

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

**“Novos complexos quadráticos planos contendo
tiossemicarbazonas derivadas de salicilaldeído:
Investigação da atividade antitumoral em modelos
celulares 2D e 3D”.**

Tamara Teixeira*

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

Orientador: Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha

*** bolsista CAPES**

São Carlos
2026

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Tamara Teixeira, realizada em 22/04/2026.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha (UFSCar)

Profa. Dra. Aniele de Moura (UFSCar)

Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira (UFSCar)

Prof. Dr. Cauê Benito Scarim (UNESP)

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

*“A vida é uma escalada,
mas a vista é ótima.”*

- Hannah Montana

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me conceder força, sabedoria e persistência ao longo de toda essa jornada.

Aos meus pais, Carlos e Cleize, por serem meu alicerce, pelo amor incondicional, apoio constante e por nunca medirem esforços para que eu pudesse chegar até aqui. À minha irmã, Maria Eduarda, e a toda minha família.

Aos amigos de toda a vida: Ana, Átyla, Camila, Fran, Guilherme, Hugo e Roberto. À república Além da Lenda, minha eterna casa, e a todas as moradoras, ex-alunas e homenageados. Obrigada por cada gesto de carinho, apoio e amizade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fillipe Rocha, pela orientação, ensinamentos valiosos, paciência e acolhimento ao longo de todo o processo.

Ao CCQM e a todos os seus membros, pela troca constante de conhecimentos e ambiente colaborativo. Agradeço, em especial, ao Dr. Dário, pelos ensinamentos em cultivo celular, e à doutoranda Isabella, pela ajuda diária.

Ao grupo LERCI, ao professor Alzir e a todos os integrantes, pela colaboração e convivência. À doutora Jocely, pela realização dos experimentos de citometria de fluxo e por toda disponibilidade, e ao Dr. Marcos, pelo auxílio nos experimentos de JC-1.

Aos professores Dr. Javier Ellena e Dr. João Honorato, ao Dr. Pedro Henrique Santiago, ao doutorando Fabiano e aos membros do LaMuCrEs, pela realização das medidas de difração de raios X em monocristal.

À Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti e ao grupo LABEN, pela disponibilidade do uso do citômetro e pelo suporte técnico.

Aos doutorandos Rayane e Wladimir e aos professores Adelino e José Anchieta (IQ/UNESP-Araraquara), pela realização dos experimentos de uptake celular e pela colaboração científica.

Aos doutores Carlos André e Karine, pela realização dos experimentos de espectrometria de massas.

Aos amigos que São Carlos me presenteou: Isa e Saulo, pelo carinho, companheirismo e apoio em todos os momentos. Aos queridos Marcos, Pedro e Mayara, por toda parceria, suporte, viagens e momentos de descontração. À Jocely, por ser, desde o início, uma presença importante e especial. Também agradeço à Bitá e Ewan, que, mesmo por um breve período, deixaram uma marca significativa nessa trajetória.

Por fim, agradeço à CAPES pela bolsa concedida, e aos demais órgãos de fomento, CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Declaro que utilizei ferramenta de inteligência artificial (ChatGPT, Gemini) exclusivamente para fins de correção gramatical, melhoria da redação e organização textual. Todo o conteúdo foi revisado, validado e é de responsabilidade da autora.

LISTA DE ABREVIATURAS

μM	Micromolar
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
^1H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio-1
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$	Ressonância Magnética Nuclear de fósforo-31
ATCC	American Type Culture Collection
CDCl_3	Clorofórmio- d_1
CVCL	Cellosaurus
CO_2	Dióxido de carbono
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de Raios X
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
FBS	Fetal Bovine Serum
IC_{50}	Concentração inibitória de 50%
IS	Índice de seletividade
IV	Infravermelho
KBr	Brometo de potássio
MS	Espectrometria de Massas
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
nm	Nanômetro
PBS	Phosphate-buffered saline
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium iodide
PPh_3	Trifenilfosfina
ppm	Partes por milhão

RMN	Ressonância magnética nuclear
RNAse A	Ribonuclease A
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SD	Desvio padrão
TSC	Tiosemicarbazona
UV-Vis	Espectroscopia ultravioleta-visível

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 – Reagentes e materiais utilizados e suas respectivas procedências.	24
TABELA 3.2 – Parâmetros para ionização dos compostos.	28
TABELA 3.3 – Programa de aquecimento para a determinação de Pd em células por HR-CS GFAAS.	34
TABELA 3.4 – Parâmetros instrumentais para a determinação de Pd em células por HR-CS GF AAS.	34
TABELA 4.1 – Dados de condutividade molar, em DMSO.	37
TABELA 4.2 – Atribuições dos principais estiramentos observados para os complexos e ligantes da série 1.	40
TABELA 4.3 – Atribuições dos principais estiramentos observados para os complexos e ligantes da série 2.	41
TABELA 4.4 – Dados de absortividade molar (ϵ) e tentativa de atribuição das bandas.	44
TABELA 4.5 – Dados de δ para os complexos e sintetizados em DMSO/D ₂ O.	45
TABELA 4.6 – Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H para os ligantes e complexos da Série 1.	47
TABELA 4.7 – Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H para os ligantes e complexos da Série 2.	48
TABELA 4.8 – Principais distâncias [Å] e ângulos [°] de ligação para os complexos.	56
TABELA 4.9 – Dados teóricos e experimentais obtidos através da espectrometria de massas.	59
TABELA 4.10 – Valores de IC ₅₀ e índice de seletividade (IS) para os complexos obtidos, ligantes livres, complexo precursor e cisplatina nas linhagens A2780cis, A2780, MDA-MB-231, MCF-7, A549 e MRC-5, após 48 h de incubação.	63

TABELA 4.11 – Valores de IC ₅₀ para o complexo PdD2, ligante D2 livre, complexo precursor e cisplatina nas linhagens A375, HacaT e CHO-K1, após 48 h de incubação.	65
TABELA 4.12 – Valores de IC ₅₀ e índice de seletividade (IS) para o complexo PdD2 e Cisplatina, nas linhagens tumorais e não tumoral de ovário.....	66
TABELA 4.13 – Dados de condutividade molar.....	68
TABELA 4.14 – Atribuições dos principais estiramentos observados para o ligante D2 livre e para os complexos NiD2 e PtD2.....	70
TABELA 4.15 – Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H para o ligante D2 e complexos PtD2 e NiD2.....	71
TABELA 4.16 – Principais distâncias [Å] e ângulos [°] de ligação para os complexos.	75
TABELA 4.17 – Dados teóricos e experimentais obtidos através da espectrometria de massas.	76
TABELA 4.18 – Valores de IC ₅₀ e índice de seletividade (IS) para os complexos obtidos e cisplatina nas linhagens A2780cis, A2780 e MRC-5, após 48 h de incubação.	77
TABELA 4.19 - Porcentagem de absorção de Pd nas células A2780 e MRC-5 determinada por HR-CS GFAAS.	95

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Fluxograma que resume as etapas da metástase do câncer. Adaptado de Ieso e Yool (2018) ⁷	2
FIGURA 1.2 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil para o triênio de 2026–2028 por sexo, exceto pele não melanoma. ¹¹	3
FIGURA 1.3 – Principais alvos identificados dos metais de transição. Adaptado de Marloye e colaboradores (2016) ²⁵	5
FIGURA 1.4 – Estrutura de alguns compostos de platina empregados como quimioterápicos.	6
FIGURA 1.5 – Estrutura química da Padeliporfina (TOOKAD).	9
FIGURA 1.6 – Estrutura química geral das tiossemicarbazonas.	12
FIGURA 1.7 – Estrutura química da Triapina ® (3-AP).	13
FIGURA 1.8 – Estruturas cristalográficas de alguns dos complexos sintetizados pelo Laboratório CCQM. ^{91,92}	15
FIGURA 1.9 – Proposta estrutural dos complexos.	16
FIGURA 1.10 – Fases do desenvolvimento de um medicamento: descoberta, estudos pré-clínicos, ensaios clínicos, aprovação regulatória e pós-comercialização. Adaptado de Vieira (2020) ¹⁵⁸	18
FIGURA 1.11 – Representação esquemática comparativa destacando as principais diferenças estruturais e funcionais entre culturas celulares 2D e 3D. Adaptado de SALINAS-VERA (2022) ¹⁵⁹	21
FIGURA 4.1 – Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante M1 e do complexo PdM1.	39
FIGURA 4.2 – Espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis para o ligante M1 e complexo PdM1, em DMSO.	43

FIGURA 4.3 – Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos coordenados em DMSO/D ₂ O.....	45
FIGURA 4.4 – Esquemas de distribuições dos sinais referentes aos prótons dos ligantes livres e complexos coordenados.	46
FIGURA 4.5 – Espectro de RMN de ^1H para o ligante M1, em DMSO- d_6	49
FIGURA 4.6 – Espectro de RMN de ^1H para o ligante PdM1, em DMSO- d_6	50
FIGURA 4.7 – Comparativo entre os espectros de RMN ^1H do ligante M1 e do complexo PdM1, em DMSO.	52
FIGURA 4.8 – Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY do complexo PdM1, em DMSO- d_6	52
FIGURA 4.9 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o complexo PdM1, em DMSO- d_6	53
FIGURA 4.10 – Mapa de correlação ^1H – ^{13}C HSQC do complexo PdM1, em DMSO- d_6	54
FIGURA 4.11 – Mapa de correlação ^1H – ^{13}C HMBC do complexo PdM1, em DMSO- d_6	54
FIGURA 4.12 – Estrutura cristalográfica do complexo PdM1, com os elipsóides a 30% de probabilidade.....	57
FIGURA 4.13 – Estrutura cristalográfica do complexo PdM1, com os elipsóides a 30% de probabilidade.....	58
FIGURA 4.14 – Espectro de massas para o composto PdM1 em m/z.	60
FIGURA 4.15 – Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN do complexo PdM1 em DMSO, nos períodos de 0, 24 e 48h de incubação.	61
Figura 4.16 – Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN do complexo PdM1 em DMSO/meio de cultura DMEM (90:10, v/v), nos períodos de 0, 24 e 48h de incubação.	62
Figura 4.17 – Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante D2 e dos complexos NiD2 e PtD2.....	69

FIGURA 4.18 – Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo PtD2 em DMSO/D ₂ O e para o complexo NiD2 em CH ₂ Cl ₂ /D ₂ O.	71
FIGURA 4.19 – Espectro de RMN de ^1H para o ligante D2, em DMSO- <i>d</i> ₆	72
FIGURA 4.20 – Espectro de RMN ^1H para o complexo PtD2, em DMSO- <i>d</i> ₆	73
FIGURA 4.21 – Espectro de RMN ^1H para o complexo NiD2, em CDCl ₃	74
FIGURA 4.22 – Estrutura cristalográfica dos complexos NiD2 e PtD2, com os elipsóides a 30% de probabilidade.	75
FIGURA 4.23 – Espectro de massas para o composto NiD2 em m/z.	76
FIGURA 4.24 – Espectro de massas para o composto PtD2 em m/z.	77
FIGURA 4.25 – Efeito do composto PdD2, em diferentes concentrações, na morfologia celular da linhagem tumoral A2780, durante 48 horas de incubação. As imagens foram obtidas através do microscópio CELENA®, utilizando objetiva de 10 ×.	79
FIGURA 4.26 – Efeito do composto PdD2, em diferentes concentrações, na morfologia celular da linhagem não tumoral MRC-5, durante 48 horas de incubação. As imagens foram obtidas através do microscópio CELENA®, utilizando objetiva de 10 ×.	81
FIGURA 4.27 – Efeito do composto PdD2, em diferentes concentrações, na morfologia celular da linhagem tumoral A2780, após 48 horas de incubação, com os marcadores Green Plasma e DAPI. As imagens foram obtidas através do microscópio CELENA®, utilizando objetiva de 10 ×.	82
FIGURA 4.28 – Efeito do composto PdD2, em diferentes concentrações, sobre a viabilidade celular da linhagem tumoral A2780, após 48 horas de incubação, com o kit LIVE/DEAD®. As imagens foram obtidas através do microscópio CELENA®, utilizando objetiva de 4 ×.	84
FIGURA 4.29 – Efeito do complexo PdD2 sobre a capacidade clonogênica de células tumorais A2780. (A) Imagens representativas das colônias formadas após o tratamento com diferentes concentrações do composto. (B) Análise quantitativa do	

número e da área (%) das colônias em relação ao controle. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. *** $p < 0,0007$ e **** $p < 0,0001$ em comparação ao controle. 86

FIGURA 4.30 – Efeito do complexo PdD2 sobre a capacidade clonogênica de células tumorais MRC-5. (A) Imagens representativas das colônias formadas após o tratamento com diferentes concentrações do composto. (B) Análise quantitativa do número e da área (%) das colônias em relação ao controle. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. 87

FIGURA 4.31 – Esquema ilustrativo da progressão do ciclo celular, destacando as fases da interfase (G_1 , S e G_2) e a fase mitótica (M). 89

FIGURA 4.32 – Efeito do complexo PdD2 na distribuição das fases do ciclo celular de células tumorais A2780 após 48 h de tratamento. As células foram expostas a diferentes concentrações do complexo, e a distribuição percentual foi determinada por citometria de fluxo após coloração com iodeto de propídio. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de experimentos independentes. **** $p < 0,0001$ em comparação ao controle. 90

FIGURA 4.33 – Esquema ilustrativo dos mecanismos celulares envolvidos nos processos de apoptose e necrose. 91

FIGURA 4.34 – Efeitos do complexo PdD2 e da cisplatina na indução de apoptose em células tumorais A2780. A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo após tratamento com os compostos, e os resultados são apresentados como a porcentagem de células apoptóticas. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle são indicadas por * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ 92

FIGURA 4.35 – Efeito do complexo PdD2, nas concentrações de $0,5 \times IC_{50}$ e IC_{50} , sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células tumorais A2780, após 24 h de incubação, utilizando o corante JC-1. As imagens foram obtidas através do microscópio CELENA®, utilizando objetiva de $4 \times$ 94

FIGURA 4.36 – Efeito do composto PdD2, em diferentes concentrações, na morfologia celular dos esferoides da linhagem tumoral A2780, durante 144 horas, e

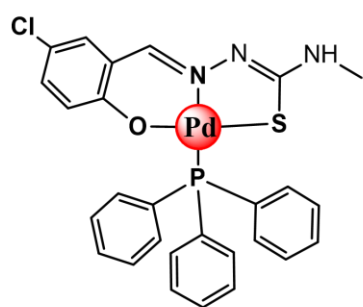
gráfico da relação entre o diâmetro dos esferoides e tempo de tratamento. As imagens foram obtidas através do microscópio CELENA®, utilizando objetiva de 4 ×. 97

FIGURA 4.37 – Efeito do composto PdD2, em diferentes concentrações, na viabilidade celular dos esferoides da linhagem tumoral A2780, após 144 horas, através de microscopia de fluorescência com o kit LIVE/DEAD®. As imagens foram obtidas através do microscópio CELENA®, utilizando objetiva de 4 ×..... 98

LISTA DE ESQUEMAS

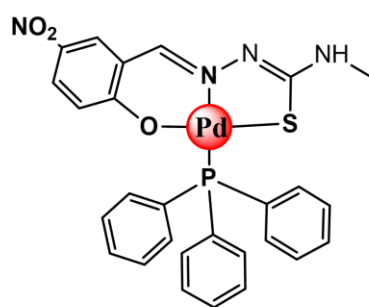
ESQUEMA 4.1 – Rota sintética para a obtenção dos ligantes tiossemicarbazonas.....	36
ESQUEMA 4.2 – Rota sintética para a obtenção dos complexos de Pd(II).....	37
ESQUEMA 4.3 – Rotas sintéticas para a obtenção dos complexos de Ni(II) e Pt(II), respectivamente.	67

ESTRUTURAS E MASSAS MOLECULARES



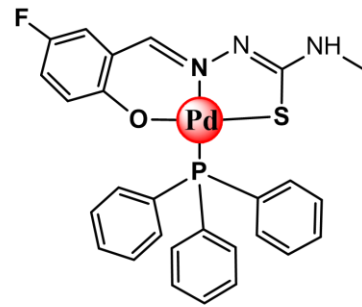
PdM1

$C_{27}H_{23}ClN_3OPPdS$
M.M.: 610,4028



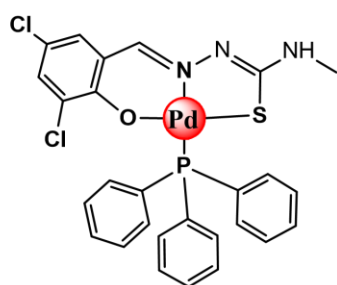
PdM2

$C_{27}H_{23}N_4O_3PPdS$
M.M.: 620,9553



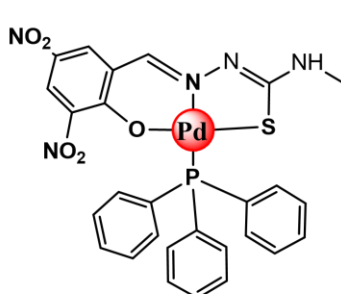
PdM3

$C_{27}H_{23}FN_3OPPdS$
M.M.: 593,9482



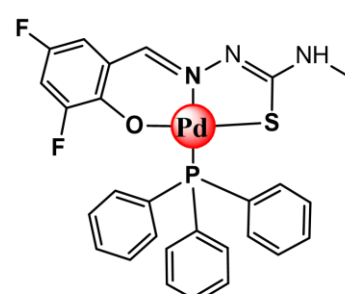
PdD1

$C_{27}H_{22}Cl_2N_3OPPdS$
M.M.: 644,8478



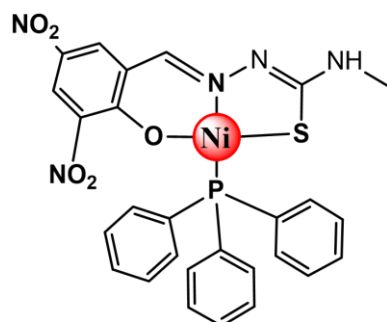
PdD2

$C_{27}H_{22}N_5O_5PPdS$
M.M.: 665,9528



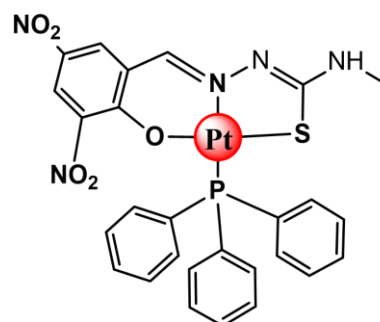
PdD3

$C_{27}H_{22}F_2N_3OPPdS$
M.M.: 611,9386



NiD2

$C_{27}H_{22}N_5NiO_5PS$
M.M.: 618,2262



PtD2

$C_{27}H_{22}N_5O_5PPtS$
M.M.: 754,6168

RESUMO

NOVOS COMPLEXOS QUADRÁTICOS PLANOS CONTENDO TIOSSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE SALICIALDEÍDO: INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL EM MODELOS 2D E 3D. O câncer permanece entre as principais causas de mortalidade no mundo, destacando a necessidade do desenvolvimento de agentes terapêuticos mais seletivos e eficazes. Nesse contexto, complexos metálicos contendo tiossemicarbazonas têm despertado interesse devido à sua versatilidade estrutural e ao potencial para modular propriedades biológicas relevantes. O presente trabalho teve como objetivo a síntese, caracterização estrutural e avaliação da atividade antitumoral de novos complexos de Pd(II), Pt(II) e Ni(II) contendo tiossemicarbazonas derivadas do salicilaldeído, associados à trifenilfosfina. A caracterização dos compostos por meio de condutividade molar, espectroscopias no infravermelho e UV-Vis, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear e difração de raios X de monocristal confirmou a formação de complexos neutros com geometria quadrática plana distorcida, nos quais as tiossemicarbazonas atuam como ligantes tridentados (O,N,S). Os complexos apresentaram elevada estabilidade em solução, em consonância com a coordenação multidentada e a rigidez estrutural do sistema. Os ensaios de viabilidade celular revelaram que a atividade citotóxica foi restrita aos complexos contendo o ligante **D2**, portador de dois grupos nitro, nas linhagens de câncer de ovário, com destaque para o complexo de Pd(II), que apresentou maior atividade. Ensaios morfológicos e clonogênicos demonstraram que o complexo **PdD2** apresenta efeitos citotóxicos e citostáticos, além de maior seletividade em relação às células tumorais. Estudos mecanísticos, empregando marcadores fluorescentes e citometria de fluxo, indicaram que o composto induz morte celular predominantemente por apoptose, associada a alterações no ciclo celular, comprometimento da integridade de membrana e despolarização do potencial de membrana mitocondrial. Adicionalmente, os experimentos em modelos tridimensionais evidenciaram que o complexo PdD2 mantém sua atividade em microambientes fisiologicamente mais relevantes, afetando a morfologia, o crescimento e a viabilidade celular dos esferoides tumorais. Em conjunto, os resultados posicionam o complexo PdD2 como um candidato de interesse para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais baseados em tiossemicarbazonas.

ABSTRACT

NEW SQUARE-PLANAR COMPLEXES CONTAINING SALICYLALDEHYDE-DERIVED THIOSEMICARBAZONES: INVESTIGATION OF ANTITUMOR ACTIVITY IN 2D AND 3D MODELS. Cancer remains one of the leading causes of mortality worldwide, highlighting the need for the development of more selective and effective therapeutic agents. In this context, metal complexes containing thiosemicarbazones have attracted considerable interest due to their structural versatility and their potential to modulate relevant biological properties. The present study aimed to synthesize, structurally characterize, and evaluate the antitumor activity of new Pd(II), Pt(II), and Ni(II) complexes containing salicylaldehyde-derived thiosemicarbazones associated with triphenylphosphine. Characterization of the compounds by molar conductivity, infrared and UV–Vis spectroscopy, mass spectrometry, nuclear magnetic resonance, and single-crystal X-ray diffraction confirmed the formation of neutral complexes with distorted square-planar geometry, in which the thiosemicarbazones act as tridentate (O,N,S) ligands. The complexes exhibited high stability in solution, consistent with multidentate coordination and the structural rigidity of the system. Cell viability assays revealed that cytotoxic activity was restricted to complexes containing the D2 ligand, bearing two nitro groups, in ovarian cancer cell lines, with particular emphasis on the Pd(II) complex, which showed the highest activity. Morphological and clonogenic assays demonstrated that the PdD2 complex exerts both cytotoxic and cytostatic effects, in addition to displaying greater selectivity toward tumor cells. Mechanistic studies, employing fluorescent probes and flow cytometry, indicated that the compound induces cell death predominantly through apoptosis, associated with alterations in the cell cycle, loss of membrane integrity, and depolarization of the mitochondrial membrane potential. Furthermore, experiments in three-dimensional models demonstrated that the PdD2 complex retains its activity in more physiologically relevant microenvironments, affecting the morphology, growth, and viability of tumor spheroids. Taken together, these results position the PdD2 complex as a promising candidate for the development of new thiosemicarbazone-based antitumor agents.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 Câncer	1
1.2 A utilização de metais como quimioterápicos	4
1.3 Tiossemicarbazonas.....	11
1.4 Planejamento Estrutural	13
1.5 Modelos de Cultura Celulares	17
2. Objetivos.....	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. Parte Experimental.....	24
3.1 Materiais.....	24
3.2 Sínteses.....	25
3.2.1 Síntese dos ligantes tiossemicarbazonas.....	25
3.2.2 Síntese dos complexos de Paládio (II)	25
3.2.3 Síntese dos complexos NiD2 e PtD2.....	25
3.3 Instrumentação e técnicas de caracterização.....	26
3.3.1 Condutividade molar.....	26
3.3.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV).....	26
3.3.3 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis)	26
3.3.4 Ressonância magnética nuclear (RMN)	27
3.3.5 Difração de raios X por monocristal (DRX)	27

3.3.6	Espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC Q-TOF MS)	28
3.4	Ensaio biológicos	29
3.4.1	Estabilidade em solução	29
3.4.2	Cultivo celular	29
3.4.3	Viabilidade celular	30
3.4.4	Ensaio morfológico	30
3.4.5	Ensaio por microscopia de fluorescência	30
3.4.6	Ensaio clonogênico	31
3.4.7	Análise do ciclo celular	32
3.4.8	Apoptose por Anexina V	32
3.4.9	Potencial da membrana mitocondrial	32
3.4.10	Uptake celular	33
3.4.11	Ensaio de cultura 3D	34
3.5	Análise estatística	35
4.	Resultados e discussões	36
4.1	Sínteses dos ligantes	36
4.2	Síntese dos complexos de Paládio	36
4.3	Condutividade molar	37
4.4	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	37
4.5	Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível	42
4.6	Ressonância Magnética Nuclear	44
4.7	Difração de Raios X por monocristal	55

4.8	Espectrometria de massas	58
4.9	Estabilidade em solução.....	60
4.10	Viabilidade celular	62
4.11	Síntese, caracterização e viabilidade celular dos complexos de Níquel e Platina 67	
4.12	Ensaio morfológico	78
4.13	Ensaio clonogênico	85
4.14	Análise do ciclo celular	88
4.15	Apoptose por Anexina V	91
4.16	Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	93
4.17	Uptake Celular.....	95
4.18	Ensaio de cultura 3D	95
5.	Conclusões.....	99
6.	Referências Bibliográficas	101
7.	Apêndices	120

1. Introdução

1.1 Câncer

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células anormais, com elevado potencial de invasão e disseminação para outros tecidos e órgãos do corpo¹. Essas células anormais surgem a partir de mutações no material genético de células previamente saudáveis, decorrentes tanto de fatores externos (como tabagismo, radiação ultravioleta e agentes químicos), quanto de fatores internos, incluindo predisposição hereditária, falhas espontâneas na replicação do DNA e alterações acumuladas ao longo do envelhecimento ^{2,3,4}. As células cancerosas são identificadas pela alta capacidade de proliferação e metabolismo rápido, enquanto as células saudáveis são mais regulares. A rápida proliferação celular das células tumorais é devida a sua capacidade de ativar e/ou modificar vias metabólicas para a obtenção de mais energia ^{5,6}.

A letalidade do câncer está fortemente associada ao desenvolvimento e à proliferação da metástase tumoral (Figura 1.1). Esse processo ocorre quando células cancerosas se desprendem do tumor primário e migram para tecidos adjacentes ou órgãos distantes. Em tumores mais volumosos, a presença de regiões hipóxicas favorece a ativação de mecanismos de angiogênese, essenciais para suprir as demandas metabólicas celulares. Paralelamente, as células do tumor primário passam por alterações fenotípicas importantes, incluindo a redução das adesões célula-célula, o que facilita sua saída da massa tumoral e a invasão da matriz extracelular e, ao atingirem os sistemas sanguíneo ou linfático, essas células podem circular, sobreviver ao microambiente adverso e implantar-se em novos tecidos ⁷. Dessa forma, a metástase é responsável por até 90% dos óbitos relacionados ao câncer, pois envolve adaptações celulares complexas que dificultam o tratamento e favorecem a resistência terapêutica. ^{8,9}

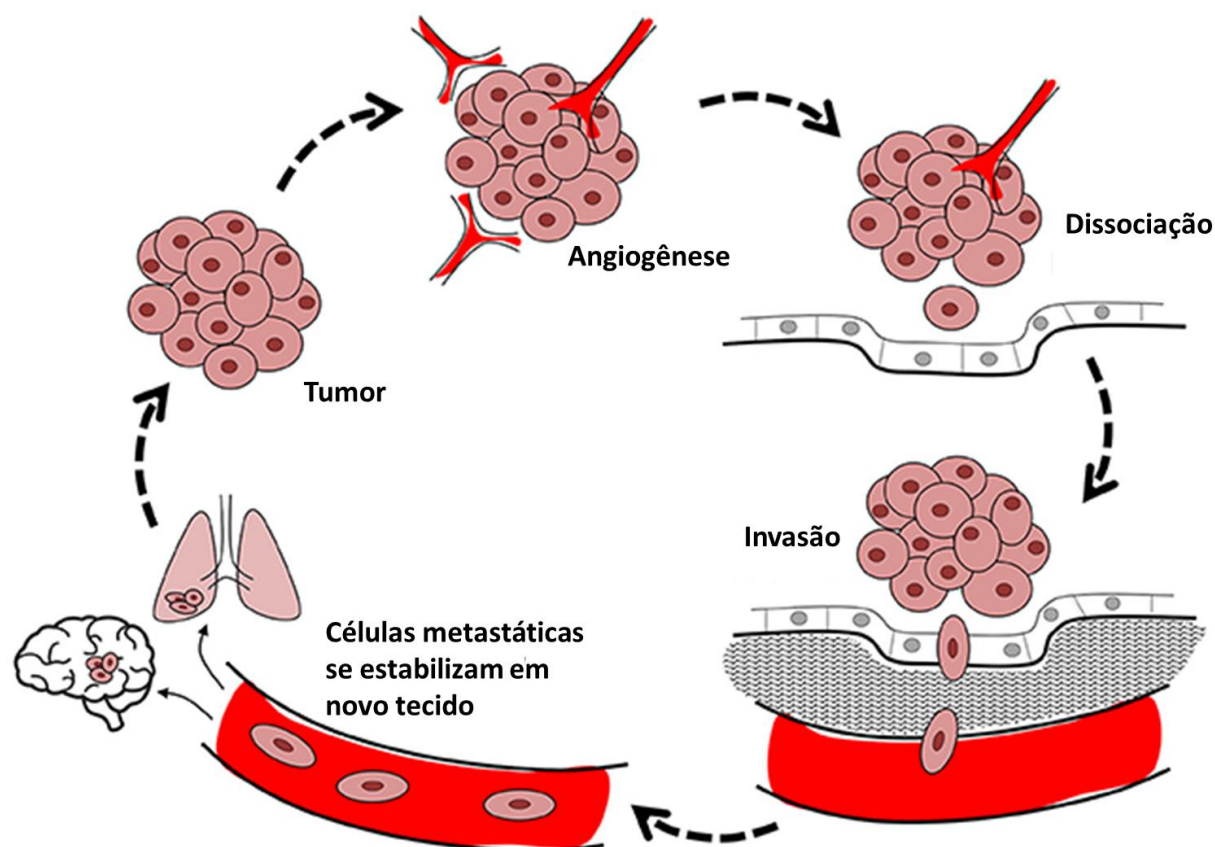


FIGURA 1.1 – Fluxograma que resume as etapas da metástase do câncer. Adaptado de Ileso e Yool (2018)⁷

De acordo com dados recentes da Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), estima-se que, em 2022, o câncer tenha causado cerca de 20 milhões de novos casos e 9,7 milhões de mortes em nível mundial. As projeções indicam que o câncer afetará uma parcela significativa da população mundial ao longo da vida: aproximadamente uma em cada cinco pessoas desenvolverá a doença, enquanto o risco de morte corresponde a cerca de um em cada nove homens e uma em cada doze mulheres ¹⁰. Dados nacionais do Instituto Nacional de Câncer (INCA) indicam que, para o triênio 2026–2028, são esperados aproximadamente 781 mil novos casos de câncer no Brasil. A Figura 1.2 apresenta os tipos de câncer mais incidentes no período, classificados por sexo¹¹.

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	77.920	30,5	Homens	Mulheres	Mama feminina	78.610	30,0
Cólon e reto	26.270	10,3			Cólon e reto	27.540	10,5
Traqueia, brônquio e pulmão	18.730	7,3			Colo do útero	19.310	7,4
Estômago	13.830	5,4			Traqueia, brônquio e pulmão	16.650	6,4
Cavidade oral	12.260	4,8			Glândula tireoide	13.310	5,1
Bexiga	9.040	3,5			Corpo do útero	9.650	3,7
Esôfago	8.750	3,4			Estômago	8.700	3,3
Fígado	7.340	2,9			Ovário	8.020	3,1
Laringe	7.310	2,9			Pâncreas	6.910	2,6
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,6			Linfoma não Hodgkin	5.980	2,3

FIGURA 1.2 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil para o triênio de 2026–2028 por sexo, exceto pele não melanoma. ¹¹

Apesar de ser o oitavo câncer mais incidente em mulheres, o câncer de ovário é o mais letal entre os cânceres reprodutivos femininos. Isso acontece devido ao fato de que sua detecção é tardia, em razão da natureza inespecífica dos sintomas, dificultando o diagnóstico precoce e reduzindo as chances de tratamento curativo. Como resultado, mais de 70% dos casos são identificados apenas em estágios avançados da doença (III ou IV). ^{12,13}

Os cânceres de ovário são classificados em epiteliais e não epiteliais, sendo os primeiros os mais comuns, representando mais de 95% dos casos. Os tipos não epiteliais, que incluem tumores de células germinativas, estromais de cordão sexual e de pequenas células, correspondem a aproximadamente 5% das ocorrências ¹⁴. O tratamento convencional para esse tipo de câncer envolve cirurgia, geralmente seguida de quimioterapia à base de platina. Nesse contexto, a associação entre carboplatina e paclitaxel constitui o esquema quimioterápico padrão, sendo a carboplatina utilizada há cerca de 15 anos como terapia complementar de primeira linha após a cirurgia de citorredução ¹⁵. Além disso, diversos ensaios clínicos têm investigado a associação de agentes terapêuticos direcionados e imunoterapia à quimioterapia primária, visando aumentar a taxa de sobrevivência dos pacientes ^{16,17}.

As principais abordagens terapêuticas para o câncer incluem quimioterapia, cirurgia, radioterapia, terapia hormonal, terapia alvo-específica, entre outras. A escolha do tratamento mais adequado depende do tipo e do estágio da doença, podendo, em muitos casos, envolver a combinação de diferentes estratégias para maximizar a eficácia clínica ¹⁸. Atualmente, a quimioterapia se destaca como um dos métodos mais utilizados no tratamento contra o câncer,

empregando agentes citotóxicos para afetar células tumorais. Pesquisas apontam que esses fármacos podem agir por diversos mecanismos, interferindo em biomoléculas essenciais, como DNA, proteínas e enzimas, ou afetando diretamente organelas celulares. Essas ações podem tanto inibir o crescimento e a proliferação das células malignas quanto desencadear sua morte celular programada ^{19,20}. Entretanto, seu uso ainda é um desafio devido à efeitos colaterais indesejáveis, como nefrotoxicidade, neurotoxicidade e supressão da medula óssea. Diante dessas limitações, intensificam-se os esforços na busca por novos agentes farmacológicos multialvos, mais eficazes e com menor toxicidade, capazes de superar as restrições impostas pelos quimioterápicos convencionais. ²¹

1.2 A utilização de metais como quimioterápicos

O desenvolvimento de fármacos antitumorais exige que eles sejam eficazes, seletivos e seguros. Dessa forma, reduzir a toxicidade por meio de compostos capazes de atuar apenas em tecidos ou células específicos é uma estratégia bastante promissora. Nesse contexto, os pró-fármacos ganham destaque, pois permanecem inativos até alcançarem o alvo desejado ou até serem ativados por estímulos, como a luz ²¹.

Os compostos metálicos apresentam mecanismos de ação terapêutica distintos daqueles observados em compostos orgânicos, principalmente devido à sua diversidade estrutural, ampla faixa de números de coordenação, múltiplos estados de oxidação acessíveis e à capacidade de realizar trocas de ligantes, fatores que favorecem interações eficazes com alvos biológicos ^{22,23}. Além disso, propriedades termodinâmicas e cinéticas, bem como as características intrínsecas tanto do íon metálico quanto dos ligantes coordenados, contribuem para uma variedade de reatividades que podem ser estrategicamente exploradas no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos ²⁴.

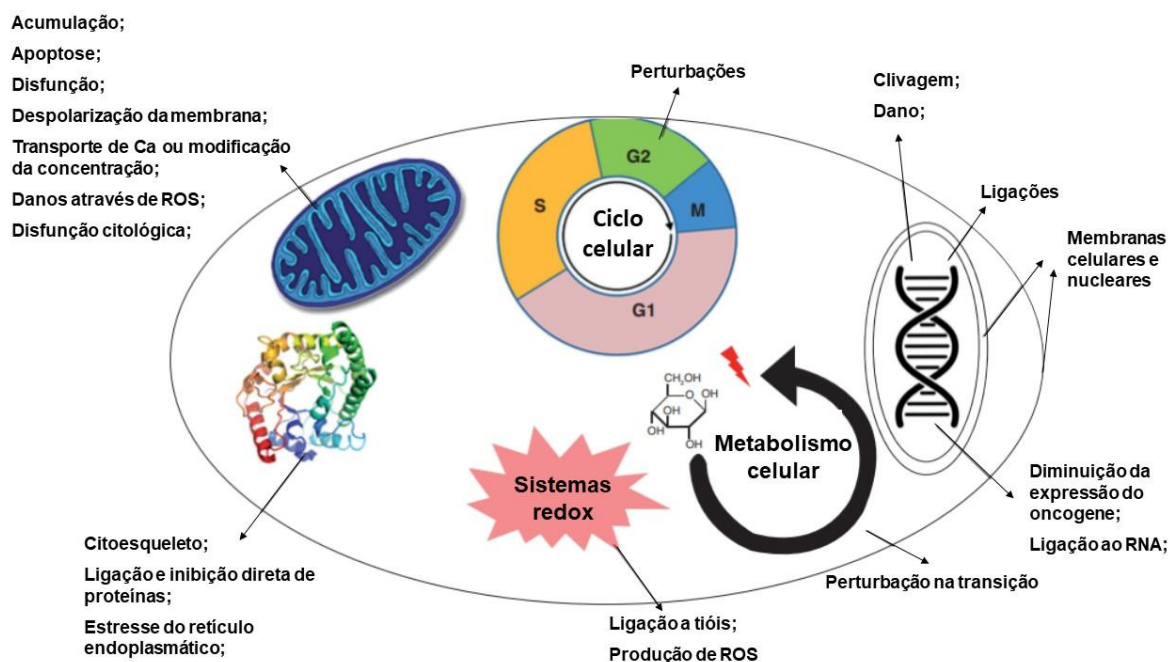


FIGURA 1.3 – Principais alvos identificados dos metais de transição. Adaptado de Marloye e colaboradores (2016)²⁵.

O uso de metais no tratamento do câncer ganhou destaque após a descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina. Esse composto à base de platina foi inicialmente sintetizado em 1845 por Michele Peyrone, entretanto, suas propriedades biológicas foram conhecidas apenas em 1965, quando o biofísico Barnett Rosenberg revelou seu potencial terapêutico ao observar que o composto era capaz de inibir a divisão celular durante experimentos com campos elétricos e culturas bacterianas ^{26,27}. Essa descoberta marcou o início da utilização de complexos metálicos como agentes antitumorais e revolucionou a quimioterapia moderna.

A cisplatina é um complexo quadrado-planar composto por um átomo de Pt(II) coordenado a dois cloretos e dois grupos amina dispostos em configuração *cis*. No meio extracelular, a elevada concentração de cloreto estabiliza a cisplatina e impede sua hidrólise, porém, no interior celular, onde os níveis de cloreto são muito menores, o composto sofre hidrólise lenta, originando espécies monoaquá e diaquá altamente reativas. Dessa forma, a atividade antitumoral da cisplatina está associada à sua capacidade de se ligar ao DNA genômico ou mitocondrial, causando danos que bloqueiam a transcrição de RNAm e a síntese proteica. Esses eventos impedem a replicação celular e desencadeiam processos de morte celular, como apoptose ou necrose. ^{28,29}

Reconhecida por sua ampla eficácia clínica, a cisplatina figura entre os quimioterápicos citotóxicos mais utilizados no tratamento de tumores sólidos, como os de ovário, testículo e bexiga. Sua administração ocorre por via intravenosa, geralmente por infusão de curta duração em solução salina, com dose controlada para garantir maior segurança e estabilidade durante o tratamento.³⁰

A ampla utilização da cisplatina motivou o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Figura 1.4). Entre eles, a carboplatina destaca-se como o análogo de segunda geração de maior relevância, amplamente empregada no tratamento de carcinomas de ovário e testículo. Apesar do mecanismo de ação desse fármaco ser o mesmo que o da cisplatina, a carboplatina apresenta menor incidência de efeitos adversos, principalmente devido à sua hidrólise mais lenta, resultante da presença de ligantes dicarboxilatos bidentados. A oxaliplatina, um complexo de terceira geração, é amplamente utilizada no câncer de cólon e colorretal, onde cisplatina e carboplatina mostram baixa eficácia.^{31,32,33}

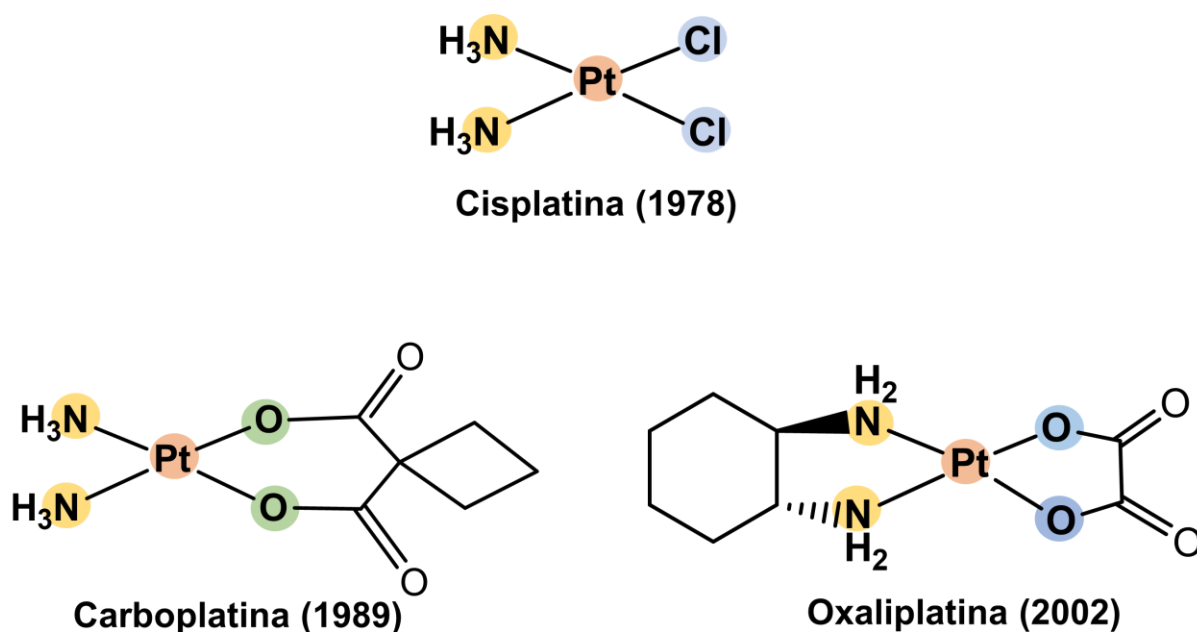


FIGURA 1.4 – Estrutura de alguns compostos de platina empregados como quimioterápicos.

Apesar da ampla aplicação clínica, a cisplatina e seus análogos apresentam limitações marcantes devido à toxicidade e ao desenvolvimento de resistência tumoral. O acúmulo do fármaco em tecidos sensíveis, especialmente nos rins, resulta em nefrotoxicidade significativa, além de efeitos hepáticos, cardíacos,

auditivos e neurológicos ligados ao estresse oxidativo e à disfunção mitocondrial, restringindo a dose administrada. Além disso, a resistência, podendo ser intrínseca ou adquirida, envolve mecanismos como redução da captação, aumento do efluxo, inativação por glutathione, maior capacidade de reparo do DNA e ativação de vias de sobrevivência celular, somados a influências metabólicas, epigenéticas e do microambiente tumoral. Esses fatores comprometem a eficácia terapêutica da cisplatina e destacam a necessidade de alternativas mais seguras e eficientes.^{34,35}

Diante dos desafios associadas ao uso de complexos de platina no tratamento do câncer, esforços contínuos surgem para identificar alternativas mais seguras e eficazes. Entre as principais estratégias, destaca-se o desenvolvimento de agentes antitumorais baseados em outros centros metálicos, com arquiteturas inovadoras e mecanismos de ação distintos, capazes de aumentar a seletividade tumoral e minimizar efeitos adversos. Nesse cenário, diversos complexos metálicos têm sido amplamente investigados, revelando potencial significativo para atuar sobre diferentes alvos biológicos e superar as limitações apresentadas pela cisplatina e seus análogos.^{36,37,38,39}

Dessa forma, os complexos contendo o centro metálico paládio tem despertado grande interesse devido às suas semelhanças estruturais e eletrônicas com os análogos de platina, uma vez que também apresentam configuração eletrônica d^8 , formam complexos diamagnéticos e com geometria quadrado planar, além de serem ácidos moles, que resulta em elevada afinidade por ligantes semelhantes. Essas características sugerem um potencial antitumoral relevante.^{40,41,42}

Contudo, o principal desafio associado ao desenvolvimento desses complexos é a elevada labilidade de suas ligações metal–ligante, que favorece a substituição dos ligantes e ocorre até 10^5 vezes mais rapidamente do que nos complexos de platina. As distinções de reatividade entre eles têm origem em suas configurações eletrônicas e nas diferenças energéticas de seus orbitais. Enquanto o paládio apresenta a configuração $[Kr]4d^{10}$, a platina possui $[Xe]4f^{14}5d^96s^1$, com orbitais 5d energeticamente mais baixos e mais estabilizados. Essa maior estabilização aumenta o potencial de ionização da platina e resulta em ligações metal–ligante mais fortes e estáveis. Além disso, a proximidade energética entre os orbitais 5d e 6s da platina favorece a participação desses elétrons na formação de ligações, contribuindo para a menor velocidade de substituição dos ligantes e para a

maior estabilidade de seus complexos em comparação aos de paládio ⁴³. Essa rápida substituição dos ligantes nos complexos de paládio compromete a estabilidade da molécula antes que ela alcance o alvo biológico desejado. Assim, o sucesso de complexos de Pd(II) como candidatos antitumorais depende fortemente do desenho de ligantes capazes de modular sua labilidade e preservar a integridade do complexo em meio biológico. ^{44,45,46}

Um dos primeiros relatos a destacar o potencial antitumoral de complexos de paládio foi apresentado por Graham e colaboradores ⁴⁷, o que impulsionou a investigação desse metal como agente quimioterápico. A partir disso, inúmeros novos complexos de paládio foram sintetizados com o objetivo de identificar potenciais metalofármacos, muitos dos quais demonstraram atividade citotóxica significativa frente a diversas linhagens tumorais ^{48,49,50}. Notavelmente, em alguns estudos, complexos de paládio exibiram desempenho antitumoral superior ao de análogos baseados em platina, reforçando o interesse contínuo nessa classe de compostos ^{51,52,53}.

O marco inicial do uso do paládio no tratamento do câncer ocorreu com o desenvolvimento do Padeliporfin/WST09 (TOOKAD), uma bacterioclorofila coordenada ao paládio (Figura 1.5). A forma natural desse pigmento é pouco solúvel e instável, mas sua complexação com o metal corrige essas limitações ao conferir maior estabilidade e melhor desempenho fotoquímico. Essas propriedades levaram ao surgimento do TOOKAD Solúvel (Padeliporfina, WST11), primeiro fotossensibilizador à base de paládio aprovado para uso clínico em 31 países da União Europeia, México e Israel para tratar câncer de próstata de baixo risco por terapia fotodinâmica vascular (VTP). ^{54,55}

como análogos vitamínicos, reforçando seu papel fisiológico como cofator na absorção de ferro, especialmente sob condições de deficiência.^{59,60,61}

Dessa forma, estudos voltados à compreensão das propriedades antitumorais de complexos de Ni(II) indicam que seu elevado potencial está relacionado à capacidade de interagir com o DNA, danificá-lo, inibir enzimas, como as topoisomerasas, induzir apoptose e reduzir a angiogênese⁶².

Embora o níquel inorgânico simples apresente toxicidade ambiental e propriedades carcinogênicas, os complexos de Ni(II), quando associados a ligantes adequados, têm sua reatividade, biodisponibilidade e interação com biomoléculas profundamente moduladas. Assim, esses complexos podem atuar de forma seletiva em células tumorais, tornando-se bons candidatos a agentes anticancerígenos.^{63,64,65}

Um estudo recente mostrou que compostos trinucleares de níquel apresentaram forte atividade citotóxica contra células tumorais, porém, de forma pouco seletiva, afetando também células saudáveis. Para superar essa limitação, uma estratégia de direcionamento celular foi explorada, envolvendo o encapsulamento dos compostos na cavidade interna da ferritina, seguida da funcionalização da superfície da proteína com ácido fólico. Essa modificação permitiu que o sistema reconhecesse células que superexpressam receptores de folato, comuns em diversos tipos de câncer. Dessa forma, foi possível direcionar os compostos de Ni(II) preferencialmente para células de câncer de mama, aumentando a citotoxicidade e preservando a linhagem celular saudável⁶⁶.

Apesar das limitações associadas à cisplatina e aos seus análogos, a platina permanece um metal central na busca por novos agentes antitumorais. Nesse contexto, diversos pesquisadores têm explorado novos alvos biológicos, mecanismos de ação e modelos estruturais para desenvolver complexos de platina capazes de contornar esses desafios.

Uma estratégia amplamente empregada consiste na coordenação de ligantes aromáticos, como piridina e seus derivados, ao centro metálico, conferindo ao complexo propriedades intercaladoras, o que representa um modo de interação com o DNA distinto daquele promovido pela cisplatina. Além disso, têm sido investigados ligantes aromáticos contendo grupos doadores de enxofre, como as tiossemicarbazonas, que podem potencializar a atividade citotóxica e modular o modo de ação desses complexos. Por outro lado, derivados de Pt(IV) usados como pró-fármacos mais estáveis e passíveis de ativação redutiva, e complexos

multinucleares que formam padrões de ligação ao DNA distintos também ganharam destaque. Dessa forma, essas abordagens visam ampliar a atividade antitumoral, reduzir toxicidade e superar mecanismos de resistência associados aos agentes clássicos de platina.^{67,68,69,70}

1.3 Tiossemicarbazonas

Na busca por novos candidatos a agentes quimioterápicos, muitos pesquisadores têm adotado a estratégia de empregar ligantes orgânicos com atividade biológica intrínseca, visando potencializar seus efeitos após a coordenação a centros metálicos. A escolha adequada desses ligantes é fundamental para o desenvolvimento de metalofármacos, uma vez que influenciam diretamente a reatividade, a lipofilicidade, a estabilidade e a labilidade do complexo, além de possibilitarem a estabilização de estados de oxidação específicos do metal. Essas modificações estruturais e eletrônicas podem resultar em melhorias significativas no desempenho terapêutico, favorecendo interações mais seletivas com alvos biológicos, maior eficácia farmacológica e redução de efeitos colaterais indesejáveis.^{71,72,73}

Nesse contexto, as tiossemicarbazonas constituem uma classe versátil de ligantes que apresentam múltiplos modos de coordenação, podendo atuar como ligantes monodentados, bidentados e tridentados (Figura 1.6). Essa diversidade de coordenação confere a esses compostos grande interesse sob os pontos de vista estrutural, eletrônico e biológico. Esses ligantes são geralmente sintetizados por meio de reações de condensação entre compostos carbonílicos, como aldeídos ou cetonas, e derivados de tiossemicarbazida, o que permite ampla flexibilidade estrutural. Modificações na natureza do precursor carbonílico ou na estrutura da tiossemicarbazida permitem ajustes finos nas propriedades químicas e biológicas desses ligantes, frequentemente resultando em alterações significativas de sua atividade farmacológica.^{74,75,76}

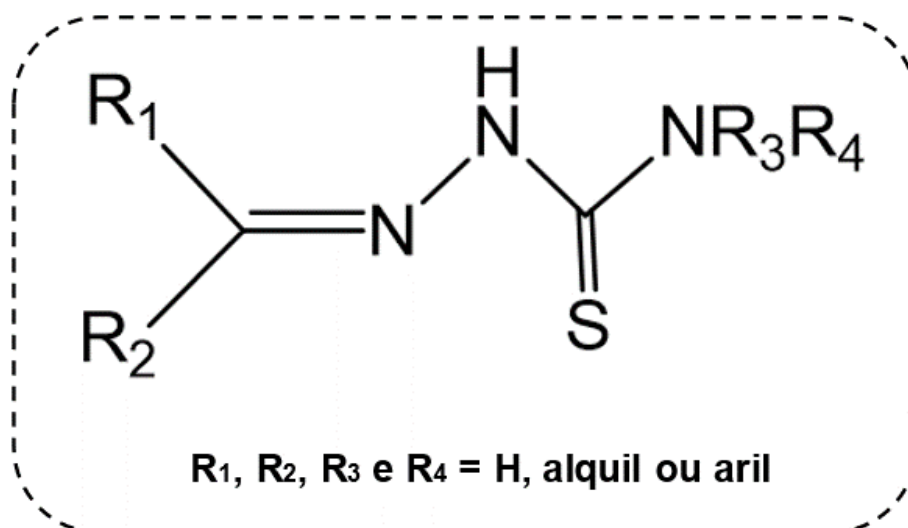


FIGURA 1.6 – Estrutura química geral das tiossemicarbazonas.

O interesse por esses compostos na medicina inicia-se na década de 1950, quando as tiossemicarbazonas passaram a ser utilizadas no tratamento de doenças infecciosas, como a tuberculose e a hanseníase. Posteriormente, a descoberta de suas propriedades antitumorais impulsionou pesquisas intensas, levando à expansão de suas aplicações terapêuticas e ao desenvolvimento de diversos derivados com potencial clínico.^{77,78,79,80}

Esses compostos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo ações antivirais, antibacterianas, antifúngicas e anticancerígenas. Estudos indicam que o elevado potencial biológico das tiossemicarbazonas está fortemente associado à sua capacidade de atuar como agentes quelantes de íons metálicos, especialmente ferro. Essa propriedade tem motivado a síntese de inúmeros derivados estruturais e a investigação de seus efeitos anticancerígenos. Acredita-se que a atividade antitumoral desses compostos esteja relacionada, principalmente, à inibição da enzima ribonucleotídeo redutase (RNR), essencial para a síntese de DNA, levando ao bloqueio do ciclo celular e, conseqüentemente, à indução de morte celular por apoptose.^{81,82,83,84}

Entre os derivados sintéticos mais relevantes, a triapina (3-AP) destaca-se atuando como um potente inibidor da ribonucleotídeo redutase (Figura 1.7). Em comparação com a hidroxiureia, fármaco clássico aprovado para uso clínico que atua diretamente sobre essa enzima, a triapina apresenta maior potência antiproliferativa e mantém atividade frente a linhagens celulares resistentes,

evidenciando seu potencial para superar limitações associadas à quimioterapia convencional. Seus efeitos antitumorais têm sido amplamente investigados em estudos pré-clínicos e clínicos, incluindo mais de 20 ensaios de fase I e II, nos quais foi avaliada tanto em monoterapia quanto em esquemas combinatórios. Mais recentemente, a Triapina avançou para ensaios clínicos de fase III, especialmente em associação com cisplatina e radioterapia, demonstrando melhora nos resultados clínicos em pacientes com câncer cervical e vaginal em estágios avançados.^{85,86,87}

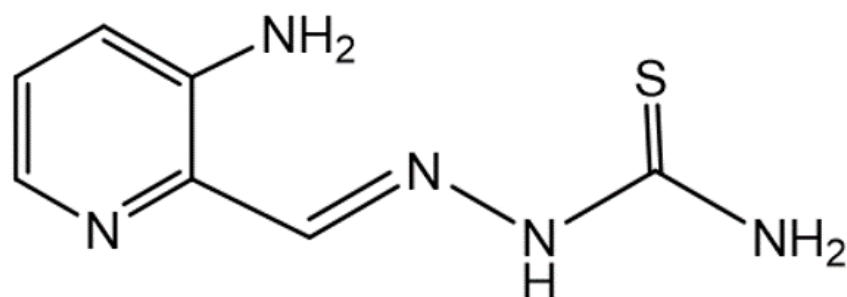


FIGURA 1.7 – Estrutura química da Triapina® (3-AP).

Além disso, as tiossemicarbazonas também apresentam a capacidade de inibir a enzima topoisomerase II, atuando por meio da estabilização dos complexos cliváveis enzima-DNA, o que leva à formação de danos genômicos irreversíveis e, conseqüentemente, à morte das células tumorais^{88,89}. Estudos conduzidos por Lima e colaboradores⁹⁰ relataram a síntese de novos complexos de paládio contendo tiossemicarbazonas que exibiram elevada atividade citotóxica frente à linhagem MDA-MB-231. Nesse contexto, a topoisomerase II passou a ser considerada um alvo molecular de interesse, uma vez que essa enzima se encontra superexpressa nessa linhagem tumoral. De forma consistente, ensaios adicionais demonstraram que os compostos com maior atividade citotóxica foram também aqueles que apresentaram maior inibição da topoisomerase II, reforçando a correlação entre o mecanismo de ação enzimático e o efeito antitumoral observado.

1.4 Planejamento Estrutural

Nos últimos anos, o Laboratório de Compostos de Coordenação na Química Medicinal (CCQM) tem se dedicado de forma sistemática à síntese e caracterização de novos complexos metálicos contendo ligantes tiossemicarbazonas (Figura 1.8). Paralelamente, o grupo vem conduzindo estudos detalhados da

atividade citotóxica desses complexos frente a diferentes linhagens celulares tumorais e não tumorais, com o objetivo de avaliar sua seletividade e potencial terapêutico. Além disso, têm sido investigadas as interações desses compostos com alvos biológicos relevantes, incluindo enzimas e biomoléculas envolvidas em processos de proliferação e morte celular, contribuindo para a elucidação de seus possíveis mecanismos de ação e para o desenvolvimento racional de novos candidatos a agentes antitumorais.

Um estudo recentemente publicado⁹¹ relatou a síntese e a caracterização detalhada de complexos bis-quelados de paládio(II) e níquel(II) contendo diferentes ligantes tiossemicarbazonas, os quais apresentaram perfis biológicos distintos. Os resultados demonstraram elevada atividade citotóxica dos complexos de Pd-TSC, enquanto o complexo de Ni-TSC mostrou-se inativo nas condições avaliadas. Observou-se que a atividade biológica foi fortemente influenciada tanto pela natureza do metal quanto pelos substituintes presentes nos ligantes, o que evidencia a importância do desenho estrutural desses sistemas. A citotoxicidade dos complexos de paládio estendeu-se também a linhagens celulares não tumorais, indicando um perfil de baixa seletividade. Apesar da eficácia observada em ensaios celulares, os complexos exibiram interação fraca com o DNA e não apresentaram inibição significativa da topoisomerase II α , comportamento atribuído, possivelmente, à elevada rigidez estrutural imposta pela coordenação bis-quelada, que pode limitar interações efetivas com esses alvos biomoleculares.

Sob uma perspectiva distinta, outro estudo⁹² descreveu a síntese e a caracterização de novos complexos de Pd(II) e Pt(II) contendo tiossemicarbazonas derivadas de tiofeno, as quais se coordenaram de forma bidentada, resultando em complexos com geometria quadrada planar distorcida. Em particular, a presença de um ligante cloreto na esfera de coordenação dos complexos de paládio conferiu maior labilidade ao sistema, favorecendo processos de substituição em meio biológico e sugerindo um possível comportamento como pró-fármacos. Essa característica pode facilitar a ativação intracelular do complexo, contribuindo para sua atividade citotóxica. De fato, apenas os complexos de Pd(II) exibiram atividade citotóxica significativa, enquanto os análogos de Pt(II), mais inertes do ponto de vista cinético, mostraram-se inativos nas condições avaliadas. Os complexos de paládio demonstraram atividade relevante frente à linhagem resistente A2780cis, além de induzirem morte por apoptose, evidenciada pelo acúmulo de células na fase sub-G1

do ciclo celular. Em conjunto, os resultados evidenciam o potencial desses complexos de Pd como agentes citotóxicos promissores, configurando-se como uma alternativa viável para superar problemas relacionados à resistência à cisplatina.

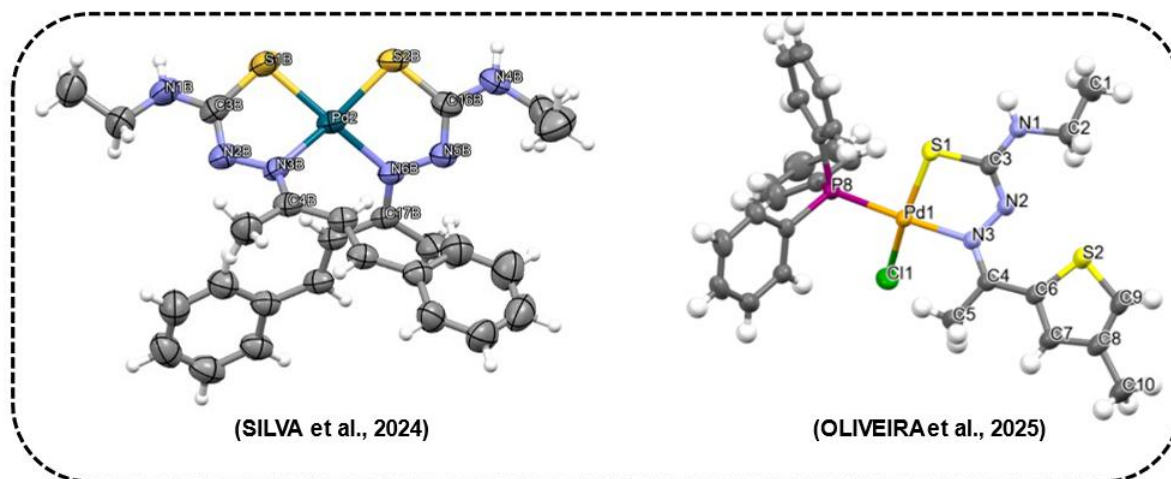


FIGURA 1.8 – Estruturas cristalográficas de alguns dos complexos sintetizados pelo Laboratório CCQM. ^{91,92}

Dessa forma, considerando os resultados apresentados nos trabalhos anteriormente discutidos, o presente trabalho visa investigar como modificações no centro metálico, bem como variações na rigidez estrutural dos complexos, influenciam suas propriedades biológicas, em especial a atividade citotóxica. Busca-se compreender de que maneira fatores como a natureza do metal, a labilidade dos ligantes, o modo de coordenação e a flexibilidade estrutural podem impactar a interação dos complexos com alvos biológicos relevantes, a seletividade frente a células tumorais e não tumorais e os possíveis mecanismos de ação envolvidos, contribuindo para o desenho racional de novos metalofármacos com maior eficácia e melhor perfil terapêutico.

Para isso, o planejamento estrutural dos complexos propostos neste trabalho fundamenta-se na utilização de metais do bloco d⁸ (níquel, paládio e platina), visando avaliar, de forma comparativa, como a natureza do centro metálico influencia as propriedades físico-químicas e biológicas dos compostos obtidos. A trifenilfosfina foi selecionada como co-ligante estratégico por sua capacidade de aumentar a lipofilicidade e a estabilidade dos complexos, características que podem favorecer a permeação através de membranas celulares e, consequentemente, potencializar a atividade biológica ^{93,94}. A tiossemicarbazona, por sua vez, foi

escolhida tanto pela sua habilidade de formar complexos estáveis com metais de transição quanto pelo seu reconhecido potencial biológico, amplamente descrito na literatura.

Adicionalmente, a modulação estrutural dos complexos foi realizada por meio da variação dos grupos substituintes na estrutura da tiossemicarbazona, com o intuito de investigar como pequenas alterações estruturais podem influenciar a reatividade química, o modo de interação com alvos biológicos relevantes e, consequentemente, a atividade citotóxica dos complexos, contribuindo para o entendimento dos fatores que regem seu desempenho como potenciais agentes quimioterápicos.

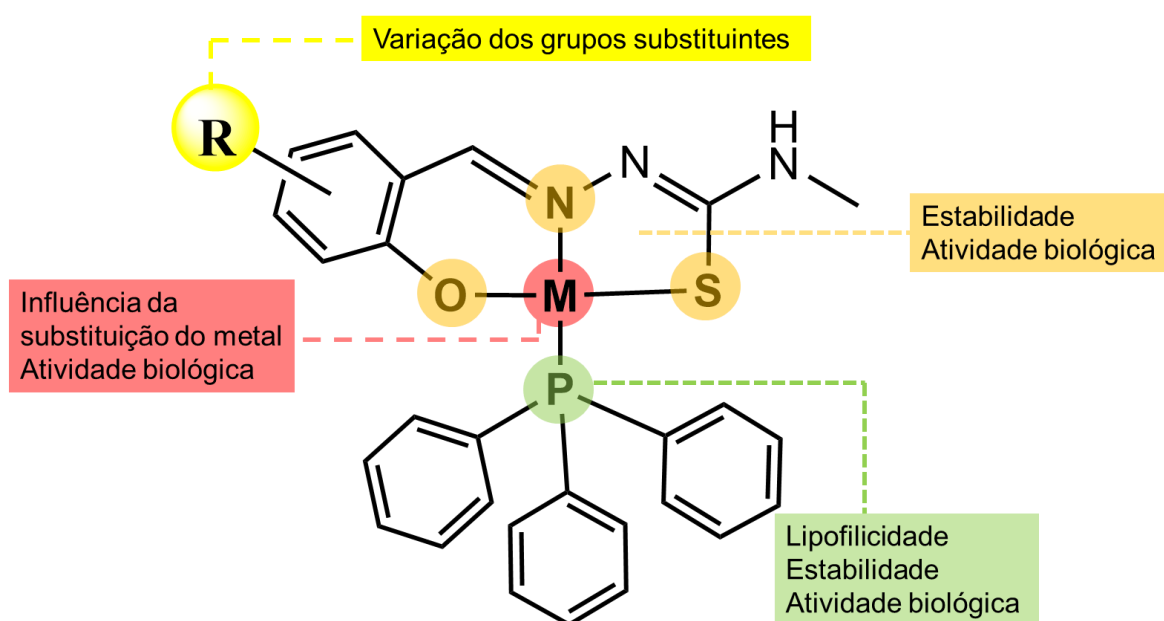


FIGURA 1.9 – Proposta estrutural dos complexos.

Por fim, foram empregados ligantes tiossemicarbazonas derivadas de salicilaldeído, de modo a possibilitar sua coordenação tridentada pelos átomos doadores O, N e S, resultando na formação de complexos com geometria quadrada planar. Essa geometria altamente planarizada, associada à coordenação multidentada (O,N,S), confere elevada estabilidade termodinâmica e maior inércia cinética aos complexos. A presença de ligantes tridentados dificulta processos de substituição e troca de ligantes, contribuindo para a manutenção do arcabouço

molecular mesmo em meio biológico, caracterizado pela presença de diversas espécies competitivas. Como consequência, essa maior estabilidade pode favorecer a permanência do complexo em sua forma ativa no ambiente intracelular, possibilitando interações mais eficientes e sustentadas com alvos biomoleculares envolvidos na regulação da morte celular.

1.5 Modelos de Cultura Celulares

O processo de desenvolvimento de um novo fármaco é composto por quatro etapas principais: descoberta, estudos pré-clínicos, ensaios clínicos, aprovação regulatória e pós comercialização. Nas últimas décadas, cerca de 90% dos candidatos a fármacos não obtiveram sucesso nas fases clínicas ou não atingiram a aprovação final, principalmente em razão da baixa eficácia, toxicidade elevada, propriedades farmacológicas inadequadas e limitações no planejamento estrutural e estratégico ^{95,96,97}.

O processo de descoberta de novos fármacos envolve uma sequência complexa e altamente integrada de etapas iniciais, que incluem a identificação e validação de alvos biológicos, o desenvolvimento de ensaios experimentais criteriosos, análise de grandes bibliotecas de compostos e identificação e otimização de moléculas promissoras. Dessa forma, essas fases iniciais são determinantes para o sucesso do desenvolvimento de medicamentos, uma vez que decisões inadequadas nesse estágio podem resultar em altas taxas de falha nas etapas pré-clínicas e clínicas. ^{98,99}

A etapa pré-clínica compreende a avaliação de compostos por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*, com o objetivo de estabelecer sua eficácia biológica inicial e seu perfil de segurança antes do início dos ensaios clínicos. Essa fase inclui a investigação da atividade farmacológica, estudos de toxicidade e a caracterização farmacocinética, fornecendo dados essenciais sobre absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Os resultados obtidos permitem a seleção de moléculas com maior potencial terapêutico, a definição de doses seguras e a redução de riscos associados às etapas clínicas subsequentes, tornando a fase pré-clínica um elemento crítico para o sucesso do processo de desenvolvimento de novos medicamentos. ^{100,101}

A fase clínica envolve ensaios em humanos destinados a avaliar segurança, eficácia e a relação risco–benefício do candidato a medicamento. Em

contextos específicos, como na oncologia, pode incluir uma fase 0 exploratória, seguida pela fase I, que avalia a segurança, a tolerabilidade e a dose em um pequeno número de voluntários. A fase II, conduzida em pacientes, investiga a eficácia terapêutica e o ajuste da dose, enquanto a fase III compreende estudos multicêntricos, com distribuição aleatória dos participantes, realizados em grandes populações para confirmar a eficácia e a segurança do medicamento. Após essa etapa, os dados são submetidos às agências reguladoras para aprovação, permanecendo o medicamento sob monitoramento pós-comercialização, por meio de estudos de fase IV ou de farmacovigilância.^{102,103}

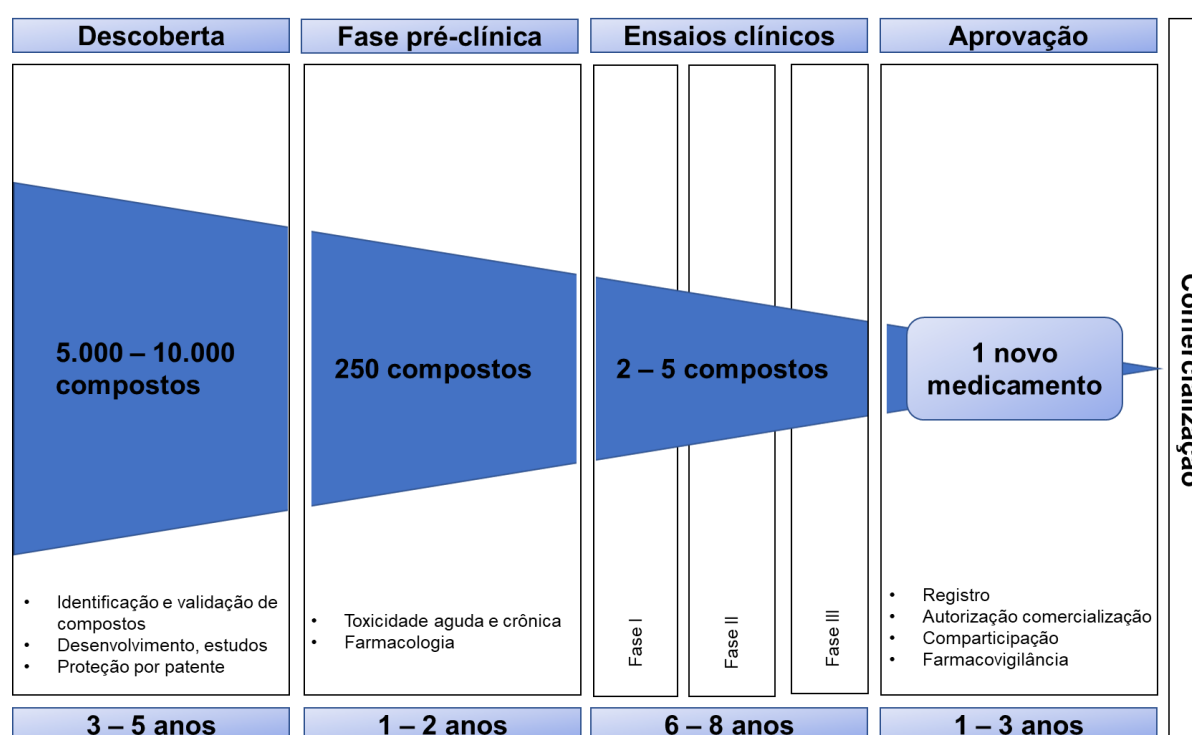


FIGURA 1.10 – Fases do desenvolvimento de um medicamento: descoberta, estudos pré-clínicos, ensaios clínicos, aprovação regulatória e pós-comercialização. Adaptado de Vieira (2020)¹⁵⁸

O desenvolvimento e a consolidação do cultivo celular desempenharam um papel fundamental no êxito dos ensaios pré-clínicos, contribuindo de maneira decisiva para o avanço da pesquisa farmacológica e, conseqüentemente, para a descoberta de novos agentes quimioterápicos.

O cultivo celular consiste em um conjunto de técnicas que possibilitam o isolamento, a manutenção da viabilidade e a proliferação de células em um

sistema *in vitro*, independente do organismo do qual foram obtidas. Esse sistema é composto por nutrientes e fatores essenciais à sobrevivência celular, mantidos sob condições controladas de temperatura, pH e osmolaridade. O desenvolvimento dessa técnica representou um marco para a pesquisa, pois permitiu avanços significativos na compreensão dos mecanismos moleculares, além de contribuir de forma decisiva para áreas como a biologia da célula tumoral e a produção de vacinas.^{104,105,106}

O marco histórico da cultura celular ocorreu em 1907, quando Harrison descreveu o método da gota suspensa para a manutenção de tecido nervoso de anfíbio fora do organismo, demonstrando, pela primeira vez, a viabilidade da sobrevivência e do crescimento celular em condições *in vitro*. Contudo, as frequentes contaminações observadas nas culturas iniciais evidenciaram algumas limitações, o que impulsionou o desenvolvimento e a padronização de procedimentos assépticos. A evolução dessas metodologias resultou, em 1951, no isolamento e a propagação das células HeLa por George Gey, a partir de tecido de carcinoma cervical, estabelecendo a primeira linhagem celular humana imortalizada.

107

Por mais de um século, o cultivo celular bidimensional (2D) tem sido amplamente empregado como ferramenta experimental, especialmente nos estágios iniciais da descoberta e avaliação de fármacos. Nesse modelo, as células são cultivadas como uma monocamada aderida a superfícies planas, como placas de Petri ou frascos de cultura, otimizadas para adesão e crescimento celular. Devido à sua simplicidade, baixo custo, reprodutibilidade e facilidade de manipulação, as culturas 2D permanecem amplamente utilizadas em ensaios *in vitro* para o estudo de citotoxicidade, de mecanismos de ação e de respostas celulares.^{108,109}

Apesar de sua relevância histórica e ampla aplicação, a técnica 2D apresenta limitações significativas. A formação de monocamadas sobre superfícies rígidas não reproduz a arquitetura real dos tecidos, resultando em interações célula–célula e célula–matriz extracelular simplificadas e pouco representativas do ambiente *in vivo*. Essas condições podem levar a alterações na morfologia, polaridade, expressão gênica e funcionalidade celular, além de proporcionar acesso homogêneo a nutrientes e oxigênio, o que não condiz com os gradientes fisiológicos observados em tecidos e tumores. Consequentemente, essas diferenças resultam

em baixa convergência entre os resultados *in vitro* e *in vivo*, comprometendo a previsibilidade de moléculas biologicamente ativas.^{109,110}

Dessa forma, nos últimos anos, pesquisadores têm se dedicado à busca por ferramentas capazes de suprir essa deficiência. Paralelamente, a comunidade científica tem intensificado o debate sobre o uso de experimentos *in vivo*, uma vez que, por razões éticas, torna-se necessária a redução do emprego de animais, além das limitações associadas à disponibilidade, ao custo e às diferenças fisiológicas em relação aos seres humanos¹¹¹.

Surgindo como uma alternativa viável, os modelos de cultura celular tridimensionais (3D) têm ganhado destaque por apresentarem características mais próximas das condições fisiológicas observadas *in vivo*. Diferentemente das culturas bidimensionais, o cultivo 3D permite que as células formem interações célula–célula e célula–matriz extracelular (MEC) mais complexas e realistas. Essas interações são essenciais para a manutenção da morfologia, polaridade, diferenciação, proliferação e sinalização celular, resultando em fenótipos mais representativos do tecido de origem. Assim, o cultivo 3D reduz significativamente a lacuna entre os modelos *in vitro* e a fisiologia celular natural.¹¹²

Uma das principais vantagens da cultura 3D é sua capacidade de mimetizar a arquitetura e a função dos tecidos, especialmente em modelos tumorais. Esferoides tumorais 3D, por exemplo, reproduzem características fundamentais dos tumores sólidos humanos, como a formação de camadas distintas (núcleo necrótico, zona quiescente e região proliferativa externa), além de gradientes de oxigênio, nutrientes e pH.^{112,113}

Além disso, a matriz extracelular desempenha papel central nos sistemas 3D, atuando como um arcabouço estrutural e bioquímico que regula a adesão, migração e comunicação celular. Ao preservar sinais da MEC e a organização tridimensional dos receptores de superfície, as culturas 3D promovem comportamentos celulares distintos daqueles observados em monocamadas 2D, incluindo menor sensibilidade artificial a fármacos e respostas biológicas mais próximas da realidade fisiológica.^{114,115}

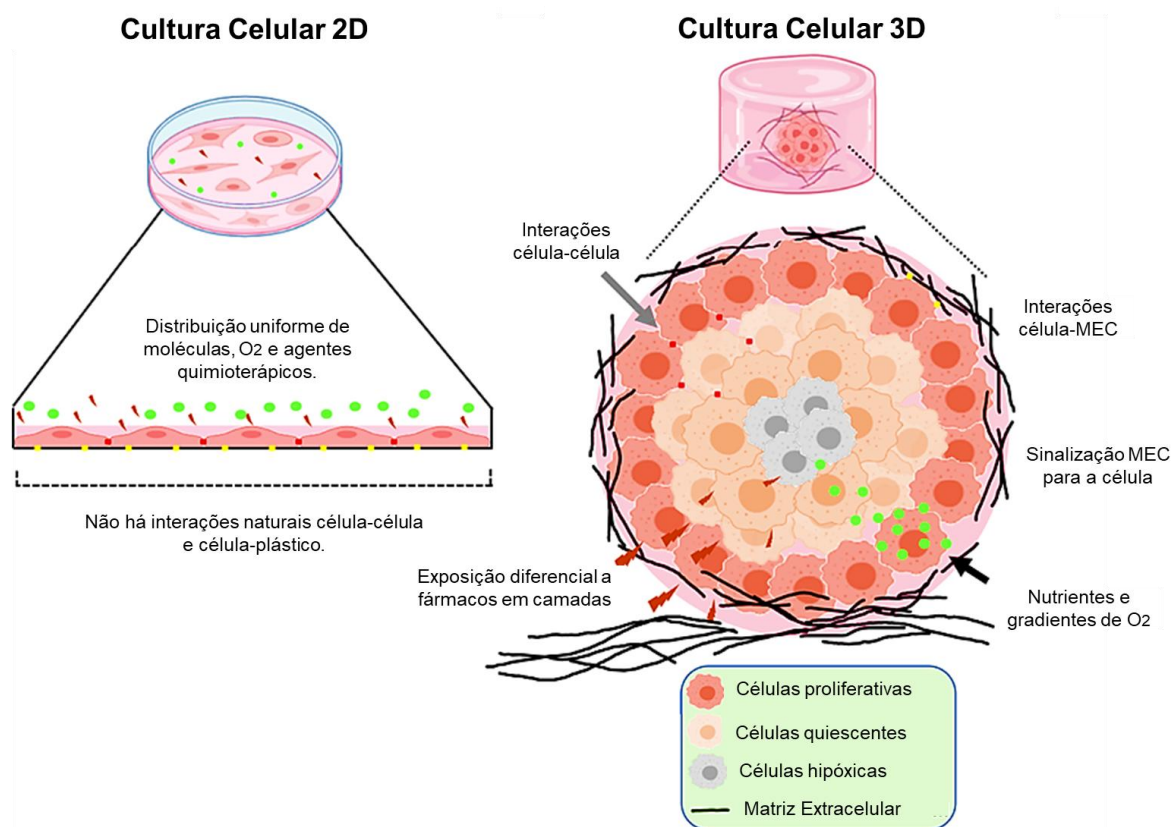


FIGURA 1.11 – Representação esquemática comparativa destacando as principais diferenças estruturais e funcionais entre culturas celulares 2D e 3D. Adaptado de SALINAS-VERA (2022)¹⁵⁹

No estudo de Fontoura *et al.* (2020)¹¹⁶, modelos de cultivo celular 2D e 3D foram comparados com as linhagens tumorais murinas B16F10 (melanoma) e 4T1 (câncer de mama). Os autores demonstraram que, enquanto as culturas 2D apresentaram crescimento em monocamadas planas e alta proliferação, os modelos 3D favoreceram a formação de esferoides compactos, com gradientes de nutrientes e regiões hipóxicas semelhantes às observadas em tumores *in vivo*. Essas diferenças estruturais refletiram-se em alterações funcionais relevantes, incluindo menor proliferação nas regiões centrais, perfis de expressão gênica mais próximos do tecido tumoral e comportamento migratório mais restrito e fisiologicamente realista. Além disso, as culturas 3D apresentaram maior resistência aos fármacos em comparação às culturas 2D, atribuída principalmente à limitada penetração das drogas e às condições de hipóxia. Dessa forma, os resultados evidenciam que os modelos 3D reproduzem melhor o microambiente tumoral, reforçando sua importância em estudos pré-clínicos.

Face ao exposto, este trabalho atua na hipótese de que a combinação entre metais d^8 , tiossemicarbazonas derivadas do salicilaldeído e trifenilfosfina pode modular significativamente as propriedades químicas e biológicas dos complexos formados. A escolha de Pd(II), Pt(II) e Ni(II) decorre do fato de que, embora apresentem semelhanças estruturais importantes, esses centros metálicos diferem quanto à labilidade e ao comportamento em meio biológico, o que pode resultar em perfis distintos de atividade antitumoral. De modo complementar, o uso de tiossemicarbazonas derivadas do salicilaldeído se justifica por sua versatilidade estrutural, reconhecido potencial biológico e capacidade de estabilizar o metal por coordenação multidentada, ao passo que a presença da trifenilfosfina pode contribuir para o ajuste das propriedades eletrônicas e lipofílicas dos sistemas. Nesse contexto, a coordenação tridentada O,N,S mostra-se particularmente estratégica por favorecer um ambiente de coordenação mais organizado e, potencialmente, mais estável em solução. Além disso, a avaliação em modelos celulares tridimensionais assume especial relevância, por permitir investigar o comportamento dos complexos em condições que reproduzem melhor a arquitetura e a complexidade do microambiente tumoral. Assim, propõe-se que variações no centro metálico e no arranjo de coordenação se reflitam diretamente na estabilidade, na citotoxicidade, na seletividade e no mecanismo de ação desses compostos, permitindo estabelecer relações mais consistentes entre estrutura química e resposta biológica, com vistas ao desenvolvimento de novos agentes antitumorais.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é investigar a influência do centro metálico e do ambiente de coordenação nas propriedades biológicas de complexos quadrático-planos de Pd(II), Pt(II) e Ni(II) contendo tiossemicarbazonas derivadas do salicilaldeído e trifenilfosfina, por meio da avaliação de sua atividade citotóxica e seletividade em modelos celulares 2D e 3D fisiologicamente mais relevantes.

2.2 Objetivos específicos

Com a finalidade de alcançar o objetivo geral, o presente trabalho teve como objetivos específicos:

- Sintetizar ligantes do tipo tiossemicarbazona por meio de reações de condensação entre a 4-metil-3-tiossemicarbazida e derivados do 2-hidroxibenzaldeído, mono-substituídos na posição 5 e di-substituídos nas posições 3,5.
- Sintetizar novos complexos metálicos de Pd(II), Pt(II) e Ni(II) contendo ligantes tiossemicarbazonas e trifenilfosfina.
- Caracterizar os ligantes e complexos obtidos por meio de condutividade molar, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e difração de raios X de monocristal.
- Avaliar a estabilidade dos compostos em dimetilsulfóxido (DMSO) e em meio de cultura celular.
- Avaliar a viabilidade celular após incubação com os compostos sintetizados frente a diferentes linhagens tumorais e não tumorais, empregando modelos celulares 2D e 3D.
- Investigar o mecanismo de ação dos compostos e o padrão de morte celular induzido.

3. Parte Experimental

3.1 Materiais

Os solventes e reagentes foram utilizados como recebidos, sem tratamento prévio, conforme fornecidos pelos fabricantes, estando listados com seus respectivos fornecedores na Tabela 3.1.

TABELA 3.1 – Reagentes e materiais utilizados e suas respectivas procedências.

Reagente	Procedência
Acetonitrila P.A	Êxodo
Diclorometano P.A	Synth
Etanol P.A	Synth
Trietilamina P.A	Êxodo
DMSO P.A	Synth
DMSO (d_6) (99,9%)	Sigma-Aldrich
Clorofórmio (d_1) (99,8%)	AcrosOrganics
4-metil-3-tiossemicarbazida	Sigma-Aldrich
2-hidroxibenzaldeído	Sigma-Aldrich
Cloreto de bis(trifenilfosfino)paládio(II) (98%)	Sigma-Aldrich
Cloreto de bis(trifenilfosfino)níquel(II)	Sigma-Aldrich
Tetracloroplatinato(II) de potássio (98%)	Sigma-Aldrich
Trifenilfosfina (99%)	Sigma-Aldrich
MTT	INLAB
Meio de cultura RPMI e DMEM	Vitrocell
Ham's F-12 Nutrient Mix	Vitrocell
Gentamicina	Sigma-Aldrich
Penicilina/Estreptomicina	Vitrocell
Anfotericina	Vitrocell
Tripsina-EDTA	Sigma-Aldrich
Soro Fetal Bovino	Vitrocell

3.2 Sínteses

3.2.1 Síntese dos ligantes tiossemicarbazonas

Para obtenção dos ligantes, uma reação de condensação foi realizada. Em um balão contendo 15 mL de etanol, 0,47 mmol de 4-metil-3-tiossemicarbazida foi adicionada juntamente com 0,47 mmol de 2-hidroxibenzaldeído (M1 = 5-Cl, M2 = 5-NO₂, M3 = 5-F; D1 = 3,5-Cl, D2 = 3,5-NO₂, D3 = 3,5-F). A reação permaneceu sob agitação e refluxo (70°C) por 24 horas.

Posteriormente, o volume da solução foi reduzido e o precipitado foi filtrado à vácuo e lavado com etanol gelado. Os rendimentos obtidos foram de: M1 = 90%, M2 = 86%, M3 = 79%, D1 = 82%, D2 = 87%, D3 = 75%.

Os ligantes sintetizados são solúveis em acetona e DMSO.

3.2.2 Síntese dos complexos de Paládio (II)

Para obtenção dos complexos de Pd(II), em um balão contendo 15 mL de acetonitrila, foram adicionados 0,042 mmol do ligante, juntamente com 0,084 mmol de trietilamina, com o intuito de ocorrer a desprotonação. Em seguida, ocorreu a adição de 0,042 mmol do complexo precursor *trans*-[PdCl₂(PPh₃)₂]. A síntese permaneceu sob agitação e refluxo. Após 24 horas de reação, o precipitado formado foi filtrado e lavado com hexano e água destilada quente. Os complexos tiveram como rendimento: PdM1 = 82%, PdM2 = 69%, PdM3 = 71%, PdD1 = 83 %, PdD2 = 65%, PdD3 = 75%. Os complexos obtidos são solúveis em DMSO, diclorometano e acetona.

3.2.3 Síntese dos complexos NiD2 e PtD2

Para a obtenção do complexo de Ni(II), em um balão contendo 10 mL de etanol e 5 mL de diclorometano, foram adicionados 0,042 mmol do ligante D2 e 0,084 mmol de trietilamina, com o objetivo de promover a desprotonação do ligante. Em seguida, adicionou-se 0,042 mmol do complexo precursor [NiCl₂(PPh₃)₂]. A mistura reacional foi mantida sob agitação e refluxo por 24 horas. Ao término da reação, o precipitado formado foi filtrado e lavado sucessivamente com hexano e água destilada quente. O complexo obtido apresentou rendimento de 73% e mostrou-se solúvel em DMSO, diclorometano e clorofórmio.

Para a síntese do complexo de Pt(II), inicialmente foi preparado o precursor *cis*-[PtCl₂(PPh₃)₂], conforme a metodologia descrita por Villarreal e colaboradores¹¹⁷. Após a obtenção desse precursor, a síntese do complexo PtD2 foi conduzida de forma análoga à do complexo NiD2, diferenciando-se apenas pelo uso exclusivo de etanol como solvente reacional. O rendimento obtido foi de 64%, e o complexo apresentou boa solubilidade em DMSO.

3.3 Instrumentação e técnicas de caracterização

3.3.1 Condutividade molar

As medidas de condutividade molar foram realizadas utilizando um condutivímetro MARCONI, modelo MA 521, pertencente ao grupo LABBES (Laboratório de Analítica, Bioanalítica, Biossensores, Eletroanalítica e Sensores). As soluções foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) para os complexos de Pd(II) e Pt(II) e em diclorometano para o complexo de Ni(II), na concentração de 1×10^{-3} mol L⁻¹.

3.3.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro FT-IR Bomem-Michelson, modelo MB-102, operando na faixa de 4000–450 cm⁻¹, com 32 varreduras. As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de KBr, na proporção de 100:1 (m/m), sendo o KBr previamente seco em estufa a 120 °C. A análise dos espectros foi realizada utilizando o software Origin 9.0.

3.3.3 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis)

Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível foram adquiridos utilizando um espectrofotômetro SHIMADZU UV-1650PC, empregando cubetas com caminho óptico de 1 cm. As titulações sucessivas dos compostos foram realizadas a partir de soluções estoque na concentração de 1×10^{-5} mol L⁻¹, preparadas em DMSO para os complexos de Pd(II) e Pt(II) e em clorofórmio para o complexo de Ni(II). A faixa espectral analisada foi de 700 a 200 nm, e os espectros foram obtidos utilizando o software UVProbe, versão 2.42.

3.3.4 Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas em um espectrômetro BRUKER 9.4 T (400 MHz), modelo AVANCE III, do Laboratório de RMN do Departamento de Química da UFSCar. Para os experimentos de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, os complexos de Pd(II) e Pt(II) foram solubilizados em DMSO e o complexo de Ni(II) em clorofórmio, utilizando-se solventes não deuterados e um capilar contendo D_2O como referência externa. Para os experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C e técnicas bidimensionais (2D), empregaram-se DMSO- d_6 para os complexos de Pd(II) e Pt(II) e clorofórmio- d_1 para o complexo de Ni(II). O tratamento dos dados foi realizado utilizando o software MestReNova, versão 12.0.

3.3.5 Difração de raios X por monocristal (DRX)

Os monocristais adequados para análise estrutural foram obtidos por difusão lenta de solvente, a partir de soluções dos complexos preparadas em mistura de diclorometano e etanol. Para os ligantes M1 e D2, os monocristais foram obtidos em soluções de etanol e DMSO. Os experimentos de difração de raios X por monocristal foram realizados em colaboração com o Laboratório de Cristalografia do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP/IFSC-USP).

A coleta de dados foi conduzida em um difratômetro Rigaku XtaLAB Synergy-S Dualflex, equipado com detector híbrido de contagem de fótons HyPix-6000HE, utilizando radiação Mo- $\text{K}\alpha$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$). Durante as medidas, os cristais foram mantidos à temperatura de 100 K. O refinamento da cela unitária, bem como a coleta, redução dos dados e correção dos efeitos de absorção, foram realizados por meio do software CrysAlisPro.

As estruturas cristalinas foram solucionadas pelo método de faseamento intrínseco utilizando o programa SHELXT-2018/2¹¹⁸ e refinadas por mínimos quadrados pelo método de matriz completa no programa SHELXL-2019/2¹¹⁹, ambos integrados ao ambiente Olex2¹²⁰. Os átomos não hidrogenóides foram localizados a partir de mapas de densidade eletrônica de Fourier e refinados com parâmetros anisotrópicos. Os átomos de hidrogênio foram posicionados em locais idealizados, de acordo com a natureza química e a hibridização dos átomos aos quais estão ligados, e refinados isotropicamente.

3.3.6 Espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC Q-TOF MS)

Para as análises por espectrometria de massas de alta resolução, aproximadamente 1 mg da amostra foi inicialmente solubilizado em 1000 µL de DMSO grau LC-MS e, em seguida, diluído em acetonitrila (ACN) grau LC-MS até a concentração final de 1 ppm. As análises foram realizadas por injeção direta, sem o uso de coluna cromatográfica. A fase móvel, operando em modo isocrático, foi composta por água Milli-Q acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e acetonitrila acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico, na proporção de 5:95 (v/v), respectivamente. A vazão empregada foi de 0,300 mL min⁻¹, com volume de injeção de 3 µL. As amostras foram analisadas em um sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (UHPLC) acoplado a um espectrômetro de massas Q-TOF 6545 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), equipado com fonte de ionização por eletrospray Jet Stream (ESI), operando no modo positivo. Os parâmetros de ionização utilizados estão descritos a seguir:

TABELA 3.2 – Parâmetros para ionização dos compostos.

Tipo de ionização	ESI+
Gás Temp (°C)	320
Gás Flow (L.min ⁻¹)	12
Nebulizer (Psi)	35
Sheath Gás Temp.	300
Sheath Gás Flow	10
VCap	3200
Nozzle Voltage (V)	700
Fragmentor	110
Skimmer	65
Energia de colisão	-
OctopoleRFPeak	750

O erro foi determinado a partir da comparação entre os valores de massa teórica e experimental obtidos nos espectros de MS, considerando-se um erro máximo aceitável de 5 ppm. Os espectros foram adquiridos na faixa de razão massa/carga (m/z) de 100 a 1000, com taxa de varredura de 3 espectros s⁻¹, e posteriormente processados utilizando o software MassHunter Workstation, versão B.08.00.

3.4 Ensaios biológicos

3.4.1 Estabilidade em solução

Considerando a importância de avaliar a estabilidade dos complexos nas condições empregadas nos ensaios biológicos, foram realizados estudos de estabilidade em DMSO e em mistura DMSO/DMEM por meio da técnica de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$. Os complexos foram solubilizados em DMSO e em DMSO/DMEM (90:10, v/v), e a estabilidade sob essas condições foi monitorada por um período de até 48 horas

3.4.2 Cultivo celular

Para a realização dos ensaios biológicos, foram utilizadas as seguintes linhagens celulares tumorais: carcinoma pulmonar A549 (ATCC N° CCL-185), carcinoma de ovário A2780 (ECACC N° 93112519), carcinoma de ovário resistente à cisplatina A2780cis (ECACC N° 93112517), carcinoma de mama triplo-negativo MDA-MB-231 (ATCC N° HTB-26), carcinoma de mama MCF-7 (ATCC N° HTB-22) e melanoma humano A375 (ATCC N° CRL-1619). Como controles não tumorais, empregaram-se as linhagens de pulmão MRC-5 (ATCC N° CCL-171), queratinócitos humanos HaCaT (CVCL_0038) e ovário de hamster chinês CHO-K1 (ATCC N° CCL-61).

As linhagens A549, MDA-MB-231, A375, MRC-5 e HaCaT foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina (100 U mL^{-1}), gentamicina (50 mg L^{-1}) e anfotericina B ($25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). As linhagens A2780, A2780cis e MCF-7 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), suplementado com 10% de FBS, penicilina (100 U mL^{-1}), gentamicina (50 mg L^{-1}) e anfotericina B ($25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). A linhagem CHO-K1 foi mantida em meio Ham's F-12 Nutrient Mix (Vitrocell), suplementado com 10% de FBS. Todas as linhagens celulares foram mantidas em estufa umidificada, a 37°C , sob atmosfera contendo 5% de CO_2 , em frascos apropriados para cultivo celular.

3.4.3 Viabilidade celular

Para os ensaios de viabilidade celular, as células foram tripsinizadas, contadas e ajustadas à concentração adequada, sendo posteriormente semeadas em placas de cultivo de 96 poços, fundo chato (Kasvi), na densidade de $1,5 \times 10^4$ células por poço. As placas foram incubadas por 24 h em estufa umidificada a 37 °C, sob atmosfera contendo 5% de CO₂, para permitir a adesão celular. Após esse período, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos complexos (50 – 0,1 µM) e novamente incubadas nas mesmas condições por 48 h. Em seguida, foram adicionados 50 µL de solução de MTT (1 mg mL⁻¹ em PBS) a cada poço, e as placas foram incubadas por mais 3 h. Durante esse período, o MTT foi reduzido pela atividade das desidrogenases mitocondriais das células viáveis, resultando na formação de cristais de formazan de coloração violeta. Os cristais de formazan formados foram solubilizados por meio da adição de isopropanol, e a absorbância foi medida em leitor de microplacas (BioTek™, Epoch™) no comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade celular foi determinada a partir dos valores de absorbância utilizando o software GraphPad Prism, versão 8.0.2.

3.4.4 Ensaio morfológico

Para os ensaios morfológicos, as linhagens celulares A2780 ($0,6 \times 10^5$ células/poço) e MRC-5 ($0,3 \times 10^5$ células/poço) foram semeadas em placas de 12 poços. As células foram incubadas por 24 h em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após esse período, as culturas foram tratadas com diferentes concentrações do composto, correspondentes a $1 \times IC_{50}$, $2 \times IC_{50}$ e $4 \times IC_{50}$, conforme o valor de IC_{50} obtido para a linhagem A2780 no ensaio de viabilidade. As possíveis alterações morfológicas induzidas pelo tratamento foram monitoradas nos tempos de 0, 24 e 48 h após a adição do composto. A avaliação morfológica foi realizada por microscopia óptica utilizando um microscópio CELENA® (Logos Biosystems).

3.4.5 Ensaios por microscopia de fluorescência

Para a avaliação morfológica por fluorescência utilizando os marcadores DAPI e CellMask™ Green Plasma Membrane, células da linhagem A2780 ($1,5 \times 10^4$ células por poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após esse período, as células

foram tratadas com diferentes concentrações do composto e novamente incubadas nas mesmas condições por 48 h. Em seguida, as células foram fixadas com metanol por 5 min e incubadas com solução de CellMask™ Green Plasma Membrane (solução de trabalho 1×) por 30 min, para marcação da membrana plasmática. Após a remoção da solução, adicionou-se DAPI (300 nM), seguido de incubação por mais 30 min, para marcação do núcleo celular. Ao final do procedimento, as imagens fluorescentes foram adquiridas utilizando um microscópio CELENA® (Logos Biosystems).

Para o ensaio de viabilidade celular utilizando o kit LIVE/DEAD®, células da linhagem tumoral A2780 ($1,5 \times 10^4$ células por poço) foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações do composto por 48 h. Em seguida, adicionou-se 100 µL da solução de marcadores preparada conforme as instruções do fabricante, mantendo-se a incubação por 30 min. Após esse período, o meio foi removido, substituído por meio de cultura fresco, e as imagens foram obtidas utilizando o microscópio CELENA® (Logos Biosystems).

3.4.6 Ensaio clonogênico

Para a realização do ensaio clonogênico, células das linhagens A2780 e MRC-5 foram semeadas em placas de 6 poços, na densidade de 500 células por poço. Após o período inicial de adesão celular, as culturas foram tratadas com diferentes concentrações do composto por 48 h. Em seguida, o meio contendo o composto foi removido e substituído por meio de cultura fresco, permitindo o crescimento das colônias por um período adicional de 10 dias. Ao final do período de crescimento, o meio de cultura foi removido, e as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e fixadas com uma solução de metanol/ácido acético (3:1, v/v) por 10 min. Posteriormente, as colônias formadas foram coradas com solução aquosa de cristal violeta a 5% (m/v) por 30 min. As placas foram então fotografadas por meio do sistema de imagem iBright™ 1500, e o número de colônias foi quantificado utilizando o software ImageJ.

3.4.7 Análise do ciclo celular

Para a análise do ciclo celular, células da linhagem A2780 foram semeadas em placas de 12 poços, na densidade de 1×10^5 células por poço. Após o período de adesão celular, as culturas foram tratadas com diferentes concentrações do complexo e mantidas por 48 h. Em seguida, as células foram coletadas, centrifugadas a 2.000 rpm por 5 min a 4 °C, lavadas com PBS gelado e fixadas em etanol 70% por 24 h a -20 °C. Após a fixação, as células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em 250 µL de solução contendo ribonuclease A (RNase A, 0,2 mg mL⁻¹; Sigma-Aldrich) e iodeto de propídio (PI, 1 µg mL⁻¹; Sigma-Aldrich), seguida de incubação em gelo por 30 min, protegidas da luz. A análise do conteúdo de DNA e da distribuição das fases do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo utilizando um equipamento Accuri C6 (BD Biosciences), com aquisição de 10.000 eventos por amostra. Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software FlowJo.

3.4.8 Apoptose por Anexina V

A detecção de apoptose foi realizada utilizando o kit PE-Anexina V/7-AAD (BD Biosciences). Células da linhagem A2780 (1×10^5 células/poço) foram semeadas em placas de 12 poços e, após o período de adesão, tratadas com diferentes concentrações do composto por 24 h. Ao término do tratamento, as células foram coletadas, centrifugadas a 2.000 rpm por 5 min a 4 °C e lavadas com PBS. Em seguida, o pellet celular foi ressuspensão em 200 µL de tampão de ligação contendo PE-Anexina V (2,5 µL) e 7-AAD (2,5 µL), seguido de incubação por 15 min à temperatura ambiente, protegida da luz. Após a incubação, as amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences), com aquisição de 10.000 eventos por amostra. A quantificação da fluorescência e a análise dos dados foram realizadas utilizando o software CellQuest (BD Biosciences). A cisplatina (50 µM) e o DMSO (0,5%) foram empregados como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.4.9 Potencial da membrana mitocondrial

Para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), utilizou-se o corante JC-1 (Termofisher). Dessa forma, células da linhagem A2780

($1,0 \times 10^4$ células por poço) foram semeadas em placas pretas de 96 poços (Corning) e tratadas com o complexo nas concentrações correspondentes ao $0,5 \times IC_{50}$ e $1 \times IC_{50}$ (0,48 e 0,96 μM) por 24 h. Em seguida, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com solução do corante JC-1 (100 μL em meio RPMI 1640 isento de vermelho de fenol) por 1 h. Ao final da incubação, as imagens fluorescentes foram adquiridas utilizando o sistema de imagem digital CELENA® S (Logos Biosystems).

3.4.10 Uptake celular

Para o ensaio de uptake celular, células tumorais da linhagem A2780 e não tumorais da MRC-5 (2×10^6 células/placa) foram semeadas em placas de Petri e, após 24 h, incubadas com o composto na concentração de 10 μM por 6 h. Em seguida, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com tampão PBS, tripsinizadas e quantificadas.

A determinação do teor de paládio internalizado foi realizada por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF AAS), utilizando um espectrômetro Analytik Jena ContrAA 700 (Alemanha), equipado com amostrador automático de sólidos SSA 600. As análises foram conduzidas por introdução direta de sólido, empregando a linha analítica de 360,955 nm e volume de pico de absorbância correspondente a três pixels. O programa de aquecimento do forno e os parâmetros instrumentais estão descritos nas Tabelas 3.3 e 3.4. Argônio de alta pureza (99,999%) foi utilizado como gás de purga. As soluções foram preparadas com água de alta pureza (18,2 M Ω cm), e ácido nítrico grau Suprapur®. As soluções padrão de Pd foram obtidas a partir de solução estoque de 100 mg L⁻¹, acidificadas com HNO₃ a 0,5% (v/v), sendo a curva de calibração construída na faixa de 0,5 a 6,5 ng de Pd. As amostras celulares foram diluídas em água deionizada, acidificadas com HNO₃ a 0,5% (v/v) e homogeneizadas. Alíquotas de 10 μL foram introduzidas automaticamente no forno de grafite, e todas as determinações foram realizadas em duplicata (n = 2).

TABELA 3.3 – Programa de aquecimento para a determinação de Pd em células por HR-CS GFAAS.

Step	Name	Temp, (°C)	Ramp, [°C s ⁻¹]	Hold [s]
1	Drying	90	3	20
2	Drying	110	5	10
4	Pyrolysis	900	300	30
6	Gas adaption	900	0	5
7	Atomize	2400	maximum	7
8	Clean	2500	500	4

TABELA 3.4 – Parâmetros instrumentais para a determinação de Pd em células por HR-CS GF AAS.

Wavelength (nm)	360,955
Read time (s)	10
Integration mode of absorbance sinal	Area
Evaluation pixels	3
Purge gas	Argon
Gas flow during atomization	Stop
Working range (ng)	0,5- 6,5

3.4.11 Ensaio de cultura 3D

Para o experimento de cultura 3D, foi utilizado o Kit Bioprint de 96 poços da tecnologia de Cultura Celular 3D Magnética (m3D). Em uma garrafa de 25 cm², contendo a linhagem celular A2780, adicionou-se 80 µL de uma solução contendo nanopartículas (NanoShuttle – PL), para magnetizar as células. Após 24h, as células foram tripsinizadas, contadas para o ajuste da concentração das células, e em seguida semeadas em uma placa de cultura repelente de 96 poços (1500 células/poço). A placa de cultura foi colocada sob drives magnéticos a fim de que formassem esferoides através das forças magnéticas dos ímãs. A placa foi armazenada em estufa (37°C - 5% CO₂) e a formação e crescimento dos esferoides foram acompanhados por um microscópio CELENA® S Digital Imaging System (Logos Biosystems). Formados os esferoides, adicionou-se diferentes concentrações do complexo e acompanhou-se o efeito do composto sobre os esferoides por 6 dias. No sexto dia, adicionou-se os marcadores fluorescentes contidos no Kit

LIVE/DEAD® e as imagens de fluorescência também foram registradas com o auxílio do microscópio CELENA®.

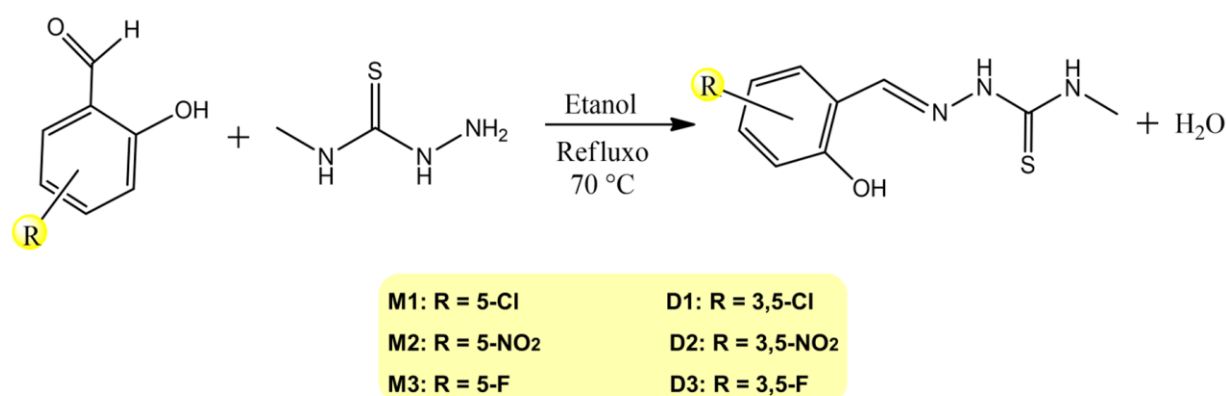
3.5 Análise estatística

A análise estatística foi conduzida no software GraphPad Prism 8.0.2. As médias e os desvios-padrão dos grupos experimentais foram calculados e submetidos à análise de variância One-way (ANOVA) para comparação entre o grupo controle e os grupos tratados. Em seguida, aplicou-se o teste de Dunnett para identificar diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.

4. Resultados e discussões

4.1 Sínteses dos ligantes

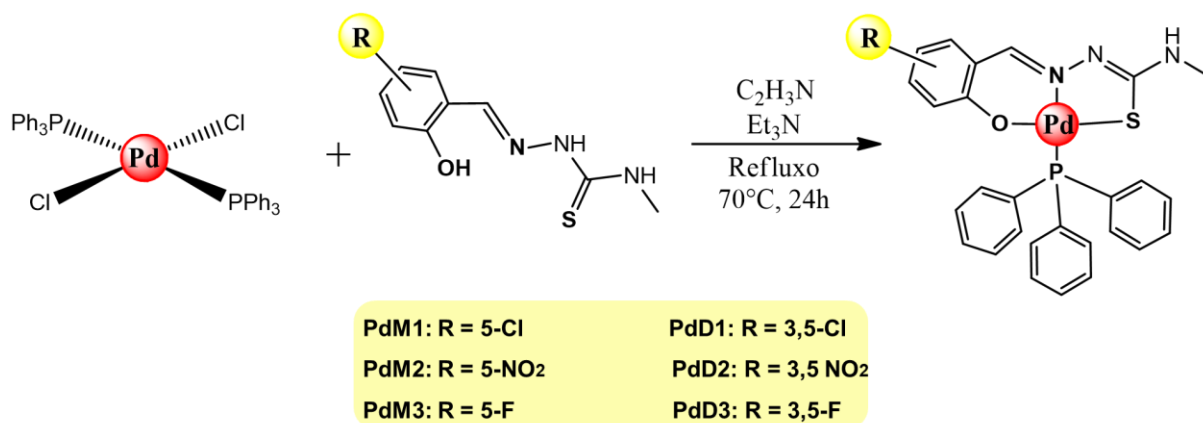
Os ligantes do tipo tiossemicarbazona foram sintetizados por meio de uma reação de condensação, realizada em etanol, entre a 4-metil-3-tiossemicarbazida e derivados do 2-hidroxibenzaldeído, monosubstituídos na posição 5 ou dissubstituídos nas posições 3 e 5, conforme ilustrado no Esquema 4.1. Os ligantes obtidos a partir dos aldeídos monosubstituídos constituem a série M, enquanto aqueles derivados dos aldeídos dissubstituídos compõem a série D.



ESQUEMA 4.4.1 – Rota sintética para a obtenção dos ligantes tiossemicarbazonas.

4.2 Síntese dos complexos de Paládio

Os complexos de Pd(II) foram sintetizados a partir de um complexo precursor *trans*-[PdCl₂(PPh₃)₂], juntamente com os ligantes sintetizados em uma solução de acetonitrila. A trietilamina foi utilizada para que ocorresse a desprotonação do ligante, e dessa forma, o ligante se coordenar de forma tridentada. A rota sintética está ilustrada no Esquema 4.2.



ESQUEMA 4.4.2 – Rota sintética para a obtenção dos complexos de Pd(II).

4.3 Condutividade molar

As medidas de condutividade molar dos complexos obtidos foram realizadas em DMSO, e os resultados indicaram que todos se comportam como não eletrólitos, de acordo com a faixa sugerida na literatura ¹²¹ (eletrólitos 1:1 entre 20 e 62 $\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$). Esses resultados são compatíveis com a formação de complexos neutros, em que o ligante se coordena ao centro de Pd(II) após dupla desprotonação, envolvendo o oxigênio fenólico e a porção tioamídica..

TABELA 4.1 – Dados de condutividade molar, em DMSO.

Complexos	Condutividade molar ($\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)
PdM1	0,68
PdM2	0,68
PdM3	0,60
PdD1	1,08
PdD2	1,07
PdD3	0,58

4.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Outro método utilizado para a caracterização dos complexos foi a espectroscopia de absorção na região do infravermelho, empregada para analisar os modos vibracionais das ligações químicas nas moléculas quando submetidas à radiação e para obter evidências da presença de grupos funcionais em suas estruturas.

Os ligantes livres apresentam duas bandas características correspondentes às vibrações $\nu(\text{N-H})$, localizadas entre 3200 e 3500 cm^{-1} , além de uma banda atribuída às vibrações $\nu(\text{O-H})$ em 3100 cm^{-1} . Nos complexos coordenados, observa-se apenas uma banda $\nu(\text{N-H})$, o que indica a desprotonação do grupo hidroxila, que passa a se coordenar diretamente ao centro metálico, bem como a desprotonação do grupo hidrazina. A participação do nitrogênio na coordenação foi evidenciada pelo deslocamento da banda $\nu(\text{C=N})$ para frequências mais baixas nos espectros dos complexos (de aproximadamente 1560 para 1530 cm^{-1}). Esse efeito é apoiado pelo deslocamento da banda $\nu(\text{N-N})$ para valores inferiores, em comparação com a posição observada no ligante livre, indicando a alteração eletrônica resultante da ligação ao centro metálico. Além do deslocamento da banda $\nu(\text{C=N})$, os espectros dos complexos exibem alterações adicionais na região associada ao sistema azometínico, coerentes com a redistribuição eletrônica decorrente da coordenação. Em paralelo, o deslocamento de $\nu(\text{C=S})$ para valores menores de onda (de aproximadamente 720 para 690 cm^{-1}) sustenta a participação do átomo de enxofre na coordenação ao paládio, fenômeno típico do enfraquecimento da ligação carbono–enxofre, indicando que os tio-ligantes neutros se converteram em ligantes aniônicos durante o processo de coordenação ao íon metálico. ^{122,123,124}

Nos espectros dos complexos também podem ser observados modos vibracionais característicos dos estiramentos $\nu(\text{P-C})$, localizados em torno de 1100 cm^{-1} , que indicam a presença do ligante fosfínico ¹²⁵. Além disso, bandas na região de 550 a 450 cm^{-1} podem ser atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{Pd-N})$ e $\nu(\text{Pd-O})$ ¹²⁶. A Figura 4.1 apresenta os espectros do ligante M1 e do complexo PdM1.

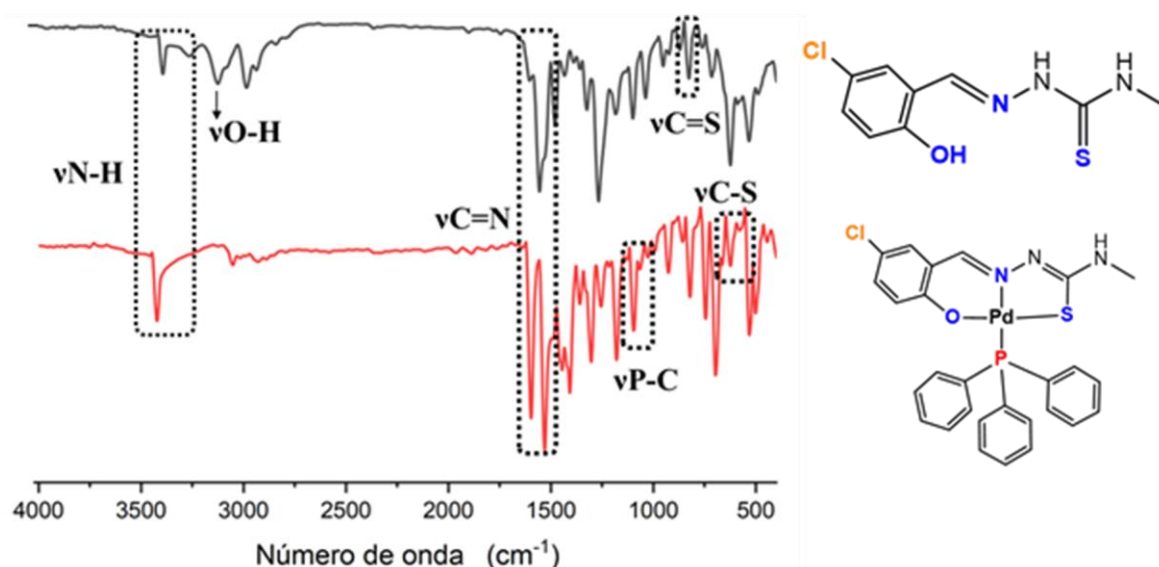


FIGURA 4.1 – Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante M1 e do complexo PdM1.

Os demais complexos apresentaram perfil espectroscópico análogo, indicando que o mesmo modo de coordenação foi preservado em toda a série. As Tabelas 4.2 e 4.3 mostram os valores, em número de onda, das principais bandas observadas nos espectros, bem como suas tentativas de atribuição.

Em resumo, as alterações observadas nos espectros de IV indicam que a coordenação promove reorganização eletrônica ao longo da estrutura do ligante TSC, consistente com a desprotonação do grupo fenólico e da função tioamídica, bem como com a ligação do ligante ao Pd(II) de modo tridentado via O, N e S. A presença das bandas atribuídas ao fragmento fosfínico reforça ainda a manutenção da trifenilfosfina na esfera de coordenação

TABELA 4.2 – Atribuições dos principais estiramentos observados para os complexos e ligantes da série 1.

Atribuições	M1	PdM1	M2	PdM2	M3	PdM3
νNH	3394 m	3416 m	3335 f	3417 m	3373 m	3422 m
νNH	3271 f	-	3253 f	-	3226 m	
νOH	3123 m	-	3077 f	-	3114 m	
$\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$	2984 m	3049	2947 f	3056 f	-	3094 f
$\nu\text{C=N}$	1560 F	1531 F	1569 F	1528m	1564 F	1532 F
$\nu\text{C=N}$	-	1597 F	-	1595 F	-	1596 F
$\nu\text{C=C}_{\text{aromático}}$	1477 m	1442 m	1521 F	1486 m	1494 F	1458 F
$\nu\text{N-N}$	1431 f	1401 m	1433 m	1370 f	1445 F	1421 F
$\nu\text{C-N}$	1274 F	1303 m	1279 F	1308 F	1277 F	1301 F
$\nu\text{P-C}$	-	1091 m	-	1099 m	-	1097 m
$\nu\text{C=S}$	720 m	691 m	740 f	698 m	719 F	690 F

F- forte; m- média; f- fraca; ν - vibração de estiramento, δ - vibração de deformação; - Não identificado

TABELA 4.3 – Atribuições dos principais estiramentos observados para os complexos e ligantes da série 2.

Atribuições	D1	PdD1	D2	PdD2	D3	PdD3
νNH	3576 m	3428 m	3324 m	3372 m	3373 m	3418 m
νNH	3375 f	-	-	-	3224 f	-
νOH	3139 m	-	3106 m	-	3095 f	-
$\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$	2997 m	3058 f	2946 f	3067 f	3021 f	3058 f
$\nu\text{C=N}$	1545 F	1532 F	1542 F	1530 F	1559 F	1532 F
$\nu\text{C=N}$	-	1597 F	-	1602 F	-	1596 F
$\nu\text{C=C}_{\text{aromático}}$	1453 m	1431 m	1502 F	1431 m	1486 F	1449 F
$\nu\text{N-N}$	1327 f	1307 m	1344 F	1322 F	1366 F	1292 m
$\nu\text{C-N}$	1268 F	1255 m	1243 F	1229 m	1227 F	1245 F
$\nu\text{P-C}$	-	1097 m	-	1100 m	-	1106 m
$\nu\text{C=S}$	731 m	694 m	714 m	691 m	709 m	690 F

F- forte; m- média; f- fraca; ν - vibração de estiramento, δ - vibração de deformação; - Não identificado

4.5 Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível

A espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta e visível (UV-vis) foi realizada com o intuito de avaliar os tipos de transições eletrônicas presentes nos complexos e nos ligantes livres. O DMSO foi utilizado como solvente para a obtenção de todos os espectros.

Os ligantes livres da série monossubstituída (série 1) exibiram bandas intraligantes em torno de 340 e 360 nm, atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, associadas aos grupos aromáticos, azometínicos e tioamídicos.^{127,128} Já o ligante M2 apresentou uma nova banda em 459 nm devido à presença do grupo cromóforo -NO₂, além das suas bandas características das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ sofrerem um efeito batocrômico, comparados aos ligantes M1 e M3. Essa nova banda pode ser atribuída à ocorrência de um processo de transferência de carga intramolecular, promovido pela interação do sistema conjugado da tiossemicarbazona com o grupo -NO₂, que é um forte aceitador de elétrons, devido à ressonância e à indução. Dessa forma, o NO₂ estabiliza significativamente o orbital LUMO do sistema, reduzindo o gap HOMO–LUMO e deslocando a absorção para comprimentos de onda maiores^{129,130,131,132,133}. Para os ligantes da série dissustituída (série 2), todas as bandas sofrerem um efeito batocrômico devido ao aumento do número de grupos substituintes no anel aromático.

Nos espectros dos complexos coordenados, observa-se a banda intraligante $\pi \rightarrow \pi^*$ mais alargada quando comparada aos dos ligantes, provavelmente também pela presença do ligante fosfínico, aumentando o número dessas transições eletrônicas. Além disso, o surgimento de uma nova banda em aproximadamente 400 nm é compatível com uma transição de transferência de carga metal-ligante (MLCT), possivelmente envolvendo contribuição do centro Pd(II) em direção aos orbitais π^* da tiossemicarbazona e/ou orbitais associados ao ambiente fosfínico^{134,135}. Na Figura 4.2, são apresentados os espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis para o ligante M1 e para o complexo PdM1 e na Tabela 4.4 são apresentados os dados de absortividade molar e tentativa de atribuição das bandas dos complexos.

O deslocamento e o alargamento das bandas após a coordenação indicam que a complexação altera o sistema eletrônico do ligante, tornando-o mais deslocalizado. Esse comportamento é coerente com a formação do anel quelato e

com a interação do sistema π da tiossemicarbazona com o centro metálico e o co-ligante fosfínico.

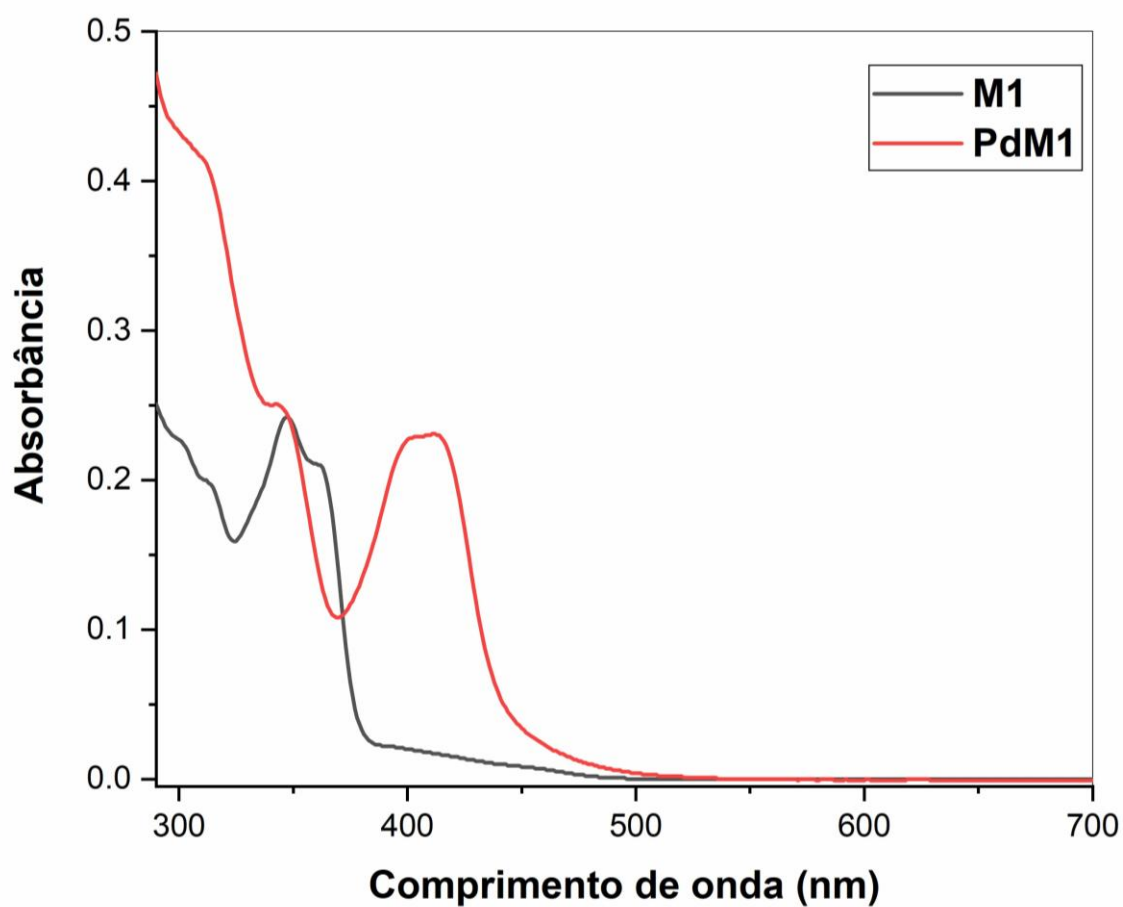


FIGURA 4.2 – Espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis para o ligante M1 e complexo PdM1, em DMSO.

TABELA 4.4 – Dados de absorptividade molar (ϵ) e tentativa de atribuição das bandas.

Complexos	λ (nm)	ϵ (mol ⁻¹ cm ⁻¹ L)	Transição provável
PdM1	308	20837	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	343	12615	IL ($n \rightarrow \pi^*$)
	412	11684	MLCT
PdM2	306	25900	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	339	25210	IL ($n \rightarrow \pi^*$)
	396	28341	MLCT
PdM3	306	18083	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	341	11432	IL ($n \rightarrow \pi^*$)
	413	10093	MLCT
PdD1	-	-	-
	344	17247	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	399	13423	MLCT
PdD2	316	18219	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	350	12656	IL ($n \rightarrow \pi^*$)
	403	11389	MLCT
PdD3	313	21359	IL ($\pi \rightarrow \pi^*$)
	348	14344	IL ($n \rightarrow \pi^*$)
	403	11425	MLCT

4.6 Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de fósforo (RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$) é uma técnica interessante para monitorar a coordenação dos ligantes tiossemicarbazonas, além de avaliar a pureza dos compostos sintetizados, em relação a subprodutos de fósforo que eventualmente podem vir a ser formados.

Os espectros de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos sintetizados apresentaram um singleto com deslocamento químico ligeiramente diferente do complexo precursor (δ 23,20 ppm, em DMSO/D₂O), indicando a coordenação dos ligantes tiossemicarbazonas, mas sem promover alterações significativas no ambiente químico do átomo de fósforo. Além disso, não foram observados sinais referentes a subprodutos contendo átomos de fósforo, como trifenilfosfina livre (δ -5 ppm) e trifenilfosfina oxidada (δ 27 ppm). Na Figura 4.3, são apresentados os espectros de todos os complexos coordenados, e na Tabela 4.5, seus respectivos valores de deslocamento químico.

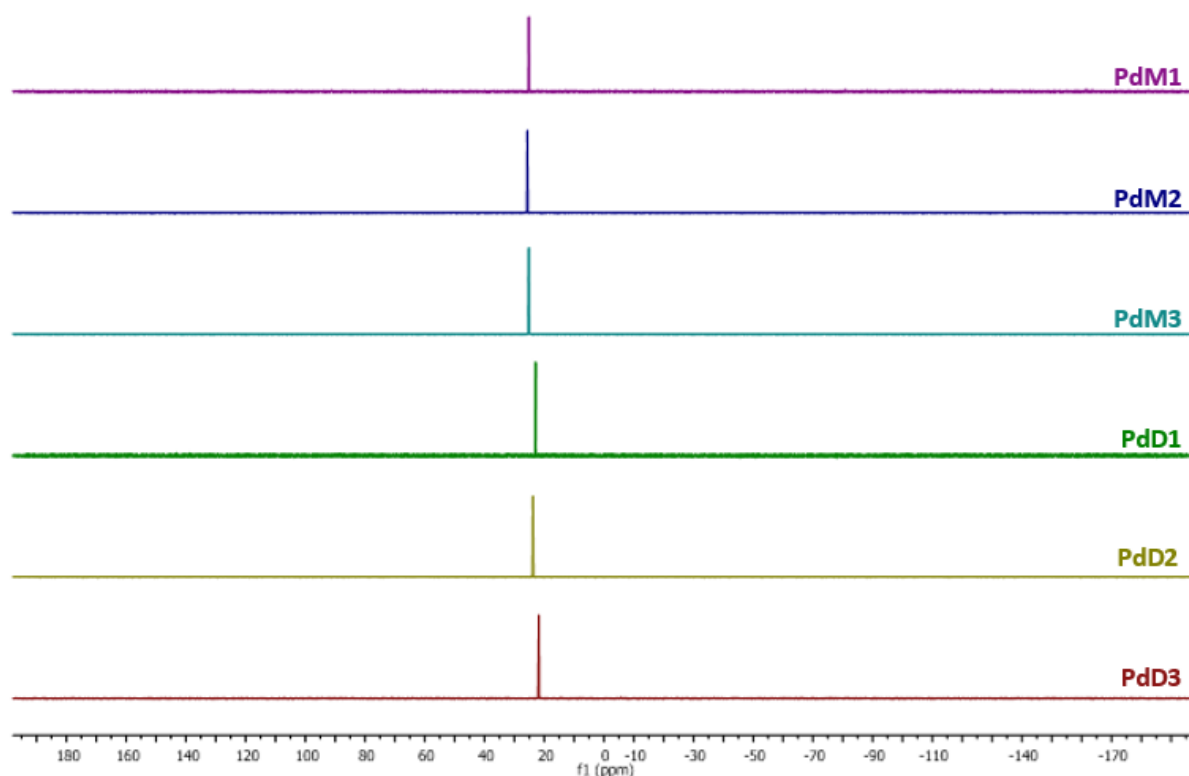
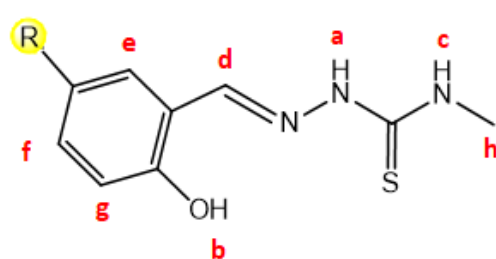


FIGURA 4.3 – Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para os complexos coordenados em DMSO/D₂O.

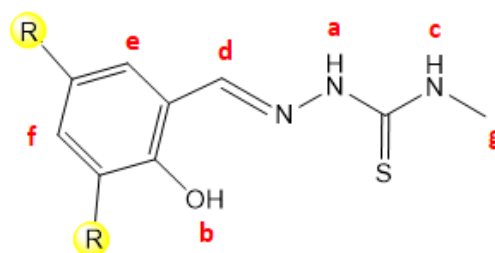
TABELA 4.5 – Dados de δ para os complexos e sintetizados em DMSO/D₂O.

Complexo	δ (ppm)
PdM1	25,14
PdM2	25,66
PdM3	25,13
PdD1	22,84
PdD2	23,79
PdD3	21,90

Nos espectros de RMN de ^1H , os sinais correspondentes a cada próton do ligante livre e do ligante coordenado foram atribuídos conforme as distribuições apresentadas na Figura 4.4.



Série 1



Série 2

FIGURA 4.4 – Esquemas de distribuições dos sinais referentes aos prótons dos ligantes livres e complexos coordenados.

As atribuições para os ligantes e complexos da série 1 e 2 são apresentadas nas Tabelas 4.6 e 4.7, respectivamente. Todos os espectros foram obtidos em DMSO- d_6 como solvente, com exceção do complexo PdD3, cuja análise foi realizada em CDCl₃, a fim de obter uma melhor resolução e separação dos sinais espectrais. Nas Figuras 4.5 e 4.6, são apresentados os espectros referentes ao ligante M1 e ao complexo PdM1, respectivamente.

TABELA 4.6 – Deslocamentos químicos de RMN de ^1H para os ligantes e complexos da Série 1.

Atribuições	M1	PdM1	M2	PdM2	M3	PdM3
H – a	11,50 (s, 1H)	-	11,60 (s, 1H)	-	11,56 (s, 1H)	-
H – b	10,23 (s, 1H)	-	11,60 (s, 1H)	-	9,99 (s, 1H)	-
H – c	8,59 (d, 1H)	7,17 (d, 1H)	8,71 (d, 1H)	7,35 (d, 1H)	8,63 (d, 1H)	7,15 (d, 1H)
H – d	8,30 (s, 1H)	8,43 (d, 1H)	8,37 (s, 1H)	8,64 (s, 1H)	8,35 (d, 1H)	8,42 (d, 1H)
H – e	8,07 (d, 1H)	7,66 (d, 1H)	8,83 (d, 1H)	8,61 (d, 1H)	7,93 (dd, 1H)	7,34 (dd, 1H)
H – f	7,22 (dd, 1H)	7,15 (dd, 1H)	8,12 (dd, 1H)	7,99 (dd, 1H)	7,10 (td, 1H)	7,05 (td, 1H)
H – g	6,87 (d, 1H)	6,51 (d, 1H)	7,06 (d, 1H)	6,52 (d, 1H)	6,91 (dd, 1H)	6,49 (dd, 1H)
H – h	3,01 (d, 3H).	2,77 (d, 3H)	3,03 (d, 3H)	2,78 (d, 3H).	3,06 (d, 3H)	2,76 (d, 3H)
H – PPh ₃	-	7,58 (m, 15H)	-	7,60 (m, 15H)	-	7,60 (m, 15H)

TABELA 4.7 – Deslocamentos químicos de RMN de ^1H para os ligantes e complexos da Série 2

Atribuições	D1	PdD1	D2	PdD2	D3	PdD3
H – a	11,66 (s, 1H)	-	11,63 (s, 1H)	-	11,60 (s, 1H)	-
H – b	10,20 (s, 1H)	-	-	-	10,04 (s, 1H)	-
H – c	8,71 (d, 1H)	7,29 (d, 1H)	8,71 (d, 1H)	7,55 (d, 1H)	8,63 (d, 1H)	4,65 (d, 1H)
H – d	8,39 (s, 1H)	8,49 (d, 1H)	8,43 (s, 1H)	8,75 (d, 1H)	8,35 (d, 1H)	8,22 (d, 1H)
H – e	7,60 (d, 1H)	7,60 (d, 1H)	8,65 (d, 1H)	8,84 (d, 1H)	7,79 (ddd, 1H),	6,77 (d, 1H)
H – f	8,09 (d, 1H)	7,43 (d, 1H)	8,90 (d, 1H)	8,53 (d, 1H)	7,25 (ddd, 1H)	6,86 (m, 1H)
H – g	3,08 (d, 3H)	2,75 (d, 3H).	3,03 (d, 3H)	2,78 (d, 3H).	3,01 (d, 3H)	2,96 (d, 3H).
H – PPh ₃	-	7,59 (m, 15H).	-	7,57 (m, 15H).	-	7,57 (m, 15H).

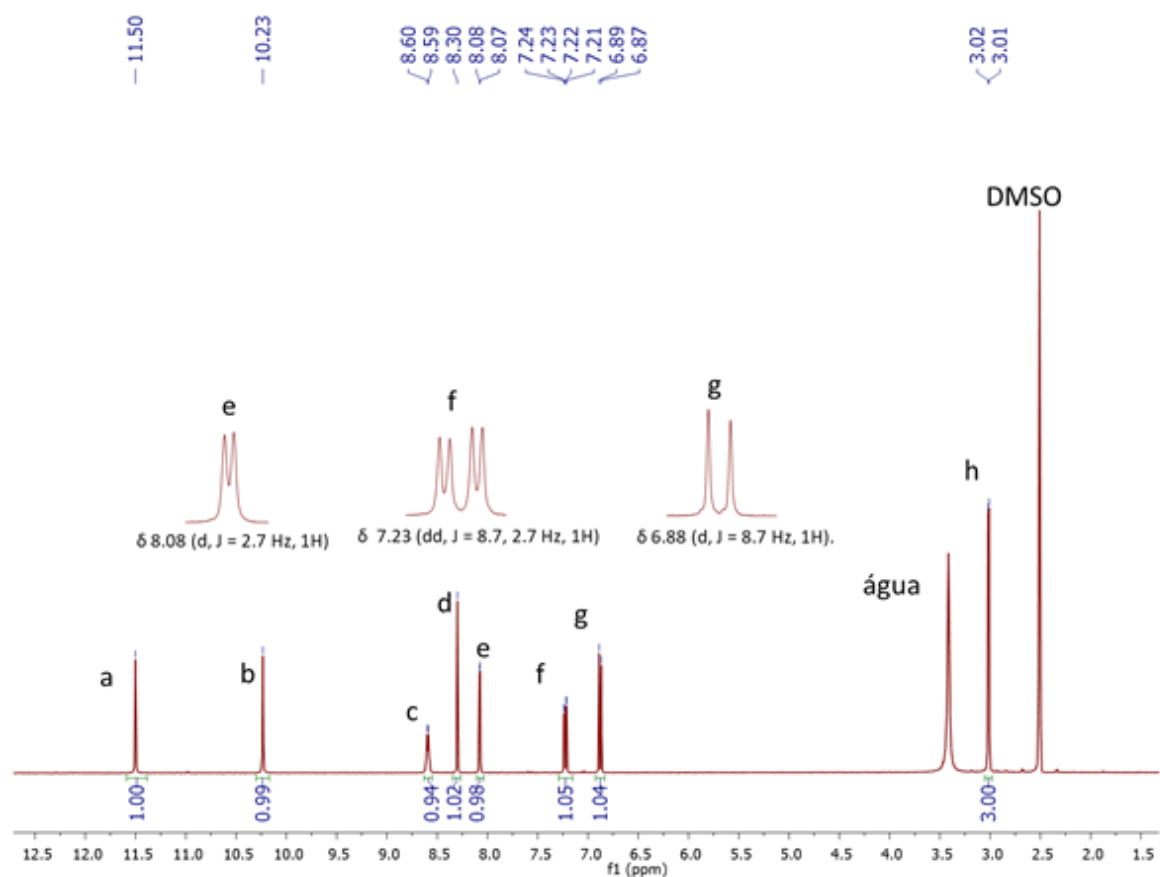


FIGURA 4.5 – Espectro de RMN de ^1H para o ligante M1, em $\text{DMSO-}d_6$.

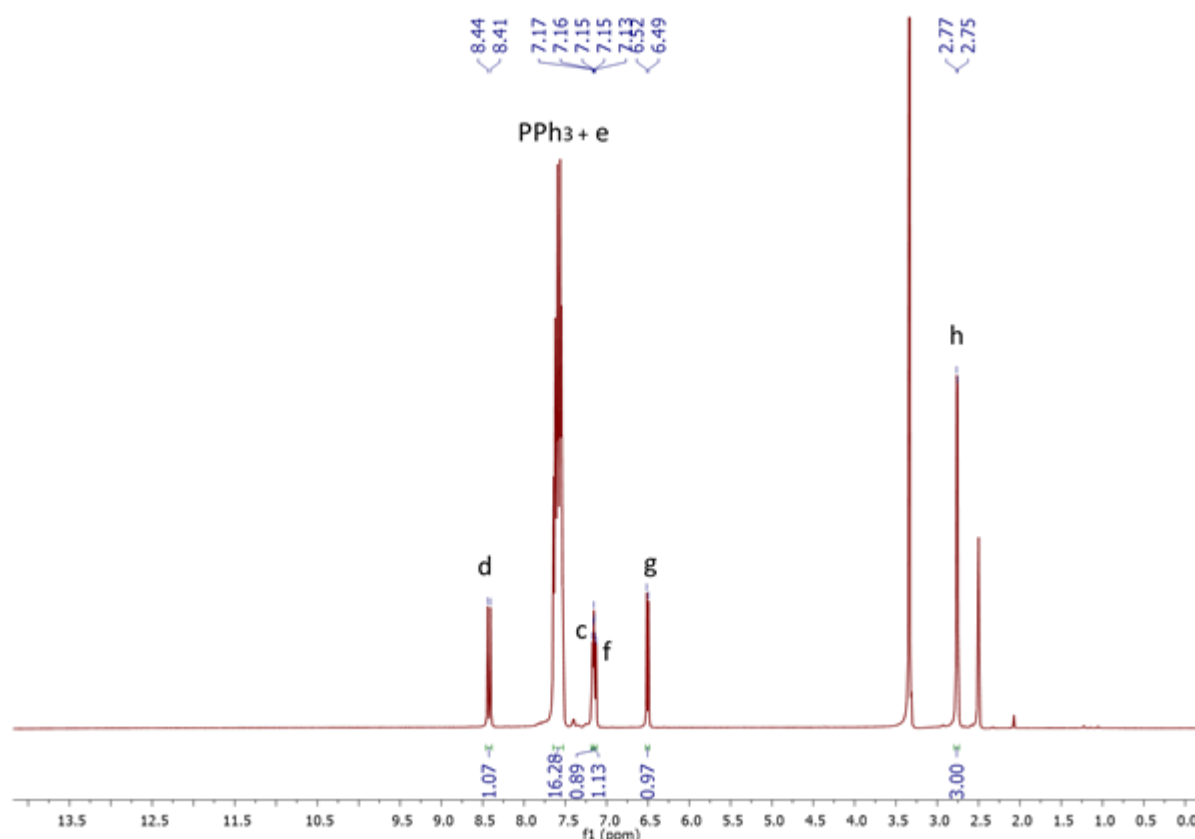


FIGURA 4.6 – Espectro de RMN de ^1H para o ligante PdM1, em $\text{DMSO}-d_6$.

Com relação ao espectro de RMN de ^1H do ligante M1 (Figura 4.5), foi observado a presença de 10 hidrogênios de acordo com as integrais de cada sinal apresentado. Na região menos desblindada, observa-se a presença de um dubleto em δ 3,08 ppm referente aos hidrogênios do grupo metil $-\text{CH}_3$ presente na posição 4 da tiossemicarbazida, com constante de acoplamento igual a $J = 4,5$ Hz. Os sinais em δ 2,5 e 3,34 ppm são característicos do $\text{DMSO}-d_6$ e da água presente nesse mesmo solvente deuterado. Já na região mais desblindada do espectro, são encontrados 2 singletos em δ 11,50 e 10,23 ppm atribuídos aos hidrogênios Ha e Hb do grupo hidrazínico e da hidroxila, respectivamente. Um dubleto em δ 8,59 ppm foi atribuído ao Hc do grupo $\text{NH}-\text{CH}_3$, com constante de acoplamento igual a $J = 4,5$ Hz, e um singletto em δ 8.30 ppm, referente ao próton do grupo imina. Já os prótons aromáticos, o Hf teve como sinal um duplo dubleto em δ 7,23 ppm, com constante de acoplamento igual a $J = 8,7$ e 2,7 Hz uma vez que ele acopla aos demais hidrogênios presentes no anel aromático. Por fim, o hidrogênio He apresentou um dubleto com deslocamento químico em δ 8.08 ppm ($J = 2.7$ Hz), indicando que seu acoplamento com o Hf é menor comparado ao Hg (δ 6.88 ppm e $J = 8.7$ Hz), visto

que o H_g está mais próximo ao H_f, apresentando um acoplamento mais efetivo. No geral, todos os ligantes apresentaram resultados próximos e condizentes com moléculas similares presentes na literatura¹²⁶. Algumas diferenças são apresentadas nos ligantes M3 e D3, por apresentarem o átomo de flúor como grupo substituinte, e como consequência, os hidrogênios aromáticos podem acoplar com esse grupo e apresentarem sinais de multiplicidade triplo dubleto (td) e duplo duplo dubleto (ddd).

De acordo com o espectro de RMN de ¹H para o complexo PdM1 (Figura 4.6), observa-se nitidamente a ausência dos sinais referentes para o próton da hidroxila e do grupo hidrazínico, indicando a coordenação do ligante ao paládio através do átomo de oxigênio fenólico e do enxofre na forma tiolato. Além disso, o sinal atribuído ao hidrogênio da imina apresentou multiplicidade de um dubleto, com constante de acoplamento de 13,8 Hz. Esse acoplamento reforça a proximidade espacial e eletrônica entre a porção azometínica e o fósforo coordenado, em concordância com o arranjo estrutural proposto^{136,122}. Além do desaparecimento dos sinais de OH e NH, o deslocamento dos demais sinais do ligante após a complexação evidencia alterações no ambiente eletrônico da molécula, consistentes com sua coordenação ao centro metálico. Vale ressaltar também a presença de um multiplete em aproximadamente 7,60 ppm, referente aos prótons aromáticos do co-ligante fosfínico.

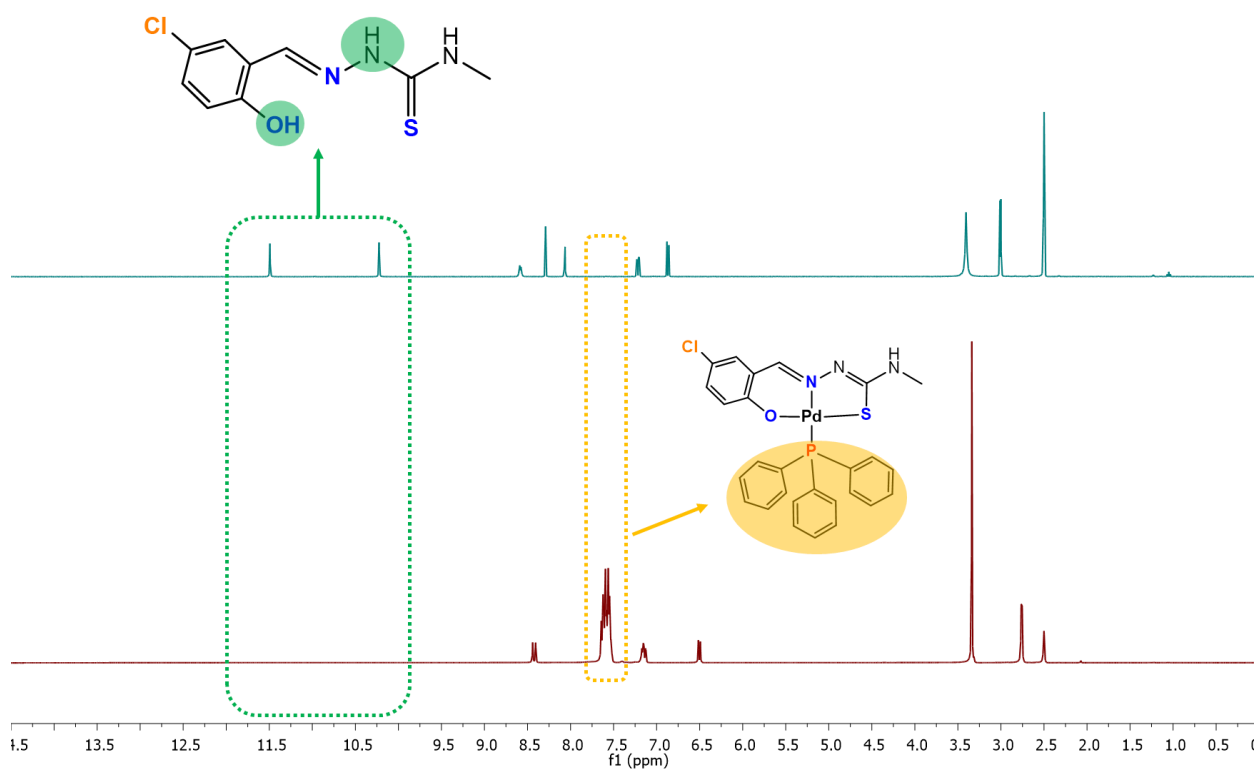


FIGURA 4.7 – Comparativo entre os espectros de RMN ^1H do ligante M1 e do complexo PdM1 , em DMSO.

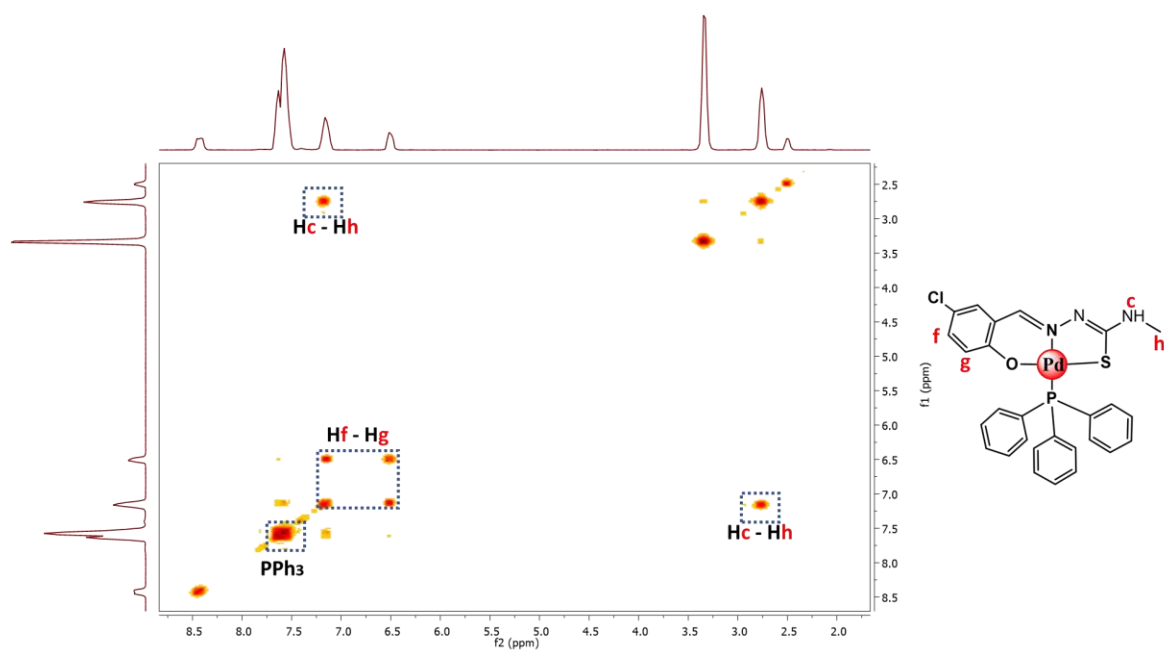


FIGURA 4.8 – Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY do complexo PdM1 , em $\text{DMSO}-d_6$.

De forma geral, os espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos apresentaram sinais dos carbonos tiolatos em cerca de 171 ppm e dos carbonos fenólicos em cerca de 161 ppm. Os sinais dos carbonos ligados ao grupo imina foram encontrados próximos à 148 ppm. Os carbonos aromáticos dos grupos salicialdeídos e da trifenilfosfina encontram-se na faixa entre 134 ppm e 118 ppm. Os carbonos dos grupos metil estão localizados em cerca de 33 ppm. As atribuições exatas dos carbonos do ligante M1, coordenado ao complexo, foram obtidas com o auxílio dos espectros HSQC e HMBC (Figuras 4.10 e 4.11, respectivamente).

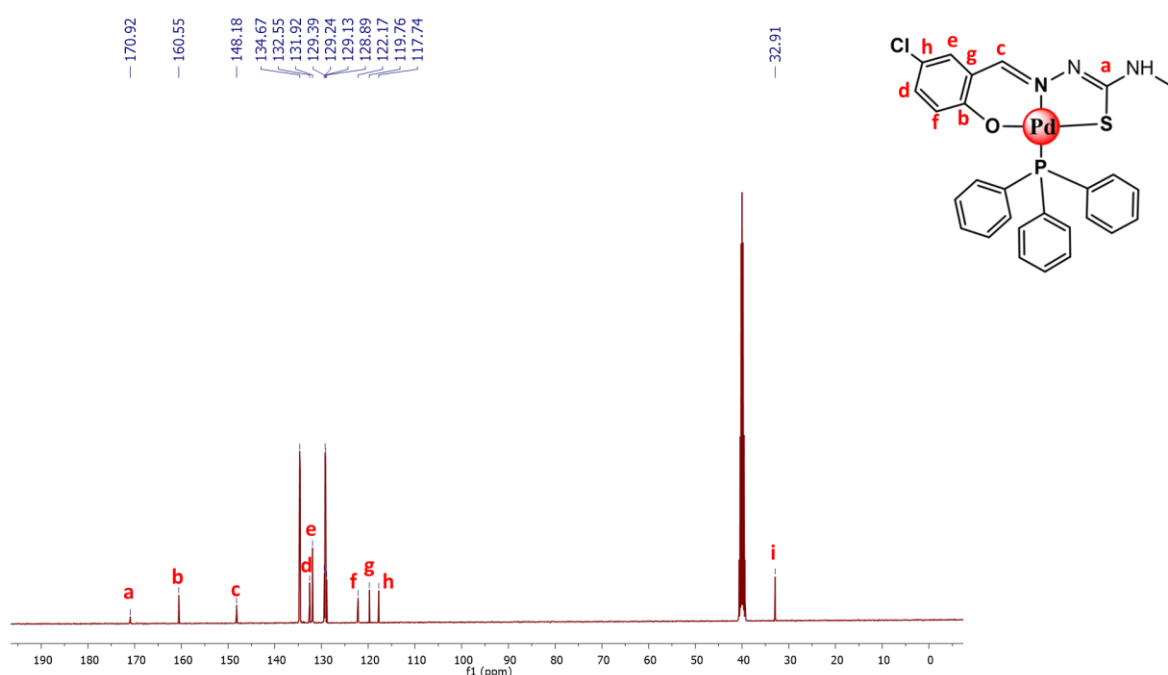


FIGURA 4.9 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o complexo PdM1, em $\text{DMSO}-d_6$.

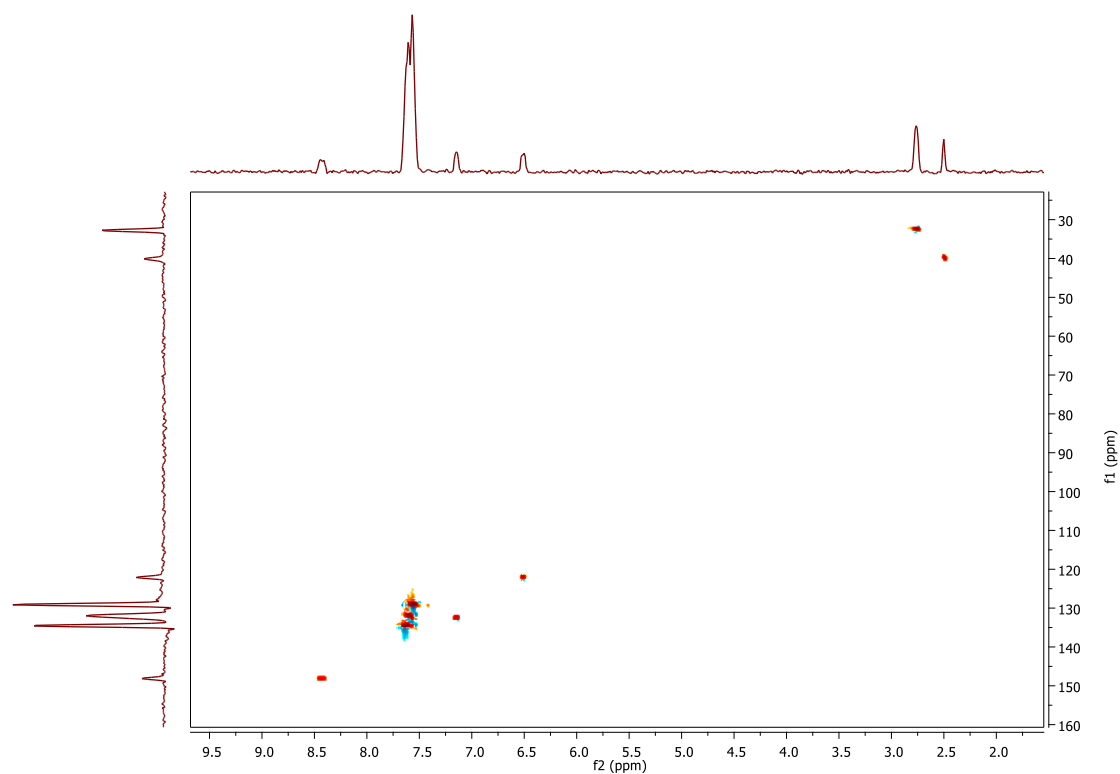


FIGURA 4.10 – Mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HSQC do complexo PdM1, em $\text{DMSO-}d_6$.

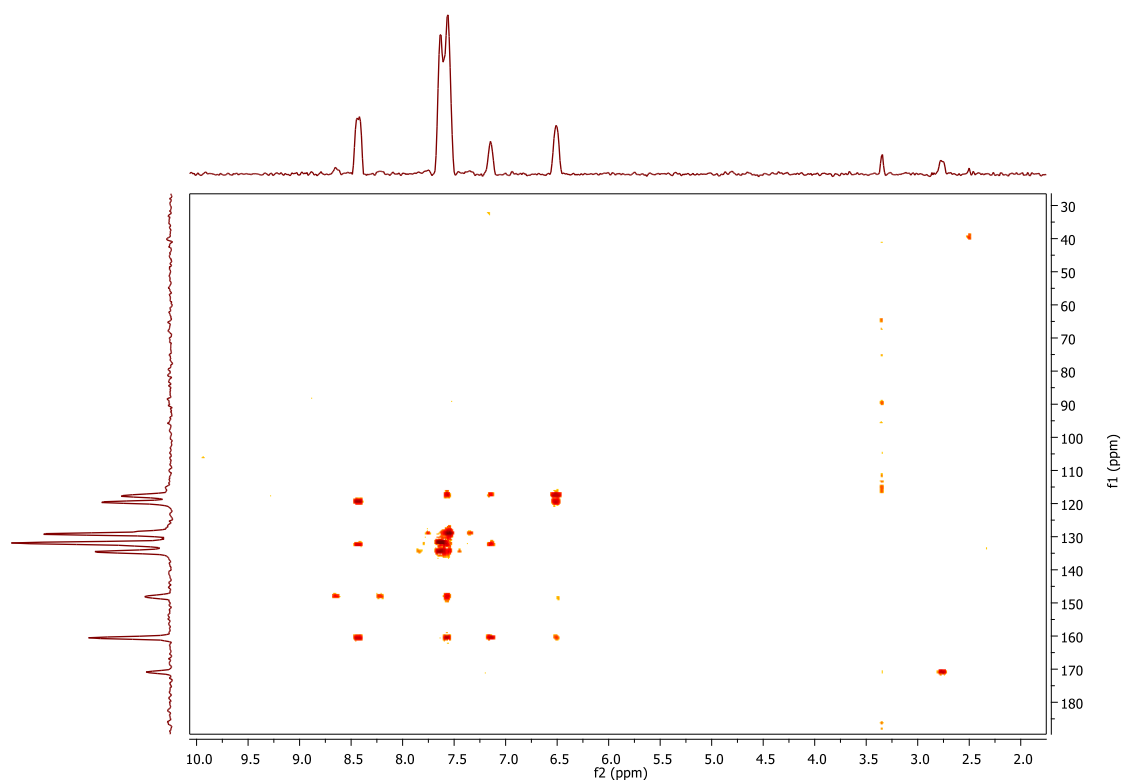


FIGURA 4.11 – Mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMBC do complexo PdM1, em $\text{DMSO-}d_6$.

4.7 Difração de raios X por monocristal

As estruturas propostas para os complexos de paládio foram confirmadas através da formação de monocristais, obtidos por meio de difusão lenta de soluções 1:1 de diclometano/etanol, com o auxílio da técnica de difração de raios X. Os principais dados de valores de distância [Å] e ângulos [°] de ligações para os complexos obtidos são indicados na Tabela 4.8 e na Figura 4.12 é mostrada a estrutura cristalográfica para o complexo PdM1.

TABELA 4.8 – Principais distâncias [Å] e ângulos [o] de ligação para os complexos.

Fragmento	PdM1	PdM2	PdM3	PdD1	PdD2	PdD3
Pd1-S1	2,2405(5)	2,2391(16)	2,2425(6)	2,2388(5)	2,2405(5)	2,2397(5)
Pd1-P1	2,2810(5)	2,2840(16)	2,2801(6)	2,2892(4)	2,2860(5)	2,2817(5)
Pd1-N3	2,0278(14)	2,035(5)	2,0252(18)	2,0329(15)	2,0278(17)	2,0314(16)
Pd1-O1	2,0348(12)	2,039(5)	2,0322(16)	2,0363(13)	2,0513(16)	2,0314(14)
C2-S1	1,7566(17)	1,755(7)	1,752(2)	1,758(2)	1,773(2)	1,7577(19)
C3-N3	1,290(2)	1,285(9)	1,294(3)	1,293(2)	1,291(3)	1,296(3)
C2-N2	1,299(2)	1,307(9)	1,302(3)	1,308(3)	1,303(3)	1,345(3)
N3-Pd1-S1	84,21(4)	84,20(16)	84,21(5)	83,99(5)	84,38(6)	84,17(5)
N3-Pd1-O1	92,64(5)	92,3(2)	92,69(7)	92,46(6)	92,20(7)	92,85(6)
P1-Pd1-S1	92,221(19)	92,96(6)	91,91(2)	92,125(16)	97,084(19)	92,358(17)
P1-Pd1-O1	90,93(4)	90,65(13)	91,20(5)	91,44(4)	86,30(4)	90,60(4)

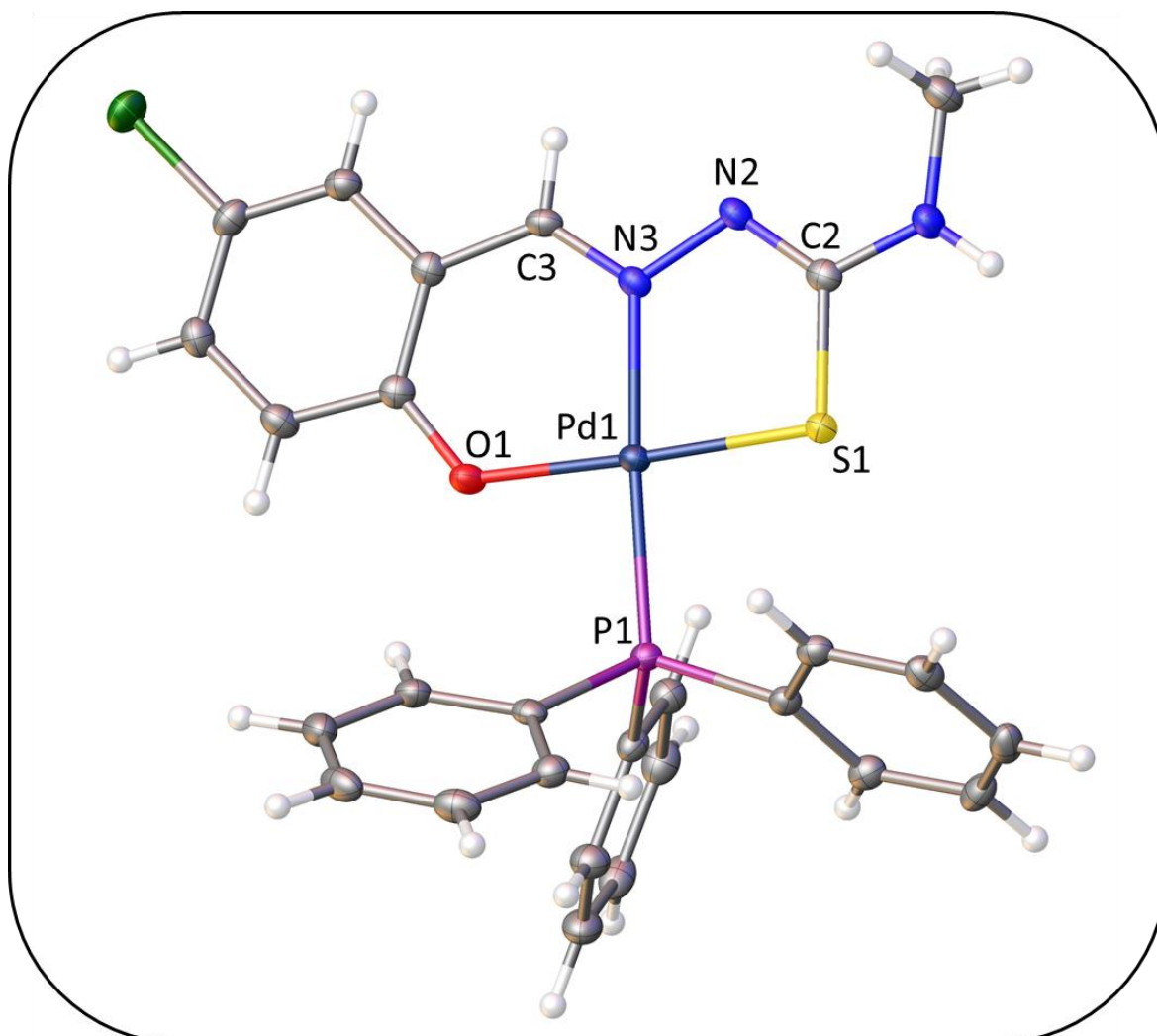


FIGURA 4.12 – Estrutura cristalográfica do complexo PdM1, com os elipsóides a 30% de probabilidade.

Conforme os dados e estruturas obtidos, é possível confirmar a coordenação do ligante tiossemicarbazona ao paládio de forma tridentada, por meio do oxigênio fenólico, do nitrogênio da imina e do átomo de enxofre, formando um complexo de geometria quadrática planar e anéis quelatos de quatro e cinco membros. Completando a esfera de coordenação, observa-se a presença da trifenilfosfina em posição trans ao nitrogênio imínico. Além disso, os ângulos de ligação em torno do centro metálico não são de 90° , indicando a formação de um arranjo quadrático planar distorcido.

Adicionalmente, foram obtidos monocristais adequados para análise por difração de raios X do ligante livre M1 (Figura 4.13). Dessa forma, a comparação dos comprimentos de ligação entre o ligante não coordenado e o complexo metálico

forneceu evidências estruturais consistentes acerca do modo de coordenação e das possíveis alterações eletrônicas decorrentes da complexação.

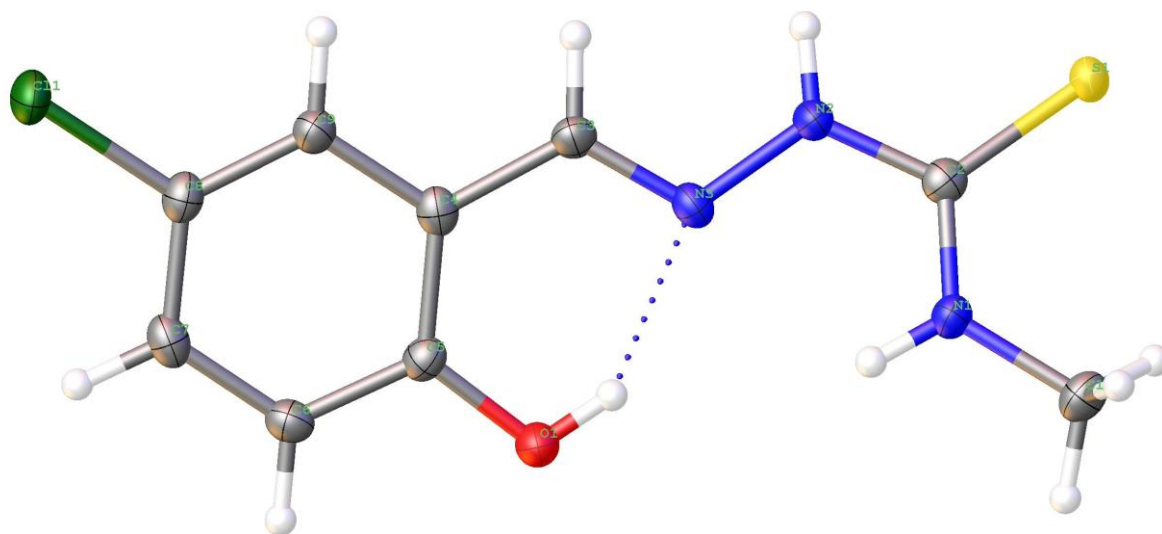


FIGURA 4.13 – Estrutura cristalográfica do complexo PdM1, com os elipsóides a 30% de probabilidade.

De acordo com os valores de distância de ligação, todos os complexos apresentaram um comprimento de ligação C(2)–S(1) em aproximadamente 1,75 Å, que é um valor mais próximo do característico de ligação simples C-S (1,82 Å)¹³⁷. Comparando esses valores com a distância de ligação C(2)–S(1) do ligante livre M1 (1,69 Å), é possível observar a diminuição do caráter de ligação dupla C=S, confirmando a coordenação do enxofre ao paládio na forma tiolato. Além disso, as distâncias para a ligação C(2)–N(2) para o ligante M1 é de 1,451 Å, e para todos os complexos são próximos de 1,30 Å, valores esses que são bem próximos dos valores das ligações iminas C(3)–N(3), evidenciando maior deslocalização eletrônica no fragmento N–C–S após a complexação, em concordância com a coordenação do enxofre na forma tiolato.

4.8 Espectrometria de massas

Através da técnica de espectrometria de massas, foi possível confirmar a obtenção da estrutura proposta por meio da análise do íon molecular dos complexos. O sistema LC Q-TOF MS em modo MS *full Scan* permitiu obter

informação sobre a massa monoisotópica da molécula, a qual foi encontrada em sua forma protonada (M+H)⁺ em todas as amostras.

TABELA 4.9 – Dados teóricos e experimentais obtidos através da espectrometria de massas.

Composto	Teórico	Experimental	Erro (ppm)
PdM1	610,0097	610,0096	0,16 ppm
PdM2	621,0336	621,0335	0,16 ppm
PdM3	594,0391	594,0399	1,35 ppm
PdD1	643,9706	643,9705	0,15 ppm
PdD2	666,0187	666,0188	0,15 ppm
PdD3	612,0297	612,0297	0 ppm

Com base nos dados apresentados na Tabela 4.9, verifica-se que os valores experimentais obtidos por espectrometria de massas estão em concordância com os valores teóricos, apresentando erros inferiores a 5 ppm, o que confirma a atribuição correta das espécies observadas.

A Figura 4.14 apresenta o cromatograma em modo *full scan* e o respectivo espectro de massas (MS) do complexo PdM1. No espectro, observa-se claramente o padrão isotópico característico do paládio, corroborando a presença do centro metálico. Além disso, a predominância do pico correspondente ao íon molecular sugere boa integridade da espécie sob as condições de ionização empregadas, com baixa tendência à fragmentação no experimento.

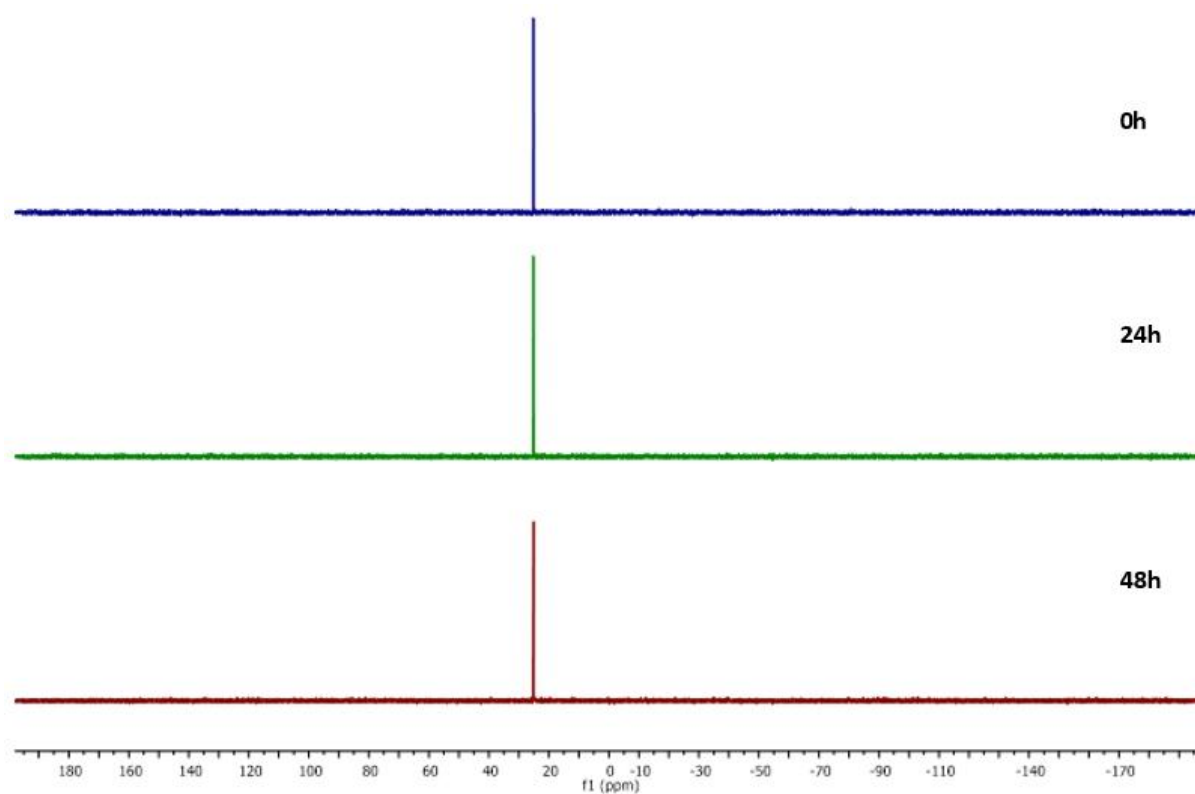


FIGURA 4.15 – Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN do complexo PdM1 em DMSO, nos períodos de 0, 24 e 48h de incubação.

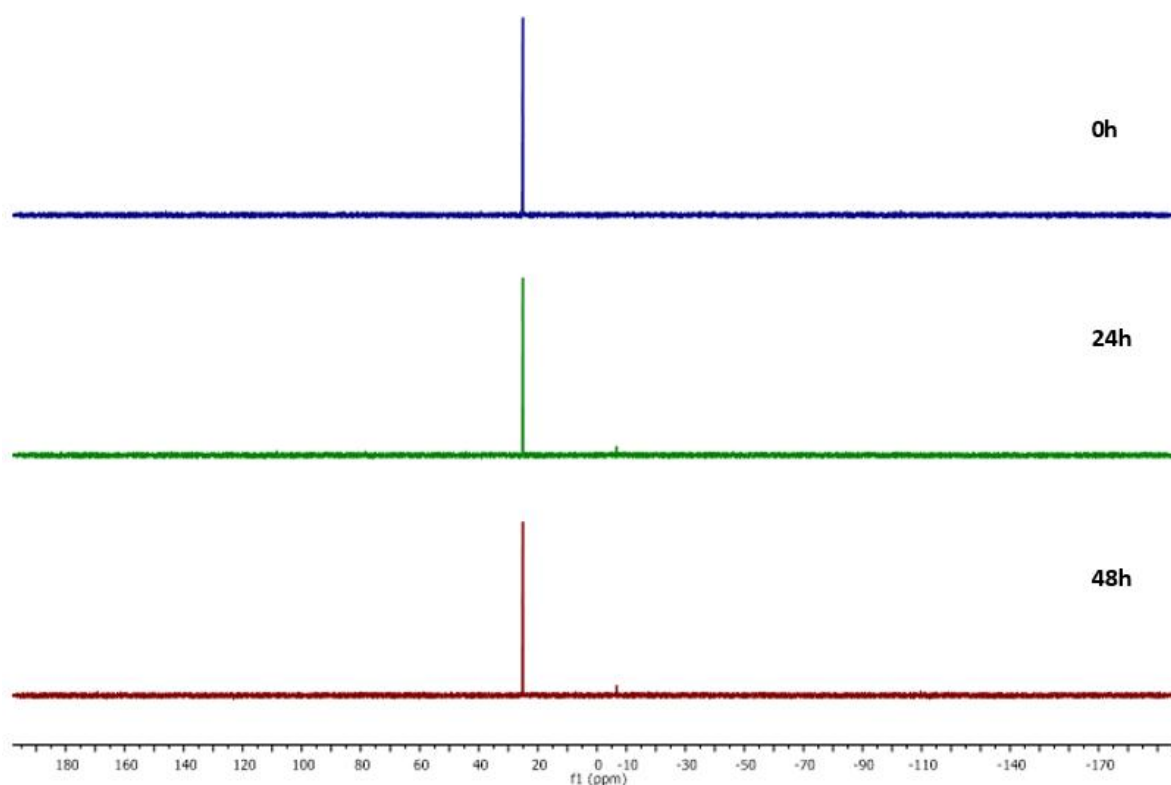


FIGURA 4.16 – Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN do complexo PdM1 em DMSO/meio de cultura DMEM (90:10, v/v), nos períodos de 0, 24 e 48h de incubação.

4.10 Viabilidade celular

As atividades citotóxicas dos complexos sintetizados, dos ligantes livres e da cisplatina foram inicialmente avaliadas frente às linhagens tumorais de ovário (A2780 e A2780cis), de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e de pulmão (A549), bem como frente à linhagem não tumoral de pulmão (MRC-5). A viabilidade celular foi determinada com base em medidas de absorbância, e a análise dos dados foi realizada no software GraphPad Prism 8.0.2. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 4.10.

TABELA 4.10 – Valores de IC₅₀ e índice de seletividade (IS) para os complexos obtidos, ligantes livres, complexo precursor e cisplatina nas linhagens A2780cis, A2780, MDA-MB-231, MCF-7, A549 e MRC-5, após 48 h de incubação.

Compostos	IC ₅₀ (μM)						IS ¹	IS ²
	A2780cis	A2780	MDA-MB-231	MCF-7	A549	MRC-5		
PdM1	>50	>50	>50	>50	>50	>50	-	-
PdM2	>50	>50	>50	>50	>50	>50	-	-
PdM3	>50	>50	>50	>50	>50	>50	-	-
PdD1	>50	>50	>50	>50	>50	>50	-	-
PdD2	3,42 ± 0,22	0,96 ± 0,02	>50	>50	>50	>50	> 14,61	> 52,08
PdD3	> 50	> 50	>50	>50	>50	>50	-	-
M1	>50	>50	>50	>50	>50	>50	-	-
M2	>50	>50	>50	>50	>50	>50	-	-
M3	>50	>50	>50	>50	>50	>50	-	-
D1	>50	>50	>50	>50	>50	>50	-	-
D2	>50	>50	>50	>50	>50	>50	-	-
D3	>50	>50	>50	>50	>50	>50	-	-
Prec Pd	>25	>25	>25	>25	>25	>25	-	-
Cisplatina	37,02 ± 5,10	11,80 ± 0,80	12,43 ± 0,20	13,98 ± 2,02	11,54 ± 1,19	29,09 ± 0,78	0,78	2,46

IS¹ = IC₅₀MRC-5/IC₅₀A2780cis e IS² = IC₅₀MRC-5/IC₅₀A27

Como observado na Tabela 4.10, apenas o complexo PdD2 apresentou atividade frente às linhagens tumorais de ovário (A2780cis e A2780). Os demais complexos e seus respectivos ligantes livres não apresentaram atividade citotóxica até a máxima concentração testada (50 μ M). Esses resultados indicaram a clara tendência do complexo contendo 2 grupos nitro (um na posição 3 e outro na posição 5 do anel aromático do salicialdeído) em apresentar atividade citotóxica nas linhagens tumorais de ovário estudadas. Dessa forma, ao analisar-se a viabilidade celular desse complexo frente à linhagem não tumoral utilizada (MRC-5), observa-se um alto índice de seletividade, indicando maior sensibilidade das linhagens tumorais de ovário ao tratamento com PdD2, em comparação com a linhagem não tumoral avaliada.

A comparação entre PdD2 e o ligante livre D2 evidencia que a coordenação ao centro de Pd(II) foi determinante para o surgimento da atividade citotóxica, uma vez que o ligante isolado permaneceu inativo até a máxima concentração testada. Esse comportamento sugere que a complexação altera de forma relevante propriedades como a distribuição eletrônica, a estabilidade e a interação com o ambiente celular, o que favorece a resposta biológica observada. Quando comparado à cisplatina nas condições avaliadas, o complexo PdD2 apresentou maior atividade frente às linhagens A2780 e A2780cis, além de índices de seletividade mais favoráveis. Embora esses dados não permitam extrapolações diretas para o desempenho *in vivo*, eles indicam que PdD2 constitui um candidato de interesse para estudos biológicos mais aprofundados.

Com base nos resultados de estudos recentes publicados pelo nosso grupo de pesquisa, observa-se que complexos de paládio contendo tiossemicarbazonas bidentadas associados a um ligante abandonador apresentam elevada atividade citotóxica frente às linhagens tumorais de ovário, além de exibirem boa seletividade em relação à linhagem não tumoral avaliada. Contudo, essa alta citotoxicidade também se estende a outras linhagens tumorais, indicando que tais complexos não apresentam marcada preferência por linhagens tumorais de ovário^{138,92}. Em contraste, os complexos investigados neste trabalho demonstraram um comportamento mais inerte, o que pode ser atribuído à maior rigidez estrutural e à ausência de ligantes lábeis.

Em continuidade aos estudos desenvolvidos pelo grupo, outra investigação descreveu complexos de paládio contendo ligantes bisfosfínicos associados a tiossemicarbazidas, os quais também exibiram elevada atividade

citotóxica frente às linhagens tumorais de ovário¹³⁹. Entretanto, diferentemente do complexo PdD2, esses compostos apresentaram menor seletividade biológica, mantendo atividade significativa contra distintas linhagens celulares. Tal comportamento sugere que, embora a presença de dois ligantes quelantes confira maior rigidez estrutural ao sistema, essa característica, por si só, não foi suficiente para restringir a ação citotóxica a um tipo celular específico. Assim, os resultados reforçam que as particularidades estruturais do complexo PdD2 desempenham papel fundamental na modulação da seletividade, distinguindo-o dos sistemas previamente relatados. Dessa forma, essas comparações sugerem que o equilíbrio entre labilidade e rigidez estrutural pode ser determinante para modular não apenas a potência, mas também o alcance do efeito citotóxico entre diferentes linhagens.

Adicionalmente, visando aprofundar a avaliação da seletividade do complexo PdD2 em relação às linhagens tumorais de ovário A2780 e A2780cis, foram realizados ensaios de viabilidade celular frente à linhagem de melanoma humano (A375), a queratinócitos humanos (Hacat) e à linhagem de ovário saudável de hamster chinês (CHO-K1).

TABELA 4.11 – Valores de IC₅₀ para o complexo PdD2, ligante D2 livre, complexo precursor e cisplatina nas linhagens A375, Hacat e CHO-K1, após 48 h de incubação.

Compostos	IC ₅₀ (μM)		
	A375	Hacat	CHO-K1
PdD2	>50	>50	31,75 ± 4,9
D2	>50	>50	>50
Prec Pd	>25	>25	>25
Cisplatina	16,45 ± 0,2	14,2 ± 0,3	29,06 ± 5,9

Conforme os dados apresentados na Tabela 4.11, o complexo PdD2 não exibiu atividade citotóxica frente às linhagens de pele avaliadas. Em contrapartida, observou-se efeito citotóxico sobre a linhagem de ovário não tumoral murina, sugerindo que a sensibilidade ao complexo pode estar associada, ao menos em parte, ao contexto celular de linhagens de origem ovariana. Embora atividade citotóxica também tenha sido observada em CHO-K1, os valores de IC₅₀ permaneceram substancialmente

superiores aos obtidos para A2780 e A2780cis, resultando em índice de seletividade significativamente superior ao da cisplatina (Tabela 4.12).

TABELA 4.12 – Valores de IC₅₀ e índice de seletividade (IS) para o complexo PdD2 e Cisplatina, nas linhagens tumorais e não tumoral de ovário.

Compostos	IC ₅₀ (μM)				
	A2780cis	A2780	CHO-K1	IS ³	IS ⁴
PdD2	3,42 ± 0,22	0,96 ± 0,02	31,75 ± 4,9	9,28	33,07
Cisplatina	37,02 ± 5,10	11,80 ± 0,80	29,06 ± 5,9	0,78	2,46

$$IS^3 = IC_{50}CHO-K1/IC_{50}A2780cis \text{ e } IS^4 = IC_{50}CHO-K1/IC_{50}A2780$$

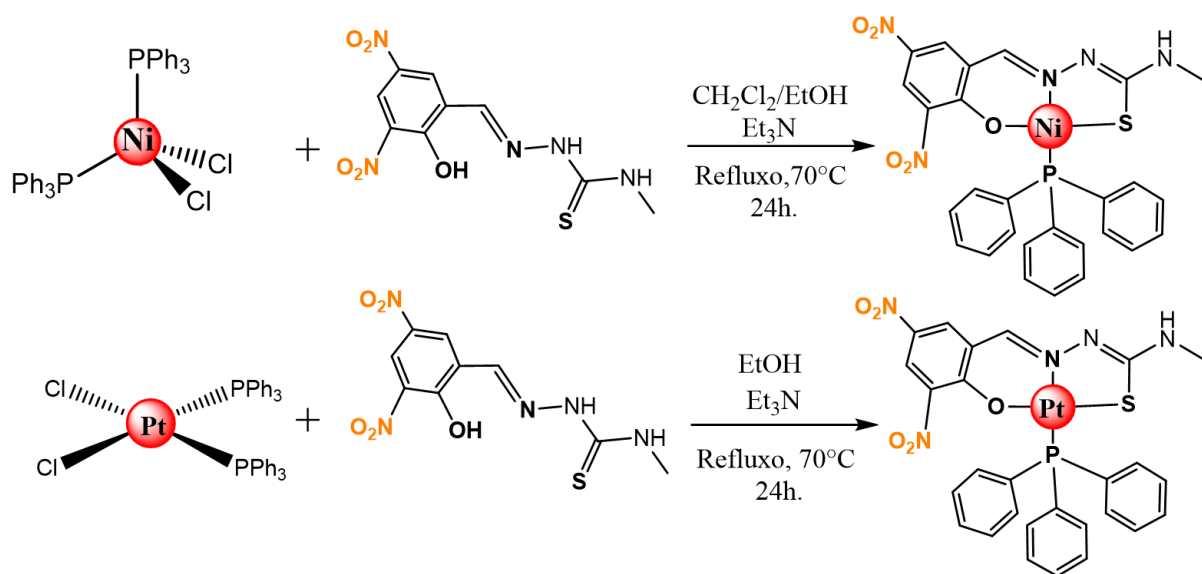
Estudos prévios da literatura indicam que complexos de paládio contendo ligantes tiossemicarbazonas tridentadas do tipo O,N,S podem apresentar atividade citotóxica associada a perfis de seletividade dependentes da natureza do ligante. Haribabu *et al.*¹²⁵ relataram complexos dessa classe, associados à trifenilfosfina, com seletividade frente a linhagens tumorais de mama, em relação à linhagem não tumoral, enquanto Munikumari *et al.*¹⁴⁰ observaram que a introdução de um grupo nitro no ligante esteve associada a menores valores de IC₅₀ em complexos análogos. Nesse contexto, os resultados obtidos para PdD2 reforçam a hipótese de que a introdução de substituintes nitro no anel aromático pode alterar de forma significativa a distribuição eletrônica do ligante e, conseqüentemente, o comportamento biológico do complexo. No entanto, como os demais derivados desta série permaneceram inativos, os dados também indicam que a atividade observada não depende exclusivamente da presença do grupo nitro, mas provavelmente do conjunto de características estruturais e eletrônicas específicas do sistema PdD2.

Em resumo, as viabilidades celulares mostraram que a atividade biológica desta série é altamente dependente da estrutura do ligante e do arranjo de coordenação ao centro de Pd(II), uma vez que pequenas modificações estruturais resultaram em perfis drasticamente distintos de citotoxicidade. O destaque de PdD2 frente às linhagens tumorais de ovário, aliado à sua baixa atividade nas demais linhagens avaliadas, sugere que esse complexo apresenta um perfil seletivo incomum dentro da série estudada. Embora os mecanismos responsáveis por esse comportamento ainda demandem investigação adicional, os dados indicam que fatores

como a modulação eletrônica do ligante, a rigidez estrutural e a estabilidade do sistema coordenado podem estar diretamente relacionados ao efeito observado.

4.11 Síntese, caracterização e viabilidade celular dos complexos de Níquel e Platina

Considerando que apenas o complexo de paládio coordenado ao ligante D2 apresentou atividade citotóxica significativa, procedeu-se à síntese de complexos análogos contendo Ni(II) e Pt(II), com o objetivo de investigar a influência do centro metálico nas propriedades antitumorais desses sistemas de coordenação. Dessa forma, os complexos de Ni(II) e Pt(II) foram sintetizados a partir dos precursores $[\text{NiCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ e *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$, respectivamente, na presença do ligante D2. A trietilamina foi empregada para promover a desprotonação do ligante, favorecendo sua coordenação tridentada aos centros metálicos. As rotas sintéticas correspondentes estão representadas no Esquema 4.3.



ESQUEMA 4.4.3 – Rotas sintéticas para a obtenção dos complexos de Ni(II) e Pt(II), respectivamente.

As medidas de condutividade molar dos complexos obtidos foram realizadas em diclorometano e DMSO para os complexos de níquel e platina, respectivamente. Os baixos valores de condutividade molar observados para NiD2 e PtD2 são compatíveis com espécies não eletrolíticas, em consonância com a formação de complexos neutros. Esse comportamento reforça a proposta estrutural desses

sistemas e está de acordo com a coordenação do ligante tiossemicarbazona em sua forma desprotonada.

TABELA 4.13 – Dados de condutividade molar

Complexos	Condutividade molar ($\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)*
NiD2	0,26
PtD2	0,94

*(eletrólitos 1:1 entre 12 – 77 para diclorometano e 20 – 62 $\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ para DMSO)¹²¹

A análise dos espectros de infravermelho dos complexos de Ni(II) e Pt(II) derivados do ligante D2 revela um comportamento espectroscópico consistente com aquele previamente observado para os análogos de paládio, corroborando o mesmo modo de coordenação.

O ligante livre D2 apresenta duas bandas atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{N-H})$ em 3324 cm^{-1} , bem como uma banda correspondente ao estiramento $\nu(\text{O-H})$ em 3106 cm^{-1} . Após a complexação, observa-se a presença de apenas uma das bandas $\nu(\text{N-H})$, evidenciando a desprotonação do grupo hidroxila e da hidrazina durante a coordenação aos centros metálicos.

Nos complexos NiD2 e PtD2, o deslocamento da banda $\nu(\text{C=S})$ para menores números de onda é compatível com o enfraquecimento da ligação C-S e com a coordenação do enxofre na forma tiolato. Em paralelo, alterações na região associada ao sistema azometínico indicam redistribuição eletrônica após a complexação. Adicionalmente, bandas atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{P-C})$, localizadas em torno de 1100 cm^{-1} , confirmam a presença do ligante fosfínico. Bandas observadas na região de $550\text{--}450 \text{ cm}^{-1}$ podem ser associadas aos estiramentos $\nu(\text{Metal-N})$ e $\nu(\text{Metal-O})$, fornecendo evidências adicionais da coordenação dos ligantes aos íons metálicos. A Figura 4.17 apresenta os espectros de infravermelho do ligante D2 e dos complexos NiD2 e PtD2, enquanto a Tabela 4.14 reúne os principais números de onda observados e suas respectivas atribuições.

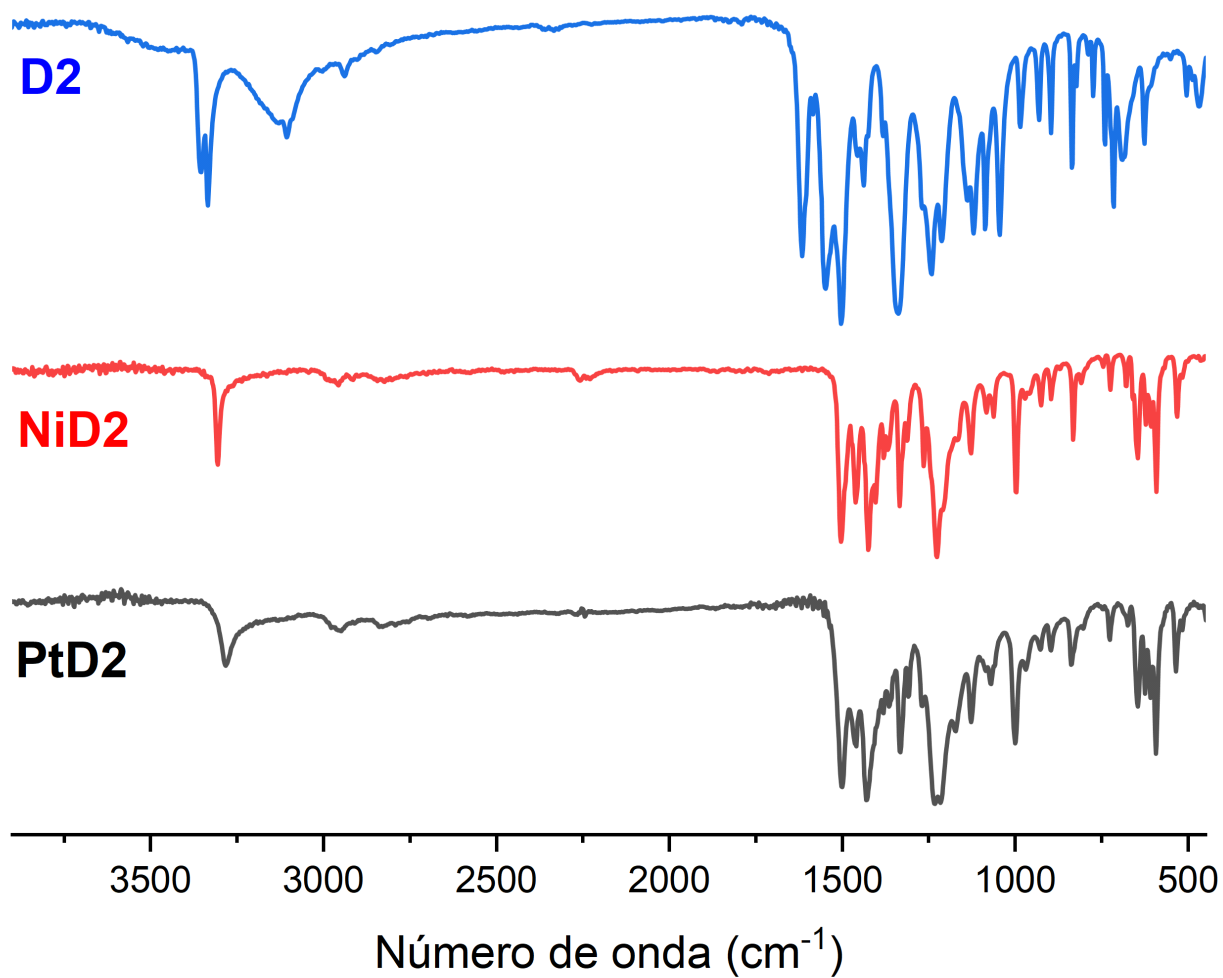


Figura 4.17 – Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante D2 e dos complexos NiD2 e PtD2.

TABELA 4.14 – Atribuições dos principais estiramentos observados para o ligante D2 livre e para os complexos NiD2 e PtD2.

Atribuições	D2	NiD2	PtD2
νNH	3324 m	3413 m	3382 m
νOH	3106 m	-	-
$\nu\text{C-H}_{\text{aromático}}$	2946 f	3057 f	3056 f
$\nu\text{C=N}$	1542 F	1606 F	1603 F
$\nu\text{C=N}$	-	1521 F	1528 F
$\nu\text{C=C}_{\text{aromático}}$	1502 F	1437 m	1435 m
$\nu\text{N-N}$	1344 F	1329 F	1324 F
$\nu\text{C-N}$	1243 F	1230 m	1227 m
$\nu\text{P-C}$	-	1097 m	1101 m
$\nu\text{C=S}$	714 m	692 m	693 m

Os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos complexos de Ni(II) e Pt(II) sintetizados apresentaram um singleto, com deslocamentos químicos distintos daqueles observados para os respectivos complexos precursores, evidenciando a coordenação efetiva do ligante ao centro metálico. Ademais, a ausência de sinais adicionais na região característica do fósforo indica a ausência de subprodutos fosforados, confirmando a pureza dos complexos obtidos. Na Figura 4.18 são apresentados os espectros correspondentes, juntamente com os valores de deslocamento químico observados.

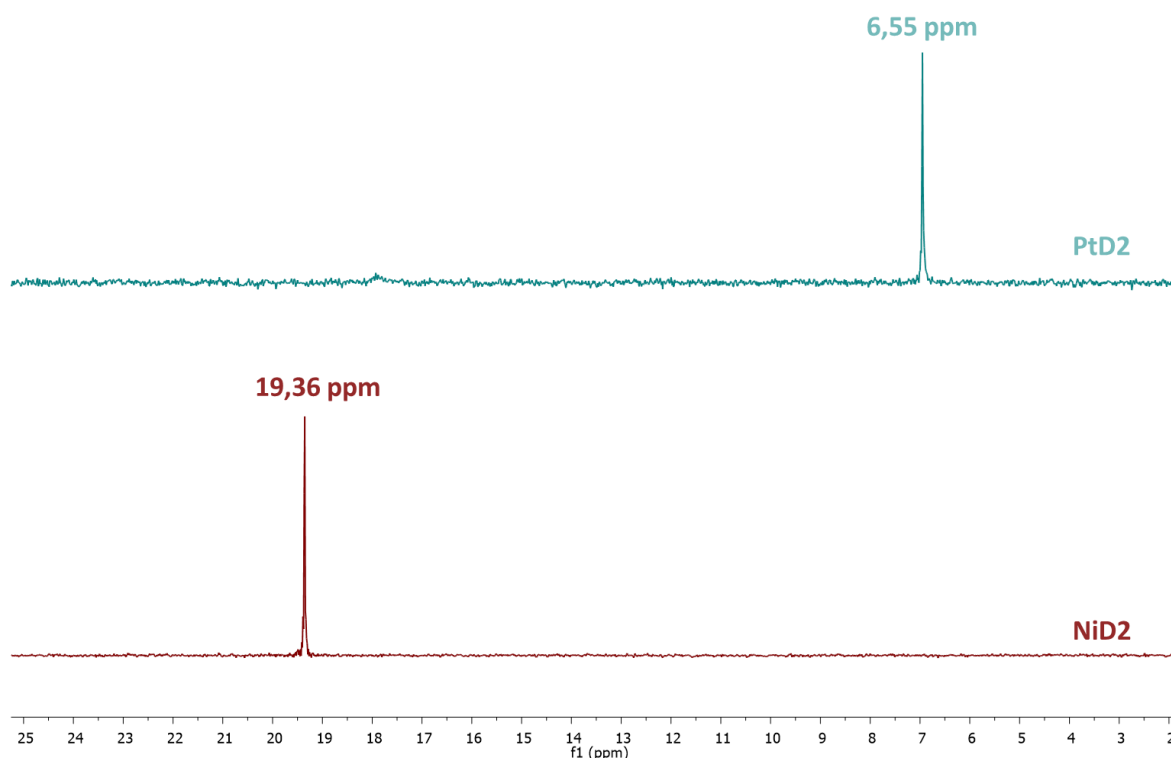


FIGURA 4.18 – Espectro de RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ para o complexo PtD2 em DMSO/ D_2O e para o complexo NiD2 em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{D}_2\text{O}$.

Nos espectros de RMN de ^1H , os sinais correspondentes aos diferentes prótons do ligante livre e dos ligantes coordenados foram devidamente atribuídos, conforme as distribuições indicadas nas respectivas figuras (Figuras 4.19 a 4.21). As atribuições realizadas para o ligante D2 e para os complexos PtD2 e NiD2, pertencentes às séries 1 e 2, encontram-se resumidas na Tabela 4.15. Os espectros do ligante livre e do complexo PtD2 foram registrados em DMSO- d_6 , enquanto o complexo NiD2 foi analisado em CDCl_3 . Os espectros representativos do ligante D2, do complexo PtD2 e do complexo NiD2 são apresentados nas Figuras 4.19, 4.20 e 4.21, respectivamente.

TABELA 4.15 – Deslocamentos químicos de RMN de ^1H para o ligante D2 e complexos PtD2 e NiD2.

Atribuições	D2	PtD2	NiD2
H – a	11,63 (s, 1H)	-	-

H – b	8,90 (d, 1H)	8.95 (d, 1H)	8.42 (d, 1H)
H – c	8,65 (d, 1H)	8,63 (d, 1H)	8,33 (d, 1H)
H – d	8,71 (d, 1H)	7,66 (d, 1H)	4,78 (d, 1H)
H – e	8,43 (s, 1H)	9,04 (d, 1H)	8,31 (s, 1H)
H – f	3,03 (d, 3H)	2,84 (d, 3H)	2,92 (d, 3H)
H – PPh ₃	-	7,59 – 7,52 (m, 15H)	7,73 – 7,43 (3 dd, 15H)

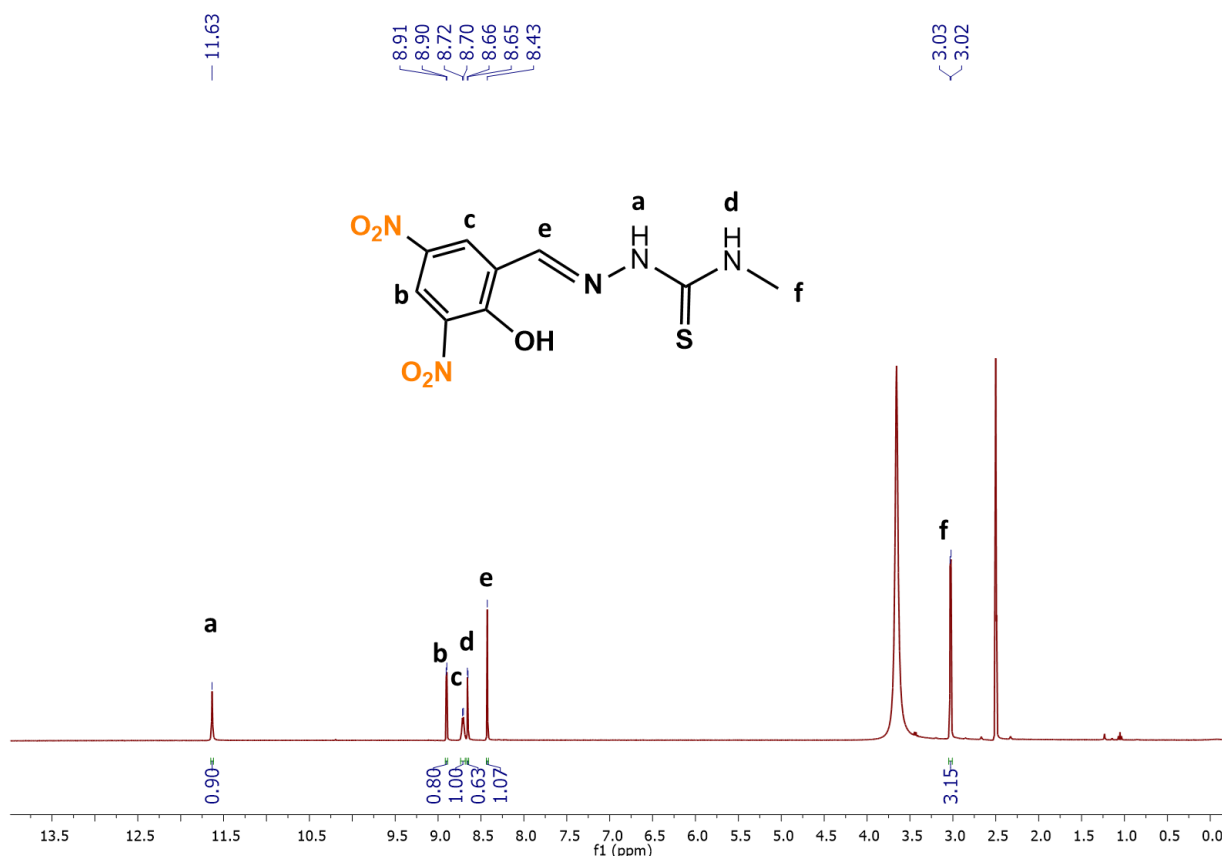


FIGURA 4.19 – Espectro de RMN de ^1H para o ligante D2, em DMSO-d_6 .

No espectro de RMN de ^1H do ligante D2, foram identificados oito hidrogênios, em concordância com as integrais relativas dos sinais observados. O sinal atribuído ao próton da hidroxila não foi detectado, possivelmente em razão de sua elevada acidez e da consequente troca protônica com o solvente. Na região mais blindada do espectro, observa-se um dubleto em δ 3,11 ppm, atribuído aos hidrogênios do grupo metila. Na região mais desblindada, identifica-se um singlete em δ 11,72 ppm, atribuído ao próton do grupo hidrazínico. O dubleto observado em δ 8,79 ppm foi atribuído ao próton do grupo NH-CH_3 , com constante de acoplamento $J = 4,5$ Hz,

enquanto o singlete em δ 8,51 ppm corresponde ao próton do grupo imínico. Por fim, os prótons aromáticos apresentaram sinais do tipo dubleto, com deslocamentos químicos em δ 8,99 e 8,74 ppm e com constante de acoplamento $J = 3,0$ Hz

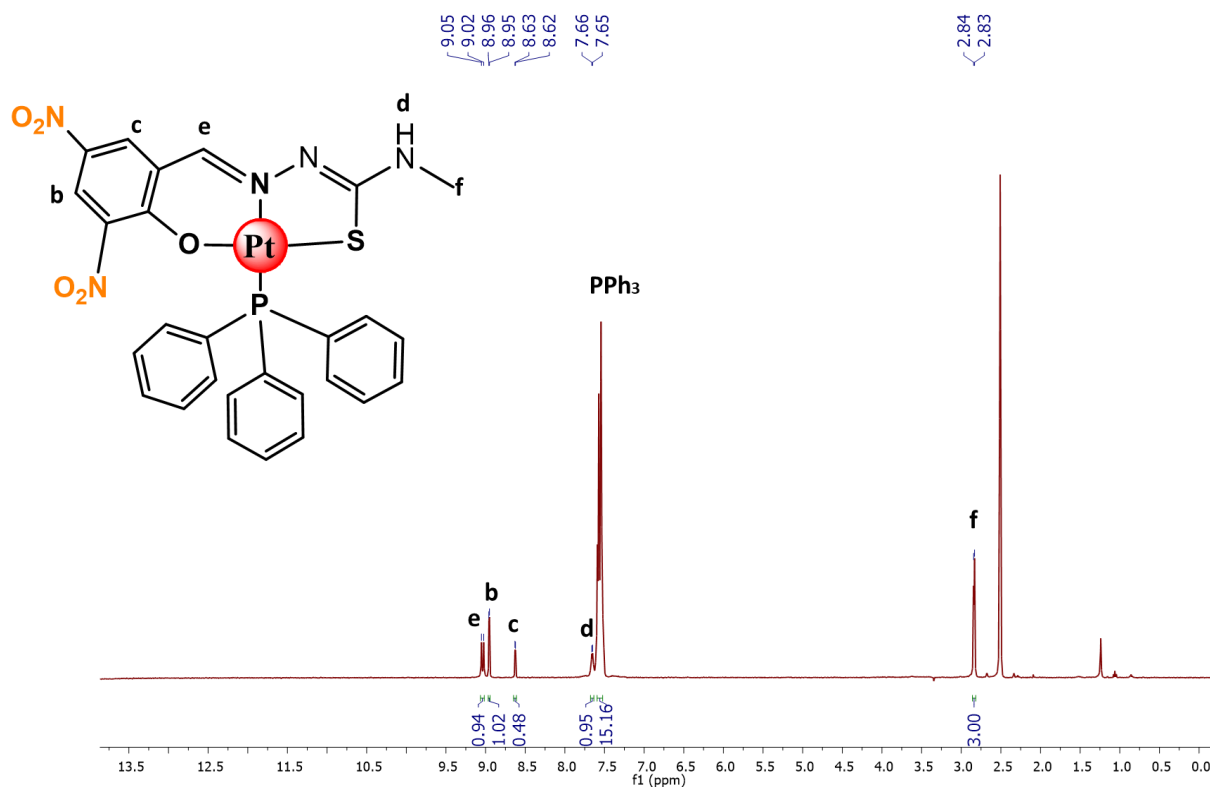


FIGURA 4.20 – Espectro de RMN ^1H para o complexo PtD2, em $\text{DMSO-}d_6$.

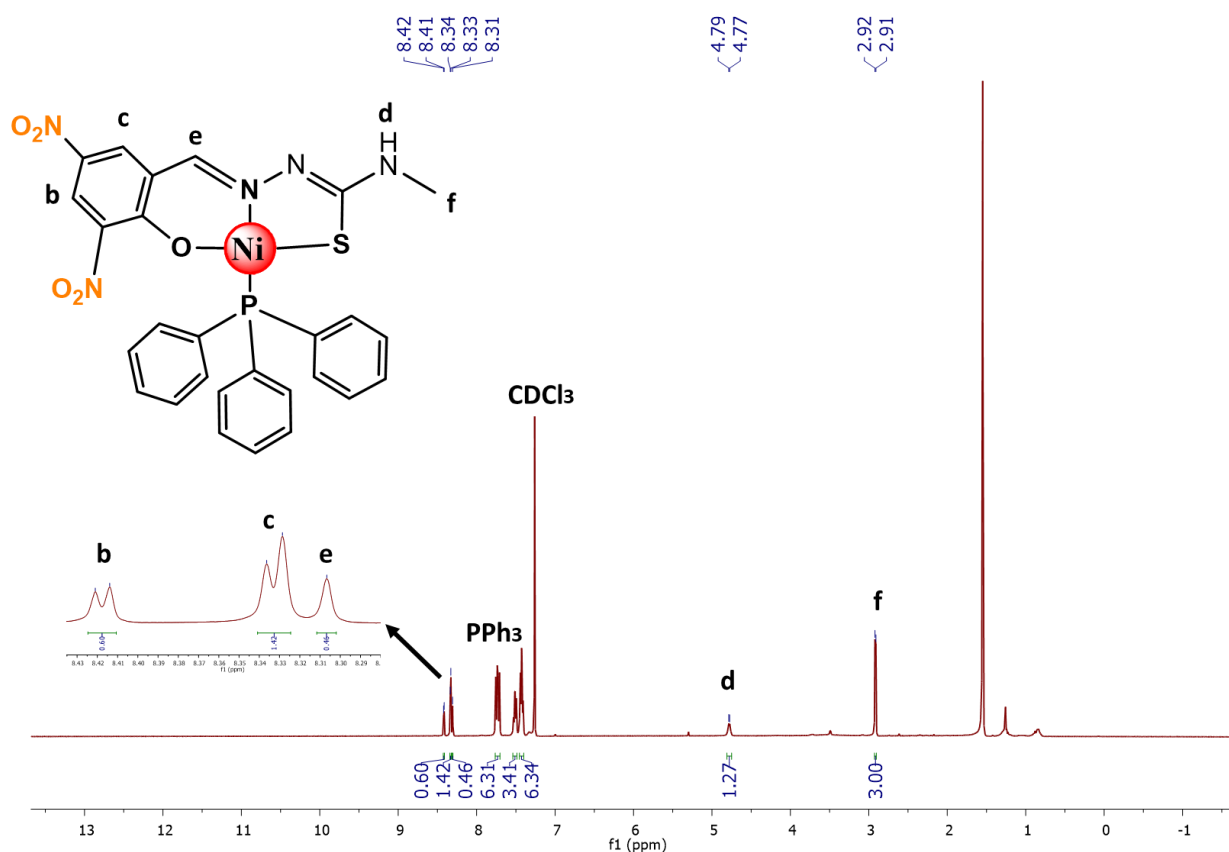


FIGURA 4.21 – Espectro de RMN ^1H para o complexo NiD2, em CDCl_3 .

A análise dos espectros de RMN de ^1H dos complexos evidencia a ausência dos sinais atribuídos ao próton da hidroxila e ao próton do grupo hidrazínico, o que indica a coordenação do ligante ao centro metálico por meio do átomo de oxigênio do grupo fenólico e do enxofre, na forma de tiolato. Observa-se, ainda, que todos os sinais associados ao ligante D2 sofrem deslocamentos químicos em relação ao ligante livre, o que reforça a coordenação efetiva com o centro metálico. Por fim, a presença de um multipeto em torno de δ 7,60 ppm é atribuída aos prótons aromáticos do co-ligante fosfínico, corroborando a presença da trifenilfosfina à esfera de coordenação do complexo.

As estruturas propostas para os complexos de níquel e platina foram confirmadas por difração de raios X em monocristal, obtidos por difusão lenta de solvente a partir de soluções 1:1 (v/v) de diclorometano/etanol. Os principais parâmetros estruturais, incluindo comprimentos de ligação (Å) e ângulos de ligação ($^\circ$), encontram-se resumidos na Tabela 4.16, enquanto as representações das estruturas cristalográficas dos complexos NiD2 e PtD2 são apresentadas na Figura 4.22.

TABELA 4.16 – Principais distâncias [Å] e ângulos [°] de ligação para os complexos.

Fragmento	NiD2	PtD2
M-S1	2,1170(3)	2,2412(8)
M-P1	2,2016(4)	2,2669(8)
M-N3	1,8912(11)	2,029(3)
M-O1	1,8741(9)	2,051(2)
C8-S1	1,7542(14)	1,763(3)
C7-N3	1,2934(18)	1,290(4)
C8-N4	1,3049(19)	1,297(4)
N3-M-S1	87,33(4)	84,04(8)
N3-M-O1	95,23(5)	92,21(10)
P1-M-S1	90,651(14)	98,65(3)
P1-M-O1	86,64(3)	85,09(6)

M = Ni e Pt.

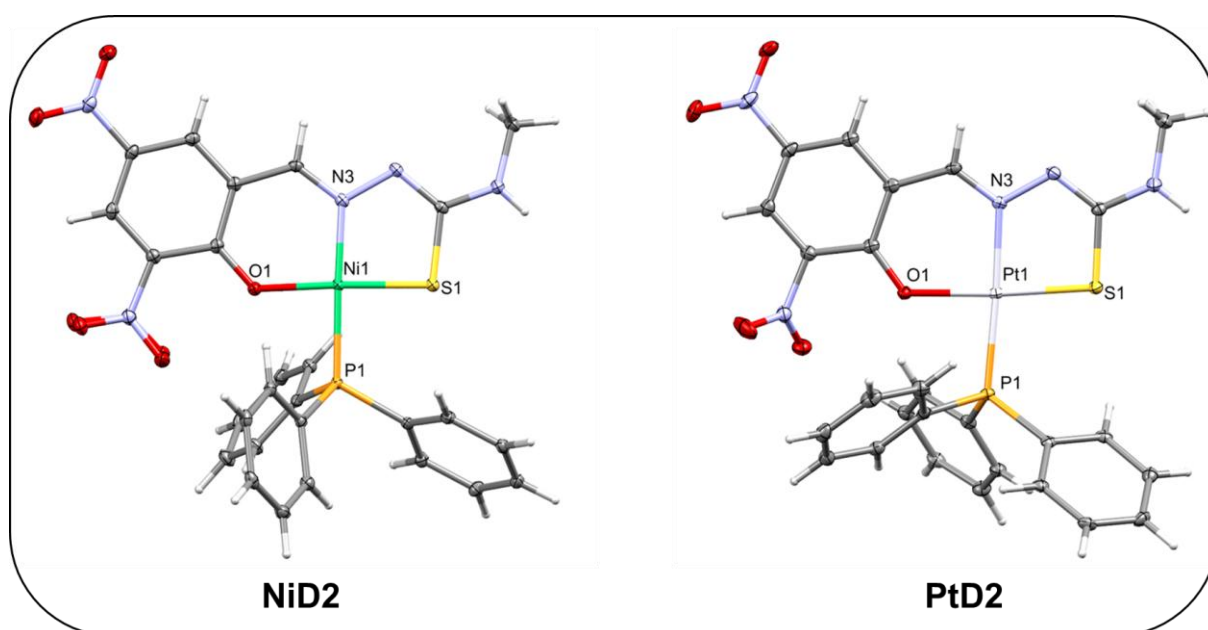


FIGURA 4.22 – Estrutura cristalográfica dos complexos NiD2 e PtD2, com os elipsóides a 30% de probabilidade.

Com base nos dados estruturais obtidos, confirma-se que o ligante tiossemicarbazona coordena-se aos centros metálicos de forma tridentada, envolvendo o átomo de oxigênio do grupo fenólico, o nitrogênio imínico e o átomo de enxofre. Essa coordenação resulta na formação de complexos com geometria quadrática planar, estabilizados por anéis quelatos de cinco e seis membros. A estereoquímica é completada pela coordenação do ligante fosfínico ao centro metálico, posicionando-se *trans* ao átomo de nitrogênio. Ademais, os ângulos de ligação ao redor do metal desviam-se dos valores ideais de 90°, evidenciando uma geometria quadrática planar levemente distorcida.

A espectrometria de massas de alta resolução foi empregada para corroborar as estruturas propostas dos complexos, por meio da identificação dos respectivos íons moleculares. A análise dos espectros (Figuras 4.23 e 4.2) revelou concordância entre as massas experimentais observadas e os valores teóricos calculados, com desvios inferiores a 5 ppm (Tabela 4.17).

TABELA 4.17 – Dados teóricos e experimentais obtidos através da espectrometria de massas.

Composto	Teórico	Experimental	Erro (ppm)
NiD2	618,0505	618,0517	1,94 ppm
PtD2	755,0800	755,0796	0,52 ppm

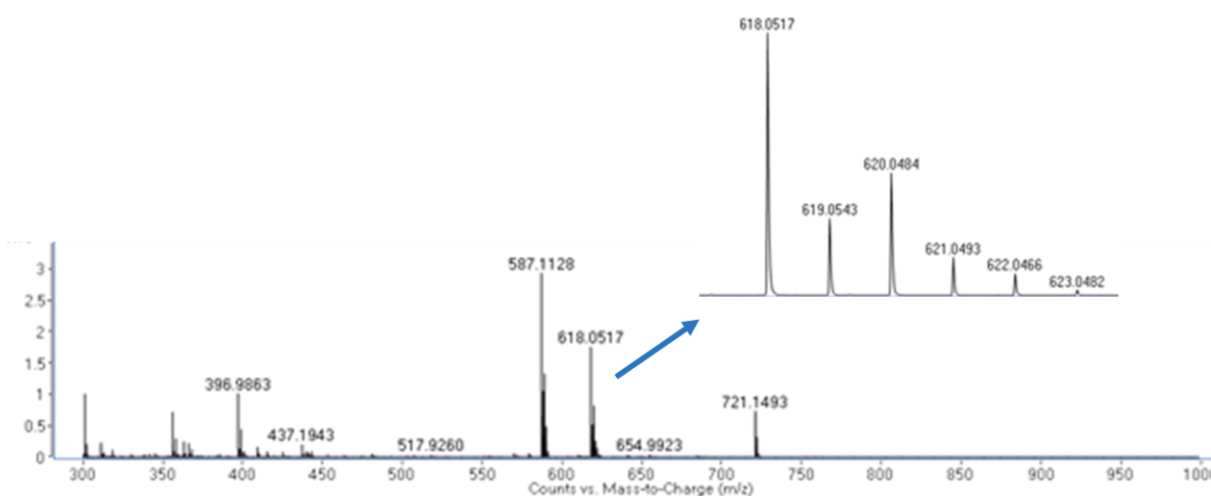


FIGURA 4.23 – Espectro de massas para o composto NiD2 em m/z.

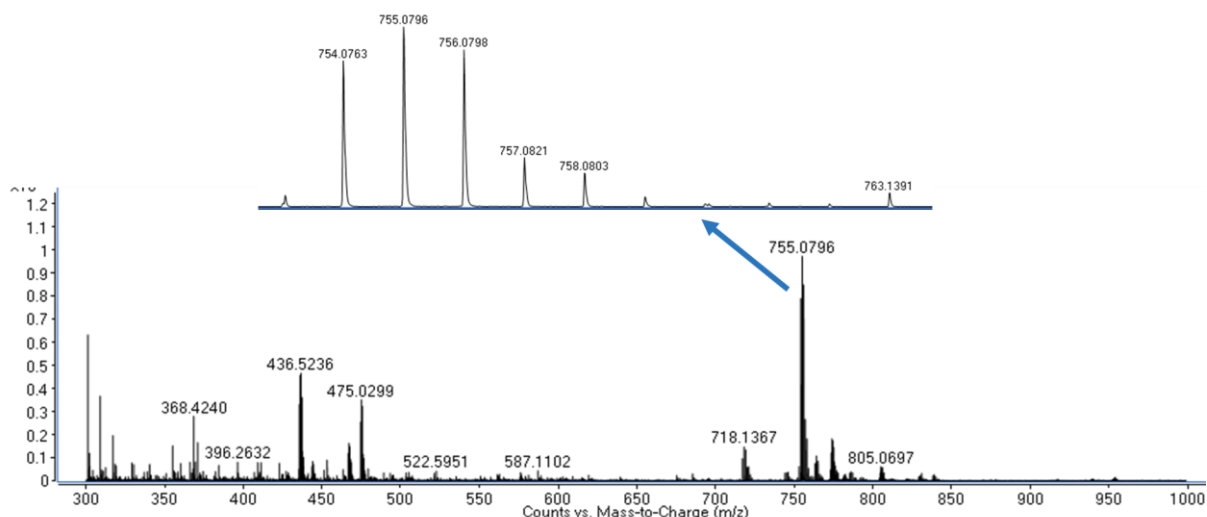


FIGURA 4.24 – Espectro de massas para o composto PtD2 em m/z.

Considerando que o complexo PdD2 apresentou atividade citotóxica restrita às linhagens tumorais de ovário A2780 e A2780cis, os complexos análogos de platina e níquel foram avaliados frente a essas mesmas linhagens, bem como à linhagem não tumoral de pulmão MRC-5, com o objetivo de investigar o perfil de seletividade dos compostos. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 4.18.

TABELA 4.18 – Valores de IC₅₀ e índice de seletividade (IS) dos complexos obtidos e da cisplatina nas linhagens A2780cis, A2780 e MRC-5, após 48 h de incubação.

Complexos	IC ₅₀ (μM)			IS ¹	IS ²
	A2780cis	A2780	MRC-5		
NiD2	19,84 ± 1,25	9,36 ± 1,05	>50	>2,52	>5,34
PtD2	25,93 ± 2,87	10,36 ± 1,49	>50	>1,92	>4,82
PdD2	3,42 ± 0,22	0,96 ± 0,02	>50	> 14,61	> 52,08
D2	>50	>50	>50	-	-
[NiCl ₂ (PPh ₃) ₂]	>50	>50	>50	-	-
<i>cis</i> -[PtCl ₂ (PPh ₃) ₂]	>50	>50	>50	-	-
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (PPh ₃) ₂]	>50	>50	>50	-	-
Cisplatina	37,02 ± 5,10	11,80 ± 0,80	29,09 ± 0,78	0,78	2,46

$$IS^1 = IC_{50}MRC-5/IC_{50}A2780cis \text{ e } IS^2 = IC_{50}MRC-5/IC_{50}A2780$$

Conforme apresentado na Tabela 4.18, os complexos NiD2 e PtD2 demonstraram atividade citotóxica frente às linhagens tumorais de ovário A2780 e

A2780cis. Em contraste, a avaliação da viabilidade celular na linhagem não tumoral MRC-5 indicou um perfil favorável de seletividade, pois não foi observada citotoxicidade nem na maior concentração testada (50 μ M). Esses resultados indicam uma preferência dos compostos por células tumorais de ovário, evidenciando um potencial seletivo relevante.

Em comparação com a cisplatina, os complexos apresentaram valores de IC₅₀ semelhantes aos observados para o fármaco de referência empregado neste estudo na linhagem A2780 e resultados menores na linhagem resistente. Contudo, ao contrário da cisplatina, os complexos não exibiram citotoxicidade frente à linhagem não tumoral avaliada, o que resultou em índices de seletividade superiores.

Com base nos resultados obtidos para a série de complexos contendo o ligante D2, observa-se que o complexo com centro metálico de paládio apresentou a maior atividade citotóxica frente às linhagens tumorais de ovário, exibindo baixos valores de IC₅₀ e índices de seletividade maiores. Em contraste, os complexos contendo níquel e platina apresentaram desempenhos biológicos semelhantes entre si. Dessa forma, os dados indicam que o paládio é mais eficiente em promover efeitos citotóxicos em concentrações mais baixas, destacando-se como o centro metálico mais promissor no design estrutural inicialmente proposto.

4.12 Ensaio morfológico

Com base no conjunto de resultados obtidos ao longo deste estudo, o complexo PdD2 foi selecionado para investigações biológicas adicionais por apresentar a maior atividade citotóxica associada ao perfil seletivo mais favorável entre os compostos avaliados. Dessa forma, este complexo foi selecionado para a realização de ensaios celulares adicionais e mais aprofundados, com o objetivo de ampliar a compreensão de seu comportamento biológico e de seus possíveis mecanismos de ação.

Inicialmente, foi realizado um estudo morfológico com o objetivo de avaliar a capacidade do complexo PdD2 em promover alterações morfológicas nas linhagens celulares A2780 e MRC-5. Para esse fim, ambas as linhagens foram tratadas com diferentes concentrações do complexo, definidas com base no valor de IC₅₀ previamente determinado para a linhagem A2780 pelo ensaio de MTT, e imagens foram adquiridas nos tempos de 0, 24 e 48 horas (Figura 4.25).

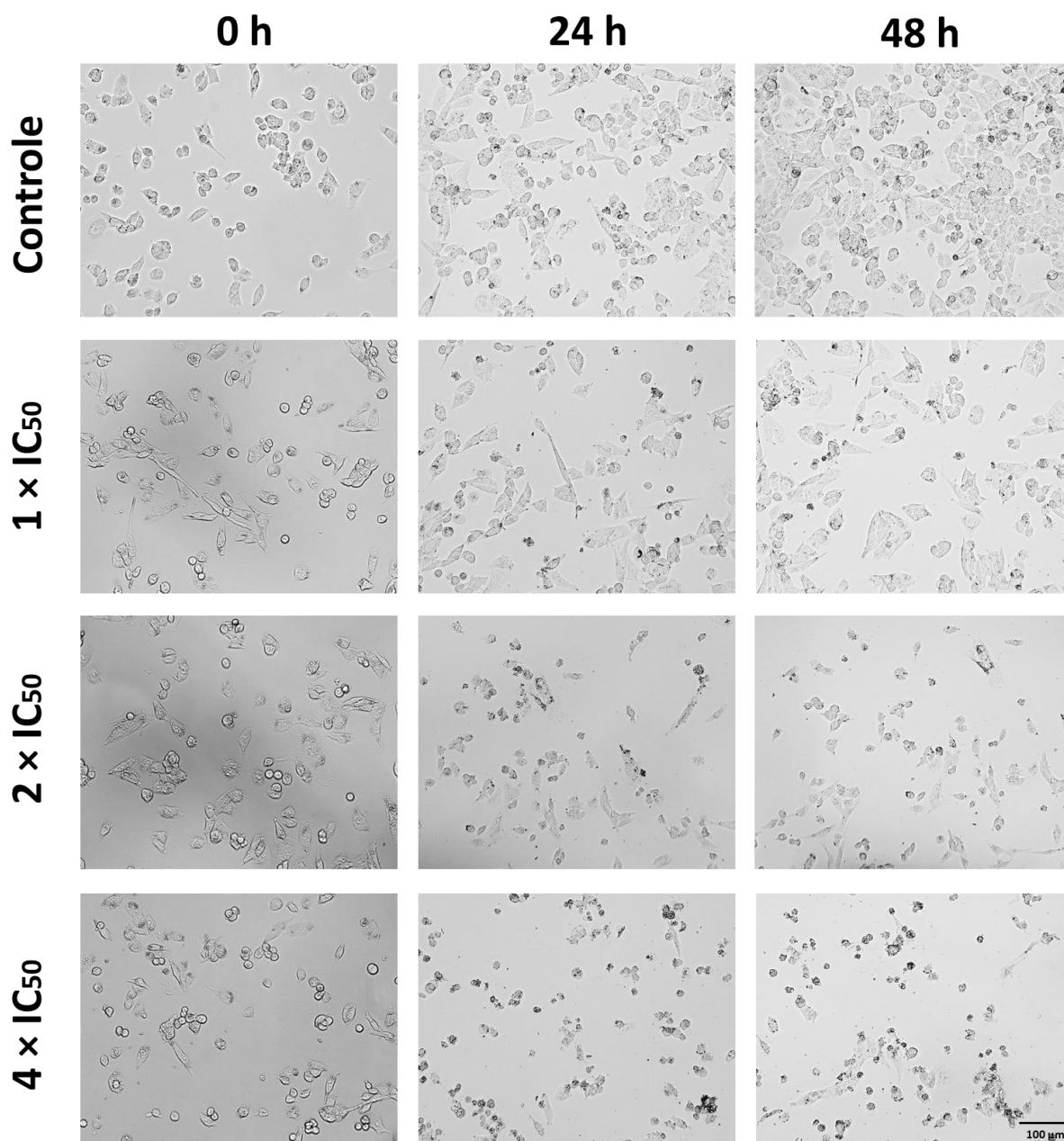


FIGURA 4.25 – Efeito do composto PdD2, em diferentes concentrações, na morfologia celular da linhagem tumoral A2780, durante 48 horas de incubação. As imagens foram obtidas através do microscópio CELENA®, utilizando objetiva de 10 ×.

Conforme ilustrado na Figura 4.25, para as células A2780, na concentração correspondente ao IC₅₀, a morfologia celular manteve-se, globalmente, semelhante à do controle, embora tenha sido observada redução da densidade celular, achado compatível com um efeito antiproliferativo relevante e possivelmente associado a um componente citostático. Em concentrações superiores ao IC₅₀, observaram-se

alterações mais pronunciadas, como arredondamento celular, redução da adesão celular, presença de detritos celulares e diminuição acentuada da densidade celular, características sugestivas de dano celular mais intenso e compatíveis com efeito citotóxico. Em células aderentes, o arredondamento e a perda de adesão são frequentemente associados à desorganização do citoesqueleto e ao comprometimento da integridade celular, podendo anteceder ou acompanhar processos de morte celular. Os dados morfológicos preliminares corroboram os resultados de viabilidade celular, demonstrando que a redução da atividade metabólica observada no ensaio de MTT está acompanhada de alterações fenotípicas compatíveis com o comprometimento funcional e estrutural das células tumorais.

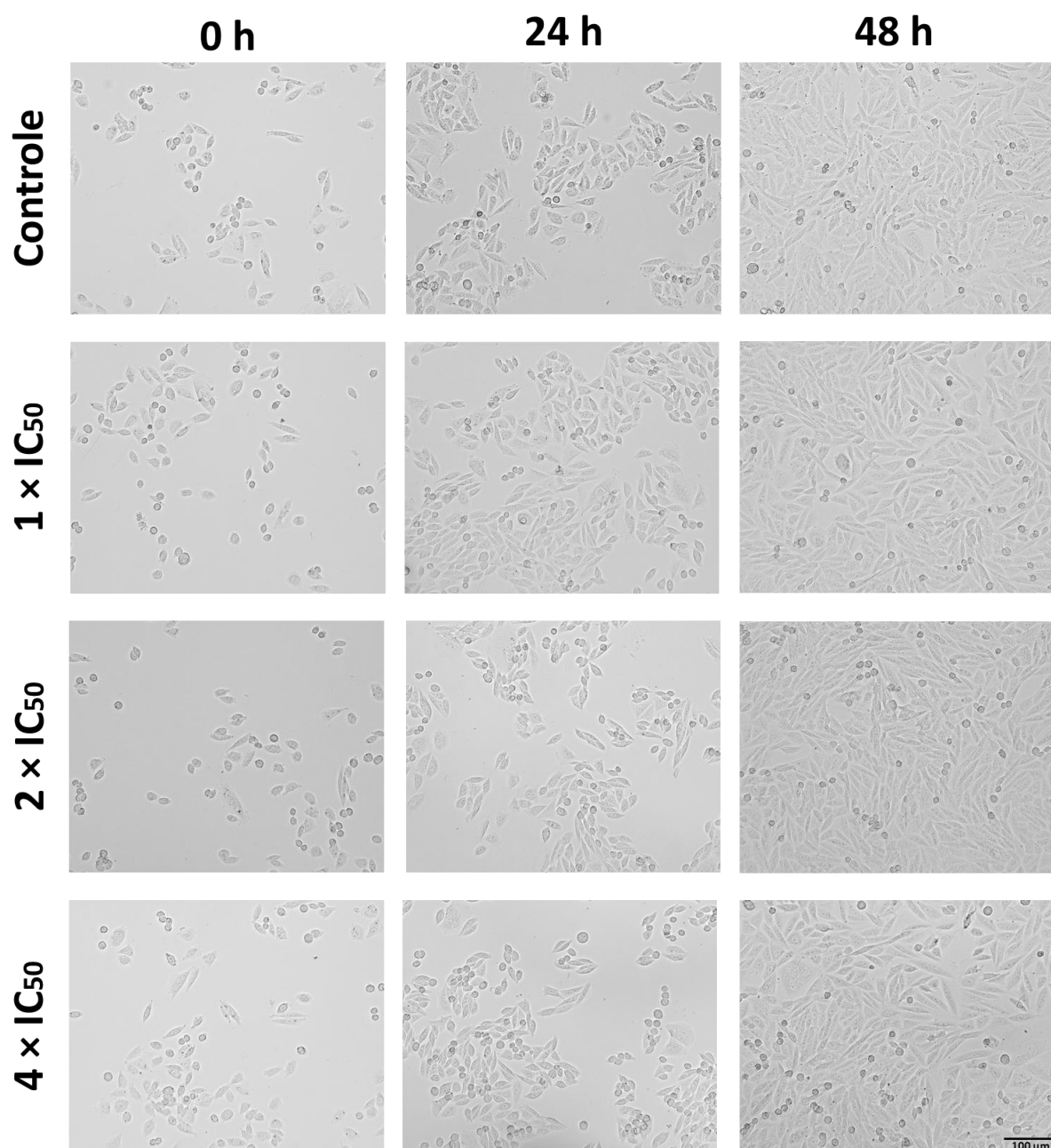


FIGURA 4.26 – Efeito do composto PdD2, em diferentes concentrações, na morfologia celular da linhagem não tumoral MRC-5, durante 48 horas de incubação. As imagens foram obtidas através do microscópio CELENA®, utilizando objetiva de 10 ×.

Para a linhagem não tumoral MRC-5 (Figura 4.26), observa-se que o complexo não promove alterações morfológicas significativas, mesmo na maior concentração avaliada, uma vez que as células mantêm características semelhantes às do controle ao longo de todo o período analisado. Esses achados reforçam o perfil seletivo favorável de PdD2, uma vez que alterações morfológicas expressivas foram

observadas apenas na linhagem tumoral A2780, enquanto MRC-5 permaneceu relativamente preservada nas condições avaliadas.

Adicionalmente, foi realizado um ensaio morfológico empregando os marcadores fluorescentes Green Plasma (CellMask™) e DAPI. O Green Plasma incorpora-se à bicamada lipídica, emitindo fluorescência verde e permitindo a visualização da membrana plasmática. O DAPI, por sua vez, liga-se especificamente ao DNA, possibilitando a marcação e a análise da morfologia nuclear das células.^{141,142}

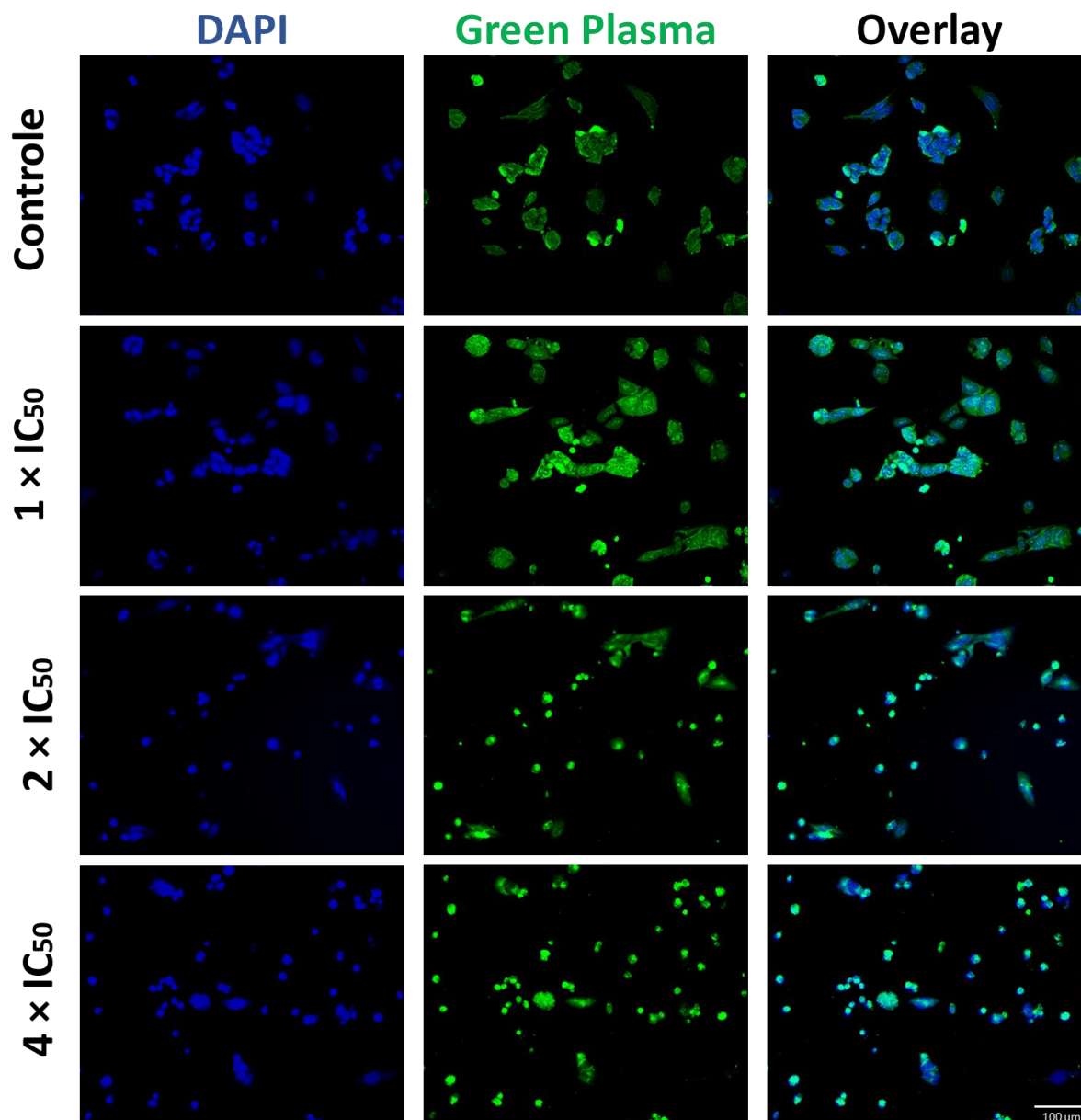


FIGURA 4.27 – Efeito do composto PdD2, em diferentes concentrações, na morfologia celular da linhagem tumoral A2780, após 48 horas de incubação, com os marcadores Green Plasma e DAPI. As imagens foram obtidas através do microscópio CELENA®, utilizando objetiva de 10 ×.

Conforme a Figura 4.27, após 48 h de tratamento, o aumento da concentração do composto promoveu um encolhimento acentuado da membrana plasmática, com evidente comprometimento de sua morfologia original. Em contraste, o núcleo celular não apresentou alterações significativas, mantendo-se semelhante ao observado no controle. Esse padrão difere daquele classicamente associado a agentes cujo efeito se manifesta por meio de alterações nucleares mais evidentes, sugerindo que PdD2 possa atuar por mecanismo distinto ou adicional ao observado com a cisplatina.

Em conjunto, a viabilidade celular da linhagem A2780 foi investigada por meio do ensaio LIVE/DEAD®, com o objetivo de complementar os dados obtidos nos ensaios morfológicos e de citotoxicidade. Esse método permite distinguir simultaneamente células viáveis e não viáveis com base em dois marcadores fluorescentes complementares. A calceína AM, permeável à membrana plasmática e inicialmente pouco fluorescente, é convertida por esterases intracelulares em calceína altamente fluorescente em células metabolicamente ativas, resultando em emissão verde. Por outro lado, o homodímero-1 de etídio é excluído por membranas íntegras e penetra apenas em células com comprometimento de membrana, ligando-se ao DNA e emitindo fluorescência vermelha. Dessa forma, o ensaio permite avaliar, simultaneamente, a atividade metabólica e a integridade da membrana plasmática após o tratamento com o complexo.

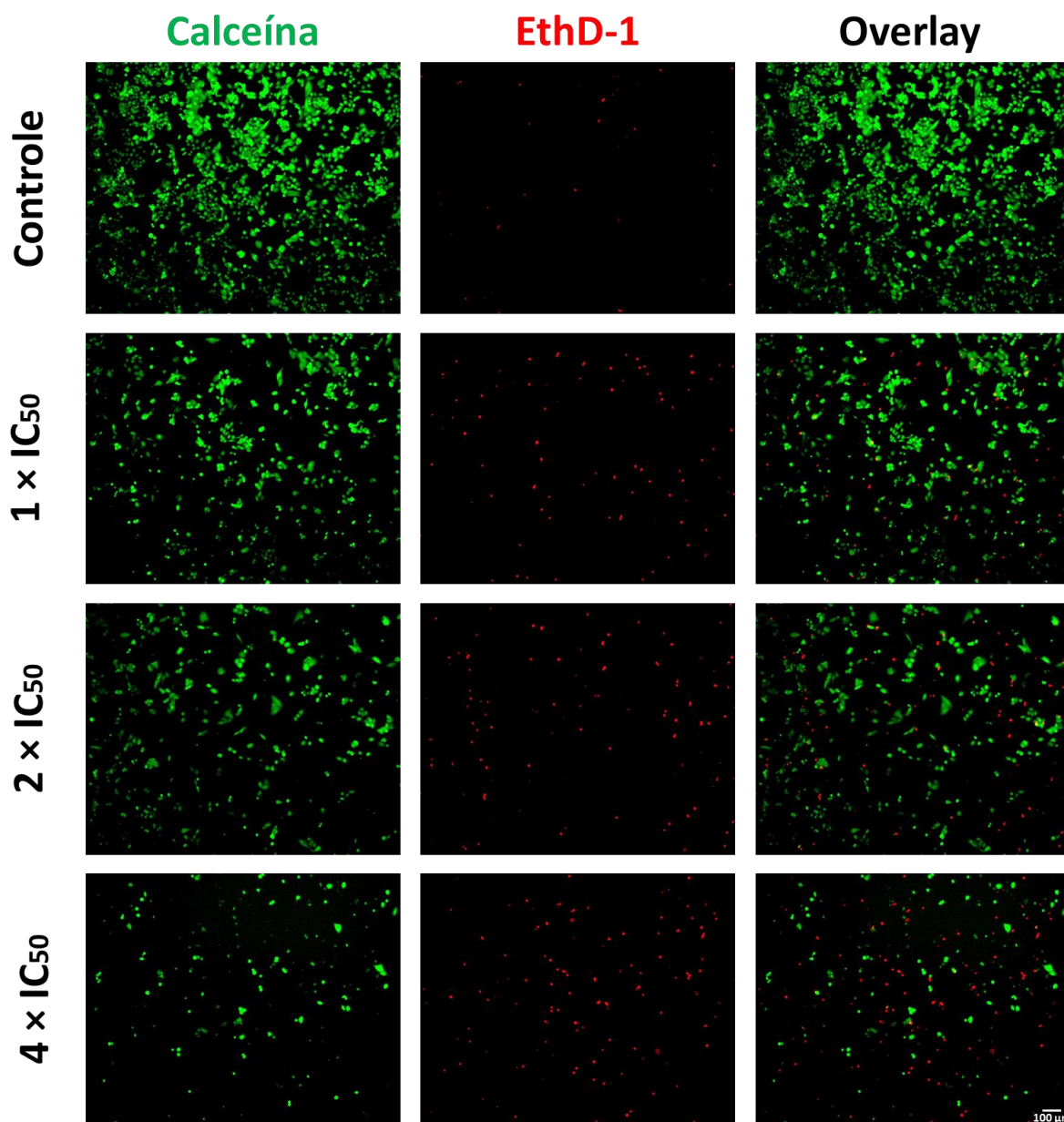


FIGURA 4.28 – Efeito do composto PdD2, em diferentes concentrações, sobre a viabilidade celular da linhagem tumoral A2780, após 48 horas de incubação, com o kit LIVE/DEAD®. As imagens foram obtidas através do microscópio CELENA®, utilizando objetiva de 4 ×.

De acordo com a Figura 4.28, o aumento da concentração de PdD2 promoveu elevação progressiva da fluorescência vermelha, concomitante à redução da fluorescência verde. Esse padrão é compatível com perda gradual da integridade da membrana plasmática e diminuição da atividade metabólica celular, evidenciando comprometimento crescente da viabilidade em função da concentração do composto. Esses resultados corroboram os achados morfológicos anteriormente observados, nos

quais foram identificados arredondamento celular, perda de aderência e alterações evidentes de membrana. Em conjunto, os dados reforçam que a ação de PdD2 sobre a linhagem A2780 envolve não apenas redução da proliferação e da atividade metabólica, mas também dano estrutural celular associado ao comprometimento da membrana plasmática. A predominância crescente da fluorescência vermelha nas maiores concentrações sugere, ainda, que a perda de integridade de membrana constitui um evento relevante na resposta celular induzida pelo complexo.

4.13 Ensaio clonogênico

O ensaio de sobrevivência clonogênica foi realizado com o propósito de investigar se a exposição ao complexo PdD2 compromete, de forma duradoura, a capacidade das células de manter seu potencial proliferativo e originar colônias após o tratamento^{143,144}. Trata-se de uma abordagem particularmente relevante, pois permite avaliar a sobrevivência reprodutiva celular e fornecer informações complementares aos ensaios de viabilidade metabólica de curto prazo. Nesse contexto, diferentes concentrações de PdD2 foram testadas frente às linhagens A2780 e MRC-5, sendo analisados tanto o número quanto a área das colônias formadas.

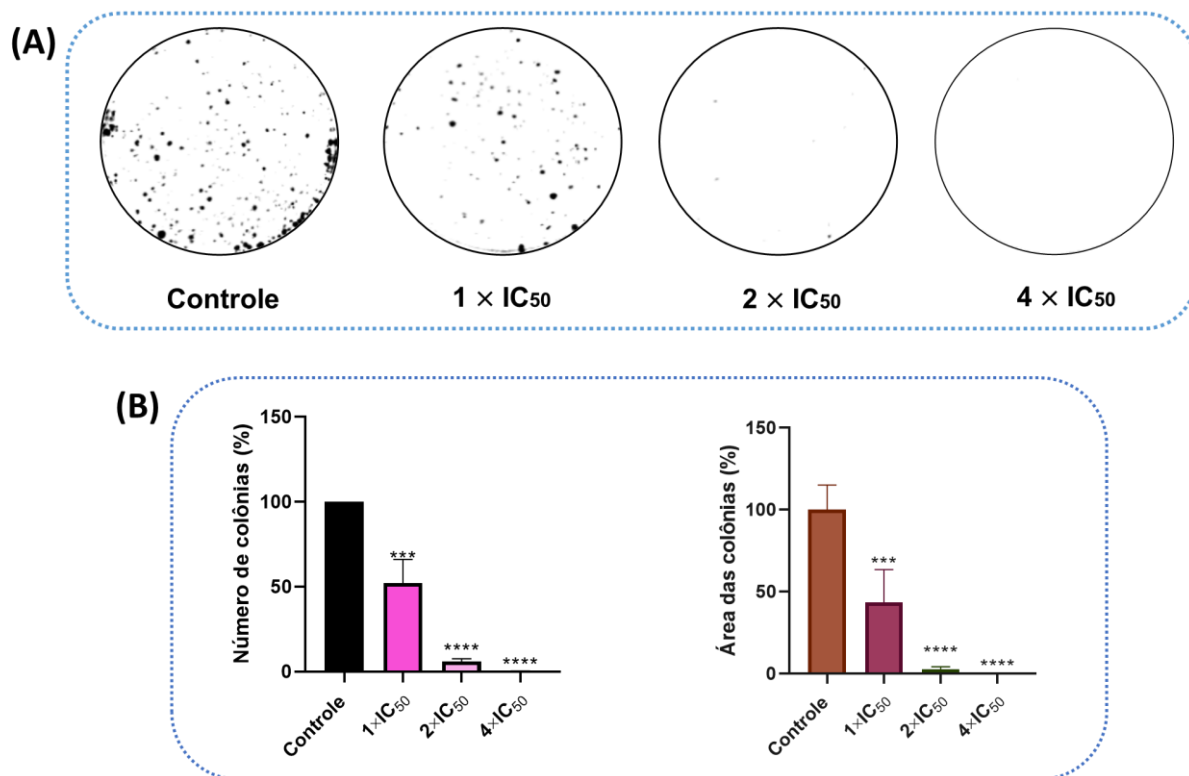


FIGURA 4.29 – Efeito do complexo PdD2 sobre a capacidade clonogênica de células tumorais A2780. (A) Imagens representativas das colônias formadas após o tratamento com diferentes concentrações do composto. (B) Análise quantitativa do número e da área (%) das colônias em relação ao controle. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. *** $p < 0,0007$ e **** $p < 0,0001$ em comparação ao controle.

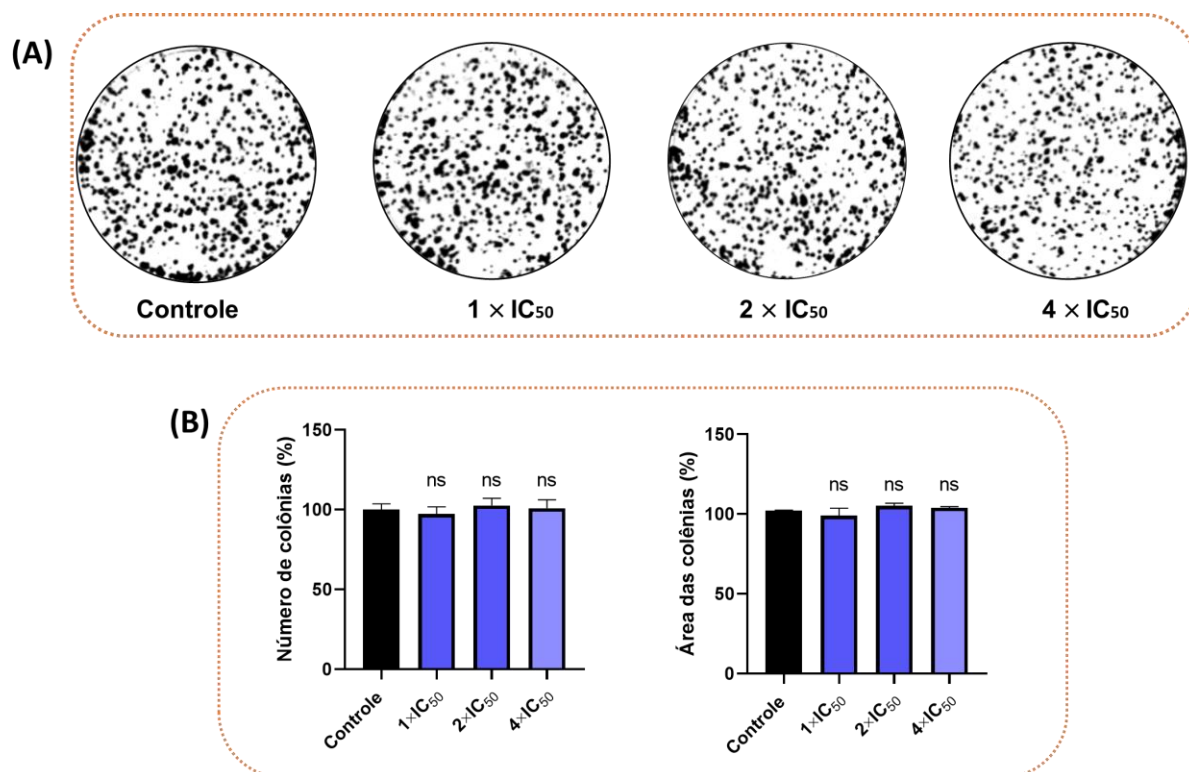


FIGURA 4.30 – Efeito do complexo PdD2 sobre a capacidade clonogênica de células tumorais MRC-5. (A) Imagens representativas das colônias formadas após o tratamento com diferentes concentrações do composto. (B) Análise quantitativa do número e da área (%) das colônias em relação ao controle. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Os resultados obtidos (Figura 4.29) mostram que PdD2 reduziu significativamente a capacidade clonogênica da linhagem tumoral A2780 já na concentração correspondente ao IC_{50} . Em concentrações superiores, a formação de colônias foi praticamente suprimida, indicando um comprometimento acentuado da sobrevivência reprodutiva celular. A diminuição simultânea do número e da área das colônias sugere que o composto interfere não apenas na fração de células capazes de sobreviver ao tratamento, mas também na expansão proliferativa das células remanescentes. Esses dados reforçam que a ação de PdD2 sobre A2780 ultrapassa um efeito agudo na viabilidade, resultando em uma limitação persistente da capacidade de repovoamento tumoral.

Em contraste, na linhagem não tumoral MRC-5, o tratamento com o complexo não resultou em alterações relevantes no número ou na área das colônias formadas, apresentando comportamento semelhante ao do controle, mesmo na maior concentração avaliada (Figura 4.30). Esse resultado corrobora a marcada preferência

do complexo por células tumorais, confirmando sua elevada seletividade e concordando com os dados previamente observados nos ensaios de viabilidade celular.

4.14 Análise do ciclo celular

O ciclo celular é um processo altamente regulado, responsável por coordenar o crescimento, a duplicação do material genético e a divisão celular. Ele é composto pela interfase, subdividida nas fases G1, S e G2, e pela fase mitótica (M) (Figura 4.31). Durante a fase G1, a célula cresce e se prepara para a síntese do DNA; na fase S, ocorre a replicação do material genético; e, na fase G2, a célula realiza ajustes finais antes de entrar em mitose. Em determinadas condições, as células podem sair temporariamente do ciclo celular e entrar em quiescência (G0). De modo distinto, a fração SubG1 corresponde a células com conteúdo de DNA inferior ao da fase G1, sendo frequentemente associada à fragmentação de DNA e morte celular. A progressão ordenada entre essas fases é controlada por uma complexa rede de reguladores moleculares e pontos de checagem, que garantem a integridade do DNA e a divisão celular adequada. Alterações nesses mecanismos de controle podem levar à desregulação do ciclo celular, resultando em proliferação descontrolada, característica central das células tumorais. ^{145,146,147}

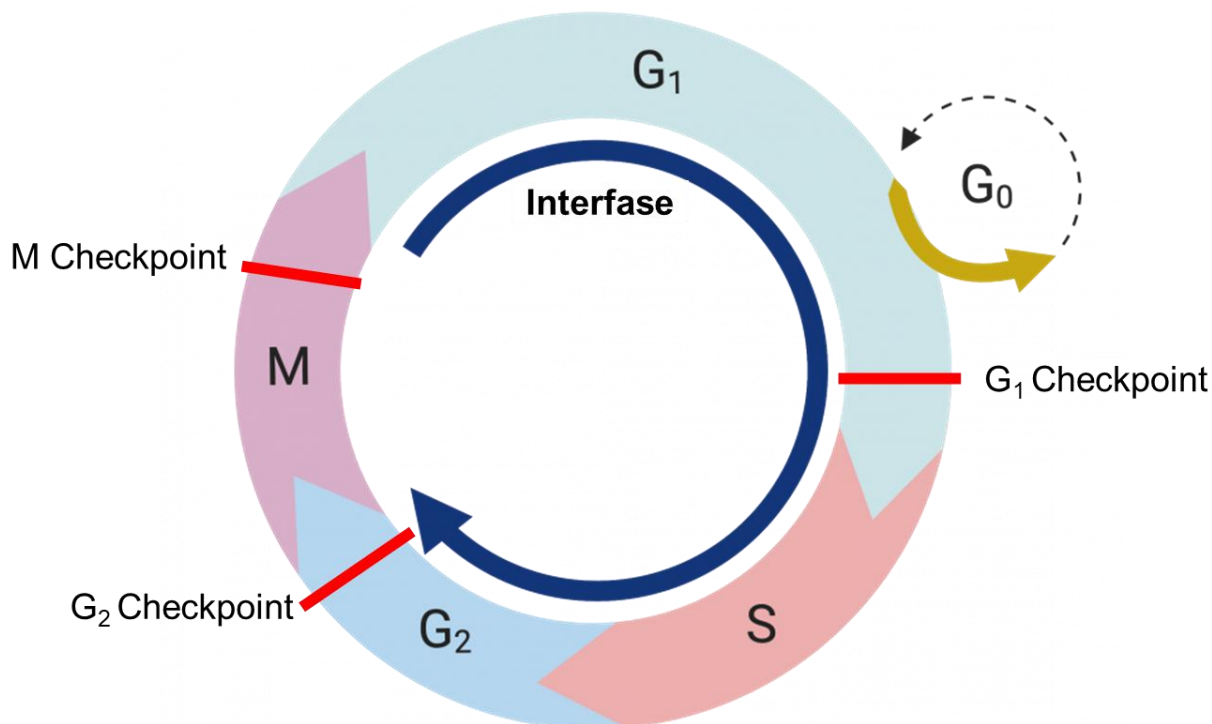


FIGURA 4.31 – Esquema ilustrativo da progressão do ciclo celular, destacando as fases da interfase (G₁, S e G₂) e a fase mitótica (M).

Nesse contexto, a análise da distribuição celular ao longo das diferentes fases do ciclo celular constitui uma ferramenta fundamental para avaliar a capacidade de um composto de interferir nos mecanismos regulatórios da proliferação celular, contribuindo para a compreensão de seu potencial antitumoral. Assim, esse ensaio permitiu investigar se o complexo PdD2 é capaz de promover alterações na distribuição do ciclo celular da linhagem tumoral A2780. Na Figura 4.32 são apresentados os histogramas e gráficos referentes à porcentagem de células em cada fase do ciclo celular após o tratamento com diferentes concentrações do complexo.

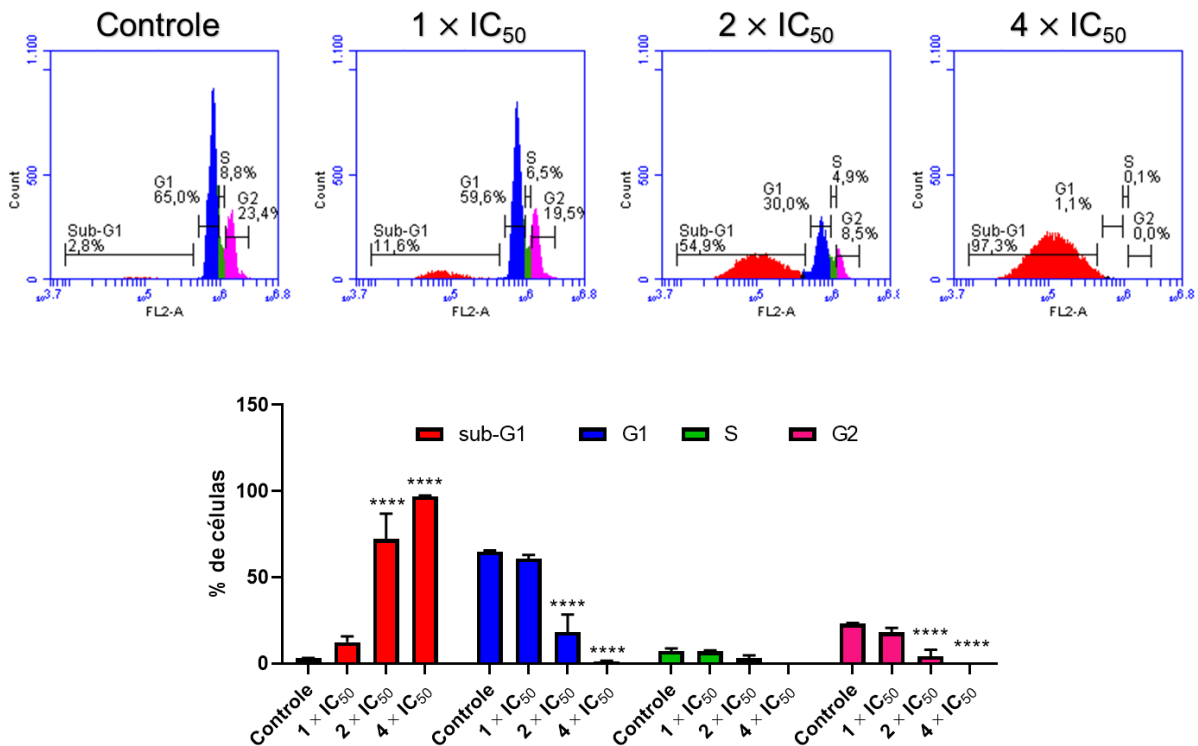


FIGURA 4.32 – Efeito do complexo PdD2 na distribuição das fases do ciclo celular de células tumorais A2780 após 48 h de tratamento. As células foram expostas a diferentes concentrações do complexo, e a distribuição percentual foi determinada por citometria de fluxo após coloração com iodeto de propídio. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de experimentos independentes. **** $p < 0,0001$ em comparação ao controle.

A análise dos histogramas de conteúdo de DNA e dos gráficos quantitativos mostra que o aumento da concentração de PdD2 promove um acúmulo progressivo e estatisticamente significativo da população SubG1, fração reconhecida como indicativa de fragmentação do DNA e associada à morte celular ¹⁴⁸. Simultaneamente, observa-se redução das populações em G1, S e G2/M, evidenciando a diminuição da proporção de células nas fases proliferativas. Esse perfil, marcado pela ausência de acúmulo expressivo em um checkpoint específico, sugere que, nas condições avaliadas, PdD2 não atua predominantemente por bloqueio pontual do ciclo celular, mas por indução progressiva de eventos compatíveis com morte celular.

4.15 Apoptose por Anexina V

Existem diferentes tipos de morte celular, sendo a apoptose e a necrose entre os principais mecanismos (Figura 4.33). A apoptose caracteriza-se como um processo de morte celular programada, altamente regulado, no qual as células sofrem retração, condensação nuclear e fragmentação em corpos apoptóticos, que são posteriormente removidos por fagocitose. Em contraste, a necrose é um processo de morte celular não programada, geralmente desencadeado por agressões externas, resultando na ruptura da membrana plasmática, na liberação do conteúdo intracelular e na consequente ativação de processos inflamatórios. ^{149,150,151}

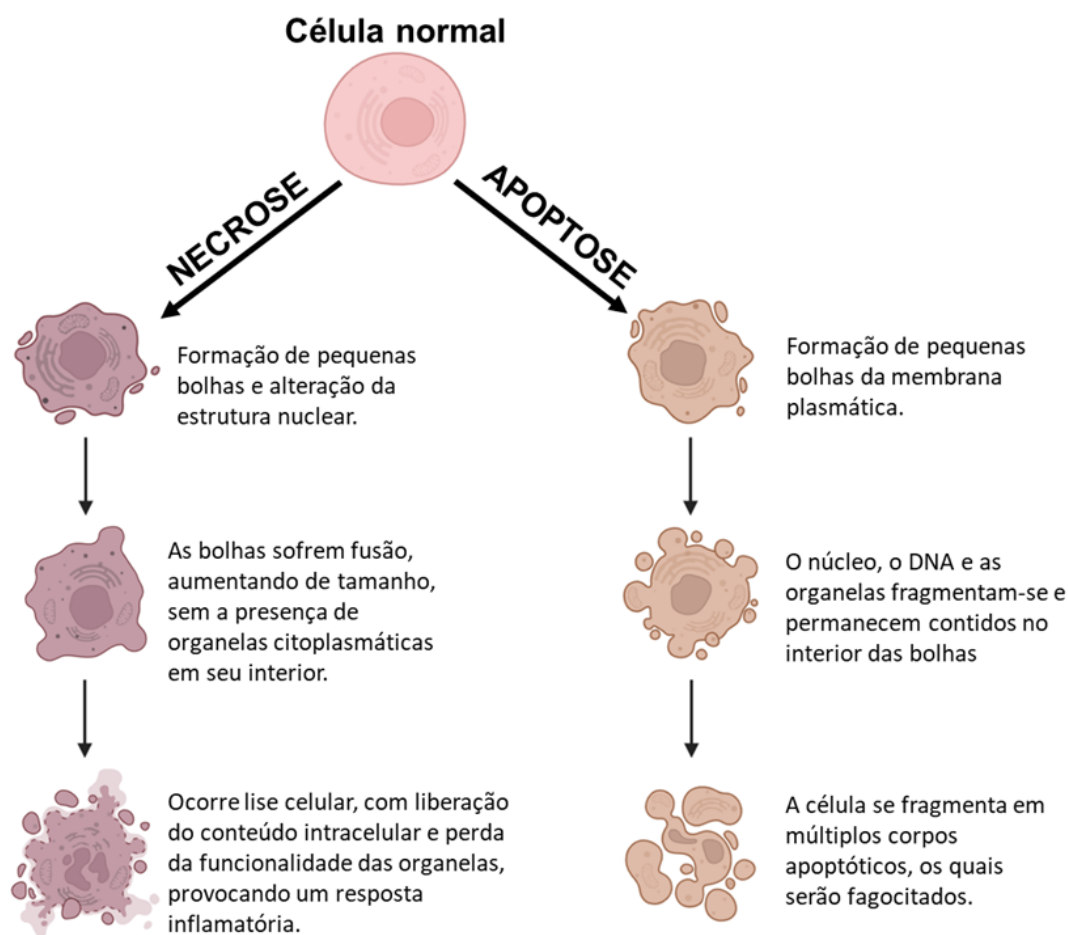


FIGURA 4.33 – Esquema ilustrativo dos mecanismos celulares envolvidos nos processos de apoptose e necrose.

Com o objetivo de investigar o tipo de morte celular induzida por PdD2, realizou-se o ensaio de Anexina V/7-AAD por citometria de fluxo. A Anexina V detecta a

externalização de fosfatidilserina, evento característico das fases iniciais do apoptose, enquanto o 7-AAD atua como marcador de perda de integridade de membrana. Dessa forma, a combinação desses marcadores permite distinguir células viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia e em estágios avançados de morte celular ^{152,153}.

Para isso, células A2780 foram tratadas com diferentes concentrações de PdD2 por 24 h, utilizando-se cisplatina (50 μ M) como controle positivo. Após o tratamento, as células foram coradas com Anexina V conjugada ao fluorocromo PE e com 7-aminoactinomicina D (7-AAD). A Figura 4.34 apresenta os diagramas de dispersão organizados em quatro quadrantes: o quadrante Q1 (Anexina V⁻/7-AAD⁻) corresponde às células viáveis; o quadrante Q2 (Anexina V⁺/7-AAD⁻) indica células em apoptose inicial; o quadrante Q3 (Anexina V⁺/7-AAD⁺) representa células em apoptose tardia / morte apoptótica avançada; e o quadrante Q4 (Anexina V⁻/7-AAD⁺) engloba células em necrose primária ou células com perda severa de membrana.

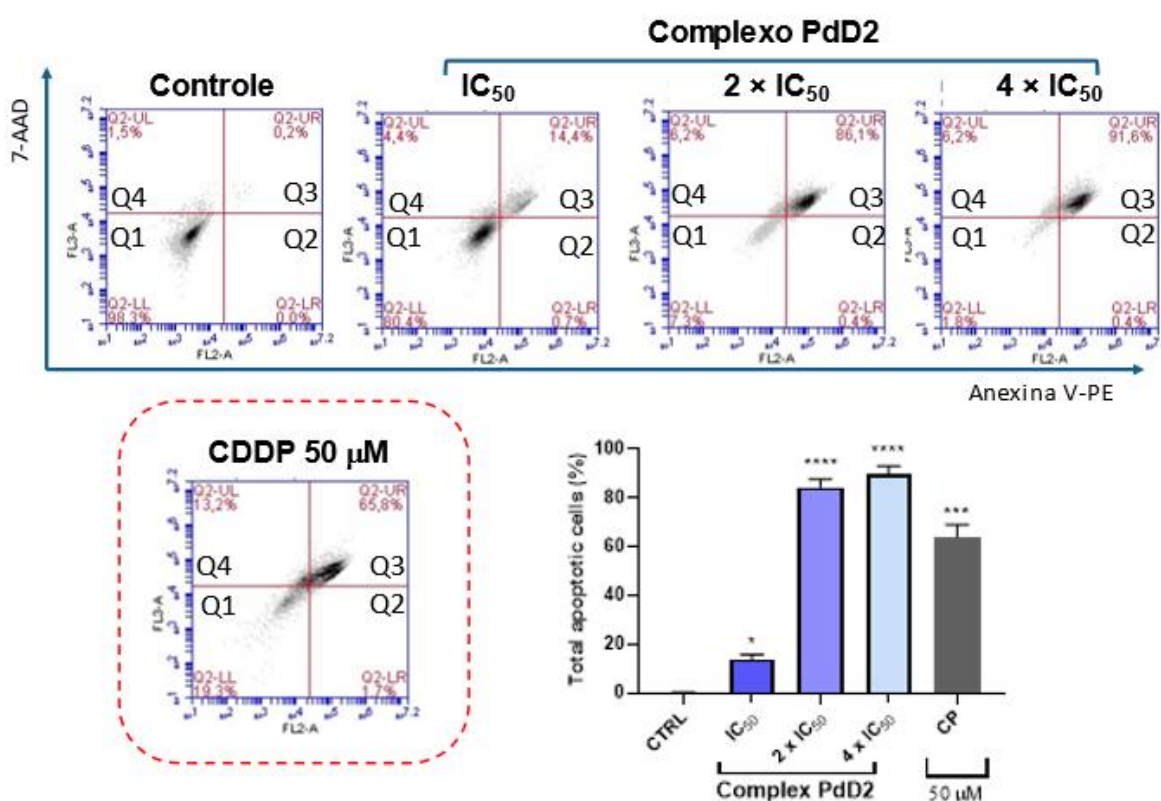


FIGURA 4.34 – Efeitos do complexo PdD2 e da cisplatina na indução de apoptose em células tumorais A2780. A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo após tratamento com os compostos, e os resultados são apresentados como a porcentagem de células

apoptóticas. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle são indicadas por * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

A análise por citometria de fluxo evidencia que o tratamento com PdD2 promove aumento acentuado da população Anexina V⁺/7-AAD⁺ nas maiores concentrações, perfil compatível com apoptose tardia. Na concentração correspondente ao IC₅₀, a fração apoptótica detectável após 24h permaneceu relativamente baixa, sugerindo que, nessa condição experimental, a redução da viabilidade celular pode estar mais relacionada a comprometimento proliferativo e/ou a eventos de morte ainda não plenamente estabelecidos nesse intervalo. Em contraste, nas concentrações de $2 \times \text{IC}_{50}$ e $4 \times \text{IC}_{50}$, observa-se um aumento expressivo da fração apoptótica total, evidenciando uma progressão acentuada para morte celular por apoptose. O predomínio da população Anexina V⁺/7-AAD⁺ nessas condições está em consonância com os achados morfológicos e com o ensaio LIVE/DEAD®, reforçando que o comprometimento de membrana observado anteriormente ocorre em associação a um processo de morte celular com importante componente apoptótico. Nas condições avaliadas, PdD2 induziu porcentagem de células apoptóticas superior à observada com a cisplatina a 50 μM , indicando elevada capacidade de indução de apoptose nesse modelo celular, ainda que essa comparação deva ser interpretada no contexto específico do tempo de exposição e das concentrações utilizadas.

Portanto, os ensaios de ciclo celular e Anexina V indicam que a resposta biológica induzida por PdD2 evolui de um comprometimento inicial da proliferação para um quadro de morte celular progressiva, com aumento da população SubG1 e acúmulo de células em apoptose tardia nas maiores concentrações.

4.16 Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$)

A compreensão dos mecanismos de apoptose é fundamental para elucidar sua participação em diversas doenças associadas à sua desregulação, além de subsidiar o desenvolvimento de fármacos direcionados a vias ou genes apoptóticos específicos. Nesse processo, as caspases desempenham papel central, atuando tanto na fase de iniciação quanto na execução da morte celular programada. Sua ativação pode ocorrer principalmente pelas vias intrínseca (mitocondrial) e extrínseca (mediada por receptores de morte celular).^{154,155}

A integridade do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é essencial para o funcionamento adequado das mitocôndrias e para a sobrevivência celular. Quando há abertura dos poros na membrana interna mitocondrial, diminui-se o potencial, promovendo a liberação de citocromo c no citosol e desencadeando a via apoptótica intrínseca.¹⁵⁶

Dessa forma, o potencial de membrana mitocondrial das células A2780 após o tratamento com o complexo PdD2 foi avaliado por microscopia de fluorescência utilizando o corante JC-1. Esse marcador permite monitorar a integridade mitocondrial por meio da variação do padrão de fluorescência: mitocôndrias com potencial preservado exibem fluorescência vermelha, enquanto a despolarização mitocondrial, característica de células em apoptose, predomina a fluorescência verde.¹⁵⁷

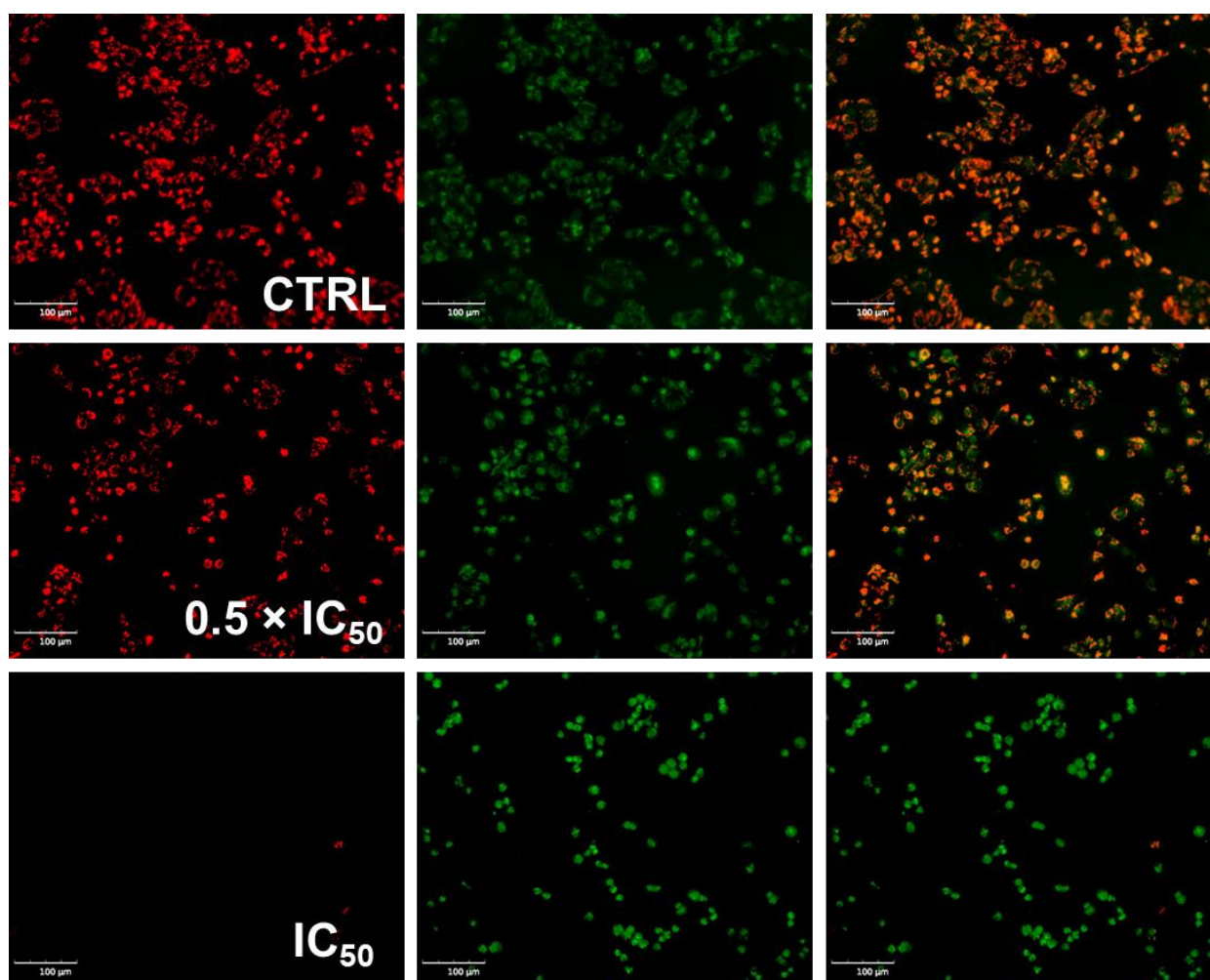


FIGURA 4.35 – Efeito do complexo PdD2, nas concentrações de $0,5 \times IC_{50}$ e IC_{50} , sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células tumorais A2780, após 24 h de incubação, utilizando o corante JC-1. As imagens foram obtidas através do microscópio CELENA®, utilizando objetiva de 4 ×.

Conforme observado na Figura 4.35, o tratamento com PdD2 promoveu redução da fluorescência vermelha, acompanhada de aumento da fluorescência verde, padrão compatível com despolarização mitocondrial. Esses resultados sugerem comprometimento da integridade funcional das mitocôndrias e reforçam a possibilidade de envolvimento da via apoptótica intrínseca na resposta celular induzida pelo complexo. Em conjunto com os dados de ciclo celular, Anexina V e alterações morfológicas, esses achados indicam que a ação de PdD2 pode envolver, ao menos em parte, eventos associados à disfunção mitocondrial e à progressão para morte celular.

4.17 Uptake Celular

Com o objetivo de investigar a eficiência de internalização celular do complexo PdD2, foram conduzidos ensaios de uptake celular nas linhagens A2780 e MRC-5. A avaliação da captação intracelular é fundamental para compreender se a atividade antiproliferativa observada está diretamente relacionada à quantidade de metal efetivamente internalizada, uma vez que a permeação pela membrana plasmática constitui etapa importante no mecanismo de ação de metalofármacos.

Para isso, as células foram incubadas com PdD2 a 10 μ M por 6 h, e o teor intracelular de paládio foi quantificado por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS), uma técnica de elevada sensibilidade para a determinação de metais-traço. Os resultados obtidos, conforme apresentados na Tabela 4.19, demonstraram maior acúmulo do metal na linhagem não tumoral MRC-5 do que em A2780. Apesar disso, os ensaios biológicos mostraram maior sensibilidade da linhagem tumoral ao tratamento. Esse resultado indica que a quantidade total de paládio internalizada, isoladamente, não se correlaciona diretamente com a citotoxicidade observada. Assim, a atividade diferencial de PdD2 entre as linhagens provavelmente depende também de fatores como destino subcelular do complexo, capacidade de adaptação metabólica, resposta a estresse e interação com alvos intracelulares. Dessa forma, os dados sugerem que a ação biológica de PdD2 não é determinada apenas pela captação celular global, mas pela forma como cada linhagem processa e responde ao composto após sua internalização.

TABELA 4.19 – Porcentagem de absorção de Pd nas células A2780 e MRC-5 determinada por HR-CS GFAAS.

	Pd (ng)		Uptake (%)
PdD2	5630	± 512	
1 - PdD2 (MRC-5)	78,4	± 6,9	1,4
2 - PdD2 (MRC-5)	72,2	± 4,9	1,3
1 - PdD2 (A2780)	37,6	± 1,9	0,7
2 - PdD2 (A2780)	39,7	± 4,3	0,7

4.18 Ensaio de cultura 3D

Considerando a atividade observada nos ensaios em cultura celular 2D, realizou-se a avaliação de PdD2 em modelo tridimensional, com o objetivo de verificar se o composto manteria sua atividade em um sistema de maior complexidade biológica. Modelos tridimensionais reproduzem de forma mais adequada características do microambiente tumoral, como gradientes de oxigênio e nutrientes, heterogeneidade proliferativa e maior interação célula–célula, constituindo um sistema mais robusto para a avaliação da atividade antitumoral.

Nesse experimento, esferoides da linhagem tumoral A2780 foram formados por meio da técnica de levitação magnética e, posteriormente, tratados com diferentes concentrações do complexo PdD2, sendo monitorados ao longo de 144 h. Conforme apresentado na Figura 4.36, a análise do crescimento dos esferoides, baseada na variação do diâmetro, revelou que o tratamento passou a comprometer o crescimento celular a partir da concentração de 5 μ M. Nessa condição, observou-se apenas um discreto aumento do diâmetro nas primeiras 48 h, seguido de estabilização no restante do período experimental. Para concentrações superiores a 5 μ M, os diâmetros dos esferoides permaneceram praticamente constantes ao longo de todo o acompanhamento, indicando inibição do crescimento.

Adicionalmente, em concentrações iguais ou superiores a 10 μ M, observou-se a desagregação progressiva dos esferoides, possivelmente associada à interferência do complexo nas interações célula–célula e na integridade estrutural do modelo tridimensional. Enquanto a estabilização do diâmetro sugere limitação da expansão proliferativa dos esferoides, a desagregação observada nas maiores concentrações indica comprometimento estrutural mais profundo, possivelmente associado à perda de coesão celular e de viabilidade celular.

Em contraste, na concentração de 1 μ M (próxima ao valor de IC₅₀ determinado nos ensaios em cultura 2D), o comportamento dos esferoides foi

semelhante ao do controle, sem impacto significativo no crescimento. Esse comportamento evidencia a menor sensibilidade do modelo 3D ao tratamento, em comparação com o sistema 2D, o que é compatível com a maior complexidade estrutural e funcional dos esferoides, que impõem barreiras adicionais à difusão do composto e reproduzem condições mais próximas do microambiente tumoral.

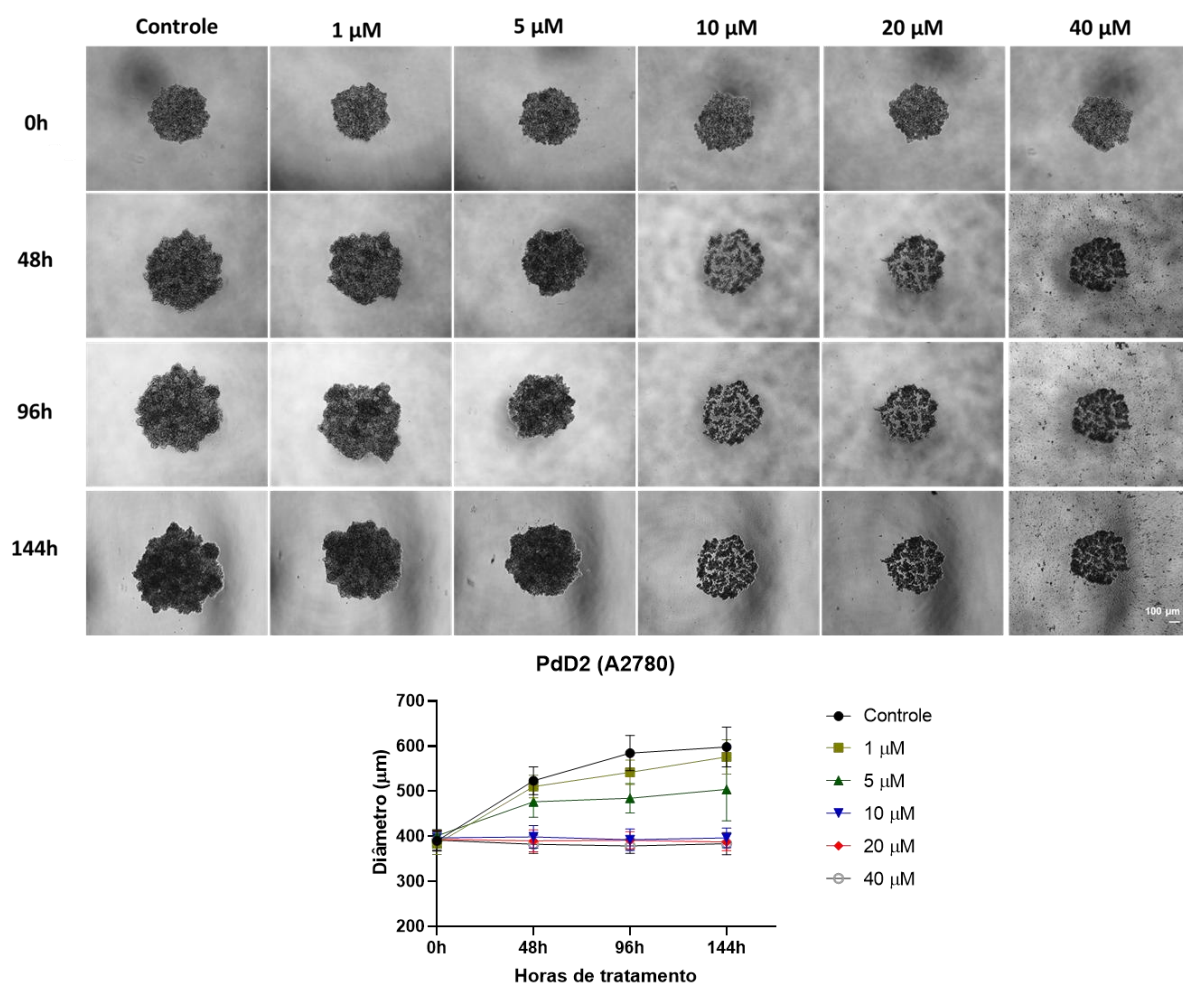


FIGURA 4.36 – Efeito do composto PdD2, em diferentes concentrações, na morfologia celular dos esferoides da linhagem tumoral A2780, durante 144 horas, e gráfico da relação entre o diâmetro dos esferoides e tempo de tratamento. As imagens foram obtidas através do microscópio CELENA®, utilizando objetiva de 4 $\times$.

Para uma melhor análise, após 144h de tratamento, adicionou-se os marcadores fluorescentes Calceína AM e EthD-1, contidos no Kit LIVE/DEAD®, para analisar a capacidade do composto de afetar a viabilidade celular dos esferoides e obter indicativos de morte celular.

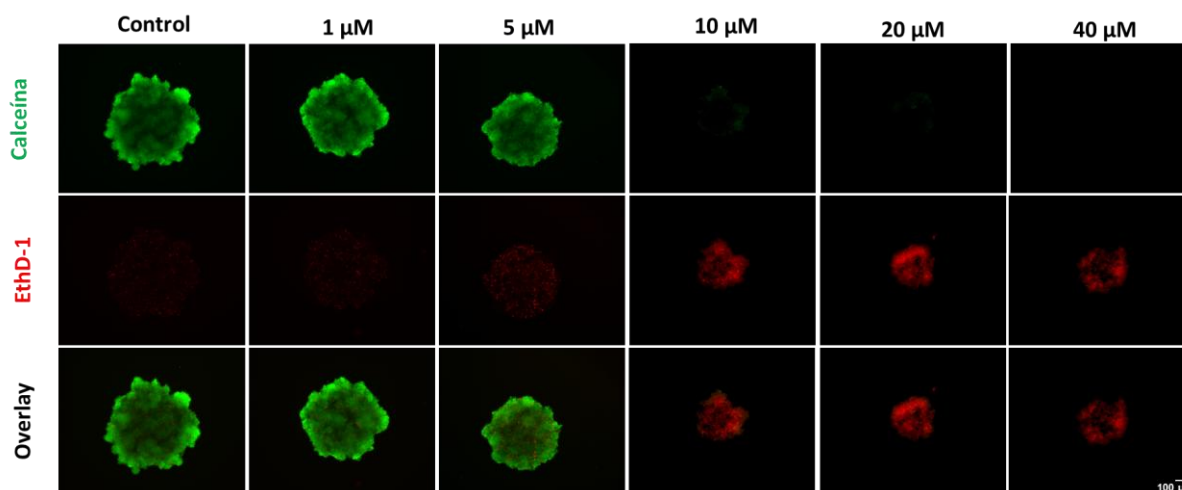


FIGURA 4.37 – Efeito do composto PdD2, em diferentes concentrações, na viabilidade celular dos esferoides da linhagem tumoral A2780, após 144 horas, através de microscopia de fluorescência com o kit LIVE/DEAD®. As imagens foram obtidas através do microscópio CELENA®, utilizando objetiva de 4 ×.

A análise das imagens apresentadas na Figura 4.37 revela um aumento expressivo da fluorescência vermelha associada ao marcador EthD-1 à medida que a concentração do composto aumenta, indicando perda da integridade da membrana plasmática e, conseqüentemente, morte celular. Esse padrão de fluorescência confirma que as alterações observadas no crescimento e na morfologia dos esferoides estão acompanhadas de perda efetiva de viabilidade, e não apenas de reorganização estrutural do modelo.

Paralelamente, observa-se uma redução da fluorescência verde, associada às células viáveis, evidenciando a diminuição da viabilidade celular dos esferoides. Esses resultados demonstram que o composto é capaz de exercer atividade citotóxica sobre a linhagem tumoral A2780 mesmo em um modelo tridimensional, que apresenta maior complexidade estrutural e relevância fisiológica. Assim, os dados indicam que PdD2 mantém atividade antitumoral relevante em um modelo tridimensional, sustentando seu interesse para investigações biológicas mais avançadas.

5. Conclusões

Os resultados deste trabalho demonstram que a combinação entre metais d^8 , tiossemicarbazonas derivadas do salicilaldeído e trifenilfosfina constitui uma estratégia consistente para a modulação das propriedades químicas e biológicas de complexos com potencial antitumoral. As diferentes técnicas de caracterização empregadas confirmaram a obtenção de complexos neutros de Pd(II), Pt(II) e Ni(II), com geometria quadrático-planar e coordenação tridentada via O,N,S, corroborando a hipótese de que esse arranjo estrutural constitui um elemento central para a estabilização dos sistemas em solução e para a definição de seu comportamento químico. Nesse sentido, os dados obtidos evidenciam que a coordenação tridentada, aliada à presença da trifenilfosfina, constitui um ambiente favorável à formação de espécies organizadas e suficientemente estáveis.

No que tange sua aplicação biológica, os resultados confirmam de forma clara que a atividade da série estudada depende não apenas da natureza do ligante, mas também, de maneira decisiva, da identidade do centro metálico. Embora os complexos de Pd(II), Pt(II) e Ni(II) apresentem arquitetura estrutural semelhante, suas respostas celulares foram substancialmente distintas, o que valida a hipótese de que pequenas variações no ambiente de coordenação podem influenciar de forma significativa na atividade citotóxica e na seletividade. Entre os sistemas avaliados, o complexo PdD2 destacou-se, apresentando maior atividade frente às linhagens tumorais de ovário, incluindo a linhagem resistente A2780cis, e um perfil seletivo mais favorável nas condições experimentais adotadas. Os ensaios mecanísticos aprofundaram essa interpretação ao indicar que sua ação envolve comprometimento da viabilidade celular, perda da capacidade proliferativa, redução da sobrevivência clonogênica, aumento da população SubG1, indução de apoptose e despolarização do potencial de membrana mitocondrial, sugerindo participação relevante da via intrínseca de morte celular. De modo igualmente importante, os estudos de uptake mostraram que a citotoxicidade observada não pode ser explicada exclusivamente pela quantidade total de metal internalizada, indicando que o efeito biológico do complexo também depende do processamento intracelular e da susceptibilidade específica de cada linhagem.

A avaliação em modelo tridimensional acrescenta especial relevância a esse conjunto de dados, ao demonstrar que, mesmo diante de um sistema mais

complexo e fisiologicamente mais representativo do microambiente tumoral, PdD2 mantém atividade antitumoral significativa. Embora concentrações mais elevadas tenham sido necessárias para comprometer o crescimento e a viabilidade dos esferoides, a limitação da expansão celular, a desagregação estrutural observada nas maiores concentrações e a perda de viabilidade, confirmada por LIVE/DEAD®, indicam que a resposta identificada em monocamada não se restringe ao modelo bidimensional. Assim, os resultados obtidos validam as hipóteses centrais que orientaram este estudo, demonstrando que variações no centro metálico e no ambiente de coordenação se refletem diretamente na estabilidade química, na atividade citotóxica, na seletividade e no comportamento biológico dos complexos investigados.

Por fim, este trabalho não apenas amplia a compreensão da relação entre estrutura e atividade em complexos metálicos contendo tiossemicarbazonas, como também fornece bases sólidas para o delineamento racional de novos metalofármacos, posicionando o complexo PdD2 como um candidato particularmente relevante para investigações futuras em sistemas biológicos de maior complexidade e mais próximos das condições tumorais *in vivo*.

6. Referências Bibliográficas

- (1) SCHWARTZ, S. M. "Epidemiology of Cancer". *Clinical Chemistry*, 2024, v. 70, n. 1, p. 140–149.
- (2) SONG, M.; GIOVANNUCCI, E. L. "Cancer Risk: Many Factors Contribute". *Science*, 2015, v. 347, n. 6223, p. 728–729.
- (3) BLACKADAR, C. B. "Historical Review of the Causes of Cancer". *World Journal of Clinical Oncology*, 2016, v. 7, n. 1, p. 54.
- (4) WU, S.; POWERS, S.; ZHU, W.; HANNUN, Y. A. "Substantial Contribution of Extrinsic Risk Factors to Cancer Development". *Nature*, 2016, v. 529, n. 7584, p. 43–47.
- (5) SCIACOVELLI, M.; GAUDE, E.; HILVO, M.; FREZZA, C. "The Metabolic Alterations of Cancer Cells". *Methods in Enzymology*, 2014, v. 542, p. 1–23.
- (6) XIA, L. et al. "The Cancer Metabolic Reprogramming and Immune Response". *Molecular Cancer*, 2021, v. 20, n. 1, p. 28.
- (7) DE IESO, M. L.; YOOL, A. J. "Mechanisms of Aquaporin-Facilitated Cancer Invasion and Metastasis". *Frontiers in Chemistry*, 2018, v. 6, p. 135.
- (8) BERGERS, G.; FENDT, S.-M. "The Metabolism of Cancer Cells during Metastasis". *Nature Reviews Cancer*, 2021, v. 21, n. 3, p. 162–180.
- (9) KIRI, S.; RYBA, T. "Cancer, Metastasis, and the Epigenome". *Molecular Cancer*, 2024, v. 23, n. 1, p. 154.
- (10) BRAY, F. et al. "Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries". *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2024, v. 74, n. 3, p. 229–263.
- (11) MARTINS, L. F. L.; CHAVES, G. V.; OLIVEIRA, J. F. P.; SOUZA, L. B. L. de; CHAGAS NETO, P.; CARVALHO, F. N. de; VASCONCELOS, G. M. de; DIAS, M. B. K.; MELLO, M. S. de C. "Perfil Epidemiológico da Incidência de Câncer no Brasil e Regiões: Estimativas para o Triênio 2026-2028". *Revista Brasileira de*

Cancerologia, 2026, v. 72, n. 2, p. e–025587.

- (12) STEWART, C.; RALYEA, C.; LOCKWOOD, S. "Ovarian Cancer: An Integrated Review". *Seminars in Oncology Nursing*, 2019, v. 35, n. 2, p. 151–156.
- (13) ŽILOVIČ, D.; ČIURLIENĖ, R.; SABALIAUSKAITĖ, R.; JARMALAITĖ, S. "Future Screening Prospects for Ovarian Cancer". *Cancers (Basel)*, 2021, v. 13, n. 15, p. 3840.
- (14) LHEUREUX, S.; BRAUNSTEIN, M.; OZA, A. M. "Epithelial Ovarian Cancer: Evolution of Management in the Era of Precision Medicine". *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2019, v. 69, n. 4, p. 280–304.
- (15) BOYD, L. R.; MUGGIA, F. M. "Carboplatin/Paclitaxel Induction in Ovarian Cancer: The Finer Points". *Oncology*, 2018, v. 32, n. 8, p. 418.
- (16) SAMBASIVAN, S. "Epithelial Ovarian Cancer: Review Article". *Cancer Treatment Research Communications*, 2022, v. 33, p. 100629.
- (17) SHAH, S. et al. "Epithelial Ovarian Cancer: Providing Evidence of Predisposition Genes". *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, v. 19, n. 13, p. 8113.
- (18) WANG, J. J.; LEI, K. F.; HAN, F. "Tumor Microenvironment: Recent Advances in Various Cancer Treatments". *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2018, v. 22, n. 12, p. 3855–3864.
- (19) BUKOWSKI, K.; KCIUK, M.; KONTEK, R. "Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy". *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, v. 21, n. 9, p. 3233.
- (20) BEHRANVAND, N. et al. "Chemotherapy: A Double-Edged Sword in Cancer Treatment". *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2022, v. 71, n. 3, p. 507–526.
- (21) PAPROCKA, R. et al. "Latest Developments in Metal Complexes as Anticancer Agents". *Coordination Chemistry Reviews*, 2022, v. 452, p. 214307.
- (22) MURILLO, M. I.; GAIDDON, C.; LE LAGACEC, R. "Targeting of the Intracellular

- Redox Balance by Metal Complexes towards Anticancer Therapy". *Frontiers in Chemistry*, 2022, v. 10, p. 967337.
- (23) KOSTOVA, I. "Anticancer Metallocenes and Metal Complexes of Transition Elements from Groups 4 to 7". *Molecules*, 2024, v. 29, n. 4, p. 824.
- (24) BRUIJNINCX, P. C. A.; SADLER, P. J. "New Trends for Metal Complexes with Anticancer Activity". *Current Opinion in Chemical Biology*, 2008, v. 12, n. 2, p. 197–206.
- (25) MARLOYE, M.; BERGER, G.; GELBCKE, M.; DUFRASNE, F. "A Survey of the Mechanisms of Action of Anticancer Transition Metal Complexes". *Future Medicinal Chemistry*, 2016, v. 8, n. 18, p. 2263–2286.
- (26) ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. "Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode". *Nature*, 1965, v. 205, n. 4972, p. 698–699.
- (27) GHOSH, S. "Cisplatin: The First Metal Based Anticancer Drug". *Bioorganic Chemistry*, 2019, v. 88, p. 102925.
- (28) QI, L.; LUO, Q.; ZHANG, Y.; JIA, F.; ZHAO, Y.; WANG, F. "Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug Cisplatin". *Chemical Research in Toxicology*, 2019, v. 32, n. 8, p. 1469–1486.
- (29) ELJACK, N. D.; MA, H.-Y. M.; DRUCKER, J.; SHEN, C.; HAMBLEY, T. W.; NEW, E. J.; FRIEDRICH, T.; CLARKE, R. J. "Mechanisms of Cell Uptake and Toxicity of the Anticancer Drug Cisplatin". *Metallomics*, 2014, v. 6, n. 11, p. 2126–2133.
- (30) ALDOSSARY, S. A. "Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin". *Biomedical and Pharmacology Journal*, 2019, v. 12, n. 1, p. 7–15.
- (31) SOUSA, G. F. de; WLODARCZYK, S. R.; MONTEIRO, G. "Carboplatin: Molecular Mechanisms of Action Associated with Chemoresistance". *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, v. 50, n. 4, p. 693–701.
- (32) TSVETKOVA, D.; IVANOVA, S. "Application of Approved Cisplatin Derivatives in

- Combination Therapy against Different Cancer Diseases". *Molecules*, 2022, v. 27, n. 8, p. 2466.
- (33) SIMPSON, P. V.; DESAI, N. M.; CASARI, I.; MASSI, M.; FALASCA, M. "Metal-Based Antitumor Compounds: Beyond Cisplatin". *Future Medicinal Chemistry*, 2019, v. 11, n. 2, p. 119–135.
- (34) ROMANI, A. M. P. "Cisplatin in Cancer Treatment". *Biochemical Pharmacology*, 2022, v. 206, p. 115323.
- (35) RANASINGHE, R.; MATHAI, M. L.; ZULLI, A. "Cisplatin for Cancer Therapy and Overcoming Chemoresistance". *Heliyon*, 2022, v. 8, n. 9, p. 10608.
- (36) ADHIKARI, S.; NATH, P.; DAS, A.; DATTA, A.; BAILDYA, N.; DUTTARROY, A. K.; PATHAK, S. "A Review on Metal Complexes and Its Anti-Cancer Activities: Recent Updates from in Vivo Studies". *Biomedical Pharmacotherapy*, 2024, v. 171, p. 116211.
- (37) LEÓN, I. E. "Transition Metal Complexes: A New Generation of Anticancer Drugs". *Future Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 17, p. 1727–1730, 2024.
- (38) PRATHIMA, T. S.; CHOUDHURY, B.; AHMAD, M. G.; CHANDA, K.; BALAMURALI, M. M. "Recent Developments on Other Platinum Metal Complexes as Target-Specific Anticancer Therapeutics". *Coordination Chemistry Reviews*, 2023, v. 490, p. 215231.
- (39) LV, L.; ZHENG, T.; TANG, L.; WANG, Z.; LIU, W. "Recent Advances of Schiff Base Metal Complexes as Potential Anticancer Agents". *Coordination Chemistry Reviews*, 2025, v. 525, p. 216327.
- (40) KAPDI, A. R.; FAIRLAMB, I. J. S. "Anti-Cancer Palladium Complexes: A Focus on PdX₂L₂, Palladacycles and Related Complexes". *Chemical Society Reviews*, 2014, v. 43, n. 13, p. 4751–4777.
- (41) JAHROMI, E. Z.; DIVSALAR, A.; SABOURY, A. A.; KHALEGHIZADEH, S.; MANSOURI-TORSHIZI, H.; KOSTOVA, I. "Palladium Complexes: New Candidates for Anti-Cancer Drugs". *Journal of the Iranian Chemical Society*,

2016, v. 13, n. 5, p. 967–989.

- (42) HARIBABU, J.; BALACHANDRAN, C.; TAMIZH, M. M.; ARUN, Y.; BHUVANESH, N. S. P.; AOKI, S.; KARVEMBU, R. "Unprecedented Formation of Palladium (II)-Pyrazole Based Thiourea from Chromone Thiosemicarbazone and $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$: Interaction with Biomolecules and Apoptosis through Mitochondrial Signaling Pathway". *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2020, v. 205, p. 110988.
- (43) BOND, G. C. "Relativistic Phenomena in the Chemistry of the Platinum Group Metals". *Platinum Metals Review*, 2000, v. 44, n. 4, p. 146–155.
- (44) CZARNOMYSY, R.; RADOMSKA, D.; SZEWCZYK, O. K.; ROSZCZENKO, P.; BIELAWSKI, K. "Platinum and Palladium Complexes as Promising Sources for Antitumor Treatments". *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, v. 22, n. 15, p. 8271.
- (45) BANGDE, P.; PRAJAPATI, D.; DANDEKAR, P.; FAIRLAMB, I. J. S.; KAPDI, A. R. "Palladacycles as Potential Anticancer Agents". In: *Palladacycles*. Elsevier, 2019, p. 343–370.
- (46) MARQUES, M. P. M. "Platinum and Palladium Polyamine Complexes as Anticancer Agents: The Structural Factor". *International Scholarly Research Notices*, 2013, v. 2013, n. 1, p. 287353.
- (47) GRAHAM, R. D.; WILLIAMS, D. R. "The Synthesis and Screening for Anti-Bacterial, -Cancer, -Fungicidal and -Viral Activities of Some Complexes of Palladium and Nickel". *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 1979, v. 41, n. 8, p. 1245–1249.
- (48) FONG, T. T.H.; LOK, C.N.; CHUNG, C. Y.S.; FUNG, Y.M. E.; CHOW, P.K.; WAN, P.K.; CHE, C.M. "Cyclometalated Palladium(II) N-Heterocyclic Carbene Complexes: Anticancer Agents for Potent In Vitro Cytotoxicity and In Vivo Tumor Growth Suppression". *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, v. 55, n. 39, p. 11935–11939.
- (49) ZMEJKOVSKI, B. B.; PANTELIĆ, N. Đ.; KALUĐEROVIĆ, G. N. "Palladium(II)

Complexes: Structure, Development and Cytotoxicity from Cisplatin Analogues to Chelating Ligands with N Stereocenters". *Inorganica Chimica Acta*, 2022, v. 534, p. 120797.

- (50) MANDAL, A. "Palladium Analogues as Complementary of Cis-Platin: a Mini Review". *Polyhedron*, 2025, v. 277, p. 117585.
- (51) ABU-SAFIEH, K. A.; ABU-SURRAH, A. S.; TABBA, H. D.; ALMASRI, H. A.; BAWADI, R. M.; BOUDJELAL, F. M.; TAHTAMOUNI, L. H. "Novel Palladium(II) and Platinum(II) Complexes with a Fluoropiperazinyl Based Ligand Exhibiting High Cytotoxicity and Anticancer Activity In Vitro". *Journal of Chemistry*, 2016, v. 2016, n. 1, p. 7508724.
- (52) MOTSWAINYANA, W. M.; ONANI, M. O.; MADIEHE, A. M.; SAIBU, M.; THOVHOGI, N.; LALANCETTE, R. A. "Imino-Phosphine Palladium(II) and Platinum(II) Complexes: Synthesis, Molecular Structures and Evaluation as Antitumor Agents". *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2013, v. 129, p. 112–118.
- (53) FAIHAN, A. S.; HATSHAN, M. R.; KADHIM, M. M.; ALQAHTANI, A. S.; NASR, F. A.; SALEH, A. M.; AL-JIBORI, S. A.; AL-JANABI, A. S. Promising Bio-Active Complexes of Platinum(II) and Palladium(II) Derived from Heterocyclic Thiourea: Synthesis, Characterization, DFT, Molecular Docking, and Anti-Cancer Studies. *Journal of Molecular Structure*, 2022, v. 1252, p. 132198.
- (54) MCFARLAND, S. A.; MANDEL, A.; DUMOULIN-WHITE, R.; GASSER, G. Metal-Based Photosensitizers for Photodynamic Therapy: The Future of Multimodal Oncology? *Current Opinion in Chemical Biology*, 2020, v. 56, p. 23–27.
- (55) KARGES, J. Clinical Development of Metal Complexes as Photosensitizers for Photodynamic Therapy of Cancer. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, v. 61, n. 5, p. e202112236.
- (56) UHLIG, E. Steric and Electronic Factors Influencing the Structure of Nickel(II) Complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 1973, v. 10, n. 3, p. 227–264.
- (57) MASARYK, L.; TESAROVA, B.; CHOQUESILLO-LAZARTE, D.; MILOSAVLJEVIC, V.; HEGER, Z.; KOPEL, P. Structural and Biological

- Characterization of Anticancer Nickel(II) Bis(Benzimidazole) Complex. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2021, v. 217, p. 111395.
- (58) KLEIN, A.; SANDLEBEN, A.; VOGT, N. Synthesis, Structure and Reactivity of Cyclometalated Nickel(II) Complexes: A Review and Perspective. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section A: Physical Sciences*, 2016, v. 86, n. 4, p. 533–549.
- (59) KARPAGAM, B.; SANKARGANESH, M.; RAVI, L.; KESAVAN, M. P.; VINOTH KUMAR, G. G.; RAJAGOPAL, G.; RAJESH, J. "Synthesis, Spectroscopic and Crystal Structure of Nickel(II) Complex of Thiosemicarbazone Based Schiff Base: Antimicrobial, Anticancer and Molecular Docking Studies." *Inorganic Chemistry Communications*, 2021, v. 132, p. 108850.
- (60) LI, Y.; DONG, J.; ZHAO, P.; HU, P.; YANG, D.; GAO, L.; LI, L. "Synthesis of Amino Acid Schiff Base Nickel (II) Complexes as Potential Anticancer Drugs In Vitro". *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2020, v. 2020, p. 8834859.
- (61) ABDOLMALEKI, S.; GHADERMAZI, M.; FATTAHI, A.; SHOKRAI, S.; ALIMORADI, M.; SHAHBAZI, B.; AZAR, A. R. J. "Synthesis, Crystallographic and Spectroscopic Studies, Evaluation as Antimicrobial and Cytotoxic Agents of a Novel Mixed-Ligand Nickel(II) Complex". *Journal of Coordination Chemistry*, 2017, v. 70, n. 8, p. 1406–1423.
- (62) ALALI, A.; ALKANAD, M.; ALKANAD, K.; VENKATAPPA, A.; SIRAWASE, N.; WARAD, I.; KHANUM, S. A. "A Comprehensive Review on Anti-Inflammatory, Antibacterial, Anticancer and Antifungal Properties of Several Bivalent Transition Metal Complexes". *Bioorganic Chemistry*, 2025, v. 160, p. 108422.
- (63) DAS, K. K.; REDDY, R. C.; BAGOJI, I. B.; DAS, S.; BAGALI, S.; MULLUR, L.; KHODNAPUR, J. P.; BIRADAR, M. S. "Primary Concept of Nickel Toxicity—an Overview". *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 2019, v. 30, n. 2, p. 141–152.
- (64) KONG, D.-M.; WANG, J.; ZHU, L.-N.; JIN, Y.-W.; LI, X.-Z.; SHEN, H.-X.; MI, H.-F. "Oxidative DNA Cleavage by Schiff Base Tetraazamacrocyclic Oxamido Nickel(II) Complexes". *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2008, v. 102, n. 4, p. 824–832.

- (65) BEGUM, W.; RAI, S.; BANERJEE, S.; BHATTACHARJEE, S.; MONDAL, M. H.; BHATTARAI, A.; SAHA, B. "A Comprehensive Review on the Sources, Essentiality and Toxicological Profile of Nickel". *RSC Advances*, 2022, v. 12, n. 15, p. 9139–9153.
- (66) TESAROVA, B.; CHAROUSOVA, M.; DOSTALOVA, S.; BIENKO, A.; KOPEL, P.; KRUSZYŃSKI, R.; HYNEK, D.; MICHALEK, P.; ECKSCHLAGER, T.; STIBOROVA, M.; ADAM, V.; HEGER, Z. "Folic Acid-Mediated Re-Shuttling of Ferritin Receptor Specificity towards a Selective Delivery of Highly Cytotoxic Nickel(II) Coordination Compounds". *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, v. 126, p. 1099–1111.
- (67) LAZAREVIĆ, T.; RILAK, A.; BUGARČIĆ, Ž. D. "Platinum, Palladium, Gold and Ruthenium Complexes as Anticancer Agents: Current Clinical Uses, Cytotoxicity Studies and Future Perspectives". *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, v. 142, p. 8–31.
- (68) VEZZU, D. A. K.; LU, Q.; CHEN, Y.-H.; HUO, S. "Cytotoxicity of Cyclometalated Platinum Complexes Based on Tridentate NCN and CNN-Coordinating Ligands: Remarkable Coordination Dependence". *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2014, v. 134, p. 49–56.
- (69) MOHAMMADI, R.; YOUSEFI, R.; DADKHAH ASEMAN, M.; MASOUD NABAVIZADEH, S.; RASHIDI, M. "DNA Binding and Anticancer Activity of Novel Cyclometalated Platinum (II) Complexes". *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2015, v. 15, n. 1, p. 107–114.
- (70) THEINER, S.; VARBANOV, H. P.; GALANSKI, M. S.; EGGER, A. E.; BERGER, W.; HEFFETER, P.; KEPPLER, B. K. "Comparative in Vitro and in Vivo Pharmacological Investigation of Platinum(IV) Complexes as Novel Anticancer Drug Candidates for Oral Application". *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2015, v. 20, n. 1, p. 89–99.
- (71) PERON, C.; MOURA, S. "Zinc and Copper Metallodrugs: A 20-Year Perspective on Therapeutic Strategies and Future Directions". *Future Medicinal Chemistry*, 2025, v. 17, n. 21, p. 2613–2626.

- (72) CLAUDEL, M.; SCHWARTE, J. V.; FROMM, K. M. "New Antimicrobial Strategies Based on Metal Complexes". *Chemistry*, 2020, v. 2, n. 4, p. 849–899.
- (73) MOHSIN, N.; KHALID, S.; RASOOL, N.; AMAN, L.; KANWAL, A.; IMRAN, M. "Metallo-Organic Complexes Containing Transition Metals: Synthetic Approaches and Pharmaceutical Aspects". *ChemPlusChem*, 2025, v. 90, n. 5, e202400748.
- (74) MATESANZ, A. I.; ALBACETE, P.; SOUZA, P. "Synthesis and Characterization of a New Bioactive Mono (Thiosemicarbazone) Ligand Based on 3, 5-Diacetyl-1, 2, 4-Triazol Diketone and Its Palladium and Platinum Complexes". *Polyhedron*, 2016, v. 109, p. 161–165.
- (75) HERNÁNDEZ, W. et al. "Synthesis and Characterization of New Palladium (II) Thiosemicarbazone Complexes and Their Cytotoxic Activity against Various Human Tumor Cell Lines". *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2013, v. 2013, n. 1, p. 524701.
- (76) HEFFETER, P.; PAPE, V. F. S.; ENYEDY, É. A.; KEPPLER, B. K.; SZAKACS, G.; KOWOL, C. R. "Anticancer Thiosemicarbazones: Chemical Properties, Interaction with Iron Metabolism, and Resistance Development". *Antioxidants & Redox Signaling*, 2018, v. 30, n. 8, p. 1062–1082.
- (77) DOMAGK, G. "Investigations on the Antituberculous Activity of the Thiosemicarbazones in Vitro and in Vivo". *American Review of Tuberculosis*, 1950, v. 61, n. 1, p. 8–19.
- (78) MOORTHY, N.; CERQUEIRA, N. M.; RAMOS, M. J.; FERNANDES, P. A. "Aryl- and Heteroaryl-Thiosemicarbazone Derivatives and Their Metal Complexes: A Pharmacological Template". *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 2013, v. 8, n. 2, p. 168–182.
- (79) SIDDIQUI, E. J.; AZAD, I.; KHAN, A. R.; KHAN, T. "Thiosemicarbazone Complexes as Versatile Medicinal Chemistry Agents: A Review". *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2019, v. 9, p. 689–703.
- (80) ARORA, S.; AGARWAL, S.; SINGHAL, S. "Anticancer Activities of Thiosemicarbazides/Thiosemicarbazones: A Review". *International Journal of*

Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2014, v. 6, n. 9, p. 34–41.

- (81) CZUBATKA-BIEŃKOWSKA, A.; SARNIK, J.; MACIEJA, A.; GALITA, G.; WITCZAK, Z. J.; POPLAWSKI, T. "Thio-Functionalized Carbohydrate Thiosemicarbazones and Evaluation of Their Anticancer Activity". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2017, v. 27, n. 12, p. 2713–2720.
- (82) KHAN, A. A.; AHMAD, R.; ALANAZI, A. M.; ALSAIF, N.; ABDULLAH, M.; WANI, T. A.; BHAT, M. A. "Determination of Anticancer Potential of a Novel Pharmacologically Active Thiosemicarbazone Derivative against Colorectal Cancer Cell Lines". *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2022, v. 30, n. 6, p. 815–824.
- (83) ALJAMALI, N. M. "Survey on Semicarbazide and Thiosemicarbazide Derivatives". *International Journal of Chemical Synthesis and Chemical Reactions*, 2021, v. 7, n. 1, p. 51–57.
- (84) ESLAMINEJAD, T.; POURSHOJAEI, Y.; NAGHIZADEH, M.; ESLAMI, H.; DANESHPAJOUH, M.; HASSANZADEH, A. "Synthesis of Some Benzyldiene Thiosemicarbazide Derivatives and Evaluation of Their Cytotoxicity on U87, MCF-7, A549, 3T3 and HUVEC Cell Lines". *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2022, v. 87, n. 10, p. 1125–1142.
- (85) PÓSA, V.; STEFANELLI, A.; NUNES, J. H. B.; HAGER, S.; MATHUBER, M.; MAY, N. V.; BERGER, W.; KEPPLER, B. K.; KOWOL, C. R.; ENYEDY, É. A.; HEFFETER, P. "Thiosemicarbazone Derivatives Developed to Overcome COTI-2 Resistance". *Cancers*, 2022, v. 14, n. 18, p. 4455.
- (86) FINCH, R. A.; LIU, M.-C.; GRILL, S. P.; ROSE, W. C.; LOOMIS, R.; VASQUEZ, K. M.; CHENG, Y.-C.; SARTORELLI, A. C. "Triapine (3-Aminopyridine-2-Carboxaldehyde-Thiosemicarbazone): A Potent Inhibitor of Ribonucleotide Reductase Activity with Broad Spectrum Antitumor Activity". *Biochemical Pharmacology*, 2000, v. 59, n. 8, p. 983–991.
- (87) JOSHI, A.; KIESEL, B. F.; CHAPHEKAR, N.; JONES, R.; GUO, J.; KUNOS, C. A.; TAYLOR, S.; CHU, E.; VENKATARAMANAN, R.; BEUMER, J. H. "In Vitro Evaluation of the Metabolic Enzymes and Drug Interaction Potential of Triapine". *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2020, v. 86, n. 5, p. 633–640.

- (88) AKINYEMI, A. O.; DA SILVEIRA ROCHA, J.; DE OLIVEIRA, G. P.; DE JESUS SANTOS, J.; OWOYEMI, B. C. D.; ROCHA, F. V. "Topoisomerase II Inhibition in Cancer: A Focus on Metal Complexes". *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2025, v. 25, n. 12, p. 891–910.
- (89) JIANG, X.; FIELDING, L. A.; DAVIS, H.; CARROLL, W.; LISIC, E. C.; DEWEESE, J. E. "Inhibition of Topoisomerases by Metal Thiosemicarbazone Complexes". *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, v. 24, n. 15, p. 12010.
- (90) LIMA, M. A.; COSTA, V. A.; FRANCO, M. A.; DE OLIVEIRA, G. P.; DEFLON, V. M.; ROCHA, F. V. "Palladium (II) Complexes Bearing Thiosemicarbazone and Phosphines as Inhibitors of DNA-Topoisomerase II Enzyme: Synthesis, Characterizations and Biological Studies". *Inorganic Chemistry Communications*, 2020, v. 112, p. 107708.
- (91) SILVA, L. T. P.; PEREIRA, G. B. S.; OLIVEIRA, G. P. P.; LIMA, M. A.; ARAUJO-NETO, J. H.; AKINYEMI, A. O.; VIEIRA, M. A.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M.; FARIAS, R. L.; ELLENA, J. A.; NETTO, A. V. G.; ROCHA, F. V. "Synthesis, Characterization, Cytotoxicity Study, Interaction with DNA and Topoisomerase II α of Square-Planar Complexes with Thiosemicarbazones". *Polyhedron*, 2024, v. 257, p. 117021.
- (92) OLIVEIRA, G. P.; LIMA, M. A.; PEREIRA, G. B. S.; COSTA, A. R.; BATISTA, A. A.; FORIM, M. R.; COMINETTI, M. R.; ZANETTI, R. D.; FARIAS, R. L.; NETTO, A. V. G.; ARAUJO-NETO, J. H.; ELLENA, J. A.; OLMEDO-MORENO, L.; CAPILLA-GONZALEZ, V.; ROCHA, F. V. "Palladium(II) and Platinum(II) Thiophene-Based Thiosemicarbazones: Synthesis, Properties, and Anticancer Studies". *Journal of Molecular Structure*, 2025, v. 1322, p. 140306.
- (93) PARVEEN, S.; HANIF, M.; MOVASSAGHI, S.; SULLIVAN, M. P.; KUBANIK, M.; SHAHEEN, M. A.; SÖHNEL, T.; JAMIESON, S. M. F.; HARTINGER, C. G. "Cationic Ru (η^6 -p-cymene) Complexes of 3-Hydroxy-4-pyr(id)ones–Lipophilic Triphenylphosphine as Co-Ligand Is Key to Highly Stable and Cytotoxic Anticancer Agents". *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2017, v. 2017, n. 12, p. 1721–1727.

- (94) COLUMBUS, I.; GHINDES-AZARIA, L.; CHEN, R.; YEHEZKEL, L.; REDY-KEISAR, O.; FRIDKIN, G.; AMIR, D.; MARCIANO, D.; DRUG, E.; GERSHONOV, E.; KLAUSNER, Z.; SAPHIER, S.; ELIAS, S.; PEVZNER, A.; EICHEN, Y.; PARVARI, G.; SMOLKIN, B.; ZAFRANI, Y. "Studying Lipophilicity Trends of Phosphorus Compounds by ^{31}P -NMR Spectroscopy: A Powerful Tool for the Design of P-Containing Drugs". *Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, v. 65, n. 12, p. 8511–8524.
- (95) NICOLAOU, K. C. "Advancing the Drug Discovery and Development Process". *Angewandte Chemie*, 2014, v. 126, n. 35, p. 9280–9292.
- (96) SEYHAN, A. A. "Lost in Translation: The Valley of Death across Preclinical and Clinical Divide – Identification of Problems and Overcoming Obstacles". *Translational Medicine Communications*, 2019, v. 4, n. 1, p. 18.
- (97) MOHS, R. C.; GREIG, N. H. "Drug Discovery and Development: Role of Basic Biological Research". *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 2017, v. 3, n. 4, p. 651–657.
- (98) HUGHES, J. P.; REES, S.; KALINDJIAN, S. B.; PHILPOTT, K. L. "Principles of Early Drug Discovery". *British Journal of Pharmacology*, 2011, v. 162, n. 6, p. 1239–1249.
- (99) DUFFY, B. C.; ZHU, L.; DECORNEZ, H.; KITCHEN, D. B. "Early Phase Drug Discovery: Cheminformatics and Computational Techniques in Identifying Lead Series". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012, v. 20, n. 18, p. 5324–5342.
- (100) DEORE, A. B.; DHUMANE, J. R.; WAGH, R.; SONAWANE, R. "The Stages of Drug Discovery and Development Process". *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 2019, v. 7, n. 6, p. 62–67.
- (101) SINGH, S. S. "Preclinical Pharmacokinetics: An Approach towards Safer and Efficacious Drugs". *Current Drug Metabolism*, 2006, v. 7, n. 2, p. 165–182.
- (102) SINGH, N.; VAYER, P.; TANWAR, S.; POYET, J.-L.; TSAIOUN, K.; VILLOUTREIX, B. O. "Drug Discovery and Development: Introduction to the General Public and Patient Groups". *Frontiers in Drug Discovery*, 2023, v. 3, p.

1201419.

- (103) CHEN, J.; LUO, X.; QIU, H.; MACKEY, V.; SUN, L.; OUYANG, X. "Drug Discovery and Drug Marketing with the Critical Roles of Modern Administration". *American Journal of Translational Research*, 2018, v. 10, n. 12, p. 4302.
- (104) DE SOUSA BARBOSA, B.; DOS SANTOS, F. A.; PIMENTEL, M. M. L.; FERNANDES, D. P.; PREXEDES, E. A.; BEZERRA, M. B. "Histórico do Desenvolvimento do Cultivo de Células Animais: Uma Revisão". *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 2015, v. 9, n. 2, p. 334–347.
- (105) DO AMARAL, J. B.; MACHADO-SANTELLI, G. M. "A Cultura de Células em 3 Dimensões e a Sua Aplicação em Estudos Relacionados à Formação do Lúmen". *Naturalia*, 2011, v. 34.
- (106) MORO, L. G.; GUARNIER, L. P.; AZEVEDO, M. F.; FRACASSO, J. A. R.; LUCIO, M. A.; CASTRO, M. V. de; DIAS, M. L.; LÍVERO, F. A. dos R.; RIBEIRO-PAES, J. T. "A Brief History of Cell Culture: From Harrison to Organs-on-a-Chip". *Cells*, 2024, v. 13, n. 24, p. 2068.
- (107) ZHAO, C. "Cell Culture: In Vitro Model System and a Promising Path to in Vivo Applications". *Journal of Histotechnology*, 2023, v. 46, n. 1, p. 1–4.
- (108) JOSEPH, J. S.; MALINDISA, S. T.; NTWASA, M. "Two-Dimensional (2D) and Three-Dimensional (3D) Cell Culturing in Drug Discovery". *Cell Culture*, 2018, v. 2, p. 1–22.
- (109) KAPAŁCZYŃSKA, M.; KOLENDA, T.; PRZYBYŁA, W.; ZAJĄCZKOWSKA, M.; TERESIAK, A.; FILAS, V.; IBBS, M.; BLIŹNIAK, R.; ŁUCZEWSKI, Ł.; LAMPERSKA, K. "2D and 3D Cell Cultures – a Comparison of Different Types of Cancer Cell Cultures". *Archives of Medical Science*, 2018, v. 14, n. 4, p. 910–919.
- (110) BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. "Three-Dimensional Cell Culture: The Missing Link in Drug Discovery". *Drug Discovery Today*, 2013, v. 18, n. 5, p. 240–249.
- (111) ELLIOTT, N. T.; YUAN, F. "A Review of Three-Dimensional in Vitro Tissue Models for Drug Discovery and Transport Studies". *Journal of Pharmaceutical*

Sciences, 2011, v. 100, n. 1, p. 59–74.

- (112) RAVI, M.; PARAMESH, V.; KAVIYA, S. R.; ANURADHA, E.; SOLOMON, F. D. P. "3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications". *Journal of Cellular Physiology*, 2015, v. 230, n. 1, p. 16–26.
- (113) HABANJAR, O.; DIAB-ASSAF, M.; CALDEFIE-CHEZET, F.; DELORT, L. "3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages". *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, v. 22, n. 22, p. 12200.
- (114) CASTIAUX, A. D.; SPENCE, D. M.; MARTIN, R. S. "Review of 3D Cell Culture with Analysis in Microfluidic Systems". *Analytical Methods*, 2019, v. 11, n. 33, p. 4220–4232.
- (115) ABUWATFA, W. H.; PITT, W. G.; HUSSEINI, G. A. "Scaffold-Based 3D Cell Culture Models in Cancer Research". *Journal of Biomedical Science*, 2024, v. 31, n. 1, p. 7.
- (116) FONTOURA, J. C.; VIEZZER, C.; DOS SANTOS, F. G.; LIGABUE, R. A.; WEINLICH, R.; PUGA, R. D.; ANTONOW, D.; SEVERINO, P.; BONORINO, C. "Comparison of 2D and 3D Cell Culture Models for Cell Growth, Gene Expression and Drug Resistance". *Materials Science and Engineering C*, 2020, v. 107, p. 110264.
- (117) 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. "Chiral Platinum (II) Complexes Featuring Phosphine and Chloroquine Ligands as Cytotoxic and Monofunctional DNA-Binding Agents". *Inorganic Chemistry*, 2015, v. 54, n. 24, p. 11709–11720.
- (118) SHELDRICK, G. M. "SHELXT – Integrating Space Group Determination and Structure Solution". *Acta Crystallographica Section A*, 2015, v. 71, p. 1.
- (119) SHELDRICK, G. M. "Crystal Structure Refinement with SHELXL". *Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry*, 2015, v. 71, p. 3–8.
- (120) DOLOMANOV, O. V.; BOURHIS, L. J.; GILDEA, R. J.; HOWARD, J. A. K.;

- PUSCHMANN, H. "OLEX2: A Complete Structure Solution, Refinement and Analysis Program". *Journal of Applied Crystallography*, 2009, v. 42, n. 2, p. 339–341.
- (121) GEARY, W. J. "The Use of Conductivity Measurements in Organic Solvents for the Characterisation of Coordination Compounds". *Coordination Chemistry Reviews*, 1971, v. 7, n. 1, p. 81–122.
- (122) CHELLAN, P.; SHUNMOOGAM-GOUDEN, N.; HENDRICKS, D. T.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; LATEGAN, C.; SMITH, P. J.; CHIBALE, K.; SMITH, G. S. "Synthesis, Structure and in Vitro Biological Screening of Palladium(II) Complexes of Functionalized Salicylaldimine Thiosemicarbazones as Antimalarial and Anticancer Agents". *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2010, v. 2010, n. 22, p. 3520–3528.
- (123) LOBANA, T. S.; INDORIA, S.; SOOD, H.; ARORA, D. S.; HUNDAL, G.; JASINSKI, J. P. "Synthesis and Structures of 3-Nitro-Salicylaldehyde-N-Substituted Thiosemicarbazones of Copper (II): Novel Bio-Active Materials against *E. faecalis*, *E. coli*, and *K. pneumoniae*". *Inorganica Chimica Acta*, 2021, v. 521, p. 120334.
- (124) ELSAYED, S. A.; BADR, H. E.; DI BIASE, A.; EL-HENDAWY, A. M. "Synthesis, Characterization of Ruthenium (II), Nickel (II), Palladium (II), and Platinum (II) Triphenylphosphine-Based Complexes Bearing an ONS-Donor Chelating Agent: Interaction with Biomolecules, Antioxidant, in Vitro Cytotoxic and Apoptotic Activity". *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2021, v. 223, p. 111549.
- (125) HARIBABU, J.; SRIVIDYA, S.; MAHENDIRAN, D.; GAYATHRI, D.; VENKATRAMU, V.; BHUVANESH, N.; KARVEMBU, R. "Synthesis of Palladium (II) Complexes via Michael Addition: Antiproliferative Effects through ROS-Mediated Mitochondrial Apoptosis and Docking with SARS-CoV-2". *Inorganic Chemistry*, 2020, v. 59, n. 23, p. 17109–17122.
- (126) YILMAZ, I.; ÇUKUROVALI, A. "Salicylaldehyde Thiazolyl Hydrazones as Ligands". *Heteroatom Chemistry*, 2003, v. 14, n. 7, p. 617–621.
- (127) LOBANA, T. S.; INDORIA, S.; SOOD, H.; ARORA, D. S.; KAUR, M.; JASINSKI,

- J. P. "Synthesis of (3-Nitro-2-Oxo-Benzaldehyde Thiosemicarbazonato)–Zinc (II) Complexes: The Position of Nitro Group in Phenyl Ring Alters Antimicrobial Activity against *K. pneumoniae*, *S. Typhimurium*, MRSA and *C. albicans*". *Dalton Transactions*, 2021, v. 50, n. 20, p. 6823–6833.
- (128) ALTIPARMAK, E. A.; EROĞLU, G. Ö.; ÖZDEMİR, N.; KURUCA, S. E.; DEMIRCI, T. "Synthesis, Cytotoxicities, Structural Properties and Comparison of Dihalogeno-Substituted Thiosemicarbazone Ligands and Mixed-Ligand Ni (II) Complexes". *Dalton Transactions*, 2025, v. 54, n. 4, p. 1454–1467.
- (129) BUREŠ, F. "Fundamental Aspects of Property Tuning in Push–Pull Molecules". *RSC Advances*, 2014, v. 4, n. 102, p. 58826–58851.
- (130) JEZUITA, A.; EJSMONT, K.; SZATYLOWICZ, H. "Substituent Effects of Nitro Group in Cyclic Compounds". *Structural Chemistry*, 2021, v. 32, n. 1, p. 179–203.
- (131) PANJA, S. K.; DWIVEDI, N.; SAHA, S. "Tuning the Intramolecular Charge Transfer (ICT) Process in Push–Pull Systems: Effect of Nitro Groups". *RSC Advances*, 2016, v. 6, n. 107, p. 105786–105794.
- (132) LEE, S.; JEN, M.; JANG, T.; LEE, G.; PANG, Y. "Twisted Intramolecular Charge Transfer of Nitroaromatic Push–Pull Chromophores". *Scientific Reports*, 2022, v. 12, n. 1, p. 6557.
- (133) DHAS, D. A.; JOE, I. H.; ROY, S. D. D.; BALACHANDRAN, S. "Spectroscopic Analysis and Charge Transfer Interaction Studies of 4-Benzyloxy-2-Nitroaniline Insecticide: A Density Functional Theoretical Approach". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015, v. 135, p. 583–596.
- (134) TANG, J.; YIN, H.-Y.; ZHANG, J.-L. "Chapter One - Luminescent Zinc Complexes as Bioprobes for Imaging Molecular Events in Live Cells". In: LO, K. K.-W., Ed. *Topics in Molecular and Cell Biology*. Academic Press, 2017, p. 1–53.
- (135) VOGLER, A.; KUNKELY, H. "Excited State Properties of Transition Metal Phosphine Complexes". *Coord. Chem. Rev.*, 2002, v. 230, n. 1–2, p. 243–251.
- (136) ALBERT, J.; GRANELL, J.; SALES, J.; FONT-BARDIA, M.; SOLANS, X.

"Optically Active Exocyclic Cyclopalladated Derivatives of Benzylidene-(R)-(1-Phenylethyl)Amines: Syntheses and X-Ray Molecular Structures of [Pd(2-{(E)-(R)-CHMeN:CH-2',6'-Cl₂C₆H₃}C₆H₄)Cl(PPh₃)] and [Pd(2-{(Z)-(R)-CHMeN:CH-2',6'-F₂C₆H₃}C₆H₄)I(PPh₃)]". *Organometallics*, 1995, v. 14, n. 3, p. 1393–1404.

- (137) SUTTON, L. E. Tables of Interatomic Distances and Configuration in Molecules and Ions. *London: The Chemical Society*, 1958.
- (138) LIMA, M. A.; TEIXEIRA, T.; FORTALEZA, D. B.; PEREIRA, G. B. S.; AKINYEMI, A. O.; MORAES, C. A. F.; FORIM, M. R.; BATISTA, A. A.; DUTRA, J. L.; ARAUJO-NETO, J. H.; ELLENA, J. A.; ROCHA, F. V. "Enhanced Anticancer Potential of Pd(II)-Thiosemicarbazone Complexes: Selectivity, Mechanisms, and 3D Models". *Pharmaceutics*, 2025, v. 17, n. 7, p. 829.
- (139) FORTALEZA, D. B.; ROCHA, J. S.; PEREIRA, G. B. S.; TEIXEIRA, T.; DUTRA, J. L.; MORAES, C. A. F.; SANTIAGO, P. H. O.; BATISTA, A. A.; FORIM, M. R.; ELLENA, J. A.; ROCHA, F. V. "Synthesis, Structural Characterization, and Antitumor Evaluation of Pd(II) Thiosemicarbazide–Diphosphine Complexes in 2D and 3D Cancer Models". *J. Inorg. Biochem.*, 2026, v. 278, p.113234.
- (140) MUNIKUMARI, G.; KONAKANCHI, R.; NISHTALA, V. B.; RAMESH, G.; KOTHA, L. R.; CHANDRASEKHAR, K. B.; RAMACHANDRAIAH, C. "Palladium(II) Complexes of 5-Substituted Isatin Thiosemicarbazones: Synthesis, Spectroscopic Characterization, Biological Evaluation and in Silico Docking Studies". *Synth. Commun.*, 2019, v. 49, n. 1, p. 146–158.
- (141) NIU, J.; MA, Y.; YANG, Y.; LV, H.; WANG, J.; WANG, T.; LIU, F.; XU, S.; JIANG, Z.; LIN, W. "Lighting up the Changes of Plasma Membranes during Apoptosis with Fluorescent Probes". *Coord. Chem. Rev.*, 2023, v. 476, p. 214926.
- (142) ESTANDARTE, A. K.; BOTCHWAY, S.; LYNCH, C.; YUSUF, M.; ROBINSON, I. "The Use of DAPI Fluorescence Lifetime Imaging for Investigating Chromatin Condensation in Human Chromosomes". *Sci. Rep.*, 2016, v. 6, n. 1, p. 31417.
- (143) FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. "Clonogenic Assay of Cells in Vitro". *Nat. Protoc.*, 2006, v. 1, n. 5, p. 2315–2319.

- (144) RAFEHI, H.; ORLOWSKI, C.; GEORGIADIS, G. T.; VERVERIS, K.; EL-OSTA, A.; KARAGIANNIS, T. C. "Clonogenic Assay: Adherent Cells". *J. Vis. Exp. JoVE*, 2011, v. 49, p. 2573.
- (145) SCHAFER, K. A. "The Cell Cycle: A Review". *Vet. Pathol.*, 1998, v. 35, n. 6, p. 461–478.
- (146) COLLINS, K.; JACKS, T.; PAVLETICH, N. P. "The Cell Cycle and Cancer". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, v. 94, n. 7, p. 2776–2778.
- (147) CECCHINI, M. J.; AMIRI, M.; DICK, F. A. "Analysis of Cell Cycle Position in Mammalian Cells". *J. Vis. Exp. JoVE*, 2012, n. 59, p. 3491.
- (148) WLODKOWIC, D.; SKOMMER, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. "Flow Cytometry-Based Apoptosis Detection". In: ERHARDT, P.; TOTH, A., eds. *Apoptosis: Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 2009, v. 559, p. 19–32.
- (149) COSTIGAN, A.; HOLLVILLE, E.; MARTIN, S. J. "Discriminating Between Apoptosis, Necrosis, Necroptosis, and Ferroptosis by Microscopy and Flow Cytometry". *Curr. Protoc.*, 2023, v. 3, n. 12, p. e951.
- (150) NIKOLETOPOULOU, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. "Crosstalk between Apoptosis, Necrosis and Autophagy". *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 2013, v. 1833, n. 12, p. 3448–3459.
- (151) VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W. "Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis". *Anat. Histol. Embryol.*, 2002, v. 31, n. 4, p. 214–223.
- (152) JIANG, L.; TEIXEIRA, R.; CARUSO, S.; ATKIN-SMITH, G. K.; BAXTER, A. A.; PAONE, S.; HULETT, M. D.; POON, I. K. H. "Monitoring the Progression of Cell Death and the Disassembly of Dying Cells by Flow Cytometry". *Nat. Protoc.*, 2016, v. 11, n. 4, p. 655–663.
- (153) ZEMBRUSKI, N. C. L.; STACHE, V.; HAEFELI, W. E.; WEISS, J. "7-Aminoactinomycin D for Apoptosis Staining in Flow Cytometry". *Anal. Biochem.*, 2012, v. 429, n. 1, p. 79–81.

- (154) WONG, R. S. Y. "Apoptosis in Cancer: From Pathogenesis to Treatment". *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2011, v. 30, n. 1, p. 1–14.
- (155) WEN, X.; LIN, Z.; LIU, B.; WEI, Y. "Caspase-mediated Programmed Cell Death Pathways as Potential Therapeutic Targets in Cancer". *Cell Prolif.*, 2012, v. 45, n. 3, p. 217–224.
- (156) BANFALVI, G. "Methods to Detect Apoptotic Cell Death". *Apoptosis*, 2017, v. 22, n. 2, p. 306–323.
- (157) SIVANDZADE, F.; BHALERAO, A.; CUCULLO, L. "Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe". *Bio-protocol*, 2019, v. 9, n. 1, p. 3128.
- (158) VIEIRA, J. M. "Fatores Determinantes da Internacionalização no Setor Farmacêutico Português, Produtor e Exportador de Produtos Farmacêuticos". Dissertação (Mestrado em Gestão de Empresas) — ISLA - Instituto Superior de Gestão e Administração de Santarém, Santarém, 2020.
- (159) SALINAS VERA, Y.; VALDES, J.; PÉREZ-NAVARRO, Y.; MANDUJANO-LÁZARO, G.; MARCHAT, L.; RAMOS PAYAN, R.; NUÑEZ-OLVERA, S.; PEREZ-PLASENCIA, C.; LOPEZ-CAMARILLO, C. "Three-Dimensional 3D Culture Models in Gynecological and Breast Cancer Research". *Frontiers in Oncology*, 2022, v. 12, p. 826113.

7. Apêndice

[Pd(M1-TSC)PPh₃] (**PdM1**): rendimento 82%. Condutividade molar ($\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$, DMSO): 0.68. UV-Vis (DMSO, 1.0×10^{-5} M) λ/nm ($\epsilon/\text{M1 cm}^{-1}$) = 308 (20837); 343 (12615); 412 (11684). Infravermelho (cm^{-1}): 3416 (νNH), 1537 e 1597 ($\nu\text{C}=\text{N}$), 1091 ($\nu\text{P}-\text{C}$), 691 ($\nu\text{C}-\text{S}$). m/z $[\text{M}]^+$ experimental (teórica): 610.0096 (610.0097). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, DMSO, 298 K): $\delta(\text{ppm})$ 25.14 (s). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): $\delta(\text{ppm})$ 8.49 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H, HC=N), 7.66 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, ArH), 7.65 – 7.52 (m, 15H, PPh₃), 7.17 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, NH) 7.15 (dd, $J = 9.1, 2.8$ Hz, 1H, ArH), 6.51 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, ArH), 2.77 (d, $J = 4.6$ Hz, 3H, CH₃). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): $\delta(\text{ppm})$ 170.92 (S-C=N), 160.55 (C-OH), 148.18 (HC=N), 134 – 117 (C aromático TSC e PPh₃) e 32.91 (CH₃).

[Pd(M2-TSC)PPh₃] (**PdM2**): rendimento 69%. Condutividade molar ($\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$, DMSO): 0.68. UV-Vis (DMSO, 1.0×10^{-5} M) λ/nm ($\epsilon/\text{M1 cm}^{-1}$) = 306 (25900); 339 (25210); 396 (28341). Infravermelho (cm^{-1}): 3417 (νNH), 1528 e 1595 ($\nu\text{C}=\text{N}$), 1099 ($\nu\text{P}-\text{C}$), 698 ($\nu\text{C}-\text{S}$). m/z $[\text{M}]^+$ experimental (teórica): 621.0335 (621.0336). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, DMSO, 298 K): $\delta(\text{ppm})$ 25.66 (s). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): $\delta(\text{ppm})$ 8.64 (s, 1H, HC=N), 8.61 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, ArH), 7.99 (dd, $J = 9.3, 2.9$ Hz, 1H, ArH), 7.66 – 7.55 (m, 15H, PPh₃), 7.35 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, NH), 6.52 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, ArH), 2.78 (d, $J = 4.5$ Hz, 3H, CH₃). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): $\delta(\text{ppm})$ 171.45 (S-C=N), 166.84 (C-OH), 148.26 (HC=N), 136 – 118 (C aromático TSC e PPh₃) e 32.95 (CH₃).

[Pd(M3-TSC)PPh₃] (**PdM3**): rendimento 71%. Condutividade molar ($\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$, DMSO): 0.60. UV-Vis (DMSO, 1.0×10^{-5} M) λ/nm ($\epsilon/\text{M1 cm}^{-1}$) = 306 (18083); 341 (11432); 413 (10093). Infravermelho (cm^{-1}): 3418 (νNH), 1532 e 1596 ($\nu\text{C}=\text{N}$), 1106 ($\nu\text{P}-\text{C}$), 690 ($\nu\text{C}-\text{S}$). m/z $[\text{M}]^+$ experimental (teórica): 594.0399 (594.0391). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, DMSO, 298 K): $\delta(\text{ppm})$ 25.13 (s). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): $\delta(\text{ppm})$ 8.42 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H, HC=N), 7.66 – 7.54 (m, 15H, PPh₃), 7.34 (dd, $J = 10.0, 3.2$ Hz, 1H, ArH), 7.15 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, NH), 7.05 (td, $J = 8.9, 3.2$ Hz, 1H, ArH), 6.49 (dd, $J = 9.2, 4.9$ Hz, 1H, ArH), 2.76 (d, $J = 4.5$ Hz, 3H, CH₃). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): $\delta(\text{ppm})$ 170.74 (S-C=N), 158.44 (C-OH), 148.26 (HC=N), 134 – 117 (C aromático TSC e PPh₃) e 33.04 (CH₃).

[Pd(D1-TSC)PPh₃] (**PdD1**): rendimento 83%. Condutividade molar ($\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$, DMSO): 1.08. UV-Vis (DMSO, 1.0×10^{-5} M) λ/nm ($\epsilon/\text{M1 cm}^{-1}$) = 344 (17247); 399 (13423). Infravermelho (cm^{-1}): 3428 (νNH), 1532 e 1597 ($\nu\text{C}=\text{N}$), 1097 ($\nu\text{P-C}$), 694 ($\nu\text{C-S}$). m/z $[\text{M}]^+$ experimental (teórica): 643.9705 (643.9706). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, DMSO, 298 K): $\delta(\text{ppm})$ 22.84 (s). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): $\delta(\text{ppm})$ 8.49 (d, $J = 13.7$ Hz, 1H, HC=N), 7.68 – 7.52 (m, 15H, PPh₃), 7.60 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, ArH), 7.43 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, ArH), 7.29 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, NH), 2.75 (d, $J = 4.6$ Hz, 3H, CH₃). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): $\delta(\text{ppm})$ 171.20 (S-C=N), 155.43 (C-OH), 148.21 (HC=N), 134 – 117 (C aromático TSC e PPh₃) e 32.91 (CH₃).

[Pd(D2-TSC)PPh₃] (**PdD2**): rendimento 65%. Condutividade molar ($\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$, DMSO): 1.07. UV-Vis (DMSO, 1.0×10^{-5} M) λ/nm ($\epsilon/\text{M1 cm}^{-1}$) = 316 (18219); 350 (12656); 403 (11389). Infravermelho (cm^{-1}): 3372 (νNH), 1530 e 1602 ($\nu\text{C}=\text{N}$), 1100 ($\nu\text{P-C}$), 691 ($\nu\text{C-S}$). m/z $[\text{M}]^+$ experimental (teórica): 666.0188 (666.0187). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, DMSO, 298 K): $\delta(\text{ppm})$ 23.79 (s). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): $\delta(\text{ppm})$ 8.84 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, ArH), 8.75 (d, $J = 13.7$ Hz, 1H, HC=N), 8.54 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, ArH), 7.62 – 7.52 (m, 16H, PPh₃ + NH), 2.78 (d, $J = 4.6$ Hz, 3H, CH₃). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): $\delta(\text{ppm})$ 172.22 (S-C=N), 157.88 (C-OH), 147.46 (HC=N), 134 – 122 (C aromático TSC e PPh₃) e 32.97 (CH₃).

[Pd(D3-TSC)PPh₃] (**PdD3**): rendimento 75%. Condutividade molar ($\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$, DMSO): 0.58. UV-Vis (DMSO, 1.0×10^{-5} M) λ/nm ($\epsilon/\text{M1 cm}^{-1}$) = 313 (21359); 348 (14344); 403 (11425). Infravermelho (cm^{-1}): 3372 (νNH), 1530 e 1602 ($\nu\text{C}=\text{N}$), 1100 ($\nu\text{P-C}$), 691 ($\nu\text{C-S}$). m/z $[\text{M}]^+$ experimental (teórica): 612.0297 (612.0297). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, DMSO, 298 K): $\delta(\text{ppm})$ 21.90 (s). ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K): $\delta(\text{ppm})$ 8.22 (d, $J = 13.7$ Hz, 1H, HC=N), 7.62 – 7.52 (m, 15H, PPh₃), 6.90 – 6.82 (m, 1H, ArH), 7.62 – 7.52 (m, 16H, PPh₃ + NH), 6.77 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, ArH), 4.65 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, NH), 2.96 (d, $J = 5.0$ Hz, 3H, CH₃). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CDCl₃, 298 K): $\delta(\text{ppm})$ 171.49 (S-C=N), 148.58 (HC=N), 134 – 106 (C aromático TSC e PPh₃) e 33.01 (CH₃).

[Ni(D2-TSC)PPh₃] (**NiD2**): rendimento 73%. Condutividade molar ($\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$, DMSO): 0.26. Infravermelho (cm^{-1}): 3413 (νNH), 1521 e 1606 ($\nu\text{C}=\text{N}$), 1097 ($\nu\text{P-C}$), 692 ($\nu\text{C-S}$). m/z $[\text{M}]^+$ experimental (teórica): 618.0517 (618.0505). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz,

CH₂Cl₂, 298 K): δ (ppm) 19.36 (s). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm) 8.35 (d, J = 2.8 Hz, 1H, ArH), 8.26 (d, J = 2.8 Hz, 1H, ArH), 8.24 (s, 1H, HC=N), 7.66 (dd, J = 11.3, 7.5 Hz, 6H, PPh₃), 7.44 (dd, J = 7.9, 6.2 Hz, 3H, PPh₃), 7.36 (dd, J = 10.5, 4.5 Hz, 6H, PPh₃), 4.71 (d, J = 4.7 Hz, 1H, NH), 2.84 (d, J = 5.0 Hz, 3H, CH₃). ¹³C{¹H} NMR (100 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm) 173.54 (S-C=N), 157.44 (C-OH), 148.31 (HC=N), 134 – 122 (C aromático TSC e PPh₃) e 32.40 (CH₃).

[Pt(D2-TSC)PPh₃] (**PtD2**): rendimento 64%. Condutividade molar ($\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$, DMSO): 0.94. Infravermelho (cm⁻¹): 3382 (ν NH), 1528 e 1603 (ν C=N), 1101 (ν P-C), 693 (ν C-S). m/z [M]⁺ experimental (teórica): 755.0796 (755.0800). ³¹P{¹H} NMR (162 MHz, DMSO, 298 K): δ (ppm) 6.55 (s). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 298 K): δ (ppm) 9.04 (d, J = 11.5 Hz, 1H, HC=N) 8.95 (d, J = 2.9 Hz, 1H, ArH), 8.63 (d, J = 2.9 Hz, 1H, ArH), 7.66 (d, J = 4.4 Hz, 1H, NH), 7.59 – 7.52 (m, 15H, PPh₃), 2.84 (d, J = 4.5 Hz, 3H, CH₃).

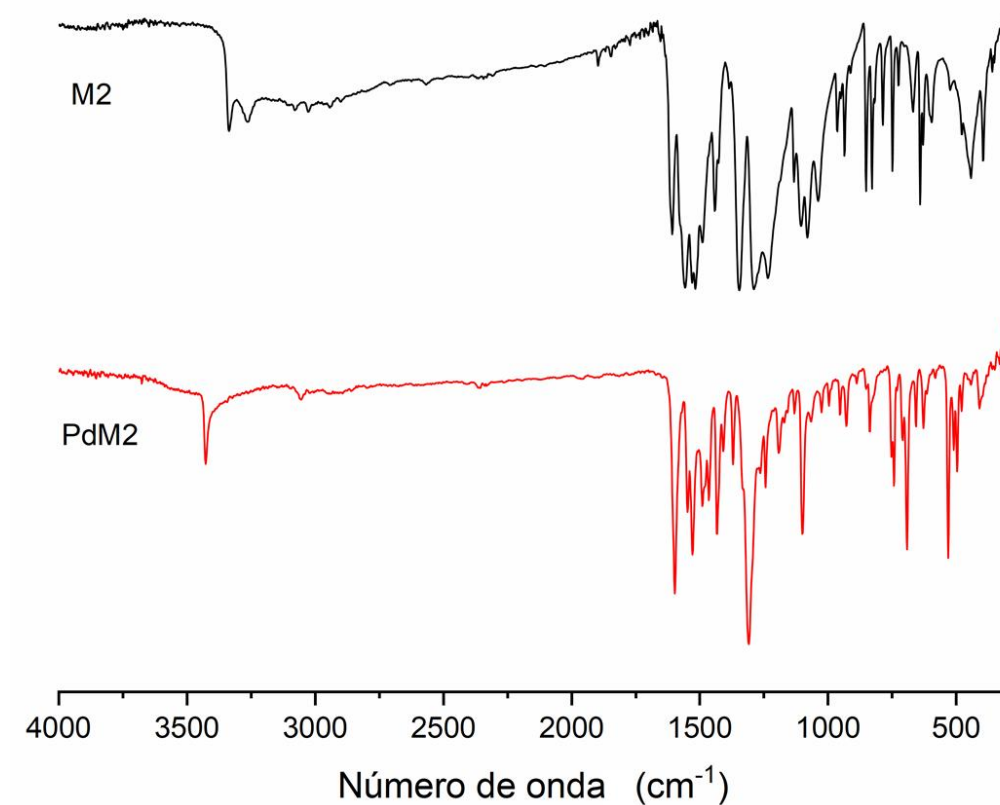


FIGURA A1 – Espectros de absorção na região do infravermelho do ligante M2 e do complexo PdM2.

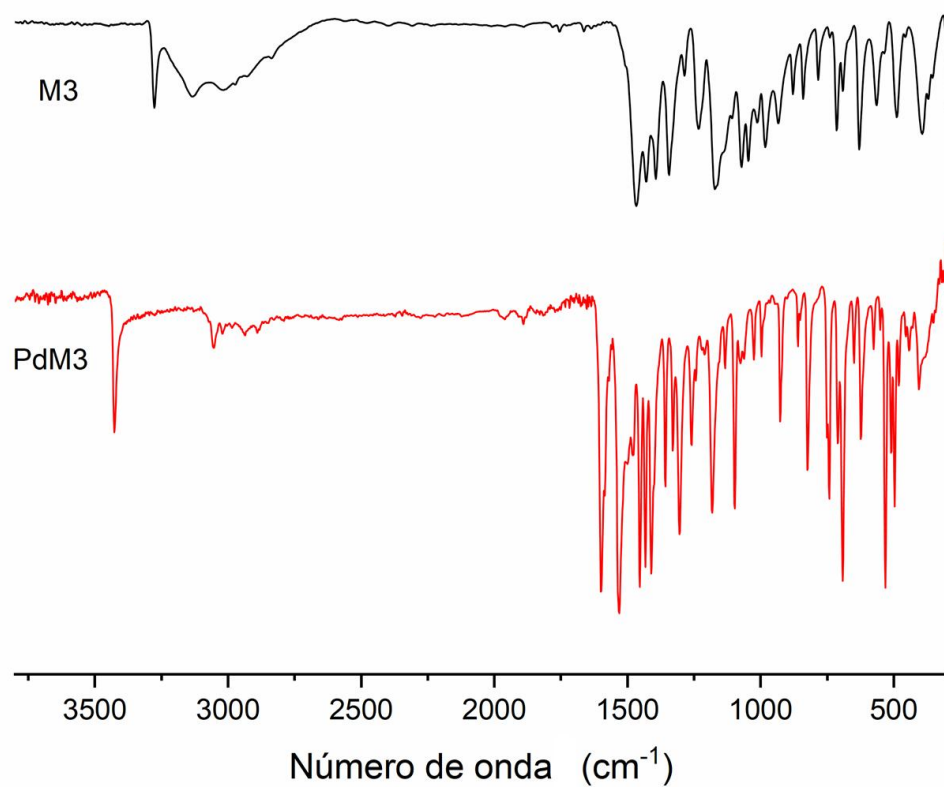


FIGURA A2 – Espectros de absorção na região do infravermelho do ligante M3 e do complexo PdM3.

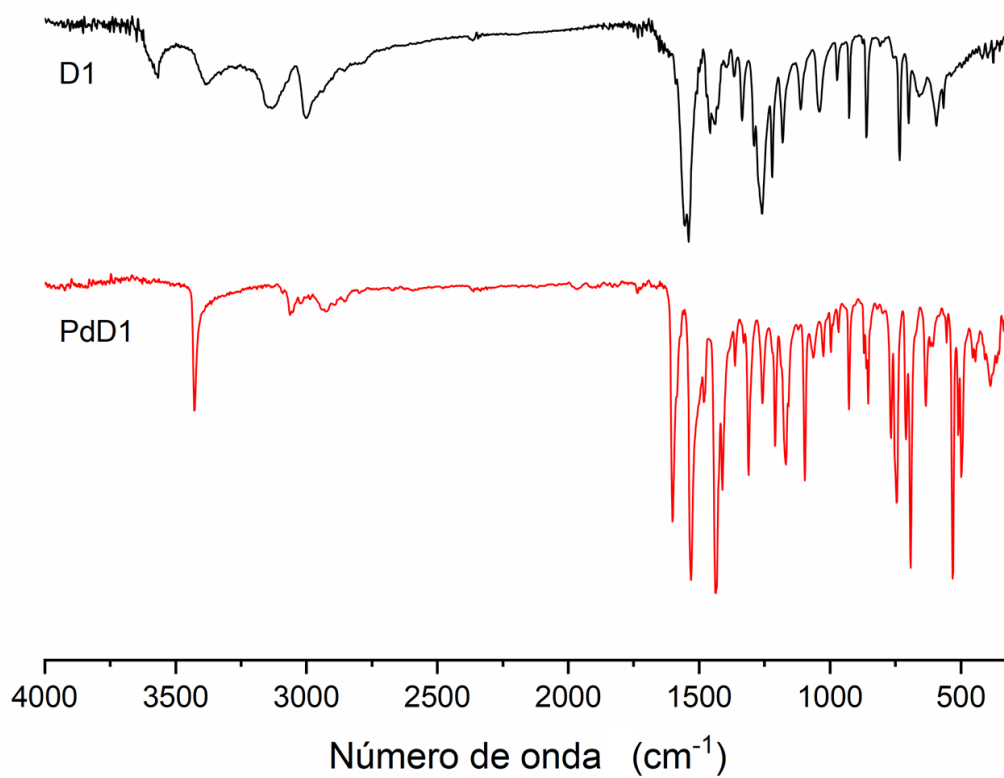


FIGURA A3 – Espectros de absorção na região do infravermelho do ligante D1 e do complexo PdD1.

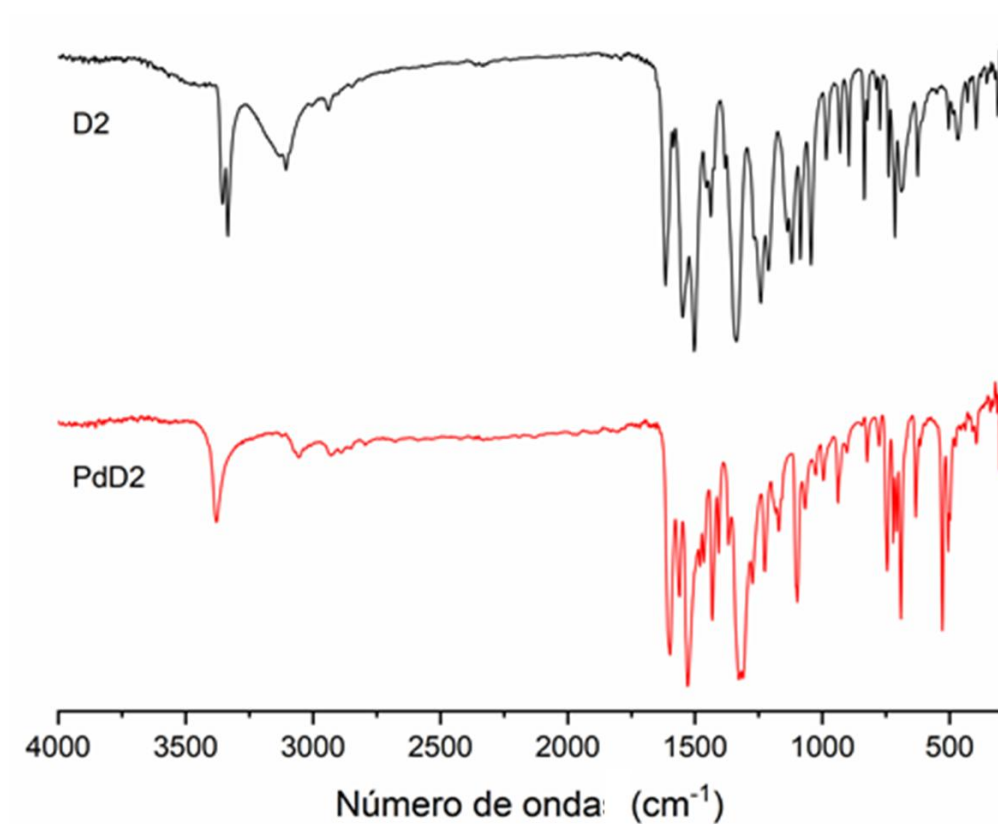


FIGURA A4 – Espectros de absorção na região do infravermelho do ligante D2 e do complexo PdD2.

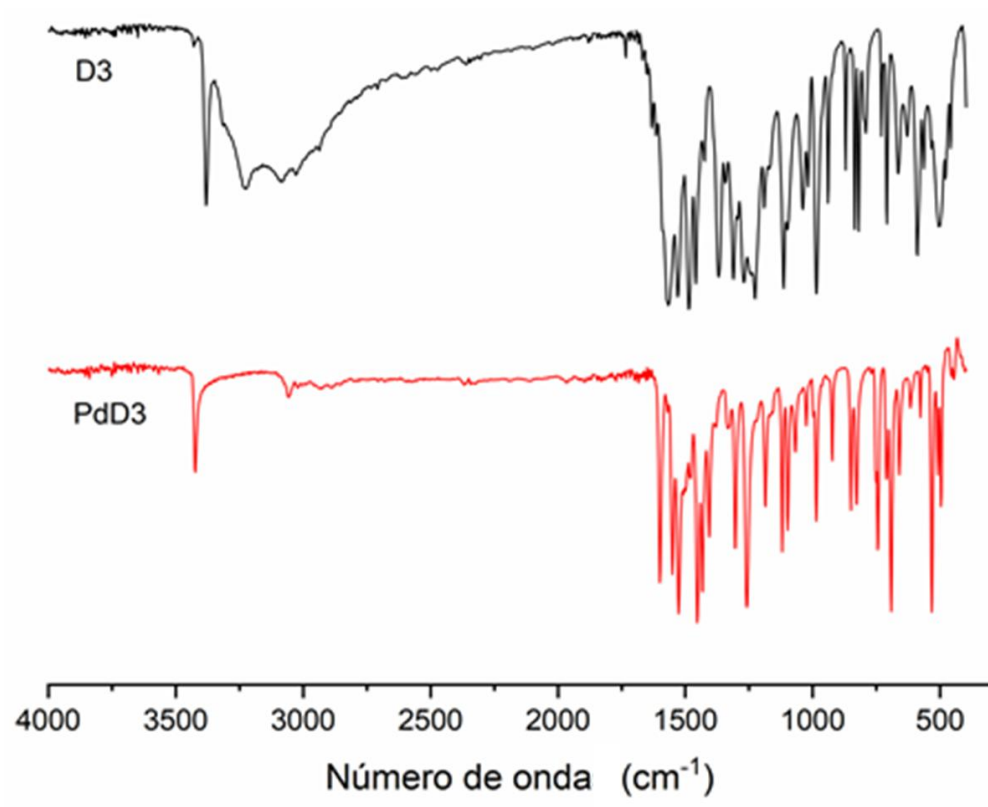


FIGURA A5 – Espectros de absorção na região do infravermelho do ligante D3 e do complexo PdD3.

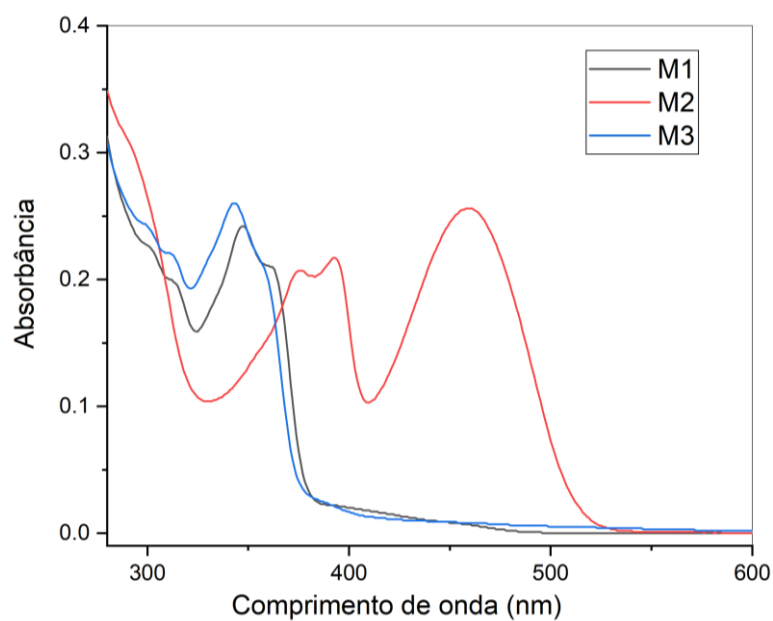


FIGURA A6 – Espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis para os ligantes M1, M2 e M3, em DMSO.

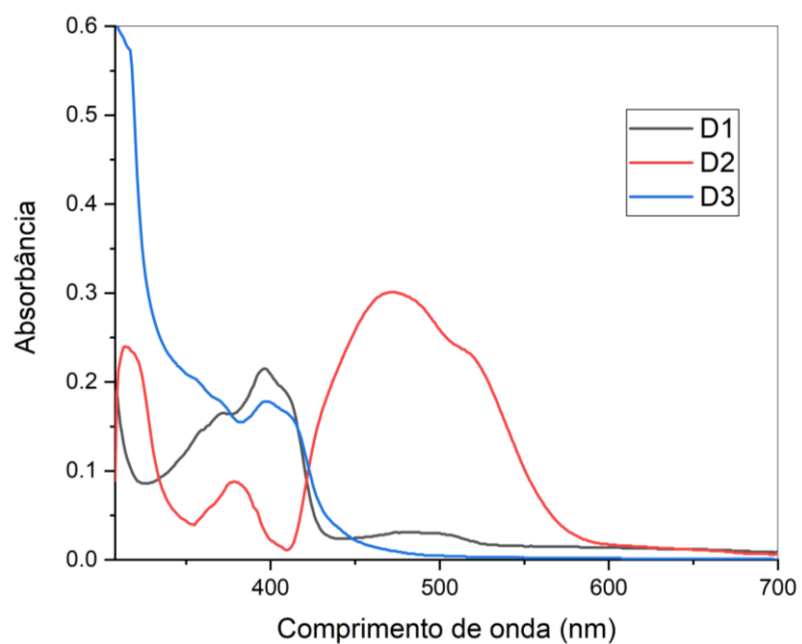


FIGURA A7 – Espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis para os ligantes D1, D2 e D3, em DMSO.

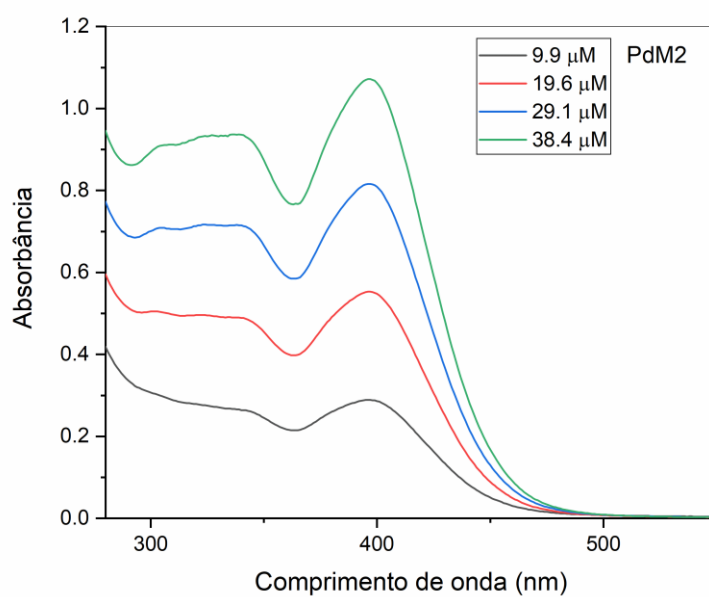


FIGURA A8 – Espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis para o complexo PdM2 em DMSO.

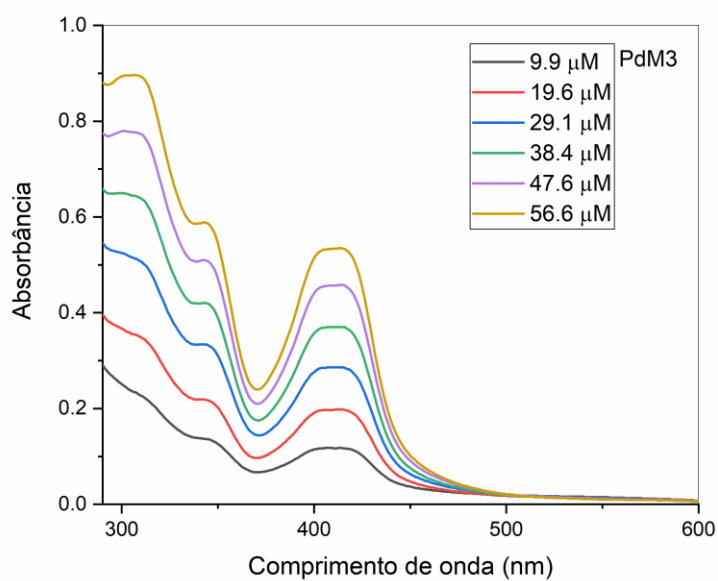


FIGURA A9 – Espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis para o complexo PdM3 em DMSO.

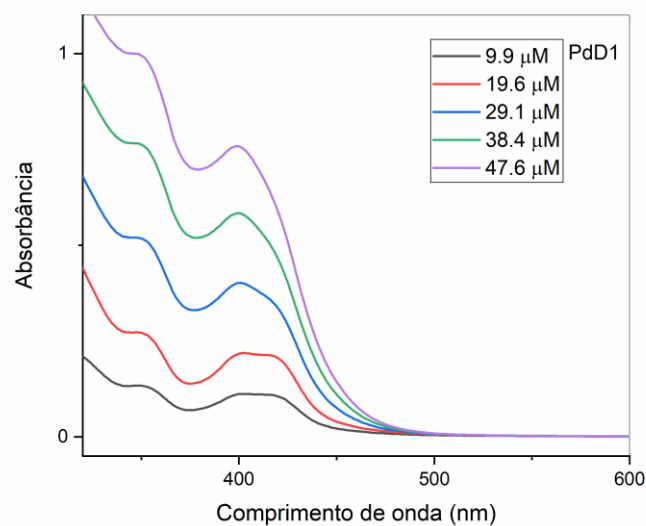


FIGURA A10 – Espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis para o complexo PdD1 em DMSO.

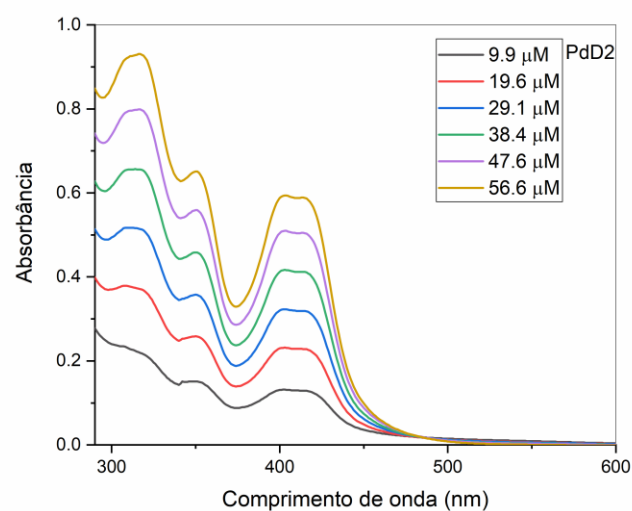


FIGURA A11 – Espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis para o complexo PdD2 em DMSO.

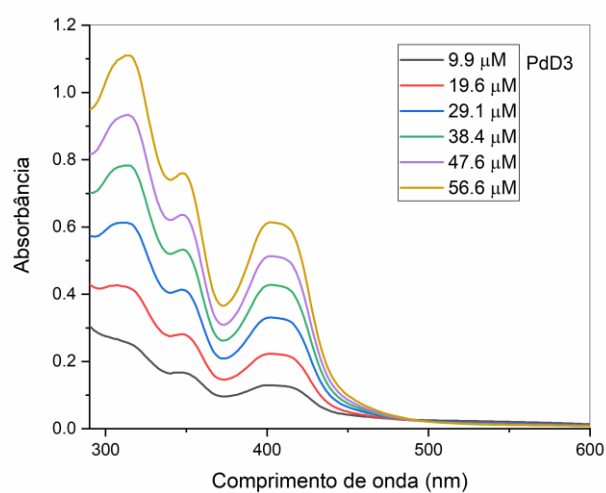


FIGURA A12 – Espectros de absorção eletrônica na região do UV-vis para o complexo PdD3 em DMSO.

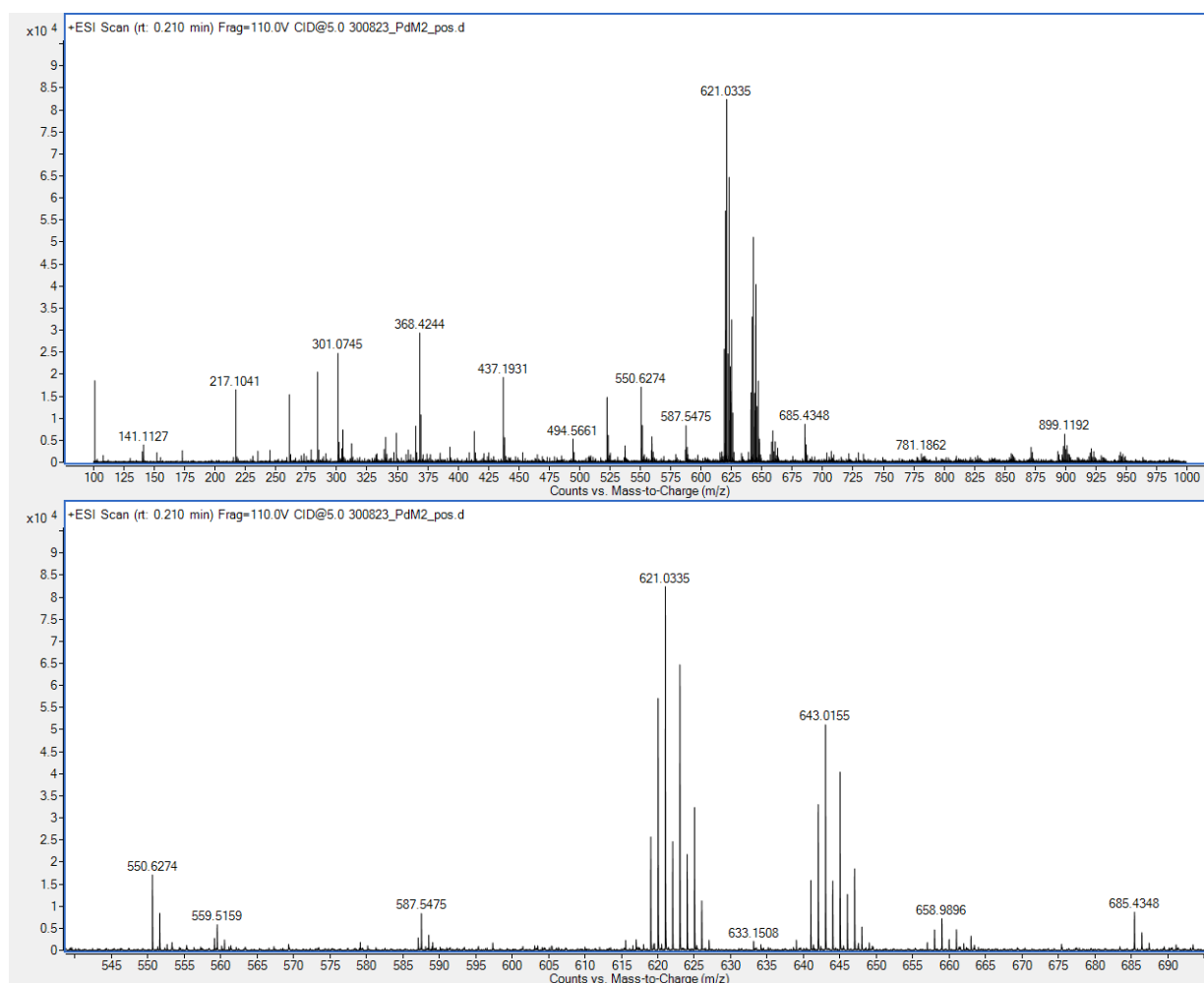


FIGURA A13 – Espectro de massas para o composto PdM2 em m/z.

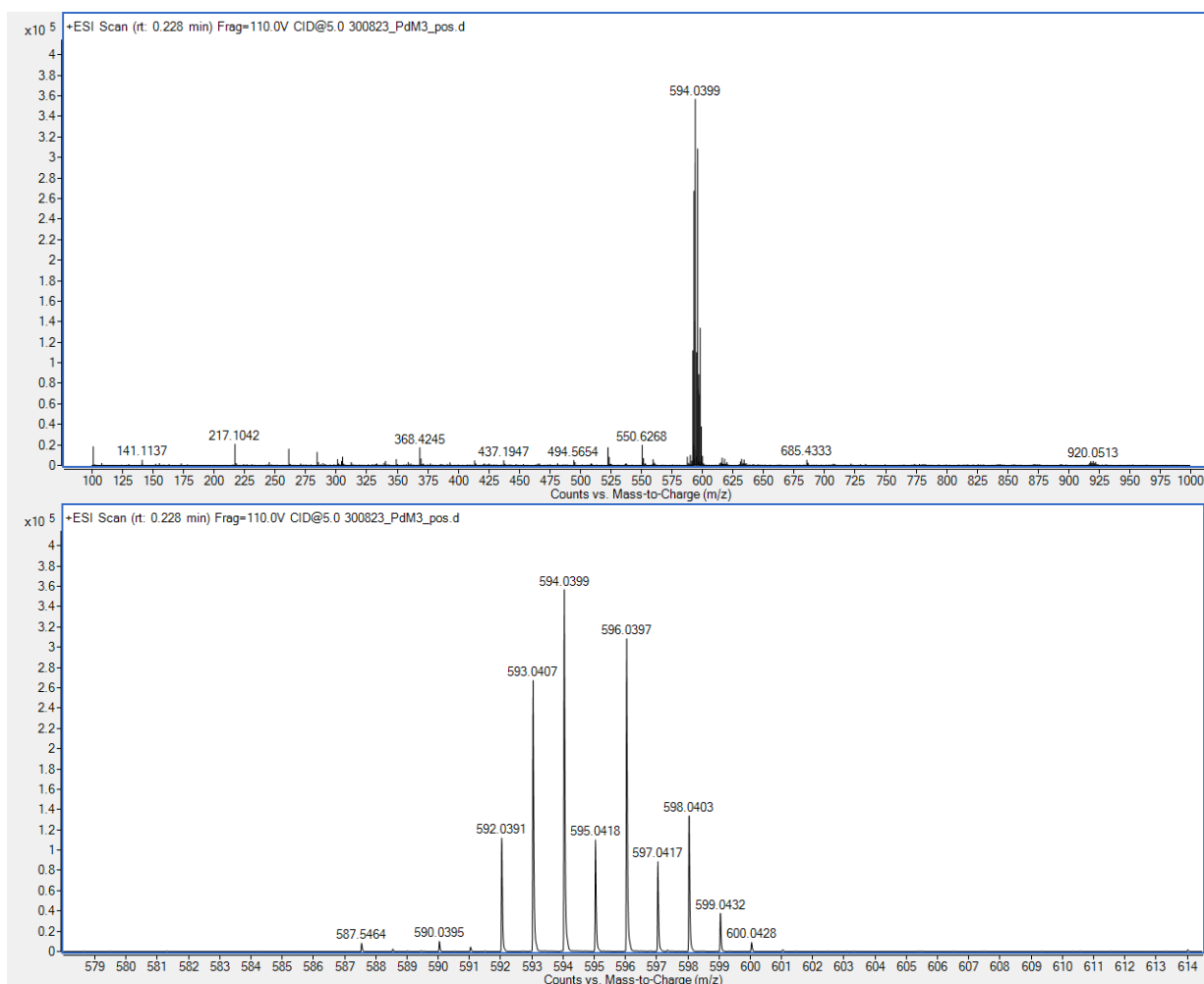


FIGURA A14 – Espectro de massas para o composto PdM3 em m/z.

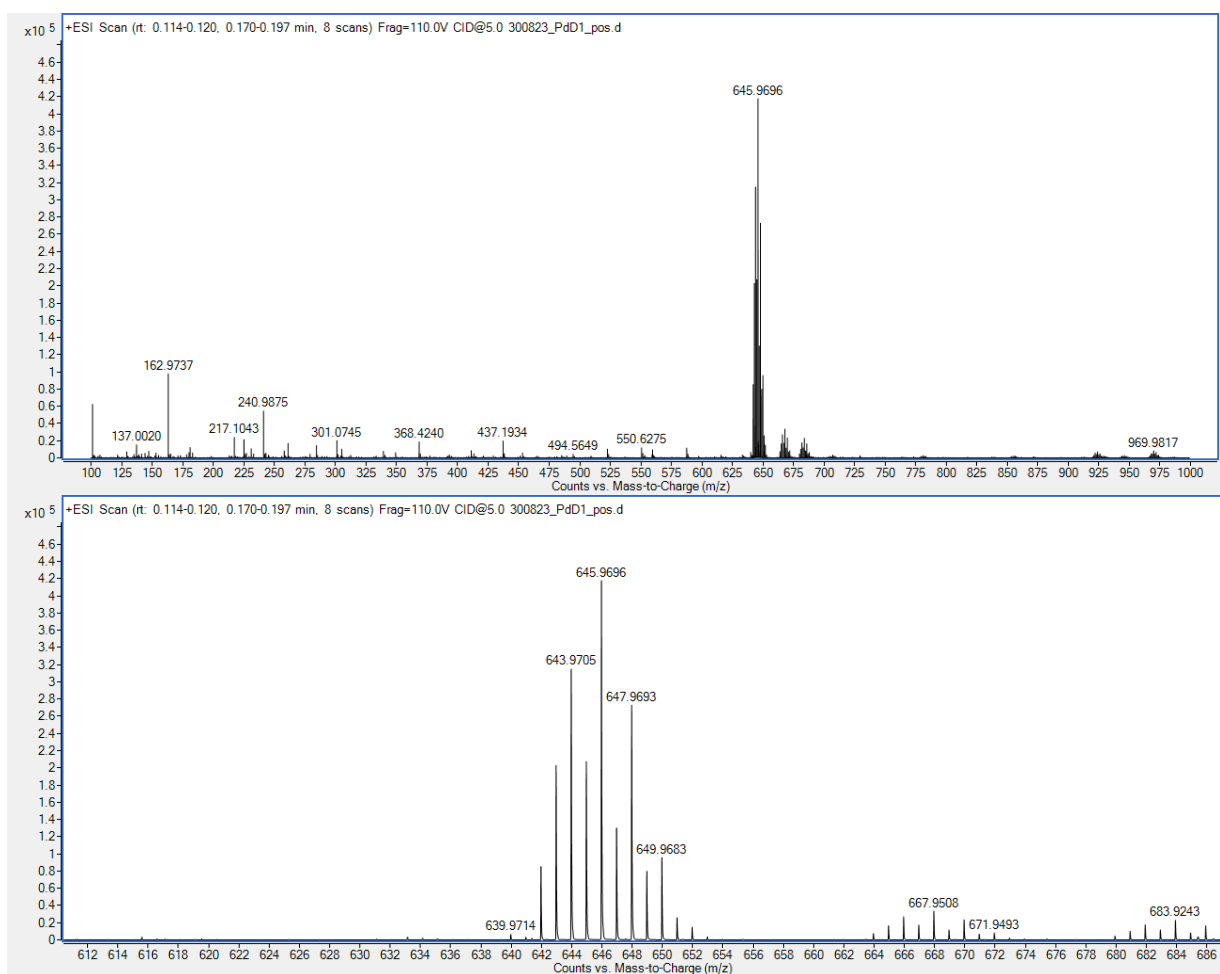


FIGURA A15 – Espectro de massas para o composto PdD1 em m/z.

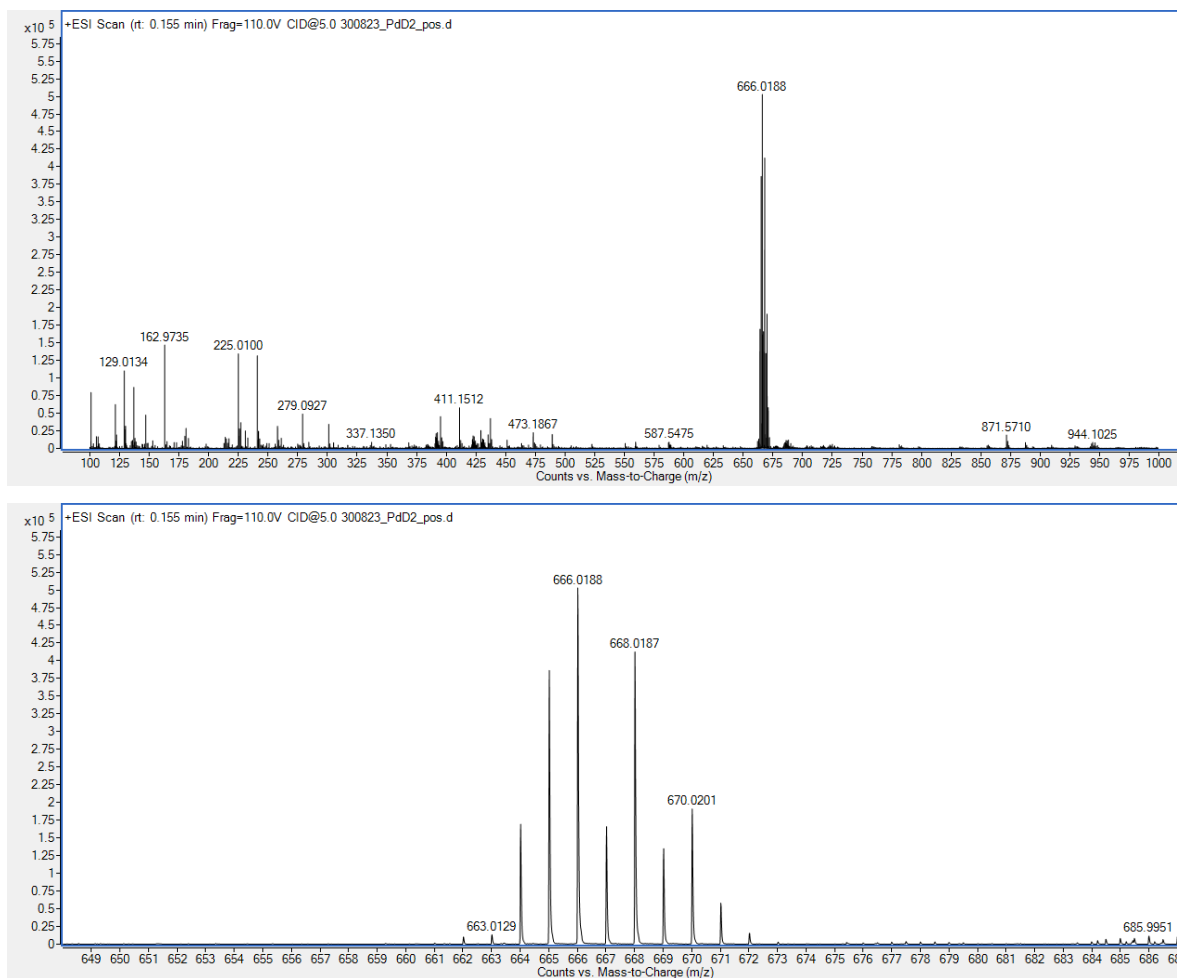


FIGURA A16 – Espectro de massas para o composto PdD2 em m/z.

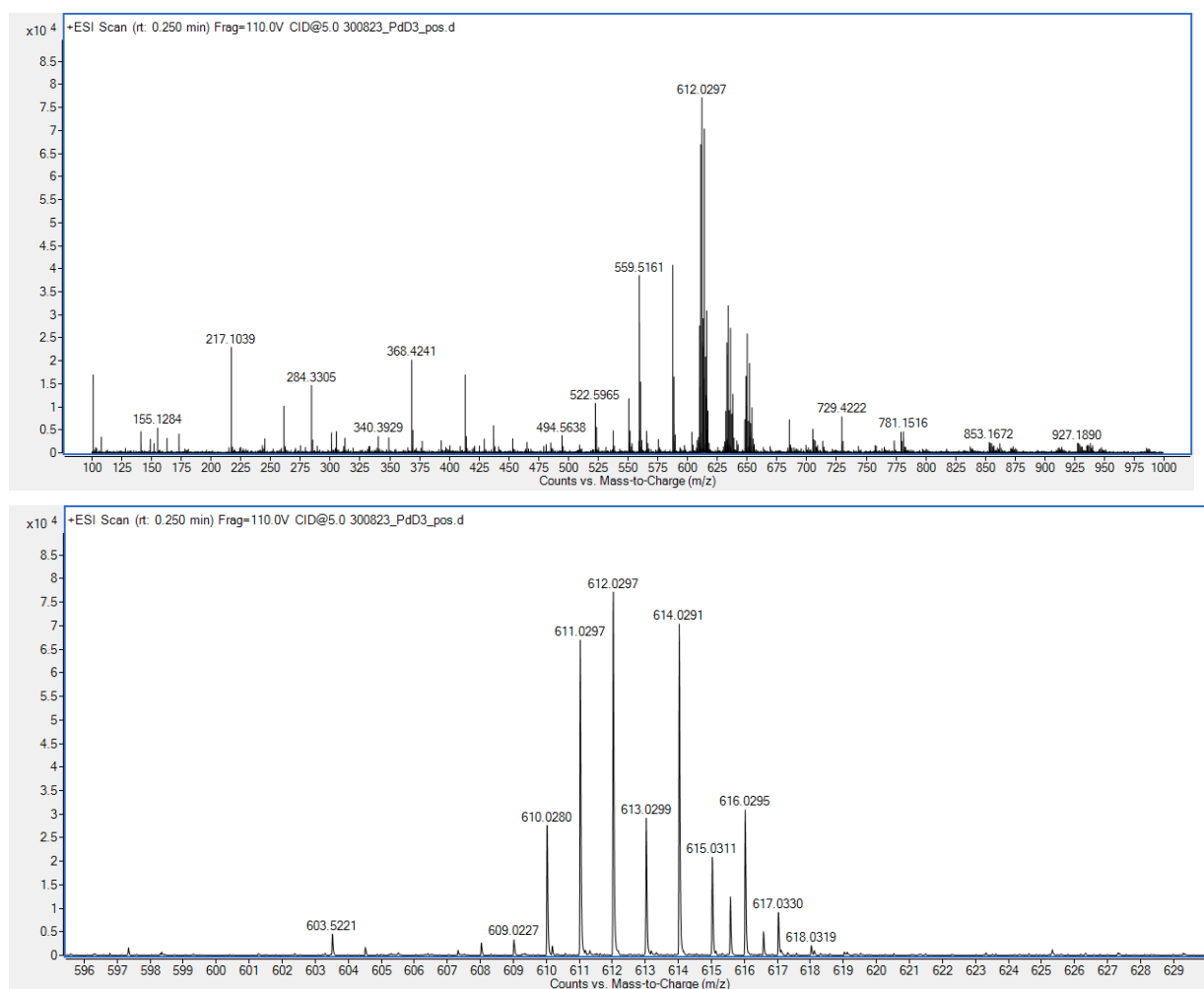


FIGURA A17 – Espectro de massas para o composto PdD3 em m/z.

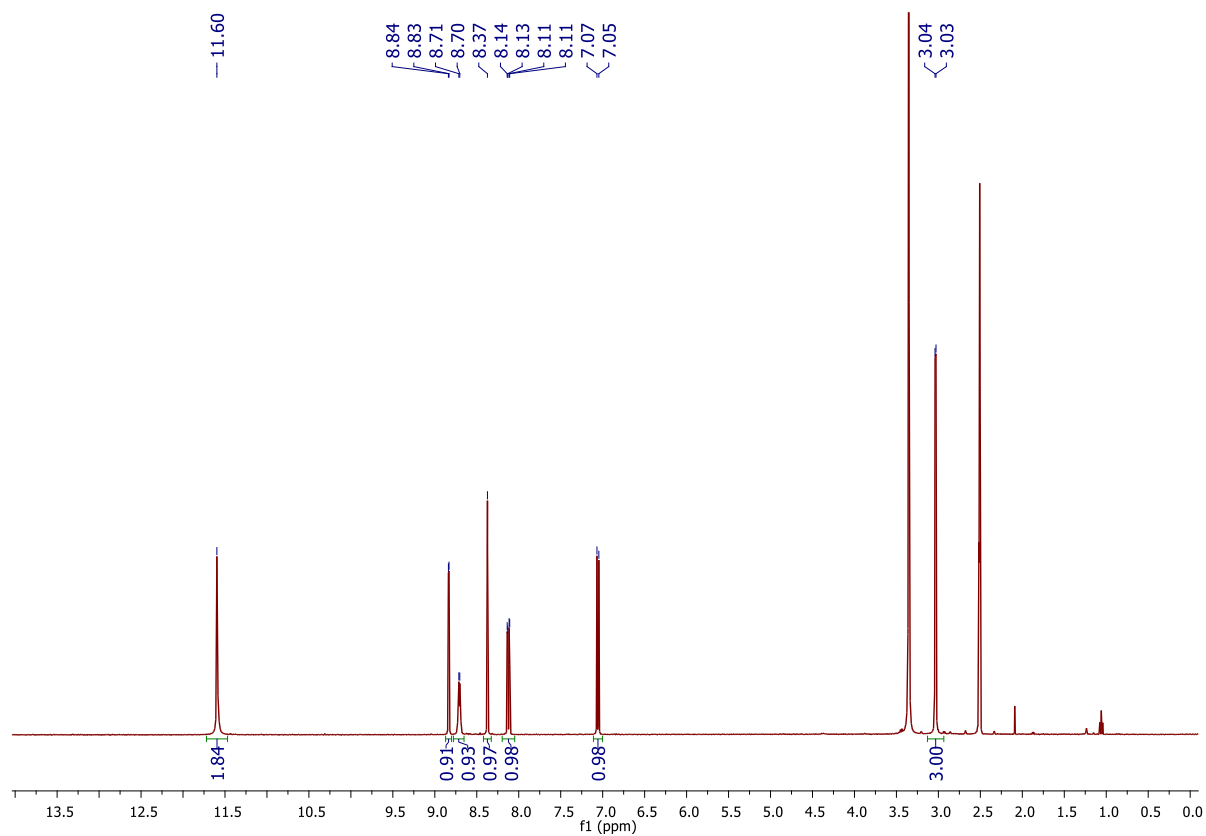


FIGURA A18 – Espectro de RMN de ¹H para o ligante M2, em DMSO-*d*₆.

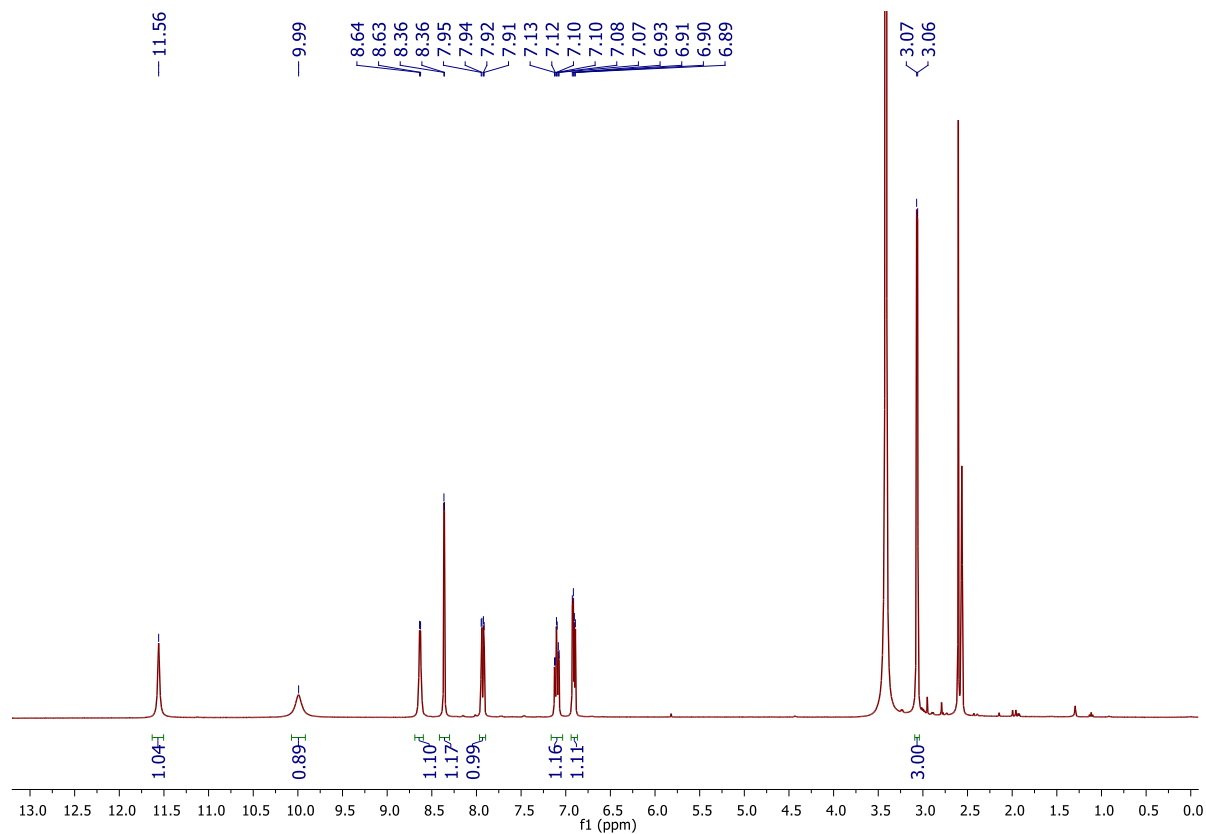


FIGURA A19 – Espectro de RMN de ¹H para o ligante M3, em DMSO-*d*₆.

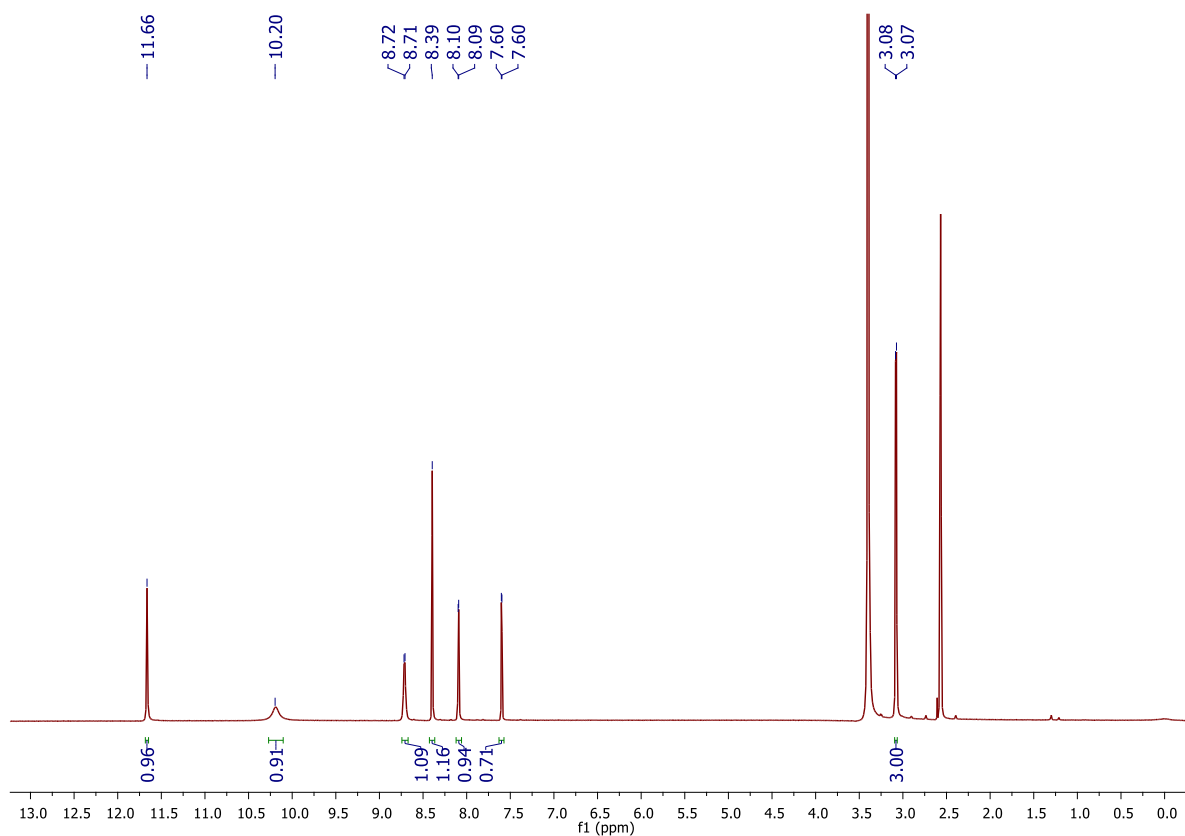


FIGURA A20 – Espectro de RMN de ¹H para o ligante D1, em DMSO-*d*₆.

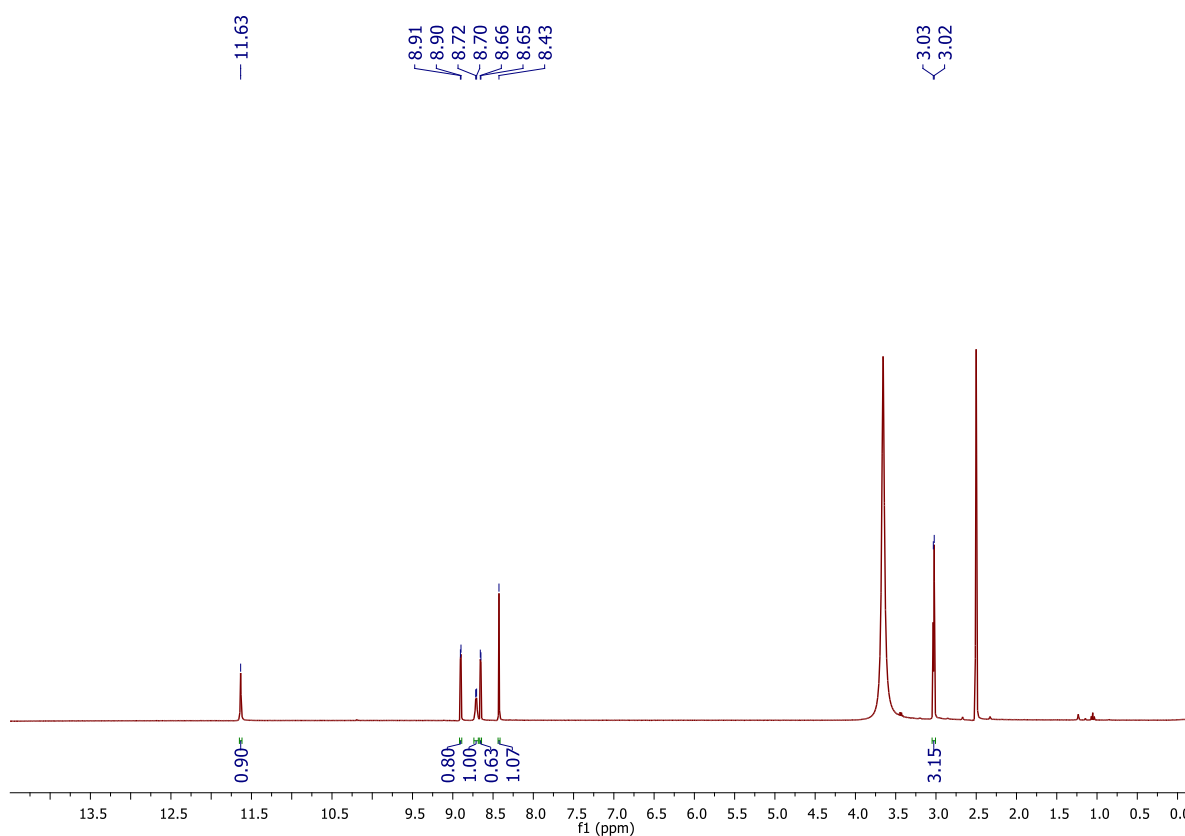


FIGURA A21 – Espectro de RMN de ¹H para o ligante D2, em DMSO-*d*₆.

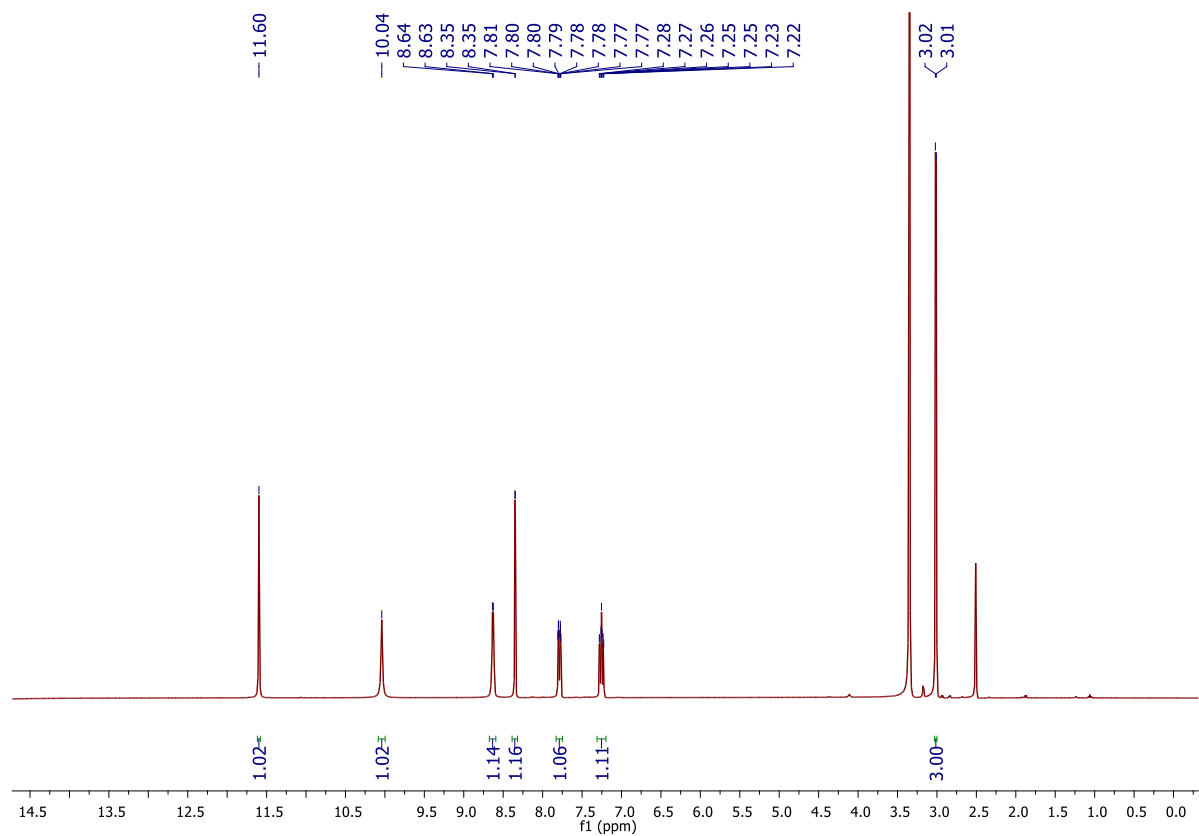


FIGURA A22 – Espectro de RMN de ¹H para o ligante D3, em DMSO-*d*₆.

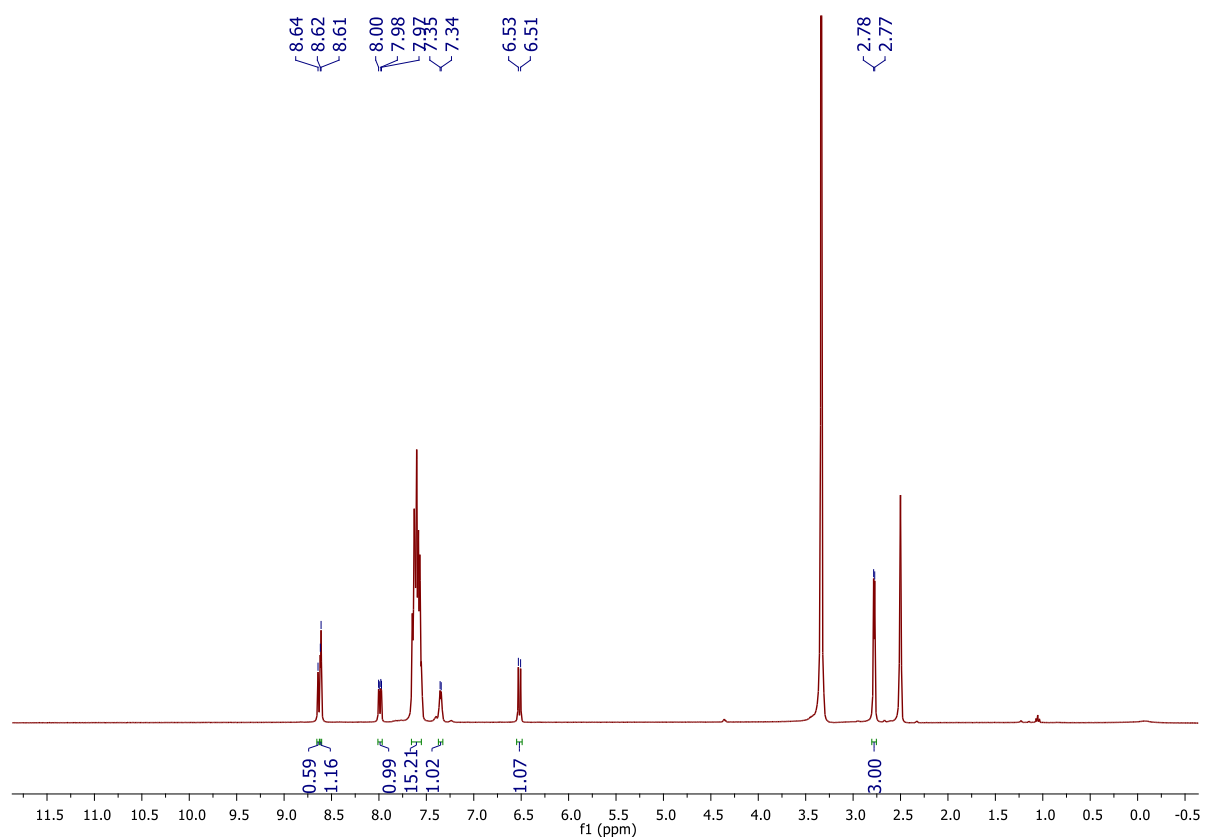


FIGURA A23 – Espectro de RMN ¹H para o complexo PdM2, em DMSO-*d*₆.

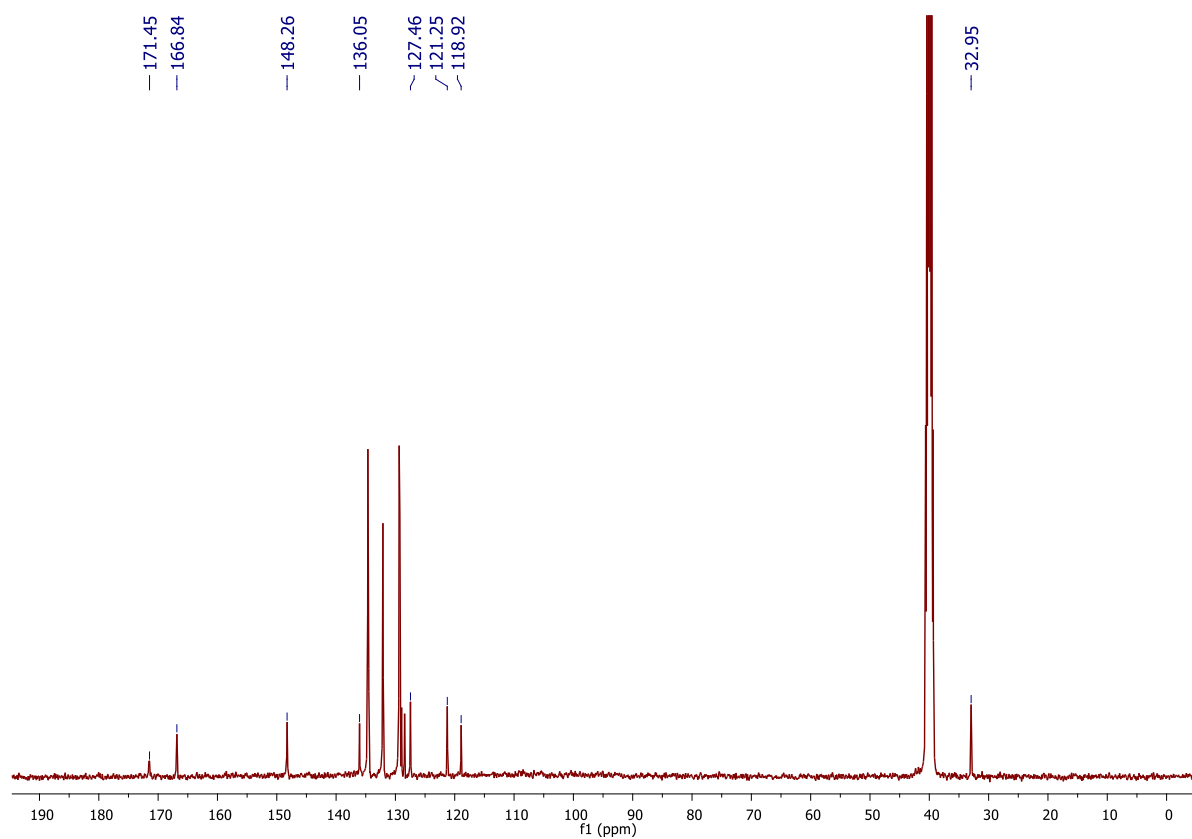


FIGURA A24 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o complexo PdM2, em $\text{DMSO-}d_6$.

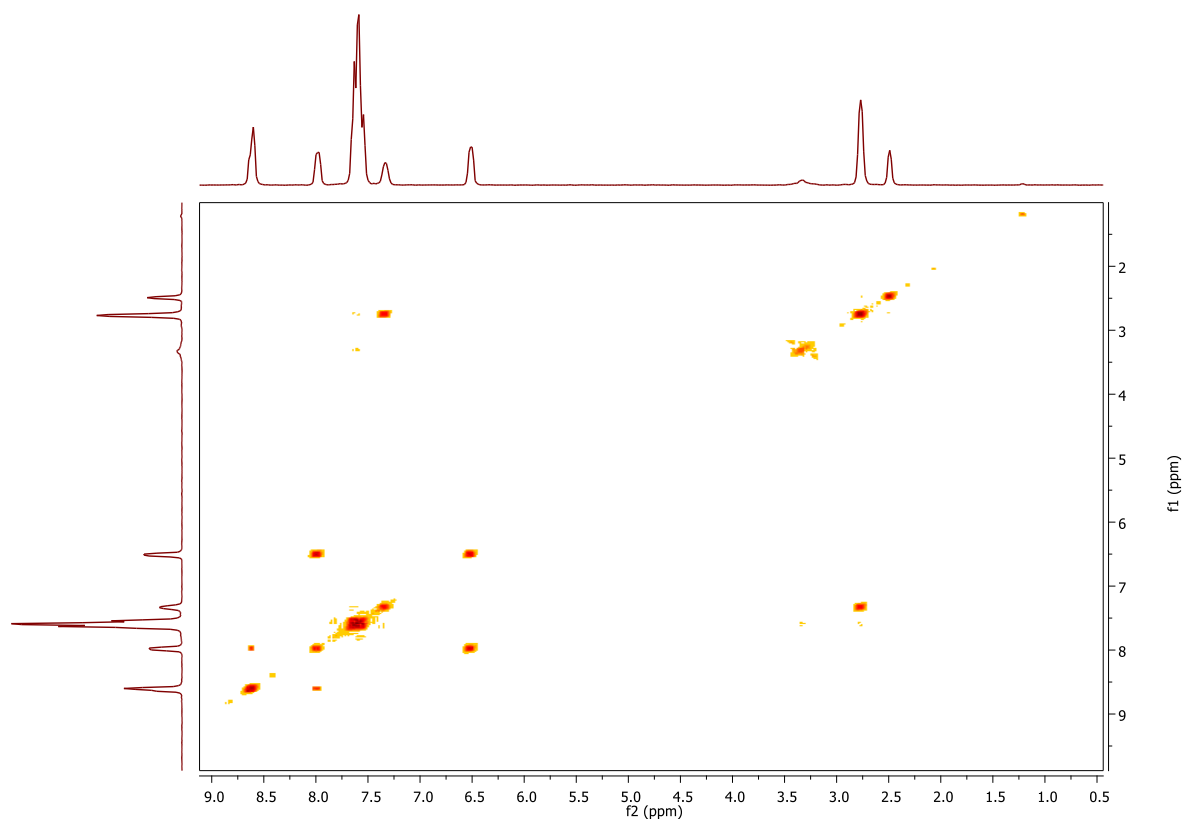


FIGURA A25 – Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY do complexo PdM2, em $\text{DMSO-}d_6$.

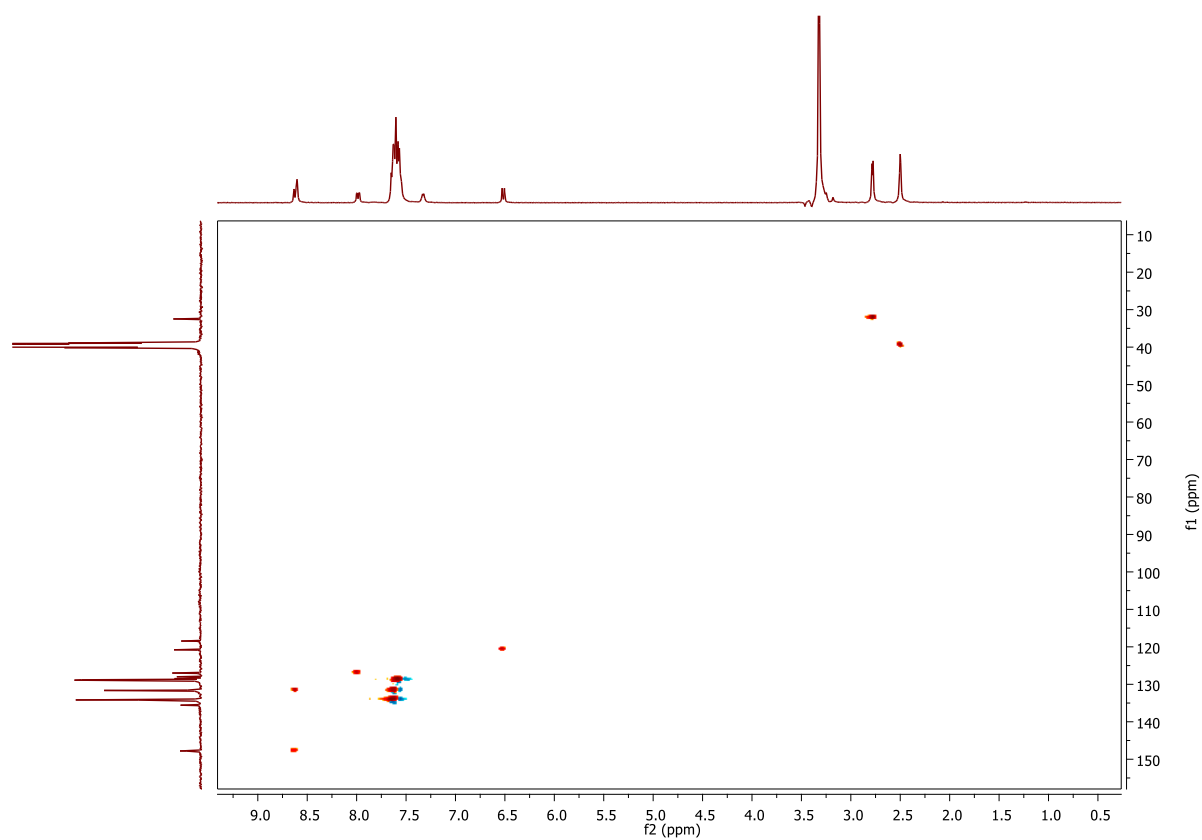


FIGURA A26 – Mapa de correlação ^1H – ^{13}C HSQC do complexo PdM2, em $\text{DMSO}-d_6$.

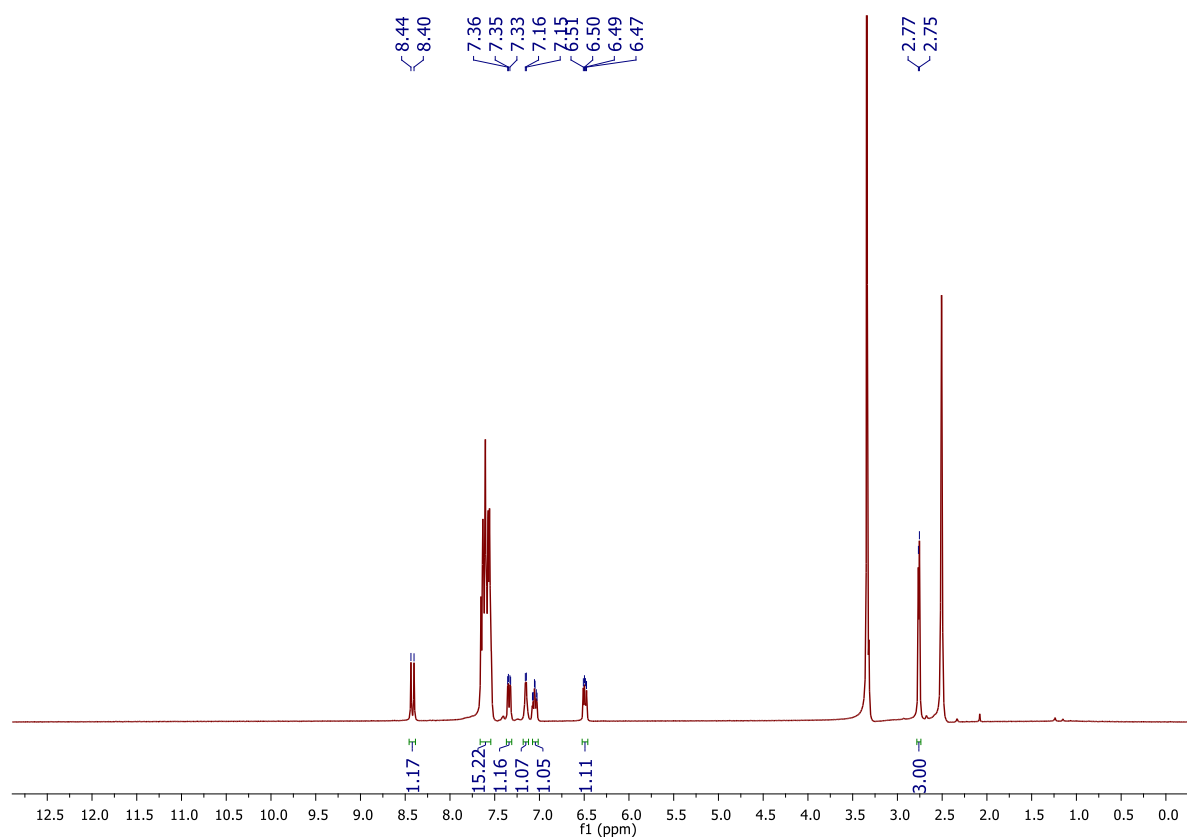


FIGURA A27 – Espectro de RMN ^1H para o complexo PdM3, em $\text{DMSO}-d_6$.

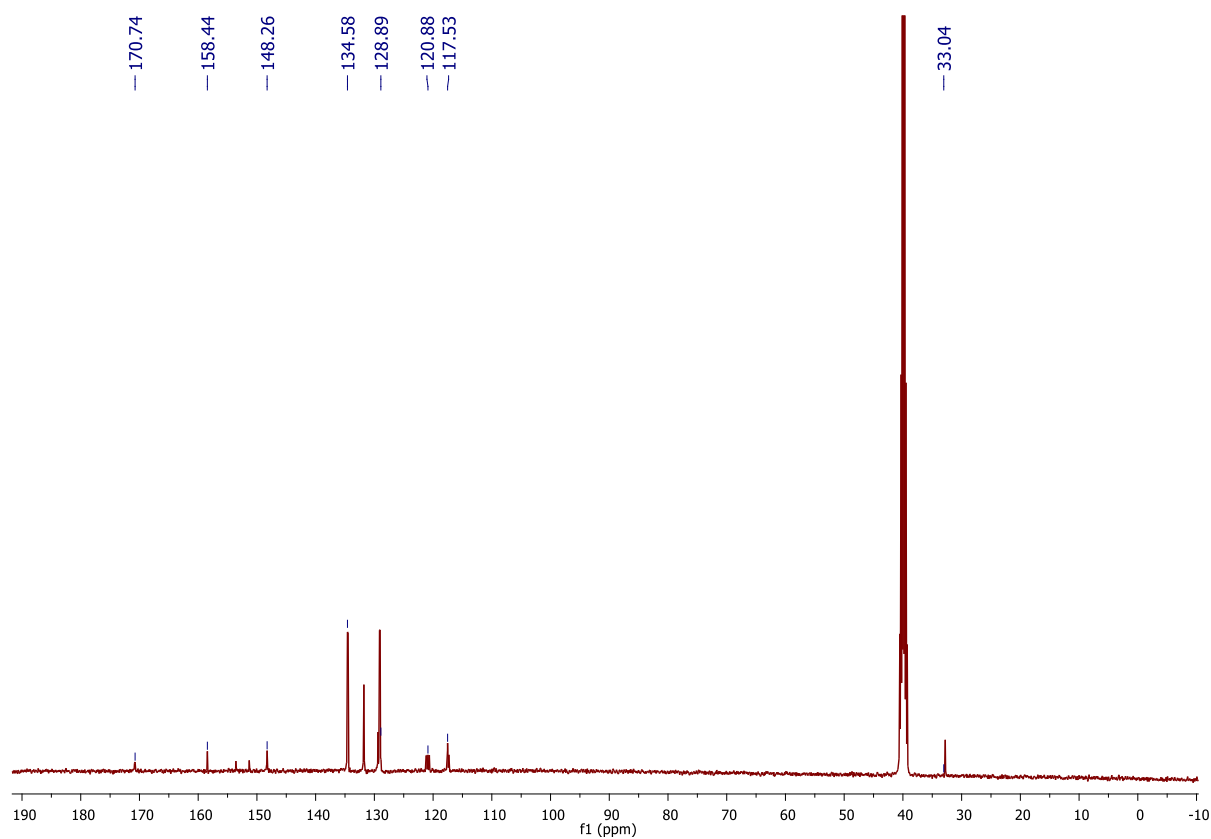


FIGURA A28 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o complexo PdM3, em $\text{DMSO}-d_6$.

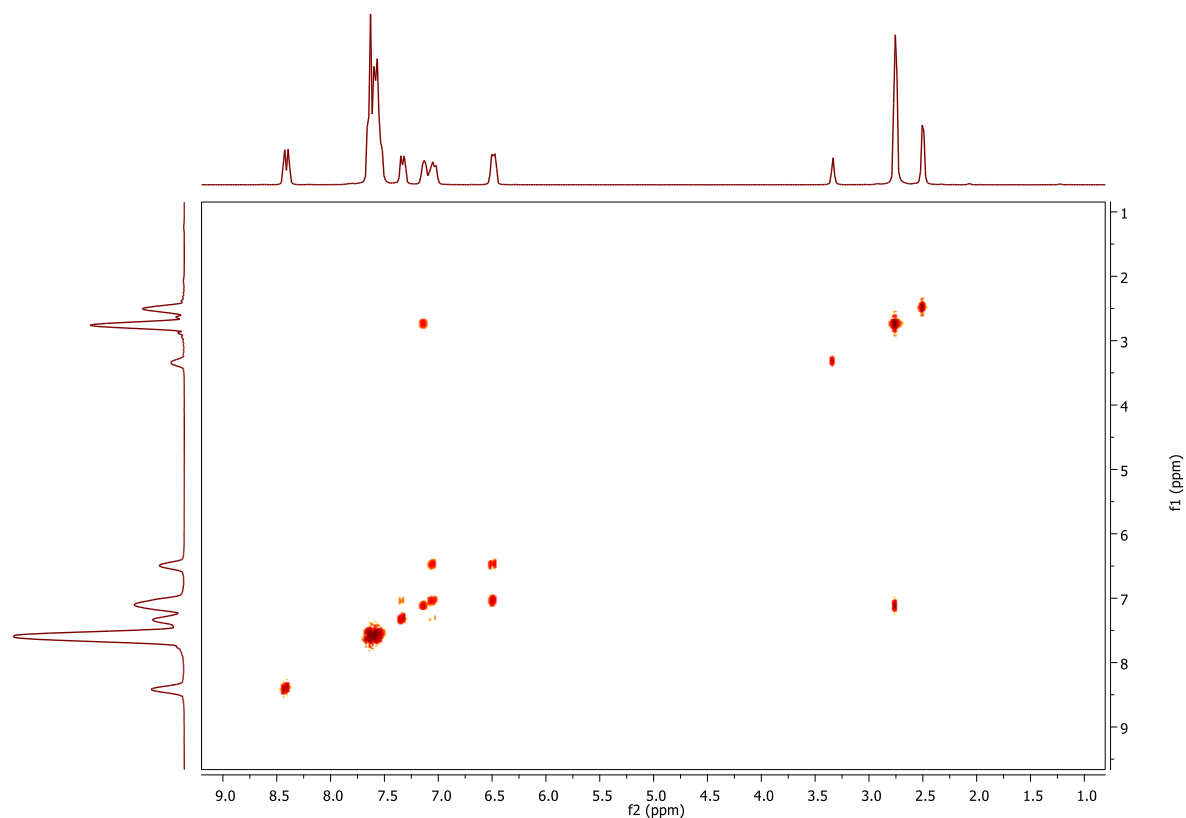


FIGURA A29 – Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY do complexo PdM3, em $\text{DMSO}-d_6$.

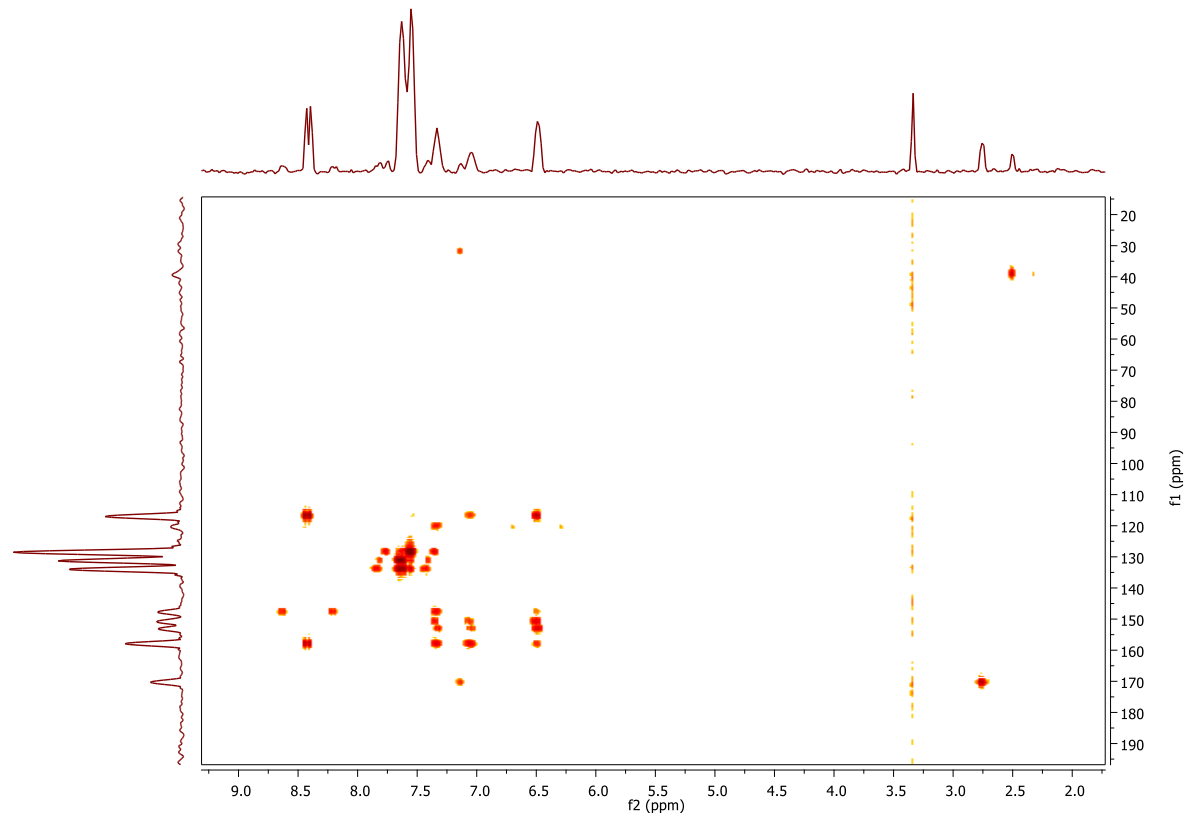


FIGURA A30 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C HMBC do complexo PdM3, em $\text{DMSO}-d_6$.

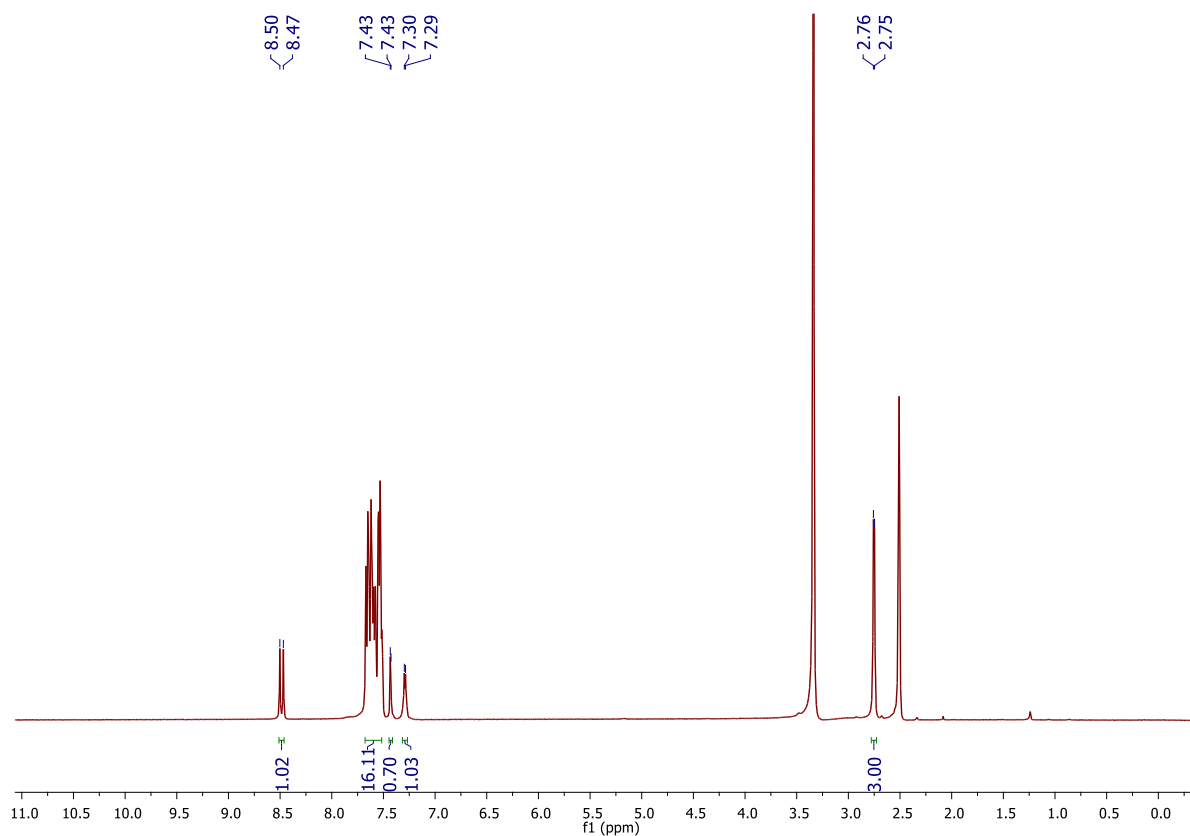


FIGURA A31 – Espectro de RMN ^1H para o complexo PdD1, em $\text{DMSO}-d_6$.

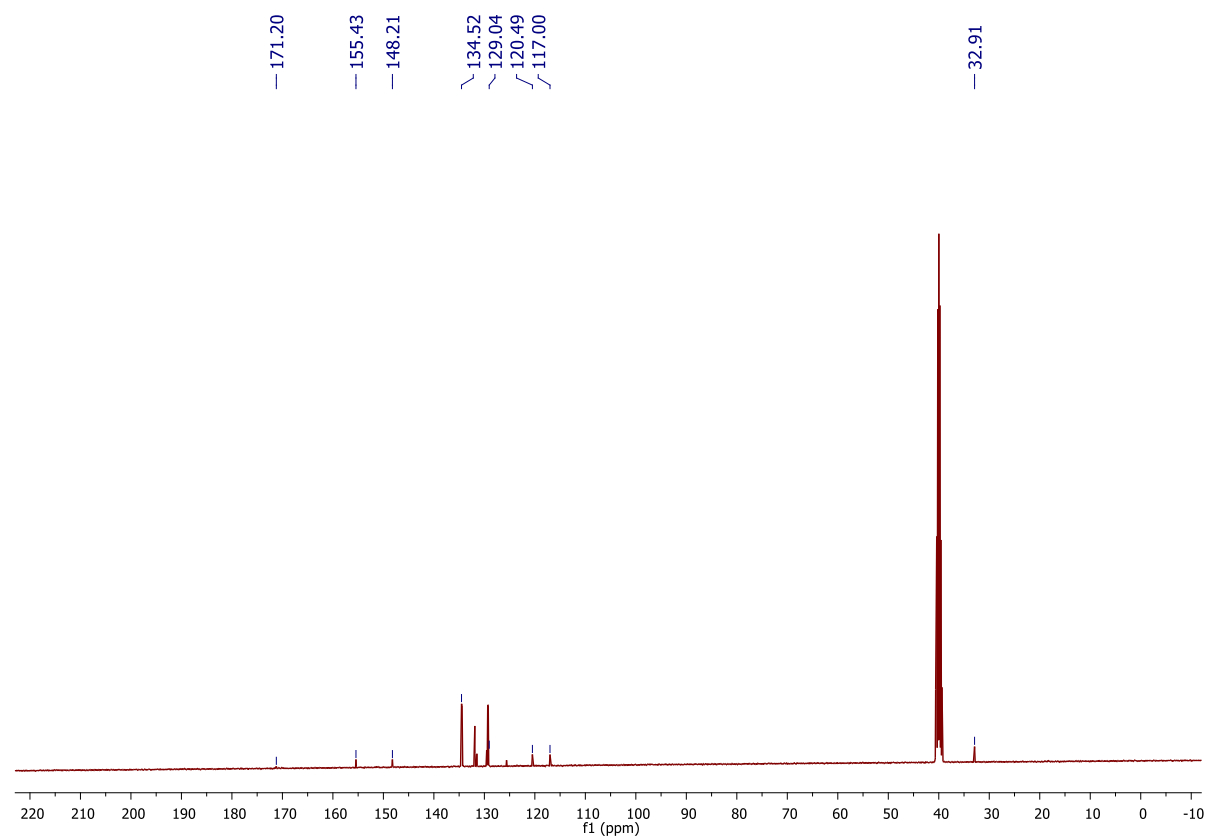


FIGURA A32 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o complexo PdD1, em $\text{DMSO}-d_6$.

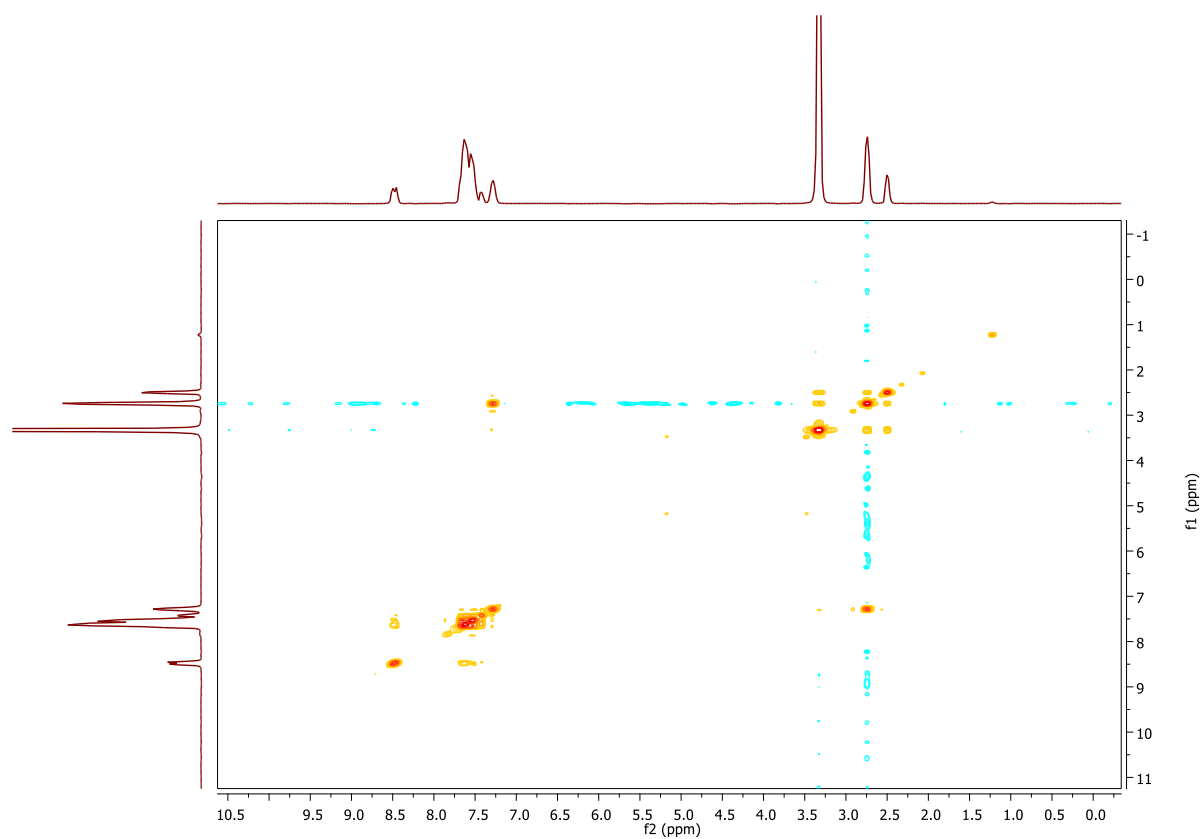


FIGURA A33 – Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY do complexo PdD1, em $\text{DMSO}-d_6$.

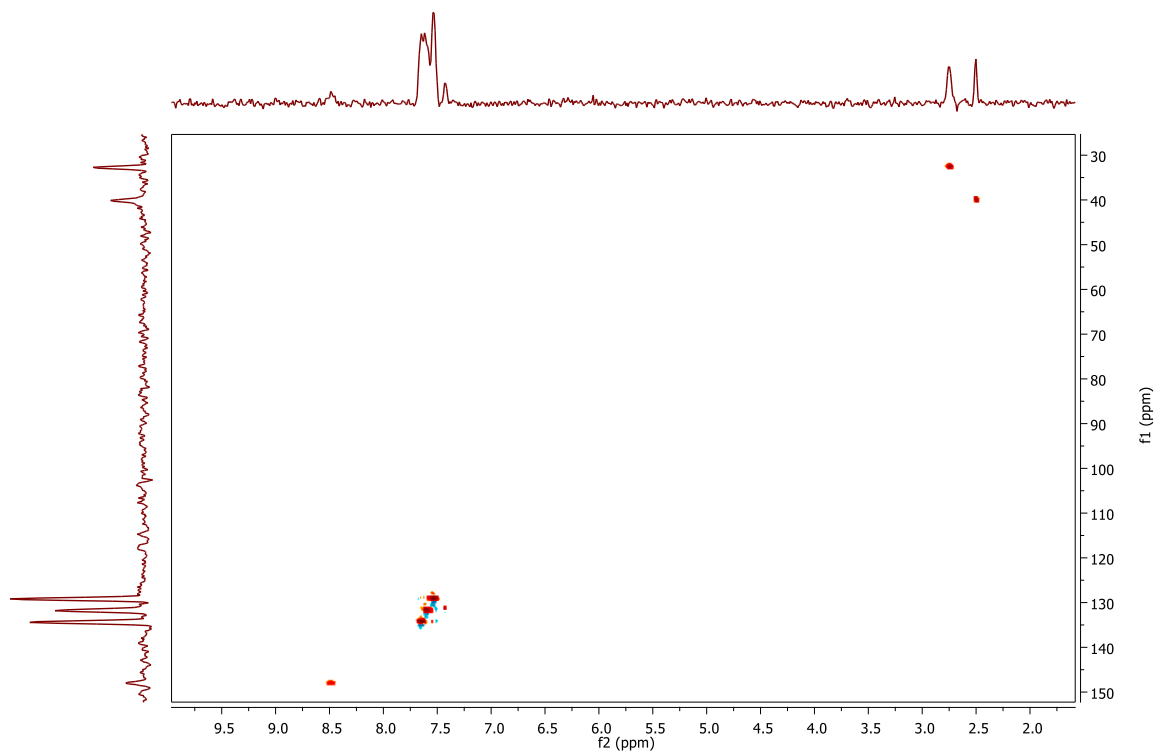


FIGURA A34 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C HSQC do complexo PdD1, em $\text{DMSO}-d_6$.

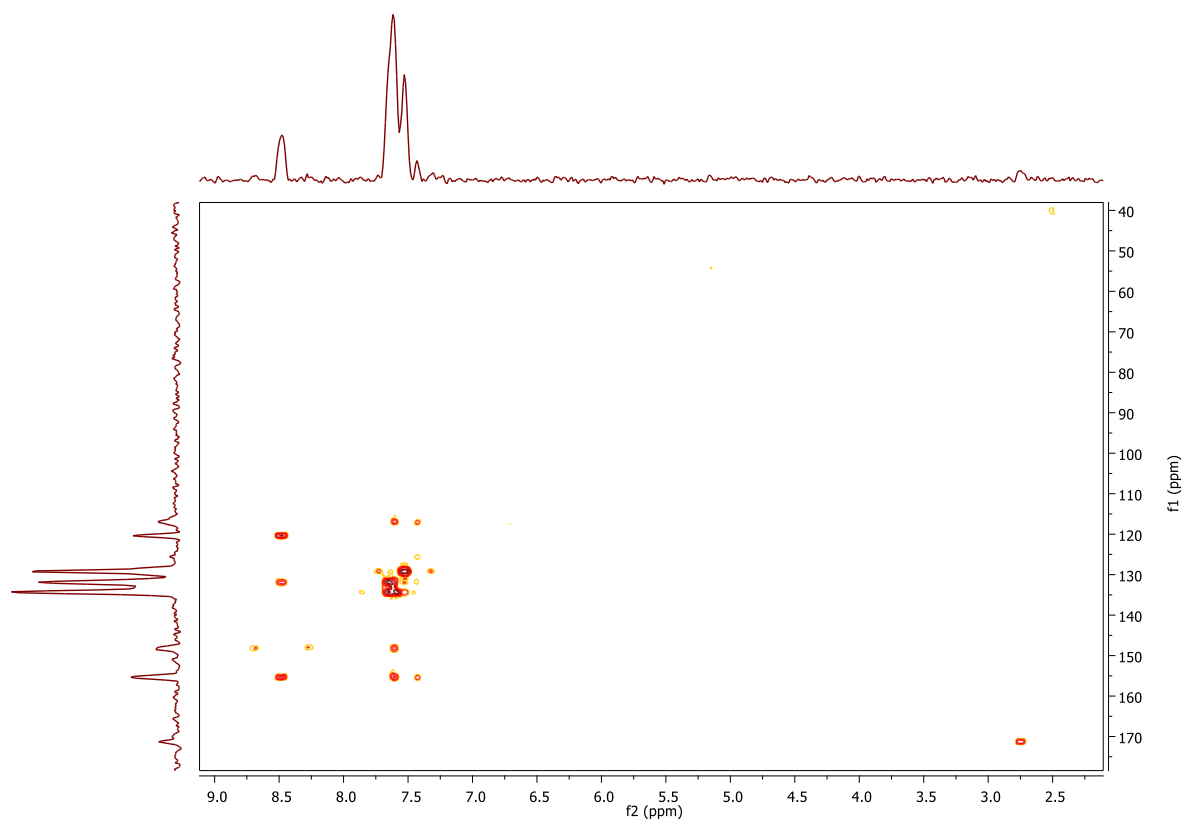


FIGURA A35 – Mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMBC do complexo PdD1, em $\text{DMSO}-d_6$.

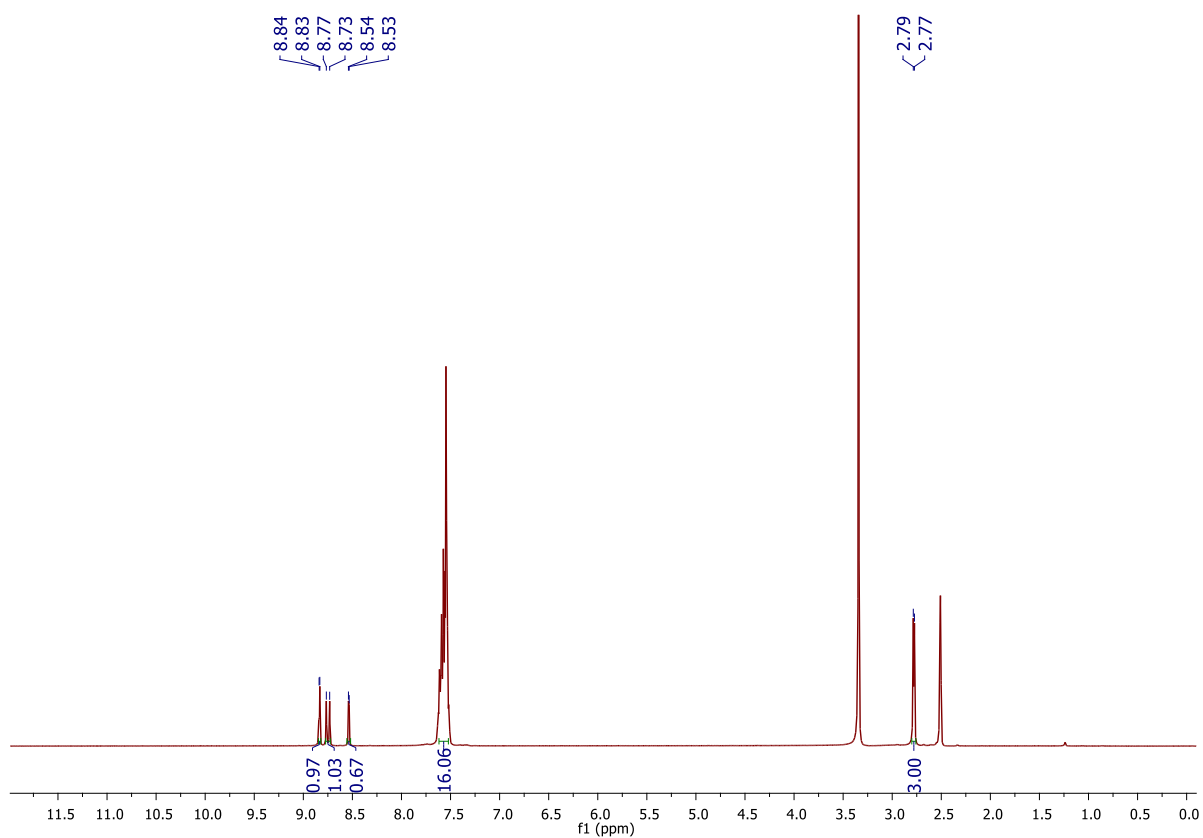


FIGURA A36 – Espectro de RMN ^1H para o complexo PdD2, em $\text{DMSO}-d_6$.

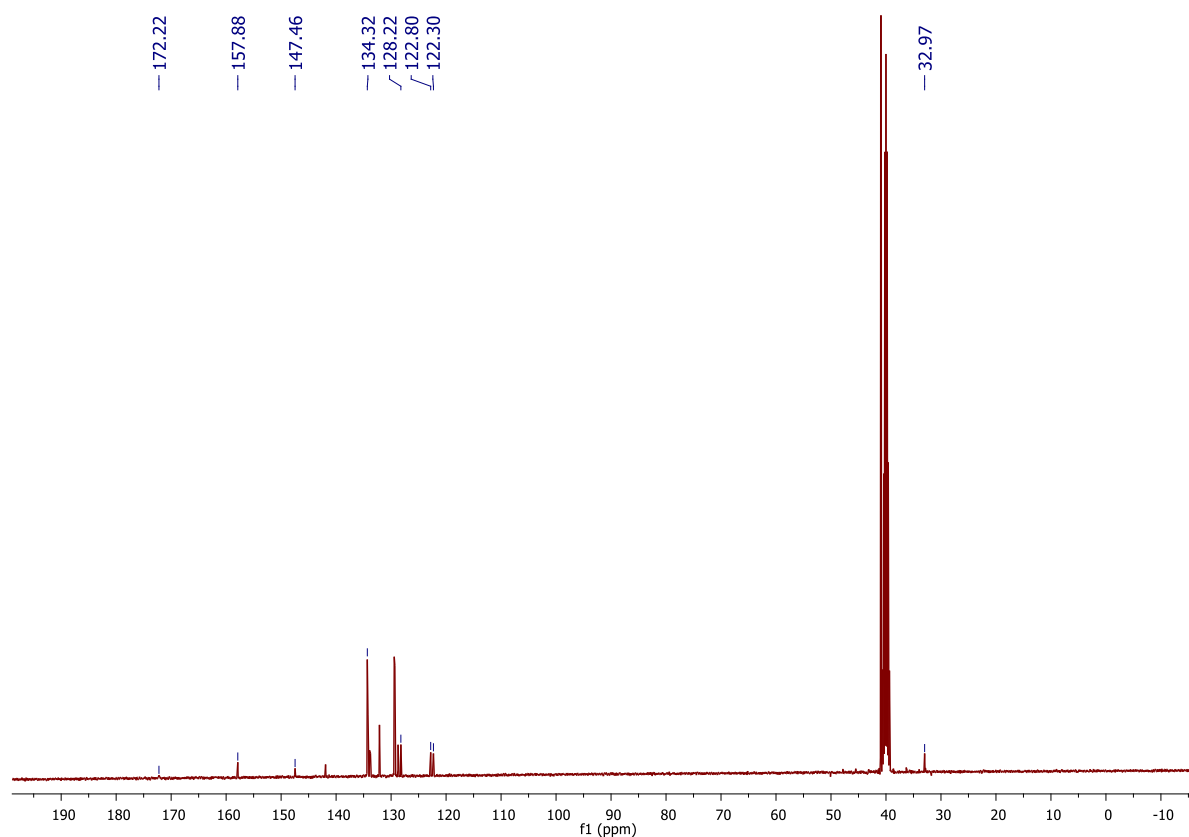


FIGURA A37 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o complexo PdD2, em $\text{DMSO}-d_6$.

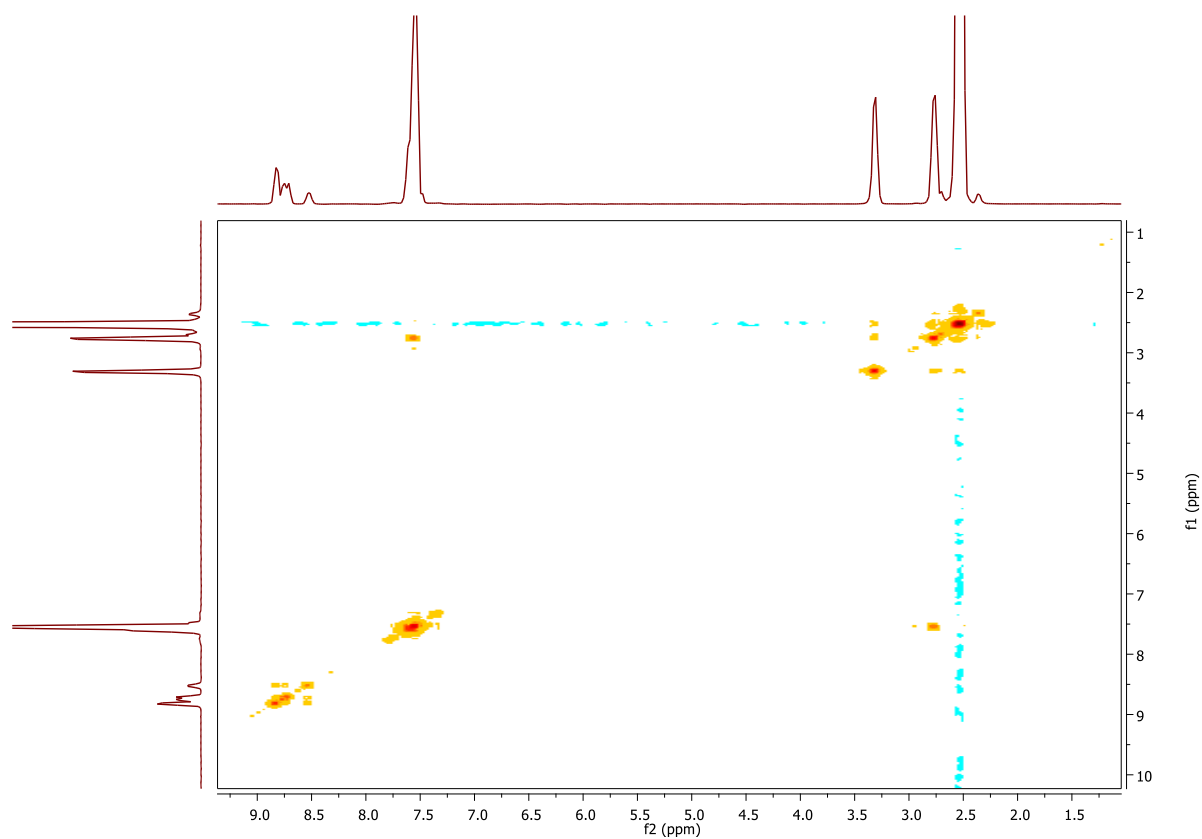


FIGURA A38 – Mapa de correlação $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY do complexo PdD2, em $\text{DMSO}-d_6$.

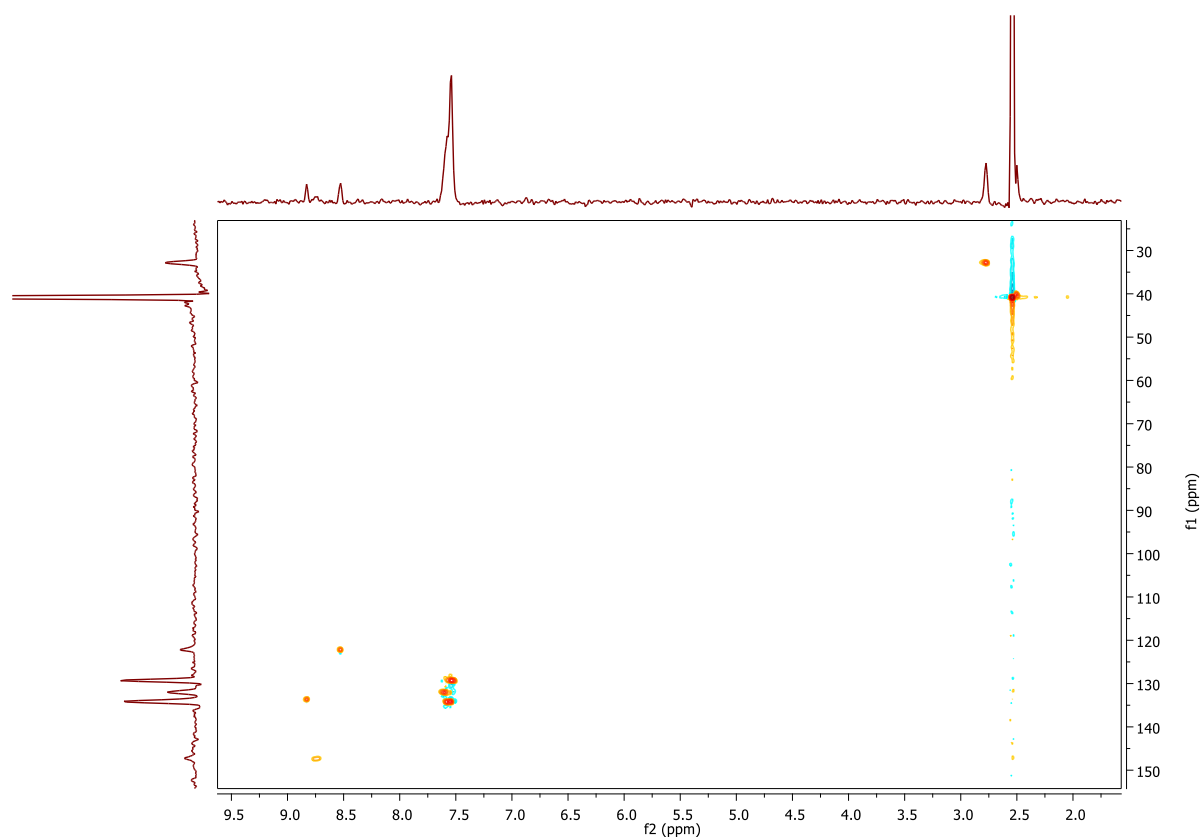


FIGURA A39 – Mapa de correlação ^1H – ^{13}C HSQC do complexo PdD₂, em DMSO- d_6 .

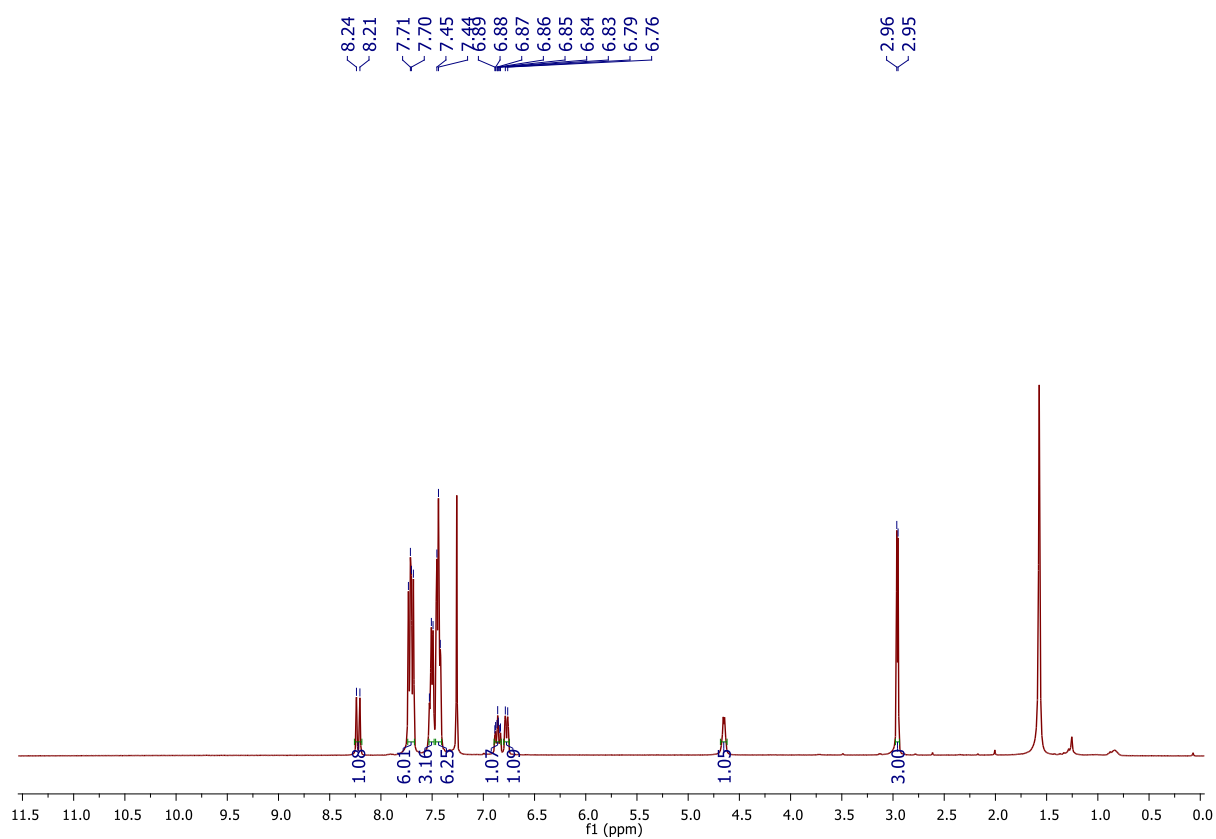


FIGURA A40 – Espectro de RMN ^1H para o complexo PdD₃, em CDCl₃.

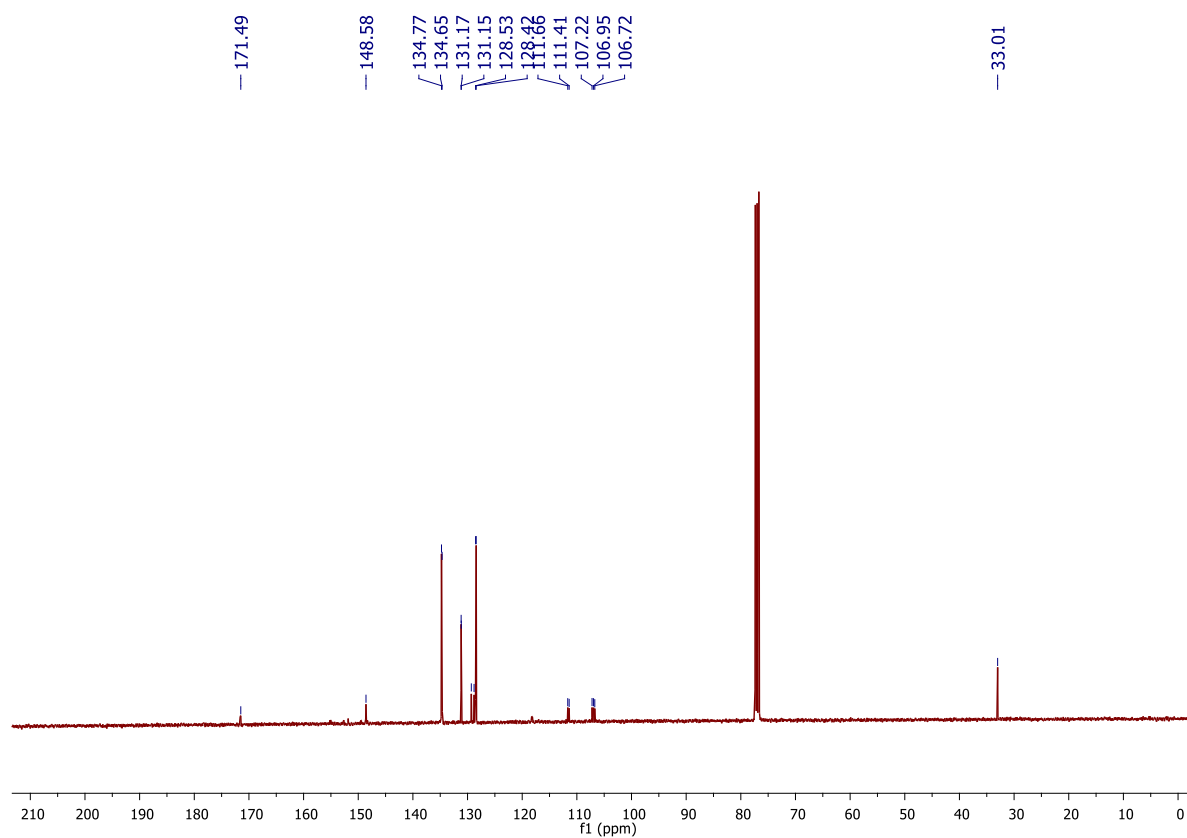


FIGURA A41 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o complexo PdD₃, em CDCl₃.

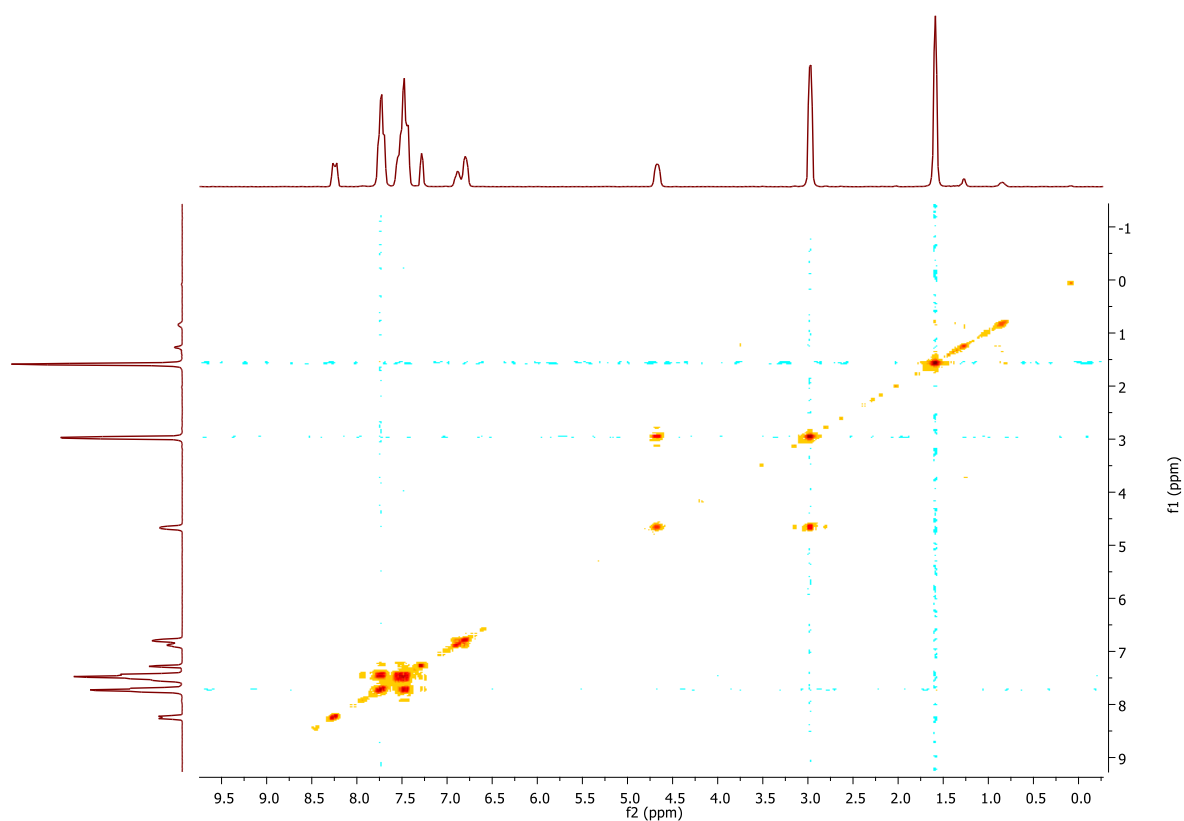


FIGURA A42 – Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY do complexo PdD₃, em CDCl₃.

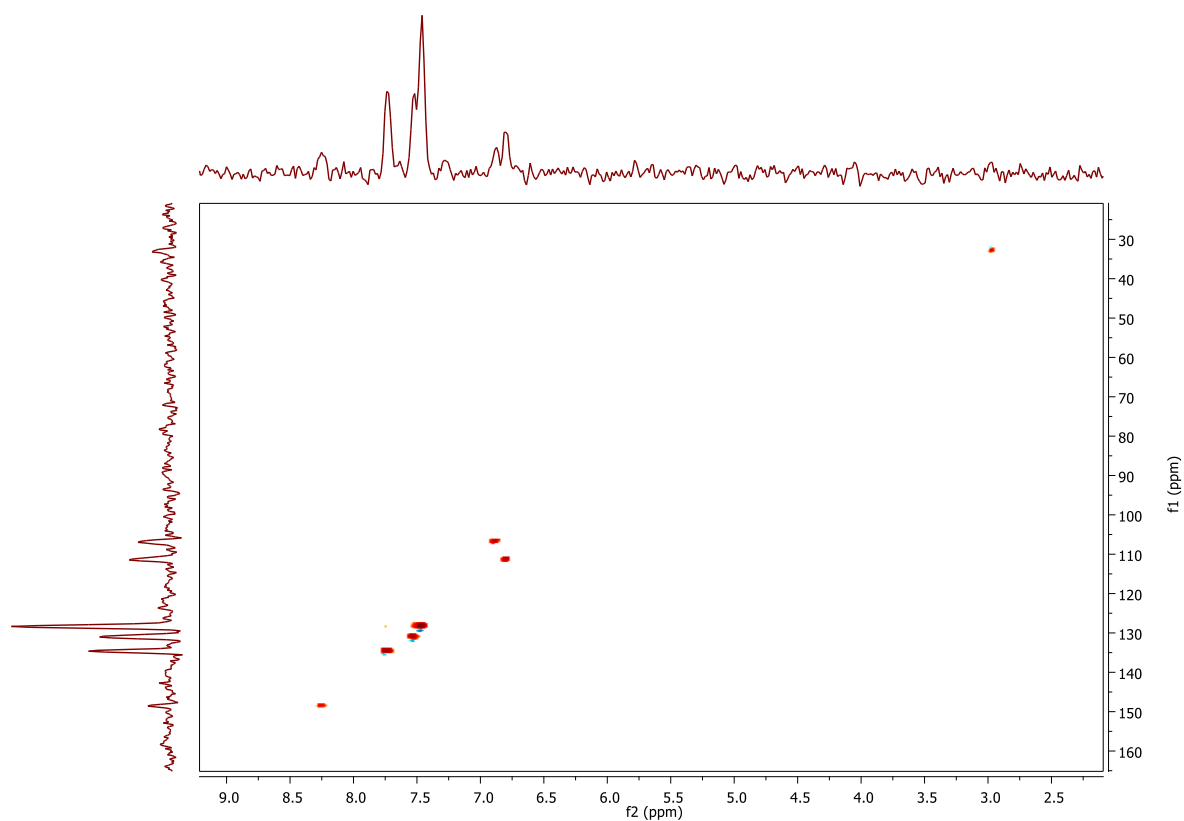


FIGURA A43 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C HSQC do complexo PdD₃, em CDCl₃.

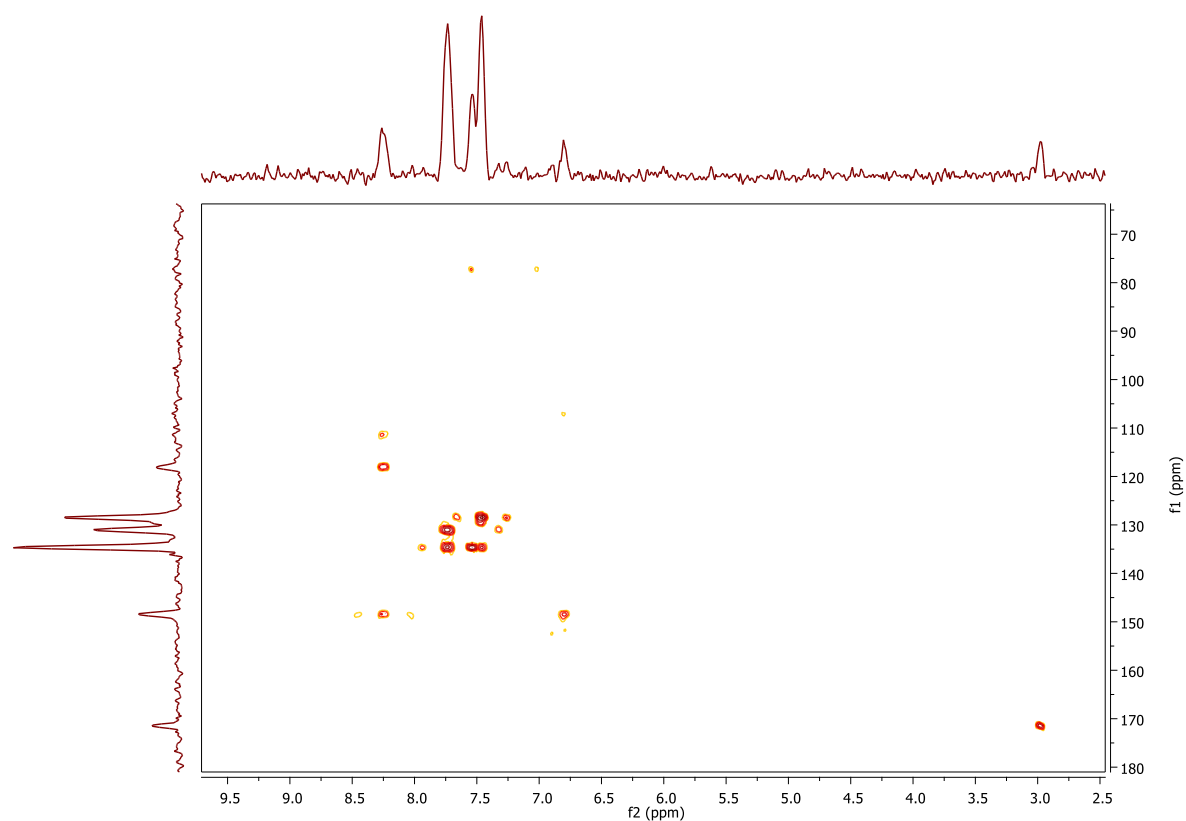


FIGURA A44 – Mapa de correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMBC do complexo PdD_3 , em CDCl_3 .

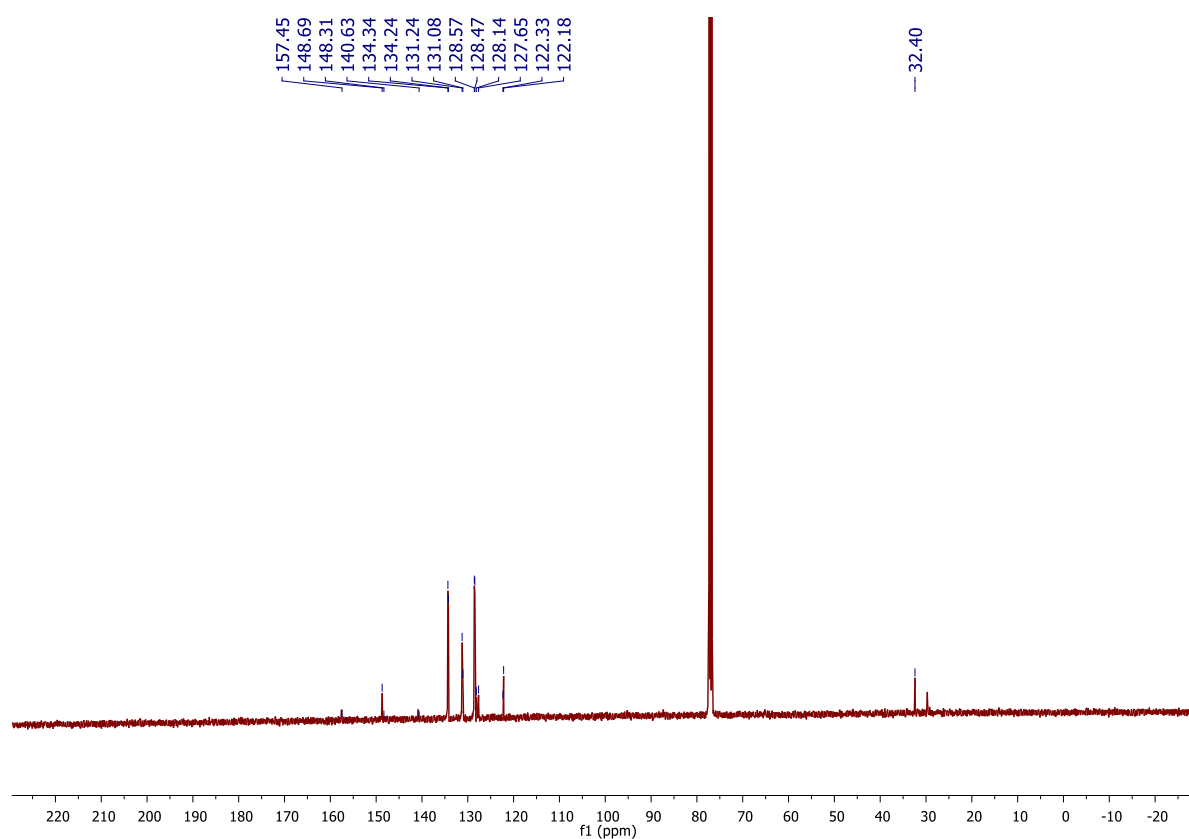


FIGURA A45 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para o complexo NiD_2 , em CDCl_3 .

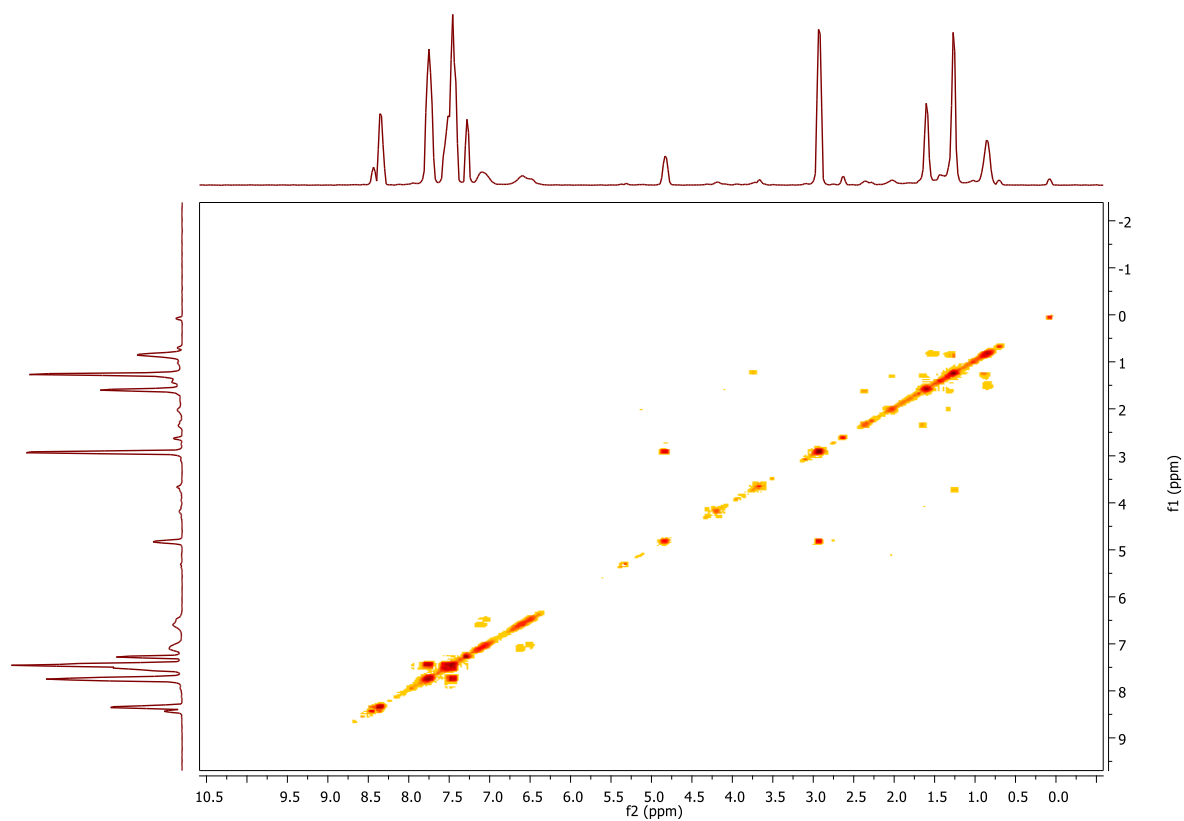


FIGURA A46 – Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY do complexo NiD_2 , em CDCl_3 .

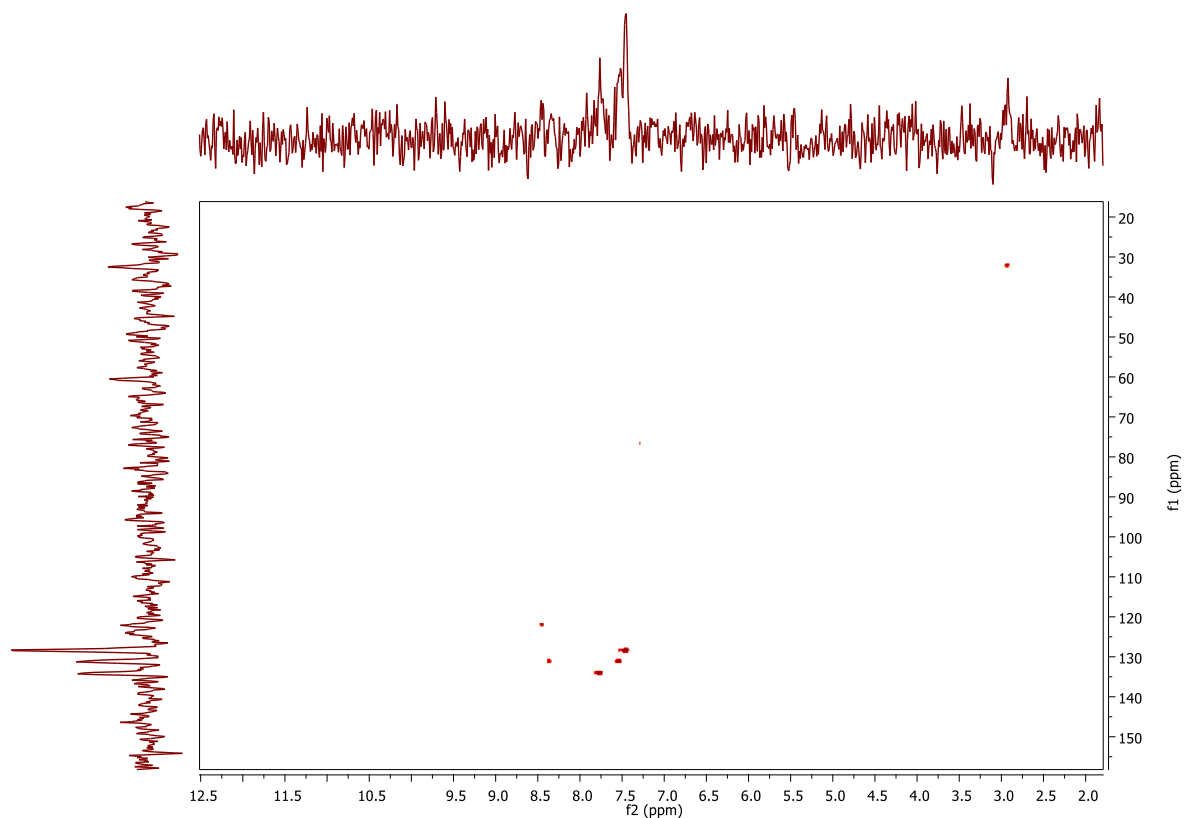


FIGURA A47 – Mapa de correlação ^1H - ^{13}C HSQC do complexo NiD_2 , em CDCl_3 .

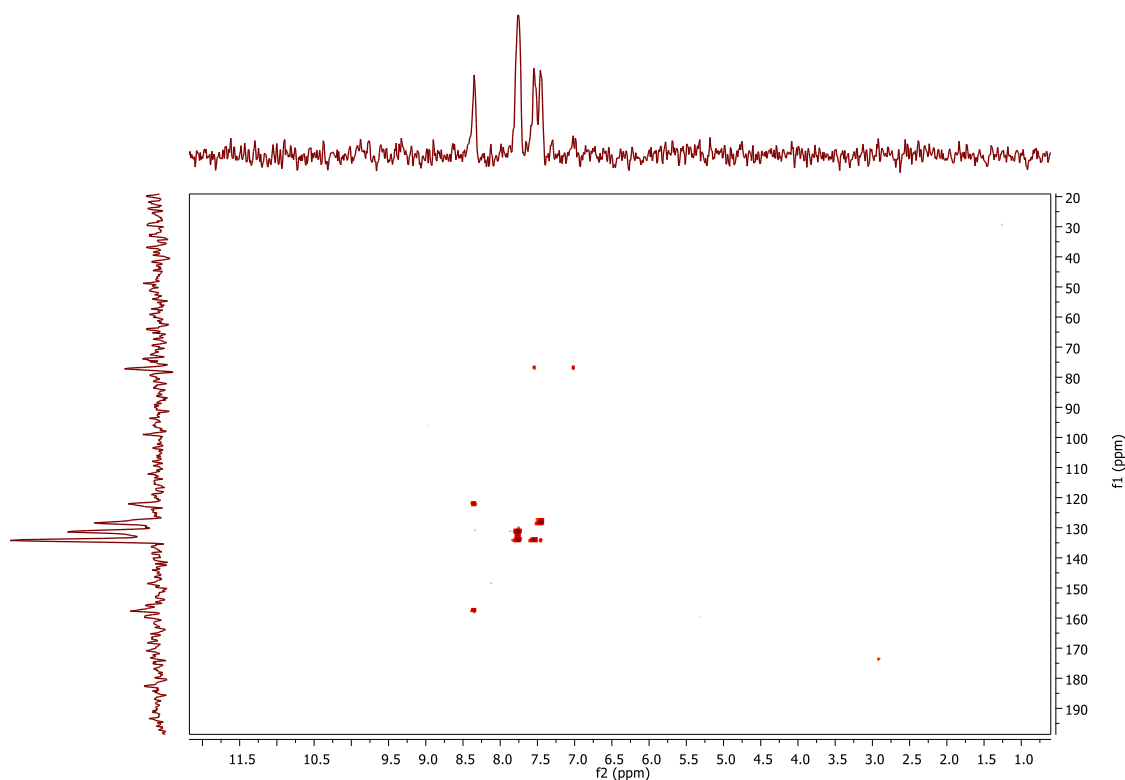


FIGURA A48 – Mapa de correlação ^1H – ^{13}C HMBC do complexo NiD2, em CDCl_3 .

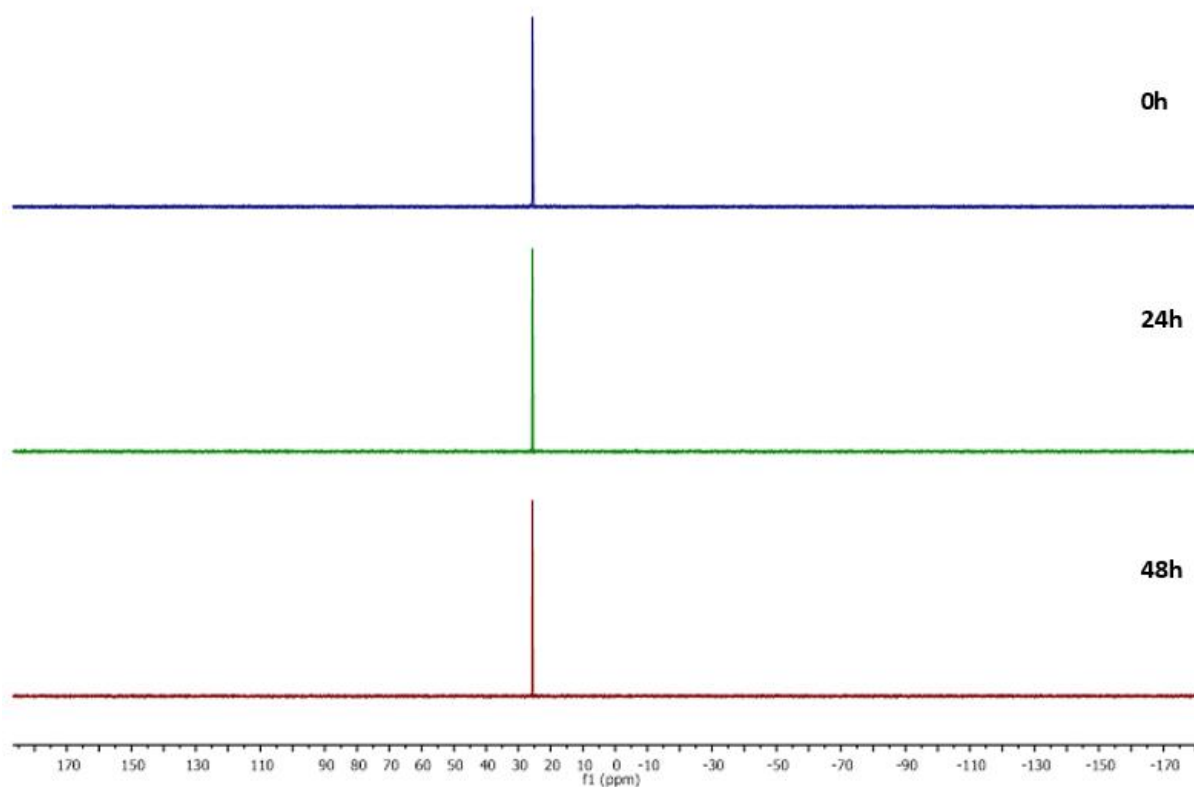


FIGURA A49 – Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN do complexo PdM2 em DMSO, nos períodos de 0, 24 e 48h de incubação.

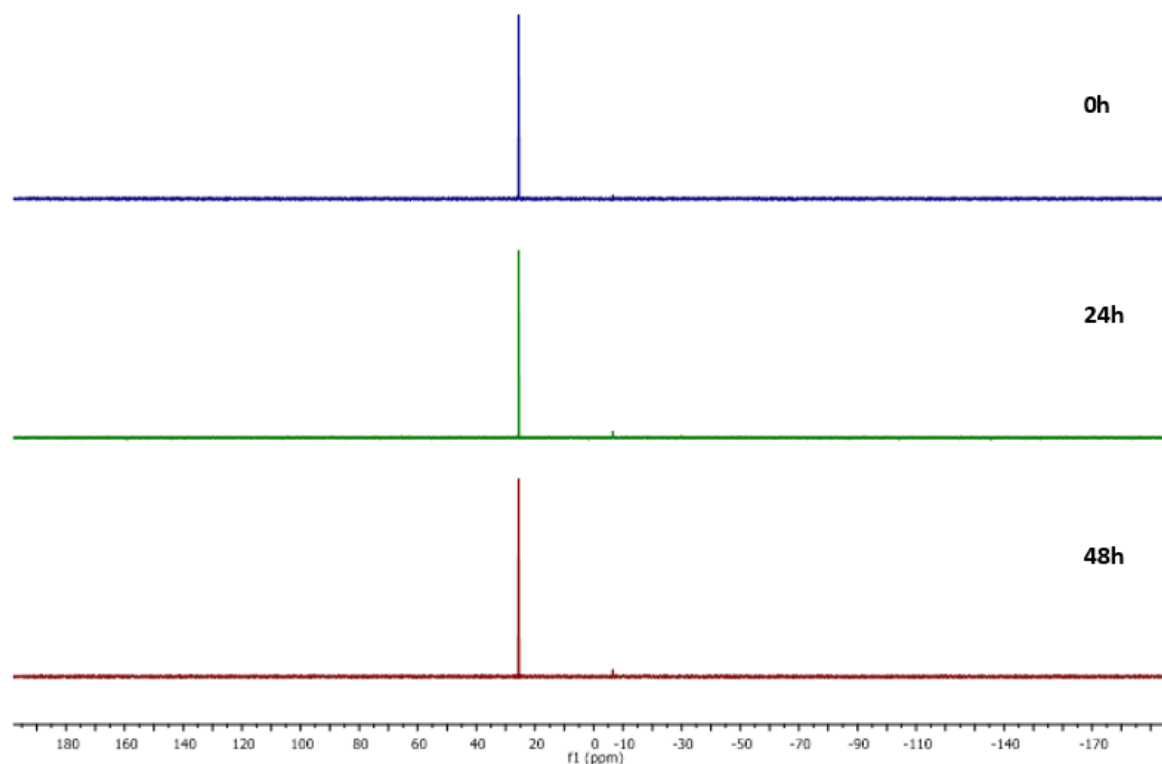


FIGURA A50 – Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN do complexo PdM2 em DMSO/meio de cultura DMEM (90:10, v/v), nos períodos de 0, 24 e 48h de incubação.

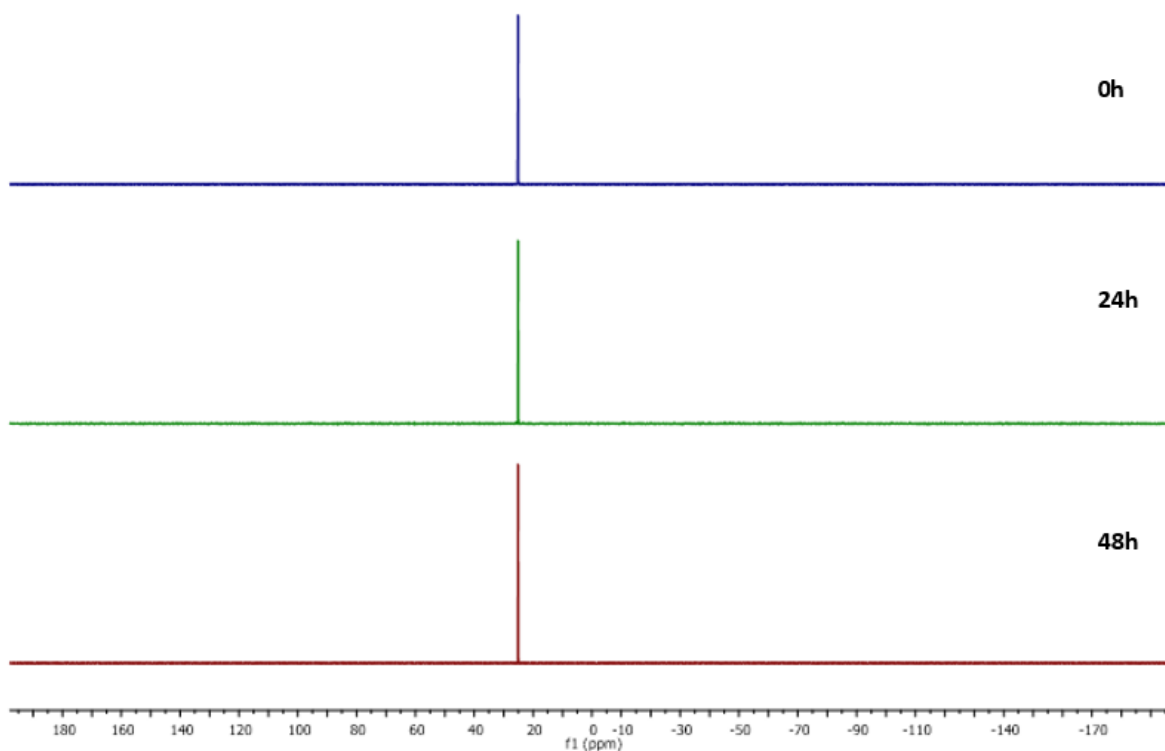


FIGURA A51 – Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN do complexo PdM3 em DMSO, nos períodos de 0, 24 e 48h de incubação.

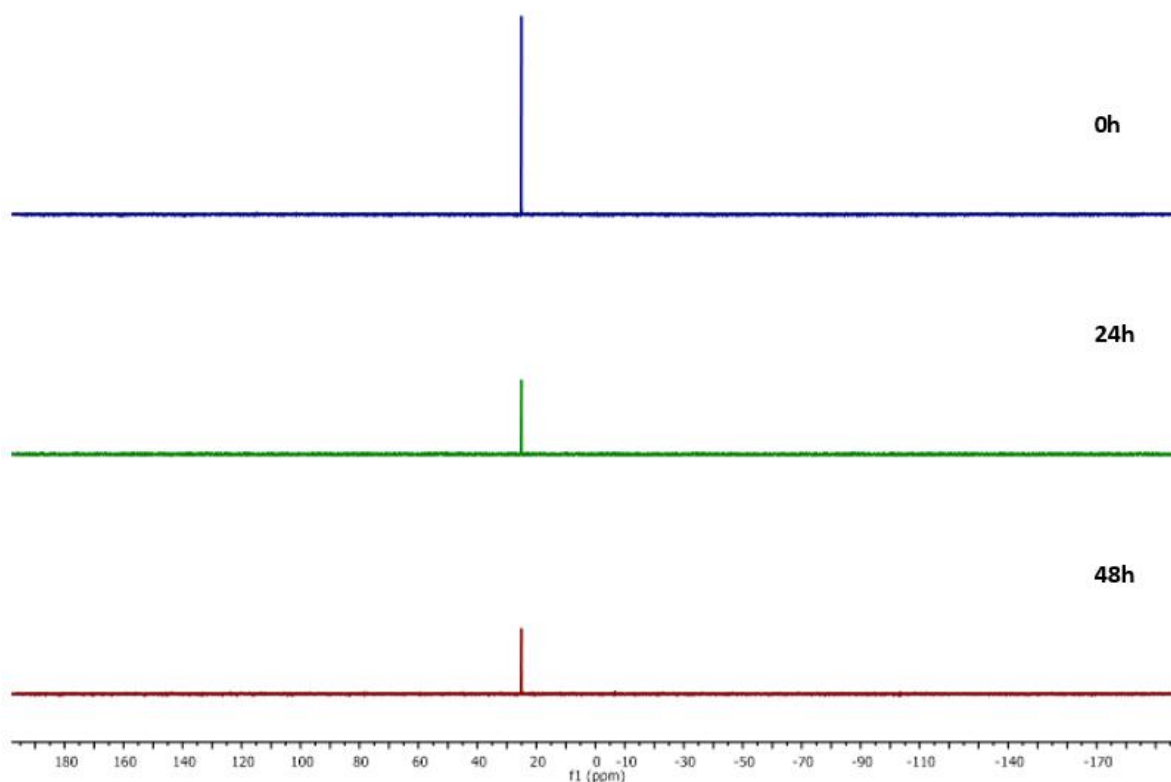


FIGURA A52 – Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN do complexo PdM3 em DMSO/meio de cultura DMEM (90:10, v/v), nos períodos de 0, 24 e 48h de incubação.

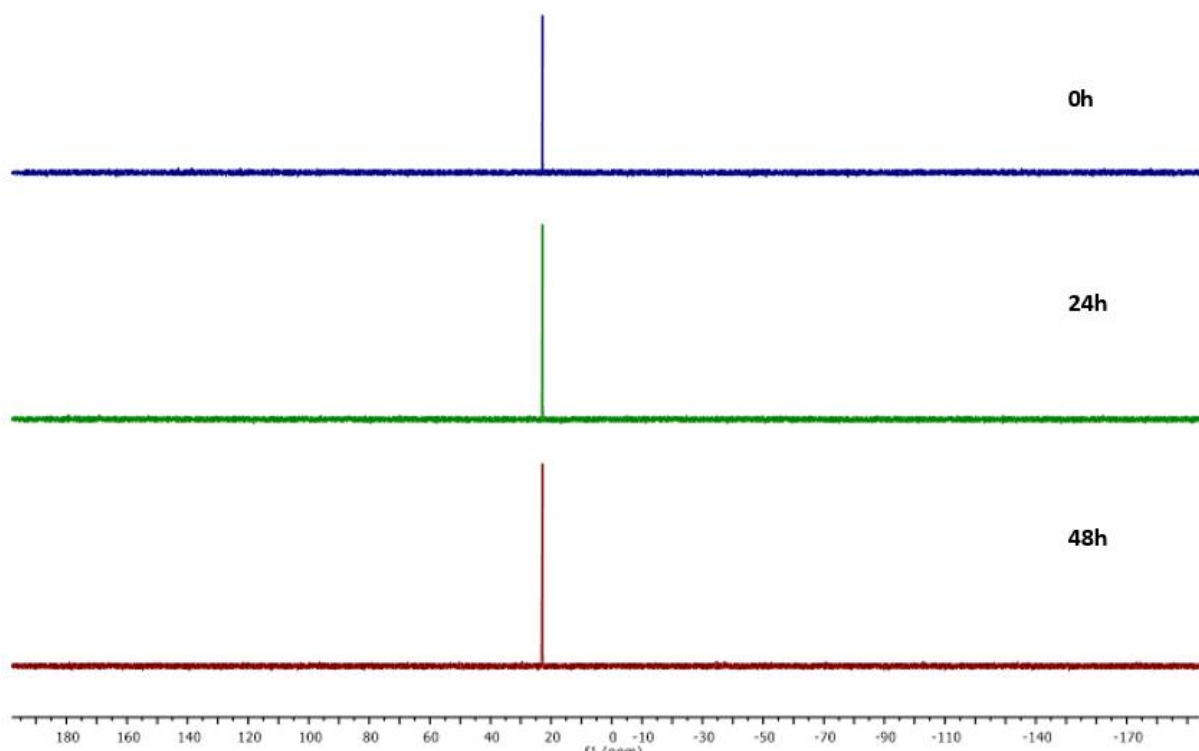


FIGURA A53 – Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN do complexo PdD1 em DMSO, nos períodos de 0, 24 e 48h de incubação.

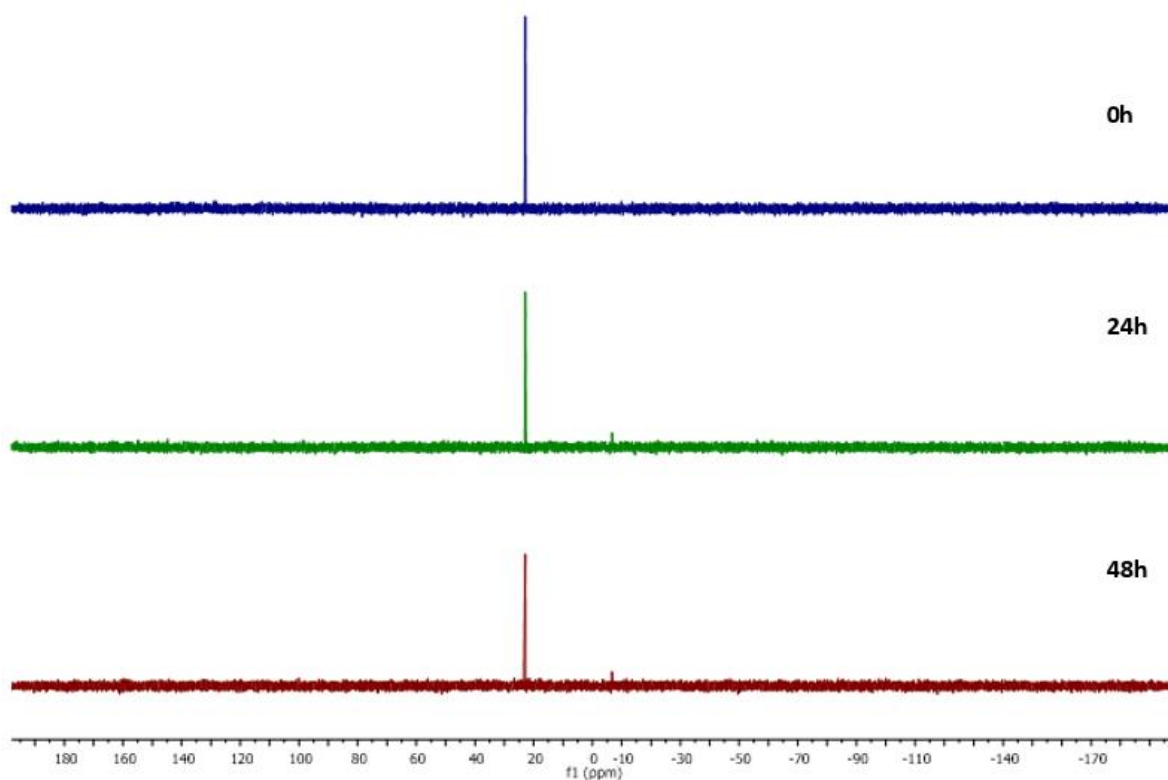


FIGURA A54 – Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN do complexo PdD2 em DMSO/meio de cultura DMEM (90:10, v/v), nos períodos de 0, 24 e 48h de incubação.

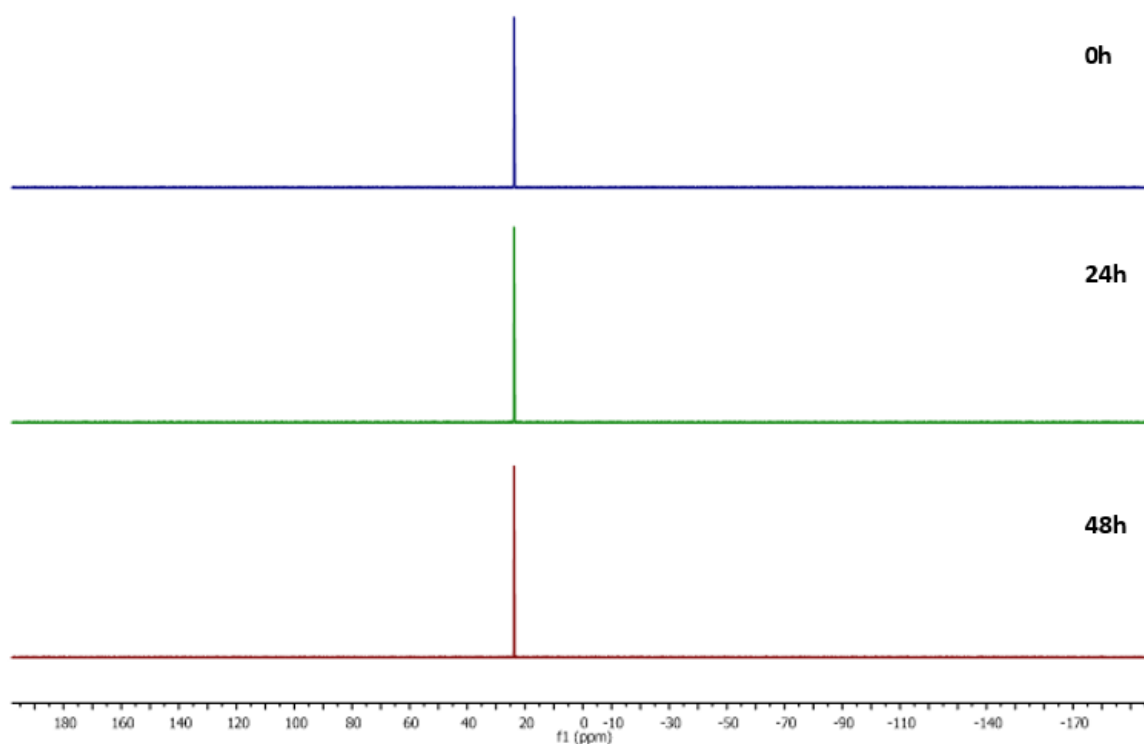


FIGURA A55 – Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN do complexo PdD2 em DMSO, nos períodos de 0, 24 e 48h de incubação.

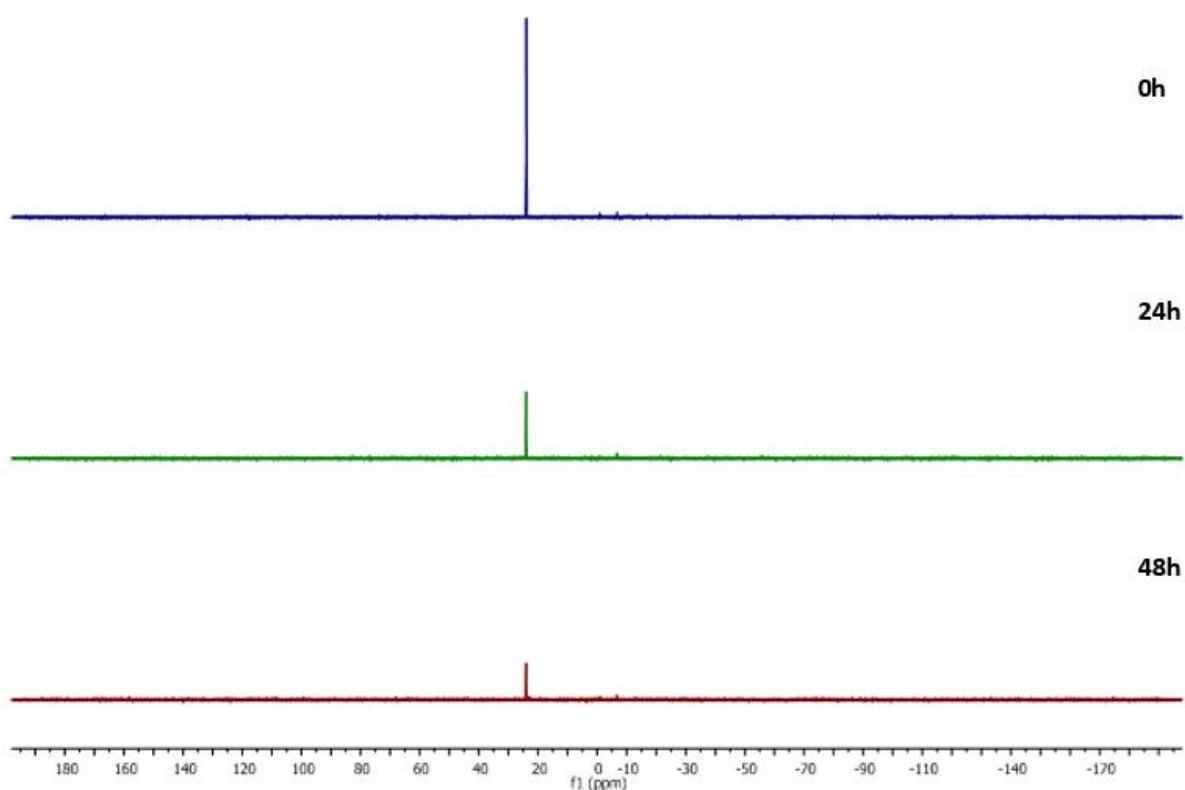


FIGURA A56 – Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN do complexo PdD2 em DMSO/meio de cultura DMEM (90:10, v/v), nos períodos de 0, 24 e 48h de incubação.

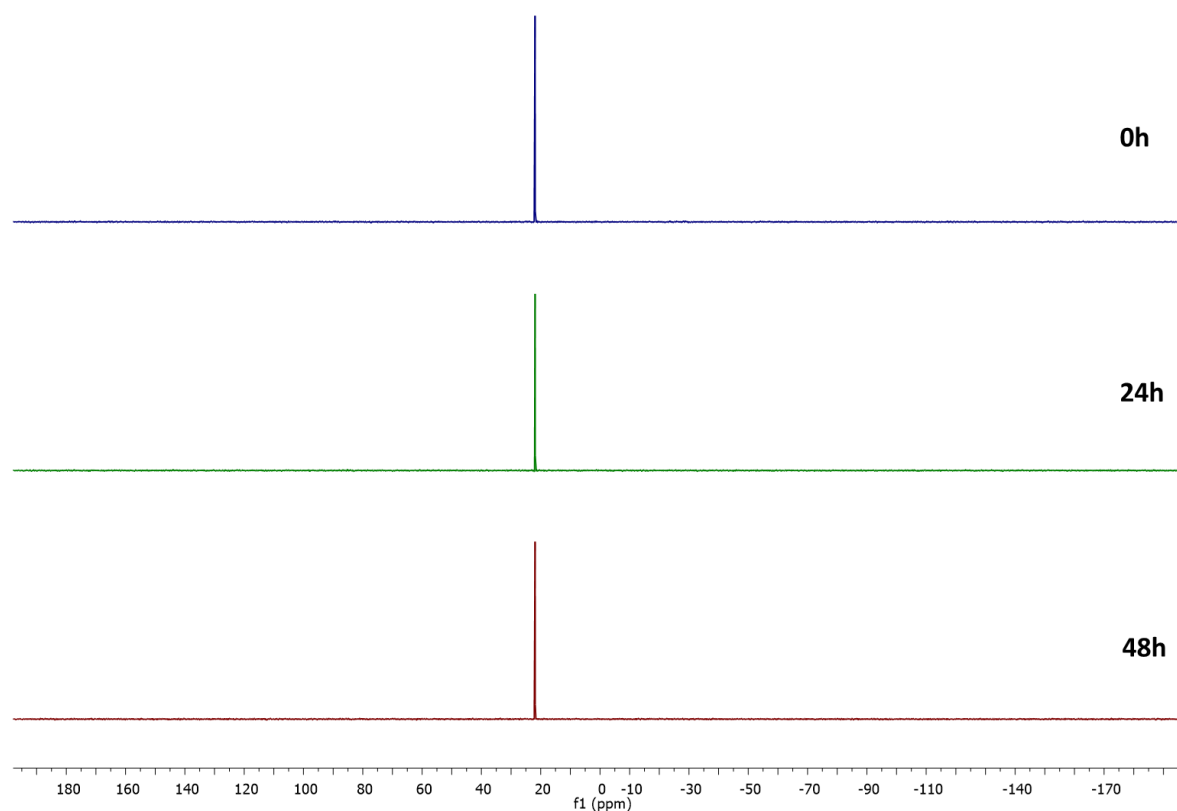


FIGURA A57 – Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN do complexo PdD3 em DMSO, nos períodos de 0, 24 e 48h de incubação.

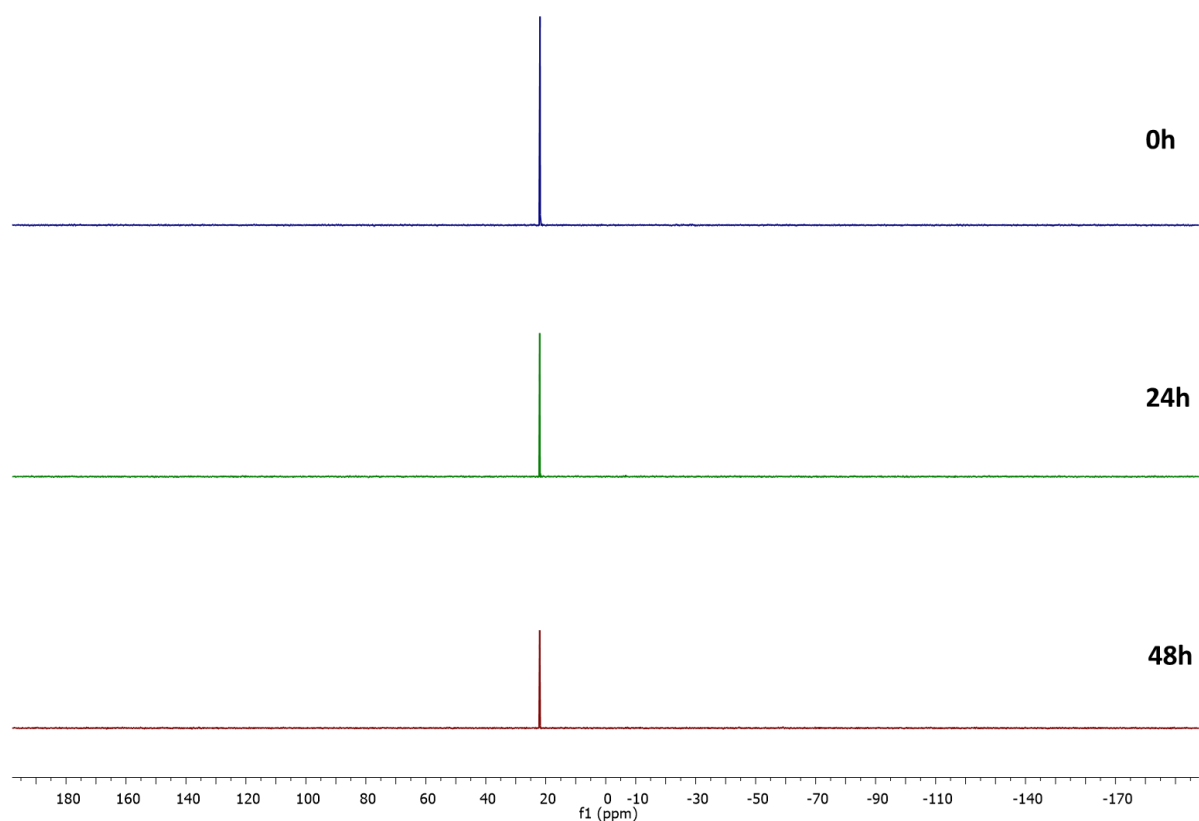


FIGURA A58 – Espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN do complexo PdD3 em DMSO/meio de cultura DMEM (90:10, v/v), nos períodos de 0, 24 e 48h de incubação.

TABELA A1 – Dados cristalográficos e refinamento de estrutura dos complexos.

	PdM1	PdM2	PdM3	PdD1	PdD2	PdD3
Formula	C ₂₇ H ₃₂ ClN ₃ OPdS	C ₂₇ H ₂₃ N ₄ O ₃ PPdS	C ₂₇ H ₂₃ FN ₃ OPdS	C ₂₇ H ₂₂ Cl ₂ N ₃ OPdS	C ₂₇ H ₂₂ N ₅ O ₅ PPdS	C ₂₇ H ₂₂ F ₂ N ₃ OPdS
<i>D</i> _{calc.} / g cm ⁻³	1.643	1.642	1.630	1.660	1.660	1.667
<i>μ</i> /mm ⁻¹	1.037	0.924	0.954	9.268	7.337	7.926
Formula Weight	610.411	620.92	593.91	644.80	665.92	611.90
Size/mm ³	0.09×0.07×0.02	0.13 × 0.102 × 0.045	0.10×0.09×0.04	0.194 × 0.068 × 0.026	0.173 × 0.019 × 0.014	0.20×0.07×0.03
<i>T</i> /K	99.99(11)	99.99(10)	100(2)	100(2)	100(2)	100(2)
Crystal System	monoclinic	monoclinic	monoclinic	monoclinic	monoclinic	monoclinic
Space Group	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>
<i>a</i> /Å	13.9759(2)	13.8805(4)	14.0308(3)	13.75070(11)	14.87475(14)	14.12270(10)
<i>b</i> /Å	10.8671(1)	10.9848(3)	10.8646(2)	11.18877(5)	9.00577(9)	10.79360(10)
<i>c</i> /Å	17.4067(3)	17.4559(5)	17.1197(4)	17.70954(14)	20.6317(2)	17.20800(10)
<i>α</i> /°	90	90	90	90	90	90
<i>β</i> /°	111.065(2)	109.339(3)	111.981(3)	108.7049(9)	105.3890(10)	111.6430(10)
<i>γ</i> /°	90	90	90	90	90	90
<i>V</i> /Å ³	2467.02(7)	2511.41(13)	2420.00(10)	2580.76(3)	2664.70(5)	2438.17(4)
<i>Z</i>	4	4	4	4	4	4
<i>Z</i> '	1		1			1
Wavelength/Å	0.71073		0.71073			1.54184
Radiation type	Mo Kα	Mo Kα	MoK _α	CuKα	CuKα	CuK _α
<i>Q</i> _{min} /°	2.43	4.84	2.442	9.502	8.89	4.943
<i>Q</i> _{max} /°	25.68	51.362	25.680	148.99	140.138	70.059
Measured Refl.	78147	30848	28990	49976	23183	27049
Independent Refl.	4679	4767	4596	5261	4959	4629
Reflections with <i>I</i> > 2(<i>I</i>)	4399	4767	4055	5261	4959	4416
<i>R</i> _{int}	0.0345	0.0482	0.0339	0.0539	0.0537	0.0398
Parameters	342	335	317	326	362	326
Restraints	0	0	0	0	0	0
Largest Peak	0.3903	4.90	0.580	0.90	0.91	0.610
Deepest Hole	-0.2725	-1.50	-0.321	-0.77	-0.67	-0.375
GooF	1.0465	1.152	1.045	1.069	1.044	1.068
<i>wR</i> ₂ (all data)	0.0436	0.1821	0.0556	0.0720	0.0776	0.0569
<i>wR</i> ₂	0.0430	0.1751	0.0521	0.0709	0.0758	0.0562
<i>R</i> ₁ (all data)	0.0195	0.0752	0.0295	0.0273	0.0327	0.0235

R_1	0.0178	0.0669	0.0232	0.0262	0.0302	0.0224
-------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

TABELA A2 – Dados cristalográficos e refinamento de estrutura dos ligantes M1 e D2.

	M1	D2
Formula	C ₉ H ₁₀ ClN ₃ OS	C ₉ H ₉ N ₅ O ₅ S
$D_{calc.}/g\ cm^{-3}$	1.542	1.642
m/mm^{-1}	4.896	2.699
Formula Weight	243.71	299.27
Colour	clear light white	yellow
Shape	prism	plate
Size/mm ³	0.18×0.14×0.06	0.15×0.05×0.05
T/K	100.00(10)	100.00(11)
Crystal System	triclinic	monoclinic
Space Group	<i>P</i> -1	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>
<i>a</i> /Å	6.7491(2)	11.9693(3)
<i>b</i> /Å	7.2206(2)	5.28721(16)
<i>c</i> /Å	11.5963(4)	19.6536(6)
<i>a</i> °	80.504(3)	90
<i>b</i> °	84.905(2)	103.203(3)
<i>g</i> °	70.423(3)	90
<i>V</i> /Å ³	524.81(3)	1210.88(7)
<i>Z</i>	2	4
<i>Z</i> '	1	1
Wavelength/Å	1.54184	1.54184
Radiation type	CuK _α	Cu K _α
$Q_{min}/^{\circ}$	3.867	3.793
$Q_{max}/^{\circ}$	79.539	79.406
Measured Refl.	11899	11351
Independent Refl.	2262	2569
Reflections with <i>I</i> > 2(<i>I</i>)	2101	2248
<i>R</i> _{int}	0.0531	0.0525
Parameters	138	183
Restraints	0	0
Largest Peak	0.601	0.473
Deepest Hole	-0.424	-0.365
GooF	1.202	1.057
<i>wR</i> ₂ (all data)	0.1590	0.1338
<i>wR</i> ₂	0.1581	0.1278
<i>R</i> ₁ (all data)	0.0566	0.0537
<i>R</i> ₁	0.0546	0.0472

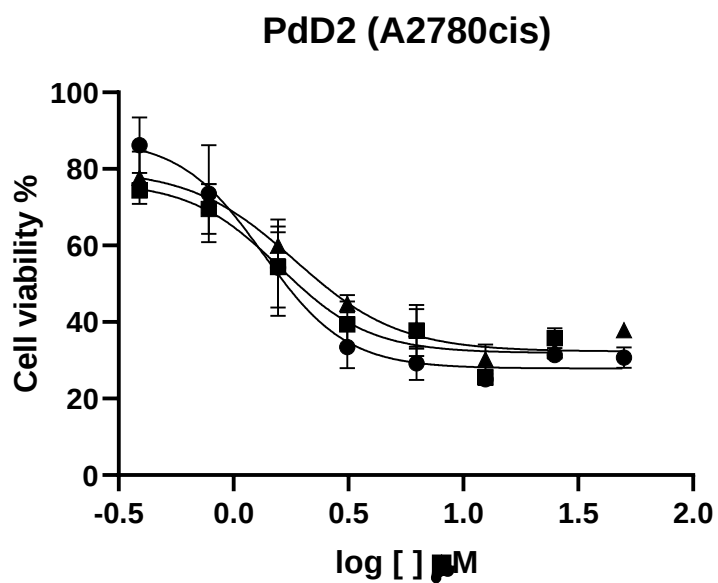


FIGURA A59 – Curvas de concentração–resposta das células tumorais A2780cis tratadas com o composto PdD2 após 48 horas de incubação.

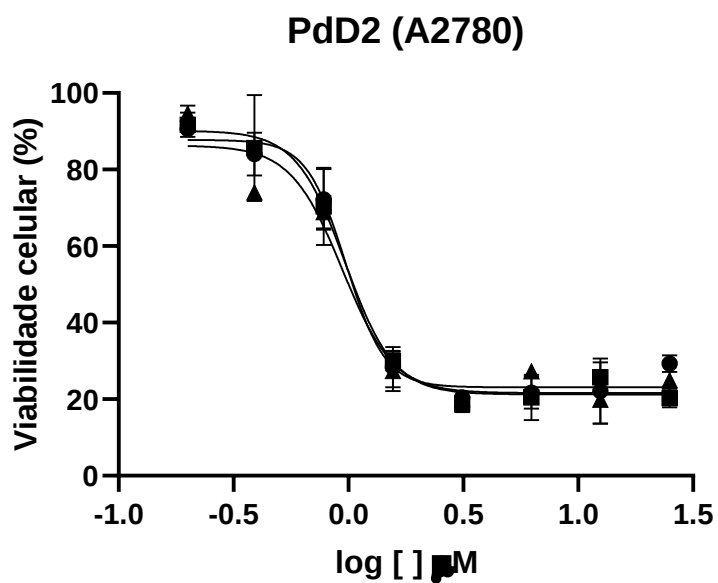


FIGURA A60 – Curvas de concentração–resposta das células tumorais A2780 tratadas com o composto PdD2 após 48 horas de incubação.

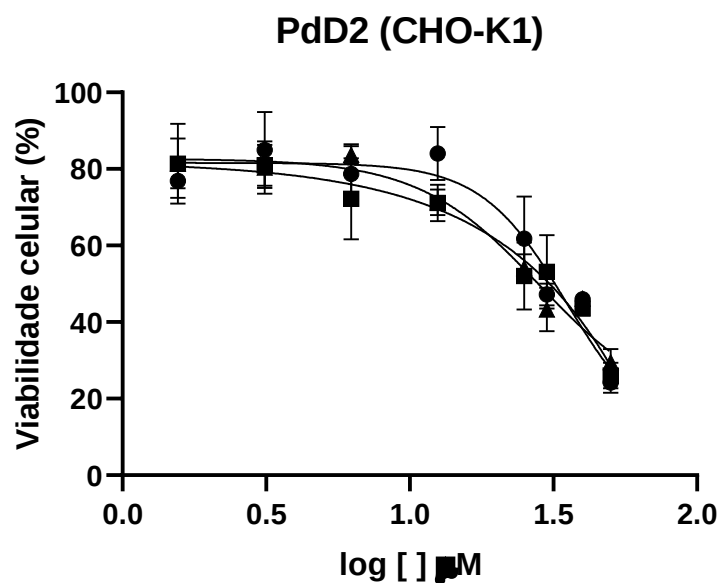


FIGURA A61 – Curvas de concentração–resposta das células tumorais CHO-K1 tratadas com o composto PdD2 após 48 horas de incubação.

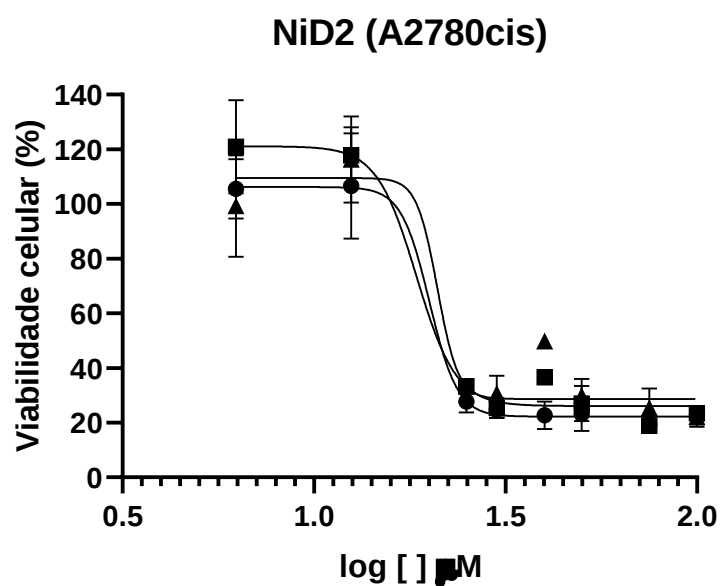


FIGURA A62 – Curvas de concentração–resposta das células tumorais A2780cis tratadas com o composto NiD2 após 48 horas de incubação.

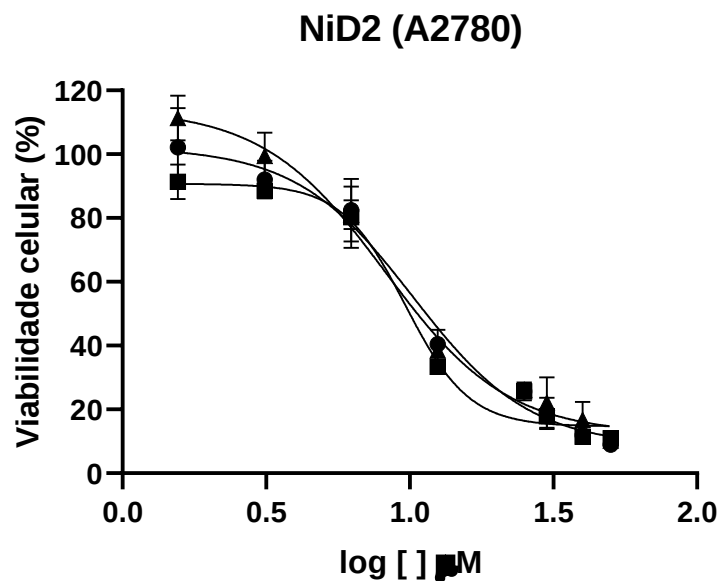


FIGURA A63 – Curvas de concentração–resposta das células tumorais A2780 tratadas com o composto NiD2 após 48 horas de incubação.

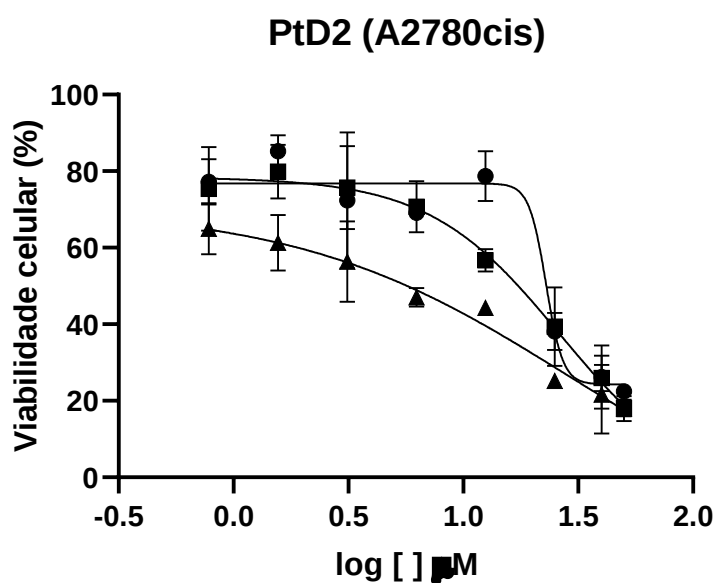


FIGURA A64 – Curvas de concentração–resposta das células tumorais A2780cis tratadas com o composto PtD2 após 48 horas de incubação.

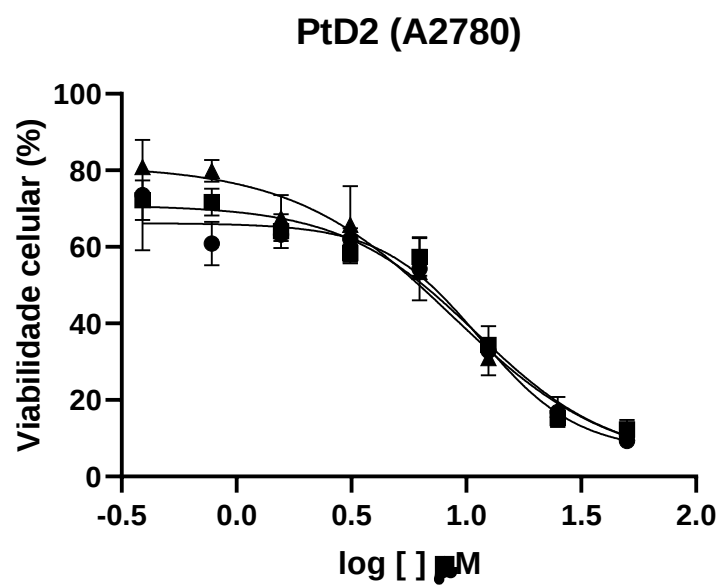


FIGURA A65 – Curvas de concentração–resposta das células tumorais A2780 tratadas com o composto PtD2 após 48 horas de incubação.