

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 16/12/2024.

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, FÍSICO-QUÍMICA E INORGÂNICA**

Wladimir Pereira Duarte Badaró

**Síntese, caracterização e atividade biológica de ciclopaladados contendo o
metil-éster da L-fenilalanina**

**ARARAQUARA
2022**

WLADIMIR PEREIRA DUARTE BADARÓ

Síntese, caracterização e atividade biológica de ciclopaladados contendo o metil-éster da L-fenilalanina

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Tonon de Almeida

ARARAQUARA

2022

B132s

Badaró, Wladimir Pereira Duarte

Síntese, caracterização e atividade biológica de ciclopaladados contendo o metil-éster da L-fenilalanina / Wladimir Pereira Duarte Badaró. -- Araraquara, 2022
110 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara

Orientador: Adelino Vieira de Godoy Netto

Coorientador: Eduardo Tonon de Almeida

1. Câncer. 2. Paládio. 3. Fenilalanina. 4. DNA. 5. Citotoxicidade. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Síntese, caracterização e atividade biológica de ciclopaldados contendo o metil-éster da L-fenilalanina"

AUTOR: WLADIMIR PEREIRA DUARTE BADARÓ
ORIENTADOR: ADELINO VIEIRA DE GODOY NETTO
COORIENTADOR: EDUARDO TONON DE ALMEIDA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Química, pela Comissão Examinadora:



Assinado de forma digital por Adelino
Vieira de Godoy Netto:19560697803
Dados: 2022.12.19 11:37:36 -03'00'

Prof. Dr. ADELINO VIEIRA DE GODOY NETTO (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Dr^a. MARIETE BARBOSA MOREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade Estadual de Maringá - UEM - Maringá

Prof. Dr. FILLIPE VIEIRA ROCHA (Participação Virtual)
Departamento de Química / Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - UFSCar - São Carlos

Araraquara, 16 de dezembro de 2022

Dados Curriculares

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Wladimir Pereira Duarte Badaró

Nome em citações bibliográficas: BADARÓ, W. P. D.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. Rua Prof. Francisco Degni, 55, Bairro Quitandinha, CEP: 14800-060 – Araraquara, SP.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2020-2022: Mestrado em Química

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araraquara.

Dissertação: Síntese, caracterização e atividade biológica de ciclopaladados contendo o metil-éster da L-fenilalanina

Orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Tonon de Almeida

Bolsa: CNPq

2015-2020: Bacharel em Química

Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Trabalho de Conclusão de Curso: Síntese e caracterização de um novo complexo derivado do acetato de paládio(II), 4-aminoacetofenona e 4-dimetilaminobenzaldeído

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Tonon de Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Luís Eduardo Sarto

2012-2015: Técnico em Química

Colégio Universitário Padre de Man

Trabalho de Conclusão de Curso: Análise Qualitativa da Água do Ribeirão Ipanema

Orientador: Prof. Glayton Andrade de Souza

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados:

1. SARTO, LUÍS EDUARDO; BADARÓ, WLADIMIR PEREIRA DUARTE; DE GOIS, ELBA PEREIRA; BARBOSA, MARÍLIA IMACULADA FRAZÃO; TORRES, CLAUDIA; VIANA, ROMMEL BEZERRA; HONORATO, JOÃO; CASTELLANO, EDUARDO ERNESTO; DE ALMEIDA, EDUARDO TONON. Crystal structures and DFT analysis of Palladium(II) complexes with Schiff bases derived from *N,N*-dialkyl-*p*-phenylenediamines. **JOURNAL OF MOLECULAR STRUCTURE**, v. 1204, p. 127549, 2019.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos:

1. BADARÓ, WLADIMIR PEREIRA DUARTE; SARTO, LUIS EDUARDO; de ALMEIDA, EDUARDO TONON. Estruturas cristalina de complexos de paládio(II) com Bases de Schiff derivadas do salicilaldeído e *N,N*-dialquil-*p*-fenilenodiaminas. 43º REUNIÃO ANUAL VIRTUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2020. (Apresentação de Trabalho/Sessão coordenada).
2. BADARÓ, WLADIMIR PEREIRA DUARTE; SARTO, LUÍS EDUARDO; de ALMEIDA, EDUARDO TONON. Complexo de paládio(II) derivado do acetato de paládio, *p*-dimetilaminobenzaldeído e *N,N*-dietil-*p*-fenilenodiamina. 42º REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. BADARÓ, WLADIMIR PEREIRA DUARTE; GARCIA, ANA CAROLINE FERREIRA; SARTO, LUÍS EDUARDO; de ALMEIDA, EDUARDO TONON. Síntese e caracterização de um novo complexo derivado do acetato de paládio(II), 4-aminoacetofenona e 4-dimetilaminobenzaldeído. **XXXIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química**, 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. GARCIA, ANA CAROLINE FERREIRA; BADARÓ, WLADIMIR PEREIRA DUARTE; SARTO, LUÍS EDUARDO; DE ALMEIDA, EDUARDO TONON. Síntese de nova base de Schiff a partir do cuminaldeído e da 4-aminoacetofenona. **XXXIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química**, 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. BADARÓ, WLADIMIR PEREIRA DUARTE; SARTO, LUÍS EDUARDO; GOIS, ELBA PEREIRA; de ALMEIDA, EDUARDO TONON. Complexos de paládio(II) com Bases de Schiff derivadas do salicilaldeído e *N,N*-dialquil-*p*-fenilenodiaminas. **XXXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química**, 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

6. Participação em eventos, Congressos, Exposições e feiras:

1. 43º REUNIÃO ANUAL VIRTUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2020.
2. 42º REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2019.
3. XXXIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG, 2019.
4. 7ª Semana da Química: "As interatividades da Química", realizado na Universidade Federal de Alfenas, 2019.
5. XXXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2018.
6. 6ª Semana da Química, realizado na Universidade Federal de Alfenas, 2016.
7. XVI Olimpíada Mineira de Química, realizada pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, 2013. (Participante).

INICIAÇÃO CIENTÍFICA

1. Bolsista FAPEMIG de Iniciação Científica em Química Inorgânica, projeto intitulado como "Síntese e Caracterização Espectroscópica do ligante imínico obtido da reação entre 4-dimetilaminobenzaldeído e 4-aminoacetofenona e seu respectivo complexo de Paládio(II)" sob orientação do Professor Dr. Eduardo Tonon de Almeida e colaboração de Luís Eduardo Sarto. Universidade Federal de Alfenas, 2018-2019.
2. Bolsista FAPEMIG de Iniciação Científica em Química Inorgânica, projeto intitulado como "Síntese e Caracterização Espectroscópica do ligante imínico obtido da reação entre *p*-fenilenodiamina e *p*-dimetilaminobenzaldeído e seu respectivo complexo de Paládio(II)" sob orientação do Professor Dr. Eduardo Tonon de Almeida colaboração de Luís Eduardo Sarto e Elba Pereira de Gois. Universidade Federal de Alfenas, 2017-2018.
3. Bolsista FAPEMIG de Iniciação Científica em Química Inorgânica, projeto intitulado como "Síntese e Caracterização Espectroscópica do ligante imínico obtido da reação entre 2-amino-piridina e trans-cinamaldeído e seu respectivo complexo de Paládio(II)" sob orientação do Professor Dr. Eduardo Tonon de Almeida. Universidade Federal de Alfenas, 2016-2017.

OUTROS:

1. Monitor bolsista na disciplina/unidade curricular Físico-Química I, sob orientação da Professora Dra. Alzira Maria Serpa Lucho. Universidade Federal de Alfenas, 2019.
2. Monitor voluntário na disciplina/unidade curricular Química Inorgânica I, sob orientação do Professor Dr. Eduardo Tonon de Almeida. Universidade Federal de Alfenas, 2016.
3. Monitor bolsista na disciplina/unidade curricular Química Geral, sob orientação do Professor Dr. Eduardo Tonon de Almeida. Universidade Federal de Alfenas, 2016.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai José Carlos (in memoriam)
e mãe Luciene, meus irmãos Ludimila
e Guilherme Victor e minha namorada
Rayane Cristina, pelo incentivo
durante toda essa jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, José Carlos (in memoriam) e Luciene por todas as lições, apoio, incentivos e sacrifícios para que fosse possível essa grande conquista, o fruto deste trabalho é graças a VOCÊS.

Aos meus irmãos Ludimila e Guilherme que partilharam todo sacrifício, além da saudade diária e serem minha força para continuar seguindo em frente.

Um agradecimento mais que especial para minha namorada Rayane Cristina, meu grande presente que a UNIFAL-MG me deu, por estar sempre presente em todos os momentos, partilhando as frustrações e alegrias. Ao Apolo Cristino, o cachorro que de início era dela, mas agora é nosso filho.

Os exemplos de vida e amigos Chico, Cecília e seus familiares, que sempre incentivaram minha vida e família.

Aos meus primos irmãos Daniel e José Roberto, por serem meus companheiros durante a infância e por serem o exemplo de vida, cada um com sua maneira. A todos os meus familiares, mesmo distantes, contribuíram de forma inspiradora.

Os meus amigos que tive o privilégio de conhecer em Alfenas, Matheus Alves, Matheus Martins, Gabriela, Luiz Fernando, Carol e Thaynan, que me acolheram durante a graduação, transformando essa etapa na mais alegre e inesquecível de todas.

Aos meus familiares de Itaú de Minas, que me adotaram após o início do meu relacionamento com Rayane, em especial aos avós José Vicente e Maria Luiza (Dona Fia) exemplo de honestidade, serenidade e companheirismo e a Roseli por todo o carinho e apoio, sendo minha segunda família.

Ao meu orientador o Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto, uma pessoa extraordinária e justa, que me apoiou, incentivou, inspirou durante o desenvolvimento

deste trabalho, além de toda paciência e compreensão, porque sem suas contribuições, o presente trabalho não seria possível.

Em especial ao meu coorientador o Prof. Dr. Eduardo Tonon de Almeida, que me incentivou, durante a graduação, a iniciar os estudos no desenvolvimento de complexo de paládio(II) e ao meu Prof. Dr. Luís Eduardo Sarto, que tive o privilégio de conhecer no Laboratório Interdisciplinar de Química (LABIQ), me acompanhando e orientando nesta etapa inicial, um amigo para a vida.

Aos amigos do Laboratório de Organometálicos, Renan Lira, Renan Zanetti, Jecika, Manuela, Ana Maria, Ana Beatriz, Thales, Bárbara e Carol por partilharem toda experiência e vivência.

Ao Rafael, técnico do Laboratório de Organometálicos, pelas medidas de infravermelho dos compostos e ao Nivaldo pelas medidas de RMN, além das conversas descontraídas, durante a realização das análises.

Em particular, o Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha, Dra. Gabriela Porto e o doutorando Mauro Lima, pelos testes de viabilidade celular.

À Deus.

Ao CNPq e CAPES, indispensáveis para a conclusão deste trabalho.

Obrigado a todos!!!!

EPÍGRAFE

“Ainda que eu falasse
A língua dos homens
E falasse a língua dos anjos
Sem amor eu nada seria”

Legião Urbana

RESUMO

O câncer é uma das enfermidades que causam um grande número de mortes no mundo. De acordo com o INCA, o Brasil terá mais de 2 milhões de novos casos de câncer no triênio 2023-2025. Apesar dos grandes avanços no diagnóstico e tratamento da doença, o desenvolvimento de resistência frente aos fármacos continua sendo o principal fator limitante para a eficácia do tratamento de pacientes com câncer. Particularmente, os complexos metálicos surgem naturalmente como candidatos muito promissores pois são capazes de atuar em múltiplos alvos. Entretanto, os complexos de paládio (II) têm atraído considerável interesse pela sua ação citotóxica *in vitro* e *in vivo* contra vários tipos de células tumorais. Neste sentido, o presente trabalho objetiva sintetizar e caracterizar um novo complexo contendo o metil-éster da *L*-fenilalanina (*L*-Fame) ciclometalada de fórmula $[Pd(C^2,N-L-Fame)(Br)(L)]$ ($L = 2,6$ -lutidina). O ciclopaladado foi preparado a partir da reação de clivagem do dímero precursor $[Pd(C^2,N-L-Fame)(Br)]_2$ e a 2,6-lutidina. Os compostos sintetizados foram caracterizados por análise elementar (CHN), espectroscopia vibracional no infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) de 1H e espectrometria de massas. O comportamento do complexo $[Pd(C^2,N-L-Fame)(Br)(L)]$ em solução foi estudado por RMN de 1H , visando analisar se sua estrutura sofre alteração em condições semelhantes ao meio biológico. A ação citotóxica do complexo $[Pd(C^2,N-L-Fame)(Br)(L)]$ foi avaliada em um painel de linhagens de células tumorais humanas. Particularmente, o ciclopaladado demonstrou ser ativo contra células tumorais de ovário resistentes à cisplatina (A2780cis) e de mama triplo-negativo (MDA-MB-231), com valores de IC_{50} igual a $9,13 \pm 0,25$ e $6,04 \pm 0,40 \mu M$, respectivamente. Considerando que o DNA é um alvo clássico dos fármacos à base de platina (II), estudos de interação entre o ciclopaladado e o ctDNA foram conduzidos. As bandas, negativa (244 nm) e positiva (276 nm) do espectro de dicroísmo circular do ctDNA não sofreram alterações com o aumento da concentração do ciclopaladado, sugerindo que a conformação do ctDNA sofre pouca ou nenhuma alteração na presença do complexo. Além disso, o aumento da concentração do ciclopaladado não foi capaz de causar a supressão da fluorescência do aduto Hoescht 33258-ctDNA, indicando que as forças que mantêm o Hoescht 33258 ligado ao DNA são significativamente mais fortes em relação àquelas estabelecidas pelo ciclopaladado.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer, paládio(II), *L*-fenilalanina, DNA, citotoxicidade.

ABSTRACT

Cancer is one of the diseases that cause a large number of deaths in the world. According to INCA, Brazil will have more than 2 million new cases of cancer in the three-year period 2023-2025. Despite the great advances in the diagnosis and treatment of the disease, the development of drug resistance remains the main limiting factor for the effectiveness of the treatment of cancer patients. Particularly, metal complexes emerge as very promising candidates, as they are capable of acting on multiple targets. Particularly, palladium(II) complexes have attracted considerable interest due to their *in vitro* and *in vivo* cytotoxic action against various types of tumor cells. In this sense, the present work aims to synthesize and characterize a new complex containing the cyclometallated L-phenylalanine (L-Fame) methyl ester with formula $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-L-Fame})(\text{Br})(\text{L})]$ ($\text{L} = 2, 6\text{-lutidine}$). The cyclopalladated compound was obtained from the reaction between the precursor $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-L-Fame})(\text{Br})]_2$ and 2,6-lutidine. The synthesized compound was characterized by elemental analysis (CHN), vibrational infrared (IR) spectroscopy, ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry. The behavior of the complex $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-L-Fame})(\text{Br})(\text{L})]$ in solution was studied by ^1H NMR aiming at analyzing structure changes under conditions similar to the biological environment. The cytotoxicity of the $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-L-Fame})(\text{Br})(\text{L})]$ complex was evaluated in a panel of human tumor cell lines. Complex $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-L-Fame})(\text{Br})(\text{L})]$ demonstrated to be active against cisplatin-resistant ovarian (A2780cis) and triple-negative breast (MDA-MB-231) tumor cells, with IC_{50} values equal to 9.13 ± 0.25 and $6.04 \pm 0.40 \mu\text{M}$, respectively. Considering that DNA is a classic target of platinum(II)-based drugs, studies between $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-L-Fame})(\text{Br})(\text{L})]$ and ctDNA were carried out. Circular dichroism spectrum showed that the negative (244 nm) and positive (276 nm) bands of the ctDNA did not change with increasing $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-L-Fame})(\text{Br})(\text{L})]$ concentration, suggesting that the ctDNA conformation undergoes little or no change in the presence of the complex. Furthermore, increasing the concentration of $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-L-Fame})(\text{Br})(\text{L})]$ was able to induce a fluorescence quenching of the Hoescht 33258-ctDNA adduct, indicating that the $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-L-Fame})(\text{Br})(\text{L})]$ interacts weakly with DNA.

KEYWORDS: Cancer, palladium(II), L-phenylalanine, DNA, cytotoxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número estimado de casos incidentes e mortes em todo o mundo em 2020.	23
Figura 2: Microscopia eletrônica da <i>Escherichia coli</i> : a) Estrutura normal b) Estrutura em filamentos devido a presença do agente desconhecido.....	27
Figura 3: Teste <i>in vivo</i> da cisplatina em camundongos com sarcoma 180.	28
Figura 4: Estrutura da cisplatina.....	29
Figura 5: Mecanismo de atuação da cisplatina no organismo.....	30
Figura 6: Estrutura da carboplatina.	31
Figura 7: Estrutura da oxaliplatina.....	32
Figura 8: Estrutura de outros quimioterápicos a base de platina.....	33
Figura 9: Estrutura do Padeliporfin.....	34
Figura 10: Mecanismo associativo para troca de ligantes do Pd(II).	36
Figura 11: Reação de aquação na presença de um ligante volumoso.....	37
Figura 12: Reação hipotética envolvendo a hidrólise de um complexo contendo o ligante.....	38
Figura 13: Representação do ciclopaladado.	40
Figura 14: Estrutura dos ciclopaladados de Caires et al. (1999) e IC ₅₀	41
Figura 15: Estrutura do [Pd ₂ (S(-)-C ₂ ,N-dmpa) ₂ (μ-dppe)Cl ₂].....	42
Figura 16: Estrutura do ciclopaladado [Pd ₂ (C ² ,N-S(-)-dmpa) ₂ (μ-dppf)Cl ₂].....	43
Figura 17: Estrutura do ciclopaladado [Pd(C ² ,N-S(-)-dmpa) ₂ (μ-dppf)].....	44

Figura 18: Substituição das benzilaminas por aminoácidos aromáticos (AA) para a formação de ciclopaladado.....	45
Figura 19: Substituição do cloridrato pelo triflato.....	46
Figura 20: Substituição das difosfinas exobidentada pela 2,6-lutidina.	48
Figura 21: Estrutura dos compostos $[Pd(C^2,N-dmba)(X)(luti)]$	48
Figura 22: Estrutura dos complexos $[Pd(X)(C^2,N-dmpa) lut]$	49
Figura 23: Proposta de substituição das benzilaminas pelo éster metílico da L-fenilalanina.	51
Figura 24: Reação de neutralização do cloridrato.	55
Figura 25: Síntese do ligante L-Fame-OTf.	55
Figura 26: Formação do precursor C1.	56
Figura 27: Síntese do dímero C1-Br.....	57
Figura 28: Reação do C1-Br-Lut.	57
Figura 29: Equipamento de análise elementar CHN.	58
Figura 30: Espectrômetro FTIR Nicolet™ iS™ 5.....	59
Figura 31: Espectrômetros de RMN 600 e 300 MHz.	59
Figura 32: Espectrômetro de massas Amazon Speed ETD – Bruker.....	61
Figura 33: Espectrômetro FTIR Nicolet™ iS™ 5.....	61
Figura 34- Equipamento de Dicroísmo Circular.....	62
Figura 35: Fluxograma das sínteses.	67

Figura 36- Fluxograma de otimizações da síntese.	69
Figura 37- Espectro de RMN de ¹ H do Ligante L1 e AA-HCl.....	71
Figura 38- Espectro de RMN de ¹ H do ligante L1 em DMSO-d ₆	72
Figura 39- Espectro na região do infravermelho (IR) do L1.....	74
Figura 40: Espectro de RMN de ¹ H do ligante L1 em DMSO-d ₆	75
Figura 41: Espectro de IV do complexo dímero C1-Br.	76
Figura 42: Espectro de RMN de ¹ H do ligante C1-Br em CDCl ₃	78
Figura 43: Espectro de IV do complexo C1-Br-Lut.	80
Figura 44: Espectro de RMN de ¹ H do C1-Br-Lut em acetona-d ₆	82
Figura 45: Espectro de massas do C1-Br-Lut em acetona.....	82
Figura 46: Estudo comportamento em solução de acetona-d ₆ no RMN de ¹ H do C1-Br-Lut.	84
Figura 47: Estudo comportamento em solução de 80% acetona-d, 10% D ₂ O e 10% (v/v) de tampão fosfato no RMN de ¹ H do C1-Br-Lut.	85
Figura 48: Estudo comportamento em solução de 80% acetona-d, 10% D ₂ O, 10% (v/v) de tampão fosfato e 100 mM de Cloreto no RMN de ¹ H do C1-Br-Lut.	86
Figura 49: Estudo de comportamento em DMSO-d ₆ no RMN de ¹ H do C1-Br-Lut...	87
Figura 50: RMN ¹ H em DMSO-d ₆ do C1-Lut-Y.....	89
Figura 51: Espectro de massas do C1-Br-Lut e C1-Lut-X em DMSO.	89
Figura 52: Estudo comportamento em solução de 80 % DMSO-d ₆ , 10% D ₂ O, 10% (v/v) de tampão fosfato e 100 mM cloreto do C1-Br-Lut-X.....	91

Figura 53: Formas do DNA.....	94
Figura 54: Ligações covalentes coordenadas da Cisplatina com o DNA.	96
Figura 55: Interações não covalentes com o DNA.	97
Figura 56: Titulação espectrofotométrica do DNA e determinação da constante de ligação Kb.....	99
Figura 57: Espectro de CD do ctDNA livre e com a presença do complexo C1-Br-Lut pela razão molar.....	101
Figura 58: a) Estrutura do Hoescht 33258. b) Interação DNA-H33258.	102
Figura 59: Espectro de supressão da fluorescência do Hoechst 33258 – ctDNA com ausência e presença do supressor C1-Br-Lut com a variação da concentração de 0 a 60 μ M.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Incidência e mortalidade de câncer no Brasil.	24
Tabela 2: Reagentes utilizados para sínteses.	53
Tabela 3: Solventes químicos para análises e sínteses.	54
Tabela 4: Condições para os estudos de comportamento em solução.	60
Tabela 5: Deslocamento químicos da RMN de ¹ H do L1.	74
Tabela 6: Deslocamentos químicos do RMN de ¹ H do C1-Br.	77
Tabela 7: Resultados da análise elementar do C1-Br-Lut.	79
Tabela 8: Deslocamentos químicos do RMN de ¹ H do C1-Br-Lut.	80
Tabela 9: Resultados de citotóxicidade para C1-Br-Lut, 2,6-Lutidina e cisplatina em acetona.	92
Tabela 10: Resultados de citotoxicidade para C1-Br-Lut, 2,6-Lutidina e cisplatina em DMSO.	93
Tabela 11: Dados de constante de ligação Kb.	100

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	23
1.1.	Cisplatina, o primeiro metalofármaco para tratamento de câncer ...	26
1.2.	Quimioterápicos de platina.....	31
1.3.	Compostos de Paládio	33
1.4.	Planejamentos de compostos de Paládio(II) bioativos	35
1.4.1.	Compostos ciclopaladados	39
1.5.	Ortometalação de aminoácidos: potencialidade de obtenção de novos compostos bioativos.....	45
1.6.	Aminas aromáticas ortopaladadas contendo 2,6-lutidina: contribuição recentes do grupo	47
2.	HIPÓTESE DO TRABALHO	51
3.	OBJETIVOS.....	52
3.1.	Objetivos específicos	52
4.	PARTE EXPERIMENTAL	53
4.1.	Reagentes e solventes.....	53
4.2.	Síntese dos compostos.....	54
4.2.1.	Síntese do ligante triflato do metil-éster da L-fenilalanina (L1)	54
4.2.2.	Síntese do precursor $[Pd(C^2, N-L-Fame)(CH_3CN)_2]OTf$ (C1).....	56

4.2.3.	Síntese do dímero [Pd(C ² ,N-L-Fame)(Br)] ₂ (C1-Br)	56
4.2.4.	Síntese de clivagem [Pd(C ² ,N-L-Fame)(Br)(2,6-lut)] (C1-Br-lut)	57
4.3.	Técnicas de caracterização.....	58
4.3.1.	Análise elementar	58
4.3.2.	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	58
4.3.3.	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	59
4.3.4.	Estudo de comportamento em solução por RMN ¹ H.....	60
4.3.5.	Espectrometria de massas.....	60
4.3.6.	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível.....	61
4.3.7.	Espectropolarímetro de Dicroísmo Circular	62
4.4.	Ensaio de viabilidade celular.....	62
4.5.	Interação com biomolécula ctDNA	64
4.5.1.	Preparo de soluções para ensaios com biomolécula.....	64
4.5.1.1.	Tampão Tris-HCl 5 mM + 50 mM de NaCl.....	64
4.5.1.2.	Solução de ctDNA (<i>Calf thymus</i>)	64
4.5.1.3.	Solução do corante Hoechst 33258 (1 mM).....	65
4.5.2.	Ensaio com a biomolécula ctDNA	65
4.5.2.1.	Titulação espectrofotométrica do DNA por UV-Vis	65
4.5.2.2.	Ensaio de interação com DNA via dicroísmo circular.....	66

4.5.2.3.	Ensaio de competição pelo DNA com Hoechst 33258.....	66
5.	Resultados e discussão	67
5.1.	Otimização das sínteses	68
5.2.	Caracterização	73
5.2.1.	Ligante L-Fame-OTF (L1)	73
5.2.2.	Complexo [Pd(C ² ,N-L-Fame)(Br)] ₂ (C1-Br):	76
5.2.3.	Complexo [Pd(C ² ,N-L-Fame)(Br)(2,6-lut)] (C1-Br-Lut):	79
5.2.3.1.	Análise elementar	79
5.2.3.2.	Espectroscopia no Infravermelho (IV) do C1-Br-Lut	79
5.2.3.3.	Espectroscopia RMN ¹ H em acetona-d ₆	80
5.2.3.4.	Estudo do comportamento do C1-Br-Lut em solução	83
5.2.3.4.1.	Estudo de comportamento em solução: acetona	84
5.2.3.4.2.	Estudo de comportamento em solução: dimetilsulfóxido	87
5.3.	Atividade Antiproliferativa.....	92
5.4.	Ensaio de interações com ctDNA.....	94
5.4.1.	Titulação espectrofotométrica do DNA por UV-Vis	98
5.4.2.	Ensaio de interação com DNA via dicroísmo circular.....	100
5.4.3.	Ensaio de competição pelo ctDNA com Hoechst 33258.....	102
6.	Conclusão.....	104

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das maiores causas de mortes do mundo. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), pertencente a Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de mortes estimado para o ano de 2020 é de aproximadamente 10 milhões de vítimas provocada pelas neoplasias. Além disso, segundo a IARC, à estimativa de novos casos de câncer para o mesmo período é de quase 20 milhões de novos casos. Observa-se na figura 1, os números correspondentes as estimativas de novos casos incidentes e mortes provocados pelo câncer em todo o mundo, para ambos os sexos e todas as idades.

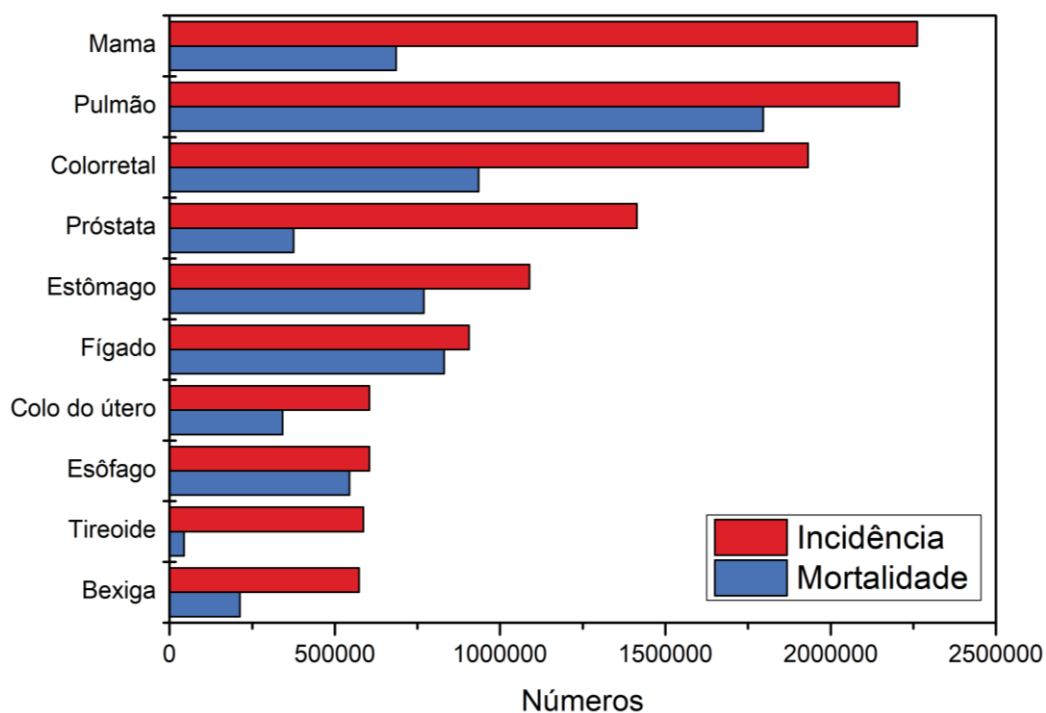


Figura 1: Número estimado de casos incidentes e mortes em todo o mundo em 2020.



Fonte: Adaptado da IARC-OMS, 2022.

As maiores incidências de novos casos no mundo estão relacionadas com os cânceres de mama e pulmão, correspondendo a cerca de 11,7% e 11,4% dos casos totais. Porém, as maiores estimativas relacionadas com os números de mortes são

atribuídas aos cânceres de pulmão e colorretal, representando 18,0% e 9,40% dos óbitos relacionados ao câncer.

No Brasil o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), vinculado ao Ministério da Saúde, estimou que a incidência de novos casos, em 2020, ligados as neoplasias, podem atingir a marca de 626 mil possíveis novos pacientes. Em 2019 foram constatados pelo INCA cerca de 232 mil óbitos provocados pelos carcinomas. Na tabela 1, podemos observar os números estimados para possíveis novos casos em 2020 e os óbitos registrados pelo INCA em 2019, referente a incidência de cânceres na população brasileira masculina e feminina.

Tabela 1: Incidência e mortalidade de câncer no Brasil.

Localização Primária	Novos casos*	Óbitos**			Localização Primária	Novos casos*	Óbitos**
Todas as Neoplasias	309.750	121.686			Todas as Neoplasias	316.280	110.344
Próstata	65.840	15.983	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>Homens</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>Mulheres</p>  </div> </div>		Mama feminina	66.280	18.068
Colorretal	20.540	10.191		Colorretal	20.470	10.385	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	16.733		Colo do útero	16.710	6.596	
Estômago	13.360	9.636		Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	12.621	
Cavidade Oral	11.200	5.120		Glândula Tireoide	11.950	571	
Esôfago	8.690	6.802		Estômago	7.870	5.475	
Bexiga	7.590	3.115		Ovário	6.650	4.123	
Laringe	6.470	3.985		Corpo do útero	6.540	1.936	
Sistema Nervoso Central	5.870	5.049		Sistema Nervoso Central	5.230	4.663	
Leucemias	5.920	4.014		Linfoma não-Hodgkin	5.450	1.523	

*2020 **2019

Fonte: Adaptado de Instituto Nacional de Câncer, 2021.

De acordo com o INCA, as maiores incidências de novos casos de câncer, em 2020, na população brasileira masculina estão relacionadas com as neoplasias de próstata e colorretal, representando um total de 21,2% e 6,6% dos possíveis novos casos. Porém, ao analisarmos os números de óbitos ocorridos em 2019, os cânceres de traqueia, brônquio, pulmões e próstata foram os responsáveis pelo maior número de vítimas, representando um total de 26,9% dos números de mortos.

Na população feminina brasileira, as maiores incidências de novos casos estão relacionadas com os cânceres de mama, correspondendo a 20,9% dos casos totais, e o colorretal, representando 6,42% dos novos casos. Além disso, o câncer de mama é uma das maiores causa de morte entre as vítimas das neoplasias, correspondendo a 16,4% dos números divulgados pelo o INCA, conforme a tabela 1. Os cânceres envolvendo o trato respiratório inferior, como traqueia, brônquios e pulmões,

corresponde como a segunda maior causa de mortes provocada pelas neoplasias na população brasileira feminina, chegando a um total de 11,4% dos mortos.

A alta incidência de número de casos tem gerado um grande impacto financeiro e social no mundo. Os custos dos tratamentos dos cânceres aumentaram exponencialmente devido a ocorrência em idades relativamente mais jovens. Além disso, em alguns casos são detectados tardiamente e necessitam de fármacos e tecnologias caras, nos quais em alguns casos, estão associados a tratamentos paliativos, em que as chances de cura em estágios avançados da doença já são muito remotas. Segundo a Sociedade Norte-Americana de Câncer a estimativa para os gastos com tratamento de câncer, em nível mundial, passará de US\$ 290 para US\$ 458 bilhões por ano entre 2010 e 2030 (MEDICI, 2018).

No Brasil, com o aumento do número de doentes e de pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), o financiamento para os tratamentos oncológicos vem se tornando um grande desafio para o Estado. Entre 1999 e 2016, os gastos com os serviços oncológicos no SUS saíram de R\$ 470 milhões para R\$ 3,90 bilhões em valores nominais, representando um crescimento de oito vezes em um período de 17 anos. Deste montante, gastou-se 59,9% com procedimentos clínicos e 31,5% com procedimentos cirúrgicos (Gomes et al., 2021; Medici, 2018).

Porém, quando são diagnosticados precocemente, os cânceres nem sempre seguem um curso tão letal, alguns são descobertos cedo o bastante para serem tratados através de cirurgias, radioterapias, imunoterapias, terapias hormonais, transplante de células-tronco e por quimioterapia (Kumar et al., 2016). Além disso, em alguns casos é necessário combinar mais de uma modalidade de tratamento.

Dentre os possíveis tratamento para o câncer, as modalidades tradicionais de tratamento de cânceres no Brasil incluem as radioterapias, quimioterapias e cirurgias. Entretanto, o Brasil vem enfrentando uma escassez ao tratamento por radiação, devido à falta de pessoal e unidades suficientes. Nesse sentido, a escassez deste tratamento tem provocado um aumento do número de óbitos oncológicos, que

poderiam ser evitados, caso houvesse a universalização desta terapia no SUS para o tratamento dos cânceres mais comuns no Brasil (Mendez et al., 2018).

No entanto, o método terapêutico mais utilizado no Brasil para o tratamento de câncer é a quimioterapia. De acordo com o INCA, a quimioterapia é um tratamento que utiliza medicamentos para destruir as células doentes, malignas, que formam um tumor. Estes medicamentos se misturam com o sangue e são levados a todas as partes do corpo, destruindo as células doentes que estão formando o tumor e impedindo que elas se espalhem pelo corpo, conseqüentemente os quimioterápicos são considerados como um tratamento sistêmico, diferente das cirurgias e radioterapias que são um tipo de tratamento localizado.

Entretanto, alguns quimioterápicos atuam de forma não específica, lesionando tanto células malignas quanto benignas, provocando, em alguns casos efeitos colaterais severos, no qual, excedem os benefícios por ele proporcionados. Além disso, o organismo acaba criando uma resistência a esses medicamentos, o que leva a uma redução da sua eficácia, limitando a utilização de muitos quimioterápicos (Bangde et al., 2019).

1.1. Cisplatina, o primeiro metalofármaco para tratamento de câncer

Durante a década de 1970, o professor doutor Barnett Rosenberg estudava o efeito de um campo elétrico na inibição da divisão celular da *Escherichia coli*. Um meio de cultura foi exposto a um campo elétrico gerado por eletrodos de platina, sendo observado a inibição da divisão celular, mas não a interrupção do crescimento, levando a formação de filamento cerca de 200 a 300 vezes maior que seu comprimento original, figura 2. Posteriormente, descobriu-se que o agente inibidor não era o campo elétrico, mas outro agente desconhecido formado *in situ*, iniciando uma intensa busca para identificar a espécie (Hoeschele, 2014).

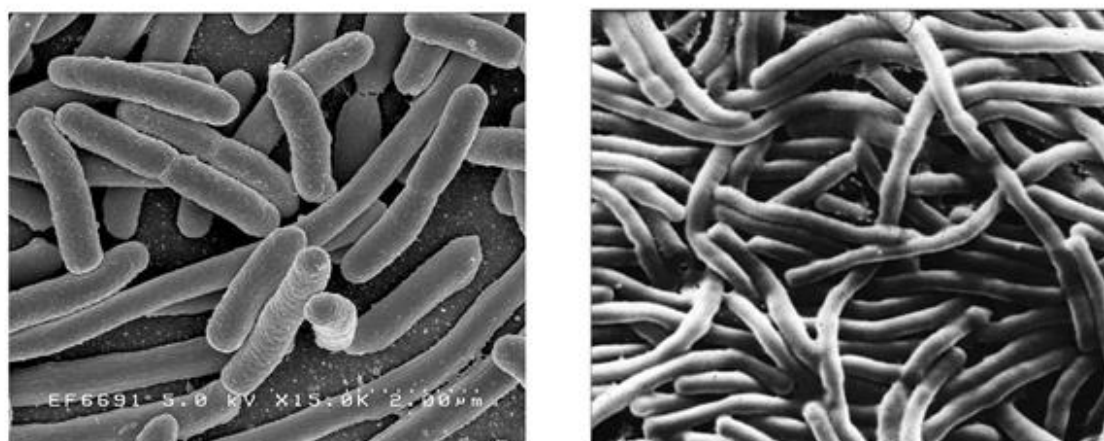
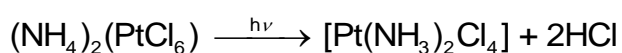


Figura 2: Microscopia eletrônica da *Escherichia coli*: a) Estrutura normal b) Estrutura em filamentos devido a presença do agente desconhecido.

Fonte; Adaptado de Hoeschele, (2014).

Rosenberg e sua equipe avaliaram sistematicamente todas as variáveis do sistema que poderia ser o possível agente inibidor da divisão celular. Eventualmente, foi levantada a hipótese de que o hexacloroplatinato de amônio ((NH₄)₂PtCl₆) produzido pela eletrólise, dos eletrodos de platina, durante o experimento, poderia ser o agente inibidor. Desta forma, utilizaram-se uma solução de (NH₄)₂PtCl₆ para realizar os experimentos *in vitro*, com o objetivo de replicar os efeitos de inibição observados, durante a submissão em um campo elétrico. Entretanto, quando submetidos ao meio de cultura, essa espécie sofreu uma alteração fotoquímica, equação 1.

Equação 1: Conversão fotoquímica do hexacloroplatinato de amônio em cis-diamintetracloroplatina(IV).



Fonte: Do Autor.

A espécie responsável pelo aumento da inibição do crescimento celular foi isolada do meio e caracterizada constatando que era a cis-diamintetracloroplatina(IV), sendo sintetizada independentemente utilizando cis-diaminodicloroplatina(II) como precursor (Hoeschele, 2014).

Ao avaliarem a atividade citotóxica do cis-[Pt(NH₃)₂Cl₄] e o seu precursor cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂], constataram, que ambas as espécie foram capaz de inibir a divisão celular *in vitro*. Entretanto, o cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂] demonstrou atividade inibitória muito superior. A partir dessa premissa, Rosenberg resolveu aplicar a hipótese de que se esse agente era capaz de inibir a divisão celular em bactérias, porque não testa-la na inibição da divisão celular de células cancerígenas, sendo posteriormente testado *in vivo* para avaliar a possível atividade antitumoral da cisplatina (Corinti et al., 2016; Hoeschele, 2014).

Os testes para avaliação da atividade antitumoral da cisplatina, foram realizados em camundongos portadores de tumores S180, figura 3, permitindo o crescimento por oito dias. Posteriormente, a partir do oitavo dias, os roedores foram tratados com uma única dose de 8,0 mg.kg⁻¹ de cisplatina.



Figura 3: Teste *in vivo* da cisplatina em camundongos com sarcoma 180.

Fonte: Adaptado de Rosenberg et al., 1970.

A figura 3, representa os resultados obtidos a partir da realização do teste *in vivo* em dois cenários diferentes. O primeiro cenário foi realizado como controle, ou seja, permitindo o crescimento do tumor sem nenhuma intervenção, essa ação acabou

levando o camundongo a óbito entre o 20º e 21º dia. No segundo cenário, representado na parte inferior da imagem 3, o camundongo foi tratado com uma dose única de cisplatina no oitavo dia de crescimento do tumor. Nota-se que a partir do 16º dia, é possível observar a regressão progressiva e bem sucedida do tumor que após trinta e seis dias da aplicação, o mesmo encontrava-se livre do sarcoma 180, as descobertas idealizadas por Rosenberg representa um marco no desenvolvimento de protocolos quimioterápicos para tratamento de tumores (Corinti et al., 2016; Hoeschele, 2014; Rosenberg et al., 1970).

Desta forma, à partir de testes subsequentes em laboratórios, verificou-se que a cisplatina, figura 4, era eficiente contra uma grande variedade de tumores, entrando para os ensaios clínicos em 1972 nos EUA e aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1978 para utilização no tratamento de tumores incluindo tumores na cabeça, pescoço, pulmão e trato geniturinário, sendo a primeira metalodroga aprovada para o tratamento de câncer (Ciarimboli, 2021; Fanelli et al., 2016).

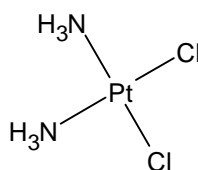


Figura 4: Estrutura da cisplatina.

Fonte: Do Autor.

O mecanismo de atuação da cisplatina no organismo, figura 5, encontra-se bem descrito na literatura, mas ainda existem algumas lacunas a serem preenchidas, que devem ser esclarecidas com novas pesquisas. O fármaco é administrado em pacientes, com prescrições semanais de 5 mg.kg^{-1} , por meio intravenoso devido à alta concentração de cloreto no meio extracelular, corresponde a cerca de 100 mM. Essa quantidade elevada de cloreto inibe a aquação dos ligantes clorido na corrente sanguínea, impedindo a substituição por outros ligantes. No entanto, uma grande quantidade da cisplatina liga-se de modo covalente às proteínas plasmáticas, apenas uma pequena quantidade do composto é direcionada ao alvo celular.

O mecanismo bioquímico pelo qual a cisplatina atravessa a membrana celular ainda é incerto. Inicialmente alguns estudos indicavam que a cisplatina entraria nas células principalmente por difusão passiva, no entanto alguns estudos recentes demonstraram que parte da absorção da cisplatina depende de energia. Além disso, os compostos de platina podem entrar nas células normais e tumorais por meio de transportadores catiônicos orgânicos presente na membrana celular.

Ao entrar no meio intracelular, acontece uma redução drástica na concentração de cloreto, para a ordem de 2 – 30 mM, figura 5. Nessas condições, os cloretos tornam-se susceptíveis a reações de aquação. Os metabólitos resultantes da aquação são mais reativos aos alvos celulares e fornecem derivados de platina com uma carga positiva que encaminhará para os alvos celulares. A espécie reativa reagirá com inúmeros alvos celulares, dentre os quais destaca-se o DNA. O átomo central de platina, liga-se covalentemente ao nitrogênio 7 das bases purínicas, como guanina e adenina, formando ligações cruzadas intra (maior proporção) e interfilamentares (menor proporção).

A ligação forma o aduto Pt-DNA, que é capaz de desencadear uma série de resposta celulares, como inibição da replicação e transcrição celular, paralisação do ciclo celular e pôr fim a morte celular por apoptose, podendo interromper o desenvolvimento de células tumoral (Cohen et al., 2001; Tchounwou et al., 2021).

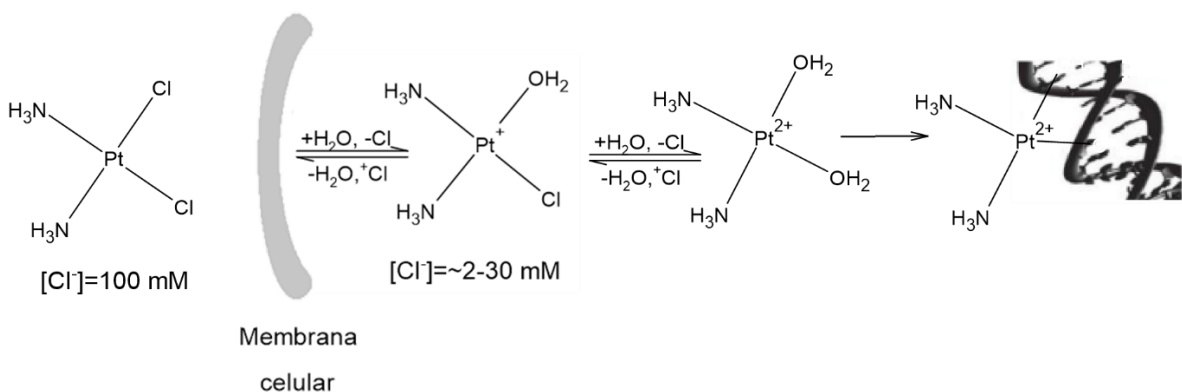


Figura 5: Mecanismo de atuação da cisplatina no organismo.

Fonte: Do Autor.

Apesar dos efeitos positivos dos compostos de platina, eles apresentam elevada toxicidade para o organismo. Os pacientes que recebem esses agentes apresentam efeitos colaterais graves, limitando a dose que pode ser administrada, além disso, a baixa solubilidade destes compostos em soluções fisiológicas acaba limitando a eficácia destas metalodrogas (Bangde et al., 2019). Os efeitos colaterais dos compostos incluem: toxicidade às células em geral, náuseas e vômitos, diminuição da produção de células sanguíneas e plaquetas na medula óssea, diminuição da resposta à infecção, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, toxicidade gastrointestinal, pressão arterial elevada e alergia (Bangde et al., 2019; Florea et al., 2011; Rubino et al., 2017).

1.2. Quimioterápicos de platina

O impacto causado pela descoberta da atividade antitumoral da cisplatina e sua aprovação para uso clínico bem como suas limitações motivou várias pesquisas dedicadas no planejamento e avaliação da atividade antitumoral de análogos da cisplatina. Neste contexto, surge a carboplatina, figura 6, descrita por Cleare e Hoeschele em 1973, sendo o segundo fármaco aprovado para uso clínico pelo FDA em 1989. O composto é comercializado mundialmente, com o nome de Paraplatina.

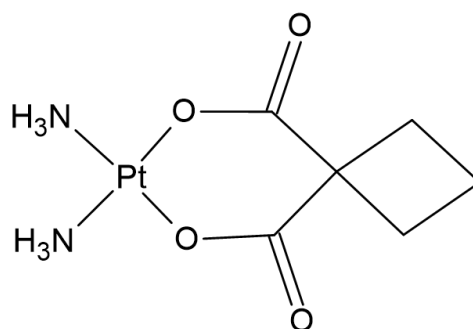


Figura 6: Estrutura da carboplatina.

Fonte: Do Autor.

A estrutura é diferente da cisplatina, devido à substituição dos ligantes cloretos por ligantes do tipo carboxilato. A alteração dos ligantes, confere uma maior solubilidade e uma reatividade menor, diminuindo a interação covalente com às proteínas plasmáticas em comparação com a cisplatina. Além disso, a Paraplatina

apresenta uma toxicidade menor, sendo facilmente excretada pelo sistema urinário, permitindo a utilização de uma dose maior. O composto é usado mundialmente no combate a uma variedade de cânceres, principalmente no tratamento de câncer de pulmão e de ovário (Pasetto et al., 2006; Wheate et al., 2010).

Outro fármaco de grande sucesso é oxaliplatina, figura 7, desenvolvido e comercializado mundialmente pela Sanofi-Aventis, aprovado pelo FDA para estudos clínicos em 2002, sendo o primeiro fármaco ativo contra alguns tipos de cânceres resistentes à cisplatina. É indicada para o tratamento de câncer coloretal metastático em combinação com a 5-fluorouracila e ácido fólico.

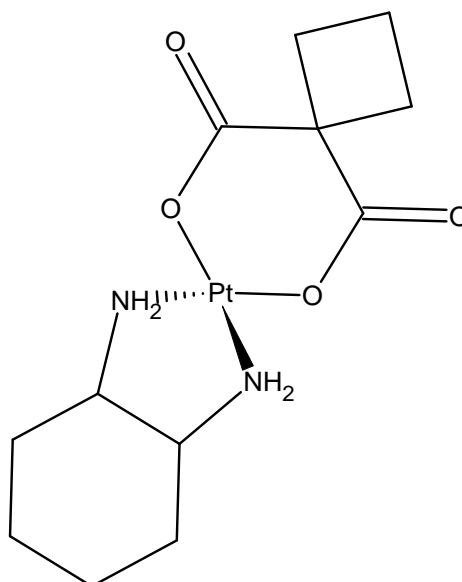


Figura 7: Estrutura da oxaliplatina.

Fonte: Do Autor.

O oxaliplatina é constituído por um grupo abandonador oxalato e pelo ligante carreador diaminociclohexano. O aduto formado com o DNA, não são reconhecidos pelos sistemas de reparo do mesmo, permitindo que esse fármaco seja ativo em algumas linhagens resistentes à cisplatina. Os metabólicos formado *in vivo*, apresentam pouca interação com as proteínas plasmáticas, além disso, não apresentam nefrotoxicidade (Pasetto et al., 2006).

Além da Paraplatina e oxaplatina, existem outros, figura 8, como o Nedaplatina, utilizado desde 1995 no Japão para o tratamento de cânceres de pulmão, esôfago, cabeça e pescoço. Outro fármaco utilizado na Coreia do Sul, desde de 1999, é o Heptaplatina, utilizado no protocolo de tratamento de tumores gastrointestinais avançados e o Lobaplatina aprovado para utilização em 2003 na China, eficiente contra a leucemia mieloide crônica, câncer de mama metastático e pulmão.

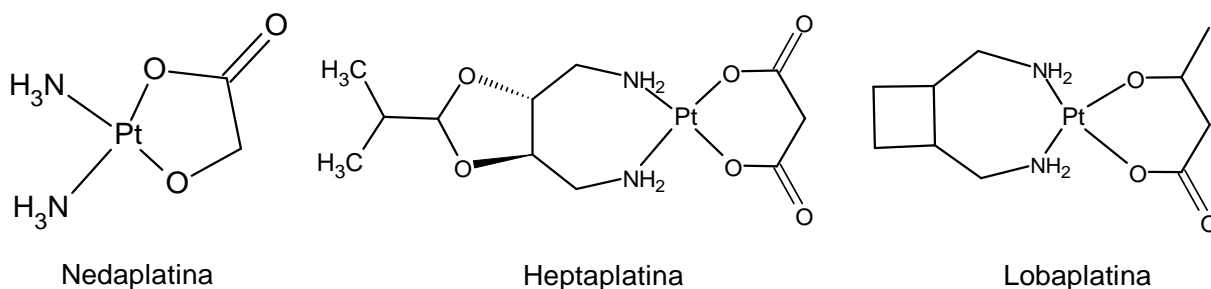


Figura 8: Estrutura de outros quimioterápicos a base de platina.

Fonte: Do Autor

1.3. Compostos de Paládio

Mediante aos efeitos colaterais severos associados aos compostos de platina, iniciou-se a busca por novos possíveis quimioterápicos, que possam superar essas desvantagens associadas à quimioterapia. Esses novos compostos devem apresentar uma redução dos efeitos colaterais e ampliação das atividades antineoplásicas (Karami et al., 2019).

Uma das estratégias quem vem sendo adotada para o desenvolvimento de novas metalodrogas, é mudar a natureza metálica, ou seja, o íon central de certos compostos. Um dos possíveis candidatos são os complexos de paládio(II), uma vez que a geometria de coordenação e raio iônico do paládio(II), 0,64 Å, muito próximo aos do íons platina(II), 0,60 Å, sendo uma alternativa promissora à terapia do câncer (Naskar et al., 2022; Karami et al., 2019). A platina e o paládio apresentam configuração eletrônica d^8 , portanto, a geometria de coordenação de seus compostos é a quadrática planar para ambos os íons, formando complexos de estruturas muito similares (Fanelli et al., 2016).

Apesar de ainda existir poucos fármacos antitumorais à base paládio(II), avanços significativos ocorreram no uso de complexos de Pd(II) em sistema de terapia fotodinâmica. Recentemente em 2020, o FDA concedeu autorização para iniciar a terceira fase de estudo clínico do Padeliporfin, figura 9, uma porfirina contendo paládio(II) derivada de uma clorofila solúvel em água. Em 2017 o mesmo recebeu aprovação para utilização na União Europeia, comercializado sob o nome de TooKad, utilizado no tratamento de pacientes com câncer de próstata de baixo risco.

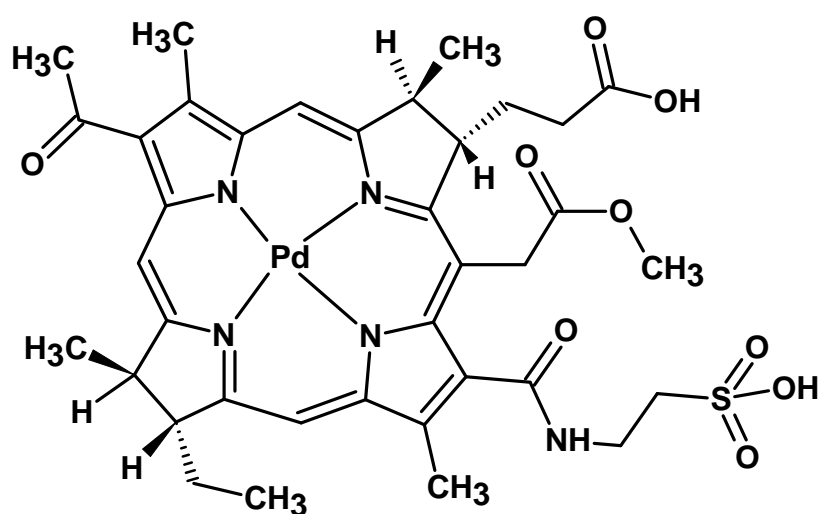


Figura 9: Estrutura do Padeliporfin.

Fonte: Do Autor.

A utilização deste composto é vinculada com uma terapia de ativação fotodinâmica. Após a administração intravenosa, o mesmo é ativado por um sistema de baixa energia fornecida por um comprimento de onda específico de 753 nm, por fibras ópticas posicionadas na próstata (Lebdai et al., 2017).

O processo de ativação do Padeliporfin, consiste no desencadeamento de uma série de reações fotoquímicas, liberando altos níveis de espécies reativas de oxigênio, que induz danos irreversíveis aos endotélio dos vasos sanguíneos, resultando em processo de oclusão do vaso por trombose, levando o tumor a sofrer necrose (Chelly et al., 2020; Lebdai et al., 2017).

Além disso, esse protocolo de tratamento vem sendo testado para diversos cânceres urológicos de baixo risco e os resultados oncológicos preliminares relataram que em um curto período de tempo, grande parte das biopsias realizadas, apresentaram resultados negativos com uma regressão da doença em 24 meses. Um grande número de pacientes evitou a utilização de terapias mais agressivas, após a utilização do Padeliporin.

O protocolo de tratamento entre o Padeliporfin e terapia fotodinâmica, vem emergindo como uma opção para o tratamento destas neoplasias, devido aos efeitos colaterais mínimos. Mesmo em altas doses, o composto apresenta extravasamento mínimo para outros tecidos, sendo rapidamente eliminados pelos sistemas hepático e renal (Chelly et al., 2020).

Os efeitos colaterais mais frequentes associados ao Tookad, são problemas de micção, incontinência urinaria, problemas sexuais, sangue na urina, infecção do trato urinário e sangramento ao redor da área genital. Outros efeitos colaterais estão relacionados com a anestesia geral, como perda de memória breve, anormalidades da frequência cardíaca e efeitos leves no fígado, de acordo com as informações fornecidas pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA).

1.4. Planejamentos de compostos de Paládio(II) bioativos

O grande desafio na preparação de compostos de paládio(II) para fins medicinais é a sua elevada cinética de troca de ligantes em relação aos compostos de platina, sendo esta 10^5 vezes mais rápida que os análogos de platina. Tal fato pode resultar na dissociação ou hidrólise dos ligantes antes de atingir o alvo farmacológico (Bangde et al., 2019; Rubino et al., 2017) reduzindo, portanto, sua atividade.

Neste contexto, os complexos de pálido(II) apresentam uma reação de troca de ligantes relativamente rápida e, desta forma, são classificados como lábeis. Um complexo lábil tem uma energia de ativação muito baixa para a substituição de ligantes. Entretanto, os compostos de platina(II), também são susceptíveis a substituição de ligantes, simplesmente reagem de forma mais lenta em comparação com os compostos de Pd(II). Os análogos de platina apresentam uma energia de

ativação maior para a substituição do ligante, devido a contração lantanídica que os elementos pós-lantanídeos da série 5d sofrem. Tal fato, resulta na formação de átomos mais compactos, com uma acentuada diminuição nos raios atômicos e iônicos, gerando átomos com maior densidade de carga, formando ligações M-L mais fortes, gerando conseqüentemente, uma energia de ativação mais alta e uma cinética de substituição mais lenta (Miessler et al., 2014; Ricci, 2018).

Os complexos com geometria quadrática planar, com configuração d^8 , realizam as reações de troca de ligantes por meio do mecanismo associativo, figura 10.

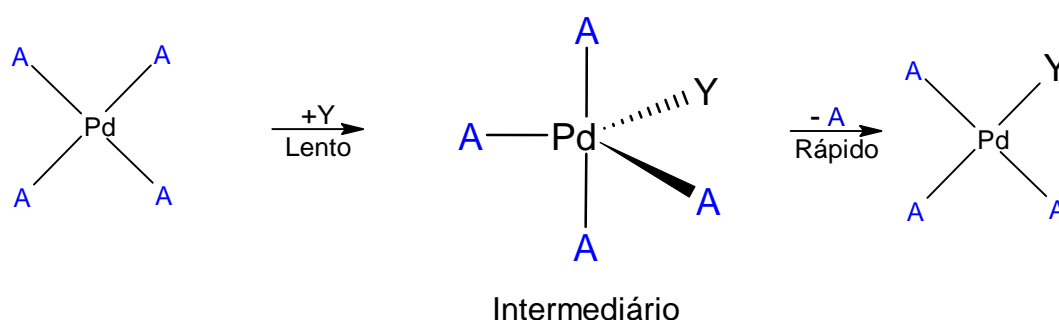


Figura 10: Mecanismo associativo para troca de ligantes do Pd(II).

Fonte: Do Autor.

Neste mecanismo o ligante Y ataca perpendicularmente o plano do paládio, ligando-se ao complexo e formando um intermediário com um número maior de coordenação, gerando um intermediário pentacoordenado. A primeira etapa ocorre de forma lenta, seguida pela etapa de saída do ligante abandonador, que apresenta uma velocidade de saída muito rápida. Posteriormente, o complexo é reorganizado novamente na estrutura de coordenação de origem, com a presença do ligante novo (Miessler et al., 2014).

A incorporação de ligantes volumosos na esfera de coordenação de complexos quadráticos planares d^8 , reduz consideravelmente a cinética de troca de ligantes nestes complexos. Geralmente as reações de substituições de ligantes em complexos quadráticos planares, recebem o ataque do grupo de entrada por uma das faces do

plano, com o grupo de entrada fornecendo densidade eletrônica ao orbital vazio do metal d^8 .

Ao utilizar um ligante volumoso, como a 2,6-lutidina, o acesso ao orbital é obstruído, conforme a figura 11. Tal fato, impede a aproximação do solvente ou outras moléculas ao íon metálico. Em um mecanismo de reação associativo, a interação repulsiva entre o substituinte volumoso e os outros ligantes no intermediário pentacoordenado são desestabilizadas, retardando a reação de troca do ligante cloreto pela água (Edwards et al., 2005; Jones et al., 2007)

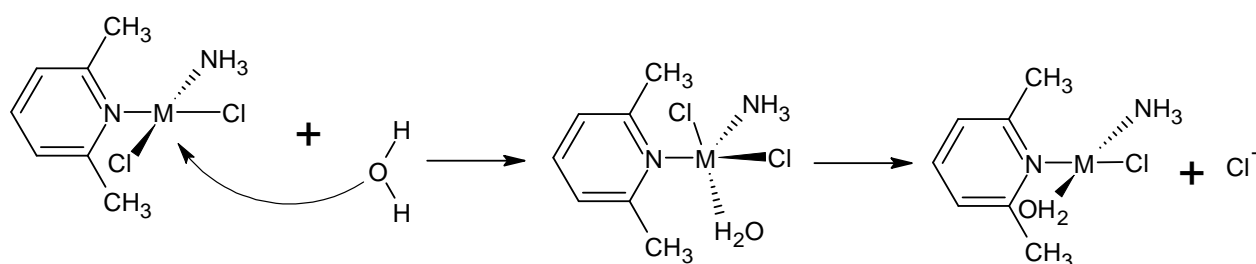


Figura 11: Reação de aquação na presença de um ligante volumoso.

Fonte: Do Autor.

Outra forma de reduzir esta labilidade é a utilização de ligantes que pode conferir não somente uma maior estabilidade termodinâmica, mas também uma cinética de troca de ligantes mais lenta para os complexos de paládio(II) permitindo torná-los ativos farmacologicamente (Rubino et al., 2017). Como o íon Pd(II) é um ácido de Pearson macio, ligantes polidentados contendo átomos doadores macios ou intermediários (ex. S, P, N, C) são empregados não somente para aumentar a estabilidade termodinâmica mas também reduzir a labilidade do complexo desejado bem como evitar a isomerização cis-trans (Jones et al., 2007; Zmejkovski et al., 2022).

É bem estabelecido que o efeito quelato também influencia os parâmetros cinéticos de complexos metálicos. A reação de substituição de um ligante quelato é geralmente mais lenta, quando comparada a de um ligante monodentado. As explicações para esse efeito baseiam-se em dois fatores: a energia necessária para

retirar o primeiro átomo coordenado e a probabilidade da reversão dessa primeira etapa (Miessler et al., 2014).

A figura 12 ilustra as etapas de uma reação hipotética envolvendo a substituição do ligante bidentado quelante etilenodiamina (en) por moléculas de água. Nessa reação de hidrólise, são esperadas duas etapas de dissociação, uma para cada átomo coordenado do ligante en.

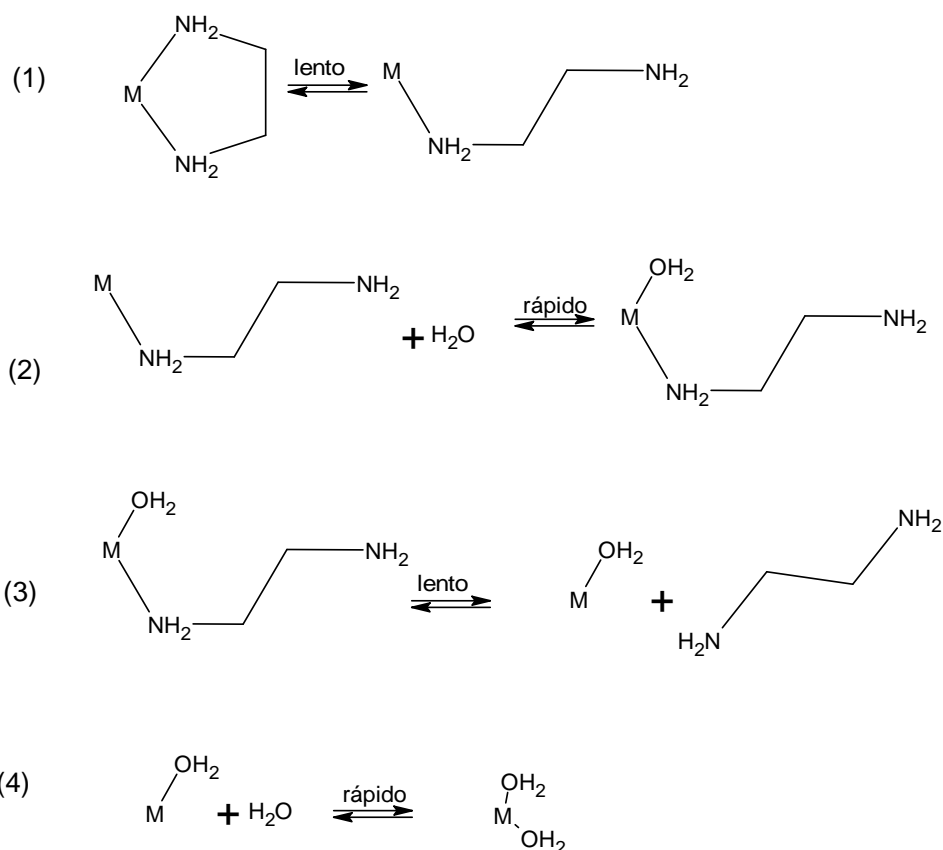


Figura 12: Reação hipotética envolvendo a hidrólise de um complexo contendo o ligante.

Fonte: Adaptado de Miessler et al. (2014).

A variação de entalpia associada à descoordenação do primeiro átomo coordenado, etapa 1, é maior quando relacionado com apenas um ligante monodentado. Se esse átomo realmente se descoordenar, sua barreira cinética para religação subsequente é menor, uma vez que, o átomo descoordenado durante a primeira etapa permanece muito próximo do centro metálico. A primeira etapa de dissociação da etilenodiamina é esperada ser mais lenta que a etapa correspondente

para a amina, pois o ligante deve se dobrar e girar para afastar o grupo NH₂ livre do metal.

A segunda etapa de dissociação (3) também deve ser lenta por dois motivos: a concentração desse intermediário é baixa e a primeira etapa de dissociação pode ocorrer facilmente no sentido inverso. O nitrogênio descoordenado é mantido próximo ao metal pelo resto do ligante, fazendo com que a sua religação seja muito provável. No geral, o efeito quelato cinético reduz as velocidades de reações de aquação por fatores de 20 a 10⁵ (Miessler et al., 2014).

Dada a importância da incorporação de ligantes quelantes e ligantes volumosos na estrutura de molecular de determinados complexos de paládio, nosso grupo de pesquisa tem usado essa estratégia, da combinação destes ligantes em complexos, para nortear a síntese de uma variedade de compostos de paládio para posterior investigação das suas atividades citotóxica frente à células tumorais e antiproliferativa contra determinados agentes patogênicos.

1.4.1. Compostos ciclopaladados

Os compostos ciclopaladados, figura 13, têm sido amplamente estudados devido a suas novas aplicações em uma vasta gama de áreas, como síntese orgânica, reações de inserção, como possíveis drogas antitumorais e em catálise. Os ciclopaladados caracterizam-se pela presença de um anel resultante da ligação de coordenação com átomos doadores de elétrons (Y) e uma ligação intramolecular covalente carbono-paládio, tornando um composto organometálico. A ligação metal-carbono é estabilizada intramolecularmente por pelo menos um átomo doador de elétrons derivado de moléculas heteromoléculas. Esta configuração permite uma grande versatilidade reacional, podendo-se obter espécies diversificadas pela variação do átomo doador (N, P, As, O, S ou Se), do tamanho do anel que pode variar de 3 a 11 membros, sendo os mais comuns com anéis de 5 a 6 membros (Bangde et al., 2019; Caires et al., 1996; Karami et al., 2019).

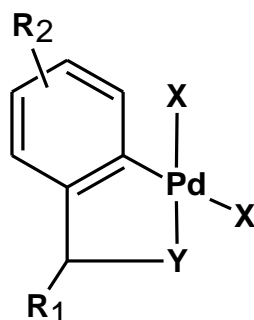


Figura 13: Representação do ciclopaladado.

Fonte: Do Autor.

Os primeiros relatos e caracterização desses tipos de complexos foram na década de 60, porém, a descoberta como catalisador ocorreu apenas na década de 90. O termo ciclopadação foi definido por Trofimenko em 1972, o que implica a formação de complexos de paládio em que um ligante orgânico sofre metalação intramolecular, com a formação de um complexo quelante, apresentando uma ligação Pd-C com outra ligação Pd-L (L= N, S, P). Devido a essa variedade de ligantes, é possível ter inúmeros mecanismos de atuação em sistemas biológicos (Bangde et al., 2019).

As potencialidades terapêuticas dos compostos ciclopaladados vêm sendo constantemente investigadas pela comunidade científica. A presença de um anel ortometalado “(C,N)Pd” contendo uma forte ligação $\sigma\text{C}\rightarrow\text{Pd}$ aumenta a estabilidade do composto organometálico, permitindo que sua estrutura seja mantida essencialmente intacta no meio biológico tempo o suficiente até interagir com o alvo farmacológico (Cortés et al., 2012; Cutillas et al., 2013; Omae, 2014).

O artigo intitulado “Síntese e atividade citotóxica de alguns azido-ciclopaladados estabilizados com ligantes bifosfínicos” (CAIRES et al., 1999) foi o primeiro estudo no âmbito nacional sobre o estudo do potencial antitumoral de ciclopaladados. Neste trabalho, foram reportados resultados muito promissores sobre a atividade citotóxica de organometálicos mono e binucleares de Pd(II) contendo difosfinas frente às linhagens de células tumorais humanas C6 (glioma cerebral), Hep-2 (orogaringe) e HeLa (cólón de útero). As estruturas dos compostos sintetizados e

caracterizados, estão representadas na figura 14, onde também são apresentadas as concentrações inibitórias (IC₅₀) dos complexos frente as linhagens de células proposta para a realização do estudo.

Os complexos de paládio(II) com ligantes difosfínicos demonstraram ser suficientemente estáveis nas condições biológicas, à ponto de induzirem efeitos citotóxicos significativos. Os compostos mononucleares. No entanto, os ciclopaladados deste trabalho apresentaram atividade citotóxica superiores aos da cisplatina.

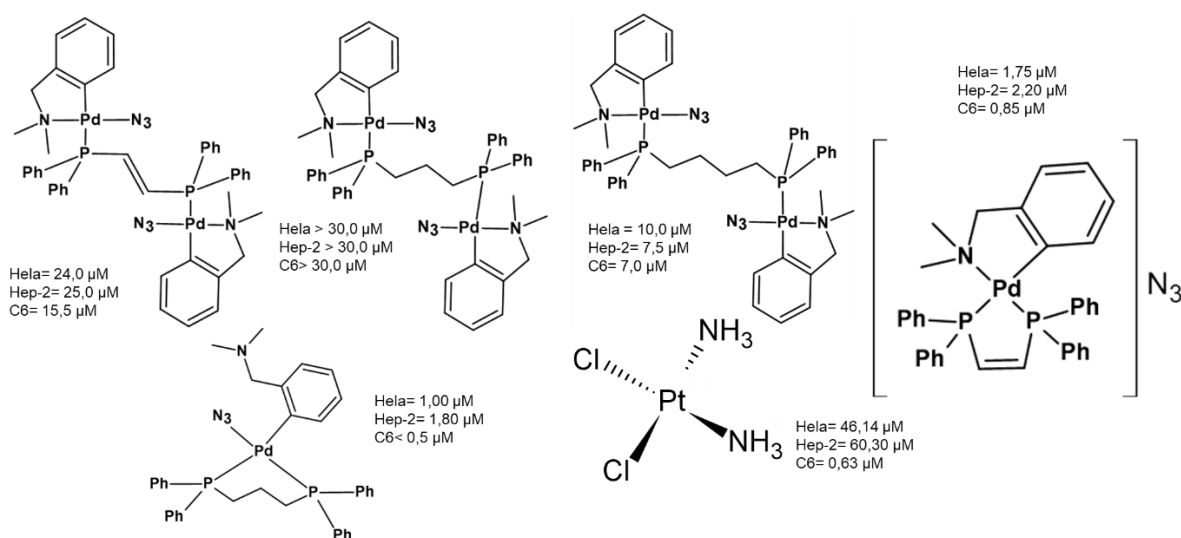


Figura 14: Estrutura dos ciclopaladados de Caires et al. (1999) e IC₅₀.

Fonte: Adaptado de Caires et al. (1999).

Caires *et al.* (1999) mostraram que a atividade citotóxica desses compostos, seja resultado de uma ação combinada de fatores cinéticos, termodinâmicos e estrutural que resultaram em uma labilidade menor ao complexo formado, permitindo que o mesmo seja direcionado ao alvo farmacológico.

Desde então, os avanços importantes no entendimento do mecanismo de ação de ciclopaladados contendo ligantes volumosos contra vários tipos de células tumorais foram alcançadas mediante a inúmeros estudos. Por exemplo, RODRIGUES et al. (2003), mostraram que o complexo [Pd₂(S(-)-C²,N-dmpa)₂(μ-dppe)Cl₂] {dmpa = N,N-dimetil-1-feniletilamina; dppe = 1,2-etanobis(difenilfosfina)} induziu a morte de 100% das células de melanoma murino (B16F10-Nex2) a uma concentração inferior a 1,25

$\mu\text{mol.L}^{-1}$. Ensaios *in vivo* indicaram que esse composto não foi tóxico aos ratos quando injetado três vezes, com dose semanal de até $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$, e foi capaz de retardar o crescimento do tumor e prolongar a sobrevivência animal. Ao final do experimento, os camundongos pareciam saudável sem lesões nos órgãos.

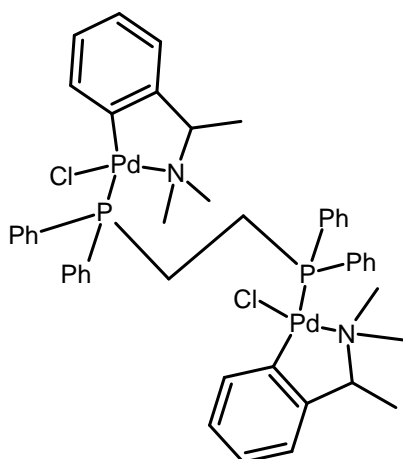


Figura 15: Estrutura do $[\text{Pd}_2(\text{S}(-)\text{-C}_2,\text{N-dmpa})_2(\mu\text{-dppe})\text{Cl}_2]$.

Fonte: Adaptado de (Rodrigues et al., 2003).

Por apresentar atividade *in vivo*, Rodrigues e seus colaboradores determinaram o efeito do complexo $[\text{Pd}_2(\text{S}(-)\text{-C}^2,\text{N-dmpa})_2(\mu\text{-dppe})\text{Cl}_2]$ sobre a linhagem celular tumoral do melanoma murino. A partir do DNA extraído das células em suspensão, observou-se um padrão claro de degradação na estrutura da dupla fita, mas não aumentam os níveis de caspases 1 e 3, sugerindo a indução de apoptose independente de caspase. No entanto, o enantiômero S afeta muito ativamente o metabolismo respiratório da célula, causando um colapso no gradiente de prótons mitocondrial, provocando uma queda abrupta na acidificação extracelular (Rodrigues et al., 2003).

MORAES *et al.* (2013) demonstraram que o ciclopaladado $[\text{Pd}_2(\text{R}(+)\text{-C}^2,\text{N-dmpa})_2(\mu\text{-dppe})\text{Cl}_2]$, enantiômero R da figura 15, foi capaz de promover a morte das células K562 a uma concentração inferior a $1,50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (células de leucemia humana), sem apresentar toxicidade para células sanguíneas. Ensaios posteriores evidenciaram que a atividade citotóxica *in vitro* desse ciclopaladado está associada à oxidação de grupos tióis de proteínas embebidas na membrana mitocondrial. A

oxidação dessas proteínas resulta na abertura de poros que promovem a perda dos componentes da matriz mitocondrial, o aumento na produção de espécies oxigenadas reativas, o inchaço e a ruptura da membrana, levando a liberação do citocromo C e a ativação da Caspase 3, e conseqüentemente, a morte celular por apoptose. A presença de redutores de tiol, tais como ditioneitol (DTT), glutatona (GSH) e N-acetilcisteína (NAC) inibiram a ação do composto, comprovando que a morte celular foi desencadeada pela oxidação de grupos tióis de proteínas presentes na membrana mitocondrial das células tumorais (Moraes et al., 2013).

Bincoletto *et al.* (2005) descreveram que ciclopaladado binuclear difosfínico, $[\text{Pd}_2(\text{C}^2, \text{N-S}(-)\text{dmpa})_2(\mu\text{-dppf})\text{Cl}_2]$, derivado da *N,N*-dimetil-1-feniletilamina (dmpa) e 1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno (dppf), figura 16. Esse composto foi capaz de inibir a cetepsina B de forma reversível. Os resultados indicaram que o ciclopaladado, figura 16, liga-se à cetepsina livre B, com constante de dissociação $K_H = (12 \pm 1) \mu\text{M}$ e ao sistema enzima/substrato com $\alpha K_H = (2,4 \pm 0,3) \mu\text{M}$. A aplicação deste complexo, em ratos com tumor de Walker, resultou em 90% de inibição do crescimento do tumor. Após doze dias da inoculação, as células tumorais produziram tumores sólidos com uma massa de 4,0 g, no entanto, quando os animais foram tratados com uma dose de $2,0 \text{ mg.kg}^{-1}$, a massa tumoral foi reduzida para 0,3 g. Contudo, os estudos toxicológicos mostraram que não houve alterações morfológicas aos glóbulos vermelhos e brancos, foram obtidos resultados semelhantes com os tecidos hepático, renais e do baço murino (Bincoletto et al., 2005).

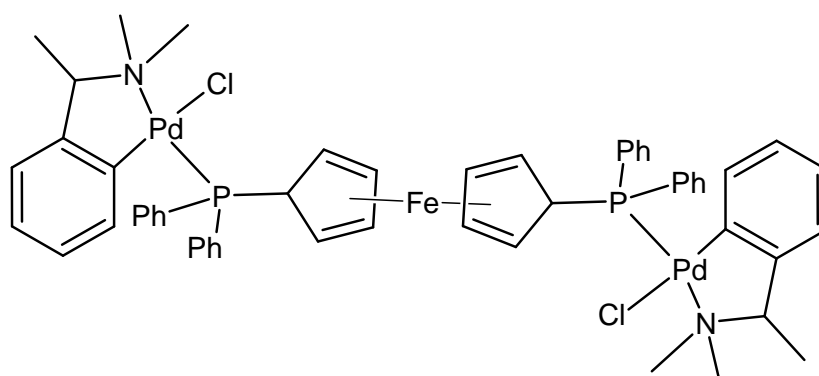


Figura 16: Estrutura do ciclopaladado $[\text{Pd}_2(\text{C}^2, \text{N-S}(-)\text{dmpa})_2(\mu\text{-dppf})\text{Cl}_2]$.

Fonte: Adaptado de Bincoletto et al. (2005).

Bechara e seus colaboradores (2014) avaliaram a atividade antitumoral *in vitro* do ciclopaladado $[Pd(C^2,N-S_{(-)}dmpa)_2(\mu-dppf)]$, figura 17, para linhagem celular Saos, osteossarcoma humano, resistente a maioria dos quimioterápicos comerciais. A linhagem celular foi tratada com o composto com presença e ausência de catepsina B e quelantes de cálcio, monitorando vários parâmetros relacionados apoptose. Os resultados *in vitro*, mostram que o complexo da figura 17, induziu a morte celular por apoptose com a presença da catepsina B e cálcio, necessários para a atividade antitumoral do composto (Bechara et al., 2014).

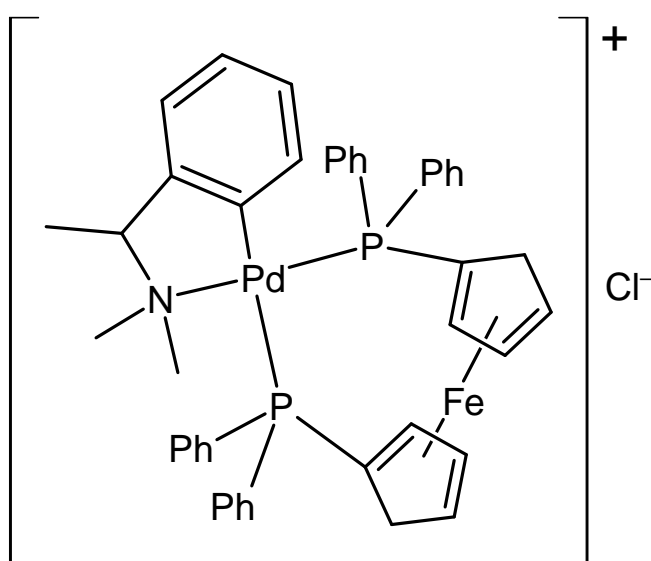


Figura 17: Estrutura do ciclopaladado $[Pd(C^2,N-S_{(-)}dmpa)_2(\mu-dppf)]$.

Fonte: Adaptado de Bechara et al. (2014).

Entretanto, devido aos resultados excelentes obtidos no estudo *in vitro*, os autores estenderam a investigação citotóxica do complexo da figura 17 nos ensaios *in vivo*. O estudo foi realizado aplicando células tumorais metastáticas B16F10-Nex2, em camundongos, tratados com o complexo $[Pd(C^2,N-S_{(-)}dmpa)_2(\mu-dppf)]$ por um período de 10 dias. Os resultados mostraram que os camundongos tratados com o complexo, apresentavam menos colônias metastáticas, em comparação com o grupo não tratado com o mesmo, indicando, que o composto apresenta uma excelente ação *in vitro* e *in vivo*.

Uma alternativa na substituição dos anéis ciclopaladado formado pelas benzilaminas é a substituição por aminoácidos aromáticos, conforme é mostrado na figura 18. Entretanto, a ortopaladação de aminoácidos não é uma tarefa trivial. Por muito tempo, acreditou-se que as arilalquilaminas primárias eram inertes para a ativação direta de ligações N–H por Pd (II), mas sua ciclometalação provou ser possível quando as condições adequadas de reação são utilizadas. No entanto, a maioria das sínteses dos complexos obtidos tem apresentado rendimentos baixos ou moderados. Neste contexto, a sínteses e aplicações de complexos organometálicos utilizando aminoácidos tem ganhado grande destaque por se tratarem de agentes quelantes, sendo muito versáteis por coordenarem com o paládio via grupos funcionais amino e carboxílicos (HAJIPOUR et al., 2009). Além disso, a presença de grupos funcionais amino e carboxílico possibilita a conjugação de outros aminoácidos bem como outros grupos de interesse, como anticorpos.

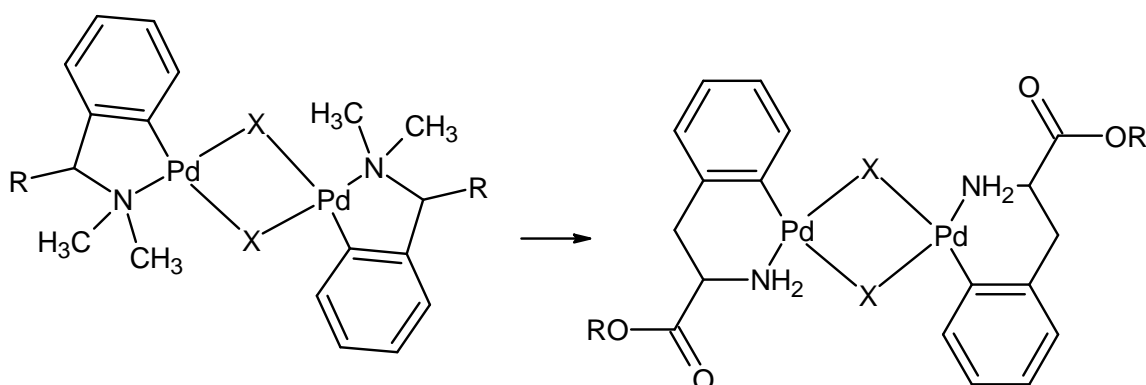


Figura 18: Substituição das benzilaminas por aminoácidos aromáticos (AA) para a formação de ciclopaladado.

Fonte: Do Autor

1.5. Ortometalação de aminoácidos: potencialidade de obtenção de novos compostos bioativos

No artigo de Vicente et al. (2007), é relatada uma certa dificuldade de ortometalar a L-fenilalanina devido a formação de uma espécie N,O-quelantes ao paládio. Uma forma de contornar esse problema é a utilização de grupos ésteres em vez de ácidos carboxílicos, evitando a coordenação N,O quelante da L-fenilalanina e

impedindo a coordenação do metal pelo grupo carboxilato, levando, portanto, a formação do ciclopaladado. Neste trabalho, a ortometalação foi realizada usando quantidade equimolares acetato de paládio e L-fenilalanina, em acetonitrila, durante seis dias sob condição de refluxo.

Em 2011, Vicente e seus colaboradores publicaram um novo trabalho, no qual descreveram uma nova metodologia para ciclopaladação de aminas primárias e secundárias utilizando o sal triflato do metil-éster da L-fenilalanina em vez seu cloridrato, figura 19.

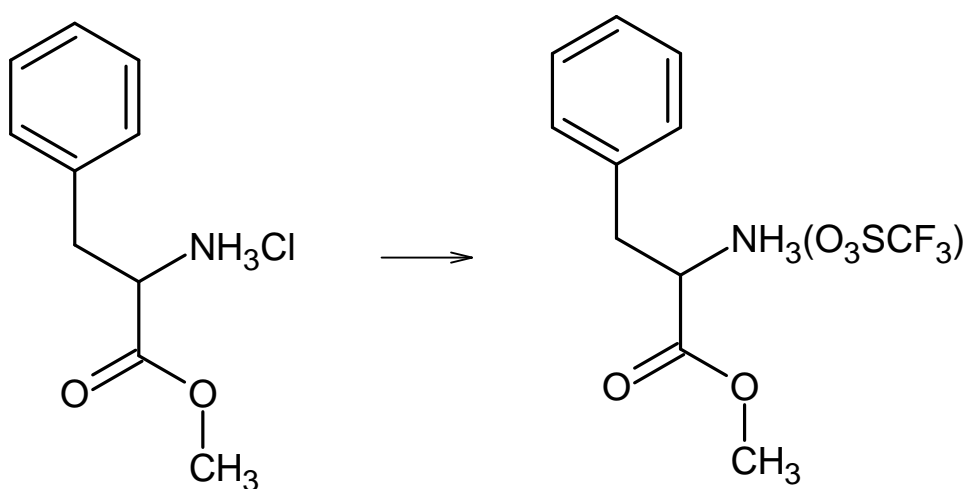


Figura 19: Substituição do cloridrato pelo triflato.

Fonte: Do Autor.

As condições empregadas anteriormente, para obtenção de ciclopaladados formados a partir de ésteres de aminoácidos aromáticos, foram substituídas para condições mais brandas de reação, no qual, deveriam ocorrer em condição de refluxo com uma temperatura de 65 °C por 2h e 78 °C por 4h, reduzindo drasticamente o tempo de síntese. Além disso, ao empregar a espécie contendo o sal triflato do metil-éster da L-fenilalanina, nota-se uma melhora significativa no rendimento de obtenção do ciclopaladado, quando comparada com as espécies que utilização as aminas livres ou seus respectivos cloridratos (Vicente et al., 2011).

Os complexos orto-paladados de L-fenilalanina são interessantes por pelo menos três razões. Em primeiro lugar, os complexos de paládio contendo aminoácidos como ligantes, bem como os complexos ciclopaladados, têm atraído grande interesse por sua potencial atividade citotóxica. Em segundo lugar, eles podem ser precursores úteis para preparar derivados funcionalizados de L-fenilalanina. Entre os derivados possíveis, os aminoácidos orto-halogenados são particularmente interessantes, pois são facilmente preparados por outros métodos, como substituição eletrofílica direta e, além disso, podem ser usados para preparar outros aminoácidos por meio de reações catalisadas por paládio. Finalmente, paladaciclos opticamente ativos são reagentes auxiliares adequados para a resolução de misturas racêmicas e determinação da pureza enantiomérica e configuração absoluta de fosfinas quirais, aminoácidos, e outros ligantes (Vicente et al., 2007).

1.6. Aminas aromáticas ortopaladadas contendo 2,6-lutidina: contribuição recentes do grupo

Mediante ao descrito até o momento, as pesquisas desenvolvidas no nosso grupo consistem em novas estratégias de simplificação ou hibridação molecular, utilizando como ponto de partida as estruturas dos compostos organometálicos ativos descritos por CAIRES et al. (1999). Essas estratégias vêm sendo implantadas nas sínteses de novas moléculas, buscando compreender quais partes das estruturas são importantes para atividade e quais não são. Essa estratégia de simplificação molecular consiste na modificação da estrutura da substância original, de interesse terapêutico, preservando os pontos e grupos farmacofóricos e buscando manter ou otimizar as propriedades farmacológicas e reduzir seu padrão de complexidade molecular.

Em face do exposto, novas famílias de compostos ciclopaladado, tem surgido. Um exemplo de compostos desenvolvido por da Cunha et al. (2020) é a substituição das difosfinas exobidentada, em estruturas ciclopaladados binucleares, por 2,6-lutidina (lut). Um ligante piridínico volumoso monodentado, figura 20, obtendo-se assim os ciclopaladados mononucleares $[PdX(C^2,N-dmba)(lut)]$.

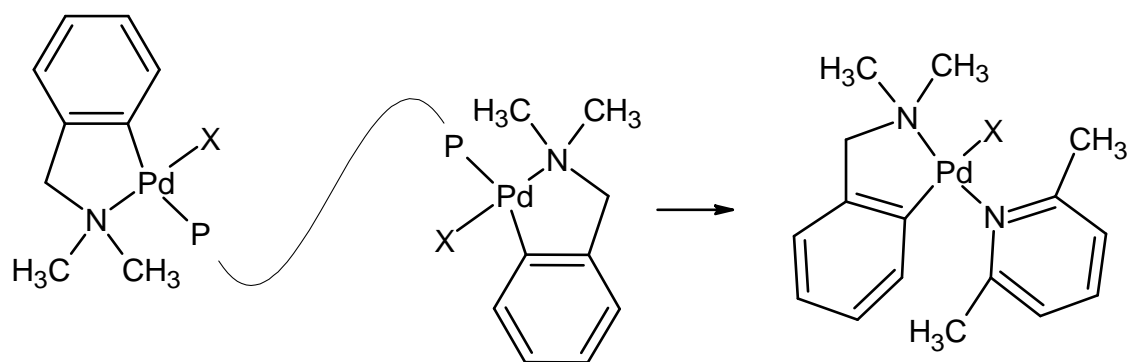


Figura 20: Substituição das difosfinas exobidentada pela 2,6-lutidina.

Fonte: Do Autor.

O trabalho de Cunha *et al.* (2020) teve como objetivo sintetizar e caracterizar estruturalmente composto ciclopaladado de fórmula $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\text{X})(\text{luti})]$ à partir da reação de clivagem entre os dímeros $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\text{X})]_2$, ($\text{X}=\text{Cl}$, I , N_3 e NCO) e a 2,6-lutidina, figura 21.

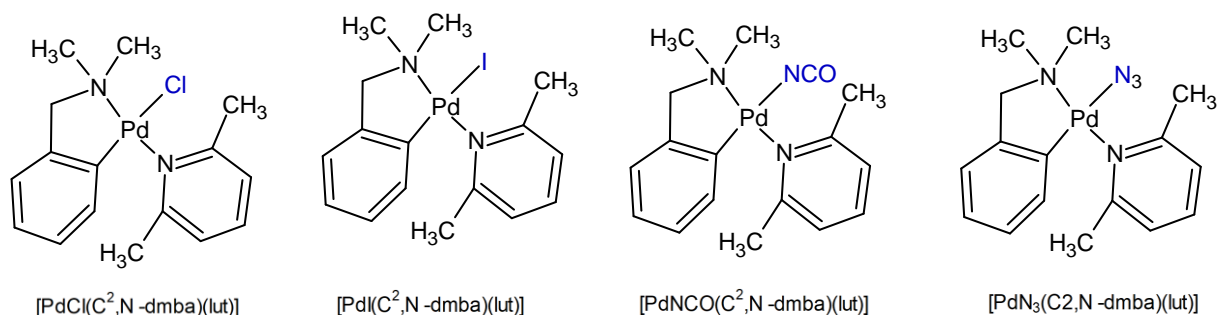


Figura 21: Estrutura dos compostos $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\text{X})(\text{luti})]$.

Fonte: Adaptado de da Cunha et al. (2020).

Os compostos $[\text{PdX}(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\text{luti})]$, figura 21, tiveram sua atividade citotóxica testada frente as linhagens celulares 4T1 (adenocarcinoma mamário murino), B16F10-Nex2 (melanoma murino), A2058, SK-MEL-110 e SK-MEL-5 (melanomas 13 humano) e foi utilizada a cis-platina como teste controle. Verificou-se que os complexos foram ativos, apresentando valores de IC_{50} inferiores à $10 \mu\text{M}$. Além disso, todos os compostos foram cerca de 100 vezes mais ativos que a cisplatina em todas as linhagens testadas. Observou-se que a natureza do ligante aniônico X não desempenhou um papel significativo na atividade citotóxica. Neste caso, os autores

sugeriram que sua citotoxicidade pode não ser o efeito direto do composto de Pd(II) original, mas é provavelmente que possa ser mediado por alguma espécie ativa semelhante produzido em solução (da Cunha et al., 2020).

O fato desses compostos ciclopaladados apresentar índices de citotoxicidade interessantes foi um ponto importante para a continuação de estudos posteriores para aumentar o conhecimento sobre a relação estrutura-atividade.

O trabalho publicado por Zanetti et al. (2022), compreende dois complexos ciclopaladados derivados da *N,N*-dimetil-1-feniletilamina (dmpa) e 2,6-lutidina (lut) com fórmula geral $[Pd(C^2,N-dmpa)(X)(lut)]$ com $X=Cl$ e N_3 , figura 22. Esses compostos foram sintetizados a partir da reação de clivagem do dímero $[Pd(C^2,N-dmpa)(X)]_2$ com a 2,6-lutidina.

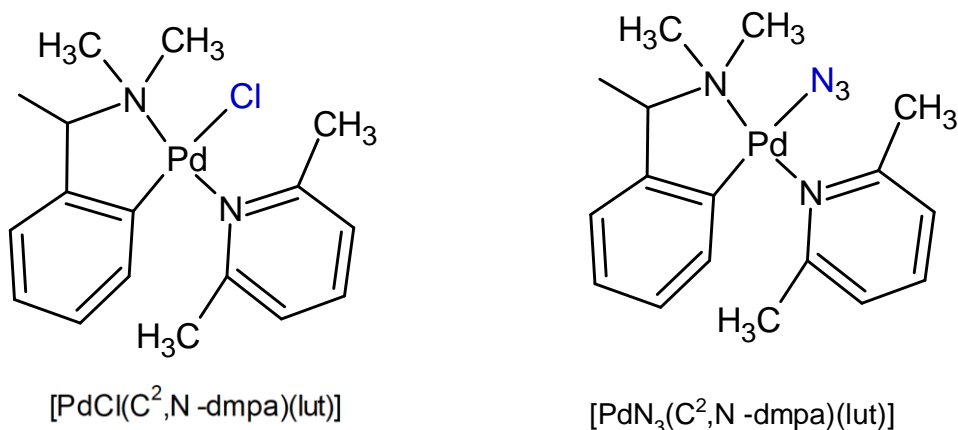


Figura 22: Estrutura dos complexos $[Pd(X)(C^2,N-dmpa)lut]$.

Fonte: Adaptado de Zanetti et al. (2022).

O estudo *in vitro* do efeito inibitório dos compostos mononucleares $[Pd(X)(C^2,N-dmpa)(lut)]$, foi realizado contra o glioblastoma humano (U251 e T98G) e linhagens celulares de melanoma (HT144 e LB373). Utilizando a cisplatina para fins de comparação utilizando as mesmas condições.

Os valores de IC_{50} nas células T98G e HT114 mostraram que ambos ciclopaladados foram ativos com valores de IC_{50} entre 0,9 e 1,7 μM , respectivamente. Já os índices de citotoxicidade da cisplatina foram de 1,7 μM , para T98G, e 1,3 μM

para HT144. A atividade citotóxica dos ciclopaladados nas células LB373MEL mostrou valores semelhantes, estando muito próximo da faixa de IC₅₀ encontrada para a cisplatina, quando analisados dentro margem de erro. Para a linhagem U251, o azido-composto apresentou um valor de IC₅₀ muito semelhante a cisplatina (Zanetti et al., 2022).

Levando em conta a similaridade dos efeitos antiproliferativos desses ciclopaladados frente às linhas tumorais, bem como seu comportamento em solução, o complexo [Pd(C²,N-dmpa)(N₃)(lut)] foi escolhido para investigar sua capacidade de interagir com o ctDNA. Ao realizar o estudo de interação do [Pd(C²,N-dmpa)(N₃)(lut)] com o ctDNA por titulação espectrofotométrica via UV-Vis, com concentrações crescentes da biomolécula, observou-se que não houve nenhum deslocamento batocrômico e hipocromismo das bandas monitoradas, sugerindo o estabelecimento de uma interação fraca com o DNA. Além disso, devido à baixa magnitude observada no hipocromismo, não foi possível determinar a constante de ligação do aduto (Zanetti et al., 2022). O espectro de dicroísmo circular (CD), mostra que a presença do composto de azida, mesmo em concentrações elevadas, não provocou alteração no perfil espectral do ctDNA, sugerindo que o ciclopaladado participa de interações fracas com a biomolécula. Como interações fracas com o DNA ou por sulco menor não causam mudanças espectrais significativas, Zanetti e seus colaboradores realizaram o experimento de competição de fluorescência no ctDNA entre o corante Hoeschst-33258 e o complexo [Pd(C²,N-dmpa)(N₃)(lut)]. Após adições sucessivas do composto para o DNA-Hoechst 33258, observou-se uma baixa supressão de cerca de 4,6%, indicando que o complexo ciclopaladado foi incapaz de deslocar o Hoechst 33258 ligado ao ct-DNA (Zanetti et al., 2022).

Os estudos de ligação do composto com ctDNA com o [Pd(C²,N-dmpa)(N₃)(lut)], no entanto, mostraram baixa ou nenhuma afinidade, sugerindo que a citotoxicidade observada contra as linhagens celulares humanas, pode envolver diferentes mecanismos de ação em comparação com a do agente anticâncer cisplatina.

2. HIPÓTESE DO TRABALHO

Baseando nos resultados anteriores envolvendo os complexos do tipo [PdX(dmba)(lut)] e [PdX(dmpa)(lut)], pressupôs que a substituição do anel ortometalado C²,N-dmba e C²,N-dmpa por C²,N-aa (L-fenilalanina), figura 23, pode gerar compostos não somente interessantes do ponto de vista da bioatividade, como também pode ser usado como plataforma para a preparação de novos compostos ciclopaladados contendo cadeias complexas de peptídeos.

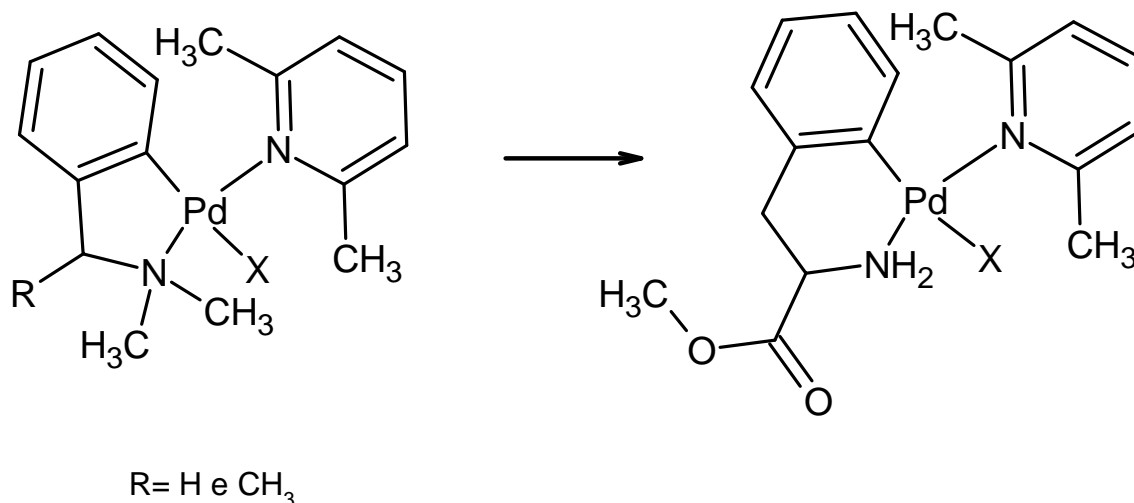


Figura 23: Proposta de substituição das benzilaminas pelo éster metílico da L-fenilalanina.

Fonte: Adaptado de Zanetti *et al.* (2022) e Cunha *et al.* (2020).

6. CONCLUSÃO

As otimizações realizadas nas metodologias de sínteses descritas por Vicente *et al.* (2011) demonstraram-se ser importantes e viáveis para aumentar consideravelmente o rendimento da obtenção do complexo C1-Br. Os resultados de teor de C, N e H concordam com os valores calculados para a estequiometria $[Pd(C^2,N-L-Fame)(Br)(L)]$. O espectro no IV do complexo C1-Br-Lut concordam com a presença da metil-éster da L-fenilalanina ciclometalada bem como a 2,6-lutidina coordenada. O espectro de RMN- 1H também mostra claramente a ciclometalação da metil-éster da L-fenilalanina e coordenação da 2,6-lutidina. Particularmente, o deslocamento do sinal do átomo H adjacente ao sítio de metalação para regiões de campo mais protegido é resultado do efeito da região de blindagem criada pelo anel piridinico, concordando com a orientação *trans* da 2,6-lutidina em relação ao átomo de N do ligante metil-éster de L-fenilalanina.

Os testes de comportamento em solução indicaram que o composto C1-Br-Lut mantém sua estrutura essencialmente intacta em solução. Porém, quando dissolvido no solvente coordenante DMSO, observou-se a presença de duas espécies em solução, cujas composições prováveis são $[Pd(C^2,N-L-Fame)(DMSO)(L)]^+$ e $[Pd(C^2,N-L-Fame)(DMSO)_2]^+$. Os testes de viabilidade celular mostram que a presença dessas espécies em DMSO deve ser responsável pelo aumento expressivo de citotoxicidade, especialmente contra as células A2780cis. Observa-se ainda que composto C1-Br-Lut dissolvido em DMSO apresenta uma atividade superior ao da cisplatina contra as linhagens MDA-MB-231 (célula tumoral de mama triplo-negativo) e HepG2 (célula tumoral de fígado).

Os ensaios de interação com o DNA mostraram que o composto C1-Br-Lut, apresenta pouca afinidade com DNA, com o K_b de $2,50 \times 10^3$ e os espectro de dicróismos circular (CD) indicaram que não houve nenhuma alteração na conformação do DNA. Além disso, os estudos de competição com Hoescht-33258, mostraram que o composto não é capaz de deslocar o corante. Tais evidências, indicam que esse composto deve apresentar outro(s) alvo(s) farmacológico(s) diferente(s) em relação ao da cisplatina.

REFERÊNCIAS

- Alarcón, L. P., Andrada, H. E., Olivera, M. E., Fernando Silva, O., & Dario Falcone, R. (2022). Carrier in carrier: Catanionic vesicles based on amphiphilic cyclodextrins complexed with DNA as nanocarriers of doxorubicin. *Journal of Molecular Liquids*, 360, 119488. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119488>
- Andrezálová, L., & Országhová, Z. (2021). Covalent and noncovalent interactions of coordination compounds with DNA: An overview. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 225, 111624. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111624>
- Bangde, P., Prajapati, D., Dandekar, P., Fairlamb, I. J. S., & Kapdi, A. R. (2019a). Palladacycles as Potential Anticancer Agents. In *Palladacycles* (pp. 343–370). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815505-9.00010-X>
- Bangde, P., Prajapati, D., Dandekar, P., Fairlamb, I. J. S., & Kapdi, A. R. (2019b). Palladacycles as Potential Anticancer Agents. In *Palladacycles* (pp. 343–370). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815505-9.00010-X>
- Bangde, P., Prajapati, D., Dandekar, P., Fairlamb, I. J. S., & Kapdi, A. R. (2019c). Palladacycles as Potential Anticancer Agents. In *Palladacycles* (pp. 343–370). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815505-9.00010-X>
- Bechara, A., Barbosa, C. M. V., Paredes-Gamero, E. J., Garcia, D. M., Silva, L. S., Matsuo, A. L., Nascimento, F. D., Rodrigues, E. G., Caires, A. C. F., Smaili, S. S., & Bincoletto, C. (2014). Palladacycle (BPC) antitumour activity against resistant and metastatic cell lines: The relationship with cytosolic calcium mobilisation and cathepsin B activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 79, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.073>
- Bincoletto, C., Tersariol, I. L. S., Oliveira, C. R., Dreher, S., Fausto, D. M., Soufen, M. A., Nascimento, F. D., & Caires, A. C. F. (2005). Chiral cyclopalladated complexes derived from N,N-dimethyl-1-phenethylamine with bridging bis(diphenylphosphine)ferrocene ligand as inhibitors of the cathepsin B activity

- and as antitumoral agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(8), 3047–3055.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.01.057>
- Bucevičius, J., Lukinavičius, G., & Gerasimaitė, R. (2018). The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and beyond. *Chemosensors*, 6(2), 18.
<https://doi.org/10.3390/chemosensors6020018>
- Caires, A. C. F., & Mauro, A. E. (1996). Compostos ciclometalados de coordenação intramolecular. *Química Nova*, 19.
- Chelly, S., Maulaz, P., Bigot, P., Azzouzi, A., & Lebdaï, S. (2020). Erectile function after WST11 vascular-targeted photodynamic therapy for low-risk prostate cancer treatment. *Asian Journal of Andrology*, 22(5), 454.
https://doi.org/10.4103/aja.aja_138_19
- Ciarimboli, G. (2021). Anticancer Platinum Drugs Update. *Biomolecules*, 11(11), 1637.
<https://doi.org/10.3390/biom11111637>
- Cohen, S. M., & Lippard, S. J. (2001). *Cisplatin: From DNA damage to cancer chemotherapy* (pp. 93–130). [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(01\)67026-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(01)67026-0)
- Corinti, D., Coletti, C., Re, N., Chiavarino, B., Crestoni, M. E., & Fornarini, S. (2016). Cisplatin Binding to Biological Ligands Revealed at the Encounter Complex Level by IR Action Spectroscopy. *Chemistry - A European Journal*, 22(11), 3794–3803.
<https://doi.org/10.1002/chem.201504521>
- Cortés, R., Crespo, M., Davin, L., Martín, R., Quirante, J., Ruiz, D., Messeguer, R., Calvis, C., Baldomà, L., Badia, J., Font-Bardía, M., Calvet, T., & Cascante, M. (2012). Seven-membered cycloplatinated complexes as a new family of anticancer agents. X-ray characterization and preliminary biological studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 557–566.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.06.002>
- Cutillas, N., Yellol, G. S., de Haro, C., Vicente, C., Rodríguez, V., & Ruiz, J. (2013). Anticancer cyclometalated complexes of platinum group metals and gold.

Coordination Chemistry Reviews, 257(19–20), 2784–2797.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.03.024>

da Cunha, G. A., de Souza, R. F. F., de Farias, R. L., Moreira, M. B., Silva, D. E. S., Zanetti, R. D., Garcia, D. M., Spindola, D. G., Michelin, L. F. G., Bincoletto, C., de Souza, A. A., Antunes, A. A., Judice, W. A. de S., Leitao, R. C. F., Deflon, V. M., Mauro, A. E., & Netto, A. V. G. (2020). Cyclopalladated compounds containing 2,6-lutidine: Synthesis, spectral and biological studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 203, 110944. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110944>

de Almeida, V. L., Leitão, Adrei., Reina, L. del C. B., Montanari, C. A., Donnici, C. L., & Lopes, M. T. P. (2005). CÂNCER E AGENTES ANTINEOPLÁSICOS CICLO-CELULAR ESPECÍFICOS E CICLO-CELULAR NÃO ESPECÍFICOS QUE INTERAGEM COM O DNA: UMA INTRODUÇÃO. *Química Nova*, 28, 118–129.

Edwards, G. L., Black, D. St. C., Deacon, G. B., & Wakelin, L. P. (2005). In vitro and in vivo studies of neutral cyclometallated complexes against murine leukæmias. *Canadian Journal of Chemistry*, 83(6–7), 980–989. <https://doi.org/10.1139/v05-109>

Fanelli, M., Formica, M., Fusi, V., Giorgi, L., Micheloni, M., & Paoli, P. (2016a). New trends in platinum and palladium complexes as antineoplastic agents. In *Coordination Chemistry Reviews* (Vol. 310). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.11.004>

Florea, A.-M., & Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers*, 3(1), 1351–1371. <https://doi.org/10.3390/cancers3011351>

Gattuso, H., Duchanois, T., Besancenot, V., Barbieux, C., Assfeld, X., Becuwe, P., Gros, P. C., Grandemange, S., & Monari, A. (2015). Interaction of iron II complexes with B-DNA. Insights from molecular modeling, spectroscopy, and cellular biology. *Frontiers in Chemistry*, 3(DEC). <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00067>

- Gomes, H. M. da S., do Nascimento, J. C. H. B., Sousa, A. R. C., & Almeida, A. N. de M. (2021). GASTOS DO SISTEMA PÚBLICO DE SAÚDE COM TRATAMENTO EM ONCOLOGIA. *RAHIS- Revista de Administração Hospitalar e Inovação Em Saúde*, 18(2), 74–89. <https://doi.org/10.21450/rahis.v18i2.6877>
- Hoeschele, J. D. (2014). Biography of Professor Barnett: a tribute to his life and his achievements. *Anticancer Research*, 34, 417–421.
- Jones, C., & Thornback, J. (2007). *Medicinal Applications of Coordination Chemistry*. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847557759>
- Junqueira, L. C., & da Silva Filho, J. C. (2012). *Biologia Celular e Molecular* (9th ed.). Guanabara Koogan.
- Karami, K., Jamshidian, N., & Zakariazadeh, M. (2019a). Synthesis, characterization and molecular docking of new C,N-palladacycles containing pyridinium-derived ligands: DNA and BSA interaction studies and evaluation as anti-tumor agents. *Applied Organometallic Chemistry*, 33(3), 1–22. <https://doi.org/10.1002/aoc.4728>
- Kellett, A., Molphy, Z., Slator, C., McKee, V., & Farrell, N. P. (2019a). Molecular methods for assessment of non-covalent metallodrug–DNA interactions. *Chemical Society Reviews*, 48(4), 971–988. <https://doi.org/10.1039/C8CS00157J>
- Kumar, V., Pritzker, D. N., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (n.d.). *Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças 9ª EDIÇÃO*.
- Lebdai, S., Bigot, P., Leroux, P.-A., Berthelot, L.-P., Maulaz, P., & Azzouzi, A.-R. (2017). Vascular Targeted Photodynamic Therapy with Padeliporfin for Low Risk Prostate Cancer Treatment: Midterm Oncologic Outcomes. *Journal of Urology*, 198(2), 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2017.03.119>
- MEDICI, A. C. (2018). *Custo do Tratamento do Câncer no Brasil: Como Melhorar o Foco*. <https://www.researchgate.net/publication/323879334>

- Mendez, L. C., Moraes, F. Y., Fernandes, G. dos S., & Weltman, E. (2018). Cancer Deaths due to Lack of Universal Access to Radiotherapy in the Brazilian Public Health System. *Clinical Oncology*, 30(1), e29–e36. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2017.09.003>
- Metzler-Nolte, N., & Schatzschneider, U. (2009). *Bioinorganic Chemistry: A practical course*. Walter de Gruyter.
- Miessler, G., Fischer, P., & Tarr, D. A. (2014). *Química Inorgânica* (5th ed.). Pearson Education.
- Moraes, V. W. R., Caires, A. C. F., Paredes-Gamero, E. J., & Rodrigues, T. (2013). Organopalladium compound 7b targets mitochondrial thiols and induces caspase-dependent apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Cell Death & Disease*, 4(6), e658–e658. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.190>
- Nakamoto, K., Tsuboi, M., & Strahan, G. D. (2008). *Drug–DNA Interactions*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470370612>
- Naskar, R., Ghosh, P., Manna, C. K., Murmu, N., & Mondal, T. K. (2022). Palladium(II) complexes with thioether based ONS donor ligand: Synthesis, characterization, X-ray structure, DFT study and anti-cancer activity. *Inorganica Chimica Acta*, 534, 120802. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2022.120802>
- Omae, I. (2014). Applications of five-membered ring products of cyclometalation reactions as anticancer agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 280, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.019>
- Oun, R., Moussa, Y. E., & Wheate, N. J. (2018). The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Transactions*, 47(19), 6645–6653. <https://doi.org/10.1039/C8DT00838H>
- Pages, B. J., Ang, D. L., Wright, E. P., & Aldrich-Wright, J. R. (2015). Metal complex interactions with DNA. In *Dalton Transactions* (Vol. 44, Issue 8, pp. 3505–3526). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c4dt02700k>

- Pasetto, L. M., D'Andrea, M. R., Brandes, A. A., Rossi, E., & Monfardini, S. (2006). The development of platinum compounds and their possible combination. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 60(1), 59–75. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2006.02.003>
- PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., & VYVYAN, J. R. (2010). *Introdução a Espectroscopia: Vol. 4ª ed.* (Cengage Learning).
- Rehman, S. U., Sarwar, T., Husain, M. A., Ishqi, H. M., & Tabish, M. (2015). Studying non-covalent drug–DNA interactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 576, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.03.024>
- RICCI, G. F. B. (2018). *Oximas ortopaladadas contendo fosfinas: síntese, caracterização estrutural e estudos biológicos.* Tese (doutorado) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química.
- Rocha, C. R. R., Silva, M. M., Quinet, A., Cabral-Neto, J. B., & Menck, C. F. M. (2018). DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics*, 73, e478s. <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e478s>
- Rodrigues, E. G., Silva, L. S., Fausto, D. M., Hayashi, M. S., Dreher, S., Santos, E. L., Pesquero, J. B., Travassos, L. R., & Caires, A. C. F. (2003). Cyclopalladated compounds as chemotherapeutic agents: Antitumor activity against a murine melanoma cell line. *International Journal of Cancer*, 107(3), 498–504. <https://doi.org/10.1002/ijc.11434>
- Rosenberg, B., & Camp, L. van. (1970). The successful regression of large solid S180 tumors by platinum compounds. *Cancer Research*, 30, 1799–1802.
- Rubino, S., Busà, R., Attanzio, A., Alduina, R., di Stefano, V., Girasolo, M. A., Orecchio, S., & Tesoriere, L. (2017). Synthesis, properties, antitumor and antibacterial activity of new Pt(II) and Pd(II) complexes with 2,2'-dithiobis(benzothiazole) ligand. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(8), 2378–2386. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.067>

- SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., & KIEMLE, E. D. J. (2005). *Spectrometric Identification of organic compounds* (7th ed.). John Wiley & Sons.
- Tchounwou, P. B., Dasari, S., Noubissi, F. K., Ray, P., & Kumar, S. (2021). Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy. *Journal of Experimental Pharmacology, Volume 13*, 303–328. <https://doi.org/10.2147/JEP.S267383>
- Vicente, J., Saura-Llamas, I., García-López, J. A., Calmuschi-Cula, B., & Bautista, D. (2007a). Ortho palladation and functionalization of L-phenylalanine methyl ester. *Organometallics*, 26(10), 2768–2776. <https://doi.org/10.1021/om070127y>
- Vicente, J., Saura-Llamas, I., García-López, J.-A., Calmuschi-Cula, B., & Bautista, D. (2007b). Ortho Palladation and Functionalization of L-Phenylalanine Methyl Ester. *Organometallics*, 26(10), 2768–2776. <https://doi.org/10.1021/om070127y>
- Vicente, J., Saura-Llamas, I., Oliva-Madrid, M.-J., García-López, J.-A., & Bautista, D. (2011). A New Method for High-Yield Cyclopalladation of Primary and Secondary Amines. Atom-Efficient Open-to-Air Inexpensive Synthesis of Buchwald-Type Precatalysts. *Organometallics*, 30(17), 4624–4631. <https://doi.org/10.1021/om200464s>
- Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G. E., & Oun, R. (2010). The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Transactions*, 39(35), 8113. <https://doi.org/10.1039/c0dt00292e>
- Zanetti, R. D., da Cunha, G. A., Moreira, M. B., Farias, R. L., de Souza, R. F. F., de Godoy, P. R. D. V., Brassesco, M. S., Rocha, F. v., Lima, M. A., Mauro, A. E., & Netto, A. V. G. (2022). Orthopalladated N,N-dimethyl-1-phenethylamine compounds containing 2,6-lutidine: Synthesis, DNA binding studies and cytotoxicity evaluation. *Polyhedron*, 229, 116185. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2022.116185>

Zmejkovski, B. B., Pantelić, N. Đ., & Kaluđerović, G. N. (2022). Palladium(II) complexes: Structure, development and cytotoxicity from cisplatin analogues to chelating ligands with N stereocenters. *Inorganica Chimica Acta*, 534, 120797. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2022.120797>