^4 cells/well and incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ for 24 h to allow the cells to attach to the plate [27]. Dilutions of the test complexes were prepared to obtain concentrations from 500 to 1.95 $\mu\text{g/mL}$. The dilutions were added to the cells after the change of the medium and any cells that did not adhere, and incubated again for 24 h. The cytotoxicity of the complexes was determined by adding 30 μL of resazurin and read after an incubation period of approximately 2 hours. The reading was performed in a microplate Synergy H1 (BioTek®) reader using excitation and emission filters at wave lengths of 530 and 590 nm, respectively. Assays were performed in triplicate.

4.1.4. Cytotoxicity Activity for suspension line K-562 (ATCC CCL-243)

The cells were incubated at 37 °C with 5% CO₂ on plates with a surface area of 75 cm² in 50 mL RPMI-1640 (Vitrocell®, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum, gentamicin sulfate (50 mg/L) and amphotericin B (2 mg/L). This technique consists in centrifuging (252 g for 5 min), counting the number of cells in a Newbauer chamber, non-viable using a *trypan blue* solution 0.4% (Sigma-Aldrich) which excludes cells and then adjusting the concentration of 2×10^5 cells/mL in RPMI-1640. Next, 100 μL suspension was deposited into each well of a 96-well microplate obtaining a cell concentration of 2×10^6 cells/well [28]. Dilutions of the test complexes

were prepared to obtain concentrations from 500 to 1.95 µg/mL. The dilutions were added to the cells and incubated for 24 h. The cytotoxicity of the complexes was determined by adding 30 µL of resazurin and read after an incubation period of approximately 5 hours. The reading was performed in a microplate Synergy H1 (BioTek®) reader using excitation and emission filters at wave lengths of 530 and 590 nm, respectively. Assays were performed in triplicate.

In all cytotoxicity assays as reference drug cisplatin (Sigma-Aldrich) was used at a concentration of 10 mg/mL and DMSO (Sigma-Aldrich) as control at 5%.

4.1.5. Selectivity Index (SI)

The selectivity index of the complexes was calculated from the ratio of the IC₅₀ values found for healthy MRC-5 cells on the IC₅₀ of tumor cells. The larger the value is, the more is considered active agent against tumor cells and less cytotoxic to normal cells of the host. It is considered a promising value, substances with IS > 3 [16].

4.1.6. *Artemia salina* L. Toxicity

For determining toxicity of the complexes in brine shrimp, 25 mg of egg (Natal, RN, Brazil) were incubated in a bequer (2.000 mL) with artificial salt water, at temperatures from 20 to 30 °C. Artificial salt water consisted of 23 g NaCl, 11 g MgCl₂.6H₂O, 4 g Na₂SO₄, 1.3 g CaCl₂.H₂O, 0.7 g KCl in 1000 mL distilled water. The pH was adjusted to 9.0 using NaOH 5N to avoid risk of death to the *Artemia* larvae (nauplii) by decrease of pH during incubation.

After 24 hours, 0.6 g of *Saccharomyces cerevisiae* was added to the bequer for every liter of salt water in order to feed the nauplii; 48 hours after the eggs were incubated, the nauplii were extracted for the experiment.

A suspension of nauplii containing (10-15) organisms (120 µL) was added to each well of 96-well microplates, including the control group. In a separate 96-well microplates serial dilution of complexes and solvent DMSO (2%) was performed. Tested concentrations were 1.500 to 5.85 µg/mL. After 24 hours of incubation, the plate were then examined under a binocular microscope Lupa (X3.0) and the numbers of live nauplii in each well were counted and the medium lethal concentration (LC₅₀) [19]. Assays were performed in triplicate.

In all toxicity assays as reference drug cisplatin (Sigma-Aldrich) was used at a concentration of 15 mg/mL and DMSO (Sigma-Aldrich) as control at 2%.

3.1.6. *In vivo* Acute Toxicity

Female 16–20 weeks old BALB/c mice weighing 24–26 g were purchased from Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) central animal facilities CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica), SP, Brazil. They were maintained in polycarbonate boxes at 23 ± 2 °C, 56 ± 2% humidity, at 12 h light/dark cycle, kept under specific-pathogen-free

conditions (positive-pressure cabinet) and provided food and water *ad libitum* in accordance with the protocols of the Universidade Estadual Paulista (UNESP).

The safety profile of the complexes was evaluated by the test of acute toxicity in BALB/c mice according to established by the OECD (Organization for Economic Cooperation Development) through the classical method acute toxicity (LD₅₀) per single dose orally (gavage) of the complexes [29].

Each complex had the vehicle sunflower oil, and it was used as control (control group). The complexes were administered in a single dose at 1.000 mg/Kg body weight per gavage (n= 6 animals / complex). When any complexes had accidental loss of more than 50% of the animals; Doses of 500 and 300 mg/Kg body weight were administered. The animals were monitored for 14 days and the behavioral parameters (hippocratic screening) were evaluated.

At the end of the experiment animals were weighed, blood was collected via the submandibular vein, euthanized in CO₂ chambers and organs (heart, lungs, kidney right, kidney left, spleen and liver) surgically removed, weighed and macroscopically analyzed. Statistical analysis was performed by GraphPad Prism Version 1.5 software, through the analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's test establishing $P < 0.05$ significance level.

3.1.7. Quantification of the enzymes aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels in the serum of BALB/c mice

In order to analyze whether there was any biochemical changes in the liver of the animals was performed quantification of AST and ALT enzymes in the serum of mice after administration of the complexes (via gavage) before sacrificing them as described. A collection of 500 μ L of blood via submandibular vein was performed. Blood samples were placed into collection tubes, centrifuged at 1097.6 g for 15 minutes to separate the serum and were then stored at -70 ° C and analyzed on the day of collection.

The quantification of enzymes was performed using the biochemical Diagnostic kits Labtest S.A. (Lagoa Santa, MG, Brazil).

Statistical analysis was performed by GraphPad Prism Version 1.5 software, through the analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's test establishing $P < 0.05$ significance level.

3.1.8. Oral bioavailability *in vivo*

Female 4–8 weeks old BALB/c mice weighing 15–20 g were purchased from Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) central animal facilities CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica), SP, Brazil. They were maintained in the same conditions of item 3.1.6.

The determination oral bioavailability *in vivo* of the complexes was performed according to the method suggested [30]. The animals (n = 2 animals / complex) received an oral gavage dose of 300 mg/Kg body weight. In times of 20 minutes, 1, 2, 4 hours, 2 animals had blood drawn through a small hole inducing bleeding in mice face of the targeting retro-orbital veins draining the

submandibular and the face of the mice at the point at which joining the origin of the jugular vein. So that drops of blood exude from the point of penetration [31]. The plasma was separated and stored at -70°C for chemical quantification.

3.1.9. Specimen preparation for ICP-OES

The metal ion (zinc) was quantified using Optical Emission Spectrometer by Inductively Coupled Plasma (ICP-OES) Thermo Scientific Model 6300.

Samples ($50\mu\text{L}$) were diluted 1:100 with a solution containing 0.01% (v/v) Triton X-100, 0.5% (v/v) nitric acid [32]. During the experiment was performed the method of recovery validation test, which gave a result of 94-104%.

Acknowledgments

We thank FAPESP ref. Process: 2013/09265-7 and 2013/14957-5, CNPQ-Glaxo ref. Process: 406827/2012-5 and PROPE ref Process: 0102/004/43 for financial Support.

Table 2. Cytotoxicity (IC₅₀) of the ZnCl₂, free ligands and complexes 1–2 and cisplatin against tumor cell lines and normal cell (MRC-5)

Complexes	IC ₅₀ (μM) ± SD										
	MRC-5 ¹	HepG2 ²	SI*	HeLa ²	SI*	MDA-MB-231 ²	SI*	K-562 ²	SI*	DU 145 ²	SI*
ZnCl ₂ ·6H ₂ O	239.9 ± 16.8	698.4 ± 10.9	0.3	864.5 ± 14.0	0.3	475.4 ± 64.3	0.5	1088.7 ± 73.8	0.2	382.9 ± 7.8	0.6
Hatc-Et	9.0 ± 0	552.8 ± 45.0	0	746.0 ± 23.2	0	903.5 ± 65.3	0	420.3 ± 3.7	0	531.5 ± 12.6	0
Hatc-Ph	7.4 ± 0	36.3 ± 1.5	0.2	25.0 ± 0.2	0.3	24.3 ± 5.0	0.3	11.1 ± 0.6	0.7	15.1 ± 2.1	0.5
[Zn(atc-Et) ₂] (1)	12.1 ± 4.0	7.1 ± 3.7	1.7	102.0 ± 17.6	0.1	3.9 ± 0	3.1	52.0 ± 8.6	0.2	9.4 ± 3.4	1.3
[Zn(atc-Ph) ₂] (2)	12.1 ± 3.0	3.3 ± 0	3.6	325.0 ± 58.4	0	5.5 ± 3.1	2.2	14.1 ± 3.8	1.0	34.1 ± 7.0	0.3
Cisplatin	46.2 ± 4.9	60.3 ± 15.1	0.8	85.0 ± 10.1	0.5	143.3 ± 3.3	0.3	75.4 ± 6.0	0.6	56.5 ± 6.8	0.8

*The SI of the complex was calculated from the ratio of IC₅₀ values MRC-5¹ / IC₅₀ of tumors² cells. It is considered a promising value, substances with SI > 3.

References

- [1] WHO. World Health Organization. 2015. Available online: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>> (accessed on 6 April 2015).
- [2] American Cancer Society, 2015. Available online: <<http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2014/>> (accessed on 15 May 2015).
- [3] NCI. National Cancer Institute. 2015. Available online: <<http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>> (accessed on 6 April 2015).
- [4] KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 8, p. 573-584, 2007. ISSN 1474-175X.
- [5] BIELAWSKI, K. et al. Cytotoxicity and induction of apoptosis of human breast cancer cells by novel platinum(II) complexes. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 35, n. 2, p. 254-64, 2013. ISSN 1382-6689.
- [6] DO NASCIMENTO, F. B. et al. Synthesis, characterization, X-ray structure and in vitro antimycobacterial and antitumoral activities of Ru(II) phosphine/diimine complexes containing the "SpymMe2" ligand, SpymMe2=4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine. **J Inorg Biochem**, v. 102, n. 9, p. 1783-9, 2008. ISSN 0162-0134.
- [7] GOLFETO, C. C. et al. Synthesis, characterization and cytotoxic activities of the [RuCl₂(NO)(dppp)(L)]PF₆ complexes. **J Inorg Biochem**, v. 104, n. 5, p. 489-95, 2010. ISSN 0162-0134.
- [8] PAVAN, F. R. et al. Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 5099-5107, 2011. ISSN 0223-5234.
- [9] MONDELLI, M. A. et al. Ruthenium(II)/4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine complexes: Synthesis, characterization, X-ray structures and in vitro cytotoxicity activities on cancer cell lines. **Polyhedron**, v. 68, p. 312-318, 2014. ISSN 0277-5387.
- [10] MALONE, R. **Bioinorganic Chemistry: A Short Course**. Canadá. 2002. ISBN 0-471-15976-X.
- [11] LI, M. X. et al. Synthesis, crystal structures, in vitro biological evaluation of zinc(II) and bismuth(III) complexes of 2-acetylpyrazine N(4)-phenylthiosemicarbazone. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 7, p. 2418-2423, 2012. ISSN 0960-894X.
- [12] LI, M. X. et al. Mn(II), Co(II) and Zn(II) complexes with heterocyclic substituted thiosemicarbazones: synthesis, characterization, X-ray crystal structures and antitumor comparison. In: (Ed.). **Eur J Med Chem**, v. 45, p.3169-77, 2010. ISBN 1768-3254.
- [13] OLIVEIRA, C. G. et al. Manganese(II) complexes with thiosemicarbazones as potential anti-Mycobacterium tuberculosis agents. **J Inorg Biochem**, 2013. ISSN 0162-0134.
- [14] OLIVEIRA, C. G. et al. Cobalt(III) Complexes with Thiosemicarbazones as Potential anti-Mycobacterium tuberculosis Agents. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 1848-1856, 2014. ISSN 0103-5053.

- [15] STEFANI, C. et al. Alkyl substituted 2'-benzoylpyridine thiosemicarbazone chelators with potent and selective anti-neoplastic activity: novel ligands that limit methemoglobin formation. **J Med Chem**, v. 56, n. 1, p. 357-70, 2013. ISSN 0022-2623.
- [16] CHELOPO, M. P. et al. Anticancer activity of ruthenium(II) arene complexes bearing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline amino alcohol ligands. **Eur J Med Chem**, v. 66, p. 407-14, 2013. ISSN 0223-5234.
- [17] MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med**, v. 45, n. 5, p. 31-4, 1982. ISSN 0032-0943.
- [18] SOLIS, P. N. et al. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). **Planta Med**, v. 59, n. 3, p. 250-2, 1993. ISSN 0032-0943.
- [19] LOGARTO PARRA, A. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001. ISSN 0944-7113.
- [20] FERRAZ, K. O. et al. Copper(II) complexes with 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones: spectral studies and toxicity against *Artemia salina*. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 73, n. 1, p. 140-5, 2009. ISSN 1386-1425.
- [21] KRSTIC, N. M. et al. Steroid dimers-in vitro cytotoxic and antimicrobial activities. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 143, p. 365-75, 2014. ISSN 0960-0760.
- [22] MUSCELLA, A. et al. Antitumor activity of [Pt(O,O'-acac)(gamma-acac)(DMS)] in mouse xenograft model of breast cancer. In: (Ed.). **Cell Death Dis**, v. 5, p. 1014, 2014. ISBN 2041-4889.
- [23] ARAUJO, R. C. et al. Evaluation of the anti-mycobacterium tuberculosis activity and in vivo acute toxicity of *Annona sylvatic*. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, p. 209, 2014. ISSN 1472-6882.
- [24] ZHANG, S. et al. Pharmacokinetics and biodistribution of zinc-enriched yeast in rats. **ScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 217142, 2014. ISSN 1537-744X.
- [25] G.M. Sheldrick, SHELXS97, Program for the Solution of Crystal Structures, University of Göttingen, Germany, 1997.
- [26] G.M. Sheldrick, SHELXL97, Program for the Refinement of Crystal Structures, University of Göttingen, Germany, 1997.
- [27] O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000. ISSN 0014-2956.
- [28] AKHTAR, M. N. et al. Total synthesis, cytotoxic effects of damnacanthal, nordamnacanthal and related anthraquinone analogues. In: (Ed.). **Molecules**, v. 18, p.10042-55, 2013. ISBN 1420-3049.
- [29] OECD. Guideline 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. Paris: Head of Publications Service, 2001. Available online: <<http://www.oecd.org/publications>> (accessed on 18 November 2014).
- [30] GRUPPO, V. et al. Rapid microbiologic and pharmacologic evaluation of experimental compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1245-1250, 2006. ISSN 0066-4804.

- [31] GOLDE, W. T.; GOLLOBIN, P.; RODRIGUEZ, L. L. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. In: (Ed.). **Lab Anim (NY)**, v. 34, p.39-43, 2005. ISBN 0093-7355.
- [32] BATISTA, B. L. et al. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. **Anal Chim Acta**, v. 639, n. 1-2, p. 13-8, 2009. ISSN 0003-2670.