

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

**“COMPLEXOS FOSFÍNICOS DE Pd(II) COM PRODUTOS
NATURAIS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE E INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS”**

Jocely de Lucena Dutra*

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

**Orientador: Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista
* bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Jocely de Lucena Dutra, realizada em 29/11/2023.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista (UFSCar)

Prof. Dr. Roberto Santana da Silva (USP)

Profa. Dra. Camilla Abbehausen (UNICAMP)

Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha (UFSCar)

Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira (UFSCar)

"Trabalhe como se tudo
dependesse de ti.
Confie como se tudo
dependesse de Deus."
Inácio de Loyola

*Dedico este trabalho aos meus pais
Marta e João, e ao meu irmão
Jones, por todo amor, incentivo e
ensinamentos*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proteger, me guiar e me conceder as competências necessárias para desenvolver este trabalho.

A minha família que não mediu esforços pra me apoiar, por todo amor e cuidado.

Ao professor Alzir Azevedo Batista, pela orientação durante o desenvolvimento do trabalho, por toda confiança e ensinamentos.

À Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti (Gerontologia-UFSCar) e as membras do grupo LABEN, Me. Marina Mantellatto Grigoli e Dra. Angelina Fuzer, pela disponibilidade da sua estrutura para a realização dos testes biológicos.

À Dra. Angélica Graminha por ensinar o protocolo para o desenvolvimento dos experimentos de ciclo celular e apoptose e pela disposição em me auxiliar com minhas dúvidas.

Aos Prof. Dr. Eduardo Ernesto Castellano, Dr. Javier Ellena, Dr. João Honorato e aos membros do LaMuCrEs, pelas medidas de difração de raio-X em monocristal e por todo suporte dado.

Aos membros do LERCI, atuais e antigos, Adriana, Alex, Celis, Fabiano, Gabriel, Gregory, Gustavo, João, Legna, Letícia Klein, Marcos, Nadija, Pedro, Rafael, Saulo, Taíse, Tamires e Wilmer por toda parceria, aprendizados, cafézinhos e boas risadas.

Aos membros do LabMeeB, em especial ao Caio e a Millena, muito obrigada pela amizade e ótima convivência.

Ao Prof. Dr. Fillipe V. Rocha (DQ-UFSCar) e aos membros do grupo CCQM, Gabi, Mauro, Dário, George, Tamara, José e Josias pela disponibilidade da sua estrutura.

Aos amigos: Caio, Cimili, David, Jany, Jhony, João, Katia, Laís do vôlei, Laís, Luciano, Marcela, Mayara, Monique, Nádija, Raphael, Rodrigo, Tamara, Thalita e Wagner.

Ao Vitor, por todo companherismo, cuidado e pela paciência nos momentos de dificuldade.

Ao Departamento de Química da UFSCar, especialmente aos servidores Ademir Sartori, Luciana Vizotto e Paulo Lambertucci e ao Programa de Pós-Graduação em Química, em especial às secretárias Ariane, Cristina, Luciani e Thainá, pela disponibilidade e ajuda prestada.

A CAPES, pela bolsa concedida.

Lista de tabelas

TABELA 1. 1. Valores de IC ₅₀ (µM) e índice de seletividade (IS) encontrados para os complexos do tipo Ru/bifosfina/naftoquinona frente à linhagem tumoral (MDA-MB-231) e não tumoral (MCF-10A) de mama humana.	13
TABELA 4. 1. Dados de análise elementar (valores teóricos entre parêntesis) e condutividade molar (ohm ⁻¹ cm ² mol ⁻¹) em DMSO e CH ₂ Cl ₂	37
TABELA 4. 2. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados das estruturas cristalinas dos complexos A1 , A2 , A4 e A5	39
TABELA 4. 3. Atribuição tentativa das principais frequências vibracionais, nos espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos A1-A5 e curcumina, em KBr.	40
TABELA 4. 4. Razão massa carga (m/z) teóricos e experimentais, e erro em ppm, referentes ao pico [M] ⁺ dos complexos A1-A5	41
TABELA 4. 5. Comprimento de onda de absorção máxima (λ, nm) absorvidade molar (ε, L mol ⁻¹ cm ⁻¹) e atribuição tentativa das bandas. Os espectros eletrônicos experimentais foram registrados em soluções dos complexos em DMSO.	48
TABELA 4. 6. Teste de IC ₅₀ para atividade sequestradora de radicais livres (30 min).	49
TABELA 4. 7. Valores de IC ₅₀ obtidos para os complexos A1-A5 (A1 - [Pd(cur)(PPh ₃) ₂]PF ₆ ; A2 - [Pd(cur)(dppe)]PF ₆ ; A3 - [Pd(cur)(dppp)]PF ₆ ; A4 - [Pd(cur)(dppb)]PF ₆ ; A5 - [Pd(cur)(dppf)]PF ₆), precursores (P1 - [PdCl ₂ (PPh ₃) ₂]; P2 - [PdCl ₂ (dppe)]; P3 - [PdCl ₂ (dppp)]; P4 - [PdCl ₂ (dppb)]; P5 - [PdCl ₂ (dppf)]), curcumina (cur) e cisplatina (CDDP) frente as linhagens celulares tumorais (MDA-MB-231, MCF-7, SKBR-3, DU-145, A2780 e A2780cis) e não tumorais (MCF-10A e MRC-5) após 48 horas de tratamento.	53
TABELA 4. 8. Índices de seletividade (IS), obtidos a partir da divisão dos valores de IC ₅₀	54
TABELA 4. 9. Valores de IC ₅₀ obtidos na linhagem celular A2780cis, irradiado com luz de led em 460 – 465 nm (15 min) e sem irradiação, para os complexos A1-A5	55
TABELA 4. 10. Valores das constantes de supressão Stern-Volmer (K _{sv}), constantes de taxa de supressão biomolecular (k _q), constantes de ligação (K _b), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos (ΔH ^o , ΔS ^o e ΔG ^o) para o sistema composto-HSA em diferentes temperaturas.	71

TABELA 5. 1. Dados de análise elementar (valores teóricos entre parêntesis) e condutividade molar (Λ_m , $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$) em DMSO e CH_2Cl_2	81
TABELA 5. 2. Razão massa carga (m/z) teóricos e experimentais, e erro em ppm, referentes ao pico $[\text{M}]^+$ dos complexos B1-B4	82
TABELA 5. 3. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados das estruturas cristalinas dos complexos B1 e B4 modificado.....	84
TABELA 5. 4. Atribuição tentativa das principais frequências vibracionais características nos espectros de absorção na região do infravermelho dos ligantes e complexos B1-B4 , em KBr.	89
TABELA 5. 5. Comprimento de onda de absorção máxima (λ , nm), absortividade molar (ϵ , $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{L}$) e atribuição tentativa das bandas dos complexos B1-B4 , em solução de DMSO.....	90
TABELA 5. 6. Valores de IC_{50} obtidos para os complexos B1-B4 (B1 - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lau})]\text{PF}_6$; B2 - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lap})]\text{PF}_6$; B3 - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lpm})]\text{PF}_6$; B4 - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{ali})]\text{PF}_6$), precursor (P2 - $[\text{PdCl}_2(\text{dppe})]$), lausona (lau), lapachol (lap), 3-estitil-lausona (lpm), alizarina (ali) e cisplatina (CDDP) frente as linhagens celulares tumorais (MCF-7, SKBR-3, A549, DU-145, A2780 e A2780cis) e não tumoral (MRC-5) após 48 horas de incubação com os compostos.....	92
TABELA 5. 7. Valores das constantes de supressão Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de taxa de supressão biomolecular (k_q), constantes de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) para o sistema composto-HSA em diferentes temperaturas, para os complexos B1-B4	103
TABELA 6. 1. Condutividade molar (Λ_m , $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$) em DMSO e CH_2Cl_2 e dados de análise elementar (valores teóricos entre parêntesis), dos complexos C1-C3 . ..	109
TABELA 6. 2. Razão massa carga (m/z) teóricos e experimentais, e erro em ppm, referentes ao pico $[\text{M}]^+$ dos complexos B1-B4	109
TABELA 6. 3. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos de ligação (deg) selecionados para lapachol, C2 e C3	111
TABELA 6. 4. Comprimento de onda de absorção máxima (λ , nm), absortividade molar (ϵ , $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{L}$) e tentativa de atribuição das bandas dos complexos C1-C3 , em solução de DMSO.	116
TABELA 6. 5. Valores de IC_{50} obtidos para os complexos C1-C3 (C1 - $[\text{Pd}(\text{dppp})(\text{lap})]\text{PF}_6$, C2 - $[\text{Pd}(\text{dppb})(\text{lap})]\text{PF}_6$ e C3 - $[\text{Pd}(\text{dppf})(\text{lap})]\text{PF}_6$) precursores (P3 - $[\text{PdCl}_2(\text{dppp})]$, P4 - $[\text{PdCl}_2(\text{dppb})]$ e P5 - $[\text{PdCl}_2(\text{dppf})]$), lapachol (lap) e cisplatina	

(CDDP) frente as linhagens celulares tumorais MCF-7, SKBR-3, DU-145, A549, A2780, A2780cis e MRC-5 após 48 horas de tratamento.	118
TABELA 6. 6. Valores de fator de resistência para os complexos da série C e CDDP obtidos a partir da divisão dos valores de IC_{50}	119
TABELA 6. 7. Valores das constantes de supressão Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de taxa de supressão biomolecular (k_q), constantes de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) para o sistema composto-HSA em diferentes temperaturas, para os complexos C1-C3	130

Lista de figuras

FIGURA 1. 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, exceto pele não melanoma, estimados para 2023 por sexo. *Números arredondados para múltiplo de 10. Figura adaptada. ¹⁹	3
FIGURA 1. 2. Representação do processo de metástase. Figura adaptada. ^{22,23}	4
FIGURA 1. 3. Linha do tempo para o desenvolvimento dos medicamentos à base de platina empregados no tratamento do câncer. *NSCLC = Non-Small-Cell Lung Carcinoma, **SCLC= Small-Cell Lung Carcinoma e ***CML = Chronic Myeloid Leukemia). Figura adaptada ¹¹	6
FIGURA 1. 4. Modos de interação covalente entre a cisplatina e o DNA. (A) ligação intrafita, (B) ligação interfitas, (C) ligação monofuncional com uma base nitrogenada e (D) ligação bifuncional intermolecular (o metal se liga ao DNA em uma posição, e a segunda ligação é feita com outra biomolécula). Adaptado de referencia. ³⁹	7
FIGURA 1. 5. Estrutura química da curcumina (IUPAC: 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) e rizoma de <i>Curcuma longa L.</i>	8
FIGURA 1. 6. Estrutura de algumas moléculas pertencentes as classes das antraquinonas e naftoquinonas. Em preto estão representadas as subestruturas básicas de cada classe e em vermelho os substituintes que caracterizam os derivados. Adaptado de referência ⁵²	9
FIGURA 1. 7. Estrutura dos complexos contendo os ligantes lapachol e lausona sintetizados pelo LERCI, onde L = lapachol ou lausona. Figura fonte. ⁵²	12
FIGURA 1. 8. Estrutura dos complexos de cobre(I) contendo os ligantes trifenilfosfina, lausona, lapachol, 3-estiril-lausona e 4-cloroestiril-3-lausona. ¹¹	14
FIGURA 1. 9. Estrutura dos complexos rutênio/areno/alizarina. ¹⁵	14
FIGURA 1. 10. Esquema representativo da ligação entre metais e ligantes fosfínicos terciários.	16
FIGURA 1. 11. (A) Estruturas de complexos de Pt(II) e Pd(II) com atividade (IC ₅₀) frente às linhagens tumorais de pulmão (A549) e mama (MCF-7) e (B) Estrutura química do complexo de paládio com bipy e curcumina com atividade frente às linhagens tumorais de pulmão (A549), mama (MCF-7) e cervical (HeLa).	16
FIGURA 1. 12. Estrutura química da Padeliporfina.	18
FIGURA 1. 13. Fórmulas estruturais dos ligantes produtos naturais utilizados para o desenvolvimento dos novos complexos de Pd (II)	19

FIGURA 4. 1. Estruturas cristalográficas obtidas dos complexos A1 , A2 , A4 e A5 (o contra-íon PF_6^- foi omitido para melhor visualização das moléculas), átomos representados no modo ORTEP (elipsoides em 30%).	38
FIGURA 4. 2. Espectro de massas do complexo A1 .	41
FIGURA 4. 3. Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos A1 – $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{PPh}_3)_2]\text{PF}_6$, A2 – $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppe})]\text{PF}_6$, A3 – $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppp})]\text{PF}_6$, A4 – $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ e A5 – $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, em CH_2Cl_2 (com capilar de D_2O).	42
FIGURA 4. 4. Espectro de RMN de ^1H obtido para o complexo A3 , em acetona- d_6 .	43
FIGURA 4. 5. Mapa de contorno ^1H – ^1H COSY obtido para o complexo A2 em acetona- d_6 . Vê-se destacados os diferentes grupos de acoplamentos exibidos pelo complexo.	44
FIGURA 4. 6. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ obtido para o complexo A4 , em acetona- d_6 .	45
FIGURA 4. 7. Esquema representativo dos níveis de energia e transições, com destaque para transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$.	46
FIGURA 4. 8. Espectro eletrônico experimental (obtido em DMSO), deconvolução e atribuição tentativa das bandas do complexo A1 .	47
FIGURA 4. 9. Esquema representativo do teste de sequestro de radicais livres DPPH.	48
FIGURA 4. 10. Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ de A1 em DMSO, em diferentes tempos.	50
FIGURA 4. 11. Espectros UV-vis do complexo A1-A5 e curcumina, ambos a $20 \mu\text{M}$, em 0,5% DMSO e meio de cultura RPMI sem fenol (99,5 %) em diferentes tempos.	51
FIGURA 4. 12. Micrografias das células A2780cis após tratamento com o complexo A1 em diferentes concentrações ($1/4 \times \text{IC}_{50}$ ($0,3 \mu\text{M}$), IC_{50} ($1,4 \mu\text{M}$), $2 \times \text{IC}_{50}$ ($2,8 \mu\text{M}$) e $4 \times \text{IC}_{50}$ ($5,6 \mu\text{M}$)) e tempos de exposição.	56
FIGURA 4. 13. Micrografias das células MRC-5 após tratamento com o complexo A1 em diferentes concentrações e tempos de exposição.	57
FIGURA 4. 14. (A) Micrografias das células A2780cis obtidas no ensaio de <i>Wound Healing</i> no qual avaliou-se o efeito na migração celular do complexo A1 nas concentrações $1/8 \times \text{IC}_{50}$ ($0,2 \mu\text{M}$) e $1/2 \times \text{IC}_{50}$ ($0,7 \mu\text{M}$) (lente objetiva utilizada no experimento foi com aumento de $4\times$). (B) Representação gráfica da porcentagem de fechamento da risca após 24 e 48 h de incubação com o complexo. As imagens	

apresentadas são representativas de cada condição e os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Dunnet's.	58
FIGURA 4. 15. Sobrevivência clonogênica das células A2780cis tratadas com diferentes concentrações ($1/2 \times IC_{50}$ (0,7 μ M), IC_{50} (1,4 μ M), $2 \times IC_{50}$ (2,8 μ M) e $4 \times IC_{50}$ (5,6 μ M)) do complexo A1 por 48 horas. A representação dos poços e limiares para o experimento é mostrada junto com as quantificações gráficas da área e intensidade das colônias. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,005$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Dunnet's.	59
FIGURA 4. 16. Sobrevivência clonogênica das células MRC-5 tratadas com diferentes concentrações do complexo A1 por 48 h. A representação dos poços e limiares para o experimento é mostrada junto com as quantificações gráficas da área e intensidade das colônias. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,005$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Dunnet's.	60
FIGURA 4. 17. Representação esquemática da progressão das fases do ciclo celular.	61
FIGURA 4. 18. (A) Histogramas de DNA do ensaio do ciclo celular nas células A2780cis incubadas com iodeto de propídio (PI) (detectado no canal FL2-A), após tratamento com o complexo A1 em diferentes concentrações ($1/2 \times IC_{50}$ (0,7 μ M), IC_{50} (1,4 μ M) e $2 \times IC_{50}$ (2,8 μ M)), por 48 h. (B) Gráfico da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após tratamento com o complexo A1 , em diferentes concentrações, por 48 h. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,005$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Turkey's.	62
FIGURA 4. 19. Ilustração esquemática das alterações morfológicas da lesão celular que culmina em necrose ou em apoptose. Adaptada de: Referência ¹¹⁴	63
FIGURA 4. 20. Representação esquemática de um histograma de dois parâmetros para a distribuição das células em apoptose e necrose.	64
FIGURA 4. 21. (A) Histogramas de dois parâmetros que mostra a distribuição das células A2780cis após tratamento com diferentes concentrações dos complexos A1 ($1/2 \times IC_{50}$ (0,7 μ M), IC_{50} (1,4 μ M) e $2 \times IC_{50}$ (2,8 μ M)), incubadas por 24 h, em seguida, marcadas com Anexina V-PE (detectado no canal FL2-A) e 7-AAD (detectado no canal	

FL3-A) para medir o efeito dos complexos na indução de apoptose nas células tumorais. (B) Gráfico da porcentagem de células apoptóticas após tratamento com os complexos A1 em diferentes concentrações. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Tukey's.....	65
FIGURA 4. 22. Estruturas químicas do H ₂ DCFDA, H ₂ DCF e DCF.....	66
FIGURA 4. 23. Indução de ERO em células A2780cis. (A) Imagens representativas das células A2780cis tratadas com DMSO, H ₂ O ₂ e complexo A1 - [Pd(PPh ₃) ₂ (cur)]PF ₆ em diferentes concentrações ($\frac{1}{8} \times IC_{50}$ (0,2 μ M), $\frac{1}{4} \times IC_{50}$ (0,4 μ M) e $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ (0,7 μ M)) e (B) Gráfico de intensidade de fluorescência relativa após tratamento. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Tukey's.....	67
FIGURA 4. 24. Estrutura cristalográfica da albumina de soro humana (adaptada ⁸⁵);	68
FIGURA 4. 25. Espectros de supressão de fluorescência da HSA na ausência (a) e presença do composto A1 (b-h; b= 5 μ M; c= 10 μ M; d= 15 μ M; e= 20 μ M; f= 25 μ M; g= 30 μ M e h= 35 μ M), com concentração constante da HSA de 5 μ M. Razão [Complexo]/[HSA]= 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7.	69
FIGURA 4. 26. Gráfico da viabilidade celular do complexo A1 incubada com HSA em A2780cis. O complexo (2,5 μ M) foi incubado com concentrações crescentes de HSA, por 48 h. As células viáveis foram estimadas pelo ensaio MTT e os resultados foram comparados com células tratadas com os complexos, mas na ausência das proteínas. Os dados representam a média \pm DP de dois ensaios independentes em triplicado. Significância nos níveis * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Dunnet's.....	73
FIGURA 4. 27. Espectros de UV-vis dos complexos A1-A5 em trizma com 10% DMSO, em 0 e 24 horas, com incubação a 1000 RPM a 37°C.....	74
FIGURA 4. 28. Espectros de RMN ¹ H da guanosina (espectro vermelho) e do complexo A1 com a guanosina (1 mol: 2 mol) (espectro preto) em 48 horas, em DMSO deuterado.	75
FIGURA 4.29. Viscosidade relativa do CT-DNA na ausência e presença dos complexos A1-A5 (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 μ M) e do padrão tiazol laranja, em diferentes razões molares [composto]/[DNA]=0,00; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 e 0,30,	

com concentração constante de CT-DNA de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 10% de DMSO; *Estrutura cristalina de um fragmento de DNA contendo o tiazol intercalado (adaptada) ¹³³	76
FIGURA 4.30. Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pBR322 (40 μM) na ausência e presença dos complexos (10% DMSO) e cisplatina (CP), em diferentes razões molares [Complexo]/[plasmídeo] (0,25; 0,50 e 1,00); MPM - Marcador de peso molecular; DNA - Controle negativo (em tampão Trisma-HCl).....	77
FIGURA 4. 31. Espectros de supressão de fluorescência do DNA-Hoechst na ausência (a) e presença dos complexo A1 (b-h; b=2,5 μM ; c=5 μM ; d=7,5 μM ; e=10,0 μM ; f=12,5 μM ; g=15,0 μM e h=17,5 μM), concentração constante da DNA-Hoechst de 75 e 2,5 μM , respectivamente. **Estrutura cristalina de um fragmento de DNA inserido o Hoechst no sulco menor do DNA (adaptada) ¹³⁴	78
FIGURA 5. 1. Espectro de massas do complexo B1-B4	82
FIGURA 5. 2. Estrutura cristalográfica (A) do complexo B4 (PF_6^- foi ocultado para melhor visualização) e (B) de um subproduto do complexo B4 obtido a partir de em uma solução do complexo B4 em 90% DMSO e 10% de meio de cultura DMEM. Átomos representados no modo ORTEP (elipsoides em 30%).....	83
FIGURA 5. 3. Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (A) dos complexos B1-B4 em $\text{CH}_2\text{Cl}_2(\text{D}_2\text{O})$	85
FIGURA 5. 4. Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo B3 em diferentes temperaturas, em CD_2Cl_2	85
FIGURA 5. 5. Espectro de RMN de hidrogênio (^1H) obtido para o complexo B4 , em acetona deuterada.....	86
FIGURA 5. 6. Correlação ^1H - ^1H COSY obtido para o complexo B2 em acetona deuterada. São destacados os diferentes grupos de acoplamentos dos hidrogênios na região alifática do espectro.....	87
FIGURA 5. 7. Espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ obtidos para o complexo B2 e para o lapachol livre, em acetona deuterada.....	88
FIGURA 5. 8. Espectros de UV-vis dos complexos B1-B4 (20 $\mu\text{mol/L}$) obtidos em 0, 24 e 48 h, em meio de cultura RPMI sem fenol e 0,5% de DMSO, incubados a 37°C.	91
FIGURA 5. 9. Alterações morfológicas das células tumorais de ovário (A2780) após o tratamento com diferentes concentrações do complexo B2 ($1/4 \times \text{IC}_{50}$ (0,87 μM), $1/2 \times \text{IC}_{50}$ (1,75 μM), IC_{50} (3,50 μM), $2 \times \text{IC}_{50}$ (7,00 μM) e $4 \times \text{IC}_{50}$ (14,00 μM)). As células	

- foram tratadas com o **B2** e fotografadas por diferentes períodos. Imagens micrográficas correspondentes a uma das triplicatas representativas.94
- FIGURA 5. 10. Alterações morfológicas nas células não tumorais de pulmão (MRC-5) após o tratamento com diferentes concentrações do complexo **B2** (5 μM ; 10 μM ; 20 μM ; 40 μM). As células foram tratadas com o **B2** e fotografadas por diferentes períodos. Imagens micrográficas correspondentes a uma das triplicatas representativas. As setas apontam para as células em formato arredondado.95
- FIGURA 5. 11. Sobrevivência clonogênica das células A2780 tratadas com diferentes concentrações do complexo **B2** ($1/2 \times \text{IC}_{50}$ (1,75 μM), IC_{50} (3,5 μM), $2 \times \text{IC}_{50}$ (7,0 μM) e $4 \times \text{IC}_{50}$ (14,0 μM)) por 48 h. **(A)** Representação dos poços de uma das triplicatas e **(B)** quantificações gráficas da área e intensidade das colônias. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Dunnet's.....96
- FIGURA 5. 12. Sobrevivência clonogênica das células MRC-5 tratadas com diferentes concentrações do complexo **B2** (2,5 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 20 μM e 40 μM)) por 48 horas. **(A)** Representação dos poços de uma das triplicatas e **(B)** quantificações gráficas da área e intensidade das colônias. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Dunnet's.97
- FIGURA 5. 13. **(A)** Histogramas de DNA do ensaio do ciclo celular nas células A2780 incubadas com iodeto de propídio (PI) (detectado no canal FL2-A), após tratamento com o complexo **B2**, em diferentes concentrações ($1/2 \times \text{IC}_{50}$ (1,75 μM), IC_{50} (3,5 μM), $2 \times \text{IC}_{50}$ (7,0 μM)), por 48 h. **(B)** gráfico da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após tratamento com o complexo **B2**, em diferentes concentrações, por 48 h. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,005$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA.98
- FIGURA 5. 14. Gráficos dot plots de Anexina V-PE vs 7-ADD, para determinação de células A2780 em apoptose após o tratamento com diferentes concentrações do complexo **B2** (IC_{50} (3,5 μM), $2 \times \text{IC}_{50}$ (7,0 μM) e $4 \times \text{IC}_{50}$ (14,0 μM)) e cisplatina (CDDP, 50 μM) por 24 h. Gráfico da porcentagem total de células em apoptose (inicial e tardia) após o tratamento com o complexo **B2**. Diferenças significativas do controle são indicadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ usando ANOVA e teste Tukey's.....99
- FIGURA 5. 15. Espectros de UV-vis dos complexos **B1-B4** em trizma com 40% DMSO, em 0 e 24 horas, com incubação a 1000 RPM a 37°C.....100

FIGURA 5. 16. Espectros de supressão de fluorescência da HSA na ausência (a) e presença do composto B2 (b-h; b= 2,5 µM; c= 5 µM; d= 7,5 µM; e= 10 µM; f= 12,5 µM; g= 15,0 µM e h= 17,5 µM), com concentração constante da HSA de 2,5 µM. Razão [Complexo]/[HSA]= 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7. Gráficos de Stern-Volmer para supressão de fluorescência da HSA na presença dos compostos à 298, 303 e 310 K.	101
FIGURA 5. 17. Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pBR322 (40 µM) na ausência (DNA) e presença dos complexos B1-B4 (10% DMSO) e cisplatina (CP), em diferentes razões molares [Complexo]/[plasmídeo] (0,25; 0,50 e 1,00); MWM - Marcador de peso molecular; DNA - Controle negativo (em tampão Trisma-HCl). .	104
FIGURA 5. 18. (A) Viscosidade relativa do CT-DNA na ausência e presença dos complexos B1-B4 e do padrão tiazol laranja (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µM), em diferentes razões molares [composto]/[DNA]=0,00; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 e 0,30, com concentração constante de CT-DNA de 100 µmol L ⁻¹ e 40% de DMSO. (B) Espectros de supressão de fluorescência do DNA-Hoechst na ausência (a) e presença do complexo B1 (b-i; b=7,5 µM; c=15 µM; d=22,5 µM; e=30,0 µM; f= 37,5 µM; g=42,5 µM e i= 50,0 µM), concentração constante da DNA-Hoechst de 75 e 2,5 µM, respectivamente.	105
FIGURA 6. 1. Estruturas cristalográficas obtidas para os complexos (A) C2 - [Pd(dppb)(lap)]PF ₆ e (B) C3 - [Pd(dppf)(lap)]PF ₆ (o contraíon PF ₆ ⁻ foi omitido para melhor visualização). Átomos representados no modo ORTEP (elipsoides em 30%).	110
FIGURA 6. 2. Espectros de RMN de ³¹ P{ ¹ H} dos complexos C1 – [Pd(dppp)(lap)]PF ₆ , C2 – [Pd(dppb)(lap)]PF ₆ e C3 – [Pd(dppf)(lap)]PF ₆ em CH ₂ Cl ₂ (D ₂ O).	112
FIGURA 6. 3. Espectro de RMN de ¹ H do complexo C3 – [Pd(dppf)(lap)]PF ₆ em CO(CD ₃) ₂	113
FIGURA 6. 4. Região mais desblindada dos espectros de RMN ¹³ C{ ¹ H} do lapachol e complexos C1 – [Pd(dppp)(lap)]PF ₆ , C2 – [Pd(dppb)(lap)]PF ₆ e C3 – [Pd(dppf)(lap)]PF ₆ em CO(CD ₃) ₂	114
FIGURA 6. 5. Espectros de absorção na região do infravermelho, do lapachol e complexos C1-C3 , em pastilhas de KBr.	115
FIGURA 6. 6. Espectros de UV-vis dos complexos C1 , C2 e C3 (40 µmol/L) obtidos em 0, 24 e 48 h, em meio de cultura celular RPMI sem fenol e 0,5% de DMSO, a 37°C.	116

- FIGURA 6. 7. Micrografias das células A2780cis após tratamento com o complexo **C3** em diferentes concentrações ($1/2 \times IC_{50}$ (0,6 μ M), IC_{50} (1,1 μ M), $2 \times IC_{50}$ (2,2 μ M) e $4 \times IC_{50}$ (4,4 μ M) e tempos de exposição.120
- FIGURA 6. 8. Micrografias das células MRC-5 após tratamento com o complexo **C3** em diferentes concentrações e tempos de exposição.121
- FIGURA 6. 9. Micrografias das células A2780cis obtidas no ensaio de *Wound Healing* do complexo **C3** nas concentrações ($1/8 \times IC_{50}$ (0,1 μ M), $1/4 \times IC_{50}$ (0,3 μ M) e $1/2 \times IC_{50}$ (0,6 μ M)). Lente objetiva utilizada no experimento foi com aumento de 4 \times . Representação gráfica da porcentagem de fechamento da risca após 48 h de incubação com o complexo. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Dunnet's.122
- FIGURA 6. 10. Sobrevivência clonogênica das células A2780cis tratadas com diferentes concentrações do complexo **C3** ($1/4 \times IC_{50}$ (0,3 μ M), IC_{50} (1,2 μ M), $2 \times IC_{50}$ (2,4 μ M) e $4 \times IC_{50}$ (4,8 μ M)) por 48 horas. A representação dos poços e limiares para o experimento é mostrada junto com as quantificações gráficas da área e intensidade das colônias. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,005$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Dunnet's.123
- FIGURA 6. 11. Sobrevivência clonogênica das células MRC-5 tratadas com diferentes concentrações do complexo **C3** por 48 horas. A representação dos poços e limiares para o experimento é mostrada junto com as quantificações gráficas da área e intensidade das colônias. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,005$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Dunnet's.124
- FIGURA 6. 12. **(A)** Histogramas de DNA do ensaio do ciclo celular nas células A2780cis incubadas com iodeto de propídio (PI) (detectado no canal FL2-A), após tratamento com o complexo **C3**, em diferentes concentrações ($1/2 \times IC_{50}$ (0,6 μ M), IC_{50} (1,1 μ M) e $2 \times IC_{50}$ (2,2 μ M)), por 48 h. **(B)** Gráfico da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após tratamento com o complexo **C3**, em diferentes concentrações, por 48 h. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,005$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Turkey's.125

- FIGURA 6. 13. Gráficos dot plots de Anexina V-PE vs 7-ADD, para determinação de células A2780cis em apoptose após o tratamento com diferentes concentrações do complexo **C3** ($1/2 \times IC_{50}$ (0,6 μ M), IC_{50} (1,1 μ M), $2 \times IC_{50}$ (2,2 μ M) e $4 \times IC_{50}$ (4,4 μ M)) por 24 h. Gráfico da porcentagem total de células em apoptose (inicial e tardia) após o tratamento com o complexo **C3**. Diferenças significativas do controle são indicadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ usando ANOVA e teste Tukey's.126
- FIGURA 6. 14. Espectros de UV-vis dos complexos **C1-C3** em trizma com 40% DMSO, em 0 e 24 horas, com agitação a 1000 RPM a 37°C.127
- FIGURA 6. 15. Espectros de supressão de fluorescência da HSA na ausência (a) e presença do composto **C3** (b-h; b= 2,5 μ M; c= 5 μ M; d= 7,5 μ M; e= 10 μ M; f= 12,5 μ M; g= 15,0 μ M e h= 17,5 μ M), com concentração constante da HSA de 2,5 μ M. Razão [Complexo]/[HSA]= 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7. Gráficos de Stern-Volmer para supressão de fluorescência da HSA na presença dos compostos à 298, 303 e 310 K.128
- FIGURA 6. 16. Viscosidade relativa do CT-DNA na ausência e presença dos complexos **C1-C3** (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 μ M) e do padrão tiazol laranja, em diferentes razões molares [composto]/[DNA]=0,00; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 e 0,30, com concentração constante de CT-DNA de 100 μ mol L⁻¹ e 20% de DMSO.131
- FIGURA 6. 17. Espectros de supressão de fluorescência do DNA-Hoechst na ausência e presença dos complexos (A) **C1**, (B) **C2** e (C) **C3**, concentração constante da DNA-Hoechst de 75 e 2,5 μ M, respectivamente.132

Lista de esquemas

ESQUEMA 4. 1. Rota sintética dos complexos pertencentes à série A.	37
ESQUEMA 5. 1. Esquema de síntese representativo dos complexos B1-B4	80
ESQUEMA 6. 1. Esquema de síntese representativa dos complexos C1-C3	108

RESUMO

“COMPLEXOS FOSFÍNICOS DE Pd(II) COM PRODUTOS NATURAIS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS” Esta tese detalha a síntese, caracterização e avaliação de atividade antitumoral de doze complexos de Pd^{II}/fosfina, monocatiônicos, contendo ligantes derivados de produtos naturais. Os complexos foram divididos em três séries, sendo elas: Série A; complexos de fórmula geral [Pd(cur)(P-P)]PF₆, onde cur = curcumina, PF₆⁻ = íon hexafluorofosfato e P-P= PPh₃=trifenilfosfina (**A1**), dppe = 1,2-bis(difenilfosfina)etano (**A2**), dppp = 1,3-*bis*(difenilfosfina)propano (**A3**), dppb = 1,4'-*bis*(difenilfosfina)butano (**A4**) e dppf = 1,1'-*bis*(difenilfosfina)ferroceno (**A5**); Série B, complexos de fórmula geral [Pd(dppe)(O-O)]PF₆, onde O-O= lau = lausona (**B1**), lap = lapachol (**B2**), lpm = 3-estiril-lausona (**B3**) e ali = alizarina (**B4**); Série C, complexos do tipo [Pd(P-P)(lap)]PF₆, onde P-P = dppp (**C1**), dppb (**C2**) e dppf (**C3**). A caracterização dos complexos foi realizada por análise elementar, condutividade molar, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear 1D e 2D (³¹P{¹H}, ¹H e ¹³C{¹H}), espectrometria de massas e difração de raios X de monocristal, para alguns dos complexos obtidos. A avaliação da estabilidade em solventes biológicos relevantes, utilizando espectroscopia de absorção na região do UV-vis, revelou instabilidade na Série A, devido à auto-oxidação da curcumina, conforme relatado em literatura, enquanto os complexos da Série B e C foram estáveis. A viabilidade celular foi avaliada em diversas linhagens celulares, como células tumorais de mama (MDA-MB-237, MCF-7 e SKBR-3), pulmão (A549), próstata (DU-145), ovário (A2780 e A2780cis) e as não tumorais de mama (MCF-10A) e pulmão (MRC-5), variando o número de linhagens em cada série. Para a Série A os complexos apresentaram baixos valores de IC₅₀ em diversas das linhagens tumorais testadas, sendo maioria deles menores que o IC₅₀ da curcumina e da cisplatina. O [Pd(cur)(PPh₃)₂]PF₆ se destacou nas linhagens tumorais MDA-MB-231 (5,0 ± 0,2 μM), A2780 (0,5 ± 0,1 μM) e A2780cis (1,4 ± 0,4 μM) que os demais complexos da série, sendo o maior índice de seletividade exibido para a linhagem A2780 (≥40). A Série B demonstra sistematicamente os efeitos da coordenação de naftoquinonas e antraquinonas ao Pd nos valores de IC₅₀, destacando o complexo com o ligante lapachol (**B2**) como o mais ativo nas células tumorais testadas, especialmente para A2780 (IC₅₀ 3,5 ± 0,1 μM, SI ≥ 11,4). Na Série C,

[Pd(dppf)(lap)]PF₆ se destacou apresentando IC₅₀ de $1,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ e IS $\geq 36,4$ na A2780cis. De modo geral, os complexos **A1**, **B2** e **C3** foram capazes de inibir a formação de colônias, induzir alterações morfológicas nas linhagens tumorais, no entanto não inibiram a migração celular. Além disso, os complexos **A1**, **B2**, e **C3** promoveram acúmulo na fase Sub-G1, que representa a fração de células mortas e com DNA fragmentado. O ensaio por citometria de fluxo com Anexina-V e 7-AAD mostraram que os complexos induzem a morte das células por apoptose. Os complexos demonstraram interações fracas e reversíveis com o sulco menor do DNA, sem afetar as suas estruturas secundárias e terciárias. Ensaio de interação com a HSA foram realizados, revelando interações moderadas a fortes com os complexos. O possível mecanismo de morte celular causada pelos complexos é por indução à formação de ERO (Espécies Reativas de Oxigênio) nas células, como demonstrado para o complexo **A1** nas células A2780cis .

ABSTRACT

“PHOSPHINE COMPLEXES OF Pd(II) WITH NATURAL PRODUCTS: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION, EVALUATION OF CYTOTOXICITY AND INTERACTION WITH BIOMOLECULES” This thesis details the synthesis, characterization and evaluation of antitumor activity of twelve monocationic Pd^{II}/phosphine complexes featuring ligands derived from products natural. The complexes were categorized in three Series: Series A; complexes with the general formula [Pd(cur)(P-P)]PF₆, where cur=curcumin, PF₆=hexafluorophosphate and P-P= PPh₃=triphenylphosphine (**A1**), dppe=1,2-bis(diphenylphosphine)ethane (**A2**), dppp= 1,3-bis(diphenylphosphine)propane (**A3**), dppb=1,4'-bis(diphenylphosphine)butane (**A4**) and dppf=1,1'-bis(diphenylphosphine)ferrocene (**A5**); Series B, complexes with the general formula [Pd(dppe)(O-O)]PF₆, where O-O= lau=lausone (**B1**), lap=lapachol (**B2**), lpm=3-styryl-lausone (**B3**) and ali=alizarin (**B4**); Series C, complexes of the type [Pd(P-P)(lap)]PF₆, where P-P= dppp (**C1**), dppb (**C2**) and dppf (**C3**). Their characterization involves elemental analysis, molar conductivity, absorption spectroscopy in the infrared region, 1D and 2D nuclear magnetic resonance (³¹P{¹H}, ¹H and ¹³C{¹H}), mass spectrometry and single-crystal X-ray diffraction. Stability assessment in biological relevant solvents, using UV-vis absorption spectroscopy, revealed instability on Series A, due to the self-oxidation of curcumin, as previously reported, while the Series B and C complexes were stable. The antitumor activity was evaluated in variety of cell lines, such as breast (MDA-MB-237, MCF-7 and SKBR-3), lung (A549), prostate (DU-145), ovarian (A2780 and A2780cis) and non-tumor cells of the breast (MCF-10A) and lung (MRC-5), varying the number of lines in each Series. Series A complexes showed low IC₅₀ in several of the tumor lines tested, including some cell lines which the activity is superior to curcumin and cisplatin. The [Pd(cur)(PPh₃)₂]PF₆ stands out in tumor lines MDA-MB-231 (5,0 ± 0,2 μM), A2780 (0,5 ± 0,1 μM) and A2780cis (1,4 ± 0,4 μM) than the other complexes in the series, with the highest selectivity index displayed for the A2780 lineage (≥40). Series B systematically demonstrates the effects of naphthoquinones and anthraquinone coordination to Pd on IC₅₀ values, highlighting the lapachol complex (**B2**) as the most active in of tumor cells tested, especially for A2780 (IC₅₀ 3.5 ± 0,1 μM, SI ≥ 11.4). In series C, **C3** complex stands out presenting IC₅₀ 1.1 ± 0.2 μM and SI ≥ 36.4 in A2780cis. In general, complexes **A1**, **B2** and **C3** were able to inhibit colony formation and induce

morphological changes in tumor lines. Furthermore, the **A1**, **B2**, and **C3** complexes promoted a cycle cell arrest in the Sub-G1 phase, which represents the fraction of dead cells with fragmented DNA. The flow cytometry assay with Annexin-V and 7-AAD showed that the complexes induce cell death by apoptosis. The complexes demonstrated weak and reversible interactions with the minor groove of DNA, without affecting its secondary and tertiary structures. Interaction assays with HSA were performed, revealing moderate to strong interactions with the complexes. The possible mechanism of death for the complexes is by inducing the formation of ROS in cells, as demonstrated for the **A1** complex in A2780cis cells.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 Revisão da Literatura	2
1.1.1 Aspectos gerais sobre Câncer	2
1.1.2 Complexos de platina no tratamento do câncer	5
1.1.3 Produtos naturais: Moléculas bioativas provenientes de metabólitos secundários de plantas superiores	7
1.1.4 As contribuições do LERCI na química bioinorgânica	11
1.1.5 Complexos de Paládio	15
1.2 Planejamento dos novos complexos de Pd(II)/fosfina com ligantes de produtos naturais	18
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL	22
3.1 Materiais	22
3.1.1 Tratamento do argônio para síntese em atmosfera inerte	22
3.1.2 Solventes	22
3.1.3 Reagentes químicos	22
3.2 Sínteses dos complexos	23
3.2.1 Síntese dos precursores do tipo [PdCl ₂ (P-P)]	23
3.2.2 Síntese dos complexos [Pd(cur)(P-P)]PF ₆ – Série A	23
3.2.3 Síntese do complexos [Pd(dppe)(O-O)]PF ₆ – Série B	23
3.2.4 Síntese do complexos [Pd(P-P)(lap)]PF ₆ – Série C	24
3.3 Instrumentação	24
3.3.1 Condutividade Molar	24
3.3.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	24

3.3.3	Espectroscopia de absorção na região do UV-visível.....	24
3.3.4	Análise elementar (C, H, N e S).....	24
3.3.6	Espectrometria de massas	25
3.3.7	Difração de Raios X.....	25
3.4	Obtenção dos experimentos biológicos	26
3.4.1	Teste de estabilidade dos complexos em solução.....	26
3.4.2	Linhagens e Cultura das Células	27
3.4.3	Ensaio de viabilidade celular por MTT	27
3.4.4	Ensaio de viabilidade celular por MTT, com irradiação.....	28
3.4.5	Morfologia celular.....	28
3.4.6	Ensaio de sobrevivência clonogênica	28
3.4.7	Ensaio de Ciclo Celular.....	28
3.4.8	Ensaio de apoptose com Anexina V	29
3.4.9	Análise de formação de espécies reativas de oxigênio	29
3.4.10	Ensaio de antioxidante DPPH.....	30
3.4.11	Transporte pela albumina	31
3.5	Estudos de interação dos complexos com biomoléculas	31
3.5.1	Determinação da concentração do DNA.....	31
3.5.2	Medidas de viscosidade	31
3.5.3	Ensaio e deslocamento do Hoechst.....	32
3.5.4	Eletroforese em gel de agarose.....	33
3.5.5	Reação com o nucleosídeo guanosina.....	33
3.5.6	Estudo de interação com HSA.....	34
CAPÍTULO 4	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO: SÉRIE A	36
4.1	Síntese e caracterização dos complexos da série A.....	36
4.2	Estudos biológicos dos complexos da série A.....	51

4.3 Estudos de interação com biomoléculas da série A	67
4.4 Conclusões parciais da série A	78
CAPÍTULO 5	80
RESULTADOS E DISCUSSÃO: SÉRIE B.....	80
5.1 Síntese e caracterização dos complexos da série B	80
5.2 Estudos biológicos dos complexos da série B.....	91
5.3 Estudos de interação com biomoléculas da Série B.....	100
5.4 Conclusões parciais da série B	106
CAPÍTULO 6	108
RESULTADOS E DISCUSSÃO: SÉRIE C.....	108
6.1 Síntese e caracterização dos complexos da série C	108
6.2 Estudos biológicos dos complexos da série C	117
6.3 Estudos de interação com biomoléculas da série C	127
6.4 Conclusões parciais da série C	132
CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES FINAIS	134
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
APÊNDICE	150

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

O câncer representa um significativo desafio global para a saúde, sendo recentemente destacado em uma comunicação na revista *Cancer* por pesquisadores da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer. Os dados revelaram que o câncer está entre as duas principais causas de morte prematura em 127 países. De acordo com esses especialistas, a tendência é que o câncer ultrapasse as doenças cardiovasculares, tornando-se a principal causa de morte prematura na maioria dos países ao longo deste século.¹ Diante desse cenário, enfrentar essa doença, incluindo o desenvolvimento de novos fármacos, continua sendo um desafio considerável.

O desenvolvimento de um medicamento é um processo prolongado e dispendioso que envolve a descoberta de uma nova molécula, testes *in vitro* e em modelos animais (*in vivo*), abrangendo estudos iniciais de segurança, farmacologia e toxicologia. Esse processo culmina nos ensaios clínicos de fases I, II e III, aprovação pelas agências reguladoras e, posteriormente, na fase IV. É importante destacar que muitos candidatos que chegam aos ensaios clínicos falham devido a desafios como baixa biodisponibilidade, eficácia limitada e efeitos colaterais graves.²⁻⁴ Este trabalho, portanto, contribui para o setor ao identificar novos compostos como potenciais candidatos a medicamentos por meio de síntese e caracterização, além de realizar estudos iniciais *in vitro* para avaliar os efeitos desses compostos em células tumorais.

A concepção dos novos compostos é orientada pelas limitações relacionadas aos efeitos colaterais e à resistência adquirida identificados nos medicamentos convencionais. O sucesso do metalofármaco cisplatina na terapia do câncer tem impulsionado investigações direcionadas aos compostos de coordenação. Como resultado, uma variedade de metais e ligantes tem sido investigada no desenvolvimento de novas substâncias com potencial aplicação no tratamento dessa doença. O paládio é um metal do mesmo grupo da platina e com química de coordenação muito similar.⁵ No entanto, apesar da semelhança química entre Pd(II) e Pt(II), a cinética de suas reações é notavelmente diferente, sendo que complexos de Pd(II) são geralmente mais lábeis, o que significa que eles têm uma maior tendência a liberar e substituir seus ligantes, em comparação com os complexos de Pt(II). Compostos derivados desse metal têm sido amplamente explorados em vários estudos como promissores agentes metalofármacos, sendo destacados por sua

notável atividade antitumoral, revelando que o estresse oxidativo pode ser um mecanismo de ação.^{6,7} Além disso, recentemente um complexo de paládio, o padeliporfina, foi aprovado na união europeia para utilização em câncer de próstata de baixo risco, utilizado em terapia fotodinâmica direcionada vascular (VTP).⁸⁻¹⁰

Na síntese dos novos complexos à base de paládio, foram escolhidos ligantes provenientes de produtos naturais, como a curcumina, naftoquinonas e alizarina. Alguns desses ligantes já exibem propriedades biológicas, incluindo atividade antitumoral, e desempenham um papel crucial na modulação de características dos complexos, tais como lipofilicidade, solubilidade e estabilidade. Adicionalmente, o nosso grupo de pesquisa, o Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos (LERCI), possui ampla expertise na utilização desses ligantes na síntese de compostos de coordenação, alcançando resultados altamente promissores na área.¹¹⁻¹⁶ Com isso, o objetivo deste estudo é contribuir para a descoberta de novos compostos com atividade citotóxica contra células tumorais, destacando, ao mesmo tempo, aspectos estruturais relevantes dos complexos de paládio por meio de técnicas de caracterização.

1.1 Revisão da Literatura

1.1.1 Aspectos gerais sobre Câncer

O câncer é uma das doenças mais desafiadoras e devastadoras que a humanidade enfrenta, com impactos profundos em níveis individuais, familiares, sociais e econômicos. É uma condição complexa e multifacetada, que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, independente de idade, gênero ou origem étnica. A história do câncer é longa e repleta de avanços notáveis na compreensão, prevenção, diagnóstico e tratamento da doença. No entanto, o câncer continua a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que em 2020 ocorreram mais de 19 milhões de novos casos de câncer globalmente, com cerca de 10 milhões de mortes relacionadas à doença.¹⁷ A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) prevê que até o ano de 2040, cerca de 29,5 milhões de novos casos de câncer serão diagnosticados, globalmente, resultando em aproximadamente 16,4 milhões de óbitos.¹⁸ No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer, as estatísticas para o triênio 2023-2025 sugerem a ocorrência de cerca de

704 mil novos casos de câncer para cada ano. O tumor maligno mais incidente no Brasil é o de pele não melanoma. Os valores estimados para 2023 mostram que, excetuando-se o tumor de pele, não melanoma, os tumores mais incidentes nas mulheres são de mama, colón e reto, seguido por colo de útero. Nos homens, é estimado maior incidência de câncer de próstata, colón e reto, seguido por traqueia, brônquio e pulmão. A FIGURA 1. 1 mostra a distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, exceto pele não melanoma, estimados para 2023, por sexo.¹⁹


Localização Primária	Casos	%		%	Casos	Localização Primária
Próstata	71.730	30,0%		30,1%	73.610	Mama feminina
Cólon e reto	21.970	9,2%		9,7%	23.660	Cólon e reto
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%		7,0%	17.010	Colo do útero
Estômago	13.340	5,6%		6,0%	14.510	Traqueia, brônquio e pulmão
Cavidade oral	10.900	4,6%		5,8%	14.160	Glândula tireoide
Esôfago	8.200	3,4%		3,3%	8.140	Estômago
Bexiga	7.870	3,3%		3,2%	7.840	Corpo do útero
Laringe	6.570	2,7%		3,0%	7.310	Ovário
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%		2,3%	5.690	Pâncreas
Fígado	6.390	2,7%		2,3%	5.620	Linfoma não Hodgkin

FIGURA 1. 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, exceto pele não melanoma, estimados para 2023 por sexo. *Números arredondados para múltiplo de 10. Figura adaptada.¹⁹

A elevada incidência e mortalidade relacionada ao câncer deve-se à sua complexidade, abrangendo mais de uma centena de tipos de doenças. Todas essas condições são caracterizadas pela proliferação descontrolada de células originárias de diferentes órgãos e tecidos do corpo. Essas células perdem a sua especialização funcional em comparação com as células normais correspondentes, iniciando um crescimento desordenado, que ultrapassa os limites saudáveis. Esse crescimento pode resultar na invasão de áreas circundantes ao local de origem, ou até mesmo na disseminação para outros órgãos, o que é conhecido como metástase (FIGURA 1.2).²⁰ Esses processos têm origem em mutações genéticas, que podem ser associadas a fatores internos e externos ao paciente. Os fatores internos incluem predisposições genéticas, que podem até mesmo ser de origem hereditária. Por outro lado, os fatores

externos estão relacionados ao estilo de vida e ao ambiente, e podem estar vinculados a diversos hábitos pessoais e práticas culturais.^{19,21}

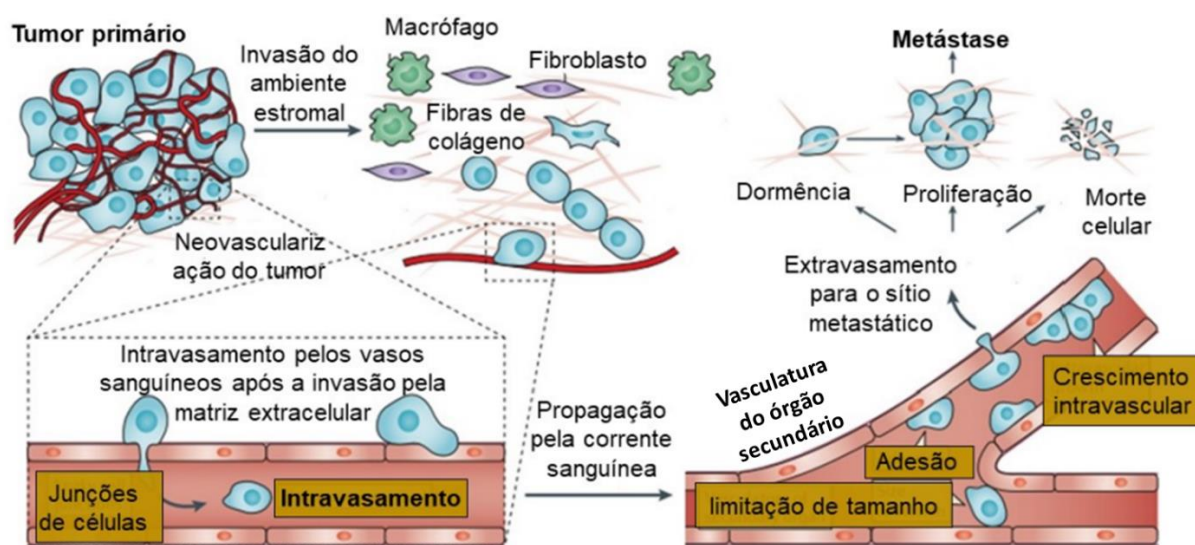


FIGURA 1. 2. Representação do processo de metástase. Figura adaptada.^{22,23}

A quimioterapia, dentre as opções terapêuticas disponíveis, é uma das mais amplamente utilizadas no tratamento do câncer. Ela faz uso de agentes farmacológicos, com propriedades antitumorais, para abordar diversas manifestações da doença, podendo ser administrados por via oral ou intravenosa. Essas drogas quimioterápicas são aplicadas em diferentes cenários clínicos, com o objetivo de buscar a cura da doença, ou proporcionar alívio sintomático ao paciente. No entanto, assim como em todos os tratamentos que envolvem medicamentos, a quimioterapia está associada a efeitos colaterais, que, em alguns casos, podem ser graves. Além disso, existe a possibilidade de desenvolvimento de resistência ao tratamento, o que pode limitar significativamente a eficácia dessa abordagem terapêutica.^{24,25}

Mais recentemente têm surgido outras modalidades terapêuticas, como a imunoterapia e a hormonioterapia sendo as mais comuns. Na imunoterapia, os medicamentos conhecidos como inibidores de *checkpoint* imunológico desempenham um papel importante, agindo ao bloquear as proteínas envolvidas no processo de verificação do crescimento desordenado de células. Essa ação estimula uma resposta do sistema imunológico, permitindo que os linfócitos identifiquem novamente as células tumorais. Por sua vez, a hormonioterapia emprega uma abordagem distinta para tratar o câncer, focando-se em células que possuem receptores hormonais, como ocorre em casos de câncer de mama e próstata. Os medicamentos utilizados na

hormonioterapia funcionam como bloqueadores dos hormônios sexuais, como testosterona ou estrógeno, desestimulando o crescimento das células tumorais.²⁶

1.1.2 Complexos de platina no tratamento do câncer

Pesquisadores em todo o mundo têm dedicado suas carreiras ao desenvolvimento de complexos metálicos e à compreensão dos mecanismos envolvidos em sua ação em organismos vivos. O marco inicial para essa pesquisa foi a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina em 1965 pelo Dr. Barnett Rosenberg. A aprovação da cis-diaminodicloroplatina(II), comumente denominado como cisplatina, como agente quimioterápico em 1978 (FIGURA 1. 3) possibilitou tratamentos eficazes para uma variedade de cânceres que, naquela época, apresentavam altas taxas de mortalidade, como câncer testicular, ovariano, de cabeça e pescoço, e pulmonar.^{27,28}

Subsequentemente, foram desenvolvidos outros complexos inorgânicos, dando origem à segunda e terceira gerações de fármacos à base de platina, o que resultou na aprovação pela U.S. FDA de compostos como a carboplatina e a oxaliplatina como agentes quimioterápicos. Em países específicos, também foram aprovados para uso clínico três outros compostos: nedaplatina, lobaplatina e heptaplatina (FIGURA 1. 3). Devido às suas notáveis eficácias antitumorais, os medicamentos à base de platina se consolidaram como tratamentos de primeira linha no combate ao câncer.²⁹⁻³³

Há um consenso geral de que o mecanismo de ação provável da cisplatina é a interação com o DNA. Isso ocorre quando o fármaco está na corrente sanguínea, no meio extracelular, onde a concentração de cloreto é cerca de 100 mM, tornando inviável a hidrólise do composto e mantendo o complexo com sua estrutura original. No entanto, a cisplatina é caracterizada por sua alta lipofilicidade, o que facilita sua permeação pela membrana celular. Ao adentrar a célula, a concentração de cloreto diminui para 3 a 4 mM, possibilitando a labilização do cloreto e, conseqüentemente, a hidrólise do complexo, com a substituição dos átomos de cloro por moléculas de água.^{34,35}

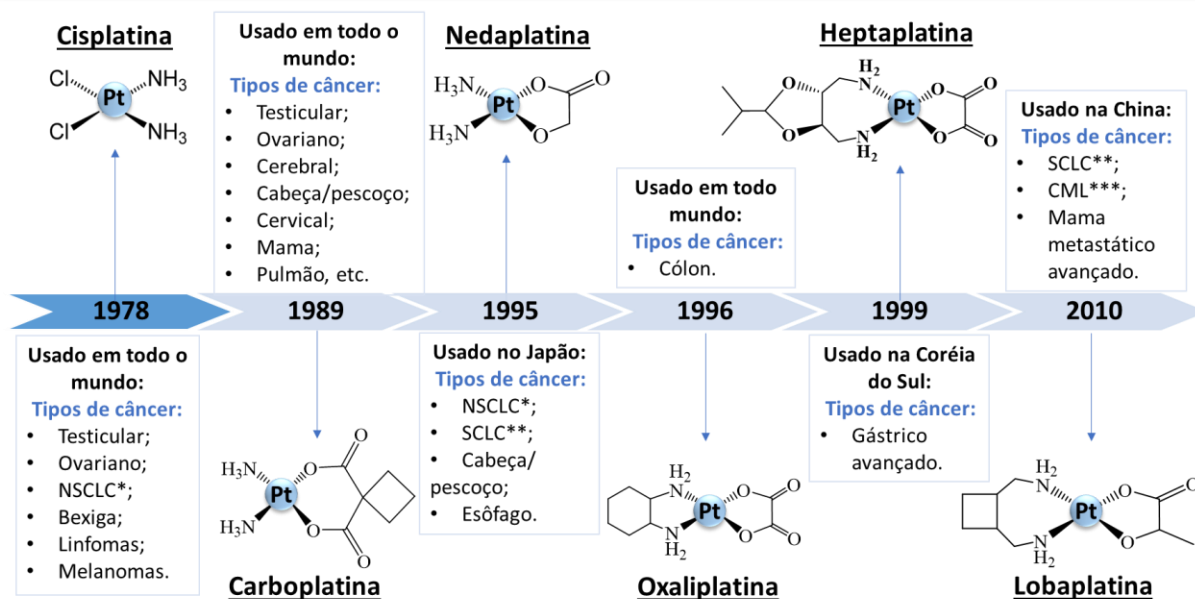


FIGURA 1. 3. Linha do tempo para o desenvolvimento dos medicamentos à base de platina empregados no tratamento do câncer. *NSCLC = Non-Small-Cell Lung Carcinoma, **SCLC= Small-Cell Lung Carcinoma e ***CML = Chronic Myeloid Leukemia). Figura adaptada¹¹.

O complexo resultante da labilização dos cloretos e da coordenação das moléculas de água pode interagir com diversos alvos moleculares no interior da célula. No entanto, a máxima atividade está associada à coordenação do aquo-complexo com as bases nitrogenadas, especialmente com o nitrogênio na posição 7 da guanina.³⁶ Ao danificar o DNA, esses complexos impedem a transcrição e replicação do material genético, desencadeando uma cascata metabólica que leva à ativação da morte programada da célula, um fenômeno conhecido como apoptose.³⁷

A ligação covalente do aquo-complexo formado a partir da cisplatina com o DNA pode ocorrer de várias maneiras, como monofuncional, o que significa que cada átomo de metal faz uma ligação com uma base nitrogenada (FIGURA 1. 4(C)). Também pode ser bifuncional, onde cada metal forma duas ligações com o DNA. Essas ligações bifuncionais podem ocorrer na mesma fita do DNA (intrafita, FIGURA 1. 4(A)) ou em fitas diferentes (interfitas, FIGURA 1. 4(B)). Uma forma diferente de ligação bifuncional é a intermolecular, na qual o metal se liga ao DNA em uma posição, e a segunda ligação é feita com outras biomoléculas, como proteínas e aminoácidos (FIGURA 1. 4(D)).^{37,38}

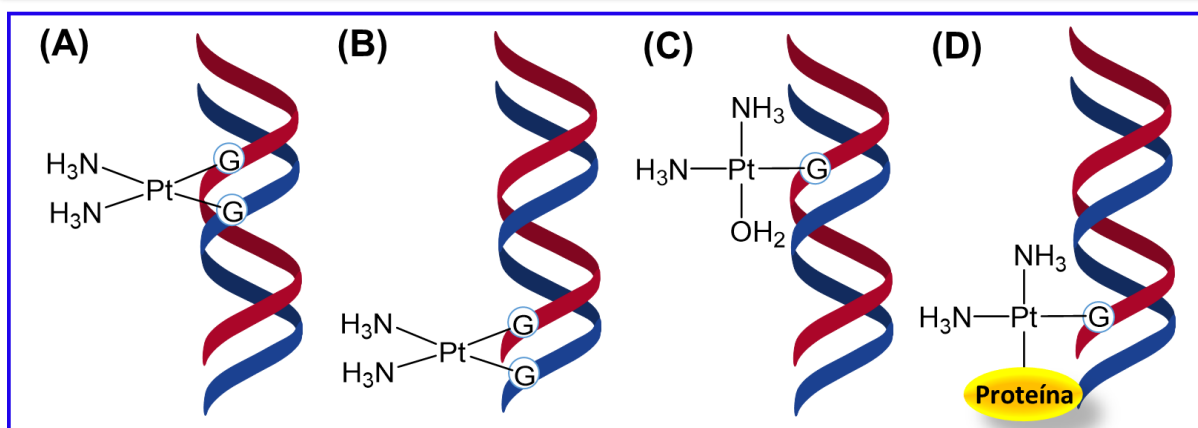


FIGURA 1. 4. Modos de interação covalente entre a cisplatina e o DNA. (A) ligação intrafitas, (B) ligação interfitas, (C) ligação monofuncional com uma base nitrogenada e (D) ligação bifuncional intermolecular (o metal se liga ao DNA em uma posição, e a segunda ligação é feita com outra biomolécula). Adaptado de referencia.³⁹

Apesar do desenvolvimento de outros fármacos análogos à cisplatina, na quimioterapia do câncer, alguns dos efeitos indesejados persistem nos medicamentos mais utilizados dessa classe. No total, mais de 40 efeitos colaterais específicos podem surgir durante o tratamento, com maior incidência associada a processos que resultam em nefrotoxicidade, ototoxicidade, cardiotoxicidade, neurotoxicidade, hematotoxicidade, hepatotoxicidade e gastrotoxicidade.⁴⁰

1.1.3 Produtos naturais: Moléculas bioativas provenientes de metabólitos secundários de plantas superiores

A natureza tem sido uma fonte primordial de inspiração para o avanço da ciência, pois a observação das inúmeras transformações nela presentes tem conduzido os seres humanos à compreensão de fenômenos naturais e à aplicação do conhecimento adquirido no desenvolvimento de tecnologias, resultando em progressos em diversas áreas científicas. Os primeiros registros sobre a utilização de plantas medicinais datam de cerca de 5000 anos atrás, quando os sumérios descreveram o uso de aproximadamente 250 espécies distintas de plantas, como a papoula, a mandrágora e o meimendo, todas ricas em alcaloides, na preparação de medicamentos para diversas finalidades.^{41,42}

O interesse pelas propriedades medicinais das plantas tem conduzido os cientistas ao desenvolvimento de uma química moderna e avançada, relacionada a produtos naturais. Esse interesse não apenas se concentra na extração e

identificação desses compostos, mas também na síntese e biossíntese dessas substâncias originárias de organismos vivos.

A cúrcuma tem uma longa história de aplicação terapêutica na medicina tradicional asiática. A curcumina, 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, conhecida popularmente como açafrão da terra (FIGURA 1. 5), é uma das principais substâncias presentes no rizoma de *Curcuma longa* L. e outras espécies da *Curcuma*. A curcumina, juntamente com outros dois compostos, chamados desmetoxicurcumina e bis-desmetoxicurcumina, são chamados de curcuminoides.^{43,44} A curcumina é amplamente utilizada como corante e também como aditivo alimentar. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu uma ingestão diária aceitável de curcumina, na faixa de 0 a 3 mg por quilo de peso corporal, como aditivo alimentar. Além disso, seu uso terapêutico tem sido objeto de pesquisa, e foi identificado como um potencial agente anticancerígeno.^{45,46}

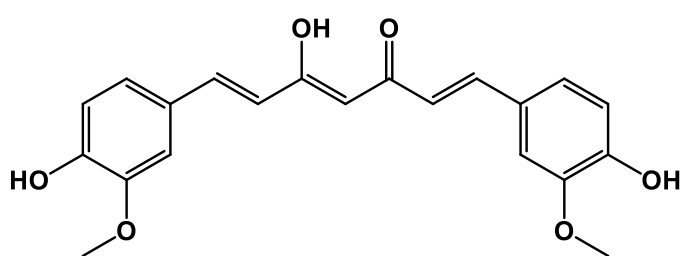


FIGURA 1. 5. Estrutura química da curcumina (IUPAC: 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) e rizoma de *Curcuma longa* L..

A aplicação clínica da curcumina é, no entanto, limitada por sua fraca biodisponibilidade e perfis farmacocinéticos, devido à sua instabilidade estrutural em condições fisiológicas. Em pH fisiológico, a curcumina se degrada rapidamente por auto-oxidação, formando produtos de clivagem, como biclopentadiona, vanilina e ácido ferúlico.^{47,48}

Uma das naftoquinonas encontrada em plantas é a lausona (Figura 1. 6), além da estrutura básica das naftoquinonas, apresenta um grupo funcional de álcool adicional (2-hidroxi-1,4-naftoquinona). A lausona é um componente proeminente presente nas folhas das árvores de Henna (*Lawsonia inermis*), as quais são achadas em diversas regiões, como África, Índia, Sri Lanka e Oriente Médio. As folhas de Henna são amplamente utilizadas na composição de tintas avermelhadas para tatuagens e pinturas na pele, uma prática que remonta ao Egito antigo. A lausona

é o principal composto responsável por conferir a cor vermelha ao extrato das folhas de Henna. Além de seu uso como corante, a lausona também foi tradicionalmente empregada na medicina popular e tem sido objeto de estudos realizados por diferentes grupos de pesquisa, devido à sua capacidade antibacteriana e propriedades anti-inflamatórias.⁴⁹⁻⁵¹

Outra planta que se destaca, não apenas por sua utilização na medicina popular, mas também por sua beleza, é o ipê, uma árvore comum na América Central e do Sul. Essa árvore é notável pela alta durabilidade de sua madeira e pelas flores que variam de cor de acordo com a espécie, podendo ser branca, roxa, amarela, rosa e lilás. O Brasil é privilegiado por possuir 40 das quase 45 espécies de ipê, todas pertencentes aos gêneros *Tabebuia* e *Handroanthus*. As principais distinções entre essas espécies se referem às cores das flores, ao tipo de madeira e ao arranjo floral nos galhos.⁵²

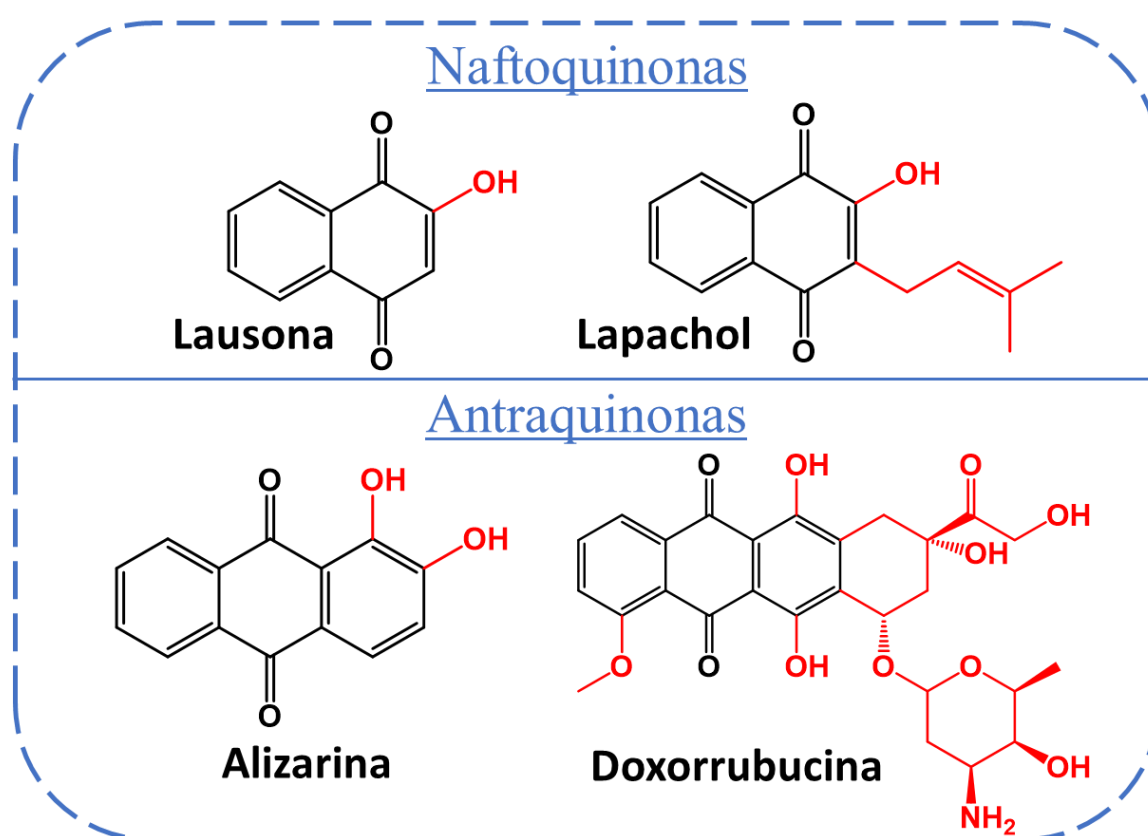


FIGURA 1. 6. Estrutura de algumas moléculas pertencentes as classes das antraquinonas e naftoquinonas. Em preto estão representadas as subestruturas básicas de cada classe e em vermelho os substituintes que caracterizam os derivados. Adaptado de referência⁵².

Dentre as substâncias isoladas do ipê, a mais conhecida é o lapachol, uma naftoquinona (FIGURA 1. 6), que é abundante na casca e no caule, principalmente das espécies de ipê roxo (*Handroanthus heptaphyllus* e *Tabebuia avellanedae*). O lapachol é renomado por suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, antibióticas e antineoplásicas. Um estudo demonstrou que o lapachol foi capaz de inibir o crescimento de tumores primários em ensaios pré-clínicos conduzidos em camundongos, o que levou ao avanço para ensaios clínicos em pacientes com câncer, em 1974. Nesses estudos clínicos, o lapachol também mostrou a capacidade de inibir o crescimento de tumores, no entanto foram observados diversos efeitos colaterais, resultando na interrupção dessas investigações.⁵³⁻⁵⁵

O lapachol possui várias propriedades que contribuem para suas habilidades no combate às células tumorais. Uma característica notável é a capacidade de induzir estresse oxidativo por meio da formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). Essas espécies são capazes de causar danos aos componentes celulares essenciais, resultando no desequilíbrio do ciclo celular e no desencadeamento de mecanismos que levam à morte celular por apoptose. Além disso, o lapachol também exibe a capacidade de interagir e inativar enzimas do tipo topoisomerases I e II, que desempenham papéis cruciais no processo de replicação e empacotamento do DNA durante a divisão celular. A inativação dessas enzimas também conduz à morte celular por apoptose.⁵⁴

Outra classe de quinonas de ocorrência natural, amplamente explorada devido à presença de dois anéis aromáticos em sua estrutura básica, são as antraquinonas. A versatilidade dessas substâncias decorre da capacidade de sintetizar diversos derivados ao introduzir substituintes nesses anéis. Uma das antraquinonas mais renomadas é a doxorrubicina (FIGURA 1. 6), uma antraquinona mais complexa que inclui em sua estrutura uma unidade de açúcar e outras funções álcool substituídas. Sua principal aplicação deriva de sua notável atividade antineoplásica, pois demonstrou ser eficaz no tratamento de diversos tipos de câncer, como câncer de bexiga, mama, estômago, pulmão, ovário, tireoide, mieloma múltiplo e algumas formas de leucemia. A ação antineoplásica da doxorrubicina é, em parte, atribuída à sua capacidade de interagir com o DNA, intercalando-se entre os pares de bases e, assim, levando à inativação e subsequente inibição da replicação do DNA. A Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso da doxorrubicina, na quimioterapia, em 1974, e ela continua a ser amplamente empregada no tratamento

do câncer até os dias de hoje. Um dos limitantes do seu uso são os efeitos colaterais comuns aos quimioterápicos, como a perda de cabelo, supressão da medula óssea, vômitos e outros.⁵⁶⁻⁵⁹

Um exemplo de antraquinona amplamente utilizada na indústria de pigmentos é a alizarina (FIGURA 1. 6). Essa substância é encontrada em grande quantidade nas raízes da planta *Rubia tinctorum*, e tem sido usada para tingir tecidos e como componente de tintas para pinturas em geral desde 2000 A.C. Alterações no pH das soluções em que a alizarina está presente, permitem obter uma ampla gama de tons, que variam do alaranjado ao vermelho escuro. Além de seu uso em aplicações artísticas, a alizarina também é empregada em estudos biológicos, principalmente devido à intensa fluorescência que ela exibe. Além disso, a alizarina possui a capacidade de se acumular nos tecidos ósseos, tornando-a útil não apenas como agente fluorescente nesses tecidos, mas também em ensaios relacionados ao tratamento de tumores ósseos.⁶⁰⁻⁶²

1.1.4 As contribuições do LERCI na química bioinorgânica

O Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos (LERCI) do Departamento de Química (DQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) tem se dedicado, por mais de 15 anos, à pesquisa da compreensão das propriedades químicas e biológicas de compostos de coordenação que envolvem diversos tipos de centros metálicos. O trabalho do Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista e seus alunos resultou na síntese de centenas de compostos inéditos, especialmente durante a última década, quando um dos principais objetivos tem sido a investigação do modo de ação desses complexos em sistemas biológicos.

Entre os numerosos compostos de diversas classes estruturais, o LERCI tem procurado explorar a versatilidade de vários metais, buscando estabelecer conexões com as propriedades exibidas por moléculas derivadas de produtos naturais. Várias pesquisas realizadas pelo grupo se concentram na síntese e caracterização de complexos de rutênio que incorporam ligantes fosfínicos, bipyridínicos, além das naftoquinonas lapachol e lausona em suas estruturas.^{12-14,63} Na FIGURA 1. 7 apresenta-se as estruturas e fórmulas gerais exibidas pelos complexos contendo naftoquinonas já estudados pelo grupo.

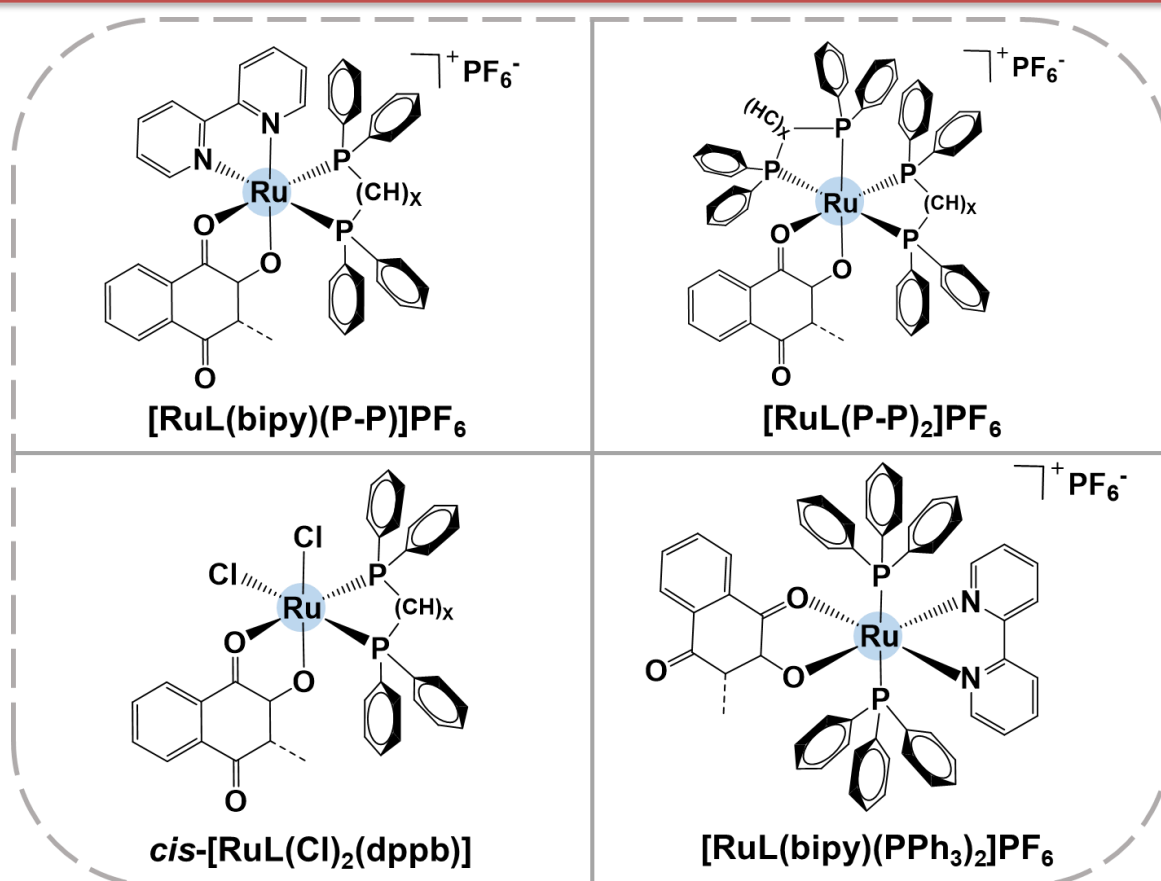


FIGURA 1. 7. Estrutura dos complexos contendo os ligantes lapachol e lausona sintetizados pelo LERCI, onde L = lapachol ou lausona. Figura fonte.⁵²

Os complexos de fórmula geral $[\text{RuL}(\text{bipy})(\text{PPh}_3)_2]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{Cl})_2\text{L}(\text{dppb})]$ foram submetidos a avaliações de atividade antiparasitária contra *Leishmania amazonensis* e *Plasmodium falciparum*, revelando que os complexos demonstraram atividade consideravelmente superior, em comparação aos ligantes livres correspondentes. Notavelmente, o complexo $[\text{Ru}(\text{Cl})_2(\text{Lap})(\text{dppb})]$ (onde Lap = lapachol) destacou-se como o composto antiparasitário mais potente e seletivo, exibindo níveis de atividade comparáveis aos medicamentos de referência usados no tratamento dessas doenças.¹³

Complexos do tipo $[\text{RuL}(\text{bipy})(\text{P-P})]\text{PF}_6$ e $[\text{RuL}(\text{P-P})_2]\text{PF}_6$ (FIGURA 1. 7) também foram submetidos a avaliação quanto à atividade antitumoral em várias linhagens celulares. Os valores de citotoxicidade obtidos para a linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 e sua correspondente não tumoral MCF-10A estão destacados na Tabela 1.1. Nota-se que os complexos, que incluem o lapachol como ligante, se destacam, mostrando-se mais seletivos em comparação com os complexos que contêm lausona. Todos os complexos exibiram maior atividade nas linhagens tumorais em comparação com a cisplatina. Além disso, a maioria dos complexos demonstrou

uma seletividade superior à cisplatina. Um aspecto notável foi a capacidade do complexo $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ de modificar o potencial de membrana mitocondrial e gerar ERO nas células MDA-MB-231, levando à morte celular por apoptose.^{12,14}

TABELA 1. 1. Valores de IC_{50} (μM) e índice de seletividade (IS) encontrados para os complexos do tipo Ru/bifosfina/naftoquinona frente à linhagem tumoral (MDA-MB-231) e não tumoral (MCF-10A) de mama humana.

Compostos	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)		IS
	MDA-MB-231	MCF-10 ^a	
$[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$	(0,09 ± 0,02)	(0,55 ± 0,07)	6,1
$[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$	(0,13 ± 0,01)	(2,70 ± 0,50)	20,8
$[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	(0,11 ± 0,04)	(0,72 ± 0,01)	6,5
$[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	(0,15 ± 0,03)	(2,76 ± 0,30)	18,4
$[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	(0,06 ± 0,01)	(0,58 ± 0,02)	9,7
$[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppe})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	(0,07 ± 0,03)	(0,77 ± 0,03)	11,0
Lausona	> 100	> 100	-
Lapachol	> 100	> 100	-
Cisplatina	(10,23 ± 0,20)*	(29,45 ± 0,85)	2,9

*Referência.⁶⁴

Estudos ainda não divulgados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram a eficácia desses complexos na inibição do crescimento de tumores primários em camundongos, com níveis de atividade comparáveis aos do cisplatina, e sem os efeitos colaterais normalmente associados ao fármaco de platina, como a nefrotoxicidade, além de manter a massa corporal dos animais inalterada. É importante mencionar que esses compostos foram patenteados no Brasil sob o título "Processo de Obtenção de Compostos de Rutênio, Compostos de Rutênio Obtidos e seu uso" (BR 10 2016 016535 0 A2).⁵²

Além de complexos de rutênio, também complexos de cobre com produtos naturais foram explorados pelo nosso grupo. Na FIGURA 1.8 são apresentadas as estruturas dos complexos de Cu(I) com ligantes trifenilfosfina e naftoquinonas. Além das naftoquinonas, lausona e lapachol, já apresentadas anteriormente, também ligantes derivados de produtos naturais, 3-estiril-lausona (3b) e 4-cloroestiril-3-lausona (4b), foram utilizados. Estes complexos apresentaram citotoxicidade contra células tumorais humanas de mama (MDA-MB231 e MCF-7) e

pulmão (A549). Este trabalho foi um importante marco, que contribui para o desenvolvimento de trabalhos que visam compreender a potencialidade dos complexos de cobre para uso medicinal.¹¹

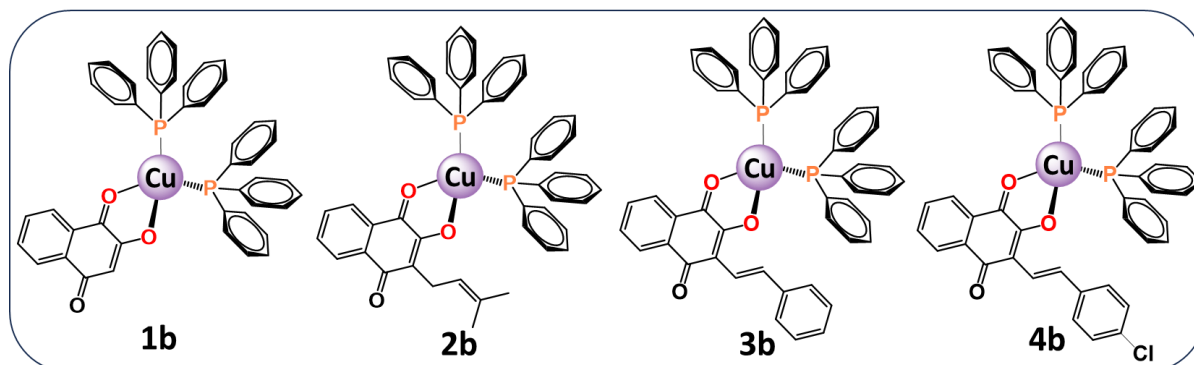


FIGURA 1. 8. Estrutura dos complexos de cobre(I) contendo os ligantes trifenilfosfina, lausona, lapachol, 3-estiril-lausona e 4-cloroestiril-3-lausona.¹¹

Também, nosso grupo explorou a química da combinação de rutênio/areno com a antraquinona alizarina (L), e três novos complexos com as fórmulas gerais $[\text{Ru}(\text{L})\text{Cl}(\eta^6\text{-p-cimeno})]$ (C1), $[\text{Ru}(\text{L})(\eta^6\text{-p-cimeno})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ (C2) e $[\text{Ru}(\text{L})(\eta^6\text{-p-cimeno})(\text{PEt}_3)]\text{PF}_6$ (C3) foram sintetizados, como mostrado na FIGURA 1. 9. A citotoxicidade dos complexos foi avaliada nas linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e pulmão (A549) e não tumorais MCF-10A (mama) e MRC-5 (pulmão). Os complexos C1 e C2 foram mais seletivos às linhagens de tumor de mama, e C2 foi o mais citotóxico ($\text{IC}_{50} = 6,5 \mu\text{M}$ para MDA-MB-231). Os experimentos toxicológicos *in vivo*, com peixe-zebra, indicaram que C1 e C3 exibem a maior toxicidade de desenvolvimento embrionário de peixe-zebra (inibição de movimentos espontâneos e batimentos cardíacos), enquanto C2, a droga anticancerígena mais promissora nos testes pré-clínicos *in vitro*, revelou a menor toxicidade *in vivo*.¹⁵

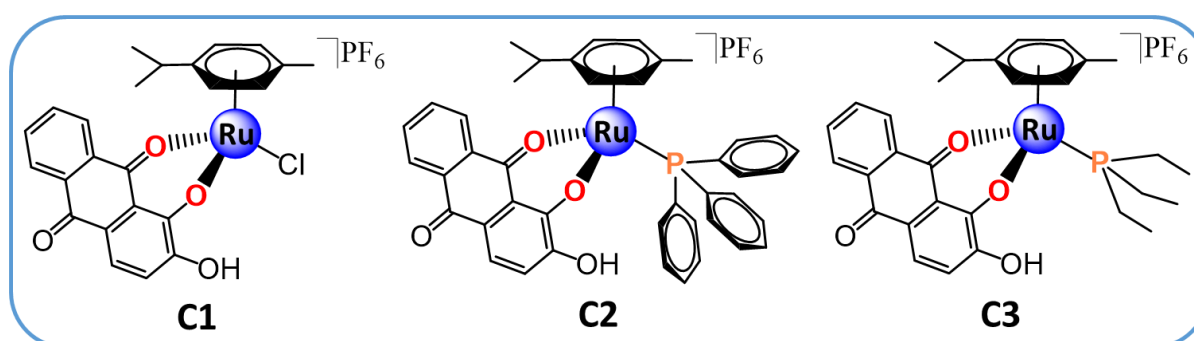


FIGURA 1. 9. Estrutura dos complexos rutênio/areno/alizarina.¹⁵

1.1.5 Complexos de Paládio

Dentre os íons metálicos mais promissores na síntese de novos compostos de coordenação com atividade antitumoral, o paládio se destaca, pois faz parte do grupo da platina e com química de coordenação muito similar. O estado de oxidação mais importante para este grupo é 2+, e geralmente os complexos de Pd(II) e Pt(II) são quadráticos planos, diamagnéticos.^{5,65} Ambos os íons metálicos, Pd(II) e Pt(II), são classificados como ácidos moles e tendem a formar ligações mais fortes com átomos doadores de enxofre, do que com átomos doadores de oxigênio. Apesar da semelhança química entre esses dois metais de transição, a cinética de suas reações é notavelmente diferente. Os complexos de Pd(II) são geralmente mais lábeis, o que significa que eles têm uma maior tendência a liberar e substituir seus ligantes, em comparação com os complexos de Pt(II). A velocidade de hidrólise dos complexos de Pd(II) é cerca de 10^5 vezes mais rápida do que a dos análogos de Pt(II). A rápida interação dos compostos de paládio, *in vivo*, com proteínas, impede que esse complexo atinja o DNA, tornando-o menos eficaz em sua ação antitumoral. Portanto, conclui-se que, para desenvolver um fármaco à base de paládio, é essencial que ele seja suficientemente inerte, para manter sua integridade estrutural no ambiente biológico. Isso é importante para garantir que o composto possa alcançar seu alvo, como o DNA, e exercer sua atividade terapêutica de forma eficaz.^{66,67}

A utilização de ligantes fosfínicos terciários é muito pertinente, uma vez que essas moléculas possuem características de aceitação de elétrons (caráter π -aceitador) e doação de elétrons (caráter σ -doador). Isso os torna excelentes ligantes espectadores, pois a ligação entre o metal e o fósforo é fortalecida pela retrodoação ou transferência de densidade eletrônica dos orbitais *d* preenchidos do metal para os orbitais *d* vazios do átomo de fósforo (FIGURA 1.10). Essa interação contribui para a estabilidade e a eficácia dos complexos formados com esses ligantes fosfínicos terciários.⁶⁵ Além disso, a coordenação de fosfinas na estrutura molecular do complexo aumenta a lipofilicidade deste, o que pode facilitar sua passagem pela membrana celular. Este ligante tem a capacidade de ocupar sítios hidrofóbicos em diversas enzimas, o que contribui para a estabilização da interação e conseqüentemente da inibição.⁶⁸⁻⁷²

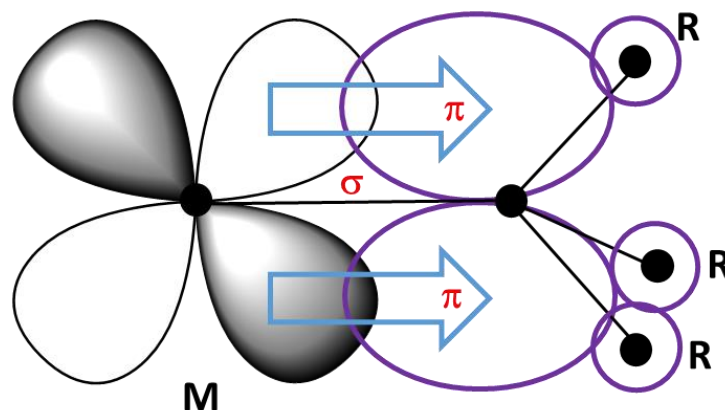


FIGURA 1. 10. Esquema representativo da ligação entre metais e ligantes fosfínicos terciários.

Icsele e colaboradores prepararam complexos de Platina(II) e Paládio(II) com as bisfosfinas 1,1'-bis(difenilfosfino)metano (dppm) e 1,2-bis(difenilfosfino)etano (dppe)⁶⁰. Entre os complexos sintetizados, pode-se comparar os complexos com os ligantes dppe, conforme ilustrado na FIGURA 1. 11 (A), onde observou-se que o complexo de Pd(II) apresentou melhor citotoxicidade nas linhagens de células tumorais de pulmão (A549) e mama (MCF-7), em comparação com o complexo análogo de Pt(II) com os mesmos ligantes. Além disso, os complexos promovem a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, levando à indução da morte celular por apoptose, causando danos nas mitocôndrias e no DNA.⁶

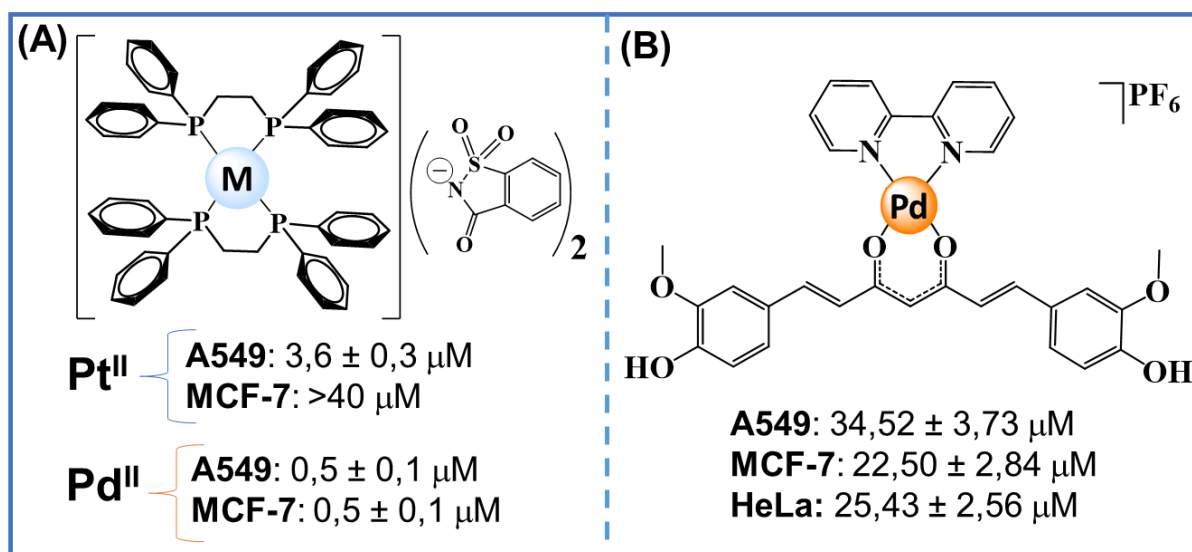


FIGURA 1. 11. (A) Estruturas de complexos de Pt(II) e Pd(II) com atividade (IC₅₀) frente às linhagens tumorais de pulmão (A549) e mama (MCF-7) e (B) Estrutura química do complexo de paládio com bipy e curcumina com atividade frente às linhagens tumorais de pulmão (A549), mama (MCF-7) e cervical (HeLa).

Li e colaboradores sintetizaram e caracterizaram oito novos complexos de Pd(II) contendo bipy e ligantes curcuminóides, e os mesmos demonstraram atividade antitumoral contra linhagens MCF-7, HeLa e A549. Na FIGURA 1.11(B) observa-se a estrutura de um dos complexos sintetizados, o qual possui o ligante curcumina. O trabalho demonstrou que alguns dos complexos de Pd(II) de bisdehidroxicurcumina são indutores de ERO e podem ser promissores como novos agentes terapêuticos para tratamento de câncer através de estratégia pró-oxidante.⁷

Ressalta-se que recentemente um complexo de paládio, a padeliporfina (FIGURA 1. 12), foi aprovado, em novembro de 2017, para uso médico na União Europeia. Vendida sob a marca Tookad, a padeliporfina é m medicamento usado para o tratamento de homens com câncer de próstata de baixo risco, onde o câncer afeta apenas um lado da próstata e normalmente se espera que os pacientes sobrevivam por pelo menos 10 anos, sob tratamento. O Tookad é administrado por injeção na veia durante 10 minutos e subsequentemente ativado na próstata por luz laser, usando um procedimento conhecido como terapia fotodinâmica direcionada vascular (VTP). Os efeitos colaterais mais comuns incluem problemas ao urinar (dor, incapacidade de urinar, forte vontade de urinar, micção frequente e incontinência), problemas sexuais (disfunção erétil e falha na ejaculação), sangue na urina, infecção do trato urinário e dor, e sangramento ao redor da área genital.⁸⁻¹⁰

O mecanismo de ação da padeliporfina, quando ativada por luz laser de 753 nm, consiste no desencadeamento de uma série de eventos no sistema vascular, que resultam em necrose focal ao longo de alguns dias. A ativação na vasculatura do tumor leva à geração de radicais de oxigênio, causando hipoxia local e liberando radicais de óxido nítrico. Isso resulta em uma vasodilatação arterial temporária, seguida pela liberação de endotelina-1, um vasoconstritor. O rápido consumo dos radicais de óxido nítrico pelos radicais de oxigênio leva à formação de espécies reativas de nitrogênio, como o peroxinitrito, resultando na constrição arterial. Além disso, a deformabilidade reduzida dos eritrócitos contribui para a agregação deles e a formação de coágulos sanguíneos nas artérias alimentadoras, causando a oclusão da vasculatura tumoral. Isso é reforçado pela apoptose das células endoteliais induzida pelas espécies reativas de nitrogênio, juntamente com a necrose das células tumorais devido à peroxidação de suas membranas.⁷³

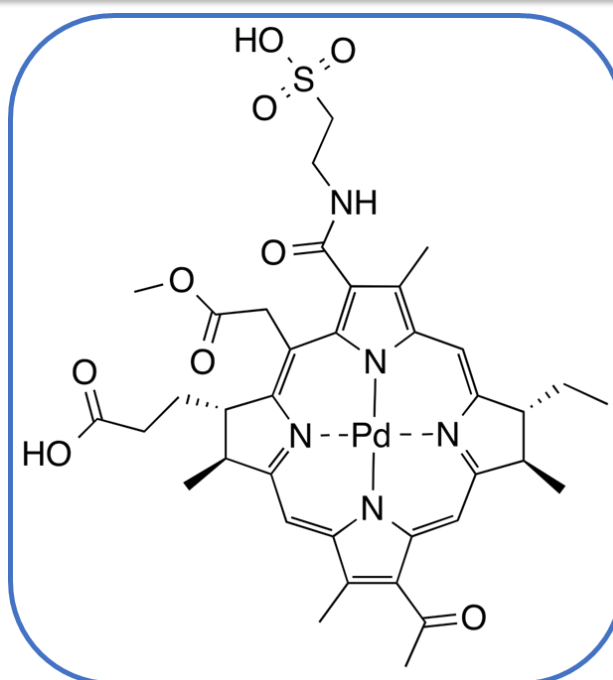


FIGURA 1. 12. Estrutura química da Padeliporfina.

1.2 Planejamento dos novos complexos de Pd(II)/fosfina com ligantes de produtos naturais

No ramo da bioinorgânica o sucesso da cisplatina abriu caminho para o desenvolvimento de novos candidatos a quimioterápicos baseados em metais. Nesse sentido, este trabalho, especificamente, busca contribuir com o desenvolvimento de novos compostos como candidatos potenciais a metalofármacos. Desse modo, nossa estratégia consiste em incorporar os ligantes de produtos naturais, que já possuem propriedades biológicas, ao cerne Pd(II)/fosfina.

O paládio, como dito anteriormente, é um metal do mesmo grupo da platina, cujos compostos apresentam geometria quadrática planar e configuração eletrônica d^8 . A recente aprovação de um complexo de paládio no tratamento do câncer, confirma o potencial dos compostos com este metal, no desenvolvimento de possíveis novos fármacos.

Do ponto de vista estrutural, o estado de oxidação 2+ do paládio permite a aplicação da técnica de RMN (Ressonância Magnética Nuclear), uma valiosa ferramenta para a caracterização de compostos metálicos. Resultados anteriores, do nosso grupo de pesquisa, indicam que os ligantes fosfínicos contribuem significativamente para a obtenção de baixos valores de IC_{50} nas linhagens tumorais. Isso é nitidamente observado quando comparamos complexos que diferiam apenas

na presença ou ausência dessa classe de ligantes. A escolha de diferentes fosfinas é devido a esses ligantes permitem a modulação de propriedades, como diferentes lipofilicidades, que contribui para uma melhor absorção dos compostos pelas células.

As fórmulas estruturais dos ligantes produtos naturais utilizados para o desenvolvimento destes novos compostos de paládio são apresentadas na FIGURA 1. 13. Desta forma, nosso trabalho dará subsídios sobre a importância da presença dos ligantes fosfínicos, produtos naturais de interesse, no planejamento de novos compostos de coordenação com atividades antitumorais, além da obtenção de dados que possibilitarão uma maior compreensão sobre os mecanismos de ação de complexos de paládio.

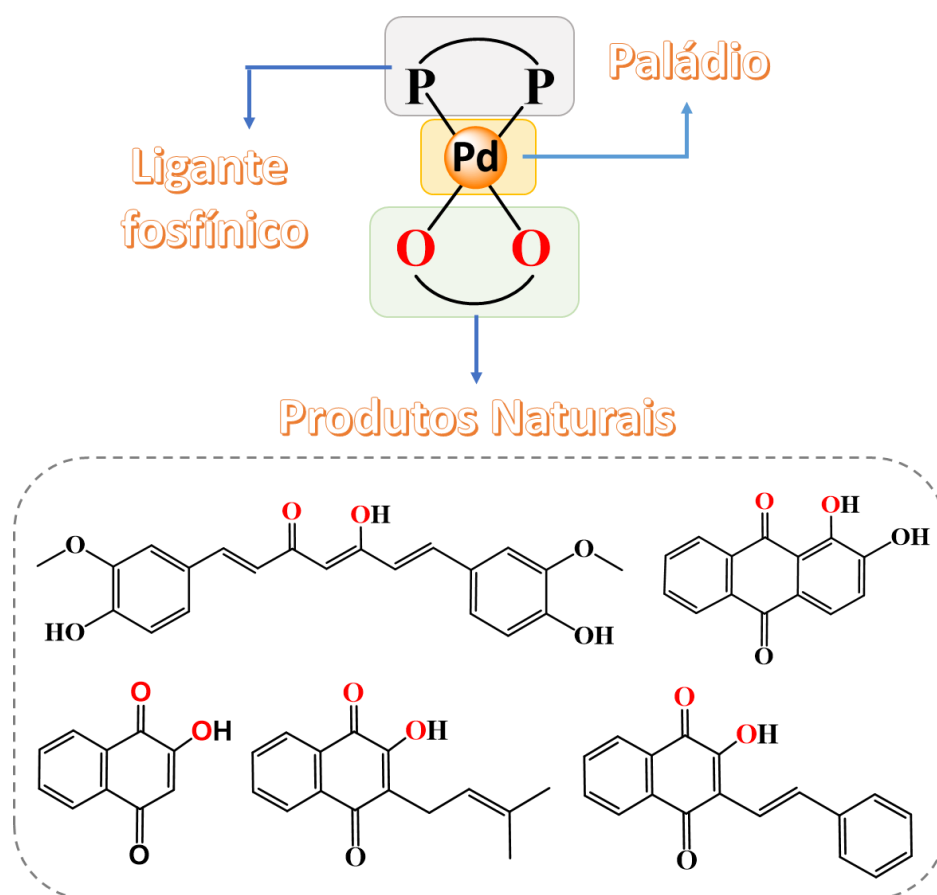


FIGURA 1. 13. Fórmulas estruturais dos ligantes produtos naturais utilizados para o desenvolvimento dos novos complexos de Pd (II).

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar as propriedades citotóxicas de complexos de Pd(II)/fosfina com ligantes produtos naturais em células tumorais humanas, a fim de contribuir com resultados que suportem uma melhor compreensão dos mecanismos de ação destes complexos.

2.2 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral descrito acima, foram executados os seguintes objetivos específicos:

- Síntese de doze novos complexos fosfínicos de Pd^{II} contendo os ligantes de produtos naturais e derivado, que se coordenam no modo bidentado pelos oxigênios, sendo ele agrupados em três séries:
 - Série A, complexos de fórmula geral [Pd(cur)(P-P)]PF₆ sendo cur o ligante curcumina e P-P = trifenilfosfina (PPh₃)₂; 1,2-*bis*(difenilfosfina)etano (dppe); 1,3-*bis*(difenilfosfina)propano (dppp); 1,4-*bis*(difenilfosfina)butano (dppb); 1,1'-*bis*(difenilfosfina)ferroceno (dppf) (**A1-A5**);
 - Série B, complexos de fórmula geral [Pd(dppe)(O-O)]PF₆ sendo O-O os ligantes lausona (lau), lapachol (lap), 3-estiril-lausona (lpm) e aliarina (ali) (**B1-B4**);
 - Série C, complexos de fórmula geral [Pd(lap)(P-P)]PF₆ onde P-P é dppp, dppb e dppf (**C1-C3**);
 - Caracterização dos complexos, empregando técnicas espectroscópicas 1D e 2D RMN, FTIR, análise elementar, condutividade molar, espectrometria de massas e difração de raios X de monocristal (quando possível a obtenção dos mesmos);
 - Estudo da estabilidade estrutural dos complexos nos solventes utilizados como veículos e no meio de cultura, e utilizados nos experimentos biológicos;
 - Determinação da viabilidade celular dos complexos frente a linhagens humanas tumorais de mama, próstata e ovário e nas linhagens humanas não tumorais de mama e pulmão;
-

- Avaliação das células tratadas com os complexos quanto a morfologia celular, capacidade de migração, sobrevivência clonogênica, impacto no ciclo celular e indução a morte por apoptose;
- Realização de testes de interação dos complexos com DNA (calf thymus e plasmídeo pBR322);
- Avaliação da interação dos complexos sintetizados com a proteína albumina de soro humano (HSA).

CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo estão descritos os materiais utilizados, no desenvolvimento da tese, as sínteses e caracterizações dos complexos fosfínicos de Pd^{II} com ligantes de produtos naturais e derivado, bem como a descrição de procedimentos referente aos estudos de suas atividades biológicas.

3.1 Materiais

3.1.1 Tratamento do argônio para síntese em atmosfera inerte

Todas as sínteses dos complexos foram realizadas sob atmosfera inerte, a qual foi obtida pela passagem de um fluxo de argônio, de procedência da White Martins, por um sistema de colunas contendo sílica gel, cloreto de cálcio e catalisador BTS-R-3-11 (Fluka Chemika), mantido a 60°C, para aumentar sua eficiência.

3.1.2 Solventes

Os principais solventes utilizados foram: acetona (Synth P. A. e Êxodo[®]), diclorometano (Synth P. A. e Êxodo[®]), éter etílico (Synth P. A.), hexano (Sigma), metanol (Synth P. A.) e dimetilsulfóxido (Êxodo[®]). Os solventes deuterados utilizados foram DMSO-d₆ e CO(CD₃)₂ (Sigma-Aldrich[®]).

3.1.3 Reagentes químicos

Os reagentes trifenilfosfina (PPh₃), 1,2-*bis*(difenilfosfina)etano (dppe), 1,3-*bis*(difenilfosfina)propano (dppp), 1,4'-*bis*(difenilfosfina)butano (dppb), 1,1'-*bis*(difenilfosfina)ferroceno (dppf), curcumina (cur), lausona (lau), alizarina (ali), hexafluorofosfato de potássio (KPF₆) e tetrafluoroborato de prata (AgBF₄) são de procedência Sigma-Aldrich. O reagente *trans*-[Pd(PPh₃)₂Cl₂] é de procedência Precmet. O lapachol e o ligante 3-estiril-lausona foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Chaquip Daher Netto (UFRJ - Macaé).

Os reagentes empregados nos ensaios biológicos foram utilizados como fornecidos: trizma base (Sigma-Aldrich[®]) e trizma-HCl (Sigma-Aldrich[®]); DNA do timo de bezerro (CT-DNA, Sigma-Aldrich[®]), albumina do soro humano (HSA, Sigma-Aldrich[®]), Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich[®]), iodeto de propídio (BD Bioscience), kit Anexina-V (BD Bioscience), azul de tripano (Sigma-Aldrich[®]), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT, Aldrich), tripsina (Vitrocell), soro fetal bovino

(FBS, Vitrocell), meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM e DMEM/F12, Vitrocell), meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, Vitrocell).

3.2 Sínteses dos complexos

3.2.1 Síntese dos precursores do tipo [PdCl₂(P-P)]

Em 50 mL de diclorometano desaerado dissolveu-se o *trans*-[PdCl₂(PPh₃)₂] (0,100 g; 1,85 mmol) e adicionou-se 2,0 mmol da bisfosfina de interesse. A solução resultante foi refluxada por 24 horas, mediante constante agitação, então foi concentrada sob pressão reduzida, adicionou-se 20 mL de hexano desaerado, obtendo-se um precipitado, que foi filtrado, lavado com hexano (3 × 5 mL), éter etílico (3 × 5 mL), e seco sob pressão reduzida. Rendimento: [PdCl₂(dppe)] 85%; [PdCl₂(dppp)] 95%; [PdCl₂(dppb)] 76%; [PdCl₂(dppf)] 62%.

3.2.2 Síntese dos complexos [Pd(cur)(P-P)]PF₆ – Série A

Em 20 mL de acetona/diclorometano (1:1, v/v), em sala escura e atmosfera inerte, dissolveu-se o precursor [PdCl₂(P-P)] (0,100 g; 0,15 mmol), e adicionou-se a curcumina (0,16 mmol), e o AgBF₄ (0,33 mmol; 0,037 g). A solução resultante permaneceu sob agitação por 4 horas, foi evaporada até a completa secura, solubilizada em diclorometano e filtrada sob celite. Após isto, a solução foi evaporada até sua completa secura, solubilizada em 2 mL de metanol, adicionado KPF₆ (0,18 mmol) e adicionados 10 mL de água, para precipitação de um sólido alaranjado que foi filtrado, lavado com hexano e seco sob pressão reduzida.

3.2.3 Síntese do complexos [Pd(dppe)(O-O)]PF₆ – Série B

Em 30 mL de acetona/diclorometano (1:1, v/v), em sala escura e atmosfera inerte, dissolveu-se o precursor [PdCl₂(dppe)] (0,15 mmol; 0,050 g) e em seguida adicionou-se o AgBF₄ (0,33 mmol; 0,037 g) e o ligante de interesse (0,16 mmol; lau 0,018 g; lap 0,025 g; 0,028 lpm; ali 0,021 g). A mistura permaneceu por 4 horas em agitação e então foi evaporada até a completa secura, solubilizada em diclorometano e filtrada sob celite. Após isto, a solução foi evaporada até sua completa secura, solubilizada em 2 mL de metanol, adicionado KPF₆ (0,18 mmol; 0,020 g) e 10 mL de água, para precipitação. O sólido resultante foi filtrado, lavado com água quente, hexano quente e seco sob pressão reduzida.

3.2.4 Síntese do complexos [Pd(P-P)(lap)]PF₆ – Série C

Em 30 mL de acetona/diclorometano (1:1, v/v), em sala escura e atmosfera inerte, dissolveu-se o precursor [PdCl₂(P-P)] (0,15 mmol; 0,050 g) e em seguida adicionou-se o AgBF₄ (0,33 mmol; 0,037 g) e o lapachol (0,16 mmol). Após 4 horas em agitação a reação foi evaporada até a completa secura, solubilizada em diclorometano e filtrada sob celite. Após isto, a reação foi evaporada até sua completa secura, solubilizada em 2 mL de metanol, adicionado KPF₆ (0,18 mmol; 0,020 g) e adicionado 10 mL de água, para precipitação do sólido formado. O sólido resultante foi filtrado, lavado com água quente, hexano quente e seco sob pressão reduzida.

3.3 Instrumentação

3.3.1 Condutividade Molar

As medidas de condutância foram realizadas utilizando-se um aparelho Meter Lab., modelo CDM230. Para as medidas utilizou-se soluções dos complexos na concentração de 10⁻³ mol.L⁻¹ em diclorometano ou DMSO.

3.3.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Foi utilizado para obtenção do espectro de absorção na região do infravermelho um espectrofotômetro Bomem Michelson FT MB-102. As amostras foram diluídas em pastilhas KBr (Merck P.A.) preparadas minutos antes da obtenção dos espectros. O KBr foi triturado e mantido em estufa 120°C antes de ser utilizado.

3.3.3 Espectroscopia de absorção na região do UV-visível

Os espectros de absorção no ultravioleta e visível (200 a 800 nm) foram adquiridos em um espectrofotômetro de arranjo de diodo da Hewlett Packard (HP) 8452A utilizando cubetas com caminho óptico de 1 cm.

3.3.4 Análise elementar (C, H, N e S)

Os teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre dos complexos foram determinados em um analisador CHN modelo EA 1108 da FISONs, no Laboratório de Análise Elementar do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

3.3.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN 1D: ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, e 2D: ^1H - ^1H COSY (*Correlated Spectroscopy*), ^1H - ^{13}C HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlance*) e ^1H - ^{13}C HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) foram obtidos em um equipamento BRUKER 9.4 T (400 MHz), modelo AVANCE III, do Laboratório de RMN do Departamento de Química da UFSCar. Para as amostras de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ utilizou-se solventes não deuterados, com um capilar (45 mm de comprimento por 1 mm de diâmetro interno) contendo D_2O como referência externa.

3.3.6 Espectrometria de massas

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Química, UFSCar, pelo MSc. Carlos André Moraes. As coletas 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. A amostra foi solubilizada em MeOH (grau LC-MS), posteriormente diluída. 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 $0,300 \text{ mL min}^{-1}$ e o volume de injeção foi de $3 \mu\text{L}$. O erro (em ppm) foi calculado a partir da massa teórica e do respectivo espectro de MS adquirido monitorando uma faixa entre 100 e 1000 Da, com uma taxa de varredura $3 \text{ espectros s}^{-1}$ e processados pelo software Mass Hunter Workstation Software versão B.08.00. Erro entre o valor teórico e experimental foi calculado utilizando-se o site.⁷⁴

3.3.7 Difração de Raios X

As coletas de difração de raio X em monocristais foram realizadas em difratômetros Rigaku XtaLAB mini ($\text{MoK}\alpha = 0.71073 \text{ \AA}$) ou XtaLAB Synergy-S, Dualflex ($\text{MoK}\alpha = 0.71073 \text{ \AA}$ ou $\text{CuK}\alpha = 1.54056 \text{ \AA}$), pelo Dr. João Honorato e Dr. Javier Ellena, no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos, na Universidade de São Paulo. As estruturas foram resolvidas com o programa SHELXT⁷⁵ usando métodos diretos, sucessivos mapas de Diferença de Fourier permitiram a localização dos átomos não hidrogênios. Excetuando-se os átomos de hidrogênio, todos os demais foram refinados anisotropicamente. Os refinamentos foram feitos pelo método

dos mínimos quadrados com uso do programa SHELXL.⁷⁶ Os cálculos dos parâmetros da célula unitária e as correções por absorção foram realizados usando o software CrysAlisPro. As representações das moléculas e tabelas de dados cristalográficos foram geradas utilizando os programas OLEX² e MERCURY.^{77,78} Detalhes específicos sobre coleta de dados e os parâmetros para cada complexo são fornecidos no Apêndice.

3.3.8 Determinação do coeficiente de partição

O coeficiente de partição dos compostos obtidos foi determinado pelo método de shake-flash⁷⁹, empregando n-octanol (Êxodo) e água. O procedimento foi realizado em triplicata para cada composto. Inicialmente, uma alíquota de 50 µL da solução estoque do composto (0,5 µM) em DMSO foi diluída em 975 µL de n-octanol e em seguida, acrescidos mais 975 µL de água. As amostras foram incubadas a 400 RPM a 37 °C durante 18 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 1 min. a 1000 rpm e a fase orgânica foi recolhida. As absorbâncias dos complexos na fase n-octanol foram medidas por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível. O valor médio das triplicatas das absorbâncias foi empregado para determinar a concentração por meio de uma curva analítica.

As concentrações dos complexos em água foram determinadas pela subtração do número de mols adicionado inicialmente, com o número de mols encontrado na fase orgânica.

O coeficiente de partição foi calculado com base na Equação 1:

$$\log P = \log \left(\frac{C_o}{C_a} \right) \quad \text{Eq. 1}$$

Onde, C_o e C_a são as concentrações do complexo na fase orgânica e aquosa, respectivamente.

3.4 Obtenção dos experimentos biológicos

3.4.1 Teste de estabilidade dos complexos em solução

A estabilidade dos complexos foi avaliada por meio do UV-vis na condição utilizada nos experimentos biológicos, em meio de cultura celular RPMI (sem fenol) e 0,5% DMSO. Os complexos (20 µM) foram incubados a 37°C e espectros eletrônicos foram registrados em 0, 24 e 48 horas.

3.4.2 Linhagens e Cultura das Células

As células das linhagens humanas MDA-MB-231, adenocarcinoma de mama triplo-negativo do fenótipo mesenquimal (ATCC (*American Type Culture Collection*) N. HTB-26); A549, adenocarcinoma epitelial alveolar de células basais de pulmão humano (ATCC N. CCL-185) e MRC-5, não tumoral de pulmão humano (ATCC N. CCL-171), foram cultivadas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). As linhagens de células tumorais humanas, de mama MCF-7 (ATCC N. HTB-22) e SKBR-3 (ATCC No. HTB-30), de próstata DU-145 (ATCC N. HTB-81), de ovário A2780 (Sigma N. 93112519) e ovário resistente a cisplatina A2780cis (Sigma N. 93112517), foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 10% de FBS. A linhagem de célula não tumoral de mama humano MCF-10A (ATCC No. CRL-10317), foi cultivada em meio DMEM/F12, suplementado com 5% de soro de cavalo (Gibco), fator de crescimento epidermal humano (EGF) (20 ng.mL^{-1}), hidrocortisona ($0,5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), insulina (Sigma-Aldrich) ($10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) e 1% de penicilina/estreptomicina. As linhagens celulares cresceram em garrafas, em monocamadas aderentes, mantidas em cultura a 37°C , 5% CO_2 em estufa umidificada, para serem utilizadas em ensaios descritos a seguir.

3.4.3 Ensaio de viabilidade celular por MTT

Para avaliar a viabilidade das células após o tratamento com os complexos empregou-se o método colorimétrico do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium], o qual indica que a viabilidade celular é proporcional à formação de cristais de formazan (produto da redução do MTT).⁸⁰ Para as análises, $1,5 \times 10^4$ células/poço foram semeadas em placas de cultura de 96 poços. As placas foram armazenadas em estufa (37°C - 5% CO_2) por 24 horas para a adesão celular. Após este tempo adicionou-se os complexos em diferentes concentrações e a placa foi mantida em estufa por 48 horas. A porcentagem de DMSO empregada neste experimento foi de 0,5% e os controles receberam esta mesma porcentagem de DMSO. Após 48 horas 50 μL de MTT foi adicionado (1 mg mL^{-1} em PBS (tampão fosfato salino)) em cada poço, as placas foram posteriormente incubadas em estufa (37°C - 5% CO_2) por um período de 3 à 4 horas. Os cristais de formazan formados foram solubilizados pela adição de isopropanol e a absorbância dos poços registrada utilizando-se um leitor de microplacas (Labtech LT4000) em um comprimento de onda de 540 nm. Os valores de IC_{50} (concentração que inibe 50% da viabilidade celular)

foram determinados por meio da curva concentração-resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 8.0.2.

3.4.4 Ensaio de viabilidade celular por MTT, com irradiação

Neste ensaio utilizou-se a mesma metodologia descrita no item 3.4.3, porém após 24 horas de tratamento com os complexos foi feita a irradiação com uma placa de luz LED (um led em cada poço), no comprimento de onda de 460-465 nm, por 15 minutos. Após completar o tempo de 48 horas de tratamento com os complexos, foi continuado o procedimento da mesma forma descrita no item 3.4.3.

3.4.5 Morfologia celular

As células A2780, A2780cis e MRC-5 foram semeadas na densidade de $1,0 \times 10^5$ células/ poço, $1,0 \times 10^5$ células/ poço e $0,5 \times 10^5$ células/ poço, respectivamente, em uma placa de 12 poços e incubadas em meio suplementado, a 37°C com 5% de CO₂ por 24 h para adesão celular. Então a morfologia celular foi examinada e as micrografias registradas, antes da adição dos complexos, 24 e 48 h após o tratamento das células nas concentrações $\frac{1}{4} \times IC_{50}$, $\frac{1}{2} \times IC_{50}$, IC_{50} , $2 \times IC_{50}$ e $4 \times IC_{50}$ dos complexos **A1**, **B2** e **C3**, em um microscópio invertido (Nikon, T5100) com objetiva de 10x. As células incubadas com 0,5% de DMSO foram o controle negativo.

3.4.6 Ensaio de sobrevivência clonogênica

As células da linhagem A2780cis (para o complexo **A1** e **C3**), A2780 (para o complexo **B2**) e MRC-5 (para os complexos **A1**, **B2** e **C3**) foram semeadas em uma placa de 6 poços na densidade de 400 células/ poço e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 24 h para adesão celular. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações ($\frac{1}{2} \times IC_{50}$, IC_{50} , $2 \times IC_{50}$ e $4 \times IC_{50}$) dos complexos pelo período de 48 h. Então o meio foi substituído por um meio fresco e as células foram incubadas por 10 dias. Em seguida, o meio foi retirado e as células foram fixadas e coradas com cristal violeta 0,5% em metanol/água (1:1) por 10 minutos. A sobrevivência relativa foi calculada usando o software ImageJ, usando o plugin "Colony Area" que mede a área e intensidade de cada colônia na imagem selecionada. O experimento foi realizado em triplicata e as células incubadas com 0,5% de DMSO foram o controle negativo.

3.4.7 Ensaio de Ciclo Celular

As células A2780 e A2780cis foram semeadas em placas de 12 poços na densidade de 1×10^5 células/ poço. Após 24 h de incubação a 37°C em atmosfera

de CO₂, as células foram tratadas com diferentes concentrações do complexo ($\frac{1}{2}\times IC_{50}$, IC_{50} , e $2\times IC_{50}$) por 48 h. Em seguida, as células foram coletadas, lavadas com PBS gelado e fixadas por 24 h a -20°C em etanol a 70%. Após a fixação, as células foram centrifugadas a 2.000 rpm por 5 min a 4°C, ressuspensas em 250µL de tampão PBS contendo RNase A (Sigma-Aldrich) 0,2 mg.mL⁻¹ e com solução de fluorocromo hipotônico Iodeto de Propídeo (PI, Sigma-Aldrich) 1 mg.mL⁻¹ e incubadas em gelo por 30 min para análise usando um citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences), registrando 10000 eventos. A distribuição da fase do ciclo celular foi analisada usando o software FlowJo. O experimento foi realizado em triplicata. As células tratadas com 0,5% de DMSO foram o controle negativo.

3.4.8 Ensaio de apoptose com Anexina V

Os ensaios de apoptose induzida pelos complexos nas células A2780cis (complexos **A1** e **C3**) e A2780 (complexo **B2**) foram realizados por citometria de fluxo usando um kit de detecção de apoptose PE-Anexina-V (BD Biosciences). As células na densidade de 1×10^5 células/ poço foram semeadas em uma placa de 12 poços e, após 24 h de incubação, foram expostas a diferentes concentração dos complexos ($\frac{1}{2}\times IC_{50}$, IC_{50} , e $2\times IC_{50}$) por 24 h. Após o tratamento, o meio foi removido e as células foram expostas aos marcadores PE-Anexina V (2,5 µL) e 7-AAD (7-amino-actinomicina D) (2,5 µL) em 200 µL de tampão de ligação, por 15 min, em temperatura ambiente no escuro. Em seguida, as células foram coletadas com scraper, centrifugadas a 2000 rpm por 5 min a 4°C e ressuspensas em 200 µL de tampão de ligação para análise usando um citômetro de fluo Accuri C6 (BD Biosciences), registrando 10000 eventos. A fluorescência foi quantificada pelo software Cell Quest (BD Biosciences). O experimento foi realizado em triplicata. As células tratadas com 0,5% de DMSO foram o controle negativo.

3.4.9 Análise de formação de espécies reativas de oxigênio

Para investigação da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) foi empregado o H₂DCFDA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato) (Sigma Aldrich), que é um composto não fluorescente capaz de permear a membrana celular, mas quando em presença de ERO, ocorre a clivagem do grupo acetato formando o composto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Em uma placa de 24 poços as células A2780cis foram semeadas 2×10^5 células/ poço e após 24 h de incubação, foi adicionado o complexo **A1** em diferentes concentrações ($\frac{1}{8}\times IC_{50}$, $\frac{1}{4}\times IC_{50}$, e $\frac{1}{2}\times IC_{50}$)

por 24 h. Nos poços de controle foi adicionado somente DMSO (0,5%). O H₂DCFDA (4,85 mg) foi dissolvido em 1 mL de DMSO, para perfazer uma solução estoque de 10 mM. Foi diluída a solução estoque com RPMI pré-aquecido, fazendo uma solução de trabalho a 10 µM de H₂DCFDA. O meio foi removido, 500µL da solução de trabalho foi adicionado em cada poço e foi incubado em estufa por 30 minutos. Após a incubação, a solução de trabalho foi removida, os poços lavados duas vezes com PBS e 500 µL de PBS foi adicionado a cada poço. As imagens foram coletadas utilizando um microscópio CELENA. Depois de obter as imagens, o PBS foi removido de todos os poços e 200 µL de tampão de ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) foi adicionado a cada poço. Incubou-se no gelo por 5 min e, em seguida, coletou-se as células lisadas em microtubos de 1,5 mL. Centrifugou-se a 21.130 × g por 10 min a 4 °C. Transferiu-se 100 µL do sobrenadante para uma placa preta de 96 poços e mediu-se os espectros de fluorescência em um fluorímetro Synergy/H1-Biotek monocromador, com comprimento de onda de excitação em 485 nm e um comprimento de onda de emissão de 530 nm.⁸¹

3.4.10 Ensaio de antioxidante DPPH

A capacidade antioxidante dos complexos pertencentes à Série A e C foi avaliada por meio da habilidade dos compostos antioxidantes presentes nas amostras de neutralizarem o radical estável DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).⁸² Foi preparada uma solução metanólica de DPPH a 0,1 mmol L⁻¹. Os experimentos foram realizados em triplicata em uma microplaca de fundo transparente de 96 poços e conduzidas no escuro. Em cada cavidade da placa foi adicionado 180 µL da solução de DPPH e 20µL da solução do composto em DMSO. Para controle foi utilizado 180 µL da solução de DPPH e 20 µL de DMSO. Para comparação foi utilizado o ácido ascórbico (AA) como solução padrão. As concentrações utilizadas dos compostos foram de 200-0,20 µmol L⁻¹. As medidas de absorbância foram realizadas após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, em um leitor de microplacas (Labtech LT4000), em comprimento de onda de 517 nm.

Os valores de IC₅₀ (a concentração do composto utilizado para eliminar 50% dos radicais livres) foram determinados por meio da curva concentração-resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 8.0.2.

3.4.11 Transporte pela albumina

Para avaliar a interferência da albumina (albumina de soro humano - HSA) no transporte do complexo **A1**, as células A2780cis ($1,5 \times 10^4$ células/poço) foram semeadas em placas de cultura de 96 poços. As placas foram armazenadas em estufa ($37^\circ\text{C} - 5\% \text{CO}_2$) por 24 horas para a adesão celular. Após esse tempo, a mistura HSA/complexo **A1** foi adicionada às células e incubadas por 48h. A concentração do complexo **A1** adicionada foi próxima ao valor de IC_{50} obtido no ensaio MTT em 48 h para A2780cis ($2,5 \mu\text{M}$). Diferentes concentrações de HSA (Sigma-Aldrich, 20 a $300 \mu\text{g/mL}$) sem os complexos foram adicionadas às células. A percentagem de células viáveis em cada tratamento foi avaliada por um ensaio MTT. A referência de 100% de viabilidade foram as células controle (sem tratamento) e as células que receberam apenas HSA com a maior concentração ($300 \mu\text{g/mL}$).

3.5 Estudos de interação dos complexos com biomoléculas

3.5.1 Determinação da concentração do DNA

Para os estudos de interação dos complexos com o DNA, foi preparado uma solução estoque de CT-DNA (*calf thymus*). Aproximadamente 2 mg de CT-DNA foi solubilizada em 1 mL de tampão Tris-HCl ($4,5 \text{ mM}$ de Tris HCl, $0,5 \text{ mM}$ de Tris base e 50 mM de NaCl) num pH 7,4. A concentração de DNA foi determinada por espectroscopia na região do UV-visível empregando um espectrofotômetro de arranjo de diodo da Hewlett Packard (HP) 8452A. A partir da absorvidade molar do DNA em 260 nm , $6600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$, do caminho óptico ($b = 1 \text{ cm}$) e da absorbância, determinou-se a concentração do CT-DNA por meio da lei de Lambert-Beer (Equação 1):

$$C = A_{260} / (\epsilon_{260} \times b) \quad \text{Eq. 1}$$

3.5.2 Medidas de viscosidade

Primeiramente, a solução estoque da DNA à $5,72 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada como descrito no item 3.5.1. Posteriormente, soluções estoque dos complexos (2 mmol L^{-1}) foram preparadas. Os volumes exatos empregados de: solução estoque de complexo em DMSO, solvente dimetilsulfóxido e solução estoque de DNA em tampão Trisma-HCl estão descritos detalhadamente na TABELA A. 1, no Apêndice.

Para as medidas de viscosidade as amostras foram adicionadas em um tubo de ensaio, seguindo ordem de adição: DMSO, volume da solução estoque do

complexo em DMSO, tampão Trisma-HCl e solução estoque do DNA. A cada adição a solução foi homogeneizada com uma leve agitação. Portanto, foram preparadas 4 mL de soluções do DNA na ausência e presença dos complexos em diferentes concentrações molares em tampão Trisma-HCl (10% DMSO ou 20% DMSO), mantendo-se a concentração constante do DNA. Para cada série de complexos foi empregado uma concentração final $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DNA. As concentrações molares dos complexos foram: 5; 10; 15; 20; 25 e $30 \mu\text{M}$, proporcionando as seguintes razões $[\text{Complexo}]/[\text{DNA}] = 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25$ e $0,30$. A solução de DNA em tampão Trisma-HCl (10% DMSO ou 20% DMSO) foi empregada como negativo controle. As soluções de DNA em tampão na ausência de DMSO e tampão Trisma-HCl na presença de DMSO também foram preparadas e os tempos de escoamento verificados.

Após o preparo das soluções, o tempo de escoamento de cada solução foi aferido em quintuplicata no viscosímetro de Ostwald (Aldrich), com o auxílio de um cronômetro digital. O viscosímetro foi acoplado a um banho termostático, permitindo assim o controle da temperatura em $(25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$. Por meio do valor médio das medidas quintuplicata, a viscosidade relativa do DNA na presença e ausência dos complexos foi calculada a partir da Equação 2.^{83,84} Os dados foram apresentados como $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ vs. $[\text{complexo}]/[\text{CT-DNA}]$.

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{(t-t_0)}{(t_{DNA}-t_0)} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde t_0 é o tempo de escoamento da solução de tampão Trisma-HCl na presença de DMSO e nas ausências tanto de complexo quanto do DNA; t_{DNA} é o tempo de escoamento da solução de CT-DNA (10% ou 20% DMSO); t é o tempo de escoamento da solução de complexo/CT-DNA. Os dados foram apresentados como $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ vs. $[\text{complexo}]/[\text{CT-DNA}]$, onde η é a viscosidade do DNA na presença dos complexos e η_0 é a viscosidade do DNA na ausência de complexo.

3.5.3 Ensaio e deslocamento do Hoechst

O ensaio de deslocamento do Hoechst pelos complexos, no sistema DNA-Hoechst, foi realizado pelo monitoramento da supressão da fluorescência do sistema DNA-Hoechst.

Determinou-se a concentração do Hoechst 33258 e do DNA por UV-Vis. O cálculo da concentração do Hoechst foi realizado empregando o valor da

absorbância e da absorvidade molar do Hoechst em 344 nm ($\epsilon = 46000 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) e do caminho óptico ($b = 1 \text{ cm}$), conforme a lei de Lambert-Beer: $A_{344} = \epsilon_{344} \times b \times C$.

Foram preparadas soluções de DNA-Hoechst (1 mL) na ausência e presença dos complexos em diferentes concentrações molares em tampão Tris-HCl (10% DMSO), mantendo-se a concentração constante do DNA-Hoechst em 75 e 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. As concentrações molares dos complexos foram: 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0 e 40,0 μM , proporcionando as seguintes razões $[\text{Complexo}]/[\text{DNA-Hoechst}] = 0,0; 0,067; 0,13; 0,20; 0,27; 0,33; 0,40; 0,47$ e 0,53. A solução de DNA-Hoechst em tampão Tris-HCl (10% DMSO) foi empregada como controle.

Imediatamente ao preparo das soluções, foram realizadas as triplicadas das medidas das soluções em uma placa opaca de 96 poços (200 μL /poço). Após o plaqueamento das soluções, os espectros de emissão de fluorescência foram registrados na região de 370 a 700 nm, com o comprimento de excitação de 340 nm. As medidas foram realizadas nas temperaturas de 25, 30 e 37°C.

3.5.4 Eletroforese em gel de agarose

Neste ensaio foi utilizado DNA plasmidial pBR322 a 40 μM com diferentes concentrações dos complexos (razões molares $[\text{Complexo}]/[\text{DNA}] = 0,25; 0,50$ e 1,00). O DNA plasmidial foi incubado com os complexos dissolvidos em DMSO (10%) a 37°C por 18 h. As medidas de mobilidade eletroforética foram realizadas em gel de agarose 1%, em tampão TAE (0,45 M Tris-HCl, 0,45 M ácido acético, 10 mM EDTA, pH 8,5). Uma alíquota de 10 mL de marcador de peso molecular (*ladder*) também foi transferida para um dos poços do gel de agarose. A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba de eletroforese com tampão TAE a 40mV por 2h30min. Ao final da corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio por 20min, e em seguida revelado em fotodocumentador Gel Doc™ EZ Bio-Rad. O tratamento das imagens foi realizado empregando *software* ImageLab™ 6.0.0.

3.5.5 Reação com o nucleosídeo guanósina

Foi preparada uma solução dos complexos da série A (0,011 mmol) e guanósina (0,022 mmol) em 500 μL de DMSO deuterado. Foram medidos espectros de RMN de ^1H em diferentes tempos.

3.5.6 Estudo de interação com HSA

Foi conduzido um estudo da interação dos compostos sintetizados com a proteína albumina do soro humano (HSA), por meio da observação da supressão da fluorescência da HSA na presença desses compostos. É relevante mencionar que a correção do efeito de filtro não foi realizada.

Inicialmente, determinou-se a concentração da HSA por UV-Vis empregando o valor da absorbância e da absorvidade molar da HSA em 280nm ($\epsilon = 36500 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) e do caminho óptico ($b = 1 \text{ cm}$), de acordo com a lei a Lambert-Beer: $C = A_{280} / (\epsilon_{280} \times b)$. Preparou-se uma solução estoque de HSA ($5,25 \mu\text{mol L}^{-1}$) em Trisma-HCl.

Em microtubos foram adicionadas diferentes concentrações dos complexos em DMSO (2.5-17.5 μM), em um volume de $100\mu\text{L}$ (10% DMSO). Aos microtubos, adicionou-se $900\mu\text{L}$ da solução estoque de HSA, completando-se um volume final de $1000\mu\text{L}$. Em um dos microtubos adicionou-se apenas a solução estoque de HSA e DMSO na ausência dos complexos.

As medidas foram realizadas em triplicata. Três alíquotas de $200\mu\text{L}$ de cada concentração dos complexos foram transferidas para três poços de uma placa opaca de fundo transparente de 96 poços as medidas. Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos em fluorímetro Synergy/H1-Biotek monocromador, à 25°C , 30°C e 37°C , realizando a excitação em 270 nm e registrados os espectros na região de 300 a 500 nm. As soluções foram incubadas por 15 minutos antes de cada medida.

A análise quantitativa do processo de supressão da fluorescência foi realizada utilizando a equação de Stern-Volmer^{85,86} (Equação 3):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad \text{Eq. 3}$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do agente supressor, respectivamente; K_{SV} é a constante de supressão da fluorescência de Stern-Volmer; k_q é a constante de supressão bimolecular; τ_0 é o tempo de vida médio da fluorescência (6,2 ns) e $[Q]$ é a concentração do complexo, o agente supressor. A constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n) foram obtidos por meio da seguinte Equação 4:

$$\log \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \log K_b + n \log [Q] \quad \text{Eq. 4}$$

Os parâmetros termodinâmicos de energia livre de Gibbs (ΔG^0), variação de entalpia (ΔH^0) e variação de entropia (ΔS^0) foram calculados para avaliar o tipo de interação dos complexos com a HSA por meio das Equações 5 e 6:

$$\ln \left[\frac{K_2}{K_1} \right] = \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \frac{\Delta H}{R} \quad \text{Eq. 5}$$

$$\Delta G = -RT \ln K_b = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Eq. 6}$$

Onde, K_1 e K_2 são as constantes de ligação nas temperaturas T_1 e T_2 e R é a constante dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO: SÉRIE A

A fim de facilitar para o leitor acerca da apresentação dos resultados discutidos, os complexos foram divididos em três séries, baseadas em 3 tipos distintos de ligantes:

Série A – Curcumina;

Série B – Naftoquinonas e antraquinona;

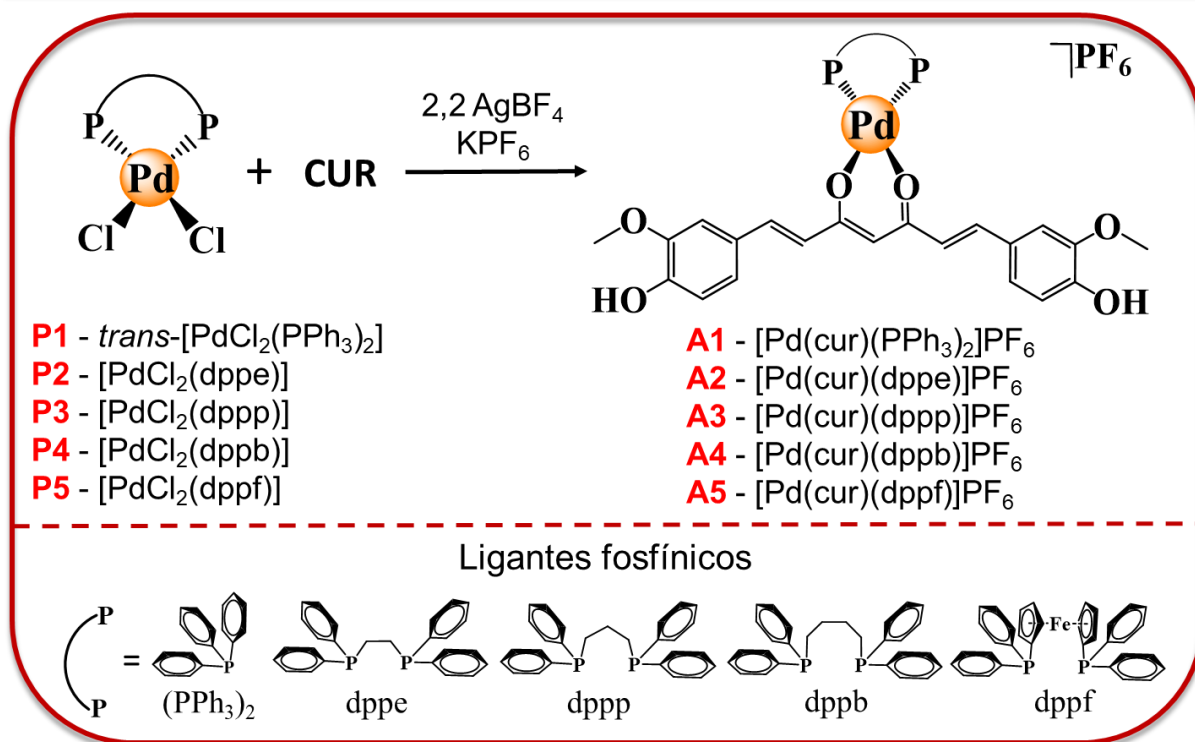
Série C – Lapachol.

Os resultados e discussões referentes a cada série foram divididos em capítulos e em cada uma das séries os dados serão abordados em partes, conforme segue:

1. Síntese e caracterização dos complexos;
2. Estudos biológicos dos complexos;
3. Interação dos complexos com biomoléculas.

4.1 Síntese e caracterização dos complexos da série A

Os complexos de fórmula geral $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{PP})]\text{PF}_6$ [onde cur = curcumina; PP = trifenilfosfina (PPh_3 ; **A1**); 1,2-*bis*(difenilfosfina)etano (dppe; **A2**); 1,3-*bis*(difenilfosfina)propano (dppp; **A3**); 1,4'-*bis*(difenilfosfina)butano (dppb; **A4**); 1,1'-*bis*(difenilfosfina)ferroceno (dppf; **A5**)] foram sintetizados pela substituição dos ligantes cloridos, dos complexos precursores, do tipo $[\text{PdCl}_2(\text{P-P})]$ (**P1-P5**), previamente sintetizados, pela curcumina. A desprotonação do ligante curcumina ocorreu na presença dos solventes, sem a necessidade da adição de base ao meio reacional. Para facilitar a saída dos cloretos foi empregado o AgBF_4 . O sal KPF_6 foi adicionado no meio reacional para que o ânion PF_6^- atuasse como o contra-íon dos complexos monocatiônicos. A rota sintética para os complexos da série A está ilustrada no ESQUEMA 4. 1.



ESQUEMA 4. 1. Rota sintética dos complexos pertencentes à série A.

Com o intuito de verificar a carga dos complexos **A1-A5** medidas de condutividade molar foram realizadas em DMSO e diclorometano, a 1 mmol.L⁻¹, os valores obtidos (TABELA 4. 1) estão dentro da faixa de eletrólito 1:1.⁸⁷ Os dados de análise elementar dos complexos são condizentes com as estruturas propostas (TABELA 4. 1).

TABELA 4. 1. Dados de análise elementar (valores teóricos entre parêntesis) e condutividade molar (ohm⁻¹ cm² mol⁻¹) em DMSO e CH₂Cl₂.

Complexos	%C	%H	Λ _m	
			DMSO*	CH ₂ Cl ₂ **
A1 - [Pd(cur)(PPh ₃) ₂]PF ₆	59,75 (59,88)	4,53 (4,32)	26,6	44,8
A2 - [Pd(cur)(dppe)]PF ₆	55,52 (55,50)	4,28 (4,26)	25,3	33,5
A3 - [Pd(cur)(dppp)]PF ₆	55,94 (55,91)	4,62 (4,40)	25,2	32,7
A4 - [Pd(cur)(dppb)]PF ₆	56,30 (56,31)	4,68 (4,53)	26,8	44,2
A5 - [Pd(cur)(dppf)]PF ₆	56,25 (56,31)	4,32 (4,04)	21,6	45,4

*Faixa para eletrólito 1:1 em DMSO 20-62 ohm⁻¹ cm² mol⁻¹; **Faixa para eletrólito 1:1 em CH₂Cl₂ 12-77 ohm⁻¹ cm² mol⁻¹.⁸⁷

A técnica de difração de raios X por monocristais foi empregada para elucidação estrutural dos complexos, no estado sólido. Os cristais foram obtidos pela

técnica de lenta evaporação de uma solução de cada complexo em diclorometano e metanol (razão 1:1 v/v). Foi possível obter monocristais adequados para difração dos complexos **A1**, **A2**, **A4** e **A5**, como mostradas as estruturas cristalinas na FIGURA 4. 1. Os complexos **A1**, **A2** e **A5** cristalizaram-se no sistema monoclinico, enquanto o complexo **A4** cristalizou-se no sistema triclinico. Os demais parâmetros cristalográficos estão descritos na TABELA A. 2, no Apêndice – Parte I. Os complexos possuem em sua esfera de coordenação a fosfina de interesse e um íon do ligante curcumina, coordenado de forma bidentada, pelos átomos de oxigênio do grupo cetona e enol, de modo desprotonado. Além disso, está presente o PF_6^- , na unidade assimétrica do complexo, que atua como contra-íon.

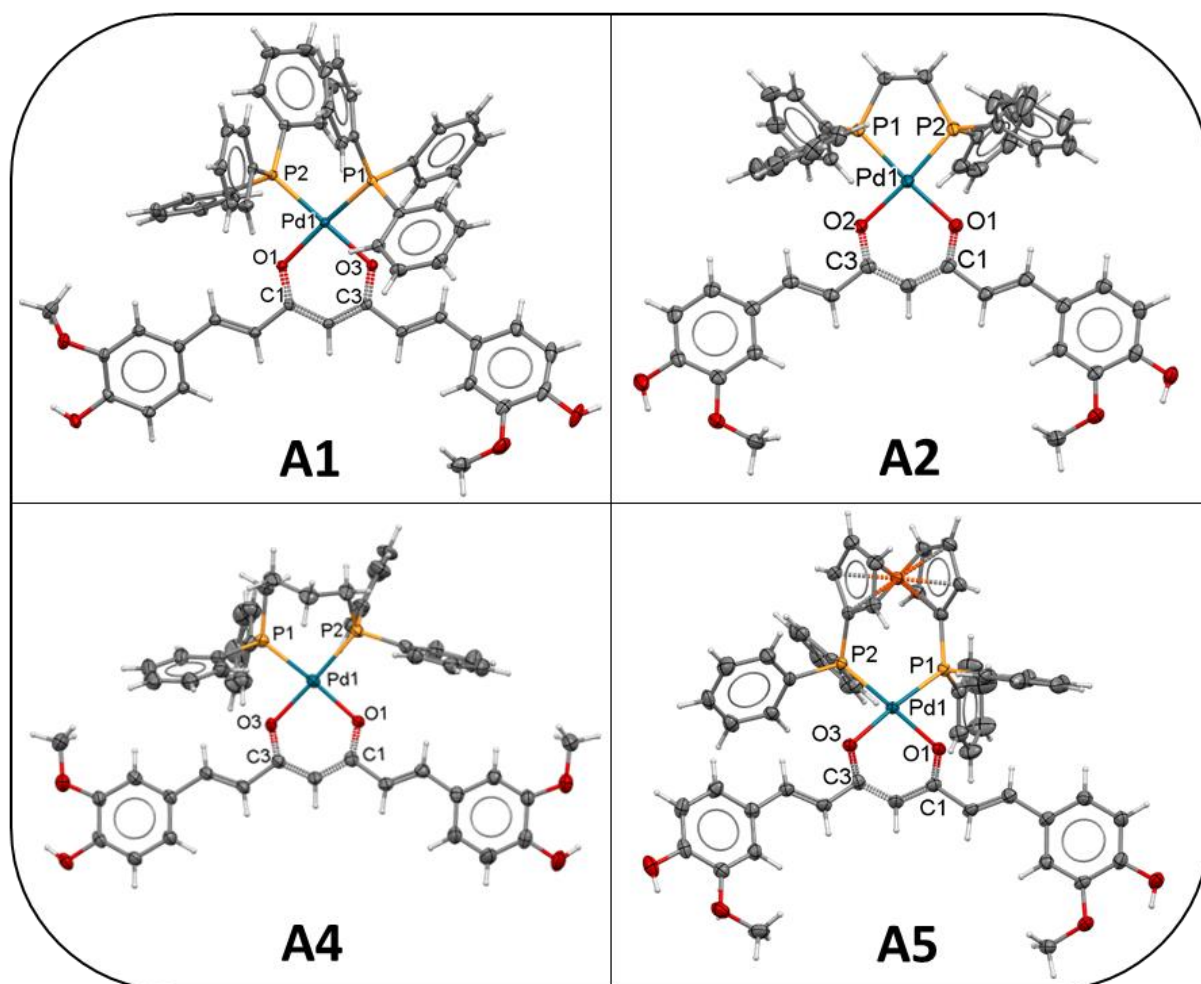


FIGURA 4. 1. Estruturas cristalográficas obtidas dos complexos **A1**, **A2**, **A4** e **A5** (o contra-íon PF_6^- foi omitido para melhor visualização das moléculas), átomos representados no modo ORTEP (elipsóides em 30%).

Os ângulos e comprimentos de ligações selecionados estão apresentados na TABELA 4. 2. Em todos os casos, pelos valores de ângulo de ligação,

o átomo de paládio apresenta uma geometria quadrática plana distorcida, evidenciado pelos ângulos próximos a 90° e 180°. Os comprimentos de ligação em torno do centro metálico, Pd–P estão de acordo com o esperado para o sistema^{88–90}, e os comprimentos Pd–O são similares ao encontrado para um complexo relatado em literatura, [Pd(bipy)(BDHC-A2)]PF₆ (BDHC-A2 = bisdehidroxicurcumina), com valores iguais a 1.975(4) (Å) e 1.978(4) (Å).⁷ Ademais, as distancias das ligações C–O são semelhantes a da curcumina livre, devido a deslocalização eletrônica já existente na molécula antes da coordenação e que permanece após esta ocorrer. Esses valores também são similares aos reportadas na literatura.⁹¹

TABELA 4. 2. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados das estruturas cristalinas dos complexos **A1**, **A2**, **A4** e **A5**.

Comprimento de ligação (Å)	Cur*	Complexos			
		A1	A2	A4	A5
Pd(1)–P(1)	–	2,2866(6)	2,2162(5)	2,2409(17)	2,2596(10)
Pd(1)–P(2)	–	2,2569(6)	2,2257(6)	2,2504(15)	2,2816(10)
Pd(1)–O(1)	–	2,0444(16)	2,0509(14)	2,063(4)	2,045(3)
Pd(1)–O(3)	–	2,0360(16)	2,0486(14)	2,051(4)	2,046(3)
C(1)–O(1)	1,298	1,286(3)	1,290(3)	1,285(7)	1,280(5)
C(3)–O(3)	1,303	1,285(3)	1,282(2)	1,271(7)	1,294(5)

Ângulo de ligação (°)	Complexos			
	A1	A2	A4	A5
P(2)–Pd(1)–P(1)	95,69(2)	86,01(2)	92,93(6)	95,95(4)
O(1)–Pd(1)–P(1)	170,01(5)	176,25(4)	175,27(11)	177,49(8)
O(1)–Pd(1)–P(2)	87,14(5)	91,07(4)	90,87(11)	83,64(8)
O(3)–Pd(1)–P(1)	84,72(5)	89,30(4)	84,01(12)	88,63(8)
O(3)–Pd(1)–P(2)	178,18(5)	173,61(4)	176,92(12)	175,40(8)
O(3)–Pd(1)–O(1)	92,74(6)	93,79(6)	92,21(15)	91,79(11)

*Valores retirados CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre) Código 636155.

A espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho também foi empregada como uma técnica de caracterização dos complexos no estado sólido. A curcumina apresenta modos vibracionais característicos na região do infravermelho, tais quais os principais são: ν OH; ν (C=O) cetona; ν (C=C) alifático;

δ CO enol e ν (C–O) fenol (TABELA 4. 4).^{92,93} A banda ν (C=O) da curcumina coordenada se deslocou para uma menor frequência, em comparação à curcumina livre, devido a enfraquecimento da ligação C=O, com a retrodoação, perda parcial do caráter de dupla ligação após coordenação. Além destas, as bandas ν (C=C) alifático (1514 cm^{-1}) e ν (C–O) fenol (1282 cm^{-1}), entre outras, do ligante curcumina, livre, permanecem em regiões similares nos espectros nos complexos. Os espectros de absorção na região do infravermelho da curcumina e dos complexos estão dispostos no Apêndice – Parte I, FIGURA A. 1 – A.6.

Os espectros na região do infravermelho exibem outras bandas características, como ν P–C, da fosfinas, por volta de 1100 cm^{-1} , e as bandas de alta e média intensidade, em torno de 840 e 557 cm^{-1} , respectivamente, que são atribuídas aos modos vibracionais do contra-íon PF_6^- .⁹⁴

TABELA 4. 3. Atribuição tentativa das principais frequências vibracionais, nos espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos **A1-A5** e curcumina, em KBr.

Atribuições	Frequência Vibracional (cm^{-1})					
	Cur	A1	A2	A3	A4	A5
ν OH	3448	3503	3510	3458	3514	3491
ν (C=O) cetona	1628	1621	1624	1616	1622	1620
ν (C=C) alifático	1514	1504	1504	1504	1506	1504
δ CO enol	1425	1435	1435	1437	1435	1435
ν (C–O) fenol	1282	1282	1280	1290	1292	1288
ν P–C	-	1095	1030	1085	1100	1095
ν P–F	-	840	840	844	840	844
δ P–F	-	557	559	557	557	559

ν = vibração de estiramento; δ = vibração no plano.

Outra técnica empregada na caracterização dos complexos **A1-A5** foi a espectrometria de massas, realizada usando um sistema Agilent 6545 qTOF MS, equipado com uma interface eletrospray (ESI) de Jet no modo positivo. Por meio desta, foi possível encontrar os sinais referentes ao íon molecular dos complexos monocatiônicos, com padrão isotópico do paládio, após a perda do contra-íon PF_6^- .

Para o complexo **A1** o pico predominante no espectro de massas obtido corresponde ao cátion complexo $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{PPh}_3)_2]^+$, sugerindo que esse complexo é altamente estável e não suscetível a fragmentação sob as condições do experimento, como mostrado na FIGURA 4. 2. Os demais complexos apresentaram o pico do cátions, como esperado, do tipo $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{PP})]^+$, porém também outras fragmentações são observadas, os espectros estão disponíveis na FIGURA A. 7, em Apêndice.

Os valores de razão massa/carga (m/z) para os cátions complexos estão de acordo com os valores esperados (teóricos), apresentando erro entre o valor teórico e experimental inferior a 2 ppm, como mostrado na TABELA 4. 4.

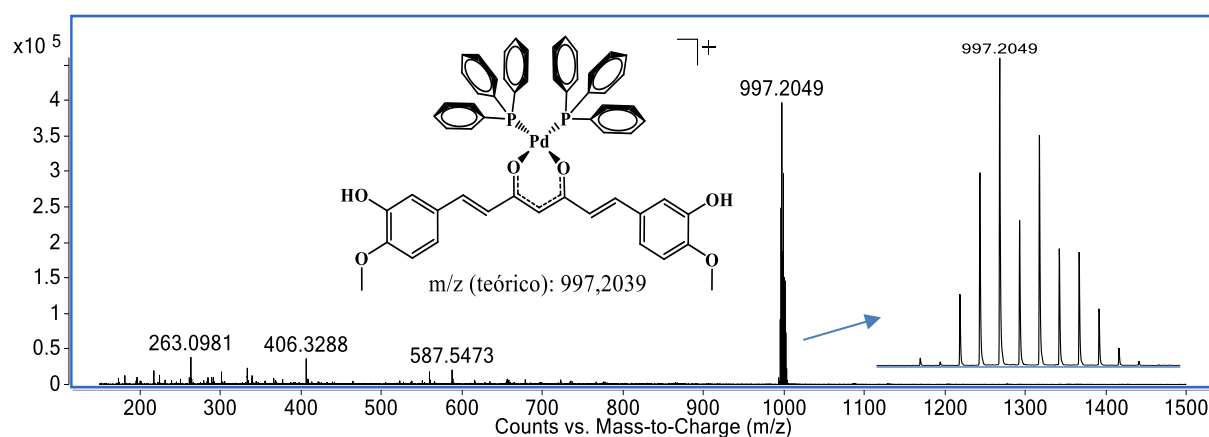


FIGURA 4. 2. Espectro de massas do complexo **A1**.

TABELA 4. 4. Razão massa carga (m/z) teóricos e experimentais, e erro em ppm, referentes ao pico $[\text{M}]^+$ dos complexos **A1-A5**.

Complexos $[\text{M}]^+$	m/z		Erro (ppm)
	Teórico	Experimental	
A1 - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{PPh}_3)_2]^+$	997,2039	997,2049	1,88
A2 - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppe})]^+$	871,1570	871,1575	0,57
A3 - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppp})]^+$	885,1726	885,1719	0,79
A4 - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppb})]^+$	899,1883	899,1879	0,44
A5 - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppf})]^+$	1027,1232	1027,1230	0,19

Uma técnica amplamente utilizada em nosso grupo de pesquisa é a ressonância magnética nuclear (RMN). Dentre os diversos núcleos que analisamos, destaca-se o núcleo do átomo de fósforo $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, que devido a sua abundância de 100% a obtenção de espectros é relativamente rápida, assim pode-se acompanhar a evolução da reação, adquirindo o espectro de alíquotas do meio reacional, utilizando-

se um capilar fechado contendo D₂O (reutilizável) no tubo. Desta forma, para a caracterização dos complexos finais, são empregadas também técnicas 1D e 2D em núcleos como carbono (¹³C) e hidrogênio (¹H), em solventes deuterados, para assim propor uma estrutura coerente com os dados obtidos.

Os espectros de RMN de ³¹P{¹H} dos precursores desta série apresentaram um singlete, em CH₂Cl₂/D₂O: *trans*-[PdCl₂(PPh₃)₂] 23,2 ppm; [PdCl₂(dppe)] 64,7 ppm; [PdCl₂(dppp)] 11,2 ppm; [PdCl₂(dppb)] 29,3 ppm e [PdCl₂(dppf)] 33,9 ppm. Após a coordenação da curcumina foi possível observar um singlete para todos os complexos, devido à equivalência magnética dos átomos de fósforo que estão *trans* aos átomos de oxigênio da curcumina. Nos complexos **A1** e **A5** os singletos deslocam-se para em regiões mais desblindadas do espectro de RMN de ³¹P{¹H} (para campo mais baixo), o que indica que o átomo de fósforo se encontra menos protegido, em relação ao precursor, ou seja, os fósforos estão doando mais em σ do que recebendo em π . No entanto, o contrário acontece para os complexos **A2**, **A3** e **A4**, pois os singletos deslocam-se para região mais blindada que nos precursores (FIGURA 4. 3). É possível ainda observar um septeto, por volta -140 ppm, referente à presença do contraíon PF₆⁻.

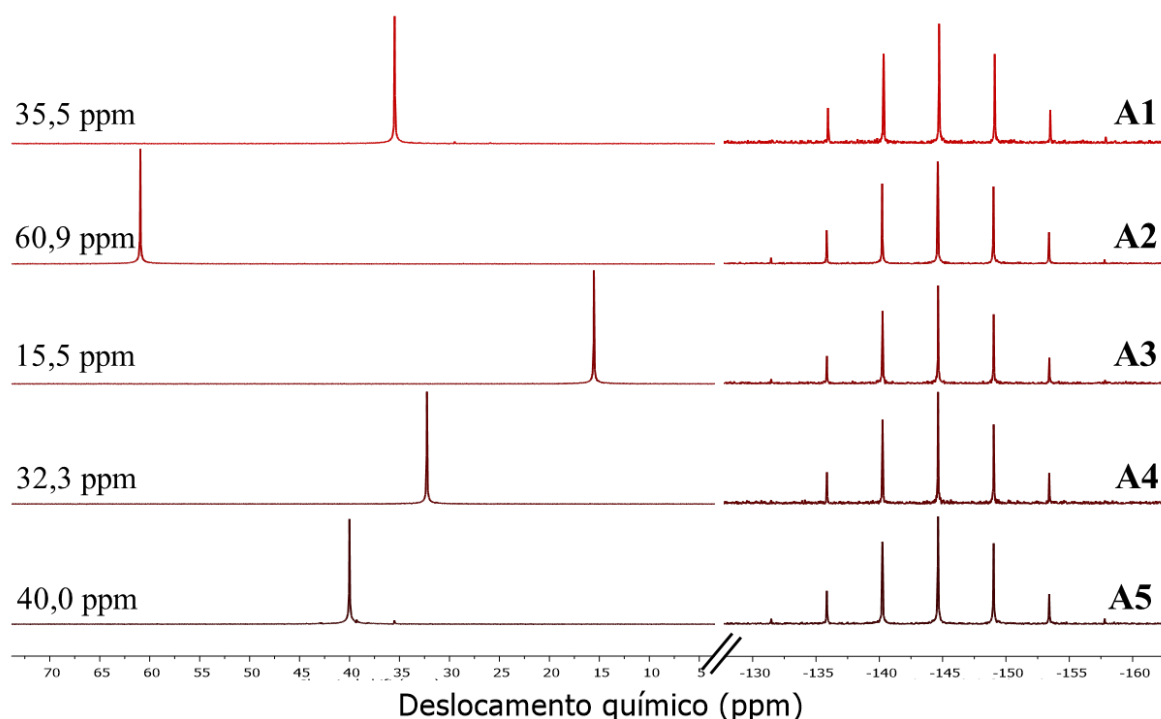


FIGURA 4. 3. Espectros de RMN de ³¹P{¹H} dos complexos **A1** – [Pd(cur)(PPh₃)₂]PF₆, **A2** – [Pd(cur)(dppe)]PF₆, **A3** – [Pd(cur)(dppp)]PF₆, **A4** – [Pd(cur)(dppb)]PF₆ e **A5** – [Pd(cur)(dppf)]PF₆, em CH₂Cl₂ (com capilar de D₂O).

Para melhor caracterização dos complexos foram realizados alguns experimentos com a curcumina. O espectro de RMN de ^1H da curcumina livre é duplicado, devido a molécula ter um plano de simetria, onde o H(1) se encontra no centro de simetria (Apêndice – Parte I, FIGURA A. 8). O hidrogênio do grupo enol não foi possível observar no espectro, pois participa da ressonância, e é o hidrogênio mais ácido da molécula, trocando facilmente com o deutério do solvente. A atribuição do espectro foi feita utilizando de comparação com dados da literatura e foi possível identificar que o produto encontra-se puro e concordante em número de hidrogênios, acoplamento e deslocamento químico.

No experimento de RMN de ^1H para os complexos pôde-se observar os sinais referentes aos ligantes curcumina e fosfina coordenados ao centro metálico. A FIGURA 4. 4 exemplifica os espectros obtidos, mostrando o complexo **A3**, onde tem-se a atribuição de todos os hidrogênios presentes nos ligantes coordenados ao paládio. Quatro regiões distintas de sinais se destacam. A primeira região corresponde aos hidrogênios alifáticos da fosfina (*a,b*) e próximo a estes os sinais das metoxilas da curcumina (H_{11}), a segunda região dos hidrogênios aromáticos e vinílicos da curcumina de δ 7,0-5,7 ppm, a terceira região de δ 7,5-8,0 ppm condizendo com os hidrogênios aromáticos da fosfinas (*o/m/p*) e um último sinal na região, em δ 8,15 ppm referente aos hidrogênios da hidroxila (H_{12}). Também pode-se observar que os acoplamentos e as integrais concordam com a estrutura proposta (vide Apêndice, FIGURA A. 2 – A. 6).

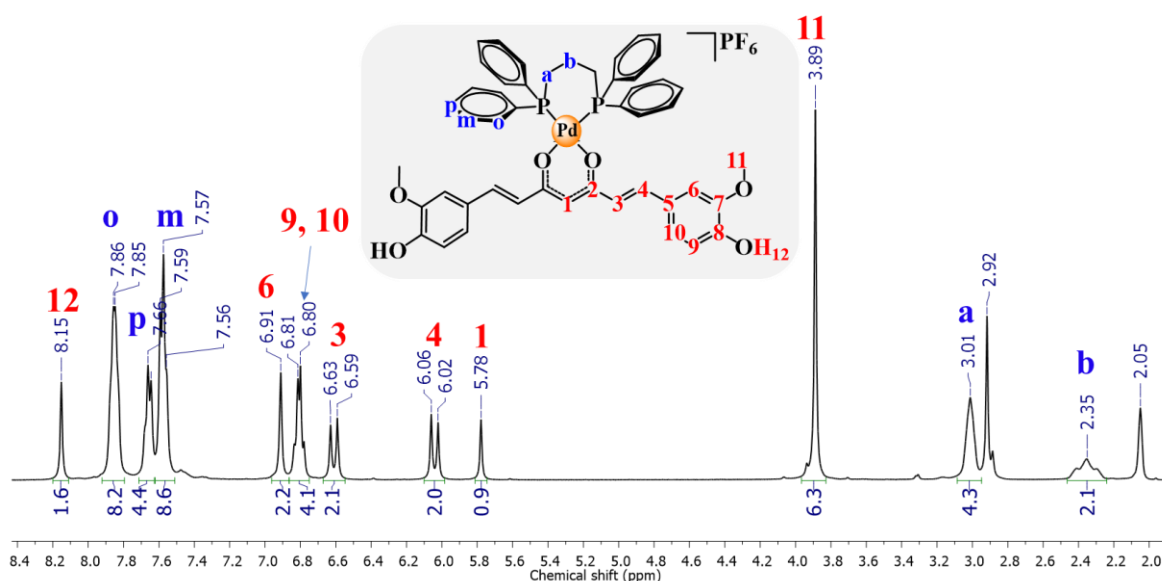


FIGURA 4. 4. Espectro de RMN de ^1H obtido para o complexo **A3**, em acetona- d_6 .

Os experimentos de mapas de contorno 2D ^1H - ^1H COSY confirmam as atribuições feitas para os complexos. Para o complexo **A2**, que exemplifica o obtido para a série A, observa-se os acoplamentos entre os hidrogênios vizinhos, como os exibidos entre os hidrogênios aromáticos das fosfinas (*o/m/p*), os hidrogênios do ligante curcumina (1/3/4/6/9/10), os hidrogênios da metoxila do ligante curcumina (11) e os hidrogênios alifáticos da dppe (*e*), conforme indicado na FIGURA 4. 5.

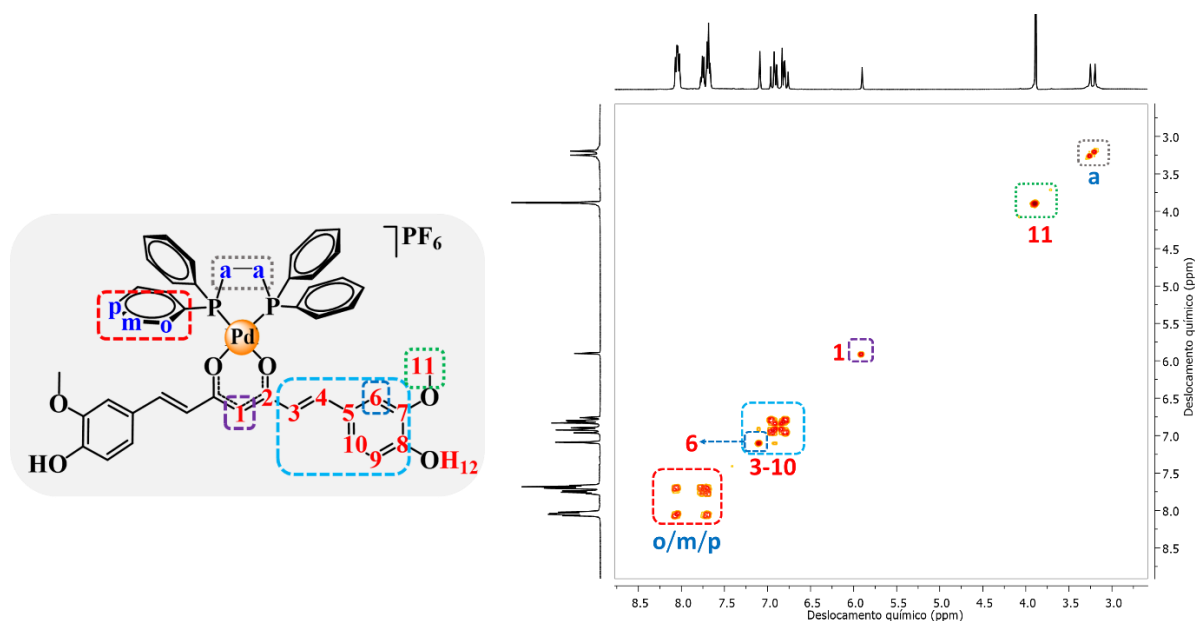


FIGURA 4. 5. Mapa de contorno ^1H - ^1H COSY obtido para o complexo **A2** em acetona- d_6 . Vê-se destacados os diferentes grupos de acoplamentos exibidos pelo complexo.

Nos espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de todos os complexos observou-se o sinal em região mais desblindada, em torno de 178 ppm, sendo ele atribuído ao carbono do grupo enol-cetona da curcumina coordenada. Este sinal apresenta um pequeno deslocamento para região mais blindada, em relação a curcumina livre (184 ppm) (FIGURA A. 13, no Apêndice – Parte I). O deslocamento químico encontrado para o carbono do grupo enol-cetona da curcumina coordenada é semelhante a complexos de Pd(II) com curcuminóides encontrado na literatura.⁷ O deslocamento químico desse sinal no RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ corrobora com os comprimentos de ligação encontrados no raio X, o qual não apresenta diferença significativa entre a curcumina livre e coordenada, pelo fato de já haver a ressonância antes da coordenação e a mesma se mantém após a coordenação.

Por meio dos espectros bidimensionais de HSQC (^1H - ^{13}C) e HMBC (^1H - ^{13}C) (FIGURA A. 11 – A. 12, em Apêndice – Parte I), que mostram acoplamentos entre

carbonos e hidrogênios que estão diretamente ligados e entre carbonos e hidrogênios a múltiplas ligações, respectivamente, facilitou a atribuição de todos os sinais observados nos espectros de carbono (^{13}C), como demonstrado para o complexo **A4** na FIGURA 4. 6 e para o restante dos complexos no Apêndice – Parte I, FIGURA A. 13.

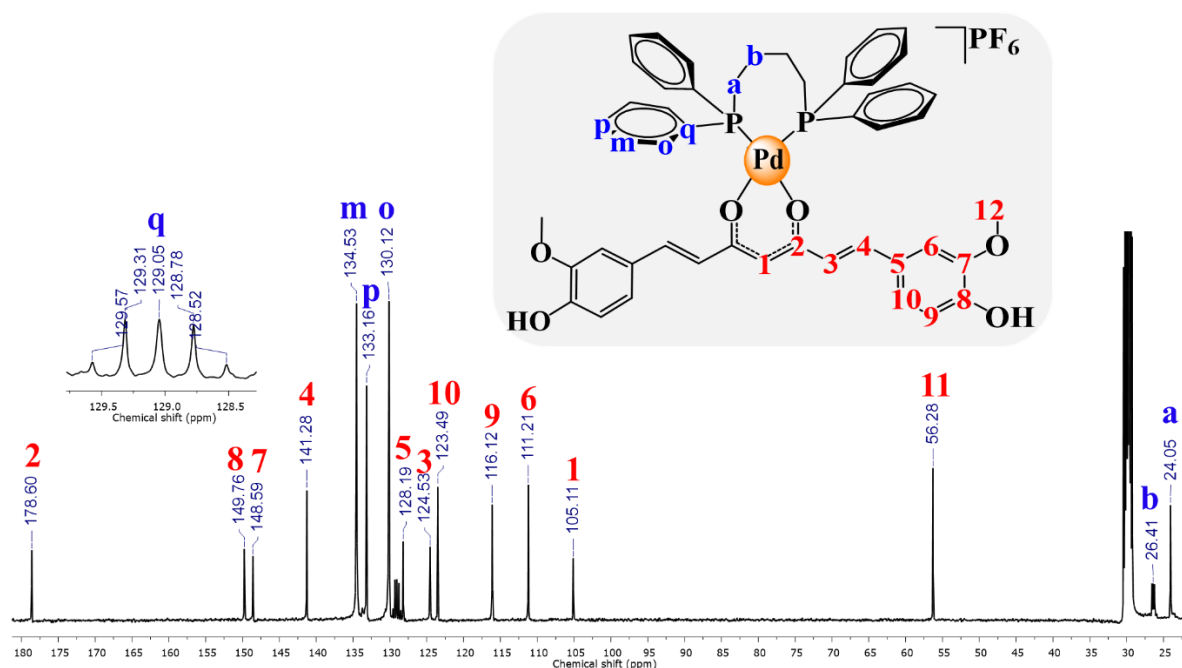


FIGURA 4. 6. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ obtido para o complexo **A4**, em acetona- d_6 .

Os complexos também foram investigados quanto às suas transições eletrônicas, por meio da espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível (200-800 nm). Quando uma molécula absorve energia, um elétron é promovido de um orbital ocupado para um orbital desocupado de maior energia potencial.⁹⁵ Na FIGURA 4. 7 apresenta-se um diagrama representativo, onde os níveis de menor energia são ocupados [σ , π e n (orbitais não ligantes)], e os níveis desocupados, ou antiligantes (π^* e σ^*), são aqueles de maior energia.

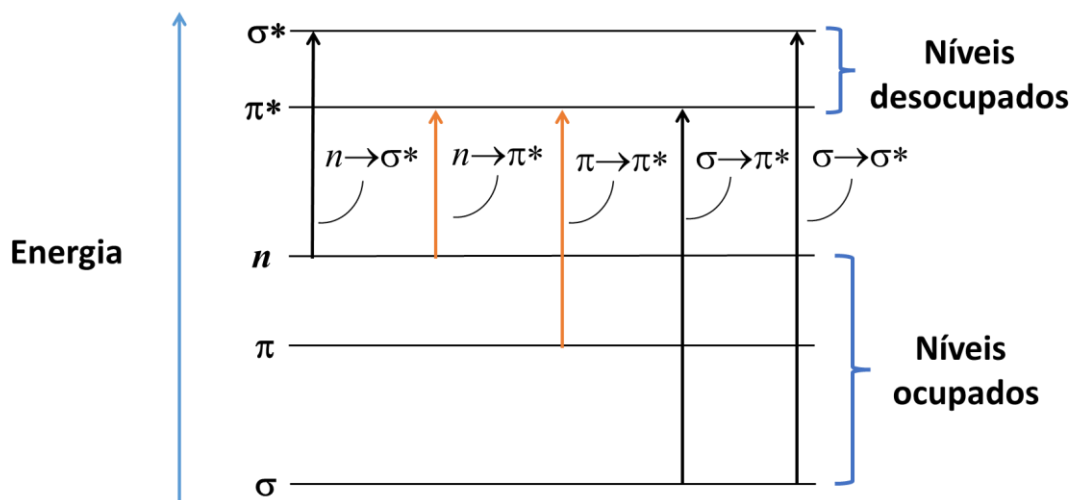


FIGURA 4. 7. Esquema representativo dos níveis de energia e transições, com destaque para transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$.

As principais bandas de absorção do ligante curcumina, no espectro de UV-vis é na região de 265, 374 (ombro) e 427 nm. A banda em 265 e 374 nm corresponde à transições $\pi \rightarrow \pi^*$, enquanto a banda em 427 nm pode ser devido à transição $n \rightarrow \pi^*$, ou a combinação das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$.^{93,96}

Os espectros dos complexos **A1-A5** apresentaram o mesmo perfil, uma banda com o máximo em aproximadamente 272 nm e outras duas bandas mais intensas com seus máximos em aproximadamente 478 e 468 nm, como mostrado na FIGURA 4. 8 (linha preta), para o complexo **A1**. O espectro do complexo **A1** foi deconvoluído em 11 componentes gaussianas. As 4 componentes gaussianas de mais alta energia (linha tracejada azul) foram atribuídas à transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ (FIGURA 4. 8). Estas bandas são tanto de transferência de carga interna (ILCT) do ligante curcumina, como já mencionado anteriormente, bem como a transições de transferência de carga interna dos anéis aromáticos dos do ligantes fosfínicos, $\pi \rightarrow \pi^*$, PPh_3 .^{95,97} As bandas de maior intensidade em 478 e 468 nm são formadas pela sobreposição de 3 bandas (linha tracejada em vermelho), como demonstrado pela deconvolução do espectro, estas são atribuídas a transições $n \rightarrow \pi^*$. Por fim, as bandas de menor intensidade (linha tracejada em verde) podem ser atribuídas a transição de metal para o ligante curcumina (MLCT, $\text{Pd} \rightarrow \pi^*$) ou transições $d-d$ do centro metálico Pd.

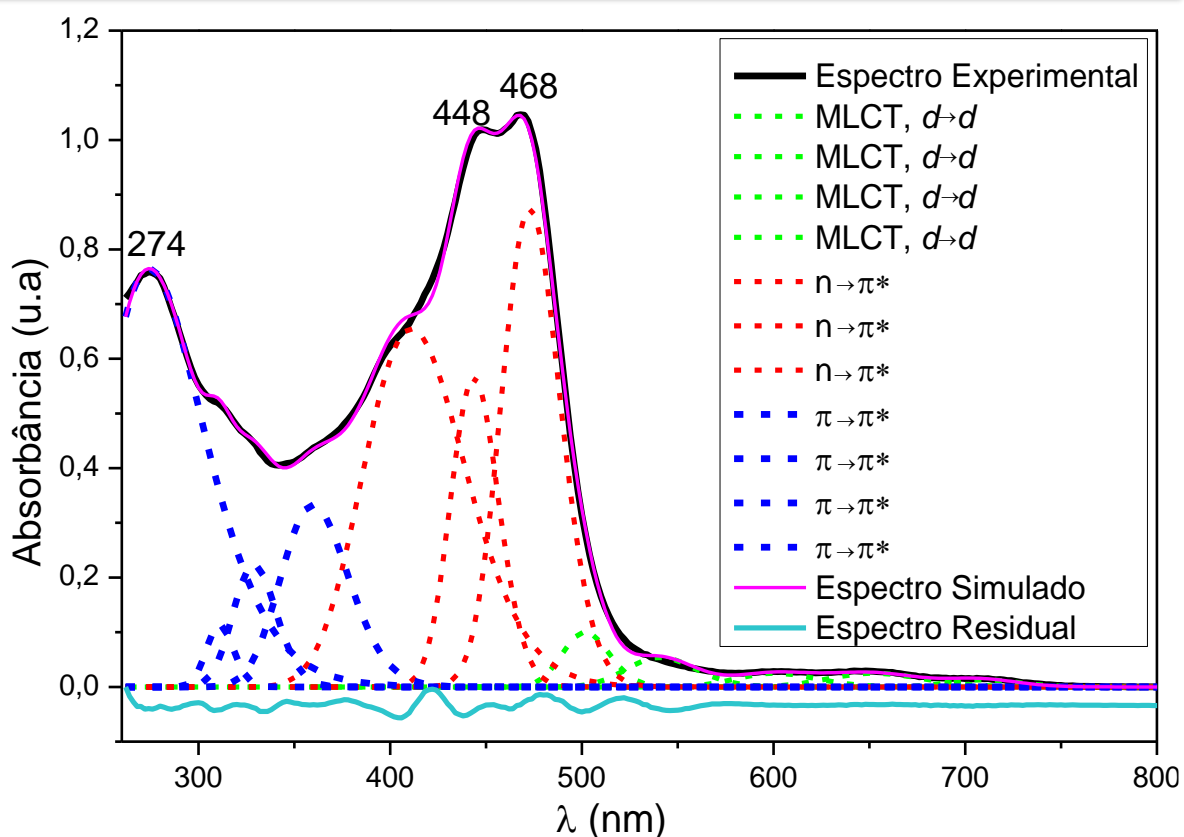


FIGURA 4. 8. Espectro eletrônico experimental (obtido em DMSO), deconvolução e atribuição tentativa das bandas do complexo **A1**.

A TABELA 4. 5 mostra os comprimentos de onda máximos das bandas observadas, bem como os respectivos valores de absorvidades molares (ϵ) de todos os complexos, além da atribuição tentativa das bandas. A absorvidade molar foi calculada graficamente a partir da relação entre absorbância e concentração do composto, dada pela lei de Lambert-Beer ($A = \epsilon bC$), em que, b e C são o comprimento da célula (1 cm para a cubeta de quartzo usada) e a concentração do cromóforo respectivamente, ϵ é dado pelo coeficiente angular da curva A versus $[C]$. As curvas referentes aos complexos **A1-A5** são apresentadas na FIGURA A. 14, na seção de Apêndice – Parte I.

TABELA 4. 5. Comprimento de onda de absorção máxima (λ , nm) absorvidade molar (ϵ , L mol⁻¹ cm⁻¹) e atribuição tentativa das bandas. Os espectros eletrônicos experimentais foram registrados em soluções dos complexos em DMSO.

Complexos	λ (nm)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Transições
A1 - [Pd(cur)(PPh ₃) ₂]PF ₆	276	34369	ILCT, $\pi \rightarrow \pi^*$
	448, 468	47007, 48277	$n \rightarrow \pi^*$ / $n \rightarrow \pi^*$
A2 - [Pd(cur)(dppe)]PF ₆	272	38432	ILCT, $\pi \rightarrow \pi^*$
	448, 468	55770, 59179	$n \rightarrow \pi^*$ / $n \rightarrow \pi^*$
A3 - [Pd(cur)(dppp)]PF ₆	268	38638	ILCT, $\pi \rightarrow \pi^*$
	446, 468	52960, 57954	$n \rightarrow \pi^*$ / $n \rightarrow \pi^*$
A4 - [Pd(cur)(dppb)]PF ₆	272	36075	ILCT, $\pi \rightarrow \pi^*$
	448, 470	46129, 50752	$n \rightarrow \pi^*$ / $n \rightarrow \pi^*$
A5 - [Pd(cur)(dppf)]PF ₆	274	38872	ILCT, $\pi \rightarrow \pi^*$
	448, 468	45738, 49780	$n \rightarrow \pi^*$ / $n \rightarrow \pi^*$

Os ensaios de atividade antioxidante dos compostos foram realizados, uma vez que a curcumina é um antioxidante natural, devido à presença de grupos fenóis ligados ao anel.⁶⁴ O ensaio de avaliação da capacidade de sequestro de radicais livres pelo DPPH é um método amplamente empregado. O DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) é um radical livre estável, que na presença de um elétron ou de um radical de hidrogênio acessível, se converte em uma molécula diamagnética estável. Sob a forma de radical, o DPPH• exibe uma coloração púrpura e uma absorção distintiva de luz em 517 nm. Essa coloração púrpura desaparece quando ocorre a transferência de elétrons do composto antioxidante para o radical livre, transformando o DPPH em uma coloração amarela (FIGURA 4. 9).

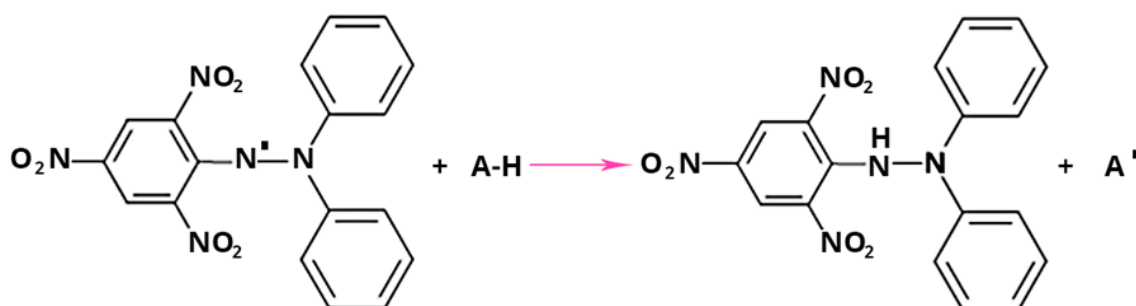


FIGURA 4. 9. Esquema representativo do teste de sequestro de radicais livres DPPH.

A TABELA 4. 6 apresenta os valores de IC_{50} (30 minutos de incubação), que representa a concentração do composto utilizado para eliminar 50% dos radicais livres. O complexo **A1** apresentou maior atividade antioxidante da série, com valor menor até que o ácido ascórbico, que é um poderoso antioxidante. Além disso, o complexo **A2** apresentou uma atividade oxidante similar ao ácido ascórbico.

TABELA 4. 6. Teste de IC_{50} para atividade sequestradora de radicais livres (30 min).

Compostos	IC_{50} (μM)
Ácido Ascórbico	20,70 \pm 2,42
A1	14,82 \pm 0,84
A2	19,08 \pm 0,78
A3	48,41 \pm 0,26
A4	34,19 \pm 2,89
A5	25,26 \pm 1,28

Para a realização dos testes biológicos uma importante informação é conhecer a estabilidade dos complexos sintetizados, em solução, principalmente no meio biológico utilizado na cultura das células e no solvente utilizado para dissolver os compostos (DMSO). Assim, primeiramente, por meio da técnica de RMN de $^{31}P\{^1H\}$ foi avaliada a estabilidade dos complexos em DMSO em 0, 24 e 48 horas. Os complexos **A1-A5** foram solubilizados em DMSO (um capilar de D_2O foi utilizado como referência) e imediatamente foi registrado um espectro de RMN de $^{31}P\{^1H\}$, depois foram registrados espectros em 24 e 48 horas. Os complexos foram estáveis em DMSO em até 48 horas, como mostrado para o complexo **A1**, na FIGURA 4. 10 e na seção de Apêndice, na FIGURA A. 15 para os demais complexos.

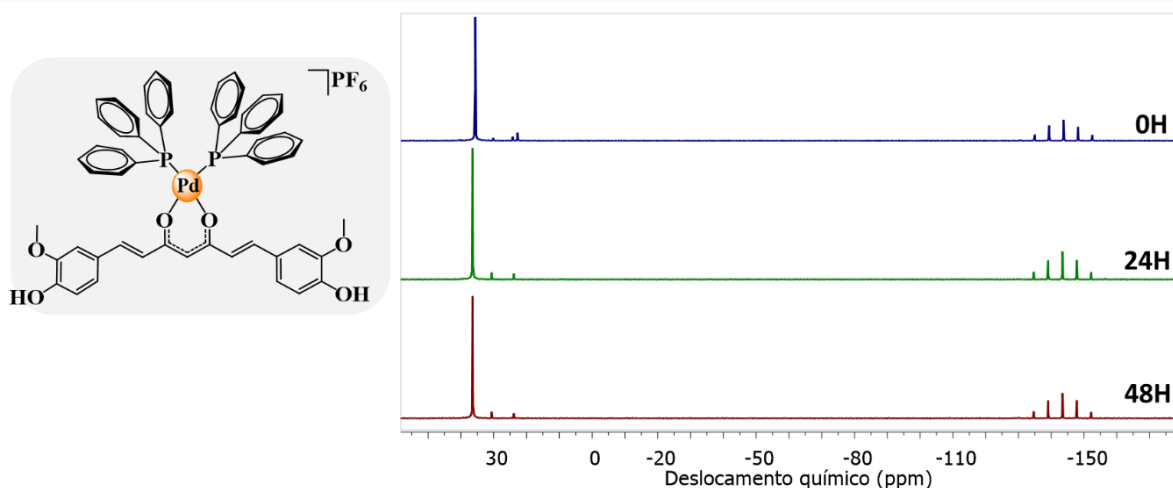


FIGURA 4. 10. Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ de **A1** em DMSO, em diferentes tempos.

Foram registrados espectros de UV-vis das soluções dos complexos **A1-A5** (20 μM) em RPMI sem fenol e 0,5% DMSO, em 0, 24 e 48 horas, para avaliar a estabilidade dos complexos nas condições dos ensaios biológicos. Houve uma diminuição da intensidade das bandas em até 48 horas para todos os complexos desta série, como mostrado na FIGURA 4. 11, indicando uma decomposição dos complexos em meio de cultura com o passar do tempo.

A estabilidade da curcumina livre também foi avaliada, nas condições experimentais utilizadas. Como apresentado anteriormente, a literatura mostra que a curcumina possui uma instabilidade em condições fisiológicas, formando diferentes subprodutos.^{48,98} Ao compararmos os espectros dos complexos sintetizados com o espectro da curcumina livre, pode-se ver que a curcumina livre se decompõe mais rapidamente, pois já em 24 horas de mistura há um completo desaparecimento da banda na região de 450 nm. A literatura traz que a biciclopentadiona é o principal produto formado a partir da auto oxidação da curcumina, podendo então ser este o produto formado.^{47,48} Os complexos **A1**, **A4** e **A5** se degradam mais lentamente, apresentando ainda uma banda de baixa intensidade em torno de 450 nm em 48 horas de mistura (FIGURA 4. 11).

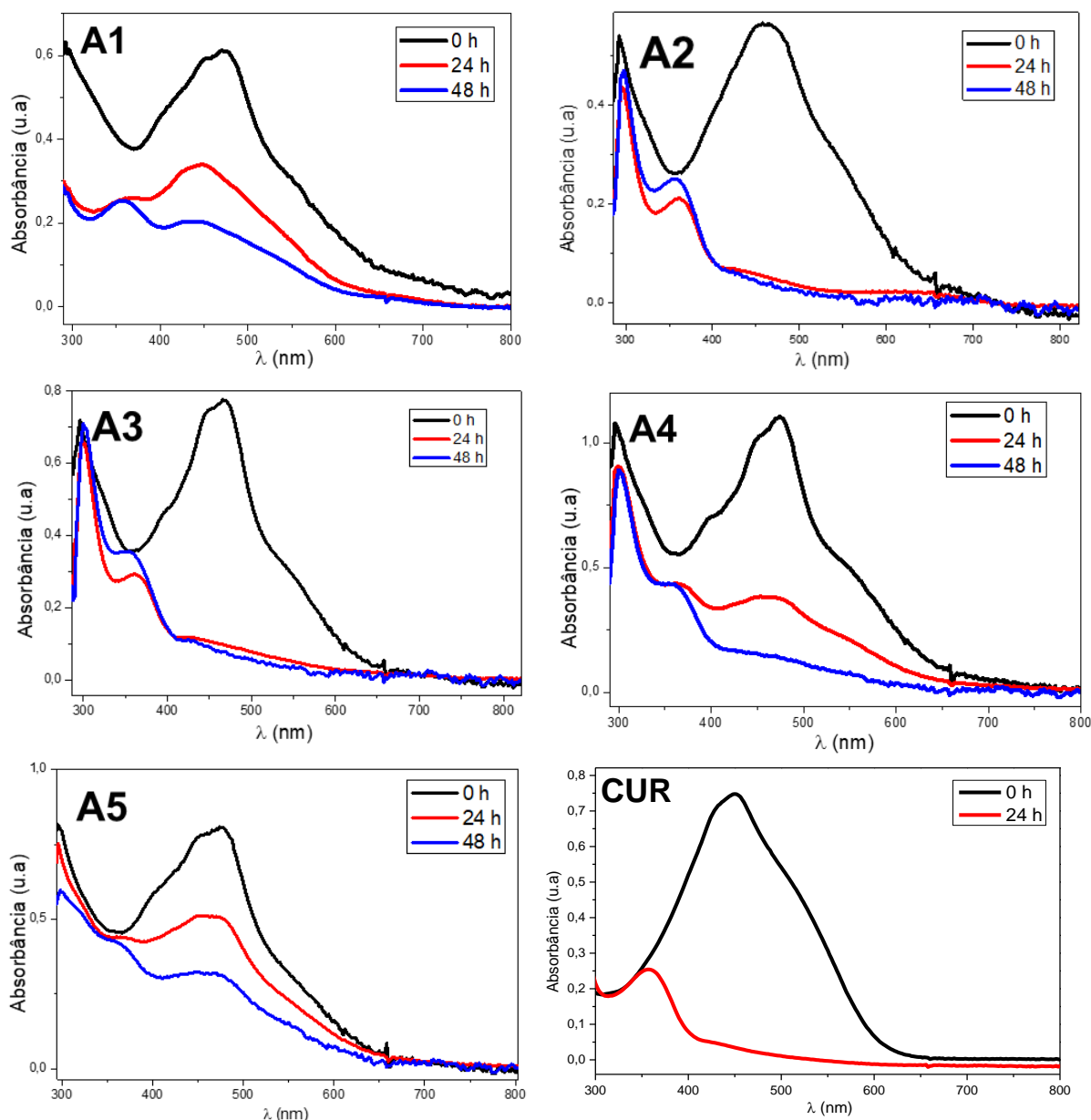


FIGURA 4. 11. Espectros UV-vis do complexo **A1-A5** e curcumina, ambos a 20 μM , em 0,5% DMSO e meio de cultura RPMI sem fenol (99,5 %) em diferentes tempos.

4.2 Estudos biológicos dos complexos da série A

O efeito dos complexos na viabilidade celular foi avaliada empregando o método de MTT.⁸⁰ Os valores de IC_{50} (concentração inibitória de 50% da viabilidade celular) foram calculados para as linhagens celulares tumorais MDA-MB-231 (mama, triplo negativo), MCF-7 (mama, ER positiva), SKBR-3 (mama, superexpressão de HER2/neu), A549 (pulmão), DU-145 (próstata), A2780 (ovário) e A2780cis (ovário resistente a cisplatina) e para as linhagens não tumorais MCF-10A (mama) e MRC-5 (pulmão). A TABELA 4. 7 mostra os resultados de IC_{50} obtidos para os complexos sintetizados, precursores, curcumina e para o fármaco de referência cisplatina e as

curvas de concentração-resposta são mostradas na FIGURA A. 16, na seção de apêndice – Parte I.

Os resultados mostraram que de modo geral os complexos exibiram valores menores de IC_{50} que a curcumina livre e que os precursores. Os complexos **A1-A5** não foram muito ativos (apresentam altos valores de IC_{50}) contra as linhagens de células tumorais MCF-7, A549 e DU-145, e nas linhagens celulares não tumorais MCF-10A e MRC-5. Os resultados de IC_{50} encontrados para os complexos de **A1-A5**, na linhagem de células MCF-7, são semelhantes ao já observado para outros complexos Pd/bipy/curcumina na mesma linhagem.⁹¹ Na linhagem de células MDA-MB-231 os complexos **A1** e **A5** se destacaram, com seus menores valores de IC_{50} , por volta de 5 $\mu\text{mol/L}$. Porém, os complexos se mostraram mais ativos (menores valores de IC_{50}) contra as linhagens de ovário, como é o caso do complexo **A1** que mostrou um muito baixo valor de IC_{50} nas linhagens de células A2780 ($0,5 \pm 0,1 \mu\text{mol/L}$) e A2780cis ($1,4 \pm 0,4 \mu\text{mol/L}$).

Um dos parâmetros correlacionados com os resultados de citotoxicidade é a lipofilicidade dos compostos (TABELA 4. 7). O coeficiente de partição em n-octanol/ meio aquoso é uma medida quantitativa da lipofilicidade e desempenha um papel essencial no desenvolvimento de compostos para aplicações biológicas, uma vez que está relacionado com processos como distribuição, absorção e outros no ambiente biológico.^{99,100} Valores positivos dos coeficientes de partição indicam que os complexos **A1-A5** têm uma afinidade maior pela fase orgânica em comparação com a fase aquosa. Esse método é frequentemente utilizado para avaliar a capacidade de um composto de atravessar as membranas plasmáticas, compostas por uma bicamada lipídica, por difusão passiva. Os resultados dos coeficientes de partição sugerem que os complexos da série A podem atravessar a membrana plasmática por difusão passiva devido à sua natureza lipofílica. Contudo, não é possível estabelecer uma relação direta com os valores de lipofilicidade e citotoxicidade para os complexos da série.

TABELA 4. 7. Valores de IC₅₀ obtidos para os complexos **A1-A5** (**A1** - [Pd(cur)(PPh₃)₂]₂PF₆; **A2** - [Pd(cur)(dppe)]PF₆; **A3** - [Pd(cur)(dppp)]PF₆; **A4** - [Pd(cur)(dppb)]PF₆; **A5** - [Pd(cur)(dppf)]PF₆), precursores (**P1** - [PdCl₂(PPh₃)₂]; **P2** - [PdCl₂(dppe)]; **P3** - [PdCl₂(dppp)]; **P4** - [PdCl₂(dppb)]; **P5** - [PdCl₂(dppf)]), curcumina (cur) e cisplatina (CDDP) frente as linhagens celulares tumorais (MDA-MB-231, MCF-7, SKBR-3, DU-145, A2780 e A2780cis) e não tumorais (MCF-10A e MRC-5) após 48 horas de tratamento.

Comp.	IC ₅₀ (μmol/L) 48 h								
	MDA-MB-231	MCF-7	SKBR-3	MCF-10A	DU-145	A2780	A2780cis	MRC-5	log P
A1	5,0 ± 0,2	24,8 ± 0,2	15,2 ± 0,8	≥40	12,6 ± 0,4	0,5 ± 0,1	1,4 ± 0,4	≥40	0,58 ± 0,08
A2	10,7 ± 0,2	22,6 ± 0,3	9,1 ± 0,8	12,8 ± 1,2	18,6 ± 0,4	5,2 ± 0,8	4,9 ± 0,5	≥40	0,27 ± 0,04
A3	15,9 ± 0,7	12,0 ± 1,1	7,2 ± 0,3	22,5 ± 1,7	18,5 ± 1,3	3,7 ± 0,3	11,8 ± 0,5	15,3 ± 0,3	0,14 ± 0,05
A4	13,4 ± 0,7	15,1 ± 0,4	9,6 ± 0,2	≥40	22,9 ± 0,6	1,1 ± 0,2	12,3 ± 0,3	≥40	0,59 ± 0,04
A5	5,8 ± 0,3	≥40	8,8 ± 0,3	≥40	≥40	5,9 ± 0,8	27,9 ± 0,6	≥40	0,23 ± 0,04
P1	≥25	≥25	≥25	n.t	n.t	n.t	≥25	n.t	n.t
P2	≥50	≥50	≥50	n.t	n.t	≥50	≥50	n.t	n.t
P3	≥50	≥50	≥50	n.t	n.t	n.t	≥50	n.t	n.t
P4	≥25	≥25	≥25	n.t	n.t	n.t	≥25	n.t	n.t
P5	≥50	≥40	≥40	n.t	n.t	n.t	9,9 ± 0,9	n.t	n.t
Cur	40,6 ± 0,5	36,8 ± 1,6	n.t	n.t	n.t	8,0 ± 0,3	22,7 ± 2,5	17,4 ± 0,2	n.t
CDDP	10,2 ± 0,2*	13,9 ± 2,0	10,2 ± 0,9	29,4 ± 0,8	2,3 ± 0,4	11,8 ± 0,8	31,8 ± 1,8	29,1 ± 0,8	29,1 ± 0,8

*Referência⁶⁴; n. t: não testado.; **A1-A5** IC₅₀ (A549): ≥40 μmol/L.

Um dos principais fatores analisados para triagem dos complexos é a seletividade, a qual se refere à habilidade dos complexos serem mais ativos frente às células tumorais, quando comparada às células não tumorais. De posse dos resultados de IC_{50} foi possível calcular os índices de seletividades, os quais são obtidos a partir da divisão dos valores de IC_{50} das células não tumorais pelos valores de IC_{50} nas células tumorais, como mostrado na TABELA 4. 8. Observou-se uma maior seletividade dos complexos frente as células de ovário, quando comparada com as células de mama. O complexo **A1** se destacou nesta série por possuir um excelente índice de seletividade em ambas linhagens de células de ovário, com valores de ≥ 40 e ≥ 28 , para as linhagens de células A2780 e A2780cis, respectivamente.

TABELA 4. 8. Índices de seletividade (IS), obtidos a partir da divisão dos valores de IC_{50} .

Compostos	IS ¹	IS ²	IS ³	IS ⁴	IS ⁵
A1 - [Pd(cur)(PPh ₃) ₂]PF ₆	$\geq 8,0$	$\geq 1,6$	$\geq 2,6$	$\geq 40,0$	$\geq 28,6$
A2 - [Pd(cur)(dppe)]PF ₆	1,2	-	1,4	$\geq 7,7$	$\geq 8,2$
A3 - [Pd(cur)(dppp)]PF ₆	1,4	1,9	3,1	4,1	1,3
A4 - [Pd(cur)(dppb)]PF ₆	$\geq 3,0$	$\geq 2,6$	$\geq 4,2$	$\geq 36,4$	$\geq 3,2$
A5 - [Pd(cur)(dppf)]PF ₆	$\geq 6,9$	-	$\geq 4,5$	$\geq 6,8$	$\geq 1,4$
Curcumina	-	-	-	2,2	-
CDDP	2,9	2,1	2,9	12,8	0,9

IS¹ = IC_{50} MCF-10A/ IC_{50} MDA-MB-231; IS² = IC_{50} MCF-10A/ IC_{50} MCF-7; IS³ = IC_{50} MCF-10A/ IC_{50} SKBR-3; IS⁴ = IC_{50} MRC-5/ IC_{50} A2780; IS⁵ = IC_{50} MRC-5/ IC_{50} A2780cis

A curcumina é um tipo de fotossensibilizador natural, que pode ativar uma resposta fotodinâmica por meio da radiação luminosa e atuar dentro da célula. Alguns autores descrevem que o mecanismo de ação da curcumina seja através da geração de ROS.^{46,101} Deste modo, foi avaliada a viabilidade celular das células A2780cis, tratadas com os complexos e irradiadas em 460-465 nm, por 15 minutos. Como pode-se observar na TABELA 4. 9, com incidência de luz os valores de IC_{50} calculados foram bem menores em comparação aos sem irradiação, indicando que esses complexos podem ser utilizados em terapia fotodinâmica. Porém, mais estudos se fazem necessários para comprovar esta hipótese.

TABELA 4. 9. Valores de IC₅₀ obtidos na linhagem celular A2780cis, irradiado com luz de led em 460 – 465 nm (15 min) e sem irradiação, para os complexos **A1-A5**.

Complexos	IC ₅₀ (μmol/L) 48 h	
	Sem irradiar	Irradiado
A1 - [Pd(cur)(PPh ₃) ₂]PF ₆	1,4 ± 0,4	0,6 ± 0,2
A2 - [Pd(cur)(dppe)]PF ₆	4,9 ± 0,5	2,6 ± 0,4
A3 - [Pd(cur)(dppp)]PF ₆	11,8 ± 0,5	3,7 ± 0,2
A4 - [Pd(cur)(dppb)]PF ₆	12,3 ± 0,3	6,9 ± 0,8
A5 - [Pd(cur)(dppf)]PF ₆	27,9 ± 0,6	12,0 ± 2,0

Assim, frente aos resultados promissores apresentados pelos complexos desta série, decidiu-se prosseguir com demais estudos biológicos com o complexo **A1**, na linhagem A2780cis, pois o mesmo apresentou um bom índice de seletividade e também baixo valor de IC₅₀.

Para analisar as mudanças morfológicas promovidas pelo complexo **A1**, na linhagem tumoral A2780cis, as células foram tratadas com diferentes concentrações do complexo (proporcionais aos valores de IC₅₀) e micrografias foram feitas antes do tratamento (0 h) e em 24 e 48 horas de tratamento com o complexo. Na FIGURA 4. 12 se vê as micrografias obtidas, onde observou-se nas concentrações >IC₅₀ alterações como diminuição de densidade celular, aparecimento de células redondas e perda de adesão celular, o que é indicativo de morte celular.¹⁰² Essas alterações são intensificadas com o aumento da concentração e com o tempo de exposição das células ao complexo **A1**.

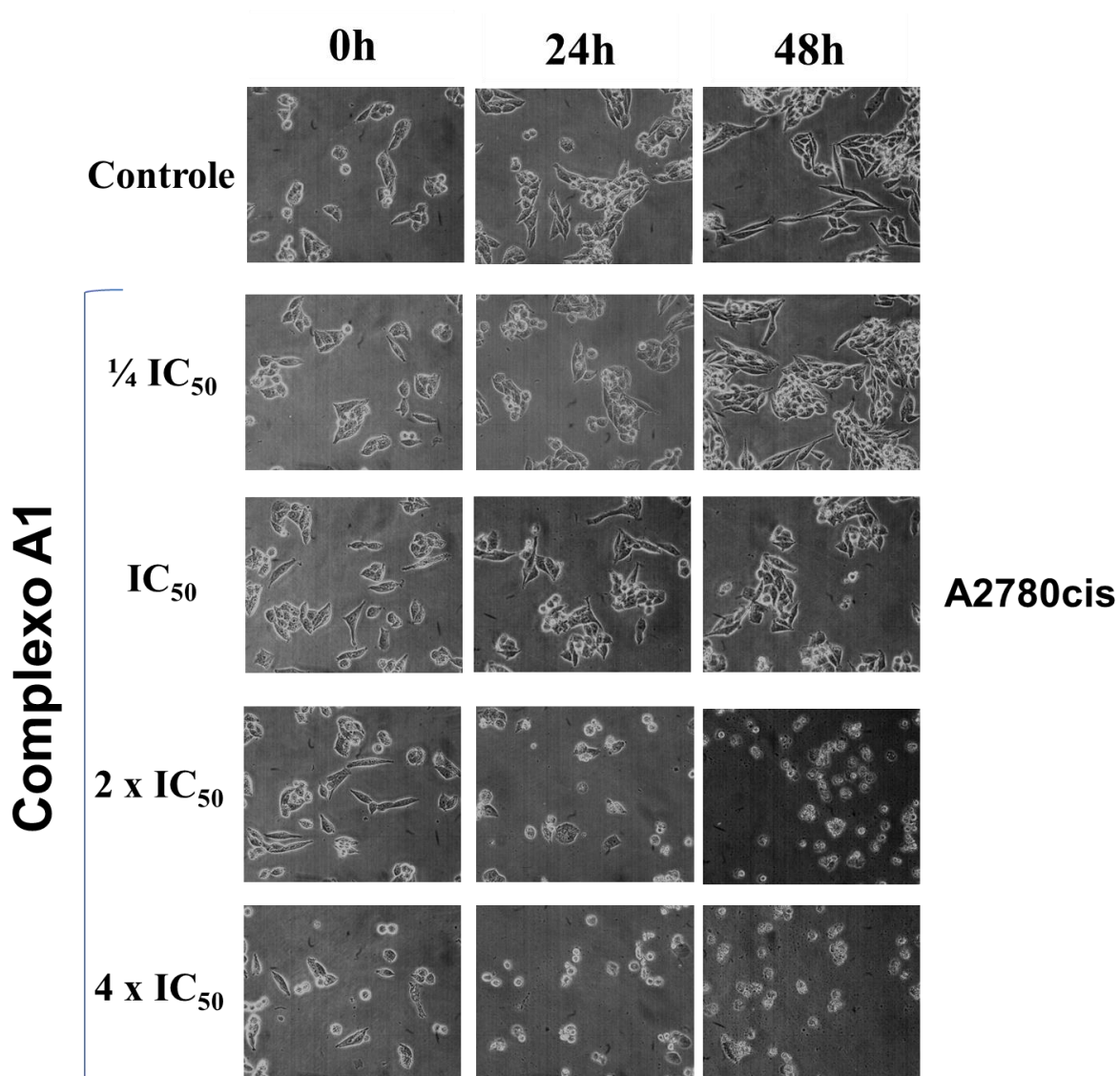


FIGURA 4. 12. Micrografias das células A2780cis após tratamento com o complexo **A1** em diferentes concentrações ($1/4 \times IC_{50}$ (0,3 μ M), IC_{50} (1,4 μ M), $2 \times IC_{50}$ (2,8 μ M) e $4 \times IC_{50}$ (5,6 μ M)) e tempos de exposição.

Para comparação, a análise morfológica também foi realizada na linhagem de células não tumorais de pulmão (MRC-5), tratadas com o complexo **A1**. Na FIGURA 4. 13, pode-se observar que apenas em 48 horas na concentração de 40 μ mol/L o complexo **A1** foi capaz de causar danos as células, pois observa-se uma menor densidade de células aderidas a placa e algumas no formato arredondado, quando comparada ao controle. Esses resultados morfológicos são consistentes com os do ensaio de MTT, em que o valor de IC_{50} é maior que 40 μ mol/L (maior concentração testada).

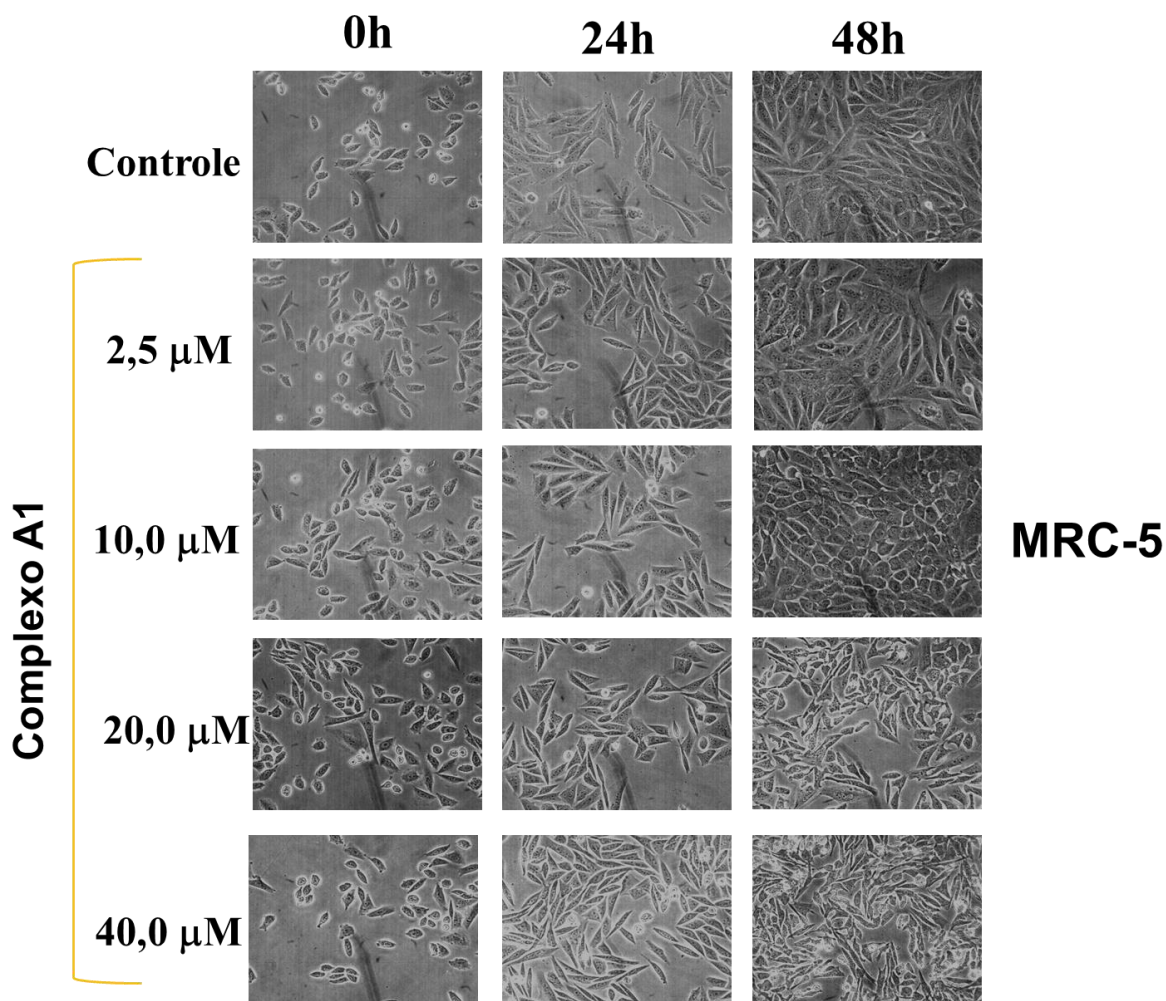


FIGURA 4. 13. Micrografias das células MRC-5 após tratamento com o complexo **A1** em diferentes concentrações e tempos de exposição.

A migração celular está diretamente associada à metástase, que representa o fenômeno pelo qual as células cancerígenas se propagam a partir do tumor original para tecidos e órgãos distantes.¹⁰³ Esse processo é a principal responsável pelas fatalidades relacionadas ao câncer, enfatizando a importância do desenvolvimento de compostos com a capacidade de inibir a migração celular como uma estratégia crucial no tratamento dessa enfermidade.^{104,105} Nesse contexto, o complexo **A1** passou por investigação quanto à sua habilidade de suprimir a migração celular, por meio da execução do ensaio de cicatrização de feridas (*Wound Healing*). Tal método envolve a criação de uma incisão controlada na monocamada celular, que apresenta uma confluência de aproximadamente 80%, seguida pelo subsequente tratamento utilizando as soluções dos referidos complexos.^{106,107}

Após o tratamento, observou-se que com o complexo **A1** é capaz de inibir a migração celular nas concentrações utilizadas, somente no tempo de 24h, uma

vez que no tempo de 48h na presença do complexo e na ausência não houve fechamento completo da risca (FIGURA 4. 14). É importante destacar que as concentrações empregadas do complexo foram mantidas abaixo do valor de IC_{50} , garantindo assim que o efeito observado fosse exclusivamente relacionado à inibição da migração celular, sem qualquer efeito citotóxico.

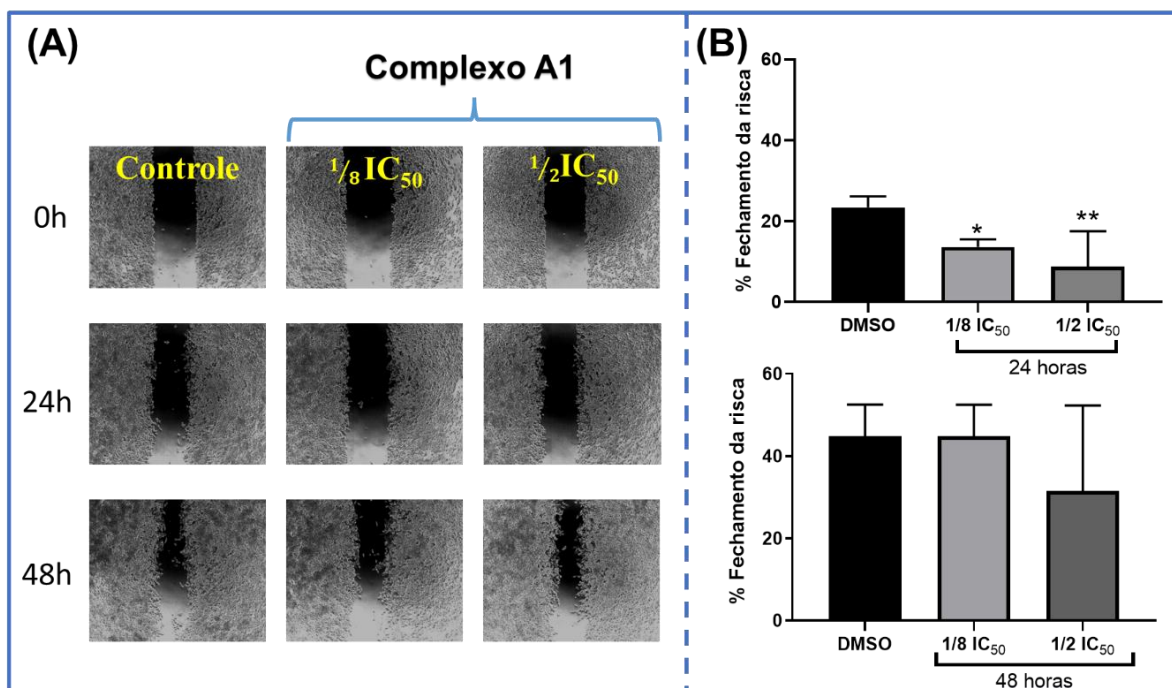


FIGURA 4. 14. (A) Micrografias das células A2780cis obtidas no ensaio de *Wound Healing* no qual avaliou-se o efeito na migração celular do complexo **A1** nas concentrações $1/8 \times IC_{50}$ ($0,2 \mu M$) e $1/2 \times IC_{50}$ ($0,7 \mu M$) (lente objetiva utilizada no experimento foi com aumento de $4\times$). (B) Representação gráfica da porcentagem de fechamento da risca após 24 e 48 h de incubação com o complexo. As imagens apresentadas são representativas de cada condição e os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Dunnet's.

O ensaio de sobrevivência clonogênica mede a capacidade de uma única célula proliferar indefinidamente e formar uma colônia de pelo menos 50 células.¹⁰⁸ Portanto, por meio deste ensaio, avaliou-se a potência citotóxica e a capacidade proliferativa das células tratadas com **A1** contra células A2780cis e MRC-5. Para a linhagem celular A2780cis, os resultados mostraram que o complexo **A1** inibiu significativamente a área e a intensidade das colônias a de maneira dependente da concentração após 48 h de tratamento (FIGURA 4. 15), indicando efeitos citotóxicos e citostáticos, ou seja, são capazes de interferir no crescimento,

desenvolvimento e na multiplicação celular e também atuam na morte das células tumorais.

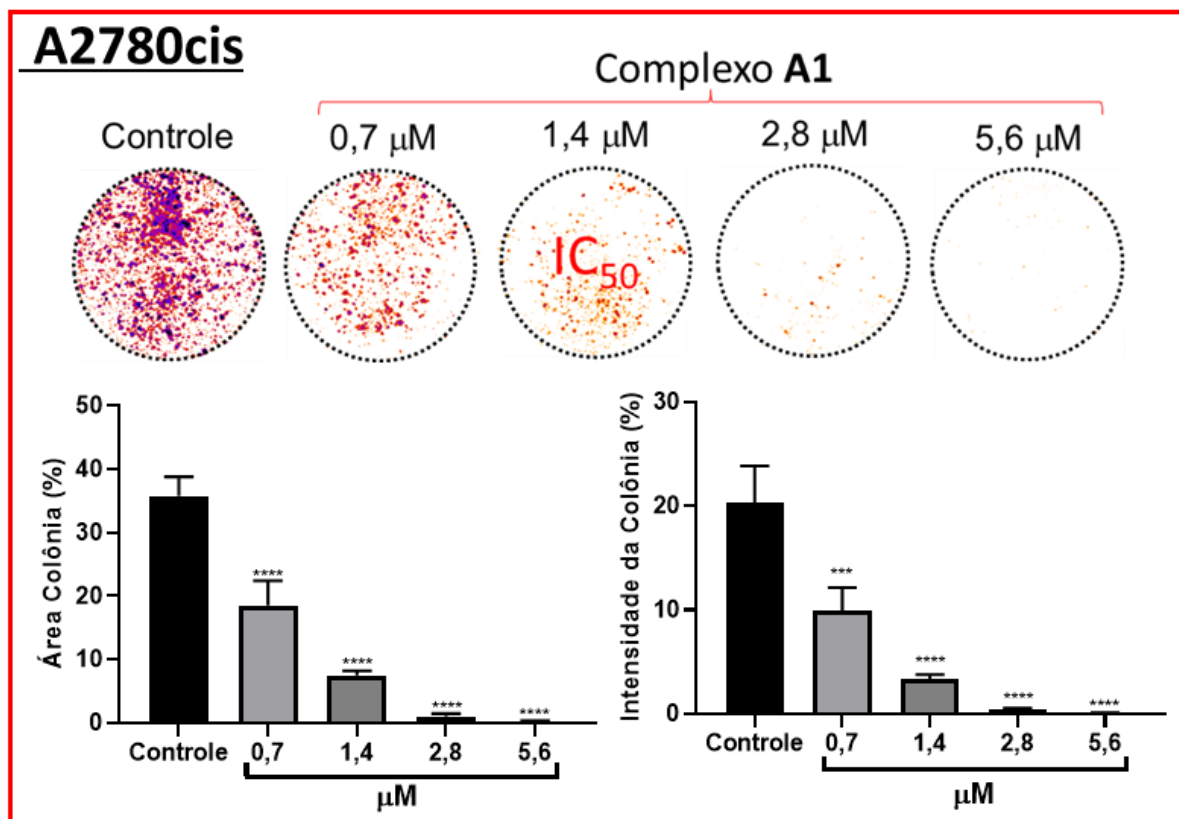


FIGURA 4. 15. Sobrevivência clonogênica das células A2780cis tratadas com diferentes concentrações ($1/2 \times IC_{50}$ (0,7 μM), IC_{50} (1,4 μM), $2 \times IC_{50}$ (2,8 μM) e $4 \times IC_{50}$ (5,6 μM)) do complexo **A1** por 48 horas. A representação dos poços e limiões para o experimento é mostrada junto com as quantificações gráficas da área e intensidade das colônias. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,005$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Dunnet's.

Para comparação, foi realizado o ensaio de formação de colônias também com as células saudáveis MRC-5 (FIGURA 4. 16). Após o tratamento com a mesma concentração do complexo **A1** utilizada no ensaio anterior foi possível observar uma pequena diminuição na área e na intensidade das colônias apenas na concentração de 5,6 μM (equivalente a $4 \times IC_{50}$ na célula A2780cis), isso indica que complexo **A1** é muito seletivo para as células tumorais A2780cis, pois o efeito citotóxico e citostático dele é mais acentuado na célula tumoral do que na célula não tumoral MRC-5.

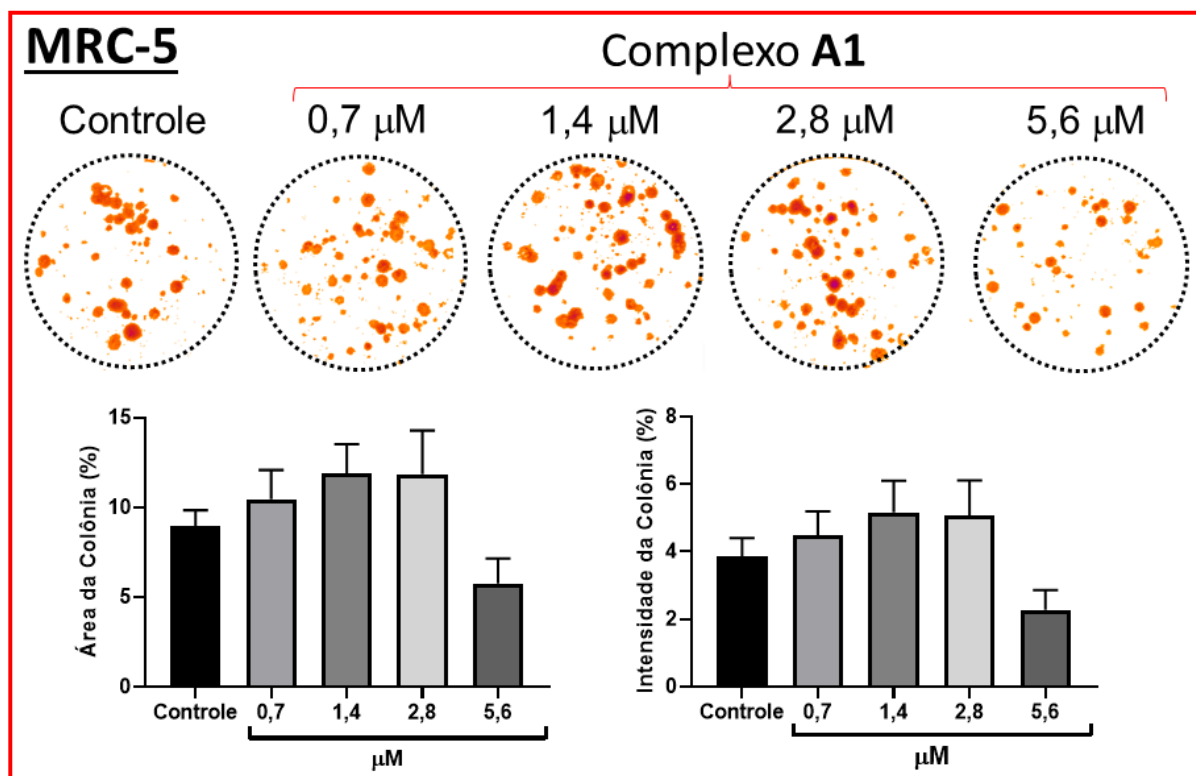


FIGURA 4. 16. Sobrevivência clonogênica das células MRC-5 tratadas com diferentes concentrações do complexo **A1** por 48 h. A representação dos poços e limiares para o experimento é mostrada junto com as quantificações gráficas da área e intensidade das colônias. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,005$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Dunnet's.

O ciclo celular é constituído por duas etapas fundamentais: a mitose (Fase M) e a interfase (FIGURA 4. 17). Durante essas fases, uma sequência de processos ocorre, desempenhando um papel crucial na replicação do DNA e na subsequente divisão da célula. A interfase, por sua vez, é subdividida em quatro etapas distintas denominadas G_0/G_1 , S, G_2/M e Sub- G_1 . Na fase G_0/G_1 , a célula se prepara para a síntese do DNA, que ocorre durante a fase S. Posteriormente, na fase G_2/M , a célula se prepara para a divisão celular que acontecerá na fase M, completando assim o ciclo. Durante a fase G_0/G_1 , as células podem entrar em um estado de repouso (quiescência) onde a atividade de replicação é suprimida, esse estado é conhecido como Sub- G_1 . Ao longo de todo o ciclo, existem pontos de controle nos quais os componentes celulares duplicados são verificados, determinando se as células continuarão a prosseguir no ciclo celular. Esse avanço só ocorre quando não são identificadas anomalias, como danos no DNA ou em organelas. Células tumorais frequentemente apresentam mutações que resultam na perda desses pontos de

controle, fazendo com que as células fiquem presas em um ciclo de replicação contínuo, levando à proliferação descontrolada das células.¹⁰⁹⁻¹¹¹

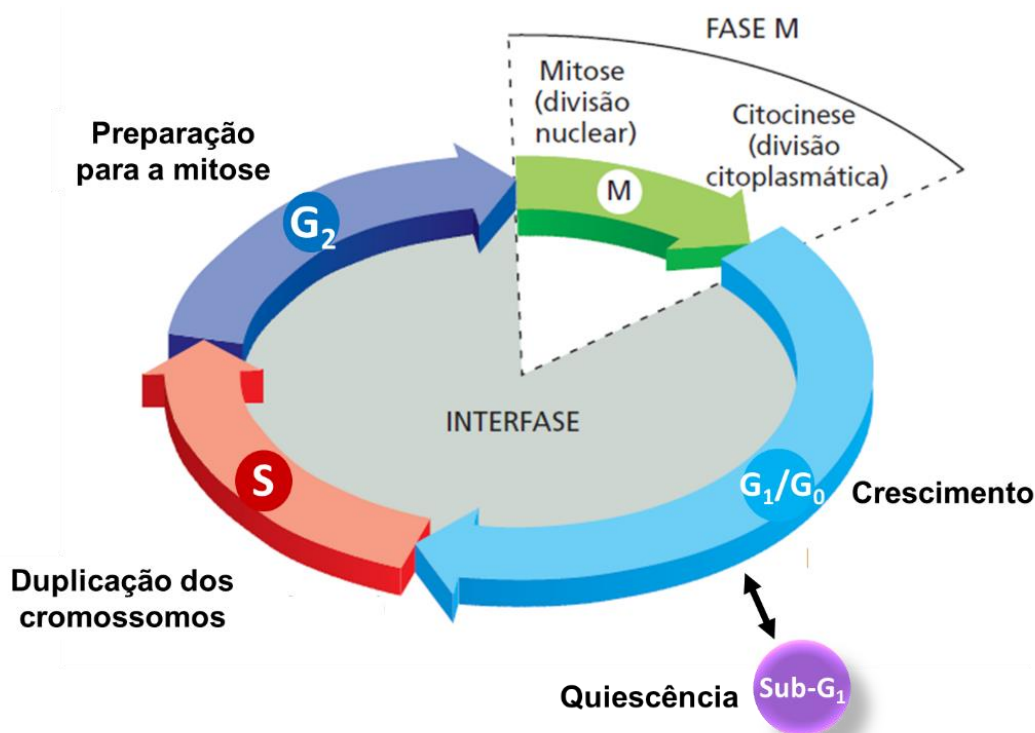


FIGURA 4. 17. Representação esquemática da progressão das fases do ciclo celular.

Neste trabalho investigou-se a capacidade do complexo **A1** de alterar a distribuição do ciclo celular das células tumorais A2780cis. Na FIGURA 4. 18 são apresentados os histogramas e os gráficos da porcentagem de distribuição do ciclo celular em diferentes concentrações de **A1**. Ao examinar o perfil de distribuição do ciclo celular, fica evidente a acumulação de células com conteúdo nuclear reduzido, indicando claramente a presença de DNA fragmentado (Sub-G₁), cuja intensidade é dependente da concentração do complexo utilizado. Esse fenômeno indica a morte celular como resultado da atuação do composto.^{12,112}

O acúmulo das células em Sub-G₁ ocorreu, significativamente, a partir da concentração do IC₅₀, conseqüentemente, a proporção das células na fase G₀/G₁ e G₂/M apresentou um decréscimo, em comparação com as células não tratadas. A redução na proporção das fases do ciclo celular sugere uma interferência significativa do complexo na progressão do ciclo celular, adicionalmente, o acúmulo de células em Sub-G₁ é compatível com a ocorrência de apoptose, uma vez que o processo de morte por apoptose leva a fragmentação do DNA, devido a atuação de enzimas nucleares.^{112,113}

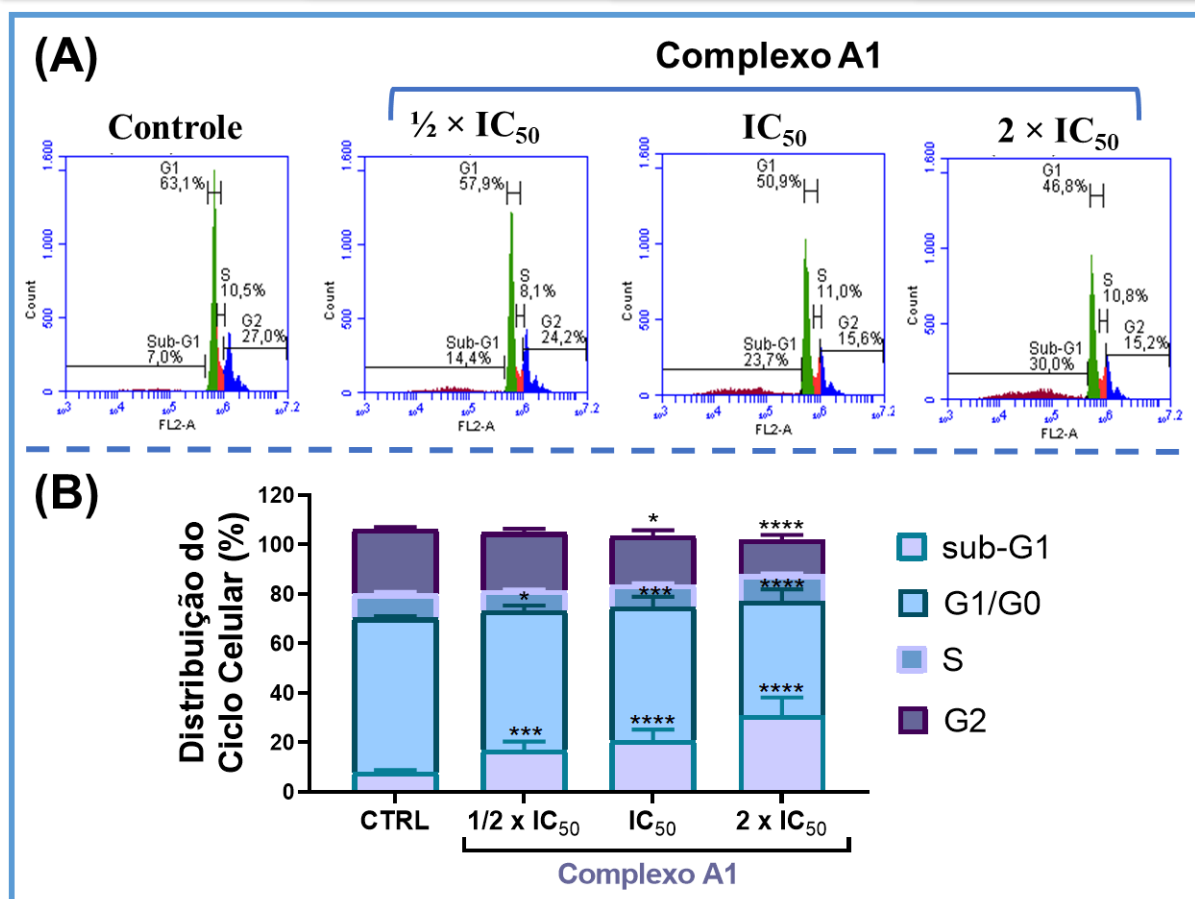


FIGURA 4. 18. **(A)** Histogramas de DNA do ensaio do ciclo celular nas células A2780cis incubadas com iodeto de propídio (PI) (detectado no canal FL2-A), após tratamento com o complexo **A1** em diferentes concentrações ($\frac{1}{2} \times IC_{50}$ (0,7 μ M), IC_{50} (1,4 μ M) e $2 \times IC_{50}$ (2,8 μ M)), por 48 h. **(B)** Gráfico da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após tratamento com o complexo **A1**, em diferentes concentrações, por 48 h. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,005$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Turkey's.

A morte celular é um processo natural e essencial no ciclo de vida das células em organismos multicelulares, existem dois principais modos de morte celular que se distinguem através das vias bioquímicas envolvidas e das alterações morfológicas das células, a apoptose e a necrose (FIGURA 4. 19). A apoptose é uma morte celular programada, parte do desenvolvimento normal ou resposta a danos, em que as células encolhem, formam corpos apoptóticos e são fagocitadas (engolidas) por outras células, minimizando o impacto no tecido circundante e evitando a liberação de substâncias nocivas. Já a necrose é uma morte celular não programada, resultante de lesões extremas, levando à liberação de conteúdo celular e inflamação, prejudicando o tecido circundante.^{114,115}

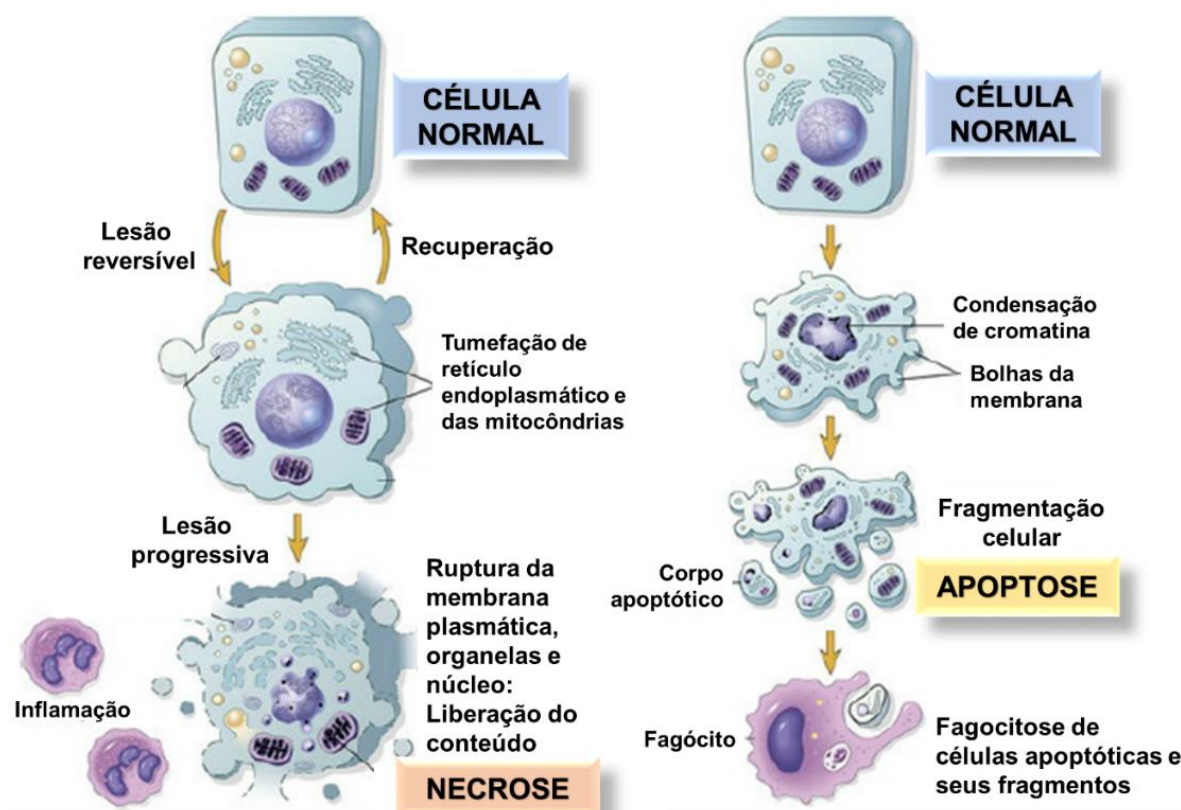


FIGURA 4. 19. Ilustração esquemática das alterações morfológicas da lesão celular que culmina em necrose ou em apoptose. Adaptada de: Referência¹¹⁴.

Com o objetivo de determinar o tipo de morte celular induzida pelo complexo **A1**, foi conduzido um ensaio utilizando o kit Anexina V-PE. Esse kit possibilita a diferenciação entre a morte celular por via apoptótica ou necrótica. No início da apoptose, a membrana celular mantém sua integridade, nesse estágio, a fosfatidilserina é exposta na superfície externa da membrana, sinalizando a morte programada para que os fagócitos possam reconhecê-la.¹¹⁶ A anexina V é uma proteína capaz de se ligar à fosfatidilserina. Quando unida ao fluoróforo PE (ficoeritrina), gera um sinal fluorescente que viabiliza a quantificação de células em apoptose através da técnica de citometria de fluxo.¹¹⁷ O 7-AAD (7-amino-actinomicina D) é uma substância que pode penetrar no núcleo das células, incorporando-se ao DNA e produzindo um sinal fluorescente.¹¹⁸ Esse sinal pode ser identificado por citometria de fluxo e serve para indicar células em estágios tardios de apoptose ou necrose.

Os resultados obtidos neste ensaio são apresentados em gráficos de dot plot, os quais são dividido em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4). No primeiro quadrante, Q1, as células viáveis são negativas para ambos os marcadores; no

segundo quadrante, Q2, as células estão em apoptose inicial, marcadas com o fluorocromo anexina V-PE; o terceiro quadrante, Q3, ilustra a magnitude da fluorescência emitida pelas células em apoptose tardia, que foram marcadas de maneira conjunta com anexina V-PE e 7-ADD e por último, o quarto quadrante, Q4, representa a intensidade de fluorescência proveniente das células em estado de necrose, identificadas como positivas para o marcador 7-ADD (FIGURA 4. 20).¹¹

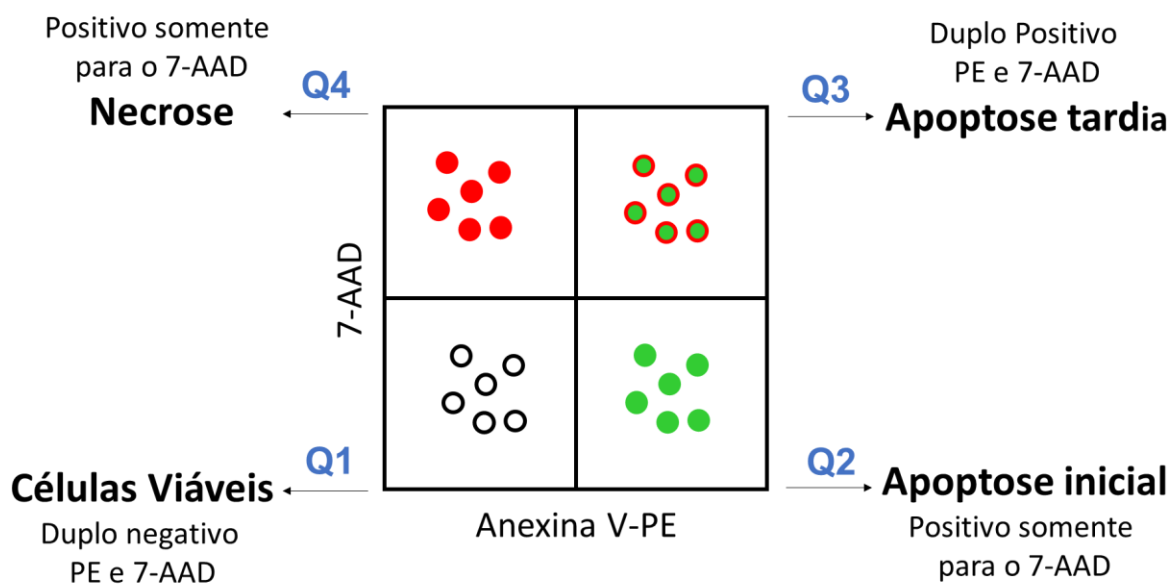


FIGURA 4. 20. Representação esquemática de um histograma de dois parâmetros para a distribuição das células em apoptose e necrose.

Enfim, as células tumorais A2780cis foram tratadas com diferentes concentrações complexo **A1** ($1/2 \times IC_{50}$, IC_{50} e $2 \times IC_{50}$) por 24 h e analisadas por citometria de fluxo com os corantes apresentados anteriormente. O potencial do complexo **A1** para induzir a apoptose é apresentado na FIGURA 4. 21(A). A partir da análise do gráfico (FIGURA 4. 21(B)), podemos inferir que o complexo **A1** foi capaz de induzir tanto a apoptose precoce quanto a tardia, a partir da concentração do IC_{50} . Essa conclusão está de acordo com os resultados obtidos por meio da análise de ciclo celular.

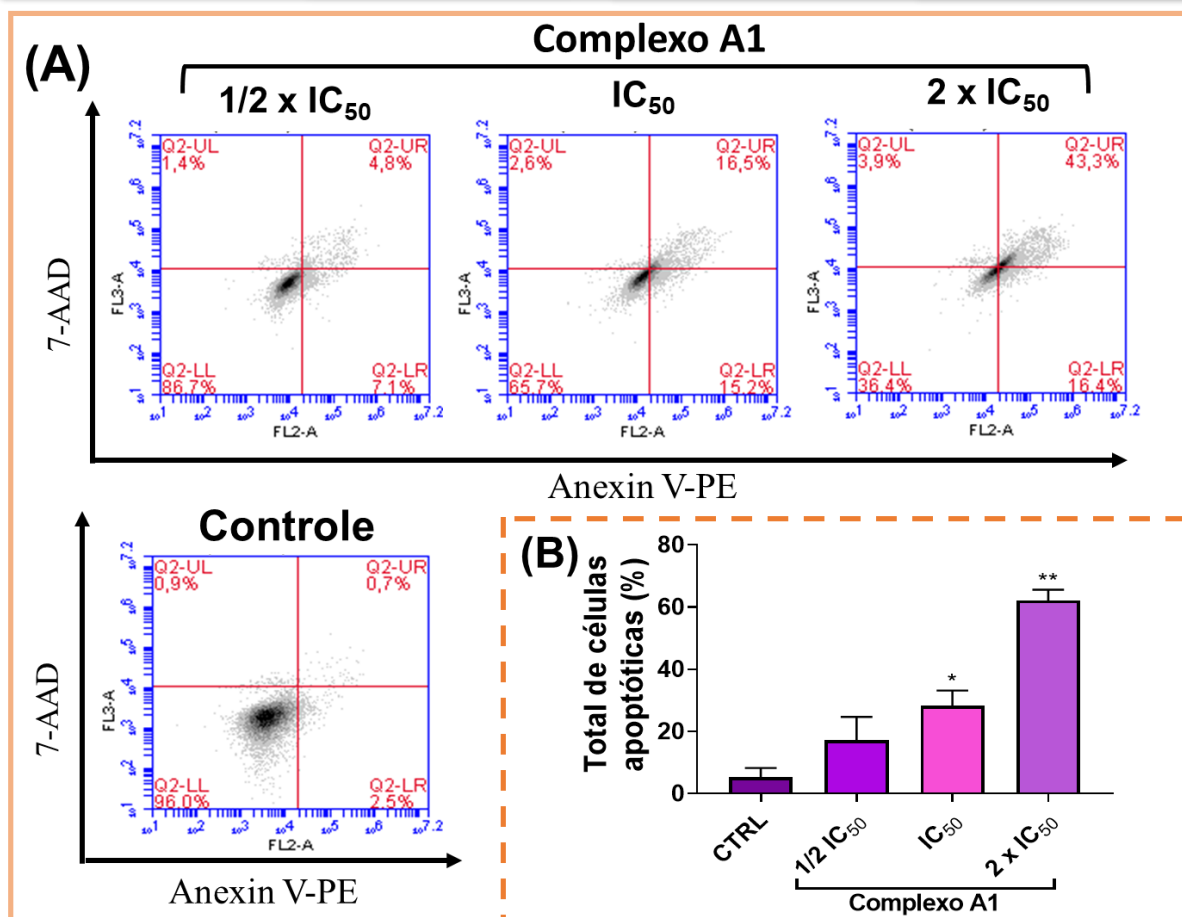


FIGURA 4. 21. (A) Histogramas de dois parâmetros que mostra a distribuição das células A2780cis após tratamento com diferentes concentrações dos complexos **A1** ($1/2 \times IC_{50}$ ($0,7 \mu M$), IC_{50} ($1,4 \mu M$) e $2 \times IC_{50}$ ($2,8 \mu M$)), incubadas por 24 h, em seguida, marcadas com Anexina V-PE (detectado no canal FL2-A) e 7-AAD (detectado no canal FL3-A) para medir o efeito dos complexos na indução de apoptose nas células tumorais. (B) Gráfico da porcentagem de células apoptóticas após tratamento com os complexos **A1** em diferentes concentrações. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Tukey's.

As espécies reativas de oxigênio podem surgir como subprodutos do metabolismo natural do organismo ou como resultado da exposição a substâncias estranhas. ERO desempenham papéis significativos em diversos processos fisiológicos, atuando como mediadores na transdução de sinais e na ativação de enzimas como a tirosina quinase, entre outros. No entanto, um acúmulo excessivo de ERO pode levar ao estresse oxidativo, desencadeando a ativação das vias de sinalização apoptótica, resultando na morte celular.¹¹⁹

Utilizou-se como sonda H₂DCFDA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato), o qual exibe uma fluorescência verde após a clivagem do grupo acetato, por ERO,

produzindo o composto fluorescente, nomeado de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (FIGURA A. 22).¹²⁰

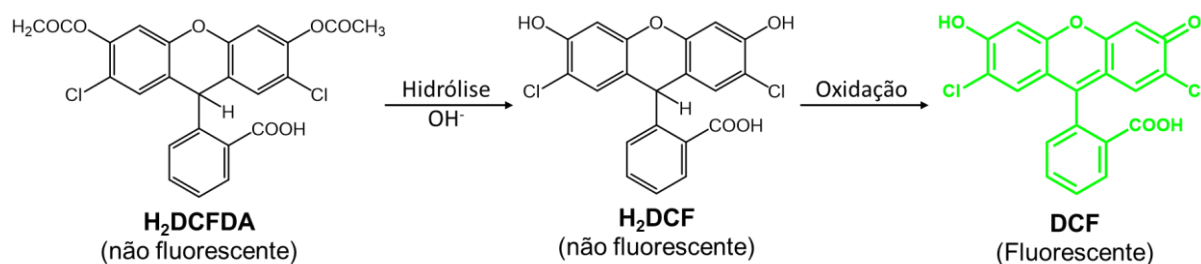


FIGURA 4. 22. Estruturas químicas do H₂DCFDA, H₂DCF e DCF.

Neste sentido, esse corante foi utilizado para quantificar as ERO em células A2780cis, as quais foram tratadas com diferentes concentrações do complexo **A1** abaixo do IC₅₀, pois não desejava-se células mortas. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi empregado como controle positivo, e o DMSO como controle negativo, para efeitos de comparação com os complexos.

Os níveis de ERO intracelular foram medidos por fluorescência e os resultados obtidos são apresentados na FIGURA 4. 23(A). As células A2780cis, quando expostas ao H₂O₂ e ao complexo **A1**, demonstraram uma significativa fluorescência verde em relação ao controle negativo. Um aumento considerável de fluorescência foi observado, principalmente para a maior concentração complexo **A1** (FIGURA 4. 23(B)). Portanto, pode-se indicar que [Pd(PPh₃)₂(cur)]PF₆ é capaz de induzir a formação de ERO e que o estresse oxidativo é um plausível mecanismo de morte celular causado pelo mesmo.

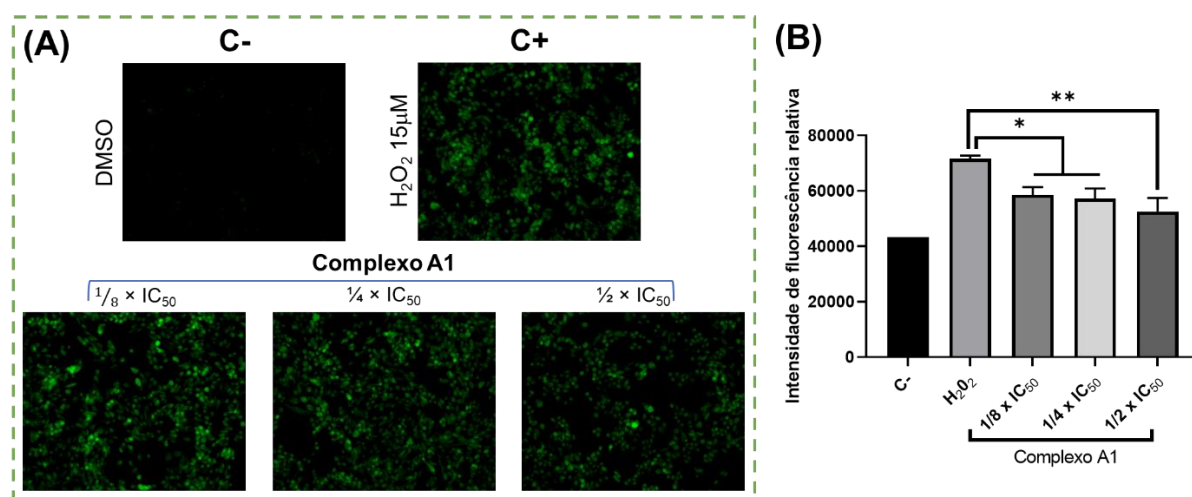


FIGURA 4. 23. Indução de ERO em células A2780cis. **(A)** Imagens representativas das células A2780cis tratadas com DMSO, H₂O₂ e complexo **A1** - [Pd(PPh₃)₂(cur)]PF₆ em diferentes concentrações ($1/8 \times IC_{50}$ (0,2 μM), $1/4 \times IC_{50}$ (0,4 μM) e $1/2 \times IC_{50}$ (0,7 μM)) e **(B)** Gráfico de intensidade de fluorescência relativa após tratamento. Os dados representam a média ± DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis de * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 e **** p < 0,0001 usando ANOVA e teste Tukey's.

4.3 Estudos de interação com biomoléculas da série A

A interação com a albumina do soro humano (HSA) é uma das etapas cruciais na farmacocinética de possíveis fármacos, desempenhando um papel fundamental na distribuição pelo corpo, atividade farmacológica, toxicidade, eficácia do medicamento e outros aspectos importantes. Outro aspecto significativo é a capacidade de melhorar a solubilidade de medicamentos hidrofóbicos no plasma. A albumina é frequentemente considerada o modelo ideal para estudos iniciais de interação de compostos com proteínas séricas, realizados *in vitro*.^{85,121}

A HSA é uma proteína globular de cadeia polipeptídica simples composta por 583 resíduos de aminoácidos. Ela possui três domínios homólogos de hélices, conhecidos como I, II e III, os quais estão subdivididos em subdomínios A e B, conforme evidenciado na estrutura cristalina da HSA (FIGURA 4. 24). Os subdomínios IIA e IIIA, também conhecidos como sítios Sudlow I e II, respectivamente, representam as principais regiões responsáveis pelas interações de compostos com a albumina.^{85,122}

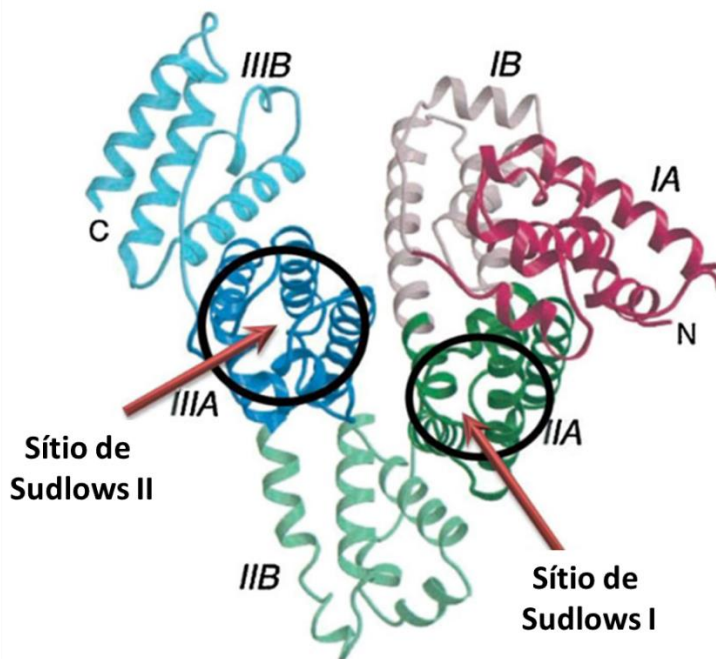


FIGURA 4. 24. Estrutura cristalográfica da albumina de soro humana (adaptada⁸⁵);

A HSA contém um resíduo de triptofano situado na posição 214 dentro do subdomínio IIA de sua estrutura proteica (Sudlow II), o que confere à biomolécula uma fluorescência intrínseca. Nesse contexto, a interação dos compostos da série A com a proteína HSA foi avaliada pela supressão da fluorescência do fragmento de triptofano.^{122,123} Os espectros de fluorescência da HSA foram registrados tanto na ausência quanto na presença do composto **A1** em várias concentrações, como ilustrado na FIGURA 4. 25 (os espectros dos demais complexos na FIGURA A. 18, no Apêndice – Parte I).

Os resultados apresentados indicam uma redução na fluorescência da HSA na presença dos compostos da série A, o que sugere que a interação entre essas substâncias provoca alterações na conformação do microambiente em torno do resíduo de fluoróforo Trp-214. Foi observada uma diminuição nas intensidades da fluorescência da HSA à medida que as concentrações dos complexos aumentavam nas soluções, com reduções que variaram de 52% a 33% em relação ao valor inicial da fluorescência.

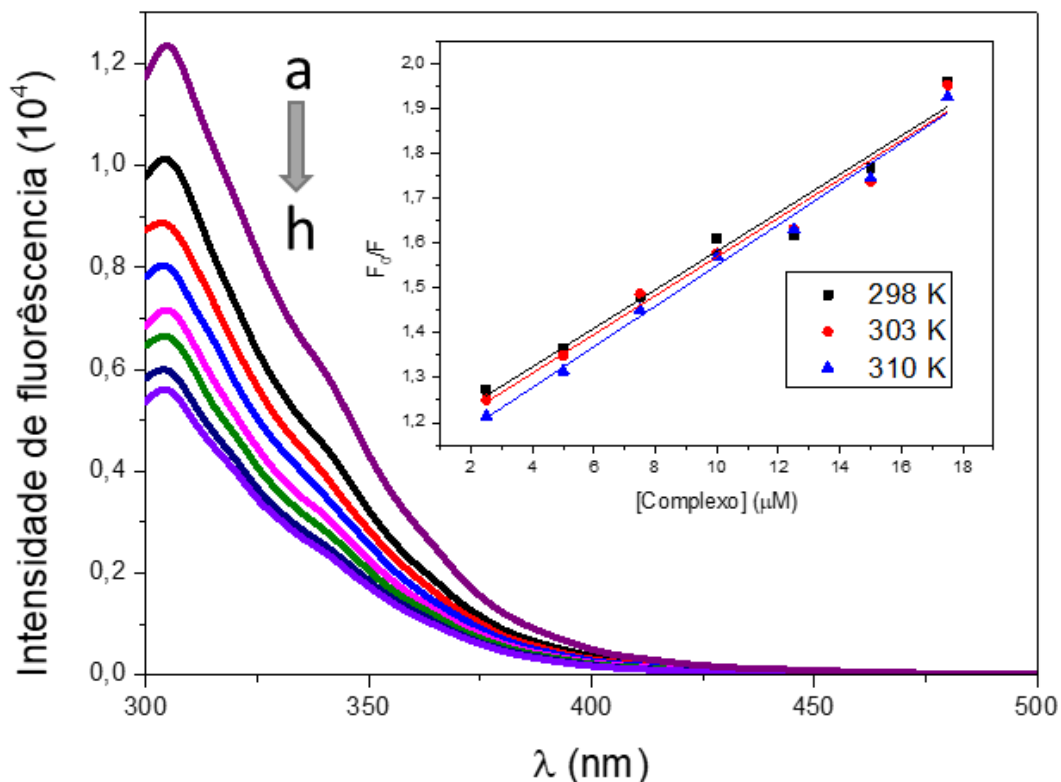


FIGURA 4. 25. Espectros de supressão de fluorescência da HSA na ausência (a) e presença do composto **A1** (b-h; b= 5 μM ; c= 10 μM ; d= 15 μM ; e= 20 μM ; f= 25 μM ; g= 30 μM e h= 35 μM), com concentração constante da HSA de 5 μM . Razão $[\text{Complexo}]/[\text{HSA}] = 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7$.

A diminuição da fluorescência da HSA na presença de um supressor ocorre principalmente por meio de dois mecanismos, geralmente classificados como processos dinâmicos e estáticos. Os mecanismos foram diferenciados pela análise da variação das constantes de supressão (K_{sv}) em relação à temperatura e pela constante biomolecular de supressão (k_q).^{86,124}

A constante de Stern-Volmer (K_{sv}) foi determinada através de uma regressão linear dos dados obtidos no gráfico (F_0/F) em função da concentração do complexo $[\text{Complexo}]$, enquanto k_q foi calculada a partir dos valores de K_{sv} assumindo $\tau_0 = 6,2 \text{ ns}$.¹²⁴

A linearidade dos gráficos de Stern-Volmer indica o envolvimento de apenas um tipo de mecanismo de supressão. Os valores de K_{sv} não diminuem ou não apresentam mudanças significativas, considerando o desvio padrão, com o aumento da temperatura, indicando que o mecanismo de supressão é predominantemente estático (TABELA 4. 10). A supressão estática é caracterizada pela inibição da emissão de um fluoróforo devido à formação de um complexo fluoróforo-supressor no

estado fundamental. Portanto, a única emissão observada é aquela proveniente dos fluoróforos não complexados. Na supressão estática, o aumento da temperatura leva a uma diminuição na estabilidade do intermediário fluoróforo-supressor. Isso resulta em um efeito de supressão menor, refletido na redução da constante de K_{sv} .^{85,123} O valor máximo da constante biomolecular de supressão (k_q) para a supressão dinâmica de biopolímeros é de $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.¹²⁴ Entretanto, os valores da constante k_q determinados foram maiores para todos os complexos. Portanto, os resultados sustentam a hipótese de um mecanismo de supressão estático.

Os dados de fluorescência foram analisados utilizando a Equação de Scatchard modificada para calcular a constante de ligação (K_b) e o número de sítios (n) de ligação na interação entre HSA e os complexos da Série A. A partir das constantes de ligação, os parâmetros termodinâmicos foram determinados utilizando a equação termodinâmica de Van't Hoff (TABELA 4. 10).⁸⁶

Os valores de K_b na ordem de 10^4 a 10^5 indicam interações moderadas a fortes entre os complexos e a HSA. O número de sítios de ligação indica uma estequiometria de aproximadamente 1:1 entre os complexos de paládio e a HSA.

TABELA 4. 10. Valores das constantes de supressão Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de taxa de supressão biomolecular (k_q), constantes de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) para o sistema composto-HSA em diferentes temperaturas.

Comp.	T (K)	K_{sv} ($\times 10^4 M^{-1}$)	k_q ($\times 10^{14} M^{-1} s^{-1}$)	R^2	K_b ($\times 10^4 M^{-1}$)	n	R^2	ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K)	ΔG° (kJ mol ⁻¹)
A1	298	(4,52 ± 0,19)	2,26	0,9563	(4,48 ± 0,25)	1,38	0,9588	5,62	108,6	-26,7
	303	(4,66 ± 0,25)	2,32	0,9627	(5,06 ± 0,20)	1,27	0,9739		108,6	-27,3
	310	(4,78 ± 0,19)	2,39	0,9678	(5,14 ± 0,36)	1,18	0,9837		108,3	-28,0
A2	298	(20,7 ± 1,2)	10,37	0,9687	(18,9 ± 2,9)	0,98	0,9736	-18,3k	39,7	-30,1
	303	(19,8 ± 0,4)	9,91	0,9673	(16,7 ± 0,4)	0,93	0,9749		39,5	-30,3
	310	(18,3 ± 0,8)	9,16	0,9627	(15,4 ± 1,0)	0,86	0,9718		40,3	-30,8
A3	298	(1,04 ± 0,03)	5,22	0,9755	(8,71 ± 0,26)	0,71	0,9647	1,44	99,4	-28,2
	303	(1,07 ± 0,03)	5,35	0,9704	(8,80 ± 0,19)	0,67	0,9526		99,4	-28,7
	310	(1,23 ± 0,03)	6,16	0,9685	(8,91 ± 0,13)	0,55	0,9647		99,4	-29,4
A4	298	(6,65 ± 0,04)	3,33	0,9452	(5,96 ± 0,17)	0,77	0,9542	13,5	136,6	-27,2
	303	(7,50 ± 0,09)	3,75	0,9446	(6,52 ± 0,18)	0,77	0,9528		136,6	-27,9
	310	(8,24 ± 0,13)	4,12	0,9520	(7,14 ± 0,19)	0,76	0,9643		136,3	-28,8
A5	298	(8,09 ± 0,32)	4,04	0,9929	(8,36 ± 0,84)	1,14	0,9909	13,2	138,5	-28,1
	303	(7,61 ± 0,42)	3,80	0,9927	(9,15 ± 0,91)	1,18	0,9864		138,5	-28,8
	310	(7,53 ± 0,30)	3,76	0,9869	(8,67 ± 0,88)	1,23	0,9907		137,1	-29,3

Os sinais e magnitudes dos parâmetros termodinâmicos foram examinados para avaliar as principais forças intermoleculares envolvidas na interação entre os compostos e a HSA. Os valores negativos de ΔG indicam que os processos de interação entre todos os compostos e a HSA são espontâneos nas temperaturas avaliadas. Os valores positivos de ΔH e ΔS (com exceção do complexo **A2**) sugerem que as inserções dos complexos na estrutura proteica são predominantemente impulsionadas por interações hidrofóbicas. O aumento na entropia ocorre durante o processo inicial de aproximação do composto à albumina e nas mudanças conformacionais no microambiente do subdomínio IIA. Essas alterações expõem os fragmentos apolares do resíduo da proteína Trp-214 ao solvente. Essas mudanças típicas induzem a reorganização das moléculas de água em torno do intermediário formado entre o supressor e a proteína, maximizando o efeito hidrofóbico na interação entre o complexo e a HSA. O complexo **A2** apresentou valor negativo de ΔH e positivo de ΔS , o que sugere interação eletrostáticas.⁸⁶

Os resultados apresentados na TABELA 4. 10 indicam que os complexos exibem uma afinidade moderada a alta pela albumina, o que possibilita o transporte e a solubilidade dos complexos da série A no plasma humano pela HSA. No entanto, é importante observar que a alta afinidade de associação também pode restringir a distribuição dos compostos nos tecidos do corpo devido à estabilidade do aduto formado entre a HSA e o complexo.

Para avaliar a interferência de HSA no transporte e distribuição do complexo **A1**, as células A2780cis foram expostas a **A1** a uma concentração constante próxima do IC_{50} , juntamente com concentrações crescentes de HSA, por 48h. Para cada análise, a porcentagem de células viáveis foi avaliada por um ensaio MTT, no qual as células sem tratamento (controle negativo) representaram a referência de 100% de viabilidade.

Os resultados mostram que a HSA, mesmo nas maiores concentrações da proteína, não interferiu na viabilidade celular, evidenciando que a interação do complexo **A1** com HSA possibilita seu carreamento mas não o indisponibiliza e limita sua atividade (FIGURA 4. 26).

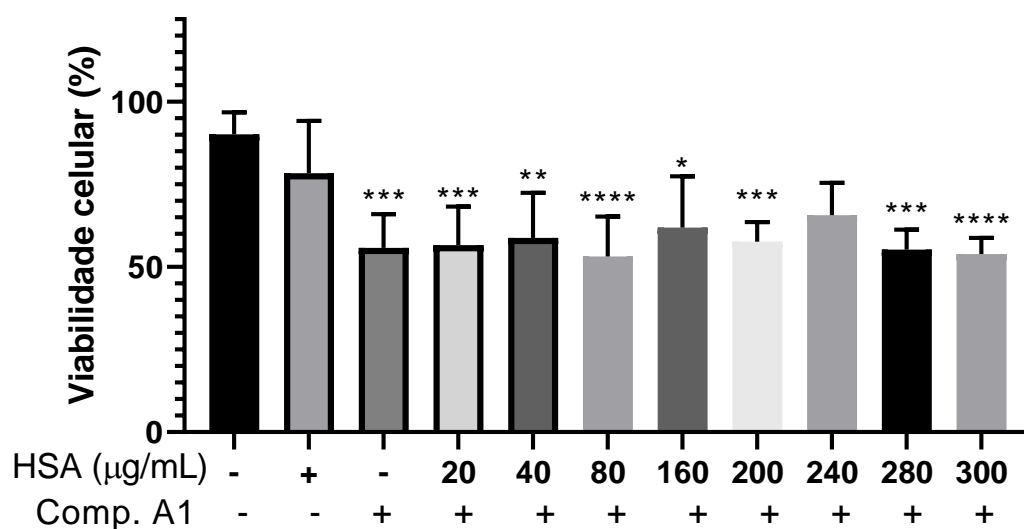


FIGURA 4. 26. Gráfico da viabilidade celular do complexo **A1** incubada com HSA em A2780cis. O complexo (2,5 µM) foi incubado com concentrações crescentes de HSA, por 48 h. As células viáveis foram estimadas pelo ensaio MTT e os resultados foram comparados com células tratadas com os complexos, mas na ausência das proteínas. Os dados representam a média \pm DP de dois ensaios independentes em triplicado. Significância nos níveis * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Dunnet's.

Outra importante investigação é a dos potenciais alvos biológicos dos complexos metálicos. Nesse sentido, explorou-se os possíveis modos de interação entre os complexos da Série A com o ácido desoxirribonucleico (DNA) e, como consequência, avaliou-se a biomolécula é um possível alvo biológico.

Antes de realizar os ensaios de interação com DNA, estudos de estabilidade foram realizados registrando-se espectros de UV-vis dos complexos em trizma com 10% de DMSO nos tempos de 0 e 24 horas com incubação a 37°C e agitação a 1000 RPM. Na Série A, para os complexos **A1-A4** foi observada uma pequena diminuição das bandas nos espectros de UV-vis após 24 horas, possivelmente devido a decomposição dos complexos, como já mencionado anteriormente, no entanto grande parte do complexo ainda encontra-se em solução, sendo possível assim fazer sua avaliação de interação com DNA. Para o complexo **A5**, por outro lado, observou-se o total desaparecimento das bandas em até 24 horas, desta forma é possível sugerir que o mesmo não é estável nestas condições (FIGURA 4. 27).

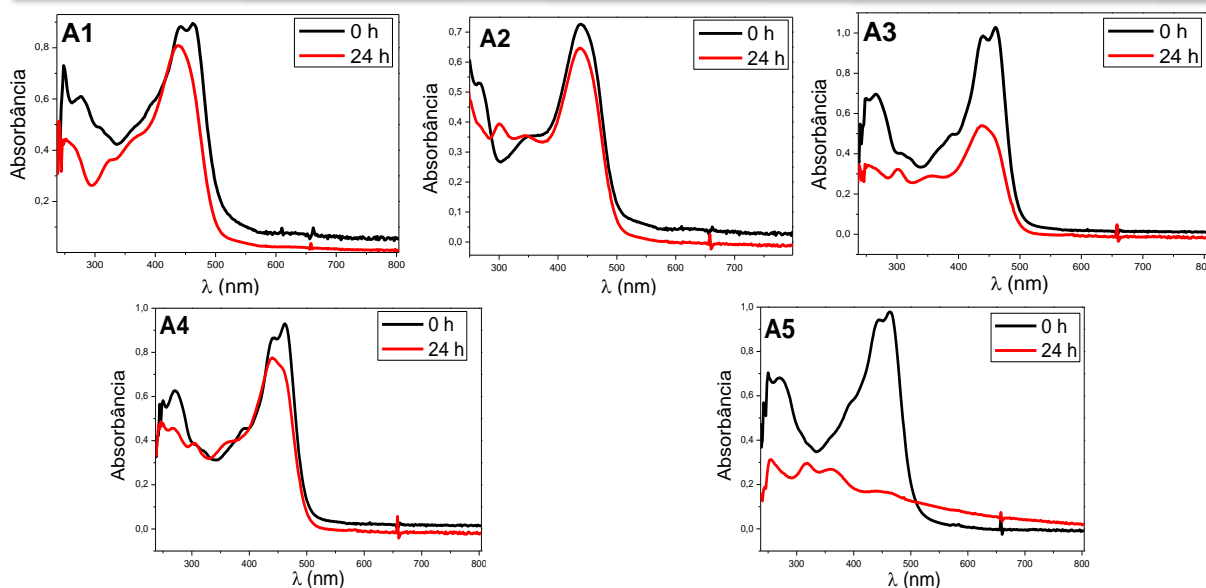


FIGURA 4. 27. Espectros de UV-vis dos complexos **A1-A5** em trizma com 10% DMSO, em 0 e 24 horas, com incubação a 1000 RPM a 37°C.

O mecanismo de ação de diversos complexos de platina é fundamentado na formação de ligações covalentes com o DNA, sendo que a interação primordial ocorre na posição N7 de adenina e guanina do DNA.¹²⁵ Ensaios que investigam a reação de complexos com nucleófilos de importância biológica são úteis para fornecer insights sobre o mecanismo de ação desses compostos no organismo.¹²⁶ Neste trabalho foi realizado o estudo da interação do nucleosídeo guanosina com os complexos da série A por RMN ¹H, este modelo vem sendo amplamente empregado no estudo de interação de complexos de Pd(II) e constituintes do DNA.^{127,128} Em literatura foram identificados diversos modos de coordenação para a ligação entre o paládio e a guanosina, incluindo coordenação monodentada através dos átomos de nitrogênio N1, N3 ou N7; complexos quelatos que envolvem os átomos de nitrogênio N7 e oxigênio O6; e compostos polinucleares que são conectados por meio dos átomos de nitrogênio N1 e N7, entre outros.¹²⁹

Podemos observar na FIGURA 4. 28 os espectros de RMN ¹H do complexo **A1** (1 mol) com a guanosina (2 mol), em DMSO deuterado, registrado após 48 horas em solução. Também, foi registrado o espectro da guanosina em DMSO deuterado para comparação dos deslocamentos químicos (FIGURA 4. 28, espectro em vermelho). Podemos observar que não houveram alterações dos sinais referentes aos hidrogênios nos espectros de RMN ¹H registrados reação do complexo **A1** com a guanosina, até 48 h. Na FIGURA A. 19, em Apêndice – Parte I, estão apresentados os espectros de RMN ¹H registrados em 0, 24 e 48 h, deste experimento.

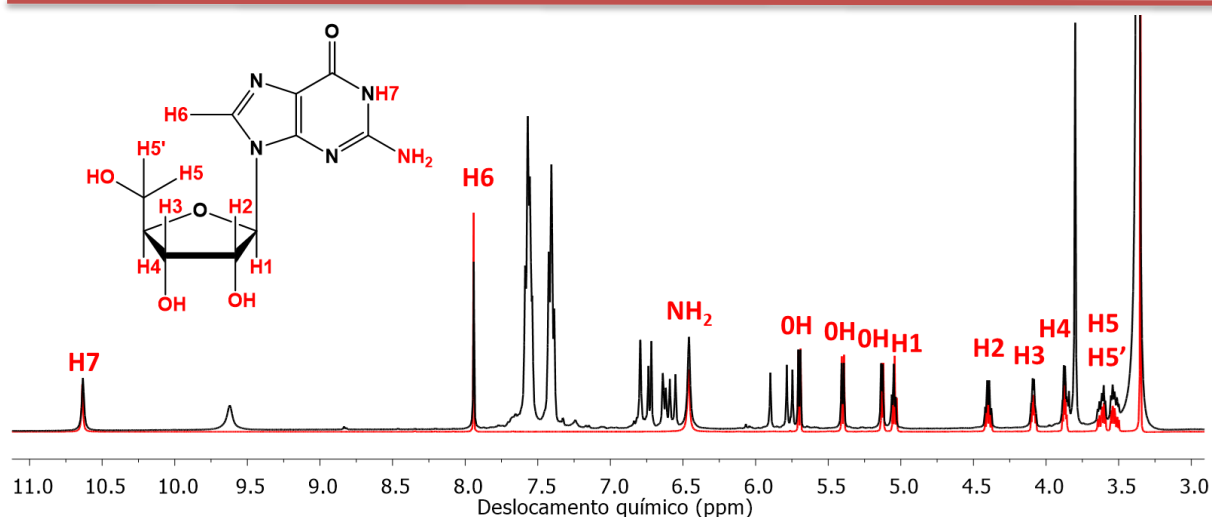


FIGURA 4. 28. Espectros de RMN ^1H da guanosina (espectro vermelho) e do complexo **A1** com a guanosina (1 mol: 2 mol) (espectro preto) em 48 horas, em DMSO deuterado.

Foram realizadas medidas de viscosidade para investigar o potencial modo de interação dos complexos com o DNA. A viscosidade é uma propriedade física que representa a resistência de um fluido ao movimento, podendo ser determinada ao medir o tempo necessário para que uma quantidade específica de fluido passe por um volume conhecido.⁸³

Um agente intercalante, como a tiazol laranja, por exemplo, aumenta a distância entre os pares de bases nitrogenadas, resultando em um estiramento da dupla hélice do DNA e, conseqüentemente, em um aumento do volume e da viscosidade do DNA.^{130,131} Interações do tipo covalente resultam em uma redução na viscosidade do DNA, pois elas diminuem o comprimento axial da dupla hélice dessa biomolécula.¹³²

As medidas de viscosidade do CT-DNA, em diferentes concentrações de complexos foram realizadas, e os efeitos dos complexos e de um padrão estão representados na FIGURA 4.29, expressos como uma relação $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ versus $[\text{complexo}]/[\text{DNA}]$. A adição progressiva de alíquotas do complexo à solução não resultou em variações significativas na viscosidade do DNA, ao contrário do que foi observado com o tiazol (um agente intercalante). Isso sugere que as interações envolvidas são predominantemente de natureza eletrostática e/ou ocorrem nos sulcos do DNA.

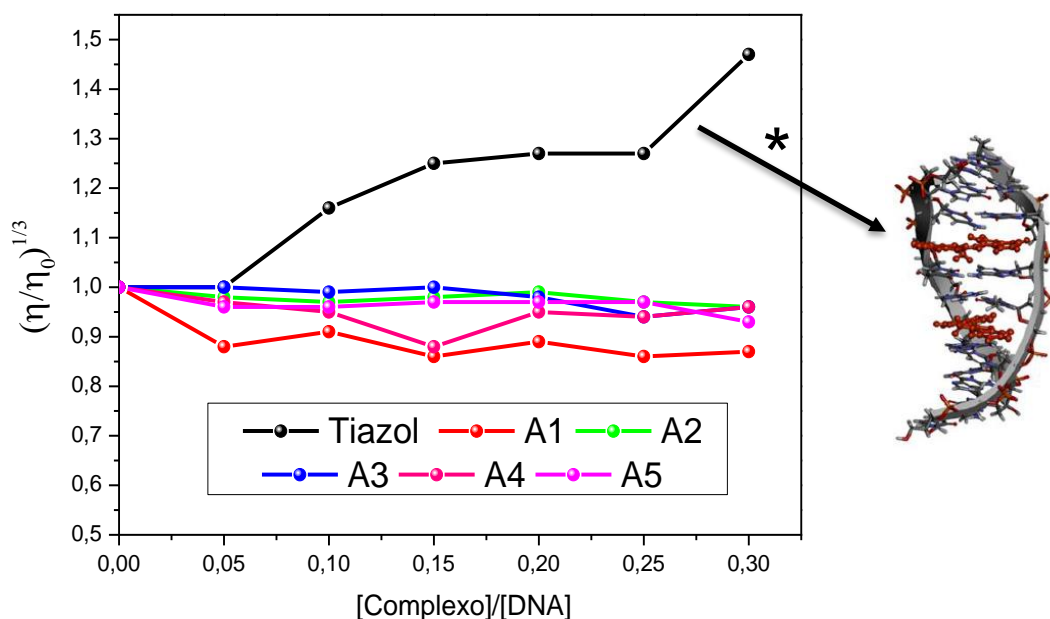


FIGURA 4.29. Viscosidade relativa do CT-DNA na ausência e presença dos complexos **A1-A5** (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 μM) e do padrão tiazol laranja, em diferentes razões molares $[\text{composto}]/[\text{DNA}] = 0,00; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25$ e $0,30$, com concentração constante de CT-DNA de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 10% de DMSO; *Estrutura cristalina de um fragmento de DNA contendo o tiazol intercalado (adaptada)¹³³

A técnica de eletroforese em gel de agarose também foi empregada para avaliar a possível interação dos complexos com o DNA. Nessa técnica, analisa-se a velocidade de migração dessa biomolécula, a qual, devido à sua carga negativa, se move em direção ao polo positivo, quando submetida a um campo elétrico. A velocidade de migração depende do tamanho e da conformação do DNA.

Os plasmídeos são excelentes modelos para estudos de mobilidade do DNA devido ao fato de serem pequenos fragmentos de DNA com tamanhos variáveis, que podem variar de poucas dezenas a mais de cem mil pares de bases. Um plasmídeo pode adotar diferentes conformações que resultam em diferentes padrões de mobilidade eletroforética, dependendo das quebras nas fitas do DNA. O DNA plasmidial sem quebra na fita dupla assume uma conformação super enrolada com migração relativamente rápida. A quebra de uma única fita do DNA super enrolado gera uma forma mais relaxada conhecida como conformação circular, que tem um movimento eletroforético mais lento em comparação com a conformação SC. Por fim, a clivagem de ambas as fitas do DNA produz uma conformação linear, que exhibe migração intermediária entre as conformações super enrolada e circular.

A FIGURA 4.30 mostra as imagens obtidas para as corridas eletroforéticas, e nela pode-se observar que a cisplatina (CP), utilizada para

comparação, na maior concentração converte o DNA plasmidial a sua forma linear, enquanto para os complexos **A1-A5** não houve mudanças nas bandas do DNA. Tais resultados sugerem que os complexos não causam torções, relaxamento ou mudanças conformacionais, significativas, na estrutura terciária do DNA, que sejam capazes de alterar a taxa de migração do plasmídeo.

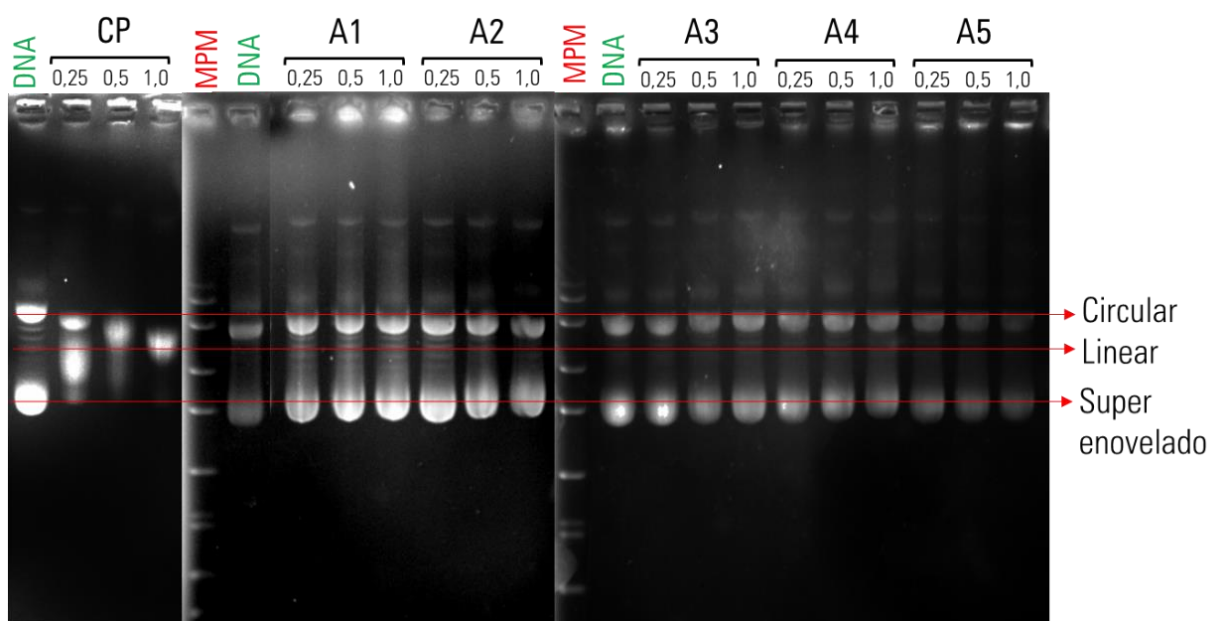


FIGURA 4.30. Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pBR322 (40 μ M) na ausência e presença dos complexos (10% DMSO) e cisplatina (CP), em diferentes razões molares [Complexo]/[plasmídeo] (0,25; 0,50 e 1,00); MPM - Marcador de peso molecular; DNA - Controle negativo (em tampão Trisma-HCl).

O Hoechst livre, utilizado como sonda fluorescente do DNA, apresenta uma emissão máxima em 460 nm, com baixo rendimento quântico de fluorescência, quando excitado em 340 nm. No entanto, o complexo DNA-Hoechst, formado após a ligação do composto aos sulcos menores do DNA, especialmente em regiões ricas em pares de bases adenina-timina, exibe um rendimento quântico de fluorescência significativamente maior em comparação ao corante livre. Isso ocorre devido à supressão do relaxamento rotacional e à proteção contra colisões com moléculas do solvente. O complexo DNA-Hoechst apresenta um amplo espectro de emissão, com um pico de emissão em 460 nm quando excitado em 340 nm.

Para avaliar se os complexos da série A interagem no sulco menor do DNA ou em regiões próximas, conduzimos o ensaio de deslocamento do Hoechst 33324 do sulco menor do CT-DNA. Isso foi feito pela medição da supressão da fluorescência do composto DNA-Hoechst. Na realização do ensaio, excitamos a

biomolécula a 340 nm, e as leituras da emissão de fluorescência foram registradas na faixa de comprimento de onda entre 370 e 700 nm.

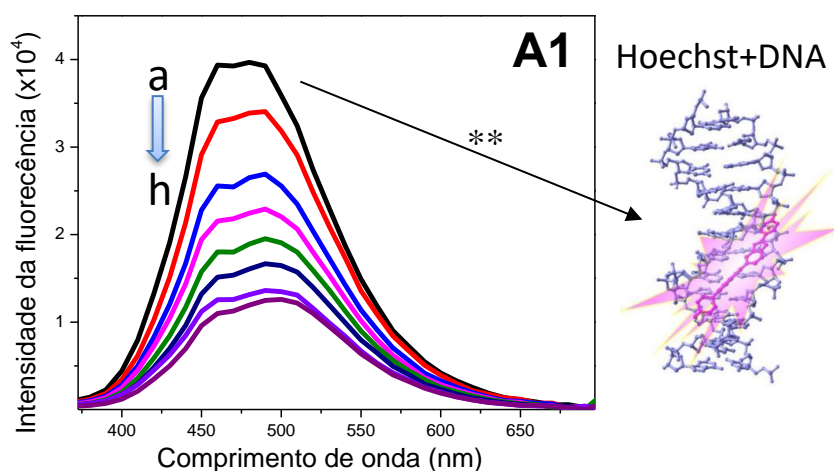


FIGURA 4. 31. Espectros de supressão de fluorescência do DNA-Hoechst na ausência (a) e presença dos complexo **A1** (b-h; b=2,5 μM ; c=5 μM ; d=7,5 μM ; e=10,0 μM ; f=12,5 μM ; g=15,0 μM e h=17,5 μM), concentração constante da DNA-Hoechst de 75 e 2,5 μM , respectivamente. **Estrutura cristalina de um fragmento de DNA inserido o Hoechst no sulco menor do DNA (adaptada)¹³⁴.

Os complexos **A1-A5** desempenharam o papel de agentes supressores da fluorescência do complexo DNA-Hoechst, resultando em uma redução nas intensidades da fluorescência à medida que as concentrações dos complexos aumentavam nas soluções. Na concentração mais elevada, o complexo **A1** provocou uma diminuição na intensidade de emissão correspondente a 31% do valor inicial (FIGURA 4. 31), os demais complexos apresentaram comportamento similar, com decréscimo de 23% a 38% (FIGURA A. 20, no Apêndice – Parte I). A supressão da fluorescência indica que os compostos possuem a capacidade, seja por meio de uma ação direta ou por pequenas alterações nas proximidades do sulco menor, de deslocar o Hoechst do sulco menor do DNA.

4.4 Conclusões parciais da série A

Resumidamente, para esta série de complexos, avaliamos as propriedades antitumorais (em ensaios *in vitro*) de cinco novos complexos contendo paládio(II), fosfina e curcumina. Um desses complexos (**A1**) inclui monofosfinas, enquanto os outros quatro (**A2-A5**) contêm bisfosfinas. Todos esses compostos foram

sintetizados e caracterizados por meio de várias técnicas espectroscópicas e difração de raios X. Uma característica desses complexos é a sua instabilidade em solução de meio biológicos, uma característica que pode ser atribuída à presença da curcumina. É importante observar que a curcumina já é conhecida na literatura por sua baixa estabilidade em condições fisiológicas. As viabilidade celular destes compostos foram avaliadas frente as linhagens tumorais MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3 (mama), DU-145 (próstata), A549 (pulmão), A2780 (ovário), A2780cis (ovário resistente a cisplatina) e não tumorais MCF-10A (mama) e MRC-5 (pulmão), em 48 h de exposição aos complexos. Os complexos **A1-A5** exibiram valores baixos de IC₅₀ na maioria das células testadas, no entanto o complexo **A1** se destacou mostrando o maior índice de seletividade, especialmente nas linhagens ovarianas.

O complexo **A1** se mostrou capaz de inibir a formação de colônias, causar interferência significativa no ciclo celular e na morfologia das células, com considerável tendência à concentração-resposta, nas células A2780cis. Além disso, o complexo **A1** induz a morte por via apoptótica nas células A2780cis. Em busca de possíveis alvos de ação dos complexos, ensaio de interação com DNA foram realizados. Os resultados demonstraram que os complexos interagem de forma fraca via sulco menor do DNA, indicando que o DNA não é o alvo principal dos compostos. Identificou-se a formação de ERO nas células A2780cis após o tratamento com o complexo **A1**, sugerindo que o estresse oxidativo é um plausível mecanismo de morte celular.

Os complexos da série A mostraram uma afinidade variando de moderada a alta com a proteína HSA, o que pode facilitar o transporte e melhorar a solubilidade desses compostos na corrente sanguínea.

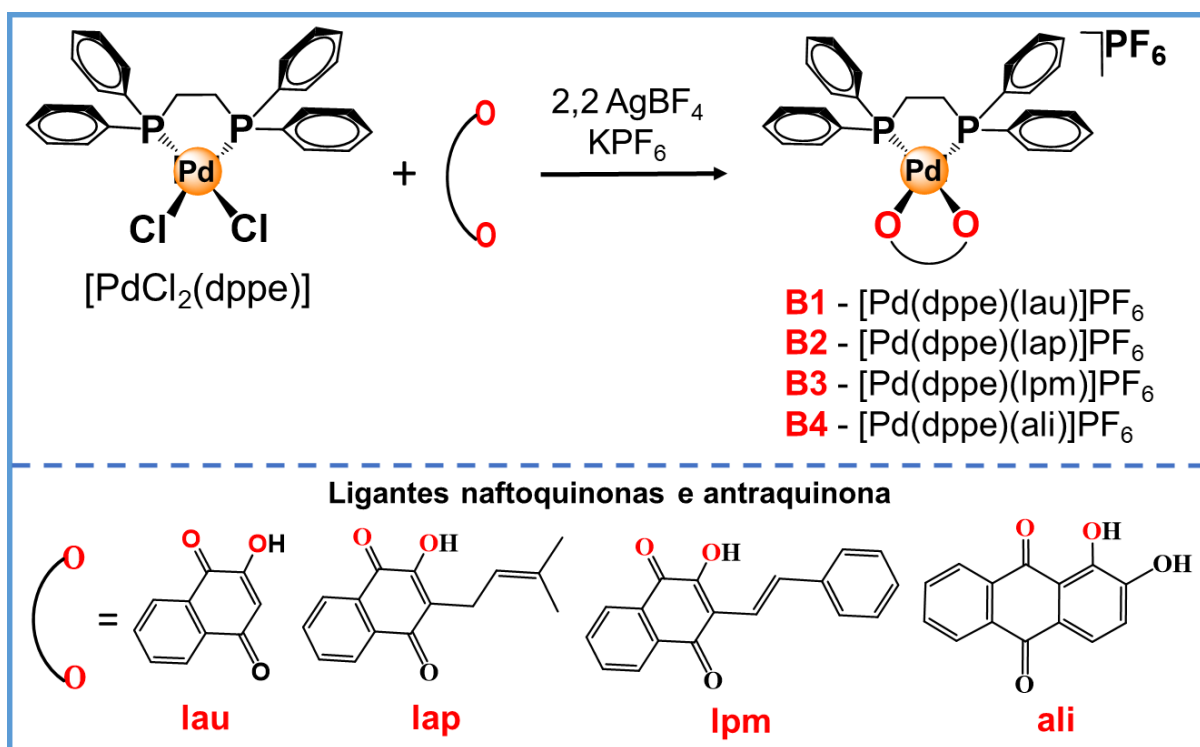
CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO: SÉRIE B

Dada a notável versatilidade demonstrada pelos ligantes naftoquinônicos e antraquinônicos, como evidenciado pelo sucesso clínico da doxorubicina como agente antineoplásico, propomos a síntese e caracterização de uma série inédita de compostos resultantes da combinação destes ligantes com Pd^{II}/dppe.

5.1 Síntese e caracterização dos complexos da série B

Os complexos de fórmula geral [Pd(dppe)(O-O)]PF₆, onde dppe = 1,2-bis(difenilfosfina)etano e O-O = lausona (**lau**; **B1**), lapachol (**lap**, **B2**), 3-estiril-lausona (**lqm**, **B3**) e alizarina (**ali**; **B4**) foram sintetizados pela substituição dos ligantes cloridos dos complexos precursores [PdCl₂(dppe)], previamente sintetizados, pelos ligantes naftoquinonas ou antraquinona. A rota sintética para a obtenção dos complexos da Série B está ilustrada no ESQUEMA 5. 1.



ESQUEMA 5. 1. Esquema de síntese representativo dos complexos **B1-B4**.

De forma similar à síntese da série A, a desprotonação dos ligantes se deu na presença dos solventes, sem requerer a adição de uma base ao sistema reacional e empregou-se AgBF_4 com o propósito de facilitar o processo de saída dos cloretos. Também o contra-íon utilizado para os complexos moncatiônicos, foi o PF_6^- , empregando-se o sal KPF_6 .

Para avaliar a carga dos complexos **B1-B4**, procedeu-se às medidas de condutividade molar dos complexos, em soluções de DMSO e CH_2Cl_2 . Os valores obtidos se encontram dentro da faixa correspondente a eletrólito 1:1, como mostrado na TABELA 5. 1.⁸⁷ Os resultados da análise elementar dos complexos estão em concordância com as suas porcentagens teóricas calculadas (TABELA 5. 1).

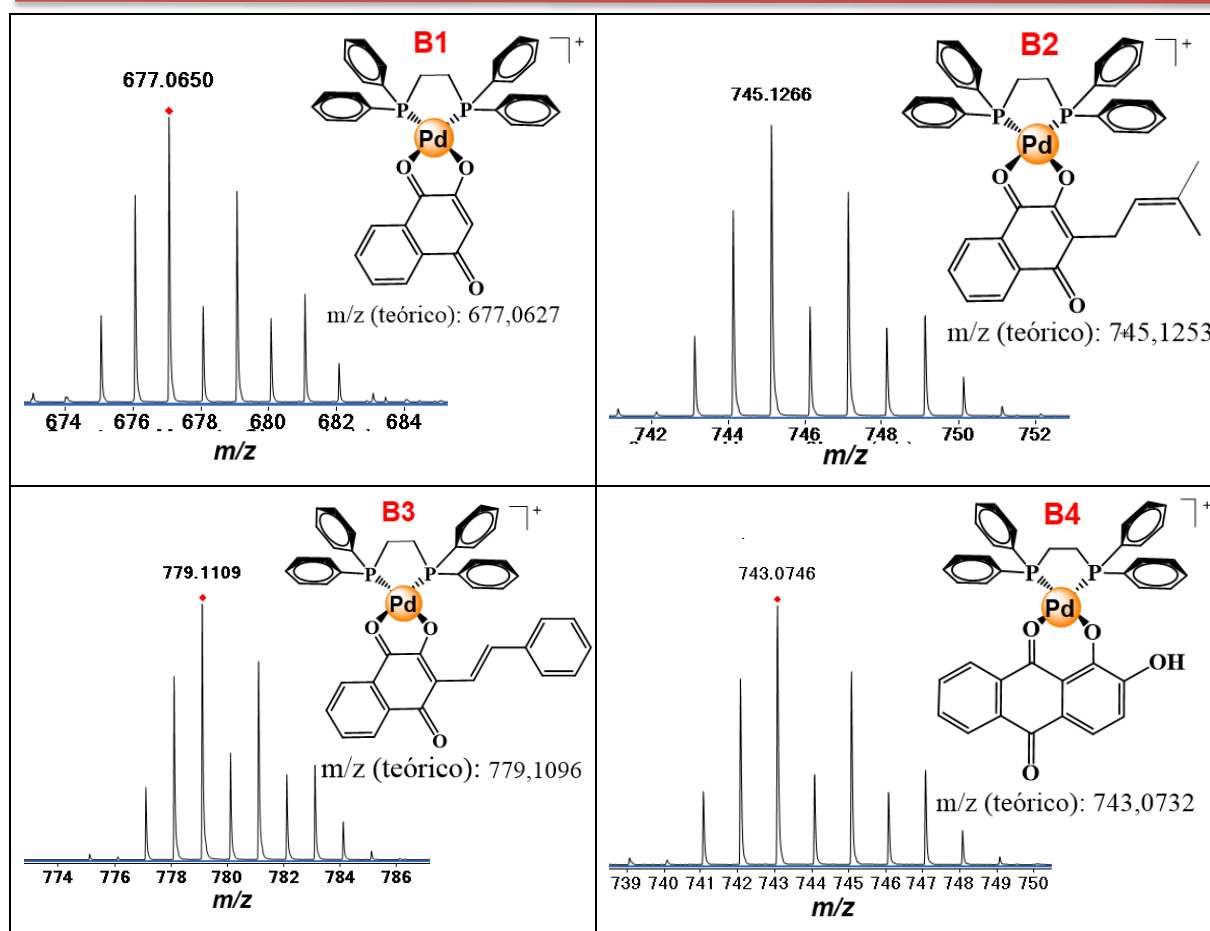
TABELA 5. 1. Dados de análise elementar (valores teóricos entre parêntesis) e condutividade molar (Λ_m , $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$) em DMSO e CH_2Cl_2 .

Complexos	%C	%H	Λ_m	
			DMSO	CH_2Cl_2
B1 – $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lau})]\text{PF}_6$	53,27 (53,17)	4,33 (4,00)	20,8	24,2
B2 – $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lap})]\text{PF}_6$	55,19 (55,26)	4,06 (4,19)	21,7	30,6
B3 – $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lpm})]\text{PF}_6$	57,21 (57,13)	3,85 (3,81)	25,2	17,2
B4 – $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{ali})]\text{PF}_6$	54,14 (54,04)	3,18 (3,51)	27,0	27,7

*Faixa para eletrólito 1:1 em DMSO 20-62 $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$; **Faixa para eletrólito 1:1 em CH_2Cl_2 12-77 $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$.⁸⁷

Nos espectros obtidos na espectrometria de massas, realizada usando um sistema Agilent 6545 qTOF MS, equipado com uma interface eletrospray (ESI) de Jet no modo positivo, foi possível encontrar os sinais referentes ao íon molecular dos complexos moncatiônicos, com padrão isotópico do paládio, após a perda do contra-íon PF_6^- . Os espectros de massas, bem como, os cátions dos complexos **B1-B4** estão apresentados na FIGURA 5. 1.

Os valores de razão massa/carga (m/z) encontrados estão de acordo com os valores teóricos, calculados para complexos moncatiônicos do tipo $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{O-O})]^+$. O erro entre o valor teórico e experimental é inferior a 4 ppm, como podem ser observados na TABELA 5. 2.

FIGURA 5. 1. Espectro de massas do complexo **B1-B4**.TABELA 5. 2. Razão massa carga (m/z) teóricos e experimentais, e erro em ppm, referentes ao pico $[M]^+$ dos complexos **B1-B4**.

Complexo $[M]^+$	m/z		Erro (ppm)
	Teórico	Experimental	
$[Pd(dppe)(lau)]^+$	677,0627	677,0650	3,40
$[Pd(dppe)(lap)]^+$	745,1253	745,1266	1,74
$[Pd(dppe)(lpm)]^+$	779,1096	779,1109	1,67
$[Pd(dppe)(ali)]^+$	743,0726	743,0746	1,88

Nesta série obteve-se monocristais do complexo **B4**, por meio da evaporação lenta de uma solução do mesmo em diclorometano e pela da técnica de difração de raios X foi possível elucidar sua estrutura, como apresentada na FIGURA 5. 2(A). Comprovou-se, assim, a coordenação de forma bidentada do ligante, por meio dos átomos de oxigênio, especificamente C3–O3 e C1=O1. Além disso, a existência do contra-íon PF_6^- na unidade assimétrica do complexo **B4** confirma a sua natureza monocatiônica (o contra-íon foi omitido na FIGURA 5. 2(A) para melhor visualização).

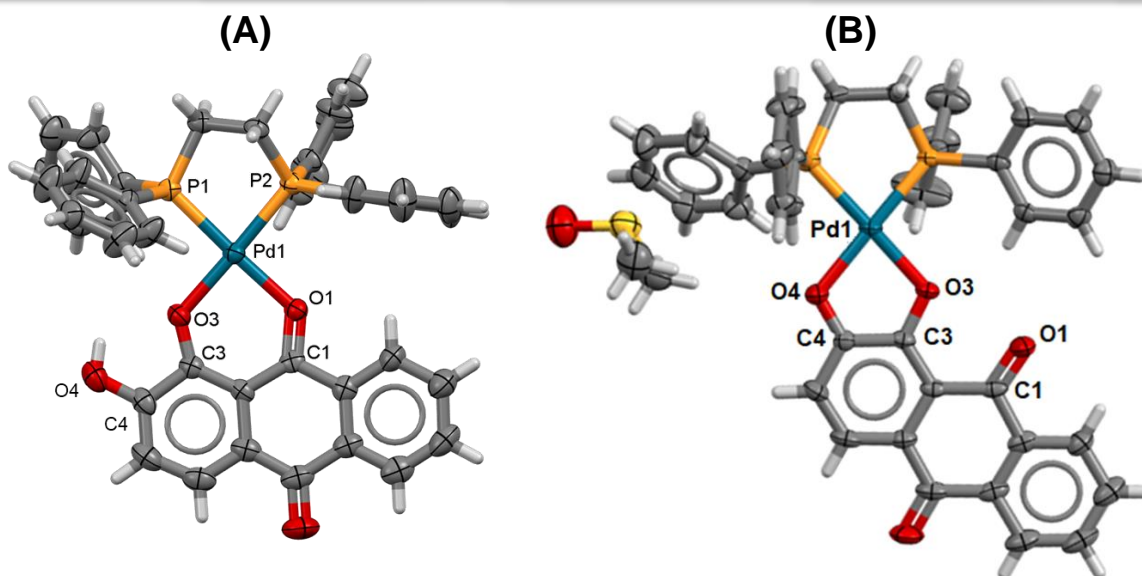


FIGURA 5. 2. Estrutura cristalográfica (A) do complexo **B4** (PF_6^- foi ocultado para melhor visualização) e (B) de um subproduto do complexo **B4** obtido a partir de em uma solução do complexo **B4** em 90% DMSO e 10% de meio de cultura DMEM. Átomos representados no modo ORTEP (elipsóides em 30%).

Diferente da série A, não há efeito de ressonância entre as ligações C3–O3 e C1=O1 (átomos envolvidos na coordenação) nos complexos obtidos nesta série, e deste modo, observa-se uma tendência nos comprimentos da ligação simples C3–O3 ($\approx 1,30 \text{ \AA}$), que se tornam mais curtos após a coordenação, além de um pequeno alongamento da ligação dupla C1=O1 ($\approx 1,24 \text{ \AA}$), isto quando comparamos a estrutura cristalográfica do complexo **B4** com a alizarina livre, como mostrado na TABELA 5. 3.

Outros monocristais foram obtidos a partir do complexo **B4** em solução de meio celular DMEM e DMSO. Por meio da estrutura cristalina elucidada, foi possível observar que houve a formação de um complexo neutro, bidentado, coordenado pelos oxigênios O(3) e O(4) (FIGURA 5. 2(B)). A obtenção deste complexo foi possível, pois, o meio de cultura DMEM tem um pH básico ($\approx 7,4$) onde ocorreu a desprotonação da hidroxila. Também foi possível observar uma molécula de DMSO em sua rede cristalina. Os comprimentos de ligação C3–O3 e C4–O4 (átomos de oxigênio envolvidos na coordenação) não apresentaram mudanças significativas. Contudo, ao verificar os ângulos de ligação (TABELA 5. 3, acima) pode-se verificar que ambos os complexos apresentam geometria quadrática plana distorcida, com ângulos ao redor do átomos de Pd(II) próximos a 90° e 180° . Os

detalhes específicos sobre coleta de dados e os parâmetros para cada complexo são fornecidos no Apêndice – Parte II, TABELA A. 3.

TABELA 5. 3. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos de ligação (°) selecionados das estruturas cristalinas dos complexos **B1** e **B4** modificado.

Comprimentos de ligação (Å)	Compostos		
	Alizarina*	B4	B4 modificado
C1=O1	1,245	1,272(7)	1,239(8)
C3-O3	1,347	1,298(7)	1,334(7)
C4-O4	1,343	1,351(9)	1,322(7)

Ângulos de ligação (deg)	Complexos	
	B4	B4 modificado
O3-Pd1-O1	88,65(18)	-
O3-Pd1-O4	-	81,62(17)
P2-Pd1-P1	84,50(7)	84,03(6)
O3-Pd1-P1	93,71(14)	175,86(13)
O1-Pd1-P2	93,17(13)	-
O3-Pd1-P2	-	97,34(12)
O1-Pd1-P1	177,27(14)	-
O4-Pd1-P1	-	97,53(13)
O2-Pd1-P2	177,93(14)	-
O4-Pd1-P2	-	172,62(14)

*Valores retirados CCDC Código 800614.

Nos espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos observou-se dois dupletos, para **B2** e **B4**, em δ 66,6 ppm ($J = 19,6$ Hz) e em δ 66,1 ppm ($J = 22,5$ Hz), respectivamente, referentes a não equivalência magnética dos átomos de fósforo que estão *trans* aos diferentes oxigênios dos ligantes (FIGURA 5.3). Para os complexos **B1** e **B3** são observados singletos alargados, devido aos dupletos que coalescem (FIGURA 5.3). Além disto, em δ -144 ppm verifica-se um multipletto que corresponde ao sinal do átomo de fósforo do contra íon PF_6^- . Os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos **B1**–**B4** são apresentadas na FIGURA A. 21, na seção de Apêndice – Parte II.

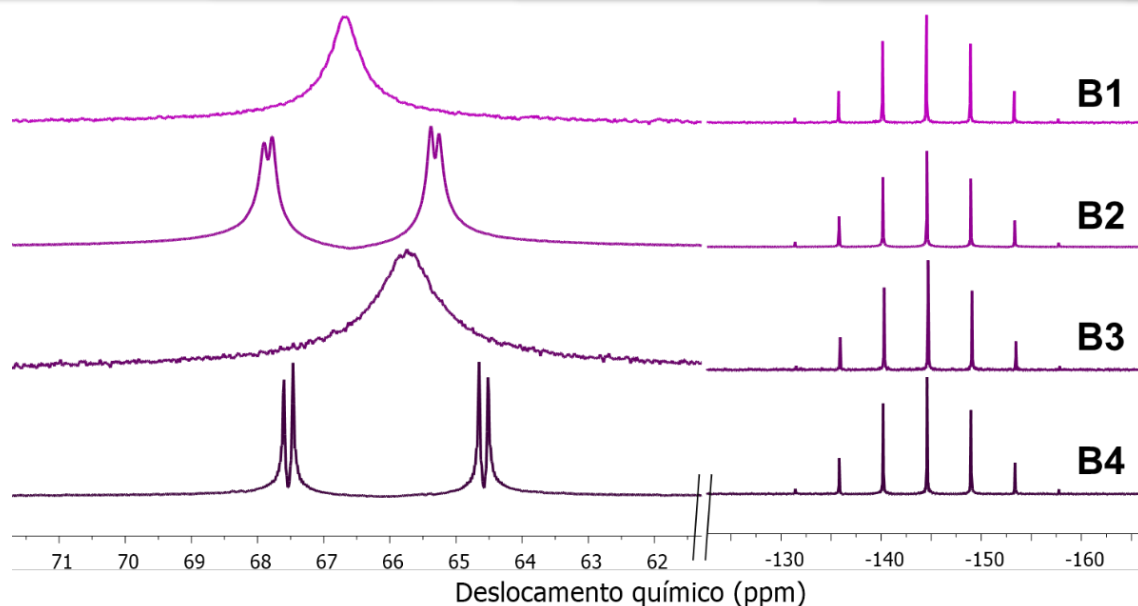


FIGURA 5. 3. Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (A) dos complexos **B1**–**B4** em $\text{CH}_2\text{Cl}_2(\text{D}_2\text{O})$.

Na tentativa de obter espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ mais bem definidos dos complexos **B1** e **B3**, foram adquiridos espectros em mais baixas temperaturas. Na FIGURA 5. 4 apresenta-se os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo **B3** obtidos em 25, 15, 0 e $\approx -10^\circ\text{C}$ e observou-se uma separação dos sinais que foi acontecendo de forma gradual, confirmando que os dupletos coalescem. No entanto, para o complexo **B1**, não foi observada a separação dos sinais até $\approx -10^\circ\text{C}$. Os espectros inteiros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos **B1** e **B3** em diferentes temperaturas são apresentadas na FIGURA A. 22-21, respectivamente, na seção de Apêndice – Parte II.

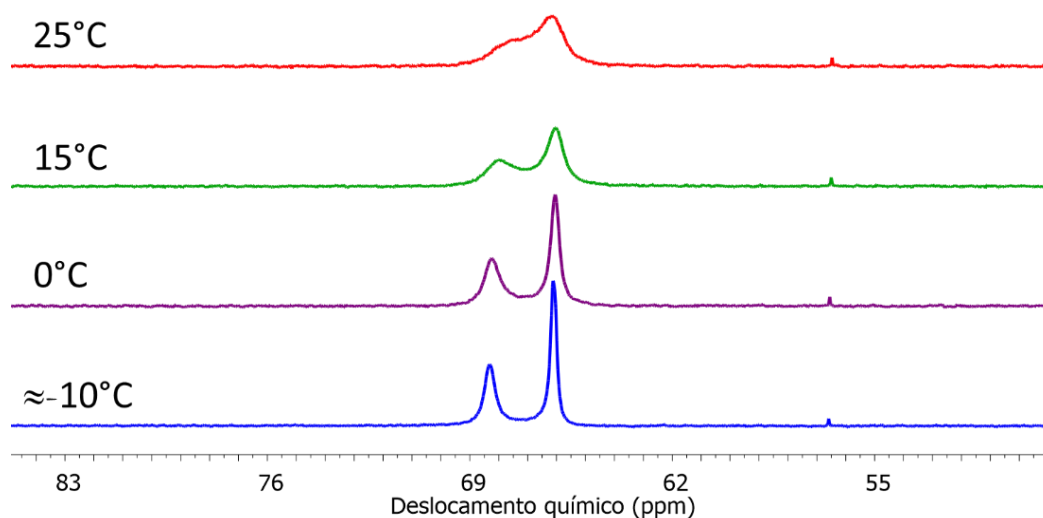


FIGURA 5. 4. Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo **B3** em diferentes temperaturas, em CD_2Cl_2 .

No experimento de RMN de ^1H para os complexos pôde-se observar os sinais referentes aos ligantes coordenados ao centro metálico, evidenciando a presença dos mesmos conforme visto na técnica de raios X. A FIGURA 5. 5 exemplifica os espectros obtidos, mostrando o espectro obtido para **B4**, onde tem-se a atribuição de todos os hidrogênios presentes nos ligantes coordenados ao paládio. Destaca-se o sinal referente aos hidrogênios alifáticos da dppe, por volta de δ 3,3 ppm, e os sinais dos hidrogênios aromáticos, diferenciados em vermelho os hidrogênios do ligante alizarina e em azul os hidrogênios orto (o), meta (m) e para (p) dos anéis aromáticos da bisfosfina dppe.

Os demais espectros de RMN de ^1H dos complexos desta série foram identificadas as regiões dos hidrogênios aromáticos da dppe e dos ligantes naftoquinônicos coordenados, que aparecem em regiões muito próximas (alguns sinais sobrepostos), e os hidrogênios alifáticos da dppe, os quais estão em concordância as integrais e acoplamentos (FIGURA A. 24, no Apêndice).

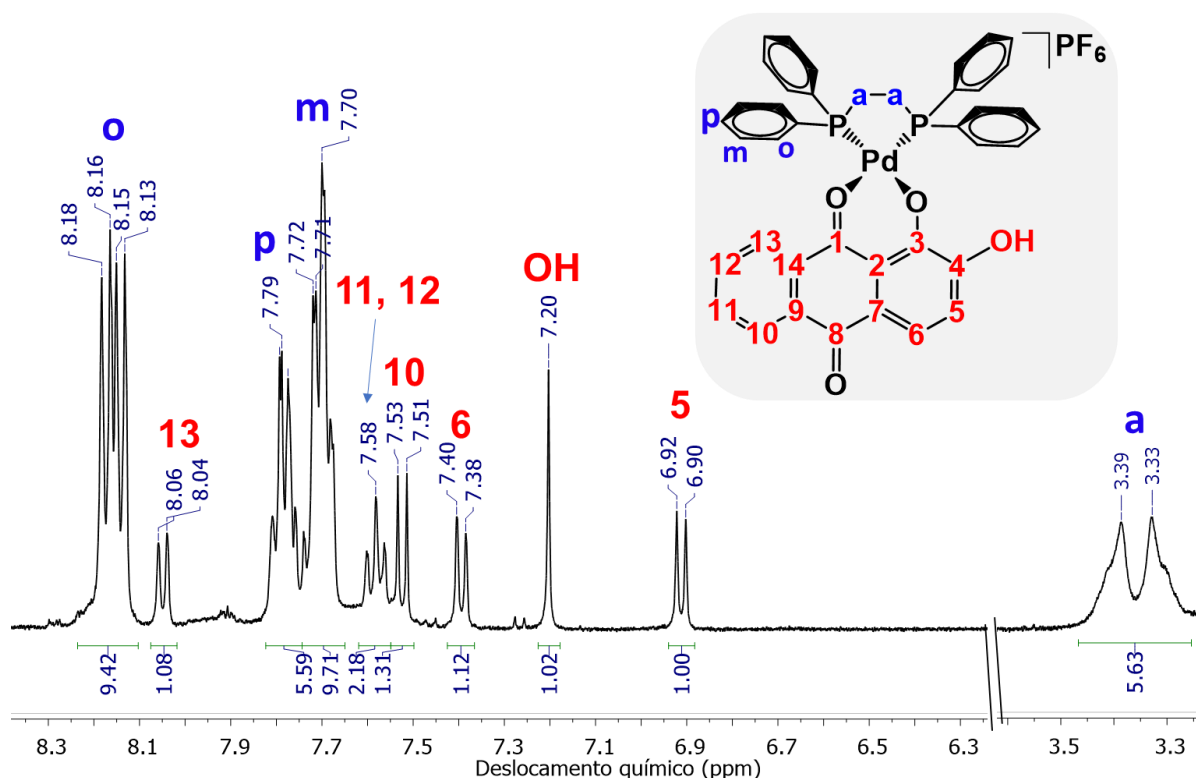


FIGURA 5. 5. Espectro de RMN de hidrogênio (^1H) obtido para o complexo **B4**, em acetona deuterada.

Os experimentos de correlação 2D ^1H - ^1H COSY confirmaram as atribuições anteriores, onde destacam-se os acoplamentos exibidos entre os

hidrogênios da região alifática do complexo **B2**, como exemplo. Conforme indicado na FIGURA 5. 6, em vermelho destacam-se os hidrogênios do ligante lapachol e em azul os hidrogênios alifáticos da bisfosfina dppe, e suas devidas correlações que permitiram a identificação dos mesmos. Os demais experimentos de correlação 2D ^1H - ^1H COSY desta série estão apresentados na FIGURA A. 25, na seção de apêndice.

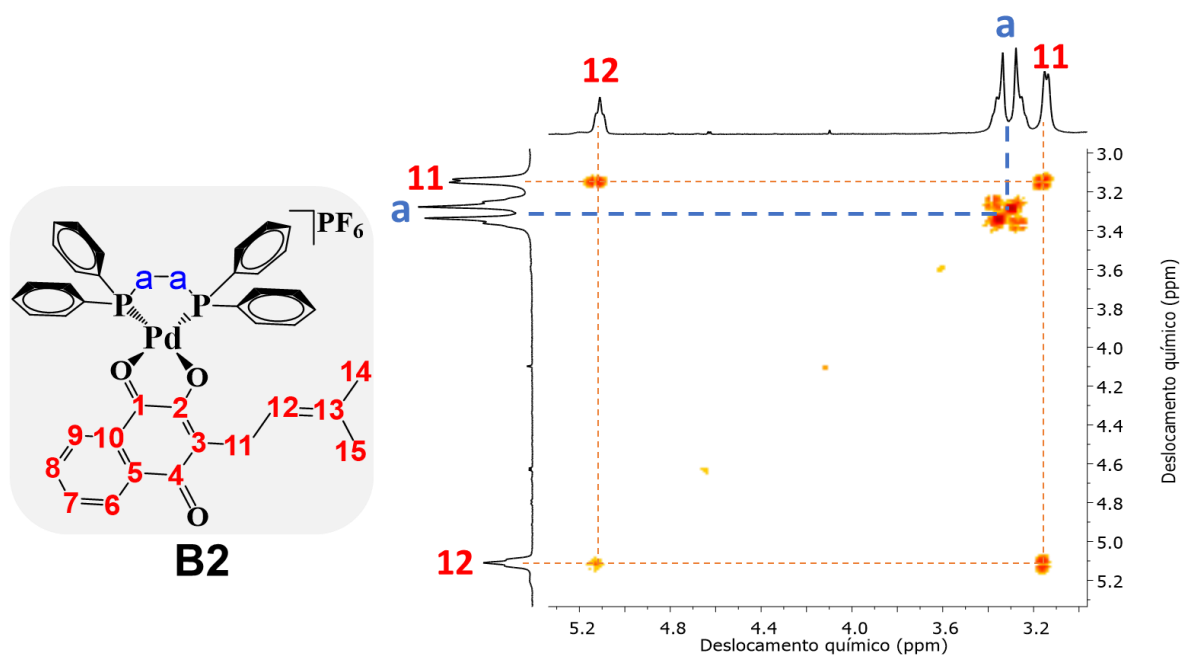


FIGURA 5. 6. Correlação ^1H - ^1H COSY obtido para o complexo **B2** em acetona deuterada. São destacados os diferentes grupos de acoplamentos dos hidrogênios na região alifática do espectro.

Os sinais exibidos nos espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ foram atribuídos com o auxílio das técnicas 2D ^1H - ^{13}C HMBC e HSQC (FIGURA A. 27 e FIGURA A. 28, em Apêndice – Parte II). Na FIGURA 5. 7 observa-se a região mais desblindada dos espectros RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do lapachol livre e complexo **B2**, como exemplo para esta série, onde observa-se os carbonos C(1), C(2) e C(4). Nota-se o maior deslocamento químico para os carbonos C(1) e C(2) para região mais desblindada, devido à diminuição da densidade eletrônica destes átomos em decorrência da coordenação do ligante ao paládio. Pouca variação é observada para o carbono C(4), o que condiz com o esperado, dado que não há coordenação do metal ao oxigênio deste carbono.

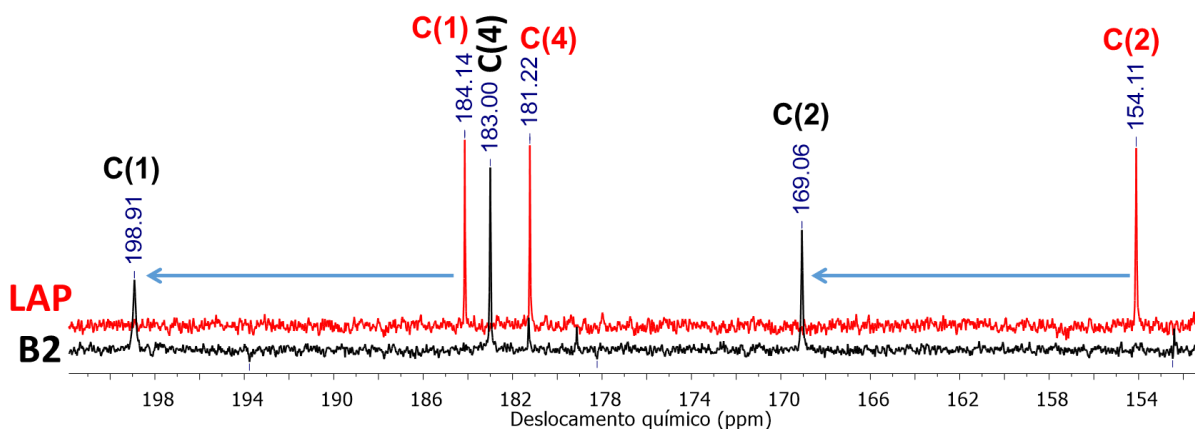


FIGURA 5. 7. Espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ obtidos para o complexo **B2** e para o lapachol livre, em acetona deuterada.

A espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho também foi empregada como uma técnica de caracterização dos complexos no estado sólido. A banda $\nu(\text{C}=\text{O})$ dos ligantes naftoquinonas e antraquinona coordenadas se deslocaram para uma menor frequência, em comparação aos ligantes livres, devido ao enfraquecimento da ligação do carbono ao oxigênio, com a retrodoação, e consequente perda parcial do caráter de dupla ligação $\text{C}=\text{O}$, após coordenação, como mostrado na TABELA 5. 4. Por outro lado, a banda $\nu(\text{C4}-\text{O})$, envolvida na coordenação, que se encontra em torno de 1000 cm^{-1} nos ligantes livres, se deslocou para uma região de maior frequência, em torno de 1100 cm^{-1} , com a coordenação ao paládio, isso ocorre devido ao aumento do caráter de dupla ligação e consequentemente deslocando para regiões de maiores frequências, fato também observado no comprimento desta ligação nas estruturas cristalinas obtidas, onde ao coordenar ela se torna mais forte (TABELA 5. 4).

Os espectros exibem outras bandas características, como as bandas de alta e média intensidade, em torno de 840 e 557 cm^{-1} , respectivamente, que são atribuídas aos modos vibracionais do contra-íon hexafluorofato (PF_6^-).⁹⁴ Os espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos **B1-B4** estão dispostos no Apêndice – Parte II, FIGURA A. 29.

TABELA 5. 4. Atribuição tentativa das principais frequências vibracionais características nos espectros de absorção na região do infravermelho dos ligantes e complexos **B1-B4**, em KBr.

Compostos	Número de onda (cm ⁻¹)			
	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C-O})$	$\nu(\text{P-F})$	$\delta(\text{P-F})$
Lausona	1679	982	-	-
B1 - [Pd(dppe)(lau)]PF ₆	1620	1105	840	557
Lapachol	1660	1050	-	-
B2 - [Pd(dppe)(lap)]PF ₆	1620	1107	840	559
3-estiril-lausona	1640	1050	-	-
B3 - [Pd(dppe)(lpm)]PF ₆	1625	1103	840	559
Alizarina	1634	1047	-	-
B4 - [Pd(dppe)(ali)]PF ₆	1614	1105	840	557

ν = vibração de estiramento; δ = vibração no plano.

Os espectros eletrônicos dos ligantes naftoquinonas encontram-se bem descritos pela literatura.¹³⁵⁻¹³⁷ É conhecido que as naftoquinonas apresentam bandas intensas em torno de 280 nm, as quais são referentes às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis aromáticos. Também são observadas nos espectros eletrônicos dos ligantes naftoquinonas bandas de característica alargada na região entre 300-450 nm, que foram atribuídas a sobreposição das transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ e de transferência de carga intramolecular (ICT, do inglês *Intramolecular Charge Transfer*) do substituinte para o anel de quinona que é um aceptor de elétrons.¹³⁶ Quando os ligantes são desprotonados as bandas ICT são mais intensas, aparecendo em torno de 500 nm, isto porque a doação do substituinte para o sistema quinonóide torna-se mais eficiente.^{11,138}

Nos espectros de UV-vis dos complexos **B1-B4** as absorções mais intensas, em torno de 280 nm, podem ser atribuídas às transições de transferência de carga intraligante dos anéis da fosfina ((ILCT) $\pi \rightarrow \pi^*$, dppe), bem como dos anéis aromáticos dos ligantes naftoquinonas ou antraquinona. As transições de menor energia no espectro dos complexos corresponde às transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ e não foram deslocadas após a coordenação.

A TABELA 5. 5 mostra os comprimentos de onda máximos das bandas observadas, bem como os respectivos valores de absorvidade molar (ϵ) de todos os

complexos, além da atribuição tentativa das bandas. Os espectros dos complexos em diferentes concentrações, em DMSO, são apresentadas na seção de apêndice na FIGURA A. 30.

TABELA 5. 5. Comprimento de onda de absorção máxima (λ , nm), absorvidade molar (ϵ , mol⁻¹ cm⁻¹ L) e atribuição tentativa das bandas dos complexos **B1-B4**, em solução de DMSO.

Complexos	λ (nm)	ϵ (mol ⁻¹ cm ⁻¹ L)	Transição
B1 - [Pd(dppe)(lau)]PF ₆	278	33654	ILCT: $\pi \rightarrow \pi^*$
	326	ombro	$\pi \rightarrow \pi^*$
	478	2548,6	$n \rightarrow \pi^*$
B2 - [Pd(dppe)(lap)]PF ₆	274	54087	ILCT: $\pi \rightarrow \pi^*$
	334	ombro	$\pi \rightarrow \pi^*$
	486	5053,5	$n \rightarrow \pi^*$
B3 - [Pd(dppe)(lpm)]PF ₆	272	42293	ILCT: $\pi \rightarrow \pi^*$
	336	31883	ILCT: $\pi \rightarrow \pi^*$
	382	36254	ICT
	566	4809,2	$n \rightarrow \pi^*$
B4 - [Pd(dppe)(ali)]PF ₆	274	46697	ILCT: $\pi \rightarrow \pi^*$
	338	ombro	$\pi \rightarrow \pi^*$
	530	10353	$n \rightarrow \pi^*$

Portanto, após bem caracterizar os complexos da série B, um estudo de estabilidade dos mesmos foi realizado nas condições utilizadas nos testes biológicos. Foram adquiridos espectros de UV-vis dos complexos (20 μ M) em meio de cultura celular RPMI (sem fenol) e 0,5% DMSO, em 0, 24 e 48 h. Os espectros obtidos inicialmente e ao fim dos experimentos não apresentaram mudanças significativas, sendo possível sugerir que os complexos são estáveis nas condições dos experimentos biológicos, em até 48 horas, com exceção do complexo **B2** e **B4**, onde foi possível observar uma diminuição das bandas em até 48 h (FIGURA 5. 8). Como visto anteriormente, o complexo **B4** em solução de meio de cultura pode formar um subproduto neutro, devido a desprotonação do grupo OH e posterior coordenação, como mostrado na FIGURA 5. 2(B).

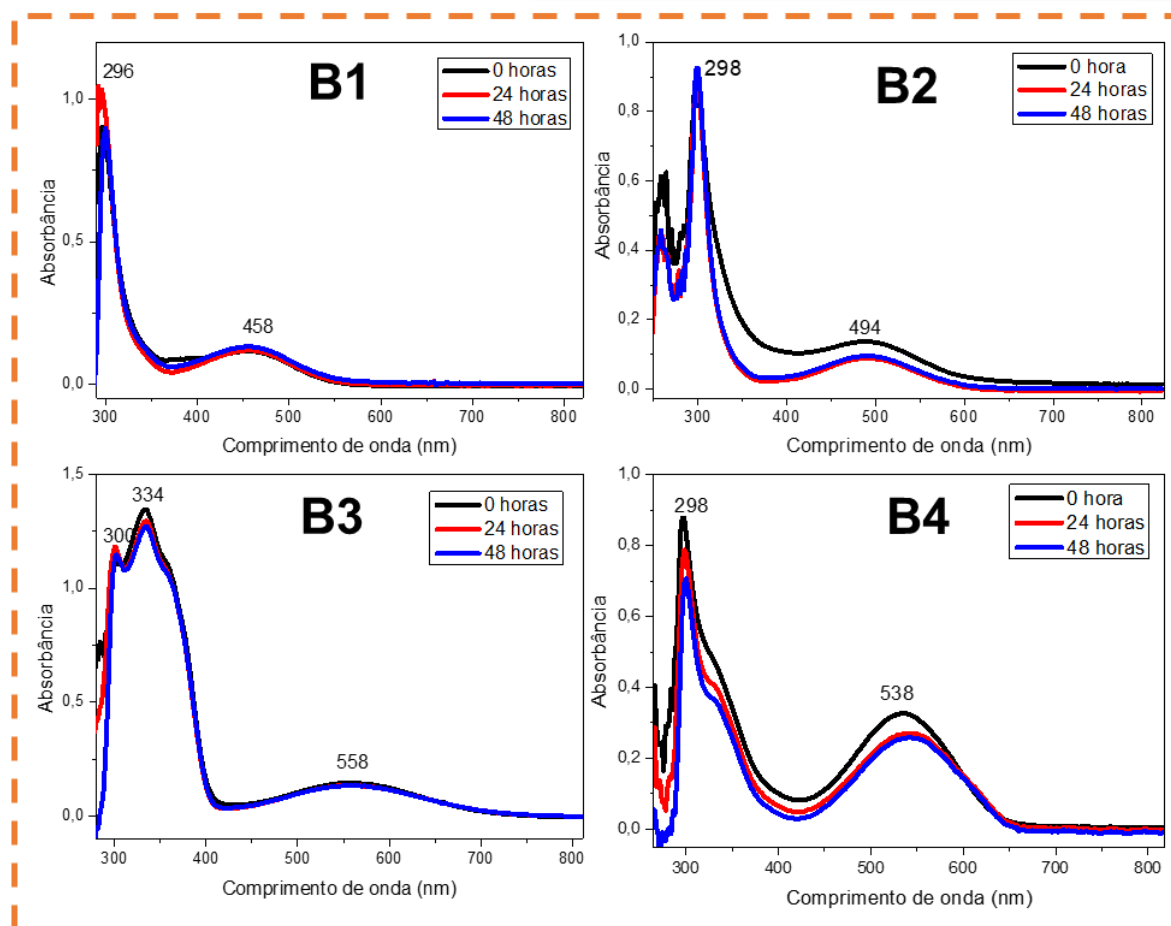


FIGURA 5. 8. Espectros de UV-vis dos complexos **B1-B4** (20 $\mu\text{mol/L}$) obtidos em 0, 24 e 48 h, em meio de cultura RPMI sem fenol e 0,5% de DMSO, incubados a 37°C.

5.2 Estudos biológicos dos complexos da série B

O ensaio de viabilidade celular dos complexos da Série B foi realizado frente as linhagens celulares derivadas de tumor humano, MCF-7, SKBR-3, A549, DU-145, A2780 e A2780cis e frente a linhagem não tumoral MRC-5. Os valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) em 48 horas estão apresentados na TABELA 5. 6.

A atividade citotóxica dos complexos **B1-B4** frente às linhagens histológicas tumorais ovarianas (A2780 e A2780cis) é consideravelmente maior que nas demais linhagens histológicas tumorais (MCF-7, SKBR-3, A549, DU-145). Os complexos apresentaram $\text{IC}_{50} \geq 40 \mu\text{mol L}^{-1}$ (maior concentração testada) nas linhagens tumorais MCF-7 e A549. Também foi observado $\text{IC}_{50} \geq 40 \mu\text{mol L}^{-1}$ na linhagem não tumoral MRC-5, mostrando que os complexos são seletivos às células tumorais.

TABELA 5. 6. Valores de IC₅₀ obtidos para os complexos **B1-B4** (**B1** -[Pd(dppe)(lau)]PF₆; **B2** - [Pd(dppe)(lap)]PF₆; **B3** - [Pd(dppe)(lpm)]PF₆; **B4** - [Pd(dppe)(ali)]PF₆), precursor (**P2** - [PdCl₂(dppe)]), lausona (lau), lapachol (lap), 3-estitil-lausona (lpm), alizarina (ali) e cisplatina (CDDP) frente as linhagens celulares tumorais (MCF-7, SKBR-3, A549, DU-145, A2780 e A2780cis) e não tumoral (MRC-5) após 48 horas de incubação com os compostos.

Comp.	IC ₅₀ (μmol/L) 48 h							IS MRC-5 A2780	IS MRC-5 A2780cis	log P
	MCF-7	SKBR-3	A549	DU-145	A2780	A2780cis	MRC-5			
B1	≥40	≥40	≥40	≥30	17,6 ± 0,2	≥40	≥40	≥2,3	-	0,77 ± 0,08
B2	≥40	13,1 ± 0,4	≥40	13,1 ± 0,3	3,5 ± 0,1	12,4 ± 0,8	≥40	≥11,4	≥5,8	0,92 ± 0,09
B3	≥40	≥40	≥40	≥40	9,9 ± 0,6	18,5 ± 0,5	≥40	≥4,0	≥2,2	1,18 ± 0,03
B4	≥40	≥40	≥40	≥40	12,8 ± 0,8	16,6 ± 0,3	≥40	≥3,1	≥2,4	1,05 ± 0,04
P2	≥50	≥50	n.t	n.t	≥50	≥50	n.t	-	-	n.t
lau	≥100	n.t	≥100	n.t	≥100	≥100	≥100	-	-	n.t
lap	≥100	n.t	≥100	n.t	≥100	69,8 ± 0,7	≥100	-	≥1,4	n.t
lpm	≥100	n.t	≥100	n.t	38,7 ± 2,8	≥100	≥100	≥2,6	-	n.t
ali	≥100	n.t	≥100	n.t	66,7 ± 2,3	≥100	≥100	-	-	n.t
CDDP	13,9 ± 2,0	10,2 ± 0,9	14,4 ± 1,4	2,3 ± 0,4	11,8 ± 0,8	31,8 ± 1,8	29,1 ± 0,8	≥2,5	-	n.t

n.t= não testado. IS (Índice de Seletividade): IS = IC₅₀(MRC-5)/ IC₅₀(A2780); IS = IC₅₀(MRC-5)/ IC₅₀(A2780cis).

De modo geral, entre os complexos da série B, o complexo **B2** teve destaque, pois o mesmo apresentou menor IC_{50} que os demais complexos da série, nas linhagens de células SKBR-3, DU-145, A2780 e A2780cis. Frente à linhagem A2780, **B2** apresentou menor IC_{50} ($3,5 \pm 0,1 \mu\text{mol/L}$) que o precursor, ligante e a cisplatina, sendo esse 3,4 vezes menor que o encontrado para a cisplatina.

Um dos parâmetros que pode se correlacionar com os resultados de citotoxicidade é a lipofilicidade dos compostos.^{99,100} Valores positivos dos coeficientes de partição ($\log P$), conforme apresentado na TABELA 5. 6, indicam que os complexos **B1-B4** têm uma maior afinidade pela fase orgânica em comparação com a fase aquosa. Esse método é frequentemente empregado para avaliar a capacidade de um composto de atravessar as membranas plasmáticas, que consistem em uma bicamada lipídica, por meio de difusão passiva. Os resultados dos coeficientes de partição sugerem que os complexos da Série B podem atravessar a membrana plasmática por difusão passiva, devido à sua natureza lipofílica. No entanto, não é possível estabelecer uma relação direta entre os valores de lipofilicidade e a citotoxicidade dos complexos desta série.

Outro fator importante de ser analisado é a seletividade, que se relaciona com a capacidade dos complexos de serem mais eficazes contra as células tumorais em comparação com as células não tumorais. Com base nos resultados do IC_{50} , calculamos os índices de seletividade, que são determinados pela divisão dos valores de IC_{50} nas células não tumorais pelos valores de IC_{50} nas células tumorais. O complexo **B2** se destacou nesta série por possuir um excelente índice de seletividade em ambas linhagens de células de ovário, com valores de $\geq 11,4$ e $\geq 5,8$, para as linhagens de células A2780 e A2780cis, respectivamente (TABELA 5. 6).

A morfologia das células tumorais de ovário da linhagem A2780 sob a influência do composto **B2** foi analisada por meio de um microscópio invertido equipado com uma câmera fotográfica. Foram registradas imagens das células em diferentes momentos de exposição ao composto, ou seja, após 0, 24 e 48 horas, em concentrações variadas, como ilustrado na FIGURA 5. 9.

Após 24 horas de exposição ao composto, já foi possível observar modificações morfológicas em comparação as células do controle negativo nas concentrações de $7,00$ e $14,00 \mu\text{mol/L}$, equivalentes a $2 \times IC_{50}$ e $4 \times IC_{50}$, respectivamente. Nas células tratadas com o composto após 48 h, foram observadas

algumas alterações, como a diminuição da confluência celular, e uma morfologia distinta das células do controle nas concentrações superiores ao IC_{50} ($3,50 \mu\text{mol/L}$).

As diferenças na morfologia das células se tornam mais notáveis a partir da concentração equivalente a $2 \times IC_{50}$, onde é possível observar células com formas irregulares e arredondadas. Essas alterações na morfologia celular, são sugestivas de morte celular.¹³⁹

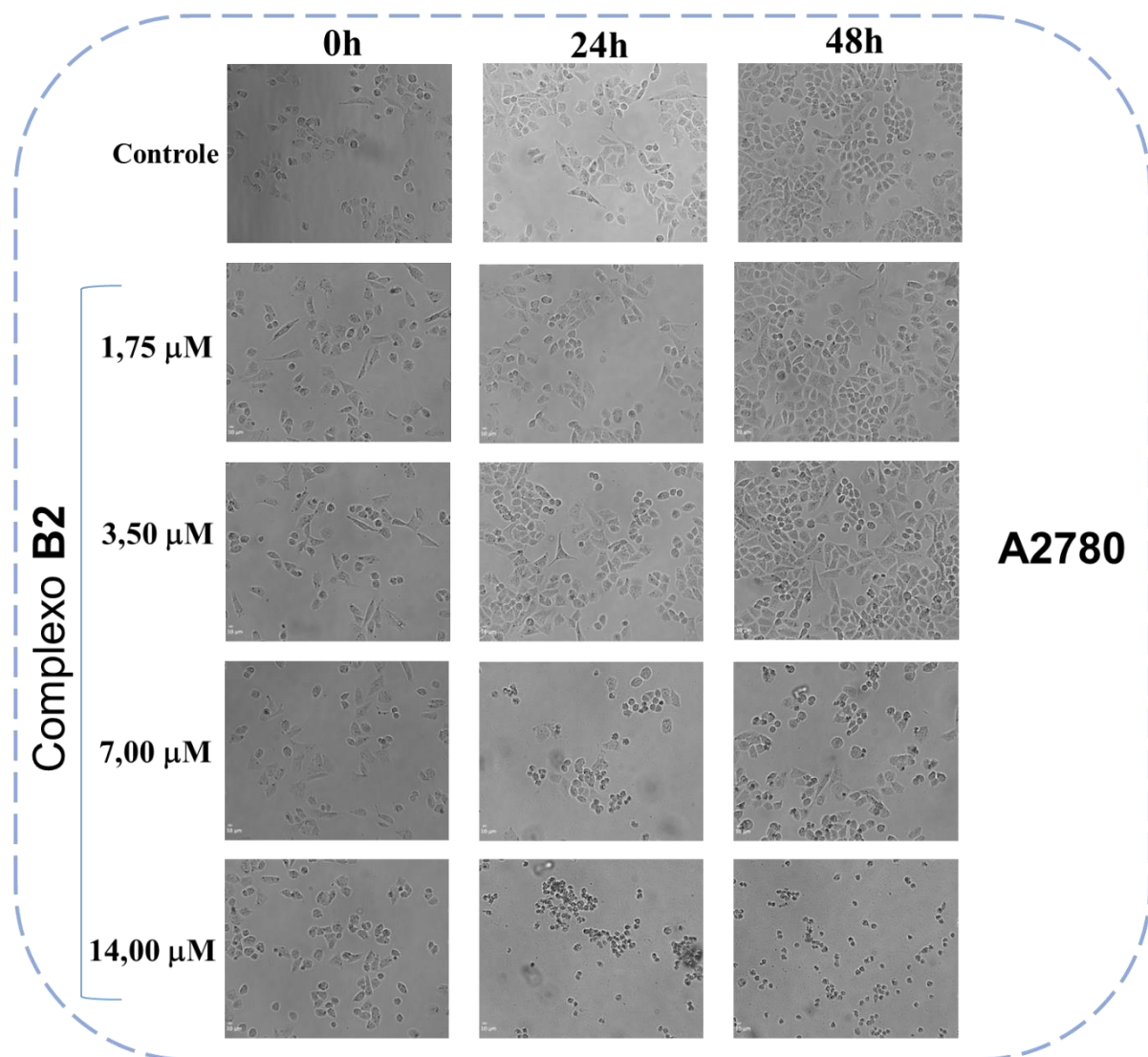


FIGURA 5. 9. Alterações morfológicas das células tumorais de ovário (A2780) após o tratamento com diferentes concentrações do complexo **B2** ($1/4 \times IC_{50}$ ($0,87 \mu\text{M}$), $1/2 \times IC_{50}$ ($1,75 \mu\text{M}$), IC_{50} ($3,50 \mu\text{M}$), $2 \times IC_{50}$ ($7,00 \mu\text{M}$) e $4 \times IC_{50}$ ($14,00 \mu\text{M}$)). As células foram tratadas com o **B2** e fotografadas por diferentes períodos. Imagens micrográficas correspondentes a uma das triplicatas representativas.

Para fins de comparação, também conduzimos uma análise morfológica nas células não tumorais de pulmão (MRC-5) que foram tratadas com o complexo **B2**.

A FIGURA 5. 10 ilustra que somente após 48 horas, na concentração de 40 $\mu\text{mol/L}$, o complexo **B2** foi capaz de induzir danos às células. Nesse ponto, observa-se algumas células com uma forma mais arredondada em comparação ao grupo controle. Esses resultados estão em consonância com os dados obtidos no ensaio de viabilidade celular (MTT).

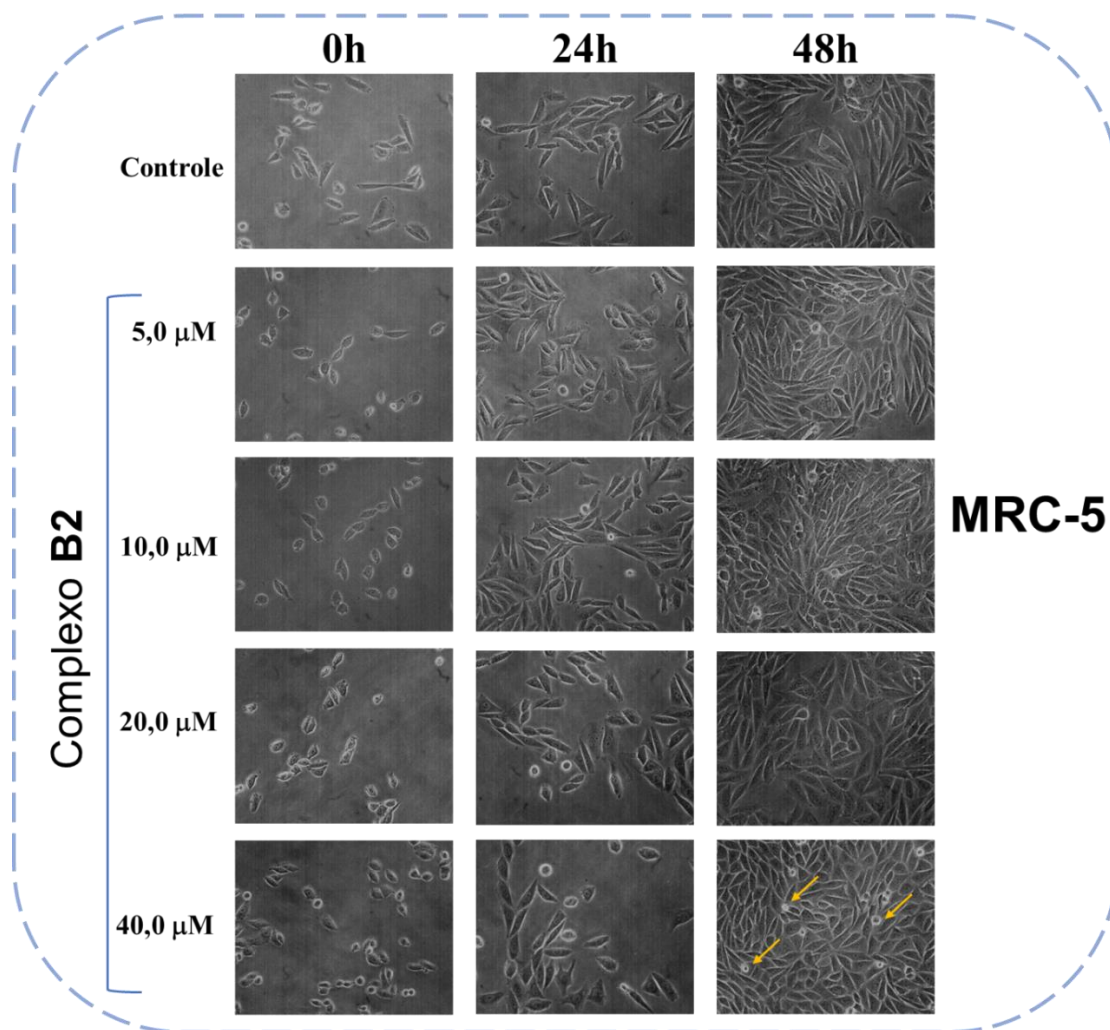


FIGURA 5. 10. Alterações morfológicas nas células não tumorais de pulmão (MRC-5) após o tratamento com diferentes concentrações do complexo **B2** (5 μM ; 10 μM ; 20 μM ; 40 μM). As células foram tratadas com o **B2** e fotografadas por diferentes períodos. Imagens micrográficas correspondentes a uma das triplicatas representativas. As setas apontam para as células em formato arredondado.

O ensaio de sobrevivência clonogênica avalia a capacidade de uma única célula se proliferar indefinidamente e formar uma colônia composta por pelo menos 50 células.¹⁰⁸ Portanto, por meio desse ensaio, foi possível avaliar a eficácia citotóxica e a capacidade proliferativa do complexo **B2** nas células A2780 e MRC-5.

No caso da linhagem celular A2780, os resultados indicaram que o complexo **B2** inibiu de maneira significativa a área e a intensidade das colônias, a partir da concentração do IC₅₀ (3,5 µM), após 48 horas de tratamento (conforme ilustrado na FIGURA 5. 11). Esses resultados são congruentes com os achados do ensaio de viabilidade celular (MTT) e sugerem efeitos citotóxicos e citostáticos. Isso significa que o complexo **B2** não apenas interfere no crescimento, desenvolvimento e na multiplicação celular, mas também induz a morte das células tumorais.

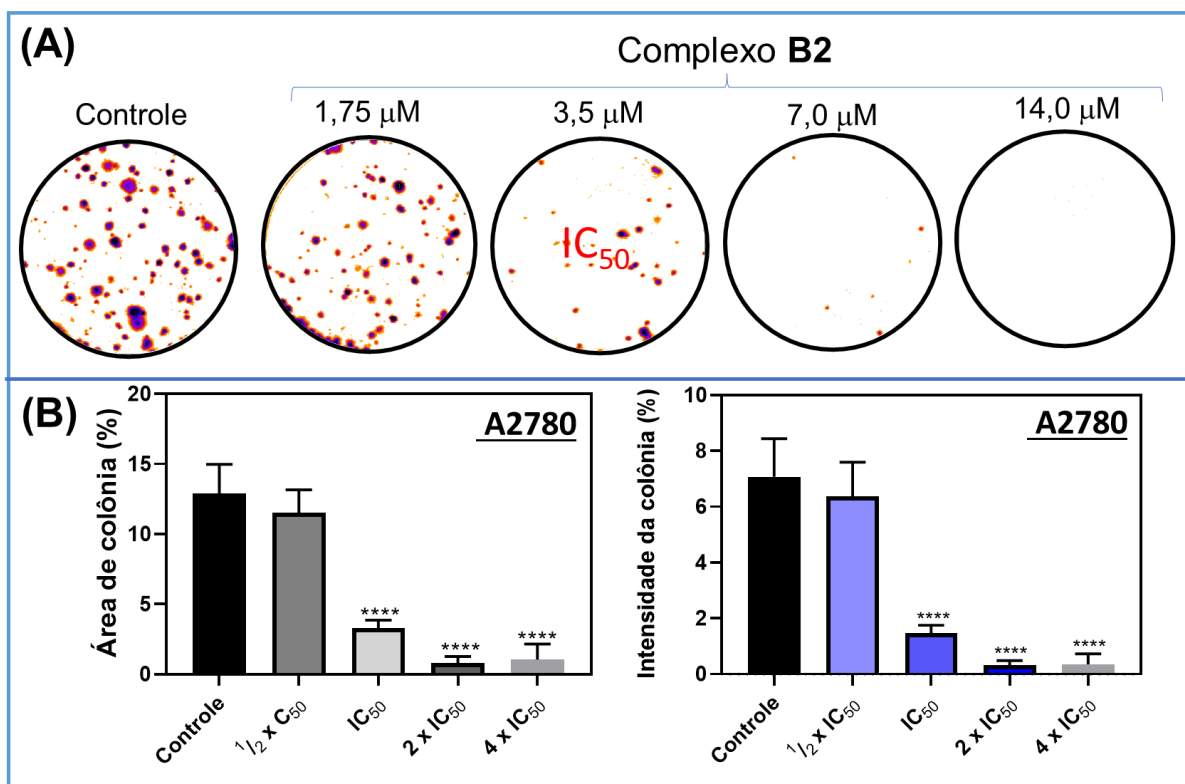


FIGURA 5. 11. Sobrevivência clonogênica das células A2780 tratadas com diferentes concentrações do complexo **B2** (1/2×IC₅₀ (1,75 µM), IC₅₀ (3,5 µM), 2×IC₅₀ (7,0 µM) e 4×IC₅₀ (14,0 µM)) por 48 h. **(A)** Representação dos poços de uma das triplicatas e **(B)** quantificações gráficas da área e intensidade das colônias. Os dados representam a média ± DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 e **** p <0,0001 usando ANOVA e teste Dunnet's.

Para fins de comparação, também conduzimos o ensaio de formação de colônias com as células saudáveis MRC-5 (conforme ilustrado na FIGURA 5. 12(A)) utilizando diferentes concentrações do complexo **B2** (2,5 µM; 5 µM; 10 µM; 20 µM e 40 µM). Observamos uma leve redução na área e na intensidade das colônias apenas na maior concentração utilizada (40 µM) (FIGURA 5. 12 (B)). Isso sugere que o complexo **B2** apresenta uma notável seletividade, uma vez que seus efeitos

citotóxicos e citostáticos são mais pronunciados nas células tumorais A2780 em comparação com as células não tumorais MRC-5.

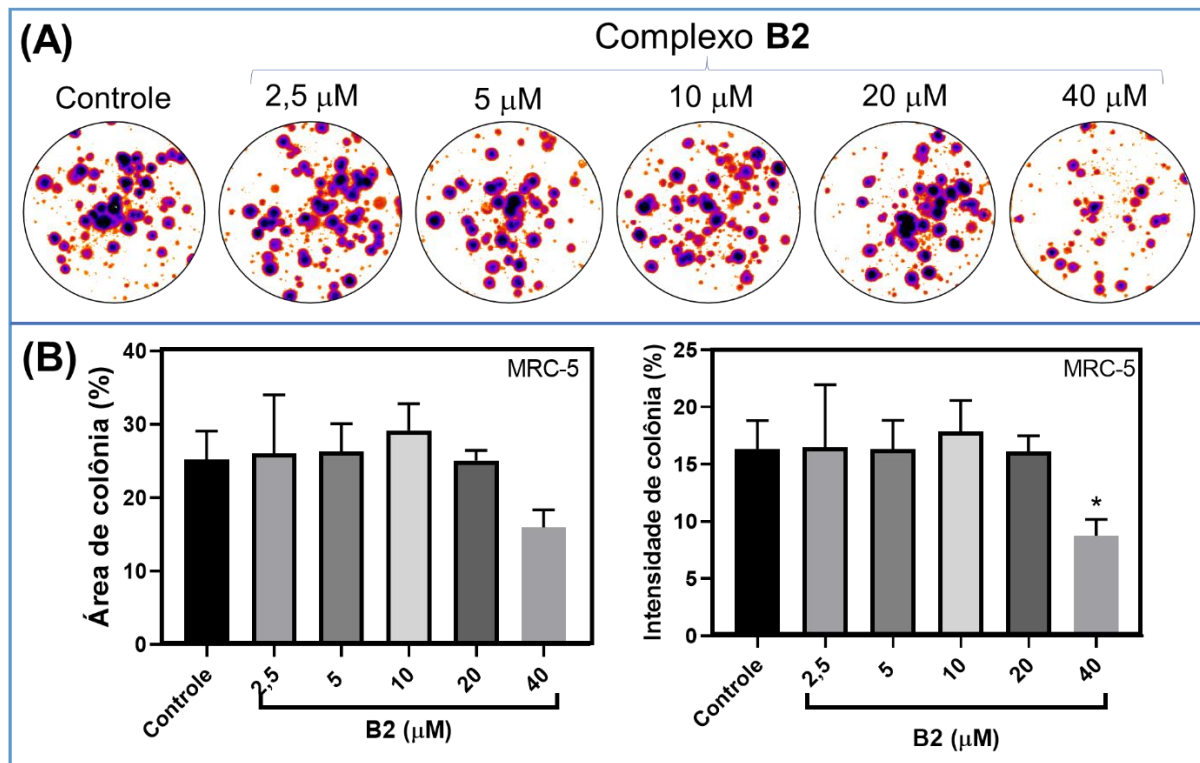


FIGURA 5. 12. Sobrevivência clonogênica das células MRC-5 tratadas com diferentes concentrações do complexo **B2** (2,5 μM; 5 μM; 10 μM; 20 μM e 40 μM) por 48 horas. **(A)** Representação dos poços de uma das triplicatas e **(B)** quantificações gráficas da área e intensidade das colônias. Os dados representam a média ± DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Dunnet's.

Conforme mencionado no capítulo anterior, é comum que as células tumorais apresentem mutações que resultam na perda dos pontos de controle do ciclo celular. Isso faz com que as células fiquem presas em um ciclo de replicação contínua, o que leva à proliferação descontrolada das células.

Portanto, investigamos a capacidade do complexo **B2** de alterar a distribuição do ciclo celular nas células tumorais A2780. A FIGURA 5. 13 apresenta os histogramas e gráficos mostrando a porcentagem de distribuição do ciclo celular em diferentes concentrações de **B2**. Ao analisar o perfil de distribuição do ciclo celular, fica evidente que há uma acumulação de células com conteúdo nuclear reduzido, o que indica claramente a presença de DNA fragmentado (Sub-G1), sendo um indicativo de apoptose. O acúmulo das células em Sub-G1 ocorreu, significativamente, a partir

da concentração de $2 \times IC_{50}$, conseqüentemente, a proporção das células na fase G1, S e G2 apresentou um decréscimo, em comparação com as células não tratadas.

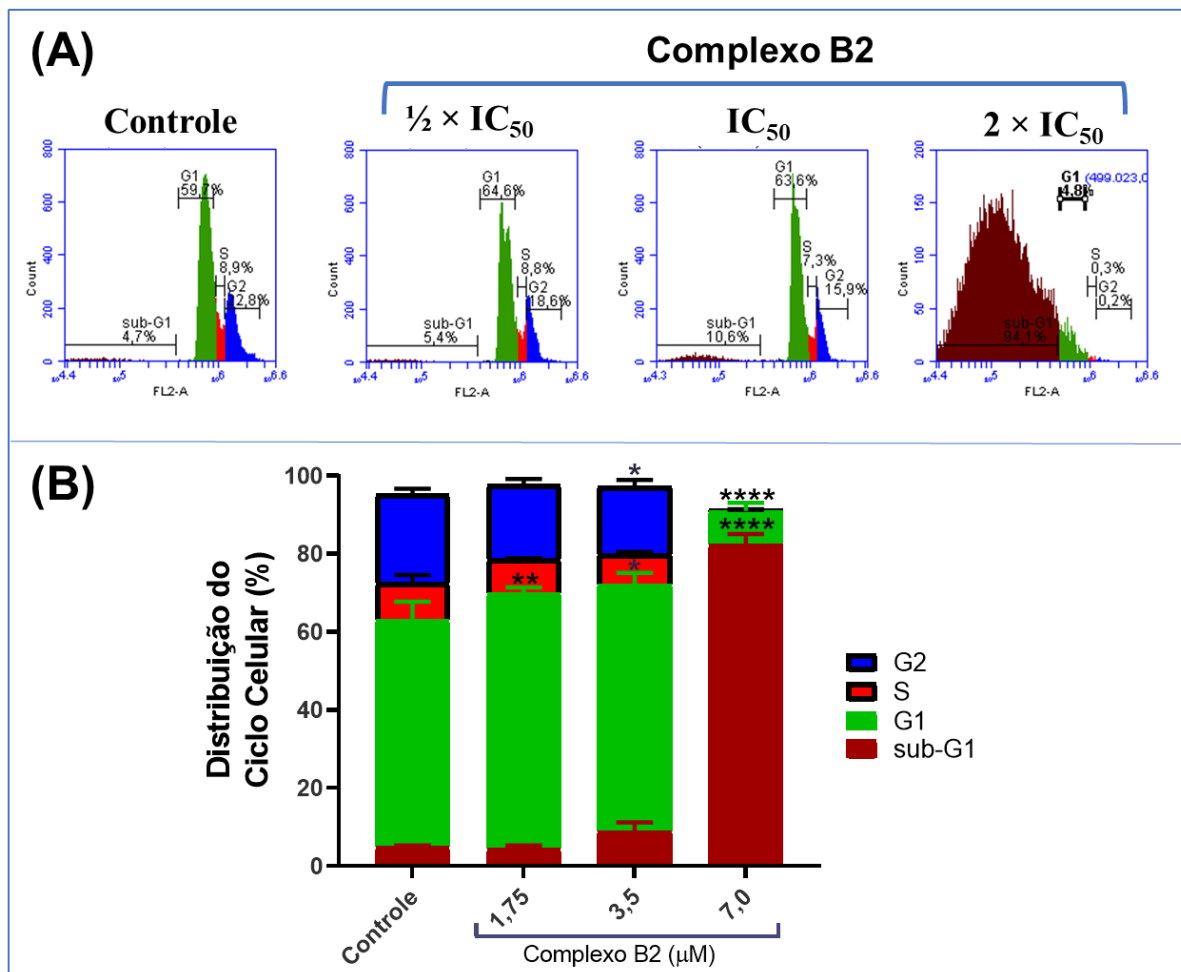


FIGURA 5. 13. **(A)** Histogramas de DNA do ensaio do ciclo celular nas células A2780 incubadas com iodeto de propídio (PI) (detectado no canal FL2-A), após tratamento com o complexo **B2**, em diferentes concentrações ($1/2 \times IC_{50}$ (1,75 μM), IC_{50} (3,5 μM), $2 \times IC_{50}$ (7,0 μM)), por 48 h. **(B)** gráfico da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após tratamento com o complexo **B2**, em diferentes concentrações, por 48 h. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,005$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Tukey's.

Para avaliar o tipo de morte causada pelo complexo **B2** nas células tumorais A2780 foi utilizada a citometria de fluxo em conjunto com os corantes anexina V-PE e 7-ADD.¹⁴⁰ Nas células não tratadas com o complexo **B2**, utilizadas como controle negativo (0,5% de DMSO), observou-se que a porcentagem de células viáveis foi de 93%, enquanto a porcentagem de células em apoptose inicial foi de 6,8%. As células não tratadas com o complexo, empregadas como controle negativo (0,5% de DMSO), a porcentagem de células viáveis foi de 93%, enquanto a

porcentagem de células em apoptose inicial e tardia foi de 6,2%. Para as células tumorais A2780 tratadas com o complexo **B2** na concentração de IC_{50} , um total de 8,5% das células estavam em processo de morte celular por apoptose em fase inicial e tardia (FIGURA 5. 14).

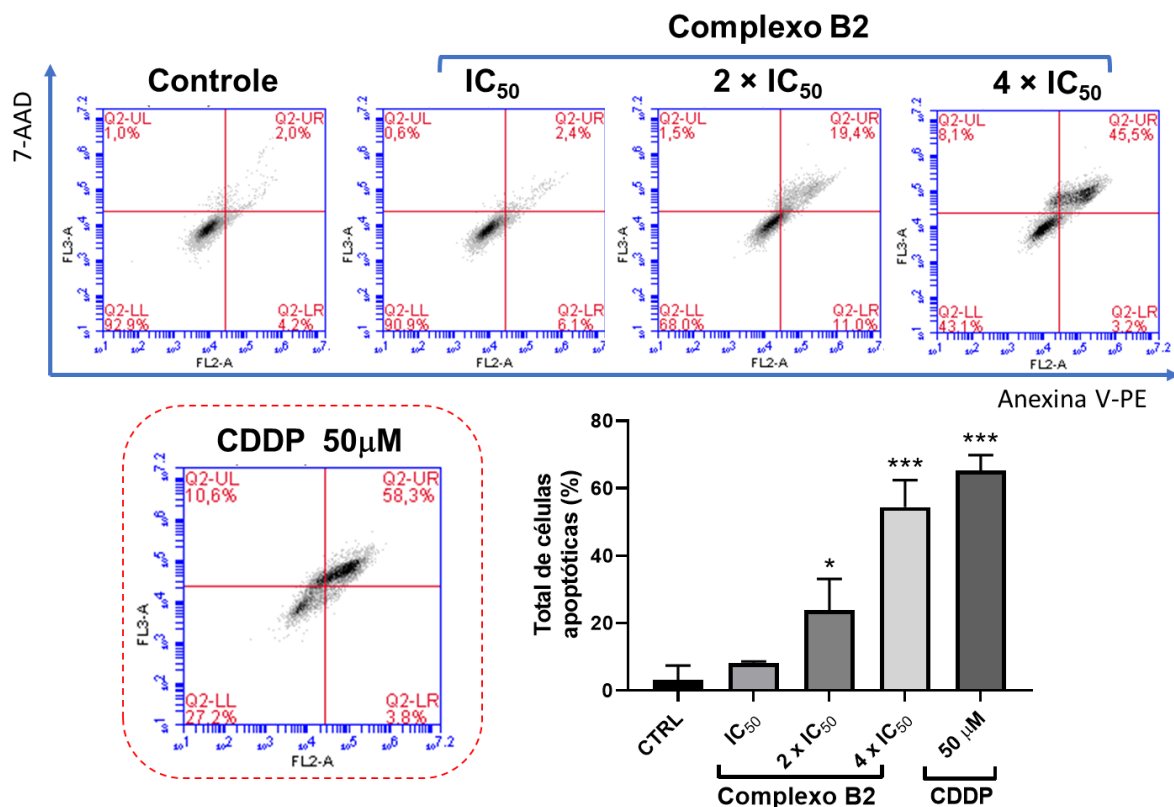


FIGURA 5. 14. Gráficos dot plots de Anexina V-PE vs 7-ADD, para determinação de células A2780 em apoptose após o tratamento com diferentes concentrações do complexo **B2** (IC_{50} (3,5 μ M), $2 \times IC_{50}$ (7,0 μ M) e $4 \times IC_{50}$ (14,0 μ M)) e cisplatina (CDDP, 50 μ M) por 24 h. Gráfico da porcentagem total de células em apoptose (inicial e tardia) após o tratamento com o complexo **B2**. Diferenças significativas do controle são indicadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ usando ANOVA e teste Tukey's.

A medida em que se aumentou as concentrações do complexo **B2**, as populações de células em apoptose cresceram e, conseqüentemente, houve um decréscimo na porcentagem de células viáveis. Na concentração de $2 \times IC_{50}$ e $4 \times IC_{50}$ do complexo, a proporção total de células apoptóticas foi significativa em relação ao controle (30,4% e 48,7%, respectivamente). Estes dados corroboram com os resultados de ciclo celular, o qual apresentou quantidade de células significativas em sub-G1 apenas na concentração de $2 \times IC_{50}$ e $4 \times IC_{50}$ do complexo. Ao analisar os resultados, fica evidente que as células são induzidas à morte por apoptose de forma dependente da concentração do complexo **B2**. Foram observadas poucas células

positivas apenas para o 7-ADD, o que significa que foram detectadas poucas células em necrose. O ensaio de apoptose para a cisplatina nas células A2780 também foi realizado e podemos observar que na concentração de 50 μM a cisplatina induz a apoptose em 62,1% das células A2780.

5.3 Estudos de interação com biomoléculas da Série B

Antes de conduzir os ensaios de interação com biomoléculas, realizamos estudos de estabilidade registrando os espectros de UV-vis dos complexos em uma solução de trizma com 40% de DMSO durante um período de 0 e 24 horas, com incubação a 37°C e agitação a 1000 RPM. Para os complexos da Série B, não observou-se diferenças significativas nos espectros até 24 h de incubação. Portanto, é possível sugerir que os complexos **B1-B4** são estáveis nas condições dos testes de interação com biomoléculas (FIGURA 5. 15).

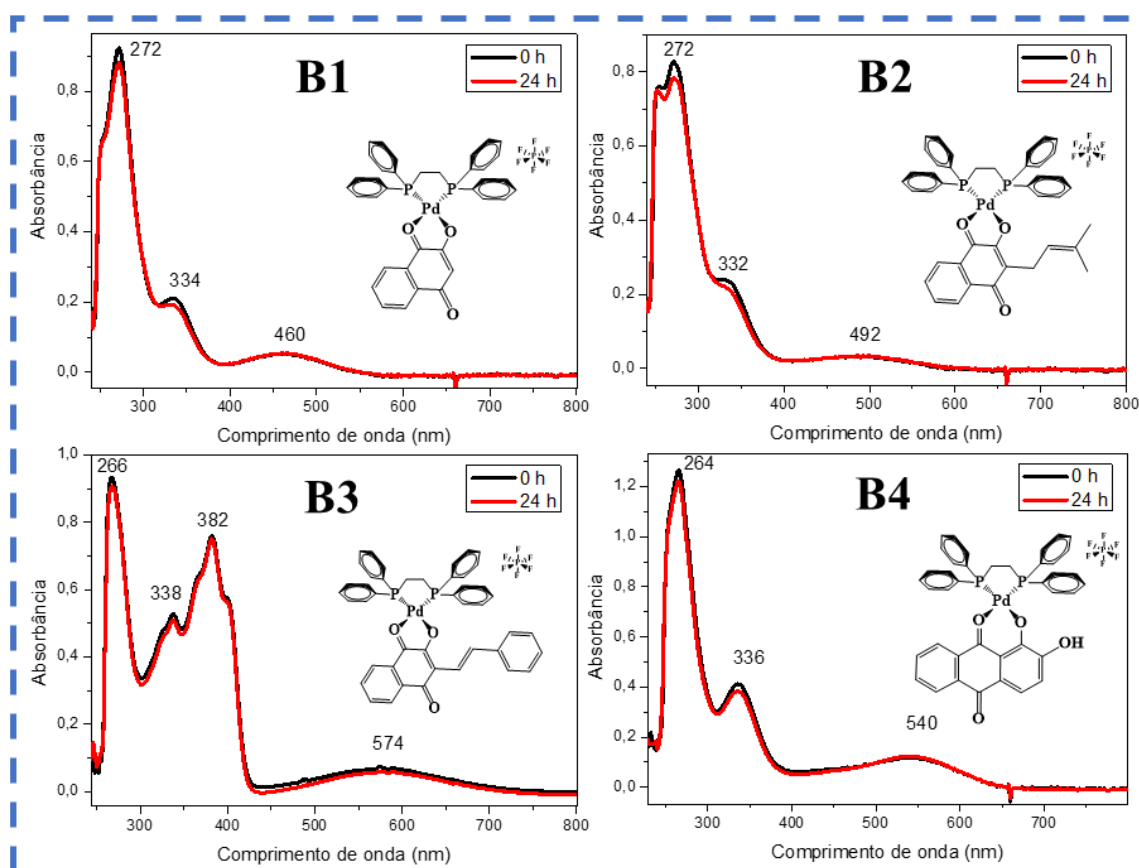


FIGURA 5. 15. Espectros de UV-vis dos complexos **B1-B4** em trizma com 40% DMSO, em 0 e 24 horas, com incubação a 1000 RPM a 37°C.

Como já mencionado no capítulo anterior, a interação de complexos com a HSA representa uma etapa crucial na farmacocinética de possíveis fármacos, desempenhando um papel fundamental na distribuição pelo corpo, atividade

farmacológica, toxicidade, eficácia do medicamento e outros aspectos importantes.^{85,121}

Os resultados dos ensaios apontam para uma diminuição na fluorescência da HSA na presença dos compostos da série B, o que sugere que a interação entre essas substâncias causa modificações na conformação do ambiente próximo ao resíduo de fluoróforo Trp-214. Foi notada uma diminuição nas intensidades de fluorescência da HSA conforme as concentrações dos complexos aumentavam nas soluções, com reduções variando de 18% a 32% em relação à fluorescência inicial. O espectro de supressão de fluorescência da HSA do complexo **B2** é apresentado na FIGURA 5. 16, o mesmo teve a redução de 25% em relação a fluorescência inicial. Os espectros de supressão de fluorescência da HSA dos demais complexos estão apresentados na FIGURA A. 32, em Apêndice – Parte II.

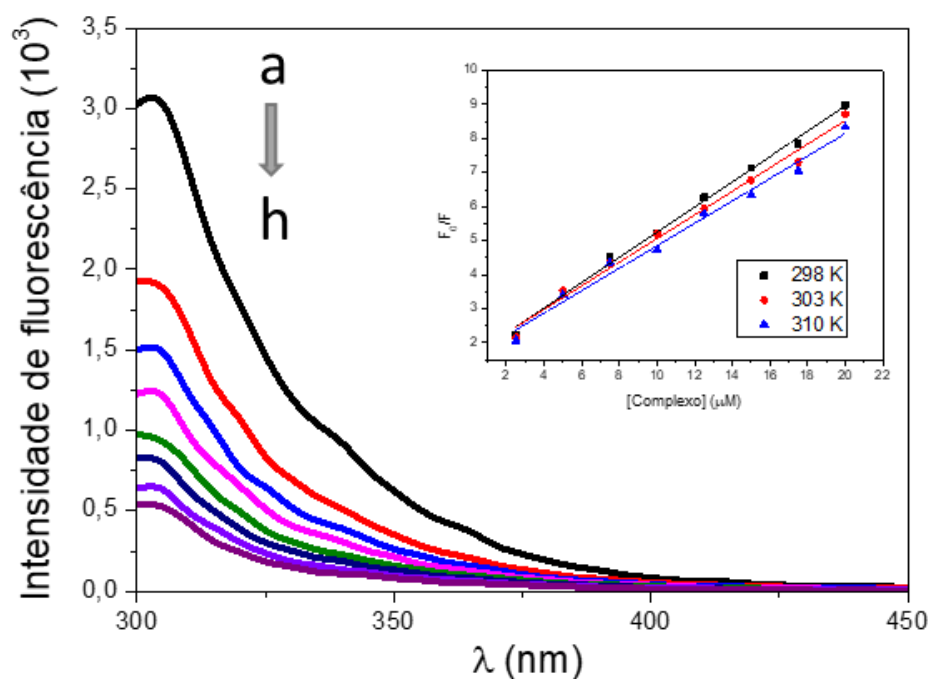


FIGURA 5. 16. Espectros de supressão de fluorescência da HSA na ausência (a) e presença do composto **B2** (b-h; b= 2,5 μM ; c= 5 μM ; d= 7,5 μM ; e= 10 μM ; f= 12,5 μM ; g= 15,0 μM e h= 17,5 μM), com concentração constante da HSA de 2,5 μM . Razão [Complexo]/[HSA]= 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7. Gráficos de Stern-Volmer para supressão de fluorescência da HSA na presença dos compostos à 298, 303 e 310 K.

A constante de Stern-Volmer (K_{sv}) foi determinada pela análise de uma regressão linear dos dados obtidos no gráfico (F_0/F) em função da concentração do complexo [Complexo], enquanto k_q foi calculada a partir dos valores de K_{sv} assumindo

$\tau_0 = 6,2 \text{ ns}$.¹²⁴ A linearidade dos gráficos de Stern-Volmer indica o envolvimento de apenas um tipo de mecanismo de supressão. A redução nos valores de K_{sv} (TABELA 5. 7) com o aumento da temperatura indica o mecanismo de supressão estática. Em um cenário de supressão estática, o aumento da temperatura resulta em uma diminuição na estabilidade do intermediário fluoróforo-supressor, o que leva a um efeito de supressão reduzido, refletido na diminuição da constante K_{sv} .^{85,123}

O valor máximo da constante biomolecular de supressão (k_q) para a supressão dinâmica de biopolímeros é de $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.¹²⁴ Entretanto, os valores da constante k_q determinados foram maiores para todos os complexos. Portanto, os resultados sustentam a hipótese de um mecanismo de supressão estático.

Os valores de K_b na ordem de 10^5 indicam interações moderadas a fortes entre os complexos e a HSA. O número de sítios de ligação indica uma estequiometria de aproximadamente 1:1 entre os complexos de paládio e a HSA.

Os valores negativos de ΔG indicam que os processos de interação entre todos os complexos e a HSA são espontâneos nas temperaturas avaliadas. Os valores negativos de ΔH e positivos de ΔS sugerem interações eletrostáticas entre os complexos e a HSA.⁸⁶

Os resultados apresentados na TABELA 5. 7 indicam que os complexos exibem uma afinidade moderada a alta pela albumina, o que possibilita o transporte e a solubilidade dos complexos da série B no plasma humano pela HSA.

TABELA 5. 7. Valores das constantes de supressão Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de taxa de supressão biomolecular (k_q), constantes de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) para o sistema composto-HSA em diferentes temperaturas, para os complexos **B1-B4**.

Comp.	T (K)	K_{sv} ($\times 10^5 M^{-1}$)	K_q ($M^{-1} s^{-1}$)	R^2	K_b ($\times 10^5 M^{-1}$)	n	R^2	ΔH° (kJ mol $^{-1}$)	ΔS° (J mol $^{-1}$ K)	ΔG° (kJ mol $^{-1}$)
B1	298	(6,55 \pm 0,26)	$1,06 \times 10^{14}$	0,9636	(5,14 \pm 0,18)	0,95	0,9767	-12,2	68,3	-32,6
	303	(6,28 \pm 0,35)	$1,01 \times 10^{14}$	0,9657	(4,74 \pm 0,16)	0,93	0,9765		68,3	-32,9
	310	(6,13 \pm 0,05)	$0,99 \times 10^{14}$	0,9505	(4,32 \pm 0,23)	0,90	0,9729		68,5	-33,4
B2	298	(3,75 \pm 0,09)	$6,05 \times 10^{13}$	0,9795	(5,36 \pm 0,02)	1,15	0,9821	-7,8	83,4	-32,7
	303	(3,40 \pm 0,05)	$5,49 \times 10^{13}$	0,9773	(5,09 \pm 0,06)	1,15	0,9791		83,4	-33,1
	310	(3,29 \pm 0,08)	$5,31 \times 10^{13}$	0,9677	(4,61 \pm 0,10)	1,13	0,9767		83,2	-33,6
B3	298	(5,98 \pm 0,13)	$9,64 \times 10^{13}$	0,9778	(9,51 \pm 0,03)	1,19	0,9751	-2,9	104,5	-34,1
	303	(4,90 \pm 0,14)	$7,90 \times 10^{13}$	0,9773	(9,33 \pm 0,03)	1,25	0,9764		104,5	-34,6
	310	(4,67 \pm 0,16)	$7,53 \times 10^{13}$	0,9756	(8,05 \pm 0,03)	1,25	0,9756		103,5	-35,0
B4	298	(2,95 \pm 0,04)	$4,76 \times 10^{13}$	0,9451	(7,98 \pm 0,37)	1,38	0,9747	-18,1	52,4	-33,7
	303	(3,02 \pm 0,04)	$4,87 \times 10^{13}$	0,9687	(7,07 \pm 0,13)	1,35	0,9779		52,4	-33,9
	310	(3,08 \pm 0,08)	$4,97 \times 10^{13}$	0,9794	(6,40 \pm 0,14)	1,30	0,9832		52,9	-34,5

Outra investigação crucial envolve a identificação dos potenciais alvos biológicos dos complexos metálicos. Nesse contexto, foram explorados os possíveis modos de interação entre os complexos da Série B e o DNA. Como resultado, avaliou-se se o DNA é uma biomolécula potencialmente afetada por esses complexos, sugerindo-o como um possível alvo biológico.

A FIGURA 5. 17 apresenta as imagens obtidas das corridas eletroforéticas do DNA plasmidial com os complexos da série B. Podemos observar que a cisplatina (CP), usada como referência, converte o DNA plasmidial para sua forma linear, enquanto para os complexos **B1-B4** não houve alterações nas bandas do DNA, permanecendo um padrão de bandas similares ao DNA. Esses resultados sugerem que os complexos não induzem torções, relaxamento ou mudanças conformacionais significativas na estrutura terciária do DNA que pudessem afetar a taxa de migração do plasmídeo.

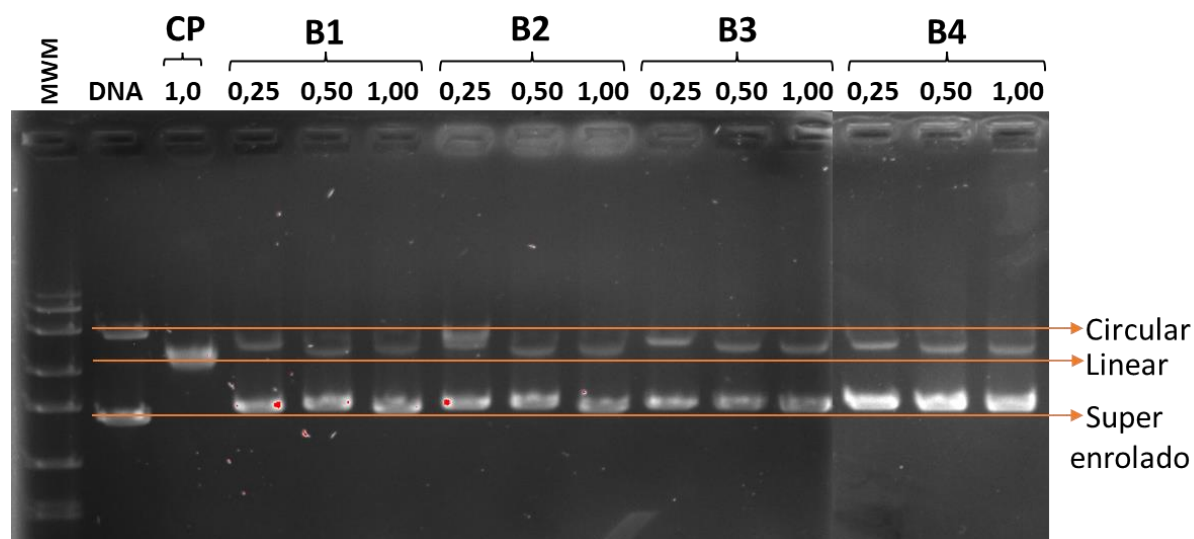


FIGURA 5. 17. Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pBR322 (40 μM) na ausência (DNA) e presença dos complexos **B1-B4** (10% DMSO) e cisplatina (CP), em diferentes razões molares [Complexo]/[plasmídeo] (0,25; 0,50 e 1,00); MWM - Marcador de peso molecular; DNA - Controle negativo (em tampão Tris-HCl).

Foram realizadas medidas de viscosidade em diferentes concentrações dos complexos da série B em solução de CT-DNA, e os efeitos dos complexos, bem como de um padrão (tiazol), estão representados na FIGURA 5. 18(A). A adição gradual de alíquotas do complexo à solução não resultou em variações significativas na viscosidade do DNA. Isso sugere que as interações envolvidas são predominantemente de natureza eletrostática e/ou ocorrem nos sulcos do DNA.

Para avaliar se os complexos da série B interagem com o sulco menor do DNA ou em regiões próximas, realizamos o ensaio de deslocamento do Hoechst 33324 do sulco menor do CT-DNA. Os complexos **B1-B4** atuaram como agentes supressores da fluorescência no complexo DNA-Hoechst, resultando em uma diminuição na intensidade da fluorescência à medida que as concentrações dos complexos aumentavam nas soluções. Na concentração mais elevada, o complexo **B1** causou uma redução na intensidade de emissão correspondente a 25% do valor inicial (conforme ilustrado na FIGURA 5. 18(B)), enquanto os demais complexos apresentaram comportamento semelhante, com uma diminuição variando de 23% a 26% (conforme demonstrado na FIGURA A. 20, no Apêndice - Parte II). A supressão da fluorescência indica que os compostos possuem a capacidade, seja por meio de uma ação direta ou por pequenas alterações nas proximidades do sulco menor, de deslocar o Hoechst do sulco menor do DNA.

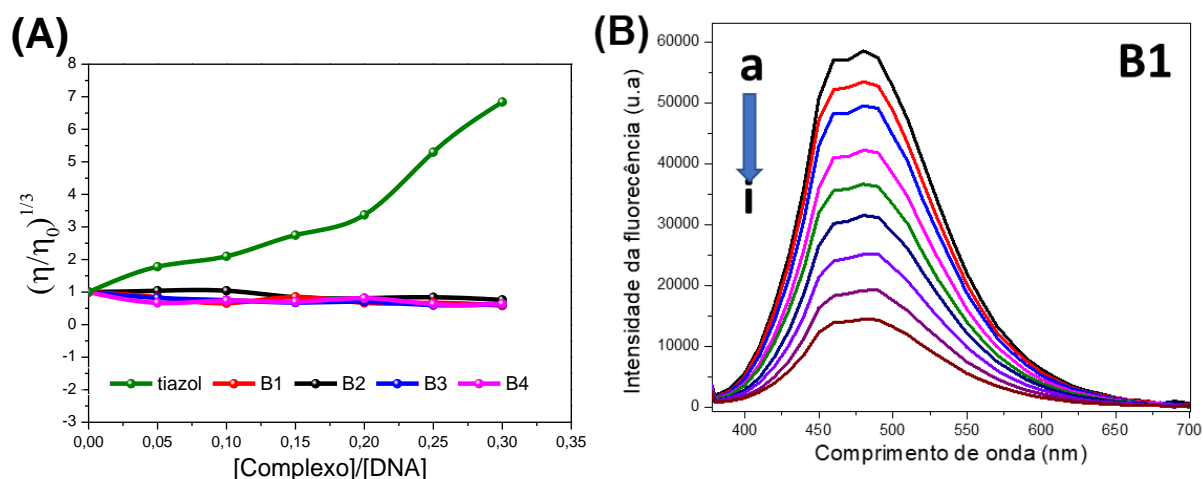


FIGURA 5. 18. **(A)** Viscosidade relativa do CT-DNA na ausência e presença dos complexos **B1-B4** e do padrão tiazol laranja (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 μM), em diferentes razões molares $[\text{composto}]/[\text{DNA}] = 0,00; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25$ e $0,30$, com concentração constante de CT-DNA de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 40% de DMSO. **(B)** Espectros de supressão de fluorescência do DNA-Hoechst na ausência (a) e presença do complexo **B1** (b-i; b=7,5 μM ; c=15 μM ; d=22,5 μM ; e=30,0 μM ; f= 37,5 μM ; g=42,5 μM e i= 50,0 μM), concentração constante da DNA-Hoechst de 75 e 2,5 μM , respectivamente.

5.4 Conclusões parciais da série B

Nesta série foram sintetizados 4 complexos de paládio contendo ligantes naftoquinônicos ou antraquinona (lausona, lapachol, 3-estiril-lausona e alizarina), os quais foram caracterizados por técnicas de condutividade molar, análise elementar, espectrometria de massas, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D de ^1H , $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e difração de raios X. Os complexos **B1-B4** mostraram-se estáveis, em DMSO (0,5%) e em meio de cultura de celular (99,5% RPMI), por meio da técnica de UV-vis em até 48 h.

Ao avaliar a viabilidade celular dos complexos série B frente a diferentes linhagens de células tumorais, foi possível notar que os compostos apresentaram menores IC_{50} nas células tumorais de ovário (A2780). Frente a linhagem A2780, **B2** apresentou menor IC_{50} ($3,5 \pm 0,1 \mu\text{mol/L}$) que o precursor, ligante e a cisplatina, sendo esse 3,4 vezes menor que o encontrado para a cisplatina. O complexo **B2** apresentou $\text{IC}_{50} > 40 \mu\text{mol/L}$ na linhagem não tumoral MRC-5, o que confere um alto valor de índice de seletividade a esse complexo ($\text{IS} \geq 11,4$).

O composto **B2** foi escolhido para os estudos adicionais nas células tumorais de ovário. O complexo exibiu efeito citotóxico e citostático nas células tumorais de ovário (A2780), levando a inibição da formação de colônias e diminuição do tamanho de colônias. Além disso, o complexo promoveu alterações morfológicas das células da linhagem A2780, bem como a diminuição da confluência celular.

Ensaio de morfologia e formação de colônias das células não tumorais MRC-5 também foram realizados, após o tratamento com o complexo **B2**. Os resultados mostraram que o composto **B2** alterou fracamente a morfologia das células, quando comparado com o controle, na concentração de $40 \mu\text{M}$ em 48h de tratamento e também nessa concentração foram observadas diminuição da área e da intensidade das colônias. Esse resultado demonstra que o composto **B2** é muito seletivo, apresentando maior citotoxicidade nas células tumorais do que nas células saudáveis testadas.

O tratamento das células tumorais com o composto **B2** alterou a proporção de células das fases do ciclo celular em comparação com as células não tratadas. A maior porcentagem de efeito foi observada em relação às células que não se encontram em nenhuma das fases do ciclo celular, apresentando um padrão anormal em relação ao conteúdo de DNA. Essas células são frequentemente referidas como células sub-G1. A presença de células hipodiplóides (células sub-G1) sugere a

possibilidade de apoptose, uma vez que o processo de apoptose resulta na fragmentação do DNA. Contudo, foi identificada que o composto **B2** induz a morte celular apoptótica por meio do ensaio de citometria de fluxo com os corantes anexina V-PE e 7AAD.

Os resultados apresentados de interação com HSA indicam que os complexos exibem uma afinidade moderada a alta pela albumina, o que possibilita o transporte e a solubilidade dos complexos da série B no plasma humano pela HSA.

Os complexos **B1-B4** demonstraram interações com o sulco menor do DNA, como indicado pelo ensaio de deslocamento do Hoechst do sulco menor-DNA, resultante das interações desses complexos com o DNA.

Os complexos não provocam mudanças substanciais nas estruturas secundária e terciária do DNA, sugerindo que o mecanismo de ação dos complexos as série B, que resulta na morte celular, não está diretamente associado a uma interação direta com o DNA.

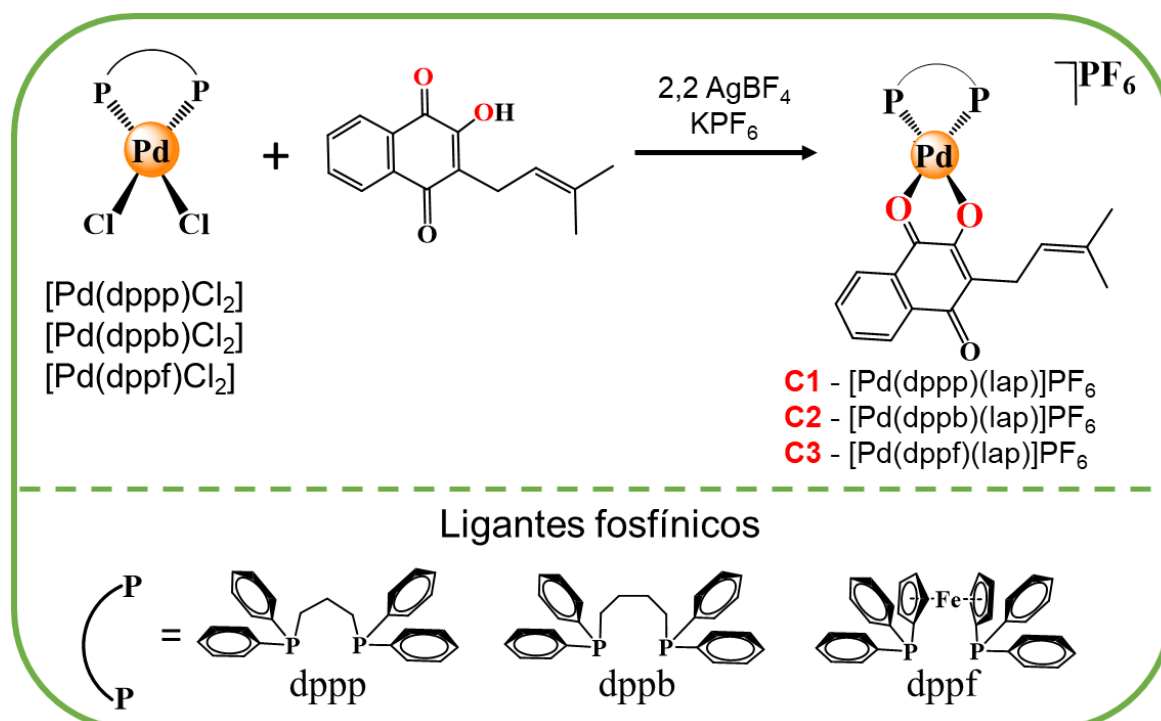
CAPÍTULO 6

RESULTADOS E DISCUSSÃO: SÉRIE C

Dado o baixo IC₅₀ apresentado contra diversas linhagens celulares pelo complexo de Pd/dppe com o ligante lapachol apresentado no capítulo anterior, propusemos a síntese e caracterização de uma série inédita de compostos resultantes da combinação Pd^{II}/lapachol com diferentes bisfosfinas. Isso com o intuito de gerar novos complexos com o potencial de demonstrar atividade contra o câncer.

6.1 Síntese e caracterização dos complexos da série C

As sínteses dos complexos da série C foram realizadas com a mesma metodologia dos complexos das séries anteriores, por meio da substituição dos cloretos nos precursores previamente preparados pelo ligante de interesse, o AgBF₄ foi utilizado para facilitar o processo de saída cloretos. A rota sintética para os complexos de fórmula [Pd(dppp)(lap)]PF₆ (**C1**), [Pd(dppb)(lap)]PF₆ (**C2**) e [Pd(dppf)(lap)]PF₆ (**C3**) está ilustrada no ESQUEMA 6. 1.



ESQUEMA 6. 1. Esquema de síntese representativa dos complexos **C1-C3**.

O ligante lapachol se coordena ao metal de forma bidentada, e a desprotonação da molécula se deu na presença do solvente, sem requerer a adição

de uma base ao sistema reacional e empregou-se o sal KPF_6 , para estabilização dos complexos monocatiônicos, com o ânion PF_6^- .

Com o intuito de verificar a carga dos complexos **C1-C3**, procedeu-se à realização de medidas de condutividade molar em soluções de DMSO e CH_2Cl_2 . Os valores obtidos se encontram dentro da faixa correspondente a eletrólito 1:1, como mostrado no TABELA 6. 1.⁸⁷

Os teores de carbono e hidrogênio presentes nos sólidos dos complexos **C1-C3** foram determinados por análise elementar, onde os valores percentuais experimentais obtidos estão condizentes com os valores percentuais teóricos calculados (TABELA 6. 1).

TABELA 6. 1. Condutividade molar (Λ_m , $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$) em DMSO e CH_2Cl_2 e dados de análise elementar (valores teóricos entre parêntesis), dos complexos **C1-C3**.

Complexos	Λ_m		%C	%H
	DMSO*	CH_2Cl_2 **		
C1 – $[\text{Pd}(\text{dppp})(\text{lap})]\text{PF}_6$	22,3	35,1	55,83 (55,74)	4,46 (4,34)
C2 – $[\text{Pd}(\text{dppb})(\text{lap})]\text{PF}_6$	21,4	33,7	56,48 (56,19)	4,85 (4,50)
C3 – $[\text{Pd}(\text{dppf})(\text{lap})]\text{PF}_6$	25,7	47,7	56,34 (56,21)	3,97 (3,95)

*Faixa para eletrólito 1:1 em DMSO 20-62 $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$; **Faixa para eletrólito 1:1 em CH_2Cl_2 12-77 $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$.⁸⁷

Por meio da técnica de espectrometria de massas, identificou-se os sinais dos cátions-complexos após a perda de contra-íon PF_6^- , com fórmula geral do tipo $[\text{Pd}(\text{P-P})(\text{lap})]^+$. Os valores de razão massa/carga (m/z) estão de acordo com os valores esperados, apresentando erros entre o valor teórico e experimental próximo a 3 ppm, como mostrado na TABELA 6. 2. Os espectros dos complexos dessa série estão disponíveis na FIGURA A. 34, na seção Apêndice – Parte III.

TABELA 6. 2. Razão massa carga (m/z) teóricos e experimentais, e erro em ppm, referentes ao pico $[\text{M}]^+$ dos complexos **B1-B4**.

Complexos $[\text{M}]^+$	m/z		Erro (ppm)
	Teórico	Experimental	
C1 – $[\text{Pd}(\text{dppp})(\text{lap})]^+$	759,1409	759,1425	2,11
C2 – $[\text{Pd}(\text{dppb})(\text{lap})]^+$	773,1565	773,1587	2,74
C3 – $[\text{Pd}(\text{dppf})(\text{lap})]^+$	901,0915	901,0950	3,86

Para esta série foram obtidos monocristais dos complexos **C2** e **C3**, por meio de lenta evaporação de uma solução dos mesmos, em diclorometano, e empregando a técnica de difração de raios X obtive-se a confirmação das estruturas propostas (FIGURA 6. 1). Ambos complexos cristalizaram em um sistema cristalino monoclinico, o complexo **C3** cristalizou em um grupo espacial $P2_1/c$, quatro moléculas por célula unitária e o complexo **C2** cristalizou-se em um grupo espacial $I2/a$, oito moléculas por célula unitária. A TABELA A. 4, contendo os parâmetros cristalográficos e de refinamento das estruturas dos complexos **C2** e **C3**, consta no Apêndice – Parte III.

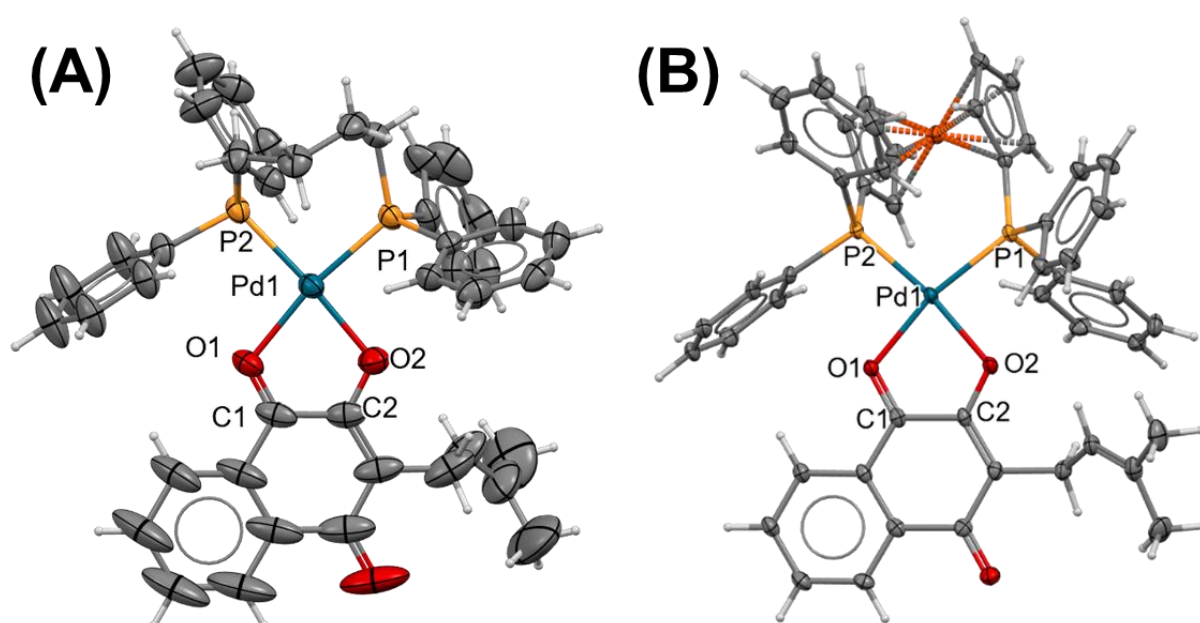


FIGURA 6. 1. Estruturas cristalográficas obtidas para os complexos (A) **C2** - $[Pd(dppb)(lap)]PF_6$ e (B) **C3** - $[Pd(dppf)(lap)]PF_6$ (o contraíon PF_6^- foi omitido para melhor visualização). Átomos representados no modo ORTEP (elipsoides em 30%).

Diferente do observado nos compostos da série A, não há efeito de ressonância entre as ligações $C1=O1$ e $C2-O2$ (átomos envolvidos na coordenação). Deste modo, observa-se uma tendência nos comprimentos das ligações simples $C2-O2$ ($\approx 1,30$ Å), que se tornam mais curtas após a coordenação, além de um pequeno alongamento das ligações duplas $C1=O1$ ($\approx 1,24$ Å), isto quando comparamos as estruturas cristalográficas do lapachol livre e coordenado (TABELA 6. 3). Além disto, os comprimentos de ligação $Pd-P$ e $Pd-O$ são consistentes com o encontrado na literatura para sistemas similares.⁸⁸⁻⁹¹

A geometria dos complexos de paládio é consistentemente com quadrática plana distorcida, o que é evidenciado pelos ângulos de ligação que se aproximam de 90° e 180° (TABELA 6.3).

TABELA 6. 3. Comprimentos de ligação (Å) e ângulos de ligação (deg) selecionados para lapachol, **C2** e **C3**.

Comprimentos de ligação (Å)	Compostos		
	Lap*	C2	C3
C1=O1	1,236	1,239(8)	1,252(4)
C2-O2	1,349	1,291(8)	1,304(4)
C4=O4	1,232	1,241(10)	1,229(4)
Pd1-P1	-	2,2396(18)	2,2511(7)
Pd1-P2	-	2,2206(16)	2,2478(7)
Pd1-O1	-	2,113(4)	2,1173(19)
Pd1-O2	-	2,063(4)	2,069(2)

Ângulos de ligação (deg)	Complexos	
	C2	C3
P2-Pd1-P1	92,60(6)	98,78(3)
O2-Pd1-O1	78,82(19)	78,86(8)
O1-Pd1-P1	170,22(14)	167,76(6)
O1-Pd1-P2	97,05(14)	93,40(6)
O2-Pd1-P1	91,45(14)	88,92(6)
O2-Pd1-P2	174,72(14)	171,90(6)

*Valores retirados CCDC 1189905.

De modo similar à série B, os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos **C1-C3** apresentaram dois dupletos, referentes a não equivalência magnética dos átomos de fósforo que estão *trans* aos diferentes átomos de oxigênio do ligante (FIGURA 6. 2). Os deslocamentos químicos nos complexos formados, em relação aos precursores, indicam que os átomos de fósforo se encontram mais desblindados ([PdCl₂(dppp)] 11,2 ppm (s); [PdCl₂(dppb)] 29,3 ppm (s); [PdCl₂(dppf)] 33,9 ppm (s)). Isso ocorre devido à substituição dos ligantes cloretos pelos oxigênios das naftoquinonas, e devido à maior eletronegatividade do oxigênio, ele desblinda o átomo de fósforo com maior eficácia do que os ligantes cloretos, resultando no

deslocamento do sinal para frequências mais elevadas. Além disto, em δ -144 ppm verifica-se um multipletto referente ao ânion PF_6^- .

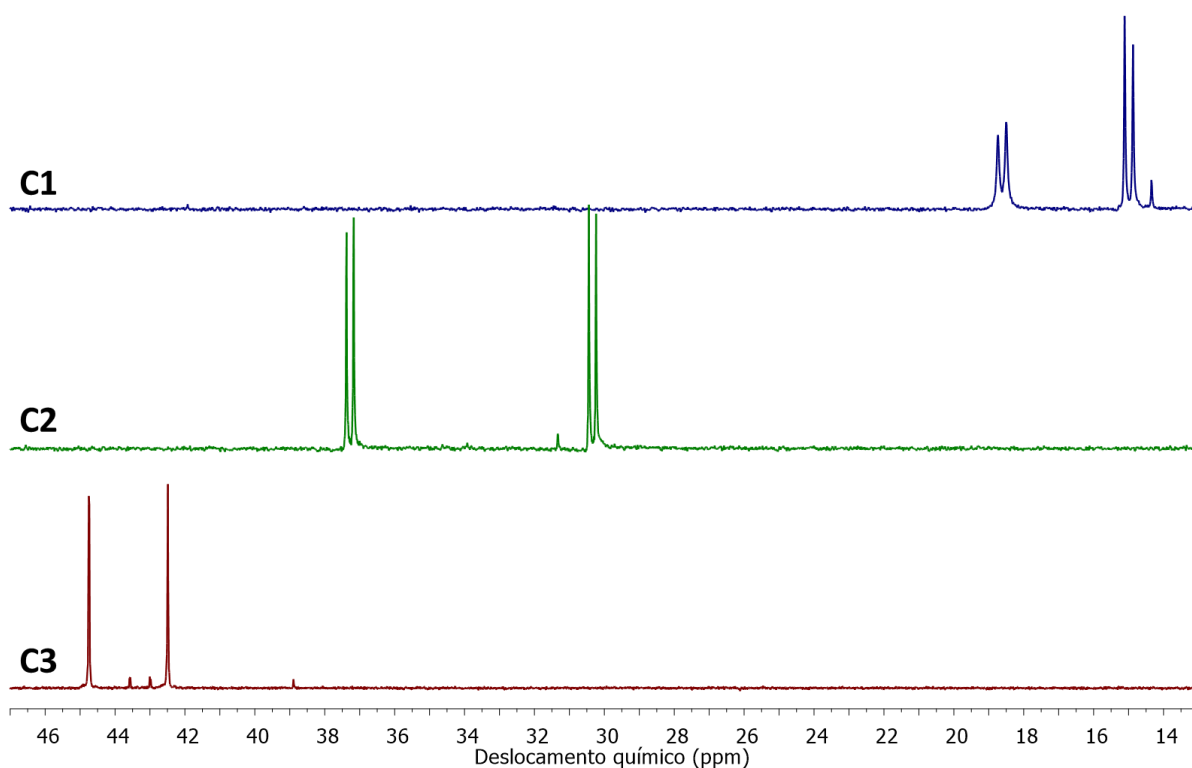


FIGURA 6. 2. Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos **C1** – $[\text{Pd}(\text{dppp})(\text{lap})]\text{PF}_6$, **C2** – $[\text{Pd}(\text{dppb})(\text{lap})]\text{PF}_6$ e **C3** – $[\text{Pd}(\text{dppf})(\text{lap})]\text{PF}_6$ em $\text{CH}_2\text{Cl}_2(\text{D}_2\text{O})$.

Nos experimentos de RMN de ^1H para os complexos **C1-C3** pôde-se observar e atribuir todos os sinais referentes aos hidrogênios presentes nos complexos. Nos espectros obtidos para o complexo **C3**, estão destacados os sinais e suas respectivas atribuições. Os espectros de ^1H registrados para esta série são apresentados na FIGURA A. 36, no Apêndice – Parte III.

No espectro de RMN ^1H do complexo **C3**, apresentado na Figura 6.3, observa-se alguns grupos distintos de sinais, o primeiro grupo, referente as metilas [H(14, 15)] e hidrogênios alifáticos [H(11, 12)] do ligante lapachol ($\approx 2,7$ e $4,7$ ppm, respectivamente), o segundo, referente aos hidrogênios do ferroceno (região $4,2$ – $5,4$ ppm) e o terceiro grupo na região dos hidrogênios aromáticos, referente aos anéis aromáticos da dppf e do ligante lapachol (região $6,9$ – $8,1$ ppm). A atribuição desses sinais foi feita com o auxílio dos mapas de contorno COSY ^1H - ^1H , onde destacam-se os acoplamentos dos hidrogênios (FIGURA A. 38, em Apêndice – Parte III).

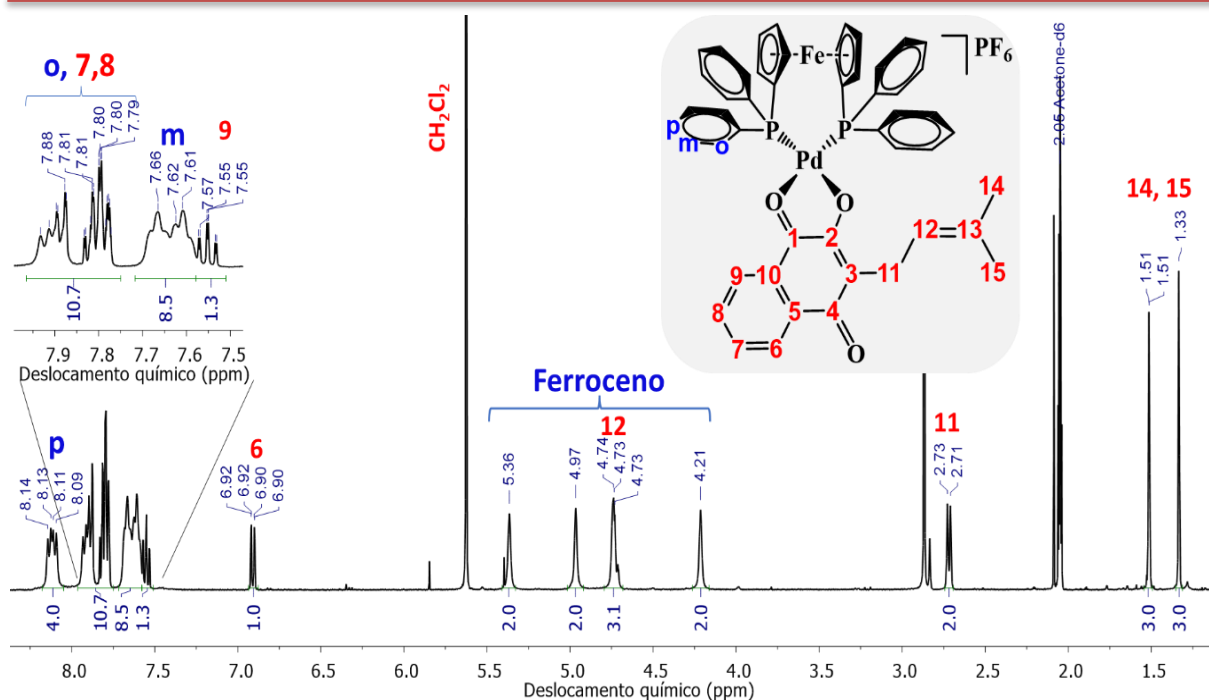


FIGURA 6. 3. Espectro de RMN de ^1H do complexo **C3** – $[\text{Pd}(\text{dppf})(\text{lap})]\text{PF}_6$ em $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$.

Nos espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos novos complexos **C1–C3** foram observados os respectivos sinais, atribuídos com o auxílio das técnicas 2D, HSQC e HMBC e estão apresentados na FIGURA A. 38 e FIGURA A. 40, respectivamente, na seção de Apêndice – Parte III.

Na FIGURA 6. 4 apresenta-se a região mais desblindada dos espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos **C1–C3** e lapachol livre, onde são observados os sinais referentes aos carbonos C1, C2 e C4 do lapachol livre e coordenado. Nota-se um deslocamento químico mais pronunciado nos carbonos C1 e C2 devido à coordenação do ligante ao centro metálico, enquanto o carbono C4 apresenta variação mínima, o que está em conformidade com as expectativas, uma vez que as mudanças mais significativas ocorrem nos sinais correspondentes aos carbonos ligados aos oxigênios que se coordenam com o centro metálico. A desblindagem dos sinais referentes aos carbonos C1 e C2, que ocorre devido à diminuição da densidade eletrônica destes átomos em decorrência da coordenação ao centro metálico de paládio.

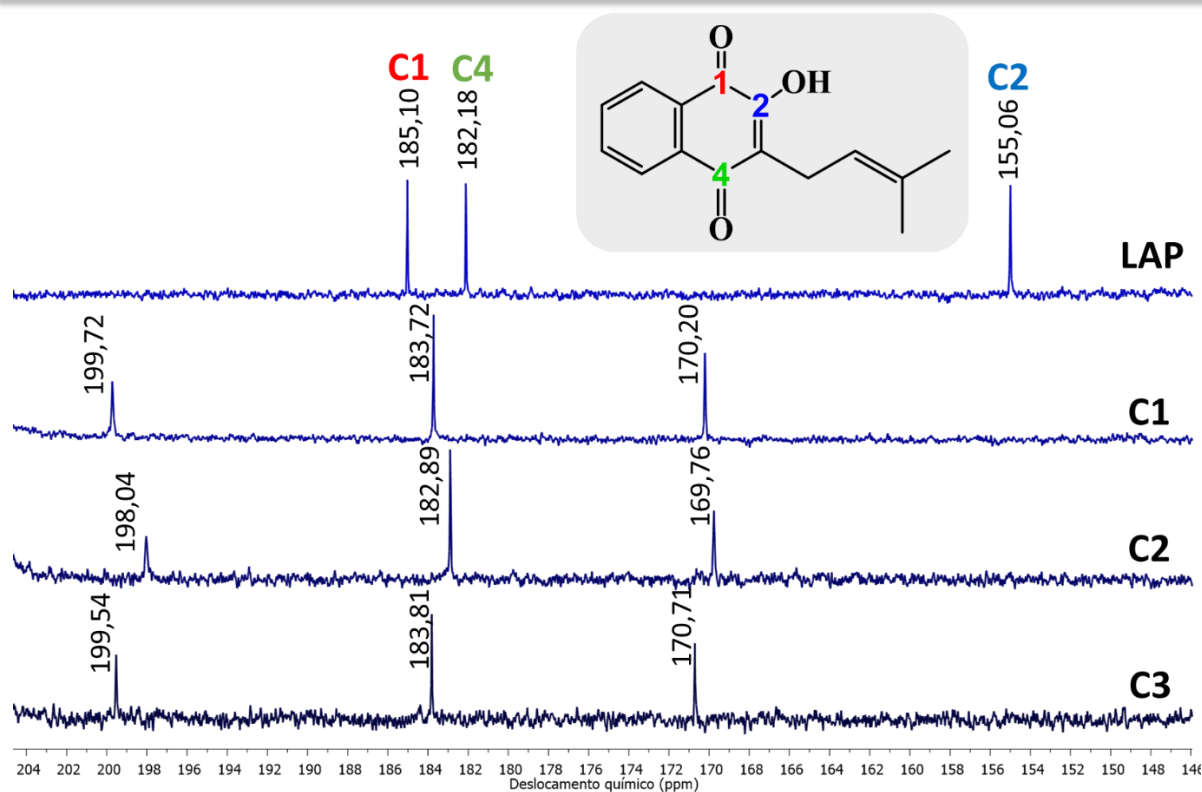


FIGURA 6. 4. Região mais desblindada dos espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do lapachol e complexos **C1** – $[\text{Pd}(\text{dppp})(\text{lap})]\text{PF}_6$, **C2** – $[\text{Pd}(\text{dppb})(\text{lap})]\text{PF}_6$ e **C3** – $[\text{Pd}(\text{dppf})(\text{lap})]\text{PF}_6$ em $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$.

Nos espectros de absorção na região do infravermelho dos complexos **C1–C3**, foi possível obter informações significativas, que contribuem para a proposta estrutural dos complexos, alinhando-se com as outras técnicas de caracterização utilizadas neste estudo. Inicialmente, na faixa de alta frequência dos espectros registrados, nota-se a falta do estiramento $\nu(\text{O-H})$ das hidroxilas presentes no ligante lapachol, que em sua forma não coordenadas apresenta uma banda $\nu(\text{O-H})$ em 3353 cm^{-1} (o espectro do lapachol livre apresenta-se na FIGURA A. 41, da seção de Apêndice). Essa ausência sugere que o ligante está coordenado por meio do átomo de oxigênio em sua forma desprotonada.

Conforme pode-se observar na FIGURA 6. 5, as vibrações de estiramento $\nu(\text{C1=O1})$ e $\nu(\text{C4=O4})$ sofrem deslocamentos para regiões de mais baixas energias. O estiramento $\nu(\text{C4=O4})$ não está diretamente envolvido na coordenação, mas ele sofre um leve deslocamento devido à mudanças na densidade eletrônica no anel. Por outro lado, a banda $\nu(\text{C1=O1})$ se desloca devido à sua coordenação com o centro metálico, levando à diminuição de sua densidade eletrônica, como já observado na técnica de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$.

Quanto à ligação $\nu(\text{C2-O2})$, a banda associada a essa ligação sofre um deslocamento no espectro devido à coordenação com o paládio, aumentando o caráter de dupla ligação e, como resultado, desloca-se para regiões de frequências mais altas. Esse fenômeno também é observado no comprimento dessa ligação nas estruturas cristalinas obtidas, onde sua força aumenta quando ela se coordena ao paládio (TABELA 6. 3).

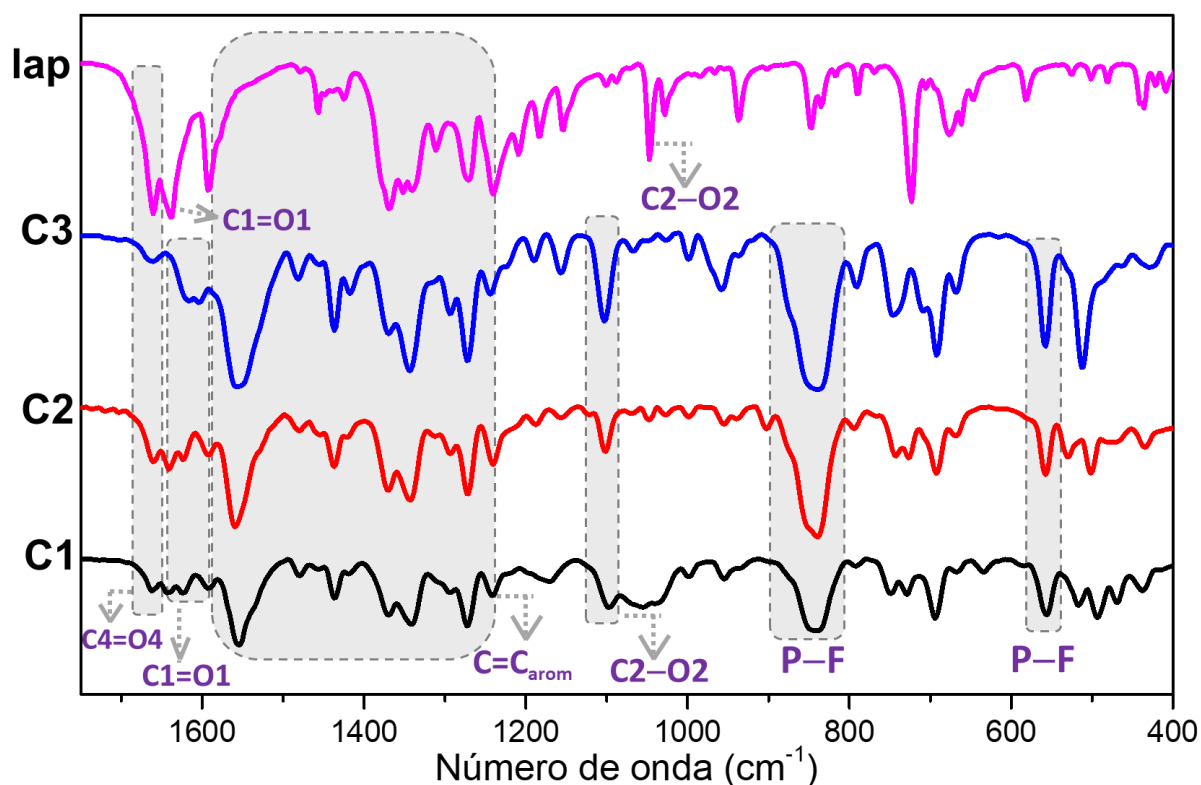


FIGURA 6. 5. Espectros de absorção na região do infravermelho, do lapachol e complexos **C1–C3**, em pastilhas de KBr.

Os espectros apresentam também outras bandas características, como os $\nu\text{C}=\text{C}$ aromáticos e as bandas em 840 cm^{-1} $\nu(\text{P-F})$ e 557 cm^{-1} $\delta(\text{P-F})$ pertencentes ao ânion PF_6^- . Todos os espectros de absorção na região do infravermelho registrados para esta série são apresentados na FIGURA A. 42, no Apêndice.

Os espectros de UV-vis dos complexos são semelhantes entre si, pois apresentam duas bandas características, a primeira absorção mais intensa, em torno de 280 nm, atribuída à transição de transferência de carga intraligante dos anéis da bisfosfina ((ILCT) $\pi \rightarrow \pi^*$), bem como do anel aromático do lapachol. A segunda transição, de menor energia, no espectro dos complexos corresponde às transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$, em torno de 480 nm.^{11,138,141}

Na TABELA 6. 4 apresenta-se os comprimentos de onda máximos das bandas observadas, bem como os respectivos valores de absorvidade molar (ϵ) de todos os complexos, além da atribuição tentativa das bandas. Os espectros dos complexos em diferentes concentrações, em DMSO, são apresentadas na seção de apêndice na FIGURA A. 43.

TABELA 6. 4. Comprimento de onda de absorção máxima (λ , nm), absorvidade molar (ϵ , mol⁻¹ cm⁻¹ L) e tentativa de atribuição das bandas dos complexos **C1-C3**, em solução de DMSO.

Complexos	λ (nm)	ϵ (mol ⁻¹ cm ⁻¹ L)	Transição
C1 - [Pd(dppp)(lap)]PF ₆	280	42784	ILCT/ $\pi \rightarrow \pi^*$
	484	3648,3	$n \rightarrow \pi^*$
C2 - [Pd(dppb)(lap)]PF ₆	280	36796	ILCT/ $\pi \rightarrow \pi^*$
	486	2713,7	$n \rightarrow \pi^*$
C3 - [Pd(dppf)(lap)]PF ₆	276	39967	ILCT/ $\pi \rightarrow \pi^*$
	492	4272,9	$n \rightarrow \pi^*$

Com o intuito de analisar a estabilidade dos complexos, nas condições dos experimentos biológicos, foram obtidos espectros de UV-vis de soluções contendo os complexos **C1-C3** em uma concentração de 40 μ M, em meio de cultura RPMI sem fenol e 0,5% DMSO, em três tempos distintos: 0, 24 e 48 horas. Constatou-se que não houve mudanças significativas nos espectros eletrônicos obtidos ao longo do tempo, como apresentado na FIGURA 6. 6. Portanto, é possível comprovar que os complexos são estáveis nas condições dos testes biológicos.

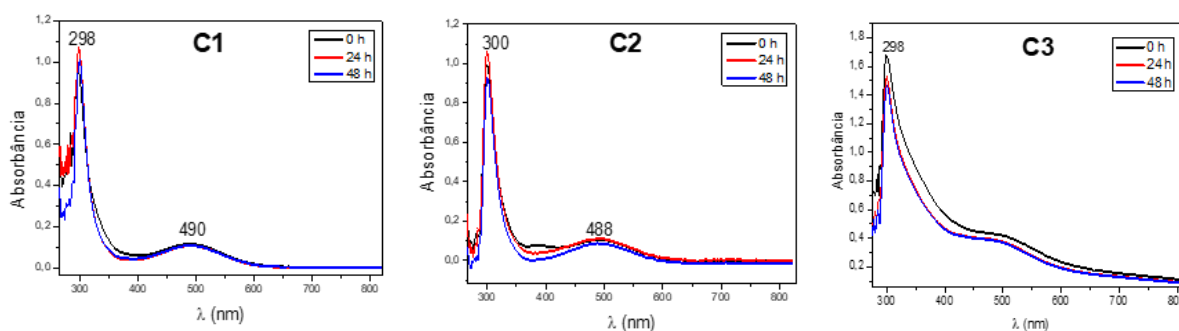


FIGURA 6. 6. Espectros de UV-vis dos complexos **C1**, **C2** e **C3** (40 μ mol/L) obtidos em 0, 24 e 48 h, em meio de cultura celular RPMI sem fenol e 0,5% de DMSO, a 37°C.

6.2 Estudos biológicos dos complexos da série C

A avaliação da viabilidade celular dos complexos sintetizados na série C foi conduzida em diversas linhagens celulares, utilizando o método de ensaio MTT. Com base nos resultados obtidos nesses testes, foi realizada uma triagem para identificar o composto que apresentou o menor IC₅₀ (concentração inibitória de 50% da viabilidade celular) e melhor seletividade. Esse composto foi selecionado para prosseguir com testes adicionais, visando compreender melhor o modo de atuação dos complexos nas células.

Os valores de IC₅₀ foram calculados para células tumorais de mama (MCF-7 e SKBR-3), próstata (DU-145), pulmão (A549), ovário (A2780 e A2780cis) e não tumoral de pulmão (MRC-5). Os valores obtidos correspondem ao IC₅₀ após 48 horas de exposição das células empregadas em diferentes concentrações dos complexos. A TABELA 6. 5 apresenta os valores de IC₅₀ obtidos para os complexos **C1-C3**, lapachol, precursores e CDDP.

Para o ligante lapachol não foi possível calcular o IC₅₀ sendo este ≥ 100 $\mu\text{mol/L}$ (maior concentração usada) na maioria das linhagens celulares testadas. Observa-se que para os complexos **C1** e **C2** não foi possível calcular o IC₅₀ nas linhagens celulares tumorais MCF-7, SKBR-3, DU-145 e A549, sendo estes ≥ 40 $\mu\text{mol/L}$ (maior concentração utilizada). O complexo **C3**, de modo geral, foi o mais ativo da série C, apresentando menor IC₅₀ que os demais complexos.

Uma possível explicação para a melhor atividade do complexo **C3** é sua lipofilicidade. Conforme apresentado na TABELA 6. 5, o log P (coeficiente de partição em n-octanol/meio aquoso) para o complexo **C3** é positivo ($0,41 \pm 0,02$), sugerindo que há uma afinidade maior pela fase orgânica em comparação com a fase aquosa, sugerindo também que o mesmo pode atravessar a membrana plasmática por difusão passiva devido à sua natureza lipofílica. Os complexos **C2** e **C3** apresentam valores negativos de coeficiente de partição, mostrando que os mesmos possuem maior afinidade pela fase aquosa. Assim, é possível sugerir que há uma relação entre a maior atividade do complexo **C3** na maioria das linhagens tumorais testadas com sua lipofilicidade.

TABELA 6. 5. Valores de IC₅₀ obtidos para os complexos **C1-C3** (**C1** – [Pd(dppp)(lap)]PF₆, **C2** – [Pd(dppb)(lap)]PF₆ e **C3** – [Pd(dppf)(lap)]PF₆) precursores (**P3** - [PdCl₂(dppp)], **P4** - [PdCl₂(dppb)] e **P5** - [PdCl₂(dppf)]), lapachol (lap) e cisplatina (CDDP) frente as linhagens celulares tumorais MCF-7, SKBR-3, DU-145, A549, A2780, A2780cis e MRC-5 após 48 horas de tratamento.

Comp.	IC ₅₀ (μmol/L)							IS	IS	Log P
	MCF-7	SKBR-3	DU-145	A549	A2780	A2780cis	MRC-5	MRC-5 A2780	MRC-5 A2780cis	
C1	≥40	≥40	≥30	≥40	15,7 ± 0,7	8,4 ± 0,8	≥40	≥2,5	≥4,8	-1,05 ± 0,02
C2	≥40	≥30	≥40	≥40	4,4 ± 0,4	19,0 ± 0,6	≥40	≥9,1	≥2,1	-0,04 ± 0,03
C3	9,6 ± 0,3	7,5 ± 0,8	≥40	14,9 ± 0,8	2,2 ± 0,1	1,1 ± 0,2	≥40	≥18,2	≥36,4	0,41 ± 0,02
P3	≥50	≥50	n.t	≥50	≥50	≥50	≥50	-	-	-
P4	≥25	≥25	n.t	≥25	≥25	≥25	≥25	-	-	-
P5	≥40	≥40	n.t	≥40	≥40	9,9 ± 0,9	≥40	-	4,0	-
lap	≥100	≥100	n.t	≥100	≥100	69,3 ± 0,7	≥100	-	1,4	-
CDDP	13,9 ± 2,0	10,2 ± 0,9	2,3 ± 0,4	14,4 ± 1,4	11,8 ± 0,8	31,8 ± 1,8	29,1 ± 0,8	2,5	-	-

n.t: não testado.

É observada a mesma tendência dos complexos das demais séries, apresentando maior inibição da viabilidade celular nas linhagens tumorais de ovário. Comparando com os precursores, a coordenação do lapachol, ao metal, contribuiu para o aumento da capacidade de inibição da viabilidade celular dos complexos **C1-C3**, frente às linhagens tumorais de ovário (A2780 e A280cis). Destaca-se o complexo **C3**, que em comparação aos demais, pois apresentou os melhores índices de seletividade frente as células tumorais de ovário e ovário resistente a cisplatina, em comparação com a linhagem não tumoral MRC-5 ($IS \geq 18$ e ≥ 36 , respectivamente). Também, o complexo **C3** tem o IC_{50} aproximadamente 30 vezes menor que a cisplatina, fármaco inorgânico de referência, frente à linhagem A2780cis. Portanto, o mesmo foi escolhido para prosseguir com os experimentos mais avançados nas células A2780cis.

A partir dos resultados obtidos nas duas linhagens celulares de ovário, é possível encontrar o valor de fator resistência, calculado pela razão dos valores de IC_{50} A2780cis pelo valor de IC_{50} A2780 (TABELA 6. 6). Os valores de fator de resistência dos complexos **C1** e **C3** (0,5) são menores que o valor da CDDP (2,7), esses resultados indicam que estes complexos podem apresentar um mecanismo diferente com relação a CDDP na célula resistente, uma vez que estes complexos aumentam a atividade nas células A2780cis.

TABELA 6. 6. Valores de fator de resistência para os complexos da série C e CDDP obtidos a partir da divisão dos valores de IC_{50} .

Compostos	Fator de Resistência	
	IC_{50} A2780cis/	IC_{50} A2780
C1 - [Pd(dppp)(lap)]PF ₆		0,5
C2 - [Pd(dppb)(lap)]PF ₆		4,3
C3 - [Pd(dppv)(lap)]PF ₆		0,5
CDDP		2,7

Um dado importante para a continuidade dos ensaios biológicos é a observação da influência dos complexos na morfologia celular. Acompanhamos as alterações morfológicas da linhagem tumoral de ovário resistente à cisplatina (A2780cis) em soluções contendo diferentes concentrações de **C3**. Ao observar as micrografias referentes ao controle, apresentadas na FIGURA 6. 7, observa-se que a morfologia da linhagem A2780cis, na ausência de tratamento com os compostos,

apresentando formato alongado. Alterações consideráveis na morfologia das células são observadas nas concentrações $2 \times IC_{50}$ e $4 \times IC_{50}$ a partir de 24 h, onde a confluência entre as células é menor e nota-se maior quantidade de células em formato esférico, sendo um indicativo de inviabilização das mesmas e desencadeamento de mecanismos de morte celular.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Nas concentrações equivalentes ou inferiores ao IC_{50} , não foi identificada nenhuma alteração morfológica. Isso indica que, nessas condições, as células mantiveram sua integridade morfológica e foram indistinguíveis do grupo controle do experimento.

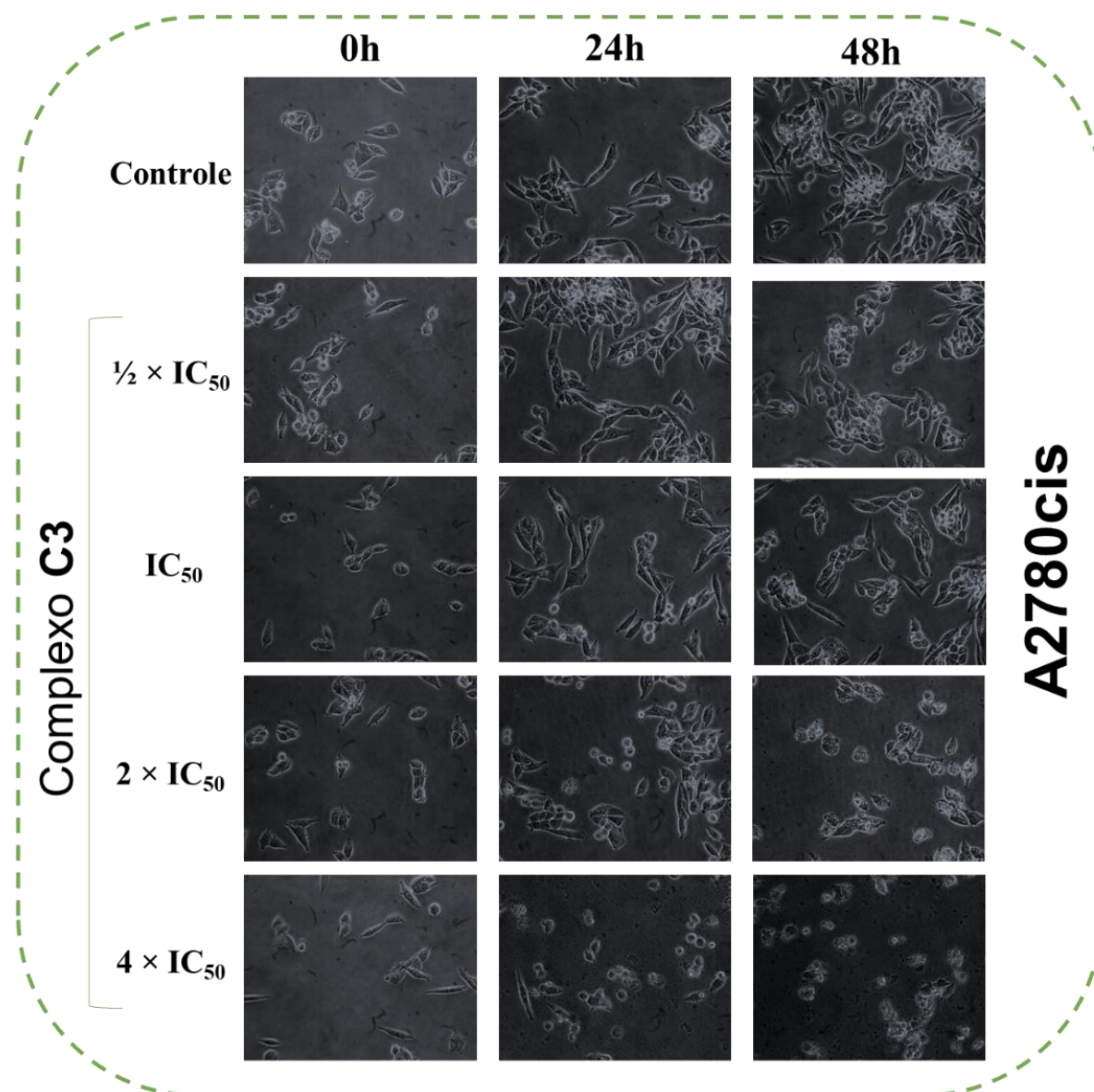


FIGURA 6. 7. Micrografias das células A2780cis após tratamento com o complexo **C3** em diferentes concentrações ($\frac{1}{2} \times IC_{50}$ (0,6 μ M), IC_{50} (1,1 μ M), $2 \times IC_{50}$ (2,2 μ M) e $4 \times IC_{50}$ (4,4 μ M) e tempos de exposição.

Para comparação, a análise morfológica também foi realizada na linhagem de células não tumorais de pulmão (MRC-5) tratadas com o complexo **C3**. Na FIGURA 6. 8, podemos observar as micrografias das células MRC-5, e nota-se que a partir da concentração de 20 $\mu\text{mol/L}$ em 48 horas a morfologia das células apresentam algumas diferenças em relação ao controle. Foi possível observar células com formatos diferentes do controle e algumas células desaderidas no formato arredondado, indicando morte celular.

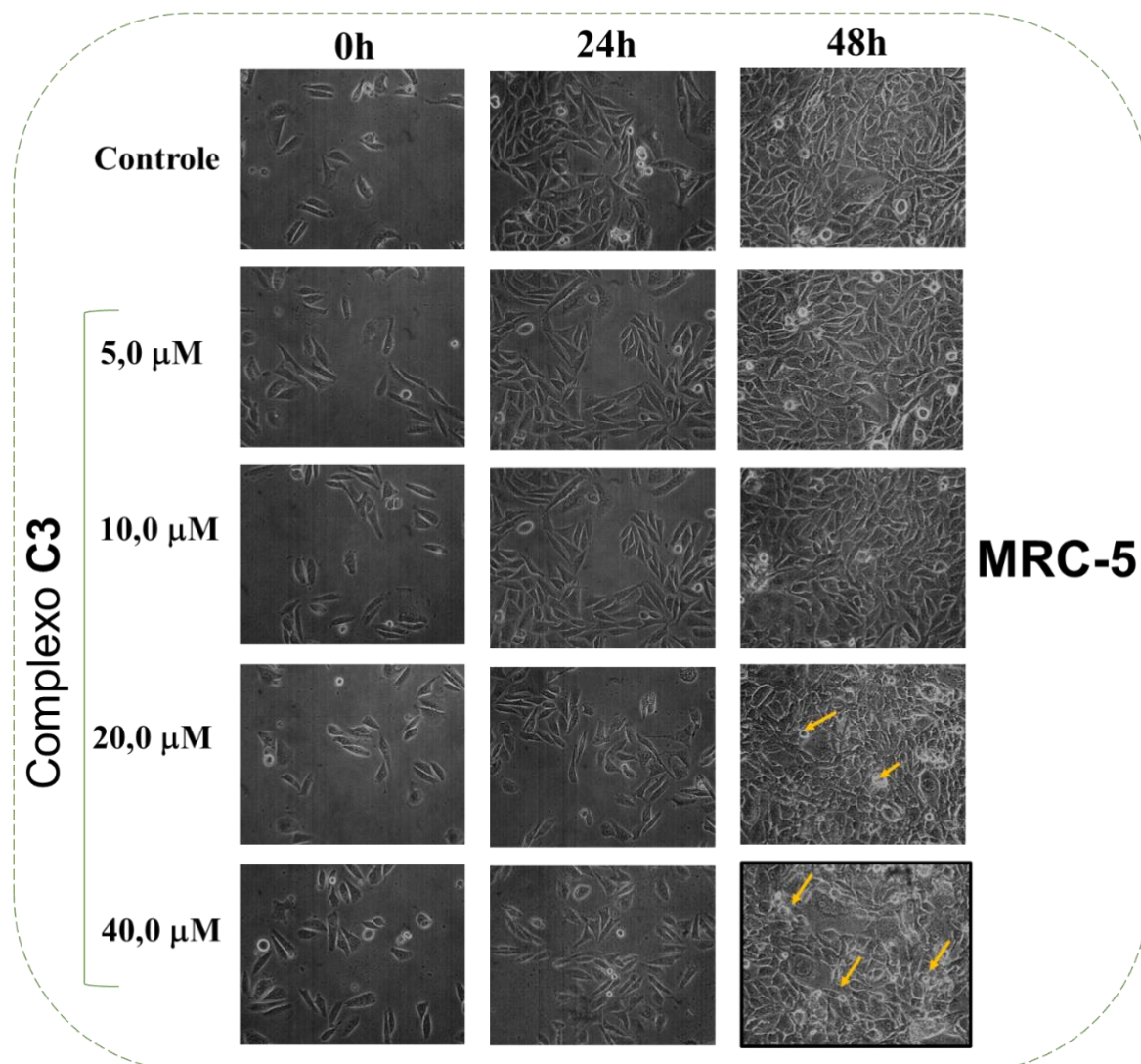


FIGURA 6. 8. Micrografias das células MRC-5 após tratamento com o complexo **C3** em diferentes concentrações e tempos de exposição.

A migração celular está diretamente associada à metástase, que representa o fenômeno pelo qual as células cancerígenas se propagam a partir do tumor original para tecidos e órgãos distantes.¹⁰³ O complexo **C3** foram investigados quanto à sua capacidade de inibir a migração celular por meio do ensaio de cicatrização de feridas (*Wound Healing*). Esse ensaio implica na realização de uma

incisão controlada na monocamada celular, a qual atinge uma confluência de cerca de 80%. Em seguida, os tratamentos são aplicados utilizando as soluções do complexo **C3**. É importante destacar que as concentrações empregadas do complexo foram mantidas abaixo do valor de IC_{50} , garantindo assim que o efeito observado fosse exclusivamente relacionado à inibição da migração celular, sem efeito citotóxico.

Após o tratamento nas células A2780cis, observou-se que com o complexo **C3** não foi capaz de inibir a migração celular nas concentrações utilizadas, uma vez que no tempo de 48 h na presença do complexo e na ausência não houve diferenças no fechamento da risca, como mostrado nas micrografias e no gráfico de porcentagem fechamento da risca na FIGURA 6. 9.

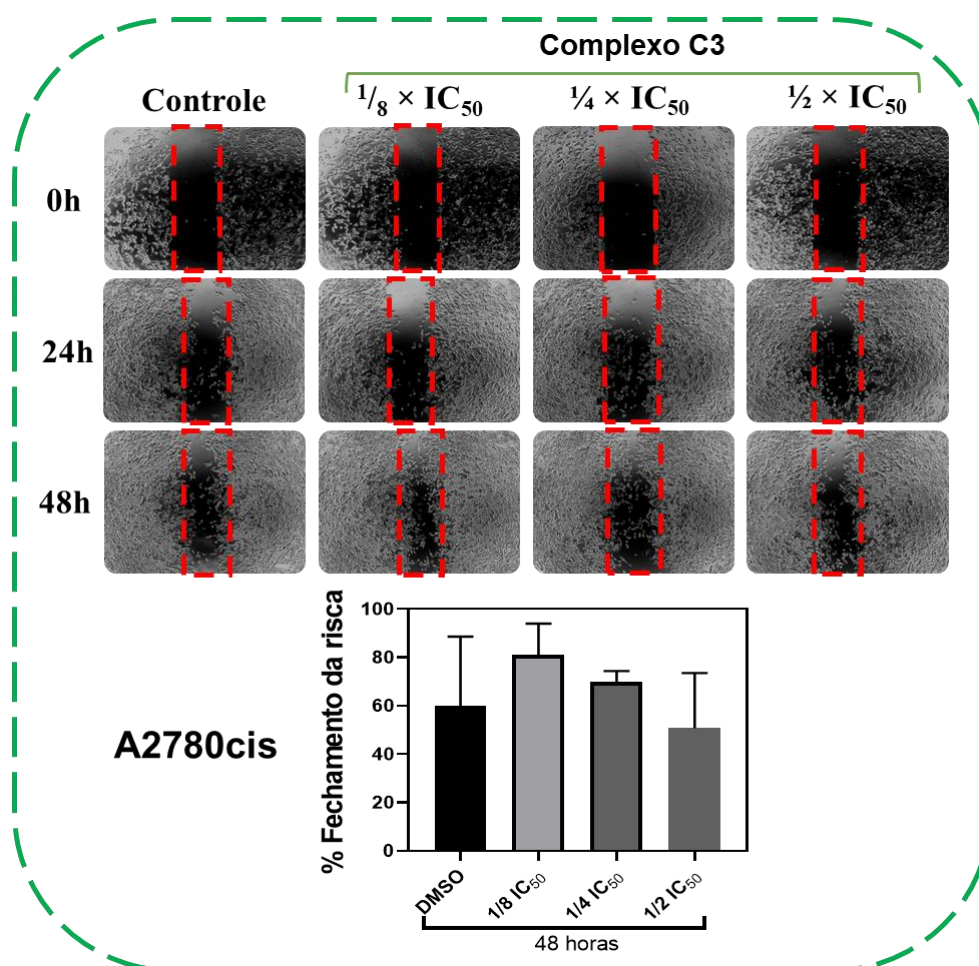


FIGURA 6. 9. Micrografias das células A2780cis obtidas no ensaio de *Wound Healing* do complexo **C3** nas concentrações ($1/8 \times IC_{50}$ (0,1 μM), $1/4 \times IC_{50}$ (0,3 μM) e $1/2 \times IC_{50}$ (0,6 μM)). Lente objetiva utilizada no experimento foi com aumento de 4x. Representação gráfica da porcentagem de fechamento da risca após 48 h de incubação com o complexo. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Dunnet's.

O ensaio de sobrevivência clonogênica mede a capacidade de uma única célula proliferar indefinidamente e formar uma colônia de pelo menos 50 células.¹⁰⁸ Nesse experimento, a cultura celular foi exposta a diferentes concentrações do complexo, e após um período de incubação de 48 horas, o meio de cultura contendo o complexo foi removido. As células foram posteriormente expostas a um novo meio de cultura sem tratamento, e avaliamos a capacidade dessas células de formarem colônias após a exposição prévia ao complexo. Deste modo, por meio deste ensaio, avaliou-se a potência citotóxica e a capacidade proliferativa do complexo **C3** contra células A2780cis e MRC-5.

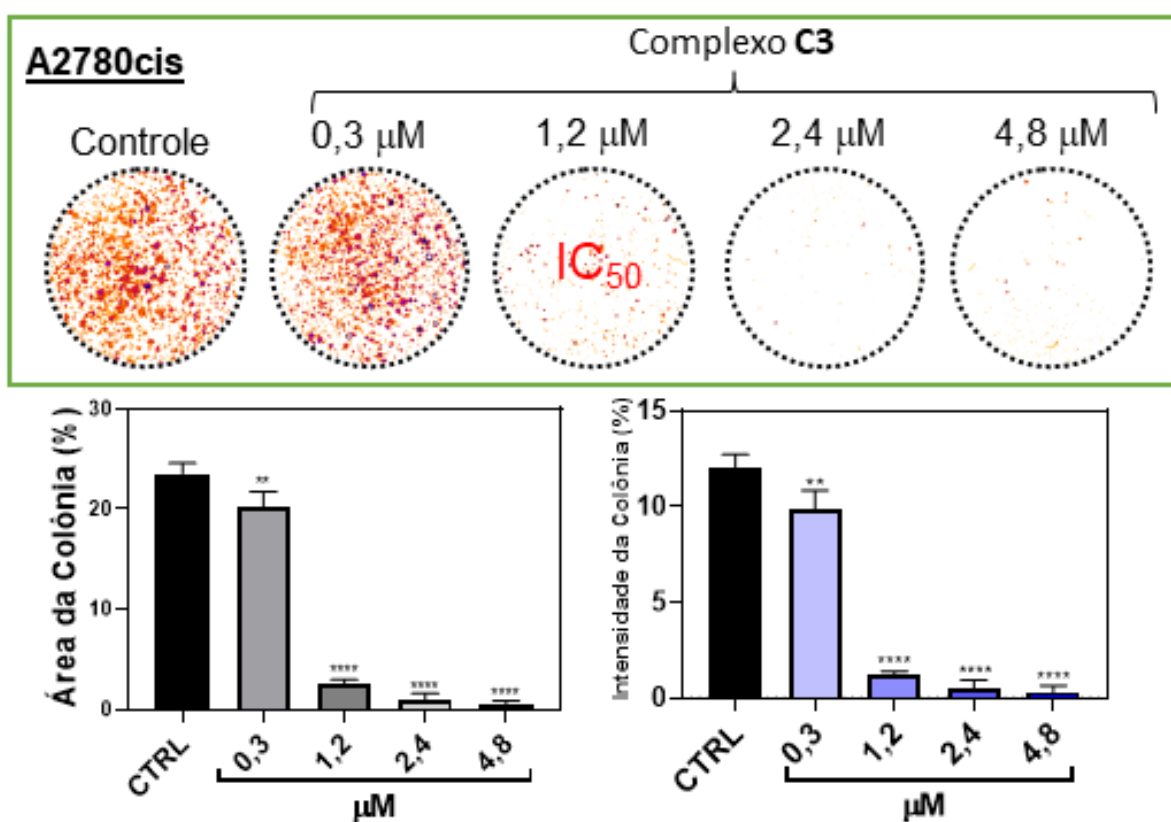


FIGURA 6. 10. Sobrevivência clonogênica das células A2780cis tratadas com diferentes concentrações do complexo **C3** ($1/4 \times IC_{50}$ (0,3 µM), IC_{50} (1,2 µM), $2 \times IC_{50}$ (2,4 µM) e $4 \times IC_{50}$ (4,8 µM)) por 48 horas. A representação dos poços e limiares para o experimento é mostrada junto com as quantificações gráficas da área e intensidade das colônias. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,005$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Dunnet's.

Para as células A2780cis, os resultados mostraram que o complexo **C3** inibiu significativamente a área e a intensidade das colônias, a partir da concentração do IC_{50} após 48 h de tratamento (FIGURA 6. 10). Este resultado está de acordo com

o ensaio MTT, que aponta tanto para efeitos citotóxicos quanto citostáticos, ou seja, esses compostos são capazes de interferir no crescimento, desenvolvimento e na multiplicação celular, além de promover a morte das células tumorais.

Para fins de comparação, também foi realizado o ensaio de formação de colônias com as células saudáveis MRC-5 (FIGURA 6. 11). O IC₅₀ do complexo **C3** não foi determinado, portanto nos ensaios de formação de colônias foram utilizadas concentrações menores que 40 µM (maior concentração usada no ensaio de MTT). Após o tratamento com o composto **C3** foi possível observar uma maior diminuição na área e na intensidade das colônias a partir da concentração de 10 µM (equivalente a aproximadamente 10×IC₅₀ na célula A2780cis). Esse resultado ainda indica que complexo é muito seletivo para as células tumorais A2780cis, pois o efeito citotóxico e citostático dele é mais acentuado na célula tumoral do que na célula não tumoral MRC-5.^{64,145}

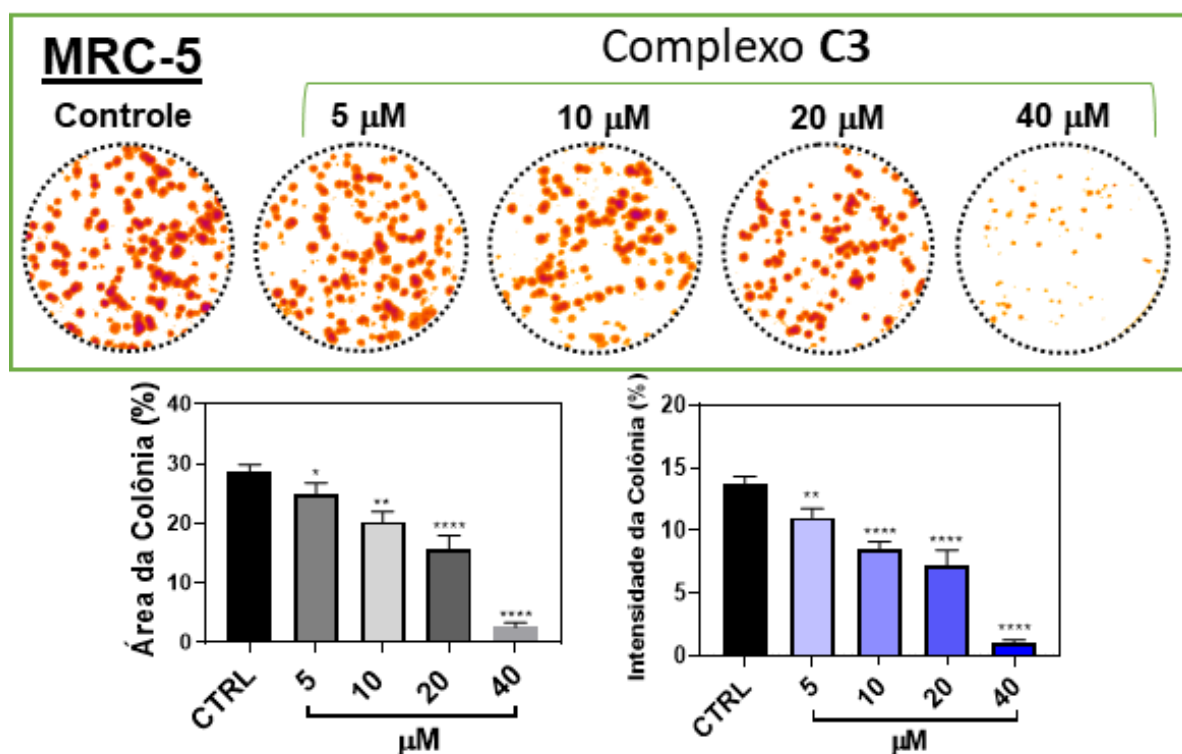


FIGURA 6. 11. Sobrevivência clonogênica das células MRC-5 tratadas com diferentes concentrações do complexo **C3** por 48 horas. A representação dos poços e limiões para o experimento é mostrada junto com as quantificações gráficas da área e intensidade das colônias. Os dados representam a média ± DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,005$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Dunnet's.

Ao analisar as fases do ciclo celular, as células A2780 tratadas com o **C3** nas diferentes concentrações apresentaram um aumento gradativo da população com padrão anormal no conteúdo de DNA, denominadas de células sub-G1. O acúmulo de células na fase Sub-G1 tornou-se significativo a partir da concentração correspondente ao IC_{50} ($1,1 \mu M$), resultando em uma diminuição na proporção de células na fase G2/M em comparação com as células não tratadas, como demonstrado na FIGURA 6. 12. Essa redução na proporção da fase G2/M do ciclo celular sugere uma interferência substancial do complexo na progressão do ciclo celular. Além disso, o acúmulo de células na fase Sub-G1 é consistente com a ocorrência de apoptose, uma vez que o processo apoptótico envolve a fragmentação do DNA devido à atuação de enzimas nucleares.

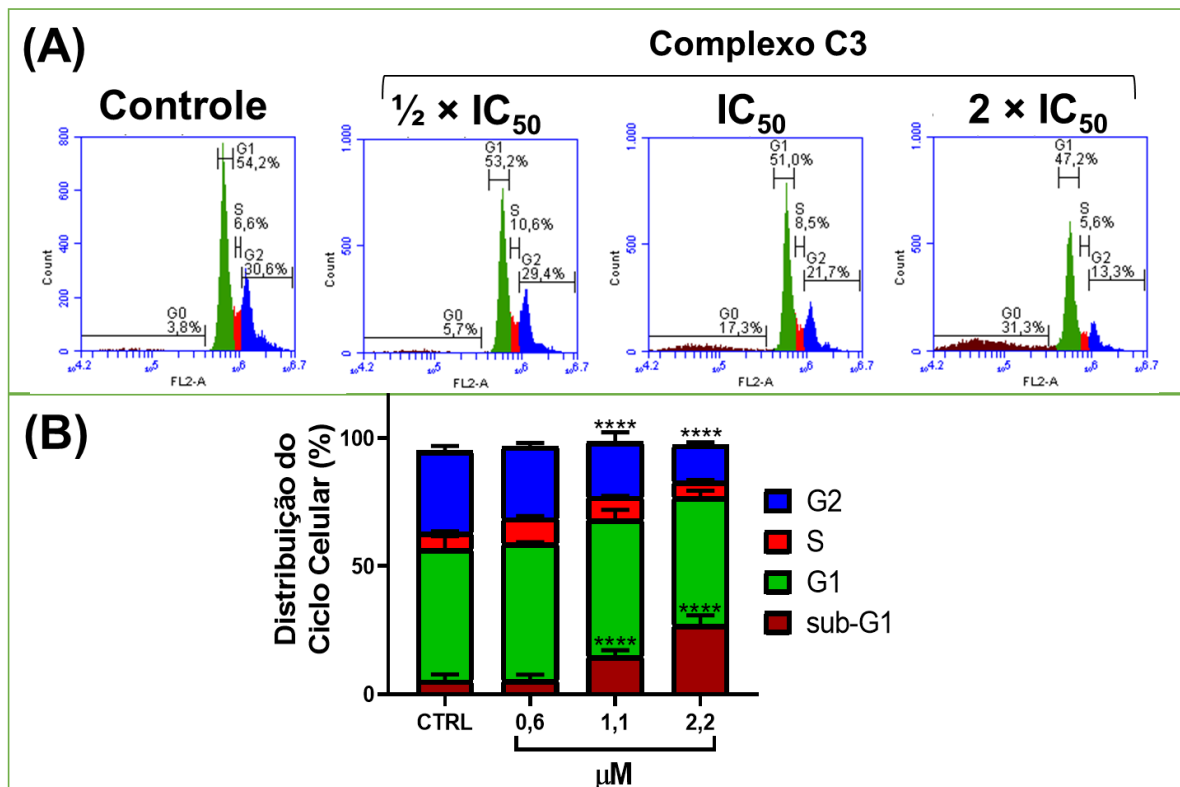


FIGURA 6. 12. **(A)** Histogramas de DNA do ensaio do ciclo celular nas células A2780cis incubadas com iodeto de propídio (PI) (detectado no canal FL2-A), após tratamento com o complexo **C3**, em diferentes concentrações ($1/2 \times IC_{50}$ ($0,6 \mu M$), IC_{50} ($1,1 \mu M$) e $2 \times IC_{50}$ ($2,2 \mu M$)), por 48 h. **(B)** Gráfico da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após tratamento com o complexo **C3**, em diferentes concentrações, por 48 h. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata. Significância nos níveis * $p < 0,005$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ usando ANOVA e teste Turkey's.

Para determinar o mecanismo de morte celular, induzido pelo complexo **C3** nas células tumorais A2780cis, empregou-se a citometria de fluxo, em conjunto com os corantes anexina V-PE e 7-ADD.¹⁴⁰ Desta forma, os resultados apresentados em forma de gráficos dot plots são apresentados na FIGURA 6. 13. Nesse ensaio foram utilizadas concentrações proporcionais do IC₅₀ com 48h, porém o tempo de incubação deste ensaio foi de 24 h. Esse é um possível motivo pelo qual o complexo **C3** induziu apoptose precoce e tardia nas células A2780cis apenas a partir da concentração do 2×IC₅₀. No entanto, o resultado é promissor pois esse mecanismo de morte é apontado como uma estratégia para o desenvolvimento de fármacos anticâncer.¹⁴⁶

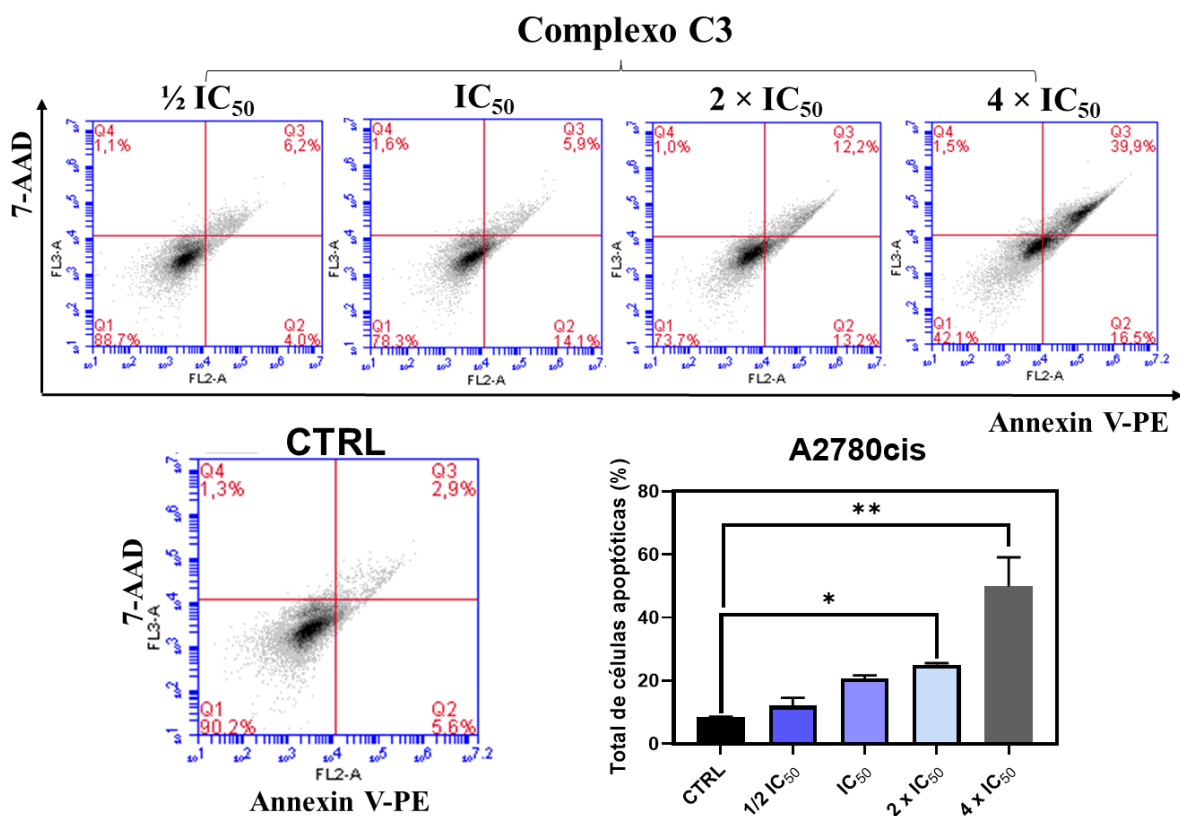


FIGURA 6. 13. Gráficos dot plots de Anexina V-PE vs 7-ADD, para determinação de células A2780cis em apoptose após o tratamento com diferentes concentrações do complexo **C3** ($1/2 \times IC_{50}$ (0,6 μ M), IC₅₀ (1,1 μ M), $2 \times IC_{50}$ (2,2 μ M) e $4 \times IC_{50}$ (4,4 μ M)) por 24 h. Gráfico da porcentagem total de células em apoptose (inicial e tardia) após o tratamento com o complexo **C3**. Diferenças significativas do controle são indicadas por *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 usando ANOVA e teste Tukey's.

6.3 Estudos de interação com biomoléculas da série C

Antes de conduzir os ensaios de interação com biomoléculas, realizamos estudos de estabilidade registrando os espectros de UV-vis dos complexos em uma solução de trizma com 40% de DMSO, durante um período de 0 e 24 horas, com incubação a 37°C e agitação a 1000 RPM. Para os complexos da Série C, observou-se uma diminuição das bandas mais intensas, da transição $\pi \rightarrow \pi^*$, e aparecimento de novas bandas, após 24 h de agitação (FIGURA 6. 14). Portanto, é possível sugerir que os complexos **C1-C3** geram subprodutos após a incubação.

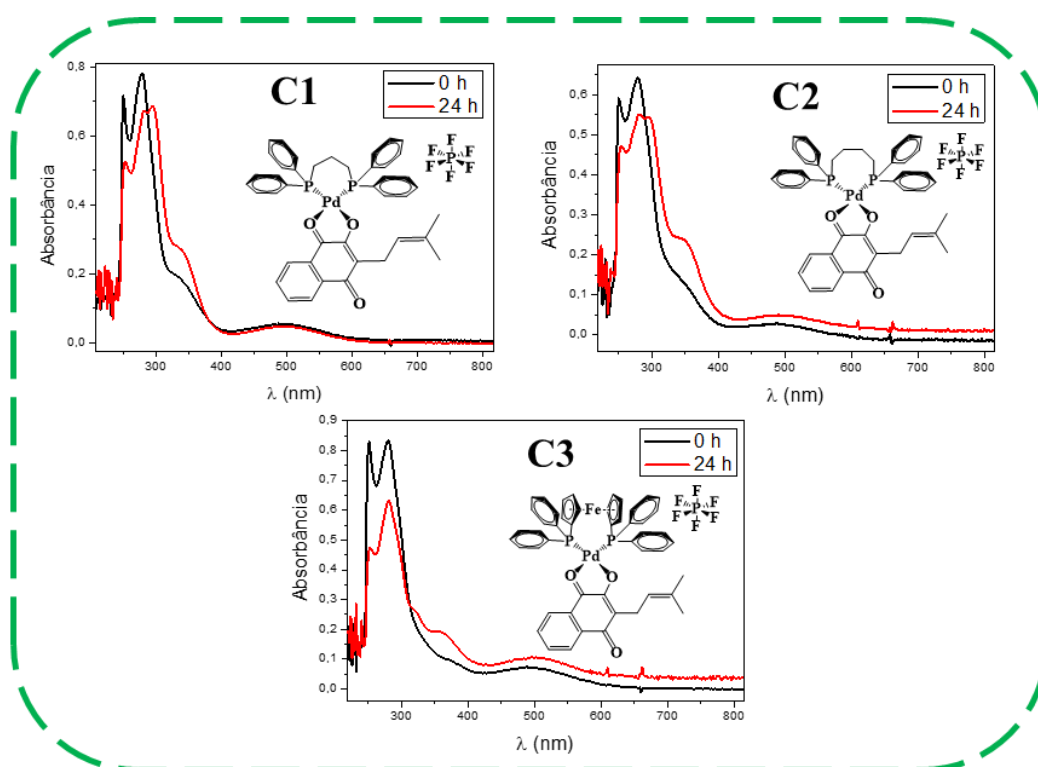


FIGURA 6. 14. Espectros de UV-vis dos complexos **C1-C3** em trizma com 40% DMSO, em 0 e 24 horas, com agitação a 1000 RPM a 37°C.

Os ensaios descritos a seguir foram conduzidos logo após a mistura da biomolécula de interesse, com os complexos da série C, portanto é possível concluir que as medidas refletem a interação das biomoléculas com os complexos na sua forma inicial, sem haver a formação de subprodutos.

Como anteriormente mencionado, a interação com a albumina de soro humano (HSA) desempenha um papel crucial na farmacocinética de potenciais fármacos. Isso é fundamental para a distribuição pelo corpo, atividade farmacológica, toxicidade, eficácia do medicamento e outros aspectos relevantes.⁸⁵

Os resultados dos ensaios indicam uma redução na fluorescência da HSA na presença dos compostos da série C. Isso sugere que a interação entre essas substâncias causa modificações na conformação do ambiente próximo ao resíduo de fluoróforo Trp-214. Foi observada uma diminuição semelhante nas intensidades de fluorescência da HSA à medida que as concentrações dos complexos aumentavam nas soluções, com reduções por volta de 30% em relação à fluorescência inicial. Os espectros de supressão de fluorescência da HSA pelo complexo **C3** são ilustrados na FIGURA 6. 15, apresentando uma redução de 30% em relação à fluorescência inicial. Os espectros de supressão de fluorescência da HSA dos demais complexos estão disponíveis na FIGURA A. 45, no Apêndice - Parte III.

Na FIGURA 6. 15 também observa-se a linearidade dos gráficos de Stern-Volmer (F_0/F vs. [Complexo]), que indicam o envolvimento de apenas um tipo de mecanismo de supressão. A redução nos valores de K_{sv} apresentados com o aumento da temperatura indica o mecanismo de supressão estática (TABELA 6. 7). Em um cenário de supressão estática, o aumento da temperatura resulta em uma diminuição na estabilidade do intermediário fluoróforo-supressor, o que leva a um efeito de supressão reduzido, refletido na diminuição da constante K_{sv} .^{85,123}

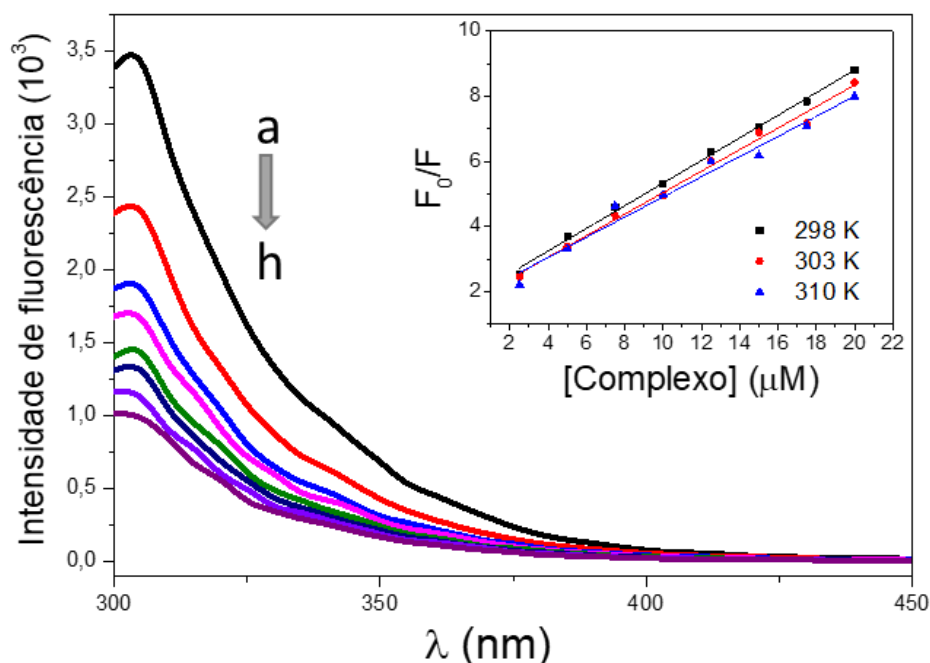


FIGURA 6. 15. Espectros de supressão de fluorescência da HSA na ausência (a) e presença do composto **C3** (b-h; b= 2,5 μM ; c= 5 μM ; d= 7,5 μM ; e= 10 μM ; f= 12,5 μM ; g= 15,0 μM e h= 17,5 μM), com concentração constante da HSA de 2,5 μM . Razão [Complexo]/[HSA]= 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7. Gráficos de Stern-Volmer para supressão de fluorescência da HSA na presença dos compostos à 298, 303 e 310 K.

Os valores máximos da constante biomolecular de supressão (k_q) para a supressão dinâmica de biopolímeros são geralmente na ordem de $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.¹²⁴ No entanto, os valores determinados para a constante k_q foram maiores do que esse limite para todos os complexos (TABELA 6. 7). Portanto, os resultados corroboram com a hipótese de um mecanismo de supressão estática.

Os valores de K_b na ordem de 10^5 indicam interações de moderadas a fortes entre os complexos e a HSA. Além disso, o valor de n próximo a 1 sugere que o complexo se liga a um sítio de ligação da HSA.

Os valores e os sinais dos parâmetros termodinâmicos foram analisados para avaliar as principais forças intermoleculares envolvidas na interação entre os compostos e a HSA. A presença de valores negativos para ΔG indica que os processos de interação entre todos os compostos e a HSA são espontâneos nas temperaturas examinadas. Os valores negativos de ΔH (entalpia) e positivos de ΔS (entropia) sugerem a ocorrência de interações predominantemente eletrostáticas entre os complexos e a albumina de soro humano (HSA).⁸⁶

Os resultados apresentados na TABELA 6. 7 indicam que os complexos exibem uma afinidade moderada a alta pela albumina, o que possibilita o transporte e a solubilidade dos complexos da série C no plasma humano pela HSA. No entanto, é importante observar que a alta afinidade de associação também pode restringir a distribuição dos compostos nos tecidos do corpo devido à estabilidade do adulto formado entre a HSA e o complexo.

TABELA 6. 7. Valores das constantes de supressão Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de taxa de supressão biomolecular (k_q), constantes de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG°) para o sistema composto-HSA em diferentes temperaturas, para os complexos **C1-C3**.

Comp.	T (K)	K_{sv} ($\times 10^5 M^{-1}$)	K_q ($\times 10^{13} M^{-1} s^{-1}$)	R^2	K_b ($\times 10^5 M^{-1}$)	n	R^2	ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K)	ΔG° (kJ mol ⁻¹)
C1	298	(2,57 ± 0,05)	4,15	0,9380	(4,83 ± 0,14)	1,23	0,9593	-18,3	47,5	-32,4
	303	(2,33 ± 0,05)	3,76	0,9386	(4,27 ± 0,10)	1,22	0,9515		47,5	-32,7
	310	(2,20 ± 0,04)	3,56	0,9516	(3,83 ± 0,14)	1,19	0,9449		47,9	-33,1
C2	298	(3,57 ± 0,09)	5,76	0,9717	(7,91 ± 0,40)	1,33	0,9797	-15,4	61,4	-33,7
	303	(3,22 ± 0,06)	5,20	0,9689	(7,14 ± 0,12)	1,33	0,9763		61,4	-34,0
	310	(2,99 ± 0,06)	4,81	0,9627	(6,52 ± 0,20)	1,34	0,9733		61,8	-34,5
C3	298	(3,27 ± 0,14)	5,28	0,9607	(6,83 ± 0,21)	1,30	0,9696	-17,4	53,3	-33,3
	303	(3,14 ± 0,12)	5,06	0,9630	(6,09 ± 0,17)	1,27	0,9689		53,3	-33,6
	310	(2,98 ± 0,12)	4,80	0,9560	(5,22 ± 0,22)	1,21	0,9666		53,3	-33,9

As medidas de viscosidade do CT-DNA em várias concentrações dos complexos da série C foram conduzidas, e os efeitos dos complexos, bem como do padrão de intercalação, laranja de tiazol, são ilustrados na FIGURA 6. 16. Os resultados são expressos como uma relação $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ versus [complexo]/[DNA]. A adição gradual de alíquotas do complexo à solução não provocou variações significativas na viscosidade do DNA, ao contrário do que foi observado com o tiazol (um agente intercalante). Esses resultados sugerem que as interações predominantes são de natureza eletrostática e/ou ocorrem nos sulcos do DNA.

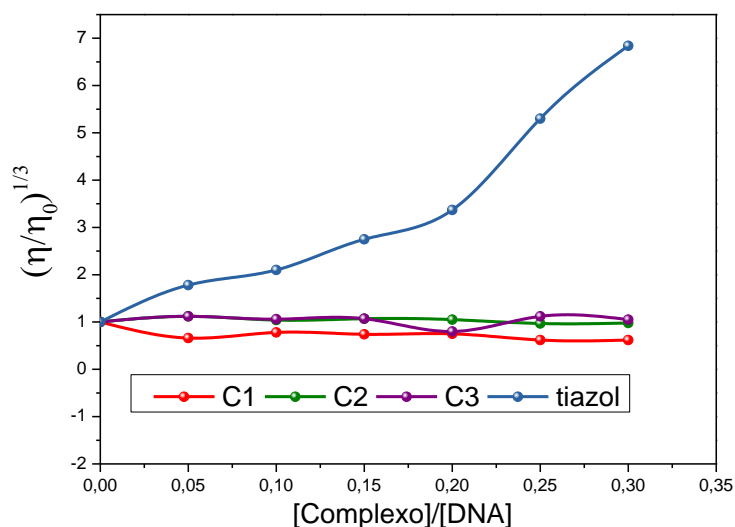


FIGURA 6. 16. Viscosidade relativa do CT-DNA na ausência e presença dos complexos **C1-C3** (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 μM) e do padrão tiazol laranja, em diferentes razões molares [composto]/[DNA]=0,00; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 e 0,30, com concentração constante de CT-DNA de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 20% de DMSO.

Finalmente, para determinar se os complexos da série C interagem com o sulco menor do DNA ou com regiões próximas, conduzimos o ensaio de deslocamento do Hoechst 33324 do sulco menor do CT-DNA. Os complexos C1-C3 atuaram como agentes supressores da fluorescência no complexo DNA-Hoechst, resultando em uma diminuição na intensidade da fluorescência à medida que as concentrações dos complexos aumentavam nas soluções. Na concentração mais elevada, os complexos **C1 e C2** causaram uma redução na intensidade de emissão correspondente a 12% e 1% do valor inicial, respectivamente (FIGURA 6. 17). O complexo **C3**, em sua maior concentração, apresentou uma diminuição da fluorescência inicial de aproximadamente 33%. A supressão da fluorescência indica que os compostos têm a capacidade, seja por meio de uma ação direta ou por

pequenas alterações nas proximidades do sulco menor, de deslocar o Hoechst do sulco menor do DNA.

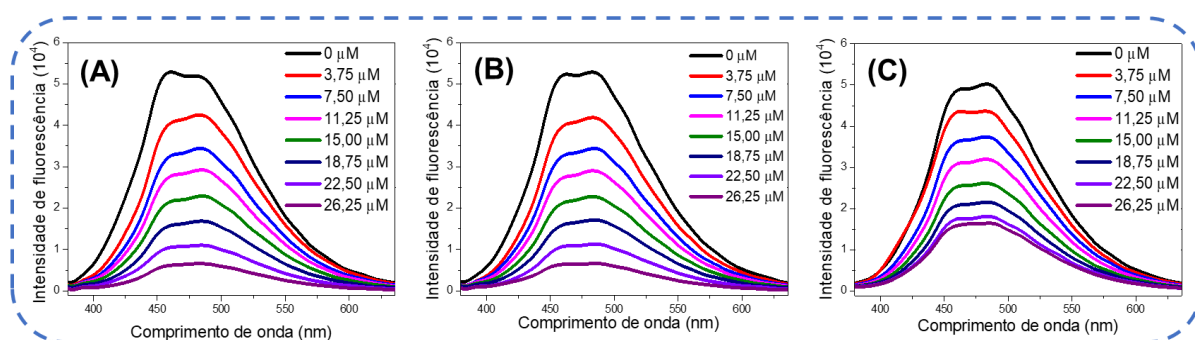


FIGURA 6. 17. Espectros de supressão de fluorescência do DNA-Hoechst na ausência e presença dos complexos (A) **C1**, (B) **C2** e (C) **C3**, concentração constante da DNA-Hoechst de 75 e 2,5 μM, respectivamente.

6.4 Conclusões parciais da série C

Nesta série foram sintetizados 3 complexos inéditos, contendo o ligante lapachol e diferentes bisfosfinas. As caracterizações dos complexos, por técnicas de condutividade molar, análise elementar, espectrometria de massas, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D de ^1H , $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e difração de raios X, confirmaram a estrutura esperada para os mesmos. Os complexos **C1-C3** demonstraram estabilidade em um período de até 48 horas, em solução de DMSO (0,5%) com meio de cultura celular (99,5% RPMI), quando avaliados utilizando a técnica de espectroscopia UV-visível.

Ao avaliar a viabilidade celular dos complexos série C frente à diferentes linhagens de células tumorais, foi possível concluir que os complexos em geral são mais ativos em células as células tumorais de ovário (A2780 e A280cis), não apresentando citotoxicidade marcante nas demais linhagens tumorais avaliadas. Com exceção do complexo **C3**, que apresentou os menores valores de IC_{50} frente a maiorias das linhagens tumorais testadas, fato este que pode estar correlacionado a maior lipofilicidade apresentada pelo complexo.

O complexo **C3** se destacou nesta série por possuir baixos valores de IC_{50} nas linhagens tumorais de ovário, sendo que o valor IC_{50} aproximadamente 30 vezes menor que a cisplatina, fármaco inorgânico de referência, frente à linhagem A2780cis. Também, o mesmo mostrou um alto índice de seletividade. Portanto, o

mesmo foi escolhido para prosseguir com os experimentos mais avançados nas células A2780cis.

O complexo **C3** exibiu efeito citotóxico e citostático nas células tumorais de ovário (A2780cis), levando a inibição da formação de colônias e diminuição do tamanho de colônias das células. Além disso, o complexo promoveu alterações morfológicas das células da linhagem A2780cis, bem como a diminuição da confluência celular a partir da concentração de $2 \times IC_{50}$.

Ensaio de morfologia e formação de colônias das células não tumorais MRC-5 também foram realizados, após o tratamento com o complexo **C3**. Os resultados mostraram que o composto **C3** alterou fracamente a morfologia das células, a partir da concentração de $20 \mu M$ em 48h de tratamento. Também nessa concentração ($20 \mu M$), foi observado a diminuição da área das colônias. Esse resultado demonstra a seletividade do complexo **C3**, apresentando maior citotoxicidade nas células tumorais do que nas células saudáveis testadas.

O tratamento das células tumorais A2780cis com o composto **C3** alterou a proporção de células nas fases do ciclo celular em comparação com as células não tratadas. A maior porcentagem de eventos foi observada na fase sub-G1. A presença de células hipodiplóides (células sub-G1) sugere a possibilidade de apoptose, uma vez que o processo de apoptose resulta na fragmentação do DNA. Foi identificada que o composto **C3** induz a morte celular apoptótica por meio do ensaio de citometria de fluxo com os corantes anexina V-PE e 7AAD.

Os resultados apresentados de interação com a HSA indicam que os complexos exibem uma afinidade de moderada a alta, pela albumina, o que possibilita o transporte e a solubilidade dos complexos da série C no plasma humano pela HSA.

Os complexos **C1-C3** demonstraram interações com o sulco menor do DNA, como indicado pelo ensaio de deslocamento do Hoechst. Não houve mudanças substanciais nas estruturas secundária e terciária do DNA, sugerindo que o mecanismo de ação dos complexos da série C, resulta na morte celular, que não está diretamente associada a uma interação com o DNA.

É conhecido que o lapachol é capaz de induzir a formação de ROS e essa indução pode ser potencializada quando há a coordenação do mesmo, ao Pd(II).^{12,147,148} Nesse sentido, o estresse oxidativo poderia ser um plausível mecanismo de morte celular causado pelos complexos da série C, no entanto mais estudos devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES FINAIS

Neste trabalho 12 complexos Pd^{II}/fosfina, contendo produtos naturais e seus derivados como ligantes, foram sintetizados e caracterizados. Independente da Série estudada, um único modo de coordenação foi observado, sendo este bidentado, através dos átomos de oxigênios dos grupos cetona e enol dos ligantes, na série A, e através dos oxigênios das quinonas e hidroxilas adjacentes nas séries B e C.

Uma característica presente em todos os complexos de paládio com a curcumina foi a instabilidade dos mesmos, nas condições dos testes biológicos (meio de cultura e 0,5% DMSO). Isso deve-se a curcumina presente nos complexos, pois é conhecido da literatura que a mesma sofre auto oxidação em condições fisiológicas.

A curcumina livre se auto oxida mais rapidamente do que quando complexada nos complexos sintetizados, mostrando assim que a coordenação agrega maior estabilidade ao ligante. Os complexos sintetizados com naftoquinonas demonstraram estabilidade nas condições dos testes biológicos em até 48 h. Para o complexo sintetizado com a antraquinona alizarina, foi identificada uma pequena diminuição na intensidade das bandas de UV-vis em até 48 h. Foi identificado o subproduto formado em meio de cultura e DMSO, e sua estrutura foi identificada por difração de raio-X em monocristal, mostrando que se trata da alizarina coordenada ao metal por meio das hidroxilas desprotonadas, formando um complexo neutro.

Os novos complexos sintetizados apresentaram de boas a excelentes atividades citotóxicas frente a diversas linhagens celulares, sendo o destaque para as linhagens celulares derivadas de tumores humanos de ovário (A2780 e A2780cis). Além disso, os compostos foram mais seletivos frente às células tumorais de ovário quando comparado às linhagens não tumorais. Diante desses resultados de seletividade, os compostos [Pd(cur)(PPh₃)₂]⁺PF₆⁻ (**A1**) da série A, [Pd(dppe)(lap)]⁺PF₆⁻ (**B2**) da série B e [Pd(dppf)(lap)]⁺PF₆⁻ (**C3**) da série C foram selecionados para estudos adicionais nas células tumorais de ovário. Estes complexos foram capazes de inibir a formação de colônias e alterar a morfologia de células da linhagem A2780cis (para os complexos **A1** e **C3**) e A2780 (complexo **B2**) nas concentrações próximas ao IC₅₀, e não mostraram capacidade de inibir a migração celular quando avaliados pelo ensaio de *Wound Healing*.

Uma observação significativa nas células ovarianas tratadas com os complexos **A1**, **B2** e **C3** diz respeito ao ensaio de quantificação e distribuição das

células nas diversas fases do ciclo celular. Quando as células ovarianas foram expostas a diferentes concentrações desses compostos, foi observado um acúmulo de células com padrões de conteúdo de DNA anormais, conhecidas como células Sub-G1. Essas células Sub-G1 são hipodiplóides, o que significa que possuem uma quantidade de DNA reduzida, refletindo a presença de células mortas com DNA fragmentado. Essa alteração na proporção das fases do ciclo celular sugere que os complexos interferem na progressão do ciclo celular. Além disso, o acúmulo de células hipodiplóides é consistente com a ocorrência de apoptose, um processo que envolve a fragmentação do DNA durante a morte celular programada. A indução do mecanismo de morte celular por apoptose foi confirmado por meio de ensaios por citometria de fluxo com os marcadores de fluorescência Anexina V-PE e 7-AAD.

Os complexos sintetizados apresentaram de moderada a alta afinidade pela proteína HSA, viabilizando o transporte e a solubilidade dos compostos na corrente sanguínea. O processo de interação entre os complexos e HSA ocorre de forma espontânea e por meio de interações eletrostáticas ou hidrofóbicas.

Na investigação dos potenciais alvos biológicos dos complexos, realizamos uma análise da interação desses complexos com o DNA. Todas as três séries de complexos demonstraram interações fracas e reversíveis com o sulco menor do DNA, sem causar danos à sua estrutura. Portanto, é provável que esses compostos não exerçam um impacto direto nos processos de transcrição, replicação e outros relacionados ao DNA. Como resultado, pode-se concluir que o DNA não é, provavelmente, o principal alvo desses compostos.

Pode-se constatar que o complexo **A1** induziu a formação de ERO nas células A2780cis, sendo o estresse oxidativo um dos possíveis mecanismos de ação deste complexo.

O estudo abrangente apresentado aqui, baseado tanto em aspectos químicos quanto biológicos, proporcionou uma compreensão aprimorada do sistema Pd^{II}-fosfinas/produtos naturais. A capacidade desses complexos para aplicação na área da medicina, conforme demonstrado neste trabalho, estimula a continuidade de pesquisas nesse campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRAY, F.; LAVERSANNE, M.; WEIDERPASS, E.; & SOERJOMATARAM, I. "The Ever-Increasing Importance of Cancer as a Leading Cause of Premature Death Worldwide." *Cancer*, 127 (16): 3029, 2021.
2. SINGH, S. "Preclinical Pharmacokinetics: An Approach Towards Safer and Efficacious Drugs." *Curr. Drug Metab.*, 7 (2): 165, 2006.
3. ANDRADE, E. L.; BENTO, A. F.; CAVALLI, J.; OLIVEIRA, S. K.; SCHWANKE, R. C.; SIQUEIRA, J. M.; FREITAS, C. S.; MARCON, R.; & CALIXTO, J. B. "Non-Clinical Studies in the Process of New Drug Development - Part II: Good Laboratory Practice, Metabolism, Pharmacokinetics, Safety and Dose Translation to Clinical Studies." *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 49 (12): 19, 2016.
4. The Drug Development Process | FDA <https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process> (accessed Dec 11, 2023).
5. GAROUFIS, A.; HADJIKAKOU, S. K.; & HADJILIADIS, N. "Palladium Coordination Compounds as Anti-Viral, Anti-Fungal, Anti-Microbial and Anti-Tumor Agents." *Coord. Chem. Rev.*, 253 (9–10): 1384, 2009.
6. ICSEL, C.; YILMAZ, V. T.; AYGUN, M.; CEVATEMRE, B.; ALPER, P.; & ULUKAYA, E. "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." *Dalt. Trans.*, 47 (33): 11397, 2018.
7. LI, Y.; GU, Z.; ZHANG, C.; LI, S.; ZHANG, L.; ZHOU, G.; WANG, S.; & ZHANG, J. "Synthesis, Characterization and ROS-Mediated Antitumor Effects of Palladium(II) Complexes of Curcuminoids." *Eur. J. Med. Chem.*, 144: 662, 2018.
8. Tookad | European Medicines Agency <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tookad> (accessed Oct 18, 2023).
9. AZZOUZI, A. R.; VINCENDEAU, S.; BARRET, E.; CICCIO, A.; KLEINCLAUSS, F.; VAN DER POEL, H. G.; STIEF, C. G.; RASSWEILER, J.; SALOMON, G.; SOLSONA, E.; ALCARAZ, A.; TAMMELA, T. T.; ROSARIO, D. J.; GOMEZ-VEIGA, F.; AHLGREN, G.; BENZAGHOU, F.; GAILLAC, B.; AMZAL, B.; DEBRUYNE, F. M. J.; FROMONT, G.; GRATZKE, C.; & EMBERTON, M.

- “Padeliporfin Vascular-Targeted Photodynamic Therapy versus Active Surveillance in Men with Low-Risk Prostate Cancer (CLIN1001 PCM301): An Open-Label, Phase 3, Randomised Controlled Trial.” *Lancet Oncol.*, 18 (2): 181, 2017.
10. BUGAJ, A. M. “Vascular Targeted Photochemotherapy Using Padoporfin and Padeliporfin as a Method of the Focal Treatment of Localised Prostate Cancer - Clinician’s Insight.” *World J. Methodol.*, 6 (1): 65, 2016.
 11. LEITE, C. M. “Propriedades Citotóxicas de Complexos de Cu(I)-Trifenilfosfina Com Ligantes Aciltioureas Ou Naftoquinonas,” 2021.
 12. OLIVEIRA, K. M.; PETERSON, E. J.; CARROCCIA, M. C.; COMINETTI, M. R.; DEFLON, V. M.; FARRELL, N. P.; BATISTA, A. A.; & CORREA, R. S. “Ru(II)-Naphthoquinone Complexes with High Selectivity for Triple-Negative Breast Cancer.” *Dalt. Trans.*, 49 (45): 16193, 2020.
 13. BARBOSA, M. I. F.; CORRÊA, R. S.; DE OLIVEIRA, K. M.; RODRIGUES, C.; ELLENA, J.; NASCIMENTO, O. R.; ROCHA, V. P. C.; NONATO, F. R.; MACEDO, T. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SOARES, M. B. P.; & BATISTA, A. A. “Antiparasitic Activities of Novel Ruthenium/Lapachol Complexes.” *J. Inorg. Biochem.*, 136: 33, 2014.
 14. DE GRANDIS, R. A.; SANTOS, P. W. da S. dos; OLIVEIRA, K. M. de; MACHADO, A. R. T.; AISSA, A. F.; BATISTA, A. A.; ANTUNES, L. M. G.; & PAVAN, F. R. “Novel Lawsone-Containing Ruthenium(II) Complexes: Synthesis, Characterization and Anticancer Activity on 2D and 3D Spheroid Models of Prostate Cancer Cells.” *Bioorg. Chem.*, 85 (January): 455, 2019.
 15. DE ARAUJO-NETO, J. H.; GUEDES, A. P. M.; LEITE, C. M.; MORAES, C. A. F.; SANTOS, A. L.; BRITO, R. da S.; ROCHA, T. L.; MELLO-ANDRADE, F.; ELLENA, J.; & BATISTA, A. A. “‘Half-Sandwich’ Ruthenium Complexes with Alizarin as Anticancer Agents: In Vitro and In Vivo Studies.” *Inorg. Chem.*, 2023.
 16. OLIVEIRA, K. M.; HONORATO, J.; DEMIDOFF, F. C.; SCHULTZ, M. S.; NETTO, C. D.; COMINETTI, M. R.; CORREA, R. S.; & BATISTA, A. A. “Lapachol in the Design of a New Ruthenium(II)-Diphosphine Complex as a Promising Anticancer Metallodrug.” *J. Inorg. Biochem.*, 214 (July 2020)2021.
 17. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cancer <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed Oct 11, 2023).
 18. IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER

- <https://www.iarc.who.int/> (accessed Mar 29, 2023).
19. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2023 : Incidência de Câncer No Brasil. Rio de Janeiro, 2022.
 20. HASSANPOUR, S. H.; & DEHGhani, M. "Review of Cancer from Perspective of Molecular." *J. Cancer Res. Pract.*, 4 (4): 127, 2017.
 21. Cancer <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed Oct 23, 2023).
 22. REYMOND, N.; D'ÁGUA, B. B.; & RIDLEY, A. J. "Crossing the Endothelial Barrier during Metastasis." *Nat. Rev. Cancer*, 13 (12): 858, 2013.
 23. OLIVEIRA, G. P. de. "Complexos de Pd(II) e Pt(II) Contendo Tiossemicarbazonas Derivadas Do Tiofeno: Síntese, Caracterização, Investigação Da Citotoxicidade e Modo de Ação," UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, 2022.
 24. NATIONAL CANCER INSTITUTE. Types of Cancer Treatment <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types> (accessed Oct 11, 2023).
 25. ARRUEBO, M.; VILABOA, N.; SÁEZ-GUTIERREZ, B.; LAMBEA, J.; TRES, A.; VALLADARES, M.; & GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Á. "Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies." *Cancers (Basel)*, 3 (3): 3279, 2011.
 26. PUCCI, C.; MARTINELLI, C.; & CIOFANI, G. "Innovative Approaches for Cancer Treatment: Current Perspectives and New Challenges." *Ecancermedicalsecience*, 13: 1, 2019.
 27. BARNETT ROSENBERG, LORETTA VANCAMP, JAMES E. TROSKO, V. H. M. "Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents." *Nature*, 222 (385): 177, 1969.
 28. KHOURY, A.; DEO, K. M.; & ALDRICH-WRIGHT, J. R. "Recent Advances in Platinum-Based Chemotherapeutics That Exhibit Inhibitory and Targeted Mechanisms of Action." *J. Inorg. Biochem.*, 207 (February): 111070, 2020.
 29. CALVERT, H. "The Clinical Development of Carboplatin – A Personal Perspective." *Inorganica Chim. Acta*, 498 (June): 118987, 2019.
 30. IBRAHIM, A.; HIRSCHFELD, S.; COHEN, M. H.; GRIEBEL, D. J.; WILLIAMS, G. A.; & PAZDUR, R. "FDA Drug Approval Summaries: Oxaliplatin." *Oncologist*, 9 (1): 8, 2004.
 31. SHIMADA, M.; ITAMOCHI, H.; & KIGAWA, J. "Nedaplatin: A Cisplatin Derivative in Cancer Chemotherapy." *Cancer Manag. Res.*, 5 (1): 67, 2013.

32. VOEGELI, R.; GUNTHER, E.; AULENBACHER, P.; ENGEL, J.; & HILGARD, P. "Lobaplatin." *Drugs Future*, 17 (10): 883, 1992.
33. CHOI, C. H.; CHA, Y. J.; AN, C. S.; KIM, K. J.; KIM, K. C.; MOON, S. P.; LEE, Z. H.; & MIN, Y. D. "Molecular Mechanisms of Heptaplatin Effective against Cisplatin-Resistant Cancer Cell Lines: Less Involvement of Metallothionein." *Cancer Cell Int.*, 4: 1, 2004.
34. KOZARICH, J. W. *Medicinal Inorganic Chemistry: Promises and Challenges.*, American Chemical Society, Washington, D. C., 2005.
35. BENEDETTI, M.; DUCANI, C.; MIGONI, D.; ANTONUCCI, D.; VECCHIO, V. M.; ROMANO, A.; VERRI, T.; & FANIZZI, F. P. "Platinum and Other Heavy Metal Compounds in Cancer Chemotherapy." *Platin. Other Heavy Met. Compd. Cancer Chemother.*, No. January: 1, 2009.
36. TODD, R. C.; & LIPPARD, S. J. "Platinum and Other Heavy Metal Compounds in Cancer Chemotherapy." *Platin. Other Heavy Met. Compd. Cancer Chemother.*, : 67, 2009.
37. BUGARČIĆ, Ž. D.; BOGOJESKI, J.; PETROVIĆ, B.; HOCHREUTHER, S.; & VAN ELDIK, R. "Mechanistic Studies on the Reactions of Platinum(II) Complexes with Nitrogen- and Sulfur-Donor Biomolecules." *Dalt. Trans.*, 41 (40): 12329, 2012.
38. BOULIKAS, T.; PANTOS, A.; BELLIS, E.; & CHRISTOFIS, P. 2007. *Platinum Drugs Cancer Therapy* 5, 537-583. Pdf. 2007. Vol. 5.
39. ZAMBLE, D. B.; & LIPPARD, S. J. "Cisplatin and DNA Repair in Cancer Chemotherapy." *Trends Biochem. Sci.*, 20 (10): 435, 1995.
40. OUN, R.; MOUSSA, Y. E.; & WHEATE, N. J. "The Side Effects of Platinum-Based Chemotherapy Drugs: A Review for Chemists." *Dalt. Trans.*, 47 (19): 6645, 2018.
41. PETROVSKA, B. B. "Historical Review of Medicinal Plants' Usage." *Pharmacogn. Rev.*, 6 (11): 1, 2012.
42. BOY, H. I. A.; RUTILLA, A. J. H.; SANTOS, K. A.; TY, A. M. T.; YU, A. I.; MAHBOOB, T.; TANGPOONG, J.; & NISSAPATORN, V. "Recommended Medicinal Plants as Source of Natural Products: A Review." *Digit. Chinese Med.*, 1 (2): 131, 2018.
43. LESTARI, M. L. A. D.; & INDRAYANTO, G. *Curcumin*. 2014. Vol. 39.

44. GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; & AGGARWAL, B. B. "Curcumin as 'Curecumin': From Kitchen to Clinic." *Biochem. Pharmacol.*, 75 (4): 787, 2008.
45. SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J.; & STEWARD, W. P. "Curcumin: The Story so Far." *Eur. J. Cancer*, 41 (13): 1955, 2005.
46. XIE, L.; JI, X.; ZHANG, Q.; & WEI, Y. "Curcumin Combined with Photodynamic Therapy, Promising Therapies for the Treatment of Cancer." *Biomed. Pharmacother.*, 146 (November 2021): 112567, 2022.
47. SCHNEIDER, C.; GORDON, O. N.; EDWARDS, R. L.; & LUIS, P. B. "Degradation of Curcumin: From Mechanism to Biological Implications." 63 (35): 7606, 2015.
48. WANG, Y. J.; PAN, M. H.; CHENG, A. L.; LIN, L. I.; HO, Y. S.; HSIEH, C. Y.; & LIN, J. K. "Stability of Curcumin in Buffer Solutions and Characterization of Its Degradation Products." *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15 (12): 1867, 1997.
49. MUHAMMAD, H. S.; & MUHAMMAD, S. "The Use of Lawsonia Inermis Linn. (Henna) in the Management of Burn Wound Infections." *African J. Biotechnol.*, 4 (9): 934, 2005.
50. LÓPEZ LÓPEZ, L. I.; NERY FLORES, S. D.; SILVA BELMARES, S. Y.; & SÁENZ GALINDO, A. "Naphthoquinones: Biological Properties and Synthesis of Lawsone and Derivatives — a Structured Review." *Vitae*, 21 (3): 248, 2014.
51. JORDÃO, A. K.; VARGAS, M. D.; PINTO, A. C.; DA SILVA, F. D. C.; & FERREIRA, V. F. "Lawsone in Organic Synthesis." *RSC Adv.*, 5 (83): 67909, 2015.
52. NETO DE ARRAUJO, J. H. "Complexos Semi-Sanduíche de Rull/Areno e Produtos Naturais: Uma Promissora Combinação Para Novos Metalofármacos," UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, 2020.
53. ALMEIDA, E. R. de. "Preclinical and Clinical Studies of Lapachol and Beta-Lapachone." *Open Nat. Prod. J.*, 2 (1): 42, 2009.
54. EPIFANO, F.; GENOVESE, S.; FIORITO, S.; MATHIEU, V.; & KISS, R. "Lapachol and Its Congeners as Anticancer Agents: A Review." *Phytochem. Rev.*, 13 (1): 37, 2014.
55. ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; & ROLIM NETO, P. J. "Lapachol: Segurança e Eficácia Na Terapêutica." *Rev. Bras. Farmacogn.*, 12: 57, 2002.
56. CORTES, E. P.; HOLLAND, J. F.; WANG, J. J.; & SINKS, L. F. "Doxorubicin in Disseminated." *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, 221 (10): 1132, 1972.

57. YANG, F.; TEVES, S. S.; KEMP, C. J.; & HENIKOFF, S. "Doxorubicin, DNA Torsion, and Chromatin Dynamics." *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, 1845 (1): 84, 2014.
58. SPETH, P. A. J.; VAN HOESEL, Q. G. C. M.; & HAANEN, C. "Drug Disposition Clinical Pharmacokinetics of Doxorubicin." 31: 15, 1988.
59. THORN, C. F.; OSHIRO, C.; MARSH, S.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T.; MCLEOD, H.; KLEIN, T. E.; & ALTMAN, R. B. "Doxorubicin Pathways." *Pharmacogenet. Genomics*, 21 (7): 440, 2011.
60. FOTIA, C.; AVNET, S.; GRANCHI, D.; & BALDINI, N. "The Natural Compound Alizarin as an Osteotropic Drug for the Treatment of Bone Tumors." *J. Orthop. Res.*, 30 (9): 1486, 2012.
61. ANGELINI, L. G.; PISTELLI, L.; BELLONI, P.; BERTOLI, A.; & PANCONESI, S. "Rubia Tinctorum a Source of Natural Dyes: Agronomic Evaluation, Quantitative Analysis of Alizarin and Industrial Assays." *Ind. Crops Prod.*, 6 (3–4): 303, 1997.
62. KAUR, P.; CHANDEL, M.; KUMAR, S.; KUMAR, N.; SINGH, B.; & KAUR, S. "Modulatory Role of Alizarin from *Rubia Cordifolia* L. against Genotoxicity of Mutagens." *Food Chem. Toxicol.*, 48 (1): 320, 2010.
63. OLIVEIRA, K. M.; CORRÊA, R. S.; BARBOSA, M. I. F.; ELLENA, J.; COMINETTI, M. R.; & BATISTA, A. A. "Ruthenium(II)/Triphenylphosphine Complexes: An Effective Way to Improve the Cytotoxicity of Lapachol." *Polyhedron*, 130: 108, 2017.
64. GRAMINHA, A. E.; HONORATO, J.; CORREA, R. S.; COMINETTI, M. R.; MENEZES, A. C. S.; & BATISTA, A. A. "A Novel Ruthenium(II) Gallic Acid Complex Disrupts the Actin Cytoskeleton and Inhibits Migration, Invasion and Adhesion of Triple Negative Breast Tumor Cells." *Dalt. Trans.*, 50 (1): 323, 2021.
65. VIEIRA ROCHA, F. "SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE COMPLEXOS DE PALÁDIO(II) COM LIGANTES SULFURADOS E TRIFENILFOSFINA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA INSTITUTO DE QUÍMICA – Araraquara." No. li2013.
66. JONES, C. J.; & THORNBACK, J. "Medicinal Applications of Coordination Chemistry." : 353, 2007.
67. OLIVEIRA, C. G. "Síntese, Caracterização e Estudo de Mecanismo de Ação de Complexos de Paládio e Platina Com Ligantes Tiossemicarbazonas Derivados Do Pireno Visando a Obtenção de Novos Quimioterápicos Anticâncer." : 193,

- 2017.
68. HONORATO, J.; COLINA-VEGAS, L.; CORREA, R. S.; GUEDES, A. P. M.; MIYATA, M.; PAVAN, F. R.; ELLENA, J.; & BATISTA, A. A. "Esterification of the Free Carboxylic Group from the Lutidinic Acid Ligand as a Tool to Improve the Cytotoxicity of Ru(II) Complexes." *Inorg. Chem. Front.*, 6 (2): 376, 2019.
 69. GUNATILLEKE, S. S.; & BARRIOS, A. M. "Tuning the Au(I)-Mediated Inhibition of Cathepsin B through Ligand Substitutions." *J. Inorg. Biochem.*, 102 (3): 555, 2008.
 70. GUNATILLEKE, S. S.; & BARRIOS, A. M. "Inhibition of Lysosomal Cysteine Proteases by a Series of Au(I) Complexes: A Detailed Mechanistic Investigation." *J. Med. Chem.*, 49 (13): 3933, 2006.
 71. QUEIROZ, S. L.; & BATISTA, A. A. "Complexos Fosfínicos e Suas Aplicações Na Medicina." *Química Nova*. 1996, p. 651–659.
 72. MESSERE, A.; FABBRI, E.; BORGATTI, M.; GAMBARI, R.; BLASIO, B. Di; PEDONE, C.; & ROMANELLI, A. "Antiproliferative Activity of Pt(II) and Pd(II) Phosphine Complexes with Thymine and Thymidine." *J. Inorg. Biochem.*, 101 (2): 254, 2007.
 73. EMA. "Anexo I - Resumo Das Características Do Medicamento - Dabigatrano." : 1, 2010.
 74. Mass calculations: mass error and m/z from formula https://warwick.ac.uk/fac/sci/chemistry/research/barrow/barrowgroup/calculators/mass_errors/ (accessed Oct 16, 2023).
 75. SHELDRICK, G. M. "SHELXT - Integrated Space-Group and Crystal-Structure Determination." *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.*, 71 (1): 3, 2015.
 76. SHELDRICK, G. M. "Crystal Structure Refinement with SHELXL." *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.*, 71 (Md): 3, 2015.
 77. DOLOMANOV, O. V.; BOURHIS, L. J.; GILDEA, R. J.; HOWARD, J. A. K.; & PUSCHMANN, H. "OLEX2: A Complete Structure Solution, Refinement and Analysis Program." *J. Appl. Crystallogr.*, 42 (2): 339, 2009.
 78. MACRAE, C. F.; BRUNO, I. J.; CHISHOLM, J. A.; EDINGTON, P. R.; MCCABE, P.; PIDCOCK, E.; RODRIGUEZ-MONGE, L.; TAYLOR, R.; VAN DE STREEK, J.; & WOOD, P. A. "Mercury CSD 2.0 - New Features for the Visualization and Investigation of Crystal Structures." *J. Appl. Crystallogr.*, 41 (2): 466, 2008.

79. BAKA, E.; COMER, J. E. A.; & TAKÁCS-NOVÁK, K. "Study of Equilibrium Solubility Measurement by Saturation Shake-Flask Method Using Hydrochlorothiazide as Model Compound." *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 46 (2): 335, 2008.
80. MOSMANN, T. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *J. Immunol. Methods*, 65 (1–2): 55, 1983.
81. HYEONCHEOL, K.; & XIANG, X. "Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining." *J. Vis. Exp.*, 160 (1)2020.
82. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; & BERSET, C. "Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity." *Leb. Technol.*, 28: 25, 1995.
83. GILROY, E. L.; HICKS, M. R.; SMITH, D. J.; & RODGER, A. "Viscosity of Aqueous DNA Solutions Determined Using Dynamic Light Scattering." *Analyst*, 136 (20): 4159, 2011.
84. SCRUGGS, R. L.; & ROSS, P. D. "Viscosity Study." 2: 593, 1964.
85. NAVEENRAJ, S.; & ANANDAN, S. "Binding of Serum Albumins with Bioactive Substances - Nanoparticles to Drugs." *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, 14 (1): 53, 2013.
86. ROSS, P. D.; & SUBRAMANIAN, S. "Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability." *Biochemistry*, 20 (11): 3096, 1981.
87. GARCIA VELHO, R. "Medidas de Condutividade Na Caracterização de Complexos Inorgânicos: Um Levantamento Bibliográfico." Programa Pós-Graduação em Química - UF, : 170, 2006.
88. ALVES, K. M.; HONORATO, J.; LIÃO, L. M.; VELOZO-SA, V. S.; GUEDES, A. P. M.; DUTRA, J. D. L.; AYALLA, A. P.; ELLENA, J.; BATISTA, A. A.; & GONÇALVES, P. J. "Meso -Tetra-(4-Pyridyl)Porphyrin/Palladium(II) Complexes as Anticancer Agents." *Dalt. Trans.*, 50 (44): 16254, 2021.
89. PLUTÍN, A. M.; MOCELO, R.; ALVAREZ, A.; RAMOS, R.; CASTELLANO, E. E.; COMINETTI, M. R.; GRAMINHA, A. E.; FERREIRA, A. G.; & BATISTA, A. A. "On the Cytotoxic Activity of Pd(II) Complexes of N,N-Disubstituted- N'-Acyl Thioureas." *J. Inorg. Biochem.*, 134 (II): 76, 2014.
90. OLIVEIRA, C. G.; ROMERO-CANELÓN, I.; COVERDALE, J. P. C.; MAIA, P. I. S.; CLARKSON, G. J.; DEFLON, V. M.; & SADLER, P. J. "Novel Tetranuclear

- PdIIand PtII anticancer Complexes Derived from Pyrene Thiosemicarbazones.” *Dalt. Trans.*, 49 (28): 9595, 2020.
91. LI, Y.; GU, Z.; ZHANG, C.; LI, S.; ZHANG, L.; ZHOU, G.; WANG, S.; & ZHANG, J. “European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis , Characterization and ROS-Mediated Antitumor Effects of Palladium (II) Complexes of Curcuminoids.” *Eur. J. Med. Chem.*, 144: 662, 2018.
92. KOLEV, T. M.; VELCHEVA, E. A.; STAMBOLIYSKA, B. A.; & SPITELLER, M. “DFT and Experimental Studies of the Structure and Vibrational Spectra of Curcumin.” *Int. J. Quantum Chem.*, 102 (6): 1069, 2005.
93. ISMAIL, E. H.; SABRY, D. Y.; MAHDY, H.; & KHALIL, M. M. H. “Synthesis and Characterization of Some Ternary Metal Complexes of Curcumin with 1,10-Phenanthroline and Their Anticancer Applications.” *J. Sci. Res.*, 6 (3): 509, 2014.
94. NAKAMOTO, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds.*, Sixth edita ed. WILEY, 2009.
95. PAVIA, DONALD L., LAMPMAN, GARY M., KRIZ, GEORGE S., VYVYAN, J. R. *Introdução à Espectroscopia.*, 4ª ed.
96. BALASUBRAMANIAN, K. “Two Colorful Applications of the PPP Method.” *XXXVII*: 449, 1990.
97. LEITE, C. M.; HONORATO, J.; MARTIN, A. C. B. M.; SILVEIRA, R. G.; COLOMBARI, F. M.; AMARAL, J. C.; COSTA, A. R.; COMINETTI, M. R.; PLUTÍN, A. M.; DE AGUIAR, D.; VAZ, B. G.; & BATISTA, A. A. “Experimental and Theoretical DFT Study of Cu(I)/ N, N-Disubstituted- N'-Acythioureato Anticancer Complexes: Actin Cytoskeleton and Induction of Death by Apoptosis in Triple-Negative Breast Tumor Cells.” *Inorg. Chem.*, 61 (1): 664, 2022.
98. HUSSAIN, A.; SOMYAJIT, K.; BANIK, B.; BANERJEE, S.; NAGARAJU, G.; & CHAKRAVARTY, A. R. “Enhancing the Photocytotoxic Potential of Curcumin on Terpyridyl Lanthanide(III) Complex Formation.” *Dalt. Trans.*, 42 (1): 182, 2013.
99. ANDRÉS, A.; ROSÉS, M.; RÀFOLS, C.; BOSCH, E.; ESPINOSA, S.; SEGARRA, V.; & HUERTA, J. M. “Setup and Validation of Shake-Flask Procedures for the Determination of Partition Coefficients (Log D) from Low Drug Amounts.” *Eur. J. Pharm. Sci.*, 76: 181, 2015.
100. TAVARES, L. C. “QSAR: A Abordagem de Hansch.” *Quim. Nova*, 27 (4): 631, 2004.
101. GUPTA, S. C.; PATCHVA, S.; & AGGARWAL, B. B. “Therapeutic Roles of

- Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials." *AAPS J.*, 15 (1): 195, 2013.
102. COLINA-VEGAS, L.; LUNA-DULCEY, L.; PLUTÍN, A. M.; CASTELLANO, E. E.; COMINETTI, M. R.; & BATISTA, A. A. "Half Sandwich Ru(II)-Acylthiourea Complexes: DNA/HSA-Binding, Anti-Migration and Cell Death in a Human Breast Tumor Cell Line." *Dalt. Trans.*, 46 (38): 12865, 2017.
103. MEHLEN, P.; & PUISIEUX, A. "Metastasis: A Question of Life or Death." *Nat. Rev. Cancer*, 6 (6): 449, 2006.
104. BERGERS, G.; & FENDT, S. M. "The Metabolism of Cancer Cells during Metastasis." *Nat. Rev. Cancer*, 21 (3): 162, 2021.
105. PITRODA, S. P.; & WEICHSELBAUM, R. R. "Integrated Molecular and Clinical Staging Defines the Spectrum of Metastatic Cancer." *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 16 (9): 581, 2019.
106. JONKMAN, J. E. N.; CATHCART, J. A.; XU, F.; BARTOLINI, M. E.; AMON, J. E.; STEVENS, K. M.; & COLARUSSO, P. "An Introduction to the Wound Healing Assay Using Live-Cell Microscopy." *Cell Adhes. Migr.*, 8 (5): 440, 2014.
107. *In Vitro Wound Healing Assays - State of the Art*. 2016. Vol. 17.
108. FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; & VAN BREE, C. "Clonogenic Assay of Cells in Vitro." *Nat. Protoc.*, 1 (5): 2315, 2006.
109. MALUMBRES, M.; & BARBACID, M. "Cell Cycle, CDKs and Cancer: A Changing Paradigm." *Nat. Rev. Cancer*, 9 (3): 153, 2009.
110. KHODJAKOV, A.; & RIEDER, C. L. "The Nature of Cell-Cycle Checkpoints: Facts and Fallacies." *J. Biol.*, 8 (10)2009.
111. OTTO, T.; & SICINSKI, P. "Cell Cycle Proteins as Promising Targets in Cancer Therapy." *17 (2): 93*, 2017.
112. CARNEIRO, B. A.; & EL-DEIRY, W. S. "Targeting Apoptosis in Cancer Therapy." *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 17 (7): 395, 2020.
113. RIBEIRO, G. H.; BATISTA, A. A.; GUEDES, A. P. M.; DE OLIVEIRA, T. D.; DE CORREIA, C. R. S. T. B.; COLINA-VEGAS, L.; LIMA, M. A.; NÓBREGA, J. A.; COMINETTI, M. R.; ROCHA, F. V.; FERREIRA, A. G.; CASTELLANO, E. E.; & TEIXEIRA, F. R. "Ruthenium(II) Phosphine/Mercapto Complexes: Their in Vitro Cytotoxicity Evaluation and Actions as Inhibitors of Topoisomerase and Proteasome Acting as Possible Triggers of Cell Death Induction." *Inorg. Chem.*, 59 (20): 15004, 2020.
114. KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; & ASTER, J. C. *Robbins & Cotran: Patologia. Bases*

- Patológicas Das Doenças., 9ª Edição ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2016.
115. D'ARCY, M. S. "Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy." *Cell Biol. Int.*, 43 (6): 582, 2019.
116. ZAKHAROV, I. I.; SAVITSKAYA, M. A.; & ONISHCHENKO, G. E. "The Problem of Apoptotic Processes Reversibility." *Biochem.*, 85 (10): 1145, 2020.
117. VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; & REUTELINGSPERGER, C. "A Novel Assay for Apoptosis. Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on Early Apoptotic Cells Using Fluorescein Labelled Annexin V." *J. Immunol. Methods*, 184 (7): 39, 1995.
118. ZEMBRUSKI, N. C. L.; STACHE, V.; HAEFELI, W. E.; & WEISS, J. "7-Aminoactinomycin D for Apoptosis Staining in Flow Cytometry." *Anal. Biochem.*, 429 (1): 79, 2012.
119. KOWOL, C. R.; HEFFETER, P.; MIKLOS, W.; GILLE, L.; TRONDL, R.; CAPPELLACCI, L.; BERGER, W.; & KEPPLER, B. K. "Mechanisms Underlying Reductant-Induced Reactive Oxygen Species Formation by Anticancer Copper(II) Compounds." *J. Biol. Inorg. Chem.*, 17 (3): 409, 2012.
120. YU, D.; ZHA, Y.; ZHONG, Z.; RUAN, Y.; LI, Z.; SUN, L.; & HOU, S. "Improved Detection of Reactive Oxygen Species by DCFH-DA: New Insight into Self-Amplification of Fluorescence Signal by Light Irradiation." *Sensors Actuators, B Chem.*, 339 (March): 129878, 2021.
121. WU, P. L. and X. "Review: Modifications of Human Serum Albumin and Their Binding Effect." *Nature*. 2018, p. 539–547.
122. GHUMAN, J.; ZUNSZAIN, P. A.; PETITPAS, I.; BHATTACHARYA, A. A.; OTAGIRI, M.; & CURRY, S. "Structural Basis of the Drug-Binding Specificity of Human Serum Albumin." *J. Mol. Biol.*, 353 (1): 38, 2005.
123. RILAK SIMOVIĆ, A.; MASNIKOSA, R.; BRATSOS, I.; & ALESSIO, E. "Chemistry and Reactivity of Ruthenium(II) Complexes: DNA/Protein Binding Mode and Anticancer Activity Are Related to the Complex Structure." *Coord. Chem. Rev.*, 398: 1, 2019.
124. HELMS, M. K.; PETERSEN, C. E.; BHAGAVAN, N. V.; & JAMESON, D. M. "Time-Resolved Fluorescence Studies on Site-Directed Mutants of Human Serum Albumin." *FEBS Letters*. 1997, p. 67–70.
125. KELLAND, L. "The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy." *Nat. Rev. Cancer*, 7 (8): 573, 2007.

126. SUMMA, N.; SCHIESSL, W.; PUCHTA, R.; VAN EIKEMA HOMMES, N.; & VAN ELDIK, R. "Thermodynamic and Kinetic Studies on Reactions of Pt(II) Complexes with Biologically Relevant Nucleophiles." *Inorg. Chem.*, 45 (7): 2948, 2006.
127. BARRA, C. V.; & NETTO, A. V. G. "Antitumour Complexes and DNA Interactions and Their Tools of Analysis: An Approach to Metalintercalators." *Rev. Virtual Quim.*, 7 (6): 1998, 2015.
128. HERIBERT HOHMANN, BJORN HELLQUIST, and R. van E. "Kinetic Study of the Interaction of Aquated Palladium(II) Complexes with Purine 5'-Nucleoside Monophosphates and Ribose 5'-Monophosphate in Aqueous Solution. Effects of Steric Hindrance and Phosphate-Induced Reactivity." *Inorg. Chem.*, 31: 1090, 1992.
129. ZHU, S.; MATILLA, A.; TERCERO, J. M.; VIJAYARAGAVAN, V.; & WALMSLEY, J. A. "Binding of Palladium(II) Complexes to Guanine, Guanosine or Guanosine 5' -Monophosphate in Aqueous Solution: Potentiometric and NMR Studies." *Inorganica Chim. Acta*, 357 (2): 411, 2004.
130. WEI, Y.; & GUO, L. H. "Binding Interaction between Polycyclic Aromatic Compounds and DNA by Fluorescence Displacement Method." *Environ. Toxicol. Chem.*, 28 (5): 940, 2009.
131. BIVER, T.; GARCÍA, B.; LEAL, J. M.; SECCO, F.; & TURRIANI, E. "Left-Handed DNA: Intercalation of the Cyanine Thiazole Orange and Structural Changes. A Kinetic and Thermodynamic Approach." *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12 (40): 13309, 2010.
132. VILLARREAL, W.; COLINA-VEGAS, L.; RODRIGUES DE OLIVEIRA, C.; TENORIO, J. C.; ELLENA, J.; GOZZO, F. C.; COMINETTI, M. R.; FERREIRA, A. G.; FERREIRA, M. A. B.; NAVARRO, M.; & BATISTA, A. A. "Chiral Platinum(II) Complexes Featuring Phosphine and Chloroquine Ligands as Cytotoxic and Monofunctional DNA-Binding Agents." *Inorg. Chem.*, 54 (24): 11709, 2015.
133. CUNHA, B. N.; LUNA-DULCEY, L.; PLUTIN, A. M.; SILVEIRA, R. G.; HONORATO, J.; CAIRO, R. R.; DE OLIVEIRA, T. D.; COMINETTI, M. R.; CASTELLANO, E. E.; & BATISTA, A. A. "Selective Coordination Mode of Acylthiourea Ligands in Half-Sandwich Ru(II) Complexes and Their Cytotoxic Evaluation." *Inorg. Chem.*, 59 (7): 5072, 2020.

134. BUCEVIČIUS, J.; LUKINAVIČIUS, G.; & GERASIMAITE, R. "The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and Beyond." *Chemosensors*, 6 (2)2018.
135. IDRIS, K. A.; SEDAIRA, H.; HASHEM, E. Y.; SALEH, M. S.; & SOLIMAN, S. A. "The Visible Absorbance Maximum of 2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinone as a Novel Probe for the Hydrogen Bond Donor Abilities of Solvents and Solvent Mixtures." *Monatshefte fur Chemie*, 127 (1): 29, 1996.
136. IBIS, C.; SAHINLER AYLA, S.; & BABAYEVA, E. "Reactions of Quinones with Some Amino Alcohols, Thiols and a UV-Vis Study." *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.*, 195 (6): 474, 2020.
137. KOSIHA, A.; PARTHIBAN, C.; & ELANGO, K. P. "Metal(II) Complexes of Bioactive Aminonaphthoquinone-Based Ligand: Synthesis, Characterization and BSA Binding, DNA Binding/Cleavage, and Cytotoxicity Studies." *J. Coord. Chem.*, 71 (10): 1560, 2018.
138. OLIVEIRA, K. M. de. "Avaliação Das Propriedades Antitumorais de Complexos de Rutênio(II) Contendo Os Ligantes Lapachol Ou Lausona." : 1, 2018.
139. GUEDES, A. P. M.; MELLO-ANDRADE, F.; PIRES, W. C.; DE SOUSA, M. A. M.; DA SILVA, P. F. F.; DE CAMARGO, M. S.; GEMEINER, H.; AMAURI, M. A.; GOMES CARDOSO, C.; DE MELO REIS, P. R.; SILVEIRA-LACERDA, E. D. P.; & BATISTA, A. A. "Heterobimetallic Ru(II)/Fe(II) Complexes as Potent Anticancer Agents against Breast Cancer Cells, Inducing Apoptosis through Multiple Targets." *Metallomics*, 12 (4): 547, 2020.
140. CARBALHO, A. T.; RIBEIRO, G. A.; NOGUEIRA, R. F.; DOS SANTOS, Á. L. B. *Citometria de Fluxo*; Rio de Janeiro, 2010.
141. SINGH, I.; OGATA, R. T.; MOORE, R. E.; CHANG, C. W. J.; & SCHEUER, P. J. "Electronic Spectra of Substituted Naphthoquinones." *Tetrahedron*, 24 (18): 6053, 1968.
142. ABBRO, L.; & DINI, L. "Common Morphological Features of Apoptotic Cell Blebs." *Ital. J. Zool.*, 70 (4): 297, 2003.
143. SYED ABDUL RAHMAN, S. N.; ABDUL WAHAB, N.; & ABD MALEK, S. N. "In Vitro Morphological Assessment of Apoptosis Induced by Antiproliferative Constituents from the Rhizomes of Curcuma Zedoaria." *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, 20132013.
144. RICHTER, V.; VOIT, F.; KIENLE, A.; & SCHNECKENBURGER, H. "Light Scattering Microscopy with Angular Resolution and Its Possible Application to

- Apoptosis." *J. Microsc.*, 257 (1): 1, 2015.
145. GRAWE, G. F.; OLIVEIRA, K. M.; LEITE, C. M.; DE OLIVEIRA, T. D.; HONORATO, J.; FERREIRA, A. G.; CASTELLANO, E.; COMINETTI, M. R.; CORREA, R. S.; & BATISTA, A. A. "Ruthenium(II)-Diphosphine Complexes Containing Acylthiourea Ligands Are Effective Against Lung and Breast Cancer." *Dalt. Trans.*, 12022.
146. SILVA, D. E. S.; BECCENERI, A. B.; SOLCIA, M. C.; SANTIAGO, J. V. B.; MOREIRA, M. B.; GOMES NETO, J. A.; PAVAN, F. R.; COMINETTI, M. R.; PEREIRA, J. C. M.; & NETTO, A. V. G. "Cytotoxic and Apoptotic Effects of Ternary Silver(I) Complexes Bearing 2-Formylpyridine Thiosemicarbazones and 1,10-Phenanthroline." *Dalt. Trans.*, 49 (16): 5264, 2020.
147. HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD, V. U.; MIANA, G. A.; & GREEN, I. R. "Lapachol: An Overview." *Arkivoc*, 2007 (2): 145, 2007.
148. GOMES, C. L.; DE ALBUQUERQUE WANDERLEY SALES, V.; GOMES DE MELO, C.; FERREIRA DA SILVA, R. M.; VICENTE NISHIMURA, R. H.; ROLIM, L. A.; & ROLIM NETO, P. J. "Beta-Lapachone: Natural Occurrence, Physicochemical Properties, Biological Activities, Toxicity and Synthesis." *Phytochemistry*, 186 (112713): 7, 2021.

APÊNDICE

MATERIAL SUPLEMENTAR

Preparo das soluções para os estudos de interação com biomoléculas DNA

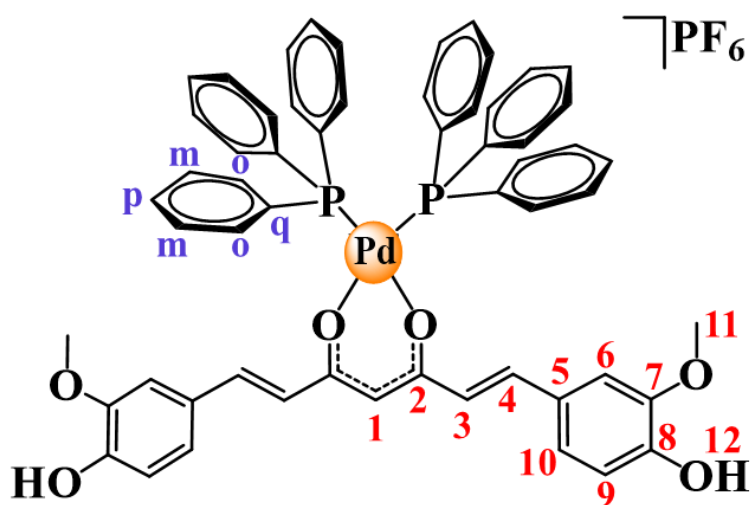
TABELA A. 1. Preparo das soluções de CT-DNA e complexos da Série A (10%) e Séries B e C (20%) para o aferimento da viscosidade do DNA. Volumes necessários das soluções estoque dos compostos da série A, solução estoque de DNA, tampão e DMSO.

Ri*	Concentração** (μM)		Volumes de solução estoque (μL)***			
	[DNA]	[C]	Composto ^a	DMSO	Trisma-HCl	DNA ^{b,c}
-	0	0	0	400/ 800	3600/ 3200	0
-	100	0	0	0	3930	70
-	100	0	0	400/ 800	3530/ 3130	70
0,05	100	5	10	390/ 790	3530/ 3130	70
0,10	100	10	20	380/ 780	3530/ 3130	70
0,15	100	15	30	370/ 770	3530/ 3130	70
0,20	100	20	40	360/ 760	3530/ 3130	70
0,25	100	25	50	350/ 750	3530/ 3130	70
0,30	100	30	60	340/ 740	3530/ 3130	70

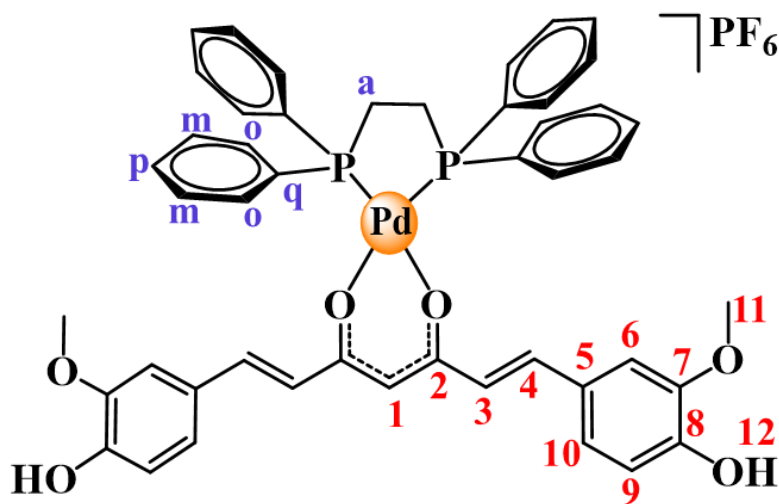
*Ri é igual a razão [Complexo]/[DNA]; **Concentrações das espécies nas soluções de aferimento da viscosidade DNA; *** ^aConcentração da solução estoque dos complexos em DMSO à 2,0 mM; ^bConcentração da solução estoque de DNA em Tampão Trisma-HCl à 5,72 mM; ^cA concentração da solução estoque DNA foi verificada antes do preparo das soluções. Solvente DMSO; Solução tampão de Trisma-HCl.

Parte I – Dados Série A

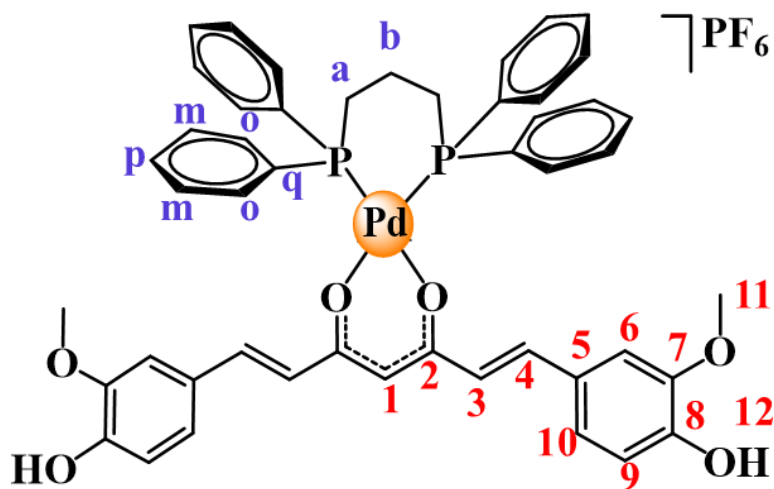
A1 - $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2(\text{cur})]\text{PF}_6$: sólido alaranjado, rendimento 71%. Anal. (Calc.) para $\text{C}_{57}\text{H}_{49}\text{F}_6\text{O}_6\text{P}_3\text{Pd}$, C, 59,75 (59,88); H, 4,53 (4,32) %. Condutividade Molar ($\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$, DMSO): 26.6. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 1622 ($\nu\text{C}=\text{O}$), 1504 ($\nu\text{C}=\text{C}$), 1282 ($\nu\text{C}-\text{O}$), 842 ($\nu\text{P}-\text{F}$). qTOF-MS m/z , calc. para $\text{C}_{57}\text{H}_{49}\text{O}_6\text{P}_2\text{Pd} [\text{M}]^+$: 997,2039; Encontrado: 997,2049. RMN ^1H (400 MHz, acetona- d_6 , 298K): δ (ppm) (multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição): 8,17 (s; 2H; OH); 7,69 (dd; 12H; $J = 11,3$ e $7,8$ Hz; $\text{Ph}_{\text{orto}} \text{PPh}_3$); 7,61 (t; 6H; $J = 7,4$ Hz; $\text{Ph}_{\text{para}} \text{PPh}_3$); 7,45 (t; 12H; $J = 7,2$ Hz; $\text{Ph}_{\text{meta}} \text{PPh}_3$); 6,89 (s; 2H; Ph cur $_{(\text{L}6)}$); 6,78-6,72 (m; 4H; Ph cur $_{(\text{L}9, \text{L}10)}$); 6,59 (d; 2H; $J = 15,5$ Hz; cur $_{(\text{L}3)}$); 5,98 (d; 2H; $J = 15,5$ Hz; cur $_{(\text{L}4)}$); 5,90 (s; 1H; cur $_{(\text{L}1)}$); 3,87 (s; 6H; cur $_{(\text{L}11)}$). RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (100 MHz, acetona- d_6 , 298K): δ (ppm): 178,35 (C2 cur); 149,81 (C8 cur); 148,57 (C7 cur); 141,46 (C4 cur); 135,48 (C $_{\text{orto}}$ PPh $_3$); 133,03 (C $_{\text{para}}$ PPh $_3$); 129,94 (C $_{\text{meta}}$ PPh $_3$); 128,14 (C5 cur); 127,97 (C $_{\text{quaternário}}$ PPh $_3$); 124,24 (C3 cur); 123,69 (C10 cur); 116,08 (C9 cur); 111,06 (C6 cur); 104,96 (C1 cur); 56,27 (C11 cur). RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2(\text{D}_2\text{O})$): 35,4 ppm (s).



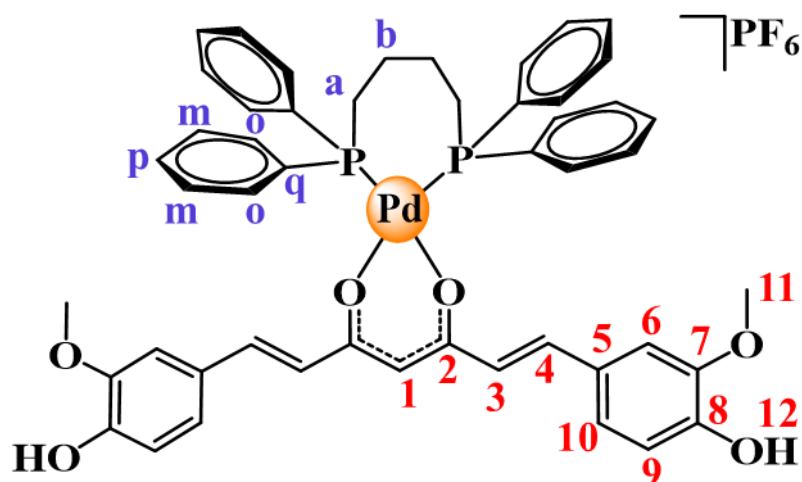
A2 - [Pd(cur)(dppe)]PF₆: sólido esverdeado, rendimento 80%. Anal. (Calc.) para C₅₄₇H₄₃F₆O₆P₃Pd, C, 55,52 (55,50); H, 4,28 (4,26) %. Condutividade Molar (S cm² mol⁻¹, DMSO): 25,3. IR (KBr, ν /cm⁻¹): 1624 (ν C=O), 1508 (ν C=C), 1280 (ν C-O), 844 (ν P-F). qTOF-MS m/z , calc. para C₄₇H₄₃O₆P₂Pd [M]⁺: 871,1570; encontrada: 871,1575. RMN ¹H (400 MHz, acetona-d₆, 298K): δ (ppm) (multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição): 8,05 (dd; 8H; J = 11,9 e 7,6 Hz; Ph_{orto} dppe); 7,80-7,72 (m; 4H; J = 7,4 Hz; Ph_{para} dppe); 7,68 (t; 8H; J = 7,1 Hz; Ph_{meta} dppe); 7,09 (s; 2H; Ph cur(L₆)); 6,94 (d; 2H; J = 15,5 Hz; Ph cur(L₄)); 6,91 (d; 2H; J = 8,5 Hz; cur(L₁₀)); 6,82 (d; 2H; J = 8,2 Hz; cur(L₉)); 6,78 (d; 2H; J = 15,5 Hz; cur(L₃)); 5,90 (s; 1H; cur(L₁₁)); 3,89 (s; 6H; cur(L₁₁)); 3,22 (d; 4H; J = 21,5 Hz; CH₂ dppe). RMN ¹³C{¹H} (100 MHz, acetona-d₆, 298K): δ (ppm): 179,27 (C₂ cur); 149,94 (C₈ cur); 148,74 (C₇ cur); 141,45 (C₄ cur); 134,32 (C_{orto} dppe); 133,86 (C_{para} dppe); 130,54 (C_{meta} dppe); 128,22 (C₅ cur); 127,47 (C_{quaternário} dppe); 124,91 (C₃ cur); 123,83 (C₁₀ cur); 116,20 (C₉ cur); 111,00 (C₆ cur); 104,79 (C₁ cur); 56,27 (C₁₁ cur); 27,06 (CH₂ dppe). RMN ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): 60,9 ppm (s).



A3 - [Pd(cur)(dppp)]PF₆: sólido alaranjado, rendimento 79%. Anal. (Calc.) para C₄₈H₄₅F₆O₆P₃Pd, C, 55,94 (55,91); H, 4,62 (4,40) %. Condutividade Molar (S cm² mol⁻¹, DMSO): 25,2. IR (KBr, ν /cm⁻¹): 1616 (ν C=O), 1504 (ν C=C), 1290 (ν C-O), 844 (ν P-F). qTOF-MS m/z , calcd. para C₄₃H₄₃O₆P₂Pd [M]⁺: 885,1726, encontrado: 885,1719. RMN ¹H (400 MHz, acetona-d₆, 298K): δ (ppm) (multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição): 8,15 (s; 2H; OH); 7,85 (m; 8H; Ph_{orto} dppp); 7,65 (d; 4H; J = 6,9 Hz; Ph_{para} dppp); 7,58 (t; 8H; J = 6,8 Hz; Ph_{meta} dppp); 6,91 (s; 2H; Ph cur(L₆)); 6,81 (q; 4H; J = 8,0 Hz; Ph cur(L₉,L₁₀)); 6,61 (d; 2H; J = 15,4 Hz; cur(L₃)); 6,04 (d; 2H; J = 15,5 Hz; cur(L₄)); 5,78 (s; 1H; cur(L₁)); 3,91 (s; 6H; cur(L₁₁)); 3,01 (m; 4H; CH₂ dppp); 2,35 (t; 2H; J = 22,7 Hz; CH₂ dppp). RMN ¹³C{¹H} (100 MHz, acetona-d₆, 298K): δ (ppm): 178,81 (C₂ cur); 149,63 (C₈ cur); 148,53 (C₇ cur); 140,94 (C₄ cur); 134,52 (C_{orto} PPh₃); 133,09 (C_{para} dppp); 130,12 (C_{meta} dppp); 128,26 (C₅ cur); 127,04 (C_{quaternário} dppp); 124,62 (C₃ cur); 123,34 (C₁₀ cur); 116,10 (C₉ cur); 111,26 (C₆ cur); 105,53 (C₁ cur); 56,26 (C₁₁ cur); 24,35 (P-CH₂ dppp); 19,86 (CH₂ dppp). RMN ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): 15,6 ppm (s).



A4 - [Pd(cur)(dppb)]PF₆: sólido alaranjado, rendimento 76%. Anal. (Calc.) para C₄₉H₄₅F₆O₆P₃Pd, C, 55,94 (55,91); H, 4,62 (4,40) %. Condutividade Molar (S cm² mol⁻¹, DMSO): 26,8. IR (KBr, ν /cm⁻¹): 1622 (ν C=O), 1506 (ν C=C), 1292 (ν C-O), 840 (ν P-F). qTOF-MS m/z , calcd. For C₄₈H₄₅O₆P₂Pd [M]⁺: 899,188; encontrado: 899,318. RMN ¹H (400 MHz, acetona-d₆, 298K): δ (ppm) (multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição): 8,15 (s; 2H; OH); 7,84-7,80 (m; 8H; Ph_{orto} dppb); 7,76-7,67 (m; 4H; Ph_{para} dppb); 7,59 (t; 8H; $J = 7,4$ Hz; Ph_{meta} dppb); 6,90 (s; 2H; Ph cur(L₆)); 6,77 (d; 4H; $J = 8,9$ Hz; Ph cur(L₉,L₁₀)); 6,61 (d; 2H; $J = 15,5$ Hz; cur(L₃)); 6,08 (d; 2H; $J = 15,5$ Hz; cur(L₄)); 5,79 (s; 1H; cur(L₁)); 3,88 (s; 6H; cur(L₁₁)); 2,83 (m; 4H; CH₂ dppb); 2,39-2,17 (m; 4H; P-CH₂ dppb). RMN ¹³C{¹H} (100 MHz, acetona-d₆, 298K): δ (ppm): 178,64 (C₂ cur); 149,81 (C₈ cur); 148,63 (C₇ cur); 141,32 (C₄ cur); 134,58 (C_{orto} dppb); 133,20 (C_{para} dppb); 130,16 (C_{meta} dppb); 129,09 (C_{quaternário} dppb); 128,24 (C₅ cur); 124,58 (C₃ cur); 123,54 (C₁₀ cur); 116,17 (C₉ cur); 111,25 (C₆ cur); 105,15 (C₁ cur); 56,33 (C₁₁ cur); 26,61 (P-CH₂ dppb); 24,09 (CH₂ dppb). RMN ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): 32,2 ppm (s).



A5 - [Pd(cur)(dppf)]PF₆: sólido vinho, rendimento 75%. Anal. (Calc.) para C₅₅H₄₇F₆FeO₆P₃Pd, C, 56,25 (56,31); H, 4,32 (4,04) %. Condutividade Molar (S cm² mol⁻¹, DMSO): 21,6. IR (KBr, ν/cm⁻¹): 1620 (νC=O), 1508 (νC=C), 1288 (νC-O), 844 (νP-F). qTOF-MS *m/z*, calcd. para C₅₅H₄₇FeO₆P₂Pd [M]⁺: 1027,1232; encontrado: 1027,1230. RMN ¹H (400 MHz, acetona-d₆, 298K): δ (ppm) (multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição): 8,61 e 8,18 (s; 2H; OH); 7,97 (dt; 8H; *J* = 11,5 e 7,8 Hz; Ph_{orto} dppf); 7,75 (t; 4H; *J* = 7,3 Hz; Ph_{para} dppf); 7,61 (t; 8H; *J* = 7,1 Hz; Ph_{meta} dppf); 6,92 (s; 2H; Ph cur(L₆)); 6,78 (d; 4H; Ph cur(L₉,L₁₀)); 6,56 (d; 2H; *J* = 15,5 Hz; cur(L₃)); 5,97 (d; 2H; *J* = 15,5 Hz; cur(L₄)); 5,88 (s; 1H; cur(L₁)); 4,77 (s; 4H; Cf ferroceno); 4,64 (s; 4H; Cg ferroceno); 3,94 e 3,88 (s; 6H; cur(L₁₁)). RMN ¹³C{¹H} (100 MHz, acetona-d₆, 298K): δ (ppm): 180,56 e 178,36 (C₂ cur); 151,84 e 149,77 (C₈ cur); 148,56 e 147,59 (C₇ cur); 141,25 (C₄ cur); 135,35 (C_{orto} dppf); 133,34 (C_{para} dppf); 130,47 (C_{quaternário} dppf); 130,02 (C_{meta} dppf); 129,18 e 127,62 (C₅ cur); 125,80 e 124,41 (C₃ cur); 123,65 (C₁₀ cur); 116,53 e 116,08 (C₉ cur); 112,49 e 111,07 (C₆ cur); 104,90 e 101,97 (C₁ cur); 78,48 (Cf ferroceno); 76,19 (Cg ferroceno); 71,11 (C_{quaternário} ferroceno); 56,37 e 56,27 (C₁₁ cur). RMN ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): 40,0 ppm (s).

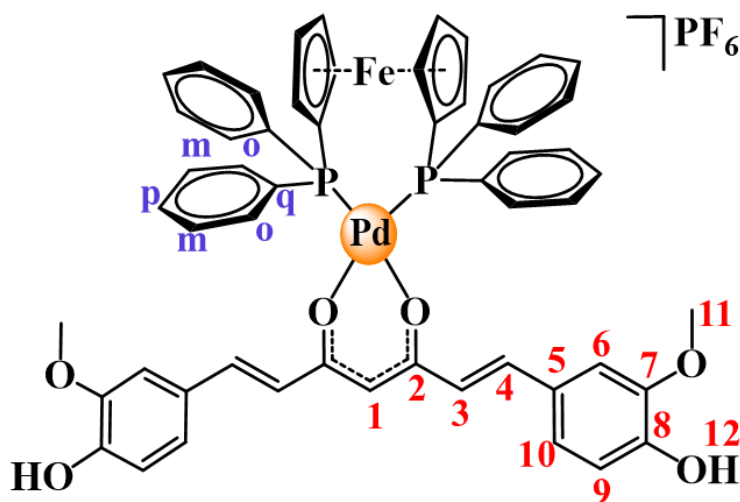


TABELA A. 2. Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento das estruturas obtidas para os complexos **A1** - [Pd(PPh₃)₂(cur)]PF₆, **A2** - [Pd(cur)(dppe)]PF₆, **A4** - [Pd(cur)(dppb)]PF₆ e **A5** - [Pd(cur)(dppf)]PF₆.

	A1	A2	A4	A5
Fórmula Empírica	C ₅₇ H ₄₉ F ₆ O ₆ P ₃ Pd	C ₄₇ H ₄₃ F ₆ O ₆ P ₃ Pd	C ₄₉ H ₄₇ F ₆ O ₆ P ₃ Pd	C ₅₈ H ₅₀ Cl ₉ F ₆ FeO ₆ P ₃ Pd
Massa molecular	1143,27	1017,12	1045,17	1531,19
Temperatura/K	100	100	293	100
Sistema Cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Triclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /c	P2 ₁ /n	P-1	P2 ₁ /n
a/Å	14,0442(3)	14,0940(2)	9,0366(6)	17,9737(3)
b/Å	9,5822(2)	22,4280(3)	16,4302(12)	15,9310(3)
c/Å	37,0985(7)	16,0300(3)	19,0475(13)	23,2031(5)
α/°	90	90	112,064(7)	90
β/°	94,609(2)	112,924(2)	96,129(6)	95,1174(18)
γ/°	90	90	101,480(6)	90
Volume/ Å ³	4976,36(18)	4666,90(14)	2516,7(3)	6617,5(2)
Z	4	4	2	4
ρ _{calc} g/ cm ³	1,526	1,448	1,379	1,537
μ/ mm ⁻¹	0,545	0,571	0,531	0,990
F(000)	2336	2072	1068	3080
Tamanho do Cristal/ mm ³	0,188 x 0,062 x 0,027	0,177 x 0,139 x 0,105	0,208 x 0,102 x 0,063	0,319 x 0,282 x 0,175
Radiação	Mo Kα (λ = 0.71073)	Mo Kα (λ = 0.71073)	Mo Kα (λ = 0.71073)	Mo Kα (λ = 0.71073)
Faixa 2θ da coleta de dados/°	3,506 a 51,496	3,742 a 51,5	5,06 a 51,496°	4,354 a 51,36
Intervalo de índices	-16 ≤ h ≤ 17, -11 ≤ k ≤ 11, -45 ≤ l ≤ 45	-17 ≤ h ≤ 17, -27 ≤ k ≤ 27, -19 ≤ l ≤ 19	-11 ≤ h ≤ 11, -20 ≤ k ≤ 20, -23 ≤ l ≤ 23	-21 ≤ h ≤ 21, -18 ≤ k ≤ 19, -28 ≤ l ≤ 28
Reflecções coletadas	76902	94656	47990	57867
Reflecções Independentes	9514 [R _{int} = 0,0650; R _{sigma} = 0,0336]	8938 [R _{int} = 0,0472; R _{sigma} = 0,0211]	9594 [R _{int} = 0,1055; R _{sigma} = 0,0941]	12522 [R _{int} = 0,0429; R _{sigma} = 0,0325]
Dados/restrições/ parâmetros	9514/0/662	8938/0/572	9594/151/590	12522/84/797
Melhor ajuste de F ²	1,081	1,058	1,004	1,105
Índices R finais [I>=2σ (I)]	R ₁ = 0,0339; wR ₂ = 0,0765	R ₁ = 0,0277; wR ₂ = 0,0685	R ₁ = 0,0800; wR ₂ = 0,2250	R ₁ = 0,0473; wR ₂ = 0,1074
Índices R finais [todos os dados]	R ₁ = 0,0395; wR ₂ = 0,0789	R ₁ = 0,0328; wR ₂ = 0,0722	R ₁ = 0,1093; wR ₂ = 0,2609	R ₁ = 0,0691; wR ₂ = 0,1247
Maior diferença Pico/ vale / e.Å ⁻³	0,74/-0,62	0,65/-0,48	2,06/-1,41	1,11/-1,11
Parâmetro Flack				

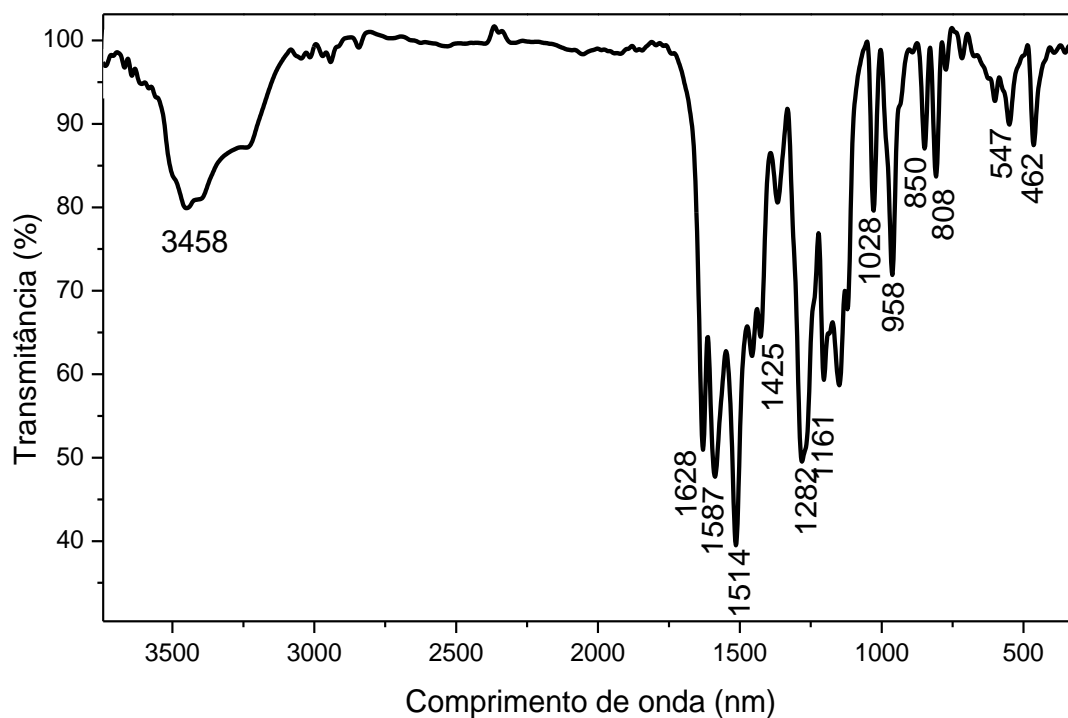


FIGURA A. 1. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm⁻¹) da curcumina em pastilha de KBr.

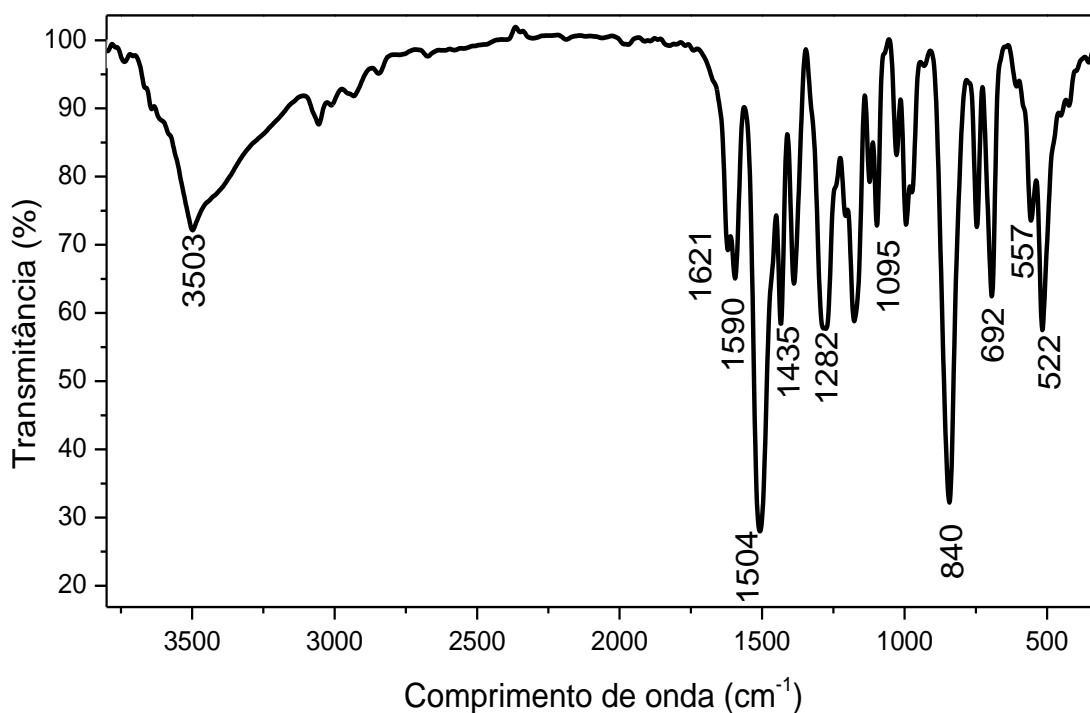


FIGURA A. 2. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm⁻¹) do **A1** - [Pd(PPh₃)₂(cur)]PF₆ em pastilha de KBr.

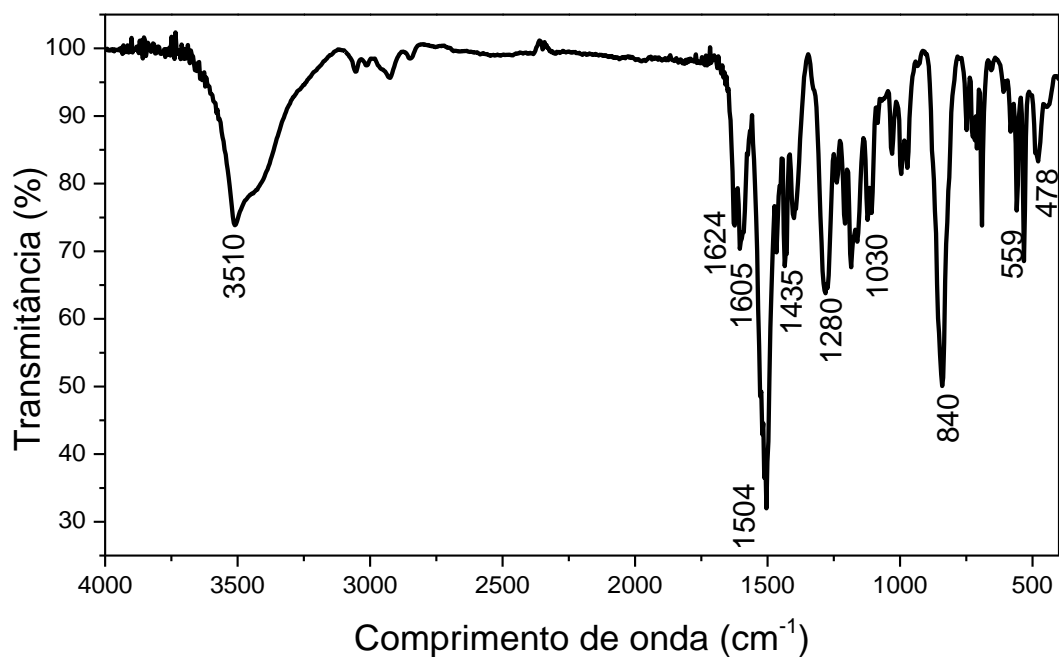


FIGURA A. 3. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm⁻¹) do **A2** - [Pd(cur)(dppe)]PF₆ em pastilha de KBr.

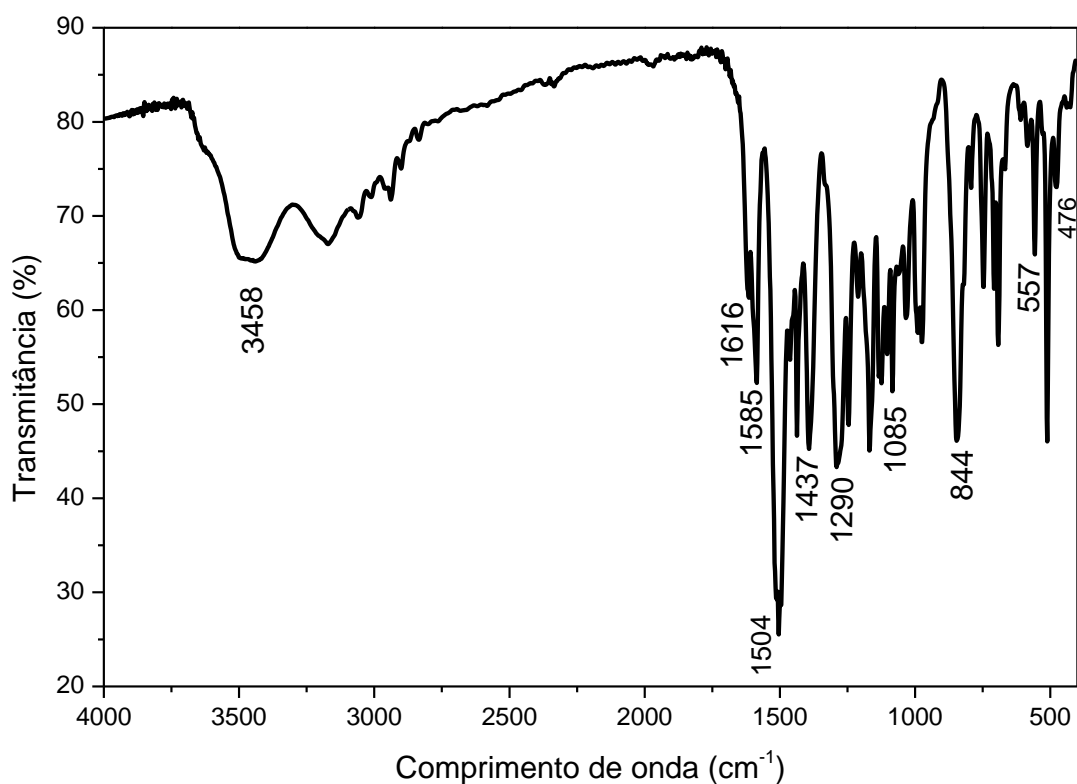


FIGURA A. 4. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm⁻¹) do **A3** - [Pd(cur)(dppp)]PF₆ em pastilha de KBr.

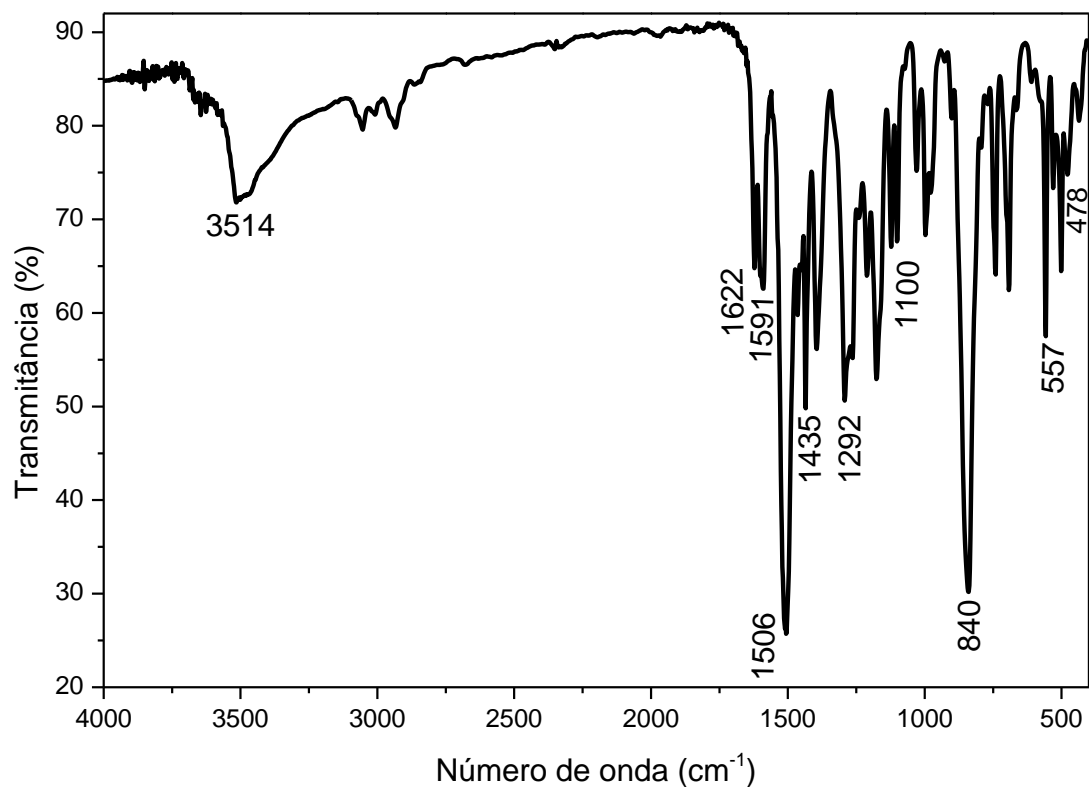


FIGURA A. 5. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm⁻¹) do **A4** - [Pd(cur)(dppb)]PF₆ em pastilha de KBr.

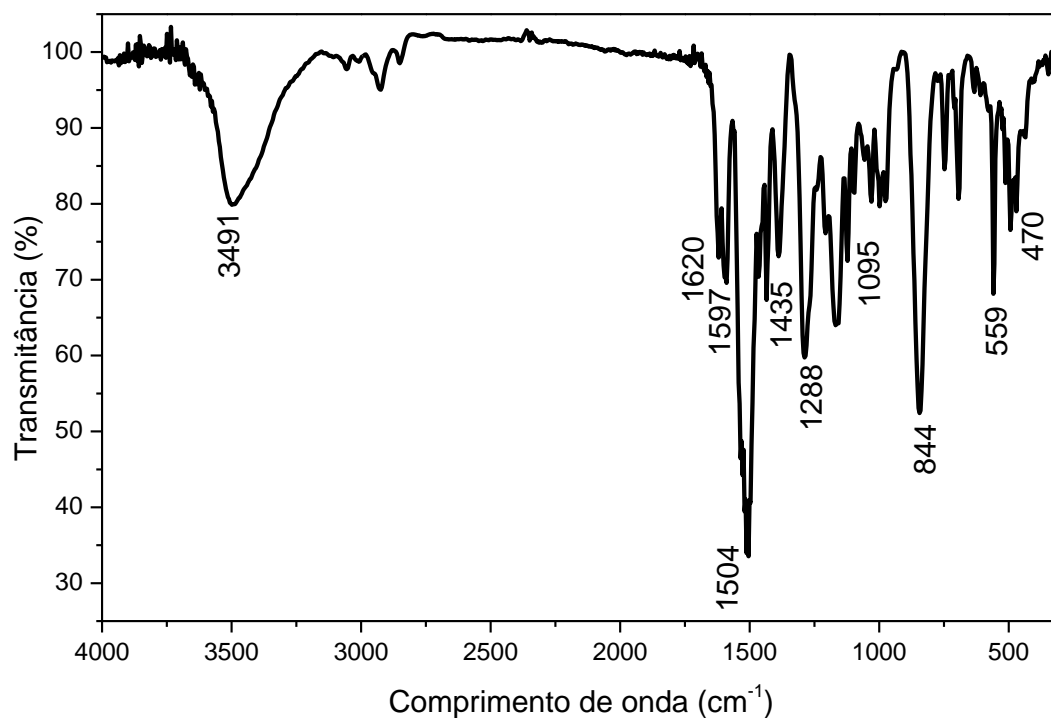
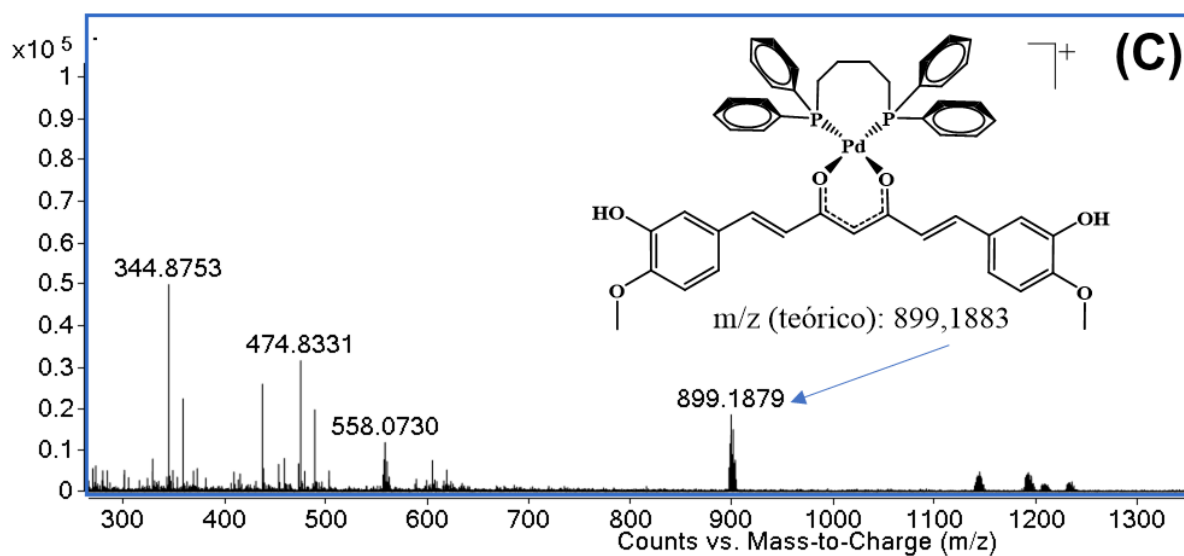
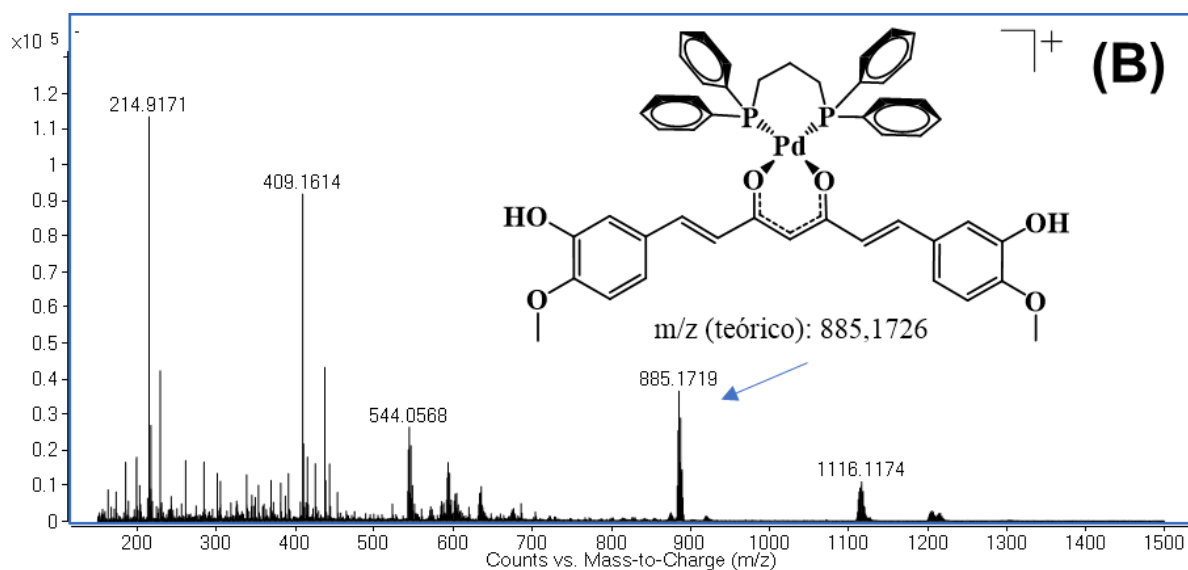
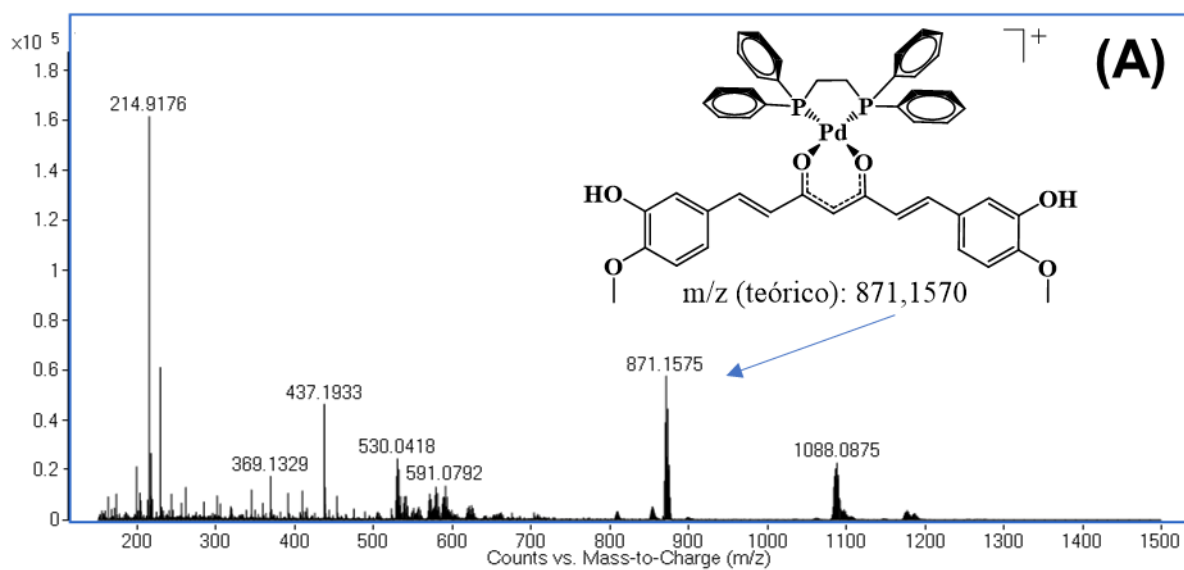


FIGURA A. 6. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm⁻¹) do **A5** - [Pd(cur)(dppf)]PF₆ em pastilha de KBr.



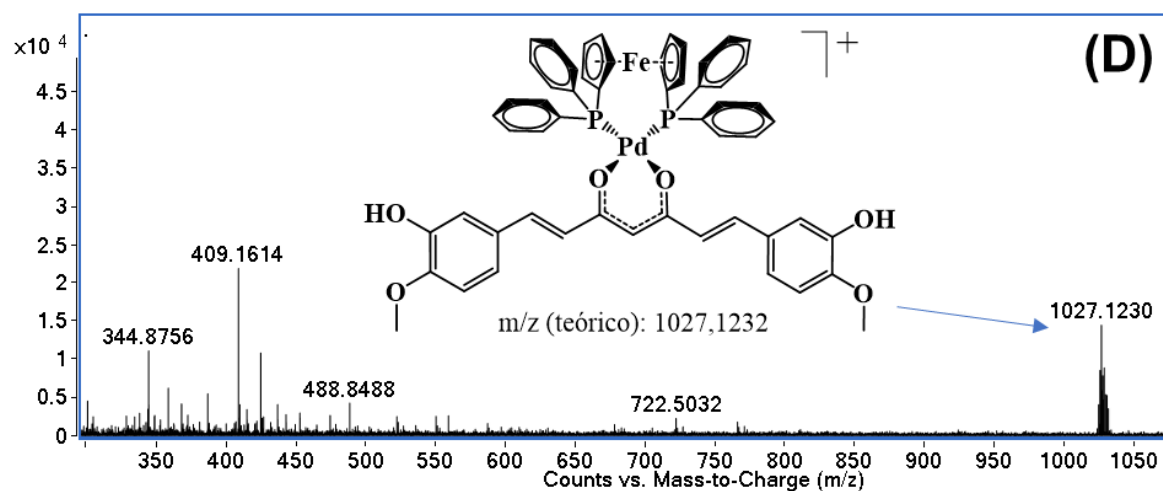


FIGURA A. 7. Espectros de massas dos complexos (A) A2; (B) A3; (C) A4 e (D) A5.

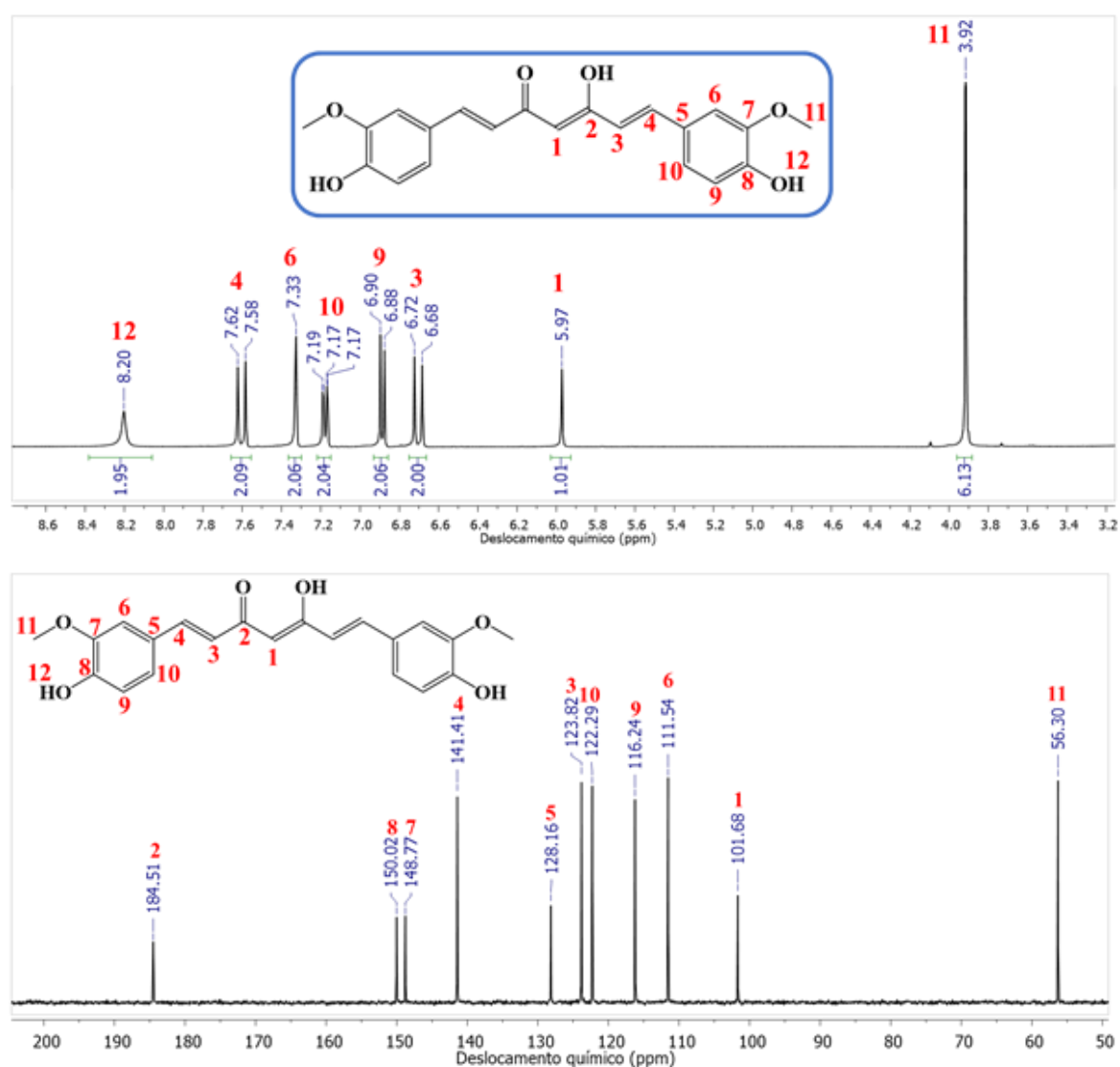
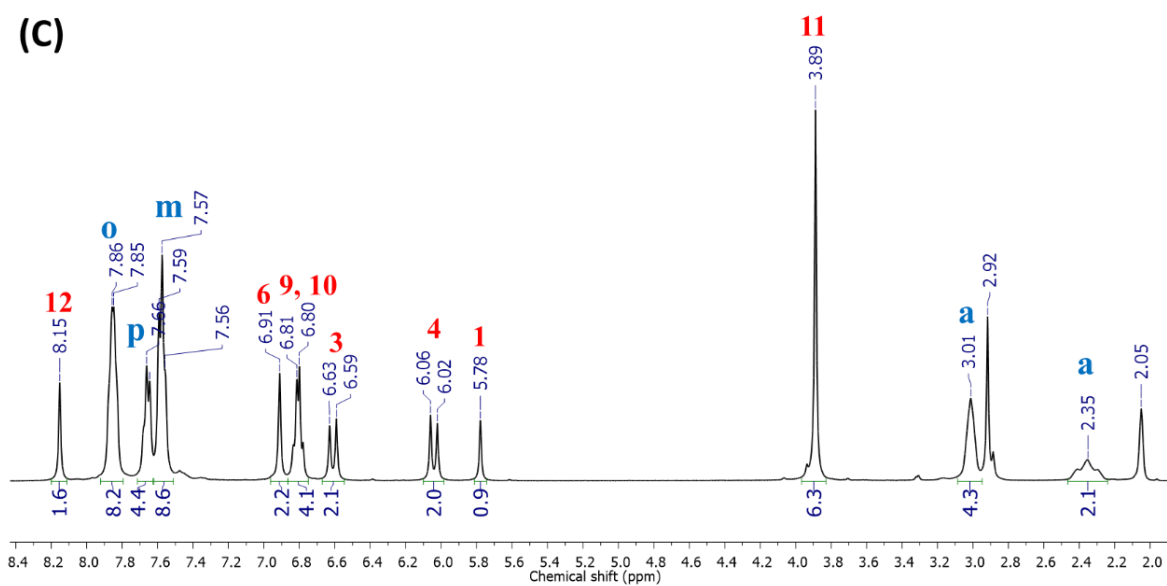
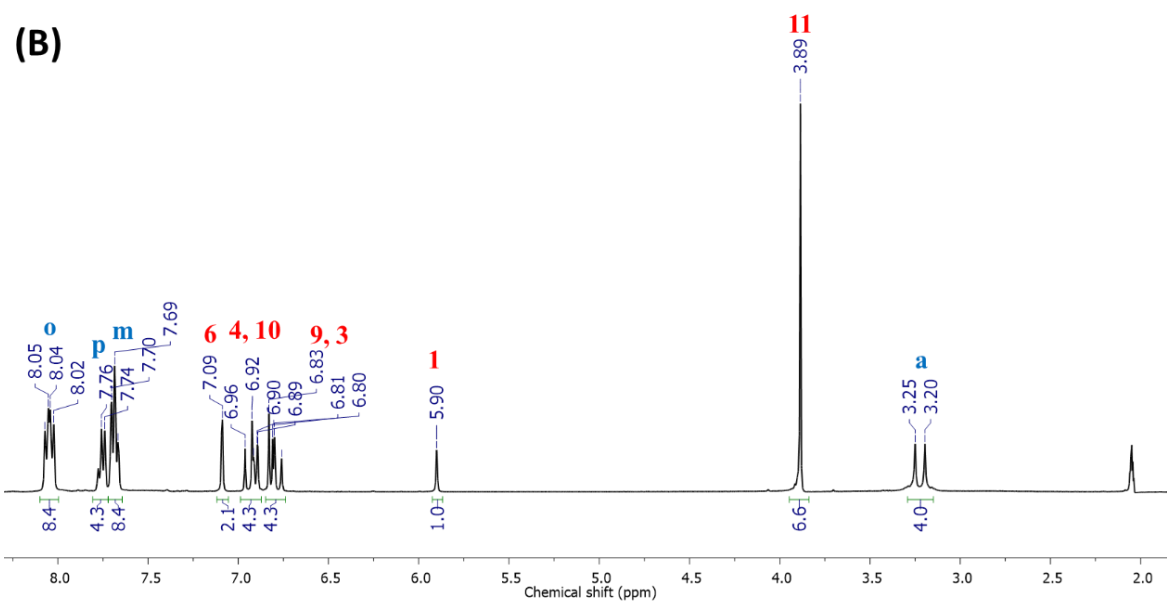
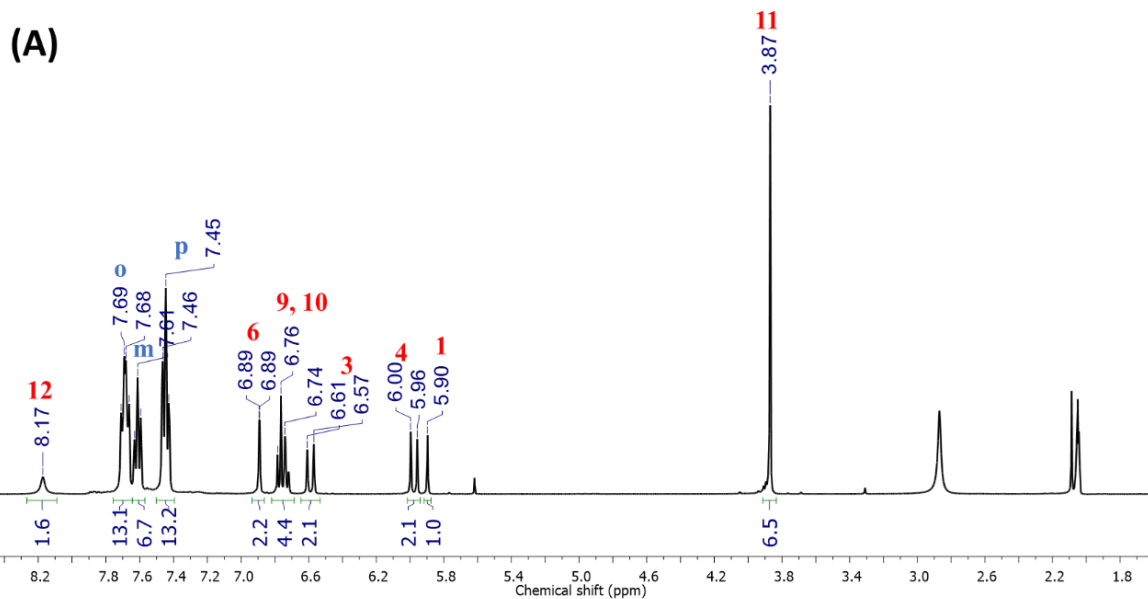


FIGURA A. 8. Espectro de (A) RMN ^1H e (B) RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ da curcumina, em acetona deuterada.



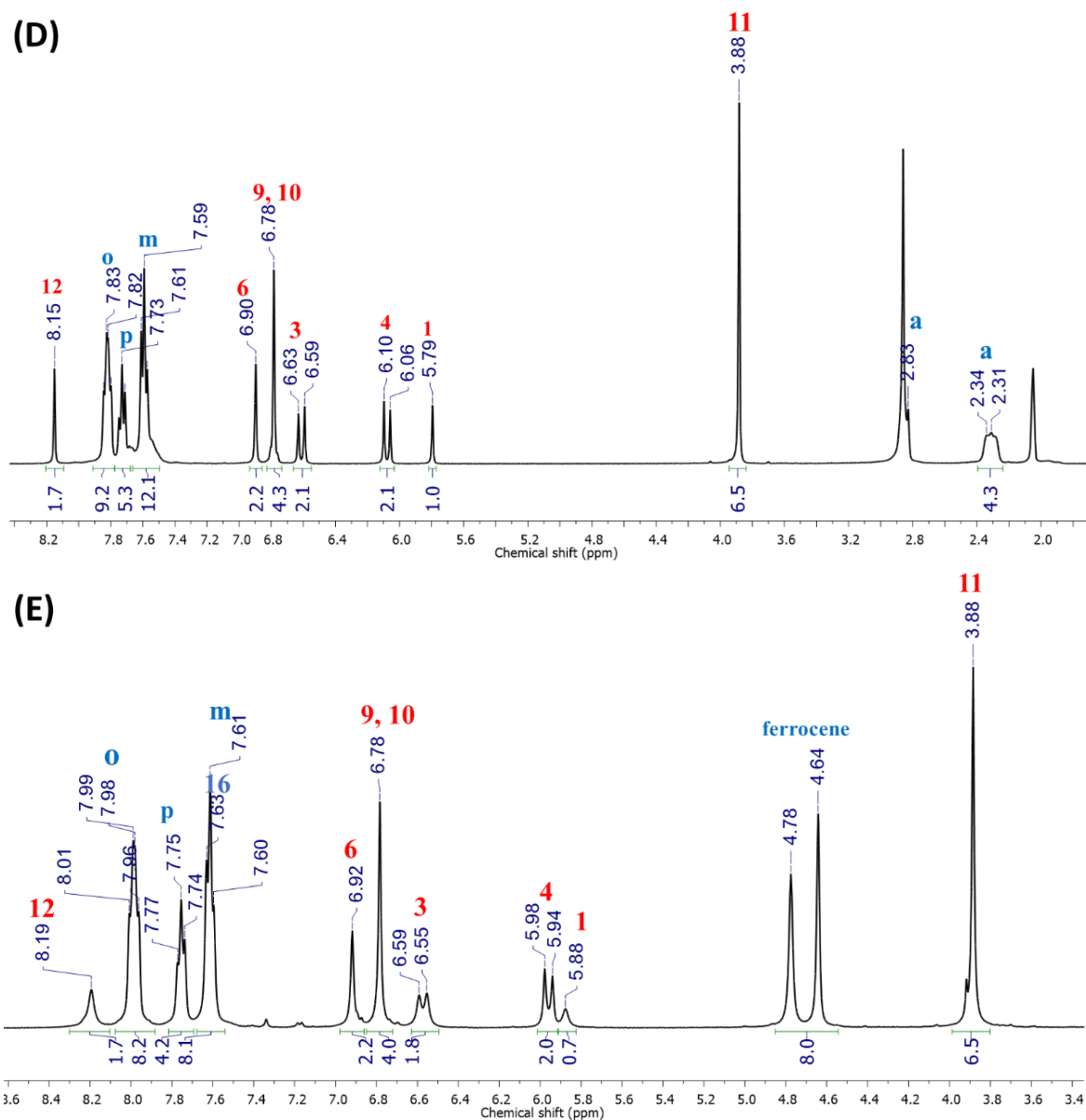
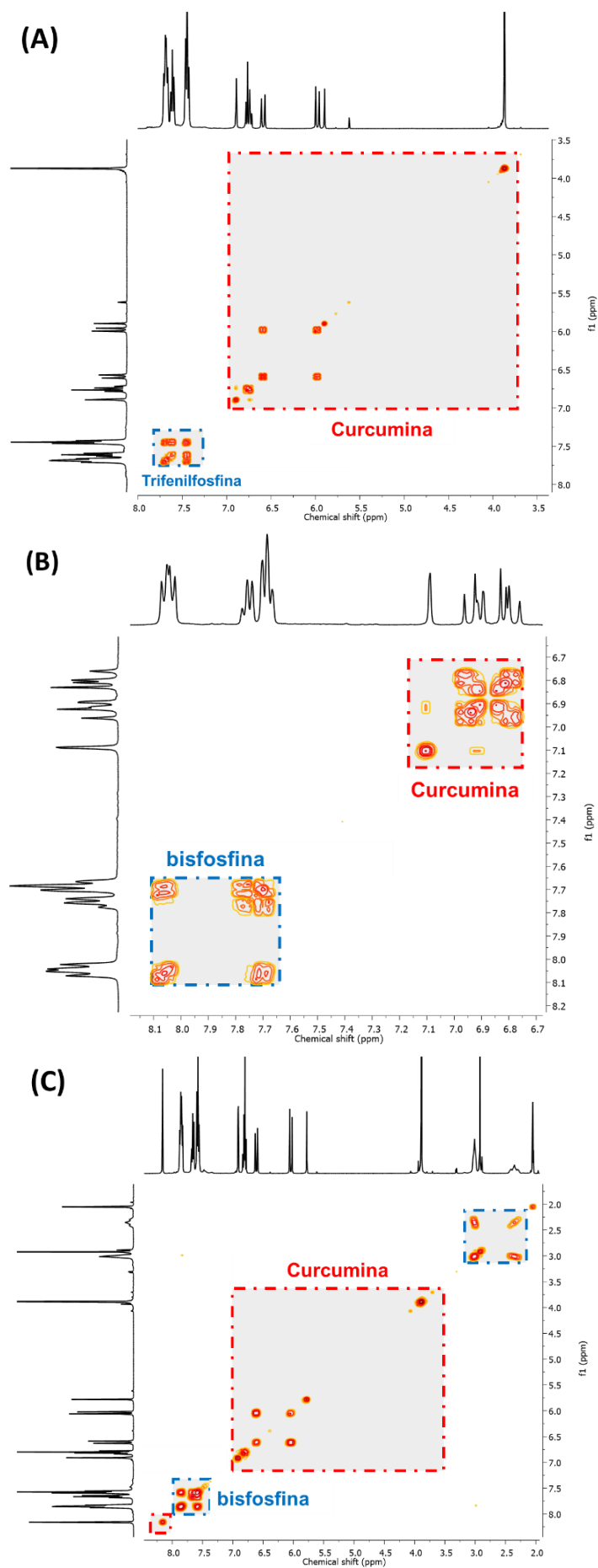


FIGURA A. 9. Espectros de RMN ^1H dos complexos (A) **A1** - $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2(\text{cur})]\text{PF}_6$; (B) **A2** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dpp})]\text{PF}_6$; (C) **A3** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppp})]\text{PF}_6$; (D) **A4** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ e (E) **A5** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, em acetona- d_6 .



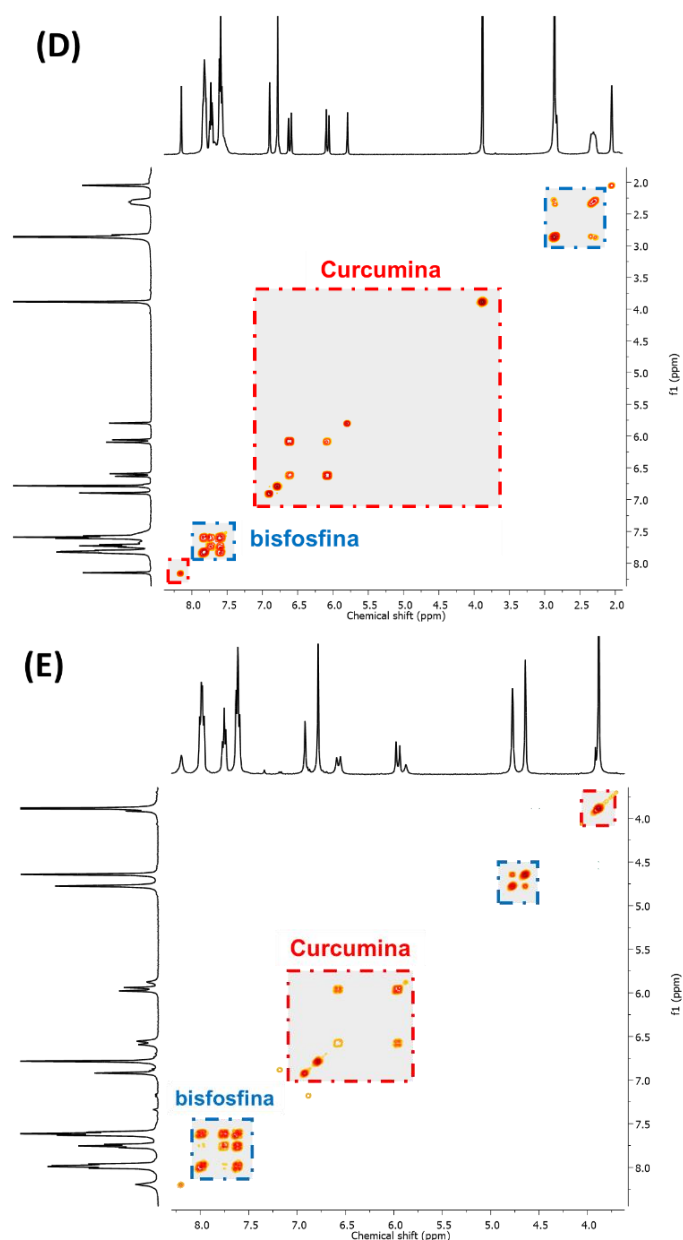
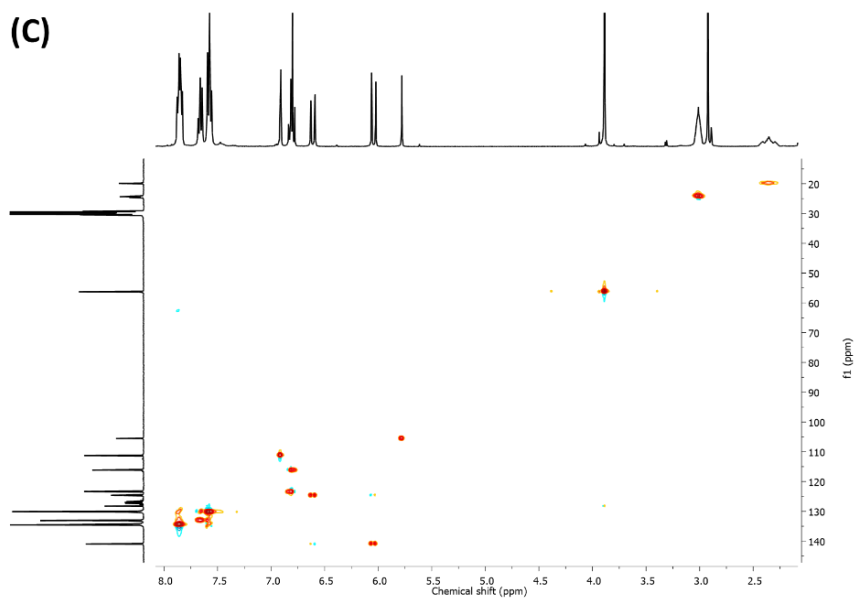
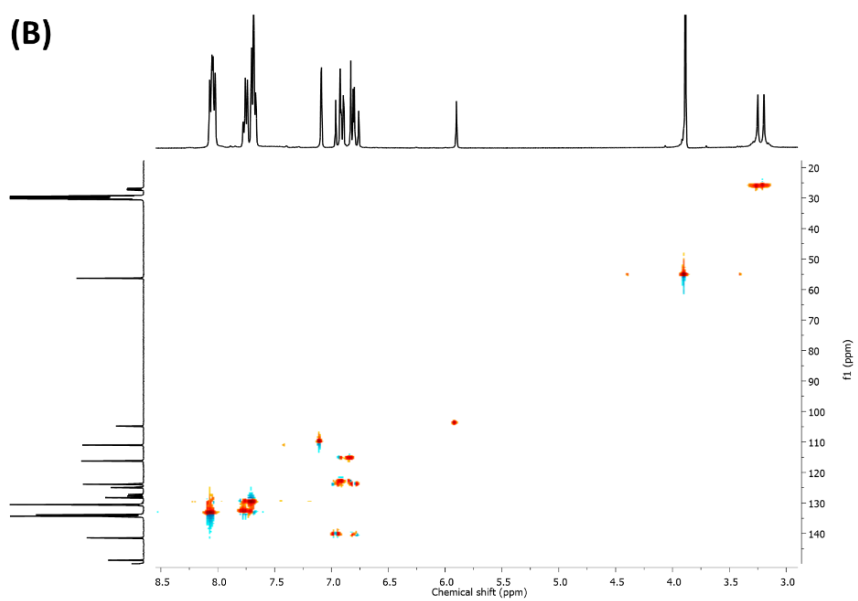
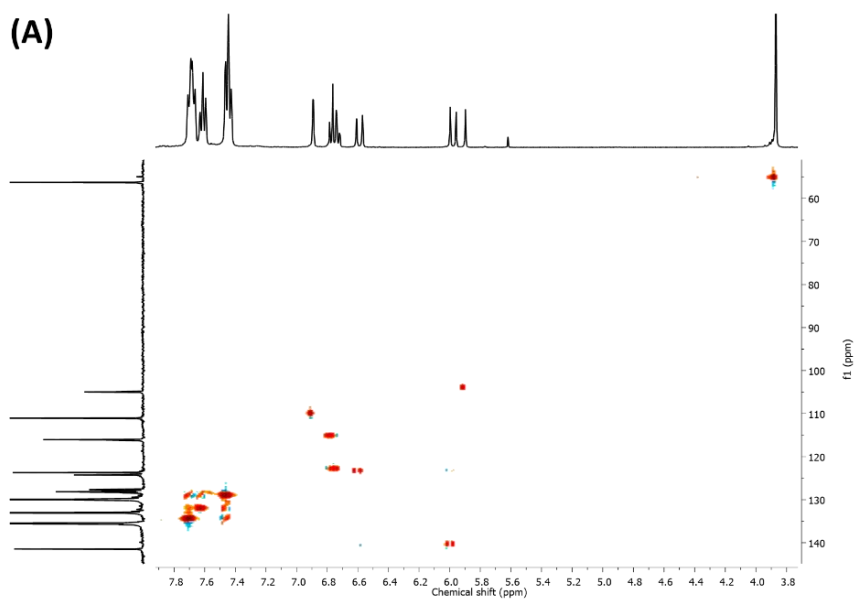


FIGURA A. 10. Mapas de correlação de RMN 2D: ^1H - ^1H COSY dos complexos (A) **A1** - $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2(\text{cur})]\text{PF}_6$; (B) **A2** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppe})]\text{PF}_6$; (C) **A3** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppp})]\text{PF}_6$; (D) **A4** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ e (E) **A5** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, em acetona- d_6 .



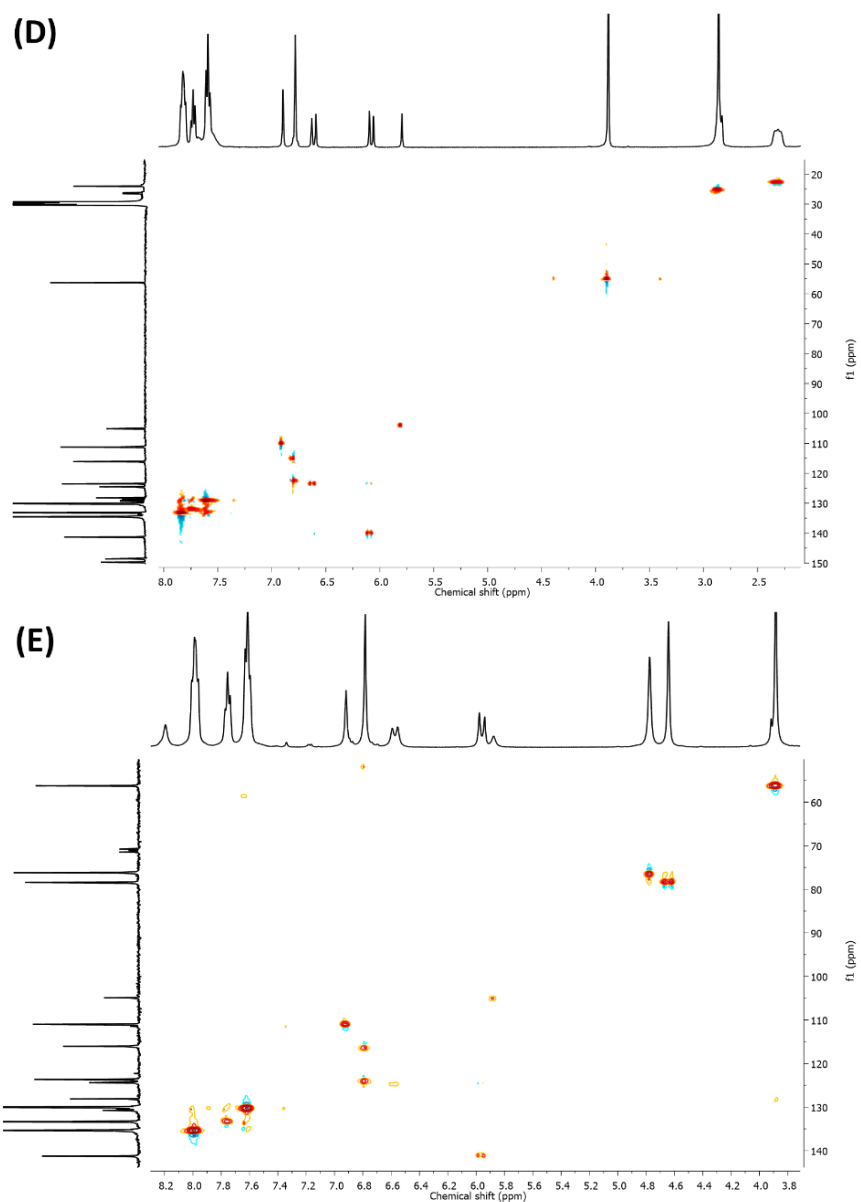
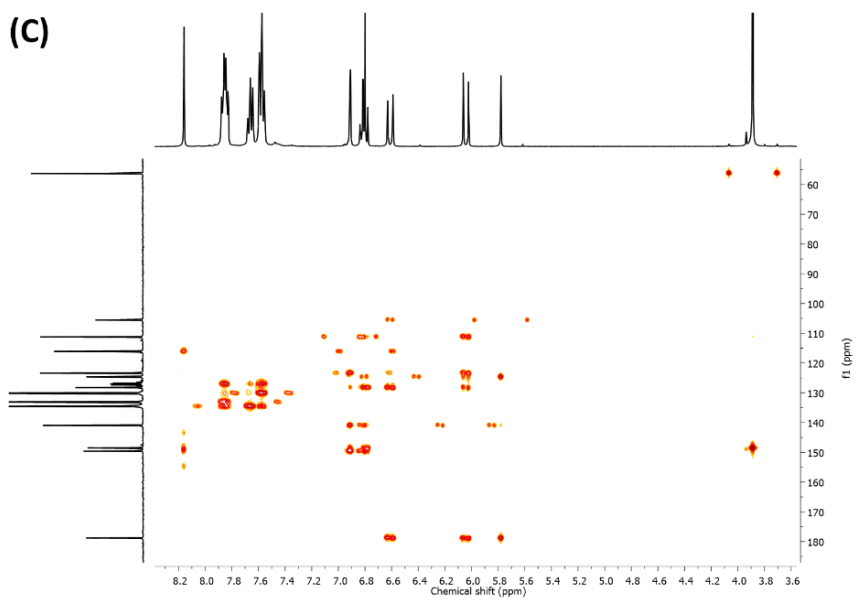
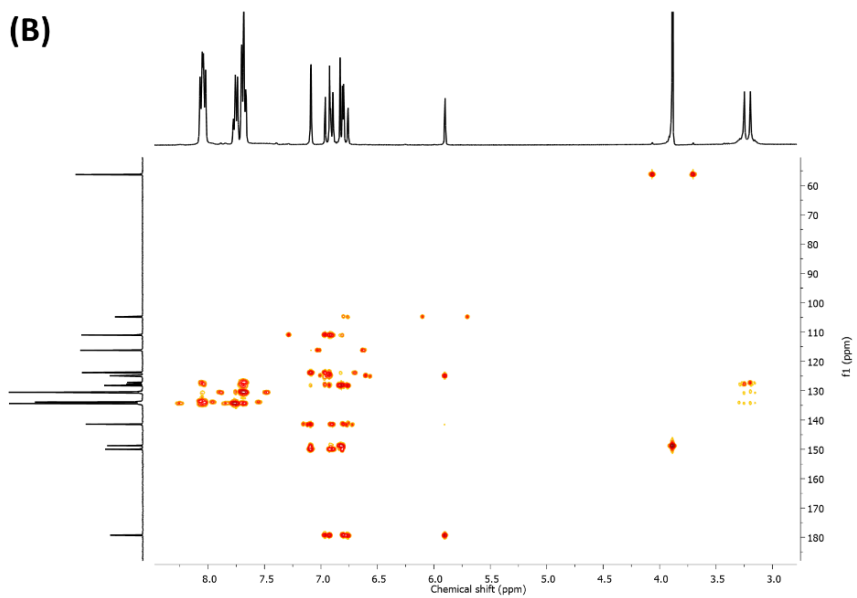
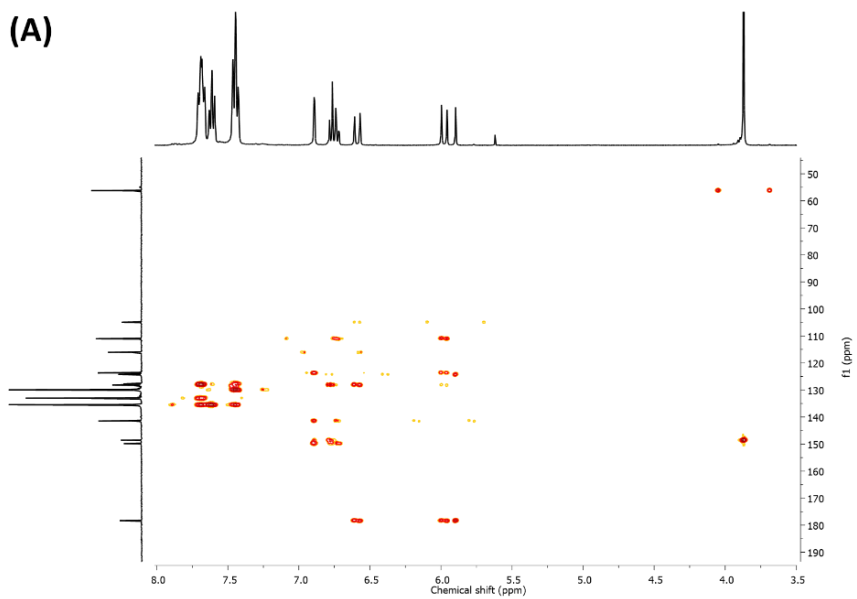


FIGURA A. 11. Mapas de correlação de RMN 2D: ^1H - ^{13}C HSQC dos complexos (A) **A1** - $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2(\text{cur})]\text{PF}_6$; (B) **A2** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppe})]\text{PF}_6$; (C) **A3** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppp})]\text{PF}_6$; (D) **A4** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ e (E) **A5** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, em acetona- d_6 .



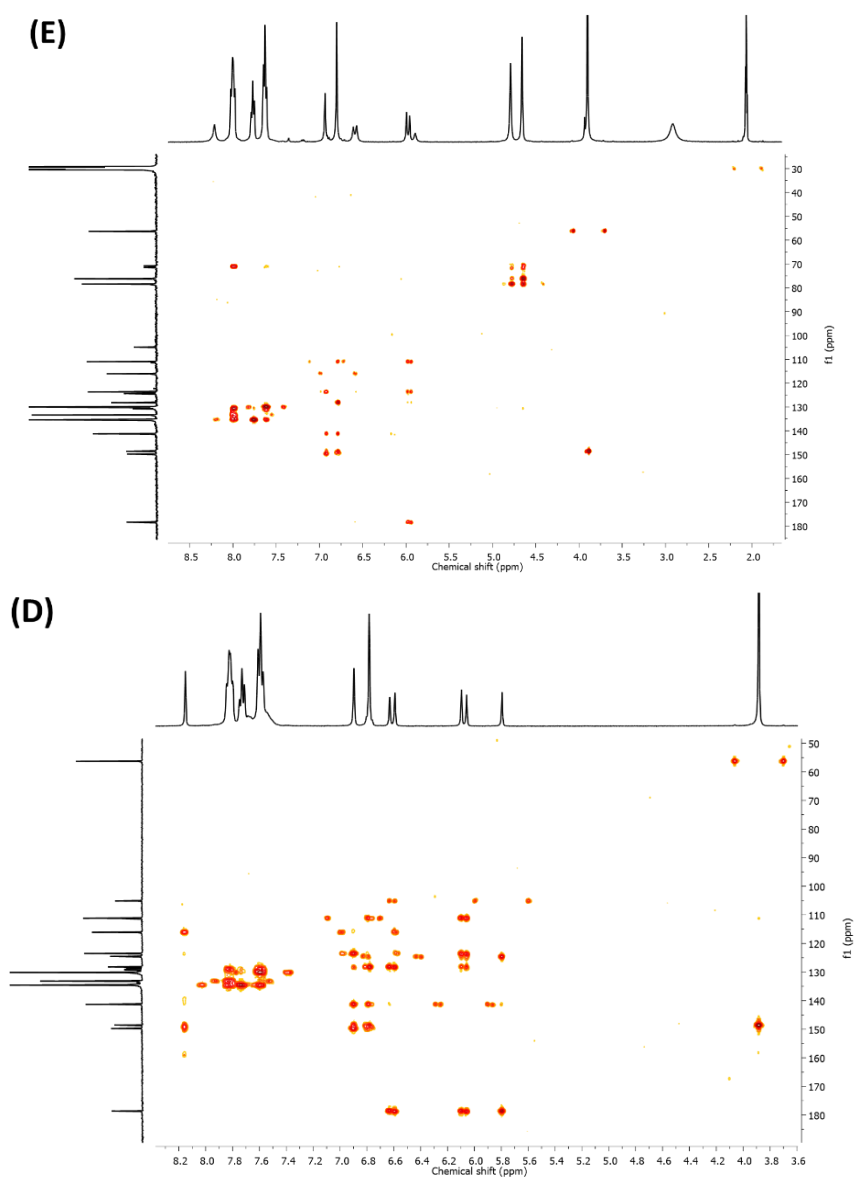
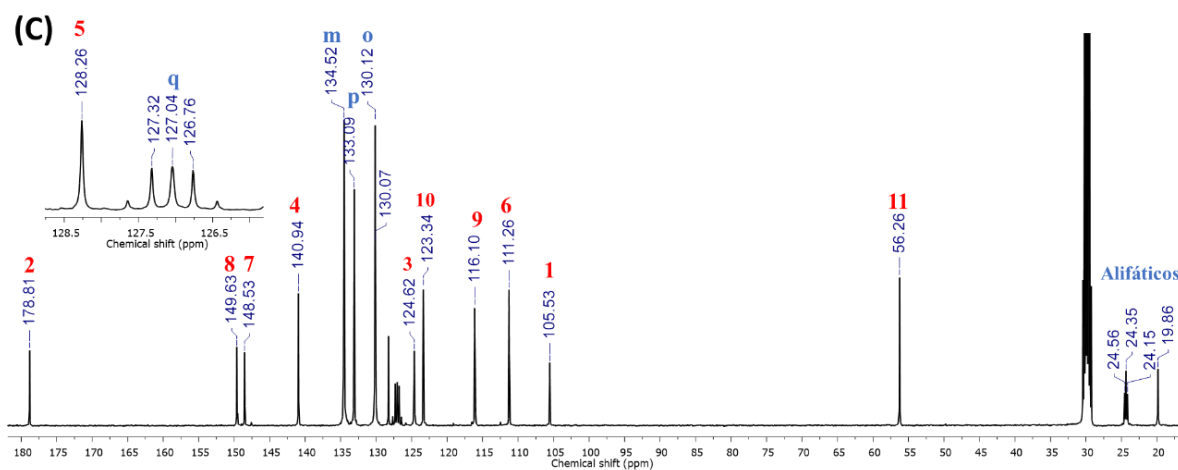
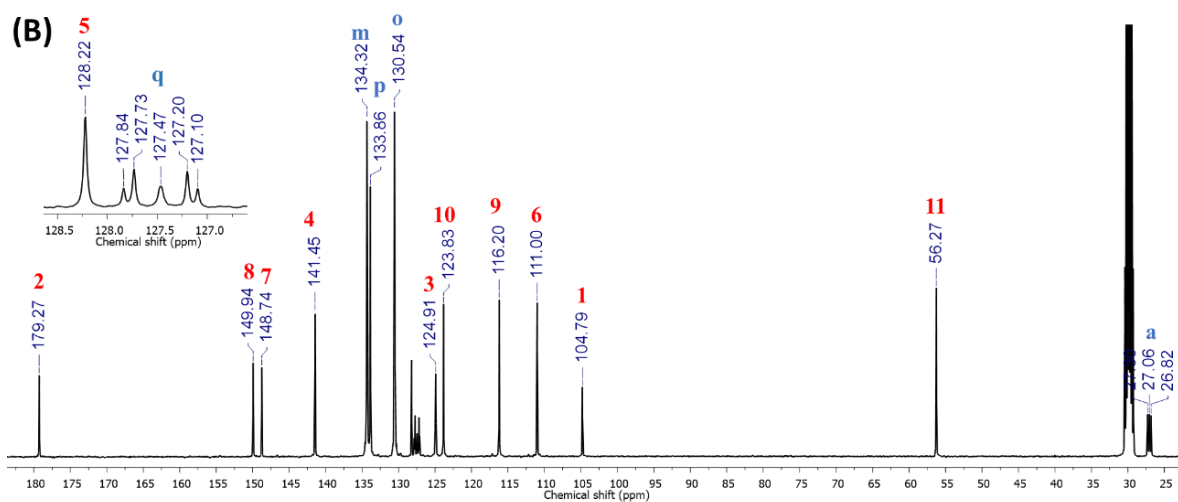
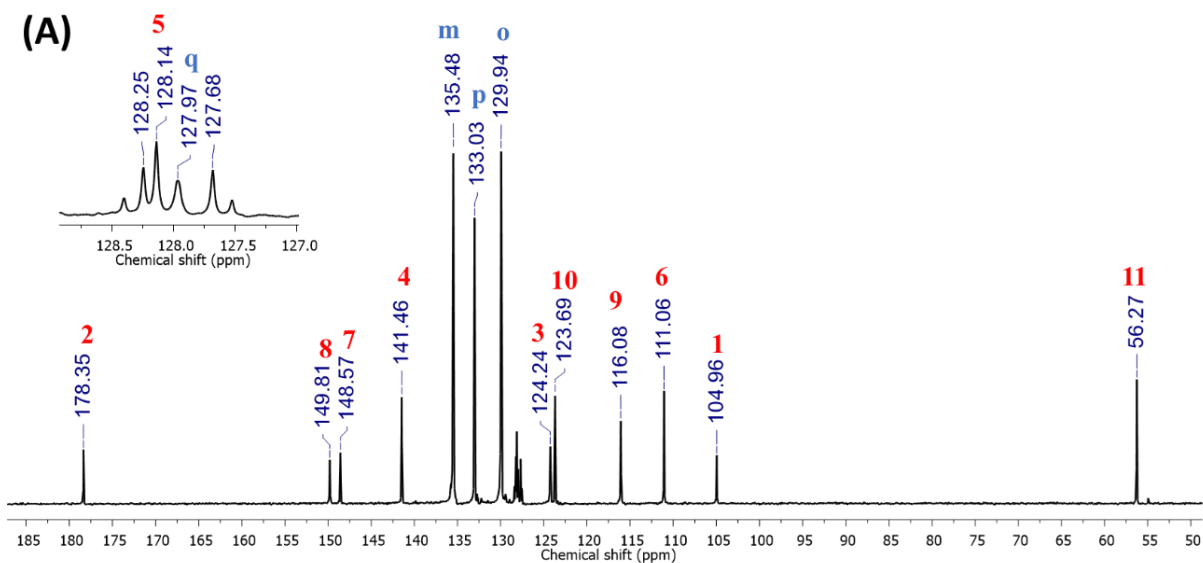


FIGURA A. 12. Mapas de correlação de RMN 2D: ^1H - ^{13}C HMBC dos complexos (A) **A1** - $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2(\text{cur})]\text{PF}_6$; (B) **A2** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppe})]\text{PF}_6$; (C) **A3** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppp})]\text{PF}_6$; (D) **A4** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ e (E) **A5** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, em acetona- d_6 .



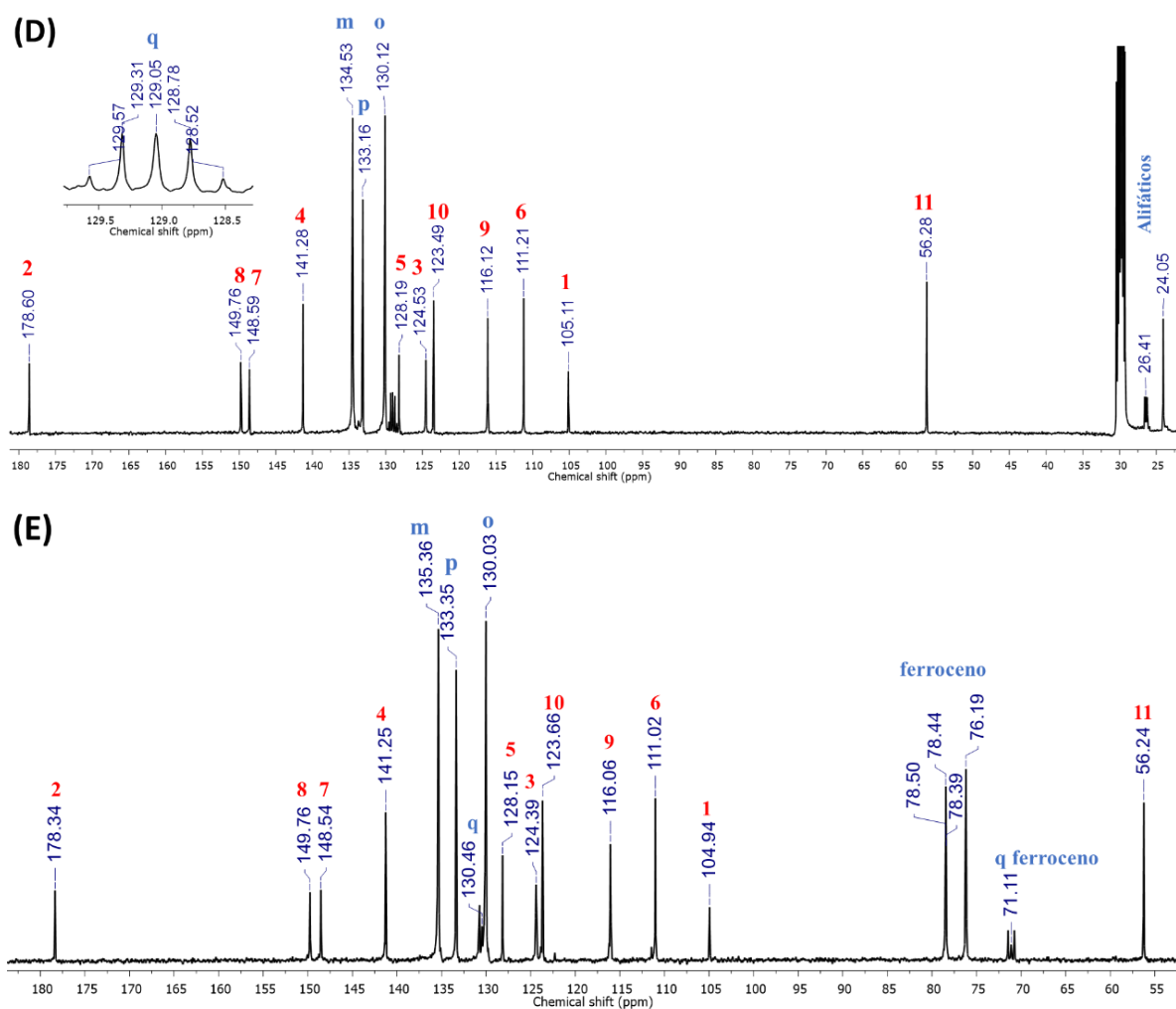


FIGURA A. 13. Espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos (A) **A1** - $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2(\text{cur})]\text{PF}_6$; (B) **A2** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppe})]\text{PF}_6$; (C) **A3** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppp})]\text{PF}_6$; (D) **A4** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ e (E) **A5** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, em acetona- d_6 .

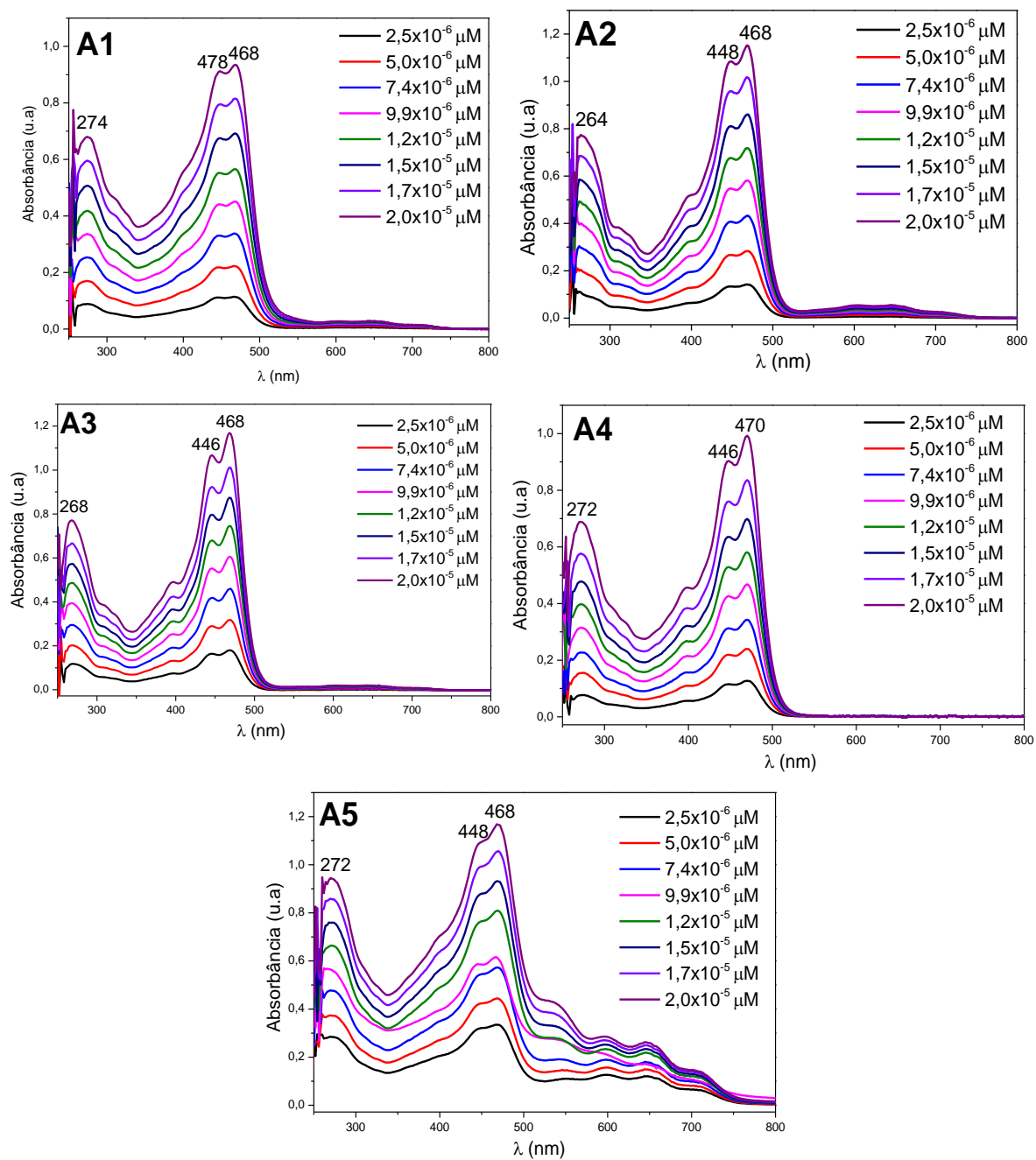
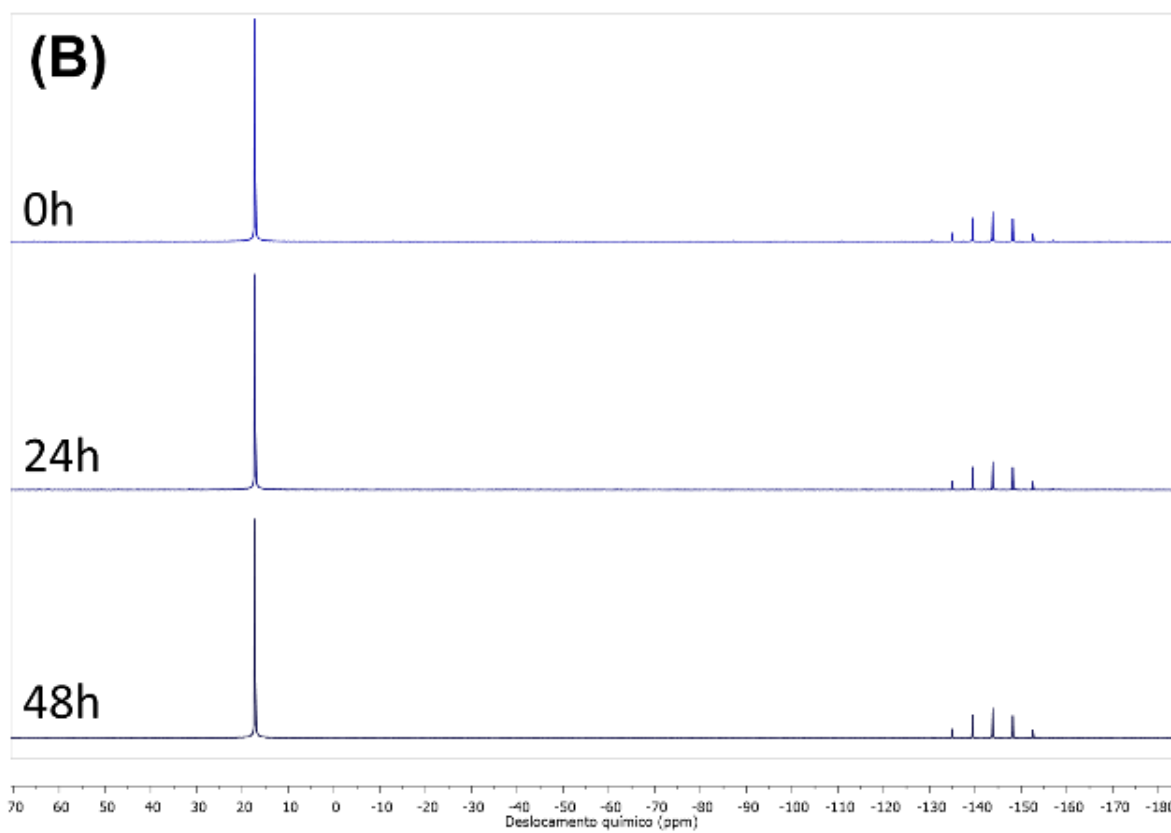
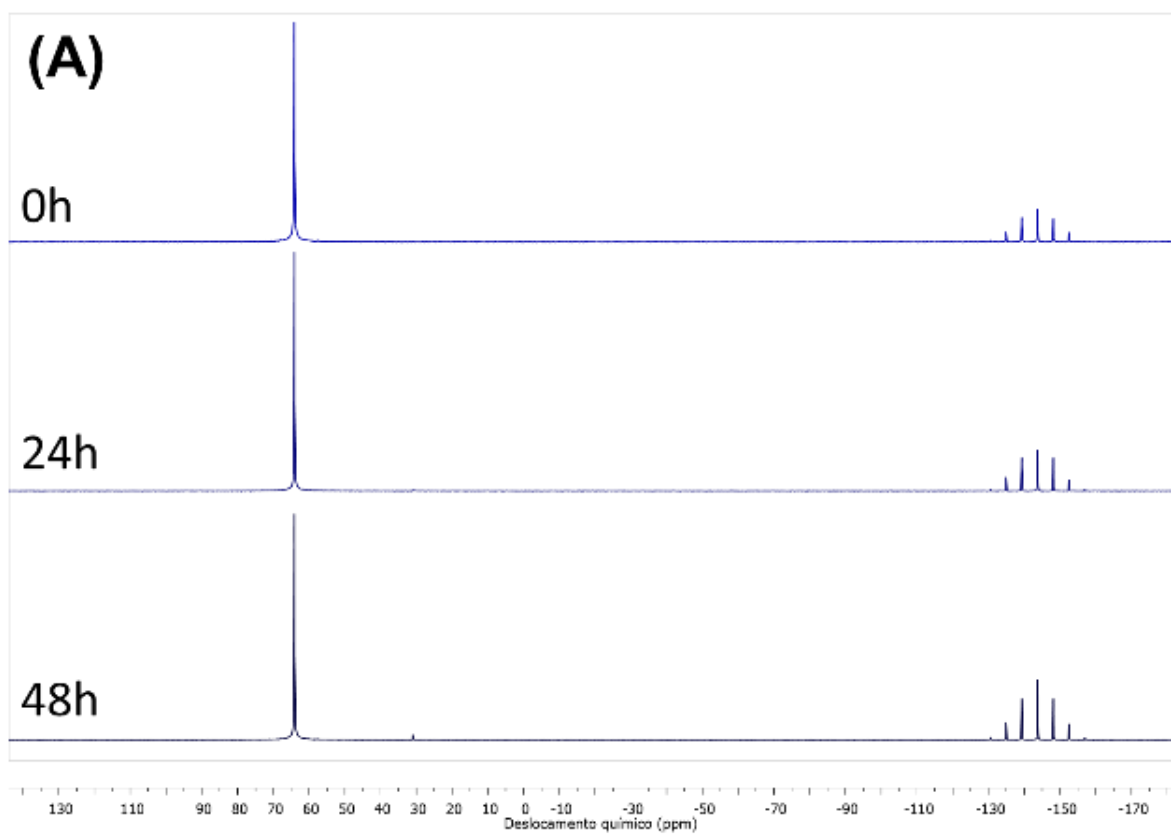


FIGURA A. 14. Espectros eletrônicos dos complexos A1-A5 em DMSO.



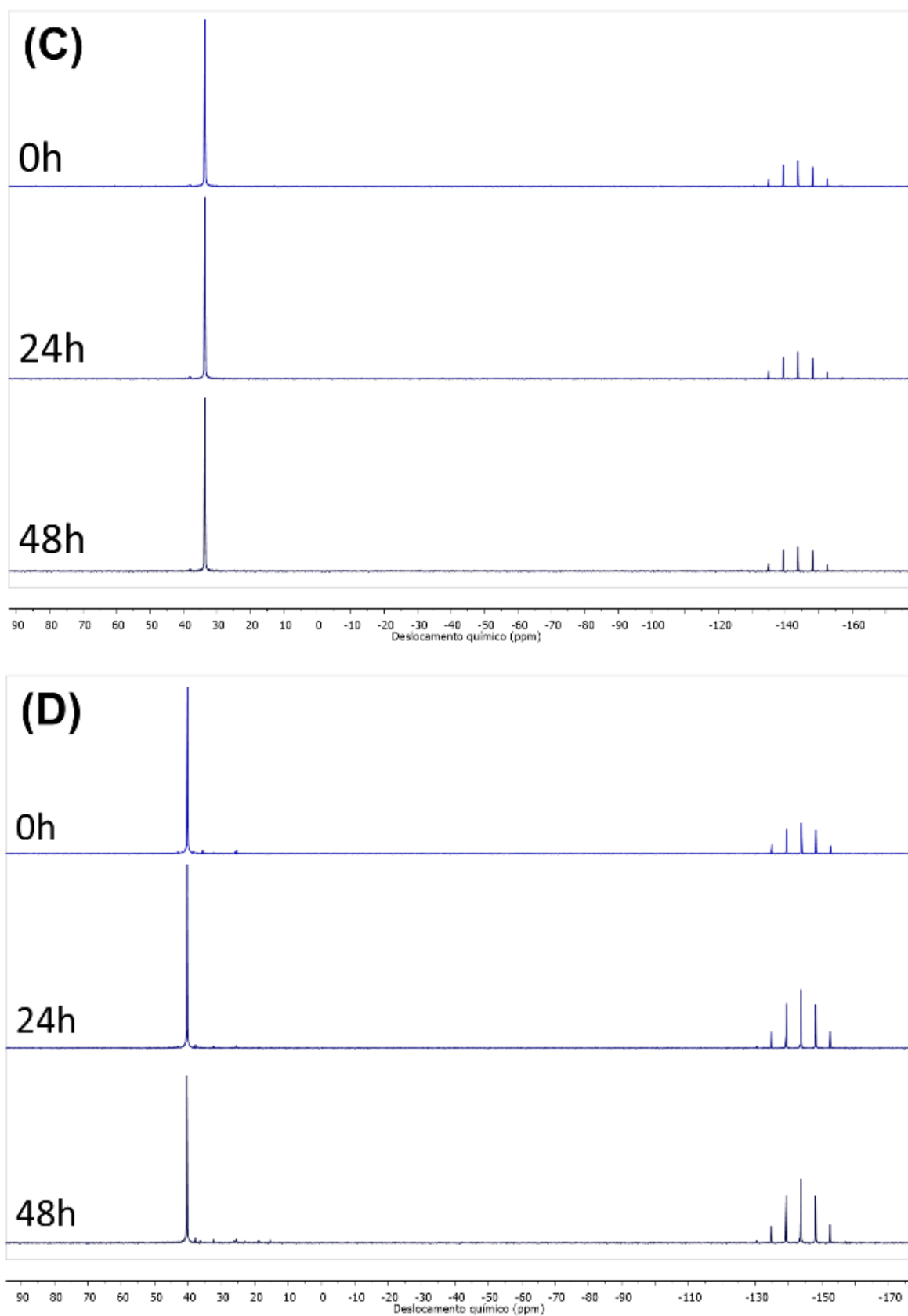
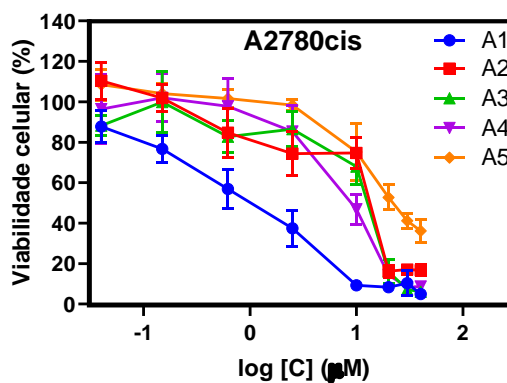
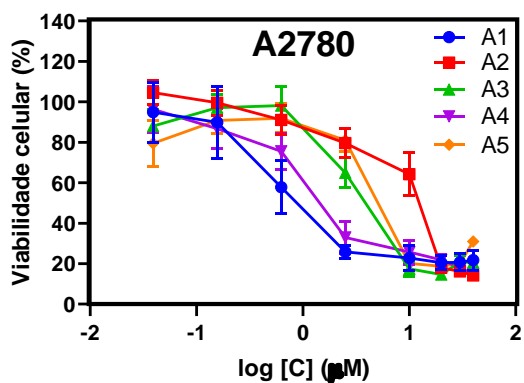
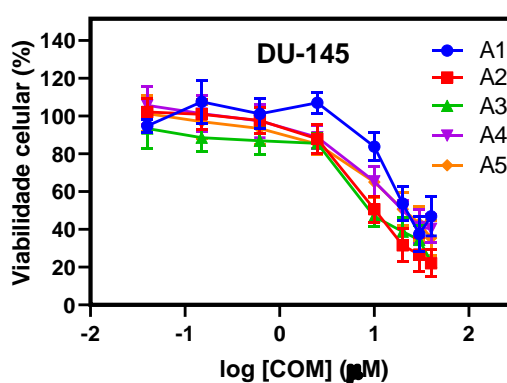
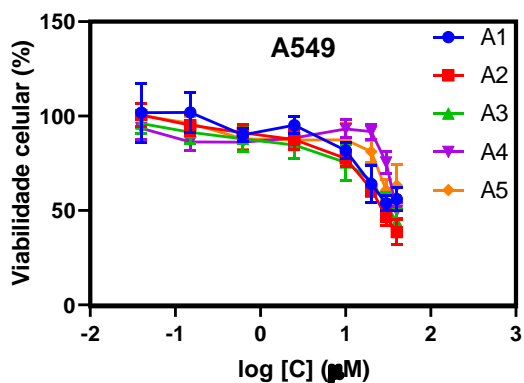
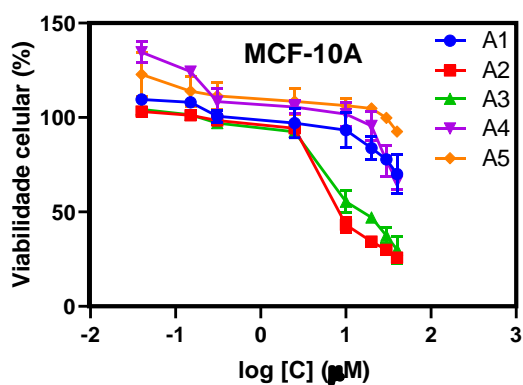
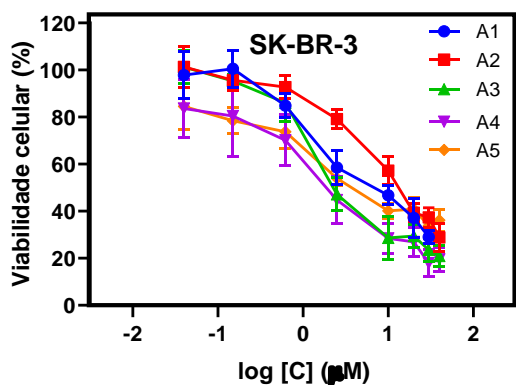
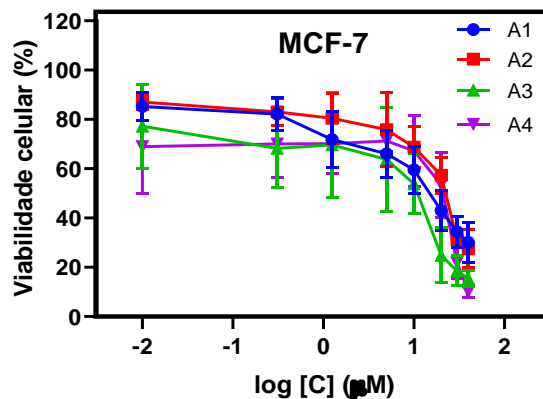
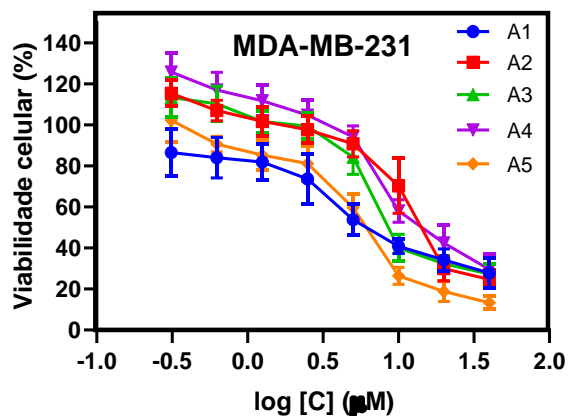


FIGURA A. 15. Espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos (A) **A2** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppe})]\text{PF}_6$; (B) **A3** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppp})]\text{PF}_6$; (C) **A4** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ e (D) **A5** - $[\text{Pd}(\text{cur})(\text{dppf})]\text{PF}_6$, em DMSO, em 0, 24 e 48 horas.



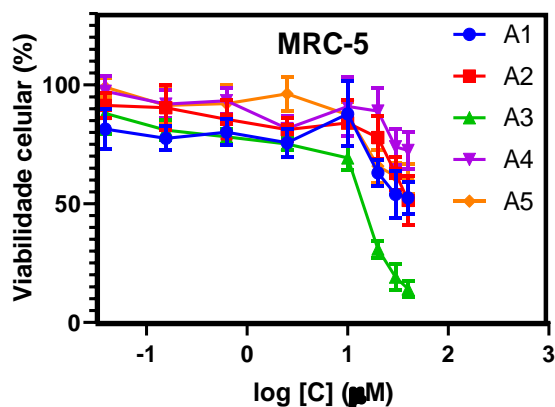


FIGURA A. 16. Curvas de concentração-resposta das células tumorais (MDA-MB-231, MCF7, SK-BR-3, A549, DU-145, A2780 e A2780cis) e das células não tumorais (MCF-10A E MRC-5) após o tratamento com os complexos **A1-A5**.

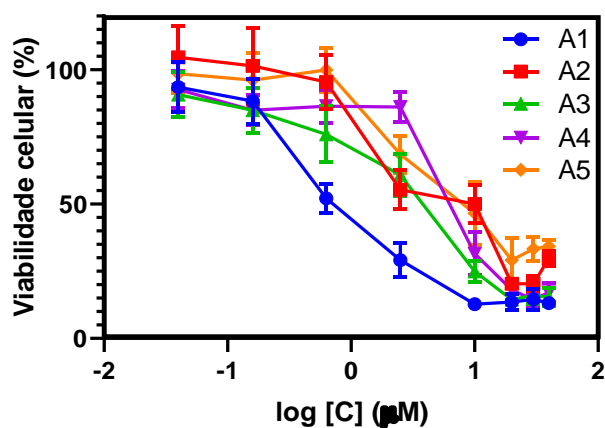
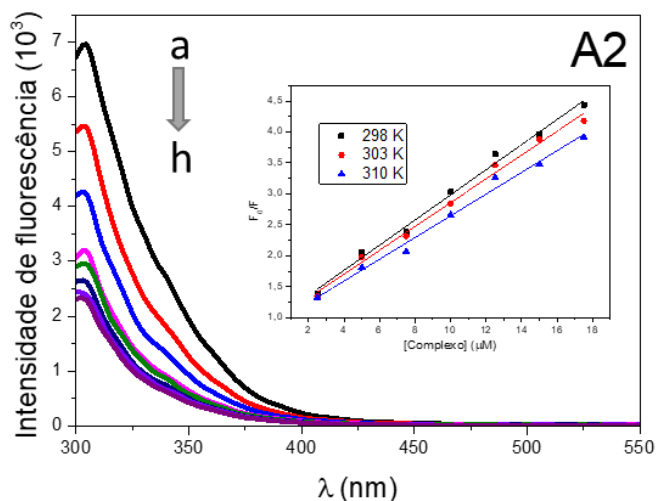


FIGURA A. 17. Curvas de concentração-resposta das células tumorais A2780cis com 15 minutos de irradiação em 460-465 nm após o tratamento com os complexos **A1-A5**.



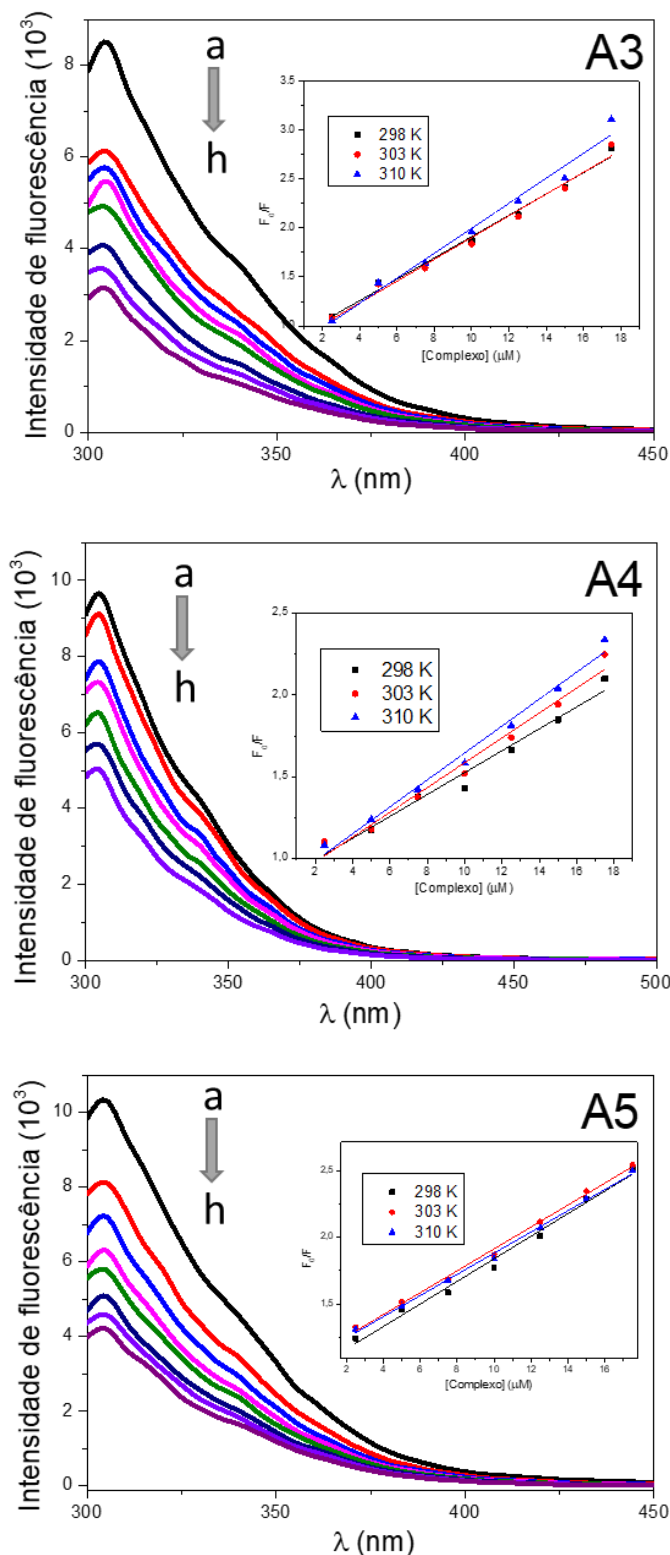


FIGURA A. 18. Espectros de fluorescência da HSA na ausência e presença dos compostos em diferentes razões [composto]/[HSA] (a = 0,5; b= 1,0; c = 1,5; d = 2,0; e = 2,5; f = 3,0; g = 3,5 e h= 4,0), com comprimento de onda de excitação a 270 nm, a 25°C em tampão Tris-HCl: **A2** - [Pd(cur)(dppe)]PF₆; **A3** - [Pd(cur)(dppp)]PF₆; **A4** - [Pd(cur)(dppb)]PF₆ e **A5** - [Pd(cur)(dppf)]PF₆. Gráficos de Stern-Volmer para supressão de fluorescência da HSA na ausência e presença dos compostos à 298, 303 e 310 K.

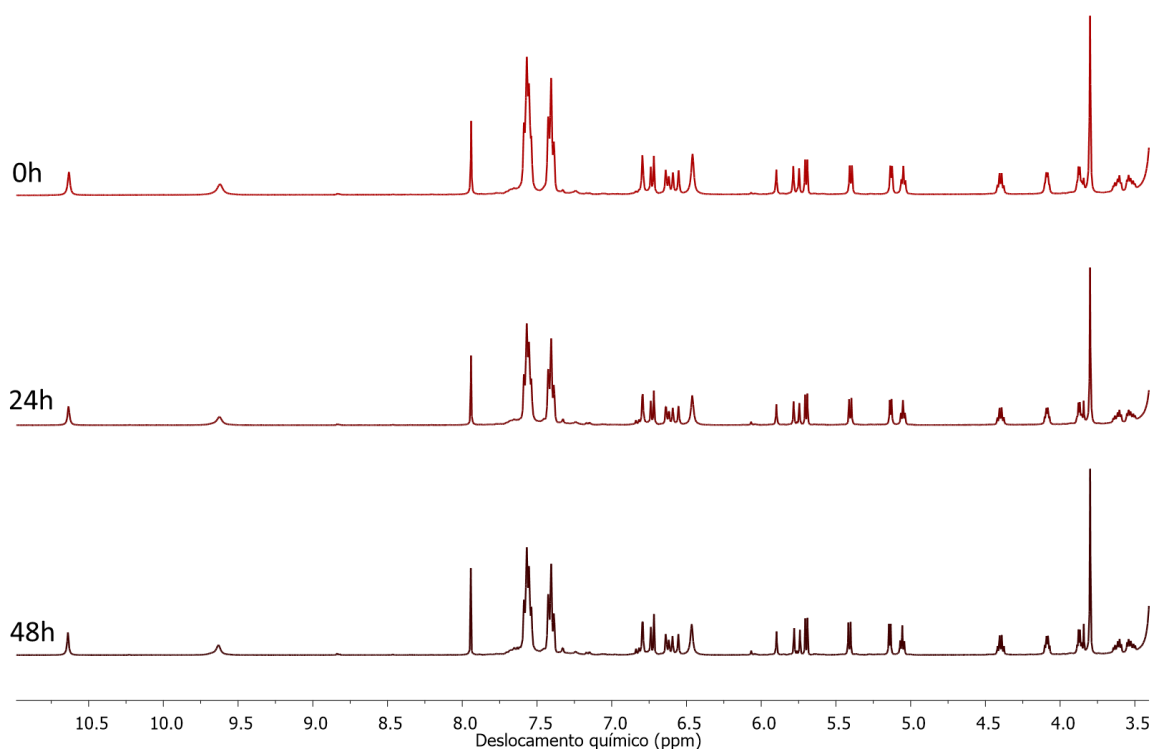


FIGURA A. 19. Espectros de RMN ^1H do complexo **A1** com a guanósina (1 mol: 2 mol) em 0, 24 e 48 horas, em DMSO deuterado.

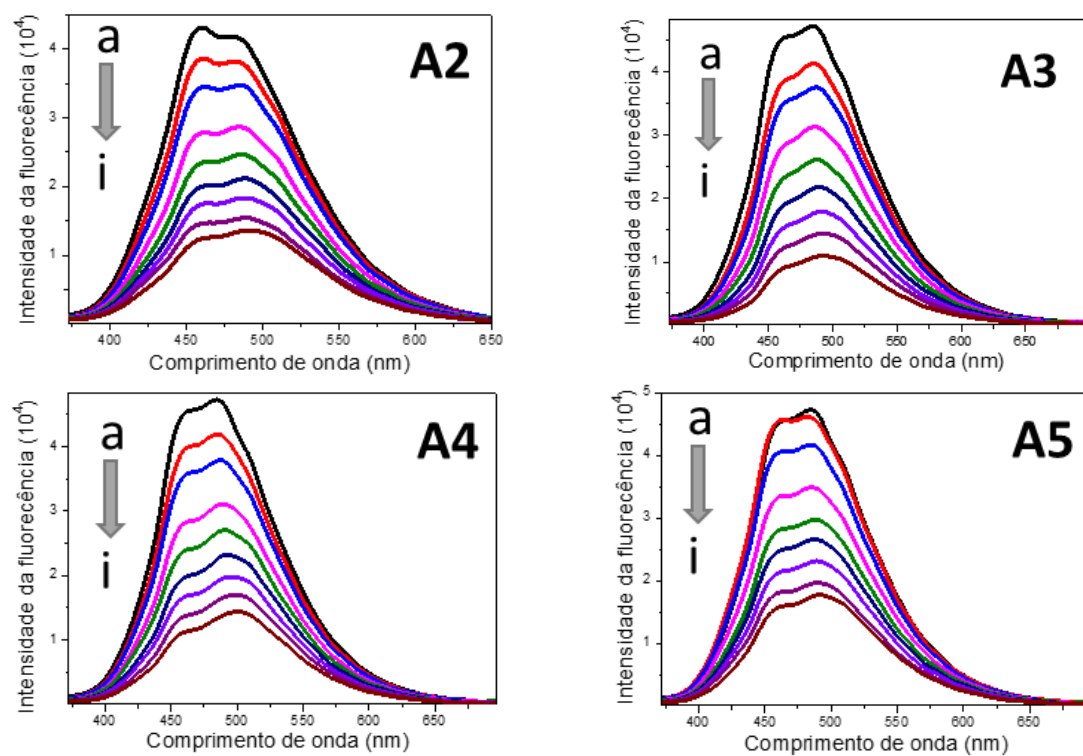
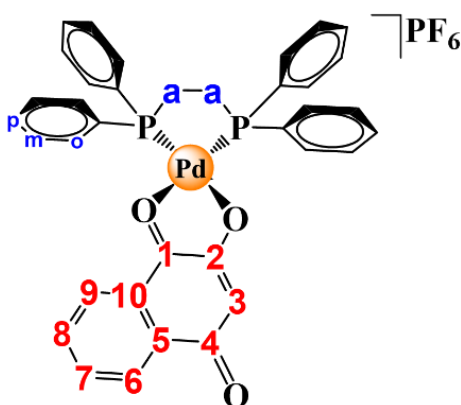


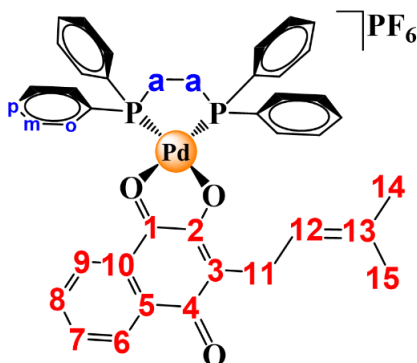
FIGURA A. 20. Espectros de fluorescência do DNA-Hoechst na ausência e presença dos compostos em diferentes razões [composto]/[DNA-Hoechst] (a = 0; b = 1; c = 2; d = 3; e = 4; f = 5; g = 6; h = 7; i = 8; j = 9 e *k = 10), com comprimento de onda de excitação a 340 nm, a 37 °C em tampão Tris-HCl: dos complexos **A2-A5**.

Parte II – Dados Série B

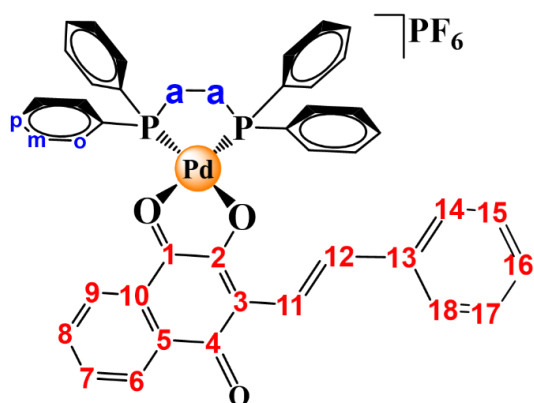
B1 - [Pd(dppe)(lau)]PF₆: sólido roxo, rendimento 66% (47 mg). Anal. (Calc.) para C₃₆H₂₉F₆O₃P₃Pd, C, 53,27 (53,17); H, 4,33 (4,00) %. Condutividade Molar (S cm² mol⁻¹, DMSO): 20,8. IR (KBr, ν /cm⁻¹): 1620 (ν C=O), 1105 (ν C-O), 840 e 557 (ν P-F). qTOF-MS m/z , calc. para C₃₆H₂₉O₃P₂Pd [M]⁺: 677,0627; encontrada: 677,0650. RMN ¹H (400 MHz, Acetona-d₆): δ 8.06 (s; 8H; dppe Ph_{orto}); 7,95 – 7,73 (m; 4H; dppe Ph_{para}); 7,74 – 7,46 (m; 12H; dppe Ph_{meta}, H(6), H(7), H(8) e H(9)); 5,85 (s; 1H; H(3)); 3,20 (d; J = 25,7 Hz; 4H; alifáticos dppe). RMN ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): 66,7 ppm (s).



B2 - [Pd(dppe)(lap)]PF₆: sólido roxo, rendimento 60% (46 mg). Anal. (Calc.) para C₄₁H₃₇F₆O₃P₃Pd, C, 55,19 (55,26); H, 4,06 (4,19) %. Condutividade Molar (S cm² mol⁻¹, DMSO): 21,7. IR (KBr, ν /cm⁻¹): 1620 (ν C=O), 1107 (ν C-O), 840 e 559 (ν P-F). qTOF-MS m/z , calc. para C₄₁H₃₇O₃P₂Pd [M]⁺: 745,1253; encontrada: 745,1266. RMN ¹H (400 MHz, acetona-d₆) δ 8,14 (dd; J = 12,9; 7,7 Hz; 8H; dppe Ph_{orto}); 7,94 (d; J = 7,7 Hz; 1H; H(9)); 7,89 (d; J = 7,6 Hz; 1H; H(6)); 7,83 (t; J = 7,2 Hz; 2H; H(7, 8)); 7,74 (t; J = 7,3 Hz; 4H; dppe Ph_{para}); 7,65 (t; J = 7,0 Hz; 8H; dppe Ph_{meta}); 5,11 (t; J = 6,9 Hz; 1H; H(12)); 3,31 (dd; J = 33,5; 10,3 Hz; 4H; alifáticos dppe); 3,14 (d; J = 6,4 Hz; 2H; H(11)); 1,52 (s; 6H; metilas H(14, 15)). RMN ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): 66,6 ppm (dd; J = 15,8 Hz).



B3 - [Pd(dppe)(lpm)]PF₆: sólido roxo, rendimento 62% (50 mg). Anal. (Calc.) para C₄₄H₃₅F₆O₃P₃Pd, C, 57,21 (57,13); H, 3,85 (3,81) %. Condutividade Molar (S cm² mol⁻¹, DMSO): 25,2. IR (KBr, ν /cm⁻¹): 1625 (ν C=O), 1103 (ν C-O), 840 e 559 (ν P-F). qTOF-MS m/z , calc. para C₄₄H₃₅O₃P₂Pd [M]⁺: 779,1096; encontrada: 779,1109. RMN ¹H (400 MHz, acetona-d₆) δ 8,16 (m; 8H; dppe Ph_{orto}); 7,96 (d; J = 16,3 Hz; 1H; H(11)); 7,92 – 7,75 (m; 4H; H(6, 7, 8, 9)); 7,76 – 7,56 (m; 12H; dppe Ph_{meta} e Ph_{para}); 7,42 (d; J = 16,4 Hz; 1H; H(12)); 7,36 – 7,15 (m; 5H; H(14, 15, 16, 17, 18)); 3,28 (d; J = 25,2 Hz; 4H; alifáticos dppe). RMN ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): 65,7 ppm (s)



B4 - [Pd(dppe)(ali)]PF₆: sólido vinho, rendimento 71% (55 mg). Anal. (Calc.) para C₄₀H₃₁F₆O₄P₃Pd, C, 54,14 (54,04); H, 3,18 (3,51) %. Condutividade Molar (S cm² mol⁻¹, DMSO): 27,0. IR (KBr, ν /cm⁻¹): 1614 (ν C=O), 1105 (ν C-O), 840 e 557 (ν P-F). qTOF-MS m/z , calc. para C₄₀H₃₁O₄P₂Pd [M]⁺: 743,0732; encontrada: 743,0746. RMN ¹H (400 MHz, Acetone-d₆): δ 8,16 (dd; J = 12,9; 7,3 Hz; 8H; dppe Ph_{orto}); 8,05 (d; J = 7,5 Hz; 1H; H(13)); 7,86 – 7,74 (m; 4H; dppe Ph_{para}); 7,70 (td; J = 7,7 e 2,2 Hz; 8H; dppe Ph_{meta}); 7,58 (t; J = 7,7 Hz; 2H; H(11, 12)); 7,52 (d; J = 7,9 Hz; 1H; H(10)); 7,39 (d; J = 8,1 Hz; 1H; H(6)); 7,20 (s; 1H; OH); 6,91 (d; J = 7,9 Hz; 1H; H(5)); 3,36 (d; J = 23,3 Hz; 4H; alifáticos dppe). RMN ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂ (D₂O)): 66,1 ppm (dd; J = 21,8 Hz).

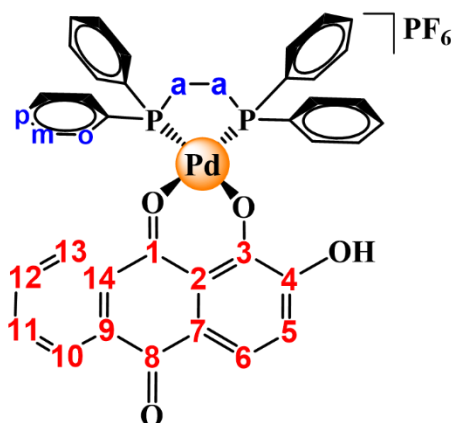


TABELA A. 3. Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento das estruturas obtidas para os complexos **B1** - [Pd(dppe)(ali)]PF₆ e **B4** modificado - [Pd(dppe)(ali)] DMSO.

	B4	B4 modificado
Fórmula Empírica	C ₄₀ H ₃₁ F ₆ O ₄ P ₃ Pd	C ₄₂ H ₃₆ O ₅ P ₂ PdS
Massa molecular	888,96	821,180
Temperatura/K	293	293
Sistema Cristalino	monoclínico	monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /n	P2 ₁ /n
a/Å	10,3575(13)	13,8880(16)
b/Å	17,380(2)	12,1399(11)
c/Å	20,841(3)	23,064(3)
α/°	90	90
β/°	98,190(12)	103,912(12)
γ/°	90	90
Volume/Å ³	3713,4(8)	3774,5(7)
Z	4	4
ρ _{calc} g/cm ³	1,590	1,445
μ/mm ⁻¹	0,701	0,676
F(000)	1792,0	1678,1
Tamanho do Cristal /mm ³	0,182 × 0,073 × 0,035	0,543 × 0,172 × 0,082
Radiação	Mo Kα (λ = 0,71073)	Mo Kα (λ = 0,71073)
Faixa 2θ da coleta de dados/°	5,086 a 53,998	5,14 a 51,36
Intervalo de índices	-13 ≤ h ≤ 13, -22 ≤ k ≤ 22, -26 ≤ l ≤ 26	-17 ≤ h ≤ 21, -18 ≤ k ≤ 17, -33 ≤ l ≤ 34
Refleções coletadas	25875	31095
Refleções Independentes	8103 [R _{int} = 0,0892; R _{sigma} = 0,1025]	8243 [R _{int} = 0,0751; R _{sigma} = 0,1453]
Dados/restrições/ parâmetros	8103/223/494	7163/189/462
Melhor ajuste de F ²	1,046	1,084
Índices R finais [I ≥ 2σ(I)]	R ₁ = 0,0648; wR ₂ = 0,1330	R ₁ = 0,0619; wR ₂ = 0,1535
Índices R finais [todos os dados]	R ₁ = 0,1378; wR ₂ = 0,1811	R ₁ = 0,1083; wR ₂ = 0,2006
Maior diferença Pico/vale / e.Å ⁻³ Parâmetro Flack	0,63/-0,78	2,06/-0,79

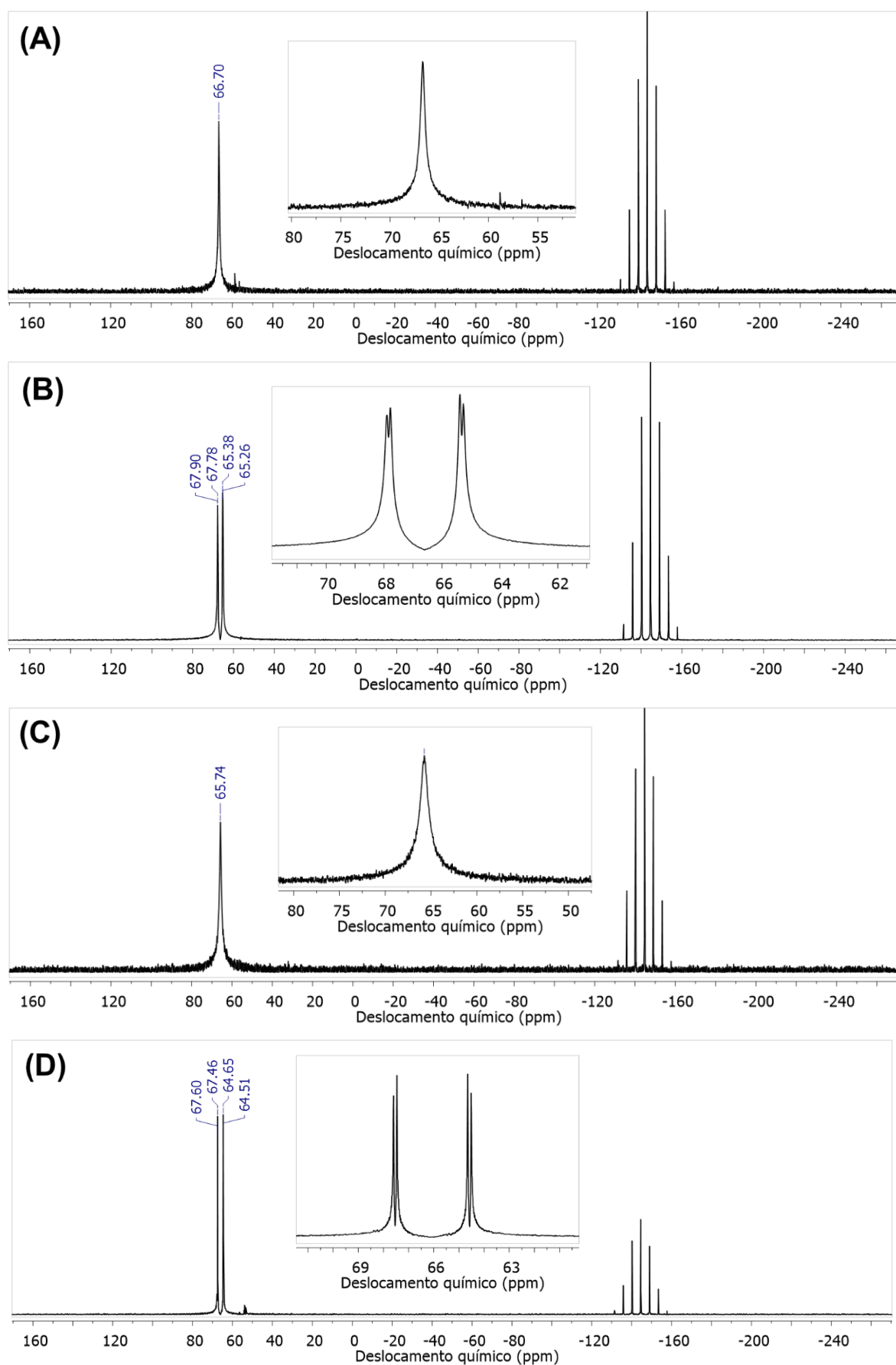


FIGURA A. 21. Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos (A) B1; (B) B2; (C) B3 e (D) B4, em $\text{CH}_2\text{Cl}_2(\text{D}_2\text{O})$.

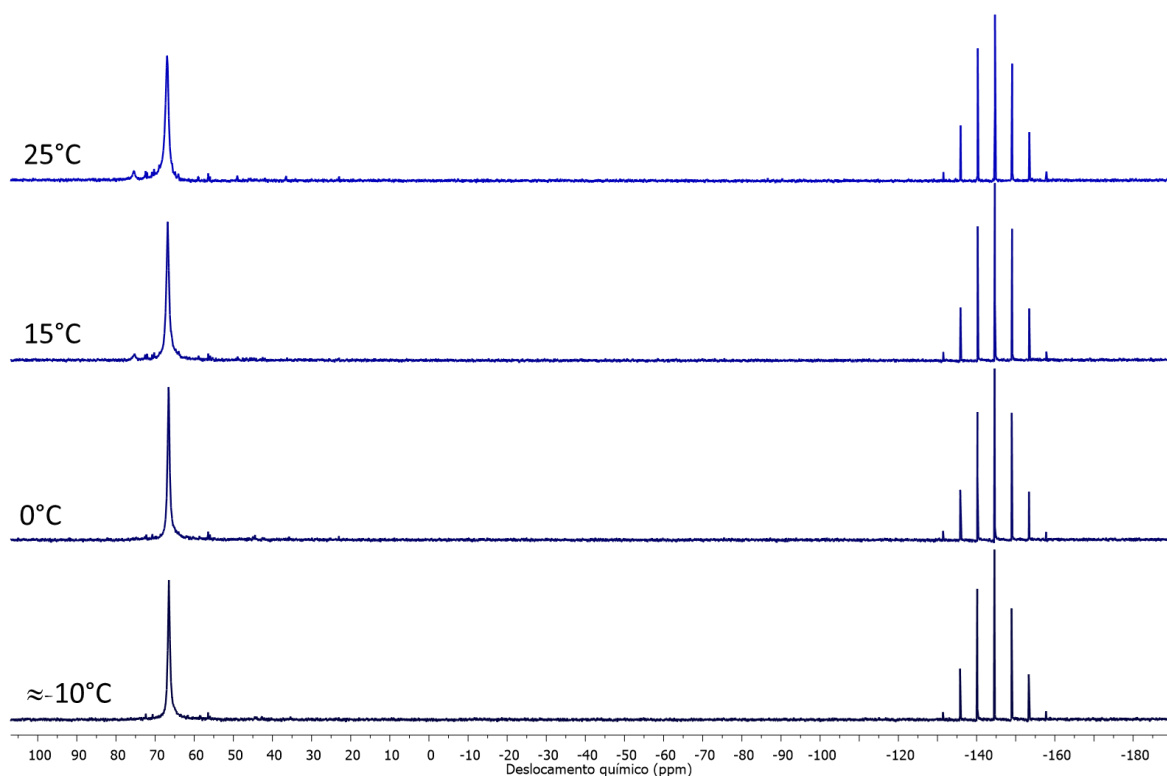


FIGURA A. 22. Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos **B1** – $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lau})]\text{PF}_6$ em diferentes temperaturas, em CD_2Cl_2 .

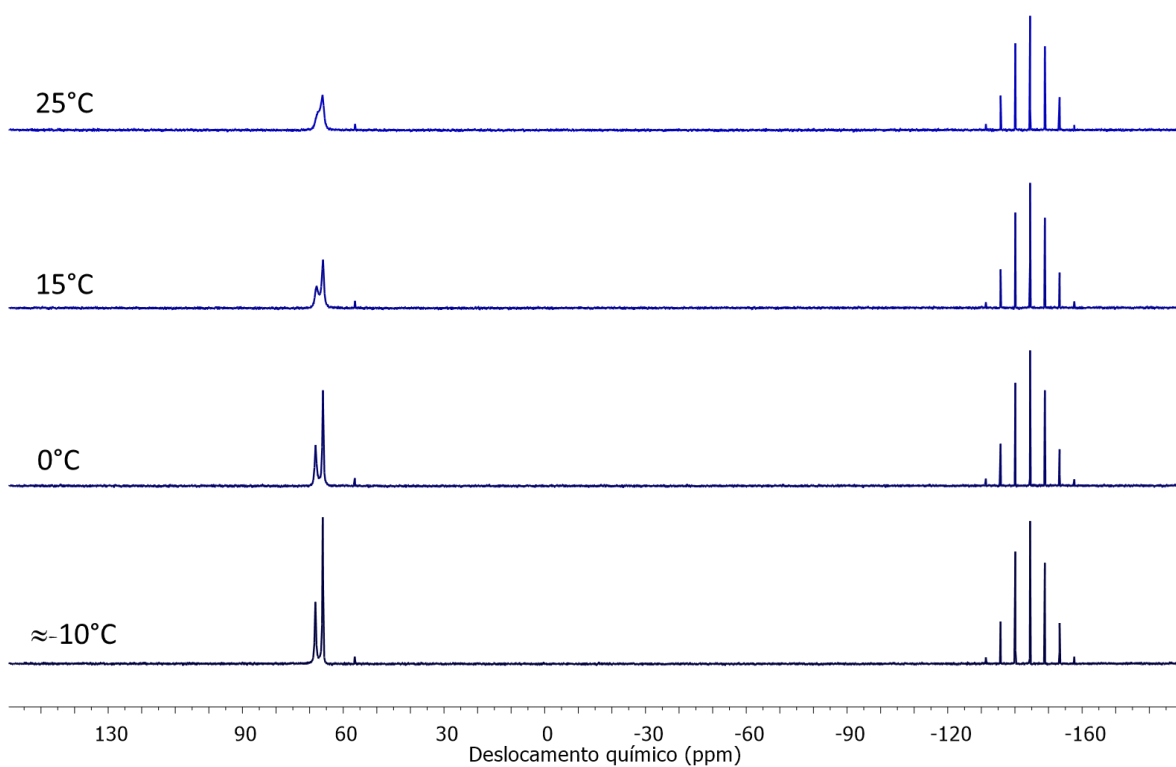
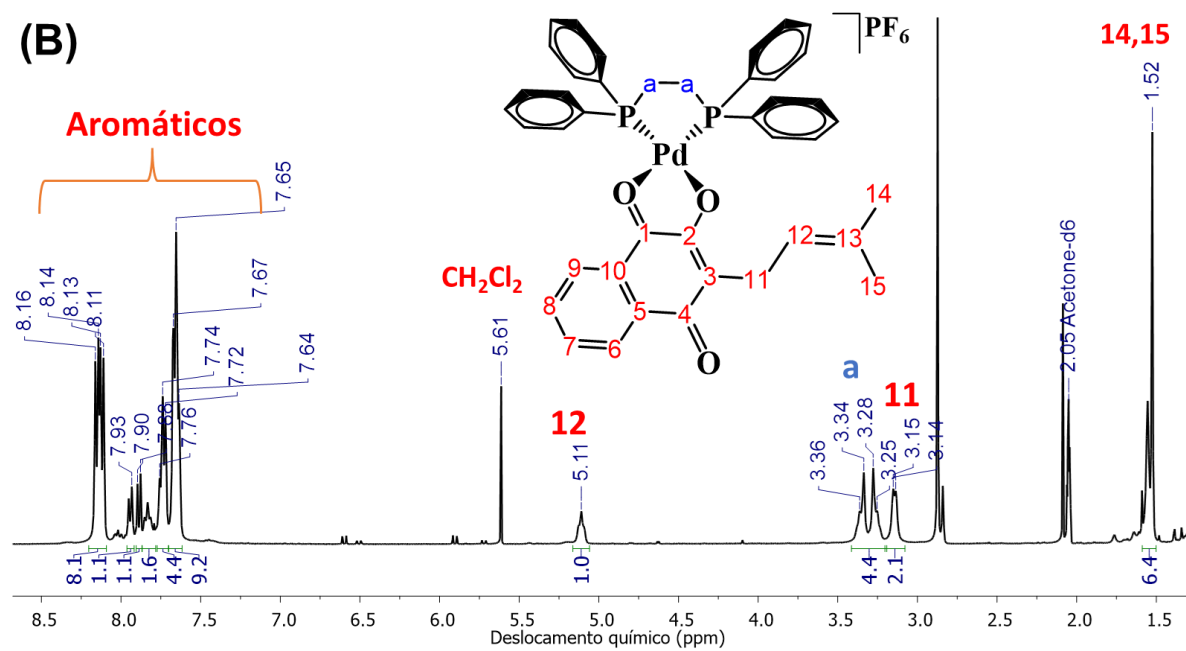
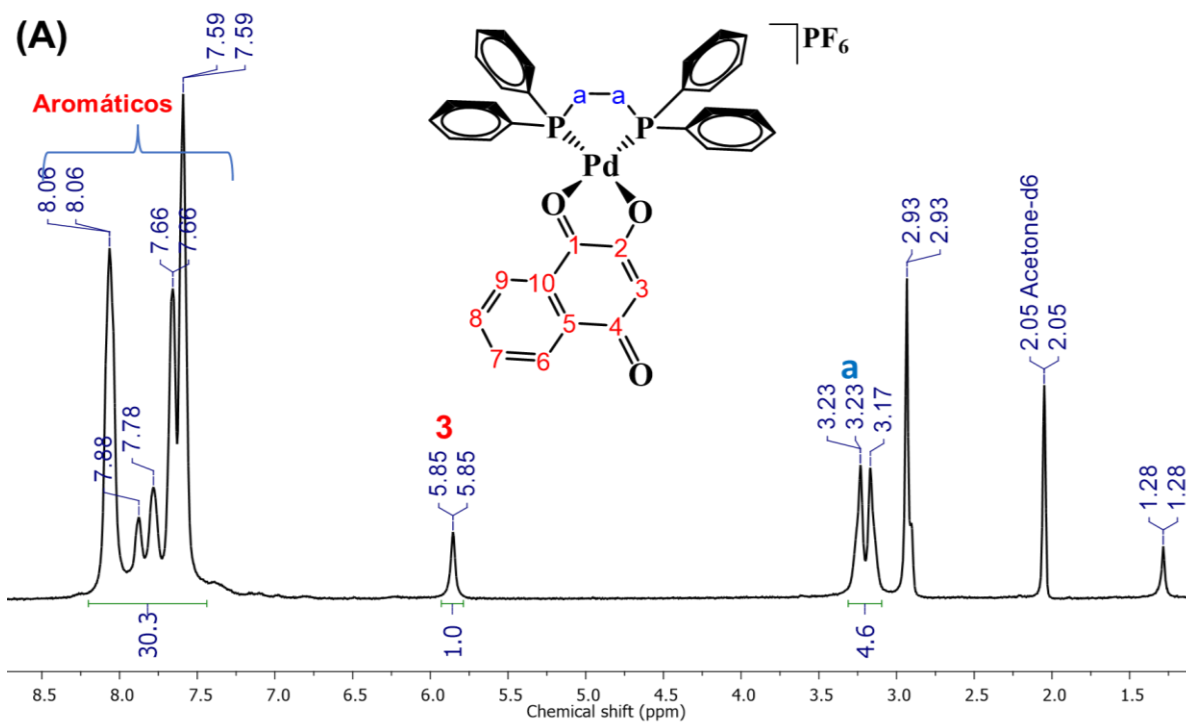


FIGURA A. 23. Espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos **B3** – $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lpm})]\text{PF}_6$ em diferentes temperaturas, em CD_2Cl_2 .



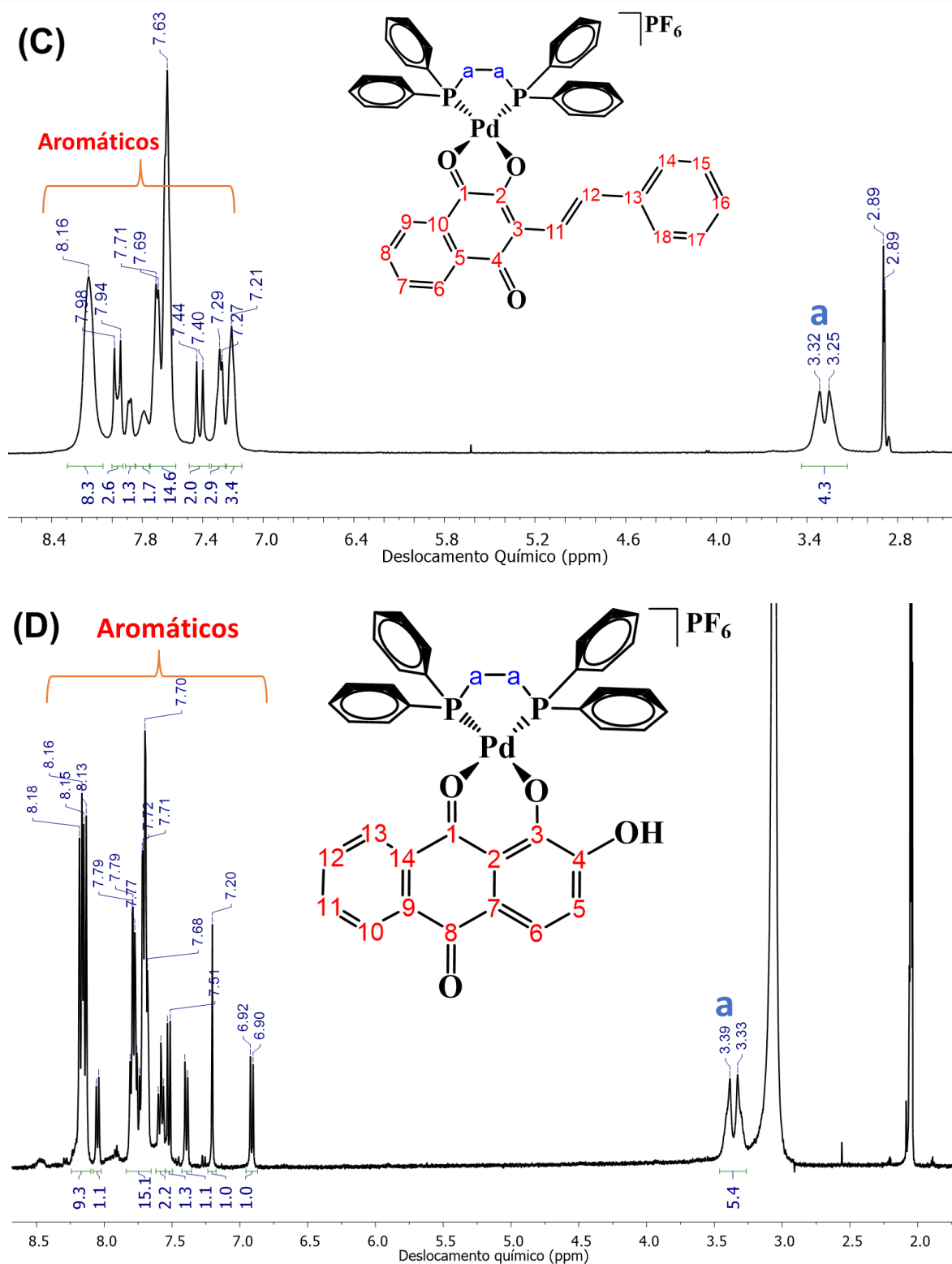
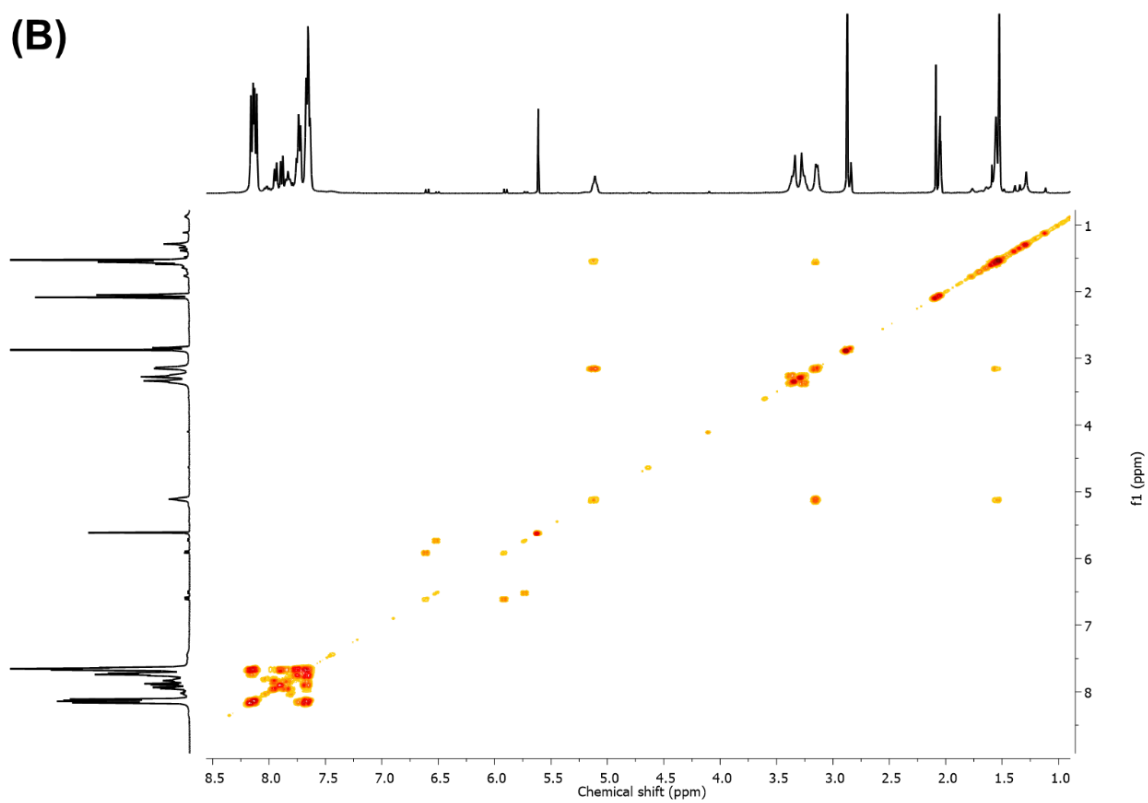
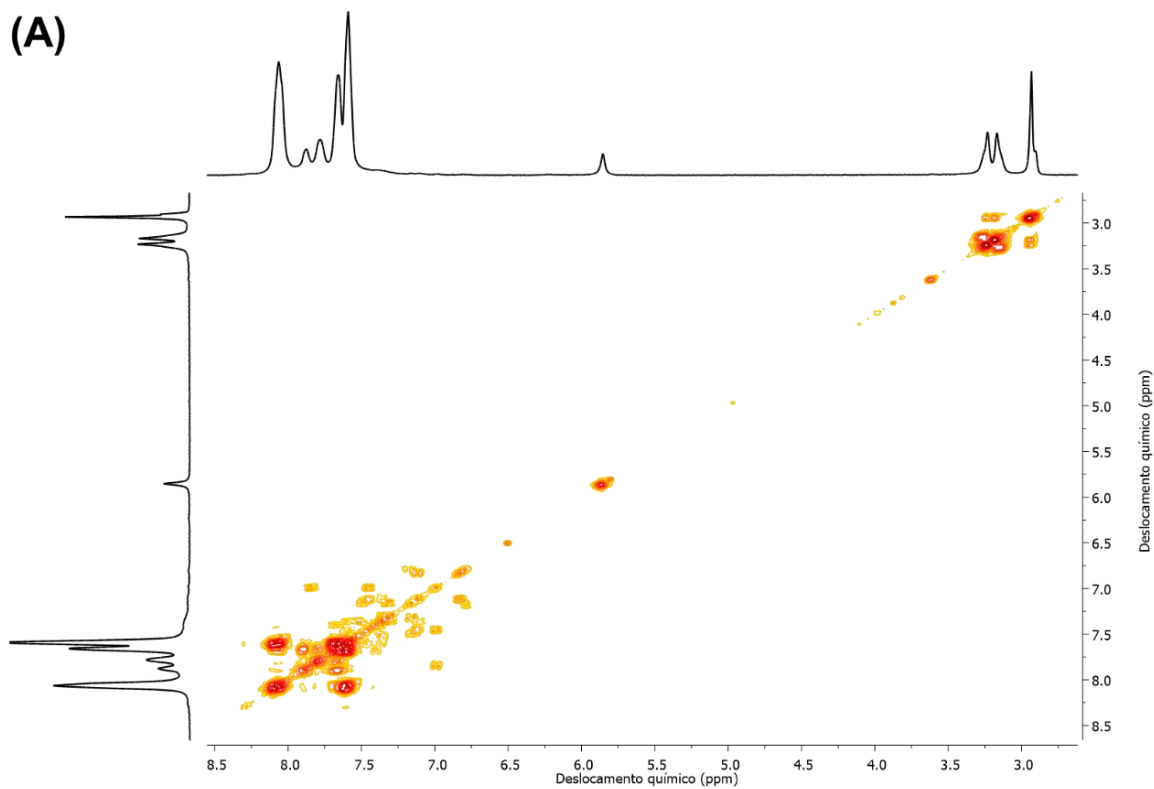


FIGURA A. 24. Espectros de RMN de ^1H dos complexos (A) **B1** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lau})]\text{PF}_6$; (B) **B2** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lap})]\text{PF}_6$; (C) **B3** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lpm})]\text{PF}_6$ e (D) **B4** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{ali})]\text{PF}_6$, em acetona- d_6 .



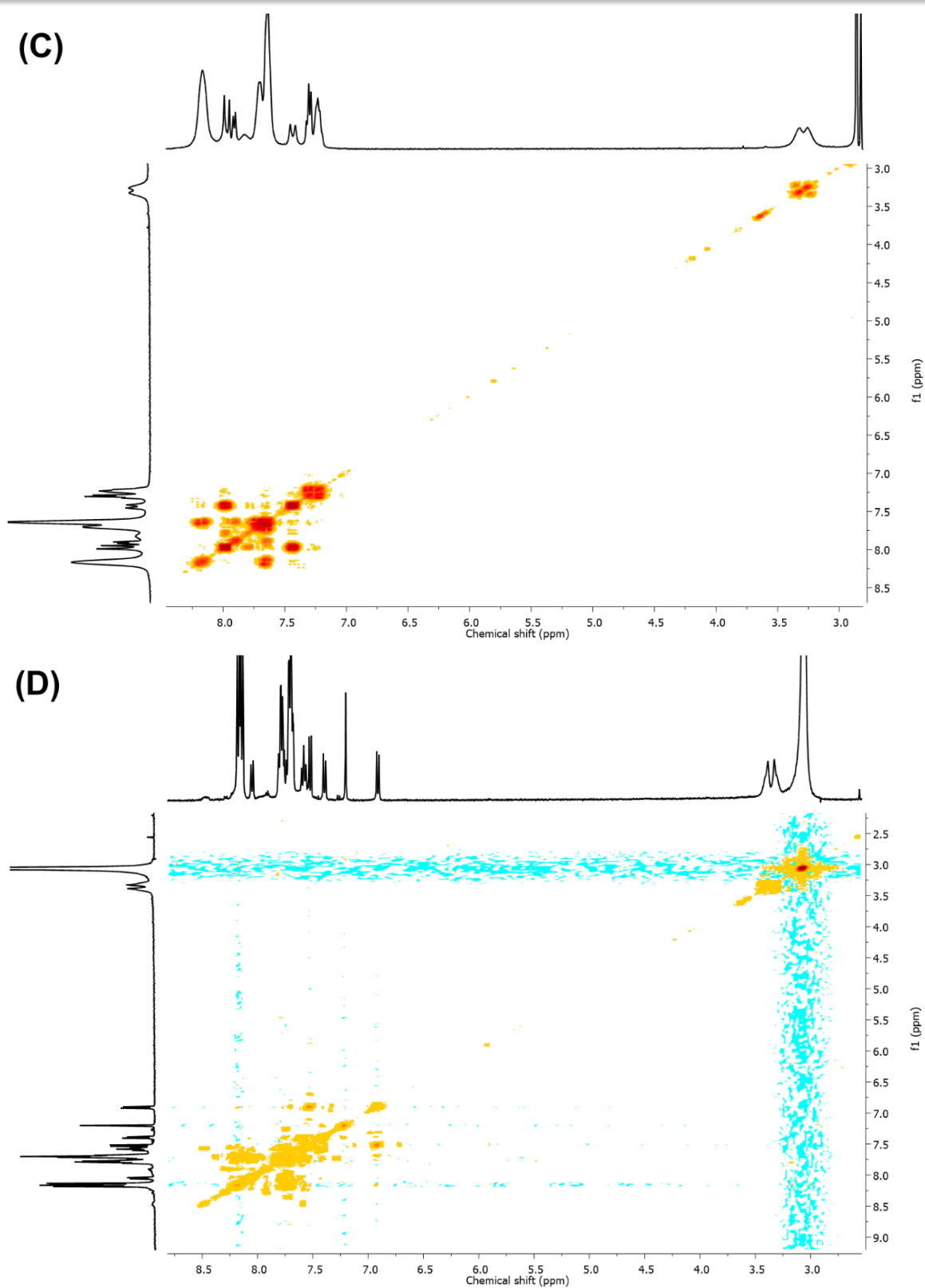
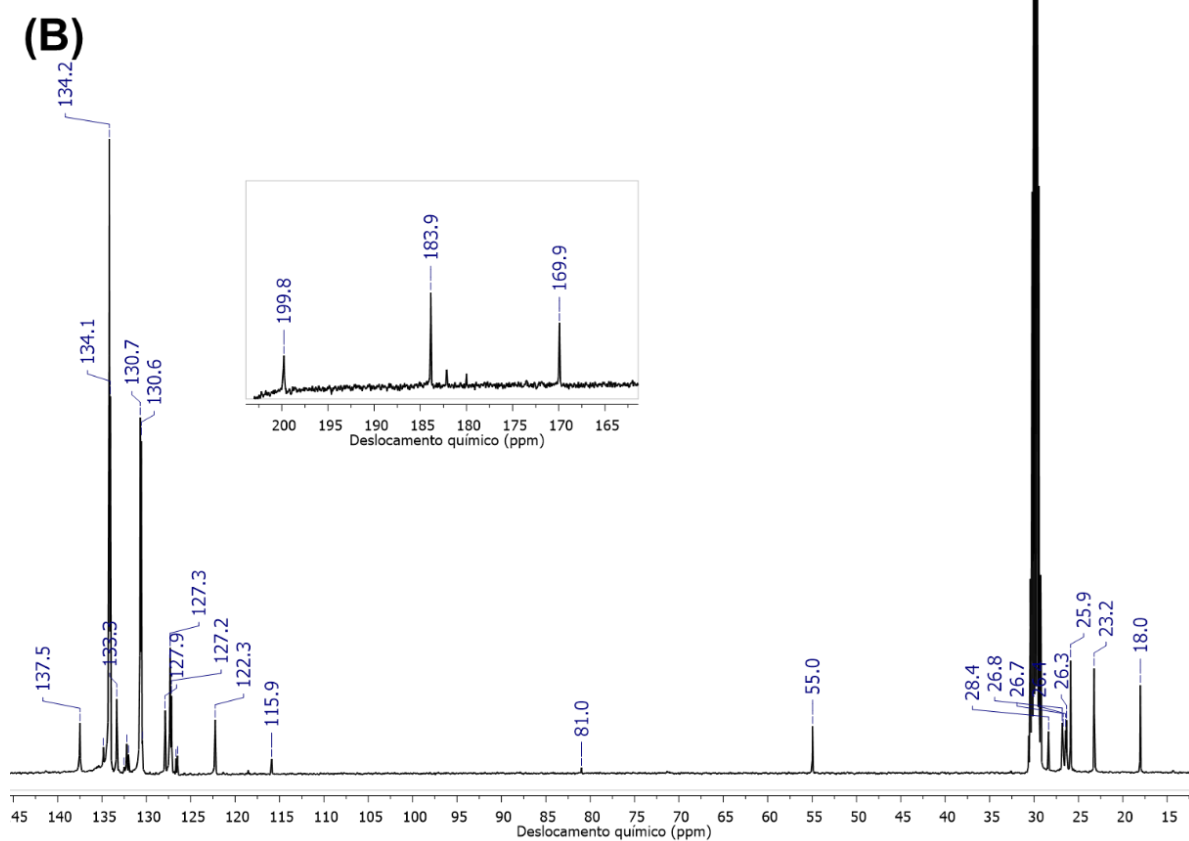
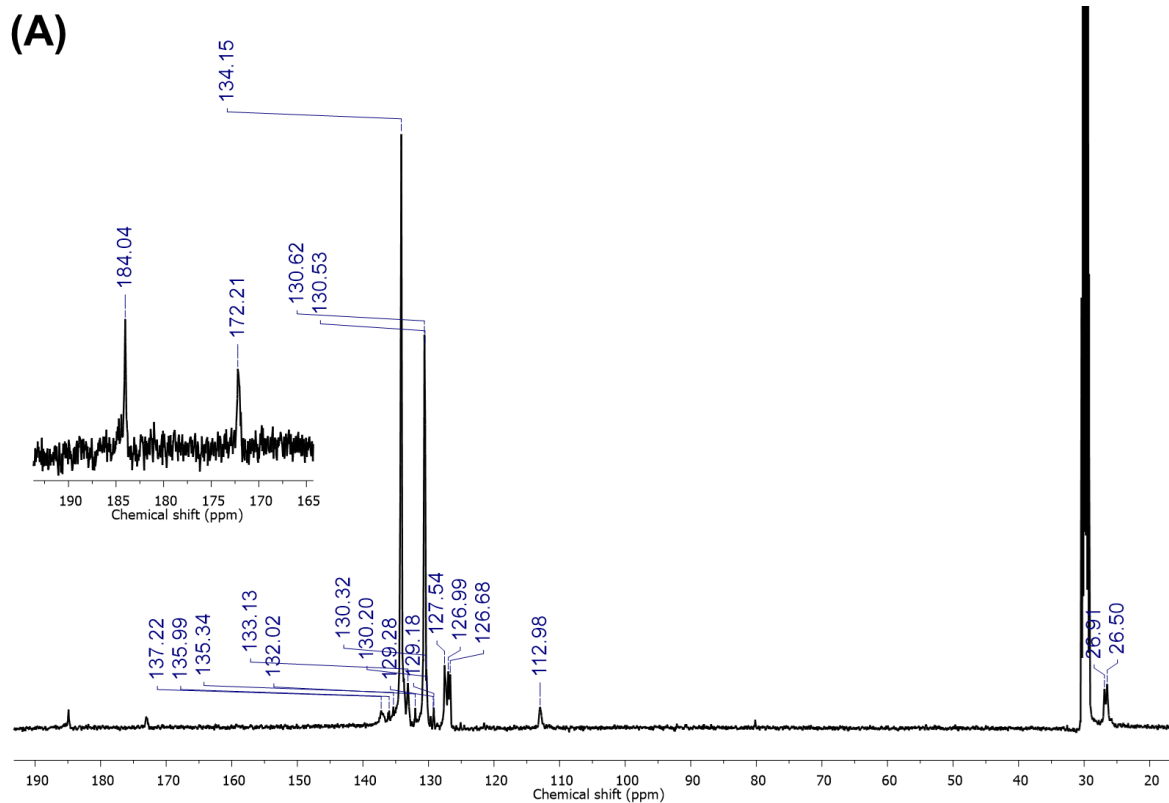


FIGURA A. 25. Mapas de correlação de RMN 2D: ^1H - ^1H COSY dos complexos (A) **B1** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lau})]\text{PF}_6$; (B) **B2** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lap})]\text{PF}_6$; (C) **B3** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lpm})]\text{PF}_6$ e (D) **B4** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{ali})]\text{PF}_6$, em acetona- d_6 .



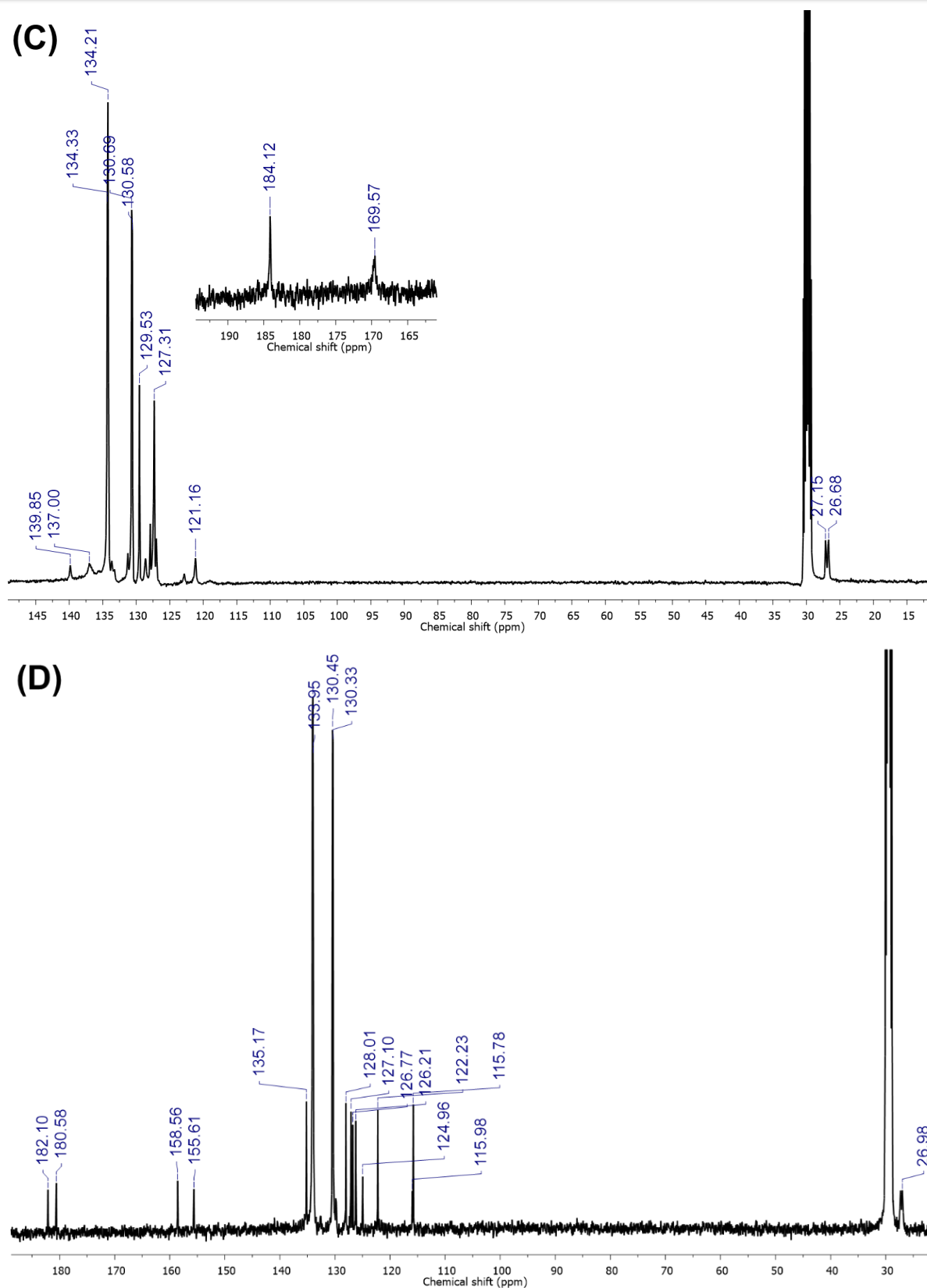
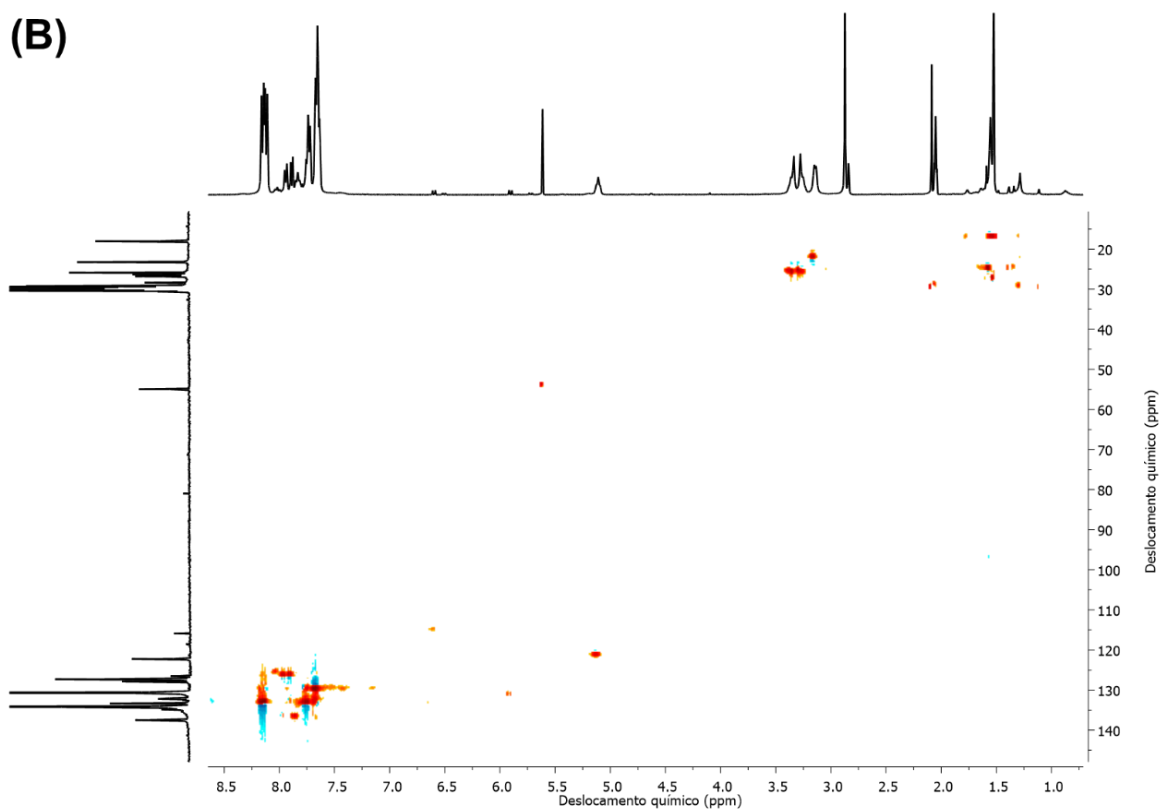
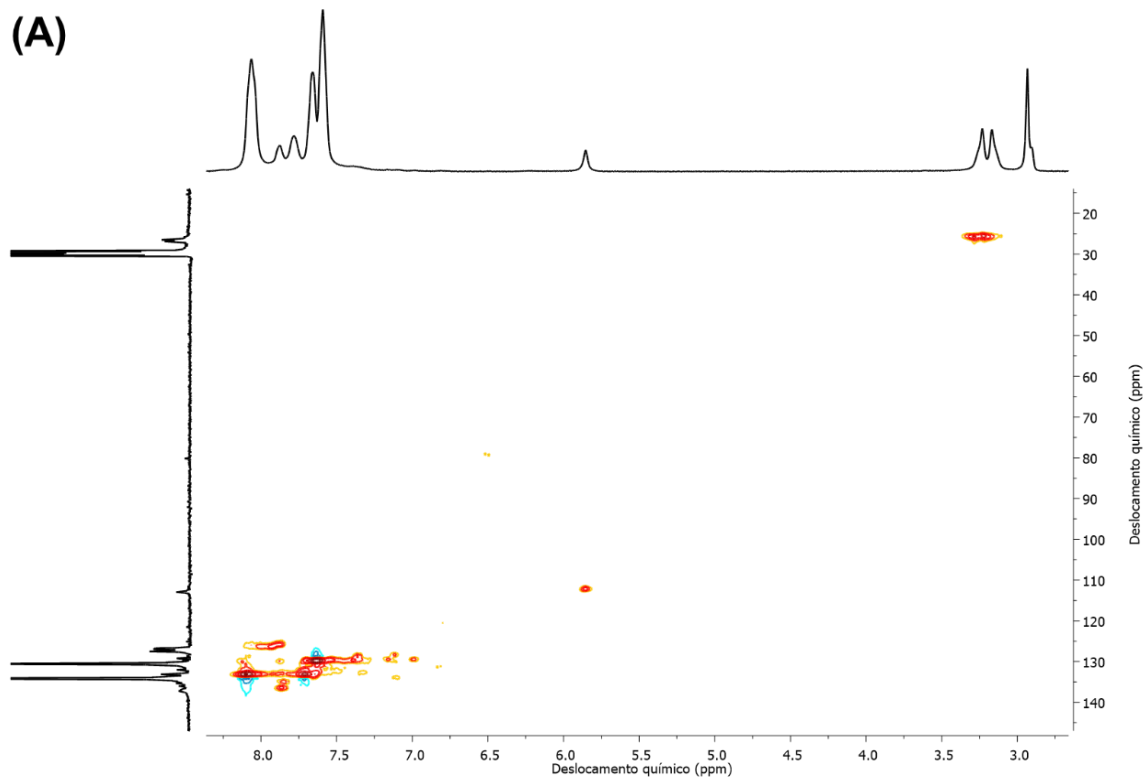


FIGURA A. 26. Espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos (A) **B1** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lau})]\text{PF}_6$; (B) **B2** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lap})]\text{PF}_6$; (C) **B3** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lpm})]\text{PF}_6$ e (D) **B4** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{ali})]\text{PF}_6$, em acetona- d_6 .



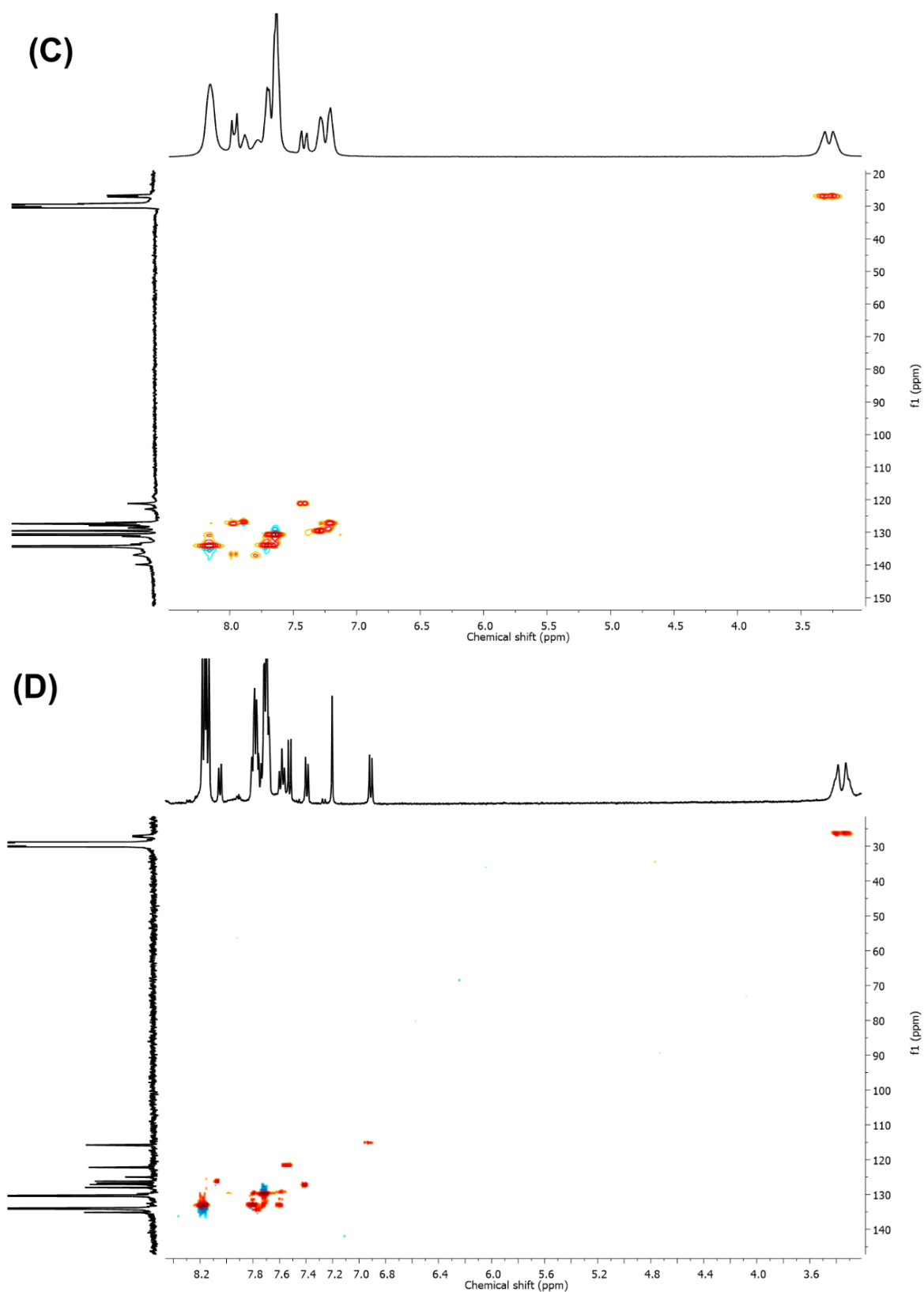
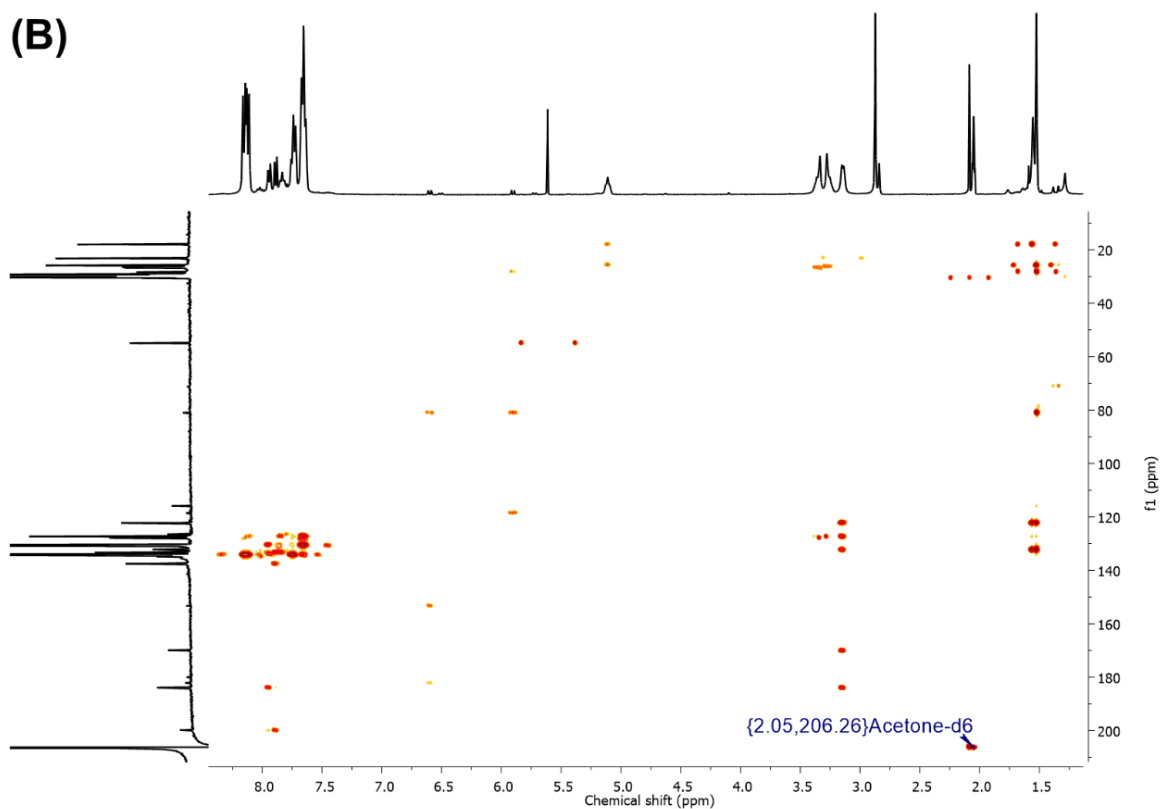
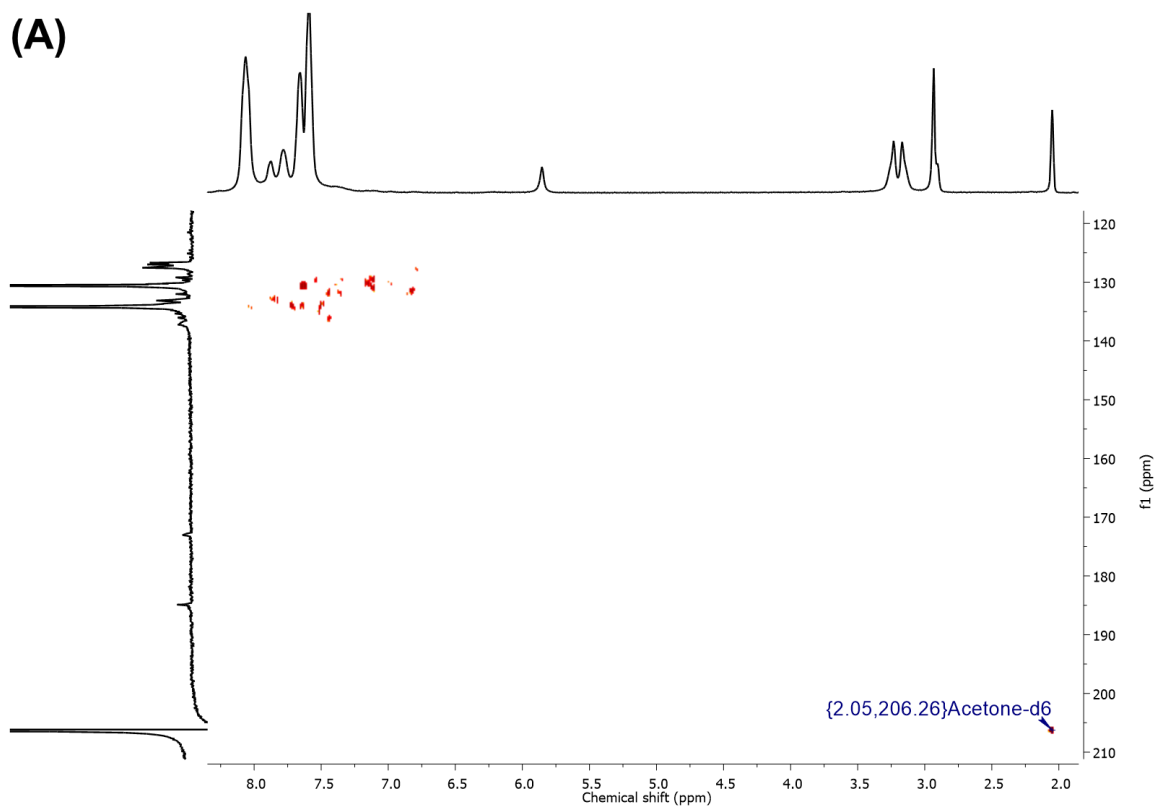


FIGURA A. 27. Mapas de correlação de RMN 2D: ^1H - ^{13}C HSQC dos complexos (A) **B1** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lau})]\text{PF}_6$; (B) **B2** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lap})]\text{PF}_6$; (C) **B3** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lpm})]\text{PF}_6$ e (D) **B4** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{ali})]\text{PF}_6$, em acetona- d_6 .



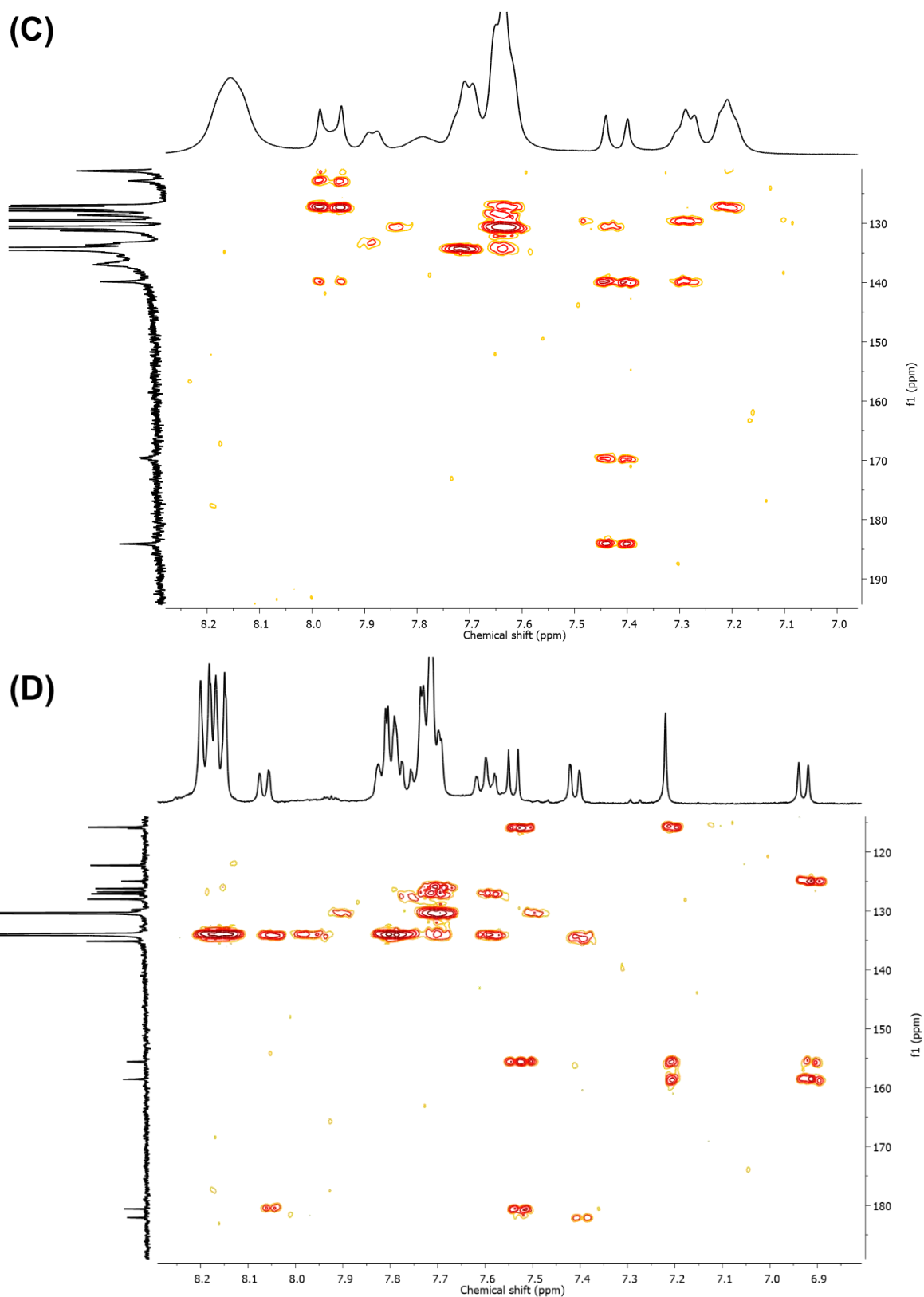
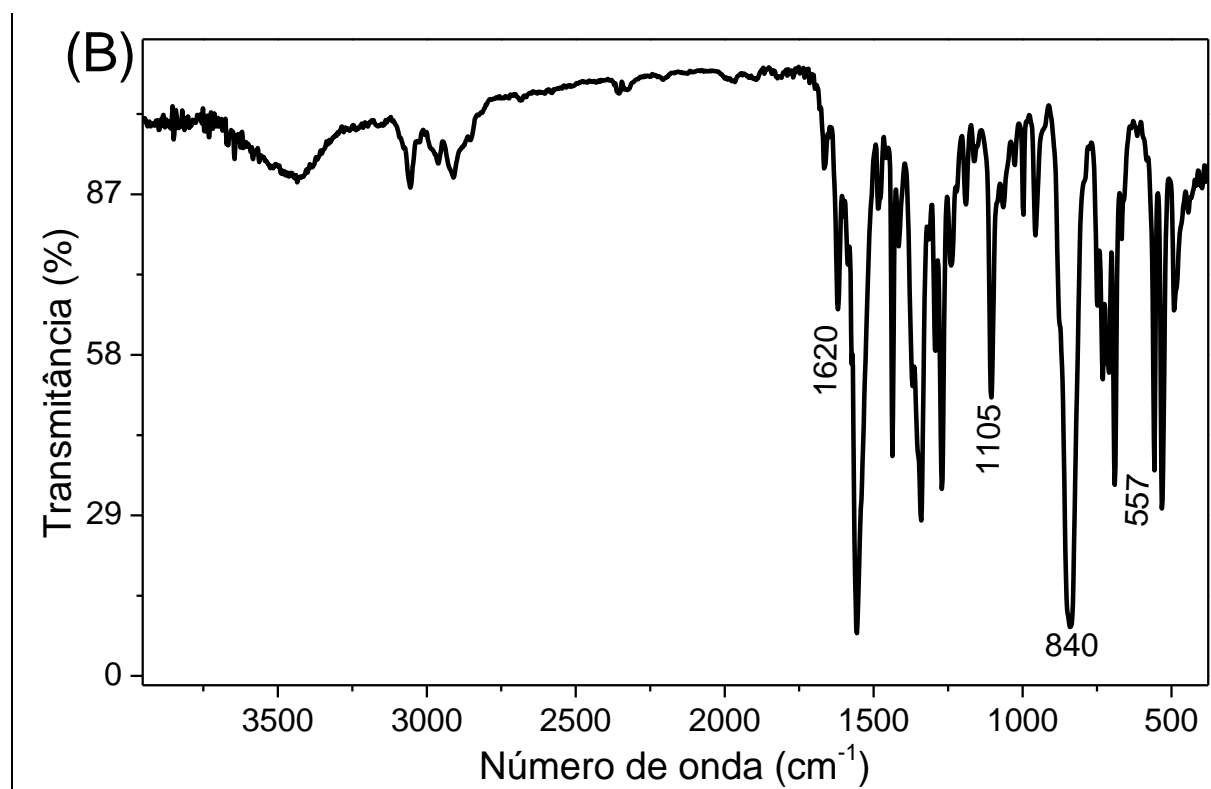
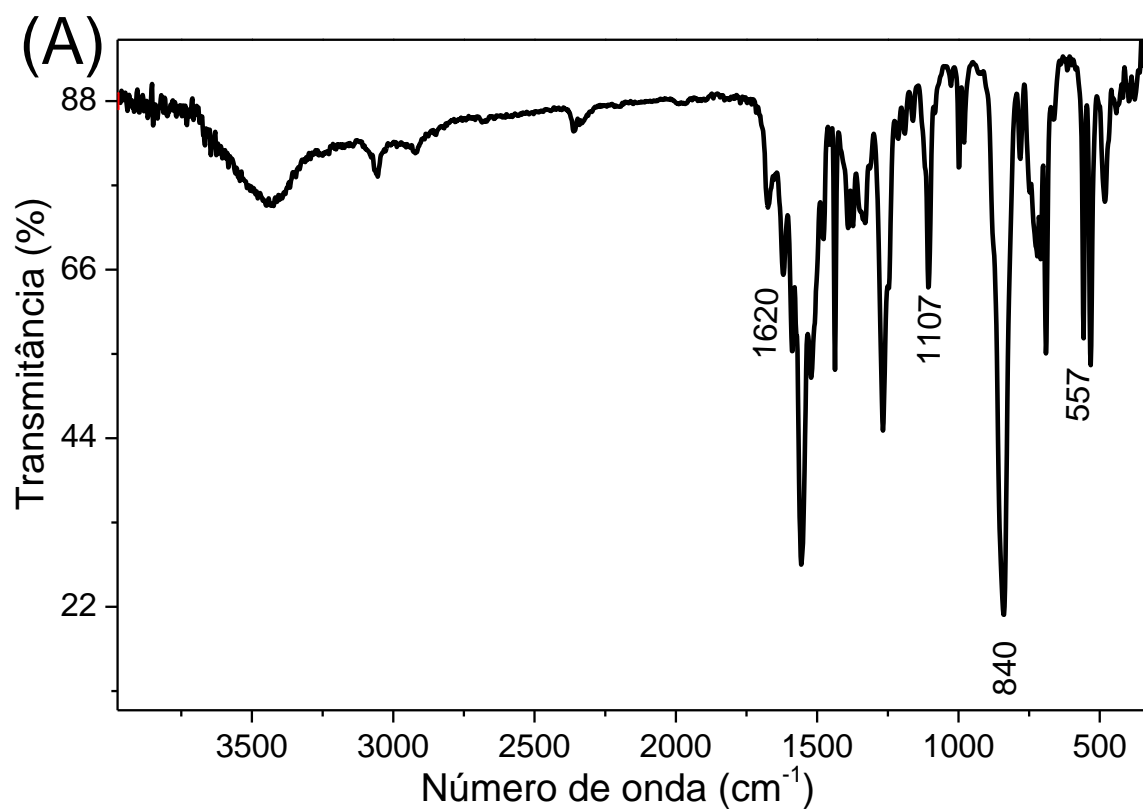


FIGURA A. 28. Mapas de correlação de RMN 2D: ^1H - ^{13}C HMBC dos complexos (A) **B1** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lau})]\text{PF}_6$; (B) **B2** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lap})]\text{PF}_6$; (C) **B3** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{lpm})]\text{PF}_6$ e (D) **B4** - $[\text{Pd}(\text{dppe})(\text{ali})]\text{PF}_6$, em acetona- d_6 .



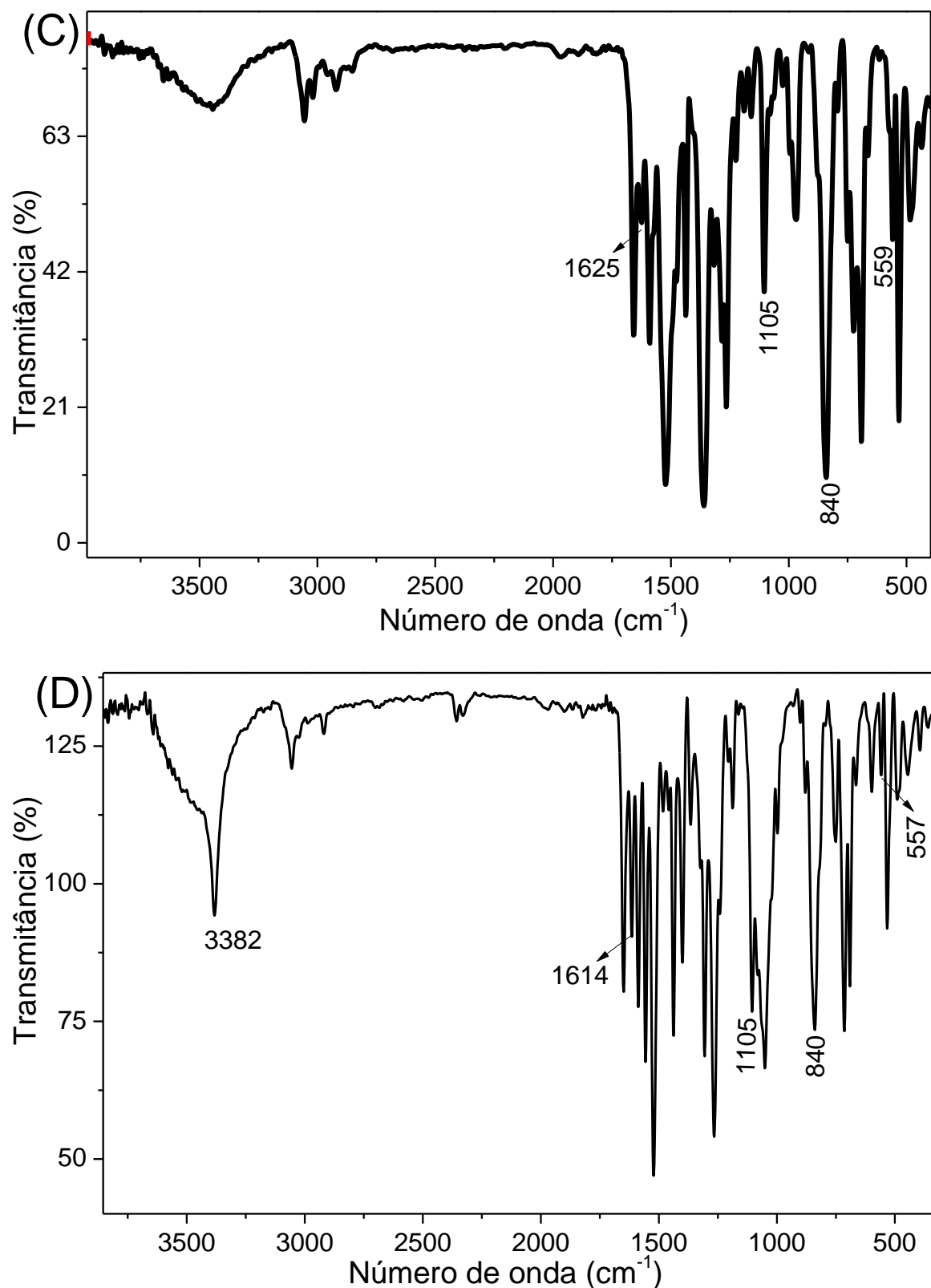


FIGURA A. 29. Espectros de absorção na região do infravermelho do complexos (A) **B1** - [Pd(dppe)(lau)]PF₆; (B) **B2** - [Pd(dppe)(lap)]PF₆; (C) **B3** - [Pd(dppe)(lpm)]PF₆ e (D) **B4** - [Pd(dppe)(ali)]PF₆ em pastilha de KBr.

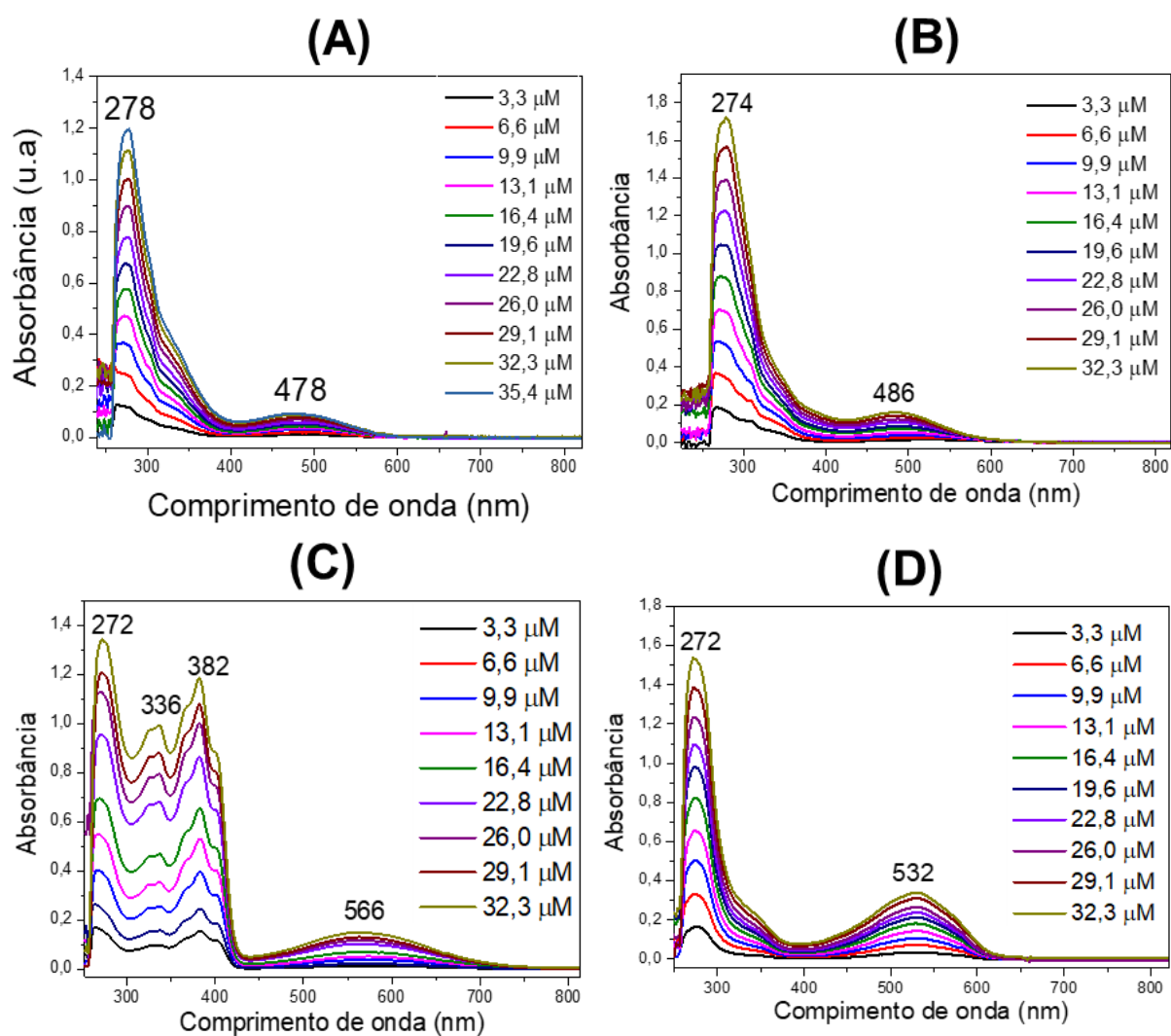


FIGURA A. 30. Espectros de UV-vis em diferentes concentrações dos complexos (A) **B1** - [Pd(dppe)(lau)]PF₆; (B) **B2** - [Pd(dppe)(lap)]PF₆; (C) **B3** - [Pd(dppe)(lpm)]PF₆ e (D) **B4** - [Pd(dppe)(ali)]PF₆, em DMSO.

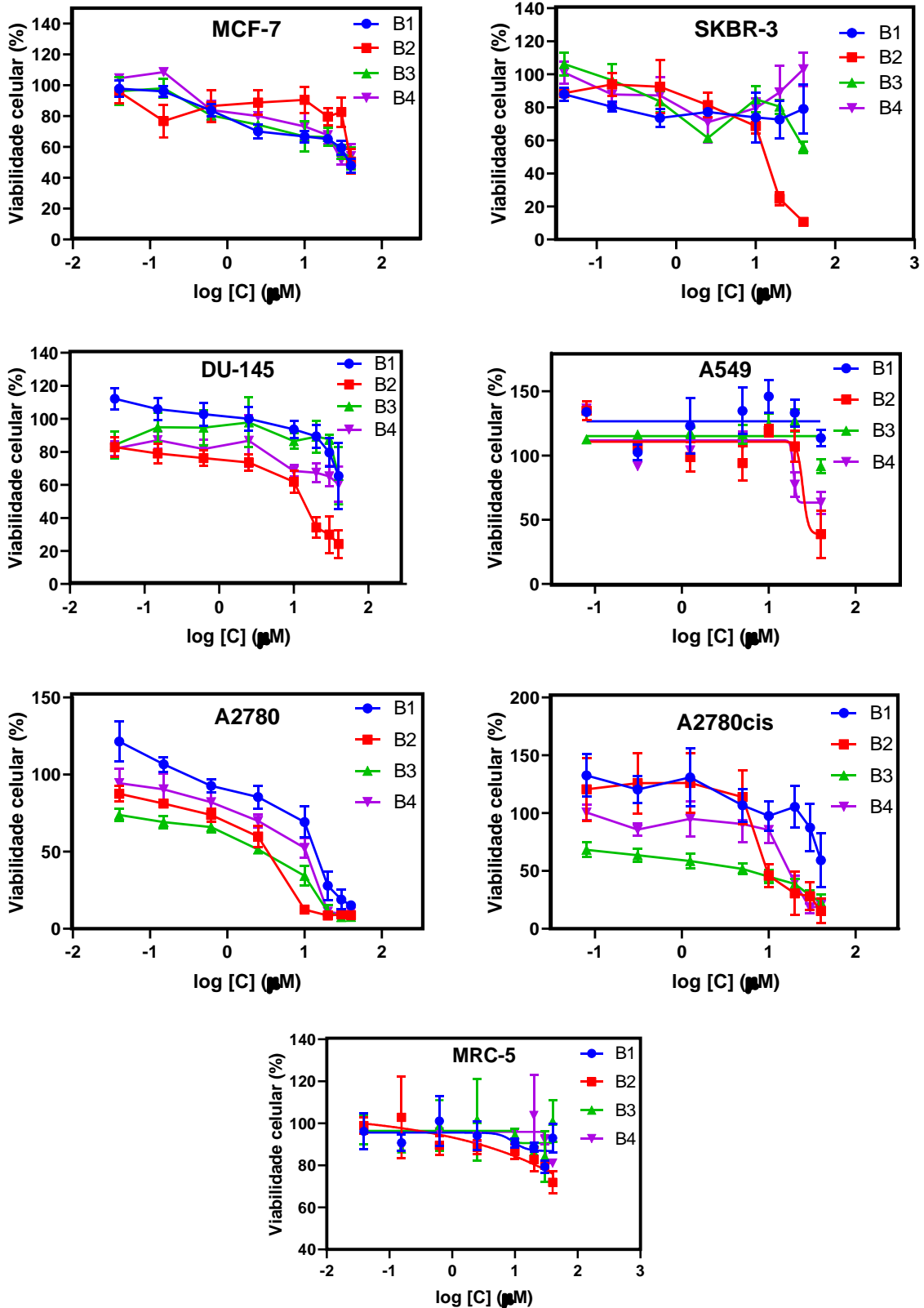


FIGURA A. 31. Curvas de concentração-resposta das células tumorais (MCF7, SKBR-3, A549, DU-145, A2780 e A2780cis) e célula não tumoral (MRC-5) após o tratamento com os complexos **B1-B4**, adicionados imediatamente após o preparo das soluções.

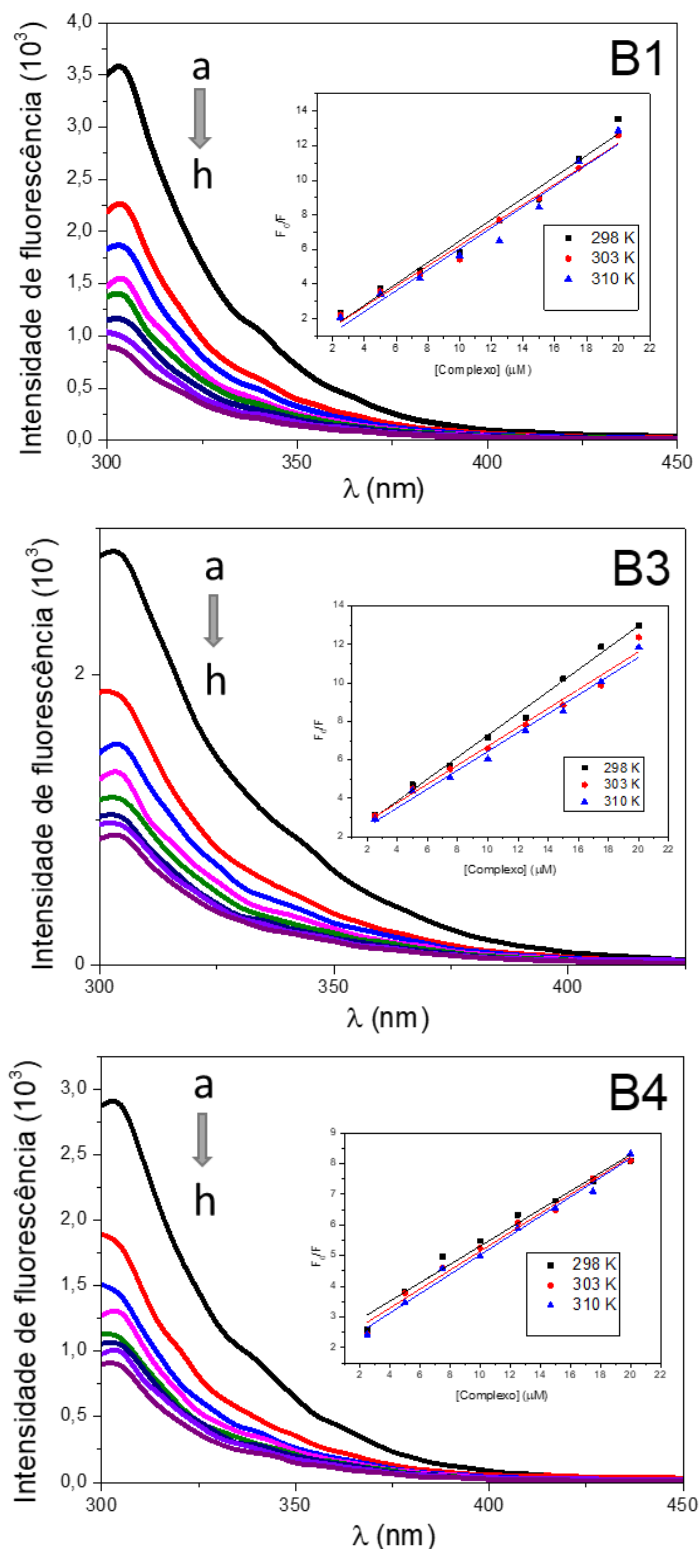


FIGURA A. 32. Espectros de fluorescência da HSA na ausência e presença dos compostos em diferentes razões [composto]/[HSA] (a = 0,5; b= 1,0; c = 1,5; d = 2,0; e = 2,5; f = 3,0; g = 3,5 e h= 4,0), com comprimento de onda de excitação a 270 nm, a 25°C em tampão Trisma-HCl: **B1** - $[Pd(dppe)(lau)]PF_6$; **B3** - $[Pd(dppe)(lpm)]PF_6$ e **B4** - $[Pd(dppe)(ali)]PF_6$. Gráficos de Stern-Volmer para supressão de fluorescência da HSA na presença dos compostos à 298, 303 e 310 K.

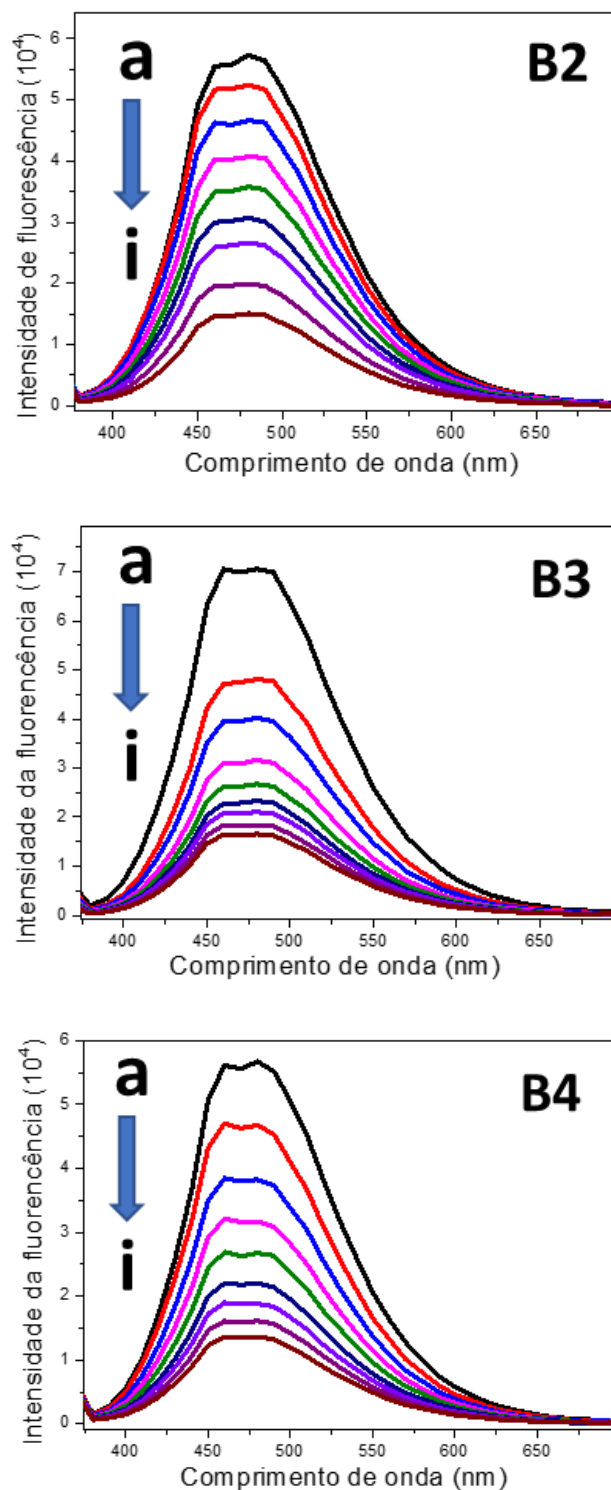


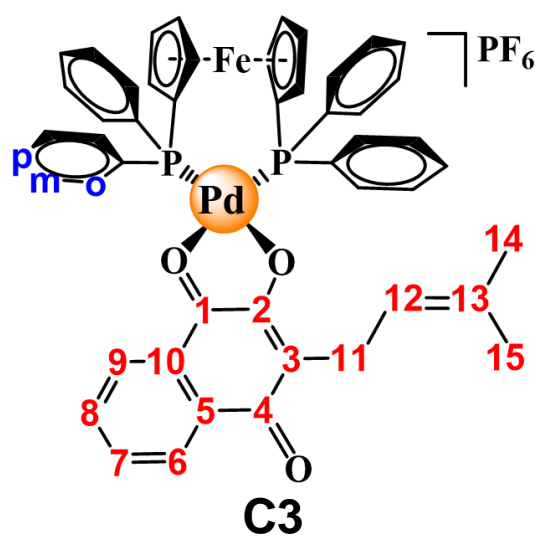
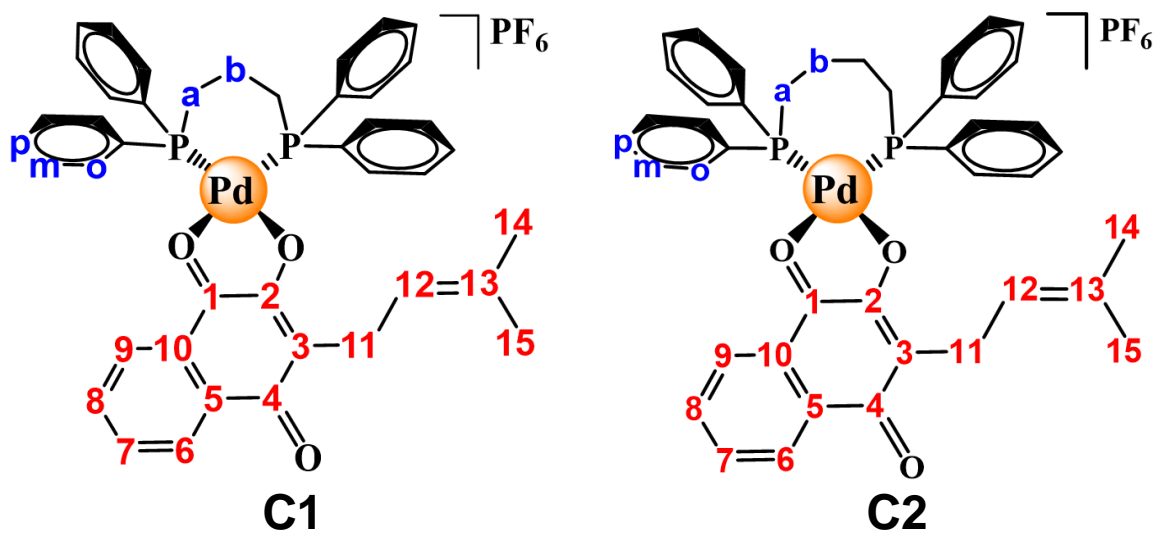
FIGURA A. 33. Espectros de supressão de fluorescência do DNA-Hoechst na ausência (a) e presença dos complexos **B2-B4** (b-i; b=7,5 μ M; c=15 μ M; d=22,5 μ M; e=30,0 μ M; f= 37,5 μ M; g=42,5 μ M e i= 50,0 μ M), concentração constante da DNA-Hoechst de 75 e 2,5 μ M, respectivamente. Comprimento de onda de excitação a 340 nm, a 25°C em tampão Trisma-HCl.

Parte III - Dados da Série C

C1 - [Pd(dppp)(lap)]PF₆: sólido roxo, rendimento 85%. Anal. (Calc.) para C₄₂H₃₉F₆O₃P₃Pd, C, 55,83 (55,74); H, 4,46 (4,34) %. Condutividade Molar (S cm² mol⁻¹, DMSO e CH₂Cl₂): 22,3 e 35,1. IR (KBr, ν /cm⁻¹): 1602 ν (C1=O), 1610 ν (C4=O), 1101 ν (C-O), 840 ν (P-F) e 557 δ (P-F). qTOF-MS m/z , calc. para C₄₂H₃₉O₃P₂Pd [M]⁺: 759,141; encontrada: 759,1425. RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 7,93 (dd; J = 12,5; 7,8 Hz; 8H; dppp Ph_{orto}); 7,88 (s; 1H; H(9)); 7,81 (t; J = 7,3 Hz; 2H; H(7, 8)); 7,67 (t; J = 7,0 Hz; 4H; dppp Ph_{para}); 7,57 (d; J = 7,3 Hz; 8H; dppp Ph_{meta}); 7,21 (d; J = 7,7 Hz; 1H; H(6)); 4,83 (t; J = 7,0 Hz; 1H; H(12)); 3,23 – 3,08 (m; 4H; alifáticos dppp(a)); 2,78 (d; J = 7,3 Hz; 2H; H(11)); 2,43 (t; J = 23,7 Hz; 2H; alifáticos dppp(b)); 1,53 e 1,41 (s; 6H; H(14, 15)). RMN ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂(D₂O)): 18,6 e 15,0 ppm (dd; J_{P-P} = 33,3 Hz).

C2 - [Pd(dppb)(lap)]PF₆: sólido roxo, rendimento 68%. Anal. (Calc.) para C₄₃H₄₁F₆O₃P₃Pd, C, 56,48 (56,19); H, 4,85 (4,50) %. Condutividade Molar (S cm² mol⁻¹, DMSO e CH₂Cl₂): 21,4 e 33,7. IR (KBr, ν /cm⁻¹): 1623 ν (C1=O), 1654 ν (C4=O), 1101 ν (C-O), 840 ν (P-F) e 557 δ (P-F). qTOF-MS m/z , calc. para C₄₃H₄₁O₃P₂Pd [M]⁺: 773,157; encontrada: 773,1587. RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 7,99 – 7,89 (s; 8H; dppb Ph_{orto}); 7,88 (d; J = 7,7 Hz; 1H; H(9)); 7,81 – 7,71 (m; 4H; dppb Ph_{para}); 7,67 – 7,56 (m; 8H; dppb Ph_{meta}); 7,53 (td; J = 7,6; 1,3 Hz; 2H; H(7, 8)); 6,95 (d; J = 6,2 Hz; 1H; H(6)); 4,88 (t; 1H; J = 7,0 Hz; H(12)); 3,26; 2,78; 2,41; 1,96 (s; 8H; CH₂ alifáticos); 2,90 (d; 2H; J = 7,3 Hz; H(11)); 1,54; 1,40 (s; 6H; H(14,15)). RMN ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂(D₂O)): 37,3 e 30,3 ppm (dd; J_{P-P} = 38,5 Hz).

C3 - [Pd(dppf)(lap)]PF₆: sólido roxo, rendimento 75%. Anal. (Calc.) para C₄₉H₄₁F₆FeO₃P₃Pd, C, 56,34 (56,21); H, 3,97 (3,95) %. Condutividade Molar (S cm² mol⁻¹, DMSO): 25,7. IR (KBr, ν /cm⁻¹): 1620 ν (C1=O1), 1654 ν (C4=O4), 1097 ν (C-O), 844 ν (P-F) e 557 δ (P-F). qTOF-MS m/z , calc. para C₄₉H₄₁FeO₃P₂Pd [M]⁺: 901,092; encontrada: 901,0950. RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 8,12 (dd; J = 13,1; 7,7 Hz; 4H; dppf Ph_{para}); 7,97 – 7,76 (m; 10H; dppf Ph_{orto} e H(7,8)); 7,71 – 7,58 (m; 8H; dppf Ph_{meta}); 7,55 (td; J = 7,6; 1,3 Hz; 1H; H(9)); 6,91 (dd; J = 7,7; 0,7 Hz; 1H; H(6)); 5,36; 4,97; 4,74; 4,21 (s, 8H, ferroceno); 4,71 (s; 1H; H(12)); 2,72 (d; J = 7,2 Hz; 2H; H(11)); 1,51 e 1,33 (s; 6H; H(14,15)). RMN ³¹P{¹H} (CH₂Cl₂(D₂O)): 44,6 e 42,5 ppm (dd; J_{P-P} = 2,6 Hz).



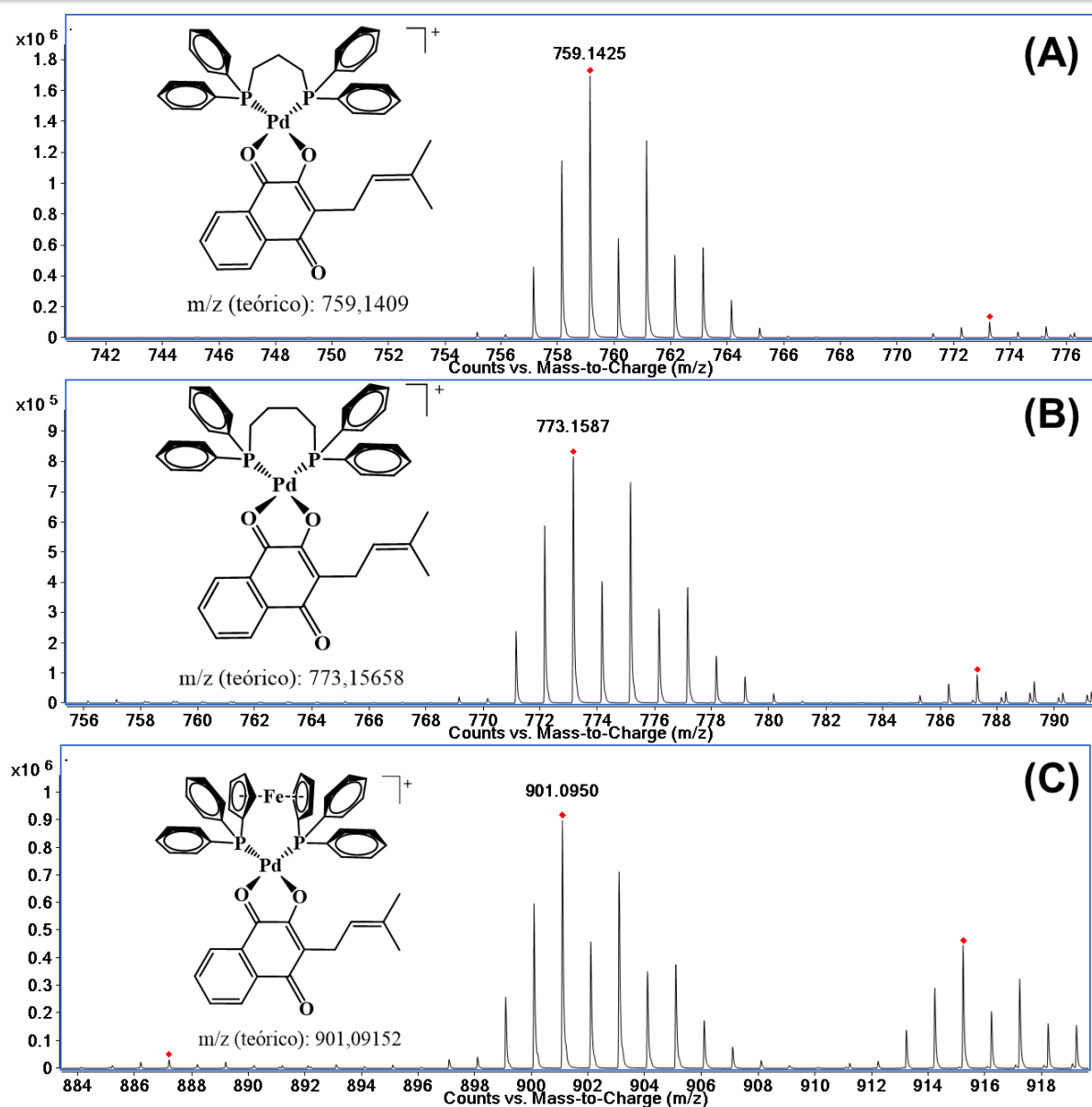


FIGURA A. 34. Espectro de massas dos complexos (A) **C1** - [Pd(dppp)(lap)]PF₆; (B) **C2** - [Pd(dppb)(lap)]PF₆ e (C) **C3** - [Pd(dppf)(lap)]PF₆.

TABELA A. 4. Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento das estruturas obtidas para os complexos **C2** - [Pd(dppb)(lap)]PF₆ e **C3** - [Pd(dppf)(lap)]PF₆.

	C2	C3
Fórmula Empírica	C ₄₃ H ₄₁ F ₆ O ₃ P ₃ Pd	C ₄₉ H ₄₁ FeO ₃ P ₂ Pd
Massa molecular	919,130	902,01
Temperatura/K	293	100
Sistema Cristalino	monoclínico	monoclínico
Grupo espacial	I2/a	P2 ₁ /c
a/Å	26,131(2)	9,69490(10)
b/Å	8,7171(7)	28,6105(2)
c/Å	37,334(3)	16,31870(10)
α/°	90	90
β/°	93,321(7)	102,4070(10)
γ/°	90	90
Volume/Å ³	8490,0(11)	4420,70(6)
Z	8	4
ρ _{calc} /cm ³	1,438	1,355
μ/mm ⁻¹	0,614	6,904
F(000)	3740,7	1844,0
Tamanho do Cristal /mm ³	0,401 × 0,084 × 0,053	0,179 × 0,139 × 0,034
Radiação	Mo Kα (λ = 0,71073)	Cu Kα (λ = 1,54184)
Faixa 2θ da coleta de dados/°	4,92 à 51,5	9,34 à 140,098
Intervalo de índices	-39 ≤ h ≤ 41, -12 ≤ k ≤ 13, -57 ≤ l ≤ 57	-11 ≤ h ≤ 11, -34 ≤ k ≤ 33, -19 ≤ l ≤ 19
Refleções coletadas	80138 8127	73349 8379
Refleções Independentes	[R _{int} = 0,2117, R _{sigma} = 0,2444]	[R _{int} = 0,0632, R _{sigma} = 0,0312]
Dados/restrições/parâmetros	8127/136/455	8379/0/507
Melhor ajuste de F ²	1,045	1,053
Índices R finais [I ≥ 2σ (I)]	R ₁ = 0,0659, wR ₂ = 0,1460	R ₁ = 0,0389, wR ₂ = 0,0952
Índices R finais [todos os dados]	R ₁ = 0,1272, wR ₂ = 0,1855	R ₁ = 0,0419, wR ₂ = 0,0969
Maior diferença Pico/vale / e.Å ⁻³	0,96/-1,00	1,01/-0,66
Parâmetro Flack		

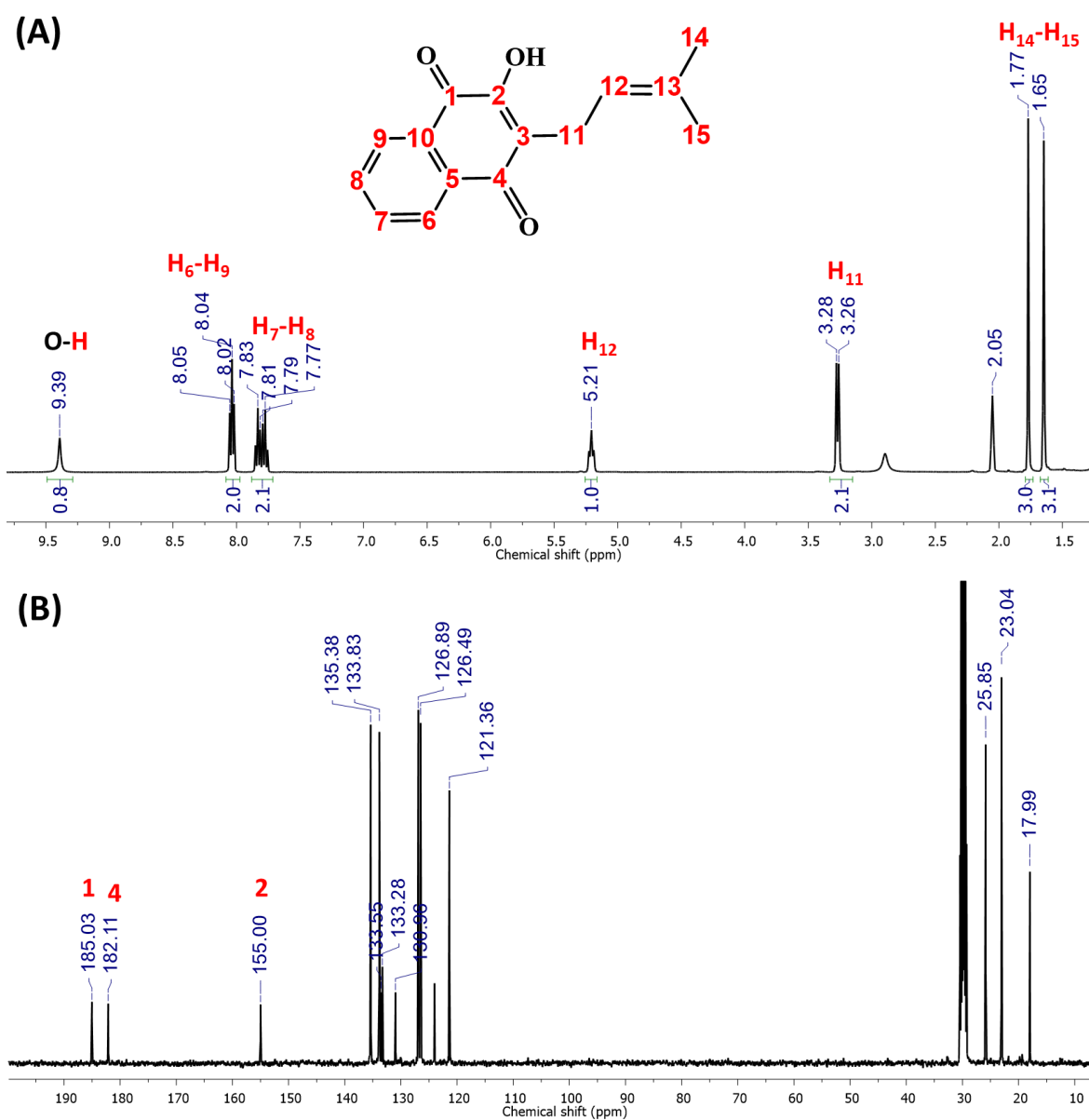


FIGURA A. 35. Espectro de (A) RMN ^1H e (B) RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do lapachol, em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

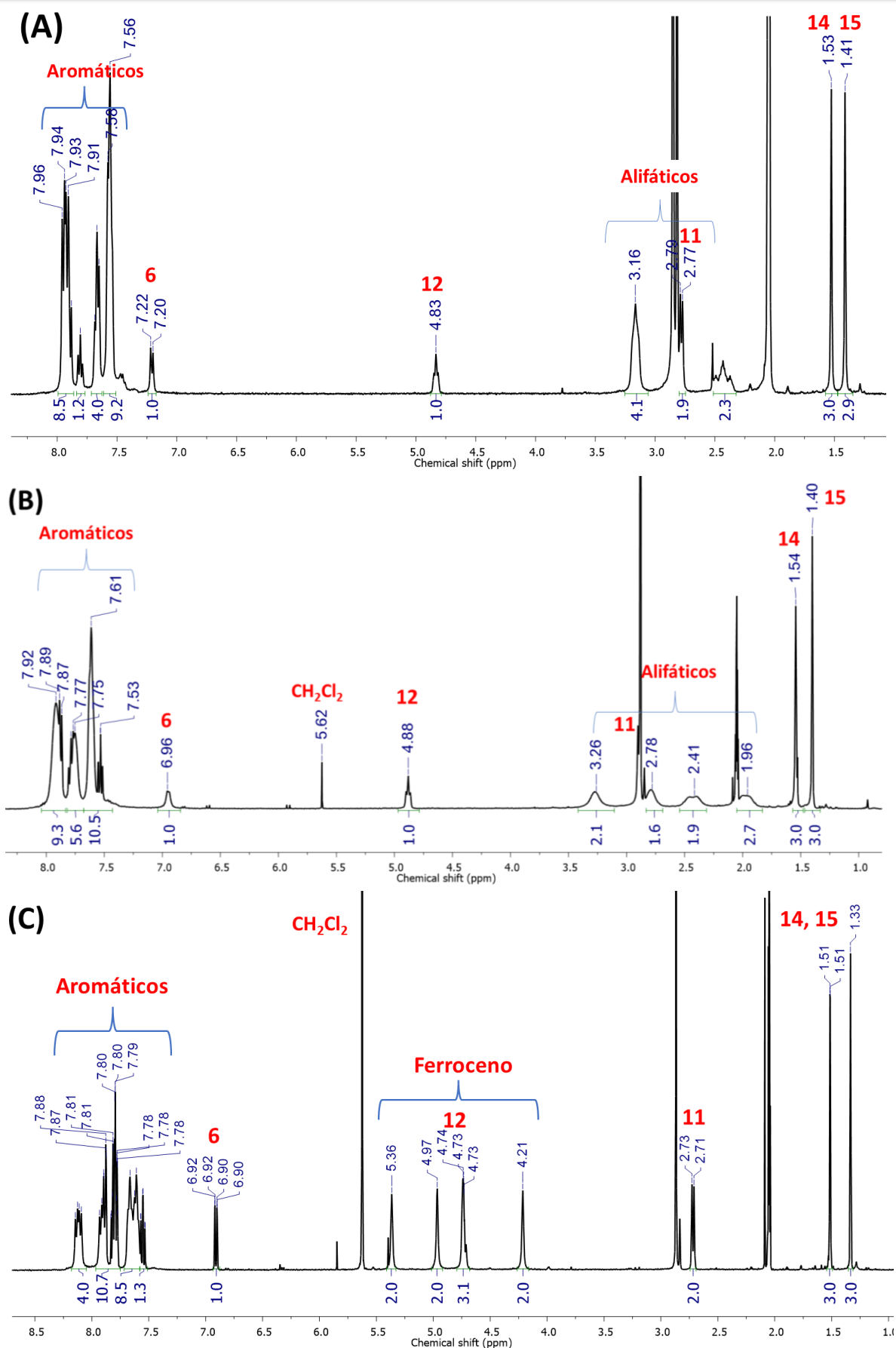


FIGURA A. 36. Espectros de RMN ^1H dos complexos (A) **C1** - $[\text{Pd}(\text{dppp})(\text{lap})]\text{PF}_6$; (B) **C2** - $[\text{Pd}(\text{dppb})(\text{lap})]\text{PF}_6$ e (C) **C3** - $[\text{Pd}(\text{dppf})(\text{lap})]\text{PF}_6$, em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

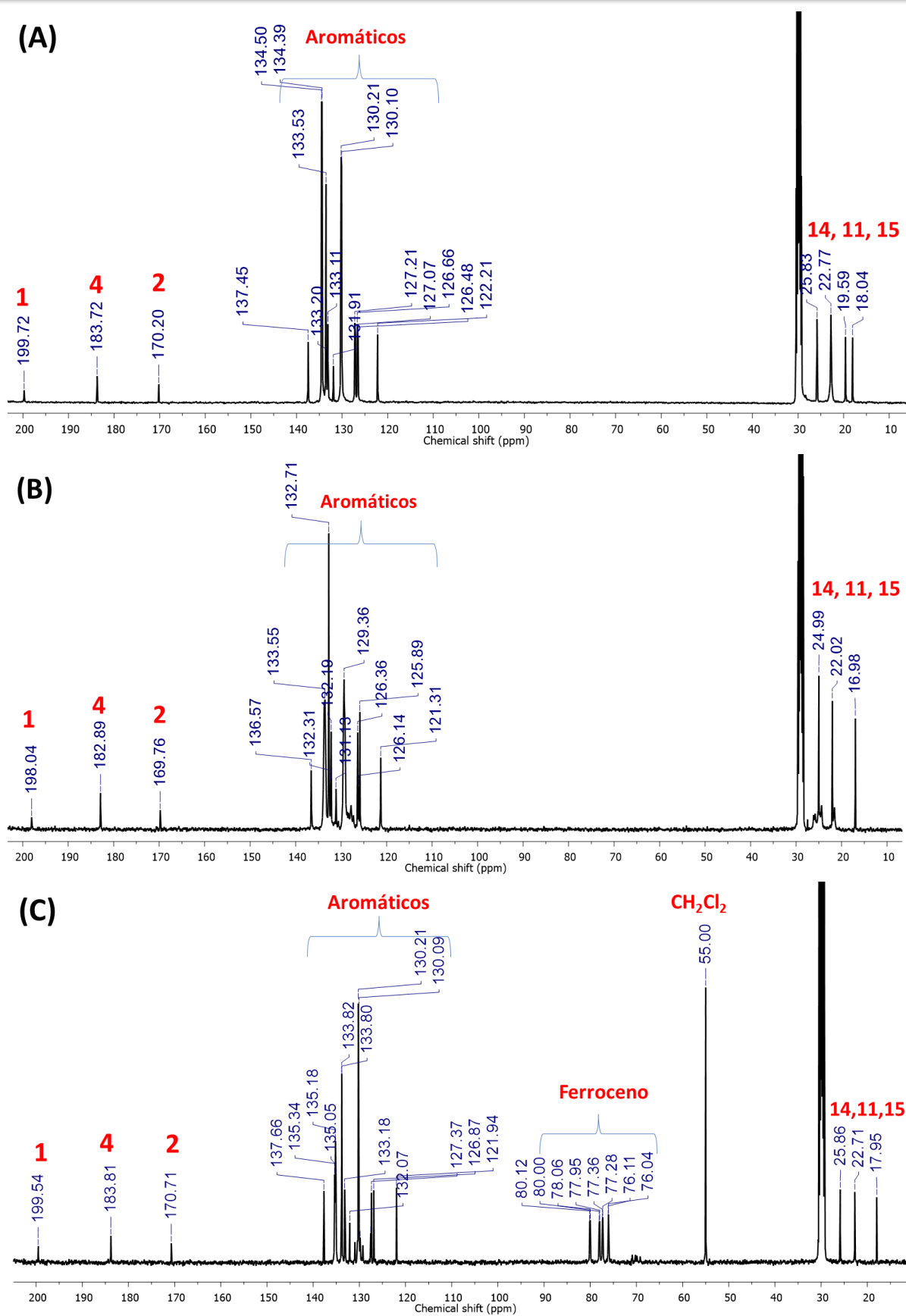
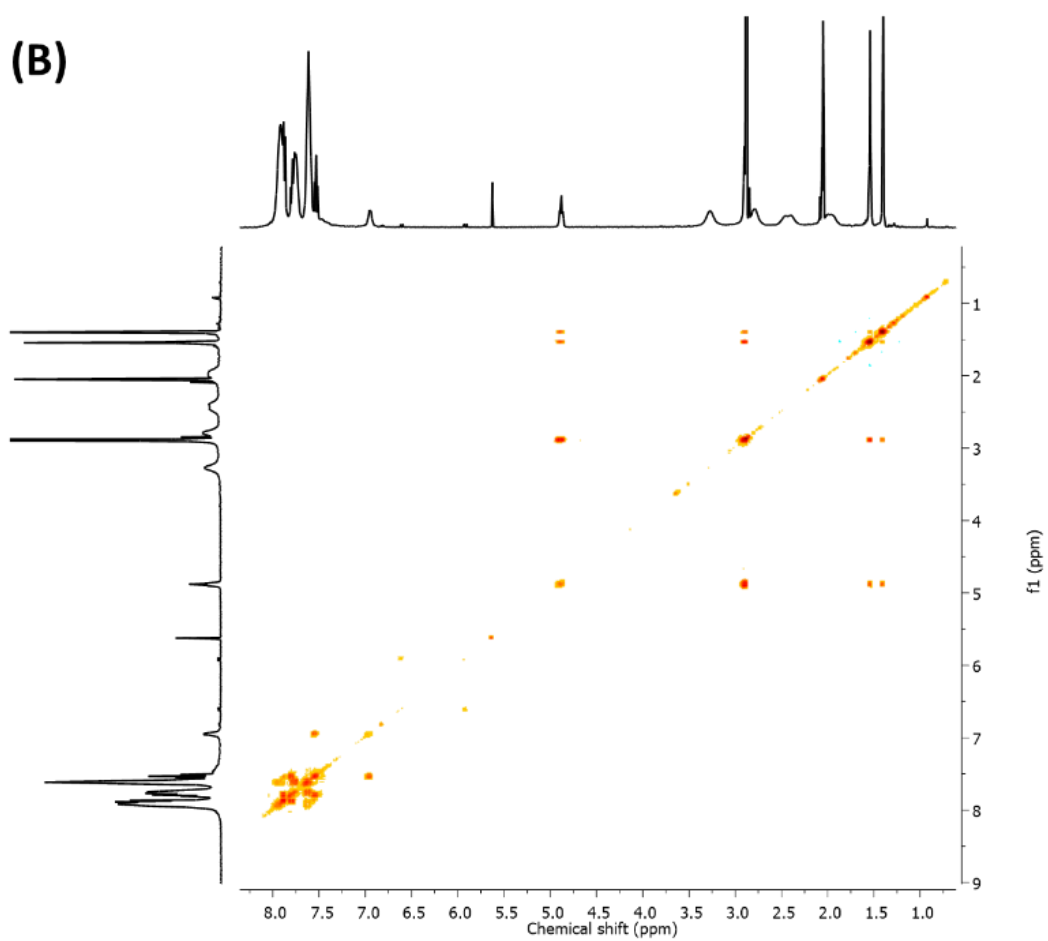
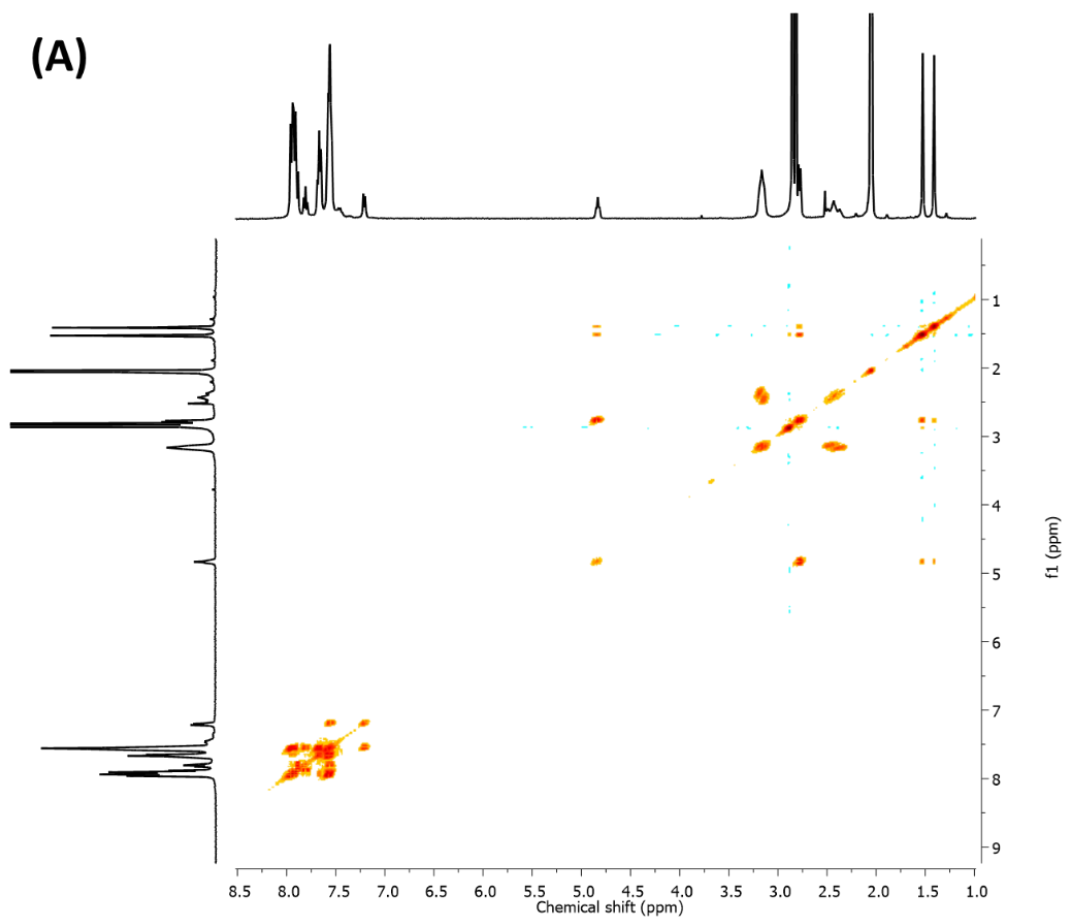


FIGURA A. 37. Espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos (A) **C1** - $[\text{Pd}(\text{dppp})(\text{lap})]\text{PF}_6$; (B) **C2** - $[\text{Pd}(\text{dppb})(\text{lap})]\text{PF}_6$ e (C) **C3** - $[\text{Pd}(\text{dppf})(\text{lap})]\text{PF}_6$, em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.



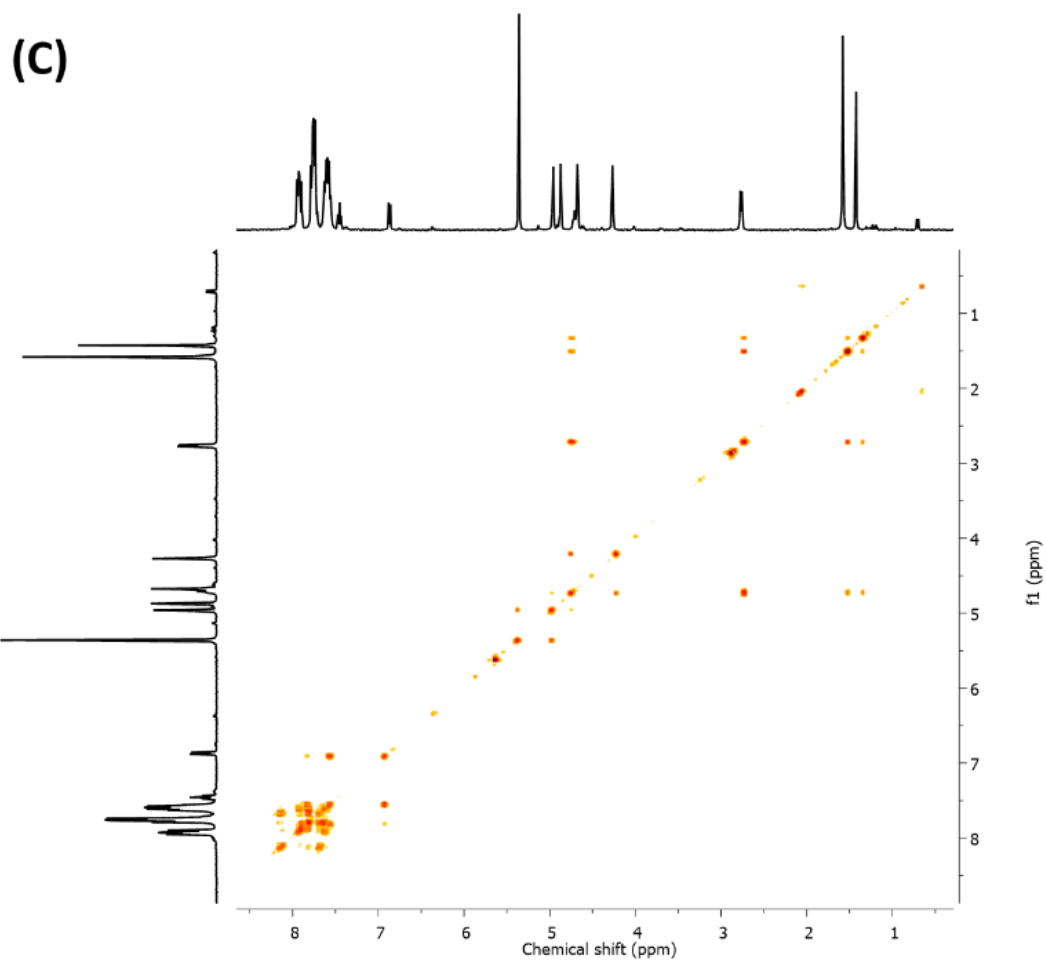
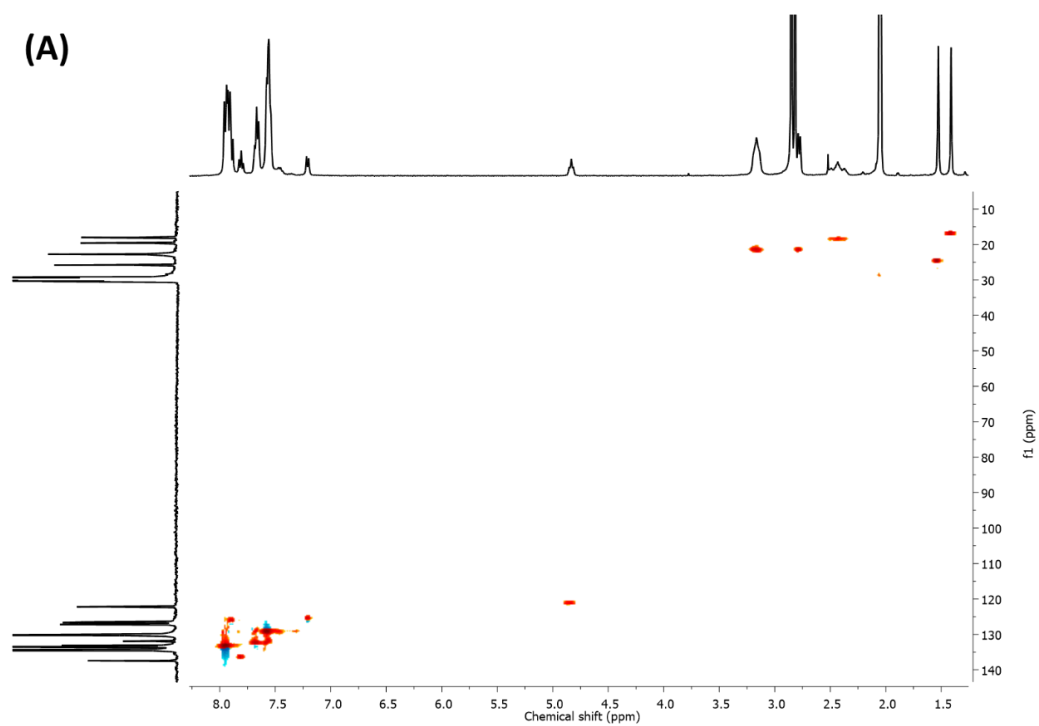


FIGURA A. 38. Mapas de correlação de RMN 2D: ^1H - ^1H COSY dos complexos (A) **C1** - $[\text{Pd}(\text{dppp})(\text{lap})]\text{PF}_6$; (B) **C2** - $[\text{Pd}(\text{dppb})(\text{lap})]\text{PF}_6$ e (C) **C3** - $[\text{Pd}(\text{dppf})(\text{lap})]\text{PF}_6$, em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.



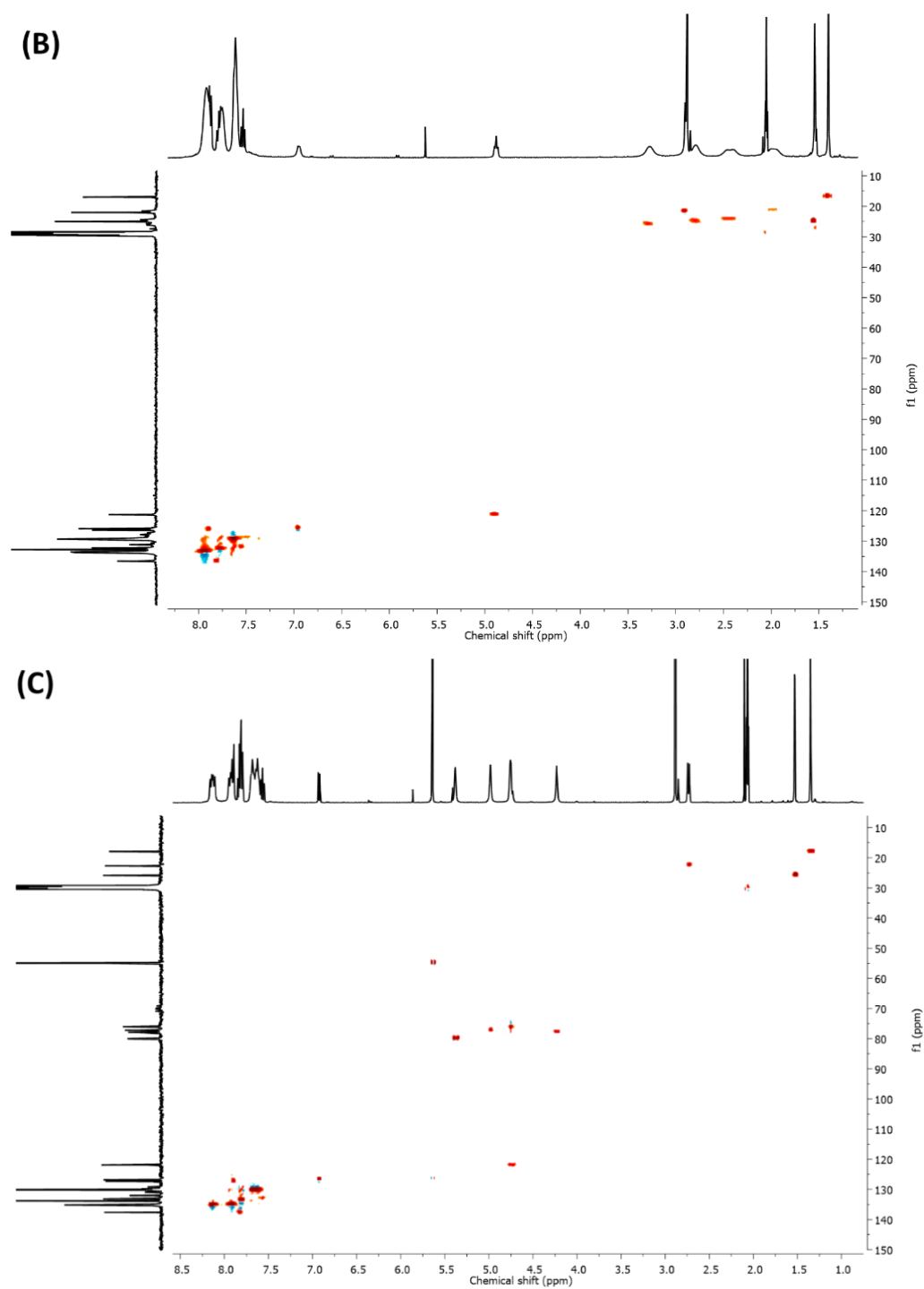
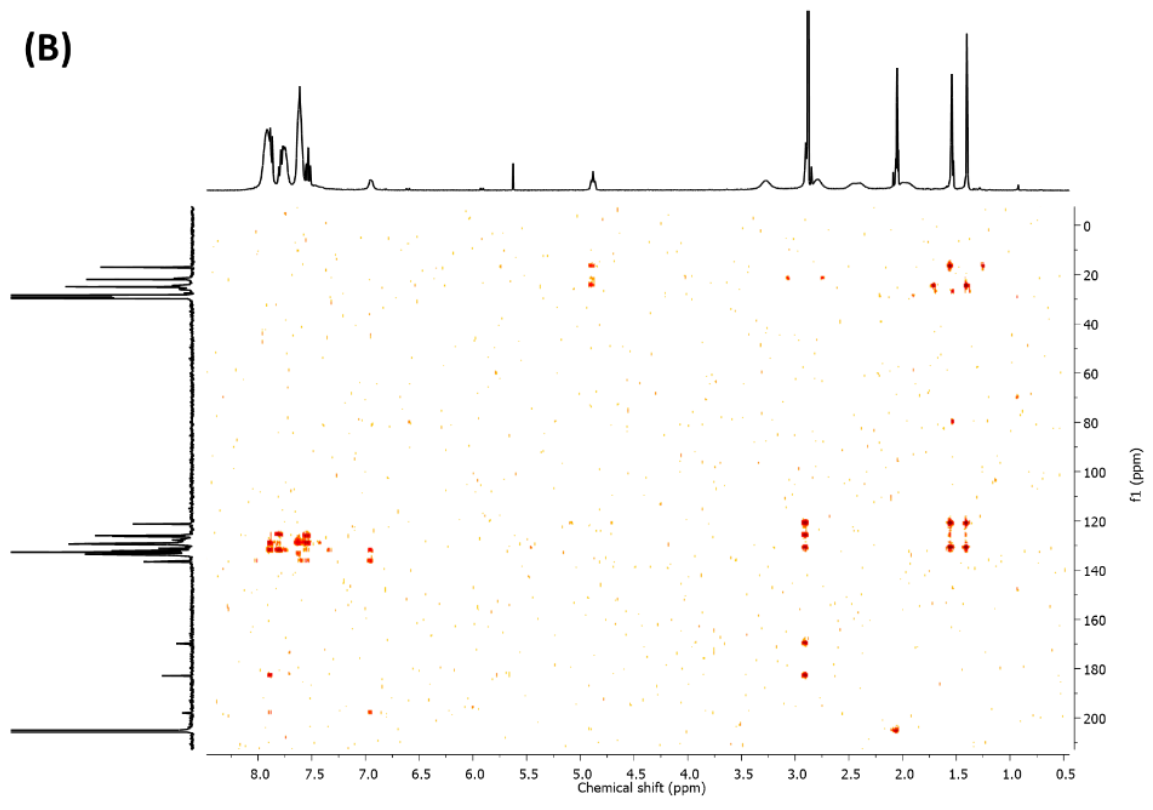
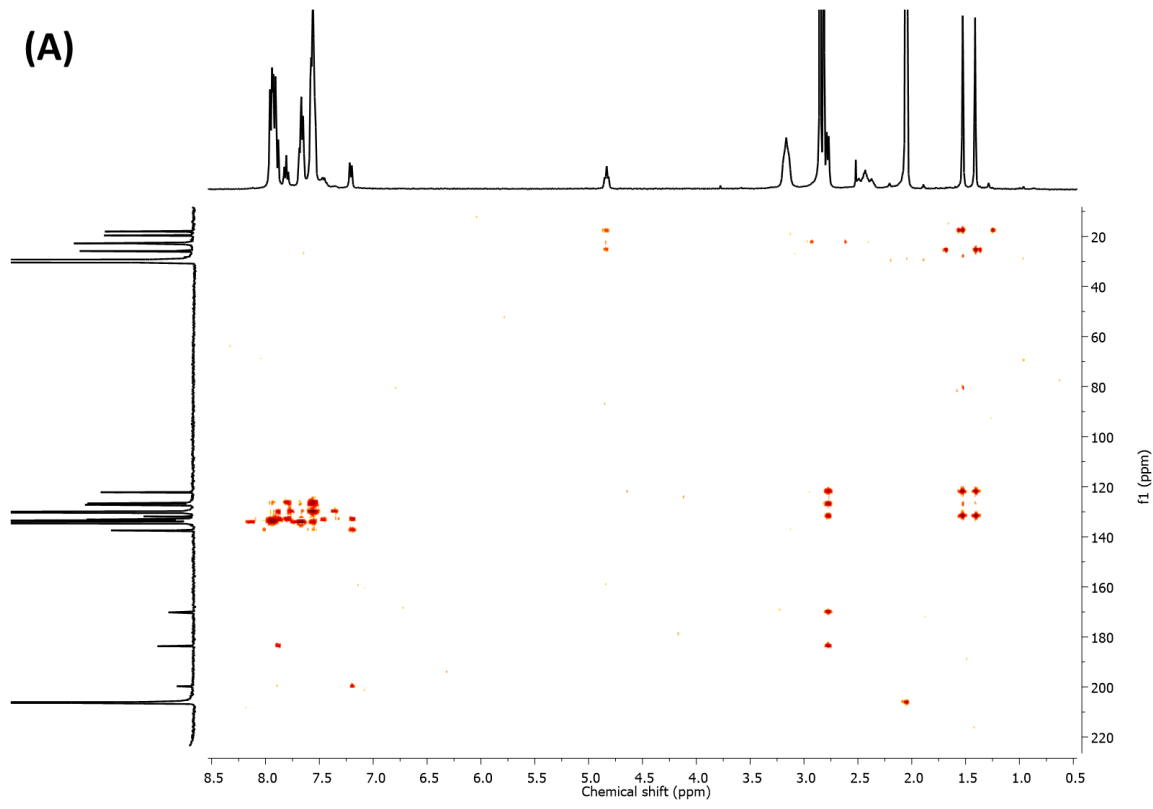


FIGURA A. 39. Mapas de correlação de RMN 2D: ^1H - ^{13}C HSQC dos complexos (A) **C1** - $[\text{Pd}(\text{dppp})(\text{lap})]\text{PF}_6$; (B) **C2** - $[\text{Pd}(\text{dppb})(\text{lap})]\text{PF}_6$ e (C) **C3** - $[\text{Pd}(\text{dppf})(\text{lap})]\text{PF}_6$, em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.



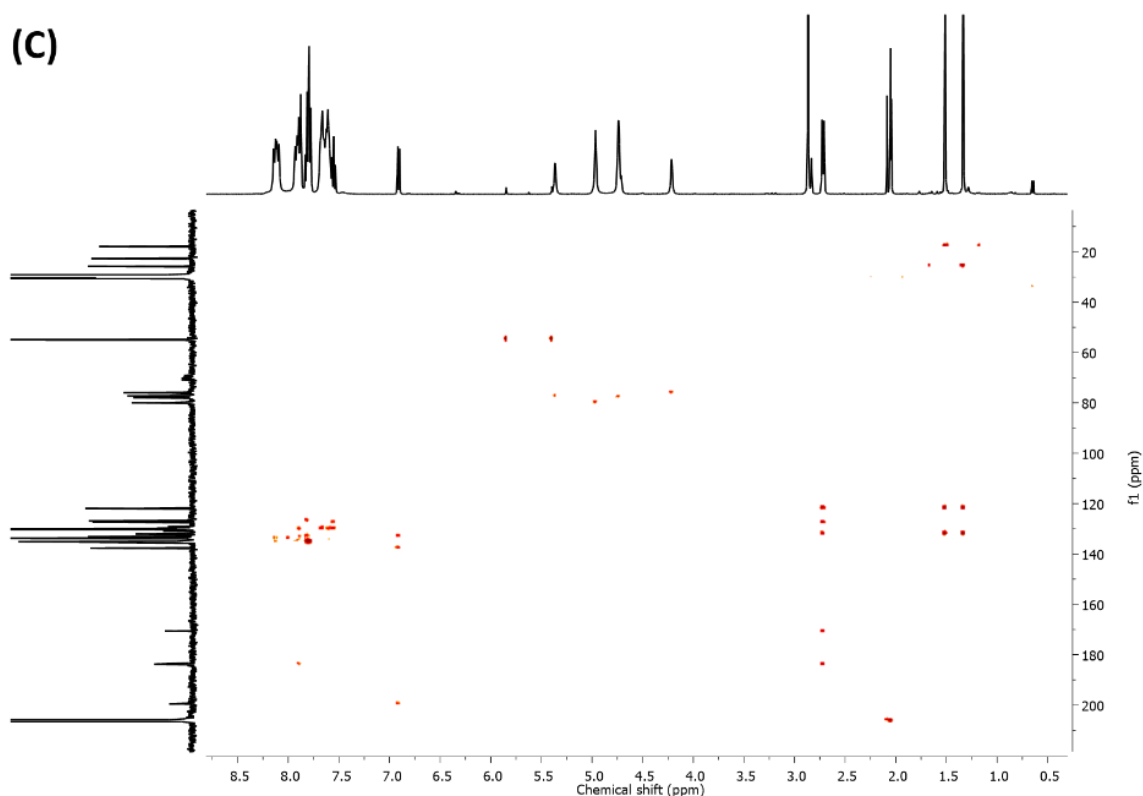


FIGURA A. 40. Mapas de correlação de RMN 2D: ^1H - ^{13}C HMBC dos complexos (A) **C1** - $[\text{Pd}(\text{dppp})(\text{lap})]\text{PF}_6$; (B) **C2** - $[\text{Pd}(\text{dppb})(\text{lap})]\text{PF}_6$ e (C) **C3** - $[\text{Pd}(\text{dppf})(\text{lap})]\text{PF}_6$, em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

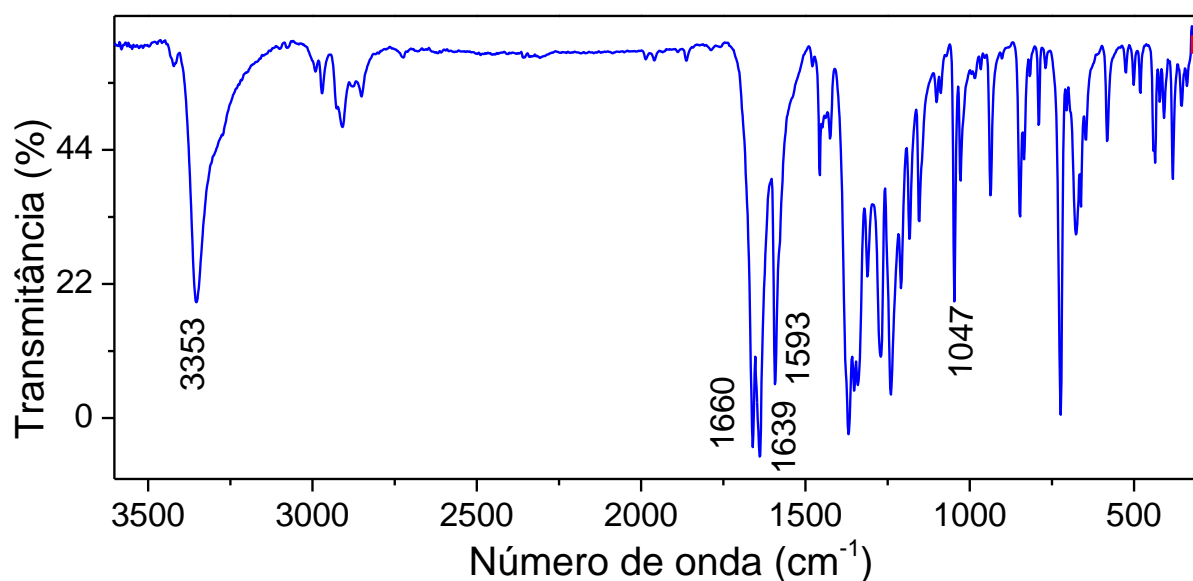


FIGURA A. 41. Espectro de absorção na região do infravermelho do lapachol, em pastilha de KBr.

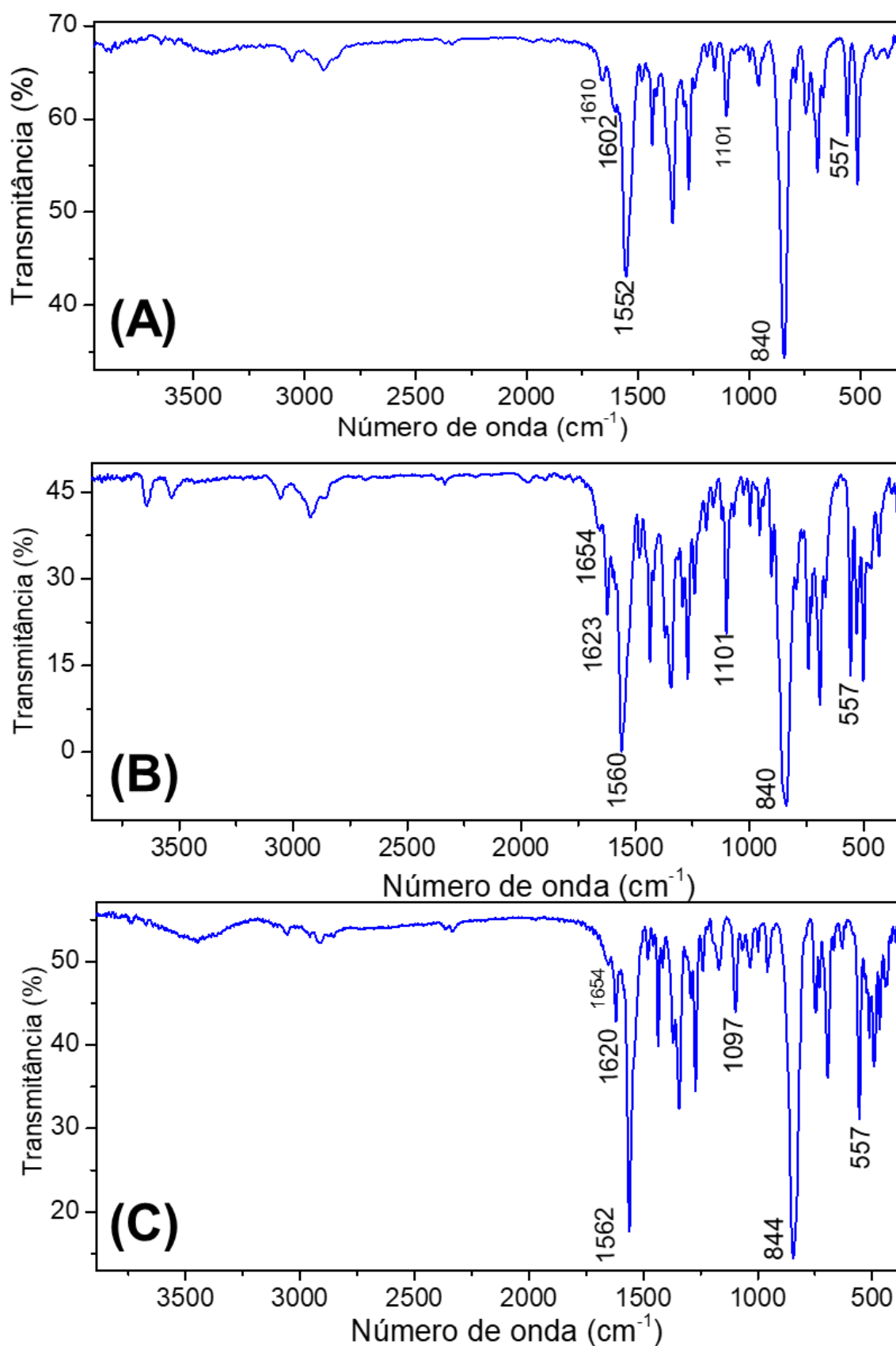


FIGURA A. 42. Espectro de absorção na região do infravermelho do complexos (A) C1, (B) C2 e (C) C3, em pastilha de KBr.

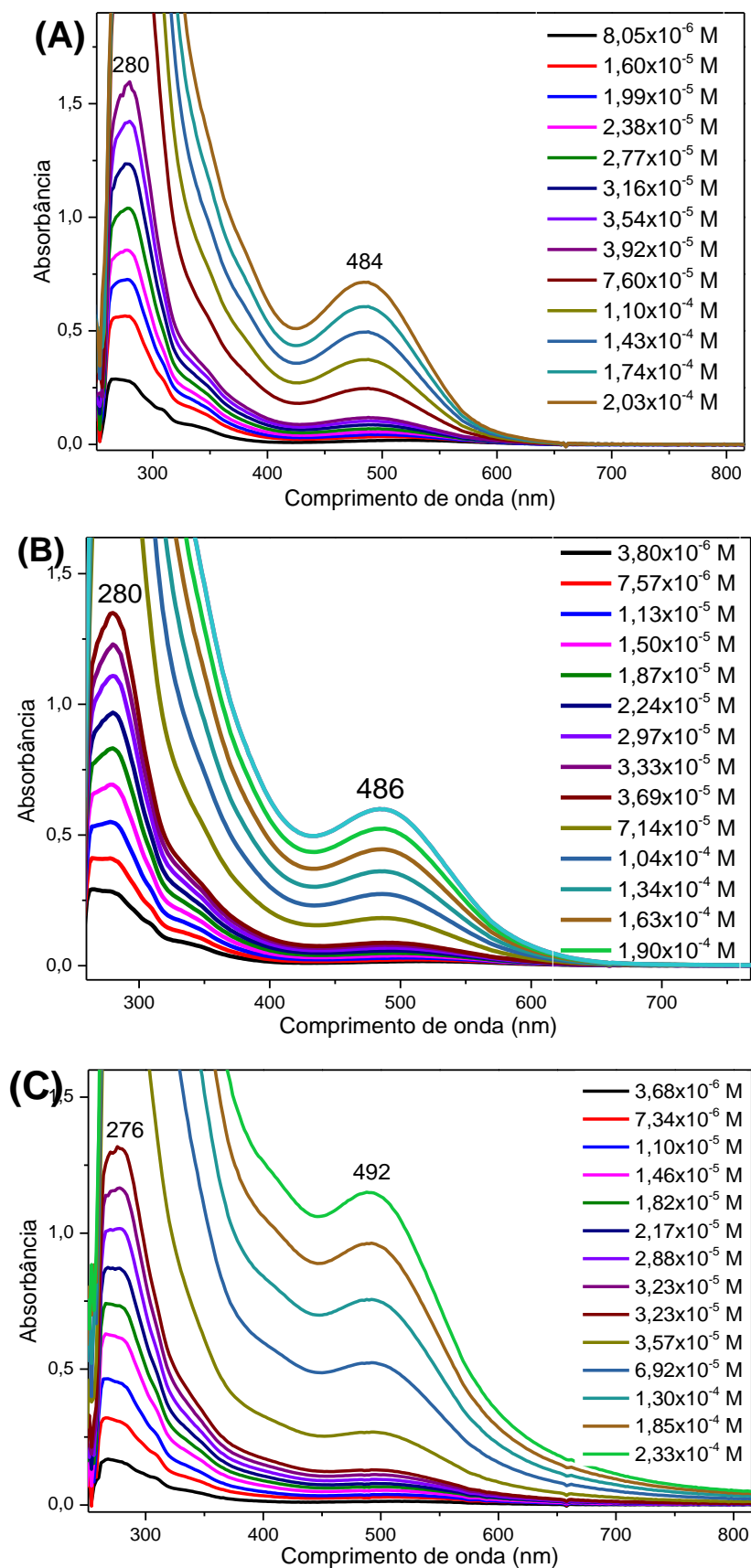


FIGURA A. 43. Espectros de UV-vis em diferentes concentrações dos complexos (A) C1, (B) C2 e (C) C3, em DMSO.

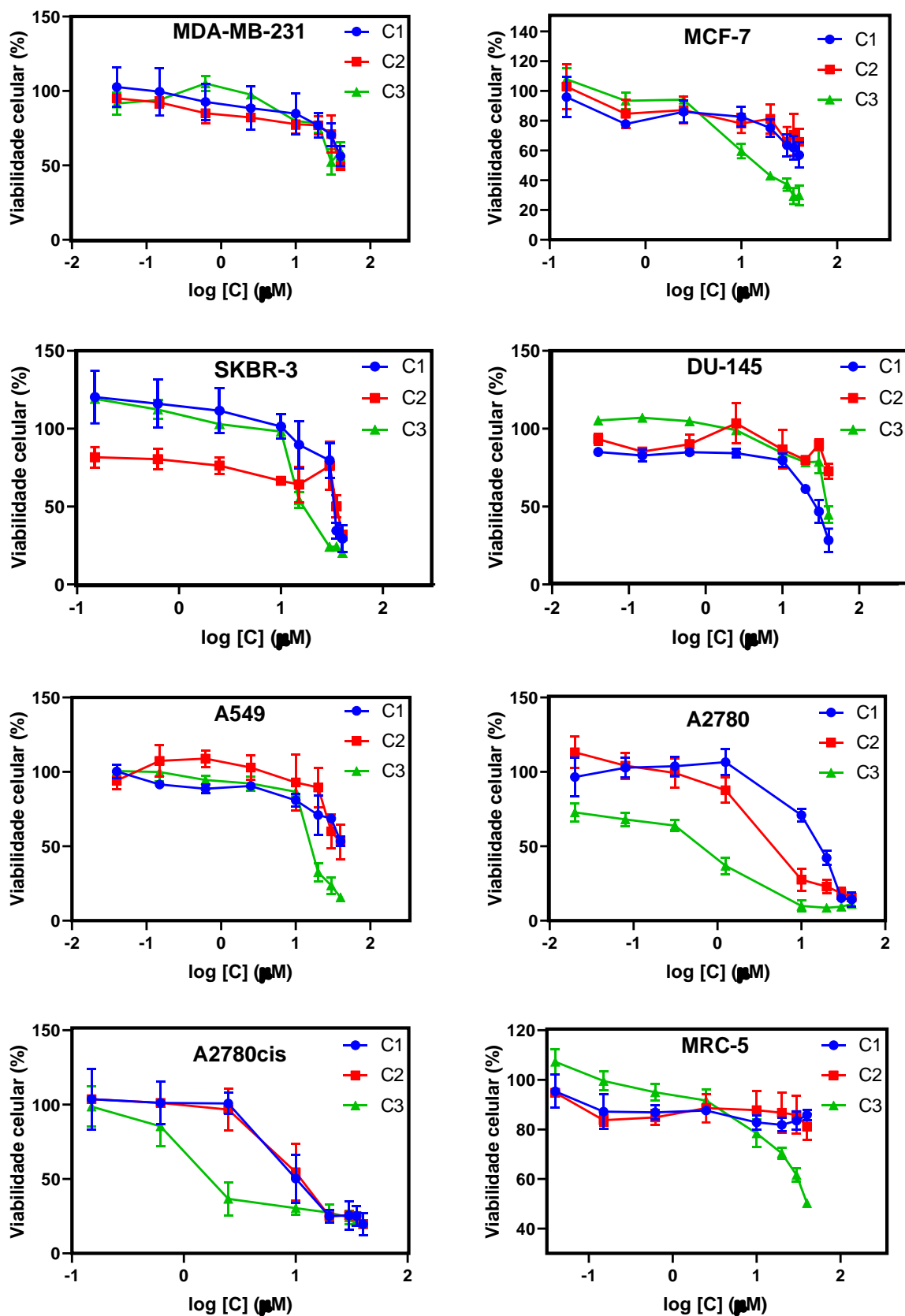


FIGURA A. 44. Curvas de concentração-resposta das células tumorais (MDA-MB-231, MCF7, SK-BR-3, A549, DU-145, A2780 e A2780cis) e célula não tumoral (MRC-5) após o tratamento com os complexos **C1-C3**, adicionados imediatamente após o preparo das soluções.

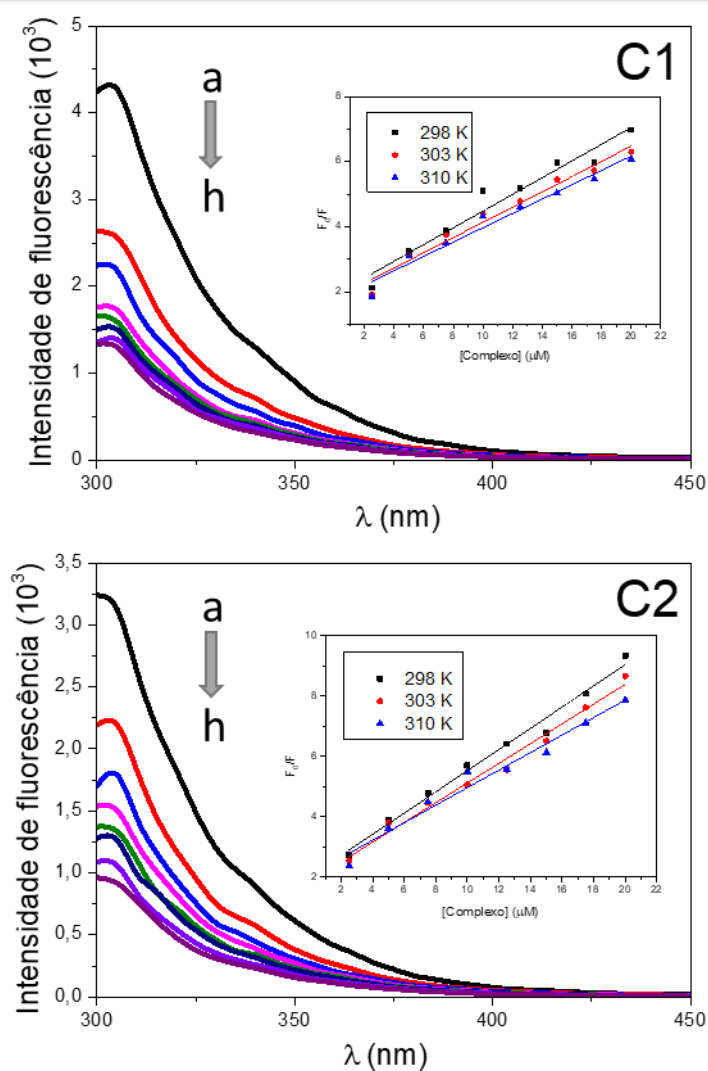


FIGURA A. 45. Espectros de supressão de fluorescência da HSA na ausência (a) e presença dos compostos **C1** e **C2** (b-h; b= 2,5 μM ; c= 5 μM ; d= 7,5 μM ; e= 10 μM ; f= 12,5 μM ; g= 15,0 μM e h= 17,5 μM), com concentração constante da HSA de 2,5 μM . Razão [Complexo]/[HSA]= 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7. Gráficos de Stern-Volmer para supressão de fluorescência da HSA na presença dos compostos à 298, 303 e 310 K.