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

Wladimir Pereira Duarte Badaró

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

ARARAQUARA
2022

WLADIMIR PEREIRA DUARTE BADARÓ

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

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

Área de concentração: Química Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Tonon de Almeida

ARARAQUARA

2022

B132s

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

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Adelino Vieira de Godoy Netto
Coorientador: Eduardo Tonon de Almeida

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

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

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

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

Prof. Dr. ADELINO VIEIRA DE GODOY NETTO (Participaçao Virtual)
Departamento de Quimica Analitica, Fisico-Quimica e Inorganica / Instituto de Quimica - UNESP - Araraquara

Drª. MARIETE BARBOSA MOREIRA (Participaçao Virtual)
Departamento de Química / Universidade Estadual de Maringá - UEM - Maringá

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

Araraquara, 16 de dezembro de 2022

Dados Curriculares

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Wladimir Pereira Duarte Badaró

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

ENDEREÇO PROFISSIONAL

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

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2020-2022: Mestrado em Química

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araraquara.
Dissertação: Síntese, caracterização e atividade biológica de ciclopaladados contendo o metil-éster da L-fenilalanina
Orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Tonon de Almeida
Bolsa: CNPq

2015-2020: Bacharel em Química

Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)
Trabalho de Conclusão de Curso: Síntese e caracterização de um novo complexo derivado do acetato de paládio(II), 4-aminoacetofenona e 4-dimetilaminobenzaldeído
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Tonon de Almeida
Coorientador: Prof. Dr. Luís Eduardo Sarto

2012-2015: Técnico em Química

Colégio Universitário Padre de Man
Trabalho de Conclusão de Curso: Análise Qualitativa da Água do Ribeirão Ipanema
Orientador: Prof. Glayton Andrade de Souza

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados:

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

Trabalhos completos publicados em anais de congressos:

1. BADARÓ, WLADIMIR PEREIRA DUARTE; SARTO, LUIS EDUARDO; de ALMEIDA, EDUARDO TONON. Estruturas cristalina de complexos de paládio(II) com Bases de Schiff derivadas do salicilaldeído e N,N-dialquil-p-fenilenodiaminas. 43º REUNIÃO ANUAL VIRTUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2020. (Apresentação de Trabalho/Sessão coordenada).

2. BADARÓ, WLADIMIR PEREIRA DUARTE; SARTO, LUÍS EDUARDO; de ALMEIDA, EDUARDO TONON. Complexo de paládio(II) derivado do acetato de paládio, pdimetilaminobenzaldeído e N,N-dietil-p-fenilenodiamina. 42º REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

3. BADARÓ, WLADIMIR PEREIRA DUARTE; GARCIA, ANA CAROLINE FERREIRA; SARTO, LUÍS EDUARDO; de ALMEIDA, EDUARDO TONON. Síntese e caracterização de um novo complexo derivado do acetato de paládio(II), 4-aminoacetofenona e 4-dimetilaminobenzaldeído. **XXXIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química**, 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

4. GARCIA, ANA CAROLINE FERREIRA; BADARÓ, WLADIMIR PEREIRA DUARTE; SARTO, LUÍS EDUARDO; DE ALMEIDA, EDUARDO TONON. Síntese de nova base de Schiff a partir do cuminaldeído e da 4-aminoacetofenona. **XXXIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química**, 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

5. BADARÓ, WLADIMIR PEREIRA DUARTE; SARTO, LUÍS EDUARDO; GOIS, ELBA PEREIRA; de ALMEIDA, EDUARDO TONON. Complexos de paládio(II) com Bases de Schiff derivadas do salicilaldeído e *N,N*-dialquil-*p*-fenilenodiaminas. **XXXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química**, 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

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

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

INICIAÇÃO CIENTÍFICA

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

OUTROS:

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

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

À Deus.

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

Obrigado a todos!!!!

EPÍGRAFE

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

Legião Urbana

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número estimado de casos incidentes e mortes em todo o mundo em 2020. 23

Figura 2: Microscopia eletrônica da *Escherichia coli*: a) Estrutura normal b) Estrutura em filamentos devido a presença do agente desconhecido. 27

Figura 3: Teste *in vivo* da cisplatina em camundongos com sarcoma 180. 28

Figura 4: Estrutura da cisplatina. 29

Figura 5: Mecanismo de atuação da cisplatina no organismo. 30

Figura 6: Estrutura da carboplatina. 31

Figura 7: Estrutura da oxaliplatina. 32

Figura 8: Estrutura de outros quimioterápicos a base de platina. 33

Figura 9: Estrutura do Padeliporfin. 34

Figura 10: Mecanismo associativo para troca de ligantes do Pd(II). 36

Figura 11: Reação de aquação na presença de um ligante volumoso. 37

Figura 12: Reação hipotética envolvendo a hidrólise de um complexo contendo o ligante. 38

Figura 13: Representação do ciclopaladado. 40

Figura 14: Estrutura dos ciclopaladados de Caires et al. (1999) e IC_{50}. 41

Figura 15: Estrutura do $[Pd_2(S(-)\text{-}C2,N\text{-}dmpa)2(\mu\text{-}dppe)Cl_2]$. 42

Figura 16: Estrutura do ciclopaladado $[Pd_2(C^2,N\text{-}S_{(-)}dmpa)_2(\mu\text{-}dppf)Cl_2]$. 43

Figura 17: Estrutura do ciclopaladado $[Pd(C^2,N\text{-}S_{(-)}dmpa)_2(\mu\text{-}dppf)]$. 44

Figura 18: Substituição das benzilaminas por aminoácidos aromáticos (AA) para a formação de ciclopaladado.....45

Figura 19: Substituição do cloridrato pelo triflato.....46

Figura 20: Substituição das difosfinas exobidentada pela 2,6-lutidina. 48

Figura 21: Estrutura dos compostos [Pd(*C²,N*-dmba)(X)(luti)].....48

Figura 22: Estrutura dos complexos [Pd(X)(*C²,N*-dmpa) lut)].....49

Figura 23: Proposta de substituição das benzilaminas pelo éster metílico da L-fenilalanina. 51

Figura 24: Reação de neutralização do cloridrato. 55

Figura 25: Síntese do ligante L-Fame-OTf. 55

Figura 26: Formação do precursor C1. 56

Figura 27: Síntese do dímero C1-Br.....57

Figura 28: Reação do C1-Br-Lut. 57

Figura 29: Equipamento de análise elementar CHN. 58

Figura 30: Espectrômetro FTIR Nicolet™ iS™ 5.....59

Figura 31: Espectrômetros de RMN 600 e 300 MHz.....59

Figura 32: Espectrômetro de massas Amazon Speed ETD – Bruker.....61

Figura 33: Espectrômetro FTIR Nicolet™ iS™ 5.....61

Figura 34- Equipamento de Dicroísmo Circular.....62

Figura 35: Fluxograma das sínteses. 67

Figura 36- Fluxograma de otimizações da síntese. 69

Figura 37- Espectro de RMN de ^{1}H do Ligante L1 e AA-HCl. 71

Figura 38- Espectro de RMN de ^{1}H do ligante L1 em DMSO-d_6. 72

Figura 39- Espectro na região do infravermelho (IR) do L1. 74

Figura 40: Espectro de RMN de ^{1}H do ligante L1 em DMSO-d_6. 75

Figura 41: Espectro de IV do complexo dímero C1-Br. 76

Figura 42: Espectro de RMN de ^{1}H do ligante C1-Br em $CDCl_3$. 78

Figura 43: Espectro de IV do complexo C1-Br-Lut. 80

Figura 44: Espectro de RMN de ^{1}H do C1-Br-Lut em acetona-d_6. 82

Figura 45: Espectro de massas do C1-Br-Lut em acetona. 82

Figura 46: Estudo comportamento em solução de acetona-d_6 no RMN de ^{1}H do C1-Br-Lut. 84

Figura 47: Estudo comportamento em solução de 80% acetona-d, 10% D2O e 10% (v/v) de tampão fosfato no RMN de ^{1}H do C1-Br-Lut. 85

Figura 48: Estudo comportamento em solução de 80% acetona-d, 10% D2O, 10% (v/v) de tampão fosfato e 100 mM de Cloreto no RMN de ^{1}H do C1-Br-Lut. 86

Figura 49: Estudo de comportamento em DMSO-d_6 no RMN de ^{1}H do C1-Br-Lut. .87

Figura 50: RMN ^{1}H em DMSO-d_6 do C1-Lut-Y. 89

Figura 51: Espectro de massas do C1-Br-Lut e C1-Lut-X em DMSO. 89

Figura 52: Estudo comportamento em solução de 80 % DMSO-d_6, 10% D2O, 10% (v/v) de tampão fosfato e 100 mM cloreto do C1-Br-Lut-X. 91

Figura 53: Formas do DNA.....94

Figura 54: Ligações covalentes coordenadas da Cisplatina com o DNA. 96

Figura 55: Interações não covalentes com o DNA. 97

Figura 56: Titulação espectrofotométrica do DNA e determinação da constante de ligação Kb.....99

Figura 57: Espectro de CD do ctDNA livre e com a presença do complexo C1-Br-Lut pela razão molar.....101

Figura 58: a) Estrutura do Hoescht 33258. b) Interação DNA-H33258. 102

Figura 59: Espectro de supressão da fluorescência do Hoechst 33258 – ctDNA com ausência e presença do supressor C1-Br-Lut com a variação da concentração de 0 a 60 µM. 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Incidência e mortalidade de câncer no Brasil. 24

Tabela 2: Reagentes utilizados para sínteses. 53

Tabela 3: Solventes químicos para análises e sínteses. 54

Tabela 4: Condições para os estudos de comportamento em solução. 60

Tabela 5: Deslocamento químicos da RMN de ^{1}H do L1. 74

Tabela 6: Deslocamentos químicos do RMN de ^{1}H do C1-Br. 77

Tabela 7: Resultados da análise elementar do C1-Br-Lut. 79

Tabela 8: Deslocamentos químicos do RMN de ^{1}H do C1-Br-Lut. 80

Tabela 9: Resultados de citotóxicidade para C1-Br-Lut, 2,6-Lutidina e cisplatina em acetona. 92

Tabela 10: Resultados de citotoxicidade para C1-Br-Lut, 2,6-Lutidina e cisplatina em DMSO. 93

Tabela 11: Dados de constante de ligação Kb. 100

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....23

1.1. Cisplatina, o primeiro metalofármaco para tratamento de câncer...26

1.2. Quimioterápicos de platina.....31

1.3. Compostos de Paládio.....33

1.4. Planejamentos de compostos de Paládio(II) bioativos.....35

1.4.1. Compostos ciclopaladados.....39

1.5. Ortometalação de aminoácidos: potencialidade de obtenção de novos compostos bioativos.....45

1.6. Aminas aromáticas ortopaladadas contendo 2,6-lutidina: contribuição recentes do grupo.....47

2. HIPÓTESE DO TRABALHO.....51

3. OBJETIVOS.....52

3.1. Objetivos específicos.....52

4. PARTE EXPERIMENTAL.....53

4.1. Reagentes e solventes.....53

4.2. Síntese dos compostos.....54

4.2.1. Síntese do ligante triflato do metil-éster da L-fenilalanina (L1).....54

4.2.2. Síntese do precursor [Pd(C^2,*N*-L-Fame)($CH_3CN)_2$]OTf (C1).....56

4.2.3. Síntese do dímero [Pd(C^2,*N*-L-Fame)(Br)]$_2$ (C1-Br) 56

4.2.4. Síntese de clivagem [Pd(C^2,*N*-L-Fame)(Br)(2,6-lut)] (C1-Br-lut) 57

4.3. Técnicas de caracterização.....58

4.3.1. Análise elementar 58

4.3.2. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho 58

4.3.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 59

4.3.4. Estudo de comportamento em solução por RMN ^{1}H.....60

4.3.5. Espectrometria de massas.....60

4.3.6. Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível.....61

4.3.7. Espectropolarímetro de Dicroísmo Circular 62

4.4. Ensaio de viabilidade celular.....62

4.5. Interação com biomolécula ctDNA 64

4.5.1. Preparo de soluções para ensaios com biomolécula.....64

4.5.1.1. Tampão Tris-HCl 5 mM + 50 mM de NaCl.....64

4.5.1.2. Solução de ctDNA (*Calf thymus*) 64

4.5.1.3. Solução do corante Hoechst 33258 (1 mM).....65

4.5.2. Ensaios com a biomolécula ctDNA 65

4.5.2.1. Titulação espectrofotométrica do DNA por UV-Vis 65

4.5.2.2. Ensaio de interação com DNA via dicroísmo circular.....66

4.5.2.3. Ensaio de competição pelo DNA com Hoechst 33258 66

5. Resultados e discussão 67

5.1. Otimização das sínteses 68

5.2. Caracterização 73

5.2.1. Ligante L-Fame-OTF (L1) 73

5.2.2. Complexo [Pd(C^2,*N*-L-Fame)(Br)]2 (C1-Br): 76

5.2.3. Complexo [Pd(C^2,*N*-L-Fame)(Br)(2,6-lut)] (C1-Br-Lut): 79

5.2.3.1. Análise elementar 79

5.2.3.2. Espectroscopia no Infravermelho (IV) do C1-Br-Lut 79

5.2.3.3. Espectroscopia RMN ^{1}H em acetona-d_6 80

5.2.3.4. Estudo do comportamento do C1-Br-Lut em solução 83

5.2.3.4.1. Estudo de comportamento em solução: acetona 84

5.2.3.4.2. Estudo de comportamento em solução: dimetilsulfóxido 87

5.3. Atividade Antiproliferativa 92

5.4. Ensaios de interações com ctDNA 94

5.4.1. Titulação espectrofotométrica do DNA por UV-Vis 98

5.4.2. Ensaio de interação com DNA via dicroísmo circular 100

5.4.3. Ensaio de competição pelo ctDNA com Hoechst 33258 102

6. Conclusão 104

1. INTRODUÇÃO

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

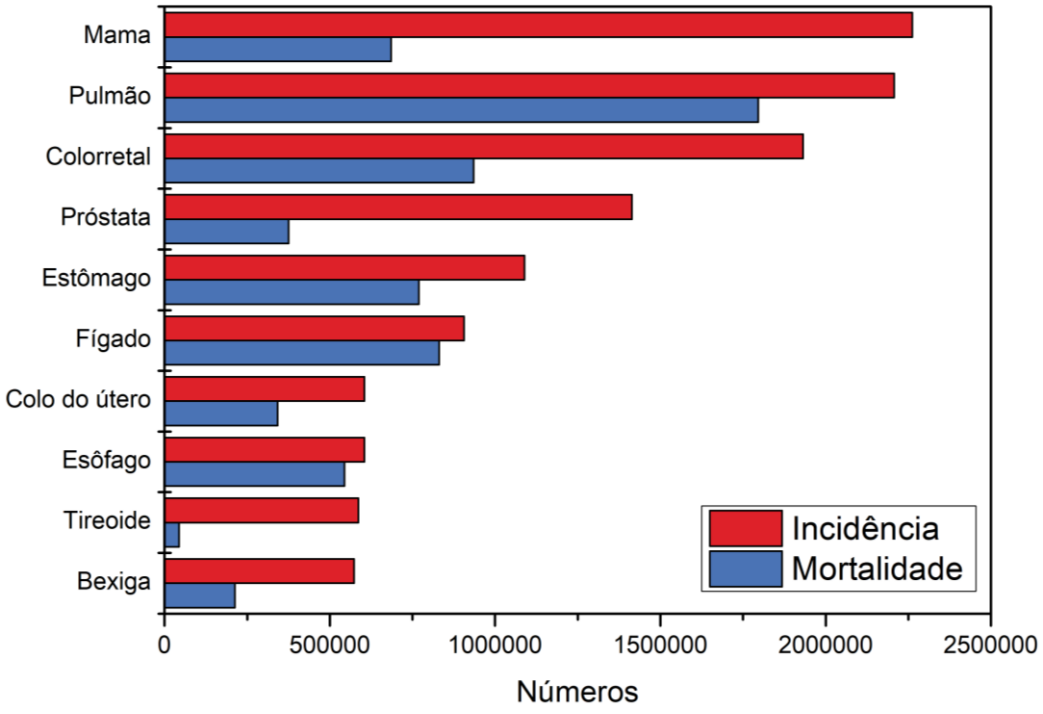


Figura 1: Número estimado de casos incidentes e mortes em todo o mundo em 2020.

Fonte: Adaptado da IARC-OMS, 2022.

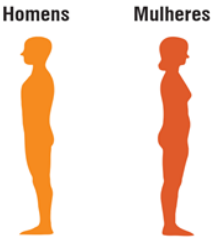
As maiores incidências de novos casos no mundo estão relacionadas com os cânceres de mama e pulmão, correspondendo a cerca de 11,7% e 11,4% dos casos totais. Porém, as maiores estimativas relacionadas com os números de mortes são

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

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

Tabela 1: Incidência e mortalidade de câncer no Brasil.

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



*2020 **2019

Fonte: Adaptado de Instituto Nacional de Câncer, 2021.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.1. Cisplatina, o primeiro metalofármaco para tratamento de câncer

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

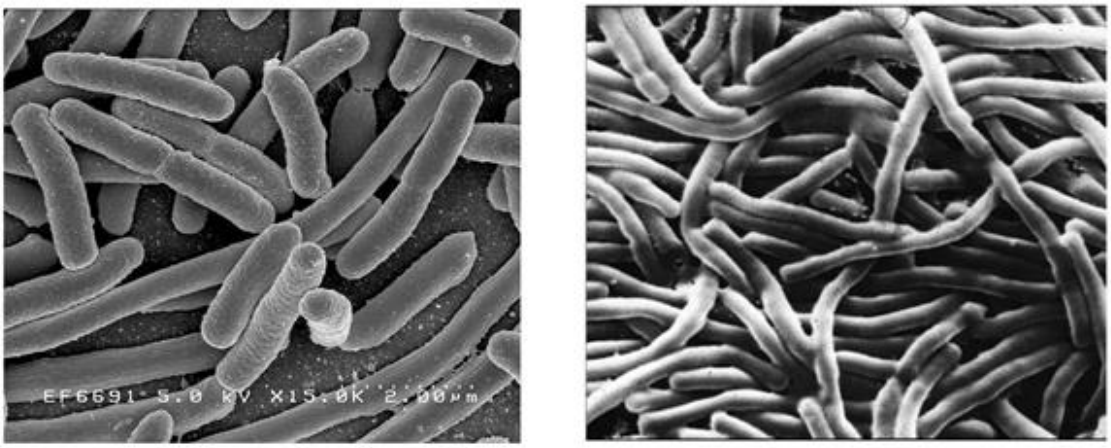


Figura 2: Microscopia eletrônica da *Escherichia coli*: a) Estrutura normal b) Estrutura em filamentos devido a presença do agente desconhecido.

Fonte; Adaptado de Hoeschele, (2014).

Rosenberg e sua equipe avaliaram sistematicamente todas as variáveis do sistema que poderia ser o possível agente inibidor da divisão celular. Eventualmente, foi levantada a hipótese de que o hexacloroplatinato de amônio ($(NH_4)_2PtCl_6$) produzido pela eletrólise, dos eletrodos de platina, durante o experimento, poderia ser o agente inibidor. Desta forma, utilizaram-se uma solução de $(NH_4)_2PtCl_6$ para realizar os experimentos *in vitro*, com o objetivo de replicar os efeitos de inibição observados, durante a submissão em um campo elétrico. Entretanto, quando submetidos ao meio de cultura, essa espécie sofreu uma alteração fotoquímica, equação 1.

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

$$(NH_4)_2(PtCl_6) \xrightarrow{h\nu} [Pt(NH_3)_2Cl_4] + 2HCl$$

Fonte: Do Autor.

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

Ao avaliarem a atividade citotóxica do cis-[$Pt(NH_3)_2Cl_4$] e o seu precursor cis-[$Pt(NH_3)_2Cl_2$], constataram, que ambas as espécie foram capaz de inibir a divisão celular *in vitro*. Entretanto, o cis-[$Pt(NH_3)_2Cl_2$] demostrou atividade inibitória muito superior. A partir dessa premissa, Rosenberg resolveu aplicar a hipótese de que se esse agente era capaz de inibir a divisão celular em bactérias, porque não testa-la na inibição da divisão celular de células cancerígenas, sendo posteriormente testado *in vivo* para avaliar a possível atividade antitumoral da cisplatina (Corinti et al., 2016; Hoeschele, 2014).

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



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

Fonte: Adaptado de Rosenberg et al., 1970.

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

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

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

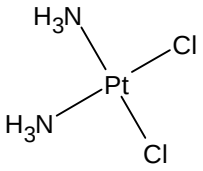


Figura 4: Estrutura da cisplatina.

Fonte: Do Autor.

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

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

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

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

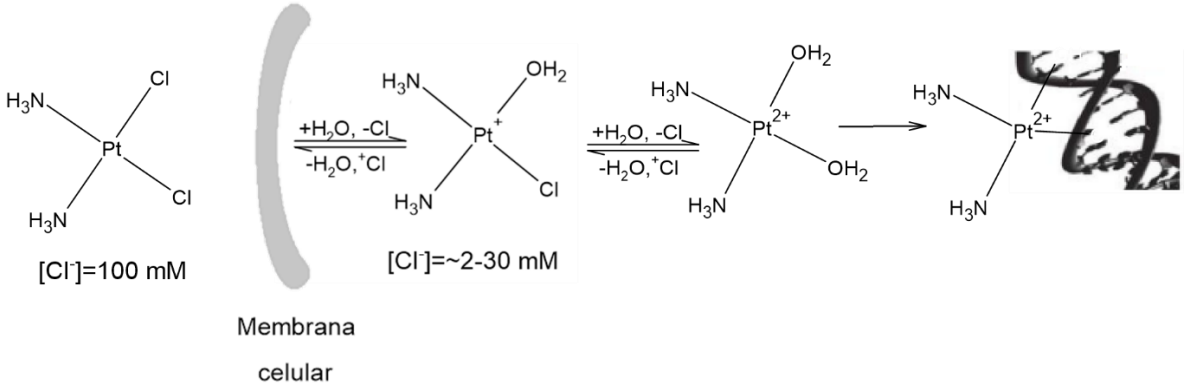


Figura 5: Mecanismo de atuação da cisplatina no organismo.

Fonte: Do Autor.

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

1.2. Quimioterápicos de platina

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

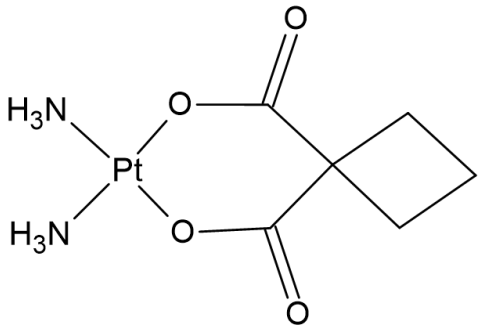


Figura 6: Estrutura da carboplatina.

Fonte: Do Autor.

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

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

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

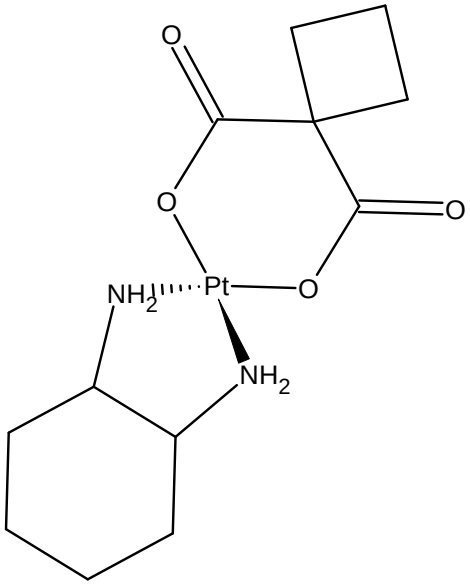
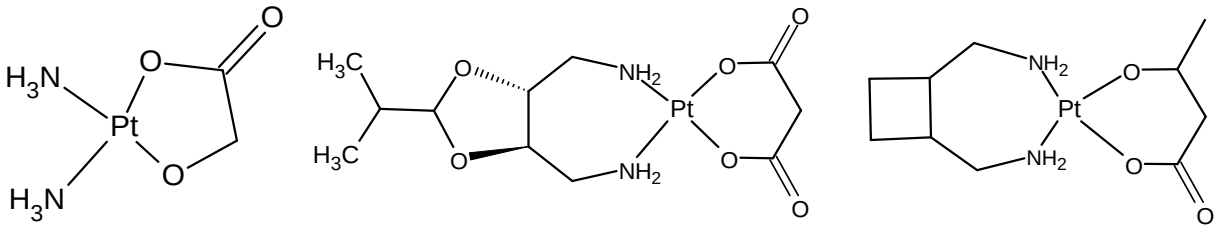


Figura 7: Estrutura da oxaliplatina.

Fonte: Do Autor.

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

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



Nedaplatina Heptaplatina Lobaplatina

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

Fonte: Do Autor

1.3. Compostos de Paládio

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

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

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

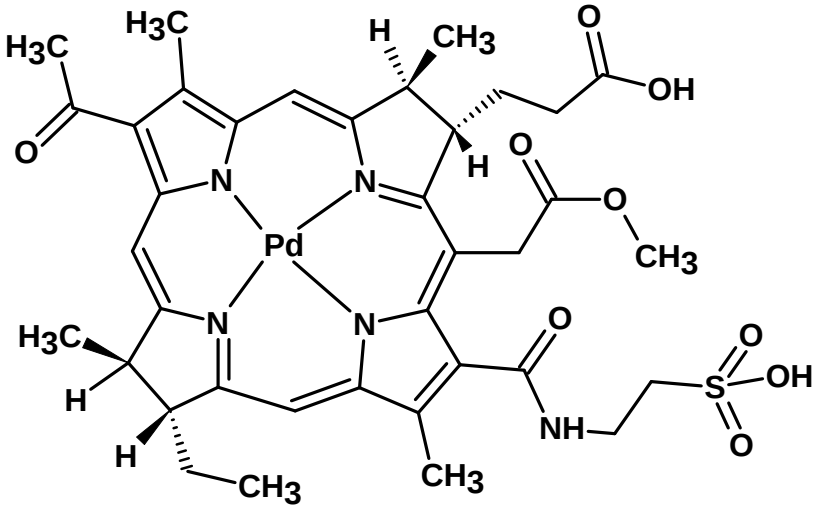


Figura 9: Estrutura do Padeliporfin.

Fonte: Do Autor.

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

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

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

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

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

1.4. Planejamentos de compostos de Paládio(II) bioativos

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

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

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

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

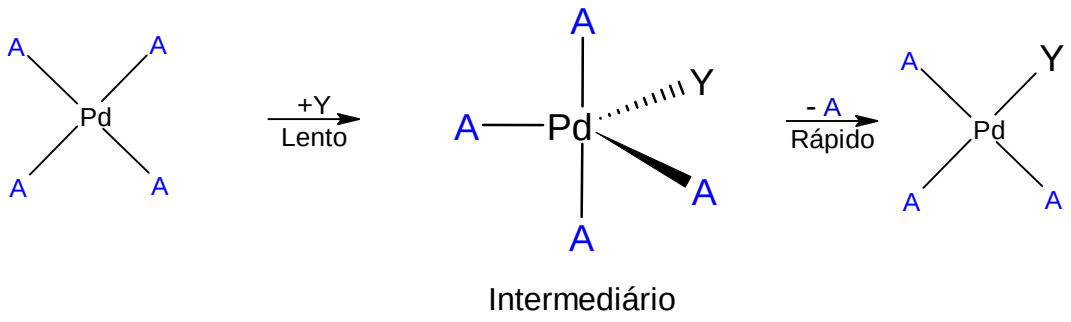


Figura 10: Mecanismo associativo para troca de ligantes do Pd(II).

Fonte: Do Autor.

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

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

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

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

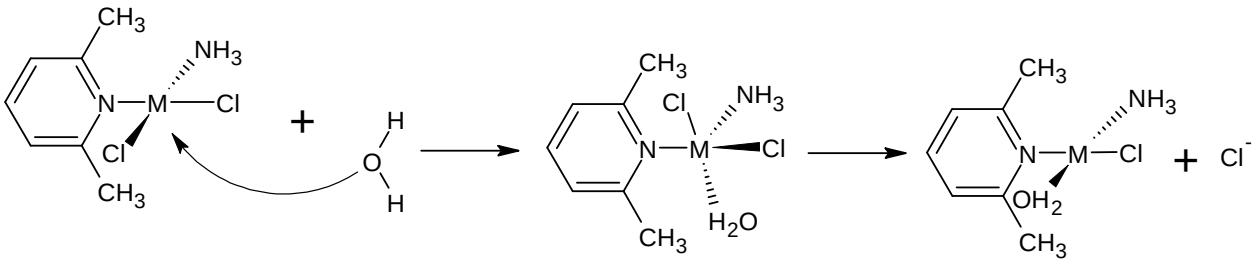


Figura 11: Reação de aquação na presença de um ligante volumoso.

Fonte: Do Autor.

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

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

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

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

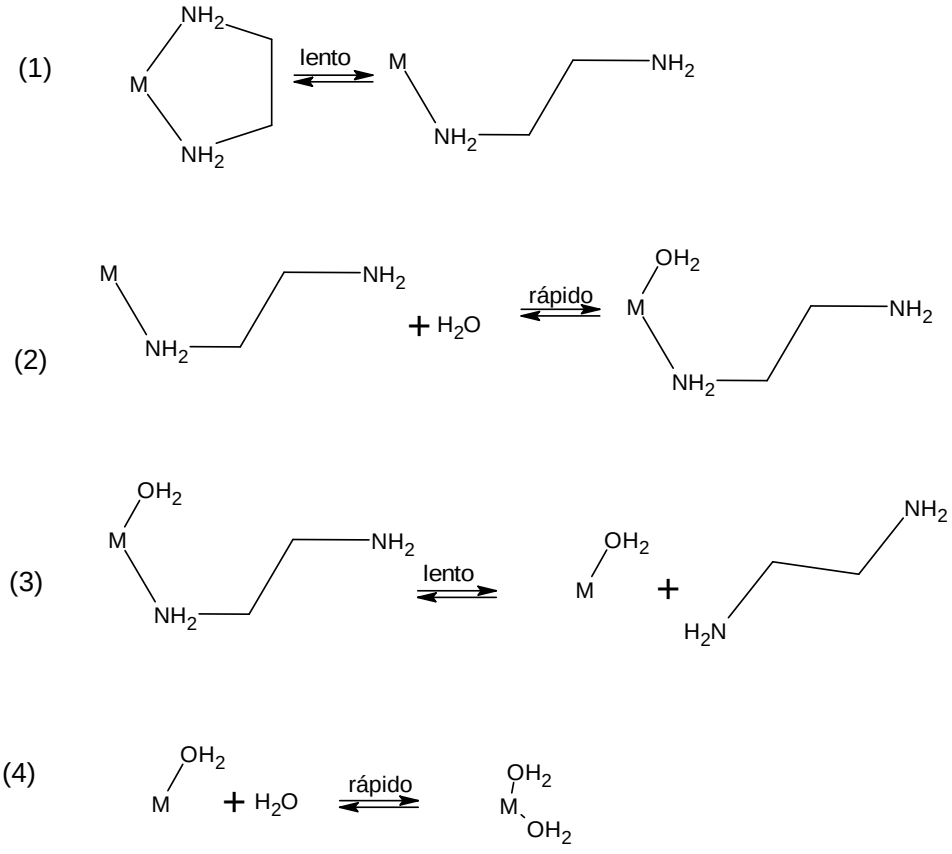


Figura 12: Reação hipotética envolvendo a hidrólise de um complexo contendo o ligante.

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

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

para a amina, pois o ligante deve se dobrar e girar para afastar o grupo NH_2 livre do metal.

A segunda etapa de dissociação (3) também deve ser lenta por dois motivos: a concentração desse intermediário é baixa e a primeira etapa de dissociação pode ocorrer facilmente no sentido inverso. O nitrogênio descoordenado é mantido próximo ao metal pelo resto do ligante, fazendo com que a sua religação seja muito provável. No geral, o efeito quelato cinético reduz as velocidades de reações de aquação por fatores de 20 a 10^5 (Miessler et al., 2014).

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

1.4.1. Compostos ciclopaladados

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

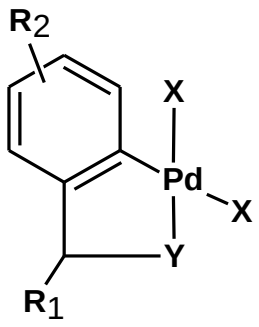


Figura 13: Representação do ciclopaladado.

Fonte: Do Autor.

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

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

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

caracterizados, estão representadas na figura 14, onde também são apresentadas as concentrações inibitórias (IC_{50}) dos complexos frente as linhagens de células proposta para a realização do estudo.

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

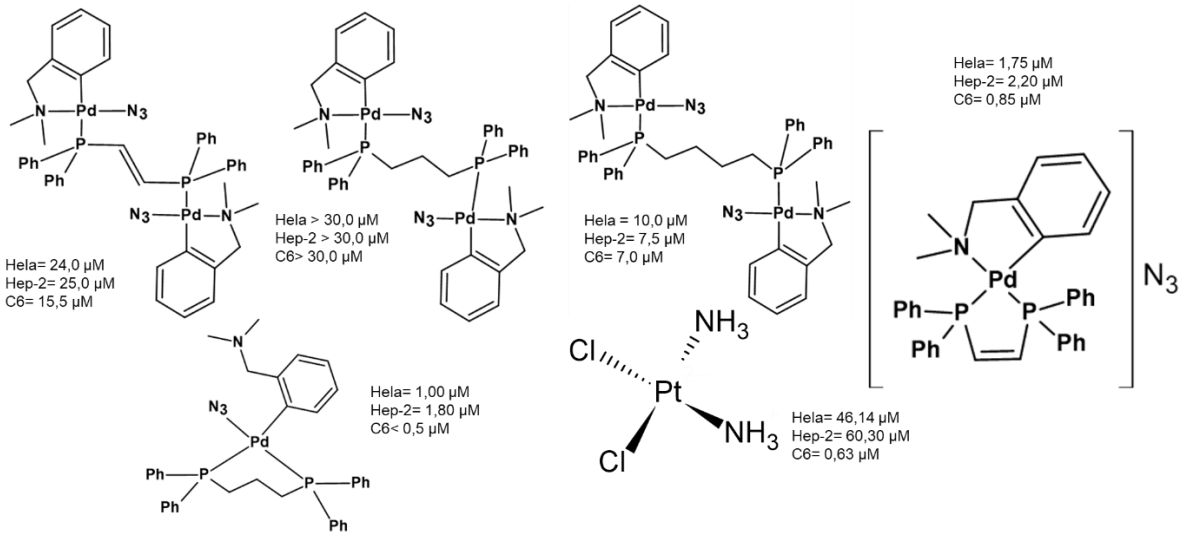


Figura 14: Estrutura dos ciclopaladados de Caires et al. (1999) e IC_{50}.

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

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

Desde então, os avanços importantes no entendimento do mecanismo de ação de ciclopaladados contendo ligantes volumosos contra vários tipos de células tumorais foram alcançadas mediante a inúmeros estudos. Por exemplo, RODRIGUES et al. (2003), mostraram que o complexo $[Pd_2(S(-)\text{-}C^2,N\text{-dmpa})_2(\mu\text{-dppe})Cl_2]$ {dmpa = N,N-dimetil-1-feniletilamina; dppe = 1,2-etanobis(difenilfosfina)} induziu a morte de 100% das células de melanoma murino (B16F10-Nex2) a uma concentração inferior a 1,25

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

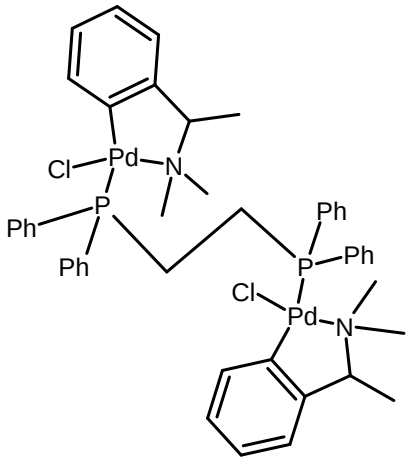


Figura 15: Estrutura do [Pd_2($S_{(-)}$-C^2,N-dmpa)$_2$(μ-dppe)Cl_2].

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

Por apresentar atividade *in vivo*, Rodrigues e seus colaboradores determinaram o efeito do complexo [Pd_2($S_{(-)}$-C^2,N-dmpa)$_2$(μ-dppe)Cl_2] sobre a linhagem celular tumoral do melanoma murino. A partir do DNA extraído das células em suspensão, observou-se um padrão claro de degradação na estrutura da dupla fita, mas não aumentam os níveis de caspases 1 e 3, sugerindo a indução de apoptose independente de caspase. No entanto, o enantiôemero S afeta muito ativamente o metabolismo respiratório da célula, causando um colapso no gradiente de prótons mitocondrial, provocando uma queda abrupta na acidificação extracelular (Rodrigues et al., 2003).

MORAES *et al.* (2013) demonstraram que o ciclopaladado [Pd_2($R_{(+)}$-C^2,N-dmpa)$_2$(μ-dppe)Cl_2], enantiômero R da figura 15, foi capaz de promover a morte das células K562 a uma concentração inferior a 1,50 μmol.L^{-1} (células de leucemia humana), sem apresentar toxicidade para células sanguíneas. Ensaios posteriores evidenciaram que a atividade citotóxica *in vitro* desse ciclopaladado está associada à oxidação de grupos tióis de proteínas embebidas na membrana mitocondrial. A

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

Bincoletto *et al.* (2005) descreveram que ciclopaladado binuclear difosfínico, $[Pd_2(C^2,N\text{-}S_{(-)}dmpa)_2(\mu\text{-}dppf)Cl_2]$, derivado da *N,N*-dimetil-1-feniletilamina (dmpa) e 1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno (dppf), figura16. Esse composto foi capaz de inibir a cetepsina B de forma reversível. Os resultados indicaram que o ciclopadado, figura 16, liga-se à catepsina livre B, com constante de dissociação K_H= (12 ± 1) μM e ao sistema enzima/substrato com αK_H= (2,4 ± 0,3) μM. A aplicação deste complexo, em ratos com tumor de Walker, resultou em 90% de inibição do crescimento do tumor. Após doze dias da inoculação, as células tumorais produziram tumores sólidos com uma massa de 4,0 g, no entanto, quando os animais foram tratados com uma dose de 2,0 $mg.kg^{-1}$, a massa tumoral foi reduzida para 0,3 g. Contudo, os estudos toxicológicos mostraram que não houve alterações morfológicas aos glóbulos vermelhos e brancos, foram obtidos resultados semelhantes com os tecidos hepático, renais e do baço murino (Bincoletto et al., 2005).

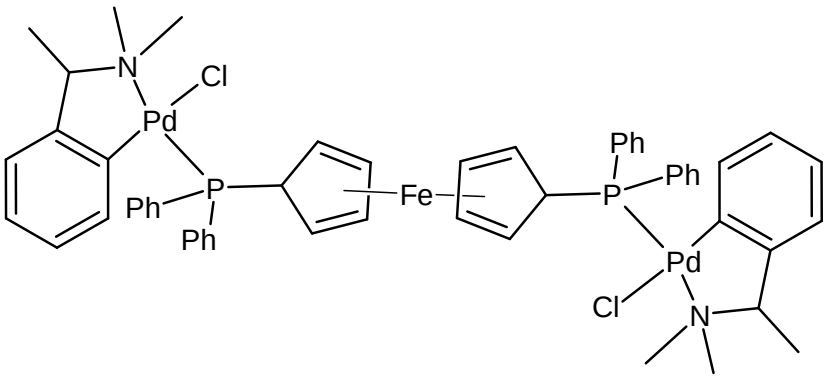


Figura 16: Estrutura do ciclopaladado $[Pd_2(C^2,N\text{-}S_{(-)}dmpa)_2(\mu\text{-}dppf)Cl_2]$.

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

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

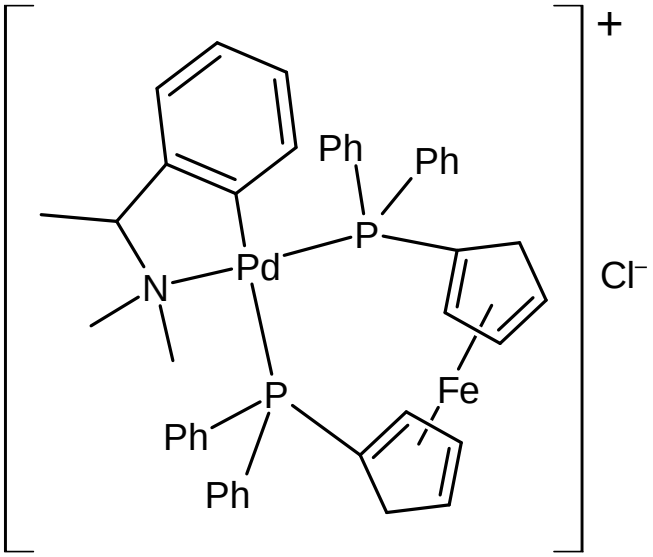


Figura 17: Estrutura do ciclopaladado [Pd(C^2,N-$S_{(-)}$dmpa)$_2$(μ-dppf)].

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

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

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

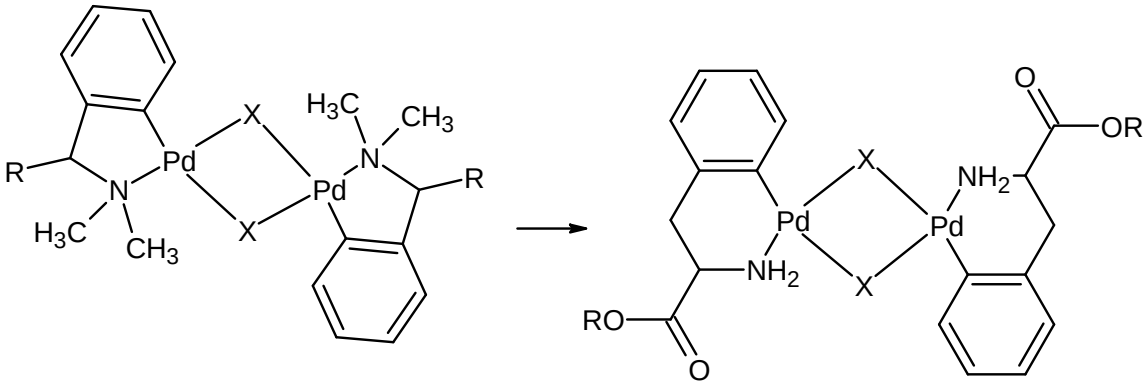


Figura 18: Substituição das benzilaminas por aminoácidos aromáticos (AA) para a formação de ciclopaladado.

Fonte: Do Autor

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

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

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

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

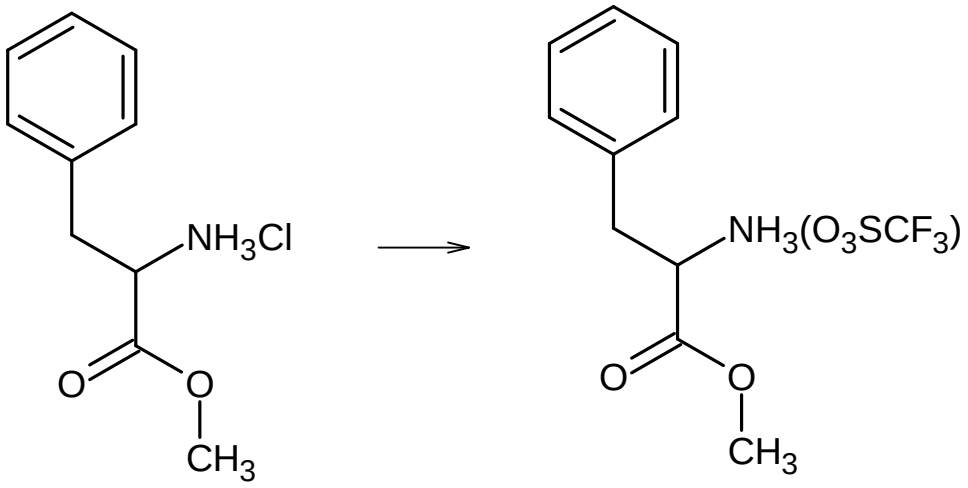


Figura 19: Substituição do cloridrato pelo triflato.

Fonte: Do Autor.

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

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

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

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

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

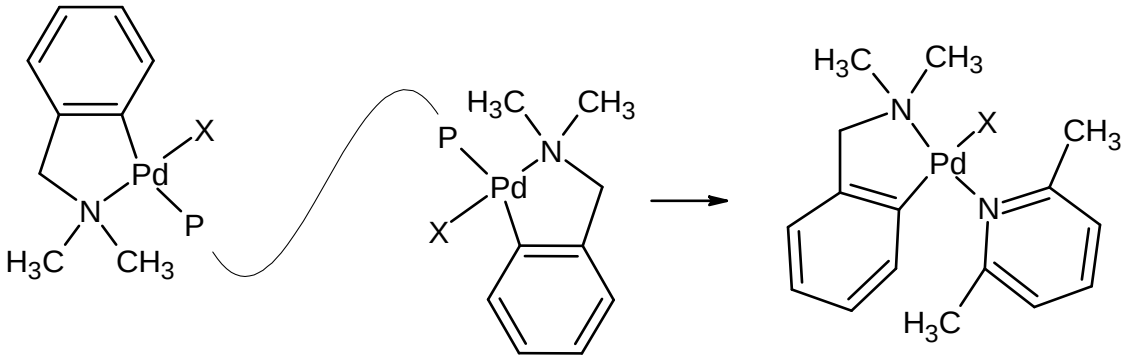


Figura 20: Substituição das difosfinas exobidentada pela 2,6-lutidina.

Fonte: Do Autor.

O trabalho de Cunha *et al.* (2020) teve como objetivo sintetiza e caracterizar estruturalmente composto ciclopaladado de fórmula [Pd(*C²,N*-dmba)(X)(luti)] à partir da reação de clivagem entre os dímeros [Pd(*C²,N*-dmba)(X)]$_2$, (X=Cl, I, N_3 e NCO) e a 2,6-lutidina, figura 21.

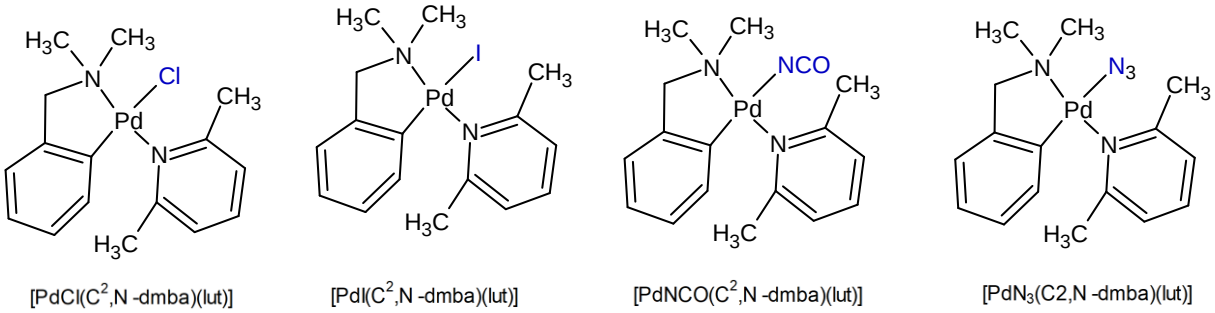


Figura 21: Estrutura dos compostos [Pd(*C²,N*-dmba)(X)(luti)].

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

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

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

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

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

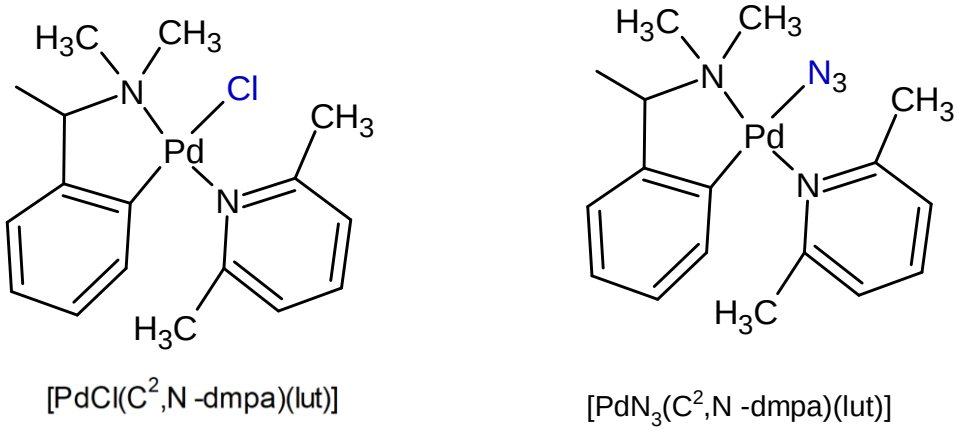


Figura 22: Estrutura dos complexos [Pd(X)(*C*^{2},*N*-dmpa) lut)].

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

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

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

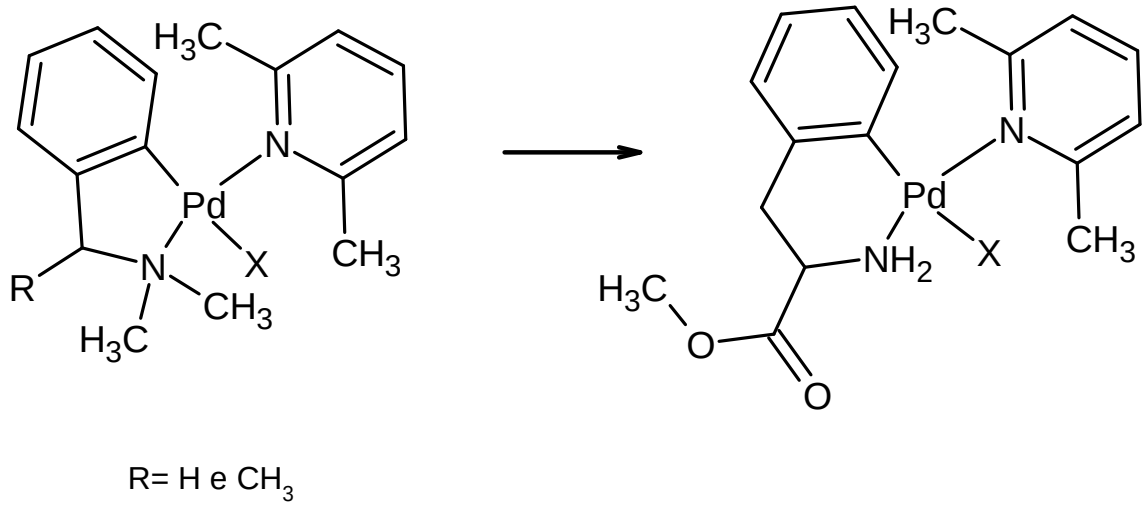
para HT144. A atividade citotóxica dos ciclopaladados nas células LB373MEL mostrou valores semelhantes, estando muito próximo da faixa de IC_{50} encontrada para a cisplatina, quando analisados dentro margem de erro. Para a linhagem U251, o azido-composto apresentou um valor de IC_{50} muito semelhante a cisplatina (Zanetti et al., 2022).

Levando em conta a similaridade dos efeitos antiprofilerativos desses ciclopaladados frente às linhas tumorais, bem como seu comportamento em solução, o complexo [Pd(C^2,N-dmpa)(N_3)(lut)] foi escolhido para investigar sua capacidade de interagir com o ctDNA. Ao realizar o estudo de interação do [Pd(C^2,N-dmpa)(N_3)(lut)] com o ctDNA por titulação espectrofotométrica via UV-Vis, com concentrações crescentes da biomolécula, observou-se que não houve nenhum deslocamento batocrômico e hipocromismo das bandas monitoradas, sugerindo o estabelecimento de uma interação fraca com o DNA. Além disso, devido à baixa magnitude observada no hipocromismo, não foi possível determinar a constante de ligação do aduto (Zanetti et al., 2022). O espectro de dicroísmo circular (CD), mostra que a presença do composto de azida, mesmo em concentrações elevadas, não provocou alteração no perfil espectral do ctDNA, sugerindo que o ciclopaladado participa de interações fracas com a biomolécula. Como interações fracas com o DNA ou por sulco menor não causam mudanças espectrais significativas, Zanetti e seus colaboradores realizaram o experimento de competição de fluorescência no ctDNA entre o corante Hoeschst-33258 e o complexo [Pd(C^2,N-dmpa)(N_3)(lut)]. Após adições sucessivas do composto para o DNA-Hoechst 33258, observou-se uma baixa supressão de cerca de 4,6%, indicando que o complexo ciclopaladado foi incapaz de deslocar o Hoechst 33258 ligado ao ct-DNA (Zanetti et al., 2022).

Os estudos de ligação do composto com ctDNA com o [Pd(C^2,N-dmpa)(N_3)(lut)], no entanto, mostraram baixa ou nenhuma afinidade, sugerindo que a citotoxicidade observada contra as linhagens celulares humanas, pode envolver diferentes mecanismos de ação em comparação com a do agente anticâncer cisplatina.

2. HIPÓTESE DO TRABALHO

Baseando nos resultados anteriores envolvendo os complexos do tipo [PdX(dmba)(lut)] e [PdX(dmpa)(lut)], pressupôs que a substituição do anel ortometalado C^2,N-dmba e C^2,N-dmpa por C^2,N-aa (L-fenilalanina), figura 23, pode gerar compostos não somente interessantes do ponto de vista da bioatividade, como também pode ser usado como plataforma para a preparação de novos compostos ciclopaladados contendo cadeias complexas de peptídeos.



R= H e CH_3

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

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

3. OBJETIVOS

Em face do exposto, o presente trabalho teve como objetivo geral obter complexos Pd(II) contendo 2,6-lutidina e o ligante C,N-doador derivado do éster metílico da L-fenilalanina, assim como avaliar o potencial antitumoral do composto por estratégia *in vitro* e estudar a interação com a biomolécula de ctDNA.

3.1. Objetivos específicos

- Sintetizar o ligante triflato do éster metílico da L-fenilalanina (L1);
- Sintetizar o complexo dímero $[Pd(C^2,N\text{-L-Fame})(Br)]_2$ (C1-Br);
- Preparar o complexo monomérico $[Pd(C^2,N\text{-L-Fame})(Br)(2,6\text{-lut})]$ (C1-Br-Lut) oriundo da reação de clivagem entre o C1-Br com a 2,6-lutidina;
- Caracterizar todos os compostos obtidos pelas técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H), infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e análise elementar;
- Avaliar o comportamento do complexo (C1-Br-Lut) em solução por meio da técnica espectroscópicas de RMN ^1H, utilizando o solvente não coordenante (acetona) e solvente coordenante (dimetilsulfóxido);
- Realizar os teste de viabilidade celular do C1-Br-Lut, pelo método colorimétrico MTT frente às linhagens celulares A2780cis (tumoral de ovário com resistência a cisplatina), A549 (tumoral de pulmão), HepG2 (tumoral de fígado), MDA-MB-231 (tumoral de mama triplo-negativo) e MRC5 (não tumoral de pulmão de origem fetal);
- Avaliar a interação do complexo C1-Br-Lut frente a biomacromoléculas DNA através da técnica de dicroísmo circular (DC), pelo método de titulação espectrofotométrica e a competição com o H-33258 por supressão de fluorescência.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes, tabela 2 e 3, utilizados para o desenvolvimento deste trabalho eram padrão analítico (P.A), com um alto grau de pureza e confiabilidade, permitindo a utilização sem purificação prévia.

Tabela 2: Reagentes utilizados para sínteses.

Reagentes Químicos	Fórmula química	TF (°C)	TE (°C)	Procedência
2,6-Lutidina	C_7H_9N	-6,0	144,0	Merck
Acetato de paládio	$[Pd(OAc)_2]_n$	205,0	216,3*	Sigma-Aldrich
Ácido deoxiribonucleíco tipo I	Ct-DNA	-**	-**	Sigma-Aldrich
Ácido trifluorometanossulfônico	CF_3SO_3H	-40,0	162,0	Sigma-Aldrich
Brometo de sódio	NaBr	747,0	1396,0	Riedel-de Haën™
Carbonato de sódio	Na_2CO_3	851,0	1600,0	Carlo Erba
Cloreto de sódio	NaCl	801,0	1465,0	Synth
Ester metílico l-fenilalanina	$C_{10}H_{13}NO_2$ .HCl	158,0	-**	Sigma-Aldrich
Fosfato de potássio monobásico	K_2PO_4	252,6	400,0	Synth
Fosfato de sódio dibásico	Na_2HPO_4	200,0	1340,0	Synth
Sulfato de magnésio	$MgSO_4$	1124,0	S/I**	Riedel-de Haën™
Tris-(Hidroximetil)-Aminometano	$NH_2C(CH_2OH)_3$	167,0	220,0	Sigma-Aldrich

*Temperatura de decomposição ** Sem informação

Fonte: Do Autor.

Tabela 3: Solventes químicos para análises e sínteses.

Solventes Químicos	Fórmula química	TF (°C)	TE (°C)	Procedência
Acetonitrila	C_2H_3N	-45,0	82,0	NEON
Acetona	$(CH_3)_2CO$	-94,0	56,0	NEON
Acetona deuterada	$(CD_3)_2CO$	-93,8	55,5	Sigma-Aldrich
Clorofórmio	$CHCl_3$	-63,5	61,2	NEON
Clorofórmio deuterado	$CDCl_3$	-64,0	60,9	Sigma-Aldrich
Diclorometano	CH_2Cl_2	-96,7	39,6	NEON
Dimetilsulfóxido	$(CH_3)_2SO$	18,5	189,0	Sigma-Aldrich
Dimetilsulfóxido deuterado	$(CD_3)_2SO$	20,2	189,0	Sigma-Aldrich
Éter etílico	$(C_2H_5)_2O$	-116,3	34,6	Synth
Metanol	CH_3OH	-97,6	64,7	Sigma-Aldrich
Óxido de deutério	D_2O	3,8	101,4	Sigma-Aldrich
Pentano	C_5H_{12}	-129,8	36,1	Synth

Fonte: Do Autor.

4.2. Síntese dos compostos

As sínteses do ligante e do complexo dímero foram relatadas no trabalho de Vicente et al. (2011), no qual foi apresentada uma nova metodologia sintética para ciclopaladação de aminas primárias e secundárias a partir de sais triflatos do aminoácido desejado ao invés dos seus respectivos cloridratos. Contudo, foram necessárias realizar algumas otimizações com a finalidade de melhorar os rendimentos e a pureza dos produtos.

4.2.1. Síntese do ligante triflato do metil-éster da L-fenilalanina (L1)

Em um béquer de 250 mL, reagiu-se 1,0000 g (4,64 mmol) de cloridrato de éster metílico de L-Fenilalanina com 0,6000 g (5,66 mmol) carbonato de sódio, figura 24, em excesso, em 30,00 mL água e sob agitação magnética por quinze minutos. Esta reação visa neutralizar o cloridrato, regenerando o grupo NH_2 para reagir com o ácido tríflico. A solução aquosa resultante da neutralização foi colocada em um funil de separação de fases. Adicionou-se 15,00 mL de diclorometano e agitou-se o funil suavemente. Após a agitação, o funil foi deixado em repouso para as fases líquidas

se separarem. Após a separação, a fase mais densa (diclorometano) foi extraída, repetiu-se o processo de lavagem da fase orgânica por mais duas vezes.

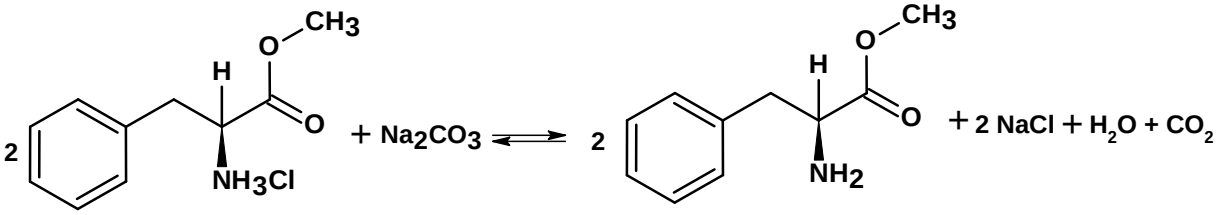


Figura 24: Reação de neutralização do cloridrato.

Fonte: Do autor.

Em seguida, adicionou-se na fase orgânica sulfato de magnésio anidro, com a finalidade de extrair resíduo de água. Realizou-se uma filtração simples, separando a mistura formada após a adição de $MgSO_4$. Posteriormente, a fase orgânica foi concentrada no rotaevaporador, sob baixa pressão, até um volume de 5,00 mL.

A solução concentrada foi transferida para um béquer de 100 mL e, em seguida, adicionou-se lentamente 0,51 mL (5,65 mmol) de ácido tríflico com o auxílio de uma pipeta, sob agitação magnética. Após a adição do ácido, notou-se a formação de um sólido branco, indicando a formação do triflato do metil-éster da *L*-fenilalanina, figura 25. Em seguida, adicionou-se 5,00 mL de CH_2Cl_2 e a suspensão foi mantida sob agitação por 10 minutos. Ao término, a suspensão foi filtrada e o sólido lavado com porções de CH_2Cl_2 e posteriormente seco sob vácuo. O rendimento foi de 83%.

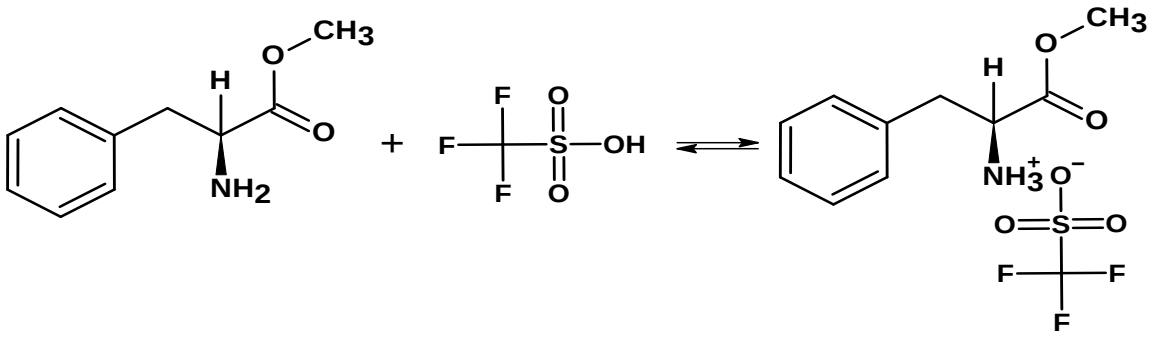


Figura 25: Síntese do ligante L-Fame-OTf.

Fonte: Do autor.

4.2.2. Síntese do precursor [Pd(C^2,*N*-L-Fame)(CH_3CN)$_2$]OTf (C1)

Dissolveu-se em um balão de fundo redondo de 50 mL, adicionou-se 0,1023 g (0,456 mmol) de acetato de paládio(II) em 20,00 mL de acetonitrila (CH_3CN) e, em seguida, adicionou-se lentamente, durante a primeira etapa de aquecimento, o ligante L1 (0,1500 g, 0,456 mmol), figura 25, sob agitação magnética constante e refluxo. O aquecimento foi mantido à 65 ºC nas primeiras 2h de reação e 78ºC durante 4h subsequentes. Ao término da reação, figura 26, a suspensão foi filtrada utilizando-se uma mistura de celite e carbonato de sódio. O filtrado foi rotaevaporado, formando-se um material oleoso/sólido com um odor de ácido acético.

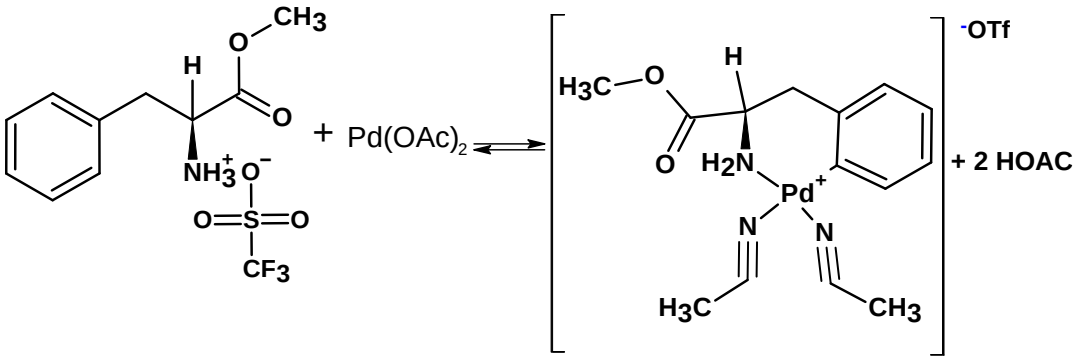


Figura 26: Formação do precursor C1.
Fonte: Do autor.

4.2.3. Síntese do dímero [Pd(C^2,*N*-L-Fame)(Br)]$_2$ (C1-Br)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, o produto da síntese anterior (C1) foi solubilizado em 30,00 mL de acetona e, em seguida, adicionou-se excesso de brometo de sódio (0,2005 g; 2,76 mmol), deixando reagir por 12h sob agitação magnética, figura 27. Ao término da reação, o solvente foi removido no rotaevaporador, gerando um sólido de coloração verde-marrom. Em seguida, adicionou-se diclorometano ao produto e a suspensão de cor alaranjada resultante foi filtrada em um filtro com celite. O filtrado foi concentrado para um volume de 5,00 mL no rotaevaporador. A adição de pentano à solução concentrada resultou na precipitação do composto. O sólido foi isolado por filtração e seco sob vácuo. O rendimento foi de 82%.

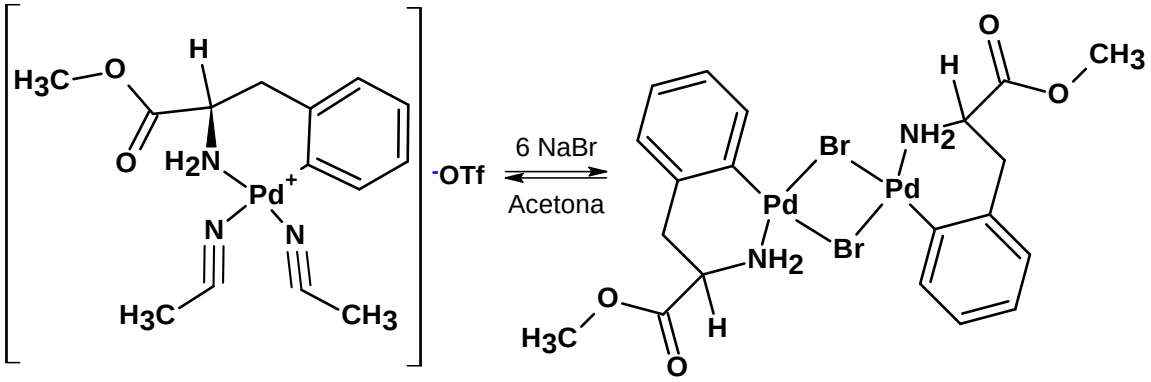


Figura 27: Síntese do dímero C1-Br.

Fonte: Do autor.

4.2.4. Síntese de clivagem [Pd(C^2,*N*-L-Fame)(Br)(2,6-lut)] (C1-Br-lut)

Em um béquer de 10 mL, adicionou-se 8,16 µL (0,0824 mmol) de 2,6-lutidina com uma pipeta em 5,00 mL de acetona. Em um outro béquer de 50 mL, preparou-se uma solução contendo 0,0306 g (0,0412 mmol) de [Pd(C^2,*N*-L-Fame)(Br)]$_2$, em 15,00 mL de acetona. Em seguida, adicionou-se lentamente a solução de 2,6-lutidina sob a solução contendo o dímero. A mistura foi mantida sob agitação magnética durante 2h, figura 28, em temperatura ambiente, resultando em uma solução de coloração amarela. A solução foi concentrada e, após adição de pentano, observou-se a formação de um precipitado. O sólido foi isolado por filtração e seco sob vácuo com rendimento de 90%.

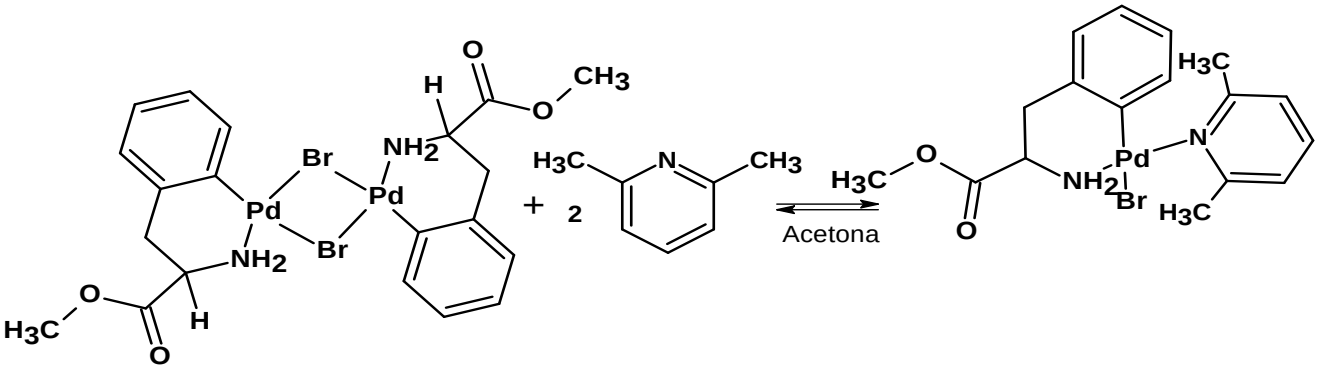


Figura 28: Reação do C1-Br-Lut.

Fonte: Do autor.

4.3. Técnicas de caracterização

4.3.1. Análise elementar

As análises dos teores de carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N) foram realizadas em um analisador Elemental Analyser 2400 CHN da Perkin Elmer series II, figura 29, pertencente à Central Analítica do Instituto de Química da USP, São Paulo (IQ-USP).



Figura 29: Equipamento de análise elementar CHN.

Fonte: Central Analítica IQ-USP, 2022.

4.3.2. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram registrados em um espectrômetro da marca Thermo Scientific Nicolet e modelo IS5, que opera entre 4000 e 400 cm^{-1}, utilizando a técnica de pastilhas de KBr. O equipamento está disponível no laboratório de Organometálicos I, localizado no Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica do Instituto de Química da UNESP, Câmpus Araraquara.



Figura 30: Espectrômetro FTIR Nicolet™ iS™ 5.

Fonte: Thermo Fisher Scientific, 2022.

4.3.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) para os núcleos de ^{1}H, e ^{13}C foram obtidos no espectrômetro BRUKER Avance III HD 600 (14,2 T e 600 MHz para ^{1}H) e BRUKER Fourier 300 (7,1 T e 300 MHz para ^{1}H), figura 31, equipamentos disponíveis na plataforma multiusuário no Instituto de Química da UNESP, Campus de Araraquara. As amostras foram preparadas com cerca de 1 - 3 mg dos compostos solubilizando em solventes deuterados.



Figura 31: Espectrômetros de RMN 600 e 300 MHz.

Fonte: Plataforma Instrumental de RMN UNESP – IQ – Câmpus Araraquara, 2022.

4.3.4. Estudo de comportamento em solução por RMN ^1H

O comportamento dos compostos em solução é de suma importância para podermos compreender os mecanismos de atuação de um potencial agente antitumoral. Deste modo, as análises de RMN são ferramentas de grande importância para tentarmos aumentar nosso conhecimento sobre tal comportamento, já que a técnica nos permite a utilização de soluções que mimetizam, pelo menos em parte, as condições fisiológicas nos quais os testes de viabilidade celular são realizados. As análises de estabilidade em solução foram realizadas monitorando os sinais de ^1H no espectrômetro de RMN BRUKER Fourier 300, pertencente ao Instituto de Química da UNESP, Campus de Araraquara. Os testes de comportamento em solução foram realizados utilizando 2,00 mg (4,24 µmol) do complexo C1-Br-Lut em diferentes condições com medidas em t=0, 24 e 48h, utilizando o volume final igual a 600 µL. Os solventes utilizados foram acetona-d_6, dimetilsulfóxido-d_6, óxido de deutério e tampão fosfato em D_2O com pH=7,4.

Tabela 4: Condições para os estudos de comportamento em solução.

Condições	Acetona-d_6 (µL)	D_2O (µL)	Tampão (µL)	$[Cl^-]$ (mM)
1	600	-	-	-
2	480	60	60	-
3	480	60	60	100
Condições	**Dimetilsulfóxido-d_6 (µL)**	**D_2O (µL)**	**Tampão (µL)**	**$[Cl^-]$ (mM)**
4	600	-	-	-
5	480	60	60	-
6	480	60	60	100

Fonte: Do Autor.

4.3.5. Espectrometria de massas

Os espectros de massas foram determinados pela razão massa/carga (m/z) com o equipamento Amazon Speed ETD, figura 32, pertencente à Central Analítica do Instituto de Química da USP, São Paulo (IQ-USP). O equipamento apresenta fonte de ionização por electrospray com o analisador do modo íon trap operando em modo positivo.

Para realizar as análises foram utilizados cerca de 1,00 mg das amostras previamente solubilizadas em dimetilsulfóxido ou acetona, posteriormente, diluídas em metanol para injeção por infusão direta. As condições utilizadas foram Nebulizer: 12 Psi, Dry gas: 4 $L.min^{-1}$, Capilary: 4500V e Dry temp: 280 °C.



Figura 32: Espectrômetro de massas Amazon Speed ETD – Bruker.
Fonte: Central Analítica IQ-USP, 2022.

4.3.6. Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

Os espectros de absorção na região do Ultravioleta – Visível foram registrados no espectrômetro THERMO Cientific – Modelo Evolution Array UV-Visible, pertencente ao laboratório de Organometálicos I, no Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica – IQAr/UNESP. Utilizou-se uma cubeta de quartzo com um caminho óptico de 1 cm. A faixa espectral utilizada foi de 200 – 1000nm, com uma resolução de 1 nm.



Figura 33: Espectrômetro FTIR Nicolet™ iS™ 5.
Fonte: Thermo Fisher Scientific, 2022.

4.3.7. Espectropolarímetro de Dicroísmo Circular

O equipamento utilizado para as análises de dicroísmo circular foi o Espectrômetro de Dicroísmo Circular da marca Jasco e modelo J-815, pertencente ao Laboratório Multiusuários I de Análise Químicas do IQAr/UNESP, figura 34. As leituras foram realizadas no intervalo de 190 a 900 nm, realizadas por leituras de varreduras de comprimento de onda com temperatura fixa e comprimentos de ondas em função do tempo.

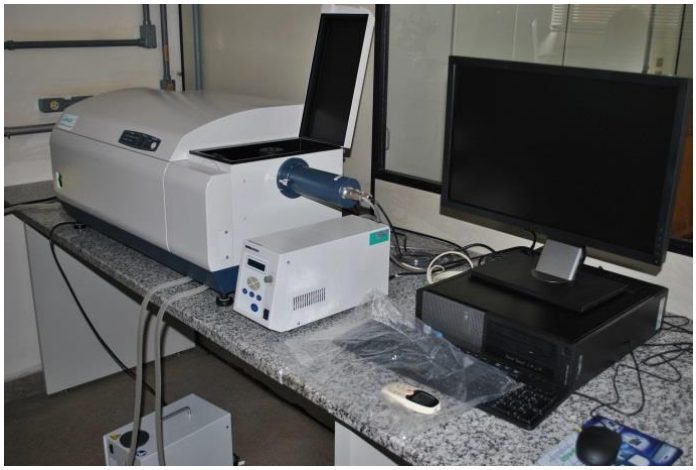


Figura 34- Equipamento de Dicroísmo Circular.

Fonte: Laboratório Multiusuário de Análises Químicas UNESP – IQ – Câmpus Araraquara, 2022.

4.4. Ensaio de viabilidade celular

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Composto de Coordenação na Química Medicinal no Departamento de Química da UFSCar pelo doutorando Mauro Almeida Lima e Dra. Gabriela Porto de Oliveira sob supervisão do Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha.

As linhagens celulares que foram utilizadas: A2780cis (tumoral de ovário com resistência a cisplatina), MRC5 (não tumoral de pulmão de origem fetal), DU-145 (tumoral de próstata) e PNT2 (não tumoral de próstata). Para essas linhagens, as soluções-mães dos compostos C1-Br-Lut e 2,6-lutidina foram obtidas em acetona.

Em modo comparativo, os ensaios de citotoxicidade também foram realizados com o complexo C1-Br-Lut e 2,6-lutidina solubilizado em dimetilsulfóxido, utilizando as seguintes linhagens: A2780cis (tumoral de ovário com resistência a cisplatina), A549 (tumoral de pulmão), HepG2 (tumoral de fígado), MDA-MB-231 (tumoral de mama triplo-negativo) e MRC5 (não tumoral de pulmão de origem fetal).

A linguagem celular A2780cis foi cultivada em meio RPMI-1640 e as demais linhagens em meio DMEM, ambos meios de cultura foram suplementados com 10% (v/v) de FBS (soro fetal bovino). O cultivo foi realizado dentro de garrafas de plástico armazenadas em estufa a 37ºC com atmosfera de 5% de CO_2.

A contagem das células foi realizada utilizando o contador automático TC20 (Bio Rad) com auxílio do corante Azul de Tripano. Após a contagem da suspenção, foram adicionadas às placas de 96 poços alíquotas com 150 µL contendo $1,5x10^4$ células mL^{-1}. As placas foram mantidas por 24 h na estufa e em seguida foi adicionado a cada poço 0,75 µL de uma solução de dimetilsulfóxido e acetona contendo os compostos de interesse. As concentrações finais dos compostos nos poços foram de $1,00x10^{-1}$; $2,00x10^{-1}$; $3,90x10^{-1}$; $8,00x10^{-1}$; 1,58; 3,16; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 $\mu mol.L^{-1}$; ajustadas de acordo a toxicidade do composto. Em seguida, as placas foram incubadas novamente na estufa por mais 48 h com atmosfera de 5% de CO_2.

Após a incubação das microplacas foi adicionado a cada poço 50 µL de uma solução de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolio), com concentração de 1 $mg.mL^{-1}$, e incubada novamente na estufa por 4h. Por fim, retirou-se a solução de cada poço e adicionou-se 100 µL de Álcool Isopropílico com 10% de DMSO, em seguida foram realizadas as medidas de absorbância em cada poço com o leitor de microplacas híbrido da BioTek modelo EPOCH. Os dados obtidos foram tratados utilizando Excel 360 e GraphPadPrism 8.0.2.

4.5. Interação com biomolécula ctDNA

4.5.1. Preparo de soluções para ensaios com biomolécula

Neste tópico serão relatadas as metodologias para o preparo das soluções utilizadas nos ensaios de interação com a biomolécula ctDNA.

4.5.1.1. Tampão Tris-HCl 5 mM + 50 mM de NaCl

Foram dissolvidos 0,3029 g Tris(hidroximetil)aminometano (121,14 $g.mol^{-1}$) em 500 mL de água destilada. Adicionou-se a solução anterior 1,462 g de NaCl (58,44 $g.mol^{-1}$) e ajustou-se o pH entre 7,2 a 7,4 utilizando HCl 1M. O tampão foi armazenado em geladeira com a temperatura entre 2 a 8 ºC.

4.5.1.2. Solução de ctDNA (*Calf thymus*)

A solução de ctDNA foi preparada pela adição aproximada de 10,00 mg da biomolécula em 5,00 mL de uma solução de tampão salina Tris-HCl, pH=7,4. A razão entre as absorbâncias das bandas de absorção molecular em 260 e 280 nm resultou no valor de 1,85, indicando que a solução estava isenta de proteínas. Assim, a concentração de ctDNA foi determinada espectrofotometricamente através da lei de Lambert-Beer utilizando o coeficiente de absortividade molar (ε) de 6600 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ para a banda de 260 nm (Equação 2).

Equação 2: Determinação da concentração.

$$C = \frac{A_{260}}{6600 - b}$$

Segundo a equação 2, C = concentração de ctDNA, A260 = banda de absorção em 260 nm, b = caminho óptico.

4.5.1.3. Solução do corante Hoechst 33258 (1 mM)

Foram dissolvidos 6,239 mg do corante Hoeschst 33258 (623,96 g.mol^{-1}) em 10,00 mL de água. O recipiente de armazenamento, deve ser protegido para evitar o contato com a iluminação, devido a fotossensibilidade do Hoeschst.

4.5.2. Ensaios com a biomolécula ctDNA

4.5.2.1. Titulação espectrofotométrica do DNA por UV-Vis

Os espectros de UV-Vis foram obtidos para o complexo na presença de quantidades crescentes de ctDNA, na região de 200 a 350 nm em tampão salino Tris-HCl, pH 7,4. A titulação foi realizada a temperatura ambiente mantendo a concentração do complexo fixa em 20 μM, enquanto a concentração do ctDNA foi variada de 0 até 60 μM.

Partindo de uma solução do complexo de 1 mM preparado em DMSO, foram adicionados 60 μL do composto em 2940 μL de tampão em uma cubeta de quartzo de 3,5 mL (cubeta 1). Em uma segunda cubeta, o branco foi preparado com 60 μL de DMSO puro e 2940 μL de tampão salino tris-HCl, pH 7,4. Após a primeira leitura da cubeta 1, foram adicionados sucessivamente alíquotas de 18 μL de uma solução fresca de ctDNA (1x10^{-3} mol.L^{-1}) em ambas as cubetas 1 e 2, sucessivamente, até um total de 10 adições. Assim, a proporção molar do aduto, composto-DNA, foi variada de 0,3 a 3,0 com intervalos de 0,3 em cada adição.

A constante de ligação (Kb) foi obtida através da equação de Benesi-Hildebrand (Equação 3):

Equação 3: Equação Benesi-Hildebrand

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

Onde A_0 e A são as absorbâncias do complexo livre e do complexo com DNA, respectivamente. Os coeficientes ε_G e ε_{H-G} são os coeficientes de absortividade molar do complexo de Pd(II) livre e do aduto composto-DNA, respectivamente.

De tal modo, Kb foi extraído através da razão entre o coeficiente linear e o angular obtidos a partir da curva de $\frac{A_0}{A - A_0}$ em função de $\frac{1}{[DNA]}$.

4.5.2.2. Ensaio de interação com DNA via dicroísmo circular

Espectros de dicroísmo circular (CD, do inglês "*circular dichroism*") foram obtidos para amostras de ctDNA na presença de quantidades crescentes do complexo C1-Br-Lut. As medidas foram registradas no espectropolarímento de Dicroísmo Circular J-815 da JASCO. Utilizando cubeta de quartzo de 3 mL, na faixa 216 a 300 nm, com acumulo de 8 scans, largura de banda de 1,0 nm, velocidade de 100 $nm.min^{-1}$ e temperatura de 25 ºC. A concentração de ctDNA foi fixada em 50 µM em tampão salino Tris-HCl (pH 7,4), enquanto que a concentração dos complexos variou de 0 a 15 µM, isto é, obteve-se razões molares dos adutos (composto-DNA) entre 0 a 0,3 mantendo-se o percentual de DMSO inferior a 2 % (v/v). Adições crescentes do complexo de Pd(II) foram realizadas, partindo-se de uma solução recém-preparada em concentração de 1 mM em DMSO. As amostras foram incubadas a 37 ºC por 24h e após este período os espectros de CD foram coletados.

4.5.2.3. Ensaio de competição pelo DNA com Hoechst 33258

O estudo de competição com Hoechst 33258 pelo ctDNA foi realizado por meio da técnica de espectroscopia de fluorescência. Espectros de emissão foram registrados em um espectropolarímetro JASCO (J-815) entre 358 a 660 nm, largura de banda 5,0 nm e acumulação de 2 scans a 25 º C. O comprimento de onda de excitação foi 338 nm. Incialmente em tampão salino Tris-HCl, foram preparados 30 mL de uma solução de 60 µM de ctDNA com 6 µM de Hoechst 33258, ou seja, razão molar do aduto Hoechst—ctDNA igual a 1:10. Tal solução foi igualmente distribuída em dez tubos de ensaio com posteriores adições crescentes dos compostos, partindo-se de soluções recém-preparadas em DMSO (2 mM). Dessa forma, foram obtidas concentrações na faixa entre 0 a 60 µM de modo que o percentual de DMSO não que excedesse 1% (v/v). Após 5 min de repouso entre cada adição, os espectros de fluorescência foram coletados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 35 está representado um breve resumo das sínteses realizadas neste trabalho. A reação de orto-metalação da L-fenilalana foi conduzida segundo o procedimento descrito por Vicente et al. (2011). A partir do dímero (C1-Br), realizou-se uma reação de clivagem com 2,6-lutidina, obtendo o composto C1-Br-Lut, o qual teve sua atividade citotóxica e capacidade de interação com o DNA avaliada.

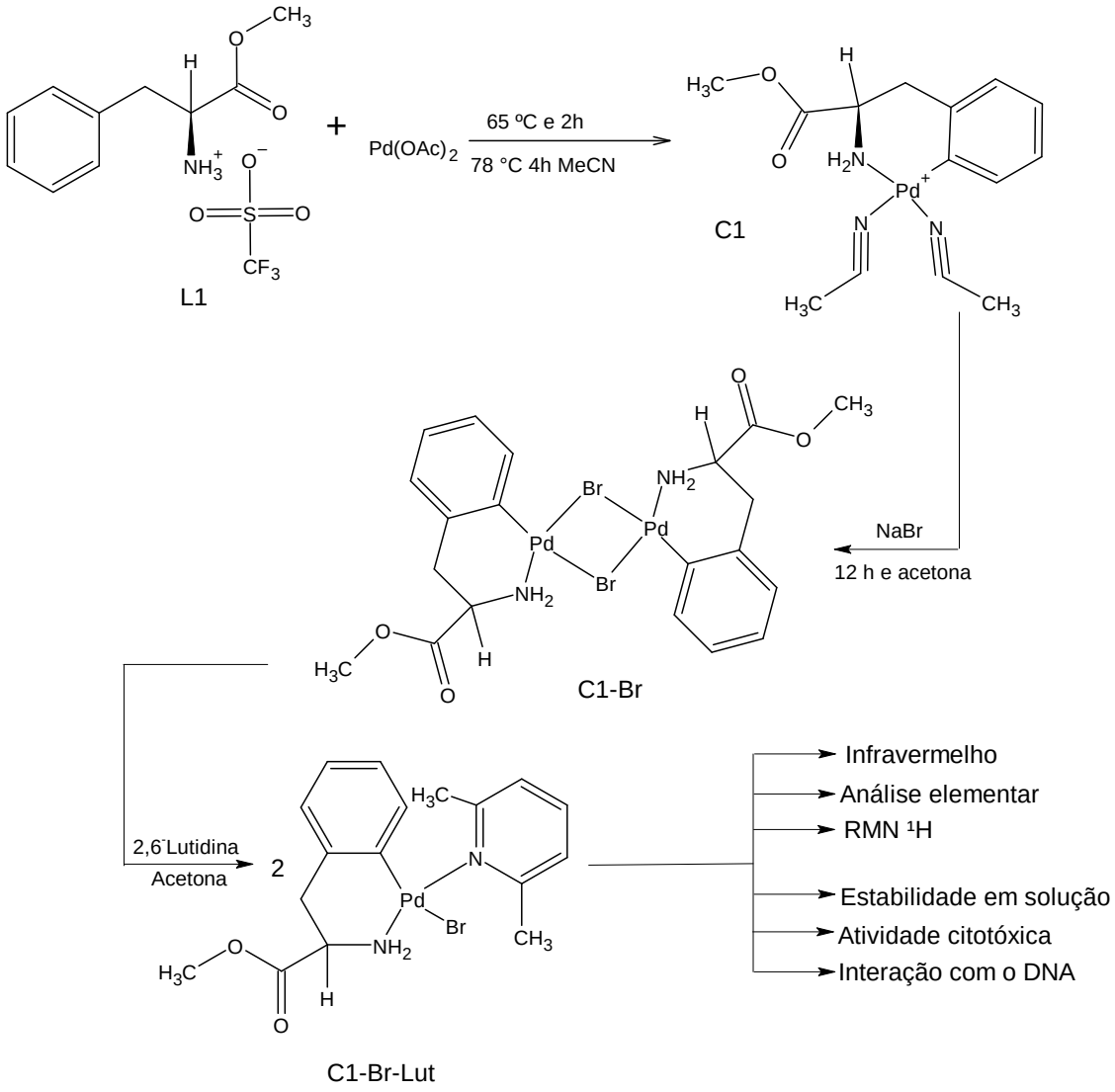


Figura 35: Fluxograma das sínteses.

Fonte: Do Autor.

5.1. Otimização das sínteses

Ao realizar a metodologia de síntese proposta por Vicente et al. (2011) para obtenção do complexo dímero C1-Br, o rendimento obtido foi de 23% muito discrepante com o relatado, que era de 89%. Assim, foram propostas três otimizações na metodologia da síntese, para aumentar o rendimento, figura 36.

Na etapa I da otimização 1, o ligante L1 foi adicionado lentamente, durante 1h, na solução contendo $Pd(OAc)_2$/MeCN. Em seguida, o sistema foi levado ao aquecimento de 65 °C por 2h e, posteriormente, a 78 °C por 4h. Já a etapa I da otimização 2, o ligante foi adicionado lentamente durante 2h com temperatura de 65 °C. Em seguida, a temperatura foi aumentada para 78 °C por 4h.

Ao término das sínteses da etapa I, as suspensões das otimizações 1 e 2 foram previamente filtradas em uma mistura de celite e carbonato de sódio com a finalidade de neutralizar o ácido acético formado durante a primeira etapa. Em seguida, o filtrado foi rotaevaporado, em baixa pressão, para retirar o solvente utilizado na primeira etapa da síntese. Posteriormente, iniciou-se a etapa II da síntese das otimizações 1 e 2. O produto isolado da etapa I foi devidamente solubilizado em acetona, onde o mesmo reagiu com brometo de sódio por 12h. Ao fim do período da reação, a suspensão foi rotaevaporada, resultando na formação de um sólido de coloração verde-marrom. Em seguida, realizou-se uma extração do composto desejado com diclorometano. A fase orgânica de cor laranja foi filtrada em celite e foi concentrado em 5,00 mL no rotaevaporador. Em seguida, adicionou-se pentano para forçar a precipitação do composto C1-Br. Após a realização da etapa II, as metodologias alternativas 1 e 2 resultaram em um rendimento de 46 e 48%, respectivamente.

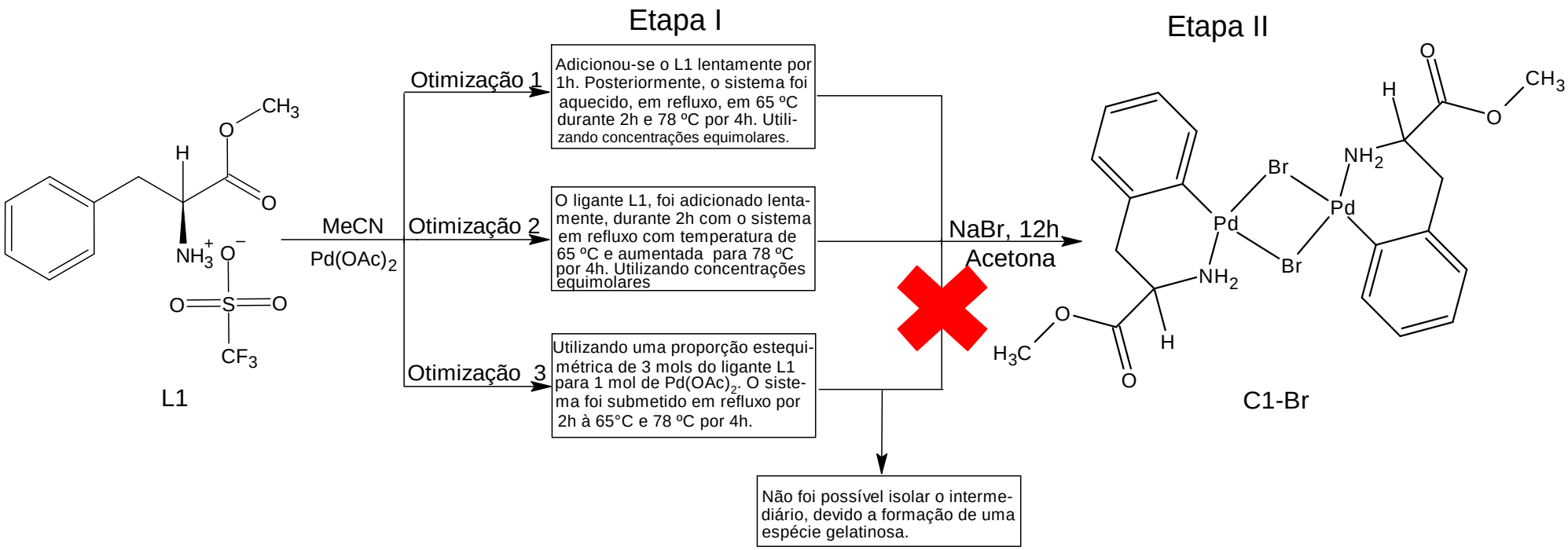


Figura 36- Fluxograma de otimizações da síntese.

Fonte: Do autor.

Na fase I da otimização 3, foi empregada uma proporção maior do ligante de 3:1, adicionado-o de forma rápida, porém, o isolamento do composto não foi possível, pelo fato de formar um óleo gelatinoso, portanto, inviabilizando as análises de caracterização.

Nota-se que, ao adotar as otimizações 1 e 2 de síntese, houve um aumento considerável do rendimento, em cerca de 50%, indicando que a saturação do meio reacional é um fator determinante para o rendimento. Porém, a discrepância do rendimento com o artigo permaneceu grande. Outro fato muito importante é que a utilização do triflato do metil-éster da L-fenilalanina, conforme o artigo de Vicente *et al.* (2011), provoca a redução drástica do tempo de reação em relação ao Vicente *et al.* (2007), passando de seis dias para uma reação de 6h.

Após a reação da etapa II, o artigo de Vicente *et al.* (2011) recomenda que a solução seja concentrada seguida pela adição de éter dietílico (Et_2O) para precipitação de precipitado amarelo, porém, o resultado desta mistura é uma solução homogênea, sem nenhuma precipitação e com o decorrer do tempo, a solução tornou-se esverdeada. Para contornar esse problema, o Et_2O foi substituído pelo n-pentano, resultando na precipitação de um composto marrom.

Apesar dos avanços iniciais nas otimizações das metodologias de síntese, fomos surpreendidos com a pandemia do COVID-19, sendo necessário a realização do isolamento social, o que resultou em uma série de limitações no desenvolvimento do projeto e das análises. Ao restabelecer as atividades, foi realizado uma análise RMN de ^1H do ligante triflato do éster metílico da L-Fenilalanina (L1) e do cloridrato de éster metílico de L-Fenilalanina (AA-HCl), em dimetilsulfóxido-d_6, figura 37, permitindo uma comparação entre o produto obtido e o reagente de partida.

.

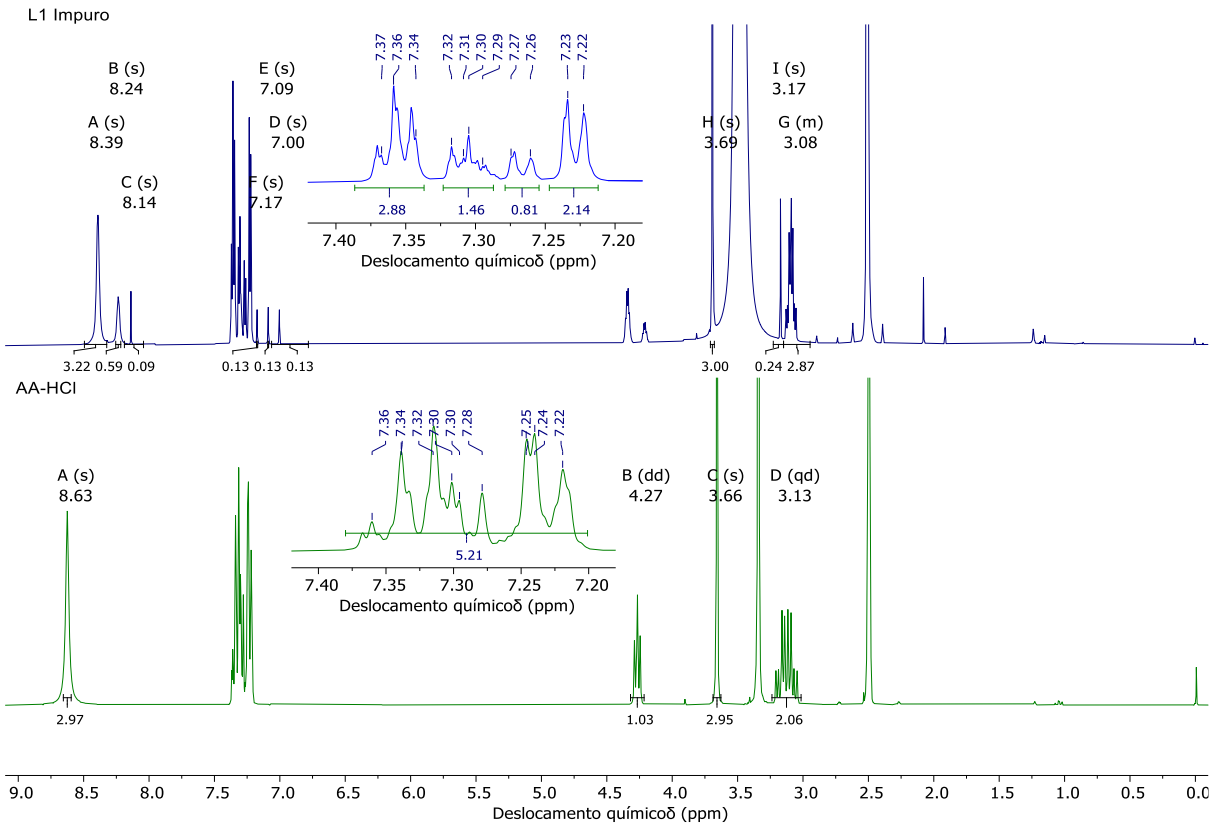


Figura 37- Espectro de RMN de ^{1}H do Ligante L1 e AA-HCl.

Fonte: Do autor.

Analisando na figura 37 os espectros de ^{1}H do triflato (L1) e cloridrato do éster metílico da L-Fenilalanina, nota-se uma diferença de significativas no conjunto de sinais. Podemos observar que o sinal e 8,63 ppm no espectro do cloridrato, referente ao grupo $-NH_3^+$, sofre um deslocamento para 8,39 ppm após a formação do triflato (L1). Observa-se ainda a presença de outros sinais em 8,24 e 8,14 ppm, oriundos de possíveis impurezas geradas durante a reação.

Nota-se na região dos sinais aromáticos, entre 7,40 e 7,20 ppm, uma diferença significativa dos sinais, indicando a formação de um novo produto, mas com presença de impurezas, devido aos sinais presentes entre 7,17 e 7,00 ppm no espectro do triflato (L1). Os multipletos observados em 3,08 e 3,13 ppm são distintos. No espectro do triflato (L1) é possível ainda detectar a presença de uma impureza pelo aparecimento de um singleto, atribuído como I, em 3,17 ppm.

O baixo rendimento obtido no complexo intermediário C1-Br deve estar relacionado à presença de impurezas no triflato L1. A forma encontrada para a purificação do triflato L1 envolveu uma pequena alteração na metodologia de síntese. Após a adição do ácido tríflico sobre o aminoácido neutralizado em CH_2Cl_2, descrita no tópico 4.2.1, ocorre a formação de uma suspensão contendo um sólido branco. Sobre esta suspensão deve ser adicionado um excesso de 5,00 mL de CH_2Cl_2, seguido de agitação magnética por cinco minutos. Esse procedimento é de vital importância, uma vez que o ligante triflato L1 não é solúvel em diclorometano, mas as impurezas formadas durante a síntese, são solúveis. Esse fato é confirmado pelo o espectro na figura 38, referente ao ligante L1 após esse processo de purificação.

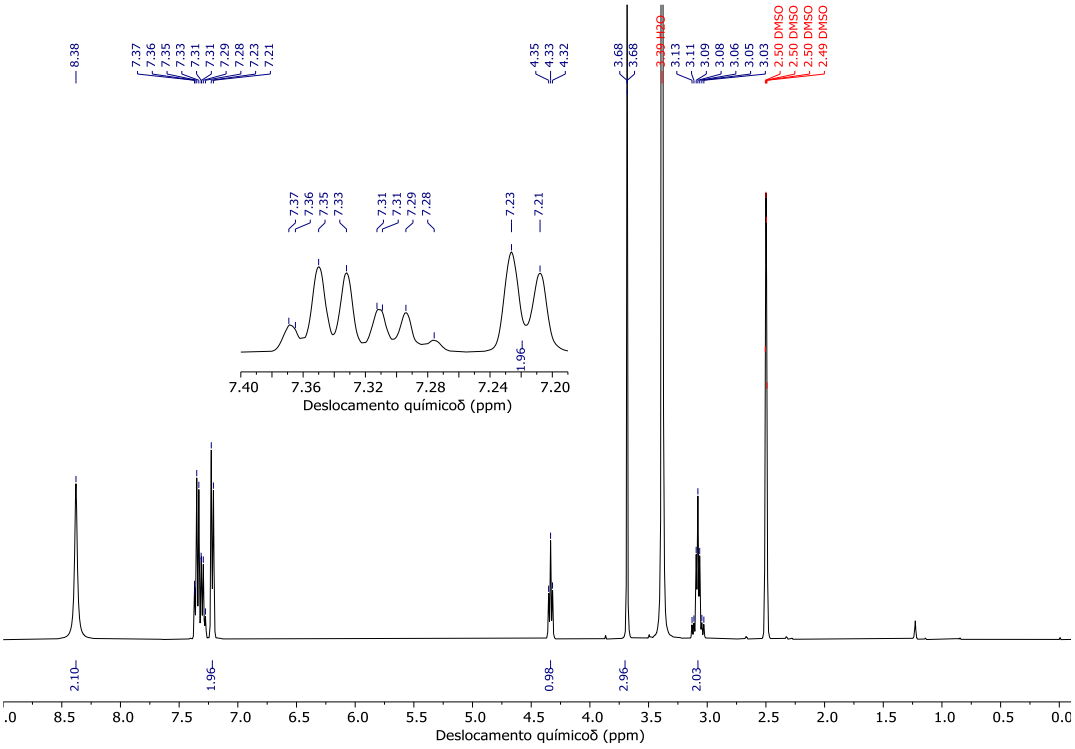


Figura 38- Espectro de RMN de ^1H do ligante L1 em DMSO-d_6.

Fonte: Do autor.

Comparando as figuras 37 e 38, podemos observar que, ao adicionar um excesso de diclorometano, o mesmo foi capaz de solubilizar todas as impurezas, permitindo assim obter o triflato livre de interferentes.

Após o processo de purificação, o ligante L1 obteve um rendimento de 83%, o mesmo foi empregado na síntese do complexo C1-Br, que obteve um rendimento de 82%. Desta forma, podemos concluir que o fator limitante na síntese do C1-Br deve-se à presença as impurezas presentes no triflato L1, que após essas séries de otimizações nas sínteses, os rendimentos mostraram-se compatíveis com os descritos no artigo de Vicente et al. 2011, permitindo a obtenção do complexo dímero C1-Br puro.

5.2. Caracterização

5.2.1. Ligante L-Fame-OTF (L1)

Analisando o espectro na região de infravermelho, figura 39, (4000 a 400 cm^{-1}) do ligante L1, nota-se a presença de uma banda de estiramento antissimétrico (ν_a) e simétrico (ν_s) referentes a ligação (N-H) em 3230 cm^{-1} e 3175 cm^{-1} respectivamente. As bandas associadas à deformação angular antissimétrica e simétrica do grupo NH3 ocorrem em 1634 cm^{-1} e 1507 cm^{-1} respectivamente. Nota-se a presença de duas bandas de deformação angular fora do plano de C-H aromático em 757 e 697 cm^{-1} referente a monosubstituição do anel aromático. Uma banda de extrema importância é a banda referente ao estiramento da carbonila (C=O), presente no grupo éster, encontrada em 1741 cm^{-1} (PAVIA et al., 2010; Vicente et al., 2011)

Podemos observar a presença das bandas do íon triflato em 1293 cm^{-1} (ν_aS=O), e 1168 cm^{-1} (ν_sS=O) e em 640 cm^{-1}, atribuído ao estiramento da ligação (S-O). Já a presença do grupo CF_3 pode ser evidenciada pelas bandas em 1193 e 1034 cm^{-1} referente aos modos de estiramento da ligação C-F. O aparecimento de novas bandas referente ao íon triflato e ao grupo do NH_3^+, ou seja, bandas pertencentes as ligações de (S=O), (S-O), (C-F) são uma evidência da formação do composto L1 (SILVERSTEIN et al., 2005).

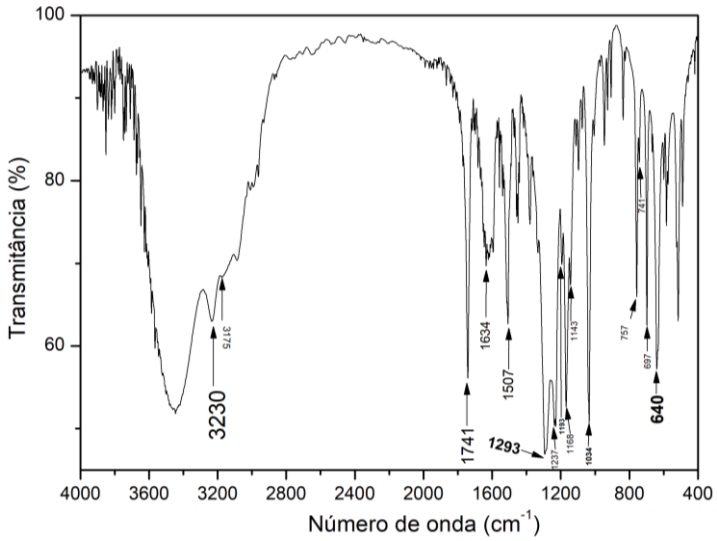
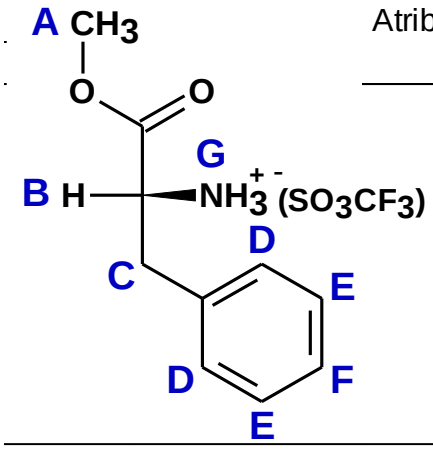


Figura 39- Espectro na região do infravermelho (IR) do L1.

Fonte: Do autor.

Analisando a tabela 5 e figura 40, podemos observar os deslocamentos químicos (δ ppm) no espectro de RMN de ^{1}H, figura 40, do ligante L-fame-OTF (L1), realizado em dimetilsulfóxido-d_6 (DMSO-d_6) como solvente, por ser insolúvel em clorofórmio-d. Os prótons foram denominados A a G, para facilitar a elucidação estrutural.

Tabela 5: Deslocamento químicos da RMN de ^{1}H do L1.



Atribuições	^{1}H-NMR	
	δ (ppm)	J/(Int)
A	3,68	s (3H)
B	4,33	t, 6,7 Hz (1H)
C	3,07	m (2H)
D	7,22	d, 7,3 Hz (2H)
E	7,35	t, 7,4 Hz (2H)
F	7,31	m (1H)
G	8,38	s (2H)

Fonte: Do autor.

Nota-se um singleto de forte intensidade em 3,68 com uma integral igual a três sendo atribuído a metila ligada ao éster. A presença do grupo éster acaba gerando

um efeito de desblindagem na metila aumentando o seu deslocamento para regiões de menor blindagem. Observa-se também em 4,33, com um J=6,7 Hz, hidrogênio B ligado ao carbono quiral, um tripleto devido a presença de dois hidrogênios (C) na vizinhança. Um multipleto é observado entre 3,02-3,16 referente ao próton vizinho ao carbono quiral, com uma integral igual a dois.

Analisando os prótons da região aromática, observa-se um dupleto em 7,22, com J=6,7 Hz, e integral igual a dois, referente ao próton D. Um tripleto em 7,35, com J=7,4 Hz, atribuído ao hidrogênio E, que apresenta acoplamento com dois prótons distintos (D e F) gerando uma integral igual a dois. Um multipleto, de integral igual a um, entre 7,26-7,33 referente a atribuição F, que sofre acoplamento com dois hidrogênios (E) que se encontram em regiões quimicamente idênticas. Na atribuição G, trata-se de um hidrogênio ligado a um nitrogênio que é observado um singleto em 8,39 que foi atribuído a esse próton, com uma integral igual a dois (Vicente et al., 2011).

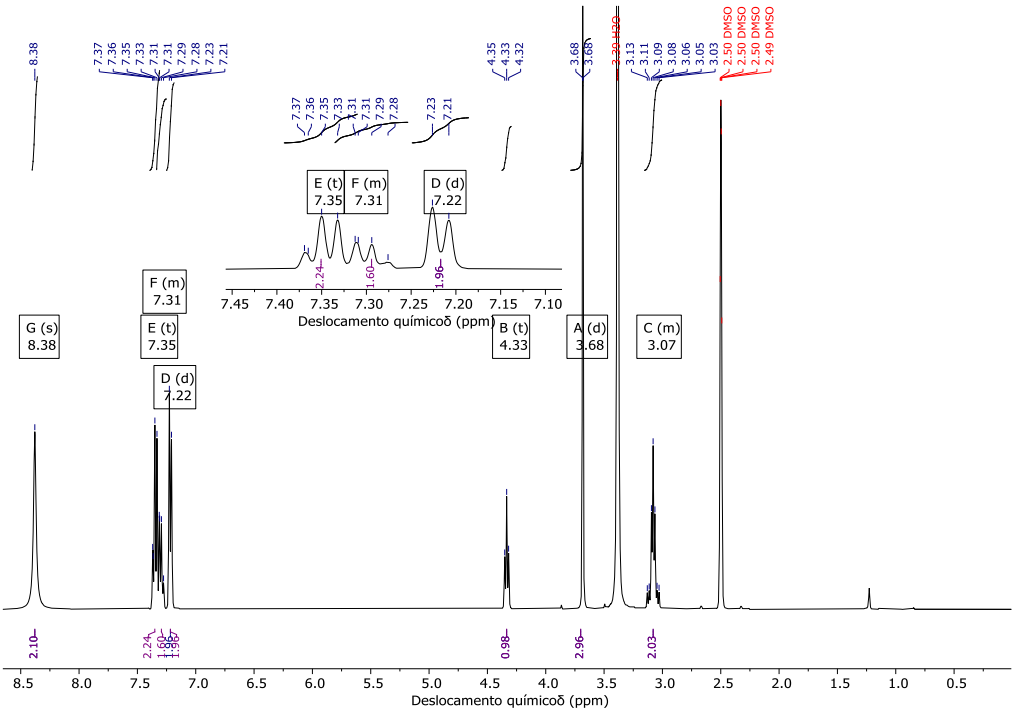


Figura 40: Espectro de RMN de ^{1}H do ligante L1 em DMSO-d_6.

Fonte: Do autor.

5.2.2. Complexo [Pd(C^2,*N*-L-Fame)(Br)]2 (C1-Br):

O espectro no IV do complexo C1-Br, figura 41, mostra as bandas típicas do éster metílico da *L*-Fenilalanina em 3298 (νaNH2), 3240 (νsNH2), 1638 (δaNH2), 1558 (δaNH2) e 1245 cm^{-1}(νC-N) e a ausência das bandas do íon triflato, As bandas do grupo éster são observadas em 1732 (νC=O), 1066 (νaC-O)e 1044 cm^{-1} (νsC-O). Nota-se a presença de uma banda γCH intensa em 750 cm^{-1} referente ao anel aromático disubstituido na posição orto (1,2), sendo uma evidência de que houve a formação de um anel ciclometalado, (PAVIA et al., 2010; SILVERSTEIN et al., 2005).

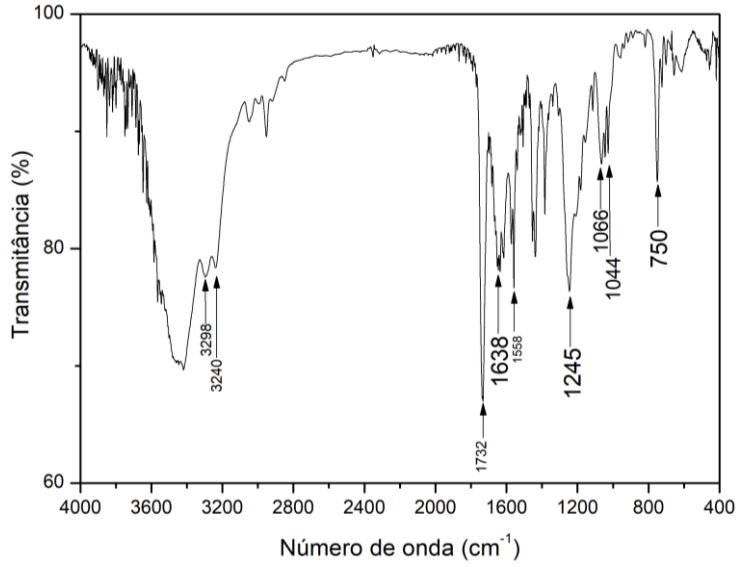
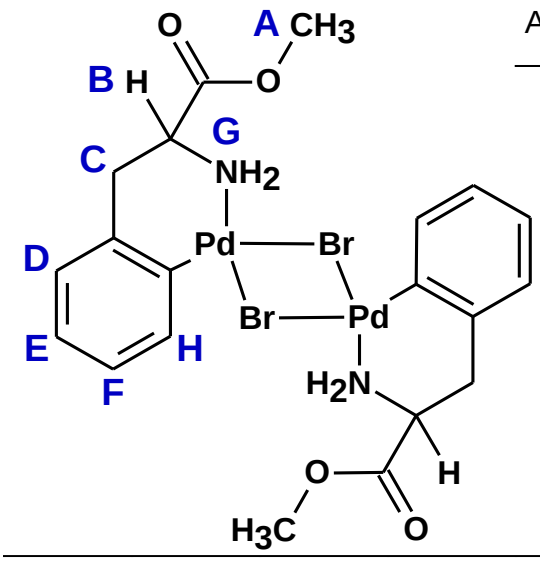


Figura 41: Espectro de IV do complexo dímero C1-Br.

Fonte: Do autor.

O espectro de RMN de ^1H do complexo C1-Br em clorofórmio-d ($CDCl_3$) é apresentado na figura 42 e a tabela 6 descreve os valores dos deslocamentos químicos (δ ppm).

Tabela 6: Deslocamentos químicos do RMN de ^{1}H do C1-Br.



Atribuições	^{1}H-NMR	
	δ (ppm)	J/(Int)
A	3,49	s (6)
B	4,25	m (2)
C	3,68	m (4)
D	7,31	d, J=7,7 Hz (2)
E	6,82	t, J=7,1 (2)
F	6,74	m (2)
G	4,01	s (4)
H	6,74	m (2)

Fonte: Do autor.

Observou-se na figura 42, a duplicação dos valores das integrais em relação aos valores do ligante L1. Em 3,49 ppm é observado um singleto atribuído ao próton A, com uma integral igual a seis. Já o sinal referente ao hidrogênio B ligado ao carbono quiral apresentou uma pequena alteração de 4,33 para 4,25 ppm. Outro multipleto observado na região de 3,68 ppm atribuído aos hidrogênios C.

Podemos observar que houve uma série de desdobramentos nos sinais dos prótons presente no anel aromático, gerando novos deslocamentos atribuídos a D, E, F e H, indicando que os átomos de hidrogênios, deixaram de ser quimicamente idênticos em relação ao precursor triflato L1.

Além disso, nota-se o desaparecimento de um próton aromático, sendo atribuído anteriormente como um próton D. Isto acontece devido ao evento da ciclometalação, ou seja, o paládio ligou-se ao carbono do anel aromático, formando a ligação Pd-C_{arom}. Os protons H e F absorvem praticamente na mesma frequência e estão associados ao multipleto em 6,74 ppm, cuja integral é igual a 4. Já o núcleo D está relacionado ao dupleto em 7,31 ppm com uma integral igual a dois. Em 6,82 ppm é observado um tripleto, com J=7,1 Hz, atribuído ao próton E com uma integral igual a dois. No ligante L1, existiam dois prótons (E) na posição meta que eram

quimicamente idênticos. Com a ciclometalação, esse prótons deixaram de ser magneticamente equivalentes devido à presença do Pd(II) na vizinhança, provocando um desdobramento dos sinais em E e H. Nota-se um sinal em 4,01 ppm atribuído aos hidrogênios G da amina com uma integral igual a quatro. A coordenação do paládio com a amina (NH_2) produz um deslocamento químico do próton para uma região de maior blindagem. O deslocamento do sinal do grupo NH_2, em comparação com prótons da amina do ligante L1 livre, indica que houve a formação da ligação coordenada N-Pd (Vicente et al., 2011).

Podemos concluir que ocorreu a formação do ciclopaladado devido ao desaparecimento do sinal do proton D, desdobramento dos sinais dos prótons aromáticos e os deslocamentos dos sinais em relação ao triflato precursor.

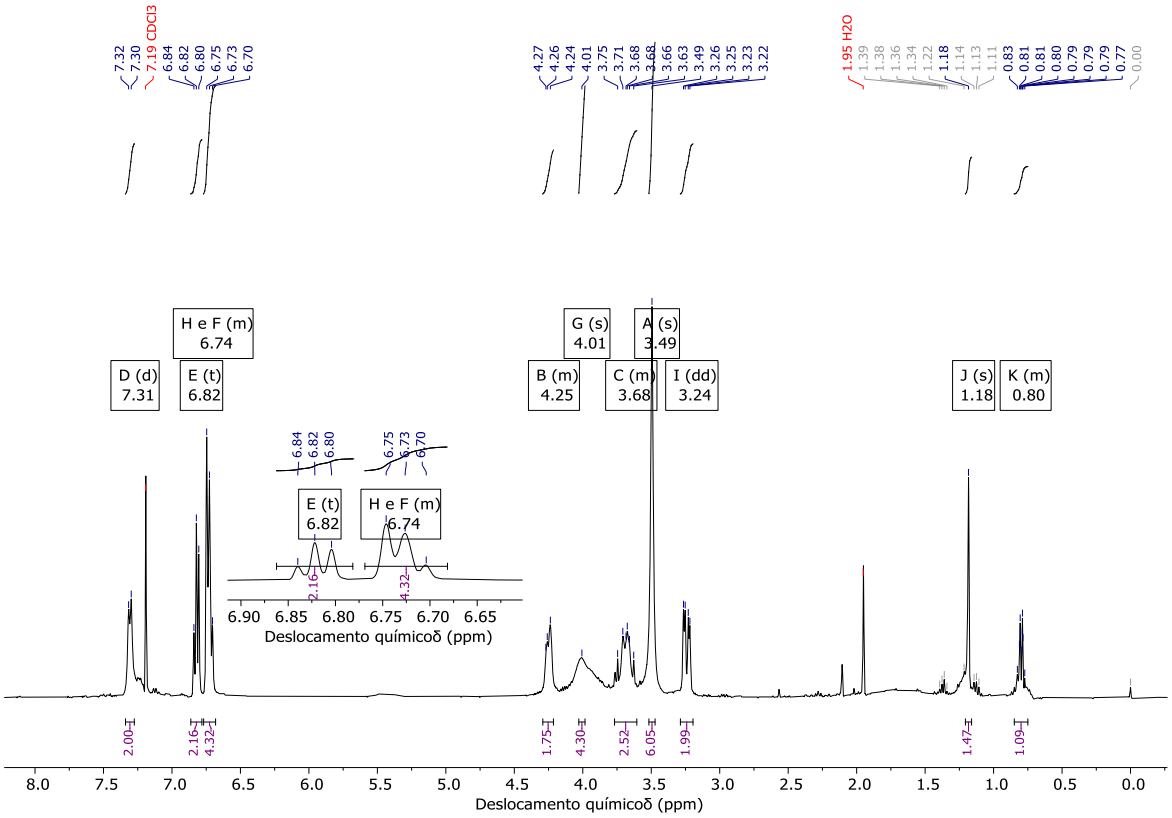


Figura 42: Espectro de RMN de ^1H do ligante C1-Br em $CDCl_3$.

Fonte: Do autor.

5.2.3. Complexo [Pd(C^2,*N*-L-Fame)(Br)(2,6-lut)] (C1-Br-Lut):

5.2.3.1. Análise elementar

Realizou-se a análise elementar para a determinação do teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio, os resultados são observados na Tabela 7.

Tabela 7: Resultados da análise elementar do C1-Br-Lut.

Análise elementar						
Composto	C (%)		H (%)		N (%)	
	Obt.	Calc.	Obt.	Calc.	Obt.	Calc.
C1-Br-Lut	43,11	43,29	4,50	4,49	5,77	5,94

Fonte: Do autor

Os resultados de % C, N e H obtidos, Tabela 7, concordam com os valores calculados para a estequiometria [Pd(C^2,*N*-L-Fame)(Br)(2,6-lut)]. Além disso, os resultados obtidos mostraram que o composto C1-Br-Lut apresentou um alto grau de pureza por apresentar os valores obtidos muito próximos dos calculados. A diferença de valores do calculado para o obtido do carbono foi de 0,18%, o hidrogênio de 0,01% e para o nitrogênio de 0,17%.

5.2.3.2. Espectroscopia no Infravermelho (IV) do C1-Br-Lut

O espectro no IV do complexo C1-Br-Lut, figura 43, contempla as bandas características do éster metílico da L-Fenilalanina ciclometalado em 3277 (νaNH_2), 3190 (νsNH_2), 1606 (δaNH_2), 1574 (δaNH_2) e 1206 cm^{-1}(νC-N). As absorções do grupo éster são detectadas em 1738 (νC=O), 1074 (νaC-O) e 1021 cm^{-1} (νsC-O). A presença de uma banda γCH intensa em 728 cm^{-1} evidencia a existência de um anel aromático orto-dissubstituido. As bandas típicas da 2,6-lutidina coordenada são observadas em 3110 cm^{-1} (νCH), 1468 cm^{-1} (νC=N), 785 (νanel) e 754 cm^{-1} (νanel). presença do ligante 2,6-lutidina após a reação de clivagem para a formação do monômero (PAVIA et al., 2010; SILVERSTEIN et al., 2005).

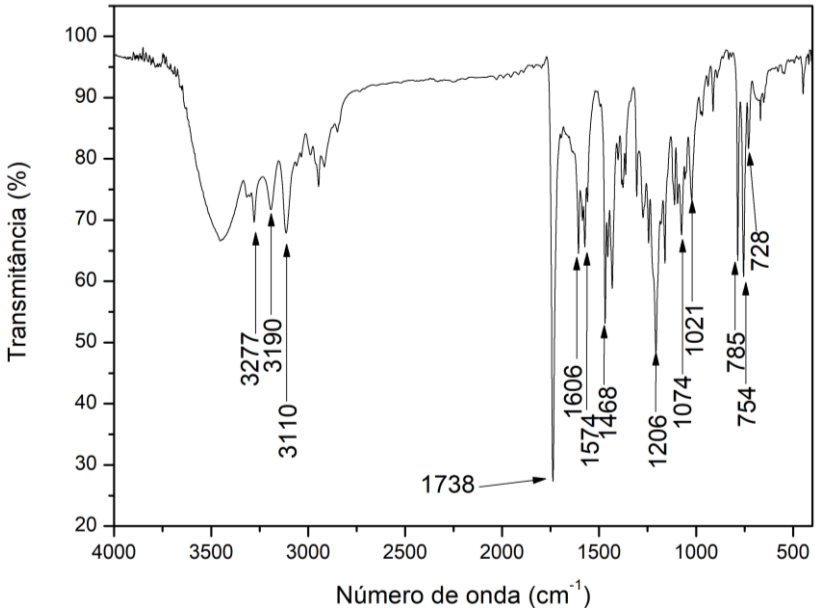


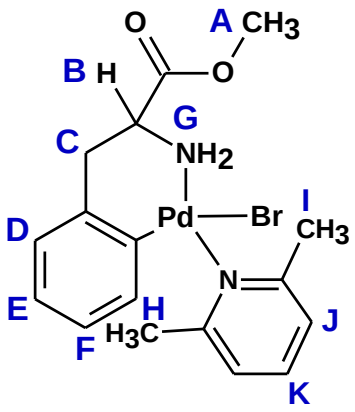
Figura 43: Espectro de IV do complexo C1-Br-Lut.

Fonte: Do autor.

5.2.3.3. Espectroscopia RMN ^{1}H em acetona-d_6

O espectro de RMN de ^{1}H do complexo C1-Br-lut em acetona-d_6 é ilustrado pela figura 44 e a tabela 8 contempla os valores dos deslocamentos químicos (δ ppm).

Tabela 8: Deslocamentos químicos do RMN de ^{1}H do C1-Br-Lut.



Atribuições	^{1}H-NMR	
	δ (ppm)	J/(Int)
A	3,74	s (3)
B	3,55	m (1)
C	3,29	m (2)
D	6,94	d, J=7,4 Hz (1)
E	6,83	t, J=7,3 Hz (1)
F	6,60	t , J= 7,3 Hz (1)
G	4,49	m (2)
H	6,23	d, J=7,6 Hz (1)
I e I'	3,10 e 3,19	s (6)
J	7,29	dd, J=11,4, 7,6 Hz (2)
K	7,74	t, J=7,7 Hz (1)

Fonte: Do autor.

O espectro de RMN-^{1}H concorda com a estrutura do complexo C1-Br-Lut, sendo observado os sinais típicos do metil-éster de fenilalanina ciclopaladada e da 2,6-lutidina coordenada. As integrais dos sinais estão de acordo com a fórmula proposta. Com relação ao ligante ortopaladado, foi observado um singleto em 3,74 ppm associado ao grupo -OCH_3 e os multipletos associados ao átomo H_B ligado ao carbono quiral (3,55 ppm) e dos grupos metilênicos (H_C) em 3,29 ppm. O sinal alargado na região de 4,49 é atribuído aos prótons G da amina coordenada. Um conjunto de dupletos característicos dos 4 H do anel aromático é observado em 6,94 (H_D), 6,83 (H_E), 6,60 (H_F) e 6,23 ppm (H_H). Particularmente, o sinal do átomo H_H é localizado em regiões de campo mais protegido. Este fato é explicado pelo efeito da região de blindagem criada pelo anel piridínico, que se encontra em posição ortogonal adjacente. Essa informação concorda com a proposta de que o ligante 2,6-lutidina está *trans* ao N do ligante metil-éster de L-fenilalanina (da Cunha et al., 2020; Vicente et al., 2011; Zanetti et al., 2022).

Com relação aos sinais de 2,6-lutidina coordenada, verifica-se que, após a clivagem, os sinais da metila da luitidina deixaram de ser magneticamente equivalentes, gerando dois singletos em 3,10 e 3,19 ppm sendo deslocados para uma região mais desblindada, com a soma da integral igual a seis. Os prótons J se apresentaram como um duplo dupleto, com J=11,4 e 7,6 Hz, em 7,29 ppm, com uma integral igual a dois. Observa-se um tripleto em 7,74 ppm (J=7,7 Hz) referente ao hidrogênio K. Os deslocamentos dos sinais da 2,6-lutidina para campo mais desprotegido (correspondente ao aumento da frequência) evidencia a coordenação com o paládio, uma vez que o efeito indutivo do metal diminui a nuvem eletrônica dos hidrogênios próximos a ele, ou seja, reduz a blindagem dos núcleos em relação ao campo magnético (da Cunha et al., 2020). Os prótons E e D estão relacionados, respectivamente, ao tripleto em 6,83 ppm (J=7,3 Hz) e ao dupleto em 6,94 ppm (J=7,4 Hz). O multipleto em 4,49 é atribuído aos prótons G da amina enquanto que os demais sinais não apresentaram uma mudança de sinal significativo.

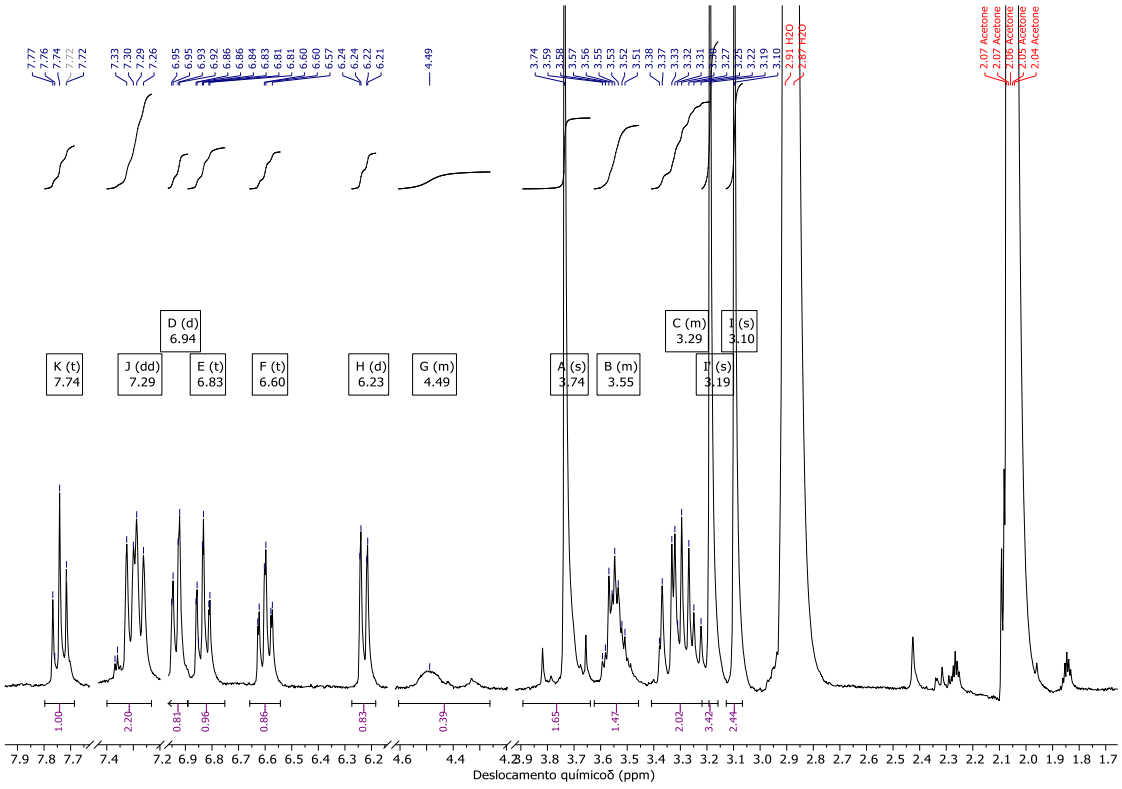


Figura 44: Espectro de RMN de ^{1}H do C1-Br-Lut em acetona-d_6.

Fonte: Do autor.

No espectro de massas, figura 45, do complexo em acetona pura, observa-se o pico referente ao fragmento $[M\text{-}Br]^+$ em 391,07. Entretanto, nas condições empregadas, não foi possível detectar o íon molecular $[M]^+$. Esse fato é justificável pela ligação Pd-Br não ser tão forte.

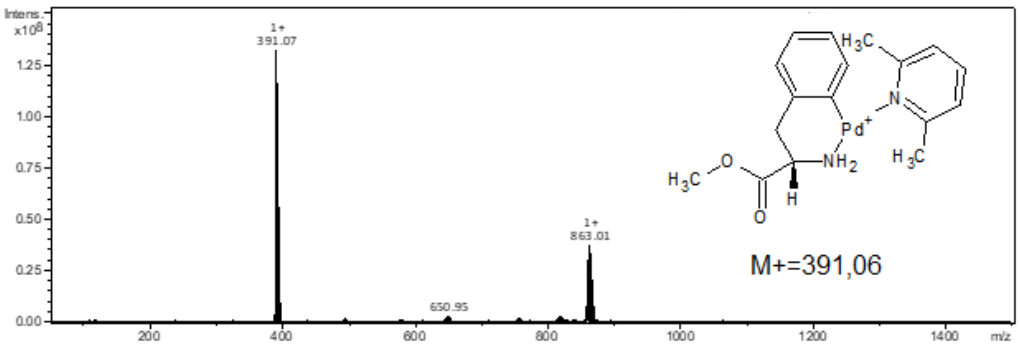


Figura 45: Espectro de massas do C1-Br-Lut em acetona.

Fonte: Do Autor.

5.2.3.4. Estudo do comportamento do C1-Br-Lut em solução

O desenvolvimento de compostos com finalidade de aplicações biológicas deve envolver o conhecimento da estrutura majoritária presente em solução em função do tempo (0h, 24 h e 48 h), uma vez que a atividade citotóxica apresentada, devem ser atribuídas corretamente para o composto formado em solução. Por esse motivo, foram realizados o estudo de estabilidade do C1-Br-Lut em ressonância magnética de ^{1}H em dois cenários distintos.

Os estudos de comportamento do complexo C1-Br-Lut em solução, foram realizados com componentes presente no meio fisiológico. O comportamento foi acompanhamento por meio do deslocamento químico (ppm) de ^{1}H por RMN no espectrômetro de 7,1 Tesla (300 MHz para ^{1}H) da marca Bruker e modelo Fourier 300, utilizando tubos de RMN de 5 mm de diâmetro. As condições empregadas foram a utilização de um tampão fosfato com pH de 7,40, preparado em óxido de deutério. Além disso, foi realizado estudo com presença e ausência de cloreto com concentrações compatíveis com o meio fisiológico.

Para o desenvolvimento dos testes de estabilidade e citotoxicidade, foram utilizados dois cenários diferentes, no primeiro caso utilizou-se um solvente menos coordenante, no caso a acetona-d_6 para a dissolução do composto. No segundo canário utilizou-se um solvente que apresenta a possibilidade de coordenar o centro metálico, neste caso utilizou-se o dimetilsulfóxido-d_6. Em ambos os solventes, o composto apresenta uma excelente solubilidade, porém, quando se observa o espectro de RMN, o composto apresenta um comportamento diferente. Como formar de comparar os resultados obtidos, realizou-se a análise de espectrometria de massa em DMSO.

5.2.3.4.1. Estudo de comportamento em solução: acetona

No experimento foram utilizados 4,24 µM do complexo C1-Br-Lut solubilizado em 600 µL de acetona-d_6. A solução recém preparada, foi medida instantaneamente, sendo definido como o tempo inicial igual a 0h. Em seguida, realizou-se mais duas medidas com tempo igual a 24 e 48h. Os dados obtidos durante a realização do experimento podem ser observados na figura 46.

Analisando os sinais de ^1H, figura 46, nota-se a presença de um único conjunto de sinais e a manutenção das multiplicidades entre 0h e 48h, com variações mínimas do deslocamento químico dos sinais. Além disso, não é observado o aparecimento de novo conjunto de sinais, o que leva a concluir que a estrutura do composto não sofre alterações significativas em acetona-d_6 por um período de 48h. Os sinais presentes entre 0,0 e 3,0 ppm são referentes ao sinal da acetona-d_6, graxa, água e pentano. Desta forma, realizou-se outro experimento de comportamento em solução utilizando as mesmas condições utilizadas no teste de citotoxicidade.

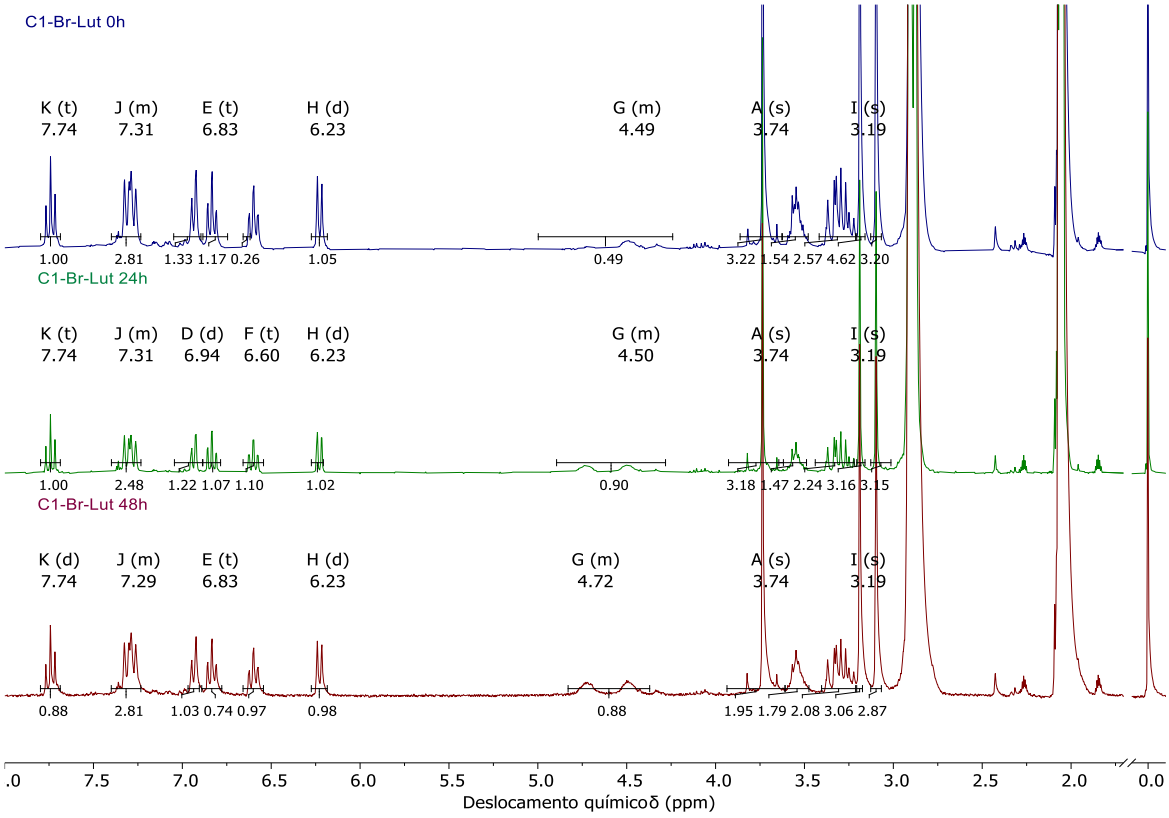


Figura 46: Estudo comportamento em solução de acetona-d_6 no RMN de ^1H do C1-Br-Lut.
Fonte: Do Autor.

As condições propostas para a realização deste novo experimento foram a utilização de 600 µL de uma solução composta por 80% de acetona-d_6, 10% de óxido de deutério (D_2O), 10% de tampão fosfato, com pH=7,4, e 4,24 µM do complexo C1-Br-Lut. Essas condições são semelhantes as utilizadas no teste de citotoxicidade, uma vez que o meio de cultura apresenta um pH=7,4. Os dados obtidos podem ser observados na figura 47. Observa-se a manutenção de todos os sinais, com os deslocamentos semelhantes aos apresentados na figura 46. Mas um fato interessante é a mudança da multiplicidade J, que deixou de ser um multipleto, transformando em um dupleto bem definido com integral igual dois. Outra mudança observada é a coalescência dos singletos associados aos grupos metílicos da 2,6-lutidina gerando um sinal único em 3,09 de integral igual a 6H. Essas mudanças de multiplicidade podem ser atribuídas a saída do ânion brometo, ligada diretamente ao paládio, e a entrada da água formando um aquo-complexo.

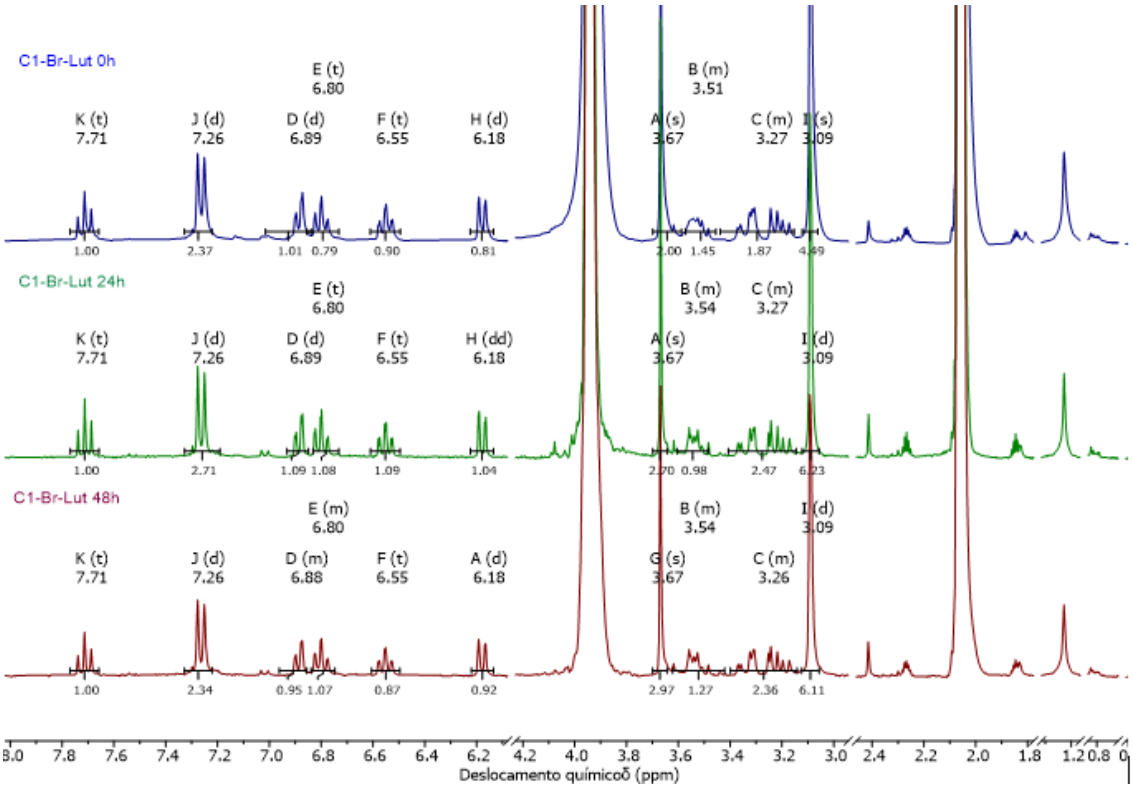


Figura 47: Estudo comportamento em solução de 80% acetona-d, 10% D2O e 10% (v/v) de tampão fosfato no RMN de ^1H do C1-Br-Lut.

Fonte: Do Autor.

Ao realizar um novo teste, figura 48, utilizando de uma solução composta por 80% de acetona-d_6, 10% de óxido de deutério (D2O),10% de tampão fosfato, com pH=7,4, 4,24 µM do complexo C1-Br-Lut e a presença de 100 mM de cloreto, constatou-se que houve uma pequena alteração do sinal dos hidrogênios J, no qual passou a apresentar um formato de multipleto com um deslocamento químico igual 7,26. Apesar deste fato, não há alterações significativas no perfil dos demais sinais, nem o aparecimento de novos conjuntos de sinais. Observa-se que, nestas condições, os sinais das metilas da 2,6-lutidina não sofreram coalescência, mas surgem em 3,10 e 3,07 ppm, levemente diferentes dos sinais observados em acetona pura (3,19 e 3,10 ppm). A pequena diferença de deslocamento químico observado nos sinais deve-se provavelmente, a alteração das características do solvente/mistura de solventes. Uma outra possibilidade envolve a supressão da hidrólise de bromo-complexo e posterior troca com íons cloreto em excesso, gerando o cloro-complexo em solução.

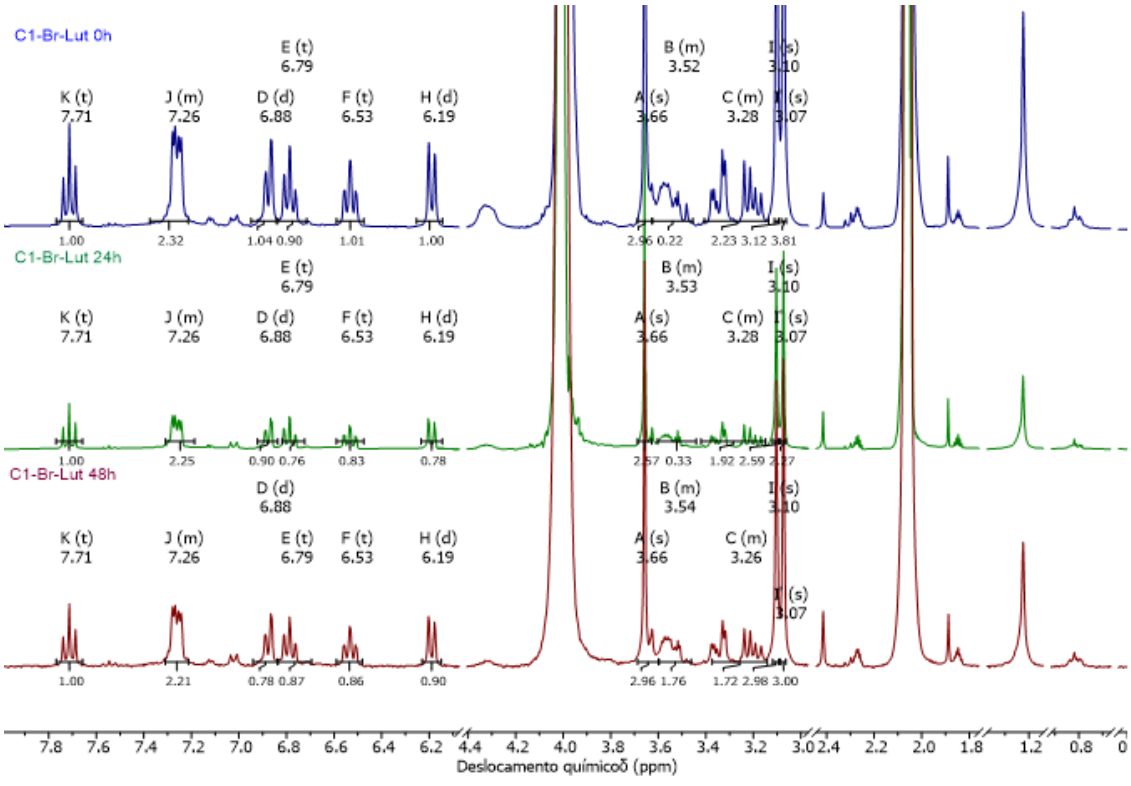


Figura 48: Estudo comportamento em solução de 80% acetona-d, 10% D2O, 10% (v/v) de tampão fosfato e 100 mM de Cloreto no RMN de ^{1}H do C1-Br-Lut.

Fonte: Do Autor.

Os ensaios de comportamento em diferentes soluções de acetona indicaram que o ligante Br do composto C1-Br-Lut sofre algum processo de troca de ligantes, dependendo das características do meio. Tal fato é esperado em função do forte efeito *trans* exercido pelo carbono. Assim, o complexo demonstrou manter essencialmente íntegro nessas condições para ser dissolvido em uma solução-mãe de acetona para diluição seriada em meio de cultura.

5.2.3.4.2. Estudo de comportamento em solução: dimetilsulfóxido

Para realizar os testes de viabilidade celular, geralmente utiliza-se como solvente o dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar o composto. No entanto, o complexo C1-Br-Lut quando solubilizado em DMSO, apresenta outro comportamento em solução, quando comparado com a utilização da acetona.

Deste modo, realizou-se o estudo de estabilidade com as condições empregadas anteriormente. Para realizar o experimento, foram utilizados 4,24 µM do complexo C1-Br-Lut solubilizado em 600 µL de DMSO-d_6. A solução recém preparada, foi medida instantaneamente, sendo definido como o tempo inicial igual a 0h. Em seguida, realizou-se mais duas medidas com tempo igual a 24 e 48h, figura 49.

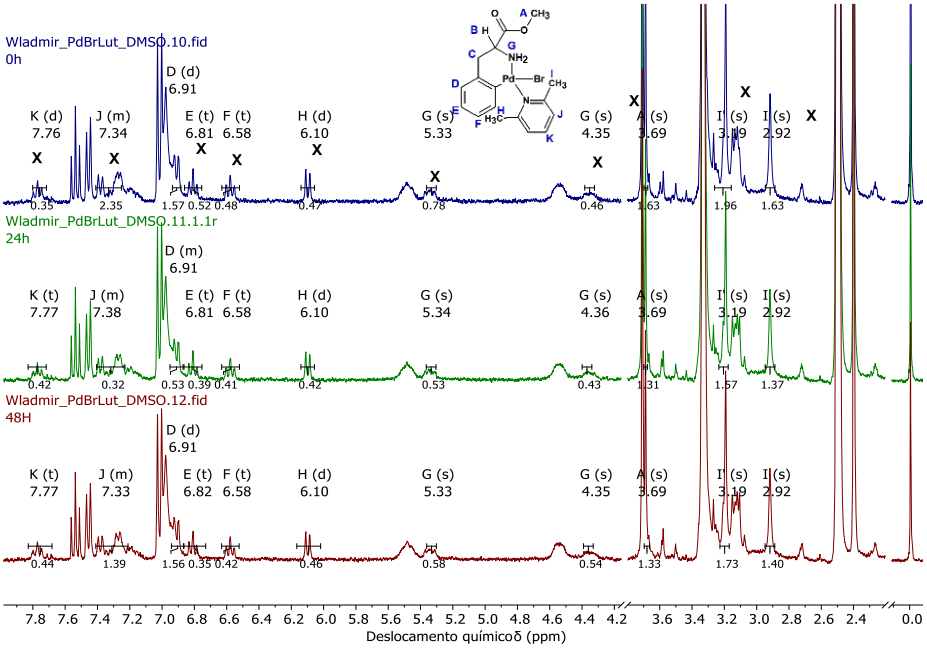


Figura 49: Estudo de comportamento em DMSO-d_6 no RMN de ^{1}H do C1-Br-Lut.
Fonte: Do Autor.

Analisando o espectro de RMN de ^{1}H em DMSO-d_6, representado na figura 49, podemos observar a presença de dois conjuntos de sinais. O primeiro conjunto refere-se ao complexo [Pd(L-Fame)(S)(2,6-lut)], onde S = molécula de solvente, indicado com X. Fazem parte desse conjuntos os sinais do metil-éster da L-fenilalanina ciclopaladada em 3,69 ppm (hidrogênios A da metila), 5,3 e 4,3 ppm (hidrogênios diastereotópicos G da amina), dupleto em 6,10 ppm (hidrogênio H), tripleto em 6,58 ppm (hidrogênio F) e o dupleto em 6,91 ppm (hidrogênio D). Além disso, é possível observar os sinais referentes aos hidrogênios da 2,6-lutidina coordenada: tripleto em 7,77 ppm (hidrogênio K), o multipleto em 7,33 ppm (hidrogênios J) e dois singletos em 2,92 e 3,19 ppm (hidrogênios das metilas). Observa-se que esse conjunto de sinais permanecem inalterados após 24 e 48h.

O segundo conjunto de sinais é de uma espécie majoritária em solução, cujos sinais são indicados com Y, Figura 50. Tal fato indica que, quando C1-Br-Lut é solubilizado em DMSO, existe a formação instantânea de outra espécie, que foi denominada como C1-Lut-Y. Essa espécie também contém os sinais característicos do metil-éster da L-fenilalanina ciclopaladada em 3,71 ppm (hidrogênios A da metila), 5,41 e 4,54 ppm (hidrogênios diastereotópicos G da amina), e um dupleto em 7,46 ppm e um multipleto em 6,98 ppm associados aos prótons aromáticos. A atribuição dos demais sinais não podem ser feita pois os mesmos encontram-se encobertos. Observa-se ainda a ausência de um sinal adicional de H aromático sob a influência da anisotropia diamagnética do anel da lutidina em torno de 6 ppm. Tal fato sugere que, esse segundo conjunto de sinais está associado a uma espécie na qual a 2,6-lutidina não está presente na sua estrutura. De fato, observa-se os sinais típicos da 2,6-lutidina livre em 7,54 ppm (tripleto, hidrogênio K, 1H), 7,02 ppm (dupleto, hidrogênios J, 2H) e 2,40 ppm (singleto, hidrogênios I, 6H).

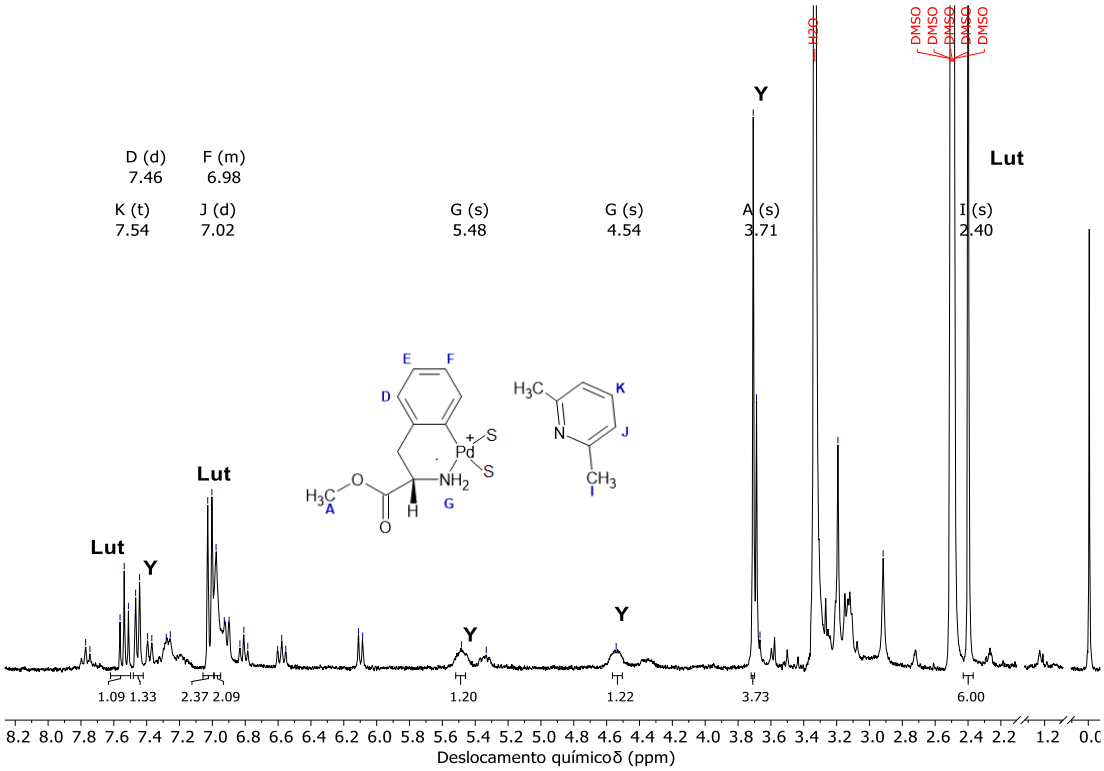


Figura 50: RMN ¹H em DMSO-d_6 do C1-Lut-Y.
Fonte: Do Autor.

Com o intuito de obter mais informações sobre as espécies presentes em solução de DMSO, foi realizado a análise de espectrometria de massas do composto C1-Br-Lut, utilizando o DMSO como solvente, figura 51.

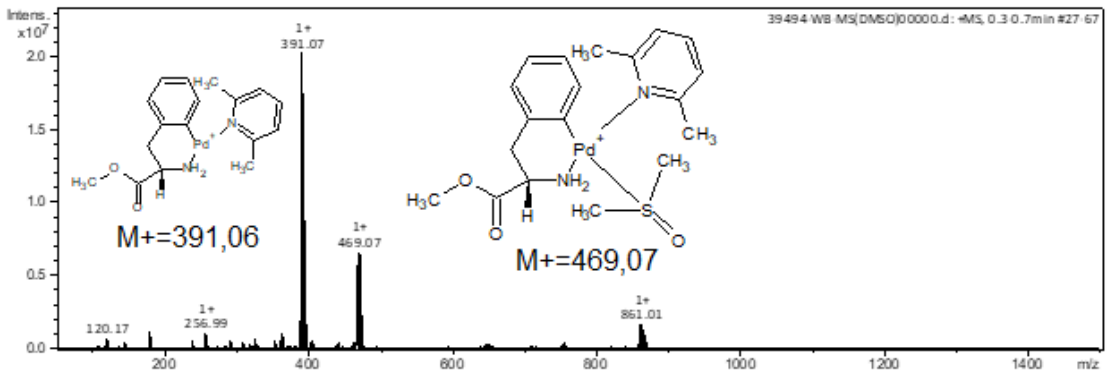


Figura 51: Espectro de massas do C1-Br-Lut e C1-Lut-X em DMSO.
Fonte: Do Autor.

Ao analisar o espectro de massas, figura 51, é possível observar a existência do íon $[Pd(L\text{-}Fame)(2,6\text{-}lut)]^+$ e o íon $[Pd(L\text{-}Fame)(2,6\text{-}lut)(DMSO)]^+$, em 391,07 e 469,07, respectivamente. Deste modo, é provável que uma das espécies formadas

em DMSO puro seja o complexo $[Pd(L\text{-}Fame)(2,6\text{-}lut)(DMSO)]^+$ atribuído como especie C1-Lut-Y.

Neste momento, é oportuno fazer algumas considerações sobre o complexo C1-Lut-Br em solução de DMSO. Com base nos resultados obtidos, sugere-se que o brometo coordenado do ciclopaladado é substituído por uma molécula de DMSO imediatamente após a dissolução:

$$[PdBr(L\text{-}Fame)(2,6\text{-}lut)(Br)] + DMSO \rightarrow [Pd(L\text{-}Fame)(2,6\text{-}lut)(DMSO)]^+ + Br^-$$

A espécie $[Pd(L\text{-}Fame)(2,6\text{-}lut)(DMSO)]^+$ está associada ao conjunto de sinais assinalados pela letra X. A espécie relacionada ao conjunto Y de sinais é encontrada em uma maior quantidade. Os resultados de RMN mostraram não somente que a ausência da lutidina na estrutura da espécie Y, mas também sinais da 2,6-lutidina descoordenada. Assim, um processo provável que pode ocorrer em solução é representado pela equação abaixo:

$$[PdBr(L\text{-}Fame)(2,6\text{-}lut)(DMSO)] + 2\ DMSO \rightarrow [Pd(L\text{-}Fame)(DMSO)_2]^+ + Br^- + lut$$

A substituição da 2,6-lutidina pelo DMSO (um ligante menos impedido estéricamente) deve ocorrer como uma resposta do sistema para aliviar as tensões provocadas pelo impedimento estérico da 2,6-lutidina na esfera de coordenação. É importante salientar que a água do solvente, também pode exercer essa mesma função. Tal comportamento já foi evidenciado em outros complexos ciclopaldados contendo 2,6-lutidina (da Cunha et al., 2020; Zanetti et al., 2022). É importante destacar que este comportamento não foi detectado quando o solvente empregado era acetona. O baixo poder coordenante da acetona não é capaz de substituir a 2,6-lutidina da estrutura do ciclopaladado, sendo observado assim um único conjunto de sinais no espectro de RMN.

Foi realizado o estudo de comportamento em condições próximas das fisiológicas. O primeiro teste realizado foi com a utilização de 600 µL de uma solução composta por 80% de DMSO-d_6, 10% de óxido de deutério (D_2O),10% de tampão fosfato, com pH=7,4, e 4,24 µM do complexo C1-Br-Lut. No segundo teste, foram

utilizadas as mesmas condições, mas com o acréscimo de 100 mM de cloreto. Os testes foram realizados com o tempo igual a 0 e 48h, no qual os resultados são dispostos na figura 52.

Ao analisar os dois primeiros espectros da figura 52, no qual, com condições de 80% DMSO-d_6, 10% D_2O e 10% tampão, é observado que a formação de duas espécies em solução. Os sinais observados em 0h são os mesmos observados em 48h, este fato indica que a formação da nova espécie C1-Br-Lut-Y é instantânea quando o C1-Br-Lut é solubilizado nestas condições. Outro teste realizado empregando 80% DMSO-d_6, 10% D_2O, 10% tampão e 100 mM de cloreto, no qual é representado na figura 52. A presença de cloreto não foi capaz de inibir a formação da nova espécie, e ambas as espécies se mostraram presentes no meio com condições fisiológicas, isso possibilitou que novos testes de citotoxicidade fossem realizados empregando o DMSO com solvente do composto C1-Br-Lut.

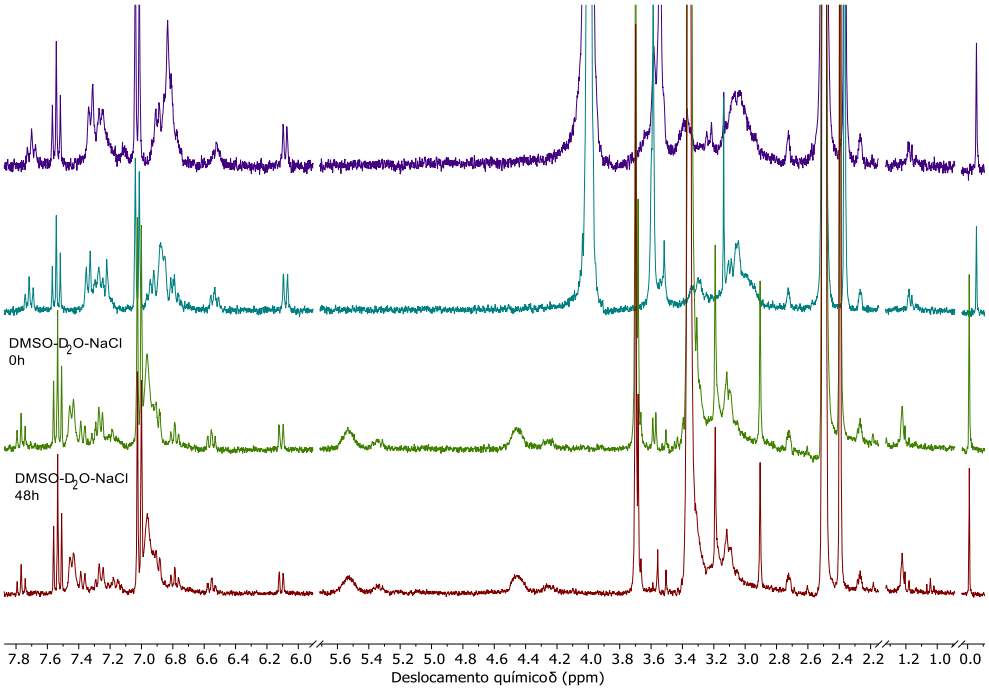


Figura 52: Estudo comportamento em solução de 80 % DMSO-d_6, 10% D2O, 10% (v/v) de tampão fosfato e 100 mM cloreto do C1-Br-Lut-X.
Fonte: Do Autor.

5.3. Atividade Antiproliferativa

Os estudos em solução indicaram que o complexo C1-Br-Lut apresenta um comportamento distinto para ambos os solventes, o mesmo teve sua atividade antiproliferativa testada para os dois solventes.

Deste modo, o composto C1-Br-Lut foi submetido aos testes de citotoxicidade, utilizando acetona como solvente. As linhagens celulares utilizadas neste primeiro caso foram: A2780cis (tumoral de ovário com resistência a cisplatina), MRC5 (não tumoral de pulmão de origem fetal), DU-145 (tumoral de próstata) e PNT2 (não tumoral de próstata). Os resultados podem ser observados na tabela 9.

Tabela 9: Resultados de citotóxicidade para C1-Br-Lut, 2,6-Lutidina e cisplatina em acetona.

Linhagens celulares	IC_{50} (μM)		
	C1-Br-Lut	2,6-Lutidina	Cisplatina
A2780cis	88,24 ± 0,11	>100	25,09 ± 0,89
MRC5	>100	>100	21,62 ± 0,80
PNT2	52,57 ± 0,04	>100	14,73 ± 0,41
DU-145	>100	>100	> 100

Fonte: Do Autor.

Analisando os dados de viabilidade celular presentes na tabela 9, observou-se que a espécie formada em solução apresenta uma atividade inibitória muito baixa. Ou seja, é necessária uma grande concentração do composto C1-Br-Lut para inibir a proliferação celular. Além disso, ao comparar os resultados entre a cisplatina e o complexo em estudo, notou-se uma atividade muito superior da cisplatina. Como controle, a 2,6-lutidina demonstrou ser inativa em todas as linhagens nas concentrações testadas.

Devido à baixa atividade citotóxica obtida com o complexo C1-Br-Lut quando solubilizado em acetona, resolveu-se empregar outro solvente para a realização do teste de citotoxicidade, neste caso o solvente escolhido foi o DMSO, uma vez que, o composto C1-Br-Lut apresenta uma excelente solubilidade no mesmo e um novo

conjunto de sinais foram identificados no espectro de RMN ^{1}H, sendo atribuído como C1-Lut-Y.

Deste modo, o composto C1-Br-Lut foi submetido a novos testes de citotoxicidade, utilizando dimetilsulfóxido como solvente. As linhagens celulares utilizadas foram: A2780cis (tumoral de ovário com resistência a cisplatina), A549 (tumoral de pulmão), HepG2 (tumoral de fígado), MDA-MB-231 (tumoral de mama triplo-negativo) e MRC5 (não tumoral de pulmão de origem fetal). Os valores são observados na tabela 10.

Tabela 10: Resultados de citotoxicidade para C1-Br-Lut, 2,6-Lutidina e cisplatina em DMSO.

Linhagens celulares	IC_{50} (μM)		
	C1-Br-Lut	2,6-Lutidina	Cisplatina
A2780cis	9,13 ± 0,25	>100	25,09 ± 0,89
MRC5	67,98 ± 0,53	>100	21,62 ± 0,80
A549	60,74 ± 4,69	>100	13,01 ± 0,47
HepG2	12,51 ± 0,68	>100	19,63 ± 0,66
MDA-MB-231	6,04 ± 0,40	>100	33,14 ± 0,36

Fonte: Do Autor.

Analisando os resultados obtidos na tabela 10, podemos constatar o efeito do DMSO na citotoxicidade, especialmente nas linhagens A2780 cis. Em acetona, o valor de IC_{50} foi de 88,24 ± 0,11 μM enquanto em DMSO, esse valor diminuiu para 9,13 ± 0,25 μM. Em face da discussão das espécies formadas em solução de DMSO e acetona, é provável que as espécies [PdBr(L-Fame)(2,6-lut)(DMSO)] e/ou $[Pd(L\text{-}Fame)(DMSO)_2]^+$ seja(m) a(s) espécie(s) responsável(is) pela atividade citotóxica observada na linhagem A2780cis. O composto dissolvido em DMSO apresenta uma atividade considerável para as linhagens MDA-MB-231 (célula tumoral de mama triplo-negativo) e HepG2 (célula tumoral de fígado), todas apresentado resultados superiores que a cisplatina. Considerando o efeito citotóxico observado, foram iniciados alguns experimentos visando aumentar nosso conhecimento sobre os possíveis alvos farmacológicos desses complexos. Nesse estudo, foram iniciados os ensaios com a biomolécula do DNA.

5.4. Ensaios de interações com ctDNA

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é um dos responsáveis por armazenar e transmitir as informações genéticas, responsáveis para o funcionamento das células, sendo uma condição vital para a vida.

A biomolécula DNA, apresenta variações estruturais (isoformas) dependentes do meio onde se encontra, figura 53. A forma do A-DNA é encontrada em meio com baixa concentração de água, apresentando diâmetro de aproximadamente 26 Å e espaçamento entre os pares de bases 2,7 Å. Outra forma encontrada é Z-DNA que possui rotação da hélice para esquerda, sendo bem diferente das outras duas conformações. O B-DNA é a forma fisiológica mais encontrada, onde as interações com as bases nitrogenadas promovem a formação da dupla hélice com rotação a direita e das fendas menor e maior, seu diâmetro é de aproximadamente 20 Å com espaçamento entre os pares de base de 3,4 Å (de Almeida et al., 2005).

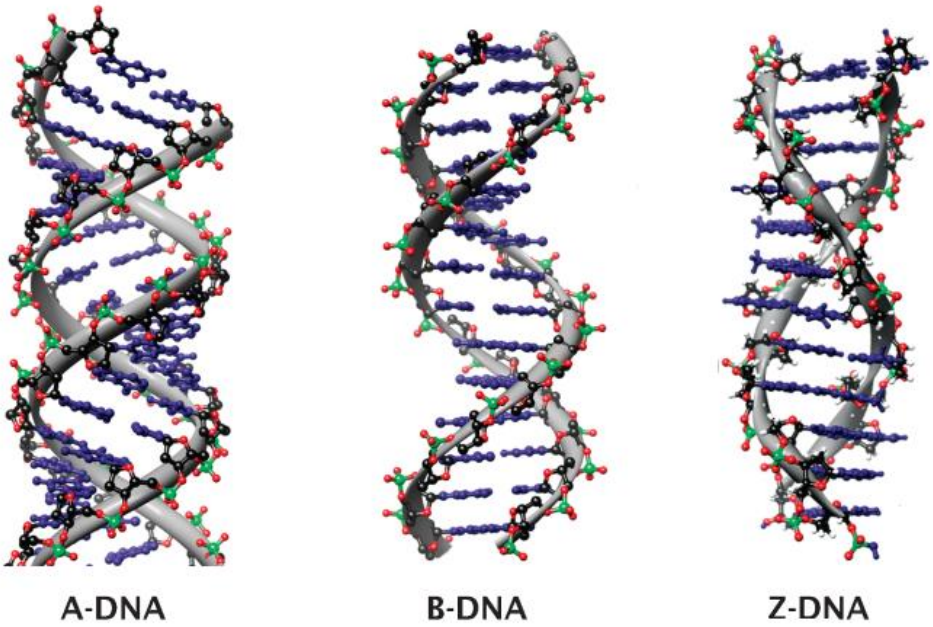


Figura 53: Formas do DNA.

Fonte: Adaptado de Nakamoto et al. (2008).

No entanto, o DNA apresenta um papel bem estabelecido na carcinogênese, uma vez que, é o responsável pela divisão celular e síntese proteica. O câncer surge a partir de mutações genéticas, ou seja, alterações no material genético das células. Durante o ciclo celular, ocorre a replicação dessa célula com anomalia, fazendo com que o número de células aumente de forma exponencial e trabalhe de forma desordenada, gerando o câncer (Junqueira & da Silva Filho, 2012).

Diversos agentes antitumorais utilizados clinicamente nos tratamentos de cânceres, apresentam mecanismos de ação relacionado ao DNA. Dentre desta classe de atuação, existem as subclasses em relação aos mecanismos, como os medicamentos que apresentam a capacidade de inibir a síntese de nucleotídeos, outros que tem o efeito direto com o DNA, ligantes que interagem na fenda menor da estrutura da biomoléculas e compostos que alteram as propriedades de pareamento das bases nucleares (de Almeida et al., 2005).

Os fármacos 5-Fluoroouracil e Metotrexato (MXT) são agentes antimetabólicos, no qual, atuam por meio do bloqueio bioquímico da síntese do DNA, inviabilizando o ciclo celular. No entanto, os antitumorais mais usados e estudados são agentes que atuam como eletrófilos sobre macromoléculas nucleofílicas, formando ligações cruzadas com as fitas ou filamentos do DNA, como por exemplo as mostardas nitrogenadas, meclorometamina, que foi utilizada com sucesso para induzir remissão tumoral em um paciente portador de linfoma (de Almeida et al., 2005).

A ligação de metalofármacos em determinadas regiões do DNA é um importante ramo de estudo da química medicinal, a natureza dessas interações, aliadas à seletividade de sequências, fazem parte da espinha dorsal das pesquisas de novos fármacos (Kellett et al., 2019).

Os principais modos de ligação entre complexos de metais de transição e o DNA são classificados como reversíveis e irreversíveis. As interações denominadas como irreversíveis, são quando as metalodrogas ligam-se com o DNA por meio das ligações covalentes coordenadas, formada entre o íon metálico e os átomos doadores de pares de elétrons da molécula de DNA (Andrezálová et al., 2021; Kellett et al.,

2019). Existem vários locais disponíveis para as ligações dos íons metálicos à moléculas de DNA, contudo, os centros metálicos acabam ligando-se preferencialmente ao átomo de N7 das base purinas G e A ou pirimídica C. O exemplo clássico que liga ao DNA covalentemente é a cisplatina (Oun et al., 2018).

O modo de ação antitumoral da cisplatina envolve a sua ligação ao DNA e é um dos exemplos mais discutidos da literatura sobre a interação entre complexos metálicos e a biomoléculas. O principal aduto cisplatina-DNA é as ligações cruzadas 1,2 – intrafita (G-G) entre duas guaninas adjacentes, que corresponde a cerca de 65% de todos os adutos e em menor extensão são as ligações cruzadas 1,3 – intrafita (G-A), sendo de 25% de todos os adutos. Entretanto, existe a ligação cruzada interfita (G-G), correspondendo cerca de 3 a 5% dos adutos (Andrezálová et al., 2021; Oun et al., 2018; Rocha et al., 2018), conforme a figura 54.

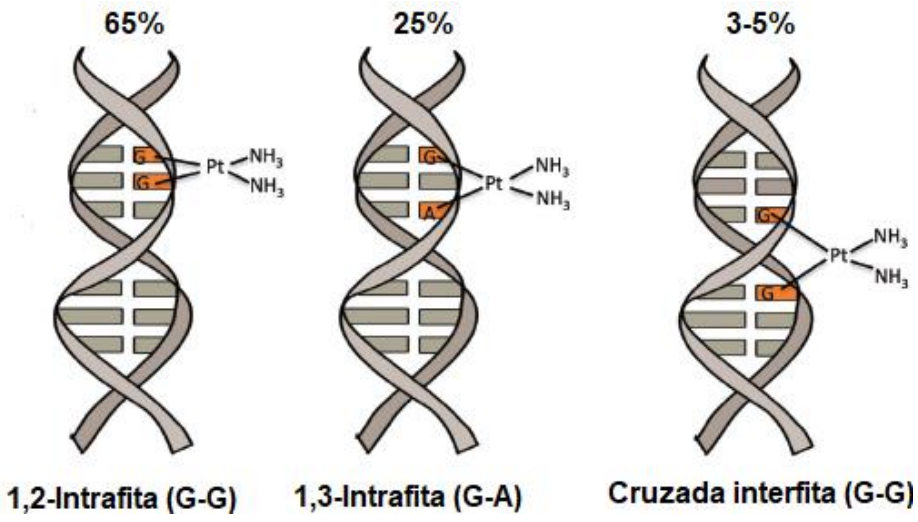


Figura 54: Ligações covalentes coordenadas da Cisplatina com o DNA.

Fonte: Adaptado de Rocha et al. (2018).

O modo de ligação reversível é fundamentado nas interações não covalentes entre o complexo e DNA como atração eletrostática, ligação de hidrogênio, Van der Waals, forças e interações hidrofóbicas (Andrezálová & Országhová, 2021). Os complexos metálicos que se ligam ao DNA por ligações não covalentes, apresentam três tipos principais de contato, que são as intercalações, inserções e interação por sulcos, figura 55 (Kellett et al., 2019).

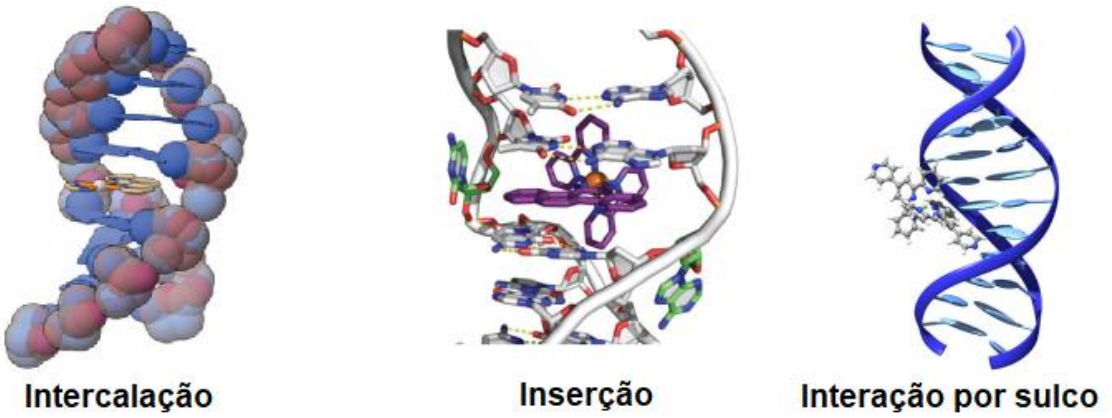


Figura 55: Interações não covalentes com o DNA.

Fonte: Adaptado de Gattuso et al., 2015; Pages et al., 2015 Kellett et al., 2019.

As ligações por intercalação são observadas quando as moléculas apresentam uma configuração estrutural planar. Esse arranjo estrutural, permite que os complexos sejam inseridos entre as bases do DNA, no qual, atuam como uma espécie de base extra, levando a uma expansão da pilha de bases de DNA. As moléculas que atuam por inserção tomam o lugar das nucleobases mal pareadas na dupla hélice, diferente dos metalointercaladores. No modo de ligação por sulco, as moléculas ficam no sulco maior ou menor com contato próximo aos grupos açúcar fosfato, essa interação pode ser alcançada por moléculas lineares estendidas que envolva uma das ranhuras da estrutura de dupla hélice (Metzler-Nolte & Schatzschneider, 2009).

Quando as interações de ligação fármaco-DNA se estabelecem, pode-se iniciar uma ação citotóxica que interferem em muitos processos do ciclo celular, como replicação e transcrição. Ao interromper o ciclo celular, começam a atuação dos mecanismos de reparo do DNA para remover as lesões. Porém, em casos de reparo prejudicado ou excesso de danos, as células sofrem apoptose, ou seja, sofrem morte celular, podendo interromper a propagação de células cancerígenas (Rocha et al., 2018).

Desta forma, existem várias técnicas experimentais para estudar a interação de complexos metálicos com a biomolécula de ctDNA, Entre as quais incluem a

titulação espectroscópica do DNA na região do ultravioleta-vísivel (UV-Vis), dicroísmo circular (CD) e o ensaio de competição com o corante Hoeschst 33258, sendo as técnicas empregadas para avaliar a interação do composto C1-Br-Lut frente ao ctDNA.

5.4.1. Titulação espectrofotométrica do DNA por UV-Vis

Dentre as técnicas mais comumente empregadas e de fácil execução, os métodos baseados em mudanças na absorção ou emissão ópticas, oriundas das propriedades dos complexos metálicos livres em comparação quando ligados ao DNA. Neste cenário, a região espectral UV-Vis ganha um grande destaque, devido a presença das bandas de absorção, muitas vezes de grande intensidade, dos complexos metálicos, que geralmente sofrem um processo de deslocamento batocrômico ou hipsocrômico após a ligação à dupla hélice de DNA (Metzler-Nolte et al., 2009). Interações fortes, como intercalação, provocam um hipocromismo significativo (>35 %) e um efeito batocrômico (>15 nm). Por outro lado, moléculas que se ligam no sulco ou por interações eletrostáticas com a superfície externa do DNA são acompanhadas por um batocromismo baixo (6–8 nm) ou inexistente (Rehman et al., 2015).

Deste modo, a titulação monitorada por espectrometria de absorção na região do UV-Vis é comumente empregada para estudar a interação de complexos metálicos com o DNA. A técnica consiste em coletar os espectros de absorção do complexo C1-Br-Lut, em uma concentração fixa de 20 µM, na ausência e com a presença de ctDNA com a variação da concentração de 0 a 60 µM, os dados obtidos estão presentes na figura 56.

Com as informações obtidas na figura 56, é possível calcular magnitude da força de ligação (Kb), formada entre as espécies, através da equação Benesi-Hildebrand, equação 6. O valor de Kb é obtido através da regressão linear entre $\frac{A_0}{A - A_0}$ em função de $\frac{1}{[DNA]}$, figura 56.

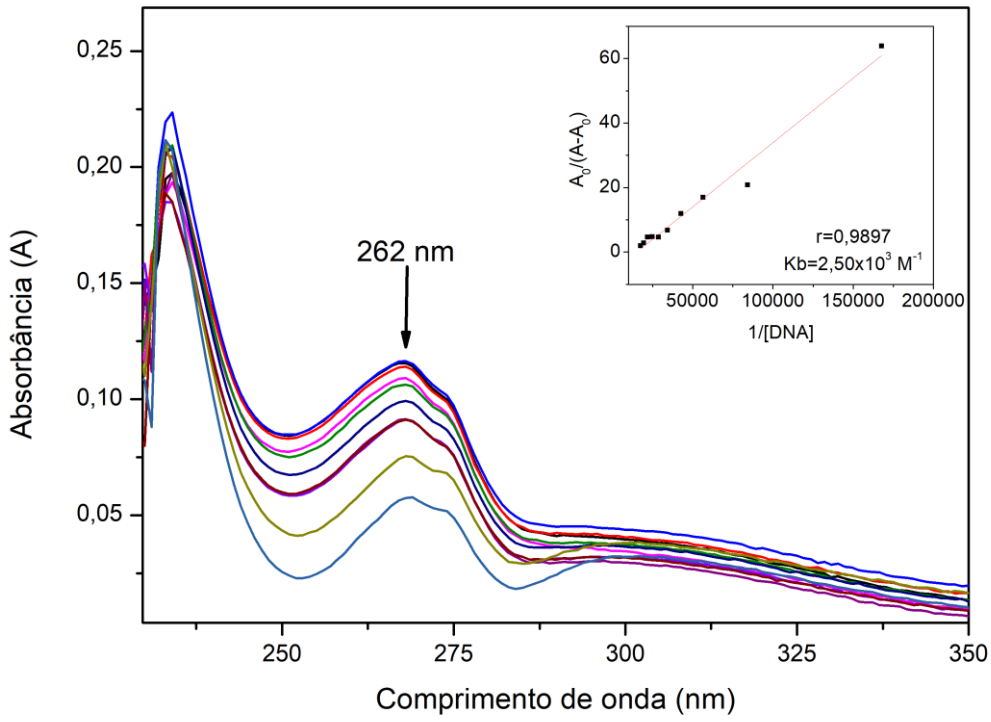


Figura 56: Titulação espectrofotométrica do DNA e determinação da constante de ligação Kb.

Fonte: Do Autor.

O complexo livre apresenta bandas intensas na região de 234 e 262 nm, indicando a presença de um sistema aromático, sendo atribuídas para as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ referente aos ligantes aromáticos substituídos. Outra banda de absorção com menor intensidade é encontrada em 310 nm, representando a transição de transferência de carga metal-ligante. No entanto, a banda de 262 nm foi monitorada para a realização do estudo de interação. Após as adições sucessivas de ctDNA, observou-se um efeito hipocrômico (45%) desta banda com o aumento da [DNA]. Entretanto, a ausência de um deslocamento batocrômico sugere que a interação entre o ciclopaladado e o DNA seja não-intercalativa.

O valor da constate intrínseca de formação, Kb, é utilizado para comparar a magnitude da força de associação entre o complexo metálico e o DNA. Em sistema com moléculas que interagem por meio do mecanismo de intercalação, os valores de

Kb variam entre 10^5 a 10^7 M^{-1}, enquanto os mecanismos com interações por vias não covalentes nos sulcos, apresentam grandezas em torno de 10^3 a 10^4 M^{-1}. O complexo C1-Br-Lut apresentou Kb de 2,50x10^3 M^{-1}, conforme a tabela 11. Esse valor indica que existe uma fraca interação entre o complexo e o ctDNA, sendo possível a formação de interações de natureza eletrostática fraca e/ou com os sulcos do ctDNA.

Tabela 11: Dados de constante de ligação Kb.

λ (nm)	Kb (x 10^3 M^{-1})	r
262	2,5	0,9897

Fonte: Do Autor.

5.4.2. Ensaio de interação com DNA via dicroísmo circular

A técnica de dicroísmo circular (CD) consiste na absorção diferenciada da luz polarizada no sentido horário ou no sentido anti-horário de partículas por uma amostra que apresente antissimetria molecular (Metzler-Nolte et al., 2009).

O CD é usado extensivamente para o estudo das estruturas secundárias de biomoléculas, como proteínas e o DNA. No caso do DNA, as bases nitrogenadas são aquirais, porém, quando ligadas a um açúcar por ligação β-glicosídica, originando um arranjo helicoidal empilhada, acabam tornando-se um composto quiral (Kellett et al., 2019). Desta forma, quando as metalodrogas interagem com o DNA e ocorrem mudanças conformacionais na sua estrutura, essas mudanças podem ser determinas pela técnica de CD.

A biomolécula de ctDNA apresenta absorção na região de 200 a 320 nm no espectro de CD, uma banda negativa em 244 nm, atribuída à estabilização da forma B do ctDNA e uma positiva em 276 nm atribuída ao empilhamento das nucleobases (Kellett et al., 2019).

Para a realização do estudo, a concentração de ctDNA foi fixada em 50 µM e as concentrações do complexo C1-Br-Lut, foram de 0 a 15 µM, gerando uma razão molar Cx/DNA de 0 a 0,3, conforme a figura 57.

As mudanças na conformação do DNA são provocadas por compostos que apresentam uma interação por modo de intercalação. Desta forma, o espectro de CD do ctDNA apresentará variações significativas nas elipticidades dos sinais. Entretanto, quando as interações apresentam um caráter eletrostático ou hidrofóbico nos sulcos, a conformação do ctDNA sofre pouca ou nenhuma alteração. Logo, o espectro de CD não é modificado (Alarcón et al., 2022).

.

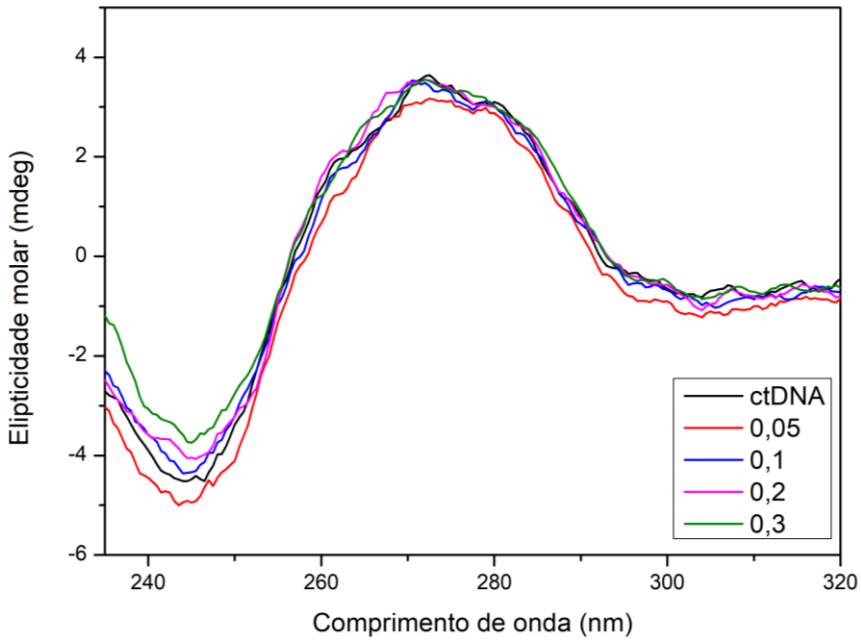


Figura 57: Espectro de CD do ctDNA livre e com a presença do complexo C1-Br-Lut pela razão molar.

Fonte: Do Autor.

As informações obtidas nos espectros de CD, figura 57, mostraram que mesmo variando as razões molares complexo: DNA, não foram observadas alterações significativas nas bandas. Esse fato, indica que o modo de interação é por caráter eletrostático e/ou por meio da interação por sulco. Além disso, essa hipótese é

corroborada com a magnitude do Kb de $2{,}50x10^{3}$ M^{-1}, obtido na titulação espectrofotométrica do ctDNA.

5.4.3. Ensaio de competição pelo ctDNA com Hoechst 33258

O Hoechst 33258 é um corante fluorescente, figura 58-a, que apresenta a capacidade de ligar em lugares específicos do ctDNA. Este composto interage por meio de interações eletrostáticas no sulco menor do DNA, em segmentos ricos em bases de adenina (A) e Timina (T) (Alarcón et al., 2022) e a estrutura do ctDNA não é afetada pela interação com o corante. Os corantes Hoechst são excitados por um comprimento de onda de 338 nm e emitem na faixa de 452 nm, dentro do espectro da cor azul. Após a ligação com o DNA, figura 58-b, sua fluorescência aumenta cerca de 30 vezes em comparação com o corante livre. O aumento é resultado da supressão do relaxamento rotacional e da hidratação, após a interação com o DNA (Bucevičius et al., 2018).

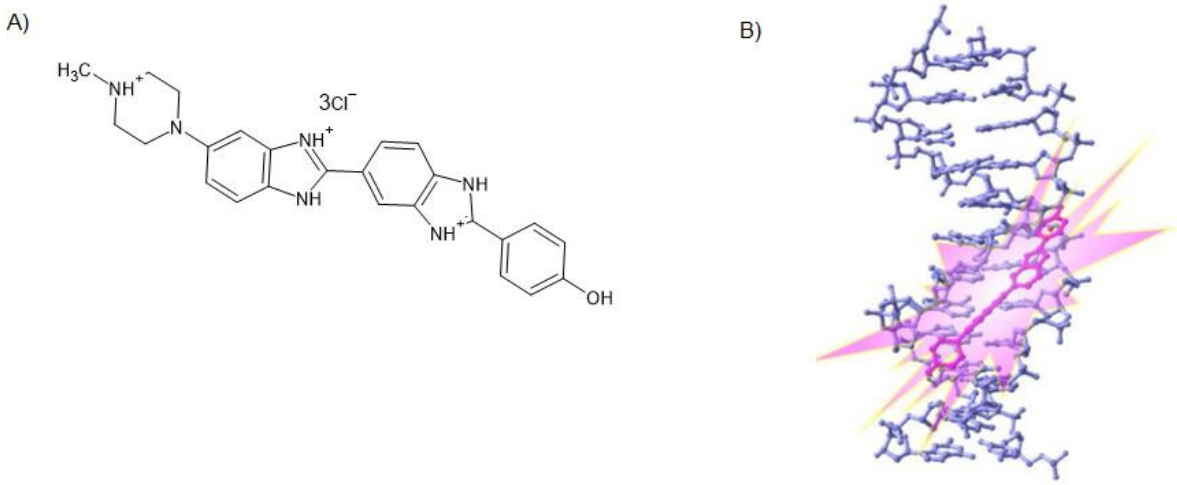


Figura 58: a) Estrutura do Hoescht 33258. b) Interação DNA-H33258.

Fonte: Adaptado de Bucevičius et al., 2018.

Desta forma, com o objetivo determinar, de forma mais detalhada, a capacidade do C1-Br-Lut de atuar como um ligante de sulco, realizou-se um experimento de competição para determinar se o complexo era capaz de deslocar o corante H33258 ligado ao ctDNA. O experimento foi realizado a partir de uma concentração fixa do

ctDNA de 60 µM com 6 µM do corante, variando a concentração do complexo de 0 a 60 µM, de modo que o percentual de DMSO não excedesse 1% (v/v). Os dados obtidos, estão representados na figura 59.

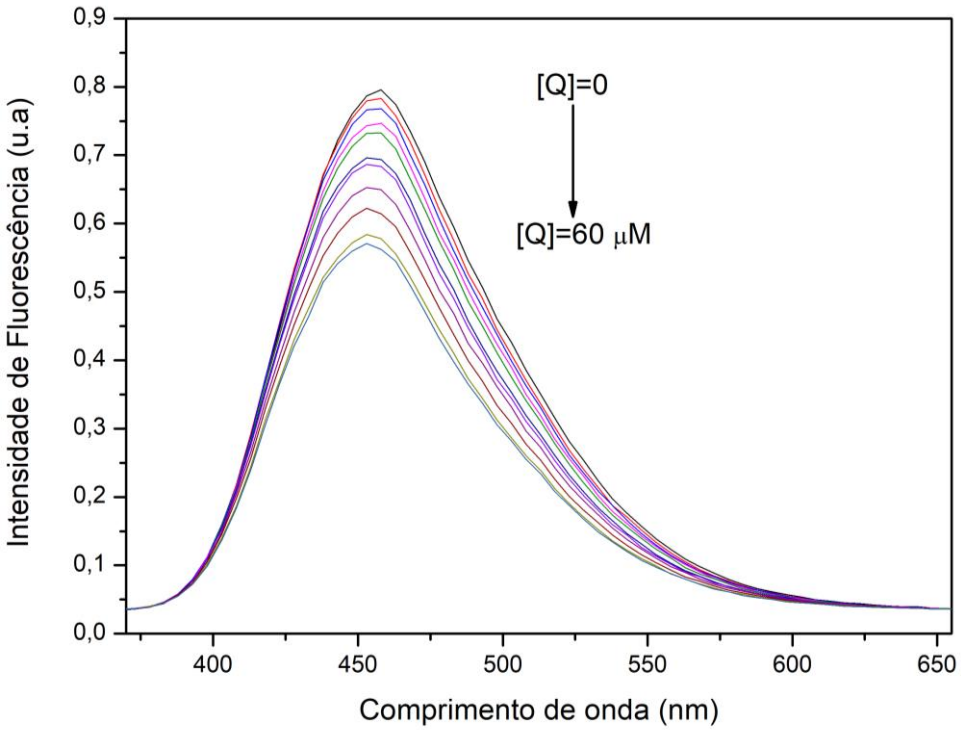


Figura 59: Espectro de supressão da fluorescência do Hoechst 33258 – ctDNA com ausência e presença do supressor C1-Br-Lut com a variação da concentração de 0 a 60 µM.

Fonte: Do Autor.

Observa-se que o aumento da concentração do C1-Br-Lut foi capaz de causar a supressão moderada da fluorescência do sistema Hoescht-ctDNA, mesmo na presença de um excesso do complexo. Isso indica que as forças que mantém o Hoescht ligado ao DNA são significativamente mais fortes que aquelas que o ciclopaladado venha a estabelece com o DNA. Entretanto, apesar do deslocamento do Hoechst geralmente ser atribuído a um evento de competição pela ligação ao sulco menor, existe a possibilidade deste corante ser deslocado por outras moléculas que se ligam em diferentes regiões do DNA, uma vez que a fluorescência do sistema Hoescht-ctDNA não foi completamente suprida, mesmo na presença de um excesso do complexo.

6. CONCLUSÃO

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

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

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

REFERÊNCIAS

Alarcón, L. P., Andrada, H. E., Olivera, M. E., Fernando Silva, O., & Dario Falcone, R. (2022). Carrier in carrier: Catanionic vesicles based on amphiphilic cyclodextrins complexed with DNA as nanocarriers of doxorubicin. *Journal of Molecular Liquids*, *360*, 119488. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119488

Andrezálová, L., & Országhová, Z. (2021). Covalent and noncovalent interactions of coordination compounds with DNA: An overview. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *225*, 111624. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111624

Bangde, P., Prajapati, D., Dandekar, P., Fairlamb, I. J. S., & Kapdi, A. R. (2019a). Palladacycles as Potential Anticancer Agents. In *Palladacycles* (pp. 343–370). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815505-9.00010-X

Bangde, P., Prajapati, D., Dandekar, P., Fairlamb, I. J. S., & Kapdi, A. R. (2019b). Palladacycles as Potential Anticancer Agents. In *Palladacycles* (pp. 343–370). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815505-9.00010-X

Bangde, P., Prajapati, D., Dandekar, P., Fairlamb, I. J. S., & Kapdi, A. R. (2019c). Palladacycles as Potential Anticancer Agents. In *Palladacycles* (pp. 343–370). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815505-9.00010-X

Bechara, A., Barbosa, C. M. V., Paredes-Gamero, E. J., Garcia, D. M., Silva, L. S., Matsuo, A. L., Nascimento, F. D., Rodrigues, E. G., Caires, A. C. F., Smaili, S. S., & Bincoletto, C. (2014). Palladacycle (BPC) antitumour activity against resistant and metastatic cell lines: The relationship with cytosolic calcium mobilisation and cathepsin B activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *79*, 24–33. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.073

Bincoletto, C., Tersariol, I. L. S., Oliveira, C. R., Dreher, S., Fausto, D. M., Soufen, M. A., Nascimento, F. D., & Caires, A. C. F. (2005). Chiral cyclopalladated complexes derived from N,N-dimethyl-1-phenethylamine with bridging bis(diphenylphosphine)ferrocene ligand as inhibitors of the cathepsin B activity

and as antitumoral agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *13*(8), 3047–3055. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.01.057

Bucevičius, J., Lukinavičius, G., & Gerasimaitė, R. (2018). The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and beyond. *Chemosensors*, *6*(2), 18. https://doi.org/10.3390/chemosensors6020018

Caires, A. C. F., & Mauro, A. E. (1996). Compostos ciclometalados de coordenação intramolecular. *Química Nova*, *19*.

Chelly, S., Maulaz, P., Bigot, P., Azzouzi, A., & Lebdai, S. (2020). Erectile function after WST11 vascular-targeted photodynamic therapy for low-risk prostate cancer treatment. *Asian Journal of Andrology*, *22*(5), 454. https://doi.org/10.4103/aja.aja_138_19

Ciarimboli, G. (2021). Anticancer Platinum Drugs Update. *Biomolecules*, *11*(11), 1637. https://doi.org/10.3390/biom11111637

Cohen, S. M., & Lippard, S. J. (2001). *Cisplatin: From DNA damage to cancer chemotherapy* (pp. 93–130). https://doi.org/10.1016/S0079-6603(01)67026-0

Corinti, D., Coletti, C., Re, N., Chiavarino, B., Crestoni, M. E., & Fornarini, S. (2016). Cisplatin Binding to Biological Ligands Revealed at the Encounter Complex Level by IR Action Spectroscopy. *Chemistry - A European Journal*, *22*(11), 3794–3803. https://doi.org/10.1002/chem.201504521

Cortés, R., Crespo, M., Davin, L., Martín, R., Quirante, J., Ruiz, D., Messeguer, R., Calvis, C., Baldomà, L., Badia, J., Font-Bardía, M., Calvet, T., & Cascante, M. (2012). Seven-membered cycloplatinated complexes as a new family of anticancer agents. X-ray characterization and preliminary biological studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *54*, 557–566. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.06.002

Cutillas, N., Yellol, G. S., de Haro, C., Vicente, C., Rodríguez, V., & Ruiz, J. (2013). Anticancer cyclometalated complexes of platinum group metals and gold.

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

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

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

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

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

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

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

Gomes, H. M. da S., do Nascimento, J. C. H. B., Sousa, A. R. C., & Almeida, A. N. de M. (2021). GASTOS DO SISTEMA PÚBLICO DE SAÚDE COM TRATAMENTO EM ONCOLOGIA. *RAHIS- Revista de Administração Hospitalar e Inovação Em Saúde*, *18*(2), 74–89. https://doi.org/10.21450/rahis.v18i2.6877

Hoeschele, J. D. (2014). Biography of Professor Barnett: a tribute to his life and his achievements. *Anticancer Research*, *34*, 417–421.

Jones, C., & Thornback, J. (2007). *Medicinal Applications of Coordination Chemistry*. Royal Society of Chemistry. https://doi.org/10.1039/9781847557759

Junqueira, L. C., & da Silva Filho, J. C. (2012). *Biologia Celular e Molecular* (9th ed.). Guanabara Koogan.

Karami, K., Jamshidian, N., & Zakariazadeh, M. (2019a). Synthesis, characterization and molecular docking of new C,N-palladacycles containing pyridinium-derived ligands: DNA and BSA interaction studies and evaluation as anti-tumor agents. *Applied Organometallic Chemistry*, *33*(3), 1–22. https://doi.org/10.1002/aoc.4728

Kellett, A., Molphy, Z., Slator, C., McKee, V., & Farrell, N. P. (2019a). Molecular methods for assessment of non-covalent metallodrug–DNA interactions. *Chemical Society Reviews*, *48*(4), 971–988. https://doi.org/10.1039/C8CS00157J

Kumar, V., Pritzker, D. N., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (n.d.). *Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças 9ª EDIÇÃO*.

Lebdai, S., Bigot, P., Leroux, P.-A., Berthelot, L.-P., Maulaz, P., & Azzouzi, A.-R. (2017). Vascular Targeted Photodynamic Therapy with Padeliporfin for Low Risk Prostate Cancer Treatment: Midterm Oncologic Outcomes. *Journal of Urology*, *198*(2), 335–344. https://doi.org/10.1016/j.juro.2017.03.119

MEDICI, A. C. (2018). *Custo do Tratamento do Câncer no Brasil: Como Melhorar o Foco*. https://www.researchgate.net/publication/323879334

Mendez, L. C., Moraes, F. Y., Fernandes, G. dos S., & Weltman, E. (2018). Cancer Deaths due to Lack of Universal Access to Radiotherapy in the Brazilian Public Health System. *Clinical Oncology*, *30*(1), e29–e36. https://doi.org/10.1016/j.clon.2017.09.003

Metzler-Nolte, N., & Schatzschneider, U. (2009). *Bioinorganic Chemistry: A practical course* . Walter de Gruyter.

Miessler, G., Fischer, P., & Tarr, D. A. (2014). *Química Inorgânica* (5th ed.). Pearson Education.

Moraes, V. W. R., Caires, A. C. F., Paredes-Gamero, E. J., & Rodrigues, T. (2013). Organopalladium compound 7b targets mitochondrial thiols and induces caspase-dependent apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Cell Death & Disease*, *4*(6), e658–e658. https://doi.org/10.1038/cddis.2013.190

Nakamoto, K., Tsuboi, M., & Strahan, G. D. (2008). *Drug–DNA Interactions*. John Wiley & Sons, Inc. https://doi.org/10.1002/9780470370612

Naskar, R., Ghosh, P., Manna, C. K., Murmu, N., & Mondal, T. K. (2022). Palladium(II) complexes with thioether based ONS donor ligand: Synthesis, characterization, X-ray structure, DFT study and anti-cancer activity. *Inorganica Chimica Acta*, *534*, 120802. https://doi.org/10.1016/j.ica.2022.120802

Omae, I. (2014). Applications of five-membered ring products of cyclometalation reactions as anticancer agents. *Coordination Chemistry Reviews*, *280*, 84–95. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.019

Oun, R., Moussa, Y. E., & Wheate, N. J. (2018). The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Transactions*, *47*(19), 6645–6653. https://doi.org/10.1039/C8DT00838H

Pages, B. J., Ang, D. L., Wright, E. P., & Aldrich-Wright, J. R. (2015). Metal complex interactions with DNA. In *Dalton Transactions* (Vol. 44, Issue 8, pp. 3505–3526). Royal Society of Chemistry. https://doi.org/10.1039/c4dt02700k

Pasetto, L. M., D'Andrea, M. R., Brandes, A. A., Rossi, E., & Monfardini, S. (2006). The development of platinum compounds and their possible combination. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *60*(1), 59–75. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2006.02.003

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., & VYVYAN, J. R. (2010). *Introdução a Espectroscopia: Vol. 4ª ed.* (Cengage Learning).

Rehman, S. U., Sarwar, T., Husain, M. A., Ishqi, H. M., & Tabish, M. (2015). Studying non-covalent drug–DNA interactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *576*, 49–60. https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.03.024

RICCI, G. F. B. (2018). *Oximas ortopaladadas contendo fosfinas: síntese, caracterização estrutural e estudos biológicos*. Tese (doutorado) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química.

Rocha, C. R. R., Silva, M. M., Quinet, A., Cabral-Neto, J. B., & Menck, C. F. M. (2018). DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics*, *73*, e478s. https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e478s

Rodrigues, E. G., Silva, L. S., Fausto, D. M., Hayashi, M. S., Dreher, S., Santos, E. L., Pesquero, J. B., Travassos, L. R., & Caires, A. C. F. (2003). Cyclopalladated compounds as chemotherapeutic agents: Antitumor activity against a murine melanoma cell line. *International Journal of Cancer*, *107*(3), 498–504. https://doi.org/10.1002/ijc.11434

Rosenberg, B., & Camp, L. van. (1970). The successful regression of large solid S180 tumors by platinum compounds. *Cancer Research*, *30*, 1799–1802.

Rubino, S., Busà, R., Attanzio, A., Alduina, R., di Stefano, V., Girasolo, M. A., Orecchio, S., & Tesoriere, L. (2017). Synthesis, properties, antitumor and antibacterial activity of new Pt(II) and Pd(II) complexes with 2,2′-dithiobis(benzothiazole) ligand. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *25*(8), 2378–2386. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.067

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., & KIEMLE, E. D. J. (2005). *Spectrometric Identification of organic compounds* (7th ed.). John Wiley & Sons.

Tchounwou, P. B., Dasari, S., Noubissi, F. K., Ray, P., & Kumar, S. (2021). Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy. *Journal of Experimental Pharmacology*, *Volume 13*, 303–328. https://doi.org/10.2147/JEP.S267383

Vicente, J., Saura-Llamas, I., García-López, J. A., Calmuschi-Cula, B., & Bautista, D. (2007a). Ortho palladation and functionalization of L-phenylalanine methyl ester. *Organometallics*, *26*(10), 2768–2776. https://doi.org/10.1021/om070127y

Vicente, J., Saura-Llamas, I., García-López, J.-A., Calmuschi-Cula, B., & Bautista, D. (2007b). Ortho Palladation and Functionalization of <scp>l</scp> -Phenylalanine Methyl Ester. *Organometallics*, *26*(10), 2768–2776. https://doi.org/10.1021/om070127y

Vicente, J., Saura-Llamas, I., Oliva-Madrid, M.-J., García-López, J.-A., & Bautista, D. (2011). A New Method for High-Yield Cyclopalladation of Primary and Secondary Amines. Atom-Efficient Open-to-Air Inexpensive Synthesis of Buchwald-Type Precatalysts. *Organometallics*, *30*(17), 4624–4631. https://doi.org/10.1021/om200464s

Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G. E., & Oun, R. (2010). The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Transactions*, *39*(35), 8113. https://doi.org/10.1039/c0dt00292e

Zanetti, R. D., da Cunha, G. A., Moreira, M. B., Farias, R. L., de Souza, R. F. F., de Godoy, P. R. D. V., Brassesco, M. S., Rocha, F. v., Lima, M. A., Mauro, A. E., & Netto, A. V. G. (2022). Orthopalladated N,N-dimethyl-1-phenethylamine compounds containing 2,6-lutidine: Synthesis, DNA binding studies and cytotoxicity evaluation. *Polyhedron*, *229*, 116185. https://doi.org/10.1016/j.poly.2022.116185

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