

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

Síntese, caracterização e investigação das propriedades antitumorais *in vitro* em modelos 2D e 3D de compostos de coordenação de Pd(II) com tiossemicarbazidas e bis(difenilfosfina)alcanos

Dario Batista Fortaleza*

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

Orientador(a): Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha

*** bolsista (CNPq)**

**São Carlos - SP
2024**



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 Dario Batista Fortaleza, realizada em 16/05/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha (UFSCar)

Profa. Dra. Camilla Abbehausen (UNICAMP)

Prof. Dr. Roberto Santana da Silva (USP)

Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto (UNESP)

Profa. Dra. Rose Maria Carlos (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Dedico este trabalho aos meus pais, Ranulfo Fortaleza Bezerra e Ordalina Batista Alves, pelo amor e apoio incondicionais que me proporcionaram. Também dedico a minha parceira de vida, Kelly A. da Encarnação Amorim, que esteve sempre ao meu lado durante toda a minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por minha vida e por todos os obstáculos superados para chegar até aqui. Agradeço a todos familiares e amigos que sempre me apoiaram.

Ao Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha por sua orientação excepcional e apoio constante durante meu doutorado. Sua expertise e incentivo foram essenciais para o progresso deste trabalho acadêmico. Estou profundamente grato pela oportunidade de aprender e crescer sob sua orientação.

Agradeço aos meus colegas de laboratório do CCQM: George, Tamara, Josenilto, Josias, Mauro e Gabriela pela companhia e aprendizados que tive com vocês.

Agradeço ao colega M.Sc. Carlos André Ferreira Moraes que realizou os experimentos de espectrometria de massa.

Agradeço ao colega M.Sc. George Bueno Santana Pereira que realizou os ensaios de interação com DNA por titulação espectroscópica UV-vis e interação com as topoisomerasas por eletroforese em gel de agarose.

Agradeço ao colega M.Sc. Josias da Silveira Rocha que realizou o ensaio de interação com a DNA por eletroforese em gel de agarose e de lipofilicidade.

Agradeça a Colega M.SC. Tamara Teixeira que realizou o ensaio de interação com a HSA.

Agradeço a colega Dra. Jocely de Lucena Dutra que realizou os ensaios de morte celular e ciclo celular por citometria de fluxo.

Agradeço ao Laboratório de Cristalografia (USP-IFSC) e ao colega Dr. Pedro Henrique de Oliveira Santiago que realizou os experimentos de difração de raios X.

Agradeço a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Departamento de Química (DQ) por proporcionarem a estrutura e o suporte necessários para a realização da minha tese. A excelência acadêmica e os recursos disponíveis foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos órgãos de fomento FAPESP, CAPES e em especial a CNPq pela bolsa de doutorado. Seus recursos foram fundamentais para viabilizar a pesquisa e o desenvolvimento deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

DPPP = Bis-(difenilfosfina)propano

DPPB = Bis-(difenilfosfina)butano

TSC = Tiossemicarbazida

MetTSC = 4-metil-3-tiossemicarbazida

EtTSC = 4-etil-3-tiossemicarbazida

MTT = Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

IC₅₀ = Concentração inibitória média

DRX = Difração de raios X

IV = Infravermelho

HSA = albumina sérica humana

DMSO = Dimetil sulfóxido

RMN = Ressonância Magnética nuclear

MRC-5 = Célula não tumoral de pulmão humano

A549 = Célula tumoral de pulmão humano

A2780 = Célula tumoral de ovário humano

A2780cis = Célula tumoral de ovário humano resistente a cisplatina

Du-145 = Célula tumoral de próstata humano

MCF-7 = Célula tumoral de mama humano

MDA-MB-231 = Célula tumoral de mama humano triplo negativo

Ctrl = Controle

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Medicamentos anticancerígenos à base de platina aprovados. .	6
TABELA 1.2 - Vantagens e desvantagens dos modelos de cultivo celular 2D e 3D.....	15
TABELA 3.1 - Parâmetros para ionização dos compostos.....	20
TABELA 3.2 - - Relação de volume CT-DNA/ Hoechst 33258 + complexos + DMSO (µL)	29
TABELA 4.1 - atribuição dos modos vibracionais no espectro do infravermelho.	34
TABELA 4.2 - Comparação dos valores de massa teórico e experimental obtidos por espectrometria de massa.	42
TABELA 4.3 - Comprimentos de ligação dos compostos PdB1 e PdB3.	45
TABELA 4.4 - Ângulos de ligação dos compostos PdB1 e PdB3.....	45
TABELA 4.5 - Teste de estabilidade por condutividade molar em DMSO.....	46
TABELA 5.1 - Dados obtidos a partir da supressão de fluorescência da HSA pelos complexos PdP3 e PdB3.	55
TABELA 6.1 - Valores de IC ₅₀ por MTT.....	58

LISTA DE FIGURAS

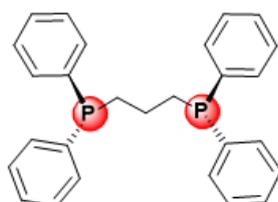
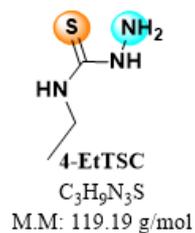
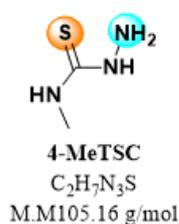
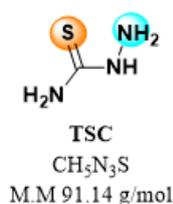
FIGURA 1.1 - Mecanismo de ação da cisplatina. Adaptado de JOHNSTONE <i>et al.</i> (2016).....	5
FIGURA 1.2 - Estrutura molecular do Tookad [®] . HANDOKO <i>et al.</i> (2015).....	8
FIGURA 1.3 - Estrutura base das tiossemicarbazidas	8
FIGURA 1.4 - Derivados de tiossemicarbazidas com propriedades antitumorais. A) IC ₅₀ = 2,37 μM para a linhagem celular MGC-803. B) IC ₅₀ = 2,43 μM para a linhagem celular MCF-7. C) IC ₅₀ = 0,01 μM para a linhagem celular SKBR3 e IC ₅₀ = 0,055 μM para a linhagem celular.....	9
FIGURA 1.5 - Complexo de Paládio (II) com 4-metil-3-tiossemicarbazida, trifenilfosfina mais grupos abandonadores. Adaptado de ROCHA <i>et al.</i> (2016).	10
FIGURA 1.6 - Estruturas-base dos complexos de Au e bisfosfinas relatados por LIU <i>et al.</i> (2008).....	11
FIGURA 1.7 - Estrutura molecular do complexo [M(DPPM) ₂]sac elucidada por ICSEL <i>et al.</i> (2019).....	12
FIGURA 1.8 - Proposta estrutural dos complexos.....	13
FIGURA 3.1 - Esquema de síntese dos complexos.	19
FIGURA 4.1 - Espectro de infravermelho do 4-etil-3-tiossemicarbazida (EtTSC), bis-(difenilfosfina)butano (DPPB) e o complexo [Pd(DPPB)(4ET)]Cl ₂ (PdB3)..	35
FIGURA 4.2 - Espectro de RMN de ¹ H do composto PdP2 em MeOD.	36
FIGURA 4.3 - Espectro de RMN de ¹ H do composto PdB3 em MeOD.	36
FIGURA 4.4 - Mapa de contorno COSY ¹ H- ¹ H do composto PdB3.	37
FIGURA 4.5 - RMN de ³¹ P dos compostos, DPPP, DPPB, PdP2 e PdB1 em MeOD.....	38
FIGURA 4.6 - Espectro de RMN de ¹³ C do composto PdB3.	40
FIGURA 4.7 - Espectro de RMN DEPT-135 do composto PdB3.....	41
FIGURA 4.8 - Mapa de contorno HSQC ¹ H- ¹³ C do composto PdB3.....	41
FIGURA 4.9 - Análise de massas do composto PdB3.	43
FIGURA 4.10 - Elucidação da estrutura molecular dos compostos PdB1 e PdB3 por Difração de raios – X de monocristal. Elipsoides representadas com 50% de probabilidade.....	44

FIGURA 4.11 - Teste de estabilidade por UV-vis em DMSO dos compostos PdP2 e PdB2.	46
FIGURA 4.12 - Estabilidade do composto PdP2 em DMSO-D2O/DMEM no intervalo de 0 e 48 horas.....	47
FIGURA 4.13 - Estabilidade do composto PdB2 em DMSO-D2O/DMEM no intervalo de 0 e 48 horas.....	48
FIGURA 5.1 - Modos de interação Medicamento-DNA. Fonte: adaptado RAMOTOWSKA et al. (2021).....	49
FIGURA 5.2 - Titulação espectroscópica dos compostos PdP3 e PdB3 com o CT-DNA.....	50
FIGURA 5.3 - Ensaio de competitividade por fluorescência dos compostos PdP3 e PdB3 com Hoechst-33258-DNA em diferentes concentrações.....	51
FIGURA 5.4 - Ensaio de eletroforese dos compostos PdP3 e PdB3 com DNA-pUC19 em diferentes concentrações [] μ M. C- (DMSO) e C+ (cisPt 15 μ M).....	52
FIGURA 5.5 - A) ensaio de eletroforese com a TOP I β tratado com diferentes concentrações de PdB3 e PdP3. B) ensaio de eletroforese para a top II α tratado com diferentes concentrações de PdB3 e PdP3. C - = pBR322 + DMSO; C+ = pBR322 + TOPO I α ou II β	53
FIGURA 5.6 - Espectros da supressão de fluorescência da HSA pelo aumento da concentração do composto PdB3 em diferentes temperaturas (25, 30 e 35 °C).....	54
FIGURA 6.1 - A) imagens das colônias MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações do composto PdB3. B) distribuição do número de colônias (%) para cada concentração (verde - MRC-5), (amarelo – A2780cís) e (vermelho - MDA-MB-231). Valores de significância: *p = 0,01 **p = 0,004 ***p = 0,0003 e ****p < 0,0001.....	62
FIGURA 6.2 - Ensaio morfológico para o composto PdB3 na linhagem celular MRC-5. Obtido com microscópio CELENA® S com zoom de 10x.	63
FIGURA 6.3 Ensaio morfológico para o composto PdB3 na linhagem celular A2780cis. Obtido com microscópio CELENA® S com zoom de 10x.....	64
FIGURA 6.4 Ensaio morfológico para o composto PdB3 na linhagem celular MDA-MB-231. Obtido com microscópio CELENA® S com zoom de 10x.....	64
FIGURA 6.5 Ensaio morfológico para o composto PdB3 nas linhagens celulares MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento com as	

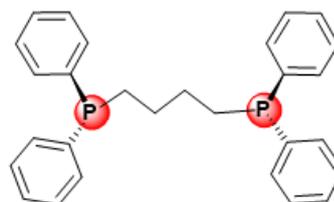
concentrações de Ctrl, 2,02 e 4,04 μ M. Obtido com microscópio CELENA® S com zoom de 10x.....	65
FIGURA 6.6 Ensaio morfológico para o composto PdB3 nas linhagens celulares MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231 marcado com PI. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom de 10x.....	67
FIGURA 6.7 - Ensaio morfológico por fluorescência. A) células A2780cís tratadas com PdB3 e marcadas com Green Plasma (verde) e DAPI (azul). B) células MDA-MB-231 tratadas com PdB3 e marcadas com Green Plasma (verde) e DAPI (azul). Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom de 20x.....	69
FIGURA 6.8 - Ensaio de fechamento de ferida do composto PdB3 nas linhagens celulares A2780cis e MDA-MB-231. Valores de significância: *p = 0,02, **p = 0,06 e *p = 0,0001. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom de 10x	71
FIGURA 6.9 - A) Micrografias das células MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231 tratadas com o composto PdB3 e marcadas com o Kit: LIVE/DEAD após 48 horas de tratamento (células verdes = células viáveis e células vermelhas = células mortas). B) Curva dose-resposta das células MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231 tratadas com o composto PdB3 por 48 horas. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom de 4x.....	73
FIGURA 6.10 - Representação das fases do ciclo celular de células eucarióticas. Fonte: adaptado de MATTHEWS <i>et al.</i> (2022).....	74
FIGURA 6.11 - A) Gráfico de distribuição da contagem de células para as fases do ciclo celular (sub-G1, G1, S e G2) tratadas com o composto PdB3. B) Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular em diferentes concentrações do composto PdB3. Nível de significância ***p = 0,0002 e ****p < 0,0001.	76
FIGURA 6.12 - A) Histograma da distribuição de morte celular tratada com diferentes concentrações do composto PdB3, Q1 - necrose, Q2 - células viáveis, Q3 - apoptose inicial e Q4 - apoptose tardia. B) Porcentagem de morte celular total (apoptose inicial + apoptose tardia). Nível de significância *p = 0,03 e **p = 0,002.	78
FIGURA 6.13 - A) Morfologia dos esferoides da célula A2780cis tratada com PdB3. B) Morfologia dos esferoides da célula A2780cis tratada com cisplatina. C) Diâmetro dos esferoides tratados com PdB3 e D) Diâmetro dos esferoides	

tratados com cisplatina. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom de 4x.....	80
FIGURA 6.14 - Marcação dos esferoides com PI e DAPI tratados com PdB3 e cisplatina após 10 dias.	83
FIGURA 6.15 - Marcação com PI e DAPI dos esferoides (A2780cis) com 3750 células por poço tratados com PdB3 por 48 horas.....	85
FIGURA 6.16 (A) Imagens confocal representativas (coloração dupla viva/morta, Kit Live/Dead) para triagem de efeito dose dependentes de esferoides MCF-7 e monocamada 2D tratada com cisplatina por 48h. (B)) Imagens confocal representativas (coloração dupla viva/morta, Kit Live/Dead) para triagem de efeito dose dependentes de esferoides MCF-7 e monocamada 2D tratada com paclitaxel por 48h. Scala de barra 200µm. Fonte: ZHAO <i>et al.</i> (2019).....	86

ESTRUTURAS MOLECULARES E MASSAS MOLECULARES



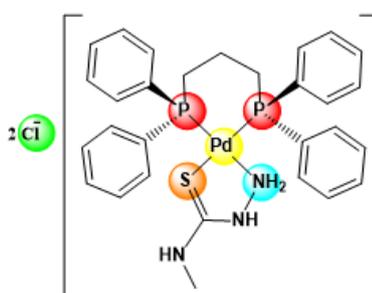
DPPP
 $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{P}_2$
 M.M: 412.44 g/mol



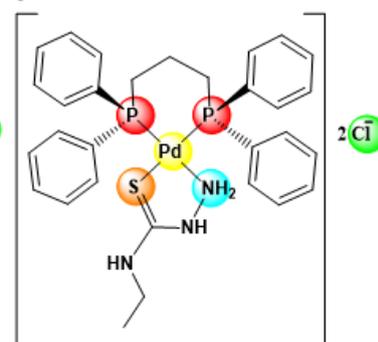
DPPB
 $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{P}_2$
 M.M: 426.47 g/mol



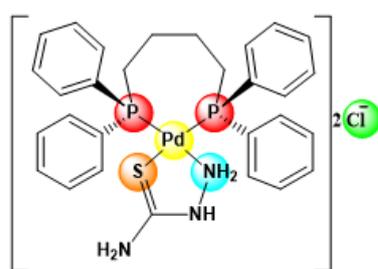
PdP1
 $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{P}_2\text{PdS}$
 M.M: 680.91 g/mol



PdP2
 $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{P}_2\text{PdS}$
 M.M: 694.93 g/mol



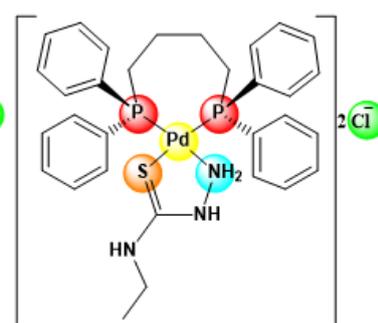
PdP3
 $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{P}_2\text{PdS}$
 M.M: 708.96 g/mol



PdB1
 $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{P}_2\text{PdS}$
 M.M: 694.93 g/mol



PdB2
 $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{P}_2\text{PdS}$
 M.M: 708.96 g/mol



PdB3
 $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{P}_2\text{PdS}$
 M.M: 722.99 g/mol

RESUMO

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTITUMORAIS *IN VITRO* EM MODELOS 2D E 3D DE COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE Pd(II) COM TIOSSEMICARBAZIDAS E BIS(DIFENILFOSFINA)ALCANOS. A crescente incidência do câncer enfatiza a necessidade urgente de desenvolver novas moléculas com potencial terapêutico. Nesse contexto, este estudo apresenta a síntese e caracterização de seis novos complexos de Pt(II) contendo derivados de tiossemicarbazidas e bis(difenilfosfinas). Os compostos foram analisados utilizando diversas técnicas, como RMN de ^1H e ^{31}P , espectrometria de massa de alta resolução, espectroscopia na região do infravermelho, UV-vis, condutividade molar e DRX de monocristal, quando disponível. Essas abordagens permitiram identificar uma estrutura molecular com geometria quadrática plana em torno do íon metálico, com os ligantes coordenando-se de forma bidentada. Adicionalmente, avaliações de lipofilicidade e estabilidade em diferentes soluções foram realizadas, assim como ensaios de interação com biomoléculas, incluindo DNA, topoisomerase e HSA, visando compreender o modo de ação dos compostos e sua capacidade de serem transportados pelo organismo. As propriedades antitumorais de todos os compostos foram avaliadas em várias linhagens celulares tumorais, abrangendo câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), câncer de ovário (A2780 e A2780cis), câncer de pulmão (A549), câncer de próstata (Du-145) e células não tumorais de pulmão (MRC-5). Entre os complexos estudados, o complexo PdB3 destacou-se, exibindo os melhores resultados contra as células tumorais de ovário e mama, com um valor de IC_{50} de aproximadamente $1\mu\text{M}$. Além disso, o composto PdB3 demonstrou capacidade de inibir a proliferação celular de forma dose-dependente no ensaio de formação de colônias. Os ensaios de morfologia celular, ciclo celular e citometria de fluxo indicaram que os compostos induzem a morte celular por apoptose. Para validar esses resultados em um contexto mais fisiologicamente relevante, foram realizados ensaios em culturas celulares 3D (esferoides). Os resultados revelaram o potencial citotóxico superior do composto PdB3 em comparação com a cisplatina na linhagem celular A2780cis, uma linhagem resistente à cisplatina. Esses resultados destacam a promissora capacidade

antitumoral de compostos estruturalmente simples, sugerindo que esse arcabouço molecular pode ser uma importante estratégia no desenvolvimento de agentes antitumorais.

ABSTRACT

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF *IN VITRO* ANTITUMOR PROPERTIES IN 2D AND 3D MODELS OF Pd(II) COORDINATION COMPOUNDS WITH THIOSEMICARBAZIDES AND BIS(DIPHENYLPHOSPHINE) ALKANES. The increasing incidence of cancer highlights the urgent need to develop new molecules with therapeutic potential. In this context, this study presents the synthesis and characterisation of six new Pt(II) complexes containing derivatives of thiosemicarbazides and bis(diphenylphosphines). The compounds were analysed using techniques such as ¹H and ³¹P NMR spectroscopy, high resolution mass spectrometry, infrared spectroscopy, UV-vis spectroscopy, molar conductivity and single crystal X-ray diffraction where available. These approaches allowed the identification of a molecular structure with a flat square geometry around the metal ion, with the ligands coordinating in a bidentate manner. In addition, lipophilicity and stability in different solutions were evaluated, as well as interaction assays with biomolecules, including DNA, topoisomerase and HSA, to understand the mode of action of the compounds and their ability to be transported by the organism. The antitumour properties of all the compounds were evaluated in various tumour cell lines, including breast (MCF-7 and MDA-MB-231), ovarian (A2780 and A2780cis), lung (A549) and prostate (Du-145) cancers and non-tumour lung cells (MRC-5). Among the complexes tested, the PdB3 complex showed the best results against ovarian and breast tumour cells, with an IC₅₀ value of approximately 1 μM. In addition, PdB3 showed the ability to inhibit cell proliferation in a dose-dependent manner in colony formation assays. Cell morphology, cell cycle and flow cytometry assays indicated that the compounds induced cell death by apoptosis. These promising results were further validated in a more physiologically relevant context with assays performed in 3D cell cultures (spheroids). The results demonstrated the superior cytotoxic potential of PdB3 compared to cisplatin in the cisplatin-resistant A2780cis cell line. This highlights the potential of the structurally simple compounds synthesised in this study and suggests that this molecular scaffold could be an important strategy in the development of effective anti-tumour agents.

SUMÁRIO

1. Revisão da literatura	1
1.1 Câncer.....	1
1.2 Desenvolvimento da quimioterapia e dos complexos de platina para o tratamento do câncer	2
1.3 Planejamento estrutural – A busca por novas moléculas antitumorais	7
1.3.1. Complexos de paládio: uma alternativa aos complexos de platina no desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos	7
1.3.2. Tiossemicarbazidas.....	8
1.3.3. Complexos com bisfosfinas.....	10
1.4 Proposta estrutural	12
1.5 Ensaio biológico em cultura celular 2D versus 3D.....	13
2. Objetivos	17
3. Materiais e métodos	18
3.1 Solventes e reagentes.....	18
3.2 Síntese	18
3.2.1. Síntese do percurso de paládio <i>cis</i> -[PdCl ₂ (CH ₃ CN) ₂]	18
3.2.2. Sínteses dos complexos	18
3.3 Técnicas de caracterizações	19
3.3.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	19
3.3.2. Ressonância magnética nuclear	19
3.3.3. Condutividade Molar	19
3.3.4. Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-visível	20
3.3.5. Espectrometria de massas de alta resolução por UHPLC-QToF-MS/MS	20
3.3.6. Difração de raios X.....	21
3.4 Ensaio com culturas de celulares	21

3.4.1. Linhagens celulares	21
3.4.2. Ensaio de viabilidade celular (IC ₅₀)	22
3.4.3. Lipofilicidade (Coeficiente de partição log P)	22
3.4.4. Ensaio de formação de colônias	23
3.4.5. Ensaio de Morfologia celular campo claro e PI	23
3.4.6. Ensaio de morfologia celular por fluorescência (Green plasma/DAPI)	24
3.4.7. Ensaio de Migração celular (“Wound healing”).....	24
3.4.8. Ensaio de viabilidade celular (LIVE/DEAD®)	25
3.4.9. Ciclo celular.....	25
3.4.10. Ensaio de morte celular (apoptose/necrose)	26
3.4.11. Ensaio de cultura celular 3D	27
3.5 Biomoléculas.....	28
3.5.1. Estudo de Interação com ct-DNA por titulação espectrofotométrica	28
3.5.2. Estudo de interação com DNA: deslocamento de Hoechst (ct-DNA)	29
3.5.3. Estudo de Interação com DNA: Eletroforese em Gel	29
3.5.4. Ensaio de inibição enzimática: DNA-Topoisomerase Iβ e IIα.....	30
3.5.5. Estudo de interação com HSA: supressão de fluorescência.....	31
3.6 Análise estatística	32
4. Caracterizações	33
4.1 Infravermelho	33
4.1.1. Espectroscopia por RMN	35
4.2 Espectrometria de massas.....	42
4.3 Análise de difração de raios X.....	44
4.4 Testes de estabilidade:	45
5. Ensaio com biomoléculas	49
5.1 Ensaio de interação com DNA	49

5.2 Ensaio de Interação com Topoisomerase I β e II α	52
5.3 Interação dos compostos com a Albumina de Soro Humano (HSA)	54
6. Ensaio celulares	57
6.1 Ensaio de viabilidade celular por MTT	57
6.2 Ensaio de formação de colônias	61
6.2.1. Ensaio morfológico (campo claro, PI e Green plasma/DAPI)	63
6.3 Migração celular	70
6.4 Viabilidade celular (Kit: LIVE/DEAD [®])	71
6.5 Ensaio de ciclo celular	74
6.6 Ensaio de morte celular (Apoptose/Necrose)	77
6.7 Análise morfológica em cultura celular 3D	79
7. Conclusões	87
8. Referências	89
9. Anexo	102

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Câncer

O câncer é um nome genérico para um grupo de doenças caracterizado pela proliferação celular descontrolada e pela desregulação do processo de morte celular. Em outras palavras, trata-se de células alteradas que se multiplicam sem controle e que se recusam a morrer, mesmo que isso leve à morte de seu hospedeiro. O acúmulo desorganizado dessas células é chamado de tumor e pode originar-se em qualquer parte do corpo. Durante a instalação do tumor, novos vasos sanguíneos são criados pelo processo de angiogênese, a fim de irrigar o tumor formado com nutrientes¹⁻³. Além do tumor crescer e comprimir órgãos próximos, as células cancerosas podem desprender-se do tumor original e migrar para outras partes do corpo por meio dos vasos sanguíneos e dos vasos linfáticos, gerando tumores secundários. Este processo é denominado metástase, sendo a forma mais agressiva e mortal da doença^{4,5}.

O processo de formação do câncer é denominado carcinogênese ou oncogênese. Esse processo ocorre de forma lenta e gradual, podendo levar anos até que seja possível realizar o diagnóstico da doença. Neste processo, as células normais sofrem ação dos agentes cancerígenos que promovem alterações em alguns de seus genes, gerando células mutadas. As células transformadas, ainda em contato com os agentes cancerígenos, dão origem às células malignas que se multiplicam de forma descontrolada e irreversível, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença⁶. Os agentes causadores da doença podem ser tanto fatores endógenos quanto exógenos. Além dos fatores genéticos hereditários, fatores externos ambientais podem contribuir para o surgimento de cânceres, como a obesidade, o consumo de tabaco, o consumo de bebidas alcoólicas, sedentarismo, a exposição excessiva ou sem proteção aos raios solares, entre outros. Sendo assim, grande parte dos casos de câncer poderia ser evitada com melhorias na qualidade de vida^{7,8}.

Segundo a Global Cancer Statistic 2020, estima-se que no ano de 2020 surgiram 19,3 milhões de novos casos de cânceres e 10 milhões de pessoas perderam a vida em decorrência da doença no mundo todo. O câncer de mama

é o tipo de câncer mais incidente no mundo (11.7%), seguido pelo câncer de pulmão (11,4%), câncer de colo retal (10,0%), próstata (7,3%) e estômago (5,6%)⁹. No Brasil, segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer), segue-se as mesmas tendências mundiais, estimando-se que para o triênio 2023 a 2025 ocorram 704 mil casos novos da doença, com 483 mil novos casos, excluindo os cânceres de pele não melanoma. Os mais incidentes são de mama, com 74 mil (10,5%), próstata, com 72 mil (10,2%), cólon e reto, com 46 mil (6,5%), pulmão, com 32 mil (4,6%), e estômago, com 21 mil (3,1%) casos novos¹⁰.

Para o tratamento do câncer, há uma grande variedade de métodos disponíveis, tais como a cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, transplante de medula óssea, hormonioterapia e terapia alvo. No entanto, as três primeiras são as mais utilizadas. A cirurgia consiste na remoção total do tumor ou de forma parcial, no modo paliativo, quando o objetivo é reduzir as quantidades de células tumorais que comprometam a qualidade de sobrevivência do paciente. A radioterapia é realizada utilizando radiação ionizante, destruindo as células tumorais ou impedindo que elas se multipliquem. E a quimioterapia consiste na utilização de medicamentos que podem ser ministrados tanto de forma oral quanto intravenosa, que se mistura à corrente sanguínea e é levado a todas as partes do corpo, destruindo e inibindo o crescimento e migração das células tumorais. O tratamento pode ser feito utilizando um único método ou a combinação de várias técnicas, dependendo de cada caso¹¹⁻¹⁶.

1.2 Desenvolvimento da quimioterapia e dos complexos de platina para o tratamento do câncer

O termo “quimioterapia” foi sugerido pelo ilustre químico alemão Paul Ehrlich, no início dos anos de 1900. Ele definiu a quimioterapia como o uso de produtos químicos para o tratamento de doenças. Paul começou a desenvolver medicamentos para o tratamento de doenças infecciosas e foi o primeiro a documentar a eficácia do uso de modelos animais na investigação de compostos químicos para o tratamento de doenças¹⁷.

O estudo de compostos químicos para o tratamento do câncer surgiu em 1942 com a investigação de compostos de mostardas nitrogenadas (O gás

mostarda foi utilizado na Primeira Guerra Mundial como arma química) por Louis Goodman e Alfred Gilman, ambos farmacologistas. Eles realizaram testes em camundongos com tumor linfóide transplantado que foram tratados com mostardas nitrogenadas e, ao observar uma regressão acentuada do tumor, Goodman e Gilman convenceram o cirurgião torácico Gustav Lindskog a tratar um paciente com linfoma não Hodgkin. Ao administrar o tratamento no paciente, o tumor entrou em remissão; no entanto, durou poucas semanas e o tumor voltou a progredir novamente. Embora o tratamento com mostarda nitrogenada não tenha sido bem-sucedido, ficou estabelecido que o uso sistemático de medicamentos poderia ser utilizado para a regressão de tumores^{17,18}.

A publicação dos resultados da mostarda nitrogenada no tratamento de linfomas ocasionou um amplo interesse em investigar moléculas para o tratamento de cânceres. Até o fim da década de 70, a investigação de novas moléculas para o tratamento do câncer era exclusivamente de moléculas orgânicas e de produtos naturais, tais como o metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, doxorubicina, extratos de planta pervinca e alcalóides da vinca. No entanto, com a descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina em 1968 e sua aprovação em 1978 para o tratamento do câncer de testículo pela FDA (Food and Drug Administration, EUA), similar à Anvisa no Brasil, introduziu-se uma nova abordagem no desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos, jogando luz no desenvolvimento de metalofármacos liderados pelos complexos de platina¹⁷⁻¹⁹.

As propriedades antitumorais da cisplatina foram descobertas por Rosenberg e colaboradores, quando observaram o efeito do campo elétrico no crescimento de bactérias com eletrodos de platina. Observou-se que a proliferação celular havia sido interrompida por sais de platina formados no meio, os quais foram posteriormente identificados como cis-diaminodichloroplatina(II) (cisplatina). A estrutura molecular da cisplatina é constituída por um átomo central de platina com o estado de oxidação +2 (Pt^{2+}), ligado a duas moléculas de amônia (NH_3) e a dois cloros na esfera de coordenação (Cl^-) com a isomeria cis, formando um complexo aduto (TABELA 1.1)²⁰⁻²².

A cisplatina apresenta um amplo espectro de ação contra neoplasias sólidas, como o câncer de ovário, mama, testículo, bexiga, colorretal, pulmão,

cabeça e pescoço. Embora tenha apresentado boa eficácia na remissão desses tumores, também foram observados efeitos colaterais graves devido à baixa especificidade da droga, atacando células normais de alta proliferação, causando toxicidade limitante da dose, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade e mielossupressão. Devido a esses efeitos colaterais, surgiu o desenvolvimento de novos complexos de platina de segunda geração, como a carboplatina, e de terceira geração, como a oxiplatina, que, devido à presença de ligantes quelantes no lugar dos cloros, apresentam uma taxa de troca com as moléculas de água mais lenta do que a cisplatina, o que permite que os efeitos colaterais sejam minimizados e possibilita aumentar a dosagem em cânceres mais agressivos²⁰⁻²².

O mecanismo de ação da carboplatina e da oxiplatina são similares ao da cisplatina. A cisplatina, ao entrar na corrente sanguínea e ao atingir a célula tumoral, é transportada para dentro da célula provavelmente por difusão passiva através da membrana plasmática ou por transporte ativo através de proteínas da membrana (proteínas transportadoras de cobre 1 (CTR1) ou proteínas transportadoras de cátions orgânicos (OCTs)). Após adentrar na célula, a cisplatina inicia o processo de ativação, onde ocorre a troca dos ligantes cloros por moléculas de água ou outras moléculas pequenas contendo grupos sulfidril. A substituição ocorre devido à diminuição na concentração de íons cloretos (Cl^-), que no meio extracelular é de aproximadamente 100 mM e, intracelularmente, a concentração é de 4-20 mM, transformando-a em aquocomplexo catiônico, como $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ e $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$. Devido aos ligantes quelantes, a carboplatina e a oxaliplatina são mais estáveis em água. Após a ativação, a platina se liga ao DNA pela base nitrogenada, preferencialmente pela posição N7 da guanina, formando ligações intra e intercadeias. Este dano ao DNA impede o ciclo celular, levando as células à morte controlada por apoptose (FIGURA 1.1)^{23,24}.

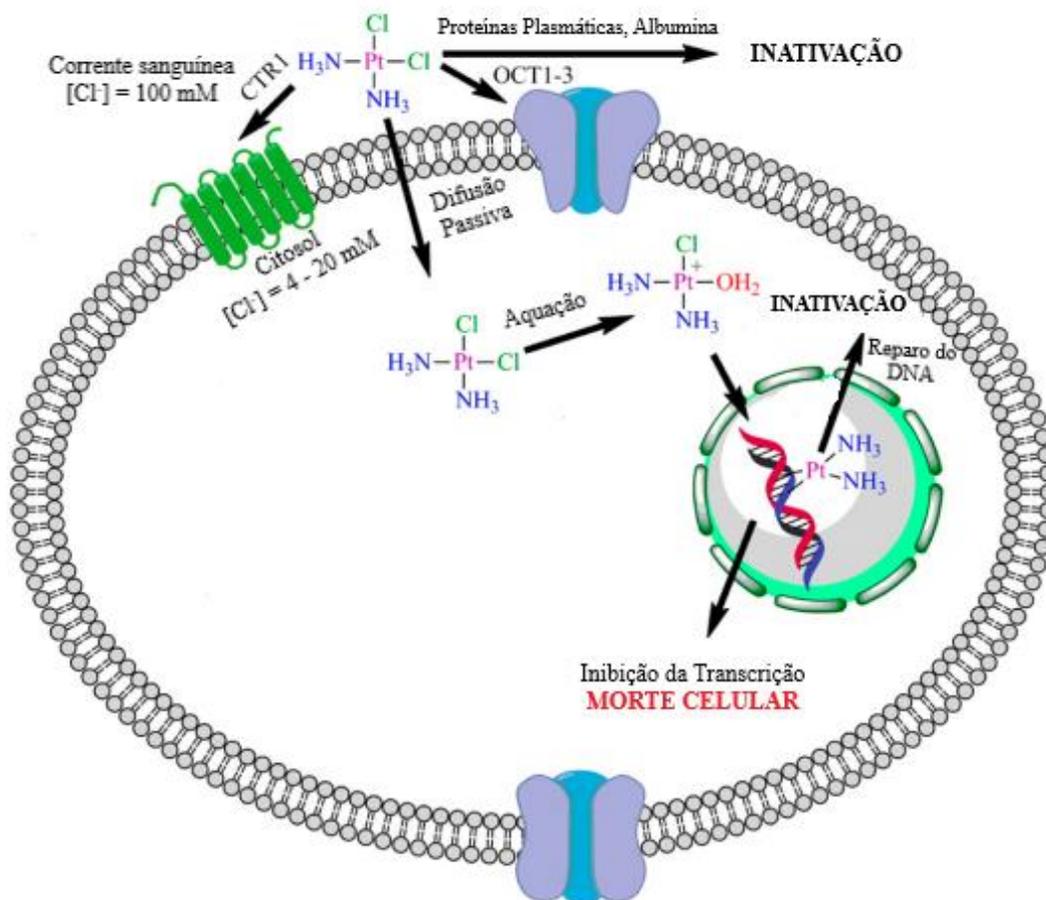
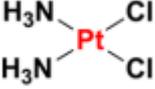
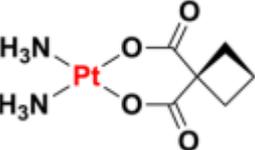
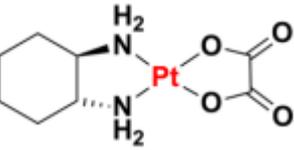
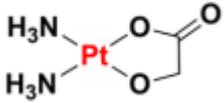
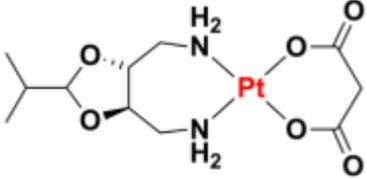
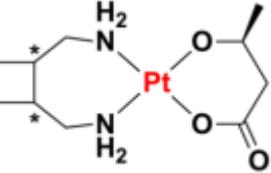


FIGURA 1.1 - Mecanismo de ação da cisplatina. Adaptado de JOHNSTONE *et al.* (2016)

Atualmente, apenas a cisplatina, carboplatina e oxiplatina são utilizadas no mundo todo, e outros três análogos de platina são utilizados de forma restrita em alguns países asiáticos, como o caso da nedaplatina, utilizada no Japão para o tratamento de câncer de cabeça, pescoço e esôfago. A Lobaplatina, aprovada na China para o tratamento de câncer de mama metastático, leucemia crônica e câncer de pulmão de pequenas células. E, a heptaplatina, utilizada na Coreia do Sul para o tratamento de câncer gástrico (TABELA 1.1)^{22,25}.

TABELA 1.1 – Medicamentos anticancerígenos à base de platina aprovados.

Nome genérico	Estrutura molecular	Aprovação concedida	Escopo da aprovação
Cisplatina		1978	Global
Carboplatina		1989	Global
Oxaliplatina		2002	Global
Nedaplatina		1995	Japão
Heptaplatina		1999	Coreia
Lobaplatina		2010	China

Embora os complexos de platina tenham alcançado êxito no tratamento de inúmeros cânceres e que aproximadamente metade dos tratamentos seja realizada com análogos de platina, os efeitos colaterais ainda são graves, e é necessária a constante investigação de novas moléculas, sejam elas orgânicas, de produtos naturais ou inorgânicas, na busca por novos agentes

quimioterápicos mais eficazes e que possam proporcionar melhor qualidade de vida ao paciente²⁶.

1.3 Planejamento estrutural – A busca por novas moléculas antitumorais

1.3.1. Complexos de paládio: uma alternativa aos complexos de platina no desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos

Devido aos danos colaterais provocados pelos complexos de platina no tratamento do câncer, outros centros metálicos têm se apresentado como promissores no desenvolvimento de medicamentos antitumorais. Entre eles, podemos destacar os íons de Au(I), Au(III), Ag(I), Ru(II), Ru(III), Rh(III), Cu(II), e Pd(II)^{27–29}. Em especial, os complexos de paládio têm ganhado bastante relevância por possuírem propriedades físico-químicas similares às da platina, como raio atômico próximo, comprimento de ligação, estado de oxidação mais comum (II) e (IV), complexos com geometria quadrado planar e complexos diamagnéticos^{30,31}.

No entanto, os compostos de Pd(II) são mais lábeis que seus análogos de Pt(II), sendo 10^4 a 10^5 vezes mais rápidos, fazendo com que sua estrutura seja alterada em fluidos biológicos e causando a inativação do composto antes de atingir seu alvo farmacológico. Com isso, a escolha dos ligantes na preparação dos compostos de Pd(II) é de grande relevância, interferindo em sua reatividade e lipofilicidade. Estudos demonstram que ligantes quelantes com átomos de N,N, bisfosfinas e N,S, além de fornecerem estabilidade aos complexos, apresentam atividades antitumorais promissoras para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos^{32–34}.

JAHROMI *et al.* (2016) e CZARNOMYSY *et al.* (2021) trazem uma revisão da literatura rica sobre uma gama de complexos de paládio promissores no tratamento do câncer. No ano de 2017, a Agência Europeia de Medicamentos (European Medicines Agency) aprovou o primeiro medicamento à base de Pd(II) a ser usado na Europa para o tratamento de tumor. O medicamento, nomeado comercialmente de Tookad[®] (padeliporfin), está sendo usado no tratamento de câncer de próstata na terapia fotodinâmica direcionada vascularizada (FIGURA

1.8). Este complexo marca um marco no desenvolvimento de complexo de paládio na medicina^{35,36}.

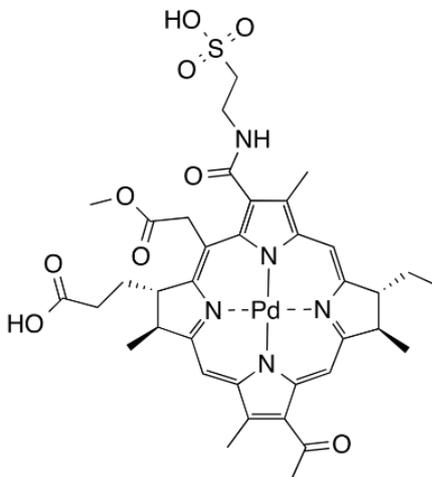


FIGURA 1.2 - Estrutura molecular do Tookad®. HANDOKO *et al* (2015).

A busca por novos agentes quimioterápicos com maior eficácia no tratamento do câncer deve ser constante, e os complexos de paládio, juntamente com os demais metais de transição, demonstram-se como uma opção promissora para este desafio³⁷.

1.3.2. Tiossemicarbazidas

As tiossemicarbazidas ($\text{NH}_2\text{-NH-CS-NH}_2$) são moléculas derivadas da hidrazina mais simples do ácido tiocarbamida (FIGURA 1.2). Suas propriedades químicas são similares às das semicarbazidas. Porém, apresentam uma versatilidade química maior em função do grupo tiona em comparação com o grupo ceto. Os derivados de tiossemicarbazida se destacam nas aplicações sintéticas, analíticas e pela ação biológica³⁸⁻⁴⁰.

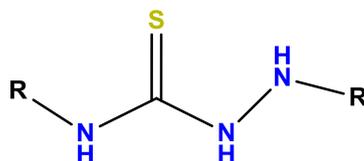


FIGURA 1.3 - Estrutura base das tiossemicarbazidas

Dentre as propriedades biológicas dos derivados das tiossemicarbazidas, podemos destacar suas atividades bactericidas, fungicidas, anti-inflamatória, antituberculosa, antioxidante, antiviral, anticonvulsiva e

antitumoral^{38,40-42}. Além disso, as tiossemicarbazidas atuam como agente quelante, ligando-se a diferentes centros metálicos, principalmente pelo N e S de modo bidentado. A coordenação com íons metálicos, além de fornecer uma rica variação estrutural, pode aumentar suas propriedades medicinais^{38,40}.

GENGET *et al.* (2018) sintetizaram derivados de [1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidina e investigaram o potencial citotóxico nas células tumorais MGC-803 (células de câncer gástrico humano), NCI-H1650 (câncer de pulmão de células não pequenas humano) e PC-3 (células de câncer de próstata humano). Dentre os compostos sintetizados, o N-benzil-2-(3-benzil-5-(benziltio)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7-il)hidrazina-1-carbotioamida apresentou uma boa atividade citotóxica na célula tumoral MGC-803 com $IC_{50} = 2,37 \mu M$, além de apresentar menor toxicidade para a célula não tumoral GES-1 (linha celular epitelial gástrica humana normal) com $IC_{50} = 27,34 \mu M$ (FIGURA 1.3 (A)).

Derivados de tiossemicarbazidas híbrido com benzofurano foram relatados por ABDELHAFEZ *et al.* (2019), e sua capacidade antiproliferativa foi avaliada nas células tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-231, o composto B presente na FIGURA-1.3, apresentou um dos melhores resultados frente a célula tumoral MCF-7 com valor de $IC_{50} = 2,43 \mu M$ superior ao fármaco comercial lapatinibe com $IC_{50} = 4,69 \mu M$. ELSEGINY *et al* (2015), também relataram híbridos de tiossemicarbazidas que apresentaram excelentes resultados contra células tumorais de mama, segundo os pesquisadores o composto C (Figura-1.3) apresentou valores de $IC_{50} = 0,01 \mu M$ contra a linhagem celular SKBR3 e valor de $IC_{50} = 0,055 \mu M$ frente a células BT-474

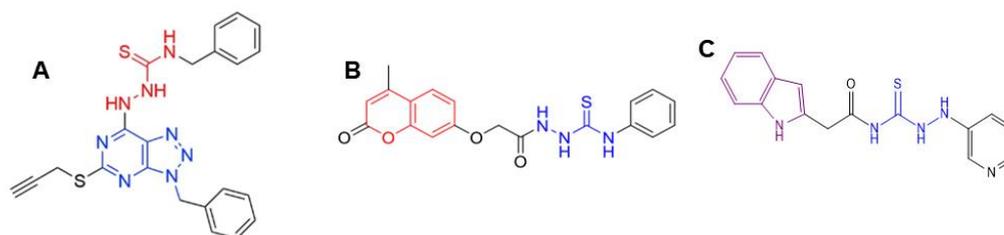


FIGURA 1.4 - Derivados de tiossemicarbazidas com propriedades antitumorais. A) $IC_{50} = 2,37 \mu M$ para a linhagem celular MGC-803. B) $IC_{50} = 2,43 \mu M$ para a linhagem celular MCF-7. C) $IC_{50} = 0,01 \mu M$ para a linhagem celular SKBR3 e $IC_{50} = 0,055 \mu M$ para a linhagem celular.

ROCHA *et al.* (2016) relataram a atividade antitumoral dos complexos de Pd(II) com 4-metil-3-tiossemicarbazida, trifenilfosfina e grupos abandonadores X (X= Cl⁻, Br⁻, I⁻, SCN⁻) nas linhagens tumorais LM3 (tumoral da glândula mamária de camundongos), LP07 (tumoral de pulmão de camundongo) e MCF-7 (tumoral de mama humana) (FIGURA 1.4). Todos os compostos sintetizados apresentaram propriedades antitumorais com valores de IC₅₀ variando entre 3,22 ± 0,84 e 10,63 ± 0,40 μM nas linhagens celulares testadas. Todos os compostos foram mais ativos que a cisplatina nas células tumorais LM3 e MCF-7. Já para a célula LP07, os compostos apresentaram valores de IC₅₀ próximos aos da cisplatina.

Estes estudos demonstram a importância dos derivados de tiossemicarbazidas na investigação de novos agentes quimioterápicos contra o câncer, seja na forma de moléculas orgânicas ou como compostos de coordenação.

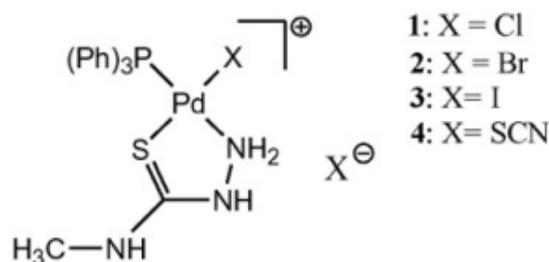


FIGURA 1.5 - Complexo de Paládio (II) com 4-metil-3-tiossemicarbazida, trifenilfosfina mais grupos abandonadores. Adaptado de ROCHA *et al.* (2016).

1.3.3. Complexos com bisfosfinas

O uso das bisfosfinas em investigações biológicas está diretamente relacionado com sua capacidade de quelar íons metálicos, principalmente por estabilizar complexos de ouro, originando a classe das aurofinas que no início da década de 80 demonstrou sua eficácia contra diversos tumores transplantados em camundongos, apresentando um potencial citotóxico 5 a 10 vezes maior em comparação com as bisfosfinas livres⁴⁷.

Após o relato da atividade antitumoral do complexo $[(AuCl_2)_2(DPPE)]$ frente à célula tumoral de leucemia P388, inúmeros complexos de ouro e demais centros metálicos foram sintetizados com derivados bisfosfínicos e investigadas suas propriedades antitumorais^{48,49}.

LIU *et al.* (2008) sintetizaram uma série de complexos de ouro e prata com derivados bisfosfínicos baseados na estrutura do complexo $[Au(DPPE)]Cl_2$. Neste estudo, os autores demonstraram que os complexos sintetizados tiveram valores de IC_{50} excelentes frente a células tumorais resistentes à cisplatina, com valores de IC_{50} inferiores a 1 μM , além de demonstrar o efeito da lipofilicidade e citotoxicidade em função da estrutura-atividade (FIGURA 1.5).

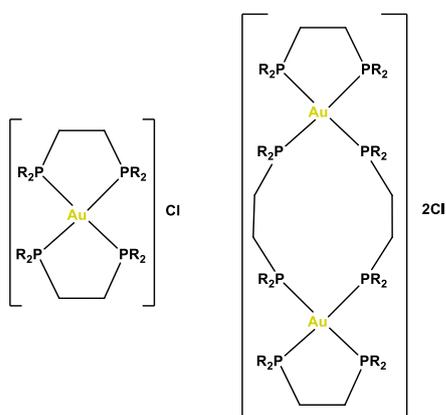


FIGURA 1.6 - Estruturas-base dos complexos de Au e bisfosfinas relatados por LIU *et al.* (2008).

ICSEL *et al.* (2019) sintetizaram e investigaram a ação citotóxica dos complexos de Pd(II) e Pt(II) com sacarina (sac) e as bisfosfinas DPPM (bis(difenilfosfina)metano) e DPPE (bis(difenilfosfina)etanol) nas células A549 (tumoral de pulmão), MCF-7 (tumoral de mama), HCT116 (tumoral do colo) e BEAS-2B (não tumoral epitelial do brônquio). Entre os complexos, os compostos $[M(DPPM)_2]sac$ apresentaram os melhores resultados citotóxicos frente às células tumorais com valores de IC_{50} entre 2,1 e 8,1 μM , demonstrando citotoxicidade superior em comparação com a cisplatina, além de demonstrar uma preferência pela célula tumoral de mama MCF-7 (FIGURA 1.6).

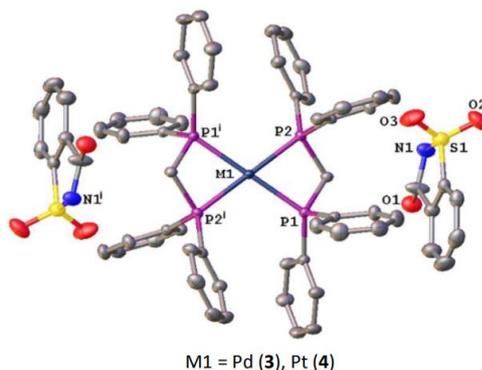


FIGURA 1.7 - Estrutura molecular do complexo [M(DPPM)₂]sac elucidada por ICSEL *et al.* (2019).

Os complexos com derivados bisfosfínicos têm se demonstrado cada vez mais relevantes na investigação e desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos, principalmente frente às linhagens tumorais resistentes à cisplatina.

1.4 Proposta estrutural

Para esta pesquisa, a síntese dos complexos foi planejada para obter complexos com geometria quadrática plana, utilizando os ligantes bisfosfínicos (DPPP e DPPE) e tiossemicarbazidas (TSC, MetTSC e EtTSC), coordenados de forma bidentada com o paládio no estado de oxidação 2+. Os ligantes bisfosfínicos contribuem para a estabilidade do complexo ao coordenar de forma quelante, doando densidade eletrônica σ e recebendo densidade eletrônica π do metal, além de fornecer propriedades lipofílicas que podem facilitar o transporte para o interior das células. As tiossemicarbazidas também contribuem para a estabilidade dos complexos ao se coordenarem de modo bidentado pelo nitrogênio e enxofre, e suas propriedades biológicas podem ser potencializadas na formação dos complexos. O paládio favorece a geometria quadrática plana e, no estado de oxidação 2+, pode melhorar a solubilidade em meio aquoso e auxiliar no transporte celular. A FIGURA 1.8 demonstra a proposta estrutural dos

complexos e suas contribuições esperadas para cada parte da molécula

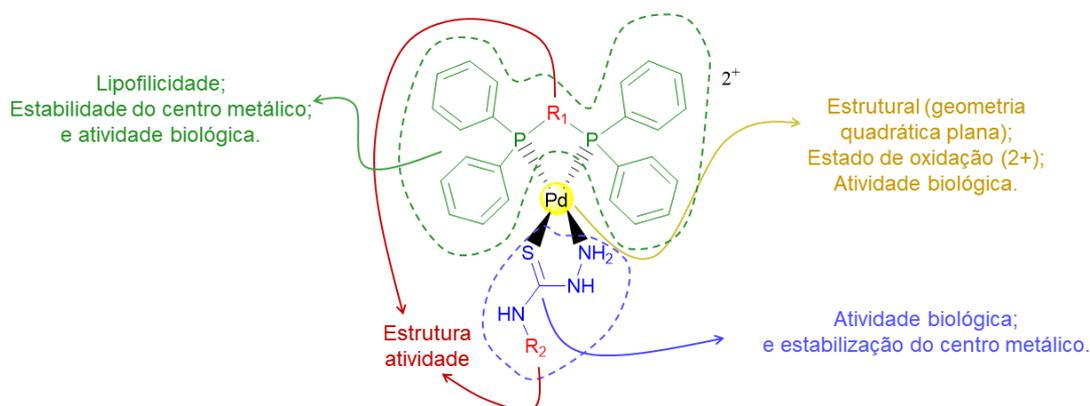


FIGURA 1.8 - Proposta estrutural dos complexos.

1.5 Ensaios biológicos em cultura celular 2D versus 3D

O desenvolvimento e aprimoramento de novas técnicas de ensaios biológicos são tão cruciais quanto a criação de compostos biologicamente ativos. Por meio de ensaios mais refinados, podemos obter insights mais profundos sobre como essas substâncias interagem com sistemas biológicos, identificando alvos específicos e possíveis efeitos colaterais.

A cultura celular tradicional em monocamada, também chamada de 2D, foi desenvolvida inicialmente por Harrison em 1907, a partir do estudo da origem de fibras nervosas. Neste estudo, Harrison observou o desenvolvimento e diferenciação de células nervosas da medula espinhal de girinos cultivadas em coágulo linfático em uma lamínula estéril, selada e mantida em uma estufa úmida⁵².

Melhorias substanciais foram feitas ao método de cultivo celular em monocamada. As células no modelo 2D são cultivadas em placas ou em garrafas com superfícies planas nas quais as células aderem à superfície e se multiplicam, formando uma monocamada sobre a superfície plástica. As células são cultivadas em meio de cultura específico, geralmente suplementado com FBS (soro bovino fetal) e L-glutamina, que auxilia no crescimento celular^{52,53}.

O método de cultura celular 2D nos forneceu inúmeras contribuições a respeito do funcionamento celular e na descoberta de medicamentos. No

entanto, este modelo apresenta sérias limitações, como alterações de metabolismo, morfologia, interação célula-célula e célula-matriz, em comparação com as condições presentes nos órgãos originais⁵²⁻⁵⁴.

Uma alternativa tem sido desenvolvida nas últimas décadas, o cultivo de células em modelos 3D, o qual possui arquitetura e processos fisiológicos similares ao tecido real. Este modelo vem para preencher o espaço entre a cultura celular bidimensional e o modelo *in vivo*, sendo o modelo *in vivo* o melhor método de estudo, embora também haja limitações ao comparar com a fisiologia humana e por motivos éticos^{52,54}.

A cultura celular 3D oferece vantagens que não são observadas no modelo 2D, aproximando-se do modelo *in vivo*, sendo de grande relevância na investigação das funções fisiológicas do tumor e na descoberta de medicamentos antitumorais. A estrutura tridimensional das células tumorais regula uma série de propriedades relevantes da doença, tais como pH alterado, hipóxia, taxa de proliferação diferenciada com as células externas altamente proliferativas devido ao acesso fácil a nutrientes e as células internas no estado de quiescência ou morte celular (células apoptóticas e necróticas) devido à escassez de nutrientes, além de resistência a medicamentos e regulação da expressão de genes e proteínas⁵²⁻⁵⁶. A TABELA 1.2 traz as principais vantagens e desvantagens da cultura celular 2D e 3D.

TABELA 1.2 - Vantagens e desvantagens dos modelos de cultivo celular 2D e 3D.

Modelo	Vantagens	Desvantagens
2D	Manutenção simples e de baixo custo.	Polarização parcial Poucas interações célula-célula e célula-matriz.
	Útil para triagem de drogas e padrões de expressão genética.	As células aderem apenas a uma superfície e migram em uma direção. Não reproduzem a complexidade celular e a rede microambiente do tumor.
3D	Reprodução da arquitetura tridimensional.	Mais caro que a cultura celular 2D.
	Maior interação célula-célula e célula-matriz. Diferentes migrações celulares no espaço. Relevante para estudo de mecanismo de resistência a medicamentos.	Modelo de cultura mais complexo.

SOUZA *et al.* (2018) realizaram uma avaliação comparativa do modelo 2D versus 3D nas células tumorais de próstata (PC-3, LNCaP e DU-145). Neste estudo, foram avaliadas a resistência ao medicamento usando paclitaxel e docetaxel, taxa de proliferação celular e o perfil de expressão genética. Os autores constataram que as células tumorais de próstata apresentaram uma maior taxa de proliferação no modelo 2D e uma maior resistência aos medicamentos no modelo 3D. Enquanto nos ensaios de expressão gênica, apresentaram diferenças entre os modelos. Na cultura 3D, as linhagens celulares PC-3 e LNCaP apresentaram os genes ANXA1 e CD44 regulados

positivamente e os genes ABCG2, OCT4 e SOX2 regulados negativamente, enquanto para a linhagem tumoral DU-145 foi o oposto para esses genes, os quais podem estar diretamente relacionados com a resistência ao tratamento quimioterápico e a agressividade do tumor, assemelhando-se ao tumor real.

Outros estudos comparativos entre os dois modelos têm corroborado as observações feitas por Souza e colaboradores, destacando a relevância da utilização de esteroides na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos antitumorais.⁵⁸⁻⁶²

2. OBJETIVOS

Nosso objetivo neste projeto foi criar moléculas estruturalmente simples, utilizando como base complexos de Pd(II) derivados de tiossemicarbazidas e bis(difenilfosfina)alcano e avaliar a relação estrutura atividade em linhagens tumorais de mama, próstata, ovário e pulmão. Além disso, explorar a diferença de resposta em modelos celulares tumorais, comparando o ambiente bidimensional (2D) com o tridimensional (3D). Esta abordagem pode revelar informações valiosas sobre a eficácia dessas novas moléculas em células tumorais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Solventes e reagentes

Todos os solventes e reagentes foram utilizados conforme fornecidos pelo fabricante, TABELA A1 no ANEXO.

3.2 Síntese

3.2.1. Síntese do percurso de paládio *cis*-[PdCl₂(CH₃CN)₂]

A síntese do percurso de paládio foi realizada conforme descrito na literatura⁶³. 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. Sínteses dos complexos

Em um balão de fundo redondo de 25 ml, o precursor de paládio *cis*-[PdCl₂(CH₃CN)₂] (0,20 mmol) foi solubilizado em 22 ml de CHCl₃/MetOH (10:1). Em seguida, adicionou-se tiossemicarbazida (0,20 mmol) à mistura e manteve-se sob agitação magnética por 2 horas. Após isso, adicionou-se bis-(difenilfosfina)alcano (0,20 mmol) e agitou-se por mais 2 horas, obtendo-se uma solução amarela. Posteriormente, a solução reacional foi filtrada por gravidade e rotaevaporada até aproximadamente 2 mL. Adicionou-se éter dietílico ou n-hexano (15 mL) para precipitar o produto, filtrado sob sucção a vácuo e secado no dessecador. Os compostos puderam ser purificados em metanol a frio para remover os precursores. O rendimento foi de 70-90%.

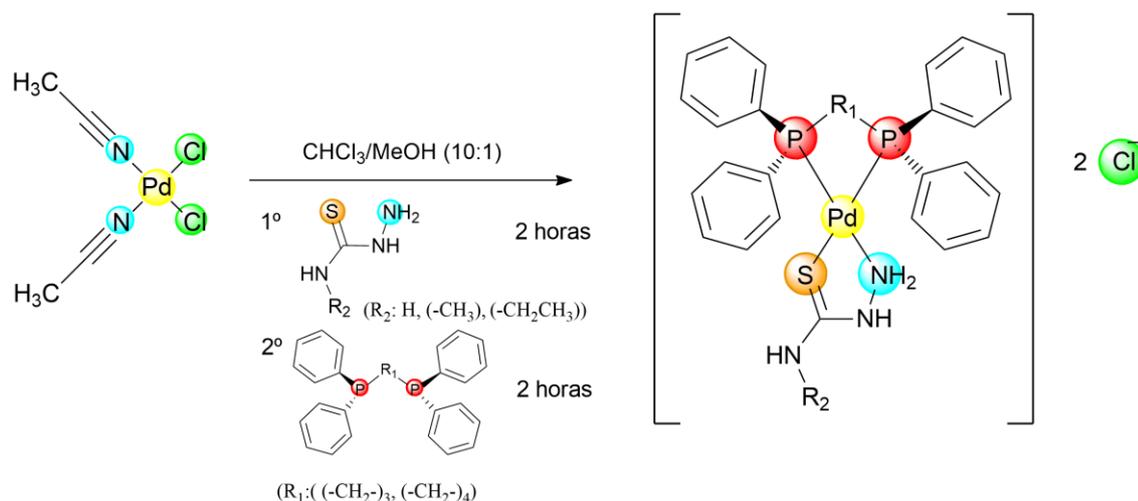


FIGURA 3.1 - Esquema de síntese dos complexos.

3.3 Técnicas de caracterizações

3.3.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos por meio do espectrômetro SHIMADZU IRTracer-100, na região de 4000-220 cm^{-1} com 64 varreduras, utilizando-se pastilhas de Csl na proporção de 100:1 (m/m). O sal de Csl foi mantido previamente na estufa a 120 °C. Os espectros foram analisados utilizando o software Origin 8.5.

3.3.2. Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de ^1H (400 MHz), $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (100 MHz) e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (162 MHz), COSY, HSQC e DEPT 135 foram registrados a partir do equipamento BRUKER 9.4 T, modelo AVANCE III, situado no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. Para obtenção dos espectros, utilizou-se o solvente MeDO (metanol deuterado) e CDCl_3 (clorofórmio deuterado), enquanto para os ensaios de estabilidade $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ usou-se DMSO, 10% de DMEM e capilar D_2O como referência externa.

3.3.3. Condutividade Molar

As medidas de condutividade molar foram realizadas em um condutímetro Meter Lab., modelo CDM230 situado no Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos (LERCI). As mesmas foram feitas a

partir de soluções dos compostos em DMSO na concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e registradas no intervalo de tempo de 0, 24 e 48 horas.

3.3.4. Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-visível

Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram obtidos em espectrofotômetro SHIMADZU UV-1650PC, utilizando soluções dos compostos em metanol, clorofórmio ou DMSO na concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. No ensaio de estabilidade em DMSO, foram registrados no intervalo de tempo de 0, 24 e 48 horas. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm e a região de varredura correspondia à faixa entre 700 a 200 nm. Os softwares utilizados para a obtenção e interpretação dos espectros foram o UVProbe 2.21 e Origin 8.5.

3.3.5. Espectrometria de massas de alta resolução por UHPLC-QToF-MS/MS

A análise de massa de alta resolução foi realizada pelo doutorando Carlos André F. Moraes do laboratório de Produtos Naturais da UFSCar. A amostra foi solubilizada em MeOH (grau LC-MS), posteriormente diluída para a concentração de 5 ppm. Para esta análise, foi realizada uma infusão direta, utilizando como fase móvel Água (solvente A, 0,1 % de ácido fórmico) e Metanol (solvente C com 0,1 % de ácido fórmico), no modo isocrático e na proporção de 05:95 v/v respectivamente. A vazão da fase móvel foi de $0.300 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e o volume de injeção foi de $3 \mu\text{L}$.

As análises qualitativas das amostras foram realizadas usando um sistema Agilent 6545 qTOF MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) equipado com uma interface eletrospray (ESI) de Jet no modo positivo, sendo empregados os seguintes parâmetros para a ionização descritos na TABELA 3.1.

TABELA 3.1 - Parâmetros para ionização dos compostos

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)	10 e 35
para o MS/MS	
OctopoleRFPeak	750

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

3.3.6. Difração de raios X

Os cristais adequados para análise por Difração de Raios X de monocristal foram medidos pelo Dr. Pedro Henrique de Oliveira Santiago do Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. Os dados foram coletados usando um difratômetro XtaLAB Synergy, Dualflex, HyPix. Os cristais foram mantidos a uma T constante = 100,00(13) K durante a coleta de dados. A estrutura foi resolvida com o programa de solução de estrutura ShelXT (Sheldrick, 2015) usando o método de solução Intrinsic Phasing e usando Olex2 (Dolomanov et al., 2009) como interface gráfica. O modelo foi refinado com a versão 2019/2 do ShelXL 2019/2 (Sheldrick, 2015) usando minimização de mínimos quadrados.

3.4 Ensaios com culturas de celulares

3.4.1. Linhagens celulares

Para os ensaios biológicos foram utilizadas as linhagens tumorais humanas de mama triplo-negativo MDA-MB-231 (ATCC. HTB-26), tumoral de mama MCF-7 (ATCC N. HTB-22), tumoral de pulmão A549 (ATCC N. CCL-185), tumoral de próstata DU-145 (ATCC N. HTB-81), tumoral de ovário A2780 (ECACC No. 93112519), tumoral de ovário resistente a cisplatina A2780cis (ECACC No. 93112517) e a linhagem não tumoral de pulmão MRC-5 (ATCC N. CCL-171). As linhagens MDA-MB-231, A549, DU-145 e MRC-5 foram cultivadas

em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Vitrocell), suplementado com 10% de FBS, e as células MCF-7, A2780 e A2780cis foram cultivadas em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute; Vitrocell), também contendo 10% de soro fetal bovino. As células foram cultivadas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ à temperatura de 37 °C.

3.4.2. Ensaio de viabilidade celular (IC₅₀)

Os ensaios de IC₅₀ foram realizados por meio do método colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Este método consiste na redução do sal de MTT de coloração amarela em cristais roxos de Formazan, através da ação de enzimas presentes em células viáveis. O número de células viáveis é proporcional ao número de cristais formados, permitindo sua quantificação.

Para a realização dos ensaios de viabilidade celular, as células foram semeadas em placas de 96 poços, com uma densidade celular de $1,5 \times 10^4$ células/poço, em 150 µL de meio suplementado. Após 24 horas de incubação (5% de CO₂ a 37 °C), as células foram tratadas com 0,75 µL das soluções estoque dos compostos em DMSO e em diferentes concentrações (0,8 µM, 1,6 µM, 6,3 µM, 12,5 µM, 25 µM, 50 µM e 100 µM). As placas foram novamente mantidas na incubadora (5% de CO₂ a 37 °C) por 48 horas. Posteriormente, adicionaram-se 50 µL de uma solução de MTT (1 mg/mL) em cada poço, a qual foi mantida em incubação por 4 horas. Após este período, a solução de cada poço foi cuidadosamente removida e adicionaram-se 100 µL de isopropanol por poço, a fim de solubilizar os cristais de formazan formados. A absorbância foi determinada no comprimento de onda de 540 nm com o auxílio do leitor de microplacas Epoch e os valores de IC₅₀ foram determinados utilizando-se o software GraphPad Prism 8.0.2.

3.4.3. Lipofilicidade (Coeficiente de partição log P)

Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de $1,0 \times 10^{-3}$ M dos complexos em DMSO e adicionou-se em 5 mL de n-octanol, ficando com a concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ M. Posteriormente, pegaram-se 750 µL das soluções dos complexos em n-octanol e misturaram-se com 750 µL de água Milli-Q®. Todas as soluções de mistura foram feitas em triplicata, elas foram incubadas por 24 horas a 37 °C sob agitação a 1000 rpm, utilizando o Termo-Shaker

Agmaxx modelo AG100. Após a incubação, analisaram-se as absorvâncias médias utilizando um espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu UV-1650PC. Os valores das concentrações dos complexos em n-octanol e água foram determinados a partir da curva padrão previamente obtida das soluções estoque no referido solvente orgânico. A medida de lipofilicidade adotada é o log P, que é a razão entre a concentração do composto em n-octanol pela concentração em água, dada pela equação 1.

$$\log P = \log \frac{[nOc]}{[nH2O]} \text{ onde } n = n^\circ \text{ de mol}$$

Equação (1)

3.4.4. Ensaio de formação de colônias

O ensaio de formação de colônias foi realizado para 3 linhagens celulares: A2780cis, MDA-MB-231 e MRC-5. As células foram semeadas em placas de 6 poços com uma densidade celular de 1000 células/poço em 2 mL de meio de cultura suplementado com 10% FBS e mantidas em estufa a 37 °C a 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos complexos (PdP3 = 0,43 µM, 0,85 µM, 1,7 µM, 3,4 µM, 6,8 µM; PdB3 = 0,25 µM, 0,51 µM, 1,01 µM, 2,02 µM, 4,04 µM) e incubadas por 48 horas. No controle, foi adicionado apenas DMSO (0,5%) nas mesmas condições. Após esse período, o meio foi substituído por um meio fresco, sem qualquer complexo, e as placas foram incubadas por 10 dias. As células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e ácido acético (3:1) por 5 min, e coradas com 5% de cristal violeta por 30 min. O número de colônias formadas foi analisado usando o software ImageJ.

3.4.5. Ensaio de Morfologia celular campo claro e PI

A avaliação das alterações morfológicas foi realizada para os dois compostos mais ativos, PdP3 e PdB3, nas células MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231. As células foram semeadas em placas de 24 poços com uma densidade celular de 6 x 10⁴ célula/poço em 1 mL de meio de cultura suplementado com 10% FBS e incubadas a 37 °C a 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período, as

células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos (PdP3 = 0,85 μ M, 1,7 μ M, 3,4 μ M, 6,8 μ M; PdB3 = 0,51 μ M, 1,01 μ M, 2,02 μ M, 4,04 μ M) e micrografias foram registradas em diferentes períodos (0, 24 e 48 horas) com o microscópio inverso (CELENA[®] S Logos Biosystems). Após 48 horas de tratamento, as células foram marcadas com PI (iodeto de propídeo) para observar morte celular. Foram adicionados 200 μ L de PI (300nM) em cada poço e incubou-se por 10 minutos; em seguida, as micrografias de fluorescência foram registradas no microscópio de fluorescência (CELENA[®] S Logos Biosystems).

3.4.6. Ensaio de morfologia celular por fluorescência (Green plasma/DAPI)

A análise morfológica por fluorescência com Green plasma e DAPI foi realizada apenas para o composto mais ativo, PdB3, nas células A2780cis e MDA-MB-231. As células foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade celular de 10^4 células/poço em 150 μ L de meio de cultura suplementado com 10% de FBS, e incubadas por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Após isso, as células foram tratadas com diferentes concentrações do composto (2,02 μ M e 4,04 μ M) e o controle com 0,5% de DMSO, e incubadas por 48 horas. Em seguida, o meio foi cuidadosamente removido e as células foram fixadas com metanol (50 μ L) por 5 minutos, o metanol foi removido e foram adicionados 50 μ L da solução CellMask Green plasma membrane (solução de trabalho 1x) e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente (20 a 25 °C). A seguir, o marcador foi removido e as células foram lavadas 2x com PBS (50 μ L) cuidadosamente. Após lavar com PBS, foram adicionados 50 μ L de DAPI (300 nM) e incubadas à temperatura ambiente por mais 10 minutos. As células foram lavadas novamente com PBS 2x e as imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência (CELENA[®] S Logos Biosystems) com os filtros adequados.

3.4.7. Ensaio de Migração celular (“Wound healing”)

O ensaio de fechamento de ferida “wound healing” foi realizado para as linhagens celulares A2780cis e MDA-MB-231 e tratadas com o composto PdB3. Em placas de 6 poços, foram semeadas 2×10^5 células/poço, em seguida, foram incubadas em estufa por 24 horas ou até atingir uma confluência celular próxima de 100%. Com o auxílio de uma ponteira de 10 μ L, foi realizada uma risca na monocamada de células aderidas aos poços. O meio de cultura foi removido, os poços foram lavados cuidadosamente com PBS e um novo meio contendo o

complexo em diferentes concentrações (0,51 μM , 1,01 μM , 2,02 μM) foi adicionado. As imagens foram registradas nos tempos de 0, 24 e 48 horas utilizando microscópio invertido (CELENA[®] S Logos Biosystems). A área de inibição da migração celular foi analisada no software ImageJ, e a porcentagem de fechamento da risca foi calculada utilizando a equação abaixo:

$$\% \text{ Fechamento da risca} = [(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h}) / (A_{t=0h})] \times 100$$

Equação (2)

onde, $A_{t=0h}$: medida da área riscada no tempo de 0 h e $A_{t=\Delta h}$: medida da área riscada no tempo de 24 e 48 h.

3.4.8. Ensaio de viabilidade celular (LIVE/DEAD[®])

As células A2780cis, MDA-MB-231 e MRC-5 foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade celular de 10^4 células/poço em 150 μL de meio de cultura suplementado com 10% de FBS, e incubadas por 24 horas a 37 °C e 5% de CO_2 . Após isso, as células foram tratadas com diferentes concentrações do composto PdB3 (1,01 μM , 2,02 μM , 4,04 μM e 8,08 μM) e o controle com 0,5% de DMSO, e foram incubadas novamente por 48 horas. Em seguida, foram adicionados 100 μL da solução LIVE/DEAD[®] preparada conforme descrito pelo fabricante, e incubada por 30 minutos. Posteriormente, todo o meio foi cuidadosamente removido e substituído por um meio fresco (100 μL). As imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência (CELENA[®] S Logos Biosystems) com a objetiva de 4x, realizadas em triplicata. A contagem das células vivas e mortas foi realizada no software ImageJ e o valor de IC_{50} foi calculado no GraphPad Prism 8.0.2.

3.4.9. Ciclo celular

As células da linhagem A2780cis foram semeadas ($2,0 \times 10^5$ células/poço) em microplaca de doze poços e incubadas por 24 h. Após a incubação, foram adicionados os compostos nas concentrações de $\frac{1}{2}\text{IC}_{50}$, IC_{50} e $4 \times \text{IC}_{50}$ em triplicata. As células foram incubadas 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 μL de

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

3.4.10. Ensaio de morte celular (apoptose/necrose)

A indução de morte celular pelo composto PdB3 foi avaliada na linhagem celular A2780cis por citometria de fluxo utilizando o kit de detecção de apoptose com os marcadores Anexina V conjugada com o fluorocromo ficoeritrina (PE) e 7-amino-actinomicina (7-AAD).

Alíquotas de 1,5 mL de uma suspensão das células A2780cis foram semeadas em placas de 12 poços (1×10^5 células/poço) e incubadas (5% de CO_2 a 37°C). Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações (0,25 μM , 1,01 μM e 4,04 μM) e incubadas por 48 horas. Posteriormente, o meio de cultura foi retirado de cada poço, os quais foram lavados com PBS, e, em seguida, foi adicionada uma alíquota de 200 μL de tampão de ligação (10 mM HEPES/NaOH; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl_2), proveniente do kit de ensaio.

O meio de cultura e o PBS utilizados foram misturados e centrifugados, e imediatamente, o pellet celular proveniente desta solução foi lavado com PBS e novamente centrifugado. As células do 'pellet celular' resultante foram ressuscitadas em 70 μL de tampão de ligação, e as células foram devolvidas aos respectivos poços.

Logo após, foram adicionados os corantes AnexinaV-PE (2,5 μL /poço) e 7-AAD (2,5 μL /poço) em cada poço. As células foram mantidas em temperatura ambiente por 20 min na ausência de luz, e desaderidas por via mecânica usando o scraper. Finalmente, a suspensão celular de cada poço foi centrifugada, e as células foram novamente ressuscitadas em 200 μL de tampão de ligação do kit de ensaio. As células foram analisadas no citômetro de fluxo BD Accuri C6. A

fluorescência foi quantificada com o software CellQuest e os dados foram tratados no software GraphPad Prism 8.0.2.

O ensaio também foi realizado para as células tratadas apenas com 0,5% de DMSO, utilizadas como controles. Para o controle positivo de morte celular por apoptose, as células foram tratadas com camptotecina. Para o controle positivo de morte celular por necrose, as células foram aquecidas a 80 °C por 2 horas e marcadas apenas com 7-AAD, assim como as células que passaram pelo mesmo tratamento foram marcadas apenas com Anexina V-PE. A fim de utilizar como controles, também foram analisadas no citômetro: células sem tratamento e não marcadas com Anexina V-PE e 7-AAD; células sem tratamento e duplamente marcadas com Anexina V-PE e 7-AAD.

3.4.11. Ensaio de cultura celular 3D

O ensaio em cultura 3D foi realizado com a linhagem celular A2780cis utilizando o Kit de Bioimpressão de 96 poços magnéticos da Greiner Bio-One. As células foram cultivadas em garrafa aderente de 25 cm² em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂ até atingir 80% da confluência celular. Em seguida, as células foram lavadas com PBS (3 mL) e removidas com tripsina (1 mL); a tripsina foi neutralizada com meio de cultura (2 mL) e transferida para um tubo falcon de 15 ml, sendo centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. As células foram ressuspensas em meio novo (5 ml), adicionaram-se 150 µL de nanopartículas magnéticas e retornaram para a garrafa de cultivo celular, incubando por 24 horas. Em seguida, as células foram novamente tratadas com tripsina e feita a contagem pelo método de exclusão de trypan blue. A densidade celular foi ajustada para 1500 células/poço ou 3750 células/poço. As células foram semeadas em placas de 96 poços repelentes e levadas ao drive magnético de 96 poços, e incubadas por 4 dias para a formação dos esferoides. Recomenda-se a troca do meio de cultura a cada 3 dias. Com a obtenção dos esferoides, foi realizado o tratamento com o composto PdB3 e cisplatina em diferentes concentrações (1,6 µM, 6,3 µM, 12,5 µM, 50 µM e 100 µM) e 0,5% de DMSO como controle. Então, micrografias dos esferoides foram registradas em diferentes períodos (0, 48, 96 e 144 h) e o diâmetro foi analisado usando o software ImageJ e tratado estatisticamente no GraphPad Prism 8.0.2.

3.5 Biomoléculas

3.5.1. Estudo de Interação com ct-DNA por titulação espectrofotométrica

Para realizar o teste de interação com DNA, primeiramente, foi preparada uma solução aquosa tamponada com 0,084 mol·L⁻¹ de Trizma-HCl e 0,016 mol·L⁻¹ de Trizma-base, (pH=7,4) à temperatura ambiente. Neste trabalho, foi utilizada uma solução estoque de DNA do timo de bezerro (calf thymus/ct-DNA) 1 mg·mL⁻¹ preparada na solução tampão Trizma à temperatura ambiente. Antes do procedimento, a solução foi armazenada em geladeira a aproximadamente 4 °C para evitar degradação da biomolécula e foi verificada a razão da absorbância nos comprimentos de onda 260 e 280 nm (A₂₆₀ / A₂₈₀) acima de 1,8, indicando que o ct-DNA estava com a quantidade aceitável de proteínas contaminantes que podem prejudicar a interação com os compostos estudados. Para determinar a concentração molar de DNA na solução, foi utilizada a absorvidade molar ($\epsilon = 6600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; $\lambda = 260 \text{ nm}$). Após obter a concentração através da Lei de Lambert-Beer, Equação 3, a solução foi diluída para 4,0 mmol·L⁻¹.

Equação 3: Equação de Lambert-Beer, onde “A” é a absorbância, “l” é o caminho óptico, “ ϵ ” é a absorvidade molar e “c” é a concentração da espécie química.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (3)$$

A constante de ligação (K_b) foi calculada utilizando a técnica de titulação espectrofotométrica, equação 4. Soluções dos compostos estudados de 1,5 mmol·L⁻¹ foram preparadas em DMSO. Em seguida, foram adicionados à cubeta de quartzo (3,0 mL) 30 μ L do composto e adicionado tampão Trizma-HCl para completar 2,0 mL, obtendo-se a concentração final do composto de 22,5 μ mol·L⁻¹. Os espectros foram obtidos adicionando à cubeta de trabalho ct-DNA, de modo que a razão [DNA]/[composto] estivesse entre 0,1 – 1,7. Durante a obtenção dos espectros, o branco apresentava a mesma concentração de ct-DNA para evitar possíveis erros.

$$\frac{[DNA]}{\epsilon_A - \epsilon_f} = \frac{[DNA]}{\epsilon_B - \epsilon_f} - \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad (4)$$

3.5.2. Estudo de interação com DNA: deslocamento de Hoechst (ct-DNA)

Em um tubo falcon de 50 ml, foram adicionados 19,80 ml de ct-DNA (84 μM) preparado em tampão Tris-HCl (5 mM Tris-HCl / 50 mM NaCl em pH 7,3), seguido por 120 μL de Hoechst 33258 (0,48 mM). Posteriormente, 900 μL da solução de ct-DNA/Hoechst 33258 foram adicionados em tubos de 2 mL, mais concentrações variadas dos compostos (9 μM , 18,75 μM , 27,75 μM , 37,5 μM , 46,5 μM , 56,5 μM , 65,25 μM , 75 μM), preparados em DMSO a partir de uma solução estoque de 0,75 mM, sendo realizado em triplicata para cada concentração; a concentração de DMSO foi mantida em 10% (v/v) (Tabela 3.2).

As soluções preparadas (ct-DNA/Hoechst 33258 + complexo + DMSO) foram mantidas sob agitação a 20 °C por 30 min. Após esse período, as soluções foram alocadas em uma microplaca preta com fundo transparente (200 μL /poço) e realizada a leitura em um fluorímetro de microplaca Synergy/H1-Biotek, onde a excitação foi feita em 340 nm. Em seguida, foi realizada uma varredura no espectro de emissão de 370 até 700 nm. Adicionalmente, as absorbâncias em 340 nm e 480 nm foram mensuradas para aplicação na equação de efeito filtro, caso necessário. As leituras foram realizadas a 25 e 37 °C.

TABELA 3.2 - - Relação de volume CT-DNA/ Hoechst 33258 + complexos + DMSO (μL)

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8
CT-DNA/Hoechst 33258	900							
complexos	12	25	37	50	62	75	88	100
DMSO	88	75	63	50	38	25	12	0

3.5.3. Estudo de Interação com DNA: Eletroforese em Gel

Os complexos PdP3 e PdB3 foram solubilizados em DMSO e incubados em diferentes concentrações (1, 10 e 100 μM) com o DNA plasmidial (pUC-19) por 24h a 37 °C. O controle positivo (C+) consistia na cisplatina (15 μM) e DNA (1 μM), enquanto o controle negativo (C-) consistia somente no DNA (1 μM), e para alcançar o volume final de 20 μL , a solução foi completada com água Milli-Q. Após o término da incubação, foram adicionados 15 μL de STEB (40% de

sacarose, 100 mM de Tris.HCl, pH = 7,4, 1 mM de EDTA, 0,5 mg·mL⁻¹ de azul de bromofenol) às amostras. Em seguida, foram transferidos 20 µL das amostras para os poços no gel de agarose (1%) em tampão TBE (1X), o qual foi submetido a uma corrente de 50 mA por 3h. Após o término da corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio por 5 min e a revelação foi realizada no fotodocumentador Gel Doc™ EZ; a imagem obtida foi tratada utilizando o software ImageLab™ 6.0.0 fornecido pela BioRad.

3.5.4. Ensaio de inibição enzimática: DNA-Topoisomerase Iβ e IIα

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, utilizaram-se 0,5 µL (500 ng) de DNA pBR322 superenovelado, 3 µL de tampão de ensaio (Tris.HCl (10 mM), NaCl (50 mM), KCl (50 mM), MgCl₂ (5,0 mM), Na₂H₂EDTA (0,1 mM), BSA (15 mg·mL⁻¹) com pH 7,9), 1µL (1,0 mM) de ATP e 3µL do composto de interesse em diferentes concentrações (1, 10 e 20 µM). Por fim, foram adicionados 1µL (4,0 nM) de TOPOIIα e água deionizada para atingir um volume final de 30 µL. Os ensaios dos controles negativo e positivo foram realizados a partir das mesmas quantidades de todos os componentes, porém com a ausência dos compostos e da TOPO, respectivamente. Adicionalmente, a preparação das amostras no ensaio de inibição enzimática da TOPOIβ foi realizada de forma semelhante à de TOPOIIα, na ausência de ATP.

A mistura reacional foi mantida em incubação a 37 °C por 40 min. Após esse período, foram adicionados 15 µL de STEB – 40% (m/v) de sacarose, 100 mM de Tris.HCl, pH = 7,5, 1 mM de EDTA, 0,5 mg·mL⁻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 ao gel de agarose 1% (m/v). A corrida eletroforética foi realizada em solução TBE 1x a 60 V durante 2 h. Após esse período, o gel foi imerso em solução corante de brometo de etídio e revelado no fotodocumentador Gel Doc™

EZ Image (BioRad). A imagem obtida foi analisada utilizando-se o software ImageLab™ 6.0.0, fornecido pela BioRad.

3.5.5. Estudo de 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 uma proporção fixa de DMSO de 5% (v/v). Realizada em triplicata para cada concentração. As soluções preparadas foram mantidas sob agitação a 20 °C por 15 min. Após esse período, as soluções foram distribuídas 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 incluíram: excitação em 270 nm, espectro de emissão de 300 – 500 nm e espectro de absorbância na região de 250 – 500 nm.

A obtenção do espectro de absorbância foi realizada caso fosse necessária a aplicação da correção do efeito filtro. As medidas foram realizadas em diferentes temperaturas: 25, 30 e 37 °C.

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se a equação de supressão de fluorescência de Stern-Volmer (EQUAÇÃO 5), assim como foi calculada a constante de ligação entre a biomolécula e os compostos testados (EQUAÇÃO 6). Com a variação de temperatura dos dados obtidos, foi possível calcular os parâmetros físico-químicos para o entendimento mais completo do sistema (EQUAÇÃO 7 e EQUAÇÃO 8).

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

Equação 5

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

Equação 6

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

Equação 7

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

Equação 8

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

F_0 = 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;

τ_0 = 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;

ΔG = variação da energia livre de Gibbs.

3.6 Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados foi realizado utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2. Empregando-se a média \pm Desvio Padrão e análise de variância (ANOVA) com o teste de Dunnet para avaliar o nível de significância em relação ao controle.

4. CARACTERIZAÇÕES

4.1 Infravermelho

Para os compostos de coordenação, a espectroscopia na região do infravermelho fornece informações sobre a possível coordenação dos ligantes livres com o centro metálico, por meio das mudanças espectroscópicas. Normalmente, quando o ligante livre coordena com o centro metálico, ocorrem alterações no espectro do infravermelho, podendo aumentar ou diminuir a intensidade da banda e deslocar para regiões de maior ou menor energia, dependendo da forma como ocorre a interação metal-ligante⁶⁴.

Analisando as bandas características das tiossemicarbazidas, observaram-se os estiramentos $\nu(\text{NH}_2 \text{ ass e s})$ na região de $3369 - 3182 \text{ cm}^{-1}$, que nos complexos deslocaram para a região de maior energia, $3658 - 3200 \text{ cm}^{-1}$, indicando novas interações de hidrogênio. A deformação angular $\delta(\text{NH}_2)$ das tiossemicarbazidas livres ocorria entre 1645 e 1634 cm^{-1} , nos complexos, essas bandas deslocaram para a região de menor energia, deslocamento de 15 a 7 cm^{-1} . O estiramento atribuído ao grupo $\nu(\text{N-C=S})$ de $1568 - 1531 \text{ cm}^{-1}$ no ligante livre, não foi observado nos espectros dos complexos ou sofreu redução significativa na sua intensidade, enquanto o estiramento $\nu(\text{C=S})$ deslocou para a região de menor energia, de $1286 - 1273 \text{ cm}^{-1}$ para $1236 - 1228 \text{ cm}^{-1}$. Estas mudanças espectroscópicas sugerem que a ligação coordenada do paládio com as tiossemicarbazidas esteja ocorrendo pelo grupo $-\text{NH}_2$ e $-\text{C=S}$ de modo bidentado⁶⁵⁻⁶⁸.

A presença dos ligantes bis(difenilfosfina)alcano DPPP e DPPB na estrutura dos complexos é confirmada pela presença das bandas características $\nu(\text{PPh})$ em $1433,1095$ e 696 cm^{-1} ⁶⁹⁻⁷¹. No entanto, não há alterações significativas entre os espectros do ligante livre e do complexo.

A TABELA 4.1 traz as principais bandas características de diagnósticos no espectro do infravermelho, e a FIGURA 4.1 mostra as comparações dos espectros da 4-etil-3-tiossemicarbazida, das bisfosfinas DPPB e do complexo PdB3, no qual são observadas todas as alterações mencionadas. Os espectros dos demais complexos encontram-se em anexo (FIGURA A1).

TABELA 4.1 - atribuição dos modos vibracionais no espectro do infravermelho.

Compostos	$\nu(\text{NH}_2 \text{ e } \text{NH}_2)$	$\delta(\text{NH}_2)$	$\nu(\text{N-C=S})$	$\nu(\text{C=S})$	PPh_2
DPPP	-	-	-	-	1433, 1095 e 696
DPPB	-	-	-	-	1431, 1097 e 694
TSC	3369, 3267 e 3182	1645	1531	1286	-
MetTSC	3337, 3289 e 3241	1642	1568	1273	-
EtTSC	3348, 3289 e 3197	1634	1546	1276	-
PdP1	3600-3205	1631	-	1230,	1436, 1099 e 694
PdP2	3658, 3452e 331	1627	1571	1232	1436, 1103 e 698
PdP3	3600-3300	1627	-	-	1435, 1101 e 692
PdB1	3630-3200	1633	-	1236	1435, 1099 e 696
PdB2	3597-3300	1631	-	1226	1436, 1099 e696
PdB3	3600-3309	1627	-	1228	1436, 1099 e 696

ν (estiramento) e δ (deformação angular)

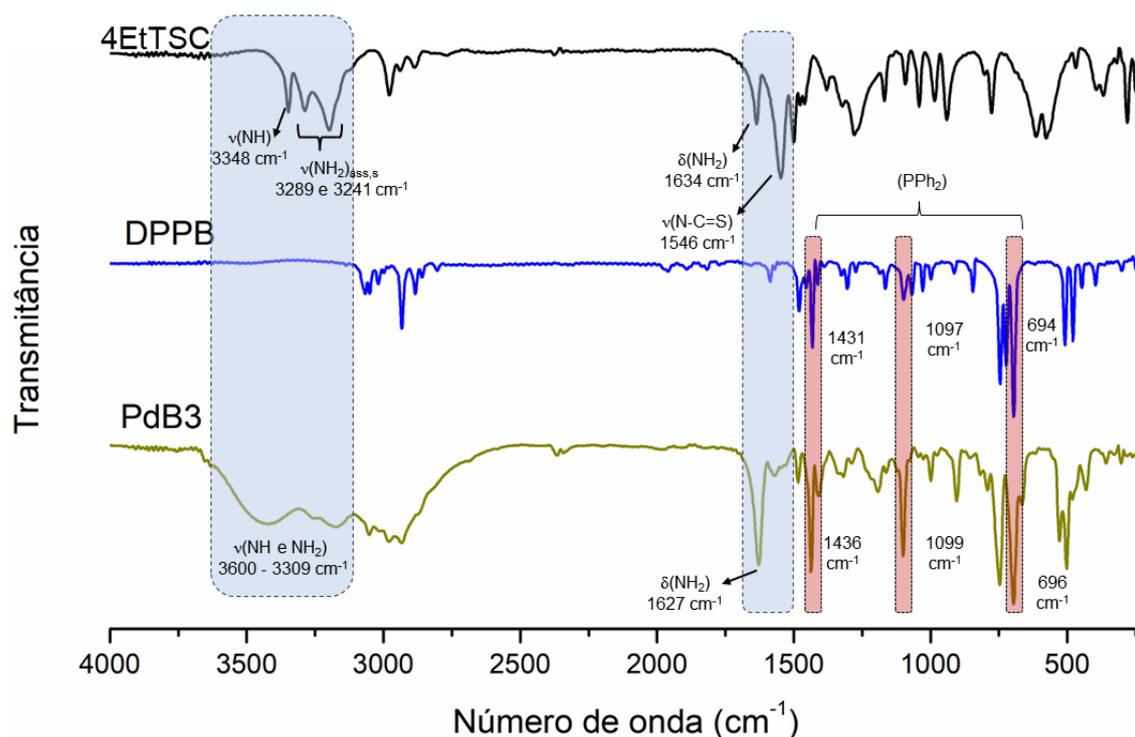


FIGURA 4.1 - Espectro de infravermelho do 4-etil-3-tiossemicarbazida (EtTSC), bis-(difenilfosfina)butano (DPPB) e o complexo [Pd(DPPB)(4ET)]Cl₂ (PdB3).

4.1.1. Espectroscopia por RMN

Todos os complexos foram caracterizados por RMN de ¹H e ³¹P, e devido à similaridade dos complexos, apenas o complexo PdB3 foi caracterizado por RMN de ¹³C, DEPT-135, COSY e HSQC. A seguir, foram selecionados dois complexos para a atribuição e discussão dos sinais, sendo eles o PdP2 e PdB3 (FIGURA 4.2 e 4.3). Os espectros de RMN dos demais complexos podem ser consultados no ANEXO (FIGURA A2 – A11).

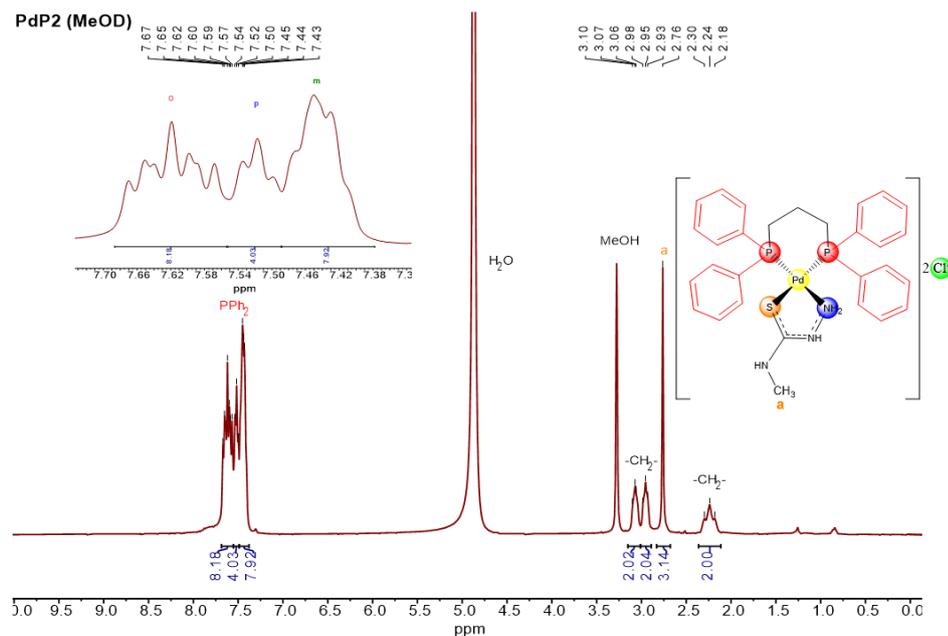


FIGURA 4.2 - Espectro de RMN de ^1H do composto PdP2 em MeOD.

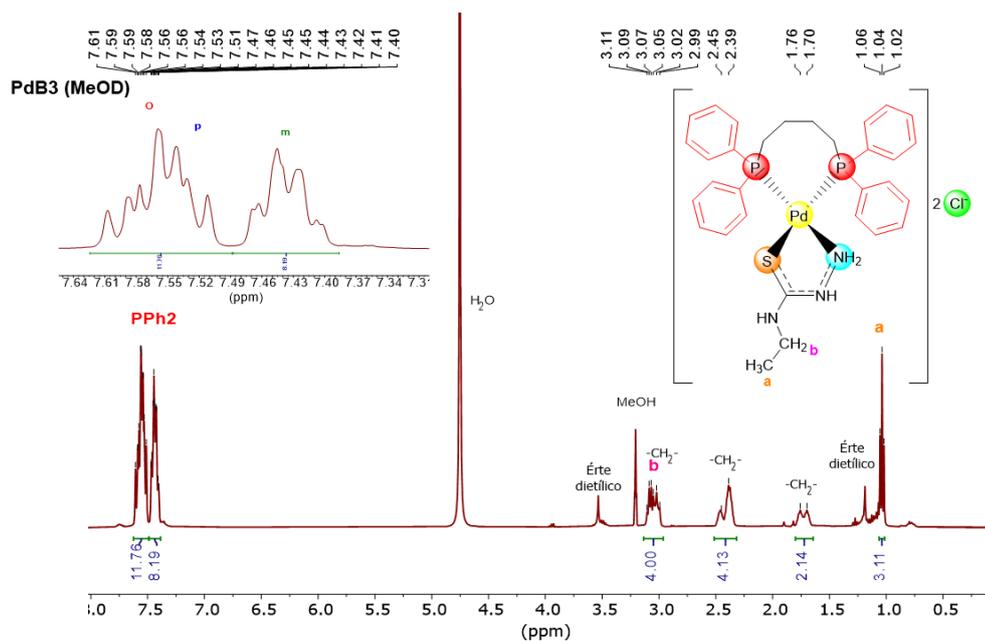


FIGURA 4.3 - Espectro de RMN de ^1H do composto PdB3 em MeOD.

No espectro de RMN de ^1H nas FIGURAS 4.2 e 4.3, observaram-se dois grupos de sinais, o primeiro na região mais blindada do espectro entre 1,0 e 3,5 ppm, atribuído aos hidrogênios alifáticos das bisfosfinas e das tiossemicarbazidas, e o segundo na região entre 7,0 e 8,0 ppm, onde se encontram os hidrogênios aromáticos pertencentes ao grupo fenil das bisfosfinas. Para o composto PdP2, os deslocamentos químicos em 2,30 – 2,18

(m), 2,98 – 2,93 (m) e 3,10 – 3,06 (m) ppm são atribuídos aos -CH₂- do DPP e os deslocamentos químicos entre 7,67 – 7,43 (m) ppm aos grupos fenil também do ligante DPPP. Já o 4-metil-3-tiossemicarbazida é observado pelo deslocamento químico em 2,79 (s) ppm, atribuído ao grupo -CH₃; os hidrogênios dos grupos NH e NH₂ não são evidenciados, pois podem sofrer desprotonação com o solvente do meio.

O composto PdB3 apresenta mais sinais na região blindada do espectro, devido ao aumento dos grupos alifáticos, com os deslocamentos químicos 1,76 – 1,70 (m) e 2,45 – 2,39 (m) ppm atribuídos ao grupo -CH₂- e os sinais em 7,61 – 7,40 relacionados aos anéis fenil do ligante DPPB. O deslocamento químico em 1,04 (t) ppm é atribuído ao -CH₃ da 4-etil-3-tiossemicarbazida, e o deslocamento químico em 3,11 – 2,99(m) ppm apresenta um total de 4H atribuído ao -CH₂- do DPPB e ao -CH₂- do 4-etil-3-tiossemicarbazida. A diferenciação dos hidrogênios da 4-etil-3-tiossemicarbazida e do DPPB foi realizada com auxílio do RMN de ¹H-¹H COSY (FIGURA 4.5).

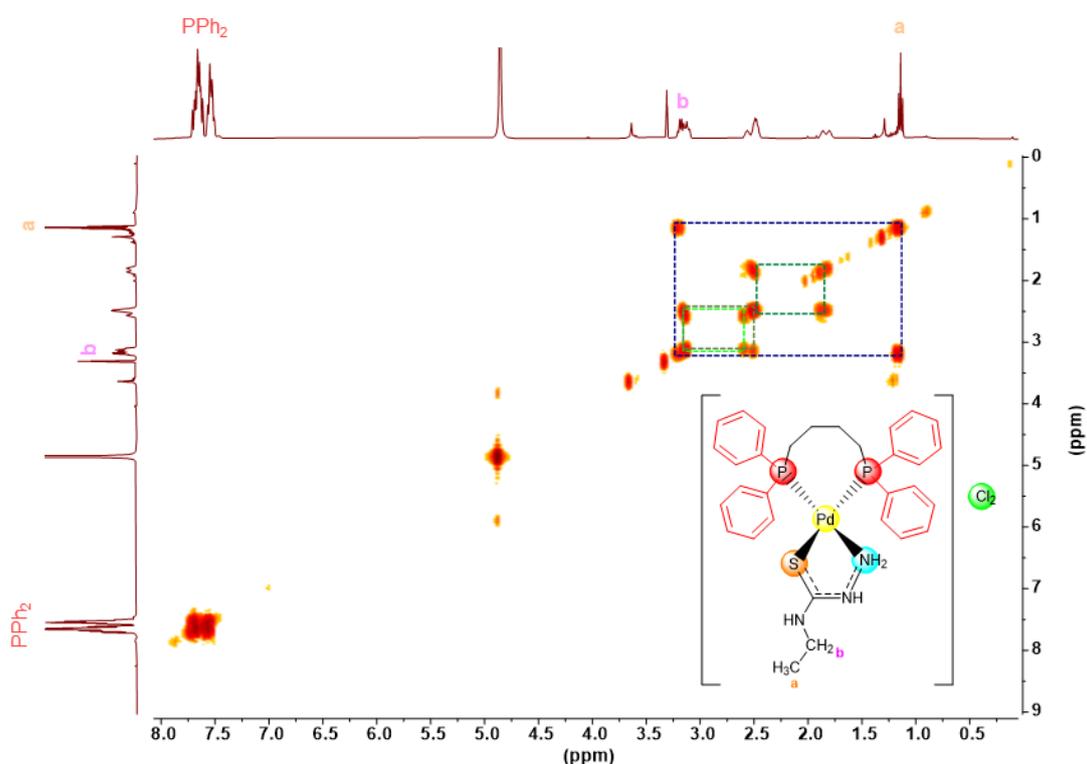


FIGURA 4.4 - Mapa de contorno COSY ¹H-¹H do composto PdB3.

A FIGURA 4.5 apresenta o RMN de ³¹P dos complexos PdP2 e PdB3 e dos ligantes DPPP e DPPB. Na TABELA 4.2, estão resumidos os valores dos

deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento $^2J_{pp}$ de todos os complexos. Os compostos bisfosfínicos DPPP e DPPB são observados na região negativa do espectro (-17,72 e -13,5, respectivamente) em sua forma livre, apresentando um único sinal (singlete). Ao coordenarem com o centro metálico, evidenciam a desblindagem das bisfosfinas, deslocando-se para a região positiva do espectro e surgindo dois dubletos. Isso indica que há dois átomos de P (fósforo) magneticamente diferentes devido à assimetria do complexo, com um P trans ao S (enxofre) gerando o dubleto P_a mais desblindado e o P trans ao N (nitrogênio) gerando o dubleto P_b . Esse fenômeno ocorre devido à capacidade do enxofre em fazer retrodoação com o paládio por meio de seus orbitais π^* livres, enquanto o nitrogênio é um doador σ simples, corroborando a proposta estrutural na qual a ligação metal-ligante ocorre de forma bidentada por ambos os ligantes. Este mesmo efeito é observado na literatura para complexos assimétricos com fosfinas e bisfosfinas.⁷²⁻⁷⁴

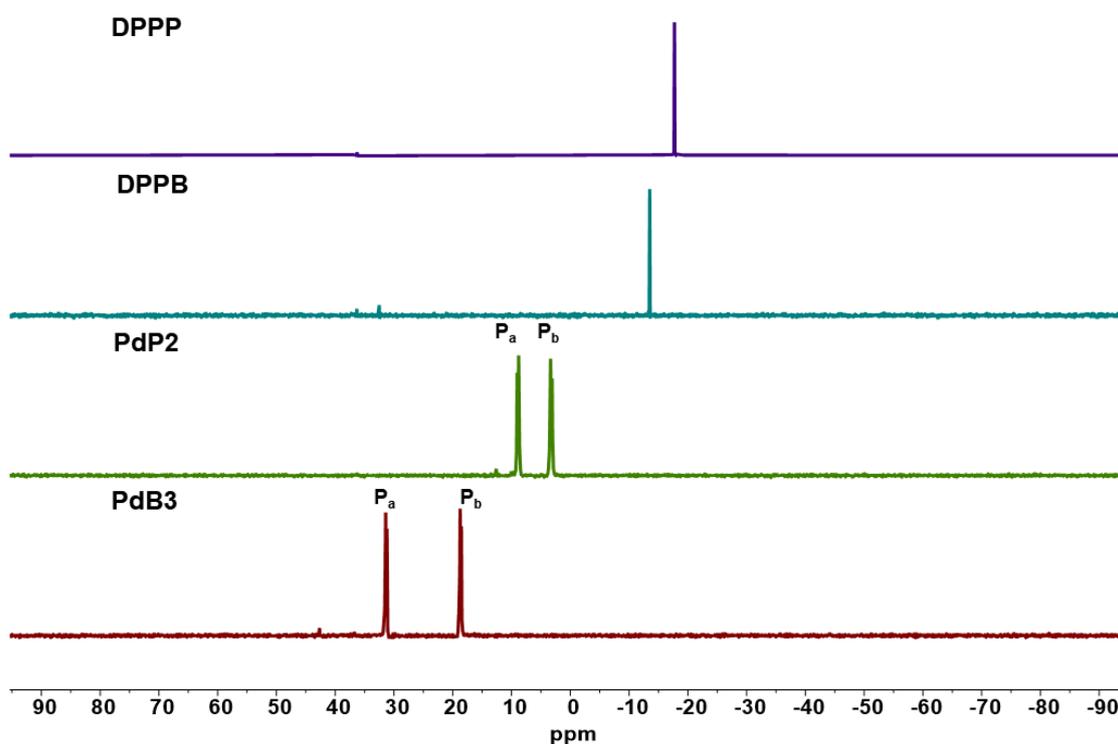


FIGURA 4.5 - RMN de ^{31}P dos compostos, DPPP, DPPB, PdP2 e PdB1 em MeOD.

TABELA 4.2 - Dados de RMN de ^{31}P dos complexos

Compostos	Deslocamento químico		Constante de acoplamento	
	P _a	P _b	$^2J_{PPa}$	$^2J_{PPb}$
PdP1	9,0	3,0	43,1	42,1
PdP2	8,9	3,2	42,8	43,3
PdP3	9,0	3,2	42,6	43,7
PdB1	30,8	19,2	34,6	34,4
PdB2	31,3	18,8	34,9	34,6
PdB3	31,3	18,5	35,8	35,3

A atribuição dos deslocamentos químicos do composto PdB3 no espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 4.6) foi auxiliada pelo RMN de DEPT-135, que distingue os carbonos com números pares de hidrogênio com sinais negativos no espectro e carbonos com números ímpares de hidrogênio com sinais positivos (FIGURA 4.7). Também foi utilizada a técnica de RMN bidimensional HSQC (^{13}C - ^1H), que correlaciona carbono e hidrogênio que estão diretamente ligados (FIGURA 4.8).

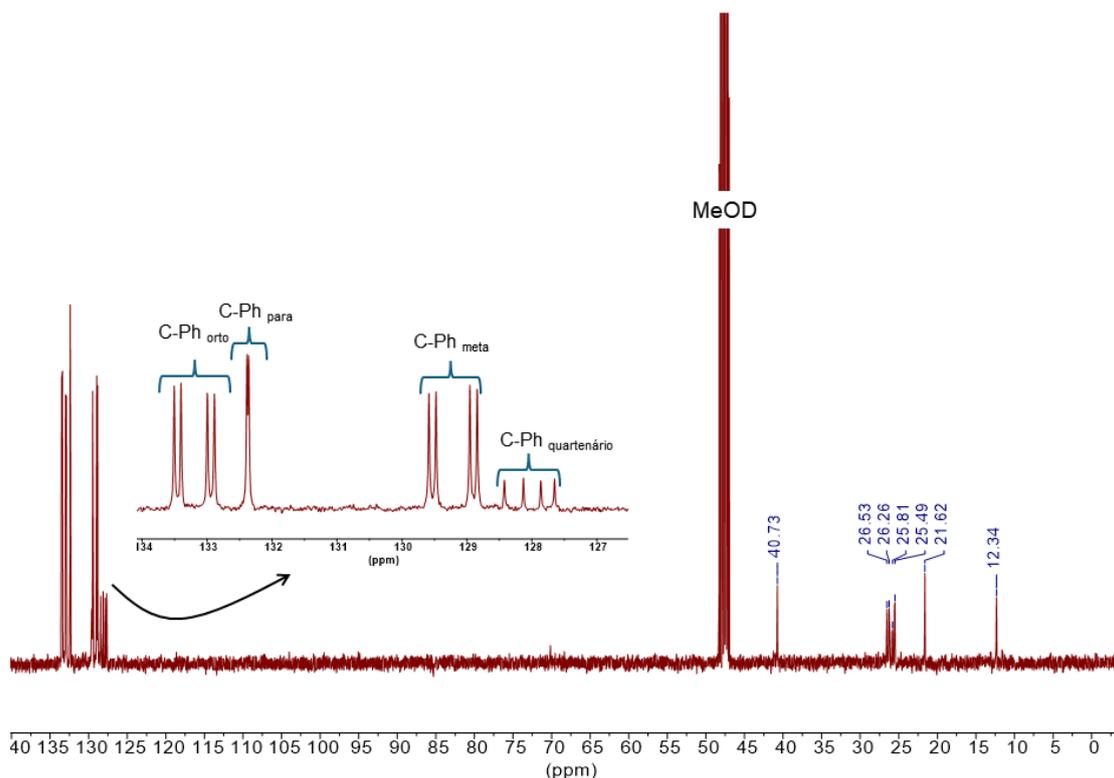


FIGURA 4.6 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto PdB3.

O deslocamento químico no RMN de ^{13}C em δ 12,35 ppm é atribuído ao $-\text{CH}_3$ da 4-etil-3-tiossemicarbazida, apresentando-se no modo positivo no DEPT-135 e diretamente ligado ao tripleto em 1,04 ppm no RMN de ^1H . Já o deslocamento químico do $-\text{CH}_2-$ da 4-etil-3-tiossemicarbazida no RMN de ^{13}C é observado em 40,73 ppm, presente na forma negativa no DEPT-135 e diretamente ligado ao ^1H com deslocamento químico em 3,11 ppm. Os deslocamentos químicos em 21,62; 25,49; 25,81; 26,26 e 26,53 ppm são atribuídos aos carbonos do grupo butano entre os átomos de fósforo. Os carbonos quaternários foram identificados pela ausência de sinal no DEPT-135 na região de 127 e 128 ppm. Os demais sinais acima de 128 ppm são atribuídos aos carbonos dos anéis aromáticos nos quais também são evidenciado o efeito trans com a duplicação dos sinais dos carbonos orto e meta.

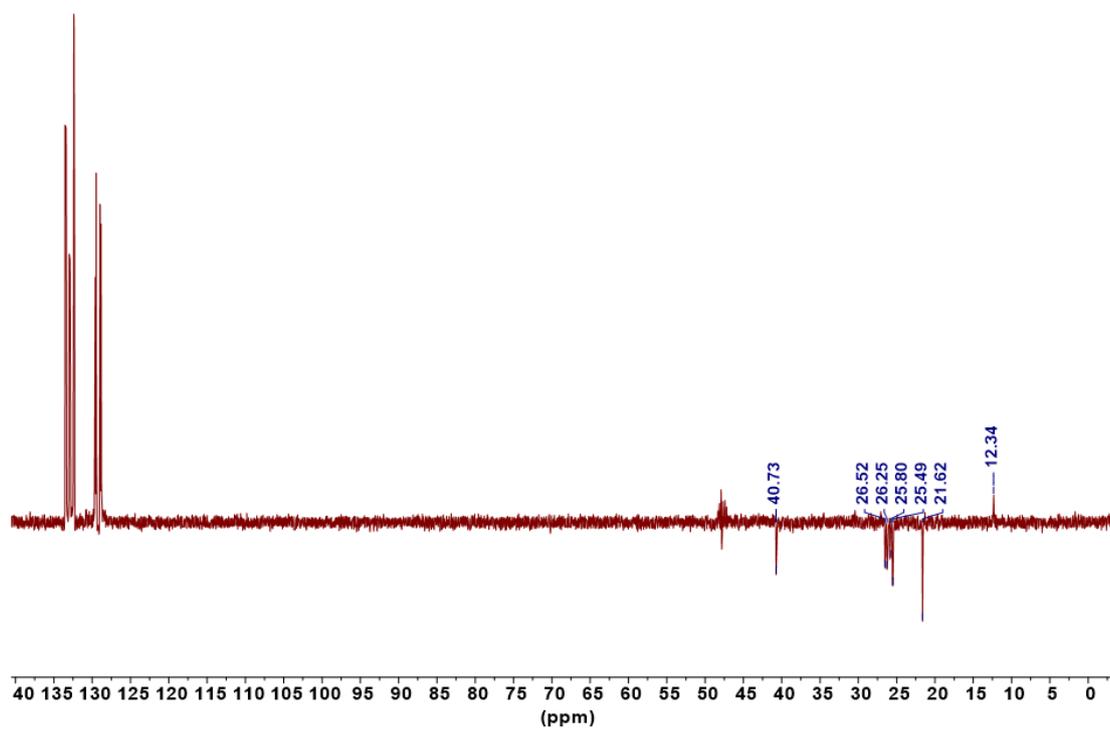


FIGURA 4.7 - Espectro de RMN DEPT-135 do composto PdB3

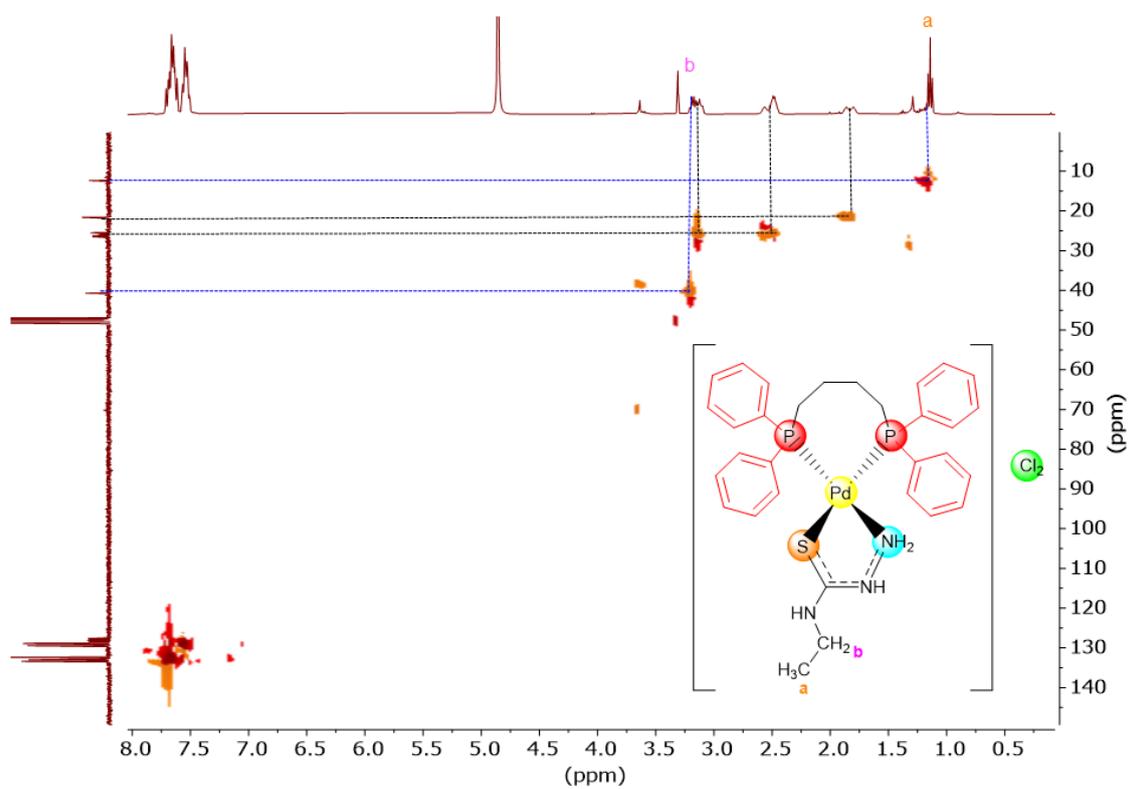


FIGURA 4.8 - Mapa de contorno HSQC ¹H-¹³C do composto PdB3

4.2 Espectrometria de massas

A análise de espectrometria de massa foi realizada para todos os complexos a fim de confirmar a obtenção dos compostos através do sinal do íon molecular. A análise foi realizada pelo método ESI (ionização por eletrospray) no modo positivo. Na análise, todos os complexos apresentaram o sinal do íon molecular da espécie ionizada na forma $[M - H]^+$ com razão m/z (massa/carga) 1:1, identificado pelo padrão isotópico do paládio. Também foi identificado o padrão isotópico do paládio para o íon molecular na forma $[M]^{2+}$ com razão m/z 1:2 para os complexos PdP2, PdP3, PdB2 e PdB3. Os valores experimentais e teóricos da massa dos compostos encontram-se resumidos na TABELA 4.2, e a FIGURA 4.9 mostra os sinais dos íons moleculares do composto PdB3 com o padrão isotópico do paládio.

TABELA 4.2 - Comparação dos valores de massa teórico e experimental obtidos por espectrometria de massa.

Compostos	$m/z [M - H]^+$		Erro (ppm)	$m/z [M]^{2+}$		Erro (ppm)
	Teórico	Experimental		Teórico	Experimental	
PdP1	608,0670	608,0686	2,96	-	-	-
PdP2	622.0822	622,0838	2,65	311.5447	311,5458	3,50
PdP3	636.0978	636,0992	2,20	318.5525	318,5539	4,27
PdB1	622.0822	622,0843	3,45	-	-	-
PdB2	636.0978	636.1000	3,46	318.5525	318,5538	3,95
PdB3	650.1135	650,1136	0,69	325.5604	325,5616	3,81

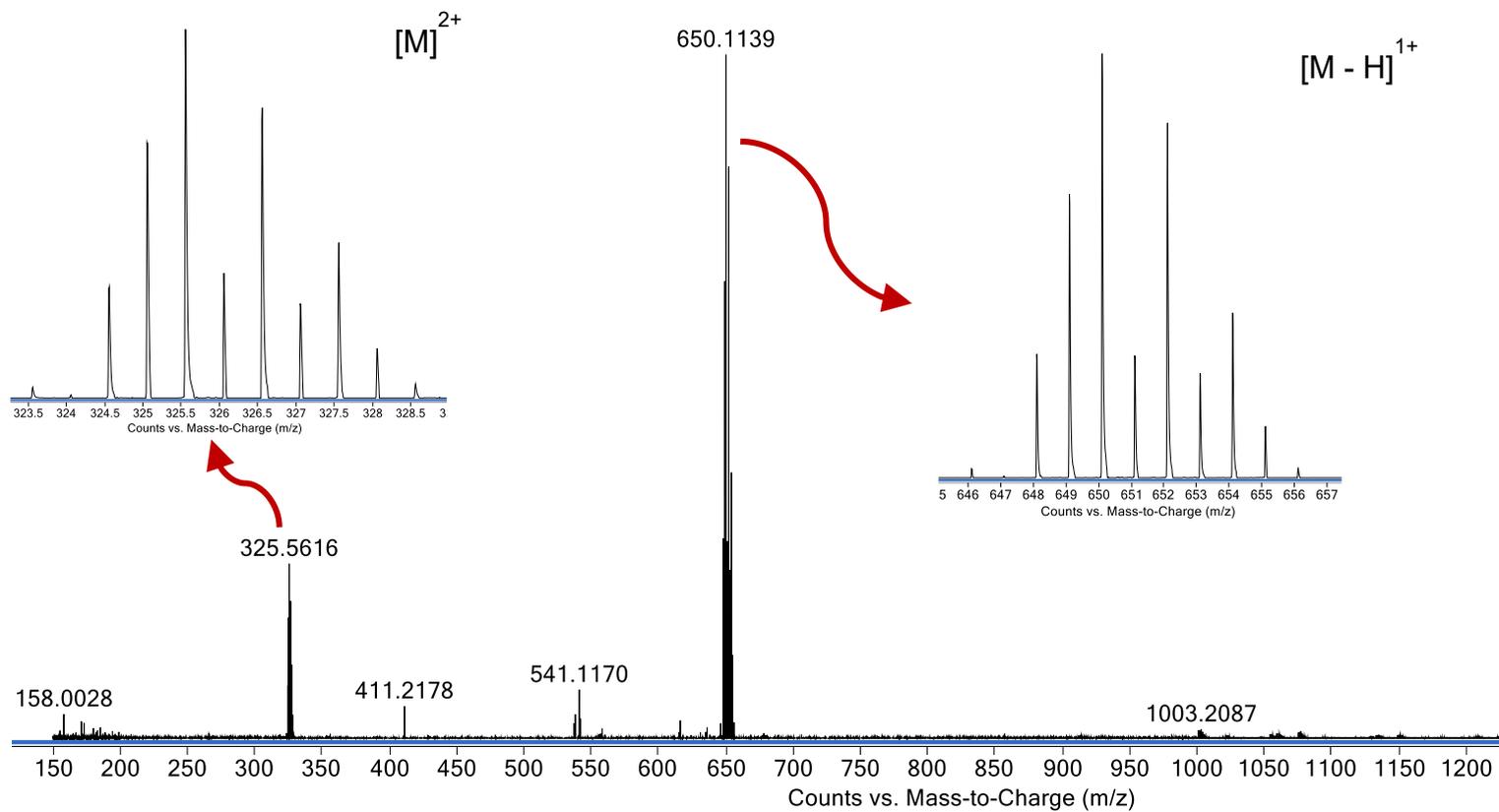


FIGURA 4.9 - Análise de massas do composto PdB3.

4.3 Análise de difração de raios X

Por meio da análise de difração de raios X, foi possível confirmar a estrutura cristalina/molecular dos compostos PdB1 e PdB3. O complexo PdB1 foi classificado como pertencente ao sistema monoclinico do grupo espacial $P2_1/c$, e o PdB3 ao sistema monoclinico do grupo espacial $P2_1/n$. O centro metálico encontra-se ligado de forma bidentada pelos dois átomos de fósforo do ligante DPPB, formando um anel de sete membros, e pelos átomos N1 e S1 dos ligantes tiossemicarbazidas, também de modo bidentado, formando um anel de cinco membros (FIGURA 4.10). De acordo com os ângulos dos ligantes em posição *trans* observados, nota-se que os complexos apresentam geometria quadrado planar distorcida, com ângulos P1-Pd1-S1 de 172.57 Å e N1-Pd1-P2 de 170.35 Å para o complexo PdB1, enquanto para o PdB3 observam-se ângulos *trans* P1-Pd1-S1 de 176.02 Å e N1-Pd1-P2 de 174.64 Å, diferindo da geometria quadrática plana perfeita ideal de 180 Å. As distâncias de ligação nos complexos encontram-se próximas ao descrito na literatura para estruturas similares⁷⁵⁻⁷⁹. Os comprimentos de ligação e ângulos de ligação em torno do centro metálico encontram-se nas TABELAS 4.3 e 4.4, e os parâmetros cristalográficos estão no ANEXO (TABELA A2).

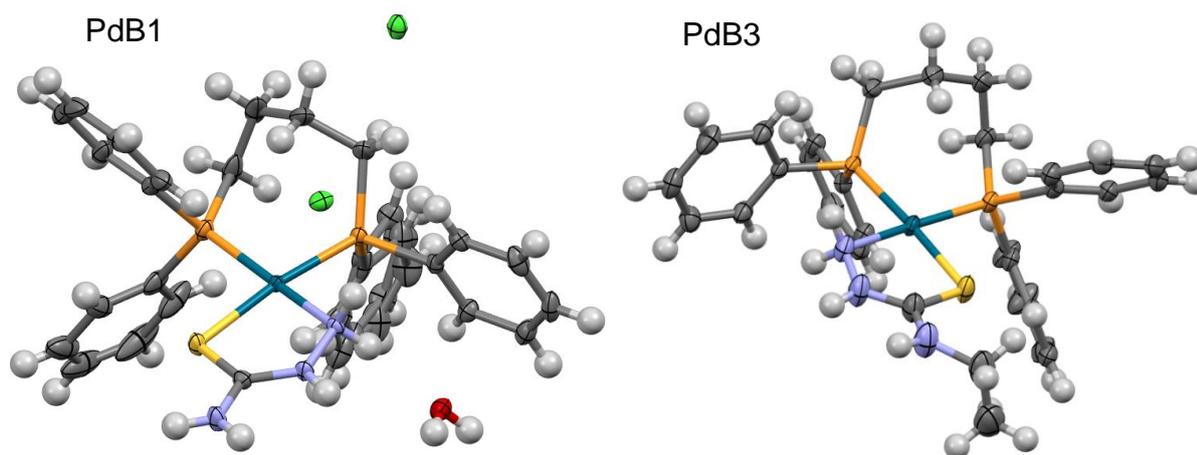


FIGURA 4.10 - Elucidação da estrutura molecular dos compostos PdB1 e PdB3 por Difração de raios – X de monocristal. Elipsoides representadas com 50% de probabilidade.

TABELA 4.3 - Comprimentos de ligação dos compostos PdB1 e PdB3.

	Comprimento de ligação (Å)	
	PdB1	PdB3
Pd1-P2	2.2690(5)	2.2716(7)
Pd1-P1	2.2812(5)	2.3023(6)
Pd1-S1	2.3251(5)	2.3198(7)
Pd1-N1	2.1090(15)	2.119(2)
N1-N2	1.419(2)	1.406(4)
C1-S1	1.7225(19)	1.723(3)
C1-N2	1.324(2)	1.327(4)
C1-N3	1.322(2)	1.321(4)

TABELA 4.4 - Ângulos de ligação dos compostos PdB1 e PdB3.

	Ângulo de ligação (Å)	
	PdB1	PdB3
P2-Pd1-P1	92.052(17)	92.36(2)
P2-Pd1-S1	91.435(17)	91.60(2)
P1-Pd1-S1	172.579(1)	176.02(3)
N1-Pd1-P2	170.35(4)	174.64(7)
N1-Pd1-P1	93.01(4)	92.19(6)
N1-Pd1-S1	84.51(4)	83.87(7)

4.4 Testes de estabilidade:

Antes de realizar a investigação das atividades biológicas dos compostos, investigou-se a estabilidade dos compostos em DMSO por meio da técnica espectroscópica UV-vis e por condutividade molar nos intervalos de 0, 24 e 48 horas. Uma vez que os compostos são insolúveis em água, utilizou-se DMSO para o preparo das soluções a serem utilizadas nos ensaios. A FIGURA

4.11 traz a sobreposição dos espectros do composto PdP2 e PdB2, nos quais podemos observar que não ocorrem mudanças significativas nos espectros com o decorrer do tempo, indicando assim que os compostos são estáveis em DMSO. Este mesmo padrão permanece para os demais compostos, cujos espectros encontram-se no ANEXO (FIGURA A30). Os valores de condutividade molar presentes na TABELA 4.5 corroboram com as observações feitas por UV-vis, demonstrando que não ocorrem alterações na condutividade molar com o passar do tempo, indicando que o complexo não sofre qualquer desprotonação, mantendo a proporção de eletrólito de 1:2.

TABELA 4.5 - Teste de estabilidade por condutividade molar em DMSO.

Compostos	$\lambda_m(\text{S cm}^2 \text{mol}^{-2})$		
	0 h	24 h	48 h
PdP1	68.5	69.5	68.6
PdP2	69.9	68.8	68.9
PdP3	54.5	54.6	54.4
PdB1	71.4	70.9	69.6
PdB2	63.8	62.1	61.4
PdB3	64.6	64.8	64.3

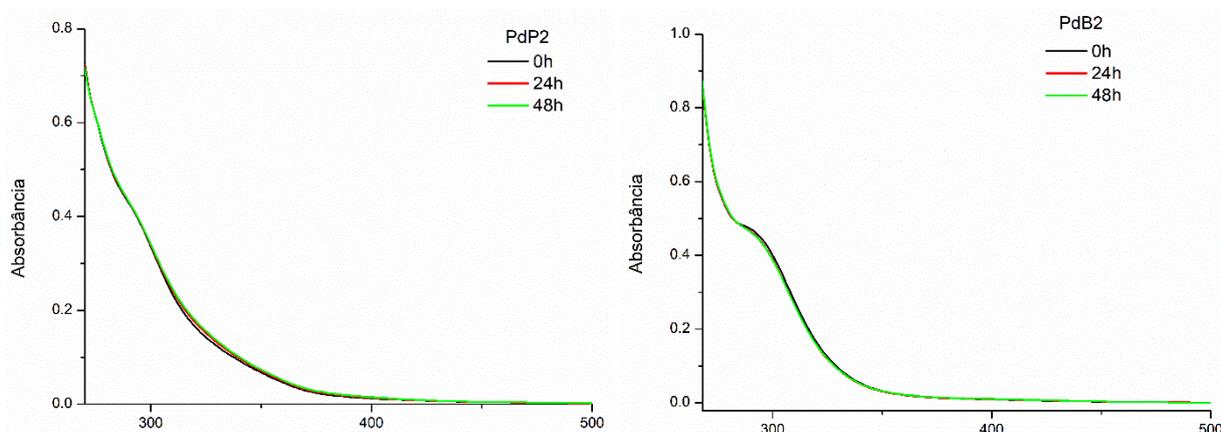


FIGURA 4.11 - Teste de estabilidade por UV-vis em DMSO dos compostos PdP2 e PdB2.

Identificando que os compostos são estáveis em DMSO, os complexos PdP2 e PdB2 foram selecionados de forma aleatória para o teste de estabilidade por RMN de ^{31}P em meio de cultura celular com DMSO- D_2O /DMEM no intervalo de tempo de 0 e 48 horas. A FIGURA 4.12 e 4.13 trazem os espectros de RMN de ^{31}P dos compostos PdP2 e PdB2, sendo observado que o espectro permanece inalterado, indicando a estabilidade dos compostos em meio de cultura. Portanto, conclui-se que os resultados a serem observados nos ensaios biológicos resultam das interações composto-célula na sua forma original.

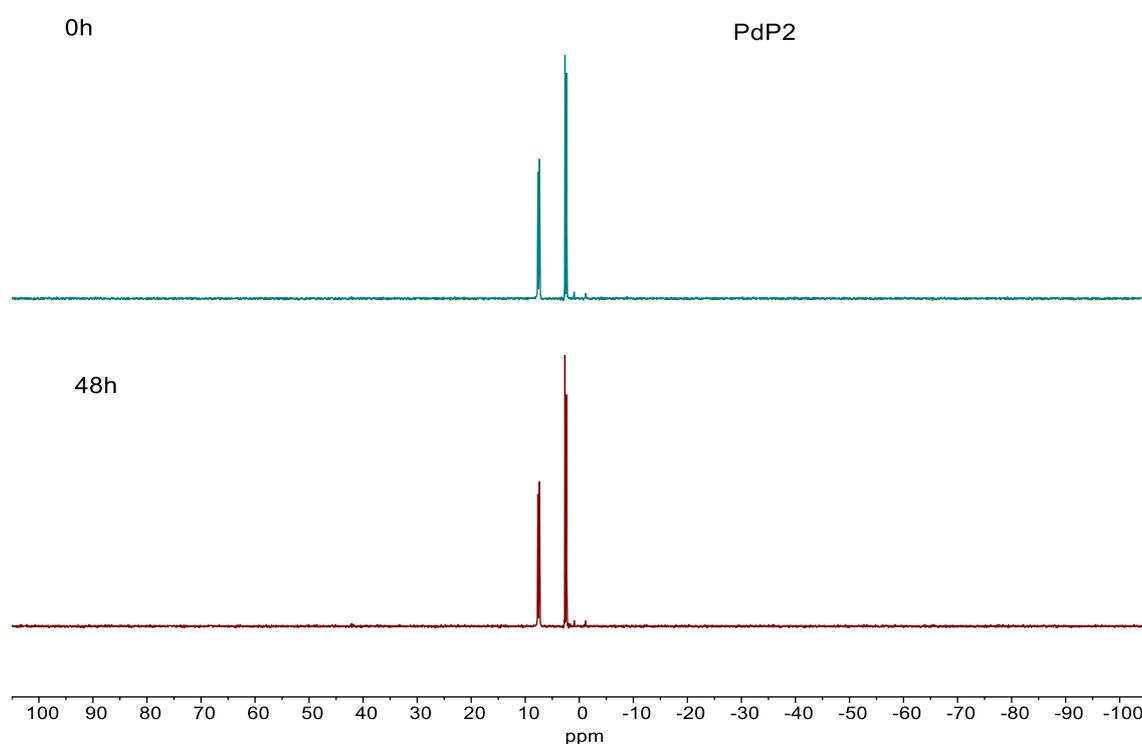


FIGURA 4.12 - Estabilidade do composto PdP2 em DMSO- D_2O /DMEM no intervalo de 0 e 48 horas.

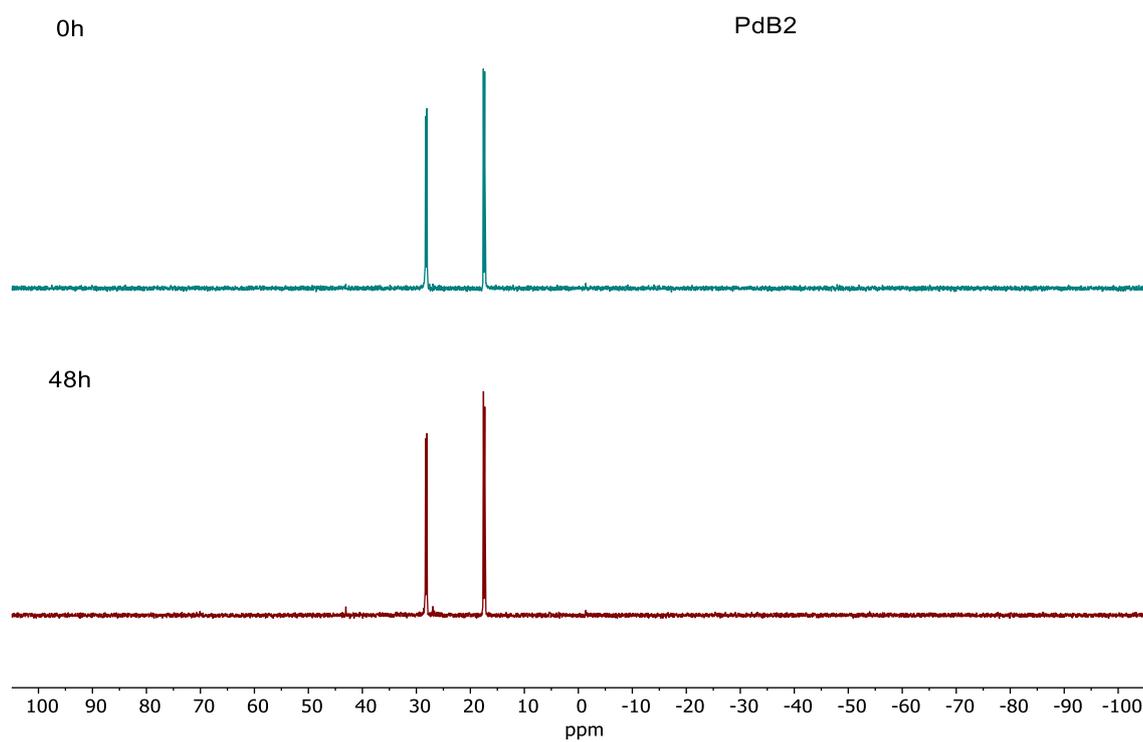


FIGURA 4.13 - Estabilidade do composto PdB2 em DMSO-D₂O/DMEM no intervalo de 0 e 48 horas.

5. ENSAIOS COM BIOMOLÉCULAS

No estudo da interação com biomoléculas, os compostos PdP3 e PdB3 foram selecionados devido aos melhores resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular frente as células tumorais. Esses resultados serão discutidos posteriormente na seção de ensaios celulares.

5.1 Ensaio de interação com DNA

O DNA é um dos principais alvos farmacológicos de drogas usadas no tratamento de diversas neoplasias. A interação Medicamento-DNA pode ocorrer de duas formas, covalente e não covalente. A interação covalente consiste na ligação direta da molécula com as bases nitrogenadas. As interações não covalentes podem ocorrer por intercalação, onde moléculas planares se empilham entre os pares de base do DNA, via suco através de interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio e por meio de interações eletrostáticas (FIGURA 5.1)⁸⁰⁻⁸³.

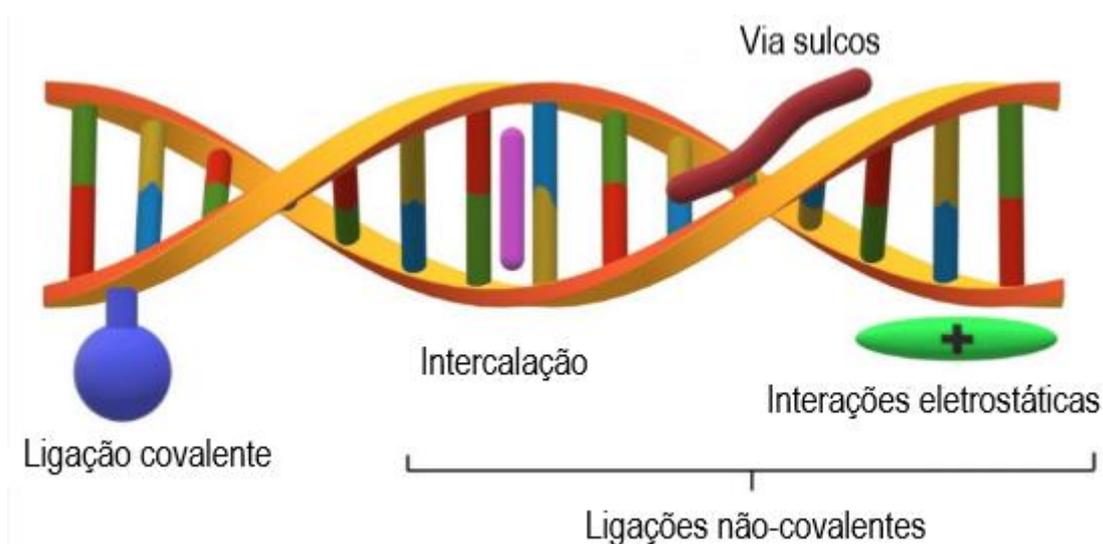


FIGURA 5.1 - Modos de interação Medicamento-DNA. Fonte: adaptado RAMOTOWSKA *et al.* (2021).

Tendo isso em mente, investigou-se a capacidade dos compostos PdP3 e PdB3 de interagir com o DNA por meio das técnicas espectroscópicas UV-vis, deslocamento de Hoechst-33258 por fluorescência e mobilidade eletroforética em gel de agarose.

Iniciou-se o estudo de interação composto-DNA com a técnica de titulação espectroscópica na região do ultravioleta visível. Este método permite a análise por meio das alterações espectroscópicas nas bandas de transição do composto ou do DNA. As interações composto-DNA por intercalação geralmente resultam em hipocromismo e batocromismo, devido às interações π^* do ligante que interagem com os orbitais π das bases de DNA, diminuindo as transições eletrônicas π - π^* do DNA. Interações mais fracas, como via suco e eletrostática, podem causar alterações hiper-crômicas^{80,81,84,85}. Analisando o espectro UV-vis para os compostos PdP3 e PdB3 titulados com diferentes concentrações de CT-DNA, apresentado na FIGURA 5.2, não se observaram quaisquer alterações significativas, indicando ausência de interação composto-DNA ou interações muito fracas, não sendo possível calcular a constante físico-química Kb (constante intrínseca de ligação composto-DNA).

Titulação por UV-vis (CT-DNA)

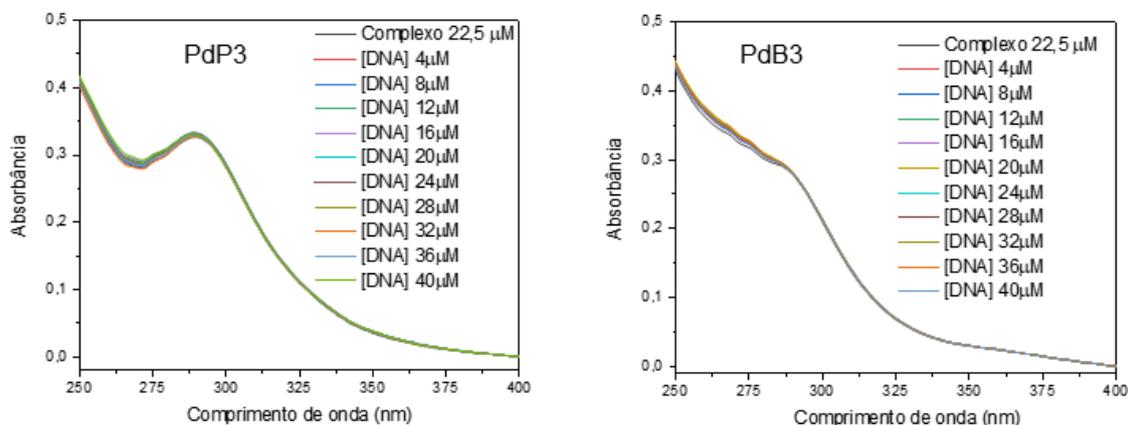


FIGURA 5.2 - Titulação espectroscópica dos compostos PdP3 e PdB3 com o CT-DNA.

Em seguida, realizou-se o estudo de competitividade com Hoechst-33258. O Hoechst-33258 é uma molécula orgânica fluorescente cuja fluorescência é aumentada ao interagir com o DNA por meio de um suco menor, a interação de outros compostos com o DNA pode provocar a supressão da fluorescência⁸⁶⁻⁸⁹. Deste modo, a FIGURA 5.3 traz os resultados de

deslocamento Hoechst-DNA + composto, sendo observado que os compostos têm a capacidade de diminuir a fluorescência do Hoechst-DNA de modo não sistemático, não sendo observada relação de supressão da fluorescência com o aumento da concentração, sugerindo interação não específica e fraca composto-DNA, indo de encontro com o resultado de titulação espectroscópica por UV-vís.

Deslocamento de Hoechst-33258

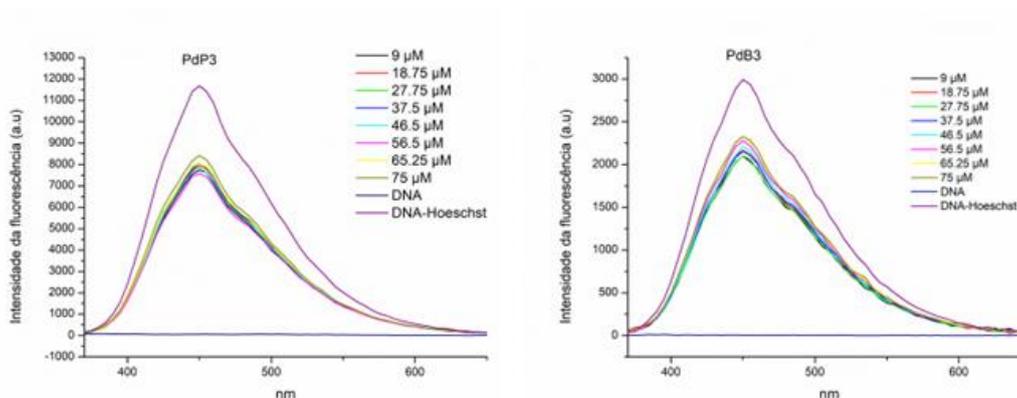


FIGURA 5.3 - Ensaio de competitividade por fluorescência dos compostos PdP3 e PdB3 com Hoechst-33258-DNA em diferentes concentrações.

O ensaio de interação composto-DNA por mobilidade eletroforética está relacionado com a capacidade do DNA plasmidial em se deslocar sob uma matriz de gel poroso ao aplicar uma diferença de potencial. O DNA plasmidial é formado por três tipos, sendo eles o superenovelado, que possui uma estrutura mais compacta apresentando uma maior mobilidade; a forma linear, que tem um deslocamento intermediário; e o circular aberto, que tem uma estrutura mais volumosa e, conseqüentemente, menor deslocamento. Quando o composto interage com o DNA superenovelado, pode causar relaxamento da estrutura e reduzir seu deslocamento no gel de agarose, ou pode fragmentar o DNA em pedaços menores, aumentando sua mobilidade⁹⁰.

Ao realizar o ensaio de interação com DNA por eletroforese, demonstrou-se que os compostos PdP3 e PdB3 não têm a capacidade de alterar as bandas do DNA superenovelado, encontrando-se igual ao controle negativo (DNA + DMSO). Apenas na banda do composto PdB3 com a concentração de 100 μM não foi observada (FIGURA 5.4). Com base nas informações obtidas das

interações composto-DNA por UV-vis, Hoechst-33258 e eletroforese, podemos propor que o DNA não é o alvo farmacológico dos compostos PdP3 e PdB3, apresentando pouca ou nenhuma interação nos ensaios realizados.

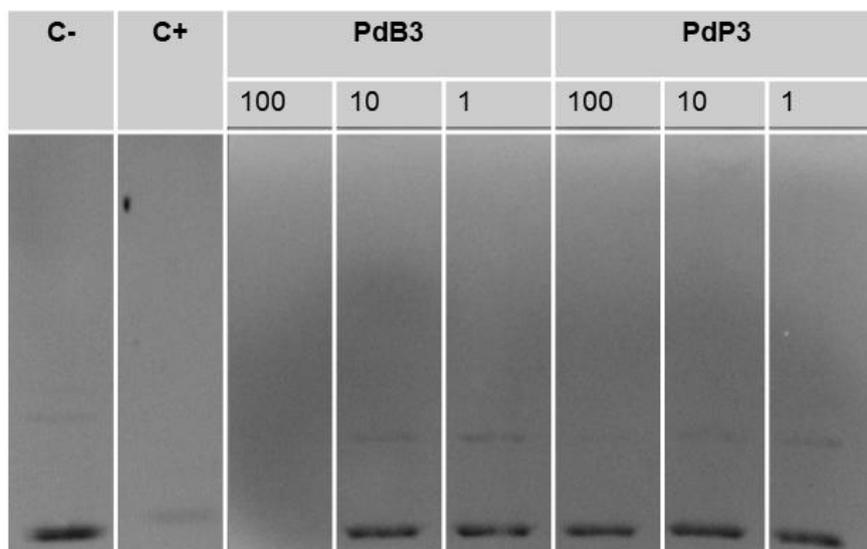


FIGURA 5.4 - Ensaio de eletroforese dos compostos PdP3 e PdB3 com DNA-pUC19 em diferentes concentrações [μM . C- (DMSO) e C+ (cisPt 15 μM).

5.2 Ensaio de Interação com Topoisomerase I β e II α

As topoisomerasas são enzimas que atuam em processos cruciais para a vida celular, tais como a replicação, transcrição, segregação cromossômica, e recombinação de DNA, realizando reações catalíticas no DNA e relaxando-o tanto positiva quanto negativamente. As topoisomerasas podem ser classificadas em TOPO I e TOPO II, com a TOPO I realizando a clivagem de uma única fita de DNA, enquanto a TOPO II realiza a clivagem em duas fitas de DNA. Além disso, podem ser subdivididas em α (alfa) e β (beta). Devido ao seu envolvimento em processos fundamentais para a manutenção e divisão celular, as topoisomerasas tornaram-se alvos farmacológicos importantes para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento do câncer, como a Doxorubicina e o Etoposídeo, usados no tratamento de diversos cânceres e têm como alvo as topoisomerasas⁹¹⁻⁹⁴.

Neste estudo, investigou-se a capacidade dos compostos PdP3 e PdB3 de inibir a ação da topoisomerase I β e II α , por meio do método de mobilidade

eletroforética em gel de agarose com o plasmídeo pBR322. A FIGURA – 5.5 A e B apresenta as imagens do gel de eletroforese do DNA plasmídeo incubado com as TOPO I β e TOPO II α tratados com diferentes concentrações de PdP3 e PdB3.

Nos ensaios de TOPO I β e TOPO II α , os resultados foram semelhantes. Inicialmente, temos o controle negativo (C-) quando o plasmídeo pBR322 foi incubado somente com DMSO, resultando nas bandas apenas das isoformas do plasmídeo pBR322. No controle positivo (C+), o plasmídeo foi incubado com a TOPO I β ou TOPO II α e, em ambos, não se observou a banda do plasmídeo superenovelado, indicando a fragmentação ou relaxamento do DNA pela ação enzimática das topoisomerases I β e II α . Ao analisar as bandas resultantes, após a adição dos compostos, não se observou diferença em comparação com o controle positivo. Sendo assim, sugere-se que essas enzimas também não são os alvos dos compostos PdP3 e PdB3.

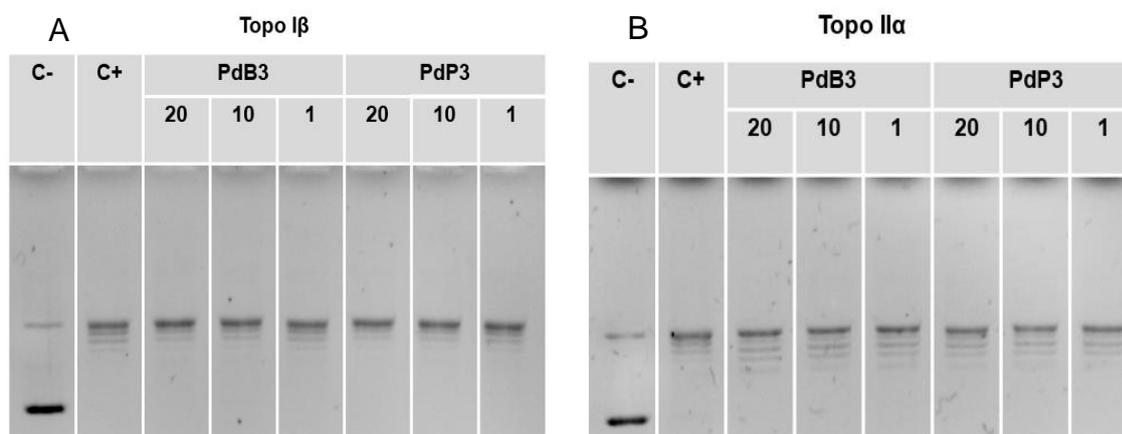


FIGURA 5.5 - A) ensaio de eletroforese com a TOP I β tratado com diferentes concentrações de PdB3 e PdP3. B) ensaio de eletroforese para a top II α tratado com diferentes concentrações de PdB3 e PdP3. C - = pBR322 + DMSO; C+ = pBR322 + TOPO I α ou II β .

5.3 Interação dos compostos com a Albumina de Soro Humano (HSA)

A Albumina Sérica Humana (HSA) é a proteína mais abundante no sistema circulatório, desempenhando a função de transporte de ácidos graxos, inúmeros metabólitos e medicamentos. A ligação de medicamentos à HSA é de grande relevância, uma vez que afeta a atividade e a disponibilidade do medicamento, além de se acumular nos tecidos tumorais, tornando-se um importante carreador de agentes quimioterápicos⁹⁵⁻⁹⁷.

O estudo de interação dos compostos PdP3 e PdB3 com a HSA foi realizado por meio da supressão da fluorescência (FIGURA 5.6 e FIGURA A33). A HSA possui fragmentos de triptofano em sua estrutura, conferindo-lhe propriedades fluorescentes; assim, compostos que interagem com a biomolécula acabam reduzindo sua fluorescência. Com base na supressão da fluorescência decorrente da interação composto-HSA, foram calculados 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° , que se encontram listados na TABELA 5.1.

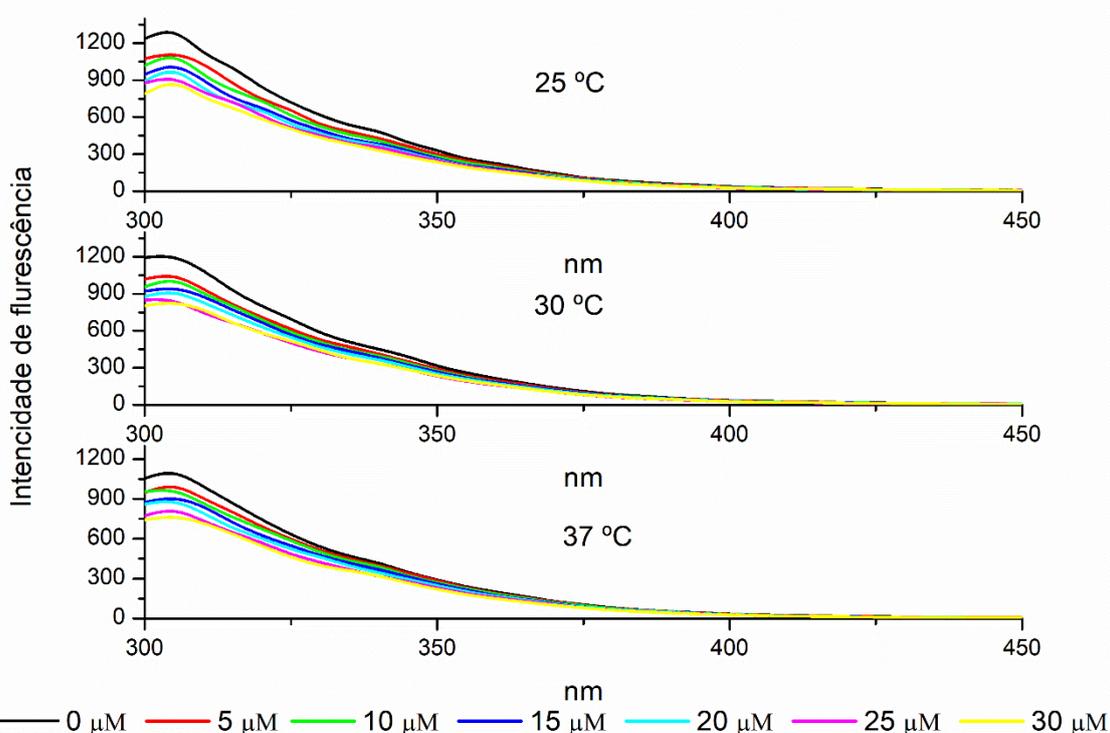


FIGURA 5.6 - Espectros da supressão de fluorescência da HSA pelo aumento da concentração do composto PdB3 em diferentes temperaturas (25, 30 e 35 °C).

TABELA 5.1 - Dados obtidos a partir da supressão de fluorescência da HSA pelos complexos PdP3 e PdB3.

Temperatura (K)	K_{sv} $10^4(M^{-1})$	K_q $10^{12}(M^{-1}s^{-1})$	K_b $10^3(M^{-1})$	n	ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG° (kJ mol ⁻¹)
PdP3							
298	1,41 ± 0,06	2,40	3,60 ± 0,001	0.86			-20.302 ± 5.170
303	1,47 ± 0,15	2,50	2,40 ± 0,001	0.82	93.40	378.29	-19.651 ± 5.217
310	1,45 ± 0,15	2,40	14,1 ± 0,002	0.99			-24.633 ± 4.844
PdB3							
298	1,39 ± 0,07	2,30	1,8 ± 0.002	0.80			-18.535 ± 4.516
303	1,33 ± 0,13	2,20	0,80 ± 0.001	0.72	-27.91	-33.33	-16.810 ± 5.293
310	1,34 ± 0,06	2,20	1,10 ± 0.001	0.75			-18.008 ± 5.243

A supressão da fluorescência pode decorrer de interação estática e dinâmica do composto com a HSA. Essas interações podem ser observadas por meio da análise da constante de supressão (K_{sv}) e pela constante de supressão biomolecular (K_q). Quando ocorre aumento de K_{sv} em decorrência do aumento da temperatura, o mecanismo de interação é dinâmico, e a diminuição de K_{sv} com o aumento da temperatura indica um mecanismo estático^{97,98}. Analisando os valores de K_{sv} obtidos para os compostos PdP3 e PdB3, observa-se que não ocorrem alterações significativas nos valores com as mudanças de temperatura; no entanto, a constante K_q encontra-se na ordem de grandeza de 10^{12} ($M^{-1}s^{-1}$), enquanto a constante de supressão da biomolécula máxima para a interação dinâmica é de 2×10^{10} ($M^{-1}s^{-1}$) e superior a esse valor é considerado interação estática⁹⁹. Dessa forma, a interação composto-HSA provavelmente esteja ocorrendo pelo mecanismo estático.

Outra informação importante é a constante de força de ligação (K_b) que nos fornece uma compreensão acerca da distribuição do medicamento no plasma, uma vez que ligações fracas resultam em baixa distribuição do fármaco. Os valores de K_b calculados para os compostos resultam em valores de magnitude de $\sim 10^3$, indicando interações moderadas a fracas⁹⁸. O número de sítios de interação calculado (n) encontra-se próximo de 1, indicando que a razão estequiométrica da interação HSA-complexo é de 1:1.

Os parâmetros termodinâmicos auxiliam no entendimento dos tipos de interação que estão ocorrendo entre composto-HSA. Os valores negativos para a energia livre de Gibbs (ΔG°) mostram que a ligação composto-HSA ocorre de forma espontânea. Valores positivos de ΔH° e ΔS° indicam interações hidrofóbicas, o que é observado para o composto PdP3, enquanto valores negativos indicam interações eletrostáticas, o que se observa para o composto PdB3¹⁰⁰. Segundo as informações obtidas neste ensaio, podemos indicar que os compostos possam ter uma interação adequada para ser carregado pela HSA.

6. ENSAIOS CELULARES

6.1 Ensaio de viabilidade celular por MTT

A ação citotóxica dos compostos foi avaliada pelo método colorimétrico MTT em diferentes linhagens celulares. Utilizaram-se as células A549 (tumoral de pulmão), Du-145 (tumoral de próstata), A2780 (tumoral de ovário), A2780cis (tumoral de ovário resistente à cisplatina), MCF-7 (tumoral de mama) e MDA-MB-231 (tumoral de mama triplo-negativa). Como controle, utilizou-se a MRC-5 não tumoral de pulmão. Estas linhagens celulares foram selecionadas, pois se encontram entre os tipos de cânceres mais incidentes no mundo⁹.

O método colorimétrico por MTT foi descrito por MOSMAN, T,(1983). Neste ensaio, a solução de coloração amarelada de MTT (1mg/mL) reage com as células vivas por meio de sua atividade mitocondrial, reduzindo a cristais roxos de formazan, solubilizados em álcool isopropanol e quantificados por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível e expressos na forma de IC₅₀ (concentração de inibição de 50% da viabilidade celular).

Os valores de IC₅₀ dos compostos sintetizados e dos precursores encontram-se na TABELA 6.1. Os compostos foram divididos em dois grupos: o grupo PdP e o grupo PdB, em referência às bisfosfinas (P = propano e B = butano). Inicialmente, pode-se observar que todos os compostos sintetizados não apresentaram atividade citotóxica nas células A549 e Du-145. No entanto, apresentaram atividades interessantes nas células tumorais de ovário (A2780 e A2780cis) e nas células tumorais de mama (MCF-7 e MDA-MB-231). Com exceção do composto PdP1, que não teve atividade em nenhuma das células testadas.

TABELA 6.1 - Valores de IC₅₀ por MTT

Compostos	MRC-5	A549	DU-145	A2780	A2780cis	MCF-7	MDA-MB-231	*IS	**IS	logP
PdP1	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	-	-	0,38
PdP2	>50	>50	>50	16,40 ± 0,3	16,04 ± 0,64	32,17 ± 1,60	31,25 ± 0,67	>3,12	>1,6	0,25
PdP3	14,45 ± 0,22	>50	>50	3,76 ± 0,06	1,70 ± 0,11	19,28 ± 0,37	3,28 ± 0,28	8,50	4,41	0,22
PdB1	>50	>50	>50	7,34 ± 0,36	21,5 ± 0,37	29,05 ± 0,55	37,04 ± 0,27	>2,32	>1,35	0,23
PdB2	14,43 ± 0,17	>50	>50	4,45 ± 0,5	9,44 ± 0,16	21,22 ± 0,71	8,67 ± 0,27	1,53	1,67	0,33
PdB3	15,54 ± 1,21	>50	>50	1,09 ± 0,07	0,99 ± 0,15	12,26 ± 0,98	1,01 ± 0,08	15,69	15,38	0,64
Cisplatina	12,47 ± 0,15	14,40 ± 1,40	2,3 ± 0,4	11,17 ± 0,30	25,61 ± 0,29	13,9 ± 2,0	>50	0,50	0,25<	-
DPPP e DPPB	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	-	-	-
Tiossemicarbazidas R2 = (H, -CH ₃ e - CH ₂ CH ₃)	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	-	-	-

*IS: (MRC5/A2780 Cis) **IS: (MRC5/MDA-MB-231)

Ao se fazer a análise dentro de cada grupo, nota-se que há um aumento relevante da atividade citotóxica conforme descemos no grupo, com a seguinte tendência PdP1<PdP2<PdP3 e PdB1<PdB2<PdB3, e ao comparar entre os grupos, o grupo PdB é mais ativo que o grupo PdP.

O aumento da atividade dentro do grupo está relacionado com os substituintes nas tiossemicarbazidas, sendo o substituinte -CH₂CH₃ (etil) o mais ativo, -CH₃ (metil) de atividade intermediária e o substituinte -H (hidrogênio) o menos ativo. Já o aumento da atividade citotóxica entre os grupos é atribuído ao aumento do -CH₂- entre as fosfinas. Dessa forma, pode-se atribuir o efeito estrutura-atividade ao aumento do grupo -CH₂- nos complexos, sendo mais pronunciado nas tiossemicarbazidas.

Para tentar entender a relação estrutura-atividade, foi realizado o ensaio de lipofilicidade por titulação UV-vis, uma vez que compostos mais lipofílicos possuem uma capacidade melhor de atravessar a membrana celular, podendo acarretar uma maior ação citotóxica. No entanto, os resultados demonstraram valores de logP semelhantes para quase todos os compostos, com exceção do complexo PdB3, que apresentou um maior valor de logP, o que pode estar relacionado com sua maior atividade, mas não justifica a relação estrutura-atividade dentro do grupo (TABELA 6.1).

Ao comparar a ação citotóxica dos compostos com os da literatura, nota-se que não há estudos sistemáticos com alterações das tiossemicarbazidas em complexos metálicos. Porém, ROCHA *et al.* (2013) e (2016), ao fazerem alterações sistemáticas em grupos lábeis da esfera de coordenação e contra íons (Cl⁻, Br⁻, I⁻ e SCN⁻) em complexos de paládio com tiossemicarbazidas (R= 4-metil e 4-fenil) e fosfinas, observaram valores baixos de IC₅₀ (2,79 ± 0,58 a 8,84 ± 1,21) em linhagens tumorais de camundongos (LM3 e LP0), demonstrando variações bem próximas e indicando que a ação dos complexos é proveniente da coordenação das tiossemicarbazidas.

Complexos metálicos com variações sistemáticas das bisfosfinas e sua influência na estrutura-atividade antitumoral são relatados desde a década de 80. Segundo SNYDER *et al.* (1986), a variação do grupo alcano de 1-6 resulta em alterações das propriedades antitumorais, com a atividade máxima para o

etano ou cis-etileno. E a substituição do grupo fenil por etil ou benzil resulta na inativação dos complexos.

Entre todos os compostos, o composto PdB3 apresenta os melhores valores de IC_{50} , destacando as células A2780, A2780cis e MDA-MB-231, com valores de $1,09 \pm 0,07$, $0,99 \pm 0,15$ e $1,01 \pm 0,08$, respectivamente. O segundo composto mais ativo é o PdP3, com valores de IC_{50} de $3,76 \pm 0,06$, $1,70 \pm 0,11$ e $3,28 \pm 0,28$ para as mesmas células, na ordem em que se encontram. Ao comparar com a cisplatina, o fármaco comercial em uso no tratamento de diversos cânceres¹⁰³, o composto PdB3 apresenta Índice de Seletividade de 15,69 (MRC-5/A2780cis) e de 15,38 (MRC-5/MDA-MB-231), enquanto a cisplatina apresenta Índice de Seletividade de 0,5 (MRC-5/A2780cis) e menor 0,25 (MRC-5/MDA-MB-231), sendo o composto mais seletivo que a cisplatina, demonstrando uma maior preferência pelas células tumorais de ovário e mama. O composto PdP3 também demonstra uma seletividade melhor que a cisplatina para a célula A2780cis, com valor de 8,50 (MRC-5/A2780cis).

Devido a esses resultados, os compostos PdP3 e PdB3 foram selecionados para ensaios complementares, a fim de compreender melhor os danos causados nas células e seu modo de ação.

Para as células tumorais de ovário, os compostos não apresentaram diferenças significativas nos valores de IC_{50} . Como a célula A2780cis apresenta problemas de resistência com a cisplatina, dificultando o tratamento do paciente, esta linhagem celular foi selecionada para estudos adicionais com os compostos mais ativos¹⁰⁴. Já as células tumorais de mama, os compostos foram mais ativos na célula MDA-MB-231, sendo esta também selecionada para estudo. A investigação dos compostos com as células MDA-MB-231 é de grande relevância, uma vez que esta é classificada como câncer triplo negativo (TNBC), ou seja, que não expressa os receptores de estrogênio ou progesterona e não produz a proteína HER2. Fazendo com que esse tipo de câncer cresça e se espalhe de forma muito agressiva^{60,105}.

6.2 Ensaio de formação de colônias

O ensaio de sobrevivência clonogênica ou de formação de colônias avalia a capacidade de uma única célula em formar colônias de 50 ou mais células. Este ensaio fornece informação sobre os efeitos citotóxicos/citostáticos de longo prazo de um medicamento ou composto de interesse, medindo a capacidade proliferativa das células em formar uma colônia após o tratamento^{106,107}. Segundo MIRZAYANS *et al.* (2007), o ensaio clonogênico é considerado 'padrão ouro', pois leva em consideração todos os tipos de morte celular e os efeitos sobre a paralisação e retardo do crescimento celular.

O ensaio clonogênico foi realizado para os compostos PdP3 e PdB3 nas células MRC-5 (controle), A2780cis e MDA-MB-231, sendo avaliado o número de colônias e a área das colônias após 10 dias de tratamento com os compostos em diferentes concentrações. A FIGURA 6.1 traz os resultados do composto PdB3, demonstrando que o composto tem um maior potencial citotóxico/citostático frente às células tumorais de mama e ovário, reduzindo o número de colônias para 35% e a área da colônia para 19% na concentração de 1,01 μM (IC_{50}), e para as concentrações iguais ou maiores que 2,02 μM ($2 \times \text{IC}_{50}$), o número e a área das colônias são reduzidos praticamente a zero (0) para a linhagem celular A2780cis.

A ação do composto na linhagem celular MDA-MB-231 mostra a redução do número e área da colônia para 30% a 40% com a concentração de 1,01 μM (IC_{50}) e inibição total para a concentração de 4,04 μM ($4 \times \text{IC}_{50}$). Na célula não tumoral de pulmão (MRC-5), o composto PdB3 reduz o número e a área das colônias para 40 a 48% na concentração de 1,01 μM e na concentração de 4,04 μM , o número e a área das colônias permanecem em torno de 31 a 43%, demonstrando uma maior ação citotóxica/citostática nas células tumorais, corroborando com os valores de IC_{50} por MTT, além do composto apresentar efeito dose-resposta dependente, que conforme aumenta a concentração, ocorre a redução no número e área das colônias. Os resultados para o composto PdP3 são similares e encontram-se no ANEXO (FIGURA A31).

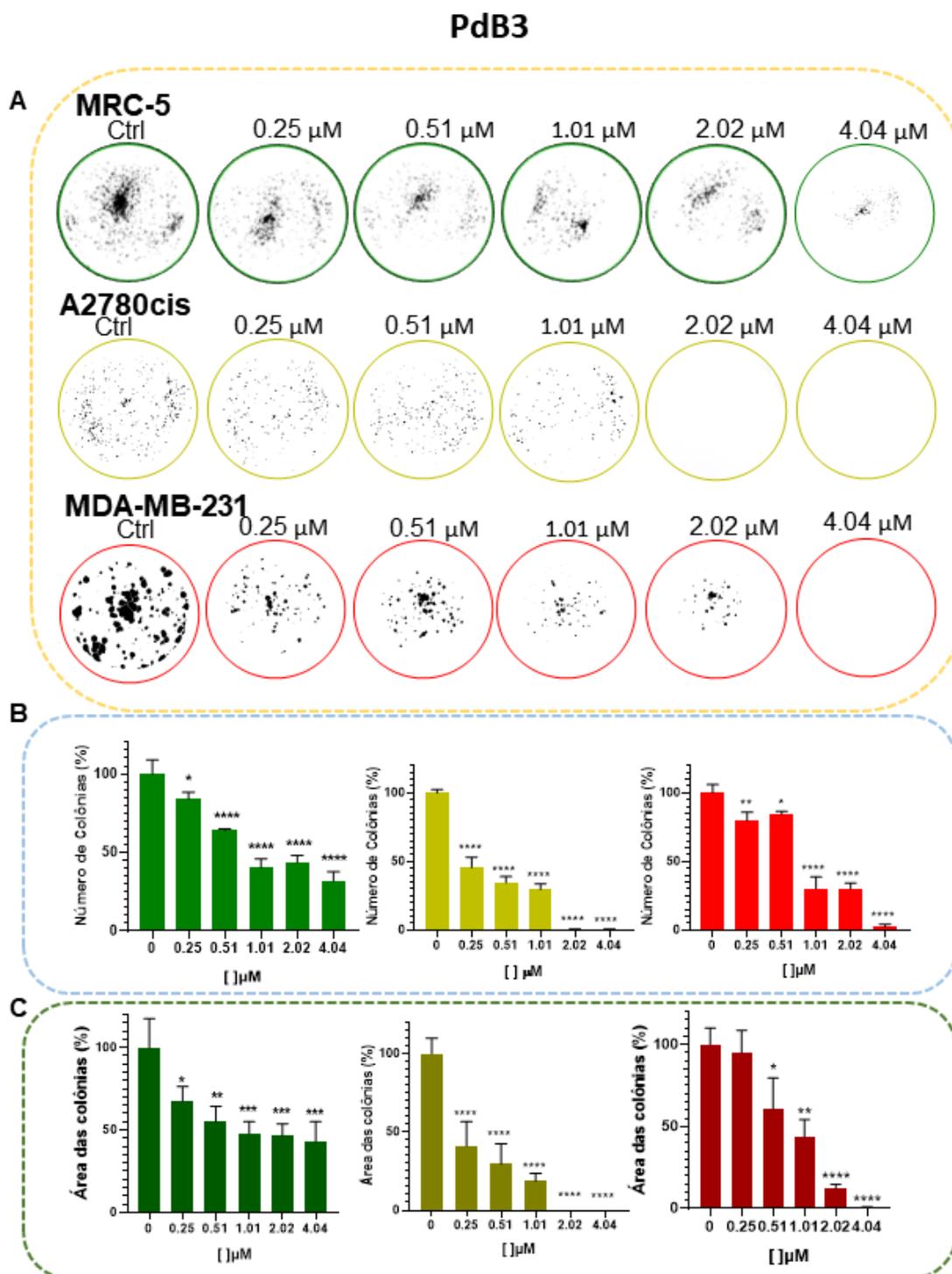


FIGURA 6.1 - A) imagens das colônias MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações do composto PdB3. B) distribuição do número de colônias (%) para cada concentração (verde - MRC-5), (amarelo - A2780cis) e (vermelho - MDA-MB-231). Valores de significância: * $p = 0,01$ ** $p = 0,004$ *** $p = 0,0003$ e **** $p < 0,0001$.

6.2.1. Ensaio morfológico (campo claro, PI e Green plasma/DAPI)

A análise da morfologia celular tem por finalidade avaliar os danos causados nas células após o tratamento com diferentes agentes, sejam eles químicos ou biológicos. As alterações no ambiente celular podem causar diferentes efeitos na saúde das células, como parada do ciclo celular, diminuição na taxa de proliferação e morte celular¹⁰⁹.

Na FIGURA 6.2, 6.3 e 6.4, trazemos as micrografias em campo claro das células MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231 tratadas com o composto PdB3 nas concentrações de 0,51, 1,01, 2,02 e 4,04 μM ($1/2 \times \text{IC}_{50}$, IC_{50} , $2 \times \text{IC}_{50}$ e $4 \times \text{IC}_{50}$), no intervalo de 0, 24 e 48 horas. A FIGURA 6.5 mostra a ampliação das imagens com as concentrações Ctrl, 2,02 e 4,04 μM , para as três linhagens celulares.

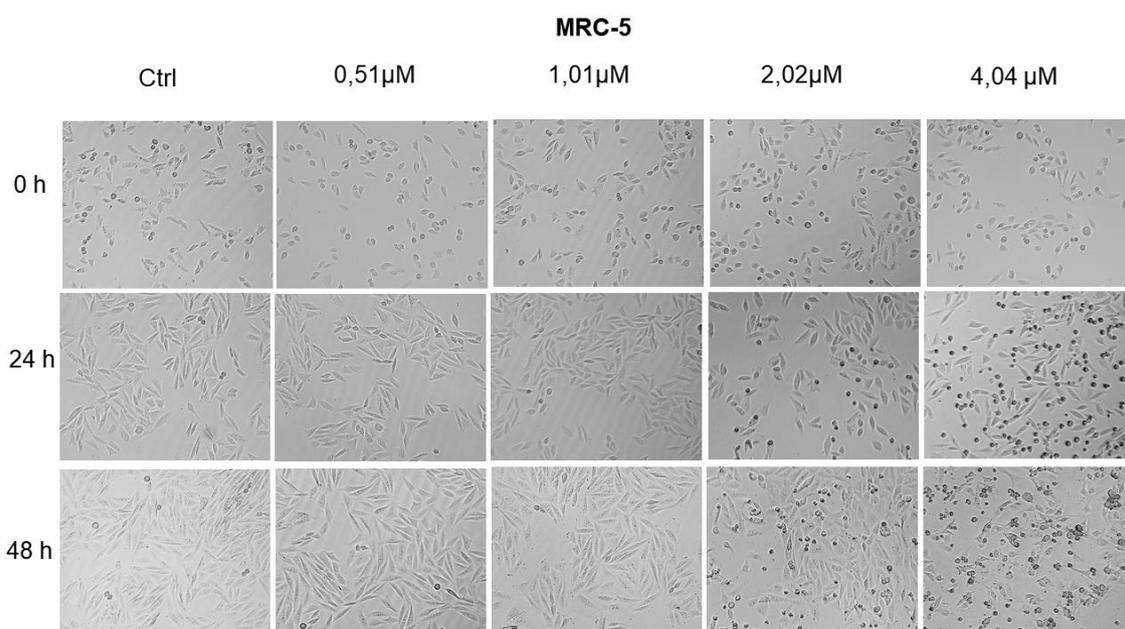


FIGURA 6.2 - Ensaio morfológico para o composto PdB3 na linhagem celular MRC-5. Obtido com microscópio CELENA® S com zoom de 10x.

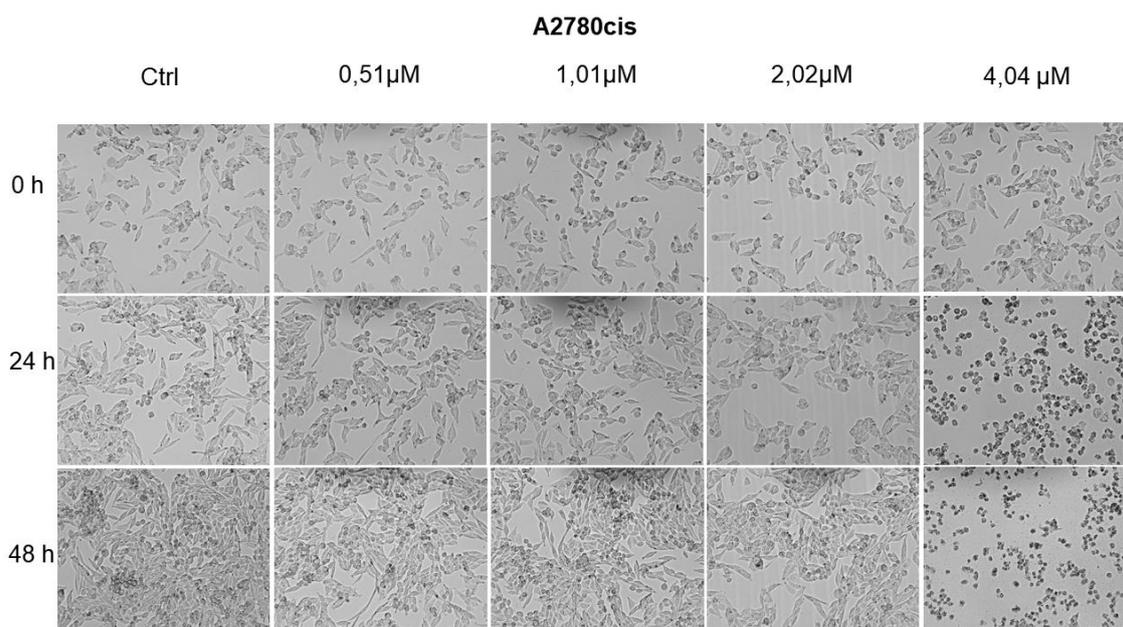


FIGURA 6.3 Ensaio morfológico para o composto PdB3 na linhagem celular A2780cis. Obtido com microscópio CELENA® S com zoom de 10x

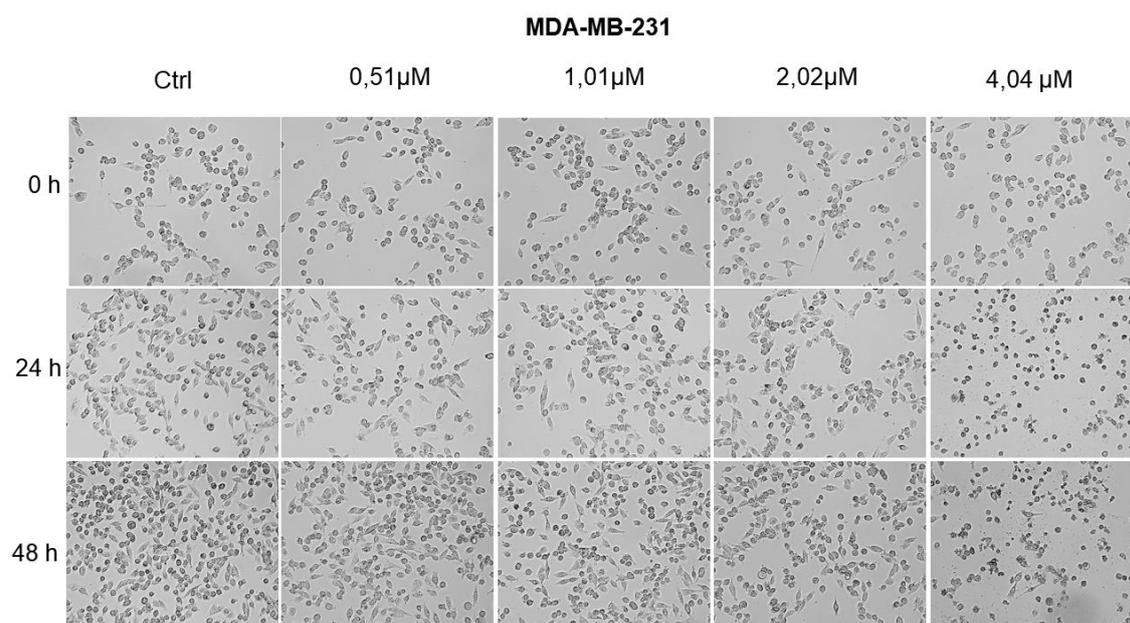


FIGURA 6.4 Ensaio morfológico para o composto PdB3 na linhagem celular MDA-MB-231. Obtido com microscópio CELENA® S com zoom de 10x

Ao analisarmos as imagens para as células A2780cis e MDA-MB-231, ambas apresentam as mesmas características. Ao adicionarmos o composto até a concentração de 2,02 μ M, não é observada nenhuma alteração significativa na estrutura celular. No entanto, observa-se a redução da densidade celular com o aumento da concentração, indicando uma ação citostática. Já com a

concentração de 4,04 μM , a maior concentração testada, verifica-se alterações significativas após 24 horas de tratamento, com as células diminuindo de tamanho, apresentando aspecto enrugado e esférico, com células em suspensão e formação de detritos, intensificado após 48 horas de tratamento. Essas alterações estão de acordo com o perfil de morte celular por apoptose. Uma vez que a morte por necrose é caracterizada pelo aumento no tamanho da célula, formação de bolha (envaginações superficiais) e ruptura da membrana celular com exposição do meio intracelular¹¹⁰⁻¹¹³.

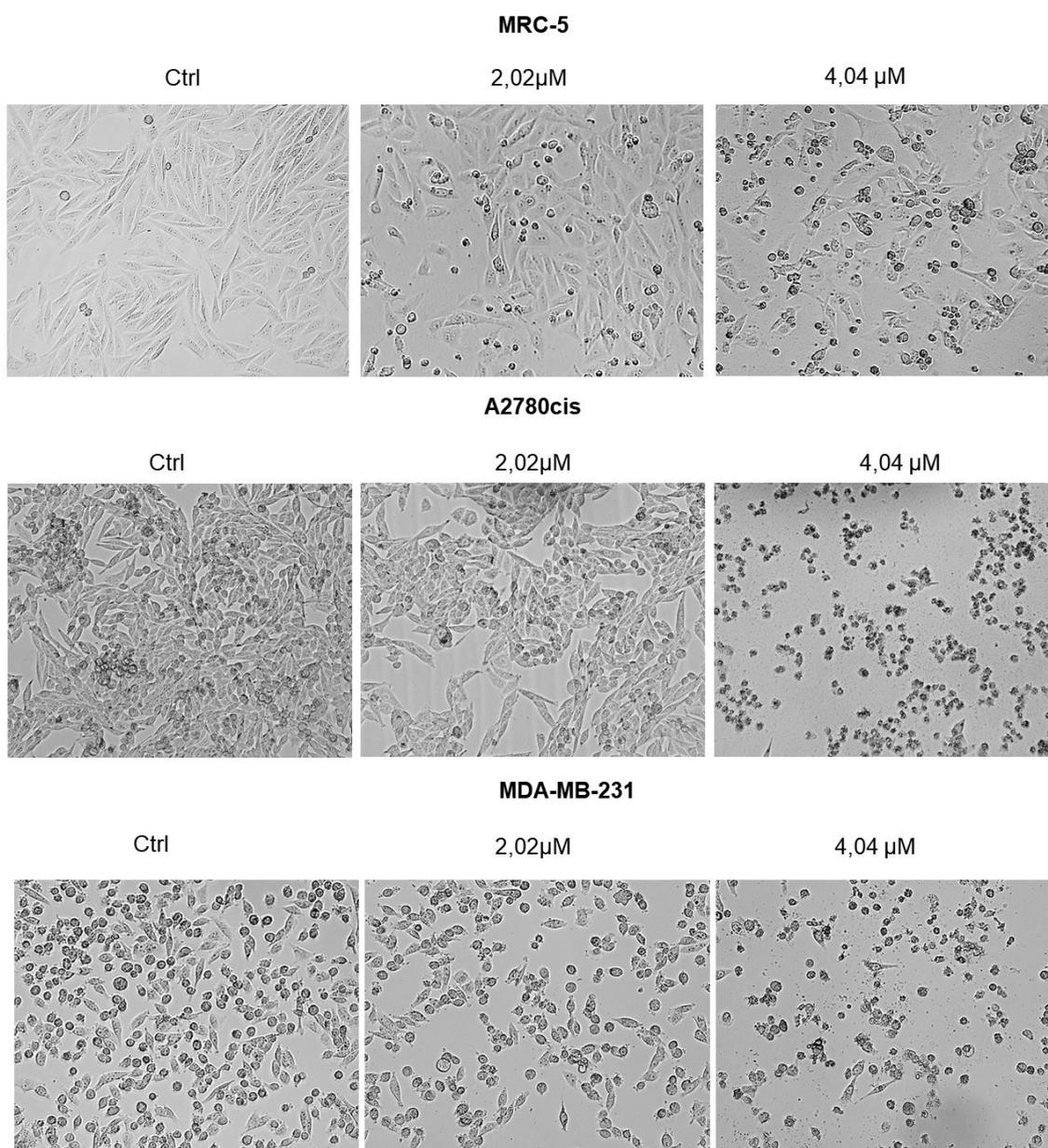


FIGURA 6.5 Ensaio morfológico para o composto PdB3 nas linhagens celulares MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231 após 48 horas de tratamento com as concentrações de Ctrl, 2,02 e 4,04 μM . Obtido com microscópio CELENA® S com zoom de 10x.

Ao comparar as células tumorais com a não tumoral, nota-se que as células MRC-5 mantêm sua estrutura celular em grande parte semelhante ao controle após o tratamento com a maior concentração, enquanto as células tumorais estão totalmente alteradas. Reafirmando a preferência do composto pelas células A2780cis e MDA-MB-231, como visto no ensaio de viabilidade celular por MTT e de formação de colônias.

Após a análise em campo claro, foi realizada a marcação das células com iodeto de propídeo (PI) (FIGURA-6.6). O PI é uma molécula orgânica fluorescente que intercala com as bases do DNA, marcando as células mortas em vermelho, uma vez que é necessário danos na membrana plasmática para ocorrer a entrada do PI, sendo impermeável a membranas de células intactas¹¹²⁻¹¹⁴. Dessa forma, podemos indicar que a maioria das células tumorais tratadas com a concentração de 4,04 μM encontra-se mortas ou em processo de morte celular, enquanto as células tratadas com a concentração de até 2,02 μM apresentam o mesmo perfil do controle, com poucas mortes.

Comparando as células tumorais com a não tumoral, as células MRC-5 apresentam pouca morte celular ao serem tratadas com a concentração de 4,04 μM , estando de acordo com as observações feitas em campo claro e indicando uma maior resistência ao tratamento com o composto, o que é positivo como agente quimioterápico, causando menos danos às células normais e mais danos às células tumorais. O composto PdP3 apresenta as mesmas características em campo claro e quando marcado com PI, e suas micrografias podem ser consultadas no anexo (FIGURA A33).

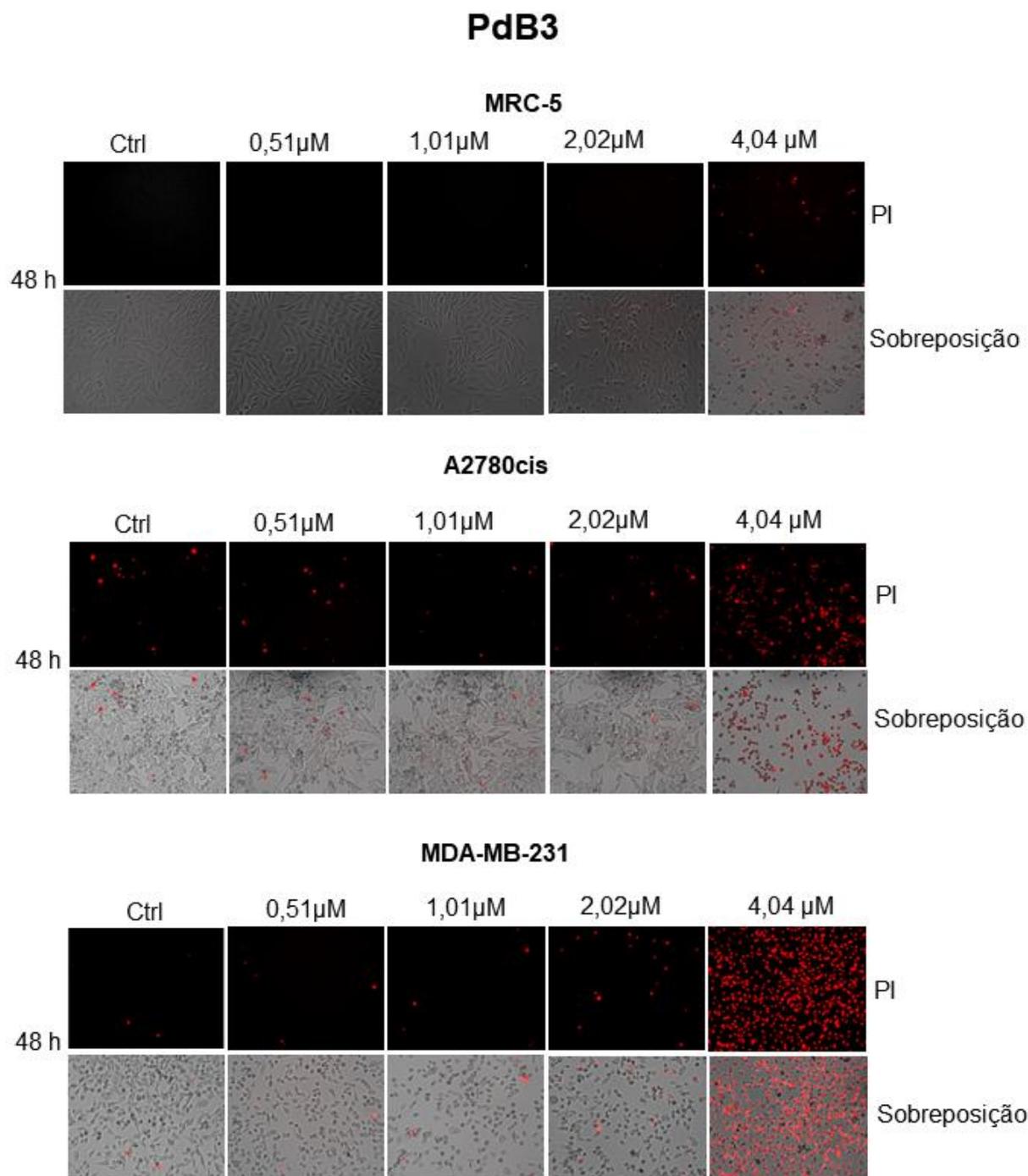


FIGURA 6.6 Ensaio morfológico para o composto PdB3 nas linhagens celulares MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231 marcado com PI. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom de 10x.

Para auxiliar na análise morfológica, foi analisada a morfologia da célula por fluorescência com Green plasma (CellMask™) e DAPI após 48 horas de tratamento. O Green plasma marca a membrana plasmática e o citoplasma em verde, e o DAPI marca o núcleo celular em azul, fornecendo mais informações acerca das alterações morfológicas.

Ao se analisar a membrana plasmática primeiro, nota-se que não há danos na membrana celular até a concentração de 2,02 μM ($2 \times \text{IC}_{50}$), permanecendo semelhante ao controle. Já com a concentração de 4,04 μM , a membrana celular encontra-se totalmente deformada, com encolhimento e empacotamento na forma esférica para ambas as linhagens celulares (A2780cis e MDA-MB-231) tratadas com o composto PdB3 (FIGURA 6.7).

A marcação do núcleo celular com DAPI em azul mostra a condensação e a fragmentação da cromatina para as células tratadas com a maior concentração de PdB3, enquanto nas concentrações menores não há alterações. Essas observações concordam com as informações de campo claro e a marcação com PI, indicando que as alterações morfológicas na concentração de 4,04 μM induzem a morte celular pelo mecanismo apoptótico e que as concentrações iguais ou menores que 2,02 μM afetam a proliferação celular, indicando uma ação citostática do composto nas células A2780cis e MDA-MB-231.

As alterações morfológicas aqui descritas são similares com as da literatura para as células A2780 (tumoral de ovário), A2780/C30 (tumoral de ovário resistente a cisplatina), HELA (adenocarcinoma – colo do útero), CEM (leucemia) tratadas com oxiplatina, cisplatina, carboplatina e etoposídeo (VP-16), correlacionando as alterações morfológicas com a morte celular por apoptose^{112,115,116}.

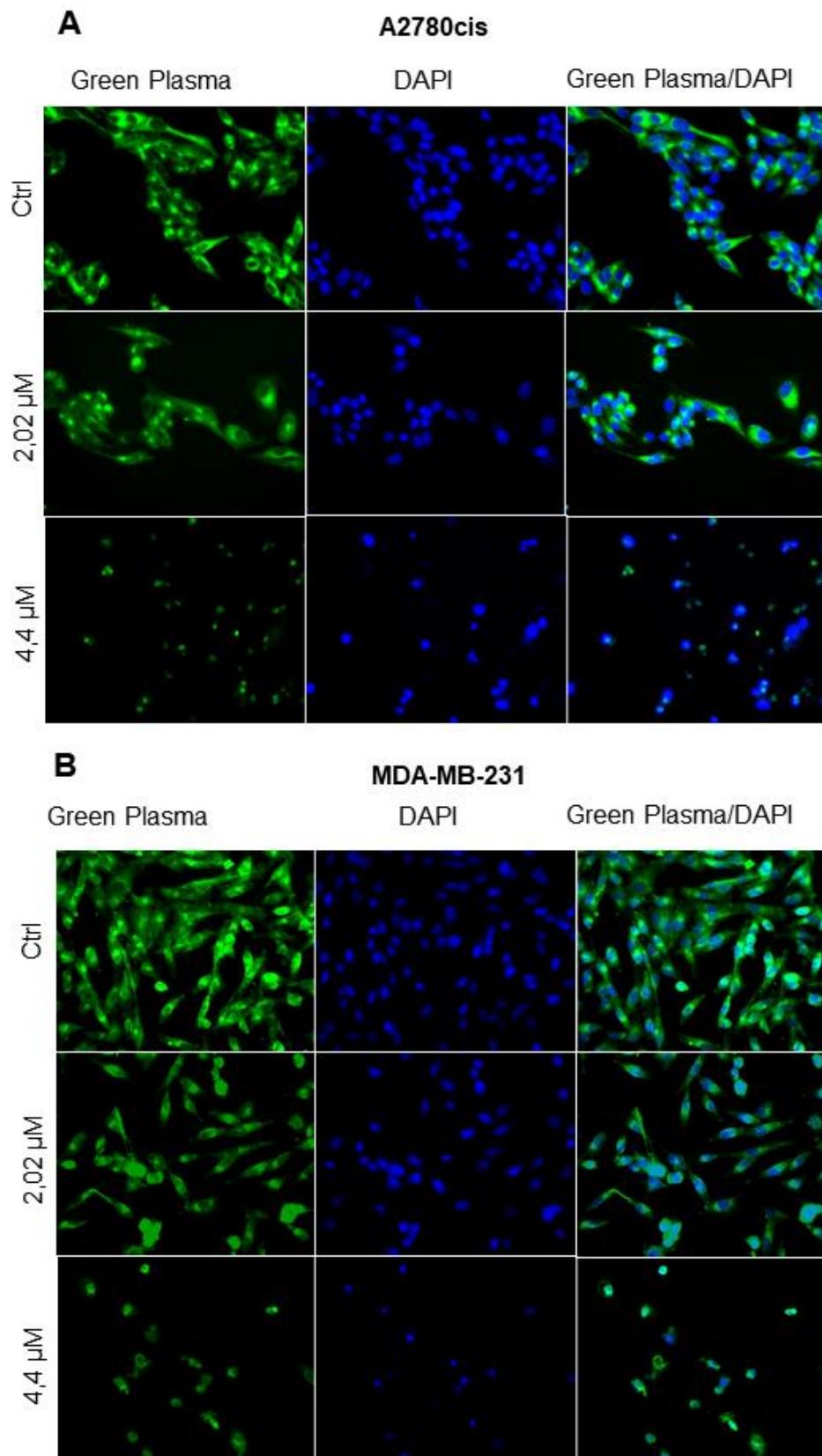


FIGURA 6.7 - Ensaio morfológico por fluorescência. A) células A2780cis tratadas com PdB3 e marcadas com Green Plasma (verde) e DAPI (azul). B) células MDA-MB-231 tratadas com PdB3 e marcadas com Green Plasma (verde) e DAPI (azul). Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom de 20x.

6.3 Migração celular

Um dos grandes problemas do câncer é a sua capacidade de invadir e migrar para outras regiões do corpo; este processo, conhecido como metástase, é a principal causa de morte decorrente da doença^{117,118}. Para avaliar se o composto PdB3 possui propriedades antimetastáticas, foi realizado o ensaio de fechamento de ferida (Wound Healing) nas células A2780cis e MDA-MB-231. Neste ensaio, uma fenda é aberta em uma monocamada de células confluentes em torno de 80-90%, então é feito o tratamento com o composto de interesse e imagens são adquiridas com auxílio de um microscópio de campo invertido em diferentes intervalos de tempo, sendo posteriormente quantificada a taxa de fechamento da fenda¹¹⁹⁻¹²¹.

No ensaio de migração celular, o composto PdB3 apresentou atividade inibitória superior na linhagem tumoral A2780cis em comparação com a MDA-MB-231, com ação inibitória em todas as concentrações testadas (0,51, 1,01 e 2,02 μM) ($\text{IC}_{50} = 1,01 \mu\text{M}$). Para as células A2780cis, no intervalo de 24h, as concentrações de 0,51 e 1,01 μM fecharam a fenda em torno de 19% e a concentração de 2,02 μM fechou em aproximadamente 10%, comparando com o controle que fechou 44% da fenda. No período de 48 horas, o controle fechou 68% e as concentrações de 0,51 e 1,01 μM fecharam 50 e 40% da fenda, respectivamente, com a concentração de 2,02 μM fechando 25% da área (FIGURA 6.8).

Na linhagem MDA-MB-231, o composto também apresenta ação inibitória ao processo de migração celular nas concentrações de 1,01 e 2,02 μM para o período de 24 horas de tratamento, fechando a fenda em torno de 23 e 18% respectivamente, enquanto o controle fechou 40%. Em 48 horas de tratamento, apenas a concentração de 2,02 μM apresenta diferença significativa na inibição da migração celular, com o fechamento da fenda em 26% em contraste com o controle que fechou 48% da área.

Estes resultados indicam que o composto PdB3 pode ter uma ação inibitória na migração das células MDA-MB-231 e A2780cis, sendo especialmente eficaz na linhagem tumoral de ovário resistente à cisplatina, provavelmente devido sua propriedade citostática. Conforme observado por

HATZIDAKI, Eleana *et al.* (2020), a cisplatina em uma concentração de $1\mu\text{M}$ não afeta a migração celular nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7. Em relação à linhagem tumoral de ovário, SHENG, W. J. *et al.* (2013) constataram que, na linhagem SKOV-3, tanto a oxiplatina quanto a neldaplatina inibiram a migração celular em 10%, enquanto a cisplatina não teve efeito significativo. Esses resultados destacam a posição favorável do composto PdB3 em comparação com os análogos de platina.

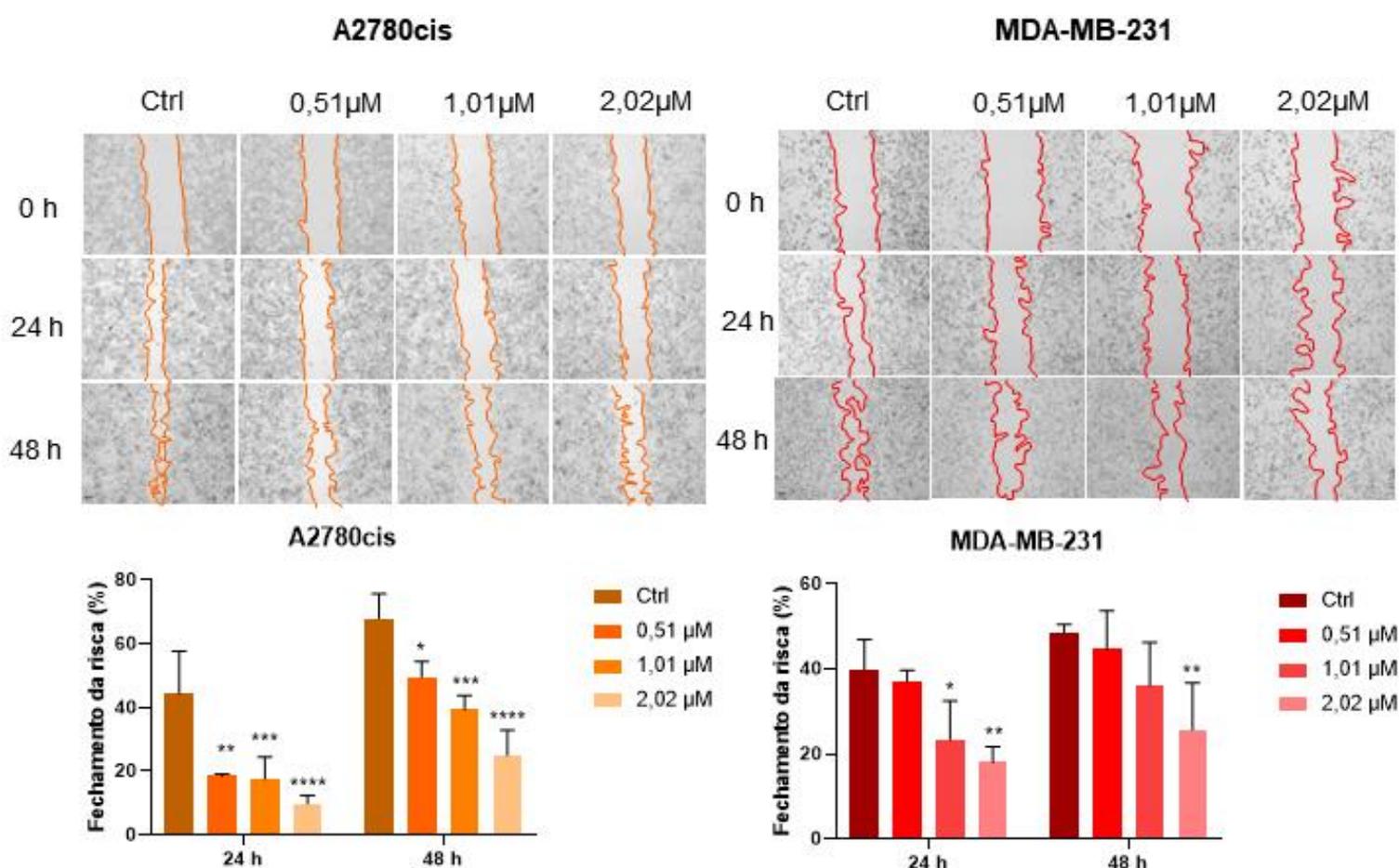


FIGURA 6.8 - Ensaio de fechamento de ferida do composto PdB3 nas linhagens celulares A2780cis e MDA-MB-231. Valores de significância: * $p = 0,02$, ** $p = 0,06$ e * $p = 0,0001$. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom de 10x

6.4 Viabilidade celular (Kit: LIVE/DEAD®)

O ensaio de viabilidade celular utilizando o Kit: LIVE/DEAD® foi realizado para o composto PdB3 com as linhagens celulares MRC-5, A2780cis e MDA-

MB-231. As células foram tratadas em diferentes concentrações e incubadas por 48 horas, após, as células foram coradas por 45 minutos e tiradas as micrografias no microscópio de fluorescência. As células viáveis foram determinadas pela fluorescência verde, devido à presença da atividade de esterase intracelular onipresente nas células viáveis que converte a calceína AM não fluorescente em fluorescente, e as células mortas são marcadas em vermelho pelo EThD-1 (homodímero de etídio) que entra nas células com a membrana celular danificada e aumenta sua fluorescência em 40 vezes após interagir com o DNA¹²⁴.

A FIGURA 6.9 A e B, traz as micrografias nas concentrações testadas e o efeito dose-resposta com valores de IC₅₀. Neste ensaio, as informações obtidas corroboram com os resultados de viabilidade celular por MTT, formação de colônias e morfológico, demonstrando valores próximos de IC₅₀ e uma maior preferência pelas células tumorais em relação à não tumoral. A presença de morte celular é observada para as concentrações iguais ou superiores a 4,04 µM nas células A2780cis e MDA-MB-231, enquanto a morte celular para a célula MRC-5 ocorre com a concentração de 8,08 µM.

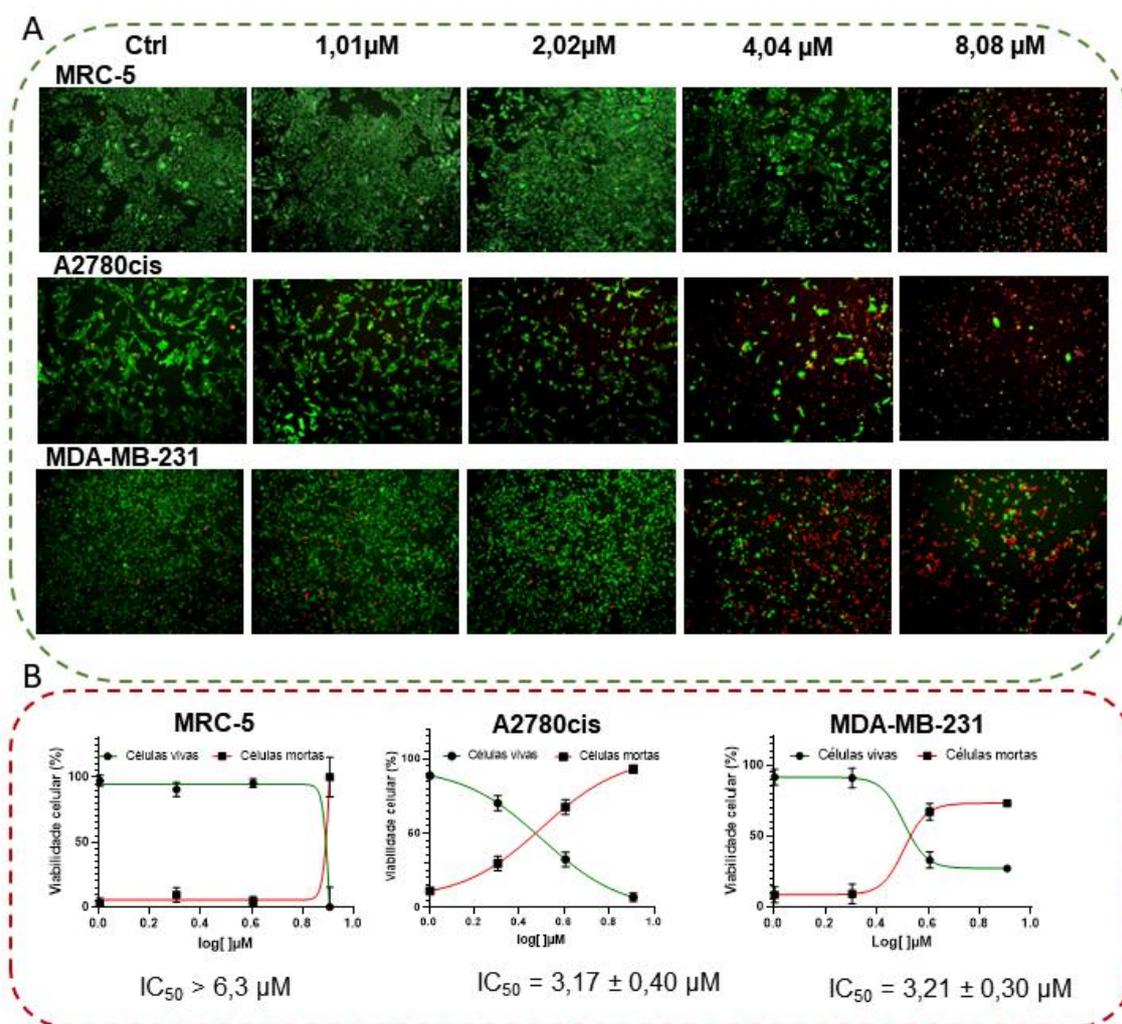


FIGURA 6.9 - A) Micrografias das células MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231 tratadas com o composto PdB3 e marcadas com o Kit: LIVE/DEAD após 48 horas de tratamento (células verdes = células viáveis e células vermelhas = células mortas). B) Curva dose-resposta das células MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231 tratadas com o composto PdB3 por 48 horas. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom de 4x.

6.5 Ensaio de ciclo celular

O ciclo celular, de forma simplista, é o processo pelo qual as células crescem e se multiplicam. Esse processo pode ser dividido em duas etapas: a interfase e a fase M (fase mitótica). A interfase é composta pelas fases G1, S e G2. A fase G1 é o momento em que a célula se prepara para sintetizar o DNA; nessa fase, a célula também pode optar por sair do ciclo celular, entrando na fase G0. A fase G0 ou estado de *quiescência*, é a fase em que as células se encontram em um estágio não proliferativo, mas com potencial para a divisão celular. Durante a fase S, ocorre a síntese e duplicação do DNA. Na fase G2, as células se preparam para entrar na fase M, verificando se todo o material genético foi duplicado corretamente. E, na fase M, a célula se divide em duas células filhas (FIGURA 6.10)¹²⁵⁻¹²⁸.

Durante as fases do ciclo celular, existem os pontos de verificação, os “checkpoints”. Esses pontos de verificação são importantes para evitar o acúmulo e a propagação de erros na divisão celular de células normais, realizando o reparo dos danos ou levando a célula à morte controlada (apoptose) caso os danos não sejam corrigidos. No entanto, nas células tumorais, os checkpoints encontram-se alterados, fazendo com que as células se multipliquem de forma descontrolada, propagando os erros¹²⁶⁻¹²⁹.

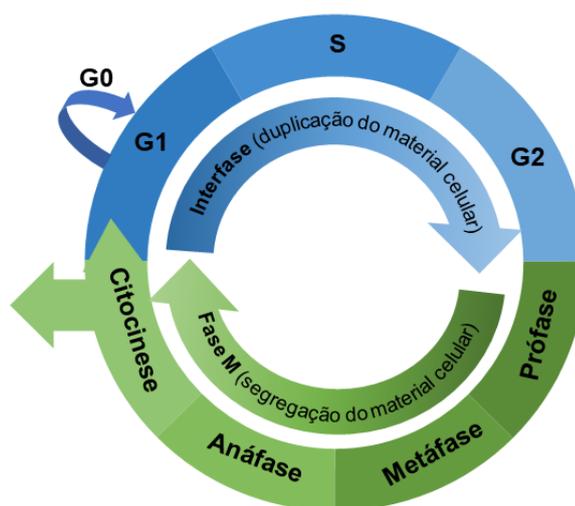


FIGURA 6.10 - Representação das fases do ciclo celular de células eucarióticas. Fonte: adaptado de MATTHEWS *et al.* (2022).

O composto PdB3 foi investigado quanto à capacidade de interferir nas fases dos ciclos celulares da célula A2780cis por citometria de fluxo nas

concentrações de 0,51 μM ($1/2 \times \text{IC}_{50}$), 1,01 μM (IC_{50}) e 4,04 μM ($4 \times \text{IC}_{50}$). A FIGURA 6.11 mostra que as células do controle tratadas com DMSO encontram-se em sua maior parte concentrada nas fases G1 e G2, com 51,7 e 26,9% respectivamente da população celular. As células tratadas com o composto mostram o acúmulo das células na fase sub-G1 conforme ocorre o aumento da concentração, com 26,1% na concentração de IC_{50} e 89,8% na concentração de $4 \times \text{IC}_{50}$.

A fase sub-G1 é identificada pela fragmentação do DNA intranuclear, indicando o processo de morte celular por apoptose^{130,131}. Dessa forma, o composto PdB3 nas concentrações de IC_{50} e $4 \times \text{IC}_{50}$ indica indução de morte celular por apoptose nas células A2780cis, estando de acordo com os resultados de ensaios morfológicos aqui relatados.

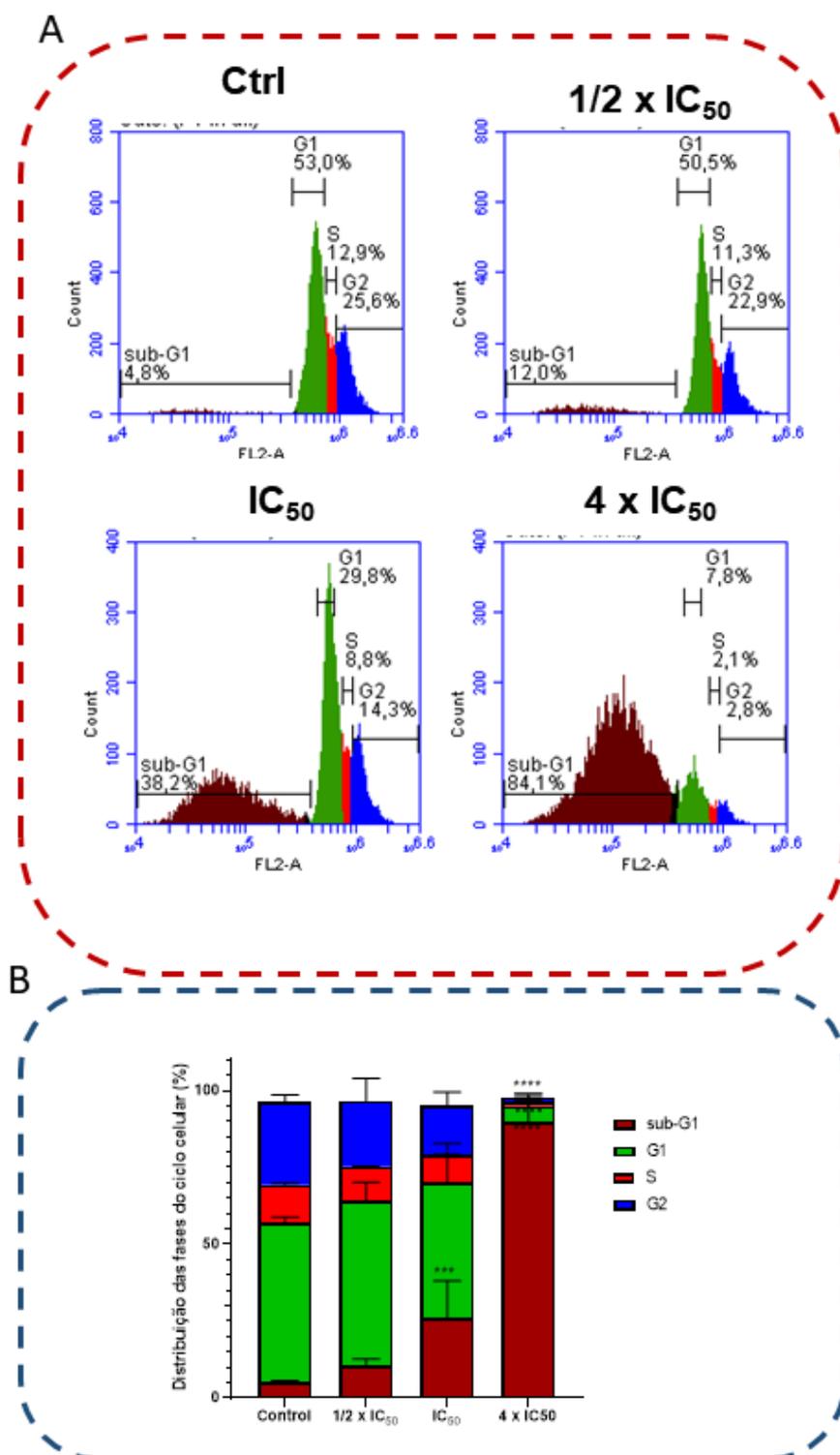


FIGURA 6.11 - A) Gráfico de distribuição da contagem de células para as fases do ciclo celular (sub-G1, G1, S e G2) tratadas com o composto PdB3. B) Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular em diferentes concentrações do composto PdB3. Nível de significância ***p = 0,0002 e ****p < 0,0001.

6.6 Ensaio de morte celular (Apoptose/Necrose)

O processo de morte celular em organismos multicelulares pode ser diferenciado de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas. Entre elas, a morte celular apoptótica e necrótica são as mais comuns¹³²⁻¹³⁴.

A morte celular apoptótica ocorre de forma controlada, desencadeada por processos fisiológicos normais, como o envelhecimento celular, ou anormais, causados por agentes farmacológicos. As células apoptóticas apresentam alterações morfológicas marcantes, como diminuição no tamanho, enrugamento, formato esférico, formação de bolhas (corpos apoptóticos), perda de adesão celular, condensação e fragmentação do DNA nuclear, e não causam processo inflamatório^{133,133,135}.

A morte celular por necrose é ocasionada por processos acidentais, caracterizada pelo aumento celular, ruptura da membrana plasmática e, conseqüentemente, exposição do meio intracelular, provocando processo inflamatório^{132,133,135,136}.

A fim de avaliar o tipo de morte que o composto PdB3 causa nas células, foi realizado o ensaio de apoptose por citometria de fluxo usando o Kit Anexina-PE na célula A2780cis. Os dados obtidos (FIGURA 6,12) indicam que o composto tem capacidade de induzir a morte celular por apoptose. Ao tratar as células com a concentração de 1,01 μM (IC_{50}) e 4,04 μM ($4 \times \text{IC}_{50}$), as células apresentam 50% e 77% da população celular em morte apoptótica, enquanto as mortes por necrose detectadas não são significativas.

Esta informação vai de encontro às observações feitas nos ensaios morfológicos de campo claro, PI, e Green Plasma/DAPI e o ensaio de ciclo celular, corroborando que o composto PdB3, na concentração de 4,04 μM , causa danos celulares irreversíveis levando à morte celular por apoptose. A indução de morte celular por apoptose causada por agentes quimioterápicos é desejada, uma vez que esse tipo de morte não desencadeia o processo inflamatório, e essas propriedades são observadas para os complexos à base de platina utilizados no tratamento do câncer de ovário^{115,116,137}.

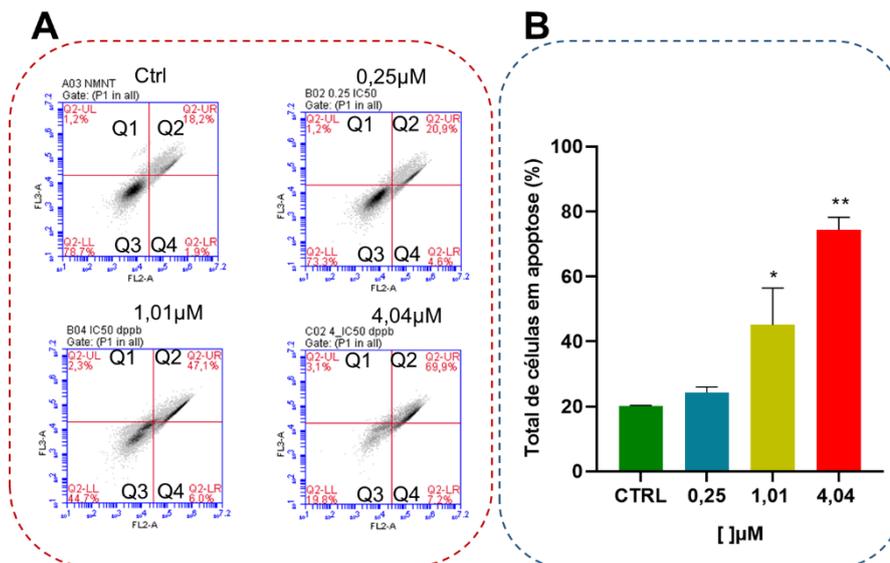


FIGURA 6.12 - A) Histograma da distribuição de morte celular tratada com diferentes concentrações do composto PdB3, Q1 - necrose, Q2 - células viáveis, Q3 - apoptose inicial e Q4 - apoptose tardia. B) Porcentagem de morte celular total (apoptose inicial + apoptose tardia). Nível de significância * $p = 0,03$ e ** $p = 0,002$.

6.7 Análise morfológica em cultura celular 3D

A cultura celular 3D se apresenta como uma ótima ferramenta para a compreensão do sistema fisiológico tumoral e na triagem para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos e seleção de medicamentos para o tratamento de pacientes^{54,62,138}. O modelo de cultura celular 3D oferece vantagens em relação ao modelo tradicional 2D, aproximando-se do modelo *in vivo*. Destaca-se os seguintes aspectos: i) as células são organizadas de forma a favorecer as interações célula-célula e célula-matriz; ii) a taxa de proliferação é diferenciada, aproximando-se do sistema *in vivo*; iii) os gradientes de oxigênio e nutrientes são distintos dentro da estrutura; iv) o pH é mais ácido; v) nota-se a presença de morte celular apoptótica e necrótica; vi) ocorre a regulação na expressão de genes e resistência a medicamentos. Enquanto no modelo bidimensional, as células são forçadas a se adaptar a uma superfície rígida, a distribuição de nutrientes e oxigênio ocorrem de forma uniforme, há menor interação célula-célula e remoção de células mortas^{54,56,60,62,138}.

Neste trabalho, o composto PdB3 e a cisplatina foram avaliados quanto à sua capacidade de alterar a estrutura celular 3D cultivada na forma de esferoides para a linhagem celular A2780cis. Os esferoides foram cultivados pelo método de levitação magnética, com a concentração celular de 1500 células por poço, em placas de 96 poços. Os esferoides foram cultivados por 4 dias até o início do tratamento, o qual foi realizado com diferentes concentrações (1,6, 6,3, 12,5, 50, e 100 μM) do composto. Os esferoides foram acompanhados por um período de 6 dias, após a adição dos compostos, totalizando 10 dias desde o plaqueamento das células.

A FIGURA 6.13 traz as mudanças morfológicas nos esferoides das células A2780cis tratadas com o composto PdB3 e cisplatina. Nota-se um aumento no tamanho dos esferoides não tratados ou tratados nas concentrações de 1,6 e 6,3 μM . O tratamento na concentração de 12,5 μM evidenciou a diminuição do tamanho dos esferoides após 48h (dia 6). A partir da concentração de 50 μM após 48h (dia 6) de tratamento, os esferoides perdem sua estrutura sofrendo fragmentação. Nota-se um aumento na fragmentação com o decorrer dos dias, indicando o enfraquecimento das interações célula-célula em decorrência da morte celular.

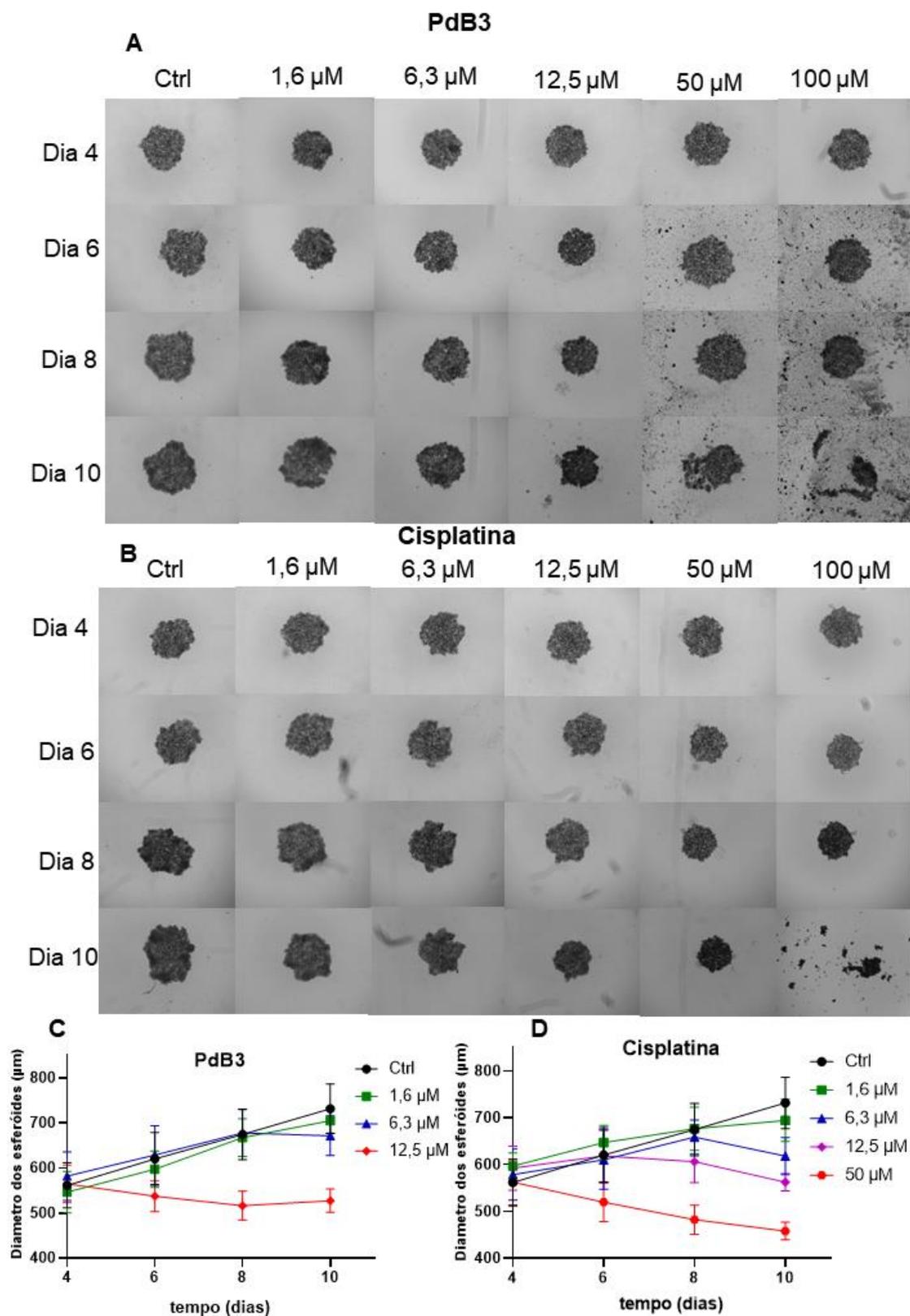


FIGURA 6.13 - A) Morfologia dos esferóides da célula A2780cis tratada com PdB3. B) Morfologia dos esferóides da célula A2780cis tratada com cisplatina. C) Diâmetro dos esferóides tratados com PdB3 e D) Diâmetro dos esferóides tratados com cisplatina. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom de 4x.

Alterações similares são observadas ao comparar com os resultados obtidos para a ação da cisplatina. No entanto, essas mudanças estruturais ocorrem em concentrações mais elevadas, sendo a diminuição do tamanho do esferoide observada na concentração de 50 μM , iniciando 48h após o tratamento. Já a fragmentação dos esferoides só é observada na concentração de 100 μM no dia 10. Estas evidências reforçam os dados obtidos no ensaio em modelo 2D (viabilidade celular por MTT), indicando que o composto PdB3 é mais ativo na linhagem celular A2780cis do que a cisplatina.

Uma informação relevante que podemos extrair deste ensaio é a maior resistência ao tratamento quando se analisa um sistema mais complexo como um arranjo celular tridimensional. Ao comparar o ensaio morfológico em 2D com o 3D para o complexo PdB3, percebe-se que as células só sofrem alterações morfológicas com a concentração de 4,04 μM no modelo 2D, e no 3D, as alterações morfológicas são observadas a partir de 12,5 μM , sendo aproximadamente 3 vezes mais resistente. No entanto, embora ocorra resistência ao tratamento no modelo 3D, as alterações morfológicas causadas pelo composto PdB3 ocorrem em concentração inferior ao valor de IC_{50} da cisplatina no modelo 2D ($\text{IC}_{50} = 25,61 \pm 0,98$).

As observações feitas nas mudanças dos esferoides, em relação ao tamanho e à resistência ao tratamento, são similares ao relatado na literatura. MANI *et al.* (2023) relataram a diminuição no tamanho dos esferoides para a linhagem tumoral CT-26 (adenocarcinoma do colo de camundongos) tratado com complexo de ósmio com derivados de fenantrolina após irradiação em 740 nm por 1 hora, observando-se o efeito da resistência ao tratamento no modelo 3D em comparação com o 2D. O efeito de resistência ao tratamento em modelos 3D também é observado para vários fármacos utilizados no tratamento do câncer em diferentes linhagens celulares, entre eles podemos destacar a cisplatina, doxorubicina, docetaxel, paclitaxel^{57,59,67,138}. Este aspecto demonstra a importância da utilização do modelo 3D na investigação de novos agentes antitumorais.

Para auxiliar na compreensão acerca da morte celular nos esferoides, realizou-se a marcação com PI e DAPI (FIGURA 6.14). Assim como no modelo 2D, a marcação com PI indica morte celular, enquanto a marcação com DAPI

auxilia no contraste para este ensaio. Para o composto PdB3, desde o controle até a concentração de 6,3 μM , a marcação com DAPI é mais intensa e encontra-se em maior área do que o PI, indicando pouca morte celular, enquanto em concentrações iguais ou superiores a 12,5 μM , a marcação com PI é mais intensa e está em maior área que o DAPI. A sobreposição PI/DAPI fornece uma coloração avermelhada na borda e roxa mais ao centro, indicando predominância de células mortas.

Para a cisplatina, a marcação com DAPI é predominante do controle até 12,5 μM , com pouca morte celular. E em 50 μM , a tonalidade vermelha é predominante, com quase 100% de morte celular, corroborando com as observações microscópicas no campo claro.

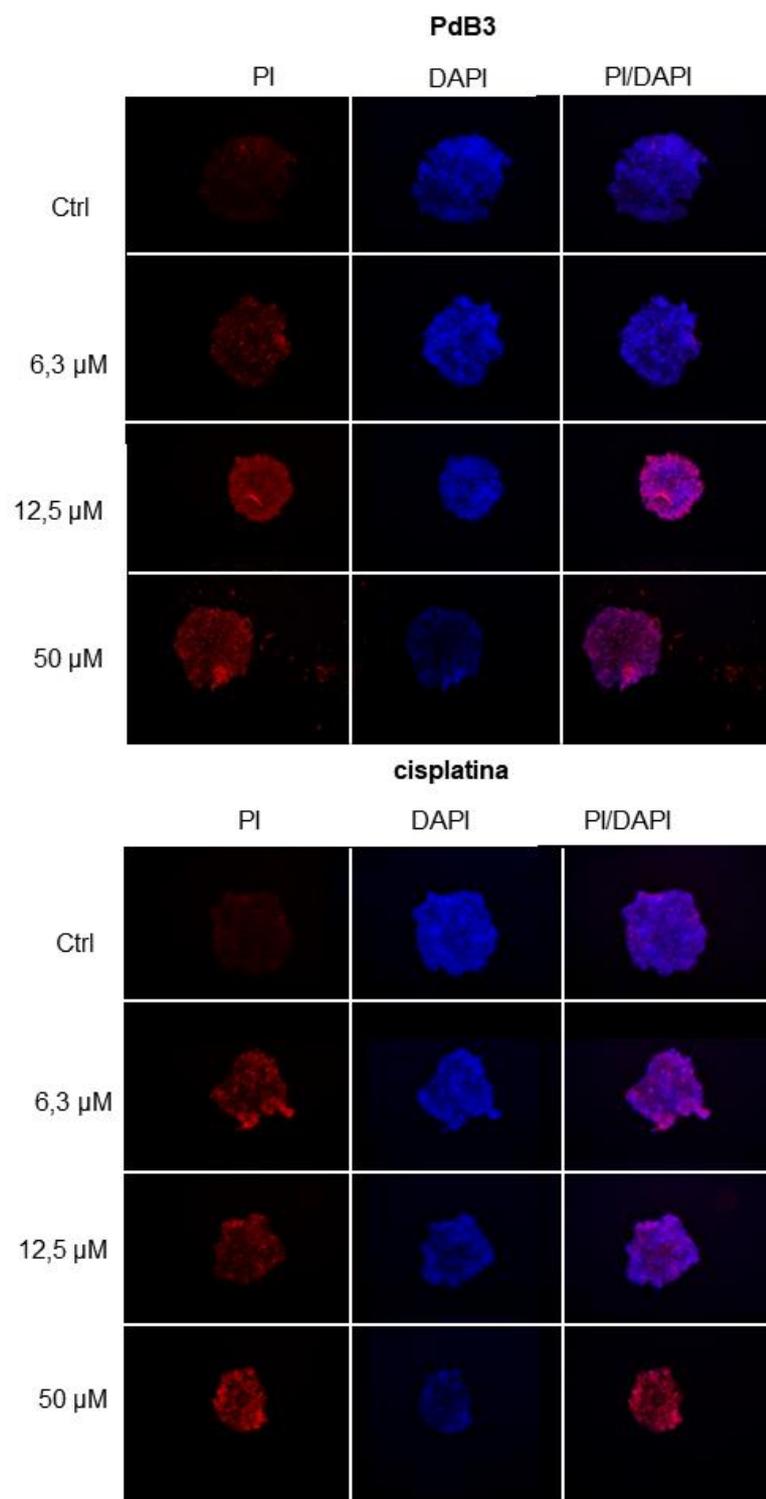


FIGURA 6.14 - Marcação dos esferoides com PI e DAPI tratados com PdB3 e cisplatina após 10 dias.

O aumento da densidade celular pode nos fornecer informações adicionais na compreensão da efetividade do composto ao esferoide da célula A2780cis, pois o aumento da densidade celular pode dificultar a ação do composto, limitando-a apenas à extremidade do esferoide. Os esferoides foram obtidos a partir de 3750 células por poço, formados após um período de 4 dias. Em seguida foram tratados com PdB3 por 48 horas. Após o tratamento, os esferoides também foram marcados com PI e DAPI.

As alterações morfológicas são semelhantes às relatadas anteriormente para a concentração de 1500 células por poço. No entanto, ao fazer a marcação com PI e DAPI, observa-se que o centro dos esferoides se encontra marcado intensamente em vermelho com as bordas predominantemente em azul ou roxa para as concentrações de 12,5 μM e 50 μM , enquanto o controle permanece majoritariamente em azul (FIGURA 6.15).

Este fato demonstra que o composto PdB3 teve a capacidade de permear a estrutura tridimensional celular mais densa, ocasionando a morte celular de dentro para fora. ZHAO *et al.* (2019) observaram o oposto para a cisplatina e o paclitaxel nos esferoides da célula MCF-7 (tumoral de mama), em que, nos esferoides mais densos, os fármacos causaram mais morte celular na borda (FIGURA 6.16). A capacidade de permeabilidade do fármaco é vista como positiva, tornando o composto mais ativo, uma vez que foi capaz de atuar sobre maior área tumoral.

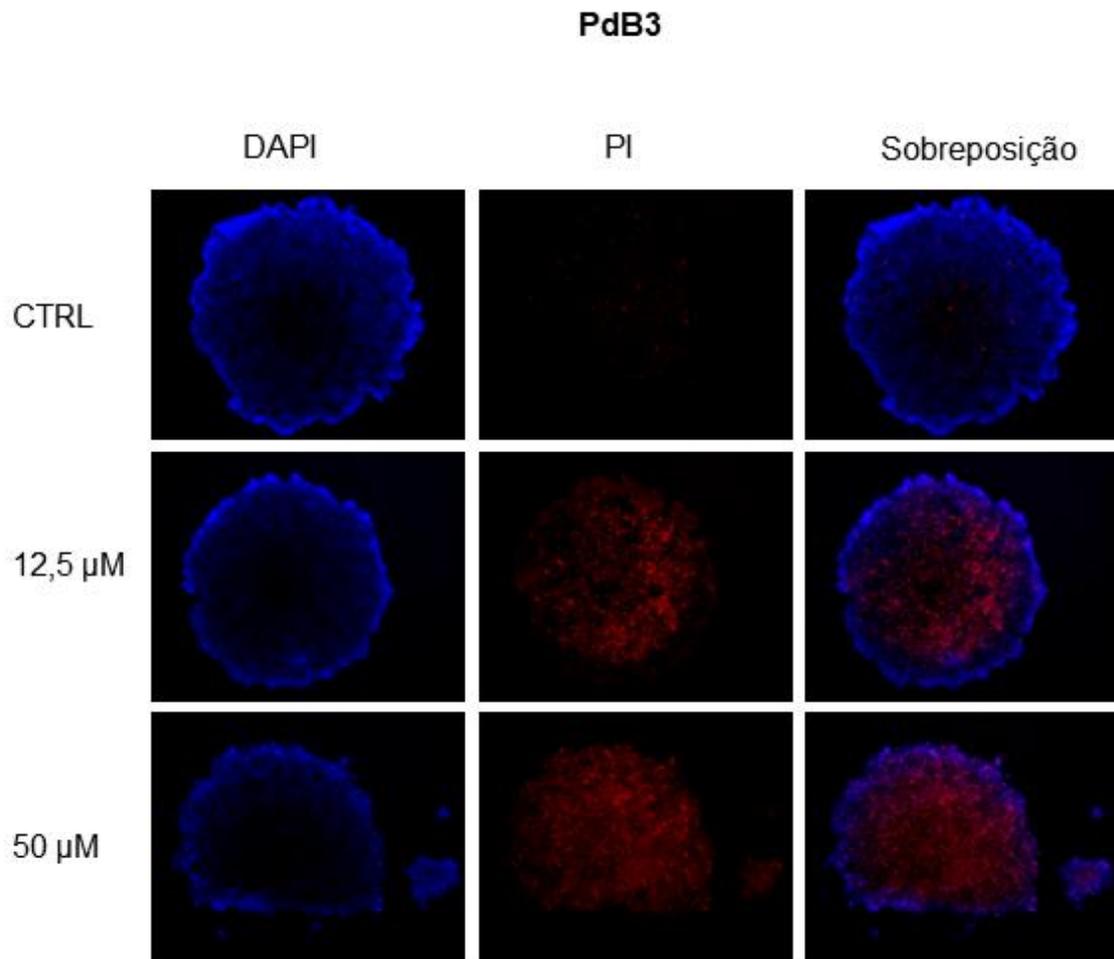


FIGURA 6.15 - Marcação com PI e DAPI dos esferoides (A2780cis) com 3750 células por poço tratados com PdB3 por 48 horas.

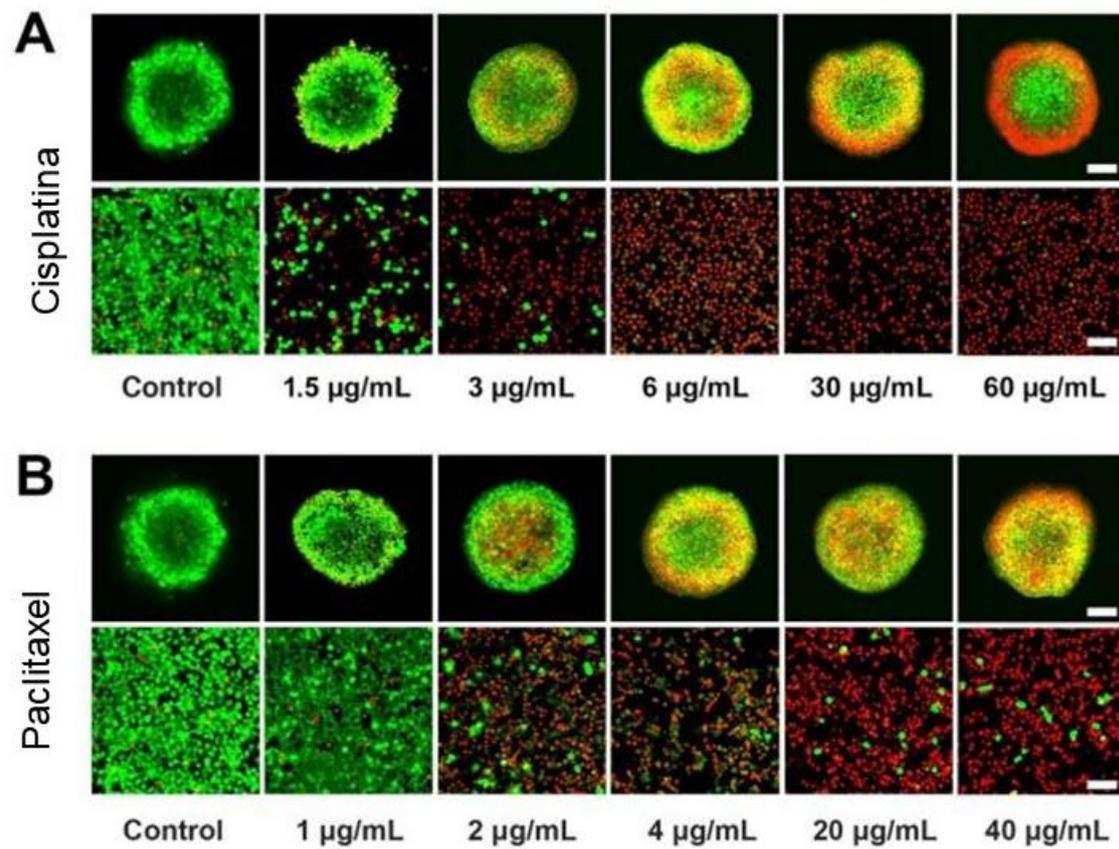


FIGURA 6.16 (A) Imagens confocal representativas (coloração dupla viva/morta, Kit Live/Dead) para triagem de efeito dose dependentes de esferoides MCF-7 e monocamada 2D tratada com cisplatina por 48h. (B) Imagens confocal representativas (coloração dupla viva/morta, Kit Live/Dead) para triagem de efeito dose dependentes de esferoides MCF-7 e monocamada 2D tratada com paclitaxel por 48h. Scala de barra 200µm. Fonte: ZHAO *et al.* (2019).

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho, seis novos complexos de Pd(II) com derivados de tiossemicarbazidas e bisfosfinas (DPPP e DPPB) foram sintetizados e caracterizados por RMN de ^1H e ^{31}P , espectroscopia na região do infravermelho, e do ultravioleta-visível, espectrometria de massas e condutividade molar. Para os compostos PdB1 e PdB3 foi possível, a obtenção da estrutura através da técnica de Raios X de monocristal. Os complexos demonstraram estabilidade em solução de DMSO e meio de cultura (DMEM), sugerindo que a estrutura molecular não é afetada, e a ação antitumoral é proveniente da interação composto-célula na sua forma original.

Nos ensaios de viabilidade celular 2D, os compostos demonstraram os melhores resultados antitumorais frente às linhagens celulares de mama (MDA-MB-231) e ovário (A2780 e A2780cis). O composto mais ativo, PdB3, apresentou um valor de IC₅₀ próximo a $\sim 1\mu\text{M}$. Além disso, observou-se o efeito estrutura-atividade, onde a adição do grupo $-\text{CH}_2-$ na estrutura molecular resultou em um aumento da atividade antitumoral. As alterações nas tiossemicarbazidas foram identificadas como a principal causa da melhoria na atividade antitumoral.

Os ensaios de inibição da formação de colônia e morfológicos corroboraram com os de viabilidade celular, evidenciando a preferência dos compostos pelas linhagens tumorais de mama e ovário em comparação com a não tumoral de pulmão. Além disso, tanto o ensaio de inibição de colônia quanto o ensaio morfológico revelaram ação citostática/citotóxica em relação à dose-resposta. Com o aumento da concentração no ensaio clonogênico, o número de colônias foi reduzido, enquanto no ensaio morfológico, a densidade celular diminuiu à medida que a concentração aumentava até $2 \times \text{IC}_{50}$. Acima dessa concentração, foram observadas alterações morfológicas características de apoptose.

As observações feitas no ensaio morfológico para a linhagem A2780cis corroboram com os resultados de ciclo celular e ensaio de morte celular. Indicando que o composto PdB3 induz morte celular por apoptose, sendo de grande relevância para compostos candidatos a agentes quimioterápicos. Uma vez que a morte celular por apoptose não leva a processos inflamatórios.

A investigação de interação dos compostos com o DNA e as topoisomerasas revelou que estes não são os alvos farmacológicos. No entanto, os compostos podem ser carregados por meio de interação com a da HSA pelo mecanismo estático na proporção 1:1, auxiliando na distribuição do composto.

O ensaio em cultura celular 3D demonstrou a capacidade da massa celular ser mais resistente a ação dos compostos. Evidenciando, que com o aumento da complexidade do ensaio os resultados são alterados. Demonstrando a importância no desenvolvimento de ferramentas e ensaios que melhorem nossa compreensão do sistema para que a transposição dos ensaios *in vitro* para o *in vivo* seja mais efetiva.

Portanto, esse trabalho demonstrou a obtenção de complexos metálicos de Pd(II) com estruturas simples, com alta capacidade de interação com células tumorais, preferencialmente de ovário e mama, sendo mais ativo e seletivo do que o fármaco padrão cisplatina. Os ensaios celulares, indicaram uma ação dupla, citostática/citotóxica, dependendo da concentração trabalhada. Destacando que em concentração de IC_{50} , o composto atuou predominantemente de maneira citostática. Tendo isso em vista, pode se apontar que a estrutura proposta foi eficaz e promissora para a continuidade de estudos que a avaliem como um promissor agente quimioterápico.

8. REFERÊNCIAS

1. STRATTON, M. R., CAMPBELL, P. J. & FUTREAL, P. A. The cancer genome. *Nature* **458**, 719–724 (2009).
2. PONDER, B. A. J. Cancer genetics. *Nature* **411**, 336–341 (2001).
3. HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
4. BERGERS, G. & FENDT, S.-M. The metabolism of cancer cells during metastasis. *Nat Rev Cancer* **21**, 162–180 (2021).
5. BACAC, M. & STAMENKOVIC, I. Metastatic cancer cell. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **3**, 221–247 (2008).
6. ALMEIDA, V. L. de *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim Nova* **28**, 118–129 (2005).
7. ANAND, P. *et al.* Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* **25**, 2097–2116 (2008).
8. GOMCELI, I., DEMIRIZ, B. & TEZ, M. Gastric carcinogenesis. *World journal of gastroenterology: WJG* **18**, 5164 (2012).
9. SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **71**, 209–249 (2021).
10. DE OLIVEIRA SANTOS, M. *et al.* Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira de Cancerologia* **69**, (2023).
11. WAKS, A. G. & WINER, E. P. Breast cancer treatment: a review. *JAMA* **321**, 288–300 (2019).
12. URRUTICOECHEA, A. *et al.* Recent advances in cancer therapy: an overview. *Curr Pharm Des* **16**, 3–10 (2010).

13. KALIBEROV, S. A. & BUCHSBAUM, D. J. Cancer treatment with gene therapy and radiation therapy. *Adv Cancer Res* **115**, 221–263 (2012).
14. A BAUDINO, T. Targeted cancer therapy: the next generation of cancer treatment. *Curr Drug Discov Technol* **12**, 3–20 (2015).
15. DESANTIS, C. E. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* **64**, 252–271 (2014).
16. ALMEIDA, V. L. DE *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim Nova* **28**, 118–129 (2005).
17. DEVITA JR, V. T. & CHU, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* **68**, 8643–8653 (2008).
18. CHABNER, B. A. & ROBERTS JR, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* **5**, 65–72 (2005).
19. NYGREN, P. What is cancer chemotherapy? *Acta Oncol (Madr)* **40**, 166–174 (2001).
20. ZHANG, C., XU, C., GAO, X. & YAO, Q. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. *Theranostics* **12**, 2115 (2022).
21. ROTTENBERG, S., DISLER, C. & PEREGO, P. The rediscovery of platinum-based cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **21**, 37–50 (2021).
22. DILRUBA, S. & KALAYDA, G. V. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemother Pharmacol* **77**, 1103–1124 (2016).
23. GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem* **88**, 102925 (2019).
24. JOHNSTONE, T. C., SUNTHARALINGAM, K. & LIPPARD, S. J. The next generation of platinum drugs: targeted Pt (II) agents, nanoparticle delivery, and Pt (IV) prodrugs. *Chem Rev* **116**, 3436–3486 (2016).
25. WHEATE, N. J., WALKER, S., CRAIG, G. E. & OUN, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton transactions* **39**, 8113–8127 (2010).

26. BROWN, A., KUMAR, S. & TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin-based chemotherapy of human cancers. *J Cancer Sci Ther* **11**, (2019).
27. LAZAREVIĆ, T., RILAK, A. & BUGARČIĆ, Ž. D. Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *Eur J Med Chem* **142**, 8–31 (2017).
28. BANTI, C. N. & HADJIKAKOU, S. K. Anti-proliferative and anti-tumor activity of silver (I) compounds. *Metallomics* **5**, 569–596 (2013).
29. GAŁCZYŃSKA, K., DRULIS-KAWA, Z. & ARABSKI, M. Antitumor activity of Pt (II), Ru (III) and Cu (II) complexes. *Molecules* **25**, 3492 (2020).
30. ASHIQ, M., DANISH, M., MOHSIN, M. A., BARI, S. & MUKHTAR, F. Chemistry of platinum and palladium metal complexes in homogeneous and heterogeneous catalysis: a mini review. *Int. J. Sci. Basic Appl. Res* **7**, 50–61 (2013).
31. CZARNOMYSY, R., RADOMSKA, D., SZEWCZYK, O. K., ROSZCZENKO, P. & BIELAWSKI, K. Platinum and palladium complexes as promising sources for antitumor treatments. *Int J Mol Sci* **22**, 8271 (2021).
32. ABU-SURRAH, A. S., AL-SA'DONI, H. H. & ABDALLA, M. Y. Palladium-based chemotherapeutic agents: Routes toward complexes with good antitumor activity. *Cancer Ther* **6**, 1–10 (2008).
33. JAHROMI, E. Z. *et al.* Palladium complexes: new candidates for anti-cancer drugs. *Journal of the Iranian Chemical Society* **13**, 967–989 (2016).
34. KAPDI, A. R. & FAIRLAMB, I. J. S. Anti-cancer palladium complexes: a focus on PdX₂L₂, palladacycles and related complexes. *Chem Soc Rev* **43**, 4751–4777 (2014).
35. NOGUEIRA, L. *et al.* Developments in vascular-targeted photodynamic therapy for urologic malignancies. *Molecules* **25**, 5417 (2020).
36. PENETRA, M., ARNAUT, L. G. & GOMES-DA-SILVA, L. C. Trial watch: an update of clinical advances in photodynamic therapy and its immunoadjuvant properties for cancer treatment. Preprint at (2023).

37. HANDOKO, Y. A., RONDONUWU, F. S. & LIMANTARA, L. The photosensitizer stabilities of Tookad® on aggregation, acidification, and day-light irradiation. *Procedia Chem* **14**, 474–483 (2015).
38. KUMAR, A., MISHRA, R., MAZUMDER, A., MAZUMDER, R. & VARSHNEY, S. Exploring Synthesis and Chemotherapeutic Potential of Thiosemicarbazide Analogs. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* **23**, 60–75 (2023).
39. BHAT, M. A., KHAN, A. A., GHABBOUR, H. A., QUAH, C. K. & FUN, H.-K. Synthesis, characterization, x-ray structure and antimicrobial activity of N-(4-chlorophenyl)-2-(pyridin-4-ylcarbonyl) hydrazinecarbothioamide. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **15**, 1751–1757 (2016).
40. ACHARYA, P. T., BHAVSAR, Z. A., JETHAVA, D. J., PATEL, D. B. & PATEL, H. D. A review on development of bio-active thiosemicarbazide derivatives: Recent advances. *J Mol Struct* **1226**, 129268 (2021).
41. PANTEA, V., COBZAC, V., TAGADIUC, O., PALARIE, V. & GUDUMAC, V. In Vitro Evaluation of the Cytotoxic Potential of Thiosemicarbazide Coordinating Compounds in Hepatocyte Cell Culture. *Biomedicines* **11**, 366 (2023).
42. KOZYRA, P. *et al.* Potential anticancer agents against melanoma cells based on an as-synthesized thiosemicarbazide derivative. *Biomolecules* **12**, 151 (2022).
43. GENG, P.-F. *et al.* Design, synthesis and in vitro biological evaluation of novel [1, 2, 3] triazolo [4, 5-d] pyrimidine derivatives containing a thiosemicarbazide moiety. *Eur J Med Chem* **146**, 147–156 (2018).
44. ABDELHAFEZ, O. M. *et al.* Design and molecular modeling of novel P38 α MAPK inhibitors targeting breast cancer, synthesized from oxygen heterocyclic natural compounds. *Bioorg Med Chem* **27**, 1308–1319 (2019).
45. ELSEGINY, S. A. *et al.* Computer-aided identification of novel anticancer compounds with a possible dual HER1/HER2 inhibition mechanism. *Bioorg Med Chem Lett* **25**, 758–762 (2015).

46. ROCHA, F. V *et al.* Cationic Pd (II) complexes acting as topoisomerase II inhibitors: Synthesis, characterization, DNA interaction and cytotoxicity. *J Inorg Biochem* 165–168 (2016).
47. MIRZADEH, N., REDDY, T. S. & BHARGAVA, S. K. Advances in diphosphine ligand-containing gold complexes as anticancer agents. *Coord Chem Rev* **388**, 343–359 (2019).
48. MIRABELLI, C. K. *et al.* Antitumor activity of bis (diphenylphosphino) alkanes, their gold (I) coordination complexes, and related compounds. *J Med Chem* **30**, 2181–2190 (1987).
49. SNYDER, R. M. *et al.* Modulation of the antitumor and biochemical properties of bis (diphenylphosphine) ethane with metals. *Cancer Res* **46**, 5054–5060 (1986).
50. LIU, J. J. *et al.* In vitro antitumour and hepatotoxicity profiles of Au (I) and Ag (I) bidentate pyridyl phosphine complexes and relationships to cellular uptake. *J Inorg Biochem* **102**, 303–310 (2008).
51. ICSEL, C. *et al.* Palladium (II) and platinum (II) saccharinate complexes with bis (diphenylphosphino) methane/ethane: synthesis, S-phase arrest and ROS-mediated apoptosis in human colon cancer cells. *Dalton Transactions* **47**, 11397–11410 (2018).
52. BRESLIN, S. & O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today* **18**, 240–249 (2013).
53. SOUZA, A. G., FERREIRA, I. C. C., MARANGONI, K., BASTOS, V. A. F. & GOULART, V. A. Advances in cell culture: more than a century after cultivating cells. *J. Biotechnol. Biomater* **6**, 2–5 (2016).
54. YAMADA, K. M. & CUKIERMAN, E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* **130**, 601–610 (2007).
55. FOGLIETTA, F., SERPE, L. & CANAPARO, R. The effective combination between 3D cancer models and stimuli-responsive nanoscale drug delivery systems. *Cells* **10**, 3295 (2021).
56. BRAJŠA, K., TRZUN, M., ZLATAR, I. & JELIĆ, D. Three-dimensional cell cultures as a new tool in drug discovery. *Period Biol* **118**, 59–65 (2016).

57. SOUZA, A. G. *et al.* Comparative assay of 2D and 3D cell culture models: proliferation, gene expression and anticancer drug response. *Curr Pharm Des* **24**, 1689–1694 (2018).
58. KISS, E. *et al.* Cisplatin treatment induced interleukin 6 and 8 production alters lung adenocarcinoma cell migration in an oncogenic mutation dependent manner. *Respir Res* **21**, 1–10 (2020).
59. ZHAO, L. *et al.* A 3D printed hanging drop dropper for tumor spheroids analysis without recovery. *Sci Rep* **9**, 19717 (2019).
60. HUANG, Z., Yu, P. & Tang, J. Characterization of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell spheroid model. *Onco Targets Ther* 5395–5405 (2020).
61. RIMANN, M. *et al.* An in vitro osteosarcoma 3D microtissue model for drug development. *J Biotechnol* **189**, 129–135 (2014).
62. TIMM, D. M. *et al.* A high-throughput three-dimensional cell migration assay for toxicity screening with mobile device-based macroscopic image analysis. *Sci Rep* **3**, 3000 (2013).
63. KOMIYA, S. *Synthesis of Organometallic Compounds: A Practical Guide*. vol. 15 (John Wiley & Sons, 1997).
64. NAKAMOTO, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Theory and Applications in Inorganic Chemistry*. (Wiley, 2008).
65. PATEL, P. & AGARWALA, B. V. Synthesis and IR spectral study of semicarbazone and thiosemicarbazones of 4-methyl-2-pentanone and their metal complexes. *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry* **26**, 1637–1650 (1996).
66. DEVI, J., YADAV, M., JINDAL, D. K., KUMAR, D. & POORNACHANDRA, Y. Synthesis, spectroscopic characterization, biological screening and in vitro cytotoxic studies of 4-methyl-3-thiosemicarbazone derived Schiff bases and their Co (II), Ni (II), Cu (II) and Zn (II) complexes. *Appl Organomet Chem* **33**, e5154 (2019).
67. EL-METWALLY, N. M. & AL-HAZMI, G. A. A. Spectroscopic evaluation for VO (II), Ni (II), Pd (II) and Cu (II) complexes derived from thiosemicarbazide: A

special emphasis on EPR study and DNA cleavage. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **107**, 289–295 (2013).

68. YÜKSEL, B. Ş. Spectroscopic characterization (IR and NMR), structural investigation, DFT study, and Hirshfeld surface analysis of two zinc (II) 2-acetylthiophenyl-thiosemicarbazone complexes. *J Mol Struct* **1229**, 129617 (2021).
69. SHANMUGAPRIYA, A. *et al.* Structurally different mono-, bi-and trinuclear Pd (II) complexes and their DNA/protein interaction, DNA cleavage, and anti-oxidant, anti-microbial and cytotoxic studies. *New Journal of Chemistry* **41**, 10324–10338 (2017).
70. ALI, K. O., ALI, H. M., GERBER, T. & HOSTEN, E. Mixed Ligand, Palladium (II) and Platinum (II) Complexes of Tertiary Diphosphines with S-1H Benzo [d] Imidazole-2-yl Benzothioate. *Orient. J. Chem* **33**, 584–592 (2017).
71. BENIAL, A. M. F., RAMAKRISHNAN, V. & MURUGESAN, R. Infrared and laser Raman studies of [Ni (II)(dppe) Cl₂] and [Co (III)(dppe) 2Cl₂] PF₆ (dppe= 1, 2-bis (diphenylphosphino) ethane). *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **58**, 1703–1712 (2002).
72. VILLARREAL, W. *et al.* Chiral platinum (II) complexes featuring phosphine and chloroquine ligands as cytotoxic and monofunctional DNA-binding agents. *Inorg Chem* **54**, 11709–11720 (2015).
73. DE OLIVEIRA, T. D. *et al.* Cytotoxicity of ruthenium-N, N-disubstituted-N'-acylthioureas complexes. *Materials Science and Engineering: C* **115**, 111106 (2020).
74. RISI, M. C., SAUNDERS, G. C. & HENDERSON, W. The coordination chemistry of sulfonyl-substituted thioureas towards the d8 metal centres platinum (II), palladium (II), nickel (II) and gold (III). *Inorganica Chim Acta* **526**, 120506 (2021).
75. VILLARREAL, W. *et al.* Chiral platinum (II) complexes featuring phosphine and chloroquine ligands as cytotoxic and monofunctional DNA-binding agents. *Inorg Chem* **54**, 11709–11720 (2015).

76. SIMONOV, Y. A., REVENCO, M. D., BOUROSH, P. N., BULMAGA, P. I. & GDANIEC, M. Supramolecular organization of the crystal structure of cis-bis (thiosemicarbazide) palladium (II) ortho-hydrophthalate. *Crystallography Reports* **54**, 846–851 (2009).
77. ICSEL, C. *et al.* Palladium (II) and platinum (II) saccharinate complexes with bis (diphenylphosphino) methane/ethane: synthesis, S-phase arrest and ROS-mediated apoptosis in human colon cancer cells. *Dalton Transactions* **47**, 11397–11410 (2018).
78. KOKINA, T. E. *et al.* Synthesis, structure, and cytotoxicity of complexes of zinc (II), palladium (II), and copper (I) chlorides with (–)-camphor thiosemicarbazone. *Polyhedron* **163**, 121–130 (2019).
79. ALI, K. O., ALI, H. M., GERBER, T. & HOSTEN, E. Mixed Ligand, Palladium (II) and Platinum (II) Complexes of Tertiary Diphosphines with S-1H Benzo [d] Imidazole-2-yl Benzothioate. *Orient. J. chem* **33**, 584–592 (2017).
80. BARRA, C. V. & NETTO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores. *Revista Virtual de Química* **7**, 1998–2016 (2015).
81. SIRAJUDDIN, M., ALI, S. & BADSHAH, A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *J Photochem Photobiol B* **124**, 1–19 (2013).
82. PIZARRO, A. M. & SADLER, P. J. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie* **91**, 1198–1211 (2009).
83. RAMOTOWSKA, S., CIESIELSKA, A. & MAKOWSKI, M. What can electrochemical methods offer in determining DNA–drug interactions? *Molecules* **26**, 3478 (2021).
84. DEIANA, M. *et al.* Interactions of isophorone derivatives with DNA: spectroscopic studies. *PLoS One* **10**, e0129817 (2015).
85. SUN, Y.-M. *et al.* DNA interaction and photodynamic antitumor activity of transition metal mono-hydroxyl corrole. *Bioorg Chem* **90**, 103085 (2019).

86. PONKARPAGAM, S., VENNILA, K. N. & ELANGO, K. P. Molecular spectroscopic and molecular simulation studies on the interaction of oral contraceptive drug Ormeloxifene with CT–DNA. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **278**, 121351 (2022).
87. MIŠKOVIĆ, K., BUJAK, M., BAUS LONČAR, M. & GLAVAŠ-OBROVAC, L. Antineoplastic DNA-binding compounds: intercalating and minor groove binding drugs. *Arh Hig Rada Toksikol* **64**, 593–601 (2013).
88. FORNANDER, L. H., WU, L., BILLETER, M., LINCOLN, P. & NORDEN, B. Minor-groove binding drugs: where is the second Hoechst 33258 molecule? *J Phys Chem B* **117**, 5820–5830 (2013).
89. GAN, C. *et al.* Study on the interactions between B-norcholesteryl benzimidazole compounds with ct-DNA. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **227**, 117525 (2020).
90. 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**, 971–988 (2019).
91. POMMIER, Y. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chem Rev* **109**, 2894–2902 (2009).
92. NITISS, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **9**, 338–350 (2009).
93. DEHSHAHRI, A. *et al.* Topoisomerase inhibitors: Pharmacology and emerging nanoscale delivery systems. *Pharmacol Res* **151**, 104551 (2020).
94. BAX, B. D., MURSHUDOV, G., MAXWELL, A. & GERME, T. DNA topoisomerase inhibitors: trapping a DNA-cleaving machine in motion. *J Mol Biol* **431**, 3427–3449 (2019).
95. TRYNDA-LEMIESZ, L. Paclitaxel–HSA interaction. Binding sites on HSA molecule. *Bioorg Med Chem* **12**, 3269–3275 (2004).
96. RABBANI, G. & AHN, S. N. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo. *Int J Biol Macromol* **123**, 979–990 (2019).

97. GELAMO, E. L. & TABAK, M. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **56**, 2255–2271 (2000).
98. RABBANI, G., LEE, E. J., AHMAD, K., BAIG, M. H. & CHOI, I. Binding of tolperisone hydrochloride with human serum albumin: effects on the conformation, thermodynamics, and activity of HSA. *Mol Pharm* **15**, 1445–1456 (2018).
99. RABBANI, G., AHMAD, E., ZAIDI, N. & KHAN, R. H. pH-dependent conformational transitions in conalbumin (ovotransferrin), a metalloproteinase from hen egg white. *Cell Biochem Biophys* **61**, 551–560 (2011).
100. ROSS, P. D. & SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry* **20**, 3096–3102 (1981).
101. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55–63 (1983).
102. ROCHA, F. V. *et al.* Synthesis, Characterization, X-ray Structure, DNA Cleavage, and Cytotoxic Activities of Palladium (II) Complexes of 4-Phenyl-3-thiosemicarbazide and Triphenylphosphane. *Eur J Inorg Chem* **2013**, 4499–4505 (2013).
103. ROTTENBERG, S., DISLER, C. & PEREGO, P. The rediscovery of platinum-based cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **21**, 37–50 (2021).
104. HASLEHURST, A. M. *et al.* EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer* **12**, 1–10 (2012).
105. KANG, Y. *et al.* A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* **3**, 537–549 (2003).
106. MUNSHI, A., HOBBS, M. & MEYN, R. E. Clonogenic cell survival assay. *Chemosensitivity: Volume 1 In Vitro Assays* 21–28 (2005).
107. BRIX, N., SAMAGA, D., BELKA, C., ZITZELSBERGER, H. & LAUBER, K. Analysis of clonogenic growth in vitro. *Nat Protoc* **16**, 4963–4991 (2021).

108. MIRZAYANS, R., ANDRAIS, B., SCOTT, A., TESSIER, A. & MURRAY, D. A sensitive assay for the evaluation of cytotoxicity and its pharmacologic modulation in human solid tumor-derived cell lines exposed to cancer-therapeutic agents. *J Pharm Pharm Sci* **10**, 298s–311s (2007).
109. WAY, G. P. *et al.* Predicting cell health phenotypes using image-based morphology profiling. *Mol Biol Cell* **32**, 995–1005 (2021).
110. KOESTER, S. K. & BOLTON, W. E. Differentiation and assessment of cell death. (1999).
111. SARASTE, A. & PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* **45**, 528–537 (2000).
112. RELLO, S. *et al.* Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis* **10**, 201–208 (2005).
113. DOONAN, F. & COTTER, T. G. Morphological assessment of apoptosis. *Methods* **44**, 200–204 (2008).
114. BANFALVI, G. Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis* **22**, 306–323 (2017).
115. STEFANO, D. T. *et al.* Aberrant DNA damage response pathways may predict the outcome of platinum chemotherapy in ovarian cancer. *PLoS One* **10**, e0117654 (2015).
116. FAIVRE, S., CHAN, D., SALINAS, R., WOYNAROWSKA, B. & WOYNAROWSKI, J. M. DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochem Pharmacol* **66**, 225–237 (2003).
117. STEEG, P. S. Targeting metastasis. *Nat Rev Cancer* **16**, 201–218 (2016).
118. CHAFFER, C. L. & WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. *Science (1979)* **331**, 1559–1564 (2011).
119. STAMM, A. *et al.* In vitro wound healing assays—state of the art. *BioNanoMaterials* **17**, 79–87 (2016).
120. JONKMAN, J. E. N. *et al.* An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adh Migr* **8**, 440–451 (2014).

121. ALMEIDA, V. M., BEZERRA, M. A., NASCIMENTO, J. C. & AMORIM, L. M. F. Triagem de drogas anticâncer: padronização do ensaio de ranhura in vitro. *J Bras Patol Med Lab* **55**, 606–619 (2020).
122. HATZIDAKI, E., DAIKOPOULOU, V., APOSTOLOU, P., NTANOVASILIS, D. A. & PAPASOTIRIOU, I. Increased breast cancer cell sensitivity to cisplatin using a novel small molecule inhibitor. *J Cancer Res Ther* **16**, 1393–1401 (2020).
123. SHENG, W. J., JIANG, H., WU, D. L. & ZHENG, J. H. Early responses of the STAT3 pathway to platinum drugs are associated with cisplatin resistance in epithelial ovarian cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **46**, 650–658 (2013).
124. SENA-LOPES, Â. *et al.* Cell viability analysis of *Toxocara cati* larvae with LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity kit. *Exp Parasitol* **212**, 107871 (2020).
125. SCHAFER, K. A. The cell cycle: a review. *Vet Pathol* **35**, 461–478 (1998).
126. PUCCI, B., KASTEN, M. & GIORDANO, A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia* **2**, 291–299 (2000).
127. MATTHEWS, H. K., BERTOLI, C. & DE BRUIN, R. A. M. Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **23**, 74–88 (2022).
128. WILLIAMS, G. H. & STOEBER, K. The cell cycle and cancer. *J Pathol* **226**, 352–364 (2012).
129. DIAZ-MORALLI, S., TARRADO-CASTELLARNAU, M., MIRANDA, A. & CASCANTE, M. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol Ther* **138**, 255–271 (2013).
130. MAROUFI, N. F. *et al.* Sensitization of MDA-MBA231 breast cancer cell to docetaxel by myricetin loaded into biocompatible lipid nanoparticles via sub-G1 cell cycle arrest mechanism. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **393**, 1–11 (2020).
131. DE OLIVEIRA, T. D. *et al.* Cytotoxicity of ruthenium-N, N-disubstituted-N'-acylthioureas complexes. *Materials Science and Engineering: C* **115**, 111106 (2020).

132. GRIVICICH, I., REGNER, A. & DA ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. *Revista brasileira de cancerologia* **53**, 335–343 (2007).
133. D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* **43**, 582–592 (2019).
134. KIM-CAMPBELL, N., GOMEZ, H. & BAYIR, H. Cell death pathways: apoptosis and regulated necrosis. in *Critical care nephrology* 113–121 (Elsevier, 2019).
135. KRYSKO, D. V, BERGHE, T. VANDEN, D'HERDE, K. & VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* **44**, 205–221 (2008).
136. KANDUC, D. *et al.* Cell death: apoptosis versus necrosis. *Int J Oncol* **21**, 165–170 (2002).
137. HUNAKOVA, L. *et al.* Modulation of cisplatin sensitivity in human ovarian carcinoma A2780 and SKOV3 cell lines by sulforaphane. *Toxicol Lett* **230**, 479–486 (2014).
138. JAGANATHAN, H. *et al.* Three-dimensional in vitro co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. *Sci Rep* **4**, 6468 (2014).

9. ANEXO

TABELA A1 - Lista de reagentes e materiais utilizados

Reagentes	Procedência
Metanol (<i>d</i> ₄) (99.8%)	Sigma-Aldrich
Clorofórmio P.A.	Labsynth
DMSO P.A.	Labsynth
Metanol P.A.	Labsynth
Éter dietílico	Sigma-Aldrich
N-Hexano	Êxodo
Acetonitrila	Sigma-Aldrich
Iodeto de céσιο (99,99 %)	Sigma-Aldrich
Cloreto de Paládio (II) (99 %)	Sigma-Aldrich
Tiossemicarbazida	Sigma-Aldrich
4-metil-3-tiossemicarbazida	Sigma-Aldrich
4-etil-3-tiossemicarbazida	Sigma-Aldrich
1,3'-bis(difenilfosfina)propano (DPPP)	Strem Chemicals
1,4'-bis(difenilfosfina)butano (DPPB)	Strem Chemicals
MTT	Sigma-Aldrich
Agarose Padrão	Kasvy
CT-DNA	Sigma-Aldrich
pUC19-DNA	Thermo Fisher
HSA	Sigma-Aldrich
meio de cultura DMEM e RPMI	Vitrocell

[Pd(DPPP)(TSC)]Cl₂: ¹H RMN (400 MHz, MeOD): δ 7.92 – 7.47 (m, 20H), 3.08 – 3.00 (m, 4H), 2.34 – 2.23 (m, 2H). ³¹P NMR (162 MHz, MeOD): δ 9.29 – 8.70 (d, *J* = 43.1 Hz), 3.28 – 2.70 (d, *J* = 41.8 Hz). IV(λcm⁻¹): 3600-3205 ν(NH₂)_{ass e sim}, 3194-3039 ν(C-H)sp², 2927 ν(CH)sp³, 1631 δ(NH), 1232 ν(C=S), 1436, 1099, 748, 694 e 509 (PPh₂). UV-vis (MeOH): λ_{máx} 287nm (ε = 13979.464 Lmol⁻¹cm⁻¹); ESI-MS: (m/z) [M-H⁺]: 608,0686. Rendimento 88,6%.

[Pd(DPPP)(4-MeTSC)]Cl₂: ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7.72 – 7.48 (m, 20H), 3.12 – 3.01 (m, 4H), 2.81 (s, 3H), 2.35 – 2.23 (m, 2H). ³¹P RMN (162 MHz, MeOD) δ 9.40 – 8.46 (d, *J* = 42.8 Hz), 3.70 – 2.75 (d, *J* = 43.3 Hz). IV(cm⁻¹) em ICs: 3658 ν(N-H), 3452 e 3331 ν(NH₂ e NH)_{ass e sim}, 3153, 3053 e 3012 ν(C-H)sp², 2931,2899 e 2800 ν(CH)sp³, 1627 δ(NH), (1571) ν(C=C e C=N), 1232 ν(C=S), 1436, 1103, 750, 698 e 511 (PPh₂). UV-vis (MeOH): λ_{máx} 287nm (ε = 13632.692 Lmol⁻¹cm⁻¹); ESI-MS: (m/z) [M-H⁺]: 622,0838, (m/z) [M²⁺]: 311,5458. Rendimento 74,25%.

[Pd(DPPP)(4-EtTSC)]Cl₂: ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7.74 – 7.44 (m, 20H), 3.29 – 3.05 (s, 4H), 3.05 – 2.93 (m, 2H), 2.83 – 2.72 (s, 1H), 2.39 – 2.18 (m, 2H), 1.22 – 1.08 (m, 3H). ³¹P RMN (162 MHz, MeOD) δ 9.43 – 8.70 (d, *J* = 42.6 Hz), 3.74 – 2.70 (t, *J* = 47.3 Hz). IV(cm⁻¹) em ICs: 3600-3300 ν(N-H), 3051 ν(C-H)sp², 2985, 2931 ν(CH)sp³, 1627 δ(NH), 1571 ν(C=C e C=N), 1435, 1101, 748, 692 e 513 (PPh₂). UV-vis (MeOH): λ_{máx} 283nm (ε = 13681.731 Lmol⁻¹cm⁻¹). ESI-MS: (m/z) [M-H⁺]: 636,0992, (m/z) [M²⁺]: 318,5539. Rendimento 84.97%.

[Pd(DPPB)(TSC)]Cl₂: ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7.85 – 7.45 (m, 20H), 3.15 – 3.04 (t, *J* = 9.0 Hz, 2H), 2.60 – 2.44 (m, 4H), 1.93 – 1.79 (d, *J* = 23.6 Hz, 2H). ³¹P RMN (162 MHz, MeOD) δ 31.18 – 30.50 (d, *J* = 34.6 Hz), 19.48 – 18.80 (d, *J* = 34.4 Hz). IV(cm⁻¹) em ICs: 3630-3200 ν(NH₂)_{ass e sim}, 3194-3039 ν(C-H)sp², 2983-2920 ν(CH)sp³, 1633 δ(NH), 1236 ν(C=S), 1435, 1099, 744, 696 e 501 (PPh₂). UV-vis (MeOH): λ_{máx} 291nm (ε = 12021.429 Lmol⁻¹cm⁻¹); 255nm (ε = 15208.929 Lmol⁻¹cm⁻¹). ESI-MS: (m/z) [M-H⁺]: 622,0843. Rendimento 90,01%.

[Pd(DPPB)(4-MeTSC)]Cl₂: ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7.75 – 7.61 (ddt, *J* = 13.9, 12.5, 4.4 Hz, 12H), 7.61 – 7.51 (qd, *J* = 7.9, 2.7 Hz, 8H), 3.25 – 3.08 (m, 2H), 2.93 – 2.78 (s, 3H), 2.63 – 2.55 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 2.55 – 2.46 (q, *J* = 5.8 Hz, 3H), 1.95 – 1.76 (d, *J* = 22.9 Hz, 2H). ³¹P RMN (162 MHz, MeOD) δ 31.60 – 30.97 (d, *J* = 34.9 Hz), 19.15 – 18.52 (d, *J* = 34.6 Hz). IV(cm⁻¹) em ICs:

3597-3300 $\nu(\text{N-H})$, 3180, 3051 $(\text{C-H})\text{sp}^2$, 2935 $\nu(\text{CH})\text{sp}^3$, 1631 $\delta(\text{NH})$, (1570) $\nu(\text{C=C e C=N})$, 1436, 1099, 746, 696 e 526 (PPh_2). UV-vis (MeOH): $\lambda_{\text{máx}}$ 291nm ($\epsilon = 13142.308 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$); 255nm ($\epsilon = 18242.308 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$). ESI-MS: (m/z) $[\text{M-H}^+]$: 636.1000, (m/z) $[\text{M}^{2+}]$: 318,5538. Rendimento 89%.

[Pd(DPPB)(4-EtTSC)]Cl₂: ^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7.74 – 7.51 (m, 20H), 3.22 – 3.08 (m, 3H), 2.64 – 2.45 (d, $J = 31.6 \text{ Hz}$, 4H), 1.92 – 1.78 (m, 2H), 1.22 – 1.11 (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 3H). ^{31}P RMN (162 MHz, MeOD) δ 31.69 – 30.93 (d, $J = 35.8 \text{ Hz}$), 19.03 – 18.26 (d, $J = 35.3 \text{ Hz}$). ^{13}C RMN (101 MHz, MeOD) δ 133.51, 133.40, 133.00, 132.89, 132.39, 132.36, 129.58, 129.47, 128.95, 128.84, 128.42, 128.13, 127.86, 127.65, 40.73, 26.53, 26.26, 25.81, 25.49, 21.62, 12.34.: IV(cm^{-1}) em ICs: 3600-3309 $\nu(\text{N-H})$, 3174, 3051 $(\text{C-H})\text{sp}^2$, 2978 e 2935 $\nu(\text{CH})\text{sp}^3$, 1627 $\delta(\text{NH})$, 1570 $\nu(\text{C=C e C=N})$, 1436 1192, 1099, 746, 696, 528 (PPh_2). UV-vis (MeOH): $\lambda_{\text{máx}}$ 290nm ($\epsilon = 12342 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$); 259nm ($\epsilon = 21777 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$). ESI-MS: (m/z) $[\text{M-H}^+]$: 650,1136, (m/z) $[\text{M}^{2+}]$: 325,5616. Rendimento 70,05%.

TSC: IV em ICs (cm^{-1}): 3369 $\nu(\text{NH})$, 3267 e 3182 $\nu(\text{NH}_2)_{\text{ass, sim}}$, 1645 e 1619 $\delta(\text{NH}_2)$, 1531 e 1485 $\nu(\text{N-C=S})$, 1286 $\nu(\text{C=S})$. UV-vis (CHCl_3): λ 361 e 315 nm.

4-MeTSC: ^1H RMN (400 MHz, MeOD): 3.06 (s, 3H). IV em ICs (cm^{-1}): 3337 $\nu(\text{NH})$, 3289 e 3241 $\nu(\text{NH}_2)_{\text{ass, sim}}$, 1642 e 1612 $\delta(\text{NH}_2)$, 1568 e 1469 $\nu(\text{N-C=S})$, 1273 $\nu(\text{C=S})$. UV-vis (CHCl_3): λ 361 e 315 nm.

4-EtTSC: ^1H RMN (400 MHz, MeOD): δ 3.61 (q, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 1H), 1.20 (t, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 2H). IV em ICs (cm^{-1}): 3348 $\nu(\text{NH})$, 3289 e 3197 $\nu(\text{NH}_2)_{\text{ass, sim}}$, 1634 $\delta(\text{NH}_2)$, 1546, 1500 $\nu(\text{N-C=S})$, 1276 $\nu(\text{C=S})$. UV-vis (CHCl_3): λ 361 nm.

DPPP: δ 7.35 – 7.32 (m, 20H), 2.23 – 2.19 (m, 4H), 1.60 – 1.48 (m, 2H). ^{31}P RMN (162 MHz, MeOD) δ -17.72. UV-vis (CHCl_3): λ 343 nm.

DPPB: ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.41 – 7.37 (m, 8H), 7.37 – 7.31 (m, 12H), 2.04 – 2.00 (m, 4H), 1.57 – 1.53 (m, 4H). ^{31}P RMN (162 MHz, MeOD) δ -13.50 (s). UV-vis (CHCl_3): λ 363 e 320 nm.

Espectro de Infravermelho

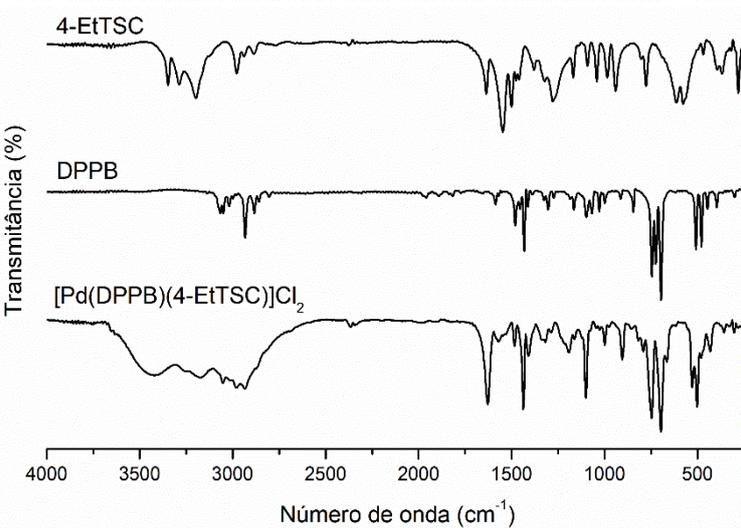
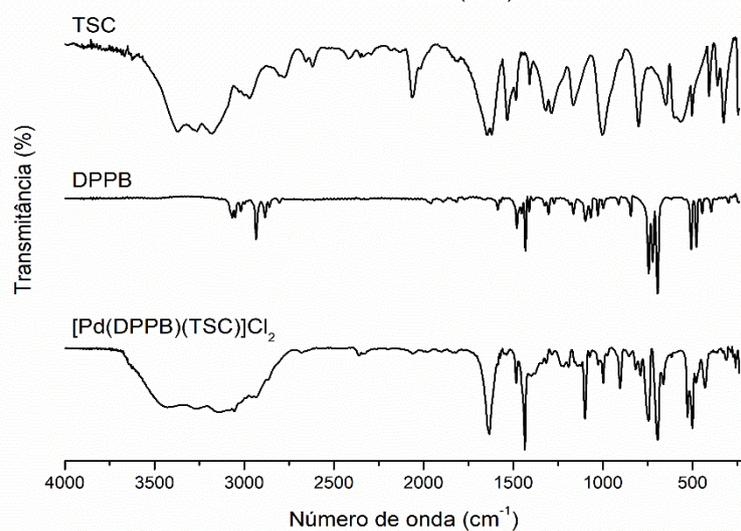
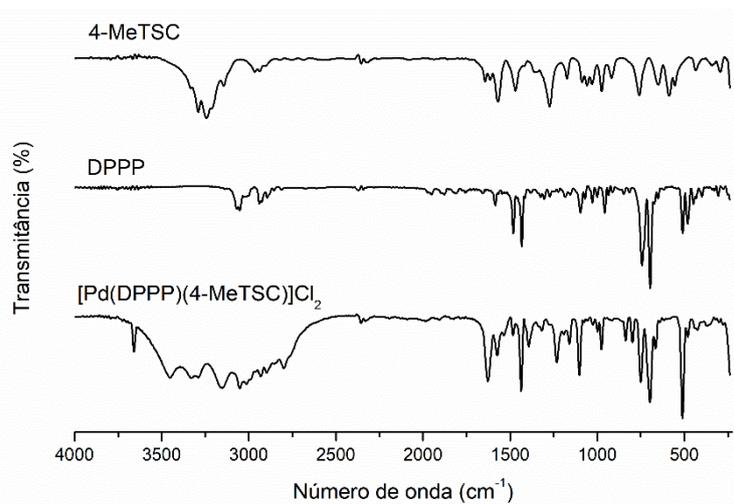
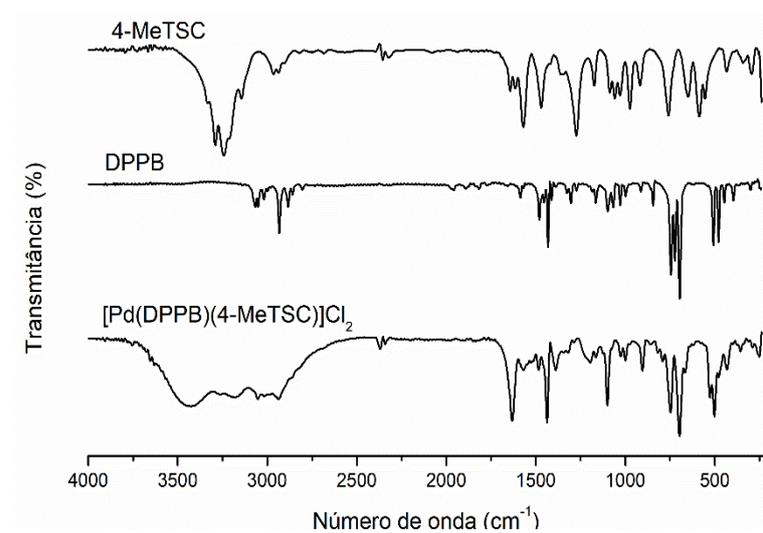
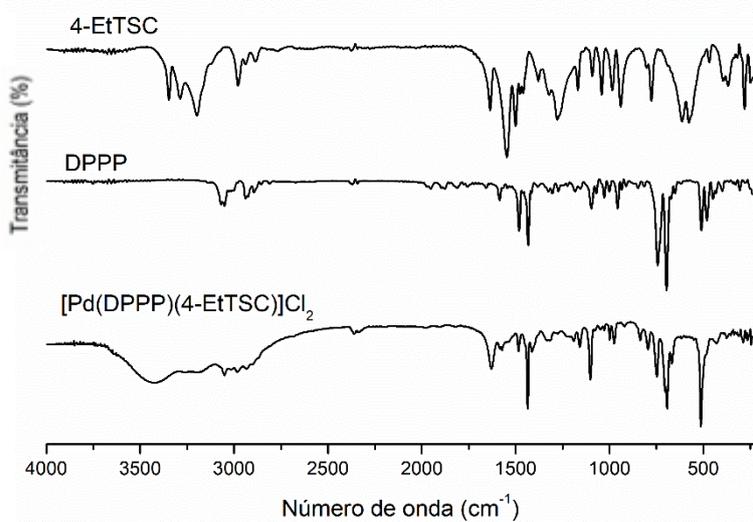
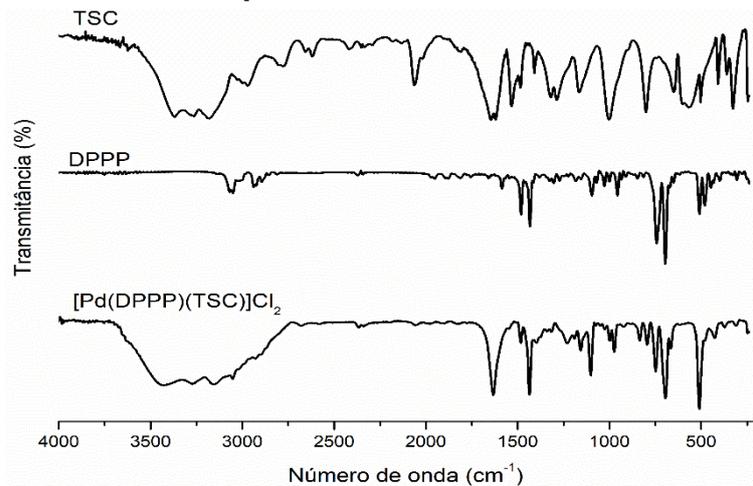
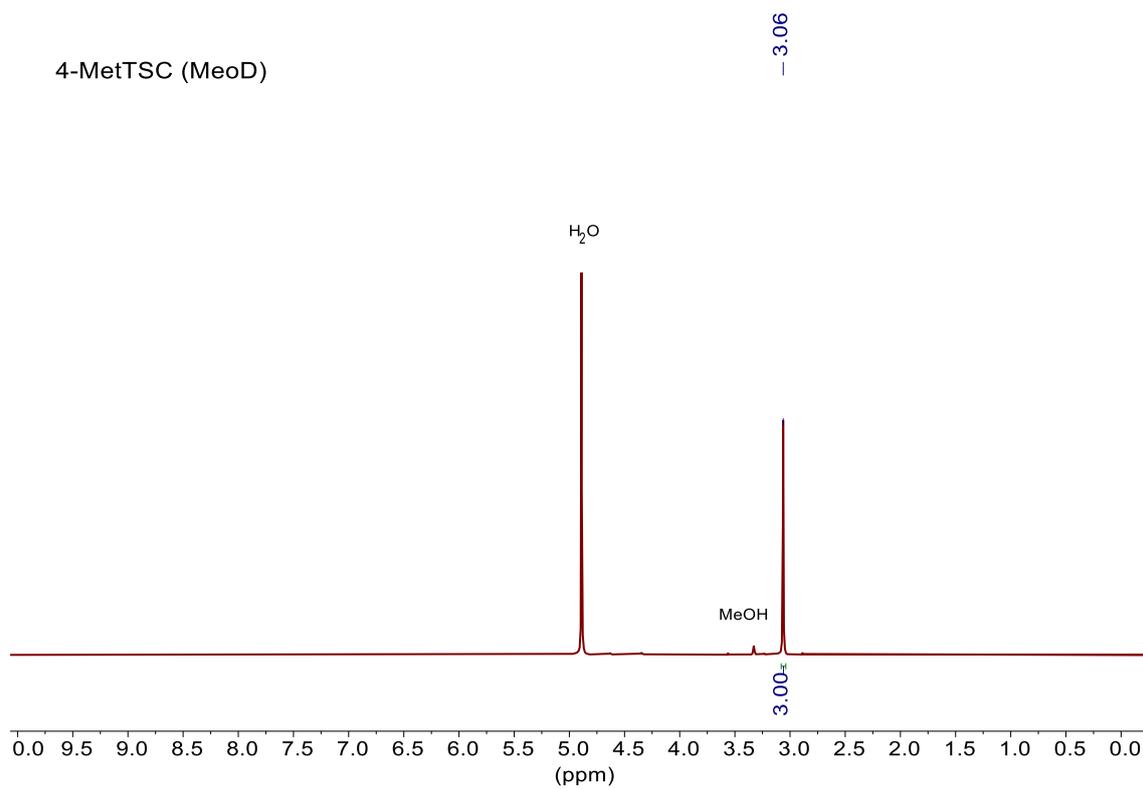


FIGURA A1 - Espectro de FTIR dos complexos com os ligantes livres.

RMN

FIGURA A2 – Espectro de rmn de ¹H da 4-metil-3-tiossemicarbazida

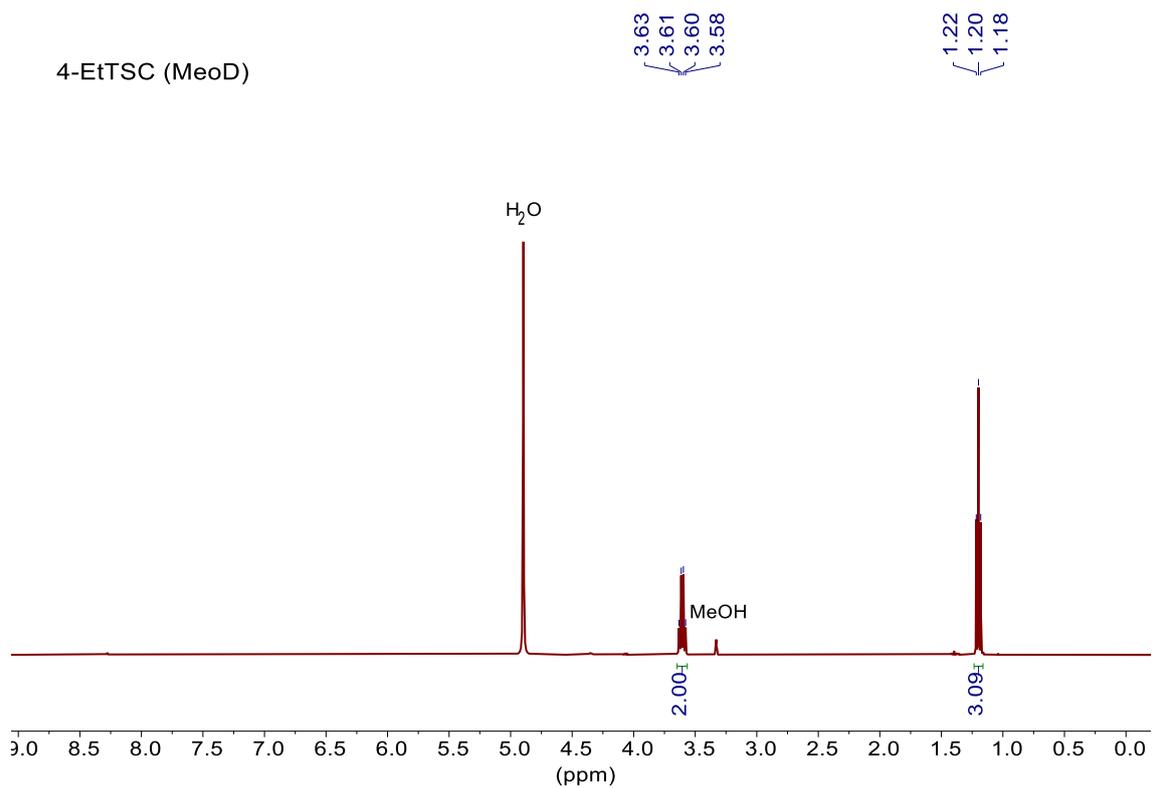


FIGURA A3 - Espectro de rnmn de ¹H da 4-etil-3-tiossemicarbazida

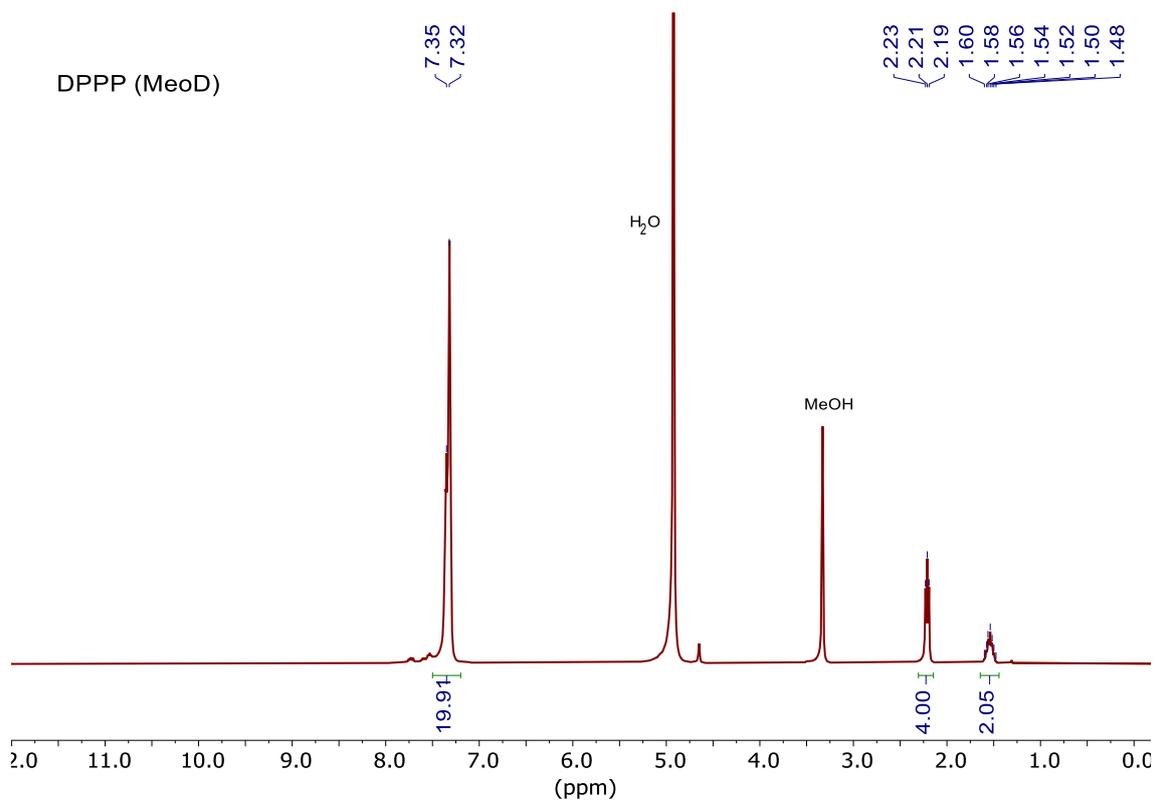


FIGURA A4 - Espectro de rnmn de ¹H da bis(difenilfosfino)propano

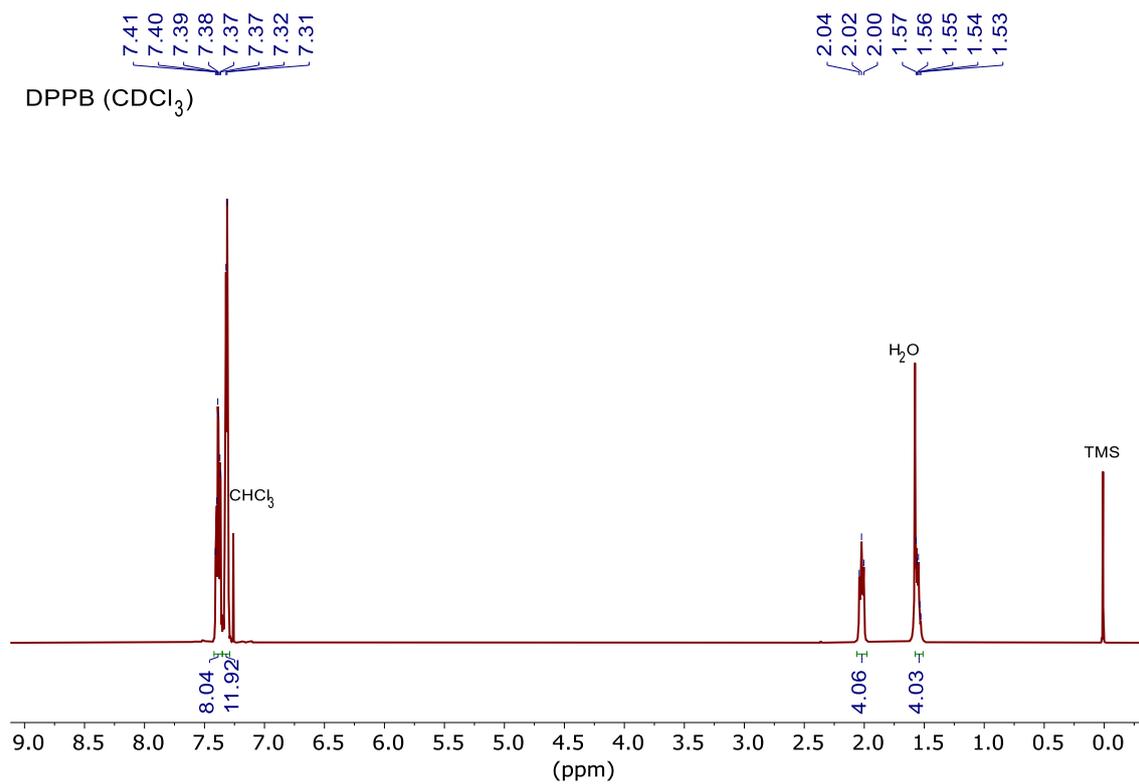


FIGURA A5 - Espectro de rnm de ^1H da bis(difenilfosfino)butano.

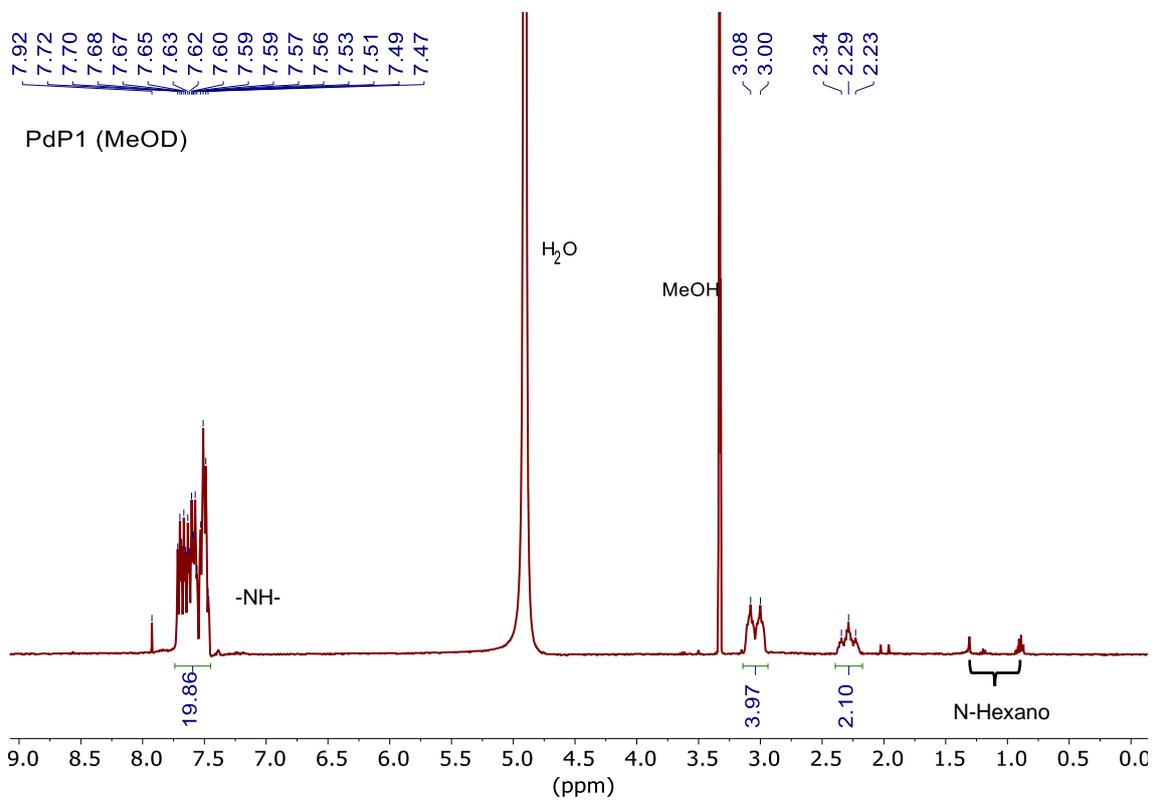


FIGURA A6 - Espectro de rnm de ^1H do complexo PdP1.

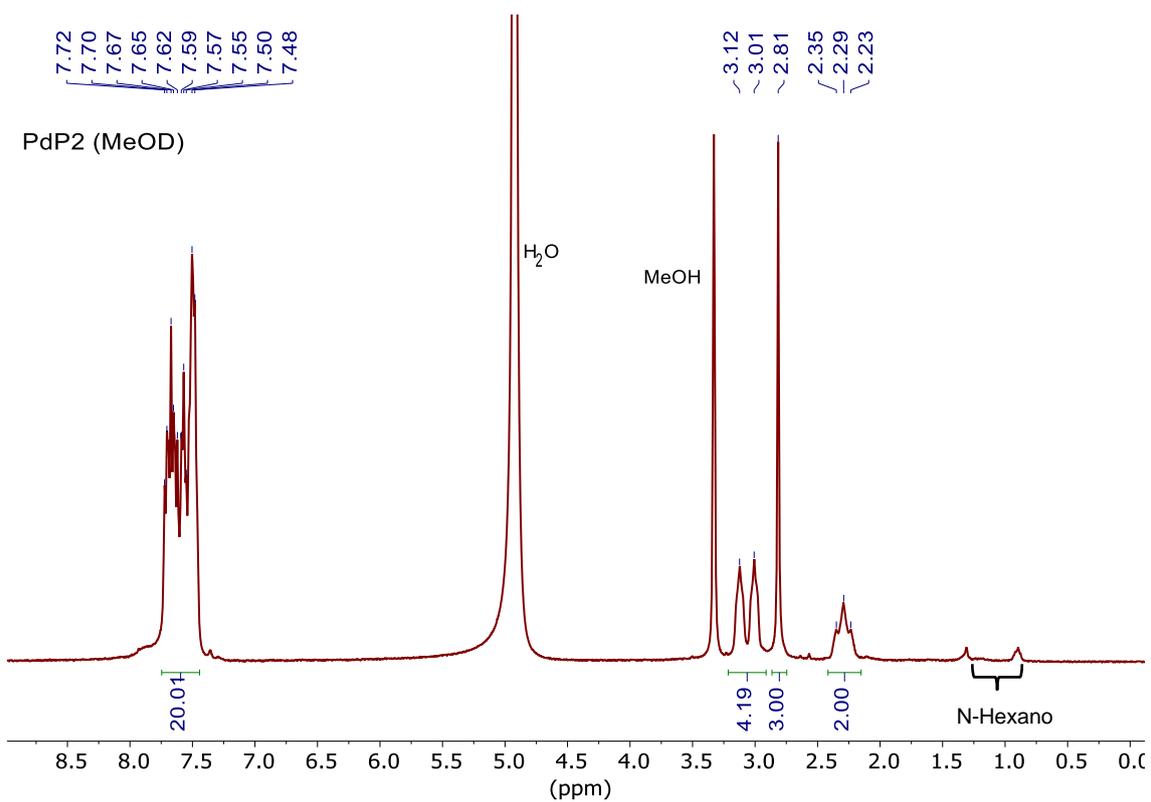


FIGURA A7 - Espectro de rmn de ¹H do complexo PdP2.

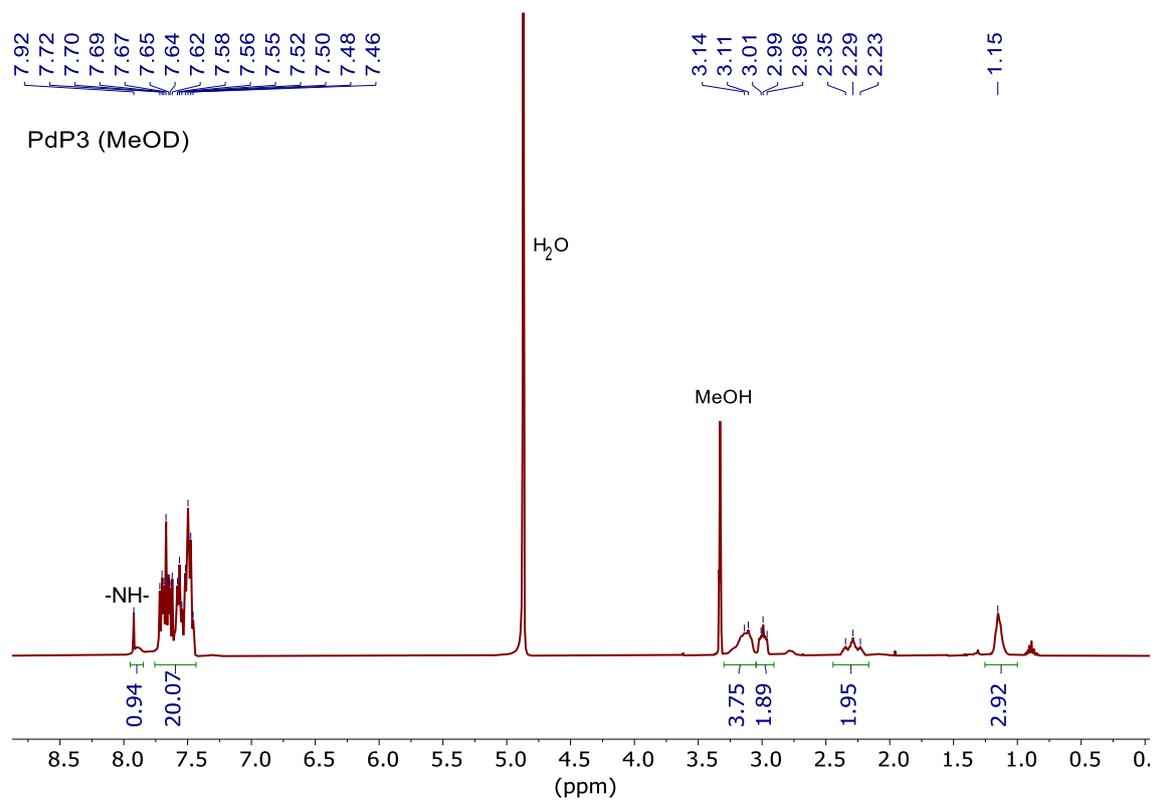


FIGURA A8 - Espectro de rmn de ¹H do complexo PdP3.

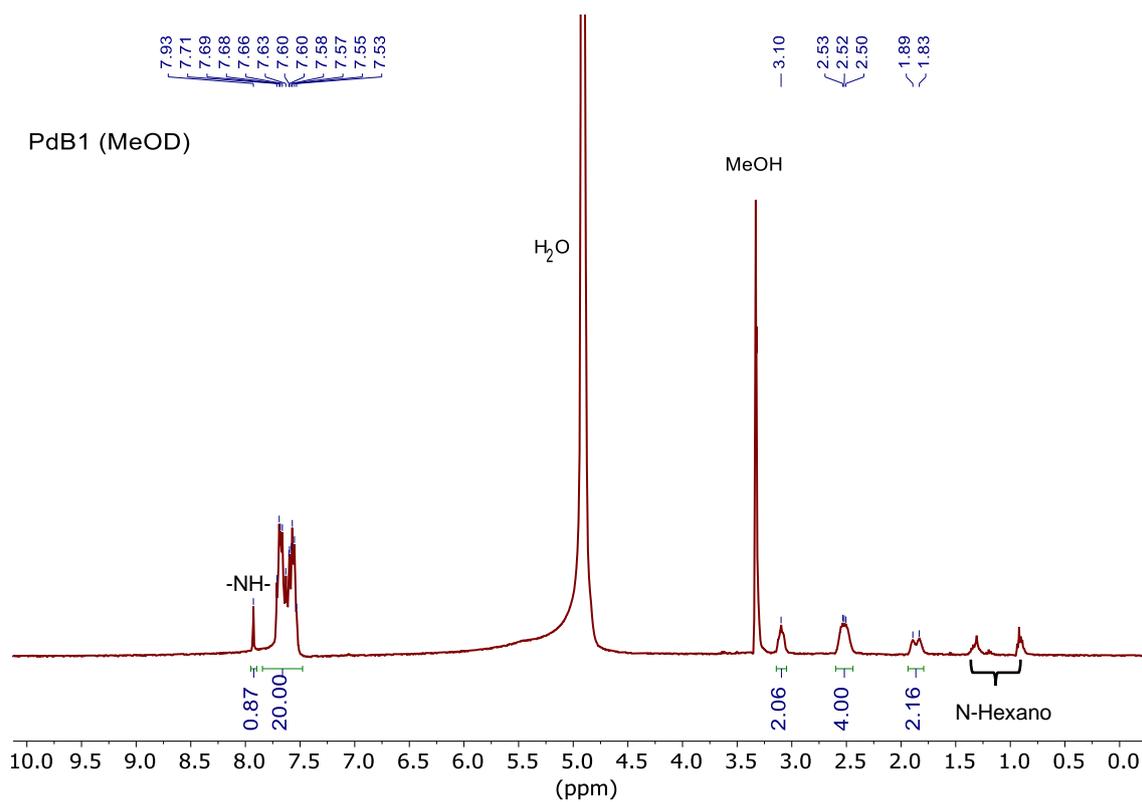


FIGURA A9 - Espectro de rnm de ¹H do complexo PdB1.

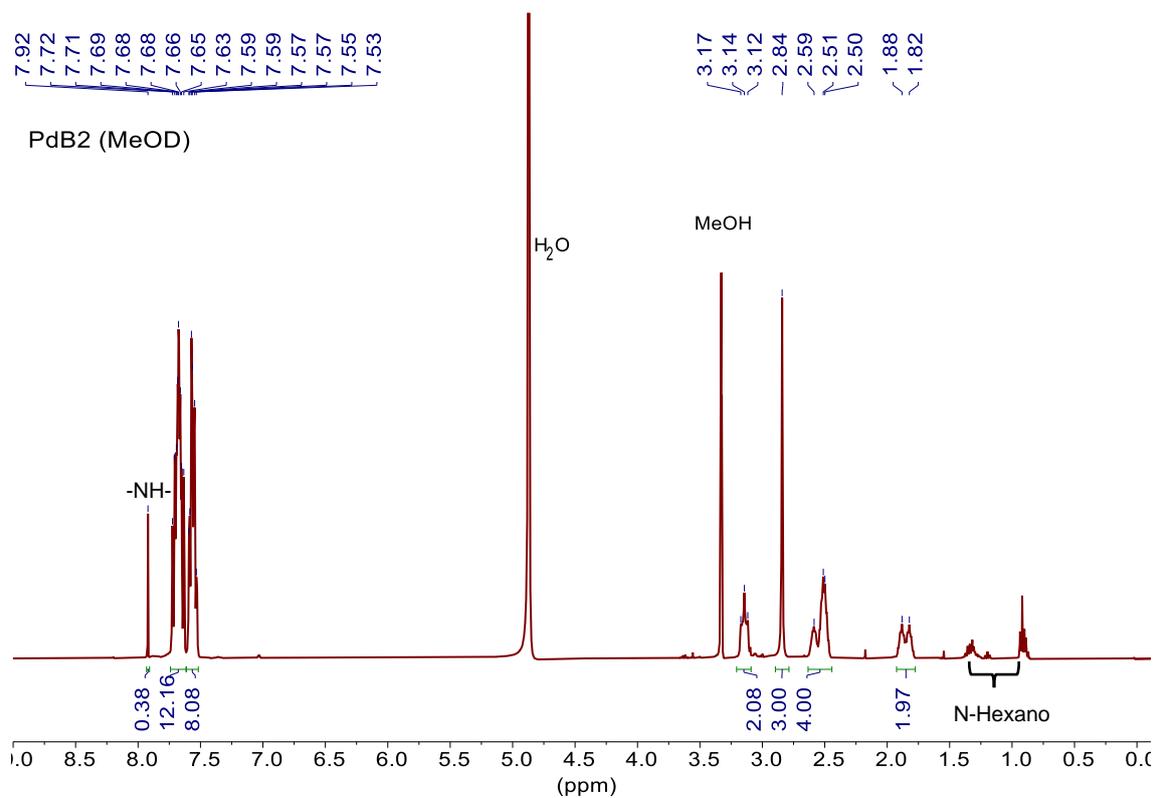


FIGURA A10- Espectro de rnm de ¹H do complexo PdB2.

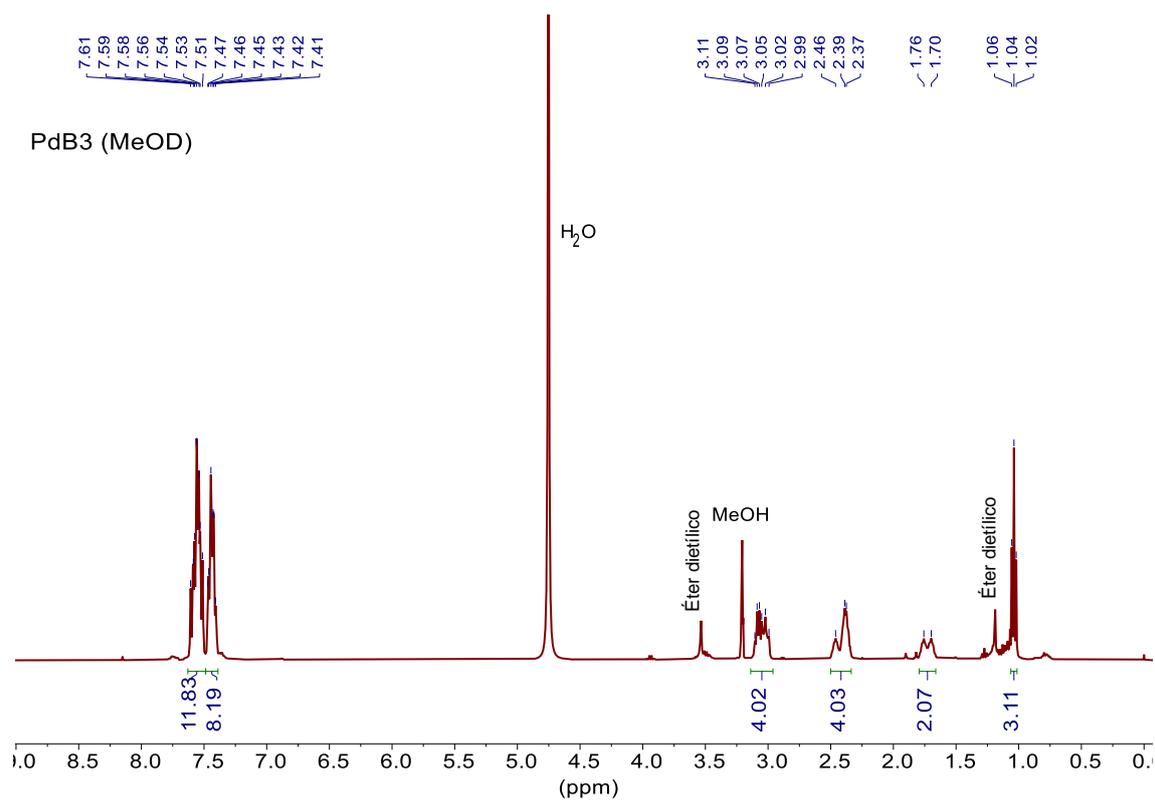


FIGURA A11 - Espectro de rnm de ¹H do complexo PdB3.

RMN de ³¹P

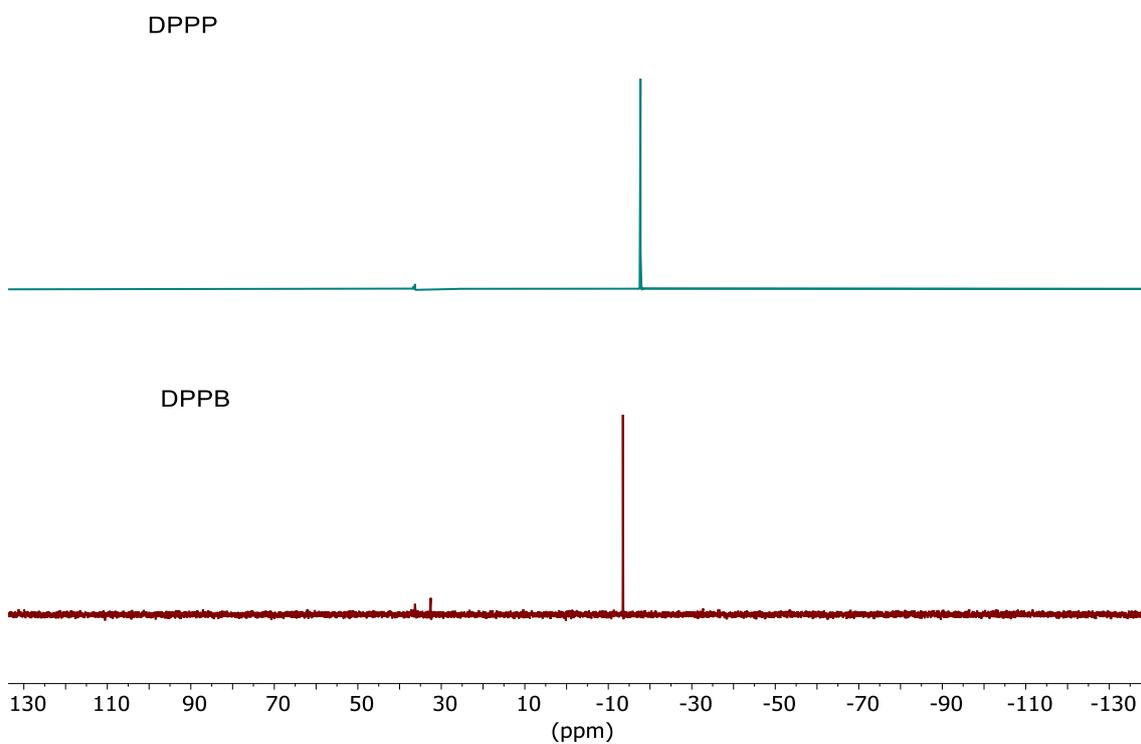


FIGURA A12 - Espectro de rnm ³¹P do ligantes DPPP e DPPM em MeOD.

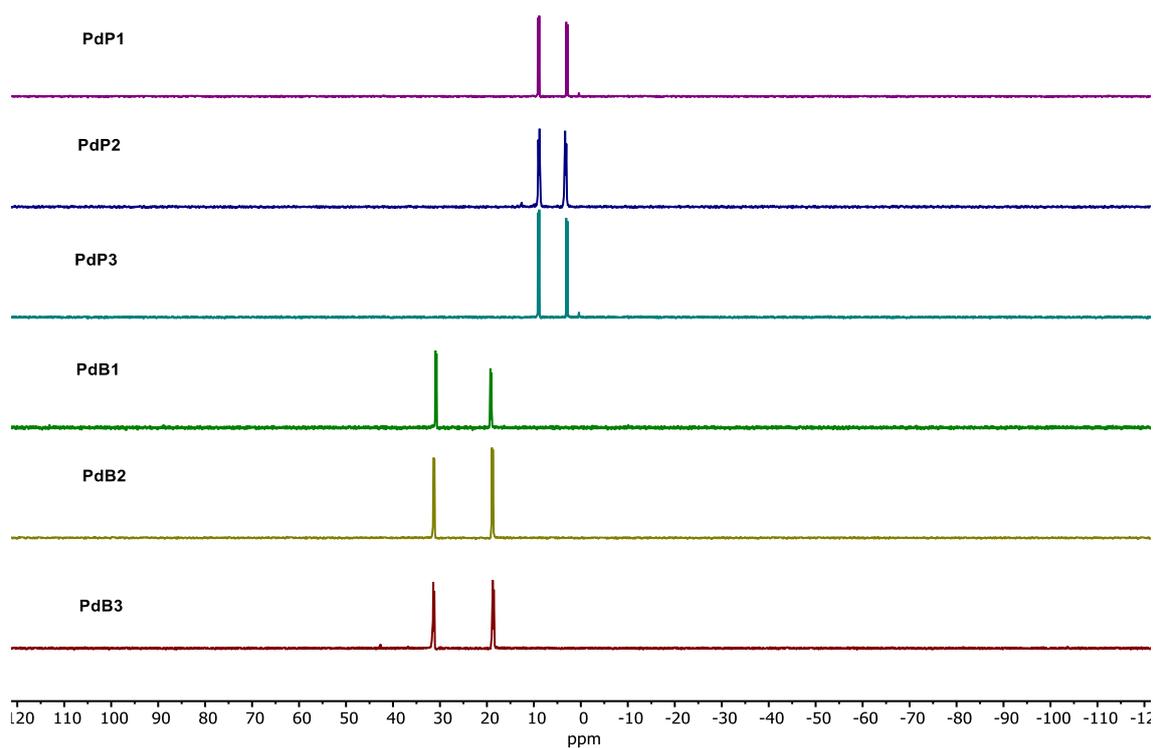


FIGURA A13- Espectro de $\text{rmn } ^{31}\text{P}$ dos complexos PdP1, PdP2, PdP3, PdB1 PdB2 e PdB3 em MeOD.

Espectrometria de Massas

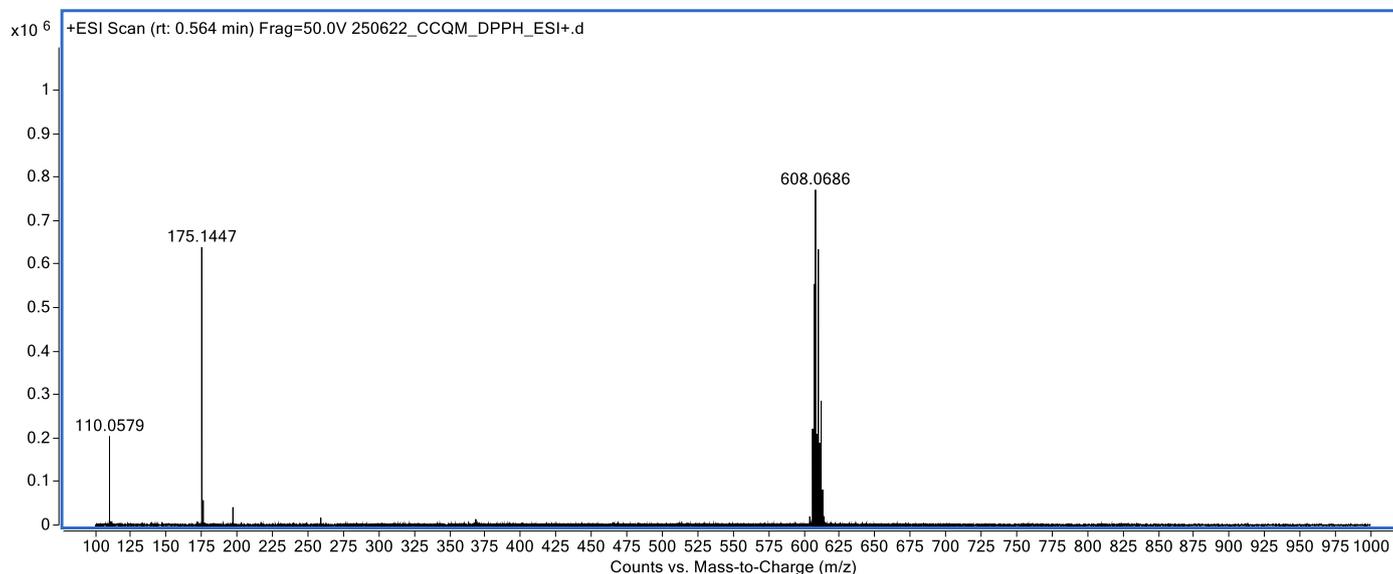


FIGURA A14 -Espectro de massas full scan para o complexo PdP1

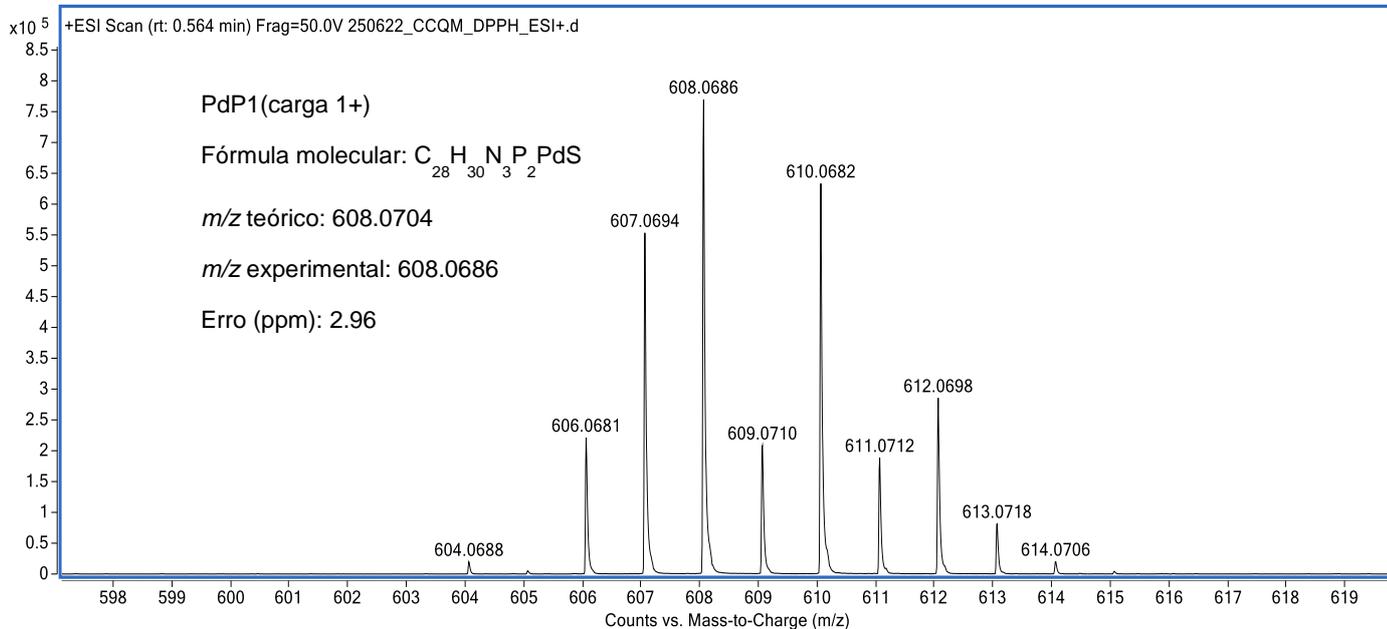


Figura A15 - Espectro de massas ampliado para o composto PdP1 com carga 1+.

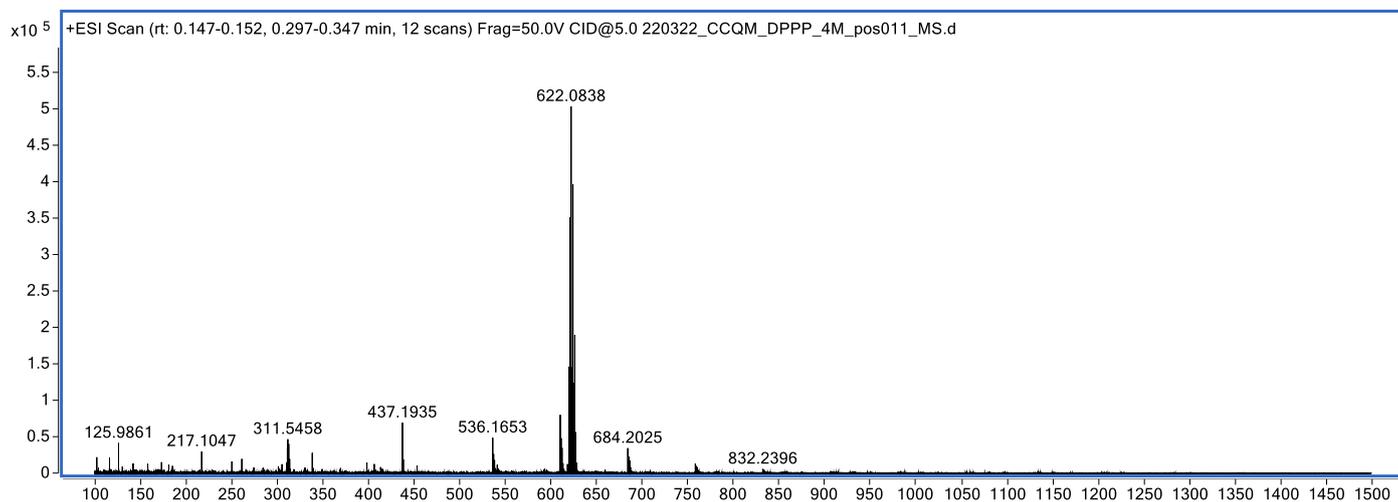


FIGURA A16- Espectro de massas full scan para o complexo PdP2.

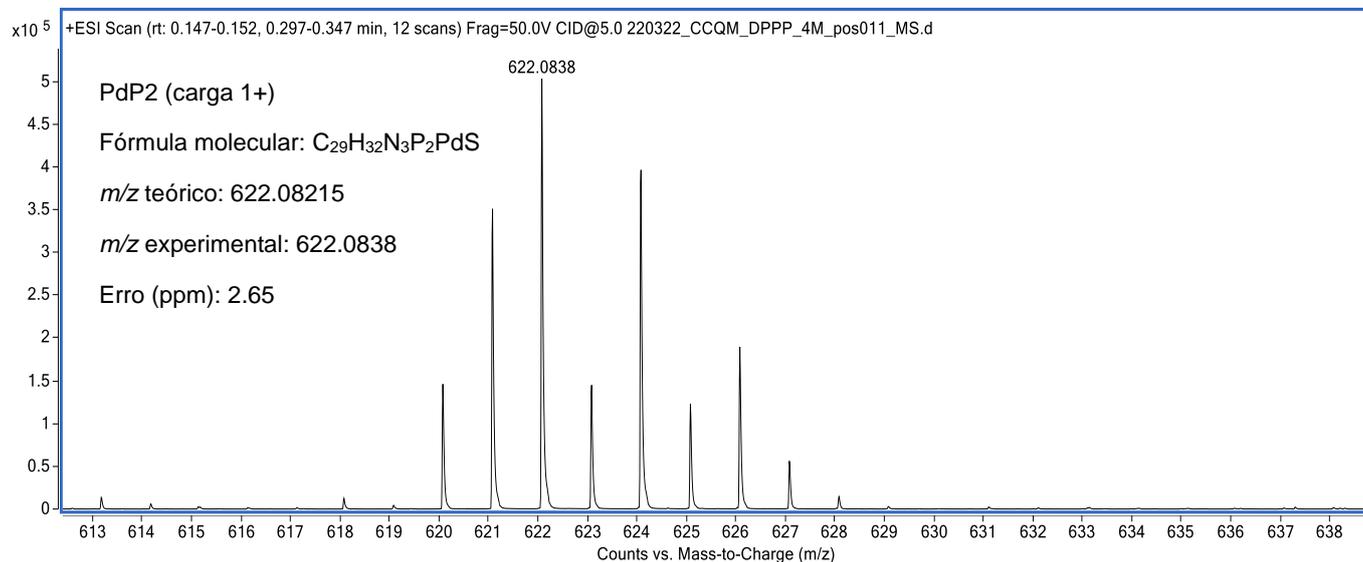


Figura A17 - Espectro de massas ampliado para o composto PdP2 com carga 1+.

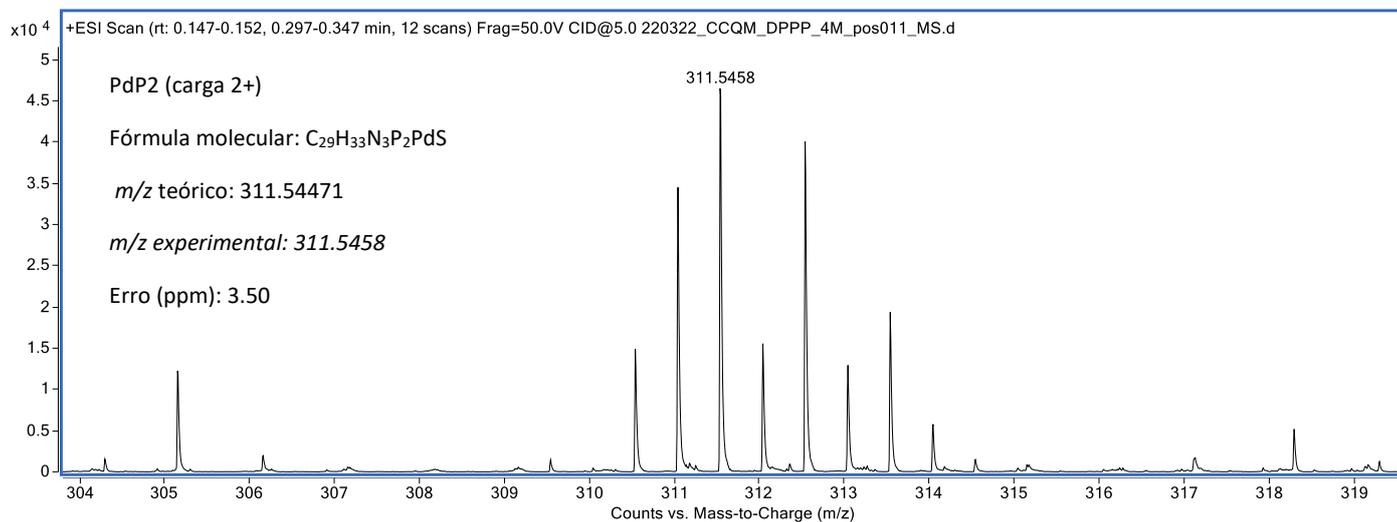


FIGURA A18 - Espectro de massas ampliado para o composto PdP2 com carga 2+.

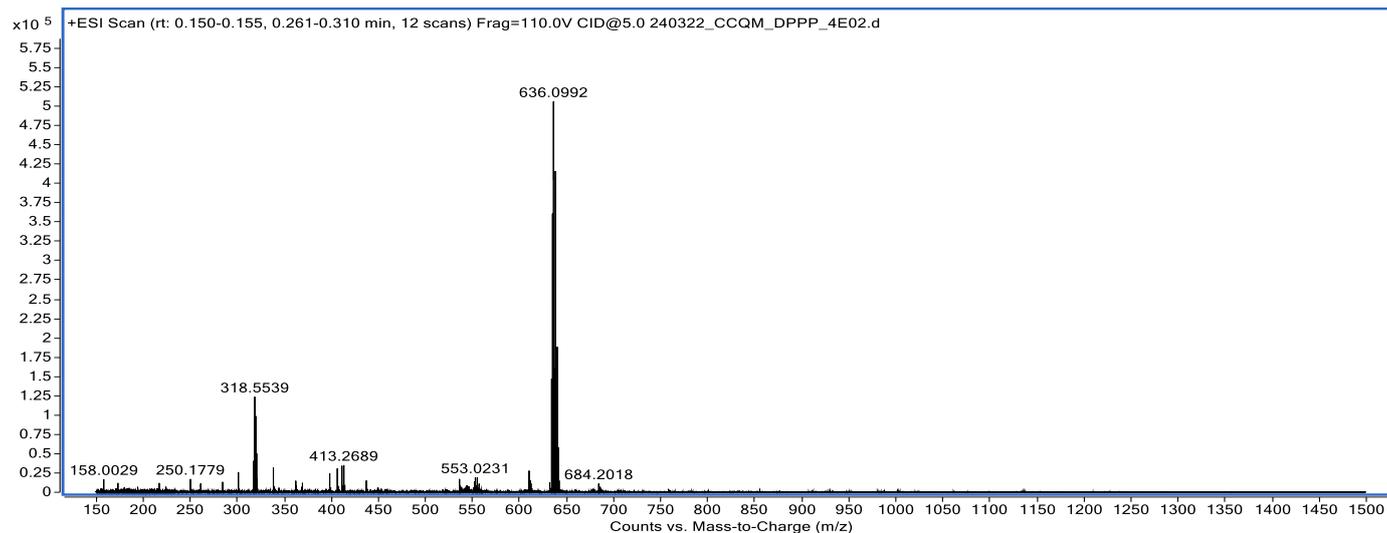


FIGURA A19 - Espectro de massas full scan para o complexo PdP3.

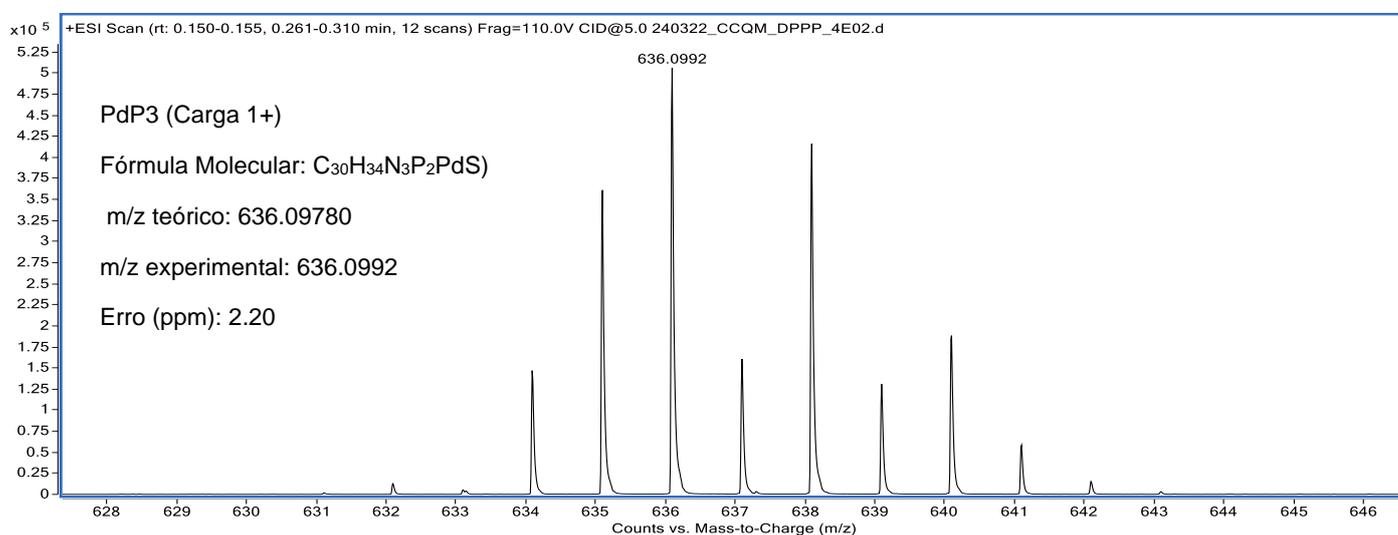


FIGURA A20 - Espectro de massas ampliado para o composto PdP3 com carga 1+.

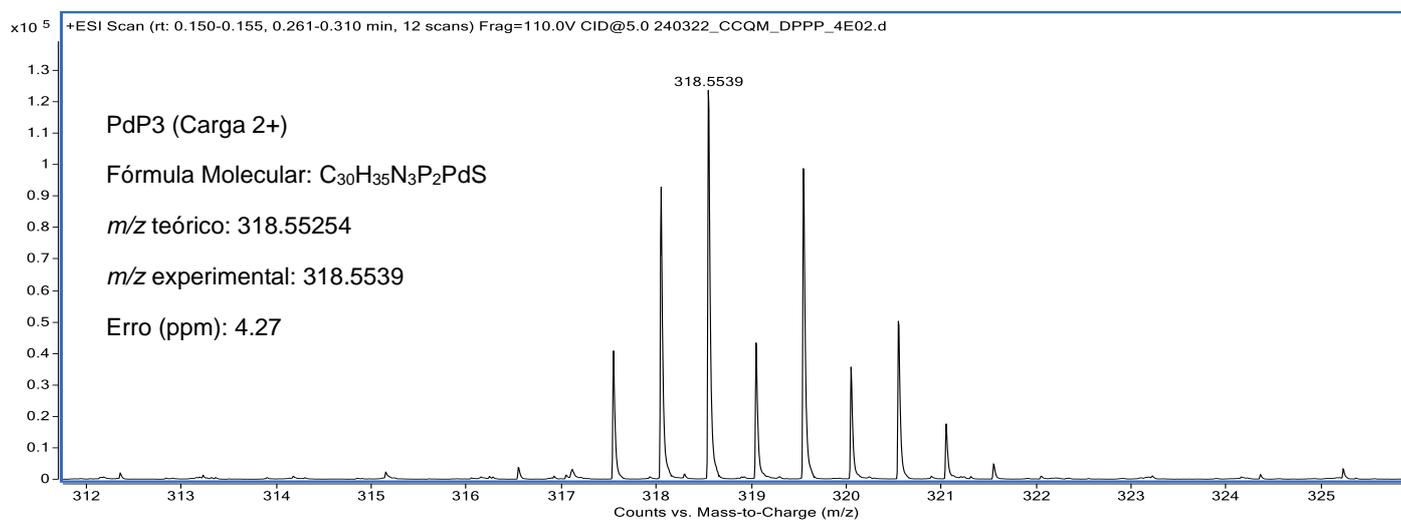


FIGURA A21 - Espectro de massas ampliado para o composto PdP3 com carga 2+.

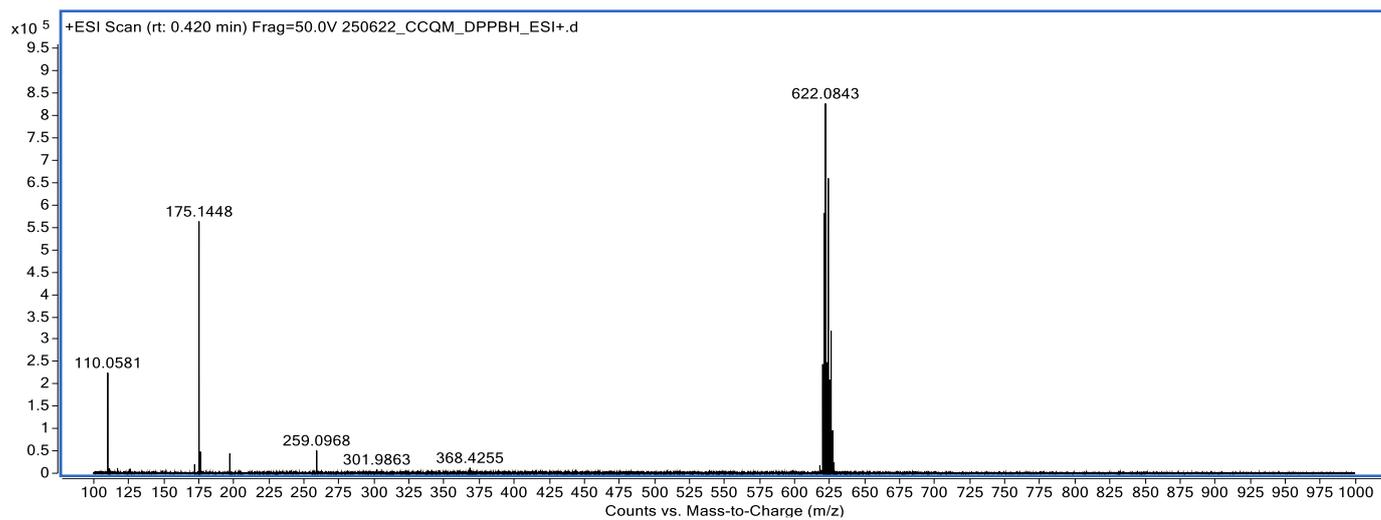


Figura A22 - Espectro de massas full scan para o complexo PdB1.

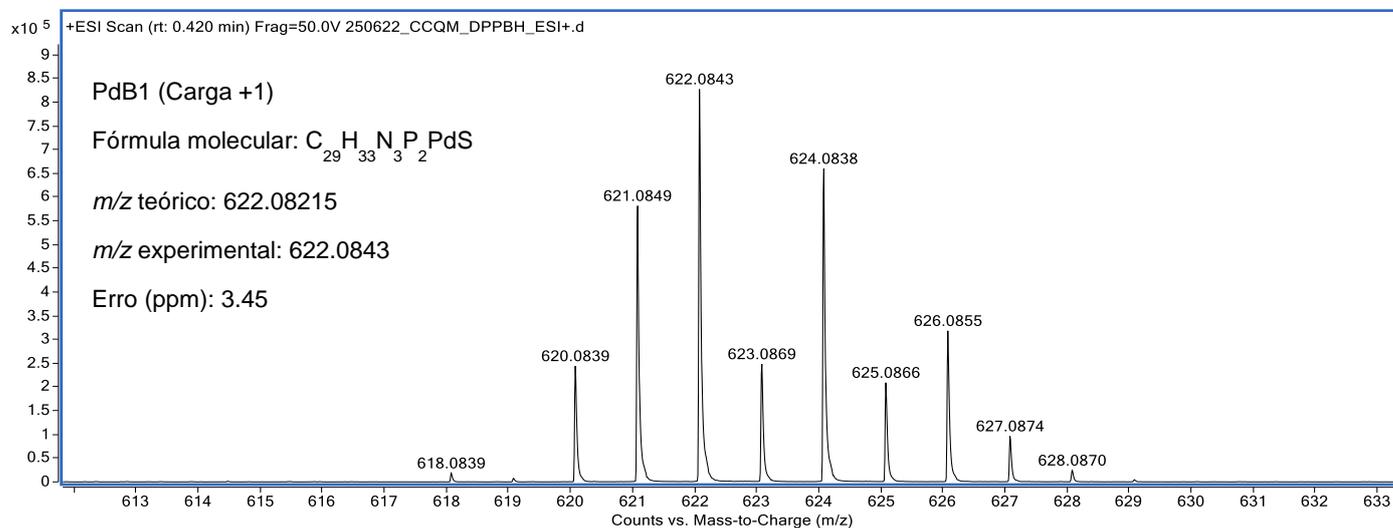


FIGURA A23 - Espectro de massas ampliado para o composto PdB1 com carga 1+.

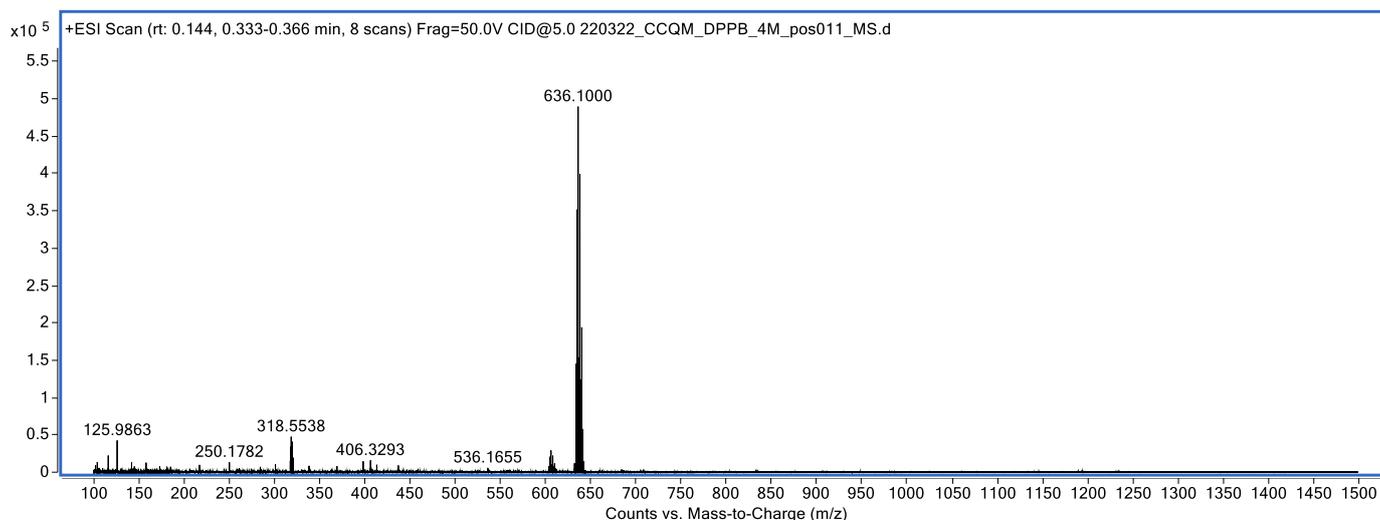


FIGURA A24 - Espectro de massas full scan para o complexo PdB2.

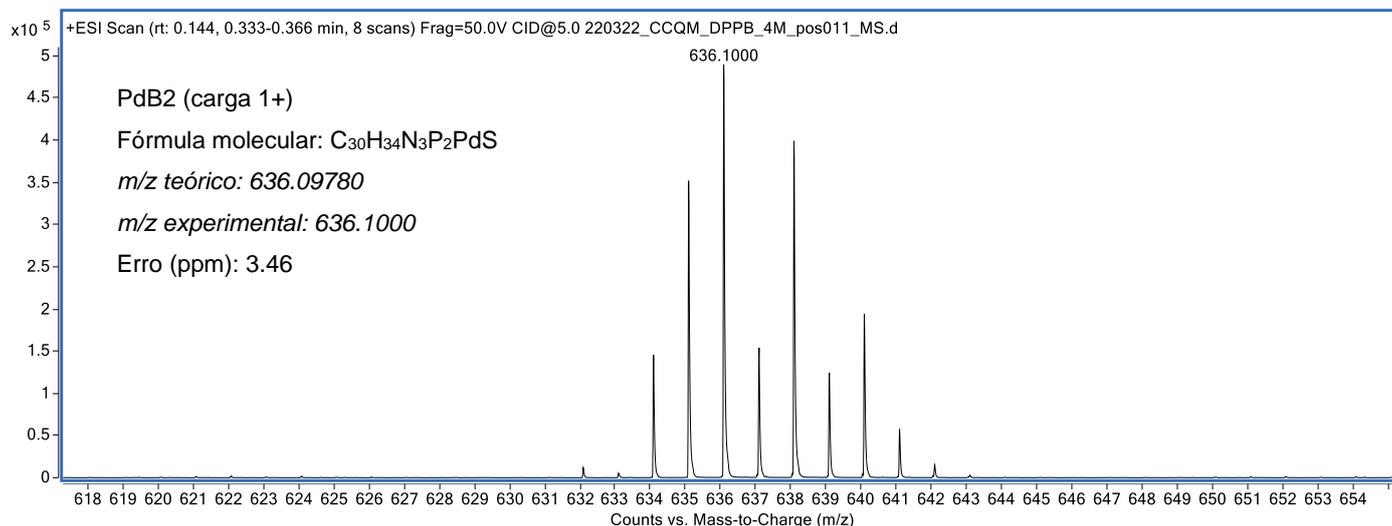


FIGURA A25 - Espectro de massas ampliado para o composto PdB2 com carga 1+.

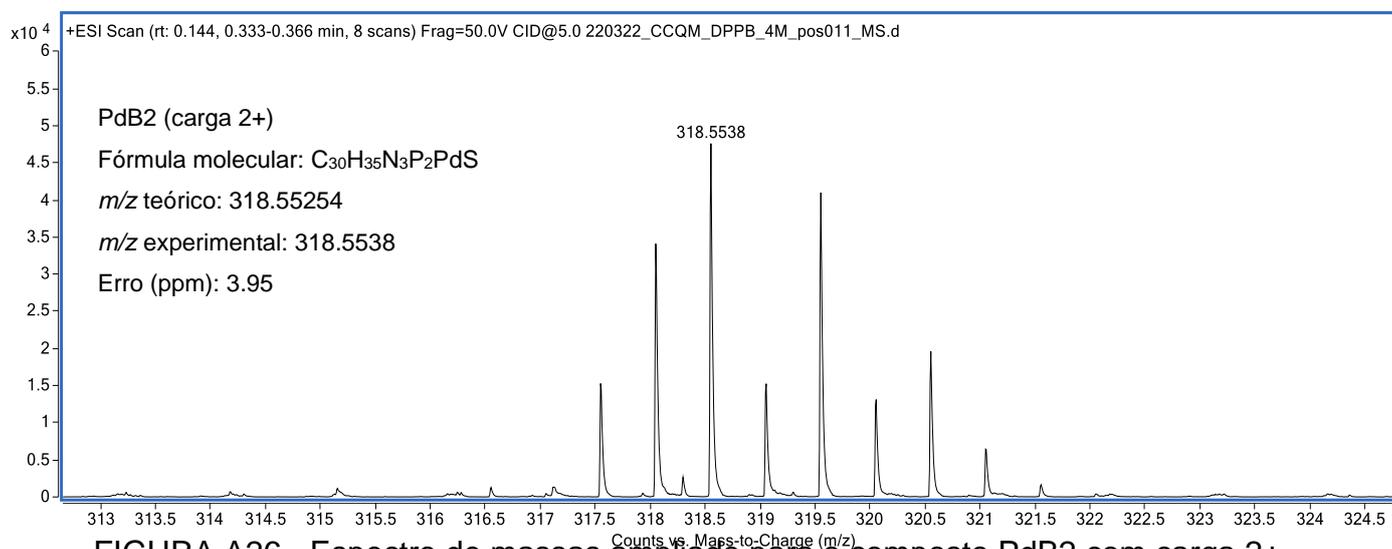


FIGURA A26 - Espectro de massas ampliado para o composto PdB2 com carga 2+.

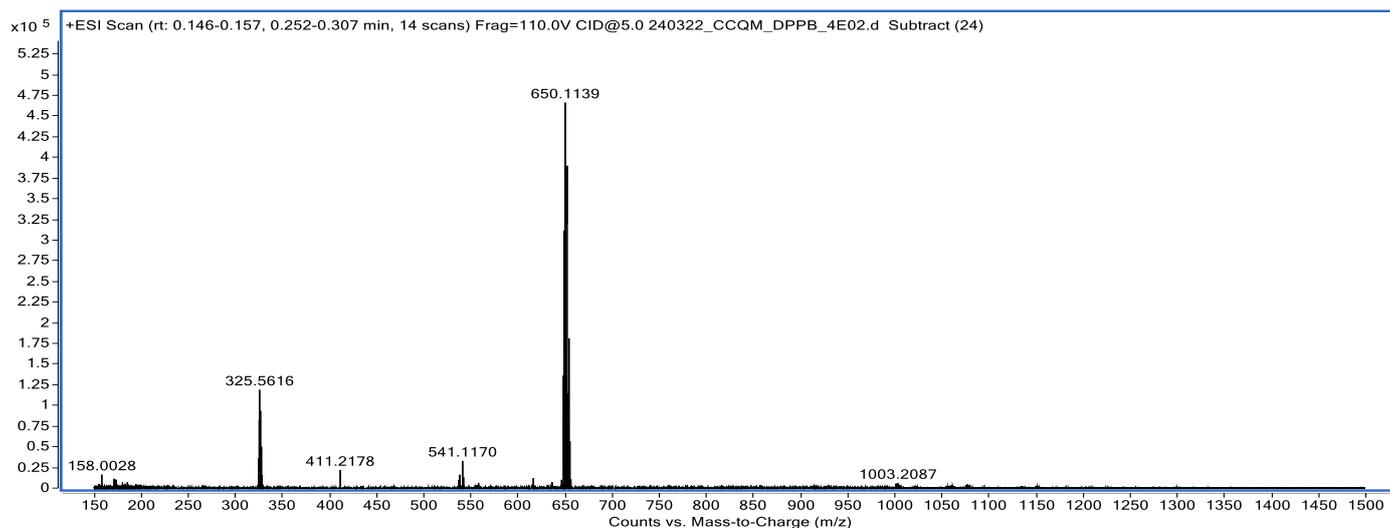


Figura A27 - Espectro de massas full scan para o complexo PdB3.

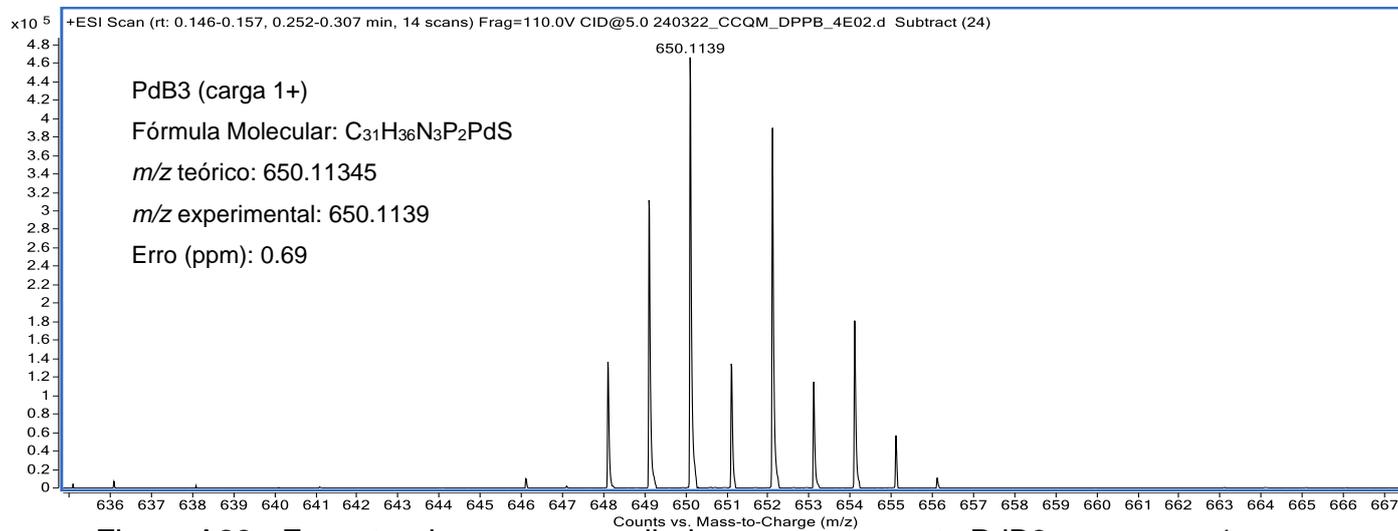


Figura A28 - Espectro de massas ampliado para o composto PdB3 com carga 1+.

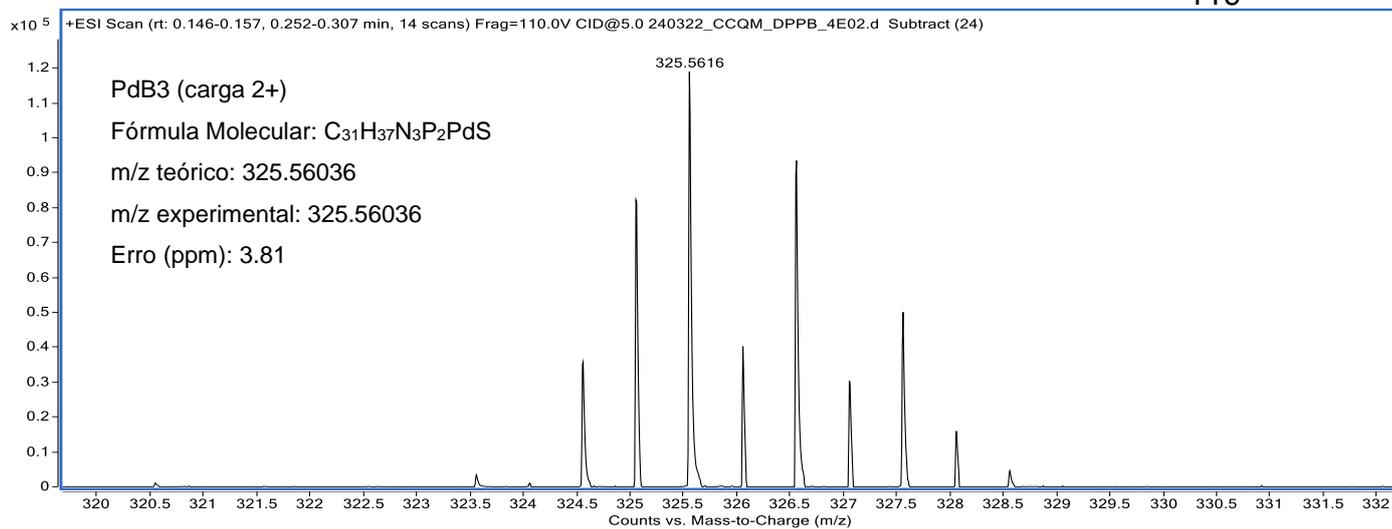


Figura A29 - Espectro de massas ampliado para o composto PdB3 com carga 2+.

Difração de raios X

TABELA A2 - Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento obtidos para os complexos PdB1 e PdB3

Compostos	PdB1	PdB3
Fórmula empírica	C ₂₉ H ₃₅ Cl ₂ N ₃ OP ₂ PdS	C ₃₁ H ₃₇ N ₃ P ₂ PdS
Massa molecular	712.90	652.03
Temperatura (K)	100(2)	100(2)
Sistema Cristalino	monoclínico	monoclínico
Grupo espacial	P21/c	<i>P2₁/n</i>
a (Å)	10.52499(7)	13.76499(10)
b (Å)	14.06602(9)	8.43170(7)
c (Å)	21.73977(15)	33.01467(19)
α (°)	90	90
β (°)	102.7601(7)	93.8421(5)
γ (°)	90	90
Volume (Å ³)	3138.97(4)	3823.15(5)
Z	4	4
ρ _{calc} (g/cm ³)	1.509	1.133
μ(mm ⁻¹)	8.138	5.363
Tamanho do cristal (mm ³)	? x? x?	0.08x0.07x0.03
Radiação	CuKα (λ = 1.54184 Å)	CuKα (λ = 1.54184 Å)
Faixa 2Θ da coleta dos dados (°)	5.225 a 70.068	4.985 a 70.074
Reflexões Coletadas	47465	50660
Reflexões independentes	5963	7261
R _{int}	0.0409	0.0363
dados/restrições/parâmetros	5537/87/404	6730/0/344
Melhor ajuste F2	1.054	1.068
Índices R finais [<i>I</i> ≥ 2σ (<i>I</i>)]	R ₁ = 0.0230 wR ₂ = 0.0572	R ₁ = 0.0323 wR ₂ = 0.0897
Índices R finais [todos os dados]	R ₁ = 0.0251 wR ₂ = 0.0584	R ₁ = 0.0348 wR ₂ = 0.0921
Maior diferença pico/vale (e / Å ⁻³)	0.514/-0.458	0.659/-0.438

Estabilidade por UV-vis

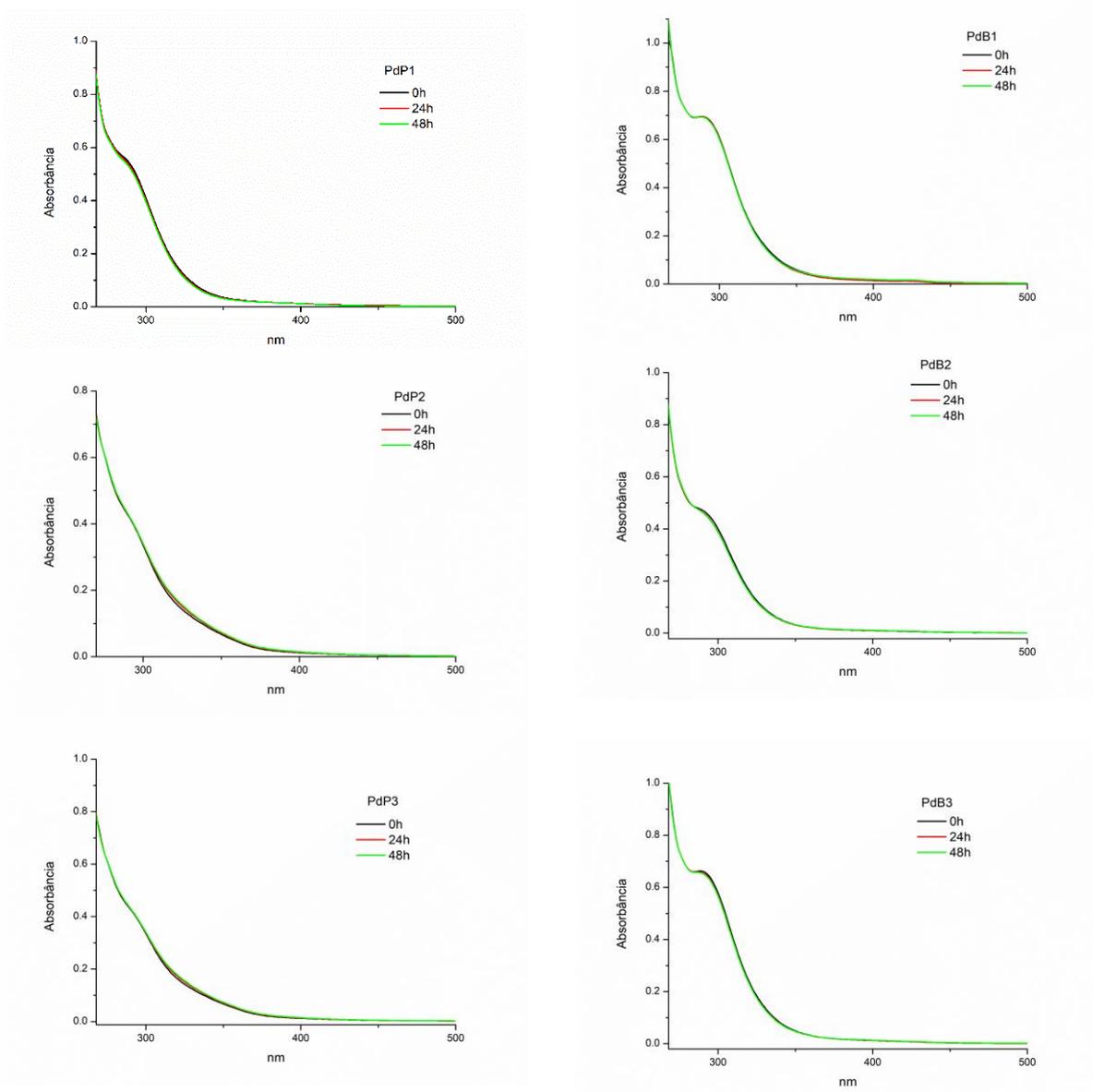


FIGURA A30 - Espectro de absorção por UV-vis em 0, 24 e 48 horas em DMSO para os complexos PdP1, PdP2, PdP3, PdB1, PdB2 e PdB3.

Ensaio de formação de colônia para o composto PdP3

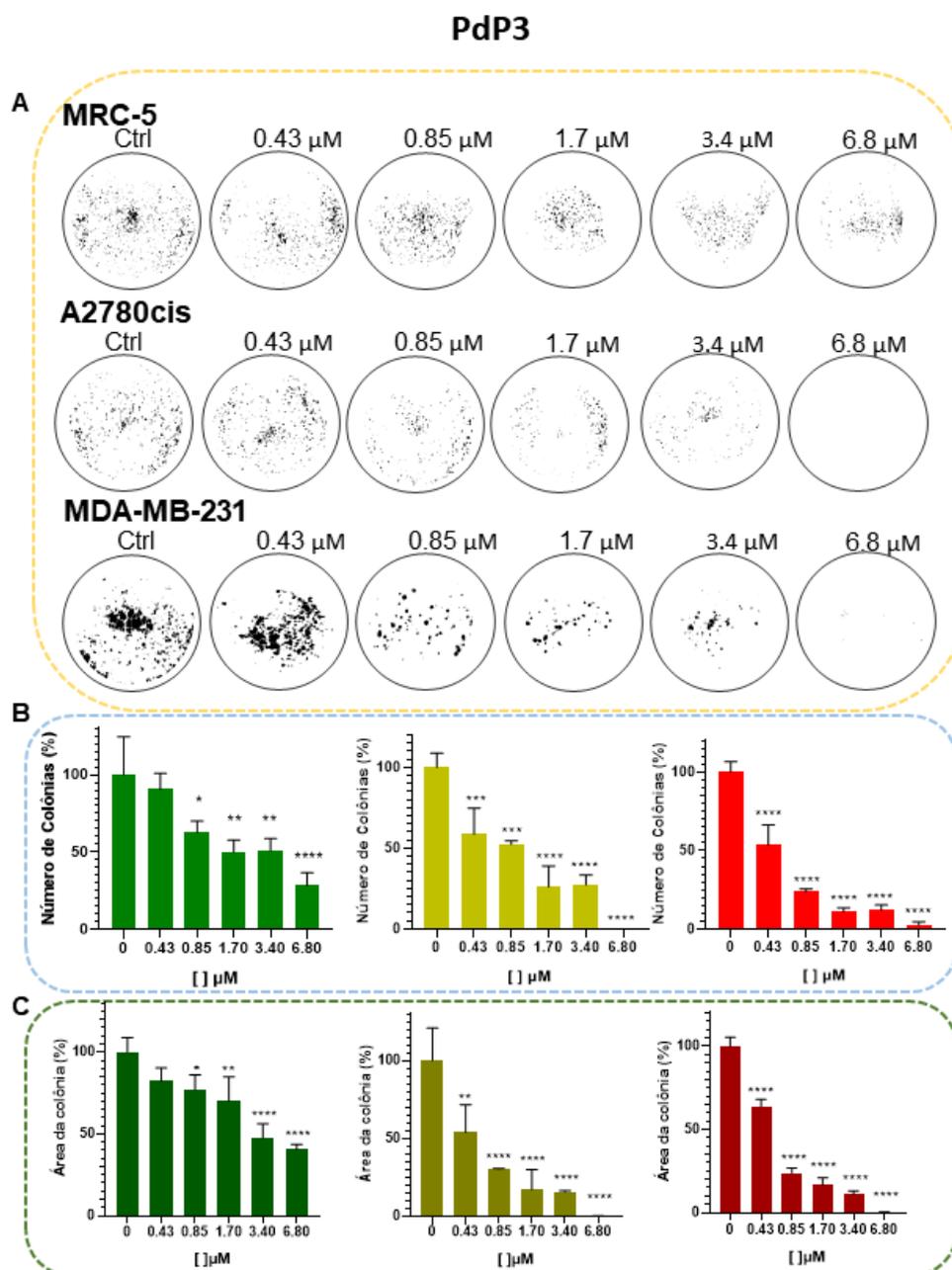


FIGURA A31 - A) imagens das colônias MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações do composto PdP3. B) distribuição do número de colônias (%) para cada concentração (verde -MRC-5), (amarelo – A2780cis) e (vermelho - MDA-MB-231), * $p = 0,01$, ** $p = 0,002$, *** $p = 0,0008$ e **** $p < 0,0001$. B) distribuição da área das colônias (%) para cada concentração (verde -MRC-5), (amarelo – A2780cis) e (vermelho - MDA-MB-231), * $p = 0,08$, ** $p = 0,002$ e **** $p < 0,0001$.

Ensaio morfológico em campo claro e fluorescência marcado com PI para o composto PdB3.

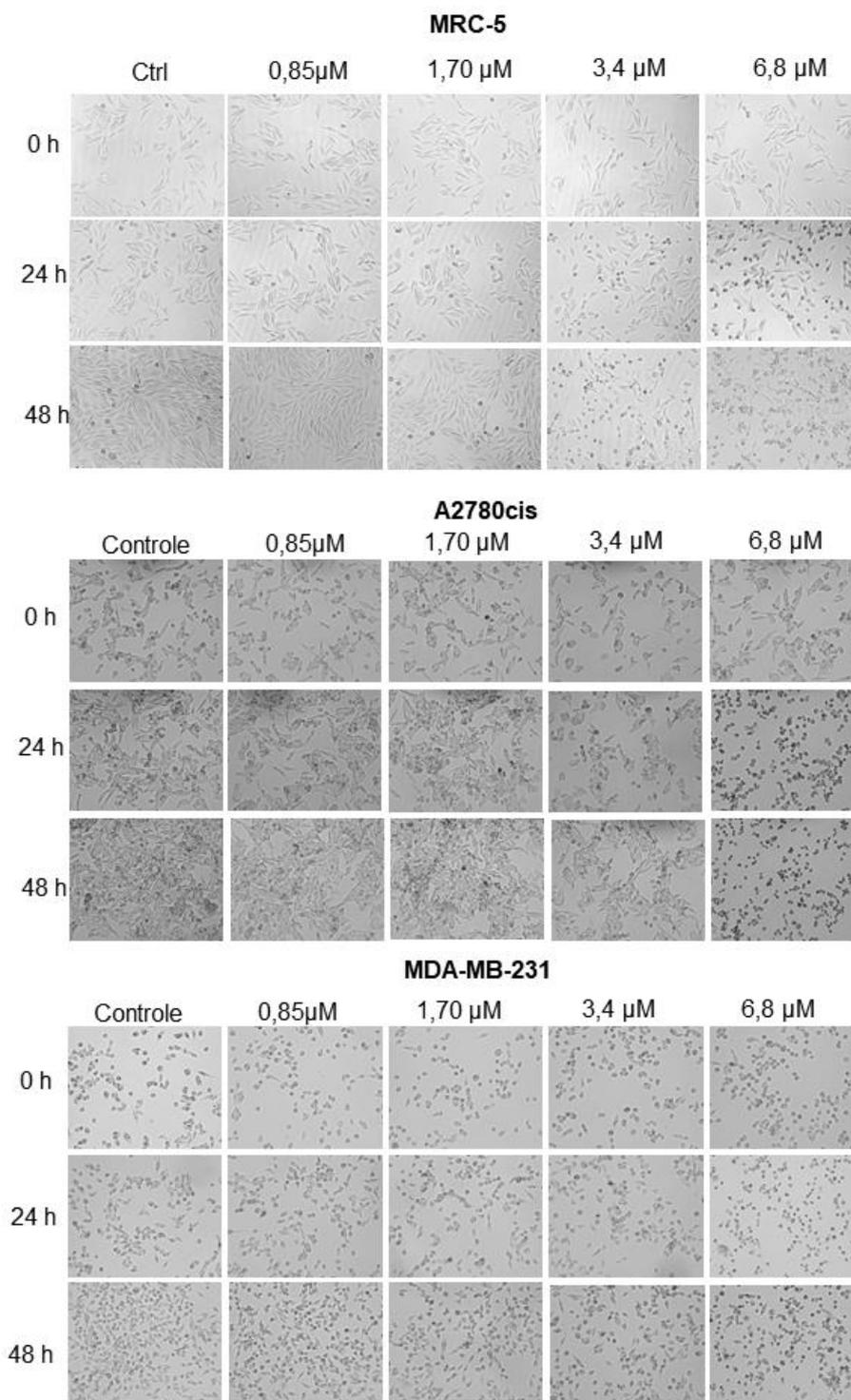


FIGURA A32 - Ensaio morfológico em campo claro em 0, 24 e 48 horas para o composto PdP3 frente as linhagens celulares MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231.

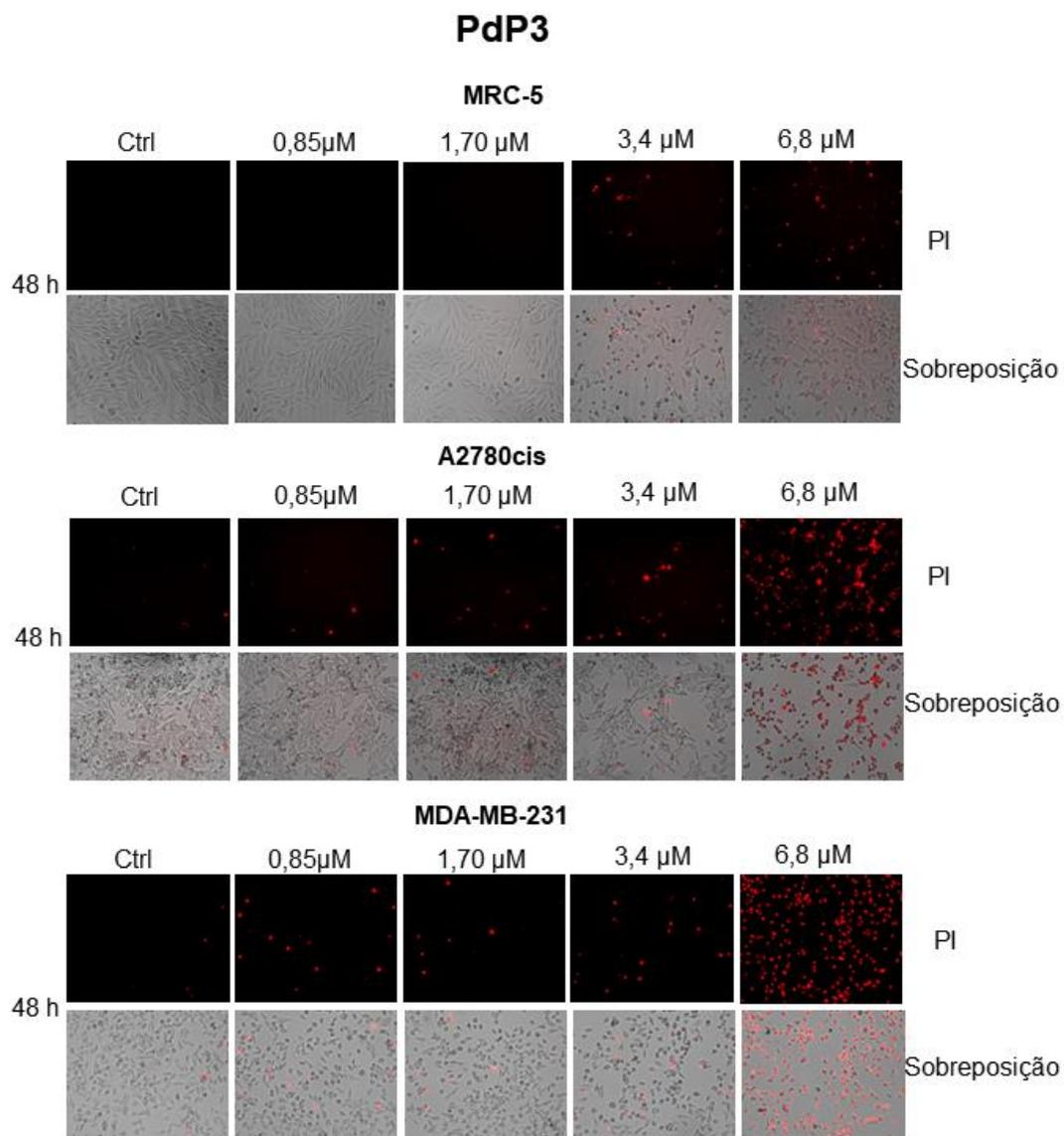


FIGURA A33 - Ensaio morfológico para o composto PdP3 nas linhagens celulares MRC-5, A2780cis e MDA-MB-231 marcado com PI. Imagens obtidas com microscópio CELENA® S com zoom de 10x.

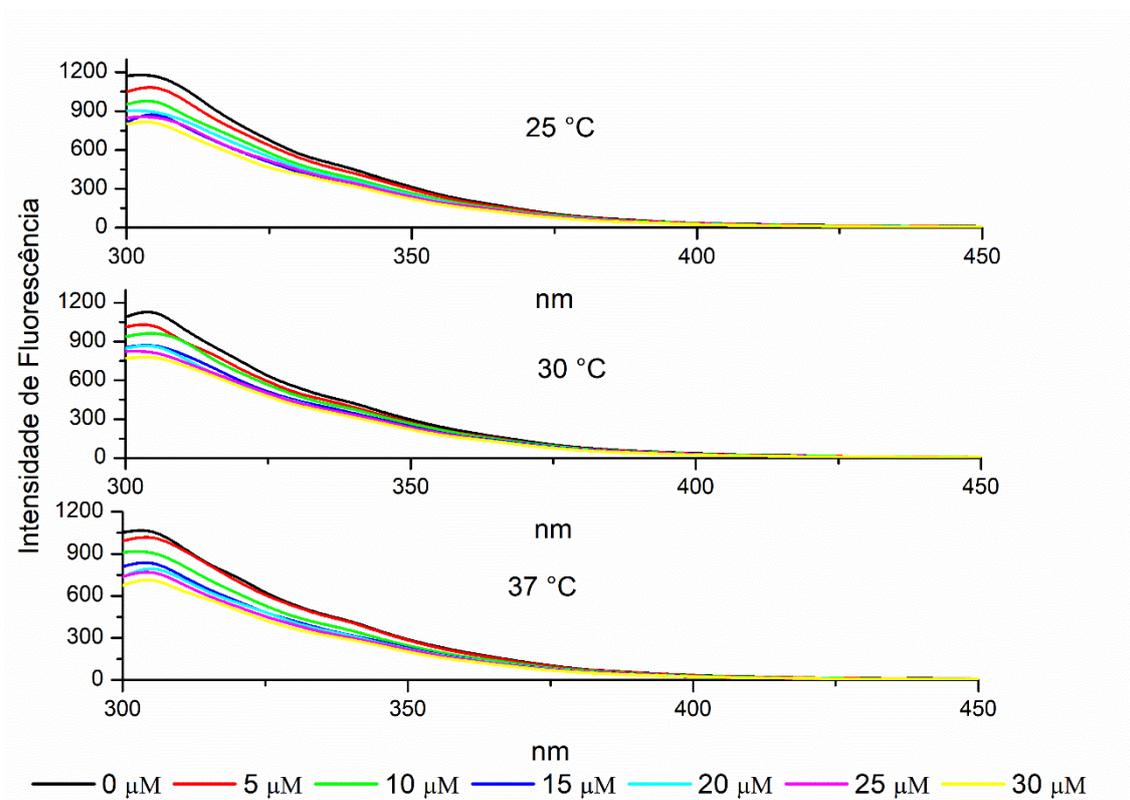
Espectro de fluorescência de interação do complexo PdB3 com HSA

FIGURA A33- Espectros da supressão de fluorescência da HSA pelo aumento da concentração do composto PdP3 em diferentes temperaturas (25, 30 e 35 °C).