

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, FÍSICO-QUÍMICA E
INORGÂNICA**

Renan Diego Zanetti

Complexos de paládio(II) contendo ligantes C,N- e N,S-doadores:
Síntese, caracterização, avaliação de citotoxicidade e estudo da
interação com biomoléculas.

Araraquara
2022

Renan Diego Zanetti

Complexos de paládio(II) contendo ligantes C,N- e N,S-doadores:
Síntese, caracterização, avaliação de citotoxicidade e estudo da
interação com biomoléculas.

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto
de Química, Universidade Estadual Paulista
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy
Netto

Araraquara
2022

Z28c

Zanetti, Renan Diego

Complexos de paládio(II) contendo ligantes C,N- e N,S-doadores : síntese, caracterização, avaliação de citotoxicidade e estudo da interação com biomoléculas / Renan Diego Zanetti. -- Araraquara, 2022
162 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Química, Araraquara

Orientador: Adelino Vieira de Godoy Netto

1. Paládio. 2. Citotoxicidade. 3. DNA. 4. Biomoléculas. 5. Enzimas. 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 TESE:

"Complexos de paládio (II) contendo ligantes C,N- e N,S-doadores: Síntese, caracterização, avaliação de citotoxicidade e estudo da interação com biomoléculas."

AUTOR: RENAN DIEGO ZANETTI

ORIENTADOR: ADELINO VIEIRA DE GODOY NETTO

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



Assinado de forma digital por
Adelino Vieira de Godoy
Netto: 19560697803
Dados: 2022.09.28 14:13:08 -03'00'

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



Documento assinado digitalmente
FILLIPE VIEIRA ROCHA
Data: 23/09/2022 18:02:06-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

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



Profa. Dra. MARIA SOL BRASSESCO ANNICHINI (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP



Documento assinado digitalmente
WAGNER ALVES DE SOUZA JUDICE
Data: 23/09/2022 11:10:16-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. WAGNER ALVES DE SOUZA JUDICE (Participação Virtual)
Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica-CIIB / Universidade de Mogi das Cruzes - UMC - Mogi das Cruzes



Documento assinado digitalmente
REGINA CELIA GALVAO FREM
Data: 28/09/2022 13:05:21-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.^a Dr.^a REGINA CÉLIA GALVÃO FREM (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 16 de setembro de 2022

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Renan Diego Zanetti

Nome em citações bibliográficas: Zanetti, R. D.; Zanetti, Renan Diego.

Data de Nascimento: 22/12/1992

Email: zanetti.renand@gmail.com

Nacionalidade: Brasileiro

Endereço: Avenida Brasília, n
1760, Vila Monte Alegre, Resid.
Patagônia, Paulínia, SP.

Naturalidade: Campinas – SP

Filiação: Marcia Aparecida de Moraes
Valter Junior Zanetti

Formação Acadêmica

2018 – 2022 Doutorado em Química (Conceito CAPES 7)

Grande área: Ciências Exatas e da Terra.

Subárea: Química Inorgânica / Especialidade: Compostos de Coordenação

Título: Síntese, caracterização e potencial aplicação biológica de complexos de paládio(II) contendo ligantes C,N,S/O doadores.

Orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto (adelino.netto@unesp.br)

Agência Financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil (Processo: 141023/2018-0).

2016 – 2018 Mestrado em Química (Conceito CAPES 7)

Grande área: Ciências Exatas e da Terra.

Subárea: Química Inorgânica / Especialidade: Compostos Organo-Metálicos

Título: Dinitrosilos de ferro contendo tiadiazol ou tiossemicarbazona derivada do cinamaldeído: síntese, caracterização e potencial aplicação antitumoral

Orientador: Prof. Dr. José Clayston Melo Pereira. (claystonmp@gmail.com)

Agência Financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. (Processo: 16/04329-5).

2012 – 2015 Graduação em Química

Grande área: Ciências Exatas e da Terra.

Subárea: Físico-Química / Especialidade: Eletrocatalise

Título: Nanopartículas de Pd suportadas em compósitos óxido-carbono: influência das interações metal-suporte na oxidação de etanol em meio básico.

Orientadora: Profa. Dra. Hebe de las Mercedes Villullas.

Agência Financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. (Processo: 14/02345-8).

Experiência Profissional e Didática

2021 – 2021 Instituto de Química Araraquara – UNESP

Avaliador no “XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp”, realizado nos dias 28 e 29 de outubro de 2021.

2020 – 2020 Instituto de Química Araraquara – UNESP

Avaliador no “XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp”, realizado nos dias 20, 21 e 22 de outubro de 2020.

2019 – 2019 Instituto de Química Araraquara - UNESP

Estágio docência na disciplina “Química Inorgânica”. Supervisora: Profa. Dra. Marian Rosaly Davolos

2016 – 2016 Instituto de Química Araraquara - UNESP

Estágio docência na disciplina “Química Inorgânica Estrutura e Propriedades: Experimental”. Supervisora: Profa. Dra. Vânia Martins Nogueira.

2010 – 2011 Rhodia Poliamida e Especialidades - Filial, RHODIA, Brasil.

Estágio técnico em controle de qualidade, Setor: Utilidades. Supervisor: Marcos Mamede Rosa Nascimento.

Prêmios e Títulos

2010 – Escola Técnica de Paulínia - ETEP

Diploma de Melhor Aluno do Curso de Química, CRQ-IV Região.

2017 – 18th International Conference on Biological Inorganic Chemistry

Pôster “*Synthesis and characterization of iron nitrosyl complexes for anticancer activity*” premiado na 18th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Florianópolis-SC.

Artigos completos publicados em periódicos

1. ALMEIDA, JANAÍNA DO COUTO; SILVA, RAPHAEL T.C.; **ZANETTI, RENAN D.**; MOREIRA, MARIETE B.; PORTES, MARCELO C.; POLLONI, LORENA; DE VASCONCELOS AZEVEDO, FERNANDA V.P.; VON POELHSITZ, GUSTAVO; PIVATTO, MARCOS; NETTO, ADELINO V.G.; ÁVILA, VERIDIANA DE MELO R.; MANIERI, KARYN F.; PAVAN, FERNANDO R ; DA COSTA FERREIRA, ANA M. ; GUERRA, WENDELL. DNA interactions, antitubercular and cytotoxic activity of heteroleptic CuII complexes containing 1,10-phenanthroline. **JOURNAL OF MOLECULAR STRUCTURE JCR**, v. 1235, p. 130234, 2021.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130234>

2. ROCHA, JOSIAS S.; PEREIRA, GEORGE B.S.; OLIVEIRA, GABRIELA P.; LIMA, MAURO A.; ARAUJO-NETO, JOÃO H.; PINTO, LUCIANO S.; FORIM, MOACIR R.; **ZANETTI, RENAN D.**; NETTO, ADELINO V.G.; CASTELLANO, EDUARDO E.; ROCHA, FILLIPE V. Synthesis and characterization of silver(I) complexes bearing phenanthroline derivatives as ligands: Cytotoxicity and DNA interaction evaluation. **INORGANIC CHEMISTRY COMMUNICATIONS JCR**, v. 131, p. 108757, 2021.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2021.108757>

3. DE MOURA, THALES REGGIANI; **ZANETTI, RENAN DIEGO**; SILVA, DEBORA EDUARDA SOARES; DE FARIAS, RENAN LIRA; MAURO, ANTONIO EDUARDO; PEREIRA, JOSÉ CLAYSTON MELO; DE SOUZA, ALINE APARECIDA; DA SILVA SIQUEIRA, FÁBIO; DE SOUZA JÚDICE, WAGNER ALVES; LIMA, MAURO ALMEIDA; ROCHA, FILLIPE VIEIRA; DEFLON, VICTOR MARCELO; VIEIRA DE GODOY NETTO, ADELINO. Palladium(II) complexes bearing 1-iminothiolate-3,5-dimethylpyrazoles: synthesis, cytotoxicity, DNA binding and enzymatic inhibition studies. **New Journal of Chemistry JCR**, v. 44, p. 19891-19901, 2020

DOI: <https://doi.org/10.1039/D0NJ02825H>

4. ALMEIDA, VITOR Y. G.; ROCHA, JOSIAS S.; FELIX, DÉBORA P.; OLIVEIRA, GABRIELA P.; LIMA, MAURO A.; FARIAS, RENAN L.; **ZANETTI, RENAN D.**; NETTO, ADELINO V. G.; ZAMBOM, CAROLINA R.; GARRIDO, SAULO S.; ROCHA, FILLIPE V. Cytotoxicity and Antibacterial Activity of Silver Complexes Bearing Semicarbazones and Triphenylphosphine. **ChemistrySelect**, v. 5, p. 14559-14563, 2020.

DOI: <https://doi.org/10.1002/slct.202004093>

5. FARIAS, R.L.; POLEZ, A.M.R.; SILVA, D.E.S.; **ZANETTI, R.D.**; MOREIRA, M.B.; BATISTA, V.S.; REIS, B.L.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N.M.; ROCHA, F.V.; LIMA, M.A.; OLIVEIRA, A.B.; ELLENA, J.; SCARIM, C.B.; ZAMBOM, C.R.; BRITO, L.D.; GARRIDO, S.S.; MELO, A.P.L ; BRESOLIN, L ; TIRLONI, B. ; PEREIRA, J.C.M. ; NETTO, A.V.G. . In vitro and in silico assessment of antitumor properties and biomolecular binding studies for two new complexes based on Nill bearing k²N,S-donor ligands. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications** *JCR*, 2020.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111815>

6. DA CUNHA, GISLAINE A.; DE SOUZA, RONAN F.F. ; DE FARIAS, RENAN L. ; MOREIRA, MARIETE B.; SILVA, DÉBORA E.S.; **ZANETTI, RENAN D.**; GARCIA, DANIEL M.; SPINDOLA, DANIEL G.; MICHELIN, LUIS F.G.; BINCOLETO, CLAUDIA; DE SOUZA, ALINE A.; ANTUNES, ALYNE A.; JUDICE, WAGNER A. DE S.; LEITAO, RENAN C.F.; DEFLON, VICTOR M.; MAURO, ANTÔNIO E.; NETTO, ADELINO V.G. Cyclopalladated compounds containing 2,6-lutidine: Synthesis, spectral and biological studies. **JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY**, p. 110944, 2019.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110944>

7. **ZANETTI, RENAN DIEGO**; GOTO, R. N. ; LEOPOLDINO, A. M. ; PEREIRA, JOSÉ CLAYSTON MELO . Synthesis and characterization of iron nitrosyl complexes for anticancer activity. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 22, p. 1-278, 2017.

Patentes e registros

PEREIRA, J. C. M. ; COSTA, M. A. M. ; NETTO, A. V. G. ; SARTI, A. ; **ZANETTI, R. D.** ; SIMÕES, M. B. ; UETI, L. H. ; CASEMIRO, L. M. ; COVELLO, I. P. S. . Processos de síntese de Tiadiazóis. 2019, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201900660, título: "Processos de síntese de Tiadiazóis", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 01/04/2019

Apresentações de Trabalho

1. ZANETTI, RD; CUNHA, G. A.; MOREIRA, M. B.; GODOY, P. R. D. V.; ANNICHINI, M. S. B.; NETTO, A. V. G. Cyclopalladated complexes derived

from 2,6-Lutidine as potential antitumor agents. 2021. **44ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Virtual**, 26 de Novembro de 2021.

2. ZANETTI, R. D.; GOTO, R. N.; LEOPOLDINO, A. M.; PEREIRA, J. C. M., *Synthesis and characterization of iron nitrosyl complexes for anticancer activity. 18th International Conference on Biological Inorganic Chemistry*, Florianópolis-SC, 01 de agosto de 2017.
3. ZANETTI, R. D.; VILLULLAS, H.M., Efeitos das interações metal-suporte na oxidação de etanol em nanopartículas de Pd. **XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp (CIC 1ª Fase)**, Araraquara-SP, 17 de setembro de 2015.
4. ZANETTI, R. D.; VILLULLAS, H.M., Efeitos das interações metal-suporte na oxidação de etanol em nanopartículas de Pd. **XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp (CIC 2ª Fase)**, Atibaia-SP, 05 de novembro de 2015.

Participação em eventos

- 44ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - Virtual. 2021. (Congresso).
- 4º Encontro de Química Medicinal e Desenvolvimento de Fármacos. 2021 (Online).
- Workshop - Inglês para pesquisadores da escrita à publicação. 2021 (Online)
- *18th International Conference on Biological Inorganic Chemistry*, Florianópolis-SC, 01 de agosto de 2017.
- Minicurso intitulado “Metals in Medicine”, Ministrante: Profa. Dra. Maria Concepción Gimeno Floría, realizado na XXXVII Escola de Verão: Química e Saúde, UFSCAR, São Carlos, 2017. Duração: 9h.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, pois sem Ele nada seria possível. A minha família, João, Luciano e Bruna pelo incondicional apoio e carinho durante essa importante fase e principalmente minha mãe, Marcia, um exemplo de humildade, honestidade, ética e inspiração eterna na minha vida.

Agradeço a minha noiva, Naira, que mesmo em seus momentos de dificuldade nunca deixou de me apoiar e amar, estando sempre ao meu lado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto, pela incondicional paciência, compreensão e apoio em todas as decisões e contribuições durante o trabalho desenvolvido. Sou muito grato pela orientação e apoio nesses tempos difíceis.

Ao técnico Dr. Nivaldo Boralle pelo entusiasmo, extenso suporte e conselhos nos experimentos de RMN e afins.

Ao Rafael pela amizade, paciência e prontidão em todas as compras e atividades de laboratório.

Agradeço também a todos os amigos do grupo de pesquisa de organometálicos Renan Lira, Bárbara, Manu, Carol, Ana Bia, Ana Maria, Wladimir, Andresa e Guilherme pela convivência prazerosa, conversas descontraídas e discussões.

À Jecika pela amizade, carinho e me aguentar nos momentos de stress. Não me esquecerei do nosso estágio/docência na turma de engenharia. Uma pessoa que vou levar no coração. Como sempre me dizia, *“O que ficam são as pessoas e as memórias que construímos com elas”*.

Ao Thales, pelos momentos divertidos, apoio nas atividades de laboratório e trabalhos realizados ao longo do doutorado.

À Débora, uma pessoa incrível que tive oportunidade de ter como amiga e companheira desde os tempos do mestrado. Agradeço o carinho e companheirismo mesmo estando distantes. Vou lembrar com felicidade das nossas conversas e momentos de comilança.

Por fim, agradeço a UNESP pela infraestrutura, a CNPq pela bolsa concedida (processo 141023/2018-0) e a FAPESP e Capes pelo suporte fornecido para realização deste trabalho.

“Life is a storm, my young friend. You will bask in the sunlight one moment, be shattered on the rocks the next. What makes you a man is what you do when that storm comes.”

Alexandre Dumas, “O Conde de Monte Cristo”

Resumo

O câncer representa o conjunto de doenças que mais causa morte em todo mundo, sendo os casos relacionados apenas ao trato respiratório aparecendo como a sexta principal causa de morte, em 2019, segundo a OMS. Dentre as diversas formas de tratamento disponíveis, a quimioterapia é uma das mais aplicadas, tendo destaque para a cisplatina, um complexo de platina(II), que teve sua ação antitumoral descoberta na década de 70 e, desde então, tem sido aplicado com esse propósito. No entanto, o caráter tóxico somado a crescente resistência a fármacos (MDR) tem motivado a busca por novos candidatos a metalo-fármacos. Assim, complexos de paládio(II) aparecem como um candidatos promissores no design de compostos com potencial atividade antitumoral, já que possuem características estruturais semelhantes a platina(II), porém com a vantagem de geralmente não serem genotóxicos. Nesse sentido, duas séries de complexos de paládio(II) foram preparadas e reportadas neste trabalho. A primeira série compreende três complexos (**R1-R3**) derivados de pirazóis de fórmula geral $[PdCl(nTPz)(PPh_3)]$, {HTPz= 3,5-dimetilpirazol-1-iminotiolato (**R1**); MTPz= 3,5-dimetilpirazol-N-metil-1-iminotiolato (**R2**); FTPz= 3,5-dimetilpirazol-N-fenil-1-iminotiolato (**R3**); e PPh_3 = trifenilfosfina. A segunda série, compreende dois complexos ciclopaladados derivados de benzilaminas de fórmula geral $[Pd(C^2,N-dmpa)(X)(lut)]$ {X = Cl^- (**RZ1**) ou NNN^- (**RZ2**)}, dmpa = N,N-dimetil-1-feniletilamina, lut = 2,6-Lutidina. Todos os complexos foram devidamente caracterizados por espectroscopia vibracional na região do IV, RMN de ^1H e ^{13}C , análise elementar e espectrometria de massas ESI/MS. Estudos de estabilidade química em solução aquosa também foram submetidos para as séries de complexos, por RMN ^1H , ^{31}P , UV-Vis e condutividade molar. Ensaio *in vitro* de atividade antiproliferativa foram submetidos para a primeira série de complexos, frente as linhagens celulares MCF-7 (tumoral de mama) e MRC-5 (fibroblasto normal de pulmão). Os complexos foram ativos contra as células tumorais testadas, sendo o composto **R2** com atividade comparável ao fármaco de referência cisplatina. Estudos de mecanismo de ação mostraram que os complexos da primeira série (**R2-R3**) tiveram a capacidade de inibir as enzimas catepsinas B e L, corroborados por estudos *in silico* por ancoragem molecular com a enzima B. Por outro lado, os mesmos compostos não apresentaram atividade inibitória frente a enzima topoisomerase II α , além de exibirem interações de natureza moderada com DNA. Para um dos compostos da segunda série (**RZ2**), a interação com DNA também foi estudada e apresentou um perfil de interação fraca com a biomolécula, porém mostrou boa capacidade de interação com a albumina de soro humano (HSA), especificamente no subdomínio II localizado no sítio I de Sudlow.

Palavras-Chave: Complexos de paládio, Citotoxicidade, DNA, Albumina (HSA), Catepsina B.

Abstract

Cancer represents the set of diseases that causes the most deaths worldwide, with cases related only to the respiratory tract appearing as the sixth leading cause of death in 2019, according to the WHO. Among the available forms of treatment, chemotherapy is one of the most applied, with emphasis on cisplatin, a platinum(II) complex, which had its antitumor activity discovered in the 1970s and since then has been applied with this purpose. However, the toxic character plus to the increasing drug resistance (MDR) has motivated the search for new candidates for metallodrugs. Thus, palladium(II) complexes appear as promising candidates for the design of compounds with potential antitumor activity, since they have structural characteristics similar to platinum(II), but with the advantage of not being genotoxic. In this sense, two series of palladium(II) complexes were prepared and reported in this work. The first series comprises three complexes (**R1-R3**) derived from pyrazoles of general formulae $[\text{PdCl}(\text{nTPz})(\text{PPh}_3)]$, {HTPz= 3,5-dimethylpyrazole-1-iminothiolate (**R1**); MTPz= 3,5-dimethyl-pyrazole-N-methyl-1-iminothiolate (**R2**); FTPz= 3,5-dimethylpyrazole-N-phenyl-1-iminothiolate (**R3**); and PPh_3 = triphenylphosphine. The second series comprises two cyclopallated complexes derived from benzylamines with the general formulae $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{X})(\text{lut})]$ {X = Cl^- (**RZ1**) or NNN^- (**RZ2**)}, dmpa = *N,N*-dimethyl-1-phenethylamine, lut = 2,6-Lutidine. All complexes were properly characterized by IR vibrational spectroscopy, ^1H and ^{13}C NMR, elemental analysis and ESI/MS mass spectrometry. Chemical stability studies in aqueous solution were also submitted for the series of complexes, by ^1H NMR, ^{31}P , UV-Vis and molar conductivity. *In vitro* assays of antiproliferative activity were performed for the first series of complexes, against the cell lines MCF-7 (breast tumor) and MRC-5 (normal lung fibroblast). The complexes were active against the tested tumor cells, with the compound **R2** with activity comparable to the reference drug cisplatin. Studies of the mechanism of action showed that the first series complexes (**R2-R3**) have had the ability to inhibit cathepsins B and L enzymes, corroborated by *in silico* studies by molecular docking with B enzyme. On the other hand, the same compounds do not showed inhibitory activity against topoisomerase II α in addition to exhibiting moderate interactions with DNA. For one of the compounds of the second series (**RZ2**), the interaction with DNA was also studied and it showed weak interaction with the biomolecule, however it showed good ability to interact with human serum albumin (HSA), specifically in the subdomain II located at the Sudlow site I.

Keywords: Palladium Complexes, Cytotoxicity, DNA, Albumin (HSA), Cathepsin B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (a) Estrutura da hemoglobina (código PDB 1B86) em representação de fita. (b) Estrutura octaédrica do grupo heme ligado ao O ₂ (oxihemoglobina). Fonte: autor.	23
Figura 2 – Sítios Cu _A , Cu _B , heme a e heme a ₃ no citocromo c oxidase (PDB código: 1OCC). O diagrama inferior mostra as posições relativas dos sítios metálicos dentro da proteína; código de cores: Cu, marrom; Fe, verde; S, amarelo; N, azul; C, cinza; O, vermelho. Fonte: adaptado de (HOUSECROFT; SHARPE, 2012)	24
Figura 3 – A esquerda: Paracelso em gravura de linha por W. Marshall após J. Payne. Wellcome Library London. A direita: página frontal do livro de Paracelso “Operum latine redditorum” Bâle: Petri Perna, 1575, BIU Sant’ e Paris. Fonte: adaptado de (MICHALEAS et al., 2021).....	26
Figura 4 – Paul Ehrlich e estruturas cíclicas para o fármaco Salvarsan. Fonte: autor.	27
Figura 5 – Da esquerda para direita: Michele Peyrone, Barnett Rosenberg e Loreta VanCamp. Contribuições na descoberta da cisplatina. Fonte: autor....	27
Figura 6 – Sequência de fotografias de dois camundongos com tumores sólidos Sarcoma-180. O camundongo no topo era um controle negativo não tratado, enquanto o inferior foi tratado com uma injeção (dia 8) de cisplatina de dose 8 mg/kg. Fonte: adaptado de (ROSENBERG, 1978).....	28
Figura 7 – Esquema de transporte e mecanismo de ação simplificado da cisplatina. Fonte: adaptado de (NEVES; VARGAS, 2014).	30
Figura 8 – Modos de ligação da cisplatina com DNA (a-f). Fonte: adaptado de (BRABEC; HRABINA; KASPARKOVA, 2017).	30
Figura 9 – a) Estrutura da topoisomerase humana I em ligação não covalente com DNA (PDB 1A35) (BAKER; RAJAN; MONDRAGN, 2009). b) Estrutura da topoisomerase humana II α em ligação com DNA (PDB 4FM9) (WENDORFF et al., 2012). Fonte: autor.	31
Figura 10 – Estrutura da catepsina B complexada com nitroxolina (PDB 3AI8) (MIRKOVIĆ et al., 2011). Fonte: autor.	32

Figura 11 – Compostos de platina pós-cisplatina. Fonte: adaptado de (MJOS; ORVIG, 2014).....	33
Figura 12 – Número de publicações de artigos científicos ao longo dos anos. Pesquisa realizada pela plataforma Scifinder no ano de 2021 utilizando as palavras-chave “palladium complex” e “anticancer”.	34
Figura 13 – Estrutura do complexo que compõe o fármaco Tookad.	35
Figura 14 – Estrutura dos complexos metálicos sintetizados (FAGHIIH et al., 2018).....	36
Figura 15 – Estrutura genérica das tiossemicarbazonas (a), tautômero tiol (b) e forma aniônica (c) (LOBANA et al., 2009).	37
Figura 16 – Estrutura genérica do tiocarbamoilpirazol.	38
Figura 17 – Fármacos comerciais que apresentam a função pirazol (KARROUCHI et al., 2018).....	38
Figura 18 – Definição estrutural de ciclopalladados. Adaptado de (DUPONT; PFEFFER, 2008).....	39
Figura 19 – Representação estrutural do ciclopalladado iônico $[Pd(C^2,N-S(-)dmpa)(dppf)]Cl$ – Biphosphinic Palladacycle Complex (BPC). Adaptado de (BECHARA et al., 2014).....	40
Figura 20 – A) Fotografias de pulmões mostrando as colônias metastáticas no grupo controle não tratado (acima) e no grupo controle tratado com BPC (abaixo). B) Quantificação de nódulos metastáticos pulmonares contados em microscópio invertido. Adaptado de (BECHARA et al., 2014).	40
Figura 21 – Estrutura dos complexos derivados do ligante N,N-dimetilbenzilamina (dmmba).....	41
Figura 22 – Representação dos tipos de ligação formadas entre metal e o fósforo nas fosfinas. Seta indica o sentido de doação da densidade eletrônica.	42
Figura 23 – Representação do ângulo de cone de Tolman. Adaptado de (HOUSECROFT; SHARPE, 2012).	43
Figura 24 – Complexos apresentados no trabalho de Rocha e colaboradores (1-4) e série análoga preparada anteriormente (5-8) (ROCHA et al., 2016).....	43
Figura 25 - Estrutura molecular de algumas piridinas.	44
Figura 26 – Modo de coordenação da piridina com metais de transição.....	45

Figura 27 – Comparação entre complexos contendo derivados de piridina e sua ação citotóxica frente a linhagem L1210 (IC ₅₀). Adaptado de (EDWARDS et al., 2005).	46
Figura 28 – Avanço da série de complexos planejadas para o desenvolvimento do projeto.	48
Figura 29 – Complexos ciclopaladados propostos para desenvolvimento do projeto.	49
Figura 30 – Esquema geral de reação para a obtenção de tiocarbamoilpirazóis.	52
Figura 31 – Esquema geral de reação para a obtenção dos complexos pirazólicos de paládio(II).	52
Figura 32 – Esquema geral de reação para a obtenção dos complexos ciclopaladados derivados da 2,6-lutidina.	54
Figura 33 – Série de complexos apresentada no trabalho de Moura (MOURA, 2016).	64
Figura 34 - Estrutura esperada dos complexos obtidos a partir dos pirazóis (R1-R3).	64
Figura 35 – Esquema geral de reação para a obtenção de tiocarbamoilpirazóis.	65
Figura 36 – Mecanismo geral de reação entre acetilcetona e tiossemicarbazida (KATRITZKY; OSTERCAMP; YOUSAF, 1987).	65
Figura 37 – Estrutura do intermediário obtido durante a reação de formação dos tiocarbamoilpirazóis.	66
Figura 38 – Estrutura esperada para o complexo R3 contendo o ligante 3,5-dimetilpirazol-N-fenil-1-iminotiolato (FTPz).	67
Figura 39 - Espectro ESI-MS para o complexo R1 em acetonitrila.	67
Figura 40 – Espectros de massa de alta resolução para o complexo R1.	68
Figura 41 - Espectro ESI-MS para o complexo R2 em acetonitrila.	68
Figura 42 – Espectros de massa de alta resolução para o complexo R2.	69
Figura 43 - Espectro ESI-MS para o complexo R3 em acetonitrila.	69
Figura 44 – Espectros de massa de alta resolução para o complexo R2.	70
Figura 45 – Estrutura dos complexos pirazólicos R1-R3 e razões m/z correspondentes às estruturas protonadas.	70

Figura 46 – Espectro vibracional na região do Infravermelho (IV) para o complexo [PdCl(HTPZ)(PPh ₃)] (R1).	71
Figura 47 – Espectro de RMN de ¹ H do complexo R2 em CDCl ₃	74
Figura 48 – Espectro de RMN de DEPTQ do complexo R2 em CDCl ₃	75
Figura 49 – Espectro de RMN HMBC ¹³ C- ¹ H para o complexo R2 em CDCl ₃	77
Figura 50 – Ensaio de estabilidade por condutividade molar para os complexos em DMSO.	78
Figura 51 – Espectros de RMN de ³¹ P para o complexo R2 em DMSO em 0, 24 e 48h.	79
Figura 52 – Espectros de RMN de ³¹ P para o complexo R1 em DMSO em 0, 24 e 48h.	80
Figura 53 – Estrutura dos complexos utilizados no estudo de atividade antiproliferativa e interação com biomoléculas.	80
Figura 54 – Linhagens celulares MCF-7 e MRC-5 tratadas com diferentes concentrações dos complexos.	82
Figura 55 – Espectro de dicroísmo circular do ct-DNA em quantidades crescentes do complexo R2 em tampão tris-HCl pH 7,3.	83
Figura 56 – Espectro de dicroísmo circular do ct-DNA em quantidades crescentes do complexo R2* em tampão tris-HCl pH 7,3.	84
Figura 57 – Espectro de UV-Vis para A) nucleotídeos do DNA desoxiadenosina 5'-monofosfato (A), desoxiguanosina 5'-monofosfato (G), desoxicitidina 5'-monofosfato (C), desoxitimidina 5'-monofosfato (T) e B) DNA de timo de bezerro (100 μM) em tampão fosfato. Adaptado de (RODGER, 2013).	85
Figura 58 - Espectro de absorção para o complexo R2 em quantidades crescentes de DNA em tampão tris-HCl pH 7,3. A seta indica o decréscimo da absorbância do complexo em relação a adição crescente de DNA. No interior: Gráfico de $\frac{[DNA]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)}$ vs $[DNA]$ para $\lambda=258$ nm.	88
Figura 59 – Espectro de absorção para o complexo R2* em quantidades crescentes de DNA em tampão tris-HCl pH 7,3. A seta indica o decréscimo da absorbância do complexo em relação a adição crescente de DNA. No interior: Gráfico de $\frac{[DNA]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)}$ vs $[DNA]$ para $\lambda=258$ nm.	88
Figura 60 – Estruturas dos corantes da família Hoechst e espectro de emissão para o Hoechst 33258.	90

Figura 61 – Representação genérica da interação do corante Hoechst com o sulco menor do B-DNA. Fonte: Adaptado de (BUCEVIČIUS; LUKINAVIČIUS; GERASIMAITIS, 2018).....	90
Figura 62 – Espectro de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}} = 340 \text{ nm}$) para o complexo DNA-Hoechst, em tampão tris-HCl pH 7,3, na presença de quantidades crescentes do composto R2 . A seta indica o decréscimo da intensidade de fluorescência com a adição do composto. No interior : Diminuição relativa da intensidade de fluorescência em função do aumento da razão [Complexo]/[DNA] em $\lambda_{\text{emissão}} = 458 \text{ nm}$	91
Figura 63 – Gráfico de Stern-Volmer para o ensaio de competição por fluorescência do complexo DNA-Hoechst na presença do composto R2 . No interior : coeficiente de determinação (R^2) e constante de Stern-Volmer (K_{SV}).92	
Figura 64 – Espectro de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}} = 340 \text{ nm}$) para o complexo DNA-Hoechst, em tampão tris-HCl pH 7,3, na presença de quantidades crescentes do composto R2* . A seta indica o decréscimo da intensidade de fluorescência com a adição do composto. No interior : Diminuição relativa da intensidade de fluorescência em função do aumento da razão [Complexo]/[DNA] em $\lambda_{\text{emissão}} = 458 \text{ nm}$	92
Figura 65 – Gráfico de Stern-Volmer para o ensaio de competição por fluorescência do complexo DNA-Hoechst na presença do composto R2* . No interior : coeficiente de determinação (R^2) e constante de Stern-Volmer (K_{SV}).93	
Figura 66 – Reação envolvendo DNA e as Topoisomerases. (A) Tanto a topoisomerase I quanto a II podem relaxar o DNA superenrolado. (B) Topoisomerase II são capazes desatar/atar o DNA de dupla fita e (C) catenar/decatenar o DNA de dupla fita. Adaptado de (NITISS et al., 2012).....	94
Figura 67 – Representação do sistema de eletroforese em gel. Adaptado de (BNCC.EMCIENCIAS, 2022).....	95
Figura 68 – Ensaio de relaxação da topoisomerase II α . C+ (plasmídeo superenrolado, topoisomerase e ATP), C- (plasmídeo superenrolado) e diferentes concentrações (μM) do complexo R2 (esquerda) e R2* (direita).....	96
Figura 69 – Acima : Atividade de catepsina B e L (%) na presença dos complexos R1-R3 em concentrações de 10 e 100 μM . *Compostos precipitados em 100 μM . Abaixo : Valores para atividade da catepsina B e L para os complexos de R2-R3 em 10 e 100 μM	98

Figura 70 – Sobreposição dos átomos pesados da estrutura molecular teórica (azul claro) e cristalina do complexo 3 . O valor de RMSD calculado foi de 0,4884 Å.....	99
Figura 71 – Melhores poses de ancoragem para os complexos de R1-R3 no sítio S da catepsina B. As poses de a-d são referentes aos compostos R1-R3 , respectivamente. Resíduos de interação são apresentados pelo modelo de varetas. As cadeias laterais principais são mostradas com átomo de carbono em azul claro, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul escuro e enxofre em amarelo. Os complexos são apresentados com átomo de carbono em cinza, cloro em verde, fósforo em laranja e paládio em ciano. Átomos de hidrogênio foram omitidos por questões de clareza.....	100
Figura 72 – Estrutura geral de ciclopaladados e suas classificações de acordo com a coordenação com o ligante orgânico. Ligante doador de quatro elétrons (CY) ou seis elétrons (YCY). Adaptado de (DUPONT; PFEFFER, 2008).	101
Figura 73 – Possíveis estruturas diméricas de ciclopaladados do tipo CY. Adaptado de (DUPONT; PFEFFER, 2008).	102
Figura 74 – Representação de uma reação genérica de formação de ciclopaladados utilizando diazobenzeno. Adaptado de (DUPONT; PFEFFER, 2008)	102
Figura 75 – Mecanismo por ativação da ligação C-H proposto para formação de ciclopaladados. Adaptado de (DUPONT; PFEFFER, 2008).....	103
Figura 76 – Mecanismo de formação de ciclopaladados utilizando intermediários aromáticos. Adaptado de (DUPONT; CONSORTI; SPENCER, 2005).	104
Figura 77 – Estrutura dos complexos ciclopaladados obtidos a partir do precursor $[Pd(C^2,N'-dmpa)(\mu-Cl)]_2$	105
Figura 78 – Estrutura dos complexos ciclopaladados obtidos a partir do precursor $[Pd(C^2,N'-dmpa)(\mu-Cl)]_2$, reportados no trabalho de (CUNHA, 2017).	106
Figura 79 – Estrutura dos complexos apresentados no trabalho de Cunha, G (DA CUNHA et al., 2020).....	106
Figura 80 – Comparação entre as estruturas dos complexos apresentado por Cunha (DA CUNHA et al., 2020) (a) e os complexos trabalhados na segunda metade do projeto (b).	107

Figura 81 – Espectros de absorção na região UV-Vis para o complexo [Pd(C ² ,N-dmpa)(Cl)(luti)] (RZ1) em DMSO:tampão Tris-HCl 70:30 em 0, 24 e 48h após o preparo da amostra.	108
Figura 82 – Espectros de absorção na região UV-Vis para o complexo [Pd(C ² ,N-dmpa)(N ₃)(luti)] (RZ2) em DMSO:tampão Tris-HCl 70:30 em 0, 24 e 48h após o preparo da amostra.	108
Figura 83 – Comparação entre o espectro de RMN de ¹ H para o complexo RZ1 em CDCl ₃ e D ₂ O:DMSO-d ₆ (30%:70%), evidenciando a espécie majoritária “a”. Setas indicam o deslocamento dos sinais nos diferentes solventes.	109
Figura 84 – Espectros de RMN de ¹ H para o complexo RZ1 em uma solução de D ₂ O:DMSO-d ₆ (30%:70%) obtidos em 0, 24, 48 and 72h após a preparação da amostra.	110
Figura 85 – Expansão do espectro de RMN de ¹ H (8,0-6,5 ppm) para o complexo RZ1 . a = [Pd(S)(C ² ,N-dmba)(lut)] ⁿ ; b = espécie b; * = 2,6-lutidine livre.	111
Figura 86 – Expansão do espectro de RMN de ¹ H (3,15-2,3 ppm) para o complexo RZ1 . a = [Pd(S)(C ² ,N-dmba)(lut)] ⁿ ; b = espécie b; * = 2,6-lutidine livre.	111
Figura 87 – Espectros de RMN de ¹ H para o complexo RZ2 em uma solução de D ₂ O:DMSO-d ₆ (30%:70%) obtidos em 0, 24, 48 and 72h após a preparação da amostra.	112
Figura 88 – Expansão do espectro de RMN de ¹ H (8,0-6,5 ppm) para o complexo RZ2 . a = [Pd(S)(C ² ,N-dmba)(lut)] ⁿ ; b = espécie b; * = 2,6-lutidine livre.	112
Figura 89 – Expansão do espectro de RMN de ¹ H (3,15-2,3 ppm) para o complexo RZ2 . a = [Pd(S)(C ² ,N-dmba)(lut)] ⁿ ; b = espécie b; * = 2,6-lutidine livre.	113
Figura 90 – Comparação entre o espectro de RMN de ¹ H para o complexo RZ1 (72h) e o ligante 2,6-Lutidina em uma solução de D ₂ O:DMSO-d ₆ (30%:70%).	114
Figura 91 – Espectro de CD para o DNA (85 μM) em tampão Tris-HCl pH 7,3 na ausência e na presença de quantidades crescentes do complexo RZ2 . r= razão molar [complexo]/[DNA].....	116
Figura 92 – Espectro de absorção na região do UV-Vis para o complexo RZ2 na ausência e na presença de quantidades crescentes de DNA. A seta indica o decréscimo na absorção com relação à adição crescente do DNA. No interior:	

Gráfico de A/A_0 (%) contra $[DNA]/[RZ2]$ em $\lambda=270$ nm. A_0 absorvância do complexo na ausência de DNA. A = absorvância na presença de quantidades crescentes de DNA.	117
Figura 93 – Espectro de fluorescência de emissão do complexo Hoechst 33258-DNA ($\lambda_{excitação}= 350$ nm) na presença de quantidades crescentes do composto RZ2 em tampão tris-HCl pH 7,3. A seta indica o decréscimo da intensidade de fluorescência com relação ao aumento da concentração de RZ2 . No interior: Gráfico de intensidade de fluorescência relativa (F/F_0) contra $[RZ2]/[DNA]$ em $\lambda_{emissão}= 458$ nm.	118
Figura 94 – Espectro de dicroísmo circular (CD) para a HSA (1×10^{-6} mol L ⁻¹) na presença de quantidades crescentes do complexo RZ2 ($0-2,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹), realizado em tampão tris-HCl pH 7,4 em 298K. r = razão molar complexo/DNA.	119
Figura 95 – Espectro de fluorescência para a HSA (1×10^{-6} mol L ⁻¹) na presença de quantidades crescentes do complexo RZ2 (de $0-8,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ , de a-h respectivamente) em 298K e com $\lambda_{ex}=280$ nm. No interior: Gráfico de F_0/F vs $[RZ2]$ em diferentes temperaturas, (a) 310K e (b) 298K.	121
Figura 96 – Espectro de fluorescência para Varfarina na ausência e na presença de misturas equimolares: varfarina e HSA; varfarina, HSA e complexo RZ2. As concentrações de ambos os componentes foram mantidas em 1×10^{-6} mol L ⁻¹ , em 50×10^{-3} mol L ⁻¹ de tampão fosfato, pH 7,4 $\lambda_{ex}=330$ nm, a 298K.	124
Figura 97 – Resultados do estudo de ancoragem molecular. (A) conformação original (átomos de C em verde) e melhor pose de redocking (átomos de C em laranja) para varfarina no sítio de ligação Sudlow-I; (B) e (C) pose predita para os compostos à base de Pd compreendendo DMSO-d ₆ e D ₂ O, respectivamente. (D) – (F) Orientação e distância das pequenas moléculas ao ambiente do fluoróforo TRP214.	126

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	A química bioinorgânica.....	23
1.2	A cisplatina e seu mecanismo de ação.....	29
1.3	Novos alvos para o tratamento do câncer	31
1.4	Complexos metálicos como antitumorais.....	33
1.5	Os ligantes no design de complexos	36
1.6	Os ligantes auxiliares.....	41
2	HIPÓTESE.....	48
2.1	Complexos derivados de pirazóis	48
2.2	Complexos ciclopaladados	48
3	OBJETIVO.....	50
3.1	Objetivos específicos	50
4	PARTE EXPERIMENTAL.....	51
4.1	Reagentes	51
4.2	Síntese dos ligantes e complexos de paládio(II).....	51
4.2.1	Síntese do ligante 3,5-dimetilpirazol-1-iminotiolato (HTPz)	51
4.2.2	Síntese do ligante 3,5-dimetilpirazol-N-metil-1-iminotiolato (MTPz) ...	51
4.2.3	Síntese do ligante 3,5-dimetilpirazol-N-fenil-1-iminotiolato (FTPz)	51
4.2.4	Síntese dos complexos pirazólicos [PdCl(XTPz)(PPh ₃)] (R1-R3)	52
4.2.5	Síntese do Precursor [Pd(C ² ,N-dmpa)(μ-Cl)] ₂	53
4.2.6	Síntese do Precursor [Pd(C ² ,N-dmpa)(μ-N ₃)] ₂	53
4.2.7	Síntese dos Ciclopaladados [Pd(C ² ,N-dmpa)(X)(lut)] (RZ1-RZ2)	53
4.3	Caracterização.....	54
4.3.1	Análise Elementar (CHN).....	54
4.3.2	Espectroscopia vibracional no infravermelho (IV)	54
4.3.3	Espectroscopia de Ressonância magnética nuclear (RMN)	54

4.3.4	Espectroscopia de absorção UV-Vis.....	55
4.3.5	Espectrometria de Massas (MS).....	55
4.3.6	Comportamento em solução aquosa	55
4.4	Ensaio de atividade antiproliferativa.....	56
4.5	Ensaio envolvendo alvos biológicos.....	57
4.5.1	Ensaio de interação com DNA	57
4.5.1.1	Titulação espectrofotométrica.....	57
4.5.1.2	Espectroscopia de dicroísmo circular (CD).....	58
4.5.1.3	Ensaio de competição com Hoechst 33258.....	59
4.5.2	Interação com Albumina de Soro Humano (HSA)	59
4.5.2.1	Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)	59
4.5.2.2	Ensaio de Fluorescência.....	60
4.5.2.3	Ensaio de competição com Varfarina	60
4.5.3	Interação com Topoisomerase II α : Ensaio de relaxação	61
4.5.4	Ensaio de inibição da Catepsina B e L	61
4.6	Metodologia Computacional	62
4.6.1	Ancoragem Molecular – Catepsina B.....	62
4.6.2	Ancoragem Molecular – Albumina (HSA)	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1	Complexos pirazólicos	64
5.1.1	Análise Elementar e Espectrometria de massas	66
5.1.2	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)	71
5.1.3	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	73
5.1.3.1	Espectro de RMN de ^1H	73
5.1.3.2	Experimento de DEPTQ e HMBC ^{13}C - ^1H	75
5.1.4	Comportamento em solução	77
5.1.5	Atividade Antiproliferativa	80

5.1.6	Ensaio de interação com DNA	82
5.1.6.1	Dicroísmo Circular (CD)	82
5.1.6.2	Titulação espectrofotométrica com DNA	84
5.1.6.3	Ensaio de competição com Hoechst 33258	89
5.1.7	Ensaio de inibição com Topoisomerase II α	93
5.1.8	Ensaio de inibição da Catepsina B e L	97
5.1.9	Ancoragem Molecular com Catepsina B	98
5.2	Complexos ciclopaladados	101
5.2.1	Estabilidade química em solução	107
5.2.2	Ensaio de interação com DNA	115
5.2.3	Ensaio de Interação com Albumina (HSA)	118
5.2.3.1	Dicroísmo Circular (CD)	119
5.2.4	Ensaio de Fluorescência	120
5.2.4.1	Competição com a Varfarina	124
5.2.5	Ancoragem Molecular com Albumina (HSA)	125
6	CONCLUSÃO	128
7	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	131
8	ANEXO	145

1 INTRODUÇÃO

1.1 A química bioinorgânica

Comumente se diz que a química dos processos biológicos é essencialmente a química orgânica. No entanto, a fronteira entre a química inorgânica e orgânica, no que diz respeito a estes processos, é um tanto difícil de se estabelecer. Grande parte dos elementos presentes no meio biológico, que são essenciais para todas as formas de vida, incluem C, H, N, O (os mais abundantes) juntamente com Na, K, Mg, Ca, P, S e Cl. Traços de metais também são presentes no meio biológico como V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn e Mo, assim como traços de não-metais que compreendem B, Si, Se, F e I (HOUSECROFT; SHARPE, 2012).

O ferro, por exemplo, é um dos metais mais importantes nos seres humanos devido a sua função de transporte e armazenamento de O_2 . Nos mamíferos, o gás absorvido pela respiração é transportado na corrente sanguínea e armazenado nos tecidos pelas metaloproteínas hemoglobina e mioglobina, respectivamente. Ambas as proteínas supracitadas são *hemoproteínas*, por conterem anéis porfirínicos com Fe no centro (grupo heme) (**Figura 1**) (HOUSECROFT; SHARPE, 2012; NELSON; COX, 2014).

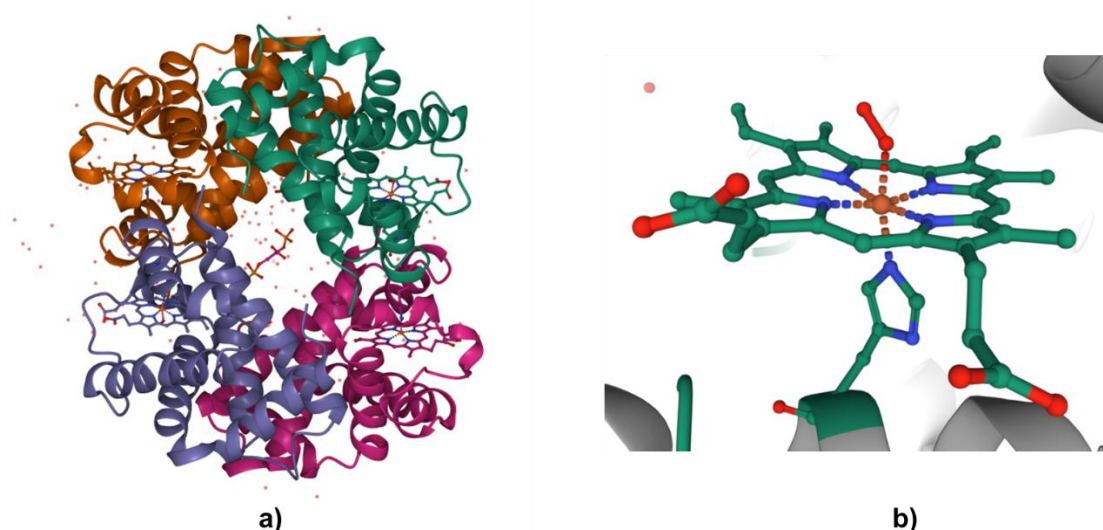


Figura 1 – (a) Estrutura da hemoglobina (código PDB 1B86) em representação de fita. (b) Estrutura octaédrica do grupo heme ligado ao O_2 (oxihemoglobina). **Fonte:** autor.

Outro papel crucial desempenhado pelo ferro em nosso organismo está relacionado à cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, por meio de enzimas denominadas *citocromos*. Os citocromos são uma família de metaloenzimas (citocromo *a*, *b* e *c*) que contém um grupo heme, no qual o centro de ferro pode sofrer reações redox reversíveis $\text{Fe(III)} \rightleftharpoons \text{Fe(II)}$. Essa característica os permite agir como centros de transferência de elétrons durante o processo de respiração (BRUCE ALBERTS et al., 2017; HOUSECROFT; SHARPE, 2012; LIU et al., 2014). Além do ferro, o cobre também tem papel importante no funcionamento da metaloenzima, mais especificamente no citocromo *c* oxidase. Responsável pela redução de O_2 à H_2O , a oxidase foi resolvida apenas em 1995, sendo sua estrutura composta por quatro centros metálicos (Cu_A , Cu_B , heme *a* e heme *a*₃) os quais acoplam a transferência de elétrons ao bombeamento de prótons (**Figura 2**).

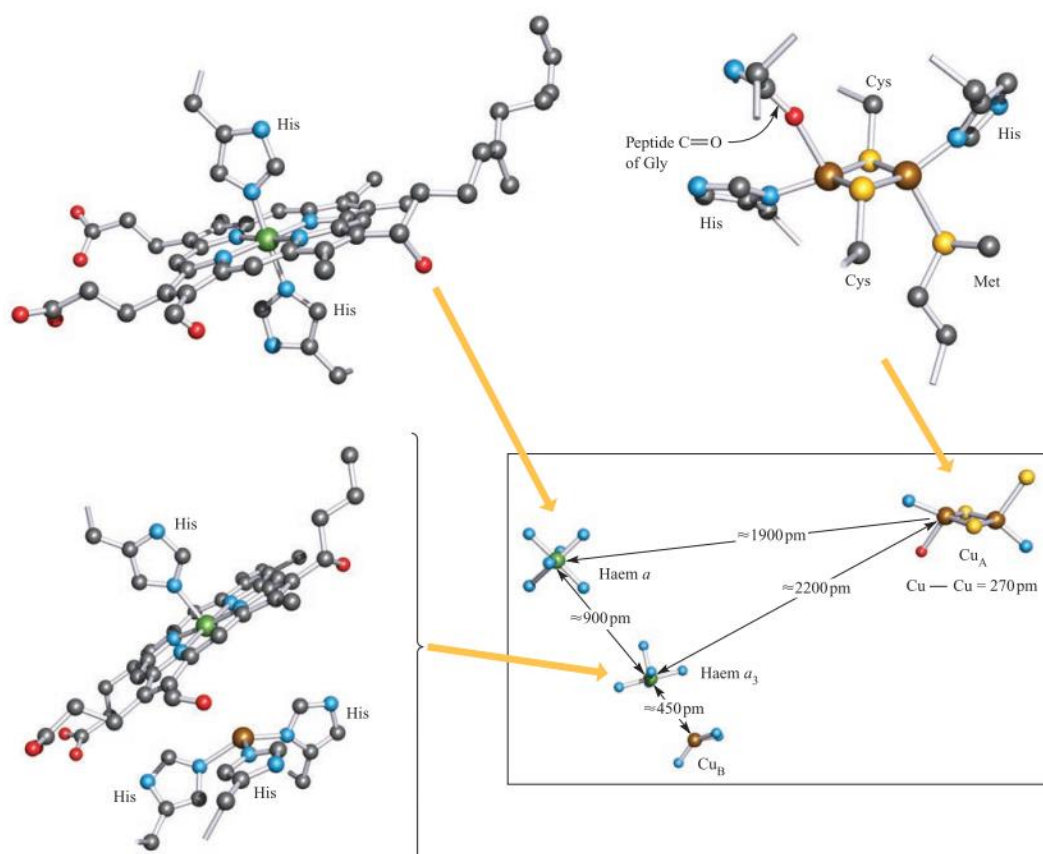


Figura 2 – Sítios Cu_A , Cu_B , heme *a* e heme *a*₃ no citocromo *c* oxidase (PDB código: 1OCC). O diagrama inferior mostra as posições relativas dos sítios metálicos dentro da proteína; código de cores: Cu, marrom; Fe, verde; S, amarelo; N, azul; C, cinza; O, vermelho. **Fonte:** adaptado de (HOUSECROFT; SHARPE, 2012).

Basicamente, a transferência de elétrons, provenientes do citocromo c, se dá do centro de Cu_A para o grupo heme a. O centro Cu_B e o grupo heme a₃ são responsáveis pela ligação com O₂, redução à H₂O e bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial (quatro prótons por molécula de O₂) (HOUSECROFT; SHARPE, 2012).

A importância do cobre, no entanto, não se limita à cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. O metal, assim como o ferro, é considerado um dos mais importantes, envolvido em uma série de processos fisiológicos. Além do seu papel na cadeia respiratória, está presente também em outras enzimas como a lisil oxidase no tecido conjuntivo, dopamina monooxigenase no cérebro, na ceruloplasmina e como cofator para a superóxido dismutase (apoCuZnSOD). É responsável também pela proteção contra radicais livres em proteínas, membranas lipídicas e ácidos nucleicos. Sua ausência pode causar severos danos ao organismo, sendo relacionada a retardo mental, anemia, hipotermia, neutropenia, diarreia, hipertrofia cardíaca, fragilidade óssea, entre outros (COUNCIL, 2000).

Uma variedade de metais desempenha funções cruciais em enzimas ou em outros processos fisiológicos em nosso organismo. No entanto, muito antes mesmo de reconhecermos sua importância nesses processos, os metais já vinham sendo utilizados nos primórdios da humanidade, não só para confecção de ferramentas e armas, mas também para fins medicinais. Os egípcios, por exemplo, já utilizavam o cobre 3000 anos antes de Cristo para esterilizar água. O ouro também era empregado para fins medicinais, sendo utilizado em medicamentos na Arábia e na China a cerca de 3500 anos atrás (BERALDO, 2005).

Theophrastus Paracelsus (Theophrastus Bombastus Von Hohenheim, 1493-1541), químico e físico alemão-suíço (**Figura 3**), aplicava mercúrio como medicamento no tratamento de sífilis e hidropisia, na idade média, além de trabalhar com outros metais como prata, ouro, cobre, antimônio e até mesmo chumbo (MICHALEAS et al., 2021). O químico alemão foi pioneiro na introdução de minerais para o tratamento de doenças, além de introduzir o conceito de dose em tratamentos medicinais: “O que há que não seja um veneno? Todas as coisas são veneno, e nada é sem veneno. Apenas a dose determina que uma coisa é ou não um veneno”.

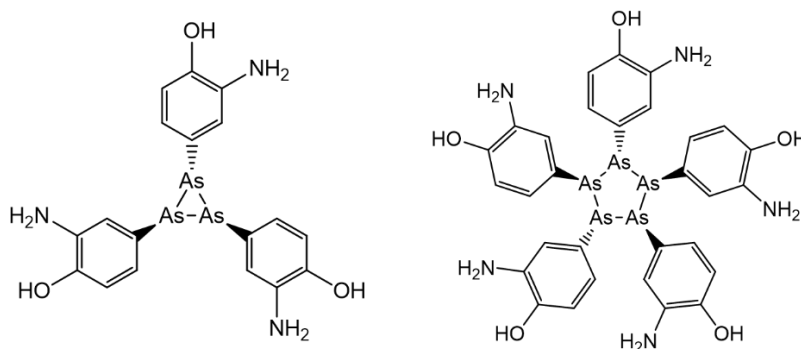


Figura 3 – A esquerda: Paracelso em gravura de linha por W. Marshall após J. Payne. Wellcome Library London. A direita: página frontal do livro de Paracelso “Operum latine redditorum” Bâle: Petri Perna, 1575, BIU Sant’ e Paris. **Fonte:** adaptado de (MICHALEAS et al., 2021).

Entretanto, apenas cerca de 400 anos após os trabalhos do químico e físico alemão é que a química inorgânica voltada para compostos medicinais tomou forma como é hoje e passou a empregar substâncias mais complexas.

Um dos primeiros metalofármacos terapêuticos foi o salvarsan, um agente organometálico antimicrobiano à base de arsênio desenvolvido pelo médico e cientista alemão Paul Ehrlich, o qual recebeu Prêmio Nobel por suas contribuições em 1908.

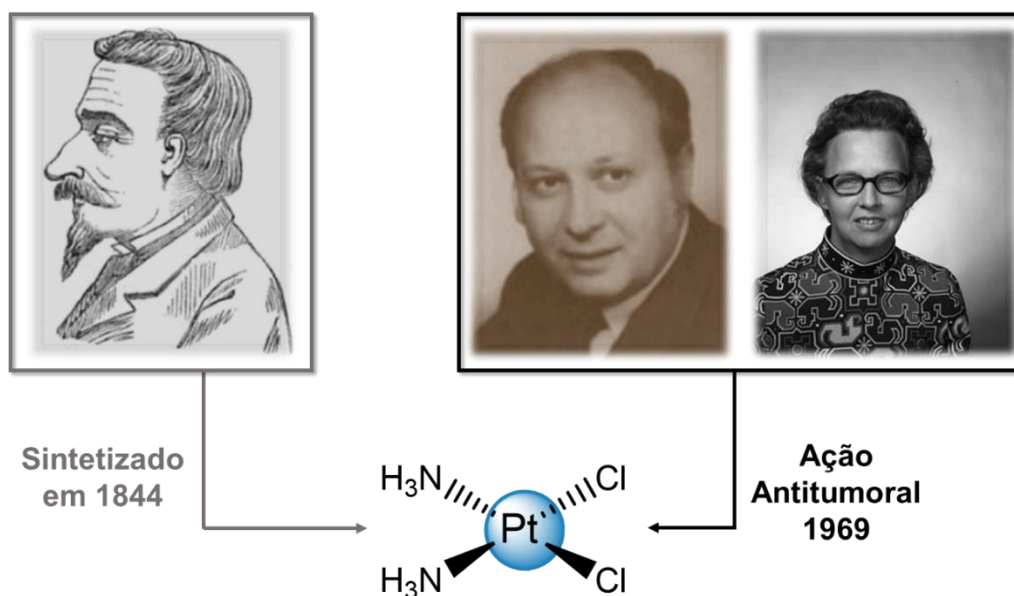
Sob o nome de 606, a mistura de compostos 3-amino-4-hidroxifenil-arsênio(III) (Salvarsan) foi aplicada com grande sucesso no tratamento da sífilis (EHRlich; BERTHEIM, 1912) (**Figura 4**). O fármaco foi uma demonstração eficaz da crença de Ehrlich de que é possível combater doenças infecciosas sem afetar o hospedeiro: a ideia das *balas mágicas* (*Magic Bullets*). O medicamento foi utilizado até o fim da segunda guerra mundial, onde foi substituído pela penicilina (MJOS; ORVIG, 2014). A introdução do salvarsan foi considerada por muitos como o surgimento da quimioterapia, fazendo de Paul Ehrlich o precursor dessa área (DREWS, 2004; KAUFMANN, 2008; STREBHARDT; ULLRICH, 2008).



Estruturas cíclicas do Salvarsan

Figura 4 – Paul Ehrlich e estruturas cíclicas para o fármaco Salvarsan. **Fonte:** autor.

Apesar da grande contribuição de Ehrlich, o metalofármaco considerado como o principal precursor da química inorgânica medicinal, é o complexo *cis*-diamindicloridoplatina(II) (*cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂]), popularmente conhecido como cisplatina. O complexo metálico, originalmente conhecido como “cloreto de Peyrone”, foi preparado pela primeira vez pelo químico italiano Michele Peyrone em 1844, sendo sua estrutura corretamente proposta somente em 1893, por Alfred Werner (FONTES; CÉSAR; BERALDO, 2005; KAUFFMAN et al., 2010; NEVES; VARGAS, 2011). Porém, somente em 1965 sua ação biológica foi descoberta, ao caso, por Barnett Rosenberg e Loreta Van Camp (**Figura 5**).

**Figura 5** – Da esquerda para direita: Michele Peyrone, Barnett Rosenberg e Loreta Van Camp. Contribuições na descoberta da cisplatina. **Fonte:** autor.

Rosenberg estava interessado em aplicar radiação eletromagnética em células bacterianas e de mamíferos para investigar se campos de dipolo elétrico ou magnético estariam envolvidos na divisão celular. Quando o campo era ligado, as bactérias apareciam como filamentos longos (até 300 vezes o tamanho convencional) ao invés de hastes curtas. O efeito, entretanto, não se devia ao campo elétrico, mas sim aos produtos de eletrólise oriundos dos eletrodos de platina. Graças a presença do químico T. Kriga, no grupo de Rosenberg, foi possível isolar o produto de eletrólise inicialmente identificado como um “cloroplatinato de amônio” $(\text{NH}_4)_2[\text{PtCl}_6]$. No entanto, essa espécie não se mostrou ativa, mas sim uma posteriormente sintetizada pelo grupo, a *cis*- $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, mais tarde conhecida como cisplatina (MAKOVEC, 2019; NEVES; VARGAS, 2011; ROSENBERG, 1978; ROSENBERG et al., 1969).

Em 1968, após testes adicionais contra várias bactérias, o complexo *cis*-diamindicloridoplatina(II) foi então administrado por via intraperitoneal a camundongos portadores de um tumor murino transplantável padrão, sarcoma-180, na dose não-letal de 8 mg/kg, mostrando uma regressão acentuada (**Figura 6**).

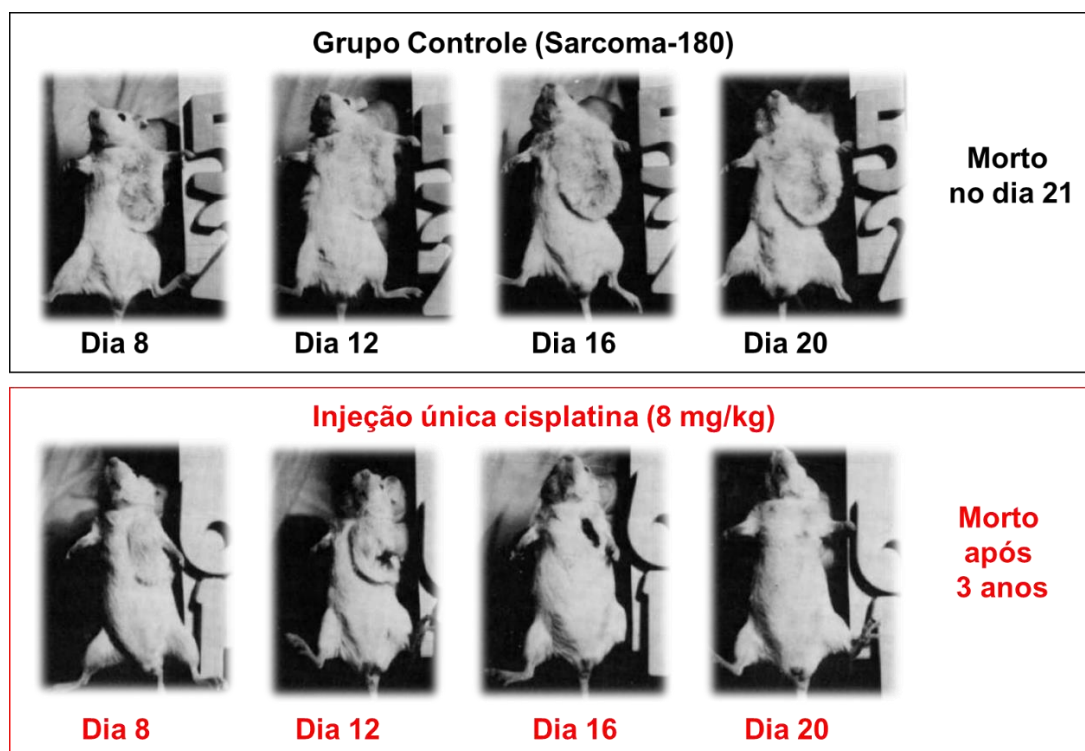


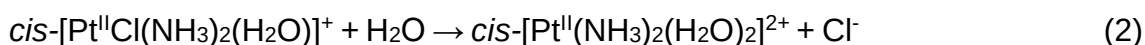
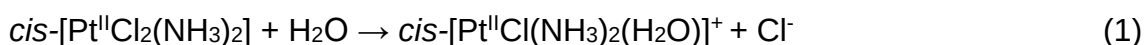
Figura 6 – Sequência de fotografias de dois camundongos com tumores sólidos Sarcoma-180. O camundongo no topo era um controle negativo não tratado, enquanto o inferior foi tratado com uma injeção (dia 8) de cisplatina de dose 8 mg/kg. **Fonte:** adaptado de (ROSENBERG, 1978).

Com testes comprobatórios *in vivo* realizados no Chester Beatty Institute em Londres, Reino Unido, a cisplatina foi adotada pelo Instituto Nacional do Câncer dos EUA (NCI) para testes clínicos. Os primeiros pacientes foram tratados em 1971 – um tempo consideravelmente curto, em termos modernos, desde a descoberta original da ação biológica da substância. Aprovação pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA foi concedida em 1978 para o tratamento do câncer de próstata (KELLAND, 2007; NEVES; VARGAS, 2011). Neste tipo de câncer, a taxa de cura pode atingir até 90%, na fase inicial. A cisplatina também pode ser aplicada no tratamento de cânceres de ovário, esôfago, colorretal, pulmão, linfoma, melanoma, entre outros.

1.2 A cisplatina e seu mecanismo de ação

O mecanismo de ação biológica da cisplatina já havia sido descrito inicialmente na década de 70 por Rosenberg e colaboradores, porém sem o aprofundamento devido ou possível para época. (ROSENBERG, 1973).

Estudos sobre o mecanismo de ação do complexo inorgânico revelam que no meio aquoso, a espécie *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] libera o ligante clorido formando os complexos *cis*-[PtCl(NH₃)₂(H₂O)]⁺ e *cis*-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺ (eqs 1 e 2) (BRABEC; HRABINA; KASPARKOVA, 2017), (GREEN; GARNER; ORTON, 1992).



A formação do aquo complexo só ocorre dentro da célula, onde a concentração de cloreto é menor (~4 mM), o que desloca o equilíbrio no sentido da formação da espécie hidrolisada. Fora da célula a concentração dos íons cloreto é consideravelmente maior, sendo da ordem de ~100 mM, impedindo a hidrólise e garantindo que a forma neutra da cisplatina seja mantida.

A forma como o complexo metálico é transportado para o meio intracelular ainda é alvo de estudos, porém algumas hipóteses sugerem que ocorra por difusão passiva através da bicamada lipídica das membranas, a qual é a mais aceita até o momento, através de transportadores de cobre ou mesmo

transportadores orgânicos catiônicos (OCT) (KLEIN; HAMBLEY, 2009; NEVES; VARGAS, 2011) (**Figura 7**).

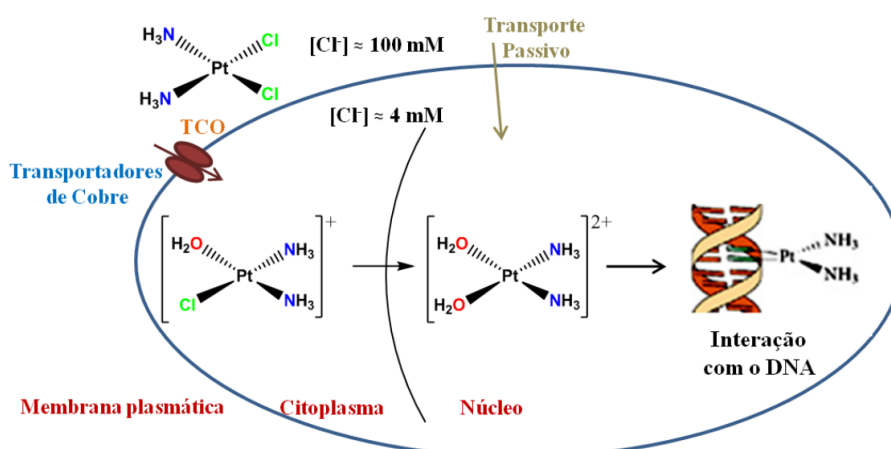


Figura 7 – Esquema de transporte e mecanismo de ação simplificado da cisplatina. **Fonte:** adaptado de (NEVES; VARGAS, 2014).

Uma vez que o aquo complexo é formado, este apresenta maior afinidade pelo DNA e pode se ligar a macromolécula formando diferentes tipos de adutos, sendo os mais comuns os bifuncionais do tipo ligação cruzada intrafita com duas bases adjacentes (G-G ou A-G) (**Figura 8**) (FONTES; CÉSAR; BERALDO, 2005; KLEIN; HAMBLEY, 2009).

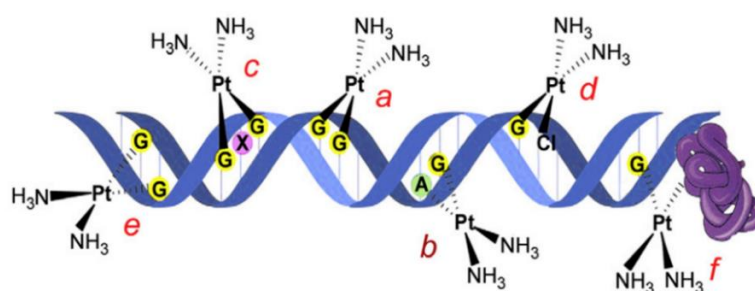


Figura 8 – Modos de ligação da cisplatina com DNA (a-f). **Fonte:** adaptado de (BRABEC; HRABINA; KASPARKOVA, 2017).

Esses adutos causam uma distorção na estrutura do DNA, que uma vez reconhecido por determinadas proteínas celulares, desencadeiam o processo de morte celular (apoptose) (KLEIN; HAMBLEY, 2009). Porém, a falta de seletividade e especificidade da cisplatina é um dos principais agravantes no seu uso somado aos efeitos de resistência adquirida. Cerca de 70-85% do complexo

inorgânico administrado reage com proteínas e outros constituintes celulares, e apenas 5-10% dessa quantidade é de fato responsável pela interação com DNA (V. CEPEDA et al., 2007). Por esse motivo, graves efeitos colaterais são observados, principalmente neuro e nefrotoxicidade, além de toxicidade no trato intestinal, responsável por quadros de náusea e vômitos (FONTES; CÉSAR; BERALDO, 2005).

1.3 Novos alvos para o tratamento do câncer

A busca por alvos alternativos ao DNA tornou-se uma necessidade na procura de compostos mais seletivos e eficientes no tratamento do câncer. O estudo sobre a constituição e diferenciação de uma célula tumoral são fundamentais, pois permitem o desenvolvimento de novas estratégias na abordagem de tratamento da doença. As topoisomerases (**Figura 9**), por exemplo, são uma família de enzimas, subdividas em tipo I ou II, a depender do tipo de clivagem no ciclo catalítico, vitais no controle da topologia, replicação e transcrição do DNA, além de desempenharem funções importantes de regulação da função fisiológica do genoma (POMMIER et al., 2016), (KATHIRAVAN et al., 2013), (WENDORFF et al., 2012). Devido a importante função desempenhada pela enzima em processos celulares, tem sido objeto de estudos como um potencial alvo no tratamento do câncer.

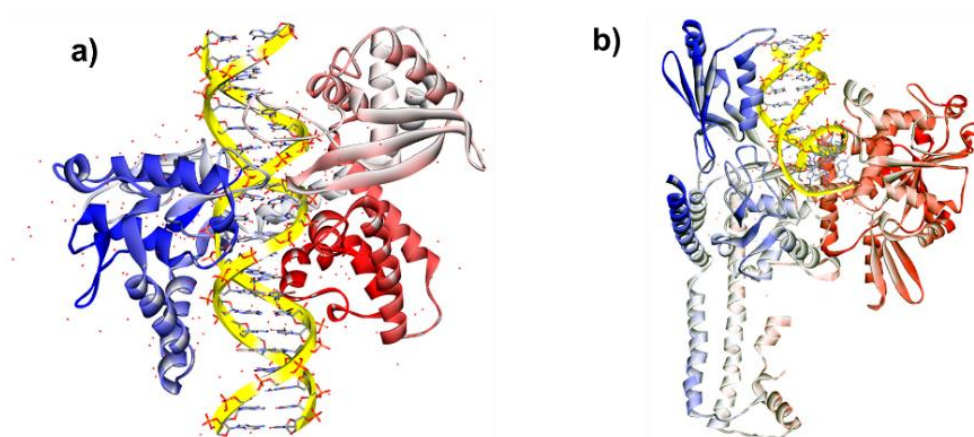


Figura 9 – a) Estrutura da topoisomerase humana I em ligação não covalente com DNA (PDB 1A35) (BAKER; RAJAN; MONDRAÑ, 2009). b) Estrutura da topoisomerase humana IIα em ligação com DNA (PDB 4FM9) (WENDORFF et al., 2012). **Fonte:** autor.

A manipulação da sua atividade enzimática para fins terapêuticos parece ser alcançada principalmente por dois mecanismos: (1) supressão da atividade catalítica da enzima através da utilização de inibidores catalíticos ou (2) transformação da enzima em um agente venenoso que é tóxico para as células, sendo esse o mecanismo que em geral apresenta maior sucesso na inibição tanto para topo1 quanto para topo2. Os venenos da topoisomerase, como são comumente referenciados, convertem uma topoisomerase em um veneno celular através do aprisionamento de um intermediário catalítico covalente na forma topoisomerase-DNA, como um complexo ternário topoisomerase-droga-DNA. Esse envenenamento é frequentemente causado pela inibição da reação de religação, que também é apoiada pelos estudos estruturais dos complexo ternário topoisomerase-fármaco-DNA (DELGADO et al., 2018).

Além das topoisomerasas, outra família interessante de enzimas são as cisteína catepsina proteases, referenciadas comumente como catepsinas. A família de enzimas humana compreende um total de até onze membros (catepsinas B, C, H, F, K, L, O, S, V, WX / Z), sendo a catepsina B (**Figura 10**) a mais amplamente estudada por apresentar tanto endo quanto exopeptidase mas principalmente devido a uma estrutura distinta apenas à catepsina B, denominada alça de oclusão e por seu papel na progressão tumoral, sendo altamente expressa em uma variedade de tumores malignos (HANG et al., 2015), (LAMPE; GONDI, 2014), (JOYCE; HANAHAN, 2004).

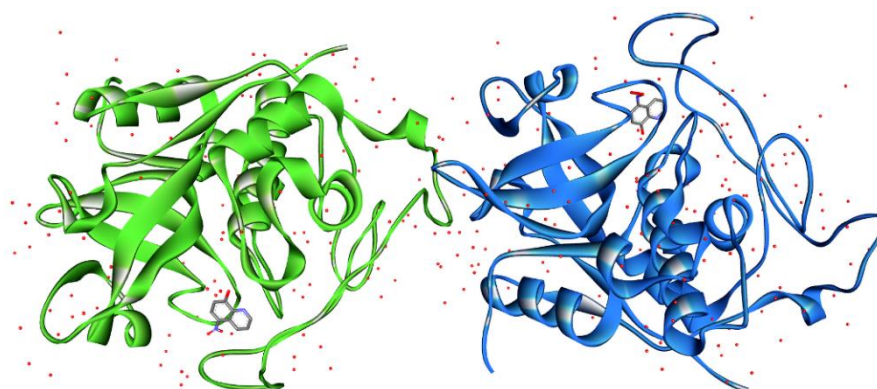


Figura 10 – Estrutura da catepsina B complexada com nitroxolina (PDB 3AI8) (MIRKOVIĆ et al., 2011). **Fonte:** autor.

A relação entre a progressão de um tumor e as catepsinas parece acontecer em múltiplas etapas (LAMPE; GONDI, 2014), no entanto, de maneira

geral, o seu papel está relacionado a degradação de proteínas da matriz extracelular (ECM) em tecidos tumorais, permitindo que as células migrem invadindo barreiras adjacentes, levando a metástase (HANG et al., 2015), (LAMPE; GONDI, 2014).

Estratégias de inibição da catepsina B envolvem a alça de oclusão como alvo, uma vez que é um ponto fundamental na atividade da enzima. Devido a sua ação extracelular, uma abordagem interessante seria a aplicação de compostos como inibidores da catepsina B que não podem entrar na célula, uma vez que a enzima faz parte do microambiente tumoral, poupando assim catepsinas intracelulares, de modo a limitar a toxicidade e garantir certa seletividade (LAMPE; GONDI, 2014).

1.4 Complexos metálicos como antitumorais

A procura por novos alvos farmacológicos assim como o entendimento do metabolismo dos cânceres são, inquestionavelmente, aspectos que irão determinar o sucesso no desenvolvimento de novas terapias. No entanto, o design de substâncias como potenciais antitumorais é também um ponto relevante a ser considerado.

Desde a descoberta da ação antitumoral da cisplatina, em 1969, a química de coordenação voltada para complexos com potencial atividade biológica tem tido destaque, principalmente, em compostos derivados de platina(II), sendo, inclusive, alguns já aprovados comercialmente, como é o caso da carboplatina e oxaliplatina (Figura 11) (MJOS; ORVIG, 2014).

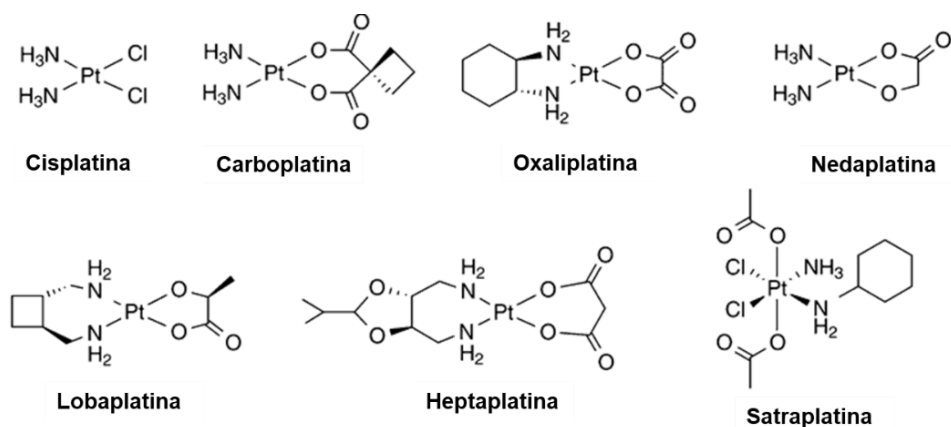


Figura 11 – Compostos de platina pós-cisplatina. **Fonte:** adaptado de (MJOS; ORVIG, 2014)

No entanto, um dos grandes agravantes na utilização da cisplatina reside na sua toxicidade, como já mencionado anteriormente. Somado a isso, o problema de resistência a fármacos (MDR – *Multi-Drug -Resistant*) é um obstáculo persistente que atinge não somente a cisplatina, mas diversos fármacos de maneira geral. Por esse motivo, hoje, a literatura já apresenta uma grande variedade de trabalhos reportando diferentes complexos metálicos como potenciais antitumorais.

Dentre essa variedade de compostos, os de paládio(II) tem se destacado nos últimos anos devido a sua característica estrutural semelhante a platina. Outra vantagem interessante a ser destacada é que, em geral, os complexos de paládio tendem a não ser genotóxicos (danos ao genoma humano) enquanto os de platina são. Esse interesse crescente pode ser observado no volume de trabalhos reportado pela literatura nos últimos anos (**Figura 12**).



Figura 12 – Número de publicações de artigos científicos ao longo dos anos. Pesquisa realizada pela plataforma Scifinder no ano de 2021 utilizando as palavras-chave “palladium complex” e “anticancer”.

Este é um dado interessante que, de fato, aponta para o paládio como um metal promissor na terapia do câncer. Uma constatação desta informação é a de que no início de 2021, a FDA – *Food and Drug Administration* – concedeu a designação “*Fast Track*” para uma forma de tratamento denominada “terapia anticâncer imuno-foto-ativada com padeliporfirina” (do inglês *ImPACT* – *Padeliporfin Immune Photo Activated Cancer Therapy*) para o tratamento de carcinoma urotelial de trato urinário superior unifocal de alto grau (UTUC) em pacientes adultos. Segundo a FDA, a designação “*Fast Track*” foi projetada para acelerar a revisão e o desenvolvimento de novos tratamentos que atenderão a

uma necessidade médica não atendida (JASON M. BRODERICK, 2021). O fármaco padeliporfirina, também comercializado como “*Tookad*”, é um complexo contendo paládio(II) como centro metálico, coordenado a um grupo porfirina (**Figura 13**) (ALLARDYCE; DYSON, 2016).

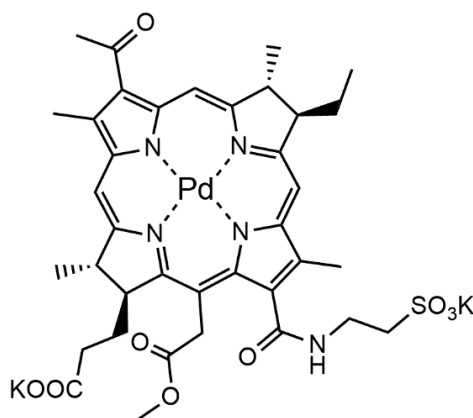


Figura 13 – Estrutura do complexo que compõe o fármaco Tookad.

No entanto, o design de complexos de paládio com atividade antitumoral tem sido o maior desafio do ponto de vista sintético. De maneira geral, complexos de Pt(II) são termodinâmica e cineticamente mais estáveis que complexos análogos de Pd(II) que apresentam trocas de ligantes da ordem de 10^4 - 10^5 vezes mais rápida que complexos de Pt(II). Devido a esta característica, os compostos de paládio podem apresentar dificuldades na manutenção de sua integridade estrutural em fluidos biológicos por tempo suficiente para atingir o alvo de interesse (JAHROMI et al., 2016).

Nesse sentido, a busca por ligantes apropriados se tornou uma etapa fundamental no preparo desses complexos, uma vez que eles desempenham um papel importante na modificação da reatividade, lipofilia, na estabilização dos estados de oxidação específicos e na inércia de substituição (JAHROMI et al., 2016). Compostos de paládio com ligantes aromáticos contendo *N*- e *N,N*-, tais como derivados de piridina, quinolina, pirazol e 1,10-fenantrolina, assim como ligantes quelantes tais como derivados de tiossemicarbazidas, benzilaminas, ditiocarbamatos, mostraram características antitumorais muito promissoras (BARRA et al., 2013; JAHROMI et al., 2016; ROCHA et al., 2016).

Em um trabalho apresentado por Faghih e colaboradores (FAGHIH et al., 2018), por exemplo, uma série de complexos de paládio(II) contendo ligantes derivados da orto-vanilina foram sintetizados para investigar sua potencial atividade antitumoral.

Os efeitos citotóxicos dessa série foram avaliados em três linhagens celulares cancerígenas: MCF-7 (adenocarcinoma mamário), A549 (adenocarcinoma pulmonar) e SKOV3 (adenocarcinoma do ovário), sendo o complexo $\text{Pd}(\text{L}_1)_2$ (**Figura 14**) o que demonstrou o melhor efeito citotóxico em quase todas as três linhagens celulares com IC_{50} de 7,21; 14,72; e 21,79 μM em MCF-7, A549 e SKOV3, respectivamente. Este complexo também se mostrou mais eficaz que a cisplatina frente as linhagens testadas (61,56; 50,81 e 43,81 μM , respectivamente).

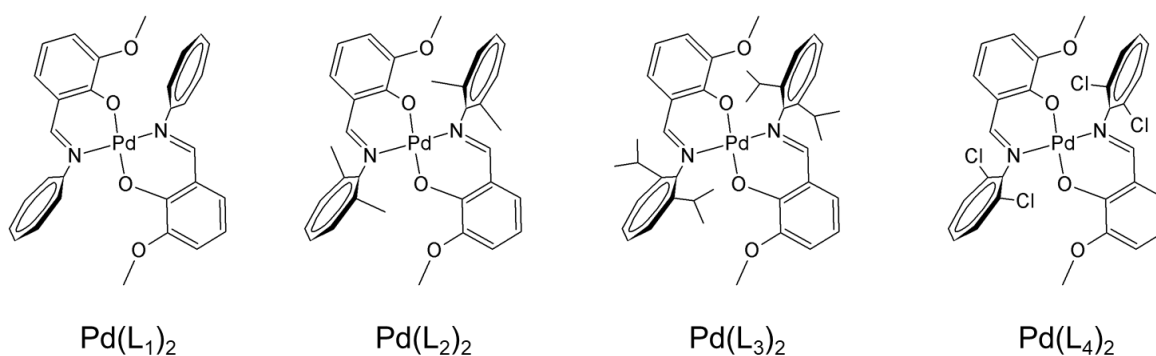


Figura 14 – Estrutura dos complexos metálicos sintetizados (FAGHIH et al., 2018)

1.5 Os ligantes no design de complexos

Como já mencionado anteriormente, não só os metais, mas a escolha dos ligantes passou a ser uma etapa importante no design de novos complexos, uma vez que moléculas orgânicas com potencial atividade biológica podem ser ligadas aos metais conferindo novas propriedades que podem, por exemplo, alterar a reatividade ou mecanismo de ação, lipofilicidade, estabilizar determinados estados de oxidação e contribuir para a estabilidade frente a reações de substituição, que são comuns em meios biológicos.

Nesse sentido, compostos derivados de tiossemicarbazonas (**Figura 15**) tem atraído bastante o interesse dos químicos devido a sua vasta área de

aplicação: podendo atuar como antiviral, antifúngico, antibacteriano, antimalárico e principalmente antitumoral (BERALDO, 2004).

São moléculas que podem ser obtidas por meio da reação de condensação de uma tiossemicarbazida com um aldeído ou cetona, constituindo uma classe importante de ligantes N,S-doadores, tendo sua química de coordenação inicialmente explorada na década de sessenta (LOBANA et al., 2009).

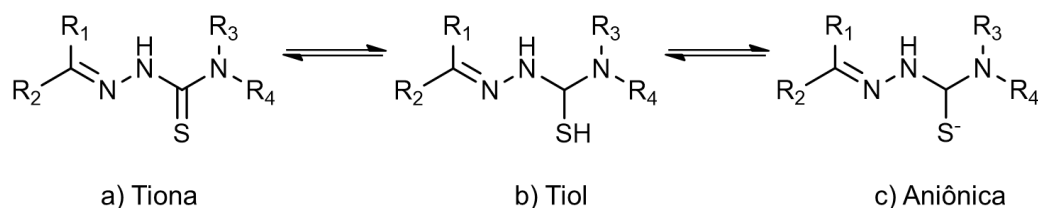


Figura 15 – Estrutura genérica das tiossemicarbazonas (a), tautômero tiol (b) e forma aniônica (c) (LOBANA et al., 2009).

Uma aplicação interessante dessa classe pode ser observada no trabalho apresentado por Tavares e colaboradores (TAVARES et al., 2014), onde doze complexos bisquelatos de Pd(II) e Pt(II) de tiossemicarbazonas derivadas de aldeídos foram sintetizados. A atividade inibitória destes complexos foi avaliada em comparação com a cisplatina em duas linhagens tumorais: de cólon (CT26.WT) e melanoma (B16-F10). Os complexos tiveram sua atividade testada também frente a célula normal de rim (BHK-21), o que possibilitou a determinação do índice de seletividade (IS) e assim a comparação efetiva entre a vasta série de compostos

Para os ligantes livres, os resultados obtidos com a linhagem B16-F10 mostraram-se como praticamente inativos ($IC_{50} > 100 \mu M$), enquanto que para a linhagem CT26.WT os mesmos ligantes apresentaram valores de IC_{50} da ordem de 1,0–8,6 μM . Os complexos, no entanto, foram mais ativos frente a linhagem BF16-F10, com IC_{50} da ordem de 0,1–12,3 μM , enquanto que para a linhagem CT26.WT os valores obtidos foram muito semelhantes à dos ligantes livres. Em comparação com a cisplatina, os complexos foram, em geral menos ativos, porém, os índices de seletividade (IS) foram superiores em alguns casos, sendo até três vezes mais seletivo que o composto de referência.

Além das tiossemicarbazonas, a versatilidade reacional das tiossemicarbazidas permite também a formação de tiocarbamoilpirazóis (**Figura**

16) numa reação adequada de ciclocondensação com compostos derivados de 1,3-dicarbonil e/ou α,β -cetonas insaturadas, levando à formação do anel pirazólico (KARROUCHI et al., 2018). A presença do núcleo pirazól aparece em diversas estruturas orgânicas, proporcionando aplicações variadas na área de tecnologia, agricultura e saúde. Com relação a sua aplicação medicinal, eles são descritos na literatura como antivirais, antifúngicos, antibacterianos, antidepressivos, antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-tuberculose e anticâncer.

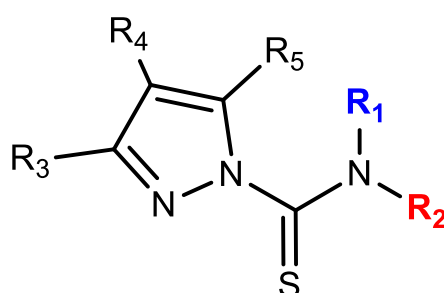


Figura 16 – Estrutura genérica do tiocarbamoilpirazol.

Devido a essa grande variedade de aplicações biológicas, os compostos pirazólicos tem despertado grande interesse do ponto de vista farmacológico, de forma que hoje já é possível encontrar comercialmente uma grande gama de medicamentos à base de pirazóis (**Figura 17**).

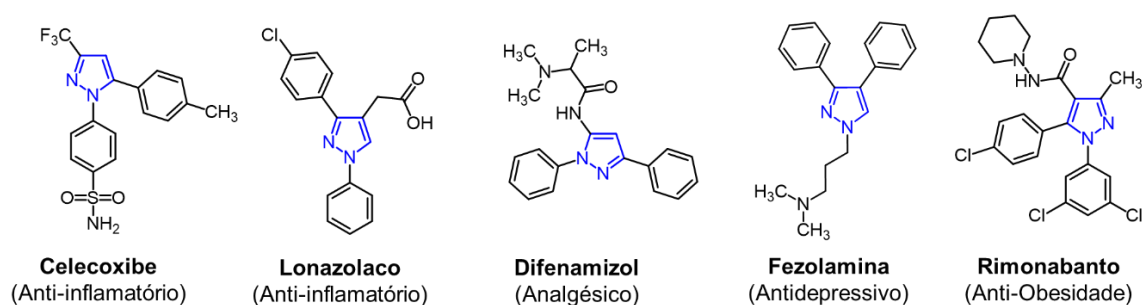


Figura 17 – Fármacos comerciais que apresentam a função pirazól (KARROUCHI et al., 2018)

A presença do anel pirazól e suas propriedades também tem atraído químicos inorgânicos, uma vez que podem ser utilizados para coordenação com diferentes metais e assim conferir novas propriedades. Nesse sentido, os tiocarbamoilpirazóis (**Figura 16**) são uma excelente alternativa do ponto de vista

sintético, uma vez que apresentam um sistema N,S doador, bastante favorável em reações com metais que são ácidos de Pearson mais moles como paládio(II) e platina(II), devido a presença do átomo de enxofre mais polarizável no ligante.

Em um trabalho apresentado pelo nosso grupo em 2013 por Barra e colaboradores (BARRA et al., 2013), uma série de quatro complexos de paládio(II) contendo N'-metil-3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol foi sintetizada, variando-se apenas a presença dos haletos como ligante (Cl, Br, I, SCN), sendo sua atividade biológica testada frente a linhagens de adenocarcinoma mamário murinho (LM3) e pulmonar murino (LP07). No ensaio realizado, o ligante livre não apresentou atividade quando comparado aos complexos obtidos, sendo os valores de IC₅₀ superiores a 140 µM. Os complexos, no entanto, apresentaram valores de inibição na ordem de 2,5–3,4 µM e bem inferiores ao da cisplatina (30,3 µM), sendo aproximadamente 9 vezes mais citotóxico que o fármaco de referência.

Além das tiossemicarbazonas e pirazóis, o grupo de ligantes derivados de benzilaminas tem sido escolhida por muitos autores devido sua facilidade de formação de anéis de cinco membros (**Figura 18**) através de reações de ciclometalação, conferindo estabilidade a complexos de paládio (OMAE, 2014).

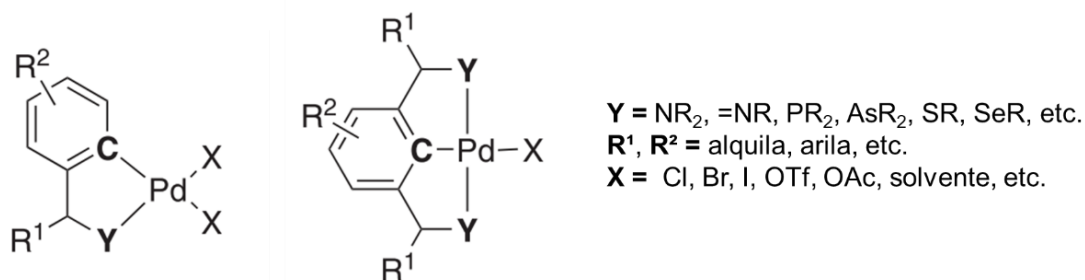


Figura 18 – Definição estrutural de ciclopaladados. Adaptado de (DUPONT; PFEFFER, 2008).

Tais complexos preparados a partir da ciclização com benzilaminas, tem não só mostrado boa estabilidade, mas também promissores resultados de atividade biológica. Em um estudo realizado por Bechara e colaboradores (BECHARA et al., 2014), por exemplo, um complexo ciclopaladado derivado do ligante S(-)-N,N-dimetil-1-feniletilamina (dmpa) (**Figura 19**) apresentou potente ação citotóxica, em ensaios *in vitro*, contra linhagens celulares tumorais de

osteosarcoma, Saos-2, com a particularidade dessa linhagem ser resistente a maioria dos quimioterápicos comerciais.

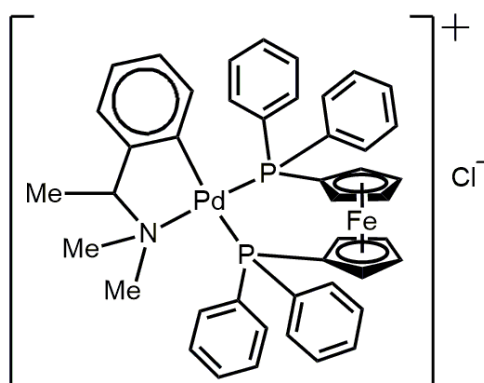


Figura 19 – Representação estrutural do ciclopaladado iônico $[Pd(C^2,N-S(-)-dmpa)(dppf)]Cl^-$ – Biphosphinic Palladacycle Complex (BPC). Adaptado de (BECHARA et al., 2014).

Em vista dos excelentes resultados *in vitro*, os autores continuaram a investigação da ação citotóxica do complexo BPC através de ensaios *in vivo*. O estudo foi realizado aplicando células tumorais metastáticas resistentes (B16F10-Nex2), em camundongos, juntamente com o complexo BPC (8 mg/kg/dia), por 10 dias. Após o determinado período, os pulmões dos camundongos foram analisados revelando que o grupo tratado com BPC apresentava significativamente menos colônias metastáticas que o grupo não tratado com o complexo (**Figura 20**), indicando assim que o composto tem não somente potente ação *in vitro* mas também *in vivo*.

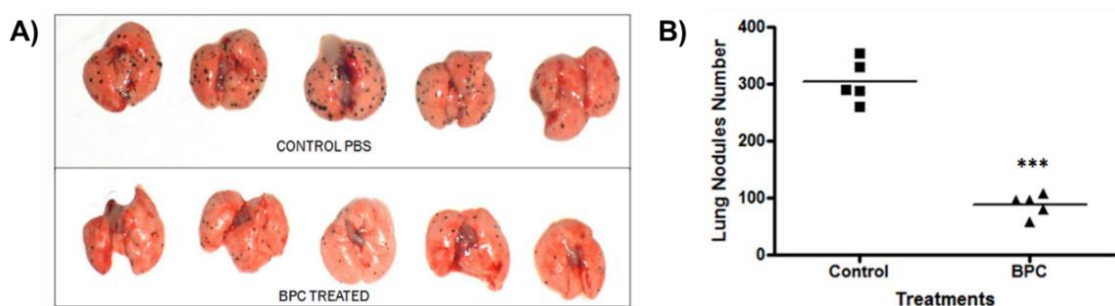


Figura 20 – A) Fotografias de pulmões mostrando as colônias metastáticas no grupo controle não tratado (acima) e no grupo controle tratado com BPC (abaixo). B) Quantificação de nódulos metastáticos pulmonares contados em microscópio invertido. Adaptado de (BECHARA et al., 2014).

Em outro exemplo mais recente apresentado por nosso grupo (DA CUNHA et al., 2020) uma série de quatro complexos derivados do ligante N,N-dimetil-benzilamina (dmmba), contendo 2,6-lutidina como ligante auxiliar, (**Figura 21**) foram sintetizados e tiveram sua ação antitumoral testada frente as linhagens de carcinoma mamário (4T1), melanoma (B16F10-Nex2), melanoma humano (A2058, SK-MEL-110 e SK-MEL-5) e fibroblasto normal pulmonar (MRC-5).

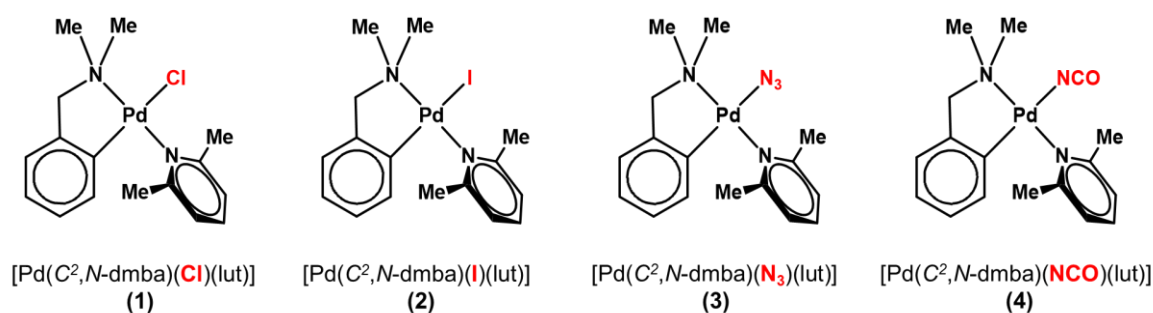


Figura 21 – Estrutura dos complexos derivados do ligante N,N-dimetil-benzilamina (dmmba).

De maneira geral, os complexos exibiram níveis comparáveis de atividade citotóxica contra todas as linhagens de células testadas, indicando que a natureza do ligante aniônico não desempenhou um papel significativo na atividade observada. Por outro lado, todos os complexos apresentaram valores de IC_{50} da ordem de 0,3-8,0 μM frente a todas as linhagens tumorais, enquanto a cisplatina (fármaco de referência) apresentou valores da ordem de 23-100 μM frente as mesmas linhagens, demonstrando a potente ação citotóxica dos complexos ciclopaladados.

Estudos adicionais por morte celular induzida apontaram ainda que parte da atividade citotóxica dos complexos pode estar relacionada a danos a mitocôndria, como já evidenciado para outros complexos ciclopaladados (GIGLI et al., 2016).

1.6 Os ligantes auxiliares

A introdução de outros grupos funcionais no arcabouço molecular de complexos metálicos pode contribuir ainda mais nas propriedades biológicas, termodinâmicas e cinéticas dessas substâncias.

As fosfinas, por exemplo, tem sido uma alternativa no design de novos compostos. São moléculas que apresentam propriedades interessantes, sendo extremamente versáteis na sua capacidade de estabilização de metais em estados de oxidação variados, possuem efeito trans razoavelmente acentuado, levando a complexos facilmente dissociáveis capazes de gerar sítios vagos de coordenação além de permitirem a alteração nos substituintes -R em compostos do tipo PR_3 (R= alquila, halogênios, etc), alterando de forma significativa a habilidade da fosfina no que diz respeito a atividade, seletividade e estabilidade de sistemas catalíticos (NAWAZ; WASEEM; MUHAMMAD, 2017; QUEIROZ; BATISTA, 1996).

A estabilidade conferida aos complexos se deve em parte a capacidade das fosfinas de formar ligações σ estáveis com metais, devido ao par de elétrons apreciavelmente básico e nucleofílico do fósforo. Ele também possui orbitais p vazios que podem se sobrepor a orbitais d preenchidos de íons metálicos e, portanto, se comportar como π aceptores. Neste tipo de ligação, a densidade eletrônica é compartilhada entre o ligante e o metal, originando ligações mais estáveis (**Figura 22**) (HOUSECROFT; SHARPE, 2012; SHRIVER et al., 2014; VALLE et al., 2008).

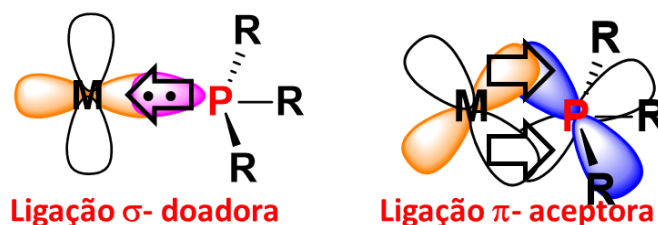


Figura 22 – Representação dos tipos de ligação formadas entre metal e o fósforo nas fosfinas. Seta indica o sentido de doação da densidade eletrônica.

O impedimento estérico fornecido pelas fosfinas é outro fator que tem grande impacto nas características termodinâmicas e cinéticas de complexos metálicos. Tolman (TOLMAN, 1977) foi o responsável por quantificar esse efeito definindo o que hoje é conhecido como *ângulo de cone de Tolman*. Aumentando-se o tamanho do substituinte R em compostos do tipo $-PR_3$ é possível aumentar o ângulo formado entre R-P-R e, conseqüentemente, o ângulo entre o metal-fósforo (**Figura 23**) (CRABTREE, 2014; HOUSECROFT; SHARPE, 2012).

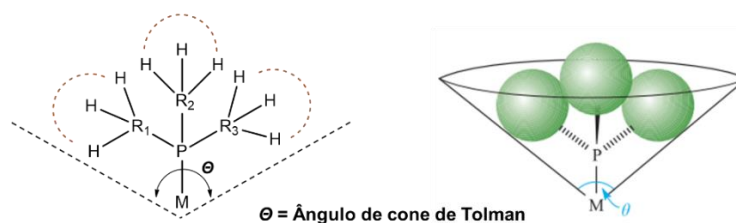


Figura 23 – Representação do ângulo de cone de Tolman. Adaptado de (HOUSECROFT; SHARPE, 2012).

A variação nos efeitos eletrônicos e estéricos em $-PR_3$ podem alterar significativamente as reatividades de complexos em uma série em que a única variante é o ligante fosfínico. Grupos mais volumosos, por exemplo, tendem a aumentar o ângulo de cone, e, portanto, causar um maior impedimento estérico no respectivo complexo metálico, dificultando reações de substituição. Tal característica pode favorecer a manutenção da estrutura planejada do complexo em meio biológico, uma vez que reações de substituição serão mais difíceis de ocorrer ou ocorrerão em um tempo maior.

Em um trabalho apresentado em 2016 por Rocha e colaboradores (ROCHA et al., 2016), foi demonstrado que a presença do ligante N,S-doador e trifenilfosfina resultou na formação de complexos ativos. Neste trabalho, uma série de quatro complexos catiônicos fosfínicos de Pd(II) contendo 4-metil-3-tiossemicarbazida como ligante foram sintetizados e comparados com uma série análoga preparada anteriormente contendo 4-fenil-3-tiossemicarbazida (**Figura 24**).

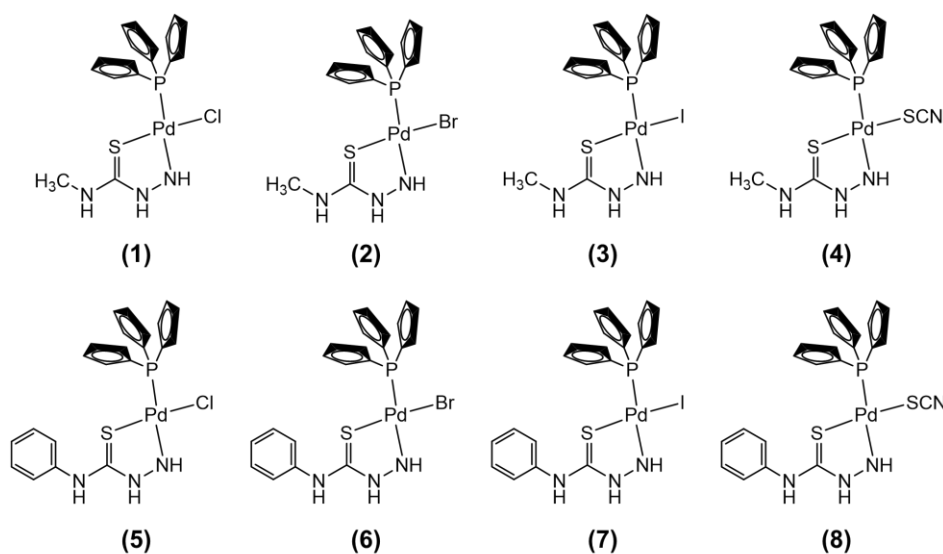


Figura 24 – Complexos apresentados no trabalho de Rocha e colaboradores (1-4) e série análoga preparada anteriormente (5-8) (ROCHA et al., 2016).

A série apresentada no trabalho teve sua atividade inibitória testada frente a linhagens celulares tumorais murino de pulmão (LP07), mama (LM3) e adenocarcinoma mamário (MCF-7). O ligante livre não apresentou valores expressivos de atividade ($>100\ \mu\text{M}$) para as três linhagens testadas sendo, portanto, considerado inativo. Os complexos, por outro lado, apresentaram baixos valores de IC_{50} da ordem $3,22\text{--}6,05\ \mu\text{M}$ para LM3, sendo até quase dez vezes mais ativo que a cisplatina na mesma linhagem ($30,3\ \mu\text{M}$). Para as linhagens LP07 e MCF-7, a tendência se mantém e baixos valores também são observados, sendo eles na faixa de $4,69\text{--}6,98\ \mu\text{M}$ e $8,78\text{--}10,63\ \mu\text{M}$, respectivamente.

Em vista da boa atividade inibitória apresentada, ensaios adicionais para investigação sobre o mecanismo de ação dos complexos foram realizados. A série foi submetida a experimentos de eletroforese para avaliar a sua capacidade em alterar a mobilidade do DNA superenrolado. Todos os complexos foram capazes de alterar sua mobilidade, no entanto, somente em altas concentrações ($100\ \mu\text{M}$), sugerindo que o mecanismo de ação deve estar associado a outro alvo. Ensaio de inibição com topoisomerase II α , por outro lado, apresentaram resultados bem mais promissores, principalmente para os complexos 3, 6, 7 e 8, que inibiram totalmente a enzima numa concentração de $5\ \mu\text{M}$ (ROCHA et al., 2016).

Além das fosfinas, outra alternativa promissora no que diz respeito a ligantes auxiliares seria a introdução de compostos aromáticos N doadores, como piridinas e dimetilpiridinas (lutidinas) (**Figura 25**) (SHIMIZU et al., 2000).

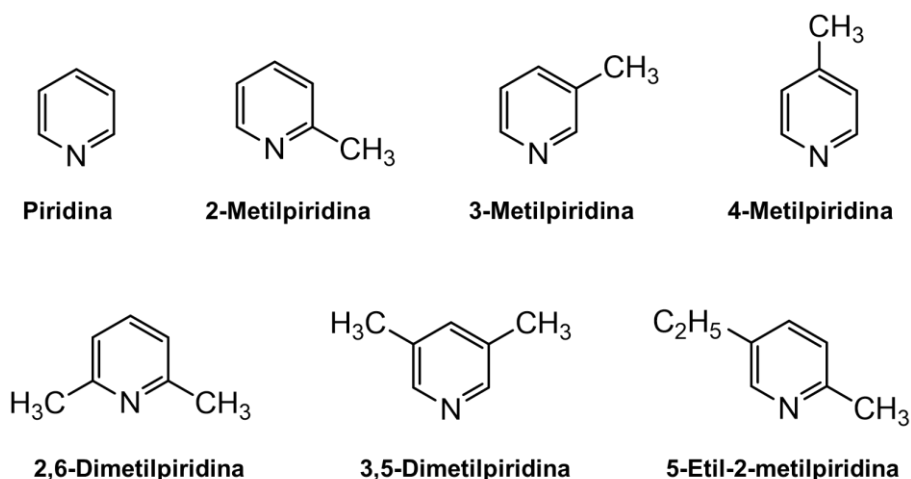


Figura 25 - Estrutura molecular de algumas piridinas.

As piridinas são compostos heterocíclicos formados por um anel aromático acompanhado de um átomo de nitrogênio. Similar ao benzeno, todos os átomos do anel possuem hibridização sp^2 . No entanto, o átomo de nitrogênio utiliza seu orbital p não hibridizado para formação da ressonância de elétrons π do anel aromático enquanto seu par de elétrons isolado se encontra em um orbital sp^2 direcionado no mesmo plano para fora do anel, não fazendo parte da ressonância. O par isolado pode ser utilizado pelo nitrogênio em diversas reações químicas como base de Lewis para formar ligação coordenada com ácidos de Lewis, por exemplo (PAL, 2018).

A ligação das piridinas com os metais envolve uma ligação σ , pela sobreposição do orbital sp^2 do heteroátomo com um orbital hibridizado do metal. A extensão dessa sobreposição é maior na primeira série de transição em comparação a segunda e terceira série, uma vez que as diferenças de energia e tamanho dos orbitais se torna maior. Além disso, assim como nas fosfinas, as piridinas podem receber densidade eletrônica dos metais por retrodoação, porém por meio de orbitais π^* do anel aromático (**Figura 26**) (PAL, 2018).

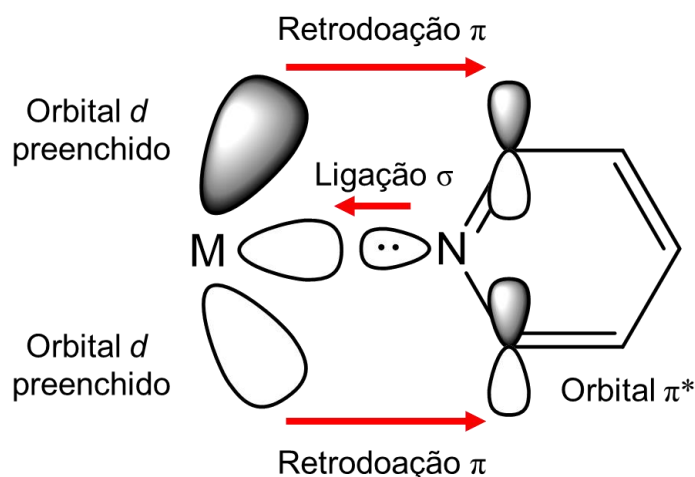


Figura 26 – Modo de coordenação da piridina com metais de transição.

Adicionalmente, as piridinas podem ainda estabelecer interações do tipo π - π *stacking*, além de interações de hidrogênio, o que pode favorecer a interação com diversos sítios biológicos. Outra característica relevante a ser apontada é o fato de que diferentes substituintes presentes na estrutura das piridinas podem causar efeitos estéricos semelhantes ao já descrito para as fosfinas,

aumentando a estabilidade de complexos metálicos frente a reações de substituição.

Além do potencial capacidade de coordenação com metais, essas moléculas aromáticas ainda apresentam variadas aplicações biológicas sendo empregadas como agentes anti-inflamatórios, antioxidantes, antivirais, antimaláricos, analgésicos, antitumorais e entre outras, tornando seu uso no design complexos com potencial aplicação biológica bastante promissor. (ALTAF et al., 2015).

Segundo Edwards e colaboradores (EDWARDS et al., 2005) por exemplo, a presença de ligantes derivados de piridina α -substituídas, como a 2,6-dimetilpiridina (2,6-lutidina), em complexos de paládio(II), levou a um aumento na atividade citotóxica frente a linhagens tumorais L1210 (leucemia) quando comparados a complexos análogos contendo derivados de piridina não substituídos (**Figura 27**).

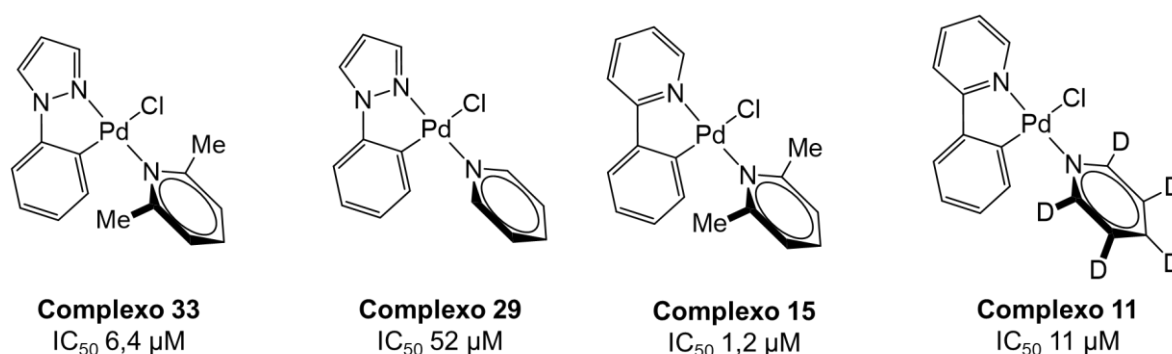


Figura 27 – Comparação entre complexos contendo derivados de piridina e sua ação citotóxica frente a linhagem L1210 (IC₅₀). Adaptado de (EDWARDS et al., 2005).

De acordo com os autores, o mecanismo de ação dessa classe de compostos ainda não é conhecida, mas a baixa atividade da 2,6-lutidina (IC₅₀ > 200 μ M) é um indicativo de que a atividade biológica observada para os complexos não se deve ao ligante monodentado. De fato, a boa atividade citotóxica parece estar relacionada à manutenção do ligante coordenado ao metal. A introdução de substituintes α à piridina provocam um impedimento estérico em torno do metal e as interações entre os grupos α -metil e o ligante bidentado fariam com que o ligante monodentado ficasse aproximadamente ortogonal ao plano de coordenação do metal. Esses substituintes α -metil

impediriam a formação de um intermediário bipiramidal trigonal e, portanto, impediriam a substituição por um mecanismo associativo.

A escolha adequada de ligantes pode ter um papel crucial na atividade de compostos metálicos não somente por modularem suas características eletrônicas e estéricas, mas também por alterarem a maneira como essas substâncias interagem no meio biológico.

2 HIPÓTESE

2.1 Complexos pirazólicos

Os complexos de Pd(II) contendo tiocarbamoilpirazóis do tipo $[PdX_2(tdmPz)]$ são ativos frente a uma série de linhagens tumorais como já observado em resultados anteriores de nosso grupo (BARRA et al., 2013). Entretanto, esses compostos interagem covalentemente com o DNA, o que resulta em uma baixa seletividade dos mesmos. Nesse sentido, uma das propostas do trabalho seria a incorporação um ligante volumoso no arcabouço molecular desses complexos (**Figura 28**), como a trifenilfosfina, visando assim reduzir sua reatividade frente ao DNA. Além disso, pretende-se analisar se a incorporação desse ligante volumoso resulta em um aumento da atividade citotóxica nas séries de complexos propostas.

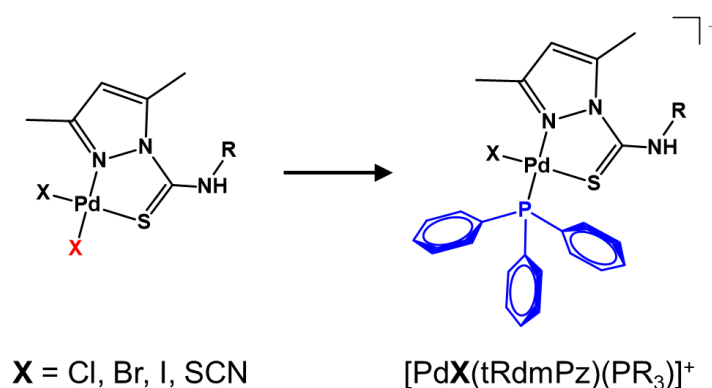


Figura 28 – Avanço da série de complexos planejadas para o desenvolvimento do projeto.

2.2 Complexos ciclopaladados

Em um trabalho anterior já reportado por nosso grupo (DA CUNHA et al., 2020), complexos ciclopaladados derivados da benzilamina, N,N-dimetil-benzilamina (dmmba), mostraram um promissor atividade citotóxica com valores de IC_{50} da ordem de 0,3-8,0 μM para diferentes linhagens tumorais, enquanto a cisplatina (fármaco de referência) apresentou valores da ordem de 23-100 μM . Apesar dos bons resultados *in vitro*, os complexos mostraram pouca interação com alvos como DNA e Catepsinas B e L, dificultando o mapeamento de seu mecanismo de ação. Dessa forma, uma proposta de trabalho seria a substituição do ligante N,N-dimetil-benzilamina (dmmba) por N,N-dimetil-1-feniletilamina

(dmpa), mantendo o ligante auxiliar 2,6-lutidina e os haletos/pseudohaletos (Cl^- , N_3^-) já incorporados anteriormente (**Figura 29**). Espera-se que os complexos mantenham a boa atividade biológica já observada para a série anterior, visto a semelhança entre os ligantes. Ademais, pretende-se analisar também o efeito que o aumento da estrutura do ligante pode causar na interação com alvos biológicos como DNA e albumina (HSA).

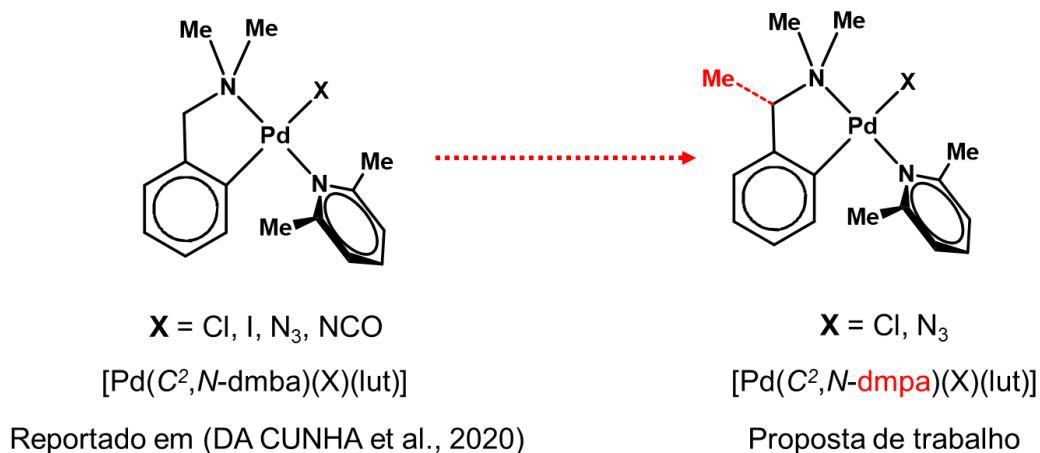


Figura 29 – Complexos ciclopaladados propostos para desenvolvimento do projeto.

3 OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo geral a síntese, caracterização e o estudo do potencial antitumoral de complexos de paládio(II).

3.1 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar complexos de paládio(II) contendo ligantes pirazólicos, de fórmula $[PdCl(L_n)(PPh_3)]$, $\{L_1 = 3,5\text{-dimetilpirazol-1-iminotiolato (R1)}; L_2 = 3,5\text{-dimetilpirazol-N-metil-1-iminotiolato (R2)}; L_3 = 3,5\text{-dimetilpirazol-N-fenil-1-iminotiolato (R3)}; \text{ e } PPh_3 = \text{trifenilfosfina}.$
- Sintetizar e caracterizar complexos ciclopaladados derivados da N,N-dimetil-1-feniletilamina (dmpa), de fórmula $[Pd(C^2,N\text{-dmpa})(X)(lut)]$ $\{X = Cl^- \text{ (RZ1)} \text{ ou } NNN^- \text{ (RZ2)}\}$, dmpa = N,N-dimetil-1-feniletilamina, lut = 2,6-Lutidina.
- Avaliar o comportamento dos complexos em solução por meio de técnicas como RMN ^{31}P , condutividade molar e espectroscopia de absorção na região do UV-Vis.
- Avaliar a atividade citotóxica dos complexos de paládio(II) derivados de pirazóis (**R1-R3**), *in vitro*, frente as linhagens celulares MCF-7 (tumoral de mama) e MRC-5 (fibroblasto normal de pulmão).
- Avaliar a interação dos complexos ciclopaladados (**RZ1-RZ2**) com a albumina de soro humano (HSA) por meio de técnicas espectroscópicas (Dicroísmo Circular, Fluorescência e UV-Vis) e por estudos *in silico* por ancoragem molecular
- Avaliar a interação dos complexos pirazólicos (**R1-R3**) com as enzimas Topoisomerases II α e catepsinas B/L.
- Avaliar a interação de todos complexos com o DNA por meio de técnicas espectroscópicas (Dicroísmo Circular, Fluorescência e UV-Vis).

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes

Todos os solventes e reagentes foram adquiridos comercialmente e usados sem purificação adicional, salvo indicação.

4.2 Síntese dos ligantes e complexos de paládio(II)

4.2.1 Síntese do ligante 3,5-dimetilpirazol-1-iminotiolato (**HTPz**)

Em um erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 1,0000 g (10,9 mmols) de tiossemicarbazida ($\text{CN}_3\text{H}_5\text{S}$) dissolvida em uma mistura de 50 mL de água destilada e 0,20 mL de HCl, em seguida um volume de 1,0 mL (9,48 mmols) de 2,4-pentanodiona (**Figura 30**). A agitação magnética foi mantida durante 6 h. A suspensão foi filtrada e o precipitado branco foi lavado com água gelada e seco a temperatura ambiente. Rendimento(%): 70-90% (KOVÁCS et al., 2005; ROCHA et al., 2010).

4.2.2 Síntese do ligante 3,5-dimetilpirazol-N-metil-1-iminotiolato (**MTPz**)

Em um erlenmeyer de 125 mL de capacidade contendo 300,6 mg (2,858 mmol) de 4-metil-3-tiossemicarbazida ($\text{C}_2\text{H}_7\text{N}_3\text{S}$) dissolvido em uma mistura de 40,0 mL de água destilada e aproximadamente 0,02 mL de HCl concentrado foi adicionado um volume de 3,00 mL (2,906 mmol) de solução de volume 1:9 de 2,4-pentadiona e álcool etílico (9,688 mmol/mL) (**Figura 30**). A adição do reagente conduziu a formação de uma solução leitosa, que desapareceu em poucos minutos dando lugar a uma fase oleosa. A agitação magnética foi mantida por 20 horas, obtendo-se uma fase oleosa amarelo esverdeada pouco viscosa, sendo esta purificada via extração fracionada em uma solução de pentano e água seguida de sucessivas lavagens. O produto foi seco em dessecador por 4 horas sob vácuo. Rendimento (%): 70-90%.

4.2.3 Síntese do ligante 3,5-dimetilpirazol-N-fenil-1-iminotiolato (**FTPz**)

Em um erlenmeyer de 50 mL de capacidade contendo 201,8 mg (1,207 mmol) de 4-fenil-3-tiossemicarbazida ($\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_3\text{S}$) dissolvido em 20 mL de álcool

etílico foi adicionado um volume de 2,00 mL de uma solução etanólica contendo 1,356 mmol de 2,4-pentadiona (**Figura 30**). A agitação magnética foi mantida por 15 horas, sendo que após este período o solvente foi totalmente evaporado em rotaevaporador, obtendo-se uma fase oleosa viscosa de cor amarelo claro. O sistema foi centrifugado e o sobrenadante recolhido para evaporação do solvente e guardado em geladeira. Rendimento (%) 90-95%.

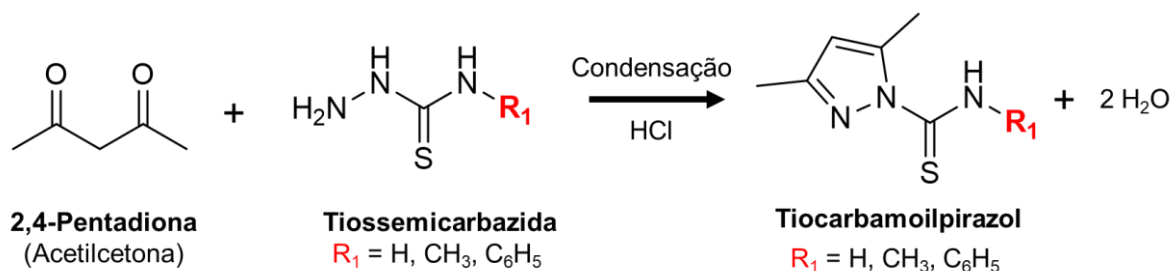


Figura 30 – Esquema geral de reação para a obtenção de tiocarbamoilpirazóis.

4.2.4 Síntese dos complexos pirazólicos [PdCl(XTPz)(PPh₃)] (**R1-R3**)

Em um erlenmeyer de 25 mL foram solubilizados em volume de 7,0 mL de clorofórmio, 0,385 mmol do precursor [PdCl₂(MeCN)₂]. Posteriormente, foram adicionados, juntamente em um único recipiente, gota a gota lentamente, 0,385 mmol do ligante pirazól correspondente (XTPz) e 0,385 mmol de trifenilfosfina solubilizados em 3 ml de uma solução de clorofórmio e metanol (1:2). A solução foi mantida em agitação por 2h obtendo-se uma solução amarelo alaranjada contendo pouco precipitado. O sólido foi filtrado, lavado com 10 ml de água e seu solvente filtrado quase totalmente evaporado em rotaevaporador. Um sólido amorfo foi obtido após a secagem do solvente e adição de pentano ao sistema (MOURA, 2016). Os sólidos obtidos foram filtrados em funil de buchner e secos em dessecador por 4 horas (**Figura 31**). Rendimento (%) 80-85%.

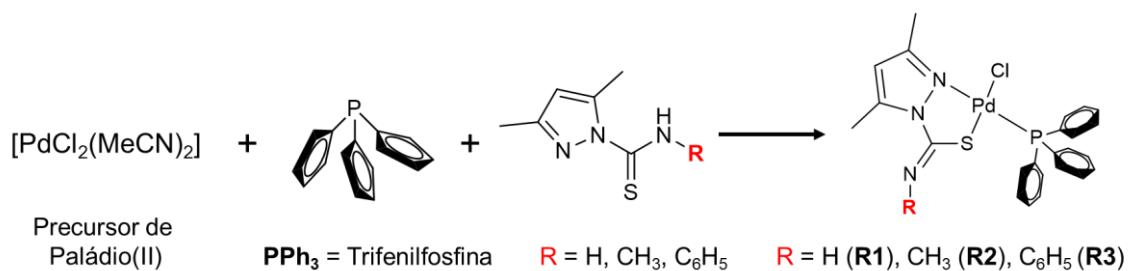


Figura 31 – Esquema geral de reação para a obtenção dos complexos pirazólicos de paládio(II).

4.2.5 Síntese do Precursor $[\text{Pd}(\text{C}^2, N\text{-dmpa})(\mu\text{-Cl})]_2$

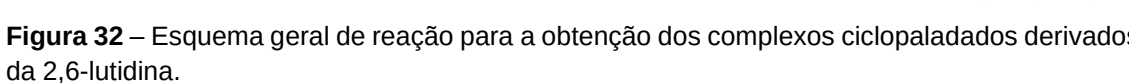
Em um béquer de 500 mL cerca de 1 g de PdCl_2 (6 mmol) foi suspensa em 100 mL de metanol. A esta suspensão foi adicionado, gota a gota, uma solução de 0,5 mg de LiCl (11 mmol) em 50 mL de metanol. A mistura permaneceu sob agitação e aquecimento entre 70-80 °C durante 45 min. Neste primeiro momento da síntese o volume de metanol foi reduzido à metade e adicionou-se mais 75 mL de metanol, o qual permaneceu sob agitação e aquecimento por mais 30 min. Posteriormente a solução, de coloração castanho escura, foi filtrada a quente em um béquer de 250 mL, no qual adicionou-se lentamente 960 μL de N,N-dimetil-1-feniletilamina (5,64 mmol) dissolvidos em 10 mL de metanol. Houve formação de um precipitado amarelo, o qual permaneceu sob agitação durante 15 min. Após o determinado período, iniciou-se a adição lenta de 1 mL de trietilamina dissolvida em 5 mL de metanol. Com o término de adição dessa base, a mistura reacional permaneceu mais 30 min em agitação. O precipitado amarelo foi filtrado, lavado com metanol e éter e seco sob vácuo. Rendimento (%): 71% (CUNHA, 2017).

4.2.6 Síntese do Precursor $[\text{Pd}(\text{C}^2, N\text{-dmpa})(\mu\text{-N}_3)]_2$

Em 0,1000 g (0,2 mmol) de $[\text{Pd}(\text{C}^2, N\text{-dmpa})(\mu\text{-Cl})]_2$ dissolvidos em 10 mL de acetona, foi adicionado gota a gota a massa correspondente a 0,4 mmol do sal de NaN_3 solubilizado em 5 mL de metanol e 1 mL de água, originando uma solução amarela clara/alaranjada. O meio reacional permaneceu sob agitação magnética a temperatura ambiente por 1 h. A solução resultante foi evaporada (até quase seca) e o sólido foi ressolubilizado em clorofórmio (5 mL) e filtrado. Esta solução foi evaporada lentamente a temperatura ambiente, formando sólidos cristalinos. Rendimento (%) 60-80%.

4.2.7 Síntese dos Ciclopaladados $[\text{Pd}(\text{C}^2, N\text{-dmpa})(\text{X})(\text{lut})]$ (**RZ1-RZ2**)

Às soluções preparadas com 0,085 mmol dos precursores $[\text{Pd}(\text{C}^2, N'\text{-dmpa})(\mu\text{-X})]_2$, X = Cl; N_3 , respectivamente, solubilizados em 5 mL de acetona adicionou-se o correspondente a 0,17 mmol do ligante 2,6-lutidina (107,153 g/mol e densidade 0,9252 g/mL) dissolvido em 5 mL de acetona, originando



Foram utilizadas soluções de DMSO-d₆/CDCl₃ para dissolução das amostras. Os deslocamentos químicos obtidos foram referenciados pelos solventes. O Software utilizado para aquisição foi o TopSpin v.3.2.

4.3.4 Espectroscopia de absorção UV-Vis

Os espectros eletrônicos foram obtidos no espectrômetro Thermo Scientific Evolution Array UV-Vis, com varredura de 190 a 1100 nm, 10 scans por amostra. Os espectros foram adquiridos no software Vision Collect.

4.3.5 Espectrometria de Massas (MS)

Para os complexos ciclopaladados, os espectros de massas foram adquiridos através do espectrômetro modelo Amazon Speed ETD - Bruker pertencente à Central Analítica do Instituto de Química da USP - São Paulo. Os espectros foram obtidos em modo positivo de ionização, dissolvidos em acetonitrila (ACN) e diluídos em metanol (MeOH). Já para os complexos pirazólicos, os espectros de massas foram adquiridos através do espectrômetro modelo 3200 QTRAP LC/MS/MS contendo analisador híbrido triplo quadrupolo/armadilha de íons linear (LIT), localizado no IQ-UNESP de Araraquara. A análise foi realizada por infusão direta MS/MS utilizando-se acetonitrila padrão LC-MS como solvente no modo positivo de ionização por electrospray.

4.3.6 Comportamento em solução

Os ensaios de estabilidade química em solução aquosa foram realizados por RMN ³¹P, condutividade molar (**R1-R3**), RMN ¹H e espectroscopia de absorção na região do UV-Vis (**RZ1-RZ2**). As soluções para os experimentos de ressonância foram preparadas dissolvendo os complexos em uma solução de DMSO-d₆ (**R1-R3**) / DMSO-d₆: D₂O 70:30% (**RZ1-RZ2**). Os espectros foram obtidos imediatamente após a preparação das soluções e então após 12, 24, 48 e 72h (FAGHIH et al., 2018; GONÇALVES et al., 2017; MATESANZ et al., 2018).

Para a condutividade foram preparadas soluções dissolvendo os complexos em DMSO (**R1-R3**) com concentração de 1x10⁻³ mol L⁻¹. Os

experimentos de condutividade foram registrados de hora em hora nas primeiras 3h, após o preparo das amostras, e em seguida após 6, 12, 24 e 48h.

Os experimentos de absorção na região do UV-Vis foram realizados dissolvendo os complexos (**RZ1-RZ2**) em DMSO de modo a obter soluções de concentração 2 mM. As cubetas utilizadas nas leituras foram preparadas com a adição de DMSO/tampão Tris-HCl (5 mM tris-HCl + 50 mM de NaCl pH 7,3) de modo a se obter uma proporção solvente orgânico/tampão de 70:30 (60 µL do Complexo + 2040 µL DMSO + 900 µL de tampão). O branco foi preparado simplesmente com a adição do solvente orgânico e tampão (2100 µL DMSO + 900 µL de tampão). As leituras por UV-Vis foram realizadas na região de 250-800 nm, com os complexos na concentração de 4×10^{-5} M, nos períodos de 0, 24 e 48h (FUENTES et al., 2020).

4.4 Ensaios de atividade antiproliferativa

A atividade antiproliferativa foi avaliada frente a linhagens celulares MCF-7 (adenocarcinoma mamário) e MRC-5 (fibroblasto normal pulmão) somente para os complexos pirazólicos (**R1-R3**). Os ensaios foram realizados no instituto de Química da UNESP de Araraquara, no laboratório de ensaio celular do grupo de Química de Coordenação e Organometálicos, pela Dra. Débora Eduarda Soares Silva.

As células foram descongeladas e cultivadas em meio DMEM (Vitrocell®) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e acrescido de sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L), incubadas à 37°C com 5% de CO₂ até atingir a confluência celular. Após a confluência celular as células foram retiradas por tripsinização, com posterior contagem. Uma concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mL foram semeadas em microplacas de 96 poços, com volume final de 100 µL (aproximadamente $2,5 \times 10^4$ células), e incubadas por 24h à 37°C com 5% CO₂ para permitir a adesão celular. As células foram então expostas aos compostos em diferentes concentrações por 48h. Após o período de tratamento foram adicionados 50 µL de uma solução de MTT 1 mg/mL em PBS, e depois de 3h o conteúdo da placa foi removido e 100 µL de álcool isopropílico adicionado a cada orifício para solubilizar os cristais formados. A leitura da absorbância foi realizada no leitor ELISA Stat Fax 4200. O valor de IC₅₀ foi

determinado utilizando as curvas de dose-resposta no GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

4.5 Ensaios envolvendo alvos biológicos

4.5.1 Ensaios de interação com DNA

A solução de ct-DNA (calf-thymus), utilizada nos experimentos foi preparada pela adição aproximada de 10 mg da biomolécula (proveniente da Sigma-Aldrich) em 5 ml de uma solução de tampão Tris-HCl (5mM Tris HCl e 50 mM de NaCl, pH 7,3). A razão entre as absorbâncias das bandas em 260 e 280 nm resultaram em um valor de 1,85, indicando que a solução estava corretamente livre de proteínas. A concentração de DNA na solução foi determinada espectrofotometricamente usando o coeficiente de absorvidade molar de $6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ da banda em 260 nm (JOKSIMOVIĆ et al., 2019).

4.5.1.1 Titulação espectrofotométrica

Espectros de UV-Vis foram obtidos em um espectrofotômetro Lambda 1050 da Perkin Elmer, na região de 230 a 700 nm, para os complexos na presença de quantidades crescentes de ct-DNA, em tampão Tris-HCl (pH 7,4). A titulação foi realizada a 25 °C mantendo a concentração do complexo fixa em $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, enquanto a concentração do ct-DNA foi variada de 0 até $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (SAKTHIKUMAR et al., 2018; SALEHZADEH et al., 2019; VILLARREAL et al., 2017).

Partindo de uma solução estoque do complexo de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparado em DMSO, foram adicionados 60 µL do composto em 2940 µL de tampão tris-HCl (pH 7,4) em uma cubeta de quartzo de 3 mL. Uma segunda cubeta para o branco foi preparada com 60 µL de DMSO e 2940 µL de tampão tris-HCl (pH 7,4). Após a primeira leitura do complexo livre da presença de DNA, foram adicionados 18 µL de uma solução estoque fresca de DNA $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, tanto na cubeta contendo o complexo como no branco.

Adições sucessivas de 18 µL da solução de DNA (branco e complexo) foram realizadas de modo a se obter uma proporção molar complexo:DNA de 0 a 3,0.

A afinidade entre os complexos preparados e o DNA foi avaliada pela constante de ligação (K_b) obtida através da equação de Wolfe-Shimer (WOLFE et al., 1987) na seguinte forma:

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)}$$

Onde $[\text{DNA}]$ é a concentração da biomolécula, ϵ_a é o coeficiente de absorvidade molar do complexo formado pelo composto metálico-DNA, em uma dada concentração de DNA aplicada, sendo calculado pela relação $A_{\text{obs}}/[\text{complexo}]$. O termo ϵ_f é o coeficiente de absorvidade molar do composto livre sem a presença da biomolécula e ϵ_b o coeficiente de absorvidade molar do composto totalmente ligado ao DNA.

O valor da constante (K_b) foi calculado através da razão entre o coeficiente angular e linear obtidos a partir de um gráfico de $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs $[\text{DNA}]$.

4.5.1.2 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

Espectros de CD foram obtidos para amostras de DNA na presença de quantidades crescentes de complexo (**R1-R3** e **RZ1-RZ2**). As medidas foram registradas em um espectropolarímetro J-815 da JASCO, utilizando cubeta de quartzo de 3 mL, na faixa 235 a 320 nm, com acumulação de 4 scans, largura de banda de 1,0 nm, velocidade de 100 nm/min e temperatura de 25 °C (VILLARREAL et al., 2017). A concentração de DNA foi mantida fixa em 5×10^{-5} mol L⁻¹ enquanto a concentração de complexo foi variada de 0 a 2×10^{-5} mol L⁻¹.

Inicialmente, 20 mL de solução de DNA 5×10^{-5} mol L⁻¹ em tampão tris-HCl (pH 7,3) foi preparada e distribuída igualmente em seis tubos de ensaio. Adições crescentes de composto em estudo foram feitas, partindo-se de uma solução fresca em concentração de 1×10^{-3} mol L⁻¹ em DMSO, de modo a obter razões

molares de complexo/DNA na ordem de 0 a 0,4. As amostras foram incubadas a 37 °C por 24h e após o período as leituras foram realizadas.

4.5.1.3 Ensaio de competição com Hoechst 33258

O estudo de competição dos complexos com Hoechst 33258 foi realizado por meio da supressão de fluorescência que o corante apresenta ao se interagir com DNA. As leituras foram realizadas em um espectropolarímetro J-815 da JASCO com detector de fluorescência, em cubeta de quartzo, com excitação em 338 nm, numa faixa de 360 a 660 nm, largura de banda de 5,0 nm, acumulação de 1 scan e temperatura de 25 °C. As concentrações de DNA e Hoechst 33258 foram mantidas fixas em 6×10^{-5} mol L⁻¹ e 6×10^{-6} mol L⁻¹, respectivamente, enquanto a concentração do complexo foi variada de 0 até $5,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (INCI et al., 2018). Um período de repouso de 5 min foi mantido entre cada adição antes da realização da leitura de fluorescência.

A fim de determinar quantitativamente a magnitude de interação entre os complexos e o DNA, a equação de Stern-Volmer foi usada:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q]$$

Onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência do aduto Hoechst-DNA antes e após a adição dos complexos, respectivamente. A constante K_{sv} é a constante de extinção de Stern-Volmer e $[Q]$ é a concentração do complexo em questão.

4.5.2 Interação com Albumina de Soro Humano (HSA)

4.5.2.1 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

Os espectros de Dicroísmo Circular (CD) da solução de albumina do soro humano (HSA – $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) foram registrados na ausência e presença de complexo (**R22**) ($0-2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) usando um espectropolarímetro JASCO J-815, na região entre 260 a 195 nm, com scan rate de 100 nm/min, 8

acumulações, à temperatura ambiente. Foi utilizada uma cubeta de quartzo com óptico de 0,1 cm.

4.5.2.2 Ensaio de Fluorescência

Os espectros de emissão foram registrados em um acessório de fluorescência do espectropolarímetro JASCO J-815, na faixa de 300-550 nm, com largura de fenda 5nm, comprimento de onda de excitação de 280 nm (referente à emissão de fluorescência dos resíduos de aminoácidos triptofano e tirosina) nas temperaturas 298 e 310 K. Foi utilizado uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm, com 3 mL de solução de albumina do soro humano (HSA) ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹), em tampão Tris-HCl (pH 7,3), a qual foi titulada em concentrações variáveis do complexo ciclopaladado (**RZ2**) ($1,0 \times 10^{-6}$ – $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹), preparado em DMSO. O efeito do filtro interno na intensidade de fluorescência foi corrigido usando a seguinte equação:

$$F_{\text{Corr}} = F_{\text{Obs}} e^{\frac{A_{\text{em}} + A_{\text{ex}}}{2}}$$

Onde F_{corr} é a intensidade de fluorescência corrigida, F_{obs} é a intensidade da fluorescência observada, A_{em} é o valor de absorbância do complexo no comprimento de onda de emissão e A_{ex} o valor de absorbância do complexo no comprimento de onda de excitação (LAKOWICZ, 2006).

4.5.2.3 Ensaio de competição com Varfarina

Afim de investigar o possível sítio de interação do complexo ciclopaladado **RZ2** na estrutura da albumina (HSA), foi utilizado o fármaco varfarina, um marcador específico do subdomínio IIA da proteína.

Os espectros de emissão da varfarina de uma mistura binária (varfarina e HSA) e de uma mistura ternária (varfarina, HSA e complexo), em igual concentração ($1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, em tampão fosfato, pH 7,3), foram registrados usando um espectrofluorímetro Horiba Jobin Yvon modelo Fluorolog-3 FL3-122, na região de 350-590 nm e comprimento de onda de excitação de 330 nm em relação à varfarina.

4.5.3 Interação com Topoisomerase II α : Ensaio de relaxação

O kit de topoisomerase II humana foi obtido da Inspiralis, Norwich, Reino Unido. O ensaio foi realizado no Departamento de Química da universidade federal de São Carlos (UFScar), pelo grupo de Compostos de Coordenação na Química Medicinal - CCQM. A mistura da reação (30 μ L) continha 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH 7,9), 50 mmol L⁻¹ NaCl, 50 mmol L⁻¹ KCl, 5,0, mmol L⁻¹ MgCl₂, 0,1 mmol L⁻¹ Na₂H₂EDTA, 15 mg mL⁻¹ BSA, 1,0 mmol L⁻¹ ATP, 500 ng pBR322 DNA, e 4,0 nmol L⁻¹ Topo II α , com duas concentrações diferentes do complexo em estudo (**R2-R2***). A mistura de reação foi incubada a 37 °C por 1 hora, sendo, após o período, terminada pela adição de 3 μ L de SDS, 15 μ L de de STEB e 60 μ L de clorofórmio: A mistura de álcool isoamílico (24:1 v/v) foi centrifugada e analisada. As amostras foram submetidas a eletroforese a 30 V por 12 horas. O gel foi então corado com uma solução de brometo de etídio (1 mg mL⁻¹) e analisado pelo Gel DocTM EZ Gel.

4.5.4 Ensaio de inibição da Catepsina B e L

As enzimas catepsina B e L (humanas) foram adquiridas no Laboratório de Enzimologia e Bioquímica de Macromoléculas, na Universidade de Mogi das Cruzes (UMC). O ensaio de inibição foi realizado no mesmo laboratório, em um espectrofluorímetro Hitach F-2700. O monitoramento da atividade enzimática foi acompanhado em λ_{ex} =360 nm e λ_{em} =480 nm, sob constante agitação, em uma cubeta de quartzo de caminho óptico 10 mm, com um volume total de 1 mL. As catepsinas B e L foram incubadas em 1000 μ L de uma solução pré-aquecida de tampão acetato de sódio (100 mM); 5mM EDTA; 100 mM NaCl; 0,01% Triton X-100 (apenas para catepsina B); 20% glicerol, pH 5,5, 3 mM DTT e 40 mM (catepsina B) ou 15 mM (catepsina L) de Z-FR-AMC (Benziloxycarbonil-Phe-Arg-7-amido-4-metilcoumarina). A medida da atividade enzimática foi realizada monitorando a formação do produto AMC (amino-4-metilcoumarina) pela hidrólise do substrato Z-FR-AMC usado como sonda fluorogênica. Os efeitos da atividade dos compostos (**R1-R3**) sobre as enzimas foram avaliados em concentrações de 10 e 100 μ M.

4.6 Metodologia Computacional

As estruturas moleculares 3-D dos complexos foram tratadas com uma abordagem *in silico* relatada recentemente, mas ligeiramente modificada (DA CUNHA et al., 2020; ROCHA et al., 2019). A seguir, as estruturas dos complexos foram construídas e primeiramente minimizadas usando simulação de mecânica molecular (MM) através do programa Biovia Discovery Studio. Além disso, o método semi-empírico utilizando o Hamiltoniano PM7 foi aplicado na aquisição das energias mínimas das estruturas. A qualidade dos resultados foi comprovada pelo desvio da raiz quadrada média (RMSD) do alinhamento entre os átomos da estrutura teórica e da estrutura molecular do cristal.

4.6.1 Ancoragem Molecular – Catepsina B

A estrutura cristalina da Catepsina B, co-cristalizada com o inibidor dipeptidil nitrila, foi obtido a partir do Protein Data Bank (PDB: 1GMY) e preparada adequadamente para o trabalho de modelagem (GREENSPAN et al., 2001). Antes da ancoragem, todos os hidrogênios foram adicionados e o sítio de ligação fixado nas coordenadas $x=28,8380$, $y=37,2531$ e $z=37,2500$ (Cys29, átomo de S-doador). O raio de ancoragem foi de 15 Å e 50 poses foram definidos para serem calculados usando a função de pontuação GoldScore, que faz parte do programa CCDC Gold. Os resultados de ancoragem foram avaliados pela escolha das poses com melhor pontuação e a capacidade de reproduzir os contatos intermoleculares originais com o inibidor co-cristalizado.

4.6.2 Ancoragem Molecular – Albumina (HSA)

Estudos de ancoragem estão usando uma abordagem ligeiramente modificada relatada por Cunha et al (DA CUNHA et al., 2020). Como se segue, a partir do *Protein Data Bank* (PDB ID 2BXD) (BERMAN et al., 2000; GHUMAN et al., 2005), a estrutura HSA 3-D resolvida por raios-X (3,05 Å) inclui a varfarina cocristalizada. As interações proteína-ligante originais foram observadas no PDBsum (DE BEER et al., 2014). Antes da ancoragem, todos os resíduos perdidos foram construídos usando o visualizador Swiss-PDB (JOHANSSON et

al., 2012). A qualidade estereoquímica da proteína completa foi verificada pelo gráfico de Ramachandran, carregando-o no PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993). Em seguida, o campo de força CHARMM corrige os ângulos diédricos ϕ e ψ de resíduos discrepantes conforme analisado nos resultados estereoquímicos. A previsão das poses para duas espécies à base de Pd (**RZ2**) tratadas com PM7 no sítio de ligação da varfarina (Sudlow I, SD-I) foi alcançada pelo software CSD GOLD v2022.1 (HARTSHORN et al., 2007; LIEBESCHUETZ; COLE; KORB, 2012). As melhores soluções foram exportadas para análise no Biovia DSV. O protocolo de ancoragem aplicando a função ChemScore foi validado reencaixando uma estrutura de varfarina otimizada para PM7 no sítio SD-I, avaliando um valor de RMSD de 0,7566 Å.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Complexos pirazólicos

Motivado por um trabalho já realizado em nosso grupo, apresentado por Moura, T. (MOURA, 2016), onde foi reportada a síntese, caracterização e atividade biológica de uma série de complexos de Pd(II) contendo tiocarbamoilpirazól derivado da 4-etil-3-tiossemicarbazida (**Figura 33**), foi proposto neste trabalho o prosseguimento da série anterior já apresentada, porém utilizando diferentes tiossemicarbazidas (**Figura 34**).

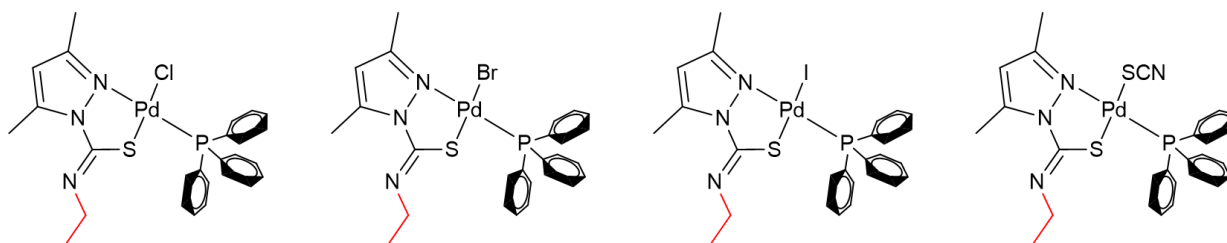


Figura 33 – Série de complexos apresentada no trabalho de Moura (MOURA, 2016).

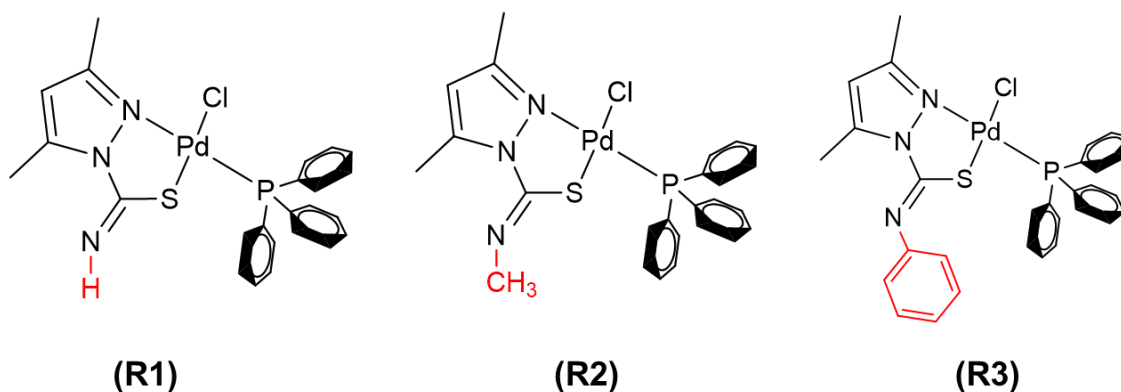


Figura 34 - Estrutura esperada dos complexos obtidos a partir dos pirazóis (R1-R3).

Devido a presença do grupo tioamida, o ligante tiocarbamoilpirazól pode se coordenar a metais tanto na sua forma neutra quanto aniônica. Nos trabalhos reportados na literatura, têm-se observado a prevalência da forma de coordenação neutra, (BARRA et al., 2013; ROCHA et al., 2016). Contudo, espera-se que para os compostos apresentados nesse trabalho a coordenação ocorra na forma aniônica, uma vez que a metodologia de síntese é análoga à proposta por Moura (MOURA, 2016).

Os ligantes tiocarbamoilpirazóis utilizados na síntese dos complexos foram obtidos a partir de uma reação de ciclocondensação entre as tiossemicarbazidas de interesse e a acetilcetona (**Figura 35**), sendo tais ligantes devidamente caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (Anexo I – Complexos pirazólicos 1-6).

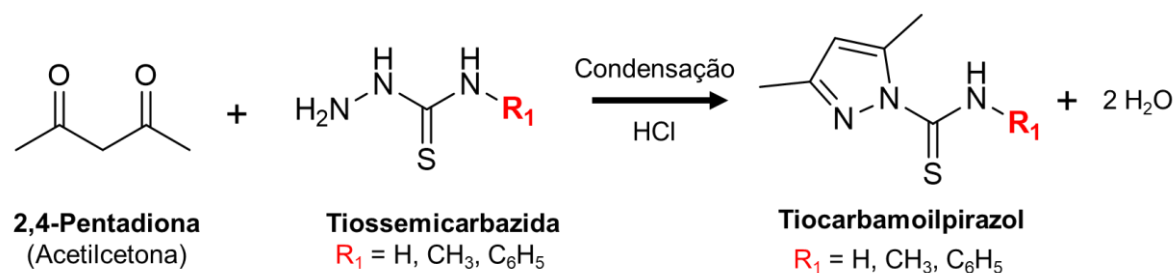


Figura 35 – Esquema geral de reação para a obtenção de tiocarbamoilpirazóis.

O ligante **FTPz**, referente ao tiocarbamoilpirazól que contém o grupo fenil como o substituinte em R_1 , ligado ao nitrogênio da tioamida, foi o único da série de ligantes que se mostrou ligeiramente diferente dos demais.

Durante a reação de ciclocondensação (**Figura 36**), há a formação de um intermediário diól (1) que após duas etapas lentas de desidratação resulta na obtenção do anel pirazól (KATRITZKY; OSTERCAMP; YOUSAF, 1987)

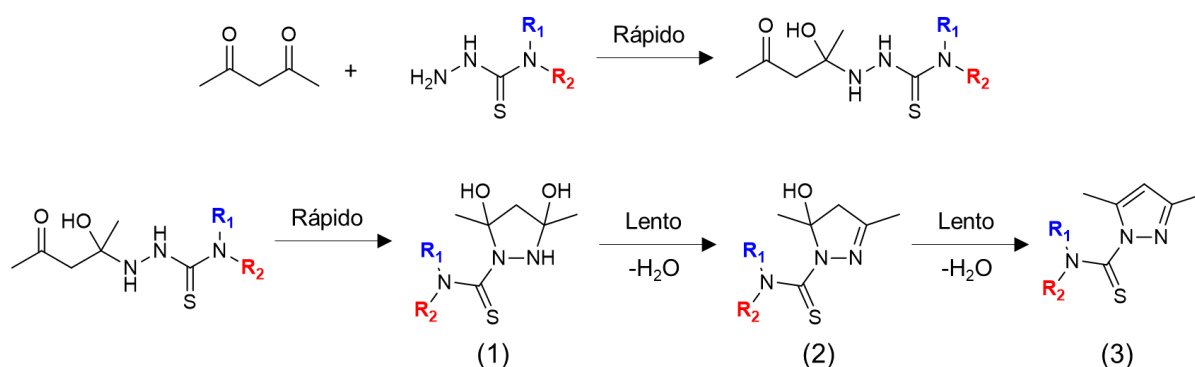


Figura 36 – Mecanismo geral de reação entre acetilcetona e tiossemicarbazida (KATRITZKY; OSTERCAMP; YOUSAF, 1987).

No caso do ligante **FTPz**, o produto obtido pela metodologia descrita é o intermediário (2), ou seja, com a presença de uma hidroxila ligada ao anel

(Figura 37), fato esse comprovado através de espectros de RMN de ^1H (Anexo I – Complexos pirazólicos 5).

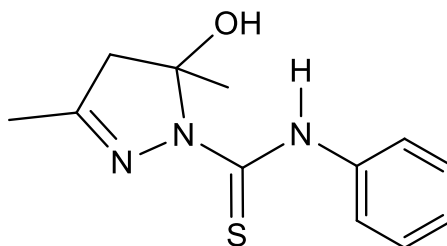


Figura 37 – Estrutura do intermediário obtido durante a reação de formação dos tiocarbamoilpirazóis.

A síntese dos complexos de Pd(II) se procedeu utilizando este ligante contendo a hidroxila, que posteriormente foi tratado com metanol em meio ácido (HCl) para garantir a desidratação completa e formação do complexo desejado. Para todos os outros ligantes, as reações se procederam como esperado, possibilitando sua utilização em sínteses posteriores.

5.1.1 Análise Elementar e Espectrometria de massas

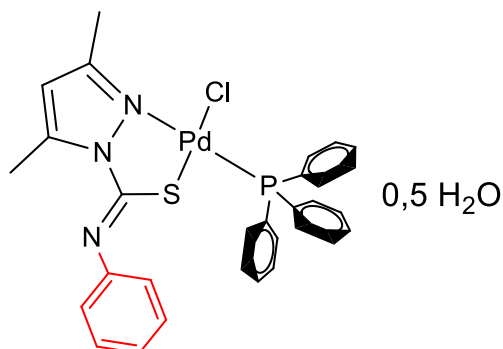
As análises elementares (CHN) (**Tabela 1**) obtidas para os complexos confirmam a estrutura esperada para os compostos, uma vez que as porcentagens experimentais e calculadas se mostram muito próximas. Vale ressaltar que os valores calculados foram baseados na estrutura dos complexos contendo moléculas de água, sendo monohidratado para o complexo **R1** e contendo meia molécula de água para o complexo **R2** e **R3**.

Tabela 1 – Composição experimental e calculada para os complexos sintetizados determinada por análise elementar.

Composto	%Carbono		%Hidrogênio		%Nitrogênio	
	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.
R1	50,41	50,01	4,01	4,37	6,74	7,29
R2	51,46	51,65	4,29	4,51	7,28	7,23
R3	55,99	56,00	3,82	4,39	6,45	6,53

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Para o complexo **R3**, os valores obtidos confirmam a estrutura esperada para o ligante 3,5-dimetilpirazol-N-fenil-1-iminotiolato (**FTPz**) na forma desidratada (**Figura 38**), conforme discutido anteriormente.



Calculado(%): C, 56,00; H, 4,39; N, 6,53

Figura 38 – Estrutura esperada para o complexo **R3** contendo o ligante 3,5-dimetilpirazol-N-fenil-1-iminotiolato (**FTPz**).

Adicionalmente, os complexos de paládio(II) foram analisados por espectrometria de massas por electrospray (ESI-MS), sendo os espectros apresentados nas figuras a seguir (**Figura 39-44**).

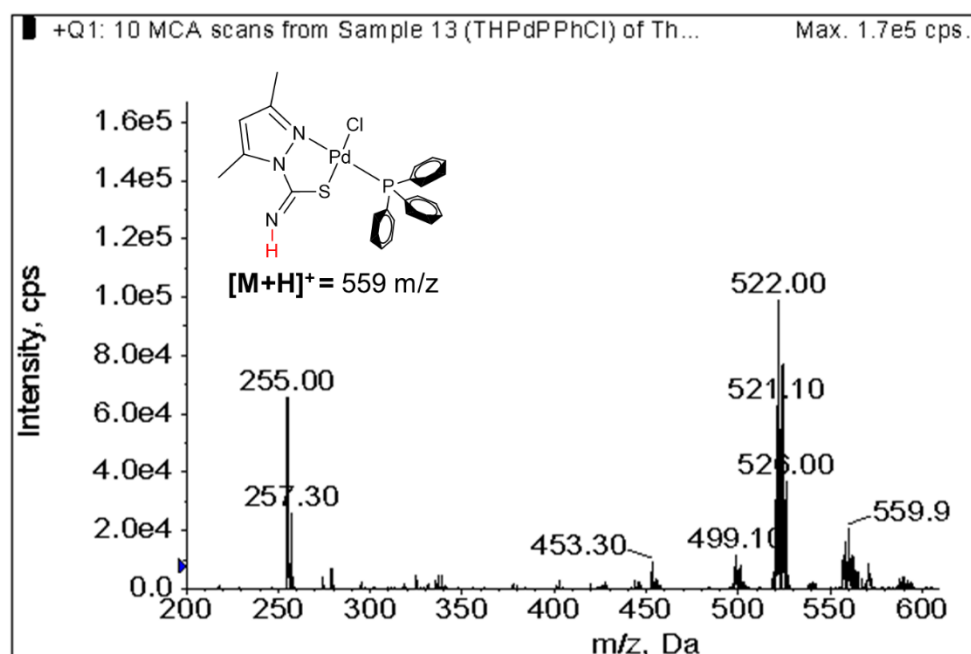


Figura 39 - Espectro ESI-MS para o complexo R1 em acetonitrila. **No interior:** Estrutura do complexo com $[M+H]^+ = 559 \text{ m/z}$.

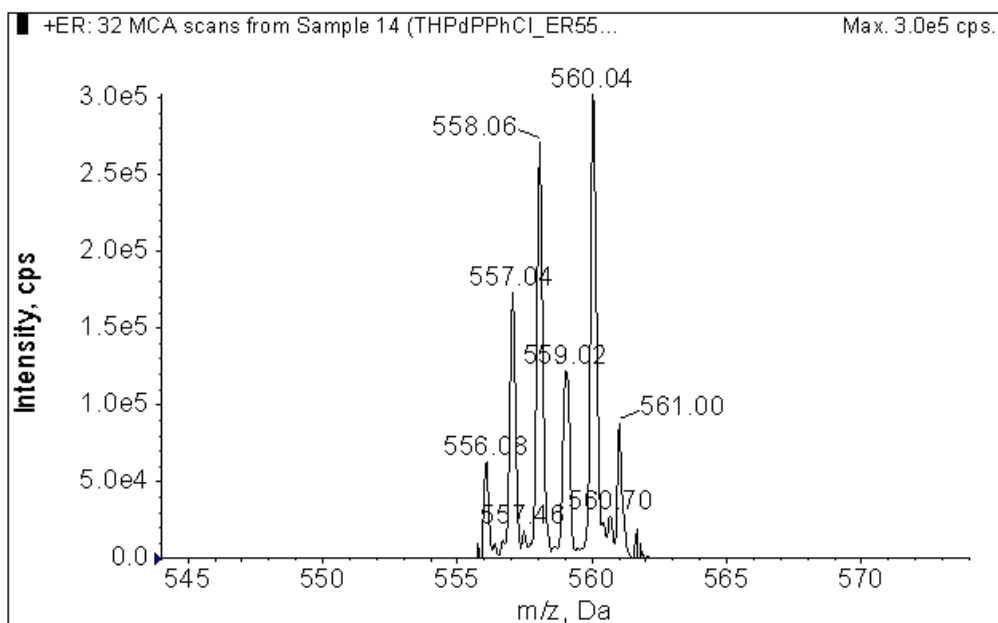


Figura 40 – Ampliação do pico m/z 559 para o complexo R1.

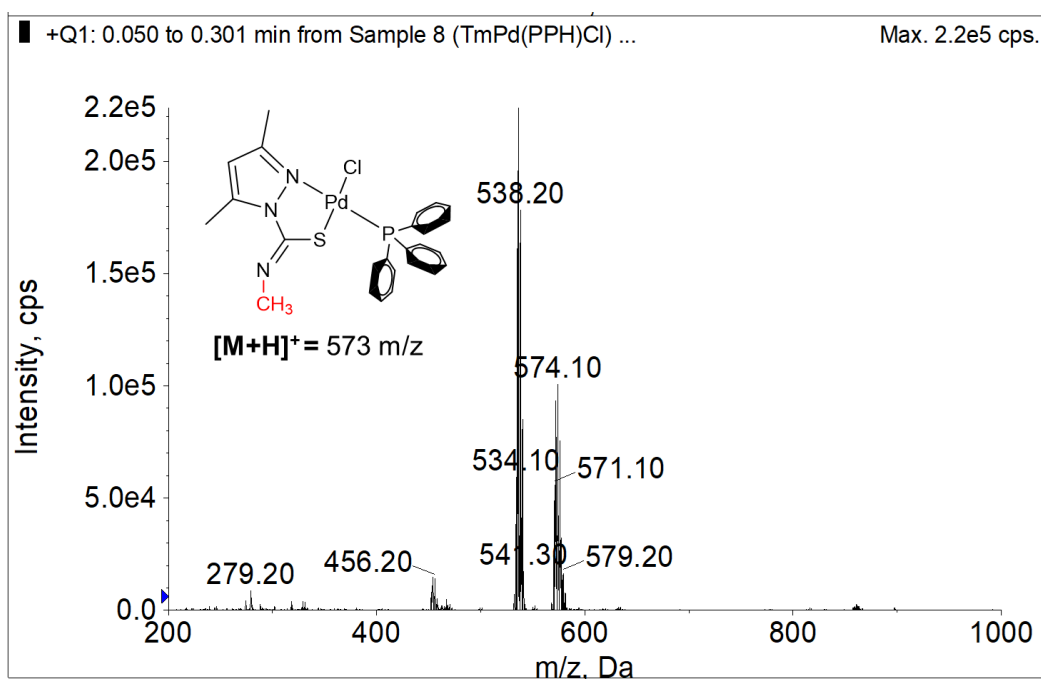


Figura 41 - Espectro ESI-MS para o complexo R2 em acetonitrila. **No interior:** Estrutura do complexo com $[M+H]^+ = 573$ m/z.

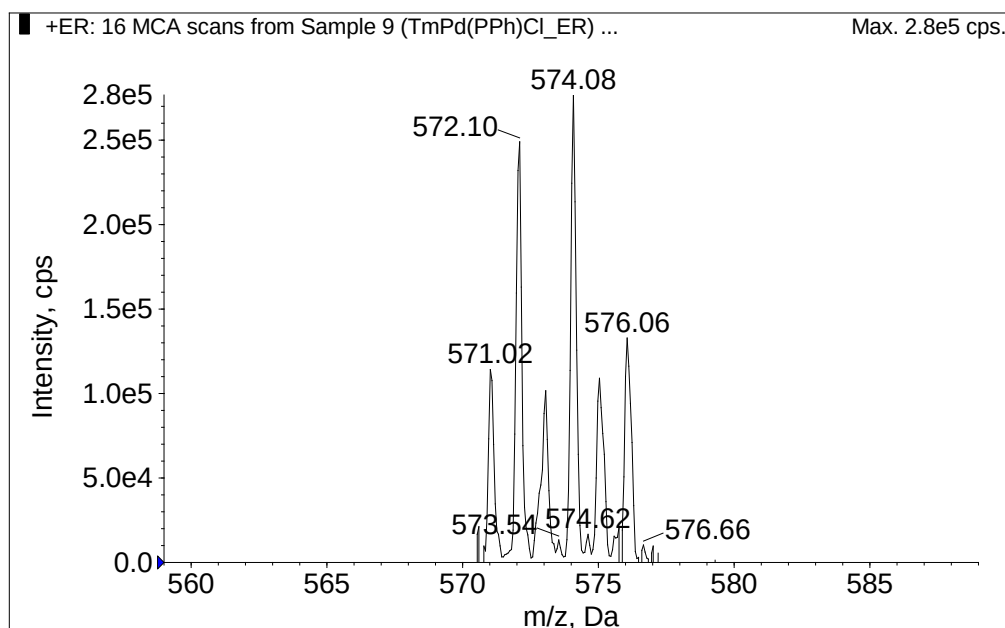


Figura 42 – Ampliação do pico m/z 574 para o complexo R2.

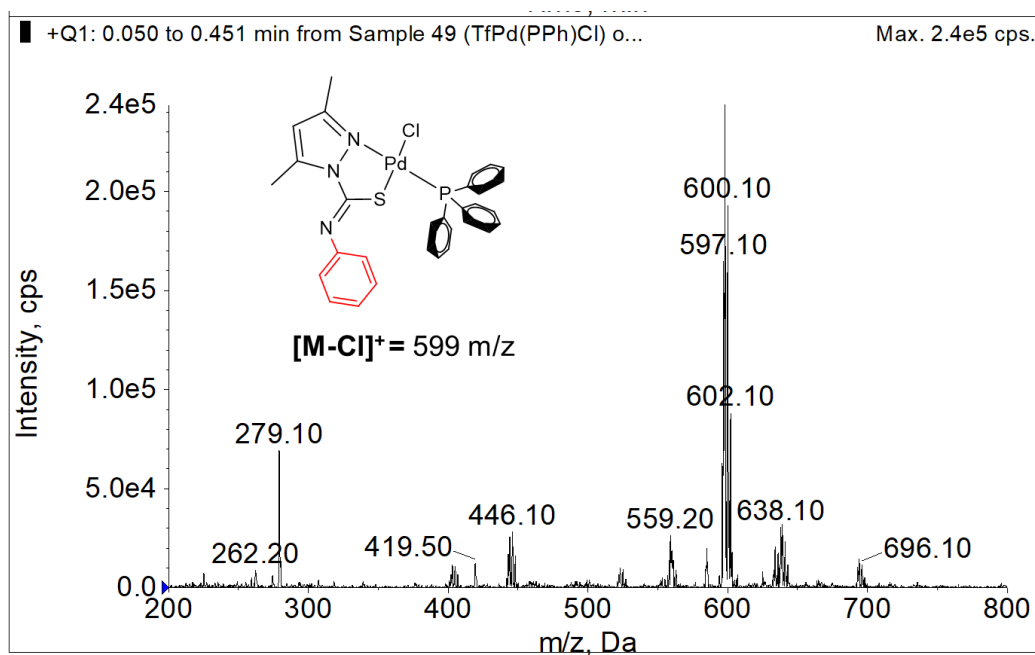


Figura 43 - Espectro ESI-MS para o complexo R3 em acetonitrila. **No interior:** Estrutura do complexo com $[M-Cl]^+ = 599 \text{ m/z}$.

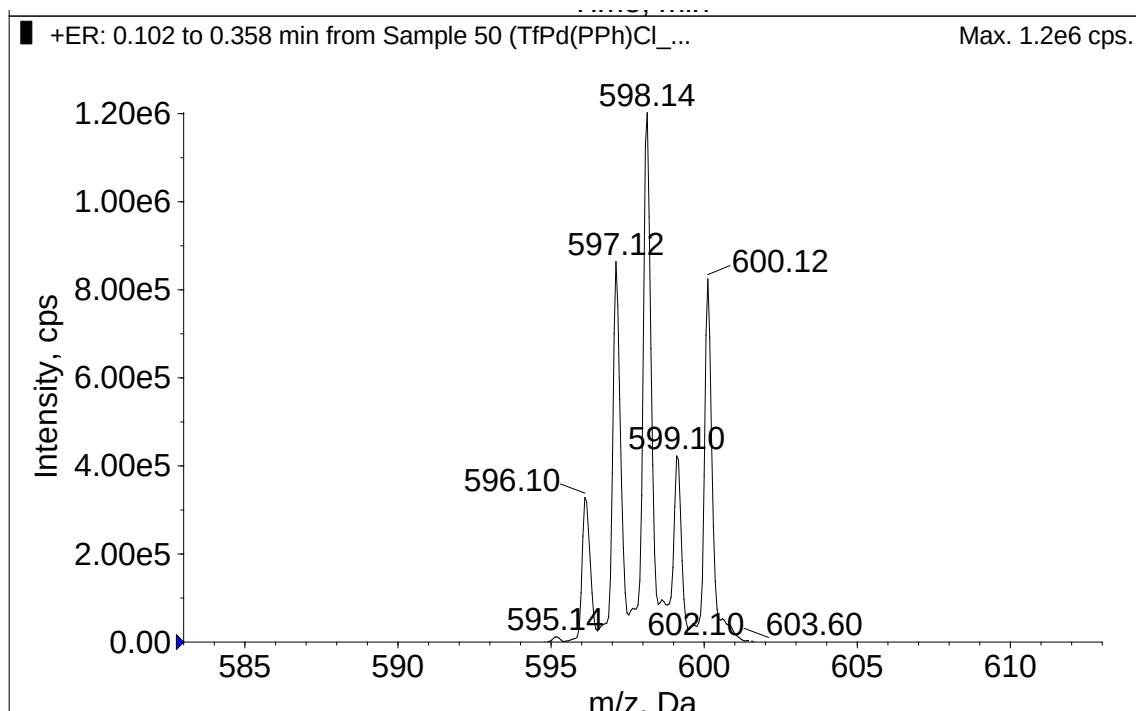


Figura 44 – Ampliação do pico m/z 599 para o complexo R3.

Íons moleculares de 559 (**R1**), 573 (**R2**) m/z correspondentes às estruturas dos respectivos complexos protonados (**Figura 45**), corroboram com a estrutura proposta para os compostos. Para o complexo **R3** não é possível identificar o íon molecular correspondente a estrutura do complexo protonado, porém é possível observar o pico base de 599 m/z condizente com uma ausência do grupo cloreto [M-Cl].

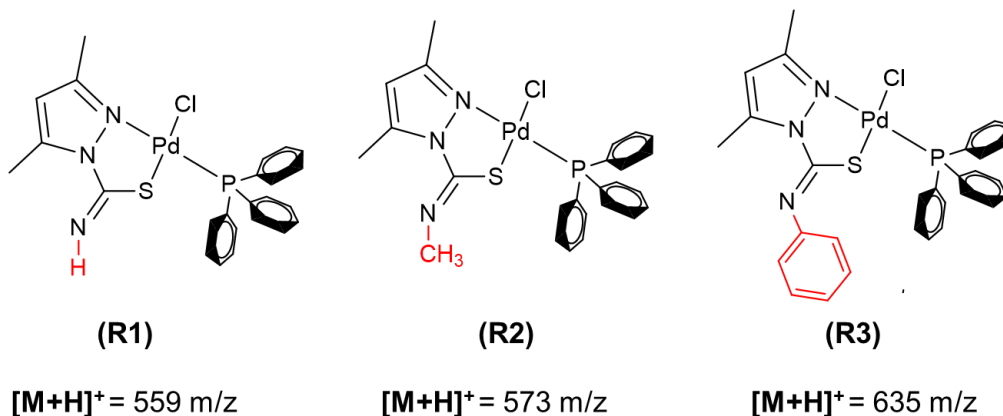


Figura 45 – Estrutura dos complexos pirazólicos R1-R3 e razões m/z correspondentes às estruturas protonadas.

Tal comportamento pode também ser observado nos espectros de massa dos complexos **R1** e **R2**, onde é possível observar a existência do pico base que corresponde justamente a ausência de um grupo cloreto.

5.1.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)

Os complexos pirazólicos (**R1-R3**) foram devidamente caracterizados por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV). O espectro IV do complexo $[\text{PdCl}(\text{HTPZ})(\text{PPh}_3)]$ (**R1**) assim como suas principais atribuições podem ser observadas na figura a seguir (**Figura 46**).

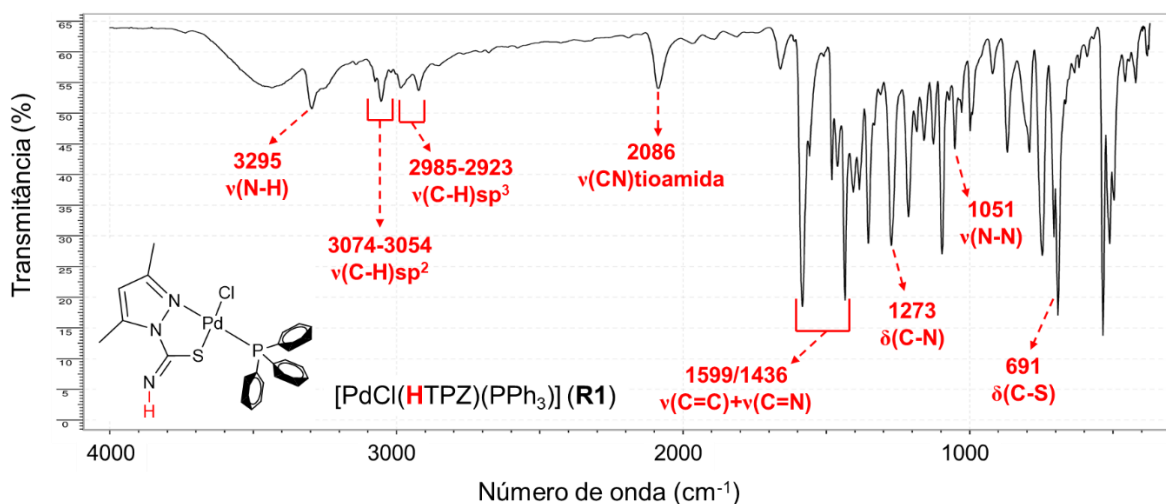


Figura 46 – Espectro vibracional na região do Infravermelho (IV) para o complexo $[\text{PdCl}(\text{HTPZ})(\text{PPh}_3)]$ (**R1**).

Os espectros obtidos para os demais complexos (**R2**, **R3**) se encontram na seção de anexo (Anexo I – Complexos pirazólicos 7-8). As atribuições tanto para os complexos quanto para seus respectivos ligantes estão apresentados na tabela a seguir (**Tabela 2**)

Tabela 2 – Principais atribuições dos modos vibracionais para os complexos pirazólicos e seus respectivos ligantes

Número de onda (cm ⁻¹)						Modos Vibracionais
HTPz	R1	MTPz	R2	FTPz	R3	
3240	3295	3328	-	3325	-	$\nu(\text{N-H})$
3134	3074	-	3085	3060	3053	$\nu(\text{C-H})_{\text{sp}2}$
2990	2985	2976	2962	2974	2923	$\nu(\text{C-H})_{\text{sp}3}$
1577	1436	1574	1437	1593	1435	$\nu(\text{C-N})_{\text{anel}}$
1599	2086	1523	1610	1513	1578	$\nu(\text{C-N})_{\text{tioamida}}$
-	1481	-	1479	-	1480	$\nu(\text{CCPPH}_3)$
1341	1353	1336	1352	1336	1346	$\nu(\text{CC})_{\text{pirazól}}$
1250	1273	1260	1262	1245	1273	$\delta\text{CN} + \delta\text{CH} + \delta\text{NH}$
1029	1051	1032	1034	1054	1050	$\nu(\text{N-N})$
808	691	798	695	801	692	$\nu(\text{C-S})$

Como fica evidente, a presença do ligante tiocarbamoilpirazól pode ser identificada por meio de estiramentos na região de 3295 cm⁻¹ referente a $\nu(\text{N-H})$ 3074 cm⁻¹ e 2985 cm⁻¹ referentes $\nu(\text{C-H})_{\text{sp}2}$ e $\nu(\text{C-H})_{\text{sp}3}$, respectivamente. Nos complexos **R2** e **R3**, é possível observar que a coordenação com o centro metálico leva a desprotonação do grupo tiocarbamoil, uma vez que o estiramento $\nu(\text{N-H})$ está ausente. Estiramentos na região de 1593-1577 cm⁻¹ são característicos de $\nu(\text{C-N})_{\text{anel}}$ do grupo pirazól que aparecem nos complexos em valores de número de onda bem mais baixos (1437-1435 cm⁻¹). Essa redução pode ser um indicativo para a coordenação com o centro metálico, uma vez que parte da densidade eletrônica do ligante se direciona para o metal fazendo com que a ligação C-N se enfraqueça.

O grupo tiocarbamoilpirazól comumente apresenta três estiramentos bem característicos: tioamida banda I 1530-1480 cm⁻¹ ($\nu\text{C=N} + \delta\text{CH} + \delta\text{NH}$), tioamida banda II 1300-1200 cm⁻¹ ($\nu\text{C=N} \delta\text{NH} + \delta\text{CH} + \nu\text{C=S}$) e tioamida banda III 1000-990 cm⁻¹ ($\nu\text{C=N} + \nu\text{C=S}$). Em geral as bandas I e II são mais facilmente

observadas e aparecem com maior intensidade, como fica evidente nos espectros obtidos. Com a coordenação com o centro metálico, as bandas características I e II sofrem ligeiros deslocamentos para o azul (10 cm^{-1}) (SINGHT; THAKUR, 1974), com destaque para o complexo **R1** que tem a banda I deslocada de 1599 para 2086 cm^{-1} . O comportamento descrito se deve em grande parte à desprotonação do nitrogênio da porção tiocarbamoil, que leva a um aumento do caráter de ligação dupla $\text{C}=\text{N}$ juntamente com a coordenação pelo átomo de enxofre.

A presença do grupo trifenilfosfina também pode ser confirmada pelo aparecimento de estiramentos na região de $1479\text{-}1481\text{ cm}^{-1}$ referente a $\nu(\text{C-C}_{\text{PPh}_3})$, que são ausentes no espectro do ligante isolado (NAKAMOTO, 2006; PAVIA et al., 2015; SOCRATES, 2001).

5.1.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

5.1.3.1 Espectro de RMN de ^1H

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos para todos os complexos. No entanto, para exemplificar a discussão, apenas o complexo **R2** será abordado. Os espectros referentes aos outros compostos se encontram na seção de anexos (Anexo I – Complexos pirazólicos 9,12).

O espectro de RMN de ^1H obtido para o complexo **R2** (**Figura 47**) confirma a presença do ligante pirazól coordenado na sua forma aniônica, já que é possível notar a ausência de um singlete em torno de $9,2\text{ ppm}$, que no ligante pirazól (Anexo I – Complexos pirazólicos 3) se refere ao grupo $-\text{NH}$ ligado a tioamida.

Três singletos intensos podem ser observados na região de maior blindagem do espectro, referentes às três metilas presentes no composto. As metilas ligadas ao anel pirazól devem apresentar valores de deslocamento químico ligeiramente semelhantes ($2,5$ e $2,7\text{ ppm}$), uma vez que o ambiente próximo a esses grupos varia pouco, além de menor deslocamento químico quando comparadas aquela ligada diretamente ao nitrogênio sp^2 da tioamida ($3,0\text{ ppm}$), já que essa sofre maior desblindagem.

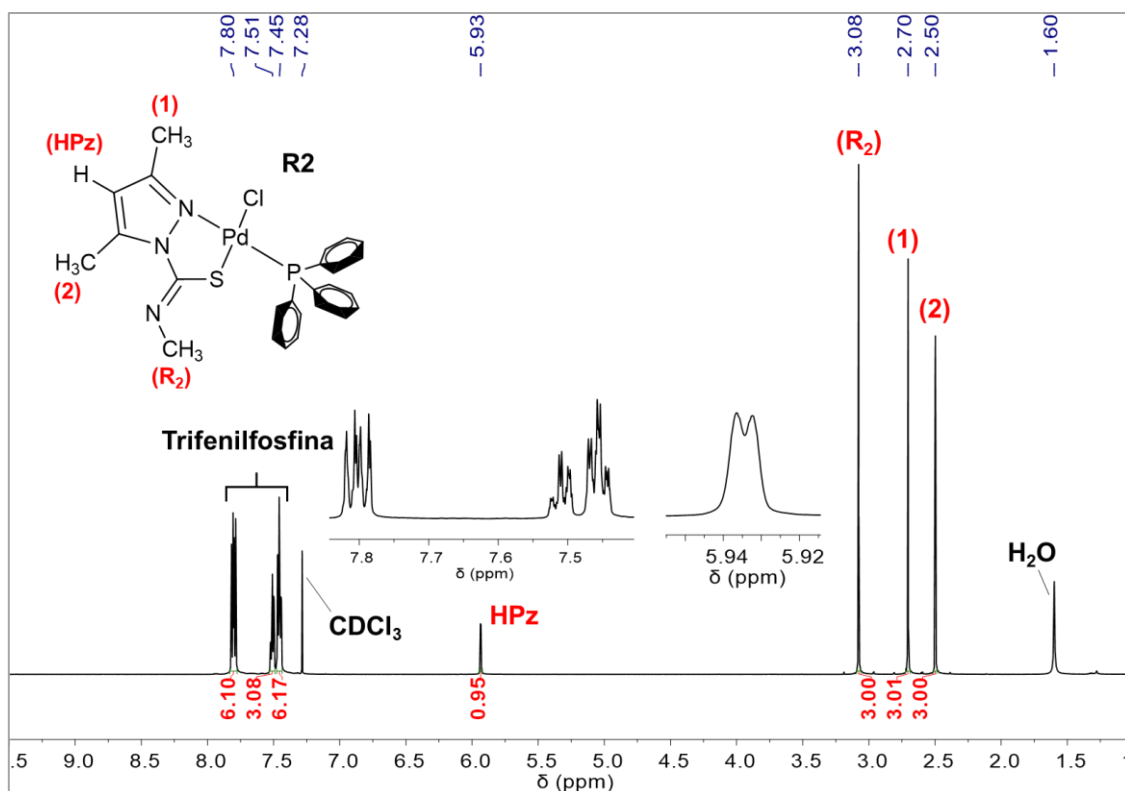


Figura 47 – Espectro de RMN de ^1H do complexo **R2** em CDCl_3 .

O dubleto isolado observado em torno de 5,9 ppm pode ser atribuído ao único grupo -CH na estrutura referente ao pirazól. O alto valor de deslocamento químico desse sinal se deve a ligação do hidrogênio a um carbono sp^2 , além do efeito de anisotropia diamagnética do anel.

Os sinais referentes ao grupo trifenilfosfina aparecem como multipletos na região mais desblindada do espectro, na faixa de 7,45-7,80 ppm. Os valores observados se apresentam mais deslocados em relação a fosfina livre (7,29-7,40 ppm), o que é esperado após a coordenação com o metal.

Os espectros obtidos para os outros dois complexos (**R1** e **R3**) mostraram resultados semelhantes, com diferenças apenas nos deslocamentos químicos referentes aos substituintes no nitrogênio da tioamida (**R2**). Para o composto **R1**, especificamente, sinais adicionais ao esperado e comparado com outros dois complexos anteriores foram observados, o que poderia sugerir a formação de espécies secundárias durante a reação ou mesmo a instabilidade do complexo levando a formação de outras estruturas em solução.

A seguir, na tabela 3, estão resumidas as atribuições para cada um dos complexos (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Valores de deslocamento químico referente ao espectro de RMN ^1H dos complexos.

Composto	RMN ^1H (δ ppm)						
	(1)	(2)	HPz	Trifenilfosfina			R ₂
R1	2,56 (s)	2,72 (s)	6,00 (d)	7,47 (m)	7,52 (m)	7,78 (m)	8,40 (s)
R2	2,50 (s)	2,70 (s)	5,93 (d)	7,45 (m)	7,51 (m)	7,80 (m)	3,08 (s)
R3	2,62 (s)	2,75 (s)	6,03 (d)	7,39 (m)	7,46 (m)	7,73 (m)	6,91 (m)
							7,01 (tt)
							7,21 (m)

5.1.3.2 Experimento de DEPTQ e HMBC ^{13}C - ^1H

Da mesma forma como observado no espectro de RMN de ^1H , os carbonos das metilas do anel pirazól (C2, C5) (**Figura 48**) aparecem com valores de deslocamento químico semelhantes, em uma região mais blindada do espectro de DEPTQ (14,87 e 15,51 ppm), enquanto que o carbono da metila ligada ao nitrogênio da tioamida (C7) aparece com deslocamento de 38,73 ppm, uma variação bem mais significativa do que aquela observada no espectro de ^1H . Isso se deve ao fato do carbono estar ligado diretamente ao átomo eletronegativo, o que não acontece no hidrogênio, que, portanto, sofre uma redução no efeito indutivo.

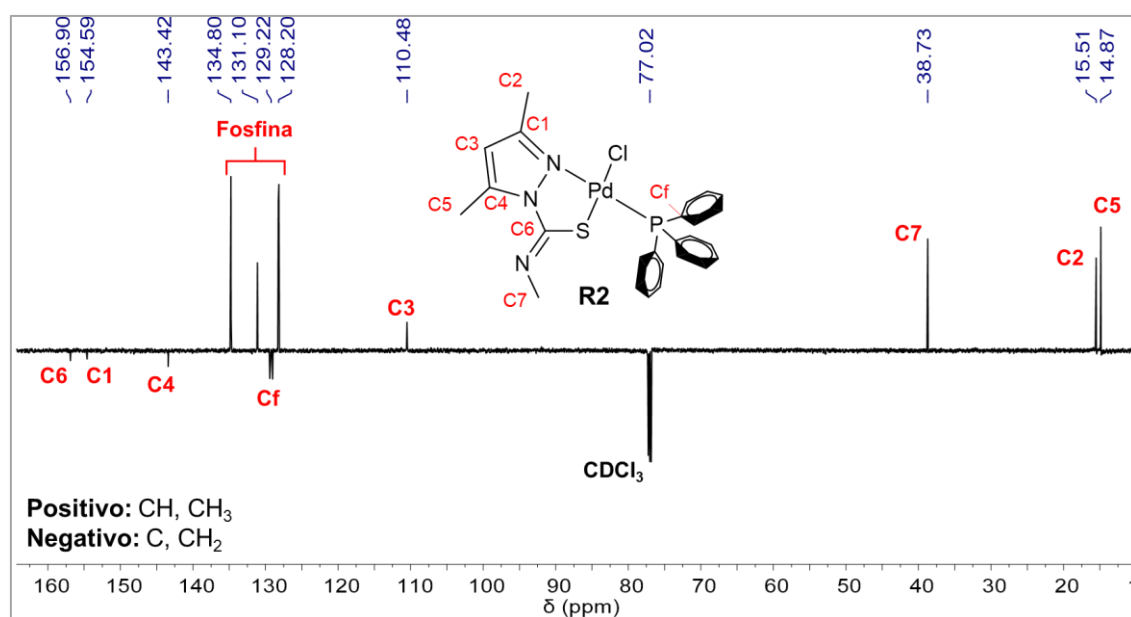


Figura 48 – Espectro de RMN de DEPTQ do complexo **R2** em CDCl_3 .

Com relação aos carbonos quartenários da estrutura, são os que apresentam os sinais mais deslocados em relação aos demais. Os carbonos C4 e C1, que formam o anel pirazol, aparecem com deslocamentos químicos da ordem de 143 e 154 ppm respectivamente, sendo o segundo mais deslocado, provavelmente devido a coordenação próxima ao Pd(II). O carbono C6, da função tioamida, que aparece em 156 ppm, sofre maior desblindagem por conta da ligação com dois átomos de nitrogênio além do átomo de enxofre que está coordenado ao metal.

A seguir, na tabela 4, estão resumidas as atribuições para cada um dos complexos (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Valores de deslocamento químico referente ao espectro de RMN DEPTQ dos complexos.

Carbono	Compostos (δ ppm)		
	R1	R2	R3
C1	156,12	154,59	155,85
C2	15,54	15,51	15,54
C3	111,23	110,48	111,11
C4	144,45	143,42	144,24
C5	14,48	14,87	15,20
C6	164,33	156,90	156,80
	128,35	128,20	128,10
Fosfina	131,23	131,10	131,09
	134,74	134,80	134,76
Cf	128,88	129,22	129,00
C7	38,73	-	-
	-	-	121,68
	-	-	123,50
C _{fenil}	-	-	128,30
	-	-	148,23

Complementarmente aos experimentos unidimensionais, experimentos de HMBC ^{13}C - ^1H foram realizados para confirmar as atribuições apontadas nas discussões anteriores (**Figura 49**).

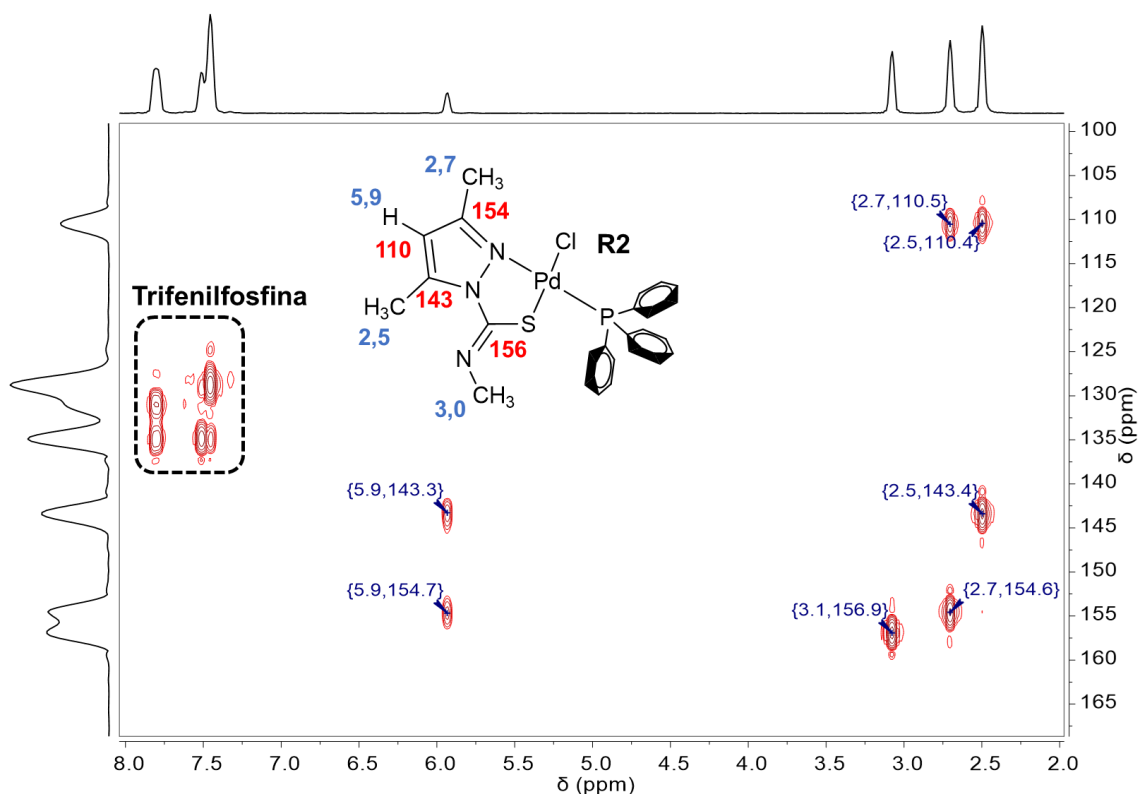


Figura 49 – Espectro de RMN HMBC ^{13}C - ^1H para o complexo **R2** em CDCl_3 .

As correlações indicadas se mostram de acordo com as atribuições feitas anteriormente, corroborando com a estrutura proposta. Para os outros complexos, os espectros bidimensionais podem ser encontrados na seção de anexo (Anexo I – Complexos pirazólicos 11,14).

5.1.4 Comportamento em solução

Se tratando de compostos onde se anseia a aplicação biológica, o conhecimento acerca da estrutura majoritária em solução é de extrema importância, uma vez que a atividade apresentada por esse composto precisa ser atribuída corretamente. Nos complexos em estudo, a presença de um ligante mais lábil como o clorido poderia ser passível de troca em meio biológico, resultado na formação de uma nova espécie. Por esse motivo, dois ensaios principais foram realizados para determinar a estabilidade dos complexos em solução: condutividade molar e ressonância magnética nuclear de ^{31}P .

O ensaio de condutividade molar foi aplicado apenas como uma medida preliminar, uma vez que espécies não identificadas no processo de

caracterização podem apresentar condutividade, ocasionado um falso positivo. O resultado obtido mostra que na primeira medida todos os complexos sintetizados se comportaram como não eletrólitos, apresentando condutividade molar da ordem de 2,23 a 2,62 $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$ (GARCIA VELHO, 2006; GEARY, 1971) que é condizente com as estruturas propostas para essa série. No entanto, é interessante observar que com o passar do tempo a condutividade molar dos complexos **R1** e **R3** aumenta, sendo um possível indicativo para a instabilidade destes compostos (**Figura 50**).

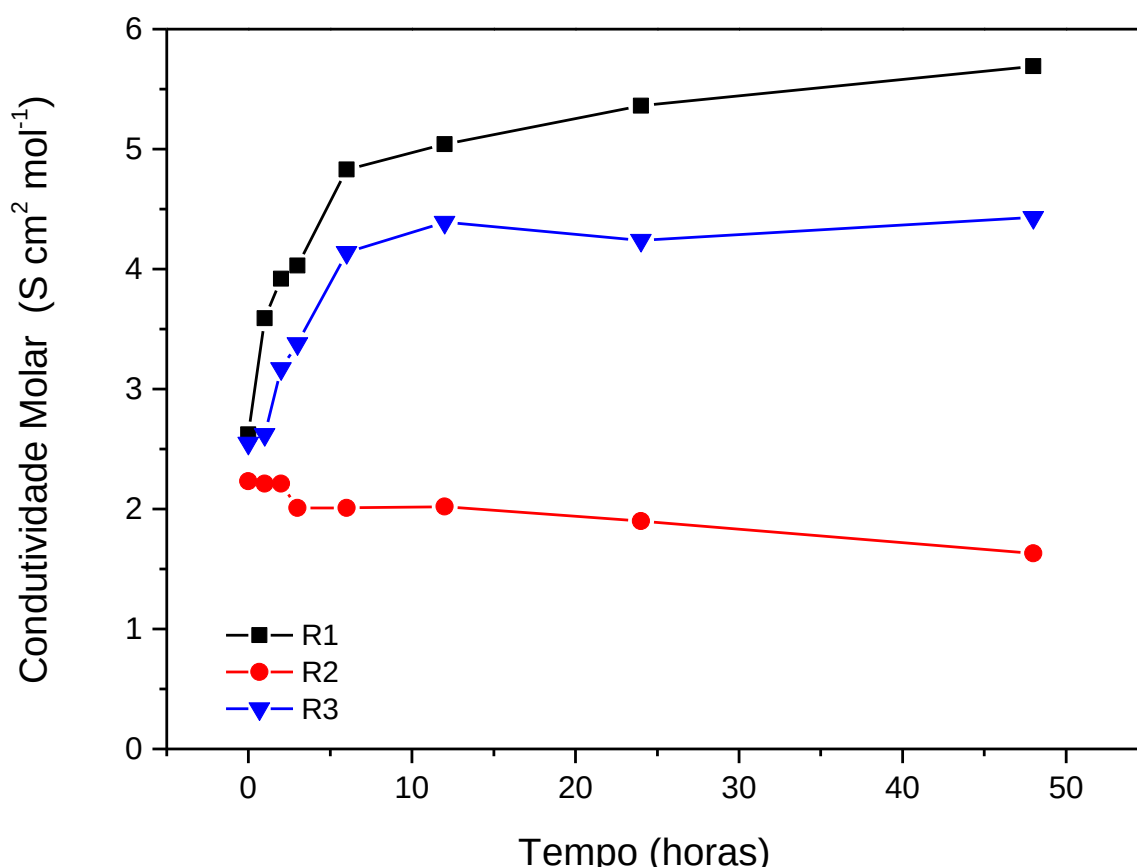


Figura 50 – Ensaio de estabilidade por condutividade molar para os complexos em DMSO.

Vale ressaltar que apesar do aumento na condutividade, os complexos não chegam a atingir valores correspondentes a espécies eletrólitas.

Uma informação mais precisa pôde ser obtida através do ensaio realizado por RMN ^{31}P , onde é esperada a presença de um único sinal de fósforo para complexos contendo apenas uma fosfina, sem deslocamentos com o passar do tempo (SILVA et al., 2018).

Para os complexos **R2** (Figura 51) e **R3** (Anexo I – Complexos pirazólicos 15), foram observados apenas um único sinal de fósforo, sem alterações de deslocamento químico ao longo das 48h do ensaio. Vale ressaltar ainda que o valor de deslocamento observado é típico para fósforo em posição trans ao nitrogênio, corroborando com a estrutura proposta para os complexos (ARES et al., 2002; DUNINA et al., 2009).

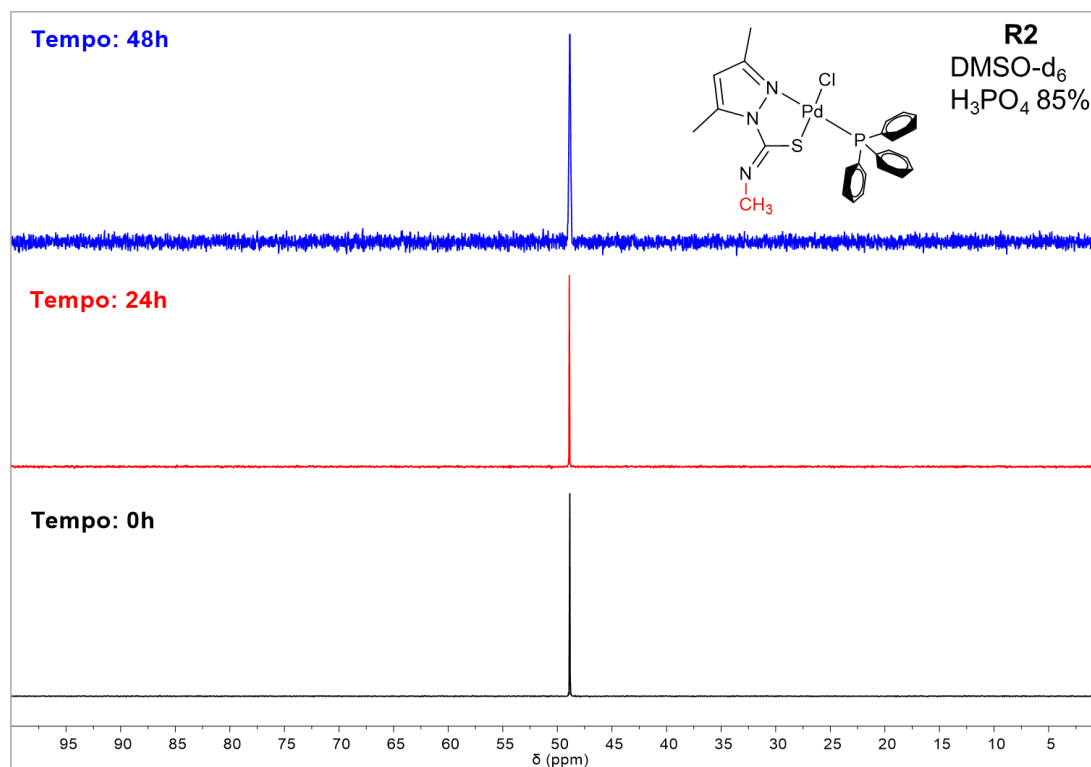


Figura 51 – Espectros de RMN de ³¹P para o complexo **R2** em DMSO em 0, 24 e 48h.

O resultado obtido para **R3** contradiz que foi apontado na condutividade molar, o que nos leva a crer que para esse complexo outras espécies, em menor quantidade, poderiam estar presentes no sólido obtido, enquanto que para o complexo **R1** não só foi observado a presença de múltiplos sinais, provando a impureza do complexo, como também um aumento da intensidade desses sinais inferiores com o passar do tempo, que poderia ser resultado da reação ou degradação lenta do complexo em solução (Figura 52).

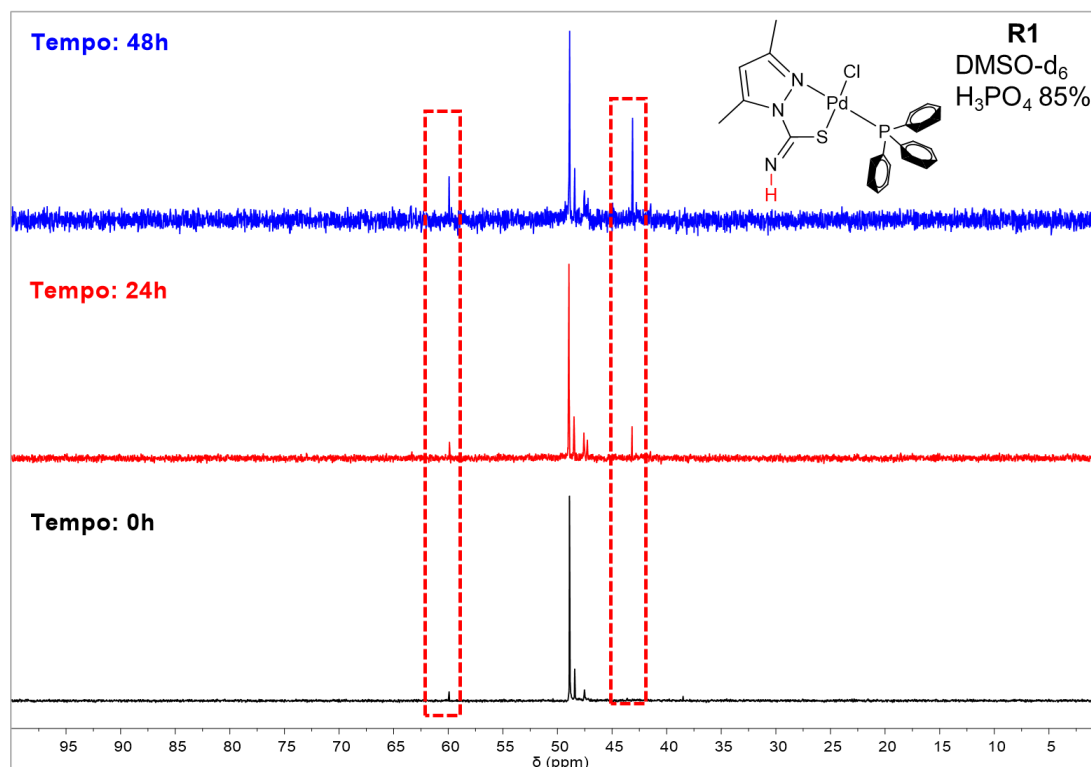


Figura 52 – Espectros de RMN de ^{31}P para o complexo **R1** em DMSO em 0, 24 e 48h.

Por conta de tal característica, o complexo **R1** foi excluído de estudos posteriores de atividade antiproliferativa e de interação com biomoléculas.

5.1.5 Atividade Antiproliferativa

O ensaio de atividade antiproliferativa se procedeu apenas com os complexos **R2**, **R3** e um complexo adicional (aqui indicado como **R2***) já reportado no trabalho de Moura (MOURA, 2016), a título de comparação com os demais (**Figura 53**).

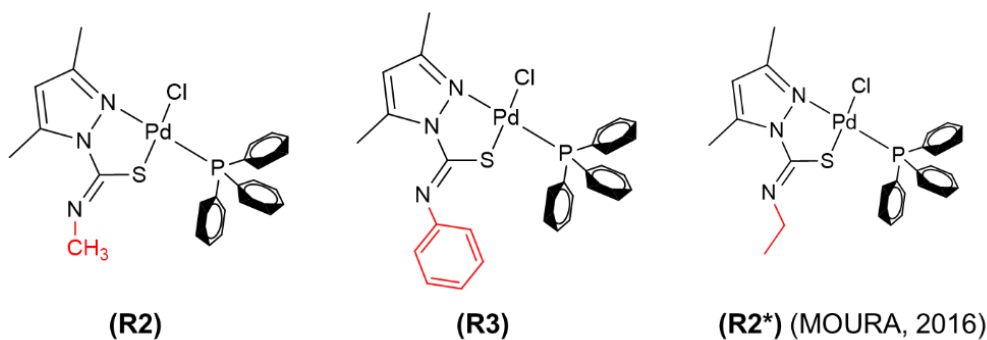


Figura 53 – Estrutura dos complexos utilizados no estudo de atividade antiproliferativa e interação com biomoléculas.

O complexo trazido do trabalho anterior, não só foi usado nos ensaios de atividade antiproliferativa como também nos estudos de interação com biomoléculas.

Os ensaios foram realizados com as linhagens celulares de MCF-7 (adenocarcinoma mamário) e MRC-5 (fibroblasto normal de pulmão) sendo os valores de IC₅₀ em μM apresentados na tabela a seguir (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Atividade antiproliferativa dos complexos e seus respectivos ligantes livres frente linhagens celulares MCF-7 e MRC-5, em 48h de incubação, expressas como valores de IC₅₀ (μM).

Compostos	IC ₅₀ (μM)	
	MCF-7	MRC-5
MTPz	>200	-
ETPz*	>200	-
FTPz	>200	-
R2	47,57 $\pm$ 1,16	26,31 $\pm$ 0,38
R2*	31,94 $\pm$ 3,35	26,32 $\pm$ 0,15
R3	>78	>78
Cisplatina	>50	19,86 $\pm$ 1,22

Fica nítido pelos resultados obtidos que os ligantes livres não apresentam atividade frente as linhagens testadas. Os complexos, entretanto, exibem melhores respostas quando comparados com os ligantes, sendo o composto **R2*** cerca de 32% mais ativo que **R2** e ambos mais ativos até que a cisplatina, apresentando valores de IC₅₀ menores que complexo de referência para a linhagem tumoral MCF-7. A série sintetizada é ainda menos ativa para linhagens normais de MRC-5 quando comparada a cisplatina, com valores de IC₅₀ ligeiramente superiores.

Quando comparada atividade dos complexos entre si, podemos notar que tanto para a linhagem de MCF-7 quanto para MRC-5 a tendência observada é a mesma. Os complexos **R2*** e **R2** apresentam atividade superior ao complexo **R3** como fica melhor exemplificado na curva de dose-resposta para obtida para as duas linhagens estudadas (**Figura 54**).

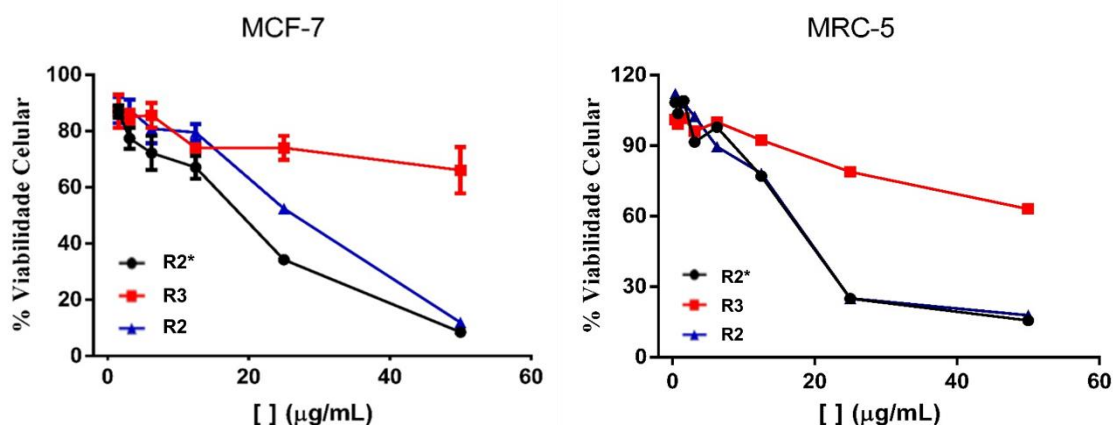


Figura 54 – Linhagens celulares MCF-7 e MRC-5 tratadas com diferentes concentrações dos complexos.

As diferenças nos valores obtidos de IC_{50} entre os complexos **R2** e **R2*** tanto para MRC-5 quanto para MCF-7 demonstram que a pequena alteração estrutural nos complexos resultou numa mudança relativamente significativa de atividade. No entanto, quando comparado ao complexo **R3**, parece haver uma influência negativa na atividade antiproliferativa com a presença do grupo fenil como substituinte no nitrogênio da tioamida.

5.1.6 Ensaios de interação com DNA

5.1.6.1 Dicroísmo Circular (CD)

Para obter um melhor entendimento com relação a forma de ação dos complexos sintetizados, ensaios de interação com DNA foram submetidos com os compostos **R2** e **R2***, os quais apresentaram melhores resultados nos ensaios de atividade antiproliferativa.

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica sensível de análise conformacional amplamente aplicado a proteínas (GREENFIELD, 2006). O espectro CD característico do DNA depende da forma com o qual se apresenta, uma vez que diferentes conformações podem ser observadas para a biomolécula (B, A ou Z) (KELLETT et al., 2019). Na forma B, o espectro consiste em duas bandas: uma negativa em torno 245 nm devido à elipticidade da estrutura de dupla hélice e outra positiva em torno de 275 nm, devido às

interações de empilhamento dos pares de bases (REHMAN et al., 2015). Essas duas bandas características podem ser utilizadas como sondas para verificação de interações de compostos com o DNA, devido a sua alta sensibilidade. Interações de natureza fraca, como eletrostática ou interação com o sulco menor, resultam em pequenas ou não alterações nessas duas bandas (245 e 275 nm), enquanto interações mais fortes, como intercalação, resultam em alterações significativas, levando, de maneira geral, a um aumento na intensidade de ambas as bandas.

Como pode ser observado nas figuras a seguir (**Figuras 55, 56**), ambos os complexos não apresentam interações significativas com o DNA, uma vez que alterações apreciáveis não são observadas nas bandas características da biomolécula, com o aumento da concentração dos compostos. Tal resultado pode ser um indicativo para interações de natureza fraca com o DNA, que pode estar associado ao sulco menor, já que os complexos são majoritariamente neutros nas condições experimentais testadas.

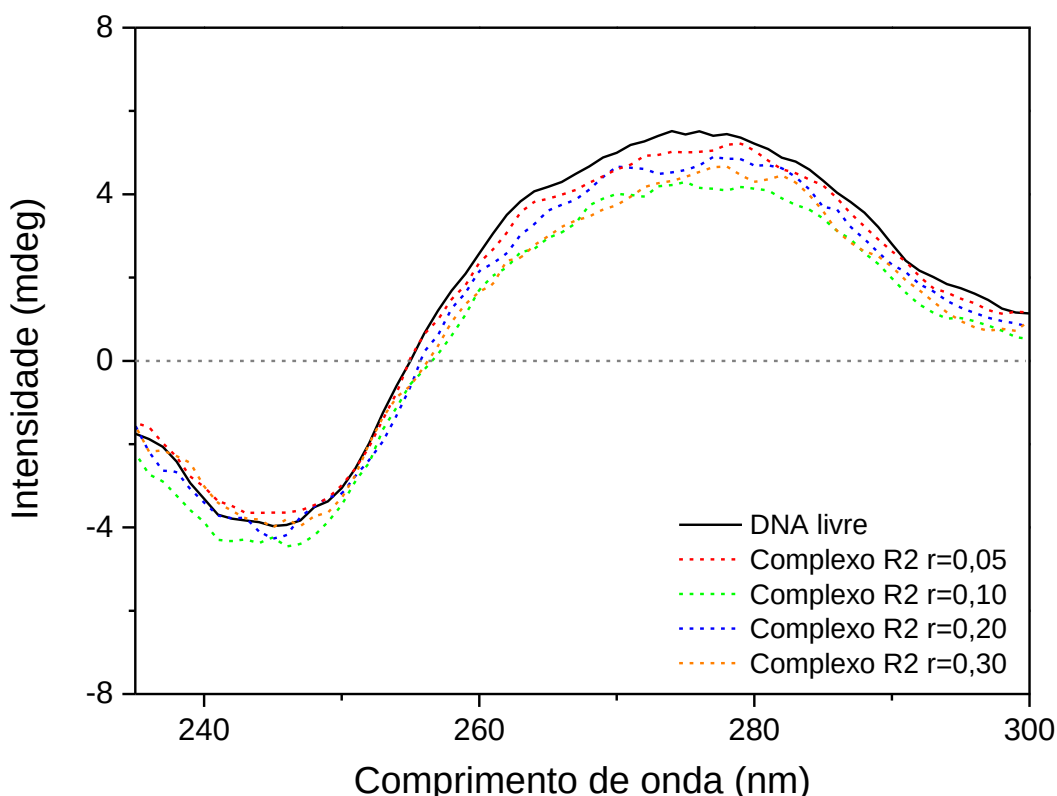


Figura 55 – Espectro de dicroísmo circular do ct-DNA em quantidades crescentes do complexo R2 em tampão tris-HCl pH 7,3. r = razão molar [complexo]/[DNA].

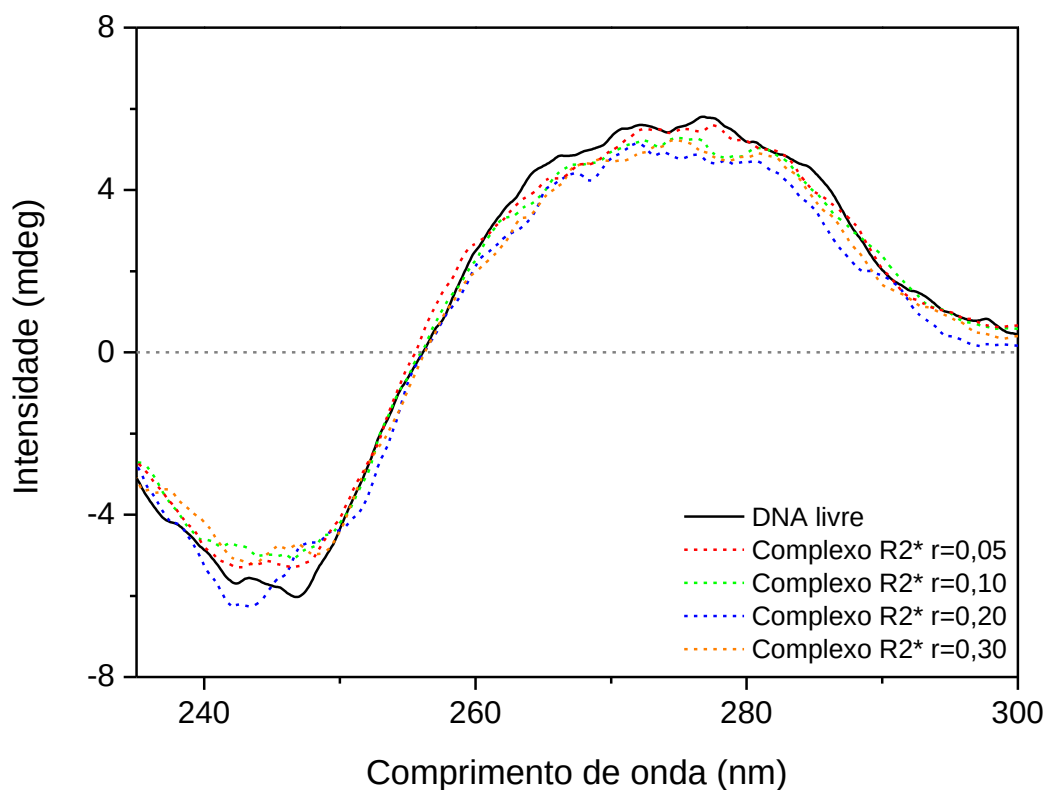


Figura 56 – Espectro de dicroísmo circular do ct-DNA em quantidades crescentes do complexo **R2*** em tampão tris-HCl pH 7,3. r = razão molar [complexo]/[DNA].

5.1.6.2 Titulação espectrofotométrica com DNA

Apesar de não absorverem na região do visível, todos os ácidos nucleicos exibem bandas na região de 240-270 nm, originárias de transições π - π^* de anéis pirimidina e purina que compõe os nucleotídeos (**Figura 57a**). A probabilidade dessas transições é elevada, sendo a absorvidade molar (ϵ) da ordem de $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (RODGER, 2013; SCHMID, 2001; SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013; TINOCO JR. et al., 2002). Em geral a base nitrogenada livre, o nucleosídeo (base ligada ao açúcar), o nucleotídeo (base ligada ao açúcar-fosfato) e o polinucleotídeo desnaturado apresentam espectros muito parecidos nesta região e, conseqüentemente, o espectro UV-Vis característico do DNA é uma banda intensa e larga na região do UV (200–350 nm) com um máximo em 260 nm (**Figura 57b**) (GONZLEZ-RUIZ et al., 2011).

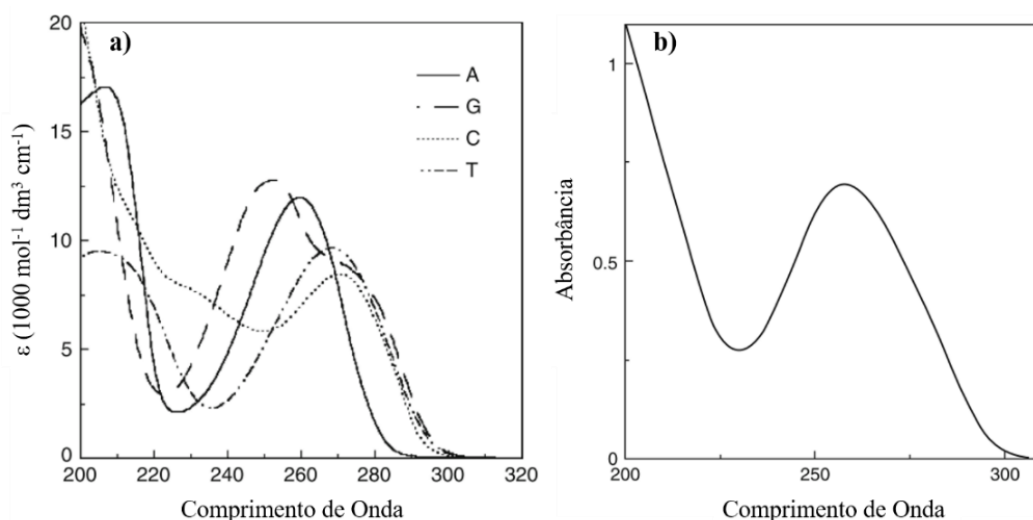


Figura 57 – Espectro de UV-Vis para A) nucleotídeos do DNA desoxiadenosina 5'-monofosfato (A), desoxiguanosina 5'-monofosfato (G), desoxicitidina 5'-monofosfato (C), desoxitimidina 5'-monofosfato (T) e B) DNA de timo de bezerro (100 μM) em tampão fosfato. Adaptado de (RODGER, 2013).

O decréscimo na absorvidade é chamado de hipocromicidade (ou hipocromismo) (TINOCO JR. et al., 2002). A hipocromicidade dos polinucleotídeos ou ácidos nucleicos em relação aos nucleotídeos isolados, origina-se essencialmente das interações de empilhamento entre bases nitrogenadas adjacentes no biopolímero helicoidal e é de natureza eletromagnética, envolvendo interações entre os momentos de transição de dipolo-elétrico das bases individuais e os momentos de transição de seus vizinhos. Logo, depende não somente dos momentos de transição intrínsecos de cada base, que diferem em magnitude e direção para as bases quimicamente distintas, mas também das orientações relativas das bases que interagem entre si. Bases empilhadas absorvem menos por nucleotídeos em relação as bases não empilhadas; duas bases empilhadas possuem uma absorção levemente menos intensa que o dobro da absorção de uma base, e assim por diante. Dessa forma, pares de bases empilhadas em uma dupla hélice absorvem menos que as bases parcialmente empilhadas de um DNA desnaturado (TINOCO JR. et al., 2002).

Uma das grandes aplicações da espectroscopia de absorção da região do UV-Vis com o DNA é no estudo de interação com moléculas pequenas. De maneira geral, essa interação pode ser investigada comparando-se o espectro da molécula pequena, do DNA livre e do complexo DNA/molécula pequena. Uma

vez que ocorra qualquer tipo de interação entre o DNA e a molécula, alterações espectrais são esperadas. Logo, duas abordagens podem ser utilizadas neste estudo: A investigação do espectro de uma concentração fixa de DNA mediante adições crescentes da molécula de interesse ou o estudo do espectro característico da molécula pequena mediante adições crescentes da biomolécula.

De qualquer forma, alterações na estrutura de dupla hélice do DNA resultam no surgimento de efeitos hipercrômicos ou hipocrômicos. A 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).

Além do hipocromismo, compostos que interagem por intercalação geralmente resultam em batocromismo. Pelo fato de o modo de intercalação envolver interações de empilhamento π entre um cromóforo aromático e os pares de bases do DNA, a extensão do hipocromismo é condizente com a força de interação por intercalação. Esse efeito pode ser razoavelmente explicado pela interação do orbital π^* do ligante com o orbital π dos pares de base do DNA, o que causa uma diminuição de energia da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ e, portanto, um deslocamento para o vermelho (batocromismo). Além disso, este mesmo orbital π agora encontra-se parcialmente deficiente em elétrons, diminuindo assim a probabilidade de transição eletrônica ocorrer e, conseqüentemente, resultando no hipocromismo. Desse modo, a combinação tanto de batocromismo (deslocamento para o vermelho) quanto de hipocromismo é normalmente atribuída a ocorrência da intercalação. Em um caso típico de intercalação, observa-se um hipocromismo de >35% e batocromismo >15 nm (REHMAN et al., 2015).

O efeito hipercrômico, por outro lado, pode ser observado pelo aumento significativo da absorbância do DNA caso haja 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. Quando a dupla hélice é tratada com um agente desnaturador, a força que mantém a estrutura de dupla hélice é destruída. A dupla hélice é separada em duas fitas simples que

possuem uma conformação enrolada aleatória. Neste caso, a interação base-nitrogenada base-nitrogenada é reduzida, aumentando a absorbância do DNA na solução pois várias bases estão na forma livre e não formam ligações de H com as bases complementares. Como consequência, a absorbância para o DNA de fita simples será 40% maior que a do DNA de fita dupla na mesma concentração (JANGIR et al., 2011; SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). Além disso, o efeito hipercrômico pode surgir devido a presença de cátions que se ligam ao DNA via ligações eletrostáticas envolvendo os grupos fosfato da cadeia do DNA, causando assim uma contração e dano generalizado à estrutura secundária do DNA.

O efeito hipercrômico também pode ser atribuído ao contato externo, interação eletrostática ou a um desenrolamento parcial da estrutura de dupla hélice, expondo mais bases do DNA. Caso a interação com o DNA seja de natureza fraca, efeitos hipocrômicos ou hipercrômicos também podem ser observados, porém em uma menor intensidade e sem mudanças significativas de desvios nos perfis espectrais (podendo ou não ser observado o efeito batocrômico <6-8 nm) (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013; THAKOR et al., 2019).

A fim de estudar a interação dos complexos metálicos sintetizados com o DNA, a titulação espectrofotométrica envolvendo a biomolécula foi aplicada para os complexos **R2** e **R2***, utilizando concentrações fixas dos complexos e adições crescentes de DNA (**Figuras 58, 59**).

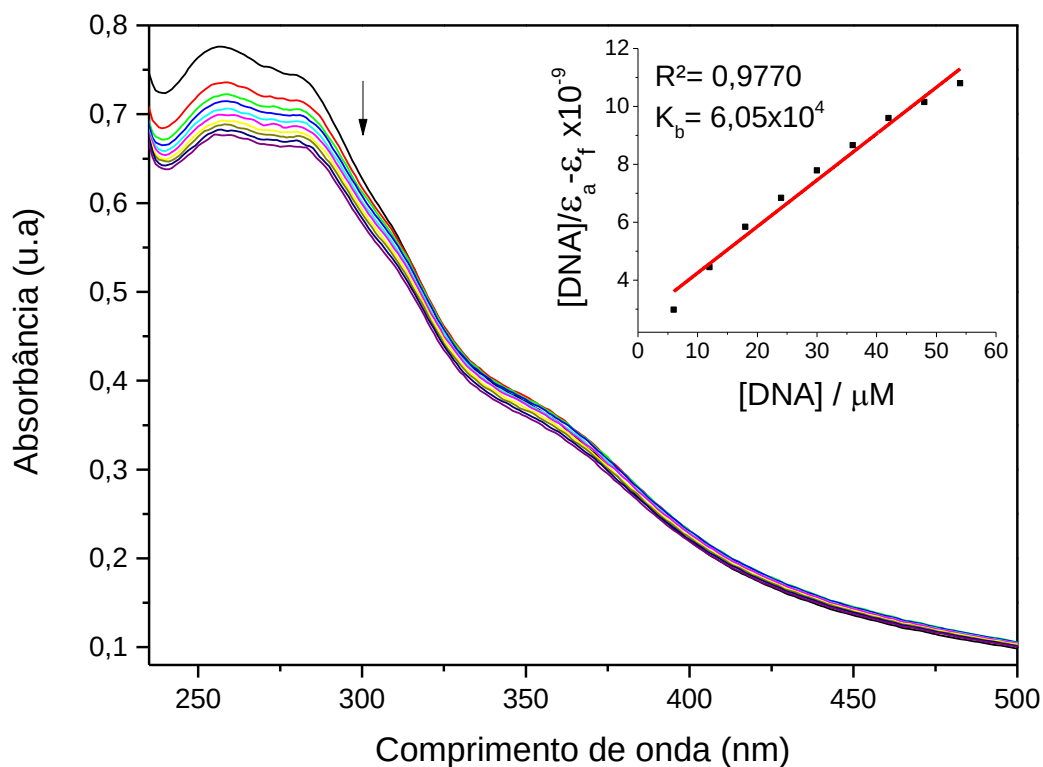


Figura 58 - Espectro de absorção para o complexo **R2** em quantidades crescentes de DNA em tampão tris-HCl pH 7,3. A seta indica o decréscimo da absorbância do complexo em relação a adição crescente de DNA. **No interior:** Gráfico de $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs $[DNA]$ para $\lambda=258$ nm.

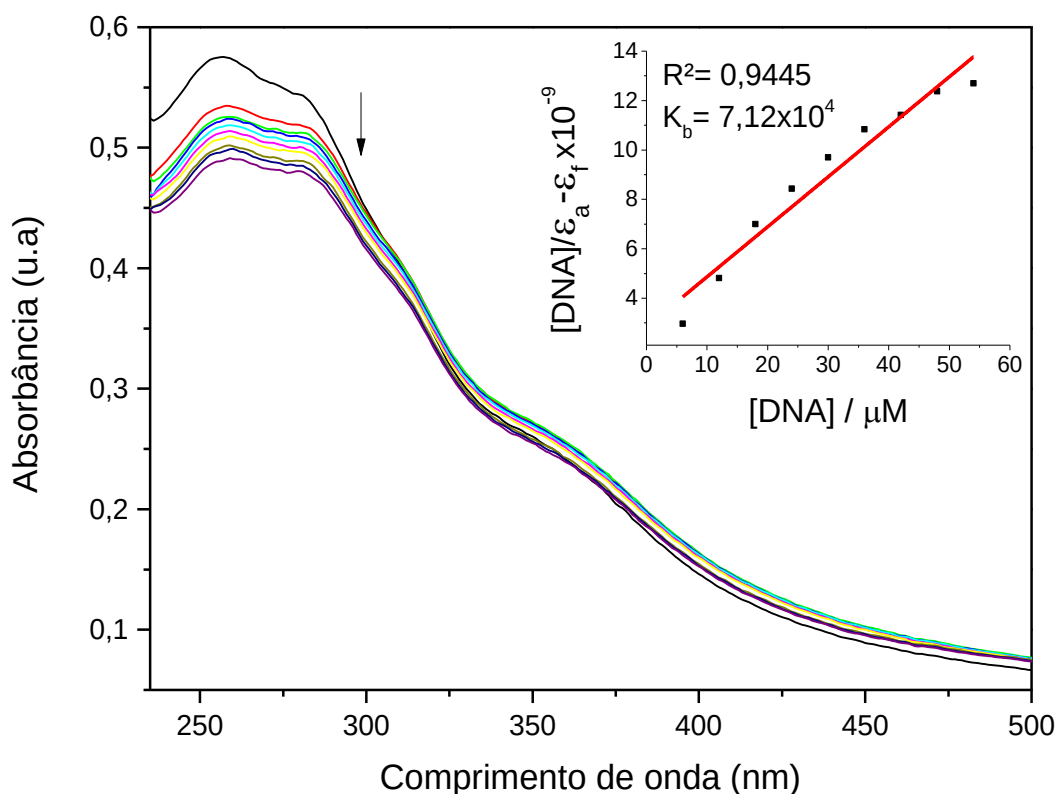


Figura 59 – Espectro de absorção para o complexo **R2*** em quantidades crescentes de DNA em tampão tris-HCl pH 7,3. A seta indica o decréscimo da absorbância do complexo em relação a adição crescente de DNA. **No interior:** Gráfico de $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs $[DNA]$ para $\lambda=258$ nm.

Como pode ser observado as sucessivas adições levaram a um decréscimo nas bandas de absorção monitoradas na região de 258 nm (hipocromismo) de ambos os complexos, porém sem deslocamentos significativos. Para quantificar tal interação, a constante intrínseca K_b foi estimada através da relação de Wolfe-Shimer (WOLFE; SHIMER; MEEHAN, 1987), sendo os valores encontrados da ordem de $6,05 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ($\log K_b$ 4,78) para o complexo **R2** e $7,12 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ($\log K_b$ 4,85) para o complexo **R2***. É interessante notar que os valores se mostraram muito próximos para ambos os complexos muito provavelmente devido as suas similaridades estruturais, que podem resultar em interações semelhantes. Esses valores sugerem ainda que tais complexos devem ter interações moderadas com o DNA, que pode ocorrer por sulco, reforçando o resultado observado anteriormente pelos experimentos de dicroísmo circular, já que intercaladores clássicos apresentam constantes K_b superiores da ordem de 10^6 - 10^7 M^{-1} (BISWAS et al., 2018; THAKOR et al., 2019).

5.1.6.3 Ensaio de competição com Hoechst 33258

Uma vez que resultados iniciais de interação com DNA apontaram para uma interação moderada, estudos adicionais de competição com Hoechst 33258 foram realizados. Hoechst é o nome dado a uma família de corantes pertencente ao grupo das bisbenzamidas. Ela compreende quatro corantes (Hoechst 33258, Hoechst 33342 e Hoechst 34580), sendo sintetizados pela empresa alemã Hoechst AG no início de 1970 e desde então usadas para experimentos envolvendo o DNA. Os corantes são excitados por luz UV ($\sim 350 \text{ nm}$) e emitem um amplo espectro de luz azul com um máximo na região de 460 nm (**Figura 60**). Após a ligação ao DNA, sua fluorescência aumenta ~ 30 vezes, garantindo uma boa relação sinal-ruído. Esse aumento de fluorescência resulta da supressão do relaxamento rotacional e redução da hidratação na ligação ao DNA (**Figura 61**) (BUCEVIČIUS; LUKINAVIČIUS; GERASIMAITĖ, 2018).

O Hoechst 33258 se liga ao DNA em dois modos diferentes: ligação de alta afinidade (K_d 1-10 nM) que resulta da interação específica com o sulco menor do B-DNA e a baixa afinidade ($K_d \sim 1000 \text{ nM}$) reflete a interação não específica com a cadeia principal de açúcar-fosfato de DNA. Em baixas

concentrações do corante, a ligação ocorre preferencialmente no sulco menor DNA (**Figura 60**) (RUIZ et al., 2013).

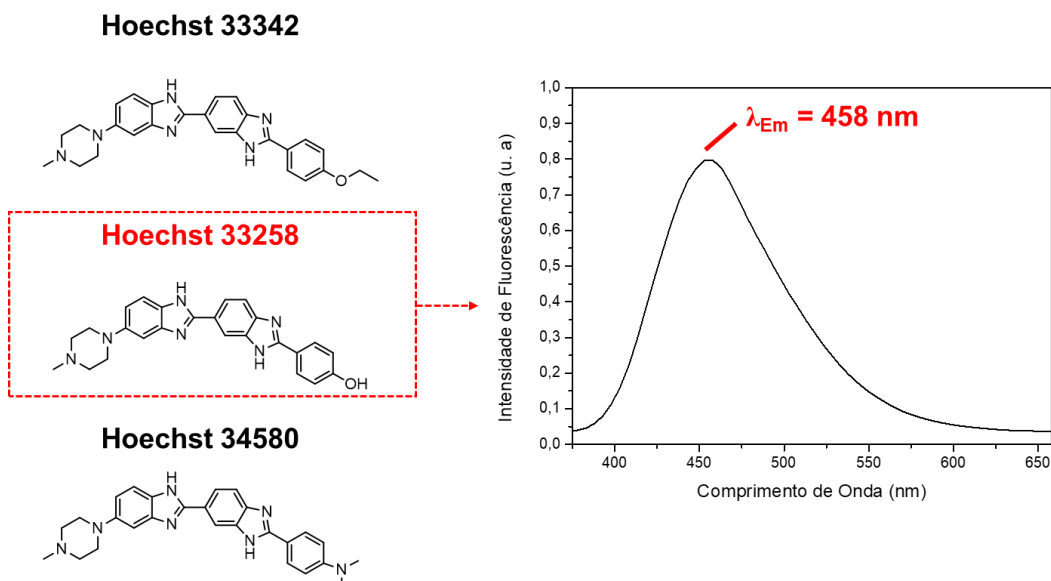


Figura 60 – Estruturas dos corantes da família Hoechst e espectro de emissão para o Hoechst 33258.

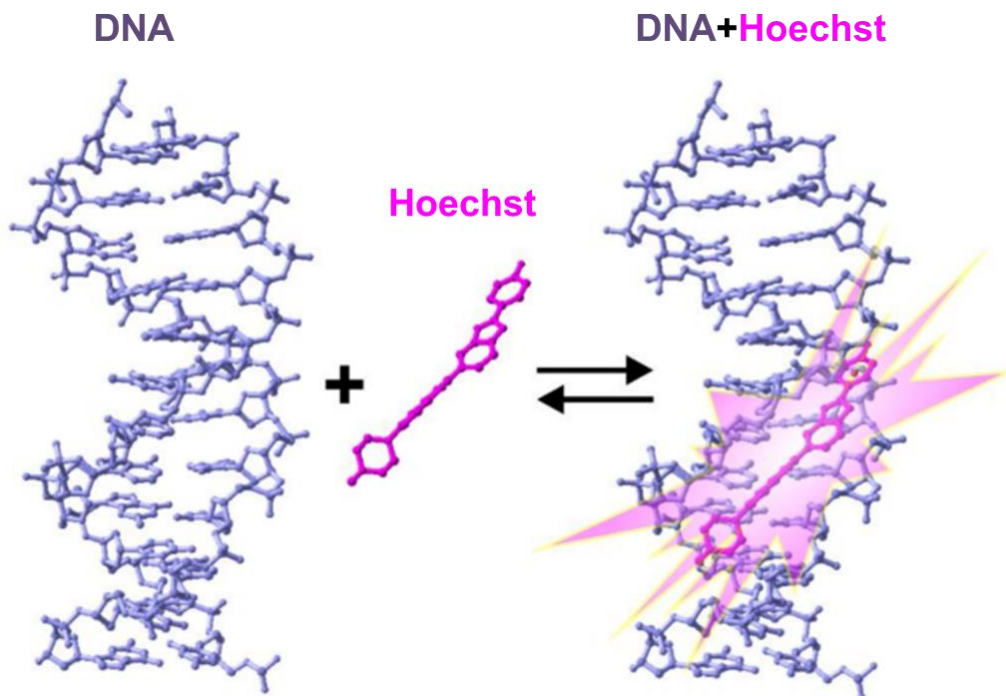


Figura 61 – Representação genérica da interação do corante Hoechst com o sulco menor do B-DNA. Fonte: Adaptado de (BUCEVIČIUS; LUKINAVIČIUS; GERASIMAITĖ, 2018).

Compostos que apresentam afinidade pelo sulco menor ou mesmo que se ligam em outras partes do DNA, são capazes de deslocar o corante, resultado assim em um decréscimo da intensidade da fluorescência do sistema Hoechst-DNA.

O ensaio de competição (**Figuras 62-65**), mostrou que a adição crescente dos complexos **R2** e **R2*** levaram a uma inibição de baixa a moderada na intensidade de fluorescência do sistema Hoechst-DNA, da ordem de 27% para **R2** e de 25% para o **R2***.

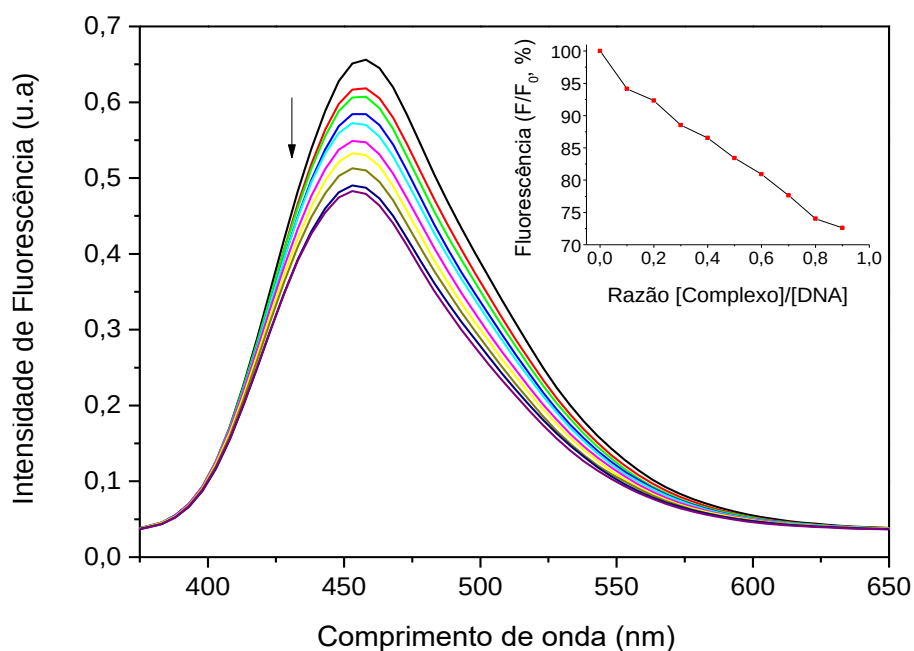


Figura 62 – Espectro de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}} = 340 \text{ nm}$) para o complexo DNA-Hoechst, em tampão tris-HCl pH 7,3, na presença de quantidades crescentes do composto **R2**. A seta indica o decréscimo da intensidade de fluorescência com a adição do composto. **No interior:** Diminuição relativa da intensidade de fluorescência em função do aumento da razão [Complexo]/[DNA] em $\lambda_{\text{emissão}} = 458 \text{ nm}$.

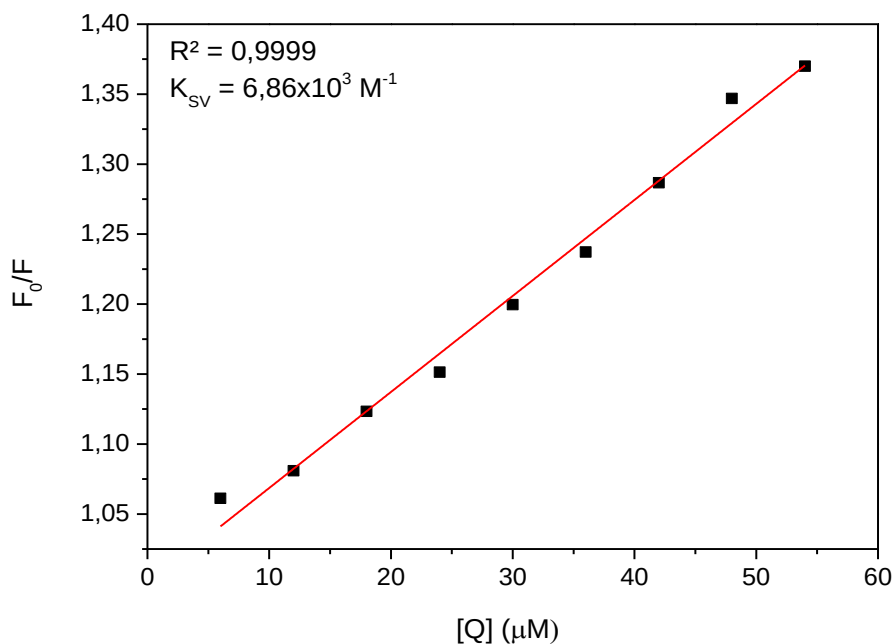


Figura 63 – Gráfico de Stern-Volmer para o ensaio de competição por fluorescência do complexo DNA-Hoechst na presença do composto **R2**. **No interior**: coeficiente de determinação (R^2) e constante de Stern-Volmer (K_{sv}).

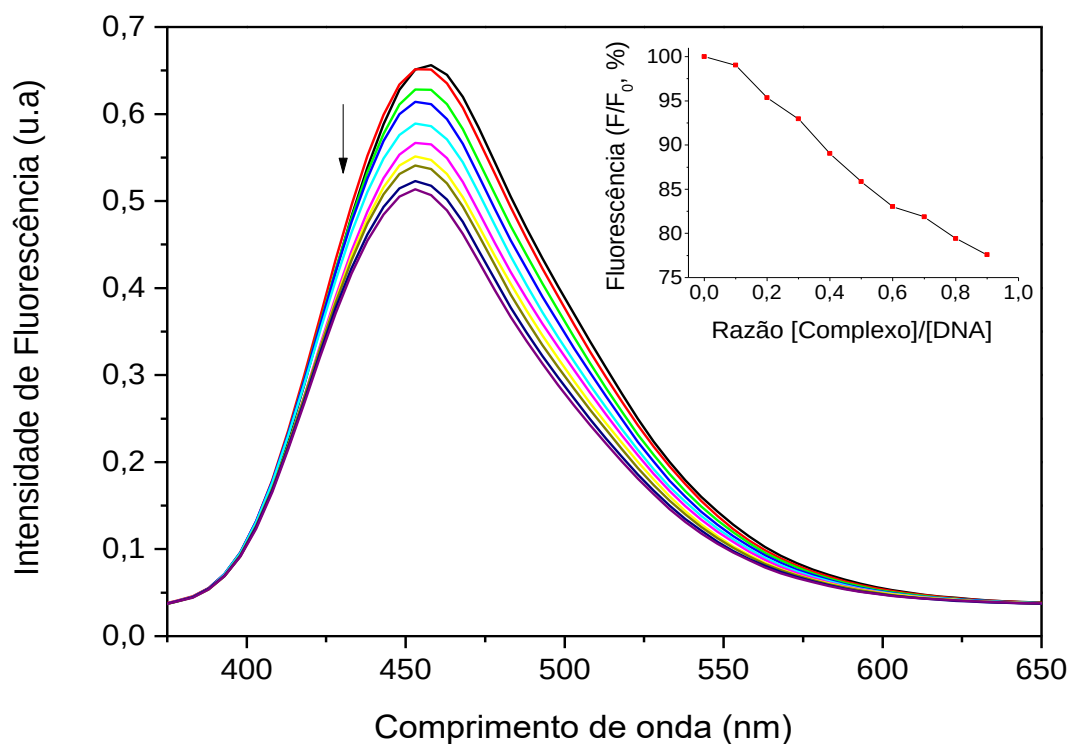


Figura 64 – Espectro de emissão de fluorescência ($\lambda_{excitação} = 340 \text{ nm}$) para o complexo DNA-Hoechst, em tampão tris-HCl pH 7,3, na presença de quantidades crescentes do composto **R2***. A seta indica o decréscimo da intensidade de fluorescência com a adição do composto. **No interior**: Diminuição relativa da intensidade de fluorescência em função do aumento da razão $[\text{Complexo}]/[\text{DNA}]$ em $\lambda_{emissão} = 458 \text{ nm}$.

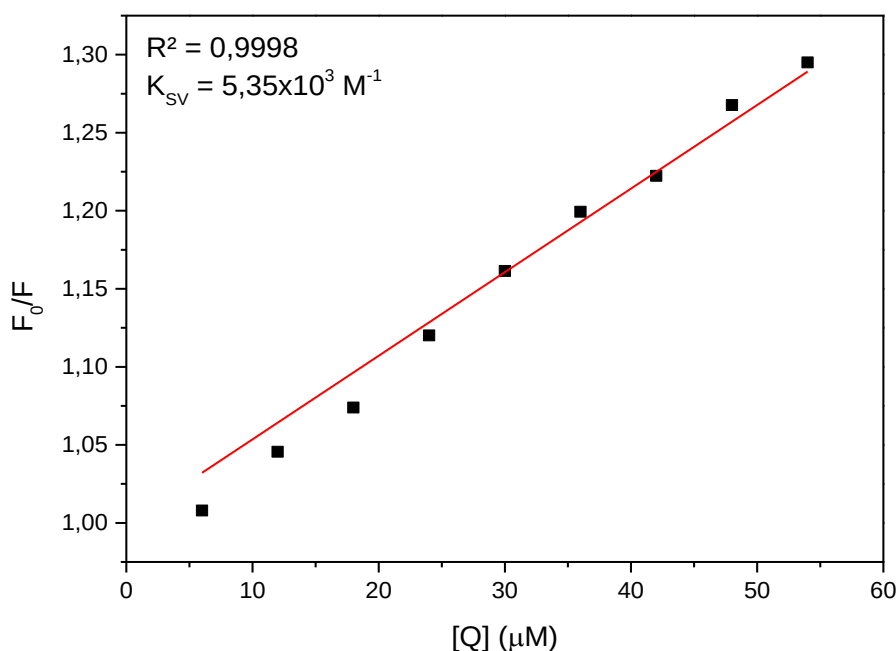


Figura 65 – Gráfico de Stern-Volmer para o ensaio de competição por fluorescência do complexo DNA-Hoechst na presença do composto **R2***. **No interior:** coeficiente de determinação (R^2) e constante de Stern-Volmer (K_{sv}).

As constantes de supressão (K_{sv}) calculadas para os compostos foram da mesma ordem com valores de $6,86 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ($\log K_{sv} 3,84$) para **R2** e $5,36 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ($\log K_{sv} 3,73$) para **R2***. Tais resultados indicam que os complexos em estudo podem apresentar interações moderadas com o sulco menor ou mesmo outras regiões do DNA.

Em conclusão aos estudos de interação com DNA, os resultados anteriores obtidos mostraram de maneira clara que ambos os complexos apresentam interações moderadas com o DNA. A ação antiproliferativa dos complexos pode estar relacionada com a interação com a biomolécula, no entanto, este não deve ser o alvo principal de ação.

5.1.7 Ensaio de inibição com Topoisomerase IIα

As topoisomerases são enzimas fundamentais no que diz respeito ao controle da topologia, replicação e transcrição do DNA, sendo divididas em tipo I e tipo II. O tipo I, que ainda se subdivide em A, B e C, é responsável pela clivagem de apenas uma fita de DNA, resultando na passagem de uma ou duas fitas através da ruptura gerada, antes de reconectá-la novamente. Já as

topoisomerases do tipo II, que se subdividem em tipos II α (TOP2A) e II β (TOP2B), em células eucarióticas, clivam ambas as fitas do DNA de modo a permitir a passagem de outra dupla fita através da clivagem gerada, seguida pela religação da dupla fita inicialmente clivada (BAKER; RAJAN; MONDRAÉN, 2009). A topo II α tem um papel central na segregação do cromossomo e replicação do DNA, sendo por esse motivo, fundamental no processo de proliferação celular. Tais características fazem com que sua elevada expressão seja utilizada como um marcador de células tumorais e como um fator prognóstico em diversas doenças malignas (SHIGEMATSU et al., 2018; WENDORFF et al., 2012). Devido sua ativa participação na proliferação celular assim como sua elevada expressão em células cancerosas, a TOP2A tem sido considerada como um potencial alvo no tratamento antitumoral (WANG; TSE-DINH, 2019). Além disso, essas enzimas são capazes ainda de relaxar o DNA superenrolado e decatenar o DNA entrelaçado, tornando a sua estrutura mais “aberta” e acessível no meio biológico (**Figura 66**) (NITISS et al., 2012).

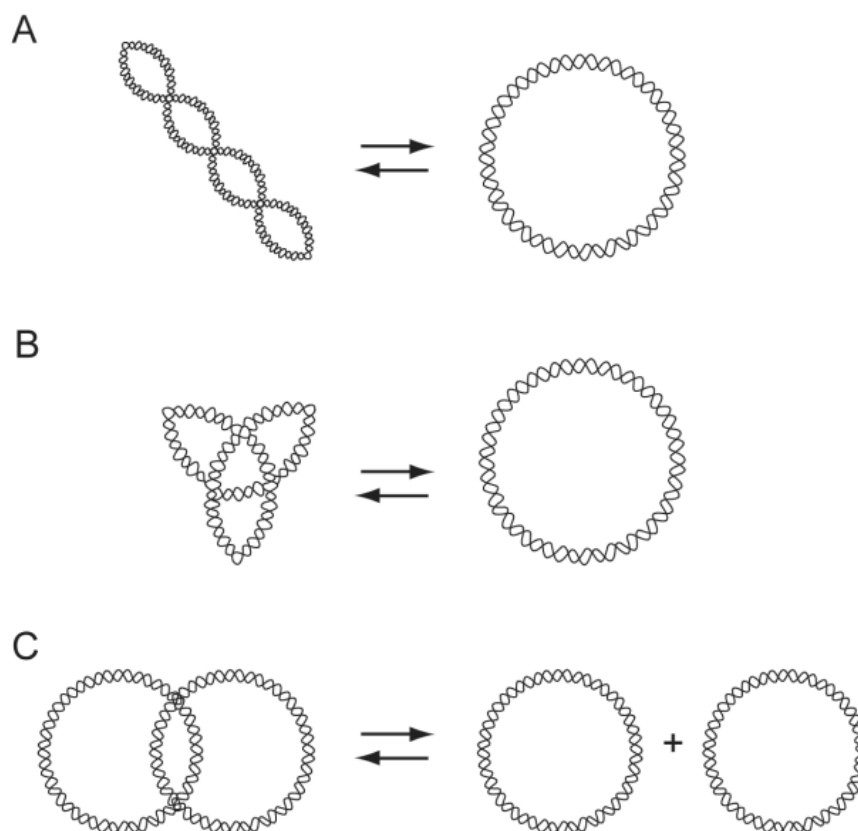


Figura 66 – Reação envolvendo DNA e as Topoisomerases. **(A)** Tanto a topoisomerase I quanto a II podem relaxar o DNA superenrolado. **(B)** Topoisomerase II são capazes desatar/atar o DNA de dupla fita e **(C)** catenar/decatenar o DNA de dupla fita. Adaptado de (NITISS et al., 2012).

Uma vez que o DNA superenrolado e relaxado possuem mobilidades eletroforéticas diferentes, essa característica pode ser utilizada para o estudo da atividade da enzima.

A eletroforese é uma técnica que consiste na migração de moléculas ionizadas através de um meio (gel), sendo tal migração dependente da corrente aplicada e do tamanho/peso da molécula. Moléculas aniônicas migram para o polo positivo (ânodo) enquanto moléculas catiônicas migram no sentido contrário. No caso do DNA, que possui uma natureza polianiônica, a migração deve ocorrer em direção ao ânodo, com a aplicação ocorrendo em poços no cátodo (**Figura 67**) (BNCC.EMCIENCIAS, 2022; BRAMMER, 2001).

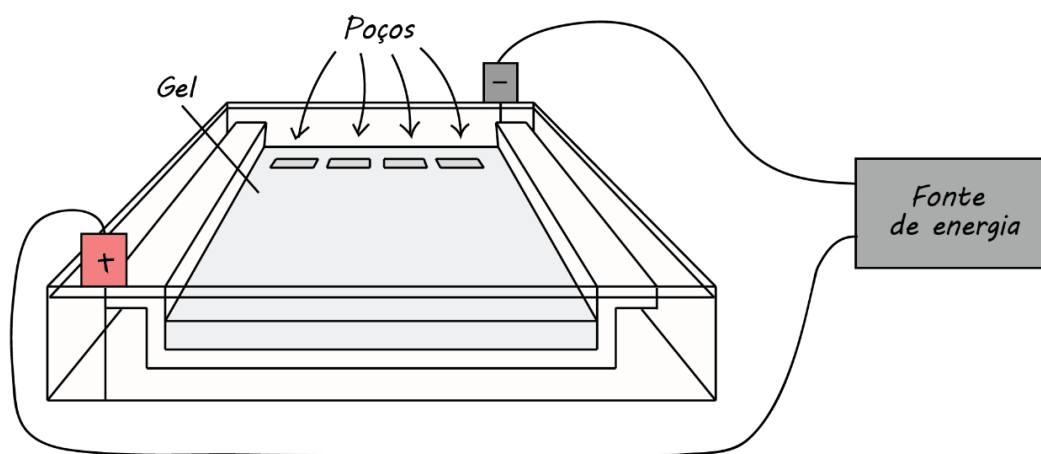


Figura 67 – Representação do sistema de eletroforese em gel. Adaptado de (BNCC.EMCIENCIAS, 2022).

Todas as moléculas de DNA têm a mesma quantidade de carga por massa. Por essa razão, a eletroforese em gel de fragmentos de DNA faz a separação baseada apenas no tamanho. Em geral, as moléculas de DNA mais compactas devem migrar mais facilmente por meio do gel poroso, enquanto moléculas maiores e mais abertas tendem a apresentar dificuldade de migração. Nesse sentido, o DNA superenrolado, mais compacto, apresenta uma mobilidade maior se comparado ao DNA relaxado. Na presença de topoisomerase II e ATP, o DNA superenrolado deve ser relaxado e, portanto, ter sua mobilidade reduzida no ensaio de eletroforese em gel. Por outro lado, na ausência de ATP, da topoisomerase II ou até mesmo de alguma espécie que

possa inibir a atividade da enzima, o DNA deve se manter na sua forma superenrolada, não tendo sua mobilidade afetada no ensaio.

Nesse sentido, o ensaio de eletroforese em gel envolvendo a enzima topoisomerase II α e plasmídeo superenrolado, foi submetido para os complexos **R2** e **R2***. No ensaio, dois controles foram aplicados: Um controle positivo (C+) que continha o plasmídeo superenrolado, topoisomerase II α e ATP e um controle negativo (C-), que continha apenas o plasmídeo superenrolado. Os complexos foram aplicados em diferentes concentrações em poços contendo DNA, topoisomerase II α e ATP (**Figura 68**).

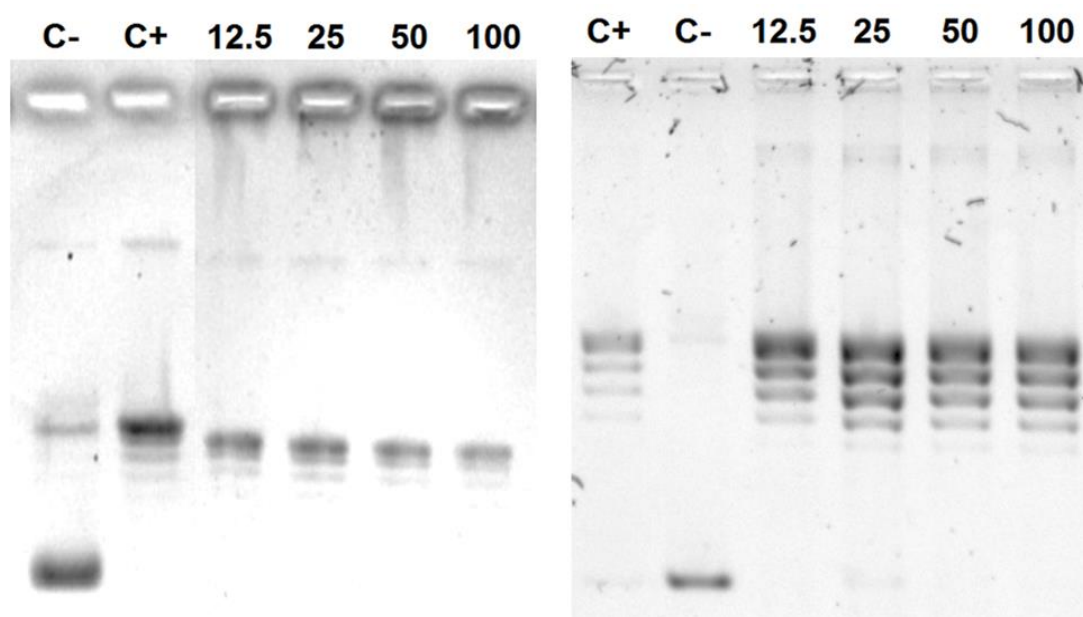


Figura 68 – Ensaio de relaxação da topoisomerase II α . C+ (plasmídeo superenrolado, topoisomerase e ATP), C- (plasmídeo superenrolado) e diferentes concentrações (μ M) do complexo **R2** (esquerda) e **R2*** (direita).

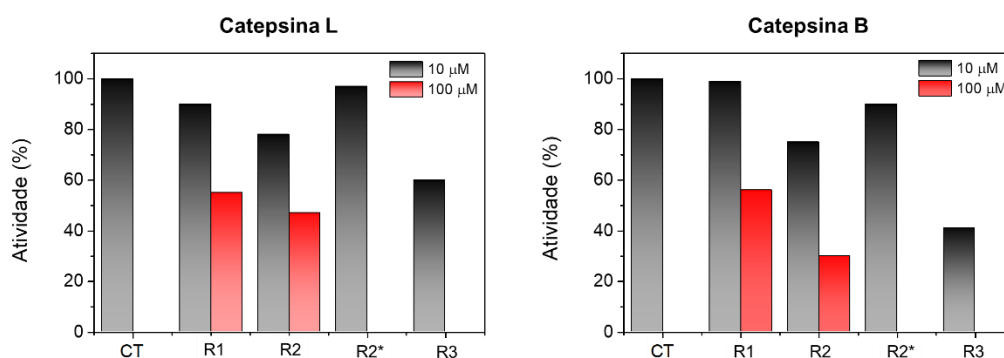
Comparando os dois controles é possível notar a diferença de mobilidade eletroforética do DNA de plasmídeo superenrolado na presença (C+) e na ausência da enzima TOP2A (C-). No controle negativo (C-), fica claro que o plasmídeo superenrolado apresenta maior mobilidade eletroforética. Por outro lado, no controle positivo (C+), a presença de ATP fornece uma condição favorável para a ação da enzima TOP2A sobre o plasmídeo, provocando sua relaxação e consequentemente diminuição na mobilidade.

Com relação à influência dos complexos sobre a mobilidade do DNA, é possível notar que independente da concentração aplicada não ocorrem alterações significativas na mobilidade. Tal fato pode sugerir que os complexos metálicos não apresentam interações apreciáveis com a enzima a ponto de alterar a sua ação sobre o plasmídeo.

Os resultados obtidos indicam que a enzima em questão não deve ser o alvo de ação dos complexos, semelhante ao observado para a interação com DNA.

5.1.8 Ensaio de inibição da Catepsina B e L

Assim como as topoisomerasas, as catepsinas (catepsina B e catepsina L) são enzimas essenciais para as células e também são utilizadas como prognósticos em diversos tipos de doenças malignas. No entanto, sua ação está principalmente envolvida em processos de degradação de proteínas da matriz extracelular (ECM), promovendo um ambiente favorável para o crescimento da célula. Diversos estudos tem mostrado a relação direta entre a expressão da catepsina B e a invasão tumoral, tornando-a assim um alvo importante no controle, progressão e mobilidade do tumor (S GONDI; LAMPE; GONDI, 2014). Por esse motivo, a literatura tem reportado uma variedade de compostos com atividade frente a catepsina B, principalmente compostos orgânicos como nitroxolina, curcumina e chalconas (MIRKOVIĆ et al., 2011). Complexos metálicos também tem sido reportado como potenciais inibidores (CASINI et al., 2008; MITROVIĆ et al., 2019; RUIZ et al., 2013), sendo que, num trabalho reportado por nosso grupo, complexos de paládio contendo ligantes tiossemicarbazona e fosfina apresentaram IC₅₀ para a inibição da enzima em valores abaixo de 10 µM (ROCHA et al., 2016). Logo, os complexos sintetizados neste trabalho foram submetidos ao ensaio de inibição tanto com a catepsina B quanto a L, em concentrações de 10 e 100 µM, conforme indicado a seguir (**Figura 69**).



Enzima	Composto	IC ₅₀ (μM)	%Ativ. em 10 μM	%Ativ. em 100 μM
Cathepsina B	R2	<100	75	31
	R2*	>10	91	Insolúvel
	R3	<10	42	Insolúvel
Cathepsina L	R2	<100	78	47
	R2*	>10	97	Insolúvel
	R3	<100	61	Insolúvel

Figura 69 – **Acima:** Atividade de catepsina B e L (%) na presença dos complexos **R1-R3** em concentrações de 10 e 100 μM. *Compostos precipitados em 100 μM. **Abaixo:** Valores para atividade da catepsina B e L para os complexos de **R2-R3** em 10 e 100 μM.

O efeito inibitório fica em evidente para a catepsina B e em particular para os complexos **R2** e **R3** em comparação aos complexos **R1** e **R2***, demonstrando que a substituição no nitrogênio da tioamida do ligante orgânico pode apresentar um papel crucial para a inibição da enzima. O complexo **R3** se destaca ainda por apresentar a maior inibição frente a catepsina B em comparação ao demais compostos (atividade residual de 42%), em uma concentração de 10 μM, sugerindo que tal complexo pode atuar como um potente agente inibidor da enzima, além de se mostrar ligeiramente mais seletivo para a catepsina B em comparação com a catepsina L.

5.1.9 Ancoragem Molecular com Cathepsina B

Em vista do promissor resultado obtido para o ensaio de inibição da catepsina B, o estudo por ancoragem molecular foi desenvolvido com o intuito de aprofundar o entendimento quanto a interação com a enzima.

As estruturas moleculares 3-D dos complexos **R1-R3** foram construídas contendo o ligante cloreto em vista dos resultados anteriores de estabilidade. A otimização geométrica foi alcançada através de cálculos QM/MM. O desvio

quadrático médio (RMSD) obtido pela sobreposição dos átomos pesados da estrutura molecular teórica e cristalina do complexo **R2*** foi de 0,4884 Å, o que corrobora a qualidade da modelagem (**Figura 70**).

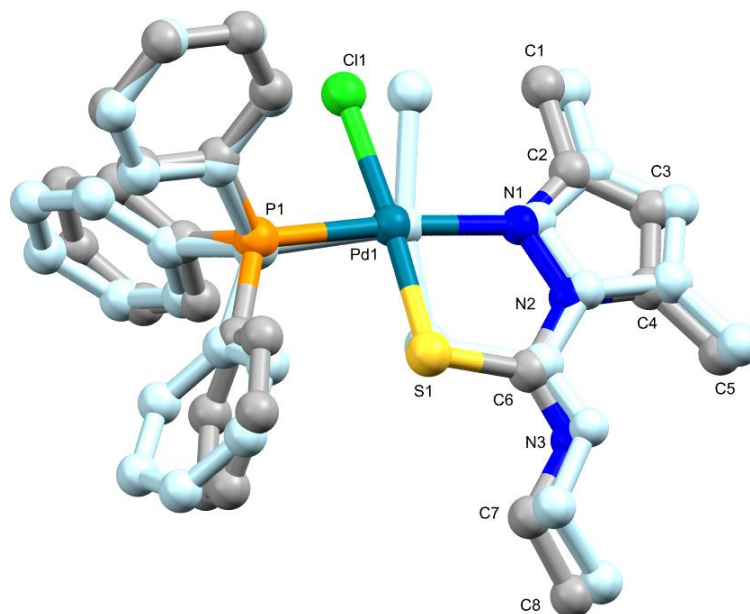


Figura 70 – Sobreposição dos átomos pesados da estrutura molecular teórica (azul claro) e cristalina do complexo **3**. O valor de RMSD calculado foi de 0,4884 Å.

O sítio ativo da catepsina B apresenta um resíduo de cisteína (Cys29) presente no domínio da esquerda que mantém contato com uma histidina (His199) através de um par iônico. Com base em estudos de cisteíno proteases (LOCKWOOD, 2019), é sabido que os resíduos localizados no sítio S são responsáveis pela especificidade da enzima, notavelmente o S₂ já que o S_n' é restrito pela alça de oclusão. De acordo com os estudos de ancoragem, os modos de ligação para os complexos **R1** e **R2** foram similares, exibindo apenas pequenas diferenças de posição (**Figura 71 a-b**).

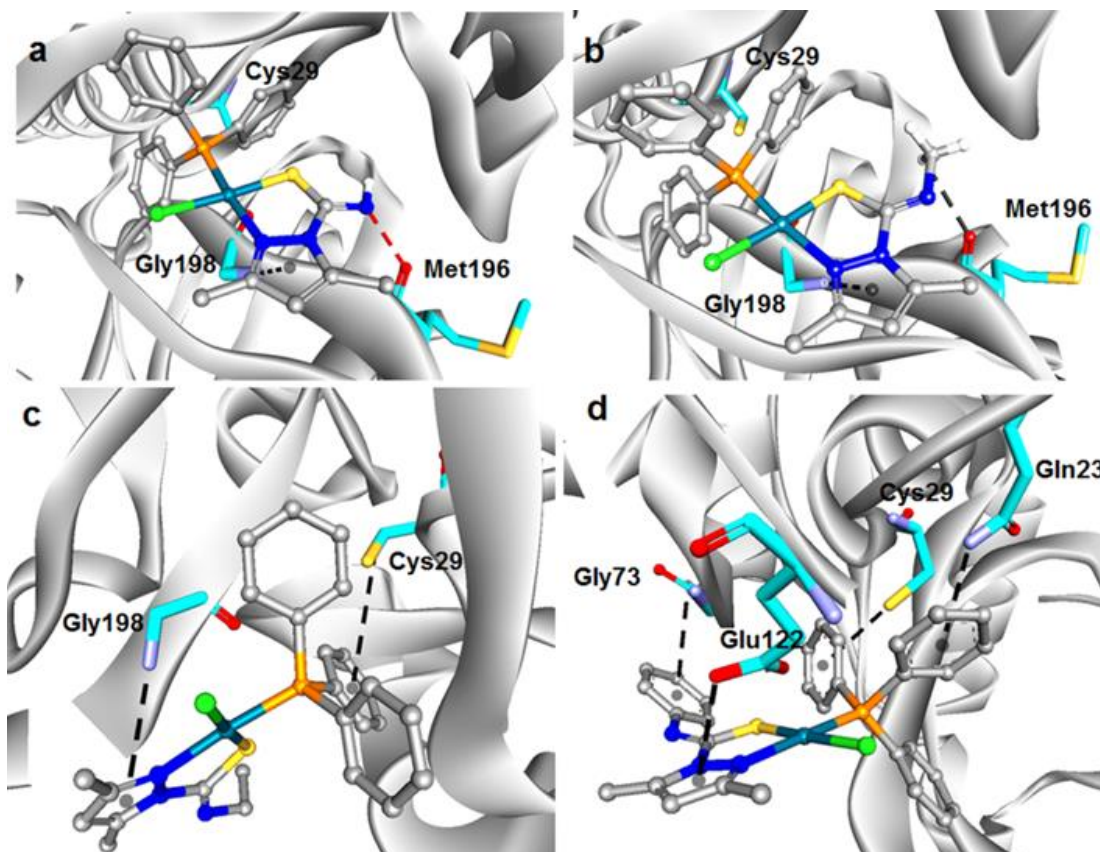


Figura 71 – Melhores poses de ancoragem para os complexos de **R1-R3** no sítio S da catepsina B. As poses de **a-d** são referentes aos compostos **R1-R3**, respectivamente. Resíduos de interação são apresentados pelo modelo de varetas. As cadeias laterais principais são mostradas com átomo de carbono em azul claro, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul escuro e enxofre em amarelo. Os complexos são apresentados com átomo de carbono em cinza, cloro em verde, fósforo em laranja e paládio em ciano. Átomos de hidrogênio foram omitidos por questões de clareza.

Tais complexos não foram capazes de interagir com a Cys29, onde o composto **R1** se encontra em uma proximidade desfavorável em relação a cadeia lateral da Met196 ($N42...OMet196$, $d = 2,80 \text{ \AA}$) mas a presença de um grupo metil na estrutura **R2** permite a presença de ligações de hidrogênio com o resíduo. De acordo com o modelo dos complexos apresentados, o fragmento pirazól, comum em todos, parece ser importante para o reconhecimento proteína-ligante no sítio de ligação S, pelo estabelecimento de interações hidrofóbicas do tipo π -par isolado com Gly198 (**Figura 71 a-c**) e Glu122 (**Figura 71 d**). Da mesma forma, pelo caráter não polar crescente da posição N-terminal da tioamida, a conformação do ligante no sítio ativo da enzima se altera. Assim, os complexos **R2*** e **R3** proporcionam interações hidrofóbicas de pares isolados com a cadeia lateral da Cys29, por anéis aromáticos da trifenílfosfina.

Com relação ao composto **R3**, este foi o único que proporcionou interações adicionais com as cadeias laterais de Gln23 e Gly73, que são importantes para a conformação do inibidor observado na estrutura cristalina (GREENSPAN et al., 2001).

Os resultados computacionais complementam as observações obtidas nos experimentos de inibição com catepsina B, especialmente para o complexo **R3**, que no ensaio se mostrou o mais ativo frente a inibição da enzima e nos estudos de ancoragem apresentou contanto adicionais e importantes no sítio de ligação.

5.2 Complexos ciclopaladados

Compostos ciclopaladados são “metalaciclos” que contém ao menos uma ligação Pd-C, com um ligante orgânico, intramolecularmente estabilizados por ao menos um átomo doador (Y) neutro, onde a porção orgânica atua como um ligante C-doador aniônico de quatro elétrons (CY) ou como um ligante C-doador aniônico de seis elétrons (YCY) (**Figura 72**) (BANGDE et al., 2019; DUPONT; CONSORTI; SPENCER, 2005; DUPONT; PFEFFER, 2008).

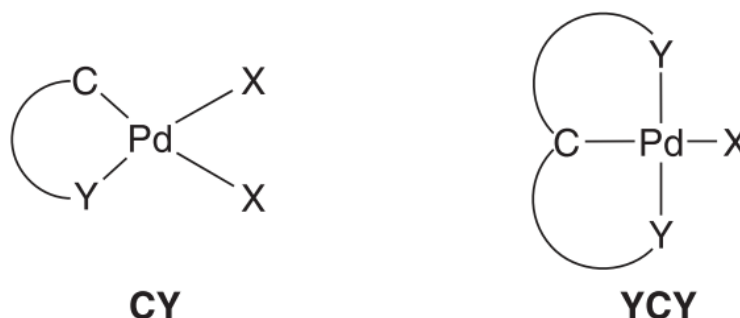


Figura 72 – Estrutura geral de ciclopaladados e suas classificações de acordo com a coordenação com o ligante orgânico. Ligante doador de quatro elétrons (CY) ou seis elétrons (YCY). Adaptado de (DUPONT; PFEFFER, 2008).

Em geral, os ciclopaladados do tipo CY existem como dímeros em ponte de halogênios ou acetatos, podendo adotar tanto uma conformação *cisóide* como também *transóide* (**Figura 73**).

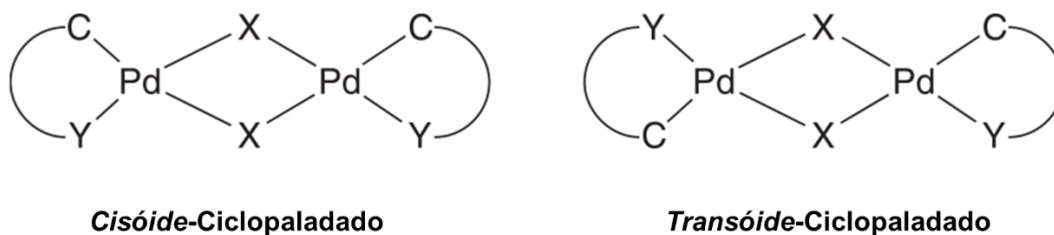


Figura 73 – Possíveis estruturas diméricas de ciclopaladados do tipo CY. Adaptado de (DUPONT; PFEFFER, 2008).

O carbono metalado ao paládio geralmente é um carbono aromático do tipo sp^2 , sendo menos comum carbonos do tipo sp^3 . Entre os ligantes mais comuns estão azobenzenos, aminas, iminas, piridinas, tiocetonas, amidas, entre outros. Os ciclopaladados mais comuns são formados por aminas terciárias e iminas e em anéis de cinco ou seis membros.

Um dos métodos mais simples e diretos de se obter os metalaciclos de paládio é por meio de “ativação da ligação C-H” ou simplesmente reação de ortopaladação. Nesse mecanismo, a presença do grupo Y é crucial para que seja formado o ciclopaladado uma vez que a formação do ciclo depende da coordenação do heteroátomo intramolecular com o metal. Esse processo de coordenação inicial ao heteroátomo (Y) facilita a posterior metalação, determinando a regioseletividade da reação (**Figura 74**) (DUPONT; PFEFFER, 2008).

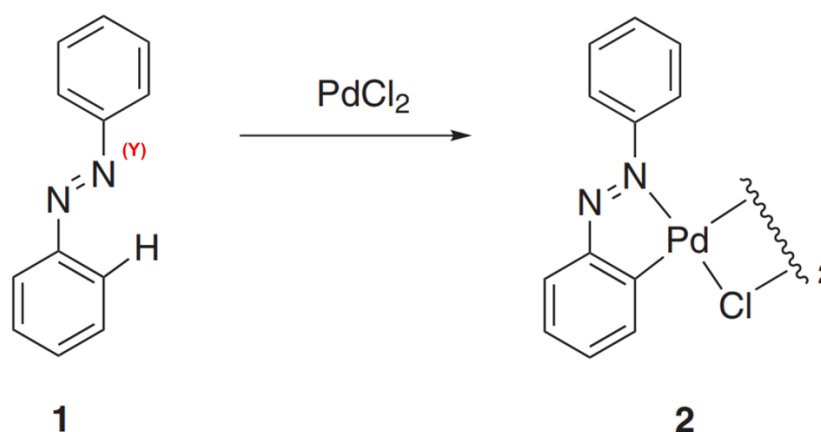


Figura 74 – Representação de uma reação genérica de formação de ciclopaladados utilizando diazobenzeno. Adaptado de (DUPONT; PFEFFER, 2008)

O mecanismo de formação do metalaciclo se assemelha bastante a reações de substituição eletrofílica aromática (SEAr), por conta do caráter eletrofílico do paládio. A reação se dá inicialmente com a coordenação ao heteroátomo (Y) (**Figura 75**), com subsequente formação de um complexo π ou um complexo de ligação de hidrogênio. Caso seja formado um complexo π , ocorre posteriormente um rearranjo levando a formação de um intermediário arenio (complexo σ). Porém se a rota levar a formação do complexo de ligação de hidrogênio, há a formação posterior de um complexo agostico. Independente da rota seguida, ao final ocorre a abstração de um próton que leva a formação do ciclopaladado (DUPONT; PFEFFER, 2008).

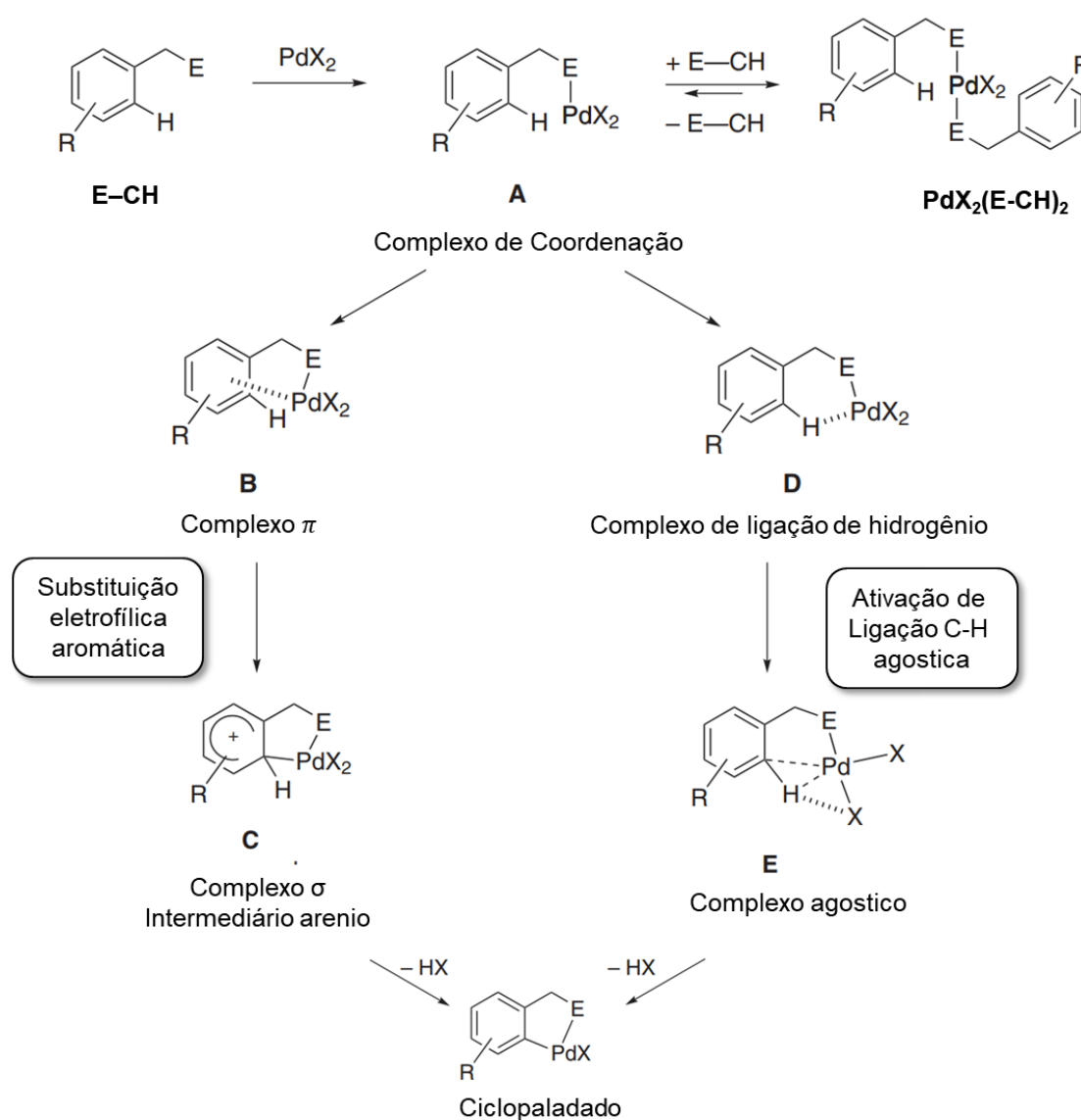


Figura 75 – Mecanismo por ativação da ligação C-H proposto para formação de ciclopaladados. Adaptado de (DUPONT; PFEFFER, 2008).

Um exemplo interessante da aplicação desse mecanismo pode ser observado através da reação entre um derivado aromático e o sal tetracloridopaladato(II) de lítio (**Figura 76**), onde o mecanismo de substituição eletrofílica aromática fica evidente (DUPONT; CONSORTI; SPENCER, 2005).

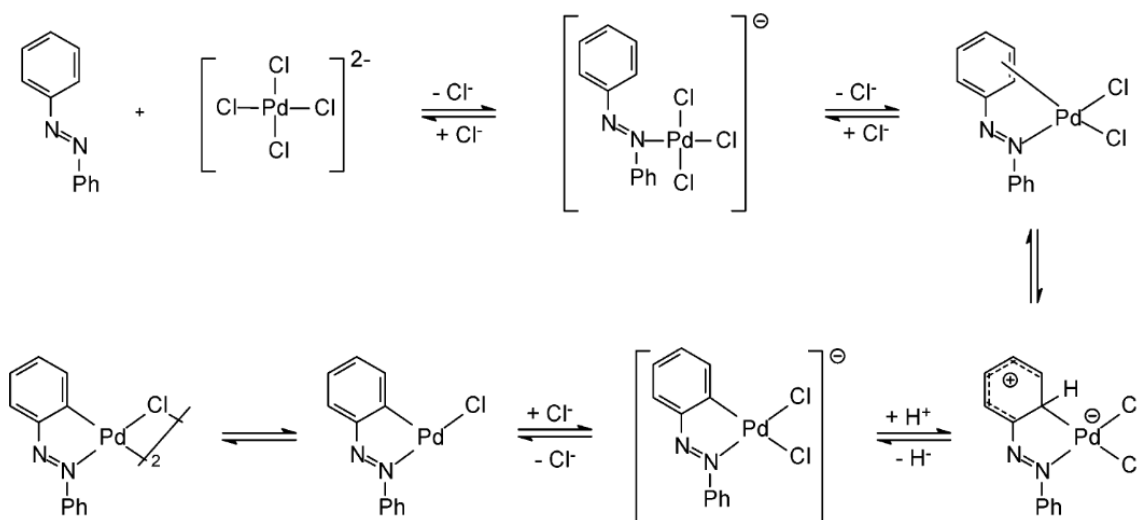


Figura 76 – Mecanismo de formação de ciclopaladados utilizando intermediários aromáticos. Adaptado de (DUPONT; CONSORTI; SPENCER, 2005).

Nesse caso, o complexo final leva a formação de um dímero, o que é comum para ciclopaladados do tipo CY, o que permite reações adicionais de clivagem utilizando outros ligantes de interesse como fosfinas, piridinas, entre outros.

Nesse sentido, na segunda etapa do projeto, se propôs o estudo de estabilidade em solução aquosa assim como da interação com DNA e albumina (HSA) de dois complexos ciclopaladados derivados do ligante N,N-dimetil-1-feniletilamina (dmpa), clivados com 2,6-lutidina. Os complexos foram obtidos a partir do precursor $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N}^{\prime}\text{-dmpa})(\mu\text{-Cl})]_2$ (**Figura 77**).

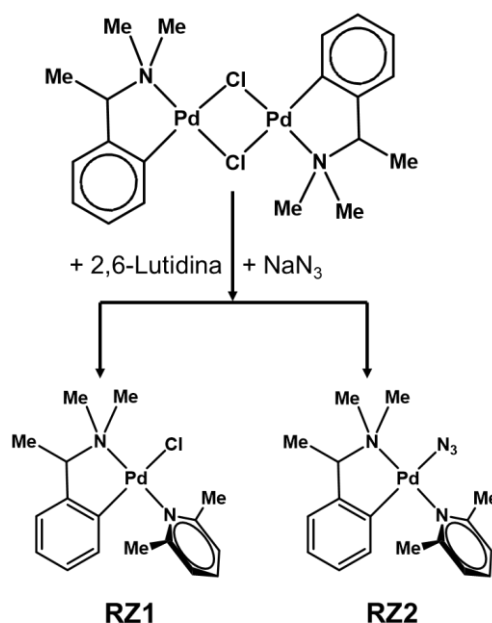


Figura 77 – Estrutura dos complexos ciclopaladados obtidos a partir do precursor $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N}'\text{-dmpa})(\mu\text{-Cl})]_2$.

Tais complexos foram selecionados baseado em resultados de atividade antiproliferativa (IC_{50}) (**Tabela 6**) de um trabalho já iniciado em nosso grupo por Cunha (CUNHA, 2017), onde foi reportada a síntese, caracterização e parcial aplicação biológica de quatro complexos derivados do ligante N,N-dimetil-1-feniletilamina (dmpa) e 2,6-lutidina (**Figura 78**).

Tabela 6 – Resultados de atividade antiproliferativa (IC_{50}) para os complexos $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N}'\text{-dmpa})(\text{X})(\text{luti})]$ para as linhagens de Glioblastomas (U251 e T98G) e melanomas humanos malignos (HT144 e LB373).

Composto	IC_{50} (μM)			
	U251	T98G	HT144	LB373
$[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N}'\text{-dmpa})(\text{Cl})(\text{luti})]$	$3,1 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,3$	$4,3 \pm 2,4$
$[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N}'\text{-dmpa})(\text{I})(\text{luti})]$	$1,0 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,6$	$0,8 \pm 0,4$	$1,6 \pm 1,4$
$[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N}'\text{-dmpa})(\text{N}_3)(\text{luti})]$	$1,0 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,5$	$0,6 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,7$
$[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N}'\text{-dmpa})(\text{NCO})(\text{luti})]$	$1,2 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,7$	$1,5 \pm 1,2$
Cisplatina	$1,1 \pm 0,3$	$1,7 \pm 1,0$	$1,3 \pm 0,2$	$5,6 \pm 3,5$

Fonte: (CUNHA, 2017).

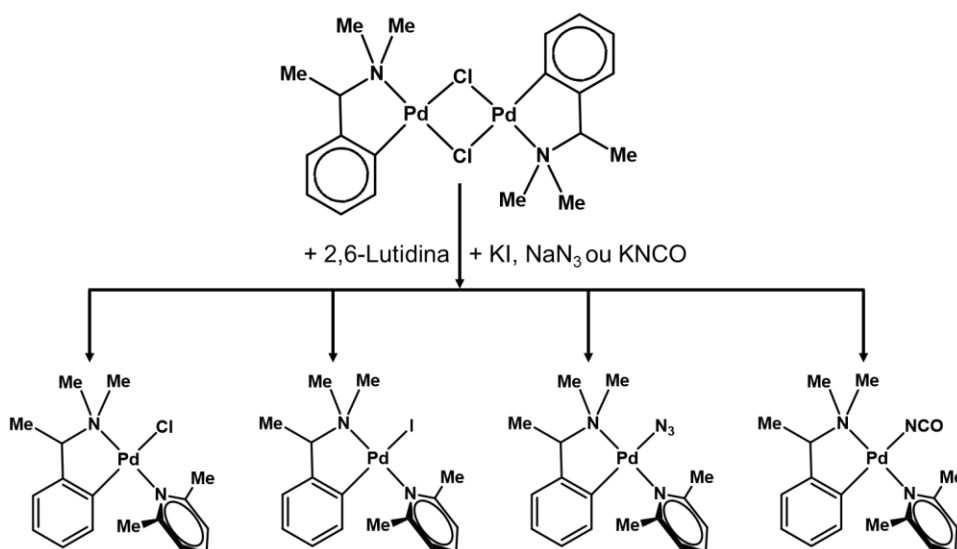


Figura 78 – Estrutura dos complexos ciclopaladados obtidos a partir do precursor $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N}'\text{-dmpa})(\mu\text{-Cl})]_2$, reportados no trabalho de (CUNHA, 2017).

Entretanto, como é possível observar na **tabela 6**, os complexos não mostraram diferenças apreciáveis entre si no que diz respeito à atividade antiproliferativa. No entanto, em um trabalho recente publicado em nosso grupo (DA CUNHA et al., 2020), uma série de quatro complexos ciclopaladados derivados do N,N-dimetil-benzilamina (dmba) foram estudados (**Figura 79**).

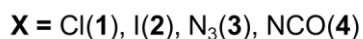
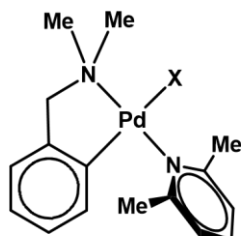


Figura 79 – Estrutura dos complexos apresentados no trabalho de Cunha, G (DA CUNHA et al., 2020).

Neste trabalho foi observado que os compostos tinham baixa estabilidade em solução aquosa, onde a espécie majoritária era oriunda da eliminação do haleto/pseudo-haleto por uma molécula de H_2O ou OH^- . A extensão dessa dissociação estava relacionada ao tipo de haleto/pseudo-haleto presente na estrutura do complexo, sendo a maior dissociação observada para o complexo

que continha o iodeto e praticamente intacto para o complexo que continha cloreto (DA CUNHA et al., 2020).

Por conta de tais observações, imaginou-se que este comportamento também seria observado na série de complexos contendo o ligante dmpa, visto a similaridade estrutural (**Figura 80**)

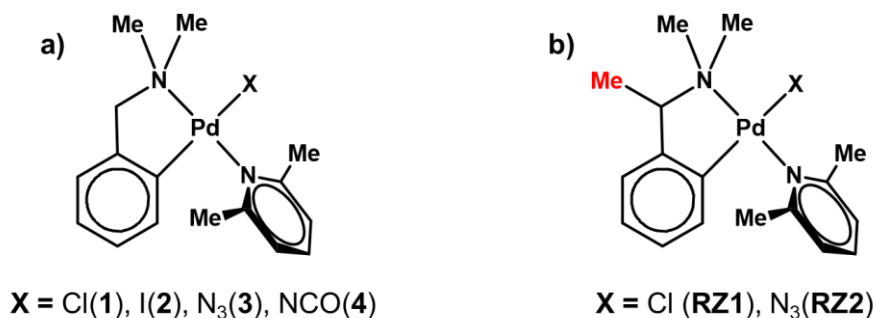


Figura 80 – Comparação entre as estruturas dos complexos apresentado por Cunha (DA CUNHA et al., 2020) (a) e os complexos trabalhados na segunda metade do projeto (b).

Assim, a escolha dos complexos **RZ1** e **RZ2**, na realidade, é resultado de duas observações: O melhor resultado de atividade antiproliferativa (IC_{50}) (**Tabela 6**), $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{N}_3)(\text{luti})]$ (**RZ2**) e o complexo que pode apresentar a melhor estabilidade em solução aquosa, $\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{Cl})(\text{luti})$ (**RZ1**).

Apesar de já terem a caracterização reportada anteriormente (CUNHA, 2017), espectros de massa (ESI-MS), espectros vibracionais na região do infravermelho (IV), assim como espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram realizados para os complexos **RZ1** e **RZ2** para confirmação da obtenção correta das estruturas (Anexo II – Complexos Ciclopaladados).

5.2.1 Estabilidade química em solução

Em vista da aplicação biológica dos compostos, a compreensão das estruturas formadas em solução é importante para uma correta atribuição de atividade. Nesse sentido, os complexos **RZ1** e **RZ2** foram submetidos a ensaios de estabilidade por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis assim como por RMN de ^1H .

Como um ensaio preliminar, espectros de UV-Vis para os complexos ciclopaladados foram obtidos uma solução aquosa contendo DMSO:Tampão tris-HCl pH 7,3 (70:30) em 0, 24 e 48h após seu preparo (**Figura 81-82**).

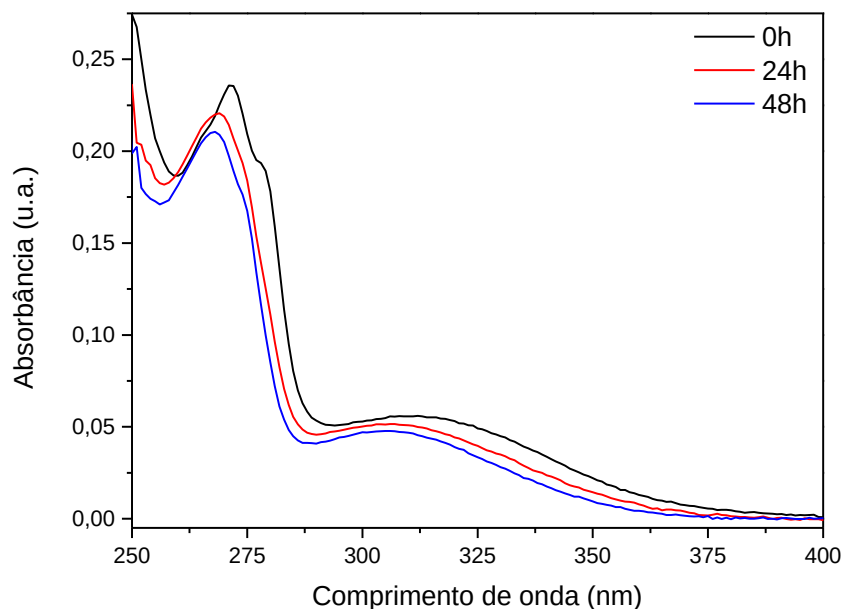


Figura 81 – Espectros de absorção na região UV-Vis para o complexo $[Pd(C^2,N-dmpa)(Cl)(luti)]$ (**RZ1**) em DMSO:tampão Tris-HCl 70:30 em 0, 24 e 48h após o preparo da amostra.

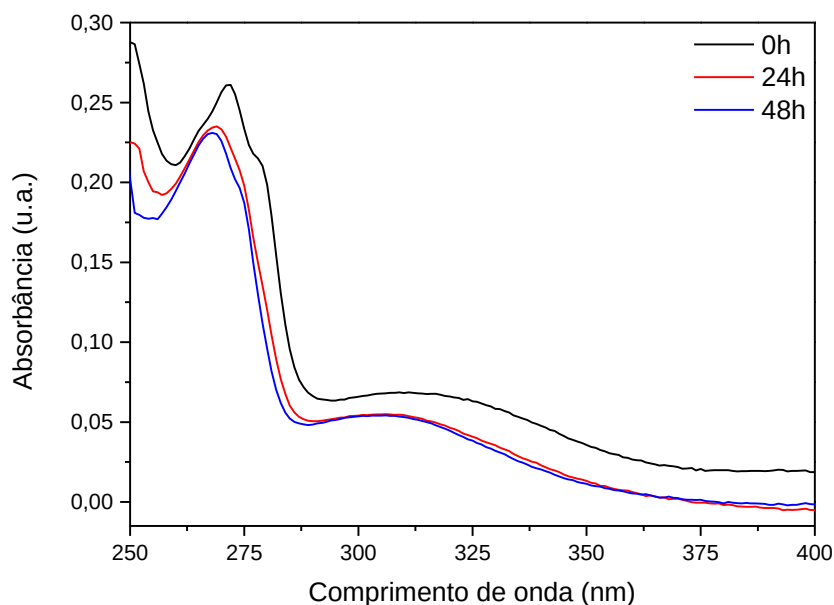


Figura 82 – Espectros de absorção na região UV-Vis para o complexo $[Pd(C^2,N-dmpa)(N_3)(luti)]$ (**RZ2**) em DMSO:tampão Tris-HCl 70:30 em 0, 24 e 48h após o preparo da amostra.

Os espectros em comum observados para os dois complexos são provenientes de bandas de transferência de carga. O comportamento apontado

pelos espectros, ao longo das 48h, mostra um ligeiro deslocamento para o azul (hipsocrômico) acompanhado de um efeito hipocrômico. As mudanças observadas são pouco significativas, porém podem ser atribuídas a um processo de autoagregação em meio aquoso (FUENTES et al., 2020; MATESANZ et al., 2018). De qualquer forma, os espectros de UV-Vis fornecem poucas informações com relação a estrutura dos complexos ciclopaladados, sendo assim o ensaio complementando por estudos de RMN de ^1H .

Os espectros de ressonância foram obtidos para os complexos em uma solução de $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-d}_6$ (30/70%) e então registrados em 0, 24, 48 e 72h, após a preparação das amostras (**Figura 84,87**).

Os espectros mostram a presença de três diferentes espécies em solução: uma espécie principal “a” e duas outras espécies minoritárias (“b” e 2,6-lutidina livre) que se mantem constantes após as primeiras 24h (**Figura 85, 86, 88, 89**). A espécie principal “a” apresenta o mesmo conjunto de sinais já observados nos espectros obtidos em CDCl_3 (**Figura 83**, Anexo II – Complexos ciclopaladados, anexo 22,23), apesar dos sinais estarem ligeiramente mais deslocados.

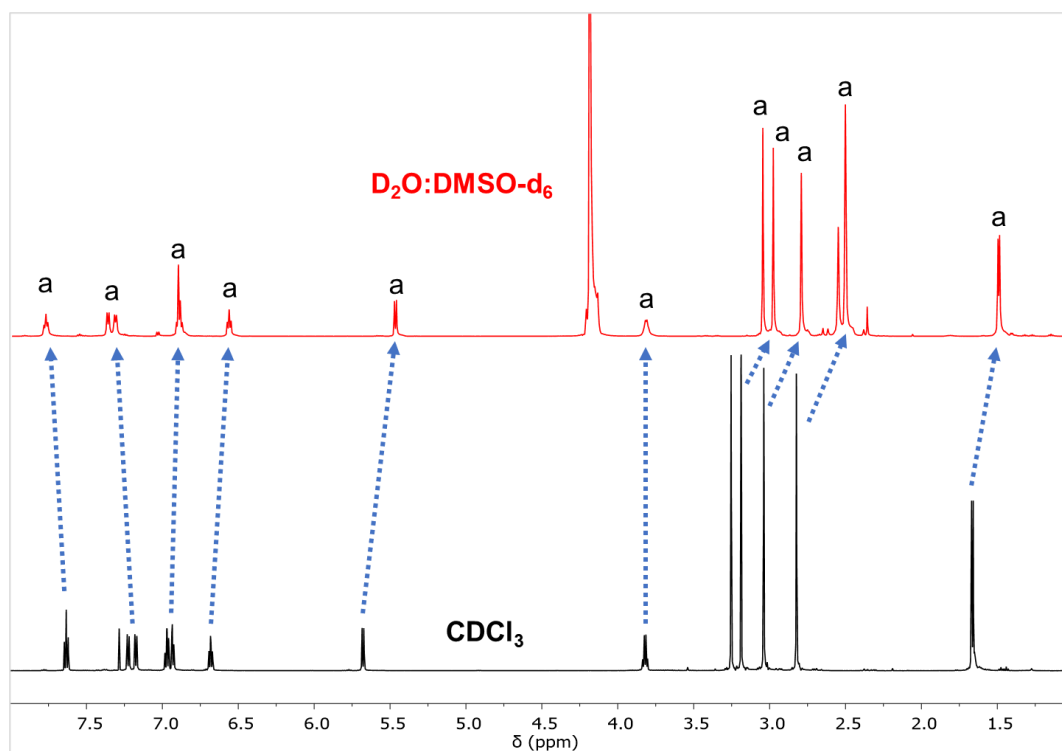


Figura 83 – Comparação entre o espectro de RMN de ^1H para o complexo **RZ1** em CDCl_3 e $\text{D}_2\text{O}:\text{DMSO-d}_6$ (30%:70%), evidenciando a espécie majoritária “a”. Setas indicam o deslocamento dos sinais nos diferentes solventes.

Tal fato pode ser explicado considerando a substituição do grupo aniônico -X nos complexos $[\text{PdX}(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{lut})]$ por moléculas de solvente ou íons OH^- (S), resultando em uma espécie em solução do tipo $[\text{Pd}(\text{S})(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{lut})]^n$ ($n=0, +1$). Essa observação parece de acordo com o que foi apresentado anteriormente nos espectros de ESI-MS (Anexo II – Complexos ciclopaladados 19-20), já que é possível notar a ausência do grupo aniônico. Nesse ponto é difícil obter mais informações sobre a estrutura de “b”, uma vez que seus sinais de RMN são obscurecidos pelos de $[\text{Pd}(\text{S})(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{lut})]^n$. No entanto, parece razoável inferir que “b” pode ser espécie do tipo $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{S})_2]^m$, com completa saída do ligante 2,6-lutidina (**Figura 90**).

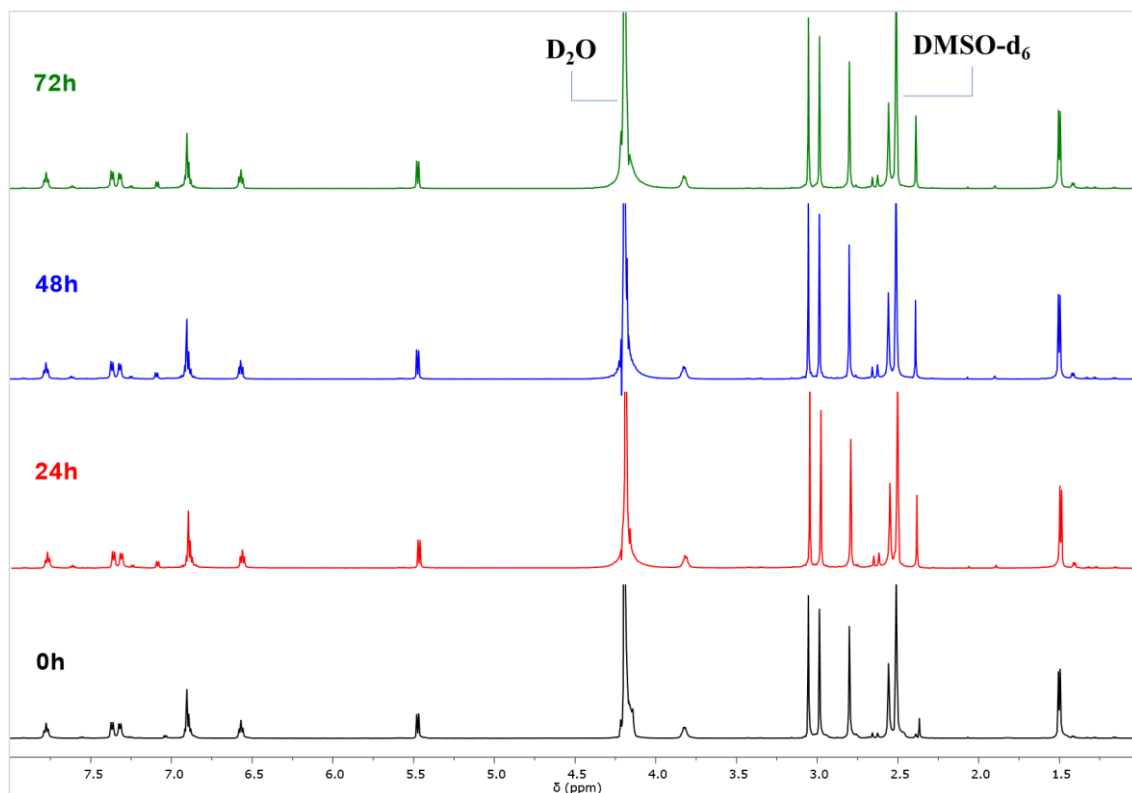


Figura 84 – Espectros de RMN de ^1H para o complexo **RZ1** em uma solução de $\text{D}_2\text{O}:\text{DMSO-d}_6$ (30%:70%) obtidos em 0, 24, 48 and 72h após a preparação da amostra.

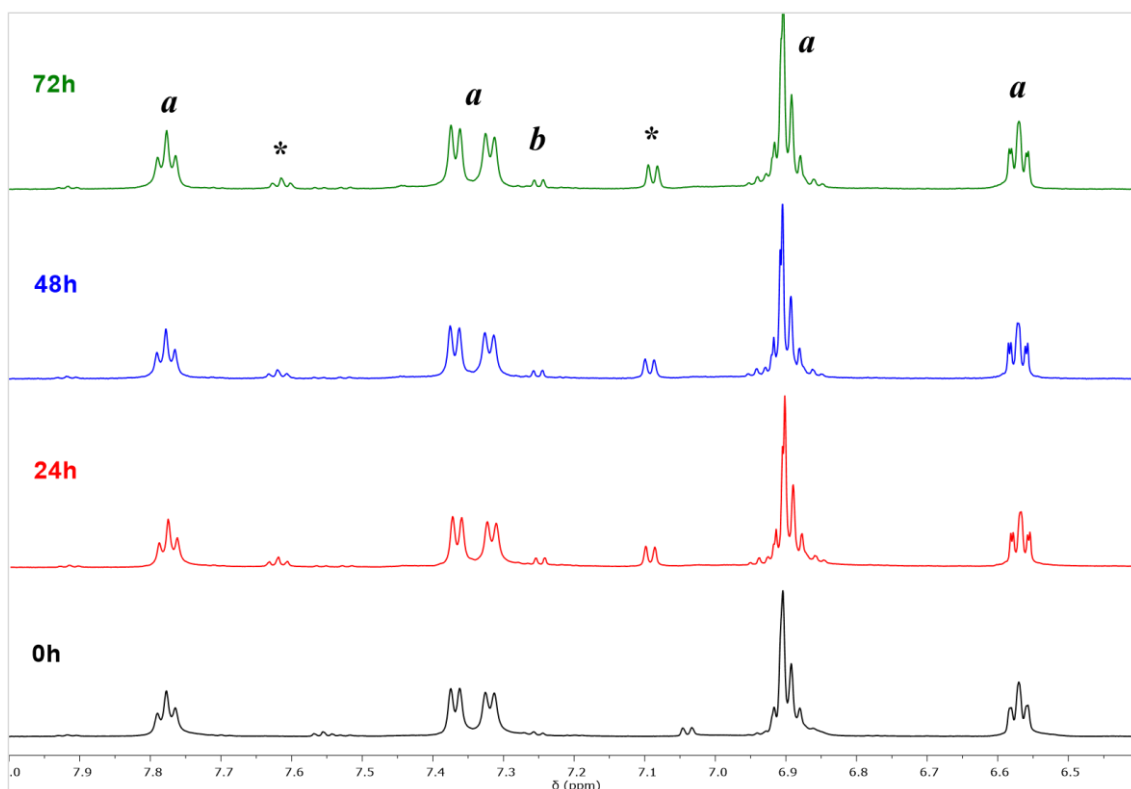


Figura 85 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (8,0-6,5 ppm) para o complexo **RZ1**. a = $[\text{Pd}(\text{S})(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\text{lut})]^n$; b = espécie b; * = 2,6-lutidine livre.

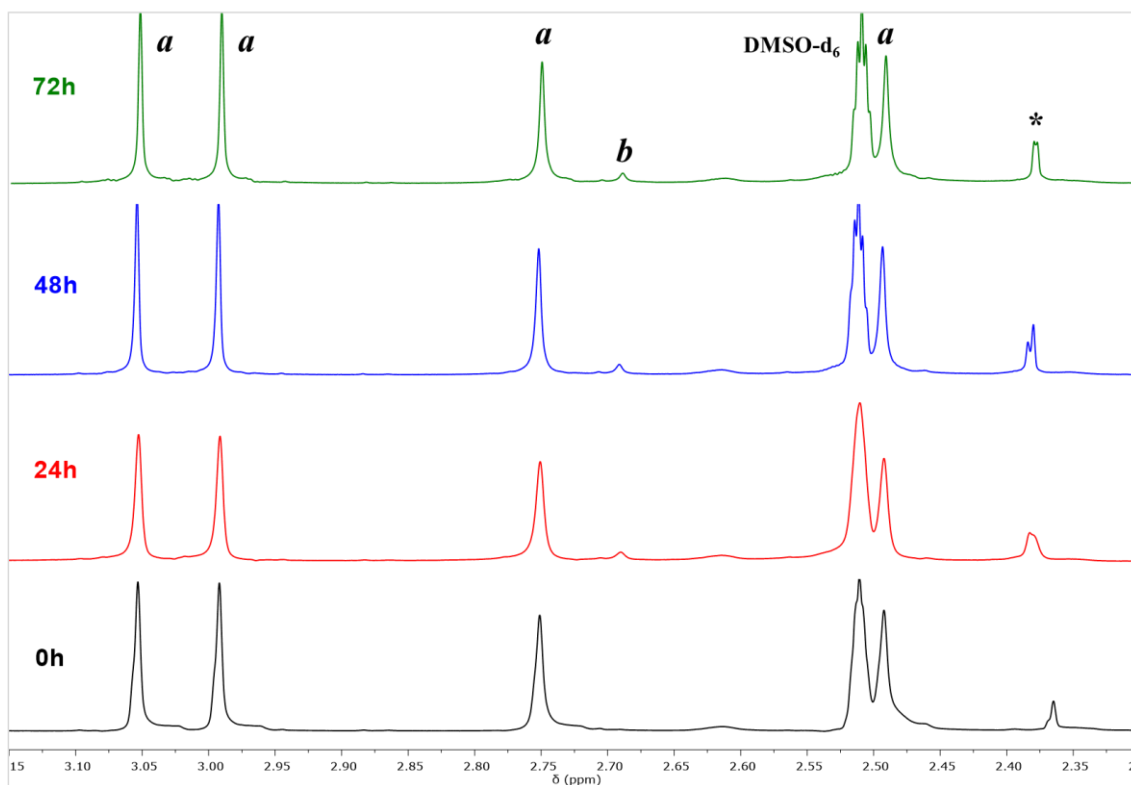


Figura 86 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (3,15-2,3 ppm) para o complexo **RZ1**. a = $[\text{Pd}(\text{S})(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\text{lut})]^n$; b = espécie b; * = 2,6-lutidine livre.

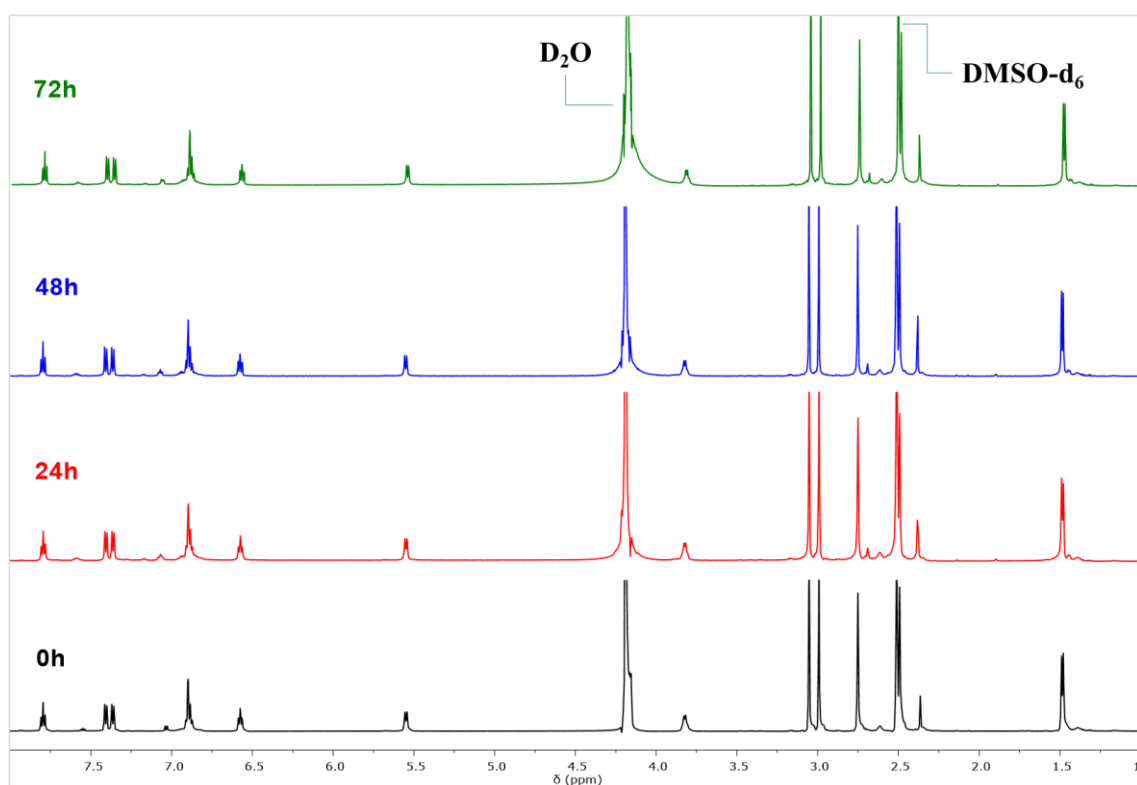


Figura 87 – Espectros de RMN de ^1H para o complexo **RZ2** em uma solução de D_2O : DMSO-d_6 (30%:70%) obtidos em 0, 24, 48 and 72h após a preparação da amostra.

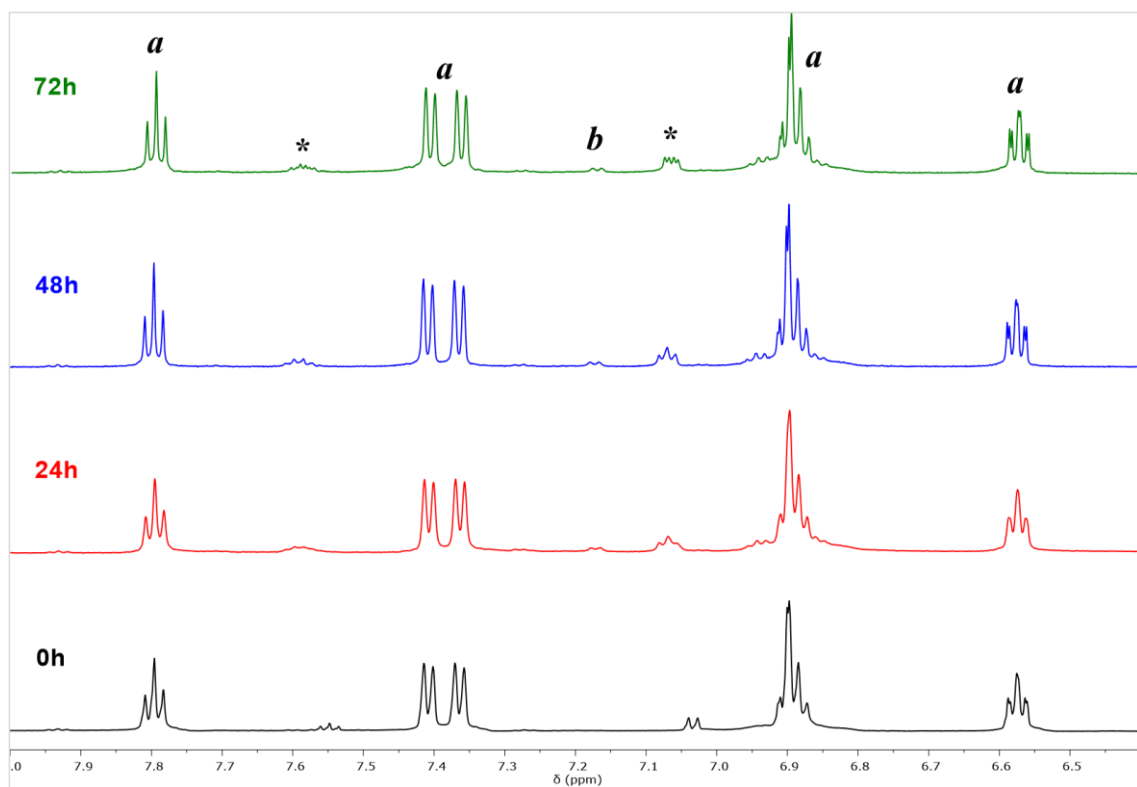


Figura 88 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (8,0-6,5 ppm) para o complexo **RZ2**. a = $[\text{Pd}(\text{S})(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\text{lut})]^n$; b = espécie b; * = 2,6-lutidine livre.

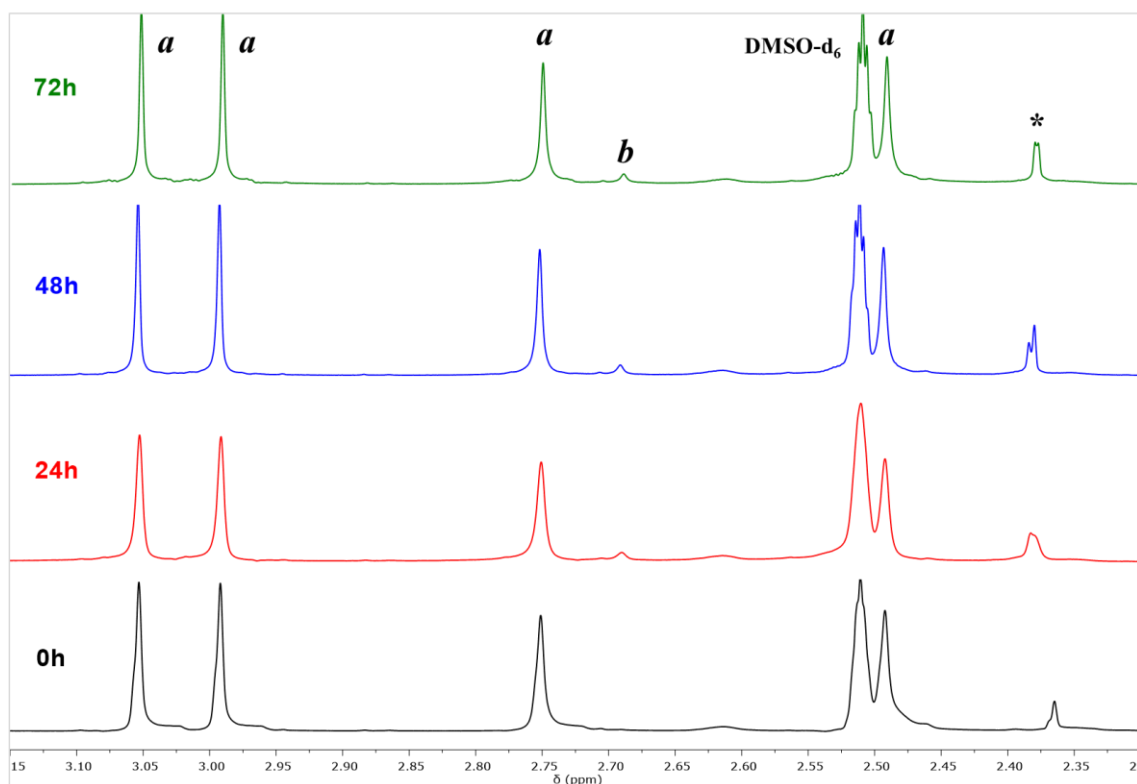


Figura 89 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (3,15-2,3 ppm) para o complexo **R22**. a = $[\text{Pd}(\text{S})(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\text{lut})]^n$; b = espécie b; * = 2,6-lutidine livre.

A presença de espécies semelhantes em solução já foi proposta para outros complexos ciclopaladados. Por exemplo, Albert et al. (ALBERT et al., 2013, 2014a, 2014b) sugeriram que, no meio biológico, compostos do tipo $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-iminas})(\mu\text{-X})_2]$ e $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-iminas})(\text{X})(\text{PPh}_3)]$ (PPh_3 = trifenilfosfina; X = Cl, OAc) são convertidos em $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-iminas})(\text{OH}_2)_2]^+$ e $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-iminas})(\text{OH}_2)(\text{PPh}_3)]^+$, respectivamente.

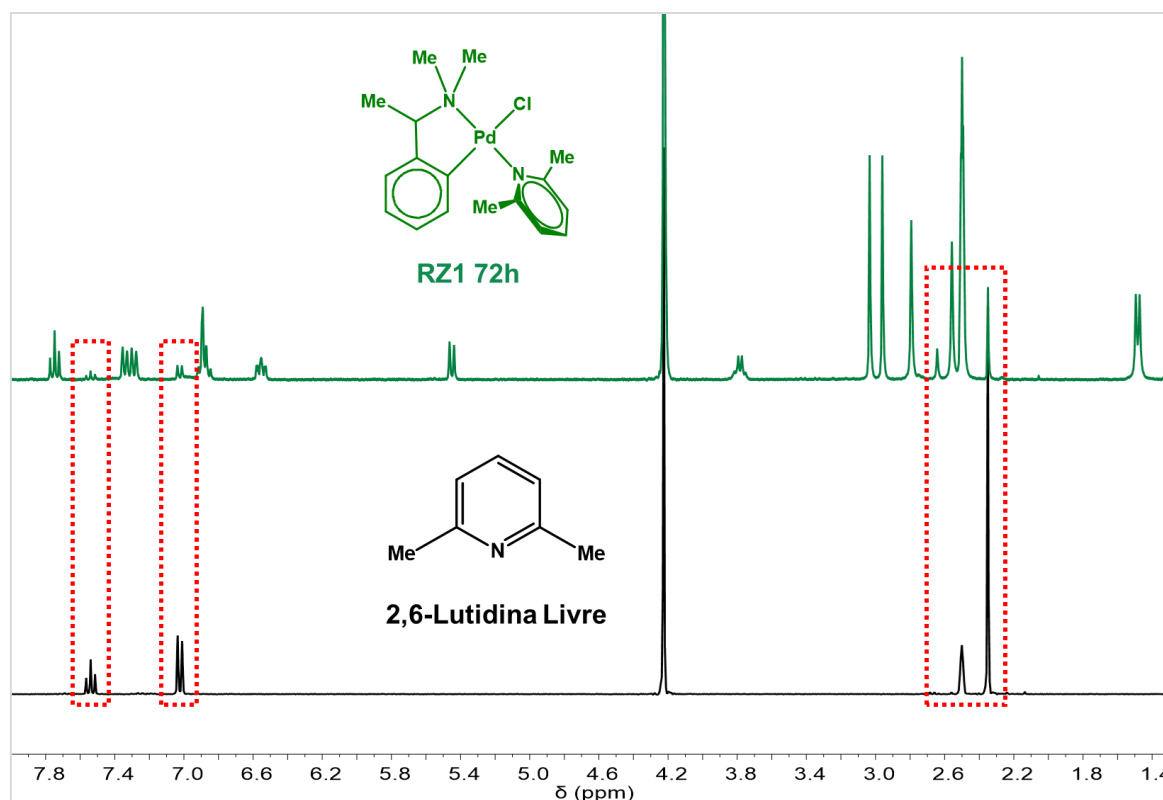


Figura 90 – Comparação entre o espectro de RMN de ^1H para o complexo RZ1 (72h) e o ligante 2,6-Lutidina em uma solução de $\text{D}_2\text{O}:\text{DMSO-}d_6$ (30%:70%).

Em um trabalho anterior reportado em nosso grupo, envolvendo complexos similares do tipo $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\text{X})(\text{lut})]$ $\{\text{X} = \text{Cl}, \text{I}, \text{N}_3 \text{ e } \text{NCO}\}$ (DA CUNHA et al., 2020), uma estimativa aproximada das quantidades da espécie “a” e 2,6-lutidina livre em solução foi realizada medindo as alturas relativas de seus sinais de RMN ^1H correspondentes. A extensão na qual o $[\text{Pd}(\text{S})(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{lut})]^n$ “a” é convertido em 2,6-lutidina e “b” livres demonstrou ser dependente da natureza do grupo X aniônico.

Espécie (a): 2,6-lutidina 1: 0.07 (X=Cl), 1: 1 (X=I), 1: 0.58 (X=NNN), 1: 0.37 (X=NCO).

Para os complexos $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{Cl})(\text{lut})]$ (**RZ1**) e $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{N}_3)(\text{lut})]$ (**RZ2**), entretanto, quando medimos as alturas relativas dos seus sinais de RMN de ^1H , como uma estimativa da quantidade de espécies “a” e 2,6-lutidina livre em solução, ambos os complexos apresentam o mesmo grau de dissociação (“a”: 2,6-lutidina livre: 1:0,28 (Cl⁻) e 1:0,26 (N₃⁻)), indicando que para

esta série de complexos a presença do grupo aniônico não deve ter influência na extensão com o qual o ligante orgânico é liberado do complexo.

Levando em consideração que a atividade antiproliferativa dos complexos **RZ1** e **RZ2** foram próximas, sendo o complexo **RZ2** ligeiramente melhor (**Tabela 6**) e suas estabilidades em solução parecidas, o complexo $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{N}_3)(\text{lut})]$ (**RZ2**) foi escolhido como um representante para investigar sua capacidade de interação com alvos biológicos como DNA e albumina (HSA).

5.2.2 Ensaios de interação com DNA

O DNA é considerado um dos alvos terapêuticos mais explorados por uma significativa porção de compostos antitumorais (PETT; HARTLEY; KIAKOS, 2015; PORTUGAL; BARCELÓ, 2016). É também considerado um alvo clássico de interação com complexos metálicos em virtude do conhecido mecanismo de ação da cisplatina. Dessa forma, os estudos de ligação ao DNA envolvendo o complexo **RZ2** foram realizados por dicroísmo circular (CD), espectroscopia UV-Vis e ensaio de competição de fluorescência com Hoechst 33258.

Como já mencionado anteriormente, o espectro CD do B-DNA exibe uma banda em ~275 nm (positiva) e outra em ~245 nm (negativa) atribuída ao empilhamento de bases de DNA e à conformação do DNA, respectivamente. Essas duas bandas características são usadas como sondas para verificar as interações dos compostos com o DNA devido à sua alta sensibilidade. Mudanças nessas bandas são geralmente atribuídas a modificações correspondentes em sua estrutura. Interações fracas, como interação com sulco ou interação eletrostática, causam pouca ou nenhuma perturbação nas bandas CD do DNA, enquanto um modo intercalativo de ligação aumenta ambas as bandas, estabilizando a conformação do B-DNA (DA SILVEIRA et al., 2011; KELLETT et al., 2019; PAIXÃO et al., 2019; REHMAN et al., 2015).

A adição crescente do complexo **RZ2** à uma solução contendo uma quantidade fixa de DNA não resultou em modificações apreciáveis no perfil espectral da biomolécula (**Figura 91**), sugerindo que o composto ciclopaladado deve estabelecer interações de natureza fraca.

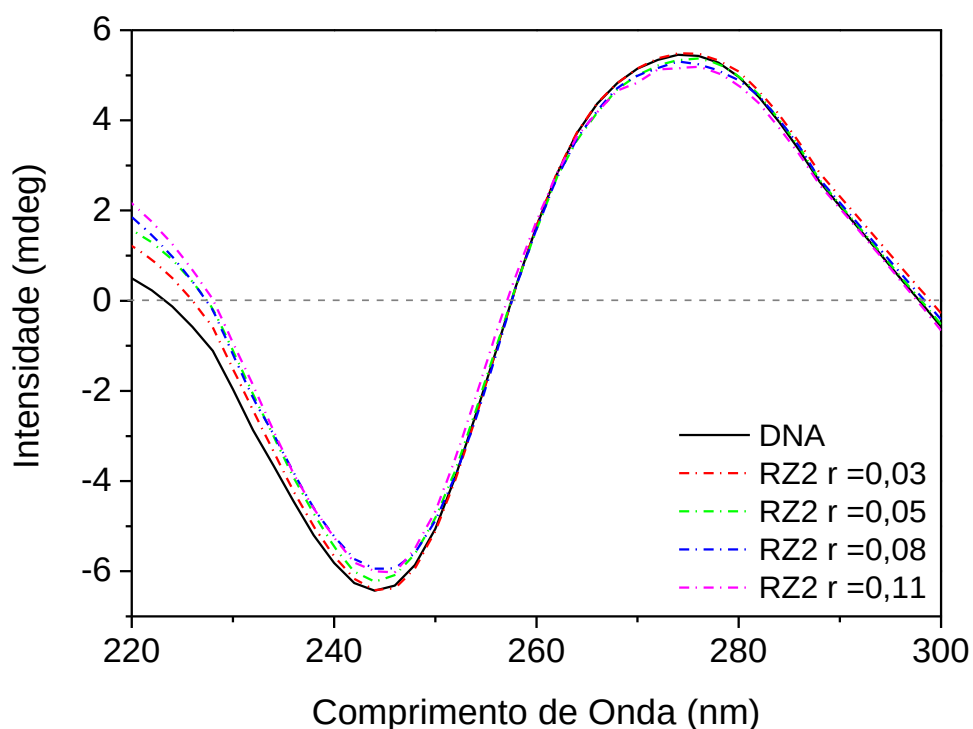


Figura 91 – Espectro de CD para o DNA (85 μ M) em tampão Tris-HCl pH 7,3 na ausência e na presença de quantidades crescentes do complexo **RZ2**. r = razão molar [complexo]/[DNA].

A interação do complexo **RZ2** com o DNA foi verificado também por meio da titulação espectrofotométrica, monitorando as alterações espectrais das bandas de transferência de carga, em função da adição crescente da biomolécula à solução. Interações de natureza forte, como intercalação, tendem a causar hipocromismo (>35%) acompanhado de batocromismo (>15 nm). Por outro lado, interações de natureza mais fraca, como por sulco, tendem a causar alterações espectrais mais sutis, sem observação clara de batocromismo, ou mesmo pouco perceptível (6-8 nm) (REHMAN et al., 2015).

Similarmente ao observado nos espectros de CD, não foram observadas alterações significativas no espectro característico do complexo ciclopaladado (**Figura 92**).

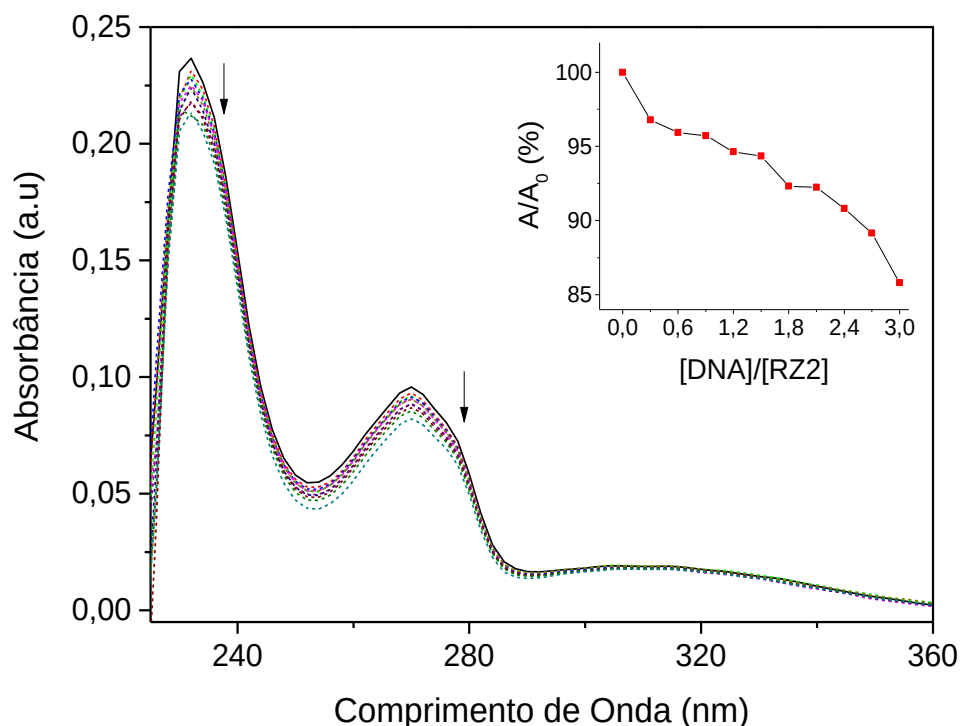


Figura 92 – Espectro de absorção na região do UV-Vis para o complexo **RZ2** na ausência e na presença de quantidades crescentes de DNA. A seta indica o decréscimo na absorção com relação à adição crescente do DNA. **No interior:** Gráfico de A/A_0 (%) contra $[DNA]/[RZ2]$ em $\lambda=270$ nm. A_0 absorvância do complexo na ausência de DNA. A = absorvância na presença de quantidades crescentes de DNA.

Adições sucessivas da biomolécula levaram a hipocromismo modesto ($\lambda=270$ nm, 14.2%) sem deslocamentos perceptíveis para o vermelho, reforçando a hipótese de uma interação fraca com o DNA. Devido ao baixo hipocromismo observado, não foi possível determinar a constante de ligação.

Uma vez que a interação fraca com o DNA parece ser a mais plausível para o modo de interação com o complexo **RZ2**, o experimento de competição de fluorescência usando Hoechst 33258 foi empregado para o complexo ciclopaladado. O Hoechst 33258, como mencionado, é um corante relacionado à família de corantes bisbenzimidazóis (Hoechst 33258, Hoechst 33342 e Hoechst 34580) usado para ensaios com o DNA. Em baixas concentrações do corante, a ligação ocorre preferencialmente no sulco menor.

Após adições sucessivas do composto **RZ2** à uma solução contendo DNA-Hoechst 33258, observou-se uma supressão modesta (4,6%) indicando que o complexo ciclopaladado foi incapaz de deslocar o Hoechst 33258, o que concorda bem com sua capacidade de se ligar fracamente ao DNA (**Figura 93**).

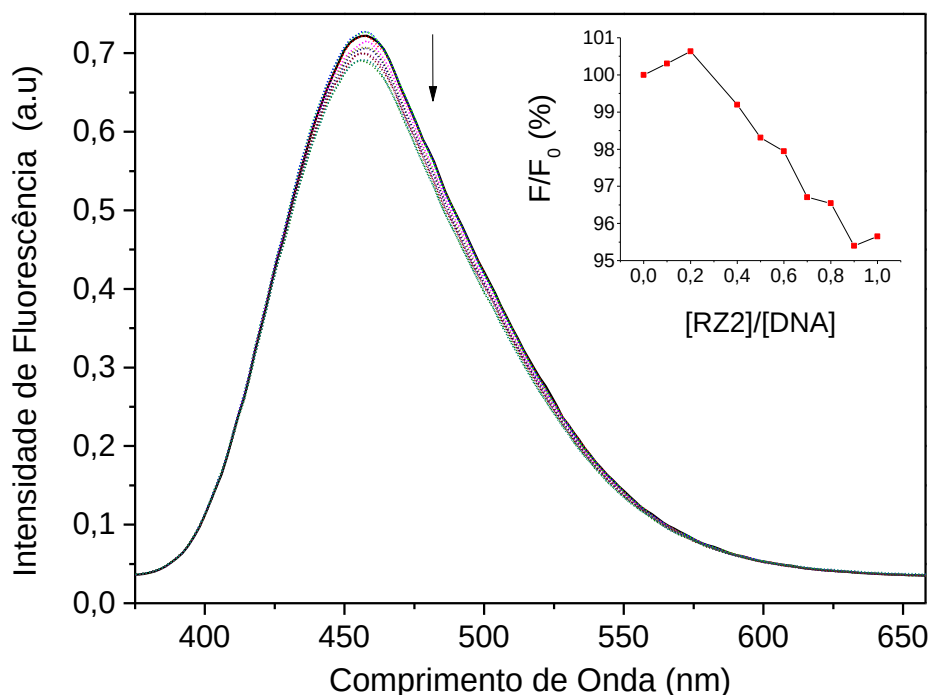


Figura 93 – Espectro de fluorescência de emissão do complexo Hoechst 33258-DNA ($\lambda_{\text{excitação}} = 350 \text{ nm}$) na presença de quantidades crescentes do composto **RZ2** em tampão tris-HCl pH 7,3. A seta indica o decréscimo da intensidade de fluorescência com relação ao aumento da concentração de **RZ2**. **No interior:** Gráfico de intensidade de fluorescência relativa (F/F_0) contra $[RZ2]/[DNA]$ em $\lambda_{\text{emissão}} = 458 \text{ nm}$.

Em geral, os ensaios envolvendo o DNA mostraram que o composto ciclopaladado **RZ2** apresentou baixa ou nenhuma afinidade pela biomolécula e, portanto, sua atividade antiproliferativa deve envolver mecanismos de ação biológica distintos ao da cisplatina. Cabe ainda ressaltar que na série análoga de compostos relatados anteriormente em nosso grupo, $[PdX(C^2,N\text{-dmba})(lut)]$ $\{X = Cl^-$ (1), I^- (2), NNN^- (3), NCO^- (4) $\}$ (DA CUNHA et al., 2020), o comportamento de interação com o DNA foi semelhante aquele observado para **RZ2**.

Estudos biológicos envolvendo outros alvos de interesse, como por exemplo em organelas como retículo endoplasmático ou mesmo mitocôndrias, são necessários para atribuir corretamente o mecanismo de ação dessa série de ciclopaladados.

5.2.3 Ensaios de Interação com Albumina (HSA)

A albumina tem emergido como uma proteína de grande interesse por sua versatilidade no transporte de diversas drogas, além de promover uma melhora

no perfil farmacocinético de drogas baseadas em proteínas ou peptídeos (KRATZ, 2008). É uma proteína de longa circulação e altamente abundante no sangue, sendo principalmente considerada como um potencial transportador para fármacos com aplicação antitumoral por conta de quatro principais características: (1) É transportadora natural de ligantes nativos e outras espécies hidrofóbicas; (2) É resgatada da depuração sistêmica e degradação por mecanismos naturais; (3) Se acumula em locais de vazamento vascular; (4) É altamente absorvida e metabolizada por células cancerosas de crescimento rápido e carentes de nutrientes (HOOGENBOEZEM; DUVALL, 2018).

Por conta de tais características, sua aplicação como potencial carreador tem sido explorada por várias classes de agentes antitumorais.

5.2.3.1 Dicroísmo Circular (CD)

Afim de avaliar a capacidade do complexo **RZ2** em se ligar e/ou interagir com a albumina, foram realizados espectros de dicroísmo circular em diferentes concentrações do composto, na presença de uma quantidade fixa de albumina (**Figura 94**).

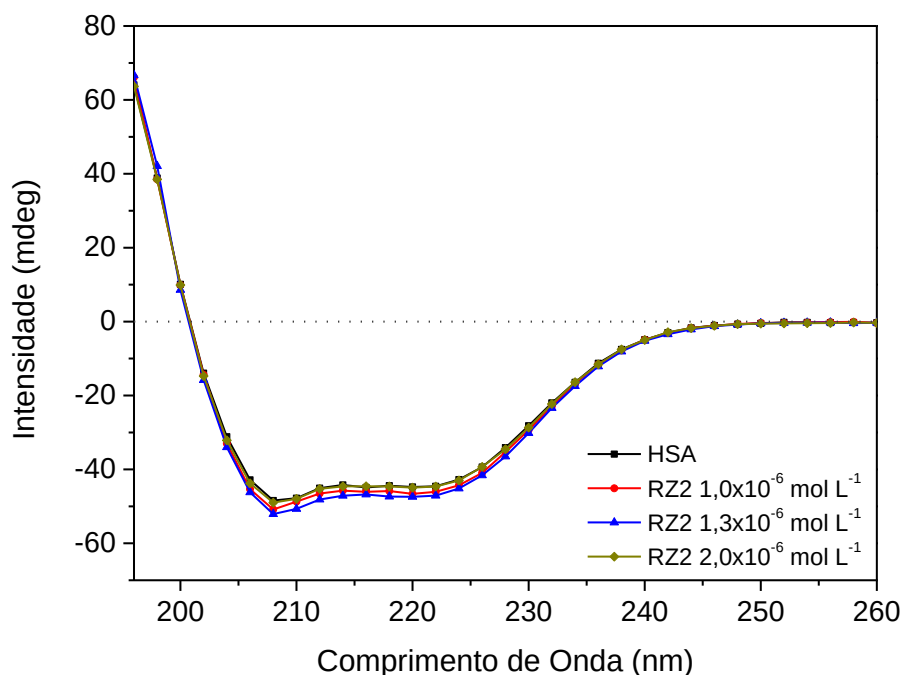


Figura 94 – Espectro de dicroísmo circular (CD) para a HSA (1x10⁻⁶ mol L⁻¹) na presença de quantidades crescentes do complexo RZ2 (0-2,0x10⁻⁶ mol L⁻¹), realizado em tampão tris-HCl pH 7,4 em 298K. r = razão molar complexo/DNA.

De maneira geral, o espectro de dicroísmo característico da albumina (HSA) apresenta duas bandas negativas na região do ultravioleta (UV) em 208 e 222 nm, que são características da estrutura em α -hélice da proteína (BJELOGRLIĆ et al., 2019).

Como fica claro nos espectros obtidos, mesmo com a adição crescente do complexo, alterações significativas não foram observadas no perfil da proteína, visto que os espectros se mantem praticamente inalterados. No entanto, assim como observado no ensaio de dicroísmo com o DNA, tal resultado não descarta a possibilidade de interação com a albumina, mas apenas que a presença do complexo não altera de maneira expressiva a estrutura secundária da mesma.

5.2.4 Ensaio de Fluorescência

A HSA é reconhecida por conter um resíduo de triptofano e 18 resíduos de tirosina, sendo estes principalmente os responsáveis pela emissão de fluorescência intrínseca da macromolécula, embora a fenilalanina também funcione como um fluoróforo, mas com rendimento quântico mais baixo em comparação ao anterior. Quando excitada a 280 nm, a emissão de fluorescência resultante é devida à contribuição de triptofano e tirosina (ALI; AL-LOHEDAN, 2018), sendo o máximo de emissão observado na região de 330 nm.

Assim, complementarmente ao ensaio de dicroísmo, a interação entre HSA e complexo ciclopaladado (RZ2) foi investigada por espectroscopia de fluorescência usando o modelo de Stern-Volmer (**Figura 95**).

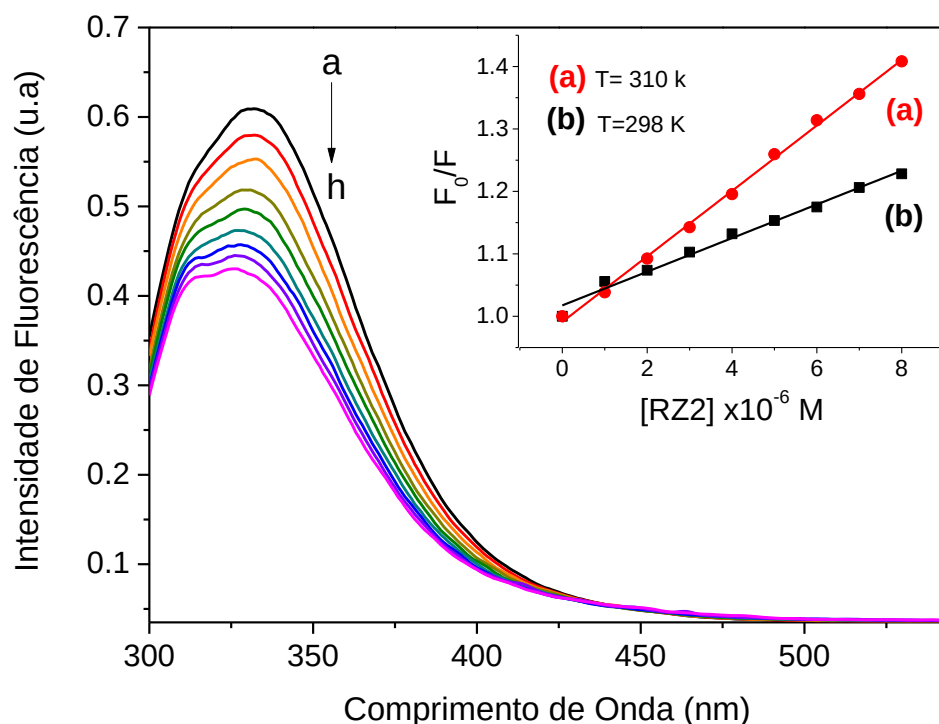


Figura 95 – Espectro de fluorescência para a HSA (1×10^{-6} mol L⁻¹) na presença de quantidades crescentes do complexo RZ2 (de $0-8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, de a-h respectivamente) em 298K e com $\lambda_{ex}=280$ nm. No interior: Gráfico de F_0/F vs [RZ2] em diferentes temperaturas, (a) 310K e (b) 298K.

Como é possível observar pelos espectros, a adição crescente do complexo **RZ2** (a→h) levou a um decréscimo no máximo de fluorescência observada para a proteína, o qual é resultante da interação entre o complexo ciclopaladado e os resíduos que promovem a fluorescência. Tal interação foi estimada através da constante de extinção, K_{sv} (**Tabela 7**), seguindo a equação a seguir (1):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q T_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

Onde F_0 e F representam as intensidades de fluorescência da proteína na ausência e na presença do complexo metálico, respectivamente. K_q é a constante de extinção biomolecular, T_0 é o tempo de vida médio da proteína na ausência de complexo (10^{-8} s), K_{sv} é a constante de Stern-Volmer e $[Q]$ é a concentração do composto em estudo.

Tabela 7 – Constantes de supressão de Stern-Volmer para interação da HSA com o complexo RZ2 em diferentes temperaturas.

T (K)	$K_{sv} \times 10^4$ (L mol ⁻¹)	$K_q \times 10^{12}$ (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	R*
298	2,69	2,69	0,9857
310	5,24	5,24	0,9980

As constantes calculadas tanto em 25 °C ($2,69 \times 10^4$ L mol⁻¹) quanto em 37 °C ($5,24 \times 10^4$ L mol⁻¹), apresentaram valores na ordem de 10^4 , os quais são próximos a ordem de grandeza encontrada para outras drogas e compostos exógenos (10^5 L mol⁻¹) que apresentam interações moderadas com a proteína (BJELOGRLIĆ et al., 2019).

Além disso, é interessante observar o aumento no valor da constante com o aumento da temperatura. De fato, a constante K_{sv} possui forte relação com a temperatura, assim como com a viscosidade (GEHLEN, 2020), sendo essa relação utilizada para estimar os tipos de mecanismo envolvidos no processo de supressão da fluorescência.

Dois mecanismos principais podem ser descritos para o processo supressão: estático e dinâmico. No mecanismo estático há a formação de um complexo não fluorescente entre a proteína e o composto metálico no estado fundamental. A estabilidade deste complexo é diminuída com o aumento da temperatura e, portanto, os valores da constante de supressão, K_{sv} , diminuem com sua elevação (MOREIRA et al., 2015). Já no mecanismo dinâmico, a interação do complexo metálico com a macromolécula ocorre durante o tempo de vida do estado excitado da mesma. Após a colisão do complexo com a albumina excitada, a biomolécula retorna ao estado fundamental sem emissão de luz. Assim, o aumento de temperatura ocasiona uma diminuição da viscosidade do meio reacional, favorecendo a difusão da espécie supressora em direção ao fluoróforo no seu estado excitado. Neste caso, o aumento na temperatura provoca um aumento no número de colisões entre o complexo metálico a proteína (HSA) excitada e, conseqüentemente, observa-se um aumento na constante de supressão, K_{sv} (MOREIRA et al., 2015).

Comparando os valores de K_{sv} obtidos, podemos inferir que o mecanismo preferencial de supressão seja o dinâmico, já que observamos um aumento no valor da constante com o aumento da temperatura. Entretanto, a possibilidade

de um mecanismo estático não pode ser descartada visto que o valor da constante de supressão biomolecular (K_q) foi da ordem de 10^{12} , superior ao valor máximo da constante de difusão encontrada para supressores dinâmicos ($2 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), o que em geral, é um indicativo para o mecanismo estático (VILLARREAL et al., 2017), (ZHAO et al., 2010).

Adicionalmente, utilizando uma forma modificada da equação de Stern-Volmer (2), foi possível obter parâmetros importantes como número de sítios de ligação, assim como a constante de ligação (**Tabela 8**).

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad (2)$$

Onde temos que F_0 e F representam as intensidades de fluorescência da proteína na ausência e na presença do complexo metálico, respectivamente. K_b é a constante de ligação, n é o número de sítios de ligação na estrutura da proteína (HSA) e $[Q]$ a concentração do composto em estudo.

Tabela 8 – Constante de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) e os parâmetros termodinâmicos da interação de HSA com o complexo ciclopaladado (RZ2) em diferentes temperaturas.

T (K)	K_b (mol L^{-1})	n	R^*	ΔH (kJ mol^{-1})	ΔS (kJ mol^{-1})	ΔG (kJ mol^{-1})
298	$0,4 \times 10^3$	0,65	0,9838	305,51	1,04	-14,84
310	$4,5 \times 10^4$	1,04	0,9839			-27,75

*Coeficiente de correlação.

Como apresentado anteriormente (**Tabela 8**), o número de sítios calculados próximos de 1 (0,65-1,04) indicam um único sítio de ligação com a HSA (VILLARREAL et al., 2017) e o valor da constante K_b se encontra em ordens de grandeza (10^3 - 10^4) semelhante a de outros complexos ciclopaladados, (KARAMI et al., 2014, 2017), o que indica um mesmo comportamento.

Além disso, utilizando relações clássicas termodinâmicas (3, 4), foi possível obter parâmetros importantes relacionados a natureza das interações entre complexo ciclopaladado e a proteína.

$$\ln(K_2/K_1) = [(1/T_1) - (1/T_2)] \Delta H^\circ / R \quad (3)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (4)$$

De acordo com os valores calculados (**Tabela 8**), podemos observar que em geral o processo apresenta tanto $\Delta H > 0$ quanto $\Delta S > 0$, indicando que forças hidrofóbicas são predominantes na interação entre o ciclopalladado e a albumina. Além disso, os valores negativos para ΔG ($\Delta G < 0$), demonstram que o processo ocorre de forma espontânea (DA CUNHA et al., 2020; VILLARREAL et al., 2017).

5.2.4.1 Competição com a Varfarina

Com o objetivo de investigar o sítio específico de interação do complexo metálico na albumina, foi realizado o ensaio de competição utilizando a varfarina, um fármaco anticoagulante, o qual é um marcador específico do sítio I no subdomínio IIA da proteína (BJELOGRLIĆ et al., 2019; KARAMI et al., 2017; PETITPAS et al., 2001). Dessa forma, o ensaio de competição entre o complexo metálico e a varfarina com a HSA, foi investigado por espectroscopia de fluorescência (**Figura 96**).

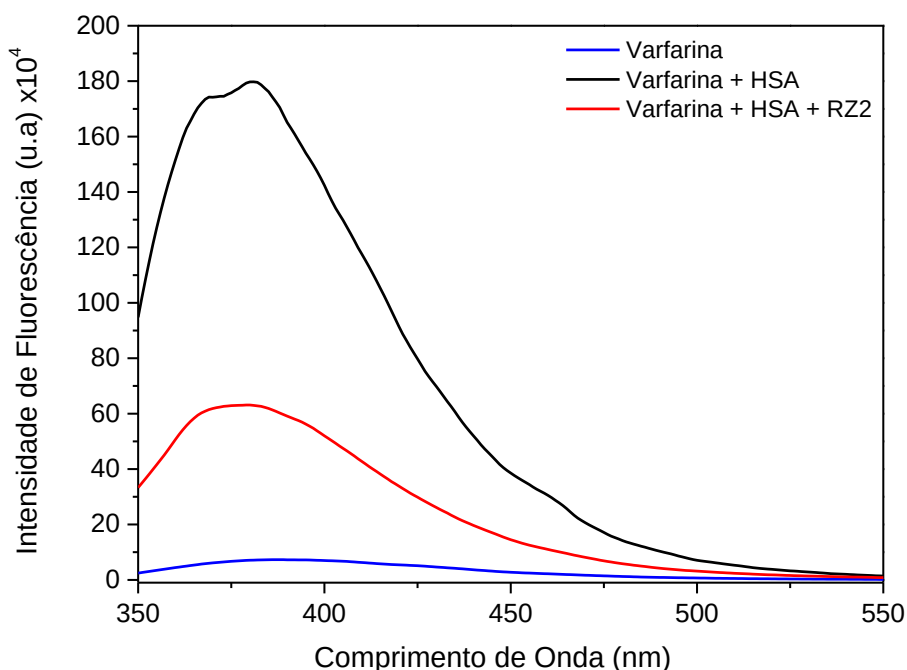


Figura 96 – Espectro de fluorescência para Varfarina na ausência e na presença de misturas equimolares: varfarina e HSA; varfarina, HSA e complexo RZ2. Em tampão fosfato, pH 7,3 λ_{ex} =330 nm, a 298K.

O fármaco quando ligado a albumina, na presença de tampão, apresenta fluorescência, o que fica claro quando observado o espectro da proteína ligada a varfarina (Var+HSA). Isso ocorre pois quando o anticoagulante se liga a HSA, com alta afinidade ao sítio Sudlow I, ele se encontra em sua forma desprotonada.

A análise da estrutura cristalina, formada entre a varfarina e a proteína, mostra uma série de interações que contribuem para a estabilidade da droga no interior do sítio, o que se reflete em um aumento na fluorescência do fármaco quando ligado a proteína em comparação a sua forma livre (ABOU-ZIED, 2015).

No entanto, quando observamos o espectro obtido na presença do complexo metálico (HSA+Var+RZ2), é possível notar um decréscimo significativo na fluorescência da varfarina. Tal fato demonstra a capacidade do complexo ciclopalladado em deslocar o fármaco do sítio de ligação, sugerindo que o composto em estudo deve ocupar o mesmo sítio da varfarina, sítio I subdomínio IIA.

5.2.5 Ancoragem Molecular com Albumina (HSA)

Em vista do resultado obtido para o ensaio interação com Albumina (HSA), o estudo por ancoragem molecular foi desenvolvido com o intuito de aprofundar o entendimento quanto a interação com a proteína.

Para o aduto de varfarina-HSA original, duas ligações de H clássicas (RWF)O—H...O(TYR150), (RWF)O—H...N(HIS242) e uma ligação de H bifurcada (ARG222) N—H...O(RWF) são interações-chave, apesar do ambiente hidrofóbico da porção Sudlow I (DA CUNHA et al., 2020; FARIAS et al., 2021), (**Figura 97 A**). A varfarina simulada por PM7 replicou este modo de ligação original dentro de 2,0 Å, com valor de RMSD equivalente a 0,7566 Å.

Duas moléculas à base de Pd de fórmulas gerais $[Pd(S)(C^2,N-dmpa)(lut)]^+$ {S = DMSO-d₆ ou D₂O} foram escolhidas para as previsões de pose em vista de sua maior proporção na solução (**Figura 97 B -C**). O composto compreendendo o ligante DMSO, $[Pd(DMSO-d_6)(C^2,N-dmpa)(lut)]^+$, encontrou conformação adequada no sítio de ligação da varfarina à medida que a energia livre total mudou em -38,73 kcal mol⁻¹, formando principalmente contatos hidrofóbicos. Quatro deles incluíam as cadeias laterais de LEU238, LEU260 e ALA291. Além disso, duas interações polares com os resíduos chave TRY150, ARG222 e uma

ligação de H bifurcada com ARG257. Este contato não covalente com o grupo sulfóxido parece conduzir a porção oposta dmpa-fenil para a cadeia lateral de TRP214, pois a distância entre eles é de 3,788 Å, (**Figura 97 D-E**). Para contatos interatômicos entre grupos fenil, o limite superior varia em 3,3 – 3,8 Å (JANIAK, 2000), suportado por raios de vdW para C_{sp^2} em 1,77 Å (ALVAREZ, 2013; CHERNYSHOV; ANANYEV; PIDKO, 2020). O fármaco de varfarina cristalizado está a pelo menos 4,0 Å longe do ambiente TRP214.

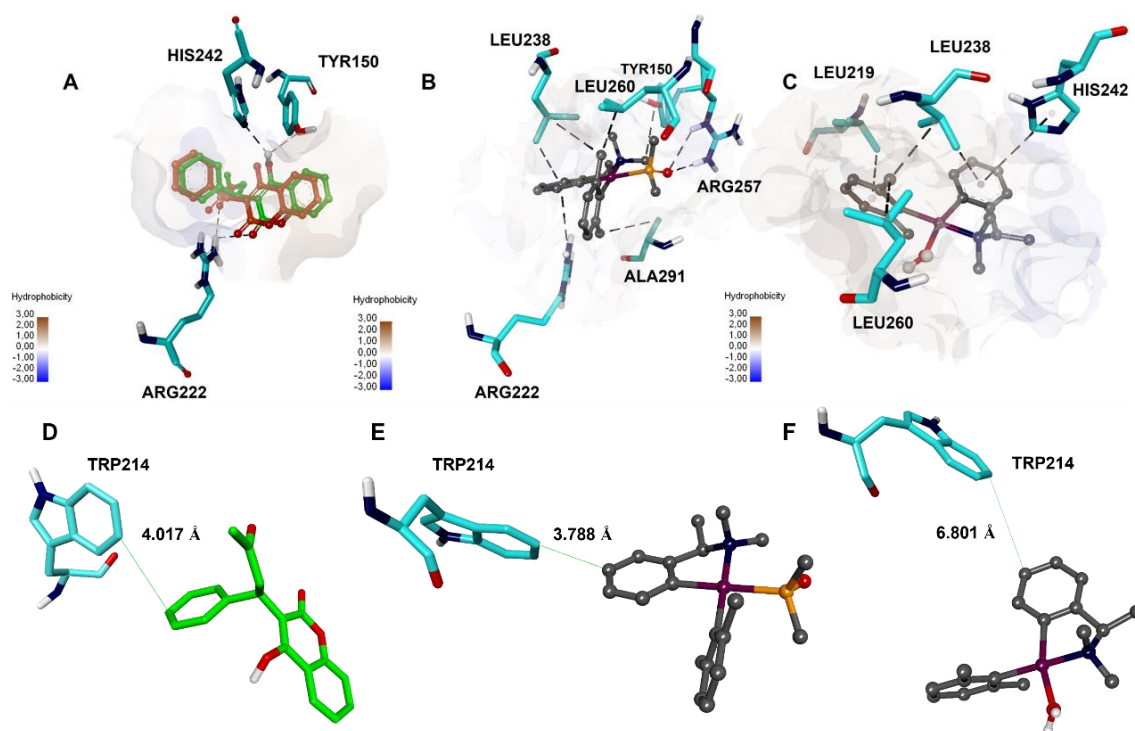


Figura 97 – Resultados do estudo de ancoragem molecular para a albumina (HSA, PDB ID 2BXD). (A) conformação original (átomos de C em verde) e melhor pose de *redocking* (átomos de C em laranja) para varfarina no sítio de ligação Sudlow-I; (B) e (C) pose predita para os compostos à base de Pd compreendendo DMSO- d_6 e D_2O , respectivamente. (D) – (F) Orientação e distância das pequenas moléculas ao ambiente do fluoróforo TRP214.

Por outro lado, o aqua-complexo $[Pd(D_2O)(C^2,N\text{-dmpa})(lut)]^+$ apresenta conformação estável no sítio Sudlow I, $-34,26 \text{ kcal mol}^{-1}$, através de um contato $\pi - \pi$ em forma de T com a cadeia lateral de HIS242, e outros três contatos hidrofóbicos com as cadeias laterais de LEU219, LEU238 e LEU260 (**Figura 97 C**). Apesar disso, considerando sua orientação molecular na porção, o anel dmpa-fenil está distante 6,8 Å da cadeia lateral do fluoróforo TRP214, excluindo quaisquer contatos interatômicos (**Figura 97 F**). Com base nesses cálculos,

parece razoável supor que $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})(\text{C}^2, N\text{-dmpa})(\text{lut})]^+$ é incapaz de induzir uma extinção no espectro de luminescência do aduto de varfarina-HSA no ensaio de competição, sendo o composto compreendendo o ligante DMSO, $[\text{Pd}(\text{DMSO-}d_6)(\text{C}^2, N\text{-dmpa})(\text{lut})]^+$, o mais provável de promover interações nesse sítio.

6 CONCLUSÃO

Um dos grandes desafios hoje para o tratamento do câncer, do ponto de vista da química de coordenação, está no desenvolvimento de novos complexos que sejam mais seletivos e menos tóxicos para o paciente do que o fármaco histórico de referência, a cisplatina. Na procura por candidatos promissores nesse sentido, foram apresentados neste trabalho duas séries de complexos de paládio(II): uma derivada de ligantes pirazólicos, e outra derivada de ligantes quelantes benzilaminas, na forma de ciclopaladados.

Os três complexos pirazólicos de fórmula $[\text{PdCl}(\text{XTPz})(\text{PPh}_3)]$ ($\text{X}=\text{H}$, Me, Fenil) foram devidamente caracterizados por múltiplas técnicas mostrando-se de acordo com as estruturas esperadas pelo planejamento experimental. Do ponto de vista de estabilidade, o complexo $\text{PdCl}(\text{HTPZ})(\text{PPh}_3)$ **R1**, mostrou-se instável em solução aquosa, de acordo com ensaios de RMN de ^{31}P , sendo por esse motivo excluído de estudos de atividade biológica.

Os complexos restantes (**R2**, **R3** e **R2***, proveniente de trabalhos anteriores) apresentaram valores de atividade antiproliferativa relativamente próximos ao do fármaco de referência, cisplatina, para as linhagens celulares de MCF-7 (adenocarcinoma mamário) e MRC-5 (fibroblasto normal de pulmão), porém consideravelmente inferiores do que seus respectivos ligantes livres, demonstrando a capacidade antiproliferativa dos compostos de coordenação.

Na tentativa de investigar os mecanismos de ação biológica, ensaios envolvendo DNA, Topoisomerase II α e Catepsinas B e L foram aplicados para os três complexos anteriores. Por meio de experimentos de dicroísmo circular (CD), titulação espectrofotométrica e competição com Hoechst 33258, ficou claro que os complexos pirazólicos apresentam interação com DNA, porém de forma moderada, uma vez que as constantes calculadas assim como o perfil observado por dicroísmo mostraram alterações sutis na estrutura da biomolécula. O DNA não deve ser descartado como um potencial alvo, porém a ação biológica desses complexos não se deve inteiramente a esse alvo. Comportamento semelhante foi observado nos ensaios envolvendo Topoisomerase II α , uma vez que os complexos não foram capazes de alterar a mobilidade do DNA no ensaio de eletroforese.

Por outro lado, os ensaios envolvendo Catepsina B e L se mostraram promissores. Os complexos mostraram boa capacidade na inibição da atividade da enzima B, com destaque para o complexo **R3** que se mostrou o mais ativo. Tal resultado foi ainda confirmado por estudos de ancoragem molecular, que provaram que o composto ciclopaladado supracitado é capaz de promover interações adicionais com resíduos de aminoácidos que os demais complexos não são.

A segunda série de complexos, derivada de benzilaminas, é resultado da continuação de um trabalho já iniciado em nosso grupo, reportado por Cunha, G (CUNHA, 2017). Os complexos ciclopalados de fórmula $[Pd(C^2,N\text{-dmpa})(X)(lut)]$ $\{X= Cl \text{ (RZ1)} N_3 \text{ (RZ2)}\}$ foram sintetizados e sua caracterização realizada em comparação ao trabalho reportado anteriormente.

Os complexos foram submetidos a ensaios de estabilidade em solução, mostrando um perfil semelhante, independente do haleto/pseudo-haleto coordenado ao metal. Os estudos de RMN ^1H , desenvolvidos em um período de 72h, mostraram a prevalência da espécie $[Pd(S)(C^2,N\text{-dmpa})(lut)]^n$ ($n=0, +1$), onde S pode ser moléculas de solvente ou OH^- . Devido a característica comum dos dois compostos em solução, o complexo **RZ2** foi selecionado para estudos posteriores de interação com DNA e albumina, uma vez que este foi ligeiramente mais ativo nos ensaios de atividade antiproliferativa.

Do ponto de vista de interação com DNA, o complexo ciclopaladado **RZ2** se mostrou pouco eficiente na interação com a biomolécula, demonstrando uma fraca interação, conforme apresentado nos ensaios de dicroísmo circular (CD), titulação espectrofotométrica e competição com Hoechst 33258. Os resultados são um indicativo que sua atividade antiproliferativa deve envolver outros alvos biológicos.

Experimentos envolvendo albumina de soro humano (HSA), por outro lado, mostraram capacidade moderada do complexo ciclopaladado em interagir com a proteína, resultado esse bastante promissor devido sua versatilidade no transporte de diversas drogas. Graças ao ensaio de competição com a varfarina por fluorescência, ficou claro que a interação com a proteína deve ocorrer preferencialmente no sítio I no subdomínio IIA. A ancoragem molecular do complexo **RZ2** no sítio I da HSA mostrou que a espécie mais provável de

promover tais interações nessa porção é o composto compreendendo o ligante DMSO, $[\text{Pd}(\text{DMSO-d}_6)(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{lut})]^+$.

Em resumo, as duas séries de complexos se mostraram bastante promissoras. Os complexos pirazólicos mostraram moderada atividade antiproliferativa, entretanto, boa capacidade de inibição de Catepsina B. Por outro lado, os complexos ciclopaladados apresentaram uma potente atividade antiproliferativa, com potencial de serem transportados pela albumina (HSA), porém sem qualquer interação com DNA ou informação adicional sobre seus mecanismos de ação. Estudos envolvendo essa série com outros alvos de interesse, como topoisomerasas, catepsinas ou até mesmo organelas como mitocôndria ou retículo endoplasmático, poderiam fornecer ricas informações sobre sua forma de ação.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABOU-ZIED, O. Understanding the Physical and Chemical Nature of the Warfarin Drug Binding Site in Human Serum Albumin: Experimental and Theoretical Studies. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 14, p. 1800–1816, 2015.

ALBERT, J. et al. Cyclopalladated benzophenone imines: Synthesis, cytotoxicity against human breast adenocarcinoma cell lines and DNA interaction. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 724, p. 289–296, 2013.

ALBERT, J. et al. Cyclopalladated and cycloplatinated benzophenone imines: Antitumor, antibacterial and antioxidant activities, DNA interaction and cathepsin B inhibition. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 140, p. 80–88, 2014a.

ALBERT, J. et al. Cyclopalladated Benzophenone Imines: Synthesis, Antitumor Activity, Cell Accumulation, DNA Interaction, and Cathepsin B Inhibition. **Organometallics**, v. 33, n. 24, p. 7284–7292, 22 dez. 2014b.

ALI, M. S.; AL-LOHEDAN, H. A. Spectroscopic and computational evaluation on the binding of safranin with human serum albumin: Role of inner filter effect in fluorescence spectral correction. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 203, p. 434–442, 2018.

ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. Metal-based drugs that break the rules. **Dalton Trans.**, v. 45, n. 8, p. 3201–3209, 2016.

ALTAF, A. A. et al. A Review on the Medicinal Importance of Pyridine Derivatives. **Journal of Drug Design and Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 1–11, 2015.

ALVAREZ, S. A cartography of the van der Waals territories. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 24, p. 8617–8636, 2013.

ARES, R. et al. Cyclopalladated compounds with bridging and chelating diphosphine ligands . Effect of ring size . Crystal and molecular structure of. **Synthesis**, v. 21, n. v, p. 2309–2315, 2002.

BAKER, N. M.; RAJAN, R.; MONDRAGÓN, A. Structural studies of type I

- topoisomerases. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 3, p. 693–701, 2009.
- BANGDE, P. et al. **Palladacycles as Potential Anticancer Agents**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.
- BARRA, C. V. et al. Synthesis, cytotoxic activity and DNA interaction of Pd(II) complexes bearing N'-methyl-3,5-dimethyl-1-thiocarbamoylpyrazole. **Polyhedron**, v. 65, n. April, p. 214–220, 2013.
- BECHARA, A. et al. 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**, v. 79, p. 24–33, 2014.
- BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: O amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 461–471, 2004.
- BERALDO, H. Contribuições da química inorgânica para a química medicinal. **Química Nova na Escola**, n. 6, p. 4–6, 2005.
- BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- BISWAS, N. et al. Example of two novel thiocyanato bridged copper (II) complexes derived from substituted thiosemicarbazone ligand: structural elucidation , DNA / albumin binding , biological profile analysis , and molecular docking study. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 0, n. 0, p. 1–22, 2018.
- BJELOGRLIĆ, S. K. et al. Pd(II) complexes with N-heteroaromatic hydrazone ligands: Anticancer activity, in silico and experimental target identification. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 199, n. June, p. 110758, 2019.
- BNCC.EMCIENCIAS. **Eletroforese em gel**. Disponível em: <<https://pt.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/gel-electrophoresis>>. Acesso em: 15 ago. 2022.

BRABEC, V.; HRABINA, O.; KASPARKOVA, J. Cytotoxic platinum coordination compounds. DNA binding agents. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 351, p. 2–31, 2017.

BRAMMER, S. P. A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas. **Documentos on line Embrapa**, v. 06, p. 1–8, 2001.

BRUCE ALBERTS et al. **Fundamentos da biologia celular**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

BUCEVIČIUS, J.; LUKINAVIČIUS, G.; GERASIMAITE, R. The use of hoechst dyes for DNA staining and beyond. **Chemosensors**, v. 6, n. 2, 2018.

CASINI, A. et al. Emerging protein targets for anticancer metallodrugs: Inhibition of thioredoxin reductase and cathepsin B by antitumor ruthenium(II)-arene compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 21, p. 6773–6781, 2008.

CHERNYSHOV, I. Y.; ANANYEV, I. V.; PIDKO, E. A. Revisiting van der Waals Radii: From Comprehensive Structural Analysis to Knowledge-Based Classification of Interatomic Contacts. **ChemPhysChem**, v. 21, n. 5, p. 370–376, 2020.

COUNCIL, N. R. **Copper in Drinking Water**. Washington, DC: The National Academies Press, 2000.

CRABTREE, R. H. **The Organometallic Chemistry of The Transition Metals**. 6. ed. New Jersey: Wiley, 2014.

CUNHA, G. A. DA. **Investigação estrutural e potencialidades biológicas de espécies ciclopaladadas contendo o ligante 2,6-lutidina**. [s.l.] UNESP, 2017.

DA CUNHA, G. A. 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.

DA SILVEIRA, V. C. et al. Binding of oxindole-Schiff base copper(II) complexes to DNA and its modulation by the ligand. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 12, p. 1692–1703, 2011.

DE BEER, T. A. P. et al. PDBsum additions. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 292–296, 2014.

DELGADO, J. L. et al. Topoisomerases as anticancer targets. **Biochemical Journal**, v. 475, n. 2, p. 373–398, 2018.

DREWS, J. Paul Ehrlich: Magister Mundi. **Nature Reviews**, v. 3, n. September, 2004.

DUNINA, V. V. et al. First enantiopure imine CN-palladacycle of non-metallocenic planar chirality with the [2.2]paracyclophane backbone. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 20, n. 14, p. 1661–1671, 2009.

DUPONT, J.; CONSORTI, C. S.; SPENCER, J. The potential of palladacycles: More than just precatalysts. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 6, p. 2527–2571, 2005.

DUPONT, J.; PFEFFER, M. **Palladacycles : Synthesis, Characterization and Applications**. 1. ed. [s.l.] Wiley-VCH, 2008.

EDWARDS, G. L. et al. In vitro and in vivo studies of neutral cyclometallated complexes against murine leukæmias. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 83, n. 6–7, p. 980–989, 2005.

EHRlich, P.; BERTHEIM, A. On the hydrochloric acid 3,3'-diamino-4,4'-dioxarsenobenzene and its closest relatives. **Rep of the German Chem Soc**, v. 45, p. 756–766, 1912.

FAGHIH, Z. et al. Palladium (II) complexes based on Schiff base ligands derived from ortho-vanillin; synthesis, characterization and cytotoxic studies. **Inorganica Chimica Acta**, v. 471, p. 404–412, 2018.

FARIAS, R. L. et al. In vitro and in silico assessment of antitumor properties and biomolecular binding studies for two new complexes based on Ni II bearing k²N, S-donor ligands. **Materials Science & Engineering C**, v. 121, n. December 2020, p. 111815, 2021.

FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A Química inorgânica na terapia

do câncer. **Química nova**, v. 6, n. li, p. 2–7, 2005.

FUENTES, L. et al. Exploring DNA binding ability of two novel α -N-heterocyclic thiosemicarbazone palladium(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 203, n. October 2019, p. 110875, 2020.

GARCIA VELHO, R. **Medidas de condutividade na caracterização de complexos inorgânicos: um levantamento bibliográfico**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2006.

GEARY, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 81–122, 1971.

GEHLEN, M. H. The centenary of the Stern-Volmer equation of fluorescence quenching: From the single line plot to the SV quenching map. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 42, p. 100338, 2020.

GHUMAN, J. et al. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. **Journal of Molecular Biology**, v. 353, n. 1, p. 38–52, 2005.

GIGLI, R. et al. The biphosphinic paladacycle complex induces melanoma cell death through lysosomal-mitochondrial axis modulation and impaired autophagy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 107, p. 245–254, 2016.

GONÇALVES, A. C. R. et al. PtII, PdII and AuIII complexes with a thiosemicarbazone derived from diacetylmonooxime: Structural analysis, trypanocidal activity, cytotoxicity and first insight into the antiparasitic mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 141, p. 615–631, 2017.

GONZLEZ-RUIZ, V. et al. An Overview of Analytical Techniques Employed to Evidence Drug-DNA Interactions. Applications to the Design of Genosensors. In: **Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies**. [s.l.] InTech, 2011. p. 65–90.

GREEN, M.; GARNER, M.; ORTON, D. M. Cisplatin- the last five years.

Transition Metal Chemistry, v. 176, p. 164–176, 1992.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 2006.

GREENSPAN, P. D. et al. Identification of dipeptidyl nitriles as potent and selective inhibitors of cathepsin B through structure-based drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 26, p. 4524–4534, 2001.

HANG, R. et al. Targeting Cathepsin B for Cancer Therapies Hang. **Horiz Cancer Res**, v. 56, p. 23–40, 2015.

HARTSHORN, M. J. et al. Diverse, high-quality test set for the validation of protein-ligand docking performance. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 726–741, 2007.

HOOGENBOEZEM, E. N.; DUVALL, C. L. **Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies** *Advanced Drug Delivery Reviews* Elsevier B.V., , 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.011>>

HOUSECROFT, C. E.; SHARPE, A. G. **Inorganic Chemistry**. 4^a ed. Harlow: Pearson, 2012.

İNCI, D. et al. New binary copper(II) complexes containing intercalating ligands: DNA interactions, an unusual static quenching mechanism of BSA and cytotoxic activities. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 36, n. 15, p. 3878–3901, 2018.

JAHROMI, E. Z. et al. **Palladium complexes: New candidates for anti-cancer drugs** *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2016.

JANGIR, D. K. et al. FTIR and circular dichroism spectroscopic study of interaction of 5-fluorouracil with DNA. **Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology**, v. 105, n. 2, p. 143–148, 2011.

JANIAK, C. A critical account on n-n stacking in metal complexes with aromatic nitrogen-containing ligands. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 21, p. 3885–3896, 2000.

JASON M. BRODERICK. **FDA grants Fast Track designation to novel treatment for UTUC**. Disponível em: <<https://www.urologytimes.com/view/fda-grants-fast-track-designation-to-novel-treatment-for-utuc>>. Acesso em: 4 fev. 2021.

JOHANSSON, M. U. et al. Defining and searching for structural motifs using DeepView/Swiss-PdbViewer. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, 2012.

JOKSIMOVIĆ, N. et al. Synthesis, Anticancer Evaluation and Synergistic Effects with cis platin of Novel Palladium Complexes: DNA, BSA Interactions and Molecular Docking Study . **Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 78–92, 2019.

JOYCE, J. A.; HANAHAN, D. Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. **Cell Cycle**, v. 3, n. 12, p. 1516–1519, 2004.

KARAMI, K. et al. In vitro cytotoxicity studies of palladacyclic complexes containing the symmetric diphosphine bridging ligand. Studies of their interactions with DNA and BSA. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 73, p. 8–17, 2014.

KARAMI, K. et al. Cyclopalladated complexes containing metformin and benzylamine derivatives: Synthesis, characterization, binding interactions with DNA and BSA, in vitro cytotoxicity studies. **Inorganica Chimica Acta**, v. 467, p. 46–55, 2017.

KARROUCHI, K. et al. **Synthesis and Pharmacological Activities of Pyrazole Derivatives: A Review**. [s.l: s.n.]. v. 23

KATHIRAVAN, M. K. et al. Topoisomerase as target for antibacterial and anticancer drug discovery. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 419–435, 2013.

KATRITZKY, A. R.; OSTERCAMP, D. L.; YOUSAF, T. I. The mechanisms of heterocyclic ring closures. **Tetrahedron**, v. 43, n. 22, p. 5171–5186, 1987.

KAUFFMAN, G. B. et al. Michele Peyrone (1813 – 1883), Discoverer of Cisplatin. **Platinum Metals Rev.**, v. 54, n. 4, p. 250–256, 2010.

KAUFMANN, S. H. E. Paul Ehrlich: Founder of chemotherapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 5, p. 373, 2008.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 8, p. 573–584, 2007.

KELLETT, A. et al. Molecular methods for assessment of non-covalent metallodrug-DNA interactions. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 4, p. 971–988, 2019.

KLEIN, A. V.; HAMBLEY, T. W. Platinum Drug Distribution in Cancer Cells and Tumors. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 10, p. 4911–4920, 2009.

KOVÁCS, A. et al. Structural, spectroscopic and computational studies of the HgL₂Cl₂ complex (L = 3,5-dimethyl-1-thiocarboxamide pyrazole) and the crystal structure of L. **New Journal of Chemistry**, v. 29, n. 6, p. 833, 2005.

KRATZ, F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 3, p. 171–183, 2008.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3rd. ed. [s.l.] Springer, 2006.

LAMPE, C. M.; GONDI, C. S. Cathepsin B Inhibitors for Targeted Cancer Therapy. **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 06, n. 10, p. 417–421, 2014.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

LIEBESCHUETZ, J. W.; COLE, J. C.; KORB, O. Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, n. 6, p. 737–748, 2012.

LIU, J. et al. Metalloproteins containing cytochrome, iron-sulfur, or copper redox centers. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4366–4369, 2014.

LOBANA, T. S. et al. Bonding and structure trends of thiosemicarbazone

derivatives of metals-An overview. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, n. 7–8, p. 977–1055, 2009.

LOCKWOOD, T. D. Biguanide is a modifiable pharmacophore for recruitment of endogenous Zn^{2+} to inhibit cysteinyl cathepsins: review and implications. **BioMetals**, v. 32, n. 4, p. 575–593, 2019.

MAKOVEC, T. Cisplatin and beyond : molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. 2019.

MATESANZ, A. I. et al. Mononuclear Pd(II) and Pt(II) complexes with an α -N-heterocyclic thiosemicarbazone: Cytotoxicity, solution behaviour and interaction: Versus proven models from biological media. **Inorganic Chemistry Frontiers**, v. 5, n. 1, p. 73–83, 2018.

MICHALEAS, S. N. et al. Theophrastus Bombastus Von Hohenheim (Paracelsus) (1493–1541): The eminent physician and pioneer of toxicology. **Toxicology Reports**, v. 8, p. 411–414, 2021.

MIRKOVIĆ, B. et al. Novel Mechanism of CathepsinB Inhibition by Antibiotic Nitroxoline and Related Compounds. **ChemMedChem**, v. 6, n. 8, p. 1351–1356, 2011.

MITROVIĆ, A. et al. Organoruthenated Nitroxoline Derivatives Impair Tumor Cell Invasion through Inhibition of Cathepsin B Activity. **Inorganic Chemistry**, v. 58, n. 18, p. 12334–12347, 2019.

MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4540–4563, 2014.

MOREIRA, M. B. et al. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 227–232, 2015.

MOURA, T. R. DE. **Compostos de Pd (II) contendo ligantes N , S-doadores : síntese , caracterização e estudo da atividade citotóxica**. [s.l.] UNESP, 2016.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination**

compounds. Part A, Theory and applications in inorganic chemistry. [s.l: s.n.].

NAWAZ, H.; WASEEM, A.; MUHAMMAD, R. Synthesis , characterization , cytotoxicity and computational studies of new phosphine - and carbodithioate - based palladium (II) complexes. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 31, p. 1–14, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6^a ed. New York: Artmed, 2014.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Platinum(II) Complexes in Cancer Therapy. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, p. 196–209, 2011.

NITISS, J. L. et al. **Topoisomerase assays**. [s.l: s.n.].

OMAE, I. Applications of five-membered ring products of cyclometalation reactions as anticancer agents. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 280, p. 84–95, 2014.

PAIXÃO, D. A. et al. In vitro anti-Trypanosoma cruzi activity of ternary copper(II) complexes and in vivo evaluation of the most promising complex. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, n. October 2018, p. 157–166, 2019.

PAL, S. Pyridine: A Useful Ligand in Transition Metal Complexes. In: PANDEY, P. P. (Ed.). **Pyridine**. 1. ed. London: IntechOpen, 2018. p. 17.

PAVIA, D. L. et al. **Introduction to Spectroscopy**. 5. ed. Stamford: Cengage Learning, 2015.

PETITPAS, I. et al. Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin. Anatomy of drug site I. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 25, p. 22804–22809, 2001.

PETT, L.; HARTLEY, J.; KIAKOS, K. Therapeutic Agents Based on DNA Sequence Specific Binding. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 14, p. 1293–1322, 2015.

POMMIER, Y. et al. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 11, p. 703–721, 2016.

PORTUGAL, J.; BARCELÓ, F. Noncovalent Binding to DNA: Still a Target in Developing Anticancer Agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 36, p. 4108–4134, 2016.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Complexos fosfínicos e suas aplicações na medicina. **Química Nova**, v. 16, p. 651–659, 1996.

REHMAN, S. U. et al. Studying non-covalent drug-DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 576, p. 49–60, 2015.

ROCHA, F. V. et al. 3,5-Dimethyl-1-thiocarbamoylpyrazole and its Pd(II) complexes: Synthesis, spectral studies and antitumor activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1698–1702, 2010.

ROCHA, F. V. et al. Cationic Pd(II) complexes acting as topoisomerase II inhibitors: synthesis, characterization, DNA interaction and cytotoxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 159, p. 165–168, 2016.

ROCHA, F. V. et al. Computational studies, design and synthesis of Pd(II)-based complexes: Allosteric inhibitors of the Human Topoisomerase-II α . **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 199, n. May, p. 110725, 2019.

RODGER, A. UV Absorbance Spectroscopy of Biological Macromolecules. In: **Encyclopedia of Biophysics**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. v. 2p. 2714–2718.

ROSENBERG, B. et al. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumor Agents. **Nature**, v. 222, p. 385–386, 1969.

ROSENBERG, B. Platinum complexes and Cancer. **Naturwissenschaften**, v. 60, p. 399–406, 1973.

ROSENBERG, B. Platinum complexes for the treatment of Cancer. **Interdisciplinary Science Reviews**, v. 3, n. 2, p. 134–147, 1978.

RUIZ, J. et al. Novel bis-C,N-cyclometalated iridium(III) thiosemicarbazide antitumor complexes: Interactions with human serum albumin and DNA, and inhibition of cathepsin B. **Inorganic Chemistry**, v. 52, n. 2, p. 974–982, 2013.

S GONDI, C.; LAMPE, C. M.; GONDI, C. S. Cathepsin B Inhibitors for Targeted Cancer Therapy. **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 06, n. 10, p. 417–421, 2014.

SAKTHIKUMAR, K. et al. Antimicrobial , Antioxidant and DNA Interaction Studies of Water-soluble Complexes of Schiff Base Bearing Morpholine Moiety. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 4, p. 727–738, 2018.

SALEHZADEH, S. et al. DNA binding and molecular docking studies of a new Cu (II) complex of isoxsuprine drug. **Polyhedron**, v. 162, p. 232–239, 2019.

SCHMID, F. Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2001. p. 1–4.

SHIGEMATSU, H. et al. Overexpression of topoisomerase II alpha protein is a factor for poor prognosis in patients with luminal B breast cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 42, p. 26701–26710, 2018.

SHIMIZU, S. et al. Pyridine and Pyridine Derivatives. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. 1. ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000. p. 29.

SHRIVER, D. et al. **Inorganic Chemistry**. [s.l: s.n.].

SILVA, H. V. R. et al. Phosphine / diimine ruthenium complexes with Cl⁻, CO, NO⁺, NO⁻ and pyridine ligands : Pro-apoptotic activity on triple-negative breast cancer cells and DNA / HSA interactions. **Polyhedron**, v. 144, p. 55–65, 2018.

SINGH, B.; THAKUR, K. P. Thioamide Bands and Nature of Bonding - II. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, v. 36, n. April 1973, p. 1735–1737, 1974.

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug-DNA interactions and their study

by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 124, p. 1–19, 2013.

SOCRATES, G. **Infrared Characteristic Group Frequencies. Tables and Charts**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

STREBHARDT, K.; ULLRICH, A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 Years of progress. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 6, p. 473–480, 2008.

TAVARES, T. T. T. et al. Platinum(II) and palladium(II) aryl-thiosemicarbazone complexes: synthesis, characterization, molecular modeling, cytotoxicity, and antimicrobial activity. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 67, n. 6, p. 956–968, 2014.

THAKOR, K. P. et al. Fluorescence and absorption studies of DNA – Pd (II) complex interaction : Synthesis , spectroanalytical investigations and biological activities. **The Journal of Biological and Chemical Luminescence**, v. 34, p. 113–124, 2019.

TINOCO JR., I. et al. **Physical Chemistry Principles and Applications in Biological Sciences**. 5^a ed. [s.l.] Prentice Hall, 2002.

TOLMAN, C. A. Steric Effects of Phosphorus Ligands in Organometallic Chemistry and Homogeneous Catalysis. **Chemical Reviews**, v. 77, n. 3, p. 313–348, 1977.

V. CEPEDA et al. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 3–18, 2007.

VALLE, E. M. A. et al. Sobre uma degenerescência accidental nos deslocamentos químicos de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ em complexos difosfínicos de rutênio. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 807–812, 2008.

VILLARREAL, W. et al. Copper(I)–Phosphine Polypyridyl Complexes Synthesis, Characterization, DNA/HSA Binding Study, and Antiproliferative Activity. **Inorganic Chemistry Frontiers**, v. 56, n. 7, p. 3781–3793, 2017.

WANG, W.; TSE-DINH, Y.-C. Recent Advances in Use of Topoisomerase

Inhibitors in Combination Cancer Therapy. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 730–740, 2019.

WENDORFF, T. J. et al. The Structure of DNA-Bound Human Topoisomerase II Alpha: Conformational Mechanisms for Coordinating Inter-Subunit Interactions with DNA Cleavage. **J. Mol. Biol.**, v. 424, n. 3–4, p. 109–124, 2012.

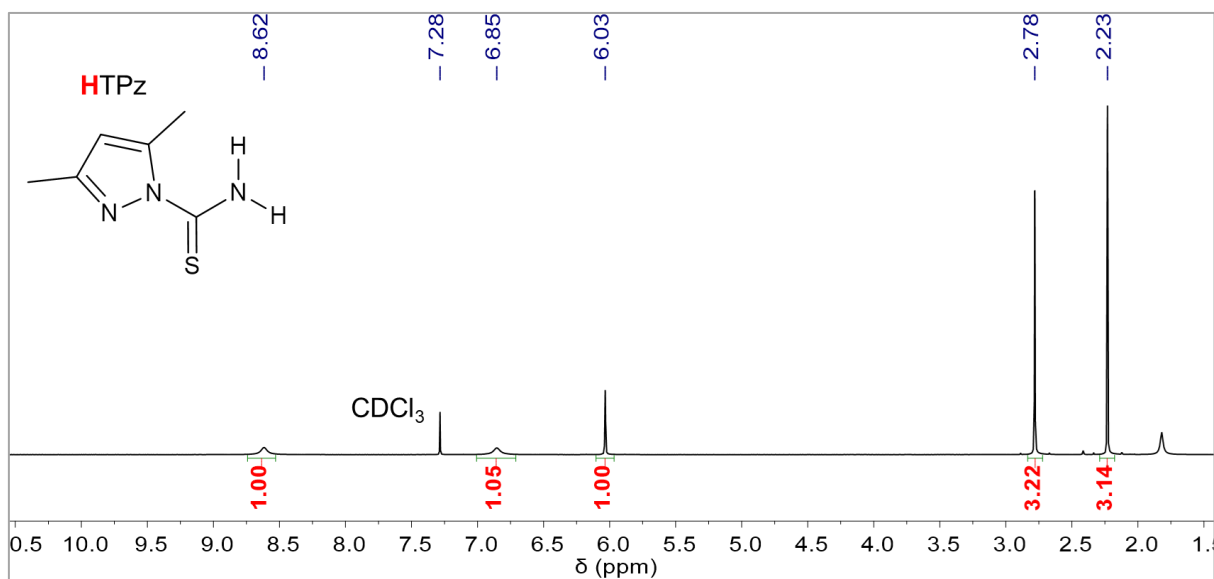
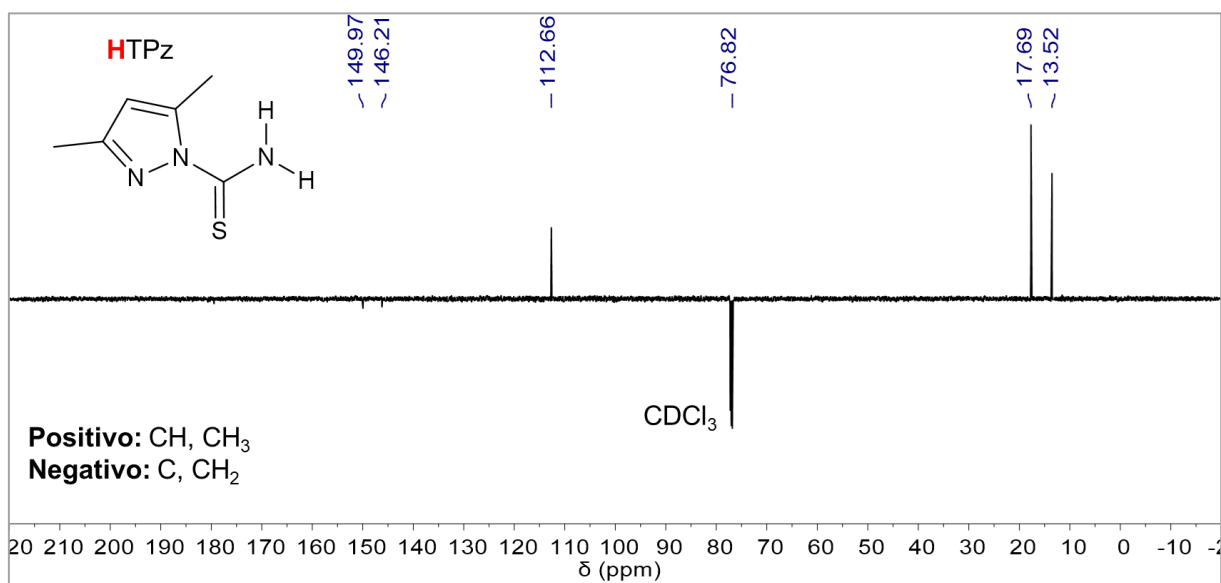
WOLFE, A. et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Physically Intercalate into Duplex Regions of Denatured DNA. **Biochemistry**, v. 26, n. 20, p. 6392–6396, 1987.

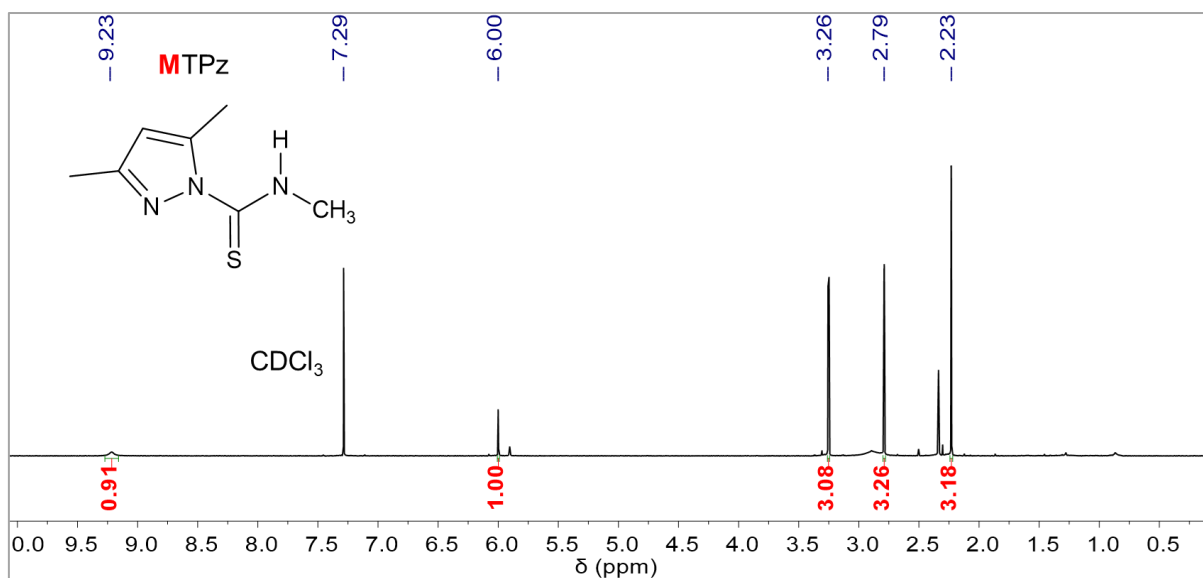
WOLFE, A.; SHIMER, G. H.; MEEHAN, T. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Physically Intercalate into Duplex Regions of Denatured DNA ? n. 1975, p. 6392–6396, 1987.

ZHAO, X. et al. New insights into the behavior of bovine serum albumin adsorbed onto carbon nanotubes: Comprehensive spectroscopic studies. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 16, p. 5625–5631, 2010.

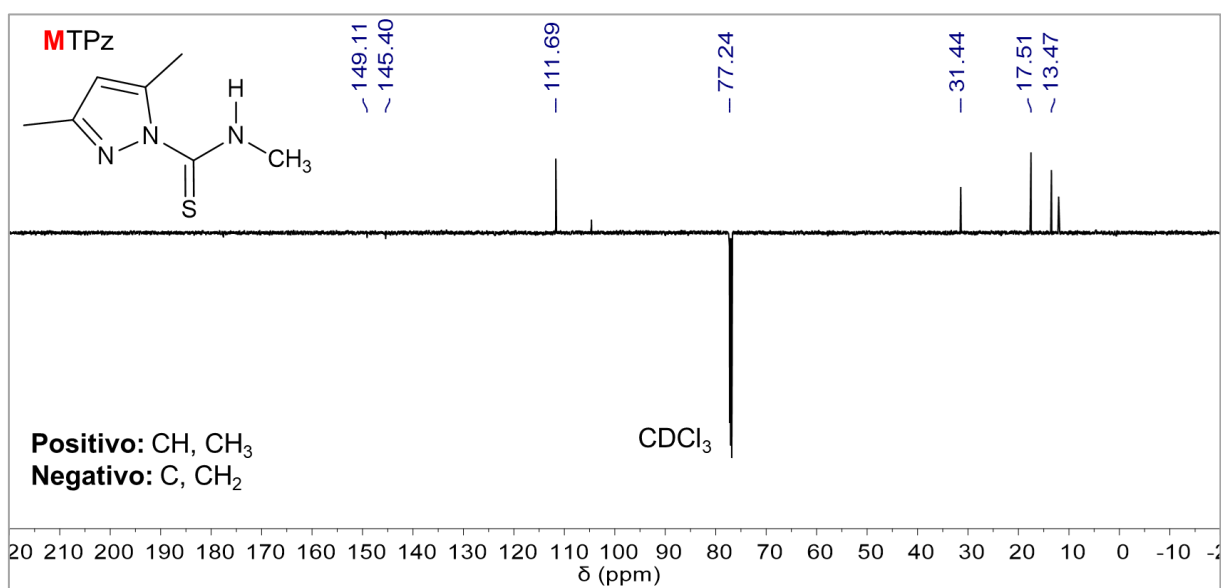
8 ANEXO

Anexo I – Complexos pirazólicos

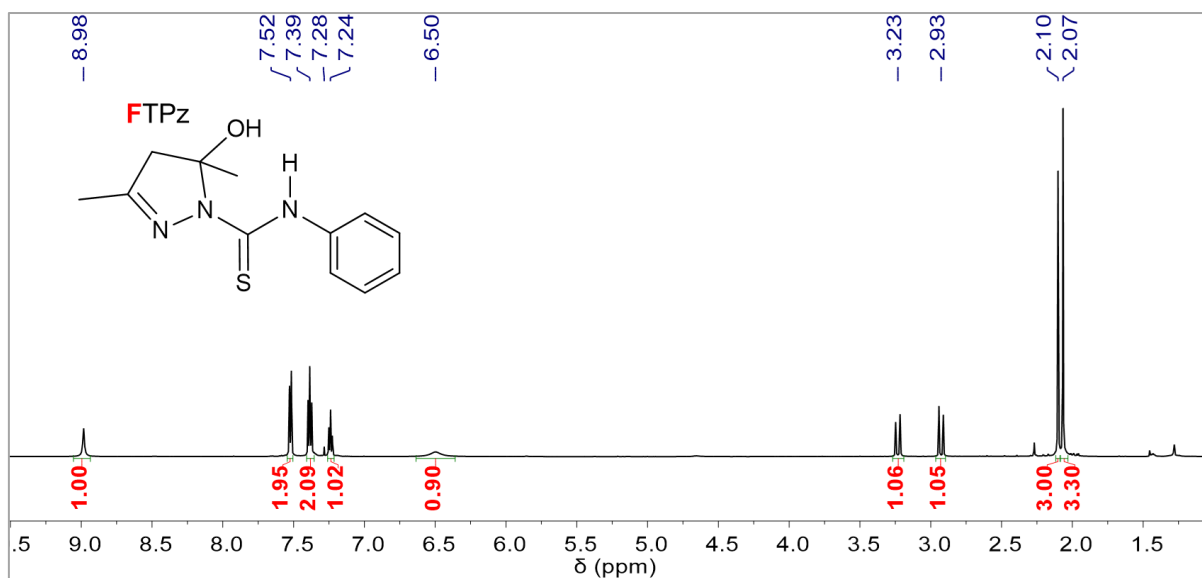
Anexo 1 – Espectro de RMN de ¹H do ligante **HTPz** em CDCl₃.Anexo 2 – Espectro de RMN DEPTQ do ligante **HTPz** em CDCl₃.



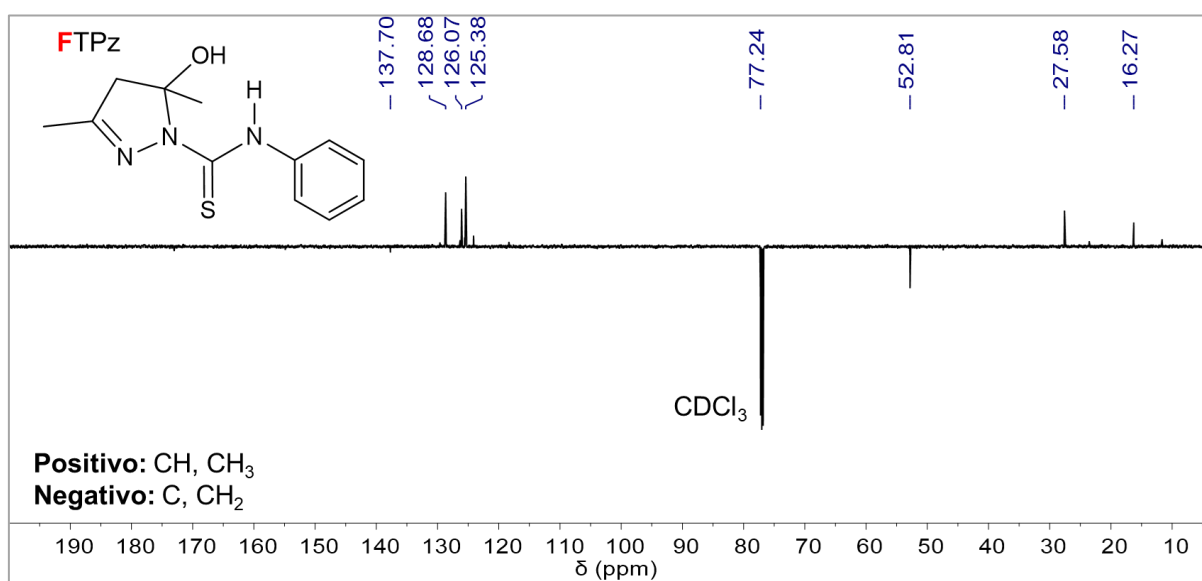
Anexo 3 – Espectro de RMN de ¹H do ligante **MTPz** em CDCl₃.



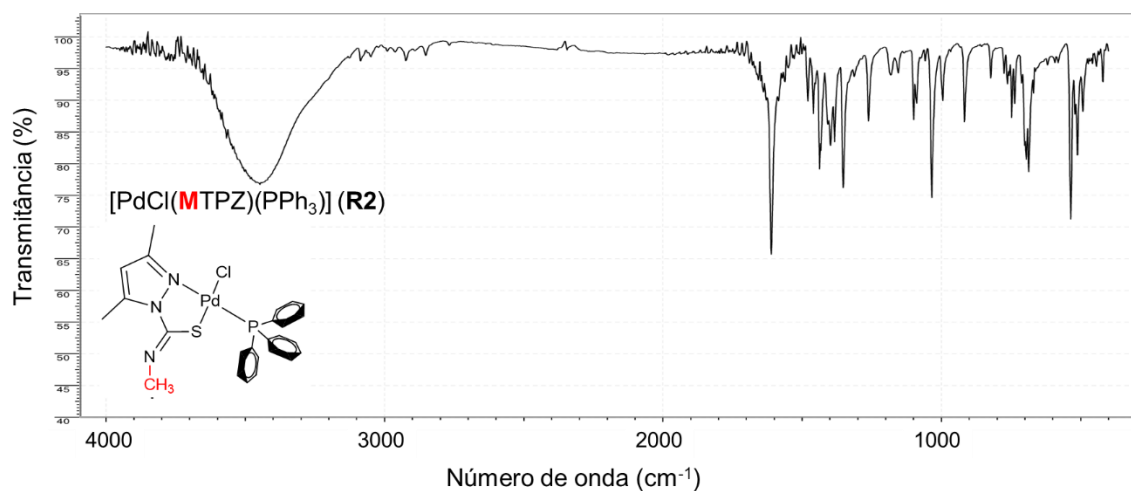
Anexo 4 – Espectro de RMN DEPTQ do ligante **MTPz** em CDCl₃.



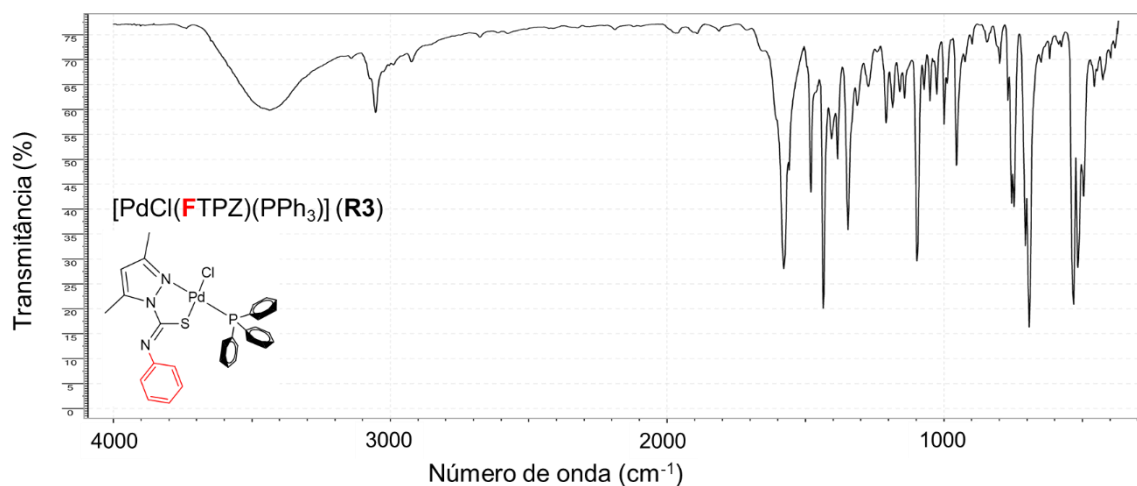
Anexo 5 – Espectro de RMN de ¹H do ligante **FTPz** em CDCl₃



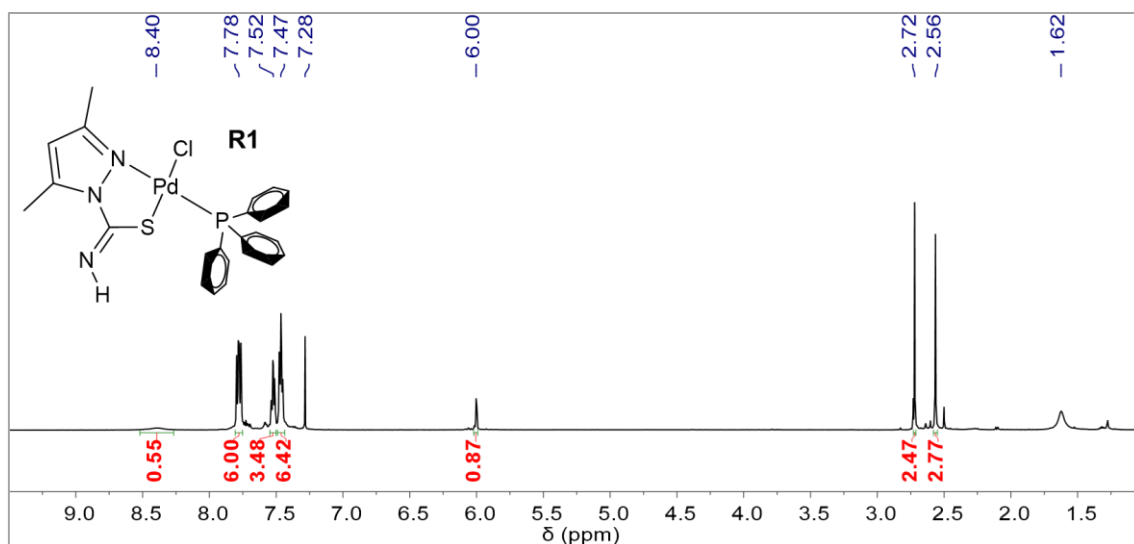
Anexo 6 – Espectro de RMN DEPTQ do ligante **FTPz** em CDCl₃.



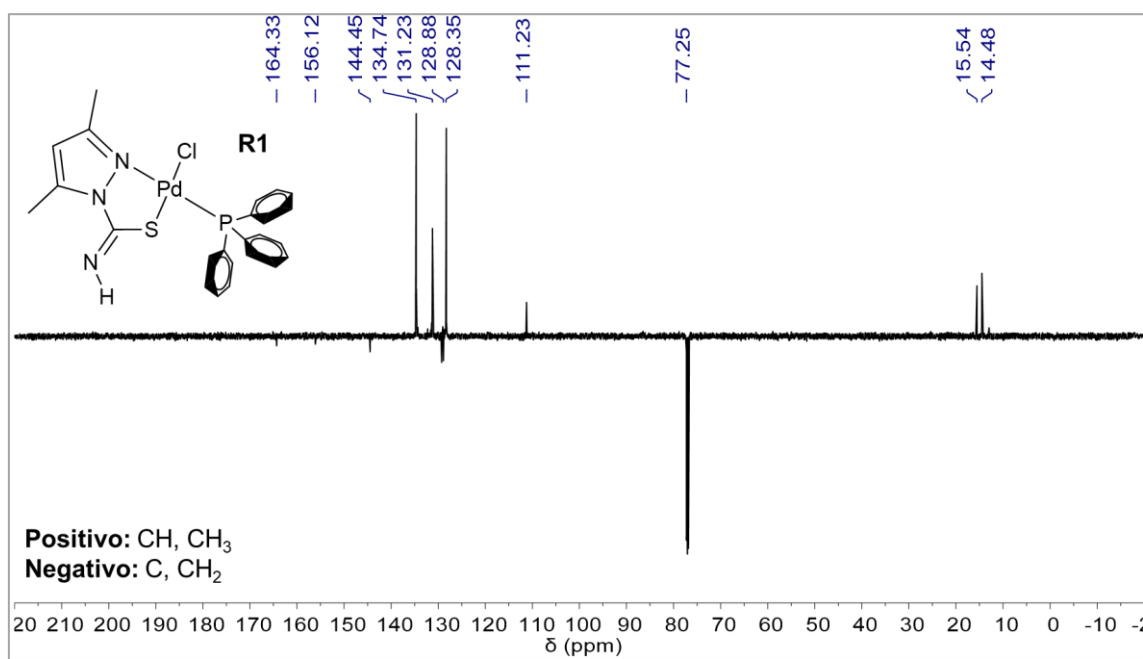
Anexo 7 – Espectro vibracional na região do Infravermelho (IV) para o complexo $[\text{PdCl}(\text{MTPZ})(\text{PPh}_3)]$ (R2).



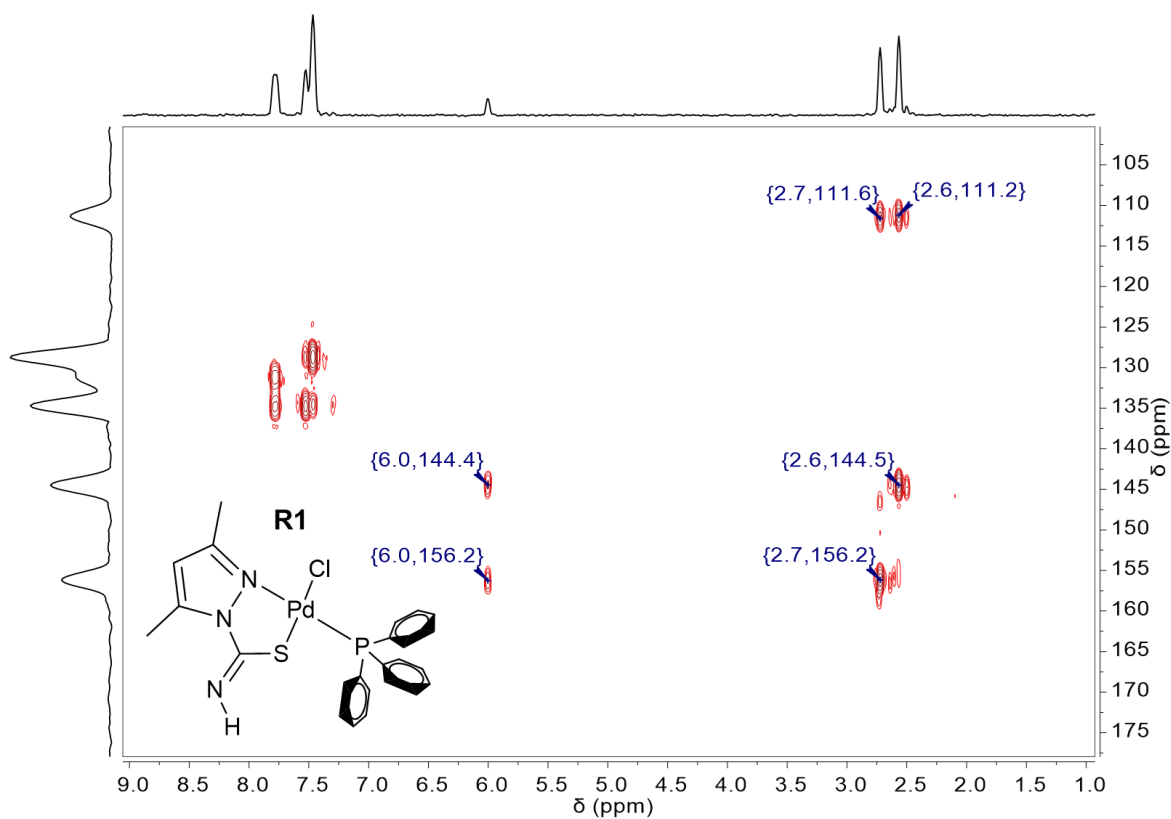
Anexo 8 – Espectro vibracional na região do Infravermelho (IV) para o complexo $[\text{PdCl}(\text{FTPZ})(\text{PPh}_3)]$ (R3).



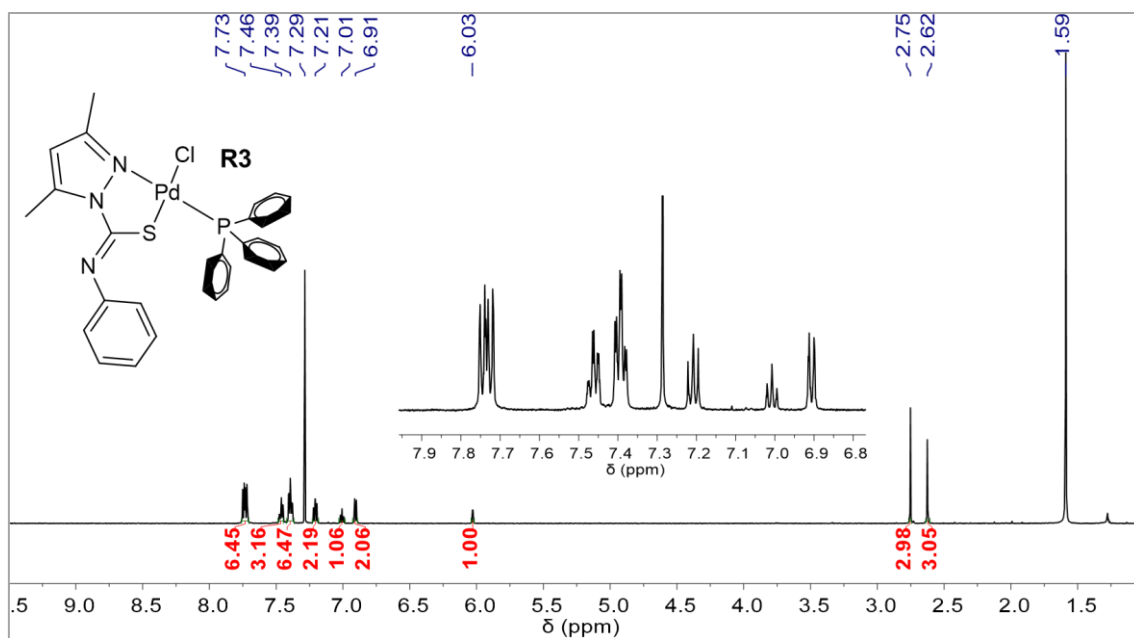
Anexo 9 – Espectro de RMN de ¹H do complexo **R1** em CDCl₃.



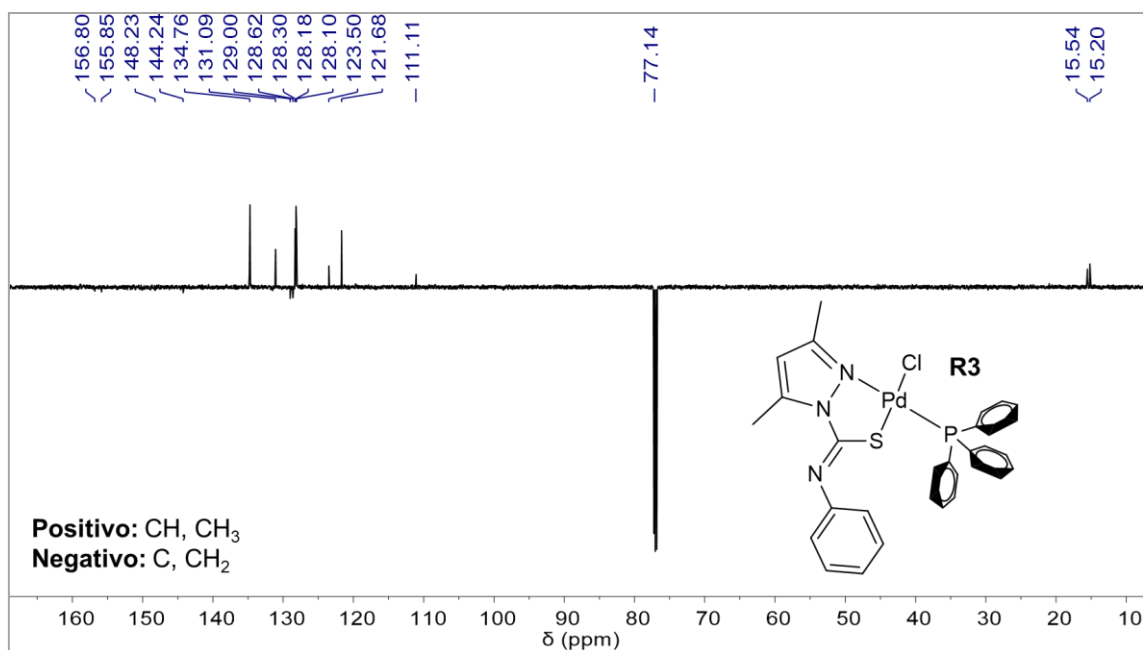
Anexo 10 – Espectro de RMN de DEPTQ do complexo **R1** em CDCl₃.



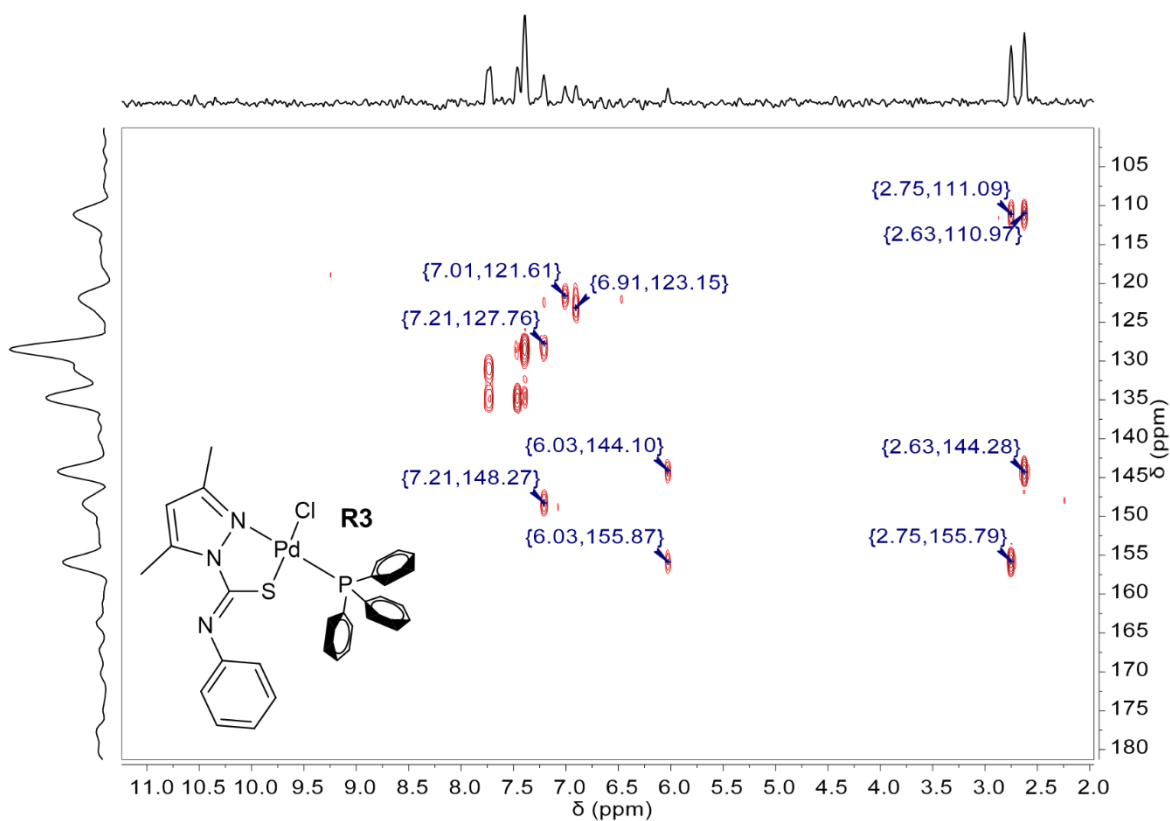
Anexo 11 – Espectro de RMN – HMBC ^{13}C - ^1H para o complexo **R1** em CDCl_3



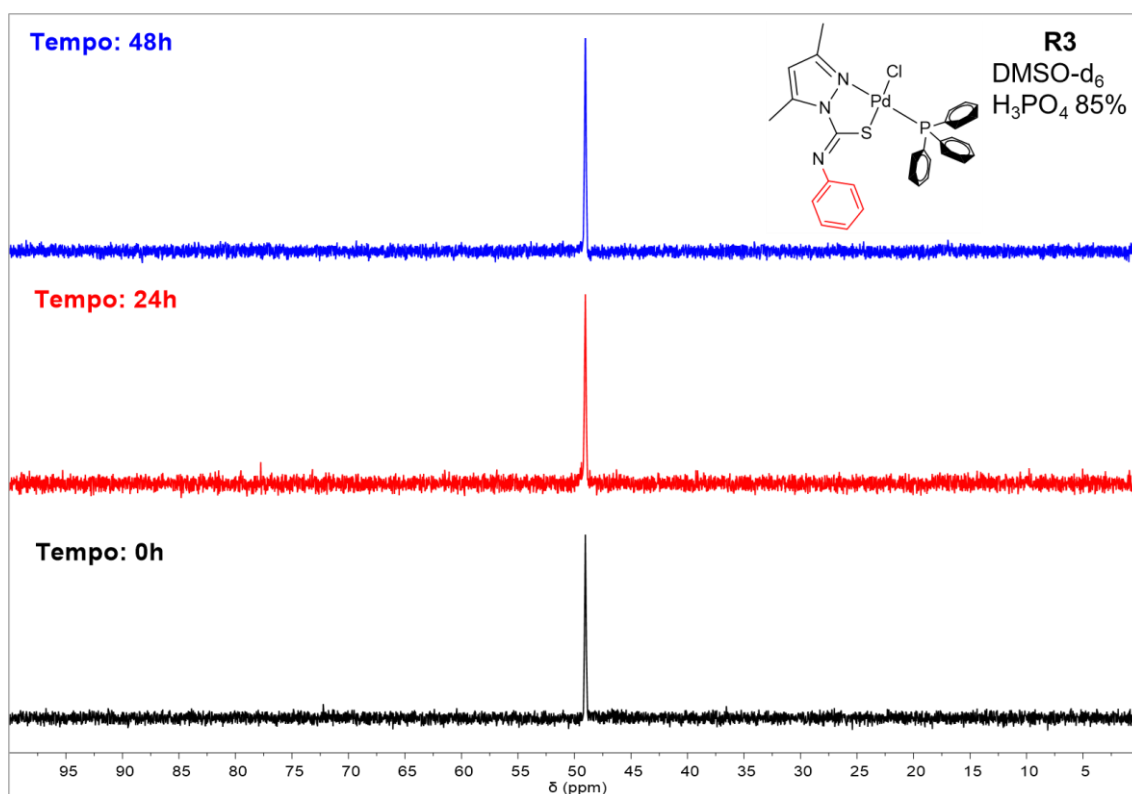
Anexo 12 – Espectro de RMN de ^1H do complexo **R3** em CDCl_3 .



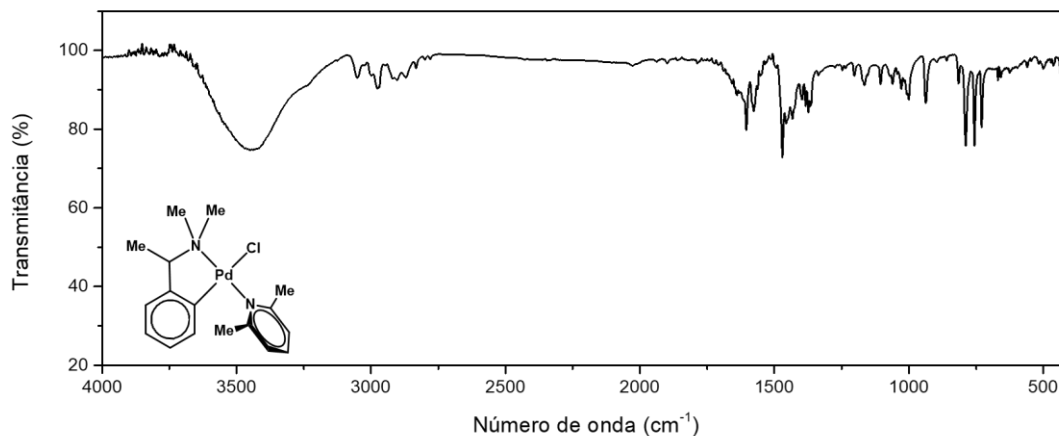
Anexo 13 – Espectro de RMN de DEPTQ do complexo **R3** em CDCl₃.



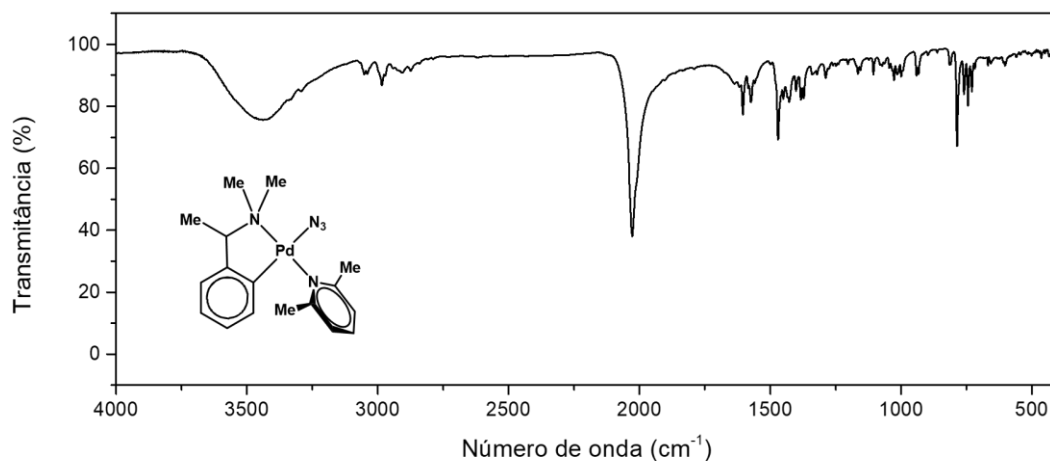
Anexo 14 – Espectro de RMN – HMBC ¹³C-¹H para o complexo **R3** em CDCl₃.



Anexo 15 – Espectros de RMN de ^{31}P para o complexo R3 em DMSO em 0, 24 e 48h

Anexo II – Complexos ciclopaladados

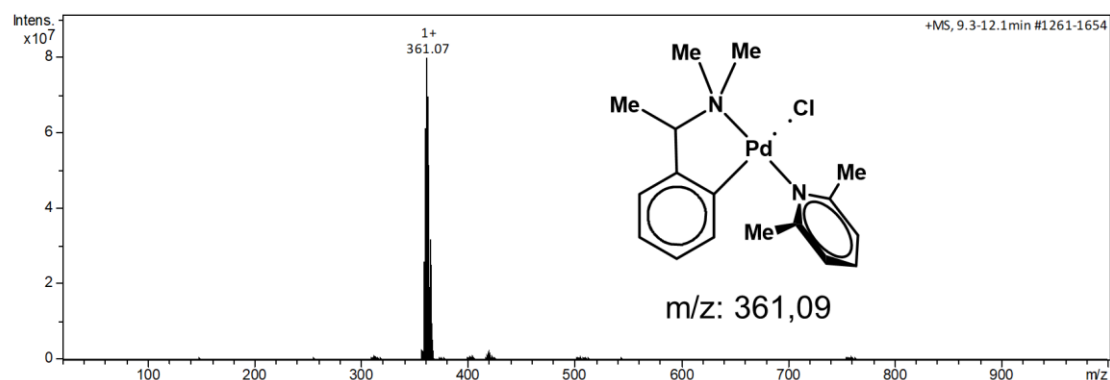
Anexo 16 – Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Pd}(\text{S-C}^2, \text{N-dmpa})(\text{Cl})(\text{luti})$ (**RZ1**).



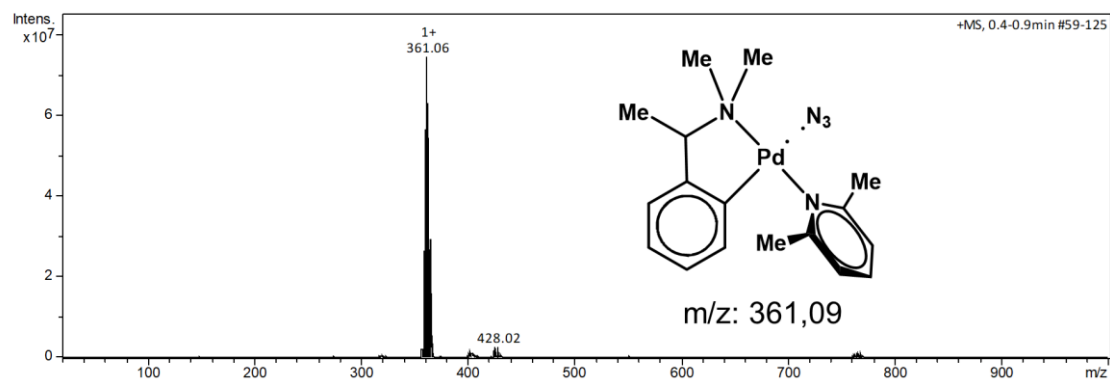
Anexo 17 – Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $\text{Pd}(\text{S-C}^2, \text{N-dmpa})(\text{N}_3)(\text{luti})$ (**RZ2**).

Número de Onda (cm ⁻¹)		Modo Vibracional
RZ1	RZ2	
3050	3051	v(CH)
3024	3040	
2977	2984	v(CH ₃) _{alifático}
2869	2874	
----	2027	v(NNN)
1605	1604	v(anel)
1577	1574	
1470	1470	
1456	1450	
815	814	δ(C-H) _{out-of-plane}
756	754	δ(C-H) _{out-of-plane}

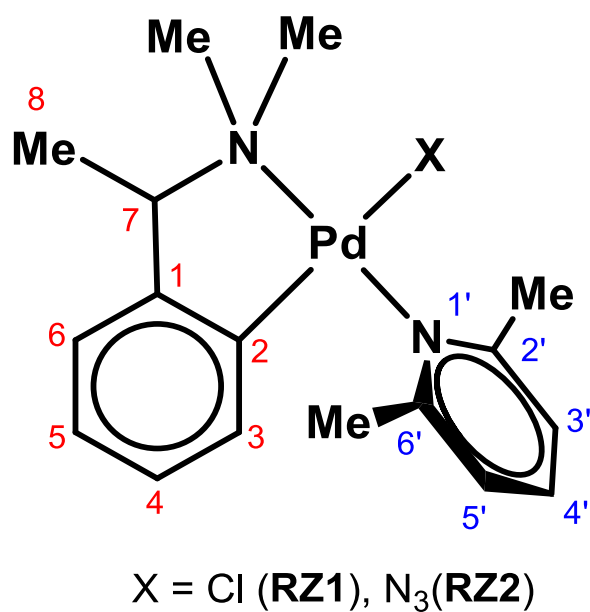
Anexo 18 – Principais atribuições do espectro de infravermelho para os complexos **RZ1** e **RZ2**.



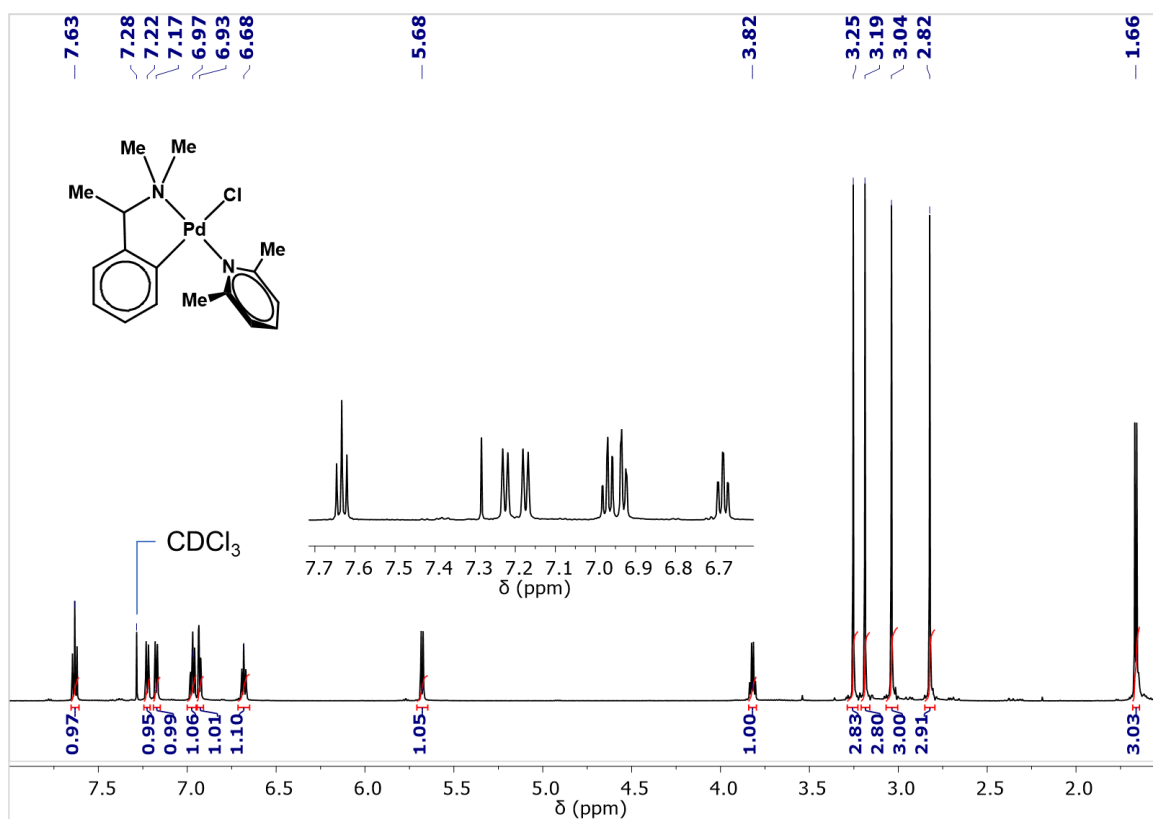
Anexo 19 – Espectro ESI-MS para o complexo **RZ1**.



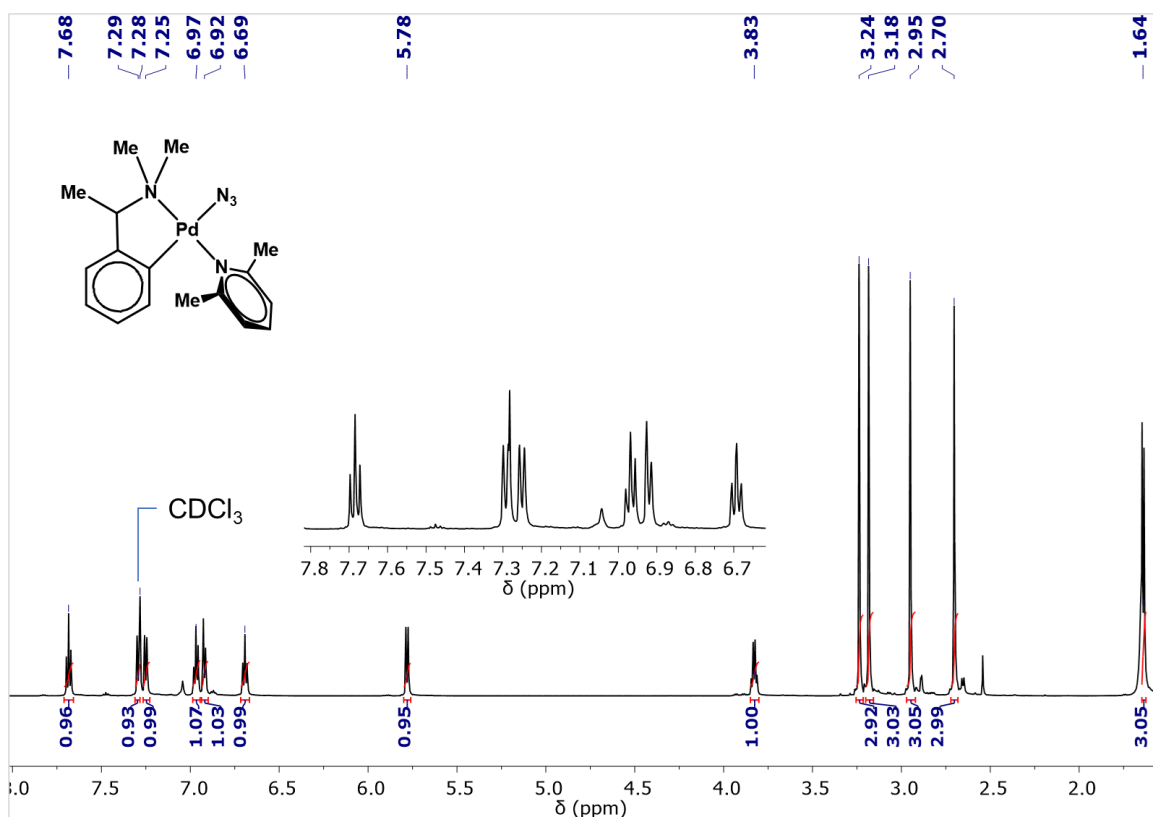
Anexo 20 – Espectro ESI-MS para o complexo **RZ2**.



Anexo 21 – Numeração adotada para atribuição dos espectros de RMN para os complexos **RZ1** e **RZ2**.



Anexo 22 – Espectro de RMN de ^1H do complexo **RZ1** em CDCl_3 .



Anexo 23 – Espectro de RMN de ^1H do complexo **RZ2** em CDCl_3 .

RMN ^1H		
Posição	RZ1	RZ2
H3	5.68 (dd), $^3J=7.61$, $^4J=1.02$	5.78 (d), $^3J=7.41$
H4	6.68 (td), $^3J=7.61$, $^4J=1.43$	6.69 (t), $^3J=7.41$
H5	6.97 (td), $^3J=7.61$, $^4J=1.02$	6.97 (t), $^3J=7.41$
H6	6.93 (dd), $^3J=7.61$, $^4J=1.43$	6.92 (d), $^3J=7.41$
H7	3.82 (q), $^3J=6.53$	3.83 (q), $^3J=6.57$
Me8	1.66 (d), $^3J=6.53$	1.64 (d), $^3J=6.57$
Me ^N	3.04 (s)	2.95 (s)
Me ^N	2.82 (s)	2.70 (s)
H3'	7.23 (d) $^3J=7.61$	7.29 (d) $^3J=7.67$
H4'	7.63(t) $^3J=7.61$	7.68 (t) $^3J=7.67$
H5'	7.18(d) $^3J=7.61$	7.25 (d) $^3J=7.67$
Me ^{2'}	3.25 (s)	3.24 (s)
Me ^{6'}	3.19 (s)	3.18 (s)

Anexo 24 – Atribuições obtidas a partir do espectro de RMN de ^1H para os complexos $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{Cl})(\text{lut})]$ (**RZ1**) e $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{N}_3)(\text{lut})]$ (**RZ2**). (s) = singleto, (d) = dubleto, (dd) = dubleto de dubletos. (t) = tripleto, (td) = tripleto de dubletos, (q) = quadrupeto.

Chemical structure: CN1C(C)(C)N(C)C2=CC=CC=C2C1=CC=C3C(=C(C=C3)N)N(C)C4=CC=CC=C4C13

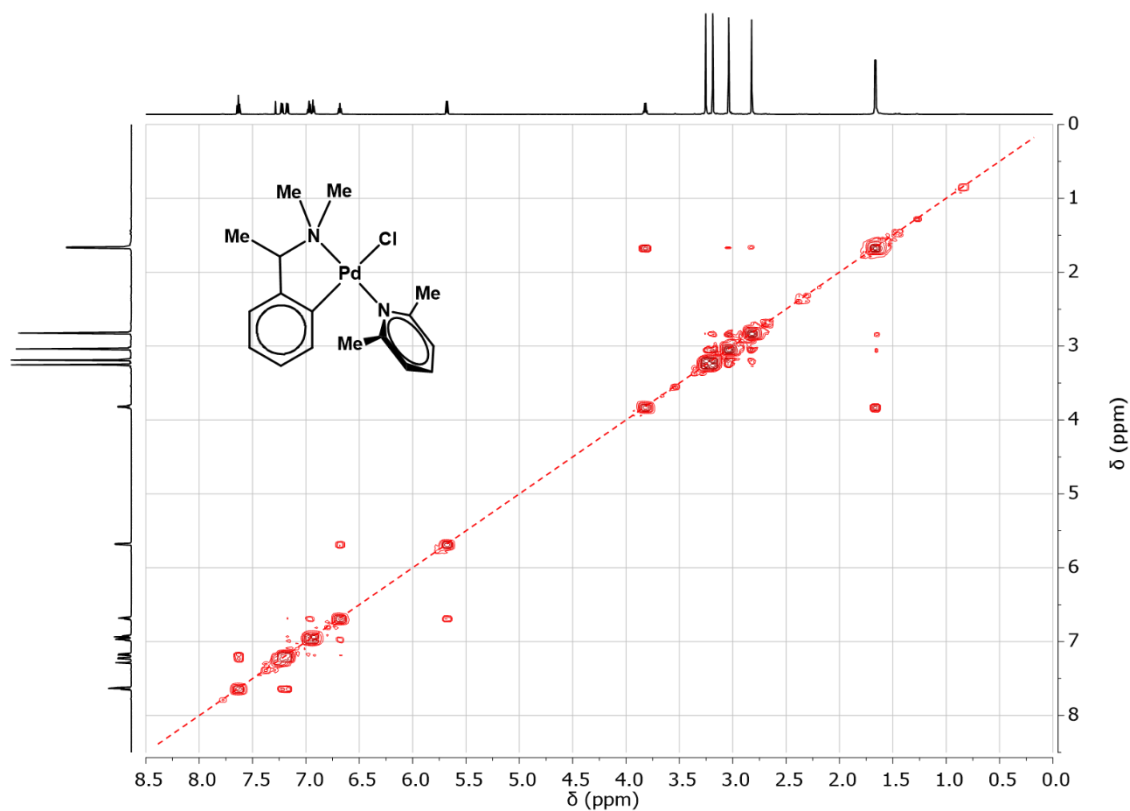
13C NMR peaks (ppm): 159.55, 159.28, 153.63, 145.87, 138.26, 131.97, 125.27, 124.32, 123.07, 122.87, 122.06, 77.03, 75.67, 51.75, 46.40, 27.89, 27.80, 20.20.

DEPT results:
Positivo: CH, CH₃
Negativo: C, CH₂

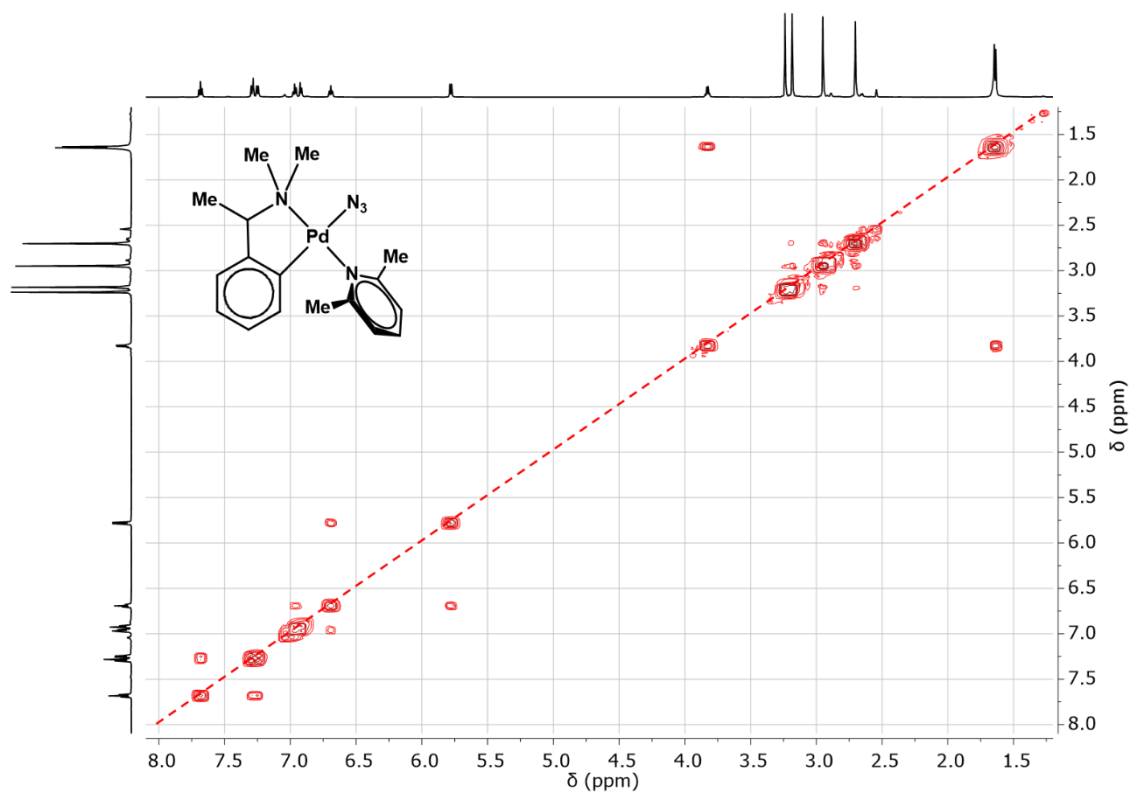
157

Posição	RMN ^{13}C	
	RZ1	RZ2
C1	145,63	145,87
C2	153,40	153,63
C3	131,05	131,97
C4	125,25	125,27
C5	124,29	124,32
C6	121,97	122,06
C7	75,95	75,67
Me ⁸	20,60	20,20
N-Me	52,24	51,75
N-Me	47,49	46,40
C2'	159,46	159,28
C3'	122,85	123,07
C4'	137,94	138,26
C5'	122,56	122,87
C6'	159,73	159,55
Me ^{2'}	28,31	27,89
Me ^{6'}	28,30	27,80

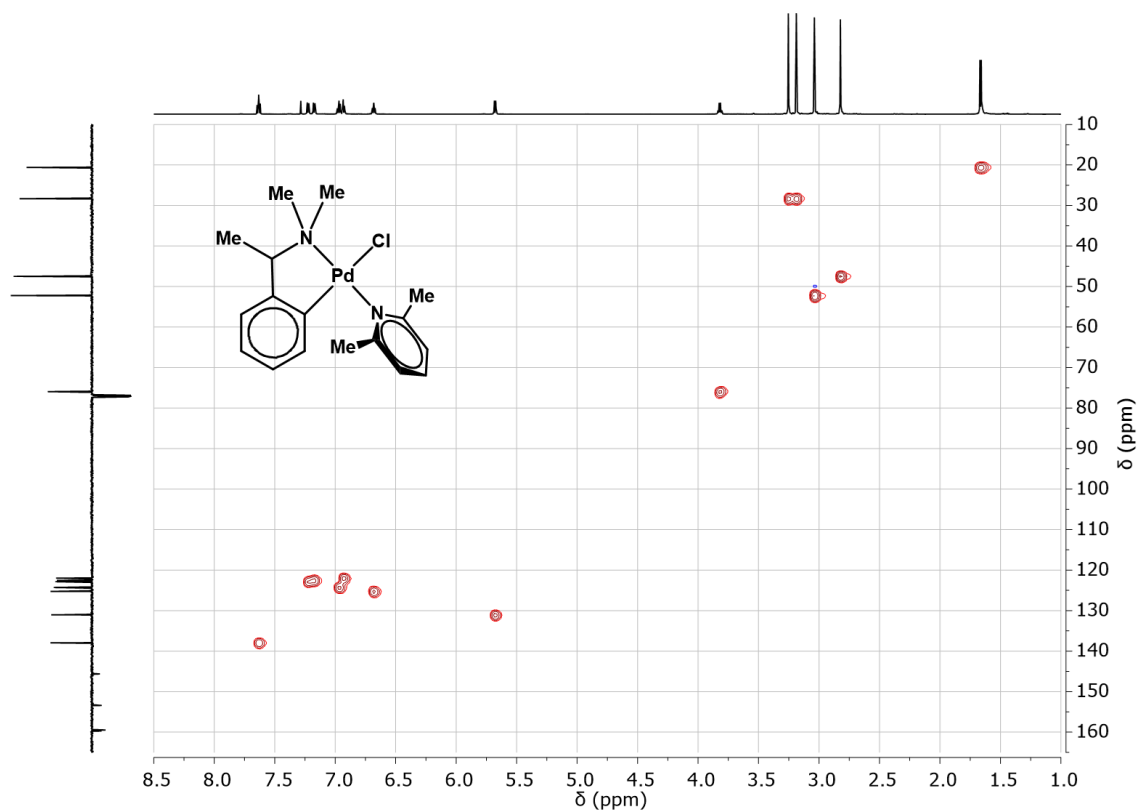
Anexo 27 – Atribuições obtidas a partir do espectro de DEPTQ ^{13}C para os complexos $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{Cl})(\text{lut})]$ (**RZ1**) e $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmpa})(\text{N}_3)(\text{lut})]$ (**RZ2**).



Anexo 28 – Espectro de RMN – COSY para o complexo **RZ1** em CDCl_3 .



Anexo 29 – Espectro de RMN – COSY para o complexo **RZ2** em CDCl_3 .



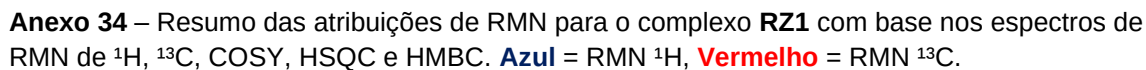
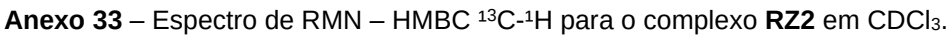
Anexo 30 – Espectro de RMN – HSQC ^{13}C - ^1H para o complexo **RZ1** em CDCl_3 .

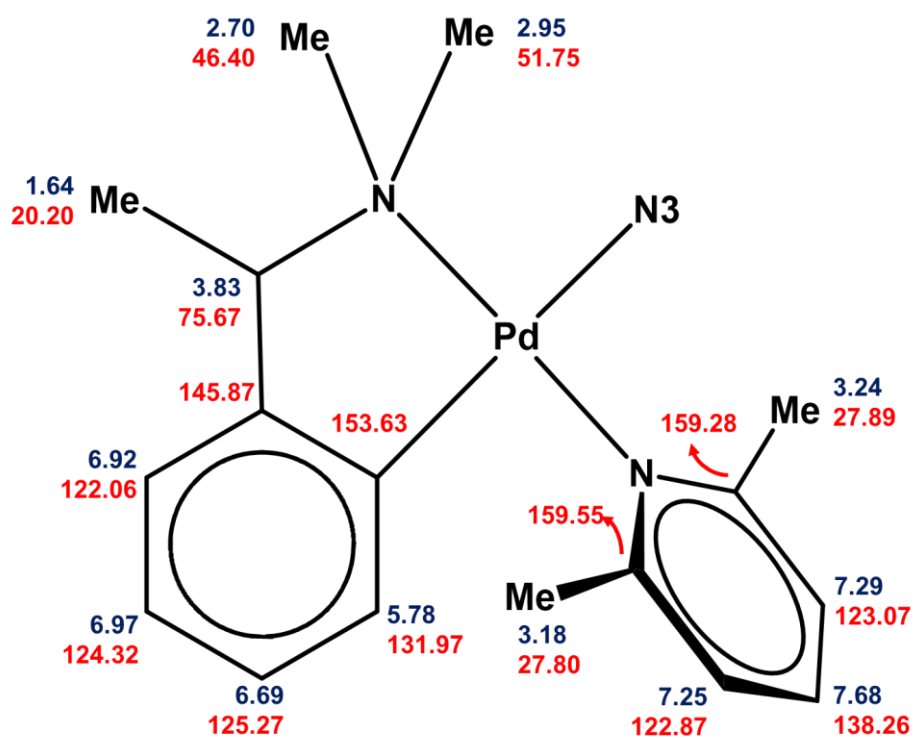


Anexo 31 – Espectro de RMN – HSQC ^{13}C - ^1H para o complexo **RZ2** em CDCl_3 .



Anexo 32 – Espectro de RMN – HMBC ^{13}C - ^1H para o complexo **RZ1** em CDCl_3 .





Anexo 35 – Resumo das atribuições de RMN para o complexo **RZ2** com base nos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC. **Azul** = RMN ^1H , **Vermelho** = RMN ^{13}C .