

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

***“Síntese, Caracterização e Estudos de
Citotoxicidade e Alvo Biológico de Complexos
Quadráticos Planos Contendo Tiossemicarbazonas”***

Ludimila Thayane Paes Silva

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MESTRE EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA INORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha

**São Carlos - SP
2019**



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Ludimila Thayane Paes Silva, realizada em 20/09/2019:

Prof. Dr. Filipe Vieira Rocha
UFSCar

Prof. Dr. Pedro Paulo Corbi
UNICAMP

Profa. Dra. Clelia Mara de Paula Marques
UFSCar

“É caminhando que se faz o caminho”

(Enquanto Houver Sol – *Titãs*)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Geralda e Rogério, por todo amor, esforços e apoio incondicional. E a meu irmão, Ranyere, pelo carinho e cuidado.

Agradeço ao professor Fillipe pela acolhida e oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa, por todos os ensinamentos, pela compreensão e disposição. Obrigada, professor!

Agradeço aos amigos do CCQM: Mauro, Gabi, Vinícius, Josias, Vitor, Herisson e George; e ao Lucas e Wystan, por todos os conhecimentos construídos e compartilhados, por todos os *helps*, pelas conversas edificantes, pelos besteiróis, pelas sextas-feiras de música, cervejinhas, festinhas, Hidden Agenda...obrigada pela amizade!

Agradeço ao Carlos Henrique pela companhia nas cansativas horas de escrita, principalmente por torná-las mais agradáveis; pelos cuidados, por todo incentivo, apoio e carinho. Obrigada!

Agradeço à Rosa e Michele, pelo encontro no momento certo, por todos os Tuyos e 'J-lo do Brasil' tocados, pelas palavras de apoio e pela amizade.

Agradeço à Bianca pelo profissionalismo e pelo suporte nos momentos mais complicados dessa etapa acadêmica.

Aos colegas da pós-graduação do DQ-UFSCAR, especialmente àqueles dos laboratórios LERCI e LABMeeb pela ajuda e carisma.

Agradeço ao pós.doc Allan Ribeiro (LSPN-UFSCAR) e ao doutorando Wystan Kreisly (LSPN-UFSCAR) pelas análises de espectrometria de massas.

Agradeço ao doutorando João Honorato (LERCI) e ao professor Dr. Eduardo Ernesto Castellano (IFSC-USP) pela resolução das estruturas cristalinas.

Agradeço aos doutorandos Mauro Almeida (CCQM-UFSCAR) e Gabriela Porto (CCQM-UFSCAR) pela realização de testes de IC₅₀.

Agradeço ao professor Nailton Monteiro (LaQMEDSOMM), e à sua aluna de mestrado Marcelle Vieira, pelos estudos de docagem molecular.

Agradeço ao doutorando Renan Lira (Grupo de Compostos de Coordenação e Organometálicos-UNESP) pela realização da titulação espectroscópica com o DNA.

Agradeço ao Instituto Federal Baiano por conceder licença para que eu pudesse realizar esse curso de mestrado. Agradeço também aos colegas do IF-Baiano *campus* Guanambi, especialmente aos colegas professores de química por todo o apoio e compreensão.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Departamento de Química (DQ) por fornecer estrutura e equipamentos necessários para realização dessa pesquisa. E agradeço ainda aos professores, técnicos, secretaria, pessoal da limpeza... todos os profissionais envolvidos e comprometidos com o ensino e desenvolvimento da ciência.

Aos órgãos de fomento FAPESP e CNPq.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação e para a realização desse trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Å	Angstrom (10^{-10} m)
ATP	Adenosina de Trifosfato
BT-E	N -Etil -2-(1-metil-3-fenilprop-2-en-1-ilideno)hidrazinacarbotoamida
BT-H	N -2-(1-metil-3-fenilprop-2-en-1-ilideno)hidrazinacarbotoamida
BT-M	N -Metil-2-(1-metil-3-fenilprop-2-en-1-ilideno)hidrazinacarbotoamida
CDCl ₃	Clorofórmio- <i>d</i> ₁
<i>Cis</i>	Isômero de conformação <i>cis</i> em um composto
cm ⁻¹	Frequência vibracional em centímetros inversos
Ct-DNA	Calf Thymus DNA (DNA de timo de vitelo)
CT-E	N -Etil-2-(1-fenil-3-fenilprop-2-en-1-ilideno) hidrazinacarbotoamida
CT-H	N-2-(1-fenil-3-fenilprop-2-en-1-ilideno)hidrazinacarbotoamida
CT-M	N -Metil-2-(1-fenil-3-fenilprop-2-en-1-ilideno)hidrazinacarbotoamida
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (meio de cultura)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido- <i>d</i> ₆
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DU-145	Célula de câncer de próstata humana
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
J	Constante de acoplamento
Literatura	Literatura científica
MCF-7	Adenocarcinoma de mama
MDA-MDB-231	Adenocarcinoma de mama
MLCT	<i>Metal-to-ligand charge-transfer</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
nm	Nanômetro (10^{-9} m)
[PdCl(BT-M)(P(4FPh) ₃)]	Protótipo (complexo protótipo)

ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
TOPOII α	Topoisomerase II α
UV-Vis	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e do visível
ϵ	Absortividade molar
λ	Comprimento de onda
μ	Micro (10^{-6})

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 - Reagentes e suas respectivas procedências.....	18
TABELA 3.1 - Dados de síntese e caracterização dos ligantes.....	27
TABELA 3.2 Caracterização dos complexos da série protonada e desprotonada. ...	31
TABELA 3.1 - Atribuições tentativas de bandas de acordo a literatura (para ligantes, referências 14-20; complexos: 3,6,8).	36
TABELA 3.2 - Valores teóricos e experimentais do pico do íon molecular dos complexos (espectrometria de massas no modo positivo para H ⁺).	38
TABELA 3.4 - Comprimentos de onda, absortividade molar e atribuições de bandas.	42
TABELA 3.3 - Seleção de distâncias de ligações e ângulos dos compostos.....	47
TABELA 3.5 - Valores de deslocamento químico para os hidrogênios do ligante CT-M e seu complexo da série protonada.	51
TABELA 3.6 -Valores de deslocamento químico para os hidrogênios do ligante CT-M e seus complexos da série protonada e desprotonada.	53
TABELA 3.7 - Valores de deslocamento químico para os hidrogênios dos ligantes (L) e seus respectivos complexos (C) da série desprotonada.	54
TABELA 4.1 - Dados do complexo [Ni(BT-M) ₂]. Valores teóricos da análise elementar aparecem entre parênteses.	57
TABELA 4.2 - Comprimento de onda e absortividade molar máxima para as principais bandas presentes nos espectros dos compostos.	59
TABELA 4.3 - Valores da atribuição das bandas diagnóstica de formação do complexo.	60
TABELA 4.4 - Valores de deslocamento químico (em ppm) para os complexos análogos de Ni(II) e Pd(II) (C), com o ligante BT-M (L).	63
TABELA 4.5 - Seleção de distâncias e ângulos de ligação para os complexos [Ni(BT-M) ₂] e [Pd(BT-M) ₂].	65
TABELA 5.1 - Valores de IC ₅₀ dos compostos testados frente às linhagens tumorais MCF-7 e DU-145, e não tumoral PNT2.....	70
TABELA 5.2. Valores de IC ₅₀ dos compostos testados frente à linhagem tumoral de mama MDA-MDB-231.....	74
TABELA 5.3 - Dados da titulação espectroscópica do DNA com os complexos de Paládio.....	79

LISTA DE FIGURAS

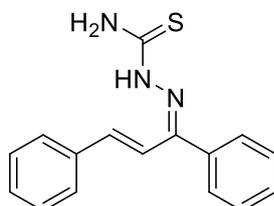
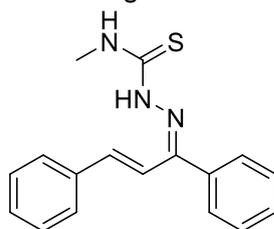
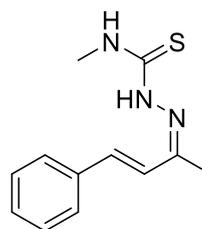
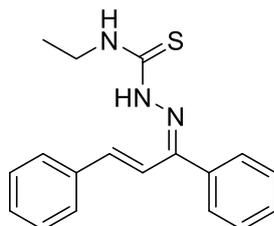
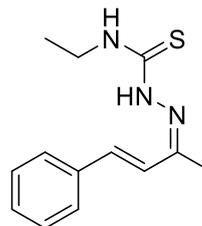
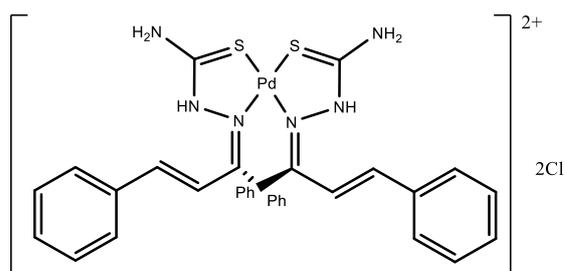
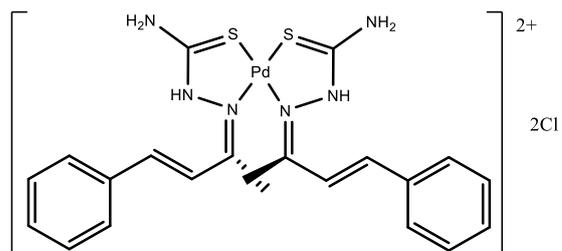
FIGURA 1.1 - Modos de interação com o DNA (adptado) ⁹	3
FIGURA 1.2 – Estrutura da cisplatina.	3
FIGURA 1.3 - Ciclo enzimático da TOPOII α e demonstração do sítio de ação dos venenos etopósido e doxorubicina (adaptado) ^{19,20}	5
FIGURA 1.4 - Estruturas dos principais venenos da TOPOII α	6
FIGURA 1.5 – Estruturas de alguns dos inibidores catalíticos da TOPOII α	8
FIGURA 1.6 - Estrutura geral das tiossemicarbazonas.	9
FIGURA 1.7 - Extraído de HUANG et al (2010) ³⁸ . A) Estrutura do composto TSC24; B) docagem molecular para o composto TSC24 indicando interação com o sítio da ATPase da TOPOII α	9
FIGURA 1.8 - Extraído de Da Silva filho et al (2019) ³⁹ . A) Estrutura do composto 3a; resultados de docagem molecular para: B) Etopósido e C) composto 3a....	10
Figura 1.9 - Estrutura geral dos complexos de geometria quadrática plana estudados por Ziegles et al (2011) ⁴⁷	11
FIGURA 1.10 - Extraído de Deng et al (2018) ⁴⁰ . a) Estrutura geral dos complexos de Co(III) contendo tiossemicarbazonas; b) Um dos complexos, o [Co(MQTS) ₂] ⁺ no sítio da ATPase; c) [Co(MQTS) ₂] ⁺ (R ₁ = H; R ₂ = -CH ₃) no bolso de alocação do etopósido no complexo clivado.	12
Figura 1.11 - Adaptado. Estrutura geral dos complexos (1-6) de Pd(II) contendo tiossemicarbazona em trabalho de Lima (2018) ⁴⁸	13
FIGURA 1.12 - Extraído de Lima (2018) ⁴⁸ . Capacidade inibitória da enzima TOPOII α pelos complexos 1 a 6. Controle negativo (C-): plasmídeo (3,3% (v/v) DMSO). Controle positivo (C+): DNATopoisomerase- plasmídeo.	13
FIGURA 1.13 - Estrutura dos precursores chalcona, tiossemicarbazidas e benzalcetona e dos ligantes tiossemicarbazonas.	15
FIGURA 1.14 – Complexo protótipo e planejamento estrutural dos complexos de Pd(II) e de Ni(II).	16
FIGURA 3.1 - Esquema de reação de complexos da série protonada.	28
FIGURA 3.2- Exemplo de estrutura de complexo protonada e desprotonada.	29
FIGURA 3.3 - Esquema de síntese dos complexos da série desprotonada.	30
FIGURA 3.4 - Espectro do ligante CT-E com atribuições de algumas bandas.	32
FIGURA 3.5 - Representação das estruturas dos precursores: a) tiossemicarbazida; b) Chalcona; e c) do ligante CT-E.	33

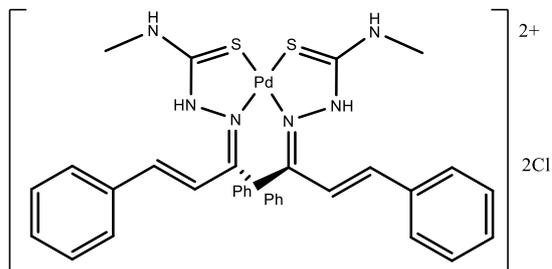
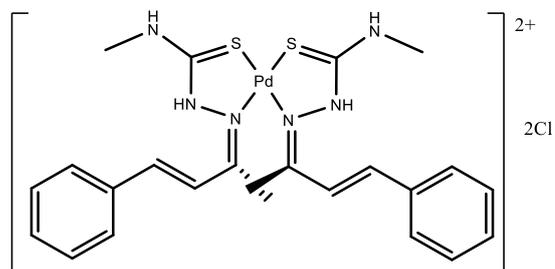
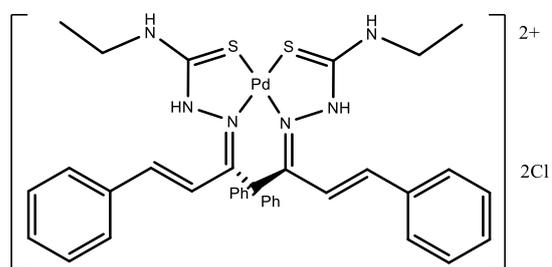
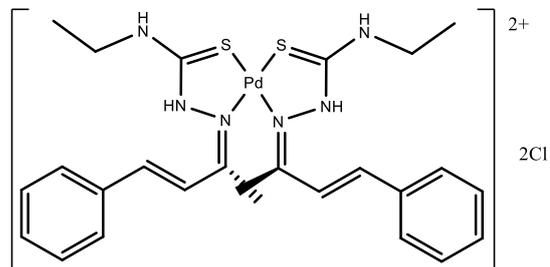
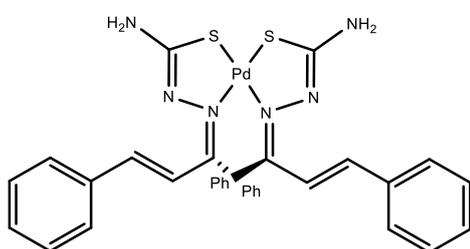
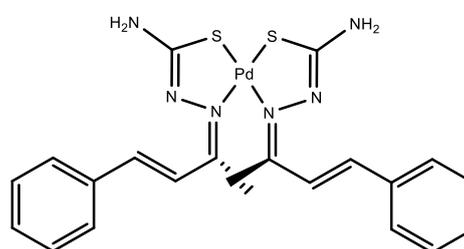
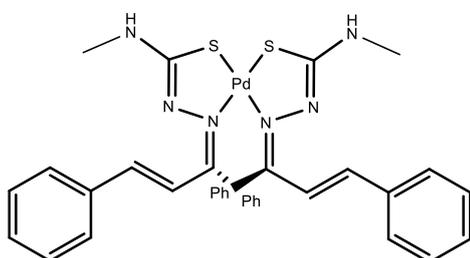
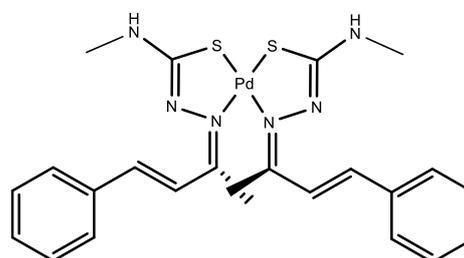
FIGURA 3.6- Espectros de absorção na região do infravermelho do precursor tiosemicarbazida (em azul) e do ligante CT-E (vermelho).	34
FIGURA 3.7 - Espectros de absorção na região do infravermelho dos precursores tiosemicarbazida (azul), chalcona (verde) e do ligante CT-E (vermelho).	34
FIGURA 3.8 - Espectros de absorção na região do infravermelho do ligante CT-E (vermelho), e dos complexos $[Pd(CT-E)_2]$ (cinza) e $[Pd(CT-E)_2]Cl_2$	35
FIGURA 3.9 - Espectros de massas teórico e experimental do complexo $[Pd(BT-E)_2]$	39
FIGURA 3.10. Dados de condutividade molar dos complexos em 0, 2, 16, 24 e 48 horas.	40
FIGURA 3.11 - Teste de estabilidade em até 48 h por espectroscopia na região do UV-Vis para o complexo $[Pd(BT-H)_2]Cl_2$, $10^{-5} mol.L^{-1}$ em DMSO (transparência do solvente= 270 nm).	41
FIGURA 3.12 – Espectros de absorção na região do UV-Vis dos complexos da série desprotonada, obtidos em solução de etanol- $10^{-5} mol.L^{-1}$	43
FIGURA 3.13 - Espectros de absorção na região do UV-Vis dos complexos da série protonada, obtidos em solução de etanol- $10^{-5} mol.L^{-1}$	43
FIGURA 3.14 – Espectros de absorção na região do UV-Vis do ligante BT-H e dos complexos $[Pd(BT-H)_2]Cl_2$ e $[Pd(BT-H)_2]$, obtidos em solução de etanol- $10^{-5} mol.L^{-1}$	44
FIGURA 3.15 - Estrutura dos ligantes BT-E e seu complexo $[Pd(BT-E)_2]$, com elipsóides com 30% de probabilidade.	45
FIGURA 3.16- Estrutura do ligante CT-M e de seu complexo $[Pd(CT-M)_2]Cl_2$, com elipsóides com 30% de probabilidade.	46
FIGURA 3.17 - Estrutura dos complexos $[Pd(CT-E)_2]$ e $[Pd(CT-E)_2]Cl_2$ com elipsóides com 30% de probabilidade.	48
FIGURA 3.18 - Estrutura do complexo $[Pd(BT-M)_2]$ com elipsóides com 30% de probabilidade.	48
FIGURA 3.19. Espectro de RMN de hidrogênio do ligante CT-M (em $CDCl_3$) e atribuições dos sinais.	50
FIGURA 3.20 - Espectro de RMN de hidrogênio do complexo $[Pd(CT-M)_2]Cl_2$ (em $CDCl_3$) e atribuições dos sinais.	51

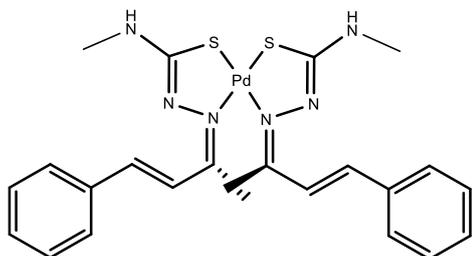
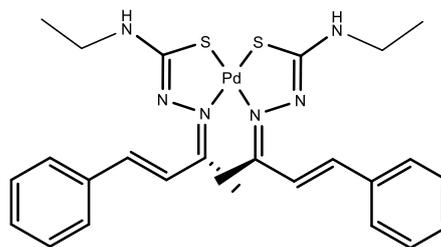
FIGURA 3.21 - Representação do efeito indutivo nos complexos da série protonada e desprotonada com o ligante CT-M. Setas pontilhadas em azul claro representam menor intensidade do efeito.	53
FIGURA 4.1. Esquema de síntese do complexo [Ni(BT-M) ₂].	56
FIGURA 4.2 - Espectro do ligante e do seu complexo de Ni(II). 10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ , etanol (limite do solvente = 205 nm ⁹²)	58
Figura 4.3 - Espectro de absorção na região do UV-Vis do ligante BT-M e seus complexos [Ni(BT-M) ₂] e [Pd(BT-M) ₂] (concentração = 10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ , em etanol).	59
FIGURA 4.4 - Espectros de Infravermelho dos compostos BT-M e [Ni(BT-M) ₂] com atribuição de bandas diagnósticas da formação do complexo.	60
FIGURA 4.5 - Espectro de ¹ HRMN do ligante BT-M e atribuições dos sinais.	62
FIGURA 4.6 - Espectro de ¹ HRMN do complexo [Ni(BT-M) ₂].	62
FIGURA 4.7. Representação de comparação do efeito indutivo nos complexos. As intensidades de cor das setas indicam a intensidade do efeito (cor mais escura = efeito mais intenso), com as setas pontilhadas indicando regiões em que este efeito é menos intenso.	63
FIGURA 4.8 – Estrutura cristalina do complexo [Ni(BT-M) ₂] com elipsoides de 30% de probabilidade.	64
FIGURA 4.9 - Gráfico com resultados da condutividade molar do complexo [Ni(BT-M) ₂] por até 48h em DMSO (10 ⁻³ molL ⁻¹ ; transparência do solvente = 270 nm).	66
FIGURA 5.1 - Reação de formação do MTT formazan, indicação colorimétrica de viabilidade celular.	69
FIGURA 5.2 - a) Gráfico em barras com os valores de IC ₅₀ e o erro padrão (SEM) para os complexos da série desprotonada e fármaco padrão cisplatina. b) Gráfico em barras com os valores de IC ₅₀ e o erro padrão (SEM), para os complexos da série protonada e fármaco padrão cisplatina.	71
FIGURA 5.4 - Gráfico das massas molares (g·mol ⁻¹) versus média dos valores de IC ₅₀ (μmol·L ⁻¹) para as linhagens tumorais testadas, em escala logarítmica (complexos da série protonada = [Pd(L) ₂]Cl ₂ ; e série desprotonada = [Pd(L) ₂].	73
FIGURA 5.5 - A) Estrutura cristalina do complexo [Pd(CT-E) ₂]Cl ₂ ; B) Estrutura cristalina do complexo [Pd(BT-E) ₂] ; C) Representação da interação do complexo [Pd(CT-E) ₂]Cl ₂ com o complexo clivado ; D) representação das interações do complexo [Pd(BT-E) ₂] com o complexo clivado.	76

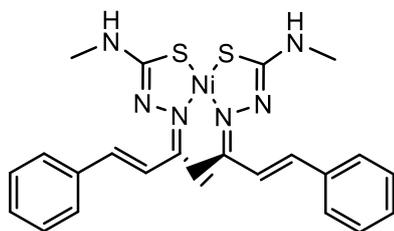
- FIGURA 5.6 - A) estrutura cristalina do complexo $[Pd(CT-M)_2]Cl_2$; B) Estrutura cristalina do complexo $[Pd(BT-M)_2]$; C) Representação da interação do complexo $[Pd(BT-M)_2]Cl_2$ com o complexo clivado; D) representação das interações do complexo $[Pd(BT-M)_2]$ com o complexo clivado. 77
- FIGURA 5.7 - Extraído de Rocha et al (2019). Complexos de Pd(II) contendo (a) tiosemicarbazida ($X = I^-$) e (b) tiossemicarbazona ($X=N_3^-$). Setas indicam as imagens de docagem molecular obtidas para esses compostos em estudo de interação com o domínio da ATPase da TOPOII α 78
- FIGURA 5.8 - Gráfico Absorbância vs Comprimento de onda dos espectros de absorção do complexo $[Pd(CT-E)_2]$ na presença de adições de ct-DNA. $[Complexo] = 2 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$, $[DNA] = 0 - 6 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$. Gráfico inserido: $A_0/(A-A_0)$ vs $1/[DNA]$ 81
- FIGURA 5.9 - Gráfico Absorbância vs Comprimento de onda dos espectros de absorção do complexo $[Pd(CT-E)_2]Cl_2$ na presença de adições de ct-DNA. $[Complexo] = 2 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$, $[DNA] = 0 - 6 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$. Gráfico inserido: $A_0/(A-A_0)$ vs $1/[DNA]$ 81
- FIGURA 5.10 - Gráfico Absorbância vs Comprimento de onda dos espectros de absorção do complexo $[Pd(BT-E)_2]Cl_2$ na presença de adições de ct-DNA. $[Complexo] = 2 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$, $[DNA] = 0 - 6 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$. Gráfico inserido: $A_0/(A-A_0)$ vs $1/[DNA]$ 82
- FIGURA 5.11 - Fotodocumentação da eletroforese em ensaio de avaliação da capacidade de interação com o DNA dos complexos $[Pd(BT-H)_2]$ $[Pd(BT-M)_2]$ e $[Ni(BT-M)_2]$. C- (controle negativo): plasmídeo (5% (v/v) DMSO). C+ (controle positivo): DNA e cisplatina. 83
- FIGURA 5.13 – Fotodocumentação da eletroforese em ensaio de avaliação da capacidade inibitória da enzima TOPOII α pelos complexos $[Pd(BT-H)_2]$, $[Pd(BT-M)_2]$ e $[Ni(BT-M)_2]$. C-: plasmídeo (5% (v/v) DMSO). C+: DNATopoisomerase-plasmídeo. 85
- FIGURA 5.14 - Fotodocumentação da eletroforese em ensaio de avaliação da capacidade inibitória da enzima TOPOII α pelos complexos $[Pd(BT-H)_2]Cl_2$ e $[Pd(BT-M)_2]Cl_2$. C-: plasmídeo (5% (v/v) DMSO). C+: DNATopoisomerase-plasmídeo. 85

ESTRUTURAS E MASSAS MOLARES

CT-HMassa molar: 281.38 g mol⁻¹**BT-H**Massa molar: 219.31 g mol⁻¹**CT-M**Massa molar: 295.40 g mol⁻¹**BT-M**Massa molar: 233.4 g mol⁻¹**CT-E**Massa molar: 309.43 g mol⁻¹**BT-E**Massa molar: 247.36 g mol⁻¹**[Pd(CT-H)₂]Cl₂**Massa molar: 740.05 g mol⁻¹**[Pd(BT-H)₂]Cl₂**Massa molar: 615.92 g mol⁻¹

[Pd(CT-M)₂]Cl₂Massa molar: 768.11 gmol⁻¹**[Pd(BT-M)₂]Cl₂**Massa molar: 643.97 gmol⁻¹**[Pd(CT-E)₂]Cl₂**Massa molar: 796.16 gmol⁻¹**[Pd(BT-E)₂]Cl₂**Massa molar: 672.02 gmol⁻¹**[Pd(CT-H)₂]**Massa molar: 667.15 gmol⁻¹**[Pd(BT-H)₂]**Massa molar: 543.07 gmol⁻¹**[Pd(CT-M)₂]**Massa molar: 695.21 gmol⁻¹**[Pd(BT-M)₂]**Massa molar: 571.07 gmol⁻¹

[Pd(CT-E)₂]Massa molar: 723.26 g mol⁻¹**[Pd(BT-E)₂]**Massa molar: 599.12 g mol⁻¹

[Ni(BT-M)₂]Massa molar: 523,34 g mol⁻¹

RESUMO

“Síntese, Caracterização e Estudos de Citotoxicidade e Alvo Biológico de Complexos Quadrático Planos Contendo Tiossemicarbazonas”

A diversidade de tipos de cânceres requer a busca por diferentes agentes antineoplásicos capazes de agir mais específica e seletivamente minimizando os efeitos colaterais dos medicamentos atualmente utilizados. Neste sentido, uma das estratégias adotadas é o desenvolvimento de compostos que atuem em alvos biológicos específicos; dentre estes alvos, a enzima topoisomerase II α , ou TOPOII α tem sido amplamente estudada. Em trabalho recente do nosso grupo de pesquisa, foi encontrado que, complexos de Pd(II) em geometria quadrática plana, contendo tiossemicarbazona (doares S, N) e variações de co-ligantes fosfínicos e halogênios, exibiram boa atividade citotóxica frente à linhagens tumorais de mama e pulmão; além de inibirem a ação da TOPOII α em concentração 2,8 vezes menor que o medicamento padrão, o etopósido. A inibição da enzima foi atribuída à interações entre a tiossemicarbazona complexada e sítios ativos da enzima. Deste modo, no presente trabalho, buscou-se identificar qual a importância dos co-ligantes, da identidade da tiossemicarbazona e do centro metálico na citotoxicidade frente à células tumorais, bem como na inibição enzimática da TOPOII α . Para tal, mudanças no arcabouço molecular foram realizadas: (i) modificações na estrutura da tiossemicarbazona; (ii) substituição dos co-ligantes por outra molécula de tiossemicarbazona; (iii) identidade do metal. Com estes objetivos, foram então sintetizados seis ligantes (L) tiossemicarbazonas (S, N doadores), treze novas estruturas de complexos bisquelatos em geometria quadrática plana: doze de Pd(II), divididos em duas séries de seis complexos que se diferenciam pela natureza protonada e desprotonada do ligante (de fórmula geral $[Pd(HL)_2]Cl_2$ e $[Pd(L)_2]$, respectivamente); e um complexo de Ni(II), $[Ni(L)_2]$. Após obtenção de todos os compostos planejados (os quais foram caracterizados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas), a investigação da atividade citotóxica dos ligantes e complexos de Pd(II) frente às linhagens tumoral de mama MCF-7, e linhagens de próstata DU-145 (tumoral) e PNT2 (não-tumoral), mostrou que, as tiossemicarbazonas livres apresentaram baixa citotóxicidade ($IC_{50} > 50 \mu mol.L^{-1}$), enquanto, os complexos contendo as tiossemicarbazonas com menor massa molar apresentaram alta citotóxicidade (IC_{50} em intervalo de $12,00-0,22 \mu mol.L^{-1}$). Não foi observada seletividade quanto às linhagens tumorais e não tumoral testadas. Comparou-se também a citotóxicidade apresentada por um dos complexos contendo os co-ligantes fosfínico e halogênio, $[PdCl(BT-M)(P(4FPh)_3)]$ ($IC_{50} = 0,56 \pm 0,1 \mu mol.L^{-1}$), e seus análogo bisquelatos $[Pd(BT-M)_2]$ ($IC_{50} = 0,43 \pm 0,3 \mu mol.L^{-1}$) e $[Ni(BT-M)_2]$ ($IC_{50} > 12 \mu mol.L^{-1}$), frente à linhagem tumoral de mama MDA-MD-231. Os valores de IC_{50} sugerem que a natureza do metal é fundamental na atividade avaliada. Estudos de docagem molecular sugeriram que os complexos de Pd(II) não possuem afinidade com sítios da TOPOII α , e experimentalmente, foi observado que os complexos de Pd(II) mais citotóxicos e o complexo de Ni(II) não interagem significativamente com o DNA e não são capazes de inibir a enzima TOPOII α (em concentrações de 1, 10 e $50 \mu mol.L^{-1}$), apontando que estes, não são os alvos biológicos dos complexos. A não inibição da TOPOII α sugere que a ausência dos co-ligantes pode ter sido responsável pela perda da atividade inibitória enzimática.

ABSTRACT

“Synthesis, Characterization and Cytotoxicity and Biological Target Studies of Square Planar Complexes Containing Thiosemicarbazones”

The diversity of cancer diseases and the side effects caused by the drugs commonly used in cancer treatment require different antineoplastic agents able to operate more specific and in a way to minimize the side effects. With that in mind, efforts are made to develop compounds for selective biological target, such as the enzyme topoisomerasell α , or TOPOII α , which has been widely studied. In a recent work of our research group, it was found that Pd(II) complexes with thiosemicarbazone ligand (N, S donor) and co-ligands' phosphinic and halides, in a distorted square planar molecular geometry, showed cytotoxic activity against breast and lung tumor cell lines; they also inhibited TOPOII α enzyme at a 2,8 times smaller concentration than the standard drug, etoposide. This activity was attributed to the interaction of the complexed thiosemicarbazone ligand with enzyme's active sites. Therefore, in the present work, it was attempt to comprehend the importance of the co-ligands and of the thiosemicarbazone identity, as well as the metallic ion influence in the biological activities. Thereunto, in this work, changes in the molecular framework were performed: (i) substitution of co-ligands for another thiosemicarbazone molecule; (ii) changes in the thiosemicarbazone structure; (iii) metal ion identity. It was synthesized six thiosemicarbazones ligands (L) (N, S donor), thirteen new bischelate complexes structures in a square planar geometry : twelve Pd(II), divided in two analogues series of general formulae [Pd(L) $_2$] and [Pd(HL) $_2$]Cl $_2$, differentiated by anionic and neutral ligands coordination, respectively, and a Ni(II) complex, [Ni(L) $_2$]. After obtaining all the compounds (characterized by spectroscopic and spectrometric techniques), the investigation of cytotoxic activity of ligands and their Pd(II) complexes against the tumoral cell lines MCF-7 (breast) and DU-145 (prostate) and non-tumoral PNT2 (prostate) showed that the free thiosemicarbazone ligands presented low cytotoxicity (IC $_{50}$ > 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), while their Pd(II) complexes containing the lower molecular masses thiosemicarbazone presented IC $_{50}$ values in the 12,00-0,22 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ interval for tumoral cell lines. It was not observed selectivity among the cell lines tested (tumoral and non-tumoral). Comparing the cytotoxicity exhibited by a Pd(II) complex containing the co-ligands, [PdCl(BT-M)(P(4FPh) $_3$] (IC $_{50}$ = 0,56 \pm 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), and its bischelate analogues complexes of Pd(II) and Ni(II), [Pd(BT-M) $_2$] (IC $_{50}$ = 0,43 \pm 0,3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) and [Ni(BT-M) $_2$] (IC $_{50}$ > 12 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), against tumoral breast cancer cell line MDA-MD-231, it is suggested that metal ion identity is essential in the cytotoxicity of complexes. Molecular Docking studies showed that the Pd(II) bischelate complexes do not present affinity with TOPOII α active sites. Experimentally, it was observed that the most cytotoxic complexes of Pd(II) and the Ni(II) complex do not Interact significantly with DNA and they are not able to inhibit TOPOII α (at concentrations of 1, 10 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), pointing out that these are not the biological targets of the complexes. It is suggested that, the absence of co-ligands could be the responsible for the loss of enzymatic inhibitory activity.

SUMÁRIO

1 - Introdução	1
1.1 - Câncer.....	1
1.2 - Quimioterápicos e DNA	2
1.3 - Topoisomerase II α e Quimioterápicos	4
1.4 - Tiossemicarbazonas e Seus Complexos.....	8
1.5 - Planejamento.....	14
2. Objetivos	17
2.1 - Objetivo geral	17
2.2 - Sínteses.....	17
2.2.1 - Reagentes	17
2.2.2 - Metodologia sintética	18
2.2.2.1 - Síntese dos Ligantes	18
2.2.2.2 - Síntese do precursor de Paládio: [PdCl ₂ (CH ₃ CN) ₂]	19
2.2.2.3 - Sínteses dos Complexos [Pd(HL) ₂]Cl ₂	19
2.2.2.4 - Sínteses dos Complexos [Pd(L) ₂].....	19
2.3 - Determinação do ponto de fusão.....	19
2.4 - Medidas de condutividade molar	20
2.5 - Difração de Raios X de monocristal	20
2.6 - Docagem Molecular.....	20
2.7 - Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho	21
2.8 - Ressonância magnética nuclear.....	22
2.9 - Espectroscopia eletrônica na região do UV-Visível	22
2.10 - Análise Elementar de C, H e N.....	22
2.11 - Espectrometria de Massas	22
2.12 - Citotoxicidade	23
2.13 - Interação com DNA	24
2.13.1 - Interação com plasmídeo superenovelado	24
2.13.2 - Titulação espectroscópica por UV-Vis com DNA.....	24
2.14 - Inibição da enzima DNA-Topoisomerasella	26
3. Resultados e Discussões	27
3.1 - Ligantes.....	27
3.2 - Complexos.....	28
3.3 - Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho	32
3.4 - Espectrometria de Massas	37
3.5 - Teste de Estabilidade: Medidas de Condutividade Molar	39
3.6 - Espectroscopia eletrônica na região do UV-Visível	41
3.7 - Difração de Raios-X de Monocristal	44
3.8 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio	49
4. Complexo de Níquel	56
4.1 - Metodologia	56
4.1.1 - Síntese	56
4.1.2 - Caracterizações.....	57
4.2 - Resultados e Discussões	57
4.2.1 - Espectroscopia Eletrônica de absorção na Região do Ultravioleta-Visível.....	58
4.2.2 - Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho	60
4.2.3 - Espectroscopia de Ressonância Magnética de Hidrogênio.....	61
4.2.4 - Difração de Raios-X de Monocristal	64
4.2.5 - Teste de Estabilidade em DMSO (condutividade molar)	66

4.3 - Breves Considerações	67
5. Resultados dos Ensaios Biológicos e Docagem Molecular	69
5.1 - Ensaio de IC ₅₀ (Concentração de Inibição de 50% da Viabilidade Celular)	69
5.2 - Docagem Molecular para estudos de interação com a enzima TOPOII α	75
5.3 - Titulação Espectroscópica de Absorção na Região do UV-Vis com o DNA	79
5.4 - Interação com o DNA Via Eletroforese em Gel de Agorose	82
5.5 - Interação com a TOPOII α Via Eletroforese em Gel de Agarose	84
6. Considerações Finais.....	87
7. Referências bibliográficas	89
8. Apêndices	98

1 - Introdução

1.1 - Câncer

O termo câncer se refere a um conjunto de doenças multietapas que têm como principal característica a proliferação descontrolada de células modificadas¹. Existem mais de 200 tipos de cânceres, os quais se diferem por sua capacidade de afetar tanto órgãos quanto tecidos².

Embora não sejam ainda completamente elucidados os mecanismos que promovem tais doenças, é sabido que a ação de agentes cancerígenos, os quais podem ser fatores genéticos ou exposição excessiva à substâncias tóxicas, inicia a doença por meio da ativação dos protooncogeneses, genes inativos em células saudáveis. Este processo induz a célula a comportar-se de forma anormal multiplicando-se continuamente³.

O aglomerado dessas células é denominado tumor², o qual estimula a formação de novos vasos sanguíneos (processo de angiogênese) para que nutrientes sejam levados à células tumorosas. Através desses novos vasos, ao desprender-se de seu tecido de origem, estas células podem atingir vasos sanguíneos ou linfáticos e espalhar-se para diferentes regiões do corpo gerando assim o processo de metástase ou proliferação do câncer⁴. Por serem menos especializadas que as células saudáveis, estas novas células afetam os tecidos e órgãos comprometendo as suas funções e podendo levar o organismo à morte².

É sabido que o câncer é a segunda doença que mais mata no mundo com a última estimativa da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 2018) apontando a incidência de mais de 18 milhões de novos casos de cânceres no mundo, para ambos os sexos e em todas as idades, com os cânceres de mama (11.6%) e de próstata (7.1%) entre os de maiores incidências⁵. Somente no Brasil, para o biênio 2018-2019, é estimado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) a ocorrência de 600 mil novos casos

Uma vez que não há cura para o câncer e somente é possível detectar a doença após formação do tumor, o qual pode levar décadas para ser formado, o diagnóstico precoce da doença é importante para evitar que a mesma não se espalhe e intensifique. Após o diagnóstico, a forma de tratamento mais adequada e eficiente deve ser escolhida, estando dentre as mais comuns a radioterapia, a cirurgia e a quimioterapia. Esta última apresenta maior abrangência de uso, devido a possibilidade de ser utilizada em diferentes etapas de avanço da doença, além de ser muitas vezes utilizada como auxiliar na cirurgia e na radioterapia⁶.

Neste contexto, a quimioterapia antineoplásica consiste no uso de fármacos para combater o câncer. Mais especificamente, o objetivo desses fármacos, também denominados de agentes quimioterápicos, é agir preferencialmente nas células neoplásicas (células de tumores malignos). Muitos quimioterápicos atuam prejudicando a divisão celular, alcançando efetivamente as células que se dividem muito rapidamente, com os tumores que possuem alta velocidade de crescimento sendo mais sensíveis à quimioterapia¹. De modo geral, os quimioterápicos utilizados podem ser classificados de acordo com seu alvo/mecanismo de ação, sendo comum terem como alvo enzimas nucleares, como as topoisomerasas, ou o DNA (ácido desoxiribonucleico).

1.2 - Quimioterápicos e DNA

A interação entre quimioterápicos e o DNA pode ocorrer por quatro modos distintos : a) *interações eletrostáticas*, como por exemplo, com compostos que possuam carga positiva interagindo com a espinha dorsal do DNA; b) *intercalação*, a qual pode ser definida como a introdução de compostos aromáticos entre bases nitrogenadas consecutivas⁷; c) *interação com os sulcos* da espinha dorsal do DNA⁸, ou ainda, por meio de d) *ligação covalente* com as bases nitrogenadas ou com o grupamento fosfodiéster. A figura 1.1 exemplifica os possíveis modos de interação descritos acima.

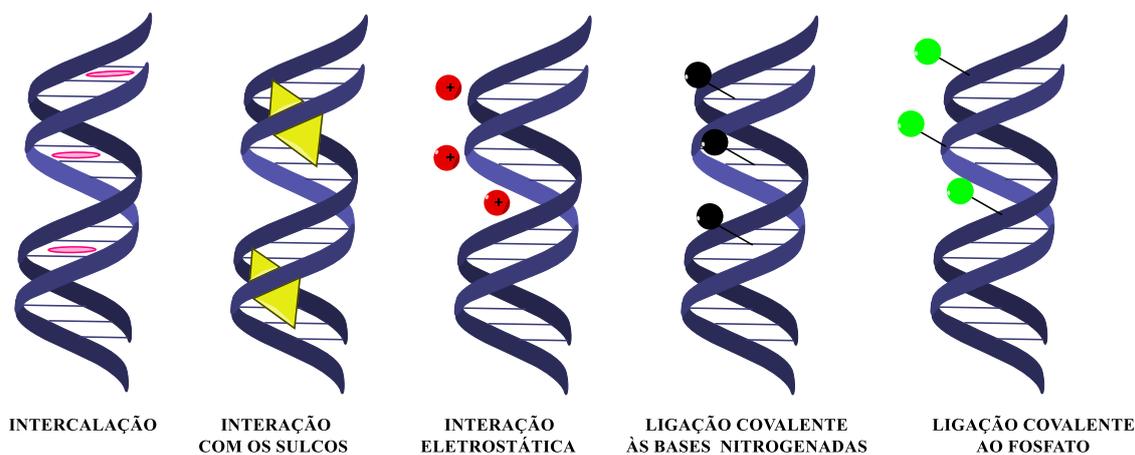


FIGURA 1.1 - Modos de interação com o DNA (adptado)⁹.

Exemplo de agente quimioterápico antineoplásico que se liga covalentemente às bases nitrogenadas do DNA, deformando a sua estrutura e induzindo à apoptose celular é o cis-diamindicloridoplatina(II), conhecido popularmente como cisplatina (figura 1.2).

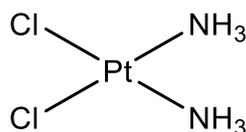


FIGURA 1.2 – Estrutura da cisplatina.

Apesar de bastante utilizada, a cisplatina atua em limitado espectro de cânceres (age principalmente frente aos cânceres de testículo, pescoço, cabeça, ovário e bexiga⁹) e está associada a diversos efeitos colaterais graves como a nefrotoxicidade, uma vez que ela pode facilmente se ligar à grupos tiois de enzimas renais e desativá-las, provocando efeitos adversos ao rim¹⁰. Ainda, seu uso pode levar à resistência multidrogas (desenvolvimento de resistência ao quimioterápico e à outros compostos)¹¹.

Embora o DNA seja atualmente o maior alvo dos medicamentos utilizados na terapia contra o câncer¹², ele está igualmente presente tanto em células saudáveis quanto em células cancerosas. Deste modo, esforços são

feitos na busca de outros alvos biológicos que proporcionem ou promovam alguma seletividade.

1.3 - Topoisomerase II α e Quimioterápicos

A enzima topoisomerase II α , ou TOPOII α , é uma enzima que é mais expressa em algumas linhagens tumorais como mama (um dos tipos de câncer de maior incidência no mundo), e portanto, seu uso como alvo representa uma eficiente estratégia quimioterápica¹³⁻¹⁶.

As topoisomerasas são enzimas que em células eucariotas catalisam mudança topológica essencial no DNA: com a abertura da dupla hélice para que ocorram processos como a transcrição e replicação do material genético, são geradas estruturas supertensionadas (DNA positivo e DNA negativo) as quais se tornam inviabilizadas para os referidos processos se não forem corrigidas; as enzimas topoisomerasas atuam relaxando essas estruturas supertensionadas permitindo a realização bem sucedida de tais processos^{17,18}.

De maneira generalizada, essas enzimas proporcionam a relaxação do DNA realizando a quebra de uma ou duas fitas da dupla hélice e transpassando um outro segmento de DNA por meio da fissura, a qual é depois religada. O genoma humano codifica dois tipos de topoisomerasas, dentre as quais está a TOPOII α que realiza a quebra e posterior religação de duas fitas do DNA^{19,20}.

O ciclo enzimático da TOPOII α (figura 1.3), a qual age homodimericamente, inicia-se com a enzima em forma de “garra aberta”. Após a ligação de duas moléculas de ATP no sítio da ATPase da enzima, a mesma adquire uma configuração de “garra fechada” estando delimitados em seu interior dois segmentos de DNA denominados de G (*gate*) e T (*transporter*). Com a presença do íon Mg²⁺, a enzima liga-se covalentemente à duas fitas de um mesmo segmento do DNA, segmento G, quebrando-as em uma reação de transesterificação, por meio de um ataque nucleofílico de um par de tirosinas à duas ligações fosfodiéster, separadas por uma distância de quatro bases e em

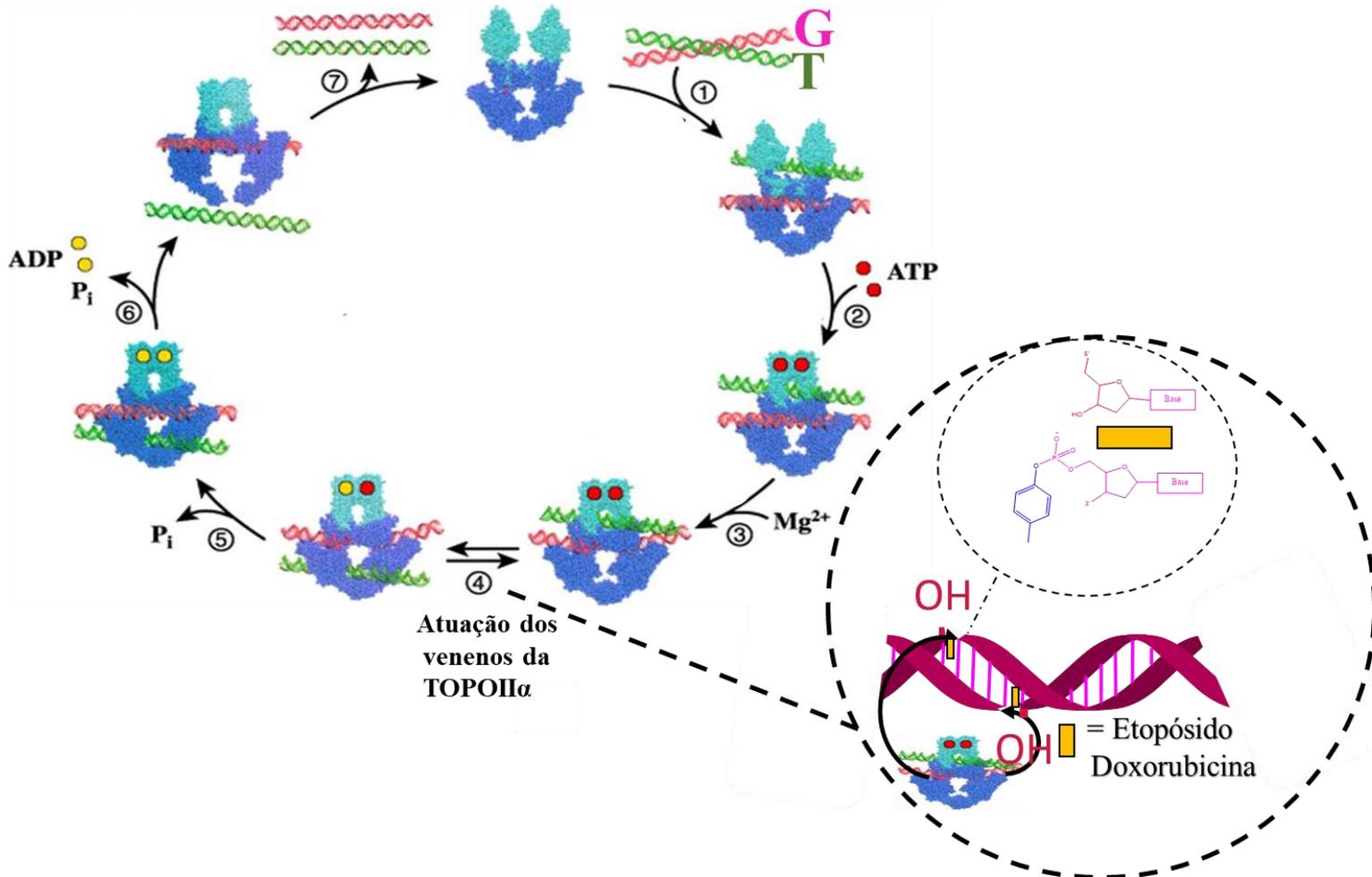


FIGURA 1.3 - Ciclo enzimático da TOPOIIα e demonstração do sítio de ação dos venenos etopósido e doxorubicina (adaptado)^{20,21}.

uma extremidade 5'-fosfodiester do DNA segmentado. Deste modo, forma-se o que é denominado de complexo clivado: enzima ligada covalentemente ao segmento G de DNA^{20,21}.

Posteriormente, o segmento T é promovido, intacto, por meio da fissura no segmento G²². Logo em seguida, as ligações fosfodiester do segmento G são religadas e a hidrólise do ATP faz com que a enzima volte à sua forma de “garra aberta”, finalizando assim um ciclo enzimático e deixando a estrutura do DNA menos tensionada²⁰.

O etopósido, a doxorubicina e a mitoxantrona (figura 1.4) são exemplos de quimioterápicos que fazem parte de uma classe de compostos denominada de venenos da topo por atuarem no complexo clivado estabilizando a estrutura DNA-TOPOII α . Isto é, enquanto naturalmente o tempo de vida de um complexo clivado é curto, a estabilização desta estrutura leva ao aumento do tempo de vida e da quantidade desse complexo na célula. Tal fato muda a fisiologia do DNA e evita a sua transcrição e replicação. Como consequência, a célula aciona comandos de reparos, os quais podem levar à dois caminhos: ou à religação da dupla fita do segmento G ou à apoptose¹⁵. A segunda via, apoptose, representa o caminho pelo qual o veneno da TOPO combate as células neoplásicas.

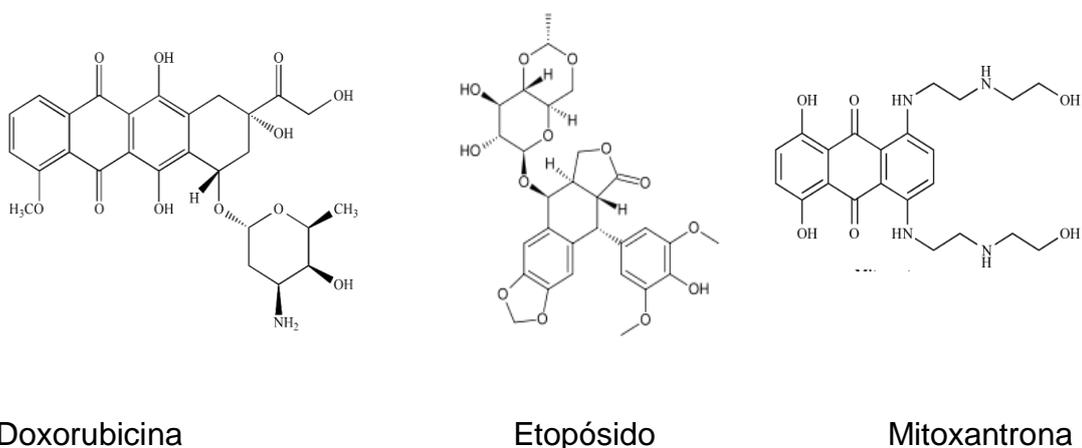


FIGURA 1.4 - Estruturas dos principais venenos da TOPOII α .

Anualmente, aproximadamente um milhão de pacientes são tratados mundialmente com venenos da topo²³, e o uso desses antineoplásicos

é bastante abrangente. O etopósido, por exemplo, é utilizado para diversos cânceres como os de ovário, câncer testicular, carcinoma e leucemia mieloide. A doxorubicina e daunorubicina são utilizadas principalmente em tumores sólidos, câncer de bexiga e ossos, cânceres hematológicos e no câncer de mama; a mitoxantrona é utilizada no tratamento de câncer de próstata avançado e certas formas de leucemia; ainda o tenipósido, um análogo do etopósido, e o amrubicino são também venenos da topo utilizados²⁴⁻²⁶. Entretanto, existem limitações associadas ao uso desses venenos, como o desenvolvimento de resistência e efeitos colaterais, a citar, cardiotoxicidade e surgimento de doenças secundárias, como a mielosupressão²³.

Enquanto a resistência estaria associada à diminuição da expressão de TOPOII α ou alteração da função da enzima²⁷, é sugerido que problemas de cardiotoxicidade seriam consequência da atuação desses venenos em uma isoforma da topoll, denominada de TOPOII β , bem como a promoção de translocações gênicas, o que levaria à doenças secundárias (como a mielosupressão)^{15,24}. A TOPOII α e a TOPOII β compartilham mais de 70% de sequência homóloga de aminoácidos e as diferenças de mecanismos entre elas não foram ainda completamente elucidadas²⁸. Ainda, os efeitos colaterais são creditados à presença de TOPOII α em células saudáveis, com aquelas de rápida proliferação, como as de intestino e da medula óssea, sendo as mais afetadas²⁴.

Apesar da conjuntura citada, a TOPOII α é um bom alvo, pois é reportada uma diferença crucial entre as isoformas: enquanto a β tem expressão constante durante todo o ciclo celular e é mais expressa em células não-proliferantes²⁹, a isoforma α duplica ou triplica a sua expressão nas fases G₂/M do ciclo celular, sendo altamente expressa em células de rápida proliferação, como as células tumorais, se comparadas às quiescentes¹⁸.

Ainda, a importância da TOPOII α como alvo terapêutico pode ser exemplificada não somente com o uso clínico atual dos venenos da topo, como o etopósido, a daunorubicina e a doxorubicina, os quais são fármacos padrão aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA); mas também pela

existência de estudos de outra classe de compostos denominados de inibidores catalíticos da topo.

Os inibidores catalíticos da topo são compostos que atuam em outras etapas do ciclo enzimático que não seja aumentando o nível de complexo clivado. Dentre os exemplos de inibidores da topoll destacam-se (figura 1.5) a aclarubicina, aplicada no tratamento de leucemia mieloide aguda, e a suramina, ambos agem prevenindo que a topoll se ligue ao DNA; e a novobiocina, que inibe a enzima ao se ligar ao sítio da ATPase. A característica mais interessante destes agentes é a sua habilidade de modular o efeito citotóxico de outros agentes cancerígenos³⁰ excetuando os venenos da topo, pois um inibidor pode agir como um antagonista de um veneno¹⁵.

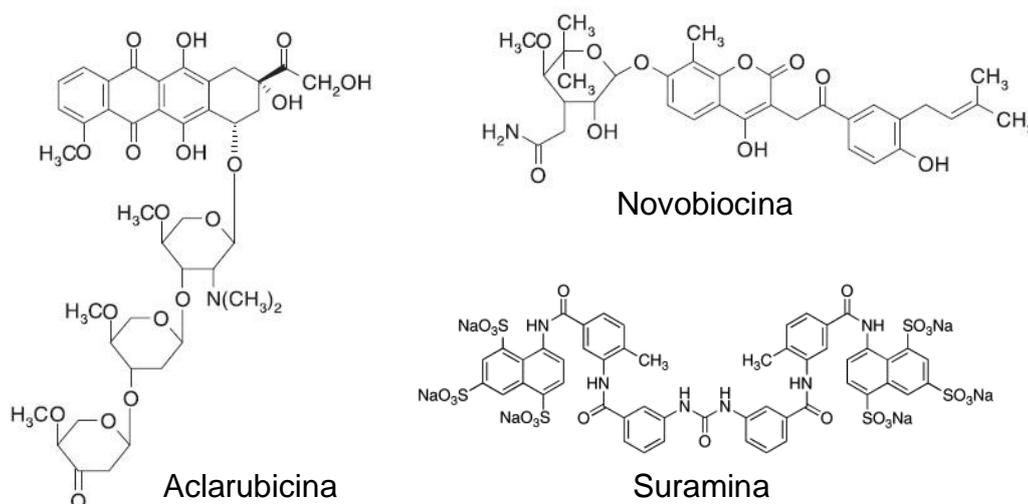


FIGURA 1.5 – Estruturas de alguns dos inibidores catalíticos da TOPOII α .

1.4 - Tiossemicarbazonas e Seus Complexos

As tiossemicarbazonas (figura 1.6) são moléculas orgânicas amplamente conhecidas por sua variedade de atividades biológicas: fungicida, bactericida, mimético da insulina, antitumoral e anticancerígena³¹⁻³⁸. Quanto à sua atividade anticancerígena, o mecanismo de ação desses compostos não é completamente esclarecido ainda, podendo estar relacionado com múltiplos alvos²; no entanto, é encontrado na literatura científica correlação entre tiossemicarbazonas e inibição da TOPOII α .

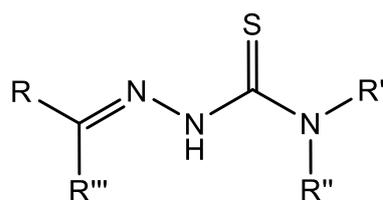


FIGURA 1.6 - Estrutura geral das tiossemicarbazonas.

Nesse sentido, o trabalho que mais se destaca por ser um dos estudos mais completos, robusto e pioneiro, é o de HUANG *et al* (2010)³⁹. Neste trabalho, os autores sintetizaram e testaram frente a uma variedade de linhagens tumorais diversas tiossemicarbazonas, as quais apresentaram alta atividade citotóxica à concentrações da ordem de micromolar. Destacou-se como composto mais promissor a tiossemicarbazona denominada de TSC24 (figura 1.7-a), cujo valor de IC₅₀ para a linhagem tumoral de câncer de mama, MCF-7 (linhagem com alta expressão de TOPOII α), foi de 0.34 \pm 0.19 μ mol·L⁻¹.

O trabalho revelou que o TSC24 apresenta maior afinidade pelo sítio ATPase da TOPOII α se comparado às moléculas de ATP. Ainda, estudos de docagem molecular apresentaram o composto TSC24 em uma conformação plana e rígida no sítio da ATPase (figura 1.7-b), mostrando forte interação entre o nitrogênio do compostos e hidrogênio de resíduos de aminoácidos desse sítio.

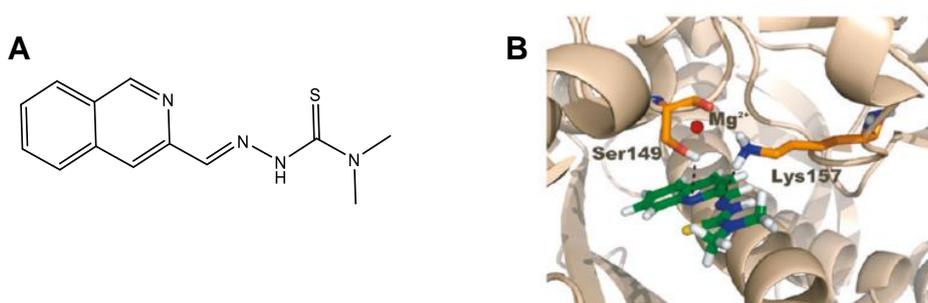


FIGURA 1.7 - Extraído de HUANG *et al* (2010)³⁹. A) Estrutura do composto TSC24; B) docagem molecular para o composto TSC24 indicando interação com o sítio da ATPase da TOPOII α .

Da Silva filho *et al* (2019)⁴⁰ apresentaram outro perfil de atuação para uma série de compostos derivados de acridina-tiossemicarbazonas. Dentre estas, o composto que mais se destacou foi o denominado 3a (figura 1.8-a), o qual apresentou inibição total de crescimento em concentrações de $6,85 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $6,30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para as linhagens MCF-7 (câncer de mama) e PC3 (câncer de próstata), respectivamente. O composto foi capaz de atuar na estabilização do complexo clivado DNA-TOPOII α em concentração de $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ através de intercalação com pares de bases do DNA (principalmente por meio de interações π - π stack), sugerindo atuação destes compostos como possíveis venenos da topo. Nota-se na figura 1.8-c, que a referida tiossemicarbazona encontra-se no mesmo sítio de interação com o DNA que o etopósido (figura 1.8-b), e que a mesma encontra-se em geometria não plana.

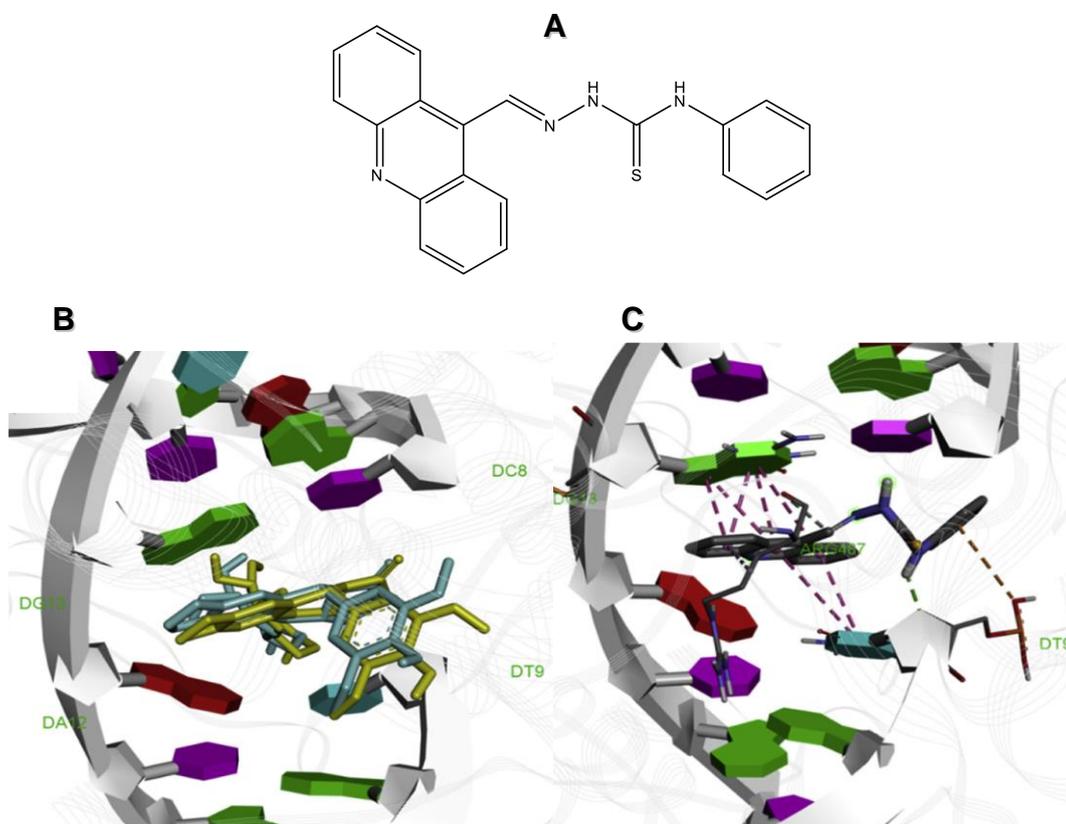


FIGURA 1.8 - Extraído de Da Silva filho *et al* (2019)⁴⁰ . A) Estrutura do composto 3a; resultados de docagem molecular para: B) Etopósido e C) composto 3a.

Embora a atividade anticancerígena das tiossemicarbazonas sejam promissoras, é reportado na literatura que a complexação à metais de transição potencializam a ação antineoplásica desses compostos, com os complexos apresentando maior citotoxicidade⁴¹⁻⁴⁵. Além disso, são encontrados estudos sobre a investigação da ação citotóxica e inibição da TOPOII α de complexos de metais de transição contendo tiossemicarbazonas^{44,46,47}; nestes, a maior atividade dos complexos, se comparada ao ligante livre, é associada à maior rigidez da estrutura do ligante no complexo, bem como à geometria quadrática plana deste último⁴⁸.

Dentro dessa perspectiva, o trabalho de Ziegles *et al* (2011)⁴⁸ mostrou que enquanto as tiossemicarbazonas como ligantes livres não apresentaram inibição da TOPOII α nem mesmo em concentrações acima de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, os seus respectivos complexos de Cu(II) (figura 1.9) apresentaram inibição da enzima em concentração de 0.3-7.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Os mesmo exibiram ainda boa capacidade antiproliferativa para as células das linhagens tumorais de mama SK-BR-3 e MCF-7, as quais apresentam alta expressão da TOPOII α . Avaliou-se ainda o perfil de inibição dos complexos e foi sugerido que estes atuavam como inibidores catalíticos, sugerindo ainda que a geometria quadrática plana fosse um fator determinante, pois, possivelmente, os complexos estariam ligando-se ao sítio da ATPase.

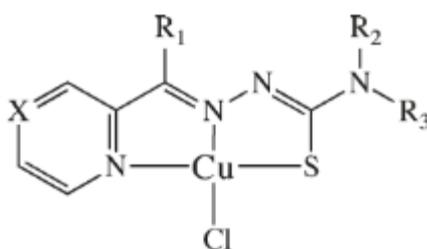


Figura 1.9 - Estrutura geral dos complexos de geometria quadrática plana estudados por Ziegles *et al* (2011)⁴⁸.

Trabalho de Deng *et al* (2018)⁴¹ corrobora com a ideia da importância da geometria para inibição catalítica. Os autores mostraram que complexos bisquelatos de Co(III) contendo tiossemicarbazonas tridentadas, em geometria octaédrica distorcida, inibiram a atividade da TOPOII α em baixa

concentração ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), com os estudos de docagem molecular apontando que estes complexos se encaixam bem no bolso onde se liga o etopósido, enquanto o impedimento estérico destes seria um empecílio para a sua alocação no centro do sítio da ATPase (figura 1.10).

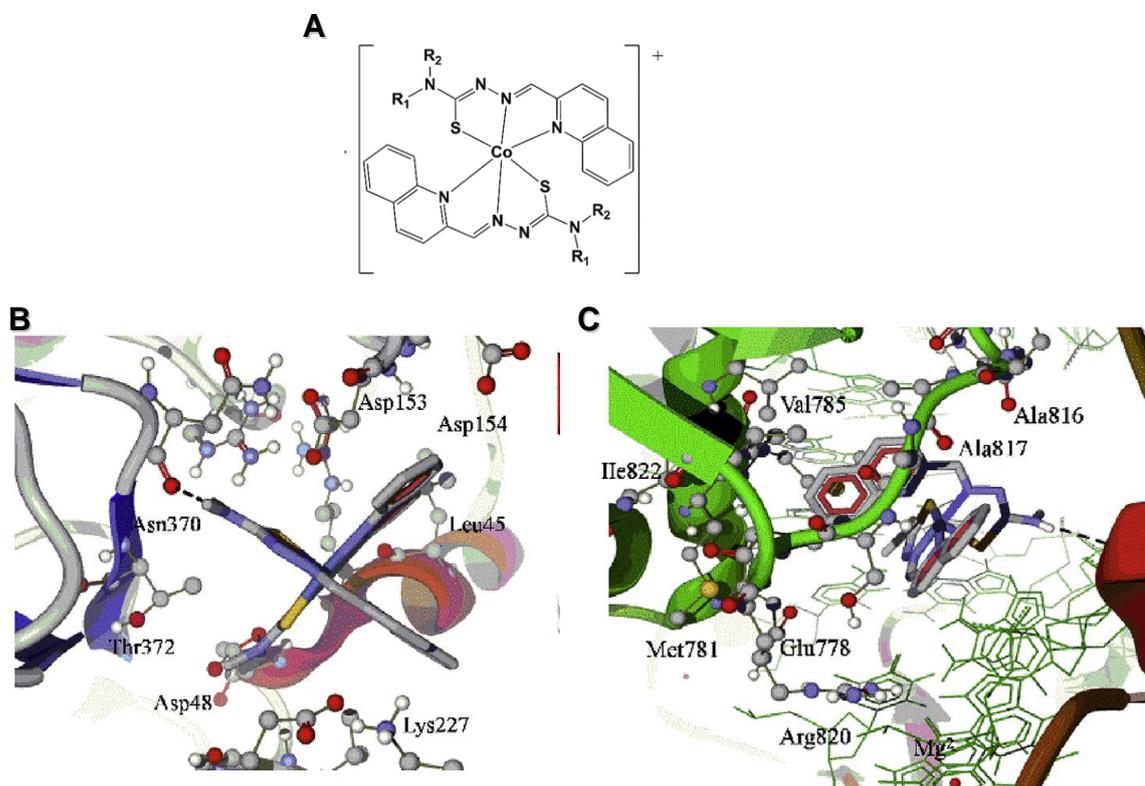


FIGURA 1.10 - Extraído de Deng *et al* (2018)⁴¹. a) Estrutura geral dos complexos de Co(III) contendo tiosemicarbazonas; b) Um dos complexos, o $[\text{Co}(\text{MQTS})_2]^+$ no sítio da ATPase; c) $[\text{Co}(\text{MQTS})_2]^+$ ($\text{R}_1 = \text{H}$; $\text{R}_2 = -\text{CH}_3$) no bolso de alocação do etopósido no complexo clivado.

Considerando-se os compostos de íons metálicos com tiosemicarbazonas, destaca-se aqui os estudos de citotoxicidade e inibição da TOPOII α de complexos de Pd(II) contendo tiosemicarbazonas^{10,49-51}, pois, o íon Pd(II), um íon d^8 , consegue facilmente conferir rigidez ao ligante tiosemicarbazona assegurando uma geometria quadrática plana, o que para a inibição da TOPOII α estaria atrelada à atuação destes compostos como inibidores catalíticos, os quais poderiam superar a eficiência dos venenos quanto à seu quadro de efeitos colaterais.

Em trabalho prévio do grupo de pesquisa, Lima (2018)⁴⁹ encontrou maior citotoxicidade (valores de IC_{50} entre $0,56\text{-}3,43 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) para

seis complexos com o íon Pd(II) contendo tiossemicarbazona, co-ligantes fosfínico e haletos, em geometria quadrática plana (figura 1.11), se comparada àquela encontrada para o ligante tiossemicarbazona livre ($IC_{50} > 25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) frente à linhagem tumoral de mama MDA-MDB-231. A avaliação da atividade inibitória da enzima TOPOII α , por meio de eletroforese em gel de agarose (figura 1.12), mostrou que os complexos mais citotóxicos foram também os que apresentaram maior inibição enzimática; sendo quatro destes complexos 2,8 vezes mais potentes do que o fármaco padrão etoposido ($36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

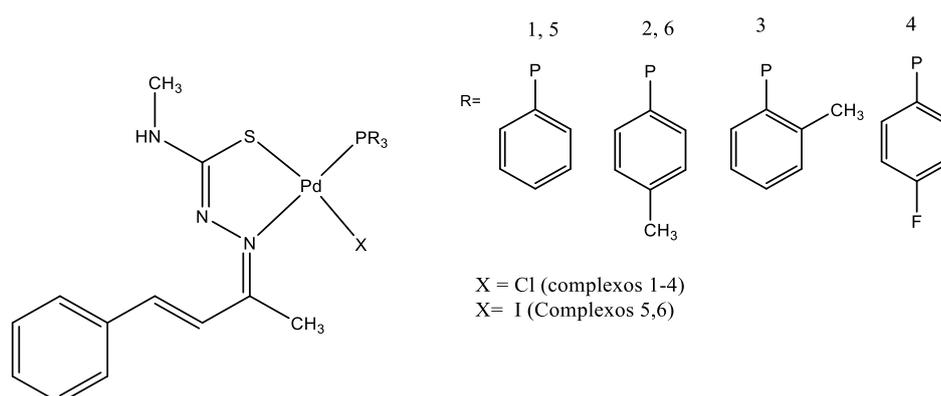


Figura 1.11 - Adaptado. Estrutura geral dos complexos (1-6) de Pd(II) contendo tiossemicarbazona em trabalho de Lima (2018)⁴⁹.

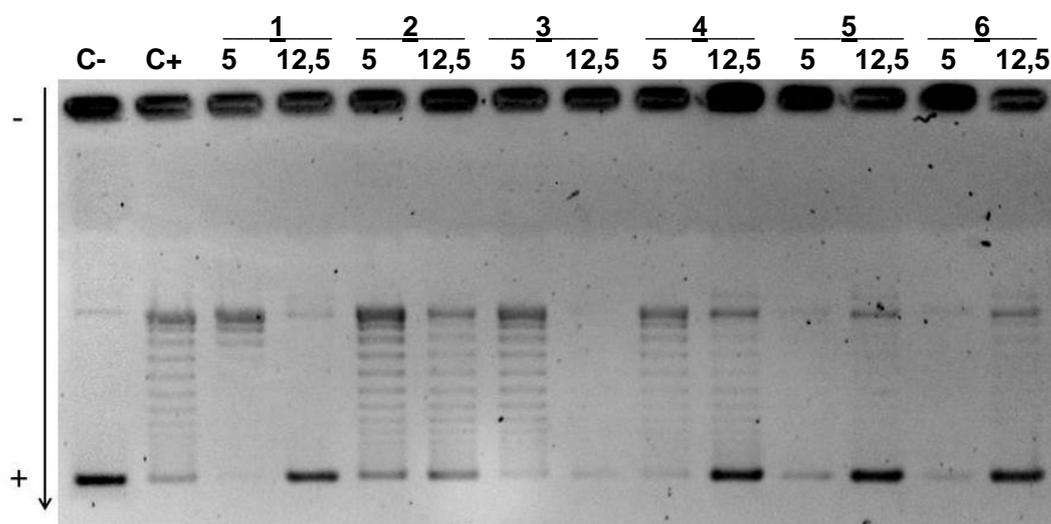


FIGURA 1.12 - Extraído de Lima (2018)⁴⁹. Capacidade inibitória da enzima TOPOII α pelos complexos 1 a 6. Controle negativo (C-): plasmídeo (3,3% (v/v) DMSO). Controle positivo (C+): DNATopoisomerase- plasmídeo.

O trabalho supracitado fomentou a curiosidade sobre a relação entre a presença da tiossemicarbazona nos complexos e a inibição enzimática apresentada por estes, pois, a variação dos co-ligantes fosfínicos levou os complexos 1, 4, 5 e 6 a apresentarem inibição enzimática em mesma concentração (12,5 μM).

Com base em tudo o que foi até aqui exposto, é notório que mais esforços são necessários na busca por antineoplásicos mais seletivos. Tendo em vista os dados que apontam câncer de mama e próstata entre os tipos de cânceres de maiores incidências, atrelado ao fato de que é reportado que linhagens de câncer de mama estão associadas à uma maior expressão da TopoII α ³¹⁻³⁴; o presente trabalho propõe o desenvolvimento de complexos de Pd(II)-tiossemicarbazonas, o estudo citotóxico, de alvo biológico destes compostos, bem como a investigação do papel do metal na atividade biológica.

1.5 - Planejamento

Até onde é de conhecimento, a síntese e estrutura de somente uma das tiossemicarbazonas sintetizadas neste trabalho é inédita, sendo as demais encontradas em banco de dados de estruturas químicas. Já a síntese e estrutura de todos os complexos são inéditas.

A síntese dos ligantes tiossemicarbazonas foi pensada a partir de precursores cetonas e tiossemicarbazidas. Três deles elaborados com as cetonas chalcona e três com a benzalcetona, os quais, respectivamente, recebem em sua denominação a inicial C e B. As tiossemicarbazidas precursoras, substituídas por hidrogênio, metila e etila, conferem à denominação do ligante os sufixos T-H, T-M e T-E, respectivamente. A figura 1.13 apresenta as estruturas propostas para os compostos descritos acima.

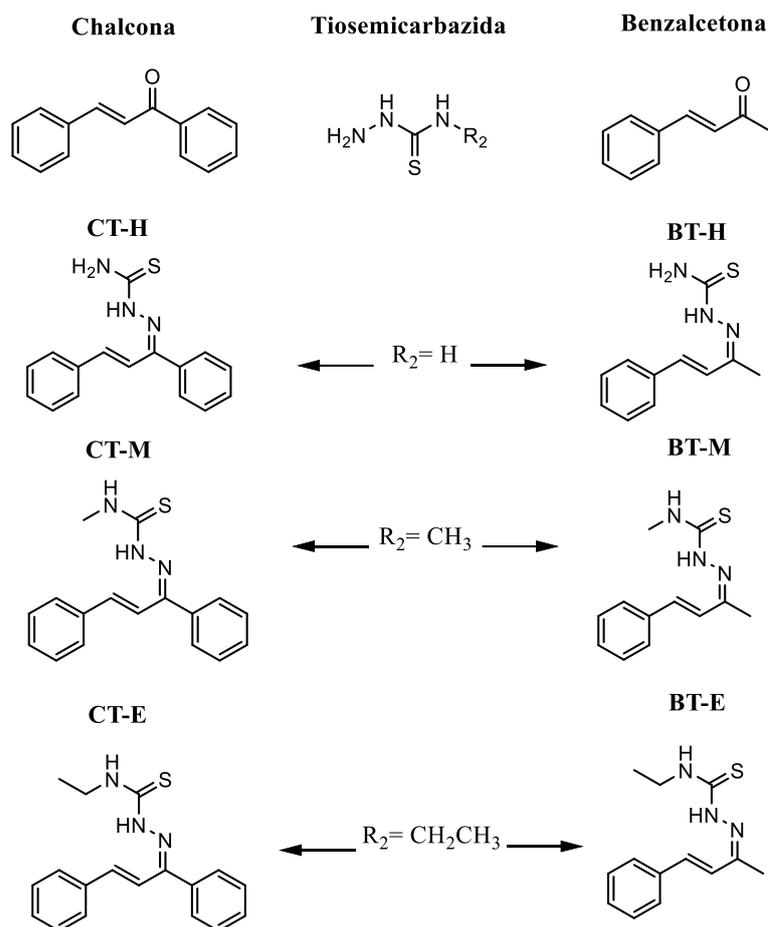


FIGURA 1.13 - Estrutura dos precursores chalcona, tiosemicarbazidas e benzalcetona e dos ligantes tiosemicarbazonas.

Na elaboração dos complexos considerou-se os aspectos reportados como importantes para atividade antineoplásica dos compostos: formação de metalociclo que garantisse uma geometria quadrática plana, sendo para isso utilizado o íon Pd(II), bem como a presença de grupos aromáticos capazes de estabelecer ligações do tipo π - π com o alvo biológico.

Os grupos R_2 e R_1 foram colocados para estudo da relação entre volume e atividade biológica, uma vez que, o volume pode ser um limitante para atuação em sítios específicos da enzima TOPOII α , como por exemplo, alocação do composto no centro do sítio da ATPase. Ainda, a idealização de complexos quelatos possibilita investigar o papel dos co-ligantes fosfínicos e haletos na inibição enzimática da TOPOII α a partir de comparação direta com resultados obtidos em trabalho prévio do grupo de pesquisa⁴⁹, para o qual o

complexo $[PdCl(BT-M)(P(4FPh)_3)]$, denominado neste trabalho de complexo protótipo, ou protótipo (figura 1.14), apresentou os melhores resultados de citotoxicidade em linhagem tumoral de mama, bem como boa atividade inibitória da TOPOII α . A utilização de bisquelatos visa também compreender se a duplicação dos ligantes tiosemicarbazonas, os quais são reportados como fundamentais para as atividades biológicas, potencializam estas atividades.

A estrutura descrita permite ainda avaliar se o papel do íon metálico é funcional, e, portanto, a natureza deste íon é fundamental para a atividade biológica observada, ou se ele é apenas estrutural, para a garantia da geometria quadrática plana, o que é possível comparando atividade biológica de complexo análogo com o íon Ni(II), o qual será também análogo ao complexo protótipo. A figura 1.14 exemplifica a estrutura geral dos complexos.

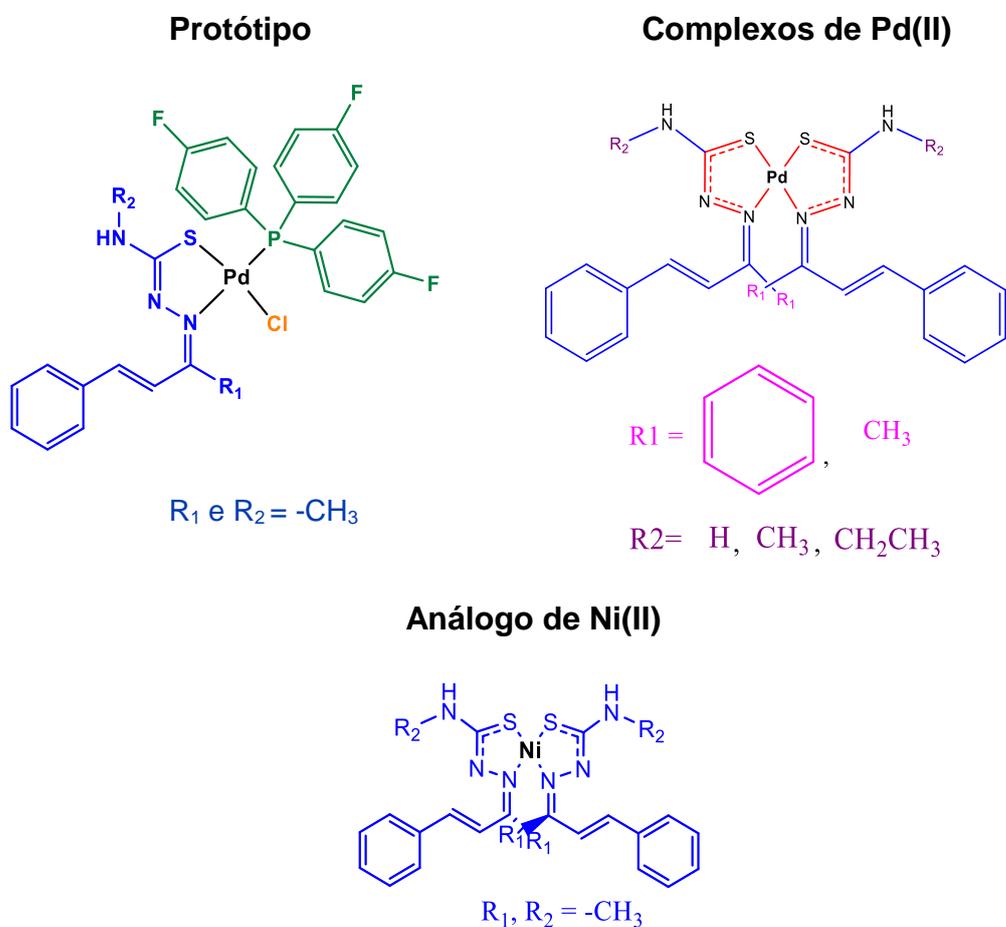


FIGURA 1.14 – Complexo protótipo e planejamento estrutural dos complexos de Pd(II) e de Ni(II).

Níquel ($\text{Ni} = [\text{Ar}]3d^8 4s^2$) e paládio ($\text{Pd} = [\text{Kr}]4d^{10}$) têm o estado de oxidação 2+ como o mais estável (adquirindo configuração eletrônica igual à $\text{Ni(II)} = [\text{Ar}]3d^8$ e $\text{Pd(II)} = [\text{Kr}]4d^8$). Em complexos, para o Pd(II), a configuração de valência d^8 assegura uma geometria quadrática plana, enquanto para o Ni(II), além desta, outras geometrias são possíveis, sendo as mais comuns a tetraédrica e octaédrica^{52,53}. A cinética destes íons é diferenciável, com o Ni(II) apresentando maior velocidade de reação que o Pd(II)¹⁶. Destaca-se que, enquanto o Pd(II) pertence ao grupo da platina, e compõe portanto os chamados metais nobres, o níquel tem praticamente mesma abundância, e é mais susceptível à oxidação se comparado ao paládio⁵³.

2. Objetivos

2.1 - Objetivo geral

Investigar a atividade citotóxica e alvo biológico de complexos quadráticos planos bisquelatos de Pd(II) contendo tiossemicarbazonas, e em quadro comparativo, identificar como mudanças no arcabouço molecular, geradas pela: (i) ausência de co-ligantes fosfínicos e halogênio, (ii) mudanças nos substituintes das tiossemicarbazonas; e (iii) identidade do metal, alteram a citotoxicidade e a interação com a enzima topoisomerasella.

Experimental

2.2 - Sínteses

2.2.1 - Reagentes

A procedência e pureza dos reagentes utilizados neste trabalho são mostradas na tabela TABELA 2.1. Os mesmos foram utilizados sem tratamento prévio.

TABELA 2.1 - Reagentes e suas respectivas procedências.

Reagente	Procedência
Benzalacetona (98,0%)	Sigma-Aldrich
Chalcona (98,0%)	FLUKA
Tiosemicarbazida (99,0%)	Sigma-Aldrich
4-Metil-3-tiossemicarbazida (97,0%)	Sigma-Aldrich
4-Etil-3-tiossemicarbazida (97,0%)	Sigma-Aldrich
Cloreto de Paládio(II) (99,0%)	Sigma-Aldrich
Acetato de Níquel (II) (98%)	Sigma-Aldrich
Trietilamina (99%)	Sigma-Aldrich
Etanol (99,5%)	Synth
Acetonitrila (99,9%)	Neon
Clorofórmio (99,8%)	Synth
Dimetilsulfóxido (99,9%)	Synth
Clorofórmio (d_1) (99,8%)	Sigma-Aldrich
Dimetilsulfóxido (d_6) (99,8%)	Sigma-Aldrich
Iodeto de Césio (99%)	Sigma-Aldrich
Agarose Padrão	Kasvy
Trietilamina (99%)	Sigma-Aldrich

2.2.2 - Metodologia sintética

2.2.2.1 - Síntese dos Ligantes

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, foram adicionados 5 mmol de benzalcetona (ligantes BT) e/ou 5 mmol de chalcona (Ligantes CT), solubilizados em 20 ml de solução de etanol com pH= 4, preparada com quatro gotas de solução de HCl 0,8 mol.L⁻¹. Uma vez que, as etapas envolvendo a formação de tiosemicarbazonas são facilmente reversíveis, o controle do pH é necessário para garantir o sentido de deslocamento do equilíbrio em direção à formação do produto desejado⁵⁴.

O sistema foi agitado por 5 minutos e em seguida, foram acrescentados 5 mmol da referida tiosemicarbazida (substituída com H, -CH₃ ou -CH₂CH₃). A reação de condensação foi mantida sob refluxo (80 °C) durante 24h sob agitação de 200 rpm. Ao término da reação, a solução foi transferida para um béquer, deixada em descanso sob a bancada e após sete dias, sob

lenta evaporação do solvente, foram obtidos cristais. Os produtos foram lavados com etanol, filtrados sob vácuo e deixados em dessecador para secagem.

2.2.2.2 - Síntese do precursor de Paládio: $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$

Em um erlenmeyer de 200 mL com 100 mL de acetonitrila, foram adicionadas 1,2 gramas de cloreto de paládio (II) e o sistema foi mantido sob agitação de 200 rpm e aquecimento de 50 °C. Após 4 h de reação, a mesma foi mantida somente sob agitação magnética (200 rpm) por mais 20h. O precipitado foi então filtrado sob vácuo⁵⁵.

2.2.2.3 - Sínteses dos Complexos $[\text{Pd}(\text{HL})_2]\text{Cl}_2$

Em um béquer de 25 mL, foram solubilizados, a quente, 0,6 mmol de ligante em 10 mL de acetonitrila. Esta solução foi então gotejada em um erlenmeyer de 50 mL contendo 0,3 mmol de $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$ em 10 mL de acetonitrila. A reação foi mantida sob agitação magnética e temperatura, 50 °C, por 2h e sob agitação magnética (200 rpm) e temperatura ambiente por mais 22h. O precipitado formado foi filtrado sob vácuo em funil de placa sinterizada e colocado para secar em dessecador por dois dias.

2.2.2.4 - Sínteses dos Complexos $[\text{Pd}(\text{L})_2]$

Em um erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de clorofórmio, foi solubilizado 1 mmol do ligante e acrescentado 1 mmol de trietilamina (140 μL). Em seguida, 0,5 mmol de $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$ adicionados à 10 mL de clorofórmio, em béquer de 25 mL, foi gotejado no erlenmeyer contendo o ligante. A reação foi mantida sob agitação magnética (200 rpm) e temperatura ambiente por 24h. Não houve formação de precipitado, e a solução reacional foi rotoevaporada. O produto foi então filtrado em funil de placa sinterizada, lavado com água destilada para retirada da trietilamina e colocado em dessecador por dois dias para secar.

2.3 - Determinação do ponto de fusão

As medidas de ponto de fusão foram realizadas em equipamento MARCONI NA 301, em uma razão 5 °C.min⁻¹, após as amostras

serem maceradas e compactadas em um capilar fechado, com temperatura máxima alcançada de 223°C.

2.4 - Medidas de condutividade molar

As medidas de condutividade molar foram realizadas em etanol e em DMSO em concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, com o uso do condutivímetro MARCONI modelo MA 521 (LISCC), calibrado anteriormente às medidas. A condutividade apresentada pelos solventes foi descontada dos resultados apresentados no trabalho.

2.5 - Difração de Raios - X de monocristal

As difrações de raios-X foram realizadas pelo doutorando João Honorato (LERCI-UFSCAR) em colaboração com o Prof. Dr. Eduardo Ernesto Castellano (IFSC-USP) do Laboratório de Cristalografia do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP), utilizando-se um difratômetro Rigaku XtaLAB mini II, radiação $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). As estruturas foram resolvidas com o programa SHELXT⁵⁶ usando métodos diretos, sucessivos mapas de Fourier-Diferença permitiram a localização dos átomos não hidrogênicos. Excetuando-se os átomos de hidrogênio, todos os demais foram refinados anisotropicamente. Os refinamentos foram feitos pelo método dos mínimos quadrados através do programa SHELXL. Detalhes específicos sobre coleta de dados e os parâmetros para cada complexo são fornecidos nas tabelas 8.9.1 e 8.9.2, nos apêndices.

2.6 - Docagem Molecular

Os estudos de docagem molecular foram realizados pela mestrandia Marcelle Vieira (LaQMEDSOMM-UNESP) sob orientação do professor Nailton Monteiro (LaQMEDSOMM-UNESP).

As estruturas dos complexos foram obtidas no programa MarvinSketch e os estados de protonação em pH fisiológico (pH=7,4) foram verificados. Todas as estruturas moleculares para complexos projetados foram geradas com o Discovery Studio Visualizer (DSV / Version: 17.2.0). Em seguida, foram otimizadas usando o método semi-empírico PM7 no pacote

MOPAC (Versão 2016) através do software de interface gráfica, Gabedit 2.5.0. Os comandos usados durante a otimização foram: MMOK, GOE-OK, XYZ, CHARGE = 0 (ou +1, dependendo do composto), e SINGLET. O formato do arquivo composto otimizado foi *.mol2.

Na sequência, foi realizada a docagem no software GOLD v5.5 a partir das estruturas cristalográficas da topoisomerase II α obtidas: uma delas co-cristalizada com o DNA e etopósido (PDB ID:5GWK), com resolução de 3.152 Å; e outra co-cristalizada com ATP (PDB ID: 1ZXM) com resolução de 1.87 Å. Ambas obtidas do sítio do *Protein Data Bank* (PDB).

Para ATP-ase:

A simulação de ancoragem molecular no modo rígido usando o software GOLD v5.5 foi realizada. O ligante cristalino ANP foi redockado no sítio de ligação do ATP. Foi utilizada as funções de pontuação GoldScore e ChemPLP com RMSD = 0,588. Para o reconhecimento molecular, o ANP modelado manteve-se em contato com cadeias laterais dos resíduos N91, N120, S148, S149, N160, R162, N163, G164, Y165, G166, A167, K168, Q376 e K378 compatível com PDBsum.

Para etopósido:

Utilizou-se o software GOLD v5.5 com a função de pontuação GoldScore e RMSD = 0,4805. O etopósido apresenta 17 interações (interações chave) com 9 resíduos (resíduos chave). As principais interações são duas ligações de hidrogênio dominantes com o backbone e a cadeia lateral do aminoácido aspartato 463 (A-D463). Além disso, o etopósido exibe interações hidrofóbicas π -alquila com A-M766, A-R487, A-G488 e D-DT9, interações empilhadas em π formadas em T com F-DG13 e ligações de hidrogênio não clássicas com D-DG10, F-DG13, D DT9, C-DC8 e A-G462.

2.7 - Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos no espectrômetro SHIMADZU IRTracer-100, usando pastilhas de iodeto de césio, na proporção 1:100, como suporte. Foram feitas 64 varreduras na

região de 4000 a 400 cm^{-1} . Os dados obtidos foram tratados utilizando-se os softwares Shimadzu IR Solution, 1.60, e Origin 8.0. Não foi realizada correção de linha de base para os espectros. Os espectros não apresentados no texto constam nos apêndices (8.1, 8.2 e 8.3).

2.8 - Ressonância magnética nuclear

Para a obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H , foi utilizado o espectrômetro BRUKER ARX 9,4T do Departamento de Química (DQ) da UFSCar. As amostras foram preparadas pesando-se 10 mg do composto solubilizadas em 600 μL de solvente apropriado (CDCl_3 ou $\text{DMSO-}d_6$). Todos os dados obtidos foram tratados utilizando-se o software MestReNova 6.0.2-5475. Os espectros não apresentados no texto constam nos apêndices (8.6, 8.7 e 8.8)

2.9 - Espectroscopia eletrônica na região do Ultravioleta-Visível

Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram obtidos em um espectrofotômetro SHIMADZU UV-1650PC. Após a obtenção da linha de base em etanol, foram utilizadas soluções de concentração $1 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para cada um dos compostos. Cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm foram utilizadas para obtenção dos espectros. Em seguida, foi feita a varredura na região entre 1000 a 205 nm. Os espectros obtidos foram tratados com os softwares UVprobe 2.21 e Origin 8.0. Os espectros dos ligantes não apresentados no texto estão presentes nos apêndices (8.5).

2.10 - Análise Elementar de C, H e N

As análises de porcentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas pela Central Analítica do Departamento de Química- UFSCAR São Carlos, utilizando-se de 1-5 mg dos compostos.

2.11 - Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas foi realizada pelo pós-doc. Allan Ribeiro e pelo doutorando Wystan Kreisly (LSPN-UFSCAR) utilizando-se um Water Acquity UPC² acoplado ao Xevo TQD (detector de massa de quadrupolo

tandem de bancada) utilizando-se a técnica de ionização por eletrospray (ESI) no modo positivo (para H⁺, Na⁺ e K⁺). Os espectros não apresentados no texto constam no apêndice (8.4).

2.12 - Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados pelos doutorandos Mauro Almeida (CCQM-UFSCAR) e Gabriela Porto (CCQM-UFSCAR), utilizando as seguintes linhagens celulares: MCF-7(câncer de mama), DU-145 (câncer de próstata) e PNT2 (Câncer de próstata não tumoral). As células MCF-7 foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) enquanto as demais linhagens, DU-145 e PNT2, foram cultivadas em meio RPMI1640, todos os meios com 10% (v/v) de FBS (soro fetal bovino) dentro de garrafas de plástico (Corning) armazenadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

As células foram suspensas em tripsina e incubadas na estufa a 37°C por dois minutos. Em seguida, adicionou-se o meio de cultura com 10% de FBS para inibir a ação enzimática. A suspensão foi centrifugada (centrífuga Sorval ST8-Thermo Scientific), para retirada da Tripsina, a 150 rpm por cinco minutos, com descarte do sobrenadante e resuspensão em meio de cultura.

A contagem das células foi realizada utilizando o corante Azul de Tripano em uma câmara de Neubauer no Microscópio Nikon Eclipse TS100. Após a contagem da resuspensão, foram adicionadas às placas de 96 poços alíquotas com 150 µL contendo $1,5 \times 10^4$ 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 DMSO contendo o ligante ou os complexos. As concentrações finais dos compostos nos poços foram de 8,00x10⁻¹; 1,58; 3,16; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 µmol·L⁻¹; para os compostos mais ativos as concentrações precisaram ser ajustadas para: 2,00x10⁻¹; 3,90x10⁻¹; 7,80x10⁻¹; 1,58; 3,16; 6,25; 12,50; 25,00 µmol·L⁻¹. Em seguida, as placas foram incubadas novamente na estufa por mais 48 h.^{8,57,58}

Após a incubação das microplacas foram adicionados a cada poço 50 µL de uma solução de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil

Brometo de Tetrazolio) ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e incubada novamente na estufa por 4h. Por fim, se retirou a solução de cada poço e adicionou-se $100 \mu\text{L}$ de álcool isopropílico. Em seguida foram realizadas as medidas de absorvância em cada poço com o leitor de microplacas híbrido da BioTek modelo SYNERGY H1. Os dados obtidos foram tratados utilizando Excel 2010 e GraphPadPrism 6.01.

Ressalta-se que, os procedimentos foram acompanhados pela autora dessa dissertação.

2.13 - Interação com DNA

2.13.1 - Interação com plasmídeo superenovelado

Em uma solução tampão TE 1x (Tris-HCl ($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH: 8,0)/ EDTA ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) foram adicionados $0,5 \mu\text{L}$ do plasmídeo pBR322 e $1 \mu\text{L}$ dos complexos metálicos em DMSO, em diferentes concentrações, totalizando um volume final de ensaio de $20 \mu\text{L}$. O plasmídeo utilizado foi cedido em colaboração com o laboratório da professora responsável Dulce Helena Ferreira de Souza (DQ-UFSCAR). A solução final foi incubada a 37°C por 24 h, utilizando-se o Banho Ultra Cienlab modelo CE-100/10.⁵⁷ Após o tempo de incubação as amostras foram retiradas do banho termostático e adicionou-se $15 \mu\text{L}$ de STEB (40% (m/v) de sacarose, $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Tris.HCl, pH = 7,5, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de EDTA, $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de azul de bromofenol) às amostras. Posteriormente, $20 \mu\text{L}$ das soluções foram adicionados em gel de agarose 1% (m/v). A corrida eletroforética ocorreu em solução TBE 1x a 30 mA durante 12 h (tempo necessário para obtenção de imagem em boa resolução). Após este período, o gel foi adicionado em solução corada de brometo de etídio e revelado no fotodocumentador Gel Doc™ EZ. A imagem obtida foi tratada utilizando-se o software ImageLab™ 6.0.0 fornecido pela BioRad.

2.13.2 - Titulação Espectroscópica por UV-Vis com DNA

A titulação espectroscópica por UV-Vis com o DNA foi realizada pelo doutorando Renan Lira (Grupo de Compostos de Coordenação e Organometálicos-UNESP).

Preparação do DNA

A solução de ctDNA foi preparada pela adição aproximada de 10 mg da biomolécula em 5 ml de uma solução de tampão Tris-HCl (5mM Tris HCl e 50 mM de NaCl, pH 7,4). A razão entre as absorvâncias das bandas em 260 e 280 nm resultaram em um valor de 1,85, indicando que a solução estava corretamente livre de proteínas. A concentração de DNA na solução foi determinada espectrofotometricamente usando o coeficiente de absorvidade molar de $6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ da banda em 260 nm.

Titulação espectroscópica

Espectros de UV-Vis foram obtidos para os complexos na presença de quantidades crescentes de ct-DNA, na região de 190 a 1100 nm em tampão salino Tris-HCl (pH 7,4). A titulação foi realizada a 25 °C mantendo a concentração do complexo fixa em $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, enquanto a concentração do ct-DNA foi variada de 0 até $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ^{59,60}.

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

Foram realizadas adições sucessivas de 18 μL da solução de DNA (tanto no branco quanto no complexo) até um total de 10 adições. A proporção molar complexo:DNA foi variada de 0,3 a 3,0 com intervalos de 0,3 em cada adição.

A constante de ligação (K_b) foi obtida através da equação de Benesi-Hildebrand, na seguinte forma:

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

Onde A_0 e A são as absorvâncias do complexo livre e do complexo com DNA, respectivamente. Os coeficientes ε_G e ε_{H-G} são os coeficientes de absorvidade molar do complexo livre e do complexo-DNA, respectivamente.

O valor da constante (K_b) foi calculado através da razão entre o coeficiente linear e o angular obtidos a partir de um gráfico de $A_0/(A-A_0)$ vs $1/[\text{DNA}]$ ⁶¹. Os espectros não apresentados no texto constam nos apêndices (8.10 e 8.11).

2.14 - Inibição da enzima DNA-Topoisomerasella

O ensaio de inibição da enzima DNA-Topoisomerase II α foi realizado com o kit de relaxação do DNA fornecido pela Inspiralis Limited. No ensaio efetuado utilizou-se 0,5 μL (500 ng) de DNA pBR322 superenovelado, 3 μL de tampão de ensaio (Tris.HCl (10 mmol·L⁻¹), NaCl (50 mmol·L⁻¹), KCl (50 mmol·L⁻¹), MgCl₂ (5,0 mmol·L⁻¹), Na₂H₂EDTA (0,1 mmol·L⁻¹), BSA (15 mgmL⁻¹) com pH 7,9), 1 μL (1,0 mmol·L⁻¹) de ATP e 1 μL de composto de interesse nas concentrações 1, 10 e 25 mol. μL^{-1} . Por fim, adicionou-se água e 1 μL (4,0 nmol·L⁻¹) de TOPOII α para atingir um volume final de 30 μL . A mistura reacional foi mantida em incubação a 37°C por quarenta minutos. Após este período, foram adicionados à solução 3 μL de SDS (dodecil sulfato de sódio) e realizado um choque térmico a 60°C por dois minutos para interromper o processo enzimático. Após a interrupção da ação enzimática foram adicionados 15 μL de STEB (40% (m/v) de sacarose, 100 mmol·L⁻¹ de Tris.HCl, pH = 7,5, 1 mmol·L⁻¹ de EDTA, 0,5 mgmL⁻¹ de azul de bromofenol) e 60 μL de uma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v). As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi então adicionada no gel de agarose 1% (m/v), em solução tampão de TBE 1x (Tris/Borato/EDTA) pH = 8,2. Foi realizado o mesmo procedimento para a corrida do gel e sua revelação apresentando no subitem Interação com plasmídeo superenovelado.

3. Resultados e Discussão

3.1 - Ligantes

A tabela 3.1 apresenta os dados de massa molar, rendimento das reações e análise elementar de C, H e N para os ligantes.

TABELA 3.1 - Dados de síntese e caracterização dos ligantes.

Composto	Massa Molar (g/mol)	Rendimento	Coloração	Ponto de Fusão (°C)	Análise Elementar		
					%C	%H	%N
CT-H	281,38	61%	Amarelo	143	69.170 (68.300)	5.480 (5.370)	14.820 (14.930)
CT-M	295,4	94%	Amarelo	152	69.660 (69.120)	5.946 (5.800)	14.020 (14.220)
CT-E	309,43	70 %	Amarelo	160	69.750 (69.870)	6.281 (6.190)	13.530 (13.580)
BT-H	219,31	86%	Amarelo	143	61.600 (60.250)	6.021 (5.980)	18.990 (19.160)
BT-M	233,33	80%	Amarelo	153	63.770 (61.670)	6.565 (6.480)	17.780 (18.010)
BT-E	247,36	48%	Amarelo	104	64.510 (63.120)	6.927 (6.930)	17.080 (16.990)

É importante ressaltar aqui que, os valores de rendimentos apresentados estão relacionados com a quantidade de produto cristalizado obtida. Todos os compostos se fundiram em um líquido amarelo em temperatura bem definida. Os valores de ponto de fusão sugerem que com o aumento do volume do substituinte há um aumento na temperatura de fusão desses compostos, com exceção apresentada pelo ligante BT-E. Aparentemente, as tiossemicarbazidas precursoras influenciam mais na temperatura de fusão observada do que os grupos cetonas, pois, os valores de ponto de fusão de ligantes com mesmo substituinte são bastante próximos. A citar como exemplo, os ligantes CT-H e BT-H apresentam mesma temperatura de fusão.

O resultado da análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio mostra que os compostos foram obtidos com razão de pureza

satisfatória, sendo apresentados os valores experimentais e entre parênteses os valores teóricos.

3.2 - Complexos

A síntese do precursor de paládio, bis(acetonitrila)dicloridopaládio(II), $[Pd(ACN)_2Cl_2]$, foi realizada como descrito por Al-Azmi⁶², com rendimento de 95%, sendo obtido um produto de cor alaranjada. Este foi então utilizado na reação de formação dos complexos, a qual é esquematizada na figura 3.1: os ligantes tiossemicarbazonas deslocam os ligantes lábeis do precursor de paládio, gerando os complexos bisquelatos.

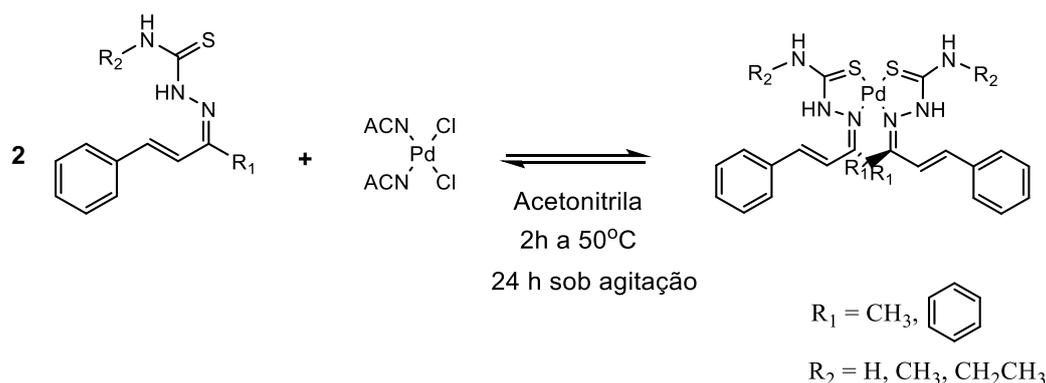


FIGURA 3.1 - Esquema de reação de complexos da série protonada.

Com exceção do complexo $[Pd(BT-E)_2]Cl_2$, o qual somente após 4 dias de evaporação lenta do solvente apresentou precipitado, formou-se precipitado após 24h de reação. Os dados de massa molar, rendimento, coloração, análise elementar (C,H,N) e condutividade molar dos complexos são mostrados na tabela 3.2.

Como demonstrado no esquema da figura 3.1, espera-se a coordenação bidentada da tiossemicarbazona ao metal, através dos átomos de enxofre do grupo tioamida e do nitrogênio terminal do grupo hidrazina, sendo a coordenação favorecida pelo efeito quelato que estes ligantes proporcionam bem como por afinidade em termos de caráter de base mole de Pearson do ligante e de ácido mole de Pearson do íon paládio⁶³. Não foi possível associar alguma tendência de reatividade para os ligantes, frente ao precursor de

paládio, capaz de explicar os valores de rendimento obtidos. Ainda, dentre esses dados, destacam-se os valores encontrados para a condutividade molar, os quais sugerem que os complexos apresentam natureza de eletrólitos 2:1⁶⁴.

Este dado, não esperado, surpreendeu por ser amplamente constatado na literatura a coordenação bidentada de ligantes tiossemicarbazonas similares de forma aniônica à íons paládio^{50,65-68}, bem como a obtenção, em nosso grupo de pesquisa, de coordenação aniônica de tiossemicarbazona utilizando-se mesmo precursor e solvente⁴⁹. Na literatura é incomum, porém, conhecida a coordenação do ligante na forma neutra, no entanto, em complexos que não são bisquelatos^{69,70}, sendo também descrita a complexação neutra como dependente do pH e de quando o ligante tiossemicarbazona é derivado de aldeído⁷¹. A figura 3.2 exemplifica a coordenação aniônica e na forma neutra do ligante, denominado neste trabalho, respectivamente, de ‘desprotonada’ e ‘protonada’.

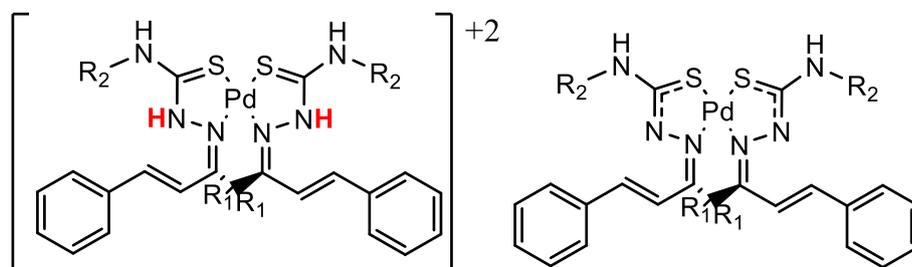


FIGURA 3.2- Exemplo de estrutura de complexo protonada e desprotonada.

Deste modo, optou-se por utilizar uma base, a trietilamina, como agente desprotonante. O esquema de síntese é mostrado na figura 3.3. Essa escolha foi feita observando-se tanto a possibilidade de retirar a base lavando os compostos com água quanto a não solubilidade dos complexos nesse solvente.

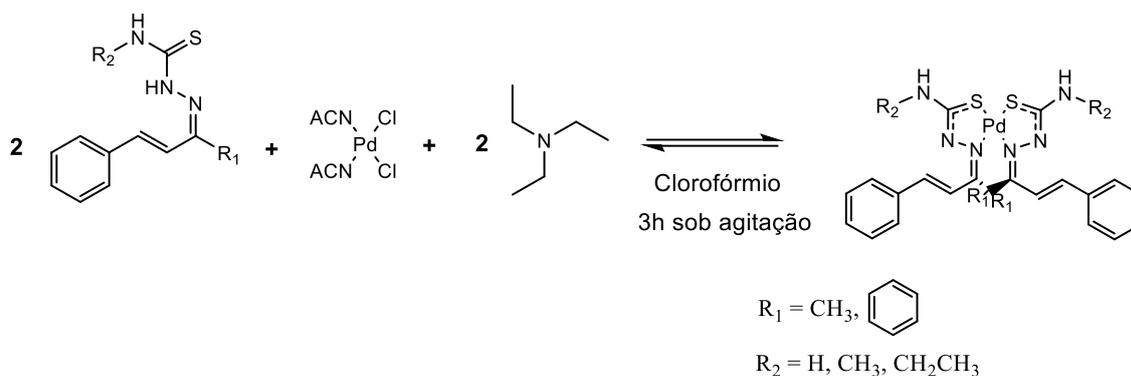


FIGURA 3.3 - Esquema de síntese dos complexos da série desprotonada.

Após realizada a caracterização do composto, e com base na constatação de coordenação do ligante de forma aniônica com utilização de um equivalente molar de desprotonante em relação ao ligante, indicando uma alta estabilidade do sistema com a presença do próton, surgiu então a curiosidade de entender se as estruturas protonadas apresentariam diferença na atividade biológica se comparada às estruturas desprotonadas. Com isso, foi realizada a síntese (esquema da figura 3.3) de uma nova série de complexos análogos, denominada de série desprotonada.

Os valores de condutividade molar obtidos para a nova série de complexos, condutividade medida também em etanol, cujos valores são apresentados na tabela 3.2, mostraram que os mesmos são não eletrólitos⁷², confirmando assim a desprotonação da tiossemicarbazona com a coordenação ao íon paládio.

Destaca-se que, os compostos apresentaram coloração amarela ou laranja, e que os complexos de ambas as séries se fundiram, em líquido vermelho, em faixa de temperatura bem definida. Os valores de porcentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio apresentaram boa concordância com os valores esperados teoricamente (apresentados na tabela 3.2 entre parênteses).

TABELA 3.2 Caracterização dos complexos da série protonada e desprotonada.

	Composto	Massa Molar (g/mol)	Rendimento	Condutividade Molar ($\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$)	Coloração	Ponto de Fusão ($^{\circ}\text{C}$)	Análise Elementar		
							%C	%H	%N
Série protonada	[Pd(CT-H) ₂]Cl ₂	740.05	60%	124.7	Amarelo	201-204	53.280 (52.220)	4.300 (4.530)	11.030 (11.110)
	[Pd(CT-M) ₂]Cl ₂	768.11	69%	120.2	Amarelo	194-196	53.250 (53.610)	4.877 (4.880)	10.810 (10.720)
	[Pd(CT-E) ₂]Cl ₂	796.16	65%	108.9	Laranja	168-173	52.760 (54.170)	4.919 (5.050)	9.835 (10.530)
	[Pd(BT-H) ₂]Cl ₂	615.92	83%	112.2	Laranja	202-204	42.950 (43.710)	4.231 (4.780)	13.430 (13.300)
	[Pd(BT-M) ₂]Cl ₂	643.97	80%	106.0	Laranja	173-176	44.500 (45.490)	6.500 (5.190)	13.900 (12.730)
	[Pd(BT-E) ₂]Cl ₂	672.02	52%	37.8	Laranja	212-220	46.280 (47.130)	5.075 (5.570)	12.020 (12.210)
Série desprotonada	[Pd(CT-H) ₂]	667.15	88%	6.37	Amarelo	192-196	57.190 (57.610)	4.337 (4.230)	11.590 (12.600)
	[Pd(CT-M) ₂]	695.21	98%	9.56	Laranja	182 -184	59.500 (58.740)	4.310 (4.640)	12.100 (12.090)
	[Pd(CT-E) ₂]	723.26	99%	5.54	Laranja	148-158	59.220 (59.780)	5.184 (5.020)	10.710 (11.620)
	[Pd(BT-H) ₂]	543.07	86%	2.25	Laranja	204-206	47.640 (48.660)	4.715 (4.460)	14.920 (15.480)
	[Pd(BT-M) ₂]	571.07	34%	4.20	Laranja	192-197	51.440 (50.480)	5.115 (4.940)	14.830 (14.720)
	[Pd(BT-E) ₂]	599.12	92%	7.43	Laranja	167-173	53.510 (52.120)	5.498 (5.380)	14.020 (14.030)

3.3 - Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

A partir da atribuição de bandas em espectros no infravermelho dos reagentes de partida e comparação dessas atribuições nos ligantes, foi possível sugerir a formação destes últimos analisando-se a supressão e/ou surgimento de bandas características atribuídas de acordo com o que é descrito na literatura para tiosemicarbazonas^{34,73-78}; bem como ser inferida a formação dos complexos com base no deslocamento de bandas referentes aos grupos contendo os átomos coordenantes (N e S) nos ligantes.

Exemplo de como tal procedimento foi realizado para os ligantes e complexos é descrito a seguir, para um dos ligantes, o CT-E (espectro da figura 3.4) seus reagentes de partida: a 4-etil-3-tiosemicarbazida (figura 3.5a) e a chalcona (figura 3.5b); e para os complexos, o procedimento é exemplificado com os complexos das séries protonada e desprotonada contendo o ligante CT-E.

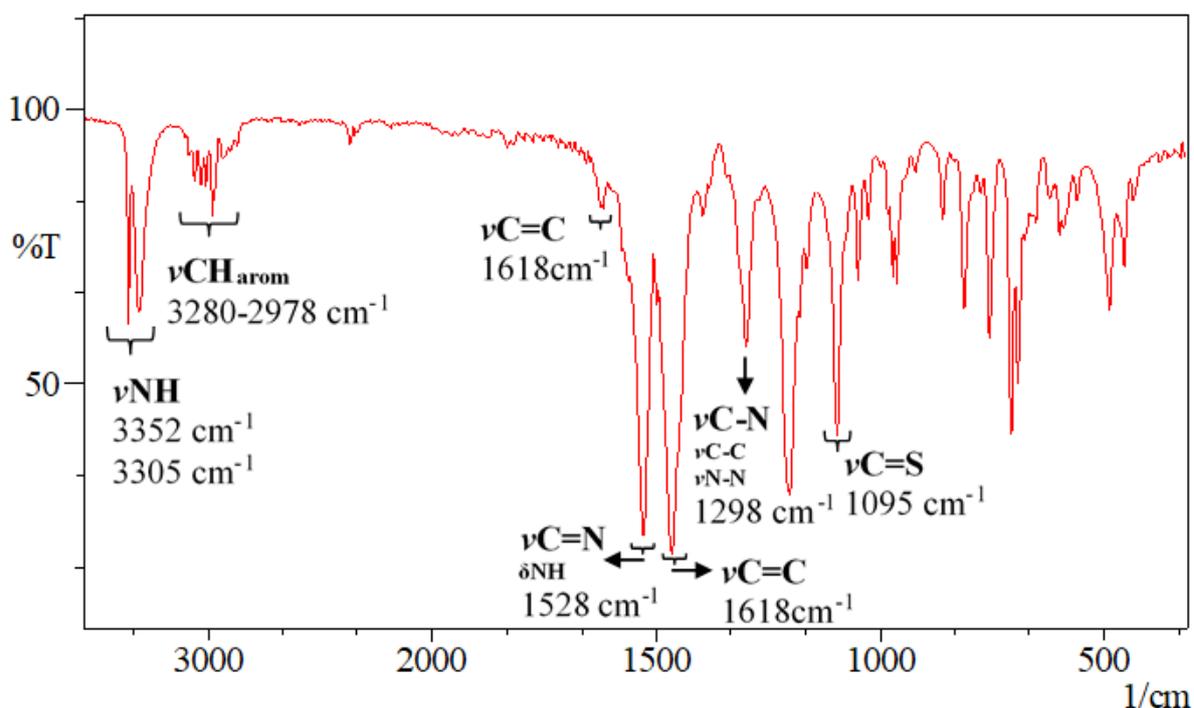


FIGURA 3.4 - Espectro do ligante CT-E com atribuições de algumas bandas.

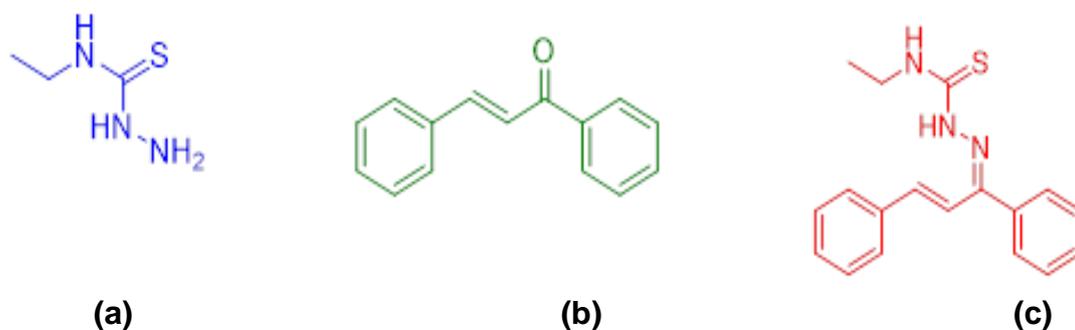


FIGURA 3.5 - Representação das estruturas dos precursores: a) tiosemicarbazida; b) Chalcona; e c) do ligante CT-E.

No espectro do ligante são atribuídas algumas das principais bandas do composto. As bandas em 3352 cm^{-1} e 3305 cm^{-1} são referentes aos estiramentos NH dos grupos NNH e SCNH(CH₂CH₃), respectivamente⁷⁵. Uma vez que, na região abaixo de 1600 cm^{-1} muitas vibrações podem contribuir para as bandas observadas, uma banda não é necessariamente produto de um tipo de vibração de um determinado grupo somente. Deste modo, para a banda observada em 1528 cm^{-1} , por exemplo, são esperadas contribuições do estiramento da ligação C=N e da deformação da ligação NH; enquanto para a banda em 1095 cm^{-1} , espera-se que esta tenha contribuições do estiramento C=N e forte contribuição do estiramento da ligação C=S^{32,79,80}; ainda, a banda em 1208 cm^{-1} , referente aos estiramentos C-N, aparece em região onde é comum os estiramento das ligações C-C e N-N⁷⁴.

Dada a complexidade das interações de bandas, a formação do ligante pode ser mais facilmente inferida se comparado seu espectro aos espectros de seus reagentes de partida. Com base em tal fato, um dos primeiros indícios observados de formação do ligante é a inexistência de uma banda alargada na região próxima à 3195 cm^{-1} , a qual é referente aos estiramentos do grupo -NH_2 ⁸¹, o qual está presente na 4-etil-3-tiosemicarbazida e vacante no ligante (figura 3.6).

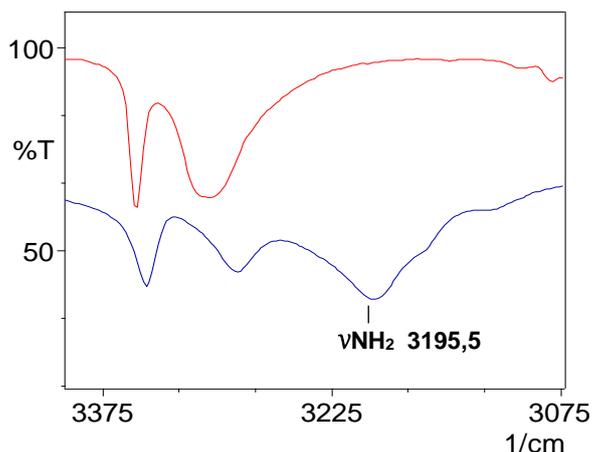


FIGURA 3.6- Espectros de absorção na região do infravermelho do precursor tiosemicarbazida (em azul) e do ligante CT-E (vermelho).

Outro indicativo é a ausência da banda atribuída ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ que aparece em 1665 cm^{-1} ⁸², presente somente no espectro do precursor chalcona (figura 3.7a). O desaparecimento das duas bandas supracitadas, referentes aos estiramentos dos grupos NH_2 e $\text{C}=\text{O}$, é esperado, uma vez que, o ligante se forma em uma reação de condensação envolvendo estes grupos. Ainda, o surgimento de uma banda em 1525 cm^{-1} no ligante (figura 3.7b), atribuída ao estiramento $\text{C}=\text{N}$, banda não existente nos espectros dos precursores, sugere também a formação do ligante.

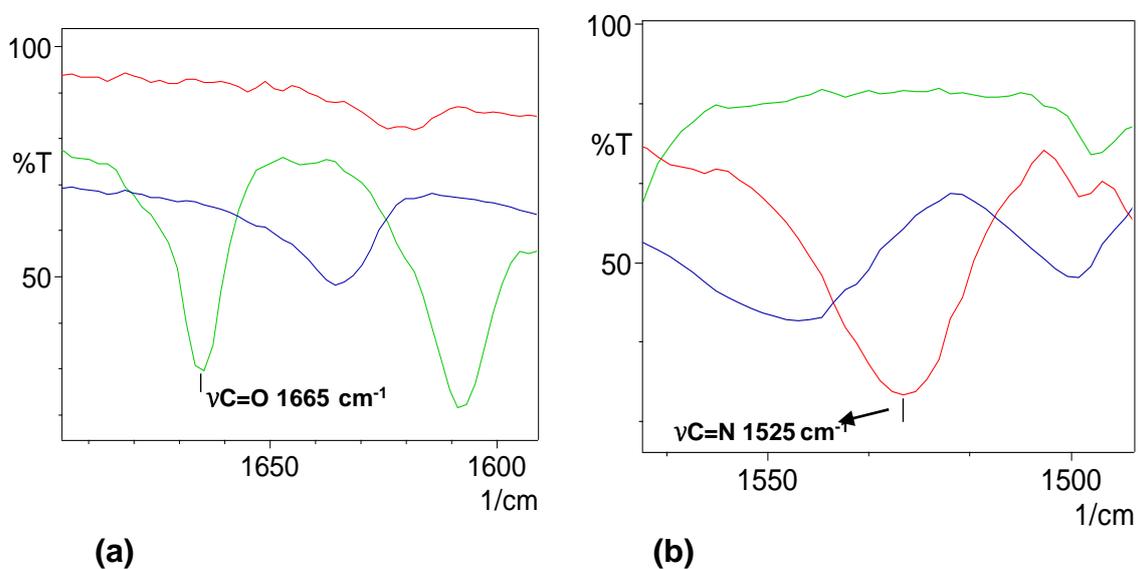


FIGURA 3.7 - Espectros de absorção na região do infravermelho dos precursores tiosemicarbazida (azul), chalcona (verde) e do ligante CT-E (vermelho).

As bandas referentes aos estiramentos das ligações C=N e C=S são importantes como diagnósticas na formação dos complexos, pois, os átomos de nitrogênio e de enxofre são os átomos coordenantes, e, portanto, é esperada variação do número de onda de absorção desses estiramentos após a coordenação ao metal. Deste modo, a formação dos complexos foi inferida com base nos deslocamentos observados para essas bandas diagnósticas, as quais são aqui demonstradas na figura 3.8 nos espectros dos complexos análogos $[\text{Pd}(\text{CT-E})_2]$ e $[\text{Pd}(\text{CT-E})_2]\text{Cl}_2$. Mesmo procedimento foi realizado para as duas séries de complexos e a tabela 3.3 mostra os valores de número de onda para as bandas diagnósticas atribuídas nos demais ligantes e nos demais complexos.

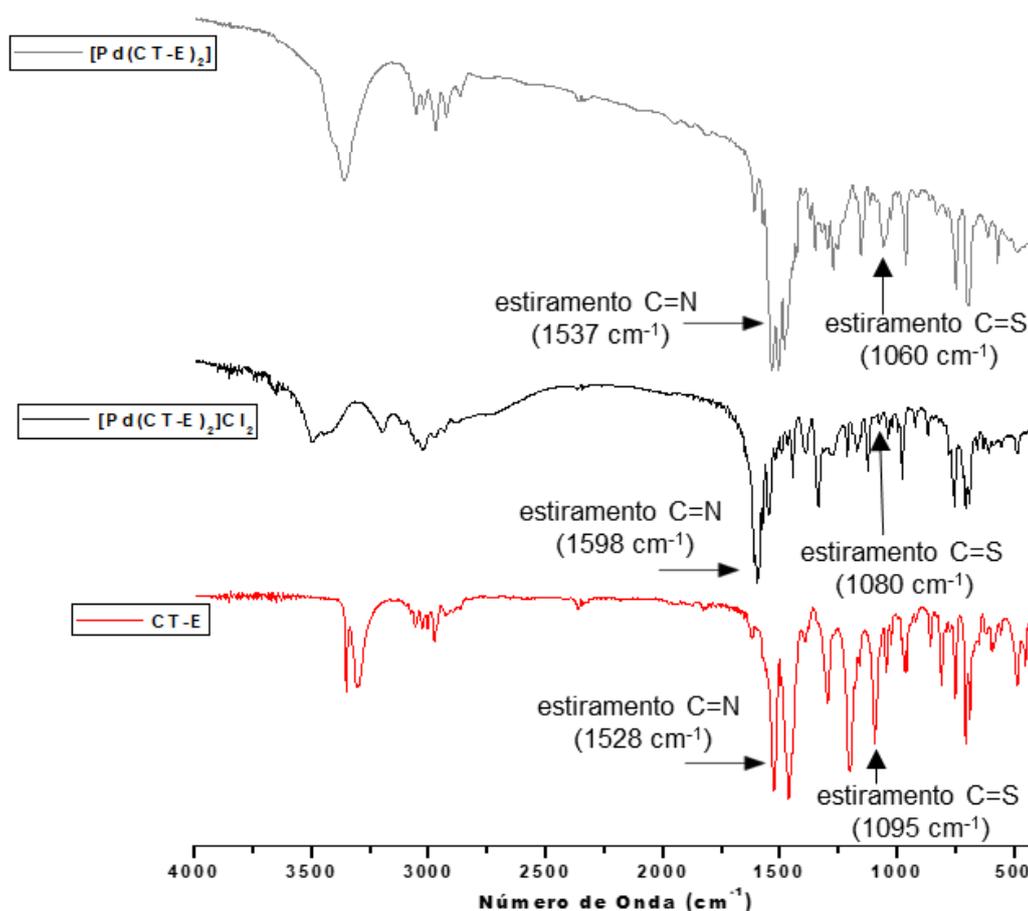


FIGURA 3.8 - Espectros de absorção na região do infravermelho do ligante CT-E (vermelho), e dos complexos $[\text{Pd}(\text{CT-E})_2]$ (cinza) e $[\text{Pd}(\text{CT-E})_2]\text{Cl}_2$.

Uma comparação entre os complexos apresentados permite inferir que no complexo desprotonado, $[\text{Pd}(\text{CT-E})_2]$, a ligação C=S é muito mais afetada ($\Delta\nu = 35 \text{ cm}^{-1}$) quando comparado com o complexo protonado, $[\text{Pd}(\text{CT-E})_2]\text{Cl}_2$ ($\Delta\nu = 15 \text{ cm}^{-1}$). Tal fato pode ser decorrente da estrutura desprotonada ter maior conjugação, permitindo uma maior deslocalização dos elétrons π , fortalecendo assim a ligação C-N com os nitrogênios adjacentes à tioamida, e enfraquecendo a ligação C=S no processo de coordenação (formação da tiosemicarbazona aniônica). Por outro lado, neste mesmo complexo, o deslocamento do estiramento da ligação C=N é menos pronunciado ($\Delta\nu = 9 \text{ cm}^{-1}$), se comparado ao complexo protonado ($\Delta\nu = 70 \text{ cm}^{-1}$), embora seja difícil a atribuição precisa deste último, devido ao perfil alargado das bandas nessa região.

TABELA 3.3 - Atribuições tentativas de bandas de acordo a literatura (para ligantes ¹⁴⁻²⁰ e complexos ^{3,6,8}).

Composto	$\nu(\text{C=N}) \text{ cm}^{-1}$	$\nu(\text{C=S}) \text{ cm}^{-1}$
CT-H	1514 (média-forte)	1072 (média)
$[\text{Pd}(\text{CT-H})_2]\text{Cl}_2$	1571 (forte)	1076 (fraca)
$[\text{Pd}(\text{CT-H})_2]$	1504 (forte)	1070 (fraca)
CT-M	1541 (muito forte)	1097 (forte)
$[\text{Pd}(\text{CT-M})_2]\text{Cl}_2$	1601(muito forte)	1074 (fraca)
$[\text{Pd}(\text{CT-M})_2]$	1548 (forte)	1058 (fraca)
CT-E	1528 (forte)	1095 (forte)
$[\text{Pd}(\text{CT-E})_2]\text{Cl}_2$	1598(forte)	1080(fraca)
$[\text{Pd}(\text{CT-E})_2]$	1537(forte)	1060 (fraca-média)
BT-H	1593 (forte)	1092 (forte)
$[\text{Pd}(\text{BT-H})_2]\text{Cl}_2$	1523(forte)	1097(muito fraca)
$[\text{Pd}(\text{BT-H})_2]$	1512 (forte)	1075(fraca)

BT-M	1552 (muito forte)	1103 (média-forte)
[Pd(BT-M) ₂]Cl ₂	1566 (forte)	1103 (muito fraca)
[Pd(BT-M) ₂]	1549 (forte)	1122 (fraca)
BT-E	1526 (muito forte)	1078 (média)
[Pd(BT-E) ₂]Cl ₂	1562 (forte)	1074 (fraca)
[Pd(BT-E) ₂]	1546 (média)	1091 (fraca)

As variações nos números de ondas dos estiramentos atribuídos para as ligações C=S e C=N, de modo geral, foram significativas quando comparados ligantes e complexos, o que permitiu inferir a formação destes últimos em ambas as séries.

Apesar de não ser possível traçar um perfil de tendência para a variação desses estiramentos que abarque todos os complexos, é notório que, de modo geral, as variações nos números de onda das bandas atribuídas aos estiramentos C=N e C=S variam, no mesmo complexo, inversamente: isto é, em complexos em que a ligação C=N se torna muito mais forte a ligação C=S se torna levemente mais fraca.

Tendência similar foi encontrada em espectros de absorção na região do infravermelho por Ali et. al (2012)⁸³ para complexos bisquelatos de Pt(II) com tiossemicarbazonas aniônicas, tendo sido comprovados por meio da difração de raios-X que a ligação C=S no complexo diminui seu caráter de ligação dupla, enquanto as ligações C-N adjacentes à tioamida aumentam seu caráter de ligação dupla após a coordenação.

3.4 - Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é uma técnica facilmente capaz de elucidar a estrutura de moléculas orgânicas simples a partir de padrões de fragmentação. Para compostos de coordenação, no entanto, os fragmentos

encontrados são bastante complexos e podem estar associados não somente à quebra da molécula, mas também à possíveis associação de fragmentos que são formados. Todavia, ela pode sugerir a existência ou não do composto de interesse, observada a presença do pico do íon molecular.

Na literatura, é encontrado o uso da espectrometria de massas para complexos de paládio utilizando-se da técnica de ionização por eletrospray (ESI-MS) no modo positivo ⁸⁴⁻⁸⁶. A tabela 3.2 apresenta os valores teóricos e os valores experimentais, do pico do íon molecular, encontrados nos espectros de massas utilizando-se da técnica acima mencionada. Esses valores são concordantes e sugerem, assim, a obtenção de todos os compostos.

TABELA 3.2 - Valores teóricos e experimentais do pico do íon molecular dos complexos (espectrometria de massas no modo positivo para H⁺).

Composto	m/z	
	Teórico	Experimental
[Pd(CT-H) ₂]Cl ₂	667,09	667,19
[Pd(CT-M) ₂]Cl ₂	695,00	695,00
[Pd(CT-E) ₂]Cl ₂	725,28	724,31
[Pd(BT-H) ₂]Cl ₂	543,06	543,17
[Pd(BT-M) ₂]Cl ₂	571,09	571,24
[Pd(BT-E) ₂]Cl ₂	599,13	599,17
[Pd(CT-H) ₂]	667,09	667,19
[Pd(CT-M) ₂]	695,00	695,00
[Pd(CT-E) ₂]	723,00	723,00
[Pd(BT-H) ₂]	543,00	543,00
[Pd(BT-M) ₂]	571,09	571,17
[Pd(BT-E) ₂]	599,13	599,23

A figura 3.9 apresenta os espectros teórico e experimental para o complexo [Pd(BT-E)₂], no modo positivo, com os íons H⁺, Na⁺ e K⁺. Destaca-se ainda que, em todos os espectros de massas dos demais complexos, encontrou-se também o padrão isotópico para o paládio ^{84,85}.

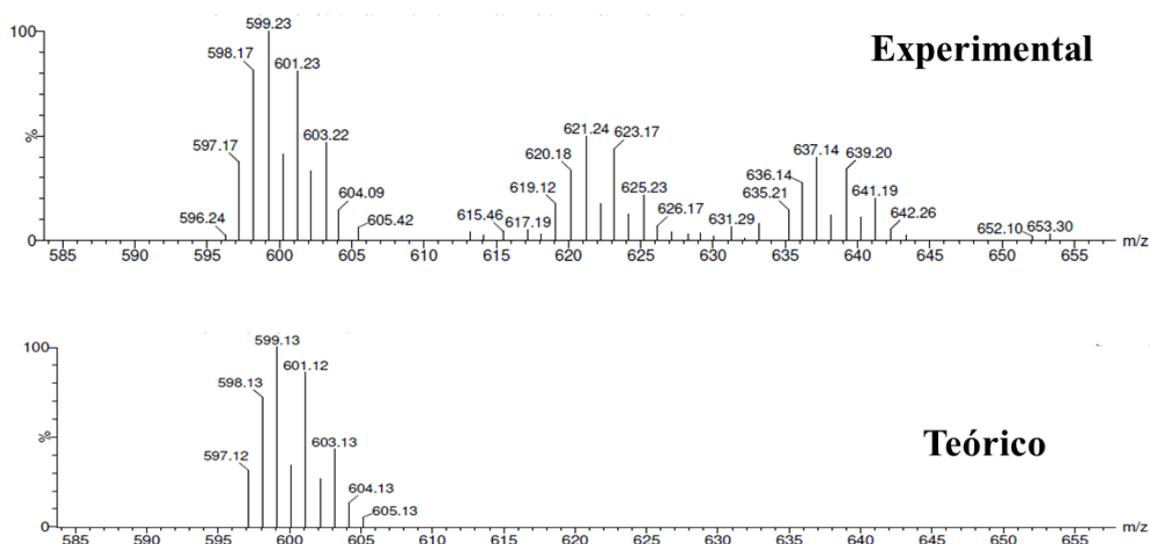


FIGURA 3.9 - Espectros de massas teórico e experimental do complexo $[\text{Pd}(\text{BT-E})_2]$.

3.5 - Teste de Estabilidade: Medidas de Condutividade Molar

Uma vez que, os compostos têm como finalidade a aplicação biológica, existe a necessidade de solubilização dos mesmos para realização dos testes. Dado que, eles não são solúveis em água, porém, apresentam boa solubilidade em um solvente comum e padrão nesses testes, o DMSO, é imprescindível tentar compreender se tal solvente interage com os compostos, muito embora mesmo com os complexos quadráticos planos possuindo dois sítios axiais livres, seja improvável a coordenação do DMSO ao Pd(II).

Diante do exposto, foi então realizado o teste de estabilidade dos compostos avaliando se a natureza de condução eletrolítica das duas séries se mantinham intactas no máximo período necessário para serem realizados os testes biológicos, 48h.

Para os complexos da série protonada, a coordenação do solvente pode alterar os valores de condutividade observados, enquanto a série desprotonada, não-eletrólito, pode passar a exibir caráter eletrólito. Como apresentado no gráfico na figura 3.10, os valores de condutividade molar para

os doze complexos mostraram que os mesmos mantiveram suas identidades de eletrólitos e não eletrólito por até 48h.

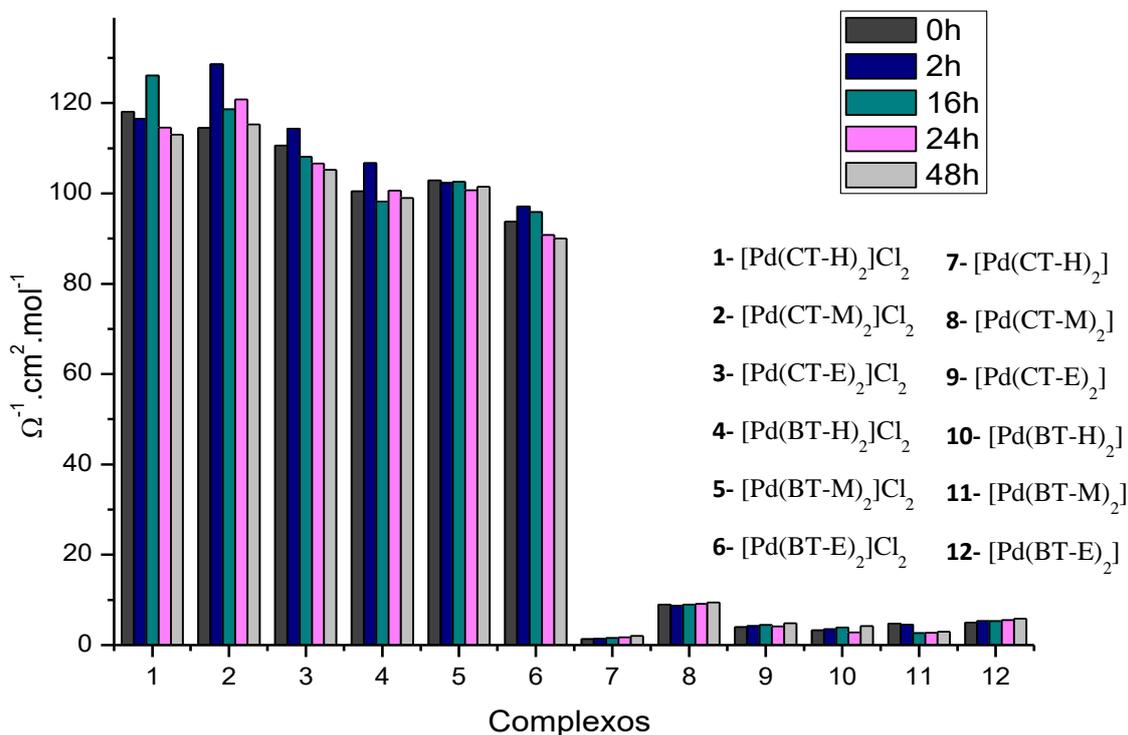


FIGURA 3.10. Dados de condutividade molar dos complexos em 0, 2, 16, 24 e 48 horas.

Ressalta-se que, as pequenas variações encontradas nos gráficos para um mesmo composto são creditadas à variação das condições de realização dos experimentos, como variação da temperatura ambiente, por exemplo. Entretanto, por não ser possível mensurar qual a diferença de condutividade atrelada à coordenação do solvente à série protonada, uma vez que, a coordenação do DMSO ou saída de um dos ligantes não altera a sua natureza de eletrólito 2:1, foi realizado o teste de estabilidade por espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis. A figura 3.11 apresenta os espectros obtidos para um dos complexos, o [Pd(BT-H)₂].

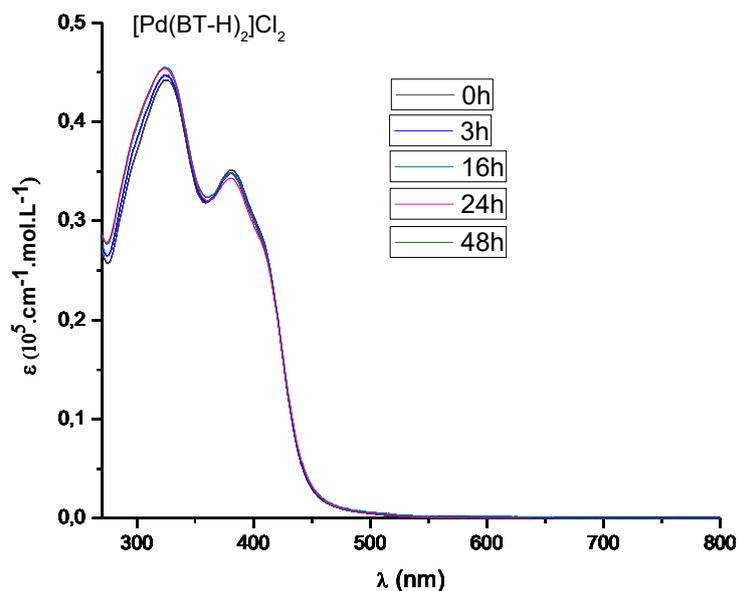


FIGURA 3.11 - Teste de estabilidade em até 48 h por espectroscopia na região do UV-Vis para o complexo $[\text{Pd}(\text{BT-H})_2]\text{Cl}_2$, $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em DMSO (transparência do solvente= 270 nm).

Seria esperada mudança no perfil das bandas ou até mesmo o surgimento de novas bandas, nos espectros, caso o solvente se coordenasse ao paládio. Nenhuma dessas constatações é observada em espectros obtidos para solução do complexo em DMSO em até 48 h. Deste modo, presume-se que, não há coordenação do solvente e este resultado é aqui estendido para os demais complexos da série protonada.

3.6 - Espectroscopia eletrônica na região do Ultravioleta-Visível

Considerando-se a solubilidade dos compostos e o limite de absorção do solvente, os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) dos ligantes e complexos foram obtidos em etanol (transparente até 205 nm) em solução diluída, $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. Nos espectros dos ligantes observam-se bandas próximas à 330 nm, uma banda e um ombro, as quais são atribuídas a transições do tipo $\pi - \pi^*$ e $n - \pi^*$ provenientes dos grupos cromóforos da molécula: NH_2 , $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{N}$ e $\text{C}=\text{S}$ ³⁴. Os tipos de transições, valores de absorvidade molar e comprimento de ondas de máxima absorção de ligantes e complexos são mostrados na tabela 3.4.

TABELA 3.4 - Comprimentos de onda, absortividade molar e atribuições de bandas.

Composto	$\pi \rightarrow \pi^*$	TCML
	$n \rightarrow \pi^*$	
	λ (εmáx)	λ (εmáx)
CT-H	333 nm (37800)	-
CT-M	333 nm (38400)	-
CT-E	334 nm (42700)	-
BT-H	329 nm (44500)	-
BT-M	329 nm (37800)	-
BT-E	329 nm (46600)	-
[Pd(CT-H) ₂]Cl ₂	324 (35600)	387 (20700)
[Pd(CT-M) ₂]Cl ₂	330 (33600)	387 (24900)
[Pd(CT-E) ₂]Cl ₂	333 (30600)	390 (25900)
[Pd(BT-H) ₂]Cl ₂	320 (44700)	373 (29600)
[Pd(BT-M) ₂]Cl ₂	332 (27400)	374 (21600)
[Pd(BT-E) ₂]Cl ₂	339 (12800)	370 (26400)
[Pd(CT-H) ₂]	332 (31400)	387 (21800)
[Pd(CT-M) ₂]	335 (34000)	386 (25400)
[Pd(CT-E) ₂]	339 (36300)	390 (29500)
[Pd(BT-H) ₂]	322 (36400)	375 (24100)
[Pd(BT-M) ₂]	331 (42200)	376 (31500)
[Pd(BT-E) ₂]	332 (39100)	376 (30900)

Os espectros dos complexos da série protonada e desprotonada são apresentados, respectivamente, nas figuras 3.12 e 3.13, e é possível observar a presença de maior número de bandas. Próximo a região de 330 nm bandas mais alargadas do que aquela encontrada no ligante, e sem a nítida presença de um ombro, parecem ser o desdobramento da banda antes

observada no ligante. Essas bandas foram também atribuídas às transições do tipo $\pi - \pi^*$ e $n - \pi^*$ ⁷⁶, não tendo sido observado significativo deslocamento do comprimento de onda de absorção (comparado ao ligante).

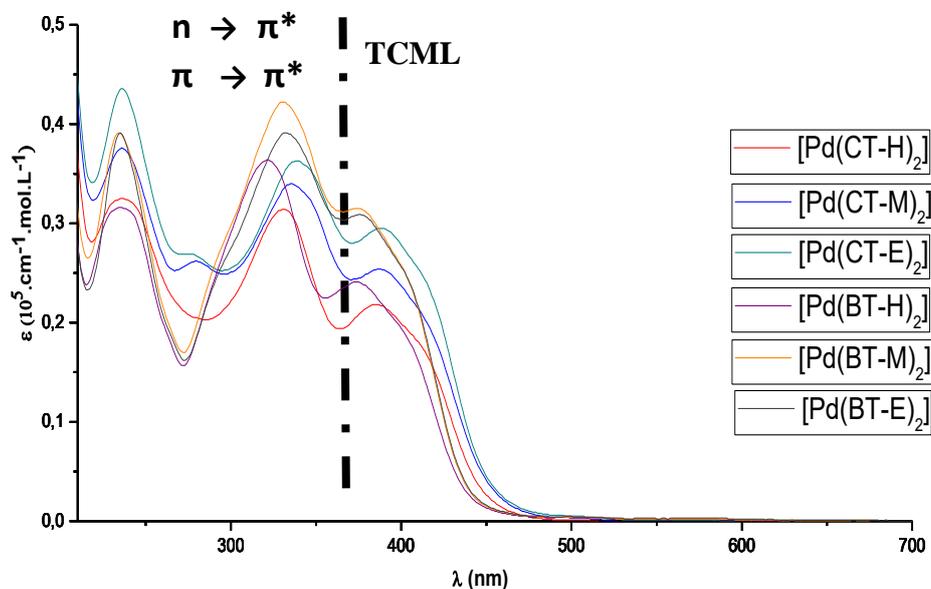


FIGURA 3.12 – Espectros de absorção na região do UV-Vis dos complexos da série desprotonada, obtidos em solução de etanol- $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

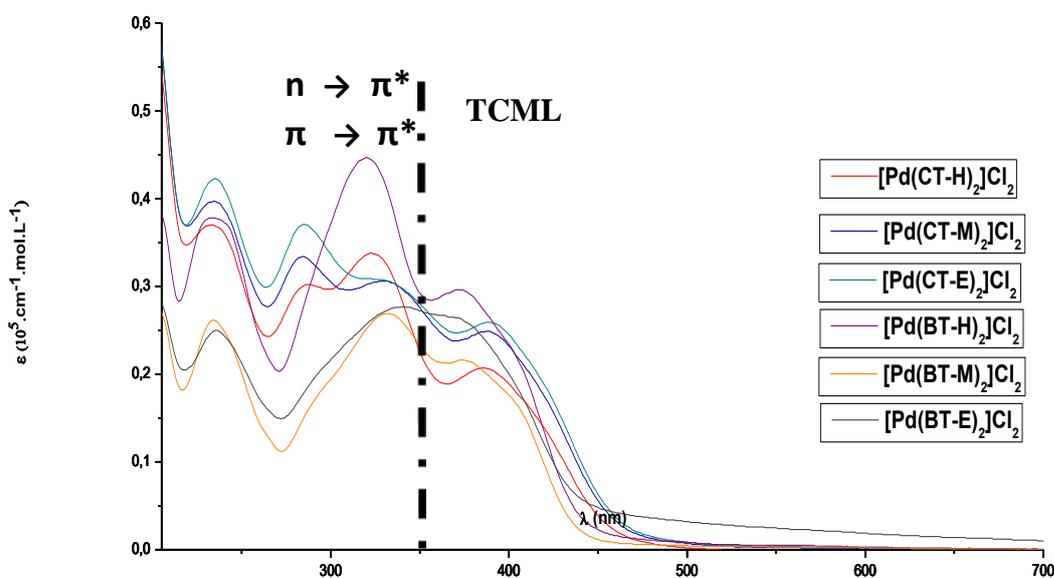


FIGURA 3.13 - Espectros de absorção na região do UV-Vis dos complexos da série protonada, obtidos em solução de etanol- $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

A presença de bandas na região de 372-389 nm, não existentes nos ligantes, são atribuídas à transferência de carga metal ligante (TCML): uma vez que, o Pd(II) tem como elétrons de valência os elétrons d^8 , sendo um íon rico em elétron, este pode realizar a transferência de densidade para orbitais moleculares vazios mais centrados nos ligantes. A presença de bandas na região abaixo de 300 nm são creditadas a transições intraligantes. Ainda, ao comparar os espectros das duas séries de complexos, observou-se de modo geral que, os compostos análogos apresentam perfil de bandas similares, praticamente sobreponíveis, com variações, no entanto, em seus valores de absorvidade molar. A figura 3.14 ilustra o que foi acima descrito e apresenta ainda sobreposição dos espectros de dois complexos com seu respectivo ligante BT-H.

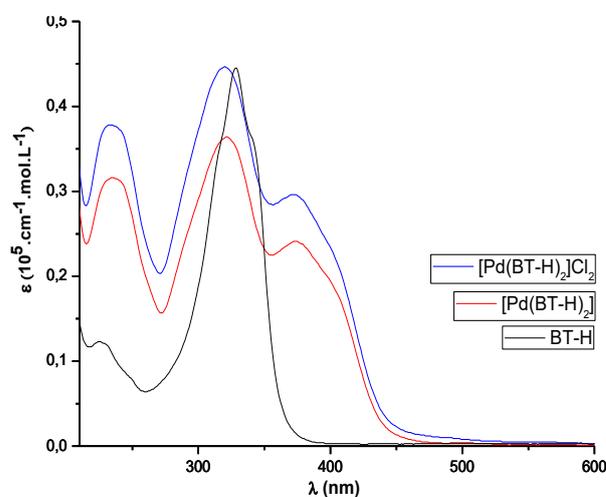


FIGURA 3.14 – Espectros de absorção na região do UV-Vis do ligante BT-H e dos complexos $[Pd(BT-H)_2]Cl_2$ e $[Pd(BT-H)_2]$, obtidos em solução de etanol- 10^{-5} mol.L $^{-1}$.

3.7 - Difração de Raios X de Monocristal

As estruturas cristalinas de cinco dos seis ligantes são inéditas, com a resolução da estrutura não inédita pertencente ao grupo, enquanto todos os complexos e suas estruturas são inéditos. Até o presente momento, foram obtidos cristais aptos para difração de raios X para dois dos ligantes e cinco complexos, dois da série protonada e três da série desprotonada.

Os dados refinados da difração elucidaram as estruturas dos compostos mostrando que essas são similares aquelas propostas tanto para os ligantes quanto para os complexos, sendo os complexos bisquelatos bidentados com ligantes coordenando-se pelos átomos de enxofre do grupo tioamida e por um dos nitrogênios do grupo hidrazina, na conformação *cis*. Todos os complexos apresentaram geometria quadrática plana distorcida em torno do centro metálico, com ângulos N-Pd-S próximos à 170° (tabela 3.3). Esses valores de ângulos são justificáveis dado o volume dos ligantes e a formação de metalociclos de cinco átomos após a coordenação.

Ainda, observa-se a coordenação do ligante tanto de forma aniônica, para os complexos da série desprotonada, quanto na forma neutra do ligante, nas estruturas da série protonada. Comparação das distâncias de ligação entre os átomos nas estruturas dos ligantes e na estrutura de seus respectivos complexos bisquelatos apontaram mudanças significativas, sendo as principais mostradas na tabela 3.3.

A citar como exemplo, a distância S₁-C₂ no ligante BT-E é de 1.629 Å, enquanto no complexo [Pd(BT-E)₂] (figura 3.15), essa distância aumenta para 1.741 Å, revelando pronunciada diminuição do caráter π dessa ligação após a coordenação ao íon metálico⁷⁵. Em contrapartida, a ligação N₂-C₂ varia de 1.353 Å, no ligante, para 1.294 Å, no complexo, indicando um fortalecimento do caráter π após a coordenação.

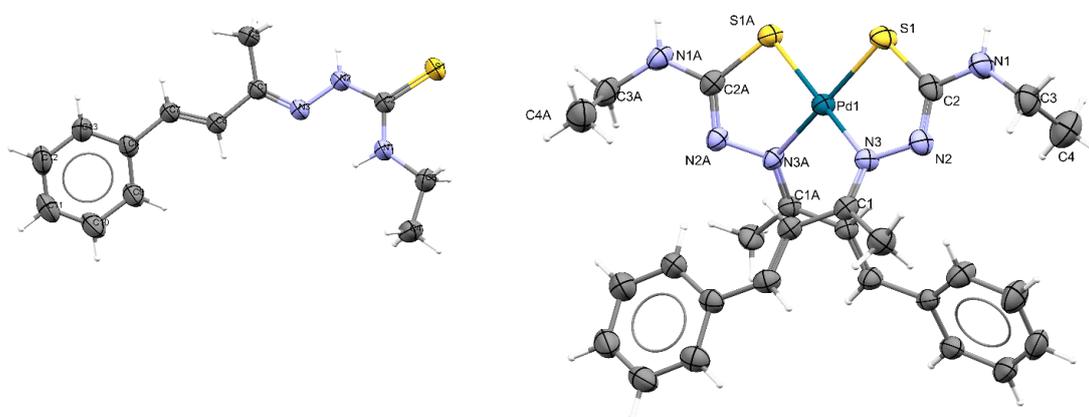


FIGURA 3.15 - Estrutura dos ligantes BT-E e seu complexo [Pd(BT-E)₂], com elipsóides com 30% de probabilidade.

A comparação dos dados de distância de ligação do ligante CT-M e de seu complexo de paládio da série protonada, $[\text{Pd}(\text{CT-M})_2]\text{Cl}_2$ (figura 3.16), mostrou tendência similar quanto á diminuição e fortalecimento do caráter π das ligações. Destaca-se aqui que, esta tendência corrobora com os dados encontrados por meio das atribuições de bandas na espectroscopia na região do infravermelho, em que foi observado, de modo geral, o enfraquecimento da ligação C=S e fortalecimento da ligação C=N nos complexos quando comparados aos seus respectivos ligantes.

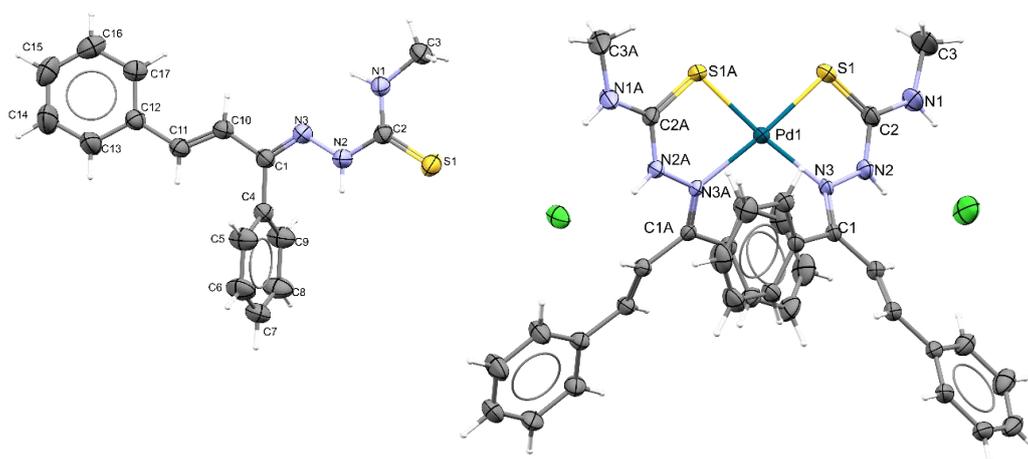


FIGURA 3.16- Estrutura do ligante CT-M e de seu complexo $[\text{Pd}(\text{CT-M})_2]\text{Cl}_2$, com elipsóides com 30% de probabilidade.

TABELA 3.3 - Seleção de distâncias de ligações e ângulos dos compostos.

Composto	Distância (Å)						Ângulo (°)	
	N ₃ -C ₁ [N _{3A} -C _{1A}]	S ₁ -C ₂ [S _{1A} -C _{2A}]	N ₂ -C ₂ [N _{2A} -C _{2A}]	Pd-S ₁ [Pd-S _{1A}]	Pd-N ₃ [Pd-N _{3A}]	N _{3A} -Pd-S ₁ [N ₃ -Pd-S _{1A}]	S ₁ -Pd-S _{1A}	N ₃ -Pd-N _{3A}
CT-M	1.436 [1.289]	1.665 [1.668]	1.356 [1.352]	-	-	-	-	-
[Pd(CT-M)₂]Cl₂	1.295 [1.297]	1.699 [1.713]	1.337 [1.330]	2.257 [2.248]	2.075 [2.064]	171.04 [171.66]	93.53	101.68
BT-E	1.282	1.663	1.353	-	-	-	-	-
[Pd(BT-E)₂]	1.297 [1.295]	1.741 [1.749]	1.294 [1.295]	2.241 [2.258]	2.106 [2.090]	167.42 [168.31]	92.20	105.89
[Pd(CT-E)₂]	1.302 [1.307]	1.747 [1.746]	1.295 [1.300]	2.241 [2.245]	2.082 [2.103]	166.28 [166.89]	91.92	106.53
[Pd(CT-E)₂]Cl₂	1.295 [1.300]	1.710 [1.703]	1.334 [1.340]	2.255 [2.259]	2.069 [2.073]	168.03 [167.36]	93.69	102.05
[Pd(BT-M)₂]	1.295	1.737	1.296	2.249	2.099	171.54	90.34	106.45

Os dados das estruturas dos complexos $[\text{Pd}(\text{CT-E})_2]$ e seu análogo da série protonada $[\text{Pd}(\text{CT-E})_2]\text{Cl}_2$ (figura 3.17), mostraram, de modo geral, similaridade para os ângulos e distâncias de ligação, excetuando a distância $\text{N}_2\text{-C}_2$ que para o complexo protonado foi maior, 1.334 Å, enquanto para o $[\text{Pd}(\text{CT-E})_2]$ esta distância foi de 1.295 Å. Esta diferença, já esperada, é resultado da ausência do próton, o que aumenta o caráter de ligação π em $\text{N}_2\text{-C}_2$, na estrutura desprotonada, e portanto, nesse complexo, uma possível maior densidade eletrônica em torno do metalociclo.

A figura 3.18 apresenta a estrutura cristalina resolvida para o complexo $[\text{Pd}(\text{BT-M})_2]$.

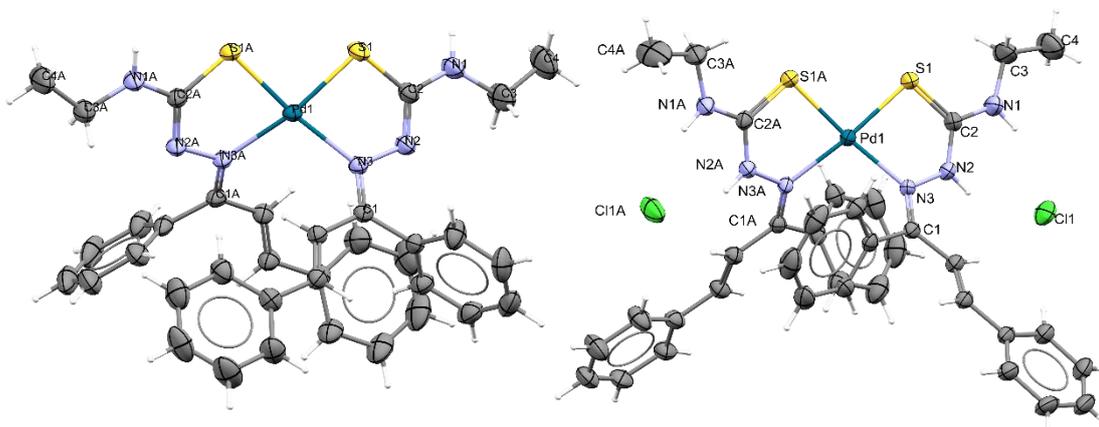


FIGURA 3.17 - Estrutura dos complexos $[\text{Pd}(\text{CT-E})_2]$ e $[\text{Pd}(\text{CT-E})_2]\text{Cl}_2$ com elipsóides com 30% de probabilidade.

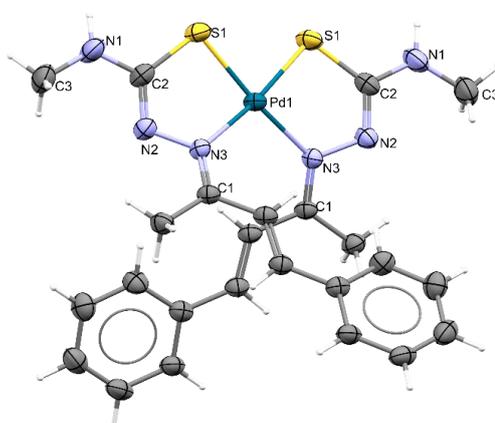


FIGURA 3.18 - Estrutura do complexo $[\text{Pd}(\text{BT-M})_2]$ com elipsóides com 30% de probabilidade.

3.8 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio permitiu inferir importantes informações sobre as estruturas obtidas. A figura 3.19 apresenta o espectro de RMN de hidrogênio do ligante CT-M e as atribuições dos sinais referentes aos hidrogênios da molécula. Os sinais foram integrados tendo como referência, integral igual a 1, os sinais característicos dos hidrogênios A e B⁸¹.

Os sinais de referência A (6.42 ppm) e B (7.08 ppm) têm multiplicidade de dubletos e constante de acoplamento igual a $^3J_{HA-HB} = 16\text{Hz}$, o que indica uma conformação *trans* desses hidrogênios ⁸¹. Os sinais em 8.50 ppm e 7.69 ppm, C e D, respectivamente, foram atribuídos aos hidrogênios ligados aos átomos de nitrogênios ^{50,66}, e aqueles próximos à 7.56 - 7.32 ppm aos hidrogênios dos anéis aromáticos da molécula ⁸⁷. O sinal em 3.26 ppm é referente aos hidrogênios da metila e apresenta-se como um sinal duplicado (3.26 ppm e 3.25 ppm), uma consequência da restrição da ligação N-D-C do grupo tioamida, o que promove dois ambientes químicos para os núcleos de hidrogênios da metila (E) ^{49,88}, gerando assim sinais de mesma intensidade. Ressalta-se ainda que, os sinais em 7.26 ppm e 1.60 ppm são referentes, respectivamente, aos sinais do solvente, CDCl_3-d_1 , e à água do solvente ⁸⁹.

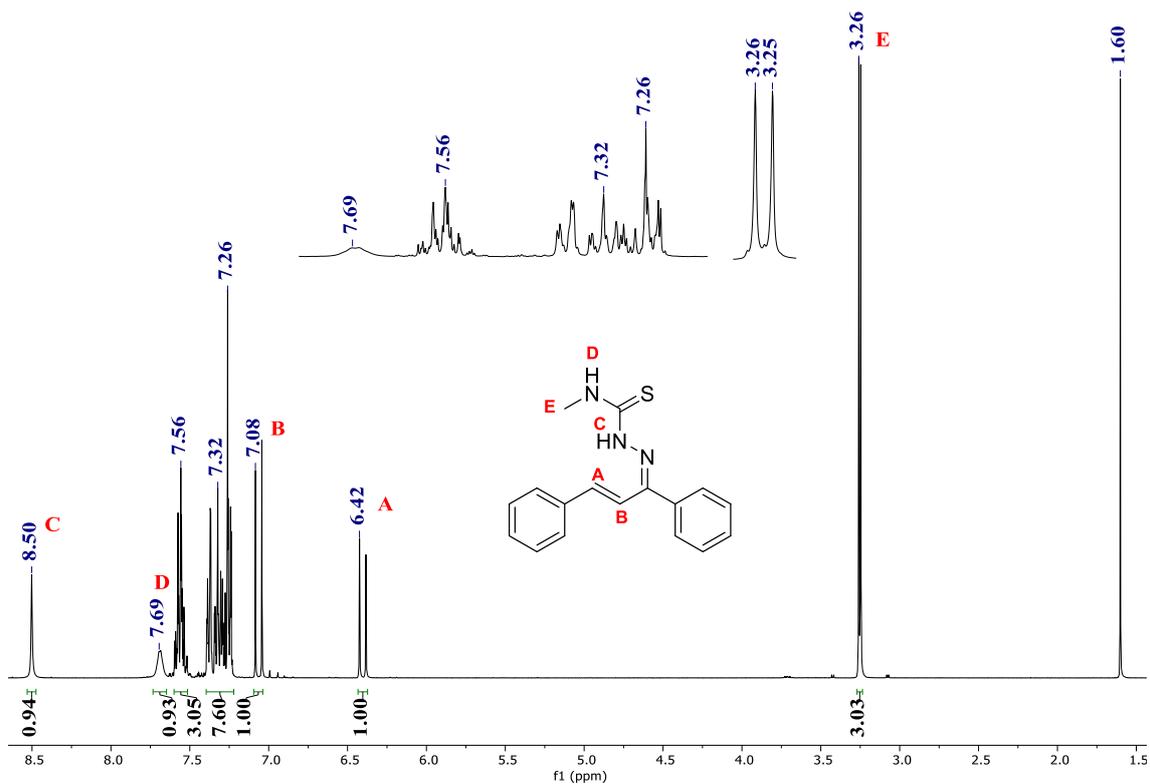


FIGURA 3.19. Espectro de RMN de hidrogênio do ligante CT-M (em CDCl₃) e atribuições dos sinais.

Observados os sinais e valores de integrais esperados, a análise do espectro do CT-M e dos demais ligantes permitiu concluir a obtenção da estrutura proposta para esses compostos. Uma vez que, após a coordenação a um íon metálico muda-se a distribuição de densidade na molécula, é esperado, com a complexação, observar mudanças nos deslocamentos químicos dos sinais dos hidrogênios no complexo quando comparado ao seu respectivo ligante. Assim, o espectro de RMN de hidrogênio e as atribuições dos sinais do complexo [Pd(CT-M)₂]Cl₂ são mostrados na figura 3.20. Os valores de deslocamento químico são comparados com os do ligante livre na tabela 3.5.

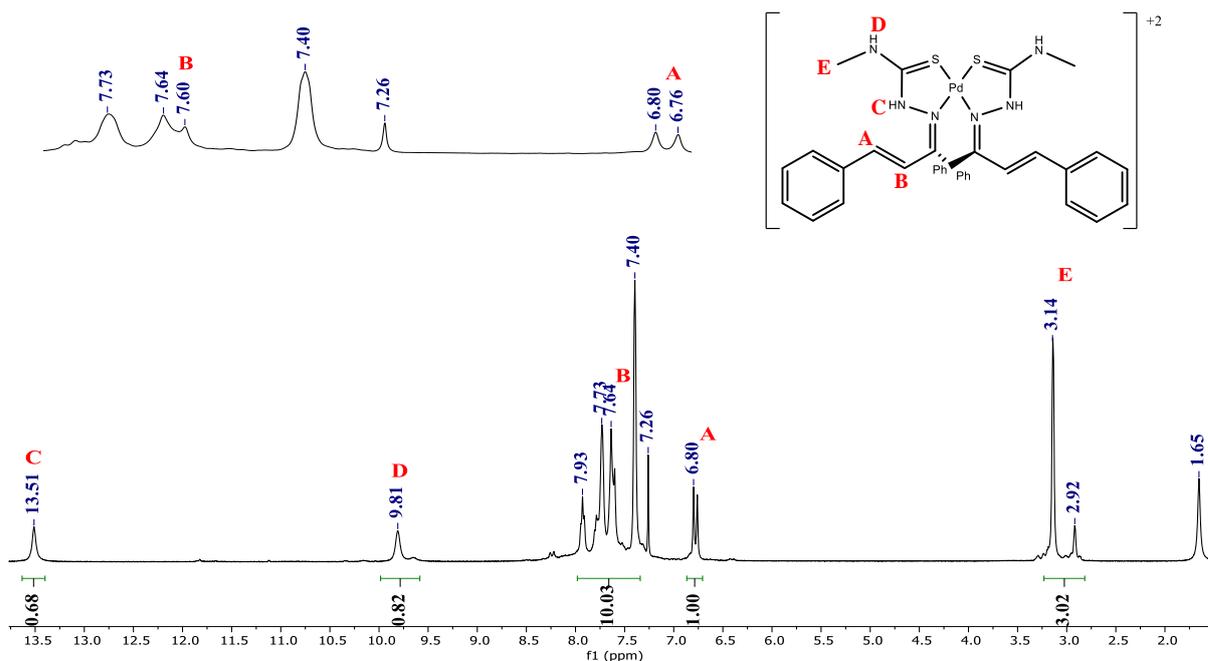


FIGURA 3.20 - Espectro de RMN de hidrogênio do complexo $[\text{Pd}(\text{CT-M})_2]\text{Cl}_2$ (em CDCl_3) e atribuições dos sinais.

TABELA 3.5 - Valores de deslocamento químico para os hidrogênios do ligante CT-M e seu complexo da série protonada.

	Deslocamento químico dos sinais de hidrogênio (em ppm)					
	A	B	C	D	E	AROMÁTICOS
CT-M	6.42	7.08	8.50	7.69	3.26	7.24 - 7.60
$[\text{Pd}(\text{CT-M})_2]\text{Cl}_2$	6.80	7.64	13.51	9.81	3.14	7.40 - 7.93

Com base na tabela 3.5, os valores de deslocamento químico dos sinais permitiram inferir a coordenação do ligante ao metal e algumas observações importantes sobre a distribuição de densidade devido a esse processo: o sinal dos hidrogênios da metila, denominado E, sofre deslocamento para região mais blindada do espectro, enquanto o hidrogênio D, ligado ao nitrogênio adjacente, se desloca para região mais desblindada. Esse efeito poderia ser uma consequência de mudança de densidade eletrônica na

região da ligação N-C, após a coordenação, retirando densidade eletrônica de região próxima ao hidrogênio D e concentrando-a mais próximo dos hidrogênios da metila, E. Esse maior enrijecimento da ligação C-N, torna ainda mais restrita a rotação em torno dessa ligação, o que faz com que os hidrogênios da metila experimentem dois ambientes diferentes, resultando na observação de um sinal de menor intensidade em 2.94 ppm.

O sinal referente ao hidrogênio B desloca-se significativamente para região mais desblindada e aparece em meio aos hidrogênios aromáticos (sinais na região de 7.40 à 7.93 ppm), o que é justificável devido à sua proximidade ao átomo de nitrogênio coordenante: a coordenação ao metal, por efeito indutivo, retira densidade da região da ligação carbono-carbono, H_BC-C=N, deixando o hidrogênio B mais exposto ao campo magnético aplicado no complexo, se comparado ao sinal no ligante livre. Ainda, a identificação deste sinal foi feita observando-se a constante de acoplamento entre este e o sinal do hidrogênio A ($^3J_{HA-HB} = 16\text{Hz}$).

Este último, sinal A, sofre também deslocamento para região mais desblindada do espectro, porém, o efeito é menos pronunciado, e deslocamento similar é observado para os hidrogênios aromáticos. O sinal do hidrogênio C sofre o maior efeito de desblindagem devido à sua proximidade aos dois grupos contendo os átomos que se coordenam ao íon paládio, com a existência deste sinal comprovando a coordenação do ligante em sua forma neutra.

Para os demais complexos da série protonada, os quais foram solúveis somente em DMSO-*d*₆, não foi possível a atribuição dos sinais, pois estes encontram-se sem multiplicidade definida, e, destaca-se ainda o deslocamento atípico do sinal da água do solvente, que se desloca do valor esperado, 3.30 ppm, para proximamente 4.30 ppm.

A partir das informações supracitadas, sugere-se então que, em solução com DMSO deuterado, ocorre algum tipo de interação entre solvente, água e complexo, o que provocaria o perfil de sinais observado e o deslocamento do sinal da água.

Em contrapartida, a série desprotonada apresentou espectros de $^1\text{HMRN}$ a partir dos quais os sinais puderam ser atribuídos e inferida mais claramente a coordenação. Uma comparação entre os valores encontrados para os deslocamentos químicos nos complexos da série protonada e desprotonada com o ligante CT-M é mostrado na tabela 3.6, e uma representação do efeito indutivo provocado pela coordenação em ambos os complexos, é demonstrado na figura 3.21.

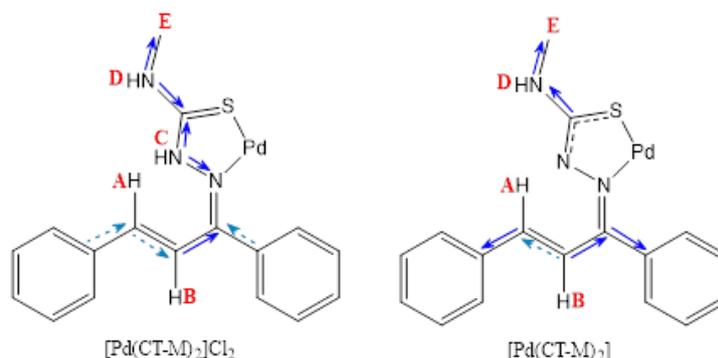


FIGURA 3.21 - Representação do efeito indutivo nos complexos da série protonada e desprotonada com o ligante CT-M. Setas pontilhadas em azul claro representam menor intensidade do efeito.

TABELA 3.6 -Valores de deslocamento químico para os hidrogênios do ligante CT-M e seus complexos da série protonada e desprotonada.

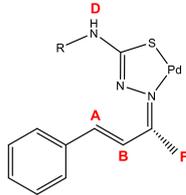
	Deslocamento químico dos hidrogênios (em ppm)					
	A	B	C	D	E	AROMÁTICOS
CT-M	6.42	7.08	8.50	7.69	3.26	7.24 - 7.60
$[\text{Pd}(\text{CT-M})_2]\text{Cl}_2$	6.80	7.64	13.51	9.81	3.14	7.40 - 7.93
$[\text{Pd}(\text{CT-M})_2]$	6.35	7.92	-	4.79	2.72	6.82 - 7.43

Destaca-se que, de modo geral, mesmo padrão de efeito indutivo foi observado para os demais complexos da série desprotonada: deslocamentos para região de maior blindagem dos hidrogênios A, D e aromáticos; enquanto o sinal referente ao hidrogênio B se desloca para região de menor blindagem. A tabela 5.11 apresenta os principais deslocamentos químicos observados entre complexos (C) e seus respectivos ligantes (L). Para

os complexos com ligantes do tipo BT, considerou-se o deslocamento dos hidrogênios da metila, aqui denominada de F.

TABELA 3.7 - Valores de deslocamento químico para os hidrogênios dos ligantes (L) e seus respectivos complexos (C) da série desprotonada.

Deslocamento químico dos hidrogênios (ppm)



	A		B		D		F		Aromáticos	
	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C
[Pd(CT-H)₂]*	6.46	6.24	7.09	7.83	6.46	7.04	-	-	7.27 -7.44 (7.57-7.67)	6.83 -7.31 (7.32 - 7.44)
[Pd(CT-M)₂]	6.42	6.35	7.08	7.92	7.71	4.79	-	-	7.22 - 7.60	6.82 - 7.43
[Pd(CT-E)₂]	6.42	6.44	7.07	8.02	7.65	4.90	-	-	7.23 - 7.41 (7.52 - 7.60)	6.90- 7.48) (7.23-7.32)
[Pd(BT-H)₂]	6.84	6.82	6.94	7.49	6.59	4.96	2.11	2.13	7.28- 7.49	7.30 - 7.43
[Pd(BT-M)₂]	6.84	6.80	6.91	7.57	7.63	4.94	2.08	2.14	7.28- 7.49	7.16 - 7.51
[Pd(BT-E)₂]	6.86	6.70	6.91	7.47	7.57	4.85	2.08	2.04	7.28 - 7.50	7.31- 7.40

*Sinais obtidos em DMSO-*d*₆ devido a solubilidade do complexo. Sinais em coloração azul, entre parênteses, indicam as atribuições para o segundo grupo fenil da molécula.

PARTE II: Complexo de Ni(II) com Tiossemicarbazona

4. Complexo de Níquel

Para investigação do papel do metal na atividade biológica, foi sintetizado e caracterizado complexo de Ni(II) com o ligante BT-M. Isto é, para compreender se o papel do metal na atividade biológica é somente estrutural, por assegurar geometria quadrática plana, ou se este tem papel funcional, e, portanto, a natureza do metal é fundamental para as atividades biológicas observadas. Dada a sua finalidade, a discussão aqui apresentada é pautada em comparações entre as características observadas para os complexo de Ni(II) e seu análogo de Pd(II).

4.1 - Metodologia

4.1.1 - Síntese

A síntese do complexo [Ni(BT-M)₂] foi realizada de acordo o esquema da figura 4.1. Em balão de 50 mL, foram adicionadas 10 mL de etanol e solubilizadas 139 mg (0,6 mmol) do ligante BT-M. Em seguida, adicionou-se em dose única 150 mg (0,6 mmol) do acetato de níquel tetra hidratado e observou-se a formação de precipitado (pó fino). Após 3h de reação, o meio reacional foi filtrado em funil de placa sinterizada, e o produto foi lavado com 125mL de água. O produto foi mantido em dessecador por dois dias.

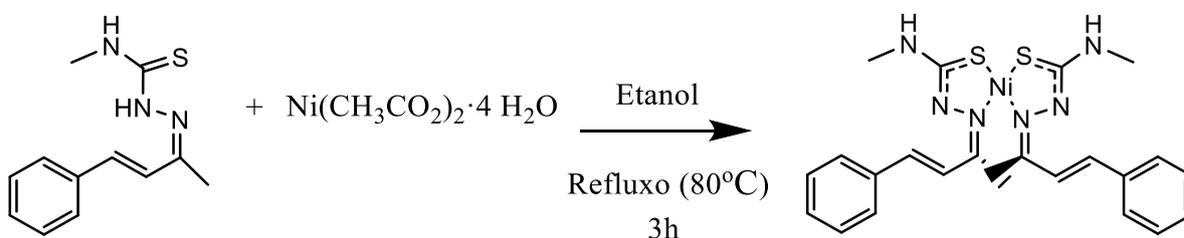


FIGURA 4.1. Esquema de síntese do complexo [Ni(BT-M)₂].

4.1.2 - Caracterizações

A descrição metodológica e de instrumentação utilizada para caracterização do complexo de níquel é similar àquela descrita nos subitens do item 2 (metodologia) para os complexos de paládio.

4.2 - Resultados e Discussão

Os dados de rendimento, coloração, ponto de fusão, condutividade molar e análise elementar de C, N e H do complexo $[\text{Ni}(\text{BT-M})_2]$ são apresentados na tabela 4.1.

TABELA 4.1 - Dados do complexo $[\text{Ni}(\text{BT-M})_2]$. Valores teóricos da análise elementar aparecem entre parênteses.

Massa Molar (g/mol)	Rendimento	Condutividade Molar ($\Omega^{-1}.\text{cm}^2.\text{mol}^{-1}$)	Coloração
523.34	83%	1.807	Verde Escuro
Ponto de Fusão ($^{\circ}\text{C}$)	Análise Elementar		
	%C	%H	%N
213 - 215	54.580 (54.870)	5.290 (5.760)	16.170 (16.000)

O resultado de condutividade molar do composto, realizado em etanol, foi de $1.807 \Omega^{-1}.\text{cm}^2.\text{mol}^{-1}$, indicando que o complexo é não eletrólito⁷². O mesmo foi filtrado como um pó de coloração verde escura e após evaporação lenta da solução mãe formou-se precipitado cristalino. O complexo de fundiu em faixa de temperatura entre 213-215 $^{\circ}\text{C}$ em líquido de cor verde-amerelada. E os dados da análise elementar obtidos sugerem que o complexo tem elevada pureza, pois, foram concordantes com os valores teóricos (na tabela 4.1 apresentado entre parênteses).

4.2.1 - Espectroscopia Eletrônica de absorção na Região do Ultravioleta-Visível

Espectros de absorção na região do ultravioleta-visível, obtidos em concentração de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em etanol, mostram que o perfil de bandas observado para o complexo se difere bastante daquele do ligante, sugerindo a formação do complexo (figura 4.2). No ligante, a banda centrada em 329 nm, $\epsilon = 0,37 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, atribuída às transições do tipo $n-\pi^*$ e $\pi-\pi^*$ referentes aos grupos tiomida e hidrazina do ligante³⁴, se desloca para região do vermelho no espectro do complexo, 350 nm e $\epsilon = 0,42 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ mol L}^{-1}$.

Tal fato é devido ao aumento da conjugação do sistema que diminui a energia entre os orbitais, fazendo assim com que as transições requeiram menor energia para acontecer⁹⁰. Acrescenta-se que no espectro do $[\text{Ni}(\text{BT-M})_2]$, esta banda apresenta perfil bastante alargado, o que pode ser um indício de que outras transições, como transferência de carga metal-ligante, contribua neste envelope⁹⁰. Além disso, absorções na região acima de 450 nm podem ser indícios de transições d-d permitidas por spin⁹¹.

Já a banda centrada em 263 nm ($\epsilon = 0,39 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) é atribuída como banda intraligante com contribuição de transições do tipo $\pi-\pi^*$ provenientes dos anéis aromáticos⁹², as quais, com a coordenação, experimentam efeito batocrômico.

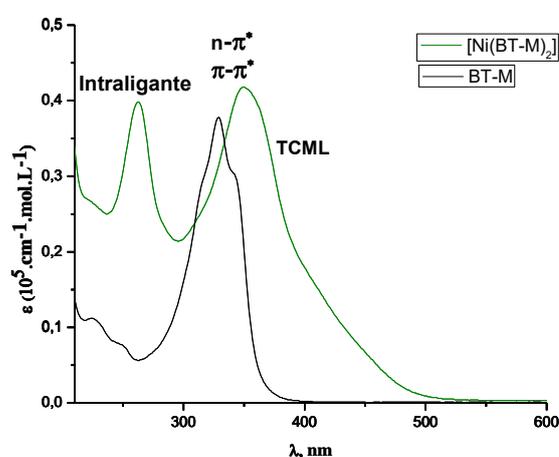


FIGURA 4.2 - Espectro do ligante e do seu complexo de Ni(II). $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, etanol (limite do solvente = 205 nm ⁹³).

Comparação entre os espectros dos complexos análogos de Ni(II) e Pd(II) é feita na figura 4.3. Nela, observa-se que as bandas no ligante sofrem maior efeito batocrômico no complexo de níquel, o que indicaria que nesse complexo, se comparado ao análogo de Pd(II), transições análogas requerem menor energia para acontecer, evidenciando que a separação energética dos conjuntos de orbitais envolvidos é menor no complexo de níquel.

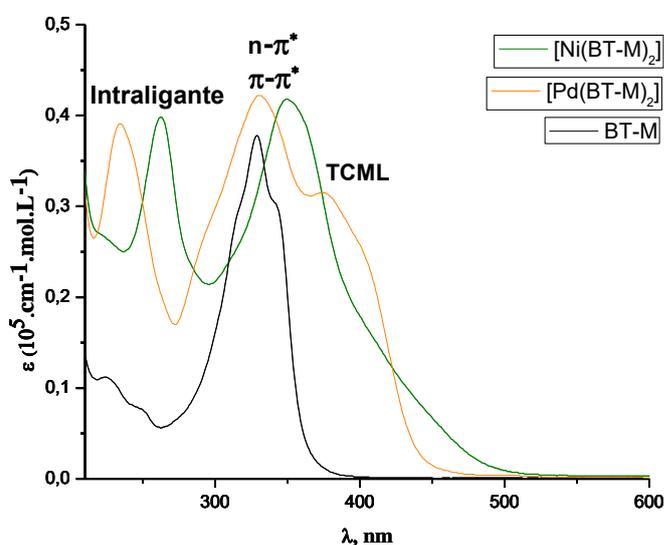


Figura 4.3 - Espectro de absorção na região do UV-Vis do ligante BT-M e seus complexos $[\text{Ni}(\text{BT-M})_2]$ e $[\text{Pd}(\text{BT-M})_2]$ (concentração = $10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$, em etanol).

A tabela 4.2 apresenta os valores de comprimento de onda, em nanômetros; absortividade molar, $\times 10^5 \text{cm}^{-1} \text{molL}^{-1}$, para as principais bandas destacadas nesta seção.

TABELA 4.2 - Comprimento de onda e absortividade molar máxima para as principais bandas presentes nos espectros dos compostos.

Composto	Intraligante	$\pi \rightarrow \pi^*$ $n \rightarrow \pi^*$ λ ($\epsilon_{\text{máx.}}$)	TCML λ ($\epsilon_{\text{máx.}}$)
BT-M		329 (37800)	-
$[\text{Ni}(\text{BT-M})_2]$	262 (39800)	350 (4180)	-
$[\text{Pd}(\text{BT-M})_2]$	234 (39100)	331 (42200)	376 (31500)

4.2.2 - Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho

A comparação das atribuições de bandas referentes aos estiramentos C=N e C=S (bandas diagnósticas de formação do complexo)^{32,66,80} nos espectros no infravermelho do ligante BT-M e do complexo [Ni(BT-M)₂] sugere a formação deste último. A tabela 4.3 exibe os valores desses estiramentos e a figura 4.4 apresenta os espectros do ligante e do complexo, com as bandas atribuídas.

TABELA 4.3 - Valores da atribuição das bandas diagnóstica de formação do complexo.

Composto	$\nu(\text{C}=\text{N}) \text{ cm}^{-1}$	$\nu(\text{C}=\text{S}) \text{ cm}^{-1}$
BT-M	1552 (muito forte)	1103 (média-forte)
[Ni(BT-M) ₂]	1546 (forte)	1049 (média)

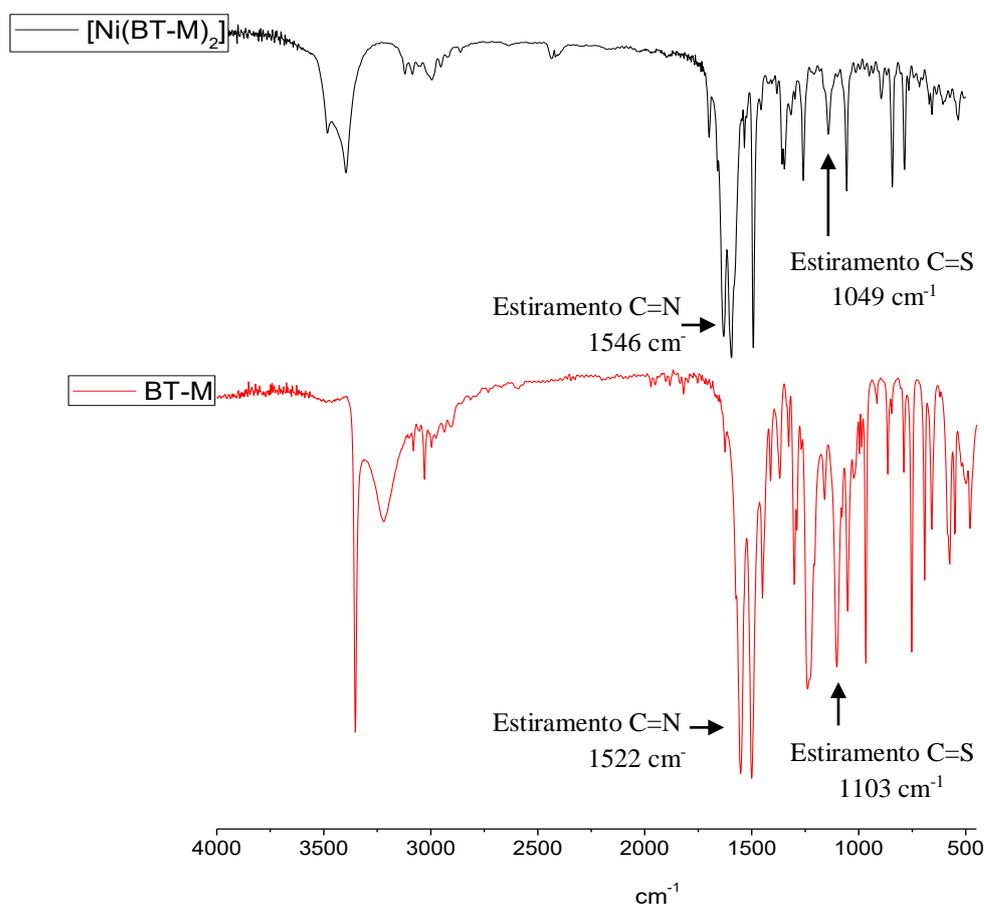


FIGURA 4.4 - Espectros de Infravermelho dos compostos BT-M e [Ni(BT-M)₂] com atribuição de bandas diagnósticas da formação do complexo.

É observado que os valores de deslocamento dos números de ondas para as bandas diagnósticas seguiram a mesma tendência observada para os complexos de Pd(II), para os quais enquanto uma das ligações fortalecia a outra diminuía o seu caráter π . Neste sentido, o número de onda atribuído no complexo [Pd(BT-M)₂] para o estiramento C=N, 1549 cm⁻¹, é próximo ao valor atribuído no seu análogo de Ni(II), 1546 cm⁻¹; bem como a variação do estiramento C=S do [Ni(BT-M)₂], evidencia também uma diminuição do caráter π desta ligação⁴⁶, tal como observado para o [Pd(BT-M)₂]. Esta observação sugere que a distribuição de densidade ao redor do metalociclo é, qualitativamente, igual nos complexos análogos de Ni(II) e de Pd(II).

4.2.3 - Espectroscopia de Ressonância Magnética de Hidrogênio

Para a investigação da complexação, foi realizada a comparação entre os espectros de ¹HRMN obtidos para ligante e complexo. Neste sentido, é aqui apresentado os espectros de ambos os compostos.

As atribuições dos sinais no espectro do ligante BT-M foram realizadas utilizando como referência de deslocamento químico o sinal do solvente, CDCl₃ δ = 7.26, observando-se os sinais referência dos hidrogênios A e B⁹⁴, bem como os valores das integrais observados. Deste modo, a constante de acoplamento calculada para os hidrogênios A e B foi de ³J_{HA-HB} = 16Hz, indicando que os mesmos encontram-se em conformação *trans*, com os sinais dos hidrogênios ligados aos nitrogênios e os aromáticos atribuídos em regiões esperadas para estes sinais^{50,66,87,88}. O espectro do ligante é apresentado na figura 4.5, na qual consta os valores das integrais e deslocamento químico obtidas para cada sinal.

O espectro de ¹HRMN do complexo [Ni(BT-M)₂], figura 4.6, sugere a formação do composto com base na comparação dos deslocamentos químicos atribuídos para os sinais dos hidrogênios do ligante e do complexo. O

sinal referência de deslocamento químico utilizado foi o do TMS (trimetilsilano, $\delta = 0.0$)⁹⁰ contido no CDCl_3 (solvente utilizado na análise).

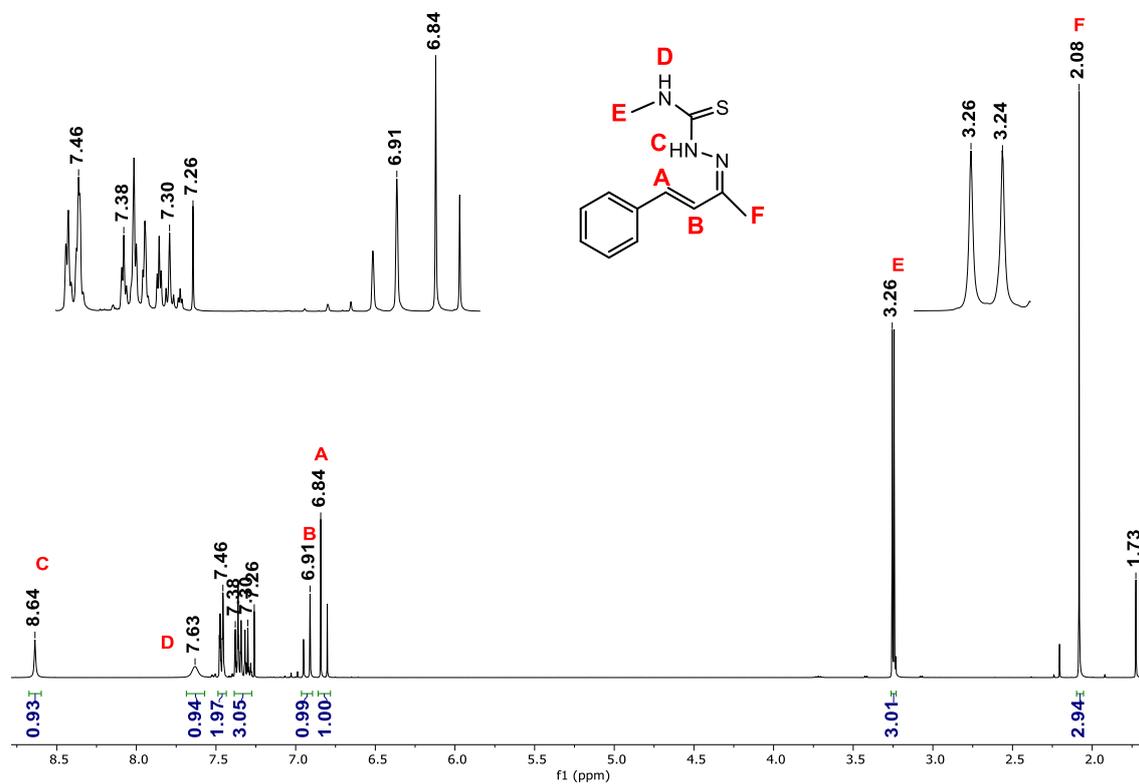


FIGURA 4.5 - Espectro de ¹HRMN do ligante BT-M e atribuições dos sinais.

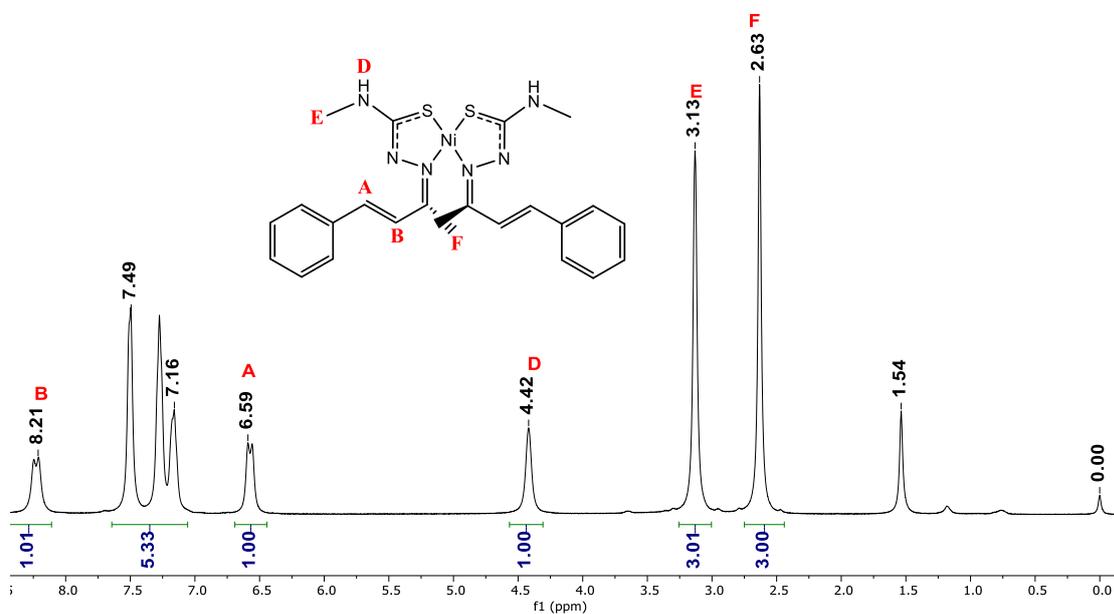


FIGURA 4.6 - Espectro de ¹HRMN do complexo [Ni(BT-M)₂].

A tabela 4.4 descreve os valores de deslocamento químico para os compostos BT-M (ligante, L), e $[\text{Ni}(\text{BT-M})_2]$ (complexo, C). A título de comparação, esta tabela apresenta ainda os valores de deslocamentos químicos encontrados no espectro do complexo análogo de Pd(II), o $[\text{Pd}(\text{BT-M})_2]$.

TABELA 4.4 - Valores de deslocamento químico (em ppm) para os complexos análogos de Ni(II) e Pd(II) (C), com o ligante BT-M (L).

Deslocamento químico dos hidrogênios (ppm)

C	A		B		D		E		F		Aromáticos	
	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C
$[\text{Ni}(\text{BT-M})_2]$	6.84	6.59	6.91	8.21	7.63	4.42	3.26	3.13	2.08	2.63	7.28 - 7.48	7.15 - 7.50
$[\text{Pd}(\text{BT-M})_2]$	6.84	6.80	6.91	7.57	7.63	4.94	3.26	3.08	2.08	2.14	7.28 - 7.49	7.25 - 7.38

A partir dos dados da tabela 4.4, é observado que os dois complexos seguem mesma tendência de deslocamentos químicos, variando somente na intensidade destes, com o complexo de Ni(II) apresentando, de modo geral, maior variação nos deslocamentos dos sinais se comparadas àquelas apresentadas pelo ligante. A figura 4.6 descreve o efeito indutivo observado nos dois complexos análogos, com as setas indicando o sentido de deslocamento da densidade eletrônica.

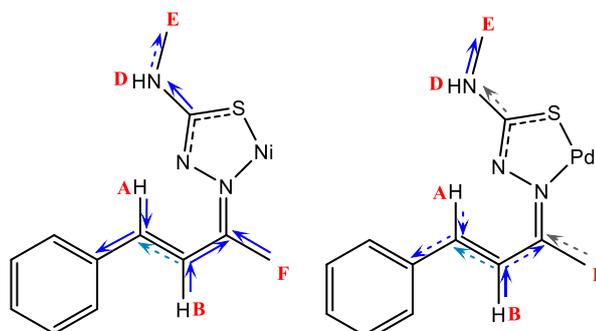


FIGURA 4.7. Representação de comparação do efeito indutivo nos complexos. As intensidades de cor das setas indicam a intensidade do efeito (cor mais escura = efeito mais intenso), com as setas pontilhadas indicando regiões em que este efeito é menos intenso.

O efeito indutivo apresentado concorda com os resultados encontrados na espectroscopia na região do infravermelho, na qual observa-se uma diminuição na distância C=N, densidade se movendo do hidrogênio B e dos hidrogênios F para a região da ligação C=N; e aumento na distância C=S, para qual além da complexação ao metal, densidade seria retirada dessa ligação pelo substituinte metila, o qual em ambos os compostos se encontra em região mais blindada do espectro de $^1\text{HRMN}$ se comparado ao ligante livre.

4.2.4 - Difração de Raios X de Monocristal

A resolução da estrutura cristalina do complexo $[\text{Ni}(\text{BT-M})_2]$, figura 4.8, mostrou que este, assim como os complexos de paládio, encontra-se em conformação *cis* com os ligantes se coordenando pelos átomos de enxofre e nitrogênio. Ainda, os ângulos de ligação em torno do metalocentro, como por exemplo, $\text{N}_{3\text{A}}\text{-Ni-S}_1 = 160.81^\circ$ e $\text{N}_3\text{-Ni-N}_{3\text{A}} = 103.23^\circ$, indicam que o complexo possui geometria quadrática plana distorcida mais pronunciada que seu análogo de paládio, provavelmente uma consequência da maior versatilidade dos orbitais no Ni(II) se organizarem espacialmente. Além disso, comprova-se a ausência do hidrogênio no N_2 , confirmando a coordenação aniônica da tiossemicarbazona ao íon Ni(II).

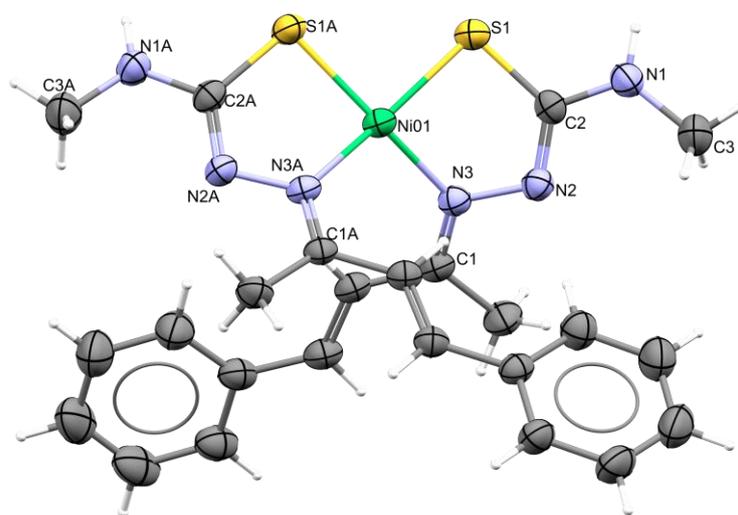


FIGURA 4.8 – Estrutura cristalina do complexo $[\text{Ni}(\text{BT-M})_2]$ com elipsoides de 30% de probabilidade.

Embora as similaridades descritas, é observado que alguns valores de distância e ângulo de ligação variam significativamente ao comparar o complexo de Ni(II) com o seu análogo do íon paládio. A tabela 4.5 apresenta esses valores para ambos os complexos.

Enquanto as distâncias de ligação entre os átomos ligados aos átomos coordenantes, como N₃-C₁, N₂-C₂ e S₁-C₂, variam pouco ao se comparar os dois complexos; como esperado, devido aos tamanhos dos dois íons, as distâncias envolvendo a ligação metal-átomos coordenantes mostraram-se significativamente maiores no complexo de Pd(II). A citar, a variação em M-S₁ entre os complexos foi de 0,104 Å e para M-N₃, esta diferença foi a aproximadamente 0,178 Å.

Destaca-se que, esta mesma tendência é encontrada na literatura, como em trabalho de Ramachandran *et al* (2012)⁹⁵ no qual os valores das distâncias nas estruturas de complexos de Pd(II) e Ni(II) contendo tiosemicarbazonas e fosfina, mostraram significativa variação, com o complexo de paládio apresentando as maiores distâncias. Esta constatação estaria relacionada ao tamanho dos raios iônicos do Ni(II) e do Pd(II). Isto é, os orbitais do Pd(II) são mais difusos e portanto, podem se sobrepor satisfatoriamente (de acordo a teoria do orbital molecular), estabelecendo a ligação à uma maior distância entre os núcleos, se comparado ao Ni(II).

TABELA 4.5 - Seleção de distâncias e ângulos de ligação para os complexos [Ni(BT-M)₂] e [Pd(BT-M)₂].

	[Ni(BT-M) ₂]	[Pd(BT-M) ₂]	
Distância de ligação (Å)	N ₃ -C ₁	1.306	1.295
	[N _{3A} -C _{1A}]	[1.316]	
	S ₁ -C ₂	1.746	1.737
	[S _{1A} -C _{2A}]	[1.743]	
	N ₂ -C ₂	1.298	1.296
	[N _{2A} -C _{2A}]	[1.299]	
	M-S ₁	2.145	2.249
	[M-S _{1A}]	[2.135]	
	M-N ₃	1.916	2.099
[M-N _{3A}]	[1.926]		

Ângulo de Ligação (°)	N _{3A} -M-S ₁	160.81	171.54
	[N ₃ -M-S _{1A}]	[160.57]	
	S ₁ -M-S _{1A}	91.16	90.34
	N ₃ -M-N _{3A}	103.23	106.4

4.2.5 - Teste de Estabilidade em DMSO (condutividade molar)

O teste de estabilidade do complexo [Ni(BT-M)₂] foi realizado em DMSO, solvente utilizado nos ensaios biológicos em incubação por até 48 h, sendo analisada a permanência de sua natureza de não eletrólito para avaliar a possível, porém improvável, coordenação do solvente ao complexo. Os resultados do teste são mostrados na figura 4.9, e indicam que, dentro desse intervalo de tempo, 48 h, o complexo manteve-se como não- eletrólito ⁶⁴, e, portanto, conclui-se que não houve coordenação do solvente ao complexo.

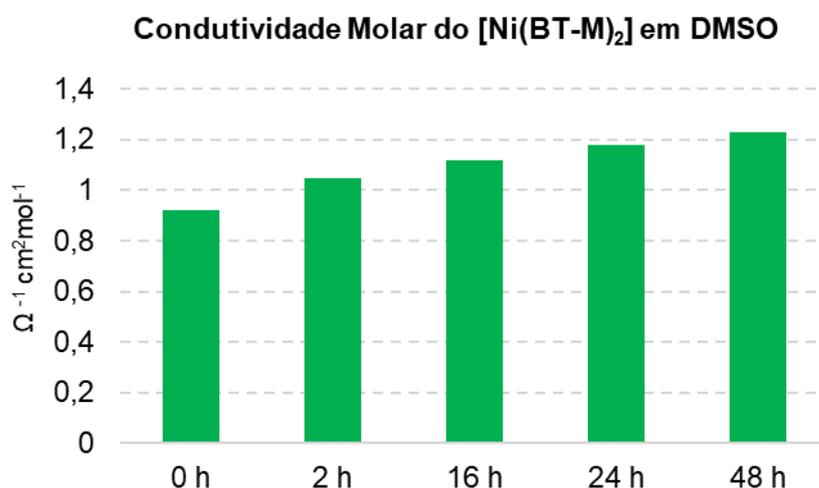


FIGURA 4.9 - Gráfico com resultados da condutividade molar do complexo [Ni(BT-M)₂] por até 48h em DMSO (10⁻³ molL⁻¹; transparência do solvente = 270 nm).

4.3 - Breves Considerações

As caracterizações apresentadas sugerem a formação da estrutura proposta para o complexo de Ni(II), sendo ele um análogo do complexo de Pd(II) da série desprotonada, o $[\text{Pd}(\text{BT-M})_2]$. Ainda, os resultados das caracterizações sugerem significativa similaridade estrutural entre estes compostos. Deste modo, em um quadro comparativo, os resultados aqui expostos respaldam a investigação do papel do metal nas atividades biológicas.

Parte III: Estudos de Atividade Citotóxica e de Alvos Biológicos

5. Resultados dos Ensaio Biológicos e Docagem Molecular

5.1 - Ensaio de IC₅₀ (Concentração de Inibição de 50% da Viabilidade Celular)

O ensaio de citotoxicidade dos complexos foi realizado, como descrito na metodologia, pelo método MTT. Este método colorimétrico consiste em utilizar a capacidade de enzimas mitocondriais, de células viáveis, reduzirem o sal de tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), em *formazan* (figura 5.1), um composto de coloração roxa escura. Deste modo, após incubação, a detecção de cor, e sua intensidade, indicam que as referidas enzimas estão ativas, e portanto, existem células vivas^{96,97}.

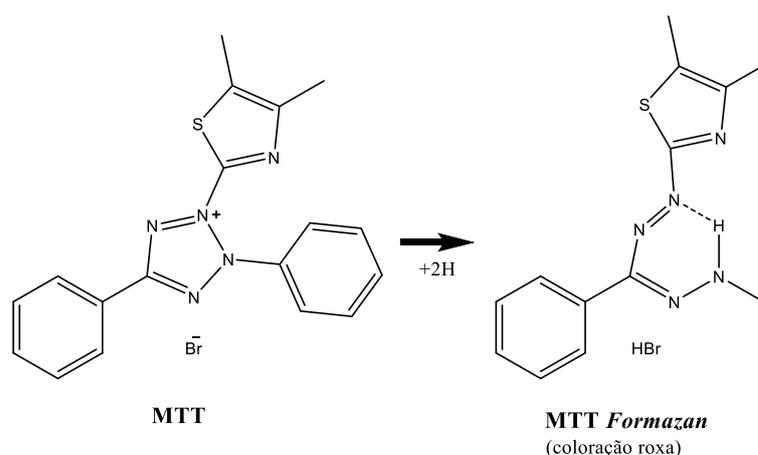


FIGURA 5.1 - Reação de formação do MTT formazan, indicação colorimétrica de viabilidade celular.

A partir de curva dose-resposta, analisou-se a concentração capaz de inibir 50% da viabilidade celular (valor de IC₅₀) após 48h de incubação dos compostos com células das linhagens tumorais de mama MCF-7 e de próstata DU-145, bem como com a linhagem não tumoral de próstata PNT2, com a finalidade de avaliar se existem diferenças de atividades citotóxicas entre uma linhagem tumoral e uma não tumoral, indicando possível preferência de atuação dos compostos. Os resultados destas análises constam na tabela 5.1, sendo também plotados nos gráficos das figuras 5.2a e 5.2b, no

qual os valores referenciais são aqueles descritos para o fármaco padrão nas referidas linhagens, a cisplatina⁹⁸.

TABELA 5.1 - Valores de IC₅₀ dos compostos testados frente às linhagens tumorais MCF-7 e DU-145, e não tumoral PNT2.

	IC ₅₀ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	PNT2	DU-145	MCF-7
CT-H	-	>100	>50
CT-M	-	>100	>100
CT-E	-	>100	>100
BT-H	-	>100	>100
BT-M	-	>100	>100
BT-E	-	>100	>100
[Pd(CT-H) ₂]Cl ₂	1,51 ± 0,07	3,17 ± 0,32	2,65 ± 0,21
[Pd(CT-M) ₂]Cl ₂	1,69 ± 0,23	>50	>50
[Pd(CT-E) ₂]Cl ₂	22,11 ± 0,15	>50	>50
[Pd(BT-H) ₂]Cl ₂	0,86 ± 0,16	7,39 ± 0,25	1,50 ± 0,45
[Pd(BT-M) ₂]Cl ₂	0,69 ± 0,19	0,35 ± 0,04	1,49 ± 0,15
[Pd(BT-E) ₂]Cl ₂	1,19 ± 0,24	2,14 ± 0,09	2,42 ± 0,72
[Pd(CT-H) ₂]	1,01 ± 0,13	3,17 ± 0,09	0,907 ± 0,078
[Pd(CT-M) ₂]	3,89 ± 0,26	12,00 ± 1,75	>50
[Pd(CT-E) ₂]	>50	>50	>50
[Pd(BT-H) ₂]	0,83 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,41 ± 0,10
[Pd(BT-M) ₂]	0,39 ± 0,07	0,97 ± 0,04	0,56 ± 0,06
[Pd(BT-E) ₂]	1,09 ± 0,04	4,49 ± 0,19	0,91 ± 0,06
[Ni(BT-M) ₂]	>50	-	-
Cisplatina	11,74 ± 1,20	15,00 ± 1,40	19,90 ± 4,20

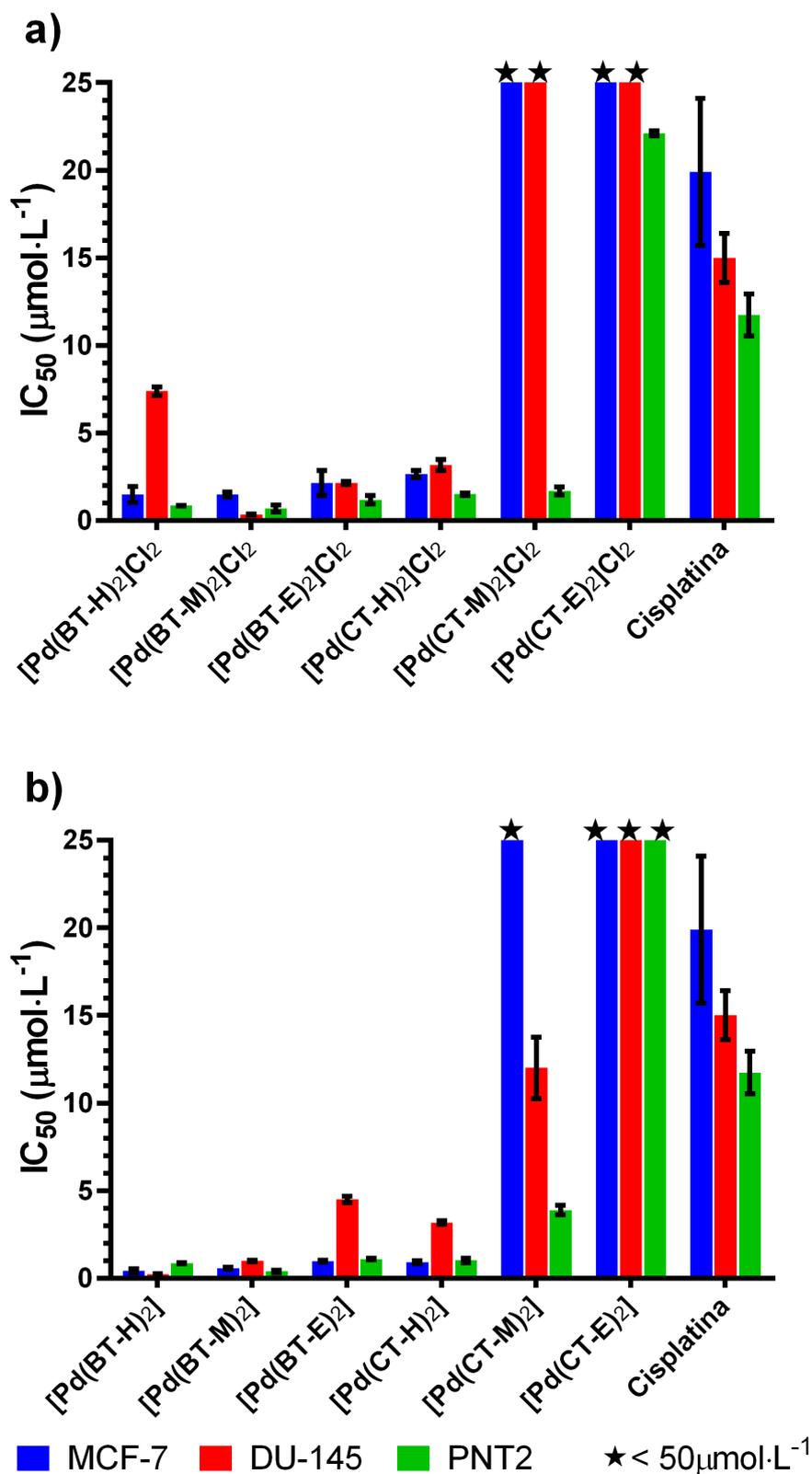


FIGURA 5.2 - a) Gráfico em barras com os valores de IC₅₀ e o erro padrão (SEM) para os complexos da série desprotonada e fármaco padrão cisplatina. b) Gráfico em barras com os valores de IC₅₀ e o erro padrão (SEM), para os complexos da série protonada e fármaco padrão cisplatina.

Observou-se que os padrões de inibição da viabilidade celular para compostos análogos das duas séries foram similares, indicando que a citotoxicidade *in vitro* não difere significativamente devido a presença do próton. O composto mais ativo foi o [Pd(BT-H)₂], o qual, para a linhagem MCF-7 apresentou IC₅₀ igual a 0,22 ± 0,02 μmol·L⁻¹ e 0,41 ± 0,10 μmol·L⁻¹, para a linhagem DU-145, sendo, portanto, em média de 50 vezes mais ativo que a cisplatina nas linhagens testadas. Salienta-se que, de modo geral, os ligantes tiossemicarbazonas apresentaram IC₅₀ substancialmente maior que seus respectivos complexos.

Esta constatação está de acordo com a literatura, pois, é descrito que a complexação aos centros metálicos é de suma importância para potencialização das atividades citotóxicas desses compostos. Nesse sentido, o trabalho de Hernández *et al* (2013)⁵⁰ apontaram resultados similares para complexos bisquelatos de Pd(II) contendo tiossemicarbazonas, com os ligantes apresentando IC₅₀ maior que 25 μmol·L⁻¹, enquanto o complexo mais ativo apresentou valores de 0,01 μmol·L⁻¹ e 0,13 μmol·L⁻¹, respectivamente, para as linhagens DU-145 e MCF-7.

A tendência geral observada para ambas as séries de complexos de Pd(II) mostrou que os complexos de menor massa molar e com substituintes de menor volume na posição R₁ (figura 5.3) apresentaram maior citotoxicidade frente às linhagens tumorais testadas. Já a variação de substituintes em R₂ não demonstrou mudança significativa dentre os complexos do tipo PdBT, enquanto nos complexos em que R₁ é um grupo fenil, PdCT, as alterações no substituinte R₂ geraram diferenças significativas nos valores de IC₅₀. A FIGURA 5.4 apresenta a relação entre a massa molar (g·mol⁻¹) e a média dos valores de IC₅₀ frente às linhagens tumorais testadas para cada complexo.

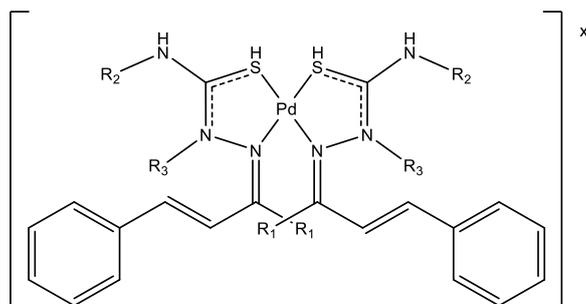


FIGURA 5.3 - Estrutura geral dos complexos de Pd(II) com ligantes tiossemicarbazonas. R_1 = metil ou fenil (PdB e PdC, respectivamente); R_2 = hidrogênio, metil ou fenil; e R_3 = hidrogênio para a série protonada.

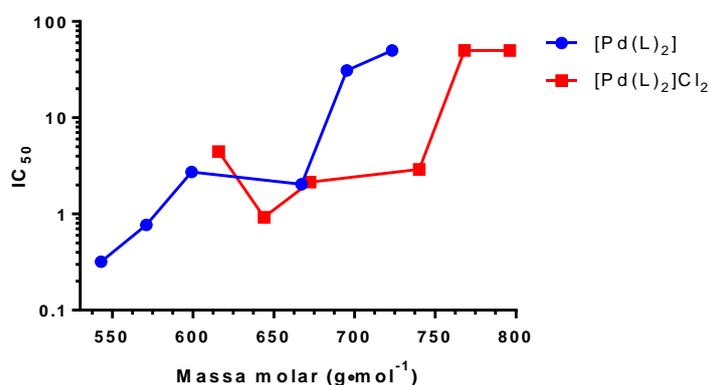


FIGURA 5.4 - Gráfico das massas molares ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) versus média dos valores de IC_{50} ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) para as linhagens tumorais testadas, em escala logarítmica (complexos da série protonada = $[\text{Pd}(\text{L})_2]\text{Cl}_2$; e série desprotonada = $[\text{Pd}(\text{L})_2]$).

Tal tendência não é fielmente seguida quando se trata da linhagem não tumoral de próstata, PNT2. Nela, os complexos análogos $[\text{Pd}(\text{BT-M})_2]$ e $[\text{Pd}(\text{BT-M})_2]\text{Cl}_2$, complexos com os segundos valores de menor massa em suas respectivas séries, são os que apresentam os menores valores de IC_{50} , $0,39 \pm 0,07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,69 \pm 0,19 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Ademais, os complexos análogos $[\text{Pd}(\text{BT-M})_2]$ e $[\text{Ni}(\text{BT-M})_2]$ apresentaram expressiva diferença de citotoxicidade, sugerindo que esta atividade biológica seja dependente da natureza do metal.

Ao confrontar a citotoxicidade dos complexos de Pd(II) nas linhagens tumorais e na linhagem não tumoral de próstata, PNT2, nota-se que

os compostos foram mais citotóxicos frente à linhagem não tumoral, indicando que os mesmos atuam, dentre as linhagens testadas, sem exibirem preferência.

Comparação entre o complexo protótipo, contendo os co-ligantes fosfínico e clorido, $[\text{PdCl}(\text{BT-M})(\text{P}(\text{4FPh})_3)]$, com seus análogos bisquelatos de Pd(II) e Ni(II), foi realizada avaliando-se a inibição de 50% da viabilidade celular frente à linhagem tumoral de mama MDA-MDB-231. Os resultados encontrados são mostrados na tabela 5.2, ao qual é ainda exibido o IC_{50} do fármaco padrão, cisplatina⁹⁸.

TABELA 5.2. Valores de IC_{50} dos compostos testados frente à linhagem tumoral de mama MDA-MDB-231.

	$\text{IC}_{50} (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
	MDA-MDB-231
BT-M	>25
Protótipo $[\text{PdCl}(\text{BT-M})(\text{P}(\text{4FPh})_3)]$	$0,56 \pm 0,1$
$[\text{Pd}(\text{BT-M})_2]$	$0,43 \pm 0,03$
$[\text{Ni}(\text{BT-M})_2]$	>12
Cisplatina	67

Com base nos dados da tabela 5.2, o complexo bisquelato de Pd(II) mostrou-se o mais citotóxico dentre todos os complexos testados, $0,43 \pm 0,03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; entretanto, a diferença entre este e o complexo protótipo não foi tão pronunciada, ao contrário do que é observado para o complexo análogo de Ni(II), que apresenta IC_{50} 27,5 vezes maior que o complexo $[\text{Pd}(\text{CT-M})_2]$, reforçando que a natureza do metal pode ser fundamental para a atividade citotóxica.

5.2 - Docagem Molecular para estudos de interação com a enzima TOPOII α

A partir das estruturas cristalinas de quatro complexos, [Pd(CT-M)₂]Cl₂, [Pd(CT-E)₂]Cl₂, [Pd(BT-M)₂] e [Pd(BT-E)₂], foram realizados cálculos de docagem molecular para estudo de possíveis sítios de atuação dos compostos, avaliando-se a interação com o sítio da ATPase (da TOPOII α), e o sítio de clivagem (complexo clivado), onde atua o etopósido. Uma vez que, busca-se estudar a relação estrutura-atividade, as interações observadas na docagem molecular são aqui comparadas em pares.

Nesta perspectiva, o complexo [Pd(CT-E)₂]Cl₂, figura 5.5a, apresentou interação do tipo ligação de hidrogênio com a citosina 14 (DC14); do tipo π -enxofre com a metionina 1055 (MET1055); hidrofóbica π -sigma com a metionina 1055 (MET1055) e ligação de hidrogênio não convencional (π -doador) com a citosina 11 (DC11). Enquanto isso, o complexo [Pd(BT-E)₂] (Figura 5.5b), que se difere do complexo acima mencionado pela presença de um grupo metila ao invés de um dos grupos fenil e pelo ligante coordenar-se aniônicamente ao Pd(II), apresentou interação do tipo ligação de hidrogênio, no entanto, com a timina (DT11). Ainda, enquanto a natureza da interação com a metionina 1055 se diferiu, sendo interação do tipo hidrofóbica alquila, o composto apresentou interação adicional com a metionina 1051 (ME1051), do tipo π -alquila.

As imagens geradas mostrando as interações dos complexos (exceto as de hidrogênio e intramoleculares, para melhor visualização) são apresentas na figura 5.5c (composto [Pd(CT-E)₂]Cl₂, 5.5a) e 5.5d (composto [Pd(BT-E)₂], 5.5b).

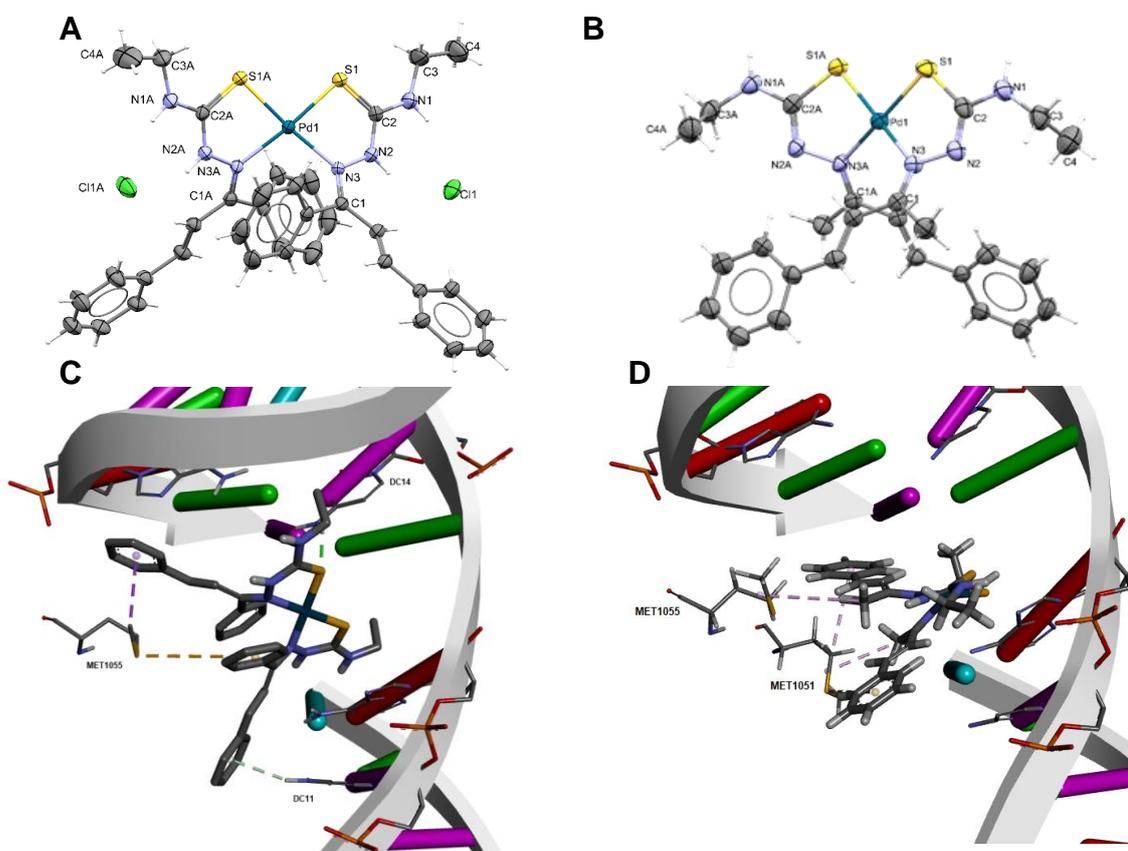


FIGURA 5.5 - A) Estrutura cristalina do complexo $[Pd(CT-E)_2]Cl_2$; B) Estrutura cristalina do complexo $[Pd(BT-E)_2]$; C) Representação da interação do complexo $[Pd(CT-E)_2]Cl_2$ com o complexo clivado; D) representação das interações do complexo $[Pd(BT-E)_2]$ com o complexo clivado.

Para o complexo $[Pd(CT-M)_2]Cl_2$ (figura 5.6a) observou-se interação do tipo hidrofóbica π -alquila com a metionina 1055 (MET1055) (figura 5.6c), sendo as restantes intramoleculares. Já o complexo $[Pd(BT-M)_2]$ (figura 5.6b), que também se difere pela troca de um grupo fenil por um metila e pela coordenação aniônica do ligante ao Pd(II), apresentou maior número de interações, inclusive, com outros resíduos de aminoácidos (figura 5.6d): interação do tipo ligação de hidrogênio com a guanina 6 (DG6) e com a serina 1052 (SER1052), do tipo hidrofóbica alquila com a metionina 1051 (MET1051) e π -alquila com a metionina 1055 (MET1055), além de ponte dissulfeto (π -enxofre) com a metionina 1055 (MET1055).

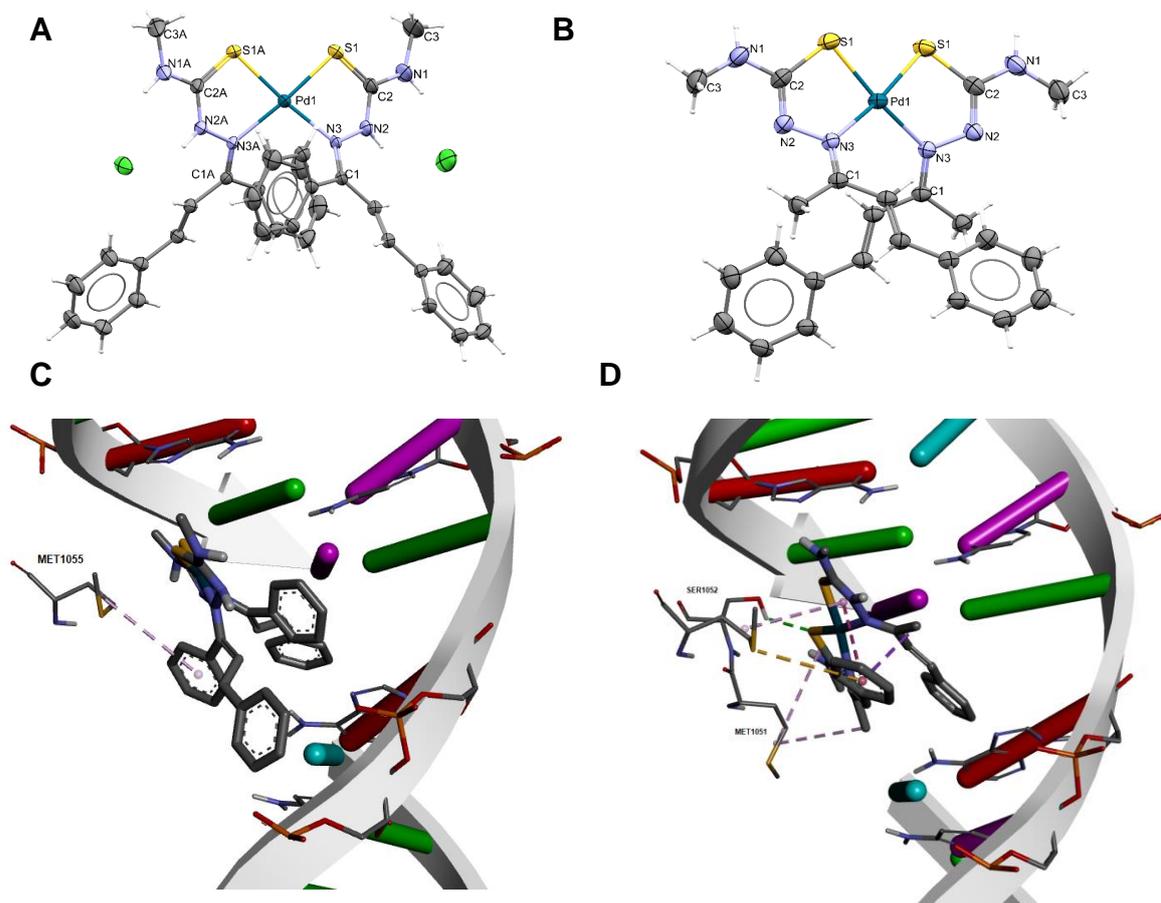


FIGURA 5.6 - A) estrutura cristalina do complexo $[Pd(CT-M)_2]Cl_2$; B) Estrutura cristalina do complexo $[Pd(BT-M)_2]$; C) Representação da interação do complexo $[Pd(BT-M)_2]Cl_2$ com o complexo clivado; D) representação das interações do complexo $[Pd(BT-M)_2]$ com o complexo clivado.

Sobre a influência da estrutura dos compostos para as interações observadas, e a partir do quadro comparativo feito entre os pares de complexos, pode-se observar que mudanças no grupo R_1 dos complexos podem gerar efeitos na estrutura que levam a diferentes tipos de interações com diferentes resíduos, com os complexos de menor volume e da série desprotonada apresentando maior número de interações.

Os resultados demonstram ainda que os complexos não possuem afinidade pelo sítio ATPase, mas fraca afinidade no domínio de clivagem, a qual foi demonstrada acima. Percebe-se, entretanto, que, os complexos interagem com o DNA enquanto complexo ternário (DNA-Complexo-Proteína), e, portanto, sugere-se que os complexos analisados, em caso de inibição

enzimática, atuam na estabilização da clivagem do DNA pela TOPOII α , apresentando assim perfil de veneno da TOPO, similar ao etopósido, porém, interagindo muito mais fracamente.

Uma vez que, estudos sugerem que a planaridade da geometria do composto seria importante para interações no domínio da ATPase^{46,99}, e estudos de docagem molecular, como aquele apresentado por Da Silva *et al* (2019)⁴⁰ apresentam compostos não planares exibindo interações com o sítio de alocação do etopósido, talvez a geometria dos complexos, quadrática plana distorcida, tenha sido um dos fatores responsáveis pela não afinidade com o sítio da ATPase.

Adicionalmente, em trabalho recente de Rocha *et al* (2019)⁹⁸ foi demonstrado que complexos de Pd(II) contendo ligante tiosemicarbazona exibiram maior número de interações e melhor encaixe no domínio da ATPase da TOPOII α se comparado à análogos contendo tiosemicarbazida, ligante de menor volume (figura 5.7). Comparando este dado, maior eficiência de alocação no sítio da ATPase para complexos com maior volume, com os dados obtidos nas docagens do presente trabalho, presume-se que a rigidez da geometria dos complexos de Pd(II) contendo duas unidades de ligantes tiosemicarbazonas seja uma configuração não ideal para interação com a TOPOII α , embora estes apresentem alta citotoxicidade.

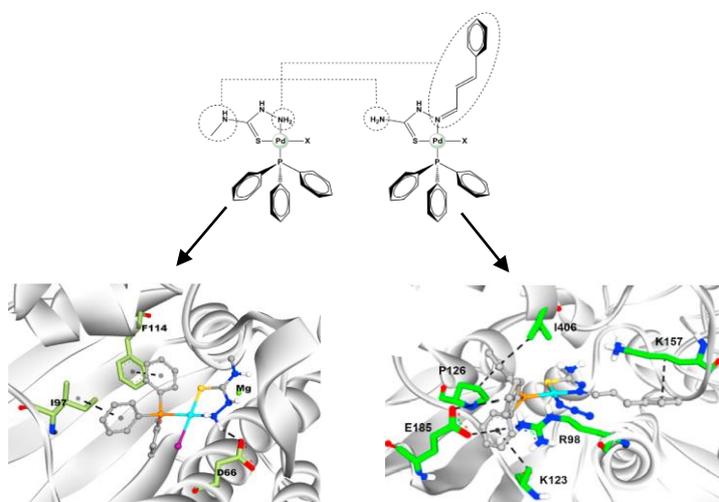


FIGURA 5.7 - Extraído de Rocha *et al* (2019). Complexos de Pd(II) contendo (a) tiosemicarbazida ($X = I^-$) e (b) tiosemicarbazona ($X = N_3^-$). Setas indicam as imagens de docagem molecular obtidas para esses compostos em estudo de interação com o domínio da ATPase da TOPOII α .

5.3 - Titulação Espectroscópica de na Região do UV-Vis com o DNA

A titulação com o DNA é comumente utilizada no estudo da interação de complexos com o DNA permitindo identificar por meio das modificações em bandas características o tipo de interação e sua força. Interações por intercalação, por exemplo, são caracterizadas pelo surgimento de hipocromismo e batocromismo devido as interações π - π entre composto e as bases do DNA⁸; enquanto o hipercromismo está associado a outros modos de interação, como ligações covalentes e interações eletrostáticas⁹. Ainda, a constante de força da ligação entre o composto e o DNA, K_b (razão entre o coeficiente linear e o angular obtidos a partir de um gráfico de $A_0/(A-A_0)$ vs $1/[DNA]$), pode dar indícios desse tipo de interação.

Assim, a titulação espectroscópica com o DNA foi realizada para os complexos de paládio, da série protonada e desprotonada, monitorando-se a banda de maior absorvidade molar desses compostos (atribuída às transições do tipo π - π^*), e adicionando-se solução de ct-DNA. A tabela 5.3 apresenta os valores de comprimento de onda, λ , em nanômetros, de máxima absorção das bandas observadas a partir da titulação e os valores de K_b calculados.

TABELA 5.3 - Dados da titulação espectroscópica do DNA com os complexos de Paládio.

	Titulação	
	λ (nm)	K_b (10^4 mol ⁻¹ .L)
[Pd(CT-H) ₂]Cl ₂	329	1,55
[Pd(CT-M) ₂]Cl ₂	326	2,04
[Pd(CT-E) ₂]Cl ₂	353	7,46
[Pd(BT-H) ₂]Cl ₂	323	1,86
[Pd(BT-M) ₂]Cl ₂	335	1,51
[Pd(BT-E) ₂]Cl ₂	335	4,46
[Pd(CT-H) ₂]	330	1,21
[Pd(CT-M) ₂]	338	3,3
[Pd(CT-E) ₂]	350	14,2
[Pd(BT-H) ₂]	324	1,87

[Pd(BT-M) ₂]	332	1,22
[Pd(BT-E) ₂]	335	1,16

Com ressalva do [Pd(BT-H)₂], todos os complexos apresentaram efeito hipocrômico com a adição do ct-DNA, não sendo possível observar efeitos batocrômico ou hipsocrômico. De modo geral, não foram observadas diferenças muito significativas ao comparar complexos análogos das duas séries, excetuando-se pelos complexos contendo o ligante BT-E, sendo o K_b do complexo da série protonada 3,8 vezes maior ($4,46 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{L}$) que seu análogo da série desprotonada ($1,16 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{L}$). Maior destaque é dado para os complexos [Pd(CT-E)₂]Cl₂ e [Pd(CT-E)₂], os quais apresentaram os maiores valores de K_b , $7,46 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{L}$ e $14,2 \times 10^5 \text{ mol}^{-1}\text{L}$, respectivamente, indicando que o complexo da série desprotonada interage mais fortemente que seu análogo.

Deste modo, é observado que os complexos com maior volume, complexos [Pd(CT-E)₂], [Pd(CT-E)₂]Cl₂ e [Pd(BT-E)₂]Cl₂ (figuras 5.8, 5.9 e 5.10, respectivamente) são os que interagem mais fortemente com o DNA. As magnitudes da constante de força da ligação, K_b , no entanto, indicam que estes e os demais complexos interagem diferentemente de um intercalador clássico, como o brometo de etídio ($K_b = 1,4 \times 10^6 \text{ mol}^{-1}\text{L}$)¹⁰⁰. Deste modo, acredita-se que outros tipos de interações mais fracas, como interação eletrostática, estejam associados aos valores de K_b encontrados.

Acrescenta-se que, para o complexo protótipo, contendo co-ligante fosfínico e clorido, o resultado da titulação foi similar, indicando $K_b = 4,0 \times 10^5$, o qual foi atribuído à interações eletrostáticas.

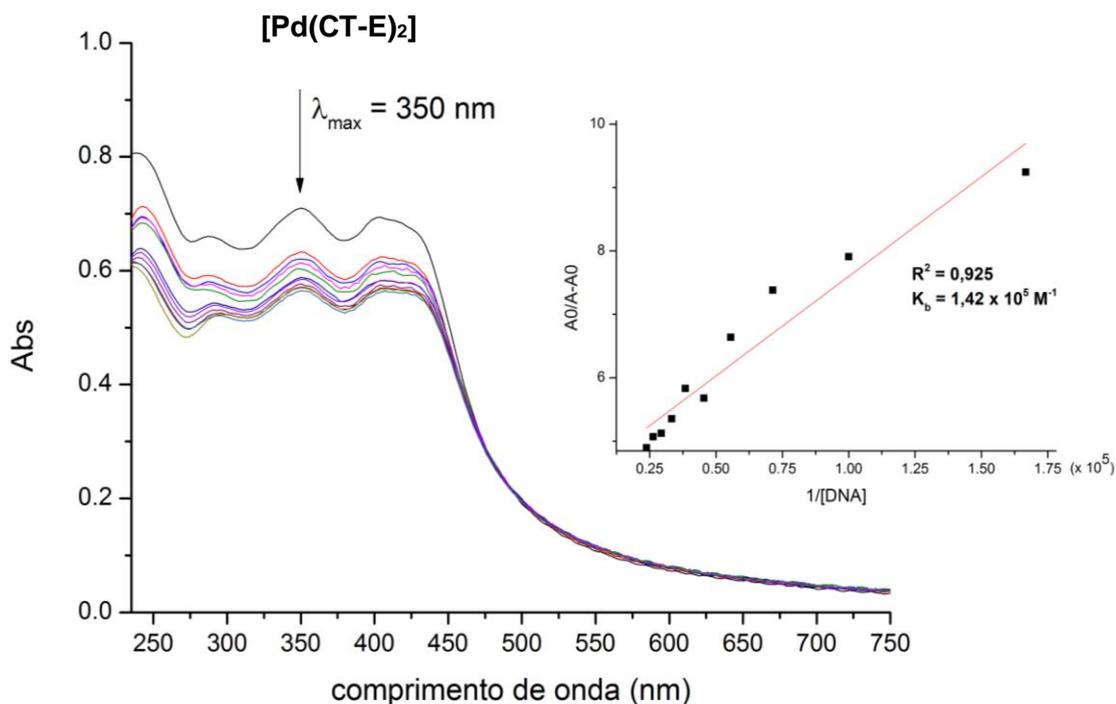


FIGURA 5.8 - Gráfico Absorbância vs Comprimento de onda dos espectros de absorção do complexo $[\text{Pd}(\text{CT-E})_2]$ na presença de adições de ct-DNA. $[\text{Complexo}] = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{DNA}] = 0 - 6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Gráfico inserido: $A_0/(A-A_0)$ vs $1/[\text{DNA}]$.

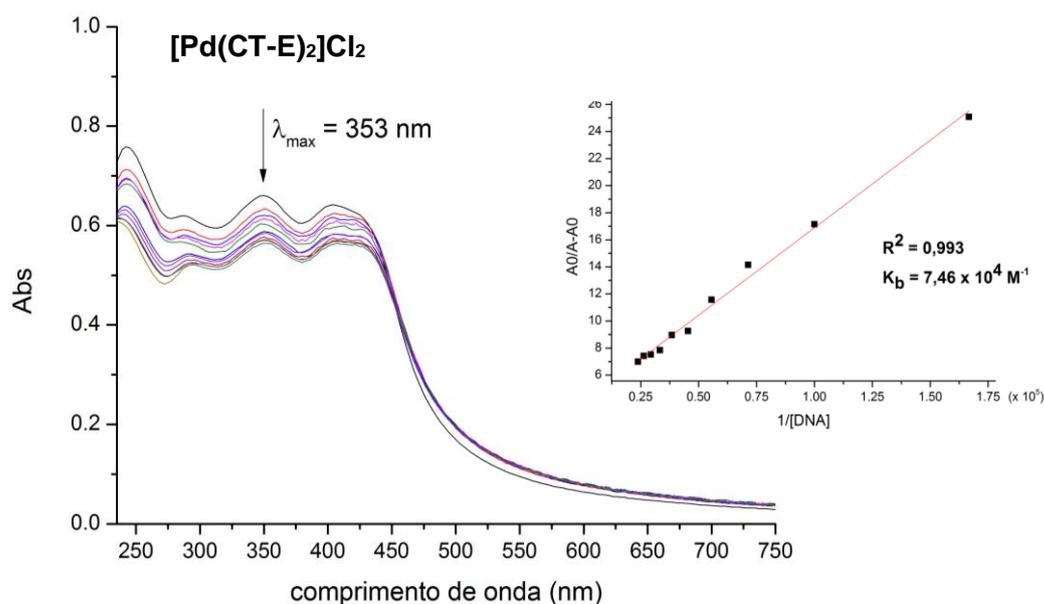


FIGURA 5.9 - Gráfico Absorbância vs Comprimento de onda dos espectros de absorção do complexo $[\text{Pd}(\text{CT-E})_2]\text{Cl}_2$ na presença de adições de ct-DNA. $[\text{Complexo}] = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{DNA}] = 0 - 6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Gráfico inserido: $A_0/(A-A_0)$ vs $1/[\text{DNA}]$.

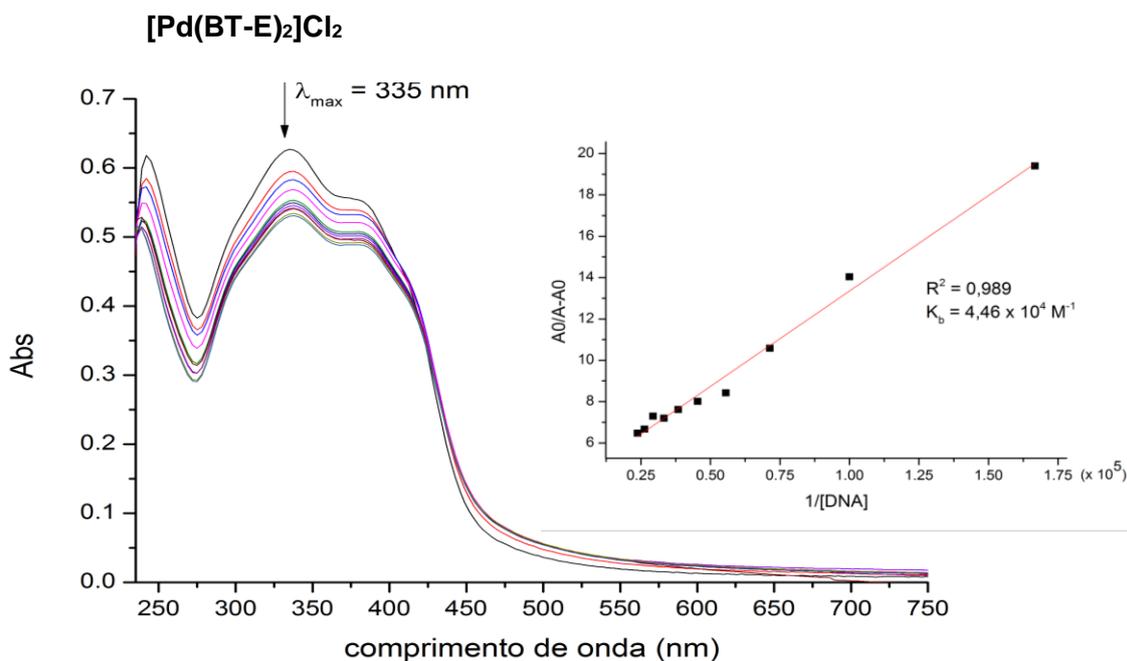


FIGURA 5.10 - Gráfico Absorbância vs Comprimento de onda dos espectros de absorção do complexo [Pd(BT-E)₂]Cl₂ na presença de adições de ct-DNA. [Complexo] = $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, [DNA] = $0 - 6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Gráfico inserido: $A_0/(A-A_0)$ vs $1/[\text{DNA}]$.

5.4 - Interação com o DNA Via Eletroforese em Gel de Agarose

Uma das formas de avaliar a interação dos compostos com o DNA é através da corrida eletroforética em gel à base de agarose: com aplicação de um campo elétrico, o DNA, que possui carga negativa em pH fisiológico, 7,4, se move em direção à um polo positivo (ânodo). A mobilidade do DNA, entretanto, depende do seu formato e da sua massa, com maiores massas se deslocando em menor velocidade; e formas mais compactas se deslocando em maior velocidade entre os poros da matriz de agarose. Ao final, o gel é introduzido em solução de brometo de etídio, a qual é capaz de corar o DNA para que seja feita uma fotodocumentação com luz ultravioleta. Se um composto é capaz de interagir com o DNA, modificando sua forma ou estrutura, bandas diferentes da banda padrão de corrida do DNA estarão presentes no gel revelado¹⁶.

Diante do exposto, para os complexos mais citotóxicos, [Pd(BT-H)₂], [Pd(BT-M)₂], [Pd(BT-H)₂]Cl₂ e [Pd(BT-M)₂]Cl₂, e para o complexo [Ni(BT-M)₂] foram realizados ensaios de corrida eletroforética para avaliar se o DNA

seria o alvo biológico desses compostos. Os complexos foram solubilizados em DMSO e incubados com o plasmídeo PBR322 por 24h. Os resultados dos ensaios são apresentados nas figuras 5.11 (complexos da série desprotonada e complexo de Ni(II)) e 5.12 (complexos da série protonada).

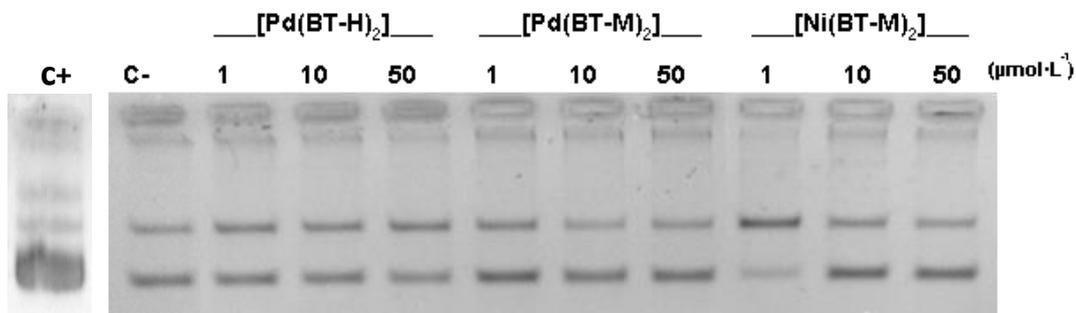
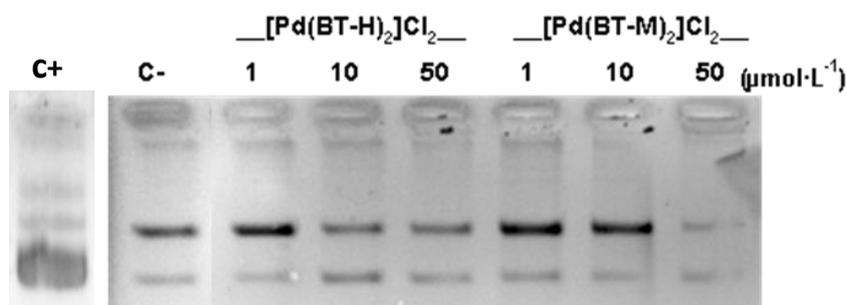


FIGURA 5.11 - Fotodocumentação da eletroforese em ensaio de avaliação da capacidade de interação com o DNA dos complexos $[Pd(BT-H)_2]$ $[Pd(BT-M)_2]$ e $[Ni(BT-M)_2]$. C- (controle negativo): plasmídeo (5% (v/v) DMSO). C+ (controle positivo): DNA e cisplatina.

FIGURA 5.12 – Fotodocumentação da eletroforese em ensaio de avaliação da



capacidade de interação com o DNA dos complexos $[Pd(BT-H)_2]Cl_2$ e $[Pd(BT-M)_2]Cl_2$. C+ (controle positivo): DNA e cisplatina. C- (controle negativo): plasmídeo (5% (v/v) DMSO). C+ (controle positivo): DNA e cisplatina.

Nestes ensaios, o controle negativo (c-, composto pelo plasmídeo e DMSO) apresenta somente duas bandas, referentes às estruturas relaxada e superenovelada do DNA, representando, portanto, o padrão de corrida normal do DNA. É sabido que, a cisplatina interage com o DNA e altera a mobilidade eletroforética deste, resultando na observação de diversas bandas de DNA (controle positivo, c+). Deste modo, a comparação do padrão observado nos controles positivo e negativo permite inferir que os complexos não interagem

com o DNA, pois, mesmo padrão de bandas observado nos controles negativos está presente nas linhas referentes às corridas dos complexos, e se diferem bastante do padrão encontrado no controle positivo.

Ainda, ressalta-se que, os resultados aqui apresentados são concordantes com os resultados da titulação espectroscópica com o DNA, sendo também similar ao resultado encontrado na eletroforese do complexo protótipo $[\text{PdCl}(\text{BT-M})(\text{P}(\text{4FPh})_3)]$, o qual não interage com o DNA.

5.5 - Interação com a TOPOII α Via Eletroforese em Gel de Agarose

A inibição da enzima TOPOII α foi avaliada após incubação da enzima com o plasmídeo superenovelado PBR322, e com os quatro complexos de paládio mais citotóxicos ($[\text{Pd}(\text{BT-H})_2]$, $[\text{Pd}(\text{BT-M})_2]$, $[\text{Pd}(\text{BT-H})_2]\text{Cl}_2$ e $[\text{Pd}(\text{BT-M})_2]\text{Cl}_2$), bem como com o complexo de níquel ($[\text{Ni}(\text{BT-M})_2]$). Uma vez que a enzima é capaz de relaxar o DNA superenovelado, é esperado que com a inibição desta sejam visualizadas bandas fortes de DNA superenovelado. Acrescenta-se que, este teste é validado pelo teste de interação com o DNA via eletroforese, o qual mostrou que os complexos não são capazes de alterar a mobilidade eletroforética do DNA. Isto é, caso haja alterações nos padrões de bandas do DNA, estas devem ser consequência de atividade da enzima TOPOII α .

No presente ensaio, o controle negativo é composto pelo plasmídeo e 1,5 μL de DMSO (mesmo volume de solução dos compostos adicionado em cada amostra); enquanto o controle positivo consiste no plasmídeo superenovelado incubado com a TOPOII α e 1,5 μL de DMSO. A figura 5.13 é a fotodocumentação do ensaio eletroforético acima descrito para os complexos da série desprotonada e o complexo de Ni(II).

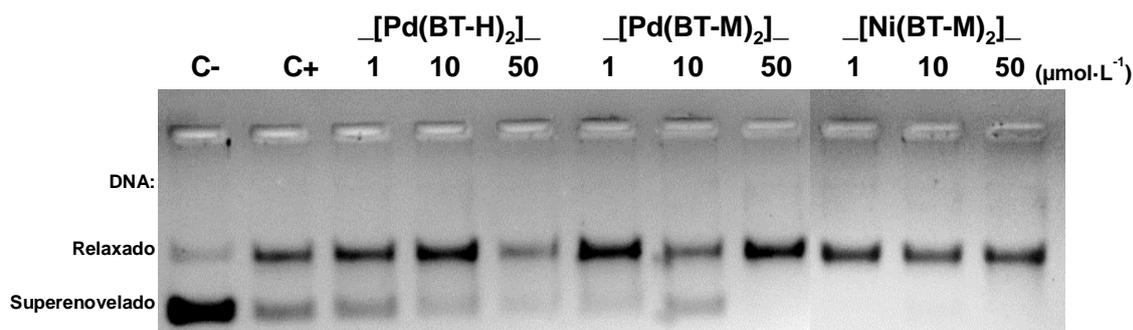


FIGURA 5.13 – Fotodocumentação da eletroforese em ensaio de avaliação da capacidade inibitória da enzima TOPOII α pelos complexos $[\text{Pd}(\text{BT-H})_2]$, $[\text{Pd}(\text{BT-M})_2]$ e $[\text{Ni}(\text{BT-M})_2]$. C-: plasmídeo (5% (v/v) DMSO). C+: DNATopoisomerase-plasmídeo.

É notável que nenhum dos compostos foi capaz de inibir a TOPOII α , pois, em todas as linhas referentes aos complexos existe a presença de banda referente ao DNA relaxado, as quais são parecidas àquela encontrada no controle positivo. Resultado similar foi encontrado para os complexos análogos da série protonada, o qual é apresentado na figura 5.14.

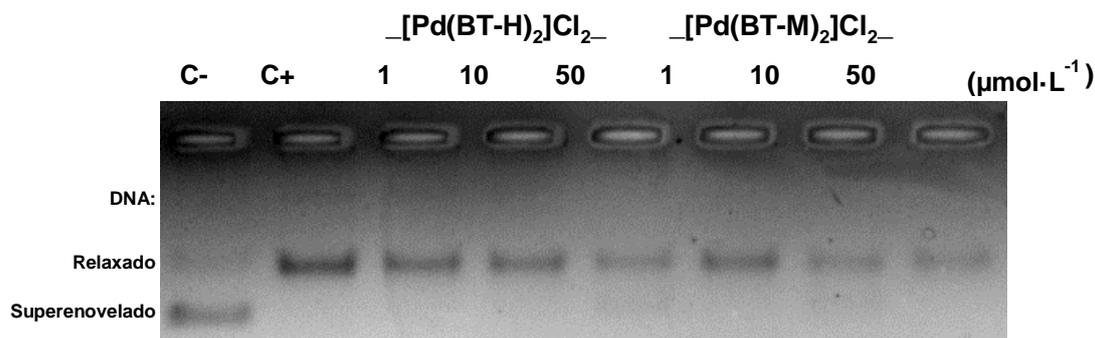


FIGURA 5.14 - Fotodocumentação da eletroforese em ensaio de avaliação da capacidade inibitória da enzima TOPOII α pelos complexos $[\text{Pd}(\text{BT-H})_2]\text{Cl}_2$ e $[\text{Pd}(\text{BT-M})_2]\text{Cl}_2$. C-: plasmídeo (5% (v/v) DMSO). C+: DNATopoisomerase-plasmídeo.

Destaca-se que, estes resultados são concordantes com aqueles descritos na docagem molecular, a qual indicou que os complexos não possuem afinidade com a enzima TOPOII α . Ainda, estes resultados se

contrapõem àqueles observados para o complexo protótipo [PdCl(BT-M)(P(4FPh)₃)], o qual, em mesmo tipo de ensaio, foi capaz de inibir a enzima TOPOII α em concentração igual a 12, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Neste sentido, uma das racionalizações feitas é que, embora também volumoso, o complexo protótipo seria mais versátil devido à possibilidade de flexibilização dos co-ligantes fosfínico e haleto, possibilitando que estes pudessem, por exemplo, se alocar no sítio da ATPase, ao contrário dos complexos bisquelatos por possuírem estruturas mais rígidas.

6. Considerações Finais

Foram sintetizados e caracterizados seis ligantes tiossemicarbazonas a partir dos quais foram sintetizados treze complexos bisquelatos com geometria quadrática plana distorcida: total de doze complexos de Pd(II), em duas séries análogas, protonada e desprotonada, e um de Ni(II). As duas séries de complexos de Pd(II) não mostraram significativas diferenças estruturais.

Os ensaios biológicos mostraram que os ligantes tiossemicarbazonas não apresentam citotoxicidade frente às linhagens tumorais testadas e, para os complexos, a presença do próton não gera diferenças substanciais em suas atividades biológicas. No entanto, as modificações estruturais nos grupos R₁ e R₂ são importantes para a atividade citotóxica: complexos análogos de menor massa molar, [Pd(BT-H)₂], [Pd(BT-M)₂], [Pd(BT-H)₂]Cl₂ e [Pd(BT-M)₂]Cl₂, foram mais citotóxicos frente às linhagens tumorais de mama, MCF-7, e próstata, DU-145.

Neste sentido, enquanto os complexos de Pd(II) com maior massa molar apresentam IC₅₀ superior à 50 μmol·L⁻¹, os demais variaram de 12,00 - 0,22 μmol·L⁻¹ para a linhagem MCF-7 e de 0,40 - 2,65 μmol·L⁻¹ na linhagem DU-145; mostrando que, de modo geral, os complexos de Pd(II) foram mais citotóxicos na linhagem tumoral de próstata. O confronto entre a citotoxicidade exibida nas linhagens MCF-7, DU-145 frente à PNT2, demonstra a falta de seletividade desses complexos entre linhagens tumorais e não tumoral.

A previsão da docagem molecular de que os complexos não possuem afinidade com o sítio ATPase da TOPOIIα (o que possivelmente seria uma consequência da rigidez de sua geometria, a qual não permitiria que o mesmo se alocasse no centro deste sítio), foi confirmada pelo ensaio de interação com a TOPOIIα via eletroforese, que mostrou que os complexos mais citotóxicos e o complexo de Ni(II) não foram capazes de inibir a TOPOIIα. Este último ensaio foi validado pelo estudo de interação dos compostos com o DNA via eletroforese, no qual observou-se que os complexos supramencionados não são capazes de afetar a mobilidade eletroforética do DNA nestas condições. Já os testes de titulação espectroscópica com o DNA indicaram

que os complexos interagem fracamente, possivelmente de modo eletrostático, com o DNA.

Estabelecendo uma relação entre a citotoxicidade e o ensaio de inibição da enzima topoisomerase, os resultados demonstram coerência, uma vez que se espera que inibidores da TOPOII α apresentem distinção entre os valores de IC₅₀ para linhagens que possivelmente apresentam grande expressão de TOPOII α (mama) e linhagens que não possuem esta elevada expressão (próstata). Desta forma, acredita-se que a citotoxicidade apresentada esteja relacionada com outros alvos.

Quanto ao papel dos co-ligantes, a comparação da atividade citotóxica frente a linhagem tumoral de mama MDA-MDB-231 exprimiou que o complexo [Pd(BT-M)₂], para o qual era esperada uma potencialização dessa atividade ao utilizar dois ligantes tiossemicarbazonas, exibiu maior citotoxicidade ($0,43 \pm 0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) se comparado ao complexo protótipo [PdCl(BT-M)(P(4FPh)₃)] ($0,56 \pm 0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e ao seu análogo de Ni(II), [Ni(BT-M)₂] ($>12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Porém, a substituição dos co-ligantes fosfínicos e clorido levou à perda da atividade de inibição da enzima TOPOII α . Ainda, dentro desse quadro comparativo, a citotoxicidade apresentada pelo [Ni(BT-M)₂], muito menor que a do [Pd(BT-M)₂], sugere que o metal tem papel funcional neste tipo de atividade, o que poderia estar atrelado à possíveis modulações das propriedades das tiossemicarbazonas coordenadas ao íon metálico.

Ressalta-se que, diante do exposto, os resultados obtidos neste trabalho podem servir de norte para o planejamento de novos compostos que objetivem a inibição da TOPOII α ou para estudos que se disponham a investigar outros alvos biológicos que justifiquem a alta atividade citotóxica dos complexos sintetizados e estudados no presente trabalho.

7. Referências Bibliográficas

1. Arora, S.; Agarwal, S.; Singhal, S. Anticancer Activities of Thiosemicarbazides/Thiosemicarbazones: A Review. *Innovare Academic Sciences* **2014**, 6 (9).
2. Almeida, V. L. De; Leitão, A.; Barrett, C.; Alberto, C.; Luis, C. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos Que Interagem Com o DNA: Uma Introdução. *Química Nova* **2005**, 28 (1), 118.
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. O que é o câncer? <http://www.inca.gov.br>.
4. Sudhakar, a. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods Akulapalli. *J Cancer Sci Ther.* **2010**, 1 (2), 1.
5. World Health Organization. Cancer https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1.
6. Devita, V. T.; Chu, E. AACR Centennial Series A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Research* **2008**, No. 21, 8643.
7. Dong, K. C.; Berger, J. M. Structural Basis for Gate-DNA Recognition and Bending by Type IIA Topoisomerases. *Nature* **2007**, 450 (December), 1201.
8. Barra, C. V.; Rocha, F. V.; Morel, L.; Gautier, A.; Garrido, S. S.; Mauro, A. E.; Frem, R. C. G.; Netto, A. V. G. DNA Binding, Topoisomerase Inhibition and Cytotoxicity of Palladium(II) Complexes with 1,10-Phenanthroline and Thioureas. *Inorganica Chimica Acta* **2016**, 446, 54.
9. Barra, C. V.; Netto, A. V. G. Interações Entre Complexos Antitumorais e o DNA e Suas Ferramentas de Análise: Um Enfoque Nos Metalintercaladores. *Revista Virtual de Química* **2015**, 7 (6), 1998.
10. Jahromi, E. Z.; Divsalar, A.; Saboury, A. A.; Khaleghizadeh, S.; Mansouri-Torshizi, H.; Kostova, I. Palladium Complexes: New Candidates for Anti-Cancer Drugs. *Journal of the Iranian Chemical Society* **2016**, 13 (5), 967.
11. Liscovitch, M.; Yaakov Lavie. Cancer Multidrug Resistance : A Review of Recent Drug Discovery Research Mordechai Liscovitch * and Yaakov Lavie. *IDrugs: the investigational Drugs Journal* **2002**, 5 (4).
12. R, S. G. K. et al. Mechanism of DNA Binding and Cleavage. *Biomedicine and Biotechnology* **2014**, 2 (1), 1.
13. World Health Organization.
14. Buckley, E. G. DNA Topoisomerases in Cancer Treatment. **1988**, 296 (April), 1145.
15. Nitiss, J. L. Targeting DNA Topoisomerase II in Cancer Chemotherapy John. *Nat Rev Cancer* **2009**, 9 (5), 338.

16. Rocha, F. V. Síntese, Caracterização e Estudo Da Atividade Antitumoral de Complexos de Paládio (II) Com Ligantes Sulfurados e Trifenilfosfina, Programa de Pós-Graduação-UNESP. Tese de doutorado, 2013.
17. Echols, H.; Goodman, M. F. Fidelity Mechanisms in DNA Replication. *Annual Reviews Biochemistry* **1991**, *60*, 477.
18. Watt, P. M.; Hickson, D. Structure and Function of Type II DNA Topoisomerases. *Biochemistry Journal* **1994**, *303*, 681.
19. Hou, G.; Liu, P.; Yang, J.; Wen, S. Mining Expression and Prognosis of Topoisomerase Isoforms in Non-Small-Cell Lung Cancer by Using OncoPrint and Kaplan – Meier Plotter. **2017**, No. 201504010038, 1.
20. Pommier, Y.; Leo, E.; Zhang, H.; Marchand, C. Review DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chemistry & Biology* **2010**, *17* (5), 421.
21. McClendon, A. K.; Osheroff, N. DNA Topoisomerase II , Genotoxicity , and Cancer. **2007**, *623*, 83.
22. Veselkov, D. A.; Laponogov, I.; Pan, X.; Selvarajah, J.; Mark, L.; Sanderson, M. R. Structure of a Quinolone-Stabilized Cleavage Complex of Topoisomerase IV from *Klebsiella Pneumoniae* and Comparison with a Related *Streptococcus Pneumoniae* Complex Research Papers. **2016**, 488.
23. Wijdeven, R. H.; Pang, B.; Zanden, S. Y. Van Der; Qiao, X.; Blomen, V.; Hoogstraat, M.; Lips, E. H.; Janssen, L.; Wessels, L.; Brummelkamp, T. R.; et al. Genome-Wide Identification and Characterization of Novel Factors Conferring Resistance to Topoisomerase II Poisons in Cancer. **2015**, *1* (2), 4176.
24. Pommier, Y. Drugging Topoisomerases: Lessons and Challenges. *ACS Chemical Biology*. 2013, pp 82.
25. Hande, K. R. Topoisomerase II Inhibitors. **2008**, *3*, 13.
26. Bailly, C. Contemporary Challenges in the Design of Topoisomerase II Inhibitors for Cancer Chemotherapy. *Chemical Reviews* **2012**, *112*, 3611.
27. Heestand, G. M.; Schwaederle, M.; Gatalica, Z.; Arguello, D.; Kurzrock, R. Topoisomerase Expression and Amplification in Solid Tumours: Analysis of 24,262 Patients. *European Journal of Cancer* **2017**, *83*, 80.
28. Pendleton, M.; Jr, R. H. L.; Felix, C. A.; Grimwade, D.; Osheroff, N. Topoisomerase II and Leukemia. *Ann. NY. Aca. Sci* **2014**, *1310*, 98.
29. Houlbrook, S. et al. Relationship between Expression of Topoisomerase II Isoforms and Intrinsic Sensitivity to Topoisomerase II Inhibitors in Breast Cancer Cell. *British Journal of Cancer* **1995**, *72*, 1454.
30. Larsen, A. K.; Escargueil, A. E.; Skladanowski, A. Catalytic Topoisomerase II Inhibitors in Cancer Therapy. *Pharmacology &*

- Therapeutics* **2003**, 99 (2), 167.
31. Hall, I. et al. The Cytotoxicity of Symmetrical and Unsymmetrical Bis (Thiosemicarbazones) and Their Metal Complexes in Murine and Human Tumor Cells. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem* **2000**, 333, 217.
 32. Tenório, R. P.; Góes, A. J. S.; De Lima, J. G.; De Faria, A. R.; Alves, A. J.; De Aquino, T. M. Tiosemicarbazonas: Métodos de Obtenção, Aplicações Sintéticas e Importância Biológica. *Química Nova* **2005**, 28 (6), 1030.
 33. Beraldo, H.; Gambino, D. The Wide Pharmacological Versatility of Semicarbazones , Thiosemicarba- Zones and Their Metal Complexes. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2004**, 31.
 34. Jagadeesh, M. et al. Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Synthesis and Spectroscopic Characterization of 3 , 4-Difluoroacetophenone-Thiosemicarbazone and Its Palladium (II) Complex : Evaluation of Antimicrobial and Antitumour Activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2013**, 115, 583.
 35. Wang, Y.; Gu, W.; Shan, Y.; Liu, F.; Xu, X.; Yang, Y.; Zhang, Q.; Zhang, Y.; Kuang, H.; Wang, Z.; et al. Design, Synthesis and Anticancer Activity of Novel Nopinone-Based Thiosemicarbazone Derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2017**, 27 (11), 2360.
 36. Haffner, M. C.; Aryee, M. J.; Toubaji, A.; Esopi, D. M.; Albadine, R.; Gurel, B.; Isaacs, W. B.; Bova, G. S.; Liu, W.; Xu, J.; et al. Androgen-Induced TOP2B-Mediated Double-Strand Breaks and Prostate Cancer Gene Rearrangements. *Nature Genetics* **2010**, 42 (8), 668.
 37. Jesmin, M. Antineoplastic Activities of Thiosemicarbazone Against Ehrlich Carcinoma Cells Bearing Mice. *Oncology* **2013**, 937 (15), 97.
 38. Zhu, T.; Shen, S.; Lu, Q.; Ye, X.; Ding, W.; Chen, R.; Xie, J.; Zhu, W.; Xu, J.; Jia, L.; et al. Design and Synthesis of Novel N(4)-Substituted Thiosemicarbazones Bearing a Pyrrole Unit as Potential Anticancer Agents. *Oncology Letters* **2017**, 13 (6), 4493.
 39. Huang, H.; Chen, Q.; Ku, X.; Meng, L.; Lin, L.; Wang, X.; Zhu, C.; Wang, Y.; Chen, Z.; Li, M.; et al. A Series of Alpha-Heterocyclic Carboxaldehyde Thiosemicarbazones Inhibit Topoisomerase IIalpha Catalytic Activity. *Journal of medicinal chemistry* **2010**, 53 (8), 3048.
 40. da Silva Filho, F. . et al. International Journal of Biological Macromolecules Topoisomerase Inhibition and Albumin Interaction Studies of Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, 138, 582.
 41. Deng, J.; Li, T.; Su, G.; Qin, Q.; Liu, Y.; Gou, Y. Co (III) Complexes Based on a - N -Heterocyclic Thiosemicarbazone Ligands : DNA Binding , DNA Cleavage , and Topoisomerase I / II Inhibitory Activity Studies.

Journal of Molecular Structure **2018**, 1167, 33.

42. Khan, T.; Dixit, S.; Ahmad, R.; Raza, S.; Azad, I. Molecular Docking , PASS Analysis , Bioactivity Score Prediction , Synthesis , Characterization and Biological Activity Evaluation of a Functionalized 2-Butanone Thiosemicarbazone Ligand and Its Complexes. *J Chem Biol* **2017**, 10, 91.
43. Pahontu, E.; Julea, F.; Rosu, T.; Purcarea, V.; Chumakov, Y.; Petrenco, P.; Gulea, A. Antibacterial, Antifungal and in Vitro Antileukaemia Activity of Metal Complexes with Thiosemicarbazones. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2015**, 19 (4), 865.
44. Bisceglie, F.; Musiari, A.; Pinelli, S.; Alinovi, R.; Menozzi, I.; Polverini, E.; Tarasconi, P.; Tavone, M.; Pelosi, G. Quinoline-2-Carboxaldehyde Thiosemicarbazones and Their Cu(II) and Ni(II) Complexes as Topoisomerase IIa Inhibitors. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2015**, 152, 10.
45. Pelosi, G. Thiosemicarbazone Metal Complexes : From Structure to Activity. *The Open Crystallography Journal* **2010**, 3, 16.
46. Prabhakaran, R.; Sivasamy, R.; Angayarkanni, J.; Huang, R.; Kalaivani, P.; Karvembu, R.; Dallemer, F. Inorganica Chimica Acta Topoisomerase II Inhibition Activity of New Square Planar Ni (II) Complexes Containing N-Substituted Thiosemicarbazones : Synthesis , Spectroscopy , X-Ray Crystallography and Electrochemical Characterization. *Inorganica Chimica Acta* **2011**, 374 (1), 647.
47. Res, M.; Zhao, Y.; Wang, L.; Guo, C.; Jiang, B.; Li, X. Metal Complexes of Thiosemicarbazones as Potent Anticancer Agents : A Minireview. *Med. Res* **2018**, 2 (li), 1.
48. Zeglis, B. M. et al. Role of Metalation in the Topoisomerase IIa Inhibition and Antiproliferation Activity of a Series of r -Heterocyclic-N 4 -Substituted Thiosemicarbazones and Their Cu (II) Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 54, 2391.
49. LIMA, M. A. Síntese e Caracterização de Complexos de Pd(II) Com Potencial Atividade Citotóxica e Inibidores Das Enzimas Topoisomerase II, São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química- UFSCAR. Dissertação de mestrado, 2018.
50. Hernández, W.; Paz, J.; Carrasco, F.; Vaisberg, A.; Spodine, E.; Manzur, J.; Hennig, L.; Sieler, J.; Blaurock, S.; Beyer, L. Synthesis and Characterization of New Palladium (II) Thiosemicarbazone Complexes and Their Cytotoxic Activity against Various Human Tumor Cell Lines. *Bioinorganic Chemistry and Applications* **2013**, 2013, 20.
51. Chen, J.; Huang, Y.; Liu, G.; Afrasiabi, Z.; Sinn, E.; Padhye, S.; Ma, Y. The Cytotoxicity and Mechanisms of 1 , 2-Naphthoquinone Thiosemicarbazone and Its Metal Derivatives against MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2004**, 197,

- 40.
52. Housecroft, C. E.; Sharpe, A. G. *Inorganic Chemistry*, 2nd ed.; Pearson Education Limited: Harlow, 2005.
53. Lee, J. D. *Química Inorgânica Não Tão Concisa*, 5th ed.; Blucher: São Paulo, 199AD.
54. Tenório, R. P.; Góes, A. J. S.; De Lima, J. G.; De Faria, A. R.; Alves, A. J.; De Aquino, T. M. Tiossemicarbazonas: Métodos de Obtenção, Aplicações Sintéticas e Importância Biológica. *Química Nova* **2005**, *28* (6), 1030.
55. Al-Azmi. Synthesis, Crystal Analysis and DFT Calculations of Ni(II) and Pd(II) Complexes of 3,3'-((1,2-Phenylenebis(Azanediy))Bis(2-Oxoethane-2,1-Diyl))Bis(1-Allyl-1H-Imidazol-3-ium). *Journal of Molecular Structure* **2018**.
56. Sheldrick, G. M. Research Papers SHELXT – Integrated Space-Group and Crystal- Structure Determination Research Papers. *Acta Crystallographica Section A* **2015**, *71*, 3.
57. Popolin, C. P.; Reis, J. P. B.; Becceneri, A. B.; Graminha, A. E.; Almeida, M. A. P.; Corrêa, R. S.; Colina-Vegas, L. A.; Ellena, J.; Batista, A. A.; Cominetti, M. R. Cytotoxicity and Anti-Tumor Effects of New Ruthenium Complexes on Triple Negative Breast Cancer Cells. *Plos One* **2017**, *12* (9), e0183275.
58. Colina-Vegas, L.; Lucena Dutra, J.; Villarreal, W.; Neto, J. H. de A.; Cominetti, M. R.; Pavan, F.; Navarro, M.; Batista, A. A. Ru (II) / Clotrimazole / Diphenylphosphine / Bipyridine Complexes : Interaction with DNA , BSA and Biological Potencial against Tumor Cell Lines and Mycobacterium ... *Journal of Inorganic Biochemistry* **2016**, *162* (September), 135.
59. Salehzadeh, S.; Hajibabaei, F.; Khazalpour, S.; Hosseinpour Moghadam, N.; Golbedaghi, R.; Baghaeifar, Z.; Sharifinia, S. DNA Binding and Molecular Docking Studies of a New Cu (II) Complex of Isoxsuprine Drug. *Polyhedron* **2019**, *162*, 232.
60. Villarreal, W.; Colina-Vegas, L.; Visbal, G.; Corona, O.; Corrêa, R. S.; Ellena, J.; Cominetti, M. R.; Batista, A. A.; Navarro, M. Copper(I)-Phosphine Polypyridyl Complexes Synthesis, Characterization, DNA/HSA Binding Study, and Antiproliferative Activity. *Inorganic Chemistry Frontiers* **2017**, *56*, 3781.
61. Sirajuddin, M.; Ali, S.; Badshah, A. Drug-DNA Interactions and Their Study by UV-Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2013**, *124*, 1.
62. Al-azmi, A. Synthesis, Crystal Analysis and DFT Calculations of Ni(II) and Pd(II) Complexes of 3,3'-((1,2-Phenylenebis(Azanediy))Bis(2-Oxoethane-2,1-Diyl))Bis(1-Allyl-1H-Imidazol-3-ium). *Journal of Molecular*

Structure **2018**.

63. MIESSLER, G.; FISCHER, P. J.; TARR, D. A. *Química Inorgânica. 5ª Ed. São Paulo: Pearson Education, 5ª ed.; 2014.*
64. Geary, W. J. The Use of Conductivity Measurements in Organic Solvents for the Characterisation of Coordination Compounds. *Coordination Chemistry Reviews* **1970**, 7, 81.
65. Kapdi, A. R.; Fairlamb, I. J. S. Anti-Cancer Palladium Complexes: A Focus on PdX₂L₂, Palladacycles and Related Complexes. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43 (13), 4751.
66. Lobana, T. S.; Sharma, R.; Bawa, G.; Khanna, S. Bonding and Structure Trends of Thiosemicarbazone Derivatives of Metals — An Overview. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, 253, 977.
67. Hueso-urena, F.; Moreno-carretero, M. N.; Penas-chamorro, A. L. Structural Characterization of a Novel Tetranuclear Palladium (II) Complex Containing the Pd₄S₄ Core , with the N , N , S -Tridentate 6-Amino-5-Formyl-. *Inorganic Chemistry Communications* **1999**, 2, 323.
68. José M, V. et al. The Key Role of Sulfur in Thiosemicarbazone Compounds . Crystal and Molecular Structure Of. *Journal of Organometallic Chemistry* **2001**, 623, 176.
69. Quiroga, A. G. Palladated and Platinated Complexes Derived from Phenylacetaldehyde Thiosemicarbazone with Cytotoxic Activity in Cis - DDP Resistant Tumor Cells . Formation of DNA Interstrand Cross-Links by These Complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1998**, 70, 117.
70. Rocha, F. V.; Barra, C. V.; Garrido, S. S.; Manente, F. A.; Carlos, I. Z.; Ellena, J.; Fuentes, A. S. C.; Gautier, A.; Morel, L.; Mauro, A. E.; et al. Cationic Pd(II) Complexes Acting as Topoisomerase II Inhibitors: Synthesis, Characterization, DNA Interaction and Cytotoxicity. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2016**, 159, 165.
71. Padhye, S.; Kauffman, George B. Of the Sulfur Donor Ligands, Thiosemicarbazones Have Perhaps Not Received [2,3], as Much Attention as, e.g., Dithiophosphates [I], Dithiocarbamates *. *Coordination Chemistry Reviews* **1985**, 63, 127.
72. Garcia Velho, R. Medidas de Condutividade Na Caracterização de Complexos Inorgânicos: Um Levantamento Bibliográfico. *Programa de Pós-Graduação em Química - UF* **2006**, 170.
73. Muthukumar, M.; Viswanathamurthi, P. Synthesis , Spectral Characterization and Catalytic Studies of New Ruthenium (II) Chalcone Thiosemicarbazone Complexes. *Central European Journal of Chemistry* **2010**, 8 (1), 229.
74. Thanikachalam, V. et al. Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy FT-Raman , FT-IR Spectral and DFT Studies on (E) -1-4-Nitrobenzylidenethiocarbonohydrazide. *Spectrochimica Acta*

Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy **2012**, 87, 86.

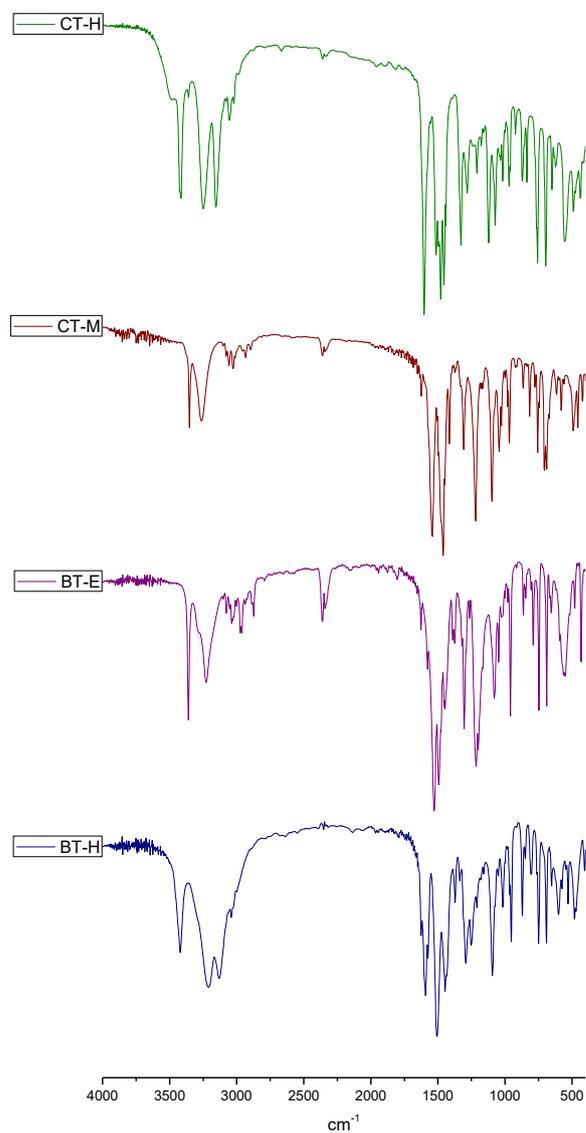
75. Tian, Y. et al. Crystal Structure and Spectroscopic Studies on Metal Complexes Containing NS Donor Ligands Derived from S-Benzyldithiocarbamate and p-Dimethylaminobenzaldehyde. *Polyhedron* **1996**, 15 (95).
76. Kalaivani, P. Influence of Terminal Substitution on Structural , DNA , Protein Binding , Anticancer and Antibacterial Activities of Palladium (II) Complexes Containing 3-Methoxy Salicylaldehyde-4 (N) Substituted Thiosemicarbazones †. *Dalton trans* **2012**, 2486.
77. Silva, J. G. D. et al. Chalcone-Derived Thiosemicarbazones and Their Zinc (II) and Gallium (III) Complexes : Spectral Studies and Antimicrobial Activity. *Journal of Coordination Chemistry* **2013**, 66 (3), 385.
78. Al, B. J. et. Novel Platinum (II) and Palladium (II) Complexes of Thiosemicarbazones Derived from 5-Substitutedthiophene-2-Carboxaldehydes and Their Antiviral and Cytotoxic Activities. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 46, 5616.
79. Sharma, S.; Athar, F.; Maurya, M. R.; Azam, A. Copper (II) Complexes with Substituted Thiosemicarbazones of Thiophene-2-Carboxaldehyde : Synthesis , Characterization and Antiamoebic Activity against E . Histolytica. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 40, 1414.
80. Rocha, F. V. Síntese, Caracterização e Estudo Da Atividade Antitumoral de Complexos de Paládio(II) Om Ligantes Sulfurados e Trifenilfosfina, 2013.
81. Silva, J. G. D. A.; Perdigão, C. C. H.; Speziali, N. L. Chalcone-Derived Thiosemicarbazones and Their Zinc (II) and Gallium (III) Complexes : Spectral Studies and Antimicrobial Activity. *Journal of Coordination Chemistry* **2013**, 8972, 385.
82. Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.*, 3 ed.; Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois S.A, 1979.
83. Ali, A. A.; Nimir, H.; Aktas, C.; Huch, V.; Rauch, U.; Veith, M. Organoplatinum(II) Complexes with 2-Acetylthiophene Thiosemicarbazone: Synthesis, Characterization, Crystal Structures, and in Vitro Antitumor Activity. *Organometallics* **2012**, 31, 2256.
84. Nobre, S. M.; Monteiro, A. L. Journal of Molecular Catalysis A : Chemical Pd Complexes of Iminophosphine Ligands : A Homogeneous Molecular Catalyst for Suzuki – Miyaura Cross-Coupling Reactions under Mild Conditions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2009**, 313, 65.
85. Vikse, K. L.; Henderson, M. A.; Oliver, G.; Mcindoe, J. S. Direct Observation of Key Intermediates by Negative-Ion Electrospray Ionisation Mass Spectrometry in Palladium-Catalysed Cross-Coupling W. *Chem.*

- Commun.* **2010**, *46*, 7412.
86. Lisowski, J.; Trzeciak, A. M. Inorganica Chimica Acta A Macrocyclic Pd (II)– Ni (II) Complex in Heck and Suzuki Reactions. *Inorganica Chimica Acta* **2015**, *431*, 145.
 87. Masaguer, R.; Alonso, C.; Navarro-ranninger, C. Palladated and Platinated Complexes Derived from Phenylacetaldehyde Thiosemicarbazone with Cytotoxic Activity in Cis - DDP Resistant Tumor Cells . Formation of DNA Interstrand Cross-Links by These Complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1998**, *70*, 117.
 88. Santos, H. F. Dos; Silva, H.; Grazul, R. M.; Fontes, A. P. S.; Paschoal, D.; Motta, E. V. S.; Carpane, A. G.; Lopes, M. T. P. Platinum (II) and Palladium (II) Aryl- Thiosemicarbazone Complexes : Synthesis , Characterization , Molecular Modeling , Cytotoxicity , and Antimicrobial Activity. *Journal of Coordination Chemistry* **2014**, *67* (6), 956.
 89. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities In the Course of the Routine Use of NMR as an Aid for Organic Chemistry , a Day-to-Day Problem Is the Identifica- Tion of Signals Deriving from Common Contaminants Literature , but The. *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62* (3), 7512.
 90. Pavia, D. L. et al. *Introdução à Espectroscopia*, 2nd ed.; São Paulo: Cengage Learning, 2015.
 91. Manikandan, R.; Anitha, P.; Prakash, G.; Vijayan, P.; Viswanathamurthi, P. Synthesis , Spectral Characterization and Crystal Structure of Ni (II) Pyridoxal Thiosemicarbazone Complexes and Their Recyclable Catalytic Application in the Nitroaldol (Henry) Reaction in Ionic Liquid Media. *Polyhedron* **2014**, *81*, 619.
 92. Babahan, I. et al. Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Spectroscopic and Biological Approach of Ni (II), Cu (II) and Co (II) Complexes of 4-Methoxy / Ethoxybenzaldehyde Thiosemicarbazone Glyoxime. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2014**, *121*, 205.
 93. Sigma aldrich: Physical Properties of Solvents. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Aldrich/General_Information/labbasics_pg144.pdf. Acesso: 25-07-2019.
 94. Silva, J. G. D. A.; Perdigão, C. C. H.; Speziali, N. L. Chalcone-Derived Thiosemicarbazones and Their Zinc (II) and Gallium (III) Complexes : Spectral Studies and Antimicrobial Activity. *Journal of Coordination Chemistry* **2013**, 8972.
 95. Metallomics, C.; Ramachandran, E.; Kalaivani, P.; Prabhakaran, R. Metallomics PAPER Synthesis, X-Ray Crystal Structure , DNA Binding , Antioxidant And. *Metallomics* **2012**, *4*, 218.

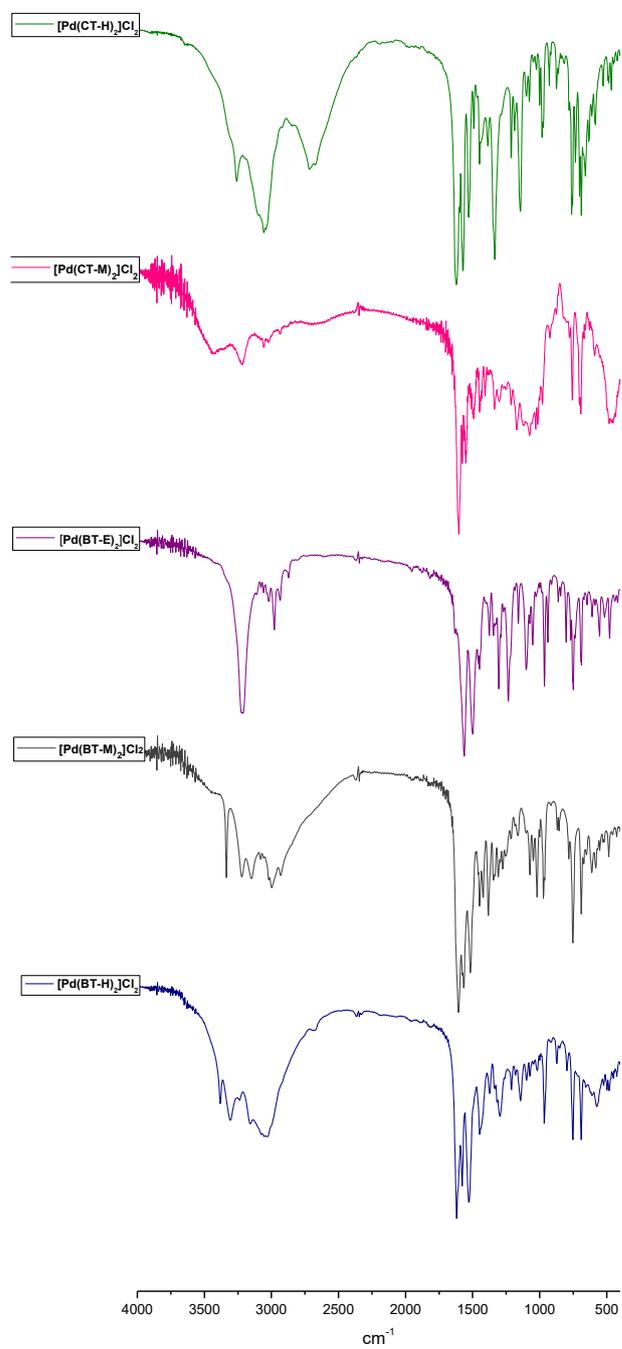
96. Twentyman, P. R.; Luscombe, M. A Study of Some Variables in a Tetrazolium Dye (MTT) Based Assay for Cell Growth and Chemosensitivity. *British Journal of Cancer* **1987**, *56*, 279.
97. Stockert, J. C. et al. Acta Histochemica MTT Assay for Cell Viability : Intracellular Localization of the Formazan Product Is in Lipid Droplets. *Acta Histochemica* **2012**, *114*, 785.
98. Rocha, F. V; Farias, R. L.; Lima, M. A.; Batista, V. S.; Nascimento-júnior, N. M.; Garrido, S. S.; Leopoldino, A. M.; Goto, R. N.; Oliveira, A. B.; Beck, J.; et al. Computational Studies , Design and Synthesis of Pd (II) -Based Complexes : Allosteric Inhibitors of the Human Topoisomerase-II α . *Journal of Inorganic Biochemistry* **2019**, *199* (June), 110725.
99. Zeglis, B. M.; Divilov, V.; Lewis, J. S. Role of Metalation in the Topoisomerase II α Inhibition and Antiproliferation Activity of a Series of α -Heterocyclic-N4-Substituted Thiosemicarbazones and Their Cu(II) Complexes. *Journal of medicinal chemistry* **2011**, *54* (li), 2391.
100. Liu, J. et al. DNA-Binding and Cleavage Studies of Macrocyclic Copper (II) Complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2002**, *91*, 269.

8. Apêndices

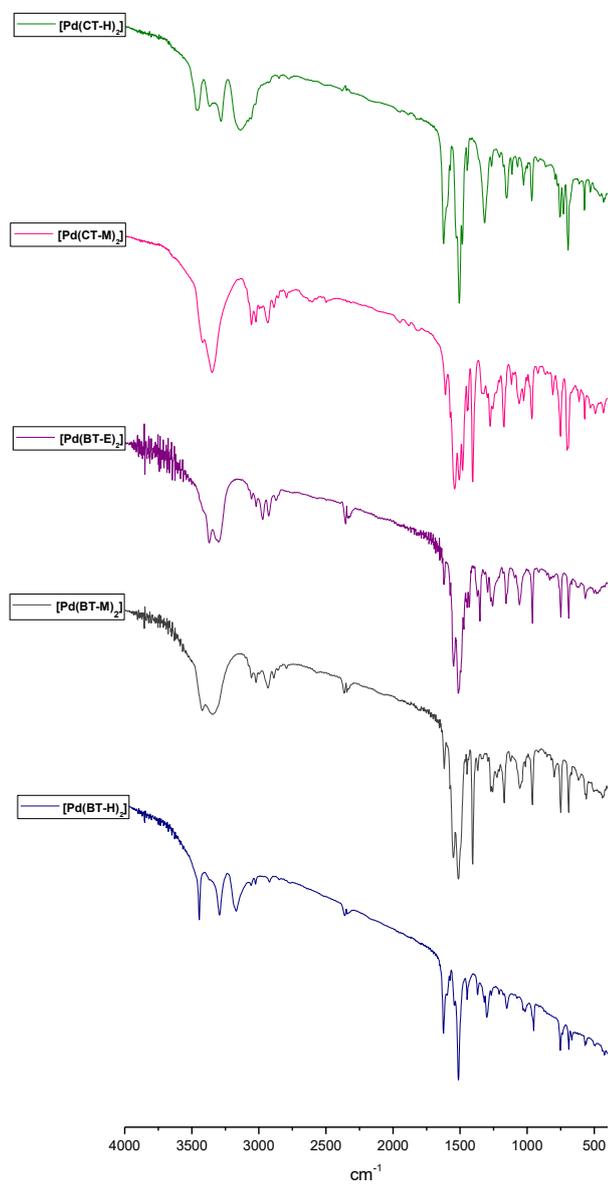
8.1- Espectros de absorção na região do infravermelho dos ligantes (1mg do composto:100mg de CsI, 400-4000 cm^{-1}) (espectros tratados no software *Origin8.0*, sem baseline).



8.2- Espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos da série protonada (1mg do composto:100mg de CsI, $400\text{-}4000\text{cm}^{-1}$) (espectros tratados no software *Origin8.0*, sem baseline).

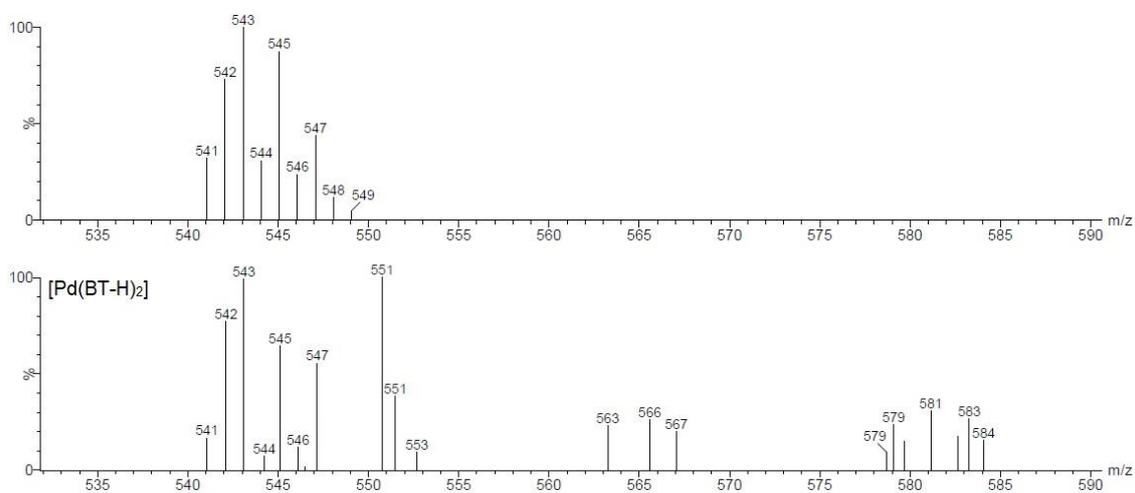


8.3 - Espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos da série desprotonada (1mg do composto:100mg de CsI, 400-4000 cm^{-1}) (espectros tratados no software *Origin8.0*, sem baseline).

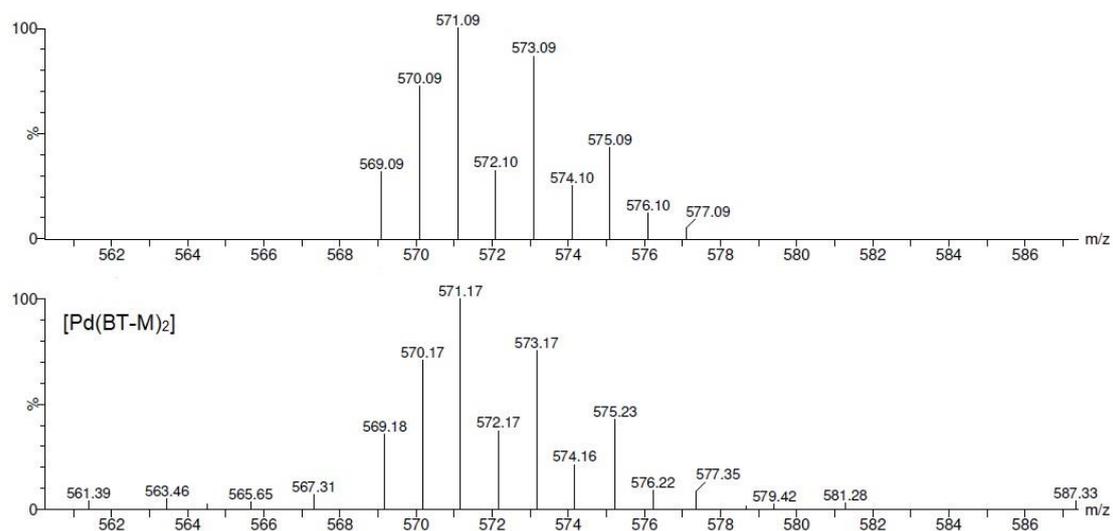


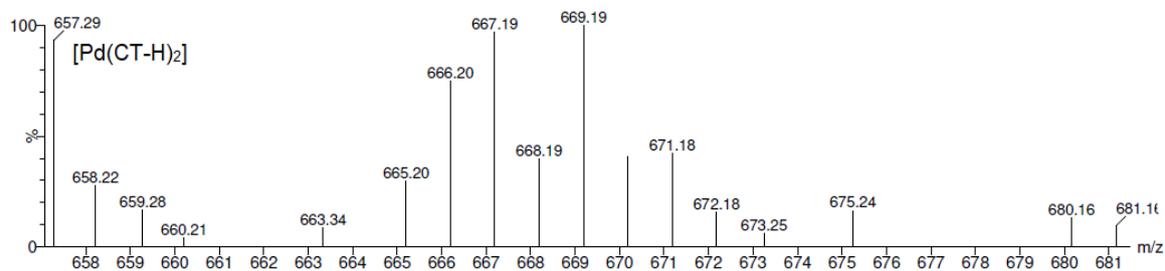
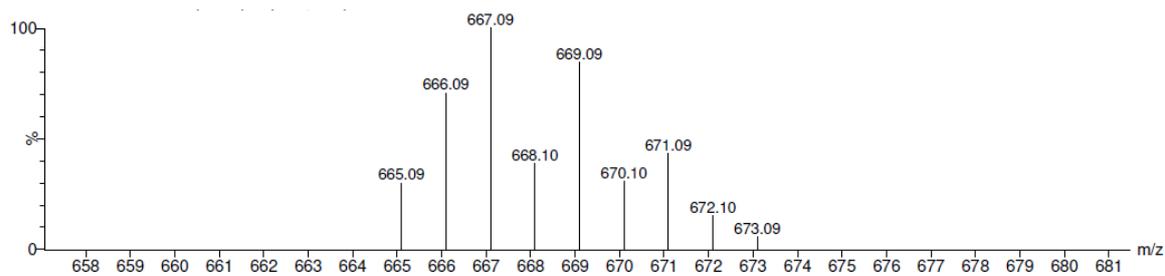
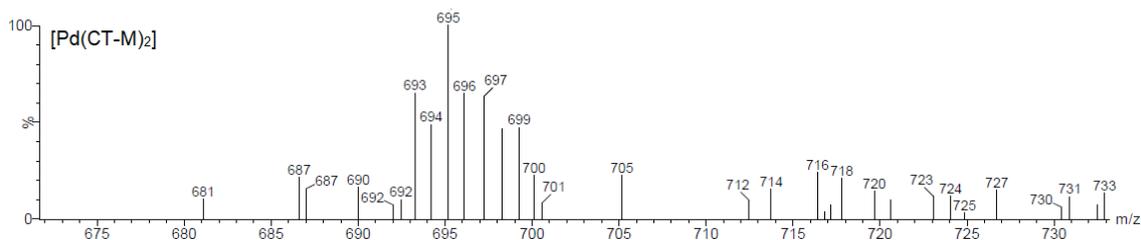
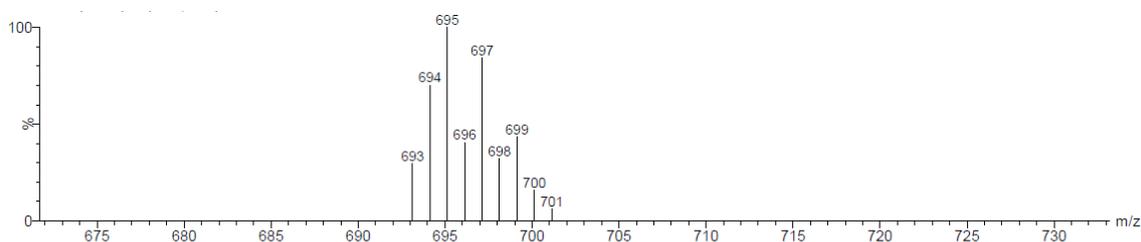
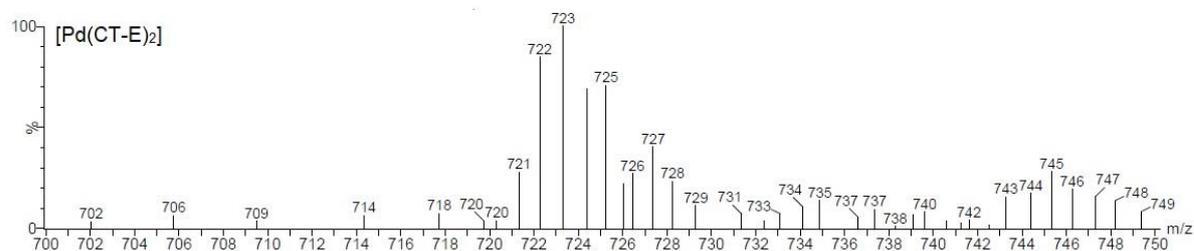
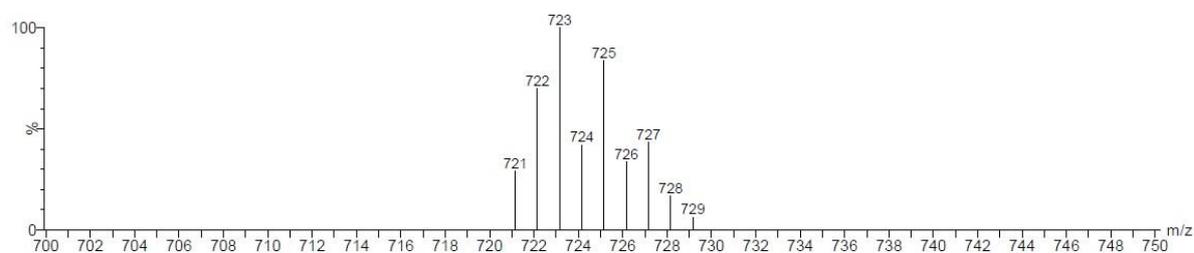
8.4- Espectros de Massas calculado (superior) e experimental (inferior) dos complexos contendo íon Paládio.

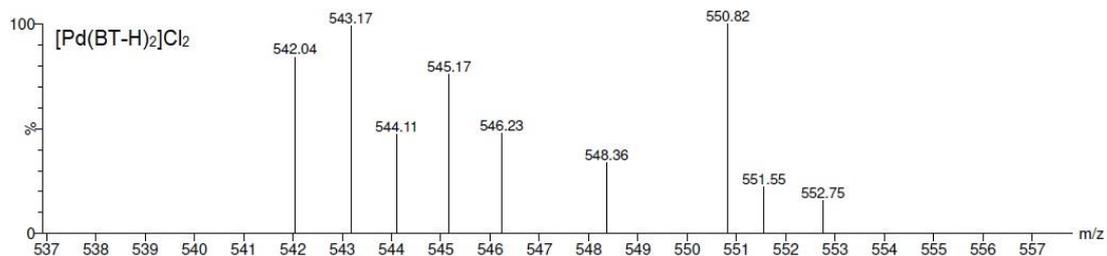
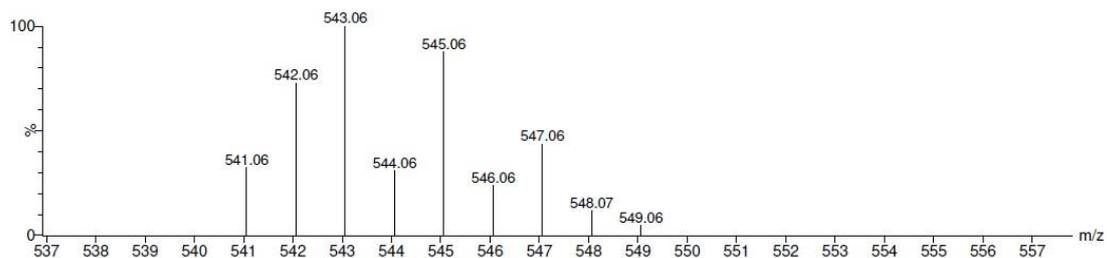
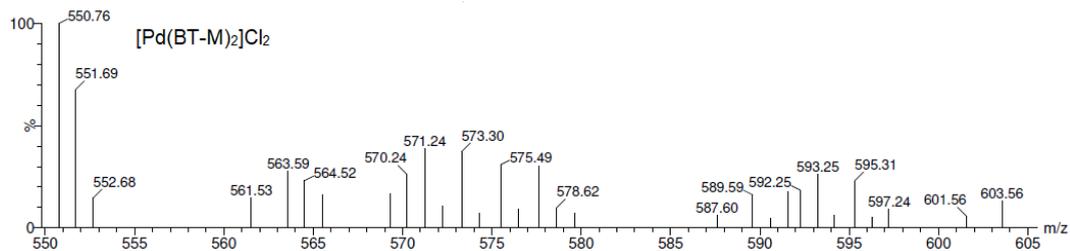
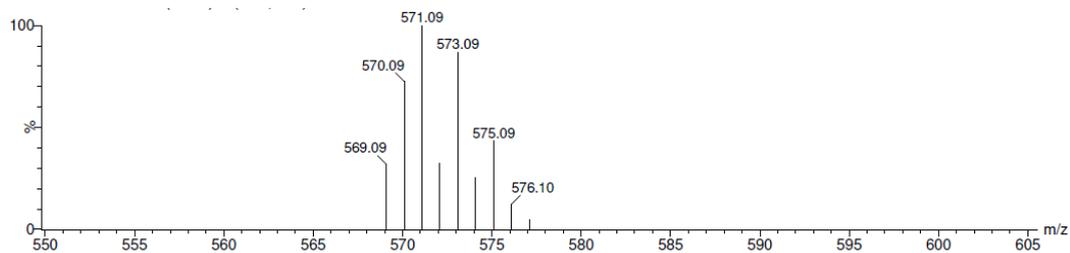
a) [Pd(BT-H)₂]

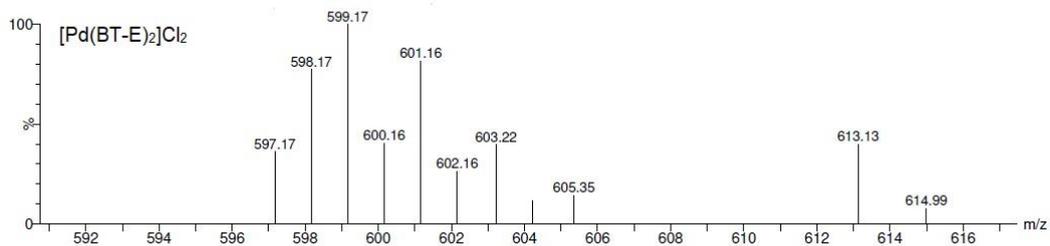
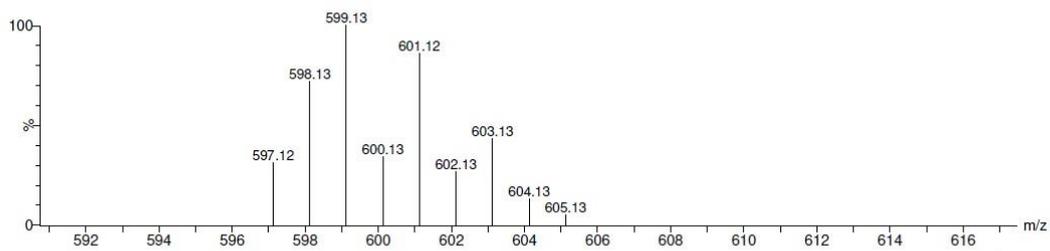


b) [Pd(BT-M)₂]

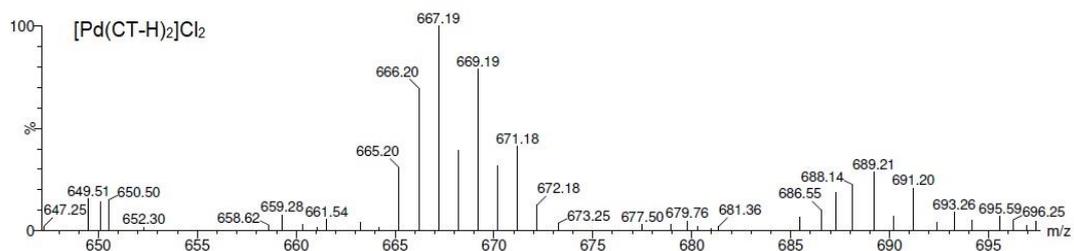
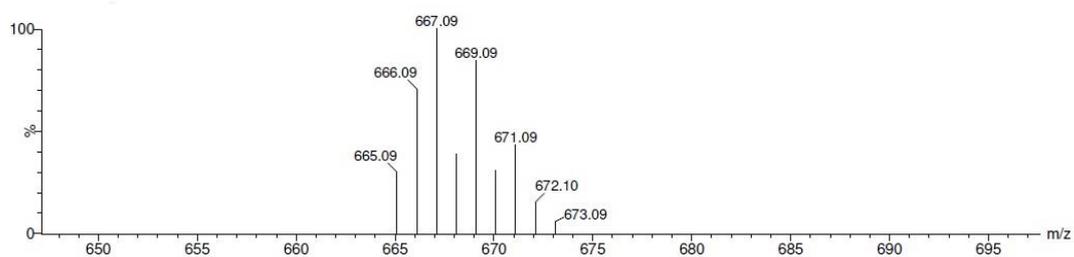


c) [Pd(CT-H)₂]d) [Pd(CT-M)₂]e) [Pd(CT-E)₂]

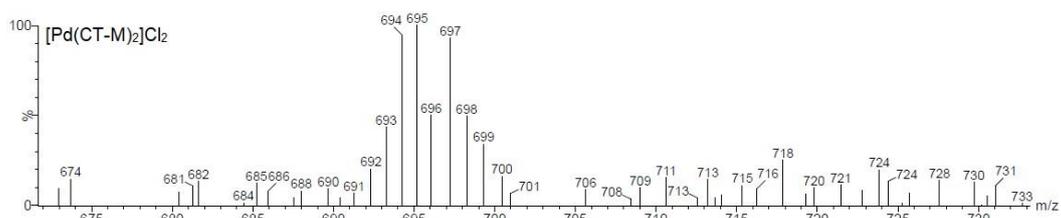
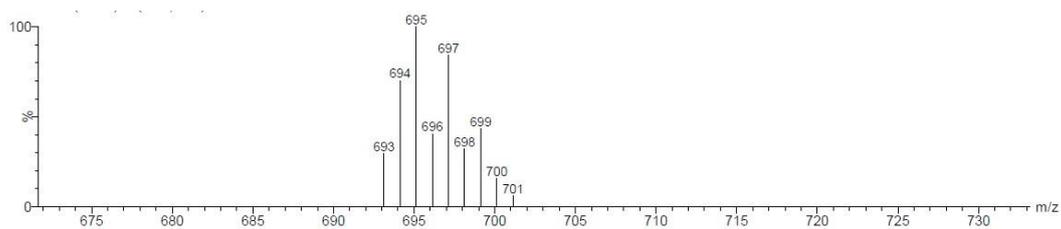
f) $[\text{Pd}(\text{BT-H})_2]\text{Cl}_2$ g) $[\text{Pd}(\text{BT-M})_2]\text{Cl}_2$ h) $[\text{Pd}(\text{BT-E})_2]\text{Cl}_2$



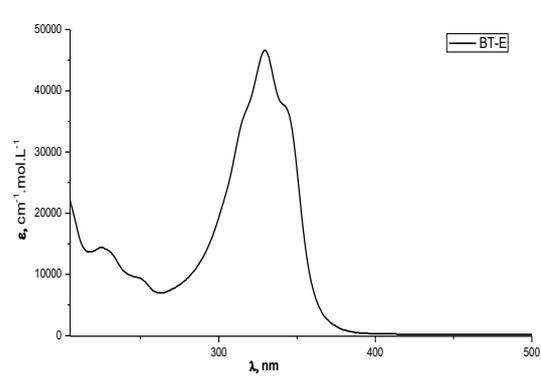
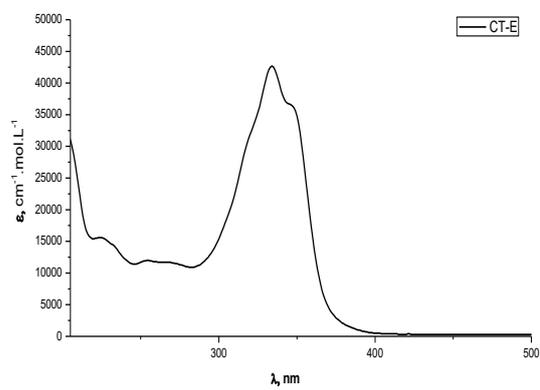
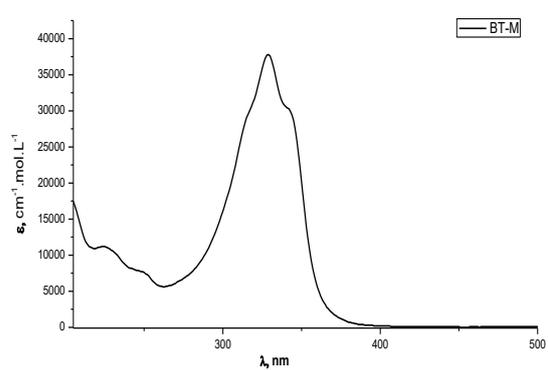
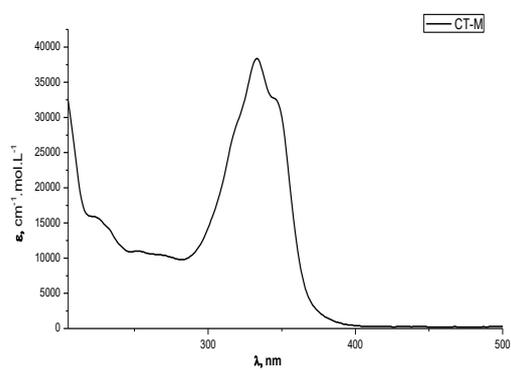
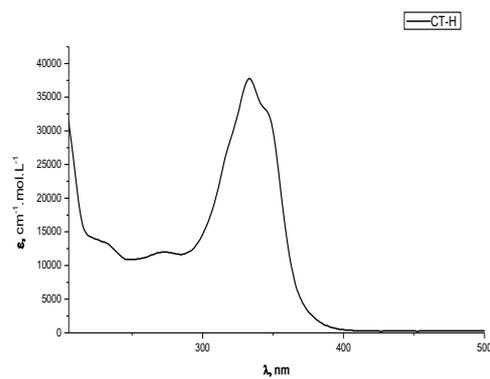
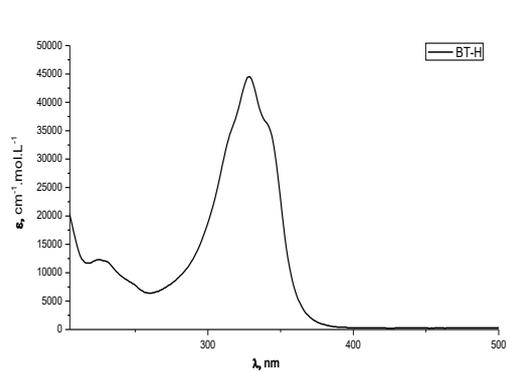
i) $[Pd(CT-H)_2]Cl_2$



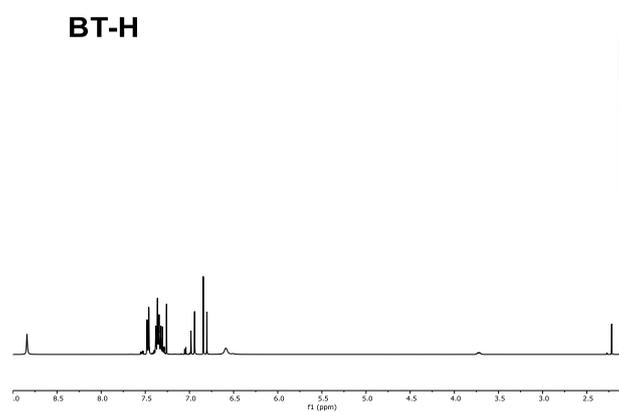
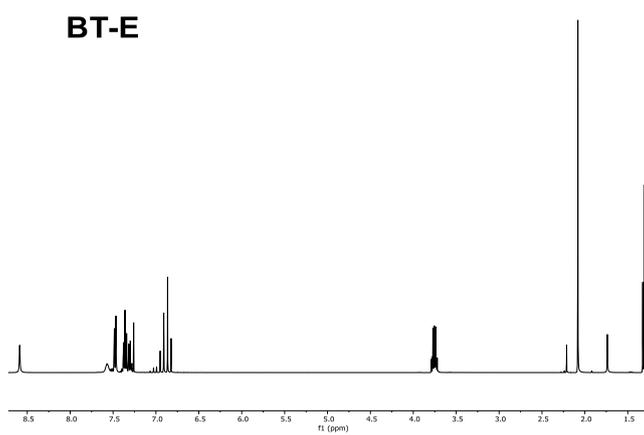
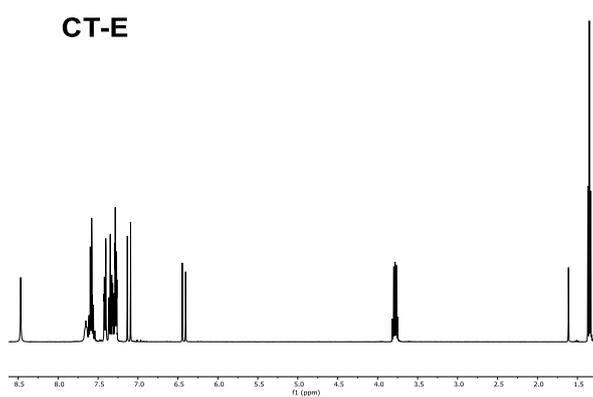
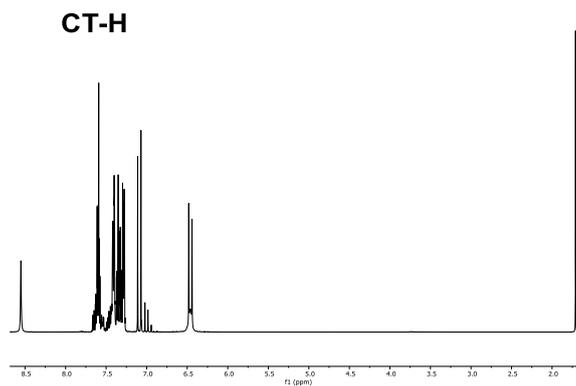
j) $[Pd(CT-M)_2]Cl_2$



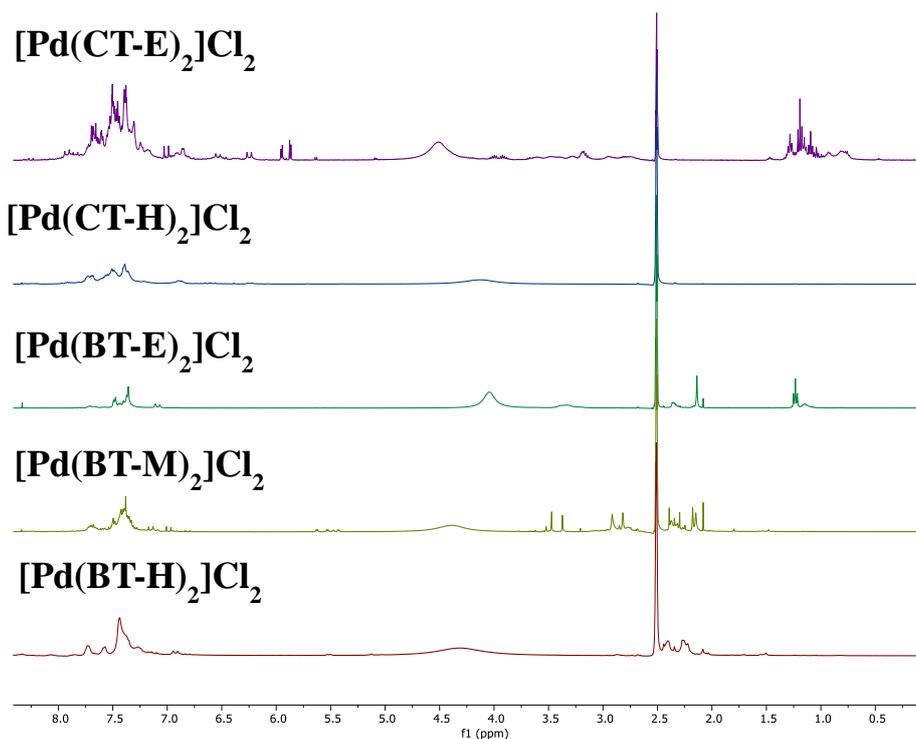
8.5 - Espectros de absorção na região do Ultravioleta-Visível para os ligantes em etanol, 10^{-5} mol.L $^{-1}$.



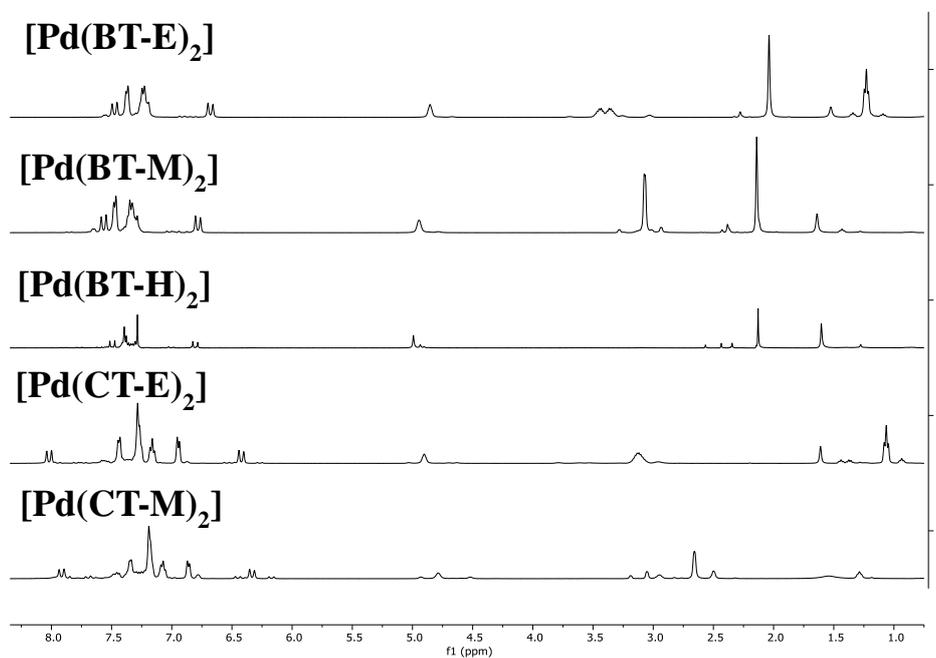
8.6 - Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio para os ligantes em CDCl_3 .



8.7- Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio para os complexos da série protonada, em DMSO- d_6 .



8.8- Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio para os complexos da série protonada, em DMSO- d_6 .



8.9.1- Dados e parâmetros da difração de Raios-X de cada composto (ligantes e complexos de Pd(II)).

	CTM	[Pd(CT-M)₂]Cl₂	BT-E	[Pd(BT-E)₂]	[Pd(CT-E)₂]	[Pd(CT-E)₂]Cl₂	[Pd(BT-M)₂]
Empirical formula	C ₃₄ H ₃₄ N ₆ S ₂	C ₃₅ H ₃₄ Cl ₅ N ₆ PdS 2	C ₁₃ H ₁₇ N ₃ S	C ₅₂ H ₆₄ N ₁₂ Pd ₂ S 4	C _{28.8} H _{28.8} N _{4.8} Pd _{0.8} S _{1.6}	C ₃₆ H ₃₈ Cl ₂ N ₆ PdS 2	C _{38.4} H _{44.8} N _{9.6} Pd _{1.6} S ₃ . 2
Formula weight	590.79	888.46	247.35	1198.19	578.58	796.14	913.67
Temperature/K	293(2)	293(2)	293(2)	293(2)	293(2)	293(2)	293(2)
Crystal system	triclinic	triclinic	monoclinic	triclinic	monoclinic	triclinic	tetragonal
Space group	P-1	P-1	P2 ₁ /c	P-1	P2 ₁ /c	P-1	I4 ₁ /a
a/Å	9.1568(4)	12.0889(4)	10.8748(8)	10.8961(4)	13.2343(4)	12.4585(4)	14.3711(2)
b/Å	11.2204(5)	12.8195(4)	7.8457(5)	13.2752(7)	11.9863(3)	13.4343(4)	14.3711(2)
c/Å	16.1819(7)	13.9702(5)	16.6475(13))	21.1768(8)	22.0713(9)	13.5032(5)	24.4762(6)
α/°	85.799(4)	93.445(3)	90	92.486(4)	90	93.913(3)	90
β/°	84.941(4)	112.922(3)	104.355(8)	95.677(3)	101.873(3)	100.199(3)	90
γ/°	75.497(4)	97.478(3)	90	113.566(4)	90	113.656(3)	90
Volume/Å³	1601.07(13))	1962.49(12)	1376.02(18))	2782.4(2)	3426.3(2)	2012.96(12)	5055.03(19)
Z	2	2	4	2	5	2	5

$\rho_{\text{calc}}/\text{cm}^3$	1.225	1.504	1.194	1.430	1.402	1.314	1.501
	CTM	[Pd(CT-M)₂]Cl₂	BT-E	[Pd(BT-E)₂]	[Pd(CT-E)₂]	[Pd(CT-E)₂]Cl₂	BT-E
μ/mm^{-1}	0.199	0.953	0.218	0.843	0.698	0.729	0.923
F(000)	624.0	900.0	528.0	1232.0	1488.0	816.0	2336.0
Crystal size/mm³	0.608 × 0.539 × 0.276	0.455 × 0.221 × 0.163	0.525 × 0.459 × 0.202	0.42 × 0.297 × 0.042	0.399 × 0.215 × 0.135	0.554 × 0.254 × 0.073	0.566 × 0.4 × 0.182
Radiation	MoK α (λ = 0.71073)	MoK α (λ = 0.71073)	MoK α (λ = 0.71073)	MoK α (λ = 0.71073)			
2θ range for data collection/°	5.526 to 54.206	5.134 to 53.988	5.548 to 53.996	5.284 to 52.998	5.238 to 53.996	5.304 to 54.204	5.67 to 51.354
Index ranges	-11 ≤ h ≤ 11, -14 ≤ k ≤ 14, -20 ≤ l ≤ 20	-15 ≤ h ≤ 15, -16 ≤ k ≤ 16, -17 ≤ l ≤ 17	-13 ≤ h ≤ 13, -9 ≤ k ≤ 10, -21 ≤ l ≤ 21	-13 ≤ h ≤ 13, -16 ≤ k ≤ 16, -26 ≤ l ≤ 26	-16 ≤ h ≤ 16, -15 ≤ k ≤ 15, -28 ≤ l ≤ 27	-15 ≤ h ≤ 15, -17 ≤ k ≤ 17, -17 ≤ l ≤ 17	-17 ≤ h ≤ 17, -17 ≤ k ≤ 17, -29 ≤ l ≤ 29
Reflections collected	35452	43136	9141	36063	38763	40421	49571
Independent reflections	7067 [R _{int} = 0.0289, R _{sigma} = 0.0200]	8551 [R _{int} = 0.0266, R _{sigma} = 0.0186]	2996 [R _{int} = 0.0239, R _{sigma} = 0.0260]	11536 [R _{int} = 0.0392, R _{sigma} = 0.0475]	7462 [R _{int} = 0.0263, R _{sigma} = 0.0191]	8889 [R _{int} = 0.0290, R _{sigma} = 0.0206]	2409 [R _{int} = 0.0237, R _{sigma} = 0.0067]
Data/restraints/parameters	7067/0/381	8551/0/444	2996/0/156	11536/0/639	7462/0/408	8889/0/426	2409/0/152
Goodness-of-fit on F²	1.043	1.152	1.053	1.147	1.170	1.066	1.190
Final R indexes [I ≥ 2σ (I)]	R ₁ = 0.0469, wR ₂ = 0.1134	R ₁ = 0.0364, wR ₂ = 0.0891	R ₁ = 0.0512, wR ₂ = 0.1230	R ₁ = 0.0425, wR ₂ = 0.0855	R ₁ = 0.0336, wR ₂ = 0.0697	R ₁ = 0.0319, wR ₂ = 0.0738	R ₁ = 0.0280, wR ₂ = 0.0645

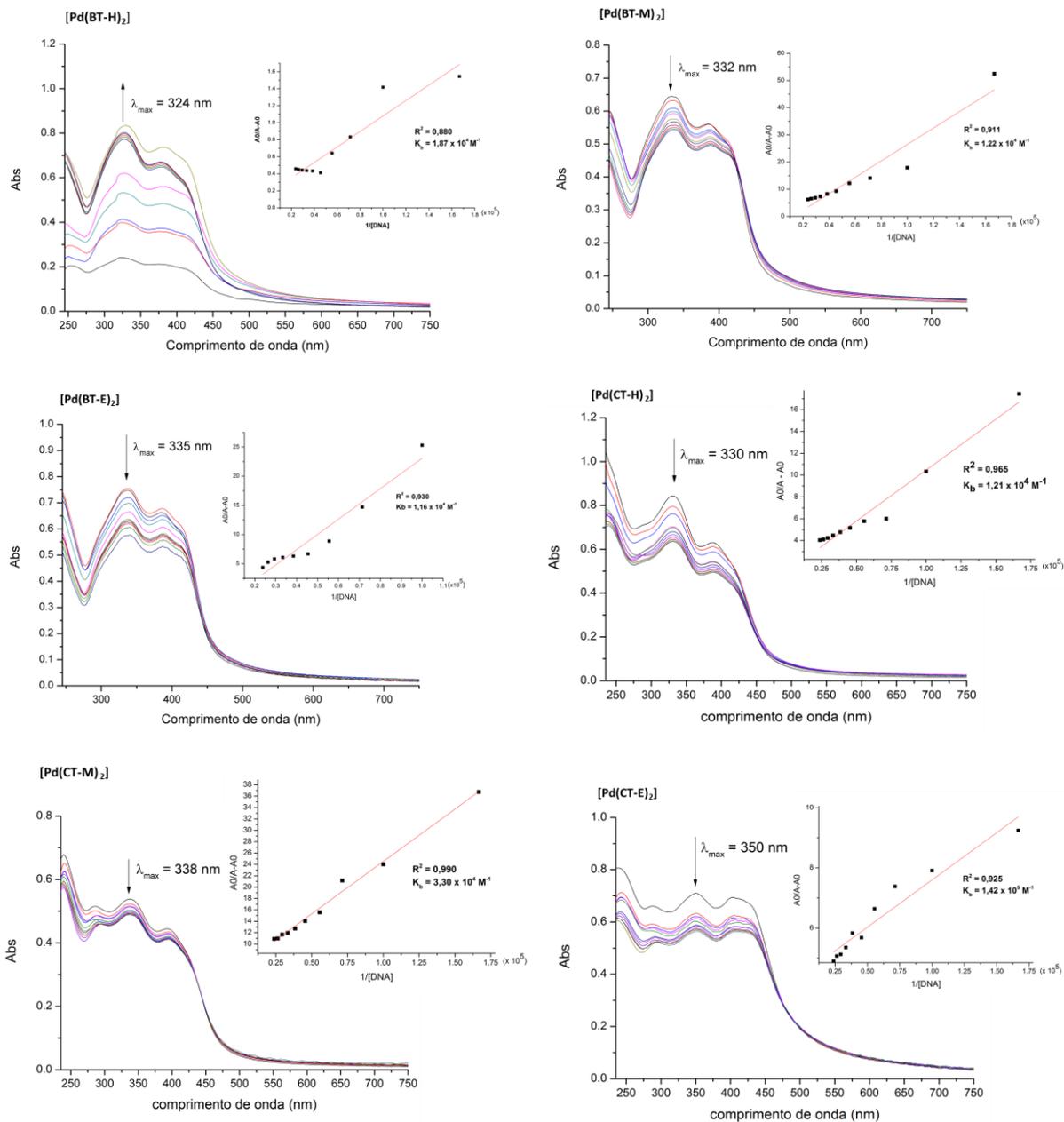
Final R indexes [all data]	R ₁ = 0.0690, wR ₂ = 0.1345	R ₁ = 0.0480, wR ₂ = 0.1041	R ₁ = 0.0701, wR ₂ = 0.1438	R ₁ = 0.0709, wR ₂ = 0.1046	R ₁ = 0.0501, wR ₂ = 0.0836	R ₁ = 0.0429, wR ₂ = 0.0826	R ₁ = 0.0355, wR ₂ = 0.0736
Largest diff. peak/hole / e Å ⁻³	0.20/-0.21	0.93/-0.49	0.22/-0.37	0.87/-0.45	0.84/-0.51	0.66/-0.39	0.34/-0.26

8.9.2 - Dados e parâmetros da difração de Raios-X do complexo de Ni(II).

	[Ni(BT-M) ₂]		[Ni(BT-M) ₂]
Empirical formula	C ₂₄ H ₂₈ N ₆ NiS ₂	μ/mm⁻¹	0.800
Formula weight	523.35	F(000)	1096.0
Temperature/K	293(2)	Crystal size/mm³	0.716 × 0.216 × 0.056
Crystal system	monoclinic	Radiation	MoKα (λ = 0.71073)
Space group	P2 ₁ /c	2θ range for data collection/°	5.154 to 54
a/Å	14.1510(7)	Index ranges	-18 ≤ h ≤ 17, -26 ≤ k ≤ 21, -12 ≤ l ≤ 13
b/Å	20.4848(12)	Reflections collected	21955
c/Å	10.4400(6)	Independent reflections	6586 [Rint = 0.0345, Rsigma = 0.0398]
α/°	90	Data/restraints/parameters	6586/0/302
β/°	92.399(5)	Goodness-of-fit on F²	1.030
γ/°	90	Final R indexes [I ≥ 2σ (I)]	R1 = 0.0420, wR2 = 0.0966

Volume/Å³	3023.7(3)	Final R indexes [all data]	R1 = 0.0654, wR2 = 0.1116
Z	4	Largest diff. peak/hole / e Å⁻³	0.31/-0.23
ρ_{calc}/g/cm³	1.150		

8.10 – Espectros obtidos na titulação espectroscópica com o DNA para a série desprotonada. Gráfico Absorbância vs Comprimento de onda dos espectros de absorção do complexo na presença de adições de ct-DNA. [Complexo] = 2×10^{-5} molL⁻¹, [DNA] = 0 - 6×10^{-5} molL⁻¹. Gráfico inserido: $A_0/(A-A_0)$ vs $1/[DNA]$.



8.11 – Espectros obtidos na titulação espectroscópica com o DNA para a série desprotonada. Gráfico Absorbância vs Comprimento de onda dos espectros de absorção do complexo na presença de adições de ct-DNA. [Complexo] = 2×10^{-5} molL⁻¹, [DNA] = 0 - 6×10^{-5} molL⁻¹. Gráfico inserido: $A_0/(A-A_0)$ vs $1/[DNA]$.

