

DIEGO BATISTA FÉLIX

Investigação de mecanismo de reação entre cisteína e ciclopaldado com potencial
atividade anticâncer

Dissertação apresentada ao
Instituto de Química de Araraquara,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. José Clayston Melo Pereira
Co-orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira Godoy Neto

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

F316i Félix, Diego Batista
Investigação de mecanismo de reação entre cisteína e
ciclopaladado com potencial atividade anticâncer / Diego
Batista Félix. – Araraquara : [s.n.], 2019
71 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: José Clayston Melo Pereira

Coorientador: Adelino Vieira Godoy Neto

1. Agentes antineoplásicos. 2. Ressonância magnética
nuclear. 3. Paládio. 4. Cisteína. 5. Cinética química. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

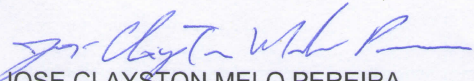
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Investigação de mecanismo de reação entre cisteína e ciclopaldado com potencial atividade anticâncer"

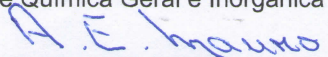
AUTOR: DIEGO BATISTA FELIX

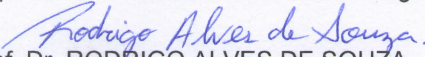
ORIENTADOR: JOSE CLAYSTON MELO PEREIRA

COORIENTADOR: ADELINO VIEIRA DE GODOY NETTO

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


Prof. Dr. JOSE CLAYSTON MELO PEREIRA
Departamento de Química Geral e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. ANTONIO EDUARDO MAURO
Departamento de Química Geral e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. RODRIGO ALVES DE SOUZA
Instituto Federal de São Paulo - IFSP - Catanduva

Araraquara, 21 de agosto de 2019

DADOS CURRICULARES

DIEGO BATISTA FELIX

I. DADOS PESSOAIS

Nascimento: 24/05/1986

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Limeira – SP

Filiação

Pai: João Batista Felix

Mãe: Maria de Fátima Soares Felix

II. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação: Curso de Licenciatura em Química, concluído em dezembro de 2014 no Instituto de Química da UNESP, Campus de Araraquara.

III. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS (PAINÉIS)

FELIX, D. B. et al. Atividade sobre modelo atômico pautada nos eixos estruturantes da alfabetização científica desenvolvida no contexto de atuação do PIBID. In: **36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ 2013)** realizada em Águas de Lindóia - SP no período de 25 a 28 de maio de 2013.

Dedicatória

Dedico aos meus pais **João Batista Felix** e **Maria de Fátima Soares Felix**, à minha irmã **Graziela Mara Felix** e a toda minha família pelo amor e apoio incondicional durante esta etapa da minha vida. Aos meus pais de coração **Caetano Giovanine Neto**, **Fátima Giovanine** e ao meu cunhado **Clayton Vinícius Giovanine** por todo apoio e motivação que fizeram superar essa etapa. E, principalmente à minha esposa **Karen Regina Giovanine Félix** pela paciência, apoio, compreensão e carinho, sem os quais esta jornada certamente seria mais árdua.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

A meu orientador **Prof. Dr. José Clayston Melo Pereira**, e ao co-orientador **Prof. Dr. Adelino Vieira Godoy Neto** pela confiança, amizade e ensinamentos que permitiram o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos professores e técnicos presentes na banca do Exame Geral de Qualificação, **Prof. Dr. Marcelo Nalim** e a **Profa. Dra. Lucineia Vizzotto Marconcini**; em especial, a **Profa. Dra. Daniela Ramos Truzzi** da USP-SP por todo apoio dado nos experimentos de Stopped-Flow, pela disposição e contribuições para este trabalho.

Aos amigos e amigas do Grupo de pesquisa da Organometálicos, **Natália (Chiquinha)**, **Renan Lira**, **Renan Zanetti**, **Jecika**, **Thales**, **Débora**, **Bárbara**, **Joana**, **Carol**, **Ronan** e **Rafael** pela amizade, convivência e principalmente aprendizado.

Aos amigos extra IQ **Anselmo Barreto**, **Fabiano**, **D. Márcia** (grande exemplo de ética), **Prof. Toledo**, **Mestre Carlão**, **Erivan**, **Maycon**, **Rodolfo Fantin**, **André Ribeiro**, **Alcebíades**, **Antônio Muniz (em memória)**, **Thiago Pereira** aos Maestros **Júnior Luís Villas Boas** e **Rodrigo Muller** ao primeiro professor musical **Dú Barsotti**, aos amigos **Erickson**, **Branca**, **Tio Sadraque**, **Placa** aos grandes mestres da cultura oriental Sensei **Júlio Mário**, Shifu **Emerson** aos instrutores de tatame **Márcio**, **Marcelo** e **Margarete**, **Felipinho**, **Laís**, **Chevette** e **Raphael**, grande amiga e irmã de coração **Taty** e ao grande amigo/irmão **Beraldo** que sempre torceram pelo meu sucesso, otimizaram minha perseverança, disciplina e auxiliaram no desenvolvimento de minha resiliência.

Em especial, ao **Prof. Dr. Ossamu Hojo**, por todos os ensinamentos extracurriculares bem como o grande **Mestre Sr. Milton (em memória)** e aos **professores e funcionários do Instituto de Química** pela aprendizagem e amizade.

Muito obrigado por comporem parte de minha história.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

“O conhecimento possui um preço que nem todos querem pagar”.

Platão

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo investigar a reação entre moléculas de importância biológica tais como aminoácidos e bases nitrogenadas com complexo de paládio com potencial anticâncer com fórmula geral $[Pd(dmba)(Cl)tu]$. Para essa finalidade foram realizados ensaio de ressonância magnética nuclear para obter informações de caráter estrutural sobre produto da reação, bem como estudos cinéticos que foram realizados por meio de monitoramento de mudança espectral em função do tempo. Sabe-se que a reação possui elevada labilidade, nesse caso, foi necessário utilizar técnica específica de fluxo interrompido (*Sttoped-flow*). A caracterização dos produtos da reação será realizada com base nos resultados obtidos por técnicas de espectroscopia de RMN e espectrometria de massas. Notou-se essencialmente que a importância desse estudo ocorre uma vez que o complexo majoritário possivelmente formado estará em maior proporção quanto ao complexo precursor contendo o ligante cloreto, mostrando, portanto, que a estrutura do complexo em meio de cultura contendo cisteína não permanece estável. Assim, o estudo da relação estrutura – atividade destes complexos de paládio devem levar em consideração sua estabilidade em solução e em presença de moléculas de importância biológica tais como a L-cisteína e a glutatona.

Palavras-chave: Potencial anticâncer; Mecanismo de reação; Ciclopaladado; cisteína.

ABSTRACT

This dissertation investigates the reaction between biologically important molecules, such as amino acids and hydrogen bases, with a potentially anti-cancer palladium complex having the general formula $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{Cl})\text{tu}]$. In order to do this, nuclear magnetic resonance assays were carried out to obtain structural information about the product of the reaction; kinetic studies were also carried out by monitoring spectral changes as a function of time. It is known that the reaction has high lability, and as a result, a *stopped-flow* technique was employed. Characterization of the reaction products will be done based on the results obtained from NMR and mass spectroscopy studies. The essential finding of this study was that the possibly-formed majority complex has a high proportion than the precursor complex containing the binding chloride, thus showing that the structure of the complex in a culture of cysteine does not hold stability. As a consequence, studies of the relation structure-activity for these palladium complexes should take into consideration its stability in solution and in the presense of biologically important molecules such as L-cysteine and glutatione.

Keyword: Anticancer potential; reaction; mechanism; Cyclopaladated; Cysteine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Agenda ONU 2030.....	18
Figura 2. Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes, no Brasil, em 2018.	19
Figura 3. Comparação de célula normal e célula cancerosa.....	20
Figura 4. Estrutura molecular do composto Salvarsan.	20
Figura 5. Mecanismos de ação da mercaptopurina MMP.	21
Figura 6. Complexos de platina de primeira e segunda geração.....	22
Figura 7. Esquema do acúmulo celular e do mecanismo de ação dos complexos de Pt ²⁺ gerados a partir da <i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₃] no meio biológico.....	23
Figura 8. Estrutura molecular do ligante Tioureia.	27
Figura 9. Esquema da reação entre bis-quelato e tioureia. Razão molar 1:2. Onde, X = Cl.....	28
Figura 10. Estrutura molecular do complexo [Pd(dmba)(Cl)(tu)]	28
Figura 11. Esquema de funcionamento da técnica Stopped flow.	30
Figura 12. Solução A (Sa). Solução C (Sc), após 2h de agitação magnética.....	33
Figura 13. Numeração da estrutura molecular do ligante RS.....	38
Figura 14. Espectro de RMN ¹ H para o ligante CISTEÍNA realizado em <i>d</i> ₆ -DMSO a 14,1T.....	39
Figura 15. Ampliação do espectro de RMN ¹ H para o ligante CISTEÍNA realizado em <i>d</i> ₆ -DMSO a 14,1T.....	40
Figura 16. Espectro de RMN ¹³ C para o ligante CISTEÍNA realizado em <i>d</i> ₆ -DMSO a 14,1T.....	41
Figura 17. Expansão do mapa de contorno HSQC para o ligante cisteína realizado em <i>d</i> ₆ -DMSO a 14,1T.....	42
Figura 18. Numeração da estrutura molecular do complexo precursor.....	43

Figura 19. Espectro de RMN ^1H para o complexo ciclopaladado realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.....	44
Figura 20. Ampliação do espectro de RMN ^1H para o complexo ciclopaladado realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.	45
Figura 21. Espectro DEPT 135 para o complexo ciclopaladado realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.	45
Figura 22. Mapa de contorno HSQC para o complexo ciclopaladado realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.....	46
Figura 23. Numeração da estrutura molecular para o produto da reação entre complexo precursor e RS.	48
Figura 24. Espectro de RMN ^1H para a reação do complexo precursor com cisteína complexada realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.	48
Figura 25. Comparação dos espectros de RMN de ^1H para o complexo precursor com cisteína complexada realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.....	49
Figura 26. Espectro de massa do produto formado pela reação entre o complexo ciclopaladado e cisteína. Proporção 1:1.....	51
Figura 27. Ampliação do espectro de massa do produto formado pela reação entre o complexo ciclopaladado e cisteína. Proporção 1:1.	52
Figura 28. Simulação do espectro de massa do produto formado pela reação entre o complexo ciclopaladado e cisteína. Proporção 1:1.	52
Figura 29. Numeração da estrutura molecular proposta como produto da reação entre cisteína e $[\text{Pd}(\text{dmba})\text{Cl}(\text{tu})]$	53
Figura 30. Espectros referente ao $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{Cl})\text{tu}]$, à cisteína e à reação entre o $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{Cl})\text{tu}]$ e a cisteína. Condições: $[\text{Pd}] = 1,0 \times 10^{-3}$ $[\text{RS}] = 1,0 \times 10^{-2}$. $T = 25^\circ\text{C}$	54

Figura 31. Curvas de absorção molecular a 330 nm com o tempo pela reação entre ciclopaladado (1mmol.L ⁻¹) com variação da concentração de cisteína a 25 °C, pH=7,4, tempo total de 200 s, para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem.....	55
Figura 32. Ampliação da curva de absorção molecular a 330 nm com o tempo pela reação entre ciclopaladado (1 mmol.L ⁻¹) com variação da concentração de cisteína a 25 °C, pH=7,4, para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem no intervalo de 0 a 0,7 s. Etapa rápida.	56
Figura 33. Linearização (ln(A _∞ -A _i)) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaladado (1 mmol.L ⁻¹) com cisteína (10 mmol.L ⁻¹) a 25 °C, pH=7,4 para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa rápida da reação. (Kobs: 3,720).	56
Figura 34. Linearização (ln(A _∞ -A _i)) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaladado (1 mmol.L ⁻¹) com cisteína (20 mmol.L ⁻¹) a 25 °C, pH=7,4 para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa rápida da reação. (Kobs: 4,891).	56
Figura 35. Linearização (ln(A _∞ -A _i)) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaladado (1 mmol.L ⁻¹) com cisteína (30 mmol.L ⁻¹) a 25 °C, pH=7,4 para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa rápida da reação. (Kobs: 6,512).	57
Figura 36. Linearização (ln(A _∞ -A _i)) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaladado (1 mmol.L ⁻¹) com cisteína (40 mmol.L ⁻¹) a 25 °C, pH=7,4 para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa rápida da reação. (Kobs: 8,231).	57
Figura 37. Linearização (ln(A _∞ -A _i)) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaladado (1 mmol.L ⁻¹) com cisteína	

(50 mmol.L⁻¹) a 25 °C, pH=7,4 para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa rápida da reação. (K_{obs}: 9,174).57

Figura 38. Correlação linear entre K_{obs} e concentração de total de cisteína pH = 7,4 para obtenção da primeira constante de segunda ordem (K₁, coeficiente angular) através do ajuste linear da reta. K₁ = 1743,66 M⁻¹s⁻¹ (etapa rápida). Dependente da concentração de cisteína.58

Figura 39. Ampliação da curva de absorção molecular a 330 nm com o tempo pela reação entre ciclopaladado (1 mmol.L⁻¹) com variação da concentração de cisteína a 25 °C, pH=7,4, para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem no intervalo de 1 a 40 s. Etapa lenta.59

Figura 40. Linearização (ln(A[∞]-A_i)) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaladado (1 mmol.L⁻¹) com cisteína (10 mmol.L⁻¹) a 25 °C, pH=7,4 para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa lenta da reação. (K_{obs}: 0,057).....60

Figura 41. Linearização (ln(A[∞]-A_i)) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaladado (1 mmol.L⁻¹) com cisteína (20 mmol.L⁻¹) a 25 °C, pH=7,4 para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa lenta da reação. (K_{obs}: 0,064).....60

Figura 42. Linearização (ln(A[∞]-A_i)) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaladado (1 mmol.L⁻¹) com cisteína (30 mmol.L⁻¹) a 25 °C, pH=7,4 para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa lenta da reação. (K_{obs}: 0,068).....60

Figura 43. Linearização (ln(A[∞]-A_i)) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaladado (1 mmol.L⁻¹) com cisteína

(40 mmol.L ⁻¹) a 25 °C, pH=7,4 para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa lenta da reação. (K _{obs} : 0,071).....	60
Figura 44. Linearização (ln(A [∞] -A _i) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaladado (1 mmol.L ⁻¹) com cisteína (50 mmol.L ⁻¹) a 25 °C, pH=7,4 para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa lenta da reação. (K _{obs} : 0,076).....	61
Figura 46. Comparação entre K ₁ = 1743,66 M ⁻¹ s ⁻¹ (etapa rápida), dependente da concentração de cisteína e K ₂ = 4,5 mmol.L ⁻¹ s ⁻¹ (etapa lenta), independente da concentração de cisteína,	62
Figura 47. Mecanismo de reação proposto para a formação do novo composto quelato.	63
Figura 48. Mapa de contorno HSQC para o ligante cisteína realizado em <i>d</i> ₆ -DMSO a 14,1T.....	68
Figura 49. Expansão do mapa de contorno HSQC para o complexo livre realizado em <i>d</i> ₆ -DMSO a 14,1T.....	68
Figura 50. Expansão do mapa de contorno HSQC para o complexo livre realizado em DMSO <i>d</i> ₆ a 14,1T.....	68
Figura 51. Expansão do mapa de contorno HSQC para o complexo livre realizado em <i>d</i> ₆ -DMSO a 14,1T.....	69
Figura 52. Ampliação do espectro de RMN ¹ H para o produto formado pela reação realizado em <i>d</i> ₆ -DMSO a 14,1T.	69
Figura 53. Ampliação do espectro de RMN ¹ H para o produto formado pela reação realizado em <i>d</i> ₆ -DMSO a 14,1T.	69
Figura 54. Ampliação da comparação dos espectros de RMN de ¹ H para o complexo precursor com cisteína complexada realizado em <i>d</i> ₆ -DMSO a 14,1T.....	70

Figura 55. Mapa de contorno HSQC para o complexo precursor com cisteína complexada realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.....	70
Figura 56. Ampliação do mapa de contorno HSQC para o complexo precursor com cisteína complexada realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.....	70
Figura 57. Ampliação do mapa de contorno HSQC para o complexo precursor com cisteína complexada realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.....	71
Figura 58. Ampliação do mapa de contorno HSQC para o complexo precursor com cisteína complexada realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes e solventes utilizados nas preparações dos compostos.	32
Tabela 2. Variação da concentração, em mmol.L ⁻¹ , para o ligante em função da concentração fixa, em mM, de complexo à 25°C.	35
Tabela 3. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C obtidos para o ligante cistina livre.....	42
Tabela 4. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C obtidos para o ciclopaladado livre.	47
Tabela 5. Dados de RMN de 1D e 2D obtido para o produto da reação.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Câncer: o mal do século, metas e estatísticas para 2030	18
1.2	A pioneira Cisplatina (<i>cis</i> -diamindicloroplatina (II)).....	22
1.3	Complexos de Paládio, natureza química dos ligantes e labilidade	26
1.4	Reações muito rápidas, como estudá-las?.....	29
2	OBJETIVO	31
3	PARTE EXPERIMENTAL	32
3.1	Reagentes e Solventes	32
3.2	Preparação do complexo precursor e tampão.....	33
	3.2.1 Preparação do Complexo ciclopaladado	33
	3.2.2 Preparação da solução tampão (Tris-HCl 5mM)	34
3.3	Caracterização do produto da reação e análises cinéticas	34
	3.3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	34
	3.3.2 Medidas Cinéticas por UV-vis	35
	3.3.3 Medidas Cinéticas por <i>Stopped-Flow</i>	35
	3.3.4 Cálculos cinéticos.....	36
	3.3.5 Espectrometria de massas	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
4.1	Espectroscopia de RMN de ¹ H e ¹³ C.....	38
	4.1.1 RMN de ¹ H para o ligante cisteína (RS).....	38
	4.1.2 RMN de ¹³ C para o ligante cisteína.....	41
	4.1.3 RMN de ¹ H para o complexo precursor [Pd(C ² ,N-dmba)Cl(tu)]....	43
	4.1.4 RMN de ¹³ C para o complexo precursor [Pd(C ² ,N-dmba)Cl(tu)] ..	45
	4.1.5 Experimentos de RMN 2D heteronuclear para o ciclopaladado [Pd(C ² ,N-dmba)Cl(tu)].....	46
	4.1.6 RMN de 1D e 2D para o produto da reação entre ciclopaladado e cisteína	48
4.2	Espectrometria de massas	51

4.3	Espectroscopia de absorção na região UV-vis	53
4.3.1	Espectro UV-vis da interação entre o complexo [Pd(dmba)(Cl)tu] e cisteína	53
4.3.2	Medidas cinéticas da reação entre o complexo [Pd(dmba)(Cl)tu] e cisteína por Stopped-Flow.....	55
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	64
	REFERÊNCIAS	65
6	APÊNDICE	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: o mal do século, metas e estatísticas para 2030

Em 2015, a Organização das Nações Unidas (ONU) publicou um plano de metas contendo 17 objetivos de desenvolvimento sustentável (**figura 1**) para os próximos 15 anos, ou seja, deverão ser realizados em sua totalidade ou parcialmente até 2030.

Figura 1. Agenda ONU 2030.



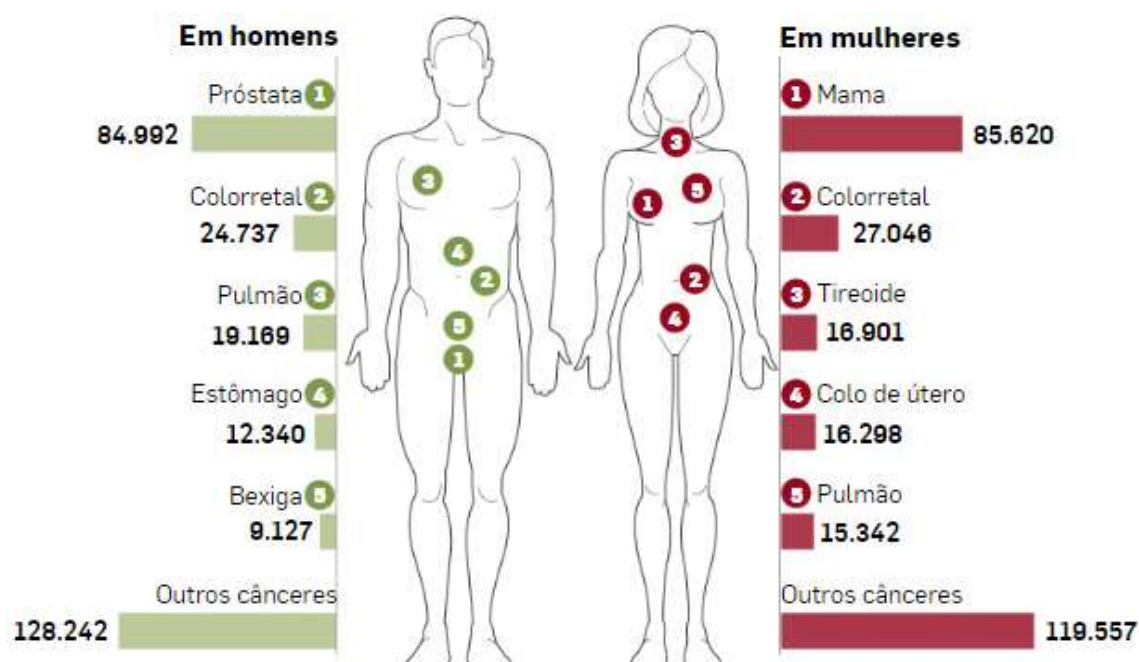
Fonte: (ONU, [s.d.]).

Dentre todos esses objetivos, nos quais as nações ligadas a ONU se comprometem a não medir esforços para cumprí-los, destaca-se nas entrelinhas desse contexto de trabalho o **Objetivo 3: SAÚDE E BEM ESTAR**, que enfatiza a erradicação de doenças tropicais negligenciadas e epidêmicas, tais como tuberculose e malária.

Ele também incentiva avanços nos estudos de pesquisas em busca da cura de doenças como AIDS, Alzheimer e alguns tipos de câncer, sendo esta última um grande problema de saúde pública, abrangendo mais de 12% de todas as causas de mortalidade ao redor do mundo, segundo estimativa da Organização Pan-Americana da Saúde (OMS, [s.d.]), apenas no ano de 2018, o câncer causará a morte de aproximadamente 9,6 milhões de pessoas.

Em âmbito nacional, segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer), a doença representa a segunda causa de mortalidade na população adulta brasileira, perdendo apenas para as patologias cardiovasculares (OLIVEIRA et al., 2016). No Brasil, estima-se que em 2018 houveram cerca de 559 mil novos casos de câncer os quais aproximadamente 43% resultaram em morte (**figura 2**) tendo como um dos maiores precursores o câncer de próstata nos homens e, de mama, nas mulheres.

Figura 2. Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes, no Brasil, em 2018.

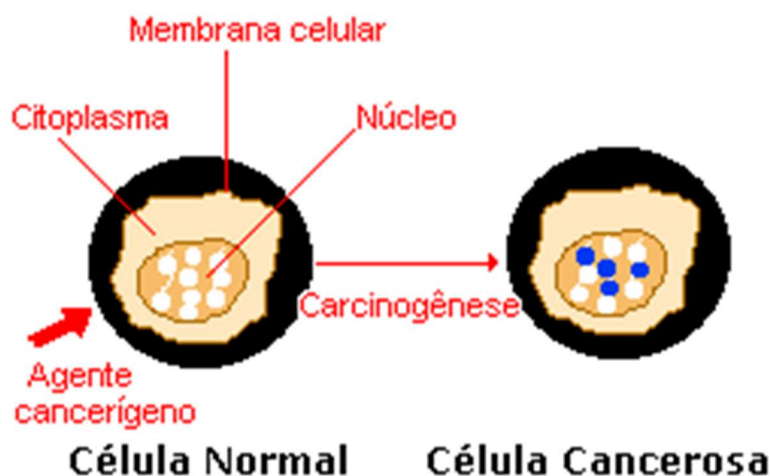


Fonte: Apud (ESTADÃO, 2018).

Sabe-se que o câncer não possui uma causa única e com isso fatores externos como o meio em que a pessoa está inserido ou fatores internos como hereditariedade, imunologia podem causar anomalias celulares adquiridas por meio de erros na replicação do DNA.

O crescimento de forma desordenada (maligno) de células de câncer que invadem os tecidos e órgãos pode provocar proliferação para outras partes do corpo. Dividindo-se rapidamente, tais células tendem a ser agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (FONTES; CÉSAR; BERALDO, 2005) **figura 3**. Estas anomalias podem ser resultado dos efeitos de carcinógenos, como o tabagismo, radiação, substâncias químicas ou agentes infecciosos (J. WIGHT; R. OGDEN, 1998) e (MIRVISH et al., 2018).

Figura 3. Comparação de célula normal e célula cancerosa.

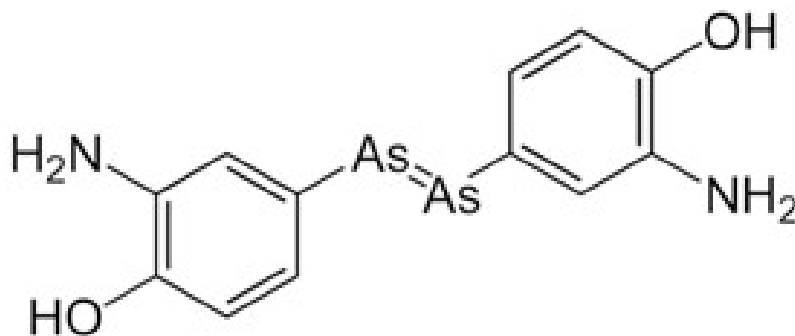


Fonte: (INCA, [s.d.]).

Apesar de se tratar de um meio biológico, a busca para o tratamento de doenças não se pode resumir apenas a compostos orgânicos, exigindo assim a interdisciplinaridade das ciências, posto que as propriedades e mecanismos bioquímicos e/ou físico-químicos que compõem as células favorecerem a inserção da química inorgânica nas aplicabilidades dentro do ramo da medicina.

Dentro desse cenário sabe-se que há muito tempo os metais têm constituído medicamentos para tratamentos de doenças além do câncer, como por exemplo, substâncias a base de ouro para o tratamento de tuberculose e antitumorais ou a sífilis tratada com a substância Salvarsan (ou composto 606) – um composto organoarsênico que contém o elemento arsênio (**figura 4**) – descoberta por Paul Ehrlich, laureado com o prêmio Nobel de Medicina, em 1908.

Figura 4. Estrutura molecular do composto Salvarsan.



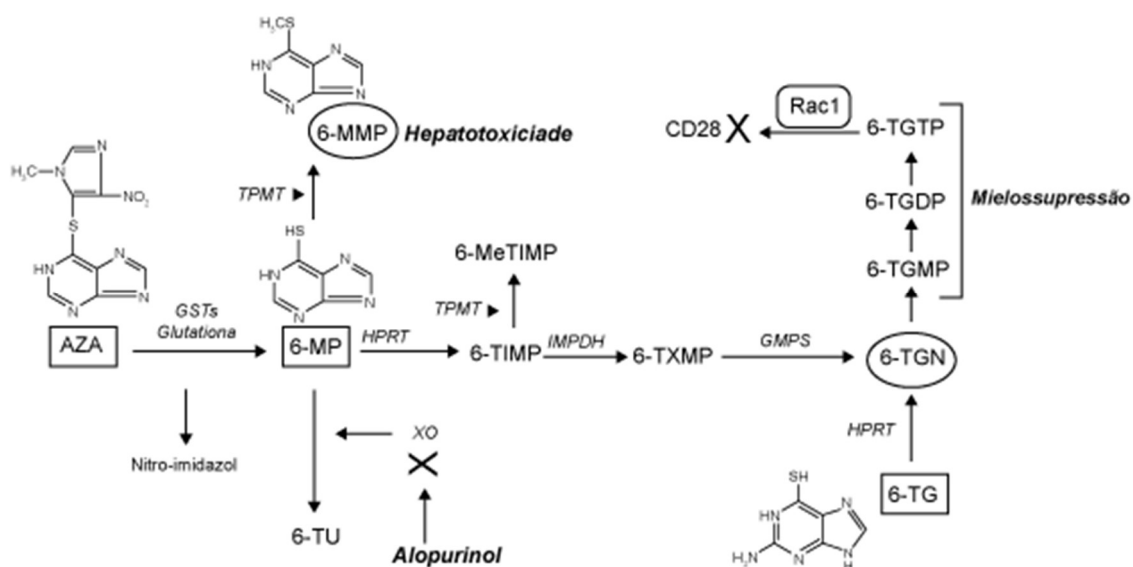
Fonte: Autoria própria.

Barnett Rosenberg, em 1965, ao se constatar a ação bactericida da cisplatina, conduziram estudos e pesquisas para que ela também fosse utilizada para o tratamento de alguns tipos de câncer. Após esse acaso, vários grupos de pesquisa espalhados ao redor do mundo interligando Universidades e Institutos passaram a se dedicar a trabalhos que buscam possíveis respostas afim de conduzir a descoberta da cura dessa doença e, também, tratamentos que minimizem ao máximo os efeitos colaterais causados por tratamentos rústicos (SILVA; VARGAS, 2012).

Dentre esses tratamentos para o câncer há os cirúrgicos, radioterápicos, quimioterápicos ou uma combinação destes procedimentos a depender do local e extensão do tumor primário. Em casos avançados, o paciente pode ser tratado com radioterapia combinada com uso de cisplatina associada à outras drogas, tais como: o antimetabólico 5-Fluoracil (5-FU) (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003); (DIASIO; HARRIS, 1989).

Este último é utilizado contra câncer devido à capacidade de bloquear bioquimicamente a síntese do DNA do tumor. Outro antimetabólico bastante conhecido é a 6-mercaptopurina (6-MMP) utilizado para o tratamento de leucemia (**figura 5**). Sua atividade anticancerígena tem relação com esta capacidade de descontinuar a reprodução celular, e como as células tumorais são as que estão mais envolvidas com o processo reprodutivo, elas são as mais afetadas (LEONCINI et al., 2014).

Figura 5. Mecanismos de ação da mercaptopurina MMP.

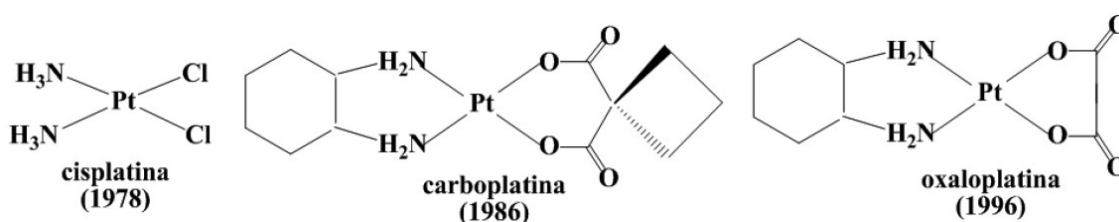


Fonte: (PACHECO NETO et al., 2008).

1.2 A pioneira Cisplatina (*cis*-diamindicloroplatina (II))

Desde 1978, quando a agência americana “Food and Drugs Administration (FDA)” permitiu o uso clínico da cisplatina, denominada complexo de primeira geração, para o tratamento de câncer de ovário e de testículo (NAVEEN KUMAR et al., 2013) resultaram posteriormente no surgimento dos compostos de segunda geração tais como: carboplatina e oxaplatina (**figura 6**).

Figura 6. Complexos de platina de primeira e segunda geração.



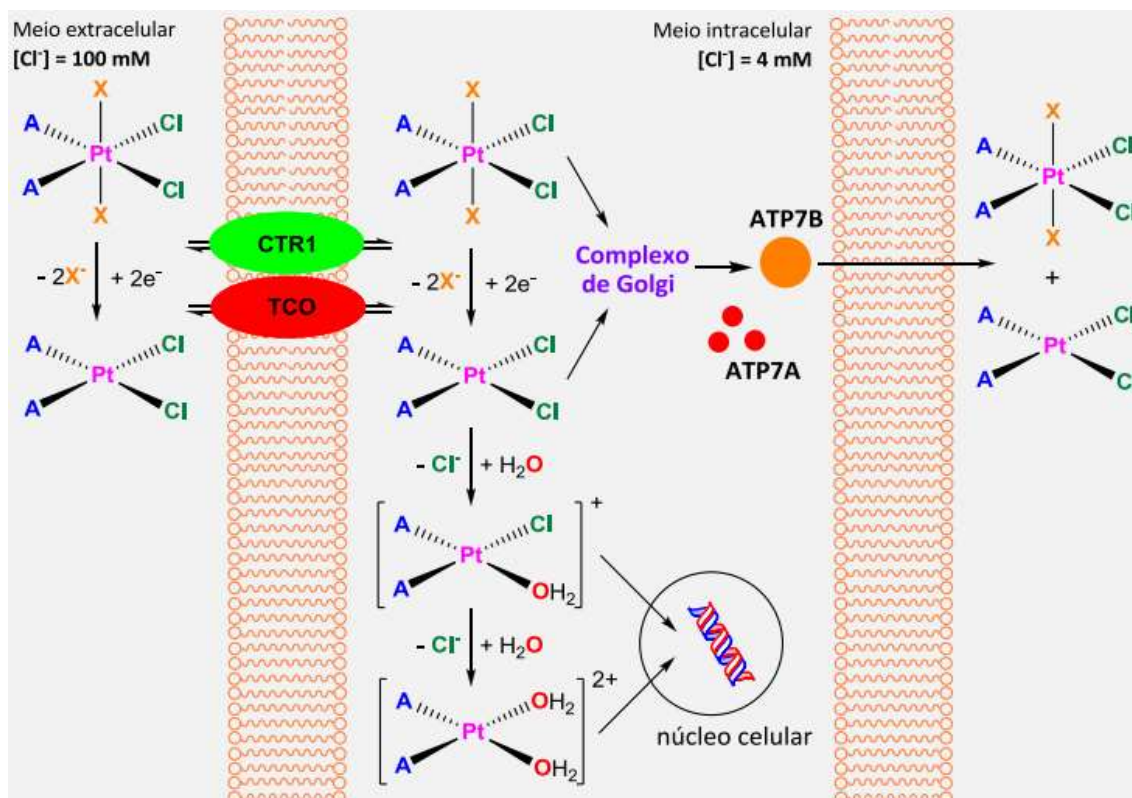
Fonte: (SILVA, 2010).

Ao observar as estruturas dos complexos nota-se facilmente suas diferenças quanto ao seus ligantes, uma vez que suas propriedades físico-químicas e biológicas se dão dentro de um conjunto de fatores que englobam toda a molécula, ou seja, a natureza de seus ligantes que irão compor o composto organometálico.

Vários estudos sugerem que no meio intracelular, o complexo *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] libera um ligante cloro formando os complexos *cis*-[PtCl(NH₃)₂(H₂O)]⁺ e *cis*-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺ equação 1 (eq. 2) e equação 2 (eq. 3) (TMC LITERATURE HIGHLIGHTS - 29, 1992). Estes aquacomplexos interagem com as bases nitrogenadas do DNA inibindo a proliferação do câncer conforme demonstrado na **figura 7** (SILVA; VARGAS, 2012).



Figura 7. Esquema do acúmulo celular e do mecanismo de ação dos complexos de Pt^{2+} gerados a partir da *cis*- $[PtCl_2(NH_3)_3]$ no meio biológico.



Fonte: (SILVA; VARGAS, 2012).

Porém, os complexos de Pt^{2+} , como a cisplatina, podem reagir com diversas biomoléculas no sangue, limitando sua concentração no núcleo celular e, portanto, diminuindo seu potencial como inibidor de processos de divisão celular.

Uma busca por alternativas para o uso da cisplatina tem relação com a resistência crescente de células de câncer à ação desta droga. Por exemplo, na busca por alternativa à cisplatina, é a utilização de complexos Pt^{4+} que apresentam menor interação com biomoléculas sanguíneas (SILVA; VARGAS, 2012).

Nesse caso, a concentração do complexo no meio intracelular poderia ser maior e, assim, a atividade anticâncer seria mais efetiva comparada ao complexo *cis*- $[PtCl_2(NH_3)_2]$ (NAVEEN KUMAR et al., 2013). É importante ressaltar que complexos de Pt^{4+} não interagem com o DNA da célula de câncer, portanto, são considerados pró-fármacos (MCALPINE; JOHNSTONE, 1990).

A atividade anticâncer do complexo *cis*-[PtCl₄(NH₃)₂] ocorre após a redução do íon metálico Pt⁴⁺ por biomoléculas encontradas em células formando um complexo com íon Pt²⁺ Equação 3 (eq. 4).



Atualmente, sabe-se que, além da possibilidade dos complexos de Pt⁴⁺ sofrerem redução (eq. 4) dentro ou fora da célula, levando ao deslocamento do equilíbrio no sentido de favorecer o acúmulo celular dos complexos de Pt⁴⁺ e, por sua vez, resultando no aumento da concentração de íons Pt²⁺ originando complexos de alta resistência que causam sérios efeitos colaterais.

Altear fatores históricos como esses apresentados, sem dúvida, motivam vários cientistas ligados a química inorgânica medicinal a desenvolverem novos candidatos a fármacos que não sejam baseados em platina (LAVANYA et al., 2018).

Ressair entre as referências o trio de pesquisadores composto pela engenheira química Frances H. Arnold, o químico George P. Smith e o bioquímico inglês Gregory P. Winter Smith, laureados com o prêmio Nobel de Química do ano de 2018 pelo desenvolvimento de enzimas com aplicações farmacêuticas, em que os anticorpos evoluíram através de um método denominado *fago display* que podem atuar na cura de alguns tipos de câncer metastático (PRIZE, 2018), demonstrando assim a importância da interdisciplinaridade para a qual a ciência vem caminhando no último século.

Assim sendo, tem-se como consequência o aumento do interesse pela busca de respostas fundamentadas em moléculas de interesse biológico que utilizem outros metais de transição e não sejam altamente propensos a exercer graves efeitos colaterais. E ainda, possuir elevado grau de eficiência desde a síntese, caracterização e testes *in vitro* de fármacos, tendo como candidatos metais de transição que possuam particularidades semelhantes à platina, tais como o paládio.

Segundo a literatura, a síntese e a caracterização seguida de testes de atividade antibacterianas revelaram que entre todos os complexos sintetizados, aqueles que contém o íon Pd²⁺ demonstraram serem os melhores candidatos antibacterianos na administração contra tuberculose e contra o agente

Trypanosoma cruzi (PLUTÍN et al., 2017) além de serem anticancerígenos (LAVANYA et al., 2018).

1.3 Complexos de Paládio, natureza química dos ligantes e labilidade

Compostos de paládio vêm sendo considerados como uma alternativa aos compostos de platina. O interesse nas potencialidades farmacológicas de derivados de Pd(II) está relacionado ao fato deste íon ser isoeletrônico ao Pt(II) com complexos de geometria de coordenação quadrática-planar. Além disso, ambos os íons complexos apresentam similar raio iônico (Pt(II) = 0,74 Å e Pd(II) = 0,78 Å) (LAVANYA et al., 2018).

Apesar da semelhança entre os íons complexos de platina e paládio, os primeiros complexos de Pd(II) não apresentaram efeitos citotóxicos eficientes. Em parte, isto se deve aos parâmetros cinéticos de reações de substituição destes compostos, uma vez que íons complexos de Pd(II) reagem aproximadamente 10^5 vezes mais rapidamente que seus análogos de Pt(II) (MORO, 2011). Assim, a baixa atividade antitumoral de parte dos complexos de Pd(II) foi atribuída aos rápidos processos de hidrólise que conduziam à dissociação dos grupos abandonadores em solução e, conseqüentemente, à formação de espécies muito reativas incapazes de atingir seus alvos farmacológicos (LAVANYA et al., 2018).

Segundo alguns autores de grupos de pesquisa, supracitado, complexos de Pd(II) contendo ligantes: *N, S*-quelantes – aqueles que se coordenam tanto pelo átomo de enxofre quanto de nitrogênio ao mesmo tempo formando um anel – (THOMAZELLA, 2011) possuem uma cinética de substituição lenta o suficiente para a manutenção de sua integridade estrutural em solução para posterior interação com o DNA das células cancerosas (MORO; MAURO; ANANIAS, 2004).

Para demonstrar a relação entre velocidades de dissociação de ligantes da esfera de coordenação e atividade biológica se fazem necessários estudos cinéticos de reações entre compostos de paládio e moléculas biológicas, como bases nitrogenadas e/ou aminoácidos além da avaliação da influência de tais espécies sob o efeito anticâncer dessa nova classe de complexo.

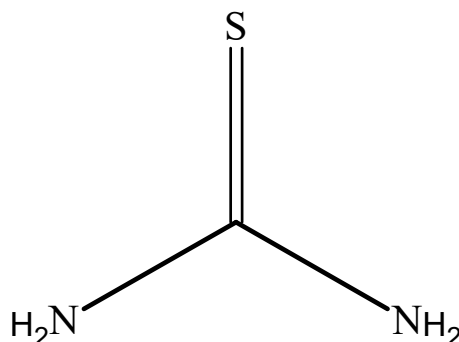
A vanguarda quanto ao interesse nas aplicações de complexos paladados na química inorgânica medicinal tem se tornado uma oportunidade de estudo no que tange compreender seus benefícios, uma vez que seus efeitos favoráveis não são atribuídos apenas ao metal, mas sim ao conjunto metal-ligante [M-L].

Ao selecionar o centro metálico do complexo e seus ligantes sendo do tipo quelante (ou não) chega-se a um ponto de fundamental importância, optar pela escolha de um ligante que possui variedade com o meio biológico e que não cause efeitos inesperados.

Consoante a isso, sabe-se que a tioureia (**figura 8**), vem sendo estudada como opção de ligante devido a sua capacidade de reduzir a nefrotoxicidade de fármacos a base de platina que tem sido utilizada com frequência por apresentar eficiência em sua propriedade intercaladora com o DNA, cujo seu modo de ação é diferente em relação ao da cisplatina, por não apresentar interações não-covalentes (MARZANO et al., 2002).

No entanto, há pouca evidência em estudos anticâncer quanto a sua eficiência quando o centro metálico é Pd(II), isso resulta na necessidade de preparar métodos para a síntese e caracterização em espécies contendo paládio, tioureia e DMBA.

Figura 8. Estrutura molecular do ligante Tioureia.



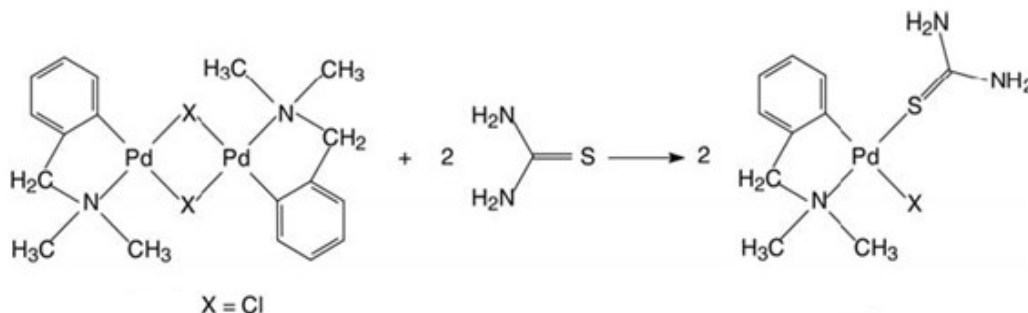
Fonte: Autoria própria.

Como o metal apresenta elevada labilidade, visto que sua integridade estrutural não é mantida tempo suficiente até atingir o alvo farmacológico em fluidos biológicos, ligantes quelantes termodinamicamente estáveis e cineticamente inertes, como N-dimetilbenzilamina (dmba) tem sido utilizados para sintetizar complexos ciclopaladados, como por exemplo o composto [Pd(C²,N-dmba)Cl(tu)], o qual foi o precursor para o presente trabalho, uma vez que mostrou efeitos antimetásticos de fundamental importância e elevada labilidade para investigar o mecanismo de reação pela interação de moléculas de importância biológica (MORO, 2011).

Dentro desse cenário trabalhos como o de Moro (MORO; MAURO; ANANIAS, 2004), a fim de contribuir para a química de coordenação, em

especial, para a inorgânica medicinal, realizou a síntese do complexo $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{X})(\text{tu})]$ – em que X é o íon cloreto (Cl^-) podendo ser substituído também pelos ligantes N_3 , NCO , que culminou na síntese do dímero $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{Cl})(\text{tu})]_2$ (**figura 9**), cuja estrutura contendo o ligante cloreto foi a mais coerente com os resultados da caracterização através das espectroscopia no IV e de RMN de ^1H (MORO; MAURO; ANANIAS, 2004).

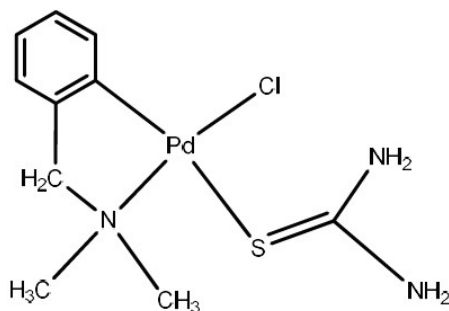
Figura 9. Esquema da reação entre bis-quelato e tiourea. Razão molar 1:2. Onde, X = Cl.



Fonte: (MORO; MAURO; ANANIAS, 2004).

Os trabalhos de Moro sugerem em sua conclusão ao observar a estrutura do composto (**figura 10**), a síntese de novas espécies de complexos, visto que há a presença de sítios de coordenação na tiourea. Devido ao fato da primeira possuir uma estrutura que pode sugerir o surgimento da propriedade σ -doador, e com isso favorecer sua interação com núcleo bases, essa propriedade eletrônica e estérica do ligante, pode resultar a este o desfavorecimento do efeito quelante; o dmba, porém, favorecerá a eficiência para a tiourea. Questionamentos desse tipo garantem trabalhos posteriores como este aqui apresentado, bem como a investigação de mecanismos de reação desses complexos em meios biológicos com atividades biológicas anticâncer.

Figura 10. Estrutura molecular do complexo $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{Cl})(\text{tu})]$.



Fonte: (MORO; MAURO; ANANIAS, 2004).

A compreensão de investigações cinéticas das interações de complexos metálicos com outras moléculas biológicas, como proteínas e peptídeos, através de grupos amina terminal, grupos carboxilatos ou imidazólico da histidina e principalmente o grupo tiol da metionina, são de fundamental importância quando relacionadas ao efeito da nefrotoxicidade da droga complexada (TREVISAN et al., 2001).

Uma vez selecionado o centro metálico do complexo, conhecer a natureza dos ligantes que irão estruturar e compor o composto organometálico se faz necessário no cenário contemporâneo, para demonstrar a relação entre velocidades de dissociação de ligantes da esfera de coordenação e atividade biológica.

Estudos cinéticos de reações entre compostos de paládio e moléculas biológicas como: carboidratos, lipídios, vitaminas, aminoácidos, proteínas e bases nitrogenadas, geralmente, são pouco realizados, bem como propostas de novas sínteses de complexos tendo como ligantes tais moléculas biológicas.

Na intenção de avaliar reações extremamente rápidas e compreendendo a existência dessa elevada labilidade nas reações supracitadas, surge a necessidade de utilizar técnicas cinéticas com equipamentos de fluxo interrompido (*Stopped flow*), uma vez que estes permitem medir análises com ordem de grandeza de milissegundos (TEIXEIRA, 2016).

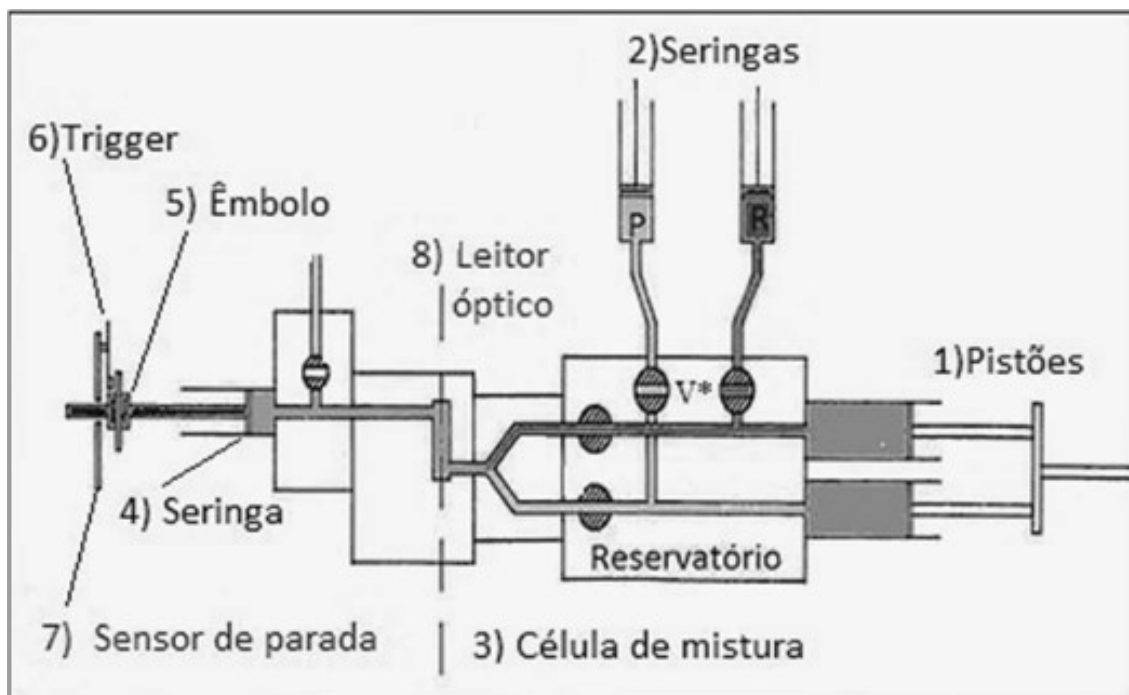
1.4 Reações muito rápidas, como estudá-las?

Tendo origem em meados da década de 1940 (CHANCE, 1940), e, sendo aprimorada sequentemente (GIBSON; MILNES, 1964), com o objetivo de economizar reagentes e obter misturas homogêneas com ausência de gases, a técnica de fluxo interrompido (*Stopped flow*) permite uma mistura rápida entre soluções colocadas em reservatórios e injetadas rapidamente, na ordem de milissegundos, para uma cuba de mistura.

A **figura 11**, ilustra o esquema de funcionamento, onde os pistões, ao serem acionados, auxiliam os reagentes presentes nas seringas serem armazenados no reservatório que posteriormente serão rapidamente misturados homogeneamente e encaminhados para célula de observação espectrofotométrica, preenchendo a seringa de frenagem.

O movimento do êmbolo dessa seringa de frenagem ativa o sensor de parada e aciona o Trigger (detector) para ativar o início da aquisição de dados espectrofotométricos (BATISTELA et al., 2006).

Figura 11. Esquema de funcionamento da técnica Stopped flow.



Fonte: (TEIXEIRA, 2016).

A importância na utilização dessa técnica é controlar a mistura de várias soluções em um curto espaço de tempo e ter maior precisão na sincronização entre o processo de mistura e a aquisição para garantir a reprodutibilidade do experimento (BOGOJESKI et al., 2011) e (SOUZA, 2016).

Porém, vale ressaltar que o surgimento de novos instrumentos que possibilitem maior fluxo sendo percebidos por sensores eletrônicos mais rápidos abrirão novas possibilidades para investigar as reações entre novas substâncias sintetizadas em sistemas biológicos, podendo com isso comparar o comportamento experimental com as teorias existentes (GRILLO, 2009).

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos cinéticos envolvidos na reação entre o composto [Pd(dmba)Cl(tu)] e cisteína, associando-se técnicas espectroscópicas (RMN e UV-vis), para se constatar tais interações e *Sttoped-Flow* para se obter as constantes cinéticas observadas (K_{obs}).

3 PARTE EXPERIMENTAL

O procedimento experimental adotado envolveu a preparação em duas etapas, sendo a primeira a síntese do complexo ciclopaladado precursor $[Pd(C^2,N-dmba)Cl(tu)]$, conforme metodologia já descrita na literatura por MORO et al., 2009.

Já a segunda, consiste em solubilizar o complexo ciclopaladado e o ligante cisteína em solvente comum a ambos, para que posteriormente sejam investigados a reação entre eles através dos dados obtidos pelas técnicas de UV-vis e Stopped-Flow, bem como o produto final da reação pela interpretação de espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas.

A preparação do complexo precursor foi realizada a temperatura ambiente e não houve necessidade de conduzi-la em atmosfera inerte ou em proteção contra a luz.

O composto ciclopaladado obtido é estável ao ar, possui característica não-higroscópicas e foi armazenado em pequeno frasco de eppendorf devidamente rotulado e armazenado em dessecador.

3.1 Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes utilizados estão listados na Tabela 1, assim como suas respectivas fórmulas moleculares e procedências.

Tabela 1. Reagentes e solventes utilizados nas preparações dos compostos.

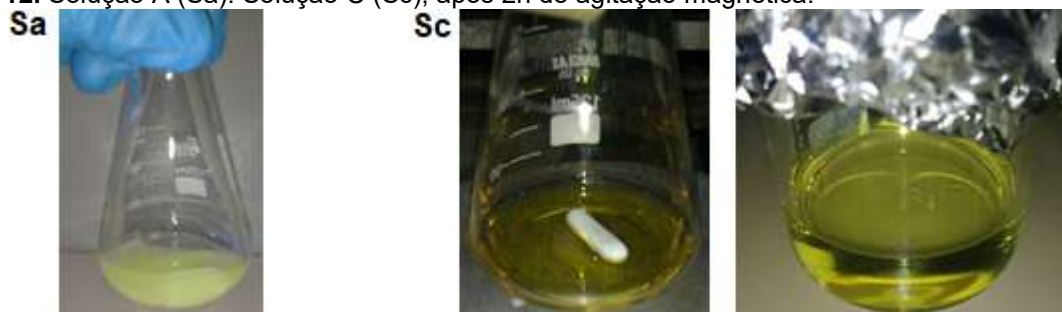
Reagente/Solvente	Fórmula molecular	Procedência
Acetona	C_3H_6O	Panreac
Ácido clorídrico	HCl	Sigma-Aldrich
Cisteína	$C_3H_7NO_2S$	Sigma-Aldrich
Cloreto de sódio	NaCl	Sigma-Aldrich
Dimetilsulfóxido	C_2H_6OS	Sigma-Aldrich
Dimetilsulfóxido – d6	C_2D_6OS	Sigma-Aldrich
Metanol	CH_3OH	Merck
Tioureia	CH_4N_2S	Sigma-Aldrich
Trizma base	$NH_2C(CH_2OH)_3$	Sigma-Aldrich

3.2 Preparação do complexo precursor e tampão

3.2.1 Preparação do Complexo ciclopaladado

Conforme mencionado na **seção 1.4**, em um erlenmeyer de 50 mL (**figura 12**), foram adicionado 0,0500 g (0,16 mmol) de $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{C}^2, \text{N-dmba})_2]$ em uma solução de 5 mL de metanol com 5 mL de acetona, obtendo-se assim uma Solução A (Sa) de coloração amarela (turva).

Figura 12. Solução A (Sa). Solução C (Sc), após 2h de agitação magnética.



Fonte: Autoria própria.

Em seguida, foi adicionado à Sa a Solução B (Sb) gota-a-gota e sob agitação magnética obtendo-se uma Solução C (Sc) (**figura 12**), de coloração amarela (transparente) que permaneceu sob agitação magnética por 2 h.

Ressalta-se que Sb foi previamente preparada com 0,0137 g (0,32 mmol) de $(\text{NH}_2)_2\text{CS}$, (tu), solubilizada em 5 mL de metanol

Após este período, a solução foi filtrada sendo obtida em um béquer protegido por papel alumínio para não receber impurezas (**figura 12**) e submetida a evaporação lenta por 24 h sob exaustão em capela. Onde, após a evaporação dos solventes, observou-se a formação de um sólido que foi armazenado em Eppendorf e mantida em dessecador por 72 h.

Rendimento: 85%.

3.2.2 Preparação da solução tampão (Tris-HCl 5mM)

Em um béquer de 1000 mL foram dissolvidos 0,3029 g de Trizma base e 1,472 g de NaCl em 500 mL de água destilada. Em seguida, foi ajustado o pH da solução para 7,4 utilizando solução de HCl 1mol.L⁻¹. O tampão foi armazenado em geladeira (2 – 8 °C).

3.3 Caracterização do produto da reação e análises cinéticas

3.3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ¹H, ¹³C e experimentos de correlação gCOSY (¹H-¹H), gHSQC (¹H-¹³C e ¹H-¹⁵N) e gHMBC (¹H-¹³C e ¹H-¹⁵N) foram registrados no Espectrômetro multinuclear Bruker, modelo Avance III 600 MHz HD (14,1 T, Sonda: Triple Inverse TCI Cryo-probehead), localizado no IQ-Unesp campus da cidade de Araraquara-SP.

Utilizou-se dimetilsulfóxido deuterado (C₂D₆OS *d*₆-DMSO) para solubilização das amostras. O software utilizado para aquisição e interpretação dos espectros foi o TopSpin. V.3.2.

3.3.1.1 Preparo da amostra para análise de RMN

Em frascos tipo eppendorf, com capacidade para 2 mL, preparou-se soluções de 200 µL de *d*₆-DMSO contendo, em cada frasco, 1 mg do ciclopaladado [Pd(µ-Cl)(C²,N-dmba)]₂ e 1mg de cisteína.

Em seguida, para a reação, ambas soluções foram misturadas e homogeneizadas.

3.3.2 Medidas Cinéticas por UV-vis

As reações entre as espécies de importância biológica, tais como L-cisteína, foram acompanhadas por meio de variação espectral na região do UV-Vis. As reações foram estudadas em condições de pseudo-primeira ordem com, no mínimo, 10 vezes de excesso de L-cisteína em relação ao complexo. A temperatura ($25 \pm 0,2$ °C) foi controlada por meio de um banho termostático.

3.3.3 Medidas Cinéticas por *Stopped-Flow*

O monitoramento foi realizado no comprimento de onda (λ) 330nm por 200 segundos, obtendo-se 1600 pontos por amostra com intervalos de 12,5 μ s.

Tabela 2. Variação da concentração, em mmol.L⁻¹, para o ligante em função da concentração fixa, em mM, de complexo à 25°C.

λ (nm)	[COMPLEXO]	[LIGANTE]
330	1	10
330	1	20
330	1	30
330	1	40
330	1	50

No preparo da amostra para monitoramento em *Stopped-Flow*: foram solubilizados o complexo precursor e o ligante em solução tampão Tris-base contendo 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), mantendo um excesso de 10 vezes a concentração do ligante em relação ao complexo. A **tabela 02** indica as devidas variações na concentração.

3.3.4 Cálculos cinéticos

As constantes de pseudo primeira ordem observadas (k_{obs}) foram determinadas a partir dos gráficos de $\ln(A_{\infty}-A_t)$ versus tempo (s).

$$\ln(A_{\infty}-A_t) = k_{obs} \times t$$

A_{∞} = absorbância no tempo final da reação

A_t = absorbância em cada instante da reação

t = tempo em segundos

3.3.5 Espectrometria de massas

Assim como o preparo da amostra para análise de RMN, para essa técnica experimental utilizou-se como solvente apropriado metanol padrão HPLC-MS e posteriormente diluídas a concentrações adequadas para o experimento.

A amostra foi analisada no espectrômetro modelo 3200 QTRAP LC/MS/MS contendo analisador híbrido triplo quadruplo/armadilha de íons linear (LIT), localizado no IQ-UNESP de Araraquara.

A análise foi realizada por infusão direta MS/MS utilizando-se metanol padrão LC-MS como solvente no modo positivo de ionização por electrospray.

Parâmetros: IonSpray (IS): 5000V, DP: 20V, EP: 10V.

Experimentos: varredura de íons e enhanced resolution (ER).

A proporção estequiométrica para a reação foi análoga ao RMN, ou seja, 1:1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O estudo espectroscópico dos ligantes, cisteína (RS) serviu de base para o estudo dos possíveis novos complexos formados, sendo realizadas as análises de UV-vis, Ressonância Magnética Nuclear e Massas

Os estudos cinéticos foram realizados por meio de análises de espectros eletrônicos da solução contendo os reagentes em função do tempo.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C , permitem analisar a estrutura das moléculas. A análise de RMN foi realizada para cisteína, para o complexo ciclopaladados precursor devidamente isolado, bem como para a reação entre o complexo precursor com o ligante cisteína.

Nesse caso, para os compostos analisados, foram atribuídas numeração adequada para maior compreensão e facilitar a interpretação dos espectros obtidos.

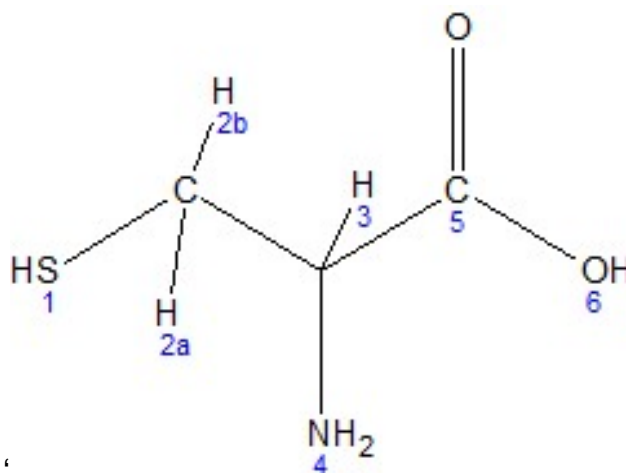
4.1 Espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C foram utilizados neste trabalho para confirmar a formação dos produtos. Inicialmente os sinais de ^1H e ^{13}C do ligante e do complexo foram identificados e atribuídos. Isto facilita a confirmação da estrutura do produto pela análise das mudanças químicas e magnéticas que ocorrem nestes núcleos. Para a atribuição inequívoca de todos os sinais foram utilizados experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais (HSQC e HMBC).

4.1.1 RMN de ^1H para o ligante cisteína (RS)

A (**figura 13**) demonstra uma numeração conveniente para atribuição das posições dos átomos do ligante cisteína (RS) para discussão no decorrer deste trabalho.

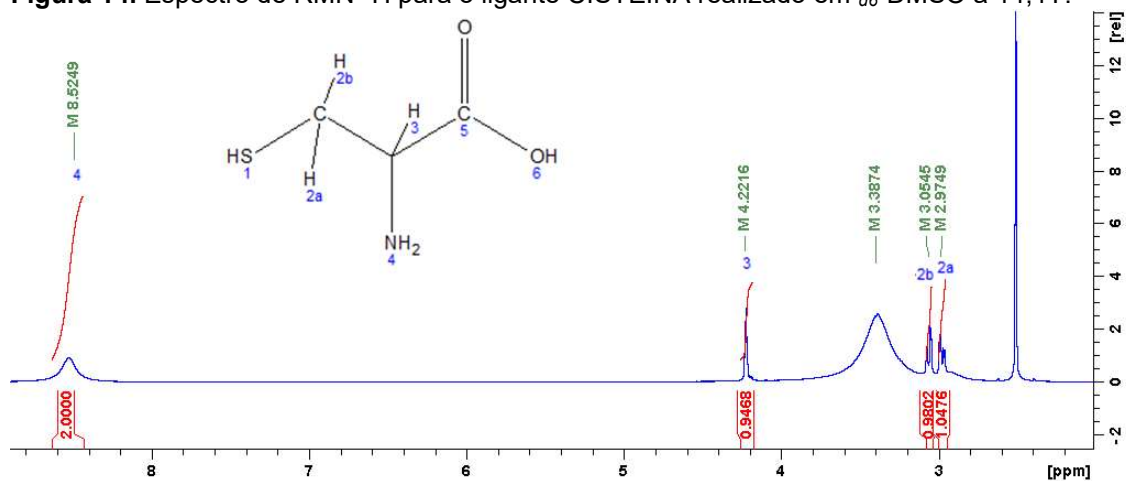
Figura 13. Numeração da estrutura molecular do ligante RS.



Fonte: Autoria própria.

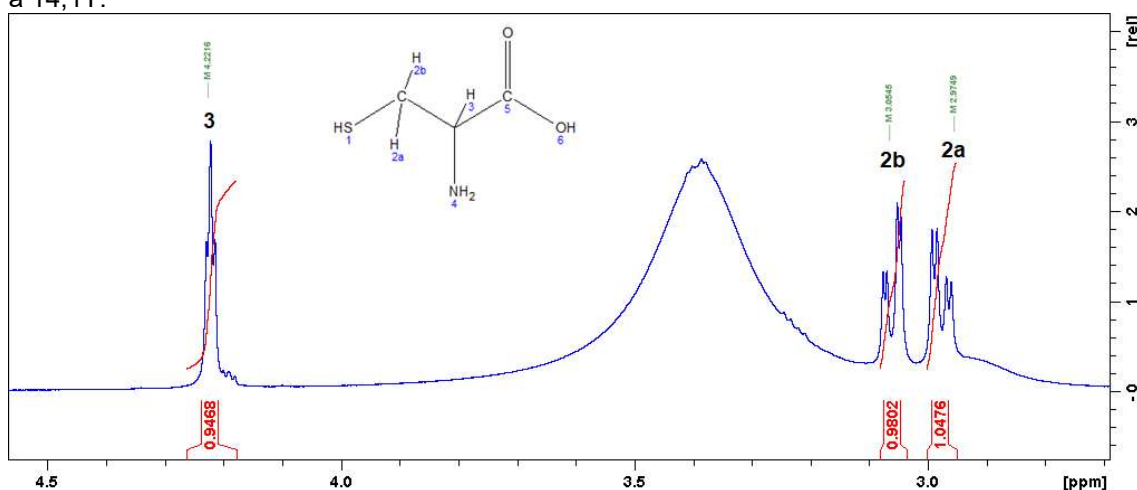
O espectro de RMN de ^1H do ligante cisteína (**figura 14**) apresentou sinais condizentes com sua estrutura química, entre 2,6 a 9,0 ppm.

Figura 14. Espectro de RMN ^1H para o ligante CISTEÍNA realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.



Para maior nitidez das multiplicidades dos sinais observados a (figura 15) apresenta a ampliação do espectro ou sinais condizentes com sua estrutura química, entre 2,5 a 4,4 ppm.

Figura 15. Ampliação do espectro de RMN ^1H para o ligante CISTEÍNA realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.



O sinal 2,98, apresenta-se como um duplo duplete com $J = 14,5$ e $5,1$, e $3,05$ ppm é observado outro sinal com o mesmo padrão, com ($J = 14,5$ e $3,8$ Hz). Os hidrogênios 2a e 2b acoplamento entre si ($^2J = 14,5$ Hz) porque são diasterotópicos, ou seja, vizinhos a um centro quiral (C3). Grupos diasterotópicos não são equivalentes, apresentando deslocamento químico distintos.

O segundo acoplamento é com H-3, gerando o outro duplete mais alargado devido ao efeito de alargamento de linha provocado pelo nitrogênio (N^{14}) da amina, apresenta-se centrado como um tripleto largo (tl), centrado em $4,21$ ppm, com $J \sim 4,4$ Hz.

Finalmente, em $8,52$ ppm é observado um sinal alargando, referente aos três hidrogênios, possivelmente dois do grupo amina e um do grupo SH (o sinal referente ao grupo COOH tem maior deslocamento).

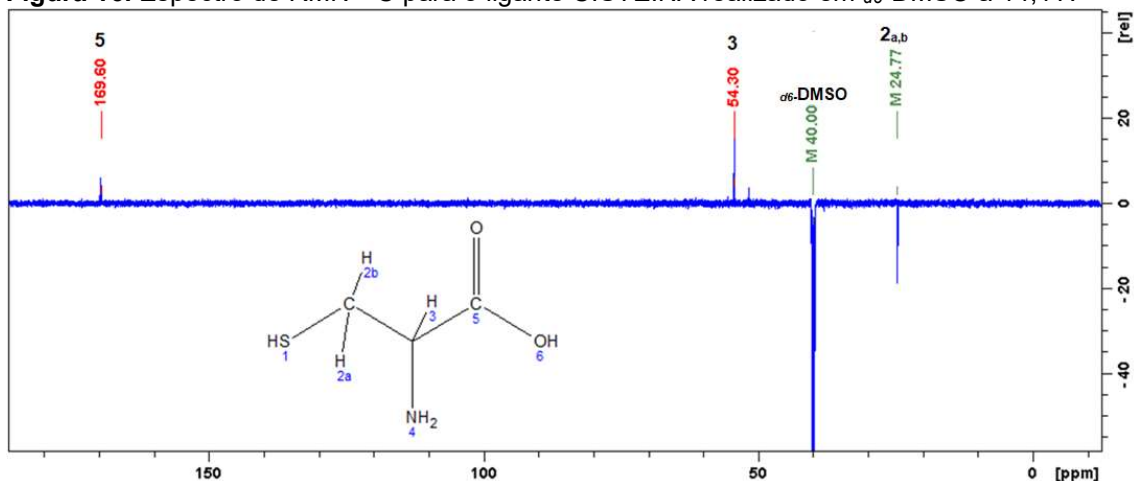
4.1.2 RMN de ^{13}C para o ligante cisteína

O espectro de RMN via DEPTQ 135 apresenta os sinais de ^{13}C em fases distintas, em que os sinais dos carbonos metílicos (CH_3) e metínicos (CH) se apresentam em uma fase e os carbonos metilénos (CH_2) e os que não possuem hidrogênio ligado (C) apresentam-se em fase contrária.

Como esperado, o espectro da cisteína (**figura 16**) apresentou três sinais. Foi observado um sinal negativo em 24,27 ppm, atribuído ao carbono do grupo metilénico (C-2), bem como em 40,00 ppm relativo ao solvente.

E, em 53,87 ppm, correspondente ao carbono metínico (C-3). Em 169,60 ppm, encontra-se o sinal mais desblindado, correspondente ao carbono da carboxila (C-5).

Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C para o ligante CISTEÍNA realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.



Os sinais de ^{13}C foram atribuídos inequivocamente utilizando experimentos de RMN 2D (**figura 17**) e em comparação com a literatura (AKBARZADEH et al., 2016). A tabela 1 apresenta a atribuição dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para o ligante cisteína.

Figura 17. Expansão do mapa de contorno HSQC para o ligante cisteína realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.

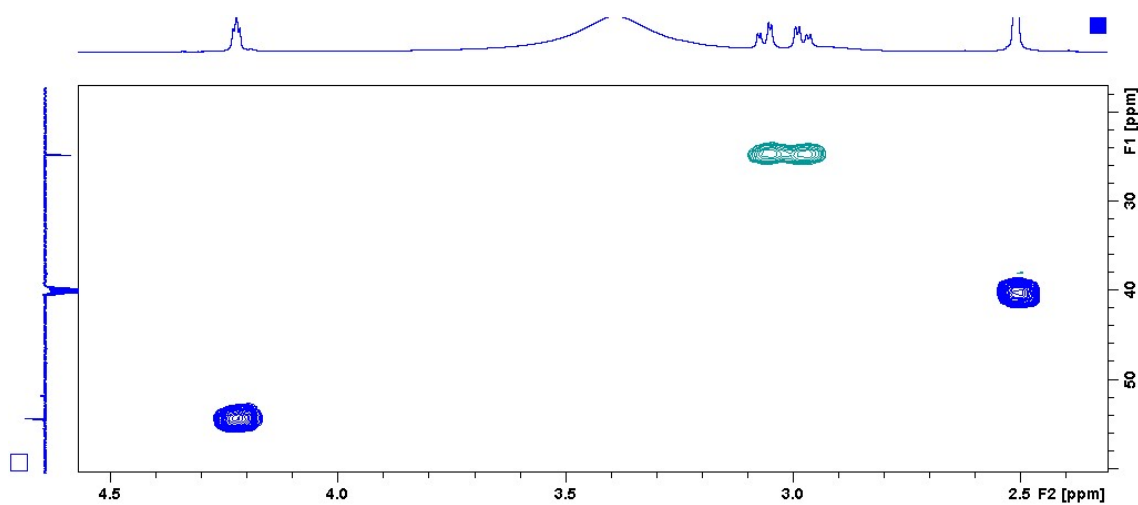


Tabela 3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para o ligante cistina livre.

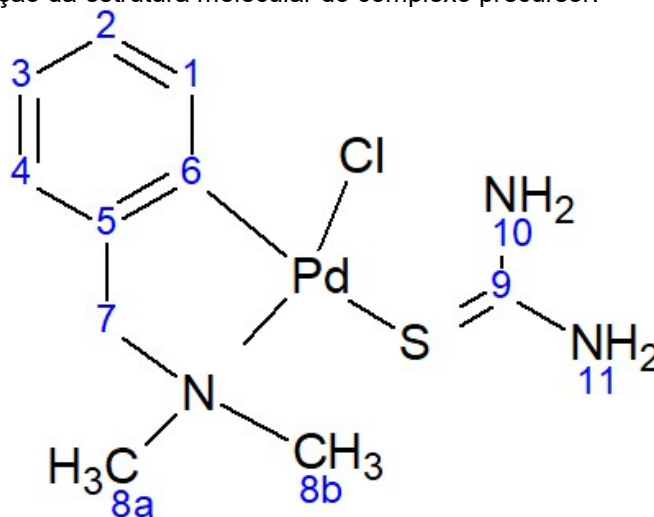
Dados experimentais			
nº	^1H (ppm); I; M	J (Hz)	^{13}C (ppm)
2a	2,967; 1H; dd	15,5; 5,1	24,77
2b	3,054; 1H; dd	15,5; 3,8	24,77
3	4,214; 1H; tl	4,4	54,30
4	8,516; 2H; sl	-	-
5	n/o-	-	169,60

sl = singleto largo; dd = duplo dubleto; tl = tripleto largo; I=integral; M=multiplicidade

4.1.3 RMN de ^1H para o complexo precursor $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})\text{Cl}(\text{tu})]$

A (**figura 18**) demonstra uma numeração conveniente para atribuição das posições dos átomos do ciclopaladado $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})\text{Cl}(\text{tu})]$ para discussão no decorrer deste trabalho.

Figura 18. Numeração da estrutura molecular do complexo precursor.

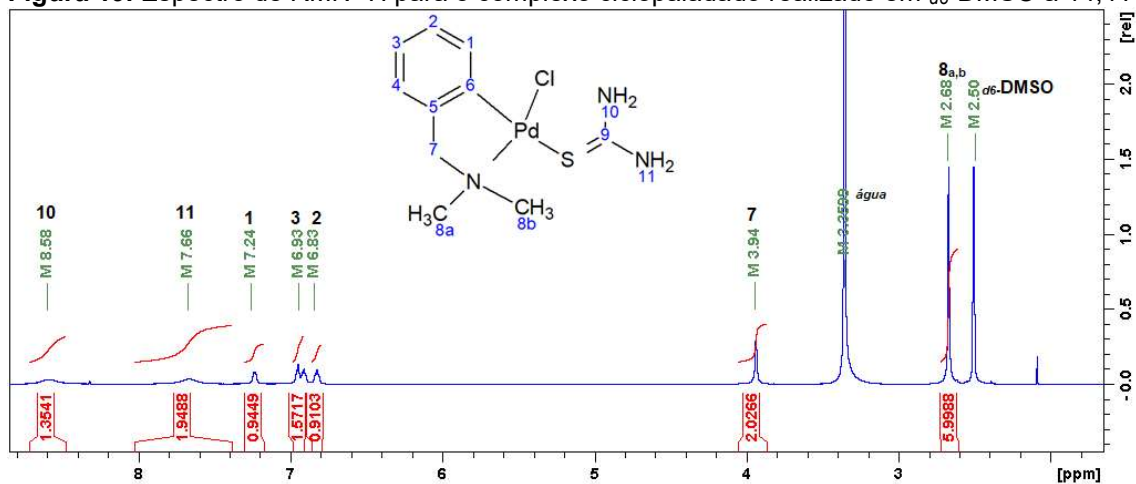


Fonte: Autoria própria.

No espectro de RMN de ^1H (**figura 19**) obtido para o complexo ciclopaladado livre são observados: quatro sinais na região entre 6,7 e 7,3 ppm, correspondente aos quatro hidrogênios do anel aromático (H1 a H4); dois sinais alargados em 7,66 e 8,58 ppm, atribuídos aos quatro hidrogênios dos dois grupamentos amina; um singleto em 3,93 ppm, relativo aos dois metilênicos (H7) e um singleto em 2,66 ppm, pertencentes aos hidrogênios das metilas (8a e 8b).

O fato dos hidrogênios metilênicos (H-7) e metílicos (H-8) apresentam-se como singletos. A diferença de deslocamento químico entre os hidrogênios das aminas 10 e 11 é coerente com o fato de estarem ligadas a um sistema rígido (ligação S=C) e estarem sujeitas a ambientes magnéticos distintos. Entretanto, a atribuição entre ambas depende de experimentos que estudam a interação nuclear espacial, ou de NOE.

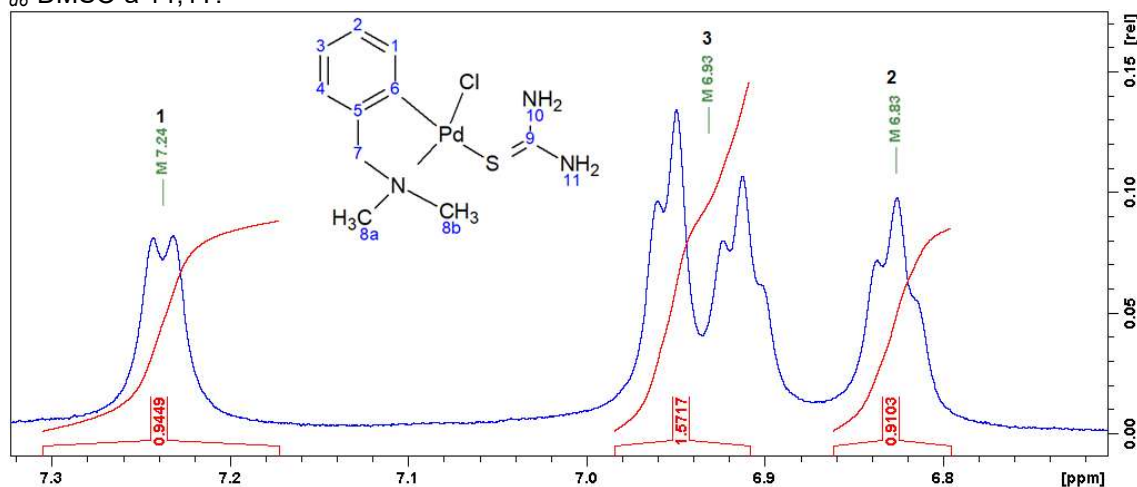
Figura 19. Espectro de RMN ^1H para o complexo ciclopaladado realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.



O padrão de acoplamento dos hidrogênios da região aromática é condizente com um anel benzênico di-substituído em *orto* e com ligantes magneticamente distintos entre si (suficiente para diferenciar os sinais dos quatro hidrogênios). Neste caso, o padrão de acoplamento esperado é de um duplo duplete (dd) para os hidrogênios H-1 (*orto* com H2 e *meta* com H3) e H4 (*orto* com H3 e *meta* com H2) e de um duplo duplo duplete (ddd) para os hidrogênios H-2 (*orto* com H-1 e H-3 e *meta* com H-4) e para H-3 (*orto* com H-2 e H-4 e *meta* com H-1).

Devido ao alargamento de linha causado pela presença de um metal, os acoplamentos em *meta* (J de 2 a 3 Hz) não foram observados. Sendo assim, o duplete largo ($J = 6,6$ Hz) mais desblindado, em 7,23 ppm, foi relacionado com o hidrogênio H-1, por estar *orto* ao carbono ligado ao paládio (H6), o segundo duplete ($J = 6,6$ Hz), em 6,95 ppm foi atribuído a H-4 e os tripletos em 6,82 e 6,91 ppm ($J = 6$ Hz) aos hidrogênios H-3 e H-4. A distinção entre H3- e H-4 só foi possível por experimentos de RMN 2D heteronucleares.

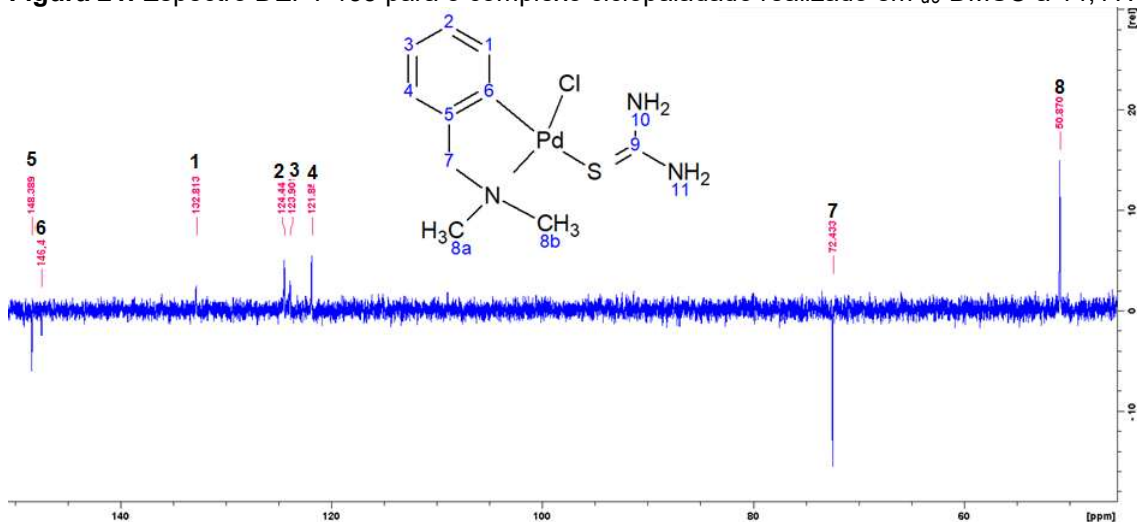
Figura 20. Ampliação do espectro de RMN ^1H para o complexo ciclopaladado realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.



4.1.4 RMN de ^{13}C para o complexo precursor $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})\text{Cl}(\text{tu})]$

No espectro obtido para o complexo ciclopaladado é possível observar cinco sinais de ^{13}C (**figura 21**) na região de aromático e dois na região alifática. O sinal em 50,87 ppm, com fase positiva, pode ser atribuído aos carbonos das metilas (C-8) e, em 72,43 ppm, ao carbono metilênico C-7. Na região aromática, os quatro sinais com fase positiva (entre 121 e 148 ppm) foram atribuídos aos carbonos CH do anel e, na fase negativa um sinal em 148,39 ppm, relativo a um carbono não hidrogenado, C-5 ou C-6. Portanto, um dos carbonos do anel aromático não foi detectado (possivelmente por pouco tempo experimental) neste espectro.

Figura 21. Espectro DEPT 135 para o complexo ciclopaladado realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.



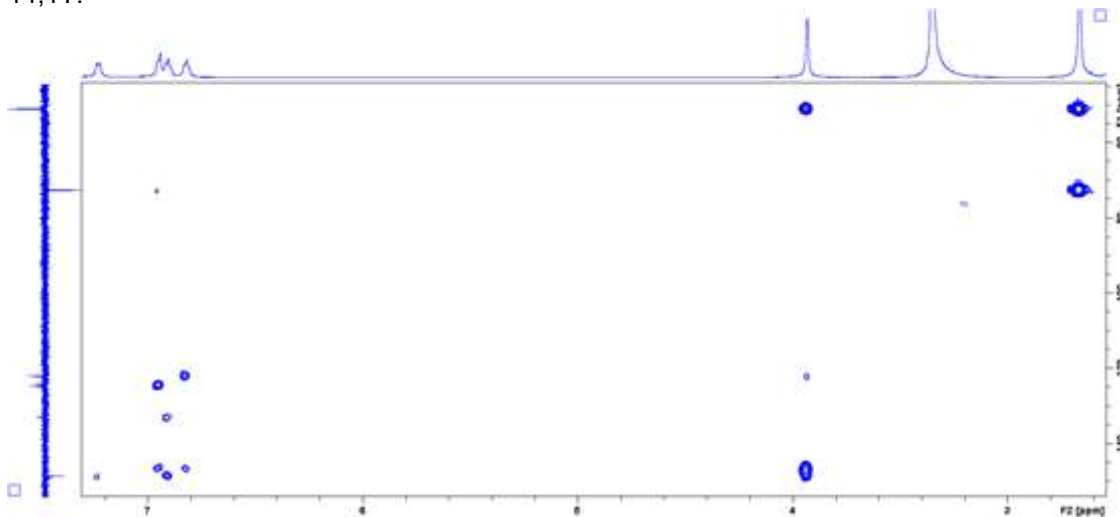
4.1.5 Experimentos de RMN 2D heteronuclear para o ciclopaladado [Pd(C²,N-dmba)Cl(tu)]

Para fazer a atribuição inequívoca dos sinais foram realizados experimentos de RMN 2D heteronucleares, em que os sinais representam os ¹H e ¹³C que estão diretamente ligados (acoplamento J_1) ou em duas ou mais ligações (usualmente J_2 e J_3).

O experimento da **figura 22** apresenta o espectro de HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation) obtido para o complexo ciclopaladado.

Com ele foi possível determinar todos os pares ¹H-¹³C da estrutura. A atribuição dos sinais de ¹³C foi realizada com base nos dados de correlação heteronuclear ¹H-¹³C a uma ligação (HSQC) e a duas ou mais ligações (HMBC). Os conjuntos ¹H-¹³C foram atribuídos pelos dados de HSQC, entretanto a atribuição inequívoca dos sinais utilizou experimentos de HMBC.

Figura 22. Mapa de contorno HSQC para o complexo ciclopaladado realizado em *d*₆-DMSO a 14,1T.



A diferenciação dos pares HC(1) de HC(4) baseou-se no acoplamento heteronuclear entre H(4)-C(7) a três ligações, (uma vez que o acoplamento H(1)-C(7) seria a uma distância de quatro ligações).

Da mesma forma, os deslocamentos químicos de C5 e C6 foram atribuídos devido a ligação H(3)-C(5) e H(2)-C(6), ambas a três ligações. Pelo HMBC ainda restou a dúvida entre atribuição de H3/C3 ou H2/C2 e C-5 e C6.

A **tabela 4** apresenta os dados de ^1H e ^{13}C obtidos para o ciclopaladado.

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para o ciclopaladado livre.

Posição	^1H (ppm); l; M; J(Hz)	^{13}C / HSQC	HMBC	Posição (Distância ligação)
1	7,24 1H dl (6,6)	132,8	123,9 148,4	C-2 (J2) ou C-3 (J3) C-6 (J2) ou C-5 (J3)
2	6,82 1H tl (6,6)	127,5	121,8 146,4	C-4 (J3) C-6 (J3)
3	6,91 1H tl (6,6)	124,4	132,8 148,4	C-1 (J3) C-5 (J3)
4	6,95 1H dl (6,6)	121,8	72,4 123,9 146,4	C-7 (J3) C-3 (J2)/C-2(J3) C-6 (J3)/C-5(J2)
5	-	148,4	-	-
6	-	146,4	-	-
7	3,93 2H sl	72,4	50,9 121,8 146,9	C-8 (J3) C-4 (J3) C-5 (J2)/C-6(J3)
8	2,66 6H sl	50,9	72,4 50,87	C-7 (J3) C-8 (J2)
9	-	n/d	-	-
10*	8,58 2H sl	-	-	-
11*	7,66 2H sl	-	-	-

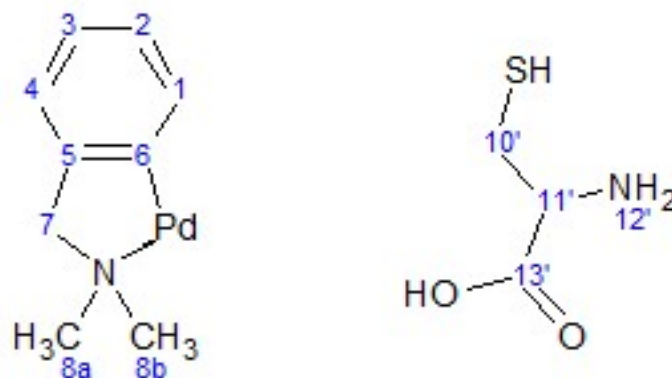
* = trocável; sl = singleto largo; dd = duplo dubleto; tl = tripleto largo; l=integral;

M=multiplicidade

4.1.6 RMN de 1D e 2D para o produto da reação entre ciclopaladado e cisteína

A (figura 26) demonstra a numeração das posições dos átomos para o produto da reação entre o complexo precursor $[Pd(C^2,N-dmba)Cl(tu)]$ e a cisteína.

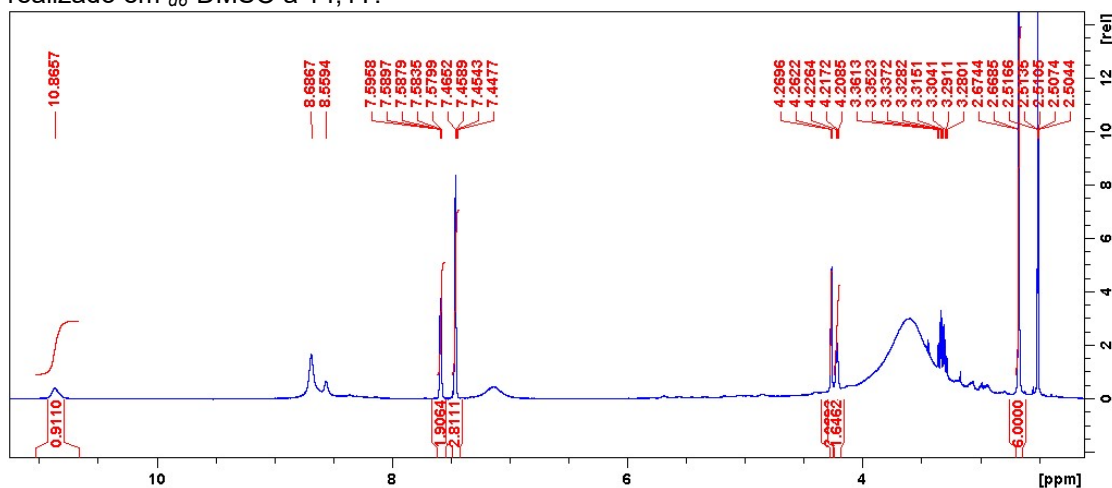
Figura 23. Numeração da estrutura molecular para o produto da reação entre complexo precursor e RS.



Fonte: Autoria própria.

O espectro de RMN de 1H para o produto da reação entre o ciclopaladado e a cisteína na região de 2,6 a 10,6 ppm, está mostrado na **figura 27**.

Figura 24. Espectro de RMN 1H para a reação do complexo precursor com cisteína complexada realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.

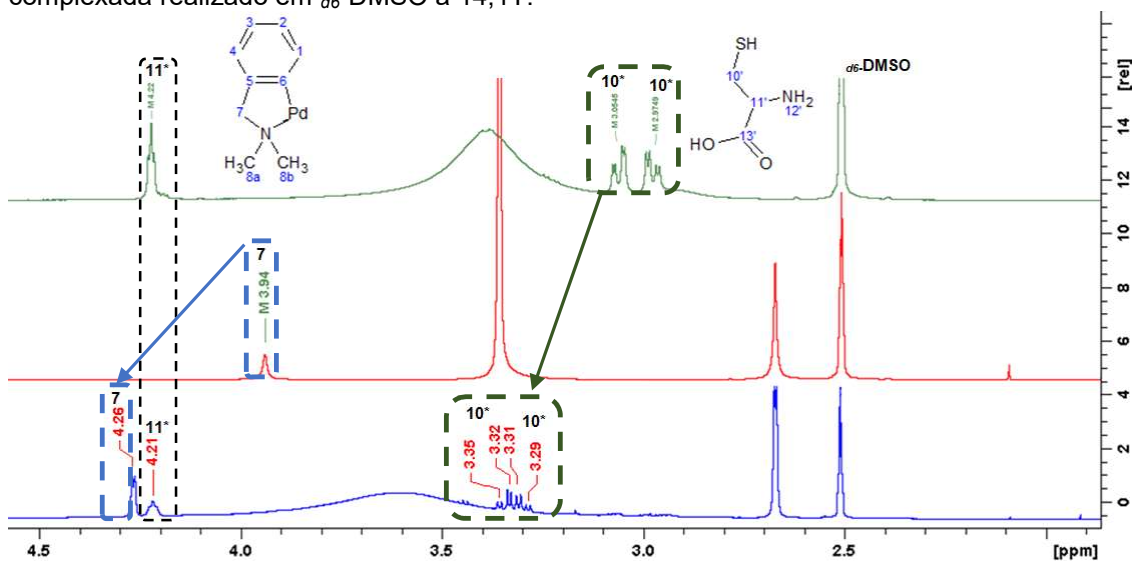


Observa-se a presença de dois sinais típicos do anel dmba ortometalado em 7,59 e 7,46 ppm bem como o aparecimento dos sinais em 4,25 e 2,70 ppm atribuídos, respectivamente aos grupos CH_2 e NMe_2 . Verifica-se o deslocamento de parte desses sinais quando comparados aqueles do ciclopaladado precursor, sugerindo a preservação da estrutura do anel ortometalado após a reação.

Conforme já descrito, o ligante cisteína livre apresenta como duplo dubleto sinal em 2,97 para 3,05 ppm para os hidrogênios 2a e 2b, respectivamente, nota-se com clareza o deslocamento desses para 3,29 para 3,33 ppm. Para os hidrogênios do grupo amina -NH_2 o deslocamento deu-se de 8,52 para 8,69 ppm. O deslocamento do sinal atribuído ao grupo NH_2 indica a participação do átomo de nitrogênio na coordenação. Tal efeito também foi evidenciado no trabalho (PARISH et al., 1996), no qual foi estudado a interação entre o ciclo aurato $[\text{Au}(\text{dmba})(\text{OAc})_2]$ e cisteína.

Analisando o espectro da **figura 27**, verifica-se a presença dos sinais típicos do fragmento DMBA e da molécula da cisteína. Para fins comparativos a **figura 28** ilustra os espectros para o ligante isolado (espectro superior verde), complexo precursor isolado (espectro central vermelho) e para o produto da reação entre ambos (espectro inferior azul).

Figura 25. Comparação dos espectros de RMN de ^1H para o complexo precursor com cisteína complexada realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.



Os dados de 1D e 2D da **tabela 05** apresentam os deslocamentos químicos observados para identificação e atribuição do produto formado.

Tabela 5. Dados de RMN de 1D e 2D obtido para o produto da reação.

n ^o	Livre		complexada	
	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)
10*	2,967 1H dd (15,5; 5,1)	24,28	3,286 1H dd (14,6; 6,7)	37,31
	3,054 1H dd (15,5; 3,8)		3,335 1H dd (14,6; 5,4)	
11*	4,214 1H tl (4,4 Hz)	53,87	4,207 1H tl (5,7 Hz)	51,24
12*	8,516 2H sl	-	8,689 2H sl	-
13*	-	169,17		169,2

Os mapas de contorno (e suas devidas ampliações) bidimensionais HMBC e HSQC (apêndice) permitiram correlacionar os átomos de carbono e hidrogênio do novo complexo obtido.

Dentre os deslocamentos dos sinais dos átomos de ¹³C do novo complexo formado, destaca-se o do 10C*. O fato desse carbono estar ligado diretamente ao átomo de enxofre o torna muito sensível aos efeitos da coordenação. Neste caso, observa-se um deslocamento para a região de campo mais desprotegido de 13 ppm o que sugere a participação do átomo de enxofre na coordenação.

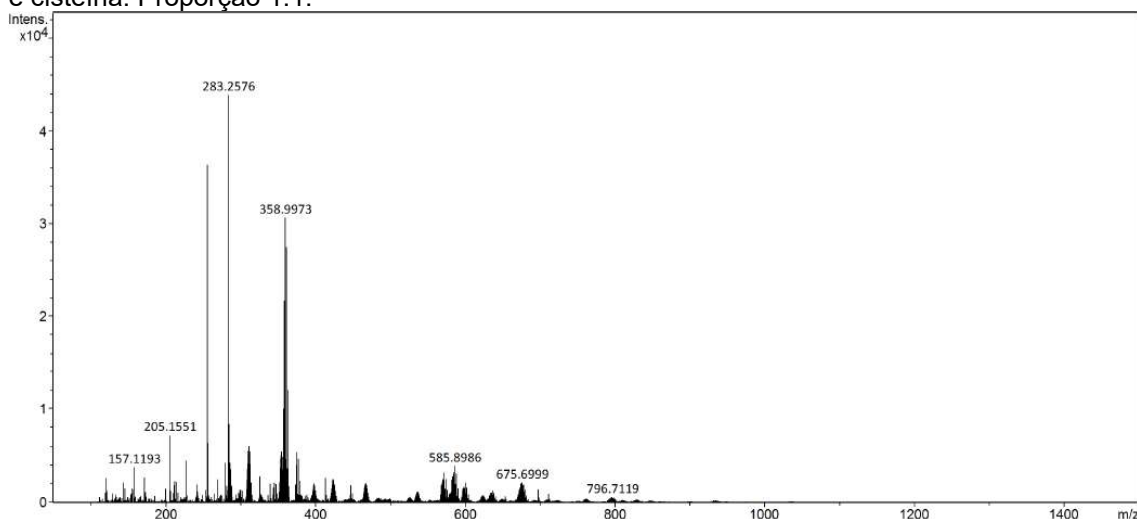
A coordenação *N,S*-quelante da cisteína resulta em um aumento da entropia dos produtos quando comparada com a variação entrópica dos reagentes.

4.2 Espectrometria de massas

Por oferecer informações sobre a composição atômica e molecular de compostos orgânicos e inorgânicos utilizar a técnica de espectrometria de massa torna-se uma aliada na confirmação de prováveis produtos formados em uma reação química uma vez que é possível determinar a fórmula molecular baseada na relação massa/carga.

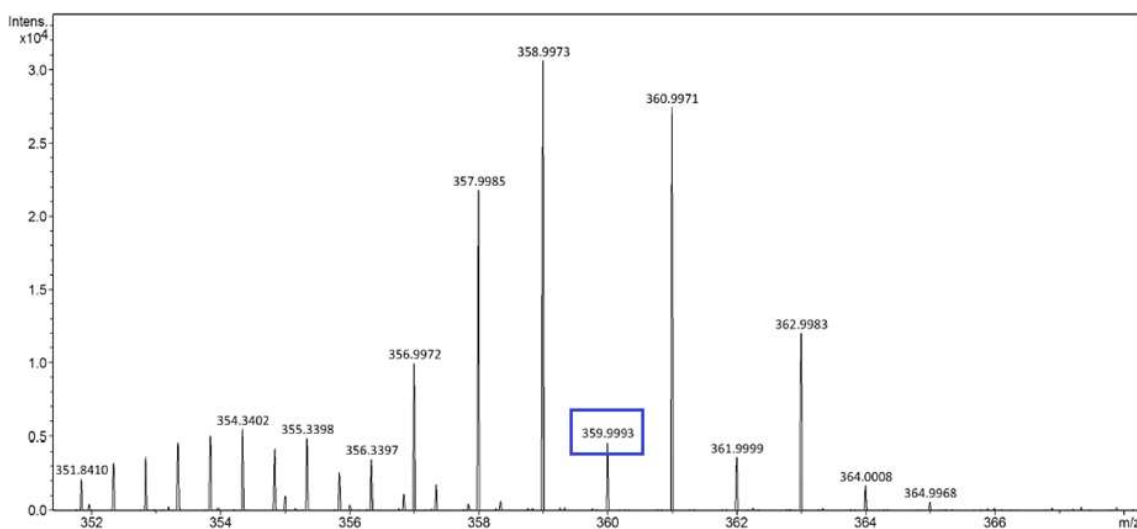
Para essa finalidade, foram obtidos espectros de massa (**figura 26**) do produto entre a reação do ciclopaladado com a cisteína na proporção estequiométrica 1:1.

Figura 26. Espectro de massa do produto formado pela reação entre o complexo ciclopaladado e cisteína. Proporção 1:1.



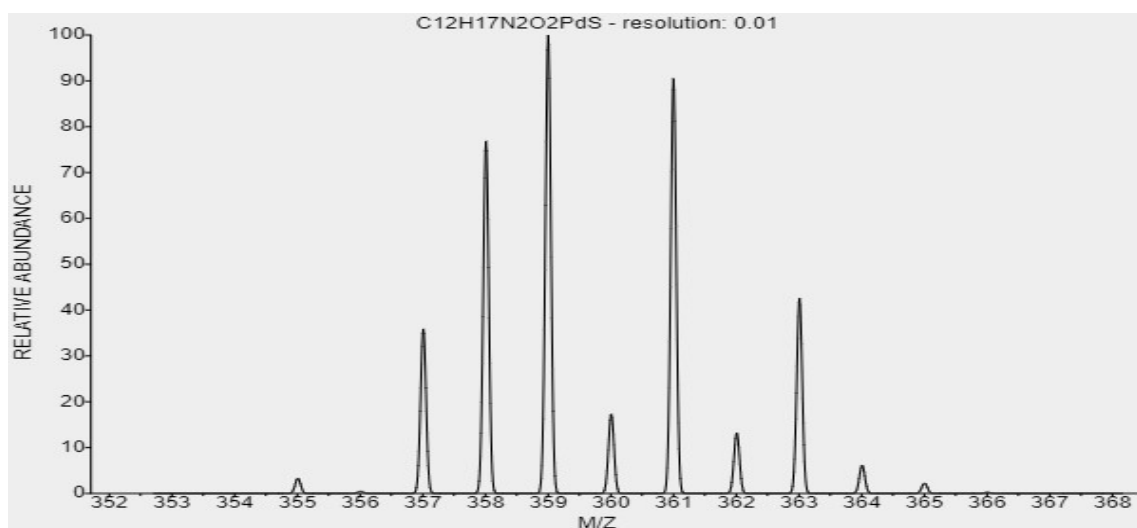
Foi observado que o fragmento correspondente ao pico em m/z 359,99 provém do complexo quelato conforme ilustrado na **figura 27** demonstrando a ampliação do espectro de massas.

Figura 27. Ampliação do espectro de massa do produto formado pela reação entre o complexo ciclopaladado e cisteína. Proporção 1:1.



Para reforçar a concordância entre o produto final obtido pela reação cuja fórmula molecular é $C_{12}H_{17}N_2O_2PdS$ e a massa molar igual 359,76g/mol, foi simulado (**figura 28**) o espectro de massas para o composto em questão cujo resultado foi comparado com o espectro obtido pelo equipamento. Ao analisar os espectros nota-se concordância entre ambos.

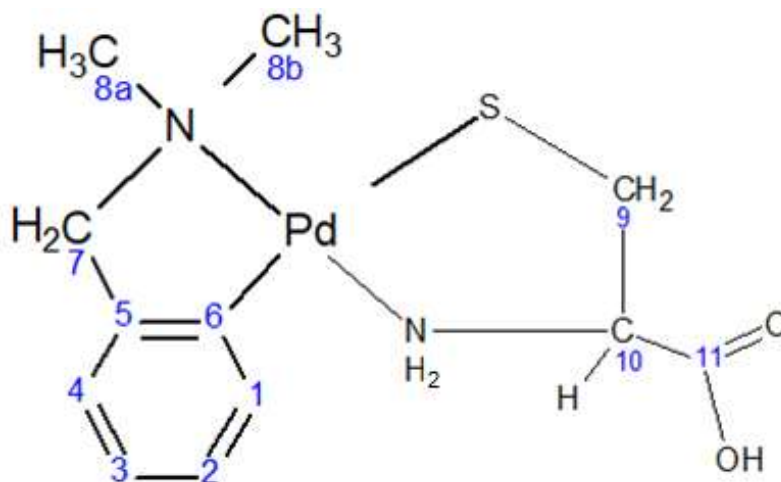
Figura 28. Simulação do espectro de massa do produto formado pela reação entre o complexo ciclopaladado e cisteína. Proporção 1:1.



Este resultado mostra que ocorre a formação de um novo produto, cuja estrutura analisada por RMN está coerente, conforme esperado. A partir desses dados, pode-se evidenciar a ocorrência da substituição do cloreto, seguida da eliminação da tiourea pela formação do quelato com cisteína.

Face ao exposto, o produto final da reação entre $[Pd(dmba)(tu)]$ e (RS) possui a estrutura conforme ilustrada pela (**figura 29**), na qual os ligante tioureia e cloro do ciclopaladado precursor são substituídos por uma molécula de cisteína coordenada no modo N,S -quelante demonstrado pela numeração das posições dos átomos da cisteína complexada através do átomo de enxofre ($Pd-S$) formando o quelato $[Pd(C^2,N-dmba)(RS)]$.

Figura 29. Numeração da estrutura molecular proposta como produto da reação entre cisteína e $[Pd(dmba)Cl(tu)]$.



4.3 Espectroscopia de absorção na região UV-vis

4.3.1 Espectro UV-vis da interação entre o complexo $[Pd(dmba)(Cl)tu]$ e cisteína

A reação entre o complexo $[Pd(dmba)(Cl)tu]$ e cisteína (RS) , **equação 4**, foi monitorada por espectrofotometria na região do UV-Vis. O espectro eletrônico do complexo $[Pd(dmba)(Cl)tu]$ apresenta uma banda centrada na região do comprimento de onda em 330 nm. Por outro lado, a cisteína não apresenta banda de absorção nesta mesma região do espectro. Após a mistura das duas espécies, $[Pd(dmba)(Cl)tu]$ e cisteína, foi observado uma mudança no espectro eletrônico, em particular uma variação na intensidade da banda de absorção centrada em 330 nm. Esta mudança espectral foi atribuída a formação da espécie $[Pd(dmba)(RS)]$.



Essa reação ocorreu em uma escala de tempo de poucos minutos e, portanto, foram realizados estudos cinéticos baseados na mudança espectral supracitada. Contudo, foram propostos e realizados experimentos utilizando técnicas adequadas para o estudo em questão.

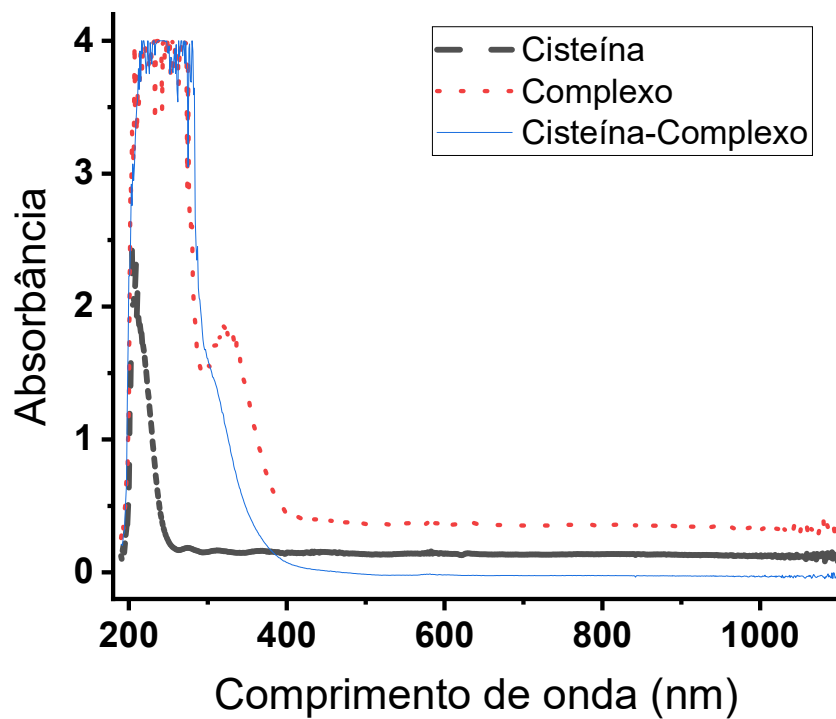


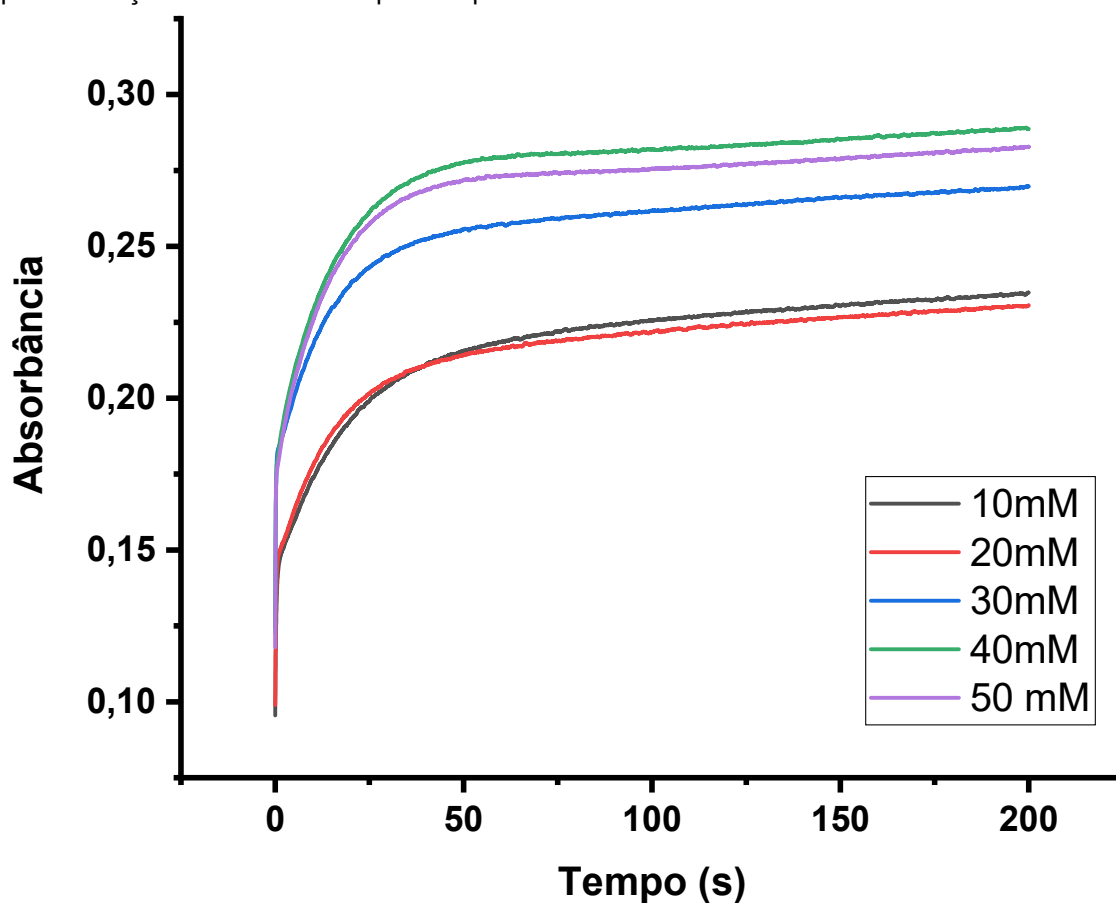
Figura 30. Espectros referente ao $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{Cl})\text{tu}]$, à cisteína e à reação entre o $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{Cl})\text{tu}]$ e a cisteína. Condições: $[\text{Pd}] = 1,0 \times 10^{-3}$ $[\text{RS}] = 1,0 \times 10^{-2}$. $T = 25^\circ\text{C}$.

4.3.2 Medidas cinéticas da reação entre o complexo [Pd(dmba)(Cl)tu] e cisteína por Stopped-Flow

A **figura 30** demonstra o comportamento geral da reação com tempo total de 200 s, conforme variação da concentração segundo a **tabela 2**.

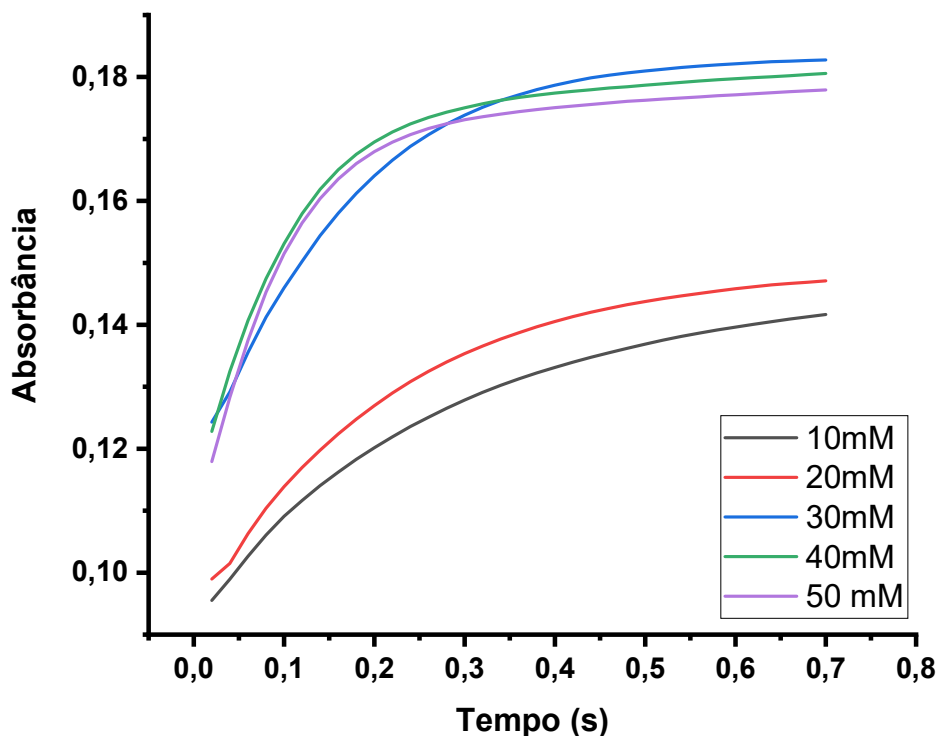
Em todas as condições experimentais, observa-se que a reação ocorre em duas etapas.

Figura 31. Curvas de absorção molecular a 330 nm com o tempo pela reação entre ciclopaladado (1mmol.L^{-1}) com variação da concentração de cisteína a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,4$, tempo total de 200 s, para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem.



A etapa mais rápida (**figura 31**) ocorre no primeiro segundo de reação cujas curvas individuais em cada variação da concentração de cisteína encontra-se no apêndice.

Figura 32. Ampliação da curva de absorção molecular a 330 nm com o tempo pela reação entre ciclopaladado (1 mmol.L^{-1}) com variação da concentração de cisteína a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7,4$, para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem no intervalo de 0 a 0,7 s. Etapa rápida.



A partir dos gráficos de $\ln(A_\infty - A_t)$ versus tempo (s), conforme ilustradas pelas **figuras 33, 34, 35, 36 e 37**, foram calculados os valores de K_{obs} para as diversas condições experimentais supracitadas.

Figura 33. Linearização ($\ln(A_\infty - A_t)$) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaladado (1 mmol.L^{-1}) com cisteína (10 mmol.L^{-1}) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7,4$ para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa rápida da reação. (K_{obs} : 3,720).

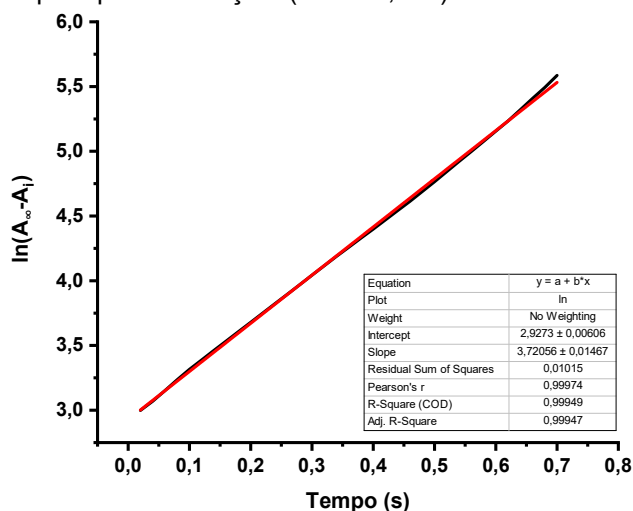


Figura 34. Linearização ($\ln(A_\infty - A_t)$) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaladado (1 mmol.L^{-1}) com cisteína (20 mmol.L^{-1}) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7,4$ para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa rápida da reação. (K_{obs} : 4,891).

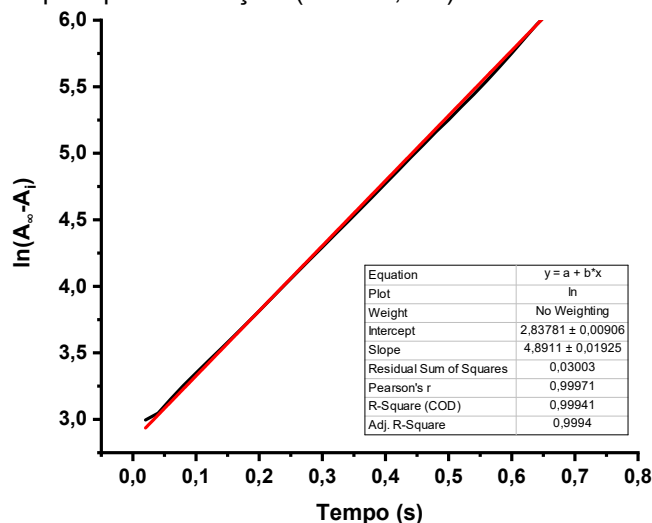


Figura 35. Linearização ($\ln(A_{\infty}-A_i)$) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaldado (1 mmol.L^{-1}) com cisteína (30 mmol.L^{-1}) a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,4$ para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa rápida da reação. (Kobs: 6,512).

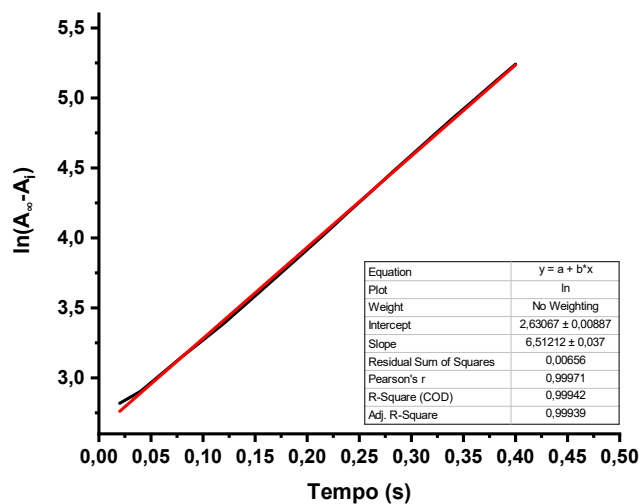


Figura 36. Linearização ($\ln(A_{\infty}-A_i)$) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaldado (1 mmol.L^{-1}) com cisteína (40 mmol.L^{-1}) a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,4$ para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa rápida da reação. (Kobs: 8,231).

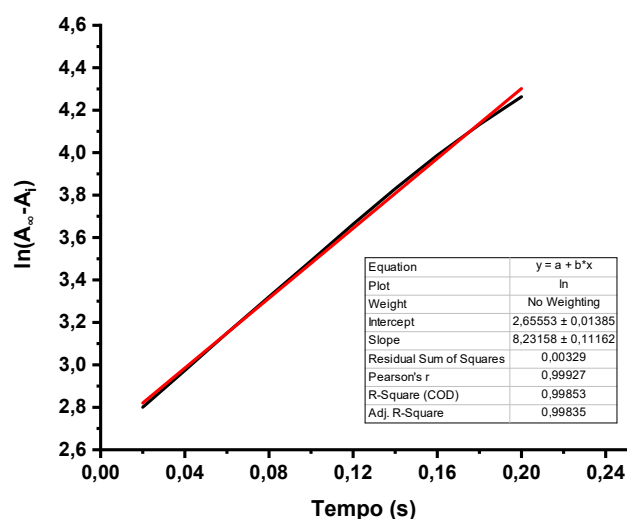
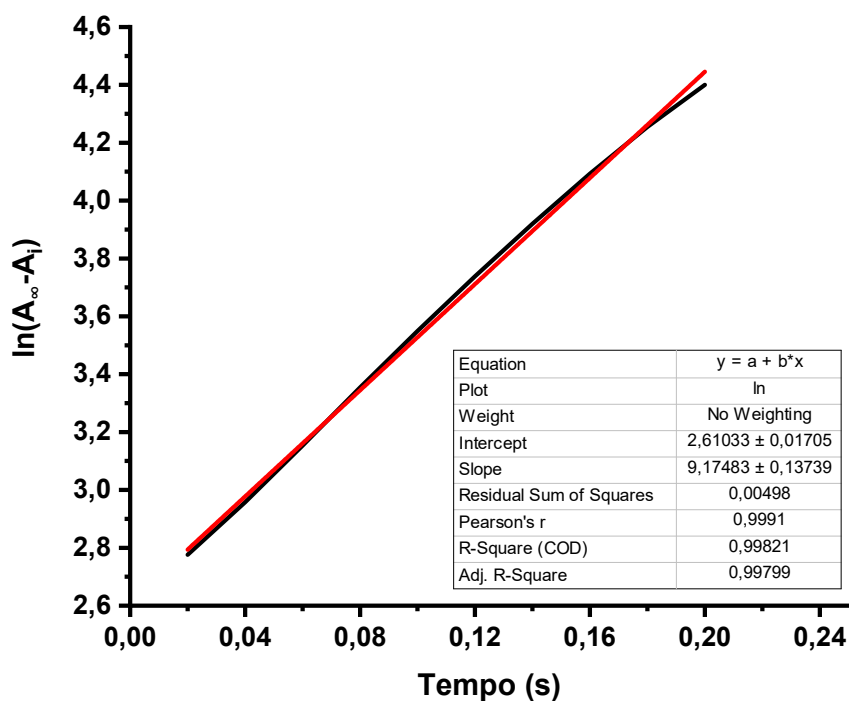
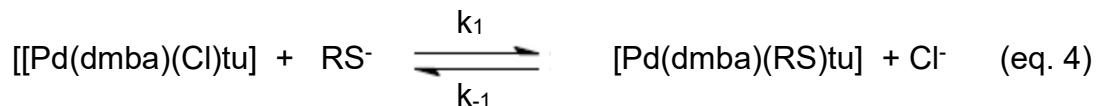


Figura 37. Linearização ($\ln(A_{\infty}-A_i)$) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaldado (1 mmol.L^{-1}) com cisteína (50 mmol.L^{-1}) a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,4$ para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa rápida da reação. (Kobs: 9,174).



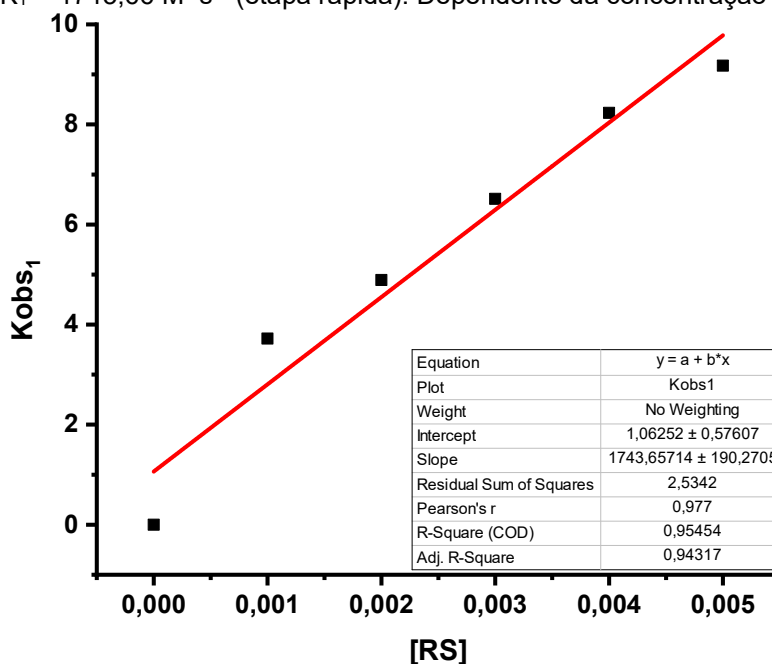
Uma relação linear pode ser observada na **figura 38** referente aos valores de k_{obs} e a concentração de L-cisteína.

De acordo com a equação $k_{obs} = k_1[RS] + k_{-1}$, foram calculados os valores para as constantes de velocidades específicas k_1 e k_{-1} para a formação da espécie $[Pd(dmba)(RS)tu]$, conforme a equação 4 (eq. 4):



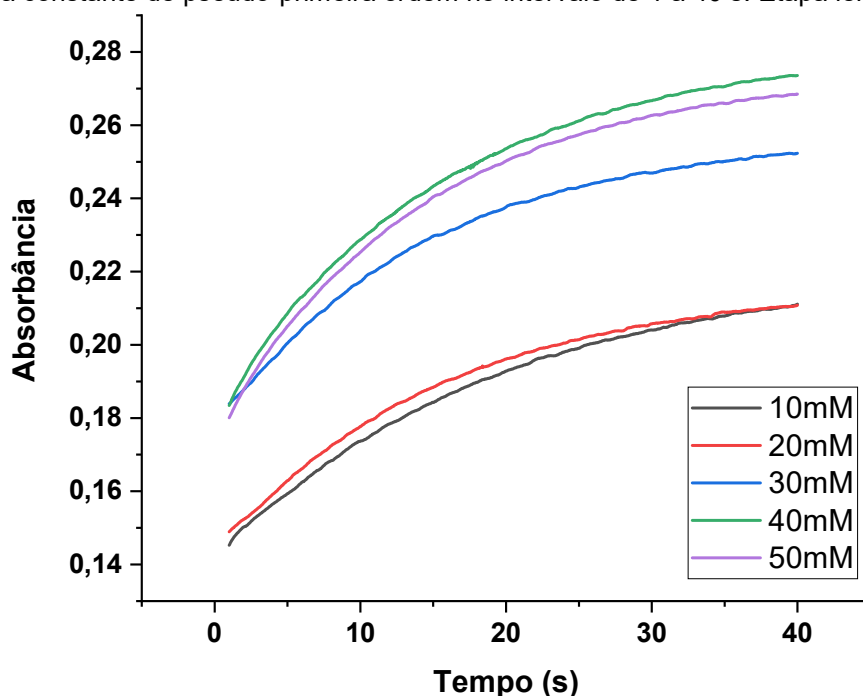
O valor de k_1 ($1743,7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) está de acordo com outros sistemas estudados na literatura os quais sugerem a saída do haleto e entrada do nucleófilo (SUMMA et al., 2006).

Figura 38. Correlação linear entre K_{obs} e concentração de total de cisteína pH = 7,4 para obtenção da primeira constante de segunda ordem (K_1 , coeficiente angular) através do ajuste linear da reta. $K_1 = 1743,66 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (etapa rápida). Dependente da concentração de cisteína.



Já a segunda etapa mais lenta ocorre logo após o primeiro segundo da reação. A **figura 39** demonstra o comportamento geral da reação após a etapa rápida observando o intervalo de tempo lento da reação, de 1 s até 40 s.

Figura 39. Ampliação da curva de absorção molecular a 330 nm com o tempo pela reação entre ciclopaladado (1 mmol.L^{-1}) com variação da concentração de cisteína a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7,4$, para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem no intervalo de 1 a 40 s. Etapa lenta.



A partir dos gráficos de $\ln(A_\infty - A_t)$ versus tempo (s), conforme ilustradas pelas **figuras 40, 41, 42, 43 e 44**, foram determinadas as constantes cinéticas de pseudo primeira ordem observadas (k_{obs}) da etapa lenta cujas curvas individuais em cada variação da concentração de cisteína encontram-se no apêndice.

Figura 40. Linearização ($\ln(A_{\infty}-A_t)$) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaladado (1 mmol.L^{-1}) com cisteína (10 mmol.L^{-1}) a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,4$ para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa lenta da reação. (Kobs: 0,057).

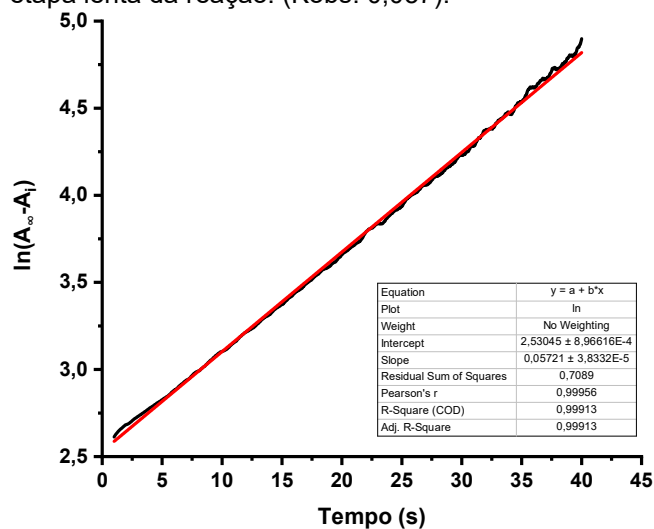


Figura 41. Linearização ($\ln(A_{\infty}-A_t)$) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaladado (1 mmol.L^{-1}) com cisteína (20 mmol.L^{-1}) a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,4$ para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa lenta da reação. (Kobs: 0,064).

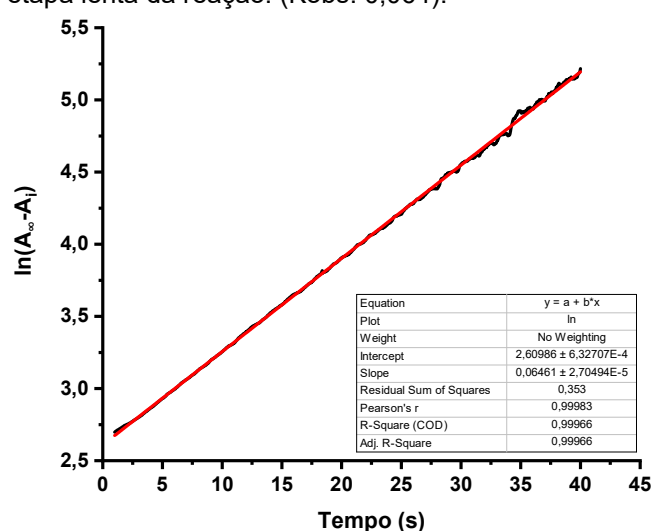


Figura 42. Linearização ($\ln(A_{\infty}-A_t)$) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaladado (1 mmol.L^{-1}) com cisteína (30 mmol.L^{-1}) a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,4$ para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa lenta da reação. (Kobs: 0,068).

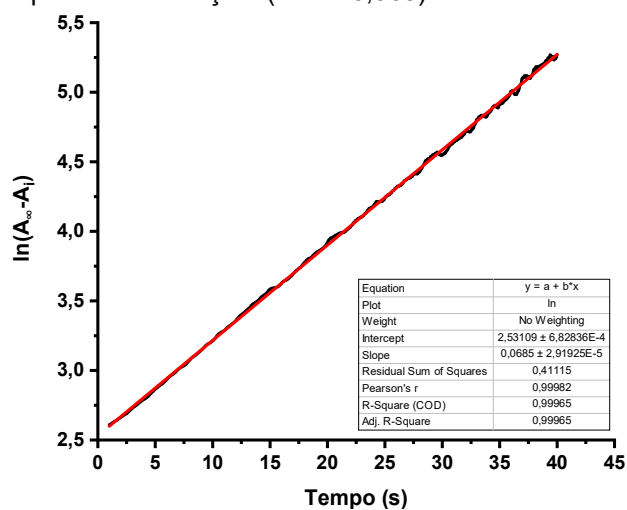


Figura 43. Linearização ($\ln(A_{\infty}-A_t)$) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaladado (1 mmol.L^{-1}) com cisteína (40 mmol.L^{-1}) a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,4$ para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa lenta da reação. (Kobs: 0,071).

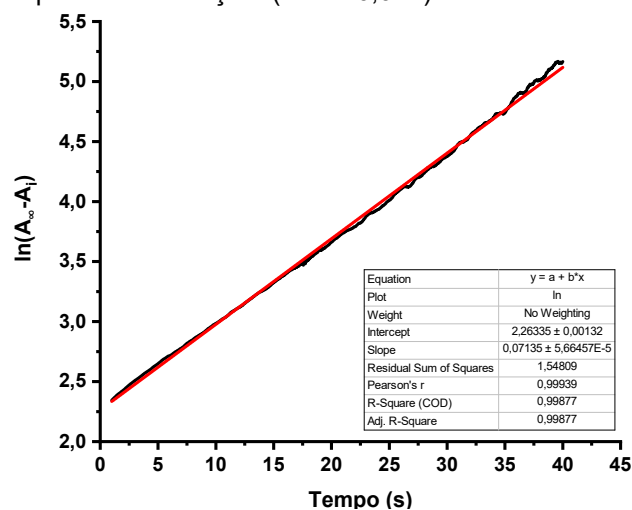
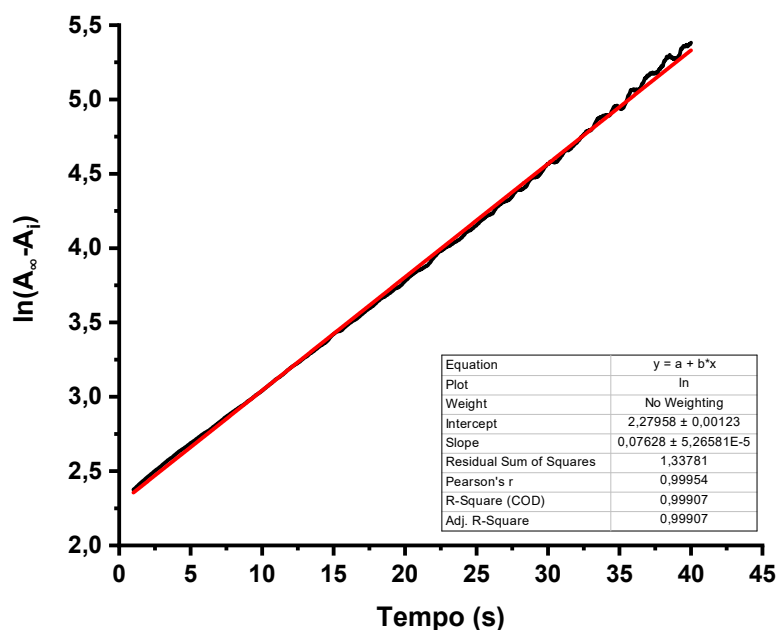


Figura 44. Linearização ($\ln(A_\infty - A_t)$) da curva em função do tempo (s) no primeiro segundo da reação referente a reação entre ciclopaladado (1 mmol.L^{-1}) com cisteína (50 mmol.L^{-1}) a 25°C , $\text{pH}=7,4$ para obtenção da constante de pseudo-primeira ordem em relação a etapa lenta da reação. (Kobs: 0,076).

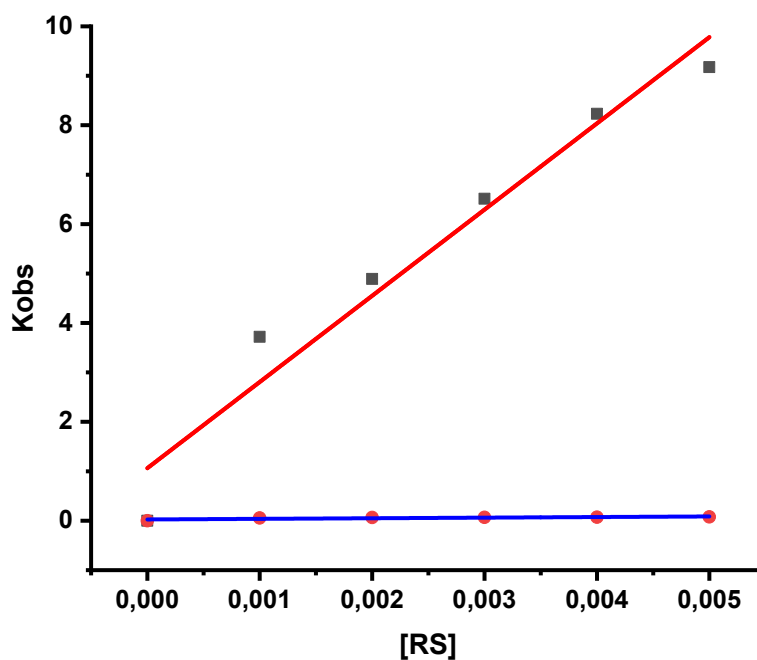


Como discutido anteriormente, a primeira etapa da reação é dependente da concentração de cisteína concordante com a substituição do cloreto por este ligante. A segunda etapa da reação é mais lenta e independente da concentração de cisteína conforme observado na comparação entre as constantes de observação (**figura 45**).

Segundo a literatura (SUMMA et al., 2006), a interação do tiol com um complexo metálico similar ocorre em duas etapas, a saber: substituição do ligante cloreto pelo tiol por meio da coordenação do enxofre e, em seguida, quelação deste tiol por meio da ligação da amina ao metal e saída de ligante. Este mecanismo é bem enquadrado para nossos estudos cinéticos.

Portanto, a elevada reatividade do haleto presente no complexo ciclopaladado favorece pioneiramente sua substituição. É proposto e considerado que o efeito *trans* do grupo $-\text{NH}_2$ do ligante DMBA favoreça a formação do quelato com o Pd, tornando o produto um quelato.

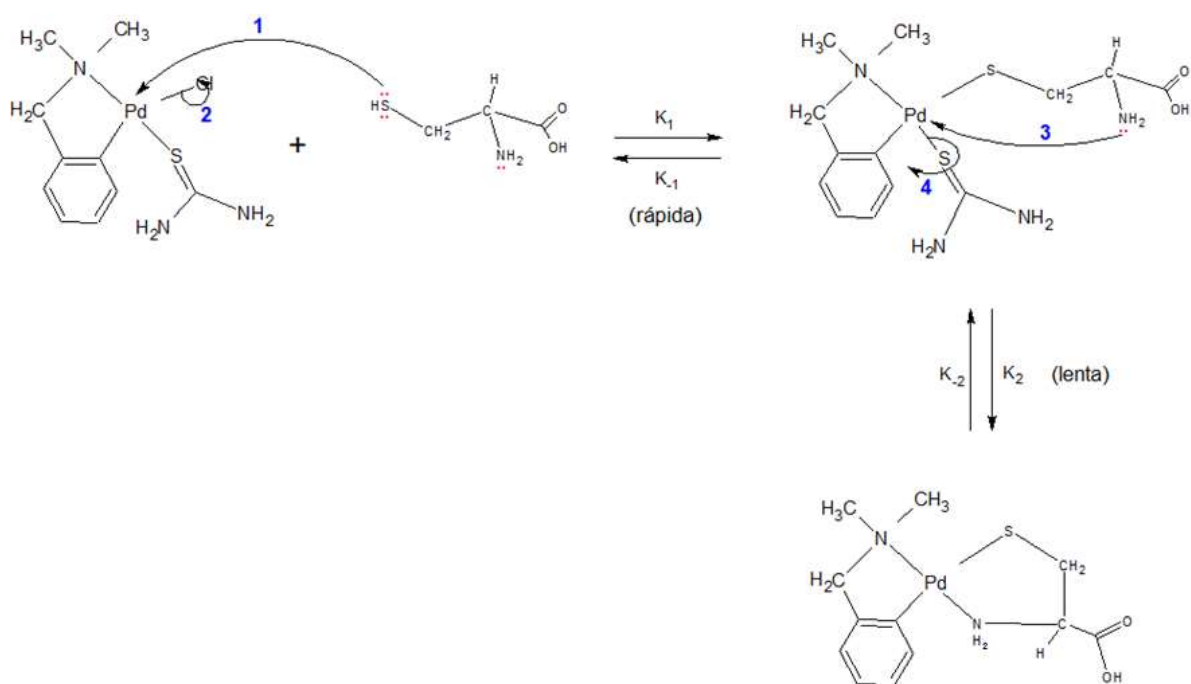
Figura 45. Comparação entre $K_1 = 1743,66 \text{ mmol.L}^{-1}\text{s}^{-1}$ (etapa rápida), dependente da concentração de cisteína e $K_2 = 4,5 \text{ mmol.L}^{-1}\text{s}^{-1}$ (etapa lenta), independente da concentração de cisteína, pH = 7,4 a 25°C.



A **figura 46**, propõe o mecanismo de substituição seguido da formação do composto quelato. É importante ressaltar que uma terceira etapa da reação bastante lenta foi observada e atribuída a substituição do ligante cisteína por solvente. Esta etapa ocorre após 40 s de reação e a fase de equilíbrio não foi monitorada.

Nesse caso, a reação estudada é análoga as reação com tioureia e complexos cujo centro metálico é a Pt(II) com ligantes tridentados cuja investigação ocorre com grupos piridina e aminas (FILHO et al., 2006).

Figura 46. Mecanismo de reação proposto para a formação do novo composto quelato.



5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O aminoácido selecionado, cisteína, como molécula de importância biológica para investigação do mecanismo de reação entre este com o complexo de paládio com potencial atividade anticâncer, demonstrou ser de fundamental relevância, posto que, estão presentes no meio de cultura utilizado em estudos *in vitro*. Neste trabalho foi observado que a reação entre ciclopaladado e a L-cisteína tende a formar um novo composto.

Essa importância ocorre uma vez que o complexo majoritário, possivelmente formado, estará em maior proporção quanto ao complexo precursor contendo o ligante cloreto, mostrando, portanto, que a estrutura do complexo em meio de cultura contendo cisteína não permanece estável. Assim, o estudo da relação estrutura–atividade destes complexos de paládio deve levar em consideração sua estabilidade em solução e em presença de moléculas de importância biológica, tais como a L-cisteína e a glutatona, entre outras.

O trabalho desenvolvido abre novas perspectivas de estudos atrelados, principalmente, para a síntese e obtenção do produto formado pela reação estudada no presente trabalho. Pretende-se obter um monocristal, a fim caracterizá-lo para que, em seguida, possa submetê-lo em investigação biológica nos meios de cultura de células tumorais.

A realização de novos experimentos de UV-vis e RMN em diferentes concentrações investigando a reação entre novas classes de aminoácidos, também poderá conduzir novas possibilidades de compreensão e interpretação de resultados em ensaios de citotoxicidade com outras linhagens tumorais e linhagem de células normais.

REFERÊNCIAS

- AKBARZADEH, M. et al. Metallo-vesicular catalysis: A mixture of vesicular cysteine/iron mediates oxidative pH switchable catalysis. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 424, n. August, p. 181–193, 2016.
- BATISTELA, V. R. et al. Vagner Roberto Batistela, André Luiz Tessaro, Rafael R. da S. Soares, Vagner Roberto de Souza e Noboru Hioka*. v. 29, n. 5, p. 1101–1105, 2006.
- BOGOJESKI, J. et al. Equilibrium studies of the reactions of palladium(II) bis(imidazol-2-ylidene) complexes with biologically relevant nucleophiles. the crystal structures of $[(TLtBu)PdCl]ClO_4$ and $[(BLiPr)PdCl]_2$. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 24, p. 6515–6523, 2011.
- CHANCE, B. The accelerated flow method for rapid reactions. **Journal of the Franklin Institute**, v. 229, n. 6, p. 737–766, 1940.
- DIASIO, R. B.; HARRIS, B. E. Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 16, n. 4, p. 215–237, 1989.
- ESTADÃO. **Câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://socgastro.org.br/novo/2018/09/cancer-no-brasil-pode-aumentar-em-78-nos-proximos-20-anos/>>. Acesso em: 20 nov. 2018.
- FILHO, J. R. O. et al. Binding of cysteine and glutathione to Ru(II) and Ru(III) centers: Formation and products reactivities. **Inorganica Chimica Acta**, v. 359, n. 9, p. 2888–2895, 2006.
- FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A química inorgânica na Terapia do Câncer. **Cadernos Temáticos de química nova na escola**, n. 6, p. 2–7, 2005.
- GIBSON, Q.; MILNES, L. Apparatus for rapid and sensitive spectrophotometry. **Biochemical Journal**, v. 91, n. 1, p. 161–171, 1964.
- GRILLO, I. Applications of stopped-flow in SAXS and SANS. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 14, n. 6, p. 402–408, 2009.
- INCA. **Carcinogênese**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=317>. Acesso em: 20 nov. 2018.
- J. WIGHT, A.; R. OGDEN, G. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer--a review. **Oral oncology**, v. 34, n. 6, p. 441–447, 1998.
- JOVANOVIĆ, S. et al. Kinetics and mechanism of substitution reactions of the new bimetallic $[\{PdCl(bipy)\}\mu-(NH_2)(CH_2)_6H_2N]\{PtCl(bipy)\}Cl(ClO_4)_4$ complex with important bio-molecules. **Polyhedron**, v. 101, p. 206–214, 2015.
- LAVANYA, M. et al. Synthesis, crystal structure, DNA binding and antitumor studies of β -diketonate complexes of divalent copper, zinc and palladium. **Inorganica Chimica Acta**, v. 469, p. 76–86, 2018.
- LEMMA, K. et al. Kinetics and mechanism for reduction of anticancer-active

tetrachloroam(m)ine platinum(IV) compounds by glutathione. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 300–306, 2000.

LEONCINI, E. et al. Adult height and head and neck cancer: A pooled analysis within the INHANCE Consortium. **Head and Neck**, v. 36, n. 10, p. 1391, 2014.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–8, 2003.

MARZANO, C. et al. Synthesis of a new platinum(II) complex: Anticancer activity and nephrotoxicity in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 16, n. 4, p. 413–419, 2002.

MCALPINE, D.; JOHNSTONE, B. M. The ototoxic mechanism of cisplatin. **Hearing Research**, v. 47, n. 3, p. 191–203, 1990.

MIRVISH, S. S. et al. Total N-Nitroso Compounds and Their Precursors in Hot Dogs and in the Gastrointestinal Tract and Feces of Rats and Mice: Possible Etiologic Agents for Colon Cancer. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 11, p. 3526S-3529S, 2018.

MORO, A. C. et al. Antitumor and antimycobacterial activities of cyclopalladated complexes: X-ray structure of [Pd(C₂N-dmba)(Br)(tu)] (dmba = N,N-dimethylbenzylamine, tu = thiourea). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 4611–4615, 2009.

MORO, A. C. **Espécies moleculares e supramoleculares de Pd(II) com ligantes mono, bi e polidentados: caracterização estrutural e atividades biológicas**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Química - Araraquara, 2011.

MORO, A. C.; MAURO, A. E.; ANANIAS, S. R. (dmba = N , N-dimetilbenzilamina ; X = Cl , N₃ , NCO) por tiourea. v. 29, n. 1, p. 57–61, 2004.

MOURA SOUZA, F. DE; ARICÓ, E. M. Mapa cronológico da evolução das definições ácido-base: um potencial material de apoio didático para contextualização histórica no ensino de química. **Educacion Quimica**, v. 28, n. 1, p. 2–10, 2017.

NAVEEN KUMAR, D. R. et al. Acceleration of pro-caspase-3 maturation and cell migration inhibition in human breast cancer cells by phytoconstituents of Rheum emodi rhizome extracts. **EXCLI Journal**, v. 12, n. 1, p. 462–478, 2013.

OLIVEIRA, M. M. DE et al. Estimativa de pessoas com diagnóstico de câncer no Brasil: dados da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. suppl 2, p. 146–157, 2016.

OMS, O. E. OMS. Disponível em: <https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094>. Acesso em: 16 nov. 2018.

ONU. **Agenda ONU 2030**.

PACHECO NETO, M. et al. Monitoração terapêutica da azatioprina: uma revisão: [revisão] TT - Therapeutic drug monitoring of azathioprine: a review: [review]. **J. bras. patol. med. lab**, v. 44, n. 3, p. 161–167, 2008.

PARISH, R. V et al. Chemical and biological reactions of diacetato [2-(dimethylaminomethyl)- phenyl gold(III)[Au(O₂CMe)₂](dmamp). **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, p. 69–74, 1996.

PLUTÍN, A. M. et al. Palladium(II)/N,N-disubstituted-N'-acylthioureas complexes as anti-Myco**acterium tuberculosis** and anti-Trypanosoma cruzi agents. **Polyhedron**, v. 132, n. li, p. 70–77, 2017.

PRIZE, N. **Prize Nobel 2018**. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/summary/>>.

ROCHA, R. C.; TOMA, H. E. Transferência de elétrons em sistemas inorgânicos de valência mista. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 624–638, 2002.

SILVA, G. B.; VARGAS, M. D. Complexos de Pt4+: Estratégia Molecular no Combate ao Câncer. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 102–117, 2012.

SOUZA, M. P. DE. **PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA CINÉTICA DE DESOXIGENAÇÃO DA OXI-HEMOGLOBINA Florianópolis - SC Junho / 2016**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

SUMMA, N. et al. Thermodynamic and kinetic studies on reactions of Pt(II) complexes with biologically relevant nucleophiles. **Inorganic Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2948–2959, 2006.

TEIXEIRA, A. **Determinação das constantes cinéticas da reação de desoxigenação da oxi-hemoglobina por um método de otimização híbrido utilizando dados experimentais em Stopped Flow Mixer 4000/S**. [s.l: s.n.].

THOMAZELLA, N. A. **Compostos de paládio(II) contendo ligantes sulfurados: síntese, caracterização e investigação da atividade biológica**. [s.l: s.n.].

TMC LITERATURE HIGHLIGHTS - 29. Cisplatin - the last five years. **Trans. Met. Chem.**, v. 17, p. 164–176, 1992.

TREVISAN, A. et al. Tubular segment-specific biomarkers of nephrotoxicity in the rat. **Toxicology Letters**, v. 124, n. 1–3, p. 113–120, 2001.

6 APÊNDICE

Figura 47. Mapa de contorno HSQC para o ligante cisteína realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.

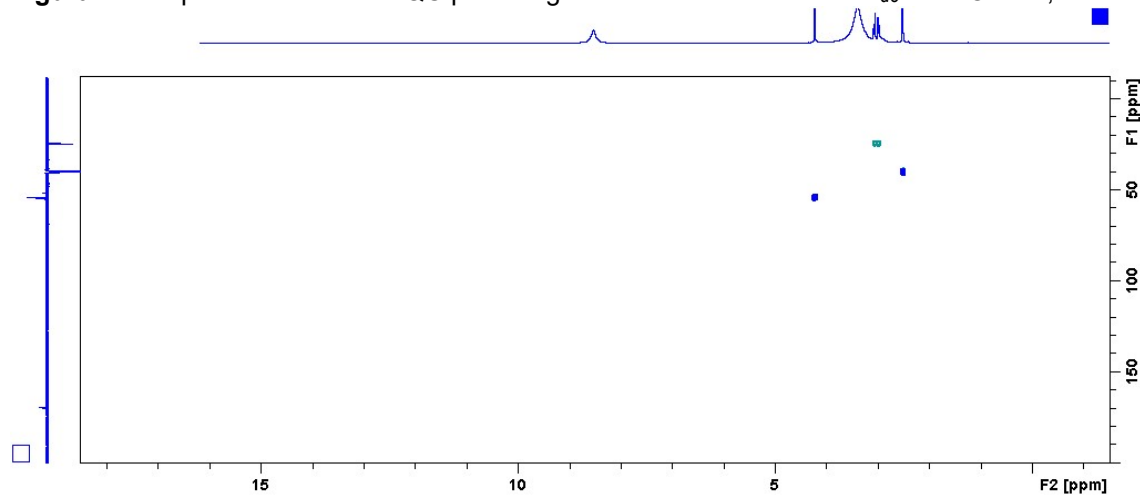


Figura 48. Expansão do mapa de contorno HSQC para o complexo livre realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.

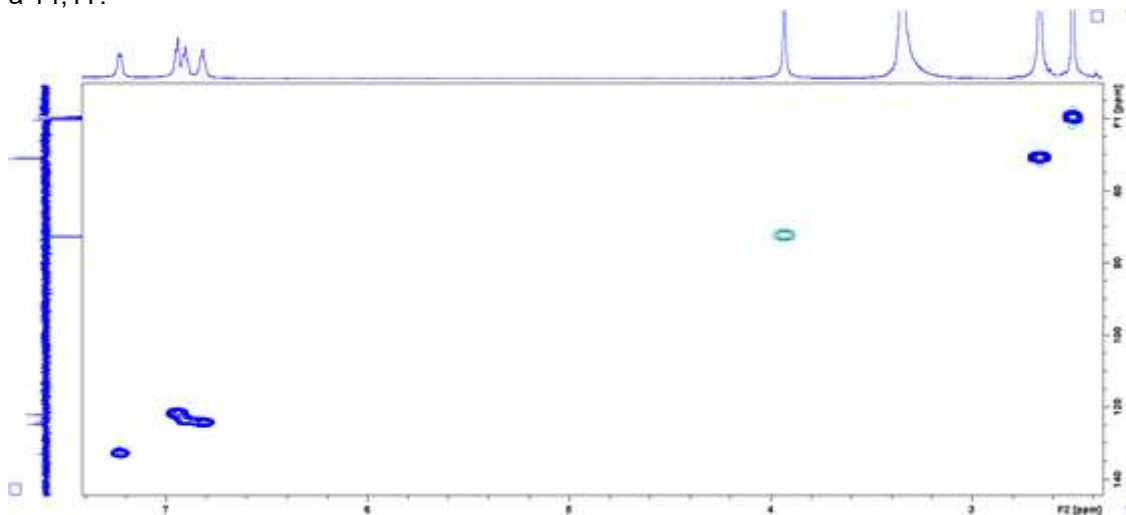


Figura 49. Expansão do mapa de contorno HSQC para o complexo livre realizado em $DMSO_{d_6}$ a 14,1T.

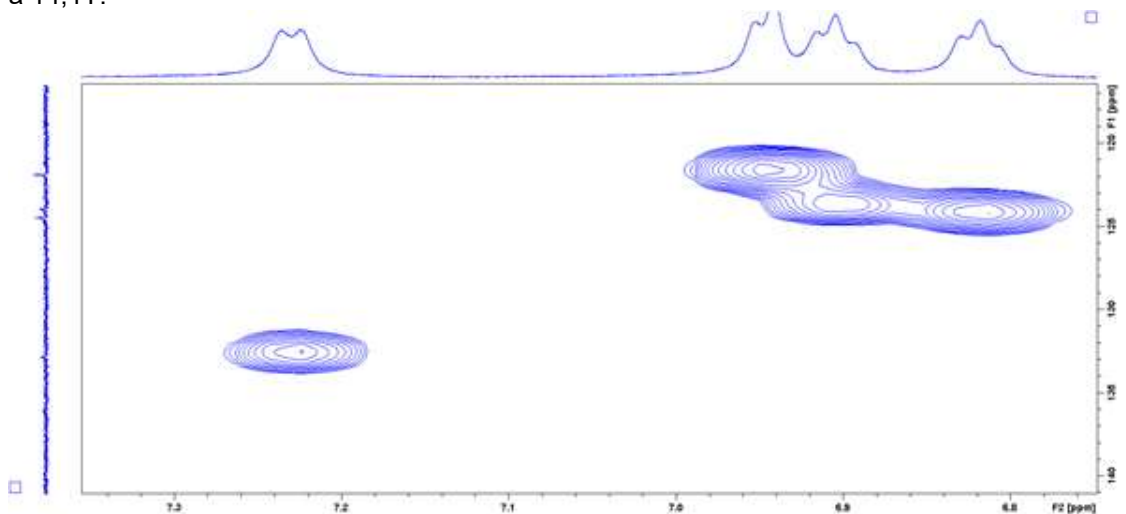


Figura 50. Expansão do mapa de contorno HSQC para o complexo livre realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.

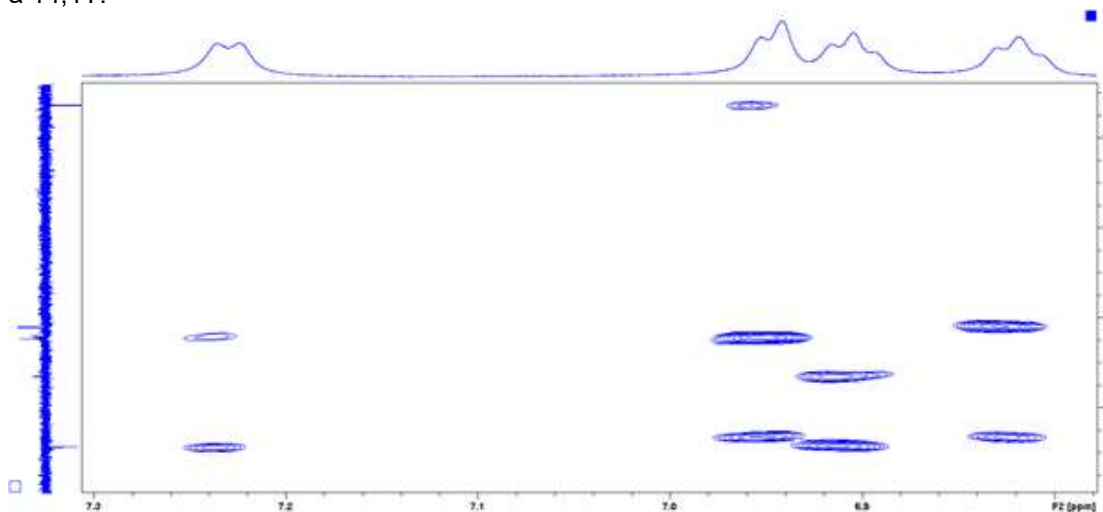


Figura 51. Ampliação do espectro de RMN ^1H para o produto formado pela reação realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.

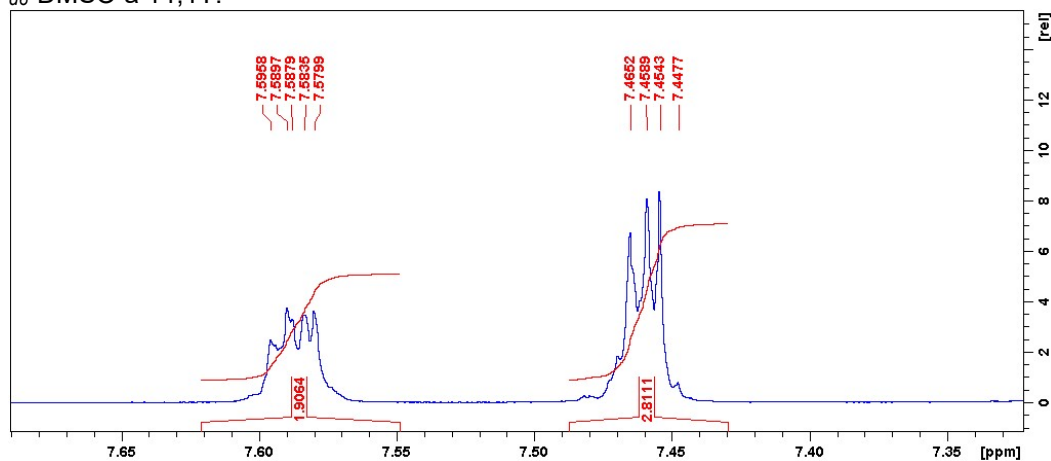


Figura 52. Ampliação do espectro de RMN ^1H para o produto formado pela reação realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.

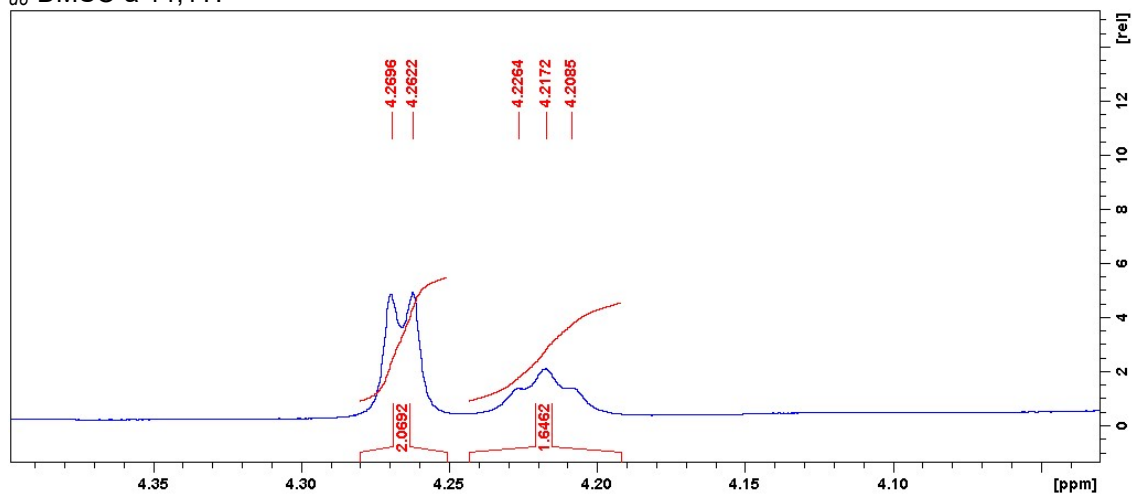


Figura 53. Ampliação da comparação dos espectros de RMN de ^1H para o complexo precursor com cisteína complexada realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.

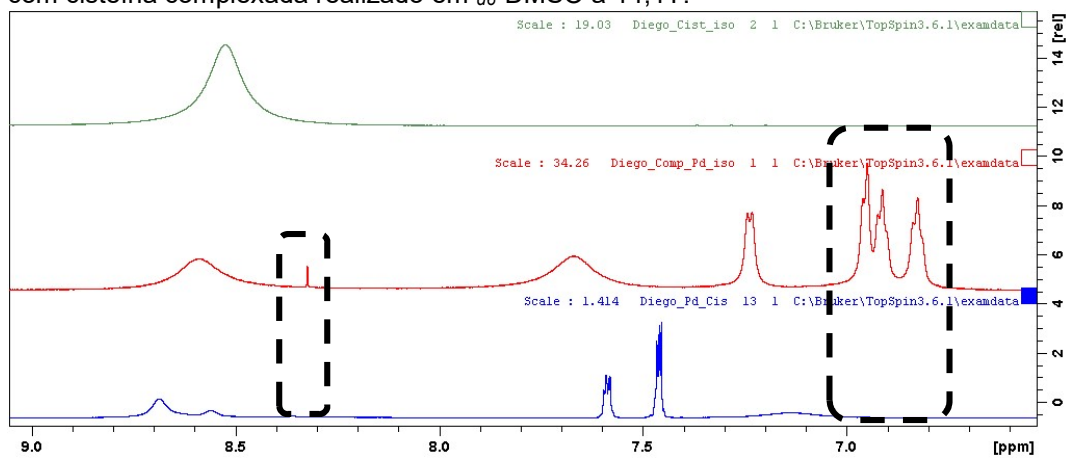


Figura 54. Mapa de contorno HSQC para o complexo precursor com cisteína complexada realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.

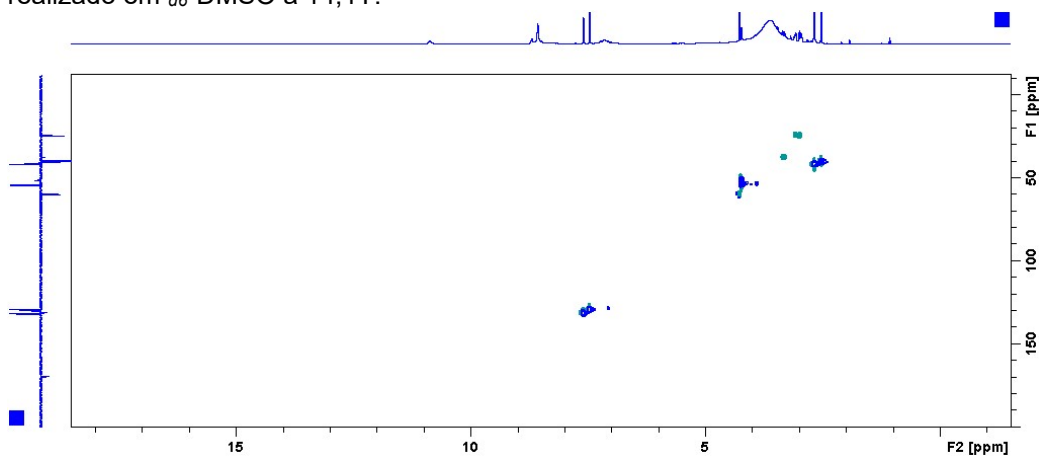


Figura 55. Ampliação do mapa de contorno HSQC para o complexo precursor com cisteína complexada realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.

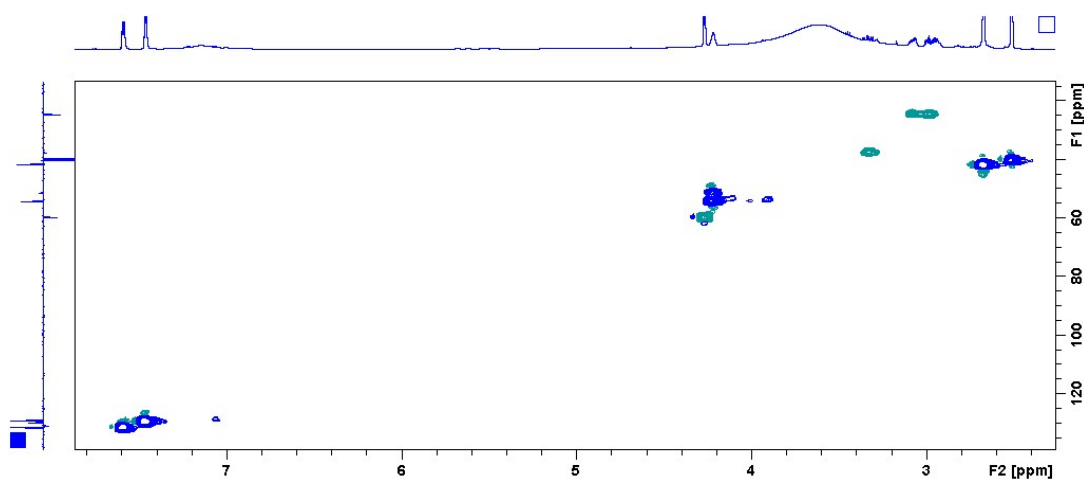


Figura 56. Ampliação do mapa de contorno HSQC para o complexo precursor com cisteína complexada realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.

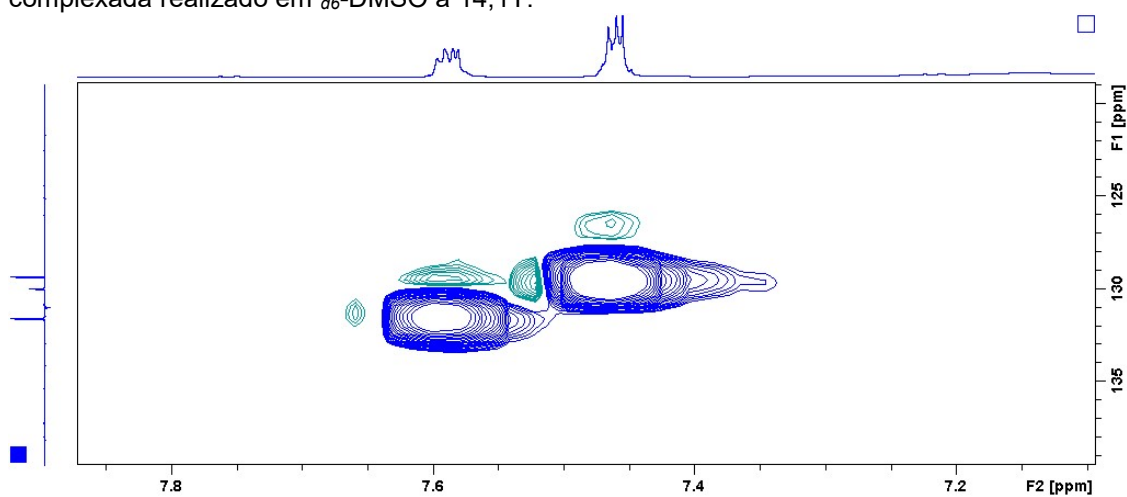


Figura 57. Ampliação do mapa de contorno HSQC para o complexo precursor com cisteína complexada realizado em d_6 -DMSO a 14,1T.

