

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

Ana Maria Romão Polez

**Síntese, caracterização e estudo da interação com o DNA de um ciclopaladado
contendo tetralonaoxima e 2,6-lutidina**

Araraquara

2023

Ana Maria Romão Polez

**Síntese, caracterização e estudo da interação com o DNA de um ciclopaladado
contendo tetralonaoxima e 2,6-lutidina**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Química da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos
requisitos para obtenção do título de Bacharel em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto

Co-orientador: Prof. Dr. Renan Lira de Farias

Araraquara

2023

P765s Polez, Ana Maria Romão
Síntese, caracterização e estudo da interação com o DNA de um
ciclopaladado contendo tetralonaoxima e 2,6-lutidina / Ana Maria
Romão Polez. -- Araraquara, 2023
48 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Química) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química,
Araraquara
Orientador: Adelino Vieira de Godoy Netto
Coorientador: Renan Lira de Farias

1. Câncer. 2. Paládio. 3. Oximas. 4. Fármacos. 5. DNA. 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.

ANA MARIA ROMÃO POLEZ

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE INTERAÇÃO COM O DNA DE UM
CICLOPALADADO CONTENDO TETRALONAOXIMA E 2,6-LUTIDINA..

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” como parte dos requisitos
para obtenção do título de Bacharelado em
Química.

Araraquara, 13 de janeiro de 2023

BANCA EXAMINADORA



Assinado de forma digital por
Adelino Vieira de Godoy
Netto:19560697803
Dados: 2023.01.13 15:50:20 -03'00'

Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto
Instituto de Química – UNESP - Araraquara

Documento assinado digitalmente
 ANGELICA ELLEN GRAMINHA VERONI
Data: 16/01/2023 10:33:47-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Dr^a. Angelica Ellen Graminha
Instituto de Química – UNESP - Araraquara

Documento assinado digitalmente
 THALES REGGIANI DE MOURA
Data: 16/01/2023 10:59:42-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Dr. Thales Reggiani de Moura
Instituto de Química – UNESP - Araraquara

Dedico esse trabalho às minhas avós Maria e Anita (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Adelino, pela oportunidade concedida de fazer do grupo, por toda paciência, ajuda, compreensão e apoio nas horas mais difíceis, pela amizade e confiança ao longo dos anos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Renan Lira, por todo carinho, palavras de incentivo, paciência e toda confiança direcionada a mim desde a minha primeira síntese.

A todos os meus colegas que fizeram e fazem parte do grupo de Química de Coordenação e Organometálicos: Renanzinho, Débora, Wladimir, Bárbara, Débora, Thales, Andresa, Angelica, Heitor, Pedro, Arielly, Ronaldo, Ana Beatriz por toda ajuda oferecida desde o momento em que entrei no grupo, pelas conversas descontraídas na copa do Departamento.

Ao Rafael (PT) pela infinidade de espectros de infravermelho, pela amizade ao longo dos anos e pelas melhores playlists (contendo Creed, obviamente).

Aos colegas de Departamento, em especial à Prof Regina pelo carinho e confiança no meu trabalho como monitora, ao Chicória e Cross pelo apoio de sempre.

Ao Nivaldo pela obtenção dos espectros de RMN, bem como as frutíferas discussões do mesmo, pela amizade e momentos de descontração.

Aos meus colegas de graduação Fábio, Helô, Lariça, Ramiro, Lucy, Jean, Marcos e Marina, por toda a ajuda e companheirismo nas horas mais difíceis.

Ao grupo do INSS, em especial à Marininha, Vinícios (Vibra), Rodolpho, Leonardo Albino, Guilherme, Isabela, Laura, Leonardo (Leléó), Bruno e Douglas por toda amizade, idas ao Raiz e os melhores churrascos.

Às minhas amigas e irmãs Natany e Nathalia pela amizade, companheirismo, carinho, apoio e incentivo ao longo dos anos.

Aos meus amigos Marco Roberto e Lucas pela amizade, carinho, incentivo, companheirismo, ensinamentos e pela constante presença nos melhores momentos e nos mais difíceis.

Ao meu primo João (Juninho) pela amizade, pelos momentos vividos e os que ainda estão por vir, por todo o apoio e incentivo de sempre.

À minha família, em especial ao meu tio Guilherme que sempre esteve presente na minha vida, ao meu primo Vitor (Gatito) pelos melhores momentos que já vivi ao seu lado desde a sua chegada à nossa família, à Mayara por toda amizade ao longo dos anos, à minha irmã Jaqueline que sempre fez questão de ser e estar presente em todos os momentos.

Aos meus pais, Aparecida e Herso, que sempre fizeram tudo por mim desde o meu nascimento, sem vocês nada seria possível.

Ao Instituto de Química da UNESP por toda infraestrutura oferecida.

À CNPq pelo apoio financeiro na forma de bolsa de Iniciação Tecnológica.

“All that is gold does not glitter,
Not all those who Wander are lost.”
(TOLKIEN, 2002, p. 170)¹

¹ TOLKIEN, J. R. R. **Lord of the Rings**: Lord of the Rings. São Paulo: Harper Collins 2002.

RESUMO

O câncer é a segunda doença que mais causa mortes no mundo. Dentre os tratamentos mais empregados, destaca-se a Quimioterapia, que são administrados fármacos à base de platina. Entretanto, estes compostos apresentam algumas limitações como baixa seletividade e efeitos colaterais. Nota-se uma significativa demanda por novos metalofármacos capazes de superar tais problemas. Assim, neste trabalho apresenta-se o desenvolvimento e estudo de interação com o DNA de um novo composto ciclopaladado contendo os ligantes tetralonaoxima e 2,6-lutidina, do tipo $[PdCl(tetrox)(luti)]$, onde tetrox = tetralonaoxima e luti = 2,6-lutidina. O composto foi caracterizado através das técnicas de infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , HSQC e HMBC e análise elementar (CHN%). Adicionalmente, a estrutura cristalina e molecular do composto 1t-AM foi interpretada através da técnica de difração de raios X por monocristal. As habilidades dos compostos em estimular a perda de viabilidade celular da linhagem MRC5 (pulmão) estão sendo avaliadas pelo método colorimétrico MTT. Finalmente os perfis de interação com o DNA foram investigados via titulação espectrofotométrica ($K_b = 3,05 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), supressão de fluorescência (10%) e dicroísmo circular (DC).

Palavras-chave: câncer; paládio; oximas; fármacos; DNA.

ABSTRACT

Cancer is the second main cause of death in the world. Among the most used treatments, Chemotherapy stands out, in which platinum-based drugs are administered. However, these compounds have some limitations such as low selectivity and side effects. There is a significant demand for new metallopharmaceuticals capable of overcoming such problems. Therefore, in this work it is presented the development and study of interaction with DNA of a new cyclopalladated compound bearing tetraloneoxime and 2,6-lutidine, of the type $[\text{PdCl}(\text{tetrox})(\text{luti})]$, where tetrox = tetraloneoxime and luti = 2,6-lutidine. The compound has been characterized by infrared (IR) and ^1H nuclear magnetic resonance (NMR), ^1H , HSQC and HMBC and elemental analysis (CHN%). Additionally, the crystalline and molecular structure of the 1t-AM compound was interpreted using the single crystal X-ray diffraction technique. The compounds' abilities to stimulate the loss of cell viability towards cell line MRC5 (lung) are being evaluated by the MTT colorimetric method. Finally, DNA interaction profiles have been investigated by spectrophotometric titration ($K_b = 3.05 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), fluorescence quenching (10%) and circular dichroism (CD).

Keywords: cancer; palladium; oximes; drugs. DNA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas da Carcinogênese.	18
Figura 2 - Agentes metalofármacos anticâncer utilizados atualmente.	18
Figura 3 - Mecanismo de ação da cisplatina.....	19
Figura 4 - Mecanismo associativo de substituição de ligantes em complexos quadrático planares de paládio (II).	20
Figura 5 - Exemplo de uma reação envolvendo a aquação de um complexo contendo o ligante bidentado quelante etilenodiamina (en).	21
Figura 6 - Representação esquemática de ciclopaladados do tipo CY e YCY, sendo Y = -NR ₂ , NR, -PR ₂ ; -SR, =S, etc.; R ₁ e R ₂ = alquila, arila, etc. L = haletos, acetato, etc.....	22
Figura 7 - Composto ciclopaladado proposto neste trabalho	23
Figura 8 - Esquema da síntese do ligante tetralonaoxima (tetrox).	24
Figura 9 - Esquema da síntese do dímero precursor [Pd(C ² ,N-tetrox)(μ-Cl)] ₂	25
Figura 10 - Esquema da síntese do complexo 1t-AM.	28
Figura 11 - Espectro de IV para a oxima (preto), dímero precursor (vermelho) e o complexo 1t-AM (azul).	30
Figura 12 - Espectro de RMN de ¹ H para o composto em CDCl ₃	32
Figura 13 - Espectro de correlação HSQC (CDCl ₃) de C e H para o complexo 1t-AM.	33
Figura 14 - Espectro de correlação HMBC (CDCl ₃) de C e H alifáticos para o complexo 1t-AM.	34
Figura 15 - Espectro de correlação HMBC (CDCl ₃) de C e H aromáticos para o complexo 1t-AM.	35
Figura 16 - Principais correlações observadas pelo HMBC para o ligante tetrox presente no composto 1t-AM.	36
Figura 17 - Principais correlações observadas pelo HMBC para o ligante luti presente no composto 1t-AM.	36
Figura 18 - Estrutura cristalina com complexo 1t-AM.	37
Figura 19 - Estudo de estabilidade em solução para o complexo 1t-AM em DMSO-d ₆ nos intervalos de tempo de 0h, 24h e 48h.....	39
Figura 20 - Espectros eletrônicos na região UV-Vis para diferentes razões molares de ctDNA.	42

Figura 21 - Determinação da constante de ligação K_b a partir da correlação linear de Benesi-Hidelbrand.....	43
Figura 22 - Dicroísmo Circular do DNA com relação de $[1t-AM]/[DNA]$ variando entre 0 a 0,4.....	44
Figura 23 - Espectro de emissão de fluorescência do Hoechst 33258-DNA com concentrações de 1t-AM variando entre 0-60 μM	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela 1 – Valores de CHN% obtidos e calculados para o complexo 1t-AM.	29
Tabela 2 - Principais absorções no infravermelho observadas nos espectros da tetrox, do precursor metálico e do complexo 1t-AM.	31
Tabela 3 - Dados de RMN para o complexo.	37
Tabela 4 - Principais distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação do composto 1t-AM.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549: linhagem celular de câncer de pulmão

B-DNA: forma B do ácido desoxirribonucleico

CD: dicroísmo circular

CDCl₃: clorofórmio deuterado

ctDNA: Ácido desoxirribonucleico do timo de bezerro (calf thymus)

DMSO: dimetilsulfóxido

DMSO-*d*₆: dimetilsulfóxido deuterado

DNA: Ácido desoxirribonucleico

HMBC: *Heteronuclear Multiple bond correlation*

HSQC: *Heteronuclear single-quantum correlation*

IC₅₀: concentração inibitória de 50% da viabilidade celular

IS: índice de seletividade

IV: infravermelho

KBr: brometo de potássio

luti: 2,6-lutidina

MRC-5: linhagem celular sadia de fibroblasto de pulmão

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolio

NH₃: amônia; ligante Amin

Pd^{II} : paládio (II)

PPh₃: trifenilfosfina

Pt^{II} : platina (II)

RMN ¹H: ressonância magnética nuclear de núcleo de hidrogênio

FBS: soro bovino fetal

UV-Vis: ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Câncer	17
1.2	Antitumorais a base de platina	18
1.3	Complexos de paládio como potenciais agentes citotóxicos contra células tumorais.....	20
1.4	Justificativa do trabalho.....	22
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral	23
2.2	Objetivos Específicos.....	23
3	METODOLOGIA.....	24
3.1	Procedência de reagentes e solventes	24
3.2	Obtenção dos compostos ciclopaladados	24
3.2.1	Síntese da tetralonaoxima	24
3.2.2	Síntese do dímero precursor $[Pd(C^2,N-tetrox)(\mu-Cl)]_2$	25
3.2.3	Síntese do composto ciclopaladado $[PdCl(tetrox)(luti)]$	25
3.3	Caracterização dos compostos	26
3.3.1	Análise Elementar.....	26
3.3.2	Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho.....	26
3.3.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	26
3.3.4	Difratometria de Raios X de monocristal.....	26
3.4	Ensaio de estabilidade em solução	27
3.5	Ensaio biológicos	27
3.5.1	Titulação Espectrofotométrica com DNA	27
3.5.2	Dicroísmo Circular	28
3.5.3	Ensaio de Competição com Hoechst 33258	28

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	Caracterização	29
4.5.2	Análise Elementar	29
4.5.3	Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho	29
4.5.4	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	31
4.5.5	Difratometria de Raios X de monocristal	37
4.6	Ensaio de estabilidade em solução	38
4.7	Ensaaios biológicos	40
4.7.2	Ensaaios de interação com o ctDNA	40
5.	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

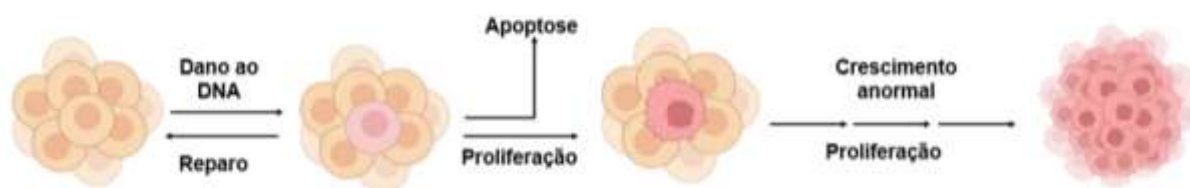
1.1 Câncer

Câncer é o termo que abrange um conjunto de doenças que possuem em comum o crescimento desordenado de células que ocasionam a formação de tumores (INCA 2022). As alterações genéticas destas células promovem danos a homeostase dos tecidos à medida que as células mutadas se multiplicam. Tais células transformadas caracterizam-se por rápidas taxas de proliferação e baixas taxas de apoptose.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o câncer é considerado como a segunda maior causa de mortes em todo mundo (OMS 2022). Em pesquisas mais recentes, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou mais de 2 milhões de casos novos no triênio de 2023 – 2025, sendo 704 mil casos novos por ano (INCA 2022). Entre eles, 72 mil casos de câncer de próstata e 74 mil casos de câncer de mama. Em comparação com o triênio anterior, entre 2020 e 2022, foram estimados 625 mil novos casos da doença, sendo que as causas para esse rápido crescimento são complexas, mas pode estar relacionado com o envelhecimento e crescimento da população (INCA 2022).

O desenvolvimento de um tumor é chamado de carcinogênese ou oncogênese, que se dá por diversos fatores, tais como a exposição à agentes carcinogênicos, que está proporcionalmente relacionado aos hábitos de vida de um indivíduo. Dentre os fatores de risco, destaca-se o tabagismo, consumo de bebida alcoólica e sedentarismo (INCA 2022).

A carcinogênese (Figura 1) envolve as etapas de iniciação, promoção e progressão. Quando os agentes cancerígenos entram em contato com as células saudáveis, estes induzem a modificação em alguns genes (iniciação), ocasionando alterações celulares. No entanto, nesta fase ainda não é possível detectar a formação de um tumor. A promoção ocorre quando as células iniciadas são expostas frequentemente aos oncopromotores, sendo transformadas em células malignas. Quando estas células se multiplicam de maneira desordenada, ocorre o estágio de progressão, que leva a formação do câncer (INCA 2022).

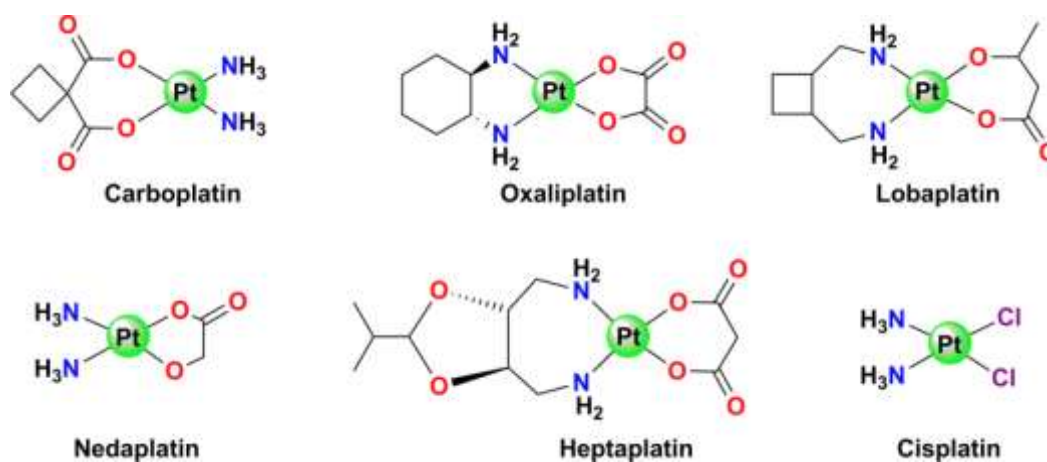
Figura 1 - Etapas da Carcinogênese.

Fonte: elaborada pelo Autor (2023). Criado com biorender.com

Dentre as formas de tratamento disponíveis, destacam-se a radioterapia, cirurgia e quimioterapia. Durante a quimioterapia, são administrados fármacos denominados agentes antineoplásicos ou quimioterápicos, objetivando a redução do quadro tumoral (INCA 2022). Dentre os fármacos disponíveis, os agentes tumorais a base de platina desempenham um papel muito importante nos regimes quimioterápicos. No entanto, o aumento da resistência celular bem como os efeitos colaterais associados ao uso destes agentes é alvo de preocupações.

1.2 Antitumorais a base de platina

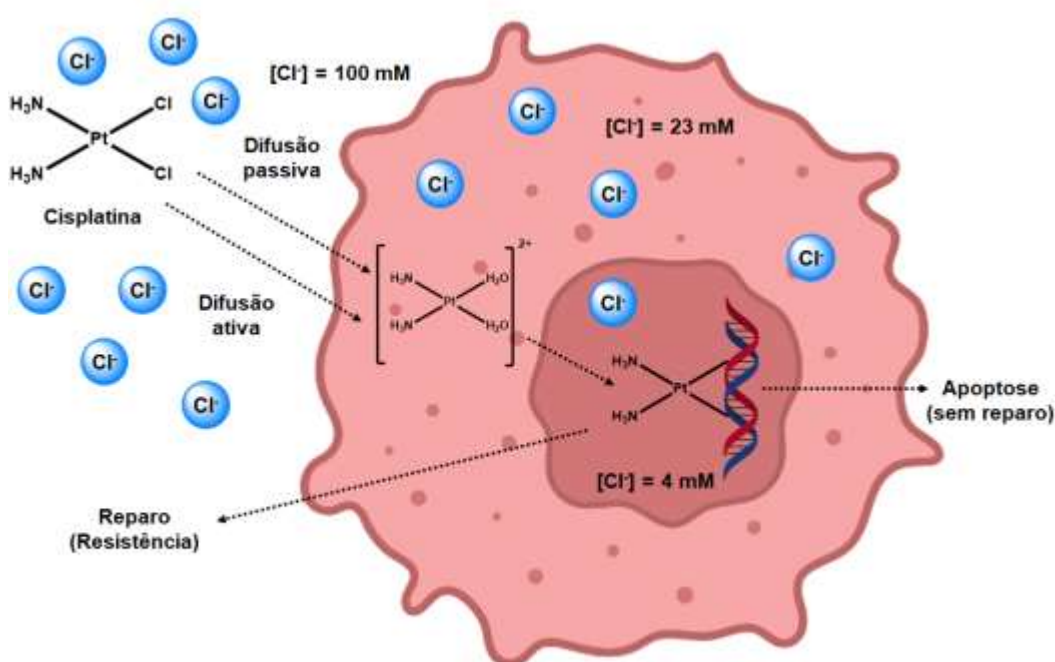
Desde que, fortuitamente, a atividade antineoplásica da cisplatina foi descoberta, muitos complexos baseados neste metal foram planejados com o objetivo de obter novos agentes antitumorais mais eficientes. Dentre eles, destacam-se a Carboplatina e a Oxaliplatina, caracterizados por apresentarem vantagens sobre a cisplatina. Outros fármacos foram aprovados em outros países, como é o caso da nedaplatina (Japão), lobaplatina (China) e heptaplatina (Korea), Figura 2 (FARIAS, 2020).

Figura 2 - Agentes metalofármacos anticâncer utilizados atualmente.

Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

Compostos de Pt^{II} tem como principal mecanismo de sua ação antitumoral, a interação com o DNA. Quando a cisplatina é internalizada, seus ligantes Cl^- sofrem aquação, resultando na formação de complexos do tipo $[PtNH_3]_2(H_2O)_2]^{2+}$. Os aquocomplexos reagem majoritariamente com o N(7) da guanina, formando adutos com essas nucleobases, conforme é descrito na Figura 3. Ao se ligar ao DNA, a lesão resulta em uma distorção da estrutura de dupla hélice do DNA que, se não for reparada, conduz a uma cascata de eventos que culmina na morte celular.

Figura 3 - Mecanismo de ação da cisplatina.



Fonte: elaborada pelo Autor (2023). Criado com biorender.com

Por outro lado, o DNA se encontra tanto nas células tumorais como nas células saudáveis, com isso ambas as células são afetadas pelo mecanismo citotóxico. Sendo assim, a cisplatina e seus análogos apresentam baixos índices de seletividade (IS), que proporcionam aos pacientes múltiplos efeitos colaterais, como por exemplo nefrotoxicidade, neurotoxicidade, náusea, vômito, dores de cabeça, entre outros, durante o tratamento. Destacam-se ainda a resistência celular e os mecanismos de defesa que podem diminuir o nível de eficiência dos fármacos (GHOSH 2019, OUN *et al.* 2018).

Em face do exposto, muitos grupos de pesquisa têm buscado alternativas para os complexos de platina usados medicinalmente visando obter complexos de platina ou não capazes de destruir as células tumorais por outros mecanismos.

1.3 Complexos de paládio como potenciais agentes citotóxicos contra células tumorais

Dentre os complexos pesquisados, os de Pd^{II} foram de início objetos constante de investigação pela sua similaridade estrutural com os compostos de Pt^{II} . No entanto os compostos de Pd^{II} são mais lábeis que os de Pt^{II} (MIESSLER; FISCHER; TARR, 2014). Sobre o ponto de vista de desenvolvimento de fármacos, essa é uma questão crucial, pois se o complexo não mantém sua estrutura íntegra até atingir o alvo farmacológico sua utilidade como fármaco é nula. Nesse sentido, é possível planejar compostos de paládio (II) menos lábeis a partir da escolha adequada dos ligantes que o compõe.

É bem estabelecido que complexos quadrático planares participam de reações de troca de ligante via mecanismo associativo. Neste mecanismo, forma-se um intermediário pentacoordenado após a formação da ligação com o novo ligante. Posteriormente, ocorre a liberação do grupo abandonador e regeneração da geometria quadrática planar (Figura 4) (MIESSLER; FISCHER; TARR, 2014). Nesse contexto, uma forma de diminuir a cinética de troca de ligantes em compostos de Pd^{II} envolve a incorporação de ligantes volumosos que dificultam a formação do intermediário pentacoordenado (MIESSLER; FISCHER; TARR, 2014). Dentre os ligantes volumosos disponíveis, destacam-se a trifenilfosfina (PPh_3) e a 2,6-lutidina (luti).

Figura 4 - Mecanismo associativo de substituição de ligantes em complexos quadrático planares de paládio (II).



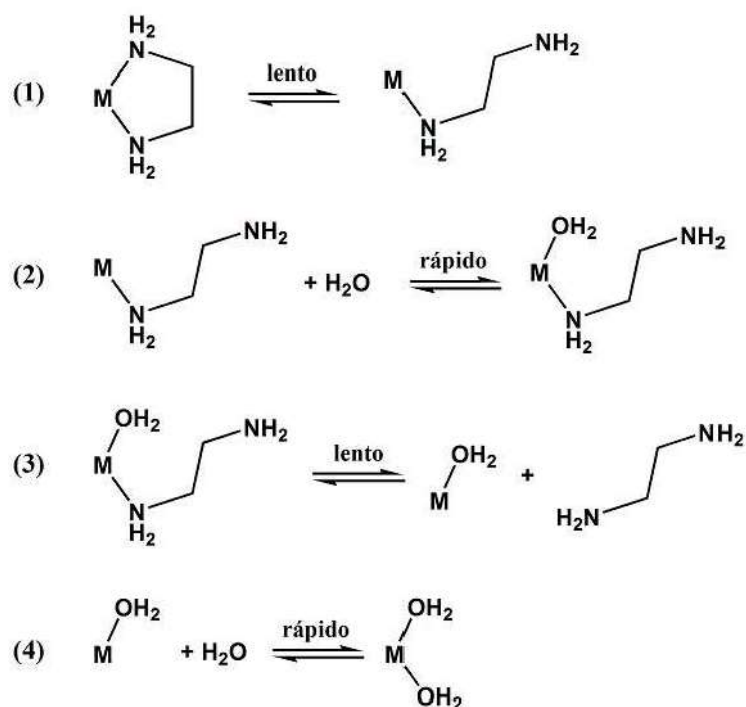
Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

Além do uso de ligantes volumosos, uma estratégia muito conhecida na redução da cinética de troca de ligantes em compostos de paládio (II) faz uso de ligantes quelantes devido ao efeito quelato (MIESSLER; FISCHER; TARR, 2014). A

reação de substituição de um ligante quelante é usualmente mais lenta quando comparada com a de um ligante monodentado. Este efeito baseia-se em dois fatores, como a energia necessária para a remoção do primeiro átomo coordenado e a probabilidade da reversão da primeira etapa (MIESSLER; FISCHER; TARR, 2014). A Figura 5 exemplifica as etapas de uma reação hipotética que envolve a substituição do ligante quelante etilenodiamina (en) por moléculas de água.

Nesta reação, espera-se duas etapas de dissociação, uma para cada átomo de nitrogênio coordenado do ligante em (a adição de água nas etapas **2** e **4** deve ser provavelmente rápida, devido a sua alta concentração no meio).

Figura 5 - Exemplo de uma reação envolvendo a aquação de um complexo contendo o ligante bidentado quelante etilenodiamina (en).



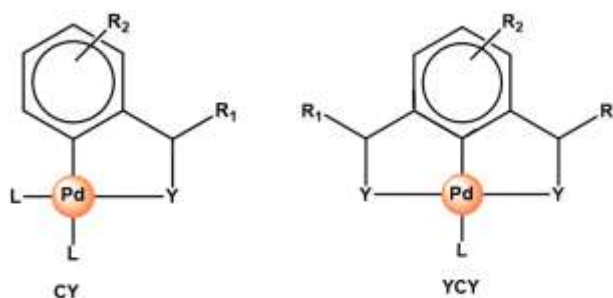
Fonte: Adaptado de MIESSLER; FISCHER; TARR; 2014.

A variação de entalpia referente à descoordenação do primeiro átomo de N (etapa **1**) é maior do que para um ligante monodentado relacionado. Se esse átomo se descoordenar, sua barreira cinética para a coordenação subsequente é menor do que para um ligante monodentado relacionado, visto que o átomo descoordenado na etapa **1** mantém-se muito próximo ao centro metálico. Espera-se que a etapa de dissociação (**1**) da en ocorra mais lentamente que a etapa correspondente para a amônia, pois o ligante deve se dobrar e girar para separar o grupo NH_2 livre do metal.

A segunda etapa de dissociação (**3**) também deve ocorrer mais lentamente devido a dois fatores, sendo estes a baixa concentração do intermediário e a etapa de dissociação **1** que pode ocorrer no sentido inverso. O nitrogênio descoordenado é mantido próximo ao metal pelo resto do ligante, sucedendo uma possível religação (MIESSLER; FISCHER; TARR, 2014). De modo geral, esse efeito quelato cinético minimiza as velocidades de reações de aquação por fatores de 20 a 10^5 (MIESSLER; FISCHER; TARR, 2014).

Dentre os principais complexos quelatos, destacam-se os compostos ciclopaladados. Estes compostos constituem uma classe de complexos organometálicos, e são caracterizados pela presença de um anel resultante da ligação de coordenação com átomos doadores de elétrons (Y) e uma ligação intramolecular covalente carbono-paládio, como esquematizado no esquema apresentado na Figura 6 (CAIRES, 2007; DUPONT; PFEFFER, 2008).

Figura 6 - Representação esquemática de ciclopaladados do tipo CY e YCY, sendo Y = -NR₂, NR, -PR₂; -SR, =S, etc.; R₁ e R₂ = alquila, arila, etc. L = haletos, acetato, etc.



Fonte: Adaptado de DUPONT; PFEFFER, 2008.

As potencialidades terapêuticas dos compostos ciclopaladados vêm sendo constantemente investigadas pela comunidade científica (CAIRES, 2007; OMAE, 2014; CUTILLAS *et al.* 2013; GAROUFIS; HADJIKAKOU; HADJILIADIS, 2009). A existência de um anel ortometalado “(C,N)Pd” contendo uma forte ligação σ C→Pd aumenta a estabilidade do composto no meio biológico tempo suficiente até interagir com o alvo farmacológico (CUTILLAS *et al.* 2013).

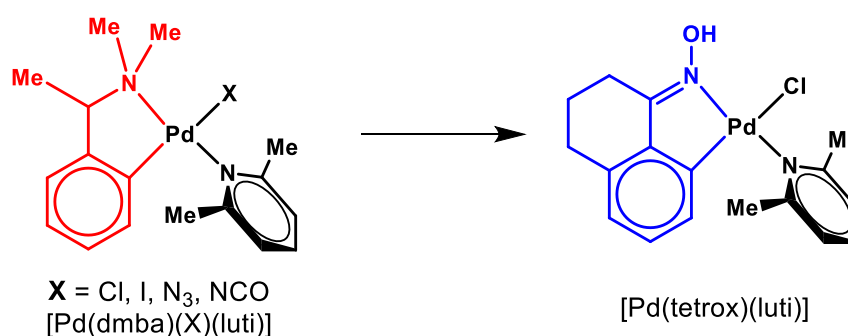
1.4 Justificativa do trabalho

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem investigando relações estrutura-atividade de uma série de compostos ciclopaladados. No trabalho de Cunha *et al.* (2020) foi descrito a atividade antiproliferativa de compostos do tipo [PdX(dmba)(luti)] frente a uma variedade de células tumorais com valores de IC₅₀ da

ordem de 0,3-8,0 μM , ao passo que a cisplatina foi menos ativa (23-100 μM). Esses resultados têm nos motivado a sintetizar complexos análogos objetivando detectar quais partes da molécula são importantes para a atividade e quais não são.

Neste trabalho, pretende-se avaliar os efeitos resultantes da substituição do ligante N,N-dimetil-benzilamina (dmba) por tetralonaoxima (tetrox), mantendo o ligante auxiliar 2,6-lutidina (Figura 7). A incorporação do núcleo da tetralona foi motivada visando aumentar a lipofilicidade do composto para estabelecer interações favoráveis com possíveis sítios hidrofóbicos em biomoléculas alvo.

Figura 7 - Composto ciclopaladado proposto neste trabalho.



Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho envolve a síntese, caracterização, investigação da atividade biológica de um composto ciclopaladado inédito do tipo $[\text{PdCl}(\text{tetrox})(\text{luti})]$, em que tetrox = tetralonaoxima e luti = 2,6-lutidina, obtido a partir da reação entre o precursor metálico $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{tetrox})]_2$ e o respectivo ligante.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Sintetizar e caracterizar o precursor dimérico de fórmula $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-tetrox})(\mu\text{-Cl})]_2$ a partir da reação de transciclometalação utilizando-se o precursor $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{C}^2, \text{N-dmba})]_2$ (dmba = N,N-dimetilbenzilamina) e a tetrox;
- II. Sintetizar e caracterizar o composto ciclopaladado de fórmula $[\text{PdCl}(\text{tetrox})(\text{luti})]$. Caracterizar os compostos sintetizados pelas

técnicas de análise elementar, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear, difração de raios X de monocristal;

- III. Investigar o comportamento do complexo em solução;
- IV. Determinar o índice de citotoxicidade (IC_{50}) do complexo frente às linhagens de tumores humanos de pulmão (A549) e não tumorais MRC-5 (fibroblasto de pulmão);
- V. Investigar a interação do composto frente à biomolécula DNA através do método de titulação espectrofotométrica, Dicroísmo Circular (CD) e ensaios de substituição competitiva.

3 METODOLOGIA

3.1 Procedência de reagentes e solventes

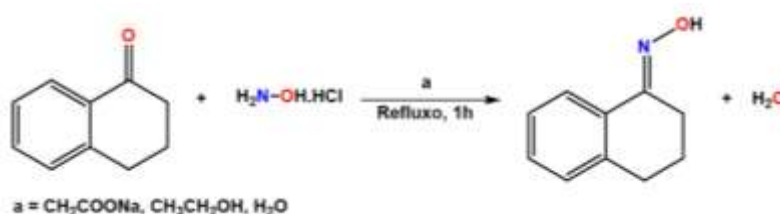
Todos os reagentes, solventes e materiais de partida desse trabalho foram adquiridos de fontes comerciais com padrão de pureza analítico, sendo assim, foram utilizados sem purificação prévia.

3.2 Obtenção dos compostos ciclopaladados

3.2.1 Síntese da tetralonaoxima

A síntese do ligante tetrox foi adaptada do procedimento previamente reportado na literatura (BUCHANAN; DAWSON 1978) de acordo com o esquema de reação apresentado na Figura 8. Assim sendo, partiu-se de 100 mg de (1,44 mmol) de cloridrato de hidroxilamina e 400 mg (4,88 mmol) de α -tetralona em 2 mL de etanol. A síntese foi realizada sob catálise básica e mantida em agitação sob refluxo durante 1 h. Transcorrido este período, sob o sistema ainda quente, adicionou-se 25 mL de água destilada gelada. O precipitado formado foi filtrado e isolado na forma de um sólido branco cristalino. O rendimento obtido foi de 75%. O sólido, após seco à vácuo, foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho.

Figura 8 - Esquema da síntese do ligante tetralonaoxima (tetrox).



Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

3.2.2 Síntese do dímero precursor $[Pd(C^2,N\text{-tetrox})(\mu\text{-Cl})]_2$

O dímero precursor de fórmula $[Pd(C^2,N\text{-tetrox})(\mu\text{-Cl})]_2$ foi obtido por meio da reação de transciclometalação do dímero $[Pd(C^2,N\text{-dmmba})(\mu\text{-Cl})]_2$, a partir de uma rota já estabelecida na literatura (RYABOV *et al.* 1992). Para esta reação, suspendeu-se 220,5 mg (0,399 mmol) do dímero $[Pd(C^2,N\text{-dmmba})(\mu\text{-Cl})]_2$ em 20 mL de uma mistura 1:1 de $CH_3COOH:CHCl_3$, mantida em agitação e aquecimento a 55°C. A esta suspensão, foi gotejada uma solução contendo 135,0 mg (0,838 mmol) de tetrox em 5 mL de uma mistura de solventes 1:1 de $CH_3COOH:CHCl_3$. Conforme a adição do ligante tetrox, o meio reacional tornou-se solúvel com coloração laranja-esverdeado. A solução foi mantida em agitação e temperatura ($T = 55^\circ C$) constantes durante 24 h e após esse período cessou-se essas condições e observou-se a formação de um precipitado verde escuro. O sólido foi isolado por filtração simples e lavado com $CHCl_3$, e após seco à vácuo, foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho.

Figura 9 - Esquema da síntese do dímero precursor $[Pd(C^2,N\text{-tetrox})(\mu\text{-Cl})]_2$.



Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

3.2.3 Síntese do composto ciclopaladado $[PdCl(tetrox)(luti)]$

O monômero inédito de fórmula $[PdCl(tetrox)(luti)]$ foi obtido através da reação de clivagem do dímero precursor $[Pd(C^2,N\text{-tetrox})(\mu\text{-Cl})]_2$. A metodologia empregada assemelha-se ao descrito por Bozza *et al.* 2019.

Sendo assim, partiu-se de 77 mg (0,188 mmol) do dímero $[Pd(C^2,N\text{-tetrox})(\mu\text{-Cl})]_2$ suspensos em 10 mL de acetona, resultando em uma suspensão amarelada. A esta suspensão, foram adicionados lentamente 5 mL de uma solução do ligante 2,6 – lutidina em acetona. A medida que o ligante é adicionado, a suspensão inicial se transforma em uma solução de coloração amarelo pálido. A reação permaneceu em agitação durante 1 h à temperatura ambiente, e após esse período foi filtrada por

filtração simples. Ao decorrer da evaporação do solvente do filtrado, houve a formação de um sólido amarelo cristalino com rendimento de 80%.

O sólido foi seco à vácuo e em seguida foi caracterizado pelas técnicas de análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho e RMN e difração de raios X de monocristal.

3.3 Caracterização dos compostos

3.3.1 Análise Elementar

A análise elementar, para a determinação dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio do complexo, foi realizada em analisador elementar Perkin Elmer 2400 series II com detector de condutividade térmica (TCD) através do método Pregl – Dumas, disponível na central analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP - capital).

3.3.2 Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho

Os espectros de FTIR foram obtidos no espectrofotômetro Nicolet IS5 Thermo Scientific, na região de 400 – 4000 cm^{-1} , utilizando pastilhas de KBr.

3.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) para os núcleos de ^1H , e ^{13}C , HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) e HMBC (Hetero Multiple Bond Coherence) foram obtidos no espectrômetro multinuclear BRUKER Avance III HD 600 (14, 1T), equipamento disponível na plataforma multiusuário no Instituto de Química da UNESP, Campus de Araraquara. O solvente utilizado foi CDCl_3 e seu sinal residual em 7,26 ppm foi utilizado como referência.

3.3.4 Difratometria de Raios X de monocristal

As medidas de difração de raios X de monocristal foram feitas pelo Prof. Dr. Javier Ellena no Instituto de Física de São Carlos – USP. Os dados foram obtidos a temperatura ambiente (25 °C) no difratômetro Rigaku XtaLAB mini, utilizando a radiação $\text{Mo K}\alpha$ ($\lambda = 0,710 \text{ \AA}$), monocromatizada por cristal de grafite. A estrutura foi resolvida por método direto usando o software SHELXT. As correções de redução, dimensionamento e absorção de dados foram realizadas usando CrysAlisPro. A representação gráfica da estrutura foi elaborada pelo software Mercury 4.1.

3.4 Ensaio de estabilidade em solução

A estabilidade química do complexo foi avaliada pela técnica espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H . As amostras foram solubilizadas em DMSO-d_6 e os espectros foram adquiridos em um espectrômetro multinuclear BRUKER Avance III HD 600 (14, 1T) a 298 K nos tempos de 0, 24 e 48 h.

3.5 Ensaios biológicos

3.5.1 Titulação Espectrofotométrica com DNA

Espectros de UV-Vis foram obtidos para os complexos na presença de quantidades crescentes de *ct*DNA, na região de 200 a 800 nm em tampão salino Tris-HCl (pH 7,4). A titulação foi realizada a temperatura ambiente mantendo a concentração do complexo constante em 20 μM , enquanto a concentração do *ct*DNA foi variada de 0 até 60 μM .

O complexo foi solubilizado em DMSO a fim de se obter uma solução de concentração de 1 mM, e a partir desta solução, foram adicionados 60 μL do composto em 2940 μL de tampão em uma cubeta de quartzo de 3,5 mL. Em uma segunda cubeta, o branco foi preparado com 60 μL de DMSO puro e 2940 μL de tampão salino tris-HCl, pH 7,4. Após a primeira leitura da cubeta 1, foram adicionados sucessivamente alíquotas de 18 μL de uma solução fresca de *ct*DNA ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em ambas as cubetas 1 e 2, sucessivamente, até um total de 10 adições. Deste modo, a proporção molar do aduto, complexo—DNA, foi variada de 0,3 a 3,0 com intervalos de 0,3 em cada adição.

A constante de ligação (K_b) foi obtida através da equação de Benesi-Hildebrand (Equação 1):

$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\epsilon_G}{\epsilon_{H-G} - \epsilon_G} + \frac{\epsilon_G}{\epsilon_{H-G} - \epsilon_G} \times \frac{1}{K_b[\text{DNA}]}$$

Sendo, A_0 e A as absorbâncias do complexo livre e do complexo com DNA, respectivamente. Os coeficientes ϵ_G e ϵ_{H-G} os coeficientes de absorvidade molar do complexo ciclopaladado livre e do aduto composto—DNA, respectivamente.

Logo, K_b foi obtido através da razão entre o coeficiente linear e o angular obtidos a partir da curva de $\frac{A_0}{(A - A_0)}$ em função de $\frac{1}{[\text{DNA}]}$.

3.5.2 Dicroísmo Circular

O espectro de dicroísmo circular (CD) foi obtido para uma solução de DNA preparada em tampão salino Tris-HCl (pH 7,4) com a adição de crescentes quantidades do composto 1t-AM. A concentração do DNA foi mantida constante (50 μM) enquanto a concentração do complexo variou de 0 a 20 μM .

Foram realizadas crescentes adições do complexo à solução do DNA, partindo-se de uma solução $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em DMSO. As amostras foram incubadas a 37 °C durante 24h. Após esse tempo, as medidas foram registradas utilizando uma cubeta de quartzo, na faixa 235 a 320 nm, com acumulação de 5 scans, largura de banda 1,0 nm, com velocidade de 100 nm/min e temperatura a 25 °C.

3.5.3 Ensaio de Competição com Hoechst 33258

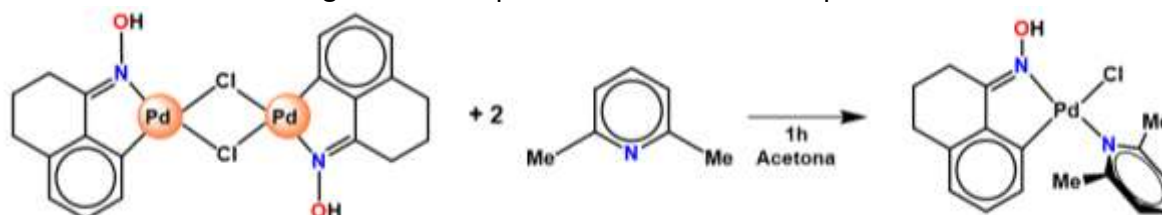
O estudo de competição foi realizado com a sonda Hoechst 33258. O espectro de emissão foi registrado no comprimento de onda de excitação 338 nm, em uma faixa de 358 a 660 nm. Preparou-se uma solução de ctDNA (60 μM) em tampão salino Tris-HCl (pH 7,4), com o Hoechst 33258 (6 μM).

Diferentes concentrações do composto 1t-AM em DMSO ($2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) foram adicionados à solução Hoechst 33258-DNA. A concentração do complexo foi variada de 0 a 60 μM e as medidas foram realizadas após 5 minutos de repouso entre cada adição.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reação de clivagem do dímero pela lutidina conduz a formação de um único produto, o qual foi caracterizado pelas técnicas abaixo.

Figura 10 - Esquema da síntese do complexo 1t-AM.



Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

4.1 Caracterização

4.5.2 Análise Elementar

Os valores obtidos na análise quantitativa de carbono, hidrogênio e nitrogênio, e seus respectivos valores calculados para o composto ciclopaladado encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de CHN% obtidos e calculados para o complexo 1t-AM.

Composto	% C		% H		% N	
	Obt.	Calc.	Obt.	Calc.	Obt.	Calc.
1t - AM	49,8	49,9	4,5	4,6	6,8	6,8

Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

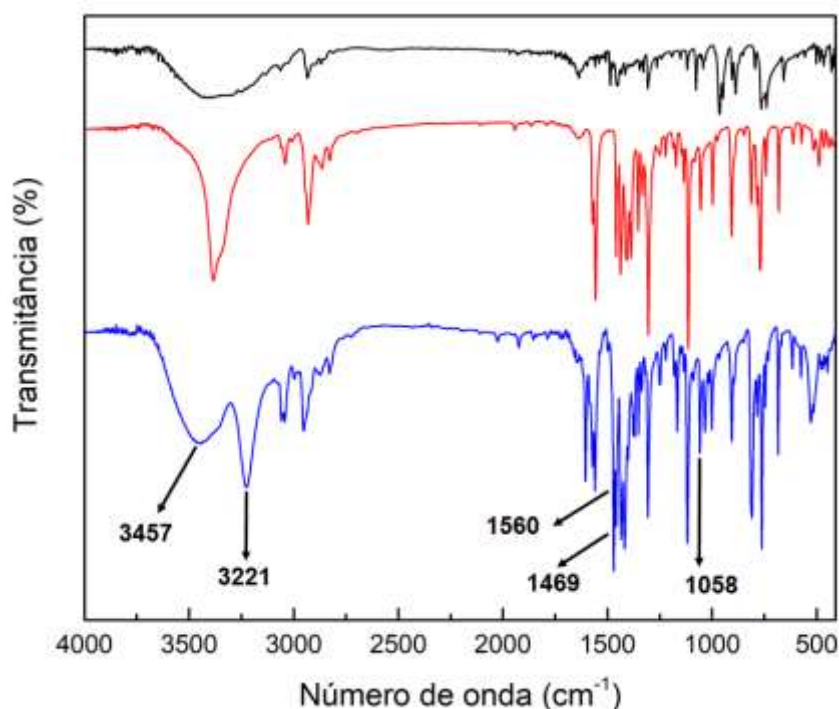
Observa-se que a porcentagem obtida para cada elemento encontra-se próximo da calculada, sugerindo a fórmula mínima proposta $C_{17}H_{19}N_2OPd$. Esta fórmula concorda com a estequiometria do complexo $[PdCl(tetrox)(luti)]$.

4.5.3 Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho

As atribuições realizadas em todos os espectros foram baseadas em trabalhos envolvendo a caracterização por espectroscopia no IV (CUNHA, 2017; VELASQUES *et al.* 2022).

Os espectros obtidos para a tetralonaoxima, dímero precursor e o complexo 1t-AM são apresentados na Figura 11, com destaque para os principais grupos funcionais.

Figura 11 - Espectro de IV para a oxima (preto), dímero precursor (vermelho) e o complexo 1t-AM (azul).



Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

Para o diagnóstico da coordenação das oximas ortometaladas, são monitorados os deslocamentos das bandas associadas aos estiramentos dos grupos OH, C=N e NO. No espectro da tetrox livre observa-se três bandas em 3449, 1639 e 965 cm^{-1} , atribuídas aos modos νOH , $\nu\text{C=N}+\delta\text{OH}$ e νNO . No espectro do dímero precursor, observa-se que a banda νOH torna-se mais estreita e deslocada para região de mais baixa frequência (3380 cm^{-1}) devido à redução das ligações de hidrogênio intermoleculares em função da coordenação. No caso do composto 1t-AM, observam-se duas bandas νOH em 3457 e 3221 cm^{-1} . A primeira banda de característica alargada é atribuída ao grupo OH livre de ligação de hidrogênio. Já a segunda banda mais estreita é atribuída ao grupo OH envolvido em ligações de hidrogênio intramoleculares. A banda $\nu\text{C=N}+\delta\text{OH}$ (dímero, 1556; 1t-AM, 1560 cm^{-1}) sofreu deslocamento significativo após a ciclometalação. Este fato deve-se ao efeito do deslocamento de carga do átomo de nitrogênio para o centro metálico em função da coordenação. Detectou-se também um deslocamento significativo da banda νNO para 1055 (dímero metálico) e 1058 cm^{-1} (1t-AM), sendo este um indicativo da participação do grupo oxima na coordenação (VELASQUEZ *et al.* 2022). Já a presença da luti pode ser evidenciada pelo aparecimento das suas bandas νCN típicas

em 1600 e 1470 cm^{-1} (RAMALINGAM *et al.* 2011). No espectro do complexo 1t-AM, observa-se o surgimento de uma banda em 1469 cm^{-1} , o que concorda com a presença da luti na composição do complexo 1t-AM.

Na Tabela 2 encontram-se os valores de comprimento de onda dos principais grupos caracterizados para o ligante livre tetrox, para o dímero precursor e para o complexo.

Tabela 2 - Principais absorções no infravermelho observadas nos espectros da tetrox, do precursor metálico e do complexo 1t-AM.

Número de Onda / cm^{-1}			Atribuições
tetrox	$[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{C}^2, \text{N-tetrox})]_2$	1t - AM	
3449	3380	3457; 3221	VOH
1639	1556	1560	VC=N+ δ OH
965	1055	1058	VNO
---	---	1469	VCNluti

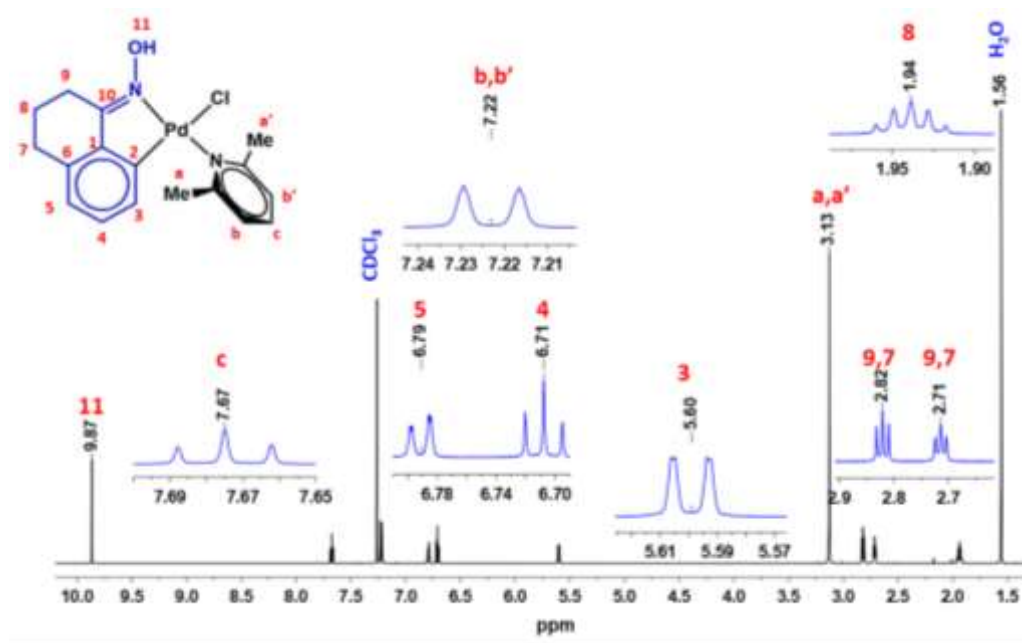
Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

4.5.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

O composto foi submetido aos experimentos de RMN para os núcleos de ^1H , bem como as técnicas de correlação bidimensional HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) e HMBC (Hetero Multiple Bond Coherence). Todas as medidas foram realizadas utilizando clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente.

A caracterização dos sinais nos espectros seguiu a numeração apresentada na Figura 12 é apresentado o espectro de RMN de ^1H para o composto 1t-AM.

Figura 12 - Espectro de RMN de ^1H para o composto 1t-AM em CDCl_3 .



Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

A presença de um único conjunto de sinais no espectro de RMN de ^1H para a tetrox ortopaladada e a luti coordenada indica a presença de uma única espécie em solução. Todos os sinais apresentam deslocamentos em relação aos ligantes livres, sugerindo a formação de uma nova molécula.

De acordo com a Figura 12, uma análise da integração dos sinais referentes aos hidrogênios dos ligante tetrox e 2,6-lutidina revela uma proporção 1:1, concordando com a estequiometria proposta $[\text{PdCl}(\text{tetrox})(\text{luti})]$.

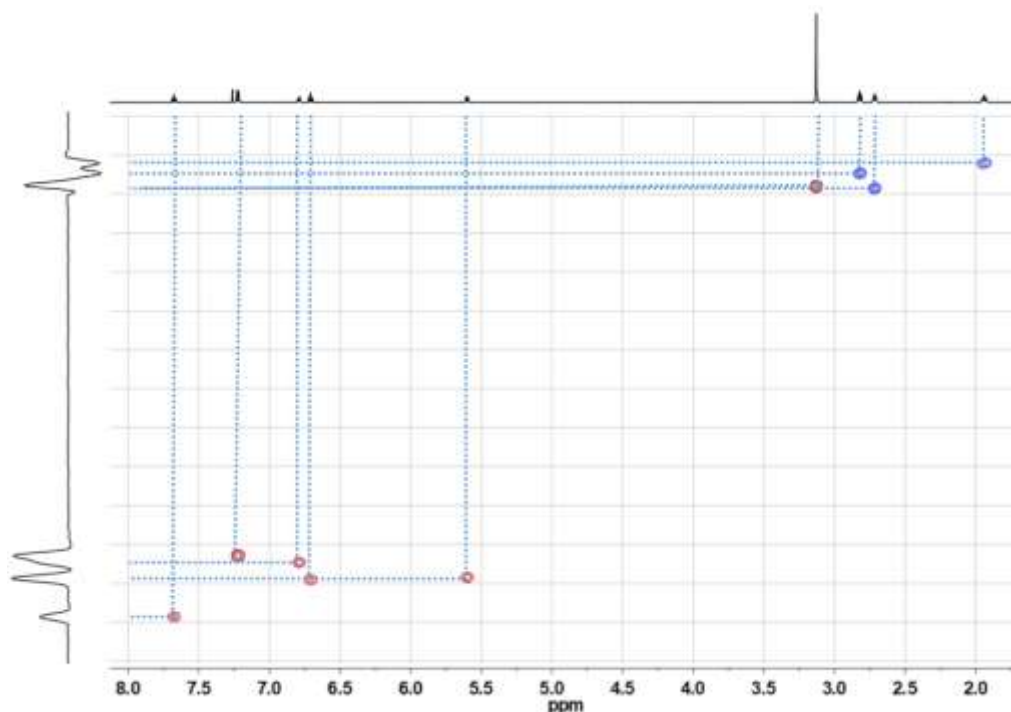
O espectro mostra claramente a ortopaladação da tetrox. Além da ausência do sinal H2, observa-se o sistema de spin dos núcleos aromáticos H3, H4 e H5 em 5,60 (d, $J^3 = 7,6$ Hz), 6,71 (t, $J^3 = 7,6$ Hz) e 6,79 ppm (dd, $J^3 = 7,6$ Hz, $J^4 = 1$ Hz). É importante destacar que o sinal referente ao H3 está deslocado para campo mais protegido em relação aos demais hidrogênios aromáticos da tetrox. Este efeito deve-se à ação do cone de proteção que surge dos elétrons π da 2,6-lutidina coordenada (CUNHA, 2017). O efeito da anisotropia magnética exercido pelo anel aromático do ligante luti, que blinda o próton orto ao sítio de metalação, concorda com a disposição trans da luti em relação ao nitrogênio da tetrox. Os átomos de H que compõem a porção alifática da tetrox são observados em 2,82 (t, $J^3 = 6,2$ Hz), 2,71 (t, $J^3 = 6,2$ Hz) e 1,94 ppm (q, $J^3 = 6,2$ Hz). O sinal em 1,94 ppm é atribuído ao H8 que acopla com

os H7 e H9. Contudo, não é possível atribuir os sinais de H7 e H9 sem o auxílio dos espectros bidimensionais. Na região de campo de maior desblindagem, observa-se a presença de um singlete em 9,87 ppm referente ao grupo OH da oxima.

Os hidrogênios aromáticos referentes ao anel da luti são associados ao dubleto em 7,22 ppm (Hb e Hb', $J^3 = 7,7$ Hz) e ao tripleto em 7,67 ppm (Hc, $J^3 = 7,7$ Hz). O sinal em 3,13 ppm é atribuído aos hidrogênios Ha e Ha' das metilas do ligante luti. O fato deste sinal aparecer na forma de singlete com integração para 6H indica que há um plano de simetria que passa pelo plano de coordenação, tornando os núcleos da luti equivalentes magneticamente.

O espectro HSQC foi discutido em duas partes: a parte dos carbonos e hidrogênios da tetrox e a dos átomos da luti, Figura 13.

Figura 13 - Espectro de correlação HSQC (CDCl_3) de C e H para o complexo 1t-AM.



Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

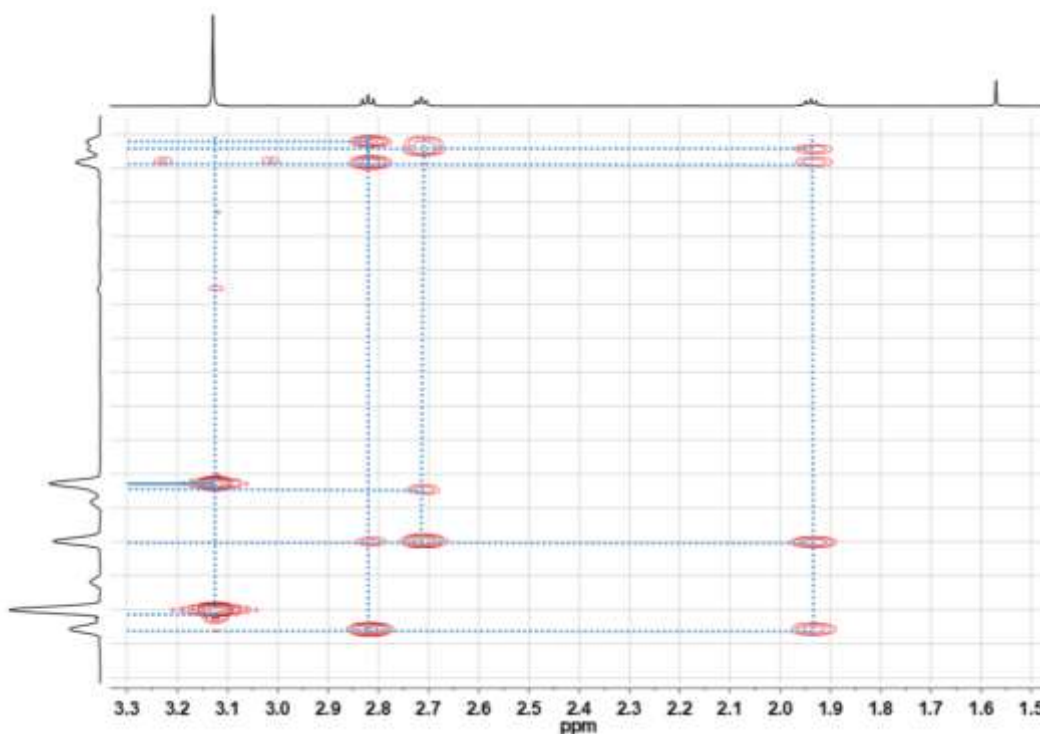
Na região dos carbonos alifáticos da tetrox, o quinteto referente ao H8 correlaciona-se com o sinal em 22,03 ppm. Os sinais de ^{13}C em 24,72 e 28,55 ppm correlacionam com os dubletos em 2,82 e 2,71 ppm, respectivamente. Na porção aromática da tetrox, nota-se que o dubleto atribuído ao H3 em 5,61 ppm tem correlação com o sinal em 128,44 ppm. Já os sinais referentes ao H4 (6,71 ppm) e H5

(6,79 ppm) mostram correlações com os sinais ^{13}C em 129,01 e 124,59 ppm, respectivamente.

Na porção aromática da luti, verifica-se que o dubleto associado aos átomos Hb e Hb' apresenta correlação com o sinal de carbono em 122,86 ppm enquanto que o tripleto em 7,68 ppm (Hc) correlaciona-se com o sinal em 138,70 ppm. O singlete associado às metilas Ha e Ha' (3,13 ppm) mostra correlação com o sinal em 28,02 ppm.

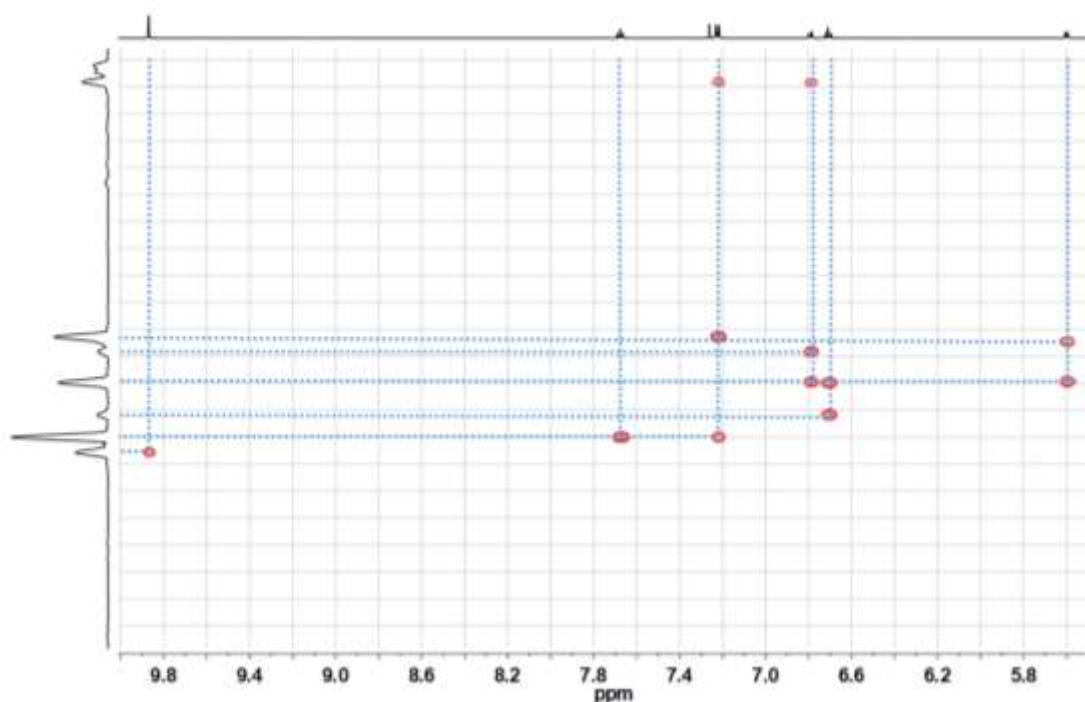
O espectro HMBC foi discutido em duas partes: a parte dos carbonos e hidrogênios alifáticos e aromáticos dos ligantes tetrox e luti, Figura 14 e 15, respectivamente.

Figura 14 - Espectro de correlação HMBC (CDCl_3) de C e H alifáticos para o complexo 1t-AM.



Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

Figura 15 - Espectro de correlação HMBC (CDCl_3) de C e H aromáticos para o complexo 1t-AM.



Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

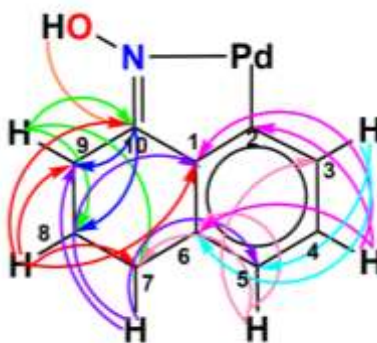
Na região alifática da tetrox os carbonos C9 em 24,72 ppm, C8 em 22,03 ppm, C7 em 28,55 ppm e C6 em 139,45 ppm são identificados pelas suas correlações diretas com os respectivos hidrogênios no espectro de HSQC (Figura 14). Já o carbono C10 em 165,67 ppm correlaciona-se com o H11 da oxima. O hidrogênio H9 (2,82 ppm) apresenta correlação com os C10, C8 e C7, já o H8 (1,94 ppm) correlaciona-se com os C10, C9, C7 e C1 (139,9 ppm) da porção aromática da tetrox. O hidrogênio H7 pode acoplar com C9 e com os carbonos C5 (124,59 ppm) em para e e C1 em meta da porção aromática da tetrox. Já o C10, correlaciona-se com os carbonos C9 e C8.

Na região aromática da tetrox os carbonos C3 em 128,44 ppm, C4 em 1290,1 ppm e C5 em 124,59 ppm são identificados pelas suas correlações diretas com os respectivos hidrogênios no espectro de HSQC (Figura 15). O hidrogênio H3 (5,61 ppm) correlaciona-se com os carbonos C5 em para e com o C6 em meta, já o H4 apresenta correlação com os carbonos C6 em para, C1 em meta e com o C2 em 151,81 ppm. Já o hidrogênio H6 correlaciona-se com os carbonos C3, C6 e C7 da porção alifática.

Os hidrogênios e carbonos restantes pertencem ao sistema aromático e alifático do ligante luti. Os hidrogênios alifáticos Ha (3,13 ppm) e Ha' (3,13 ppm) deste ligante correlacionam-se com os carbonos Cd e Cd' em 160,06 ppm e os hidrogênios Hb (7,22 ppm), Hb' (7,22 ppm) da porção aromática do ligante 2,6-lutidina apresentam correlações com os carbonos Ca e Ca' em 28,02 ppm e com Cd e Cd', já o hidrogênio Hc correlaciona-se com os carbonos Cd e Cd'.

A Figura 16 mostra as correlações feitas para o espectro HMBC, com os hidrogênios do ligante tetrox.

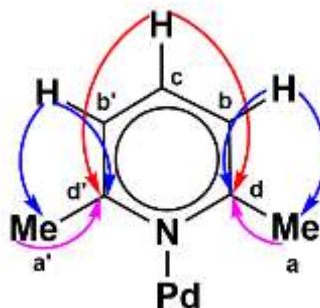
Figura 16 - Principais correlações observadas pelo HMBC para o ligante tetrox presente no composto 1t-AM.



Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

A Figura 17 mostra as principais correlações feitas com o espectro de HMBC para o sistema aromático do ligante luti.

Figura 17. Principais correlações observadas pelo HMBC para o ligante luti presente no composto 1t-AM.



Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

Os dados obtidos no experimento de RMN para o composto 1t-AM estão resumidos na Tabela 3.

Os dados de difração de raios X de monocristal confirmam que o composto 1t-AM é um monômero. A partir dos valores dos ângulos de ligação N2 – Pd – C1 (95.42°) e N1 – Pd – Cl1 (78.83°). Estudos por difração de raios X do composto 1t-AM confirmaram a obtenção de um complexo de geometria quadrática planar distorcida. Essa geometria ocorre devido a coordenação quelante dos átomos C e N no ligante tetrox, formando o anel ortometalado de cinco membros, seguida pela coordenação do átomo de N do ligante 2,6-lutidina e do Cl no ciclopaladado.

Em relação ao ligante 2,6-lutidina, este encontra-se trans em relação ao átomo de N do ligante tetrox, como já observado pelo espectro de RMN de ^1H .

O composto 1t-AM apresenta distâncias Pd – N1 = 1,979 Å e Pd – C1 = 1,974 Å, comparáveis às distâncias de ligação de outros ciclopaladados análogos descritos na literatura (CUNHA *et al.* 2020).

A distância de ligação Pd – N2 (2,019 Å) é ligeiramente mais curta em relação à distância de ligação no complexo $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\text{luti})(\text{Cl})]$ de (2,0492 (14) Å) (CUNHA *et al.* 2020).

Os valores das distâncias e os ângulos de ligações observadas para o ciclopaladado se encontram na Tabela 4.

Tabela 4 - Principais distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação do composto 1t-AM.

Ângulo de ligação			(°)
C1	Pd	N1	78,83
C1	Pd	N2	95,42
Ligação Química			(Å)
Pd	N1ox		1,979
Pd	C1		1,974
Pd	Cl		2,442
Pd	N2		2,019

Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

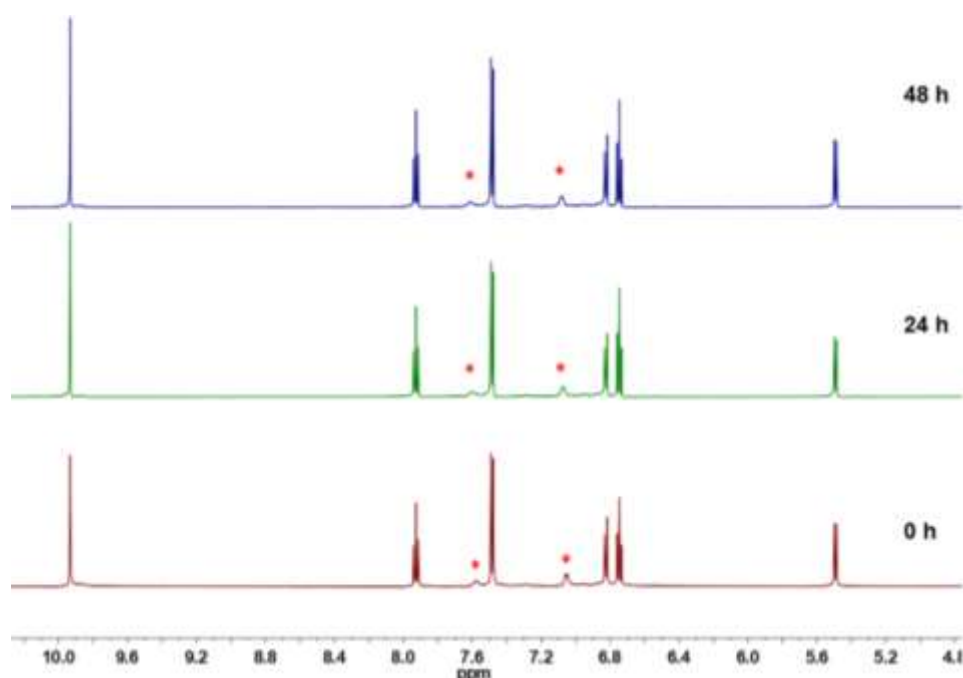
4.6 Ensaio de estabilidade em solução

Considerando a realização de ensaios *in vitro*, é necessário investigar a integridade dos complexos metálicos em solução. Os compostos são considerados estáveis quando não se observa alterações no núcleo de coordenação da espécie, como a saída ou troca de ligantes nas condições dos experimentos.

Devido à baixa solubilidade dos complexos em água, é utilizado o solvente dimetilsulfóxido (DMSO) para a solubilização dos mesmos nos ensaios de avaliação da viabilidade celular. No entanto, o solvente DMSO apresenta natureza coordenante, com isso, a solubilização dos complexos neste solvente pode apresentar trocas de ligantes, dando origem a outras espécies.

Sendo assim, objetivando o estudo da estabilidade do composto 1t-AM em solução, foram coletados espectros de RMN de ^1H nos tempos de 0, 24 e 48h. Este período de tempo foi selecionado pois é o tempo de incubação usualmente empregado nos ensaios de viabilidade celular. Os espectros para o experimento de estabilidade são apresentados na Figura 19.

Figura 19 - Estudo de estabilidade em solução para o complexo 1t-AM em DMSO- d_6 nos intervalos de tempo de 0h, 24h e 48h.



Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

Observando os espectros coletados em diferentes intervalos de tempo (0, 24 e 48h), nota-se a presença de um conjunto de sinais associado à espécie majoritária em solução. Este conjunto de sinais possui o mesmo padrão daquele observado em CDCl_3 , sugerindo que essa espécie contém a tetrox ortopaladada e a luti coordenada em uma configuração trans ao N da oxima. Essa espécie é formada imediatamente após a dissolução do sólido em DMSO, uma vez que a intensidade de seus sinais não sofreu nenhuma alteração ao longo do período analisado. Verifica-se ainda um

conjunto adicional de sinais de baixa intensidade associado à presença de lutidina livre (2,42; 7,08 e 7,60 ppm) (CUNHA, 2017) Integrando-se os sinais referentes ao grupo metílico da espécie majoritária e da luti livre, encontrou-se uma relação de 6:1 (espécie majoritária:lutidina livre). Tal fato indica que uma pequena fração do complexo sofre uma reação de substituição envolvendo a lutidina coordenada. Não foi possível detectar com precisão os sinais referentes à espécie $[Pd(tetrox)(S)_2]^+$ (S = solvente) resultante da substituição da luti.

4.7 Ensaios biológicos

4.7.2 Ensaios de interação com o ctDNA

Várias moléculas pequenas capazes de ligar ao DNA genômico têm demonstrado ser eficientes agentes quimioterápicos contra células tumorais, microrganismos patogênicos e vírus. O DNA é o alvo farmacológico de um número significativo de fármacos usados clinicamente ou em testes clínicos avançados. A ideia de atingir o DNA para regular as funções celulares, a partir da modulação da expressão gênica ou da interferência na replicação, demonstra ser lógico e conceitualmente simples (BARRA; NETTO, 2015).

O DNA é um biopolímero linear de nucleotídeos unidos por ligações fosfodiéster capazes de estocar e transmitir a informação genética na célula. A cadeia de açúcar-fosfato carregada negativamente é hidrofílica e encontra-se exposta a solução aquosa do meio intracelular. Já as bases nitrogenadas planares e de caráter mais lipofílico orientam-se para o interior da dupla-hélice. A orientação das ligações no DNA faz com que se formem dois sulcos – o sulco maior e menor. A estrutura supramolecular da hélice dupla é estabilizada por várias forças não-covalentes, tais como, ligações de hidrogênio e interações π - π atuando entre as bases nitrogenadas; atração eletrostática entre as cadeias açúcar-fosfato (negativas) e os cátions em solução. Dada a complexidade estrutural desta biomolécula, a interação entre uma molécula pequena e o DNA pode ser covalente ou não-covalente via interações eletrostáticas ou hidrofóbicas nos sulcos do DNA ou entre os pares de bases empilhados (intercalação) (BARRA; NETTO, 2015).

Várias técnicas vêm sendo usadas para investigar as interações covalentes e não-covalentes entre moléculas pequenas e o DNA (SIRAJUDDIN *et al.* 2013; REHMAN *et al.* 2015). Dentre as técnicas conhecidas, a espectroscopia de absorção

eletrônica é uma das mais utilizadas pois fornece informações preliminares importantes. O espectro de absorção no UV-VIs do DNA apresenta uma banda intensa e larga na região do UV (200–350 nm) com um máximo em 260 nm, que tem contribuições das transições eletrônicas dos cromóforos presentes na purina (adenina e guanina) e pirimidina (citosina e timina). A probabilidade dessas transições é elevada e, conseqüentemente, a absorvidade molar (ϵ) é da ordem de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Esta técnica permite determinar a concentração molar do DNA baseado na medida do valor de absorbância em 260 nm. A razão das absorbâncias (A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}) pode também indicar a pureza do DNA. O DNA suficientemente livre de proteína dá uma razão no intervalo de 1,8–1,9. Pequenas alterações no máximo da absorção e na absorvidade molar podem ocorrer com variações no pH ou força iônica no meio.

A interação com o DNA pode ser investigada comparando-se o espectro da molécula pequena, do DNA livre e do complexo DNA/molécula pequena. A banda do DNA, bem como as absorções do complexo sofrem mudanças caso ocorra algum tipo de interação. Assim, esse tipo de estudo requer o monitoramento de uma dessas bandas à medida que alíquotas de soluções de concentração crescente de DNA são adicionadas a uma solução contendo concentração constante do complexo. Ao aumentar a concentração da molécula pequena, monitora-se qualquer mudança na absorção ou no deslocamento do máximo da absorção. Alterações na estrutura de dupla hélice do DNA resultam no surgimento de efeitos hipercrômicos ou hipocrômicos. Qualquer alteração na conformação e estrutura do DNA induzida pela ligação da molécula pequena é traduzida em mudanças espectrais. Desestabilização da estrutura secundária resulta em um hipercromismo enquanto que o hipocromismo é resultante da estabilização da estrutura secundária do DNA via efeitos eletrostáticos ou de intercalação (REHMAN *et al.* 2015).

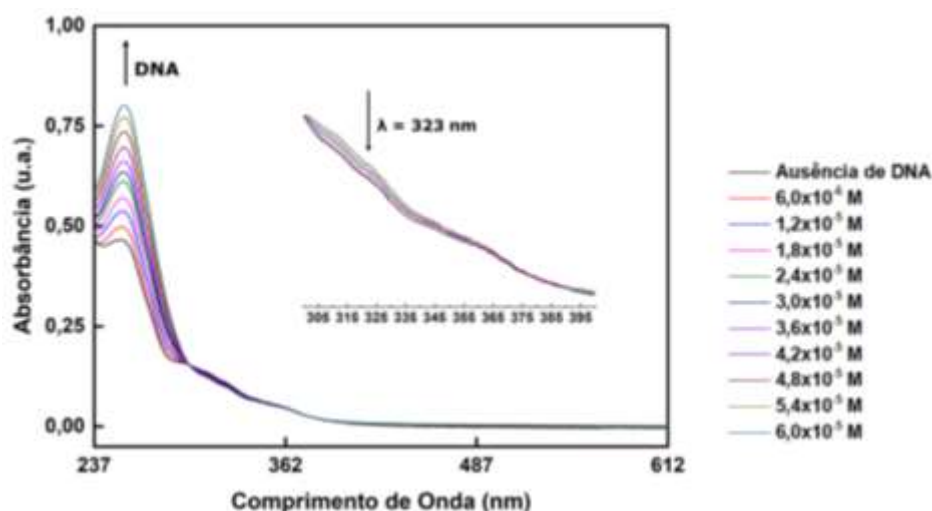
Quando ocorre a intercalação, o orbital π^* da molécula intercalante pode interagir com o orbital π dos pares de base do DNA e, assim, diminuindo a energia da transição π - π^* , resultando em batocromismo. Em contrapartida, o orbital π está parcialmente preenchido com elétrons, diminuindo a probabilidade das transições e, conseqüentemente, resultando em hipocromismo (GAO *et al.* 2010). Desse modo, a combinação de batocromismo e hipocromismo é atribuída a ocorrência da

intercalação. Em um típico caso de intercalação, observa-se um hipocromismo > 35% e batocromismo > 15 nm.

No caso de molécula que se ligam aos sulcos do DNA, não se observa batocromismo (ou o efeito batocrômico é muito pequeno, 6-8 nm). Já o efeito hipercrômico é o aumento significativo da absorbância do DNA mediante a desnaturação. As duas fitas do DNA são mantidas unidas principalmente por ligações de H, interações de empilhamento e efeitos hidrofóbicos entre os pares de bases.

A Figura 20 apresenta os espectros eletrônicos do complexo 1t - AM na presença de aliquotas crescentes de ct-DNA.

Figura 20 - Espectros eletrônicos na região UV-Vis para diferentes razões molares de ctDNA.



Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

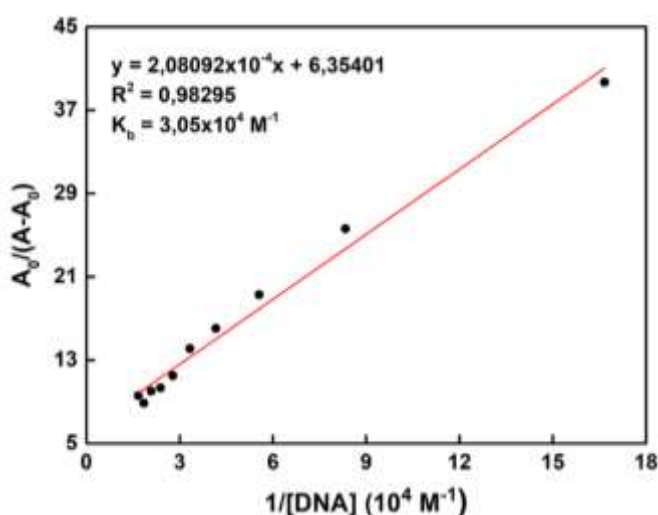
Observa-se que o aumento da concentração do ct-DNA resultou em um efeito hipocrômico de cerca de 11% referente à banda TC do complexo em 323 nm, sem deslocamentos batocrômico ou hipsocrômico. A magnitude da afinidade de ligação entre um complexo metálico e o DNA pode ser avaliado por meio dos valores das constantes de ligação (K_b). De acordo com a literatura, compostos intercaladores clássicos e metalintercaladores apresentam valores de K_b no intervalo entre 10^5 – 10^7 M^{-1} . Valores inferiores a estes sugerem a ocorrência de outros modos de ligação não covalente entre o DNA e uma molécula pequena (SIRAJUDDIN *et al.* 2013).

O valor da constante de ligação (K_b) entre o DNA e o complexo 1t - AM foi obtido por meio da equação de Benesi-Hildebrand (Equação 1):

$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G} - \varepsilon_G} + \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G} - \varepsilon_G} \times \frac{1}{K_b [DNA]}$$

Onde A e A₀ são as absorvâncias do complexo livre e do aduto complexo-DNA respectivamente. ε_C e ε_{D-C} são os coeficientes de absorção do complexo livre e do aduto complexo-DNA, K_b é a constante de ligação (ABDEL-RAHMAN *et al.* 2019). Por meio da equação acima, foi construído o gráfico de $\frac{A_0}{(A - A_0)}$ em função de $\frac{1}{DNA}$, representado na Figura 21.

Figura 21. Determinação da constante de ligação K_b a partir da correlação linear de Benesi-Hidelbrand.



Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

O valor da constante de ligação (K_b) encontrado para o complexo ($3,05 \times 10^4 M^{-1}$) é inferior aos valores apresentados por compostos intercaladores. Além disso, não foi observado o deslocamento batocrômico da banda monitorada, esperado no caso da intercalação. De acordo com a literatura, o hipocromismo também pode ser observado como consequência da formação de uma ligação não covalente via sulcos da estrutura do DNA.

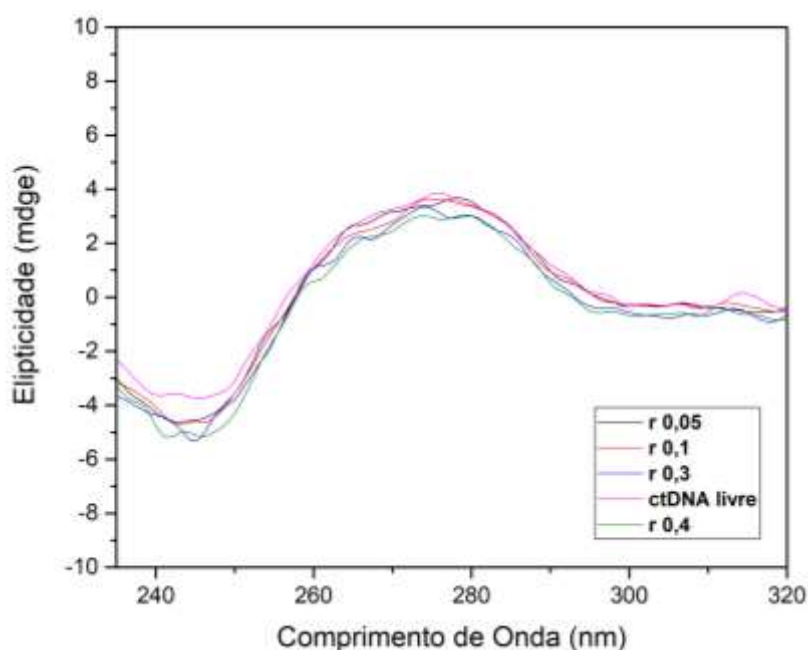
Para obter mais evidências da interação entre o complexo de paládio com o ctDNA, experimentos de dicroísmo circular (CD) e ensaios de competição foram realizados.

Devido a sua alta sensibilidade, o dicroísmo circular (CD) é uma técnica espectroscópica utilizada para analisar mudanças conformacionais causadas pela ligação de moléculas pequenas ao DNA. O espectro de CD do DNA na forma B, no

qual o plano das bases encontra-se perpendicular ao plano central, exibe duas bandas típicas na região do UV. Observa-se uma banda negativa na região de 245 nm e uma banda positiva na região de 275 nm, que são atribuídas à estrutura de dupla hélice e ao empilhamento das nucleobases, respectivamente (SILVA, 2020). Caso ocorra intercalação ao DNA, esta ocasiona mudanças significativas na intensidade das duas bandas do DNA, enquanto que as interações do tipo eletrostáticas ou nos sulcos resultam em pequenas ou nenhuma alteração espectral (SILVA, 2020).

O espectro de CD do ctDNA na ausência e na presença do composto 1t-AM foi registrado, Figura 22. De acordo com o espectro obtido, pode-se observar que o complexo não causou nenhuma mudança significativa, demonstrando que a estrutura do B-DNA é mantida quando o composto interage com a biomolécula, sugerindo que o complexo 1t-AM pode interagir com o ctDNA por meio de ligações nos sulcos ou interações eletrostáticas.

Figura 22. Dicroísmo Circular do DNA com relação de $[1t-AM]/[DNA]$ variando entre 0 a 0,4.



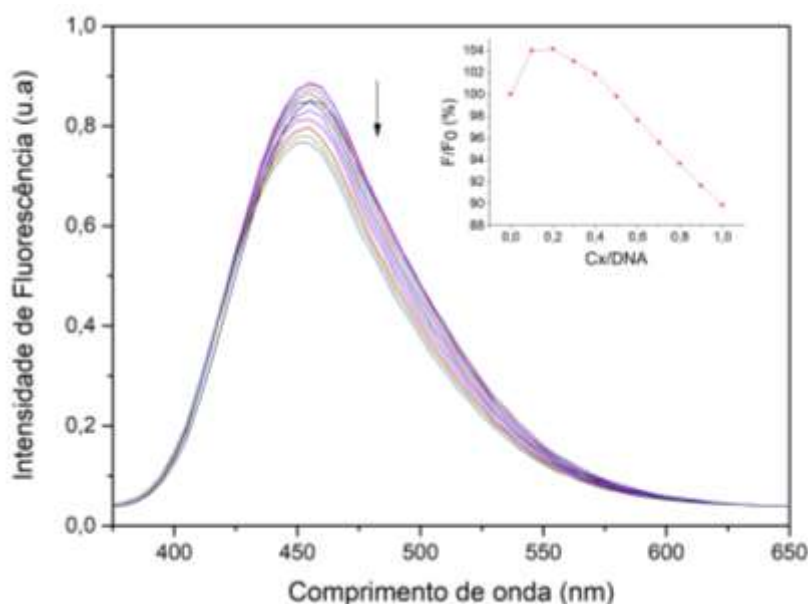
Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

Estudos de ligação competitiva com o Hoechst 33258 foram realizados para o composto 1t-AM, a fim de evidenciar possíveis modos de ligação ao DNA. O Hoechst 33258 se liga ao sulco menor do DNA e apresenta uma intensa fluorescência quando ligado à esta biomolécula. Após sua ligação ao DNA, a fluorescência do Hoechst

aumenta aproximadamente 30 vezes (SILVA, 2020). Se um complexo metálico for capaz de substituir ou expulsar a sonda do aduto Hoechst-ctDNA será observada uma supressão da fluorescência.

Os espectros de fluorescência do aduto Hoechst-ctDNA coletados após adições de alíquotas do composto 1t-AM são apresentados na Figura 23.

Figura 23 - Espectro de emissão de fluorescência do Hoechst 33258-DNA com concentrações de 1t-AM variando entre 0-60 μ M.



Fonte: elaborada pelo Autor (2023).

À medida que aumenta-se a concentração do complexo, ocorre uma supressão da fluorescência de aproximadamente 10%. Esse resultado indica que, mesmo em concentrações elevadas, o complexo é incapaz de substituir ou expulsar todo o Hoechst ligado no aduto. Dessa forma, é possível sugerir que a força da interação entre o complexo e o DNA é mais fraca que a força que mantém unida o aduto Hoechst-ctDNA.

5. CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi obtido um complexo ciclopaladado inédito de fórmula $[PdCl(tetrox)(luti)]$ a partir da reação de clivagem do dímero precursor e 2,6-lutidina. O complexo foi devidamente caracterizado pelas técnicas de análise elementar, espectroscopia no infravermelho e espectroscopia de RMN, o complexo teve a sua estrutura molecular determinada pela técnica de difração de raios X de monocristal. Os resultados cristalográficos mostram a estrutura mononuclear do ciclopaladado na

qual a tetrox está ligada no modo *C,N*-quelante e a 2,6-lutidinina está coordenada *trans* em relação ao nitrogênio da tetrox.

Estudos do comportamento em solução de DMSO indicaram que o complexo mantém sua estrutura relativamente intacta por no mínimo 48h. Esse resultado possibilitou iniciar uma série de estudos biofísicos/bioquímicos envolvendo o complexo.

Os resultados da titulação espectrofotométrica e de dicroísmo circular sugerem que o complexo interage com o DNA de modo não intercalativo. Já os resultados provenientes dos ensaios de substituição competitiva com o Hoechst 33258 indicam que o complexo interage fracamente com o DNA uma vez que o mesmo não foi capaz de substituir ou expulsar o Hoechst ligado ao DNA.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, L. H. *et al.* Some new Ag(I), VO(II) and Pd(II) chelates incorporating tridentate imine ligand: Design, synthesis, structure elucidation, density functional theory calculations for DNA interaction, antimicrobial and anticancer activities and molecular docking studies. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 33, n. 4, p. e4699, 2019.
- BARRA, C. V.; NETTO, A. V. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1998-2016, 2015.
- BUCHANAN, G.W., DAWSON, B.A., Stereochemical analysis of aromatic oximes. ^{13}C - ^{15}N nuclear spin coupling and ^{13}C shieldings as conformational probes. **Can. J. Chem.** v. 56, p. 2200–2204, 1978.
- CAIRES, A. C. F. Recent Advances Involving Palladium (II) Complexes for the Cancer Therapy. **Anti-Cancer Agents in Med. Chem.**, v. 7, p. 484-491, 2007.
- CUNHA, G. A. DA. Investigação estrutural e potencialidades biológicas de espécies ciclopaladadas contendo o ligante 2,6-lutidina. [s.l.] UNESP, 2017.
- CUNHA, G. A. DA. *et al.* Cyclopalladated compounds containing 2,6-lutidine: Synthesis, spectral and biological studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 203, n. May 2019, p. 110944, fev. 2020.
- CUTILLAS, N. *et al.* Anticancer cyclometalated complexes of platinum group metals and gold. **Coord. Chem. Rev.**, v. 257, p. 2784– 2797, 2013
- DUPONT, J.; PFEFFER, M. Palladacycles: synthesis, characterization and applications. Weinheim: WILEY-VCH, p. 434, 2008.
- FARIAS, R. L. D. Compostos de paládio (II) contendo tiossemicarbazonas: síntese, interação com alvos enzimáticos e avaliação do potencial antitumoral. 2020. Tese (Doutorado). Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- GAROUFIS, A.; HADJIKAKOU, S.K.; HADJILIADIS, N. Palladium coordination compounds as anti-viral, antifungal, anti-microbial and anti-tumor agents. **Coord. Chem. Rev.**, v. 253, p. 1384–1397, 2009.
- GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, p. 102925, 2019.
- Instituto Nacional de Câncer. **INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025**. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>>. Acessado em: 01 Dez. 2022.
- Instituto Nacional de Câncer. **O que é câncer?**. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>>. Acessado em: 01 Dez. 2022.

Instituto Nacional de Câncer. **Tratamento do câncer**. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento>>. Acessado em: 01 Dez. 2022.

Instituto Nacional de Câncer. **Tratamento do câncer**. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento>>. Acessado em: 01 Dez. 2022.

MIESSLER, G. L.; FISCHER, P. J.; TARR, D. A. **Química Inorgânica**. 5ª ed. São Paulo: Pearson, 2014.

OUN, R.; MOUSSA, Y. E.; WHEATE, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 19, p. 6645-6653, 2018.

OMAE, I. Applications of five-membered ring products of cyclometalation reactions as anticancer agents. **Coord. Chem. Rev.**, v. 280, p. 84-95, 2014.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Cancer. Fact sheets. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acessado em: 19 Jan. 2023.

RAMALINGAM, S., PRABHU, T., PERIANDY. S., Experimental Study (FT IR and FT Raman), Computed Vibrational Frequency Analysis and Computed IR Intensity and Raman Activity Analysis on 2, 6-Lutidine: HF and DFT Calculations. **Int. J. Ind. Chem.**, v.2, p. 12-22, 2011.

RYABOV, A.D., KAZANKOV, G.M., YATSIMIRSKY, A.K., KUZ'MINA, L.G., BURTSEVA, O.Y., DVORTSOVA, N. V., POLYAKOV, V.A. Synthesis by Ligand Exchange, Structural Characterization, and Aqueous Chemistry of Ortho-Palladated Oximes. **Inorg. Chem.**, v. 31, p. 3083–3090, 1992.

SILVA, D. E. S. Desenvolvimento de novos complexos de prata(I) contendo ligantes tiossemicarbazonas com potencial antitumoral contra células de câncer de mama triplo negativo. 2020. Tese (Doutorado). Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

SIRAJUDDIN, M., BADSHAH A. S. Ali, A., **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 124, p. 1–19, 2013.

VELASQUES, J. M.; SOUZA, R.; SILVA, D. E.; FARIAS, R.L.; ZANETTI, R.; MOREIRA, M.; ELLENA, J.; PEREIRA, J.; MAURO, A.; OLIVEIRA, A.; NETTO, A. V. G. Orthopalladated tetralone oxime compounds bearing tertiary phosphines: Synthesis, structure, biological and *in silico* studies. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 958, 2022.