

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Estudo da atividade anticâncer *in vitro* para complexos de Pd(II): avaliação dos substituintes dos ligantes tiossemicarbazonas”.

Mauro Almeida Lima*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA INORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha
*** bolsista CAPES**

São Carlos - SP
2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Mauro Almeida Lima, realizada em 28/02/2023.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha (UFSCar)

Profa. Dra. Heveline Silva (UFMG)

Profa. Dra. Daniela Ramos Truzzi (USP)

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza (UFSCar)

Profa. Dra. Angelina Maria Fuzer (UFSCar)

*“O verdadeiro encanto é a gentileza.
Torne-se uma boa pessoa. Isso é tudo.”*

Arataka Reigen (Mob Psycho 100)

Dedico este trabalho ao meu pai Eldison e minha mãe Marilze,
por todo o afeto, cuidado e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, aos meus pais e irmão, pelo apoio contínuo, pelo amor e carinho que vocês me dão. Agradeço a todos os integrantes das famílias Almeida e Lima.

Agradeço ao Prof. Dr. Fillipe pela oportunidade de estar sob a sua orientação. Sou grato por tudo o que aprendi com você, pelo apoio e pelas conversas.

Agradeço aos meus colegas de laboratório: Daniel, Lucas, Herrison, Vitor, Gabriela, Ludmila, George, Josias, Amos, Josenilton, Tamara, Vinicius e Fábio. Agradeço a todos pela amizade, companhia e todas as reuniões e confraternizações. Aprendi muito com todos vocês!

Agradeço aos meus amigos Andressa, Bruno, Lucas, Lewi, Tucci, e Fred pelo apoio, principalmente durante a pandemia, obrigado pela companhia em cinemas, jogos e conversas.

Agradeço a colega e Prof^a. M.Sc. Ludimila Thayane Paes Silva (IF Baiano) por disponibilizar os ligantes utilizados neste trabalho.

Agradeço ao colega e Prof. Dr. Renan Lira de Farias (PUC-Rio) e ao Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto (UNESP – Araraquara) por disponibilizar parte dos complexos de Pd(II) utilizados neste trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Produtos Naturais (UFSCar) e ao colega M.Sc. Carlos André Ferreira Moraes que realizaram os experimentos de espectrometria de massas.

Agradeço ao Laboratório de Cristalografia (USP-IFSC) e ao colega Dr. João Honorato de Araujo Neto que realizaram os experimentos de difração de raios X.

Agradeço a colega Dr^a. Gabriela Porto de Oliveira por realizar os cálculos de Superfície de Hirshfeld.

Agradeço ao colega M.Sc. George Bueno Santana Pereira e o Prof. Dr. Rafael Gomes da Silveira (IF Goiano) que realizaram os cálculos computacionais de DFT.

Agradeço ao Laboratório de Biologia do Envelhecimento (UFSCar) e as colegas Dr^a. Analu Rocha Costa e Dr^a. Leticia Pires de Oliveira por realizar as leituras no citômetro de fluxo.

Agradeço ao Laboratório de Analítica, Bioanalítica, Biossensores, Eletroanalítica e Sensores por disponibilizar o viscosímetro para realizar o experimento. Também agradeço ao colega M.Sc. Paulo Cardoso Gomes Junior pelo auxílio.

Agradeço à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Departamento de Química (DQ) por toda a infraestrutura necessária para o desenvolvimento do trabalho. A todos os professores, técnicos e profissionais comprometidos com o desenvolvimento da ciência brasileira.

Aos órgãos de fomento FAPESP, CNPq e, sobretudo, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa, pois sem ela este trabalho não teria sido realizado.

LISTA DE ABREVIATURAS

Palavra	Abreviatura
(+)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinil-1-il) propona	ICRF-187
1,1-difenil-2-picrilhidrazil	DPPH
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido desoxirribonucleico sal de sódio, <i>calf thymus</i>	<i>ct</i> -DNA
Ácido etilenodiamino tetra-acético	EDTA
Albumina de soro humano	HSA
Catepsina B	CatB
Câncer de pulmão de células não pequenas	NSCLC
Câncer de pulmão de células pequenas	SCLC
Clorofórmio- <i>d</i> ₁	CDCl ₃
Concentração inibitória de 50%	IC ₅₀
Dimetilsulfóxido	DMSO
Estágio disseminativo	ES
Espectrometria de Massas	MS
Infravermelho por transformada de Fourier	FTIR
N -Etil-2-(1-fenil-3-fenilprop-2-en-1-ilideno) hidrazinacarbotoamida	L-C3
N -Metil-2-(1-fenil-3-fenilprop-2-en-1-ilideno)hidrazinacarbotoamida	L-C2
N-2-(1-fenil-3-fenilprop-2-en-1-ilideno)hidrazinacarbotoamida	L-C1
N-2-(1-metil-3-fenilprop-2-en-1-ilideno)hidrazinacarbotoamida	L-B1
N-Etil -2-(1-metil-3-fenilprop-2-en-1-ilideno)hidrazinacarbotoamida	L-B3
Ressonância magnética nuclear	RMN
Topoisomerase II β	TOPOII β
Topoisomerase II α	TOPOII α
Trifenilfosfina	PPh ₃
<i>Quadrupole Time-of-Flight</i>	qTOF
UV-Visível	UV-Vis
<i>Ligand-to-metal charge-transfer</i>	LMCT
<i>Metal-to-ligand charge-transfer</i>	MLCT

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Expressão gênica de TOPOII α e TOPOII β por ensaios de proteção de nuclease.	9
TABELA 3.1 - Reagentes e suas respectivas procedências.....	23
TABELA 3.2 - Parâmetros empregados para a ionização.	27
TABELA 3.3 - Valores das concentrações das frações de IC ₅₀ utilizados.	30
TABELA 4.1 - Parâmetros empregados para a ionização.	59
TABELA 4.2 - Comparação das massas teóricas e das massas obtidas por espectrometria de massas para os complexos de Pd(II).....	60
TABELA 4.3 - Valores das principais distâncias e ângulos de ligação obtidos através das estruturas tridimensionais obtidas.	62
TABELA 4.4 - Comparação entre a conformação observada para os complexos de Pd(II) a partir das estruturas difratadas.	65
TABELA 4.5 - Comparação entre os ângulos e distâncias de ligação da estrutura experimental obtida por DRX e da estrutura otimizada através do DFT.....	71
TABELA 4.6 - Descritores relativos calculados via TD-DFT para os complexos PdC3-CI e PdC3-DMSO	72
TABELA 4.7 - Valores médios das concentrações de IC ₅₀ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) \pm desvio padrão. Ensaio realizado em 48 h de incubação dos compostos para as linhagens celulares de mama humana MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3 e MFC-10A. O experimento foi realizado em três triplicatas.	75
TABELA 4.8 - Valores médios das concentrações de IC ₅₀ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) \pm desvio padrão. Ensaio realizado em 48 h de incubação dos compostos para as linhagens celulares de ovário tumoral A2780 e A2780cis, com o valor do Fator de Resistência (F _R). O experimento foi realizado em três triplicatas.....	77
TABELA 4.9 - Valores médios das concentrações de IC ₅₀ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) \pm desvio padrão. Ensaio realizado em 48 h de incubação dos compostos para as linhagens celulares A549, MRC5 e A375. O experimento foi realizado em três triplicatas.	79
TABELA 4.10 - Índice de seletividade (SI*) em relação à linhagem não tumoral MRC5.	80
TABELA 4.11 - Valores calculados de K _b ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$) para os complexos sintetizados e os valores do coeficiente de determinação (R ²).	91

TABELA 4.12 - Dados calculados a partir da supressão de fluorescência da HSA pelos complexos PdA1 , PdB1 e PdC1	95
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Esquema da divisão celular normal. ³ (Adaptado) (Criado utilizando-se a plataforma biorender.com).....	1
FIGURA 1.2 - Esquema da progressão das células cancerosas. ^{3,5} (Adaptado) (Criado utilizando-se a plataforma biorender.com).....	2
FIGURA 1.3 - Estimativas da OMS para novos casos de câncer e mortes, no ano de 2020, para todas as idades e sexos. ⁷ (Adaptado)	3
FIGURA 1.4 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2022 por sexo, exceto pele não melanoma. ¹⁰ (Adaptado)	3
FIGURA 1.5 - (A) Ativação da cisplatina pela troca dos Cl ⁻ por H ₂ O quando a cisplatina entra na célula. (B) Principais interações entre cisplatina e DNA com as respectivas porcentagens da frequência do tipo de ligação. ²² (Adaptado).....	5
FIGURA 1.6 - Estrutura dos metalofármacos de platina com as respectivas datas em que foram iniciados os estudos em ensaios clínicos. ^{19,27} (Adaptado)	6
FIGURA 1.7 - Estrutura do complexo de Pd(II) Tookad, aprovado para terapia fotodinâmica.	7
FIGURA 1.8 - Estruturas tridimensionais das enzimas TOPOII α (7QFN) e TOPOII β (1ZXN), disponibilizadas pelo banco de dados RCSB PDB (RCSB.org). ^{48,49} (Adaptado)	9
FIGURA 1.9 - Estrutura do etoposídeo, doxorubicina e mitoxantrona. ^{52,53} (Adaptado)	10
FIGURA 1.10 - Ciclo catalítico da enzima DNA-Topoisomerase II; representação esquemática da enzima está destacada em um círculo vermelho. O ciclo inicia-se com a aproximação e ligação da enzima às duas duplas fitas do DNA, aos segmentos G em verde e ao segmento T em vermelho (etapa 1). Em seguida, duas moléculas de ATP são inseridas no domínio da ATPase, destacado em verde (etapa 2). O segmento G é clivado (etapa 3), e o segmento T é transportado através do segmento G clivado, e há a hidrólise de um ATP (etapa 4). O segmento G é religado, e a segunda molécula de ATP é hidrolisada (etapa 5). Há a dissociação das moléculas de ADP e a abertura da enzima para o transporte do segmento T através do terminal C (etapa 6). Por fim, há a dissociação da enzima do DNA (etapa 7). ^{51,52} (Adaptado) (Criado utilizando-se a plataforma biorender.com).....	11

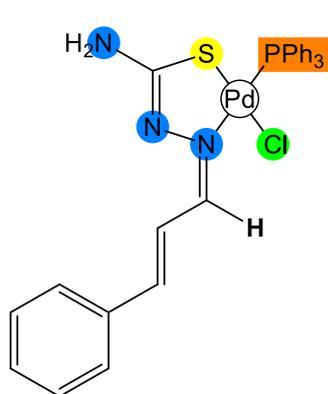
FIGURA 1.11 - Estruturas dos complexos apresentados por Zeglis e colaboradores. ⁶² (Adaptado).....	13
FIGURA 1.12 - Estrutura dos complexos de Pd(II) apresentados por Rocha e colaboradores. ⁶⁷	14
FIGURA 1.13 - (A) Estrutura genérica para os complexos de oxorênio (V) e suas respectivas geometrias. (B) Ataque nucleofílico de um tiol ao complexo com geometria pirâmide de base quadrada.	15
FIGURA 1.14 - Reação de condensação para a formação de uma tiossemicarbazona.	17
FIGURA 1.15 - Estrutura química dos complexos metálicos de Pd(II) com indicações de cada fragmento e sua função.	18
FIGURA 3.1 - Reação de redução mitocondrial do MTT e formação do Formazan. 30	
FIGURA 3.2 - Representação estrutural do DPPH.....	33
FIGURA 3.3 - Esquema da reação catalisada pela Catepsina B.....	38
FIGURA 4.1 - Esquema de reação na formação dos complexos de Pd(II).	39
FIGURA 4.2 - Proposta estrutural para os complexos de Pd(II).	40
FIGURA 4.3 - Espectros de RMN ¹ H (400 MHz) em <i>d</i> -CDCl ₃ para os complexos de Pd(II) linha 1 (PdB1), linha 2 (PdB3), linha 3 (PdC1), linha 4 (PdC2) e linha 5 (PdC3).	41
FIGURA 4.4 - Representação detalhada da estrutura com composto PdC3	42
FIGURA 4.5 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) em <i>d</i> -CDCl ₃ para o complexo PdC3 , com as atribuições para os sinais.....	42
FIGURA 4.6 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) em <i>d</i> -CDCl ₃ ampliado do complexo PdC3 , em que 10,27 ppm apresenta o sinal referente ao grupo H-N(3), e em 3,29 ppm apresenta o sinal referente ao CH ₂ (17) com o diagrama (árvore de Pascal) e os respectivos valores das constantes de acoplamento incorporados ao espectro.	43
FIGURA 4.7 - Espectros de RMN ¹ H (400 MHz) em <i>d</i> -CDCl ₃ do ligante L-C3 (1) e do complexo PdC3 (2), com indicação dos deslocamentos dos sinais vinílicos.	44
FIGURA 4.8 - Experimento bidimensional ¹ H- ¹ H COSY para o complexo PdC3 em <i>d</i> - CDCl ₃ com os principais sinais atribuídos e destacados sobre o espectro.	45
FIGURA 4.9 - Espectro de RMN ¹³ C em <i>d</i> -CDCl ₃ para o complexo PdC3 com sinais atribuídos e ampliação da região de 127 a 135 ppm.....	46
FIGURA 4.10 - Espectro de RMN ¹³ C DEPT-135 em <i>d</i> -CDCl ₃ para o complexo PdC3	47

FIGURA 4.11 - Experimento bidimensional ^1H - ^{13}C HSQC para o complexo PdC3 em $d\text{-CDCl}_3$, com os principais sinais atribuídos e destacados sobre o espectro.....	48
FIGURA 4.12 - Espectros de RMN ^{31}P em $d_6\text{-DMSO}$ para os complexos de Pd(II) linha 1 (PdB1), linha 2 (PdB3), linha 3 (PdC1), linha 4 (PdC2) e linha 5 (PdC3).....	49
FIGURA 4.13 - Espectros de RMN ^{31}P em $d_6\text{-DMSO}$ para o complexo de PdB3 nos tempos de 0 (1), 24 (2) e 48 h (3).....	50
FIGURA 4.14 - Espectro vibracional de FTIR em Csl para os complexos PdB1 , PdB3 , PdC1 , PdC2 e PdC3 entre 4400 – 250 cm^{-1}	51
FIGURA 4.15 - Espectro vibracional de FTIR em Csl para o ligante L-C1 e o complexo PdC1 entre 4000 – 250 cm^{-1}	52
FIGURA 4.16 - Espectros de absorção na região do UV-Visível para os complexos PdB1 (A) e PdB3 (B) em DMSO nos tempos de 0, 24, 48 h e sete dias e os ligantes L-B1 (A) e L-B3 (B) em etanol.	54
FIGURA 4.17 - Representação das ligações σ e π com indicação ao sentido da transferência eletrônica entre o centro metálico e o ligante.	54
FIGURA 4.18 - Espectros de absorção na região do UV-Visível para os complexos PdC1 (A), PdC2 (B) e PdC3 (C) em DMSO.....	56
FIGURA 4.19 - Espectros de absorção na região do UV-Visível para o complexo PdC3 em diclorometano (A), metanol (B) e DMSO(C).	58
FIGURA 4.20 - Espectro de massas para o complexo PdB1	60
FIGURA 4.21 - Representações estruturais tridimensionais do ligante L-A1 e do complexo PdA1 obtidas para os respectivos monocristais, elipsoides de 50% de probabilidade térmica.	61
FIGURA 4.22 - Comparação entre as distâncias das ligações C(10)-S e C(10)-N quando o complexo PdC3 está na forma $[\text{Pd}(\text{H-L})]^+$ (PdC3-CI) ou $[\text{PdL}]$ (PdC3-DMSO).....	63
FIGURA 4.23 - Representações estruturais tridimensionais do complexo PdC3 obtidas para os respectivos monocristais, elipsoides de 50% de probabilidade térmica. A. PdC3-CI (PdH-L^+) cristalizado em Acetonitrila/Clorofórmio. B. PdC3-DMSO (PdL) cristalizado em DMSO.....	64
FIGURA 4.24 - Representações estruturais tridimensionais dos complexos PdB1 e PdB2 obtidas para os respectivos monocristais, elipsoides de 50% de probabilidade térmica.....	66

FIGURA 4.25 - Representação estrutural do complexo PdC3 e a numeração utilizada.	67
FIGURA 4.26 - Superfície d_{norm} ao redor da unidade assimétrica do composto PdC3-CI : (A) grupos envolvidos em interações intermoleculares mais fortes representados nas regiões de coloração vermelha; e (B) regiões em vermelho menos intensas.	68
FIGURA 4.27 - Representação da impressão digital bidimensional da superfície de Hirshfeld para o composto PdC3-CI , contendo os contatos mais significativos para o empacotamento cristalino.....	69
FIGURA 4.28 - Superfície d_{norm} ao redor da unidade assimétrica do composto PdC3-DMSO : (A) grupos envolvidos em interações intermoleculares mais fortes representados nas regiões de coloração vermelha; e (B) regiões em vermelho menos intensas.	70
FIGURA 4.29 - Espectros teóricos para as estruturas PdC3-CI e PdC3-DMSO comparados com os espectros experimentais do composto PdC3 em 0 h em uma semana em solução.	73
FIGURA 4.30 - Gráficos do $\log IC_{50}$ versus a massa molar (g/mol) com compostos.	78
FIGURA 4.31 - Fotografias do ensaio clonegênico realizado com células A2780cis (600 células/poço), as células foram incubadas na presença dos complexos PdA1 , PdB2 e PdC1 em diferentes frações do IC_{50} . Foram cinco dias de tratamento com os complexos e cinco dias de cultivo pós-tratamento.	82
FIGURA 4.32 - (A) Gráfico em barras das médias das áreas de colônias e (B) gráfico do número de colônias observadas para a célula A2780cis com o tratamento dos compostos em concentração em razão do IC_{50} de cada complexo (** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$).....	83
FIGURA 4.33 - Ilustração de (A) uma célula viável e aderida ao substrato, (B) uma célula viável suspensa, (C) corpos apoptóticos e (D) apoptose tardia ou necrose. ¹²⁵ (Adaptado) (Criado utilizando-se a plataforma biorender.com)	84
FIGURA 4.34 - Fotografias do ensaio morfológico ao fim da incubação de 30 h para os compostos testados em diferentes concentrações. Linhagem A2780cis.....	85
FIGURA 4.35 - Gráfico da área da ferida (%) versus o tempo para cada um dos compostos testados em frações do IC_{50} (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).	86
FIGURA 4.36 - Fotografias do ensaio de migração celular nos tempos 0 h e 30 h após a adição dos compostos em diferentes concentrações. Linhagem A2780cis.....	87

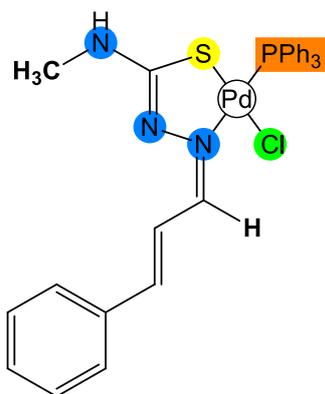
FIGURA 4.37 - i) Gráficos da dispersão das células em diferentes fases do ciclo celular para diferentes concentrações do complexo PdA1 . ii) Gráfico em barras das porcentagens obtidas das dispersões em cada concentração do complexo PdA1 . Linhagem A2780cis(*p<0,05).	88
FIGURA 4.38 - Atividade antioxidante (%) dos complexos PdA1 , PdB1 , PdC1 e AA em diferentes concentrações ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).	89
FIGURA 4.39 - Espectros de absorção do complexo PdB1 com a titulação de alíquotas de DNA na região do UV-Vis. $R = 100 \times [\text{DNA}]/[\text{Complexo}]$	90
FIGURA 4.40 - Espectros da supressão de fluorescência do complexo DNA-Hoechst com o aumento da concentração com o composto PdA1 . Espectros foram obtidos a 25°C (A) e 37°C (B).	92
FIGURA 4.41 - Viscosidade relativa do <i>ct</i> -DNA ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) na presença dos complexos de Pd(II), do padrão tiazol laranja (TO) e cisplatina (CDDP) nas diferentes razões molares $[\text{composto}]/[\text{DNA}] = 0,06; 0,13; 0,20; 0,26, 0,33$ e $0,40$	93
FIGURA 4.42 - Espectros da supressão de fluorescência da HSA pelo aumento da concentração do complexo PdA1 em diferentes temperaturas (25, 29, 33 e 37°C). 94	
FIGURA 4.43 - Fotografia do gel de agarose. 1% (m/v) do ensaio de inibição da enzima TOPOII α para os complexos PdA1 , PdA2 e PdA3 nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	97
FIGURA 4.44 - Fotografia do gel de agarose. 1% (m/v) do ensaio de inibição da enzima TOPOII β para os complexos PdA1 , PdA2 e PdA3 nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	98
FIGURA 4.45 - Gráfico das intensidades relativas obtidas no ensaio de inibição da Catepsina B para o complexo PdC1 na concentração de $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	100

ESTRUTURAS E MASSAS MOLECULARES



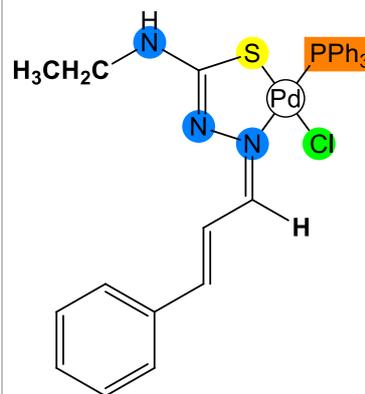
PdA1

$C_{28}H_{26}ClN_3PPdS$
M.M.: 608,43 g/mol



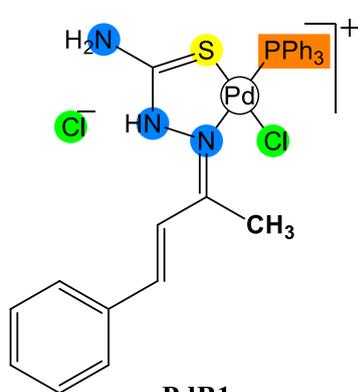
PdA2

$C_{29}H_{28}ClN_3PPdS$
M.M.: 622,45 g/mol



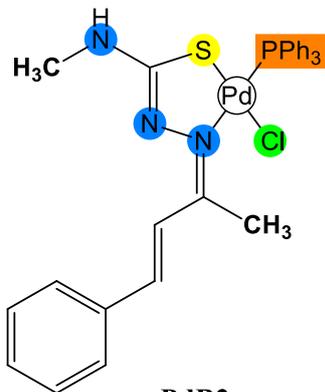
PdA3

$C_{30}H_{30}ClN_3PPdS$
M.M.: 636,48 g/mol



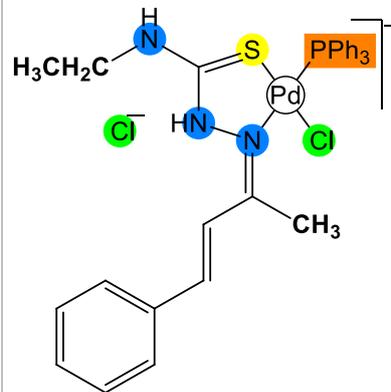
PdB1

$C_{29}H_{28}Cl_2N_3PPdS$
M.M.: 658,92 g/mol



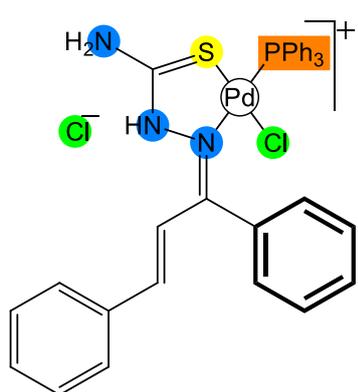
PdB2

$C_{30}H_{29}ClN_3PPdS$
M.M.: 636,48 g/mol



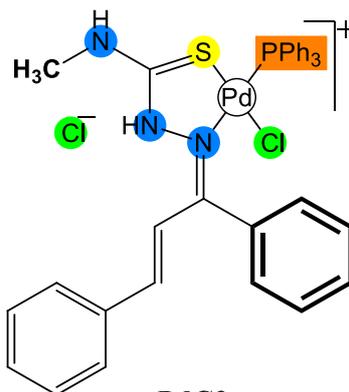
PdB3

$C_{31}H_{32}Cl_2N_3PPdS$
M.M.: 686,97 g/mol



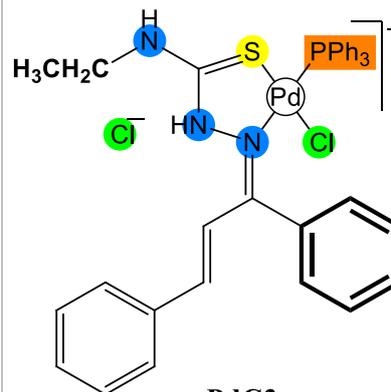
PdC1

$C_{34}H_{30}Cl_2N_3PPdS$
M.M.: 721,00 g/mol



PdC2

$C_{35}H_{32}Cl_2N_3PPdS$
M.M.: 735,01 g/mol



PdC3

$C_{36}H_{34}Cl_2N_3PPdS$
M.M.: 749,04 g/mol

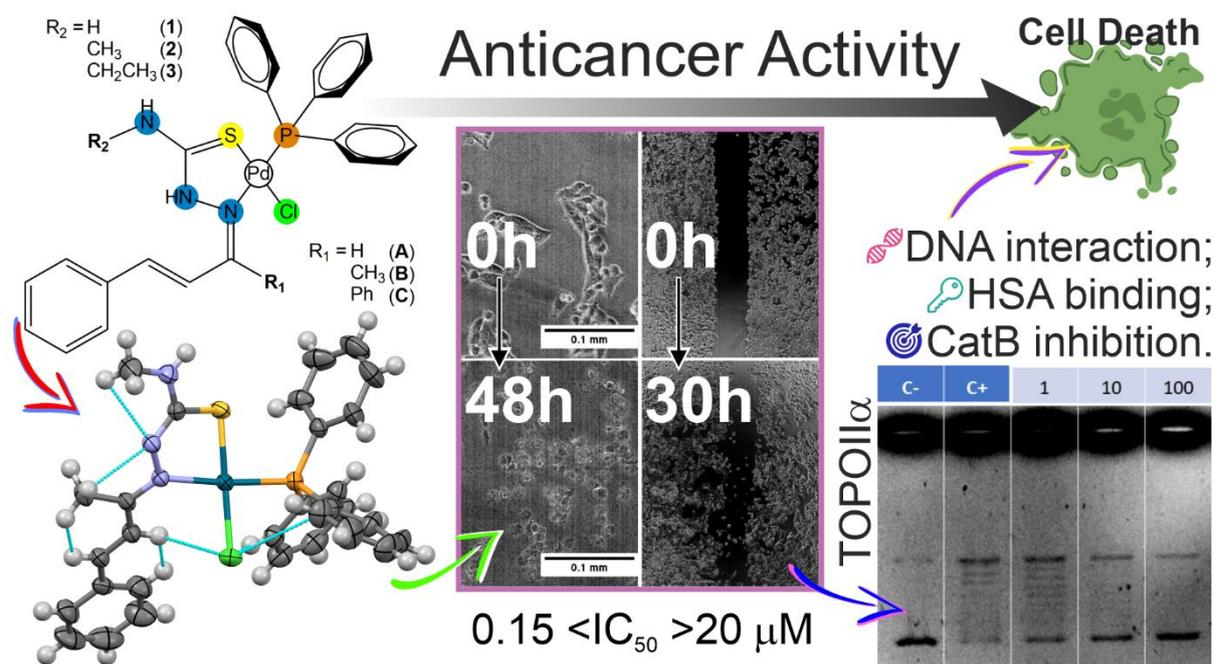
RESUMO

“ESTUDO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER *IN VITRO* PARA COMPLEXOS DE Pd(II): AVALIAÇÃO DOS SUBSTITUINTES DOS LIGANTES TIOSSEMICARBAZONAS.” O câncer é um grupo de doenças de importância global. Em razão disso, realiza-se pesquisas para aprimorar as terapias já existentes e novas terapias. Fármacos à base de Pt(II) destacam-se no tratamento e atuam, principalmente, sobre o DNA. Existem outros alvos biológicos, como as enzimas topoisomerasas, que atuam na replicação do DNA e encontram-se superexpressas em tumores, e a enzima cathepsina B, que está associada à progressão do câncer. Em razão disso, o presente trabalho se dispôs a estudar complexos de Pd(II) como possíveis inibidores enzimáticos e a avaliar o seu potencial anticâncer através de ensaios celulares *in vitro*. Foram reunidos nove complexos de Pd(II): cinco sintetizados neste trabalho, e quatro por colaboradores. Todos os compostos são formados por trifenilfosfina e tiossemicarbazonas, com estrutura genérica $[PdCl(PPh_3)(TSC)]$. Os complexos sintetizados foram caracterizados pelas técnicas de RMN (1H , ^{13}C e ^{31}P), FTIR, UV-Vis, espectrometria de massas e difração de raios X, uma vez que foram obtidos diversos monocristais. Foram realizados ensaios de citotoxicidade dos compostos nas seguintes linhagens celulares: A2780, A2780cis, MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3, MCF10-A, A549, MRC5 e A375, entre as quais os complexos da família **B** foram significativamente mais ativos nas linhagens de ovário ($IC_{50} < 1 \mu M$) e mama ($IC_{50} \sim 2 \mu M$). É importante destacar que os complexos se apresentaram mais ativos que a cisplatina e obtiveram altos índices de seletividade. Adicionalmente, foram realizados ensaios de sobrevivência clonogênica, morfologia, migração e ciclo celular, através dos quais observou-se dois perfis de atividade: citotóxico e citostático. Os complexos de Pd(II) pouco interagiram com o DNA, predominando as interações eletrostáticas, e atuaram frente à HSA pelo mecanismo intermediário-estático. A inibição da TOPOII α foi observada apenas para os complexos **PdA1**, **PdA2** e **PdA3**, os quais apresentam um perfil de inibidor catalítico da enzima, uma vez que não atuaram sobre a isoforma beta (TOPOII β). O complexo **PdC1** apresentou maior potencial de inibição da CatB. Sendo assim, as três famílias de complexos apresentaram características únicas, sendo que cada uma se destacou em uma parte da pesquisa, como a inibição catalítica da TOPOII α (**A**), alta citotoxicidade frente às linhagens tumorais de mama e ovário (**B**) e capacidade de inibir a enzima CatB (**C**). Por fim, demonstrou-se que os complexos de Pd(II) apresentaram-se como potenciais agentes antineoplásicos.

ABSTRACT

“STUDY OF IN VITRO ANTICANCER ACTIVITY FOR Pd(II) COMPLEXES: EVALUATION OF SUBSTITUENTS FOR THIOSEMICARBAZONE LIGANDS”. The group of cancer diseases has health global importance; therefore, research is developing out to improve existing therapies and new therapies. The drugs of Pt(II) bases are notably in cancer treatment and act on DNA structure. Other biological targets to cancer treatment are the topoisomerases enzymes, act in DNA replication and are overexpressed in tumors, and the cathepsin B enzyme, stimulate the cancer progression. Hence, the present work had proposed to study Pd(II) complexes as enzymatic inhibitors and to evaluate their anticancer potential through *in vitro* cell assays. Nine Pd(II) complexes were collected: 5 synthesized in this work and 4 by collaborators. All compounds are formed by triphenylphosphine and thiosemicarbazones, with generic structure [PdCl(PPh₃)(TSC)]. The synthesized complexes were characterized by the techniques of NMR (¹H, ¹³C and ³¹P), FTIR, UV-Vis, mass spectrometry and X-ray diffraction, since several single crystals were obtained. Cytotoxicity assays of the compounds were performed in cell lines: A2780, A2780cis, MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3, MCF10-A, A549, MRC5 and A375 among which, the complexes of the **B** family were significantly more active in ovarian cells (IC₅₀<1 μM) and breast cells (IC₅₀~2 μM). A highlight of this assay was the complexes were more active than cisplatin and had high selectivity index (SI). In addition, the clonogenic survival, morphology, migration, and cell cycle assays were performed, through which two activity profiles were observed: cytotoxic and cytostatic. The Pd(II) complexes low interacted with DNA, were observed electrostatic interactions, and assay with HSA demonstrated an intermediate-static mechanism. Inhibition of TOPOIIα was observed only for the complexes **PdA1**, **PdA2** and **PdA3** which have a catalytic inhibitor profile, since they did not act on the beta isoform (TOPOIIβ). The **PdC1** complex showed greater potential for CatB inhibition. Thus, the three families of complexes presented unique characteristics, and each one stood out in one part of the research, such as: catalytic inhibition of TOPOIIα (**A**), high cytotoxicity against breast and ovarian tumor lines (**B**), and ability to inhibit the enzyme CatB (**C**). Finally, it was demonstrated that Pd(II) complexes were presented as potential antineoplastic agents.

GRAPHICAL ABSTRACT



Sumário

1 -	Introdução	1
1.1 -	Câncer.....	1
1.2 -	Tratamento e metalofármacos	4
1.3 -	Enzimas DNA-Topoisomerase	8
1.4 -	Enzima Catepsina B.....	14
1.5 -	Justificativa e Planejamento estrutural	16
2 -	Objetivos	21
2.1 -	Objetivo geral	21
2.2 -	Objetivos Específicos	21
3 -	Parte Experimental.....	23
3.1 -	Materiais.....	23
3.2 -	Síntese	24
3.2.1 -	Síntese do precursor de paládio [PdCl ₂ (CH ₃ CN) ₂]	24
3.2.2 -	Síntese dos complexos paládio	24
3.3 -	Técnicas de caracterização.....	25
3.3.1 -	Ressonância magnética nuclear.....	25
3.3.2 -	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	26
3.3.3 -	Espectroscopia eletrônica de absorção molecular na região do UV-Visível	26
3.3.4 -	Espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-QToF-MS/MS) ..	26
3.3.5 -	Difração de Raios X por monocristal	27
3.3.6 -	Superfície de Hirshfeld	28
3.3.7 -	Cálculos computacionais	28
3.4 -	Ensaio com cultura celular (<i>in vitro</i>)	28
3.4.1 -	Viabilidade celular (IC ₅₀).....	29
3.4.2 -	Ensaio de sobrevivência clonogênica.....	30
3.4.3 -	Ensaio de morfologia celular	31

3.4.4 -	Ensaio de migração celular “ <i>Wound Healing</i> ”.....	31
3.4.5 -	Análise do ciclo celular	32
3.5 -	Atividade antioxidante (DPPH).....	32
3.6 -	Ensaio de interação com biomoléculas	33
3.6.1 -	Interação com DNA: titulação espectroscópica com <i>ct</i> -DNA.....	33
3.6.2 -	Interação com DNA: deslocamento de Hoechst (<i>ct</i> -DNA)	34
3.6.3 -	Interação com DNA: avaliação por viscosidade (<i>ct</i> -DNA)	34
3.6.4 -	Interação com HSA: supressão de fluorescência.....	35
3.6.5 -	Ensaio de inibição enzimática: DNA-Topoisomerase II	36
3.6.6 -	Ensaio de inibição enzimática: Catepsina B.....	37
3.7 -	Análise estatística	38
4 -	Resultados e discussão	39
4.1 -	Síntese e caracterização dos complexos metálicos.....	39
4.1.1 -	Ressonância magnética nuclear.....	40
4.1.2 -	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR)	50
4.1.3 -	Espectroscopia eletrônica de absorção molecular na região do UV-Visível	52
4.1.4 -	Espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-QToF-MS/MS) ..	59
4.1.5 -	Difração de raios X.....	60
4.1.6 -	Superfície de Hirshfeld (HS).....	66
4.1.7 -	Cálculos computacionais.....	70
4.2 -	Ensaio com linhagens celulares	74
4.2.1 -	Viabilidade celular (IC ₅₀).....	74
4.2.2 -	Ensaio de sobrevivência clonogênica.....	81
4.2.3 -	Ensaio de morfologia celular	84
4.2.4 -	Ensaio de migração celular (<i>Wound Healing</i>).....	86
4.2.5 -	Avaliação do ciclo celular	87
4.3 -	Atividade antioxidante (DPPH).....	88

4.4 -	Ensaio de interação com biomoléculas	89
4.4.1 -	Interação com DNA: titulação espectroscópica com <i>ct</i> -DNA	89
4.4.2 -	Interação com DNA: deslocamento de Hoechst (<i>ct</i> -DNA)	91
4.4.3 -	Interação com DNA: avaliação por viscosidade (<i>ct</i> -DNA)	92
4.4.4 -	Interação com HSA: supressão de fluorescência	93
4.4.5 -	Ensaio de inibição enzimática: DNA-Topoisomerase II	96
4.4.6 -	Ensaio de inibição enzimática: Catepsina B	99
5 -	Considerações finais	101
5.1 -	Conclusões	101
6 -	Referências	105
7 -	Apêndices	123

1 - Introdução

1.1 - Câncer

As doenças classificadas como cânceres possuem em comum a presença de células malignas, ou seja, células que perderam o seu comportamento normal e multiplicam-se indefinidamente, atrapalhando o funcionamento natural dos tecidos. Essas células podem formar tumores sólidos e espalham-se pelo corpo. Cada tipo de câncer está associado a um tecido de origem que irá determinar algumas características da doença.¹

O crescimento celular sadio é gerido por diversos fatores que comunicam às células normais quando devem se reproduzir. Esse processo de divisão celular possui etapas de preparação, síntese (proteínas, ácidos nucleicos e outros) e verificação. Quando essas etapas funcionam bem, duas novas células são formadas, e, caso algum erro aconteça no processo, a própria célula inicia seu processo de apoptose, impedindo a propagação do erro (FIGURA 1.1).²

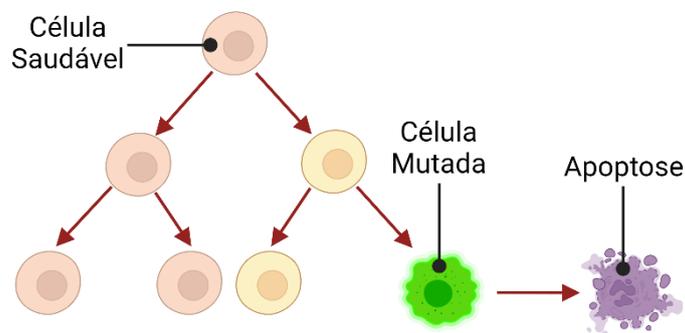


FIGURA 1.1 - Esquema da divisão celular normal.³ (Adaptado) (Criado utilizando-se a plataforma biorender.com)

Já as células neoplásicas são aquelas que, devido a alguma alteração do seu material genético, têm seu metabolismo alterado. As mutações impedem que a célula faça a apoptose, e ela começa a se multiplicar indefinidamente. Essa reprodução desordenada propaga as mutações e acumula mais defeitos ao material genético celular.⁴ As células neoplásicas, geralmente, são classificadas entre benignas e malignas; as malignas, por sua vez, são nomeadas de câncer. Uma das grandes diferenças entre essas duas classes é a capacidade das células cancerosas

de se desprenderem do tecido original e espalharem-se pelo organismo – essa etapa de migração é conhecida por metástase.¹

O descontrole da multiplicação das células cancerosas está associado às mutações, que vão se acumulando no material genético das células. Isso as torna insensíveis aos sinais de supressão de crescimento, desse modo, gera-se a imortalização replicada. As células vão se multiplicando indefinidamente e não realizam a apoptose. Complementarmente, essa massa celular pode fomentar o processo de angiogênese, que é a formação de novos vasos sanguíneos, o que pode auxiliar a desregulação metabólica, endócrina, imunológica, entre outras (FIGURA 1.2).¹

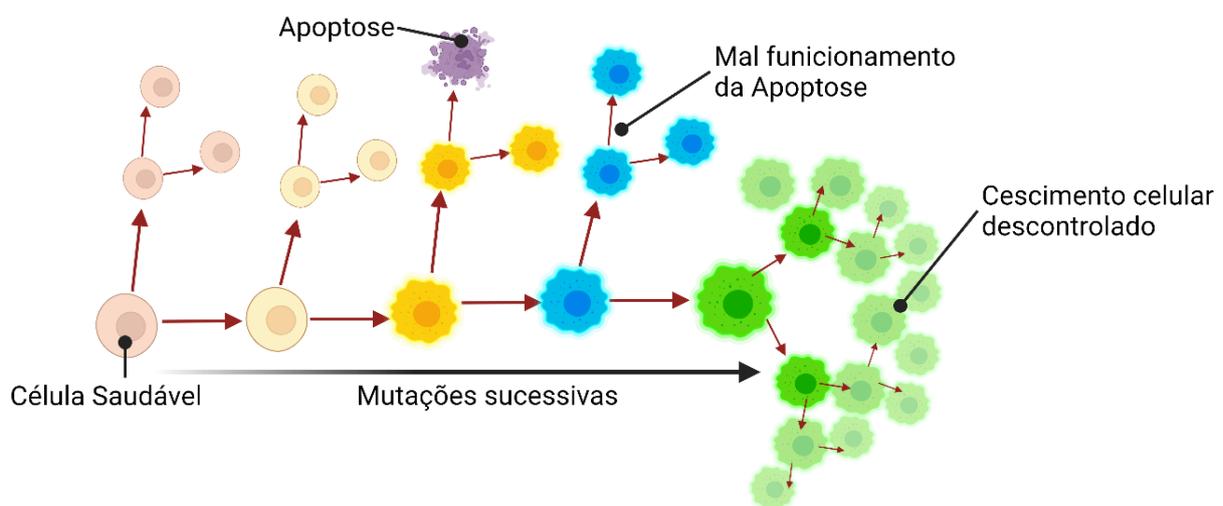


FIGURA 1.2 - Esquema da progressão das células cancerosas.^{3,5} (Adaptado) (Criado utilizando-se a plataforma biorender.com)

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças classificadas como câncer são uma das principais causas de morte em todo o mundo. Em estimativas fornecidas pelo Observatório Global do Câncer (GLOBOCAN-IARC) para o ano de 2020, foram, aproximadamente, vinte milhões de novos casos de câncer e quase dez milhões de mortes (FIGURA 1.3). Observa-se que os três cânceres mais incidentes são de mama, pulmão e colorretal. Juntos, contribuem para $\frac{1}{3}$ dos novos casos.⁶

Estimativa de novos casos de câncer para o ano de 2020

Estimativa do número de morte por câncer para o ano de 2020

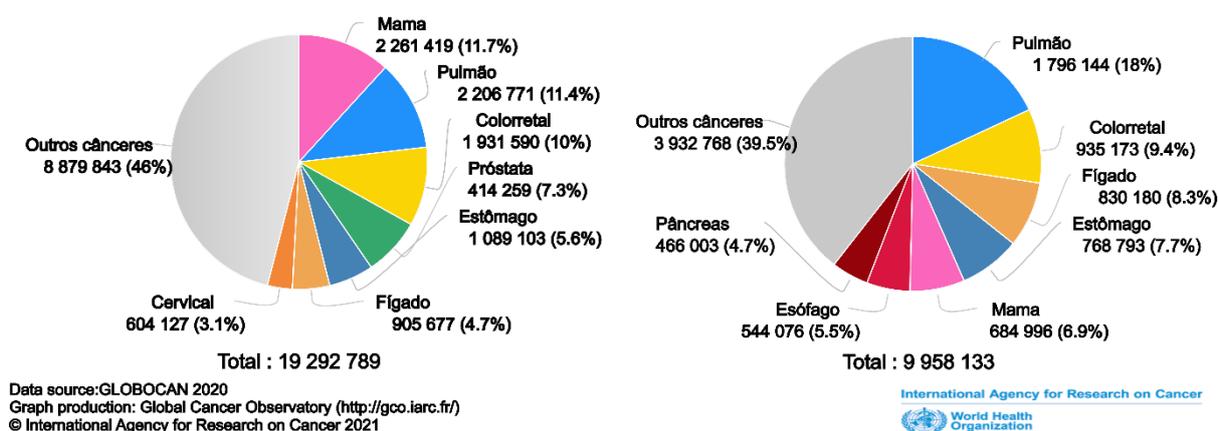


FIGURA 1.3 - Estimativas da OMS para novos casos de câncer e mortes, no ano de 2020, para todas as idades e sexos.⁷ (Adaptado)

No Brasil, as informações fornecidas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), em estimativas feitas para o triênio de 2023 – 2025, apresentam dados de incidência semelhantes aos da OMS, quando são estimados, para o país, 704 mil novos casos a cada ano. Divididos entre sexos, os cânceres de próstata e mama feminina são os mais incidentes. Na sequência, observa-se o colorretal (cólon e reto) e das vias aéreas (traqueia, brônquio e pulmão), disponível na FIGURA 1.4. Atualmente, para o Brasil e os países em desenvolvimento, espera-se a redução dos tipos de câncer causados por patógenos, como HPV (vírus do papiloma humano, do inglês *human papillomavirus*), bem como o surgimento de novos tipos de cânceres relacionados ao desenvolvimento socioeconômico, o que gera um aumento da expectativa de vida dos habitantes.^{8,9}

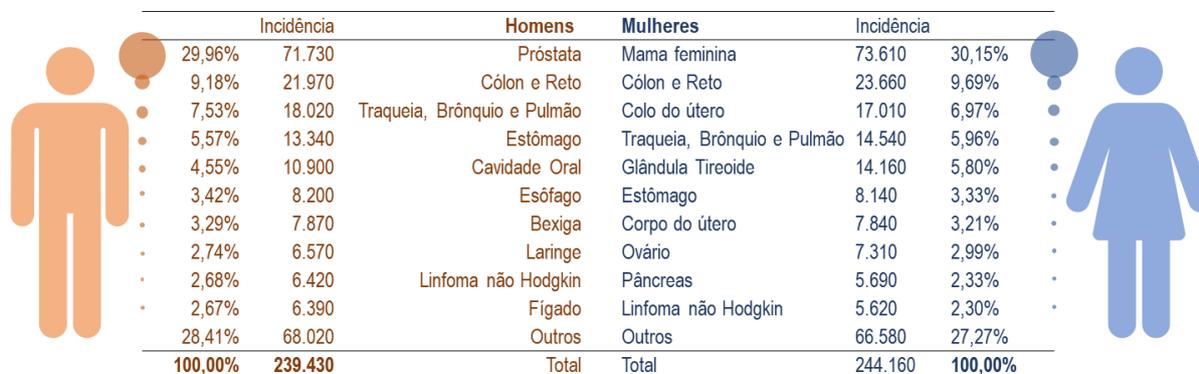


FIGURA 1.4 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2022 por sexo, exceto pele não melanoma.¹⁰ (Adaptado)

1.2 - Tratamento e metalofármacos

O tratamento do câncer é realizado através de diferentes terapias que podem ser combinadas de acordo com as necessidades do paciente. A partir do conhecimento em torno do câncer, as terapias vão se modernizando ou desenvolvem-se novas terapias. Entre elas, destacam-se a **cirurgia** (responsável pela remoção do tecido tumoral), a **radioterapia** (que utiliza radiação ionizante para reduzir o crescimento tumoral), a **quimioterapia** (que utiliza moléculas capazes de inibirem o crescimento celular ou matarem as células cancerosas. Atualmente, é a única terapia disponível para o tratamento de metástase), **hormonioterapia** (utiliza a regulação hormonal no tratamento), **imunioterapia** (atua no fortalecimento do sistema imune do paciente), **terapia fotodinâmica** (utiliza moléculas que são ativadas pela luz – agente fotossensibilizante – para matar células tumorais) e a **terapia-alvo** (que utiliza moléculas pequenas ou anticorpos para inativar alvos – enzimas – que atuam no crescimento do câncer).¹¹⁻¹⁶

A quimioterapia é o foco do atual trabalho. Existem diversos fármacos quimioterápicos que são utilizados para o tratamento dos mais de cem tipos de cânceres existentes.¹⁷ Normalmente, esses fármacos atuam na morte de células tumorais e na redução do crescimento celular, e, entre esses fármacos, destaca-se a cisplatina.¹⁸

O complexo *cis*-diaminodicloroplatina (II), mais conhecido por cisplatina, é um fármaco quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de cânceres de bexiga, ovário, testículo, cabeça e pescoço, além de ser utilizado de forma combinada com outros fármacos para pulmão (ES-SCLC), mama, cólon e reto, fígado, pele (do tipo melanoma), pâncreas, entre outros. A cisplatina foi aprovada para o tratamento de câncer pela FDA (*Food and Drug Administration*) em 1978.^{19,20}

O mecanismo mais aceito para a atividade da cisplatina descreve que o complexo metálico se aproxima da célula com sua estrutura, sem alteração, devido à alta concentração do íon cloreto no meio extracelular, e, quando o fármaco é transportado para o meio intracelular, há a troca dos ligantes Cl⁻ por H₂O. Após as trocas de ligantes, o aqua complexo [Pt(OH₂)₂(NH₃)₂] realiza ligações covalentes com as aminas presentes nas bases nitrogenadas do DNA. A interação majoritária entre

os complexos de platina e o DNA é a ligação covalente em relação às duas guaninas adjacentes de uma mesma fita: 1,2 intrafita (FIGURA 1.5).^{21,22}

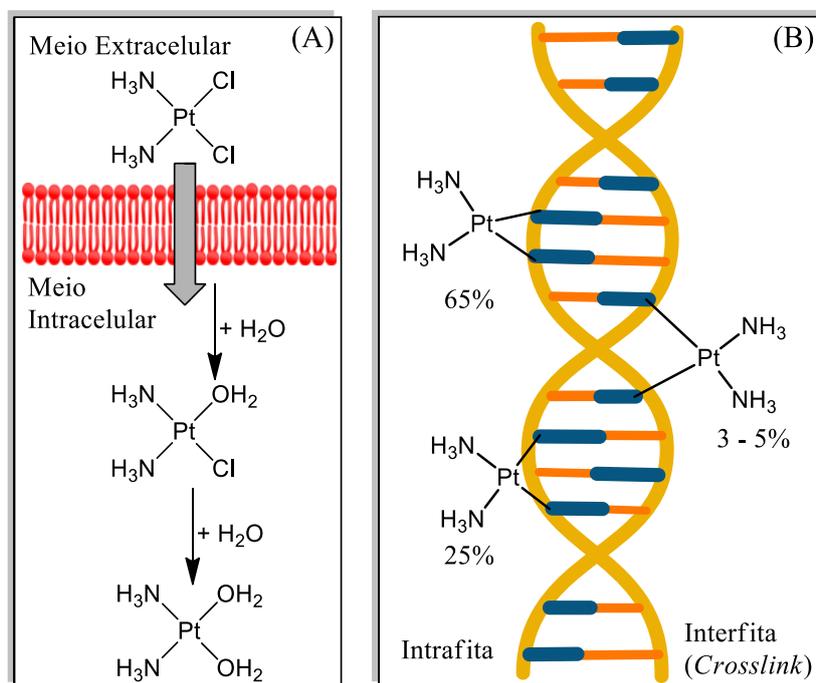


FIGURA 1.5 - (A) Ativação da cisplatina pela troca dos Cl⁻ por H₂O quando a cisplatina entra na célula. (B) Principais interações entre cisplatina e DNA com as respectivas porcentagens da frequência do tipo de ligação.²² (Adaptado)

Desde então, surgiram outros compostos de coordenação com o metal platina, inspirados no sucesso da cisplatina. Os exemplos mais significativos são a carboplatina e oxaliplatina, conhecidos como fármacos de segunda geração. A carboplatina – cis-diamino (2-ciclobutanodicarboxilato)platina(II) – possui uma estrutura semelhante à da cisplatina, no entanto, os ligantes cloridos foram substituídos por um ligante quelato que coordena ao metal pelo oxigênio.^{23,24} No caso da carboplatina, a atuação desse fármaco é semelhante à cisplatina, entretanto, apresenta menor toxicidade e redução dos efeitos colaterais, como menor efeito de nefrotoxicidade, neurotoxicidade e gastrotoxicidade. Todavia, o fármaco necessita de uma concentração de 20 a 40 vezes maior que a da cisplatina para obter o mesmo resultado.^{25,26}

A oxaliplatina – trans-1R,2R-diaminociclohexano-oxalatoplatina(II) –, por sua vez, apresenta um espectro de ação distinto e atua frente a outros tipos de câncer, sendo mais ativa para alguns tumores, incluindo aqueles que adquiriram resistência à

cisplatina.^{19,25,27} A estrutura molecular da cisplatina, carboplatina, oxaliplatina bem como a de outros fármacos à base de platina e suas respectivas propriedades estão apresentadas na FIGURA 1.6.

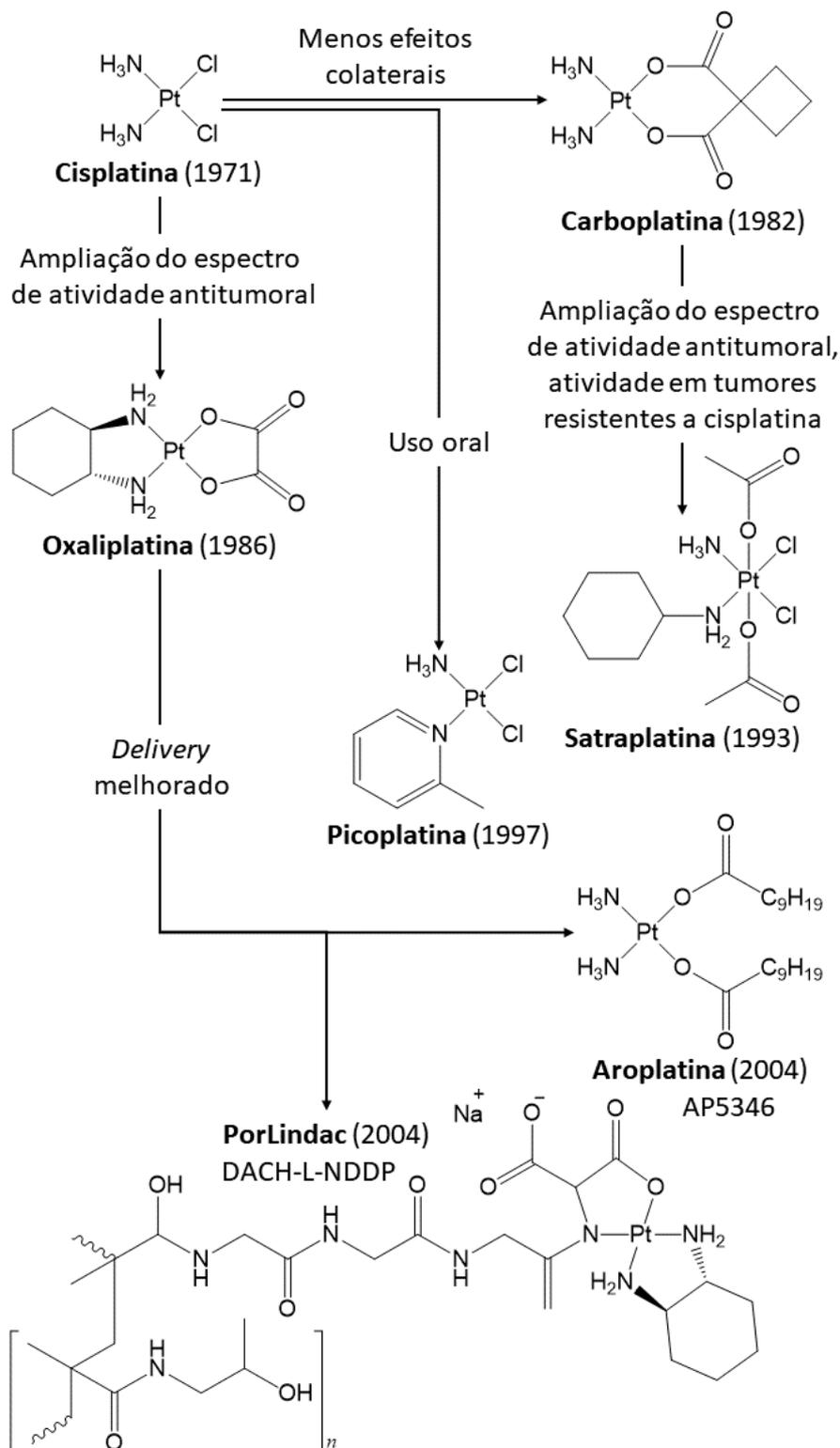


FIGURA 1.6 - Estrutura dos metalofármacos de platina com as respectivas datas em que foram iniciados os estudos em ensaios clínicos.^{19,27} (Adaptado)

Outros íons metálicos vêm sendo avaliados como possíveis metalofármacos antineoplásicos. Entre os metais estudados, destacam-se: Au(I), Au(III), Ag(I), Pd(II), Ru(II), Ru(III), Ir(II) e Cu(II)²⁸⁻³⁴. Até recentemente, os metalofármacos de platina eram os únicos aprovados para o tratamento do câncer, entretanto, em 2017, a Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency*) aprovou um complexo porfirínico de Pd(II), Tookad (*padeliporfin*), para o tratamento de câncer de próstata via terapia fotodinâmica (FIGURA 1.7).^{35,36} De acordo com o mecanismo proposto por Wang e colaboradores³⁷, a principal vantagem do Tookad em relação a outros fotossensibilizantes é a transferência direta de elétrons e/ou a abstração de hidrogênio, o que permite a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*) na ausência de dióxigênio (O₂). As reações instantâneas com moléculas de água e dióxigênio produzem peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânion superóxido (O₂⁻) e o radical hidroxila ([•]OH).

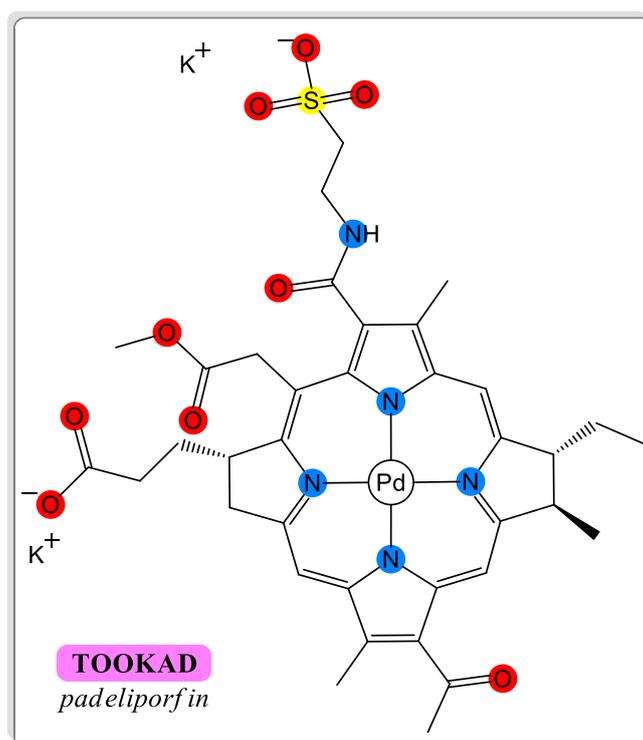


FIGURA 1.7 - Estrutura do complexo de Pd(II) Tookad, aprovado para terapia fotodinâmica.

Como observado, o potencial terapêutico dos compostos de coordenação é extremamente atrativo devido à sua diversidade estrutural, com diferentes modos de coordenação, atividade redox e reatividade com diversos

substratos orgânicos.³⁸ Tais propriedades permitem que os complexos metálicos possam interagir com uma gama de biomoléculas, de modo a alterar o mecanismo de proliferação celular.³⁹ Uma vertente interessante é o uso de compostos de coordenação como inibidores enzimáticos para o tratamento dos diferentes tipos de câncer.

1.3 - Enzimas DNA-Topoisomerase

Normalmente, o material genético encontra-se altamente compactado e torcido em torno de si mesmo. Essa conformação do DNA é um mecanismo para reduzir o seu volume, entretanto, a estrutura superenovelada não permite o acesso às bases nitrogenadas, o que inviabiliza os processos de replicação, tradução, recombinação e reparação.^{40,41} Para isso, é necessário que a estrutura seja relaxada, de modo que a informação genética esteja disponível. Assim, as enzimas nucleares DNA-topoisomerase são um conjunto de biomoléculas que atuam na redução do superenovelamento do DNA por meio da quebra de uma ou duas fitas do DNA, sendo as enzimas topoisomerases essenciais nos processos de replicação do DNA a condensação e a segregação cromossômicas.^{42,43}

Esse grupo de enzimas é dividido em dois tipos: I e II. Essa classificação está relacionada ao número de fitas, que são cisalhadas por cada enzima, sendo assim, a topoisomerase do tipo I quebra apenas uma fita do DNA, e a do tipo II quebra as duas fitas. Além dessa classificação, as enzimas são subdivididas em α e β , o que diz respeito ao lado em que a enzima se liga, de modo covalente, e realiza a quebra da fita de DNA.^{43,44}

A enzima TOPO do tipo II apresenta as duas isoformas, TOPOII α e TOPOII β . Ambas as enzimas dispõem da mesma função, entretanto, o contexto em que o relaxamento do DNA é realizado pode ser diferente.⁴⁵ Em ensaios *in vitro* relatados na literatura, observou-se uma maior expressão da TOPOII α em células proliferativas, enquanto em células não proliferativas a expressão dessa enzima não foi detectada em algumas leituras. Já para a TOPOII β , a sua expressão foi detectada em todas as células de mamíferos, entretanto, sua maior expressão é observada quando as células se apresentavam em um estado pós-mitótico (FIGURA 1.8).^{46,47}

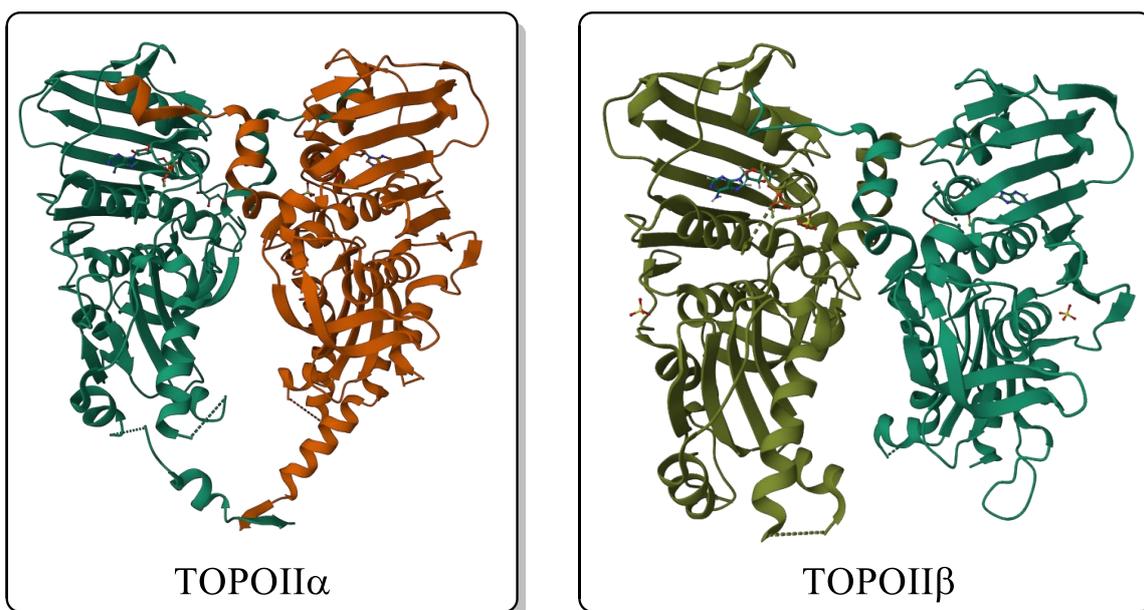


FIGURA 1.8 - Estruturas tridimensionais das enzimas TOPOII α (7QFN) e TOPOII β (1ZXN), disponibilizadas pelo banco de dados RCSB PDB (RCSB.org).^{48,49} (Adaptado)

Em um estudo clássico, Giacconne e colaboradores⁵⁰ realizaram a quantificação das expressões de TOPOII α e β a partir de tecidos tumorais e não tumorais de pulmão. O trabalho contou com a participação de 60 pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) e 25 pacientes com pulmão saudável. Por meio dos dados obtidos, os autores verificaram que a enzima TOPOII β mantém sua expressão gênica quantificável para ambos os tecidos de pulmão, mas a TOPOII α foi quantificável apenas para os tecidos tumorais, sendo assim, os autores relataram que a isoforma α possui sua expressão associada a tecidos proliferativos, como os tecidos tumorais (TABELA 1.1).

TABELA 1.1 - Expressão gênica de TOPOII α e TOPOII β por ensaios de proteção de nuclease.

	Tecido normal		Tecido NSCLC	
	TOPOII α	TOPOII β	TOPOII α	TOPOII β
Pacientes avaliados	22	12	57	30
Quantificado	0 (0%)	12 (100%)	48 (84%)	30 (100%)
Não detectado	15 (68%)	–	7 (12%)	–
Detectado não quantificado	7 (32%)	–	2 (4%)	–

Em razão disso, a enzima DNA-Topoisomerase II α (TOPOII α) é um dos principais alvos de fármacos antineoplásicos no tratamento de câncer de mama, pulmão, próstata, entre outros. Como apresentado, essa enzima é essencial para o processo de replicação do DNA, o que leva à multiplicação celular.⁵¹ Atualmente, fármacos como etoposídeo, doxorrubicina e mitoxantrona são utilizados no tratamento de tumores e possuem a topoisomerase como alvo principal. Esses fármacos são conhecidos como venenos da TOPOII, uma vez que eles estabilizam o complexo covalente DNA-TOPOII, de modo a não permitir o religamento da fita cisalhada (FIGURA 1.9).^{52,53}

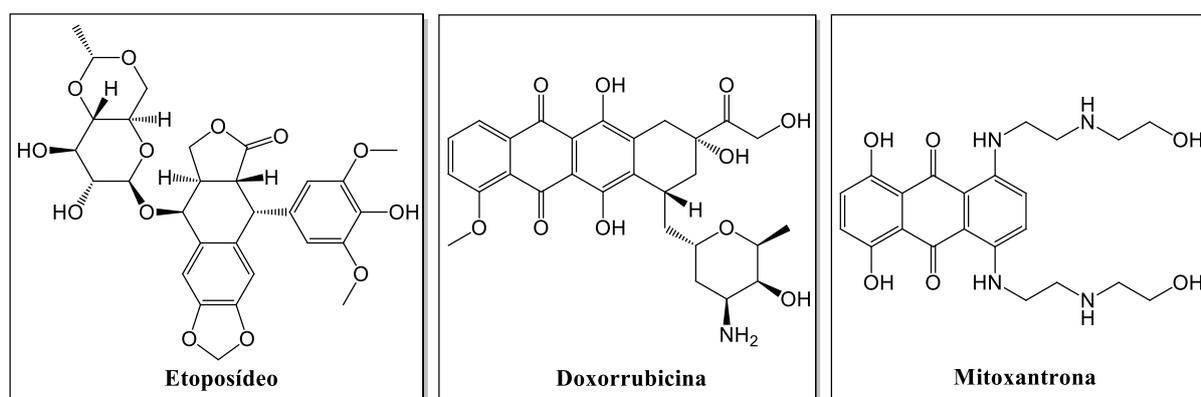


FIGURA 1.9 - Estrutura do etoposídeo, doxorrubicina e mitoxantrona.^{52,53} (Adaptado)

Outro grupo de agentes capazes de inibirem a enzima TOPOII sem a estabilização covalente do complexo DNA-TOPOII é denominado de inibidores catalíticos. Esse grupo atua sobre a enzima dos seguintes modos: interfere na ligação entre o DNA e a TOPOII (aclarrubicina e suramina), estabiliza os complexos não covalentes DNA...TOPOII (merbarona, ICRF-187) e/ou inibe a ligação do ATP (novobiocina).⁵⁴⁻⁵⁷ Todos os modos de interação estão associados à inibição de alguma etapa do ciclo enzimático da TOPOII. Na FIGURA 1.10, é representado o ciclo da enzima, e nele observa-se que os venenos da TOPOII atuam exclusivamente na etapa de transposição de uma dupla fita por outra (etapa 4), já os inibidores catalíticos atuam em diferentes etapas.

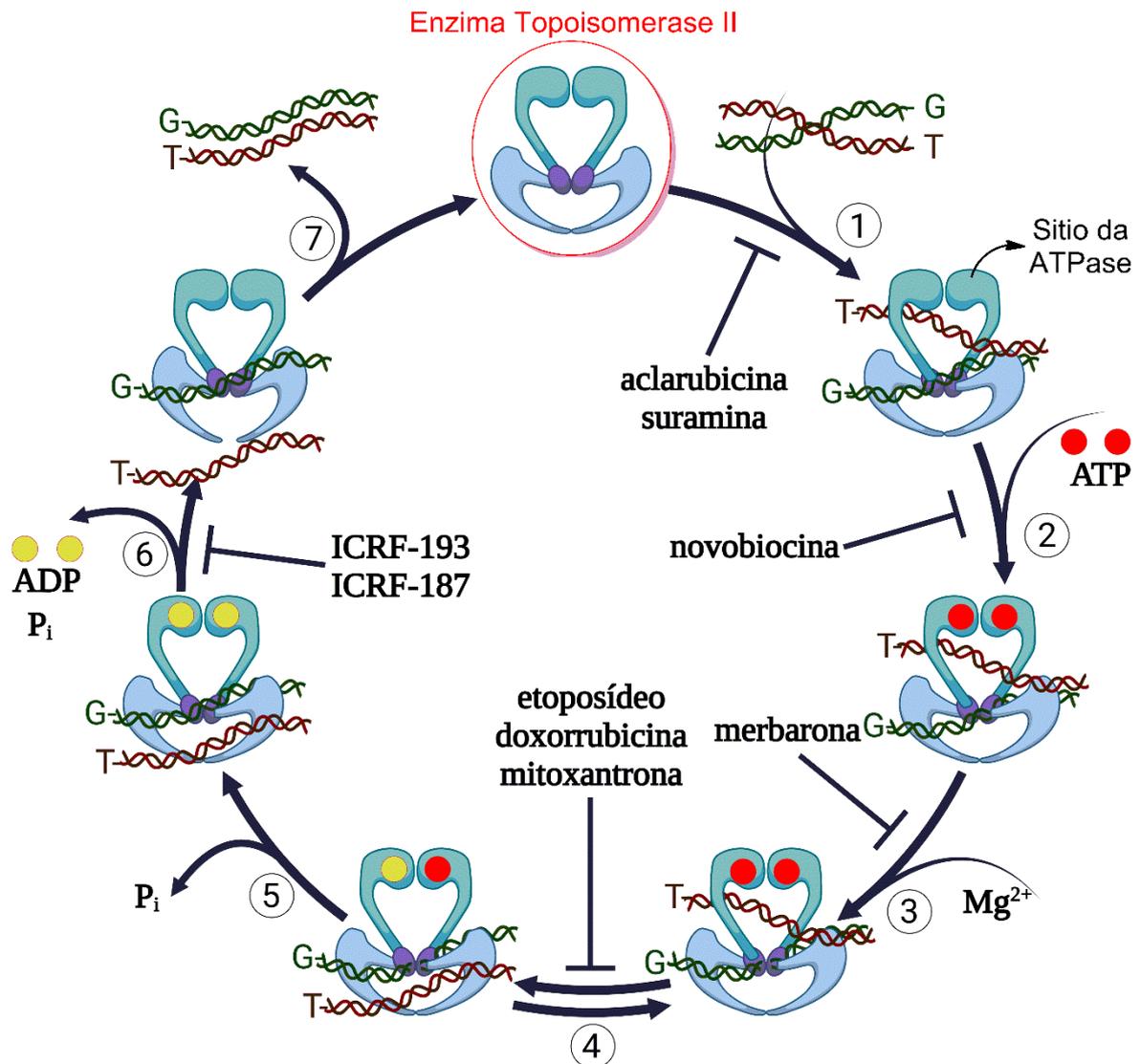
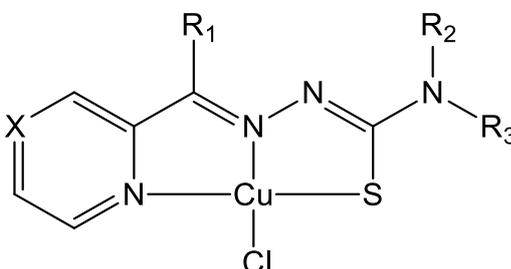


FIGURA 1.10 - Ciclo catalítico da enzima DNA-Topoisomerase II; representação esquemática da enzima está destacada em um círculo vermelho. O ciclo inicia-se com a aproximação e ligação da enzima às duas duplas fitas do DNA, aos segmentos G em verde e ao segmento T em vermelho (etapa 1). Em seguida, duas moléculas de ATP são inseridas no domínio da ATPase, destacado em verde (etapa 2). O segmento G é clivado (etapa 3), e o segmento T é transportado através do segmento G clivado, e há a hidrólise de um ATP (etapa 4). O segmento G é religado, e a segunda molécula de ATP é hidrolisada (etapa 5). Há a dissociação das moléculas de ADP e a abertura da enzima para o transporte do segmento T através do terminal C (etapa 6). Por fim, há a dissociação da enzima do DNA (etapa 7).^{51,52} (Adaptado) (Criado utilizando-se a plataforma biorender.com)

Além do perfil de interação do inibidor catalítico com o ciclo enzimático, outro importante aspecto é a obtenção de moléculas capazes de distinguir as isoformas, não atuando ou atuando de forma pouco efetiva frente à isoforma β . Como apresentado, enquanto a TOPOII α está diretamente associada à proliferação celular, a TOPOII β é, constantemente, expressa para funções essenciais não proliferativas. É conhecido que os venenos da TOPOII atuam sobre ambas as isoformas, o que aumenta, consideravelmente, a toxicidade sobre os tecidos não tumorais, como a cardiotoxicidade, observada para a classe das antraciclina.⁵⁸ Outra desvantagem dos venenos da TOPOII é que seu uso está associado ao surgimento de tumores secundários, referente ao mau funcionamento da enzima TOPOII β , o que aumenta as chances de ocorrerem novas mutações no material genético.^{59–61}

Em razão disso, busca-se o desenvolvimento de inibidores catalíticos capazes de agir, preferencialmente, sobre a TOPOII α . Nos trabalhos já publicados na literatura, são apresentadas diferentes moléculas com possível ação inibitória. Entre esses trabalhos, destaca-se o de Zeglis e colaboradores⁶², que apresentaram complexos de Cu(II) coordenados às tiossemicarbazonas (FIGURA 1.11). Os autores relatam que escolheram os ligantes tiossemicarbazonas devido às suas propriedades antitumorais e capacidade de inibir a enzima TOPOII α .⁶³ Ficou demonstrado no trabalho que os complexos de Cu(II) obtiveram sucesso na inibição catalítica da enzima devido à sua geometria quadrática-plana. Por meio de estudos *in silico*, foi verificado que o arcabouço molecular do sítio da ATPase comportou o complexo plano, já o nitrogênio imínico e o enxofre estabilizaram a estrutura por meio de ligações com o sítio da ATPase, assim, impedindo a entrada do ATP e parando o ciclo da enzima.



	X	R ₁	R ₂	R ₃
Cu(Fp4mT)Cl	CH	H	Me	H
Cu(Fp4eT)Cl	CH	H	Et	H
Cu(Fp4ipT)Cl	CH	H	iPr	H
Cu(Fp4alT)Cl	CH	H	allyl	H
Cu(Ap4mT)Cl	CH	Me	Me	H
Cu(Ap4eT)Cl	CH	Me	Et	H
Cu(Fp4pyrrT)Cl	CH	H	pyrrolidine	
Cu(Fp4bzT)Cl	CH	H	Bz	H
Cu(FpT)Cl	CH	H	H	H
Cu(Ap4alT)Cl	CH	Me	allyl	H
Cu(Apz4mT)Cl	N	Me	Me	H

FIGURA 1.11 - Estruturas dos complexos apresentados por Zeglis e colaboradores.⁶² (Adaptado)

Outro trabalho que reforça a importância da geometria em torno do centro metálico foi apresentado por Rocha e colaboradores,⁶⁴ que utilizaram o íon Pd(II) (FIGURA 1.12). A vantagem do paládio (II) é que, devido à sua configuração d^8 , a sua geometria é quadrática-plana independentemente dos ligantes, desse modo, não há a necessidade de usar ligantes específicos apenas para sustentar a geometria plana.^{65,66} Nesse trabalho apresentado por Rocha e colaboradores, os complexos também apresentaram capacidade inibitória da enzima TOPOII α , de tal modo que, por meio de ensaios *in silico*, foi observado o mesmo perfil de interação através da estabilização do complexo metálico no sítio da ATPase. Novamente, foi utilizado o ligante tiossemicarbazona, que se apresentou útil ao criar ligação entre o arcabouço molecular da ATPase e os complexos através do enxofre, além das interações $\pi - \pi$ *stacking*.⁶⁷

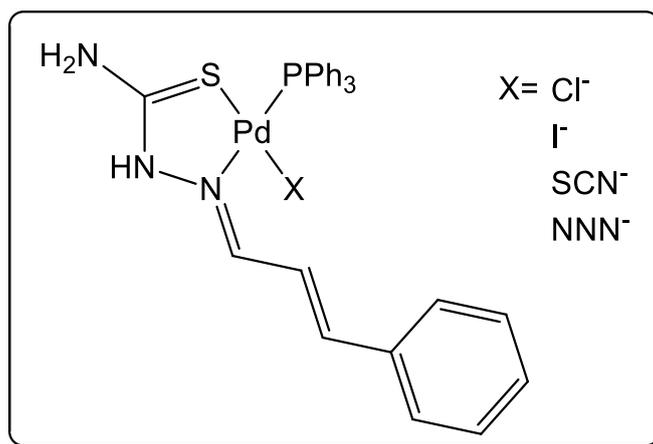


FIGURA 1.12 - Estrutura dos complexos de Pd(II) apresentados por Rocha e colaboradores.⁶⁷

Comparando-se os valores de viabilidade celular (IC_{50}) dos complexos de Cu(II) e Pd(II) com a linhagem MCF-7 dos trabalhos supracitados, ambos apresentam valores de IC_{50} próximos de $\sim 2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, indicando uma forte relação entre a inibição da enzima TOPOII α com a atividade citotóxica observada.

1.4 - Enzima Catepsina B

Responsáveis pela regulação de diversos processos fisiológicos, as catepsinas destacam-se como um importante grupo entre as proteases.⁶⁸ Os humanos possuem, em seu genoma, três famílias de catepsinas: as serínicas (A e G), aspárticas (D e E) e as cisteínicas (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W, e X). As catepsinas cisteínicas são encontradas, majoritariamente, no sistema endolisossomal, ou seja, encontram-se dentro das células e atuam em diversos processos, como de proteólise (reações de degradação de proteínas), participam da regulação do ciclo celular, além de serem um importante sinalizador extracelular excretado pelas células.^{69,70} Entretanto, encontrar as catepsinas fora do sistema lisossomal está relacionado com uma série de doenças, desde câncer e infecções a doenças autoimunes cardiovasculares e ósseas.⁷¹

A Catepsina B (CatB) é uma das integrantes do grupo das catepsinas cisteínicas, e sua superexpressão está associada à pancreatite, fibrose hepática e câncer. No caso das neoplasias, destacam-se melanoma (pele), colorretal, glioma (sistema nervoso), próstata, mama e pulmão,⁷² entre as quais a CatB desempenha

um papel importante na progressão da doença, como a promoção da angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos e no processo migratório, uma vez que a presença de CatB no soro é um forte indicador de metástase.⁷³ Ambos os processos são combinados, de modo que a maior irrigação do tumor permite às células malignas migrarem para os vasos sanguíneos. Tal fato permite o transporte e o estabelecimento de células cancerosas em outros tecidos. Portanto, o bloqueio da enzima está associado à inibição da angiogênese, metástase e progressão tumoral.⁷⁴

Em conformidade ao que foi apresentado, a observação de altas expressões da enzima CatB em meio extracelular é considerada um prognóstico ruim para os pacientes com câncer, estabelecendo-a como importante marcador.⁷⁵ Apesar da CatB extracelular ser o principal causador dos efeitos descritos, também foi observado que alta expressão no meio intracelular pode ser considerado um fator pró-tumoral.⁷⁶

Em um trabalho reportado por Baird e colaboradores,⁷⁷ foram apresentados complexos de oxorênio (V) coordenados aos ligantes do tipo pinça tridentado (SXS) e um ligante tiol monodentado. Os complexos foram cristalizados e apresentaram duas geometrias diferentes de acordo com o tipo de ligante pinça: SNS (bipirâmide trigonal distorcido) e SSS e SOS (pirâmide de base quadrada distorcida), apresentadas na FIGURA 1.13.

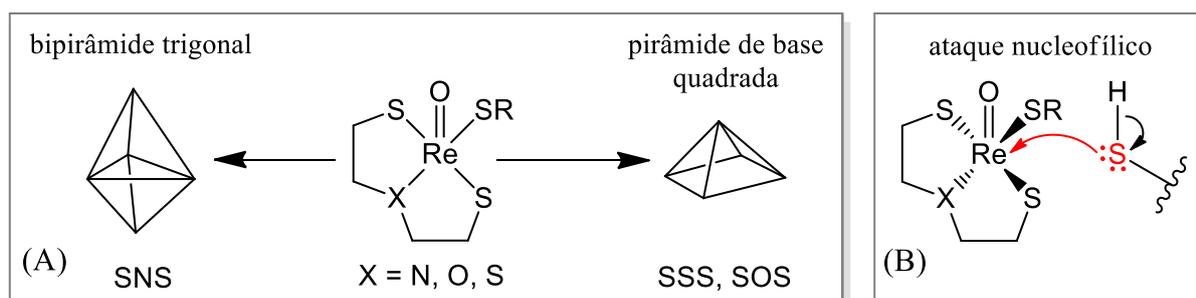


FIGURA 1.13 - (A) Estrutura genérica para os complexos de oxorênio (V) e suas respectivas geometrias. (B) Ataque nucleofílico de um tiol ao complexo com geometria pirâmide de base quadrada.

Os ensaios de inibição da enzima CatB demonstraram que apenas os complexos SSS e SOS foram capazes de inibir a ação da enzima. De acordo com os autores, tal característica deve-se à estrutura com geometria pirâmide de base

quadrada possuir um sítio de interação com o metal trans à ligação Re=O, desse modo, o sítio de interação permite ataques nucleofílicos por parte do grupo tiolato da cisteína.

Assim, tendo por base o trabalho de Baird e colaboradores,⁷⁷ é possível realizar um planejamento estrutural de complexos metálicos que possam se ligar à cisteína presente na CatB, tendo em vista que compostos com geometria que possua ao menos um sítio axial disponível em torno do metal têm maior chance de inibir a ação da enzima. Em vista disso, complexos com a geometria quadrática-plana, a qual possuem ambos os sítios axiais disponíveis, poderiam, teoricamente, inibir a ação enzimática através da ligação da base S-H ao metal.

1.5 - Justificativa e Planejamento estrutural

Baseado no que foi apresentado, o presente trabalho buscou compreender mais sobre o sistema de complexos metálicos com atividade antineoplásicas e sua aplicação em biomoléculas de interesse, como as enzimas DNA-topoisomerase II e Catepsina B. Para isso, foi escolhido o centro metálico paládio (II), que apresenta uma geometria quadrática-plana, que se demonstrou importante na inibição da enzima TOPOII α e que pode ligar-se à CatB. Adicionalmente, existe uma vasta literatura do amplo histórico de citotoxicidade em linhagens tumorais in vitro. Por fim, há o composto *padelioporfina*, um complexo de Pd(II) que foi recentemente aprovado na União Europeia (EMA) para o tratamento de câncer de próstata via PDT.^{78,79}

O sistema escolhido para a investigação sistemática da estrutura na atividade reúne o centro iônico de Pd(II), no qual foram coordenados diferentes tiossemicarbazonas, uma importante classe de ligantes N, S doadores capazes de formar quelatos com o centro metálico. Essas bases apresentam grande diversidade estrutural e são sintetizadas através da condensação de uma tiossemicarbazida com uma cetona ou aldeído (FIGURA 1.14).⁸⁰

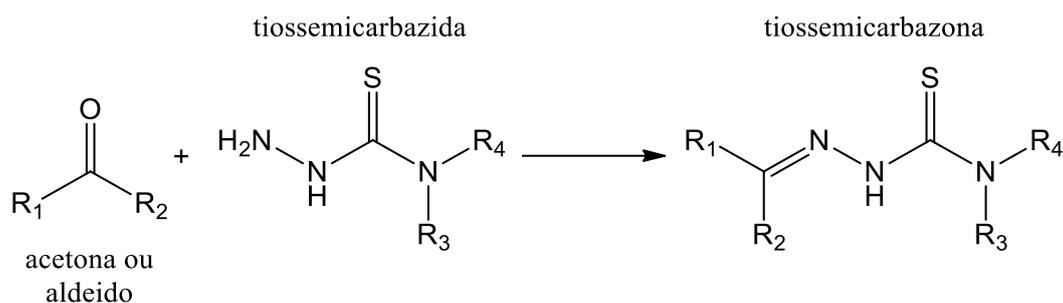


FIGURA 1.14 - Reação de condensação para a formação de uma tiossemicarbazona.

As tiossemicarbazonas são amplamente estudadas devido a sua vasta capacidade de interagir no meio biológico. Atualmente, é conhecido o seu potencial antiviral, antibacteriano, antiprotozoário, antifúngico e antitumoral.⁸¹ Um destaque entre as tiossemicarbazonas é a molécula de Triapina, que, de acordo com os sites *DrugBank.com* e *ClinicalTrials.gov*, se encontra em ensaios clínicos, nas fases II e III, para o tratamento de diferentes tipos de cânceres.^{82,83} A principal função da Triapina é a inibição da enzima ribonucleotídeo redutase, que participa da síntese dos ribonucleotídeos, que compõem os ácidos nucleicos.^{84,85}

Neste trabalho, em específico, o cinamaldeído, molécula encontrada na canela, e cetonas derivadas foram escolhidos para compor os ligantes tiossemicarbazonas. Esses ligantes possuem uma fraca atividade na inibição do crescimento de células neoplásicas, com valores de IC_{50} variando de 40 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.^{86,87} A presença de um sistema eletrônico deslocalizado apresentado por essas moléculas permite a formação de interações por emparelhamento π - π , ao passo que essas interações hidrofóbicas podem atuar na inibição de sítios enzimáticos de interesse.⁸⁸

Outra parte integrante da estrutura proposta é a trifenilfosfina (PPh_3). Esse ligante desempenha dois papéis importantes. O primeiro é a estabilização dos complexos metálicos, principalmente, quando se trata de ácidos moles de Lewis, que são estabilizados com a ligação $\text{M}^{n+}-\text{PPh}_3$, devido à formação da retrodoação composta por uma interação de simetria σ doador e π receptor, o que fortalece a ligação química entre o metal e o ligante.⁸⁹ A segunda razão em que se destaca a PPh_3 é a sua afinidade em sistemas biológicos, sendo um ligante que reduz o caráter hidrofílico de complexos metálicos e que está associado à maior penetração celular.⁹⁰

Alguns complexos metálicos que compõem o sistema atual já foram avaliados em alguns aspectos, como citotoxicidade e interação com o DNA. Entretanto, o presente trabalho trouxe a proposta de avaliar sistematicamente como as alterações nos sítios R₁ e R₂ modificam as atividades citotóxicas ao se comparar um maior número de complexos. Além da atividade citotóxica, buscou-se avaliar o comportamento dos complexos frente às enzimas supracitadas (FIGURA 1.5).

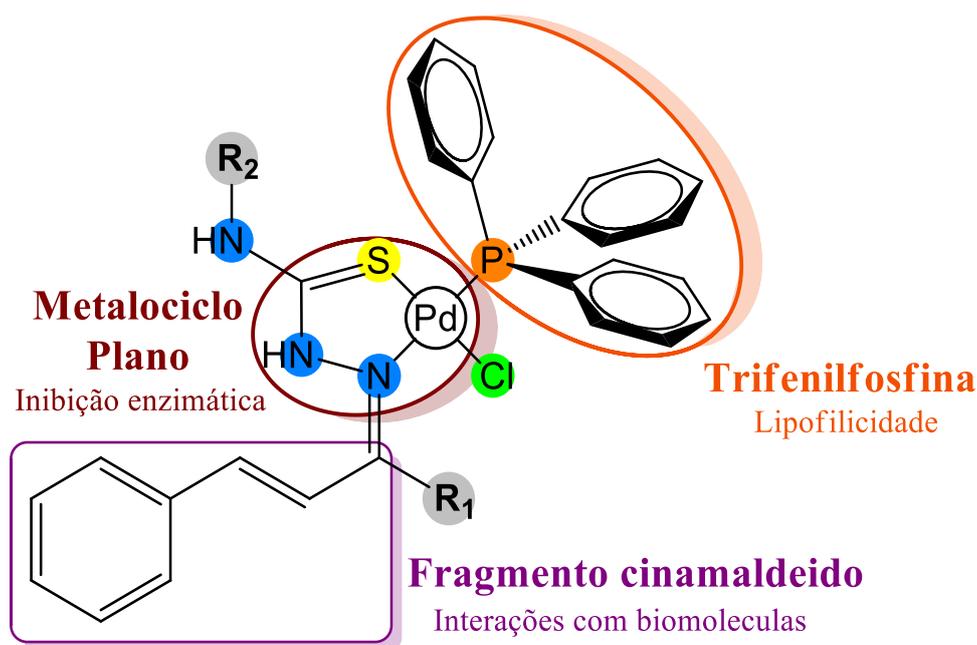


FIGURA 1.15 - Estrutura química dos complexos metálicos de Pd(II) com indicações de cada fragmento e sua função.

O sítio R₁ define a família a que cada complexo de Pd(II) pertence, e o substituinte está associado ao grupo aldeído/cetona, que foi inserido à estrutura da tiossemicarbazona. Desse modo, as famílias são classificadas em: **A** (CinamAldeído, R₁ = H), **B** (Benzalacetona, R₁ = CH₃) e **C** (Chalcona R₁ = Ph). A variação de R₁ aumenta o tamanho do substituinte próximo ao ligante Cl⁻, o que pode interferir em sua labilidade ou na capacidade do Pd(II) ligar-se a outros substratos, e a presença de grupos hidrofóbicos pode auxiliar as interações com as biomoléculas.

O substituinte R₂ traz pequenas variações à estrutura dos complexos, sendo que foram utilizados os substituintes H (**1**), CH₃ (**2**) e CH₂CH₃ (**3**). Essas mudanças estruturais variam no segundo arcabouço molecular próximo ao anel formado com o centro metálico, agora vizinho da trifenilfosfina. Tais alterações buscam criar uma população coesa para cada família e, assim, observar se os efeitos

apresentados pelas famílias podem ser alterados por R_2 . Por fim, espera-se estabelecer uma relação estrutura-atividade e diferenciar as influências de cada sítio.

2 - Objetivos

2.1 - Objetivo geral

Avaliar como as mudanças estruturais nos substituintes dos ligantes tiossemicarbazonas de composto de coordenação de Pd(II) influenciam a atividade anticâncer *in vitro* e sua capacidade de interagir com biomoléculas de interesse.

2.2 - Objetivos Específicos

- Elucidar as estruturas dos complexos de Pd(II) sintetizados;
- Avaliar os efeitos causados pelos complexos quando incubados com diferentes linhagens celulares humanas *in vitro*;
- Estudar o mecanismo de interação dos complexos com diferentes biomoléculas;
- Avaliar a capacidade dos complexos de atuarem como inibidores enzimáticos.

3 - Parte Experimental

3.1 - Materiais

O complexo **PdB2** foi sintetizado anteriormente pelo autor deste trabalho, e sua caracterização está disponível na literatura.⁷⁸ Os complexos **PdA1**, **PdA2** e **PdA3** foram fornecidos pelo Prof. Dr. Renan Lira de Farias (PUC-Rio), e toda a caracterização está descrita em sua tese.⁹¹ De modo semelhante, os ligantes utilizados na síntese dos complexos do presente trabalho foram fornecidos pela Prof^a. MSc Ludimila Thayane Paes Silva (IF Baiano), que descreveu esses ligantes em sua dissertação.⁹²

Os demais materiais e reagentes utilizados na execução do trabalho e seus respectivos fornecedores estão descritos na TABELA 3.1.

TABELA 3.1 - Reagentes e suas respectivas procedências.

Reagente	Procedência
Clorofórmio (<i>d</i> ₁) (99,8%)	AcrosOrganics
Agarose Padrão	Kasvy
Clorofórmio P.A.	Labsynth
Diclorometanol	Labsynth
DMSO P.A.	Labsynth
Metanol P.A.	Labsynth
Acetonitrila	Sigma-Aldrich
HSA	Sigma-Aldrich
Iodeto de céσιο (99,99 %)	Sigma-Aldrich
<i>calf thymus</i> - DNA	Sigma-Aldrich
Cloreto de Paládio (II) (99 %)	Sigma-Aldrich
DPPH	Sigma-Aldrich
MTT	Sigma-Aldrich
Trifenilfosfina (99%)	Sigma-Aldrich

3.2 - Síntese

3.2.1 - Síntese do precursor de paládio [PdCl₂(CH₃CN)₂]

Em um Erlenmeyer de 125 mL com 50,0 mL de acetonitrila previamente aquecida até 80°C, adicionou-se, lentamente, 500 mg de cloreto de paládio (II). Após a adição do sal, foi observada a formação de uma solução de coloração amarela. Após 4 h de reação, a solução foi concentrada por evaporação do solvente, e o sólido amarelo foi filtrado. Foram obtidos 0,585 mg de [PdCl₂(CH₃CN)₂] e 80% de rendimento.

3.2.2 - Síntese dos complexos paládio

Em um Erlenmeyer de 25 mL contendo 0,19 mmol de [PdCl₂(CH₃CN)₂] solubilizados em 15 mL de acetonitrila, foram adicionados 0,19 mmol de ligante tiossemicarbazona. A reação foi mantida sob agitação magnética por 24 h em temperatura ambiente (25 – 28°C). Em seguida, foi feita a adição de 0,19 mmol de trifenilfosfina (PPh₃), e o meio reacional foi mantido sob agitação por mais 24 h. Após esse período, o volume da solução foi reduzido por evaporação, e o sólido formado foi filtrado sob vácuo. A solução reacional foi reservada e mantida em temperatura ambiente para a formação de cristais.⁷⁸

[PdCl(**L-B1**)(PPh₃)]Cl (**PdB1**) – rendimento de 90% (mol/mol). C₂₉H₂₈Cl₂N₃PPdS. IFTR (cm⁻¹): 3451-3237 νNH; 3050 νCH_{sp}²; 1617 νC=C_{ArH}; 1542 δN-H; 1097 τ(P-C_{Ph}); 748 νC=S; 688 δC-H_{Ar}. RMN de (CDCl₃) ¹H (400 MHz) δ(ppm): 13,51 (s, 1H, N(2)-H), 10,03 (s, 1H, N(3)-H), 8,55 (d, J=16,1 Hz, 1H, H-8), 7,76 (m, 6H, o-H_{Ar} PPh₃), 7,70 (m, 2H, H-1 + H-5), 7,57 (m, 3H, p-H_{Ar} PPh₃), 7,48 (m, 6H, m-H_{Ar} PPh₃), 7,37 (m, 3H, H-2 + H-3 + H-4), 7,24 (m, 1H, H-7), 6,10 (s, 1H, N(3)-H), 2,67 (s, 3H, R1(CH₃)). RMN de (CDCl₃) ³¹P{¹H} (162 MHz) δ(ppm) = 30,85. HRMS (QTof, modo positivo) m/z: calculado: 622,0459; obtido: 622,0445 [M]⁺.

[PdCl(**L-B3**)(PPh₃)]Cl (**PdB3**) – rendimento de 85% (mol/mol). C₃₁H₃₂Cl₂N₃PPdS. IFTR (cm⁻¹): 3408-3237 νNH; 3068-2916 νCH_{sp}²; 1555 νC=C_{ArH}; 1514 δN-H; 1095 τ(P-C_{Ph}); 748 νC=S; 689 δC-H_{Ar}. RMN de (CDCl₃) ¹H (400 MHz) δ(ppm): 12,92 (s, 1H, N(2)-H), 10,08 (s, 1H, N(3)-H), 8,50 (d, J=16,1 Hz, 1H, H-8), 7,78 (m, 6H, o-H_{Ar} PPh₃), 7,67 (m, 2H, H-1 + H-5), 7,57 (m, 3H, p-H_{Ar} PPh₃), 7,49 (m, 6H, m-H_{Ar} PPh₃), 7,36 (m, 3H, H-2 + H-3 + H-4), 7,18 (d, J=16,1 Hz, 1H, H-7), 3,24 (q, dd J=7,2; J=5,0 Hz, H2,

R2(CH₂)), 2,64 (s, 3H, R1(CH₃)), 1,22 (t, J=7,1 Hz, 3H, R2(CH₃)). RMN de (CDCl₃) ³¹P{¹H} (162 MHz) δ(ppm) = 30,89. HRMS (QTof, modo positivo) *m/z*: calculado: 650,0772; obtido: 650,0777 [M]⁺.

[PdCl(L-C1)(PPh₃)]Cl (**PdC1**) – rendimento de 65% (mol/mol). C₃₄H₃₀Cl₂N₃PPdS. IFTR (cm⁻¹): 3379-3255 νNH; 3094-3002 νCH_{sp}²; 1598 νC=C_{ArH}; 1533 δN-H; 1095 τ(P-C_{Ph}); 750 νC=S; 691 δC-H_{Ar}. RMN de (CDCl₃) ¹H (400 MHz) δ(ppm): 8,07 (d, J=16,1 Hz, 1H, H-8), 7,84 (m, 3H, R1(Ph)), 7,59 (m, 9H, H-1 + H-3 + H-5 + *o*-H_{Ar} PPh₃), 7,52 (m, 2H, R1(Ph)), 7,46 (m, 3H, *p*-H_{Ar} PPh₃), 7,38 (m, 6H, *m*-H_{Ar} PPh₃), 7,36 (m, 2H, H-2 + H-4), 6,75 (d, J=16,1 Hz, 1H, H-7). RMN de (CDCl₃) ³¹P{¹H} (162 MHz) δ(ppm) = 29,83. HRMS (QTof, modo positivo) *m/z*: calculado: 684,0616; obtido: 684,0612 [M]⁺.

[PdCl(L-C2)(PPh₃)]Cl (**PdC2**) – rendimento de 68% (mol/mol). C₃₅H₃₂Cl₂N₃PPdS. IFTR (cm⁻¹): 3460-3250 νNH; 3068-2907 νCH_{sp}²; 1581 νC=C_{ArH}; 1489 δN-H; 1095 τ(P-C_{Ph}); 745 νC=S; 692 δC-H_{Ar}. RMN de (CDCl₃) ¹H (400 MHz) δ(ppm): 13,67 (s, 1H, N(2)-H), 10,18 (s, 1H, N(3)-H), 8,15 (d, J=16,1 Hz, 1H, H-8), 7,84 (m, 2H, R1(Ph)), 7,77 (m, 2H, R1(Ph)), 7,64 (m, 3H, H-1 + H-5 + R1(Ph)), 7,57 (m, 6H, *o*-H_{Ar} PPh₃), 7,51 (m, 3H, *p*-H_{Ar} PPh₃), 7,42 (m, 9H, H-2 + H-3 + H-4 + *m*-H_{Ar} PPh₃), 6,91 (d, J=16,1 Hz, 1H, H-7), 2,91 (s, 3H, R2(CH₃)). RMN de (CDCl₃) ³¹P{¹H} (162 MHz) δ(ppm) = 31,70. HRMS (QTof, modo positivo) *m/z*: calculado: 698,0772; obtido: 698,0773 [M]⁺.

[PdCl(L-C3)(PPh₃)]Cl (**PdC3**) – rendimento de 69% (mol/mol). C₃₆H₃₄Cl₂N₃PPdS. IFTR (cm⁻¹): 3434-3236 νNH; 3054-2929 νCH_{sp}²; 1587 νC=C_{ArH}; 1520 δN-H; 1097 τ(P-C_{Ph}); 745 νC=S; 685 δC-H_{Ar}. RMN de (CDCl₃) ¹H (400 MHz) δ(ppm): 13,67 (s, 1H, N(2)-H), 10,27 (s, 1H, N(3)-H), 8,18 (d, J=16,1 Hz, 1H, H-8), 7,86 (m, 2H, R1(Ph₃)), 7,79 (m, 2H, R1(Ph₃)), 7,62 (m, 3H, H-1 + H-5 + R1(Ph₃)), 7,58 (m, 6H, *o*-H_{Ar} PPh₃), 7,51 (m, 3H, *p*-H_{Ar} PPh₃), 7,42 (m, 9H, H-2 + H-3 + H-4 + *m*-H_{Ar} PPh₃), 6,90 (d, J=16,1 Hz, 1H, H-7) 3,29 (dd J=7,2; J=5,0 Hz, 2H, R2(-CH₂)), 1,23 (t, J=7,2 Hz, 3H, R2(-CH₃)). RMN de (CDCl₃) ³¹P{¹H} (162 MHz) δ(ppm) = 31,71. HRMS (QTof, modo positivo) *m/z*: calculado: 712,0929; obtido: 712,0931 [M]⁺.

3.3 - Técnicas de caracterização

3.3.1 - Ressonância magnética nuclear

Para a obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H (400 MHz), ¹³C{¹H} (100 MHz) e ³¹P{¹H} (162 MHz), foi utilizado o

espectrômetro BRUKER ARX 9,4T do Departamento de Química (DQ) da UFSCar. Para o complexo **PdC3**, foram realizadas as medidas relacionadas aos experimentos Dept135, COSY, HSQC e HMBC. Todos os dados obtidos foram tratados utilizando-se o software MestReNova 12.0.

3.3.2 - Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro SHIMADZU IRTracer-100, usando-se pastilhas de CsI como suporte. Foram feitas 64 varreduras na região de 4000 a 250 cm^{-1} . Os dados obtidos foram tratados utilizando-se os softwares Shimadzu IR Solution, 1.60 e Origin 9.0.

3.3.3 - Espectroscopia eletrônica de absorção molecular na região do UV-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, foi realizada a leitura dos espectros para os compostos em uma solução de DMSO, diclorometano e metanol nas concentrações de $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Os espectros das soluções foram obtidos nos tempos de 0 h, 24 h, 48 h e 336 h (uma semana) após a primeira medição. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm para obtenção dos espectros. A varredura foi realizada entre 600 a 200 nm. Os dados obtidos foram tratados utilizando-se os softwares Shimadzu UVProbe 2.42 e Origin 9.0.

3.3.4 - Espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-QTOF-MS/MS)

A amostra foi solubilizada em DMSO (grau LC-MS) e, posteriormente, diluída para a concentração de 5 ppm em CH_3CN (grau LC-MS). Para essa análise, foi realizada uma infusão direta, utilizando-se como fase móvel água (solvente A, 0,1 % de ácido fórmico) e CH_3CN (solvente C com 0,1 % de ácido fórmico), no modo isocrático, em uma proporção de 05:95 v/v, respectivamente. A vazão da fase móvel foi de $0.300 \text{ mL min}^{-1}$, e o volume de injeção foi de 3 μL .

As análises quantitativas das amostras foram realizadas usando-se um sistema Agilent 6545 qTOF MS (Agilent Technologies), equipado com uma interface

eletrospray (ESI) de Jet no modo positivo. Foram empregados os parâmetros para a ionização descritos na TABELA 3.2.

O erro (em ppm) foi calculado a partir da massa teórica e do respectivo espectro de MS adquirido. Foi monitorada uma faixa entre 100 a 1000 Da, com uma taxa de varredura 3 espectros s⁻¹ e processados pelo software Mass Hunter Workstation Software versão B.08.00.

TABELA 3.2 - Parâmetros empregados para a ionização.

Tipo de ionização	ESI+
Gás Temp. (°C)	300
Gás Flow (L·min ⁻¹)	12
Nebulizer (Psi)	35
Sheath Gás Temp.	280
Sheath Gás Flow	10
VCap	2000
Nozee Voltage (V)	700
Fragmentor	100
Skimmer	50
Energia de colisão (eV) para o MS/MS	10 e 35
OctopoleRFPeak	750

3.3.5 - Difração de Raios X por monocristal

A difração de Raios X foi realizada em um difratômetro Rigaku XtaLAB mini II, radiação MoK α ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). As medidas e resolução estrutural foram realizadas pelo Dr. João de Honorato de Araújo Neto no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos, na Universidade de São Paulo. O software SHELXT foi utilizado para a resolução da estrutura a partir de métodos diretos e de sucessivos mapas de diferença de Fourier, que permitiram a localização dos átomos não hidrogênios. O refinamento estrutural foi realizado pelo mesmo software, com o qual foi utilizado o método dos mínimos quadrados.⁹³ Com o software CrysAlisPro, foram calculados os parâmetros da célula unitária e as correções por absorção. As

representações gráficas das moléculas e tabelas de dados cristalográficos foram geradas utilizando-se os softwares OLEX2 e MERCURY.

3.3.6 - Superfície de Hirshfeld

Através das estruturas cristalográficas obtidas, foram realizados os cálculos da superfície de Hirshfeld (HS), uma ferramenta útil na elucidação de interações não covalentes que contribuem na formação do empacotamento cristalino. As imagens referentes à superfície de Hirshfeld do complexo **PdC3** bem como os gráficos de impressão digital 2D correspondentes foram obtidos através do software Crystal Explorer 21.5.

3.3.7 - Cálculos computacionais

A Teoria do Funcional da Densidade (DFT) foi utilizada, a fim de determinar as estruturas moleculares do composto **PdC3**. O método aplicado foi o B3LYP (método híbrido de três parâmetros Becke, usando-se o funcional de correlação de Lee-Yang-Parr) e os conjuntos bases 6-31G+(d, p) para os átomos C, H, O, S, N e Cl, já para o elemento mais pesado, P e Pd, utilizou-se a base lan12dz.

Nos cálculos de energia, foi aplicado o método Dependente de Tempo (TD-DFT) para trinta estados para singletos e tripletos. O método foi validado pela comparação das estruturas teóricas com as experimentais obtidas por difração de raios X bem como pelos dados espectroscópicos na região do UV-Vis e infravermelho. Os cálculos foram efetuados utilizando-se o programa Gaussian09 e a interface gráfica Gaussview 5.0

3.4 - Ensaios com cultura celular (*in vitro*)

As linhagens celulares humanas utilizadas nos ensaios foram: A2780 (tumoral de ovário), A2780cis (tumoral de ovário com resistência à cisplatina), A549 (tumoral de pulmão), MRC5 (não tumoral de pulmão de origem fetal), MDA-MB-231 (tumoral de mama triplo-negativo), MCF-7 (tumoral de mama), SK-BR-3 (tumoral de mama), MCF-10A (não tumoral de mama) e A375 (tumoral de pele – melanoma).

A linhagem MCF-10A foi cultivada em meio de cultura DMEM/F-12, suplementada com 5% de soro de cavalo, fator de crescimento epidermal humano (EGF) (20 ng/mL), hidrocortisona (0,05 mg/mL), insulina (0,01 mg/mL), penicilina (1%),

estreptomicina (1%) e L-glutamina (2 mM). As linhagens celulares A2780, A2780cis e MCF-7 foram cultivadas em meio RPMI-1640, e as demais linhagens em meio DMEM; ambos os meios de cultura foram suplementados com 10% (v/v) de FBS (soro fetal bovino), antibiótico e antimicótico. O cultivo foi realizado dentro de frascos de cultura armazenados em uma incubadora úmida a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂.

3.4.1 - Viabilidade celular (IC₅₀)

O ensaio de viabilidade celular para obtenção da concentração inibitória mínima de 50% (IC₅₀) foi realizado utilizando-se uma microplaca de 96 poços, em que foi adicionada, em cada poço, uma solução de 150 µL, contendo 1,5x10⁴ células (1,0x10⁵ células/mL) suspensas em meio de cultura. A contagem das células foi realizada utilizando-se um contador automático TC20 (Bio Rad) com auxílio do corante azul de Tripiano.

As placas foram mantidas por 24 h na incubadora úmida (37°C, 5% CO₂), e, em seguida, foi adicionado, a cada poço, 0,75 µL de uma solução de DMSO (0,5% v/v), contendo os compostos de interesse. As concentrações finais dos compostos nos poços variaram entre 0,10, 0,19, 0,39, 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25,00, 50,00 e 100,00 µmol·L⁻¹. Foram realizadas três amostras em triplicadas para cada concentração. Em seguida, as placas foram incubadas, novamente, na incubadora úmida a 37°C por mais 48 h, com atmosfera de 5% de CO₂.

A razão de células viáveis foi obtida através do método MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazólio –, um sal orgânico de coloração amarela. Por meio da sua redução por via mitocondrial, há formação do corante de cor púrpura formazan, que é proporcional à viabilidade celular (FIGURA 3.1). Após a incubação das microplacas, foram adicionados, a cada poço, 50 µL de uma solução de MTT (1 mg·mL⁻¹) em PBS e as células foram incubada novamente na estufa por 4 h.

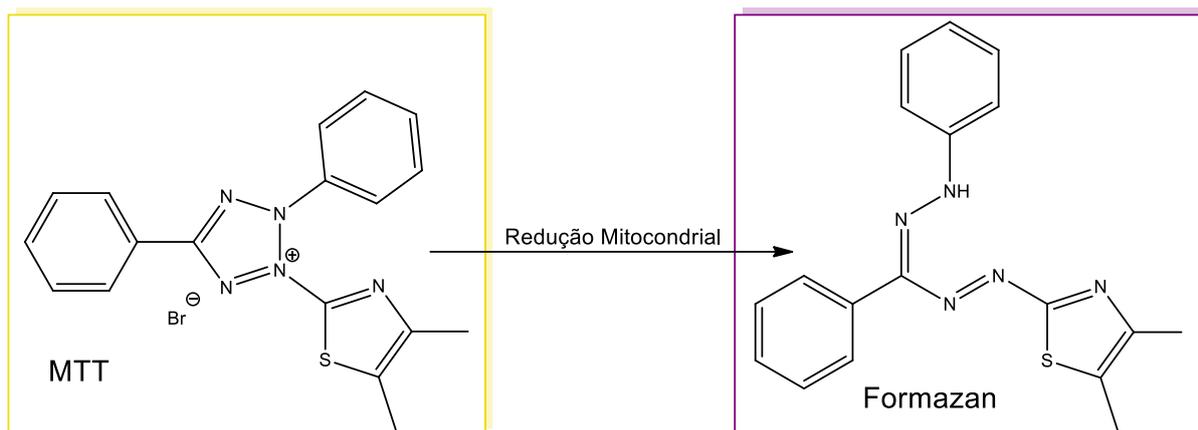


FIGURA 3.1 - Reação de redução mitocondrial do MTT e formação do Formazan.

Por fim, retirou-se a solução de cada poço e adicionou-se 100 μL de álcool isopropílico com 10% de DMSO para a solubilização dos cristais de Formazan. Em seguida, foram realizadas as medidas de absorvância (540 nm), em cada poço, com o espectrofotômetro da BioTek modelo EPOCH. Os dados obtidos foram analisados, utilizando-se Excel 360 e GraphPadPrism 8.0.2.

3.4.2 - Ensaio de sobrevivência clonogênica

Foram semeadas, em cada poço, 600 células da linhagem A2780cis em uma microplaca de seis poços. Após a incubação de 24 h em atmosfera de 5% de CO_2 , foi adicionada aos poços uma solução de composto nas concentrações de $\frac{1}{2}$ IC_{50} , IC_{50} e $2 \times \text{IC}_{50}$ em triplicata (TABELA 3.3), as quais foram incubadas novamente pelo período de cinco dias. Logo após esse período, o meio de cultura foi trocado por meio de cultura fresco, e as placas foram incubadas por mais cinco dias.

TABELA 3.3 - Valores das concentrações das frações de IC_{50} utilizados.

Frações de IC_{50}	Concentrações ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	PdA1	PdB1	PdC1
$4 \times \text{IC}_{50}$	0,60	0,05	0,15
$2 \times \text{IC}_{50}$	0,30	0,10	0,31
IC_{50}	0,15	0,20	0,62
$\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$	0,08	0,40	1,24
$\frac{1}{4} \text{IC}_{50}$	0,04	0,80	2,48

Por fim, o meio de cultura foi removido e lavado com PBS. Subsequentemente, adicionou-se uma solução fixadora de metanol e ácido acético (3:1 v/v) durante cinco minutos, e, em seguida, as células foram coradas com solução de violeta de metila. As placas foram lavadas com água destilada. Após secar, foram fotografadas utilizando-se o iBright™ FL1500 (ThermoFisher) e foram analisadas com auxílio do software ImageJ.

3.4.3 - Ensaio de morfologia celular

Uma suspensão de células da linhagem A2780cis, contendo $1,2 \times 10^5$ células, foi adicionada em cada poço de uma microplaca de doze poços. Após incubação de 24 h com atmosfera de 5% de CO₂, foi adicionada aos poços uma solução de composto nas concentrações de $\frac{1}{4} IC_{50}$, $\frac{1}{2} IC_{50}$, IC_{50} , $2 \times IC_{50}$ e $4 \times IC_{50}$ (em triplicata), e as placas foram incubadas novamente por 48 h. Com o auxílio do microscópio invertido Nikon Eclipse TS 100, acoplado a uma câmera fotográfica digital Moticam (1.3 Megapixels), os poços das placas foram fotografados nos tempos 0, 24 e 48 h, e foram analisadas as mudanças morfológicas observadas.

3.4.4 - Ensaio de migração celular “*Wound Healing*”

Em uma microplaca de doze poços foi adicionada, em cada poço, uma suspensão de $4,0 \times 10^5$ células da linhagem A2780cis. A placa foi incubada por 24 h, e foi observada a formação de uma monocamada de células. Utilizando-se uma ponteira de micropipeta, foi feito um risco (ferida) no centro do poço, em seguida, os poços foram lavados, e adicionou-se meio de cultura e uma solução de composto nas concentrações $\frac{1}{2} IC_{50}$, IC_{50} e $2 \times IC_{50}$ em triplicata.

Utilizando-se o mesmo sistema de câmera digital acoplada ao microscópio citado anteriormente, foram fotografados os poços nos tempos 0, 24 e 30 h. As imagens obtidas foram analisadas, utilizando-se o software ImageJ. Assim, foi possível calcular a taxa de fechamento da ferida em relação ao tempo a partir da diferença da A_0 (área no tempo 0 h) e A_t (área no tempo t), divididas pela A_0 (EQUAÇÃO 1), e os valores obtidos foram analisados com o software GraphPadPrism 8.0.2.

$$\% \text{ área fechada} = \left(\frac{A_0 - A_t}{A_0} \right) \times 100$$

3.4.5 - Análise do ciclo celular

As células da linhagem A2780cis foram plaqueadas ($2,0 \times 10^5$ células/poço) em microplaca de doze poços e incubadas por 24 h. Após a incubação, foram adicionados os compostos nas concentrações de $\frac{1}{2}IC_{50}$, IC_{50} e $2 \times IC_{50}$ em triplicata. As células foram incubadas, novamente, por 48 h. Após a exposição, o meio foi descartado, e os poços foram lavados com PBS. As células foram suspensas e centrifugadas a 1000 rpm, por cinco minutos, a 4°C.

A solução sobrenadante foi descartada, e o pellet de células foi fixado com 500 μ L de álcool etílico gelado (70 %), por 24 h, a -20°C. Após incubação, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas, e o sobrenadante foi descartado, o pellet de células foi ressuspendido em ribonuclease (RNase A) 0,2 mg/mL e PI (iodeto de propídeo) e incubado por trinta minutos. O citômetro de fluxo BDAccuri C6 (BD Biosciences) foi utilizado para obter as porcentagens de células em cada fase do ciclo celular. As análises dos resultados foram feitas nos softwares BDAccuri C6 e GraphPadPrism 8.0.2.

3.5 - Atividade antioxidante (DPPH)

A atividade antioxidante dos compostos foi mensurada através do corante DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) (FIGURA 3.2). Em uma microplaca preta com fundo transparente de 96 poços, foram adicionados 20 μ L (metanol/DMSO 19:1) de uma solução de compostos nas concentrações 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25,00, 50,00 e 100,00 μ mol·L⁻¹. Foi feita uma triplicata para cada concentração. Logo após, foram adicionados aos poços 180 μ L de DPPH (0,1mmol·L⁻¹ em metanol). A microplaca foi agitada e incubada por 30 min a 25°C. Após o período de incubação, a placa foi novamente agitada, e foi lida a absorbância do DPPH em 515 nm, utilizando-se o leitor de microplacas da BioTek modelo EPOCH. Os valores de absorbância foram analisados utilizando-se o software GraphPadPrism 8.0.2, e a taxa de consumo do DPPH foi calculada através da EQUAÇÃO 2.⁹⁴

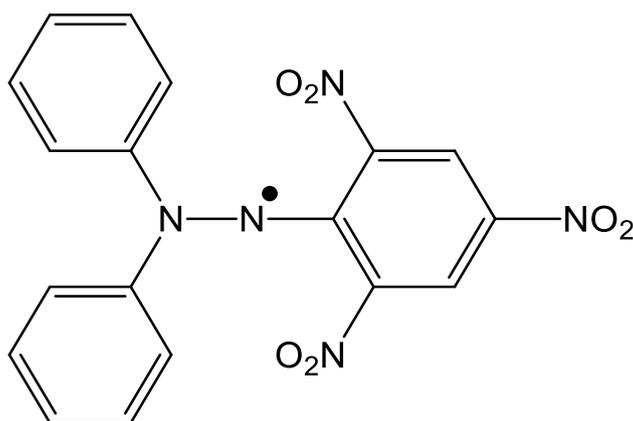


FIGURA 3.2 - Representação estrutural do DPPH.

$$\text{Consumo DPPH}(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

EQUAÇÃO 2

3.6 - Ensaio de interação com biomoléculas

3.6.1 - Interação com DNA: titulação espectroscópica com *ct*-DNA

O ensaio de titulação espectroscópica foi realizado com a manutenção da concentração de complexo metálico fixada em $9,1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em 2500 μL de tampão Tris-HCl ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,4). Para a realização desse ensaio, variou-se a concentração do CT-DNA em razão R_i de 15 a 120% ($R_i = [\text{DNA}]/[\text{composto}]$). Os espectros foram registrados na região de 600 a 200 nm. A constante de ligação do complexo com CT-DNA (K_b) foi determinada aplicando-se a Equação de Benesi-Hildebrand (EQUAÇÃO 3),

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\varepsilon A - \varepsilon F)} = \left(\frac{[\text{DNA}]}{(\varepsilon B - \varepsilon F)} \right) + \frac{1}{K_b(\varepsilon B - \varepsilon F)}$$

EQUAÇÃO 3

Em que: $[\text{DNA}]$ = concentração adicionada de DNA;

εA = absorvância observada/[composto];

ϵF = coeficiente de absorvidade molar do composto;

ϵB = coeficiente de absorvidade molar do composto ligado ao DNA; e

K_b = constante de ligação DNA-composto

Por meio da equação da reta obtida através do gráfico $[DNA]/(\epsilon A - \epsilon F)$ vs $[DNA]$, foram obtidos os valores de coeficiente angular $[1/(\epsilon B - \epsilon F)]$ e coeficiente linear $[1/K_b(\epsilon B - \epsilon F)]$. A constante de ligação intrínseca K_b foi calculada através da razão entre o coeficiente angular e o coeficiente linear.

3.6.2 - Interação com DNA: deslocamento de Hoechst (*ct*-DNA)

Em um microtubo de 2 mL, foi preparada uma solução de tampão Tris-HCl ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4) com CT-DNA ($75 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e Hoechst ($2,5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), com 5% (v/v) de DMSO com volume total de 1 mL. Outras soluções nas mesmas condições foram preparadas com o incremento da concentração de complexos metálicos nas seguintes concentrações: 2,5, 5, 10, 15, 20, 25 e $30 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Foi feita uma triplicata para cada concentração.

Essas soluções foram preparadas e mantidas sob agitação a 20°C por 30 min. Após esse período, as soluções foram aliqüotadas em uma microplaca preta com fundo transparente ($200 \text{ }\mu\text{L}/\text{poço}$). Foi utilizado o fluorímetro de microplaca Synergy/H1-Biotek, em que foi feita a excitação em 340 nm. Em seguida, foi realizada uma varredura no espectro de emissão de 370 até 700 nm. Adicionalmente, as absorvâncias em 340 nm e 480 nm foram mensuradas para aplicação na equação de efeito filtro, caso necessário. As leituras foram realizadas em 25, 30 e 37°C .

3.6.3 - Interação com DNA: avaliação por viscosidade (*ct*-DNA)

Em diferentes tubos de ensaio, foram preparadas soluções em tampão Tris-HCl ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4) com *ct*-DNA ($1,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e 10% (v/v) de DMSO, com volume total de 3 mL cada. Em cada tubo, foi adicionada uma solução de composto em DMSO, respeitando-se a concentração de 10%, desse modo, foram preparados oito tubos com as seguintes concentrações de composto: 0, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05 e 0,06 $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Foi feita uma triplicata para cada concentração.

Os tubos foram mantidos em banho termostático a 25°C por 30 min antes da medida de viscosidade, e a sala foi climatizada e mantida à temperatura constante de 25°C, com o uso de ar-condicionado. Com o auxílio do viscosímetro eletrônico ROTAVISC lo-vi (IKA), a viscosidade de cada tubo foi aferida cinco vezes, e o valor médio das viscosidades foi calculado. Os dados foram tratados utilizando-se o software GraphPadPrism 8.0.2.

3.6.4 - Interação com HSA: supressão de fluorescência

Foram preparadas diferentes soluções de 1 mL com tampão Tris-HCl (0,1 mol·L⁻¹, pH 7.4), contendo HSA (2,5 μmol·L⁻¹), os compostos em diferentes concentrações (2,5, 5, 10, 20, 40, 80 e 150 μmol·L⁻¹) e proporção fixa de DMSO de 5% (v/v). Foi feita uma triplicata para cada concentração. As soluções preparadas foram mantidas sob agitação a 20°C por 15 min. Após esse período, as soluções foram aliqüotadas em 200 μL por poço em microplaca de 96 poços preta com fundo transparente e levadas ao fluorímetro Synergy/H1-Biotek. Os dados de leitura foram: excitação em 270 nm, espectro de emissão 300 – 500 nm e espectro de absorbância na região de 250 – 500 nm.

A obtenção do espectro de absorbância foi feita caso fosse necessária a aplicação da correção do efeito filtro. Realizou-se as medidas em diferentes temperaturas: 25, 29, 33 e 37°C.

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se a equação de supressão de fluorescência de Stern-Volmer (EQUAÇÃO 4), assim como foi calculada a constante de ligação entre a biomolécula e os compostos testados (EQUAÇÃO 5). Com a variação de temperatura dos dados obtidos, foi possível calcular os parâmetros físico-químicos para o entendimento mais completo do sistema (EQUAÇÃO 6 e EQUAÇÃO 7),

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q]$$

Equação 4

$$\log\left[\frac{F_0 - F}{F}\right] = \log K_b + n \log[Q]$$

Equação 5

$$\ln \left[\frac{K_{b1}}{K_{b2}} \right] = \frac{1}{R} \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \Delta H$$

Equação 6

$$\Delta G = -RT \ln K_b = \Delta H - T\Delta S$$

Equação 7

Em que: [Q] = concentração do agente supressor de fluorescência;

F₀ = intensidade de fluorescência na ausência do agente supressor;

F = intensidade de fluorescência na presença do agente supressor;

K_{SV} = constante de supressão da fluorescência de Stern-Volmer;

k_q = constante de supressão biomolecular;

τ₀ = tempo de vida médio da fluorescência (6,2 ns);

K_b = constante de ligação em determinada temperatura;

T = temperatura (K);

R = constante dos gases ideais;

ΔH = variação da entalpia;

ΔS = variação da entropia; e

ΔG = variação da energia livre de Gibbs.

3.6.5 - Ensaio de inibição enzimática: DNA-Topoisomerase II

O ensaio de inibição da enzima DNA-Topoisomerase IIα foi realizado com o kit de relaxamento do DNA fornecido pela Inspiralis Limited (*Human Topoisomerase II Relaxation Assay Kit*). 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

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), 1μL (1,0 mmol·L⁻¹) de ATP e 1μL de composto de interesse em diferentes concentrações. Por fim, adicionou-se água e 1μL (4,0 nmol·L⁻¹) de TOPOII para atingir um volume final de 30 μL.

A mistura reacional foi mantida em incubação a 37°C por 40 min. Após esse período, foram adicionados à solução 3 μL de SDS (dodecil sulfato de sódio) e realizado um choque térmico a 60°C por 2 min 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 60μL de uma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v). As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min. A fase aquosa foi adicionada em gel de agarose 1% (m/v), em solução tampão de TBE 1x (Tris/Borato/EDTA) pH = 8,2.

Após a centrifugação, 20 μL das soluções das amostras foram adicionados no gel de agarose 1% (m/v). A corrida eletroforética ocorreu em solução TBE 1x a 45 V durante 3 h. Após esse período, o gel foi adicionado em solução corante de brometo de etídio e revelado no fotodocumentador Gel Doc™ EZ (BioRad). A imagem obtida foi analisada utilizando-se o software ImageLab™ 6.0.0, fornecido pela BioRad.

3.6.6 - Ensaio de inibição enzimática: Catepsina B

O ensaio de inibição da Catepsina B foi realizado utilizando-se um kit fornecido pela Abcam (*Cathepsin B Inhibitor Screening Kit* – ab185438). Utilizando-se uma microplaca preta de 96 poços, foram adicionados 48 μL de tampão de reação, 1 μL de reagente e 1 μL de Catepsina B em cada poço. Os compostos foram adicionados posteriormente (10 μL) em diferentes concentrações (50, 100, 150, 200, 250 e 300 μmol·L⁻¹). Por fim, foi adicionada ao poço a solução contendo o substrato Ac-RR-AFC, totalizando 100 μL.

Além dos compostos de Pd(II), foi realizado um ensaio para o inibidor comercial da enzima F-F-FMK. A enzima Catepsina B atua como catalisador na clivagem do substrato e libera o fragmento AFC (Coumarin 151), que é fluorescente (FIGURA 3.3). As medidas de fluorescência foram feitas no fluorímetro Synergy/H1-

Biotek a 37°C com excitação em 400 nm, e foi lida a emissão em 505 nm. Foram realizadas cinco medidas com intervalos de 5 min entre cada uma.

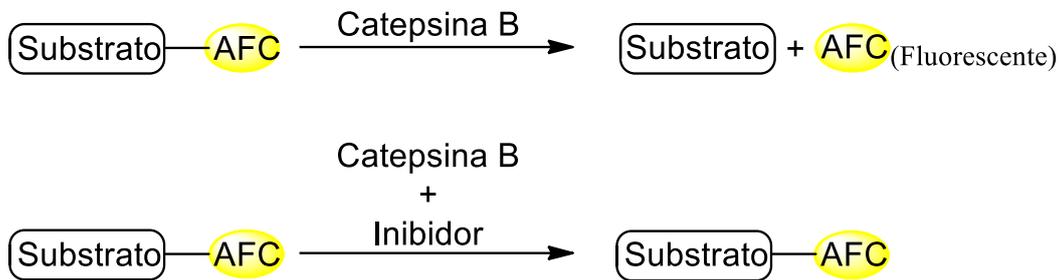


FIGURA 3.3 - Esquema da reação catalisada pela Catepsina B.

Após as medidas, foi plotado o gráfico do tempo versus a intensidade. Com o valor do coeficiente angular (S_0 – sem inibição, S – amostra), foi possível calcular a inibição relativa (I) dos compostos (EQUAÇÃO 8).

$$I(\%) = \frac{S_0 - S}{S_0} \times 100$$

Equação 8

3.7 - Análise estatística

A análise estatística dos experimentos foi realizada utilizando-se o software GraphPadPrism 8.0.2. Através das médias e desvios padrões calculados, foi realizada a análise de variância (ANOVA), comparando-se o controle com as amostras. O teste de Dunnet foi utilizado para determinar, de forma estatística, o quanto as amostras se diferenciaram dos controles.

4 - Resultados e discussão

4.1 - Síntese e caracterização dos complexos metálicos

A síntese dos complexos de Pd(II) foi realizada a partir da reação de substituição dos ligantes presentes no precursor $[\text{Pd}(\text{Cl})_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$. Inicialmente, o precursor foi solubilizado em acetonitrila à temperatura ambiente, formando uma solução amarelo claro, em seguida, foi adicionado o ligante tiossemicarbazona (TSC) à solução. Uma rápida mudança de coloração do meio reacional foi observada, adquirindo coloração laranja intenso com a presença de precipitado. A substituição das acetonitrilas coordenadas ao íon Pd(II) ocorre por mecanismo associativo ativado, em que o ligante TSC aproxima-se do centro metálico via posição axial (d_{z^2}), e há a formação do intermediário penta coordenado, em seguida, há a saída da CH_3CN . Após a primeira substituição, o ligante ataca novamente o centro metálico e substitui a segunda acetonitrila. Nesse instante, há a formação de um anel quelado de cinco membros.⁷⁸

Com a substituição dos ligantes acetonitrila e a formação do anel quelado, os complexos de paládio (II) formam um intermediário bimetálico em solução, o qual é formado pelos anéis quelatos recentemente formados e possui dois clorídeos em ponte. O intermediário é desfeito com a adição de um terceiro ligante à solução, a trifenilfosfina. Após 24 h da adição do TSC à solução, foi adicionado ao meio reacional a PPh_3 . Houve uma mudança de coloração lenta de acordo com a solubilização dos cristais de PPh_3 . A coloração final observada foi um laranja claro (FIGURA 4.1).

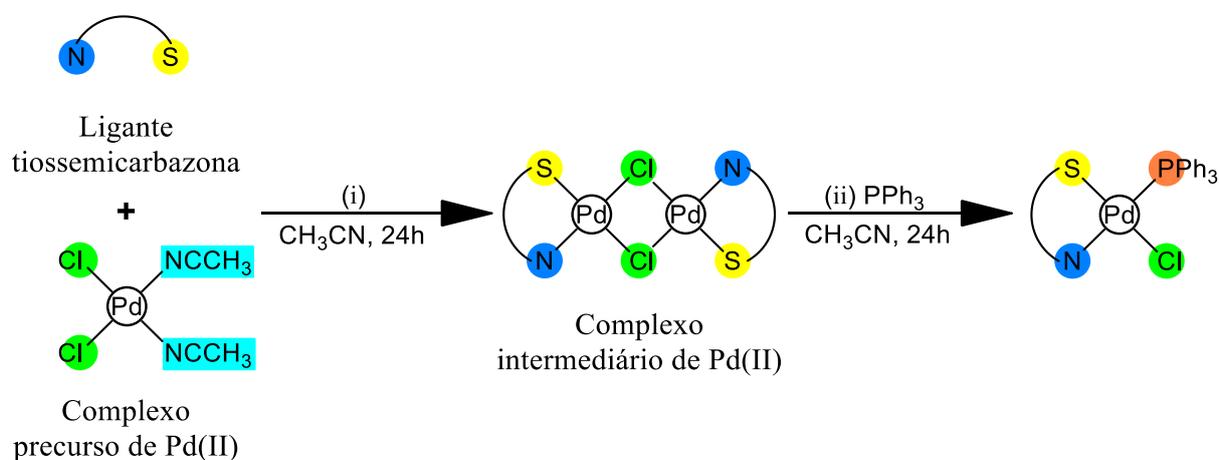


FIGURA 4.1 - Esquema de reação na formação dos complexos de Pd(II).

Foram sintetizados e caracterizados cinco novos complexos de Pd(II) (FIGURA 4.2) pelas técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR), espectroscopia de absorção da região do UV-Visível (UV-Vis), espectrometria de massas de alta resolução (MS) e difração de Raios X (DRX).

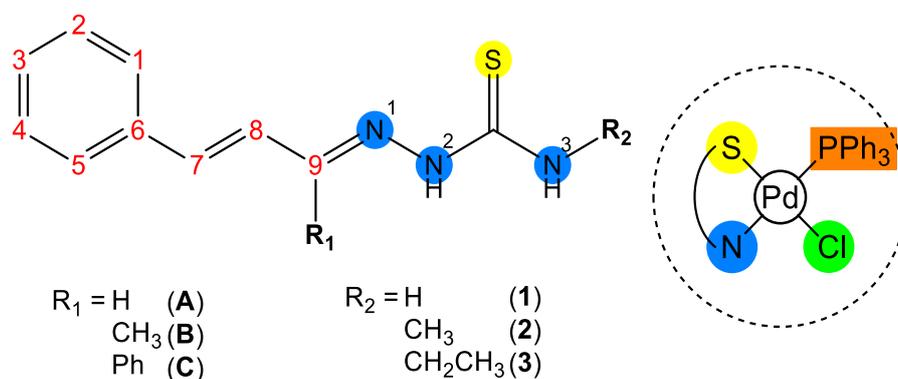


FIGURA 4.2 - Proposta estrutural para os complexos de Pd(II).

4.1.1 - Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e ^{31}P foram obtidos em um espectrômetro BRUKER ARX 9,4T (400 MHz) do Departamento de Química (DQ) da UFSCar, e os dados foram analisados utilizando-se o software MestReNova 12.0.2. Em conformidade com o esperado, os espectros RMN de ^1H para os complexos **PdB1**, **PdB3**, **PdC1**, **PdC2** e **PdC3** apresentaram valores de deslocamento químico semelhantes entre si, uma vez que são análogos e possuem diferenças pontuais em suas estruturas.

Na FIGURA 4.3, os sinais dos grupos CH_3 e CH_2CH_3 encontram-se na região mais protegida do espectro, e, nessa seção, observou-se, para os compostos **PdB1** (1), **PdC2** (4) e **PdC3** (5), a presença do solvente acetonitrila em 2,0 ppm. Os sinais encontrados na região superior a 10 ppm referem-se a H-N(2) e H-N(3), contudo, esses sinais não foram detectados para o complexo **PdC1** (3). O sinal H-N(2) apresentou-se mais ácido entre as aminas. Foi realizada a comparação entre o sinal do ligante livre e do complexo, o qual demonstrou um deslocamento de 8,37 ppm (**L-C3**) para 13,66 ppm (**PdC3**). Assim, a coordenação ao centro metálico representou uma redução da densidade eletrônica em torno dessa ligação. Tal verificação

espectroscópica pode ser observada experimentalmente, de modo que sabe-se que esse próton pode ser facilmente removido com a adição de base em solução.⁹²

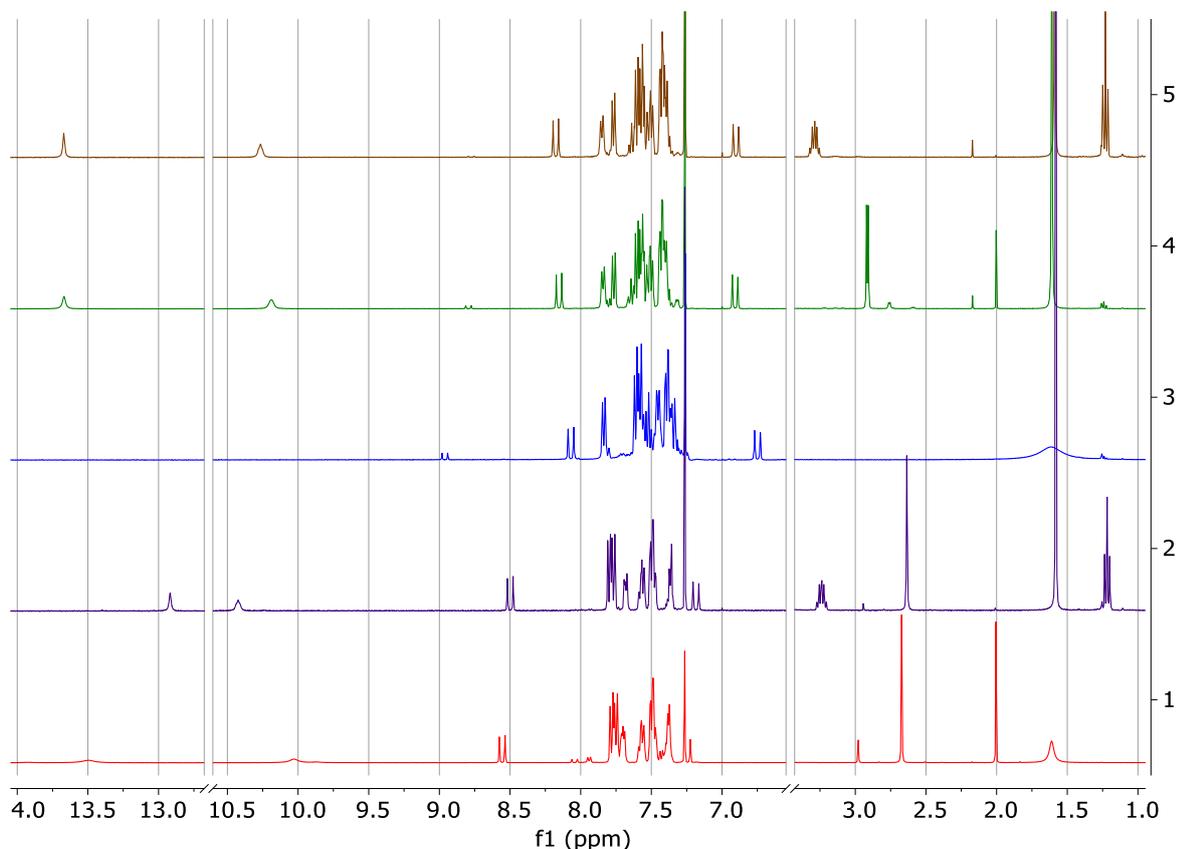


FIGURA 4.3 - Espectros de RMN ¹H (400 MHz) em *d*-CDCl₃ para os complexos de Pd(II) linha 1 (**PdB1**), linha 2 (**PdB3**), linha 3 (**PdC1**), linha 4 (**PdC2**) e linha 5 (**PdC3**).

Devido à grande semelhança estrutural entre os compostos de Pd(II) sintetizados, foi feita uma avaliação detalhada do **PdC3**, que é o composto de coordenação com maior complexidade estrutural da série (todos os demais espectros de RMN ¹H estão disponíveis entre a FIGURA A1 – A5). A FIGURA 4.4 e a FIGURA 4.5 apresentam a proposta estrutural para o composto **PdC3** e o espectro de RMN ¹H com os sinais de interesse ampliados, respectivamente.

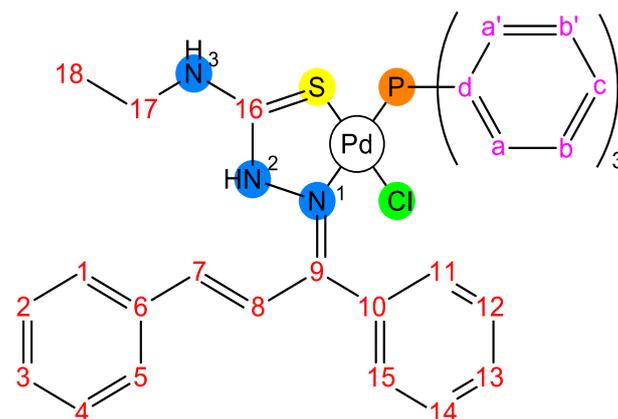


FIGURA 4.4 - Representação detalhada da estrutura com composto **PdC3**.

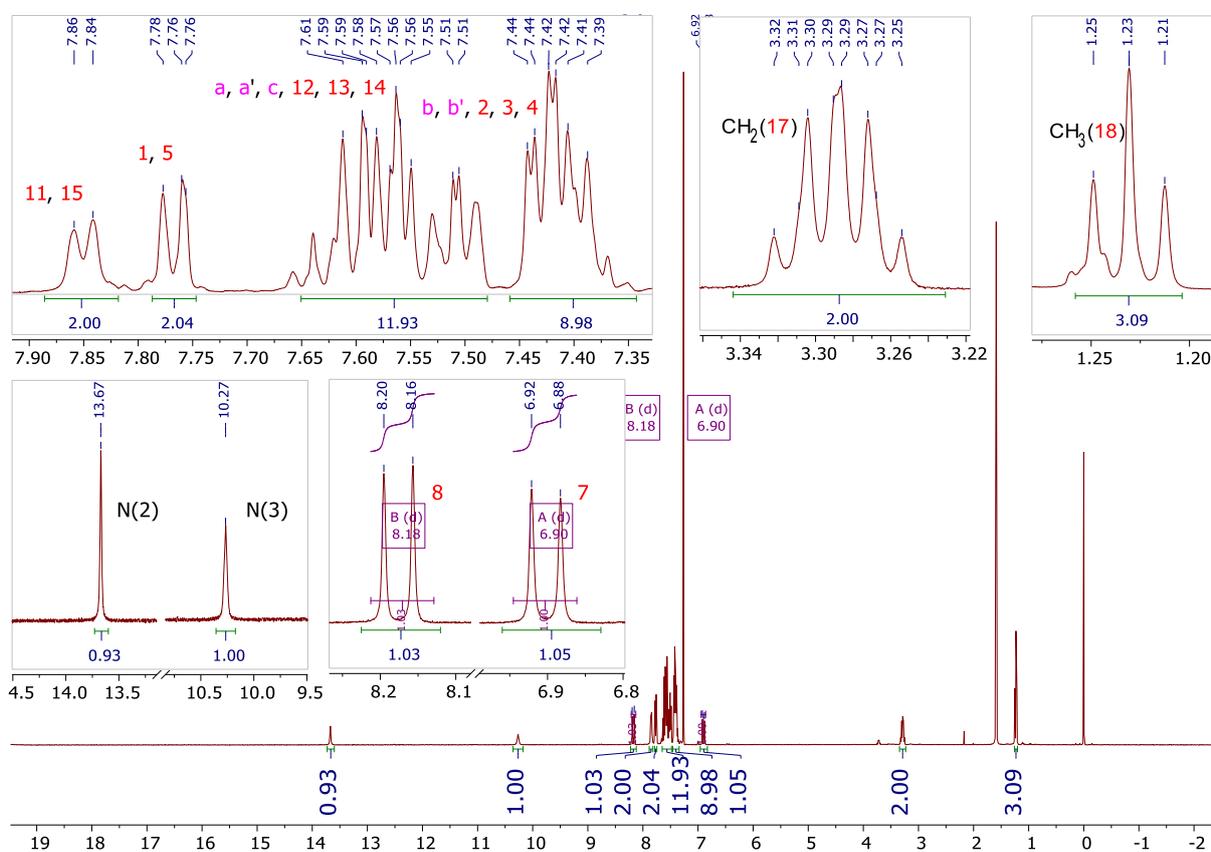


FIGURA 4.5 - Espectro de RMN ¹H (400 MHz) em *d*-CDCl₃ para o complexo **PdC3**, com as atribuições para os sinais.

Na região mais blindada do espectro, foram identificados os sinais referentes aos hidrogênios nos C18 (1,23 ppm) e C17 (3,29 ppm) correspondentes ao substituinte N-etil no ligante tiossemicarbazona. O sinal em 1,23 ppm apresentou multiplicidade tripeto com constante de acoplamento $J_{H-H} = 7,0$ Hz, característico de hidrogênios vicinais de cadeia alifática. Em concordância, o sinal em 3,29 ppm

apresentou multiplicidade caracterizada como duplo-dubleto, e foi possível calcular duas constantes de acoplamento $J_{H-H} = 7,32$ Hz e $J_{H-H} = 5,5$ Hz, que são referentes: i) ao acoplamento de hidrogênios vicinais de cadeia alifática (CH_3CH_2) com $J = 6-8$ Hz; e ii) ao acoplamento com o hidrogênio H-N(3) com $J \sim 5$ Hz. Normalmente, não se observa multiplicidade em sinais de H-N, contudo, como demonstrado na FIGURA 4.6, o sinal H-N(3) em 10,27 ppm apresentou-se na forma de um tripleto deformado.

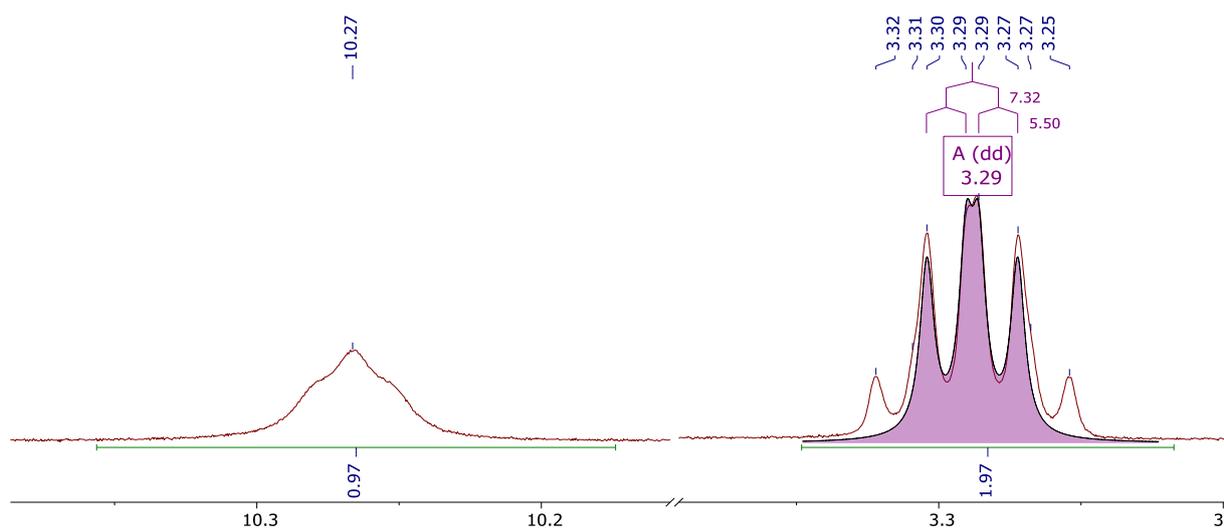


FIGURA 4.6 - Espectro de RMN 1H (400 MHz) em d - $CDCl_3$ ampliado do complexo **PdC3**, em que 10,27 ppm apresenta o sinal referente ao grupo H-N(3), e em 3,29 ppm apresenta o sinal referente ao $CH_2(17)$ com o diagrama (árvore de Pascal) e os respectivos valores das constantes de acoplamento incorporados ao espectro.

Está concentrada na região aromática grande parte dos sinais de H das estruturas estudadas. De acordo com a FIGURA 4.5 e a ampliação da FIGURA 4.7, os sinais referentes aos H dos anéis aromáticos encontraram-se entre os sinais dos hidrogênios vinílicos. No ligante **L-C3**, os sinais H(7) e H(8) foram observados em 6,33 e 7,02 ppm, respectivamente, entretanto, com a coordenação ao Pd(II), houve um deslocamento da densidade eletrônica do ligante para suprir a carga positiva do metal. Isso gerou uma mudança no ambiente químico dos sinais vinílicos, que foram deslocados para 6,90 [H(7)] e 8,18 [H(8)] ppm. Esses sinais foram identificados devido à constante de acoplamento entre hidrogênios vinílicos na posição trans $J = 11-18$ Hz. Para o espectro do ligante **L-C3** e para o complexo **PdC3**, foram calculadas as constantes $J = 16,3$ Hz e $J = 15,3$ Hz, respectivamente.⁷⁸

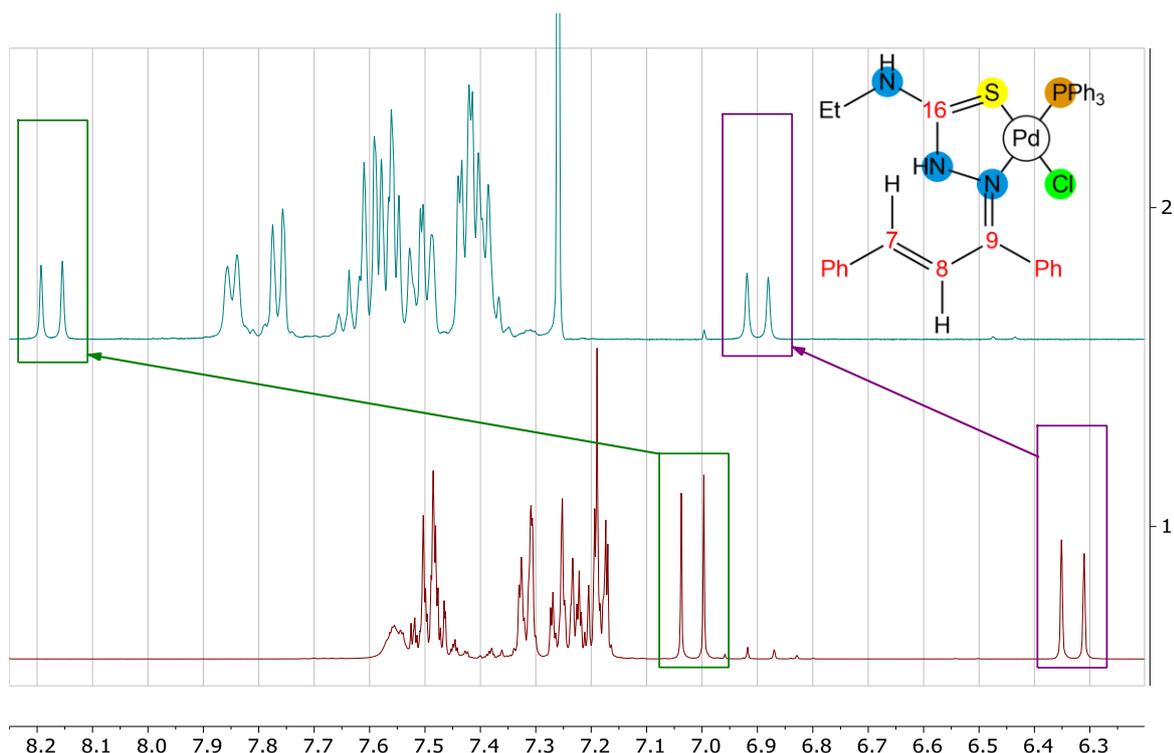


FIGURA 4.7 - Espectros de RMN ^1H (400 MHz) em $d\text{-CDCl}_3$ do ligante **L-C3** (1) e do complexo **PdC3** (2), com indicação dos deslocamentos dos sinais vinílicos.

Como observado na FIGURA 4.7, após a coordenação, todos os sinais foram deslocados para região mais desblindada do espectro. Os sinais referentes aos hidrogênios ligados aos anéis aromáticos ($25\times\text{H}$) encontraram-se, em parte, aglutinados em multipletos indissociáveis. Os sinais entre 7,34 – 7,45 ppm foram atribuídos aos hidrogênios H(3), H(4) e H(2) da tiossemicarbazona, b' e b da trifenilfosfina. Esses sinais foram os que menos sofreram mudanças em seu deslocamento químico quando comparados aos ligantes.

Os sinais entre 7,48 – 7,62 ppm foram designados aos hidrogênios H(12), H(13) e H(14) do ligante TSC e a' , a e c da PPh_3 . Por fim, os sinais que apresentaram maior desblindagem foram as duplas H(11), H(15) e H(1), H(5), com deslocamentos químicos de 7,82 e 7,77 ppm, respectivamente. Esses sinais foram os mais desblindados e estão *orta* posicionados em relação à cadeia principal do ligante TSC.

O experimento 2D ^1H - ^1H COSY apresenta as correlações diretas entre os núcleos de hidrogênio. No espectro bidimensional, os sinais que compartilham as

mesmas coordenadas indicam uma interação entre os núcleos de ^1H . De acordo com a FIGURA 4.8, observou-se que as atribuições realizadas para os espectros de RMN ^1H 1D estão em conformidade com o experimento COSY. Verificou-se as principais interações de acoplamento: os hidrogênios de CH_2/CH_3 do grupo substituinte etil no ligante TSC, a interação dos hidrogênios $\text{H-N}(3)/\text{CH}_2$ e o par de hidrogênios vinílicos $\text{H}(8)/\text{H}(7)$.

Também destacou-se a região aromática, em que foi encontrada a maioria das interações, o que está de acordo com o espectro 1D, uma vez que a maioria dos hidrogênios pertencentes à estrutura está nessa região. Por fim, na região superior a 13 ppm, é observado o sinal referente ao $\text{H-N}(2)$, sendo o sinal mais ácido, e, devido à sua posição entre uma amina terciária e um carbono da tioamida, não apresenta interação com outros núcleos hidrogênios.

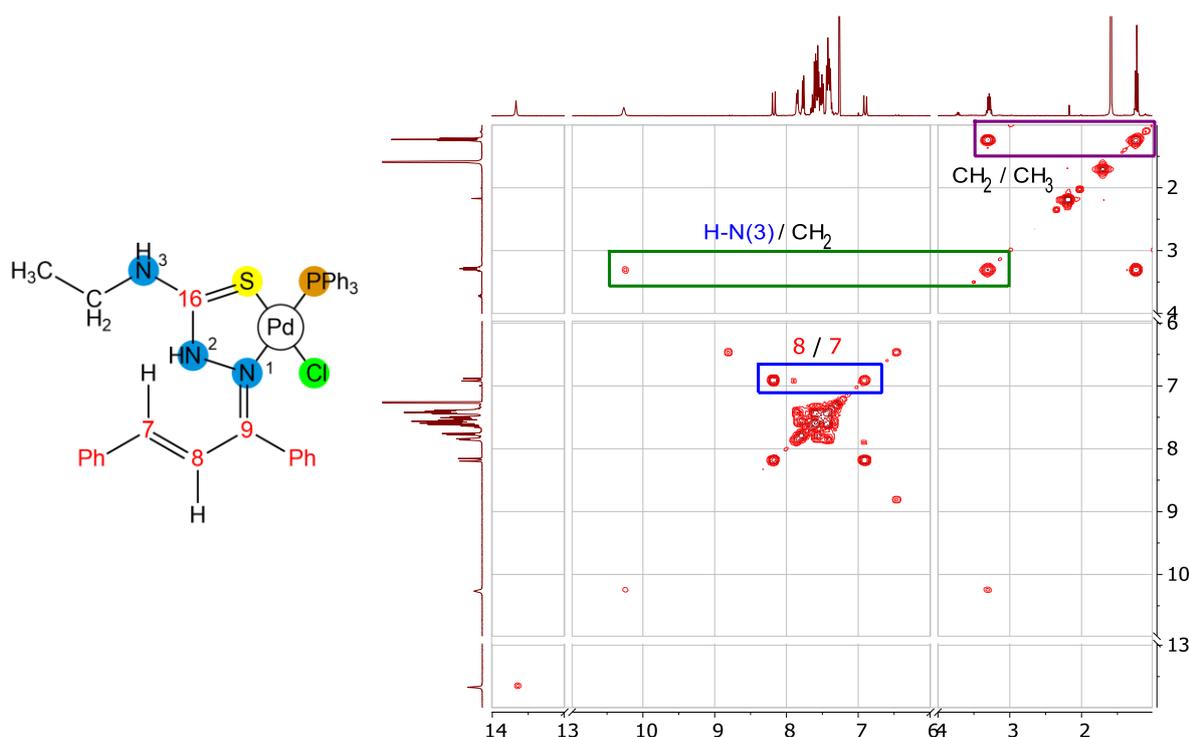


FIGURA 4.8 - Experimento bidimensional ^1H - ^1H COSY para o complexo **PdC3** em $d\text{-CDCl}_3$ com os principais sinais atribuídos e destacados sobre o espectro.

A FIGURA 4.9 apresenta o espectro de RMN para o núcleo de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (100 MHz) obtido para o complexo **PdC3**. Nele, foi possível averiguar os sinais referentes aos carbonos alifáticos em 13,69 e 40,27 ppm, que corresponderam ao substituinte N-etil do ligante TSC. Simultaneamente, foi realizado o experimento

DEPT-135 (FIGURA 4.10), que inverte o sinal de CH₂, o que auxiliou na identificação do sinal C17. Também foi observada a presença do solvente de reação, acetonitrila, em 30,96 ppm.

Os sinais referentes aos carbonos do grupo vinil (C7 e C8) foram encontrados em 119,70 e 150,18 ppm, e, em sequência, os sinais mais desprotegidos foram atribuídos a C9 (166,04 ppm) e C16 (207,12 ppm), que correspondem aos carbonos ligados diretamente aos átomos N e S, respectivamente, que participam da coordenação ao metal Pd(II) na formação do complexo.

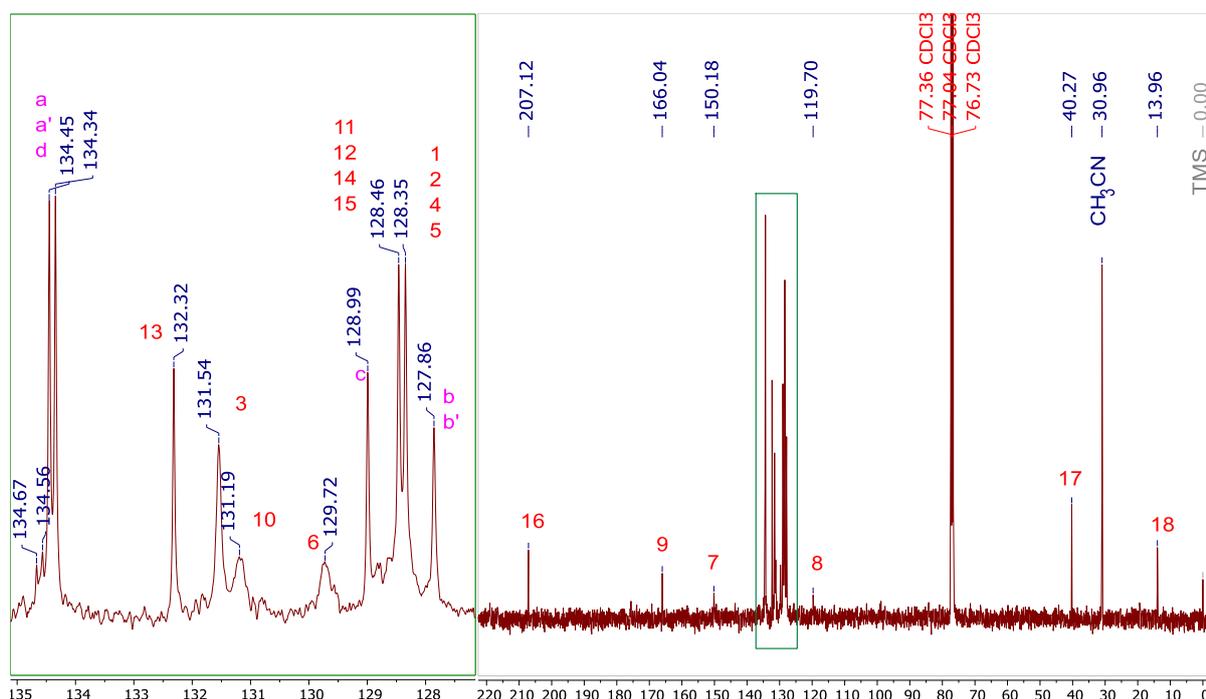


FIGURA 4.9 - Espectro de RMN ¹³C em *d*-CDCl₃ para o complexo **PdC3** com sinais atribuídos e ampliação da região de 127 a 135 ppm.

Na FIGURA 4.9, foi destacada a região dos carbonos aromáticos (de 127 a 135 ppm), em que foi possível identificar os sinais referentes aos grupos fenílicos, que compõem a estrutura. Destacou-se que os sinais mais blindados são referentes aos carbonos *meta* posicionados da PPh₃ (*b* e *b'*) e os carbonos *orto* (1, 5 e 11, 15) e *meta* (2, 4 e 12, 14), posicionados nos anéis aromáticos do ligante TSC.

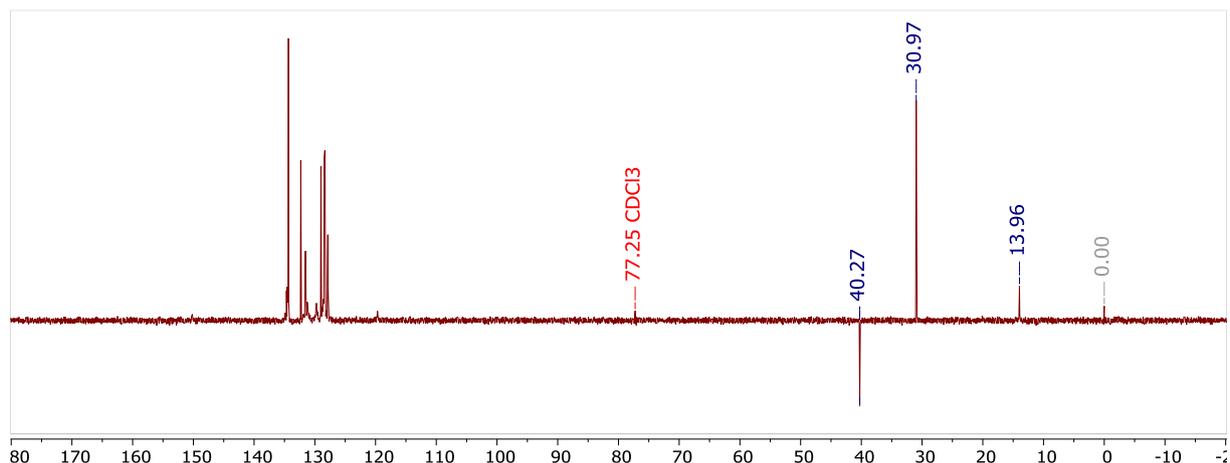


FIGURA 4.10 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT-135 em $d\text{-CDCl}_3$ para o complexo **PdC3**.

O experimento bidimensional de correlação entre os núcleos ^1H - ^{13}C , com distância de uma ligação química (HSQC), foi realizado para o complexo **PdC3**. O espectro obtido apresenta as correlações entre os núcleos estudados, nesse caso, indicando a quais núcleos de carbono e hidrogênio estão ligados entre si. Na FIGURA 4.11, foi possível distinguir os sinais na região alifática dos espectros e os sinais referentes ao grupo vinílico, além dos sinais de solvente presentes na amostra. O espectro está em conformidade com as atribuições realizadas para os espectros unidimensionais de ^1H e ^{13}C .

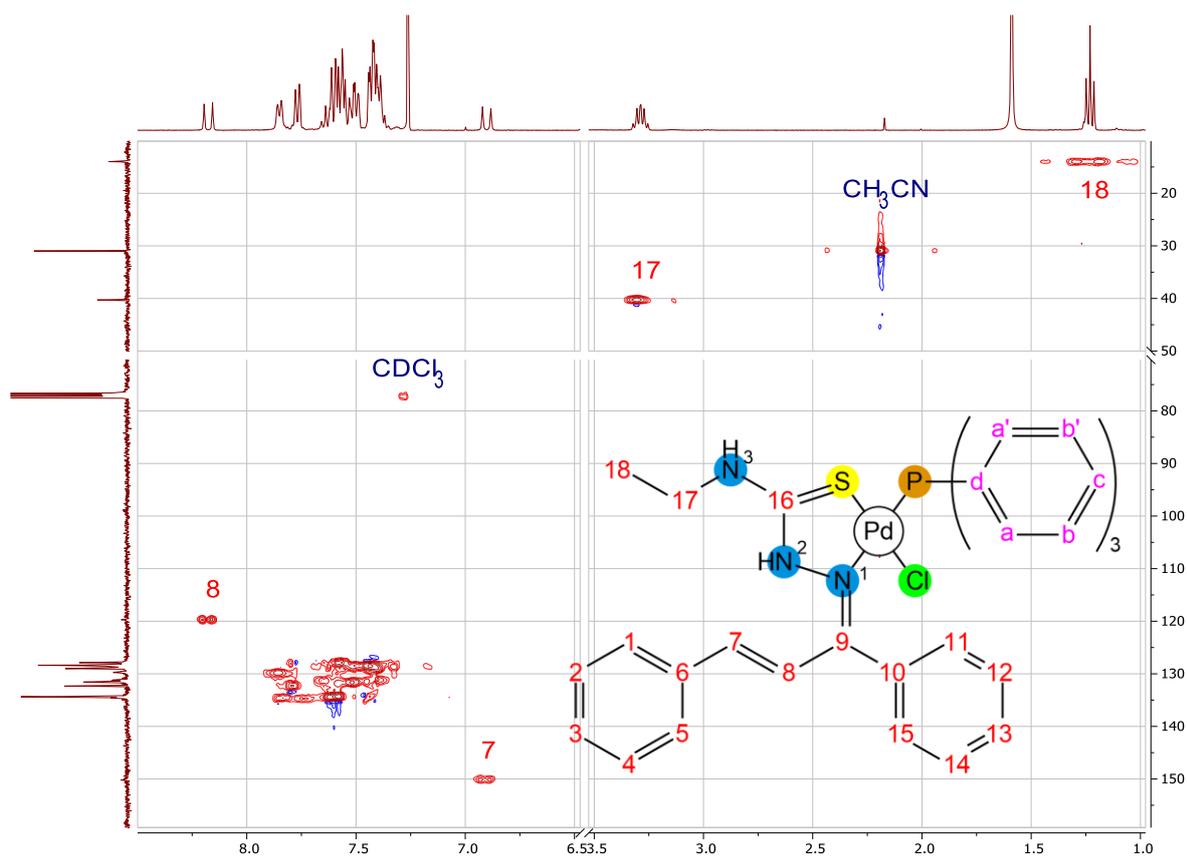


FIGURA 4.11 - Experimento bidimensional ^1H - ^{13}C HSQC para o complexo **PdC3** em $d\text{-CDCl}_3$, com os principais sinais atribuídos e destacados sobre o espectro.

O ambiente químico do ligante trifenilfosfina nos complexos foi avaliado por RMN de ^{31}P . Os valores de deslocamento químico dos diferentes complexos sintetizados foram semelhantes entre si, vide pequenas mudanças estruturais (FIGURA 4.12). Houve o deslocamento do sinal da PPh_3 livre em $-6,81$ ppm para 30 ppm (FIGURA A6). Esse fenômeno referiu-se à redução da densidade eletrônica no P da trifenilfosfina devido à coordenação ao Pd(II).

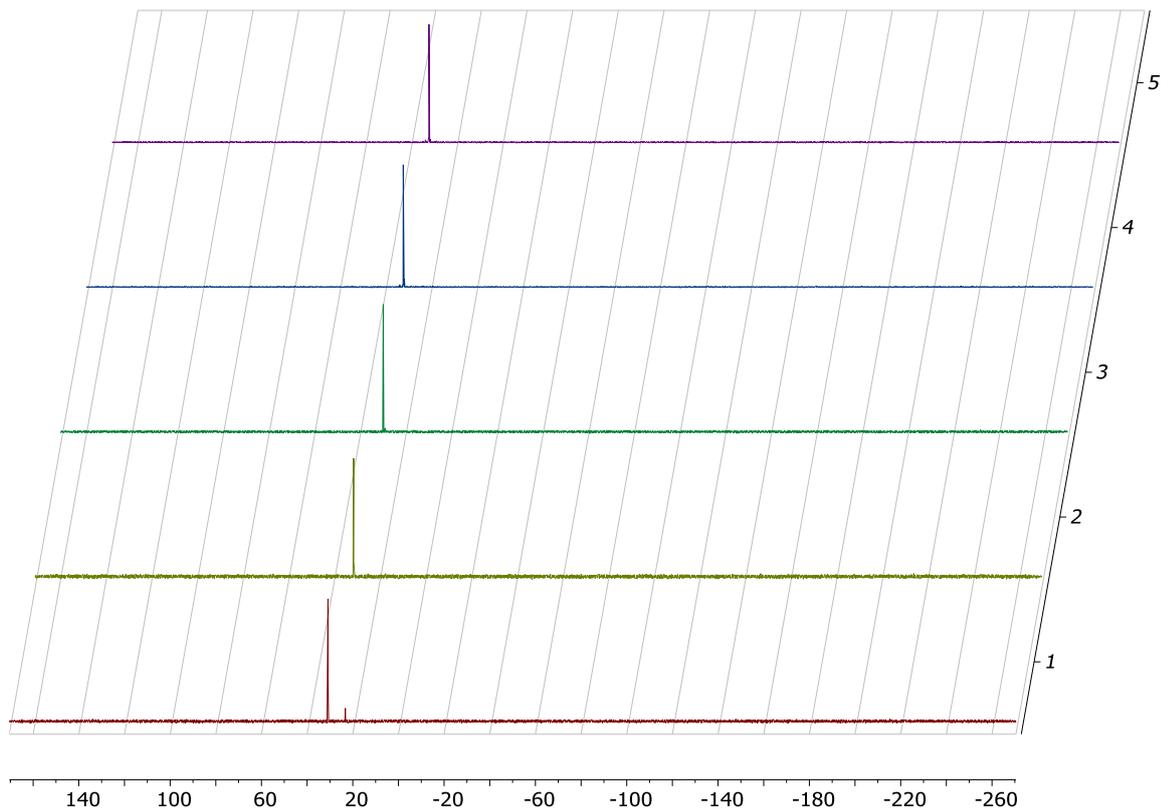


FIGURA 4.12 - Espectros de RMN ^{31}P em d_6 -DMSO para os complexos de Pd(II) linha 1 (**PdB1**), linha 2 (**PdB3**), linha 3 (**PdC1**), linha 4 (**PdC2**) e linha 5 (**PdC3**).

Por fim, o complexo de **PdB3** foi submetido ao ensaio de estabilidade em d_6 -DMSO, uma vez que é o solvente utilizado nos ensaios de viabilidade celular e interação com biomoléculas. O ensaio avaliou o sinal da fosfina coordenada através de RMN de ^{31}P , e o complexo analisado permaneceu estável ao fim de 48 h e não apresentou mudança no deslocamento químico ou na intensidade do sinal (FIGURA 4.13).

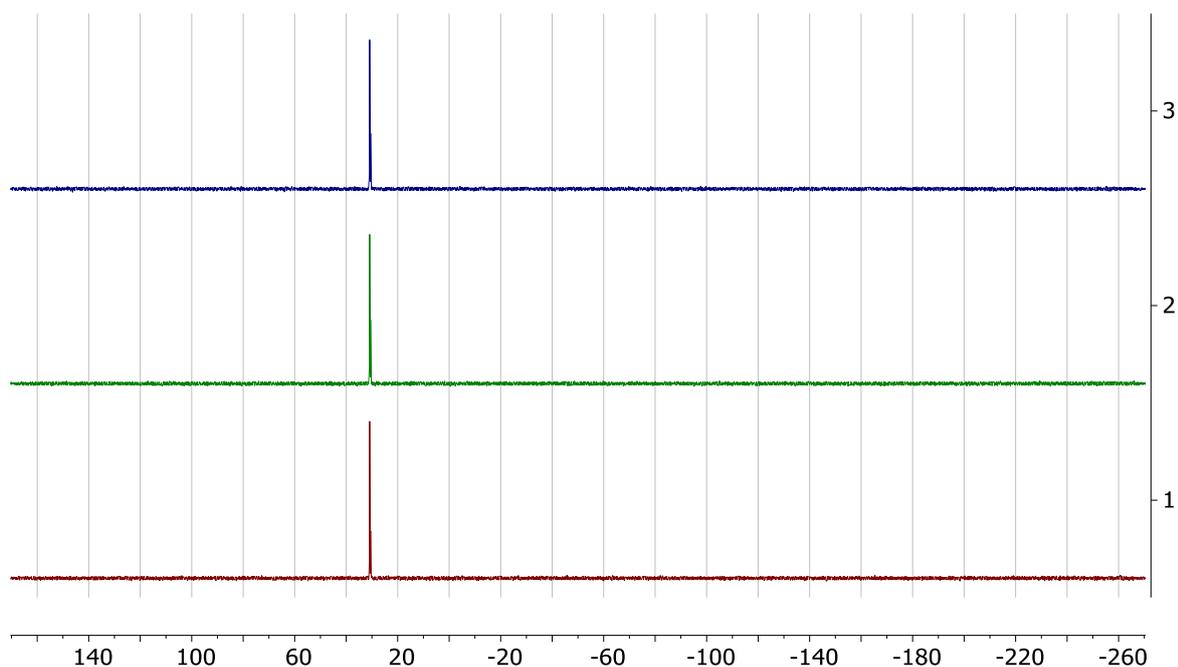


FIGURA 4.13 - Espectros de RMN ^{31}P em d_6 -DMSO para o complexo de **PdB3** nos tempos de 0 (1), 24 (2) e 48 h (3).

4.1.2 - Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR)

Os complexos foram submetidos à espectroscopia vibracional na região do infravermelho. Os espectros foram obtidos através do espectrômetro SHIMADZU IRTracer-100 do Departamento de Química (DQ) da UFSCar, e foram utilizadas pastilhas de Csl como suporte. A leitura foi realizada com 64 varreduras na região de 4400 a 250 cm^{-1} . Após aquisição, os dados foram tratados utilizando-se o software IRsolution (Shimadzu) e Origin 9 (OriginLab).

Foram avaliadas as bandas diagnósticas esperadas para os complexos de Pd(II) com tiossemicarbazona. Na FIGURA 4.14, estão apresentados os espectros de FTIR para os complexos sintetizados. Na região entre 3500 – 3200 cm^{-1} , encontrou-se bandas finas e de intensidade média referente ao estiramento $\nu\text{N-H}$. Foi observada, para o complexo **PdC1** no espectro de RMN ^1H , ausência dos sinais característicos dos hidrogênios N-H. Contudo, isso pode ser explicado devido à troca do H por D nas ligações N-H, uma vez que verificou-se que o solvente CDCl_3 utilizado estava com $\text{pH} < 6$, mas, pela técnica de FTIR, foi possível observar o conjunto de bandas referentes ao $\nu\text{N-H}$.

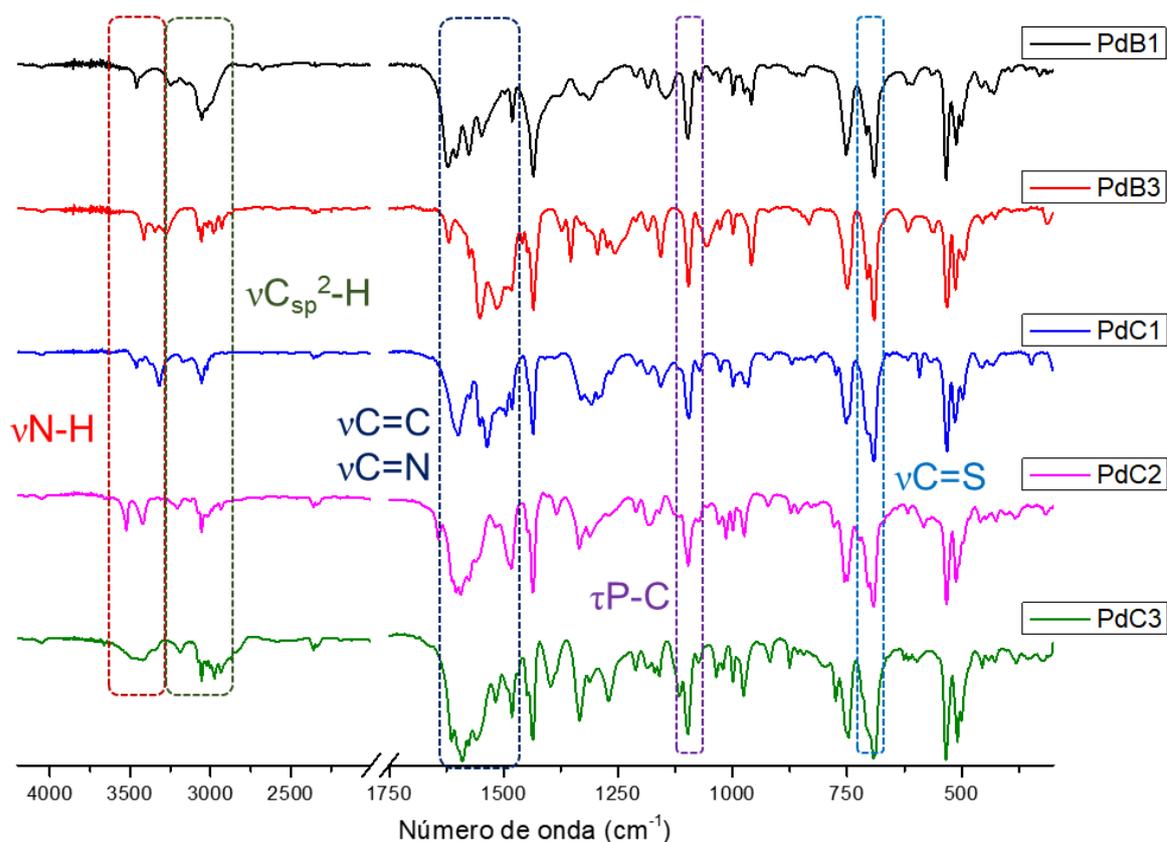


FIGURA 4.14 - Espectro vibracional de FTIR em CsI para os complexos **PdB1**, **PdB3**, **PdC1**, **PdC2** e **PdC3** entre 4400 – 250 cm^{-1} .

Na região de 3100 cm^{-1} , atribuiu-se as bandas do estiramento $\nu\text{C-H}$ de hibridização sp^2 . As bandas na região inferior a 3000 cm^{-1} foram observadas para todos os complexos, com exceção do complexo **PdC1**, que não possui carbonos com hibridização sp^3 .⁹¹ Na região de $1600 - 1400 \text{ cm}^{-1}$, foram detectadas bandas de forte intensidade referentes aos estiramentos $\nu\text{C=C}$ e $\nu\text{C=N}$. As duas bandas estão marcadas, conjuntamente, na FIGURA 4.15. A banda em 1090 cm^{-1} , referente à deformação assimétrica $\tau(\text{P-C}_{\text{Ph}})$, atestou a presença do ligante PPh_3 no arcabouço molecular.

A banda referente ao estiramento $\nu\text{C=S}$ foi encontrada nos ligantes TSC livres em 750 cm^{-1} . Trata-se de uma banda crucial na caracterização desses complexos, pois, normalmente, após a coordenação, a banda reduz sua forte intensidade e desloca-se para regiões menos energéticas. Nos espectros dos complexos, essa banda foi encontrada em torno de 710 cm^{-1} , o que indicou o enfraquecimento da ligação C=S como resposta à coordenação ao Pd(II) .⁹⁵ Na

FIGURA 4.15, é apresentada a comparação dos espectros de FTIR do ligante **L-C1** e do complexo **PdC1**.

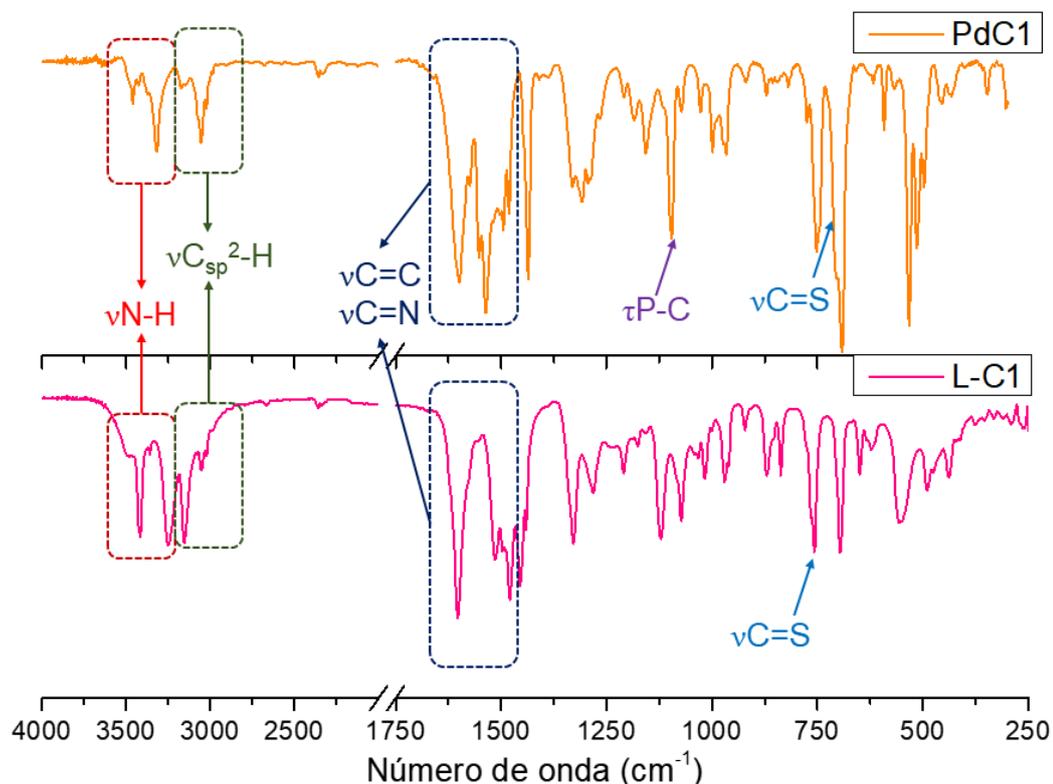


FIGURA 4.15 - Espectro vibracional de FTIR em Csl para o ligante **L-C1** e o complexo **PdC1** entre 4000 – 250 cm^{-1} .

Em conformidade com o enfraquecimento da banda referente à $\nu_s\text{C}=\text{S}$, foi observado o fortalecimento da banda referente ao estiramento $\nu\text{C}=\text{N}$. Por meio da comparação entre ambos os espectros, observou-se o deslocamento dessa banda de 1515 cm^{-1} (**L-C1**) para 1545 cm^{-1} (**PdC1**). Desse modo, a coordenação do ligante TSC ao Pd(II) resultou em mudanças em torno das ligações da tioamida, enfraquecendo a ligação C=S e fortalecendo as interações C=N.

4.1.3 - Espectroscopia eletrônica de absorção molecular na região do UV-Visível

O estudo sobre o estado excitado dos complexos metálicos foi feito por meio do espectrofotômetro SHIMADZU UV-1650PC, em que foram realizados os espectros de absorção na região do UV-Visível. Foi feita uma solução na concentração de $1,0 \times 10^5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para os compostos em DMSO. Esse solvente foi

escolhido, uma vez que os complexos não são solúveis em solução salina ou em meio de cultura para a aplicação em ensaio de citotoxicidade, por isso, o solvente utilizado na solubilização dos compostos é o DMSO. Através do ensaio de absorção na região do UV-Vis, também foi avaliada a estabilidade estrutural desses complexos em solução.

Os complexos da família **B** ($R_1=CH_3$) apresentaram-se estáveis ao fim de uma semana solubilizados em DMSO, uma vez que não foram identificadas mudanças significativas nos espectros (FIGURA 4.16). Foi identificado, nos espectros dos complexos, o surgimento de uma banda referente à transferência de carga do metal para o ligante (TCML) entre 380 – 400 nm. Tais bandas de TCML são características dessa classe de complexos que apresentam ligantes que se coordenam pelos átomos N, S e P. Sendo assim, as ligações que formam os complexos apresentam dois tipos de interação, uma de simetria σ do ligante para o metal e outra de simetria π do metal para o ligante. Desse modo, quando excitados os elétrons, estes ocupam os orbitais responsáveis pela retrodoação (FIGURA 4.17).⁹⁶

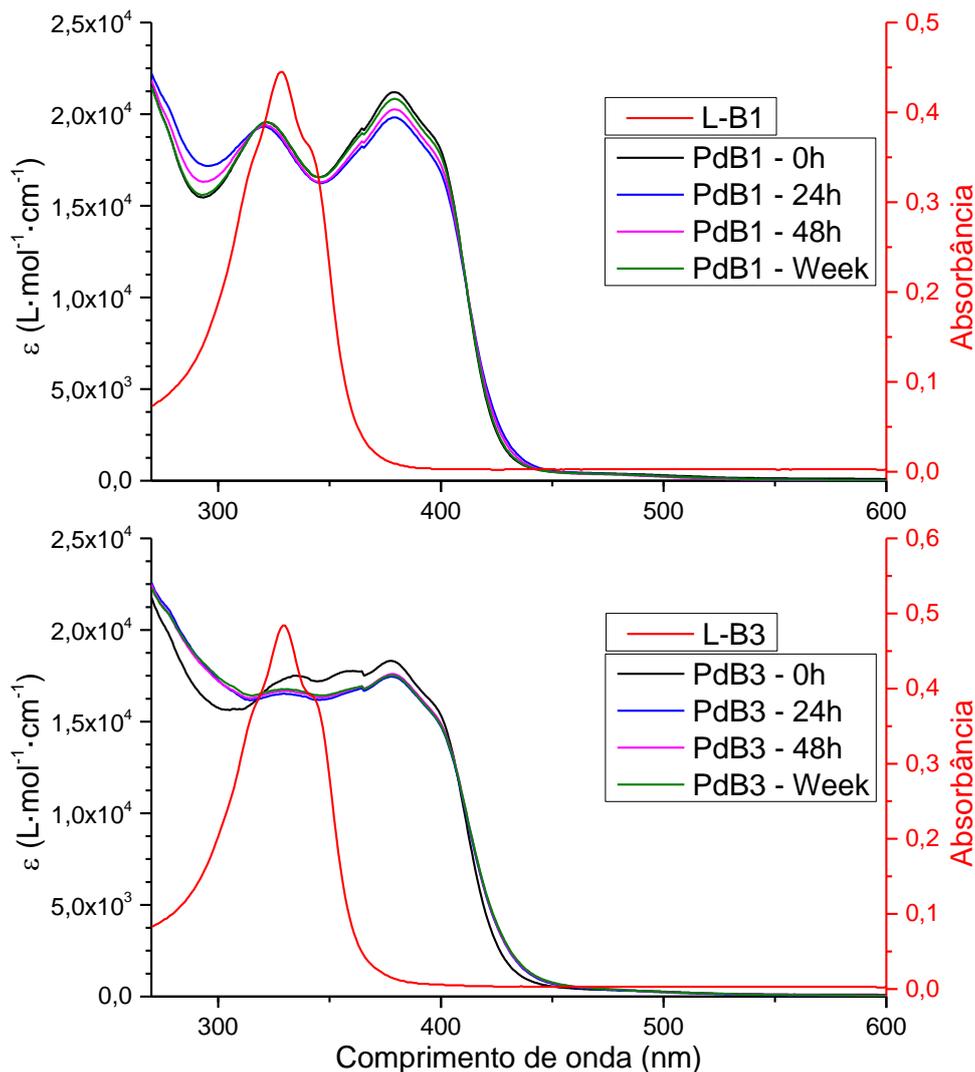


FIGURA 4.16 - Espectros de absorção na região do UV-Visível para os complexos **PdB1** (A) e **PdB3** (B) em DMSO nos tempos de 0, 24, 48 h e sete dias e os ligantes **L-B1** (A) e **L-B3** (B) em etanol.

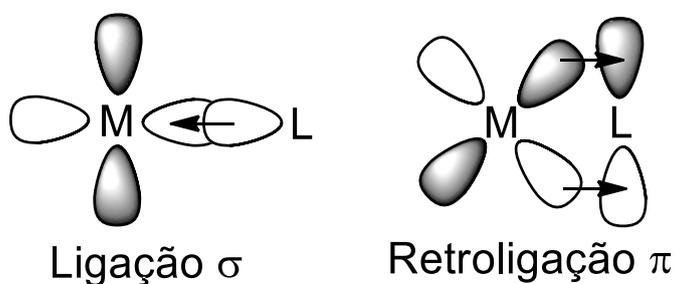


FIGURA 4.17 - Representação das ligações σ e π com indicação ao sentido da transferência eletrônica entre o centro metálico e o ligante.

As demais bandas no espectro foram atribuídas como transições eletrônicas intraligantes do tipo $n \rightarrow \pi^* = 330$ nm e $\pi \rightarrow \pi^* = 275$ nm (FIGURA 4.16). Observou-se que os espectros dos ligantes apresentaram o mesmo conjunto de bandas, e, quando coordenadas, as bandas intraligantes sofreram um pequeno deslocamento hipercrômico de 5 nm, indicando que a coordenação ao íon metálico de Pd(II) pouco alterou as propriedades eletrônicas do ligante TSC.

Contudo, para os complexos com o $R_1 = \text{Ph}$ (família **C**), foram observadas várias mudanças nos espectros de absorção nos diferentes tempos avaliados. Na FIGURA 4.18, são apresentados os espectros dos complexos em diferentes tempos. Nesses espectros, foi verificado o surgimento da banda em 490 nm (TCML), seguida de um hipocrômismo da banda na região de 380 – 400 (TCML) e um hipercrômismo na região de 300 a 320 (bandas intraligantes $n \rightarrow \pi^*$).

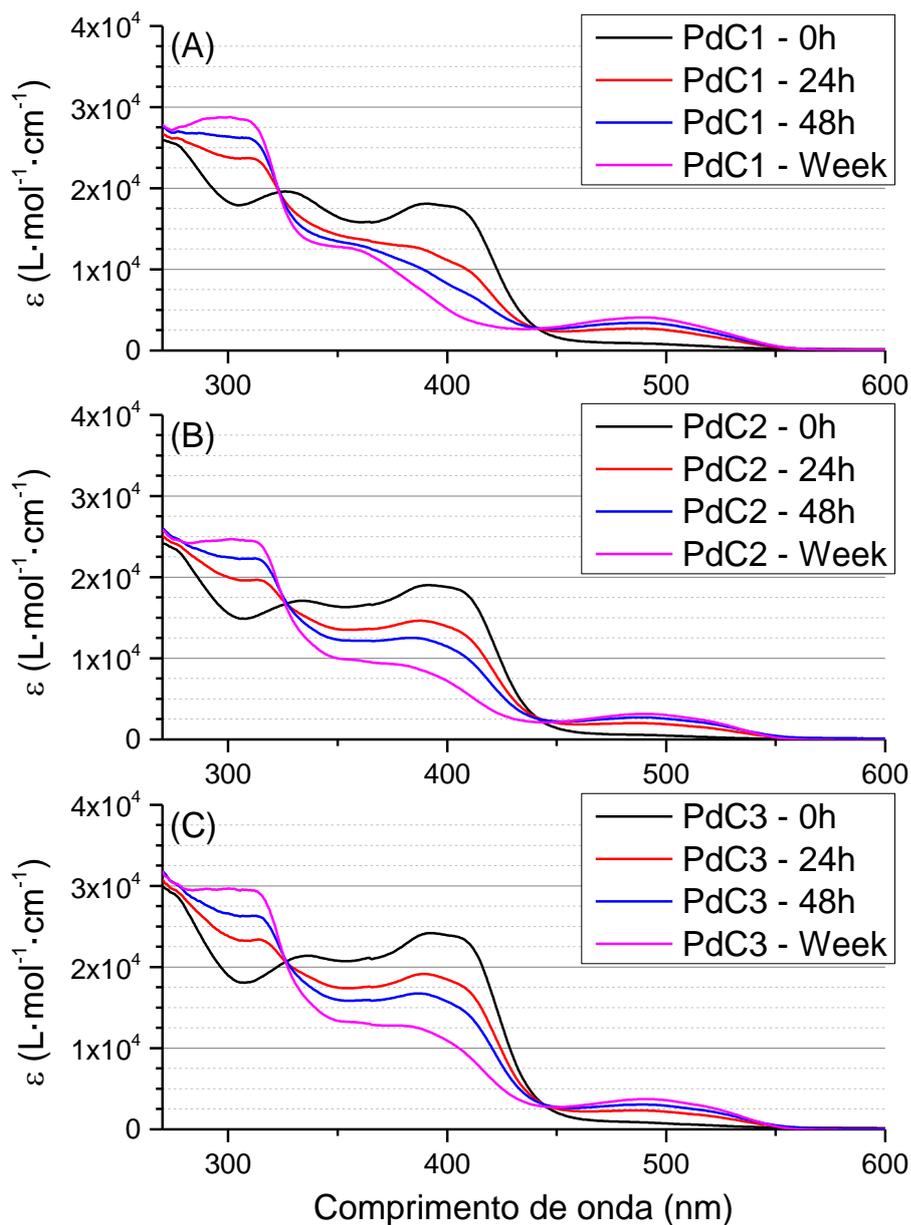


FIGURA 4.18 - Espectros de absorção na região do UV-Visível para os complexos **PdC1** (A), **PdC2** (B) e **PdC3** (C) em DMSO.

A hipótese inicial para as alterações nos espectros eletrônicos foi de que houve uma troca do ligante clorido pelo solvente DMSO, no entanto, com o auxílio da técnica de difração de raios X aliada ao estudo computacional, foi observado que essa hipótese estava equivocada, e ela foi descartada. A partir de novas evidências, uma segunda hipótese foi formulada, em que as alterações observadas através dos espectros de UV-Vis em diferentes tempos se devem a uma mudança na conformação estrutural dos compostos, ou seja, à formação de isômeros estruturais em solução.

Desse modo, a segunda hipótese consegue explicar as mudanças observadas nos espectros na região intraligante, uma vez que essa mudança de conformação ocorre na molécula de TSC, coordenada ao centro metálico Pd(II).

A fim de uma maior compreensão da situação, ensaios de estabilidade foram realizados para o complexo **PdC3** em diferentes solventes: diclorometano (apolar) e metanol (polar prótico). Tais resultados foram comparados com os espectros obtidos em DMSO (polar aprótico). Através dos espectros obtidos, foi observado que a natureza do solvente implica o padrão espectral no tempo 0 h. Em relação aos demais tempos de análise, verificou-se hipercrômismo na região de 275 – 315 nm, referente às bandas intraligantes, e hipocrômismo nas bandas de TCML. As soluções em metanol e diclorometano apresentam poucas mudanças entre os espectros de 24 h e 48 h (FIGURA 4.19).

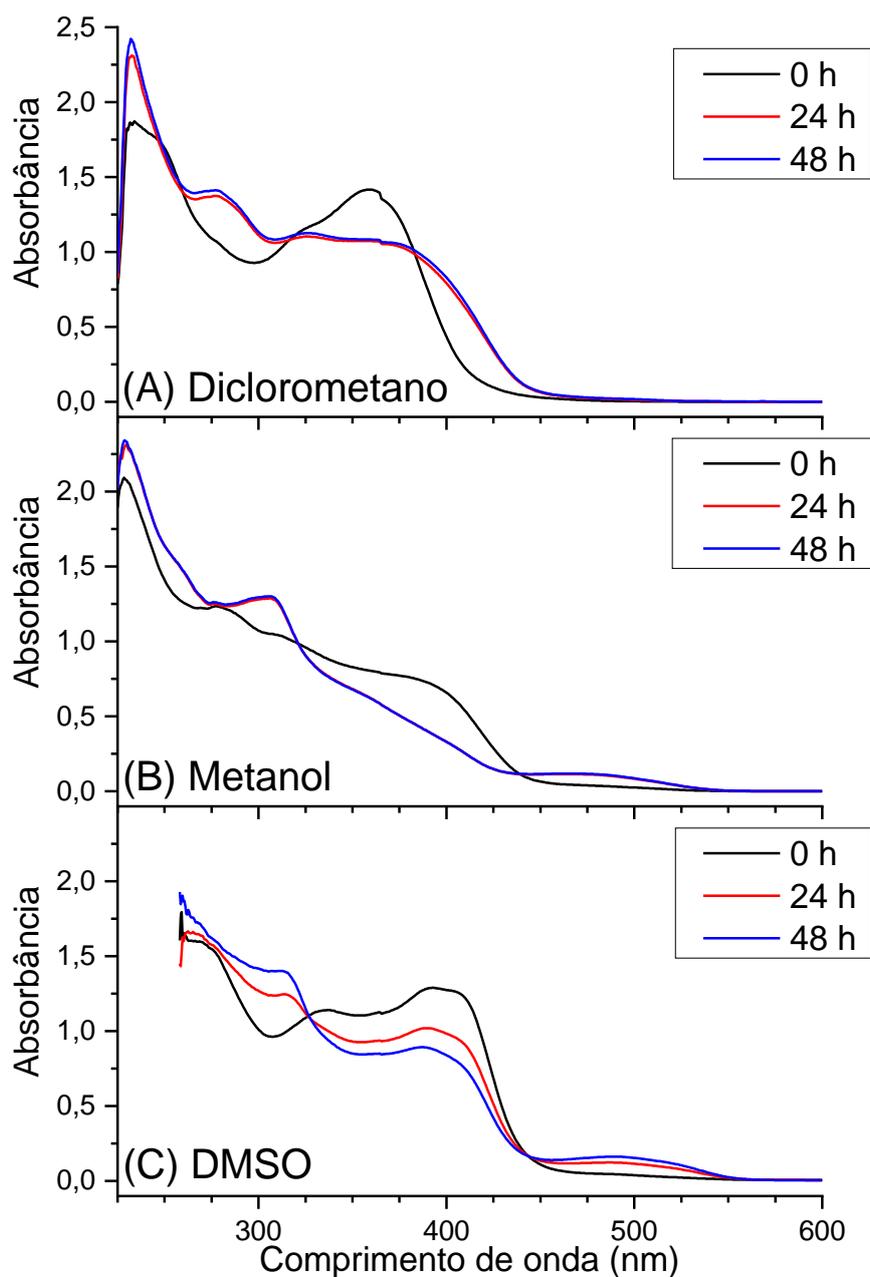


FIGURA 4.19 - Espectros de absorção na região do UV-Visível para o complexo **PdC3** em diclorometano (A), metanol (B) e DMSO(C).

Com o passar do tempo, deu-se o surgimento da banda referente à TCML entre 464 – 486 nm, a qual foi observada apenas para os solventes polares. Por fim, pode-se indicar que os complexos são estáveis em solução, e que as mudanças eletrônicas observadas se deveram a outros efeitos, como mudança de conformação e desprotonação da tioamida presente no anel quelado ao metal.

4.1.4 - Espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-QToF-MS/MS)

A técnica de espectrometria de massa de alta resolução foi aplicada para todos os complexos de Pd(II) sintetizados, as medidas foram realizadas pelo M.Sc. Carlos André Ferreira Moraes (Laboratório de Produtos Naturais – UFSCar). O equipamento utilizado foi o Agilent 6545 qTOF MS (Agilent Technologies), equipado com uma interface eletrospray (ESI) de Jet no modo positivo, monitorado por uma faixa de 100 a 1000 Da com uma taxa de varredura de três espectros s⁻¹. A Tabela 4.1 apresenta os parâmetros empregados na análise estrutural. Os dados obtidos foram processados pelo software Mass Hunter Workstation B.08.00.

TABELA 4.1 - Parâmetros empregados para a ionização.

Tipo de ionização	ESI+
Gás Temp. (°C)	300
Gás Flow (L·min ⁻¹)	12
Nebulizer (Psi)	35
Sheath Gás Temp.	280
Sheath Gás Flow	10
VCap	2000
Nozee Voltage (V)	700
Fragmentor	100
Skimmer	50
Energia de colisão (eV) para o MS/MS	10 e 35
OctopoleRFPeak	750

A partir da técnica de MS, verificou-se a presença dos complexos em sua forma catiônica [PdCl(HL)(PPh₃)]⁺, além disso, foi possível detectar o cátion com a fórmula genérica [Pd(L)(PPh₃)]⁺ referente à labilização do Cl⁻ e H⁺ (FIGURA 4.20). Ambos os cátions detectados apresentaram o padrão isotópico do Pd, sendo os dois picos mais intensos referentes aos isótopos ¹⁰⁶Pd e ¹⁰⁸Pd, o que está de acordo com a abundância isotópica descrita na literatura.^{97,98} O padrão isotópico obtido nos espectros de massa está disponível nas FIGURAS A7 – A11.

A TABELA 4.2 apresenta as fórmulas e a razão m/z referentes aos picos detectados bem como o erro (em ppm) calculado a partir da massa teórica e dos resultados experimentais. De modo geral, o erro calculado não ultrapassou os 3 ppm, o que corroborou a elucidação estrutural, que é um forte indício de que a estrutura proposta foi sintetizada.

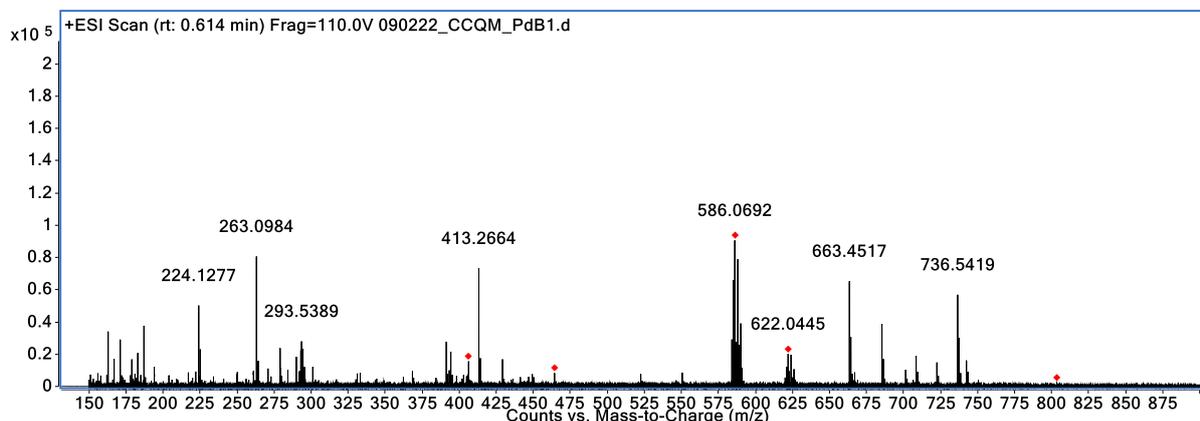


FIGURA 4.20 - Espectro de massas para o complexo **PdB1**.

TABELA 4.2 - Comparação das massas teóricas e das massas obtidas por espectrometria de massas para os complexos de Pd(II).

Espécie	PdCl(HL)(PPh ₃) ⁺			Pd(L)(PPh ₃) ⁺		
	Teórico (m/z)	Experimental (m/z)	Erro (ppm)	Teórico (m/z)	Experimenta l (m/z)	Erro (ppm)
PdB1	622,0459	622,0445	2,31	586,0692	586,0692	0,10
PdB3	650,0772	650,0777	0,71	614,1005	614,1016	1,69
PdC1	684,0615	684,0612	0,57	648,0849	648,0864	2,30
PdC2	698,0772	698,0773	0,08	662,1005	662,1015	1,42
PdC3	712,0928	712,0931	0,29	676,1162	676,1174	1,76

4.1.5 - Difração de raios X

A difração de raios X foi realizada em um difratômetro Rigaku XtaLAB mini II, radiação MoK α ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$), no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos, na Universidade de São Paulo. As medidas e as resoluções estruturais foram realizadas pelo Dr. João Honorato de Araujo Neto. O sistema de complexos de Pd(II) sintetizado apresentou grande capacidade de formar

monocristais, os quais foram difratados, exceto o composto **PdC2**. Os complexos **PdA1** e **PdB2** não foram sintetizados no decurso deste trabalho, mas foram cristalizados, e seus dados serão apresentados em conjunto aos demais.

Os complexos puderam ser divididos entre os que cristalizaram de forma catiônica $[\text{Pd}(\text{H-L})]^+$ e neutra $[\text{PdL}]$, através da lenta evaporação, em temperatura ambiente, e utilizando-se os solventes Acetonitrila/Clorofórmio ou DMSO. Todas as representações estruturais estão disponíveis nas FIGURAS A12 – A18, e os dados cristalográficos nas TABELAS A1 – A4.

O efeito da coordenação do ligante TSC ao centro metálico foi observado através da comparação entre as estruturas tridimensionais de **L-A1** e **PdA1**. Para tal, foram avaliadas as distâncias de ligação entre os átomos que compõem o anel quelato (FIGURA 4.21).

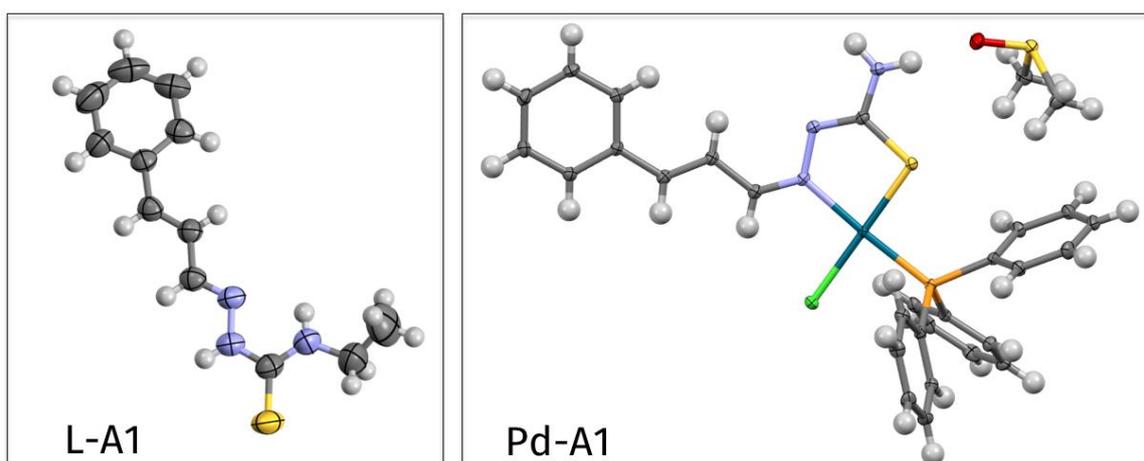


FIGURA 4.21 - Representações estruturais tridimensionais do ligante **L-A1** e do complexo **PdA1** obtidas para os respectivos monocristais, elipsoides de 50% de probabilidade térmica.

A ligação que apresentou maior alteração na sua distância de ligação foi S-C(10), que passou de 1,675 Å (**L-A1**) para 1,761 Å (**PdA1**), uma diferença de 0,086 Å. A média apresentada pela literatura das distâncias de ligação para o sistema $(\text{X})_2\text{-C}=\text{S}$, sendo X = C, N, O ou S, é de 1,671 Å. No momento em que há a coordenação ao Pd(II), a ligação C-S é alongada (TABELA 4.3).⁹⁹

TABELA 4.3 - Valores das principais distâncias e ângulos de ligação obtidos através das estruturas tridimensionais obtidas.

Compostos	L-A1	PdA1*	PdB1*	PdB2	PdB3	PdC1*	PdC3-Cl	PdC3-DMSO
Espécie			PdL	PdL	PdH-L ⁺	PdL	PdH-L ⁺	PdL
	Distância (Å)							
Pd-S	—	2,240	2,261	2,251	2,267	2,252	2,279	2,243
Pd-N(1)	—	2,086	2,095	2,097	2,131	2,118	2,146	2,122
Pd-P	—	2,356	2,252	2,255	2,254	2,250	2,247	2,245
Pd-Cl	—	2,246	2,359	2,338	2,327	2,355	2,317	2,353
S-C(10)	1,675	1,761	1,772	1,755	1,724	1,759	1,714	1,745
N(1)-C(9)	1,271	1,300	1,302	1,296	1,293	1,292	1,299	1,308
N(2)-C(10)	1,339	1,307	1,304	1,286	1,336	1,312	1,349	1,303
	Ângulos (°)							
S-Pd-Cl	—	178,43	165,78	169,47	166,43	164,94	174,66	170,92
N-Pd-P	—	174,86	173,71	175,03	170,47	167,81	176,68	172,92
S-Pd-N	—	83,44	81,44	81,14	82,74	81,53	83,32	81,77
P-Pd-Cl	—	87,89	89,13	88,69	89,61	88,58	84,24	86,33
S-Pd-P	—	92,49	94,10	93,93	92,24	92,93	94,69	91,68
N-Pd-Cl	—	96,19	96,26	96,28	97,17	99,61	97,49	100,66

* Cristalizado em solvente DMSO.

Por sua vez, a ligação entre N(2)-C(10) apresentou uma contração de 0,032 Å, o que indicou o fortalecimento dessa ligação. Desse modo, a redução da intensidade e energia da banda $\nu_{\text{C}=\text{S}}$ e o fortalecimento da banda $\nu_{\text{C}=\text{N}}$, que foram observados para os espectros vibracionais na região do infravermelho como indicadores da coordenação ao íon Pd(II), ficaram demonstrados com os dados obtidos através da técnica de DRX. Por fim, a ligação N(1)-C(9) apresentou um alongamento de 0,029 Å após a coordenação, o que indica a redução da densidade eletrônica em torno dessa ligação como consequência da coordenação ao centro metálico.

Em todas as estruturas obtidas, observou-se a geometria quadrática-plana distorcida em torno do centro metálico, e os complexos que cristalizaram na forma neutra apresentaram menor distância de ligação N(2)-C(10) e maior em S-C(10), o que foi uma alteração esperada devido à desprotonação de N(2), o que gera uma alteração na densidade eletrônica dos complexos e, conseqüentemente, o aumento do caráter de dupla ligação entre N e C(10) (FIGURA 4.22).

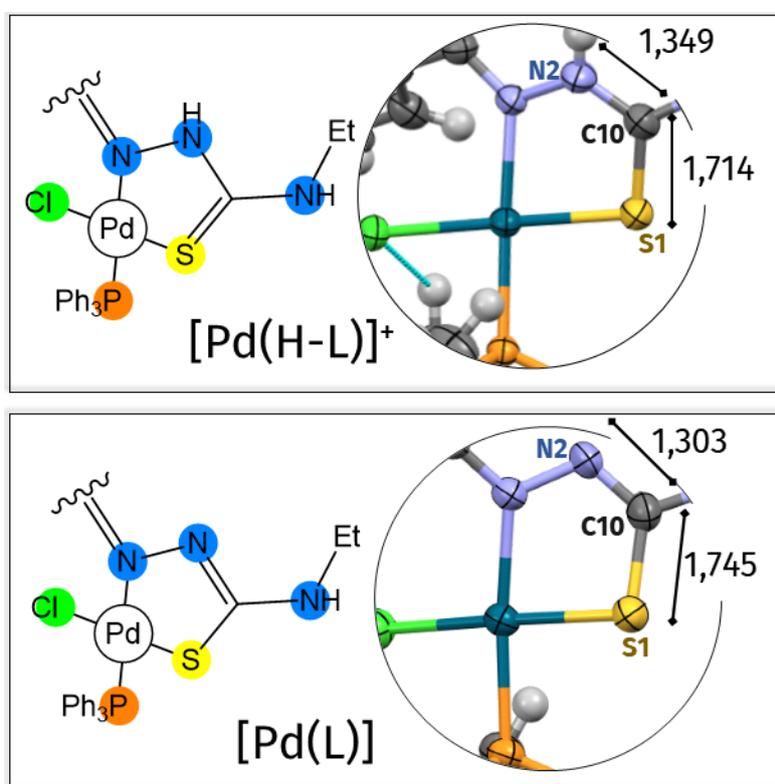


FIGURA 4.22 - Comparação entre as distâncias das ligações C(10)-S e C(10)-N quando o complexo **PdC3** está na forma $[\text{Pd}(\text{H-L})]^+$ (**PdC3-Cl**) ou $[\text{PdL}]$ (**PdC3-DMSO**).

Os efeitos da desprotonação puderam ser observados na ligação Pd–S, em que, nas espécies neutras, esse valor é inferior a 2,261 Å e, nas espécies catiônicas, possui ligações mais alongadas (2,267 – 2,279 Å). Dentro do sistema **PdC3**, a diferença de ligação Pd-S entre a espécie neutra e protonada foi de 0,036 Å.

O complexo **PdC3** foi muito importante para a compreensão do sistema atual, pois foram obtidas duas estruturas tridimensionais do mesmo composto, como dito anteriormente. O monocristal referente à estrutura denominada **PdC3-Cl** foi obtido através da solução reacional e apresentou o ligante TSC protonado, e há presença de um Cl⁻ como contra-íon. Por sua vez, a estrutura **PdC3-DMSO** teve seu monocristal obtido em uma solução complexo-DMSO e apresentou o ligante TSC desprotonado com a presença do solvente DMSO em sua estrutura tridimensional, sendo que o ligante clorido permaneceu ligado ao complexo Pd(II).

Entre as principais diferenças observadas nas estruturas tridimensionais obtidas para o composto **PdC3**, foi verificado que as duas espécies difratadas possuem conformações distintas para o mesmo complexo (FIGURA 4.23). Essa mudança de conformação pode ser uma explicação para os resultados obtidos nos ensaios de estabilidade feitos em DMSO por UV-Vis, em que os compostos da família **C** apresentaram mudanças em suas transições com o passar do tempo.

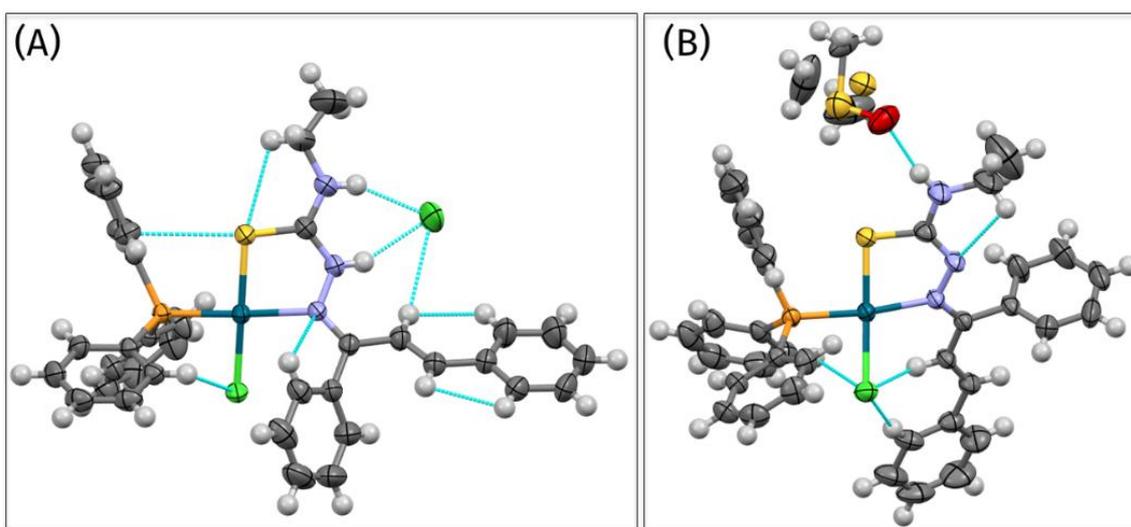
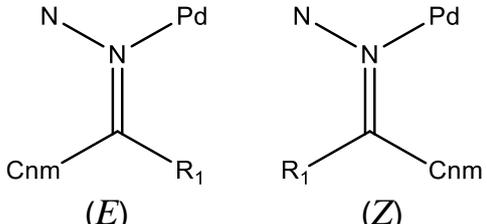


FIGURA 4.23 - Representações estruturais tridimensionais do complexo **PdC3** obtidas para os respectivos monocristais, elipsoides de 50% de probabilidade térmica. A. **PdC3-Cl** (PdH-L⁺) cristalizado em Acetonitrila/Clorofórmio. B. **PdC3-DMSO** (PdL) cristalizado em DMSO.

Quando comparados com as demais estruturas tridimensionais, observou-se que os complexos **PdA1** e **PdC3** cristalizados em Acetonitrila/CHCl₃ foram os únicos complexos que apresentaram uma conformação distinta dos demais (Tabela 4.4). Enquanto para as outras estruturas obtidas independentemente de a espécie ser neutra ou catiônica ou do solvente de cristalização, todos apresentaram a mesma conformação (*Z*). A comparação foi realizada em torno da ligação N(1)=C(9).

TABELA 4.4 - Comparação entre a conformação observada para os complexos de Pd(II) a partir das estruturas difratadas.

Compostos	Espécie	Solvente		
			(<i>E</i>)	(<i>Z</i>)
PdA1	PdL	DMSO	X	
PdB1	PdL	DMSO		X
PdB2	PdL	ACN/CHCl ₃		X
PdB3	PdH-L ⁺	ACN/CHCl ₃		X
PdC1	PdL	DMSO		X
PdC3-Cl	PdH-L ⁺	ACN/CHCl ₃	X	
PdC3-DMSO	PdL	DMSO		X

*ACN = Acetonitrila; Cnm = Cinamaldeído.

Por fim, algumas interações não covalentes foram observadas para todas as estruturas difratadas. As interações entre o Cl coordenado com os hidrogênios dos anéis aromáticos da PPh₃ apresentaram distâncias de 2,631 a 2,909 Å. Outra interação detectada foi entre o Cl_{Pd} com o hidrogênio vinílico H(8), encontrada em todas as estruturas difratadas com conformação *E*. O comprimento dessa interação variou de 2,488 a 2,763 Å (FIGURA 4.24). Para o complexo **PdA1** com conformação *Z*, foi observada interação entre Cl_{Pd} ···H(9) de 2,633 Å.

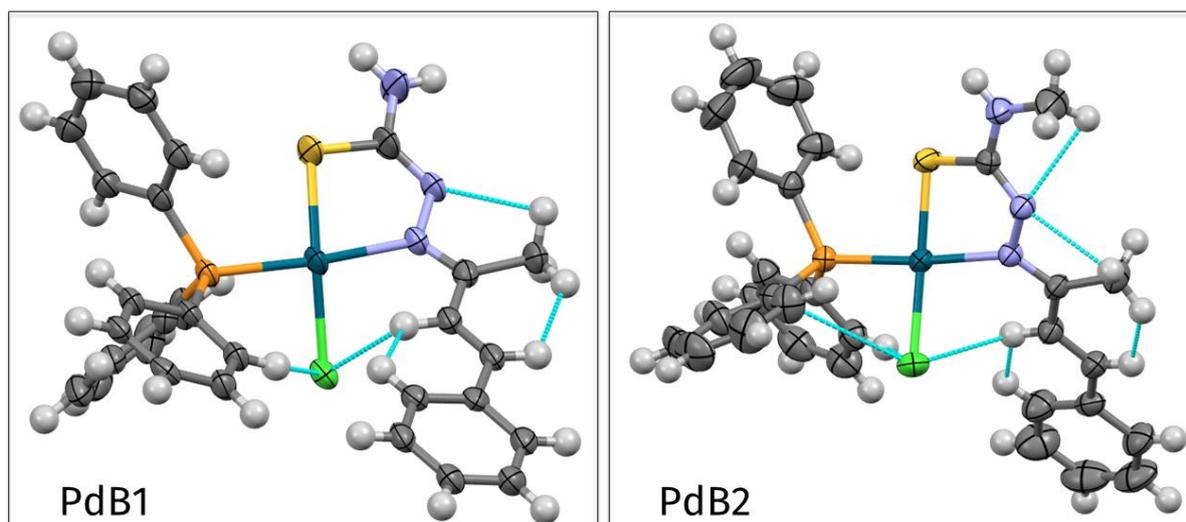


FIGURA 4.24 - Representações estruturais tridimensionais dos complexos **PdB1** e **PdB2** obtidas para os respectivos monocristais, elipsoides de 50% de probabilidade térmica.

Outro grupo de interações observadas nas estruturas tridimensionais dos complexos é as interações intermoleculares com contra-íon ou solvente de cristalização. O contra-íon Cl^- apresentou interação com os hidrogênios H-N em ambos os complexos **PdB3** e **PdC3-Cl**. A localização do contra-íon nesse arcabouço molecular deveu-se à presença dos hidrogênios dessa região serem mais ácidos, com maior capacidade de estabilizar o anión cloreto, vide os espectros de RMN ^1H .

O solvente DMSO foi difratado junto aos complexos **PdA1**, **PdC1** e **PdC3-DMSO**. Entre esses, os complexos **PdA1** e **PdC3-DMSO** apresentaram interação $(\text{CH}_3)_2\text{S}=\text{O} \cdots \text{H}(\text{N}3)$, com distâncias de 2,034 e 2,070 Å, respectivamente. A preferência de aproximação ao H(N) deveu-se a sua acidez acentuada e ao DMSO ser um solvente prótico, ou seja, pode formar espécies protanadas na presença de um ácido. No complexo **PdC1**, o solvente DMSO foi localizado próximo à esfera de coordenação com as metilas direcionadas ao ligante clorido.

4.1.6 - Superfície de Hirshfeld (HS)

As estruturas difratadas para o complexo **PdC3** foram utilizadas para a realização de cálculos da superfície de Hirshfeld (HS, sigla do inglês *Hirshfeld surface*), realizados pela Dr^a. Gabriela Porto de Oliveira, por meio dos quais é possível observar com maior clareza as interações intermoleculares (FIGURA 4.25). A

superfície normalizada (d_{norm}) é, geralmente, usada para descrever os contatos intermoleculares em função dos raios de Van der Waals. A partir dessa análise, foi possível identificar as regiões pertencentes às interações intermoleculares, as quais são caracterizadas por cores específicas que indicam a intensidade e distância dos contatos. Nesse contexto, as regiões em vermelho são provenientes dos contatos cujos comprimentos são menores do que a soma dos raios de Van de Waals dos átomos envolvidos, enquanto os contatos com distâncias mais longas foram representados em regiões azuis e brancas.¹⁰⁰

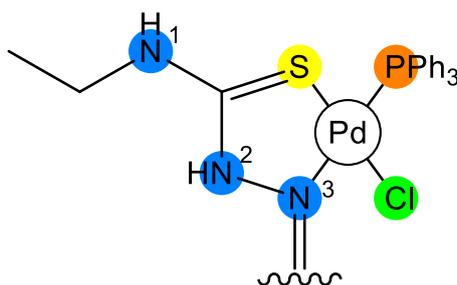


FIGURA 4.25 - Representação estrutural do complexo **PdC3** e a numeração utilizada.

A análise qualitativa do mapeamento da superfície d_{norm} para o complexo **PdC3** indicou a predominância de interações de hidrogênio através dos contatos intermoleculares N(2)-H(2)···Cl(2) e N(1)-H(1)···Cl(2), sendo consideradas as mais significativas e intensas, uma vez que são representadas em vermelho, conforme ilustradas na FIGURA 4.26. Frente ao exposto, é sugerido que essas interações representam a maior contribuição para o reconhecimento molecular. Essa análise também permite visualizar regiões menos intensas em vermelho, como demonstrado na FIGURA 4.26B, associadas aos contatos C-H···Cl, os quais contribuem, de forma menos efetiva, com o empacotamento cristalino (FIGURA A19).

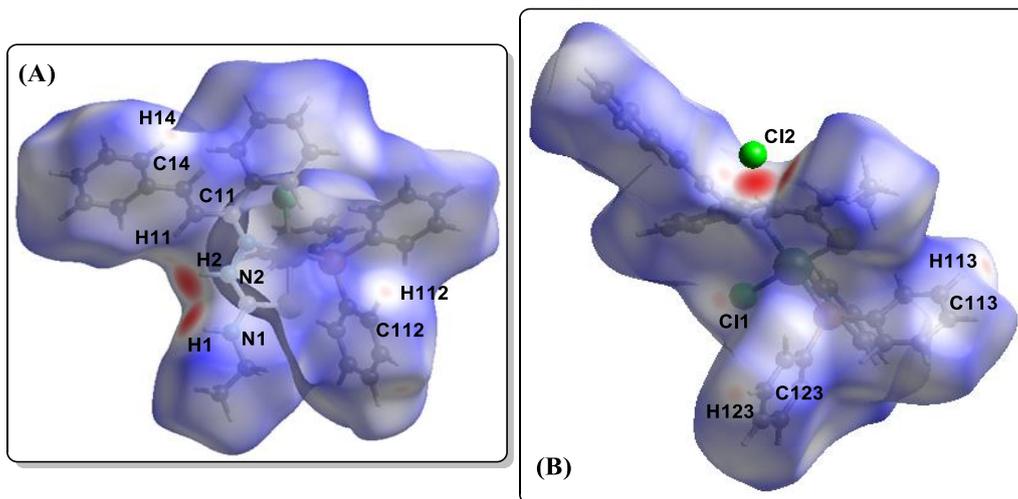


FIGURA 4.26 - Superfície d_{norm} ao redor da unidade assimétrica do composto **PdC3-Cl**: (A) grupos envolvidos em interações intermoleculares mais fortes representados nas regiões de coloração vermelha; e (B) regiões em vermelho menos intensas.

A projeção da superfície de Hirshfeld em um gráfico bidimensional em função dos parâmetros d_e e d_i , denominados “fingerprint”, permitem quantificar as contribuições dos contatos interatômicos no empacotamento cristalino. As funções geométricas de distância d_e correspondem à distância da superfície de Hirshfeld ao átomo mais próximo fora da superfície, sendo representada no eixo x do gráfico, e d_i é referente à distância da superfície ao átomo mais próximo dentro da superfície, o qual é representado no eixo y.^{101,102}

As cores nos gráficos de impressão digital 2D indicaram a eficiência da contribuição desses contatos para o empacotamento cristalino. Sendo assim, os pontos em cinza corresponderam aos contatos sem contribuição na superfície, enquanto os pontos azuis representaram os contatos com uma pequena contribuição e, variando de coloração de verde para vermelho, indicam pontos com maior contribuição. Tais projeções forneceram a contribuição porcentual dos contatos para o empacotamento.

As principais contribuições para o empacotamento cristalino do composto **PdC3-Cl** sugeridas a partir da análise da superfície de Hirshfeld são: H...H 59,0%, C...H 22,3% e Cl...H 10,1%, conforme a FIGURA 4.27. As demais interações intermoleculares são consideradas fracas, pois contribuem de forma menos

significativa no empacotamento do cristal e são constituídas pelos seguintes contatos: C...C 3,5 %, S...H 2,2 %, N...H 2,1 % e C...N 0,6% (FIGURA A20).

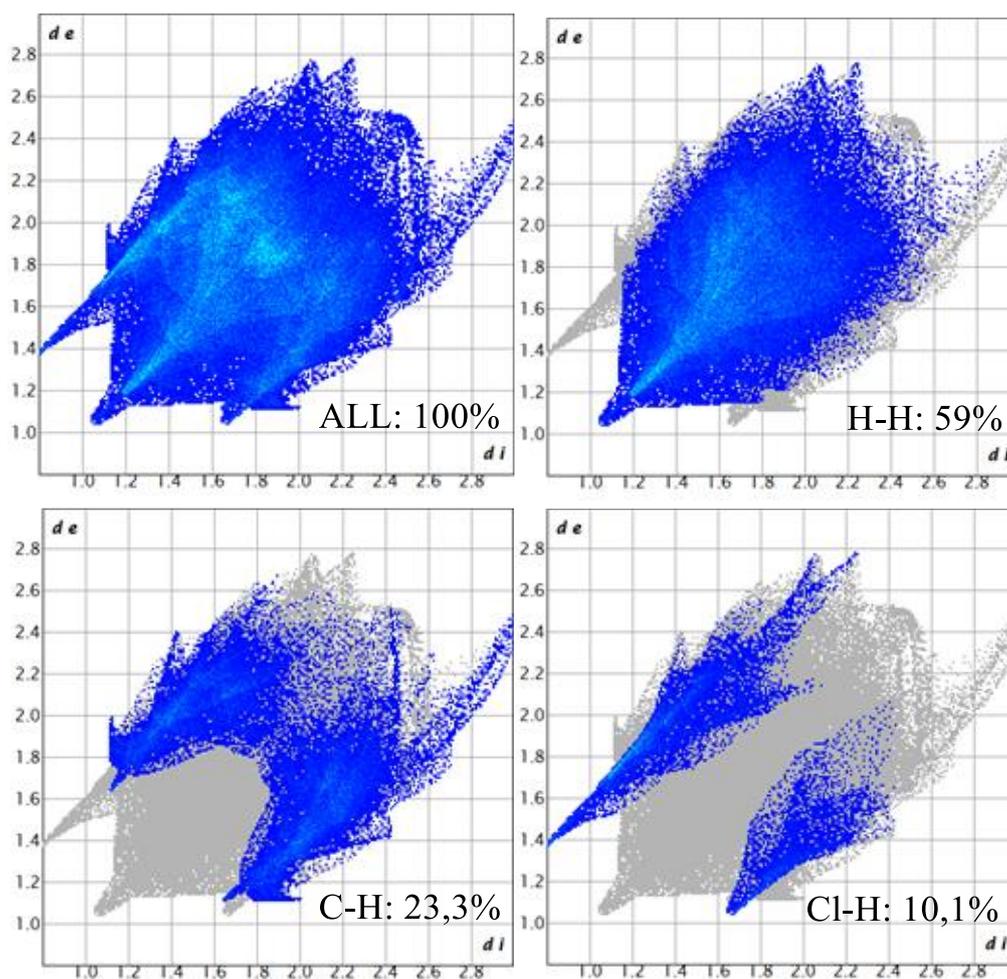


FIGURA 4.27 - Representação da impressão digital bidimensional da superfície de Hirshfeld para o composto **PdC3-Cl**, contendo os contatos mais significativos para o empacotamento cristalino.

A análise qualitativa do mapeamento da superfície d_{norm} para o complexo **PdC3-DMSO** permitiu identificar a presença de contatos N-H...O (DMSO), localizados em uma região vermelha de maior intensidade, o que sugere sua maior contribuição para coesão cristalina, conforme visto na FIGURA 4.28. Esses contatos são provenientes de interações intermoleculares envolvendo os átomos N(1)-H(1)...O(2), cujo átomo de oxigênio pertence à molécula de DMSO, que atua como solvente de cristalização.

No entanto, a análise sugeriu que o composto fora capaz de estabelecer interações intermoleculares fracas com as demais moléculas através da presença de contatos em regiões menos intensas em vermelho. As contribuições para o empacotamento cristalino dos contatos C-H...C e C-H...Cl são menos significativas (FIGURA A21). Essas contribuições foram quantificadas a partir de gráficos de impressão digital 2D.

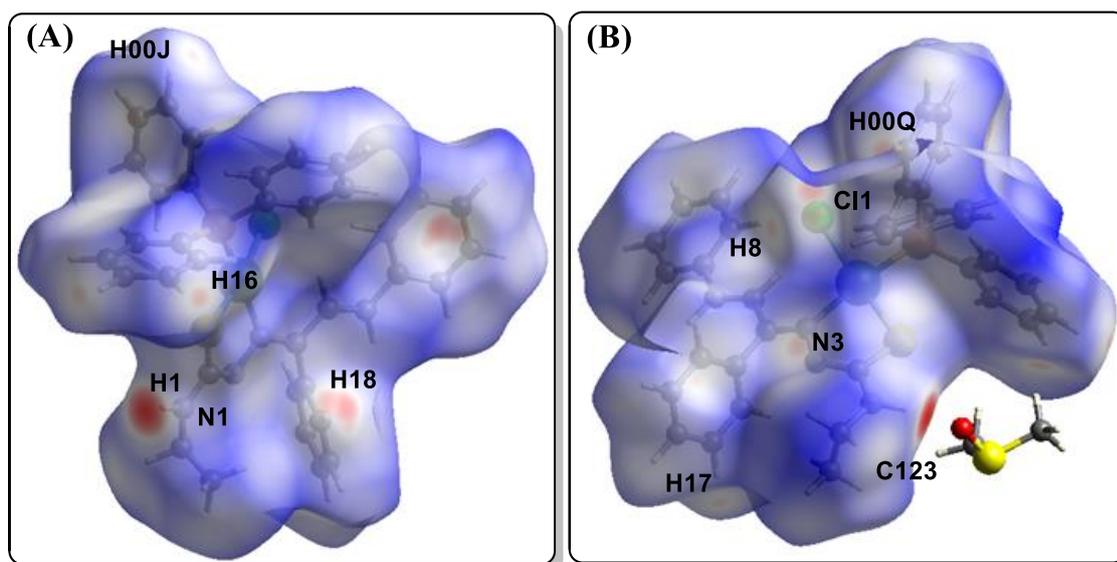


FIGURA 4.28 - Superfície d_{norm} ao redor da unidade assimétrica do composto **PdC3-DMSO**: (A) grupos envolvidos em interações intermoleculares mais fortes representados nas regiões de coloração vermelha; e (B) regiões em vermelho menos intensas.

As principais contribuições para o empacotamento cristalino do composto **PdC3-DMSO**, sugeridas a partir da análise da superfície de Hirshfeld, foram H...H 59,5%, C...H 27,0% e Cl...H 3,7%, conforme a FIGURA A22. As demais interações intermoleculares foram consideradas fracas, pois contribuíram de forma menos significativa no empacotamento cristalino e foram constituídas pelos seguintes contatos: N...H 3,2 %, S...H 3,0%, C...C 0,9% e C...N 0,2% (FIGURA A23).

4.1.7 - Cálculos computacionais

Ambas as formas difratadas para o complexo **PdC3 (PdC3-Cl e PdC3-DMSO)** foram aplicadas à Teoria do Funcional de Densidade (DFT), que foi feita por M.Sc. George Bueno Santana Pereira e o Prof. Dr. Rafael Gomes da Silveira (IF Goiano). Por meio desse cálculo computacional, as estruturas foram otimizadas no

vácuo, e foi possível obter as energias totais de ambos os sistemas: **PdC3-Cl** = -3343,31 Hartree; **PdC3-DMSO** = -3435,68 Hartree. Assim, fica demonstrado que o sistema **PdC3-DMSO** apresenta uma menor energia, o que indica uma maior estabilidade em relação ao sistema **PdC3-Cl**. A diferença entre as energias totais foi de $\Delta_{\text{DMSO-Cl}} = -92,34$ Hartree.

Como forma de validação do cálculo *in silico*, foi realizada a comparação entre os valores das distâncias e ângulos de ligação em torno do centro metálico. Observou-se os dados obtidos através da otimização calculada e dos experimentos de DRX (TABELA 4.5). Por meio desses dados, o cálculo computacional foi validado, uma vez que os erros relativos obtidos não ultrapassaram 5%.

TABELA 4.5 - Comparação entre os ângulos e distâncias de ligação da estrutura experimental obtida por DRX e da estrutura otimizada através do DFT.

Compostos	PdC3-Cl	PdC3-Cl	Erro (%)	PdC3-DMSO	PdC3-DMSO	Erro (%)
	Teórico	Exp.		Teórico	Exp.	
	Distância (Å)					
Pd-S	2,368	2,279	3,76	2,336	2,243	3,98
Pd-N(1)	2,175	2,146	1,33	2,171	2,122	2,26
Pd-P	2,318	2,247	3,06	2,339	2,245	4,02
Pd-Cl	2,388	2,317	2,97	2,431	2,353	3,21
S-C(10)	1,742	1,714	1,61	1,789	1,745	2,46
N(1)-C(9)	1,314	1,299	1,14	1,325	1,308	1,28
N(2)-C(10)	1,350	1,349	0,07	1,309	1,303	0,46
	Ângulos (°)					
S-Pd-N	81,087	83,32	-2,75	80,370	81,77	-1,74
P-Pd-Cl	87,260	84,24	3,46	86,341	86,33	0,01
S-Pd-P	95,267	94,69	0,61	94,731	91,68	3,22
N-Pd-Cl	96,432	97,49	-1,10	99,425	100,66	-1,24

$$\text{Erro} = 100 \times (\text{Teórico} - \text{Experimental}) / \text{Teórico}$$

Após a validação, foram observadas as energias relativas aos orbitais HOMO (*highest occupied molecular orbital*) e LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) das estruturas com base no Teorema de Koopman. Por meio das energias calculadas para o HOMO e LUMO, foram obtidas as energias de ionização e afinidade

eletrônica definidas por $I = -E_H$ e $A = -E_L$, respectivamente. Em sequência, baseado nos fatores supracitados, foram obtidos os valores referentes à dureza ($\eta = (I - A)$) e potencial químico ($\mu = (I + A)/2$). Por fim, o índice de global de eletrofilicidade e maciez foram calculados de acordo com as seguintes expressões: $\omega = \mu^2/2\eta$ e $S = 1/2\eta$, respectivamente (TABELA 4.6).

TABELA 4.6 - Descritores relativos calculados via TD-DFT para os complexos **PdC3-Cl** e **PdC3-DMSO**

Compostos	HOMO	LUMO	I	A	η	μ	ω	S
PdC3-DMSO	-0,178	-0,076	0,178	0,076	0,102	0,127	0,0008	4,891
PdC3-Cl	-0,205	-0,096	0,205	0,096	0,109	0,150	0,0012	4,562

A partir dos cálculos de TD-DFT (tempo dependente), as principais transições eletrônicas foram verificadas para os espectros de absorção no UV-Vis, e foi possível obter dois espectros teóricos (sem e com a presença do DMSO), que foram comparados com um espectro experimental. Por meio da FIGURA 4.29, observou-se que os espectros calculados seguem o mesmo padrão observado nos experimentos de UV-Vis, de modo que o espectro experimental a 0 h para **PdC3** é semelhante ao espectro calculado para a estrutura otimizada do **PdC3-Cl**. Analogamente, o espectro após uma semana em solução de DMSO possui padrão similar ao espectro calculado para o complexo **PdC3-DMSO**.

Comparando-se as transições eletrônicas entre os espectros teóricos para ambos os sistemas calculados, destacou-se o surgimento de uma transição centrada em 400 nm, que foi observada apenas para o sistema **PdC3-DMSO**. Por sua vez, houve uma redução da intensidade das transições na região de 350 nm e um aumento na intensidade nas transições próximas de 340 nm, quando comparados os espectros teóricos **PdC3-Cl** com **PdC3-DMSO**. As mudanças nas transições calculadas possuem correspondência direta em relação aos espectros experimentais, como pode ser acompanhado na FIGURA 4.29.

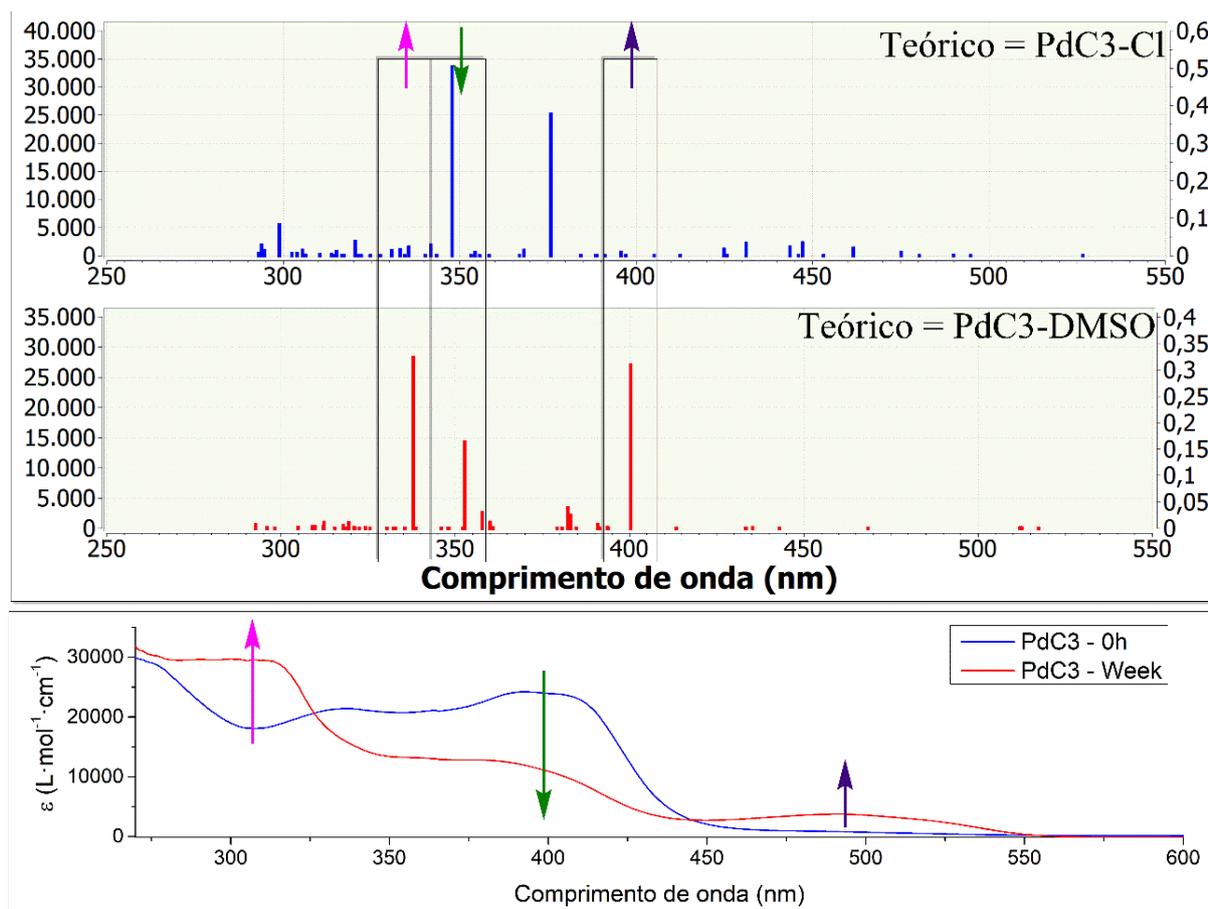


FIGURA 4.29 - Espectros teóricos para as estruturas **PdC3-Cl** e **PdC3-DMSO** comparados com os espectros experimentais do composto **PdC3** em 0 h em uma semana em solução.

Assim, foi confirmado que as mudanças observadas nos espectros experimentais durante os ensaios de estabilidade foram uma resposta às mudanças conformacionais sofridas em solução pelos complexos. O que é suportado pelos resultados observados via DRX e confirmado pelos cálculos computacionais: os complexos da família **C** possuem a capacidade de alterar a sua conformação em torno da ligação C=N. A mudança conformacional observada para o ligante TSC coordenado ao íon Pd(II) pôde ser explicada através da quebra da dupla ligação C=N, em sequência, o giro do fragmento chalcona em torno da ligação simples C-N e logo após a religação C=N.

É importante observar que, após a mudança conformacional, a distância de ligação N-Pd reduziu em 0,024 Å, o que indicou o fortalecimento dessa ligação. Assim, em conformidade com as energias totais do sistema calculado, pôde-se inferir

que o fortalecimento das ligações coordenadas ao metal induziu a redução da energia total do sistema, o que poderia justificar a mudança conformacional.

4.2 - Ensaios com linhagens celulares

4.2.1 - Viabilidade celular (IC_{50})

A influência dos compostos sobre a viabilidade celular foi testada em diferentes linhagens celulares imortalizadas, a fim de compreender como é seu comportamento. Adicionalmente, pretendeu-se avaliar se as mudanças estruturais alteraram a toxicidade da série de complexos de Pd(II). Devido ao grande número de diferentes linhagens celulares testadas, foi feita a apresentação em partes. Todos os dados de IC_{50} estão disponíveis na TABELA A1.

Entre as linhagens oriundas do tecido de mama humana, destaca-se a MDA-MB-231, uma linhagem celular de câncer de mama triplo negativo. Isso significa que esse tipo de tumor não possui receptores beta-estradiol, progesterona e HER-2, o que torna o tratamento mais difícil e inviabiliza a terapia hormonal.^{103,104} Outra linhagem de interesse é a SK-BR-3, uma linhagem em que já foi reportada a superexpressão da enzima DNA-Topoisomerasell que é um dos alvos do atual trabalho.⁶²

Devido ao alto custo para sua manutenção em cultura, foram realizados, para a linhagem celular MCF-10A, os ensaios de IC_{50} com apenas um composto de cada família, e foi escolhido o grupo **1** devido à sua maior atividade nas linhagens tumorais de mama (Tabela 4.7).

TABELA 4.7 - Valores médios das concentrações de IC₅₀ (μmol·L⁻¹) ± desvio padrão. Ensaio realizado em 48 h de incubação dos compostos para as linhagens celulares de mama humana MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3 e MFC-10A. O experimento foi realizado em três triplicatas.

R ₁	R ₂	Complexos	MDA-MB-231	MCF-7	SK-BR-3	MFC-10A
	H	PdA1	2,78 ± 0,1	> 50	10,88 ± 0,9	5,10 ± 0,1
H	Me	PdA2	1,43 ± 0,05	9,17 ± 0,5	3,31 ± 0,2	—
	Et	PdA3	4,82 ± 0,2	11,87 ± 0,8	18,61 ± 1	—
	H	PdB1	1,45 ± 0,1	3,79 ± 0,4	1,42 ± 0,07	1,58 ± 0,07
Me	Me	PdB2	0,92 ± 0,08	1,47 ± 0,2	1,48 ± 0,06	—
	Et	PdB3	1,04 ± 0,06	0,91 ± 0,008	< 2	—
	H	PdC1	5,97 ± 0,1	17,68 ± 1	2,25 ± 0,3	2,64 ± 0,06
Ph	Me	PdC2	9,66 ± 0,4	> 50	> 50	—
	Et	PdC3	> 50	> 50	> 50	—
		Cisplatina	33,14 ± 0,3	8,64 ± 0,8	5,86 ± 0,2	23,90 ± 0,7

*Abreviações: Me (metil), Et (etil) e Ph (fenil).

Os compostos, de forma geral, apresentaram um padrão de alta de interferência na viabilidade, com baixo valor de IC₅₀ nas linhagens testadas, exceto para a família **C**. Os complexos **PdC2** e **PdC3** foram inativos para a maioria das linhagens de mama testadas, já o complexo **PdC1** apresentou IC₅₀ significativamente baixo na faixa de concentrações testadas, com valores de IC₅₀ próximos aos observados para as famílias **A** e **B**.

Os complexos da família **A** apresentaram atividade intermediária, quando comparados com as demais famílias, enquanto na linhagem MDA-MB-231 todos foram mais ativos que a cisplatina. Já na linhagem MCF-7 foi verificada para os compostos uma inibição próxima ao fármaco padrão (cisplatina). Entre os complexos **PdA1**, **PdA2** e **PdA3**, ficou demonstrado que a presença do grupo metil (**2**) foi o que mais reduziu a viabilidade celular, e que sua substituição pelo grupo etil resultou em um aumento do IC₅₀ frente a todas as linhagens testadas.

A família **B** foi a mais ativa nas linhagens de mama humana, incluindo a linhagem não maligna, e todos os seus complexos foram mais ativos que a cisplatina. Essa série de compostos apresentou baixa variabilidade nos valores de IC₅₀ para MDA-MB-231 e SK-BR-3, indicando, assim, que as mudanças estruturais no

substituinte R₂ pouco afetaram a atividade celular para essas linhagens. Para a MCF-7, a ação dos complexos foi ampliada com o aumento do substituinte R₂, de modo que o complexo **PdB3** apresentou o menor valor de IC₅₀ para essa linhagem.

As linhagens de ovário escolhidas foram a A2780 e a A2780cis. Ambas possuem a mesma origem, um adenocarcinoma endometrial, cujas células, quando removidas de uma paciente, ainda não haviam recebido tratamento. Após a imortalização das células como linhagem celular, obteve-se a A2780, uma linhagem de câncer de ovário de crescimento acelerado que, devido à não exposição ao tratamento, é classificada como sensível a fármacos.^{105,106} Por outro lado, a linhagem A2780cis foi desenvolvida a partir da A2780 por meio da exposição continuada à cisplatina. A linhagem adquiriu resistência ao fármaco à base de platina, o que resultou no aumento do efluxo da droga, levando a uma redução no número de quebras de DNA induzidas pelo fármaco. Observou-se que a resistência se deve ao maior reparo e tolerância ao dano ao DNA.^{107,108}

Desse modo, os complexos foram testados frente às duas linhagens de ovário (Tabela 4.8), a fim de observar se a resistência apresentada ao fármaco cisplatina seria também constatada para os complexos de Pd(II). Quando se comparou os valores de IC₅₀ obtidos para as linhagens celulares de ovário, verificou-se que ambas foram as mais suscetíveis à ação dos complexos em comparação às demais testadas.

TABELA 4.8 - Valores médios das concentrações de IC₅₀ (μmol·L⁻¹) ± desvio padrão. Ensaio realizado em 48 h de incubação dos compostos para as linhagens celulares de ovário tumoral A2780 e A2780cis, com o valor do Fator de Resistência (F_R). O experimento foi realizado em três triplicatas.

R ₁	R ₂	Complexos	A2780	A2780cis	F _R
	H	PdA1	0,33 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,45
H	Me	PdA2	0,39 ± 0,01	0,23 ± 0,04	0,59
	Et	PdA3	0,53 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,60
	H	PdB1	0,12 ± 0,01	0,20 ± 0,01	1,66
Me	Me	PdB2	0,13 ± 0,01	0,21 ± 0,01	1,62
	Et	PdB3	0,23 ± 0,01	0,26 ± 0,01	1,13
	H	PdC1	0,40 ± 0,01	0,62 ± 0,01	1,55
Ph	Me	PdC2	3,93 ± 0,2	1,66 ± 0,01	0,42
	Et	PdC3	22,78 ± 1	11,1 ± 0,6	0,48
		Cisplatina	14,24 ± 0,05	25,09 ± 0,9	1,76

*Abreviações: Me (metil), Et (etil) e Ph (fenil).

Comparando-se os valores de IC₅₀ entre as duas linhagens de câncer de ovário, foi obtido o fator de resistência (F_R), que é a razão entre IC₅₀(A2780cis)/IC₅₀(A2780), assim, o valor de F_R indica se a linhagem resistente é tão suscetível à ação dos compostos quanto a linhagem sensível. Os complexos da família **A** apresentaram-se mais ativos frente à linhagem resistente (F_R < 1). Em contraste, a família **B** foi mais ativa frente à linhagem não resistente (F_R > 1), e, na família **C**, observou-se ambos os perfis.¹⁰⁹

Novamente, observou-se, para a família **C**, valores de IC₅₀ mais heterogêneos. Nela, houve uma relação inversa entre o tamanho do grupo substituinte (ou do peso molecular) R₂ com a atividade citotóxica. De modo semelhante, a família **A** apresentou a mesma relação entre o peso molecular do substituinte R₂ com valores de IC₅₀, entretanto, as concentrações obtidas foram muito próximas.

Alternativamente, a família **B** destacou-se com menor distinção entre as concentrações de IC₅₀, sendo que, quando o substituinte R₂ foi H (**1**) e CH₃ (**2**), não houve diferença significativa entre eles, apenas o substituinte CH₃CH₂ (**3**) apresentou um valor ligeiramente superior aos demais. Esse perfil pode ser observado através da

FIGURA 4.30, que compara as massas moleculares dos complexos com seus respectivos valores de IC_{50} para as linhagens de ovário.

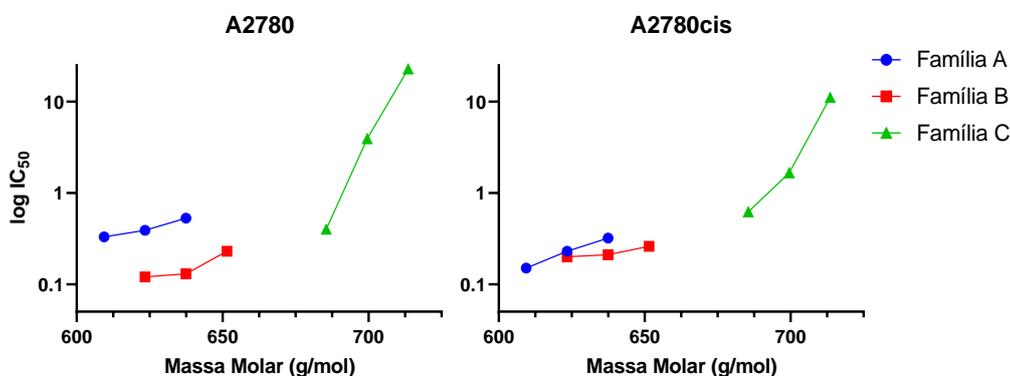


FIGURA 4.30 - Gráficos do $\log IC_{50}$ versus a massa molar (g/mol) com compostos.

A FIGURA 4.30 apresenta, novamente, a importância do grupo CH_3 , independentemente de sua posição, R_1 ou R_2 . Contudo, quando está na posição R_1 , a metila apresentou maior influência no valor de IC_{50} e reduziu os valores associados aos outros substituintes. Esse efeito foi demonstrado por meio do gráfico em que a linha referente à família **B** encontra-se predominantemente abaixo das demais.

Os complexos de Pd(II) demonstram ser pouco ativos frente à linhagem de câncer de pulmão A549, sendo que apenas a família **B** apresentou valor de IC_{50} calculável nas concentrações testadas, entretanto, exclusivamente para essa linhagem, foi evidenciada uma ordem inversa, sendo que o substituinte mais volumoso em R_2 apresentou as menores concentrações de IC_{50} . Para A549, os complexos atuaram de maneira distinta das demais células testadas e apresentaram altos valores de IC_{50} . Sabe-se que essa linhagem é oriunda de NSCLC (câncer de pulmão de células não pequenas, sigla do inglês *non-small-cell lung cancer*). Essa classe está relacionada a um menor crescimento, quando comparado ao SCLC (câncer de pulmão de células pequenas, sigla do inglês *small-cell lung cancer*), e é pouco suscetível aos inibidores da topoisomerase II, ou seja, a inatividade dos complexos observada para essa linhagem pode indicar uma preferência de ação semelhante aos inibidores da topoisomerase II.^{110,111} Já para a linhagem não tumoral de pulmão MRC5 os complexos apresentaram perfil semelhante ao que já foi demonstrado, sendo que a família **B** foi novamente a mais ativa, e o menor valor de IC_{50} foi observado para o substituinte R_2 menos volumoso.

Os compostos também foram testados frente à linhagem oriunda de melanoma (A375). Em geral, há na literatura poucos exemplos de complexos metálicos testados frente ao câncer de pele, principalmente, de compostos sem atividade ótica, o que inviabiliza tratamentos como a terapia fotodinâmica (PDT). Assim sendo, não foi surpresa a baixa atividade dos complexos frente a essa linhagem, ao contrário, a alta redução da viabilidade celular demonstrada pelo complexo **PdB1** foi um fato inesperado (Tabela 4.9).

TABELA 4.9 - Valores médios das concentrações de IC₅₀ (μmol·L⁻¹) ± desvio padrão. Ensaio realizado em 48 h de incubação dos compostos para as linhagens celulares A549, MRC5 e A375. O experimento foi realizado em três triplicatas.

R ₁	R ₂	Complexos	A549	MRC5	A375
	H	PdA1	> 50	18,50 ± 0,3	> 50
H	Me	PdA2	> 50	15,34 ± 0,8	—
	Et	PdA3	> 50	14,98 ± 0,2	—
	H	PdB1	44,8 ± 2	1,70 ± 0,2	1,34 ± 0,08
Me	Me	PdB2	30,4 ± 0,4	6,85 ± 0,3	—
	Et	PdB3	12,99 ± 1	9,28 ± 0,3	—
	H	PdC1	> 50	46,77 ± 2	> 50
Ph	Me	PdC2	> 50	> 50	—
	Et	PdC3	> 50	> 50	—
Cisplatina			13,01 ± 0,4	21,61 ± 0,8	12,21 ± 0,62

*Abreviações: Me (metil), Et (etil) e Ph (fenil).

Novamente, observou-se que a presença de um grupo CH₃ terminal na estrutura dos complexos propicia maior inibição da viabilidade celular. Tal observação está de acordo com alguns trabalhos na literatura, em que foram reportadas moléculas orgânicas diversas, entre as quais a presença do grupo metil foi associada ao aumento da atividade antiproliferativa e à supressão da migração celular.¹¹²⁻¹¹⁴

Por fim, os valores de IC₅₀ das linhagens tumorais foram comparados com os valores de IC₅₀ da MCR5, que foi a única linhagem não tumoral testada para todos os compostos. O índice de seletividade (SI do inglês *selectivity index*) foi calculado a partir da seguinte razão: SI = IC₅₀ MRC5/ IC₅₀ linhagens tumorais (TABELA 4.10). É esperado que os complexos de Pd(II) apresentem valores de SI superiores aos extratos de produtos naturais, os quais têm convencionado valores SI

> 2 como uma boa seletividade,^{115,116} já para compostos orgânicos e inorgânicos sintéticos são considerados promissores valores de SI > 10.^{117,118} A atual série de compostos apresentou, de modo geral, altos valores de SI, sendo que os maiores valores foram observados quando se compara as linhagens tumorais de ovário com a MRC5. Nesse particular, destacaram-se os complexos **PdA1** e **PdC1** com valores de SI que ultrapassam as cem vezes. Notoriamente, para as linhagens de mama, os complexos **PdA2** (MDA-MB-231) e **PdB3** (MCF-7) apresentam valores superiores de SI, superiores a dez vezes.

TABELA 4.10 - Índice de seletividade (SI*) em relação à linhagem não tumoral MRC5.

Complexos	MDA-MB-231	MCF-7	SK-BR-3	A2780	A2780cis	A549
PdA1	6,7	—	1,7	56,1	123,3	—
PdA2	10,7	1,7	4,6	39,3	66,7	—
PdA3	3,1	1,3	0,8	28,3	46,8	—
PdB1	1,2	0,4	1,2	14,2	8,5	0,0
PdB2	7,4	4,7	4,6	52,7	32,6	0,2
PdB3	8,9	10,2	—	40,3	35,7	0,7
PdC1	7,8	2,6	20,8	116,9	75,4	—
Cisplatina	0,7	2,5	3,7	1,5	0,9	1,7

*SI = [IC₅₀ linhagem não tumoral] / [IC₅₀ linhagens tumorais]

É relevante observar que a família **B**, composta pelos complexos **PdB1**, **PdB2** e **PdB3**, apresentou alta atividade frente a todas as linhagens testadas, com algumas exceções, e seus valores de índice de seletividade (SI) foram em média mais altos que os das famílias **A** e **C**. Assim sendo, demonstra-se o importante papel do grupo CH₃ terminal (família **B**) em aumentar a citotoxicidade dos complexos. De semelhante modo, é reportado em diferentes trabalhos na literatura que a presença de um grupo metil aumentou a atividade de compostos ao inibir o crescimento celular, isso para substâncias orgânicas e inorgânicas.^{119–121}

Os próximos ensaios foram realizados para obter informações sobre o perfil da atividade dos complexos metálicos e aprofundar o entendimento sobre a influência desses compostos no meio *in vitro*. Para isso, foi feita uma seleção de complexos, ou seja, um composto de cada família. O único complexo da família **C** que foi possível calcular o valor de IC₅₀ para a maior parte das células testadas foi o composto **PdC1**, e, por semelhança, foram escolhidos os complexos **PdA1** e **PdB1**.

4.2.2 - Ensaio de sobrevivência clonogênica

O ensaio de sobrevivência clonogênica celular observa se os compostos alteram a capacidade das células de se multiplicarem e formarem colônias com o passar do tempo. Assim, é possível distinguir se compostos apresentam ação citostática e/ou citotóxica. As substâncias com ação citostática tendem a alterar o crescimento celular de forma proporcional à concentração ou ao tempo de incubação, isso porque elas impedem a divisão celular, e, ao fim do período de tratamento, as células saem desse estado de dormência e retornam ao crescimento celular.

Os agentes citotóxicos, por outro lado, impedem o crescimento celular através da morte das células. Nesse modo de ação, a divisão celular não é reduzida, pois todas as células vivas continuam a se multiplicar, mas o agente citotóxico reduz a população de células vivas e, conseqüentemente, o crescimento celular.

O complexo **PdA1** apresentou um perfil citostático devido ao seu aspecto linear do crescimento celular. De modo oposto, os complexos **PdB1** e **PdC1** apresentaram um perfil mais citotóxico, principalmente, o **PdB1**, que, mesmo em concentrações abaixo do IC₅₀, demonstrou um efeito prejudicial para a formação de colônias das células (FIGURAS 4.31 e 4.32).¹²² É importante salientar que ambos os perfis auxiliam na redução da taxa de crescimento celular. Enquanto a dinâmica citostática reduz a taxa de divisão celular, o perfil citotóxico aumenta a morte celular – ambas as estratégias são utilizadas de acordo com o foco das terapias oncológicas.

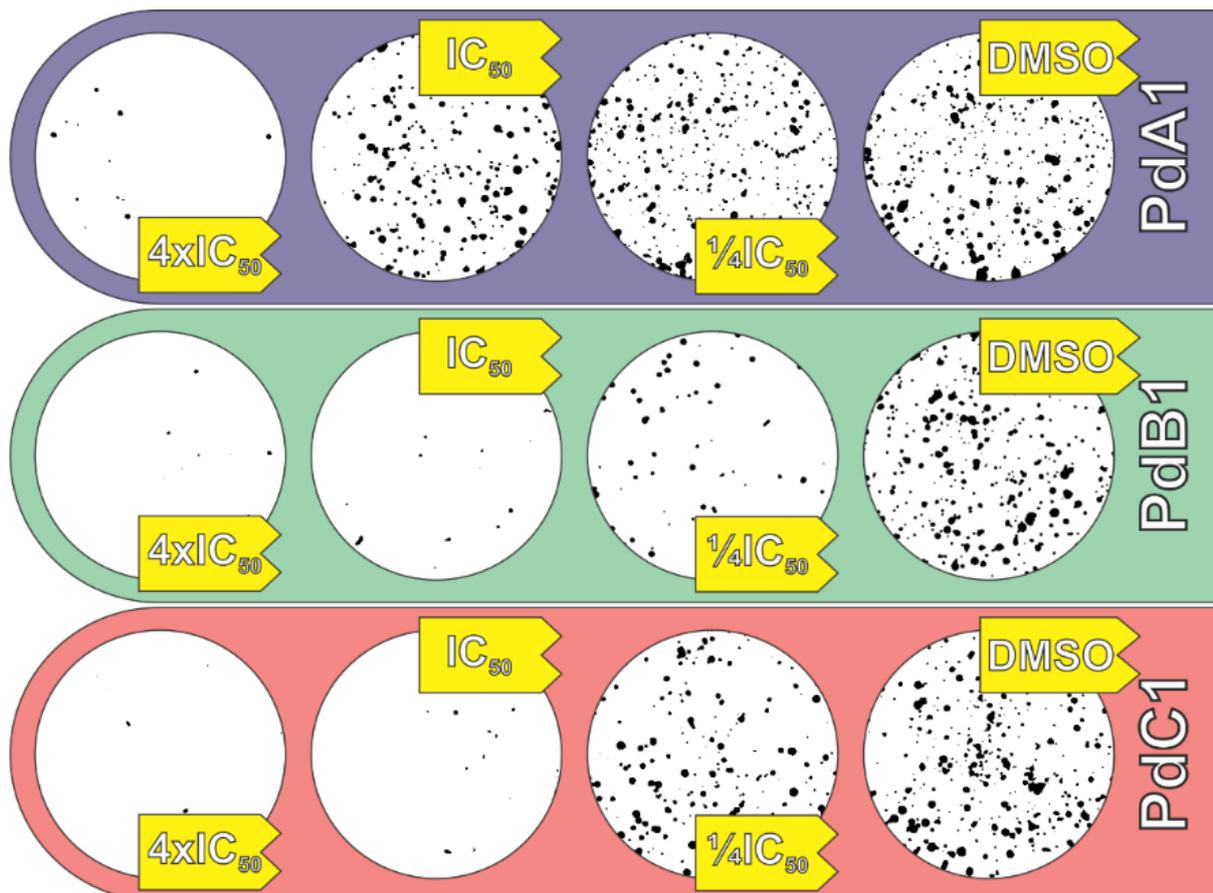


FIGURA 4.31 - Fotografias do ensaio clonegênico realizado com células A2780cis (600 células/poço), as células foram incubadas na presença dos complexos **PdA1**, **PdB2** e **PdC1** em diferentes frações do IC₅₀. Foram cinco dias de tratamento com os complexos e cinco dias de cultivo pós-tratamento.

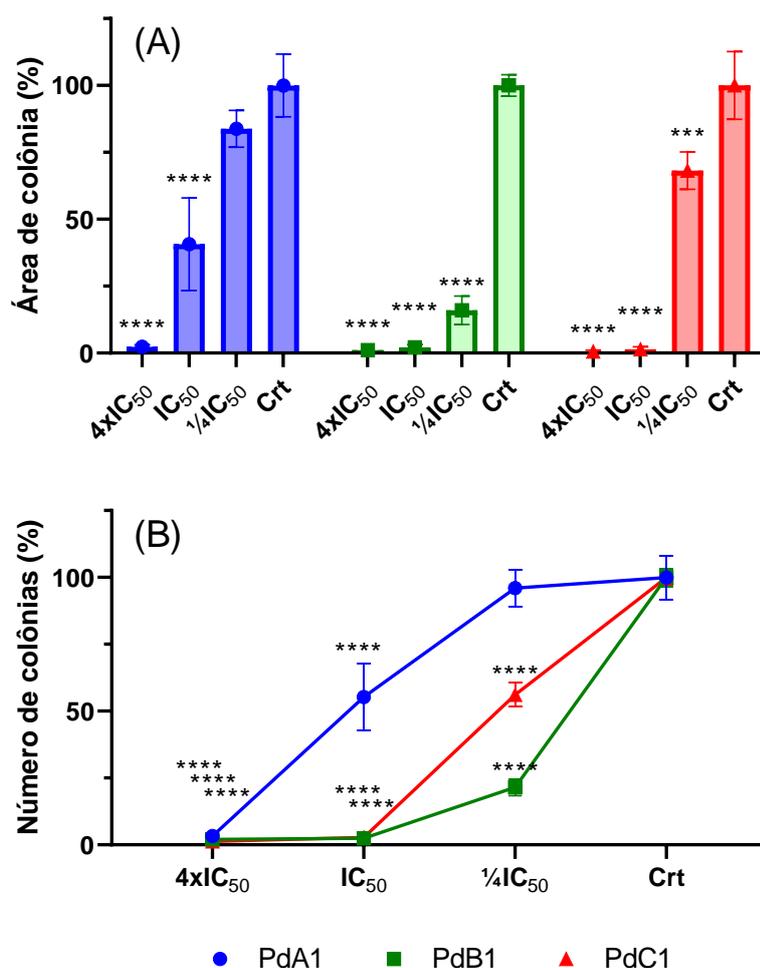


FIGURA 4.32 - (A) Gráfico em barras das médias das áreas de colônias e (B) gráfico do número de colônias observadas para a célula A2780cis com o tratamento dos compostos em concentração em razão do IC₅₀ de cada complexo (**p<0,001 e ****p<0,0001).

Em um estudo matemático apresentado por Anttila e colaboradores,¹²³ foi feito o contraste entre ambas as terapias, e os autores observaram que, se o tratamento for efetivo na redução do tumor primário, a terapia citotóxica é preferida à citostática, isso se a taxa de geração de migração (metástase) for muito superior às de mutações condutoras. Contudo, se o tumor não puder ser erradicado (um exemplo: ausência de fármacos eficazes), mas a sua progressão puder ser suprimida, uma terapia adaptativa deverá ser aplicada.

4.2.3 - Ensaio de morfologia celular

Através da avaliação da morfologia celular, é possível verificar o efeito dos compostos sobre um conjunto de células. No caso do presente trabalho, foram utilizadas linhagens celulares aderentes, ou seja, que necessitam de um suporte para se manter viáveis. Nesse caso, tratando-se de células aderentes, a presença de fragmentos celulares e a redução da densidade celular indicam processo de morte celular, como demonstrado na FIGURA 4.33.¹²⁴

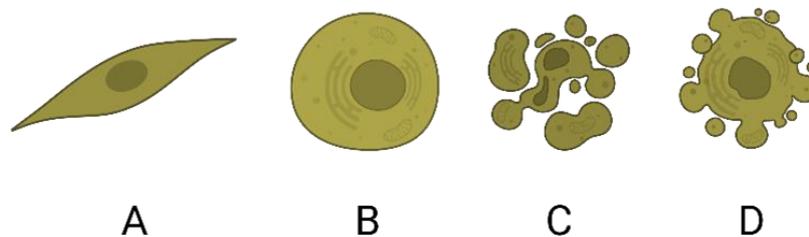


FIGURA 4.33 - Ilustração de (A) uma célula viável e aderida ao substrato, (B) uma célula viável suspensa, (C) corpos apoptóticos e (D) apoptose tardia ou necrose.¹²⁵ (Adaptado) (Criado utilizando-se a plataforma biorender.com)

As fotografias (FIGURA 4.34), em geral, apresentaram um padrão de alta toxicidade para as células da linhagem A2780cis nas concentrações superiores ao IC₅₀. Nessas concentrações, foi observada uma redução na população de células aderidas ao substrato, o aparecimento de células no formato esferoide e a presença de fragmentos celulares (*debris*). Essa ação dos compostos pôde ser associada a um perfil citotóxico, que leva as células à morte celular.¹²⁶

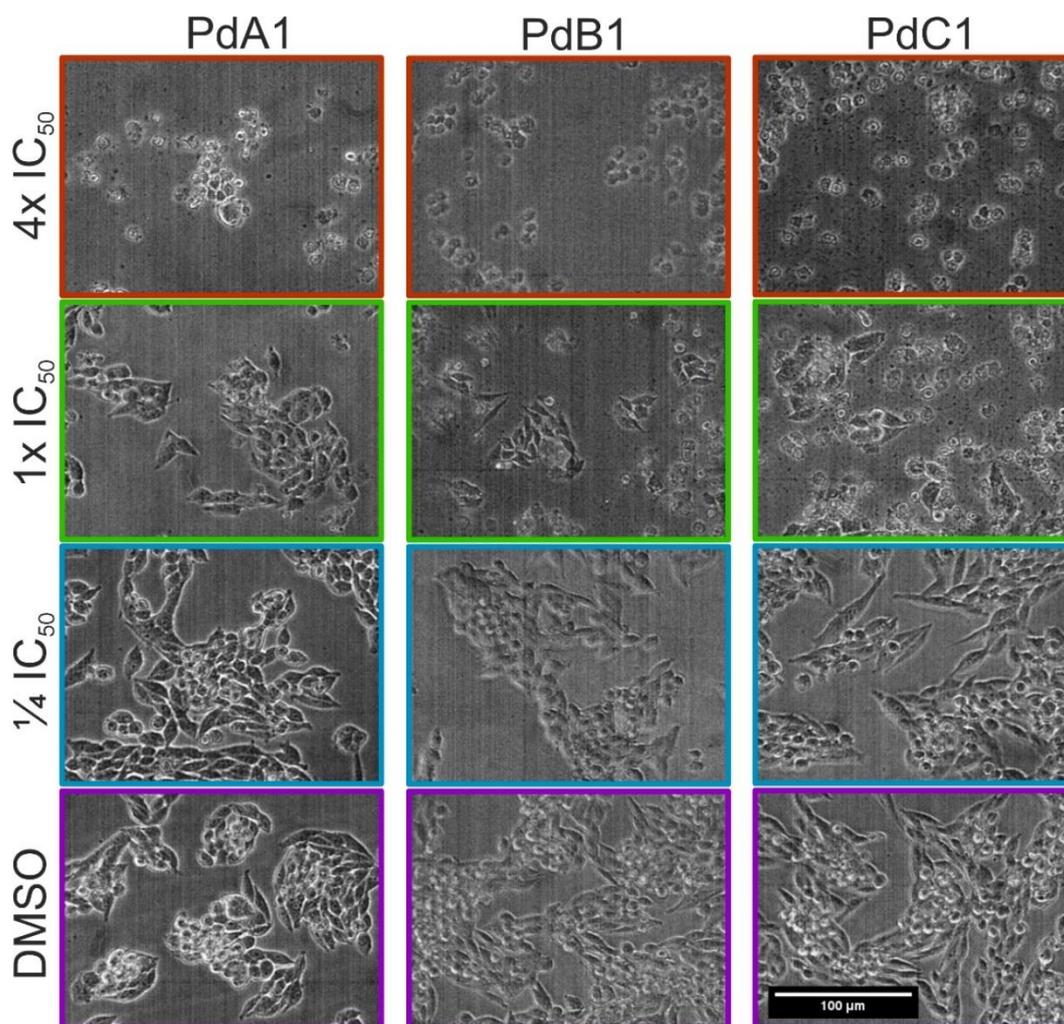


FIGURA 4.34 - Fotografias do ensaio morfológico ao fim da incubação de 30 h para os compostos testados em diferentes concentrações. Linhagem A2780cis.

Todavia, na concentração do IC₅₀ para **PdA1**, observou-se uma redução dos indícios de morte celular e apresentou-se células aderidas e sem *debris*. Desse modo, observou-se, mais uma vez, um efeito mais citostático para o complexo **PdA1** em concentrações inferiores ao IC₅₀, como observado no ensaio clonogênico, denotando-se um modo de ação dependente da concentração do composto.

Os demais complexos, da família **B** e **C**, mantiveram o feito mais citotóxico até em concentrações inferiores ao IC₅₀, com a redução da população de células, em comparação ao controle DMSO, e a presença de células em formato esferoide. As demais fotografias dos complexos em tempos distintos e nas demais concentrações estão anexadas nas FIGURAS A24 – A26.

4.2.4 - Ensaio de migração celular (*Wound Healing*)

O ensaio de fechamento da ferida avalia se os compostos são capazes de inibir a migração celular, assim, as células A2780cis foram cultivadas em microplaca até a formação de uma monocamada, em seguida, foi feito um traço na monocamada (ferida) e observou-se a influência dos compostos no fechamento dessa ferida. Ao fim do ensaio, verificou-se que todos os compostos testados reduziram a migração celular em algum grau. Foi feita a comparação da área inicial da ferida com a área após o tratamento, como apresentado na FIGURA 4.35. O controle com DMSO (0,5% v/v) apresentou o maior fechamento da ferida, já as amostras com os complexos de Pd(II) tiveram uma redução na migração celular.¹²⁷

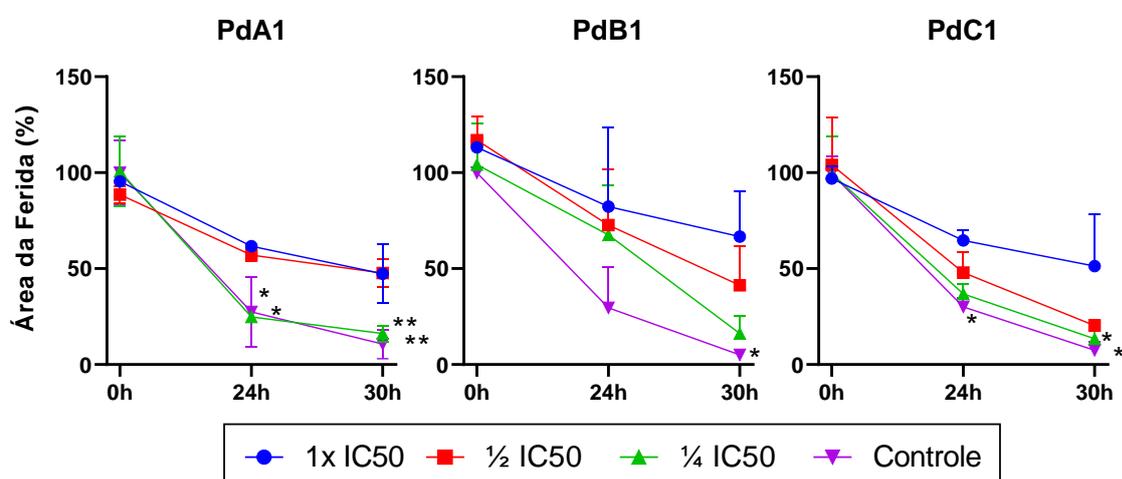


FIGURA 4.35 - Gráfico da área da ferida (%) versus o tempo para cada um dos compostos testados em frações do IC₅₀ (*p<0,05 e **p<0,01).

A redução da migração celular foi mais efetiva nas concentrações próximas ao IC₅₀, nas quais cerca de 50% do fechamento da ferida foi inibido. Para o complexo **PdA1**, a redução da migração celular nas concentrações de IC₅₀ e 1/2 IC₅₀ foi muito próxima, contudo, na concentração de 1/4 IC₅₀, o efeito inibitório não foi observado e apresentou um perfil próximo ao controle. Esse efeito de uma redução mais abrupta na capacidade inibitória da mobilidade celular também foi observado para o complexo **PdC1**. Na FIGURA 4.36, são apresentadas as fotografias obtidas após 30 h de exposição dos compostos às células, e nas FIGURAS A27 – A29 estão detalhadas as fotografias, incluindo o tempo de 24 h.

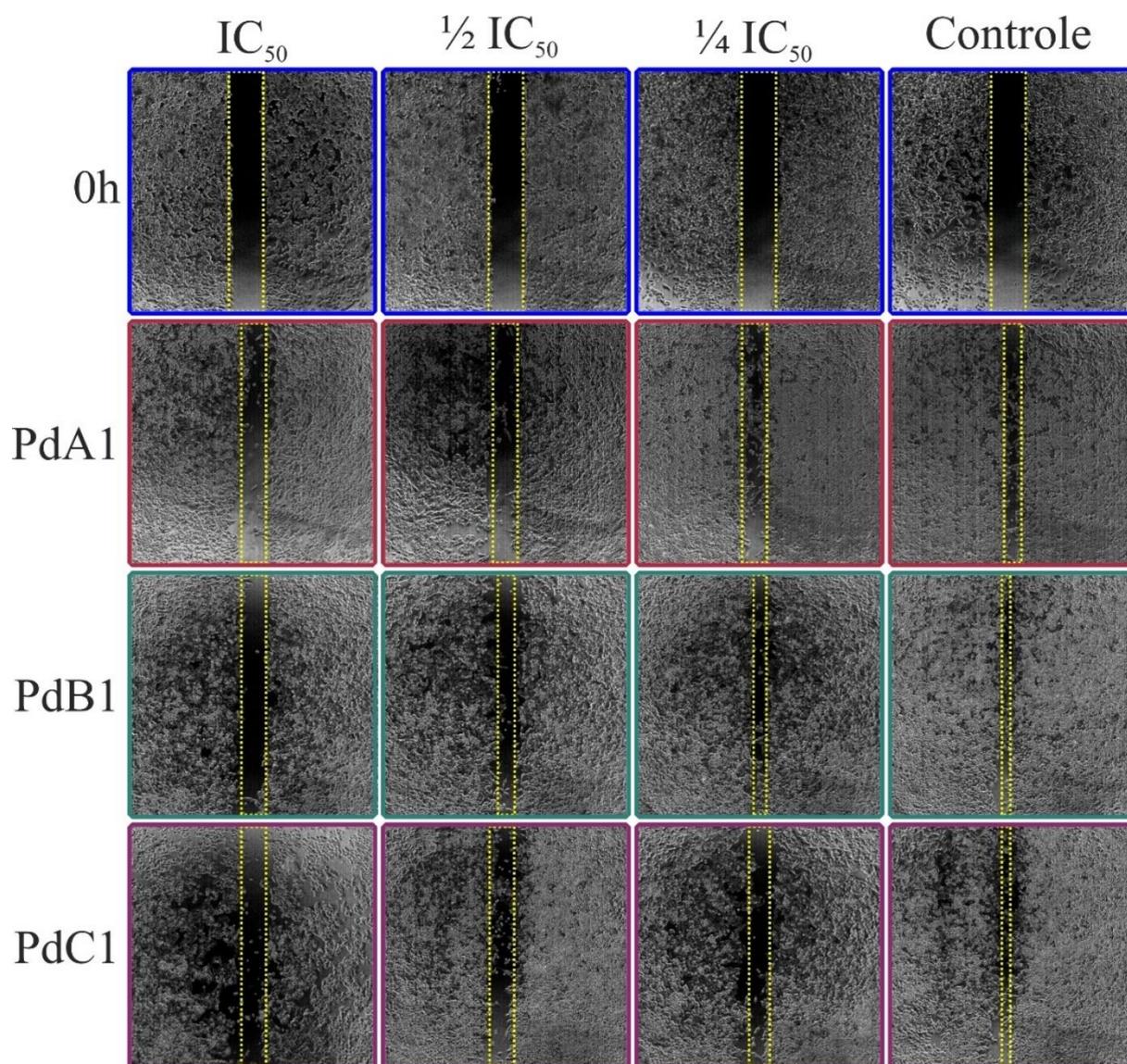


FIGURA 4.36 - Fotografias do ensaio de migração celular nos tempos 0 h e 30 h após a adição dos compostos em diferentes concentrações. Linhagem A2780cis.

4.2.5 - Avaliação do ciclo celular

Por fim, o ensaio da avaliação do ciclo celular foi realizado pelas Dr^a. Analu Rocha Costa e Dr^a. Leticia Pires de Oliveira, com o objetivo de observar a capacidade dos compostos em alterar o número de células em cada fase do ciclo celular. Os compostos foram testados frente à linhagem A2780cis em concentrações referentes ao valor de IC₅₀, que foi obtido (FIGURA 4.37). De forma geral, os complexos de Pd(II) testados não apresentaram alterações significativas no ciclo celular (em sua maioria, valores de $p > 0,05$). Possivelmente, os compostos podem

atuar de forma não específica, frente a diferentes alvos celulares. Os gráficos referentes aos complexos **PdB1** e **PdC1** estão disponíveis nas FIGURAS A30 – A33.

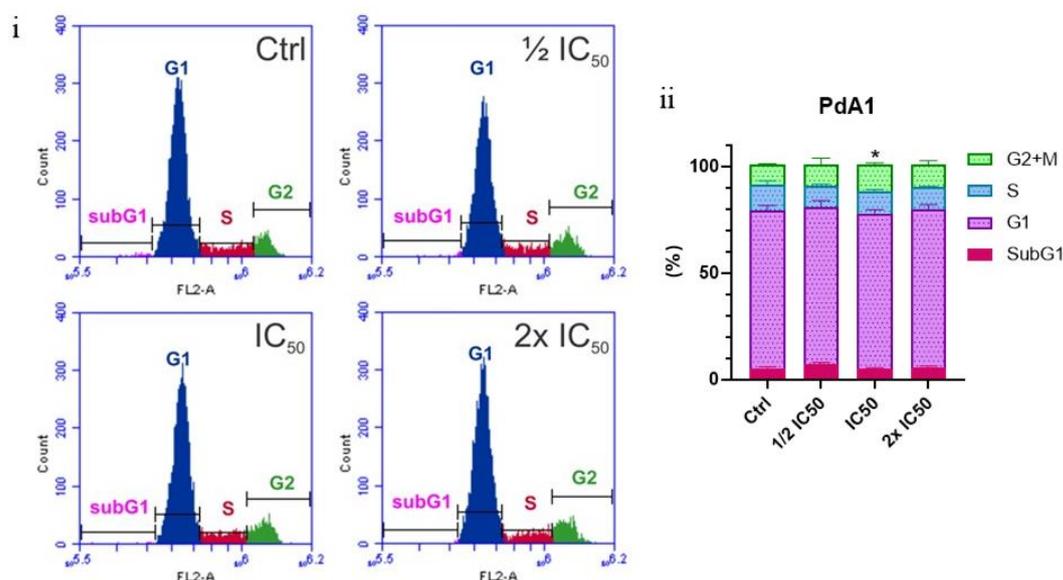


FIGURA 4.37 - i) Gráficos da dispersão das células em diferentes fases do ciclo celular para diferentes concentrações do complexo **PdA1**. ii) Gráfico em barras das porcentagens obtidas das dispersões em cada concentração do complexo **PdA1**. Linhagem A2780cis(*p<0,05).

4.3 - Atividade antioxidante (DPPH)

O DPPH trata-se de um radical orgânico livre e estável, o qual pode ser utilizado na avaliação da atividade antioxidante de diferentes substâncias, de modo que, através da mudança de cor da molécula DPPH, é realizado o ensaio colorimétrico (com o uso da espectroscopia de absorção no UV-Vis). Isso indica se algum composto é capaz de capturar o elétron radical.^{128,129} Dessa forma, foi avaliado se os complexos de Pd(II) possuem alguma atividade antioxidante.

O ensaio avaliou três complexos metálicos (**PdA1**, **PdB1** e **PdC1**), e a molécula de ácido ascórbico (**AA**) foi utilizada como padrão. Os resultados demonstram que o **AA** consumiu 90% do radical DPPH, alterando a cor inicial de púrpura para amarelo. Em contrapartida, os complexos apresentaram atividade antioxidante inferior a 20% (FIGURA 4.38) nas concentrações avaliadas, assim, ficou demonstrado que os complexos de Pd(II) não apresentaram a capacidade de capturar o elétron radical presente no DPPH ou de reagir com a molécula radical. Desse modo,

entende-se que os complexos de Pd(II) não possuem afinidade com reações radicalares, e, muito possivelmente, a sua ação no meio biológico não resulta em um estresse oxidativo.

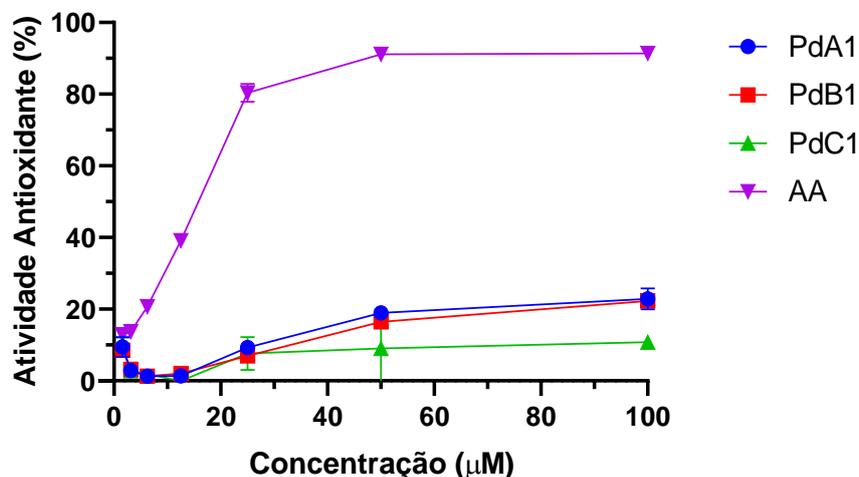


FIGURA 4.38 - Atividade antioxidante (%) dos complexos **PdA1**, **PdB1**, **PdC1** e **AA** em diferentes concentrações ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

4.4 - Ensaio de interação com biomoléculas

4.4.1 - Interação com DNA: titulação espectroscópica com *ct*-DNA

Devido à sua importância em processos metabólicos e na multiplicação celular, o DNA é um dos principais alvos de compostos antineoplásicos. Dessa forma, foram realizados diversos ensaios de interação com o DNA, a fim de identificar se os complexos de Pd(II) são capazes de alterar estruturalmente o ácido desoxirribonucleico.¹³⁰

É conhecido que o espectro eletrônico, na região do Uv-Vis do DNA ou dos complexos, é sensível a interações entre essas substâncias, apresentando mudanças significativas e características, em seu perfil, para os diferentes tipos de interação. Por exemplo, compostos que interagem por meio da intercalação entre as bases nitrogenadas do DNA causam efeitos batocrômicos e hipocrômicos devido às interações dos orbitais π do DNA com os orbitais π^* da molécula intercaladora. Isso acarreta a redução da energia para as transições $\pi-\pi^*$. Concomitantemente, os orbitais π estão semipreenchidos, o que reduz a probabilidade de transições eletrônicas, resultando nos efeitos supracitados. Semelhantemente, outras interações

com o DNA, como a eletrostática e por ligação covalente, podem apresentar efeitos hipercrômicos e outras variações nos espectros.^{131,132}

A partir de várias adições de *ct*-DNA em uma solução de complexo de Pd(II), foi possível avaliar como os compostos interagem com a biomolécula. Nesse ensaio, todos os complexos testados demonstraram baixa interação com a biomolécula. A FIGURA 4.39 apresenta os espectros do complexo **PdB1**, sozinho (em preto) e depois de sucessivas adições *ct*-DNA. A partir da análise desses resultados, inicialmente, foi observado o efeito hipocrômico referente às primeiras adições de *ct*-DNA. Após a terceira adição $R = 55$ ($R = 100 \times [ct\text{-DNA}]/[\text{Complexo}]$), houve a estabilização da solução, e os espectros obtidos apresentaram poucas alterações entre si. Esse perfil com pequenas alterações nos espectros é um indicativo de interação fraca, possivelmente, uma agregação, em razões quando o complexo é muito superior ao DNA, seguido de interações laterais, quando as concentrações das espécies estão mais próximas.

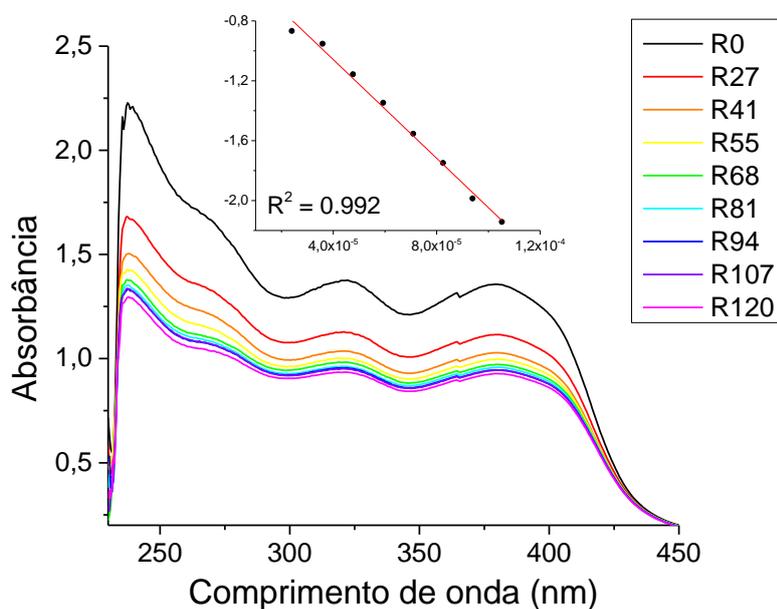


FIGURA 4.39 - Espectros de absorção do complexo **PdB1** com a titulação de alíquotas de DNA na região do UV-Vis. $R = 100 \times [\text{DNA}]/[\text{Complexo}]$

Além da avaliação dos espectros, através da equação de Benesi-Hildebrand, foi possível calcular a constante de ligação (K_b) entre o complexo e DNA, sendo que essa constante avalia quantitativamente os efeitos supracitados e

estabelece, de forma matemática, um valor que pode ser comparado entre diferentes substâncias. Os complexos, de modo geral, apresentaram valores de interação moderada quando comparados com intercaladores do DNA, que apresentaram $K_b > 10^7$ (Tabela 4.11).^{133,134} Os espectros dos demais complexos estão disponíveis nas FIGURAS A34 – A37.

TABELA 4.11 - Valores calculados de K_b ($L \cdot mol^{-1}$) para os complexos sintetizados e os valores do coeficiente de determinação (R^2).

Complexos	PdB1	PdB3	PdC1	PdC2	PdC3
$K_b \times 10^4$ ($L \cdot mol^{-1}$)	4,14	-1,47	2,45	2,92	5,86
R^2	0,992	0,938	0,958	0,974	0,994

4.4.2 - Interação com DNA: deslocamento de Hoechst (ct-DNA)

Os corantes Hoechst são de um grupo de moléculas capazes de corar o DNA, seja em ensaios biomoleculares utilizando-se o DNA livre, seja em ensaios com células vivas ou fixadas.^{135,136} Esses corantes à base de bisbenzamida interagem com o DNA via sulco menor. Tal “ligação” forma um complexo fluorescente, o qual é sensível ao desenrolar da dupla hélice, o que leva à supressão da fluorescência. Desse modo, esses corantes podem detectar danos ou alterações sofridos na estrutura do DNA.^{137,138}

A partir da formação do complexo fluorescente DNA-Hoechst, verificou-se a capacidade dos compostos de coordenação de Pd(II) em interagir com o DNA e, conseqüentemente, gerar a supressão da fluorescência devido à saída do Hoechst do sulco.⁹³ Como o complexo DNA-Hoechst não possui ligação química covalente, qualquer mudança estrutural do ácido desoxirribonucleico pode gerar o desacoplamento do Hoechst do arcabouço molecular.¹³⁹

Através dos resultados obtidos, não foi possível realizar os cálculos de supressão de fluorescência, pois as curvas não apresentaram linearidade. Entende-se que os complexos possam agir sobre a estrutura do DNA de forma inespecífica, reforçando os resultados obtidos pela espectroscopia na região do Uv-vis. Esse tipo de interação pode gerar supressões que não são proporcionais à concentração dos

complexos, como é possível observar na FIGURA 4.40. Os demais espectros estão disponibilizados nas FIGURAS A38 e A39.

Destaca-se que os espectros obtidos a 37°C tiveram maior tempo de incubação, uma vez que a mesma solução foi utilizada em diferentes temperaturas, por isso, observou-se o aumento da intensidade em razão do maior tempo em solução, que contribuiu na estabilização do adulto DNA-Hoechst.

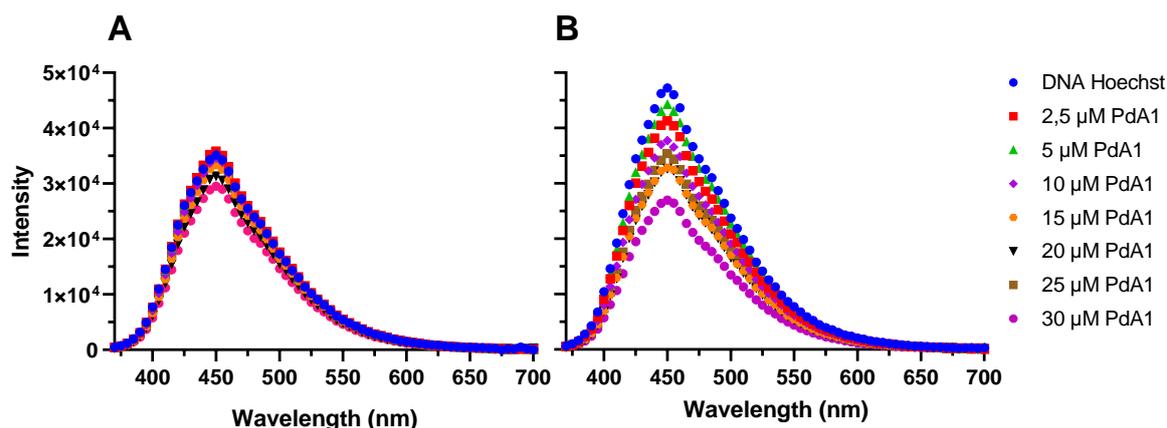


FIGURA 4.40 - Espectros da supressão de fluorescência do complexo DNA-Hoechst com o aumento da concentração com o composto **PdA1**. Espectros foram obtidos a 25°C (A) e 37°C (B).

4.4.3 - Interação com DNA: avaliação por viscosidade (*ct*-DNA)

Por meio das mudanças observadas na viscosidade de uma solução de *ct*-DNA, é possível classificar como os complexos interagem com o DNA. As interações intercalativas aumentam a viscosidade da solução de *ct*-DNA, resultante do alongamento, enrijecimento e desenrolamento da estrutura dupla hélice do DNA. As interações por ligação covalente reduzem a viscosidade da solução devido às distorções na dupla hélice e redução do comprimento da molécula. Outros modos de ação sobre o ácido nucleico pouco alteram a sua viscosidade.¹³⁰

Na FIGURA 4.41, verificou-se que os complexos mantiveram a viscosidade relativa próxima a 1 e apresentaram tendência distinta de um intercalante do DNA ou de interações covalentes, como o laranja de tiazol (TO) e da cisplatina (CDDP), respectivamente. Como apresentado anteriormente, os complexos não demonstraram capacidade linear em deslocar o Hoechst e, muito provavelmente, não

interagiram via sulcos, portanto, o modo de interação predominante entre os complexos Pd(II) com o DNA é o eletrostático e/ou por agregação.^{140,141}

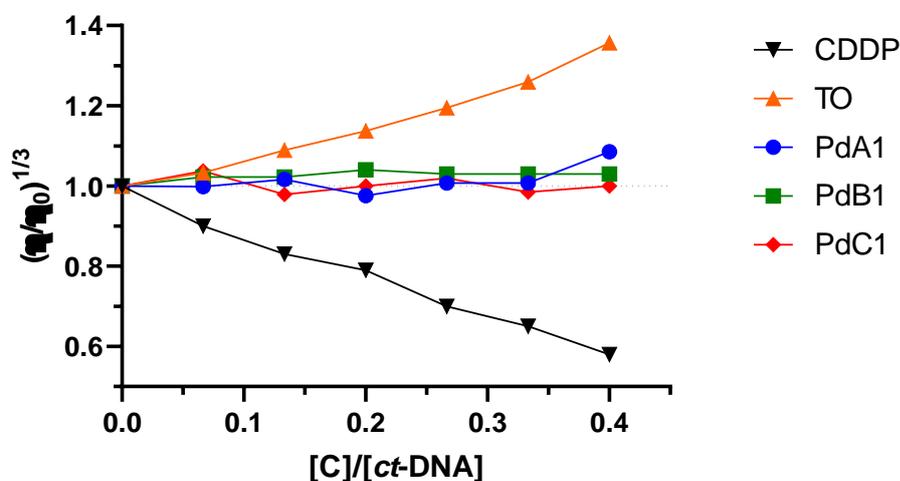


FIGURA 4.41 - Viscosidade relativa do *ct*-DNA (150 μmol·L⁻¹) na presença dos complexos de Pd(II), do padrão tiazol laranja (TO) e cisplatina (CDDP) nas diferentes razões molares [composto]/[DNA]= 0,06; 0,13; 0,20; 0,26, 0,33 e 0,40.

4.4.4 - Interação com HSA: supressão de fluorescência

A albumina de soro humano (HSA) é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, capaz de ligar-se a uma grande variedade de fármacos e moléculas endógenas (ácidos graxos, hormônios, ácidos biliares, aminoácidos, íons metálicos e metabólitos). Ela é responsável por carrear essas moléculas através dos vasos sanguíneos e distribuí-las pelo corpo, disponibilizando-as em regiões menos concentradas. A HSA desempenha um importante papel na farmacocinética e farmacodinâmica das substâncias de interesse.¹⁴²

Devido a essas propriedades, foi realizado o ensaio de supressão da fluorescência da HSA pelos complexos de Pd(II). Após a incubação de 15 min a 20°C sob agitação, os espectros foram obtidos e disponibilizados na FIGURA 4.42 e FIGURAS A40 e A41. A TABELA 4.12 foi construída a partir dos dados obtidos pelos espectros de fluorescência. Nela, pode-se observar os valores das constantes de Stern-Volmer (K_{SV}), a constante de supressão biomolecular (k_q), a constante de ligação (K_b), o número de sítios de interação (n) e as constantes físico-químicas ΔH , ΔS e ΔG .

Por meio das constantes apresentadas na TABELA 4.12, foi possível classificar o mecanismo de interação entre os compostos e HSA. Através da constante de supressão (K_{sv}) e da constante de supressão biomolecular (k_q), classifica-se os processos de interação em dinâmico ou estático. O principal aspecto utilizado para distinguir os dois mecanismos é a variação de K_{sv} com o aumento da temperatura. No mecanismo estático, o aumento da temperatura reduz a estabilidade do complexo HSA-molécula e resulta na redução do valor de K_{sv} . O oposto ocorre no mecanismo dinâmico, em que o aumento da temperatura permite uma difusão mais rápida e eleva as chances de colisões, o que aumenta a supressão e os valores de K_{sv} . É importante ressaltar que o valor máximo da constante de supressão biomolecular (k_q) permitido para uma supressão dinâmica é de $2.0 \times 10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.¹⁴³

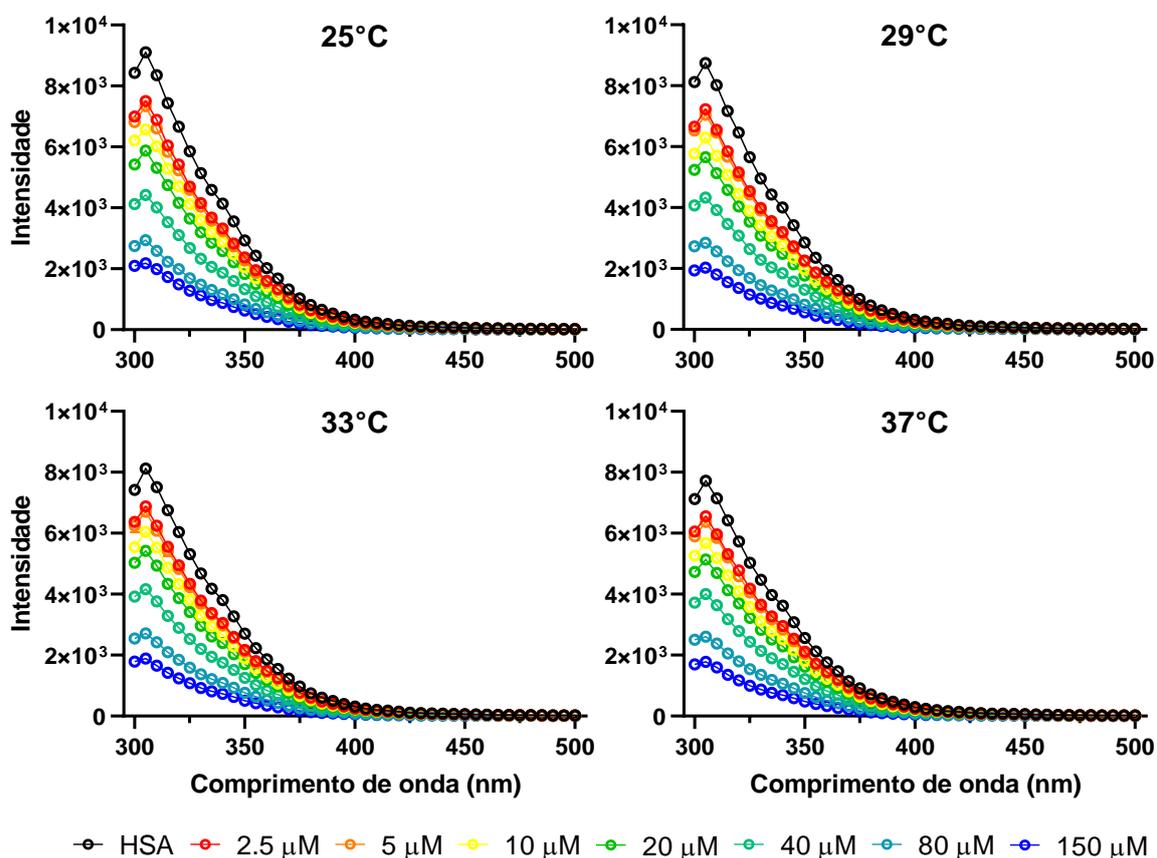


FIGURA 4.42 - Espectros da supressão de fluorescência da HSA pelo aumento da concentração do complexo **PdA1** em diferentes temperaturas (25, 29, 33 e 37°C).

TABELA 4.12 - Dados calculados a partir da supressão de fluorescência da HSA pelos complexos **PdA1**, **PdB1** e **PdC1**.

Temperatura	Ksv	k _q	K _b	n	ΔH	ΔS	ΔG
K	10 ⁴ (L·mol ⁻¹)	10 ¹² (L·mol ⁻¹ ·s ⁻¹)	10 ³ (L·mol ⁻¹)		kJ/mol	J/mol	kJ/mol
PdA1							
298	2,08 ± 0,07	3,47	1,35 ± 0,001	0,70	25,32	144,76	-17,87 ± 0,06
302	2,15 ± 0,06	3,59	1,42 ± 0,001	0,70			-18,24 ± 0,05
306	2,16 ± 0,06	3,60	1,91 ± 0,001	0,74			-19,23 ± 0,08
310	2,18 ± 0,1	3,64	1,90 ± 0,001	0,74			-19,47 ± 0,08
PdB1							
298	2,45 ± 0,07	4,08	2,38 ± 0,001	0,73	25,32	149,37	-19,27 ± 0,05
302	2,42 ± 0,09	4,03	2,48 ± 0,001	0,73			-19,64 ± 0,07
306	2,30 ± 0,08	3,83	3,27 ± 0,001	0,77			-20,60 ± 0,08
310	2,30 ± 0,05	3,83	3,37 ± 0,001	0,77			-20,95 ± 0,06
PdC1							
298	1,70 ± 0,07	2,83	5,21 ± 0,001	0,85	35,13	189,07	-21,22 ± 0,4
302	1,62 ± 0,02	2,71	6,61 ± 0,001	0,89			-22,10 ± 0,6
306	1,54 ± 0,06	2,56	7,21 ± 0,001	0,90			-22,61 ± 0,3
310	1,47 ± 0,01	2,45	9,31 ± 0,001	0,94			-23,57 ± 0,6

Isso posto, foi observado para os complexos dois diferentes perfis de supressão com a elevação da temperatura. Para o composto **PdA1**, foi observada a elevação do valor de K_{sv} , enquanto em **PdB1** e **PdC1** houve a redução das constantes K_{sv} . Desse modo, os compostos **PdB1** e **PdC1** apresentaram um mecanismo de supressão estático, já **PdA1** demonstrou um mecanismo intermediário, uma vez que a constante k_q calculada foi de $\sim 10^{12}$.

A constante de ligação K_b indica o quão fortemente estão ligados proteína-supressor. Para os complexos de Pd(II), verificou-se o aumento do K_b na ordem **PaA1** < **PdB1** < **PdC1**, semelhantemente ao aumento do substituinte R_1 . Desse modo, ficou demonstrado que a presença de um grupo Ph com elétrons deslocalizados ajuda na estabilização da ligação com a HSA.

Outra informação relevante diz respeito ao número de sítios de interação com a proteína. Em todos os casos, esse valor se aproximou-se de 1, com o destaque para o complexo **PdC1**, indicando o fortalecimento da interação. Apesar disso, os valores de K_b para os complexos são classificados como interação fraca ou intermediária, o ideal para que as moléculas sejam carregadas, como ocorre com fármacos já aprovados: observa-se K_b : $6,17 \times 10^4$ (varfarina), $5,70 \times 10^4$ (tenofovir) e $1,99 \times 10^5$ (furosemida) a 310 K.¹⁴⁴

Os parâmetros termodinâmicos calculados auxiliam na elucidação das interações envolvidas na ligação com a HSA. Os valores positivos de entalpia e entropia sugeriram que a inserção dos complexos na proteína se dá por via de interações hidrofóbicas. Já os valores negativos obtidos para a constante de Gibbs indicaram a espontaneidade do processo de interação entre os complexos e a HSA.¹⁴⁵

4.4.5 - Ensaio de inibição enzimática: DNA-Topoisomerase II

A enzima DNA-Topoisomerase II α foi selecionada devido a sua importante função no processo de replicação do DNA. É conhecido que a TOPOII α apresenta maior expressão em células tumorais do que em células sadias.^{58,65} O ensaio de inibição da TOPOII α foi realizado avaliando-se a mobilidade eletroforética do plasmídeo pBR322 após incubação com a enzima e os complexos em diferentes concentrações. Desse modo, a resposta apresentada por esse ensaio é indireta, e a

análise foi realizada sobre a capacidade dos complexos inibirem o relaxamento do plasmídeo pela TOPOII α .

Os ensaios foram realizados nas mesmas concentrações em que foi feita a avaliação de interação com DNA via eletroforese. Na FIGURA 4.43, é apresentado o gel de eletroforese obtido para os complexos da família **A**. Nele, foi possível observar no controle negativo (C-) a presença do pBR322 sem a ação da enzima. Na sequência, em C+ (controle positivo), verificou-se a quebra do plasmídeo e o enfraquecimento da banda referente ao DNA superenovelado. Além disso, observou-se o arraste gerado pela formação dos topoisômeros, estruturas de plasmídeo com diferentes graus de relaxamento.

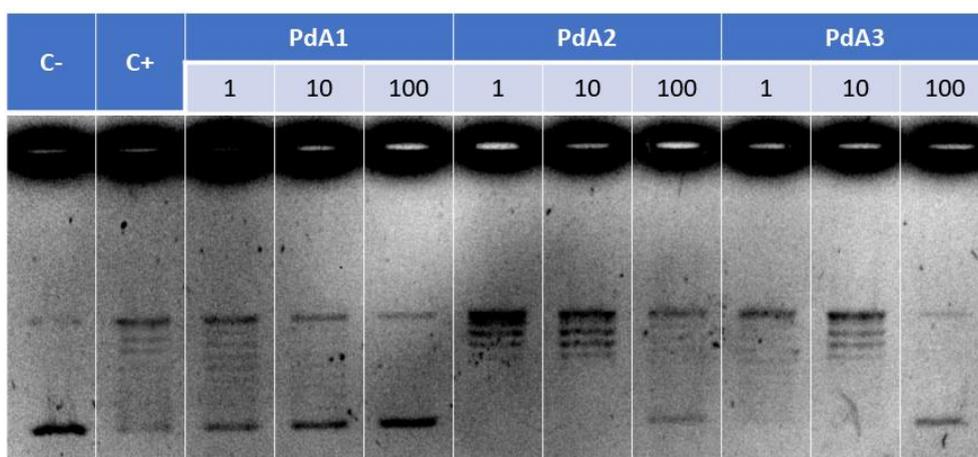


FIGURA 4.43 - Fotografia do gel de agarose. 1% (m/v) do ensaio de inibição da enzima TOPOII α para os complexos **PdA1**, **PdA2** e **PdA3** nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Os poços referentes às amostras apresentaram capacidade inibitória na maior concentração testada, sendo observada através da supressão das bandas dos topoisômeros e do surgimento da banda referente ao plasmídeo superenovelado. Nas linhas referentes ao composto **PdA1**, verificou-se que na menor concentração, uma capacidade de inibição da enzima, devido à maior concentração de DNA superenovelado, com o aumento da concentração (**PdA1** 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Foi observado o fortalecimento da banda referente ao pBR322 superenovelado, sendo possível notar uma inibição completa a 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Os complexos das famílias **B** e **C** não apresentaram atividade inibitória nas concentrações testadas, e não foi observada a redução das bandas referentes à ação de relaxamento da TOPOII α sobre o DNA. A presença de substituintes maiores na posição R₁ pode influenciar na entrada dos compostos no sítio da ATPase. Tal efeito já foi descrito por Farias, em que o tamanho dos complexos pode impedir a sua atividade inibitória.^{78,91}

Como citado anteriormente, as enzimas topoisomerase II são divididas em duas isoformas, α e β . A isoforma α é um dos principais alvos farmacológicos na terapia oncológica, por sua vez, a isoforma β não apresenta a mesma associação com o crescimento tumoral, por isso, busca-se compostos capazes de inibirem apenas a isoforma α (FIGURAS A42 e A43).

Como os complexos da família **A** foram os únicos a reduzir a atividade da TOPOII α , eles foram selecionados para o ensaio de inibição da TOPOII β . Aplicando-se o mesmo procedimento, foi obtida a fotografia do gel de agarose apresentada na FIGURA 4.44. Nesse ensaio, observou-se que os complexos não foram capazes de inibir a isoforma β , desse modo, houve a relaxação do DNA. O complexo **PdA2** foi o único a apresentar uma inibição parcial da enzima na concentração de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

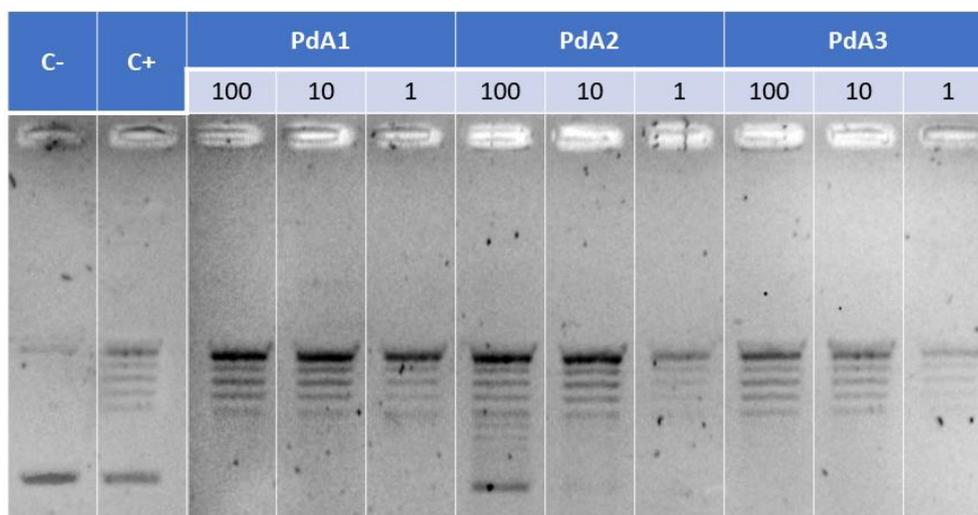


FIGURA 4.44 - Fotografia do gel de agarose. 1% (m/v) do ensaio de inibição da enzima TOPOII β para os complexos **PdA1**, **PdA2** e **PdA3** nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Ao final, pôde-se verificar que os complexos **PdA1**, **PdA2** e **PdA3** foram os únicos a apresentar atividade frente à enzima DNA-topoisomerase II α , e que, nas mesmas concentrações, os complexos não atuaram sobre a isoforma β . Desse modo, pode-se classificar esses complexos como inibidores catalíticos da TOPOII α .

Estruturalmente, a ausência de substituintes maiores em R₁ aumentou a capacidade dos complexos estudados de inibir a ação da TOPOII α , e isso relaciona-se com o modo de ação dos complexos quadráticos planos, que possuem a capacidade de se inserir no sítio da ATPase e impedir a entrada do ATP, resultando, assim, na inibição da enzima.^{62,67}

4.4.6 - Ensaio de inibição enzimática: Catepsina B

Outro importante alvo farmacológico é a enzima Catepsina B, presente em diversos mecanismos fisiológicos no corpo humano. Entretanto, a sua alta expressão no entorno de estromas tumorais está associada à formação de novos vasos sanguíneos e migração celular, que resultam nos processos de angiogênese e metástase, respectivamente.¹⁴⁶

Foram preparados três conjuntos de soluções: a primeira contendo a enzima CatB e o tampão de reação (50 μ L), a segunda formada pelas soluções dos compostos em diferentes concentrações (10 μ L), e a terceira solução contendo o substrato que, quando catalisado pela enzima, apresenta fluorescência (40 μ L). As soluções foram adicionadas aos poços de uma microplaca de 96 poços preta, mantida sob agitação por 10 min. Após esse tempo, a leitura da fluorescência (ex 400 nm/ em 505 nm) foi realizada em diferentes tempos (0, 5, 10, 15 e 20 min). Desse modo, comparou-se as intensidades relativas obtidas e foi feito o cálculo de IC₅₀.

Os complexos testados no ensaio de inibição enzimática demonstraram uma atividade inibitória moderada, reduzindo parcialmente a atividade da enzima. Através dos dados obtidos, foi feito o cálculo de IC₅₀ para os compostos **PdA1**, **PdB1** e **PdC1**, que apresentaram concentrações inibitórias mínimas de 50% nos respectivos valores: 133,8 \pm 3,5, 70,8 \pm 1,8 e 46,23 \pm 1,6 μ mol·L⁻¹.

Desse modo, observou-se a tendência de que compostos com os substituintes mais volumosos também foram mais efetivos na inibição da Catepsina B. Conforme os resultados coletados até aqui, o complexo **PdC1** apresentou maior

capacidade de interações hidrofóbicas, como as interações $\pi - \pi$, que auxiliam na estabilização de inibidores nos arcabouços moleculares da enzima, o que resulta, experimentalmente, em uma redução do valor de IC_{50} (FIGURA 4.45).

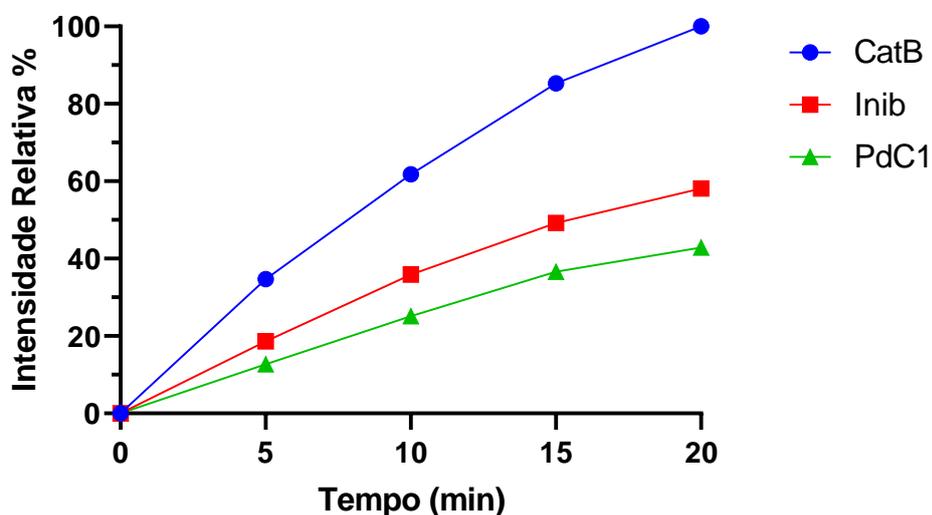


FIGURA 4.45 - Gráfico das intensidades relativas obtidas no ensaio de inibição da Catepsina B para o complexo PdC1 na concentração de $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Assim, observou-se que a atividade citotóxica, observada para os complexos, não se deve à capacidade deles inibirem a Catepsina B, uma vez que as concentrações de IC_{50} obtidas para o ensaio de inibição são muito superiores às concentrações de viabilidade celular. Entretanto, essa classe de compostos demonstrou-se versátil ao interagir com enzimas de grupos distintos.

5 - Considerações finais

5.1 - Conclusões

Ao fim deste trabalho, os complexos de Pd(II) inéditos, propostos a ser sintetizados, foram obtidos e caracterizados com sucesso, e as suas estruturas foram elucidadas, utilizando-se diversas técnicas de caracterização. Foi possível a aquisição de monocristais cristalinos para a maioria desses compostos. Por meio da análise dessas estruturas tridimensionais obtidas, foi observada a influência do centro metálico sobre os ligantes coordenados. Destacam-se os complexos da família **C**, uma vez que notou-se uma possibilidade de mudança conformacional em torno da ligação C=N(1), a qual foi detectada através da espectroscopia de UV-Vis e, posteriormente, confirmada por meio de cálculos por DFT. Ademais, duas estruturas tridimensionais distintas foram obtidas para o mesmo complexo (**PdC3**).

Através dos ensaios de inibição do crescimento celular, pode-se concluir que os complexos metálicos das famílias **A** e **B** são mais tóxicos para as células testadas do que os da família **C**. Por meio da comparação dos complexos **PdA1**, **PdB1** e **PdC1**, observou-se que o substituinte R₁ apresentou maior capacidade de influenciar os resultados de viabilidade celular, enquanto o substituinte R₂ funcionou na modulação da citotoxicidade dos complexos de acordo o tipo de linhagem celular.

Sobre o modo de ação dos complexos em relação à viabilidade celular, os resultados indicaram que o grupo R₁ atuou diretamente sobre o perfil citotóxico e citostático dos complexos, evidenciando que o ligante formado por um aldeído apresentou perfil citostático em concentração próxima ao IC₅₀, enquanto ligantes oriundos de cetonas apresentaram-se com perfil citotóxico.

Dessa maneira, entende-se que é possível modular a atividade dos complexos sobre as linhagens celulares através do grupo carbonila, que foi incorporado ao ligante tiossemicarbazona, sendo que o aldeído e a cetona menos volumosos apresentam alta citotoxicidade, enquanto os substituintes maiores reduziram a ação citotóxica dos complexos. Entretanto, essas mudanças estruturais não alteram significativamente a atividade antimigratória dos complexos, ou seja, todos apresentam possível atividade antimetastática. Os compostos em questão não foram capazes de interagir com o radical DPPH e não apresentam ação antioxidante.

Tais observações reduzem as chances dos complexos de serem espécies geradores de algum estresse oxidativo nas células. Tal observação necessita ser atestada através de ensaios de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Os ensaios de interação com DNA demonstraram que os complexos interagem via eletrostática ou por agregação e não são capazes de modificar a sua estrutura. Por sua vez, os complexos foram capazes de interagir de modo intermediário com a proteína HSA e apresentaram um mecanismo de ação intermediário-estático, sendo que foi possível calcular valores de K_b em torno de 10^3 L·mol⁻¹, o que indica a possibilidade de serem transportados pela enzima através do soro sanguíneo.

Parte da composição estrutural dos compostos foi proposta para aumentar as possíveis interações entre os complexos de Pd(II) e enzimas de interesse. Observou-se, para os ensaios com a DNA-Topoisomerase II α , que os compostos da família **A** apresentaram maior inibição da enzima. Desse modo, verificou-se que o menor volume estrutural apresentado pelos complexos **PdA1**, **PdA2** e **PdA3** propiciou maior interação com a TOPOII α , o que levou à sua inibição. Ressalta-se a característica de complexos planos serem capazes de se inserir no sítio da ATPase, o que gera a inibição enzimática, entretanto, ligantes volumosos podem impedir a inserção dos complexos no sítio. Adicionalmente, esses complexos aparentaram-se inativos frente à TOPOII β , demonstrando um caráter de inibição catalítica da enzima, como foi proposto no início do trabalho.

Enquanto isso, para a enzima Catepsina B, foi observado o efeito contrário, no qual o composto **PdC1**, o mais volumoso complexo testado, foi que demonstrou os menores valores de IC₅₀ na inibição da atividade enzimática. Desse modo, observou-se que a inibição da CatB pode ser favorecida pela presença de mais interações pelo empilhamento π - π , uma vez que os complexos da família **C** apresentam dois anéis aromáticos.

Assim, os complexos de Pd(II), contendo tiossemicarbazonas e trifenilfosfina, são um grupo de possíveis agentes antineoplásicos capazes de reduzirem a viabilidade celular in vitro, principalmente, para as linhagens de ovário e mama. Desse modo, sugere-se que mais complexos semelhantes sejam testadas

frentes as linhagens de mama e ovário, afim de se verificar mais relações estruturas-atividade, e que os ensaios biológicos possam progredir para a fase *in vivo*.

Por fim, os compostos de Pd(II) que foram estudados apresentaram distintas características, sendo alguns capazes de atuar sobre as enzimas alvos testadas e, assim, inibir importantes alvos antineoplásicos associados ao crescimento tumoral e progressão da doença. Ficou demonstrado que o substituinte R_1 é um importante modulador da atividade citotóxica e da atividade inibitória em enzimas de interesse, o que possibilita o surgimento de novas estruturas que explorem os substituintes **H**, **CH₃** e **Ph**. Em conjunto, destaca-se a necessidade de se buscar outras biomoléculas alvos que possam ser avaliadas frente aos compostos de Pd(II) e, assim, formar uma base de dados capaz de informar mais sobre os possíveis mecanismos de ação dessa classe de complexos.

6 - Referências

1. Thuler, L. C. S.; da Silva, M. J. S.; Souza, T. de A. *ABC Do Câncer - Abordagens Básicas Para o Controle Do Câncer*, Rio de Janeiro, 2020.
2. Wang, R. C.; Levine, B. Autophagy in Cellular Growth Control. *FEBS Lett* 584 (7), 1417–1426, 2010.
3. Kennedy, S. R.; Zhang, Y.; Risques, R. A. Cancer-Associated Mutations but No Cancer: Insights into the Early Steps of Carcinogenesis and Implications for Early Cancer Detection. *Trends Cancer* 5 (9), 531–540, 2019.
4. National Cancer Institute. *What Is Cancer?*. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (acessado 02/02/2023).
5. Mahmoud, Y. K.; Abdelrazek, H. M. A. Cancer: Thymoquinone Antioxidant/pro-Oxidant Effect as Potential Anticancer Remedy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 115, 108783, 2019.
6. Organização Mundial da Saúde (World Health Organization). *WHO Report on Cancer: Setting Priorities, Investing Wisely and Providing Care for All*; World Health Organization, 2020.
7. International Agency for Research on Cancer. *Global Cancer Observatory*. <https://gco.iarc.fr/> (acessado 02/02/2023).
8. Oliveira, J. *INCA estima 704 mil novos casos de câncer anualmente até 2025*. Ministério da Saúde. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/novembro/inca-estima-704-mil-novos-casos-de-cancer-anualmente-ate-2025> (acessado 02/02/2023).
9. Sudhakar, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther* 01 (02), i–iv, 2009.
10. Instituto Nacional de Câncer - INCA. *Estatísticas de câncer*. <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros> (acessado 02/02/2023).

11. National Cancer Institute. *Types of Cancer Treatment*. National Institutes of Health - US. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types> (acessado 02/02/2023).
12. DeSantis, C. E.; Lin, C. C.; Mariotto, A. B.; Siegel, R. L.; Stein, K. D.; Kramer, J. L.; Alteri, R.; Robbins, A. S.; Jemal, A. Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 64 (4), 252–271, 2014.
13. Lontos, M.; Kyriazoglou, A.; Dimitriadis, I.; Dimopoulos, M.-A.; Bamias, A. Systemic Therapy in Cervical Cancer: 30 Years in Review. *Crit Rev Oncol Hematol* 137, 9–17, 2019.
14. Ben-Dror, J.; Shalamov, M.; Sonnenblick, A. The History of Early Breast Cancer Treatment. *Genes (Basel)* 13 (6), 2022.
15. Abshire, D.; Lang, M. K. The Evolution of Radiation Therapy in Treating Cancer. *Semin Oncol Nurs* 34 (2), 151–157, 2018.
16. El-Hussein, A.; Manoto, S. L.; Ombinda-Lemboumba, S.; Alrowaili, Z. A.; Mthunzi-Kufa, P. A Review of Chemotherapy and Photodynamic Therapy for Lung Cancer Treatment. *Anticancer Agents Med Chem* 21 (2), 149–161, 2021.
17. Chabner, B. A.; Roberts, T. G. Chemotherapy and the War on Cancer. *Nat Rev Cancer* 5 (1), 65–72, 2005.
18. Dasari, S.; Bernard Tchounwou, P. Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action. *Eur J Pharmacol* 740, 364–378, 2014.
19. Kelland, L. The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7 (8), 573–584, 2007.
20. Ghosh, S. Cisplatin: The First Metal Based Anticancer Drug. *Bioorg Chem* 88, 102925, 2019.
21. Barabas, K.; Milner, R.; Lurie, D.; Adin, C. Cisplatin: A Review of Toxicities and Therapeutic Applications. *Vet Comp Oncol* 6 (1), 1–18, 2008.

22. Rocha, C. R. R.; Silva, M. M.; Quinet, A.; Cabral-Neto, J. B.; Menck, C. F. M. DNA Repair Pathways and Cisplatin Resistance: An Intimate Relationship. *Clinics* 73, e478s, 2018.
23. Oun, R.; Moussa, Y. E.; Wheate, N. J. The Side Effects of Platinum-Based Chemotherapy Drugs: A Review for Chemists. *Dalton Transactions* 47 (19), 6645–6653, 2018.
24. Ho, G. Y.; Woodward, N.; Coward, J. I. G. Cisplatin versus Carboplatin: Comparative Review of Therapeutic Management in Solid Malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 102, 37–46, 2016.
25. Neves, A. P.; Vargas, M. D. Platinum(II) Complexes in Cancer Therapy. *Revista Virtual de Química* 3 (3), 2011.
26. Sousa, G. F. de; Wlodarczyk, S. R.; Monteiro, G. Carboplatin: Molecular Mechanisms of Action Associated with Chemoresistance. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 50 (4), 693–701, 2014.
27. Stein, A.; Arnold, D. Oxaliplatin: A Review of Approved Uses. *Expert Opin Pharmacother* 13 (1), 125–137, 2012.
28. Zou, T.; Lum, C. T.; Lok, C.-N.; Zhang, J.-J.; Che, C.-M. Chemical Biology of Anticancer Gold(III) and Gold(I) Complexes. *Chem Soc Rev* 44 (24), 8786–8801, 2015.
29. Rocha, J. S.; Pereira, G. B. S.; Oliveira, G. P.; Lima, M. A.; Araujo-Neto, J. H.; Pinto, L. S.; Forim, M. R.; Zanetti, R. D.; Netto, A. V. G.; Castellano, E. E.; Rocha, F. v. Synthesis and Characterization of Silver(I) Complexes Bearing Phenanthroline Derivatives as Ligands: Cytotoxicity and DNA Interaction Evaluation. *Inorg Chem Commun* 131, 108757, 2021.
30. Almeida, V. Y. G.; Rocha, J. S.; Felix, D. P.; Oliveira, G. P.; Lima, M. A.; Farias, R. L.; Zanetti, R. D.; Netto, A. V. G.; Zambom, C. R.; Garrido, S. S.; Rocha, F. v. Cytotoxicity and Antibacterial Activity of Silver Complexes Bearing Semicarbazones and Triphenylphosphine. *ChemistrySelect* 5 (46), 14559–14563, 2020.

31. Mangiapia, G.; D'Errico, G.; Simeone, L.; Irace, C.; Radulescu, A.; di Pascale, A.; Colonna, A.; Montesarchio, D.; Paduano, L. Ruthenium-Based Complex Nanocarriers for Cancer Therapy. *Biomaterials* 33 (14), 3770–3782, 2012.
32. Lucas, S. J.; Lord, R. M.; Wilson, R. L.; Phillips, R. M.; Sridharan, V.; McGowan, P. C. Synthesis of Iridium and Ruthenium Complexes with (N,N), (N,O) and (O,O) Coordinating Bidentate Ligands as Potential Anti-Cancer Agents. *Dalton Transactions* 41 (45), 13800, 2012.
33. Duncan, C.; White, A. R. Copper Complexes as Therapeutic Agents. *Metallomics* 4 (2), 127–138, 2012.
34. Ruiz-Azuara, L.; E. Bravo-Gomez, M. Copper Compounds in Cancer Chemotherapy. *Curr Med Chem* 17 (31), 3606–3615, 2010.
35. Azzouzi, A.-R.; Vincendeau, S.; Barret, E.; Cicco, A.; Kleinclauss, F.; van der Poel, H. G.; Stief, C. G.; Rassweiler, J.; Salomon, G.; Solsona, E.; Alcaraz, A.; Tammela, T. T.; Rosario, D. J.; Gomez-Veiga, F.; Ahlgren, G.; Benzaghrou, F.; Gaillac, B.; Amzal, B.; Debruyne, F. M. J.; Fromont, G.; Gratzke, C.; Emberton, M. Padeliporfin Vascular-Targeted Photodynamic Therapy versus Active Surveillance in Men with Low-Risk Prostate Cancer (CLIN1001 PCM301): An Open-Label, Phase 3, Randomised Controlled Trial. *Lancet Oncol* 18 (2), 181–191, 2017.
36. Azzouzi, A.-R.; Barret, E.; Moore, C. M.; Villers, A.; Allen, C.; Scherz, A.; Muir, G.; de Wildt, M.; Barber, N. J.; Lebdaï, S.; Emberton, M. TOOKAD[®] Soluble Vascular-Targeted Photodynamic (VTP) Therapy: Determination of Optimal Treatment Conditions and Assessment of Effects in Patients with Localised Prostate Cancer. *BJU Int* 112 (6), 766–774, 2013.
37. Wang, Y.-Y.; Liu, Y.-C.; Sun, H.; Guo, D.-S. Type I Photodynamic Therapy by Organic–Inorganic Hybrid Materials: From Strategies to Applications. *Coord Chem Rev* 395, 46–62, 2019.
38. Trudu, F.; Amato, F.; Vañhara, P.; Pivetta, T.; Peña-Méndez, E. M.; Havel, J. Coordination Compounds in Cancer: Past, Present and Perspectives. *J Appl Biomed* 13 (2), 79–103, 2015.

39. Frezza, M.; Hindo, S.; Chen, D.; Davenport, A.; Schmitt, S.; Tomco, D.; Ping Dou, Q. Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy. *Curr Pharm Des* 16 (16), 1813–1825, 2010.
40. Wang, Y.; Rakela, S.; Chambers, J. W.; Hua, Z.-C.; Muller, M. T.; Nitiss, J. L.; Tse-Dinh, Y.-C.; Leng, F. Kinetic Study of DNA Topoisomerases by Supercoiling-Dependent Fluorescence Quenching. *ACS Omega* 4 (19), 18413–18422, 2019.
41. Sangpheak, K.; Mueller, M.; Darai, N.; Wolschann, P.; Suwattanasophon, C.; Ruga, R.; Chavasiri, W.; Seetaha, S.; Choowongkomon, K.; Kungwan, N.; Rungnim, C.; Rungrotmongkol, T. Computational Screening of Chalcones Acting against Topoisomerase II α and Their Cytotoxicity towards Cancer Cell Lines. *J Enzyme Inhib Med Chem* 34 (1), 134–143, 2019.
42. Hande, K. R. Topoisomerase II Inhibitors. *Update Cancer Ther* 3 (1), 13–26, 2008.
43. Pommier, Y. Topoisomerase I Inhibitors: Camptothecins and Beyond. *Nat Rev Cancer* 6 (10), 789–802, 2006.
44. Chai, K.; Jiang, Y.; Han, T.; Niu, J.; Yao, L.; Zhang, H.; Zeng, M.; Zhang, L.; Duan, X.; Wang, J. Synthesis, DNA Binding, Topoisomerase I Inhibition and Antiproliferation Activities of Three New Binuclear Terpyridine Platinum(II) Complexes. *Polyhedron* 157, 124–130, 2019.
45. Keck, J. M.; Conner, J. D.; Wilson, J. T.; Jiang, X.; Lisic, E. C.; Deweese, J. E. Clarifying the Mechanism of Copper(II) α -(N)-Heterocyclic Thiosemicarbazone Complexes on DNA Topoisomerase II α and II β . *Chem Res Toxicol* 32 (10), 2135–2143, 2019.
46. Bollimpelli, V. S.; Dholaniya, P. S.; Kondapi, A. K. Topoisomerase II β and Its Role in Different Biological Contexts. *Arch Biochem Biophys* 633, 78–84, 2017.
47. Liang, X.; Wu, Q.; Luan, S.; Yin, Z.; He, C.; Yin, L.; Zou, Y.; Yuan, Z.; Li, L.; Song, X.; He, M.; Lv, C.; Zhang, W. A Comprehensive Review of Topoisomerase

- Inhibitors as Anticancer Agents in the Past Decade. *Eur J Med Chem* 171, 129–168, 2019.
48. Wei, H.; Ruthenburg, A. J.; Bechis, S. K.; Verdine, G. L. Nucleotide-Dependent Domain Movement in the ATPase Domain of a Human Type IIA DNA Topoisomerase. *Journal of Biological Chemistry* 280 (44), 37041–37047, 2005.
 49. Ling, E. M.; Baslé, A.; Cowell, I. G.; van den Berg, B.; Blower, T. R.; Austin, C. A. A Comprehensive Structural Analysis of the ATPase Domain of Human DNA Topoisomerase II Beta Bound to AMPPNP, ADP, and the Bisdioxopiperazine, ICRF193. *Structure* 30 (8), 1129-1145.e3, 2022.
 50. Giaccone, G.; van Ark-Otte, J.; Scagliotti, G.; Capranico, G.; van der Valk, P.; Rubio, G.; Dalesio, O.; Lopez, R.; Zunino, F.; Walboomers, J.; Pinedo, H. M. Differential Expression of DNA Topoisomerases in Non-Small Cell Lung Cancer and Normal Lung. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1264 (3), 337–346, 1995.
 51. Larsen, A. K.; Escargueil, A. E.; Skladanowski, A. Catalytic Topoisomerase II Inhibitors in Cancer Therapy. *Pharmacol Ther* 99 (2), 167–181, 2003.
 52. Pogorelcnik, B.; Perdih, A.; Solmajer, T. Recent Advances in the Development of Catalytic Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II; As Novel Anticancer Agents. *Curr Med Chem* 20 (5), 694–709, 2013.
 53. Riddell, I. A.; Agama, K.; Park, G. Y.; Pommier, Y.; Lippard, S. J. Phenanthriplatin Acts As a Covalent Poison of Topoisomerase II Cleavage Complexes. *ACS Chem Biol* 11 (11), 2996–3001, 2016.
 54. Wander, D. P. A.; van der Zanden, S. Y.; van der Marel, G. A.; Overkleeft, H. S.; Neefjes, J.; Codée, J. D. C. Doxorubicin and Aclarubicin: Shuffling Anthracycline Glycans for Improved Anticancer Agents. *J Med Chem* 63 (21), 12814–12829, 2020.
 55. Shapiro, A. B.; Austin, C. A. A High-Throughput Fluorescence Anisotropy-Based Assay for Human Topoisomerase II β -Catalyzed ATP-Dependent Supercoiled DNA Relaxation. *Anal Biochem* 448, 23–29, 2014.

56. Tripathi, N.; Guchhait, S. K.; Bharatam, P. v. Pharmacoinformatics Analysis of Merbarone Binding Site in Human Topoisomerase II α . *J Mol Graph Model* 86, 1–18, 2019.
57. Mohi El-Deen, E. M.; Abd El-Meguid, E. A.; Karam, E. A.; Nossier, E. S.; Ahmed, M. F. Synthesis and Biological Evaluation of New Pyridothienopyrimidine Derivatives as Antibacterial Agents and Escherichia Coli Topoisomerase II Inhibitors. *Antibiotics* 9 (10), 695, 2020.
58. Nitiss, J. L. Targeting DNA Topoisomerase II in Cancer Chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 9 (5), 338–350, 2009.
59. Wang, W.; Tse-Dinh, Y.-C. Recent Advances in Use of Topoisomerase Inhibitors in Combination Cancer Therapy. *Curr Top Med Chem* 19 (9), 730–740, 2019.
60. Skok, Ž.; Zidar, N.; Kikelj, D.; Ilaš, J. Dual Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II and Other Cancer-Related Targets. *J Med Chem* 63 (3), 884–904, 2020.
61. Kozuki, T.; Chikamori, K.; Surleac, M. D.; Micluta, M. A.; Petrescu, A. J.; Norris, E. J.; Elson, P.; Hoeltge, G. A.; Grabowski, D. R.; Porter, A. C. G.; Ganapathi, R. N.; Ganapathi, M. K. Roles of the C-Terminal Domains of Topoisomerase II α and Topoisomerase II β in Regulation of the Decatenation Checkpoint. *Nucleic Acids Res* 45 (10), 5995–6010, 2017.
62. 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-N 4-Substituted Thiosemicarbazones and Their Cu(II) Complexes. *J Med Chem* 54 (7), 2391–2398, 2011.
63. Huang, H.; Chen, Q.; Ku, X.; Meng, L.; Lin, L.; Wang, X.; Zhu, C.; Wang, Y.; Chen, Z.; Li, M.; Jiang, H.; Chen, K.; Ding, J.; Liu, H. A Series of α -Heterocyclic Carboxaldehyde Thiosemicarbazones Inhibit Topoisomerase II α Catalytic Activity. *J Med Chem* 53 (8), 3048–3064, 2010.

64. Kouno, M.; Kuwamura, N.; Konno, T. Interconversion between Square-Planar Palladium(II) and Octahedral Palladium(IV) Centres in a Sulfur-Bridged Trinuclear Structure. *Chemical Communications* 57 (11), 1336–1339, 2021.
65. Gaikwad, M.; Konkimalla, V. B.; Salunke-Gawali, S. Metal Complexes as Topoisomerase Inhibitors. *Inorganica Chim Acta* 542, 121089, 2022.
66. Prabhakaran, R.; Sivasamy, R.; Angayarkanni, J.; Huang, R.; Kalaivani, P.; Karvembu, R.; Dallemer, F.; Natarajan, K. Topoisomerase II Inhibition Activity of New Square Planar Ni(II) Complexes Containing N-Substituted Thiosemicarbazones: Synthesis, Spectroscopy, X-Ray Crystallography and Electrochemical Characterization. *Inorganica Chim Acta* 374 (1), 647–653, 2011.
67. 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.; Landvogt, C.; Mauro, A. E.; Netto, A. V. G. Computational Studies, Design and Synthesis of Pd(II)-Based Complexes: Allosteric Inhibitors of the Human Topoisomerase-IIa. *J Inorg Biochem* 199, 110725, 2019.
68. Turk, B. Targeting Proteases: Successes, Failures and Future Prospects. *Nat Rev Drug Discov* 5 (9), 785–799, 2006.
69. Kramer, L.; Turk, D.; Turk, B. The Future of Cysteine Cathepsins in Disease Management. *Trends Pharmacol Sci* 38 (10), 873–898, 2017.
70. Yadati, T.; Houben, T.; Bitorina, A.; Shiri-Sverdlov, R. The Ins and Outs of Cathepsins: Physiological Function and Role in Disease Management. *Cells* 9 (7), 1679, 2020.
71. Reiser, J.; Adair, B.; Reinheckel, T. Specialized Roles for Cysteine Cathepsins in Health and Disease. *Journal of Clinical Investigation* 120 (10), 3421–3431, 2010.
72. Jedeszko, C.; Sloane, B. F. Cysteine Cathepsins in Human Cancer. *Biol Chem* 385 (11), 1017–1027, 2004.

73. Mijanović, O.; Branković, A.; Panin, A. N.; Savchuk, S.; Timashev, P.; Ulasov, I.; Lesniak, M. S. Cathepsin B: A Sellsword of Cancer Progression. *Cancer Lett* 449, 207–214, 2019.
74. Lakka, S. S.; Gondi, C. S.; Yanamandra, N.; Olivero, W. C.; Dinh, D. H.; Gujrati, M.; Rao, J. S. Inhibition of Cathepsin B and MMP-9 Gene Expression in Glioblastoma Cell Line via RNA Interference Reduces Tumor Cell Invasion, Tumor Growth and Angiogenesis. *Oncogene* 23 (27), 4681–4689, 2004.
75. Turk, V.; Stoka, V.; Vasiljeva, O.; Renko, M.; Sun, T.; Turk, B.; Turk, D. Cysteine Cathepsins: From Structure, Function and Regulation to New Frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1824 (1), 68–88, 2012.
76. Szpaderska, A. M.; Frankfater, A. An Intracellular Form of Cathepsin B Contributes to Invasiveness in Cancer. *Cancer Res* 61 (8), 3493–3500, 2001.
77. Baird, I. R.; Mosi, R.; Olsen, M.; Cameron, B. R.; Fricker, S. P.; Skerlj, R. T. '3+1' Mixed-Ligand Oxorhenium(V) Complexes and Their Inhibition of the Cysteine Proteases Cathepsin B and Cathepsin K. *Inorganica Chim Acta* 359 (9), 2736–2750, 2006.
78. Lima, M. A.; Costa, V. A.; Franco, M. A.; de Oliveira, G. P.; Deflon, V. M.; Rocha, F. V. Palladium(II) Complexes Bearing Thiosemicarbazone and Phosphines as Inhibitors of DNA-Topoisomerase II Enzyme: Synthesis, Characterizations and Biological Studies. *Inorg Chem Commun* 112, 107708, 2020.
79. Akinyemi, A. O. Synthesis, Characterization and Cytotoxicity of Pd(II) Complexes for the Inhibition of Cathepsin B. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2021.
80. Gupta, S.; Singh, N.; Khan, T.; Joshi, S. Thiosemicarbazone Derivatives of Transition Metals as Multi-Target Drugs: A Review. *Results Chem* 4, 100459, 2022.
81. de Siqueira, L. R. P.; de Moraes Gomes, P. A. T.; de Lima Ferreira, L. P.; de Melo Rêgo, M. J. B.; Leite, A. C. L. Multi-Target Compounds Acting in Cancer

- Progression: Focus on Thiosemicarbazone, Thiazole and Thiazolidinone Analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS May 15, 2019, pp 237–260.
82. *Drug Bank*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB11940> (accessed 2023-04-12).
 83. *Clinical Trials*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Cancer&term=triapine&cntry=&state=&city=&dist=> (accessed 2023-04-12).
 84. Nutting, C. M.; van Herpen, C. M. L.; Miah, A. B.; Bhide, S. A.; Machiels, J.-P.; Buter, J.; Kelly, C.; de Raucourt, D.; Harrington, K. J. Phase II Study of 3-AP Triapine in Patients with Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Annals of Oncology* 20 (7), 1275–1279, 2009.
 85. Kunos, C. A.; Sherertz, T. M. Long-Term Disease Control with Triapine-Based Radiochemotherapy for Patients with Stage IB2–IIIB Cervical Cancer. *Front Oncol* 4, 2014.
 86. Anselmo, D. B.; Polaquini, C. R.; Marques, B. C.; Ayusso, G. M.; Assis, L. R.; Torrezan, G. S.; Rahal, P.; Fachin, A. L.; Calmon, M. F.; Marins, M. A.; Regasini, L. O. Curcumin-Cinnamaldehyde Hybrids as Antiproliferative Agents against Women’s Cancer Cells. *Medicinal Chemistry Research* 2021.
 87. Bruyère, C.; Genovese, S.; Lallemand, B.; Ionescu-Motatu, A.; Curini, M.; Kiss, R.; Epifano, F. Growth Inhibitory Activities of Oxyprenylated and Non-Prenylated Naturally Occurring Phenylpropanoids in Cancer Cell Lines. *Bioorg Med Chem Lett* 21 (14), 4174–4179, 2011.
 88. Mathew, B.; Oh, J. M.; Abdelgawad, M. A.; Khames, A.; Ghoneim, M. M.; Kumar, S.; Nath, L. R.; Sudevan, S. T.; Parambi, D. G. T.; Agoni, C.; Soliman, M. E. S.; Kim, H. Conjugated Dienones from Differently Substituted Cinnamaldehyde as Highly Potent Monoamine Oxidase-B Inhibitors: Synthesis, Biochemistry, and Computational Chemistry. *ACS Omega* 7 (9), 8184–8197, 2022.
 89. Grushin, V. v. Mixed Phosphine–Phosphine Oxide Ligands. *Chem Rev* 104 (3), 1629–1662, 2004.

90. Parveen, S.; Hanif, M.; Movassaghi, S.; Sullivan, M. P.; Kubanik, M.; Shaheen, M. A.; Söhnel, T.; Jamieson, S. M. F.; Hartinger, C. G. Cationic Ru(η^6 -p-cymene) Complexes of 3-Hydroxy-4-pyr(l)dOnes – Lipophilic Triphenylphosphine as Co-Ligand Is Key to Highly Stable and Cytotoxic Anticancer Agents. *Eur J Inorg Chem* 2017 (12), 1721–1727, 2017.
91. Farias, R. L. de. Compostos de Paládio(II) Contendo Tiossemicarbazonas: Síntese, Interação Com Alvos Enzimáticos e Avaliação Do Potencial Antitumoral. Tese, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho,” Araraquara, 2020.
92. Silva, L. T. P. Síntese, Caracterização e Estudos de Citotoxicidade e Alvo Biológico de Complexos Quadráticos Planos Contendo Tiossemicarbazonas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.
93. Ribeiro, G. H.; Guedes, A. P. M.; de Oliveira, T. D.; de Correia, C. R. S. T. b.; Colina-Vegas, L.; Lima, M. A.; Nóbrega, J. A.; Cominetti, M. R.; Rocha, F. v.; Ferreira, A. G.; Castellano, E. E.; Teixeira, F. R.; Batista, A. A. Ruthenium(II) Phosphine/Mercapto Complexes: Their in Vitro Cytotoxicity Evaluation and Actions as Inhibitors of Topoisomerase and Proteasome Acting as Possible Triggers of Cell Death Induction. *Inorg Chem* 59 (20), 15004–15018, 2020.
94. Chen, Z.; Bertin, R.; Frolidi, G. EC50 Estimation of Antioxidant Activity in DPPH Assay Using Several Statistical Programs. *Food Chem* 138 (1), 414–420, 2013.
95. Farias, R. L.; Polez, A. M. R.; Silva, D. E. S.; Zanetti, R. D.; Moreira, M. B.; Batista, V. S.; Reis, B. L.; Nascimento-Júnior, N. M.; Rocha, F. V.; Lima, M. A.; Oliveira, A. B.; Ellena, J.; Scarim, C. B.; Zambom, C. R.; Brito, L. D.; Garrido, S. S.; Melo, A. P. L.; Bresolin, L.; Tirloni, B.; Pereira, J. C. M.; Netto, A. V. G. In Vitro and in Silico Assessment of Antitumor Properties and Biomolecular Binding Studies for Two New Complexes Based on Nill Bearing K2N,S-Donor Ligands. *Materials Science and Engineering: C* 121, 111815, 2021.
96. Huheey, J. E. *Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity*, 4th ed.; Keiter, E. A., Keiter, R. L., Medhi, O. K., Eds.; Pearson Education: Nova York, 2006.

97. Bakker, J. M.; Besson, T.; Lemaire, J.; Scuderi, D.; Maître, P. Gas-Phase Structure of a π -Allyl-Palladium Complex: Efficient Infrared Spectroscopy in a 7 T Fourier Transform Mass Spectrometer. *J Phys Chem A* 111 (51), 13415–13424, 2007.
98. Kostyukovich, A. Yu.; Burykina, J. v.; Eremin, D. B.; Ananikov, V. P. Detection and Structural Investigation of Elusive Palladium Hydride Intermediates Formed from Simple Metal Salts. *Inorg Chem* 60 (10), 7128–7142, 2021.
99. Allen, F. H.; Kennard, O.; Watson, D. G.; Brammer, L.; Orpen, A. G.; Taylor, R. Tables of Bond Lengths Determined by X-Ray and Neutron Diffraction. Part 1. Bond Lengths in Organic Compounds. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* No. 12, S1, 1987.
100. Spackman, M. A.; Jayatilaka, D. Hirshfeld Surface Analysis. *CrystEngComm* 11 (1), 19–32, 2009.
101. McKinnon, J. J.; Jayatilaka, D.; Spackman, M. A. Towards Quantitative Analysis of Intermolecular Interactions with Hirshfeld Surfaces. *Chemical Communications* No. 37, 3814, 2007.
102. Spackman, M. A.; McKinnon, J. J. Fingerprinting Intermolecular Interactions in Molecular Crystals. *CrystEngComm* 4 (66), 378–392, 2002.
103. Li, R.; Liu, H.; Dilger, J. P.; Lin, J. Effect of Propofol on Breast Cancer Cell, the Immune System, and Patient Outcome. *BMC Anesthesiol* 18 (1), 77, 2018.
104. Waks, A. G.; Winer, E. P. Breast Cancer Treatment. *JAMA* 321 (3), 288, 2019.
105. Domcke, S.; Sinha, R.; Levine, D. A.; Sander, C.; Schultz, N. Evaluating Cell Lines as Tumour Models by Comparison of Genomic Profiles. *Nat Commun* 4 (1), 2126, 2013.
106. Korch, C.; Spillman, M. A.; Jackson, T. A.; Jacobsen, B. M.; Murphy, S. K.; Lessey, B. A.; Jordan, V. C.; Bradford, A. P. DNA Profiling Analysis of Endometrial and Ovarian Cell Lines Reveals Misidentification, Redundancy and Contamination. *Gynecol Oncol* 127 (1), 241–248, 2012.

107. Kakar, S. S.; Jala, V. R.; Fong, M. Y. Synergistic Cytotoxic Action of Cisplatin and Withaferin A on Ovarian Cancer Cell Lines. *Biochem Biophys Res Commun* 423 (4), 819–825, 2012.
108. Alizadehnohi, M.; Nabiuni, M.; Nazari, Z.; Safaeinejad, Z.; Irian, S. The Synergistic Cytotoxic Effect of Cisplatin and Honey Bee Venom on Human Ovarian Cancer Cell Line A2780cp. *J Venom Res* 3, 22–27, 2012.
109. Oliveira, C. G.; Romero-Canelón, I.; Silva, M. M.; Coverdale, J. P. C.; Maia, P. I. S.; Batista, A. A.; Castelli, S.; Desideri, A.; Sadler, P. J.; Deflon, V. M. Palladium(II) Complexes with Thiosemicarbazones Derived from Pyrene as Topoisomerase IB Inhibitors. *Dalton Transactions* 48 (44), 16509–16517, 2019.
110. Heestand, G. M.; Schwaederle, M.; Gatalica, Z.; Arguello, D.; Kurzrock, R. Topoisomerase Expression and Amplification in Solid Tumours: Analysis of 24,262 Patients. *Eur J Cancer* 83, 80–87, 2017.
111. Berney, D. M.; Shamash, J.; Gaffney, J.; Jordan, S.; Oliver, R. T. D. DNA Topoisomerase I and II Expression in Drug Resistant Germ Cell Tumours. *Br J Cancer* 87 (6), 624–629, 2002.
112. Miyanaga, S.; Sakurai, H.; Saiki, I.; Onaka, H.; Igarashi, Y. Anti-Invasive and Anti-Angiogenic Activities of Naturally Occurring Dibenzodiazepine BU-4664L and Its Derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 20 (3), 963–965, 2010.
113. Dao, P.; Jarray, R.; le Coq, J.; Lietha, D.; Loukaci, A.; Lepelletier, Y.; Hadj-Slimane, R.; Garbay, C.; Raynaud, F.; Chen, H. Synthesis of Novel Diarylamino-1,3,5-Triazine Derivatives as FAK Inhibitors with Anti-Angiogenic Activity. *Bioorg Med Chem Lett* 23 (16), 4552–4556, 2013.
114. Chang, T. T.; More, S. v.; Lu, I.-H.; Hsu, J.-C.; Chen, T.-J.; Jen, Y. C.; Lu, C.-K.; Li, W.-S. Isomalyngamide A, A-1 and Their Analogs Suppress Cancer Cell Migration in Vitro. *Eur J Med Chem* 46 (9), 3810–3819, 2011.
115. Kim, K.; Yoo, H. J.; Jung, J.-H.; Lee, R.; Hyun, J.-K.; Park, J.-H.; Na, D.; Yeon, J. H. Cytotoxic Effects of Plant Sap-Derived Extracellular Vesicles on Various Tumor Cell Types. *J Funct Biomater* 11 (2), 22, 2020.

116. Segun, P. A.; Ogbale, O. O.; Ismail, F. M. D.; Nahar, L.; Evans, A. R.; Ajaiyeoba, E. O.; Sarker, S. D. Resveratrol Derivatives from *Commiphora Africana* (A. Rich.) Endl. Display Cytotoxicity and Selectivity against Several Human Cancer Cell Lines. *Phytotherapy Research* 33 (1), 159–166, 2019.
117. Weldon, D. J.; Saulsbury, M. D.; Goh, J.; Rowland, L.; Campbell, P.; Robinson, L.; Miller, C.; Christian, J.; Amis, L.; Taylor, N.; Dill, C.; Davis, W.; Evans, S. L.; Brantley, E. One-Pot Synthesis of Cinnamylideneacetophenones and Their in Vitro Cytotoxicity in Breast Cancer Cells. *Bioorg Med Chem Lett* 24 (15), 3381–3384, 2014.
118. Lord, R. M.; Holmes, J.; Singer, F. N.; Frith, A.; Willans, C. E. Precious Metal N-Heterocyclic Carbene-Carbaboranyl Complexes: Cytotoxic and Selective Compounds for the Treatment of Cancer. *J Organomet Chem* 907, 121062, 2020.
119. Cao, R.; Peng, W.; Chen, H.; Hou, X.; Guan, H.; Chen, Q.; Ma, Y.; Xu, A. Synthesis and in Vitro Cytotoxic Evaluation of 1,3-Bisubstituted and 1,3,9-Trisubstituted β -Carboline Derivatives. *Eur J Med Chem* 40 (3), 249–257, 2005.
120. Go, M.; Wu, X.; Liu, X. Chalcones: An Update on Cytotoxic and Chemoprotective Properties. *Curr Med Chem* 12 (4), 483–499, 2005.
121. Geldmacher, Y.; Rubbiani, R.; Wefelmeier, P.; Prokop, A.; Ott, I.; Sheldrick, W. S. Synthesis and DNA-Binding Properties of Apoptosis-Inducing Cytotoxic Half-Sandwich Rhodium(III) Complexes with Methyl-Substituted Polypyridyl Ligands. *J Organomet Chem* 696 (5), 1023–1031, 2011.
122. de Oliveira, T. D.; Plutín, A. M.; Luna-Dulcey, L.; Castellano, E. E.; Cominetti, M. R.; Batista, A. A. Cytotoxicity of Ruthenium-N,N-Disubstituted-N'-Acylthioureas Complexes. *Materials Science and Engineering: C* 115, 111106, 2020.
123. Anttila, J. v.; Shubin, M.; Cairns, J.; Borse, F.; Guo, Q.; Mononen, T.; Vázquez-García, I.; Pulkkinen, O.; Mustonen, V. Contrasting the Impact of Cytotoxic and Cytostatic Drug Therapies on Tumour Progression. *PLoS Comput Biol* 15 (11), e1007493, 2019.

124. Amanda Blaque Becceneri. Efeito de Um Complexo de Rutênio Em Células de Câncer de Mama Em Diferentes Modelos 2D e 3D in Vitro e in Vivo. Tese de doutorado, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, São Carlos, 2019.
125. Lai, F.; Shen, Z.; Wen, H.; Chen, J.; Zhang, X.; Lin, P.; Yin, D.; Cui, H.; Chen, X. A Morphological Identification Cell Cytotoxicity Assay Using Cytoplasm-Localized Fluorescent Probe (CLFP) to Distinguish Living and Dead Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 482 (2), 257–263, 2017.
126. Schneider, N. F. Z.; Persich, L.; Rocha, S. C.; Ramos, A. C. P.; Cortes, V. F.; Silva, I. T.; Munkert, J.; Pádua, R. M.; Kreis, W.; Taranto, A. G.; Barbosa, L. A.; Braga, F. C.; Simões, C. M. O. Cytotoxic and Cytostatic Effects of Digitoxigenin Monodigitoxoside (DGX) in Human Lung Cancer Cells and Its Link to Na,K-ATPase. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 97, 684–696, 2018.
127. Nagababu, P.; Barui, A. K.; Thulasiram, B.; Devi, C. S.; Satyanarayana, S.; Patra, C. R.; Sreedhar, B. Antiangiogenic Activity of Mononuclear Copper(II) Polypyridyl Complexes for the Treatment of Cancers. *J Med Chem* 58 (13), 5226–5241, 2015.
128. Sukkur Saleem, S.; Sankarganesh, M.; Adwin Jose, P.; Dhaweethu Raja, J. Design, Synthesis, Antioxidant, Antimicrobial, DNA Binding and Molecular Docking Studies of Morpholine Based Schiff Base Ligand and Its Metal(II) Complexes. *Inorg Chem Commun* 124, 108396, 2021.
129. Galasso, C.; Piscitelli, C.; Brunet, C.; Sansone, C. New In Vitro Model of Oxidative Stress: Human Prostate Cells Injured with 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) for the Screening of Antioxidants. *Int J Mol Sci* 21 (22), 8707, 2020.
130. Kellett, A.; Molphy, Z.; Slator, C.; McKee, V.; Farrell, N. P. Molecular Methods for Assessment of Non-Covalent Metallodrug–DNA Interactions. *Chem Soc Rev* 48 (4), 971–988, 2019.
131. Barra, C. V.; Netto, A. V. G. Antitumour Complexes and DNA Interactions and Their Tools of Analysis: An Approach to Metalintercalators. *Revista Virtual de Química* 7 (6), 1998–2016, 2015.

132. Venugopal, N.; Krishnamurthy, G.; Bhojya Naik, H. S.; Manohara, J. D. DNA Binding, Molecular Docking and Antimicrobial Evaluation of Novel Azo Dye Ligand and Their Metal Complexes. *J Inorg Organomet Polym Mater* 30 (7), 2608–2625, 2020.
133. Daravath, S.; Rambabu, A.; Shankar, D. S.; Shivaraj. Structure Elucidation of Copper(II), Cobalt(II) and Nickel(II) Complexes of Benzothiazole Derivatives: Investigation of DNA Binding, Nuclease Efficacy, Free Radical Scavenging and Biocidal Properties. *Chemical Data Collections* 24, 100293, 2019.
134. Khosravi, F.; Mansouri-Torshizi, H. Antibacterial Combination Therapy Using Co³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ and Pd²⁺ Complexes: Their Calf Thymus DNA Binding Studies. *J Biomol Struct Dyn* 36 (2), 512–531, 2018.
135. Bontemps, J.; Houssier, C.; Fredericq, E. Physico-Chemical Study of the Complexes of '33258 Hoechst' with DNA and Nucleohistone. *Nucleic Acids Res* 2 (6), 971–984, 1975.
136. Bucevičius, J.; Lukinavičius, G.; Gerasimaitė, R. The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and Beyond. *Chemosensors* 6 (2), 18, 2018.
137. Adhikary, A. Ensemble and Single-Molecule Fluorescence Spectroscopic Study of the Binding Modes of the Bis-Benzimidazole Derivative Hoechst 33258 with DNA. *Nucleic Acids Res* 31 (8), 2178–2186, 2003.
138. Pal, S. K.; Zhao, L.; Zewail, A. H. Water at DNA Surfaces: Ultrafast Dynamics in Minor Groove Recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (14), 8113–8118, 2003.
139. Oliveira, K. M.; Honorato, J.; Gonçalves, G. R.; Cominetti, M. R.; Batista, A. A.; Correa, R. S. Ru(II)/Diclofenac-Based Complexes: DNA, BSA Interaction and Their Anticancer Evaluation against Lung and Breast Tumor Cells. *Dalton Transactions* 49 (36), 12643–12652, 2020.
140. Villarreal, W.; Colina-Vegas, L.; Rodrigues de Oliveira, C.; Tenorio, J. C.; Ellena, J.; Gozzo, F. C.; Cominetti, M. R.; Ferreira, A. G.; Ferreira, M. A. B.; Navarro, M.; Batista, A. A. Chiral Platinum(II) Complexes Featuring Phosphine and

- Chloroquine Ligands as Cytotoxic and Monofunctional DNA-Binding Agents. *Inorg Chem* 54 (24), 11709–11720, 2015.
141. Aazam, E. S.; Zaki, M. Synthesis and Characterization of Ni(II)/Zn(II) Metal Complexes Derived from Schiff Base and *Ortho* -Phenylenediamine: *In Vitro* DNA Binding, Molecular Modeling and RBC Hemolysis. *ChemistrySelect* 5 (2), 610–618, 2020.
 142. Fanali, G.; di Masi, A.; Trezza, V.; Marino, M.; Fasano, M.; Ascenzi, P. Human Serum Albumin: From Bench to Bedside. *Mol Aspects Med* 33 (3), 209–290, 2012.
 143. Toprak, M. Fluorescence Study on the Interaction of Human Serum Albumin with Butein in Liposomes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 154, 108–113, 2016.
 144. Fernández-Sainz, J.; Pacheco-Liñán, P. J.; Granadino-Roldán, J. M.; Bravo, I.; Garzón, A.; Rubio-Martínez, J.; Albaladejo, J. Binding of the Anticancer Drug BI-2536 to Human Serum Albumin. A Spectroscopic and Theoretical Study. *J Photochem Photobiol B* 172, 77–87, 2017.
 145. Rehman, M. T.; Shamsi, H.; Khan, A. U. Insight into the Binding Mechanism of Imipenem to Human Serum Albumin by Spectroscopic and Computational Approaches. *Mol Pharm* 11 (6), 1785–1797, 2014.
 146. Akinyemi, A. O.; Pereira, G. B. S.; Rocha, F. V. Role of Cathepsin B in Cancer Progression: A Potential Target for Coordination Compounds. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 21 (13), 1612–1624, 2021.

7 - Apêndices

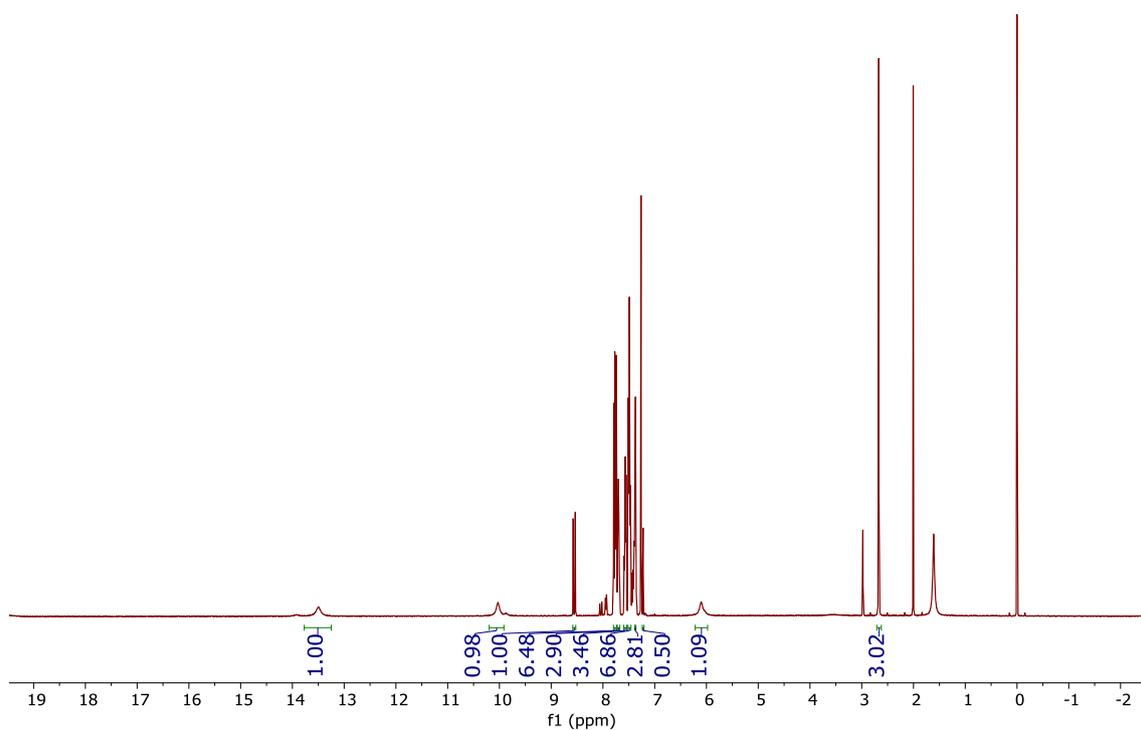


FIGURA A1 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em $d\text{-CDCl}_3$ para o complexo **PdB1**.

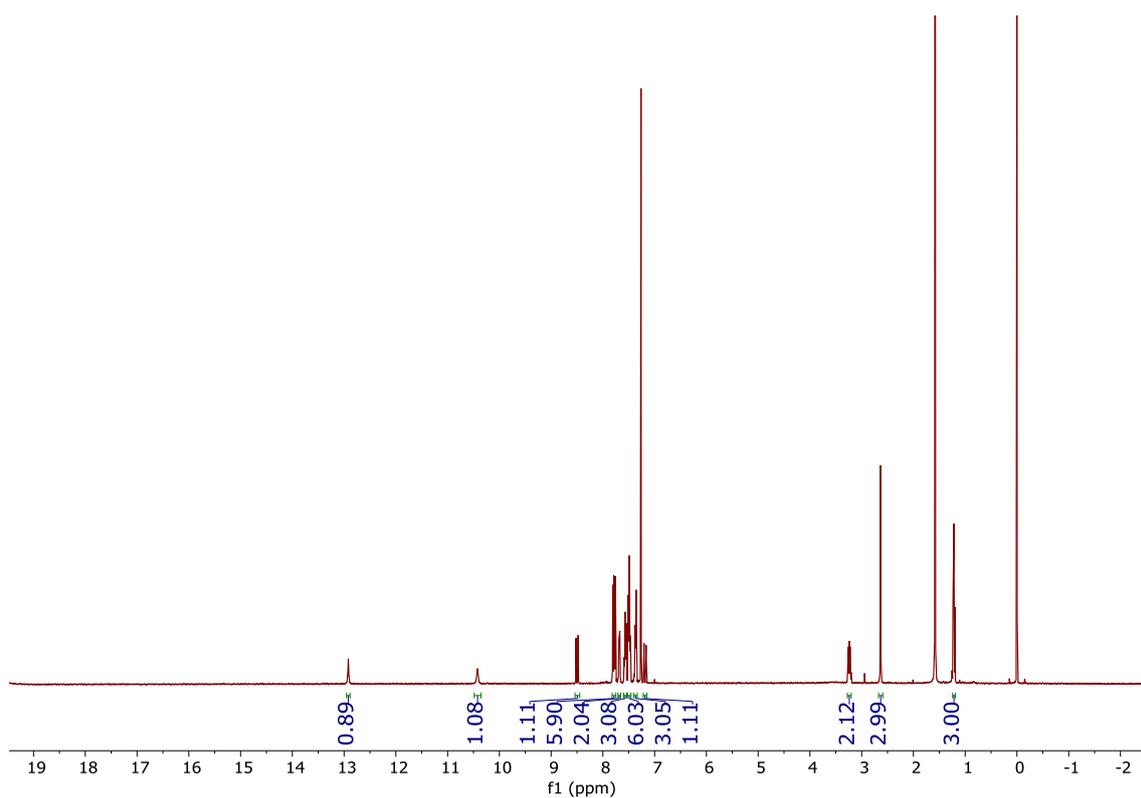


FIGURA A2 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em $d\text{-CDCl}_3$ para o complexo **PdB3**.

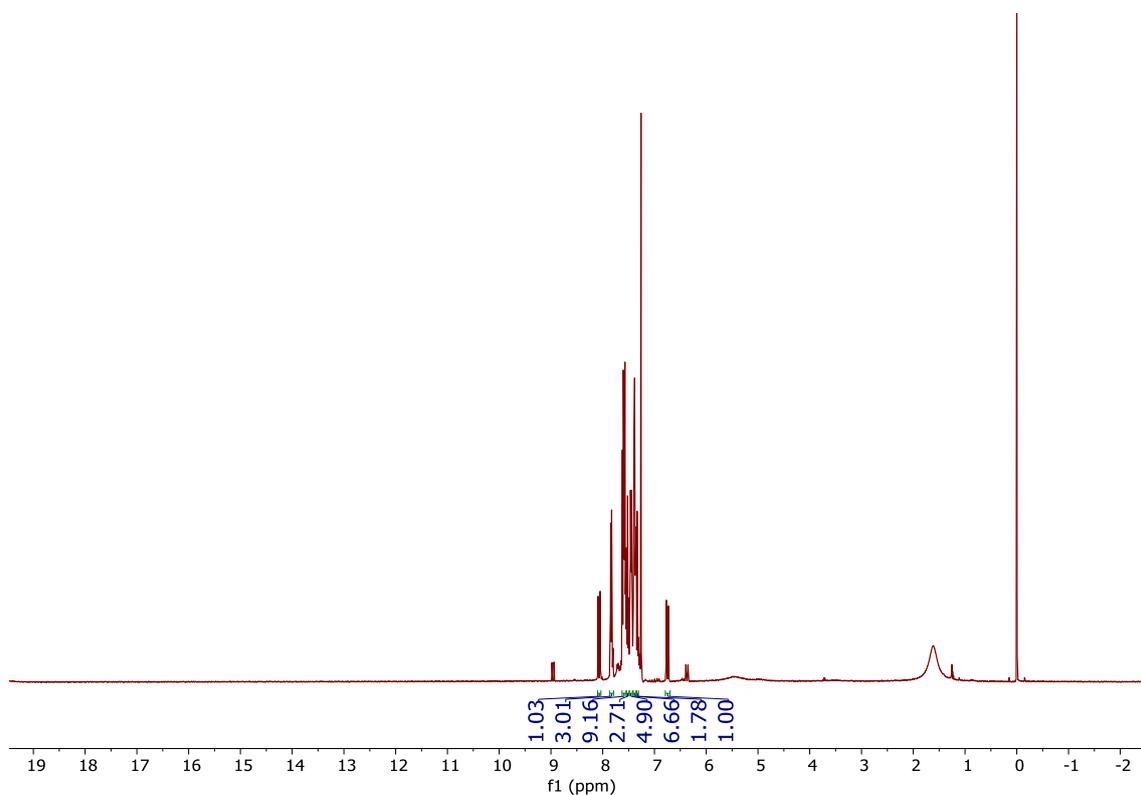


FIGURA A3 - - Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em $d\text{-CDCl}_3$ para o complexo **PdC1**.

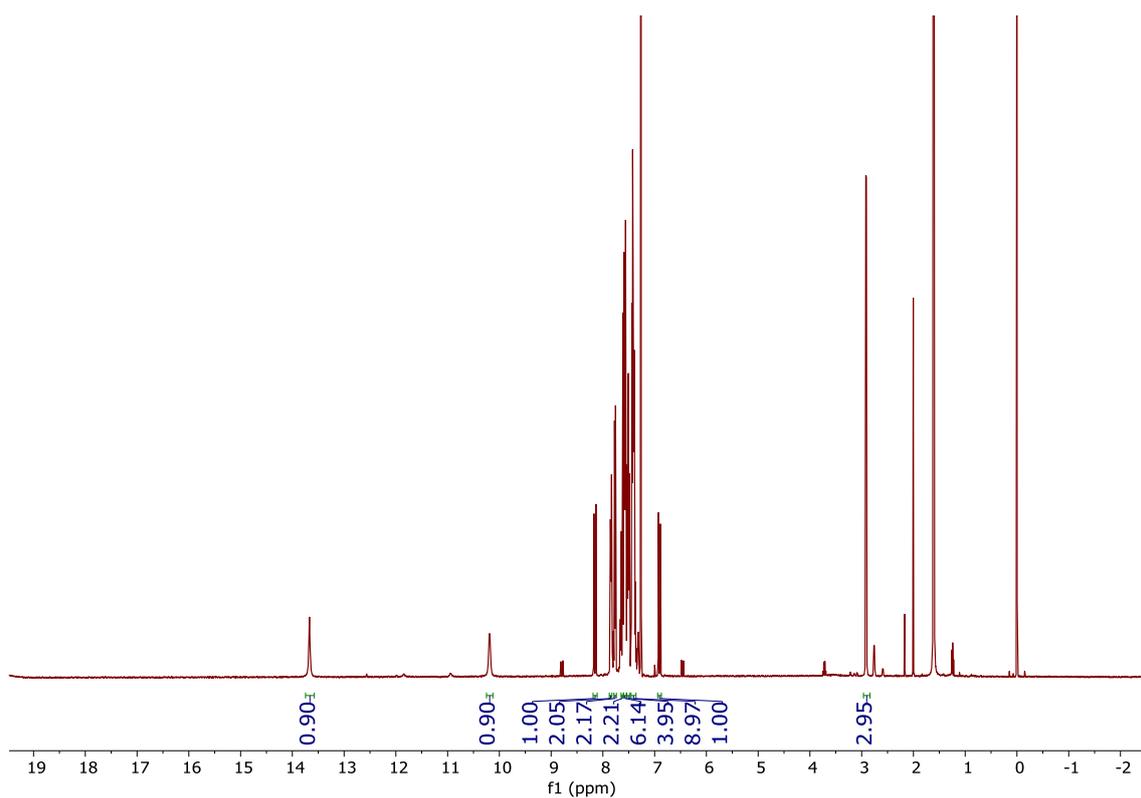


FIGURA A4- Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em $d\text{-CDCl}_3$ para o complexo **PdC2**.

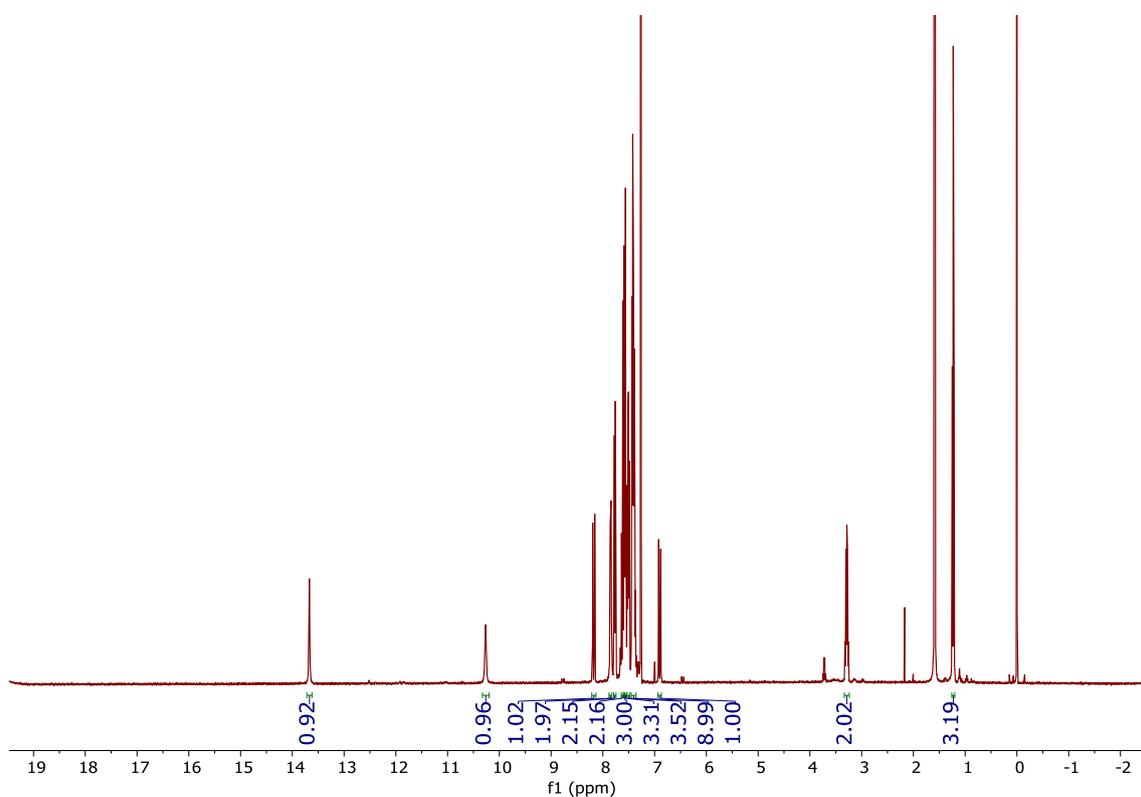


FIGURA A5 - - Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em $d\text{-CDCl}_3$ para o complexo **PdC3**.

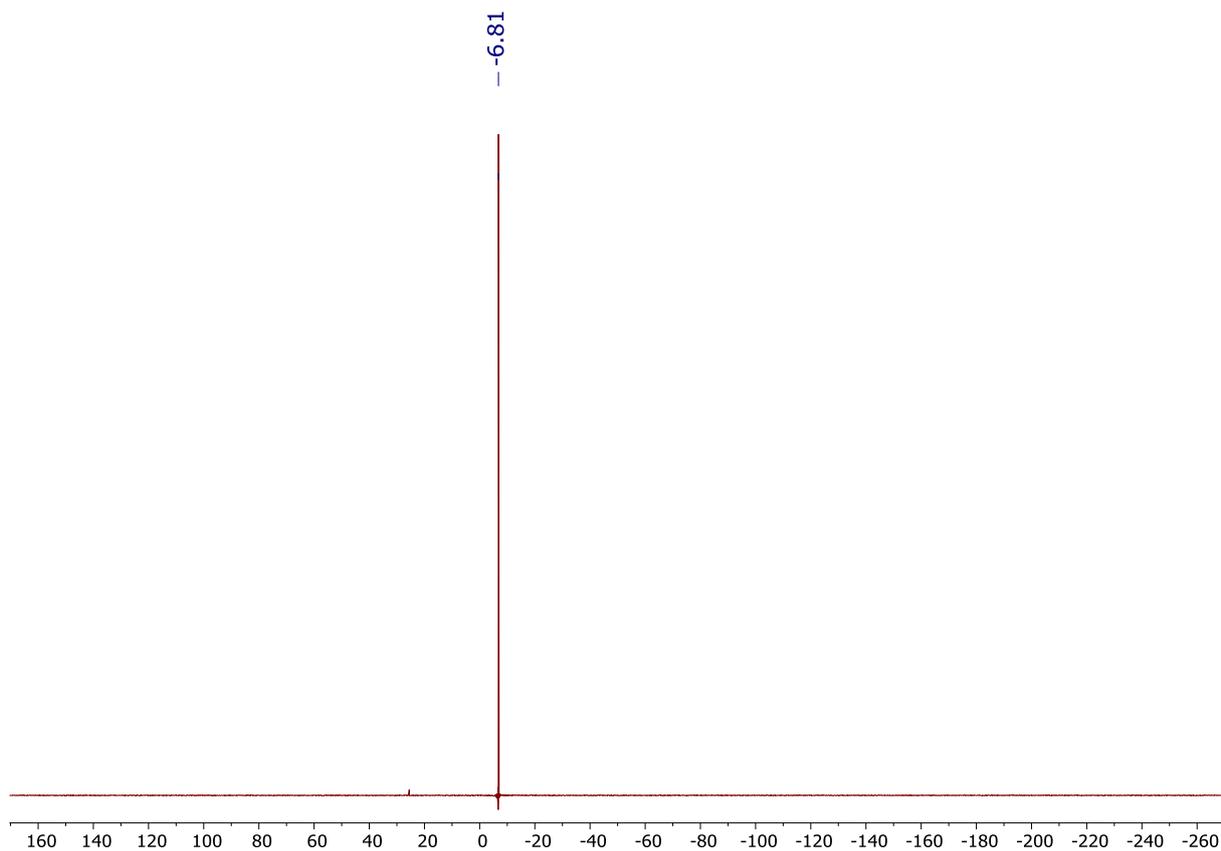


FIGURA A6 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em $d^6\text{-DMSO}$ para PPh_3 .

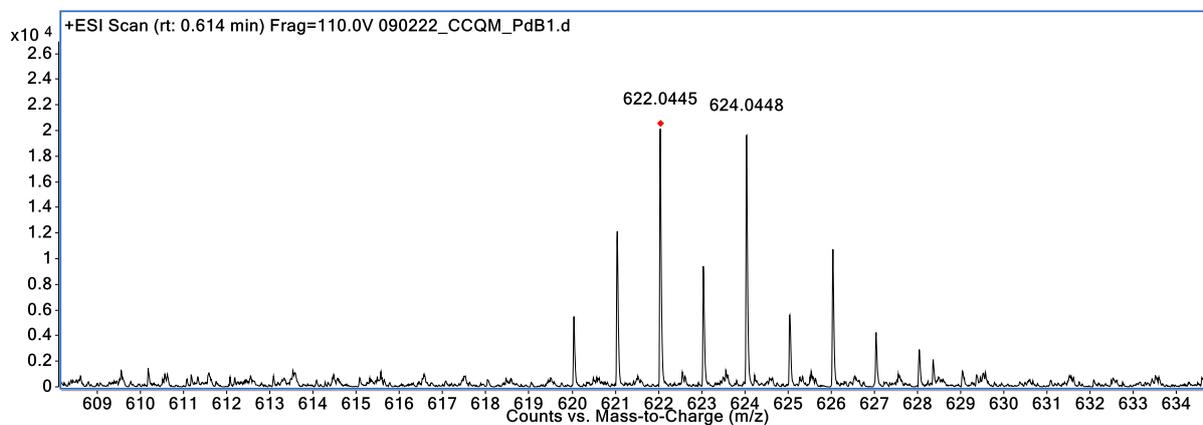


FIGURA A7 - Espectro de massas ampliado para o complexo **PdB1**.

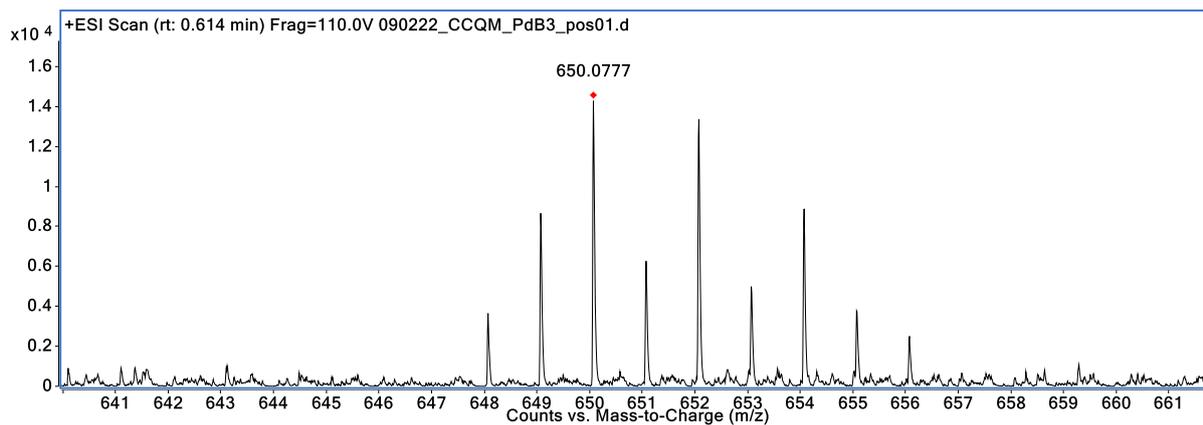


FIGURA A8 - Espectro de massas ampliado para o complexo **PdB3**.

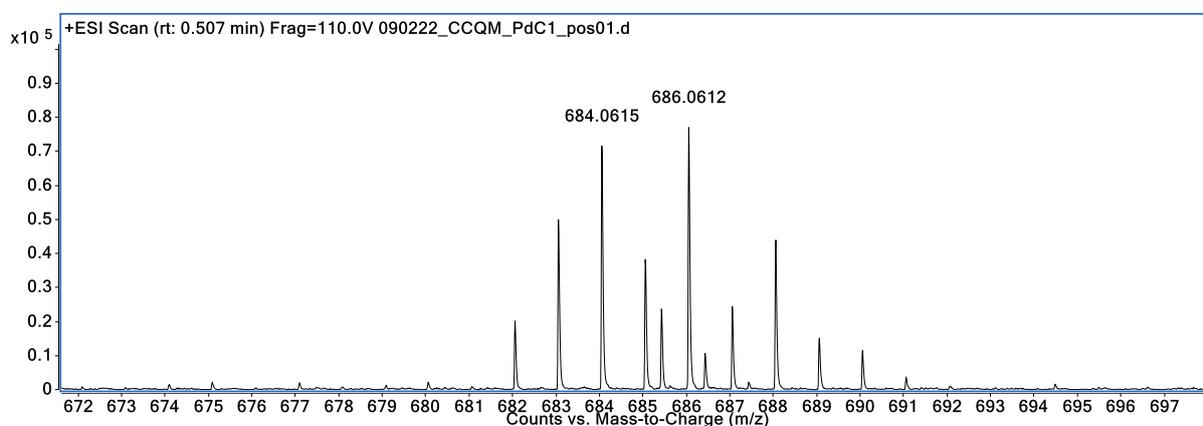


FIGURA A9 - Espectro de massas ampliado para o complexo **PdC1**.

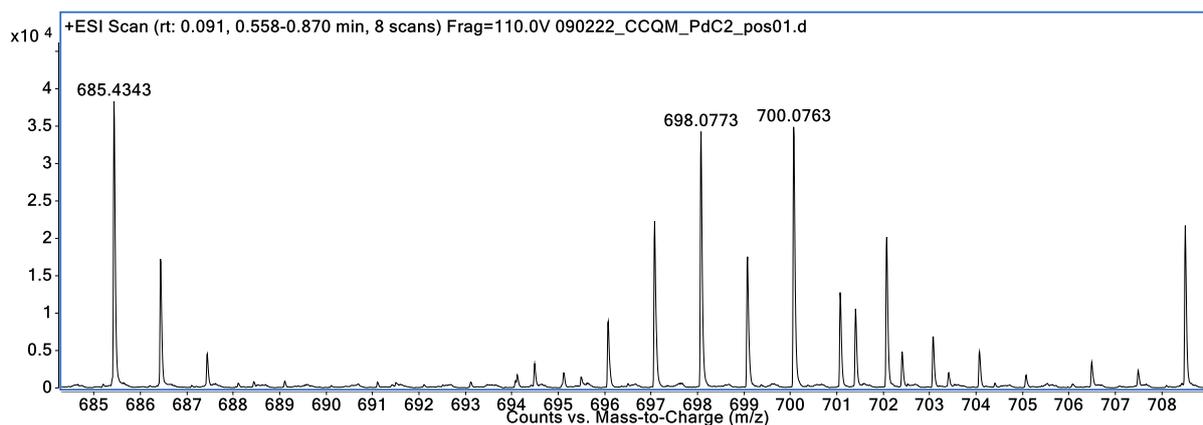


FIGURA A10 - Espectro de massas ampliado para o complexo **PdC2**.

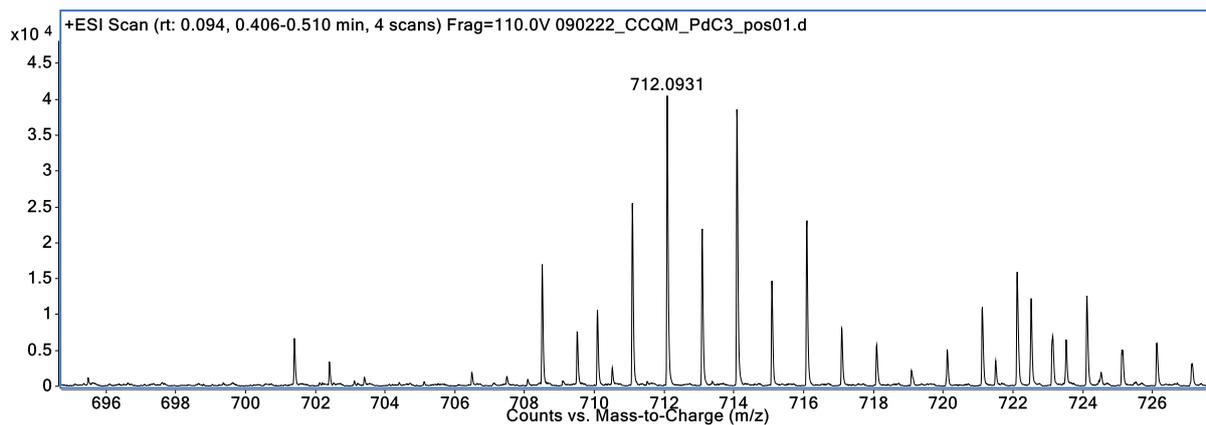


FIGURA A11 - Espectro de massas ampliado para o complexo **PdC3**.

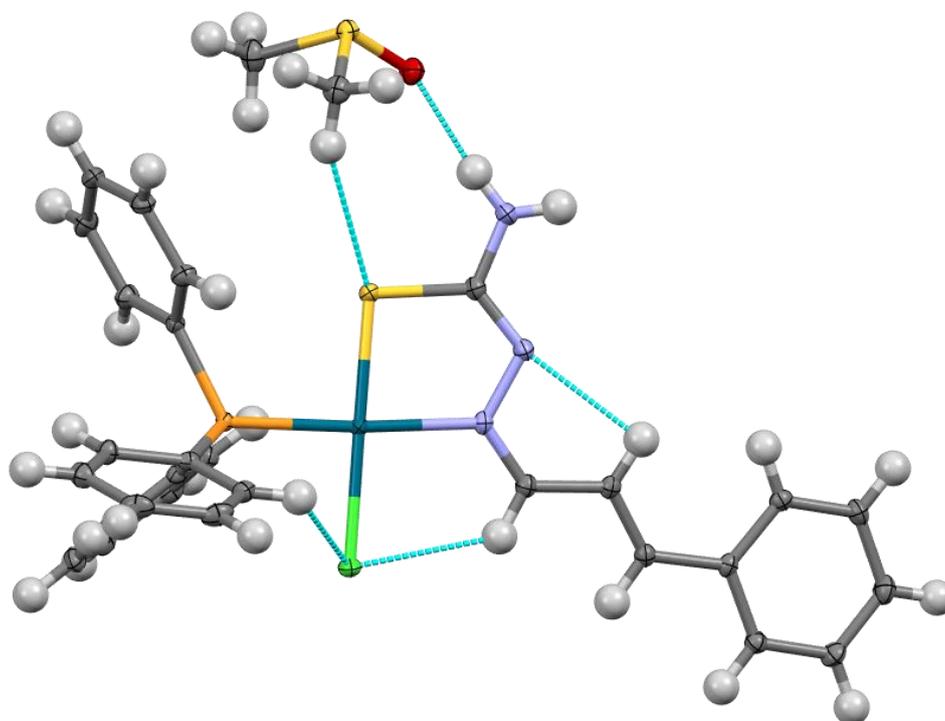


FIGURA A12 - Representação estrutural tridimensional do complexo **PdA1** obtida para o respectivo monocristal, elipsoides de 50% de probabilidade térmica.

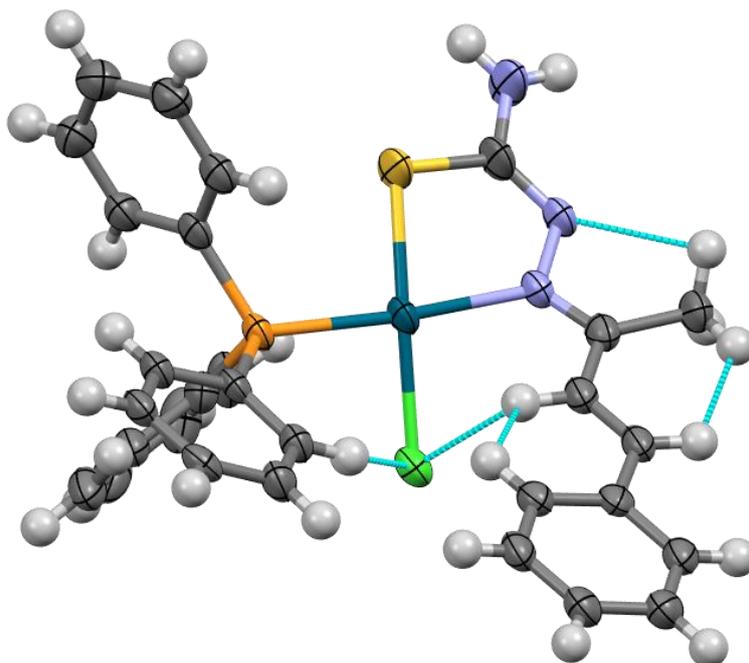


FIGURA A13 - Representação estrutural tridimensional do complexo **PdB1** obtida para o respectivo monocristal, elipsoides de 50% de probabilidade térmica.

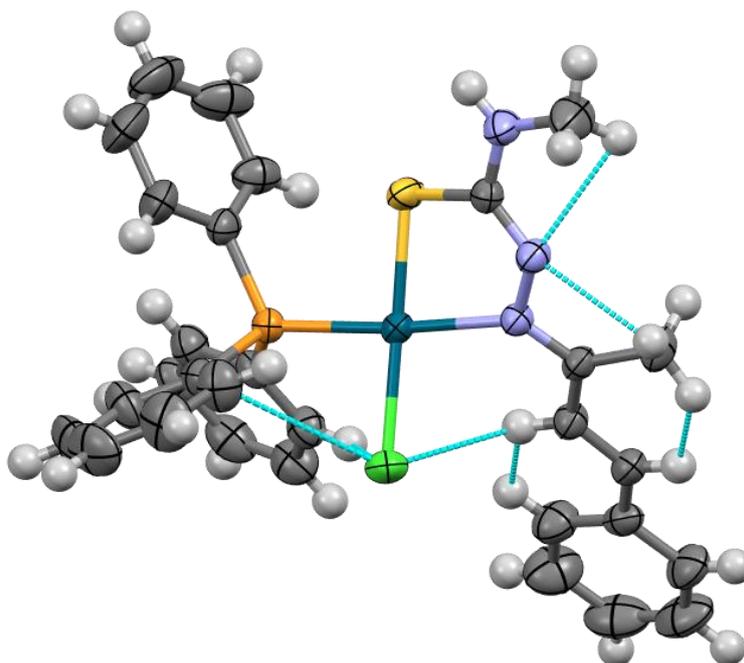


FIGURA A14 - Representação estrutural tridimensional do complexo **PdB2** obtida para o respectivo monocristal, elipsoides de 50% de probabilidade térmica.

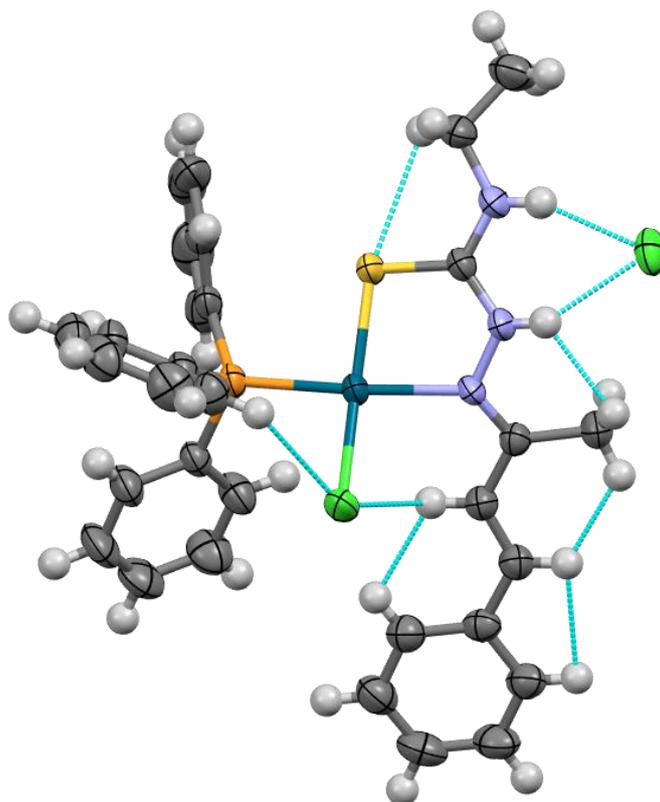


FIGURA A15 - Representação estrutural tridimensional do complexo **PdB3** obtida para o respectivo monocristal, elipsoides de 50% de probabilidade térmica.

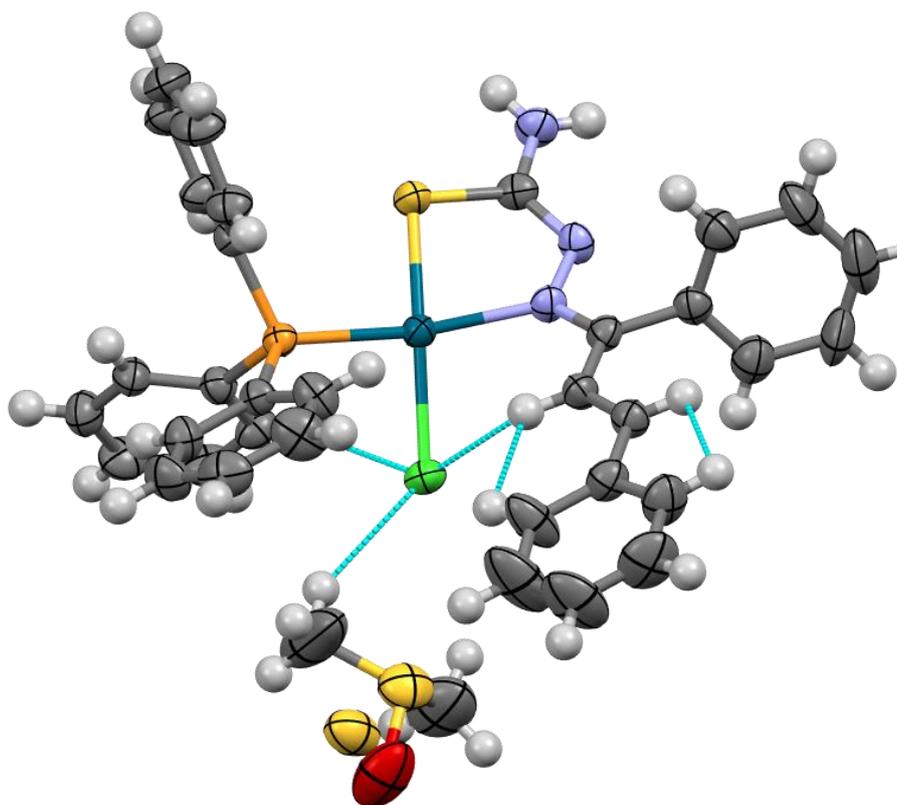


FIGURA A16 - Representação estrutural tridimensional do complexo **PdC1** obtida para o respectivo monocristal, elipsoides de 50% de probabilidade térmica.

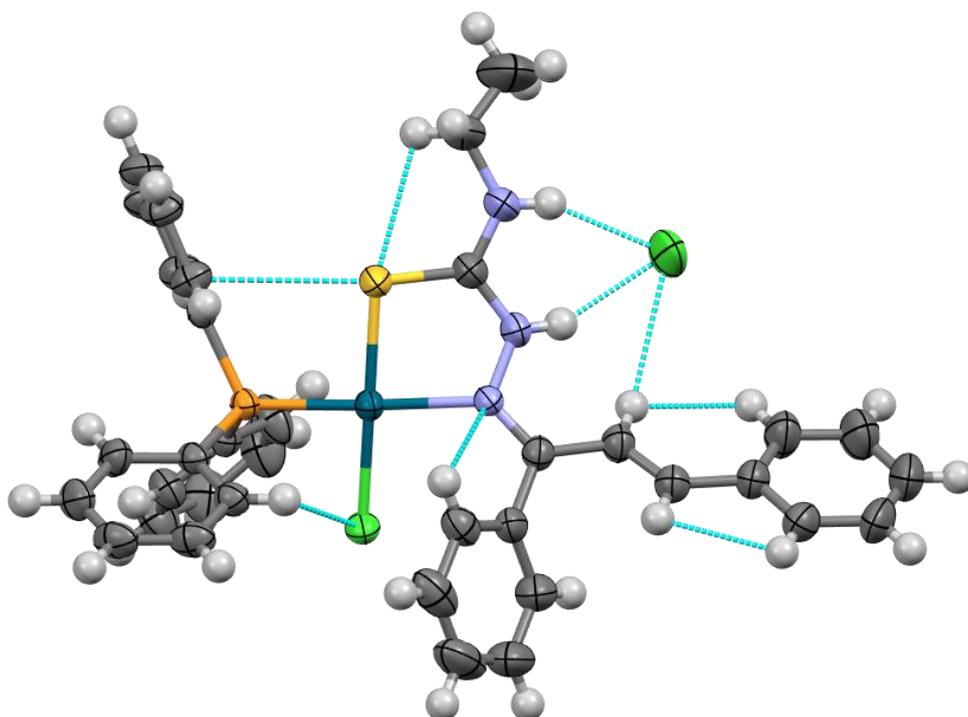


FIGURA A17 - Representação estrutural tridimensional do complexo **PdC3-Cl** obtida para o respectivo monocristal, elipsoides de 50% de probabilidade térmica.

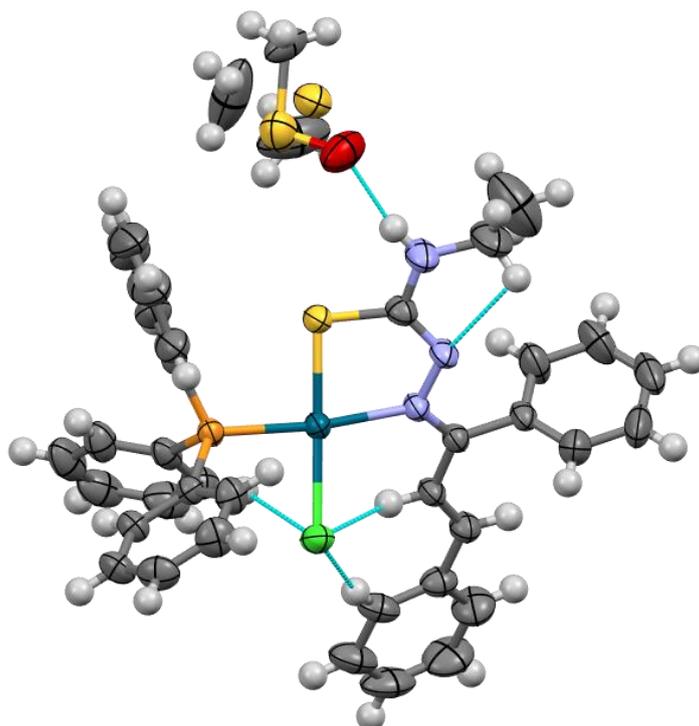


FIGURA A18 - Representação estrutural tridimensional do complexo **PdC3-DMSO** obtida para o respectivo monocristal, elipsoides de 50% de probabilidade térmica.

TABELA A2 - Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento das estruturas obtidas para **L-A1** e **PdA1**.

Composto	L-A1	PdA1
Fórmula empírica	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ S	C ₃₀ H ₃₁ ClN ₃ OPPdS ₂
Massa molecular	233,33	686,52
Temperatura (K)	293(2)	99,98(10)
Sistema Cristalino	Ortorrômbico	Monoclínico
Grupo espacial	Pbca	P2 ₁ /n
a (Å)	11,9215(10)	11,38617(18)
b (Å)	8,1190(7)	20,2343(3)
c (Å)	27,543(2)	13,1368(2)
α (°)	90	90
β (°)	90	97,9391(14)
γ (°)	90	90
Volume (Å ³)	2665,9(4)	2997,58(9)
Z	8	4
ρ _{calc} (g/cm ³)	1,163	1,521
μ(mm ⁻¹)	0,222	0,930
F(000)	992,0	1400,0
Tamanho do cristal (mm ³)	0,515 × 0,229 × 0,083	0,144 × 0,133 × 0,122
Radiação	Mo Kα (λ = 0,71073)	Mo Kα (λ = 0,71073)
Faixa Θ ₂ da coleta dos dados (°)	5,916 a 69,014	4,876 a 59,15
Intervalo de índice	-16 ≤ h ≤ 18, -12 ≤ k ≤ 12, -39 ≤ l ≤ 42	-15 ≤ h ≤ 15, -28 ≤ k ≤ 28, -18 ≤ l ≤ 18
Reflexões Coletadas	26095	45374
Reflexões independentes	5411 [R _{int} = 0,0556, R _{sigma} = 0,0681]	8404 [R _{int} = 0,0319, R _{sigma} = 0,0238]
dados/restrições/parâmetros	5411/0/147	8404/0/354
Melhor ajuste F ²	0,966	1,050
Índices R finais [I ≥ 2σ (I)]	R ₁ = 0,0576, wR ₂ = 0,1473	R ₁ = 0,0228, wR ₂ = 0,0532
Índices R finais [todos os dados]	R ₁ = 0,1739, wR ₂ = 0,2009	R ₁ = 0,0275, wR ₂ = 0,0551
Maior diferença pico/vale (e / Å ⁻³)	0,28/-0,21	0,44/-0,63

TABELA A3 - Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento das estruturas obtidas para os complexos **PdB1** e **PdB2**,

Composto	PdB1	PdB2
Fórmula empírica	C ₂₉ H ₂₇ ClN ₃ PPdS	2(C ₃₀ H ₂₉ ClN ₃ PPdS)
Massa molecular	622,41	1272,88
Temperatura (K)	100,0	293
Sistema Cristalino	Monoclínico	Triclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /c	P-1
a (Å)	17,2041(5)	11,5049(3)
b (Å)	12,5527(3)	16,2048(4)
c (Å)	15,4719(4)	17,4711(4)
α (°)	90	112,378(2)
β (°)	93,327(2)	92,328(2)
γ (°)	90	92,937(2)
Volume (Å ³)	3335,65(15)	3001,58(13)
Z	4	2
ρ _{calc} (g/cm ³)	1,239	1,408
μ(mm ⁻¹)	0,766	0,853
F(000)	1264,0	1296,0
Tamanho do cristal (mm ³)	0,197 × 0,123 × 0,066	
Radiação	Mo Kα (λ = 0,71073)	
Faixa Θ ₂ da coleta dos dados (°)	4,182 a 51,356	
Intervalo de índice	-20 ≤ h ≤ 20, -15 ≤ k ≤ 13, -18 ≤ l ≤ 18	
Reflexões Coletadas	34441	11774
Reflexões independentes	6330 [R _{int} = 0,0342, R _{sigma} = 0,0239]	
dados/restrições/parâmetros	6330/0/326	
Melhor ajuste F ²	1,045	
Índices R finais [I ≥ 2σ (I)]	R ₁ = 0,0347, wR ₂ = 0,0790	R ₁ = 0,0313, wR ₂ = 0,0800
Índices R finais [todos os dados]	R ₁ = 0,0406, wR ₂ = 0,0813	
Maior diferença pico/vale (e / Å ⁻³)	0,82/-0,81	

TABELA A4 - Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento das estruturas obtidas para os complexos **PdB3** e **PdC1**,

Composto	PdB3	PdC1
Fórmula empírica	C ₃₁ H ₃₂ Cl ₂ N ₃ PPdS	C ₃₆ H ₃₅ ClN ₃ OPPdS ₂
Massa molecular	686,92	762,61
Temperatura (K)	293(2)	298(2)
Sistema Cristalino	Triclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P-1	P2 ₁
a (Å)	8,0497(3)	8,9723(6)
b (Å)	12,0856(4)	20,6518(13)
c (Å)	16,5953(5)	10,5638(7)
α (°)	93,273(3)	90
β (°)	98,749(3)	94,246(6)
γ (°)	101,680(3)	90
Volume (Å ³)	1556,20(9)	1952,0(2)
Z	2	2
ρ _{calc} (g/cm ³)	1,466	1,297
μ(mm ⁻¹)	0,912	0,721
F(000)	700,0	780,0
Tamanho do cristal (mm ³)	0,409 × 0,364 × 0,28	0,225 × 0,2 × 0,118
Radiação	Mo Kα (λ = 0,71073)	Mo Kα (λ = 0,71073)
Faixa Θ ₂ da coleta dos dados (°)	5,242 a 51,5	5,524 a 51,35
Intervalo de índice	-9 ≤ h ≤ 9, -14 ≤ k ≤ 14, -20 ≤ l ≤ 20	-10 ≤ h ≤ 7, -19 ≤ k ≤ 25, -12 ≤ l ≤ 11
Reflexões Coletadas	30876	7258
Reflexões independentes	5947 [R _{int} = 0,0239, R _{sigma} = 0,0158]	5839 [R _{int} = 0,0227, R _{sigma} = 0,0430]
dados/restrições/parâmetros	5947/0/354	5839/41/417
Melhor ajuste F ²	1,167	1,057
Índices R finais [I ≥ 2σ (I)]	R ₁ = 0,0264, wR ₂ = 0,0562	R ₁ = 0,0312, wR ₂ = 0,0721
Índices R finais [todos os dados]	R ₁ = 0,0323, wR ₂ = 0,0616	R ₁ = 0,0374, wR ₂ = 0,0756
Maior diferença pico/vale (e / Å ⁻³)	0,52/-0,31	0,43/-0,38

TABELA A5 - Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento das estruturas obtidas para os complexos **PdC3** e **PdC3-DMSO**,

Composto	PdC3	PdC3-DMSO
Fórmula empírica	C ₃₆ H ₃₄ Cl ₂ N ₃ PPdS	C ₃₈ H ₃₉ ClN ₃ OPPdS ₂
Massa molecular	748,99	790,66
Temperatura (K)	293(2)	298(2)
Sistema Cristalino	Triclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P-1	P2 ₁ /c
a (Å)	10,2043(4)	17,7028(8)
b (Å)	13,9510(6)	12,0178(6)
c (Å)	14,1613(6)	17,8206(8)
α (°)	117,596(4)	90
β (°)	93,622(3)	94,927(4)
γ (°)	99,133(4)	90
Volume (Å ³)	1742,34(14)	3777,3(3)
Z	2	4
ρ _{calc} (g/cm ³)	1,428	1,390
μ(mm ⁻¹)	0,821	0,748
F(000)	764,0	1624,0
Tamanho do cristal (mm ³)	0,31 × 0,146 × 0,13	0,351 × 0,26 × 0,178
Radiação	Mo Kα (λ = 0,71073)	Mo Kα (λ = 0,71073)
Faixa Θ ₂ da coleta dos dados (°)	5,16 a 51,498	4,956 a 51,362
Intervalo de índice	-12 ≤ h ≤ 12, -17 ≤ k ≤ 17, -17 ≤ l ≤ 17	-21 ≤ h ≤ 21, -14 ≤ k ≤ 13, -21 ≤ l ≤ 21
Reflexões Coletadas	27232	25390
Reflexões independentes	6674 [R _{int} = 0,0345, R _{sigma} = 0,0293]	7161 [R _{int} = 0,0299, R _{sigma} = 0,0375]
dados/restrições/parâmetros	6674/0/398	7161/61/386
Melhor ajuste F ²	1,085	1,103
Índices R finais [I ≥ 2σ (I)]	R ₁ = 0,0299, wR ₂ = 0,0715	R ₁ = 0,0348, wR ₂ = 0,0851
Índices R finais [todos os dados]	R ₁ = 0,0408, wR ₂ = 0,0807	R ₁ = 0,0458, wR ₂ = 0,0943
Maior diferença pico/vale (e / Å ⁻³)	0,42/-0,36	0,55/-0,34

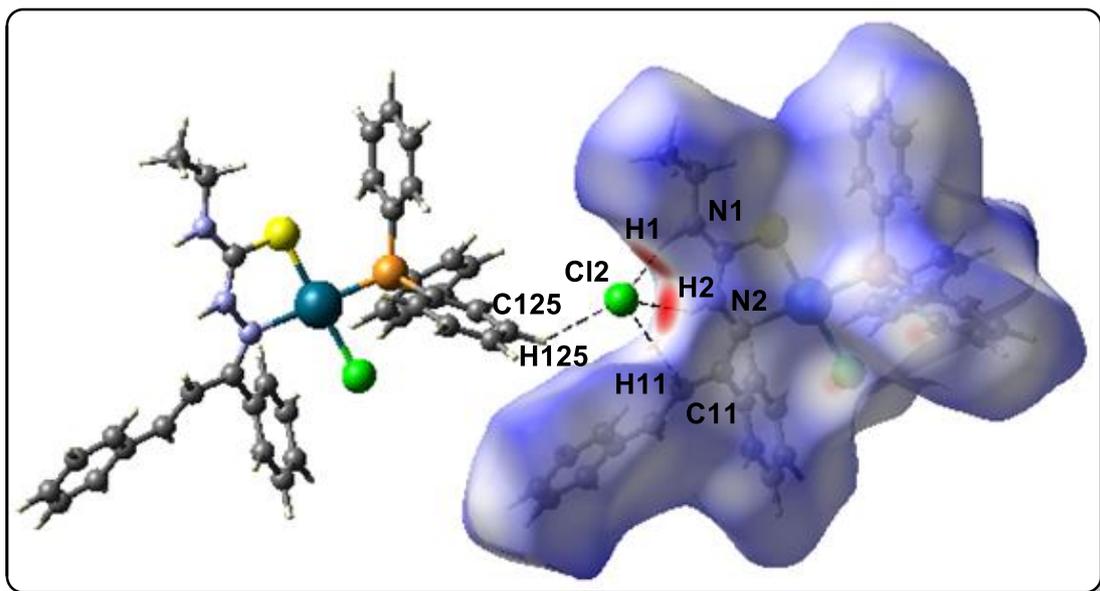


FIGURA A19 - Superfície d_{norm} ao redor da unidade assimétrica do composto **PdC3**, representação dos contatos mais significativos.

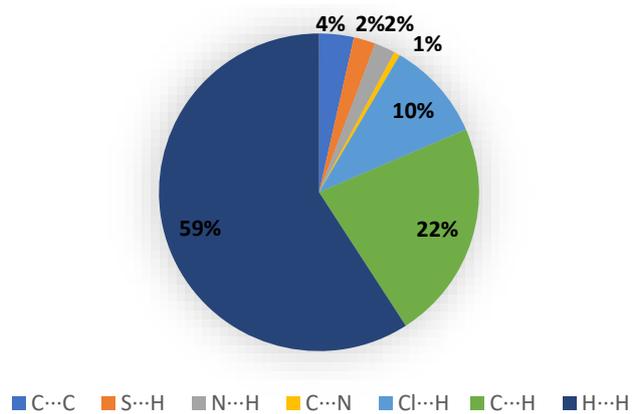


FIGURA A20 - A contribuição percentual de contatos interatômicos que ocorrem no cristal do composto **PdC3**.

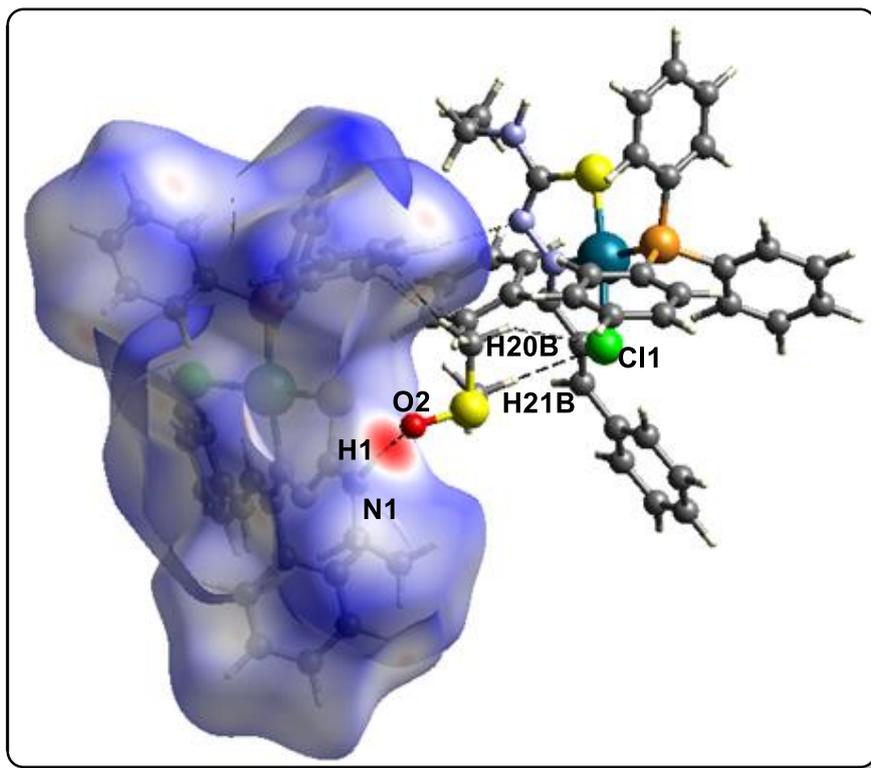


FIGURA A21 - Superfície d_{norm} ao redor da unidade assimétrica do composto **PdC3-DMSO**, representação dos contatos mais.

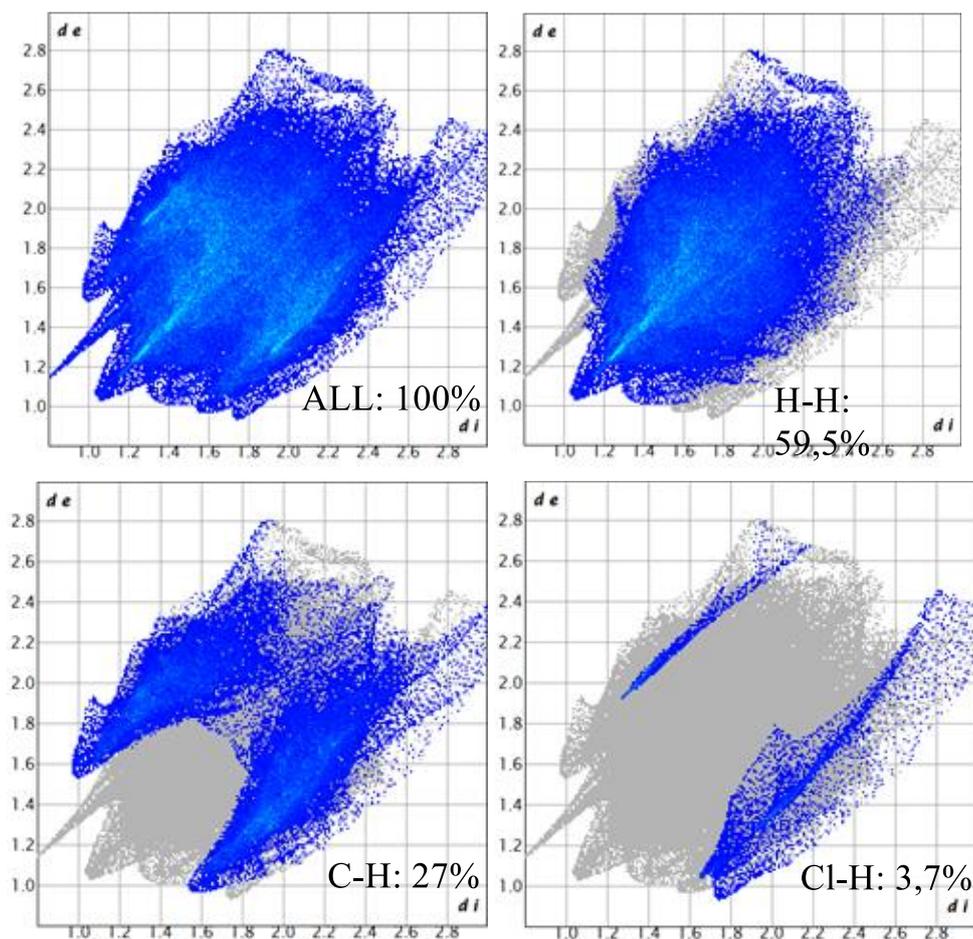


FIGURA A22 - Representação da impressão digital bidimensional da superfície de Hirshfeld do composto **PdC3-DMSO** para os contatos mais efetivos para o empacotamento cristalino.

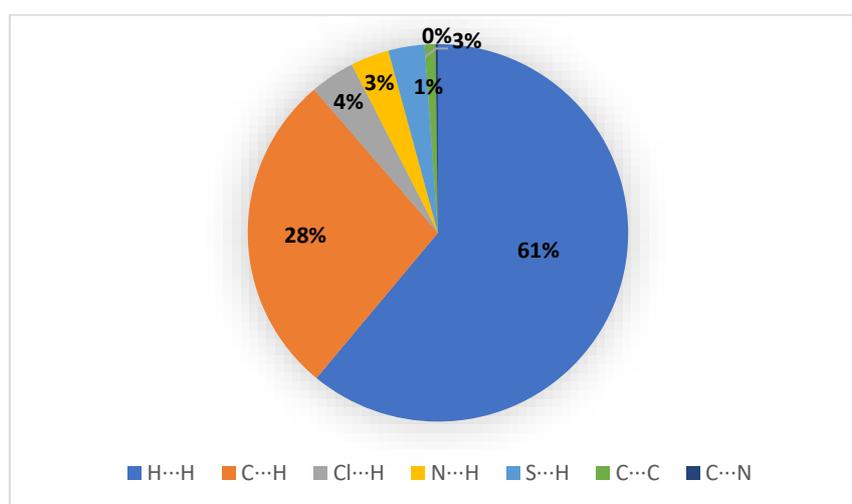


FIGURA A23 - A contribuição percentual de contatos interatômicos que ocorrem no cristal do composto **PdC3-DMSO**.

TABELA A6 - Valores médios de IC₅₀ (μmol·L⁻¹) em 48 h de incubação dos compostos para as diferentes linhagens celulares.

	MDA-MB-231	MCF-7	SK-BR-3	MFC-10A	A2780	A2780cis	A549	MRC5	A375
PdA1	2,78 ± 0,1	> 50	10,88 ± 0,9	5,10 ± 0,1	0,33 ± 0,01	0,15 ± 0,01	> 50	18,50 ± 0,3	> 50
PdA2	1,43 ± 0,05	9,17 ± 0,5	3,31 ± 0,2	—	0,39 ± 0,01	0,23 ± 0,04	> 50	15,34 ± 0,8	—
PdA3	4,82 ± 0,2	11,87 ± 0,8	18,61 ± 1	—	0,53 ± 0,01	0,32 ± 0,01	> 50	14,98 ± 0,2	—
PdB1	1,45 ± 0,1	3,79 ± 0,4	1,42 ± 0,07	1,58 ± 0,07	0,12 ± 0,01	0,20 ± 0,01	44,8 ± 2	1,70 ± 0,2	1,34 ± 0,08
PdB2	0,92 ± 0,08	1,47 ± 0,2	1,48 ± 0,06	—	0,13 ± 0,01	0,21 ± 0,01	30,4 ± 0,4	6,85 ± 0,3	—
PdB3	1,04 ± 0,06	0,91 ± 0,01	< 2	—	0,23 ± 0,01	0,26 ± 0,01	12,99 ± 1	9,28 ± 0,3	—
PdC1	5,97 ± 0,1	17,68 ± 1	2,25 ± 0,3	2,64 ± 0,06	0,40 ± 0,01	0,62 ± 0,01	> 50	46,77 ± 2	> 50
PdC2	9,66 ± 0,4	> 50	> 50	—	3,93 ± 0,2	1,66 ± 0,01	> 50	> 50	—
PdC3	> 50	> 50	> 50	—	22,78 ± 1	11,1 ± 0,6	> 50	> 50	—
Cisplatina	33,14 ± 0,3	8,64 ± 0,8	5,86 ± 0,2	23,90 ± 0,7	14,24 ± 0,05	25,09 ± 0,9	13,01 ± 0,4	21,61 ± 0,8	12,21 ± 0,62

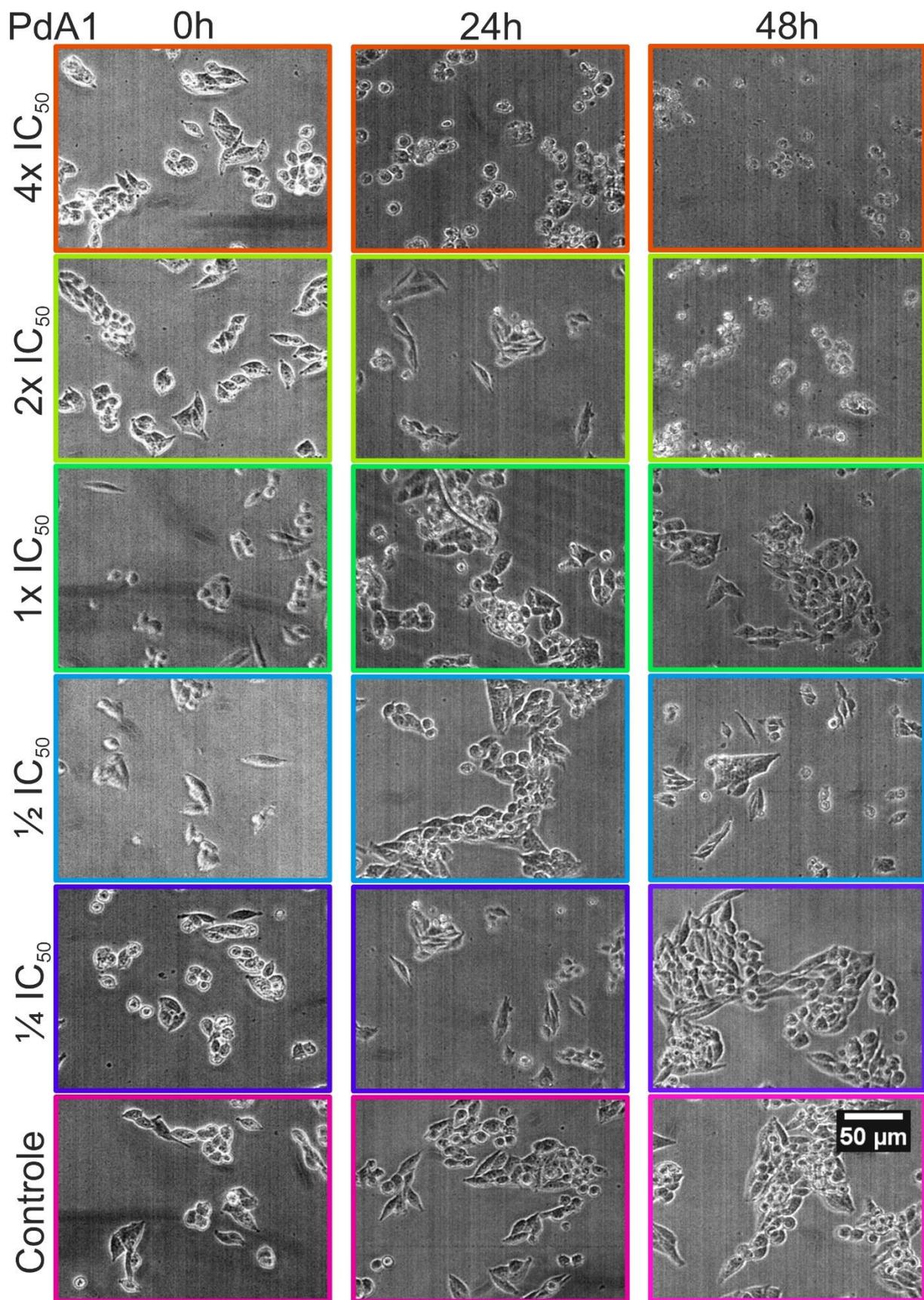


FIGURA A24 - Fotografias do ensaio de avaliação morfológica para o complexo **PdA1** na linhagem A2780cis.

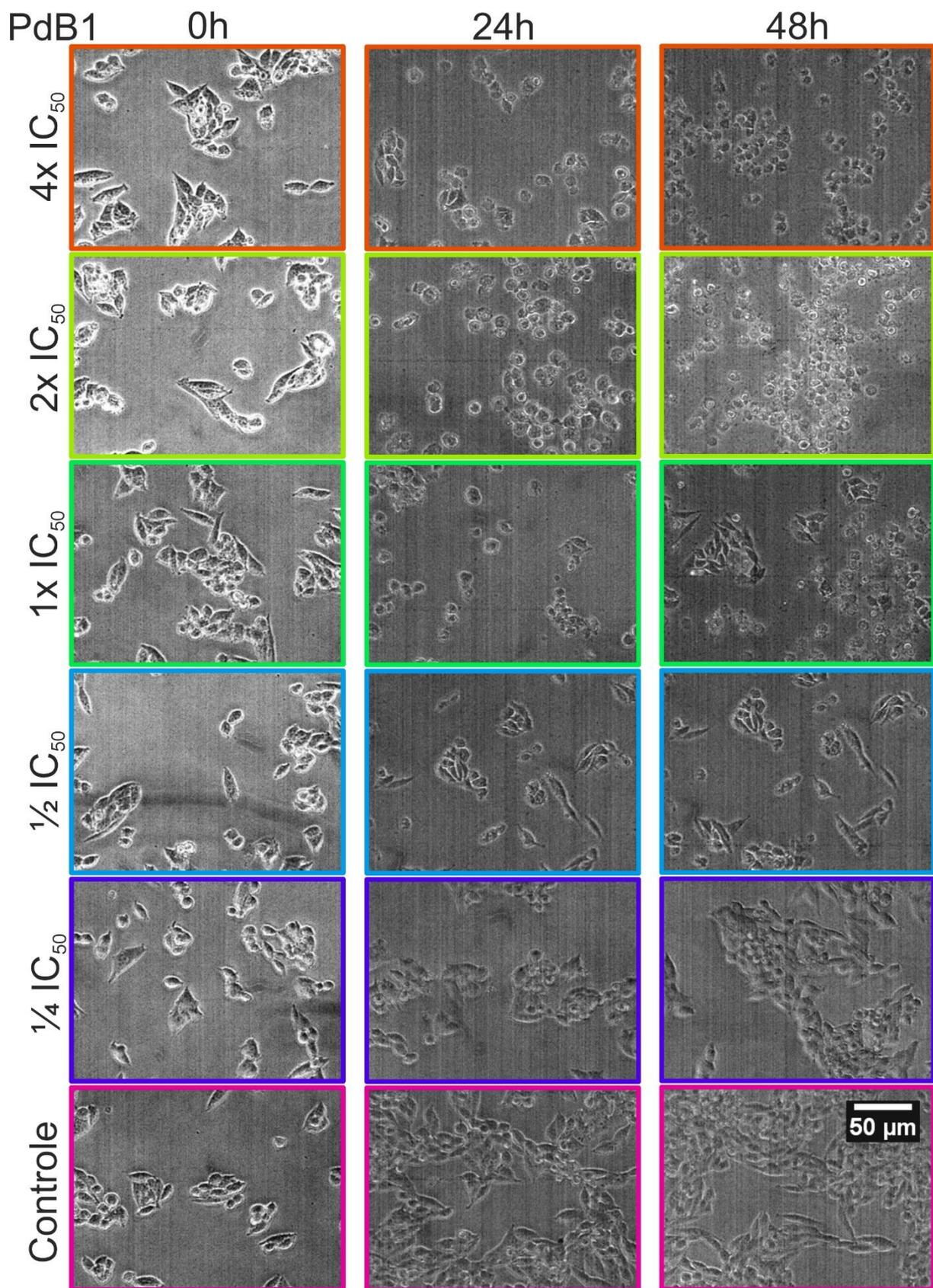


FIGURA A25 - Fotografias do ensaio de avaliação morfológica para o complexo **PdB1** na linhagem A2780cis.

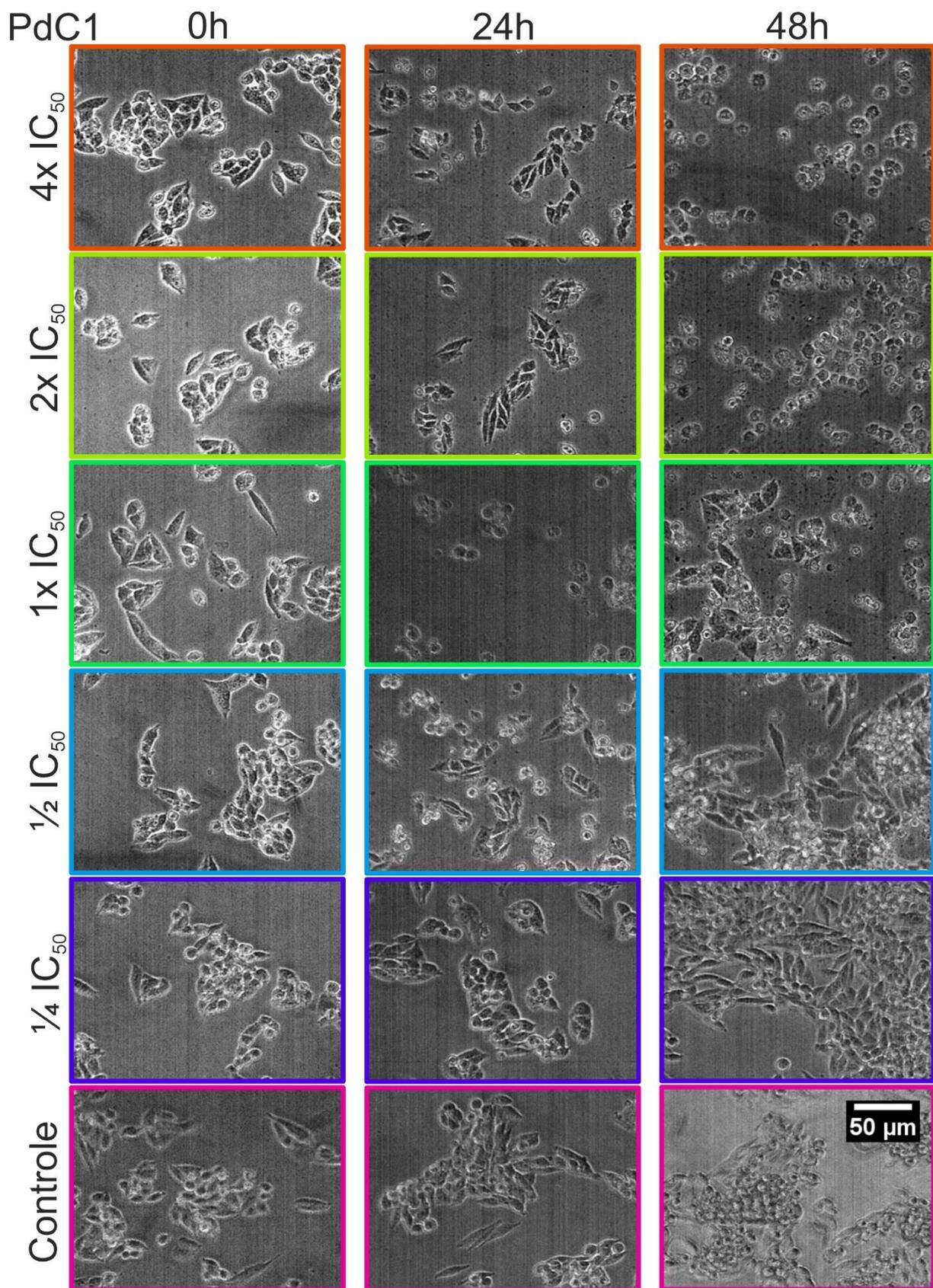


FIGURA A26 - Fotografias do ensaio de avaliação morfológica para o complexo PdC1 na linhagem A2780cis.

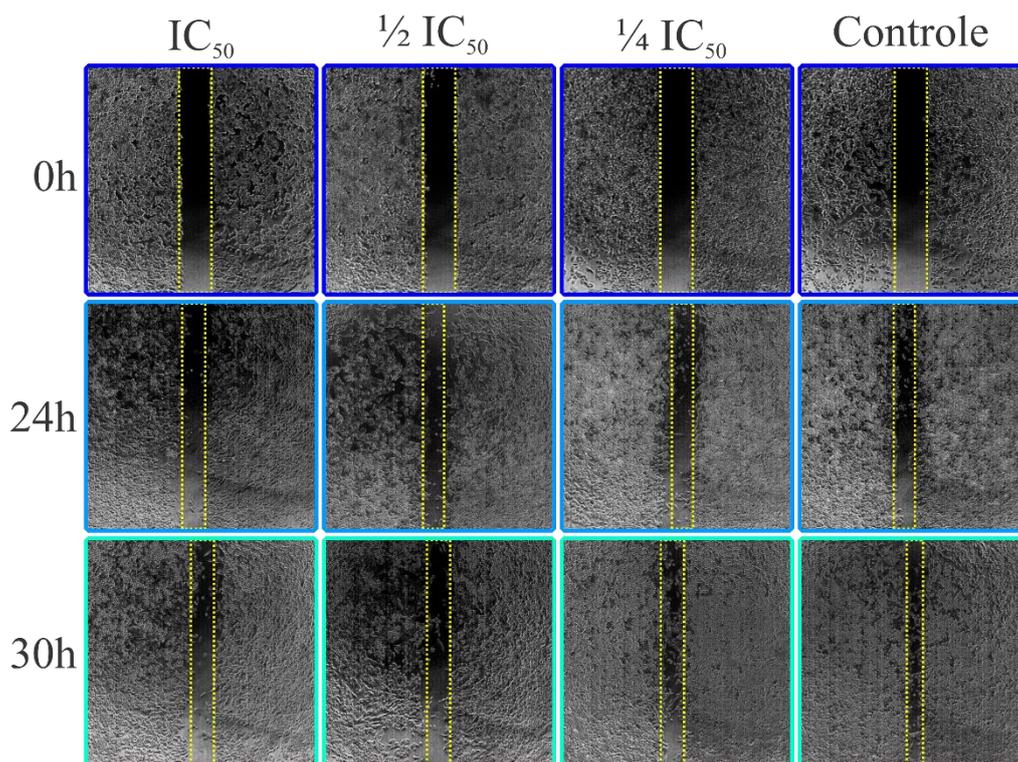


FIGURA A27 - Fotografias do ensaio de migração celular para o complexo **PdA1** na linhagem A2780cis.

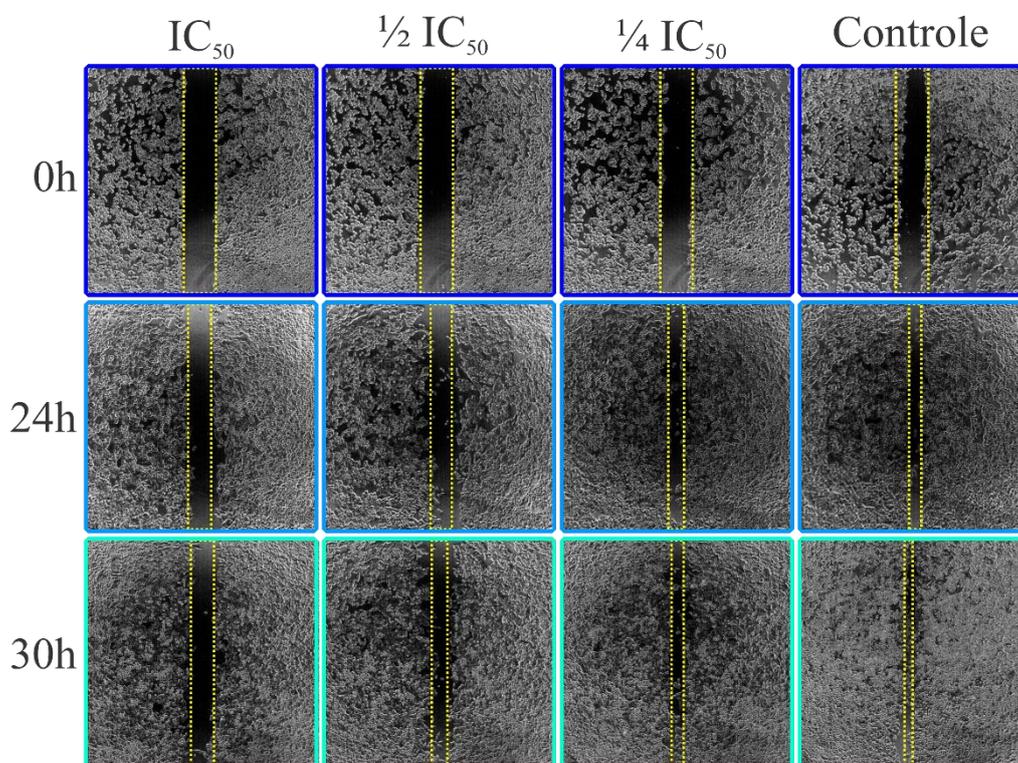


FIGURA A 28 - Fotografias do ensaio de migração celular para o complexo **PdB1** na linhagem A2780cis.

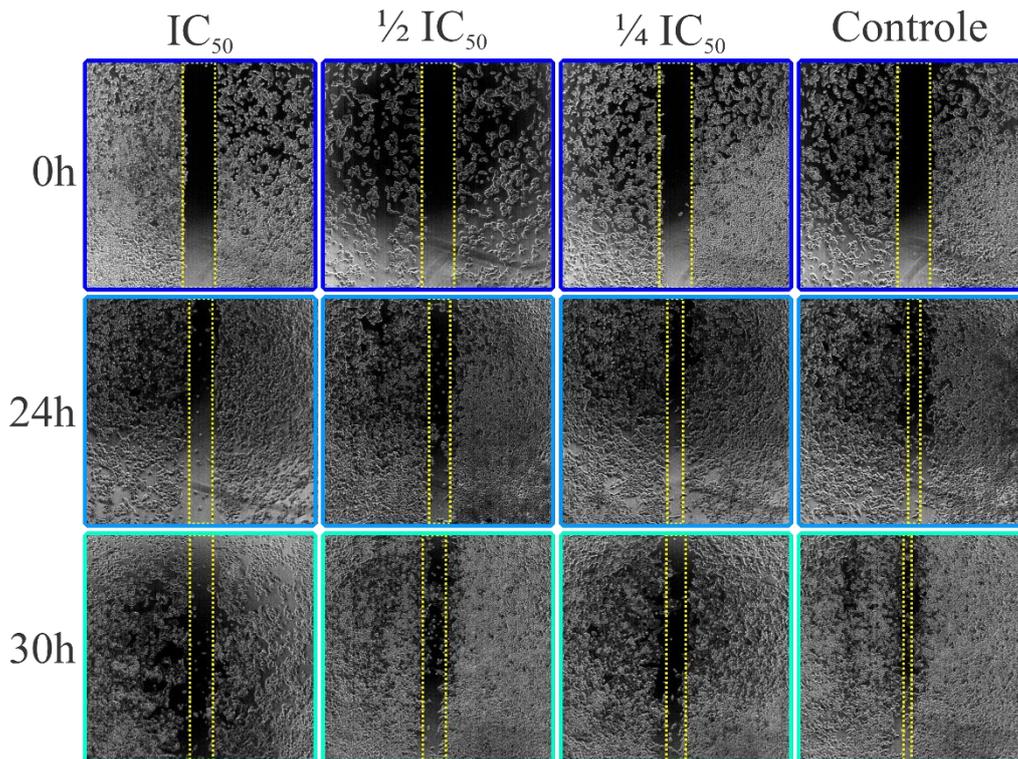


FIGURA A29 - Fotografias do ensaio de migração celular para o complexo **PdC1** na linhagem A2780cis.

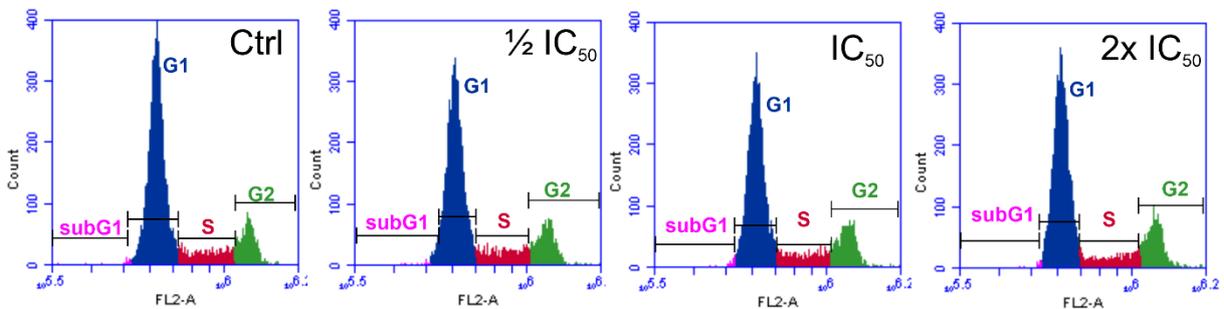


FIGURA A30 - Gráficos da dispersão das células em diferentes fases do ciclo celular para o complexo **PdB1**,

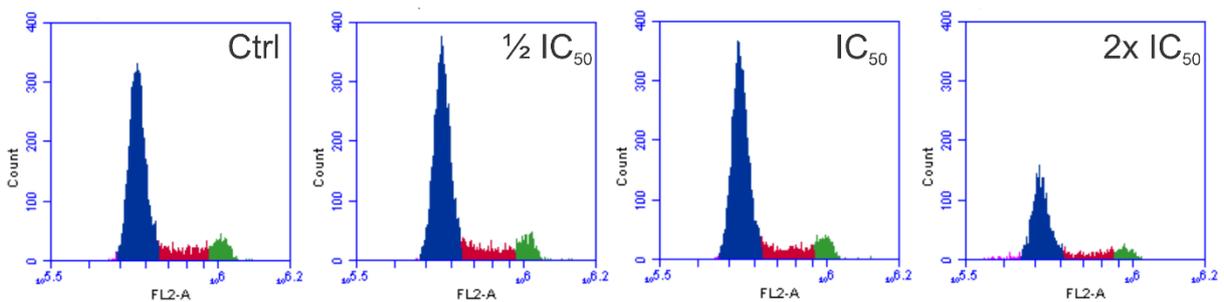


FIGURA A31 - Gráficos da dispersão das células em diferentes fases do ciclo celular para o complexo **PdC1**.

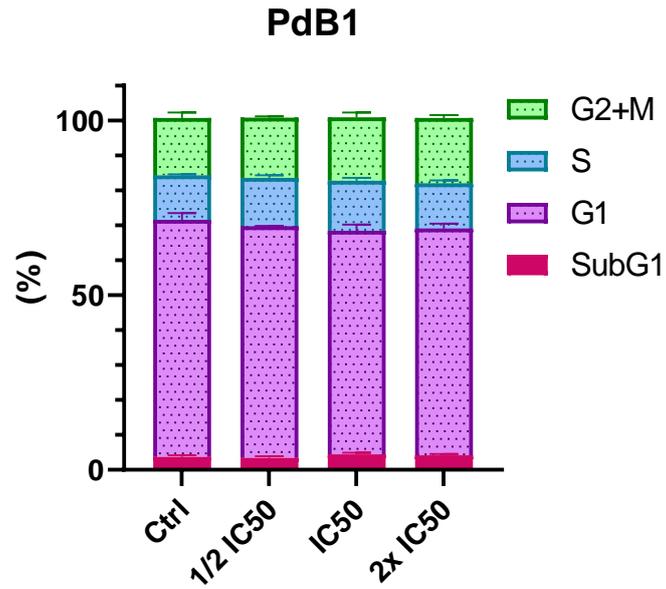


FIGURA A32 - Gráfico em barras das porcentagens obtidas as dispersões em cada concentração do complexo **PdB1**, Linhagem A2780cis.

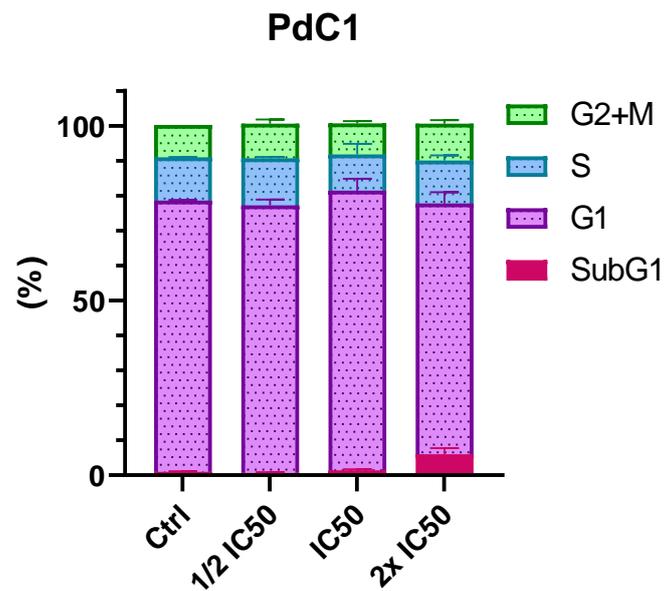


FIGURA A33 - Gráfico em barras das porcentagens obtidas as dispersões em cada concentração do complexo **PdC1**, Linhagem A2780cis.

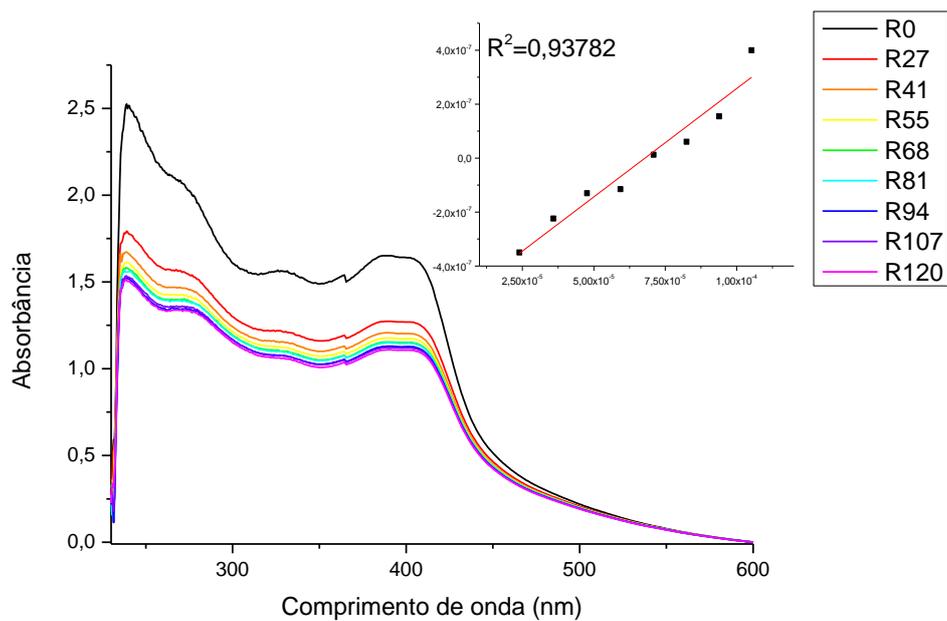


FIGURA A34 - Espectros de absorção do complexo **PdB3** com a titulação de alíquotas de DNA na região do UV-Vis, $R = 100 \times [\text{DNA}] / [\text{Complexo}]$.

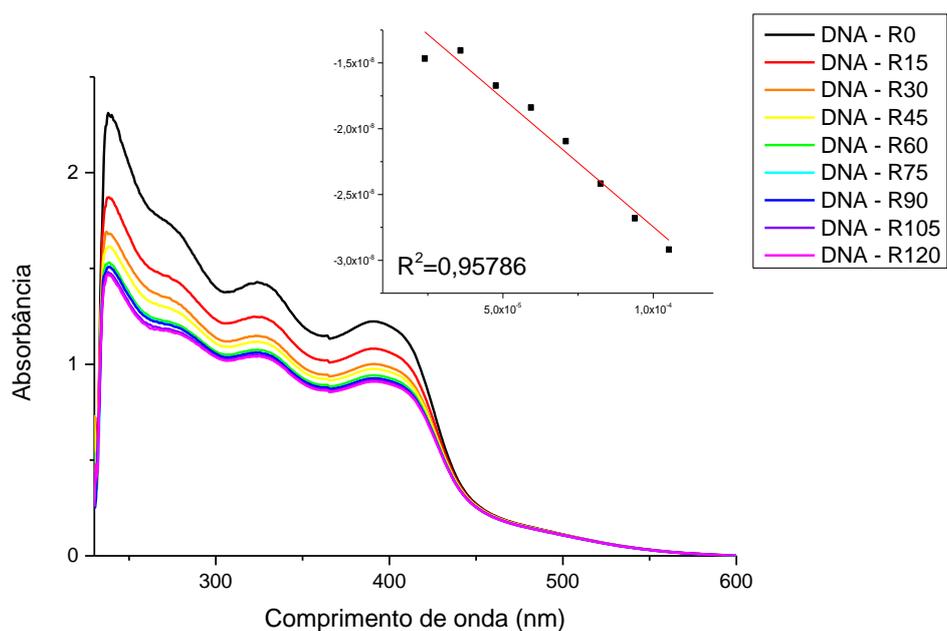


FIGURA A35 - Espectros de absorção do complexo **PdC1** com a titulação de alíquotas de DNA na região do UV-Vis, $R = 100 \times [\text{DNA}] / [\text{Complexo}]$.

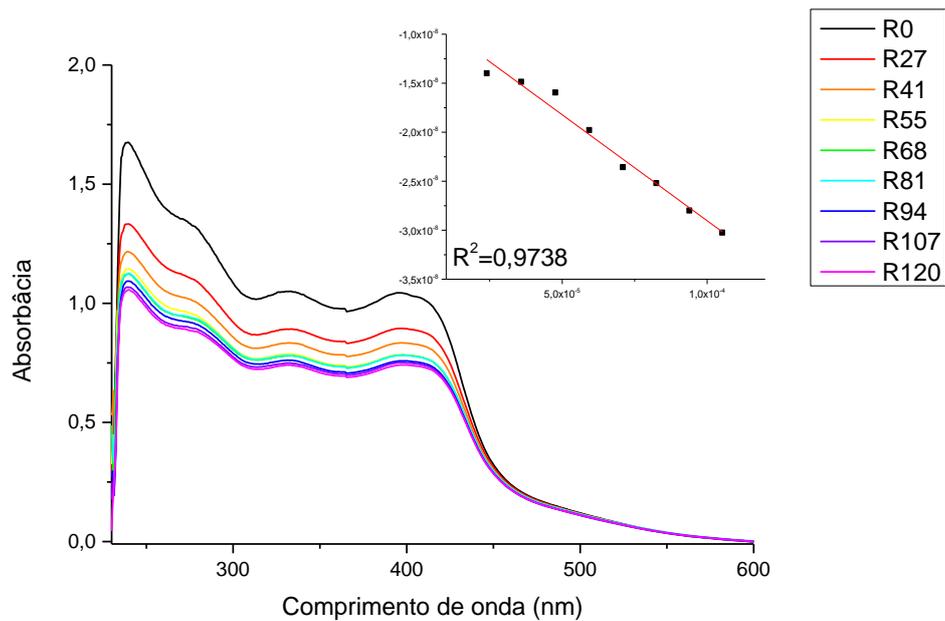


FIGURA A36 - Espectros de absorção do complexo **PdC2** com a titulação de alíquotas de DNA na região do UV-Vis, $R = 100 \times [\text{DNA}] / [\text{Complexo}]$.

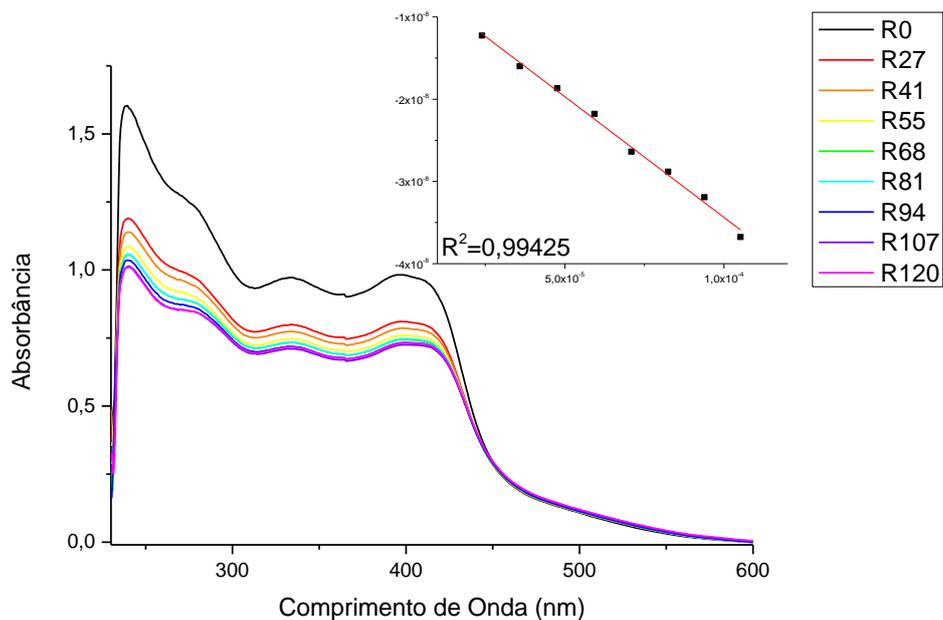


FIGURA A37 - Espectros de absorção do complexo **PdC3** com a titulação de alíquotas de DNA na região do UV-Vis, $R = 100 \times [\text{DNA}] / [\text{Complexo}]$.

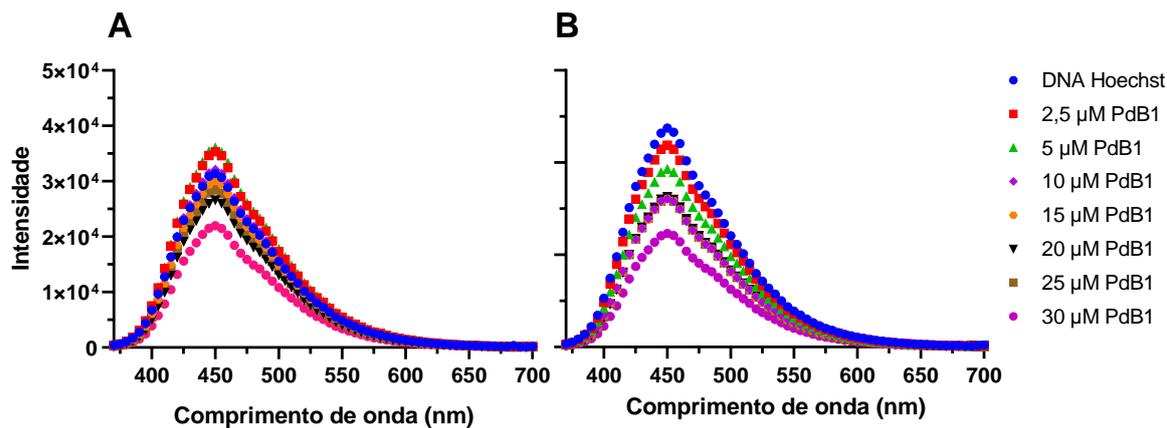


FIGURA A38 - Espectros da supressão de fluorescência do complexo DNA-Hoeschst com o aumento da concentração com composto **PdB1**, Espectros foram obtidos a 25 (A) e 37°C (B).

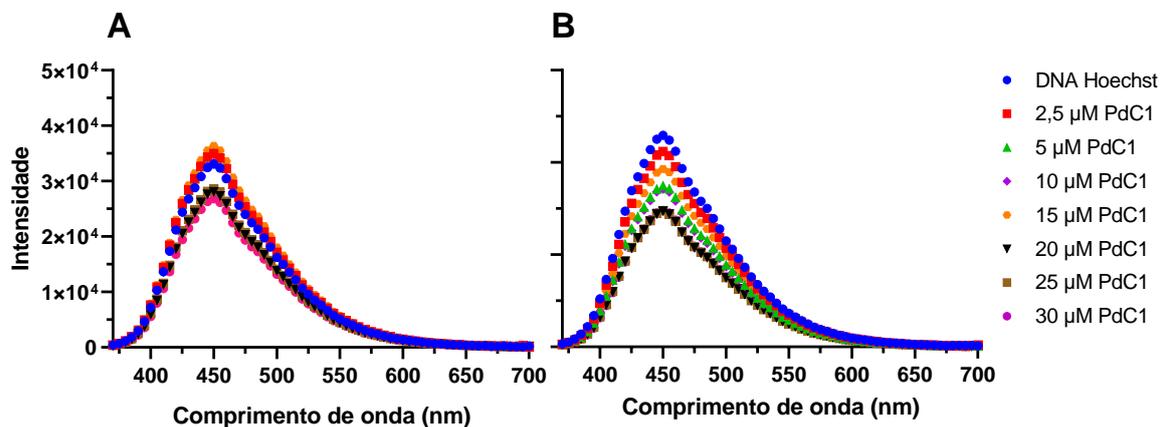


FIGURA A39 - Espectros da supressão de fluorescência do complexo DNA-Hoeschst com o aumento da concentração com composto **PdC1**, Espectros foram obtidos a 25 (A) e 37°C (B).

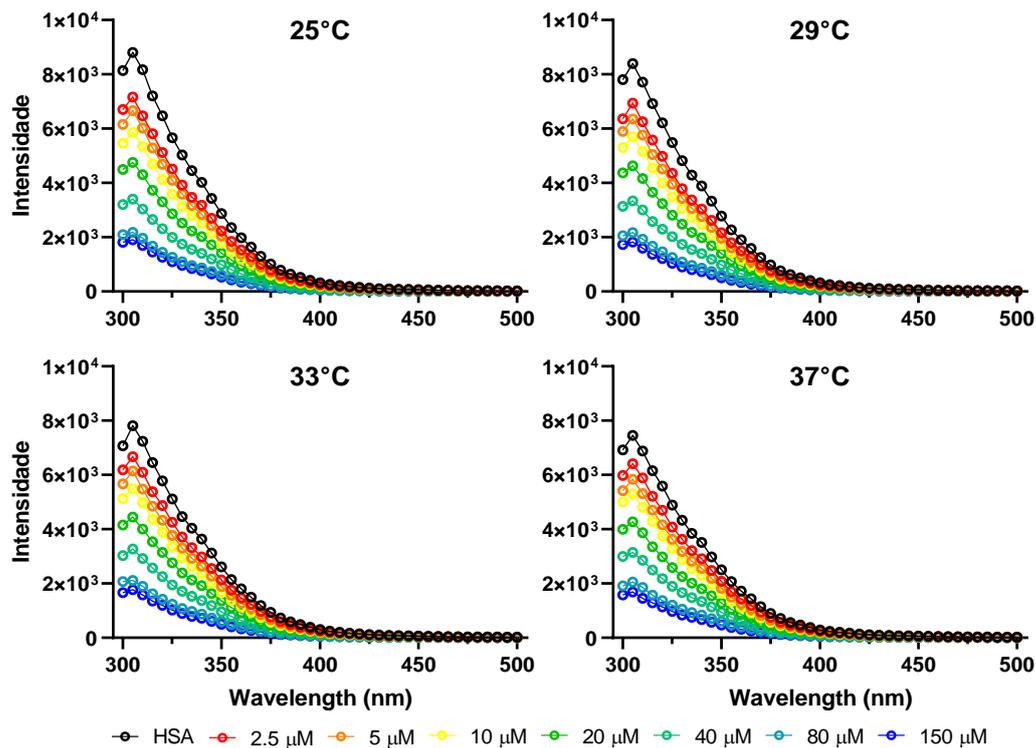


FIGURA A40 - Espectros da supressão de fluorescência da HSA pelo aumento da concentração do complexo **PdB1** em diferentes temperaturas (25, 29, 33 e 37°C).

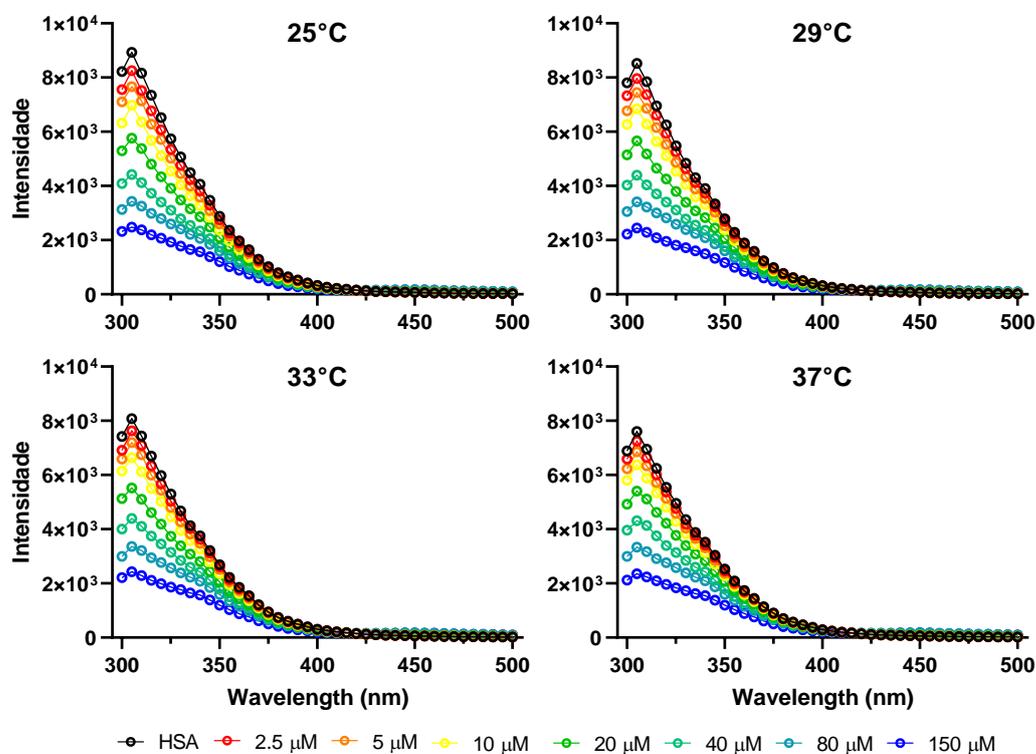


FIGURA A41 - Espectros da supressão de fluorescência da HSA pelo aumento da concentração do complexo **PdC1** em diferentes temperaturas (25, 29, 33 e 37°C).

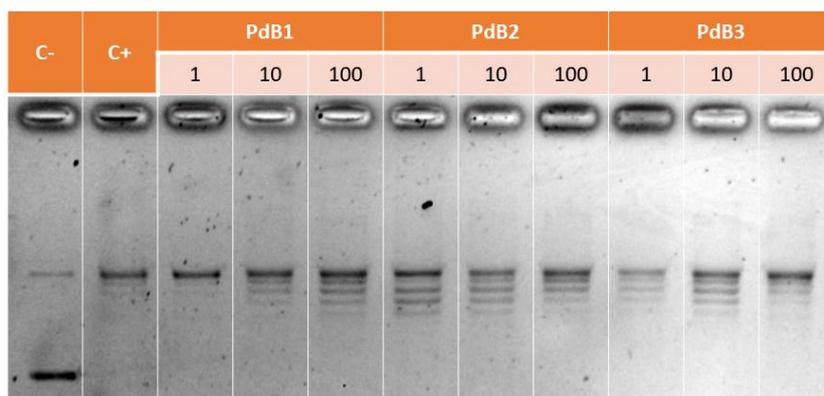


FIGURA A42 - Fotografia do gel de agarose 1% (m/v) do ensaio de inibição da enzima TOPOIIA para os complexos **PdBA1**, **PdB2** e **PdB3** nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

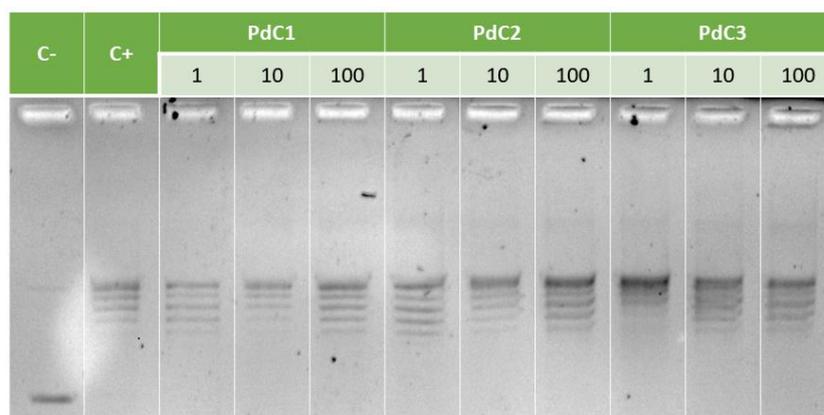


FIGURA A43 - Fotografia do gel de agarose 1% (m/v) do ensaio de inibição da enzima TOPOIIA para os complexos **PdC1**, **PdC2** e **PdC3** nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.