

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

**“Síntese e Caracterização de Complexos de Pd(II) com
Potencial atividade Citotóxica e Inibidores das
enzimas Topoisomerase II”.**

Mauro Almeida Lima*

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

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

São Carlos - SP
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Mauro Almeida Lima, realizada em 29/05/2018:

Fillipe Vieira Rocha

Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha
UFSCar

Adelino Netto

Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto
UNESP

Moacir Rossi Forim

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim
UFSCar

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo o que existe, e por poder estudar a natureza e conhecê-lo mais por meio dela.

Agradeço à minha família, ao meu pai Eldison, minha mãe Marilze e meu irmão Vitor, pelo apoio contínuo, pelo carinho e amor que vocês me dão, em especial a minha mãe que leu toda a minha dissertação (☺). Agradeço a todos integrantes da família Almeida e Lima.

Agradeço ao Prof. Dr. Fillipe V. Rocha por todo apoio e atenção, por estar sempre disposto a ensinar e trabalhar em equipe. Obrigado Fillipe pela oportunidade de realizar esta pesquisa!

Agradeço aos colegas de laboratório: Daniel, Lucas, Belém (Herisson), Vitor (Vitão), Gabriela, Ludimila, Vinicius e Fábio (LOL). Agradeço a todos pela amizade, companhia e trocadilhos ruins que reunimos nesse tempos.

Agradeço também aos meus amigos da ABU pelas boas conversas, cinema e rolês, mas principalmente por crescer com vocês, aprendendo mais e mais sobre a Vida, a Verdade e o Universo (sabemos que a resposta não é 42).

Ao Prof. Dr. Vitor Deflon (IQSC-USP), pela resolução das estruturas cristalográficas

Ao Instituto Federal Goiano por fornecer os softwares e as bases de dados utilizados nos cálculos computacionais de DFT.

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

Palavra	Abreviatura
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Topoisomerase II α	TOPOIIA
N -Metil-2-(1-metil-3-fenilprop-2-en-1-ilideno)hidrazinacarbotioamida	TSC-CC
(+)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinil-1-il) propana	ICRF-187
Glutamina	Gln
Arginina	Arg
Ácido etilenodiamino tetra-acético	EDTA
Albumina de soro bovino	BSA
células tumorais de pulmão pequenas	SCLC
células tumorais de pulmão não pequenas	NSCLC
Dimetilsulfóxido	DMSO
Tetraidrofurano	THF
Dimetilformamida	DMF
<i>Ligand-to-metal charge-transfer</i>	LMCT
<i>Metal-to-ligand charge-transfer</i>	MLCT

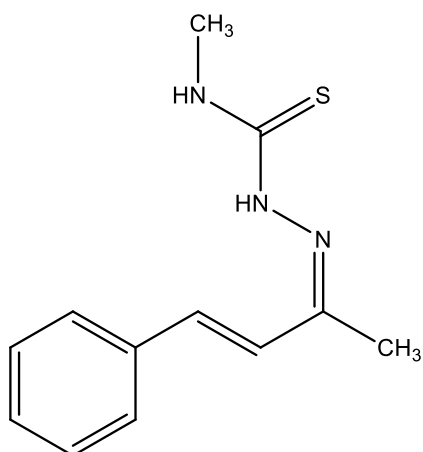
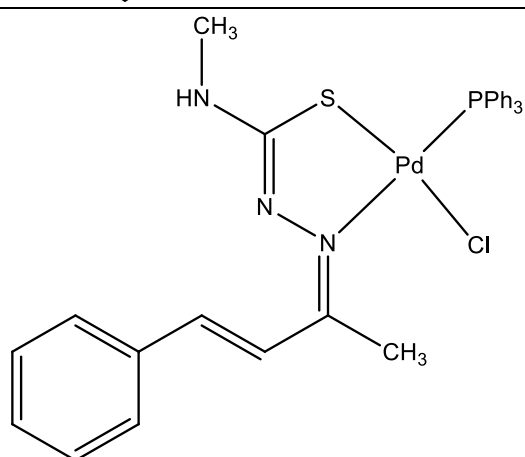
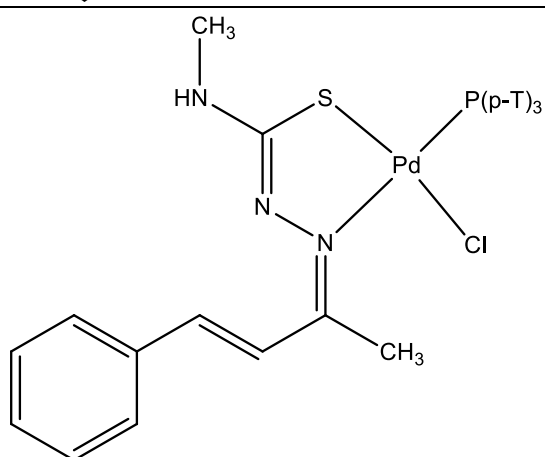
LISTA DE TABELAS

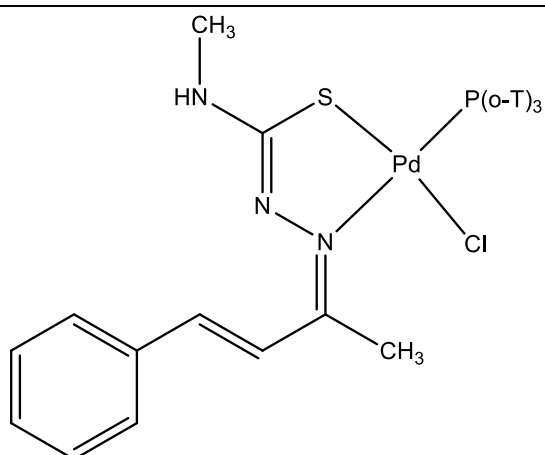
TABELA 3.1 - Reagentes e suas respectivas procedências.	20
TABELA 4.1 - Temperaturas de fusão dos complexos de 1 a 6 . (°C).....	30
TABELA 4.2 - Seleção de comprimento e ângulos de ligações dos monocristais 2 e 3	32
TABELA 4.3 - Principais frequências na região de infravermelho e atribuições.	35
TABELA 4.4 - Deslocamentos químicos de RMN ¹ H do TSC-CC e complexos	37
TABELA 4.5 - Comparação dos dados experimentais (Ex) e teóricos (T) da transição de maior intensidade e a maior contribuição dos orbitais calculados.	48
TABELA 4.6 - Valores experimentais de comprimento de onda de maior intensidade e suas atribuições.....	49
TABELA 4.7 - Dados de IC ₅₀ (μmol·L ⁻¹) e Índice de Seletividade (SI).	51

LISTA DE FIGURAS

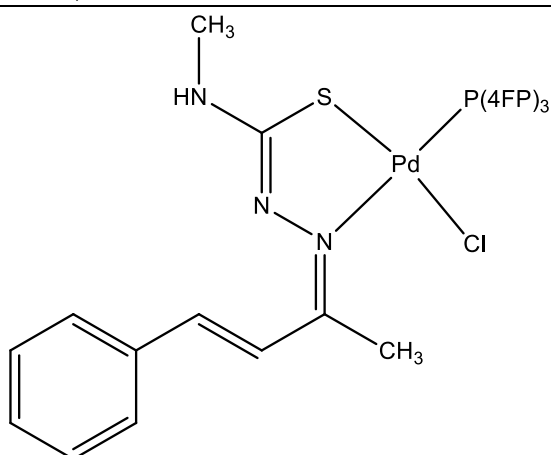
FIGURA 1.1 - Os 10 cânceres com maior incidência e mortalidade do mundo em 2012 por sexo.(adaptado) ⁴	2
Figura 1.2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma*. ⁵	3
FIGURA 1.3 - Estrutura da cis-diaminodicloroplatina.....	4
FIGURA 1.4 - Ciclo catalítico da topoisomerase II. Domínios da ATPase estão apresentados em azul claro, o domínio nuclear está representado por azul escuro. ¹⁷	5
FIGURA 1.5 - Estrutura do etopósido (A) e a doxorubicina (B).....	7
FIGURA 1.6 - Estrutura da aclarrubicina, suramina, novobiocina e ICRR-187.8	
FIGURA 1.7 - Estrutura química e numeração das tiossemicarbazonas segundo a IUPAC.....	9
FIGURA 1.8 - Estrutura da tiossemicarbazona 4i ($R^1 = OCH_3$, $R^2 = Ph$). (adaptado).....	9
FIGURA 1.9 - Estrutura geral das tiossemicarbazonas sintetizadas por de OLIVEIRA et al. (2017) ³⁰ .(adaptado).....	10
FIGURA 1.10 - Esquema geral de uma fosfina do tipo PR_3	11
FIGURA 1.11 - Estrutura dos complexos 1 , 3 , 4 e 6 de Au(I) estudados por GANDIN et al.....	12
FIGURA 1.12 - Estrutura dos complexos apresentados por BISCEGLIE et al. ⁴²	13
FIGURA 1.13 - Fórmula estrutural das tiossemicarbazonas sintetizadas por ZEGLIS et al. (2011) ⁴³	14
FIGURA 1.14 - Melhores posições ancoradas dos complexos metálicos de Cu(II) no domínio ATPase. Complexos de Cu(II) nas seguintes cores: amarelo, azul, cinza, verde e vermelho.....	15
FIGURA 1.15 - Esquema adaptado dos complexos apresentados por ROCHA et al. ⁴⁹	17
FIGURA 1.16 - Planejamento para as estruturas dos complexos do presente trabalho.	18
FIGURA 4.1 - Esquema da síntese dos complexo 1 a 6	28
FIGURA 4.2 - Competição dos elétrons em torno do centro metálico.	29
FIGURA 4.3 - Estrutura ORTEP dos complexos 2 e 3 com elipsoide de 50% de probabilidade obtida pela análise de Difração de Raios X.	31
Figura 4.4 - Estrutura de N -Metil-2-(1-metil-3-fenilprop-2-en-1-ilideno)hidrazinacarbotoioamida (TSC-CC) com elipsoide de 50% apresentada por Rocha et al. ⁵⁶	32
FIGURA 4.5 - Sobreposição da estrutura de raios X difratada e estrutura calculada para o complexo 3	33
FIGURA 4.6 - Estrutura proposta para os complexos 1 e 4	33
FIGURA 4.7 - Espectros de IV dos complexos de Pd(II) obtidos e do ligante.34	
FIGURA 4.8 - Esquema da coordenação de TSC-CC ao metal Pd(II).	35

FIGURA 4.9 - Esquema geral dos complexos com as marcações para a análise dos espectros de RMN ^1H .	36
FIGURA 4.10 - Espectro de RMN ^1H em clorofórmio (d_1) do composto TSC-CC	37
FIGURA 4.11 - Esquema de rotação em N3	38
FIGURA 4.12 - Espectro de RMN ^1H em clorofórmio (d_1) do composto 1	39
FIGURA 4.13 - Efeito anisotrópico causado sobre NHCH_3	39
FIGURA 4.14 - Demonstração dos efeito indutivo (setas vermelhas) causado pela ligação N-Pd	40
FIGURA 4.15 - Espectro de RMN ^1H em clorofórmio (d_1) do composto 2	41
FIGURA 4.16 - Espectro de RMN ^1H em clorofórmio (d_1) do composto 3	41
FIGURA 4.17 - Espectro de RMN ^1H em clorofórmio (d_1) do composto 4	42
FIGURA 4.18 - Espectro de RMN ^1H em clorofórmio (d_1) do composto 5	43
FIGURA 4.19 - Espectro de RMN ^1H em clorofórmio (d_1) do composto 6	43
FIGURA 4.20 - Espectro de RMN ^{31}P da tri(p-toluil)fosfina.	44
FIGURA 4.21 - Espectro de RMN P^{31} dos compostos 1 a 6	45
FIGURA 4.22 - Espectros eletrônicos de UV-Vis dos complexos e ligante TSC-CC	46
FIGURA 4.23 - Sobreposição do espectro experimental e teórico para o complexo 4 .	47
FIGURA 4.24 - Representação esquemática da transição de maior contribuição do estado 11 (Complexo 4)	48
FIGURA 4.25 - Gráfico em barras com valores de logP para os complexos de 1 a 6 .	50
FIGURA 4.26 - Espectros de absorção de titulação espectroscópica na região do UV-vis do complexo 4 de Pd(II) em DMSO	54
FIGURA 4.27 - Representação esquemática das formas do DNA plasmideal observadas por eletroforese em gel de agarose. ⁵³	55
FIGURA 4.28 - Incubação do plasmídeo superenovelado com os compostos 1 , 4 , 5 por 24h. Linha 1: plasmídeo/DMSO (3,3% (v/v)). Linha 2: cisplatina. (Linha 3: 1 ($0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 4: 1 ($0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 5: 1 ($3,1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 6: 1 ($12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 7: 4 ($0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 8: 4 ($0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 9: 4 ($3,1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 10: 4 ($12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 11: 5 ($0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 12: 5 ($0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 13: 5 ($3,1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 14: 5 ($12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).	56
FIGURA 4.29 - Capacidade inibitória da enzima TOPOIIA pelos complexos 1 a 6 . Linha 1: plasmídeo (3,3% (v/v) DMSO). Linha 2: DNATopoisomerase plasmídeo. Linha 3: 1 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 4: 1 ($12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).Linha 5: 2 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 6: 2 ($1,25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).Linha 7: 3 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 8: 3 ($12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).Linha 9: 4 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 10: 4 ($12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 11: 5 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha12: 5 ($12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).Linha 13: 6 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha14: 6 ($12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).	57

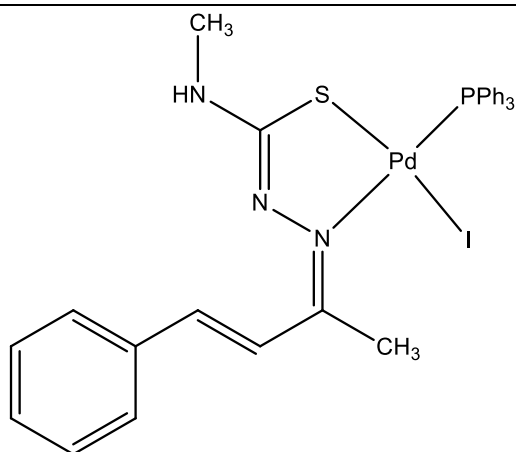
ESTRUTURAS E MASSAS MOLECULARES**TSC-CC**Massa molecular: 233.33 g mol⁻¹**[PdCl(PPh₃)TSC-CC] (1)**Massa molecular: 637.49 g mol⁻¹**[PdCl(P(p-T)₃)(TSC-CC)] (2)**Massa molecular: 679.57 g mol⁻¹



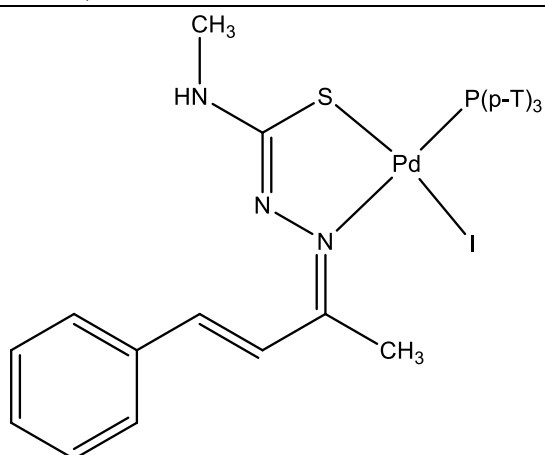
[PdCl(P(o-T)₃)(TSC-CC)] (3)
Massa molecular: 679.57 g mol⁻¹



[PdCl(P(4FP)₃)(TSC-CC)] (4)
Massa molecular: 691.46 g mol⁻¹



[PdI(PPh₃)(TSC-CC)] (5)
Massa molecular: 728.94 g mol⁻¹



[PdI(P(p-T)₃)(TSC-CC)] (6)
Massa molecular: 771.02 g mol⁻¹

RESUMO

“Complexos de Pd(II) como potenciais inibidores das enzimas Topoisomerase II”.

Sabe-se que o câncer é um conjunto de mais de 100 doenças as quais são a segunda maior causa de morte no mundo. Existem diversos fatores que se relacionam com o crescimento de tumores, abrindo portas para o planejamento de compostos com mecanismos de ação diferentes dos atuais. Um bom exemplo é a enzima TOPOIIA que é superexpressada em alguns tipos de câncer, como de pulmão e de mama, podendo se obter compostos que atuem na enzima para gerar uma maior seletividade. Nesse sentido, as tiossemicarbazonas se apresentam como possíveis inibidores enzimáticos, uma vez que possuem características estruturais que maximizam a interação com o alvo. Entretanto, têm-se observado que as tiossemicarbazonas demonstram maior capacidade inibitória quando complexadas, principalmente quando formam compostos planares. Nessa perspectiva, os complexos de paládio(II) surgem como uma alternativa na obtenção de agentes citotóxicos e inibidores da TOPOIIA. No presente trabalho foram sintetizados complexos de Pd(II) do tipo $[PdXPR_3TSC]$ ($X=Cl, I$; $PR_3=$ trifenilfosfina, tri(*p*-toluil)fosfina, tri(*o*-toluil)fosfina, tris(4-fluorofenil)fosfina; $TSC=N$ -Metil-2-(1-metil-3-fenilprop-2-en-1-ilideno)hidrazinacarbotoamida), sendo todos caracterizados pelas técnicas de RMN, IV, UV-Vis, difração de raios X, temperatura de fusão, condutividade e análise elementar. Todos os compostos tiveram sua citotoxicidade investigada frente às linhagens celulares MDA-MB-231, A549 e MCR5. Os resultados obtidos foram comparados com o da cisplatina. Entre os complexos sintetizados destacaram-se os $[PdCl(PPh_3)(TSC-CC)]$, $[PdCl(4FP)(TSC-CC)]$ e $[PdI(PPh_3)(TSC-CC)]$ com valores de IC_{50} frente a MDA-MB-231 de 0,89; 0,56; 1,04 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Vale destacar que além de serem mais ativos do que a cisplatina, apresentaram um maior índice de seletividade. Ensaio visando a compreensão de um possível alvo biológico foram realizados, através de estudos de interação com biomoléculas. Os ensaios por titulação espectroscópica e eletroforese com a molécula de DNA, demonstraram uma fraca ou nenhuma interação com o DNA, descartando-o como um possível alvo. Já os resultados oriundos dos testes de inibição da enzima TOPOIIA indicaram uma possível relação entre a citotoxicidade e a capacidade de inibição dos complexos, uma vez que os compostos com maior atividade antiproliferativa foram os que apresentaram maior taxa de inibição da enzima. Os complexos mais promissores foram duas vezes mais ativos do que o etopósido, droga padrão para inibição da TOPOIIA. Esses resultados indicam o potencial antineoplásico dos complexos sintetizados.

ABSTRACT

“Palladium(II) complexes as potential inhibitors of Topoisomerase II enzymes”.

It is known that cancer is a set of more than 100 diseases which are the second largest cause of death in the world. There are several factors related to the growth of tumors, showing different pathway for the planning of new compounds with distinct mechanisms of action. A good example is topoisomerase II enzyme that is overexpressed in some types of cancer, such as lung and breast, in order to afford compounds that act on the enzyme to obtain a better selectivity. In this sense, thiosemicarbazones are presented as possible enzymatic inhibitors, since they have structural features that maximize the interaction with the target. However, it has been observed that thiosemicarbazones demonstrate greater inhibitory capacity when complexed, especially when they form planar complexes. In this perspective, palladium (II) complexes appear as an interesting alternative to obtain compounds with high cytotoxicity and capable to inhibit the action of TOPOIIA. In this work, it were synthesized 6 palladium (II) compounds of the type $[PdXPR_3TSC]$ ($X = Cl, I$, $PR_3 =$ triphenylphosphine, tri(*p*-toluyl)phosphine, tri(*o*-toluyl)phosphine, tris(4-fluorophenyl)phosphine, $TSC =$ 1-methyl-3-phenylprop-2-en-1-ylidene hydrazinecarbothioamide. Complexes 1-6 were characterized by the NMR, IR, UV-Vis, X-ray diffraction, melting point, conductivity and elemental analysis. All compounds had their cytotoxicity investigated against MDA-MB-231, A549, MCR5 cell lines. The results obtained were compared with cisplatin. The compounds $[PdCl(PPh_3)(TSC-CC)]$ (**1**), $[PdCl(4FP)(TSC-CC)]$ (**4**) and $[PdI(PPh_3)(TSC-CC)]$ (**5**) showed better IC_{50} values against MDA-MB-231, 0.89; 0.56; 1.04 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, besides being more active than cisplatin, they presented a higher index of selectivity. Electrophoresis and DNA titration assays were performed to investigate the interaction between complexes and DNA molecule. The results showed a weak or no interaction between them, thus DNA was discarded as a possible target. However, data from the TOPOIIA enzyme inhibition assay indicated a possible relationship between cytotoxicity and the inhibition capacity of the complexes, since the compounds with the highest antiproliferative activity were those with the highest inhibition rate. Complexes **1**, **4** and **5** were twice more active than etoposide, standard drug for inhibition of TOPOIIA. These results indicate the antineoplastic potential of the synthesized complexes.

SUMÁRIO

1 - Introdução	1
1.1 - Câncer.....	1
1.2 - DNA.....	3
1.3 - DNA-topoisomerase (II).....	4
1.3.1 - Venenos e inibidores catalíticos	6
1.4 - Tiossemicarbazonas.....	8
1.5 - Fosfinas.....	11
1.6 - Complexos Metálicos.....	12
1.6.1 - Paládio	16
1.7 - Planejamento	17
2 - Objetivos	19
2.1 - Objetivo geral	19
2.2 - Objetivos Específicos	19
3 - Experimental	20
3.1 - Sínteses	20
3.1.1 - Reagentes	20
3.1.2 - Metodologia sintética	20
3.1.2.1 - Síntese TSC-CC	20
3.1.2.2 - Síntese $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$	20
3.1.2.3 - Síntese $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{TSC-CC})]$ (1)	21
3.1.2.4 - Síntese $[\text{PdCl}(\text{Pp-T})(\text{TSC-CC})]$ (2).....	21
3.1.2.5 - Síntese $[\text{PdCl}(\text{Po-T})(\text{TSC-CC})]$ (3).....	21
3.1.2.6 - Síntese $[\text{PdCl}(4\text{FP})(\text{TSC-CC})]$ (4).....	22
3.1.2.7 - Síntese $[\text{PdI}(\text{PPh}_3)(\text{TSC-CC})]$ (5).....	22
3.1.2.8 - Síntese $[\text{PdI}(\text{Pp-T})(\text{TSC-CC})]$ (6)	22
3.2 - Determinação do ponto de fusão	22
3.3 - Medidas de condutividade iônica	23
3.4 - Difração de Raios X de monocristal.....	23
3.5 - Cálculos computacionais.	23
3.6 - Espectrometria vibracional na região do Infravermelho	23
3.7 - Ressonância magnética nuclear	24
3.8 - Espectrofotometria eletrônica na região do UV-Visível	24
3.9 - Citotoxicidade	24
3.10 - Interação com DNA	25
3.10.1 - Interação com plasmídeo surperenovelado	25
3.10.2 - Titulação espectroscópica	25

3.11 - Inibição da enzima DNA-Topoisomerase II.....	26
3.12 - Medida de lipofilicidade (logP)	27
4 - Resultados e discussão	28
4.1 - <i>Dados dos complexos</i>	28
4.2 - Caracterização	29
4.3 - Difração de Raios X de monocristal.....	30
4.4 - <i>TD-DFT</i>	32
4.5 - <i>Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho</i>	34
4.6 - Ressonância magnética nuclear	36
4.6.1 - <i>RMN ¹H</i>	36
4.6.2 - <i>RMN ³¹P</i>	44
4.7 - Espectrofotometria eletrônica na região do UV-Visível	45
4.8 - Medida de lipofilicidade (logP)	49
4.9 - Citotoxicidade	50
4.10 - Interação com DNA	53
4.10.1 - Titulação espectroscópica	53
4.10.2 - Interação com plasmídeo surperenovelado	54
4.11 - Inibição da enzima DNA-Topoisomerase II α	56
5 - Considerações finais.....	59
5.1 - Conclusões.....	59
6 - Referências bibliográficas	60
7 - Apêndices	66

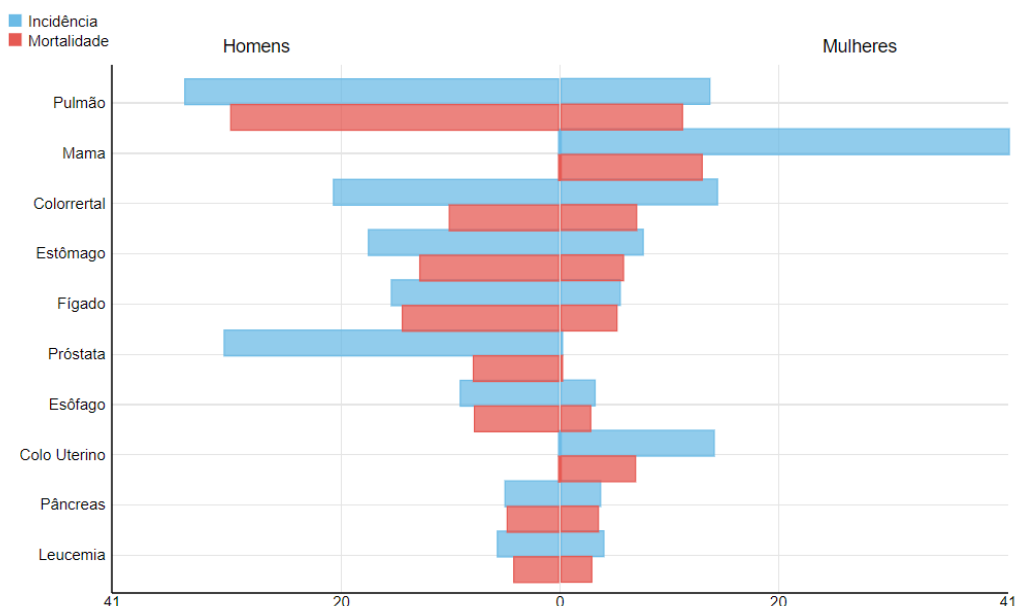
1 - Introdução

1.1 - Câncer

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças causadas por mutações no gene de uma célula normal, muitas vezes essas mutações são percebidas pelo próprio corpo, resultando na eliminação das células modificadas, todavia é possível que as células neoplásicas superem o sistema imune, e comecem a se proliferar, as células neoplásicas não apresentam mais as funções que antes apresentavam, desse modo, estas células menos especializadas podem impedir o funcionamento correto do seu tecido de origem.¹

As células cancerosas são caracterizadas por seu ciclo ininterrupto de multiplicação aglomerando-se até a formação de um tumor. Quando as células desse tumor se desprendem e espalham pelo organismo invadindo outros tecidos estabelecendo a formação de um novo tumor dar-se-à o nome de metástase.^{1,2}

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) o câncer é a segunda maior causa de morte em todo mundo, em estimativas de 2015, 1 a cada 6 pessoas foram a óbito devido à algum tipo de câncer. Os tipos de câncer com maior incidência são: pulmão, mama, colo e próstata, sendo que entre esses tipos de câncer o de pulmão possui maior incidência e mortalidade (FIGURA 1.1).³

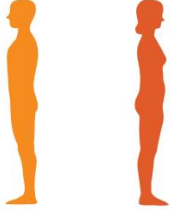


Data source: GLOBOCAN 2012
 Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>)
 © International Agency for Research on Cancer 2018

International Agency for Research on Cancer
 World Health Organization

FIGURA 1.1 - Os 10 cânceres com maior incidência e mortalidade do mundo em 2012 por sexo.(adaptado)⁴

Já o INCA (Instituto Nacional do Câncer) estima que para os anos de 2018 e 2019 haverá ocorrência de mais 600 mil novos casos de câncer por ano, em todo o Brasil. Segundo a mesma estimativa, os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina são os de maior incidência nacional (FIGURA 1.2). Conforme a Estimativa 2018 o Brasil apresenta um perfil de país em desenvolvimento com elevada mortalidade de câncer de próstata entre os homens, embora este tipo de câncer tem grande percentual de cura se diagnosticado previamente. Semelhantemente, a alta incidência de câncer do colo do útero pode ser associada, em muitos casos, ao vírus *papilomavírus humano* (HPV), que pode ser evitado com uso de vacinas.⁵

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		Homens Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1.2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma*. ⁵

O tratamento do câncer pode ser realizado por meio de diversas técnicas colaborativamente, sendo as mais utilizadas: a cirurgia, aplicada quando é possível remover o tumor; radioterapia, que consiste no uso de raios ionizantes para degradação da massa tumoral; quimioterapia que dispõe de compostos químicos para atingirem as células cancerosas levando à morte celular. ⁶

A quimioterapia é muito importante para o tratamento do câncer, principalmente por ter acesso a todo o corpo, usando as vias sanguíneas. A distribuição do quimioterápico pelos tecidos possibilita a ação antineoplásica sobre áreas de difícil acesso para a cirurgia, ou em restos de tecido tumoral que não foram retirados após um procedimento cirúrgico. ⁷

1.2 - DNA

Um dos principais alvos contra o câncer é o DNA, responsável por controlar o metabolismo celular, incluindo a mitose, produção de proteínas, dentre outras funções. Uma vez que a biomolécula é responsável em transmitir o material genético para as células filhas é natural que o DNA de células cancerosas seja o principal alvo terapêutico contra o câncer. Modificações irreparáveis em sua estrutura podem ocasionar a morte celular programada da célula, apoptose, interrompendo sua proliferação ⁷.

Entretanto, a distinção entre células tumorais e não tumorais pelos quimioterápicos é pouco efetiva, acarretando no surgimento de efeitos colaterais. Tal evento gera a morte de diversas células, principalmente as células de intensa multiplicação como as do estômago, dos folículos capilares, da pele e outros tecidos que sempre estão em reposição. ⁸ Além

dos efeitos adversos supracitados, quando ocorre uma modificação na estrutura do DNA existe a possibilidade de gerar novas mutações devido a capacidade mutagênica de alguns compostos.^{8,9}

Um dos quimioterápicos mais utilizados atualmente é a cisplatina (FIGURA 1.3) [cis-diaminodicloroplatina(II)]. Após a sua descoberta e início do seu uso contra o câncer de testículo, mais de 90% dos casos foram tratados com sucesso.¹⁰ Devido a sua estrutura plana e a presença de ligantes lábeis, a cisplatina pode se ligar covalentemente à molécula do DNA via coordenação de bases nitrogenadas ao íon metálico. Essa ligação provoca danos ao DNA levando as células ao processo de apoptose. Porém, como a maioria dos agentes anticâncer a cisplatina apresenta severos danos colaterais e restrito espectro de atividade, ou seja, é eficaz somente frente a específicos tipos de câncer.¹¹

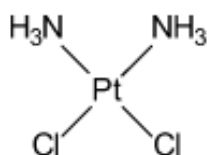


FIGURA 1.3 - Estrutura da cis-diaminodicloroplatina

Portanto, busca-se o desenvolvimento de compostos mais específicos, que atuem majoritariamente sobre células cancerosas e possuam outros alvos terapêuticos.⁹

1.3 - DNA-topoisomerase (II)

As DNA-topoisomerasas são enzimas que normalmente são superexpressadas em células de alta proliferação celular como as células cancerosas e, por isso, estas enzimas são alvos frequentes de agentes quimioterápicos. A interação de compostos com as DNA-topoisomerasas pode levar a uma maior atividade citotóxica frente a células cancerosas em relação às células não tumorais, o que poderia acarretar menos efeitos colaterais.^{12,13}

As enzimas DNA-topoisomerases participam da replicação do DNA, da condensação cromossômica e segregação cromossômica¹⁴. No corpo humano são encontradas duas classes de topoisomerases, tipo I e tipo II.¹⁵ As enzimas topoisomerases do tipo I (TOPOI) possuem a função de produzir uma quebra em uma das fitas do DNA, o que possibilita diminuir a tensão de rotação do mesmo, permitindo a essa estrutura relaxada realizar diversas funções. Já a topoisomerase do tipo II (TOPOII) possui a capacidade de quebrar a dupla fita do DNA. Essa enzima é responsável pela decatenação do DNA. Para a realização do ciclo enzimático (FIGURA 1.4) é necessário consumo de duas moléculas de ATP (adenosina trifosfato) como fonte de energia.¹⁶

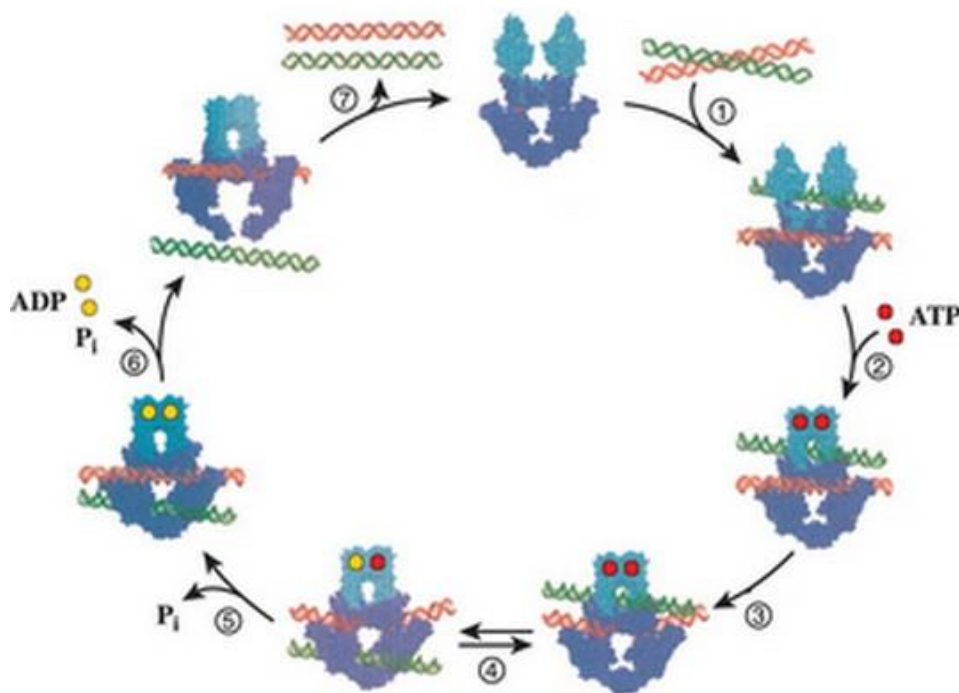


FIGURA 1.4 - Ciclo catalítico da topoisomerase II. Domínios da ATPase estão apresentados em azul claro, o domínio nuclear está representado por azul escuro.¹⁷

O ciclo inicia-se com a ligação da enzima a dois segmentos de dupla fita do DNA, chamados de segmento G (vermelho) e segmento T (verde) (etapa 1). Em seguida, duas moléculas de ATP se ligam à enzima. Isto está associado à dimerização do domínio da ATPase (etapa 2). Posteriormente, o segmento G é clivado (etapa 3) e o segmento T é transportado através de G rompido, o que é acompanhado pela hidrólise de

uma molécula de ATP (etapa 4). O segmento G é religado e a molécula de ATP restante é hidrolisada (etapa 5). Após a dissociação das duas moléculas de ADP (adenosina difosfato), o segmento de T é transportado por meio do domínio nuclear aberto (etapa 6). Por fim, o domínio nuclear é fechado e os domínios da ATPase reabrem, permitindo a dissociação do DNA (etapa 7).

As enzimas TOPOII se dividem em duas isoformas a topoisomerase-II α (TOPOIIA) e a topoisomerase-II β (TOPOIIB), ambas possuem o mesmo modo de ação. Assim, observa-se que comumente a isoforma TOPOIIA apresenta uma relação direta com os processos de transcrição e replicação do DNA, apresentando maior expressão em células cancerosas, entretanto, a expressão da TOPOIIB se mantém inalterada. Pela dependência com o ciclo celular a TOPOIIA é o alvo farmacológico de alguns quimioterápicos¹⁷. Além disso, a inibição da atividade da TOPOIIB frequentemente é associada ao surgimento de novos tumores e ou efeitos colaterais.^{18,19}

Os fármacos, que possuem a TOPOIIA como alvo, podem atuar em diferentes etapas do ciclo, contudo eles são divididos em duas categorias distintas, os venenos e os inibidores catalíticos.

1.3.1 - Venenos e inibidores catalíticos

Os venenos da topoisomerase atuam na etapa 4 do ciclo catalítico da enzima. Eles sendo responsáveis pela formação de um composto ternário estável fármaco-DNA-TOPOII, que aumenta a quebra das fitas do DNA, gerando intermediários que são tóxicos para as células, levando-as ao processo de morte celular. Exemplos de fármacos que possuem este modo de ação são: o etopósido e a doxorubicina (FIGURA 1.5).¹⁷

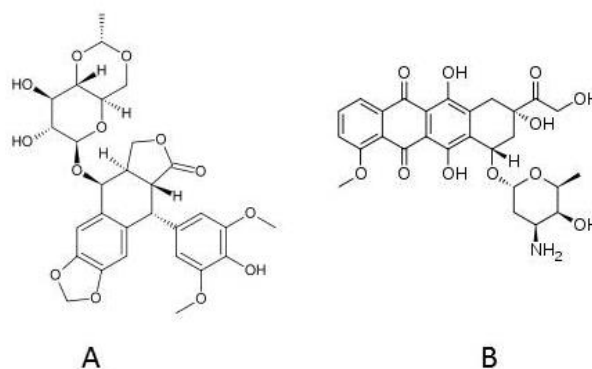


FIGURA 1.5 - Estrutura do etopósido (A) e a doxorubicina (B)

Infelizmente, estes fármacos possuem efeitos adversos como o mielossupressão (etopósido), cardiotoxicidade (doxorubicina), baixa solubilidade em água e desenvolvimento de tumores secundários. Nessa perspectiva é importante o desenvolvimento de novos fármacos capazes de atenuar os efeitos adversos e diminuir os riscos de tumores secundários.^{20,15}

Com esse intuito foi desenvolvida uma segunda classe de compostos capazes de interagir com a TOPOIIA de uma forma diferente dos venenos, conhecidos como inibidores catalíticos. Os novos inibidores podem atuar em diversas etapas do ciclo catalítico da enzima, afetando o funcionamento da proteína por diferentes vias. A aclarrubicina e suramina são responsáveis pela inibição da ligação DNA-TOPOII. Já o ICRF-187 estabiliza o complexo não covalente DNA-TOPOII e a novobiocina inibe a ligação do ATP-TOPOII (FIGURA 1.6). Inibidores catalíticos normalmente apresentam menor toxicidade ao corpo por não formarem o complexo DNA-TOPOII por ligação covalente. Pode-se destacar o ICRF-187 que além da atividade frente a enzima, também é capaz de atenuar a cardiotoxicidade gerada pela doxorubicina.¹⁷ Outra vantagem dos inibidores catalíticos é a seletividade entre as isoformas alfa e beta da topoisomeras II.^{12,15}

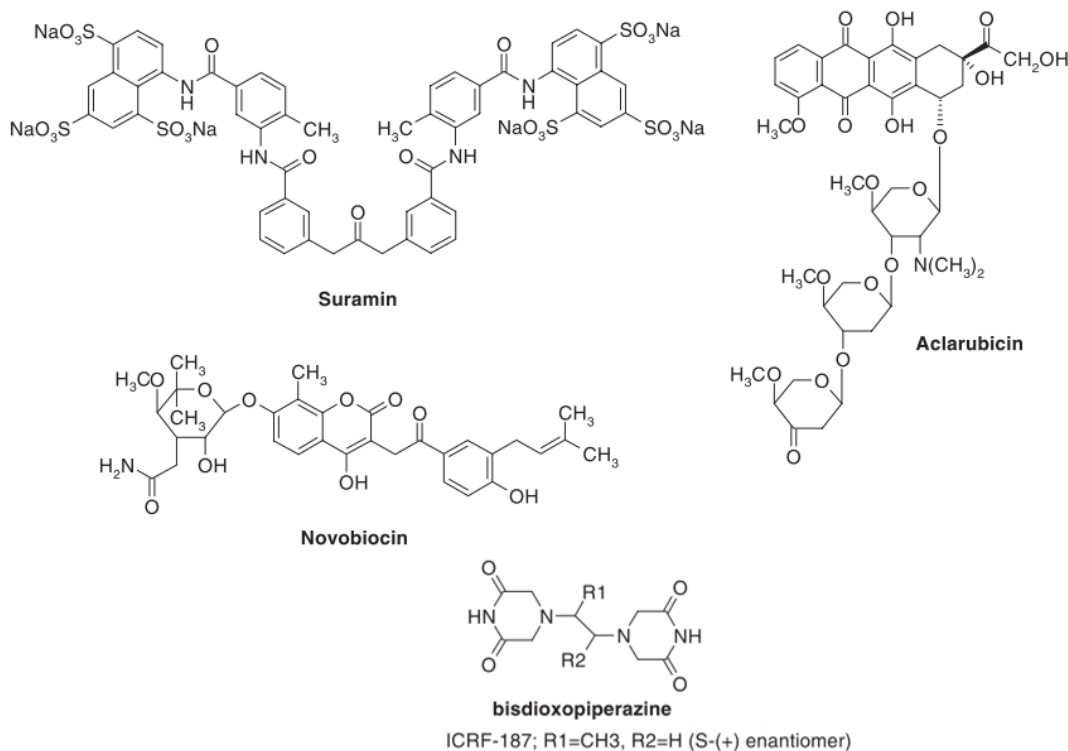
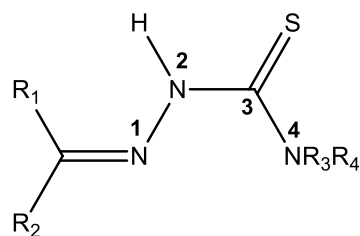


FIGURA 1.6 - Estrutura da aclarubicina, suramina, novobiocina e ICRR-187.

1.4 - Tiossemicarbazonas

Na literatura científica, constantemente são apresentados compostos com capacidade de inibir as enzimas topoisomerase. Dentre eles, as tiossemicarbazonas se destacam, pois apresentam alta atividade biológica, tais como antineoplásica; antimicrobiana; antiprotozoária; antifúngica.²²⁻²⁴

As aplicações das tiossemicarbazonas (TSC) são tão diversas quanto a sua diversidade estrutural, permitindo a realização de uma vasta gama de substituições, o que pode gerar diferentes respostas biológicas. Geralmente são obtidas por reações de condensação entre tiossemicarbazidas e cetonas e/ou aldeídos, são caracterizadas pelas sínteses simples com alto rendimento e uma variedade de possibilidades estruturais. A FIGURA 1.7 apresenta uma estrutura genérica das TSC.²⁵⁻²⁸



R1, R2, R3, R4 = H, alquil ou aril

FIGURA 1.7 - Estrutura química e numeração das tiossemicarbazonas segundo a IUPAC.

No trabalho de WANG et al.²⁹ podemos evidenciar a capacidade citotóxica de tiossemicarbazonas baseadas em nopionas (FIGURA 1.8). As TSCs foram testadas frente a várias linhagens: câncer de mama (MDA-MB-231), carcinoma cervical humano (Hela) e hepatocarcinoma humano (SMMC-7721). Entre todas as tiossemicarbazonas testadas a **4i** se destacou apresentando valores de IC₅₀ de 2.79 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 3.64 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e 2.65 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ nas linhagens celulares MDA-MB-231, Hela e SMMC-7721 respectivamente.²⁹

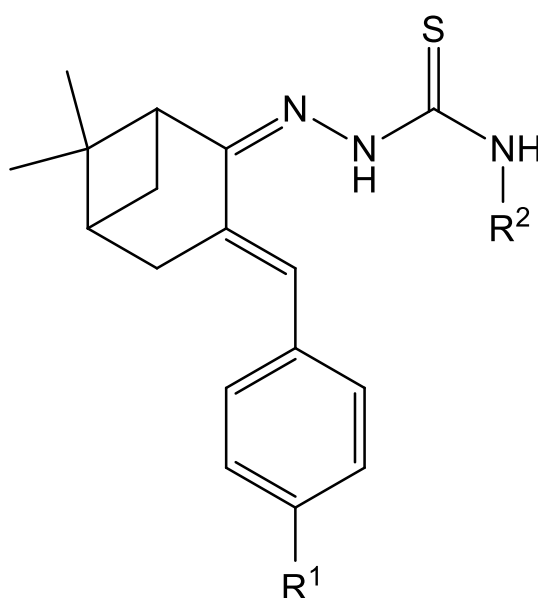


FIGURA 1.8 - Estrutura da tiossemicarbazona **4i** (R¹ = OCH₃, R² = Ph).
(adaptado)

OLIVEIRA et al. (2017)³⁰ demonstraram a capacidade das tiossemicarbazonas em atuarem como inibidores da enzima topoisomerase-II α . Foram sintetizadas 5 tiossemicarbazonas, partindo do indol-3-carboxaldeído, (FIGURA 1.9). Entre todas as tiossemicarbazonas, a **2b**

destacou-se com baixos valores de IG_{50} (Método que mede apenas a inibição da proliferação celular em 50%). As linhagens testadas foram escolhidas por serem células cancerosas associadas à superexpressão de TOPOIIA, tais como: glioma (U251), câncer de mama (MCF-7), carcinoma do ovário multirresistente (NCI-ADR / RES), renal (786-0), câncer do pulmão de células não pequenas (NCI-H460), ovário (OVCAR-3), cólon (HT-29) e leucemia (K-562). Exceto para NCI-ADR / RES em que IG_{50} foi de $6,48 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em todas as outras linhagens observou-se valores menores que $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

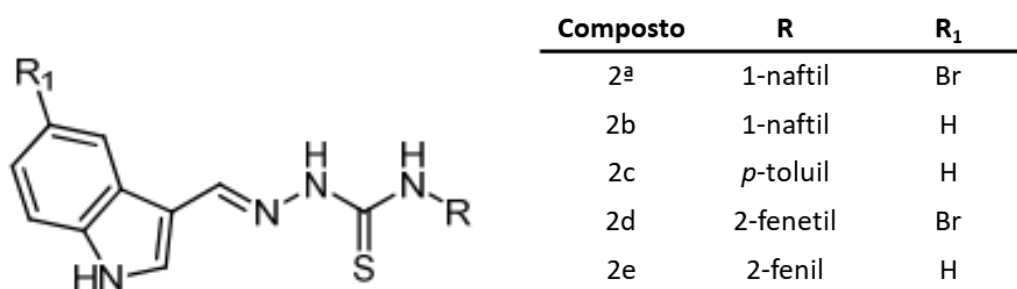


FIGURA 1.9 - Estrutura geral das tiossemicarbazonas sintetizadas por de OLIVEIRA et al. (2017)³⁰.(adaptado)

Para tiossemicarbazona **2b** (Figura 1.9) foi realizada a avaliação da inibição da TOPOIIA por relaxamento do DNA utilizando o ensaio de eletroforese. No ensaio, o DNA superenovelado (pUC19) foi incubado com a enzima durante 30 min a 37°C, como padrão positivo para inibição da TOPOIIA utilizou Ansacrina (m-AMSA). Tanto a tiossemicarbazona **2b** e o padrão n-AMSA foram incubados em duas concentrações (100 e $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). O resultado apresentado no gel. Demonstra a capacidade de **2b** de impedir em parte a ação da enzima sobre o plasmídeo pUC19.³⁰

É importante observar que ambas tiossemicarbazonas, **4i** e **2b**, aumentaram a interrupção do ciclo celular na fase G2/M, ou G2. Nessa fase é realizada uma avaliação no DNA, um *checkpoint*, que busca possíveis danos ao DNA como troca ou perda de um seguimento e replicação incompleta. O aumento de células que tiveram seu ciclo celular interrompido na fase G2/M pode estar associado a falhas na síntese de DNA, que acontece na fase anterior S. Essa fase corresponde a um processo de replicação, cuja inibição

da enzima TOPOIIA pode gerar um DNA com replicação incompleta ou um DNA defeituoso.^{29,30}

1.5 - Fosfinas

Fosfinas do tipo PR_3 (FIGURA 1.10) apresentam uma grande gama de possibilidades, e são utilizadas como agentes antioxidantes, na construção de organofosfinas e metalofosfinas. As fosfinas apresentam um par de elétrons capaz de formar ligações σ , e quando complexadas têm a possibilidade de fazer retrodoação devido ao acesso, pois os orbitais 3d não estão impedidos energeticamente. Fosfinas podem ser utilizadas em compostos para diversas aplicações tais como antineoplásicos, antimicrobianos, inseticidas, etc.³¹

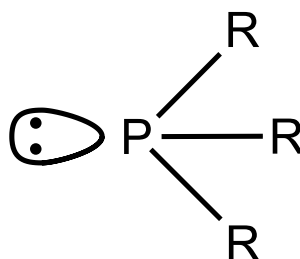


FIGURA 1.10 - Esquema geral de uma fosfina do tipo PR_3

Fosfinas possuem a capacidade de estabilizar alguns centros metálicos em diferentes estados de oxidação e, quando formam complexos, apresentam efeito *trans* acentuado, que auxilia na síntese e no planejamento desses complexos metálicos. Fosfinas do tipo PR_3 têm a possibilidade de mudança dos substituintes (R) utilizando diversas funções (FIGURA 1.10), normalmente grupos aquiril ou aril. Mudanças nestes grupos demonstram uma variedade de opção de fosfinas com diferentes aplicações. Substituintes mais doadores ou retiradores de elétrons podem influenciar o próprio centro metálico quanto a cinética e atividade biológica.^{32,33}

No meio biológico as fosfinas agem como antioxidantes, formando óxidos fosfínicos e atuam também aumentando a lipofilicidade de complexos metálicos, o que possibilita o transporte de complexos da matriz extracelular para intracelular. O seu forte efeito *trans* gera ligantes lábeis que podem ser facilmente trocados, possibilitando ligações covalentes com

diversos alvos. Fosfinas do tipo PR_3 também atuam na proteção estérica, podendo proteger um região ou ligante no complexo metálico, como também podem preencher espaços em sítios ativos de enzimas atuando como inibidores catalíticos. Essas diferentes propriedades tornam as fosfinas ligantes capazes de influenciar a farmacocinética dos compostos de coordenação.^{32,34}

GANDIN et al.³⁵ apresentam complexos de ouro(I) coordenados a trietilfosfina (FIGURA 1.11) com uma elevada citotoxicidade e capacidade de inibir as enzimas Tiorredoxina Redutase (TrxR1 e TrxR2) que são responsáveis pela redução de ligações específicas de dissulfetos e que atuam na síntese de DNA, na apoptose e outras funções.³⁶

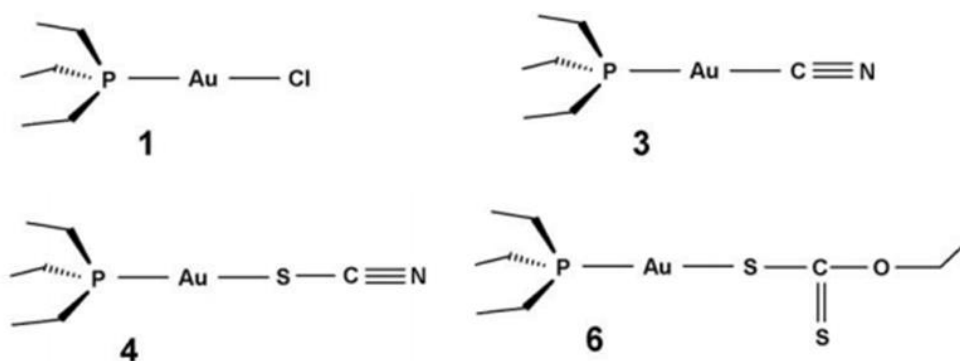


FIGURA 1.11 - Estrutura dos complexos 1, 3, 4 e 6 de Au(I) estudados por GANDIN et al.

Os complexos de Au(I) listrados na Figura 1.12 demonstraram valores de IC_{50} inferior a $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ quando testados nas seguintes linhagens tumorais, tais como, pulmão (A549), cólon (HCT-15), mama (MCF-7) e cervical (HeLa), leucemia (HL60) e melanoma (A375). Também foi observada que os mesmos complexos foram capazes de inibir as enzimas TrxR1 e TrxR2.

1.6 - Complexos Metálicos

O estudo de complexos metálicos no desenvolvimento de anti-neoplásicos se desenvolveu de forma acentuada, principalmente, após a

década de 70, quando a cisplatina foi aprovada pra o uso clínico como antineoplásico.¹⁰

Desde então, muito se têm estudado sobre a influência do centro metálico no meio biológico e como a estrutura do complexo relaciona-se com a atividade antineoplásica. Os complexos de metais de transição são versáteis e apresentam diferentes geometrias, podendo coordenar-se com diferentes moléculas orgânicas apresentando diferentes estados de oxidação. Além disso podem formar compostos com cargas positiva ou negativa.³⁷⁻⁴¹

BISCEGLIE et al.⁴² apresentam a síntese de diferentes tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II) e Ni(II). Estes compostos foram submetidos a ensaios de citotoxicidade frente a linhagem celular U937. Os resultados obtidos demonstraram uma maior atividade antiproliferativa para os complexos de Cu(II) comparada aos de Ni(II) que foram inativos. Analogamente, apenas os compostos de Cu(II) foram capazes de inibir a ação da enzima TOPOIIA. Os autores atribuíram essa disparidade na atividade devido as diferentes geometrias apresentadas para os complexos, quadrática plana para o Cu(II) e octaédrica para o Ni(II).

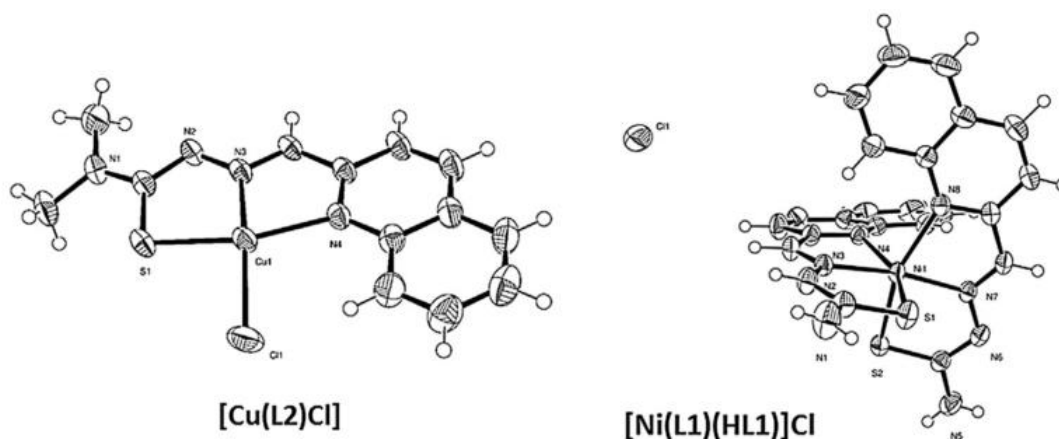


FIGURA1.12 - Estrutura dos complexos apresentados por BISCEGLIE et al.⁴²

ZEGLIS et al. (2011)⁴³, chegaram a uma conclusão semelhante, quando mostraram a potencialização da inibição da TOPOIIA e da atividade antiproliferativa frente a linhagens de células tumorais de mama humana usando tiossemicarbazonas complexadas com Cu(II) (FIGURA 1.13). Os complexos sintetizados apresentam a geometria quadrática plana. Novamente

os autores sugerem que a planaridade é um requisito fundamental para acentuar a interação entre a molécula e o sítio ativo da enzima TOPOIIA.

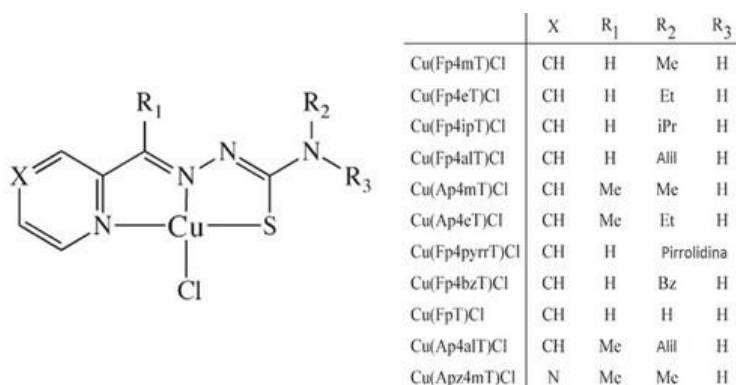


FIGURA 1.13 - Fórmula estrutural das tiossemicarbazonas sintetizadas por ZEGLIS et al. (2011)⁴³.

Utilizando a técnica computacional de docking molecular no domínio da ATPase e no domínio nuclear da enzima, foram calculadas quão forte são as ligações feitas nesses domínios e com quais aminoácidos os complexos então interagindo. O sítio da ATPase apresenta uma região com carga majoritária negativa, essa característica possibilita a inserção do complexo metálico com maior facilidade, uma vez que, os complexos de Cu(II) são positivamente carregados e a sua geometria plana facilita a entrada no sítio ativo gerando interações entre o complexo e a enzima. Nos testes realizados observou-se interações do tipo ligação de hidrogênio, as interações foram observadas com Arg32 e Gln35 (FIGURA 1.14).⁴²

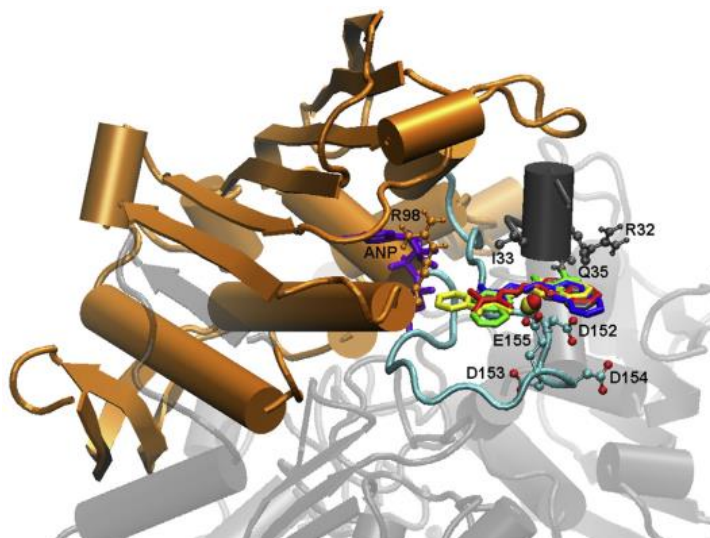


FIGURA 1.14 - Melhores posições ancoradas dos complexos metálicos de Cu(II) no domínio ATPase. Complexos de Cu(II) nas seguintes cores: amarelo, azul, cinza, verde e vermelho.

Os autores também apontam a possibilidade de inibição da TOPOIIA pelo domínio nuclear, que é a região da enzima responsável pela quebra da dupla fita de DNA. Os resultados retratam esta inibição como uma segunda forma de ação dos complexos de Cu(II), mostrando uma preferência pela inibição no domínio da ATPase. Foram realizados dois diferentes modos de interação no domínio nuclear, entretanto os diferentes modos apresentaram uma menor energia de ligação comparados com o domínio da ATPase.

Segundo ZEGLIS et al. (2011)⁴³, os resultados de citotoxicidade demonstraram que as tiossemicarbazonas sintetizadas possuem uma boa atividade antitumoral com valores de IC_{50} entre 4,3 e 8,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ frente as células SK-Br-3. Porém, quando são capazes de inibirem a topoisomerase, o fazem apenas em altas concentrações (76 – 94 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Em contrapartida, os complexos de Cu(II) apresentam uma faixa de concentração de inibição enzimática muito menor que a dos ligantes livres entre 0,3 – 7,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo comparáveis ao fármaco doxorrubicina (1 -5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e melhores que o do etopósido (50 – 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), ambos usados atualmente no tratamento contra o câncer.

Assim, os trabalhos concluem que os complexos de Cu(II) são mais ativos do que os ligantes, tanto na inibição quanto na citotoxicidade, e finalizam apresentando a importância de compostos planos para inserção neste domínio.^{42,43}

1.6.1 - Paládio

Complexos metálicos de paládio(II) são compostos muito estudados como possíveis antineoplásicos, a escolha desse metal se dá por sua semelhança com a platina, já que ambos formam complexos metálicos quadrático plano e podem apresentar ion metálico com configuração d^8 . Um vez que a platina ainda é o único metal utilizado no tratamento de neoplasias como quimioterápico.^{41,44}

Após a aprovação da cisplatina como farmaco, foram estudados complexos de paládio(II) com os mesmos ligantes da cisplatina. Entretanto observou-se que estes complexos apresentam maior labilidade de ligantes que a platina. Os complexos de Pd(II) reagem tão rápido que não atingiam o alvo biológico. Para contornar essa elevada cinética de troca de ligantes, iniciou-se o uso de ligantes quelantes que são capazes de estabilizarem mais o centro metálico, diminuindo a labilidade dos ligantes. A geometria quadrática plana do complexo de Pd(II) é uma propriedade intrínseca do metal, uma vez que essa geometria se mostrou extremamente importante para atividade frente a enzima alvo, a escolha de um metal com configuração d^8 se mostra promissora.^{41,45}

Outra vantagem na utilização do íon Pd(II) na formação de complexos com possível atividade inibitória é a capacidade de formação de ligações fortes entre o Pd(II) e átomos de enxofre, segundo a definição de ácido/base de Pearson. A TOPOIIA apresenta em sua estrutura cinco cisteínas livres que uma vez coordenada a um centro metálico podem afetar o funcionamento da proteína.⁴⁶⁻⁴⁸

ROCHA et al.⁴⁹ apresentam complexos de Pd(II) contendo ligantes N,S-doadores e fosfina como possíveis inibidores da TOPOIIA (FIGURA 1.15). Os valores de IC_{50} ($3 - 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) indicam uma citotoxicidade elevada frente células de carcinoma mamário murino (LM3),

carcinoma pulmonar murino (LP07) e câncer de mama humano (MCF-7), sendo na sua maioria mais ativos do que a cisplatina.⁵⁰ Nos ensaios de inibição frente a enzima TOPOIIA os complexos exibiram capacidade de inibi-la em concentrações próximas aos seus IC₅₀, indicando uma possível relação entre a citotoxicidade e a inibição enzimática.

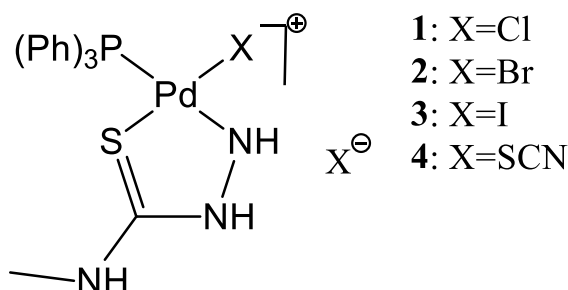


FIGURA 1.15 - Esquema adaptado dos complexos apresentados por ROCHA et al.⁴⁹

Mediante ao que foi apresentado, buscou-se neste trabalho a síntese de complexos que possibilitassem uma ação sinérgica das características das TSCs, fosfinas e centro metálico para uma maior interação com a enzima TOPOIIA e, conseqüentemente, uma maior citotoxicidade frente a linhagens tumorais, especialmente de mama e pulmão.

1.7 - Planejamento

Partindo dos dados apresentados nesta introdução e as observações experimentais relatadas na literatura planejou-se para o desenvolvimento deste trabalho complexos de Pd²⁺ com geométrica quadrática plana, que está associada com a inibição da enzima TOPOIIA, assim como o ligante quelato, tiossemicarbazona, responsável pela formação do metalocilo planar. Ligado ao metalocilo planar um substituinte contendo ligações insaturadas ou um anel aromática, afim de realizar interações do tipo $\pi-\pi$ entre o complexo e biomoléculas.

Grupos fosfínicos ligados diretamente ao centro metálicos possibilitam o aumentar a lipofilicidade dos complexos e interagir com biomoléculas por meios dos grupos aromáticos ligados ao fosforo. A presença de um haleto ligado ao metal disponibiliza possíveis ligações σ entre o

complexo e o sitio enzimático de TOPOIIA. Este planejamento estrutura é apresentado no esquema da FIGURA 1.16, onde cada grupos citado está destacado.

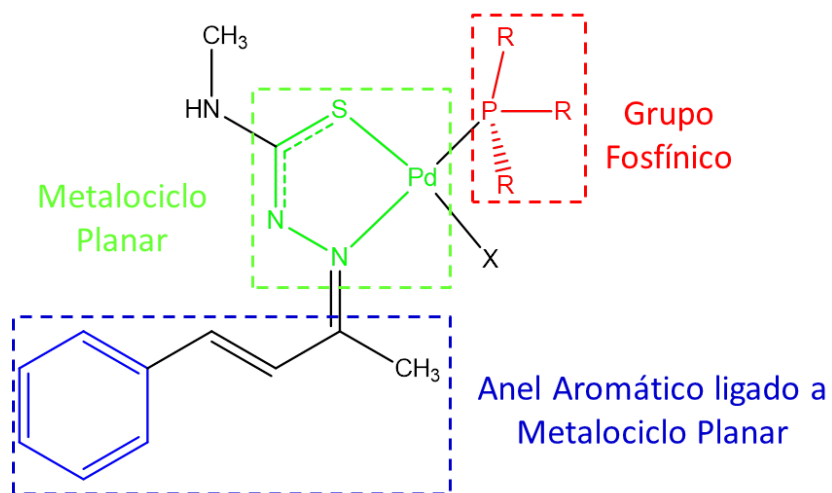


FIGURA 1.16 - Planejamento para as estruturas dos complexos do presente trabalho.

2 - Objetivos

2.1 - Objetivo geral

O objetivo deste projeto foi planejar complexos de Pd(II) capazes de inibir a enzima DNA-topoisomerase II α que apresentem significativa citotoxicidade frente a células neoplásicas.

2.2 - Objetivos Específicos

- Preparação e caracterização da tiossemicarbazona;
- Preparação e caracterização dos complexos de Pd(II);
- Investigação da citotoxicidade frente a células tumorais e não tumorais;
- Avaliação da capacidade inibitória dos complexos frente à enzima DNA-topoisomerase II α ;
- Relação estrutura-atividade.

3 - Experimental

3.1 - Sínteses

3.1.1 - Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho e seus respectivos fornecedores estão descritos na TABELA 3.1.

TABELA 3.1 - Reagentes e suas respectivas procedências.

Reagente	Procedência
Benzalacetona ($\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich
4-Metil-3-tiossemicarbazida (97%)	Sigma-Aldrich
Cloreto de Paládio(II) (99%)	Sigma-Aldrich
Trifenilfosfina (99%)	Sigma-Aldrich
Tri(<i>p</i> -toluil)fosfina (98%)	Sigma-Aldrich
Tri(<i>o</i> -toluil)fosfina (97%)	Sigma-Aldrich
Tris(4-fluorofenil)fosfina (98%)	Sigma-Aldrich
Agarose Padrão	Kasvy
Clorofórmio (<i>d</i> 1) (99,8%)	AcrosOrganics

3.1.2 - Metodologia sintética

3.1.2.1 - Síntese TSC-CC

Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 0,20 g de 4-metil-3-tiossemicarbazida (1,90 mmol) e 0,28 g de benzalacetona (1,90 mmol) solubilizadas em 50 mL de etanol. Em seguida, foram acrescentadas 5 gotas de HCl concentrado, atuando como catalisador. A reação de condensação foi mantida sob refluxo durante 24 h. Ao término da reação a solução foi concentrada em rotaevaporador, resfriada em banho de gelo e filtrada. Logo após, utilizou-se etanol gelado na lavagem do produto. Posteriormente, o sólido foi seco sob dessecador. (Obteve-se 0,23 g de massa seca, rendimento de 53%).

3.1.2.2 - Síntese $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$

Em um erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de acetonitrila previamente aquecida até 80°C, adicionou-se lentamente 500 mg de cloreto de paládio (II), após a adição do sal foi observado a formação de uma solução de coloração amarela. Após 4 h de reação a solução foi concentrada por

evaporação do solvente e o sólido amarelo foi filtrado. (Foi obtido 0,585 g de $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$, 80% de rendimento).

3.1.2.3 - Síntese $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{TSC-CC})]$ (1)

Em um béquer de 25 mL contendo 0,050 g (0,19 mmol) de $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$ solubilizado em 10 mL de acetonitrila foram adicionados 0,044 g (0,19 mmol) de TSC-CC. A reação foi mantida sob agitação magnética por 24 h em temperatura ambiente. Depois, foi feita a adição de 0,051 g (0,19 mmol) de trifenilfosfina (PPh_3), o meio reacional foi mantido sob agitação por mais 24 h. Após este período, o volume da solução foi reduzido por evaporação e o sólido formado (115 mg, rendimento de 93%) foi filtrado sob vácuo.

3.1.2.4 - Síntese $[\text{PdCl}(\text{Pp-T})(\text{TSC-CC})]$ (2)

Em um béquer de 25 mL contendo 0,050 g (0,19 mmol) de $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$ solubilizado em 10 mL de acetonitrila foram adicionados 0,044 g (0,19 mmol) de TSC-CC. A reação foi mantida sob agitação magnética por 24 h em temperatura ambiente. Depois, foi feita a adição de 0,051 g (0,19 mmol) de tri(*p*-toluol)fosfina (Pp-T), o meio reacional foi mantido sob agitação por mais 24 h. Após este período, o volume da solução foi reduzido por evaporação e o sólido formado (125 mg, rendimento de 95%) foi filtrado sob vácuo. Análise elementar: obtido (calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{ClN}_3\text{PPdS} \cdot 2/3\text{CH}_3\text{CN} \cdot 2/3\text{CHCl}_3$) (785.5 g mol^{-1}) %C 53.16 (53.52), %H 5.82 (4.83), N 6.59 (6,54).

3.1.2.5 - Síntese $[\text{PdCl}(\text{Po-T})(\text{TSC-CC})]$ (3)

Em um béquer de 25 mL contendo 0,050 g (0,19 mmol) de $[\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$ foi inicialmente solubilizado em 10 mL de acetonitrila, e posteriormente foi adicionados 0,044 g (0,19 mmol) de TSC-CC, a reação foi mantida sob agitação magnética por 24 h em temperatura ambiente. Na sequência, foi realizada a adição de 0,051 g (0,19 mmol) de tri(*o*-toluol)fosfina (Po-T) o meio reacional sendo mantido sob agitação por mais 24 h. Após este período, o volume da solução foi reduzido por evaporação e o sólido formado (126 mg, rendimento de 96%) foi filtrado sob vácuo. $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{ClN}_3\text{PPdS} \cdot$

$2/3\text{CH}_3\text{CN} \cdot 2/3\text{CHCl}_3$ (785.5 g mol^{-1}) %C 53.43 (53.52), %H 4.99 (4.83), %N 6.62 (6,54).

3.1.2.6 - Síntese [PdCl(4FP)(TSC-CC)] (4)

Em um béquer de 25 mL contendo 0,050 g (0,19 mmol) de [PdCl₂(CH₃CN)₂] solubilizado em 10 mL de acetonitrila foram adicionados 0,044 g (0,19 mmol) de TSC_CC, a reação foi mantida sob agitação magnética por 24 h em temperatura ambiente. Depois, foi feita a adição de 0,051 g (0,19 mmol) de tris(4-fluorofenil)fosfina (P(4FP))o meio reacional foi mantido sob agitação por mais 24 h. Após este período, o volume da solução foi reduzido por evaporação e o sólido formado (65 mg, rendimento de 49%) foi filtrado sob vácuo. Análise elementar: obtido (calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{ClN}_3\text{PPdS} \cdot 1/2\text{CH}_3\text{CN} \cdot 1/2\text{CHCl}_3$ (785.5 g mol^{-1}) %C 48.66 (49.09), %H 3.66 (3.66), %N 6.57(6.36).

3.1.2.7 - Síntese [PdI(PPh₃)(TSC-CC)] (5)

Este complexo foi sintetizado com o mesmo procedimento do complexo 1, em seguida, *in situ*, foram adicionados à solução 37,0 mg (0,22 mmol) de iodeto de potássio (KI), a agitação foi mantida por mais 4 h. Após este período, o volume da solução foi reduzido por evaporação e o sólido formado (80 mg, rendimento de 56%) foi filtrado sob vácuo.

3.1.2.8 - Síntese [PdI(Pp-T)(TSC-CC)] (6)

Este complexo foi sintetizado de com o mesmo procedimento do complexo 2, em seguida, *in situ*, foram adicionados à solução 37,0 mg (0,22 mmol) de iodeto de potássio (KI) a agitação foi mantida por mais 4 h. Após este período, o volume da solução foi reduzido por evaporação e o sólido formado (78 mg, rendimento de 54%) foi filtrado sob vácuo.

3.2 - Determinação do ponto de fusão

As medidas de ponto de fusão foram realizadas no equipamento MARCONI NA 301, após a compactação da amostra macerada em um capilar fechado, o sistema foi aquecido em uma razão 1°C min^{-1} , sendo a temperatura máxima alcançada de 240°C .

3.3 - Medidas de condutividade iônica

As medidas de condutividade foram feitas em acetonitrila com o uso do condutímetro MARCONI modelo MA 521 (LISCC). Foram feitas soluções dos compostos com concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Antes das medidas o equipamento foi calibrado e em seguida, realizado a leitura de condutividade do solvente.

3.4 - Difração de Raios X de monocristal

A difração de raios X foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Víctor Deflon do Laboratório de Cristalografia do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP), utilizando-se um difratômetro BRUKER KAPPA APEX II duo, radiação $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 71,073 \text{ pm}$) monocromada por grafite e coletados a temperatura ambiente (297 K), prosseguindo assim, com as etapas de integração, redução dos dados e refinamento das estruturas. Os dados recebidos em formato CIF (*Crystallographic Information File*) foram analisados e tratados no software Diamond 3.2.

3.5 - Cálculos computacionais.

Teoria do funcional da densidade (DFT) foi utilizada a fim de determinar as estruturas moleculares dos compostos que não se obteve cristais adequados para difração. O método aplicado foi o B3LYP (método híbrido de três parâmetros Becke usando o funcional de correlação de Lee-Yang-Parr) e os conjuntos bases 6-31G para C,H,O,S,N e Cl e lanl2dz para os átomos pesados de Pd e I. Nos cálculos de energia foi utilizado o método Dependente de Tempo (TD-DFT) para 40 estados para singletos e tripletos. O método foi validado pela comparação das estruturas teóricas com as experimentais obtidas por difração de raios-X, bem como pelos dados espectroscópicos na região do UV-Vis e infravermelho.

Os cálculos foram efetuados utilizando o programa Gaussian09 e a interface gráfica Gaussview 5.0

3.6 - Espectrometria vibracional na região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região do Infravermelho foram obtidos no espectrômetro SHIMADZU IRTracer-100, usando pastilhas de KBr como suporte. Foram feitas 32 varreduras na região de 4000 a 400 cm^{-1} . Os dados obtidos foram tratados utilizando os softwares Shimadzu IR Solution, 1.60, e Origin 8.0.

3.7 - Ressonância magnética nuclear

Para a obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (RMN) foi utilizado o espectrômetro BRUKER ARX 9,4T do Departamento de Química (DQ) da UFSCar. Todos os dados obtidos foram tratados utilizando-se o software MestReNova 6.0.2-5475.

3.8 - Espectrofotometria eletrônica na região do UV-Visível

Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram obtidos em um espectrofotômetro SHIMADZU UV-1650PC. Após a obtenção da linha de base em acetonitrila, foram utilizadas soluções de concentração $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ para cada um dos compostos. Cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm foram utilizadas para obtenção dos espectros, em seguida, foi feita a varredura na região entre 1100 a 190 nm.

3.9 - Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando as seguintes linhagens celulares: MDA-MB-231 (câncer de mama), A549 (câncer de pulmão) e MRC-5 (fibroblastos humanos de pulmão). As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) com 10% (v/v) de FBS (soro fetal bovino) dentro de garrafas de plástico (Corning) armazenadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 .

A contagem das células foi realizada utilizando o corante Azul de Tripiano em uma câmara de Neubauer. Após a contagem da suspensão, foram adicionadas à placas de 96 poços alíquotas com 150 μL contendo $1,5 \times 10^4$ células mL^{-1} . As placas foram mantidas por 24 h na estufa e em seguida foi adicionado a cada poço 0,75 μL de uma solução de DMSO contendo o ligante ou os complexos. As concentrações finais dos compostos

nos poços foram de $8,00 \times 10^{-1}$; 1,58; 3,16; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; para os compostos mais ativos as concentrações precisaram ser ajustadas para: $2,00 \times 10^{-1}$; $3,90 \times 10^{-1}$; $7,80 \times 10^{-1}$; 1,58; 3,16; 6,25; 12,50; 25,00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Em seguida, as placas foram incubadas novamente na estufa por mais 48 h.⁵⁰⁻⁵²

Após a incubação das microplacas foi adicionado a cada poço 50 μL de uma solução de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolio) (1 mgmL^{-1}) e incubada novamente na estufa por 4h. Por fim, se retirou a solução de cada poço e adicionou-se 100 μL de DMSO, em seguida foram realizadas as medidas de absorbância em cada poço com o leitor de microplacas híbrido da BioTek modelo SYNERGY H1. Os dados obtidos foram tratados utilizando Excel 2010 e GraphPadPrism 5.01.

3.10 - Interação com DNA

3.10.1 - Interação com plasmídeo surperenovelado

Em uma solução tampão TE 1x (Tris-HCl ($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH: 8,0)/ EDTA ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) foram adicionados 0,5 μL do plasmídeo pBR322 e 1 μL dos complexos metálicos em DMSO, em diferentes concentrações, totalizando um volume final de ensaio de 30 μL . A solução final foi incubada a 37°C por 24 h.⁵¹ Após o tempo de incubação as amostras foram retiradas do banho termostático e adicionou-se 15 μL de STEB (40% (m/v) de sacarose, $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Tris.HCl, pH = 7,5, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de EDTA, $0,5 \text{ mgmL}^{-1}$ de azul de bromofenol) às amostras posteriormente, 20 μL das soluções foram adicionados no gel de agarose 1% (m/v). A corrida eletroforética ocorreu em solução TBE 1x a 20 V durante 12 h, após este período o gel foi adicionado em solução corada de brometo de etídio e revelado no fotodocumentador Gel Doc™ EZ, a imagem obtida foi tratada utilizando o software ImageLab™ 6.0.0 fornecido pela BioRad.

3.10.2 - Titulação espectroscópica

O experimento de titulação espectroscópica de absorção foi realizado pela manutenção da concentração de ácido nucleico (30 μL) fixada em $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em 3000 μL e variando a concentração do complexo de 1

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a $45 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Os espectros foram registrados em meio tamponado; trizma-HCl (pH= 7,39); com leitura entre 700 a 200 nm. A constante de ligação do complexo com CT-DNA foi determinada aplicando-se a Equação de Benesi–Hildebrand modificada, conforme demonstra a EQUAÇÃO 1.0.^{50,53}

$$[\text{Complexo}]/(\varepsilon A - \varepsilon F) = [\text{Complexo}]/(\varepsilon B - \varepsilon F) + 1/K_b (\varepsilon B - \varepsilon F)$$

Sendo: [Complexo] = concentração adicionada do complexo;

$$\varepsilon A = \text{Abs}/[\text{Complexo}]$$

εF = coeficiente de absorvidade molar do DNA livre e

εB = coeficiente de absorvidade molar do complexo ligado ao DNA.

EQUAÇÃO 1.0 – Equação de Benesi-Hildebrand.

Por meio da inclinação e da intercepção do ajuste linear de $[\text{Complexo}] / [\varepsilon a - \varepsilon f]$ vs $[\text{Complexo}]$ tem-se $1/ [\varepsilon a - \varepsilon f]$ e $1/ K_b [\varepsilon b - \varepsilon f]$. A constante de ligação intrínseca K_b pode ser obtida através da relação da inclinação para a intercepção.

3.11 - Inibição da enzima DNA-Topoisomerase II

O ensaio de inibição da enzima DNA-Topoisomerase II α foi realizado com o kit de relaxação do DNA fornecido pela Inspiralis Limited. No ensaio efetuado utilizou-se 0,5 μL (500 ng) de DNA pBR322 superenovelado, 3 μL de tampão de ensaio (Tris.HCl ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), NaCl ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), KCl ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), MgCl_2 ($5,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ ($0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), BSA (15 mgmL^{-1}) com pH 7,9), 1 μL ($1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) de ATP e 1 μL de composto de interesse em diferentes concentrações, por fim adicionou-se água e 1 μL ($4,0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) de TOPOII para atingir um volume final de 30 μL . A mistura reacional foi mantida em incubação a 37°C por 40 minutos. Após este período foram adicionados à solução 3 μL de SDS (dodecil sulfato de sódio) e realizado um choque térmico a 60°C por 2 min para interromper o processo enzimático. Após a interrupção da ação enzimática foram adicionados 15 μL de STEB (40% (m/v) de sacarose, $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Tris.HCl, pH = 7,5, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de EDTA, $0,5 \text{ mgmL}^{-1}$ de azul de bromofenol) e 60 μL de uma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v). As amostras foram

centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos, a fase aquosa foi adicionada no gel de agarose 1% (m/v), em solução tampão de TBE 1x (Tris/Borato/EDTA) pH = 8,2. Foi aplicado o mesmo procedimento apresentando na Interação com plasmídeo surperenovelado, a corrida do gel e sua revelação.

3.12 - Medida de lipofilicidade (logP)

O Coeficiente de partição foi realizado com a solubilização 1 mg de composto em 300 μ L de DMSO. Em seguida, uma alíquota de 30 μ L desta solução foi adicionada em 750 μ L de 1-octanol e a solução foi homogeneizada. Então, foi adicionada 750 μ L de água à mistura que foi colocada sob agitação a 37°C por 24 h.⁵⁴ Após o tempo de incubação foram realizadas medidas de absorvância dos compostos em 1-octanol no espectrofotômetro SHIMADZU UV-1650PC. A referida análise foi realizada em triplicata, tendo em vista a absorvância média obtida das três soluções de complexo em 1-octanol. O valor da concentração dos complexos em 1-octanol foi determinado a partir da curva padrão previamente obtida. A medida de lipofilicidade adotada é o log P, que é da fração entre a concentração de composto em 1-octanol pela concentração em água (Equação 3.1)⁵¹

$$P = [\text{Composto}]_{n\text{-Oc}}/[\text{Composto}]_{\text{água}}$$

4 - Resultados e discussão

4.1 - Dados dos complexos

Os complexos **1-6** foram sintetizados em pelo menos duas etapas com duração de 24 h, a proposta mecanística de síntese pode ser observada na FIGURA 4.1. A reação iniciou-se com a solubilização do complexo precursor bis(acetonitrila)dicloropaládio(II) em 10 mL de acetonitrila, a seguir foi adicionado o ligante TSC-CC. Sabe-se que com a substituição da acetonitrila pelo ligante quelante há formação de um intermediário bimetálico com os dois cloros atuando como ligantes em ponte entre os dois centros metálicos. Após esta primeira etapa, foi adicionada à solução a fosfina de interesse. Os complexos **5** e **6** foram sintetizados com o incremento de uma etapa, a adição do iodeto de potássio para a troca dos haletos.

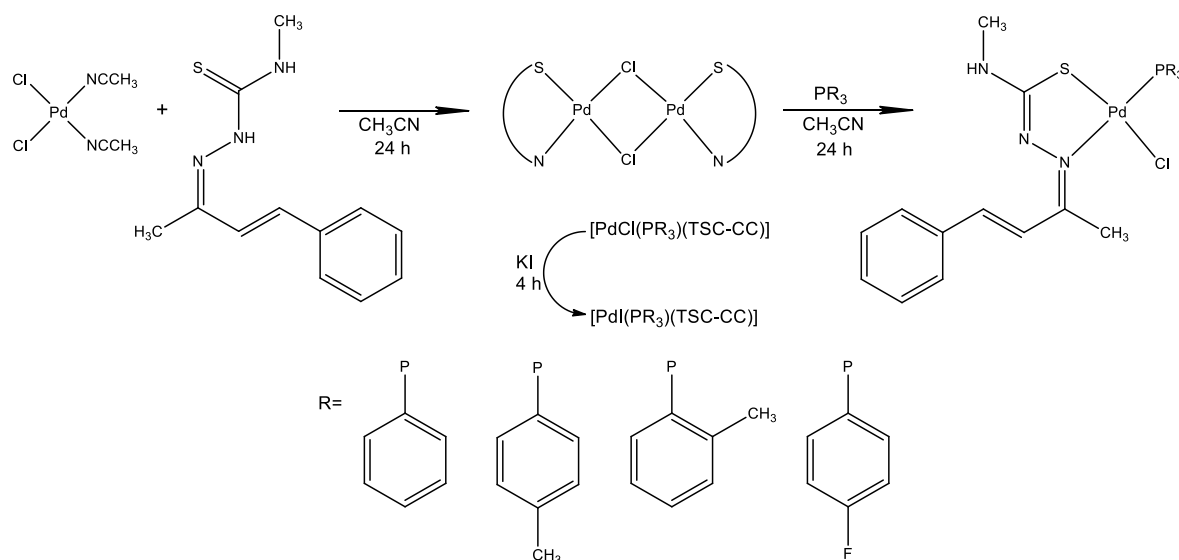


FIGURA 4.1 - Esquema da síntese dos complexo **1** a **6**

A coordenação do ligante TSC-CC ocorre via átomos doadores N e S, gerando um anel de 5 membros, favorecida por uma maior estabilidade termodinâmica devido a formação de um quelato e, conseqüentemente, aumento da entropia do sistema. Com a adição dos ligantes fosfínicos ocorre a clivagem da ligação em ponte formando os complexos desejados.

De acordo com a literatura é esperado que a fosfina se coordene *trans* N uma vez que, a coordenação *trans* S geraria competição pelos

elétrons d do metal (FIGURA 4.2), o que enfraqueceria ambas as ligações, Pd-S e Pd-P.⁴⁹

Competição da retrodoação

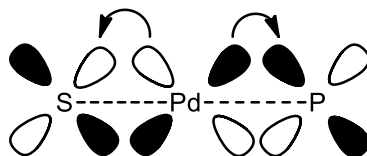


FIGURA 4.2 - Competição dos elétrons em torno do centro metálico.

A substituição dos Cl^- por I^- nos complexos **5** e **6** ocorre segundo a teoria de ácidos e bases de Pearson. O iodeto é mais polarizável que o cloreto, lhe conferindo um maior caráter de base mole, possuindo dessa forma uma maior tendência em se coordenar ao íon de Pd(II), caracterizado como um ácido mole.

4.2 - Caracterização

Todos os compostos são solúveis em clorofórmio, DMSO, DMF, THF, acetona e acetonitrila. Os referidos complexos foram submetidos à medidas de condutividade iônica, cujos valores obtidos variaram entre 16 a 35 $\text{S cm}^{-2}\text{mol}^{-1}$, de acordo com sua natureza não eletrolítica, uma vez que, em acetonitrila, os eletrólitos 1:1 apresentam condutividade na faixa de 57 a 204 $\text{S cm}^{-2}\text{mol}^{-1}$.⁵⁵

Para se determinar o ponto de fusão dos complexos, estes foram adicionados a capilares previamente fechados em uma das extremidades, compactados e submetidos a temperaturas de até 240°C. Com exceção do complexo **4**, temperatura de fusão a 175°C, os demais fundiram-se a temperaturas acima de 200°C, conforme descrito na TABELA 4.1.

Comparando os valores de ponto de fusão entre os complexos **1** e **5** e/ou **2** e **6** (TABELA 4.1) observou-se uma semelhança entre as temperaturas de fusão, indicando a pouca influência dos diferentes haletos nessa propriedade física. Em contra partida, a presença de diferentes fosfinas afeta significativamente as temperaturas de fusão dos complexos, seguindo o perfil de fusão das fosfinas livres. Sendo que a trifenilfosfina e a tri(p-

toluol)fosfina apresentam pontos de fusão entre 78 - 81°C e 122 - 125°C, respectivamente.

TABELA 4.1 - Temperaturas de fusão dos complexos de **1** a **6**. (°C)

Complexo	1	2	3	4	5	6
Temperatura	201	221	237	175	200	220

4.3 - Difração de Raios X de monocristal

Os cristais foram obtidos pela cristalização em uma solução saturada dos complexos solubilizados uma mistura de solventes de clorofórmio: acetonitrila (1:1). Segundo o protocolo foi possível obter cristais apenas para os complexos **2** e **3** sendo enviados ao Laboratório de Cristalografia do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP) onde foi realizada a difração de raios X.

Os resultados da difração de raios X demonstram que os compostos apresentam uma geometria quadrática plana distorcida em torno do Pd (FIGURA 4.3), com ângulos de 81,34° e 81,57° (S1-Pd-N1) e 169° e 174° (N1-Pd-P) para os complexos **2** e **3**, respectivamente. Este dado está coerente com a coordenação do ligante TSC-CC de maneira aniônica bidentada, uma vez que, a formação do anel de 5 membros entre o ligante TSC-CC e o Pd(II) gera uma tensão angular, provocando uma distorção na planaridade do centro metálico. Outra razão para a distorção é o grande volume do ligante fosfínico. Foi observada a coordenação da fosfina *trans* N1, e Cl1 *trans* a S1. Em ambos os casos a esfera de coordenação é completada pela presença do cloreto. Adicionalmente, no complexo **3** nota-se a presença da acetonitrila, H3A-N1S (2,499Å), atuando como solvente de cristalização.

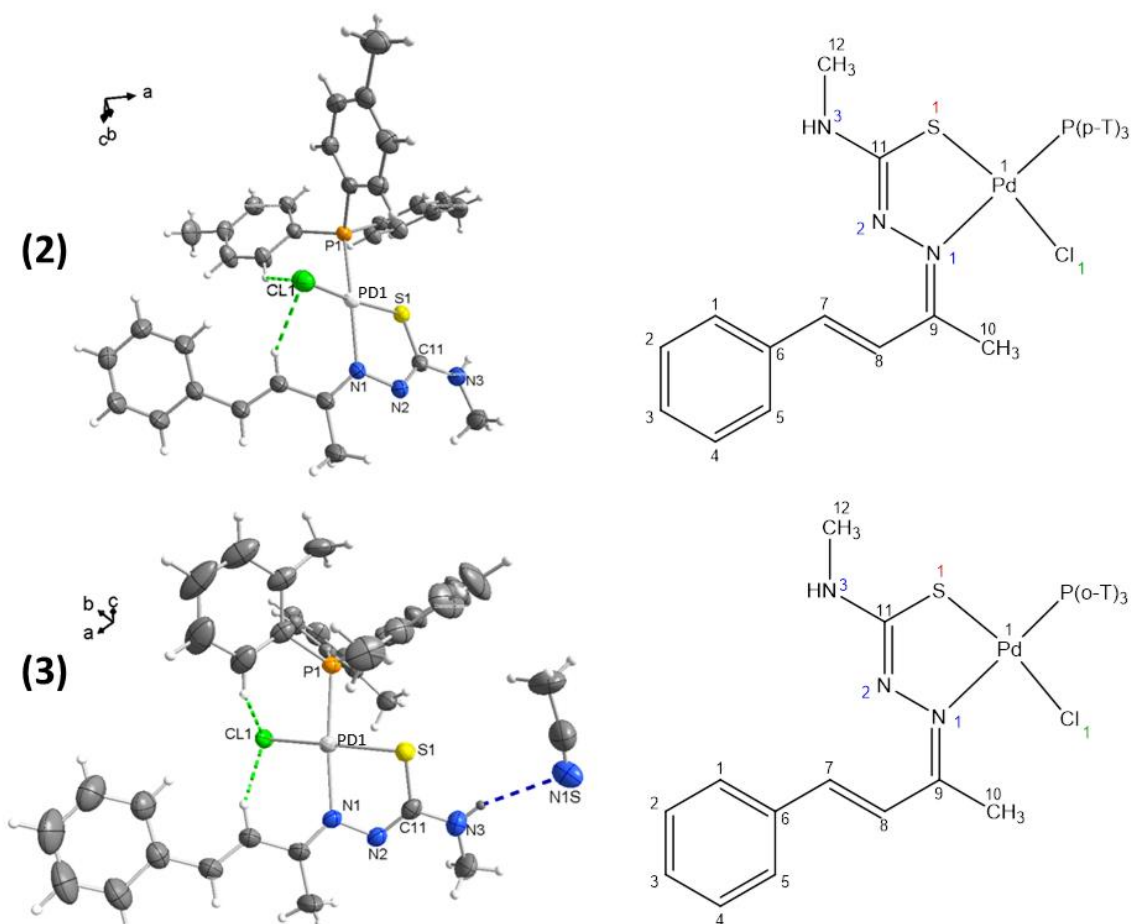


FIGURA 4.3 - Estrutura ORTEP dos complexos 2 e 3 com elipsoide de 50% de probabilidade obtida pela análise de Difração de Raios X.

Quando se compara a estrutura do ligante livre⁵⁶ (FIGURA 4.4) com as dos complexos, pode-se notar que as ligações mais afetadas pela coordenação foram S1-C11 e N2-C11 (FIGURA 4.3), devido à coordenação de S1, a ligação S1-C11 perde o caráter de dupla ligação, e gera em N2-C11 uma ligação com maior caráter π . Observa-se um aumento do comprimento da ligação S1-C11 (1,688Å) e a diminuição do comprimento de ligação N2-C11 (1,371 Å), TABELA 4.2.

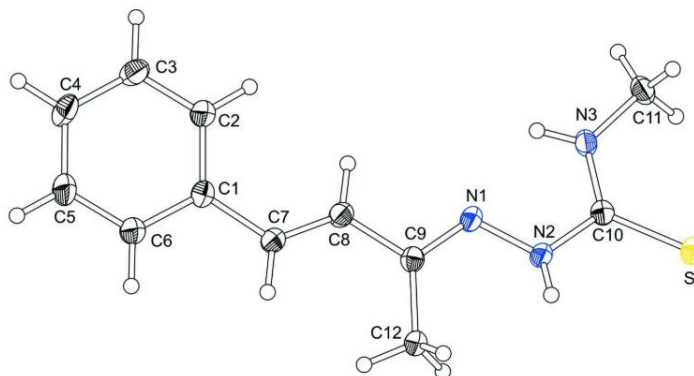


Figura 4.4 - Estrutura de N -Metil-2-(1-metil-3-fenilprop-2-en-1-ilideno)hidrazinacarbotoamida (TSC-CC) com elipsoide de 50% apresentada por Rocha et al.⁵⁶

É possível verificar na estrutura cristalina uma interação intramolecular entre Cl1 e dois hidrogênios, um do ligante TSC-CC e outro da fosfina (H8 e H14), sendo que, a distância entre o cloro e os hidrogênios variaram entre 2,562 a 2,835Å para a estrutura dos complexos 2 e 3, respectivamente.

TABELA 4.2 - Seleção de comprimento e ângulos de ligações dos monocristais 2 e 3

Ligações	Complexo 2	Complexo 3	TSC-CC
Comprimento (Å)			
Pd-N(1)	2,118	2,117	
Pd-S	2,259	2,269	
Pd-Cl	2,361	2,346	
Pd-P	2,261	2,270	
N(2)-C(11)	1,292	1,299	1,371
S-C(11)	1,764	1,760	1,688
Ângulos (°)			
N(1)-Pd-S	81,34	81,57	
N(1)-Pd-P	169,44	174,48	
S-Pd-Cl	167,69	168,31	

4.4 - TD-DFT

Após a inserção dos dados cristalográficos dos complexos 2 e 3 foram realizados os cálculos no software Gaussian09, os resultados obtidos do DFT foram comparados com as estruturas cristalográficas dos complexos

2 e 3, para a validação da metodologia aplicada. A (FIGURA 4.5) apresenta a sobreposição das estruturas obtidas de forma experimental e teórica.

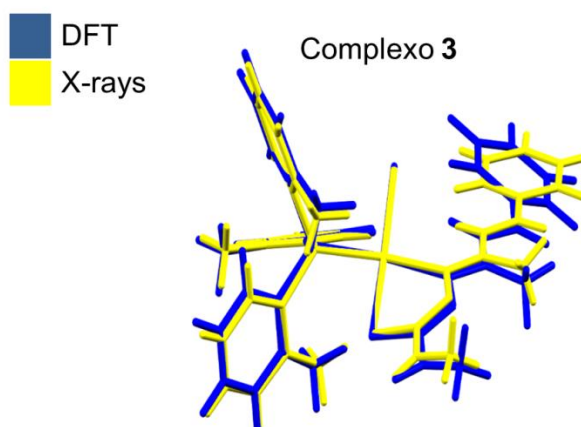


FIGURA 4.5 - Sobreposição da estrutura de raios X difratada e estrutura calculada para o complexo **3**.

Houve uma boa sobreposição da estrutura otimizada com a estrutura obtida por difração de raios X, experimentalmente. Assim, pode-se relacionar as propriedades espectroscópicas calculadas com as obtidas experimentalmente. Por serem complexos análogos, uma vez o método validado para os complexos **2 e 3** foi possível propor estruturas para os complexos **1 e 4** mesmo sem as bases cristalográficas (FIGURA 4.6).

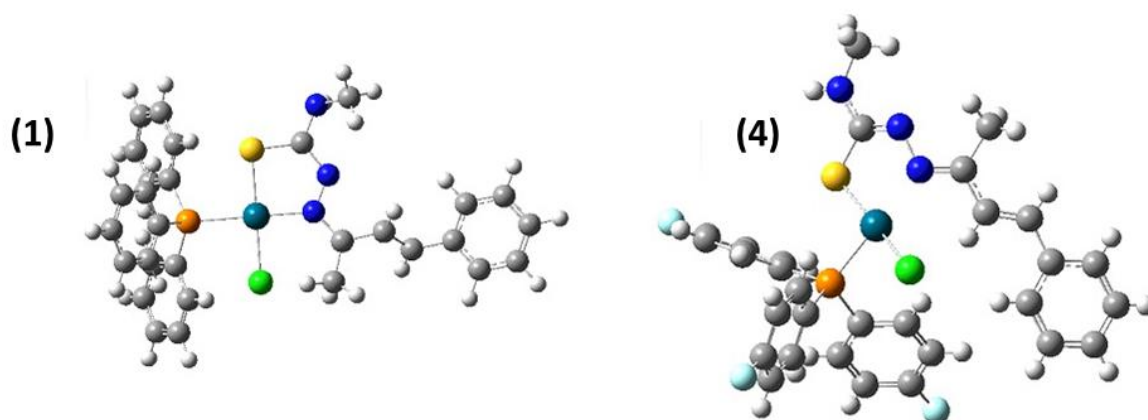


FIGURA 4.6 - Estrutura proposta para os complexos **1 e 4**.

4.5 - Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

Os espectros na região do IV do ligante TSC-CC e dos complexos **1-6** estão apresentados na FIGURA 4.7, as principais bandas foram atribuídas e mostradas na TABELA 4.3.

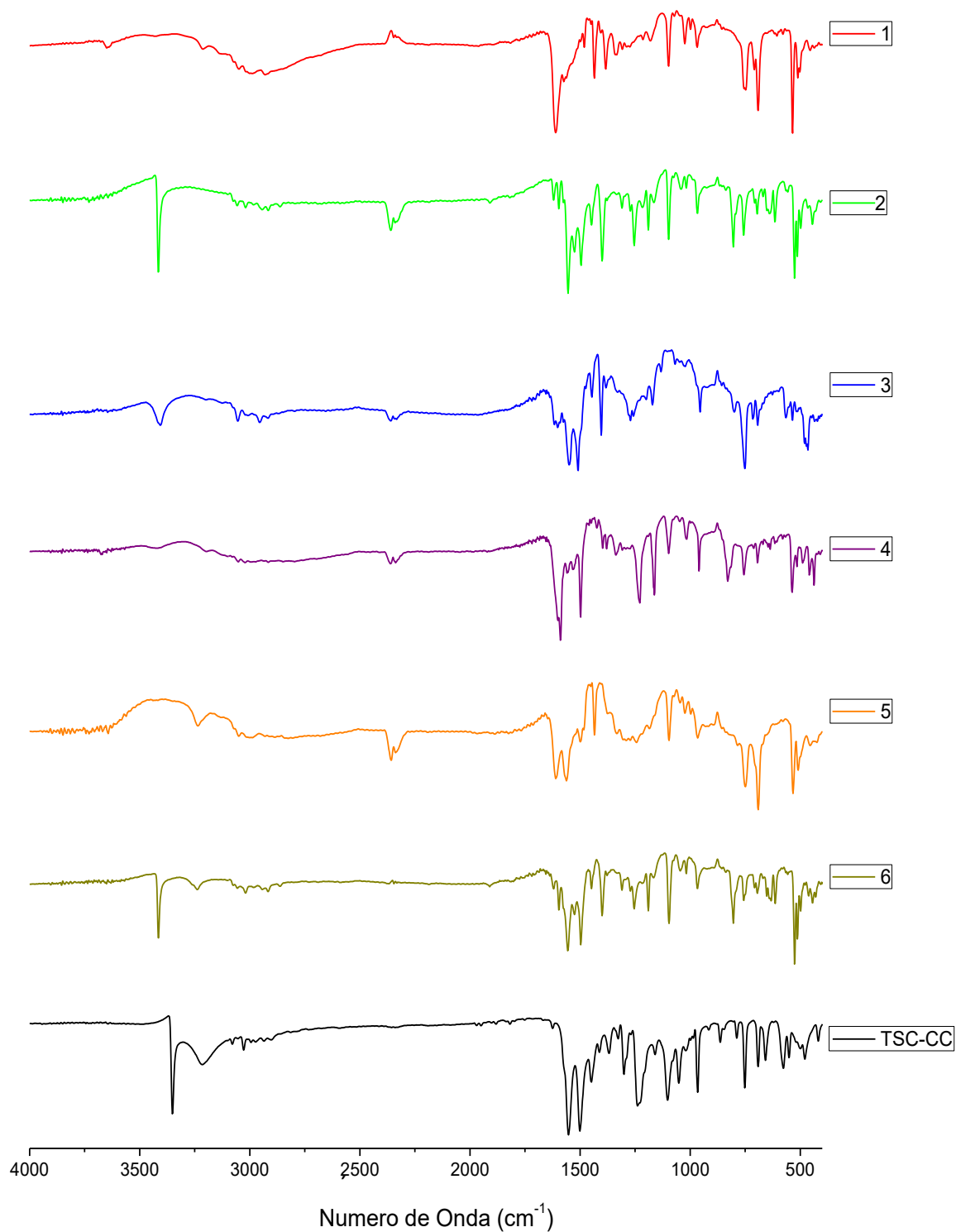


FIGURA 4.7 - Espectros de IV dos complexos de Pd(II) obtidos e do ligante.

TABELA 4.3 - Principais frequências na região de infravermelho e atribuições.

TSC-CC	1	2	3	4	5	6	Atribuição
3350	–	3410	3411	3410	–	3410	ν N3-H
3214	3211	–	–	–	3241	–	ν N2-H
3028	3053	3059	3056	3053	3050	3020	ν C-H _{aromático}
1550	1614	1554	1553	1592	1607	1600	ν C=N
1500	1554	1522	1515	1565	1554	1554	ν C=C
1300	1383	1399	1404	1379	1375	1399	ν C-N
–	1093	1100	1069	1100	1099	1093	ν P-C
751	693	693	691	693	691	693	ν C=S

ν = estiramento

No espectro vibracional de TSC-CC pode-se destacar as seguintes bandas: 3350 e 3214 cm^{-1} referentes ao estiramento N2-H e N3-H; 1300 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-N; banda referente ao estiramento C=S em 751 cm^{-1} , tais bandas são diagnósticas podendo fornecer informações importantes sobre os efeitos da complexação do ligante. A FIGURA 4.8 apresenta um esquema de numeração que facilitará as discussões subsequentes.

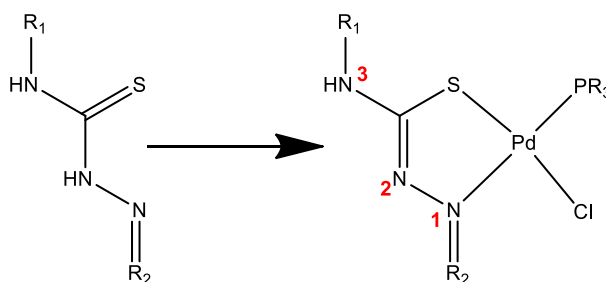


FIGURA 4.8 - Esquema da coordenação de TSC-CC ao metal Pd(II).

Comparando-se o espectro do ligante livre com os espectros dos complexos verificou-se a ausência de uma banda N-H, indicando uma coordenação aniônica do ligante, e o deslocamento das bandas C=N e C=S. Com a ligação do Pd(II) à TSC-CC ocorre um rearranjo da densidade eletrônica do ligante, provocando a desprotonação em N2. Quanto à banda C=S presente em 751 cm^{-1} no ligante, observou-se o deslocamento de aproximadamente 60 cm^{-1} para região menos energética nos espectros dos complexos. Isto é decorrente da doação de densidade eletrônica do S para o metal, o que diminuiu a densidade eletrônica com caráter π da ligação C=S e,

consequentemente, resultou na formação de uma ligação C=N2 por efeito indutivo e perda do próton em N2.

No espectro vibracional do ligante TSC-CC, a banda em 1300 cm^{-1} é caracterizada como um estriamento C-N, já nos complexos essa banda foi deslocada para a região entre 1404 a 1375 cm^{-1} . O deslocamento dessa banda é consequência da retirada de densidade eletrônica de S e a desprotonação em N2 que por sua vez, possibilita a formação de uma ligação com caráter π entre C-N2. Por essa razão, houve um deslocamento da banda para região de maior energia no espectro.

Nos espectros vibracionais dos complexos observou-se o surgimento de um banda próxima a 1090 cm^{-1} , que é caracterizada pelo estriamento C-P, tal banda indicou a presença dos grupos fosfínicos na estrutura dos referidos complexos, deste modo, evidencia a coordenação da fosfina ao metal paládio(II).

4.6 - Ressonância magnética nuclear

4.6.1 - RMN ^1H

A atribuição dos sinais de RMN ^1H foi feita segundo a numeração da FIGURA 4.9, onde é apresentada um esquema geral da estrutura dos complexos metálicos **1 - 6**.

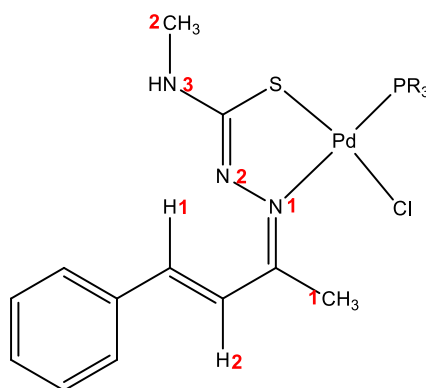


FIGURA 4.9 - Esquema geral dos complexos com as marcações para a análise dos espectros de RMN ^1H .

Os espectros a seguir foram obtidos em clorofórmio deuterado (CDCl_3 , d_1), que apresenta um sinal característico em 7,2 ppm.⁵⁷ Os espectros

de cada composto são apresentados nas figuras a seguir (4.10 — 4.19). Os deslocamentos químicos e o número de prótons calculados são apresentados na TABELA 4.4 com as devidas atribuições.

TABELA 4.4 - Deslocamentos químicos de RMN ^1H do TSC-CC e complexos

TSC-CC	1	2	3	4	5	6	Atribuição
2,12[3H]	2,55[3H]	2,38[3H]	2,38[3H]	2,57[3H]	2,57[3H]	2,43[1H]	C _{Metila 1}
3,27[3H]	2,80[3H]	2,88[1H]	2,88[1H]	2,84[1H]	2,82[1H]	2,81[1H]	C _{Metila 2}
—	—	2,40[9H]	2,40[9H]	—	—	2,33[9H]	CH ₃ Fosfina
~7,4[6H]	~7,5[20H]	~7,4[16H]	~7,4[16H]	~7,4[16H]	~7,4[20H]	~7,4[16H]	C _{Aromático}
6,97[1H]	7,11[1H]	7,0[1H]	6,99[1H]	7,32[1H]	7,13[1H]	7,02[1H]	H1
6,85[1H]	8,44[1H]	8,68[1H]	8,68[1H]	8,35[1H]	7,92[1H]	8,27[1H]	H2
8,67[1H]	10,18[1H]	4,45[1H]	4,45[1H]	10,33[1H]	10,17[1H]	8,52[1H]	N3

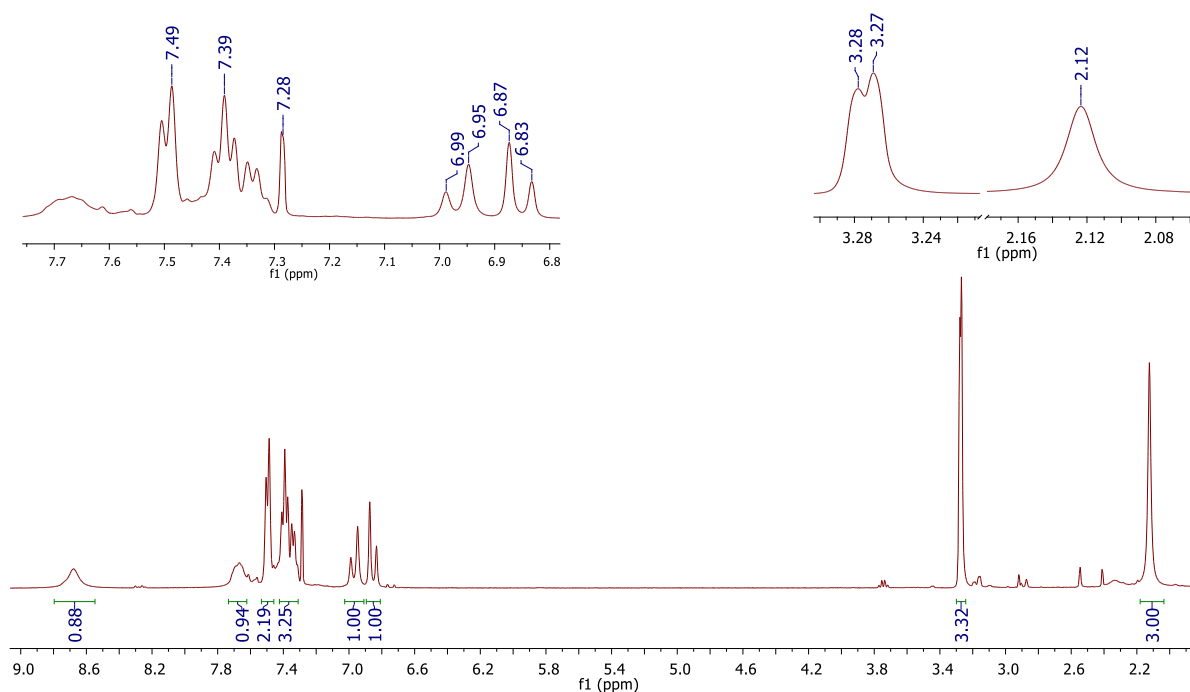


FIGURA 4.10 - Espectro de RMN ^1H em clorofórmio (d_1) do composto TSC-CC

Na análise do espectro de RMN ^1H do ligante livre (TSC-CC) observou-se a presença de um sinal duplicado em 3,27 ppm referente aos hidrogênios de C2, entretanto, os hidrogênios ligados a N não apresentam acoplamento. O referido sinal não é um dubleto, mas um sinal duplicado, devido a rotação em N3 o que possibilita dois ambientes químicos diferentes

para os hidrogênios em C2. O esquema da rotação proposto na FIGURA 4.11 simula o movimento que muda o ambiente químico da metila C1 e gera o sinal duplicado.

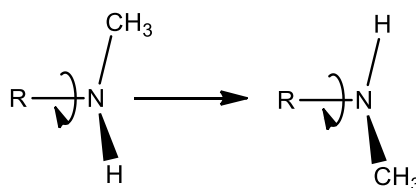


FIGURA 4.11 - Esquema de rotação em N3

Os dois dubletos em 6,9 ppm são referentes a H1 e H2 que encontram-se em posição *trans*, de acordo com a literatura nestes casos de H *trans* a outro H em carbonos adjacentes é observado uma constante de acoplamento em torno de 12 a 18 Hz. O valor da constante de acoplamento obtida para H1-H2 foi de $J_{H1-H2}=16$ Hz, apresentando mais um indício da estrutura do ligante. Em 7,28 ppm encontrou-se o sinal referente ao solvente utilizado, e entre 7,30 a 7,54ppm ocorrem os sinais referentes aos hidrogênios do anel aromático monosubstituído.

Os sinais dos hidrogênios do N3 e N2 possuem deslocamento químico de 7,67 e 8,68 ppm respectivamente, e o sinal de H-N2 encontra-se na região mais desblindada do espectro, o que demonstra uma tendência ácida neste próton.

Após a coordenação do ligante TSC-CC, os complexos **1** a **6** foram submetidos a mesma metodologia para a obtenção do espectro RMN ^1H . O composto **1** (FIGURA 4.12) apresentou o deslocamento dos sinais referentes aos hidrogênios de C1 e C2 em comparação ao ligante. O sinal referente ao C2 deslocou de 3,28 para 2,8 ppm, assim houve um efeito de blindagem devido a coordenação de TSC-CC, enquanto que C1 deslocou de 2,12 para 2,55 ppm, apresentando assim, o efeito inverso.

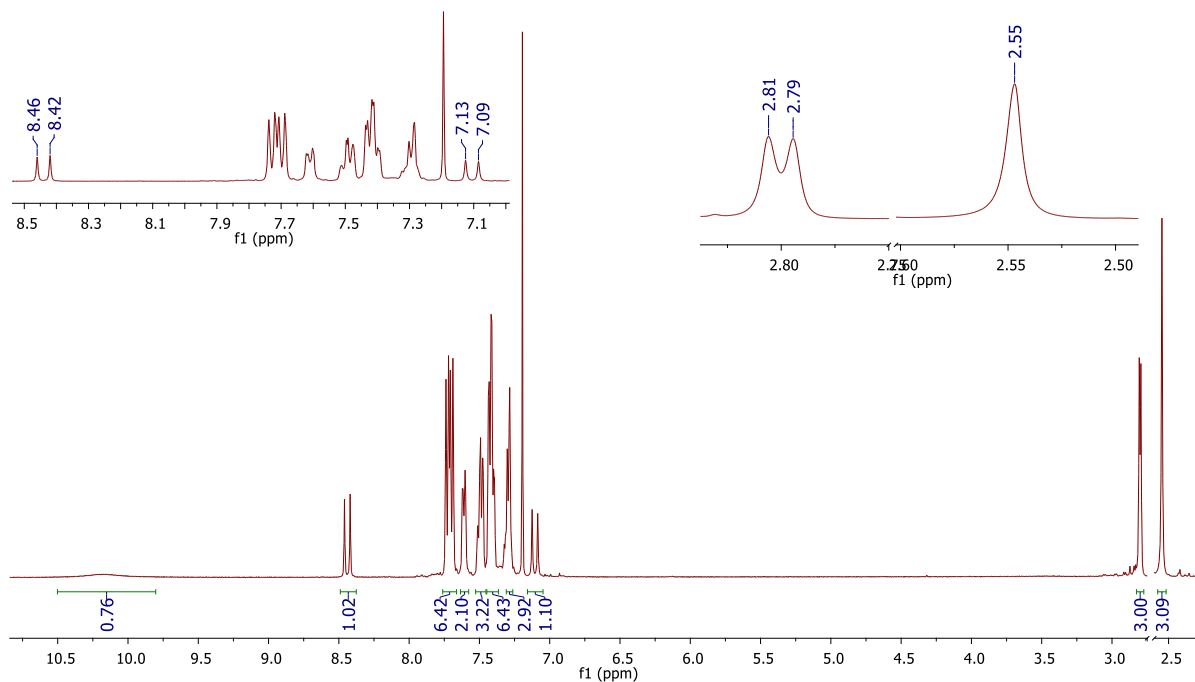


FIGURA 4.12 - Espectro de RMN ^1H em clorofórmio (d_1) do composto **1**

Estes deslocamentos ocorrem devido a perda de um próton em N2 indicando a formação de uma ligação do tipo ligação π em C-N2. Tal transferência induz uma região de maior densidade eletrônica sobre a ligação C-N2, quando os hidrogênios de C2 encontram-se nesta região de blindagem os seus núcleos necessitam de maior energia para que ocorra a ressonância nuclear, por isso, o sinal referente deslocou-se para região mais blindada do espectro. (FIGURA 4.13).

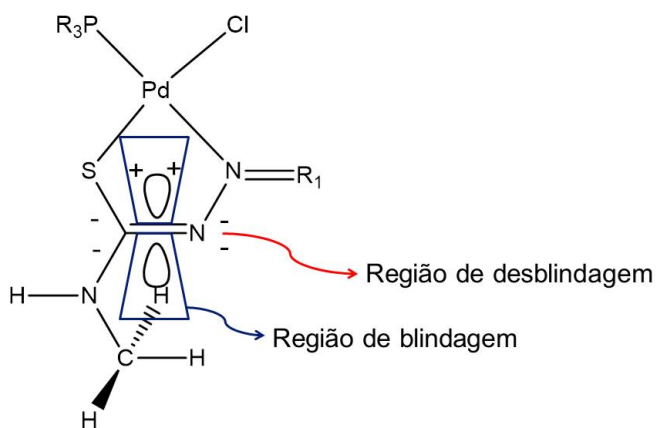


FIGURA 4.13 - Efeito anisotrópico causado sobre NHCH_3

No entanto, o sinal da metila (C1) foi deslocado para região desblindada do espectro, devido ao efeito indutivo, no qual, o metal ligado a N1 retira a densidade eletrônica dos átomos adjacentes, gerando regiões de menor blindagem. (FIGURA 4.14).⁵⁸

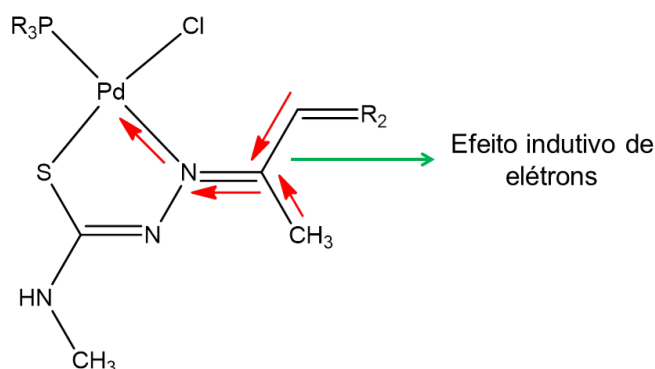


FIGURA 4.14 - Demonstração dos efeito indutivo (setas vermelhas) causado pela ligação N-Pd

Os sinais de H1 e H2 que estavam próximos (6,97 e 6,85 respectivamente) no espectro do TSC-CC foram deslocados por causa da coordenação ao metal. Os deslocamentos químicos de 6,85 e 6,97 ppm no ligante livre foram transpostos para 7,11 e 8,44 ppm (H1 e H2 respectivamente no composto **1**). O referido deslocamento deve-se ao efeito indutivo de elétrons em direção ao centro metálico. O H2 foi o que mais sofreu com o deslocamento de densidade eletrônica, tornando-se menos blindado que H1. A constante de acoplamento manteve-se em $J_{H1-H2}=16$ Hz. No espectro do complexo **1** também foi observado a presença de mais 15 H oriundos da trifenilfosfina.

No complexo **2** observou-se os mesmos efeitos já apresentados no complexo **1**. No entanto, para o complexo **2** o sinal referente aos hidrogênios do N3 aparecem em 4,44 ppm (FIGURA 4.15). A ocorrência desse sinal é comum em tiossemicarbazonas aniônicas, pois o mesmo efeito de blindagem de C1, foi observado com o hidrogênio de N3. Isso também indica a coordenação do ligante pelo metal. Outra diferença entre os espectros é o surgimento do pico em 2,4 ppm referente as metilas da tri(*p*-toluil)fosfina e mais 12 H referente aos anéis aromáticos dissubstituídos.

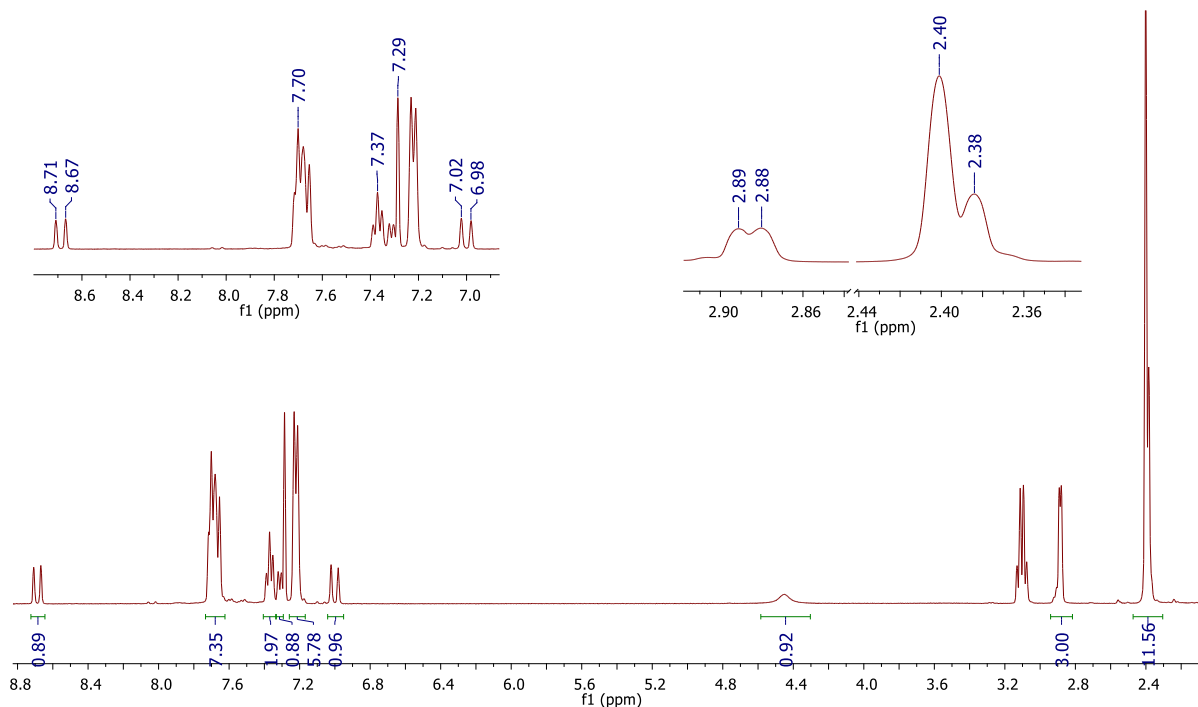


FIGURA 4.15 - Espectro de RMN ^1H em clorofórmio (d_1) do composto **2**

Os complexos **2** e **3** são isômeros devido ao uso das fosfinas (2: tri(*p*-toluil)fosfina ; 3: tri(*o*-toluil)fosfina). Assim sendo, observou-se espectros de RMN ^1H semelhantes, verificou-se que os mesmo efeitos são encontrados em ambos compostos (FIGURA 4.16).

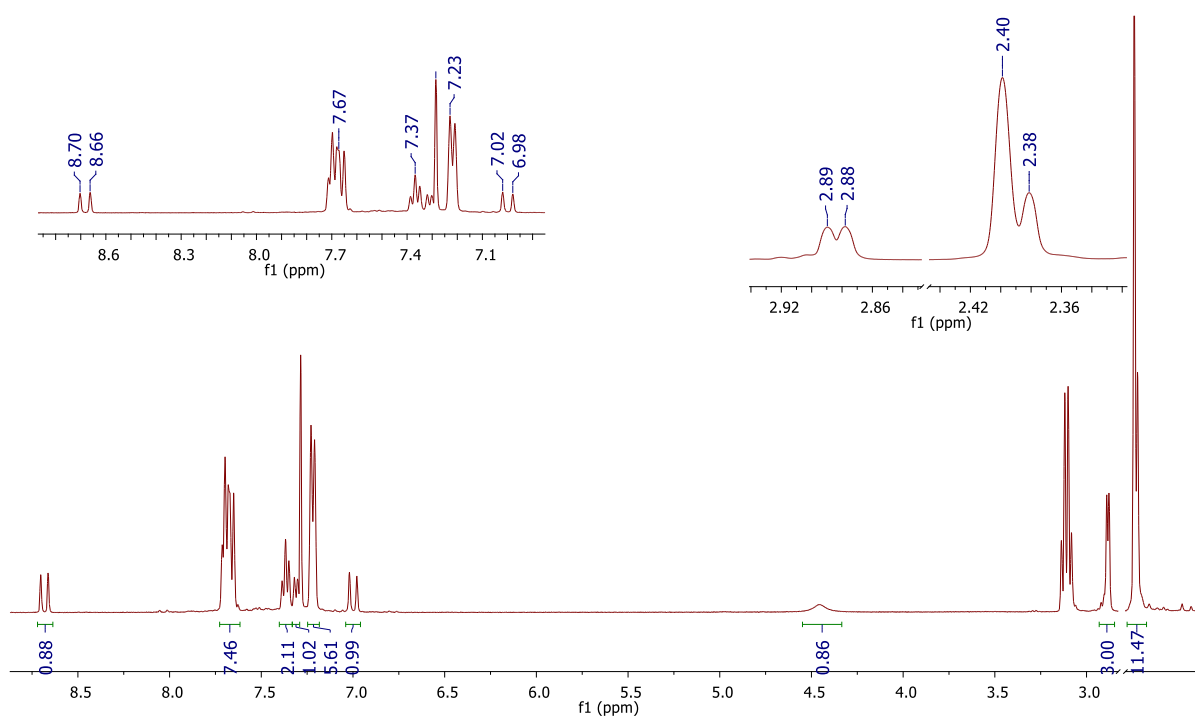


FIGURA 4.16 - Espectro de RMN ^1H em clorofórmio (d_1) do composto **3**

O complexo **4** contém a tris(4-fluorofenil)fosfina, e por este motivo apresenta menos hidrogênios na região aromática em comparação aos espectros dos compostos **1**, **2** e **3**. No espectro observou-se que o sinal referente a H1 está muito próximo dos outros sinais aromáticos restando, não sendo possível identifica-lo, assim, apenas o sinal de H2 em 8,35 ppm (FIGURA 1.17).

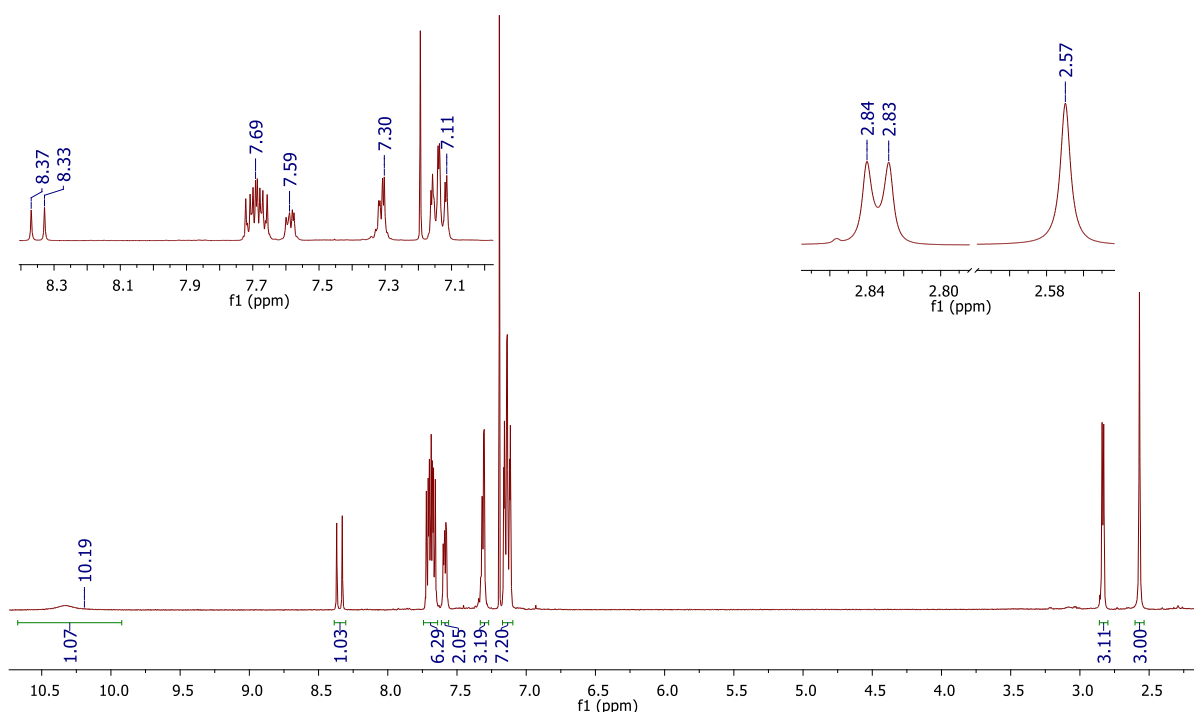


FIGURA 4.17 - Espectro de RMN ^1H em clorofórmio (d_1) do composto **4**

Observou-se que os espectros de RMN ^1H dos complexos **5** e **6** apresentaram e baixa resolução dos sinais, o que possivelmente é um efeito resultante da troca do cloro pelo iodo, uma vez que estes complexos possuem maior massa molar que os clorados, isso resultou em uma menor concentração das soluções. Mesmo assim, foi possível observar sinais característicos como as duas metilas do ligante TSC-CC. Foram encontrados na região dos aromáticos os sinais referentes a H1 ou H2 com acoplamento de 16Hz, característico (FIGURAS 1.18 e 1.19).

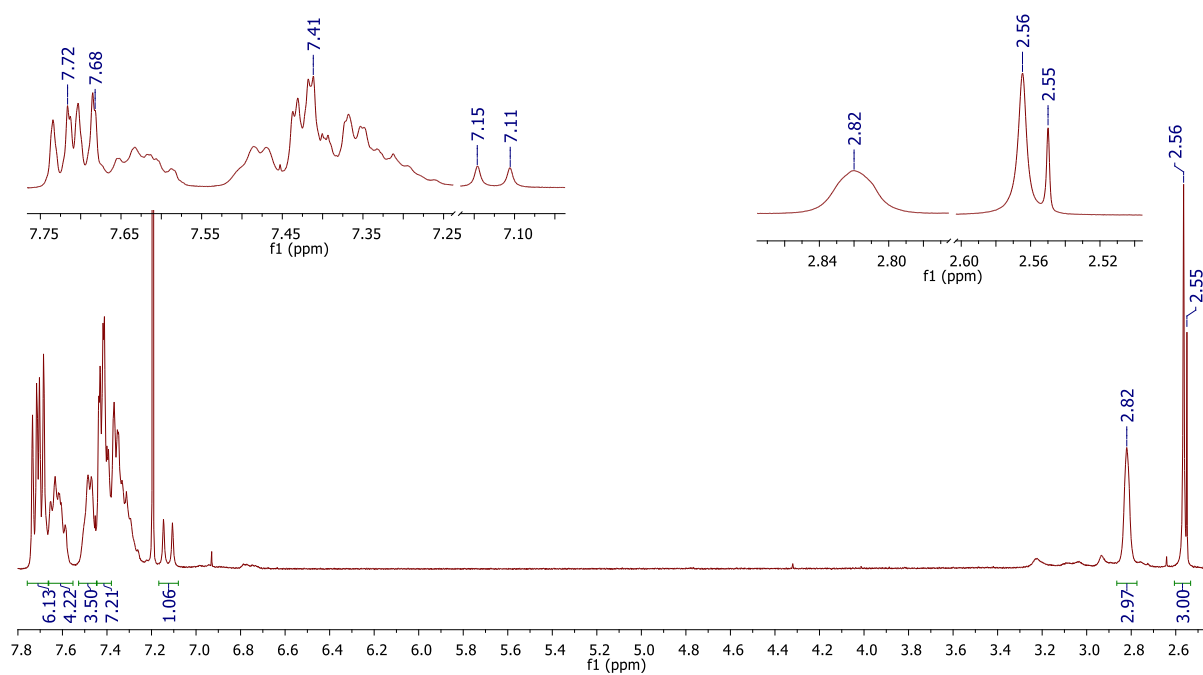


FIGURA 4.18 - Espectro de RMN ^1H em clorofórmio (d_1) do composto **5**

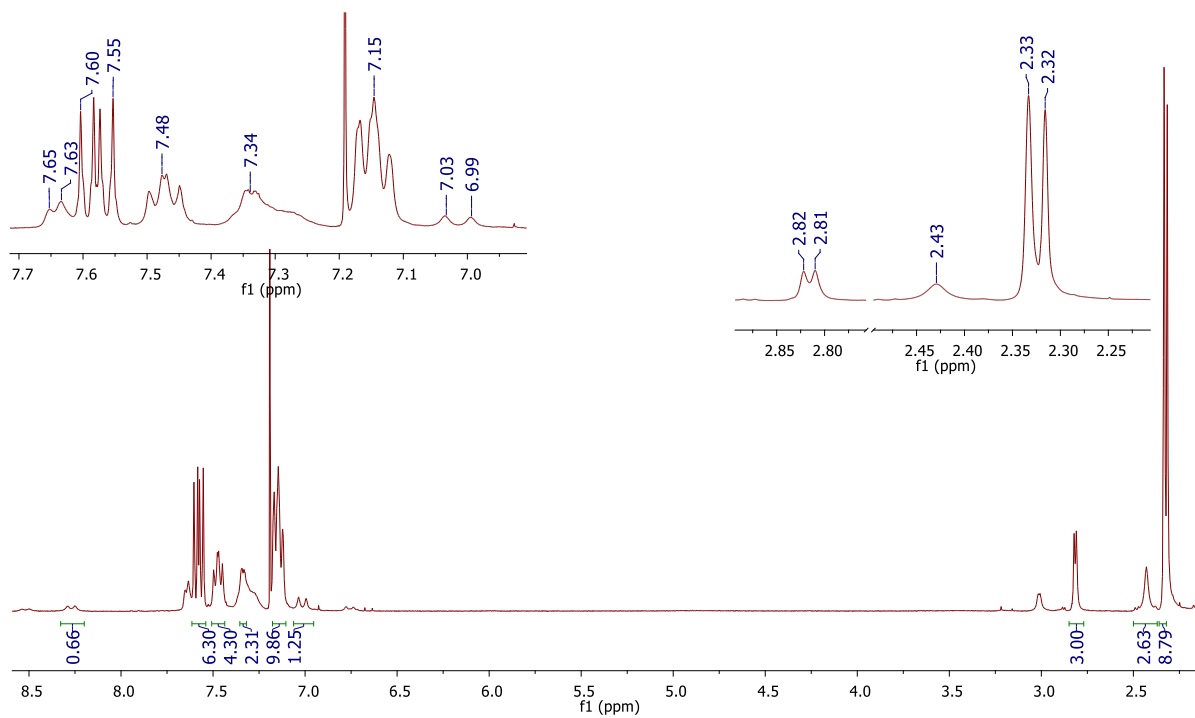


FIGURA 4.19 - Espectro de RMN ^1H em clorofórmio (d_1) do composto **6**

4.6.2 - RMN ^{31}P

Os espectros de RMN ^{31}P foram realizados com o objetivo de observar se ocorreu a coordenação do grupo fosfínico ligado ao metal. O espectro de RMN ^{31}P foi feito logo após a ressonância de ^1H , e a medida foi realizada com a mesma solução deuterada. Os espectros de RMN ^{31}P apresentaram deslocamento do sinal do fósforo da região blindada para mais desblindada do espectro, esse deslocamento indica a coordenação da fosfina ao Pd(II), onde o metal atua como retirador de densidade eletrônica, diminuindo assim a blindagem do núcleo. O espectro da tri(p-toluil)fosfina exemplifica o perfil obtido para as fosfinas livres (FIGURA 4.20) e os espectros obtidos para os complexos **1** a **6** estão dispostos na FIGURA 4.21.

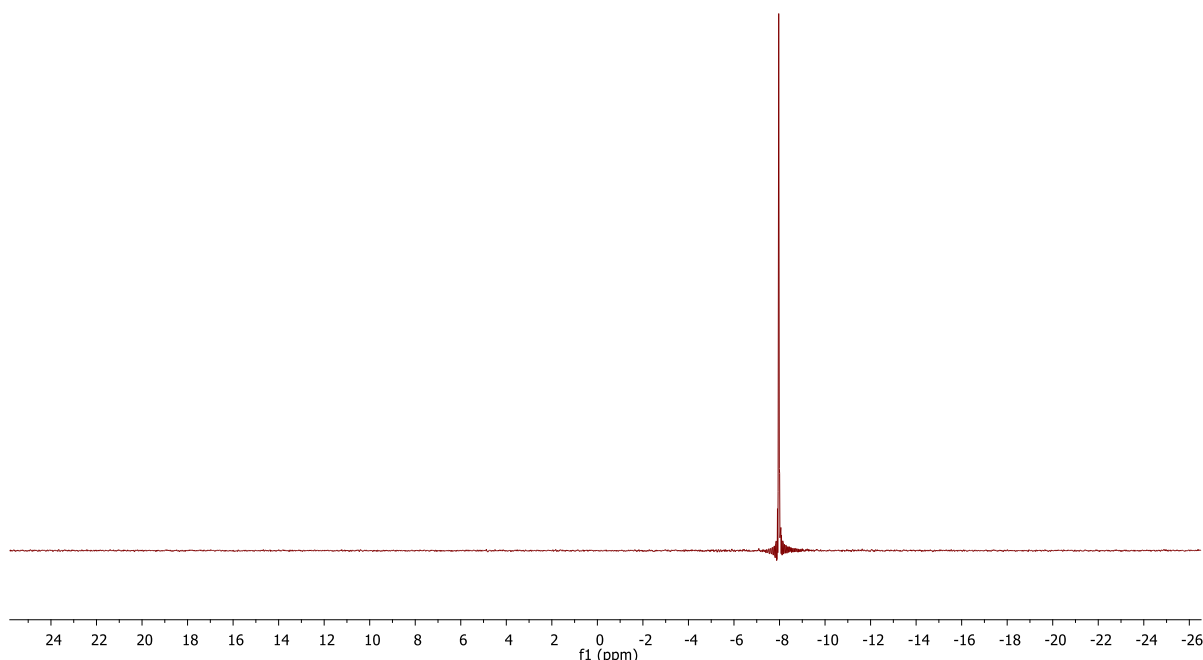


FIGURA 4.20 - Espectro de RMN ^{31}P da tri(p-toluil)fosfina.

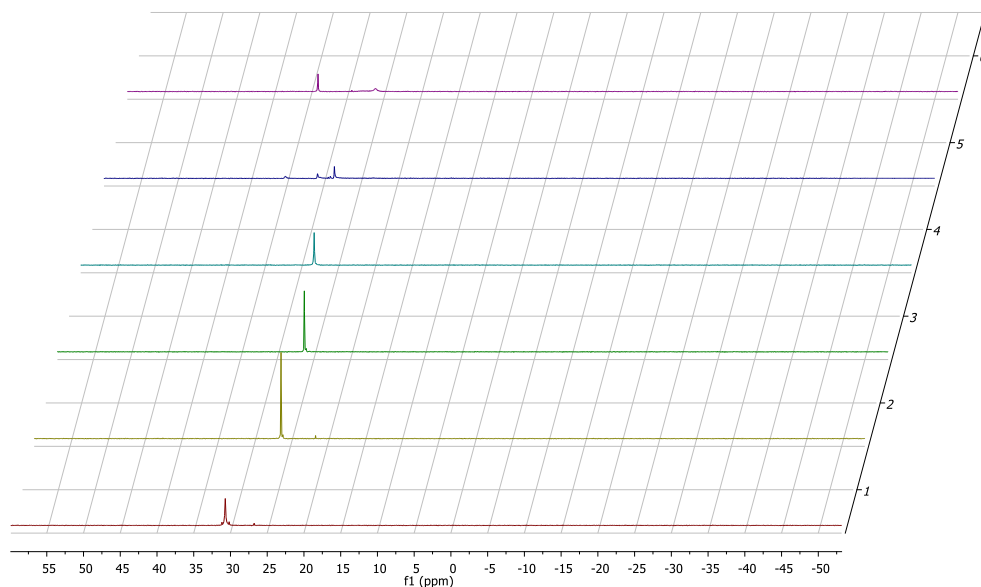


FIGURA 4.21 - Espectro de RMN P^{31} dos compostos **1** a **6**

4.7 - Espectrofotometria eletrônica na região do UV-Visível

Os espectros eletrônicos do ligante e dos complexos foram realizados em acetonitrila na concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. A FIGURA 4.22 apresenta a sobreposição dos espectros. O espectro do ligante TSC-CC demonstrou os maiores valores de absorvidade molar ($\epsilon = 14.267,62 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) entre todos os compostos, apresentando uma banda em região de alta energia em torno de 330 nm. Sendo assim, o alto valor de absorvidade encontrado, junto com a sua região de absorção e a largura da banda indica uma transição do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$.

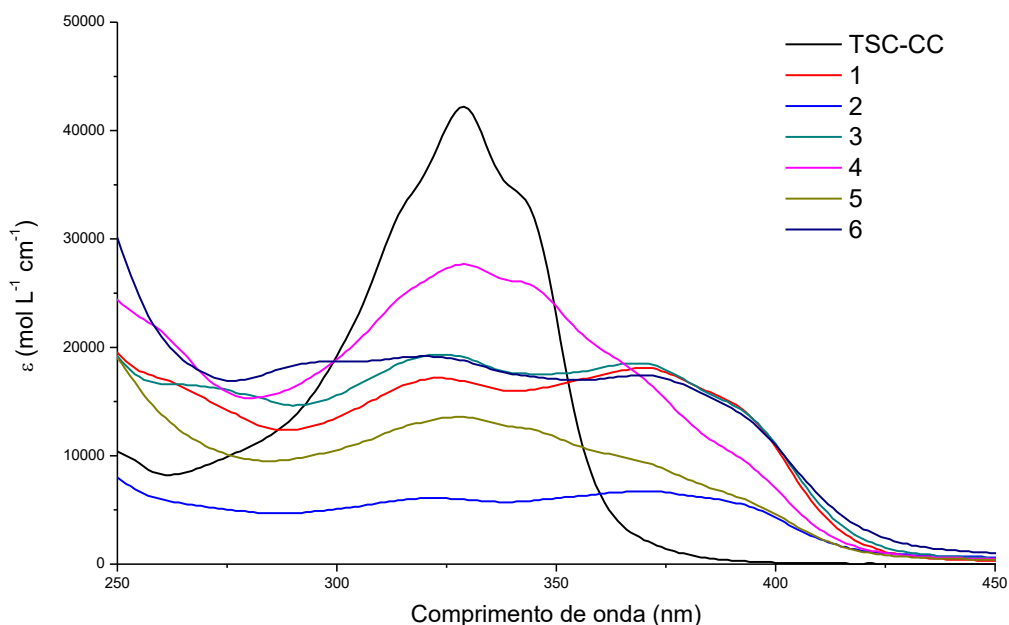


FIGURA 4.22 - Espectros eletrônicos de UV-Vis dos complexos e ligante TSC-CC.

Este tipo de transição intraligante ocorre comumente na região do ultravioleta, por causa da sua alta energia em relação a transferências de carga ou banda MC (centrada no metal), por exemplo. Assim, a geração de um nó orbital no momento da transição eletrônica faz com que ela seja muito permitida, fato esse que favorece a interação da densidade eletrônica com a luz incidente segundo TURRO et al.⁵⁹

O menor número de átomos e conseqüentemente menor número de estados vibracionais faz com que a banda seja mais estreita em relação aos complexos. O grande número de ligações σ permite que a molécula ainda tenha modos vibracionais acessíveis, o que provoca o alargamento da banda em relação a ligantes mais rígidos como a fenantrolina, que por exemplo apresenta uma banda fina em 290 nm.⁶⁰

Observou-se que os complexos apresentam bandas largas na região de 270 a 400 nm. E normalmente essa região está relacionada a Transferência de Carga (MLCT ou LMCT) para complexos de paládio, uma vez que a conformação quadrática plana estabiliza os orbitais do centro do íon metálico, tornando-os energeticamente mais distantes dos orbitais do ligante, conseqüentemente, faz com que a transição de carga seja mais

energética.^{47,61} Observando-se a configuração (d^8) do íon metálico e a configuração ácido π dos ligantes associados atribuiu-se a transição a uma transferência de carga do metal para o ligante; $M \rightarrow L$ (MLCT).

Os cálculos de TD-DFT realizados para os complexos clorados mostraram boa sobreposição e perfis coerentes com os experimentais (FIGURA 4.23). Os deslocamentos observados são atribuídos à diferença experimental onde o espectro foi obtido em acetonitrila enquanto os cálculos foram realizados no vácuo. Sendo assim, a ferramenta computacional permitiu confirmar a natureza das transições eletrônicas.

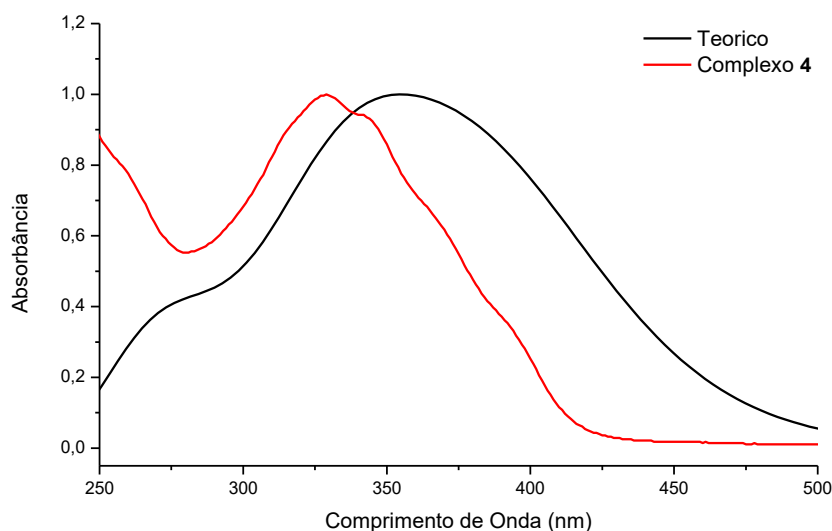


FIGURA 4.23 - Sobreposição do espectro experimental e teórico para o complexo 4.

É importante ressaltar, que o estado excitado alcançado na absorção é oriundo de um conjunto de transições eletrônicas, dado que no momento em que a absorção ocorre, a densidade eletrônica na molécula inteira se reorganiza e o resultado dessa reorganização são essas várias transições. Assim, é inviável analisar todas as transições que compõem o estado de maior intensidade, desta forma, investigou-se a transição que contribui mais significativamente para a composição do estado.

No complexo 4, por meio de cálculos teóricos de DFT observou-se a ocorrência de 942 transições eletrônicas simultâneas no estado 11, que

é o maior responsável pela banda de transição de carga em 380nm. Nesse caso, 78.08% da contribuição do estado excitado de maior força de oscilador é referente à transição dos orbitais 160 → 162, onde o orbital 160 se caracteriza como um orbital com grande densidade de carga no centro metálico, enquanto que o orbital 162 se caracteriza pela ausência de densidade eletrônica no metal (FIGURA 4.24). O mesmo foi observado para todos os complexos clorados e as devidas atribuições teóricas encontram-se na TABELA 4.5.

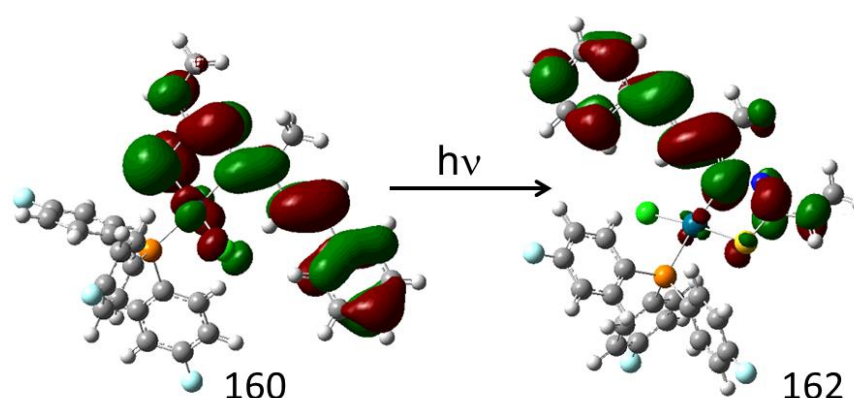


FIGURA 4.24 - Representação esquemática da transição de maior contribuição do estado 11 (Complexo 4)

TABELA 4.5 - Comparação dos dados experimentais (Ex) e teóricos (T) da transição de maior intensidade e a maior contribuição dos orbitais calculados.

Complexo	Comprimento de Onda (nm)		Estado	Orbitais (Contribuição %)
	Ex.	T.		
1	370	352	20	147→150 (43,3)
2	370	354	20	159→162 (51,0)
3	370	350	22	159→162 (58,5)
4	329	352	11	160→162 (78,1)

Afim de comparar semelhanças entre os complexos, foram escolhidas as bandas de maior absorvidade molar (ϵ) que estão dispostas na TABELA 4.6, e observou-se que os complexos **1**, **2** e **3** apresentaram o mesmo comprimento de onda entre si. Tal semelhança refere-se a própria

estrutura do complexo, em que os três complexos possuem fosfinas substituídas com H ou CH₃ nas posições *orto* ou *para*.

TABELA 4.6 - Valores experimentais de comprimento de onda de maior intensidade e suas atribuições.

Composto	Comprimento de Onda (nm)	ϵ (mol·L ⁻¹ cm ⁻¹)	Transição
TSC-CC	228	42100	$\pi \rightarrow \pi^*$
1	370	18100	M→L
2	370	6700	M→L
3	370	18500	M→L
4	329	27700	M→L
5	327	13600	M→L
6	321	19200	M→L

Quanto ao complexo **4** que possui uma fosfina fluorada apresentou deslocamento hipsocrômico (para região de maior energia). Sugere-se então, que a entrada de átomos de flúor na estrutura estabiliza os orbitais moleculares, o que foi confirmado por cálculo. E quando se compara a energia dos orbitais HOMO do complexo fluorado (**4**) tem energia de -0,19266 eV, enquanto que, o HOMO do complexo **1**, com trifenilfosfina, possui energia de -0,19093 eV.

Por fim, os complexos em que foi substituído o cloreto por iodeto também apresentaram deslocamento hipsocrômico, em comparação aos complexos **1**, **2** e **3**. Porém, observa-se um mesmo perfil de absorção.

4.8 - Medida de lipofilicidade (logP)

A medida de lipofilicidade ou coeficiente de partição foi feita em uma mistura de água/1-octanol, devido a precipitação dos complexos durante a agitação foi necessário a solubilização prévia de 1mg de complexo em DMSO (300 μ L). Partindo da solução inicial foram coletados 30 μ L e adicionados ao 1-octanol (750 μ L), depois se misturou com água (750 μ L). Desta forma, foi possível realizar o ensaio com uma quantidade máxima de 2% (v/v) de DMSO no volume total (FIGURA APÊNDICE 1 a 8). Entretanto, devido a baixa solubilidade dos complexos **2** e **3** não foi possível obter o coeficiente de partição para estes compostos. A FIGURA 4.25 apresenta um

gráfico em barras onde cada barra corresponde ao valor de logP calculado para cada complexo.

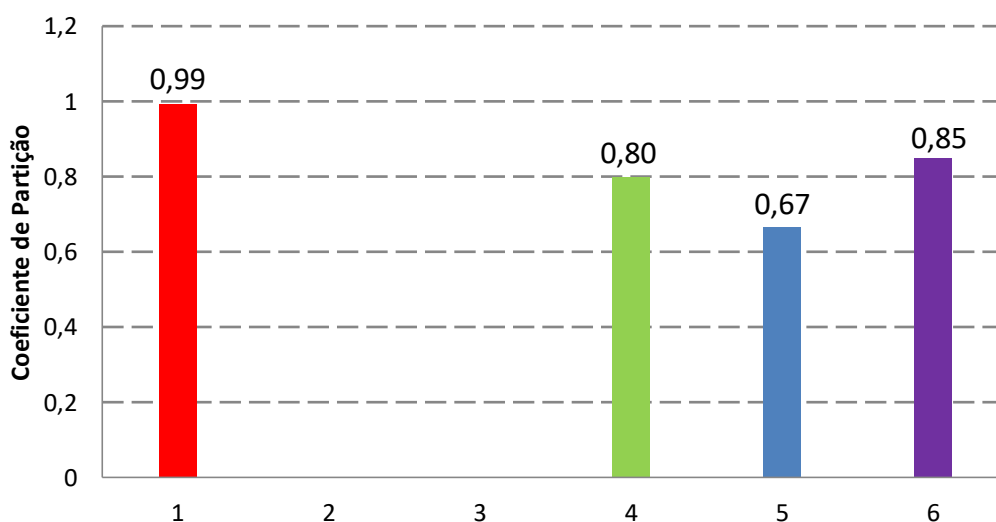


FIGURA 4.25 - Gráfico em barras com valores de logP para os complexos de 1 a 6.

Os complexos apresentaram características lipofílicas, log P positivo. A faixa de log P que os compostos se encontram é considerada uma faixa ótima para a travessia da membrana fosfolipídica da célula,⁵¹ e transporte pelas vias sanguíneas, uma vez que esta pequena tendência lipofílica não impede que os complexos interajam em ambientes mais hidrofílicos. Os complexos 1 e 4 apresentaram log P igual ou superior a 0,8 indicando sua capacidade de permear a membrana celular.

4.9 - Citotoxicidade

A avaliação citotóxica dos compostos foi feita utilizando o método MTT, pela determinação dos dados de IC₅₀, ou seja, a concentração mínima necessária para inibir em 50% o crescimento celular. O ensaio foi feito comparando-se células tratadas com os compostos e células não tratadas (controle). As células utilizadas para o ensaio foram MDA-MB-231 (câncer de mama), A549 (câncer de pulmão) e MRC5 (célula não tumoral de fibroblasto de feto humano) afim de comparar quais são as preferencia da ação citotóxica dos complexos. As linhagens tumorais foram escolhidas devido a conhecida superexpressão de TOPOIIA.^{12,13}

Os resultados obtidos revelaram alta atividade inibitória dos complexos com a linhagem celular MDA-MB-231. Todos os complexos, exceto o composto **2**, apresentaram maior citotoxicidade que a cisplatina sendo que o complexo **4** mostrou um IC_{50} 4 vezes menor que o fármaco padrão. Nesse estudo, observou-se maior atividade dos complexos com a fosfina fluorada e sem substituintes para essa linhagem celular. O ligante TSC-CC apresentou um valor de IC_{50} superior a $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, o que acentua a importância da coordenação na maior atividade de algumas moléculas orgânicas.

Relacionando os valores obtidos do IC_{50} para MDA-MB-231 com o log P observou-se uma maior citotoxicidade para os complexos mais lipofílicos, com exceção de **6**, que apresentou valor de log P superior a 0,8, entretanto, não demonstrou alta citotoxicidade, indicando que a substituição do haleto, neste caso diminuiu a atividade. Estes resultados podem indicar que ocorreu a entrada dos complexos **1** e **4** de forma mais efetiva nas células gerando uma maior efeito antiproliferativo. Por fim, os complexos **2** e **3** que se mostraram pouco solúveis não apresentaram boa atividade nos ensaios citotóxicos (TABELA 4.7).

TABELA 4.7 - Dados de IC_{50} ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e Índice de Seletividade (SI).

Compostos	Linhagens Celulares			SI*
	MDA-MB-231	A549	MCR5	
TSC-CC	>25	>25	–	
1	0,89±0,2	16,7 ± 2,4	5,5 ± 1,3	6,2
2	3,43±0,8	24,6 ± 2,8	4,7 ± 1,6	1,3
3	1,58±0,7	8,4 ± 1,9	–	–
4	0,56±0,1	12,6 ± 2,8	2,7 ± 0,4	4,8
5	1,04±0,2	15,6 ± 3,7	6,2 ± 1,6	4,4
6	1,29±0,6	19,7 ± 2,7	7,0 ± 1,8	5.4
Cisplatina	2,44 ± 0,2	17,5 ± 4,7	5.1 ± 0.7	2.1

* SI = [MRC5] / [MDA-MB-231]

O câncer de pulmão é caracterizado pela sua superexpressão de TOPOIIA, no entanto existem diversos tipos de células cancerosas de origem pulmonar com características distintas. Essas células são comumente divididas entre células tumorais de pulmão não pequenas (NSCLC, sigla em inglês) ou células tumorais de pulmão pequenas (SCLC, sigla em inglês).⁶²

As NSCLC são formadas por células tumorais como adenocarcinomas (de origem epitelial glandular), células escamosas (de origem epitelial), dentre outras. As NSCLC são normalmente mais resistentes à ação de quimioterápicos do que as SCLC, e podem ser formadas em regiões mais distantes das vias aéreas.⁶²

Já as SCLC surgem dos tecidos das vias aéreas centrais, na parte interna do pulmão. Uma característica dessas células é a maior taxa de crescimento e metástase do que as células NSCLC. Sendo assim, é um tipo de câncer mais agressivo que pode surgir dentro do pulmão.

Nesse trabalho utilizou-se da linhagem celular A549, um adenocarcinoma ou uma NSCLC, que apresentou maiores concentrações de IC₅₀ do que a linhagem de mama. Os complexos **1**, **3**, **4** e **5** apresentaram menores concentrações que a cisplatina no ensaio de IC₅₀, e o complexo **3** foi o mais ativo da série para esta linhagem. Já o complexo **2** demonstrou menor toxicidade contra ambas linhagens tumorais.

A grande diferença entre as concentração de IC₅₀ das duas linhagens motivou o estudo das células cancerosas de pulmão. E alguns trabalhos apresentaram que há uma diferença entre a expressão de TOPOIIA entre células NSCLC e SCLC. Comumente as células do tipo SCLC apresentam maior expressão da enzima TOPOIIA que as células NSCLC. Esses ensaios indicaram que as células NSCLC são mais resistentes a inibidores de topoisomerase II.^{13,63-65}

Durante o cultivo celular de diferentes linhagens observou-se que a MRC5 possui proliferação elevada ou alta taxa de multiplicação, quando comparada com as demais células. Tal propriedade pode estar relacionada com a origem dessa linhagem, que é de feto humano com 14 semanas de gestação. Sendo a MRC5 uma célula de rápida proliferação, possivelmente apresenta alta taxa de enzimas de divisão celular, com a TOPOIIA. No entanto, ainda não foram encontrados dados que atestem a quantificação de topoisomerase II na MRC5. Estas observações justificam os baixos valores de IC₅₀ encontrados para os complexos na linhagem celular MCR5, quando comparada com a linhagem A549.

O índice de seletividade (IS) deu-se pela razão entre a inibição celular de um composto tendo em vista a comparação de duas linhagens diferentes, $IS = IC_{50}(MRC5)/IC_{50}(MDA-MB-231)$. Tal razão auxilia na comparação da atividade e seletividade dos compostos frente ao fármaco padrão, no caso, cisplatina.^{51,66} Os IS obtidos no presente trabalho demonstram que os complexos sintetizados apresentam maior seletividade que a cisplatina, a maioria dos complexos apresentaram $IS > 4$, sendo considerado dentro da literatura como um bom índice de seletividade para compostos com possível ação antitumoral.

4.10 - Interação com DNA

4.10.1 - Titulação espectroscópica

O complexo **4** apresentou, em media, maior atividade citotóxica na linhagem de mama, e foi escolhido para ser analisado no ensaio de interação com o DNA por titulação espectroscópica.

As interações dos complexos de metais de transição com o DNA podem ser covalentes ou não-covalentes. Quando ocorre interação covalente, o ligante lábil dos complexos é substituído por uma base nitrogenada do DNA, ao passo que as interações não-covalentes incluem: intercalação, interação com os sulcos e atração eletrostática. A FIGURA 4.26 apresenta os espectros eletrônicos da titulação espectroscópica para o composto **4** em diferentes concentrações.

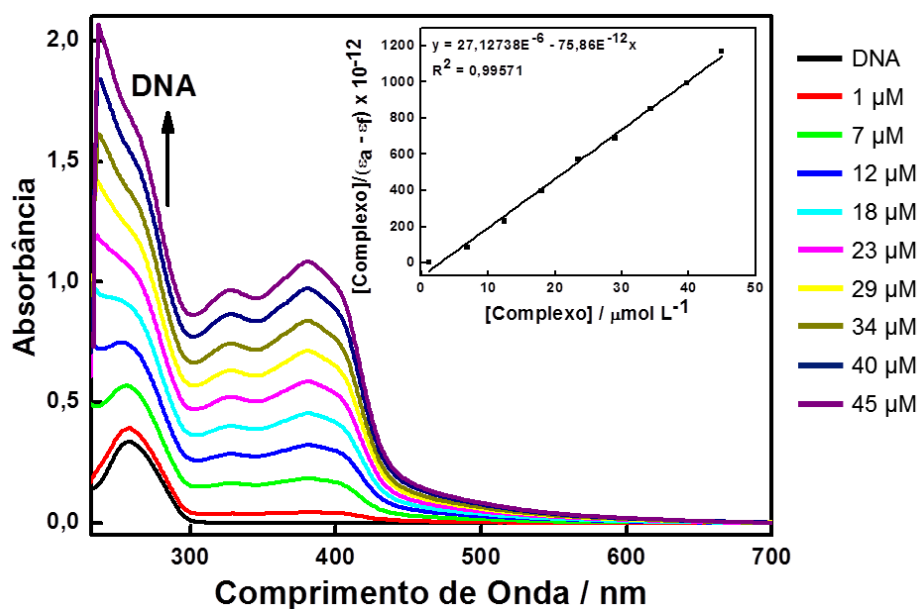


FIGURA 4.26 - Espectros de absorção de titulação espectroscópica na região do UV-vis do complexo **4** de Pd(II) em DMSO

Os espectros de absorção não apresentam efeito hipocromico ou batocromismo, o que indicaria a possibilidade de intercalação do complexo entre as bases do DNA. Possivelmente, o complexo possui uma interação fraca que foi atribuída a uma atração eletrostática, ou uma interação nos sulcos do DNA, devido a um efeito hiperacrômico. Como os complexos são neutros, existe a possibilidade de uma interação eletrostática não clássica, formando ligações de hidrogênio entre o complexo e as bases do DNA. A constante intrínseca de ligação (K_b) apresentada para o complexo foi de $4,0 \pm 0,8 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, comumente esse valor é associado a uma interação eletrostática ou não interação^{50, 52},

4.10.2 - Interação com plasmídeo surperenovelado

Outra forma de análise da interação dos compostos com DNA é por meio da eletroforese, uma técnica bem conhecida e conceituada, consistindo no arraste de moléculas por uma matriz porosa (gel de agarose).⁵³ Esse arraste é realizado aplicando-se uma carga elétrica e uma corrente sobre o gel, o DNA corre no gel em razão da sua carga negativa em pH neutro ou fisiológico (7,4). Deste modo, o plasmídeo corre no gel do cátodo para ânodo.

Existe uma relação entre a mobilidade e o tamanho da molécula. O DNA superenovelado possui menor volume, sendo mais compacto do que o DNA relaxado (FIGURA 4.27). Essa diferença conformacional da molécula afeta seu deslocamento através do gel. Assim, o DNA superenovelado possui maior mobilidade no gel que o DNA relaxado. Devido a essa particularidade é possível observar as mudanças na forma do DNA através da retenção no gel de eletroforese.⁵³

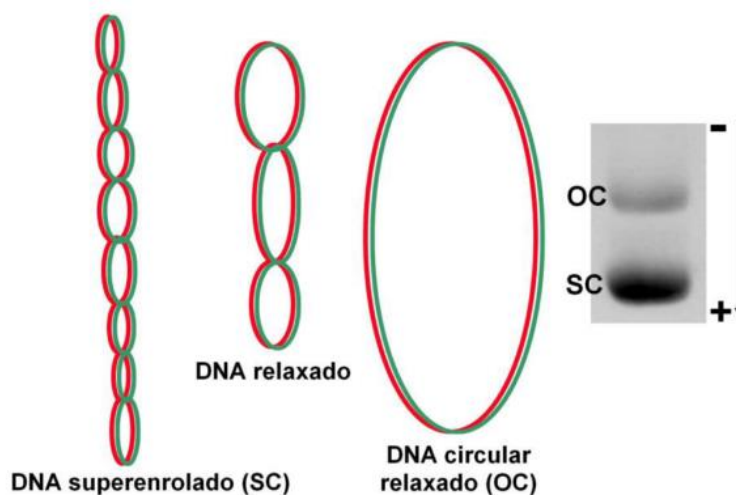


FIGURA 4.27 - Representação esquemática das formas do DNA plasmídeo observadas por eletroforese em gel de agarose.⁵³

Os complexos escolhidos para o procedimento foram o **1**, **4** e **5** por apresentarem os menores valores de IC_{50} com a MDA-MB-231. Os complexos foram solubilizados em DMSO, e uma alíquota foi adicionada à mistura reacional com o plasmídeo solubilizado em tampão TE (Tris-EDTA), deste modo, a porcentagem máxima de DMSO em solução foi de 3,3% (v/v). Após a incubação dos complexos com o plasmídeo por 24 h, a mistura reacional foi adicionada no gel de agarose 1% (m/v) e o gel foi submetido a eletroforese de 20 mV por 12 h. Esse baixo potencial em um longo período de tempo tem como objetivo aumentar a resolução do ensaio. Ao fim da corrida o gel foi mergulhado numa solução de brometo de etídio para corar o gel, em seguida, foi feita a fotodocumentação.

A FIGURA 4.28 apresenta o gel de agarose revelado, L1 representa o controle negativo, plasmídeo pB322 e 3,33% (v/v) de DMSO; L2 representa o controle positivo, plasmídeo e cisplatina. Sabe-se que a

cisplatina é capaz de afetar a estrutura do DNA e alterar sua mobilidade eletroforética, seja formando torções em sua estrutura, o que dificulta moderadamente a mobilidade no gel ou clivando algumas ligações do DNA, diminuindo o enovelamento do plasmídeo e ainda mais a mobilidade no gel de agarose. As demais linhas apresentam a interação do plasmídeo com os complexos após 24h de incubação.

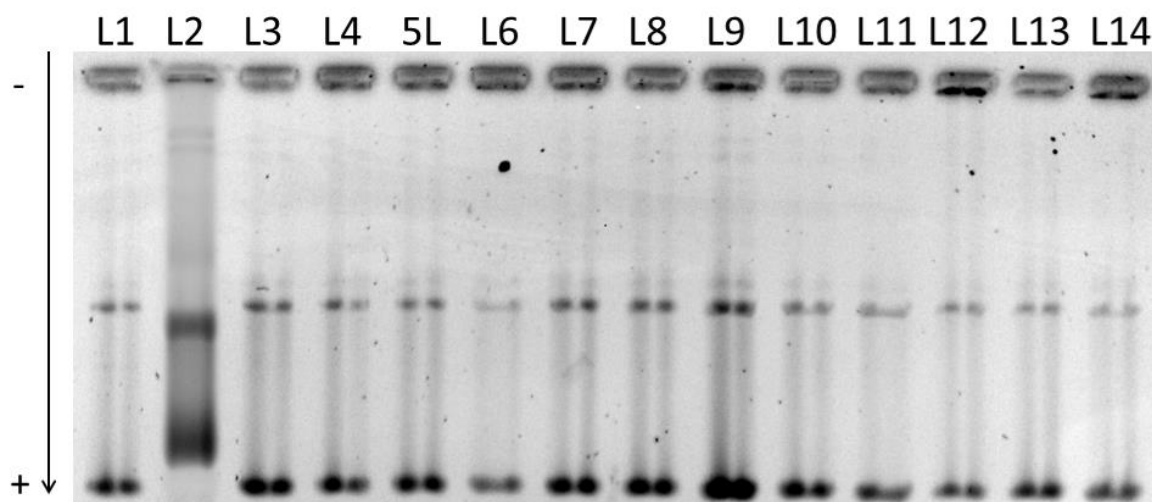


FIGURA 4.28 - Incubação do plasmídeo superenovelado com os compostos 1, 4, 5 por 24h. Linha 1: plasmídeo/DMSO (3,3% (v/v)). Linha 2: cisplatina. (Linha 3: **1** ($0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 4: **1** ($0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 5: **1** ($3,1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 6: **1** ($12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 7: **4** ($0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 8: **4** ($0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 9: **4** ($3,1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 10: **4** ($12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 11: **5** ($0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 12: **5** ($0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 13: **5** ($3,1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 14: **5** ($12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.)

Os dados demonstram a ausência de interação entre o plasmídeo e os complexos, sendo que a única mudança significativa de mobilidade eletroforética foi observada na linha 2, correspondente ao controle positivo, indicando que o DNA não seja o alvo desses compostos.

4.11 - Inibição da enzima DNA-Topoisomerase II α

O ensaio de inibição da DNA-Topoisomerase II foi realizado com o kit fornecido pela Inspiralis Limited, utilizando o plasmídeo pBR322 (DNA superenovelado), o qual foi incubado com todos os complexos

individualmente em duas diferentes concentrações, 5 e 12,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. O resultado obtido apresentou a melhor inibição da enzima associada aos complexos **1**, **4**, **5** e **6** (FIGURA 4.29).

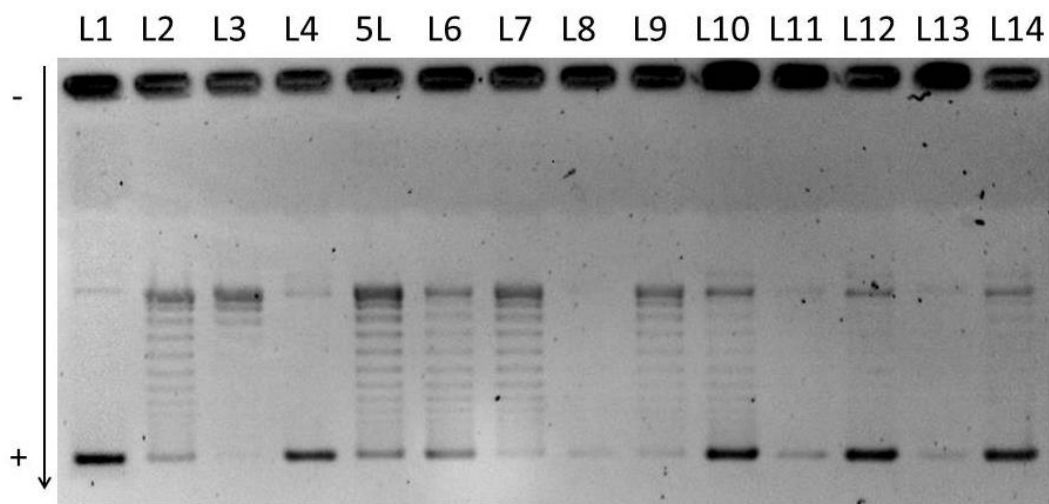


FIGURA 4.29 - Capacidade inibitória da enzima TOPOIIA pelos complexos **1** a **6**. Linha 1: plasmídeo (3,3% (v/v) DMSO). Linha 2: DNATopoisomerase plasmideo. Linha 3: **1** (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 4: **1** (12,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).Linha 5: **2** (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 6: **2** (1,25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).Linha 7: **3** (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 8: **3** (12,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).Linha 9: **4** (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 10: **4**(12,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha 11: **5** (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha12: **5** (12,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).Linha 13: **6** (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Linha14: **6** (12,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Neste ensaio foi observado que nas linhas referentes aos complexos **1**, **4**, **5** e **6** houve inibição da enzima TOPOIIA na concentração de 12,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. De acordo os ensaios anteriores, não há indicações que os complexos atuem sobre o DNA, sendo assim, o resultado apresentado acima indica apenas a atividade da enzima TOPOIIA sobre o plasmídeo pBR322. Sendo qualquer alteração no perfil de bandas relacionada a interação direta entre os complexos e a enzima alvo. Desta forma podemos observar a inibição da enzima, ou seja, a presença de DNA superenovelado, nas linhas 4, 10, 12 e 14.

Comparando-se a ação dos complexos frente a TOPOIIA com um fármaco já utilizado, o etopósido (inibição a 35 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), nota-se uma ação de 2,8 vezes mais eficaz dos complexos de paládio(II). Confrontando-se

os resultados obtidos de citotoxicidade e inibição da TOPOIIA pode-se observar uma relação existente entre eles. Os complexos que apresentaram maior inibição da enzima são os mesmos se mostraram mais citotóxicos frente a linhagem de mama.

5 - Considerações finais

5.1 - Conclusões

Neste trabalho foram planejados e sintetizados 6 novos complexos de paládio(II), os quais foram caracterizados pelas técnicas espectroscópicas de IV, RMN e UV-vis. Os dados obtidos corroboraram com a estrutura molecular determinada pela difração de raios X de monocristal, a qual apresenta uma geometria plana distorcida ao redor do íon Pd(II). Cálculos computacionais permitiram propor estruturas para os complexos análogos sem dados cristalográficos.

Após a caracterização dos complexos, foram realizados os ensaios de citotoxicidade para a avaliação da citotoxicidade frente as seguintes linhagens celulares: câncer de mama (MDA-MB-231), câncer de pulmão (A549) e fibroblasto pulmonar (MRC5). Os complexos apresentaram desempenho satisfatório, sendo que em sua maioria foram mais ativos que a cisplatina, além disso, demonstraram boa seletividade quando comparados com a fármaco padrão.

Uma vez que os compostos apresentaram significativa atividade citotóxica, a investigação de um possível alvo terapêutico se mostrou necessária. Ensaios de interação entre o DNA e os complexos foram realizados, entretanto não foi observado interações significativas que justificassem a citotoxicidade obtida.

A avaliação da capacidade inibitória dos complexos frente a enzima TOPOIIA forneceu importantes informações sobre um possível meio de ação, já que os complexos mais ativos nas células tumorais foram os que apresentaram maior capacidade em inibir a enzima alvo, em concentrações mais baixas do que o fármaco etopósido.

Outra importante observação é a influencia do grupo fosfínico na citotoxicidade e na inibição da enzima TOPOIIA, onde os complexos com fosfinas fluoradas (**4**) ou com o anel fenílico não substituído (**1** e **5**) apresentaram os menores valores de IC₅₀ para a MDA-MB-231 e maior inibição da enzima TOPOIIA em comparação com os demais complexos.

6 - Referências bibliográficas

1. Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. *ABC DO CÂNCER: Abordagens Básicas Para o Controle Do Câncer*; 2011.
2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. O que é o câncer?
3. World Health Organization. Key statistics
<http://www.who.int/cancer/resources/keyfacts/en/> (accessed Mar 20, 2018).
4. International Agency for Research on Cancer; GLOBOCAN2012
<http://globocan.iarc.fr> (accessed Mar 20, 2018).
5. Ministério da Saúde; Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Estimativa 2018-Incidência de câncer No Brasil*; 2017.
6. Bernardi, A.; Jacques-silva, M. C.; Lenz, G. Abordagem Molecular No Desenvolvimento de Fármacos Anti-Tumorais. *Infarma* **2003**, 2 (9), 61.
7. Sudhakar, a. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods Akulapalli. *J Cancer Sci Ther.* **2010**, 1 (2), 1.
8. Yamanaka, K.; Chatterjee, N.; Hemann, M. T.; Walker, G. C. Inhibition of Mutagenic Translesion Synthesis: A Possible Strategy for Improving Chemotherapy? *PLoS Genet.* **2017**, 13 (8), 1.
9. Dertinger, S. D.; Avlasevich, S. L.; Torous, D. K.; Bemis, J. C.; Phonethepswath, S.; Labash, C.; Carlson, K.; Mereness, J.; Cottom, J.; Palis, J.; et al. Persistence of Cisplatin-Induced Mutagenicity in Hematopoietic Stem Cells: Implications for Secondary Cancer Risk Following Chemotherapy. *Toxicol. Sci.* **2014**, 140 (2), 307.
10. Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature* **1969**, 222 (5191), 385.
11. Dasari, S.; Bernard Tchounwou, P. Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, 740, 364.
12. Liu, D.; Huang, C.; Kameyama, K.; Hayashi, E.; Yamauchi, A.; Sumitomo, S.; Yokomise, H. Topoisomerase IIalpha Gene Expression Is Regulated by the P53 Tumor Suppressor Gene in Nonsmall Cell Lung Carcinoma Patients. *Cancer* **2002**, 94 (8), 2239.
13. Doyle, L. Topoisomerase Expression in Cancer Cell Lines and Clinical Samples. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1994**, 34, 32.
14. ANDERSON, H.; ROBERGE, M. DNA Topoisomerase II: A Review of Its Involvement in Chromosome Structure, DNA Replication, Transcription and Mitosis. *Cell Biol. Int. Rep.* **1992**, 16 (8), 717.
15. Pommier, Y. Drugging Topoisomerases: Lessons and Challenges. *ACS Chemical Biology.* 2013, pp 82.
16. Baviskar, A. T.; Amrutkar, S. M.; Trivedi, N.; Chaudhary, V.; Nayak, A.; Guchhait, S. K.; Banerjee, U. C.; Bharatam, P. V.; Kundu, C. N. Switch in Site

- of Inhibition: A Strategy for Structure-Based Discovery of Human Topoisomerase II?? Catalytic Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, 6 (4), 481.
17. Larsen, A. K.; Escargueil, A. E.; Skladanowski, A. Catalytic Topoisomerase II Inhibitors in Cancer Therapy. *Pharmacol. Ther.* **2003**, 99 (2), 167.
 18. Riddell, I. A.; Agama, K.; Park, G. Y.; Pommier, Y.; Lippard, S. J. Phenanthriplatin Acts as a Covalent Poison of Topoisomerase II Cleavage Complexes. **2016**.
 19. Haffner, M. C.; Aryee, M. J.; Toubaji, A.; Esopi, D. M.; Albadine, R.; Gurel, B.; Isaacs, W. B.; Bova, G. S.; Liu, W.; Xu, J.; et al. Androgen-Induced TOP2B-Mediated Double-Strand Breaks and Prostate Cancer Gene Rearrangements. *Nat. Genet.* **2010**, 42 (8), 668.
 20. Chen, W.; Qiu, J.; Shen, Y. Topoisomerase II α , Rather than II β , Is a Promising Target in Development of Anti-Cancer Drugs. *Drug Discov. Ther.* **2012**, 6 (5), 230.
 21. Kumar, A.; Ehrenshaft, M.; Tokar, E. J.; Mason, R. P.; Sinha, B. K. Nitric Oxide Inhibits Topoisomerase II Activity and Induces Resistance to Topoisomerase II-Poisons in Human Tumor Cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2016**, 1860 (7), 1519.
 22. Zhu, T.; Shen, S.; Lu, Q.; Ye, X.; Ding, W.; Chen, R.; Xie, J.; Zhu, W.; Xu, J.; Jia, L.; et al. Design and Synthesis of Novel N(4)-Substituted Thiosemicarbazones Bearing a Pyrrole Unit as Potential Anticancer Agents. *Oncol. Lett.* **2017**, 13 (6), 4493.
 23. Tenório, R. P.; Góes, A. J. S.; De Lima, J. G.; De Faria, A. R.; Alves, A. J.; De Aquino, T. M. Tiossemicarbazonas: Métodos de Obtenção, Aplicações Sintéticas e Importância Biológica. *Quim. Nova* **2005**, 28 (6), 1030.
 24. Huang, H.; Chen, Q.; Ku, X.; Meng, L.; Lin, L.; Wang, X.; Zhu, C.; Wang, Y.; Chen, Z.; Li, M.; et al. A Series of Alpha-Heterocyclic Carboxaldehyde Thiosemicarbazones Inhibit Topoisomerase II α Catalytic Activity. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (8), 3048.
 25. Wangpu, X.; Lu, J.; Xi, R.; Yue, F.; Sahni, S.; Park, K. C.; Menezes, S.; Huang, M. L. H.; Zheng, M.; Kovacevic, Z.; et al. Targeting the Metastasis Suppressor, N-Myc Downstream Regulated Gene-1, with Novel Di-2-Pyridylketone Thiosemicarbazones: Suppression of Tumor Cell Migration and Cell-Collagen Adhesion by Inhibiting Focal Adhesion Kinase/Paxillin Signaling. *Mol. Pharmacol.* **2016**, 89 (5), 521.
 26. Casas, J. S.; García-Tasende, M. S.; Sordo, J. Main Group Metal Complexes of Semicarbazones and Thiosemicarbazones. A Structural Review. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 209 (1), 197.
 27. Stacy, A. E.; Palanimuthu, D.; Bernhardt, P. V.; Kalinowski, D. S.; Jansson, P. J.; Richardson, D. R. Structure-Activity Relationships of Di-2-Pyridylketone, 2-Benzoylpyridine, and 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones for Overcoming Pgp-Mediated Drug Resistance. *J. Med. Chem.* **2016**, 59 (18), 8601.

28. Pahontu, E.; Julea, F.; Rosu, T.; Purcarea, V.; Chumakov, Y.; Petrenco, P.; Gulea, A. Antibacterial, Antifungal and in Vitro Antileukaemia Activity of Metal Complexes with Thiosemicarbazones. *J. Cell. Mol. Med.* **2015**, *19* (4), 865.
29. Wang, Y.; Gu, W.; Shan, Y.; Liu, F.; Xu, X.; Yang, Y.; Zhang, Q.; Zhang, Y.; Kuang, H.; Wang, Z.; et al. Design, Synthesis and Anticancer Activity of Novel Nopinone-Based Thiosemicarbazone Derivatives. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (11), 2360.
30. de Oliveira, J. F.; Lima, T. S.; Vendramini-Costa, D. B.; de Lacerda Pedrosa, S. C. B.; Lafayette, E. A.; da Silva, R. M. F.; de Almeida, S. M. V.; de Moura, R. O.; Ruiz, A. L. T. G.; de Carvalho, J. E.; et al. *Thiosemicarbazones and 4-Thiazolidinones Indole-Based Derivatives: Synthesis, Evaluation of Antiproliferative Activity, Cell Death Mechanisms and Topoisomerase Inhibition Assay*; Elsevier Masson SAS, 2017; Vol. 136.
31. Echeverri, M.; Alvarez-Valdés, A.; Navas, F.; Perles, J.; Sánchez-Pérez, I.; Quiroga, A. G. Using Phosphine Ligands with a Biological Role to Modulate Reactivity in Novel Platinum Complexes. *R. Soc. Open Sci.* **2018**, *5* (2).
32. Queiroz, S. L.; Batista, A. A. Complexos Fosfínicos e Suas Aplicações Na Medicina. *Quim. Nova* **1996**, 651.
33. Berners-Price, S.; Sadler, P. Phosphines and Metal Phosphine Complexes: Relationship of Chemistry to Anticancer and Other Biological Activity. *Bioinorg. Chem.* **1988**, *70*, 27.
34. Santiago, M. O. Síntese, Caracterização e Estudos Cinéticos Da Isomerização de Compostos de Ru(II) Contendo Ligantes (X-Bipy), Universidade Federal de São Carlos, 2014.
35. Gandin, V.; Fernandes, A. P.; Rigobello, M. P.; Dani, B.; Sorrentino, F.; Tisato, F.; Björnstedt, M.; Bindoli, A.; Sturaro, A.; Rella, R.; et al. Cancer Cell Death Induced by Phosphine Gold(I) Compounds Targeting Thioredoxin Reductase. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *79* (2), 90.
36. Nakamatsu, E. H. Caracterização Funcional e Estrutural Do Sistema Tiorredoxina Mitocondrial de *Saccharomyces Cerevisiae*, 2012.
37. Va, A.; Garci, J. C.; Alonso-sa, A. L.; Ruiz-azuara, L.; Meji, M. F. C. The Mitochondrial Apoptotic Pathway Is Induced by Cu (II) ´ Nas Ô) in SK-N-SH Antineoplastic Compounds (Casioper Neuroblastoma Cells after Short Exposure Times. No. li.
38. Knoll, J. D.; Turro, C. Control and Utilization of Ruthenium and Rhodium Metal Complex Excited States for Photoactivated Cancer Therapy. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, 282–283, 110.
39. Cloonan, S. M.; Elmes, R. B. P.; Erby, M.; Bright, S. A.; Poynton, F. E.; Nolan, D. E.; Quinn, S. J.; Gunnlaugsson, T.; Williams, D. C. Detailed Biological Profiling of a Photoactivated and Apoptosis Inducing Pdppz Ruthenium(II) Polypyridyl Complex in Cancer Cells. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (11), 4494.
40. Fung, S. K.; Zou, T.; Cao, B.; Lee, P.; Man, Y.; Fung, E.; Hu, D.; Lok, C.; Che, C. Cyclometalated Gold (III) Complexes Containing N-Heterocyclic Carbene

- Ligands Engage Multiple Anti-Cancer Molecular Targets *Angewandte*. **2017**, *1*.
41. Kapdi, A. R.; Fairlamb, I. J. S. Anti-Cancer Palladium Complexes: A Focus on PdX₂L₂, Palladacycles and Related Complexes. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (13), 4751.
 42. Bisceglie, F.; Musiari, A.; Pinelli, S.; Alinovi, R.; Menozzi, I.; Polverini, E.; Tarasconi, P.; Tavone, M.; Pelosi, G. Quinoline-2-Carboxaldehyde Thiosemicarbazones and Their Cu(II) and Ni(II) Complexes as Topoisomerase IIa Inhibitors. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *152*, 10.
 43. Zeglis, B. M.; Divilov, V.; Lewis, J. S. Role of Metalation in the Topoisomerase II α Inhibition and Antiproliferation Activity of a Series of α -Heterocyclic-N4-Substituted Thiosemicarbazones and Their Cu(II) Complexes. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (li), 2391.
 44. Ulukaya, E.; Ari, F.; Dimas, K.; Ikitimur, E. I.; Guney, E.; Yilmaz, V. T. Anti-Cancer Activity of a Novel Palladium(II) Complex on Human Breast Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46* (10), 4957.
 45. Jahromi, E. Z.; Divsalar, A.; Saboury, A. A.; Khaleghizadeh, S.; Mansouri-Torshizi, H.; Kostova, I. Palladium Complexes: New Candidates for Anti-Cancer Drugs. *J. Iran. Chem. Soc.* **2016**, *13* (5), 967.
 46. Hasinoff, B. B.; Wu, X.; Krokhin, O. V.; Ens, W.; Standing, K. G.; Nitiss, J. L.; Sivaram, T.; Giorgianni, A.; Yang, S.; Jiang, Y.; et al. Biochemical and Proteomics Approaches to Characterize Topoisomerase II α Cysteines and DNA as Targets Responsible for Cisplatin-Induced Inhibition of Topoisomerase II α . *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67* (3), 937.
 47. Bandyopadhyay, N.; Pradhan, A. B.; Das, S.; Lu, L.; Zhu, M.; Chowdhury, S.; Naskar, J. P. Synthesis, Structure, DFT Calculations, Electrochemistry, Fluorescence, DNA Binding and Molecular Docking Aspects of a Novel Oxime Based Ligand and Its Palladium(II) Complex. *Photochem. Photobiol.* **2016**, *160* (li), 336.
 48. Khandani, M.; Sedaghat, T.; Erfani, N.; Haghshenas, M. R.; Khavasi, H. R. Synthesis, Spectroscopic Characterization, Structural Studies and Antibacterial and Antitumor Activities of Diorganotin Complexes with 3-Methoxysalicylaldehyde Thiosemicarbazone. *J. Mol. Struct.* **2013**, *1037*, 136.
 49. Rocha, F. V.; Barra, C. V.; Garrido, S. S.; Manente, F. A.; Carlos, I. Z.; Ellena, J.; Fuentes, A. S. C.; Gautier, A.; Morel, L.; Mauro, A. E.; et al. Cationic Pd(II) Complexes Acting as Topoisomerase II Inhibitors: Synthesis, Characterization, DNA Interaction and Cytotoxicity. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *159*, 165.
 50. Barra, C. V.; Rocha, F. V.; Morel, L.; Gautier, A.; Garrido, S. S.; Mauro, A. E.; Frem, R. C. G.; Netto, A. V. G. DNA Binding, Topoisomerase Inhibition and Cytotoxicity of Palladium(II) Complexes with 1,10-Phenanthroline and Thioureas. *Inorganica Chim. Acta* **2016**, *446*, 54.
 51. Popolin, C. P.; Reis, J. P. B.; Becceneri, A. B.; Graminha, A. E.; Almeida, M. A. P.; Corrêa, R. S.; Colina-Vegas, L. A.; Ellena, J.; Batista, A. A.; Cominetti, M. R. Cytotoxicity and Anti-Tumor Effects of New Ruthenium Complexes on Triple

- Negative Breast Cancer Cells. *PLoS One* **2017**, 12 (9), e0183275.
52. Colina-Vegas, L.; Lucena Dutra, J.; Villarreal, W.; Neto, J. H. de A.; Cominetti, M. R.; Pavan, F.; Navarro, M.; Batista, A. A. Ru (II) / Clotrimazole / Diphenylphosphine / Bipyridine Complexes : Interaction with DNA , BSA and Biological Potencial against Tumor Cell Lines and Mycobacterium ... *J. Inorg. Biochem.* **2016**, 162 (September), 135.
 53. Barra, C. V.; Netto, A. V. G. Interações Entre Complexos Antitumorais e o DNA e Suas Ferramentas de Análise: Um Enfoque Nos Metalintercaladores. *Rev. Virtual Quim.* **2015**, 7 (6), 1998.
 54. Colina-Vegas, L.; Villarreal, W.; Navarro, M.; De Oliveira, C. R.; Graminha, A. E.; Maia, P. I. D. S.; Deflon, V. M.; Ferreira, A. G.; Cominetti, M. R.; Batista, A. A. Cytotoxicity of Ru(II) Piano-Stool Complexes with Chloroquine and Chelating Ligands against Breast and Lung Tumor Cells: Interactions with DNA and BSA. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, 153, 150.
 55. Garcia Velho, R. Medidas de Condutividade Na Caracterização de Complexos Inorgânicos: Um Levantamento Bibliográfico. *Programa Pós-Graduação em Química - UF* **2006**, 170.
 56. Rocha, F. V.; Godoy Netto, A. V. de; Beck, J.; Daniels, J.; Oliveira, A. B. de. *N*-Methyl-2-(1-Methyl-3-Phenylprop-2-En-1-Ylidene)Hydrazinecarbothioamide. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online* **2014**, 70 (7), o800.
 57. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities In the Course of the Routine Use of NMR as an Aid for Organic Chemistry , a Day-to-Day Problem Is the Identification of Signals Deriving from Common Contaminants Literature , but The. *J. Org. Chem.* **1997**, 62 (3), 7512.
 58. Rocha, F. V. Síntese, Caracterização e Estudo Da Atividade Antitumoral de Complexos de Paládio(II) Om Ligantes Sulfurados e Trifenilfosfina, 2013.
 59. Turro, N. J.; Ramamurthy, V.; Scaiano, J. C. Principles of Molecular Photochemistry: An Introduction. *Book* **2009**, 495.
 60. Sastri, C. V.; Eswaramoorthy, D.; Giribabu, L.; Maiya, B. G. DNA Interactions of New Mixed-Ligand Complexes of Cobalt(III) and Nickel(II) That Incorporate Modified Phenanthroline Ligands. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, 94 (1–2), 138.
 61. Pattanayak, P.; Patra, D.; Brandão, P.; Mal, D.; Felix, V. Synthesis and Characterization of Palladium (II) Complex of Schiff Base Ligand : C \ S Bond Cleavage and Catalytic Activity. *INOCHÉ* **2015**, 53, 68.
 62. Gazdar, A. F.; Girard, L.; Lockwood, W. W.; Lam, W. L.; Minna, J. D. Lung Cancer Cell Lines as Tools for Biomedical Discovery and Research. *J. Natl. Cancer Inst.* **2010**, 102 (17), 1310.
 63. Berney, D. M.; Shamash, J.; Gaffney, J.; Jordan, S.; Oliver, R. T. D. DNA Topoisomerase I and II Expression in Drug Resistant Germ Cell Tumours. *Br. J. Cancer* **2002**, 87 (6), 624.
 64. Giaccone, G.; van Ark-Otte, J.; Scagliotti, G.; Capranico, G.; van der Valk, P.;

- Rubio, G.; Dalesio, O.; Lopez, R.; Zunino, F.; Walboomers, J.; et al. Differential Expression of DNA Topoisomerases in Non-Small Cell Lung Cancer and Normal Lung. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1264* (3), 337.
65. Heestand, G. M.; Schwaederle, M.; Gatalica, Z.; Arguello, D.; Kurzrock, R. Topoisomerase Expression and Amplification in Solid Tumours: Analysis of 24,262 Patients. *Eur. J. Cancer* **2017**, *83*, 80.
66. Al-Musayeib, N. M.; Mothana, R. A.; Al-Massarani, S.; Matheussen, A.; Cos, P.; Maes, L. Study of the in Vitro Antiplasmodial, Antileishmanial and Antitrypanosomal Activities of Medicinal Plants from Saudi Arabia. *Molecules* **2012**, *17* (10), 11379.

7 - Apêndices

A. Espectros UV-Vis e curvas analíticas para realização do coeficiente de partição.

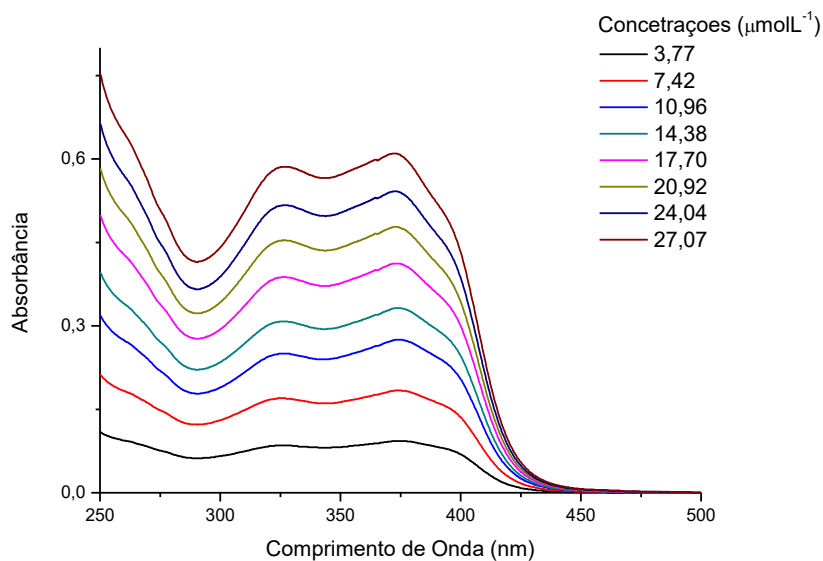


FIGURA APÊNDICE 1 – Espectros de absorção no UV-Vis do complexo 1 em diferentes concentrações ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em 1-octanol para realização da curva analítica.

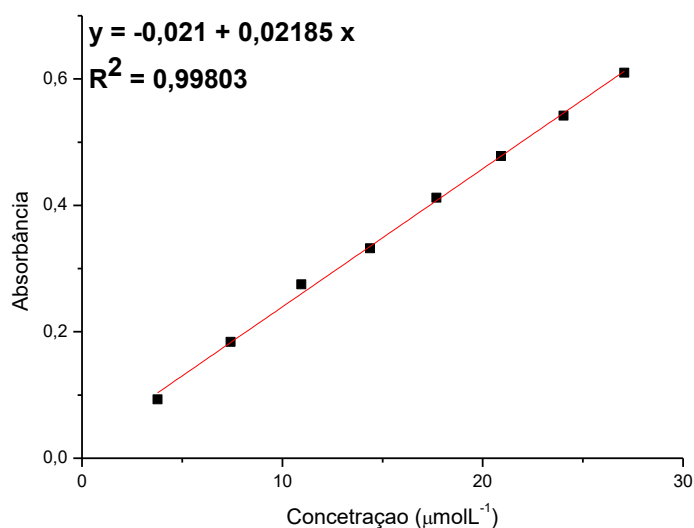


FIGURA APÊNDICE 2 – Curva analítica do complexo 1 em diferentes concentrações ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em 1-octanol.

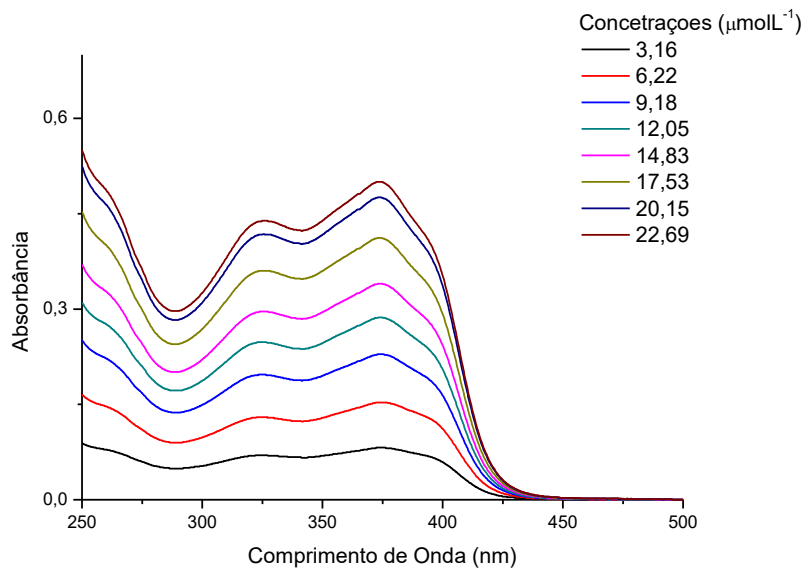


FIGURA APÊNDICE 3 – Espectros de absorção no UV-Vis do complexo 4 em diferentes concentrações ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em 1-octanol para realização da curva analítica.

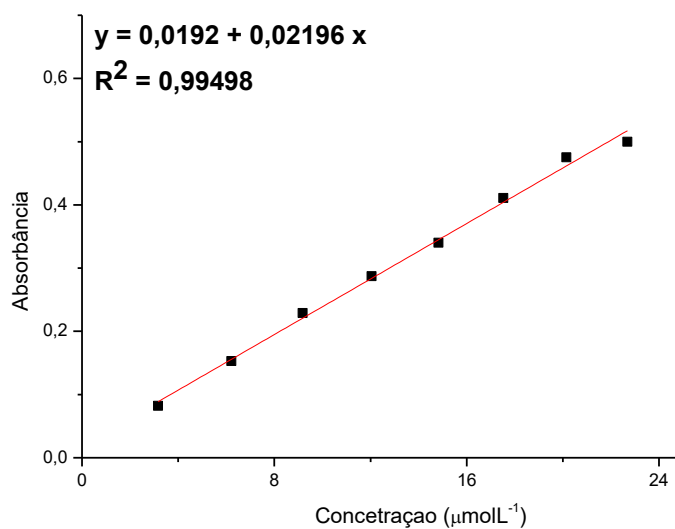


FIGURA APÊNDICE 4 – Curva analítica do complexo 4 em diferentes concentrações ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em 1-octanol.

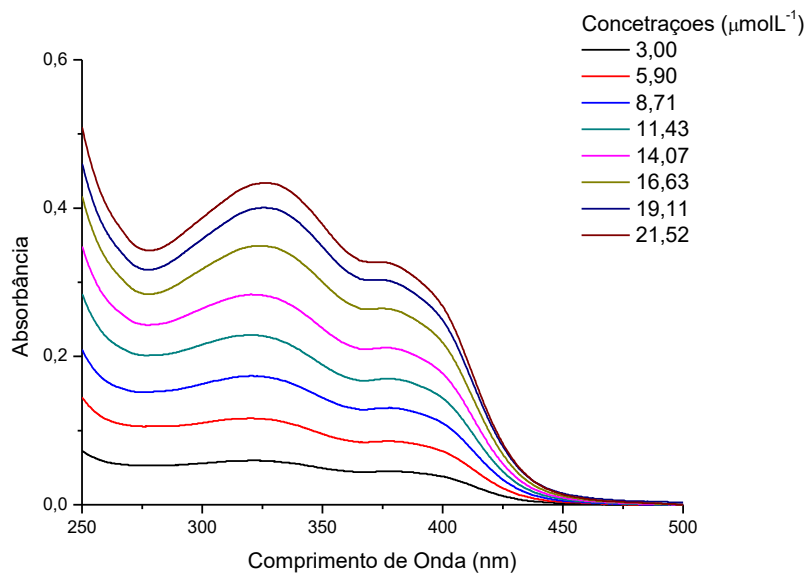


FIGURA APÊNDICE 5 – Espectros de absorção no UV-Vis do complexo **5** em diferentes concentrações ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em 1-octanol para realização da curva analítica.

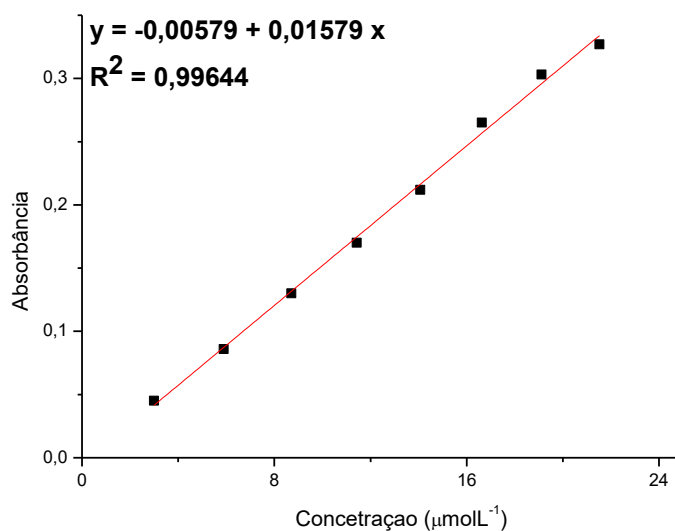


FIGURA APÊNDICE 6 – Curva analítica do complexo **5** em diferentes concentrações ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em 1-octanol.

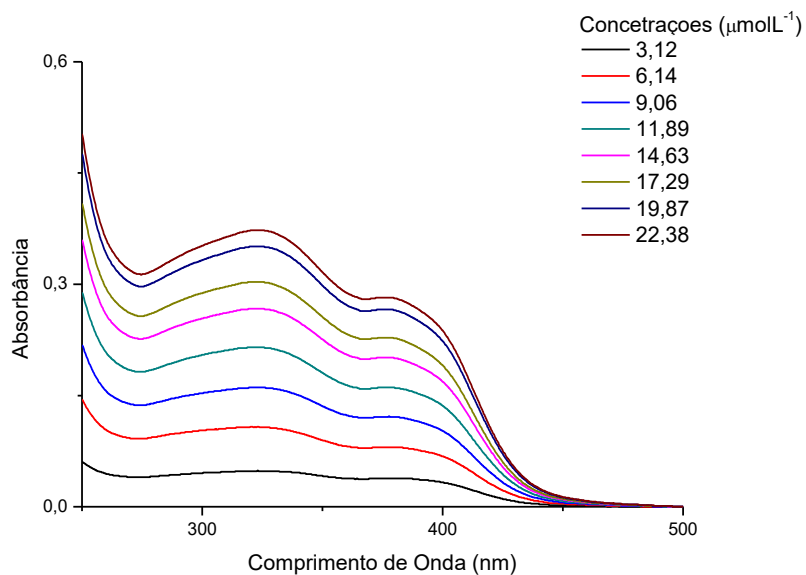


FIGURA APÊNDICE 7 – Espectros de absorção no UV-Vis do complexo **6** em diferentes concentrações ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em 1-octanol para realização da curva analítica.

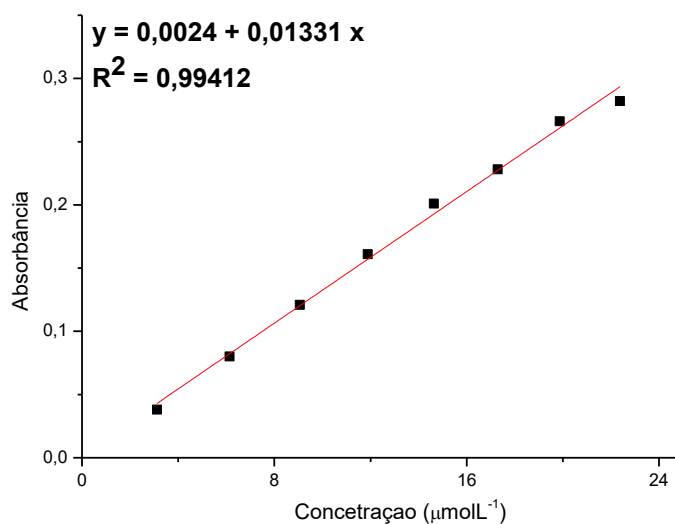


FIGURA APÊNDICE 8 – Curva analítica do complexo **6** em diferentes concentrações ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em 1-octanol.