

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - DOUTORADO
UEL/UEPG/UNICENTRO

BIANCA SANDRINO

*Estudos de Filmes de Langmuir e LB de complexo fosfínico de rutênio visando potenciais
aplicações biológicas*

PONTA GROSSA

2014

BIANCA SANDRINO

Estudos de Filmes de Langmuir e LB de complexo fosfínico de rutênio visando potenciais aplicações biológicas

Tese apresentada à Universidade Estadual Ponta Grossa, como requisito do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: *Profa. Dra. Karen Wohnrath*

Co-orientador: *Dra. Thatyanne M. Nobre Pavinatto*

PONTA GROSSA

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

S219 Sandrino, Bianca
 Estudos de Filmes de Langmuir e LB de
 complexo fosfínico de rutênio visando
 potenciais aplicações biológicas/ Bianca
 Sandrino. Ponta Grossa, 2014.
 125f.

 Tese (Doutorado em Química - Área de
 Concentração: Química), Universidade
 Estadual de Ponta Grossa, Universidade
 Estadual de Londrina e Universidade
 Estadual do Centro- Oeste.
 Orientadora: Prof^a Dr^a Karen Wohnrath.
 Coorientadora: Prof^a Dr^a Thatyanne M.
 Nobre Pavinatto.

 1.Complexo de rutênio.
 2.Anticancerígenos. 3.Fosfolipídios.
 4.Filmes de Langmuir. I.Wohnrath, Karen.
 II. Pavinatto, Thatyanne M. Nobre. III.
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Universidade Estadual de Londrina.
 Universidade Estadual do Centro- Oeste.

CDD: 546.632

TERMO DE APROVAÇÃO

BIANCA SANDRINO

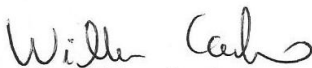
“ESTUDOS DE FILMES DE LANGMUIR E LB DE COMPLEXO FOSFÍNICO DE RUTÊNIO VISANDO POTENCIAIS APLICAÇÕES BIOLÓGICAS.”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

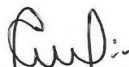
Orientador:



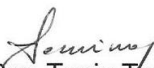
Profa. Dra. Karen Wohnrath
UEPG/PR



Prof. Dr. Wilker Caetano
UEM/PR



Dr. Fábio B. do Nascimento
São Carlos/SP



Profa. Dra. Tania Toyomi Tominaga
UNICENTRO/PR



Prof. Dr. Sergio Toshio Fujiwara
UEPG/PR

Ponta Grossa, 30 de setembro de 2014.

Dedico esta tese a meu Pai (Etelvoldo, saudade eterna, in Memorian) por ter sido o primeiro a sonhar com esse título, a minha Mãe (Gilma) por ter conseguido nos fazer chegar até aqui.

Aos meus irmãos (Bruna e Gui) que são os melhores que Deus poderia ter dado.

A meu marido Paulo por ter sempre estado ao meu lado incondicionalmente.

Aos meus filhos Maria Eduarda e Matheus por serem a razão de seguir sempre buscando o melhor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela sua presença em minha vida, sem que precise pedir, pelo auxílio nas minhas escolhas, por me confortar nas horas difíceis e abrir os meus caminhos.

À minha família, pelo apoio incondicional, força, incentivo e amizade sem igual. Sem eles nada disto seria possível.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Karen Wohnrath, por todos os conhecimentos transmitidos, com um papel fundamental para a minha formação profissional. Agradeço também pela amizade, incentivo e sábias sugestões, sempre presente ao longo desses anos.

À Dra. Thatyanne M. Nobre Pavinatto, pela coorientação, imensa amizade e pela contribuição com seus conhecimentos e sugestões.

Ao Profa Dra. Tania T. Tominaga (UNICENTRO), pela amizade e testes biológicos.

Ao Prof^o Dr. Marcio P. de Araujo e amigos da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração, conhecimentos e sugestões sobre síntese e caracterização de complexos inorgânicos.

Ao Prof^o Dr. Osvaldo N. de Oliveira Jr. pela disponibilidade de infraestrutura e discussão dos resultados, sempre com muita prestreza.

A Profa Dra. Barbara C. Fiorin pelos cálculos teóricos e Prof^o Dr. Adriano Viana pelas medidas de RMN.

A Profa Dra. Christiana A. Pessoa pela infraestrutura do Grupo de Desenvolvimento de Eletrodos Modificados (GDEM).

Aos colegas do GDEM por me ajudarem nas discussões de dúvidas no laboratório. Em especial a Ellen pelos cálculos termodinâmicos e demais. Agradeço também pela amizade e momentos de descontração ao longo desses anos.

Aos professores e colegas do Programa de Doutorado em Química. Aos funcionários do DeQuim.

A CAPES pelo auxílio financeiro

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Um dos grandes desafios na concepção de medicamentos é a identificação de compostos com potencial toxicidade para as células-alvo e a compreensão do seu modo de ação. Nesta tese, foi analisada a propriedade antitumoral do complexo de rutênio *mer*-[RuCl₃(dppb)(VPy)] (dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano e VPy = 4-vinilpiridina) (RuVPy), e os resultados mostraram que este composto levou a uma taxa de mortalidade de 50% de células de câncer de laringe (HEp-2) com $120 \pm 10 \mu\text{mol L}^{-1}$, indicando sua alta toxicidade. Para a compreensão do modo de ação em nível molecular deste complexo, associada à sua interação com membranas celulares, monocamadas de Langmuir foram utilizadas como um modelo simples de membrana. O RuVPy apresentou um forte efeito sobre as isotermas de pressão de superfície, especialmente sobre as propriedades elásticas do zwitteriônico dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e dos fosfolipídios carregados negativamente dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) e dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS). Resultados dos parâmetros termodinâmicos indicaram que há miscibilidade entre os componentes das monocamadas mistas não ideais. Interações preferencialmente atrativas e repulsivas foram constatadas entre o RuVPy e os fosfolipídios zwitteriônico e aniônicos, respectivamente, sendo a monocamada mista de DPPS/RuVPy energeticamente desfavorável. A interação entre o grupo de maior densidade eletrônica do RuVPy, obtido por cálculo de teoria funcional da densidade (DFT), e o grupo fosfato dos fosfolipídios foi confirmada por espectroscopia de infravermelho de reflexão e absorção de modulo polarizado (PM-IRRAS) realizada na interface ar-água. Prova desta interação foi constatada por resultados eletroquímicos dos filmes Langmuir-Blodgett da mistura fosfolipídio/RuVPy. A presença do complexo no substrato condutor, por ter maior densidade eletrônica, forma “defeitos” na monocamada dos fosfolipídios aumentando o acúmulo de elétrons na interface eletrodo/solução tornando o material mais permeável. Desta forma, é evidente que além de eventuais contribuições de outros receptores ou componentes celulares não poderem ser descartadas, os resultados aqui apresentados trazem os efeitos significativos nas membranas celulares que provavelmente estão associados à alta toxicidade do RuVPy.

Palavras-chave: complexo de rutênio, anticancerígenos, fosfolipídios, filmes de Langmuir.

ABSTRACT

One of the major challenges in drug design is to identify compounds with potential toxicity toward target cells, preferably with molecular-level understanding of their mode of action. In this study, the antitumor property of a ruthenium complex, *mer*-[RuCl₃(dppb)(VPy)] (dppb = 1,4-bis(diphenylphosphine) butane and VPy = 4-vinylpyridine), (RuVPy) was analyzed. Results showed that this compound led to a mortality rate of 50% of human laryngeal carcinoma HEp-2 cell with $120 \pm 10 \mu\text{mol L}^{-1}$, indicating its high toxicity. Toward a better understanding if its mode of action is associated with its interaction with cell membranes, Langmuir monolayers were used as a membrane model. RuVPy had a strong effect on the surface pressure isotherms, especially on the elastic properties of the zwitterionic dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and the negatively charged dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) and dipalmitoylphosphatidylserine (DPPS) phospholipids. Results of thermodynamic parameters indicated miscibility between the components is not ideal mixed monolayers. Preferably attractive and repulsive interactions between RuVPy and zwitterionic or anionic phospholipids, respectively, are observed with the mixed monolayer of DPPS/RuVPy energetically unfavorable. These data were confirmed by polarization-modulated infrared reflection-absorption spectroscopy (PM-IRRAS). In addition, interactions between the positive group from RuVPy and the phosphate group from the phospholipids were corroborated by density functional theory (DFT) calculations, allowing the determination of the Ru complex orientation at the air-water interface. Proof of this interaction was confirmed by electrochemical results of Langmuir-Blodgett films of the phospholipid/RuVPy mixture. The presence of the RuVPy on the conductor substrate, which presents higher electron density, form "defects" in the monolayer of phospholipids increasing the accumulation of electrons in the electrode/solution interface making it more permeable material. Although possible contributions from receptors or other cell components cannot be discarded, the results reported here represent evidence for significant effects on the cell membranes which are probably associated with the high toxicity of RuVPy.

Keywords: Ruthenium complex, anticancer, phospholipids, Langmuir films.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) Representação da interação entre os orbitais $d\pi$ do metal (M) e orbitais $3p$ do ligante (L), onde 1 é a ligação σ e 2 é retrodoação π ; e (B) Ângulo de cone de Tolman para PR_3 . Imagens adaptadas da referência 52.	23
Figura 2: Estruturas propostas para os complexos (A) fac - $[RuCl_3(NO)(dppf)]$, onde $dppf$ = 1,10-bis(difenilfosfina)ferroceno representado por X na estrutura; (B) da série $[RuCl_2(NO)(dppp)(L)]PF_6$, onde $dppp$ = 1,3-bis(difenilfosfina)propano e L = piridina, 4-metilpiridina, 4-fenilpiridina e dimetilsulfóxido; (C) mer - $[RuCl_3(dppb)H_2O]$ aqui denominado Ruaquo, onde $dppb$ = 1,4 bis(difenilfosfina)butano e (D) da série $[RuCl(dppb)L]Cl$, onde L = 2-benzoilpiridina tiosemicarbazona (H2Bz4DH), N(4)-metil (H2Bz4M) e N(4)-fenil (H2Bz4Ph).	24
Figura 3: Gráfico de pressão de superfície vs área por molécula (isoterma) e ilustração do processo de formação de filme de Langmuir para uma molécula ideal anfifílica, o ácido esteárico.	30
Figura 4: Representação da organização estrutural dos filmes LB formados por deposições do tipo Y, X e Z, adaptação da referência [65].	32
Figura 5: Espectros de absorção na região do ultravioleta visível para o complexo RuVPy com concentração de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em CH_2Cl_2 e DMSO realizados com solução fresca e após 24 h.	51
Figura 6: Espectros de RMN de ^{31}P do complexo RuVPy em DMSO no tempo inicial do experimento (a), após 2 horas de adição de DMSO (b) e 24 horas de adição de DMSO (c). Referência D_2O/H_3PO_4 85%, a 200 MHz a temperatura ambiente.	52
Figura 7: Mecanismo dissociativo proposto do RuVPy na presença de DMSO formando o complexo mer - $[RuCl_3(dppb)(DMSO)]$ e posteriormente o complexo $trans$ - $[RuCl_2(dppb)(DMSO)_2]$.	53
Figura 8: Estrutura molecular do fosfolipídio zwitteriônico DPPC (A) e dos aniônicos DPPG (B) e DPPS (C).	54
Figura 9: Espectros de absorção na região do ultravioleta visível para (A) o DPPC, DPPG, DPPS (0,5 mM) e sua respectivamente misturas de DPPC/RuVPy, DPPG/RuVPy e DPPS/RuVPy com 10 e 50% do RuVPy (0,5 mM) em (B) $CHCl_3$ e (C e D) solução de $CHCl_3/MeOH$ (4:1 v:v).	55
Figura 10: Espectros de RMN de ^{31}P do complexo RuVPy, (A) do DPPC e da mistura DPPC/RuVPy (90/10, massa/massa) (B) do DPPG e da mistura DPPG/RuVPy (90/10, massa/massa) e (C) do DPPS e da mistura DPPS/RuVPy (90/10, massa/massa), em $CHCl_3$ ou $CHCl_3/MeOH$ e como referência D_2O/H_3PO_4 85% 400 MHz.	56
Figura 11: Efeito do RuVPy no índice de sobrevivência de células normais VERO (A) e de células cancerígenas HEp-2 (B) por 24h. Cada coluna representa a média $\pm$ desvio padrão para dois experimentos cada, realizado em sextuplicata	59
Figura 12: Isotermas de π vs área por molécula do complexo RuVPy em subfase de (A) água ultrapura e (C) em tampão fosfato salino a 20 °C. Estruturas espaciais do complexo RuVPy obtidas por cálculos teóricos para (B) subfase de água ultrapura e (D) tampão fosfato salino. No espaço em destaque é representada a área ocupada entre os átomos H68, H57 e Cl71, a qual corresponde a área extrapolada ($25 \text{ \AA}^2$) (A) e átomos H67, H55 e C75, o qual corresponde a área extrapolada ($43 \text{ \AA}^2$) (C) para monocamadas condensadas. (E) é o mapa de potencial eletrostático do RuVPy no espaço (isovalor 0,05) com escala de cor do vermelho(negativo) de -0.18 u.a. para o azul (positivo) de 0.17 u.a.	63

Figura 13: Isotermas π vs área por molécula dos compostos (A) DPPC, (B) DPPG, (C) DPPS, a 20 °C, em tampão fosfato salino.....	64
Figura 14: Isotermas π vs área por molécula dos compostos RuVPy, (A) DPPC, (B) DPPG, (C) DPPS e suas respectivas misturas, (—) 10% Ru, (—) 30% Ru, (—) 50% Ru, (—) 70% Ru e (—) 90% Ru, a 20 °C em tampão fosfato salino. Figura inserida: Módulo de compressibilidade (C_s^{-1}) versus a pressão de superfície para os compostos puros e respectivas misturas.....	66
Figura 15: Gráficos da área de maior ordenamento das monocamadas mistas e pressão de colapso (A) DPPC/RuVPy, (B) DPPG/RuVPy e (C) DPPS/RuVPy em função da proporção de RuVPy (0, 10, 30, 50, 70, 90 e 100%)	68
Figura 16: Áreas moleculares experimentais (linha sólida) e ideais (linha tachada) para as monocamadas mistas (A) DPPC/RuVPy, (B) DPPG/RuVPy e (C) DPPS/RuVPy, em diferentes proporções de RuVPy (0, 10, 30, 50, 70, 90 e 100 %), obtidas sobre subfase aquosa contendo solução tampão PBS, nas pressões de 5-30 mN m ⁻¹	69
Figura 17: Relação entre a área molecular em excesso (ΔA^E) das misturas (A) DPPC/RuVPy, (B) DPPG/RuVPy e (C) DPPS/RuVPy sobre subfase aquosa contendo solução tampão PBS, em função da proporção de RuVPy (0, 10, 30, 50, 70, 90 e 100 %) em diferentes pressões de superfície.....	71
Figura 18: Energia livre em excesso para as monocamadas mistas (A) DPPC/RuVPy, (B) DPPG/RuVPy e (C) DPPS/RuVPy, em diferentes proporções de RuVPy (0, 10, 30, 50, 70, 90 e 100 %), obtidas sobre subfase aquosa contendo solução tampão PBS, nas pressões de 5-30 mN m ⁻¹	72
Figura 19: Energia livre para as monocamadas mistas (A) DPPC/RuVPy, (B) DPPG/RuVPy e (C) DPPS/RuVPy, em diferentes proporções de RuVPy (0, 10, 30, 50, 70, 90 e 100 %), obtidas sobre subfase aquosa contendo solução tampão PBS, nas pressões de 5-30 mN m ⁻¹	73
Figura 20: Energia livre para as monocamadas mistas DPPC/RuVPy, DPPG/RuVPy e DPPS/RuVPy com 10% de RuVPy, em diferentes pressões de superfície (27, 28, 29, 30, 31 e 32 mN m ⁻¹), obtidas sobre subfase aquosa contendo solução tampão PBS, pH7,4.....	74
Figura 21: Coeficiente de atividade f_1 (A) e f_2 (B) da monocamada mista DPPS/RuVPy em tampão PBS, pH 7,4, em função da proporção molar.	75
Figura 22: Troca de energia (A) e parâmetro de interação (B) das monocamadas mistas DPPS/RuVPy em função da razão molar de RuVPy.	76
Figura 23: Imagens de BAM correspondentes ao filme de Langmuir do complexo RuVPy obtido em diferentes pressões, em subfase de tampão fosfato salino (pH 7,4) a 20 °C. Devido o intenso brilho das monocamadas de RuVPy foi necessário utilizar o auto ajuste do equipamento a fim de diminuir a intensidade de luz refletida até o fim da coleta de imagens do filme.....	78
Figura 24: Imagens de BAM correspondentes aos filmes de Langmuir dos fosfolipídios (A) DPPC, (B) DPPG e (C) DPPS, em subfase de tampão fosfato salino, a 20°C.	79
Figura 25: Imagens de BAM correspondentes aos filmes de Langmuir mistos, DPPC/Ru, DPPG/Ru e DPPS/Ru, com 10% de RuVPy, em subfase de tampão fosfato salino, a 20°C.	81
Figura 26: Espectro de massas ESI para o complexo RuVPy oxidado 0,2 mg.mL ⁻¹ em solução de acetonitrila com ácido fórmico.....	83
Figura 27: Espectros de PM-IRRAS das monocamadas obtidas em subfase de tampão fosfato salino, em pressão de 30 mN m ⁻¹ dos compostos puros DPPC (A), DPPG (B) e DPPS(C) e das misturas com 10% de RuVPy.	85

Figura 28: Espectros de PM-IRRAS dos filmes LB em Si (3 bicamadas) dos compostos puros e mistos com RuVPy (10%) para DPPC (A), DPPG (B) e DPPS(C).....	90
Figura 29: Voltamogramas cíclicos do LB/RuVPy (1 e 3 camadas) sobre substrato de ITO em solução de HCl $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte, a 50 mV s^{-1} vs. Ag/AgCl.	92
Figura 30: Voltamogramas cíclicos do substrato ITO (A) e dos filmes LB com 3 camadas dos compostos puros e mistos com RuVPy (10%), DPPC (B), DPPG (C) e DPPS(D) em tampão PBS (pH=7,4) a 50 mV s^{-1} versus Ag/AgCl.....	94
Figura 31: Voltamogramas cíclicos do substrato ITO (A) e dos filmes LB dos compostos puros e mistos com RuVPy (10%), DPPC (B), DPPG (C) e DPPS (D) sobre substrato de ITO, em tampão PBS pH 7 com 5 mmol L^{-1} da sonda redox, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]:\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, versus Ag/AgCl.....	96
Figura 32: Diagramas de Nyquist do substrato ITO (curva em preto) e dos filmes LB do RuVPy (curva em rosa), do DPPC puro (curva em vermelho), do filme misto com 10% de RuVPy (círculos vazios), em tampão PBS pH 7,4 com 1 mmol L^{-1} da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$	99
Figura 33: Voltamogramas cíclicos (A) e diagramas de Nyquist (B) do eletrodo de CV, dos filmes LB e cast dos filmes puros e mistos de DPPC com RuVPy (10%) em tampão PBS pH 7 com 5 mmol L^{-1} da sonda redox $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]:\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ versus Ag/AgCl.	102
Figura 34: (A) Estrutura de lipossomos adaptada da referencia 170 e (B) Imagem das soluções lipossômicas de DPPC a direta, e de DPPC/RuVPy na proporção 90/10% a esquerda, ambas em tampão PBS pH 7,4.	105
Figura 35: Espectros de absorção na região do UV-Vis de soluções de RuVPy e do DPPC puro (1 mmol. L^{-1}) e do complexo que foi encapsulado em lipossomos na proporção de 10% de RuVPy após liofilização e solubilização em CH_2Cl_2	105
Figura 36: Imagens de MEV para os filmes casted contendo os lipossomos de DPPC (A) e DPPC/RuVPy com 10% de RuVPy(B) escala = 1 e 2 nm	109
Figura 37: Efeito do RuVPy no índice de sobrevivência de células cancerígenas HEP-2 por 24h. Cada coluna representa a média $\pm$ desvio padrão para dois experimentos cada, realizado em sextuplicata.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ou RC_{50} , % de inibição de crescimento de células de tumorais para complexos bifosfínicos de rutênio e metalodroga de referência.....	28
Tabela 2: Números de onda e atribuição das principais bandas do RuVPy em filme de Langmuir sobre subfase de tampão fosfato salino, em pressão de 30 mN m^{-1}	86
Tabela 3: Números de onda e atribuição das principais bandas dos compostos puros DPPC, DPPG, DPPS e das respectivas misturas com 10% de RuVPy em filmes de Langmuir sobre subfase de tampão fosfato salino, em pressão de 30 mN m^{-1}	87
Tabela 4: Números de onda e atribuição dos principais estiramentos dos grupos funcionais dos compostos puros e da mistura fosfolipídios/RuVPy em filmes LB em Si.	91
Tabela 5: Dados obtidos dos voltamogramas do substrato ITO e dos filmes LB dos compostos puros e mistos na presença par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$	97
Tabela 6: Dados de resistência obtidos dos Diagramas de Nyquist do substrato ITO e dos filmes LB dos compostos puros DPPC, DPPG, DPPS e RuVPy e dos filmes mistos de fosfolipídios com 10% de RuVPy.....	100
Tabela 7: Dados obtidos dos voltamogramas e diagramas de Nyquist do substrato ITO e dos filmes LB dos compostos puros e mistos.	102
Tabela 8: Distribuição média de tamanho e carga dos lipossomos de DPPC puro e da mistura DPPC/RuVPy na proporções 90/10 % em função do tempo.	106
Tabela 9: Números de onda e atribuição dos principais estiramentos dos grupos funcionais dos lipossomos de DPPC e da mistura DPPC/RuVPy em filmes cast sobre em Si.	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\text{\AA}$ - angstrom, 10^{-10} m

AFM - microscopia de força atômica

A_{12} - área molecular média no filme misto

BAM - microscopia de ângulo de Brewster

BiPy- 2,2'-bipiridina

DLS (Dynamic Light Scattering) - espalhamento de luz dinâmico

dppb - 1,4-*bis*(difenilfosfina)butano

DPPC - dipalmitoilfosfatidilcolina

dppe -1,2-*bis*(difenilfosfina)etano

dppf - 1,10-*bis*(difenilfosfina)ferroceno

DPPG - dipalmitoilfosfatidilglicerol

dppm - 1,1-*bis*(difenilfosfina)metano

dppp -1,3-*bis*(difenilfosfina)propano

DPPS - dipalmitoilfosfatidilserina

E_{pa} - potencial de pico anódico

E_{pc} - potencial de pico catódico

FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) - espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

f_1, f_2 - coeficiente de atividade para os componentes da mistura

HEp-2 - linha de célula de carcinoma de laringe humana

IC_{50} – concentração da droga estabelecida para inibir crescimento celular em 50%

I_p - parâmetro de interação

I_{pa} – corrente de pico anódico

I_{pc} - corrente de pico catódico

ITO - óxido de estanho dopado com índio

KP1019 –HInd[trans-RuCl₄(Ind)₂] (Ind = indazolium)

LB - Langmuir-Blodgett

MEV - Microscopia eletrônica de Varredura

MeOH – metanol

NAMI-A –HIm[trans-RuCl₄(DMSO)Im] (Im = Imidazolium)

PM-IRRAS- espectros de reflexão-absorção modulada de polarização na região do infravermelho

RC(50) - inibição do crescimento celular em 50% das células

RMN - ressonância magnética nuclear

RuVPy - *mer*-[RuCl₃(dppb)(VPy)]

TCLM - transferência de carga ligante-metal

TEM – microscopia eletrônica de transmissão

UV-Vis - espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível

VC- voltametria cíclica

VERO - linha de células do tipo fibroblasto normais

VPy – 4-vinilpiridina

ΔA^E - área em excesso

ΔG^E - energia livre em excesso

ΔG^M - energia livre da mistura

λ - comprimento de onda

$\pi - A$ - pressão de superfície vs área por molécula (isoterma)

ω - troca de energia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Atividade biológica de complexos de Rutênio	20
2.2 Atividade antitumoral de complexos bifosfínicos de rutênio	22
2.3 Filmes de Langmuir	29
2.4 Técnica Langmuir-Blodgett	31
2.4 Filmes de Langmuir e LB de fosfolipídios, aplicações como modelos de membrana frente a complexos metálicos inorgânicos	33
2.6 Filmes LB de complexos fosfínicos de Rutênio	36
3. OBJETIVOS	39
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	40
4.1 Reagentes	40
4.2 Síntese do complexo RuVPy	40
4.3 Filmes de Langmuir	40
4.4 Filmes Langmuir-Blodgett (LB)	41
4.5 Filmes cast de DPPC puro e com 10% de RuVPy	41
4.6 Preparo de formulação lipossômica do complexo RuVPy em vesículas de DPPC	42
4.7 Princípios e condições experimentais das técnicas de caracterização	42
4.7.1 Estudo teórico da estrutura do complexo RuVPy puro	42
4.7.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear – RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	43
4.7.3 Espectroscopia de Absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	43
4.7.4 Ensaio de viabilidade celular	43
4.7.5 Análises termodinâmicas dos filmes de Langmuir mistos	44
4.7.6 Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM) dos filmes de Langmuir	47
4.7.7 Espectrometria de massa com ionização por spray eletrostático	47
4.7.8 Espectroscopia de absorção e reflexão na região do infravermelho – Módulo Polarizado (PM-IRRAS) de filmes de Langmuir e LB	48
4.7.9 Medidas eletroquímicas de Filmes LB e cast	48

4.7.10 Distribuição de tamanho dos lipossomos e potencial Zeta _____	49
4.7.11 Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG) de lipossomos ____	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES _____	50
5.1 Estudo de interação do RuVPy com DMSO e fosfolipídios _____	50
5.2 Ensaio de viabilidade celular _____	58
5.3 Interação entre o complexo RuVPy e modelos de membrana celular _____	60
5.3.1 Isotermas de pressão de superfície dos filmes puros e mistos RuVPy e fosfolipídios _____	61
5.3.2 Análise termodinâmica dos filmes mistos RuVPy e fosfolipídios _____	69
5.4 Caracterização morfológica dos filmes puros e mistos RuVPy e fosfolipídios _____	77
5.5 Espectroscopia de absorção e reflexão na região do infravermelho – Módulo Polarizado (PM-IRRAS) dos filmes de Langmuir _____	82
5.6 Filmes Langmuir-Blodgett do RuVPy na presença de fosfolipídios _____	88
5.7 Espectroscopia de absorção e reflexão na região do infravermelho – PM-IRRAS de filmes LB do RuVPy na presença de fosfolipídios. _____	89
5.8 Estudo eletroquímico dos filmes LB de RuVPy e fosfolipídios em tampão PBS pH 7,4 _____	91
5.9 Estudo eletroquímico dos filmes LB de RuVPy e fosfolipídios na presença da molécula sonda $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ _____	95
5.11 Estudos eletroquímicos dos filmes cast do RuVPy e fosfolipídio _____	102
5.12 Obtenção e caracterização de formulação lipossômica do complexo RuVPy ____	104
6. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS FUTURAS _____	111
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	113

1. INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), aproximadamente 576 mil novos casos de câncer são estimados para o ano de 2014 no Brasil [1]. Segundo a definição deste instituto, Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Esse crescimento desordenado só ocorre quando uma célula normal sofre alterações no DNA de seus genes, uma mutação genética. As alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados protooncogenes, que a princípio são inativos em células normais, mas podem vir a transformar-se e serem responsáveis pelo surgimento destas células de câncer. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, é chamado de sarcoma. Os termos “câncer”, “neoplasia maligna” e “tumor maligno” são sinônimos e distinguem-se dos tumores benignos pelo poder de invasão e capacidade de disseminar-se para outras partes do corpo [2]. Dentre os tratamentos mais conhecidos desta doença pode-se citar: (i) cirurgia, procedimento médico que extrai o tumor cancerígeno quando as condições iniciais são favoráveis, (ii) radioterapia, terapia na qual radiação é utilizada para destruir tumores localizados que não podem ser removidos por cirurgia, ou ainda, aplica-se nos locais onde se extraiu os tumores para evitar o retorno destes e (iii) quimioterapia, onde medicamentos são aplicados no intuito de destruir, inibir ou controlar células de câncer, sendo administrados por via oral, venosa ou intramuscular [3]. Normalmente altas doses dos quimioterápicos são utilizadas para destruir as células neoplásicas e preservar as normais [4], podendo ainda ocorrer terapia combinada, onde é associado mais que um tipo de tratamento. Um fator muito importante para o sucesso destes tratamentos depende de um diagnóstico precoce da doença [5], sendo de grande relevância nesta etapa compostos inorgânicos, utilizados no diagnóstico como é o caso de complexos de Gd^{3+} , como marcador em exames de ressonância magnética, e $BaSO_4$, como agente de contraste em exames de Raio-X [6, 7].

No tratamento quimioterápico utilizam-se classes de medicamentos variadas, sendo estes atuantes nas diferentes etapas de síntese, transcrição e tradução de DNA, o que é muito

importante, pois garantem eficácia na ação em células que estão em diferentes etapas da vida celular.

Dentro do conjunto de drogas antineoplásicas conhecidas inclui-se agentes químicos que podem impedir o desenvolvimento de tumores através da inibição do crescimento celular ou pela morte das células que estão se replicando de forma continuada [8]. Estes medicamentos são comumente conhecidos como agentes antineoplásicos ciclo-celular específico (CCS do inglês “*Cell Cycle-Specific*”). Exemplos destes compostos são alguns hormônios, compostos naturais e metabólitos. Outro tipo de agentes antineoplásicos conhecidos são os de ciclo-celular não específico (CCNS do inglês “*Cell Cycle-NonSpecific*”) que exibem efeito citotóxico em células, podendo interagir ou intercalar com DNA, mas também atuam em outros sistemas dentro das células. Segundo algumas definições de citotoxicidade esta pode ser atribuída a característica de destruição celular ou ainda a mudanças metabólicas ou uma alteração de sinalização célula-célula, que poderia promover um aumento inflamatório ou uma resposta alérgica[9]. Dentro do grupo CCNS encontram-se alguns antibióticos, compostos alquilantes e os complexos de platina [5, 10]. O complexo *cis*-diaminodicloroplatina (II) (*cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]), conhecido como cisplatina, foi descoberto em 1844 por Peyrone e é atualmente um dos compostos mais utilizados no tratamento do câncer [11]. No entanto, sua atuação antitumoral foi descoberta somente em 1964, quando em ensaios realizados por Barnet Roserberg com aplicação de um campo elétrico em células bacterianas de *Escherichia Coli*, via eletrodos de Pt, causavam inibição da divisão celular [12, 13, 14]. Anos posteriores [15, 16] foi descoberto que a administração deste complexo ocorre via corrente sanguínea, onde mantém sua neutralidade devido a grande concentração de íons Cl⁻ no plasma. A característica neutra do complexo facilita a passagem pela membrana celular e nuclear. Contudo ao adentrar a célula, um ambiente com baixa concentração de Cl⁻, este complexo pode formar espécies catiônicas que são atraídas eletrostaticamente pelo DNA, o qual apresenta grupos carregados negativamente como fosfatos, e se coordenam com as bases nucleicas. Com a coordenação, a fita de DNA curva-se e desenrola-se parcialmente, sendo alvo de proteínas marcadoras que sinalizam esta célula para morrer em um processo conhecido como apoptose. Apesar de reconhecida eficiência, a cisplatina possui sérios efeitos colaterais como danos aos rins [17] além de ser mutagênica, genotóxica, tumorogênica em outros tecidos e órgãos [18]. Em estudo com cisplatina frente a células VERO, uma linha de células do tipo fibroblasto normais, estas sofrem alterações na morfologia e crescimento quando são expostas a concentrações de 25, 50, 100 ou 200 µg mL⁻¹ deste medicamento num

período de 24 e 72 [18]. Além da cisplatina, os complexos de rutênio estão entre os mais promissores agentes antineoplásicos pelo fato de demonstrarem atividade antimetastática, e o câncer metastático ser de difícil controle. Desta forma muitos esforços são realizados na busca de novos quimioterápicos baseados em compostos inorgânicos como complexos de rutênio, que apresentem menor toxicidade e maior seletividade [6]. Resultados destes trabalhos foram organizados em artigos de revisões [19, 20, 21, 31, 42, 44]. Dos trabalhos apresentados, alguns mostram a importância dos ligantes fosfínicos, mais especificamente do tipo bifosfínico ligados em ponte por grupos como metano, etano, propano ou butano [47, 48, 54, 56-59], em testes de atividade biológica. Em especialmente envolvendo o estudo de inibição de tumores malignos, percebe-se que a toxicidade destes complexos variou de acordo com o estado redox do metal, do tipo do ligante a ele coordenado, como também necessita de doses controladas do metalofármaco.

Nesta tese explorou-se a atividade biológica do complexo bifosfínico *mer*-[RuCl₃(dppb)(VPy)], onde dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano e VPy = 4-vinilpiridina, designado como RuVPy, contra a linha de célula de carcinoma de laringe humana, HEP-2 (ATCC CCL23), e em células controle normais de rim de macaco verde africano, denominadas células VERO. Investigou-se o modo de ação deste complexo sobre as membranas celulares. As evidências para isto foram obtidas via experimentos onde o RuVPy foi exposto aos modelos de membrana constituídas por monocamadas de Langmuir de diferentes fosfolipídios, o zwitteriônico dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e os carregados negativamente dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) e dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS). Cálculos termodinâmicos foram realizados e trazem uma noção qualitativa do tipo de interação existente entre o lipídio e o complexo. Além disso, as interações em nível molecular entre RuVPy e os fosfolipídios foram também confirmadas pelas mudanças observadas nas bandas na região do infravermelho nos espectros de reflexão-absorção modulada de polarização (PM-IRRAS) das monocamadas e de filmes Langmuir-Blodgett. Sobre estes filmes, quando estes foram caracterizados por técnicas eletroquímicas como voltametria cíclica e espectroscopia de impedância, uma compreensão do comportamento de transferência de carga do complexo RuVPy na presença dos fosfolipídios foi obtida. Além dos filmes de Langmuir de fosfolipídios, obteve-se vesículas lipossomais de DPPC, com o intuito de compreender a presença do RuVPy neste modelo de membrana. Resultados da caracterização dos lipossomos mostram alteração no tamanho destes devido a presença do RuVPy, o que

corrobora com os estudos de Langmuir onde em filmes mistos, o complexo RuVPy também causa alteração no formato e tamanho dos domínios dos fosfolipídios.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Atividade biológica de complexos de Rutênio

Os primeiros resultados de atividade biológica e atuação como agente antitumoral de complexos de rutênio foram descritos nos trabalhos de Dwyer e colaboradores em meados da década de 50 e 60 do século passado [22,23]. Inicialmente estes estudos mostraram a forte toxicidade do complexo Ru com n-heterocíclicos frente a animais de pequeno porte, nos quais doses letais na ordem de mg por kg. Quando foram realizados testes com tumores, ocorreu um significativo efeito de inibição quando o ligante 1,10-fenantrolina e bases correlatas estavam presentes [23]. Atualmente complexos metálicos de Ru são atrativos por sua baixa toxicidade e eficiência contra tumores resistentes à cisplatina [24]. Normalmente estes complexos apresentam uma gama de estados de oxidação acessíveis em condições fisiológicas (+2, +3 e +4), com geometria octaédrica que possibilita a interação ou intercalação com DNA devido aos sítios de coordenação adicionais. Outra característica dos complexos de Ru é que eles podem interagir com o esqueleto de fosfato e apresentam versátil troca de ligantes comparada aos complexos de platina [10].

Dentre os complexos metálicos reconhecidos por sua atuação anticancerígena, destacam-se os complexos de Ru (III), tal como o *fac*-triaminotricloreto de rutênio (III) (*fac*-[RuCl₃(NH₃)₃]), o qual é carregado para dentro das células cancerígenas pela proteína transportadora transferrina [25,26]. O transporte via transferrina é facilitado, pois como os tecidos tumorais necessitam de maior concentração de ferro, e pelo fato do Ru ser similar a este metal visto que ambos são pertencentes ao grupo VIII da série dos metais de transição, forma-se um complexo de rutênio-transferrina[27]. Outro exemplo de complexo a ser destacado por inibir a proliferação das células cancerígenas (câncer sólido-pulmão) e ter chego a etapas de testes clínicos (testado em 24 pacientes humanos) foi o HIm[trans-RuCl₄(DMSO)Im], onde Im = Imidazolium e DMSO = dimetilsulfóxido (NAMI-A), desenvolvido por Alessio e colaboradores [28], e o HInd[trans-RuCl₄(Ind)₂] (Ind =

indazolium), denominado KP1019, desenvolvido por Keppler e colaboradores [29]. O KP1019 mostrou-se citotóxico para células de câncer por mecanismos de dissociação de cloreto, enquanto o NAMI-A apresenta menor toxicidade em comparação com a cisplatina, mas apresenta atividade antimetastática, ou seja, evita a propagação de câncer [30]. Mesmo que a atividade antimetastática não tenha sido elucidada completamente, esta foi relacionada ao baixo nível de oxigênio no ambiente do tumor, o qual pode transformar as espécies de Ru (III) em espécies mais reativas de Ru (II). Estas espécies de Ru(II) por sua vez, podem ligar-se a várias biomoléculas, incluindo o DNA [31] por mecanismos, tais como: (i) ligação eletrostática, (ii) ligação externa à fita, (iii) ligação interna, nos entremeios da estrutura “*groove binding*” e (iv) ligação intercalativa (intercalação de grupos volumosos entre a dupla hélice de DNA) [32].

Apesar do DNA ser o alvo principal dos complexos de Ru, existe evidências químicas e bioquímicas do envolvimento de outras biomoléculas que podem ser alvos dos compostos, tais como os aminoácidos, agentes redutores, hormônios, peptídeos e proteínas. As interações de complexos de Ru com proteínas e lipídios localizados em superfície celular, são do tipo não covalente, as quais dependem do tipo de ligante presente e do estado de oxidação do centro metálico [33,34]. Por exemplo, a atividade antitumoral de alguns complexos de Ru contendo ligante heterocíclico nitrogenado é atribuída à interação não covalente entre os anéis aromáticos do ligante e biomoléculas [35]. Em função disto, estes compostos são chamados de “pró-drogas”, pois seus ligantes podem ser substituídos por outros presentes no meio biológico, em processos de hidrólise, reações com biomoléculas no sangue ou no interior da célula; ou até mesmo o metal sofrer reações de óxido-redução antes de alcançar seu alvo biológico[36].

Outra classe de complexos de Ru que também tem recebido destaque é a de Ru-areno [37] desde os primeiros trabalhos desenvolvidos independentemente por Sadler e Dyson, os quais sintetizaram os complexos organometálicos $[(\eta^6\text{-PhC}_6\text{H}_5)\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$, onde en = 1,2-diaminoetano [38,39] e $[(\eta^6\text{-}p\text{-MeC}_6\text{H}_4\text{Pr}^1)\text{Ru}(\text{P-pta})\text{Cl}_2]$, onde pta = 1,3,5-triaza-7-fosfatriciclo[3.3.1.1] decano [27,40]. Neste momento os autores não conseguiram explicar exatamente o modo de ação, contudo em um trabalho recente de Giannini e colaboradores indicam uma possível correlação entre a elevada atividade anticancerígena *in vitro* destes complexos e seu potencial catalítico para a oxidação de glutathiona (GSH) [41].

De forma geral percebe-se que muitos são os trabalhos que relatam a exploração de complexos de rutênio como potenciais agentes tumorais com mecanismo de ação diferente daqueles estabelecidos para os complexos de Pt [27, 29, 30, 37, 42, 43, 44, 45, 46,]. Este fato estimula os estudos com novas e diferenciadas classes de complexo de Ru.

2.2 Atividade antitumoral de complexos bifosfínicos de rutênio

Os complexos bifosfínicos têm mostrado relevante atividade contra células cancerígenas humanas nas quais a cisplatina tem eficiência limitada [47,48,49]. Este tipo de ligante apresenta ampla gama de propriedades estéricas e eletrônicas, uma vez que um par de elétrons do P é capaz de formar ligações σ estáveis com o metal além de formar orbitais híbridos, do tipo $3p\sigma^*\pi$ vazios, capazes de receber elétrons do íon metálico, conforme ilustrado na Figura 1A. Esse comportamento do P torna as fosfinas adequadas à retrodoação, onde a densidade eletrônica é sinergeticamente compartilhada entre o ligante e o metal, originando ligações mais estáveis. Em função disto, as fosfinas são capazes de estabilizar os metais de transição de valência superior e inferior, e provocar mudanças fundamentais na reatividade do centro metálico, devido ao forte efeito *trans* labilizante.

Segundo Basolo e Pearson [50] define-se efeito *trans* labilizante como sendo o efeito do ligante (L), sobre a velocidade de substituição do ligante (Y) oposto a ele, caracterizando-se como um efeito de natureza cinética. Além disso, existe o fenômeno denominado influência *trans*, o qual se caracteriza por sua natureza termodinâmica, onde o ligante L em um complexo enfraquece em certo grau a ligação *trans* a si no estado fundamental do complexo [51]. Um fator significativo na influência *trans* é o impedimento estérico causado pelo aumento do tamanho do substituinte R em compostos do tipo $P(OR)_3$ ou PR_3 , o que pode aumentar os ângulos entre R-P-R (ângulo de cone de Tolman, θ – Figura 1B), variando os ângulos de ligações de outros ligantes (L) associados ao metal. Quando se aumenta a distância M-P e M-L ocorre uma redução do caráter doador dos pares de elétrons isolados do fósforo, o que favorece baixos estados de oxidação do metal M, além disso, essa maior distância favorece reações de adição oxidativa e intramolecular, bem como favorece a formação de isômeros, nos quais se busca um impedimento estérico menor [52]. No geral pode-se dizer que fosfinas tem sua atividade anticancerígena atribuída a sua sutil estabilidade, uma vez que pode quebrar ligações em locais específicos, atuando em reações oxidativas, além de seus

grupos fenólicos poderem intercalar-se a alvos celulares como DNA, desestabilizando tal estrutura. Um exemplo de como isso ocorre é o efeito de troca de substituintes fenil no lugar de etil, que reduz a atividade anti-tumoral de complexos difosfínicos de Au (I) e Cu (I). Isto foi atribuído, em parte, a reatividade mais elevada de alquil-fosfinas em reações oxidativas *in vivo*, tais como a quebra de ligações dissulfeto, de modo a que estes ligantes têm menos probabilidade de alcançar alvos celulares (DNA) que fosfinas fenil. [53]

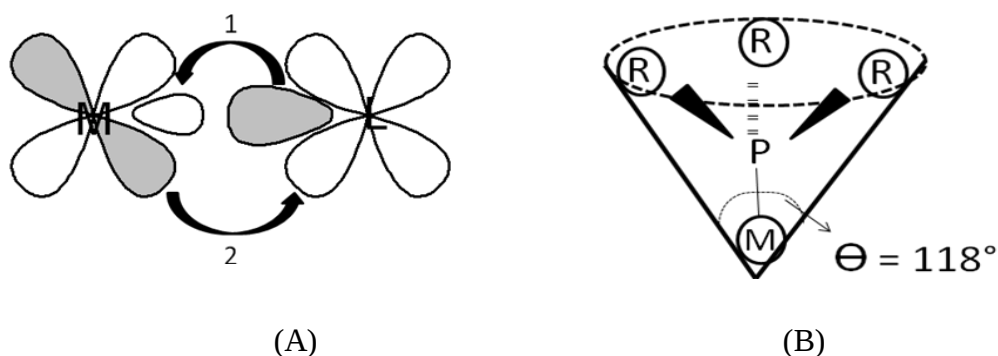


Figura 1: (A) Representação da interação entre os orbitais $d\pi$ do metal (M) e orbitais $3p$ do ligante (L), onde 1 é a ligação σ e 2 é retrodoação π ; e (B) Ângulo de cone de Tolman para PR_3 . Imagens adaptadas da referência 52.

Na literatura encontram-se estudos de atividade biológica, mais especificamente de inibição celular, de complexos de rutênio com ligantes bifosfínicos com baixo valor de concentração da droga ($\mu\text{mol L}^{-1}$), o que sem dúvida é uma característica desejável quando se realiza estudos em busca de uma metalodroga.

Um dos primeiros trabalhos foi com o complexo nitrosilo *fac*- $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppf})]$, onde dppf = 1,10-bis(difenilfosfina)ferroceno (Figura 2A) testado contra a linhagem de células de tumor da mama (MDA-MB-231), o qual apresentou uma concentração de $10 \pm 3 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a inibição do crescimento celular (IC_{50}), valor este cerca de 6 vezes menor que o encontrado para a metalodroga de referência cisplatina. Segundo os autores a bifosfina dppf foi o principal agente citotóxico, pois quando coordenada à unidade “ RuCl_3NO ” a atividade do complexo aumentou [47]. Estudos realizados com a mesma linhagem de célula, mas com o ligante dppp (1,3-bis(difenilfosfina)propano) coordenado à unidade “ RuCl_2NO ”, mostraram que a série $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(\text{L})]\text{PF}_6$ (L = piridina, 4-metilpiridina, 4-fenilpiridina e dimetilsulfóxido) (Figura 2B) apresentou diferentes valores de citotoxicidades ($19,0 \pm 3,0$; $7,4 \pm$

3,7; $7,1 \pm 1,2$; e $12,1 \pm 1,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente) [54]. Estes nitrosilos complexos foram de três a nove vezes mais ativos que a cisplatina, diferente dos ligantes n-heterocíclicos livres, os quais não atingiram atividades citotóxicas nas concentrações utilizadas ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$). A partir de medidas de $\delta^{31}\text{P}\{^1\text{H}\} = 33 \text{ ppm}$, os autores propuseram que o mecanismo envolvido em meio de DMSO (2%) é provavelmente por intercalação com o DNA a partir da dissociação do NO, e que ocorre formação da espécie hexacoordenada catiônica $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppf})(\text{DMSO})]\text{Cl}$, após a redução da espécie $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppf})]$.

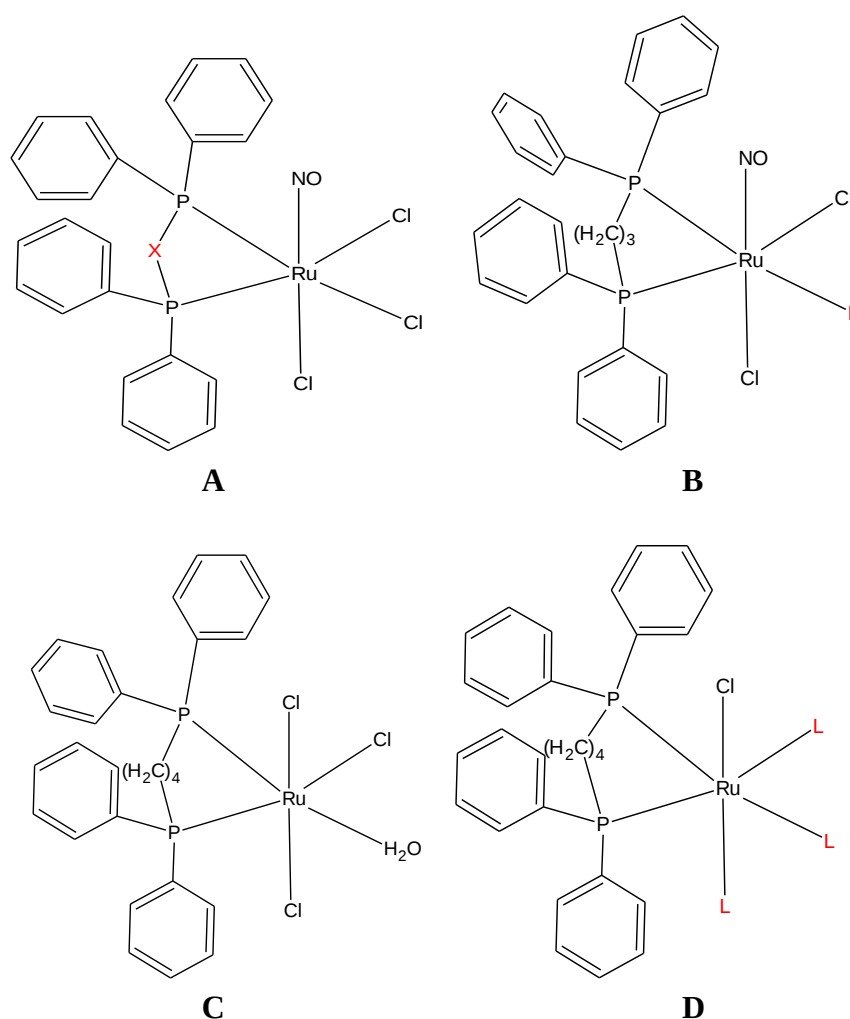


Figura 2: Estruturas propostas para os complexos (A) *fac*- $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{dppf})]$, onde dppf = 1,10-bis(difenilfosfina)ferroceno representado por X na estrutura; (B) da série $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(\text{L})]\text{PF}_6$, onde dppp= 1,3-bis(difenilfosfina)propano e L = piridina, 4-metilpiridina, 4-fenilpiridina e dimetilsulfóxido; (C) *mer*- $[\text{RuCl}_3(\text{dppb})(\text{H}_2\text{O})]$ aqui denominado Ruaquo, onde dppb=1,4 bis(difenilfosfina)butano e (D) da série $[\text{RuCl}(\text{dppb})(\text{L})]\text{Cl}$, onde L = 2-benzoilpiridina tiosemicarbazona (H2Bz4DH), N(4)-metil (H2Bz4M) e N(4)-fenil (H2Bz4Ph).

A bifosfina 1,4 bis(difenilfosfina)butano (dppb) foi estudada no complexo precursor *mer*-[RuCl₃(dppb)H₂O] (nesse trabalho denominado Ruaquo – Figura 2C) e na série de complexos de Ru(II), [RuCl(dppb)L]Cl (L = 2-benzoilpiridina tiosemicarbazona (H₂Bz₄DH), N(4)-metil (H₂Bz₄M) e N(4)-fenil (H₂Bz₄Ph)) - Figura 2D, contra as linhagens de células cancerígenas humanas UACC-62 (câncer de pele), TK-10 (câncer renal) e MCF-7 (câncer de mama). Dentre estes complexos, apenas o Ruaquo, o complexo [RuCl(dppb)(H₂Bz₄DH)]Cl e o ligante H₂Bz₄Ph exibiram atividade antitumoral contra as três linhagens celulares, sendo o [RuCl(dppb)(H₂Bz₄DH)]Cl o complexo mais ativo em relação a seus derivados tiosemicarbazonas contras estas três linhagens. Contudo, a atividade dos derivados não superou a do aqua complexo precursor. Os ligantes H₂Bz₄DH, H₂Bz₄M e complexo [RuCl(dppb)(H₂Bz₄M)]Cl mostraram efeito citotóxico seletivo contra a linhagem de células UACC-62, mas não houve relatos que explicassem tal fato e foi observado unicamente que a presença do H₂Bz₄M favorece a atividade do complexo precursor. Estes resultados mostram que os compostos analisados são promissores na área de controle de proliferação de células cancerígenas humanas, uma vez que suas ordens de magnitude são as mesmas e até superiores a observadas pelas drogas comerciais utilizadas, como a Etoposida e Colchicina, agentes neoplásicos naturais de ciclo celular específico, com inibição de crescimento de 35 e 41%, respectivamente, ativos somente para células do tipo UACC-62. A respeito do mecanismo envolvido nestes sistemas, os autores mencionaram que pode ser baseado na atuação como agentes neoplásicos ciclo não específico, similares aos complexos de Pt, podendo interagir com o DNA e também com outro alvo biológico desconhecido[48].

Tratando-se ainda de complexos com ligante dppb, relata-se o estudo com os complexos catiônicos com mercaptopirimidina (SpymMe₂), do tipo [Ru(SpymMe₂)(dppb)(N–N)]PF₆ (N–N = 2,2-bipiridina (bipy) ou 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina (Me-bipy)), testados contra as células de câncer de mama MDA-MB-231. Os valores de IC₅₀ destes complexos são apresentados na Tabela 1. Neste estudo propôs-se que os complexos precursores *cis*-[RuCl₂(dppb)(N–N)], atuam como pró-drogas, uma vez que ao serem expostos a soluções de DMSO formam espécies catiônicas do tipo [RuCl(DMSO)(dppb)(N–N)]Cl pela rápida labilização de um ligante cloreto. O mesmo não ocorre para os complexos com mercaptopirimidina, pois são mais estáveis devido à presença de ligantes bidentados (S–N e N–N), os quais possibilitam a interação com outros componentes do meio de cultura. É reportado na literatura [55] que o mecanismo de ação dos complexos com ligante cloro em posição *cis* está associado às interações com o DNA, já que os complexos com

mercaptopirimidina, por serem coordenativamente saturados e rígidos, são capazes de interagir de forma não covalente com esta biomolécula, tal como ocorre com complexos Ru(II) contendo ligantes diiminas[56].

A importância do ligante dppb em relação ao dppp foi constatada nos ensaios biológicos contra as células de câncer de mama (MDA-MB-231), uma vez que o complexo *cis*-[RuCl₂(dppb)(5,5'-p-[Me-bipy])] teve menor valor de IC₅₀ em relação aos complexos *cis*-[RuCl₂(dppp)(5,5'-Me-bipy)] (Tabela 1). Outros três complexos também foram testados, os *cis,trans*-[RuCl₂(PPh₃)₂(5,5'-Me-bipy)] e o *cis*-[RuCl₂(dppp)(4,4'-Me-bipy)], e se mostraram mais ativos que a cisplatina com valores de IC₅₀ cerca de 4 a 10 vezes menores. [57]

Os ligantes bifosfínicos também tem recebido destaque quando coordenados aos complexos organometálicos de rutênio contendo em sua estrutura anéis benzênicos, tal como o η^6 -areno, denominados como Ru-arenos do tipo “*piano stool*”. Esta classe de compostos tem sido considerada como uma alternativa promissora de agentes antitumorais e antimetastáticos, devido à sua baixa toxicidade, elevada atividade antitumoral, forte afinidade de ligação e capacidade de perturbação no processo de replicação do DNA [27, 38]. Exemplo disto tem-se os compostos catiônicos e neutros de fórmula geral $[(\eta^6\text{-cimen})\text{RuCl}(\text{X})(\text{Y})]$, onde para os catiônicos X e Y são η^2 ligantes de fósforo como a 1,1-bis(difenilfosfina)metano (dppm) e 1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppe) ou os ligantes parcialmente oxidados monóxido 1,2-bis(difenilfosfina)metano (dppmO) e o monóxido de 1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppeO). Nos complexos neutros, X é cloro e Y é um doador fósforo monodentado. Estes compostos organometálicos tiveram suas atuações testadas para diferentes tipos de células de câncer, dentre elas câncer de pulmão (H460), cervical (SIHA), mama (MCF7), próstata (PC3), ovário (A2780) e fígado (HEPG2). Os complexos de Ru(II) contendo os ligantes dppm e dppmO mostraram-se mais ativos, como pode ser observado pelos valores de IC₅₀ apresentados na Tabela 1. Nos estudos do mecanismo de ação destes complexos observou-se que a inibição do crescimento de células cancerígenas envolve a interrupção do ciclo celular, o que leva a morte celular por apoptose. Estes complexos também se mostraram potentes inibidores de metástase, conforme avaliado por testes com células de câncer de mama semeadas. Com relação ao DNA, medidas de viscosidade, desnaturação térmica e ensaios de desvio de mobilidade em gel, mostraram que estes complexos se ligam de forma a desenrolar esta biomolécula não ocorrendo intercalação [58].

Além de complexos fosfínicos mononucleares de rutênio, os complexos multinucleares têm chamado atenção. A série de complexos, $[\text{Ru}_3(\text{CO})_8(2\text{L}-2\text{H})]$, $[\text{Ru}_3(\text{CO})_7\text{PPh}_3(2\text{L}-2\text{H})]$ e $[\text{Ru}_3(\text{CO})_7(2\text{L}-2\text{H})]_2$, com dppm ou dppe em ponte onde L= Maltol, um composto flavorizante, foi testada para sete diferentes tipos de células de câncer, sendo estas de mama (MCF-7), próstata (DU-145), pulmão (H460), colón (HT-29), Leucemia mielóide crônica (K562), Leucemia mielóide aguda (HL-60) e Leucemia de células do manto (GRANTA-519). A citotoxicidade destes complexos (Tabela 1) com ligantes bifosfínicos em ponte tiveram uma redução da atividade em comparação às duas estruturas monoméricas $[\text{Ru}_3(\text{CO})_8(2\text{L}-2\text{H})]$ e $[\text{Ru}_3(\text{CO})_7\text{PPh}_3(2\text{L}-2\text{H})]$, cujo efeito foi atrelado ao comprimento das cadeias espaçadoras, no caso dppm e dppe. A menor toxicidade destes complexos em relação à cisplatina foi atribuída à capacidade dos compostos de se acumularem especificamente em tecidos de câncer, uma vez que estas células têm mais receptores de transferrina e estas são responsáveis pelo transporte destes complexos de fora para dentro das células. Os autores propuseram que outra possibilidade de mecanismo de ação ocorre com liberação de CO *in situ* e uma não interação dos ligantes maltolate por bases guanina/adenina do DNA [59].

Na Tabela 1 são resumidos os valores de inibição de crescimento celular que os complexos bifosfínicos de rutênio citados neste texto causam em diferentes linhagens de células de câncer em comparação as metalodrogas de referência utilizada em cada trabalho.

Percebe-se da Tabela 1 que os complexos bifosfínicos de rutênio, principalmente os que apresentam as bifosfinas com butano, aplicados contra células de câncer de mama, pele e renal, tiveram destacada atuação na inibição de crescimento celular, melhor que os fármacos de referência. Por exemplo, o complexo precursor *mer*- $[\text{RuCl}_3(\text{dppb})\text{H}_2\text{O}]$, apresentou valor de inibição ($\text{RC}_{50} = 100\%$) contra as células de câncer de pele, e às drogas referências Colchicina ($\text{RC}_{50} = 41\%$) e Etoposíde ($\text{RC}_{50} = 35\%$) [48]. Os complexos contendo os ligantes bipyridínicos (N-N = bipy e Me-bipy), $[\text{Ru}(\text{SpymMe}_2)(\text{dppb})(\text{N-N})]\text{PF}_6$, apresentaram baixos valores de IC_{50} (0,46 e 0,43 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente) para a inibição do crescimento das células de câncer de mama, em relação a 63 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da cisplatina[56].

Tabela 1: Concentração de IC₅₀ (μmol L⁻¹) ou RC₅₀, % de inibição de crescimento de células de tumorais para complexos bifosfínicos de rutênio e metalodroga de referência.

Complexo de Ru	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) ou RC ₅₀ %	Linhagem celular	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) ou RC ₅₀ % da droga referência	Ref.
<i>fac</i> -[RuCl ₃ (NO)(dppf)]	10 ± 3	MDA-MB-231 (mama)	63 ± 5 (cisplatina)	47
<i>mer</i> -[RuCl ₃ (dppb)H ₂ O]	100, 43 e 29% ativo	UACC-62 (pele) TK-10 (renal) MCF-7 (mama)	Colchicina 41% e Etoposíde 35% ativos somente para UACC-62	48
[RuCl(dppb)(H2BzDH)]Cl	94, 49 e 10% ativo			
[RuCl(dppb)(H2Bz4M)]Cl	83% ativo, somente para UACC-62			
[RuCl(dppb)(H2Bz4Ph)]Cl	86, 20% e não foi ativo para MCF-7			
[RuCl ₂ (NO)(dppp)(Py)] ⁺	19,0 ± 3,0	MDA-MB-231 (mama)	63 ± 5 (cisplatina)	54
[RuCl ₂ (NO)(dppp)(4-metil-Py)] ⁺	7,4 ± 3,7			
[RuCl ₂ (NO)(dppp)(4-fenil-Py)] ⁺	7,1 ± 1,2			
[RuCl ₂ (NO)(dppp)(DMSO)] ⁺	12,1 ± 1,4			
[Ru(SpymMe ₂)(dppb)(bipy)] ⁺	0,46 ± 0,02	MDA-MB-231 (mama)	63 ± 5 (cisplatina)	56
[Ru(SpymMe ₂)(dppb)(4,4-Me-bipy)] ⁺	0,43 ± 0,08			
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(bipy)]	22,6 ± 10			
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(4,4 Me-bipy)]	13,8 ± 1,3			
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppb)(5,5' Me-bipy)]	5,41 ± 0,71	MDA-MB-231 (mama)	63 ± 5 (cisplatina)	57
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppp)(5,5-Me-bipy)]	14,60 ± 1,81			
<i>cis</i> -[RuCl ₂ (dppp)(4,4' Me-bipy)]	15,64 ± 0,44			
[Ru(η ⁶ -cimen)Cl(η ² -dppe)] ⁺	1,22	H460 (pulmão)	1,7 (cisplatina)	58
[Ru(η ⁶ -cimen)Cl(η ² -dppm)] ⁺	3,13			
[Ru(η ⁶ -cimen)Cl(η ² -dppmO)] ⁺	22,07			
[Ru(η ⁶ -cimen)Cl ₂ 2(μ ² -dppe)] ⁺	61,3			
[Ru(η ⁶ -cimen)Cl ₂ (η ¹ -dppm)]	1,6			
[Ru(η ⁶ -cimen)Cl ₂ (η ¹ -dppmO)]	11,32			
[Ru(η ⁶ -cimen)Cl ₂ (η ¹ -dppeO)]	94,4			
[Ru(η ⁶ -cimen)Cl(η ² -dppm)] ⁺	2,3; 1,8; 1,9, 0,17 e >100,0	SIHA(cervical) MCF-7 (mama) PC3 (próstata) A2780 (ovário) HEPG2(fígado)	0,15; <0,1; 1,8; <0,1 e 0,1 Adriamycin (doxorubicina)	58
[Ru(η ⁶ -cimen)Cl(η ² -dppmO)] ⁺	2,2; 2,0; >100,0; 2,3 >100,0			
[Ru(η ⁶ -cimen)Cl ₂ (η ¹ -dppmO)]	2,5; 2,0; >100,0; 27,0; 10,0			
[Ru ₃ (CO) ₇ (2L-2H)] ₂ (dppm) (L= Maltol)	75, 25, 70, >100, 30, 25 e ND	MCF-7 (mama) DU-145 (Próstata) H460 (pulmão) HT-29 (colon) K562 (Leucemia) HL-60 (Leucemia) GRANTA-519 (Leucemia)	1,5; 1,0; 0,75; 3,0; 1,5; 0,75 e 0,25 (cisplatina)	59
[Ru ₃ (CO) ₇ (2L-2H)] ₂ (dppe) (L= Maltol) [#]	40, 10, 30, 30, 50, ND, ND			

somente foi testado em concentração de 25 μmol L⁻¹ devido solubilidade e ND = não foi determinada.

Os complexos bifosfínicos com ligante areno, [Ru(η⁶-cimen)Cl(η²-dppe)]PF₆ e [Ru(η⁶-cimen)Cl₂(η¹-dppm)], avaliados contra câncer de pulmão, obtiveram IC₅₀ com 1,22 e

$1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, novamente mais eficientes que $1,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ da cisplatina em ensaios que ocorreram em triplicata [58]. Quando submetidos a testes de elucidação de mecanismo de ação, tais como teste com DNA e de metástase, foram classificados como potenciais candidatos para as etapas futuras de ensaios clínicos, da mesma forma que os complexos KP1019 e NAMI-A citados anteriormente.

De modo geral, estes resultados mostram que para uma mesma linhagem de células cancerígenas, os complexos contendo os ligantes fosfínicos dppb são mais ativos que a cisplatina e em relação aos complexos contendo outras bifosfinas dppp, por exemplo, é mais eficiente. Além disto, a substituição de ligantes na esfera de coordenação de complexos, por exemplo, ligantes n-heterocíclicos, os quais são adequados por mimetizarem estruturas de moléculas biológicas [7], ou arenos podem proporcionar metalofármacos com ação contra diferentes tipos de câncer. Embora o mecanismo de ação dos complexos fosfínicos de rutênio com atividade antitumoral ainda não tenha sido estabelecido, a proposta mais aceita é a interação com o DNA e também com outro alvo biológico desconhecido. Desta forma a interação com lipoproteínas ou lipídios das membranas celulares nos motivou para o estudo da interação em filmes de Langmuir com diferentes fosfolipídios.

2.3 Filmes de Langmuir

Os filmes de Langmuir são monocamadas obtidas sobre a superfície de uma subfase aquosa, que se alto organizam pela imposição de uma pressão. Esta denominação foi dada em homenagem ao cientista Irving Langmuir, cujo trabalho pioneiro foi fundamental para a consolidação desta área de pesquisa [61]. Para a formação de tal filme, uma pequena quantidade do material de interesse deve ser diluída em solvente apolar (de baixa constante dielétrica) e altamente volátil. Esta solução pode ser espalhada com o auxílio de uma microseringa sobre a subfase que, geralmente é água ultra-pura ou soluções desta, contida em um recipiente retangular denominado cuba de Langmuir confeccionado de material inerte, geralmente de teflon. A cuba de Langmuir possui detectores de posição das barreiras, para determinar a área de superfície do filme, sensor para medir a pressão de superfície (sensor de Wilhelmy) e um sistema para deposição de filmes sobre uma lâmina (dipper). As barreiras móveis realizam a compressão simétrica das moléculas da monocamada. A partir da posição das barreiras pode-se caracterizar a pressão de superfície. A pressão de superfície (π) é

definida como a diferença de tensão superficial entre uma subfase na ausência do material (γ_0) e uma subfase com a monocamada (γ), como representado na Equação 1 [60,62].

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \dots\dots\dots [1]$$

Ao comprimir as barreiras, ocorre uma mudança da área superficial do filme decorrente da organização das moléculas espalhadas sobre a subfase, de modo a surgir fases distintas. Quando as moléculas das monocamadas estão inicialmente dispersas na subfase, ou seja, não interagem entre si, defini-se como fase gasosa, conforme ilustrado na Figura 3, letra A. Com a compressão, as moléculas passam a uma fase em que ficam mais próximas, a fase líquido-expandida (Figura 3, letra B). Com mais um pouco de compressão estas moléculas são forçadas a formar um arranjo regular, filme condensado, conhecido como fase condensada (Figura 3, letra C). Se o filme for comprimido além do ponto de máxima compactação as moléculas começam a se agrupar desordenadamente e este estágio é chamado de colapso do filme, como indicado na Figura 3.

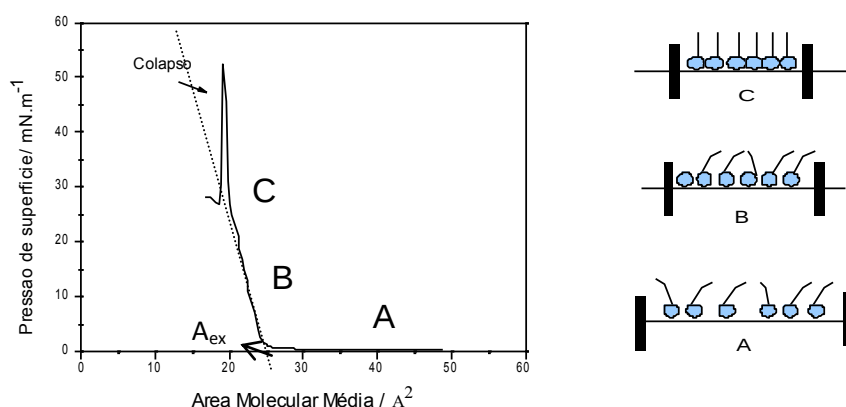


Figura 3: Gráfico de pressão de superfície vs área por molécula (isoterma) e ilustração do processo de formação de filme de Langmuir para uma molécula ideal anfifílica, o ácido esteárico.

A Figura 3 também ilustra graficamente, pela relação pressão de superfície vs área por molécula (π -A), o processo de formação de filmes para uma molécula ideal, ou seja, molécula anfifílica que apresenta uma parte hidrofílica ($\bullet$) e outra hidrofóbica (l). Apesar das moléculas anfifílicas serem ideais para a utilização desta técnica, pois apresentam isotermas com fases bem distintas, as moléculas não anfifílicas, incluindo complexos metálicos, polímeros, proteínas, também têm sido largamente estudadas na forma de filmes de Langmuir

[61]. As isotermas de pressão de superfície de materiais não anfífilos têm se mostradas mais complexas, logo o filme de Langmuir destes materiais podem não ser monomolecular, formando agregados do material na interface ar/água [61].

A partir do gráfico de isoterma π -A pode-se obter a área de máximo ordenamento das moléculas (A_{ex}), bem como a pressão de colapso. Esta primeira pode ser obtida ao traçar uma linha paralela a região da fase condensada e extrapolando-a perpendicularmente no eixo X, onde a interseção fornecerá a área limite de dispersão molecular, ou seja, a área ocupada pela molécula, conforme indicado na Figura 3. Uma segunda maneira de se obter esta área de máximo ordenamento molecular é utilizando a expressão dada pela Equação 2 [60,62]:

$$a = \frac{AM}{NaV} = \frac{CA}{cNaV} \dots\dots\dots [2]$$

Onde: A é a área do filme, M é o massa molecular do material, C é a concentração da solução espalhada em massa por unidade de volume, Na é o número de Avogadro, c é a concentração molar específica da solução e V é o volume da solução [62].

Um dos fatores que podem alterar o empacotamento das moléculas em um filme de Langmuir é a constituição da subfase, bem como os diferentes valores de pH ou força iônica. Visto que, dependendo do meio em que se encontram as moléculas formadoras do filme, estas podem se orientar buscando melhor interação de seus grupos químicos entre si e com os grupos da subfase. Além disso, a velocidade com que as moléculas são comprimidas também é de fundamental importância, já que estas necessitam de certo tempo para se reorganizarem na superfície da água para formar o melhor empacotamento.

Muitas técnicas experimentais que têm sido empregadas na caracterização de filmes de Langmuir, sendo as mais triviais: medidas de pressão de superfície, medidas de potencial, espectroscopia na região do infravermelho e do ultravioleta- visível, microscopia de ângulo de Brewster e de fluorescência, difração de raio-X, entre outras [63,64].

2.4 Técnica Langmuir-Blodgett

Em um típico experimento de Langmuir, a quantidade de material aplicado na superfície é suficientemente baixa de modo que as moléculas estão longe o suficiente entre si sobre a superfície de água e nesta condição, as moléculas exercem pouca força umas sobre as outras.

A partir do momento que sucede a redução da área superficial da monocamada formada sobre a superfície da água por um sistema de compressão de barreiras móveis, há uma diminuição da distância intermolecular, e consequentemente da tensão superficial do líquido. Durante esse processo de compressão, as moléculas organizam-se e a monocamada sofre várias transformações de fases, análoga aos estados tridimensionais gasosos, líquidos e sólidos, formando uma monocamada flutuante perfeitamente ordenada na superfície do líquido.

Quando a pressão de superfície é suficientemente elevada para garantir coesão lateral no filme a monocamada pode ser transferida, da superfície da água para uma chapa sólida classicamente referida como “substrato” [62], formando o filme de Langmuir-Blodgett (LB).

A deposição de multicamadas moleculares pode ocorrer a partir da repetição do processo de imersão e emersão deste substrato sólido na subfase. Este processo de deposição de filmes LB pode ocorrer de formas diferentes, deposição do tipo Y, X e Z, melhor exemplificadas na Figura 4. Estes tipos de deposição levam a formação de filmes com diferentes tipos de organizações estruturais, sendo o filme do tipo Y deposição do substrato tanto na imersão como na emersão, filmes X são obtidos somente pela imersão do substrato e os filmes Z apenas pela emersão do substrato. Também existem os filmes XY, com deposição total na subida e parcial na descida do substrato.

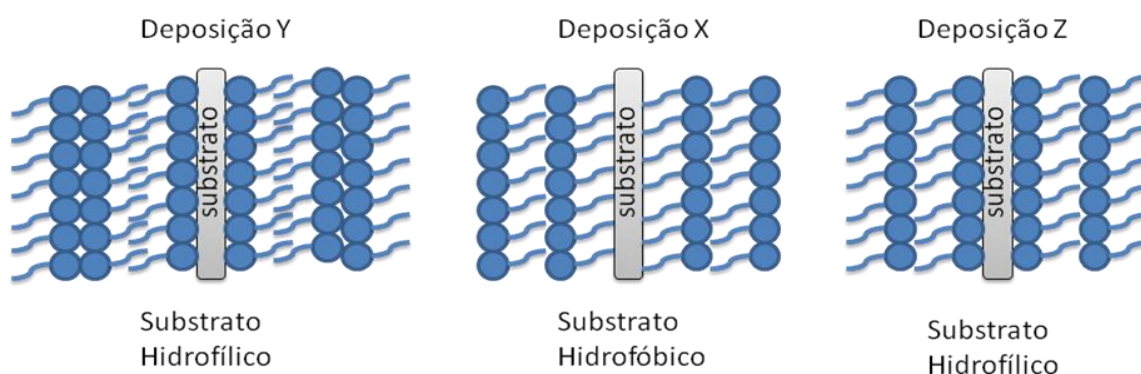


Figura 4: Representação da organização estrutural dos filmes LB formados por deposições do tipo Y, X e Z, adaptação da referência [65].

A técnica Langmuir-Blodgett é conhecida por ser um método atrativo para preparar filmes ultrafinos bem organizados. No entanto, a realização de métodos de elevada sensibilidade em análise de superfície é de relevante importância, pois podem revelar características tais como alguns defeitos nos filmes de LB, incluindo declives, domínios cristalinos não homogêneos, vacâncias, heterogeneidade lateral entre outras, que técnicas

menos sensíveis não conseguiriam. Mesmo com essa limitação na instrumentação, a obtenção destes filmes é muito atraente, pois produz filmes ultrafinos com propriedades diferenciadas daquelas observadas no “bulk” do material, devido ao arranjo molecular [66].

2.4 Filmes de Langmuir e LB de fosfolipídios, aplicações como modelos de membrana frente a complexos metálicos inorgânicos

Dentre os diferentes filmes de Langmuir que podem ser obtidos, um tipo específico é o formado por moléculas anfifílicas de fosfolipídios. Fosfolipídios são moléculas orgânicas constituintes de membrana celular com duas extremidades distintas, uma apolar denominada “cauda”, formada unicamente por cadeias de C e H unidas por um grupo glicerol a uma “cabeça” polar formada de um grupo fosfato seguido de grupos terminais que podem ser desde simples grupos OH, conhecidos como PG até grupos mais complexos como colina (PC), serina (PS), etanolamina (PE) entre outros [122]. A formação de monocamadas com este tipo de biomoléculas tem sido amplamente utilizada em estudos de interações moleculares [67, 68], reconhecimento molecular [66] e outros fenômenos biofísicos [65] graças ao ordenamento fornecido pela técnica LB. Esta característica ainda é útil para a engenharia molecular de matrizes de duas dimensões, tornando estes filmes objetos de aplicação na área de biossensores [66], microeletrônica [65] e biotecnologia [67, 68].

Filmes de Langmuir de fosfolipídios têm sido estudados há pelo menos três décadas [64], graças ao desenvolvimento de técnicas de caracterização que tem se mostrado uteis em investigações a nível molecular. Estes reconhecidos modelos de membrana são de grande interesse uma vez que são sistemas relativamente simples, que permitem avaliar interações específicas entre átomos ou grupos funcionais, o que não é viável em sistemas de elevada complexidade como experimentos de cultura celular [69].

Na literatura muitos são os estudos com filmes de Langmuir de modelos de membrana com os mais diferentes tipos de fármacos ou candidatos a fármacos. Dentre estes estudos, nesta revisão buscaram-se trabalhos nos quais complexos inorgânicos são avaliados frente aos diferentes modelos de membrana. Um deles é o trabalho com os dipicolinatos de vanádio (II, IV e V) conhecidos por sua atuação como agentes antidiabéticos, que foram aplicados ao modelo de membrana constituído pelo fosfolipídio DPPC, importante componente de membranas de mamífero. A maioria destes complexos são potentes inibidores

de fosfatases, e atuam no sítio ativo da proteína tirosina fosfatases, exercendo um efeito indireto no sinal de transdução desta proteína. Contudo, a justificativa para o estudo com modelo de membrana é que alguns compostos de vanádio também causam impacto na organização de lipídios num sistema de modelo rico em colesterol, e ainda a presença destes na membrana pode causar alteração na localização dos receptores de insulina em células sensíveis à esta. Dentre tais complexos, os com elevado estado de oxidação, administrados em pequenas doses via oral, causaram diminuição da concentração de glicose no sangue. Experimentos complementares com micela reversa de AOT (bis-(2-etilhexil)-sulfosuccinato de sódio) contendo complexos de vanádio também foram realizados e caracterizações por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica bem como por espectroscopia na região do UV-Visível permitiram aos autores avaliar as interações destes complexos bem como o grau de penetração no modelo de membrana [70].

Filmes de Langmuir de complexos de cromo III, como o $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_5(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_3$ e o *trans*- $[\text{Cr}(\text{5-metoxisalciclohex}) (\text{H}_2\text{O})_2]\text{ClO}_4$, onde 5-metoxisalciclohex= N, N'-ciclohexanobis-(5-metoxisalicilidenoimina), foram obtidos na forma de filmes mistos com os seguintes modelos de membrana: dimiristoil-fosfatidil-colina (DMPC), ácido dipalmitoil-fosfatídico (DPPA) e brometo de dioctadecil-dimetil-amônia (DOMA). A justificativa do estudo com complexos de Cr se faz pela classificação deste íon metálico como micronutriente essencial ao metabolismo de lipídios e carboidratos, além de sua toxicidade em doses superiores as indicadas ($\sim 30 \mu\text{g}/\text{dia}$). Os filmes LB obtidos foram submetidos às medidas de raio-X de baixo ângulo a fim de mostrar que a interação dos compostos causa espaçamento nas camadas do filme, em acordo com dados das isotermas de pressão. E nestas medidas constatou-se que ambos os complexos se adsorvem na região interfacial da monocamada e empurram os grupos polares para criar espaço. Medidas de fluorescência e dicroísmo circular corroboraram com a alteração na organização das bicamadas, além de que estas alterações são associadas a estrutura dos ligantes coordenados [71].

Outro exemplo é a interação entre a porfirina anfifílica catiônica 5,10,15,20-tetraquis(4-N-tetradecil-piridil) ou HPyP e três fosfolipídios saturados: dois negativamente carregados, DMPA (ácido dimiristoil fosfatídico) e DMPG (dimiristoil fosfatidil glicerol), e o zwitteriônico DMPC (L- dimiristoil fosfatidil colina), principais constituintes de lipossomos. Esta mistura foi estudada como um modelo de transporte de droga na presença de íons Zn. A análise das isotermas π -A sugeriram que a interação lipídio/PyP e a metalação da porfirina de

base livre HPyP com os íons Zn contidos na subfase aquosa, depende da disponibilidade da carga do grupo de cabeça polar do fosfolípido e da carga do grupo polar da PyP. A presença da porfirina expande a monocamada e diminui o seu módulo de compressão da superfície, C_s^{-1} , tornando o filme menos rígido. No entanto, quando estas monocamadas são espalhadas sobre uma solução aquosa com íons de zinco, um aumento de C_s^{-1} foi notado no caso de DMPA, enquanto que um decréscimo é observado quando é utilizado o DMPPG, sendo que na presença do DMPC (zwitteriônico), a metalação não ocorre. Além disto, a maior razão da área molecular da mistura ZnPyP:fosfolípido, em comparação com a base livre (HPyP:fosfolípido), mostra que a ligação da porfirina metalada com as células e vesículas sintéticas é mais forte, o que melhora sua aplicação em terapia fotodinâmica, cujo procedimento é muito aplicado no tratamento de tumores superficiais [72].

Tratando-se de interações de complexos macrocíclicos com modelos de membrana, o estudo da ftalocianina de Sn, $(PcSn(O_2C(CH_2)_8CH_3)_2$ ou PcSn10 com monocamadas de DPPC foi realizado e mostrou por diferentes medidas de microscopias, BAM para filmes de Langmuir, AFM e TEM para filmes LB transferidos, a separação de fase existente e a presença de domínios em formato elíptico. Estes domínios apresentaram anisotropia óptica, o que se deve à organização molecular, além disso por AFM observou-se que os filmes são multicamadas. Uma pesquisa computacional utilizando o método PM3 foi realizada para determinar a forma como as moléculas PcSn10 preferem organizar-se em filmes de PcSn10 puros. E foi proposta a formação de conjuntos diméricos, que juntos formaram um modelo de cristal do filme, desenvolvido através do empacotamento repetido das moléculas de PcSn10, ao longo de eixos cristalográficos de uma célula unitária. Estes resultados contribuíram, em conjunto com as análises de isotermas de pressão de superfície, para a compreensão da forte interação entre PcSn10 e DPPC na interface ar-água, onde pequenas quantidades de DPPC (1-2%) causaram modificações no filme de ftalocianina de maneira significativa. Os autores destacam ainda que a motivação para este estudo foi que a mistura adequada com fosfolípidos possibilitaria a obtenção de lipossomos para a administração da PcSn10, em condições fisiológicas, sendo estes lipossomos veículos em sistema de entrega de drogas no tratamento do câncer por terapia fotodinâmica [73].

2.6 Filmes LB de complexos fosfínicos de Rutênio

Estudos de filmes LB de complexos fosfínicos de Ru são encontrados na literatura a cerca de duas décadas [74,75], no entanto um volume e aplicações mais significativos são observados nos estudos desenvolvidos pela Prof^a Dra Karen Wohnrath e seus colaboradores. Nestes trabalhos os complexos bifosfínicos de rutênio, *mer*-[RuCl₃(dppb)(L)] (onde L = piridina, 4-metilpiridina) [76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83], {TPyP[RuCl₃(dppb)]₄} (TPyP = meso-(4-piridil)porfirina) [84] e [{RuCl₃(dppb)}₂(μ-4,4'-bipy)] (4,4'-bipy = 4,4'-bipiridina) [85], mostram a capacidade de formar filmes finos estáveis, apesar da natureza não anfifílica apresentada por estes complexos.

O primeiro relato foi em 2001, quando o complexo *mer*-[RuCl₃(dppb)(L)] (L = metilpiridina) formou filmes de Langmuir mistos com ácido esteárico sobre subfase aquosa e sobre substratos sólidos de vidro recoberto com óxido condutor (ITO). Estes filmes foram avaliados por AFM, técnica pela qual se gerou imagens que comprovaram a deposição homogênea deste complexo na forma de filme misto na proporção 75:25 (complexo:ácido), cujos valores de rugosidades se mantiveram na faixa de 6-11 nm para filmes obtidos sobre subfase aquosa.

Na tentativa de melhorar a transferência dos filmes LB ao substrato, um estudo sistemático de filmes de Langmuir dos complexos *mer*-[RuCl₃(dppb)(L)] (onde L = piridina ou 4-metilpiridina) puros e mistos com ácido esteárico foi realizado em subfases aquosa e contendo CdCl₂. Resultados de área por molécula e potencial de superfície, que não variaram linearmente com a concentração relativa do ácido esteárico, indicaram interação entre as espécies. Em análises dos filmes LB mistos observou-se que esta interação ocorreu via coordenação do complexo de rutênio com o ácido esteárico, conforme evidenciado pelo surgimento das bandas vibracionais em 1584 e 1543 cm⁻¹ atribuídas as estiramentos COO⁻. Mudanças nas absorções espectrais dos filmes também foram observadas uma vez que estes apresentaram mudança de cor. Medidas de raios-X com ausência dos picos de Bragg nos difratogramas referentes a separação média do estearato de cádmio, confirmaram a coordenação do ácido esteárico aos complexos [77].

A diferença de coloração do complexo imobilizado *mer*-[RuCl₃(dppb)(L)] (onde L = 4-metilpiridina em filmes LB em relação a cor dos complexos em solução, foi investigada por medidas de espectroscopia que permitiram identificar a oxidação das fosfinas durante a formação dos filme de Langmuir sobre a subfase aquosa. Medida de FTIR apresentou uma

banda em 1187 cm^{-1} atribuídas ao estiramento da ligação P-O. E medidas de espectroscopia de RAMAN, com dois lasers em ressonância 514,5 e 633 nm, confirmaram que as bandas de absorção em 530 e 690 nm observadas nos espectros de UV-Vis, foram atribuídas ao grupo aromático e à transferência de carga do P-Ru, respectivamente [78].

Com a finalidade de melhorar o processo de transferência de elétrons, bem como intensificar a separação de picos da oxidação dos analitos dopamina e ácido ascórbico, o complexo *mer*-[RuCl₃(dppb)(py)] foi estudado na presença de polianilina (PANI) em diferentes proporções molares. Os filmes LB mistos quando caracterizados eletroquimicamente apresentaram um pico de oxidação em -0,23 V e um pico de redução em -0,35 V similar aos processos da PANI (-0,26 e -0,37 V), mas em menores potenciais uma vez que o complexo de Ru facilita a oxidação deste polímero e a técnica LB proporciona organização com forte interação molecular entre as espécies presentes no filme [80]. Este comportamento foi diferente dos filmes *cast* da mesma mistura, pois neste caso existe uma fraca interação entre os compostos, predominando a ocorrência de agregados [79,80]. Estes filmes ultrafinos, quando depositados sobre eletrodos interdigitados de ouro, foram utilizados em sistemas sensoriais conhecidos como “*língua eletrônica*”, na presença de analitos (sucrose, quinino, NaCl e HCl). Resultados de espectroscopia de impedância mostraram a importância da natureza molecularmente nanoestruturadas pela comparação das respostas de medidas dos filmes LB com os dados obtidos dos filmes *cast*, do compósito PANI/Rupy (proporções 10, 30 e 50 mol%). E a partir da aplicação do método estatístico de Análise de Componentes Principais, PCA do inglês “*Principal Component Analysis*”, que visa buscar a máxima variabilidade dos resultados e a mínima perda de informações permitindo uma diferenciação das amostras, identificou se as amostras semelhantes ou não, qual das variáveis contribui mais para a diferenciação entre as amostras e ainda, como as amostras estavam correlacionadas entre si. De forma geral os valores das respostas dos filmes LB foram mais próximos entre si, indicando melhor reprodutibilidade em relação aos filmes *cast*. Este sistema se destacou pela baixa dispersão de dados e distinção em baixas concentrações molares de sabores melhor que a língua humana. [81, 82]. Além dos sabores, estes sensores foram capazes de distinguir bebidas comerciais como água mineral de diferentes fabricantes, água de coco natural, água de coco comercial além de água de torneira e água destilada (sistemas complexos de líquidos) de maneira rápida, simples e com boa eficiência onde em alguns casos ocorreu detecção de concentrações em nível de ppb [81].

Os promissores resultados com os filmes LB de complexos bifosfínicos mononucleares estimularam ainda o estudo com o complexo binuclear [$\{\text{RuCl}_3(\text{dppb})\}_2(\mu\text{-4,4'-bipy})$] pela técnica LB, cujo resultado eletroquímico obtido quando comparado aos filmes preparados por outras técnicas de imobilização, *cast* e *dip-coat*, apresentou maior corrente de pico do processo redox, $\text{Ru}_2^{\text{III/III}}/\text{Ru}_2^{\text{II/II}}$, atribuído à alta organização fornecida pela técnica LB [85,84].

E por fim cita-se ainda a aplicação do complexo *mer*- $[\text{RuCl}_3(\text{dppb})(4\text{-Mepy})]$ em eletrodos de pasta de carbono, cujas respostas eletroquímicas foram comparadas as de eletrodos obtidos por técnicas de Langmuir e *cast*. Todas as formas de imobilizações se mostraram robustas e aplicáveis no sensoriamento de dopamina e ácido ascórbico. As respostas de corrente de pico de oxidação destes analitos dependeram da forma de imobilização e da organização estrutural do complexo em cada eletrodo. Destacando-se que o eletrodo de pasta de carbono, além de apresentar maiores correntes, é vantajoso por ser de fácil preparação e de superfície renovável. Já a menor quantidade de material utilizado foi na preparação dos filmes LB deste complexo com superfície molecular mais reprodutível [83].

3. OBJETIVOS

Baseado na descoberta da atividade biológica comprovada e o emprego dos complexos de rutênio, em especial os complexos bifosfínicos, como promissores metalofármacos, esta tese teve por objetivo avaliar a atividade antitumoral do complexo *mer*-[RuCl₃(dppb)(VPy)] (RuVPy) e investigar o mecanismo de ação a partir da interação com fosfolipídios utilizando monocamadas de Langmuir, filmes LB e lipossomos como modelos de membrana celular, cuja simples estruturação permitem uma avaliação em nível atômico.

Em consonância com isso, os objetivos específicos do presente estudo foram:

- (i) Avaliação da atividade antitumoral do complexo RuVPy frente à linhagem de células de carcinoma de laringe humana e células controle normais;
- (ii) Realização de cálculos teóricos do complexo RuVPy;
- (iii) Investigação das interações entre o RuVPy e o modelo de membranas lipídicas, com os fosfolipídios zwitteriônico DPPC e os aniônicos DPPG e DPPS nos filmes de Langmuir. Caracterizações convencionais da técnica de Langmuir por isotermas de pressão, medidas de compressibilidade, BAM, PM-IRRAS e determinação e avaliação dos parâmetros termodinâmicos;
- (iv) Preparação de filmes LB a partir dos filmes de Langmuir do RuVPy e membranas lipídicas e caracterizações por medidas espectroscópicas e morfológicas;
- (v) Caracterização eletroquímica dos filmes LB contendo o complexo RuVPy e membranas lipídicas, para a compreensão da interação entre as espécies estudadas.
- (vi) Preparação e caracterização de lipossomos formados com o complexo RuVPy e fosfolipídios.
- (vii) Estudo antitumoral do complexo RuVPy na forma de lipossomos

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Reagentes

Os fosfolipídios L-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), rac-dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) e L-dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS) foram adquiridos da Avanti Polar Lipids, todos com 99% de pureza. O $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ e 4-vinilpiridina foram obtidos da Sigma-Aldrich, todos com grau de pureza analítico e foram utilizados sem demais tratamentos, assim como demais os reagentes e solventes utilizados.

4.2 Síntese do complexo RuVPy

O complexo *mer*- $[\text{RuCl}_3(\text{dppb})(\text{VPy})]$ foi sintetizado de acordo com uma rota estabelecida para complexos bifosfínicos com ligantes n-heterocíclicos similares [85, 86], os quais partem da substituição do ligante aqua do complexo precursor *mer*- $[\text{RuCl}_3(\text{dppb})\text{H}_2\text{O}]$ pelo ligante 4-vinilpiridina na proporção 1:1,1 (complexo/ligante), em meio de CH_2Cl_2 , sob refluxo em atmosfera de Ar. A reação foi agitada por 4 horas. Notou-se que ao decorrer da síntese, o precursor inicialmente pouco solúvel em CH_2Cl_2 deixou de existir e a reação permaneceu com uma coloração vermelha mudando somente de intensidade. A seguir, reduziu-se o volume desta solução até 10 % do volume inicial e adicionou-se hexano a fim de precipitar os cristais do complexo. Filtrou-se a vácuo esta suspensão vermelha, lavou-se com hexano e secaram-se os cristais em dessecador. Rendimento: 71%. $\text{C}_{35}\text{H}_{35}\text{NP}_2\text{Cl}_3\text{Ru}$ (MM = 738,71 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) Calc. Anal. para C 56,90; H 4,73; N 1,90%. Encontrou-se: C 56,40; H 4,52; N 2,06%. IR $\text{v}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: $\nu(\text{P-C})$ = 516, 1002, 1087, 1484 $\nu(\text{C-H})$ = 1433; $\nu(\text{Ru-N})$ = 435. UV-vis: $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ($\epsilon = \text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$): 262 ($8,55 \times 10^4$), 390 ($3,900 \times 10^3$), 450 ($2,25 \times 10^3$), 530 ($2,46 \times 10^3$). EPR: g_1 = 2,40; g_2 = 2,00; g_3 = 1,69.

4.3 Filmes de Langmuir

Os filmes de Langmuir do RuVPy, DPPC, DPPG e DPPS puros e suas respectivas misturas nas seguintes proporções de complexo (100, 90, 70, 50, 30, 10 e 0 %) foram obtidos em uma cuba Mini KSV, equipada com sensor de Wilhelmy, para medidas de pressão de superfície, instalada em sala limpa classe 10.000 do Grupo de Polímeros Bernhard Gross no Instituto de Física de São Carlos (IFSC), USP. Como subfase utilizou-se o tampão fosfato

salino ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.4 com 150 mM de NaCl) em água ultrapura (18,2 M Ω .cm) obtida em um sistema Millipore Simplicity e mantida em torno de 20 °C. As soluções estoque dos compostos foram obtidas dissolvendo RuVPy e DPPC em CH_2Cl_2 e DPPG e DPPS em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, na proporção 4/1 (v/v), a fim de se obter uma concentração de 1 mM. Depois de misturadas estas soluções nas mencionadas proporções, foram coespalhadas na subfase aquosa com auxílio de uma microseringa. Esperou-se 15 minutos para a evaporação do solvente e estabilização da monocamada e após, os filmes de Langmuir foram comprimidos numa velocidade de 10 mm min⁻¹.

4.4 Filmes Langmuir-Blodgett (LB)

Os filmes LB foram fabricados transferindo os filmes de Langmuir da subfase aquosa para uma superfície sólida com o auxílio de um braço mecânico (dipper). Os filmes foram comprimidos até atingir a pressão superficial de transferência em 30 mN m⁻¹ conforme pressão de biomembranas [87]. Antes de iniciar a transferência dos filmes de Langmuir, esperou-se 15 minutos para a estabilização da monocamada mantendo a pressão alvo constante. A transferência do filme de Langmuir para uma superfície sólida foi feita com velocidade de subida e descida do dipper de 0,5 mm min⁻¹ para monocamadas de RuVPy puro e 5 mm min⁻¹ para os fosfolipídios puros e misturados ao complexo. Deposição do tipo-Y, ou seja, deposição na subida e descida é obtida para o complexo RuVPy puro e deposição do tipo-Z, com aderência somente na subida para monocamadas com fosfolipídios e filme misto. As taxas de transferências (TR), parâmetro definido pelo decréscimo da área ocupada por monocamada (ΔA) dividida pela área da superfície sólida imersa na subfase (A), foram próximas da unidade confirmando a efetiva transferência da monocamada da interface água-ar para os substratos sólidos, tais como lâminas de sílica fundida (grau infravermelho), ITO e carbono vítreo de dimensões próximas a 20 mm².

4.5 Filmes cast de DPPC puro e com 10% de RuVPy

Estes filmes foram obtidos em um disco de carbono vítreo (ECV) embutido em um cilindro de teflon com área de 0,7 cm². Este eletrodo foi limpo via polimento com pasta de alumina, 0,05 mm, seguido de sonicação durante 5 minutos em álcool isopropílico. Após este

procedimento o ECV foi imerso em tampão PBS pH 7,4 e submetido a potencial de 1,5 V durante 3 minutos, a fim de polarizar o eletrodo. Depois de polarizado, este foi seco sob N₂ e subsequentemente uma alíquota de 5 µL da solução dos fosfolipídios puros, ou misturados com 10% de RuVPy, foi adicionada sobre a superfície do eletrodo com auxílio de uma microseringa. Esta solução foi seca a temperatura ambiente levando a formação espontânea de uma bicamada lipídica suportada. Escolheu-se esta proporção devido à concentração do complexo ficar próxima da concentração de IC₅₀ nos testes de atividade biológica e por ser capaz de causar alterações nos Filmes de Langmuir dos fosfolipídios.

4.6 Preparo de formulação lipossômica do complexo RuVPy em vesículas de DPPC

Vesículas multilamelares de fosfolipídio DPPC puro e contendo o complexo RuVPy foram obtidas pelo método de hidratação dos filmes finos[88]. Neste método primeiramente solubilizou-se fosfolipídio puro ou com 10 % de complexo de rutênio em solvente orgânico, no caso CHCl₃ para vesículas de DPPC. Em seguida o solvente foi eliminado destas soluções 1 mmol L⁻¹ através de evaporação, em atmosfera de N₂, para obtenção de um filme lipídico. Mantêm-se este filme em dessecador por 24 h e posteriormente hidratou-se com tampão fosfato pH 7,4 para formação de lipossomos. Esta solução foi submetida a banho de sonicação por 2 h e mais 20 min de sonicação em ultrasonicador de ponta, Sonics Vibra-Cell VCX 500, com amplitude de 40% a fim de reduzir o tamanho das vesículas.

4.7 Princípios e condições experimentais das técnicas de caracterização

Nesta seção estão descritas as condições experimentais e os equipamentos utilizados para caracterizar o complexo, os filmes de Langmuir, LB, *cast* e lipossomos obtidos.

4.7.1 Estudo teórico da estrutura do complexo RuVPy puro

Para obtenção da estrutura otimizada do RuVPy foram realizados estudos quânticos teóricos em nível DFT utilizando-se o pacote de programas Gaussian 03[89]. O método B3LYP com o conjunto de base Lanl2dz foi utilizada, visto que descreve todos os átomos que estão presentes na molécula [90]. A partir da estrutura otimizada foi obtido o mapa de potencial eletrostático do complexo em estudo, o qual foi visualizado pelo programa Molekel

5.3 [91]. Os cálculos computacionais para o complexo foram realizados pela Prof^a Dra Barbara Celânia Fiorin do Departamento de Química da UEPG.

4.7.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear – RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos utilizando o espectrômetro de RMN para amostras sólidas e líquidas (BRUKER UltraShield Advance AV, campo magnético de 9,4 T e frequência de 400 MHz) do Complexo de Laboratório Multiusuários da UEPG. Os espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ foram obtidos em solução desaerada de DMSO, CHCl_3 e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ na proporção 4/1 (V/V) com um tubo capilar contendo D_2O . Os deslocamentos químicos são relativos ao H_3PO_4 85%. Cada espectro foi obtido após 320 *scans*, com frequência de acoplamento para ^{31}P de 161,97 MHz. As soluções dos fosfolipídios e do complexo utilizado tinham concentração 1 mmol L^{-1} e as suas misturas continham 90% do volume de fosfolipídios e 10% do complexo RuVPy.

4.7.3 Espectroscopia de Absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Os espectros eletrônicos para as soluções dos compostos foram registrados em um espectrofotômetro Varian modelo Cary 50 Bio (GDEM/UEPG) usando uma cubeta de quartzo, caminho óptico de 0,5 cm, com soluções de concentração $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ na faixa de 200-800 nm.

4.7.4 Ensaio de viabilidade celular

A atividade biológica foi testada em células de carcinoma de laringe humana, HEP-2 (ATCC CCL23) e em células controle normais de rim de macaco verde africano denominadas células VERO. Ambos os tipos de células foram cultivadas em meio Dulbecco modificado por Iscove - IMDM (Sigma St. Louis, Missouri, USA) suplementada com 10% de serum fetal bovino, 10000 IU mL^{-1} de penicilina e 10 mg mL^{-1} de estreptomicina em ambiente úmido com 5% de CO_2 a 37°C . As células foram mantidas a esta temperatura como uma monocamada confluyente e foram rotineiramente sub culturadas duas vezes por semana. Para ensaios de atividade, placas de 96 poços foram utilizadas com poço contendo 1×10^5 células que após remoção do meio de cultura foram incubadas por 24 h com diferentes concentrações

de RuVPy ($5 - 250 \mu\text{g mL}^{-1}$) dissolvido em DMSO. Ressalta-se que as diluições ocorreram usando o meio de cultura e apresentavam uma concentração final de 1% de DMSO. Controles foram sempre tratados com a mesma quantidade de DMSO como usado nos correspondentes experimentos. Após o período de incubação, as células foram lavadas com tampão fosfato salino e meio fresco de cultura foi adicionado, sendo que e as células foram mantidas a 37°C , 5% de CO_2 e 95% de ar durante mais 48 h.

A viabilidade celular ou citotoxicidade do complexo RuVPy foi avaliada através de um ensaio colorimétrico baseado na conversão celular do sal de tetrazólio em formazan na presença de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio [92], este ensaio é comumente denominado de teste MTT (Sigma). A cada poço da placa, $50 \mu\text{L}$ de solução 1 mg mL^{-1} de MTT em meio de IMDM foi adicionado, seguido de 3 h de incubação a 37°C , 5% CO_2 e 95% ar. A solução de MTT foi removida, $50 \mu\text{L}$ de etanol e $150 \mu\text{L}$ de solução contendo tampão fosfato salino e isopropanol (1:1) foram adicionados em cada poço a fim de solubilizar os cristais formados. A absorbância de cada poço foi lida em um leitor de microplacas (Versamax, Molecular Device) a 550 nm do grupo de Nanotecnologia Farmacêutica da UNICENTRO, sendo proporcional ao número de células vivas. Experimentos foram realizados em sextuplicatas para cada concentração do RuVPy e para as células controles. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão e o índice de sobrevivência (IS) foi calculado de acordo com a equação 3[93]:

$$IS = \frac{A_{\text{droga}}}{A_{\text{controle}}} \times 100\%, \text{ onde } A \text{ é a absorbância}[3]$$

A concentração inibitória média, IC_{50} , foi obtida como a concentração que causou 50% de inibição da viabilidade celular, sendo calculada utilizando o software Calcsyn [94] e múltipla análise do efeito do fármaco.

4.7.5 Análises termodinâmicas dos filmes de Langmuir mistos

As interações em filmes mistos fosfolipídio/RuVPy nas seguintes proporções de complexo (0, 10, 30, 50, 70, 90 e 100 %) foram interpretadas baseando-se na miscibilidade dos componentes destes, sendo que a existência de interações é sugerida a partir da regra da aditividade (Equação 4). Quando uma monocamada mista apresenta um comportamento não-ideal (desvio à regra da aditividade), sugere-se interações moleculares, já que as propriedades não dependem linearmente da composição da monocamada [95].

$$A_{12}(\pi) = A_1X_1(\pi) + A_2X_2(\pi) \dots\dots\dots[4]$$

Sendo que, A_{12} é a área molecular média no filme misto, X_1 e X_2 são as frações molares dos componentes, A_1 e A_2 são as áreas moleculares nos filmes dos componentes na mesma pressão de superfície.

A fim de analisar o comportamento físico-químico de monocamadas mistas, parâmetros termodinâmicos, tais como área em excesso (ΔA^E), energia livre em excesso (ΔG^E) e energia livre da mistura (ΔG^M), podem ser mensurados a partir das isotermas de pressão de superfície vs área por molécula [96]. Com estes parâmetros, obtêm-se informações importantes sobre a miscibilidade entre os componentes da monocamada, empacotamento molecular, força de interação e a estabilidade das monocamadas mistas.

Inicialmente, para o estudo das monocamadas realizou-se o cálculo da área em excesso (ΔA^E), a qual é determinada pela diferença entre a área molecular experimental dos filmes mistos (A_{exp}) e a área molecular ideal (A_{12}) [95,97], através da equação 5.

$$A^E = A_{exp} - A_{12} = A_{exp} - (X_1A_1 - X_2A_2) \dots\dots\dots [5]$$

Se a mistura é ideal ou se os dois componentes são imiscíveis, ΔA^E é zero, sendo que $\Delta A^E = f(X_1)$ é uma linha reta. Qualquer desvio destas condições de linearidade indica não-idealidade e miscibilidade entre os componentes [95]. Desvios positivos são interpretados como a presença de interações de repulsão entre as moléculas na monocamada mista, enquanto os desvios negativos representam interações atrativas [98]. Ou seja, a condensação da monocamada ocasiona em valores negativos de ΔA^E , enquanto a ΔA^E positivos indicam a expansão da monocamada [95]. Os desvios são observados nos filmes mistos devido à fatores geométricos ou interações hidrofóbicas [95,98].

Outro parâmetro termodinâmico que pode ser estudado através das isotermas π -A é a energia livre em excesso (ΔG^E), e esta é tratada como uma indicação de interações e estabilidade da monocamada mista [95]. Em 1957, Frank Goodrich mostrou como a energia livre em monocamadas mistas pode ser avaliada a partir de dados experimentais [97], sendo que a natureza e extensão das interações entre as moléculas em um filme misto dependem fortemente da pressão do sistema e também do nível de organização da monocamada [99]. O valor de ΔG^E pode ser calculado diretamente através das isotermas π -A utilizando a equação 6:

$$\Delta G^E = \int_0^\pi A_{exp} - A_{12} d\pi = \int_0^\pi A_{exp} - (X_1 A_1 - X_2 A_2) d\pi \dots\dots\dots [6]$$

sendo A_{12} a área molecular média para uma mistura ideal e A_{exp} a área molecular obtida experimentalmente em determinada pressão de superfície.

ΔG^E negativas indicam a formação de monocamadas mistas estáveis e sugerem forte interação entre os dois componentes, enquanto um valor positivo indica que as interações entre os dois componentes são mais fracas que as interações no filme puro [95,96,100], e ainda que ocorre a separação de fases na monocamada[95]. Portanto, $\Delta G^E < 0$ indica interação atrativa entre as moléculas que compõem o filme misto e valores de $\Delta G^E > 0$ indica interações repulsivas entre as moléculas que compõem a monocamada mista, e provavelmente um dos componentes da monocamada forma agregados bidimensionais [99].

A fim de se analisar quantitativamente a estabilidade das monocamadas mistas, pode-se calcular a energia livre da mistura (ΔG^M), a qual é dada pelas Equações 7 e 8.

$$\Delta G^M = \Delta G^E + \Delta G^{ID} \dots\dots\dots [7]$$

$$\Delta G^{ID} = RT (X_1 \ln X_1 - X_2 \ln X_2) \dots\dots\dots [8]$$

onde ΔG^{ID} representa a energia livre ideal, R a constante universal dos gases (8,31451 J K⁻¹ mol⁻¹) e T a temperatura em Kelvin.

Se uma monocamada mista é mais estável que os filmes dos componentes puros, a energia livre da mistura (ΔG^M), dada pela Equação 7, é negativa. Em geral, têm-se que $\Delta G^M < 0$ indica interações atrativas e $\Delta G^M > 0$, interações repulsivas [95,96].

Além disso, parâmetros termodinâmicos que refletem as interações e tamanho da força de ligações intermoleculares podem ser analisados com mais detalhes, conforme discutido a seguir [101,102,103]. De acordo com a teoria da solução normal [101,102,103], o coeficiente de atividade f_1 é dado segundo a equação 9 [103,104].

$$\ln f_1 = \frac{\omega(1-X_1)^2}{RT}, \quad \ln f_2 = \frac{\omega(1-X_2)^2}{RT} \dots\dots\dots [9]$$

onde f_1 e f_2 representam o coeficiente de atividade para os componentes da mistura (X_1 e X_2) e ω é a troca de energia a qual descreve as forças coesivas entre moléculas distintas[101,102], e isto pode ser calculado pela equação 10.

$$\omega = \frac{\Delta G^{Exc}}{X_1 X_2} \dots\dots\dots [10]$$

O parâmetro de interação (I_p) foi calculado de acordo com a Equação 11. E este reflete o tamanho da força de ligação ou interação entre os diferentes tipos de moléculas. O sinal do valor de I_p depende do ΔG^{Exc} , onde maior valor negativo de I_p corresponde à interação mais forte [101,102,103].

$$I_p = \frac{\omega}{RT} \dots\dots\dots [11]$$

Todas as análises termodinâmicas (A^E , ΔG^E , ΔG^M , f_1 , f_2 , ω and I_p), foram analisadas nas pressões entre 5-30 mN m⁻¹.

4.7.6 Microscopia de Ângulo de Brewster (BAM) dos filmes de Langmuir

As micrografias de BAM dos filmes de Langmuir dos compostos puros e das misturas com 10% de RuVPy sobre subfase de tampão fosfato salino foram obtidas utilizando o microscópio modelo BAM2Plus da Nanofilm Technologies da Alemanha, equipado com emissão de laser de 30 mW, com luz p-polarizada a 690 nm, que permitiram obter imagens de 2 µm de resolução. Este microscópio esteve acoplado a uma cuba NIMA, modelo 601M, e a uma câmera CCD (Charge-Coupled Device). O ângulo utilizado para realização das medidas foi de 52,16°. Estas medidas foram possíveis após formação do filme de Langmuir onde o índice de refração na interface ar/água é ligeiramente alterado, dando origem à luz refletida na direção da câmara. Uma imagem da estrutura pelicular interfacial é formada pelo contraste das regiões com menor concentração molecular do filme (regiões escuras - sem reflexão) e os pontos em que a superfície da água é coberta com uma concentração molecular mais elevada do filme (regiões brilhantes - reflexão) [105]. Todas as medidas foram realizadas em duplicatas no laboratório do Grupo de Polímeros Bernhard Gross no IFSC da USP- São Carlos.

4.7.7 Espectrometria de massa com ionização por spray eletrostático

Uma solução ácida em acetronitila do RuVPy a 0,2 mg.mL⁻¹ foi caracterizada por espectrometria de massa utilizando um espectrometro LTQ XL Linear Ion Trap da Thermo Fisher Scientific INc., com ionização por *spray* eletrostático (ESI - do inglês *electrospray*

ionization). Com software Xcalibur 2.1. Estas medidas foram realizadas em colaboração com o Prof. Marcio P. de Araújo do Departamento de Química da UFPR.

4.7.8 Espectroscopia de absorção e reflexão na região do infravermelho – Módulo Polarizado (PM-IRRAS) de filmes de Langmuir e LB

Os espectros de absorção e reflexão na região do infravermelho dos filmes de Langmuir foram obtidos sobre subfase aquosa utilizando o espectrofotômetro KSV/PMI, modelo 550 (KSV instrument Ltd, Helsinki, Finlândia) do Grupo de Polímeros Bernhard Gross no IFSC da USP- São Carlos e no Laboratório do Departamento de Ciências Exatas e da Terra da UNIFESP – Campus Diadema sob supervisão do Prof^o Luciano Caseli. A Cuba de Langmuir foi configurada de modo que o feixe de luz atinge a monocamada com um ângulo de incidência determinado de 80°. A luz recebida foi continuamente modulada entre polarização *s* e *p*, com uma frequência elevada, o que permite medição simultânea de espectros para as duas polarizações. A diferença das frequências de polarizações forneceu informações específicas de superfície e a soma destas serviu como espectro de referência. Como os espectros foram medidos simultaneamente, o efeito do vapor d'água foi largamente reduzido [106].

Os espectros de absorção na região do infravermelho dos filmes LB foram obtidos a partir da análise das monocamadas sobre substratos de Si (10 x 20 mm) utilizando o mesmo espectrofotômetro KSV/PMI, modelo 550, com resolução de 4 cm⁻¹. Este equipamento foi escolhido uma vez que grande sensibilidade é requerida para análise de tão pequena quantidade de amostra existente sobre os substratos sólidos. Como referência (“branco”), para os ensaios, utilizou-se lâmina de Si sem a presença de monocamadas, sendo os demais parâmetros mantidos iguais aos utilizados para filmes sobre subfase.

4.7.9 Medidas eletroquímicas de Filmes LB e cast

Medidas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância foram realizadas em um potenciostato/galvanostato, Autolab PGSTAT30 (Eco Chemie B.V., Utrecht, the Netherlands), no GDEM da UEPG na presença de tampão PBS como eletrólito suporte. Uma cela eletroquímica convencional de três eletrodos foi utilizada com Ag/AgCl_{sat} como eletrodo de referência, um fio de Pt como auxiliar e como eletrodo de trabalho utilizou-se os filmes

obtidos. Os voltamogramas foram realizados em temperatura ambiente com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Para as medidas de impedância a faixa de frequência utilizada foi de 10 kHz a 0.1 Hz com amplitude de sinal de 10 mV. Nestes ensaios de impedância, como sonda redox, utilizou-se a solução do par $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]:\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ na proporção 1:1 com concentração de 5 mmol L^{-1} na presença de tampão PBS como eletrólito suporte, com potencial formal do sistema de 0,2 V.

4.7.10 Distribuição de tamanho dos lipossomos e potencial Zeta

O tamanho dos lipossomos e o potencial Zeta foram obtidos por espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering* ou DLS) utilizando um equipamento da ZETASIZER modelo NANO ZS90 da Malvern, equipado com laser de He-Ne ($\lambda = 633 \text{ nm}$) como fonte de radiação, a temperatura de 25°C . As medidas foram realizadas em cubetas descartáveis de poliestireno contendo 1 mL de soluções diluídas, com concentração $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$, com volume de espalhamento minimizado com uma abertura de 4,6 mm e ângulo de leitura de 90° . Estabeleceu-se como índice de refração 1,33 e viscosidade de 0,9640 relativo ao uso de tampão fosfato salino como dispersante, em acordo com especificações pré-existentes no equipamento. As medidas foram realizadas no Complexo de Laboratórios Multiusuários da UEPG num período de 15 dias com as mesmas soluções lipossômicas estocadas sob refrigeração.

4.7.11 Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG) de lipossomos

As soluções diluídas contendo lipossomos com e sem complexo RuVPy foram analisadas na forma de filme *cast* sobre substrato metálico em um microscópio eletrônico de varredura de efeito de campo com fonte de íons focalizados (FIB) da Shimadzu, modelo VEGA e MIRA 3 instalado no Laboratório Multiusuários da UEPG. A emissão de feixes de elétrons ocorreu de um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial de 17 e 15 kV, com imagens ampliadas 28 e 13 kx, respectivamente.

5. RESULTADOS E DICUSSÕES

Conforme apresentado na introdução, os complexos bifosfínicos de rutênio com a unidade “RuCl₃(P-P)” são interessantes sobre o ponto de vista estrutural, pois podem ser coordenados a vários tipos de ligantes. Além disto, podem formar filmes de Langmuir e LB, puros e mistos, com distintas aplicações, tais como sensores para moléculas biológicas e sensoramento de paladares.

O complexo *mer*-[RuCl₃(dppb)(VPy)], sintetizado durante o meu projeto de mestrado [159], foi escolhido neste trabalho após a constatação na literatura de que complexos com estrutura similar [48] e com ligantes nitrogenados [56, 57], são ativos na inibição de crescimento de diferentes tipos de células de câncer. Dentro do modo de ação destes compostos inorgânicos propõe-se a interação com estruturas celulares, como DNA, proteínas entre outras, o que motivou a realização do teste biológico do complexo RuVPy e o estudo da sua ação frente a fosfolipídios, os quais são biomoléculas formadoras de membrana celular. Destaca-se que na literatura até então não existiam trabalho com complexos de Rutênio e modelos de membrana o que tornou este trabalho inédito.

5.1 Estudo de interação do RuVPy com DMSO e fosfolipídios

Complexos metálicos de rutênio podem sofrer diversas reações quando em superfície celular, sendo a substituição de ligantes uma das principais reações que ocorre no organismo. Estas interações dependem do tipo de ligante presente e do estado de oxidação do centro metálico, o que torna a compreensão do comportamento do metalofármaco em meio biológico de fundamental importância [107]

Experimentos com o complexo RuVPy solubilizado em DMSO, foram realizados pois nos ensaios biológicos este é o solvente utilizado quando compostos insolúveis são testados. O DMSO substitui as moléculas de água no material biológico mantendo sua estrutura e função fisiológica nativa o que permite que se avalie a atuação dos compostos neste meio [108]. Inicialmente foram acompanhadas as alterações espectrais por espectroscopia de absorção de luz na região do visível para averiguar a mudança na esfera de coordenação do RuVPy. Conforme apresentado na Figura 5, em meio não coordenante, tal como CH₂Cl₂, este composto apresenta em seu espectro três bandas, a saber, um ombro em 350 nm atribuído à transição de transferência de carga do ligante para o metal (TCLM), que

corresponde à transferência de elétrons dos orbitais ($3p\sigma^*d\pi$) do átomo de fósforo do ligante bifosfínico (dppb) para o orbital $d\pi$ do metal [109]. Uma banda em 450 nm que é associada à transferência de elétrons do átomo de nitrogênio da piridina para o metal e a banda em 530 nm é atribuída à transição dos orbitais do cloro para o metal [$p\pi(\text{Cl}) \rightarrow d\pi(\text{Ru(III)})$][78]. Em solução de DMSO, propusemos a formação do complexo *mer*-[RuCl₃(dppb)(DMSO)], pois no instante inicial o espectro possui o mesmo perfil descrito para CH₂Cl₂, ou seja, uma banda em 336 nm (TCLM), uma banda em 420 nm associada com a transferência de elétrons do átomo de oxigênio do DMSO para o metal e a banda em 532 nm atribuída à transição dos orbitais do cloro para o metal [$p\pi(\text{Cl}) \rightarrow d\pi(\text{Ru(III)})$]. Este composto já é descrito na literatura a partir da reação entre o complexo precursor *mer*-[RuCl₃(dppb)H₂O] na presença de DMSO [110].

No decorrer de 24 h de reação do RuVpy na presença de DMSO, é proposta a formação do complexo de Ru(II), *trans*-[RuCl₂(dppb)(DMSO)₂] [110], pois foi observado que o espectro sofre alterações significativas como deslocamento batocrômico da banda atribuída ao ligante bifosfínico (360 nm), desaparecimento da banda da transição do N da piridina para o metal em 450 nm e decréscimo de intensidade do ligante cloreto (530 nm) devido ao aumento da simetria da estrutura do complexo do complexo *trans*-[RuCl₂(dppb)(DMSO)₂]. Este complexo já foi obtido e caracterizado em outro trabalho a partir de experimentos de eletrólise exaustiva do *mer*-[RuCl₃(dppb)(DMSO)] em -0,3 V (vs. Ag/AgCl) sendo suas características de RMN 31P e UV-Vis similares às observadas para complexos da série - [RuCl₂(dppb)(L)₂] onde L= n-heterocíclico [86].

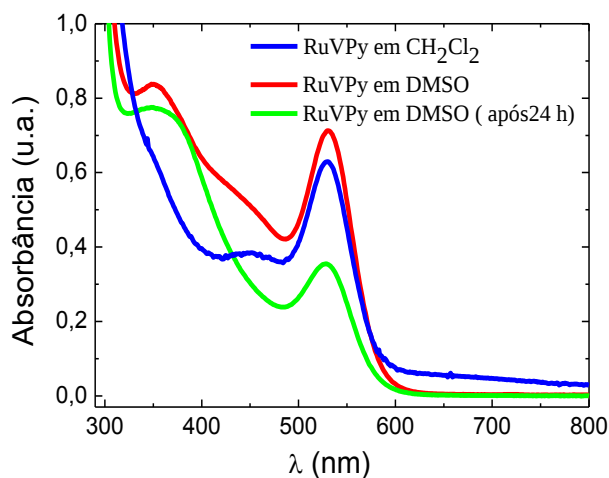


Figura 5: Espectros de absorção na região do ultravioleta visível para o complexo RuVpy com concentração de 0,5 mmol L⁻¹ em CH₂Cl₂ e DMSO realizados com solução fresca e após 24 h.

A confirmação da formação de espécie de Ru(II) na presença de DMSO foi obtida por experimentos de ressonância magnética nuclear de fósforo. O complexo *mer*-[RuCl₃(dppb)(VPy)] não apresenta sinal em espectros de RMN de ³¹P, e sim três valores de tensor *g* no espectro de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) [159], porém um simpleto é observado com deslocamento químico (δ) em 31 ppm no espectro obtido no instante inicial da adição de DMSO (Figura 6a). Este simpleto foi atribuído ao ligante dppb em sua forma livre oxidada, dppbO [111], proveniente de impureza do complexo precursor. Apesar de serem esperados dois simpletos em δ -16 e 32 ppm para o dppbO [111], a ausência do sinal em -16 ppm é atribuída à sua baixa intensidade e pouco tempo de máquina, como será discutido em experimentos posteriores na presença de fosfolipídio. Com o passar do tempo da adição de DMSO à solução do *mer*-[RuCl₃(dppb)(VPy)] (Figura 6b), um simpleto pouco definido em δ 41,8 ppm surgiu devido à presença de átomos de fósforo magneticamente equivalentes coordenados, sugerindo a formação do complexo *trans*-[RuCl₂(dppb)(DMSO)₂] [86,110]. Além deste pico, um deslocamento do simpleto de δ 31 para 33 ppm foi observado pois na presença de oxigênio ocorre a oxidação da dppbO à dppbO₂, em sua forma livre [112]. Os simpletos, em δ 33 e 41,8 ppm, não sofreram deslocamento após 24 h de reação *in situ*, tempo este igual à incubação do complexo na solução do meio de cultura (DMSO 1%) (Figura 6c), confirmando a formação do complexo *trans*-[RuCl₂(dppb)(DMSO)₂], na presença de dppbO₂ livre. Todo o mecanismo desta reação que se propõe é apresentado na Figura 7.

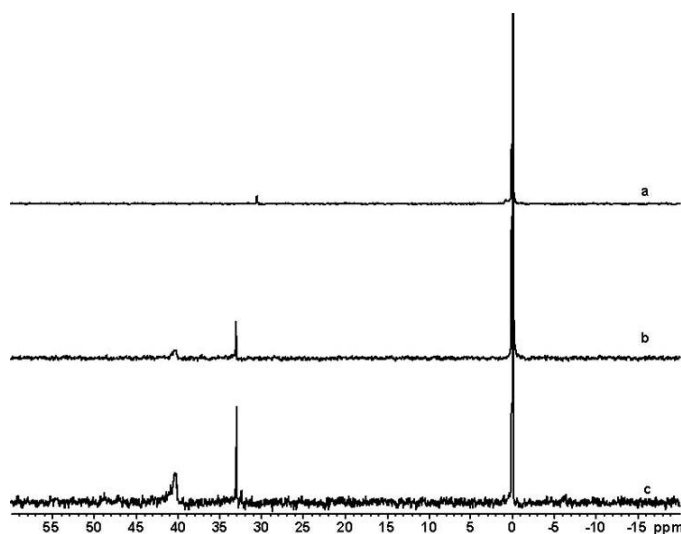


Figura 6: Espectros de RMN de ³¹P do complexo RuVPy em DMSO no tempo inicial do experimento (a), após 2 horas de adição de DMSO (b) e 24 horas de adição de DMSO (c). Referência D₂O/ H₃PO₄ 85%, a 200 MHz a temperatura ambiente.

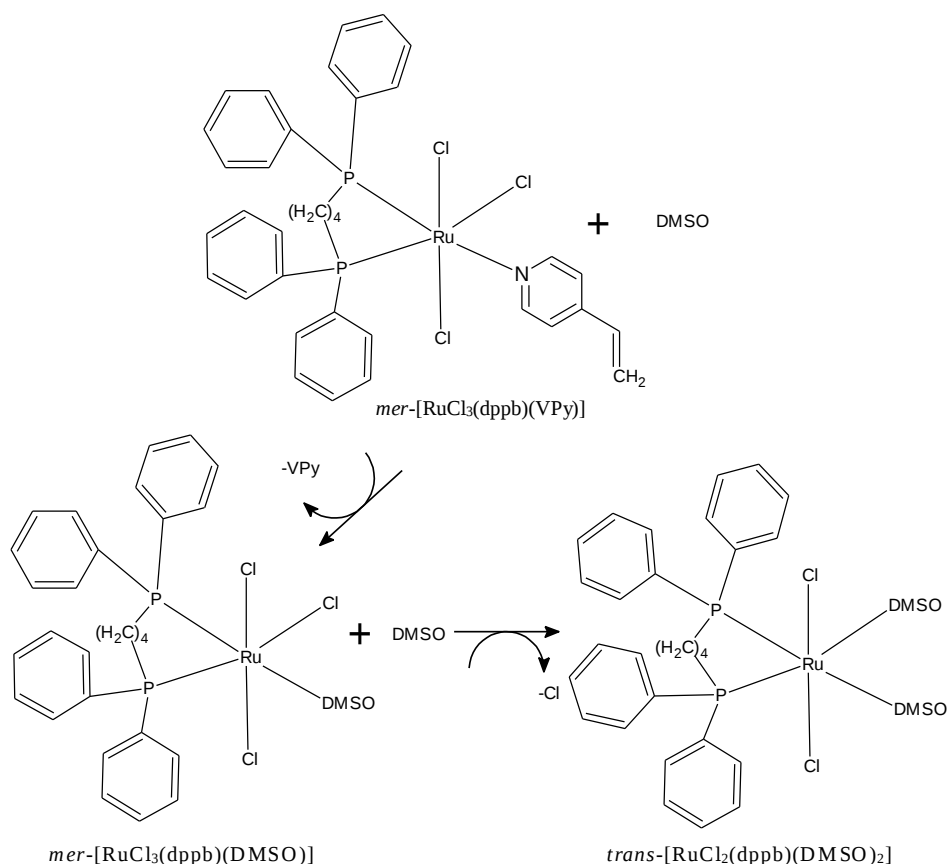


Figura 7: Mecanismo dissociativo proposto do RuVpy na presença de DMSO formando o complexo $mer-[RuCl_3(dppb)(DMSO)]$ e posteriormente o complexo $trans-[RuCl_2(dppb)(DMSO)_2]$.

Sabendo-se que o complexo pode sofrer alterações em sua esfera de coordenação em presença de DMSO, também buscou-se entender a interação do complexo RuVpy com os fosfolipídios, que são os principais constituintes de membranas celulares, sem a presença de DMSO, que por si só já causa significativas alterações em modelo de membrana [113].

Os fosfolipídios escolhidos são moléculas anfifílicas, ou seja, apresentam uma cabeça polar, que no caso do zwitteriônico DPPC (Figura 8A) é um grupo colina (sal quaternário de etilamina) e dois fosfolipídios aniônicos, DPPG (Figura 8B) com um grupo glicerol e DPPS (Figura 8C) com um grupo serina (grupo ácido orgânico). Todos estes grupos polares estão ligados a um grupo fosfato e ao esqueleto de glicerol, que por sua vez se ligam a parte apolar constituída por duas cadeias alquílicas saturadas de 16 carbonos conhecido como palmitoil. Estes fosfolipídios foram escolhidos por serem modelos representativos de membranas biológicas e em específico os fosfolipídios aniônicos por corresponderem a fração

de 15% em membranas de células de mamíferos, sendo os responsáveis por interações com proteínas, inclusive atuando em sinalização celular [114].

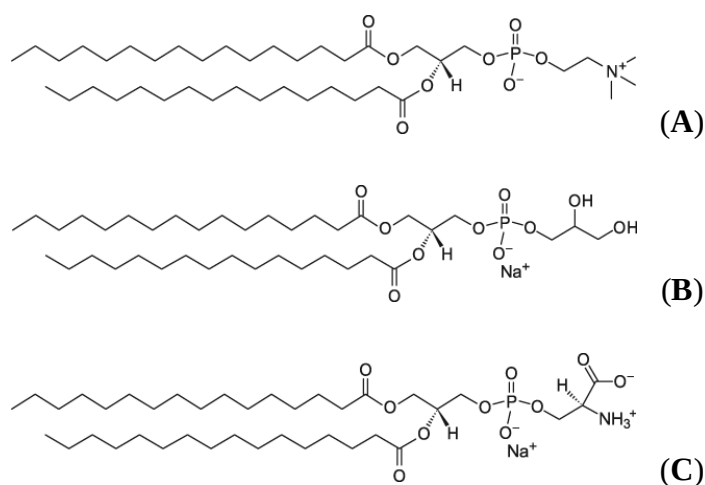


Figura 8: Estrutura molecular do fosfolipídio zwitteriônico DPPC (A) e dos aniônicos DPPG (B) e DPPS (C).

Os fosfolipídios puros não apresentam bandas de absorção na região do UV-Vis, como ilustrado nos espectros da Figura 9A. A fim de mostrar que não ocorrem ligações e sim interações entre o RuVPy e os fosfolipídios DPPC, DPPG e DPPS, os espectros das soluções mistas foram obtidos em instantes iniciais (Figura 9B, C e D, respectivamente). Estes estudos foram realizados em CHCl_3 (no caso do DPPC) e em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (no caso do DPPG e DPPS), a fim de compararmos com resultados posteriores de filmes de Langmuir.

Diferente dos experimentos realizados com DMSO, observa-se que as bandas características do RuVPy são mantidas nos espectros das misturas com os fosfolipídios (350, 450 e 530 nm) e sem deslocamentos, indicando, assim, que a esfera de coordenação do Ru(III) é preservada na presença dos fosfolipídios. A diminuição na intensidade de absorção das soluções DPPG/RuVPy e DPPS/RuVPy deve-se à menor solubilidade do RuVPy na mistura de solventes $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$.

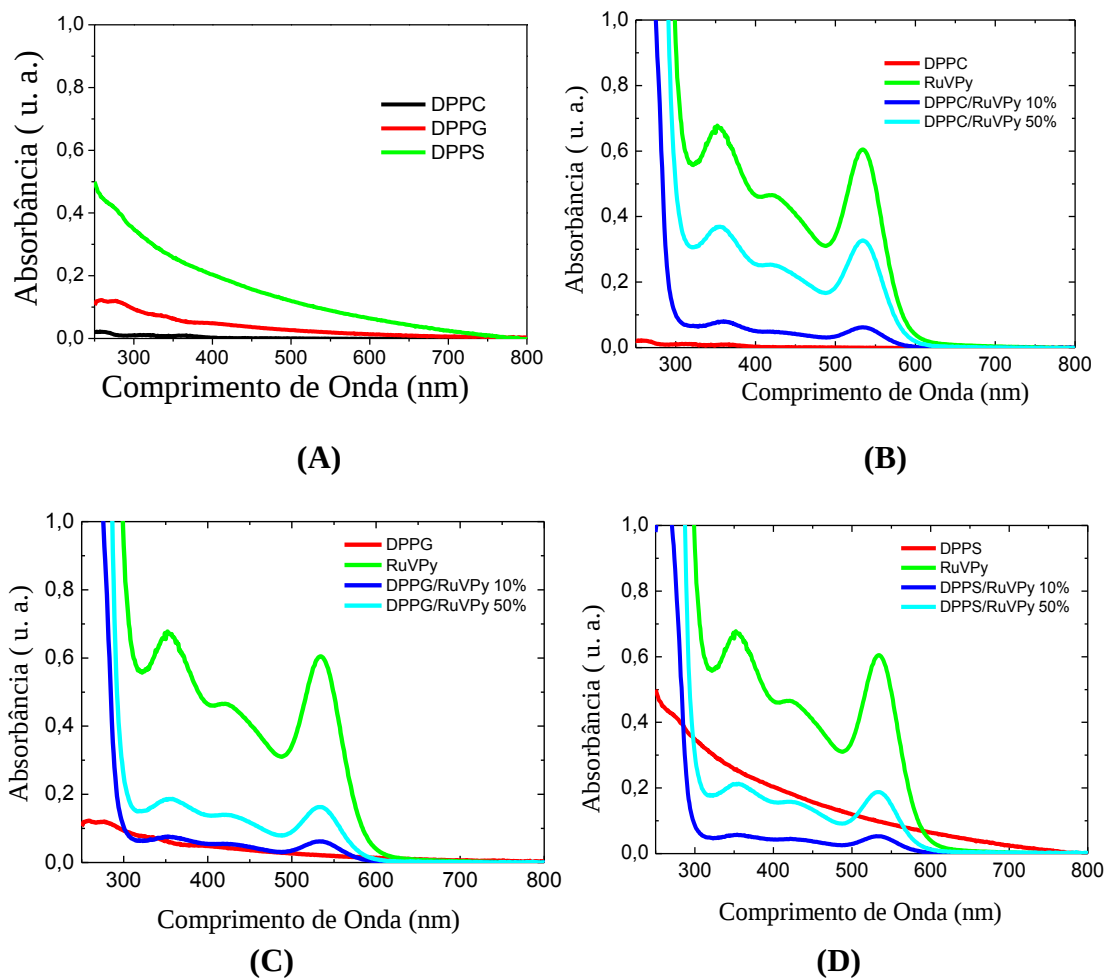


Figura 9: Espectros de absorção na região do ultravioleta visível para (A) o DPPC, DPPG, DPPS (0,5 mM) e sua respectivamente misturas de DPPC/RuVPy, DPPG/RuVPy e DPPS/RuVPy com 10 e 50% do RuVPy (0,5 mM) em (B) CHCl_3 e (C e D) solução de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1 v:v).

Medidas de RMN de ^{31}P (Figura 10) foram realizadas para os compostos puros e misturados na proporção 90/10 de fosfolipídio/RuVPy. Todas as medidas foram feitas de acordo com as condições citadas no procedimento experimental, sendo a mistura com complexo realizada após a leitura do fosfolipídio e a nova medida da mistura realizada na sequência.

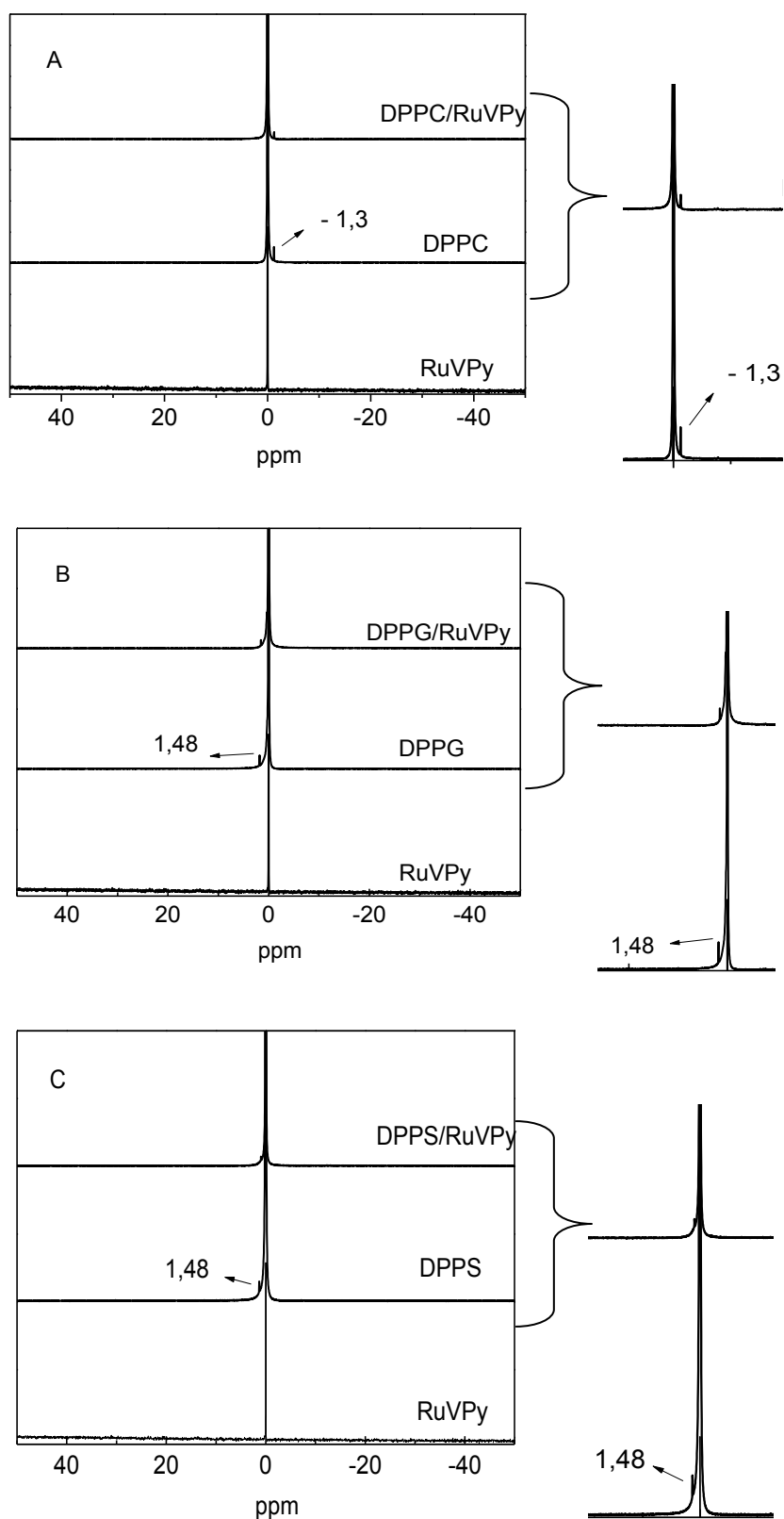


Figura 10: Espectros de RMN de ^{31}P do complexo RuVpy, (A) do DPPC e da mistura DPPC/RuVpy (90/10, massa/massa) (B) do DPPG e da mistura DPPG/RuVpy(90/10, massa/massa) e (C) do DPPS e da mistura DPPS/RuVpy (90/10, massa/massa), em CHCl_3 ou $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ e como referência $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_3\text{PO}_4$ 85% 400 MHz.

É observada nos espectros do complexo RuVPy em CHCl_3 , a presença de dois simpletos em δ -14 e 32 ppm atribuídos ao fósforo do ligante dppb livre oxidado, dppbO [111], como impureza do complexo. Estes sinais tem alterações no deslocamento químico, quando na presença dos fosfolipídios, devido à oxidação da dppbO à dppbO₂, como discutido anteriormente para o DMSO. Nenhum pico novo surge quando o complexo misturado aos fosfolipídios *in situ*, o que corrobora com os dados de UV-Vis indicando que não ocorre mudança na esfera de coordenação do RuVPy nem a formação de novas espécies de Ru(II).

No espectro de RMN de ^{31}P do DPPC puro, (Figura 10A) observa-se um simpleto em δ -1,9 ppm referente ao átomo de fósforo do grupo fosfato presente nas estruturas de fosfolipídios [115]. No espectro da mistura com RuVPy nota-se que este é deslocado para perto do pico da referência (H_3PO_4) conforme evidenciado pelo ombro acoplado ao sinal, que pode ser atribuído à hidrólise do DPPC catalisada pelo RuVPy. Para o DPPG puro, (Figura 10B) um sinal de fósforo é evidenciado na região menos blindada, com deslocamento químico em 0,7 ppm de acordo com a literatura [115], este sinal não foi mais evidenciado na presença de RuVPy. Tal ausência no espectro da mistura pode ser justificada pelo acoplamento do sinal do DPPG com H_3PO_4 , uma vez que se observa um alargamento da base do sinal em função da presença de espécies de Ru(III).

No espectro do DPPS puro (Figura 10C) observou-se um pico em δ 1,4 ppm atribuído ao fósforo do grupo fosfato diferente do que se tem na literatura, cujos valores situam-se entre 0,25 e 0,4 ppm [116]. Esta diferença entre os valores pode ser atribuída à composição do DPPS da literatura determinado em diferentes frações de membranas. Em presença do RuVPy o pico em 1,4 ppm se mantém sem alterações indicando menor interação entre o complexo e o lipídio. Conforme será discutido posteriormente nos cálculos termodinâmicos realizados para as misturas de DPPS/RuVPy, a ausência de mudanças no espectro explica a repulsão entre as moléculas.

5.2 Ensaio de viabilidade celular

A atividade citotóxica do complexo de rutênio RuVPy contra a linhagem de células de carcinoma de laringe humana, HEP-2, e células controle normais, VERO, foi examinada num período de 24 h de incubação, com uma concentração na escala de $\mu\text{mol L}^{-1}$, o complexo teve atividade inibindo o crescimento celular. A Figura 11 ilustra a viabilidade celular expressa como IC_{50} , onde uma concentração de $120 \pm 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de RuVPy foi capaz de eliminar 50% da população de células de câncer. O teste com células VERO foi realizado e um efeito citotóxico similar foi observado, $\text{IC}_{50} = 67 \pm 7 \mu\text{mol L}^{-1}$, indicando alta toxicidade do complexo RuVPy para células normais.

Apesar da alta toxicidade, os resultados obtidos são melhores em comparação aos relatos da literatura, onde uma dose muito maior ($306,9 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi necessária para inibir o crescimento de células epiteliais de carcinoma humano quando o complexo de estrutura similar ao RuVPy, o *mer*- $[\text{RuCl}_3(\text{dppb})\text{H}_2\text{O}]$ foi usado [48]. O RuVPy também apresentou melhores valores de IC_{50} para a HEP-2 quando comparados com a série de complexos contendo o ligante quelante 1-(2-picolil)-4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol (ppt) ligado ao macrociclo tridentado 1,4,7-tritiacilciclononano de enxofre ([9]anoS3) ou com ligante η^6 -areno, $[\text{Ru}([9]\text{anoS}_3)(\text{DMSO-S})(\text{ppt})][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$, $[\text{Ru}([9]\text{anoS}_3)\text{Cl}(\text{ppt})][\text{CF}_3\text{SO}_3]$ e $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Cl}(\text{ppt})][\text{Cl}]$ (280 , 300 e $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente) [117]. Estes resultados comprovam a eficiência do complexo bifosfínico quando comparado aos materiais de diferentes estruturas. No entanto, em relação à metalo droga de referência (cisplatina) o complexo RuVPy não se mostrou tão eficiente, dado a citotoxicidade da cisplatina ocorrer com menor concentração ($7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em um período de 48 h [117]. Uma explicação para tal fato pode ser o tempo utilizado nos ensaios com RuVPy que é a metade do tempo do experimento com o complexo de Pt.

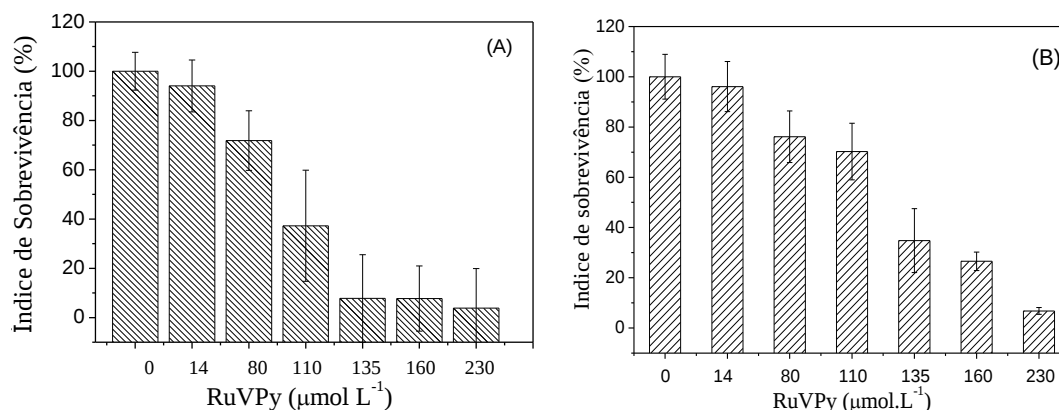


Figura 11: Efeito do RuVPy no índice de sobrevivência de células normais VERO (A) e de células cancerígenas HEp-2 (B) por 24h. Cada coluna representa a média $\pm$ desvio padrão para dois experimentos cada, realizado em sextuplicata

Um possível mecanismo para explicar a citotoxicidade do RuVPy é reportado para complexos de Ru(III), referidos como pró-drogas. Neste tipo de mecanismo, a atividade anticancerígena é atribuída à redução do complexo para espécies de Ru(II), as quais são mais reativas e suscetíveis às reações de troca de ligantes, sendo portanto, capazes de interagir com moléculas-alvo de forma mais eficiente [118,119]. Adicionalmente, baseado no mecanismo proposto para o complexo RuVPy em presença de DMSO (item 5.1) e nos resultados de testes antitumorais com os complexos de Ru(II) do tipo $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(\text{L})]\text{PF}_6$ (L= derivados n-heterocíclicos) e *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{N}-\text{N})]$ (N-N= bipyridina), onde ocorre a labilização de um ligante Cl^- e a formação de uma nova espécie em presença do solvente coordenante DMSO [54, 56], propõem-se para o RuVPy que o grupo de saída seja, além do Cl^- , que situa-se em posição *trans* a dppb, o ligante n-heterocíclico VPy, e no lugar destes coordena-se o DMSO formando o complexo *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{DMSO})_2]$. Na literatura ainda não se tem relato da ação deste complexo em específico, mas sabe-se que espécies que apresentam DMSO coordenadas como o complexo *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(\text{DMSO})]\text{PF}_6$ [54] apresentam atividade contra células de câncer de mama (MDA-MB-231), com concentrações do complexo cerca de 6 vezes menor que a cisplatina, droga de referência.

Desta maneira, mesmo sabendo-se que a espécie *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{DMSO})_2]$, é a que provavelmente se forma em ambientes com hipóxia, ou seja, ambientes com baixa concentração de oxigênio, e que é esta espécie que reage dentro do ambiente celular e não o RuVPy propõem-se que a ação deste complexo siga o padrão de agente neoplásico ciclo

celular não específico assim como os complexos de Pt, que pode interagir com o DNA e também com outras biomoléculas dentro da célula [5]. Para isto, estudos do RuVPy com fosfolipídios característicos de membrana celular foram realizados em filmes de Langmuir e LB a fim de verificar as interações existentes quando este complexo entrar em ambientes celulares específicos delimitados por membranas. Um primeiro momento em que esta interação pode vir a ocorrer é se assumirmos que o transporte deste complexo ocorre via transferina [27], e que neste tipo de sistema a proteína transportadora se conecta com seus receptores incluídos na membrana celular externa e a partir de então inicia-se o processo denominado endocitose [120].

5.3 Interação entre o complexo RuVPy e modelos de membrana celular

O complexo RuVPy tem se apresentado como um composto com potencial anticancerígeno assim como seu precursor [48]. Contudo, a alta toxicidade do RuVPy para linha de células VERO aponta para um modo de ação que pode depender fortemente da interação com outras biomoléculas tais como membranas celulares, não sendo necessário receptores específicos. Logo, o estudo da interação RuVPy com modelos simples de membrana torna-se muito atraente, uma vez que imitar membranas celulares integralmente não é viável quando se deseja obter informações precisas em nível molecular.

Apesar dos filmes de Langmuir de fosfolipídios não serem bicamadas como as membranas celulares reais, estes são vantajosos para estudo de modelos de membrana visto que permitem um controle rigoroso da composição, controle do estado de compactação e consequente estruturação da monocamada, além da planaridade que se aproxima do formato de uma superfície celular. [121] Certamente limitações em estudos de transporte através da membrana existem, mas isto não inviabiliza os estudos com estes reconhecidos modelos.

Aqui usamos monocamadas de Langmuir de fosfolipídios com cadeias hidrocarbônicas saturadas na cauda (16 átomos de carbono), DPPC, DPPG e DPPS, para representar esta membrana, dando a importância à carga de superfície, avaliando os efeitos da incorporação de RuVPy nestas estruturas. Estes filmes foram obtidos em subfase de tampão fosfato salino por apresentar íons comuns aos íons de ambiente fisiológico tais como o Na^+ , PO_4^{2-} , Cl^- , além do pH 7,4 ser o pH encontrado nestes ambientes, como por exemplo na

corrente sanguínea [122]. Nesta subfase as características das isotermas dos fosfolipídios DPPC, DPPG e DPPS foram mantidas de acordo com curvas apresentadas na literatura [123, 128, 129]. No pH 7,4 em que as medidas foram realizadas, o DPPC encontra-se neutro uma vez que o pKa do grupo fosfato é 1,7, logo este encontra-se ionizado e o sal quaternário de amônio permanece positivo a pHs abaixo de 10 [124]. O DPPG neste pH é aniônico pois o grupo glicerol da cabeça permanece protonado (pKa= 14) [125] diferente do seu grupo fosfato. Já o DPPS, tem seu grupo ácido desprotonado (pKa= 3,6) o que neutraliza a carga positiva do grupo -NH_3^+ (pKa = 9,8) [126], permanecendo a carga negativa do grupo fosfato.

Filmes de Langmuir de fosfolipídios puros e mistos com RuVPy foram obtidos espalhando soluções em CHCl_3 (no caso do DPPC) e em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (no caso do DPPG e DPPS) sobre subfase de tampão fosfato salino pH 7,4, um valor intencionalmente escolhido para aumentar a possibilidade de utilizar o conhecimento adquirido, para correlacionar com as respostas dos testes antitumorais. Estes filmes foram utilizados como modelo de membrana, uma vez que complexos metálicos são conhecidos por induzir anormalidades como bolhas em membrana [127] além de dano mitocondrial, o qual ocorre por interações com membranas internas do plasma. Desta forma, justifica-se o estudo dos filmes de Langmuir, uma vez que é conhecido que a difusão de complexos metálicos para dentro da célula pode ocorrer pela sua interação com os lipídios da membrana [71], e estas interações dependem da quantidade de metal a ser administrado e do caráter lipofílico destes complexos, visto que estes podem ser encontrados ao longo da bicamada lipofílica [123].

5.3.1 Isotermas de pressão de superfície dos filmes puros e mistos RuVPy e fosfolipídios

Experimentos iniciais foram realizados com os componentes puros, com soluções de RuVPy, DPPC, DPPG e DPPS com concentração de 1 mmol L^{-1} . Os filmes de Langmuir do complexo RuVPy foram obtidos em duas subfases distintas, água ultrapura (pH ~5,5) e tampão fosfato salino (pH 7,4). Nestas duas subfases as isotermas obtidas (Figura 12A-C) apresentaram uma inclinação acentuada e sem a presença de regiões distintas como as isotermas de moléculas anfifílicas tradicionais (Figura 3), o que pode indicar a formação de multicamadas e domínios moleculares [61]. Percebe-se que antes de $40 \text{ \AA}^2$ para isoterma em água ultrapura e antes de $60 \text{ \AA}^2$ para isoterma em tampão fosfato salino, as moléculas de

RuVPy permanecem distantes com pressão em torno de 0 mN m^{-1} , indicativo de fase gasosa. E somente a partir destes valores de áreas, 40 e $60 \text{ \AA}^2$, ocorreu aumento da pressão de superfície indicando aproximação das moléculas passando a fase líquido-expandida (LE) e a condensada (C), que não são distintas entre si. Ao fim da fase condensada percebe-se que a partir de pressões em torno de 50 mN m^{-1} em água ultrapura e 40 mN m^{-1} em tampão fosfato salino, inicia-se o colapso do filme, onde este deixa de ser ordenado dando lugar a agregados e multicamadas [61]. Destes resultados é inferido que a medida que se comprime o RuVPy ocorre a orientação das moléculas, dependendo da composição da subfase, com diminuição da área molecular sobre a superfície da interface água-ar. Tal mudança molecular pode ser avaliada com a análise da estrutura espacial do complexo, obtida por cálculos teóricos de DFT com método B3LYP e teoria lanl2dz, conforme figuras ilustradas na Figura 13B para subfase de água ultrapura. Na estrutura otimizada para o RuVPy, os átomos H68 e o H57 do grupo fosfínico, assim como o Cl71, entram em contato com a subfase ocupando uma área por molécula de aproximadamente $25 \text{ \AA}^2$, cujo valor está de acordo com a área mínima molecular extrapolada da curva de π vs área por molécula ($\sim 30 \text{ \AA}^2$). Já para isoterma em tampão fosfato salino (Figura 13D), observa-se que além dos hidrogênios do grupo fosfínico e cloreto, ocorre o contato do grupo vinil da piridina (C75) com a subfase, ocupando uma área de aproximadamente $43 \text{ \AA}^2$, também de acordo com a área mínima molecular extrapolada da curva de π vs área por molécula ($\sim 50 \text{ \AA}^2$). Estas duas orientações observadas podem ser atribuídas à tentativa do complexo de melhor acomodar seus ligantes, que tem diferentes densidades eletrônicas nos dois tipos de subfases testadas.

Segundo o dado de mapa de potencial deste complexo (Figura 13D), o ligante cloreto é o grupo que apresenta maior densidade eletrônica, seguido do grupo fosfínico onde sua densidade se concentra nos anéis aromáticos enquanto o grupo vinil piridina apresenta menor densidade. Estes resultados nos levam a esperar que as interações do tipo eletrostáticas ocorram quando grupos carregados negativamente dos fosfolipídios se aproximam de grupos com carência eletrônica (cargas positiva) do complexo ou vice-versa [26].

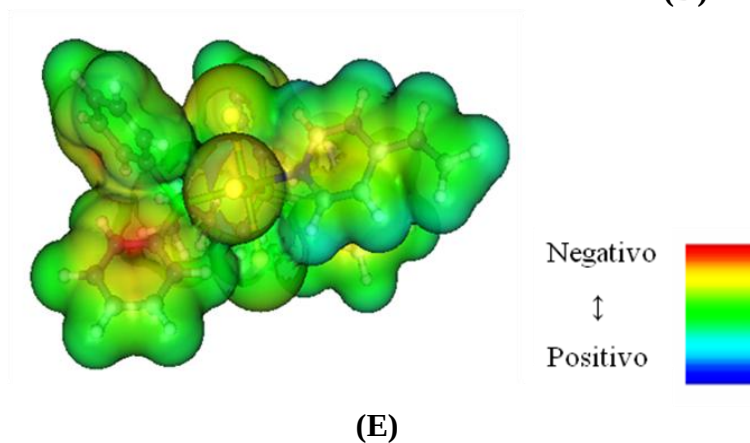
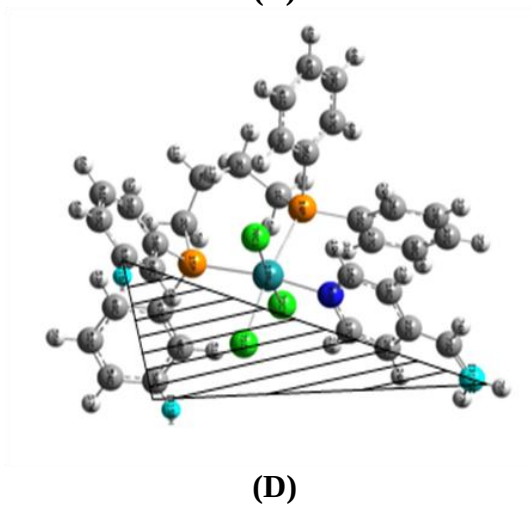
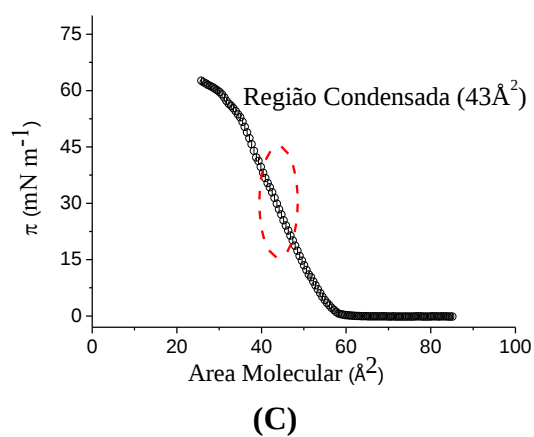
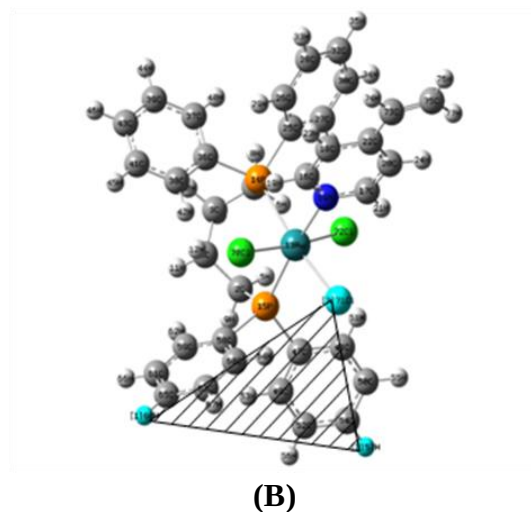
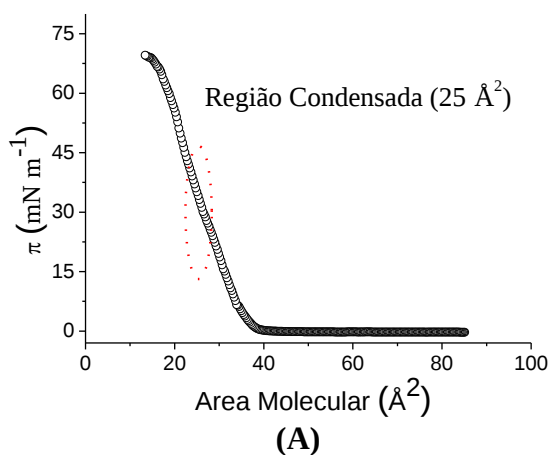


Figura 12: Isotermas de π vs área por molécula do complexo RuVPy em subfase de (A) água ultrapura e (C) em tampão fosfato salino a 20 °C. Estruturas espaciais do complexo RuVPy obtidas por cálculos teóricos para (B) subfase de água ultrapura e (D) tampão fosfato salino. No espaço em destaque é representada a área ocupada entre os átomos H68, H57 e Cl71, a qual corresponde a área extrapolada (25 Å²) (A) e átomos H67, H55 e C75, o qual corresponde a área extrapolada (43 Å²) (C) para monocamadas condensadas. (E) é o mapa de potencial eletrostático do RuVPy no espaço (isovalor 0,05) com escala de cor do vermelho(negativo) de -0.18 u.a. para o azul (positivo) de 0.17 u.a.

Na isoterma de DPPC puro (Figura 13A), observa-se um platô em torno de 5 mN m^{-1} correspondente à coexistência das fases líquido-expandida e líquido-condensada. Com o aumento da pressão surge uma fase condensada com seu auge de organização em 40 mN m^{-1} e após o colapso do filme em pressões superiores a 45 mN m^{-1} , estes valores são consistentes com a literatura [128]. Com perfil bem similar o DPPG puro (Figura 13B), teve sua isoterma também consistente com a literatura [128], com um platô decorrente da transição das fases LE-LC em torno de 8 mN m^{-1} , a fase condensada com maior organização em pressões de 40 mN m^{-1} e colapso do filme em pressões superiores a 45 mN m^{-1} . Já para monocamadas de DPPS puro, estrutura (Figura 13C), com mesmas cadeias hidrocarbônicas saturadas na cauda (16 carbonos), verifica-se um perfil de isoterma sem a presença de platô e com um volume menor de área ocupada, o que se deve a aproximação maior das cadeias alquílicas dada a pequena cabeça de fosfatidilserina ($\sim 40 \text{ Å}^2$) [129,130].

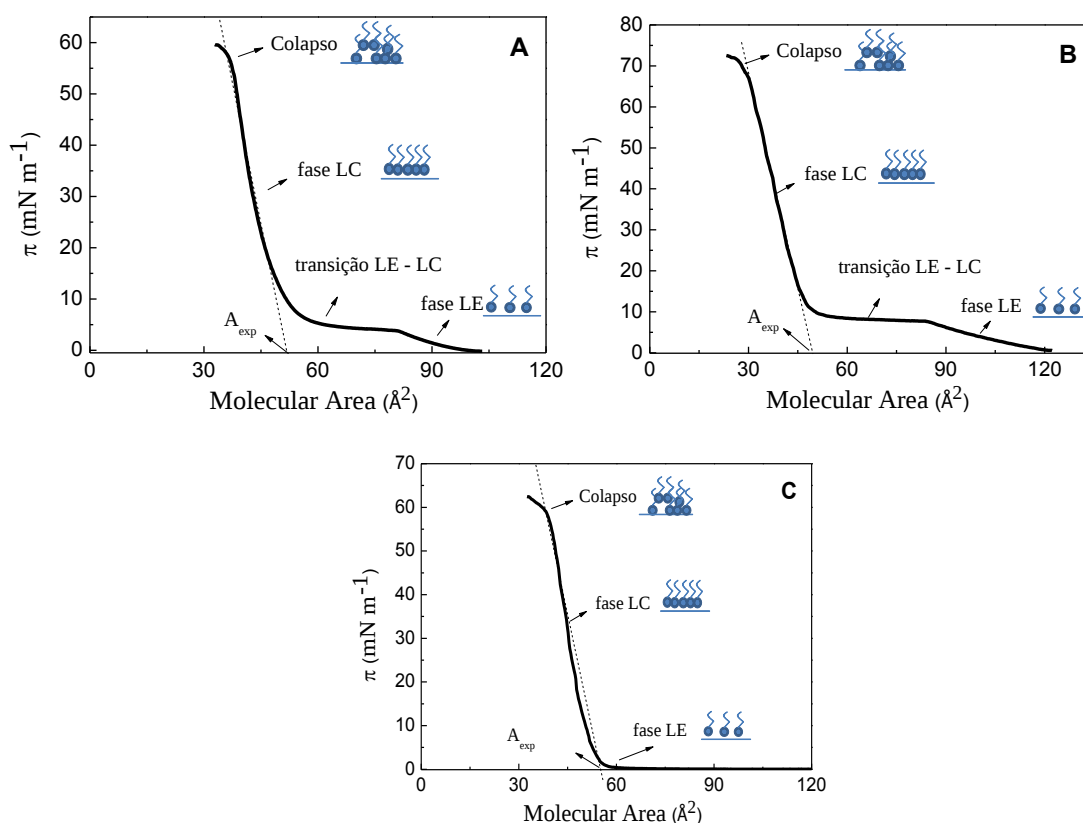


Figura 13: Isotermas π vs área por molécula dos compostos (A) DPPC, (B) DPPG, (C) DPPS, a 20°C , em tampão fosfato salino.

No estudo das monocamadas mistas de fosfolípido e complexo RuVPy as soluções iniciais dos compostos puros foram aliquotadas e misturadas de forma a obter soluções com

diferentes porcentagens de RuVPy, 10, 30, 50, 70 e 90 %. A alíquota com 10% de RuVPy corresponde à concentração final do complexo de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em meio ao modelo de membrana, valor este muito próximo à concentração referente ao IC_{50} para ensaios com células de câncer e para células controle. Adicionalmente, estas concentrações foram úteis para obter mais informações sobre a estabilidade dos lipossomos obtidos com DPPC e RuVPy. Neste estudo, os filmes de Langmuir dos fosfolipídios foram acompanhados por isotermas π vs área/molécula, ilustradas na Figura 14, para a comparação com os sistemas binários.

Com a inserção de RuVPy constatou-se significativas variações no perfil das isotermas em relação aos compostos puros, sendo que a isoterma de DPPC sofre alterações na região do platô que passou a ocorrer em maiores valores de pressão chegando a ser expandida até 25 mN m^{-1} para concentrações de 30, 50 e 70% de RuVPy, indicando maior fluidez da monocamada mista de acordo com os dados de compressibilidade. Além disso, observa-se nas curvas com 50 e 70% de RuVPy um aumento da pressão de colapso indicando maior estabilidade do filme uma vez que este suporta maiores pressões até que venha a se desorganizar[131].

Na monocamada do DPPG, assim como nas demais, com a inserção do RuVPy, houve alterações na região do platô, que passou a ocorrer em pressão superior chegando a ser expandida até próximo de 35 mN m^{-1} para concentrações de 30, 50 e 70% de RuVPy. Além disso, para as curvas de concentrações 50, 70 e 90% de RuVPy observa-se um decréscimo da pressão de colapso indicando menor estabilidade do filme.

Uma alteração de perfil ainda mais drástica é observada para o filme de DPPS na presença do RuVPy, devido às mudanças nas interações da monocamada densa de DPPS com característica típica de lipídios, cujas cadeias apolares interagem por forças de van der Waals, e sua cabeça por interações eletrostáticas entre si e com a subfase [132]. Na isoterma obtida para a mistura DPPS/Ru 10% verificam-se dois pontos de colapso; o primeiro a pressão de superfície próxima a 45 mN m^{-1} e o segundo à pressão de superfície correspondente ao colapso da monocamada de DPPS puro ($\sim 65 \text{ mN m}^{-1}$). A presença de dois colapsos sugere a imiscibilidade entre o complexo e o fosfolipídio, da mesma forma que observado no trabalho com DPPS e stanol, um composto similar ao colesterol presente em plantas [133].

A partir das isotermas de pressão do RuVPy, fosfolipídios e suas respectivas misturas (inserções nas Figuras 14A, B e C), obteve-se informações a respeito da compressibilidade da

monocamada Cs^{-1} [60,62], segundo a equação 12, onde A é a área por molécula e π a pressão de superfície.

$$Cs^{-1} = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right) \dots\dots\dots [12]$$

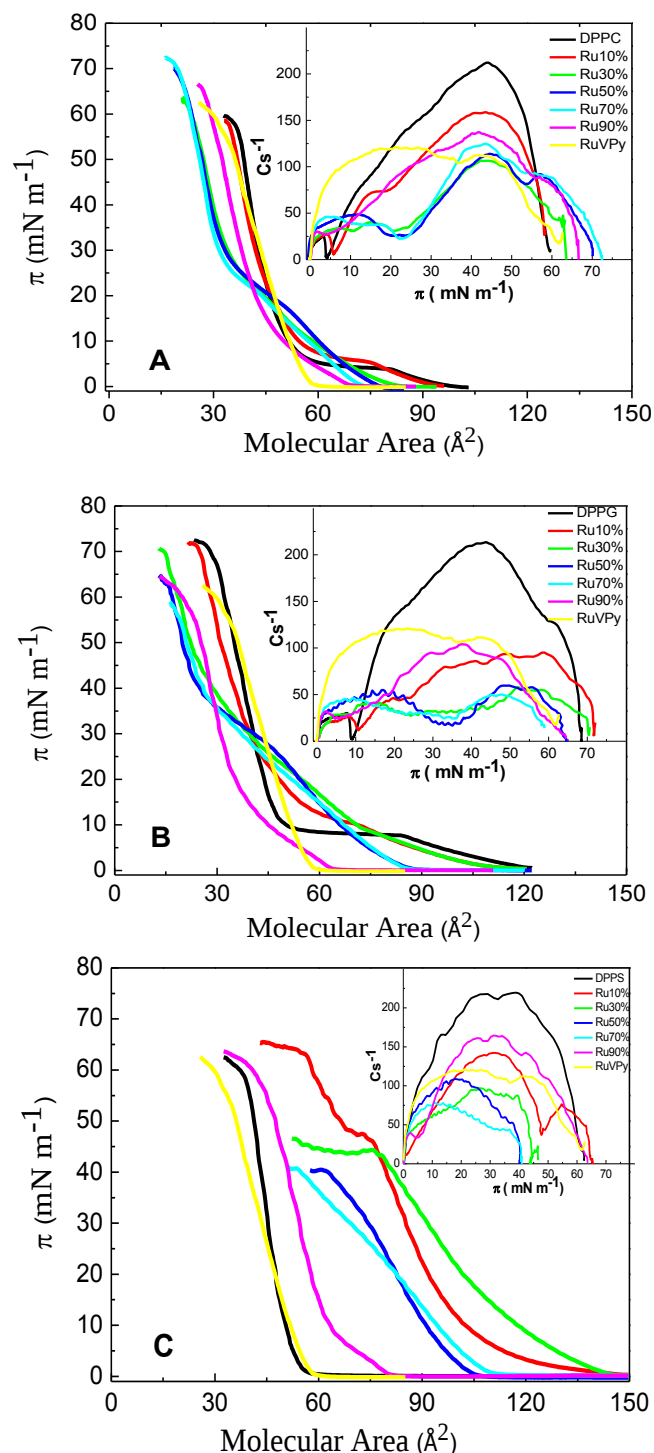


Figura 14: Isothermas π vs área por molécula dos compostos RuVPy, (A) DPPC, (B) DPPG, (C) DPPS e suas respectivas misturas, (—) 10% Ru, (—) 30% Ru, (—) 50% Ru, (—) 70% Ru e (—) 90% Ru, a 20 °C em tampão fosfato salino. Figura inserida: Módulo de compressibilidade (Cs^{-1}) versus a pressão de superfície para os compostos puros e respectivas misturas.

Dos gráficos de C_s^{-1} , podemos inferir claramente as regiões de transição de fase da monocamada durante a compressão, permitindo analisar a elasticidade do filme no plano. Quando o módulo de compressão está na faixa de 1000 a 2000 mN m^{-1} a monocamada é conhecida como sólido-condensado, entre 100 e 250 mN m^{-1} as monocamadas são líquido-condensadas e entre 10 e 50 mN m^{-1} são filmes líquido-expandidos [134]. Observa-se na inserção da Figura 14 que cada curva apresenta um valor máximo de módulo de compressibilidade, sendo que para o complexo RuVPy o máximo de C_s^{-1} ocorre na pressão próxima de 20 mN/m , valor este onde há maior organização possível da monocamada para este composto [78]. Além disto, este gráfico confirma a ausência de transição da LE para LC, mostrando que o complexo possui uma estrutura menos compressível ou menos elástico em relação aos fosfolipídios, para qualquer valor de pressão. Já para os fosfolipídios, todos possuem maiores valores de compressibilidade devido à maior elasticidade da monocamada formada sobre a interface água-ar. Dentre estes, nota-se que o DPPC e DPPG, possuem um valor máximo de C_s^{-1} em 40 mN m^{-1} , e para o DPPS uma pressão um pouco inferior ($\sim 35 \text{ mN m}^{-1}$), o que pode ser atribuído ao denso empacotamento deste composto [132].

As curvas das monocamadas mistas, com a presença de rutênio, apresentam menores valores de compressibilidade que as monocamadas dos fosfolipídios puros, o que indica que, nesta faixa de pressão, a presença de RuVPy torna a monocamada mais fluida. Não se observa uma sequencia de aumento ou diminuição com a variação das proporções de Ru, contudo percebe-se que as curvas com 10 e 90% de RuVPy, para os três conjuntos de dados, são as de maiores valores de C_s^{-1} em relação as demais proporções 30, 50 e 70%, com menores valores. Além disto, o perfil das curvas de C_s^{-1} nas proporções 30, 50 e 70% são semelhantes assim como suas isotermas.

Também a partir das isotermas de π vs área por molécula dos compostos observa-se que não há uma linearidade entre a área molecular do sistema binário e a proporção de RuVPy, conforme apresentado nas análises gráficas da Figura 15. Na presença do complexo metálico, a monocamada mista tende a ser mais condensada para as misturas de DPPC/RuVPy e DPPG/RuVPy, uma vez que a área de maior ordenamento diminui quando comparada com a área para os compostos isolados. Já para as misturas de DPPS/RuVPy (Figura 15C) verifica-se uma expansão das áreas de maior ordenamento, indicando pouca afinidade entre as estruturas presentes no filme. A menor afinidade no sistema DPPS/RuVPy também é observada pelas pressões de colapso dos filmes mistos apresentadas em conjunto

nas análises gráficas da Figura 15 (curvas em vermelho), as quais, em sua maioria, apresentam-se em valores inferiores aos dos compostos puros. Comportamento similar observa-se para a mistura DPPG/RuVPy. Bem diferente do comportamento das misturas com fosfolipídios aniônicos, a mistura DPPC/RuVPy apresenta valores de pressões de colapso superiores indicando maior estabilidade das moléculas na interface água/ar. Resultados similares de aumento ou diminuição da pressão de colapso são observados na literatura quando complexos de diferentes metais (V, Cr, Zn) e ligantes (picolinato, amino e metoxisalicilidenoimina e porfirinas) são inseridos em monocamadas de fosfolipídios [70, 71, 72].

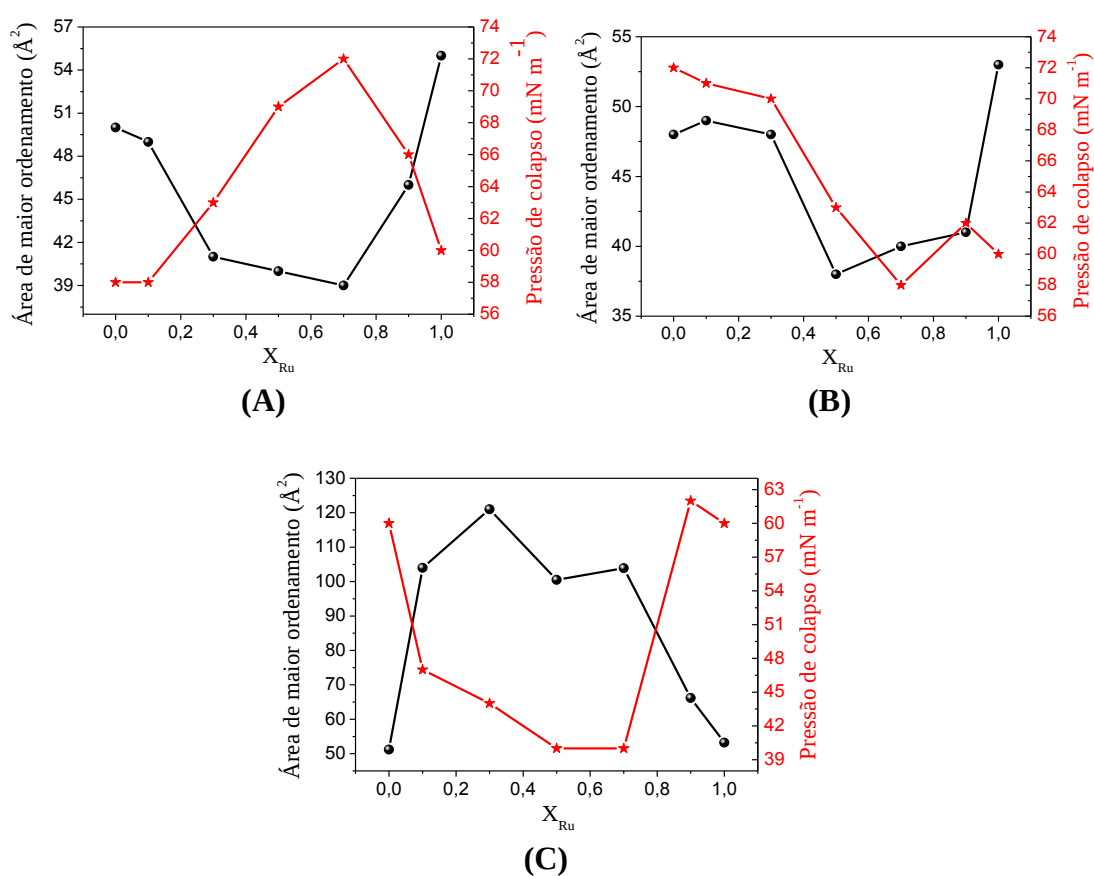


Figura 15: Gráficos da área de maior ordenamento das monocamadas mistas e pressão de colapso (A) DPPC/RuVPy, (B) DPPG/RuVPy e (C) DPPS/RuVPy em função da proporção de RuVPy (0, 10, 30, 50, 70, 90 e 100%)

5.3.2 Análise termodinâmica dos filmes mistos RuVPy e fosfolipídios

O estudo das interações entre os fosfolipídios DPPC, DPPG, DPPS com o RuVPy foi explorado pelos parâmetros físico-químicos obtidos das isotermas (realizadas em duplicatas) acima descritas: área em excesso (ΔA^E), excesso de energia livre (ΔG^E) e energia livre da mistura (ΔG^M). A Figura 16 ilustra os gráficos da relação entre a área molecular experimental e a área ideal (Equação 4) para os filmes mistos em função da proporção de RuVPy.

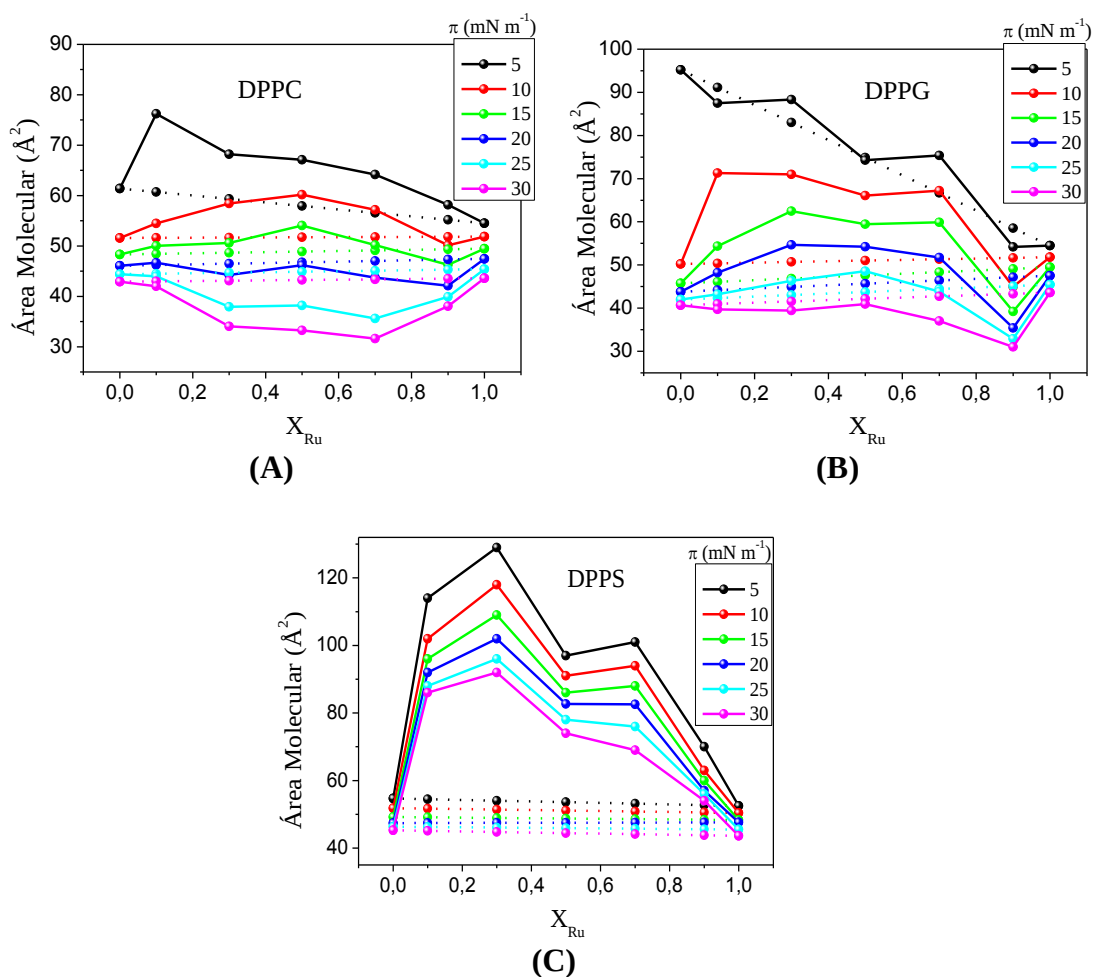


Figura 16: Áreas moleculares experimentais (linha sólida) e ideais (linha tachada) para as monocamadas mistas (A) DPPC/RuVPy, (B) DPPG/RuVPy e (C) DPPS/RuVPy, em diferentes proporções de RuVPy (0, 10, 30, 50, 70, 90 e 100 %), obtidas sobre subfase aquosa contendo solução tampão PBS, nas pressões de 5-30 mN m⁻¹.

Dos gráficos ilustrados na Figura 16, obtidos durante a formação das monocamadas mistas para todos os fosfolipídios, observou-se que não há uma relação linear entre a área

molecular e a proporção de RuVPy na monocamada mista, sendo que tal comportamento indica que há miscibilidade entre os fosfolipídios DPPC, DPPG, DPPS e o complexo RuVPy em todas as pressões estudadas, e consequentemente formam-se monocamadas não ideais na interface [95]. A relação do afastamento dos valores de áreas moleculares experimentais (linha sólida) e ideais (linha tachada), dos filmes mistos DPPC e DPPG, em baixos valores de pressão, indica que há expansão inicial da monocamada nas proporções até 70% de RuVPy, como observado nas isotermas de pressão por área por molécula. Já em valores maiores de pressão (20 e 30 mN m^{-1}) observa-se uma compactação da monocamada em presença de DPPC, em quase todas as proporções, e um comportamento quase ideal para o DPPG até 50% de RuVPy, passando a ser condensada também nas proporções maiores. Na mistura binária com DPPS, em todas as proporções e pressões, os desvios são bem maiores entre os valores de áreas moleculares experimentais e ideais, em relação do DPPC e DPPG, indicando forte repulsão entre as espécies [95,98].

Para todas as misturas de DPPC/RuVPy e DPPG/RuVPy com o aumento da pressão do sistema (30 mN m^{-1}), o ΔA^E (Figura 17A e B) diminui. No entanto, o efeito contrário mais pronunciado ocorre em misturas com DPPS (Figura 17C) em relação as misturas com DPPC e DPPG. Quando a monocamada mista de DPPC/RuVPy e DPPG/RuVPy é submetida às altas pressões (20-30 mN m^{-1}), os valores de ΔA^E são negativos, indicando que há um efeito de condensação da monocamada, devido às forças intermoleculares atrativas, fatores geométricos e/ou interações hidrofóbicas [95]. Na mistura de DPPC com 10% de RuVPy em baixa pressão (5 mN m^{-1}) o valor de ΔA^E é positivo, indicando forças intermoleculares repulsivas que vão sendo superadas a medida que se comprime o filme chegando próximo a zero mostrando idealidade da mistura com bom ordenamento das estruturas no filme. Diferentemente para a mistura DPPS/RuVPy, em todas as pressões o desvio observado foi positivo, sugerindo que as interações entre as moléculas na interface são preferencialmente repulsivas [95,98] e ainda sugere uma perturbação do empacotamento das moléculas de fosfolipídios ocasionada pela acomodação das moléculas de RuVPy neste sistema. Tal resultado exprime que os filmes mistos DPPS/RuVPy apresentam um grau de desordem elevado. A magnitude das interações entre o DPPS e o RuVPy depende significativamente da pressão de superfície, sendo que aumentando-se a pressão do sistema, o ΔA^E diminui. Em altas proporções de RuVPy o efeito de expansão da monocamada é menos expressivo, o qual pode ser ocasionado pela acomodação forçada das moléculas.

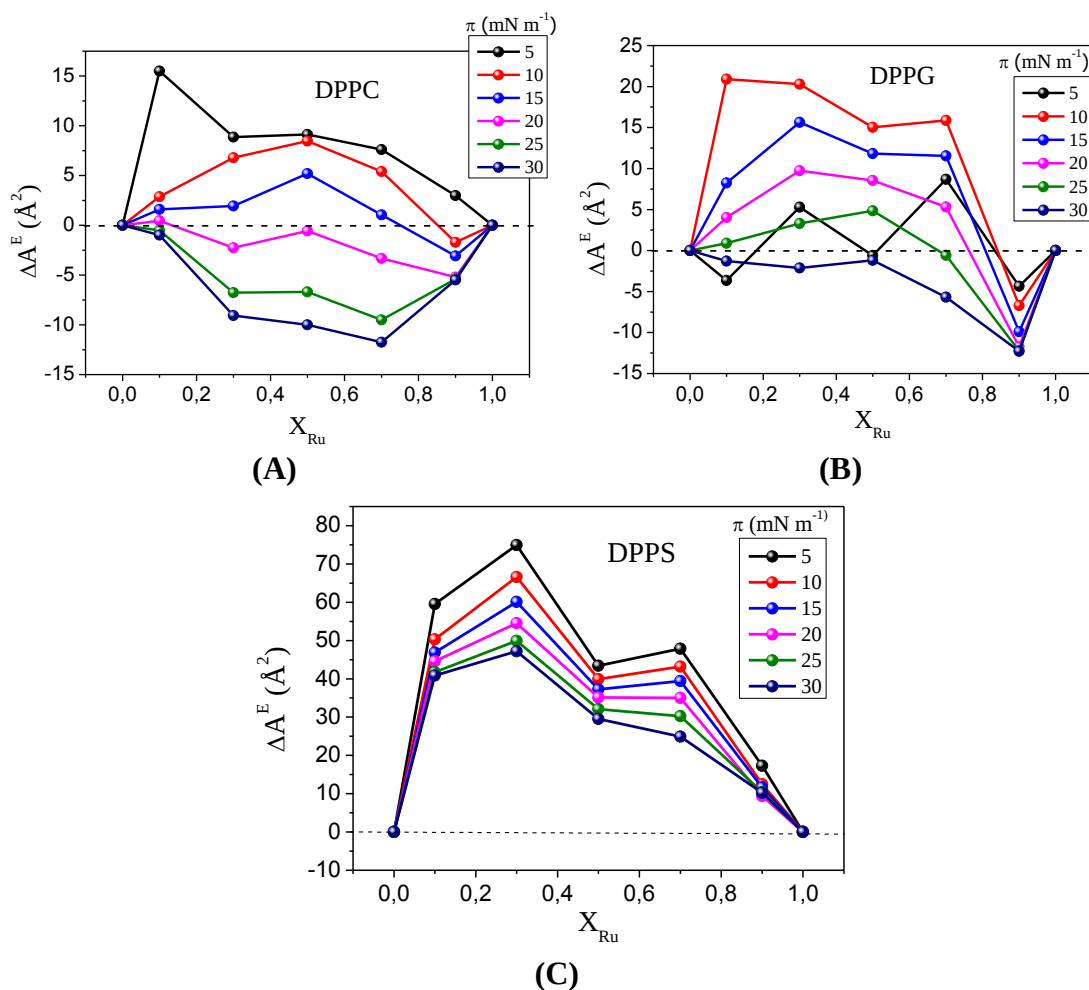


Figura 17: Relação entre a área molecular em excesso (ΔA^E) das misturas (A) DPPC/RuVpy, (B) DPPG/RuVpy e (C) DPPS/RuVpy sobre subfase aquosa contendo solução tampão PBS, em função da proporção de RuVpy (0, 10, 30, 50, 70, 90 e 100 %) em diferentes pressões de superfície.

A partir das isotermas π vs área por molécula das monocamadas dos sistemas binários, avaliou-se também a energia livre em excesso (ΔG^E) utilizando a Equação 5, cujas relações obtidas são ilustradas nos gráficos da Figura 18.

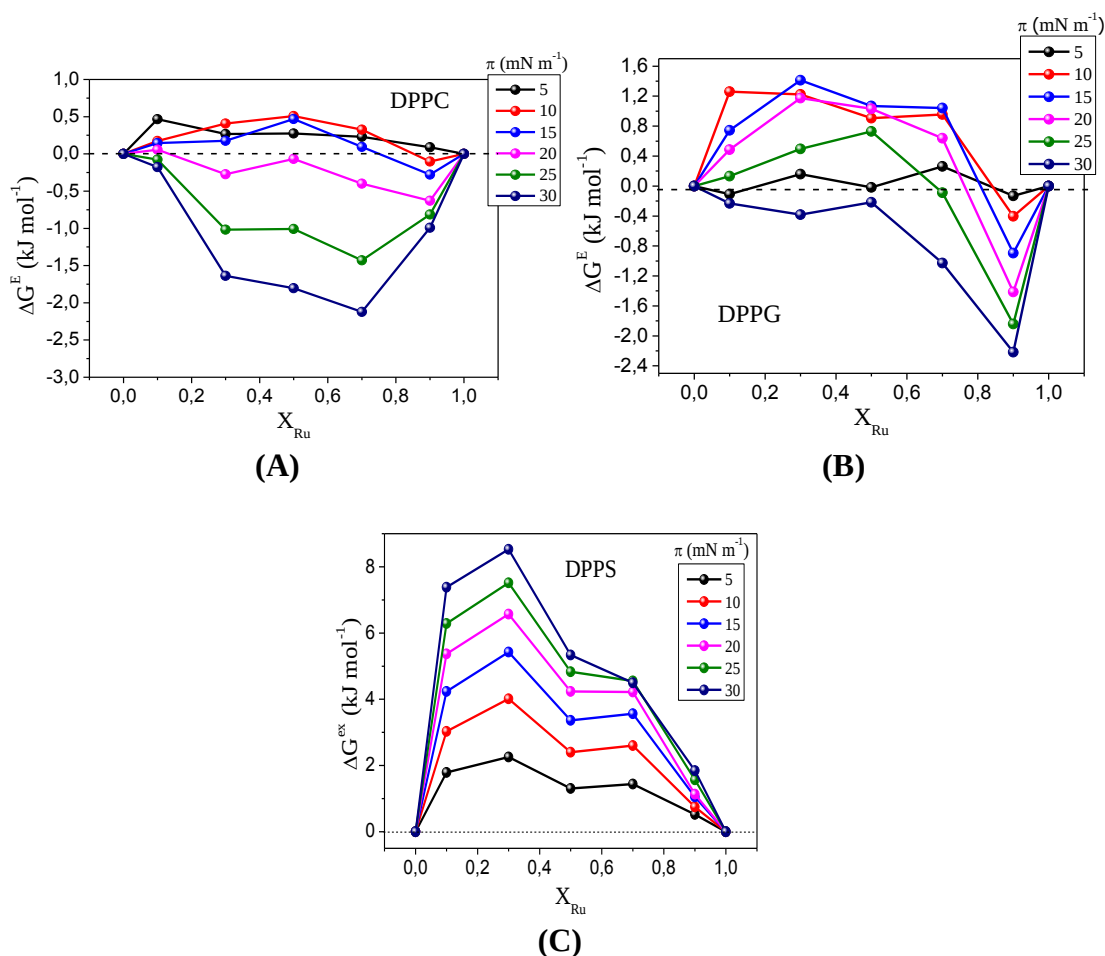


Figura 18: Energia livre em excesso para as monocamadas mistas (A) DPPC/RuVPy, (B) DPPG/RuVPy e (C) DPPS/RuVPy, em diferentes proporções de RuVPy (0, 10, 30, 50, 70, 90 e 100 %), obtidas sobre subfase aquosa contendo solução tampão PBS, nas pressões de 5-30 mN m^{-1} .

A análise da energia livre em excesso nos forneceu importantes informações sobre as monocamadas mistas. Percebemos que temos uma tendência a valores positivos com o aumento do caráter da carga negativa do grupo fosfato, indo do DPPC, para o DPPG e por fim para o DPPS. Por exemplo, no caso do DPPC/RuVPy (Figura 18A) e DPPG/RuVPy (Figura 18B) observa-se que em baixas pressões de superfície (5-15 mN m^{-1}) ΔG^E é positivo, com exceção do filme contendo 90% de DPPC/RuVPy. e para DPPS/RuVPy (Figura 18C) a energia livre em excesso é positiva em todas as pressões, com elevados valores em baixas proporções de RuVPy (10 e 30%). Este comportamento sugere interações repulsivas entre as moléculas, com interações entre os dois componentes mais fracas que as interações entre as moléculas no filme puro [95,96,100,133], portanto, há separação de fase nestas monocamadas mistas, cujo efeito é mais evidente quando o fosfolípido com grupo fosfato carregado negativamente está presente, tal como o DPPS/RuVPy (Figura 18 C). O contrário disto ocorre

quando se aumenta a pressão para 20, 25 e 30 mN m^{-1} do sistema binário DPPC/RuVPy, onde a energia livre em excesso torna-se negativa, sugerindo maior estabilidade da monocamada mista e interações atrativas entre as moléculas. Similar comportamento é observado apenas para a mistura de DPPG/Ru em $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$. Os valores de ΔG^E mais negativos com o aumento da pressão do sistema, indica que o grau de interação molecular foi reforçado com o rearranjo das moléculas na interface [95, 96] e este comportamento é mais evidente quando se tem um fosfolípídio com caráter neutro como o zwitteriônico DPPC.

A fim de quantificar a energia e, conseqüentemente, estudar a estabilidade termodinâmica das monocamadas mistas, calculou-se a energia livre da mistura (ΔG^M) (Equação 7), conforme ilustra a Figura 19 para os filmes de DPPC/RuVPy, DPPG/RuVPy e DPPS/RuVPy, em função da proporção de RuVPy

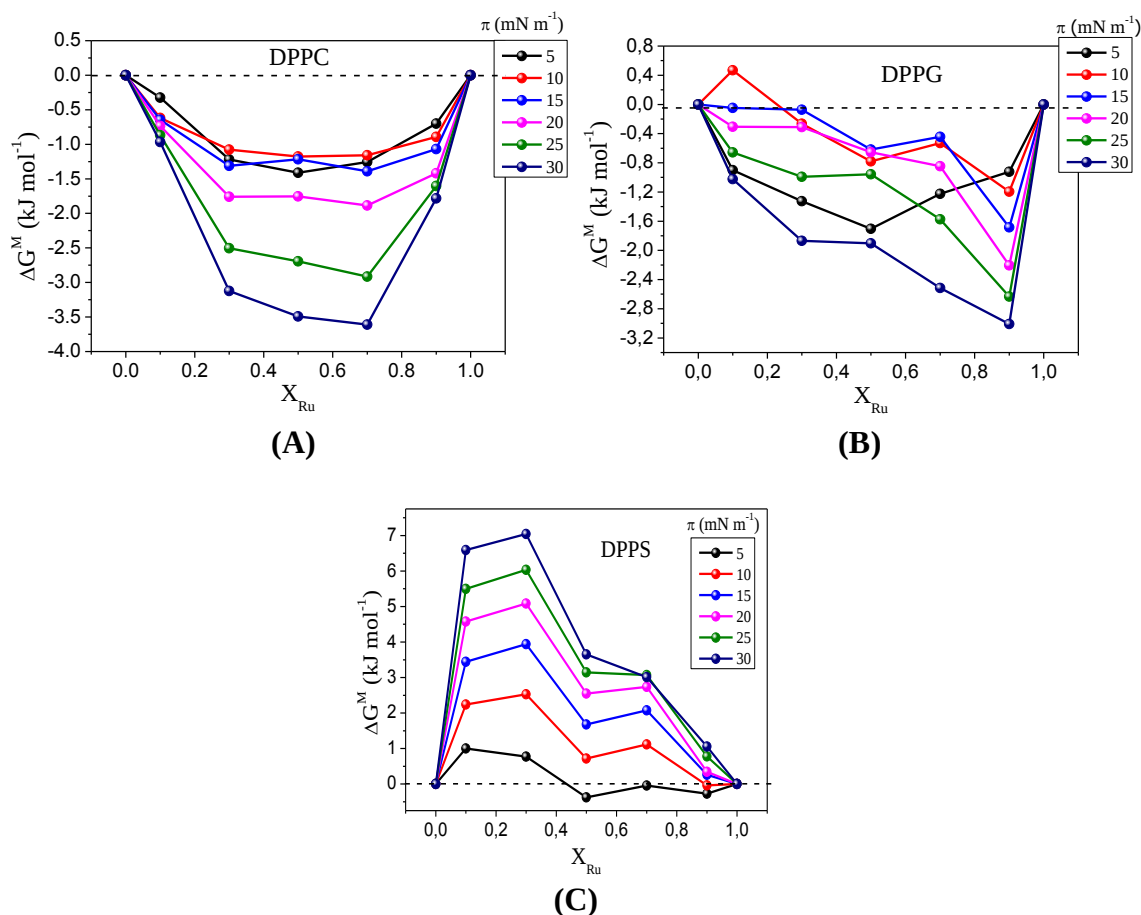


Figura 19: Energia livre para as monocamadas mistas (A) DPPC/RuVPy, (B) DPPG/RuVPy e (C) DPPS/RuVPy, em diferentes proporções de RuVPy (0, 10, 30, 50, 70, 90 e 100 %), obtidas sobre subfase aquosa contendo solução tampão PBS, nas pressões de 5-30 mN m^{-1} .

A partir da energia livre da mistura pode-se estimar a estabilidade e a interação dos componentes na monocamada mista. Para o sistema binário DPPC/RuVPy (Figura 19A) observa-se que ΔG^M é negativa em todas as condições estudadas, concluindo-se que a interação entre o fosfolípido e o complexo metálico é energeticamente favorável, isto quer dizer que o filme misto é mais estável que as monocamadas dos compostos puros [95,96]. Foi verificado que a máxima estabilidade da monocamada mista DPPC/RuVPy foi obtida para proporções de 50 e 70% de RuVPy, em $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$, com valores de $\Delta G^M = -3,49$ e $-3,61 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectivamente. Para a monocamada mista DPPG/RuVPy (Figura 19B), observa-se que em todas as condições estudadas, com exceção do filme contendo 10% de RuVPy em $\pi = 10 \text{ mN m}^{-1}$, ΔG^M é negativa, da mesma forma que para o DPPC/RuVPy, a interação entre o DPPG/RuVPy é energeticamente favorável [95,96]. A máxima estabilidade da monocamada mista foi estabelecida para proporção de 90% de RuVPy, em $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$, com valor de $\Delta G^M = -3,01 \text{ kJ mol}^{-1}$. O filme de DPPG contendo 10% de RuVPy em $\pi = 10 \text{ mN m}^{-1}$, não apresenta ΔG^M negativa, ou seja, nesta condição a monocamada é energeticamente desfavorável e apresenta $\Delta G^M = +0,468 \text{ kJ mol}^{-1}$.

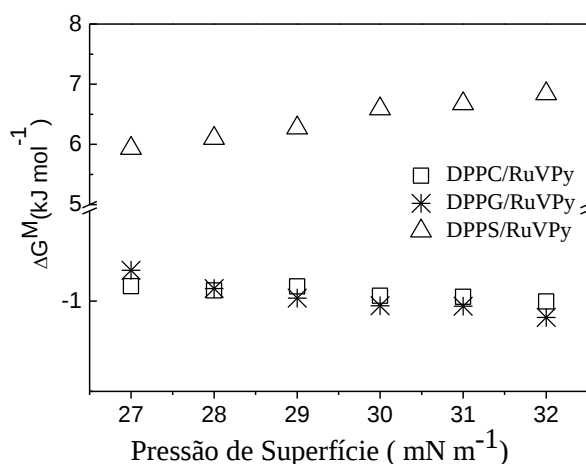


Figura 20: Energia livre para as monocamadas mistas DPPC/RuVPy, DPPG/RuVPy e DPPS/RuVPy com 10% de RuVPy, em diferentes pressões de superfície (27, 28, 29, 30, 31 e 32 mN m^{-1}), obtidas sobre subfase aquosa contendo solução tampão PBS, pH7,4.

A análise de ΔG^M para as misturas de DPPC, DPPG e DPPS com 10% de RuVPy na pressão perto de 30 mN m^{-1} (Figura 20), condição utilizada para obter filmes LB e lipossomos, verifica-se que para o DPPC e DPPG os valores são muito próximos em torno de -1 kJ mol^{-1} o que comprova a estabilidade destes filmes, diferente da mistura com DPPS com

ΔG^M médio de $+6,5 \text{ kJ mol}^{-1}$. Máxima estabilidade foi observada para proporções de 50 e 90% de RuVPy no sistema binário DPPS/RuVPy em baixas pressões ($\pi = 5 \text{ mN m}^{-1}$) com valores máximos de $\Delta G^M = -0,38$ e $-0,27 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectivamente. Porém, sob maiores pressões de superfície a energia livre de mistura é positiva, sendo que o máximo foi observado na proporção de 30% de RuVPy, em $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$, com $\Delta G^M = +7,04 \text{ kJ mol}^{-1}$. A partir de tais resultados, conclui-se que a formação da monocamada mista DPPS/RuVPy é termodinamicamente desfavorável [135].

Como o comportamento das monocamadas mistas de DPPS/RuVPy foram tão diferentes das demais misturas, cálculos de parâmetros ainda mais específicos foram realizados, tais como o coeficiente de atividade (f_i), troca de energia (ω) e parâmetro de interação (I_p), conforme apresentado nas Figuras 21 e 22.

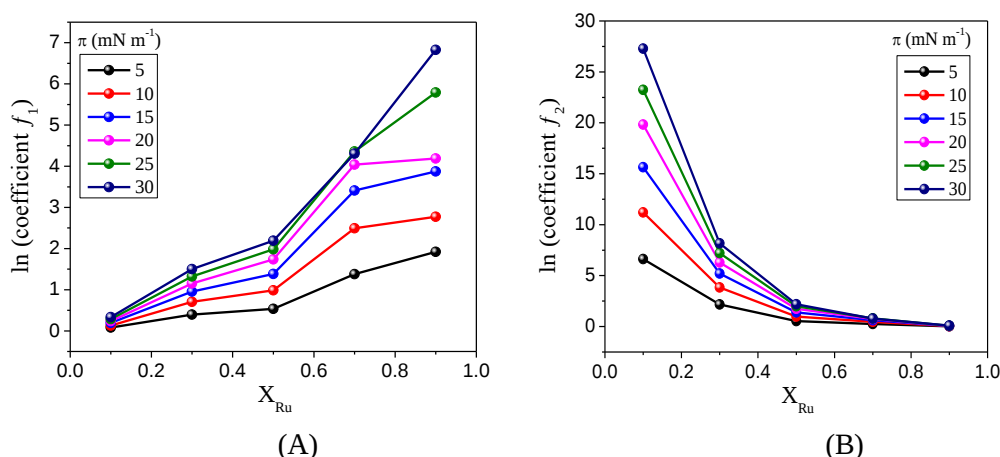


Figura 21: Coeficiente de atividade f_1 (A) e f_2 (B) da monocamada mista DPPS/RuVPy em tampão PBS, pH 7,4, em função da proporção molar.

A Figura 21 ilustra um aumento gradual no coeficiente de atividade com o aumento da pressão de superfície. Observa-se também que com o aumento da proporção de RuVPy na monocamada mista, f_1 aumenta e f_2 diminui significativamente. O maior coeficiente de atividade reflete a forte repulsão, que ocorre entre o complexo e lipídio no filme misto. De acordo com os dados apresentados, o valor de f_2 em menores proporções molares de RuVPy é ainda surpreendentemente maior, uma vez que esperava-se que somente em maiores proporções dos compostos houvesse maior efeito repulsivo, resultados similares são reportados por Bordi e colaboradores [136] em monocamadas mistas de DOTAP-DPPC. Foi

constatado que quanto maior a proporção do composto catiônico (DOTAP) na monocamada do zwitteriônico DPPC maior a repulsão no sistema, atribuídas as cargas positivas em excesso.

Na Figura 22, pode-se observar que a troca de energia (ω) e o parâmetro de interação (Ip) são significativamente maiores que os valores encontrados na literatura para monocamadas mistas com repulsão, como as estudadas por Nagadome e colaboradores com ácido desoxicólico e esteroides [137], sugerindo forte repulsão entre as moléculas da monocamada mista. O sinal Ip depende do ΔG^{ex} , uma vez que se este último pode ser positivo ou negativo o que propõe interações de atração ou repulsão, respectivamente [137]. Avaliando o valor de Ip e de ω em pressão de 30 mN m^{-1} para as monocamadas mistas contendo 10% de RuVPy, observa-se que estes foram elevados indicando repulsão ainda maior entre o RuVPy e DPPS nesta condição. Adicionalmente, os valores positivos do parametro de interação estão em acordo com a área molecular em excesso (A^{ex}), a energia livre em excesso (ΔG^{ex}) e o coeficiente de atividade (f_j), confirmando definitivamente a interação repulsiva nos filmes mistos de RuVPy e DPPS.

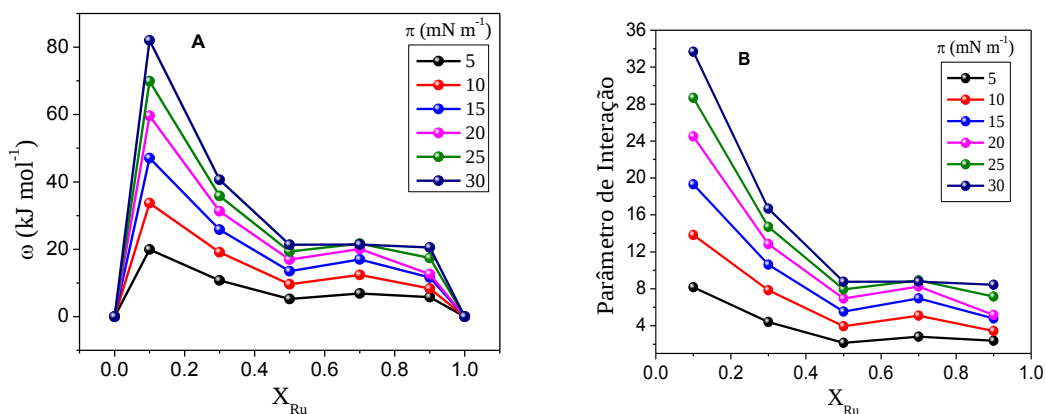


Figura 22: Troca de energia (A) e parâmetro de interação (B) das monocamadas mistas DPPS/RuVPy em função da razão molar de RuVPy.

De modo geral, a análise termodinâmica indicou a existência de boa miscibilidade dos componentes nos sistemas binários DPPC/RuVPy e com algumas exceções no DPPG/RuVPy, com desvios negativos em relação ao comportamento ideal, e menor miscibilidade na mistura DPPS/RuVPy. Observou-se que as forças atrativas prevalecem sobre as repulsivas em condições de pressão elevadas, associadas à presença da carga dos grupos polares dos

fosfolipídios DPPC e DPPG. Estas observações sugerem que há um efeito de condensação quando o RuVPy é misturado com os fosfolipídios, conforme observado pelas medidas de área de ordenamento. Resultados que relacionam a interação com a carga dos fosfolipídios serão discutidos mais adiante por dados espectroscópicos e serão úteis na análise de bicamadas de fosfolipídios em soluções aquosas que podem formar domínios vesiculares com moléculas do complexo RuVPy inseridas nas regiões hidrofóbicas dos fosfolipídios. Apesar da concentração fosfolipídio/RuVPy 10% sugerir a imiscibilidade entre o complexo e o DPPS, nos demais filmes (DPPC e DPPG) observou-se boa miscibilidade. A escolha da proporção 10 % de RuVPy, para a os demais estudos de BAM dos filmes LB e formulações lipossômicas se deu por esta ser a menor concentração estudada capaz de causar alterações nas isotermas e respectivos parâmetros termodinâmicos com aumento da fluidez das monocamadas de fosfolipídios como indicado por Cs^{-1} . A escolha da pressão em 30 mNm^{-1} para a transferência dos filmes de Langmuir para a formação dos filmes LB foi baseada nas isotermas e na energia livre em excesso, que nestas condições é negativa, indicando maior estabilidade da monocamada mista e interações atrativas entre as moléculas, além de ser um valor de pressão de membranas reais [87].

5.4 Caracterização morfológica dos filmes puros e mistos RuVPy e fosfolipídios

A morfologia das monocamadas de Langmuir do complexo RuVPy e das misturas binárias com os fosfolipídios foi avaliada por medidas de microscopia de ângulo de Brewster. Inicialmente foram realizadas medidas para o RuVPy, DPPC, DPPG e DPPS puros e para as misturas com 10 % de RuVPy, a fim de comparar as possíveis alterações no formato e homogeneidade das monocamadas confirmando a interação entre estes.

Nas imagens dos filmes de Langmuir do complexo RuVPy (Figura 22) verificou-se no início da isoterma π vs área por molécula ($\pi = 5 \text{ mN m}^{-1}$) a presença de placas espessas, coerente à formação de domínios observados nas medidas de potencial do complexo similar, o *mer*-[RuCl₃(dppb)(Mepy)], onde Mepy = 4-metilpiridina) [138]. A forte claridade apresentada por estas placas de RuVPy foi superior às demais imagens obtidas das outras regiões da isoterma, logo acredita-se que nesta pressão existem domínios de grande densidade. A utilização da relação do brilho com a espessura das placas nas imagens de BAM é descrito por

Romão e colaboradores, em estudos de interação e morfologia de misturas de DPPC e DPPG com alguns compostos alifáticos de cadeia longa [139,140], onde as regiões de alto brilho indicam existência de maior concentração dos compostos, sendo esta comprovada pela medida de espessura, via microscopia de força atômica do filme LB destes materiais após serem transferidos para substratos sólidos. Para contornar este problema, as medidas seguintes foram realizadas após o ajuste do equipamento para visualização sem claridade excessiva, quando moléculas diferentes da água estivessem presentes sobre a subfase. A imagem obtida com o aumento da compressão ($\pi = 25 \text{ mN m}^{-1}$) apresentou um filme mais homogêneo devido à aproximação das placas. Somente após ultrapassar a fase condensada 35 mN m^{-1} percebeu-se a formação de aglomerados, indicando o colapso da monocamada, consistente com a isoterma de pressão de superfície por área por molécula discutida anteriormente (Figura 14). Imagens similares de placas sugerindo formação de domínios são reportadas também para o complexo bimetálicos de rutênio tris-bipiridina $[\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{-ph}_4\text{-Ru}(\text{bpy})\text{L}_2](\text{PF}_6)_4$ (bpy = 2,2'-bipiridina, ph = fenil, L= 4,4'-di-non-1-enil-2,2'-bipiridina), que da mesma maneira se aproximam para formação de um filme mais homogêneo em pressões mais elevadas[141]

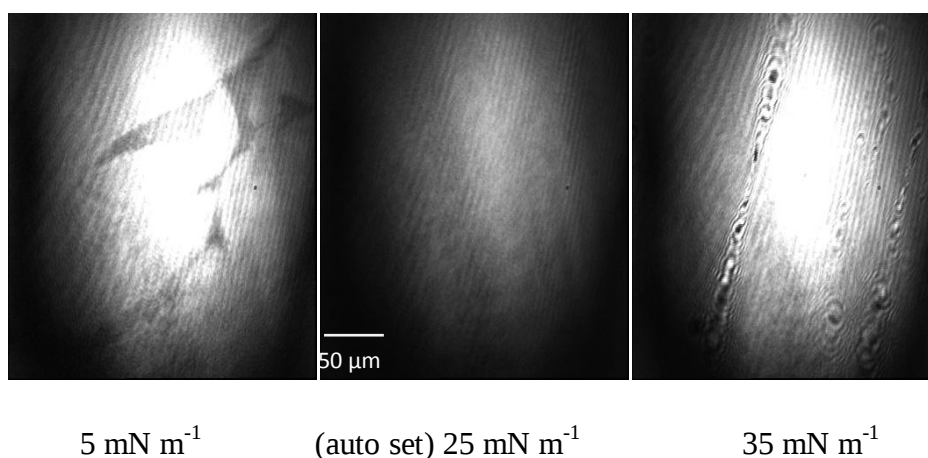
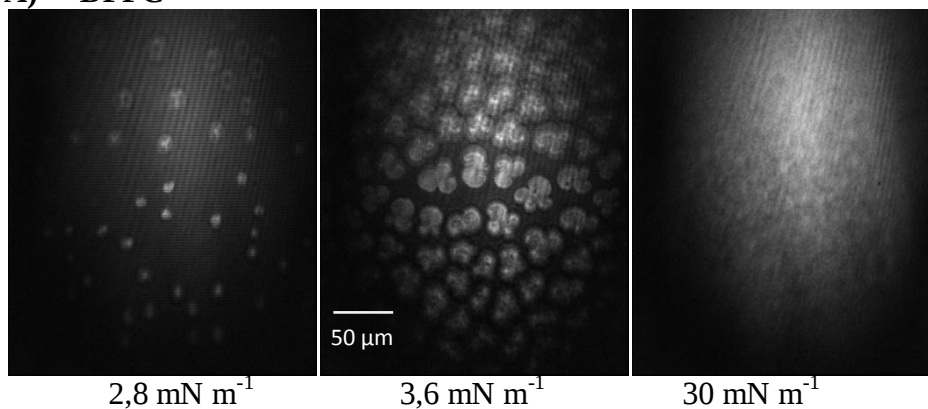


Figura 23: Imagens de BAM correspondentes ao filme de Langmuir do complexo RuVPy obtido em diferentes pressões, em subfase de tampão fosfato salino (pH 7,4) a 20 °C. Devido o intenso brilho das monocamadas de RuVPy foi necessário utilizar o auto ajuste do equipamento a fim de diminuir a intensidade de luz refletida até o fim da coleta de imagens do filme.

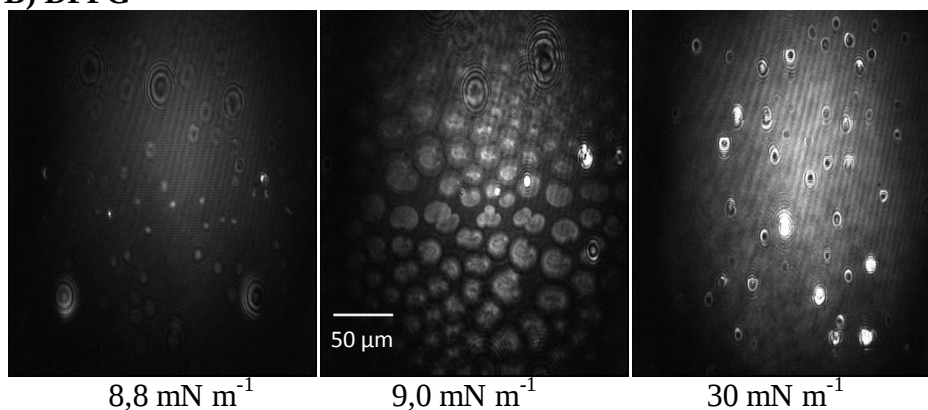
As imagens obtidas dos fosfolipídios DPPC, DPPG e DPPS são ilustradas nas Figuras 24A, B e C, respectivamente. Percebeu-se que o DPPC começa a formar domínios em pressões próxima a 2 mN m^{-1} e o DPPG a partir de 8 mN m^{-1} . Diferente disto, o DPPS não apresenta estes domínios, mesmo em altos valores de pressão [139,140,142,143]. Com o

aumento da compressão ocorre a formação de domínios maiores para ambos os compostos, DPPC e DPPG e estes passam a interagir formando um filme único homogêneo em $\pi > 30 \text{ mN m}^{-1}$. Percebe-se que nas imagens para o DPPG (Figura 24B), além da presença de domínios, existem pequenos agregados estando estes presentes em maior quantidade em pressões superiores as de maior organização do filme próximas a 30 mN m^{-1} .

A) DPPC



B) DPPG



C) DPPS

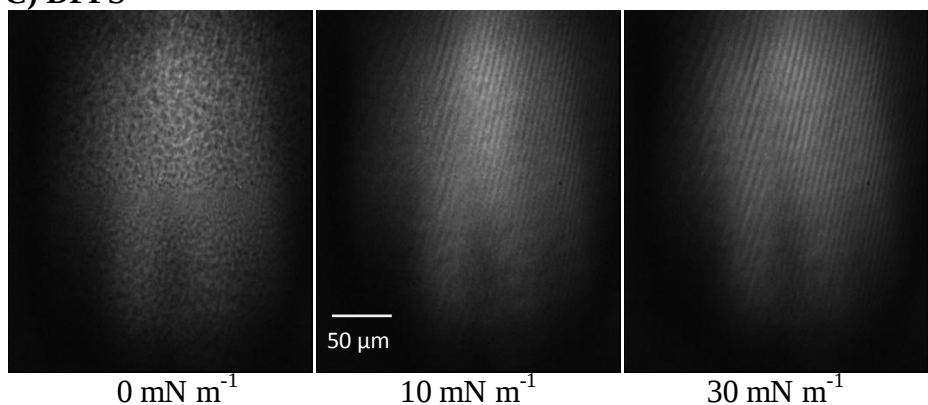


Figura 24: Imagens de BAM correspondentes aos filmes de Langmuir dos fosfolipídios (A) DPPC, (B) DPPG e (C) DPPS, em subfase de tampão fosfato salino, a 20°C .

Conhecido o perfil das monocamadas de Langmuir de cada composto, as características morfológicas dos filmes mistos, DPPC/RuVPy, DPPG/RuVPy e DPPS/RuVPy, com 10% de RuVPy foram avaliadas, conforme pode-se visualizar nas imagens apresentadas na Figura 25. A escolha desta proporção de complexo deve-se ao fato de que esta concentração, mesmo sendo a menor estudada, já causou significava alteração nas monocamadas dos fosfolipídios. Como pode ser notado, em nenhuma imagem houve na fase gasosa ($\pi \sim 5 \text{ mN m}^{-1}$) a presença de placas, iguais as imagens do filme de Langmuir do complexo (Figura 23). Da mesma forma que as isotermas π vs área/molécula, observou-se que a presença do complexo no filme de fosfolipídio alterou as características morfológicas iniciais de cada filme sobre a subfase de tampão fosfato salino, uma vez que maiores pressões, cerca de 3 mN m^{-1} , foram necessárias para o surgimento destas estruturas. Estes domínios formados são mais dispersos com formatos menos regulares daqueles observados para os fosfolipídios puros. Na pressão em torno de 20 mN m^{-1} , onde se tem um maior ordenamento molecular (fase condensada), vê-se claramente estes domínios interagindo uns com os outros formando um filme compacto com diferente, ou até mesmo, maior rugosidade como no caso da mistura DPPC/RuVPy (Figura 25A). Já na mistura DPPG/RuVPy (Figura 25B) inicialmente, $\pi = 13 \text{ mN m}^{-1}$, vê-se somente agregados de menores dimensões, uma vez que o DPPG puro também apresenta tais estruturas. Quando estes domínios interagem na fase condensada percebe-se que dois tipos diferentes de estruturas se formam, o que nos dá indícios de uma menor interação entre os compostos quando grandes pressões são impostas à monocamada. Distintamente do observado para as misturas DPPC/RuVPy e DPPG/RuVPy, na mistura DPPS/RuVPy (Figura 25C), somente antes da compressão (período de evaporação do solvente) observa-se uma sutil mudança nas imagens em 0 mN m^{-1} . Contudo, a medida que se comprime o filme, nada mais significativo ocorre com esta morfologia.

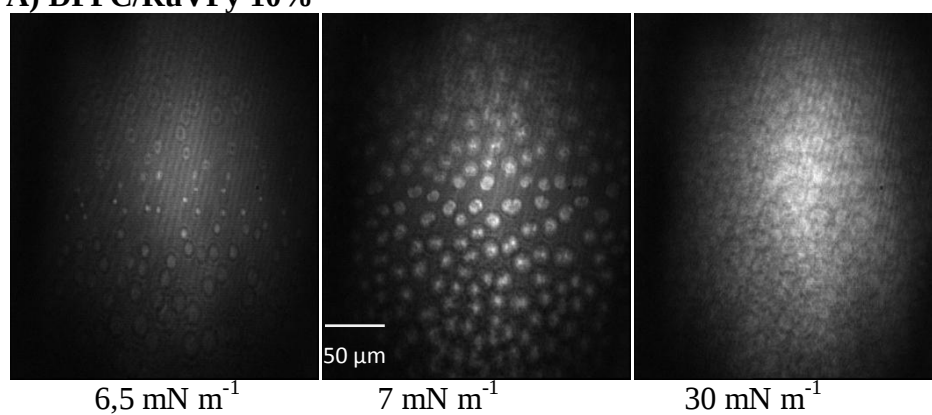
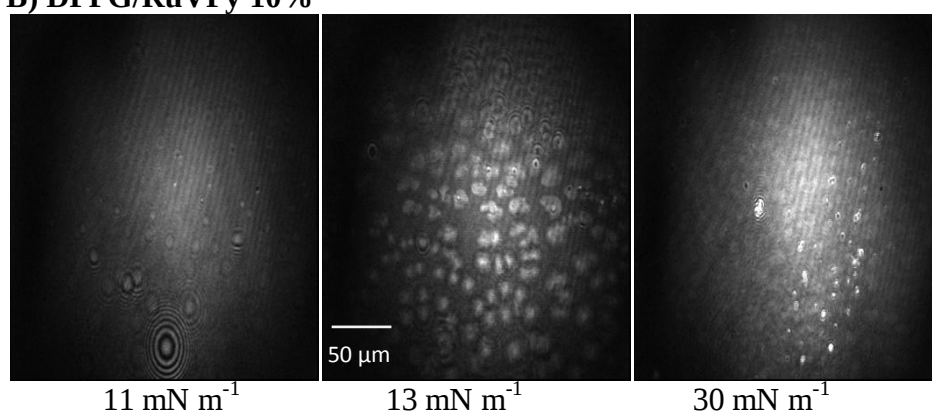
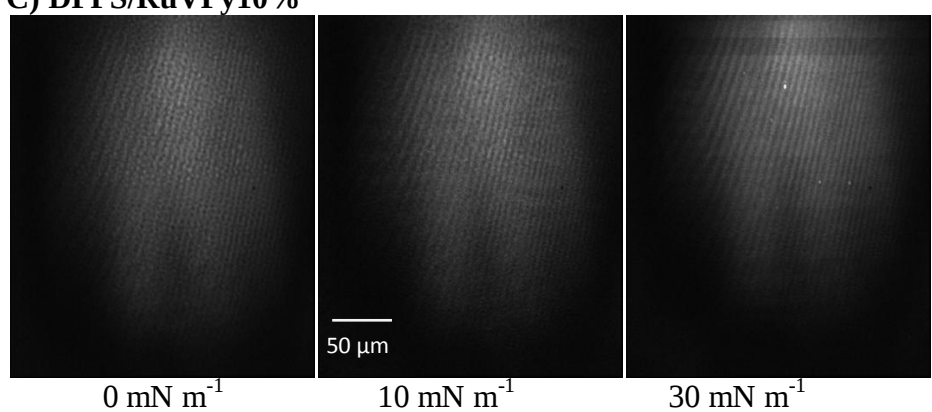
A) DPPC/RuVPy 10%**B) DPPG/RuVPy 10%****C) DPPS/RuVPy10%**

Figura 25: Imagens de BAM correspondentes aos filmes de Langmuir mistos, DPPC/Ru, DPPG/Ru e DPPS/Ru, com 10% de RuVPy, em subfase de tampão fosfato salino, a 20°C .

De maneira geral pode-se afirmar que as alterações observadas na morfologia dos filmes de Langmuir deve-se à perturbação do empacotamento das moléculas de fosfolipídios ocasionada pela acomodação das moléculas de RuVPy nestes sistemas, principalmente em

baixos valores de pressão, conforme indicado por ΔA^E , que nestas condições é positivo, indicando as forças intermoleculares repulsivas que vão sendo superadas a medida que se comprime o filme. Esta constatação esta de acordo com as isotermas de pressão de superfície que sofreram alterações no perfil na presença do complexo.

5.5 Espectroscopia de absorção e reflexão na região do infravermelho – Módulo Polarizado (PM-IRRAS) dos filmes de Langmuir

A fim de avaliar as possíveis interações entre os compostos, as monocamadas de Langmuir foram analisadas pela técnica de espectroscopia de absorção e reflexão na região do infravermelho. Na Figura 26 são apresentados os espectros de PM-IRRAS do filme de Langmuir de RuVPy obtidos após a compressão em pressão de 30 mN m^{-1} em subfase de tampão fosfato salino. No espectro do RuVPy (Figura 26A), a banda observada em 1236 cm^{-1} é atribuída ao estiramento P=O, para a monocamada condensada, indicando oxidação do ligante bifosfínico, a qual é consistente com a mudança de cor de vermelho em solução para azul em monocamadas de Langmuir para este complexo, além da banda em 1042 cm^{-1} atribuída ao estiramento P-OH. Este resultado foi baseado em medidas de infravermelho e RAMAN do complexo *mer*-[RuCl₃(dppb)(4-Mepy)] [78]. Medidas de espectrometria de massa (ESI/MS) foram realizadas com o complexo RuVPy após exposto à condições de oxidação, tais como a exposição de solução orgânica de CHCl₃ sobre subfase aquosa em atmosfera ambiente. À medida que se analisa as fragmentações geradas a partir do íon molecular (Figura 26) obtêm-se o pico m/z 644,39 o qual pode ser atribuído a massa do complexo após labilização dos ligantes cloreto e vinilpiridina em presença de ácido fórmico. Outro pico em m/z 459,03 também foi analisado e referenciado com sendo o da massa do ligante dppb em sua forma mais oxidada dppbO₂, que se formam em presença de ambientes oxidantes aquosos.

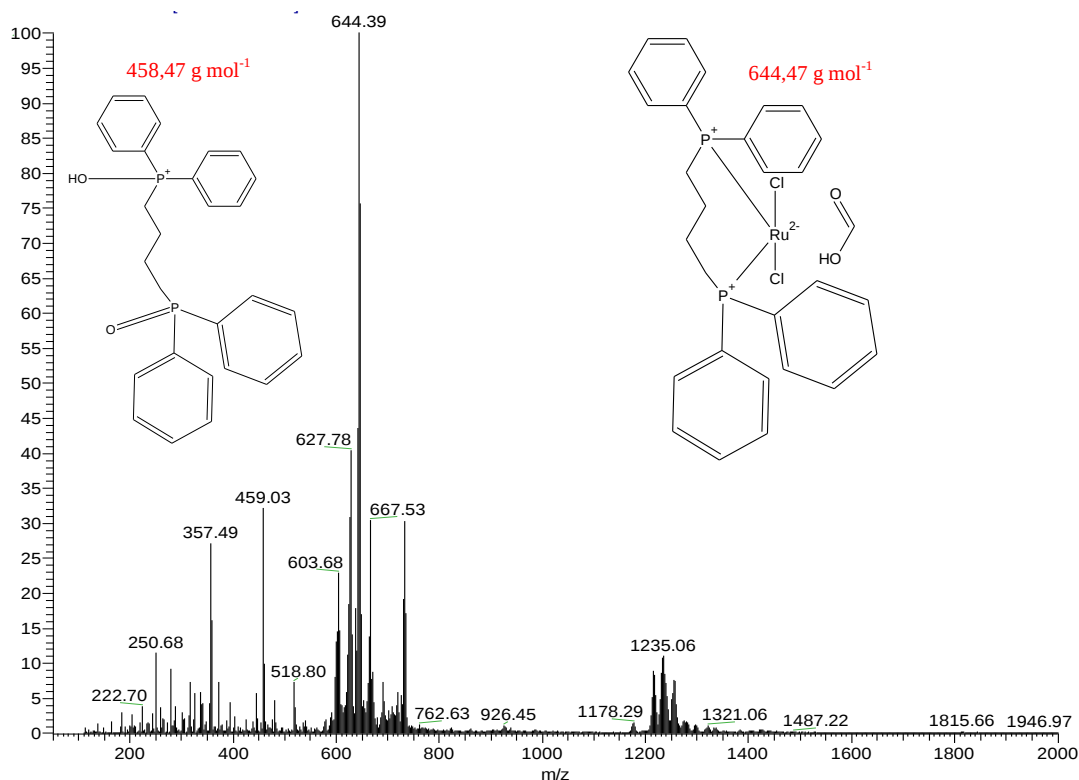


Figura 26: Espectro de massas ESI para o complexo RuVpy oxidado $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ em solução de acetonitrila com ácido fórmico.

Outras bandas características das vibrações do grupo aromático do ligante fosfínico presentes na estrutura do complexo RuVpy no espectro de IRRAS são 1095 cm^{-1} atribuída ao $\nu(\text{P-C})$ e 1444 cm^{-1} do $\nu(\text{C-H})$.

No espectro do DPPC (Figura 27A), foram observadas as bandas em 1061 e 1226 cm^{-1} , atribuídas aos estiramentos simétrico e assimétrico do grupo fosfato, bem como a banda em 1737 cm^{-1} atribuídas ao estiramento do grupo C=O . Ambas as atribuições são características de vibrações de grupos polares da cabeça do fosfolipídio [144]. Para a mistura DPPC/Ru (Figura 27A) observa-se o aumento de intensidade da banda de água na interface em 1685 cm^{-1} [145], em comparação com a monocamada de DPPC puro, indicando maior reorientação das moléculas de água na forma de um filme fino paralelo logo abaixo a superfície do filme. Esta constatação já foi observada em filmes contendo outros fosfolipídios em trabalhos com monocamadas mistas [146, 147].

Nestas condições os filmes obtidos para as monocamadas de DPPC apresentaram bandas na região de 1500 cm^{-1} atribuída à presença dos grupos C-N [148], conforme se

observa em sua estrutura Figura 9. No entanto quando se tem o filme misto DPPC/Ru, as bandas em 1505 e 1533 cm^{-1} são mais intensas e sua atribuição decorre da presença da vibração dos estiramentos C-N e C=C da piridina, respectivamente, sugerindo a interação entre RuVPy e DPPC. Esta interação entre o RuVPy e o DPPC também é confirmada pelo deslocamento dos estiramento assimétricos P=O e C=O do DPPC, os quais são alterados de 1226 para 1236 cm^{-1} e de 1737 para 1731 cm^{-1} , respectivamente. Na região do fosfato, uma sobreposição pode ocorrer com a banda atribuída ao estiramento da bifosfina, similar ao espectro do RuVPy. Além disto, percebe-se uma relevante alteração no estiramento simétrico da ligação do P=O na região de 1061 cm^{-1} . Um decréscimo de intensidade é observada para a banda em 1443 cm^{-1} atribuída ao $\delta(\text{CH}_2)$, o que em conjunto com dados da região alifática, mostram maior interação do complexo com o grupo cabeça do fosfolipídio. Esta limitada penetração do RuVPy nas cadeias hidrofóbicas do DPPC pode ser observada pelas pequenas mudanças nas bandas atribuídas aos estiramentos assimétricos do grupo metileno $\nu_a(\text{CH}_2)$, de 2916 para 2920 cm^{-1} , conforme apresentado na Figura 26A.

Similar ao efeito no filme de Langmuir do DPPC, a incorporação do RuVPy afeta efetivamente o espectro de PM-IRRAS da monocamada de DPPG, como indicado na Figura 26B. As bandas atribuídas aos estiramentos, simétrico P=O e P-O-C na região entre 1021 e 1170 cm^{-1} do DPPG são deslocadas no filme misto DPPG/Ru, e também tem uma maior intensidade na direção positiva para a mistura, provavelmente devido a reorientação dos grupos químicos. A banda do estiramento assimétrico P=O foi deslocada de 1226 para 1219 cm^{-1} com a incorporação do RuVPy. Esta mudança nas bandas de P=O indicam alteração na hidratação e consequentemente no número de ligações de H com as moléculas de água da interface [149]. Ainda na região do grupo cabeça do DPPG, a banda de forte intensidade do estiramento C=O em 1737 cm^{-1} desloca para menor número de onda (1730 cm^{-1}) na monocamada mista de DPPG/Ru e diminui de intensidade. Novamente, percebem-se sutis alterações na banda referente à ligação de água (1666 cm^{-1}) em acordo com o que se propôs anteriormente. Sendo que a cadeia alifática do DPPG não foi afetada conforme pode ser observado pelas bandas em 2920 e 2847 cm^{-1} atribuídas a $\nu_s(\text{CH}_2)$ e $\nu_a(\text{CH}_2)$, respectivamente, que se mantêm inalteradas no filme misto indicando que o RuVPy não penetra na região hidrofóbica do DPPG. Nota-se destas medidas que a magnitude das interações entre o complexo e estes dois fosfolipídios não são tão diferentes, mesmo sendo o DPPC um composto zwitteriônico e o DPPG um composto aniônico. Estes resultados estão em concordância com o valor negativo da energia livre em excesso obtida para ambos

sistemas binários em $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$, sugerindo maior estabilidade da monocamada mista e interações atrativas entre as moléculas, formando filmes estáveis com valores de ΔG^M negativos para a concentração de 10% de RuVPy na pressão de 30 mN m^{-1} .

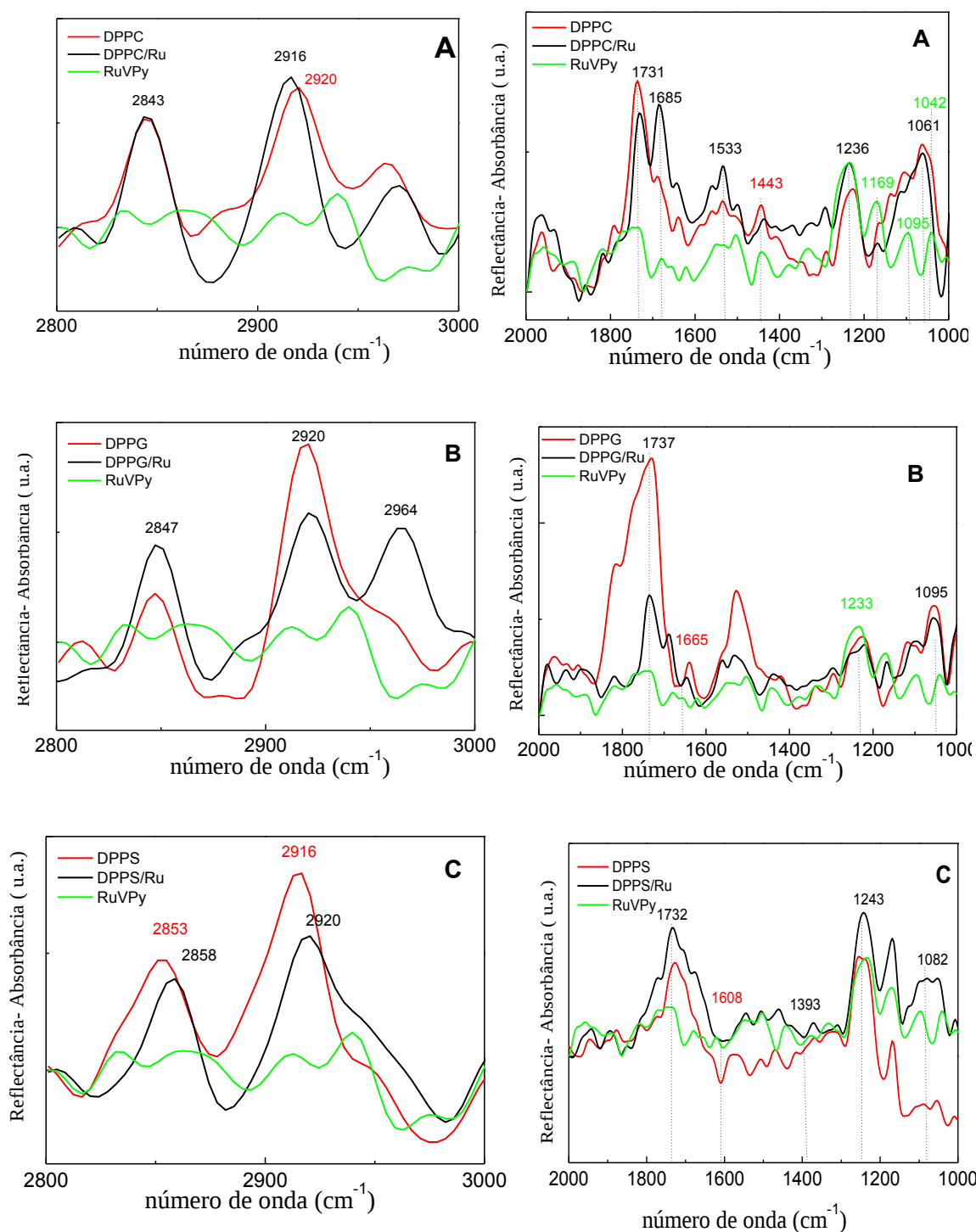


Figura 27: Espectros de PM-IRRAS das monocamadas obtidas em subfase de tampão fosfato salino, em pressão de 30 mN m^{-1} dos compostos puros DPPC (A), DPPG (B) e DPPS(C) e das misturas com 10% de RuVPy.

Da mesma forma que para os fosfolipídios DPPC e DPPG, a presença do RuVPy afeta o espectro da monocamada de DPPS (Figura 20C), em concordância com os resultados obtidos das isotermas de π vs área por molécula. A banda de absorção assimétrica do grupo carbonil da porção serina observada em 1725 cm^{-1} no espectro do filme puro, foi deslocada para 1732 cm^{-1} quando na presença de complexo. Diferente disto, a banda de absorção do grupo P=O assimétrico, caracterizado pela banda alargada centrada em 1243 cm^{-1} , ocorreu com menor alargamento, evidenciando desta forma, uma interação entre os compostos. Outra evidência é o aumento de intensidade da banda centrada em 1082 cm^{-1} , característica da absorção do grupo P=O simétrico [150]. Esta constatação também foi observada pelo alargamento das bandas relacionadas aos estiramentos dos grupos serina e fosfato nos espectros das monocamadas de DPPS estudadas na ausência e presença de uma proteína sinalizadora (GPI) [151]. Uma mudança significativa é observada na região entre 1290 e 1140 cm^{-1} , permitindo a avaliação da razão entre os máximos das bandas em 1243 e 1168 cm^{-1} . Vê-se que a razão é mais próxima da unidade para o filme misto, de maneira similar ao que se observa no espectro do RuVPy, o que pode ser devido à presença das bandas dos estiramentos simétrico P=O e P-O-C do ligante fosfínico. As Tabelas 2 e 3 resumem os estiramentos característicos das ligações dos grupos funcionais dos compostos puros e suas respectivas misturas.

Tabela 2: Números de onda e atribuição das principais bandas do RuVPy em filme de Langmuir sobre subfase de tampão fosfato salino, em pressão de 30 mN m^{-1} .

Ligações do RuVPy	Bandas da literatura ^b (cm^{-1})	Bandas observadas (cm^{-1})
C-N e C=C _{py}	1600-1430	1505 e 1533
P-C	1087	1195
P-C ou C-H	1433	1443
P-O	1187	1169
CH ₂ deformação angular	1275	1233

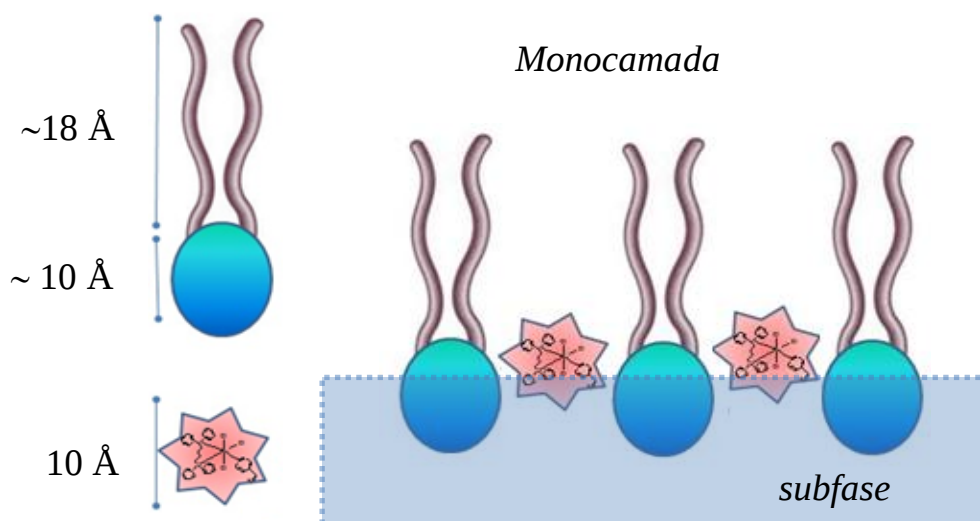
Nota: ^b referência [78 e 159].

Tabela 3: Números de onda e atribuição das principais bandas dos compostos puros DPPC, DPPG, DPPS e das respectivas misturas com 10% de RuVPy em filmes de Langmuir sobre subfase de tampão fosfato salino, em pressão de 30 mN m⁻¹.

Grupos	Faixa segundo literatura ^a (cm ⁻¹)	Bandas observadas (cm ⁻¹)		
Região polar		DPPC e	DPPG e	DPPS e
		DPPC/RuVPy	DPPG/RuVPy	DPPS/RuVPy
(PO ₂) _a	1220–1250	1226 passou a 1236	1226 passou a 1219	1243 menos larga
(PO ₂) _s	~1090	1061	1021	1082 intensificou
C=O (éster)	1710–1740	1737 passou a 1731	1737 passou a 1730	1725 passou a 1732
Região apolar				
(CH ₂) _a	2849–2854	2843	2847 intensificou	2853 passou a 2858
(CH ₂) _s	2916–2924	2916 passou a 2920	2920 diminuiu	2916 passou a 2920
C-H	1462–1473	1443 diminui	-	-

Nota: ^a referência [144]; ^b referência [78 e 159]; ^c referência [152].

Em resumo, as mudanças no espectro de PM-IRRAS causadas pela interação entre RuVPy e os fosfolipídios são concentradas nas propriedades do grupo cabeça, uma vez que não há praticamente penetração do RuVPy na região das caudas hidrofóbicas. Em busca de uma representação que ilustre tal interação, um esquema foi montado a fim de mimetizar uma monocamada mista de RuVPy e DPPC, que é o fosfolipídio mais abundante em membranas celulares. Neste esquema o arranjo geométrico do DPPC foi baseado em trabalhos prévios, que trazem medidas de comprimento desta molécula [153]. Assumiu-se o comprimento para a molécula de RuVPy de 10 Å conforme arranjo dos átomos H67, H55 e C75 na interface água/ar. Particularmente observou-se que a interação com a carga negativa do grupo P=O e C=O do fosfolipídio ocorre com grupos de potencial positivo (piridina) do RuVPy, o qual teve seu mapa de potencial eletrostático também simulado usando DFT.



Esquema 1: Organização idealizada de moléculas de RuVpy e DPPC na interface tampão PBS/ar. A configuração e comprimento de RuVpy inserido na monocamada de DPPC foram obtidos a partir dos cálculos DFT e o comprimento da porção de moléculas de DPPC imerso na subfase aquosa foi obtida a partir de medições da reflectividade por G. Fragneto e colaboradores [153].

5.6 Filmes Langmuir-Blodgett do RuVpy na presença de fosfolipídios

Os filmes LB com 3 camadas, tanto dos compostos puros como dos compostos na forma de filmes mistos (fosfolipídios/RuVpy), foram obtidos na pressão de 30 mN m^{-1} sobre substratos sólidos de Si, para análises na região do infravermelho, e sobre ITO para medidas eletroquímica. Macroscopicamente estes filmes não apresentaram significativas diferenças em relação aos substratos limpos, o que é justificável por se tratar de um filme em escala nanométrica altamente organizado. A escolha de poucas camadas é atribuída à aproximação da espessura de uma bicamada de membrana e a proporção 10% de complexo foi utilizada por ser responsável por significativas alterações nas monocamadas dos fosfolipídios.

5.7 Espectroscopia de absorção e reflexão na região do infravermelho – PM-IRRAS de filmes LB do RuVPy na presença de fosfolipídios.

Resultados de PM-IRRAS, similares aos filmes de Langmuir, foram obtidos para os filmes LB de fosfolipídios puro, RuVPy e misturas fosfolipídios/RuVPy, conforme pode-se observar nos espectros da Figura 28. Esta semelhança entre os espectros, confirma a existência de interações em nível molecular entre RuVPy e os fosfolipídios após a transferências destes filmes de Langmuir para substratos sólidos. O espectro para o filme LB do RuVPy depositado sobre substrato de Si (Figura 28 A,B,C) exibe bandas em 1192 e 1288 cm^{-1} , atribuídas aos estiramentos P-O-C e P=O, respectivamente, indicando oxidação do ligante bifosfínico, conforme explicado no 5.5 [78]. O estiramento referente ao grupo P-C em 1108 cm^{-1} , sempre em presença dos fosfolipídios, sofre um decréscimo de intensidade o que pode ser atribuído a interações entre os compostos.

Para as misturas com DPPC, DPPG e DPPS observa-se variações de intensidade da banda na região de 1650 cm^{-1} em comparação com as monocamadas dos compostos puros, atribuídas a reorientação das moléculas de água na forma de um filme fino paralelo logo abaixo a superfície do filme [145].

Com relação aos filmes dos fosfolipídios puros pode-se dizer que os estiramentos característicos dos grupos da cabeça polar bem como os estiramentos da parte apolar foram observados em acordo com a literatura. Sendo os estiramentos do grupo fosfato na região de 1220 e 1090 cm^{-1} e carbonil de 1690 a 1740 cm^{-1} os que apresentaram deslocamentos em presença do complexo, principalmente para os filmes de DPPC/RuVPy e DPPS/RuVPy, o que indica interação entre os compostos. Já para a mistura DPPG/RuVPy observou-se variações na intensidade da banda referente ao estiramento de C-H em 1446 cm^{-1} .

Na região do grupo apolar dos fosfolipídios observaram-se valores de estiramento comum a grupo acil na região de 2849–2854 cm^{-1} para os estiramentos assimétricos e 2916–2924 cm^{-1} para os simétricos, sem deslocamentos em presença do complexo somente com variação de intensidade para a mistura DPPG/RuVPy e DPPS/RuVPy.

A tabela 4 resume os valores dos principais estiramentos esperados para os compostos assim como os valores observados experimentalmente.

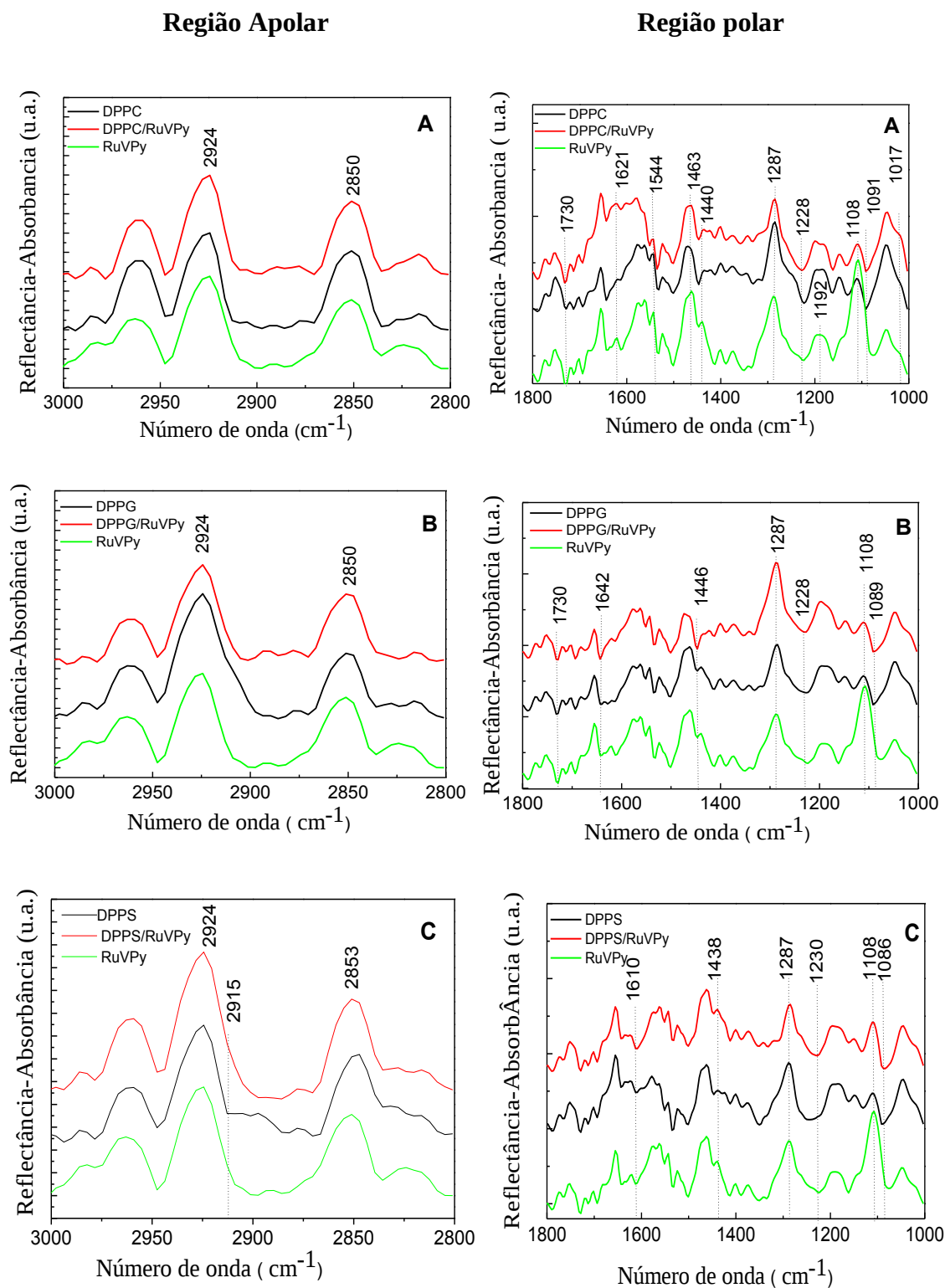


Figura 28: Espectros de PM-IRRAS dos filmes LB em Si (3 bicamadas) dos compostos puros e mistos com RuVpy (10%) para DPPC (A), DPPG (B) e DPPS(C).

Tabela 4: Números de onda e atribuição dos principais estiramentos dos grupos funcionais dos compostos puros e da mistura fosfolipídios/RuVPy em filmes LB em Si.

Grupos	Faixa segundo literatura ^a (cm ⁻¹)	Bandas observadas (cm ⁻¹)		
Região polar		DPPC e DPPC/RuVPy	DPPG e DPPG/RuVPy	DPPs e DPPS/RuVPy
(PO ₂) _a	1220–1250	1222 passou a 1228	1228	1248 passou a 1230
(PO ₂) _s	~1090	1091	1089	1090 passou a 1086
v (C=O) de ácido graxo	1690–1740	1728 passou a 1731	1730	1728
C=O (éster)	1710–1740	1713	1711	1712
COO ⁻ da serina ^c	1550 - 1610	-	-	1610 intensificou
Região apolar				
(CH ₂) _a	2849–2854	2850	2850	2853
(CH ₂) _s	2916–2924	2924	2924	2915
C-H	1462–1473	1470 passou a 1464	1446 intensificou	1460

Grupos do RuVPy	Bandas da literatura ^b (cm ⁻¹)	Bandas observadas (cm ⁻¹)
C-H de alquil	2910	2924
P-C	1484 e 1087	1463 e 1108
P-C ou C-H	1433	1440
P-O	1187	1192, 1288
CH ₂ deformação angular	1275	1287

^a referência [144]; ^b referência [78 e 159]; ^c referência [152].

5.8 Estudo eletroquímico dos filmes LB de RuVPy e fosfolipídios em tampão PBS pH 7,4

O efeito da inserção do complexo RuVPy sobre as propriedades eletroquímicas das monocamadas de DPPC, DPPG e DPPS foi avaliado por medidas eletroquímicas dos filmes LB depositados em substrato de ITO.

A técnica eletroquímica é comumente utilizada em caracterizações de filmes finos por permitir uma análise qualitativa dos processos eletroquímicos, principalmente na interface entre o eletrodo de trabalho (filme LB) e uma fina camada de solução eletrolítica adjacente a

essa superfície [154]. A compreensão dos processos de transferência de elétrons em membranas biológicas é um dos desafios atuais, uma vez que modelos simplificados de membranas celulares tem sido objeto de estudo eletroquímico a fim de mimetizar estes processos naturais. O uso de técnicas eletroquímicas, tais como a voltametria cíclica [155] e espectroscopia de impedância [156] para investigar o comportamento de lipídios em membrana torna-se cada vez mais popular, assim como a aplicação dos conceitos de cinética eletroquímica e de estrutura de interfaces eletrificadas para a interpretação da resposta eletroquímica [167].

Baseado nestes fatos, a caracterização eletroquímica dos filmes LB do RuVPy com 1 e 3 camadas sobre substrato de ITO foi empregada, conforme pode-se observar nos voltamogramas cíclicos da Figura 29. Estas medidas trazem informações qualitativas sobre o filme LB do RuVPy obtidas em soluções de HCl 0.1 mol L^{-1} (pH 1.0) a 50 mV s^{-1} . Pode-se notar nestes voltamogramas que o número de camadas afeta a resposta de corrente e que nestes eletrodos o processo redox ocorre com $E_{1/2} = 0,46$ e $0,43 \text{ V}$ para os filmes com 1 e 3 camadas, respectivamente (*versus* Ag/AgCl). O filme LB com 3 camadas do complexo exibe melhor definição da corrente de pico anódica e catódica ($I_{pa} = 2,28$ e $I_{pc} = -1,8 \text{ } \mu\text{A}$, em 50 mV s^{-1}) quando comparado a resposta do filme com 1 camada, com potencial de pico anódico e catódico de $E_{pa} = 0,58 \text{ V}$ e $E_{pc} = 0,28 \text{ V}$.

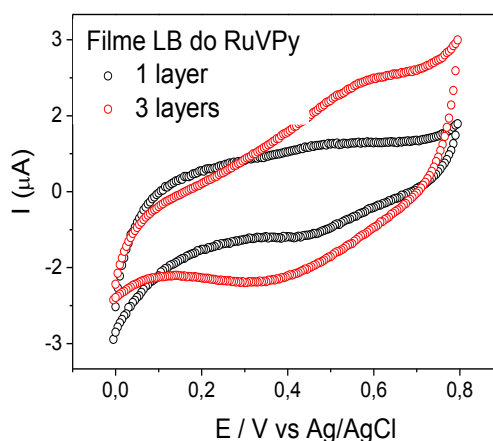


Figura 29: Voltamogramas cíclicos do LB/RuVPy (1 e 3 camadas) sobre substrato de ITO em solução de HCl $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte, a 50 mV s^{-1} vs. Ag/AgCl.

A resposta eletroquímica discutida acima pode ser atribuída como sendo dominada pelo processo RuII/RuIII, com um único elétron envolvido, como foi observado com complexos similares, tais como *mer*-[RuCl₃(dppb)(L)] (L = piridina, metilpiridina). Além disto, o aumento da intensidade de corrente de pico pode ser relacionado à maior quantidade de material imobilizado na superfície do eletrodo, conforme já é estabelecido em estudos para o complexo análogo [78, 83].

Em outros experimentos, a resposta de filmes LB do RuVPy com 1 e 3 camadas em diferentes velocidades de varredura (de 10 a 100 mV s⁻¹) foram investigadas. Observou-se que o filme com 1 camada apresenta dependência linear da I_{pa} com a velocidade de varredura (*v*) (*R*= 0,998), indicando que o complexo RuVPy está confinado na superfície do eletrodo [157]. Entretanto o filme LB do RuVPy apresentou uma dependência linear (*R*= 0,994) do I_{pa} com a raiz quadrada da velocidade de varredura (*v*^{1/2}), típico de processos controlados por difusão, indicando um eletrodo suficientemente espesso que permite que os processos redox ocorram, não apenas com as espécies superficiais, mas também com moléculas no interior do filme. Por conseguinte, os íons da solução devem migrar para o filme para compensar a carga criada [85].

O filme LB/RuVPy contendo 3 camadas foi escolhido para os subseqüentes estudos voltamétricos. Nos voltamogramas cíclicos obtidos, tanto para o substrato ITO, que serviu como branco das medidas, quanto para os filmes dos fosfolipídios e complexo RuVPy com 3 camadas em meio de tampão PBS (Figura 30A), observou-se somente corrente do tipo capacitiva, ou seja, ausência de processos de oxidação e redução na faixa de potencial 0,0 a 1,0 V. Correntes capacitivas são conhecidas por serem correntes não proporcionais à concentração do analito e por não obedecerem à lei de Faraday. Somente são correntes geradas devido à presença de um acúmulo de elétrons na superfície do eletrodo, o que aumenta a carga da dupla camada elétrica [154]. Este comportamento eletroquímico é conhecido para moléculas como os fosfolipídios [158], contudo verificou-se uma resposta similar para o complexo RuVPy, o que é atribuído ao pH do eletrólito suporte utilizado, tampão PBS pH 7, o qual imita condições de ambiente biológicos, mas não favorece a oxidação nem a redução deste centro metálico de Ru(III). Em experimentos, no qual o comportamento eletroquímico deste complexo foi avaliado em diferentes formas de imobilização, incluindo a técnica LB (dados não inclusos), verificou-se que picos de oxidação e redução ocorrem somente em eletrólitos com pH ácidos abaixo de 4, uma vez que a presença de íons H⁺ auxilia o processo de transferência de carga do centro metálico do

complexo [159]. Essa alta corrente capacitiva também está associada à uma deposição não homogênea das moléculas do complexo, a qual gera uma superfície rugosa com uma dupla camada elétrica maior, de acordo com os resultados de coalescência das regiões condensadas muito brilhantes que se observa nas imagens de BAM.

Os filmes LB com 3 camadas dos fosfolipídios, DPPC (Figura 30B), DPPG (Figura 30C) e DPPS (Figura 30D) puros, apresentaram um voltamograma com menor corrente capacitiva nesta mesma faixa de potencial (0,0 a 1,0 V), em relação ao substrato de ITO, o qual tem uma superfície hidrofílica que permite a organização dos grupos polares dos lipídios nos três eletrodos. Esse fato pode ser relacionado ao melhor recobrimento do substrato pelas monocamadas [160]. Sabe-se ainda que poucas camadas também são conhecidas por geralmente diminuir a rugosidade da superfície, comparada com os eletrodos de ITO [84] e por esta razão diminuem a corrente capacitiva esperada.

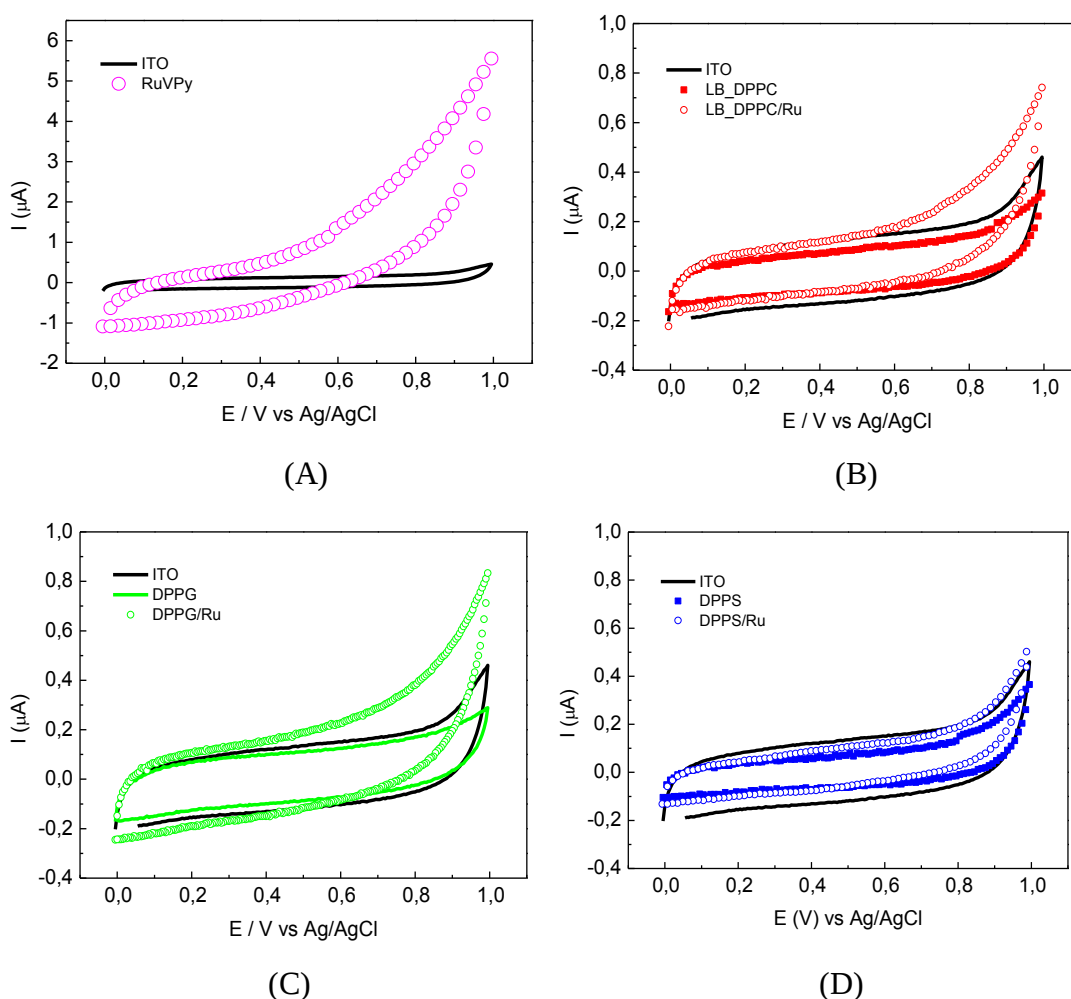


Figura 30: Voltamogramas cíclicos do substrato ITO (A) e dos filmes LB com 3 camadas dos compostos puros e mistos com RuVPy (10%), DPPC (B), DPPG (C) e DPPS(D) em tampão PBS (pH=7,4) a 50 mV s^{-1} versus Ag/AgCl.

Quando filmes mistos dos fosfolipídios com 10% de RuVPy, curvas com símbolos não preenchidos, são comparados aos filmes dos fosfolipídios puros observa-se um aumento da corrente, principalmente em potenciais acima de 0,6 V. Este aumento de corrente comprova a presença do complexo, material de maior densidade eletrônica, formando “defeitos” na monocamada dos fosfolipídios, e conseqüentemente aumenta o acúmulo de elétrons na interface eletrodo/solução. Os resultados de compressibilidade das monocamadas mistas corroboram com a presença de “defeitos” nas monocamadas de fosfolipídios causados pela presença do RuVPy, uma vez que apresentam valores de C_s^{-1} sempre menores que dos fosfolipídios puros, indicando menor organização e maior fluidez em relação ao filme puro, conforme apresentado em conjunto com os gráficos de isothermas ilustradas na Figura 14.

5.9 Estudo eletroquímico dos filmes LB de RuVPy e fosfolipídios na presença da molécula sonda $Fe(CN)_6^{-3/-4}$

Na literatura encontram-se dados que comprovam que a incorporação de moléculas biologicamente ativas, tanto em monocamadas quanto em outros modelos de membrana, causam significativos efeitos na transferência de carga destas membranas [158,161]. Neste sentido, neste trabalho procurou avaliar a incorporação do complexo RuVPy e dos fosfolipídios nos filmes LB por experimentos de voltametria cíclica, um método convencional e informativo, na presença da molécula eletroativa $Fe(CN)_6^{-3/-4}$. Na Figura 31 estão os voltamogramas obtidos tanto para o substrato ITO e filmes LB dos materiais puros, quanto para os filmes LB mistos (DPPC/RuVPy, DPPG/RuVPy e DPPS/RuVPy).

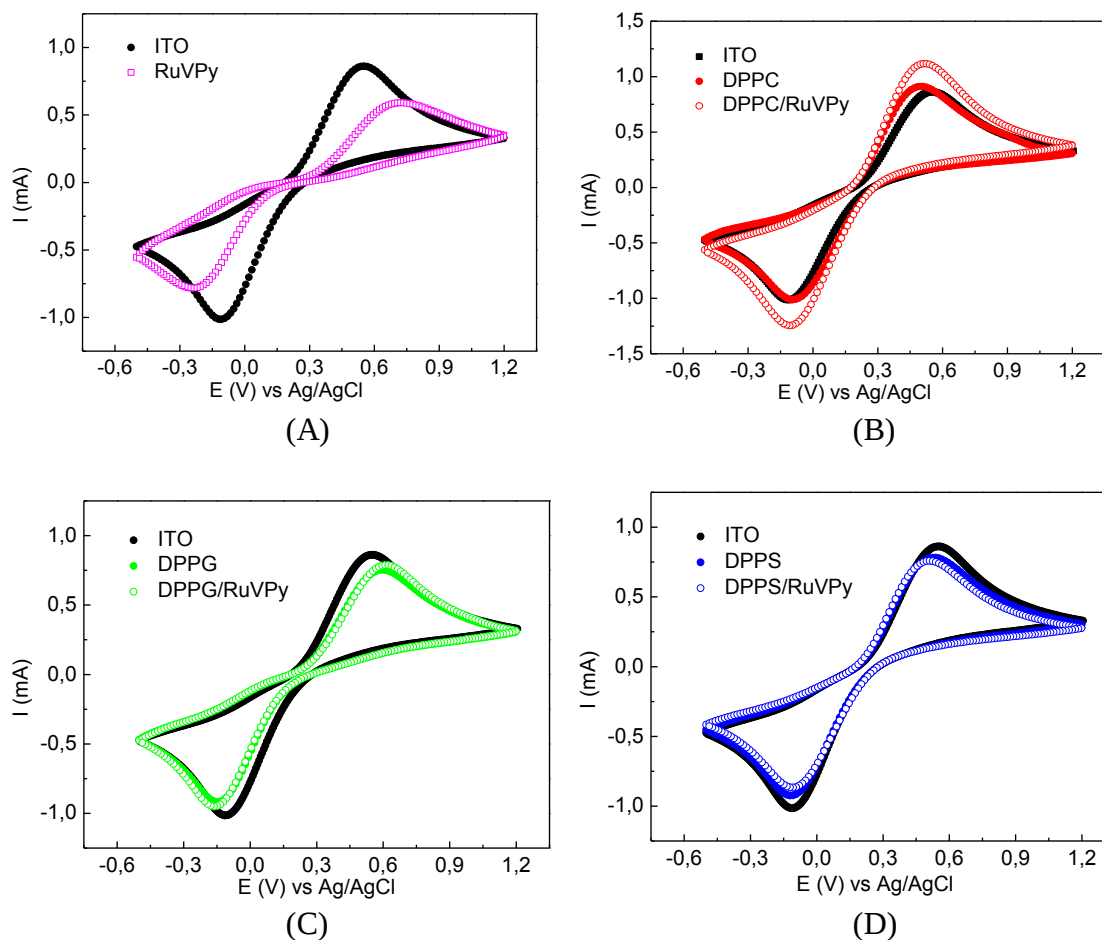


Figura 31: Voltamogramas cíclicos do substrato ITO (A) e dos filmes LB dos compostos puros e mistos com RuVPy (10%), DPPC (B), DPPG (C) e DPPS (D) sobre substrato de ITO, em tampão PBS pH 7 com 5 mmol L⁻¹ da sonda redox, K₃[Fe(CN)₆]:K₄[Fe(CN)₆], *versus* Ag/AgCl.

O perfil voltamétrico do eletrodo de ITO em presença de $\text{Fe(CN)}_6^{-3/-4}$ (Figura 31 A), apresenta um par redox com menor reversibilidade ($E_{pa} = 0,54$ e $E_{pc} = -0,11$ V) do que observado na literatura para eletrodos de carbono vítreo vs Ag/AgCl, com potencial de meia onda ($E_{1/2}$) de aproximadamente 0,2 V [161,162]. Na presença do complexo RuVPy, em comparação ao ITO, o par redox do $\text{Fe(CN)}_6^{-3/-4}$ além de ser menos reversível, apresenta menor corrente de pico ($E_{pa} = 0,68$ e $E_{pc} = -0,22$ V; $I_{pa} = 0,58$ e $I_{pc} = -0,78$). Esse filme LB tem menor reversibilidade e corrente de pico que os demais eletrodos, o que concorda com dados de capacitância deste material, conforme será observado posteriormente.

As correntes de pico dos filmes mistos em comparação com os filmes de fosfolipídios puros são um pouco maior. O DPPC na presença do RuVPy (Figura 31B) tem um aumento de 0,2 mA na corrente de pico, e de maneira menos significativa, foi constatada na resposta do filme LB do fosfolipídio aniônico DPPG com RuVPy (Figura 31C), com correntes de pico 0,03 mA maiores que o filme LB de DPPG puro. Esse aumento da intensidade da corrente de pico no sinal dos filmes mistos está correlacionado com a maior atração entre o complexo e o lipídio, conforme constatado pelos cálculos termodinâmicos obtidos na pressão de 30 mN/m (Figura 17 e 18), pressão essa utilizada para deposição desses filmes LB.

Para o fosfolipídio aniônico DPPS (Figura 31D), a presença do complexo diminuiu a corrente de pico em 0,03 mA, cuja redução é explicada pela menor interação ou até repulsão entre as espécies, como constatado na Figura 17 e 18. No entanto, ainda neste voltamograma, DPPS/RuVPy constata-se uma diminuição no valor de potencial de oxidação em 0,03 V.

Todos os valores de potenciais de oxidação (E_{pa}) e redução (E_{pc}), bem como as correntes de pico (I_{pa} e I_{pc}) discutidos acima são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Dados obtidos dos voltamogramas do substrato ITO e dos filmes LB dos compostos puros e mistos na presença par redox $Fe(CN)_6^{-3/-4}$.

Eletrodo	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	I_{pa} (mA)	I_{pc} (mA)
ITO	0,54	-0,11	0,86	-1,01
RuVPy	0,68	-0,22	0,58	-0,78
DPPC	0,49	-0,09	0,91	-1,01
DPPC/RuVPy	0,50	-0,10	1,11	-1,25
DPPG	0,58	-0,14	0,75	-0,91
DPPG/RuVPy	0,60	-0,14	0,78	-0,95
DPPS	0,52	-0,11	0,78	-0,92
DPPS/RuVPy	0,49	-0,11	0,76	-0,87

O eletrodo modificado com o filme LB DPPC/RuVPy apresentou maior reversibilidade e corrente de pico que os demais. Maiores deslocamentos anódico de potenciais

de pico em relação ao ITO (0,04 V) foi constatado com eletrodo DPPG/RuVPy devido à presença de grupos negativos do DPPG, que dificultam a aproximação do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$. Um comportamento similar a este é observado na literatura em estudos com a droga ibuprofeno, que após sua ionização negativa, apresenta repulsão eletrostática com os íons $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$, levando os autores a utilizar em seus experimentos outra molécula eletroativa, o complexo catiônico $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ [161].

A compreensão dos processos que ocorrem nos filmes depositados nas superfícies dos eletrodos, mais especificamente sobre a formação e carregamento da dupla camada elétrica na interface eletrodo/solução de eletrólito, foi avaliada por medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica. Esta técnica tem sido utilizada para caracterizar a formação de filmes em multicamadas sobre diferentes superfícies de eletrodos [163], onde o diâmetro do semicírculo obtido nos espectros de impedância refere-se diretamente à resistência de transferência de carga (R_{ct}) da solução até a superfície do eletrodo [164]. Nessas medidas, assim como nas medidas de voltametria cíclica, foram utilizadas 1 mmol L^{-1} de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como molécula sonda.

A Figura 32 ilustra os diagramas de Nyquist do eletrodo de ITO (curva em preto), eletrodo LB/RuVPy (curva em rosa), LB/DPPC e LB/DPPC/RuVPy (curva em vermelho), LB/DPPG e LB/DPPG/RuVPy (curva em verde) e LB/DPPS e LB/DPPS/RuVPy (curva em azul), em tampão PBS (pH= 7,4) com 1 mmol L^{-1} de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, na faixa de frequência de 0.1 Hz a 10 kHz. Esses diagramas de Nyquist são típicos para sistemas que podem ser descritos convencionalmente pelo circuito de Randell (um circuito elétrico equivalente que consiste em resistência ativa do eletrólito (R_s) em série, com uma combinação paralela de capacitância da dupla camada (C_{dl}) e uma impedância da reação faradaica (R_{ct})). A parte semicircular do diagrama corresponde ao processo limitado de transferência de elétrons e o diâmetro é igual a resistência de transferência de elétrons R_{ct} [158, 165].

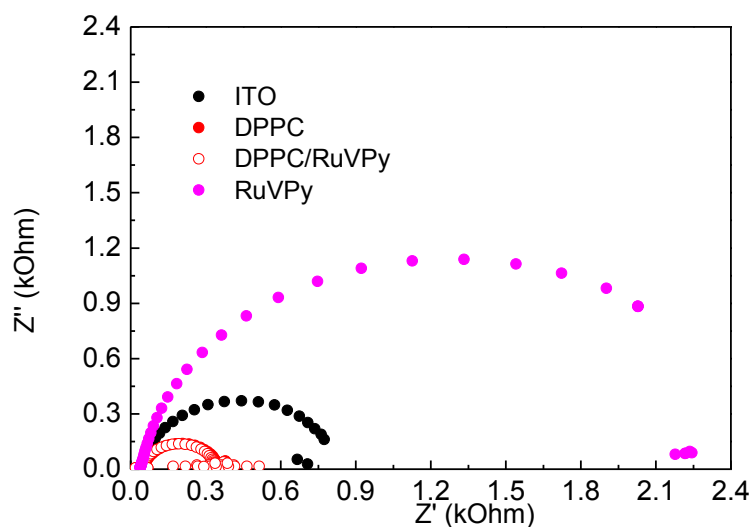


Figura 32: Diagramas de Nyquist do substrato ITO (curva em preto) e dos filmes LB do RuVPy (curva em rosa), do DPPC puro (curva em vermelho), do filme misto com 10% de RuVPy (círculos vazios), em tampão PBS pH 7,4 com 1 mmol L⁻¹ da sonda redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-}

Adicionalmente, o valor de capacitância do filme pode ser obtido do diagrama de Nyquist usando a equação 13:

$$C = \frac{1}{2\pi f_{\max} R_{ct}} \dots \dots \dots (13)$$

Onde, $f_{\max}$ corresponde à frequência no máximo valor de Z'' [166].

Mudanças no espectro de impedância são observadas devido à presença de moléculas distintas imobilizadas na superfície do ITO, cujos filmes resultaram diferentes valores de R_{ct} e C conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6: Dados de resistência obtidos dos Diagramas de Nyquist do substrato ITO e dos filmes LB dos compostos puros DPPC, DPPG, DPPS e RuVPy e dos filmes mistos de fosfolipídios com 10% de RuVPy.

Eletrodo	$R_{ct}(k\Omega)$	Capacitância (μF)
ITO	0,77	5,41
LB RuVPy	2,46	7,00
LB DPPC	0,30	6,22
LB DPPC/RuVPy	0,29	8,29
LB DPPG	1,84	4,58
LB DPPG/RuVPy	1,54	4,48
LB DPPS	0,59	5,03
LB DPPS/RuVPy	0,54	4,72

Desses dados, apenas são representativos os eletrodos ITO e os modificados com filmes LB de RuVPy e DPPC/RuVPy. O maior valor de R_{ct} foi observado para o filme LB do RuVPy (2,46 k Ω), o que é consistente com o fato do filme de RuVPy bloquear o processo de transferência de carga na superfície do ITO, e ainda o maior valor de C (7,00 μF), também consiste com as observações para os experimentos de voltametria. Os eletrodos com filme LB do DPPC e DPPC/RuVPy (Figura 32B), apresenta C de 6,22 e 8,29 μF , respectivamente, valores estes cerca de duas vezes maiores que os demais eletrodos, atribuído à presença do grupo colina $(-N(CH_3)_3)^+$ do fosfolipídio, que atua como uma contra carga e que atrai as moléculas de $Fe(CN)_6^{-3/-4}$ acumulando mais íons na dupla camada. Este acúmulo de espécies facilita os processos de transferência de carga, o que esta de acordo com os baixos valores de R_{ct} 0,30 e 0,29 k Ω para o filme LB DPPC e DPPC/RuVPy, respectivamente.

Em relação ao diagrama de Nyquist para os filmes com DPPS e sua mistura, duas outras observações podem ser feitas. Primeiro, o valor de C para a DPPS/RuVPy é menor do que para os filmes DPPS puro. Este fato pode ser compreendido considerando-se que os valores de capacitâncias obtidos pela equação (13) representam, na verdade, a soma das capacitâncias em série relacionadas com a dupla camada elétrica, ITO/filme e filme/solução de eletrólito. Deste modo, apesar da deposição do filme de LB diminuir a rugosidade na

superfície de ITO, diminuindo a capacitância de dupla camada ITO/solução, a presença do filme de fosfolipídios introduz um novo período na capacitância devido à presença dos grupos cabeças alinhados e carregados na superfície do ITO. Esta camada carregada pode atrair íons para dentro do filme LB pela migração, e esta propriedade é refletida no valor mais baixo para o R_{ct} , quando comparado com o valor para a superfície de ITO puro (0,59 e 0,54 k Ω , respectivamente) [156]. O mesmo comportamento de resistência do eletrodo DPPG e DPPG/RuVPy em relação ao ITO não foi observado, o que nos permite pensar que a migração de íons ocorre, mas algum outro fator pode ter influenciado na resposta destes eletrodos.

Além disso, pode ser visto que o valor das capacitâncias dos filmes mistos DPPC/RuVPy, DPPG/RuVPy e DPPS/RuVPy são menores do que para o valor encontrado para o filmes puros de DPPC, DPPG e DPPS. Esta menor capacitância pode ser atribuída ao fato de que quando o complexo RuVPy é transferido para a superfície de ITO, ele ocupa uma posição entre as cadeias de fosfolipídios atuando como um “mediador” entre as moléculas dos fosfolipídios e o eletrodo de ITO. Este efeito é significativo, uma vez que as interfaces eletrificadas mais importantes em sistemas vivos são membranas biológicas, que desempenham o importante papel de isolante para os íons inorgânicos e ainda potenciais eletroquímicos que podem ser mantidos através delas [167]. Vale ressaltar que, apesar da RuVPy ser neutro, o mapa de potencial eletrostático para este complexo (obtidos através de cálculos de química quântica) indica que existem locais de densidade de carga mais elevadas, com o potencial positivo, principalmente no grupo piridina, sendo este grupo o responsável pela interação com o grupo P=O carregado negativamente dos fosfolipídios. Esta interação entre o complexo Ru e os grupos cabeça dos fosfolipídios diminui a densidade de carga na camada carregada adsorvida sobre a superfície do eletrodo, provocando uma diminuição da capacitância total do filme. A observação de interação esta de acordo com a discussão da análise espectroscópica do filme de Langmuir e LB. É importante mencionar ainda que o diagrama de Nyquist para os filmes LB mistos, fosfolipídio/RuVPy, na região de mais baixas frequências, mostra o aparecimento de um comportamento linear, correspondente a inclinação da curva em 45° no diagrama, onde processos de difusão passam a ser importantes para a impedância do sistema [168, 169]. Esta observação é consistente com a demonstração de que o menor valor de R_{ct} para os filmes mistos é devido ao maior espaçamento entre as cadeias de fosfolipídios, uma vez que este espaçamento maior facilitou o movimento das espécies iônicas no interior do filme, e este processo pode ser observado na faixa de frequências utilizadas neste estudo.

5.11 Estudos eletroquímicos dos filmes cast do RuVPy e fosfolipídio

Medidas eletroquímicas de filmes *cast* contendo o complexo RuVPy e o fosfolipídio DPPC foram realizadas para comparação com os filmes LB, a fim de analisarmos o efeito da organização molecular nas respostas destas moléculas. Nestes experimentos os filmes LB e *cast* com o fosfolipídio DPPC puro e misturado ao complexo RuVPy foram obtidos sobre substratos condutores de carbono vítreo (CV) e os resultados dos voltamogramas cíclicos e diagramas de Nyquist são ilustrados na Figura 34.

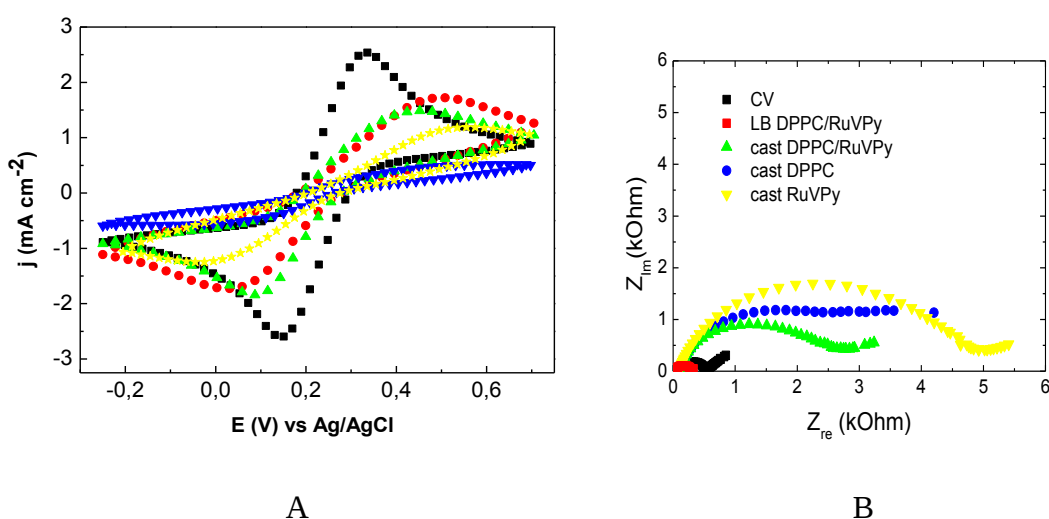


Figura 33: Voltamogramas cíclicos (A) e diagramas de Nyquist (B) do eletrodo de CV, dos filmes LB e cast dos filmes puros e mistos de DPPC com RuVPy (10%) em tampão PBS pH 7 com 5 mmol L⁻¹ da sonda redox K₃[Fe(CN)₆]:K₄[Fe(CN)₆] versus Ag/AgCl.

Tabela 7: Dados obtidos dos voltamogramas e diagramas de Nyquist do substrato ITO e dos filmes LB dos compostos puros e mistos.

Eletrodo	E _{pa} e E _{pc} (V)	E _{1/2} (V)	I _{pa} e I _{pc} (mA)	ΔI _p (mA)	R _{tc} (kΩ)	Capacitância (μF)
CV	0,33 e 0,15	0,24	2,54 e -2,60	5,14	0,42	1,19
Cast RuVPy	0,51 e 0,05	0,28	1,16 e -1,23	2,39	4,73	3,26
Cast DPPC	0,57 e 0,00	0,28	0,51 e -0,54	1,05	3,12	4,23
Cast DPPC/RuVPy	0,42 e 0,08	0,25	1,46 e -1,84	3,30	2,45	8,95
LB DPPC/RuVPy	0,48 e 0,04	0,26	1,71 e -1,73	3,44	2,46	7,00

Destes valores, constata-se que no estudo voltamétrico, foi observada maior reversibilidade e menor potencial de meia onda do processo redox do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ com eletrodo de CV sem modificação ($E_{pa} = 0,33\text{V}$, $E_{pc} = 0,15\text{ V}$ e $E_{1/2} = 0,24\text{ V}$), valor este em acordo com a literatura [161,162]. Além disto, obteve-se menor resistência deste material ($0,42\text{ k}\Omega$), que é cerca de cinco a dez vezes menor que as resistências apresentadas quando os filmes *cast* ou LB são depositados sobre o CV, cujos valores são resumidos na Tabela 7.

As respostas eletroquímicas, tal como a variação de corrente de pico, ΔI_p , e valor de resistência do filme *cast* com DPPC/RuVPy ($3,30\text{ mA}$, $2,45\text{ k}\Omega$) e LB do DPPC/RuVPy ($3,44\text{ mA}$, $2,46\text{ k}\Omega$) atestam o efeito da organização molecular destas moléculas sobre as respostas eletroquímicas da molécula sonda. É interessante mencionar que mesmo sendo a quantidade de complexo no filme LB muito menor que no filme *cast*, a superior intensidade de corrente é atribuída à organização propiciada pela técnica LB, o que é similar ao observado em estudos onde o complexo RuVPy foi imobilizado em diferentes tipos de eletrodos e novamente a técnica de obtenção de filme fino se destacou pela sua nanoestruturação [159].

As respostas do filme misto *cast* de DPPC/RuVPy ($E_{1/2} = 0,25\text{ V}$, $I_{pa} = 1,46$ e $R_{tc} = 2,45\text{ k}\Omega$) em relação ao filme contendo apenas RuVPy ($E_{1/2} = 0,28\text{ V}$, $I_{pa} = 1,16$ e $R_{tc} = 4,73\text{ k}\Omega$) mostram que menores potências, maiores intensidades de corrente de pico e menores resistências à transferência de carga são proporcionadas pela interação do complexo com o fosfolípido. O grande valor de resistência para o filme *cast* de RuVPy é decorrente do pH do meio, o qual diminui a condutividade do RuVPy puro, da mesma forma que ocorre para o filme LB de RuVPy. Além disto, os altos valores de capacitância do filme misto *cast* de DPPC/RuVPy ($C = 8,95\text{ }\mu\text{F}$) comparados aos filmes contendo apenas a espécie precursoras, *cast* de DPPC ($C = 4,23\text{ }\mu\text{F}$) e *cast* de RuVPy ($C = 3,26\text{ }\mu\text{F}$), sugerem que a combinação destas moléculas acumula maior quantidade de íons na interface e facilita os processos de transferência de carga no modelo de membrana, mesmo que pequena proporção de complexo (10%) esteja presente no meio. Estes resultados corroboram com os valores obtidos dos parâmetros termodinâmicos e podem ser correlacionados com a toxicidade apresentada pelo RuVPy às células normais e de câncer, visto que a presença do complexo causa alterações eletroquímicas nos modelos de membrana celular utilizados.

5.12 Obtenção e caracterização de formulação lipossômica do complexo RuVPy

Outro modelo de membrana reconhecidamente útil em estudos com substâncias farmacologicamente ativas são os lipossomos (Figura 35A), cuja estrutura apresenta compartimento interno aquoso que pode vir a incorporar substâncias hidrossolúveis e ainda em sua membrana formada por lipídios, incorporar substâncias lipofílicas ou anfifílicas [170]. Estas formulações lipossômicas, são reconhecidas por facilitarem a administração de drogas, principalmente às hidrofóbicas melhorando sua solubilidade em água e, por conseguinte aumentando sua eficácia [171], uma vez que ao adentrar no organismo o medicamento encontra uma série de barreiras fisiológicas que causam grande diminuição da dosagem inicial até que o efeito desejado comece a ser percebido. Sob esta ótica faz-se necessário o uso de tecnologias, tais como a incorporação de medicamentos em lipossomos, que mantém a dosagem contínua por um maior intervalo de tempo, diminuindo alguns efeitos colaterais [172].

Neste contexto, iniciaram-se estudos de obtenção de lipossomos de DPPC com o complexo RuVPy, nas mesmas condições das soluções empregadas nos filmes de Langmuir, a saber, soluções em diclorometano do complexo e do fosfolipídio nas concentrações de 1 mmol. L⁻¹. Estas soluções foram misturas para obter a proporção 90/10 % de DPPC/RuVPy, e então o solvente foi evaporado com ajuda do gás N₂ a fim de diminuir o contato destas soluções com atmosfera oxidante, formando um filme lipídico seco no frasco utilizado, o qual foi armazenado em dessecador por cerca de 24 h. Passado este tempo, que garantiu evaporação total do solvente orgânico, hidratou-se o filme com tampão PBS pH 7,4, sob agitação e esta nova solução obtida foi sonicada para diminuir o tamanho das partículas formadas. Após preparada, a solução lipossômica era homogênea de cor vermelho claro devido à presença do complexo RuVPy. Lipossomos esbranquiçados de DPPC puro também foram obtidos e serviram de referência. A imagem deste material em conjunto com lipossomos de RuVPy na proporção 10% é apresentada na Figura 35B.

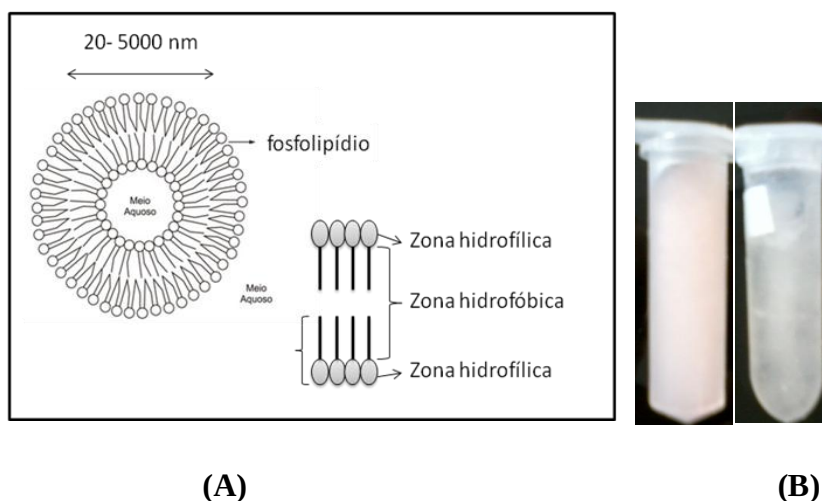


Figura 34: (A) Estrutura de lipossomos adaptada da referencia 170 e (B) Imagem das soluções lipossômicas de DPPC a direta, e de DPPC/RuVpy na proporção 90/10% a esquerda, ambas em tampão PBS pH 7,4.

Medidas de absorção de luz na região do UV dos lipossomos sem e com RuVpy (Figura 36) foram comparadas ao espectro do complexo puro, que apresenta bandas características em 350, 450 e 530 nm.

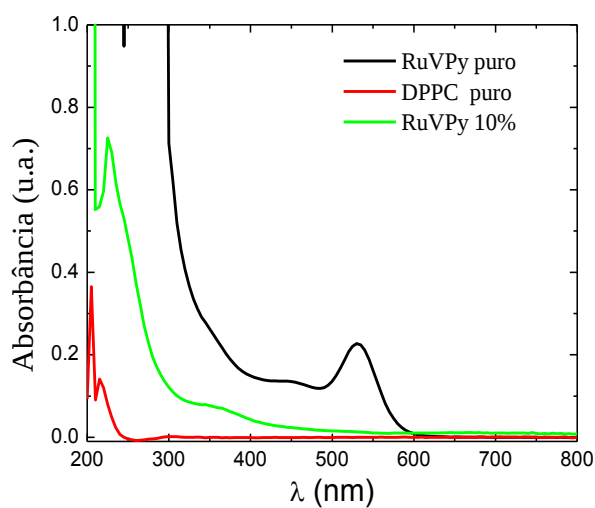


Figura 35: Espectros de absorção na região do UV-Vis de soluções de RuVpy e do DPPC puro (1 mmol. L^{-1}) e do complexo que foi encapsulado em lipossomos na proporção de 10% de RuVpy após liofilização e solubilização em CH_2Cl_2 .

Observa-se no espectro do lipossomo (Figura 36, curva em verde) a ausência das bandas em 450 e 530 nm, com exceção do ombro em 350 nm, atribuído à transferência de elétrons dos orbitais ($3p\sigma^*\pi$) do átomo de fósforo do ligante bifosfínico (dppb) para o orbital $d\pi$ do metal [86]. Este perfil espectral, mesmo com ausência das bandas em 450 e 530 nm, confirma a incorporação do complexo e nos leva a propor a formação de uma espécie de Ru(II) que não apresenta absorção nesta região do espectro conforme observado para a série $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})\text{L}_2]$ onde L= n-heterocíclico[173].

Pelo uso da técnica de UV-Vis também obteve-se a quantidade de complexo inserida nestas vesículas, medindo a absorção do sobrenadante da amostra após centrifugação. Aplicaram-se os valores de absorbância medidas na equação 14 [174] e obteve-se a taxa de encapsulamento (TE) em torno de 80%, uma vez que as medidas foram realizadas em triplicata.

$$TE = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\% \quad [14]$$

Estas soluções lipossômicas por se tratar convencionalmente de emulsões, apresentam turbidez, que por sua vez leva a um grande espalhamento de luz, tornando possível a realização de medidas “*dynamic light scattering*”, ou DLS, as quais permitem identificar o tamanho médio das partículas presentes nestas soluções, na ordem de nanômetros e avaliar ainda sua carga por medidas de potencial Zeta. Estas medidas foram realizadas para monitorar o tamanho médio das partículas, no decorrer de 15 dias, cujos valores encontrados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Distribuição média de tamanho e carga dos lipossomos de DPPC puro e da mistura DPPC/RuVPy na proporções 90/10 % em função do tempo.

Lipossomos de DPPC/RuVPy (%)	Tamanho 1º dia (nm)	Tamanho 7 dias (nm)	Tamanho 15 dias (nm)	Potencial Zeta (mV)
100/0	24,7	129,6	873,8	-4
90/10	304,2	322,9	707,7	-4,8

Para as vesículas de DPPC/RuVPy obteve-se um diâmetro médio de 304,2 nm, valor este que é cerca de 12 vezes maior que o encontrado para as vesículas de DPPC puro obtido neste trabalho. O aumento do tamanho nas vesículas de DPPC/RuVPy, está de acordo com o que se observa para sistemas de encapsulamento de compostos lipofílicos que causam maior empacotamento da bicamada [175]. Este resultado também corrobora com a diminuição dos domínios de DPPC observada nas imagens de BAM nos filmes de Langmuir mistos DPPC/RuVPy, quando na presença do RuVPy.

No monitoramento dos tamanhos destes lipossomos após 15 dias de preparo destas soluções, verificou-se que o diâmetro médio dos lipossomos de DPPC aumentou cerca de 35 vezes diferente do observado para os lipossomos com RuVPy que tiveram seu tamanho duplicado. Esta tendência de aumento de tamanho se deve a fusão das vesículas em busca de maior estabilidade. Macroscopicamente observou-se também que com o tempo este material armazenado sobre refrigeração passou a apresentar precipitados gelatinosos maiores, sendo que quanto maior a proporção de complexo, menor a quantidade de precipitado. Passado algum tempo de estocagem deste material sob tais condições, as soluções e precipitados, antes vermelho claro, tornaram-se verde escuro indicando oxidação do complexo.

Medidas de espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) do complexo encapsulado nas diferentes proporções também foram realizadas utilizando filmes *casted* obtidos sobre placas de Si. Estas medidas forneceram informações referentes aos estiramentos de ligações existentes em ambas as estruturas, sendo os espectros em acordo com os dados de PM-IRRAS dos filmes de Langmuir e LB da mistura DPPC/RuVPy. Desta forma optou-se por mostrar somente as alterações observadas nos estiramentos dos grupos químicos, devido à presença do complexo conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9: Números de onda e atribuição dos principais estiramentos dos grupos funcionais dos lipossomos de DPPC e da mistura DPPC/RuVPy em filmes *cast* sobre em Si.

Grupos	Faixa segundo literatura ^a (cm ⁻¹)	Bandas observadas (cm ⁻¹)	
Região polar		DPPC	DPPC/RuVPy
(PO ₂) _s	~1090	1092	1081
ν (C=O) de ácido graxo	1690–1740	1739	1732
Região apolar			

(CH ₂) _a	2849–2854	2846	2843
(CH ₂) _s	2916–2924	2917	2917

^a referência [144]

Verificou-se significativas alterações nos números de onda dos estiramentos referentes a cabeça do DPPC principalmente nos estiramentos dos grupos P=O e C=O. Um deslocamento discreto de 3 cm⁻¹ na banda de desdobramento assimétrico CH₂ também foi observado. Outra relevante contribuição desta medida na região do IR foi a banda do estiramento CH de anéis aromáticos do complexo em torno de 917 cm⁻¹ que deslocou para 869 cm⁻¹ quando o complexo RuVPy encontra-se inserido em lipossomos de DPPC. No conjunto geral dos dados propõe-se que a maior interação do RuVPy ocorre com a parte hidrofílica do DPPC, similar ao que se observa e propõe para os filmes de Langmuir e LB.

Medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas para filmes *casted* contendo as vesículas de DPPC e DPPC/RuVPy com 10% de RuVPy, conforme imagens apresentadas na Figura 37. Em análise destas imagens verificou-se que o diâmetro encontrado para os lipossomos de DPPC são superiores aos valores obtidos por DLS e que no caso das imagens dos substratos com DPPC/RuVPy não existem mais estruturas esféricas e sim um filme que recobriu estruturas salinas cubicas que se formaram. Este perfil bidimensional bem como o aumento dos tamanhos dos lipossomos de DPPC pode ser explicado pela falta de hidratação do meio, condições estas impostas para realização das medidas.

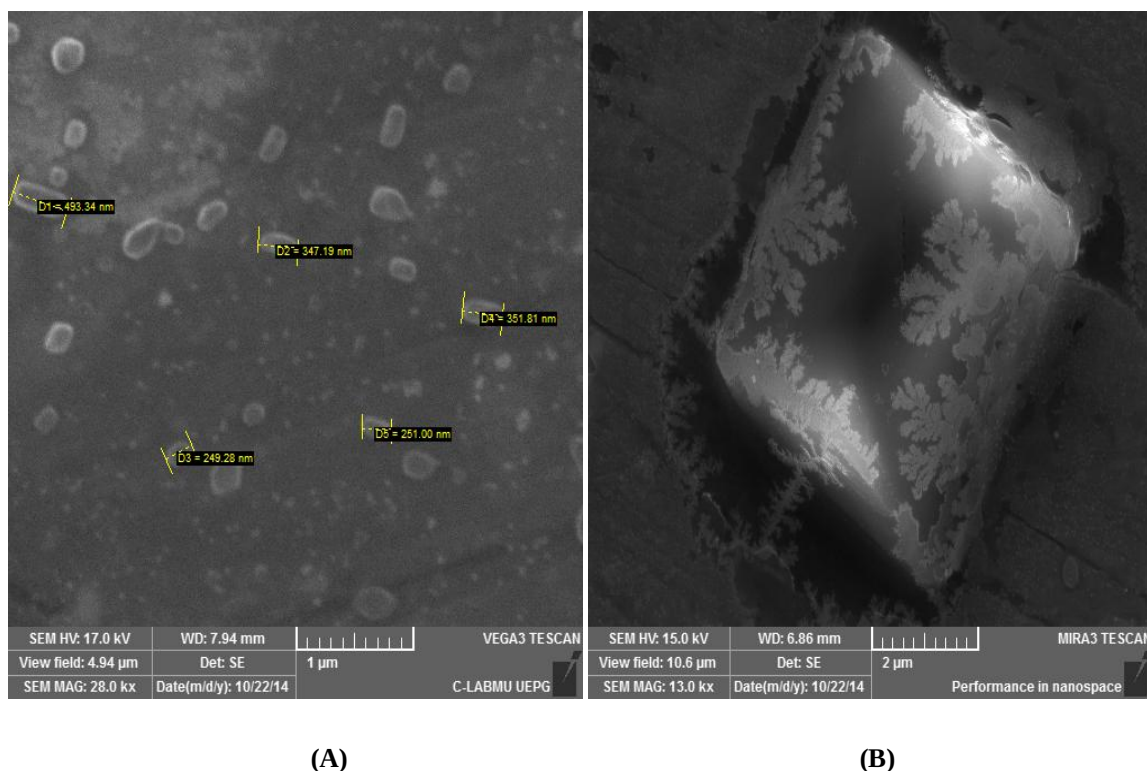


Figura 36: Imagens de MEV para os filmes *casted* contendo os lipossomos de DPPC (A) e DPPC/RuVpy com 10% de RuVpy(B) escala = 1 e 2 μ m

Por fim os lipossomos obtidos de DPPC e DPPC/RuVpy com 10% de RuVpy foram utilizados em testes biológicos com células normais VERO. A escolha desta linhagem celular foi devido a relevantemente toxicidade do RuVpy nos ensaios com o composto puro. O período de incubação utilizado foi de 24 h, com concentrações testadas na escala de μ mol L⁻¹. A Figura 38 ilustra o índice de sobrevivência em relação a concentração do complexo RuVpy. Verificou-se que mesmo em superior concentração (270 ± 10 μ mol L⁻¹ de RuVpy) estes lipossomos não foram capazes de eliminar 50% da população de células. Esta inferior citotoxicidade do complexo RuVpy encapsulado pode ser relacionada ao tempo de incubação necessário para que este tipo de estrutura libere o composto ativo, em acordo com o que se observa nas medidas de DLS, nas quais os lipossomos de DPPC/RuVpy se mostraram bastante estáveis alterando significativamente seu tamanho somente após 7 dias.

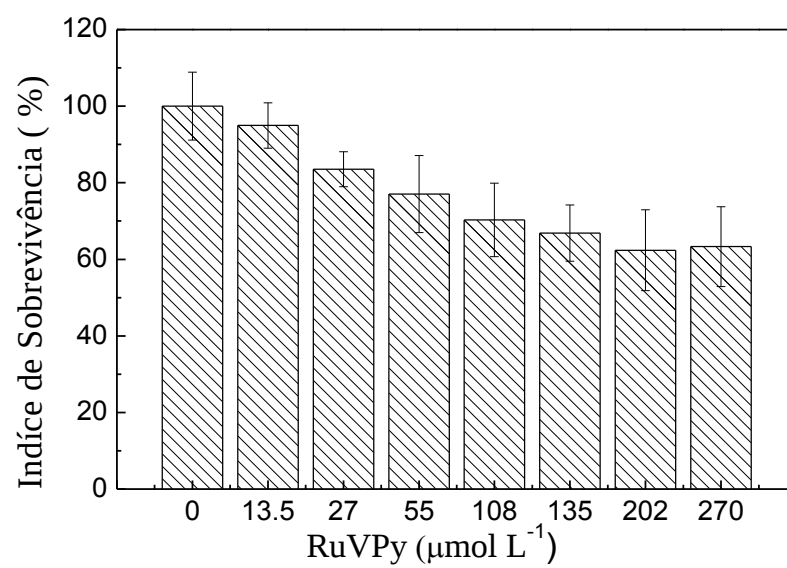


Figura 37: Efeito do RuVPy no índice de sobrevivência de células cancerígenas HEP-2 por 24h. Cada coluna representa a média $\pm$ desvio padrão para dois experimentos cada, realizado em sextuplicata

6. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS FUTURAS

A descoberta da propriedade antimetastática dos complexos de rutênio em 1999 representa um importante marco no desenvolvimento de uma nova droga antitumoral [176]. Baseado nisto, a escolha do complexo *mer*-[RuCl₃(dppb)(VPy)] para objeto de estudo desta tese deve-se ao estado redox Ru³⁺, a presença de ligante fosfínico e n-heterocíclico, cuja combinação proporciona significativa atuação contra inibição de células de câncer. No entanto, os ensaios de toxicidade mostram que o complexo RuVPy é altamente tóxico, tanto para células de câncer como para células controle. Esta falta de especificidade pode ser relacionado com um modo de ação baseado em interações com a membrana celular, sendo este complexo uma pró-droga, que em ambiente intracelulares pode vir a formar espécies de Ru(II). A hipótese de interação com membrana foi testada, de forma muito simplificada, usando monocamadas Langmuir como modelos de membrana celular. Três fosfolipídios com a mesma cauda foram utilizados, cada um contendo 16 átomos de carbono em sua região apolar e com três diferentes grupos polares sendo estes: colina para o DPPC, glicerol para o DPPG e serina para o DPPS. Uma forte interação foi confirmada pelas alterações significativas no empacotamento e morfologia dos fosfolipídios, tanto zwitteriônico (DPPC) quanto nas monocamadas dos aniônicos (DPPG e DPPS). Parâmetros termodinâmicos também foram úteis e mostraram melhor acomodação do RuVPy nos sistemas, de acordo com o a carga presente nos grupos cabeças sendo extremamente repulsiva a interação com o DPPS que apresenta 2 regiões de carga negativa. Além disso, usando PM-IRRAS pode-se identificar os grupos dos fosfolipídios que interagem com o RuVPy, o que era consistente com as propriedades eletrônicas obtidas por DFT para a estrutura otimizada de RuVPy. Embora o complexo RuVPy não seja capaz de penetrar nas regiões hidrofóbicas da cauda das monocamadas dos fosfolipídios nos filmes de Langmuir, as suas propriedades elásticas foram alteradas significativamente. Outro resultado que traduz o efeito do complexo no modelo de membrana é o obtido por medidas eletroquímicas em tampão PBS, que mostraram que os filmes mistos têm maior acúmulo de carga segundo medidas de capacitância dos filmes LB, e que em presença de espécies eletroativas, este filmes apresentam maior facilidade na transferência de carga. Se pensarmos em membranas reais conclui-se que estas se tornam mais fluidas numa interação com RuVPy, como fez com as monocamadas de Langmuir, além destas terem seus impulsos elétricos alterados. Tais características justificam uma provável atuação do complexo como responsável pelo mecanismo de morte celular, sem descartar o

mecanismo convencional esperado para um agente neoplásico ciclo não específico o qual não foi foco deste trabalho. A fim de obtermos mais ampla ideia em relação a resposta elétrica dos filmes LB, novos filmes LB poderão ser obtidos em todas as pressões a fim de avaliarmos a permeabilidade do filmes por medidas de VC e EIS.

Vesículas lipossomais de DPPC foram obtidas com RuVPy e via caracterizações realizadas destas verificou-se que o complexo pode ser encapsulado interagindo com regiões hidrofílicas da membrana vesicular. Este encapsulamento é ideal para o transporte deste composto em ambientes hidrofílicos, tais como os ambientes biológicos. Apesar dos resultados serem promissores, percebemos a necessidade de otimização da obtenção das mesmas, a fim de garantir maior liberação do complexo RuVPy dos lipossomos. A combinação destes resultados e dados obtidos das isotermas de pressão vs. área por molécula, nos mostra a viabilidade do emprego dos lipossomos contendo o complexo incorporado para prosseguir com os testes biológicos, com os mesmos tipos de linhagem celular, visando estudos de liberação controlada de drogas. Estes resultados serão comparados aos testes já realizados a fim de avaliar se haverá ou não redução da citotoxicidade do complexo.

Apesar da alta toxicidade apresentada pelo RuVPy, os resultados obtidos nesta tese serão úteis para auxiliar na projeção de novos metalofármacos que sejam altamente seletivos para as células tumorais e que apresentem baixa toxicidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Disponível em: <http://www.cancer.org.br/>. Acessado em: 07 de fevereiro de 2014.
- [2] LODISH, H.; et al. **Molecular Cell Biology**, 4th edition, W. H. Freeman; New York, 2000.
- [3] Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamentos>. Acessado em 07 de fevereiro de 2014.
- [4] MURAD, A.M.; KATZ, A.; **Oncologia Bases Clínicas do Tratamento**; Guanabara; Rio de Janeiro, 1996, p. 41.
- [5] ALMEIDA, V. L. de et al. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos Que Interagem Com o DNA: Uma Introdução. **Quim. Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.
- [6] MJOS K. D.; ORVING C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. **Chemical Reviews**, v.114, p. 4540-4560, 2014.
- [7] CHIANG L. et al. Multifunctional Ligands in Medicinal Inorganic Chemistry- Current Trends and Future Directions. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 122-144, 2012.
- [8] GOODMAN, A.; GILMAN, A. The **Pharmacological basis of Therapeutics**, Joel G. Hardman, Lee E. Limbird (Editor), Alfred Goodman Gilman (Editor), 2002
- [9] FLINT, O.P. Predicting in vivo toxicity. **Toxicology In Vitro**, v.12, p.591- 595, 1998.
- [10] CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. **Em as Bases Farmacológicas da Terapêutica**; Goodman, L. S.; Gilman, A., Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, 1995, p. 903-949.
- [11] PEYRONE M., ‘Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür’[On the Influence of Ammonia on Platinum Chloride], **Ann. Chem. Pharm.**, v. 51, p. 1, 1844.
- [12] ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode, **Nature**, v. 205, p. 698-699, 1965.
- [13] ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; GRIMLEY, E. B.; THOMSON, A. J. The inhibition of growth or cell division in Escherichia coli by different ionic species of platinum(IV) complexes. **J. Biol. Chem.**, v. 242, p. 1347-1352, 1967.
- [14] FONTES A. P. S.; CÉSAR E. T.; BERALDO H. A química inorgânica na terapia do câncer. **Química Nova na Escola**. n. 6, 2005.
- [15] KLEIN, A. V.; HAMBLEY, T. W. Platinum drug distribution in cancer cells and tumors, **Chem. Rev.**, v.109, p. 4911-4920, 2009.
- [16] CEPEDA, V.; FUERTES, M. A.; CASTILLA, G.; ALONSO, C.; QUEVEDO, C.; PÉREZ, J. M. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. **Anticancer Agents Med.** v. 7, p. 3-18, 2007.

-
- [17] JON, D.; BLACHLEY, M.D.; JULIAN B. HILL, M.D. Renal and Electrolyte Disturbances Associated with Cisplatin. **Ann Intern Med.**, v. 95, p.628-632, 1981.
- [18] GONÇALVES, E. M. et al. Morphological and growth alterations in Vero cells transformed by cisplatin. **Cell Biology International**, v. 30, p. 485-494, 2006.
- [19] BERGAMO, A. et al. Approaching tumour therapy beyond platinum drugs Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 106, p. 90–99, 2012.
- [20] ANG, W.H.; CASINI, A.; SAVA, G.; DYSON, P. J. Organometallic ruthenium-based antitumor compounds with novel modes of action. **J. Organomet. Chem.** v. 696, p. 989-998, 2011.
- [21] WARAD, I. et al. Metal ions as Antitumor Complexes-Review. **J. Mater. Environ. Sci.** v.4, p. 542-557, 2013.
- [22] DWYER, F.P. et al. Biological activity of complex ions. **Nature**. v. 170, p. 190-191, 1952.
- [23] DWYER, F.P. et al. Inhibition of Landschutz Ascites Tumour Growth by Metal Chelates Derived from 3, 4, 7, 8-Tetramethyl-1,10-Phenanthroline. **J. Cancer**, v. 19, p. 195-199, 1965.
- [24] PASTUSZKO, A. et al. Synthesis, X-ray structure, electrochemical properties and cytotoxic effects of new arene ruthenium (II) complexes. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 745, p. 64-70, 2013.
- [25] HEINRICH, T.A. et al. A new nitrosyl ruthenium complex: Synthesis, chemical characterization, in vitro and in vivo antitumor activities and probable mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 3616-3622, 2011.
- [26] ATKINS, P.W.; SHRIVER, D. F. **Química Inorgânica**. Porto Alegre: Bookmann, 2008.
- [27] ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects. **Platinum Metal Reviews**. v.45, p. 62-69, 2001.
- [28] GIANFERRARA, T.; BRATSOS, I.; ALESSIO, E. A categorization of metal anticancer compounds based on their mode of action, **Dalton Trans.** v.37, p. 7588-7598, 2009.
- [29] LIPPONER, K-G.; VOGEL E.; KEPPLER, B. K.. Synthesis, characterization and solution chemistry of *trans*-indazoliumtetrachlorobis(Indazole)Ruthenate(III), a new anticancer ruthenium complex. IR, UV, NMR, HPLC Investigations and Antitumor Activity. Crystal Structures of *trans*-methylandazoliumtetrachlorobis-(1-Methylandazole)Ruthenate(III) and its Hydrolysis Product *trans*-monoquatrichlorobis-(1-Methylandazole)-Ruthenate(III). **Metal-Based Drugs**, v. 3, p. 243-260, 1996.
- [30] SAVA, G. et al. Dual Action of NAMI-A in Inhibition of Solid Tumor Metastasis: Selective Targeting of Metastatic Cells and Binding to Collagen. **Clin.Cancer Res.** v.9, p. 1898- 1905, 2003.

-
- [31] CLARKE, M.J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coord. Chem. Rev.**, v. 236, p. 209-233, 2003.
- [32] GRUESO, E. et al. Thermodynamic and structural study of phenanthroline derivative ruthenium complex/DNA interactions: Probing partial intercalation and binding properties. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 106, p. 1-9, 2012.
- [33] BRANDT, W.W.; DWYER, F.P.; GYARFAS, E.C. Chelate Complexes of 1,10-Phenanthroline and Related Compounds. **Chem. Rev.**, v. 54, p. 959-1017, 1954.
- [34] DWYER F.P.; D.P. MELLOR, **Metal chelates in biological systems**, in: A. Shulman and F.P. Dwyer (Eds.) Chelating Agents and Metal Chelates, Academic Press, New York, 1964, p. 383-435.
- [35] LEVINA, A.; MITRA A.; LAY P.A. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. **Metallomics** v.1, p.458-470, 2009.
- [36] SCHWIETERT, C.W.; MCCUE, J.P. Coordination compounds in medicinal Chemistry. **Coord. Chem. Rev.** v. 184, p. 67-89, 1999.
- [37] TRÁVNÍČEK, Z. et al. In vitro and in vivo biological activity screening of Ru(III) complexes involving 6-benzylaminopurine derivatives with higher pro-apoptotic activity than NAMI-A. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, p. 937-948, 2011.
- [38] MORRIS, R.E. et al. Inhibition of Cancer Cell Growth by Ruthenium(II) Arene Complexes. **J. Med. Chem.** v.44, p. 3616-3621, 2001.
- [39] PEACOCK A. F. A., SADLER P. J. Medicinal organometallic chemistry: designing metal arene complexes as anticancer agents. **Chem. Asian J.**, v. 3, p. 1890–1899, 2008.
- [40] DYSON P. J. Systematic design of a targeted organometallic antitumor drug in pre-clinical development. **Chimia** v.61, p.698–703, 2007.
- [41] GIANNINI, F. et al. Highly cytotoxic trithiophenolatodiruthenium complexes of the type $[(\eta^6\text{-}p\text{-MeC}_6\text{H}_4\text{Pri})_2\text{Ru}_2(\text{SC}_6\text{H}_4\text{-}p\text{-X})^3]^+$: synthesis, molecular structure, electrochemistry, cytotoxicity, and glutathione oxidation potential. **J Biol Inorg Chem**, v. 17, p. 951–960, 2012.
- [42] Van RIJT S.H. and SADLER P.J., Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. **Drug Discovery Today**, v. 14, p. 1089-1097, 2009.
- [43] HO, P.C. **Metallotherapeutic Drugs and Metal-based Diagnostic Agents**, in: M. Gielen and E.R.T. Tiekink, (Eds.) The Use of Metals in Medicine, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, p. 297–311, 2005.
- [44] RONCONI, L.; SADLER, P.J.; Using coordination chemistry to design new medicines **Coord. Chem. Rev.**, v. 251, p. 1633-1648, 2007.

-
- [45] JAKUPEC, M.A. et al. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. **Dalton Trans.**, v. 2, p.183-194, 2008.
- [46] ANG, W.H.; DYSON, P.J. Classical and Non-Classical Ruthenium-Based Anticancer Drugs: Towards Targeted Chemotherapy. **Eur. J. Inorg. Chem.**, v. 20, p. 4003–4018, 2006.
- [47] VON POELHSITZ, G. et al. Synthesis, characterization, X-ray structure and preliminary in vitro antitumor activity of the nitrosyl complex fac-[RuCl₃(NO)(dppf)], dppf = 1,10-bis(diphenylphosphine)ferrocene. **Polyhedron**, v. 26, p. 4707–4712, 2007.
- [48] GRAMINHA, A.E. et al. Ruthenium(II) complexes of 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones with cytotoxic activity against human tumor cell lines. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 69, p. 1073–1076, 2008.
- [49] GRGURIC-SIPKA S. et al. Ruthenium(II) complexes of thiosemicarbazones: the first water soluble complex with pH-dependent antiproliferative activity. **Eur. J. Inorg. Chem.**, v.43, p.2870–2878, 2007.
- [50] BASOLO, F.; PEARSON, R.G. **Mechanisms of Inorganic Reactions**. New York, John Wiley and Son, 1967.
- [51] BOWSER, J.R. **Inorganic Chemistry**. California, Brooks/Cole Publishing Company, 1993.
- [52] VALLE, E.M.A. et al. Sobre uma Degenerescência Acidental nos Deslocamentos Químicos de RMN de ³¹P{¹H} em Complexos Difosfínicos de Rutênio. **Quim. Nova**, v. 31, p. 807-812, 2008.
- [53] BERNERSPRICE, S.J. et al, Antimicrobial and Anticancer Activity of Tetrahedral, Chelated, Diphosphine Silver(I) Complexes: Comparison with Copper and Gold. **J. Inorg. Biochem.**, v. 33, p. 285-295, 1988.
- [54] GOLFETO C.; et al. Synthesis, characterization and cytotoxic activities of the [RuCl₂(NO)(dppp)(L)]PF₆. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, p. 489-495, 2010.
- [55] CLARKE, M.J.; ZHU, F.C.; FRASCA, D.R.; Non-Platinum Chemotherapeutic Metallopharmaceuticals. **Chem. Rev.**, v. 99, p. 2511–2533, 1999.
- [56] NASCIMENTO, F.B. do 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. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 1783–1789, 2008.
- [57] SANTOS, E.R. dos et al. New ruthenium(II)/phosphines/diimines complexes: Promising antitumor(human breast cancer) and Mycobacterium tuberculosis fighting agents. **Polyhedron** v. 51, p. 292–297, 2013.
- [58] DAS, S. et al. Cytotoxicity of half sandwich ruthenium(II) complexes with strong hydrogen bond acceptor ligands and their mechanism of action. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, p. 93–104, 2010.

-
- [59] REDDY, V.D. et al. Syntheses, structures, and anticancer activity of novel organometallic ruthenium e maltol complexes. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 700, p. 180-187, 2012.
- [60] ROBERT G. **Langmuir Blodgett film**. Plenum Press, New York, 1990
- [61] FERREIRA, M. et al. Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). **Quim. Nova**, v. 28, p. 502-510, 2005.
- [62] PETTY M.C. **Langmuir-Blodgett Films - An introduction**. University Press, Cambridge, 1996.
- [63] DYNAROWICZ-ŁATKA, P.; DHANABALAN, A.; OLIVEIRA Jr, O.N. Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 91, p. 221-293, 2001.
- [64] STEFANIU, C.; BREZESINSKI G.; MÖHWALD, H. Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces, **Adv Colloid Interface Sci**, v. 208, p. 197-213, 2014.
- [65] SHIMIZU F.M. **Fabricação e Caracterização de filmes finos e ultrafinos de coroas de éter azobenzênio incorporado e estudo da birrefringência fotoinduzida**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita”. Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Presidente Prudente -SP, 2008.
- [66] GIRARD-EGROT A.P.; GODOY S., BLUM L. J. Enzyme association with lipidic Langmuir–Blodgett films: Interests and applications in nanobioscience. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 116, p. 205–225, 2005.
- [67] VANANELIA, P.N. et al. Langmuir films containing ibuprofen and phospholipids. **Chemical Physics Letters**, v. 559, p. 99-106, 2013.
- [68] JURAK, M.; CONDE, J. M. Characterization of the binary mixed monolayers of α -tocopherol with phospholipids at the air-water interface. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1828, p. 2410–2418, 2013.
- [69] MASTERS, J.R. **Animal cell culture: a practical approach**, Oxford University Press, New York, 2000.
- [70] SOSTARECZ, A.G. et al. Correlation of Insulin-Enhancing Properties of Vanadium-Dipicolinate Complexes in Model Membrane Systems: Phospholipid Langmuir Monolayers and AOT Reverse Micelles. **Chem. Eur. J.**, v. 20, p. 1 – 12, 2014
- [71] RAJA N.S. et al .Interaction of chromium(III) complexes with model lipid bilayers: Implications on cellular uptake. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, p. 332–340, 2011.
- [72] RAMOS, A.P. et al. Porphyrin–phospholipid interaction and ring metallation depending on the phospholipid polar head type. **J. Colloid and Interface Sci**. v. 350, p. 148–154, 2010.

-
- [73] RAMOS, S. et al. The cis-bis(decanoate)tin phthalocyanine/DPPC film at the air/water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 369, p. 256–266, 2012.
- [74] FU, Y.; OUYANG, J.; LEVER, A.B.P. In-situ Langmuir-Blodgett surface film electrochemical study of $\text{Ru}(\text{P}(\text{C}_{18}\text{H}_{37})_3)_2(\text{DTBSq})_2$. **J. Phys. Chem.**, v. 97, p. 13753-13760, 1993.
- [75] SANTOS, J.P. et al. Palmitic acid and aquo-ruthenium complex monolayers at the liquid-air interface and electroactive Langmuir-Blodgett films. **Thin Solid Films**, v. 349, p. 238-240, 1999.
- [76] WOHNATH, K. et al. Langmuir-Blodgett films of ruthenium phosphine complexes characterized by Atomic Force Microscopy. **Synthetic Metals**, v. 121, p. 1425-1426, 2001.
- [77] FERREIRA, M.; et al. Interactions at the Molecular Level between Biphosphine Ruthenium Complexes and Stearic Acid in Langmuir and Langmuir Blodgett Films. **J. Phys. Chem. B.**, v. 106, p. 7272- 7277, 2002.
- [78] WOHNATH, K.; et al. Molecularly Organized Langmuir Blodgett Films from a Ruthenium Biphosphine Complex. **J. Phys. Chem. B.**, v. 109, p. 4959-4964, 2005.
- [79] SOUZA, N.C.; et al. Morphological characterization of Langmuir–Blodgett films from polyaniline and a ruthenium complex (Rupy): influence of the relative concentration of Rupy. **Nanotechnology**, v. 18, p. 1-7, 2007.
- [80] FERREIRA, M.; WOHNATH, K. and OLIVEIRA, Jr. O.N. Electrochemical Properties of Mixed Films of Polyaniline and Ruthenium Complex. **Synthetic Metals**, v. 135, p. 455–456, 2003.
- [81] FERREIRA, M.; et al. High-Performance Taste Sensor Made from Langmuir Blodgett Films of Conducting Polymers and a Ruthenium Complex. **Anal. Chem.** v. 75, p. 953-955, 2003.
- [82] FERREIRA, M.; et al. Preparation, characterization and taste sensing properties of Langmuir–Blodgett Films from mixtures of polyaniline and a ruthenium complex. **Polymer**, v. 44, p. 4205–4211, 2003.
- [83] WOHNATH K. et al. Electrochemical properties of a ruthenium complex immobilized as thin films and in carbon paste electrodes. **Progress in Solid State Chemistry**. v. 33, p. 243-252, 2005.
- [84] WOHNATH, K.; et al. Langmuir and Langmuir–Blodgett Films Containing a Porphyrin–Ruthenium Complex. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. X, p. 1–8, 2005.
- [85] WOHNATH, K.; et al. Novel Binuclear Ruthenium Complex: Spectroscopic and Electrochemical Characterization, and Formation of Langmuir and Langmuir-Blodgett Films. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, p. 1634-1641, 2006.

-
- [86] WOHNATH, K. et al. Electrosynthesis of binuclear ruthenium complexes from $[\text{RuCl}_3(\text{dppb})(\text{L})]$ precursors [L= pyridine, 4-methylpyridine or dimethyl sulfoxide; dppb=1,4-bis(diphenylphosphino)butane]. **Dalton Trans.** p. 383–3386, 2000.
- [87] MARSH, D. Lateral Pressure in Membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1286, p. 183-223, 1996.
- [88] FREZARD, F. et al. Lipossomas: Propriedades Físico-Químicas e Farmacológicas, Aplicações na Quimioterapia a Base de Antimônio. **Quim. Nova**, v. 28, p. 511-518, 2005.
- [89] FRISCH C. et al. **GAUSSIAN 03**, Revision Inc. CT, Wallingford, 2004.
- [90] LIU X.-W. et al. Synthesis, characterization, DNA-binding and photocleavage of complexes $[\text{Ru}(\text{phen})_2(6\text{-OH-dppz})]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{phen})_2(6\text{-NO}_2\text{-dppz})]^{2+}$. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.99, p.2372–2380, 2005.
- [91] FLÜKIGER P.H.P.; LÜTHI S.; PORTMANN J.; WEBER. **MOLEKEL 5.3**. Swiss Center for Scientific Computing, Manno, Switzerland, 2000–2002.
- [92] DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Meth.** v. 89, p. 271-277, 1986.
- [93] MENEZES, P. F. C. et al. Photodynamic therapy for Photogem® and Photofrin® using different lights wavelengths in 375 human melanoma cells. **Laser Phys. Lett.**, v. 4, p. 546-551, 2007.
- [94] CHOU, T.-C.; TALALAY, P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 4, p. 450-454, 1983.
- [95] DYNAROWICZ-ŁATKA, P.; KITA. K. Molecular interaction in mixed monolayers at the air/water interface. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 79, p. 1-17, 1999.
- [96] GAINES Jr., G. L. Thermodynamic relationships for mixed insoluble monolayers. **Journal of colloid and interface science**, v. 21, p. 315-319, 1966.
- [97] GAINES Jr., G. L. The Thermodynamic Equation of State for Insoluble Monolayers: III. Mixed Monolayers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 85, p. 16-18, 1982.
- [98] CADENHEAD, D. A.; MÜLLER-LANDAU F. Molecular accommodation and molecular interactions in mixed insoluble monomolecular films. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 78, p. 269-270, 1980.
- [99] ANDRADE, C.A.S.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; MELO, C.P. de. Thermodynamic characterization of the prevailing molecular interactions in mixed floating monolayers of phospholipids and usnic acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 298, p. 145–153, 2006

-
- [100] MAGET-DANA, R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1462, p. 109-140, 1999.
- [101] HODA, K. et al. Mode of interaction of two fluorinated-hydrogenated hybrid amphiphiles with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) at the air–water interface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 53, p. 37–50, 2006.
- [102] HE, F.; LI, R.-x.; WU, D.-c. Monolayers of mixture of alkylaminomethyl rutin and lecithin at the air/water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 349, p. 215–223, 2010.
- [103] NAGADOME, S. et al. Monolayers (Langmuir films) behavior of multi-component systems composed of a bile acid with different sterols and with their 1:1 mixtures. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 58, p. 121–136, 2007.
- [104] HE, G. et al. Thermodynamic analysis and AFM study of the interaction of palmitic acid with DPPE in Langmuir monolayers. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 441, p. 184–194, 2014.
- [105] HÉNON, S.; MEUNIER, Microscope at the Brewster angle: direct observation of first-order phase transitions in monolayers. **J. Rev. Sci. Instrum**, v. 62, p. 936-939, 1991.
- [106] BLAUDEZ, D. et al. Characterization of Langmuir-Blodgett monolayers using polarization modulated FTIR spectroscopy. **Thin Solid Films**, v. 210/211, p. 648–651, 1992.
- [107] WANG, F.; CHEM, H.; PARKINSON, J.A.; MURDOCH, P.S.; SADLER, P. Reactions of a ruthenium(II) arene antitumor complex with cysteine and methionine. **Inor. Chem.**, v. 41, p. 4509-4523, 2002
- [108] FLORÃO, A.; et al Efeitos do Dimetilsulfóxido sobrea Proliferação de Linfócitos Humanos in vitro. **Lat. Am. J. Pharm.** v. 26, p. 215-23, 2007.
- [109] SINHA, P.K.; CHAKRAVARTY, J.; BHATTACHARYA, S.; Synthesis, characterization, redox properties and reactivities of a group of phenolato complexes of ruthenium(III). **Polyhedron**, v. 16, p. 81-87, 1997.
- [110] DINELLI, R. et al. Synthesis and Characterization of [RuCl₃(P-P)(H₂O)] Complexes; P-P) Achiral or Chiral, Chelating Ditertiary Phosphine Ligands. **Inorg. Chem.**, v.38, p.5341-5345, 1999.
- [111] GRUSHIN, V.V. Synthesis of Hemilabile Phosphine-Phosphine Oxide Ligands via the Highly Selective Pd-Catalyzed Mono-oxidation of Bidentate Phosphines: Scope, Limitations, and Mechanism. **Organometallics**, v. 20, p.3950-3961, 2001
- [112] COLLADON, M.; SCARSO A.; STRUKUL, G. Mild catalytic oxidation of secondary and tertiary amines to nitrones and N-oxides with H₂O₂ mediated by Pt(II) catalysts. **Green Chem.**, v. 10, p.793–798, 2008.

-
- [113] CHEN X. et al. Reorganization and Caging of DPPC, DPPE, DPPG, and DPPS Monolayers Caused by Dimethylsulfoxide Observed Using Brewster Angle Microscopy. **Langmuir**, v. 26, p. 18902-18908, 2010.
- [114] BLOSSER, M.C. et al. Minimal Effect of Lipid Charge on Membrane Miscibility Phase Behavior in Three Ternary Systems. **Biophysical Journal**, v. 104, p. 2629–2638, 2013.
- [115] MENESES, P.; GLONEK, T. High resolution ^{31}P NMR of extracted phospholipids. **Journal of Lipid Research**, v.29, p.679-689, 1988.
- [116] LARIJANIA, B.; POCCIA, D.L.; DICKINSON, L.C. Phospholipid Identification and Quantification of Membrane Vesicle Subfractions by ^{31}P - ^1H Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance. **Lipids**, v. 35, p. 1289-1297, 2000.
- [117] BRATSOS, I.; et al. 1-(2-Picolyl)-substituted 1,2,3-triazole as novel chelating ligand for the preparation of ruthenium complexes with potential anticancer activity. **Dalton Trans.**, v.40, p. 5188–5199, 2011.
- [118] KAMATCHI, T.S. et al. Ruthenium(II)/(III) complexes of 4-hydroxy-pyridine-2,6-dicarboxylic acid with $\text{PPh}_3/\text{AsPh}_3$ as co-ligand: Impact of oxidation state and co-ligands on anticancer activity in vitro. **Dalton Trans.**, v. 41, p. 2066–2077, 2012.
- [119] ROMERO-CANELÓN, I.; SALASSA L.; SADLER, P. J. The contrasting activity of iodido versus chlorido ruthenium and osmium arene azo-and imino-pyridine anticancer complexes: control of cell selectivity, cross-resistance, p53 dependence, and apoptosis pathway. **J. Med. Chem.** v. 56, p. 1291-1300, 2013.
- [120] Disponível em: http://www.biocarta.com/pathfiles/m_eea1Pathway.asp. Acessado em 21 de novembro de 2014
- [121] BREZESINSKI, G.; MÖHWALD H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 100–102, p. 563–584, 2003.
- [122] NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, W. H. Freeman, 2005.
- [123] MANGIAPIA, G. et al. Ruthenium-based complex nanocarriers for cancer therapy. **Biomaterials**. v. 33, p. 3770-3782, 2012.
- [124] SOUTO, C. R. O.; DUARTE, H. C. **Química da vida**. Natal, RN, EDUFRRN, 2006.
- [125] Disponível em: www.chemaxon.com. Acessado em 21 de fevereiro de 2014.
- [126] TSUI, F.C.; OJCIUS, D.M.; HUBBELL, W.L. The intrinsic pKa values for phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in phosphatidylcholine host bilayers. **Biophys. J.**, v. 49, p. 459–468, 1986.

-
- [127] TOUNEKTİ, O. et al. Bleomycinan Apoptosis-mimetic Drug That Induces Two Types of Cell Death Depending on the Number of Molecules Internalized1, **Cancer Res.**, v. 53, p. 5462-5469, 1993.
- [128] MANSOUR, H. et al. Comparison of Bilayer and Monolayer Properties of Phospholipid Systems Containing Dipalmitoylphosphatidylglycerol and Dipalmitoylphosphatidylinositol. **Langmuir**, v. 17, p. 6622-6632, 2001.
- [129] DEMEL, R. A.; PALTAUF, F.; HAUSER, H. Monolayer characteristics and thermal behavior of natural and synthetic phosphatidylserines. **Biochemistry**, v. 26, p. 8659-8665, 1987.
- [130] WYDRO, P. The Magnitude of Condensation Induced by Cholesterol on the Mixtures of Sphingomyelin with Phosphatidylcholines—Study on Ternary and Quaternary Systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, p. 594–601, 2011.
- [131] GOTO, T. E.; CASELI, L.. Understanding the Collapse Mechanism in Langmuir Monolayers through Polarization Modulation-Infrared Reflection Absorption Spectroscopy. **Langmuir**, v. 29, p.9063–9071, 2013.
- [132] STEINKOPF S. et al. Interaction of local anaesthetic articaine enantiomers with brain lipids: A Langmuir monolayer study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 394–401, 2012.
- [133] HAC-WYDRO, K.; ZAJA, A.; DYNAROWICZ-ŁATKA, P. The influence of plant stanol on phospholipids monolayers – The effect of phospholipid structure. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.360, p. 681–689, 2011.
- [134] DAVIES, J. T.; RIDEAL, E. K. **Interfacial Phenomena**, Academic Press, New York 1961.
- [135] FANG, K. et al. Thermodynamic characterization of mixed monolayers of phosphatidylcholine and arachidic acid on different subphases. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 224, p. 53-63, 2003.
- [136] BORDI, F. et al. Influence of temperature on microdomain organization of mixed cationic–zwitterionic lipidic monolayers at the air–water interface. **Colloids Surf. B**, v. 61, p. 304-310, 2008.
- [137] NAGADOME, S. et al. Monolayers (Langmuir films) behavior of multi-component systems composed of a bile acid with different sterols and with their 1:1 mixtures. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 58, p. 121–136, 2007.
- [138] WOHNATH, K. et al. Electrochemical characterization of Langmuir–Blodgett films from the ruthenium complex mer-[RuCl₃(dppb)(4-Mepy). **Thin Solid Films**, v.402, p.272–279, 2002.
- [139] ROMÃO, R.I.S; GONÇALVES DA SILVA A.M. Phase behaviour and morphology of binary mixtures of DPPC with stearonitrile, stearic acid, and octadecanol at the air–water interface. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 131, p. 27–39, 2004.

-
- [140] ROMÃO, R.I.S. et al. Microphase Separation in Mixed Monolayers of DPPG with a Double Hydrophilic Block Copolymer at the Air-Water Interface: A BAM, LSCFM, and AFM Study. **Langmuir**, v. 26, p. 17165–17177, 2010.
- [141] VERGEER, F. W. et al. Ultrathin Luminescent Films of Rigid Dinuclear Ruthenium(II) Trisbipyridine Complexes. **Adv. Funct. Mater.**, v. 16, p. 625-632, 2006.
- [142] VOLLHARDT D. et al. Nanoaggregate shapes at the air-water interfaces. **Phys.Chem.Chem Phys.** v.13, p. 4812-4829, 2011.
- [143] CHEN, X. et al. Reorganization and Caging of DPPC, DPPE, DPPG, and DPPS Monolayers Caused by Dimethylsulfoxide Observed Using Brewster Angle Microscopy. **Langmuir**, v. 26, p. 18902–18908, 2010.
- [144] MENDELSON, R.; FLACH, C. R. **Infrared Reflection–Absorption Spectrometry of Monolayer Films at the Air–Water Interface**. Mid-infrared External Reflection Spectroscopy. John Wiley & Sons Ltd, 2002. p. 1028.
- [145] SACCANI, J. et al. Stabilization of Phospholipid Multilayers at the Air-Water Interface by Compression beyond the Collapse: A BAM, PM-IRRAS, and Molecular Dynamics Study, **Langmuir**, v. 20, p. 9190- 9197, 2004.
- [146] BLAUDEZ, D. et al. Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. **J. Chem. Soc. Faraday Trans**, v. 92, p. 525-530, 1996.
- [147] PAVINATTO, F.J. et al. Cholesterol Mediates Chitosan Activity on Phospholipid Monolayers and Langmuir-Blodgett Films. **Langmuir**, v. 25, p. 10051 –10061, 2009.
- [148] COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIBERLEY, S. E. **Introduction to infrared and Raman spectroscopy**; 3 ed. Academic Press: Boston, 1990.
- [149] RODRIGUES, D.; CAMILO, F. F.; CASELI, L. Cellulase and Alcohol Dehydrogenase Immobilized in Langmuir and Langmuir–Blodgett Films and Their Molecular-Level Effects upon Contact with Cellulose and Ethanol. **Langmuir**, v. 30, p. 1855-1863, 2014.
- [150] LÓPEZ-GARCÍA, F. et al. Infrared spectroscopic study of interaction of diacylglycerol with phosphatidylserine in presence of calcium. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1169, p. 264-272, 1993.
- [151] RONZON, F. et al. Behavior of a GPI-anchored protein in phospholipid monolayers at the air-water interface. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1560, p. 1-13, 2002.
- [152] BLAUDEZ, D. et al. Polarization-Modulated FT-IR Spectroscopy of a Spread Monolayer at the Air/Water Interface. **Applied Spectroscopy**, v. 47, p. 869-874, 1993.
- [153] FRAGNETO, G. et al. Interaction of the Third Helix of Antennapedia Homeodomain with a Deposited Phospholipid Bilayer: A Neutron Reflectivity Structural Study, **Langmuir** v. 16, p. 4581- 4588, 2000.

-
- [154] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O., **Electrochemistry Principles, Methods, and Applications**. Oxford University Press, New York, 1993.
- [155] LU, X. et al. Interaction of Quercetin with Supported Bilayer Lipid Membranes on Glassy Carbon Electrode. **J. Electrochem. Sci.**, v. 3, p. 797 – 805, 2008.
- [156] NAUMOWICZ, M.; PETELSKA, A. D.; FIGASZEWSKI, Z. A. Impedance analysis of a phosphatidylcholine–phosphatidylethanolamine system in bilayer lipid membranes. **Electrochimica Acta**, v. 51, p. 5024–5028, 2006.
- [157] BARD, A.J.; FAULKNER, L.R. **Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications**. John Wiley & Sons, NY, 2001.
- [158] HOYO, J. et al. Electrochemical behaviour of mixed LB films of ubiquinone – DPPC. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 669, p. 6–13, 2012.
- [159] SANDRINO B. **Estudo do Complexo *mer*-[RuCl₃(dppb)(VPy)]: Síntese, Caracterização e Potenciais Aplicações**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2010.
- [160] YANG, J.; KLEIJN, M. Order in phospholipid Langmuir-Blodgett layers and the effect of the electrical potential of the substrate. **Biophys. J.**, v. 76, p. 323–332, 1999.
- [161] DU L. et al. A study on the interaction between ibuprofen and bilayer lipid membrane. **Electrochimica Acta**, v. 51, p. 5754–5760, 2006.
- [162] WU, Z. et al. A facile approach to immobilize protein for biosensor: self-assembled supported bilayer lipid membranes on glassy carbon electrode. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, p. 47–52, 2001.
- [163] SUN, Y.; BAI, Y.; YANG, W.; SUN, C. Controlled multilayer films of sulfonate-capped gold nanoparticles/thionine used for construction of a reagentless bienzymatic glucose biosensor. **Electrochimica Acta**, v. 52, p. 7352–7361, 2007.
- [164] SI, P. et al. Highly stable and sensitive glucose biosensor based on covalently assembled high density Au nanostructures. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 3845–385, 2011.
- [165] HALL, E.A.H.; SKINNER, N.G.; JUNG, C.; SZUNERITS, S. Investigating polymers and conducting metals as transduction mediators or immobilization matrices. **Electroanalysis**, v. 7, p. 830–837, 1995.
- [166] PAULA, M.M.S.; ZANINI, L.C.; MARTINI, E.; FRANCO, C.V. Preparação e caracterização de eletrodos de Pt e Pd modificados por poli-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]}} empregando espectroscopia de impedância eletroquímica. **Revista Matéria**, v. 13, n. 2, p. 348 – 356, 2008.
- [167] GUIDELLI, R. et al. New Directions and Challenges in Electrochemistry - Bioelectrochemistry at metal _ water interfaces. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 504, p.1–28, 2001.

-
- [168] ZHENG L. et al. Bilayer lipid membrane biosensor with enhanced stability for amperometric determination of hydrogen peroxide. **Talanta**, v. 85, p. 43–48, 2011.
- [169] SWIETLOW, A.; SKOOG, M.; JOHANSSON, G.; Double-Layer Capacitance Measurements of Self-Assembled Layers on Gold Electrodes. **Electroanalysis**, v.4, p.921-928, 1992.
- [170] FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA O. G. F., DEMICHELI, C. Lipossomas: Propriedades Físico-Químicas E Farmacológicas, Aplicações Na Quimioterapia À Base De Antimônio. **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.
- [171] MINÕES JR., J.; et al. Miscibility of Amphotericin B-Dipalmitoyl Phosphatidyl Serine Mixed Monolayers Spread on the Air/Water Interface. **J. Phys. Chem. B**, v.107, p.4189-4195, 2003.
- [172] GERALDO, V.P.; MORAES, M.L.; ZUCOLOTTI, V.; OLIVEIRA JR., O.N. Immobilization of ibuprofen-containing nanospheres in layer-by-layer films. **J Nanosci Nanotechnol**. v.11, p.1167-74, 2011.
- [173] QUEIROZ S. L. et al. The reactivity of five-coordinate Ru (II) (1,4-bis (diphenylphosphino) butane) complexes with the N-donor ligands: ammonia, pyridine, 4-substituted pyridines, 2,2'-bipyridine, bis(o-pyridyl)amine, 1,10-phenanthroline, 4,7-diphenylphenanthroline and ethylenediamine. **Inorganica Chimica Acta**, v. 267, p. 209-221, 1998.
- [174] NISNEVITCH, M.; NAKONECHNY, F.; NITZAN, Y. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy By Liposome_Encapsulated. **Bioorganicheskaya Khimiya**, v. 36, p. 396–402, 2010.
- [175] COCERA, M.; LOPES, O.; CODERCH, L.; PARRA, J. L.; MAZA, A. Permeability investigations of phospholipid liposomes by adding cholesterol. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**. v. 221, p. 9 -17, 2003.
- [176] SAVA, G.; ALESSIO, E.; BERGAMO, E.; MESTRONI, G. Sulfoxide Ruthenium Complexes: Non-Toxic Tools for the Selective Treatment of Solid Tumour Metastases. **Top. Biol. Inorg. Chem.**, v. 1, p. 143-169, 1999.