



UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA

Estudo da Actividade Anti-tumoral de Complexos Organometálicos de Ferro

Andreia Filipa Ramos Fernandes

Bioquímica

2010

Índice

Resumo.....	2
Objectivo	3
Introdução	4
Ferroceno.....	4
Compostos organometálicos como drogas antitumorais	6
<i>Cis</i> -platina	6
Doxorrubicina	7
Ferrocifen e outras aplicações do ferroceno.....	8
Cancro	9
Materiais e Métodos.....	11
Síntese e caracterização dos complexos organometálicos.....	11
Compostos organometálicos de ferro estudados	11
Linha Celular.....	14
Manutenção da Cultura Celular.....	14
Preparação do meio de crescimento da cultura celular	15
Manutenção de culturas celulares / tripsinização	15
Contagem de células.....	16
Preparação de microplacas de 96 poços.....	16
Preparação/aplicação das soluções dos complexos organometálicos.....	16
Ensaio do MTT – (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-ilo)2,5-difeniltetrazólio).....	17
Resultados e Discussão	18
Conclusões	23
Perspectivas Futuras.....	24
Bibliografia	25
Anexos.....	28

Resumo

Estudos anteriores demonstraram que os complexos organometálicos de ferro possuem boas actividades anti-tumorais. A reacção de FcCOCl ($\text{Fc} = (\text{C}_5\text{H}_5)\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_4)$) com benzimidazole, imidazole ou 4-Cl-anilina numa razão de 1:1 dá origem a complexos de ferroceno, nomeadamente o ferrocenoilbenzimidazole, ferrocenoilimidazole e ferrocenoil-4-Cl-anilina.

Após a síntese dos derivados de ferroceno realizou-se a respectiva caracterização recorrendo a técnicas espectroscópicas (FTIR e ^1H RMN).

Seguidamente, procedeu-se à análise citotóxica dos complexos na linha celular HeLa (linha celular derivada do cancro do colo do útero). As células foram incubadas com os compostos numa gama de concentrações (1 a 250 μM) durante 48 horas, sendo o efeito antiproliferativo medido pelo ensaio do MTT. Através dos valores de IC_{50} obtidos para os diferentes compostos que variam entre 34.4 e 107.7 μM , pode afirmar-se que estes apresentam actividade inibitória. O ferrocenoil-4-Cl-anilina (complexo 4) é o derivado de ferroceno com maior capacidade inibitória da actividade celular e como tal, dentro dos compostos testados, o melhor candidato a droga anti-cancerígena pois apresenta o menor valor de IC_{50} .

Objectivo

Com este trabalho pretende-se contribuir para o aumento do conhecimento na área dos compostos organometálicos com potencial acção antitumoral, nomeadamente os derivados de ferroceno.

Assim, pode-se subdividir o trabalho em duas partes. Na primeira fase pretende-se sintetizar três complexos de ferroceno: ferrocenoilbenzimidazole, ferrocenoilimidazole e ferrocenoil-4-Cl-anilina partindo de um precursor – o cloreto de ferrocenoilo. Foram depois caracterizados por espectroscopia de Infravermelho (FTIR) e de Ressonância Magnética Nuclear de protão (RMN). O trabalho de síntese é feito em atmosfera inerte (linha de vácuo e azoto).

Na segunda fase, tem-se como objectivo avaliar a actividade citotóxica por meio da utilização do ensaio de MTT e deste modo contribuir para o conhecimento do efeito de acção de compostos derivados de ferroceno em linhas tumorais, nomeadamente a HeLa. Os resultados foram expressos em IC_{50} (Concentração de composto necessária para inibir o crescimento celular em 50%).

Introdução

A base deste trabalho será a química inorgânica medicinal, que tem vindo a aprofundar a aplicação de complexos metálicos como drogas terapêuticas há mais de 5000 anos.^[40] Dentro dos complexos estudados, os iões metálicos mais utilizados são a platina (II), o ouro (I) e ouro (III), o ruténio (III), o bismuto (III), o cobre (II) e o ferro (II) (ião metálico utilizado neste trabalho).^[39]

Existe uma série de factores que favorecem o desenvolvimento dos compostos organometálicos como candidatos a fármacos, nomeadamente as propriedades de coordenação e *redox* dos iões metálicos (presença de diferentes estados de oxidação) e a solubilidade proporcionada pelos ligandos aos quais estão coordenados.^[13, 19, 21, 35 e 37]

A investigação destas drogas terapêuticas liga duas áreas, a química inorgânica e a bioquímica, de modo a compreender os efeitos citotóxicos dos complexos organometálicos.^[28] Com esta multidisciplinaridade, pretende-se obter um crescente nível de compreensão de mecanismos tais como as alterações das proteínas alvo do complexo, fenómenos de resistência e ainda previsão de toxicidade.^[26,27,28,41]

O facto de, na maioria dos casos, os centros metálicos assumirem carga positiva e antagonicamente algumas biomoléculas terem carga negativa (caso do DNA), leva a que os últimos sejam excelentes alvos terapêuticos.^[7,23] A toxicidade associada aos centros metálicos pode contudo ser excessiva, tornando estes compostos pouco viáveis.^[4] Um dos mecanismos de acção especulados para agentes bio-organometálicos envolve a activação destes pela quebra da ligação metal-ligando com posterior libertação do componente activo.^[42]

Assim, um objectivo fundamental é desenvolver complexos organometálicos selectivos para tecidos tumorais e em quantidade mínima para inibir a população celular. Neste caso, derivados de ferroceno como candidatos a drogas anti-cancerígenas, sendo que já foram desenvolvidos muitos estudos nesse âmbito que servem como base ao trabalho presente.^[42]

Ferroceno

Datam de 1951 os primeiros artigos publicados sobre a preparação do composto $C_{10}H_{10}Fe$ (só mais tarde chamado de ferroceno).^[9] Pode dizer-se que a química organometálica moderna ficou assim lançada.^[2, 30]

O ferroceno, di-(η^5 -ciclopentadienilo)ferro(II) ^[33], é um composto organometálico neutro, estável, não tóxico e a membrana celular é-lhe permeável.^[8, 34] Tem interessantes propriedades *redox* que lhe permitem facilmente sofrer uma reacção de oxidação para formar o catião correspondente, como mostra a figura seguinte (Fig. 1).^[10, 33]

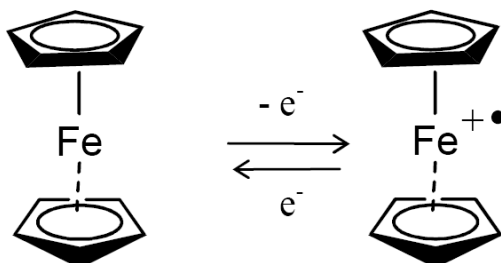


Fig. 1: Estrutura química do par *redox* ferroceno/catião ferricínio.

O ferroceno é constituído por um Fe(II) coordenado a dois anéis de ciclopentadienilo, tomando a forma de uma “sanduíche”. Tem grande estabilidade devido a obedecer à regra dos 18 electrões. Assim, uma vez que na sua forma catiónica tem um electrão desemparelhado numa das duas orbitais anti-ligantes e_2g , torna-se numa espécie de radical livre estável.

Na figura acima (Fig. 1) observa-se a interconversão do composto organometálico do estado de oxidação 2+ [Fe(II) - ferroceno] para o estado de oxidação 3+ [Fe(III) – ião ferricínico].^[7, 33] Dentro das células, o Fe(II) existe em equilíbrio com Fe(III), sendo este equilíbrio determinado pelo potencial electroquímico do par Fe^{2+}/Fe^{3+} . Este, por sua vez pode ser influenciado pelos substituintes do metaloceno. A transferência electrónica entre os dois ocorre rápida e reversivelmente e precisa da contribuição de outros pares *redox* biológicos, visto que ocorre entre Fe^{2+}/Fe^{3+} e outros dadores/aceitadores electrónicos biológicos. No decurso destas reacções são formados radicais livres que resultam na actividade antiproliferativa, aumentando esta se as modificações estruturais resultarem numa diminuição do potencial de redução para o Fe^{2+}/Fe^{3+} .

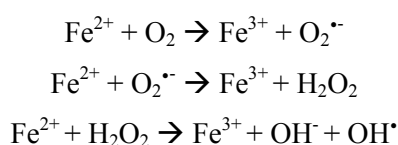
Várias investigações demonstraram que não há diminuição da actividade citotóxica nos ferrocenos não substituídos.^[12, 35] Contudo, alguns ferrocenos substituídos apresentam-na.^[27]

A fácil inclusão dos iões metálicos na molécula, ou seja, a introdução de grupos com capacidades de coordenação, permite à fracção de ferrocenoilo tornar-se um ligando organometálico, que poderá por sua vez ligar-se a outros centros metálicos de modo a aumentar as suas propriedades antiproliferativas. Esta fracção de ferroceno pode funcionar como um espaçamento hidrófobo inerte, ou seja, como um grupo fenilo ou alquilo isostéreo, cuja presença em moléculas aumenta a lipofilicidade e conseqüentemente a permeabilidade dentro das células.

A baixa solubilidade em água do ferroceno e de vários compostos seus derivados pode ser a maior desvantagem no decurso da sua análise ou aplicação.^[43]

Nos mamíferos, o ferro é transportado e armazenado por proteínas específicas (transferrinas) que evitam o contacto entre o metal e o oxigénio que circula no corpo, de forma a evitar a produção anormal de espécies reactivas de oxigénio (ROS), altamente nocivas para as células quando em excesso. Com base na reacção de Fenton - Haber, o catião sofre reacções de recombinação com outros radicais livres que podem vir a formar compostos de ferroceno substituído e sem carga levando à oxidação de lípidos, proteínas e DNA. Assim, o ferroceno está directamente relacionado com a actividade antiproliferativa. O ferroceno é biologicamente acessível à oxidação por reacção com H_2O_2 , enquanto a redução do catião ferricínico pode ser mediada por NADH e metaloproteínas.^[22]

Os efeitos genotóxicos no DNA podem ser explicados por uma reacção de Fenton - Haber:



Sabe-se que o anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) estão presentes em elevadas quantidades em diversos cancros, e portanto, o papel das espécies radicalares na iniciação, progressão e controlo das lesões cancerígenas tem sido um foco na investigação sobre a doença.

Compostos organometálicos como drogas antitumorais

Essenciais ao organismo, os metais, entre eles o ferro, começaram a ser usados para o fabrico de fármacos desde o início do século XX. Cronologicamente, Köpf-Maier, em 1984, observou, pela primeira vez, a actividade anti-tumoral de compostos ferrocénicos *in vivo* e *in vitro*, em células do tumor ascítico de Elrich (EAT)^[17], sendo que essas células apresentavam considerável resistência a agentes antitumorais clássicos.^[25] Desde então, muitos cientistas focaram a sua atenção na síntese de compostos organometálicos, concluindo quanto à sua actividade anti-cancerígena.

Cis-platina

Um dos complexos exhaustivamente estudado é a *cis*-platina (*cis*-diaminodichloroplatina (II), *cis*-Pt(NH₃)₂Cl₂), descoberta nos anos 70 por Rosenberg.^[34] A *cis*-platina é o fármaco mais potente na terapia do cancro, sendo que, se o tumor for detectado precocemente é tratável em 100% dos casos. É impressionantemente activa contra o cancro nos testículos. Apesar do seu

modo de acção ainda não estar completamente compreendido, pensa-se que a sua acção se dá no DNA através da ligação aos átomos N-7 das purinas que estão colocados na volta maior da dupla hélice e não estão envolvidos nas ligações de hidrogénio dos pares de bases. Desta ligação resultam danos na molécula levando assim à morte celular.^[43]

Contudo, este composto apresenta efeitos secundários muito agressivos, para além de que muitos dos cancros humanos têm uma resistência inata ou adquirida durante o tratamento à *cis*-platina. Como tentativa de ultrapassar estas limitações alguns análogos foram sintetizados, nomeadamente a carboplatina, a oxaliplatina, a lobaplatina, a satraplatina e a nedaplatina. (Fig. 2)^[21]

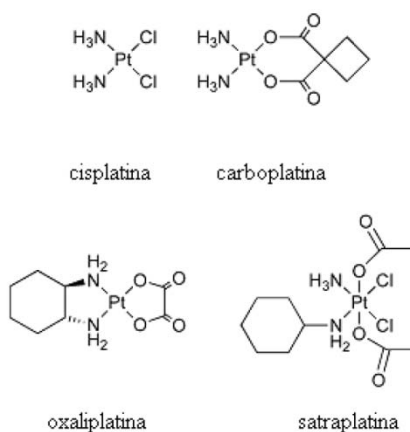


Fig. 2: Representação da estrutura química dos complexos anti-cancerígenos de platina (II) (cisplatina, carboplatina e oxaliplatina) e da satraplatina.

Doxorrubicina

Um outro fármaco amplamente utilizado na quimioterapia do cancro é a doxorrubicina (nome comercial adriamicina).^[5] É da família das antraciclina, com uma relação estrutural perto da daunomicina, sendo como esta última um intercalante do DNA. Assim, promove a apoptose, bloqueando o ciclo celular.

A doxorrubicina é também um poderoso quelante de ferro. O complexo ferro-doxorrubicina pode ligar-se ao DNA e às membranas celulares provocando a sua clivagem através da formação de radicais livres. Contudo, mais uma vez, estes complexos apresentam um elevado perfil de toxidade e efeitos colaterais prejudiciais (mielosupressão, cardiotoxicidade e alopecia).^[5]

Ferrocifen e outras aplicações do ferroceno

Uma das primeiras aplicações dos compostos organometálicos de ferro ao nível da investigação do cancro foi realizada com o objectivo de tentar colmatar algumas lacunas que uma droga já antes sintetizada – o tamoxifeno – apresentava no tratamento do cancro da mama. Este composto tem actividade anti-estrogénica causada pela ligação competitiva ao receptor de estrogénio (ER), que resulta na repressão da transcrição de DNA mediada pelo estradiol no tecido tumoral. Contudo, algumas células do cancro da mama não expressam ER e como tal são resistentes à droga. Também a elevada exposição ao fármaco pode resultar na resistência, neste caso adquirida pelas células tumorais. Uma outra limitação deste fármaco prende-se com o aumento do risco de formação de coágulos nos pulmões, para além de que, é não-hormonal. Assim, ao acoplar-se o ferroceno, este vai facilitar a captura celular, provocando o aumento da citotoxicidade. Este novo composto, resultante do acoplamento, toma o nome de ferrocifen e está representado na figura seguinte (Fig 3).^[35]

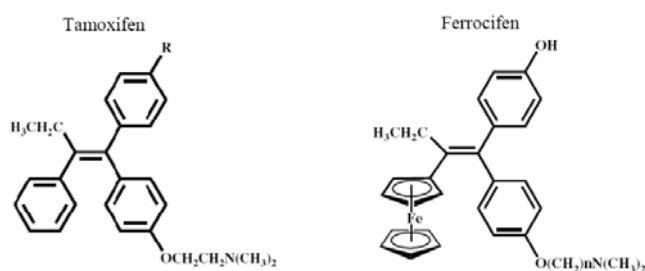


Fig. 3: Estruturas químicas do Tamoxifen e Ferrocifen

O ferrocifen foi o primeiro composto a apresentar actividade anti-cancerígena em linhas tumorais de cancro da mama de origem hormonal e não-hormonal.

Foi detectada alguma actividade antitumoral no ião de ferroceno, e apesar dos resultados não terem ainda sido compreendidos, são promissores o suficiente para serem estendidos ao desenho de sistemas. De facto, quando um ferroceno é introduzido em certas moléculas, a sua actividade citotóxica é aumentada.^[41] Assim, diversos compostos contendo ferroceno, têm sido sintetizados e usados na quimioterapia de cancros resistentes a drogas e em doenças tropicais.^[1]

Para além da sua efectiva actividade como anti-tumoral, os compostos ferrocénicos têm também interessantes propriedades anti-maláricas e anti-fúngicas.

Concluindo, o grande número de aplicações dos derivados de ferroceno em campos desde materiais de óptica não linear, sensores electroquímicos, cristais líquidos, catálise e nanopartículas, contribuíram para um grande interesse na sua química.^[31, 32, 40] Uma outra aplicação destes complexos é na inibição do integrase do HIV-1.^[6]

Cancro

O cancro (ou neoplasia) é um grupo de doenças que resultam de uma desregulação do ciclo celular.^[11] Note-se que o equilíbrio entre células vivas e células mortas é assegurado por um processo denominado por apoptose (conjunto de mudanças morfológicas discretas que levam à morte da célula, com a destruição inerente do DNA, compactação e segregação da cromatina ao longo da membrana nuclear).^[17] Quando este processo falha, tem-se uma perda progressiva da diferenciação celular e um crescimento celular descontrolado e como tal a formação de um tumor (Fig. 4).^[14]

Na síntese de drogas anti-tumorais dá-se particular atenção à quantificação da apoptose, uma vez que esta pode ser provocada por condições de stress oxidativo ou em consequência da exposição a agentes tóxicos. Visto que se sabe que a maioria das células tumorais tem um tempo de vida curto, sendo a sobrevivência daquelas que não respondem à apoptose superior, pode-se jogar com essa característica no desenho de fármacos.^[16, 38] Assim sendo, um dos focos das descobertas na área da oncologia é de identificar moléculas importantes na regulação da apoptose das células tumorais.^[23, 26]

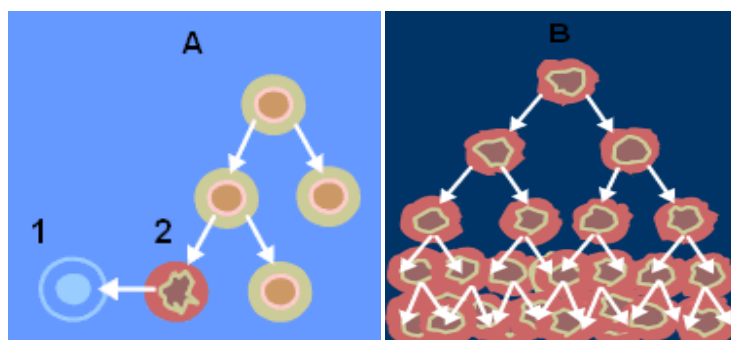


Fig. 4: A – Célula danificada (2) e consequente eliminação (1); B – Células cancerígenas não sofrem apoptose, proliferando de modo desregulado.^[45]

Assim, pode dizer-se que o cancro é caracterizado pela proliferação celular descontrolada e pela capacidade dessas novas células invadirem outros tecidos e tem várias origens, sendo promovido tanto por factores internos como por factores externos. Quanto aos últimos pode salientar-se o uso de drogas ou tabaco, organismos infecciosos, alimentação, químicos e radiação.^[20] Relativamente a factores internos, tem-se a componente genética, hormonal, condições imunológicas e mutações que decorrem do metabolismo celular.^[3]

As células tumorais divergem das células normais em vários aspectos, entre eles, a perda de diferenciação, aumento da capacidade de invasão e diminuição da sensibilidade a drogas; quimicamente, apresentam um pH mais baixo, maior percentagem de potássio e água, menor percentagem de cálcio, grande produção de radicais livres e maior número de nucleótidos metilados. Do grupo de características que tornam estas células tão nocivas para o organismo,

consta o seu potencial replicativo ilimitado resultante do facto de serem auto-suficientes no que diz respeito a sinais de crescimento e das suas capacidades de paragem da proliferação celular e de apoptose diminuída. Para além destas, apresentam ainda angiogénese sustentada, capacidade de se auto-sustentar com oxigénio e nutrientes transportados pelos novos vasos sanguíneos formados; invasão de tecidos e metastização (a massa tumoral inicial semeia as suas células que vão ao encontro de outros tecidos formando novas colónias). Deste modo, conclui-se que uma população celular neoplásica não é uma entidade estática.

As células cancerígenas podem surgir em fluidos ou em tecidos sólidos.

Por tudo o que já se referiu anteriormente, o cancro é uma das principais causas de morte dos países desenvolvidos, só antecedida pelas doenças cardiovasculares. Estima-se que em 2030, 12 milhões de pessoas morrerão com cancro. Ainda assim, se a doença for detectada precocemente existe uma grande probabilidade de cura.

O tratamento do cancro envolve várias áreas, nomeadamente: a quimioterapia, a radioterapia, terapias hormonais, de suporte e biológicas, a cirurgia e transplantes de medula óssea. A quimioterapia é um ramo da química inorgânica medicinal e baseia-se no uso de drogas citotóxicas para destruir as células tumorais.^[29] A sua utilização depende do tipo de cancro, da sua origem, do seu aspecto e das metástases. Apesar dos benefícios desta terapia, esta também acarreta riscos, nomeadamente a toxicidade do metal.^[18]

As maiores limitações da quimioterapia na actualidade são: falta de especificidade de célula, abrangendo as células de forma indiscriminada; solubilidade em água inadequada que pode comprometer a correcta distribuição da droga e expô-la à acção dos macrófagos; tempo de vida curto como consequência do catabolismo, da acção do sistema reticuloendotelial ou de sistemas de excreção eficazes; carga superficial da droga que pode inibir a penetração através da membrana plasmática ou a entrada na célula por difusão passiva; resistência à droga como consequência de características inatas ou adquiridas e toxicidade.

Actualmente existem vários tipos de drogas anti-cancerígenas, como os agentes alquilantes, antimetabolitos, agentes intercalantes de DNA e inibidores de mitose.

Materiais e Métodos

Síntese e caracterização dos complexos organometálicos

A síntese dos complexos foi feita em atmosfera inerte (linha de vácuo e azoto) usando técnicas de tubos de Schlenk. Os complexos cloreto de ferrocenoilo (1), ferrocenoilbenzimidazole (2) e ferrocenoilimidazole (3) foram sintetizados de acordo com procedimentos da literatura.^[40]

Os espectros de infravermelho foram obtidos num espectrofotómetro Mattson 7000 FT, sendo as amostras preparadas em pastilhas de KBr. Os espectros de ¹H RMN foram feitos num espectrofotómetro Bruker Avance-400 em CDCl₃. Os espectros obtidos encontram-se em Anexo.

Compostos organometálicos de ferro estudados

- **Cloreto de Ferrocenoilo** $[(\eta^5 - C_5H_5)Fe(\eta^5 - C_5H_4COCl)]$ – complexo 1

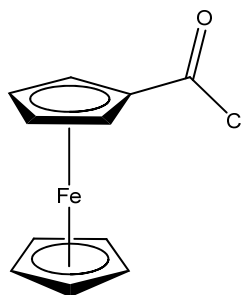


Fig. 5: Estrutura química do Cloreto de Ferrocenoilo.

- **Ferrocenoilbenzimidazole** $[(\eta^5 - C_5H_5)Fe(\eta^5 - C_5H_4CON_2C_7H_5)]$ – complexo 2

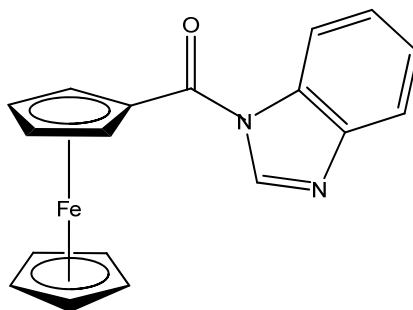


Fig. 6: Estrutura química do Ferrocenoilbenzimidazole.

- **Ferrocenoilimidazole** $[(\eta^5 - C_5H_5)Fe(\eta^5 - C_5H_4CON_2C_3H_3)]$ – complexo 3

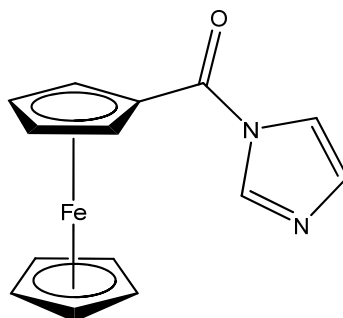


Fig. 7: Estrutura química do Ferrocenoilimidazole.

- **Ferrocenoil-4-Cl-anilina** $[(\eta^5 - C_5H_5)Fe(\eta^5 - C_5H_4CONHC_6H_4Cl)]$ – complexo 4

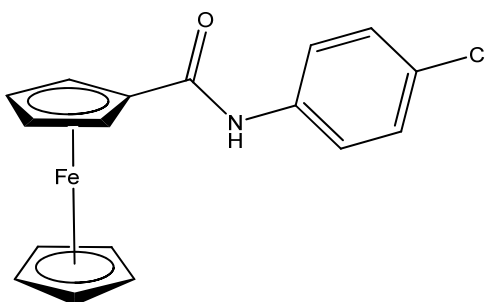


Fig. 8: Estrutura química do Ferrocenoil-4-Cl-anilina.

i) Preparação do FcCOCl (1)

Adicionou-se gota-a-gota cloreto de oxalilo (CO_2Cl_2) (solução 2 M em CH_2Cl_2 , 21.9mmol, 11mL) a uma solução de CH_2Cl_2 de FcCOOH (7.3mmol, 1.679g) a $0^\circ C$ (suspensão laranja, sob N_2). Deixou-se sob agitação durante a noite (suspensão vermelha escura). Seguiu-se um refluxo de 2 horas. Evaporou-se o solvente. Adicionou-se 20mL de pentano e filtrou-se sob celite. Repetiu-se a adição de pentano até que a solução deixou de ter coloração. Por fim, evaporou-se o solvente e guardou-se o sólido sob N_2 , no frigorífico e protegido da luz.

Espectro de infravermelho (KBr, v/cm^{-1}): 3102 (v_{C-H}), 1670 ($v_{C=O}$), 1474 (v_{C-C}), 801 (π_{C-Cl}), 509 (v_{Fe-cp}), 480 (v_{Fe-cp}).

Espectro de 1H RMN ($CDCl_3$, ppm): 4.31 (s, Hc, 5H), 4.65 (d, Hb, 2H), 4.95 (d, Ha, 2H).

ii) Preparação do FcCO(benzim) (2)

O benzimidazole (0.118g, 1mmol) e NEt_3 (1mL) foram adicionados a uma solução de FcCOCl (0.248g, 1mmol) em CH_2Cl_2 (10mL), a 0° , sob azoto e em agitação. Após agitação durante a noite, uma solução aquosa saturada de NaHCO_3 (20mL) foi adicionada à mistura. As fases foram separadas e a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro. Após a filtração, o volume do solvente era diminuído e adicionou-se *n*-hexano. Uma semana mais tarde, a mistura foi filtrada e os cristais vermelhos foram isolados, lavados com 3 x 10mL de *n*-hexano e secos sob vácuo.

Espectro de infravermelho (KBr, ν/cm^{-1}): 3114 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1674 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1608 ($\nu_{\text{C=N}}$), 1442 ($\nu_{\text{C-C}}$), 1355 ($\nu_{\text{C-N}}$), 1304 ($\nu_{\text{C=C}}$), 999 ($\nu_{\text{C-H}}$), 821 ($\pi_{\text{C-H}}$), 450 ($\nu_{\text{Fe-cp}}$).

Espectro de ^1H RMN (CDCl_3 , ppm): 8.77 (s, Hd, 1H), 8.198 (dd, Hi, 1H), 7.814 (dd, Hf, 1H), 7.407 (m, Hg/Hh, 2H), 4.953 (t, Ha, 2H), 4.645 (t, Hb, 2H), 4.292 (s, Hc, 5H).

iii) Preparação do FcCO(im) (3)

O imidazole (0.136g, 2mmol) e NEt_3 (2mL) foram adicionados a uma solução de FcCOCl (0.496g, 2mmol) em CH_2Cl_2 (10mL), a 0° , sob azoto e agitação. Após agitação durante a noite, foi adicionada uma solução aquosa saturada de NaHCO_3 (20mL) à mistura. As fases foram separadas e a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro. Após filtração, o volume do solvente era reduzido e adicionou-se *n*-hexano. Duas semanas mais tarde, a mistura foi filtrada e os cristais vermelhos foram isolados, lavados com 3 x 10mL de *n*-hexano e secos sob vácuo.

Espectro de infravermelho (KBr, ν/cm^{-1}): 3117 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1680 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1445 ($\nu_{\text{C-C}}$), 1365 ($\nu_{\text{C-N}}$), 1305 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1015 ($\nu_{\text{C-H}}$), 821 ($\pi_{\text{C-H}}$), 502 ($\nu_{\text{Fe-cp}}$), 482 ($\nu_{\text{Fe-cp}}$).

Espectro de ^1H RMN (CDCl_3 , ppm): 8.38 (m, Hd, 1H), 7.66 (t, He, 1H), 7.12 (m, Hf, 1H), 4.91 (m, Ha, 2H), 4.64 (t, Hb, 2H), 4.27 (s, Hc, 5H).

iv) Preparação do FcCO(4-Cl-Anilina) (4)

Os reagentes 4-Cl-anilina (0.2669g, 2mmol) e NEt_3 (2mL) foram adicionados a uma solução de FcCOCl (0.496g, 2mmol) em CH_2Cl_2 (10mL), a 0° , sob azoto e agitação. Após agitação durante a noite, foi adicionada uma solução aquosa saturada de NaHCO_3 (20mL) à mistura. As fases foram separadas e a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro. Após filtração, o volume do solvente era reduzido e adicionou-se *n*-hexano. Uma semana mais tarde, a mistura foi filtrada e os cristais vermelhos isolados, lavados com 3 x 10mL de *n*-hexano e secos sob vácuo.

Espectro de infravermelho (KBr, ν/cm^{-1}): 3461 (ν_{N-H}), 3106 (ν_{C-H}), 1641 ($\nu_{C=O}$), 1442 (ν_{C-C}), 1105 (ν_{C-N}), 1309 ($\nu_{C=C}$), 1086 (ν_{C-H}), 820 (π_{C-H}), 801 (π_{C-Cl}), 506 (ν_{Fe-ep}), 484 (ν_{Fe-ep}).

Espectro de 1H RMN ($CDCl_3$, ppm): 7.57 (dd, He/Hf, 2H), 7.37 (s, Hd, 1H), 7.34 (dd, Hg/Hh, 2H), 4.79 (dd, Ha, 2H), 4.46 (dd, Hb, 2H), 4.28 (s, Hc, 5H).

Linha Celular

Foi utilizada uma linha celular humana, derivada de células do epitélio do adenocarcinoma humano do colo do útero (HeLa). Esta linha provém de uma cultura primária e tem capacidade de se multiplicar indefinidamente, desde que se criem as condições apropriadas para o seu crescimento e proliferação (duplicação em cerca de 24 h). As células HeLa são muito tolerantes, sobrevivendo em condições adversas e não possuem inibição por contacto.

Têm uma aparência fenotópica tipicamente epitelial, como mostra a figura abaixo (Fig. 9).

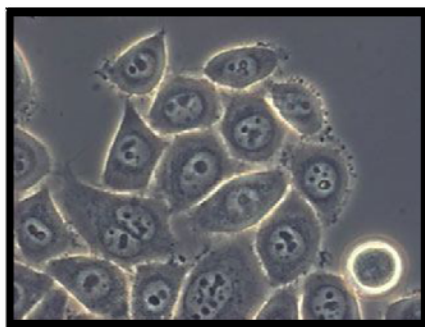


Fig. 9: Imagem morfológica da linha celular HeLa.

Manutenção da Cultura Celular

Como o nome indica, na manutenção da cultura celular pretende-se permitir o crescimento de células, *in vitro*. Para tal, tem de ser controlada uma série de factores, de modo a manter a condição de assepsia. Assim, todos os testes citotóxicos são efectuados numa sala isolada, equipada com uma câmara de fluxo laminar (Esco, classe II), uma incubadora de CO_2 (Shel Lab) e um microscópio óptico (Motic).

A câmara é essencial para trabalhar em condições de esterilidade, pondo de parte a possibilidade de uma contaminação que iria comprometer a viabilidade celular e por outro lado protegendo o experimentalista, que deste modo fica protegido durante o manuseio das células tumorais. Note-se ainda que o utilizador deverá usar bata e luvas descartáveis. Uma outra obrigatoriedade na manutenção da esterilidade prende-se com a constante utilização de álcool a 70% (nas luvas e em qualquer material que entre na câmara de fluxo), percentagem indicada de modo a desinfectar sem causar riscos de combustão. Relativamente aos materiais que entram na câmara, quando não são estéreis, devem ser desinfectados com lixívia depois de cada utilização

e submetidos à autoclave. É ainda de ter em conta que a câmara deve estar o mais desimpedida possível de modo a não perturbar o fluxo.

No que diz respeito à incubadora de CO₂ esta permite a proliferação da cultura celular uma vez que mantém um ambiente constante e reprodutível para o seu crescimento: temperatura de 37°C, humidade relativa de 90 % e concentração de CO₂ de 5 %, assegurando assim um pH de 7,0-7,2.

Já o microscópio óptico permite ao experimentalista o controlo do crescimento da cultura celular e no caso de uma contaminação a sua detecção.

Preparação do meio de crescimento da cultura celular

Devem fazer parte do meio de cultura aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos, proteínas e antibióticos.

Procedimento: previamente, aqueceram-se todas as soluções que iriam ser utilizadas no processo à temperatura óptima celular – 37 °C. Seguidamente, adicionou-se a 500 ml de meio RPMI 1640 (Lonza) 10% de soro fetal de bovino (cerca de 50 ml de FBS, Cambrex). Por fim, juntou-se 5% de L-glutamina (Lonza) ($2,10^{-3}$ mol/dm⁻³) e 5% de antibiótico (P/S: penicilina/estreptomicina, Lonza).

Manutenção de culturas celulares / tripsinização

O enzima tripsina tem a capacidade de quebrar as ligações das proteínas de suporte, facilitando a sua descolagem. Assim, quando as células apresentam cerca de 80-90 % de confluência, faz-se a passagem de células saudáveis para novas placas.

Procedimento: previamente aqueceram-se todas as soluções que iriam ser utilizadas no processo à temperatura óptima celular – 37 °C e verificou-se que a placa se encontrava com cerca de 80-90% de confluência celular. Removeu-se o meio anteriormente em contacto com a cultura celular, com o cuidado de não retirar por toque células agarradas. Lavou-se a cultura com 2mL de PBS (Lonza) para remover quaisquer resíduos de meio ou células mortas em suspensão ainda existentes, retirando no fim a totalidade da solução. Seguidamente, adicionou-se 2mL de tripsina (para hidrolisar as ligações das proteínas de adesão à superfície da placa) e incubaram-se as culturas durante 5 minutos na estufa em ambiente controlado (37 °C, 5% CO₂, Shel Lab), de modo a soltar cerca de 90% das células. Adicionou-se 4mL de PBS para libertar as restantes células e ressuspendeu-se num tubo falcon de 15mL (*OrTube*, Orange Scientific). Distribuiu-se por cada nova placa cerca de 1/3 da suspensão celular e perfez-se com meio RPMI 1640 suplementado o volume final desejado: 10mL para uma caixa de petri de 100 mm (Orange Scientific) e 15mL para um frasco *OrCap* de 150cm² (Orange Scientific).

Contagem de células

Para a contagem de células, ressuspendeu-se bem a solução celular obtida após a tripsinização, de modo a evitar aglomerados celulares ou sedimentação, e retirou-se uma pequena amostra homogénea (cerca de 20 μ L). Dividiu-se a amostra pelas duas câmaras de contagem existentes (1,0 \times 10⁴mL) no hematocítmetro e colocou-se no microscópio óptico. Seguidamente iniciou-se a contagem do número de células presentes na grelha mais densa (125 \times 125 quadrículas) em cada câmara de contagem, com o auxílio dum contador estatístico, e efectuou-se a média entre as duas contagens, para obter o número de células por mL. O número total de células foi obtido através da expressão:

$$\text{Total células/mL} = \text{Média de número de células contadas} \times 1\text{mm}^2 \times 10^4$$

Preparação de microplacas de 96 poços

Após tripsinização e contagem de células, semeou-se 7,5 \times 10⁶ células por placa de 100 mm e perfaz-se 15mL com meio RPMI 1640 suplementado. Para tal, dividiu-se 7,5 \times 10⁶ pelo número de células obtidas pela contagem e multiplicou-se por 1000 para obter o volume de células a colocar em cada placa. De seguida, aplicou-se 100 μ L dessa cultura celular a cada poço da microplaca.

Preparação/aplicação das soluções dos complexos organometálicos

Prepararam-se soluções base concentradas dos compostos a estudaram-se em 10mL de DMSO. A partir dessas, diluíram-se em DMSO para uma gama de oito concentrações, soluções essas denominadas de soluções originais, com um volume final de 0,5mL.

Considerando que se pretendia uma quantidade final de DMSO (na solução a aplicar) de 0,5%, adicionou-se 10 μ L de cada solução original a 1990 μ L de meio RPMI 1640 suplementado, de modo a obterem-se as concentrações finais a aplicar desejadas.

Preparou-se um *ependorf* com 1990 μ L de meio RPMI 1640 suplementado ao qual se adicionou 10 μ L de DMSO para servir de 2º controlo, dado que o 1º controlo será o próprio meio. Seguidamente, removeu-se o meio anteriormente em contacto com as células na microplaca.

Por último, aplicou-se o 1º controlo, o 2º controlo e as soluções de composto às diversas concentrações nos respectivos poços, de acordo com a Fig. 10.

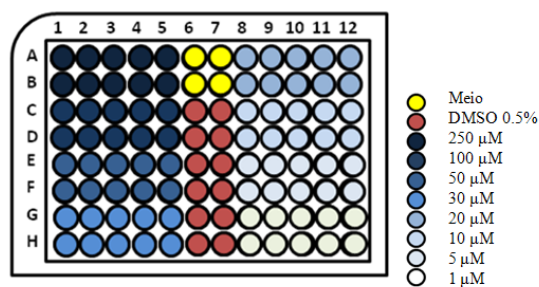


Fig. 10: Esquema de aplicação dos controlos e compostos.

Ensaio do MTT – (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-ilo)2,5-difeniltetrazólio)

Trata-se de um ensaio colorimétrico que se baseia na redução do brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-ilo)-2,5-difenilo (MTT) pelo enzima mitocondrial succinato desidrogenase, com concomitante oxidação de NADH e NADPH (Fig. 11). O enzima converte o MTT, um sal de tetrazólio amarelo e solúvel, num produto azul/roxo insolúvel: os cristais de formazano.^[39]

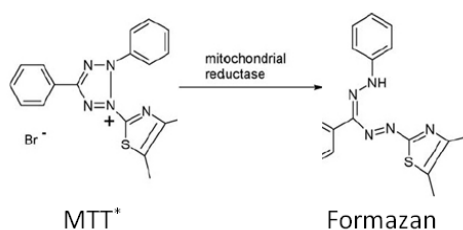


Fig. 11: Estruturas químicas do MTT e do MTT formazano.

Procedimento: preparou-se uma solução de MTT, substrato do succinato desidrogenase (presente nos mitocôndrios e activo em células vivas), em meio RPMI 1640 suplementado a uma concentração de 0,5mg/mL. Removeu-se o meio (com composto) anteriormente em contacto com as células. Aplicou-se 100µL de meio com MTT a cada poço e incubou-se a microplaca. Após duas horas, retirou-se o meio (com MTT) em contacto com as células e aplicou-se 100µL de DMSO a cada poço, dissolvendo assim os cristais roxos de MTT-formazano resultantes da redução do MTT nas células vivas. Após rápida e ligeira agitação (durante cerca de 5 segundos), faz-se a medição da absorvência (num comprimento de onda de 630nm para a referência e 570nm para as amostras) dos poços da microplaca num leitor de placas de ELISA (TECAN, Sunrise), através do programa RDR1e4. Com os valores de absorvência obtidos calculou-se as percentagens de sobrevivência e a partir destas determinou-se a concentração de composto que inibe em 50% o crescimento celular em cada poço (IC₅₀).

Resultados e Discussão

O objectivo deste trabalho foi determinar se os compostos sintetizados apresentam ou não efeito inibidor de proliferação celular. Assim, fez-se um ensaio de toxicidade, utilizando uma cultura de células HeLa para aferir a potencialidade farmacológica dos derivados de ferroceno. Para cada composto de ferroceno testado, foram realizados vários ensaios independentes, tendo cada ensaio dez replicados.

Os compostos foram testados nas concentrações 0, 1, 5, 10, 20, 30, 50, 100 e 250 μM , com o objectivo de determinar qual a concentração mínima de composto que leva a uma actividade citotóxica significativa.

Utilizaram-se os valores de absorvência obtidos para cada composto nas várias concentrações para traçar um gráfico, em função da concentração de fármaco utilizada (Viabilidade Celular (%) vs Concentração de Composto (μM)). A percentagem de sobrevivência é calculada de acordo com a seguinte relação:

$$\% \text{ sobrevivência} = \frac{\text{Abs (n}^\circ \text{ de células vivas (incubadas com composto))}}{\text{Abs (n}^\circ \text{ de células vivas (controlo))}} \times 100$$

Um gráfico ideal da variação da % da sobrevivência celular com a concentração de composto seria a seguinte (Fig. 12):

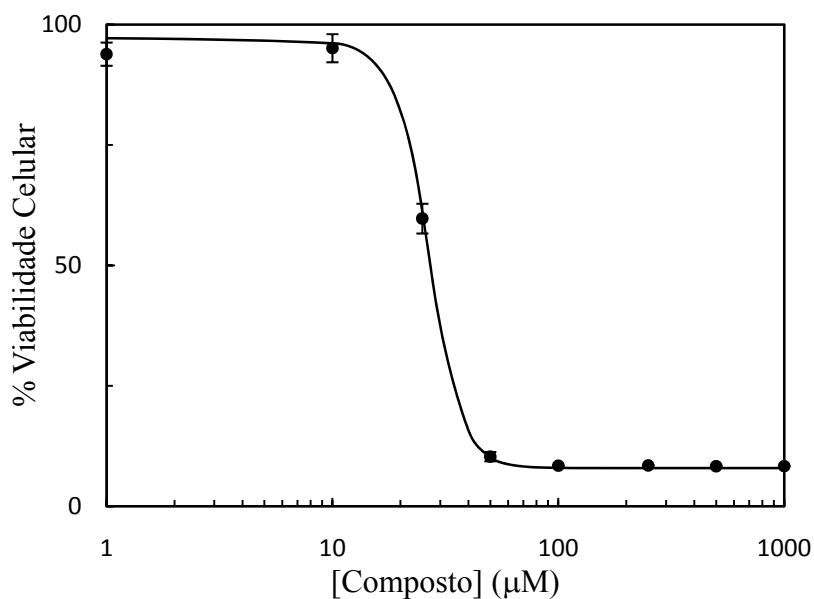


Fig. 12: Gráfico representativo da variação da % da sobrevivência celular com a concentração de composto.

Os resultados obtidos para os quatro complexos:

- **Complexo 1 – FcCOCl**

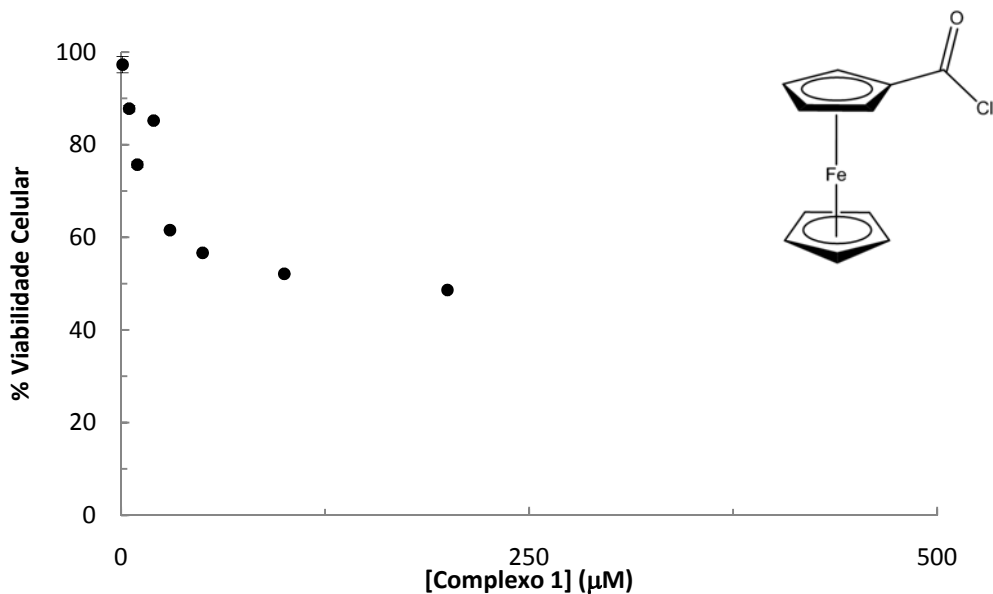


Fig 13: Representação gráfica da variação da viabilidade celular (%) com a concentração do complexo 1 (µM).

- **Complexo 2 – FcCO(benzim)**

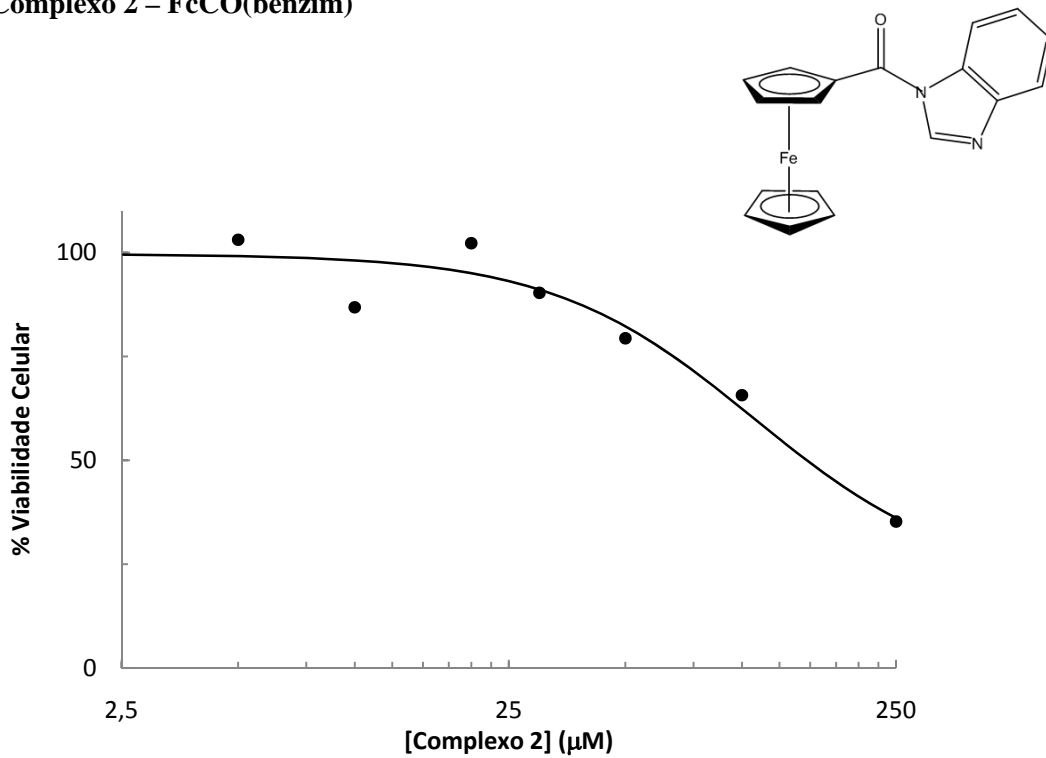


Fig 14: Representação gráfica da variação da viabilidade celular (%) com a concentração do complexo 2 (µM).

- **Complexo 3 – FcCO(im)**

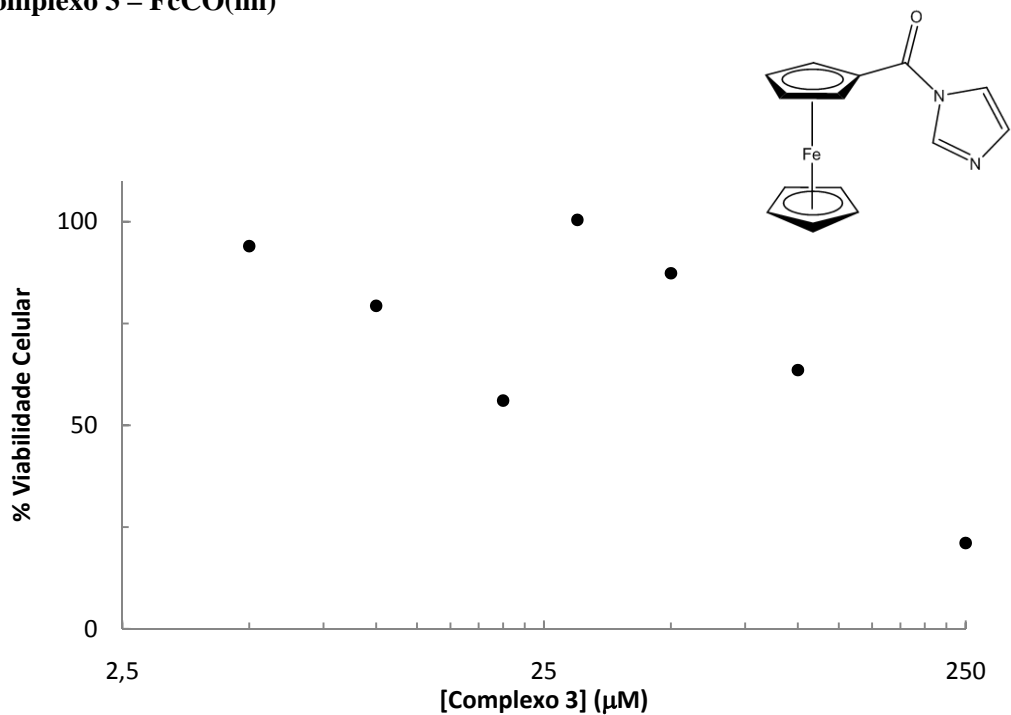


Fig 15: Representação gráfica da variação da viabilidade celular (%) com a concentração do complexo 3 (µM).

- **Complexo 4 – FcCO(4-Cl-anilina)**

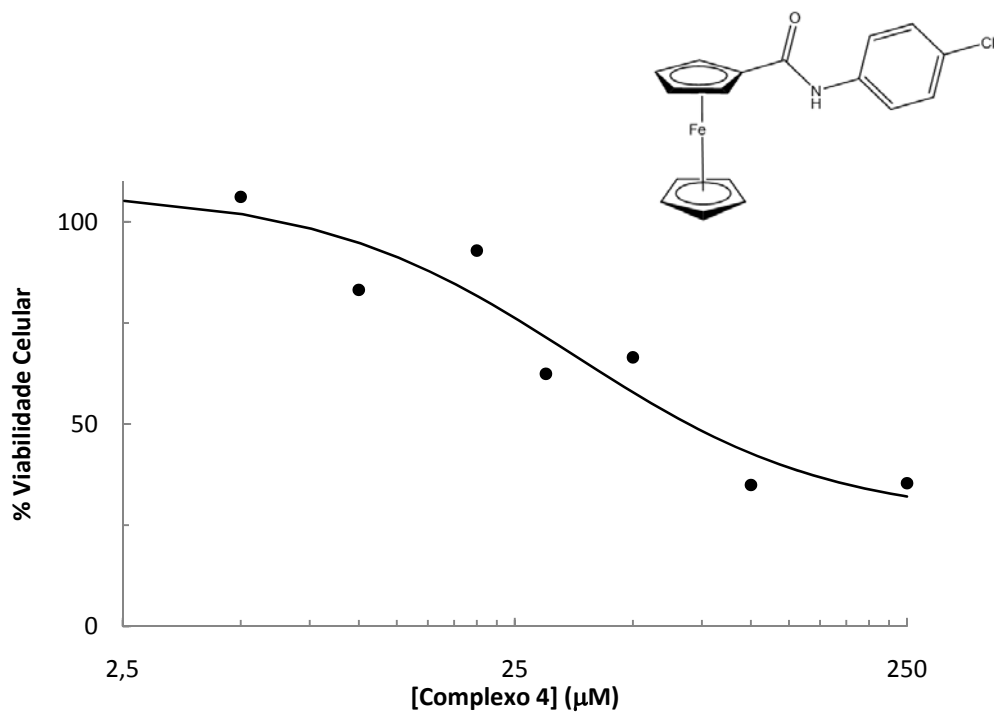


Fig 16: Representação gráfica da variação da viabilidade celular (%) com a concentração do complexo 4 (µM).

Na figura seguinte (Fig. 17) estão agrupados os gráficos que representam a acção dos vários compostos de modo a tornar mais fácil a comparação dos tempos de sobrevivência nas células HeLa.

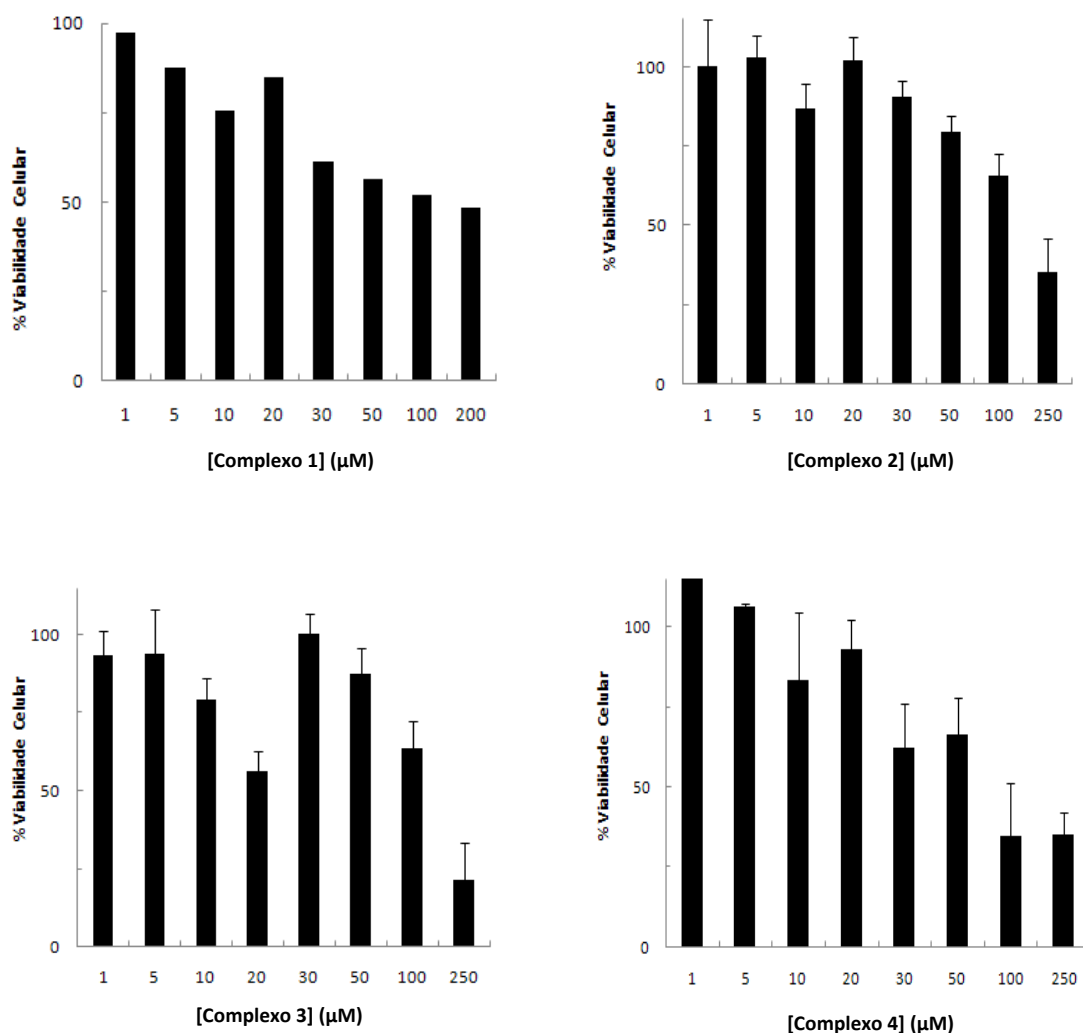


Fig. 17: Representação gráfica da variação da viabilidade celular (%) com a concentração dos complexos (μM).

Os gráficos correspondentes às figuras 14 e16 apresentam uma curva sigmoideal (excepto o gráfico correspondente ao Complexo 3). Esta curva de inibição dose - resposta permite a determinação dos valores de IC₅₀ (valores apresentados na tabela abaixo).

IC ₅₀ (μM)			
Complexo 1	Complexo 2	Complexo 3	Complexo 4
n.d	107.7	n.d	34.4

Tabela 1: Valores de inibição do crescimento celular, com os vários complexos organometálicos estudados. (n.d: não definido)

Para estes estudos usou-se uma gama de concentrações 1-250 μM . Para concentrações superiores os compostos não se dissolvem em DMSO, sendo uma das limitações dos complexos sintetizados.

As percentagens de sobrevivência variam consoante os ligandos. Assim, analisando a figura 17, no geral, a percentagem de sobrevivência diminui com o aumento da concentração de composto. Tal está de acordo com o esperado, uma vez que se prova que houve inibição do crescimento celular.

O complexo 1 não apresenta actividade inibitória, demonstrando que é necessária a coordenação ao ligando contendo azoto para levar à inibição da proliferação celular (Fig. 13). Tal pode afirmar-se uma vez que não foi possível obter o valor de IC_{50} já que à concentração máxima (250 μM) a percentagem de viabilidade celular apenas desce até perto de 50%. Também para o complexo 3, os resultados obtidos não são conclusivos. Verifica-se uma grande variação na percentagem de sobrevivência para as diferentes concentrações, sendo que não é possível calcular o IC_{50} . Como tal não se pode afirmar que o complexo de ferrocenoilimidazole tenha uma actividade antiproliferativa relevante na linha celular HeLa (Fig. 15).

No que diz respeito aos complexos 2 e 4, estes, apesar de terem uma curva sigmoidal longe do que seria o ideal, demonstram um carácter de inibição, tendo-se obtido os IC_{50} correspondentes a 107.7 e 34.4 μM , respectivamente (Fig. 14 e 16).

Dos quatro complexos testados, o que apresentou melhor capacidade de inibição foi o complexo 4, tendo um IC_{50} menor (Tabela 1).

Conclusões

Depois de testados os quatro complexos pode afirmar-se que os derivados de ferroceno sintetizados inibem a actividade celular, principalmente o ferrocenoil-4-Cl-anilina (complexo 4) com um valor de IC_{50} de $35\mu\text{M}$. Verificou-se contudo, que na ausência de substituinte azotado, a inibição não é significativa.

Uma limitação destes conjugados de ferroceno prende-se com a sua solubilidade em água, sendo que apenas se dissolvem em DMSO^[36] e só até uma concentração de $250\mu\text{M}$.

Uma vez que o IC_{50} da *cis*-platina (o fármaco mais utilizado na quimioterapia) é inferior a $10\mu\text{M}$, e que o valor mais baixo de IC_{50} obtido foi de $35\mu\text{M}$ para o complexo 4, pode afirmar-se que estes complexos não poderão para já ser considerados como alternativa à *cis*-platina, já que segundo o parâmetro de citotoxicidade não são tão potentes.

Apesar destes dados, há que salientar que não é somente o parâmetro IC_{50} a determinar a potencialidade de determinado composto como droga anti-cancerígena, pois este apenas tem em conta a toxicidade. Existem outros factores como a resistência, os efeitos secundários e a biodistribuição que assumem extrema relevância.

Perspectivas Futuras

Muitos outros estudos relacionados poderão ser realizados no âmbito deste trabalho, desde a síntese de compostos com outros ligandos, ou outros iões metálicos, até a outros estudos bioquímicos relacionados com o mecanismo de acção dos compostos. Para tal podiam ter sido realizados estudos biológicos, como electroforese de DNA em gel de agarose, citometria de fluxo, estudos de viscosidade, estudos cinéticos, estudos de dicroísmo circular entre outros e a partir deles compreender o processo apoptótico afirmando-o ou não como consequência da actuação dos compostos sobre as células tumorais.

Actualmente, estão muitas investigações em curso. Este trabalho, como todos em ciência, nunca terá fim. Existirão sempre outros complexos para sintetizar, por exemplo, neste caso seria interessante aperfeiçoar o complexo mais promissor (complexo 4), com o intuito de ser obter um valor de IC_{50} mais baixo. Para tal seria determinante perceber a função de cada grupo para a actividade inibitória. Mais uma vez, técnicas de espectroscopia como RMN ou FTIR aliar-se-iam a estudos bioquímicos sempre com o intuito de esclarecer o mecanismo de acção de compostos, uma vez que conhecer o alvo molecular dos compostos, permitirá aos experimentalistas desenhar candidatos a fármacos cada vez mais precisos.

É ainda de salientar que, uma vez que se pensa que a droga exerce a sua acção lesiva nos mitocôndrios, nomeadamente na formação de espécies reactivas de oxigénio, deverá aprofundar-se os estudos neste organelo, sempre com o objectivo de compreender o mecanismo de apoptose.

Concluindo, apesar deste trabalho não ter focado o mecanismo de acção dos complexos, estudos recentes demonstram que o mecanismo de acção de alguns compostos organometálicos não envolve uma ligação directa ao DNA. Assim, sabe-se ser possível desenvolver fármacos anti-cancerígenos eficientes, que permitam ultrapassar as desvantagens clínicas associadas ao uso dos fármacos quimioterapêuticos actualmente existentes.

Bibliografia

- [1].A.A.O. Sarhan., T. Izumi (2003). "Design and synthesis of new functional compounds related to ferrocene bearing heterocyclic moieties: a new approach towards electron donor organic metals". *Journal of Organometallic Chemistry*, **675**, 1-12.
- [2].A.H. Soloway, I. Agranat. A. R. Chase, R. E. Hernandez, E. S. Kimball, T. Cascieri, Jr., C. H. Cox (1973). "Chemoimmunotherapy of Cancer". *Journal of Medicinal Chemistry*, **17**, No **9**, 918-922.
- [3].Auyang, S. Y. (2009). "Cancer causes and cancer research on many levels of complexity." Retrieved July.(web Page)
- [4].Bonire, J.J. & Fricke, S. P. (2001). "The in vitro antitumour profile of some 1,2 diaminocyclohexane organotin complexes". *Journal of Inorganic Biochemistry*, **83**: 217-22.
- [5].Briasoulis, E., Pentheroudakis, G., Karavasilis, V., Tzamakou, E., Rammou, D. & Pavlidis, N. (2004). "Weekly paclitaxel combined with pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) give every 4 weeks: dose-finding and pharmacokinetic study in patients with advanced solid tumors". *Annals of Oncology*, **15**: 1566-1573.
- [6].Carlos H.T.P da Silva, Gino Del Ponte, Alberto F. Neto, Carlton A. Taft (2005). "Rational design of novel diketoacid-containing ferrocene inhibitors of HIV-1 integrase". *Bioorganic Chemistry*, **33**, 274-284.
- [7].Caldwell G., Eberhard W. Neuse E., Constance J. (1998). "Potential new inorganic antitumor agents from combining the anticancer traditional Chinese - Ferrocene Conjugates." *Applied Organometallic Chemistry*, **12**:793-799.
- [8].C. Biot, N. François, L. Maciejewski, J. Brocard, D. Poulain (2000). "Synthesis and Antifungal Activity of a Ferrocene-fluconazole Analogue". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **10**, 839-841.
- [9].D. R. van Staveren, N. Metzler-Nolte (2004). "Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene". *Chemical Reviews*, **104**, 5931-5985.
- [10]. D. R. van Staveren, T. Weyhermuller, N. Metzler-Nolte (2002). "Organometallic β -turn mimetics. A structural and spectroscopic study of inter-strand hydrogen bonding in ferrocene and cobaltocenium conjugates of amino acids and dipeptides". *Dalton Trans*, 210-220.
- [11]. David L., Nelson M. (2000). Lehninger – "Principles of Biochemistry". New York, W. H. Freeman and Company, Fourth Edition.
- [12]. D. Osella, P. Zanello, F. Laschi, M. Fontani, C. Nervi, G. Cavigliolo (2000). "On the mechanism of the antitumor activity of ferrocenium derivatives." *Inorganic Chimica Acta*, **306**: 42-48.
- [13]. Dougan S., McHale S., Parsons S., Sadler P. (2008). "Catalytic organometallic anticancer complexes." *PNAS*, **105** (33): 11628-11633.
- [14]. Garret, M.D. (2001). "Cell cycle control and cancer". *Current Science*, **81**: 515- 522.
- [15]. Garuti L., Roberti, M., Pizzirani, D., Pession, A., Leoncini, E., Cenci, V. & Hrelia, S. (2004). "Differential antiproliferative activity of new benzimidazole-4,7-diones". *Il Farmaco*, **59**: 663-668.

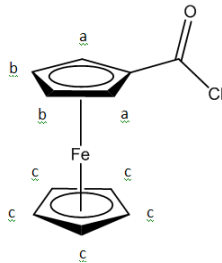
- [16]. Ghobrial, I.M., Witzig, T.E. & Adjei, A.A. (2005). "Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy". *A Cancer Journal for Clinicians*, **55**: 178-194.
- [17]. Golstein, P. & Kroemer, G. (2007). "A multiplicity of cell death pathways. Symposium on Apoptotic and Non-Apoptotic Cell Death Pathways". *European molecular biology organization reports*, **8**: 829-833.
- [18]. Haley, B. & Frenkel, E. (2008). "Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment". *Official Journal of the Society Urologic Oncology*, **26**: 57-64.
- [19]. Hall, I.H., Lackey, C.B., Kistler, T.D., Durham, R.W., Russell, J.M. & Grimes, R.N. (2000). "Antitumor activity of mono- and dimetallic transition metal carborane complexes of Ta, Fe, Co, Mo, or W". *Anticancer research*, **20**: 2345-2354.
- [20]. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000). "The Hallmarks of Cancer". *Cell*, **100**: 57-70.
- [21]. Jakupec, M.A., Galanski, M., Arion, V.B., Hartinger, C.G. & Keppler, B.K. (2007). "Antitumour metal compounds: more than theme and variations". *Dalton transactions*, 183-194.
- [22]. Jemal A., Siegel R., Ward E., (2009). "Cancer Facts & Figures." *American Cancer Society*.
- [23]. J. H. Murray and M. M. Harding (1994). "Organometallic Anticancer Agents: The effect of the central Metal and Halide Ligands on the Interaction of Metallocene Dihalides Cp_2MX_2 with Nucleic Acid Constituents". *J. Med. Chem*, **37**, 1936-1941.
- [24]. Kerr, J.F.R., Winterford, C.M. & Harmon, B.V. (1994). "Apoptosis-its significance in cancer and cancer therapy". *Cancer*, **73**: 2013-2026.
- [25]. Köpf-Maier P., (1984). "Ferrocenium Complexes: A New Type of Water-Soluble Antitumor Agent." *Cancer Research Clinical Oncology*, **108**: 336-340.
- [26]. Liu, Y. (1999). "Understanding the biological activity of amyloid proteins in vitro: from inhibited cellular MTT reduction to altered cellular cholesterol homeostatis". *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **23**: 377-395.
- [27]. M. J. Calhorda, P. J. Costa, P. N. Martinho, M. C. Gimeno, A. Laguna, S. Quintal, M. D. Villacampa (2006). "Synthesis and ligand properties towards gold and silver of the ferrocenylamidobenzimidazole ligand". *Journal of Organometallic Chemistry* **691**, 4181-4188.
- [28]. M. S. Saraiva, S. Quintal, F. C. M. Portugal, T. A. Lopes, V. Félix, J. M. F. Nogueira, M. Meireles, M. G. B. Drew, M. J. Calhorda (2008). "Nitrogen donor ligands bearing N-H groups: Effect on catalytic and cytotoxic activity of molybdenum η^3 -allyldicarbonyl complexes". *J. of Organometallic Chemistry*, **693**: 3411-3418
- [29]. Matos, M.R.P.N (2001). "Complexos Metálicos na terapêutica do Cancro". *Sociedade Portuguesa de Química*, **85**: 61- 68.
- [30]. Metzler-Nolte, D. (2004). "Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene." *Chem. Rev.* **104**: 5931-5985.
- [31]. M. D. Vukicevic, Z. R. Ratkovic, A. V. Teodorovic, G. S. Stojanovic, R. D. Vukicevic (2002). "Acylation of ferrocene: a new approach". *Tetrahedron* **58**, 9001-9006.

- [32]. Mokhles M. Abd-Elzaher (2004). "Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of cobalt(II), copper(II) and zinc(II) complexes with ferrocenyl Schiff bases containing a phenol moiety". *Appl. Bioorganometallic Chemistry*, **18**, 149-155.
- [33]. Neuse E. (2007). "Synthetic Polymers as Drug-Delivery Vehicles in Medicine." *Metal-Based Drugs*, 2008.
- [34]. P. Kopf-Maier, H. Kopf (1987). "Non-Platinum-Group Metal Antitumor Agents: History, Current Status, and Perspectives." *Chem. Rev*, **87**: 1137-1152
- [35]. Rajput M., Fouda M., Abdelsamaia R., Labib A. (2007). "On the medicinal chemistry of ferrocene." *Applied Organometallic Chemistry*, **21**: 613-625.
- [36]. Shashkov, S.N., Kiselev, M.A., Tioutiunnikov, S.N., Kiselev, A.M. & Lesieur, P. (1999). "The study of DMSO/ water and DPPC/DMSO/ water system by means of the X-ray, neutron small-angle scattering, calorimetry and IR spectroscopy". *Physica B*, **271**: 184-191.
- [37]. Sadler, A. (2008). "Medicinal Organometallic Chemistry: Designing Metal Arene Complexes as Anticancer Agents." *Chem. Asian*, **3**: 1890-1899.
- [38]. Simstein, R., Burow, M., Parker, A., Weldon, C. & Beckman, B. (2003). "Apoptosis, Chemoresistance, and Breast Cancer: Insights From the MCF-7 Cell Model System". *Experimental Biology and Medicine*, **228**: 995-1003.
- [39]. Supino, R. (1995). "MTT Assays in Methods in Molecular Biology: In Vitro Toxicity Testing Protocols", O'Hara, S. e Atterwill, C. K., Human Press Inc., Totowa, NJ, USA.
- [40]. S. Quintal, J. Matos, I. Fonseca, V. Félix, M. G. B. Drew, N. Trindade, M. Meireles, M. J. Calhorda (2007). "Synthesis and properties of new trinuclear Mo(II) complexes containing imidazole and benzimidazole ferrocene units". *Inorganic Chimica Acta* **361**: 1584-1596.
- [41]. S. Quintal, M. C. Gimeno, A. Laguna, M. J. Calhorda (2009). "Silver(I) and copper(I) complexes with ferrocenyl ligands bearing imidazole or pyridyl substituents". *Journal of Organometallic chemistry* **695**, 558-566.
- [42]. V. J. Fiorina, R. J. Dubois, S. Brynes (1978) "Ferrocenyl Polyamines as Agents for the Chemoimmunotherapy of Cancer". *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. **21**, No. 4, 393-395
- [43]. Wang, Y. & Chiu, J. (2008). "Proteomic Approaches in Understanding Action Mechanisms of Metal-Based Anticancer Drugs". *Metal-Based Drugs Journal*, **9**.
- [44]. Zhang C., Stephen J. (2003). "New metal complexes as potential therapeutics." *Current Opinion in Chemical Biology*, **7**: 481-489.
- [45]. Wikipedia (Última consulta em Julho de 2010)

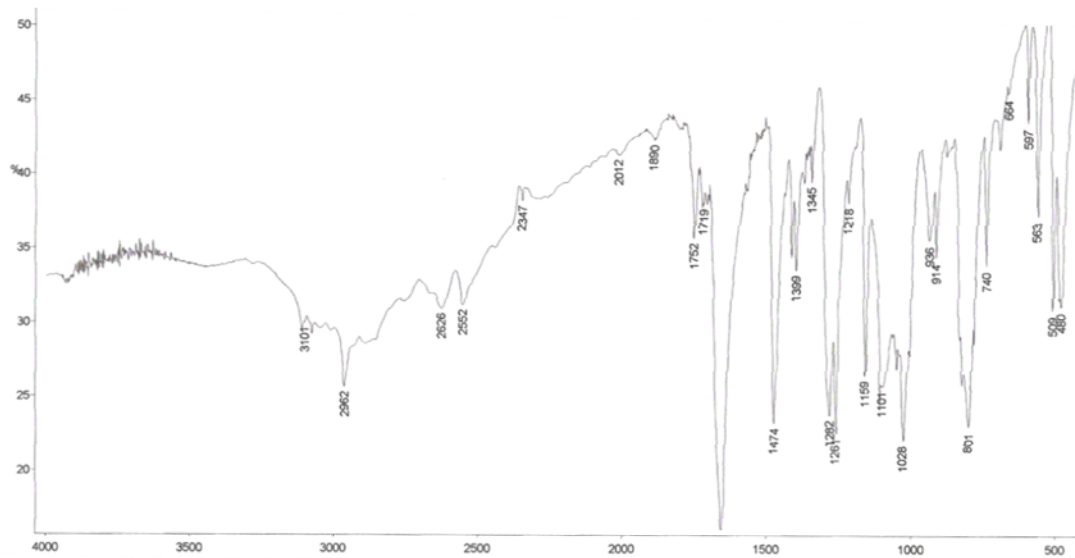
Anexos

Espectros dos complexos organometálicos:

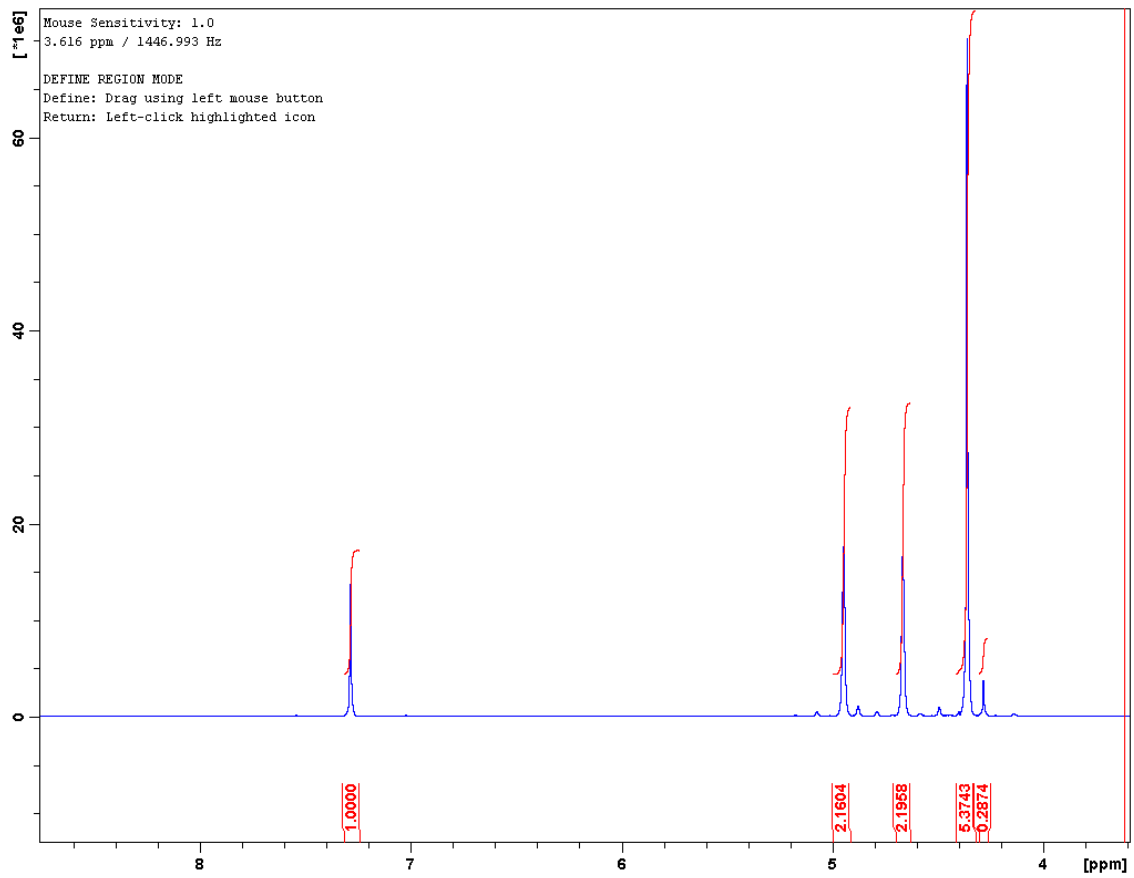
(1) Caracterização do ferrocenocarbonilo de cloro (FcCOCl)



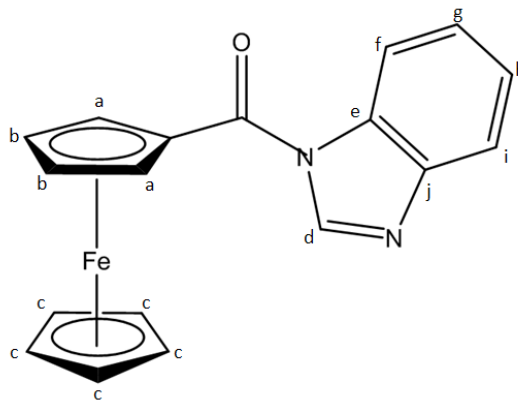
(a) Espectro de Infravermelho



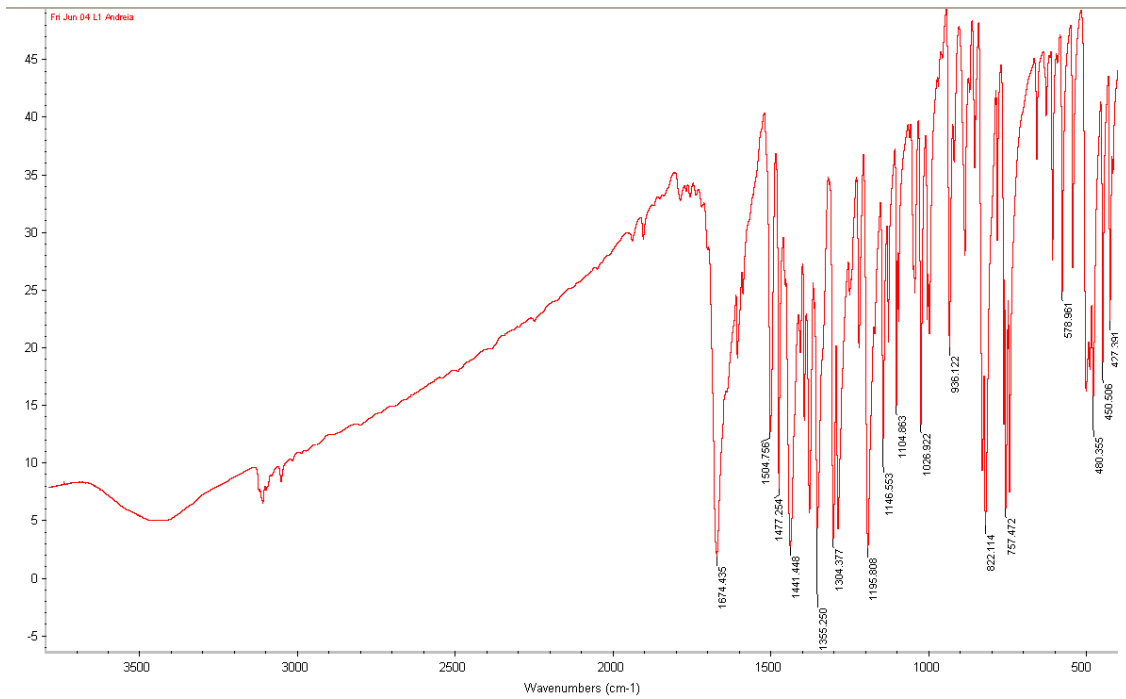
(b) Espectro de RMN



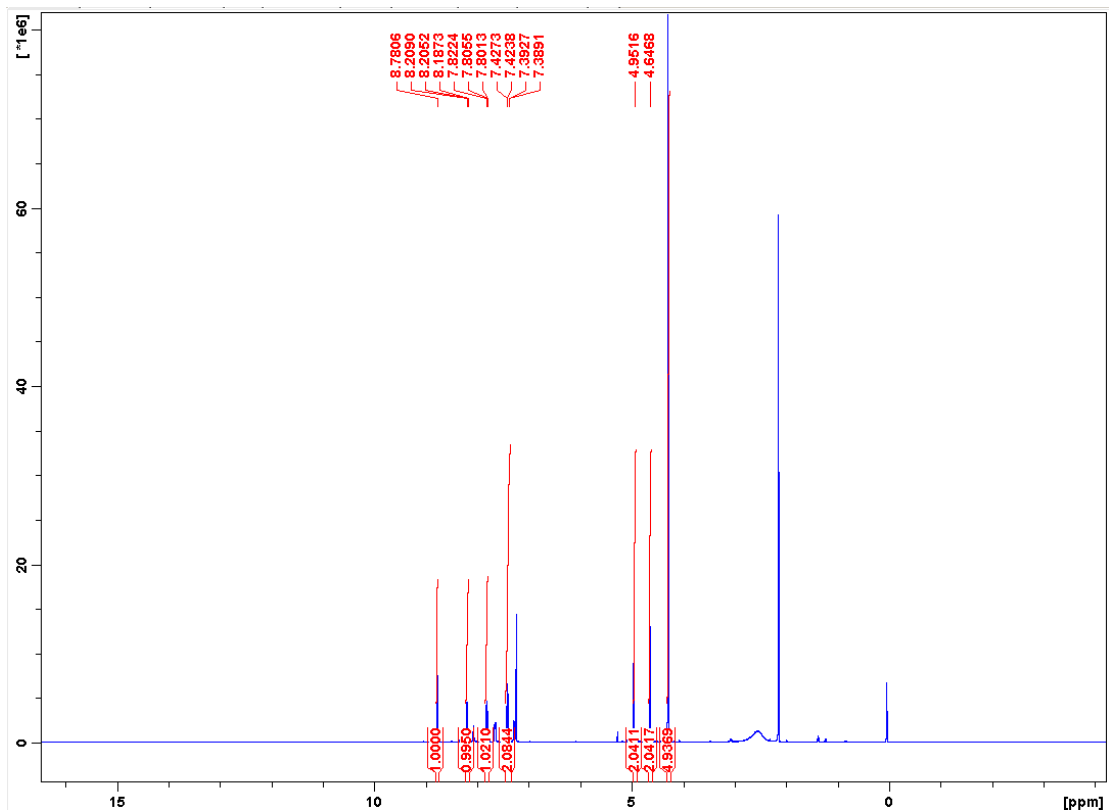
(2) Caracterização do ferrocenoilo benzimidazolo



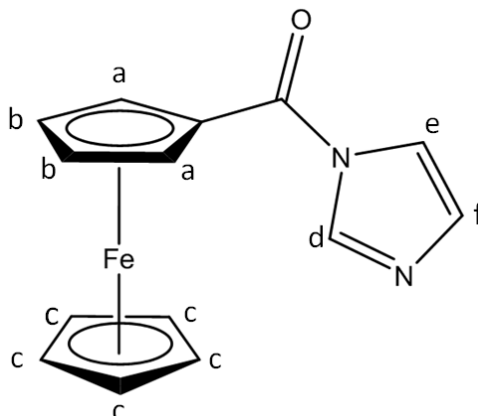
(a) Espectro de Infravermelho



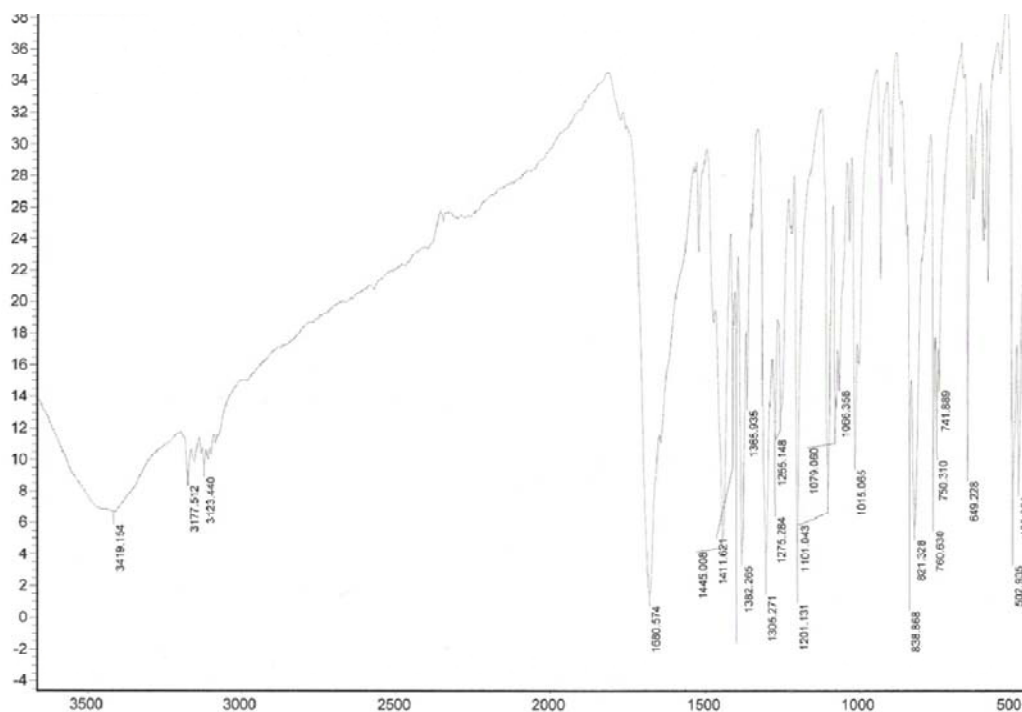
(b) Espectro de RMN



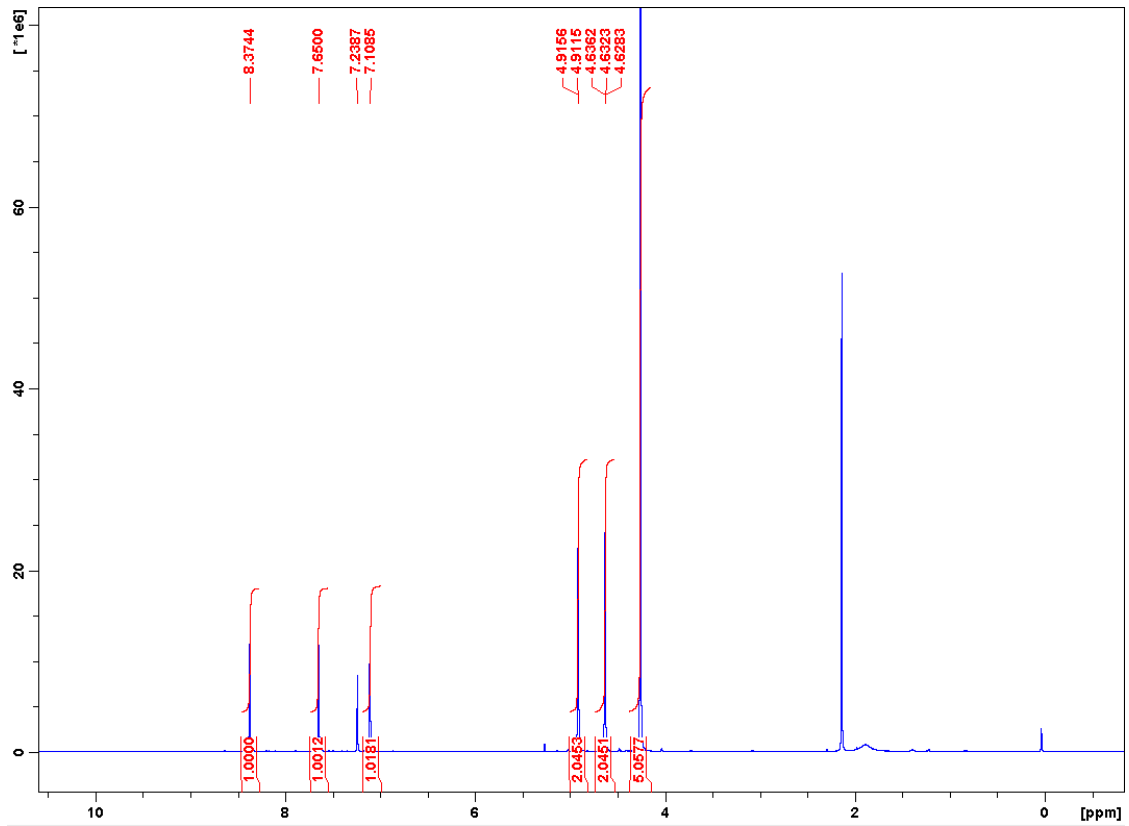
(3) Caracterização do ferrocenoilo de imidazolo



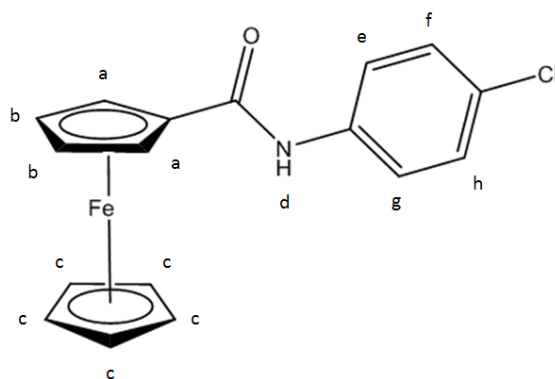
(a) Espectro de Infravermelho



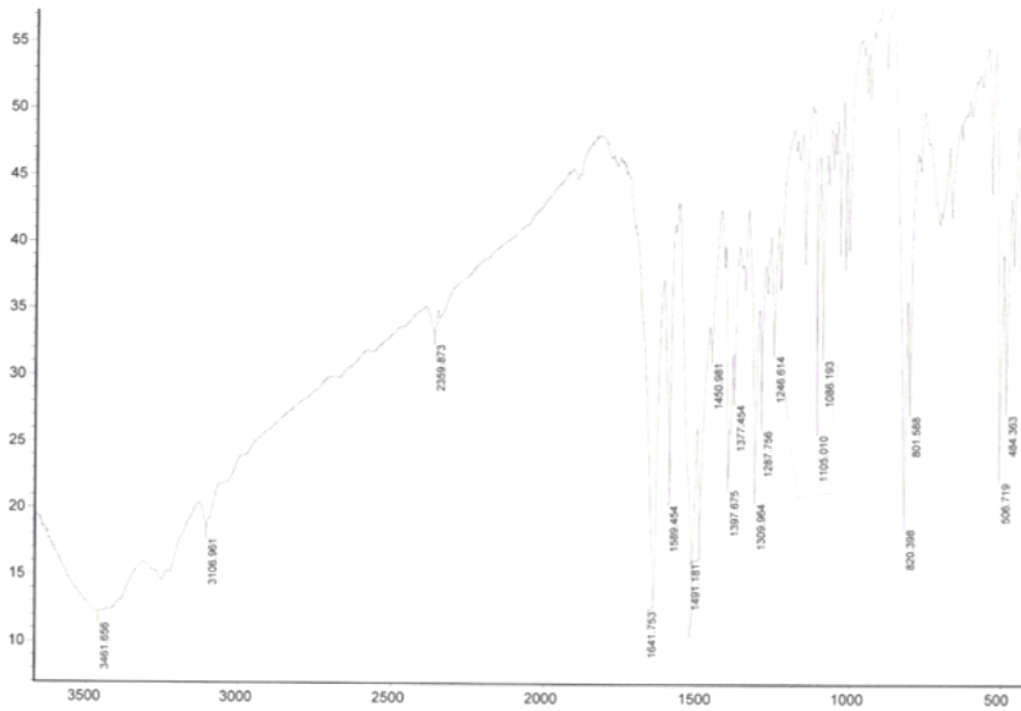
(b) Espectro de RMN



(4) Caracterização do ferrocenoilo de anilina



(a) Espectro de Infravermelho



(b) Espectro de RMN

