Carolina Gonçalves Oliveira

Síntese, caracterização e estudo de mecanismo de ação de complexos de paládio e platina com ligantes tiossemicarbazonas derivados do pireno visando a obtenção de novos quimioterápicos anticâncer

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Química.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Victor Marcelo Deflon

São Carlos – SP

2017

*Dedico este trabalho de doutorado aos meus pais
Sérgio e Gina e ao meu querido irmão Hugo
pelo apoio incondicional em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

A Deus pela vida

Aos meus pais que me apoiaram em todos os momentos. Quem sabe um dia eu consiga retribuir todo os seus esforços.

Ao meu amado irmão pela amizade e por ter me dado a sobrinha mais linda

Ao professor Dr. Victor Marcelo Deflon pela orientação, ensinamentos e confiança nesses seis anos de trabalho

Aos membros da banca pelas contribuições

Ao professor e namorado Dr. Pedro Ivo pelo apoio profissional e por cuidar de mim

Ao Professor Dr. Alzir Azevedo Batista e Dra. Monize Martins da Silva da Universidade Federal de São Carlos pelos trabalhos em colaboração. Ao professor Alessandro Desideri da Universidade de Roma Tor Vergata pelos experimentos realizados

À Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz e professor Dr. Daniel Pereira Bezerra pela realização dos ensaios citotóxicos

Ao Professor Roberto Santana por ter aberto as portas do seu laboratório e a técnica Juliana pelo apoio na realização dos experimentos

I would like to thank Professor. Dr. Peter Sadler for the opportunity. A big thanks to all Peter's group, especially to my dear friend Hannah (I still missing you! Thanks for all the tight hugs!) and his lovely husband Rob. Thanks Isolda, James, Robbin and Ji for making England much brighter. The moments together were amazing! Thanks Abraha for being so nice and for all the support in the lab. Thanks to Dr. Ivan Prokes for helping with the NMR, Dr. Lijiang Song and Mr. Phillip Aston for their help with mass spectrometry and Dr Guy

AGRADECIMENTOS

Clarskson for the X ray studies. Also, thanks to Dr. Isolda for the experiments with cells and Ji for the confocal studies along with the School of Life-sciences at the University of Warwick.

Um imenso obrigada à amiga das amigas Rosângela (Nenê). Obrigada por me ensinar tanto nesses oito anos de amizade. Obrigada por me amparar mesmo estando longe, por todo o imensurável apoio na Inglaterra e por vibrar comigo nos momentos de vitória.

Muito obrigada às amigas Mirian, primas Priscila e Mayara pela torcida e pelos momentos de alegria

Um muito obrigada aos antigos e atuais membros do GQIEB, Henrique (faz falta no lab), Pedro Ivo, Rafaela, Murilo (saudades), Vanessa, Amandha, Viviana, Jocely, Jessica e à outros grandes amigos da USP, Thiessa, Evânia e Adriel, por se tornarem a família de São Carlos. Obrigada pela amizade!

Aos tios, primos e avós Auricência e Maria (in memoriam) pelo incentivo

Aos secretários da pós-graduação Andreia, Gislei, Veroneide, Cláudia, Sílvia e Gustavo por serem tão atenciosos e prestativos

Ao CPNq pela bolsa concebida no curso de doutorado e estágio no exterior.

RESUMO

Desde a descoberta da cisplatina várias tentativas têm sido feitas com o objetivo de desenvolver novos quimioterápicos com menor toxicidade e efeitos colaterais melhorados para tratar o câncer. Complexos de coordenação com metais de transição variados vêm sendo estudados buscando melhoras na biodisponibilidade, seletividade e efeitos adversos. Neste sentido, o presente trabalho consiste na síntese e caracterização estrutural de complexos de Pd^{II} e Pt^{II} com ligantes derivados de tiossemicarbazidas contendo o grupo fluoróforo pireno visando a obtenção de potenciais agentes antitumorais. Os agentes quelantes foram preparados a partir de reações de condensação entre o pirenocarboxaldeído e a tiossemicarbazida desejada resultando em compostos 1-pirenocarboxaldeído-N(3)-R-tiossemicarbazona, H_2PrR , onde R = etil ou ciclohexil, Pr = pireno. A partir dos ligantes H_2PrR foram realizadas as reações de complexação com os íons metálicos Pd^{II} e Pt^{II} , sendo possível obter duas classes de complexos com diferentes características: complexos monoméricos contendo ligantes clorido e trifenilfosfano do tipo $[\text{MCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrR})]$ e complexos tetraméricos do tipo $[\text{M}_4(\mu\text{-S-PrR-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$, onde M = Pd^{II} ou Pt^{II} , R = etil ou ciclohexil. Nas duas primeiras séries, o grupo R foi modificado por etil e ciclohexil para investigar a correlação entre lipofilicidade e atividade antiproliferativa, enquanto que o grupamento pireno foi incluído pensando que um maior número de unidades aromáticas possivelmente melhoraria a intercalação com o DNA e/ou ser utilizado como um marcador celular. A caracterização dos complexos envolveu técnicas como: análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho e do UV-Vis, condutimetria, ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C RMN) e difração de raios X em monocristal. As análises mostraram que os agentes complexantes podem atuar em diferentes modos coordenação tanto com relação à denticidade quanto à carga. A atividade antiproliferativa dos novos compostos de Pd^{II} e Pt^{II} foi determinada, sendo que vários deles apresentaram IC_{50} promissores contra células de câncer de ovário e, em muitos casos, as atividades observadas foram melhores do que a da cisplatina. Os dados obtidos indicam efeitos diferentes nos resultados de atividade biológica para os centros metálicos (Pd vs Pt) e ligantes utilizados (Etil vs Ciclohexil). Estudos de captação e distribuição celular mostraram que o complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ atinge o núcleo celular. Com o intuito de verificar possíveis alvos biológicos, testes de interação com o DNA, ciclo celular e inibição da enzima Top IB foram realizados para os compostos. Os resultados do ciclo celular, mostraram uma maior inibição nos estádios S e G_2/M para os complexos do tipo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrR})]$. Diante dos resultados obtidos,

RESUMO

verificou-se que a Top IB é um dos alvos moleculares para os complexos do tipo $[MCl(PPh_3)(HPrR)]$, um mecanismo diferente da cisplatina. Estes resultados preliminares são bastante promissores e mostram que alguns dos complexos estudados neste trabalho apresentam-se como potenciais agentes para serem usados na terapia do câncer.

ABSTRACT

Since the discovery of cisplatin, many attempts have been made to prepare new drugs with less toxicity and side effects. Coordination complexes based on a variety of transition metals have been developed in the search for improved bioavailability, selectivity and reduced adverse side-effects. This work consists on the synthesis and structural characterization of Pd^{II} and Pt^{II} complexes with chelating compounds derived from thiosemicarbazides containing the pyrene fluorophore group aiming to obtain potential antitumor compounds. The chelating agents were prepared from condensation reactions between the pyrenecarboxaldehyde and the desired thiosemicarbazide resulting in 1-pyrenecarboxaldehyde-N (3) -R-thiosemicarbazone compounds, H₂PrR, where R = ethyl or cyclohexyl. Complexation reactions with the metal ions Pd^{II} and Pt^{II} were carried out with the H₂PrR ligands. It was possible to obtain two main classes of complexes with different characteristics: i) monomeric complexes containing chlorido and triphenylphosphane ligands of the type [MCl(PPh₃)(HPrR)] and (ii) tetramer complexes of the type [M₄(μ-S-PrR-κ³-C,N,S)₄], where M = Pd^{II} or Pt^{II} and R = ethyl ou cyclohexyl. In both series the R group was modified by ethyl and cyclohexyl in order to investigate the correlation between lipophilicity and antiproliferative activity, while the pyrene group was attached to the ligands with the belief that a higher number of aromatic units would improve DNA intercalation and/or to be used as an intracellular probe. The characterization of the complexes involved techniques such as: elemental analysis, infrared and UV-Vis spectroscopy, conductimetry, nuclear magnetic resonance (¹H and ¹³C NMR) and single crystal X-ray diffraction. The antiproliferative activity of the novel Pd^{II} and Pt^{II} compounds have been determined, several of them showed promising IC₅₀ against ovarian cancer cells, and in many cases the observed activities are better than that of cisplatin. The data obtained indicate different effects for the metal centers (Pd vs Pt) and the ligands used (ethyl vs cyclohexyl). Uptake and cellular distribution studies proved that the palladium complex [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] achieved the cell nucleus. In order to verify possible biological targets, interaction with DNA, cell cycle and inhibition experiments of the topoisomerase IB (Top IB) enzyme were performed for some compounds. Cell cycle results showed an inhibition at the S and G₂/M stages for the complexes [PdCl(PPh₃)(HPrR)]. Overall, the results indicated the Top IB enzyme as one of the targets of the complexes. These preliminary results are quite promising and show that some of the complexes studied here can be used in cancer therapy.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Progresso do tumor segundo Hanahan and Weinberg.....	22
Figura 2. Desenho ilustrativo do ciclo celular.....	25
Figura 3. Etapas da morte celular programada.....	27
Figura 4. Compostos de platina utilizados para o tratamento de câncer.....	29
Figura 5. Estruturas moleculares dos fármacos de A) Nedaplatina e B) Lobaplatina.....	30
Figura 6. As diferentes formas de coordenação da cisplatina ao DNA.....	31
Figura 7. Estrutura química dos complexos de paládio.....	33
Figura 8. Estrutura química de complexos A) dinuclear e B) trinuclear de paládio ativos para linhagens de câncer.....	34
Figura 9. Fórmula geral das Tiossemicarbazonas.....	35
Figura 10. Estruturas moleculares da Dp44mT e triapina.....	36
Figura 11. Formas tautoméricas dos ligantes tiossemicarbazonas.....	36
Figura 12. Modos de coordenação conhecido para as TSCs.....	37
Figura 13. Estrutura molecular do pireno.....	38
Figura 14. Tiossemicarbazonas derivadas do pireno utilizadas neste trabalho, onde R = etil e ciclohexil.....	38
Figura 15. Estruturas químicas dos complexos de RuII, RhII e IrII contendo ligantes tiossemicarbazonas derivadas do pireno.....	39
Figura 16. Representação das elipsóides (30% de probabilidade) para o complexo <i>trans</i> -[Ru(L1)(CO)(PPh ₃) ₂].....	40
Figura 17. A) Representação esquemática de um tetrâmero ortometalado de PdII derivado da 4-metil-3-tiossemicarbazida e B) Estrutura cristalina e molecular do tetrâmero de paládio.....	42
Figura 18. Desenho ilustrativo das formas relaxada e superenovelada do DNA.....	43
Figura 19. Etapas do ciclo catalítico da topoisomerase do DNA em células eucarióticas.....	44
20. Esquema ilustrativo demonstrando a clivagem do DNA pelas enzimas top I e top II.....	45
Figura 21. Estrutura molecular da camptotecina.....	46
Figura 22. Compostos usados para tratamento de câncer de ovário e colo do útero.....	46
Figura 23. Estrutura da sulforodamina B.....	60
Figura 24. Representação dos ligantes e códigos usados neste trabalho de acordo com a coordenação.....	80
Figura 25. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm ⁻¹) do ligante livre H ₂ PrEt em pastilha de KBr.....	81
Figura 26. Espectro de RMN de ¹ H do ligante livre H ₂ PrEt em solução de DMSO- <i>d</i> ₆ (δ, ppm).....	82
Figura 27. Espectro de RMN de ¹ H do ligante livre H ₂ PrCh em solução de DMSO- <i>d</i> ₆ (δ, ppm).....	83
Figura 28. Espectro de RMN de ¹³ C (δ em ppm) do ligante livre H ₂ PrEt em solução de DMSO- <i>d</i> ₆	84
Figura 29. Espectro de RMN de ¹³ C (δ em ppm) do ligante livre H ₂ PrCh em solução de DMSO- <i>d</i> ₆	84
Figura 30. Espectros de absorção na região do UV-Visível para o A) ligante livre H ₂ PrCh e para o precursor pirenocarboxaldeído. Ambos espectros realizados em DMSO.....	85
Figura 31. Espectro de emissão de fluorescência dos ligantes livres A) H ₂ PrCh e B) H ₂ PrEt com concentração igual a 10 ⁻⁵ e λ _{exc} = 415 nm, fenda 5.....	87
Figura 32. HPLC dos ligantes livres A) H ₂ PrCh e B) H ₂ PrEt.....	88
Figura 33. Estrutura cristalina e molecular das duas moléculas presentes na unidade assimétrica do ligante H ₂ PrEt. O grupo pireno de uma das moléculas se encontra desordenado.....	89
Figura 34. Estrutura molecular e rede cristalina do H ₂ PrEt [N(31)···S(12) ⁺ = 3,453(3) Å, N(31)–H(31)···S(12) ⁺ = 142,5°, [N(22)···S(11) = 3,497(3) Å, N(22)–H(22)···S(11) = 161,2°, [N(21)···S(12) = 3,413(3) Å, N(21)–H(21)···S(12) = 162,9°, [N(31)···N(11) = 2,617(3) Å, N(31)–H(31)···N(11) = 109,0°, [N(32)···N(12) = 2,621(3) Å, N(31)–H(32)···N(12) = 108,0°]. Operação de simetria usada ' : 1 x-1,y,z.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 35. Estrutura cristalina e molecular do ligante H ₂ PrCh.	92
Figura 36. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm ⁻¹) do complexo 1 em pastilha de KBr.	96
Figura 37. Espectro de ¹ H-RMN do composto [PtCl(PPh ₃)(HPrCh)] (3) em solução de CD ₂ Cl ₂ (δ em ppm).	97
Figura 38. Espectro de RMN de ¹³ C (APT) do complexo [PdCl(PPh ₃)(HPrCh)] (1) em solução de CD ₂ Cl ₂ (δ em ppm).	98
Figura 39. Espectro de RMN de ¹³ C (APT) do complexo [PdCl(PPh ₃)(HPrEt)] (2) em solução de CD ₂ Cl ₂ (δ em ppm).	99
Figura 40. Espectro de ³¹ P-RMN do composto [PdCl(PPh ₃)(HPrEt)] (2) em solução de CD ₂ Cl ₂ (δ em ppm).	100
Figura 41. Espectro de ³¹ P-RMN do composto [PtCl(PPh ₃)(HPrCh)] (3) em solução de CD ₂ Cl ₂ (δ em ppm).	100
Figura 42. A) Espectro de absorção na região do ultravioleta visível e B) espectro de emissão de fluorescência do complexo [PdCl(PPh ₃)(HPrCh)], em solução de DMSO com concentração na ordem de 10 ⁻⁵ e λ _{exc} = 517 nm.	101
Figura 43. Espectro de massas simulado (acima) e experimental (abaixo) ESI(+) para o complexo [PdCl(PPh ₃)(HPrCh)].	102
Figura 44. Estruturas cristalinas e moleculares dos complexos A) [PdCl(PPh ₃)(HPrCh)] e B) [PtCl(PPh ₃)(HPrCh)].	104
Figura 45. Estrutura cristalina e molecular do complexo [PdCl(PPh ₃)(HPrEt)]·MeOH (2 ·MeOH). Molécula de metanol omitida para maior clareza.	104
Figura 46. Espectro eletrônico para o [PtCl(PPh ₃)(HPrEt)] em CH ₂ Cl ₂ com adição de alíquotas de DMSO (concentração na ordem de 10 ⁻⁵ M).	106
Figura 47. Espectro de RMN de ³¹ P A) realizado com a solução fresca do complexo [PdCl(PPh ₃)(HPrCh)] em DMSO- <i>d</i> ₆ contendo 20% de D ₂ O e B) espectro do mesma solução realizado 24 horas depois.	107
Figura 48. Fatores de resistência cruzada de CDDP em células A2780 quando tratados com complexos [PdCl(PPh ₃)(PrCh)] e [PdCl(PPh ₃)(PrEt)] durante um período de 24 h.	110
Figura 49. (A) Tabela de captação celular de paládio (nanograma de metal por 10 ⁶ células) juntamente com gráfico de correlação do uptake com os valores de IC ₅₀ (μM) dos complexos 1 e 2 . (B) Distribuição celular do complexo [PdCl(PPh ₃)(HPrCh)] nas células de ovário A2780. A concentração usada foi a mesma do IC ₅₀ . O tempo de pré-incubação em meio livre de fármaco foi de 24 h e o tempo de exposição ao fármaco foi de 24 h.	112
Figura 50. Comparação da temperatura de desnaturação T _m (K) do DNA-CT para os complexos [PdCl(PPh ₃)(HPrCh)] e [PdCl(PPh ₃)(HPrCh)] quando incubados com o DNA por 24 horas.	113
Figura 51. Espectros de dicroísmo linear (DL) de DNA (100 μM) com concentração crescente do complexo [PdCl(PPh ₃)(HPrCh)].	114
Figura 52. O brometo de etídio em gel de agarose corado (0,5 g / ml) de pBlue Script KSII (+) DNA plasmidial (0,25 ug / uL) na presença de uma maior concentração dos complexos após 30 min de incubação a 37 ° C: Linha 1, controle: DNA plasmidial; Linha 2, controle: DNA plasmidial + DMSO, Linhas 3-10, DNA plasmidial + complexo 1 à 1 a 0,75, 1,5, 3, 6, 12,5, 25, 50, 100, 200 e 300 μM. FI: DNA superenovelado, FII: circular aberta, FIII: DNA linear;	115
Figura 53. Estrutura do iodeto de propídio (IP).	116
Figura 54. Histogramas FL2-H obtidos por citometria de fluxo para análise do ciclo celular (A) Controle de células não tratadas; (B) células tratadas com 0,4 μM de cisplatina. Para todos os experimentos, o tempo de exposição ao fármaco foi de 24 h. As células foram tratadas com RNA e coradas utilizando IP; (C) Tabela contendo aos dados do ciclo celular da cisplatina em três concentrações diferentes.	117
Figura 55. A) Histogramas obtido por citometria de fluxo para análise do ciclo celular de células sem os compostos (gráfico em vermelho); células tradas usando 7,5 μM do complexo	

LISTA DE FIGURAS

[PdCl(PPh ₃)(HPrCh)] (1); células tratadas usando 0,7 μM do complexo [PdCl(PPh ₃)(HPrEt)] (2); B) Representação gráfica das fases para os complexos 1 e 2 . Para todos os experimentos, o tempo de exposição ao composto foi de 24h, as células foram tratadas com RNA e coradas utilizando IP.	119
Figura 56. - Imagem ilustrativa das três primeiras colunas usadas como controle para o teste de inibição da TopIB.	120
Figura 57. Ensaio de relaxamento do DNA pela Top IB com concentrações crescentes para os ligantes H ₂ PrEt e H ₂ PrCh.	120
Figura 58. Ensaio de relaxamento do DNA pela Top IB na presença de concentrações crescentes dos complexo [PdCl(PPh ₃)(HPrCh)].	121
Figura 59. Ensaio de relaxamento do DNA pela TopIB com concentrações crescentes dos complexos [PtCl(PPh ₃)(HPrCh)] e [PtCl(PPh ₃)(HPrEt)].	122
Figura 60. Teste de inibição da Top IB dos complexos de paládio em função do tempo de incubação e da concentração, com e sem pré-incubação.	123
Figura 61. Teste de inibição da Top IB dos complexos de platina em função do tempo de incubação e da concentração, com e sem pré-incubação para A) [PtCl(PPh ₃)(HPrCh)] e B) [PtCl(PPh ₃)(HPrEt)].	124
Figura 62. (A) O substrato CL14 / CP25 utilizado para medir a cinética da clivagem da Top IB, com a clivagem preferida indicada pela seta. (B) Análise em gel da cinética de clivagem do substrato na presença de DMSO e de 25 μM do complexo [PdCl(PPh ₃)(HPrCh)].	125
Figura 63. (A) O substrato CL14 / CP25 e o oligonucleotídeo R11 complementar utilizado para medir a cinética da religação da TopIB. (B) Análise em gel da cinética de religação do substrato na presença de DMSO e de 25μM do complexo [PdCl(PPh ₃)(HPrCh)].	125
Figura 64. Espectro de absorção na região do infravermelho para o [Pd ₂ (μ-Cl) ₂ (HPrEt) ₂] até 200 cm ⁻¹ em pastilha de Csl.	128
Figura 65. Espectro de absorção na região do infravermelho para o [Pd ₂ (μ-Cl) ₂ (HPrEt) ₂] até 200 cm ⁻¹ em pastilha de Csl.	128
Figura 66. - Espectros de massa ESI(+) do complexo [Pd ₂ (μ-Cl) ₂ (HPrEt) ₂] (acima) e o seu espectro simulado (abaixo).	129
Figura 67. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm ⁻¹) do composto [Pd ₄ (μ-S-PrCh-κ ³ -C,N,S) ₄] (6) realizado em pastilhas de KBr.	132
Figura 68. A) Espectro de absorção na região do UV-Visível e B) Espectro de emissão de fluorescência do complexo [Pd ₄ (μ-S-PrCh-κ ³ -C,N,S) ₄], com concentração igual a 2,3 x 10 ⁻⁵ e λ _{exc} = 515 nm.	134
Figura 69. Espectro de ¹ H-RMN do complexo [Pt ₄ (μ-S-PrEt-κ ³ -C,N,S) ₄] (7) em solução de CDCl ₃ (δ em ppm).	135
Figura 70. ¹⁹⁵ Pt RMN dos complexos A) [Pt ₄ (μ-S-PrEt-κ ³ -C,N,S) ₄] e B) [Pt ₄ (μ-S-PrCh-κ ³ -C,N,S) ₄] em soluções de CDCl ₃ e CD ₂ Cl ₂ , respectivamente.	136
Figura 71. Espectro de massas nESI(+) do complexo [Pd ₄ (μ-S-PrCh-κ ³ -C,N,S) ₄].	137
Figura 72. Estrutura cristalina e molecular para o [Pt ₄ (μ-S-PrCh-κ ³ -C,N,S) ₄].	139
Figura 73. Vista do tetrâmero [Pt ₄ (μ-S-PrCh-κ ³ -C,N,S) ₄] para observação da cavidade central.	140
Figura 74. Teste de estabilidade do complexo [Pd ₄ (μ-S-PrEt-κ ³ -C,N,S) ₄] através do UV-Visível por 24 horas. Solução aquosa 50 μM contendo 5% de DMSO.	141
Figura 75. Resultados de acumulação celular dos complexos 5 e 7 em células de câncer de ovário.	144
Figura 76. Estudos de interação dos complexos A) [Pd ₄ (μ-S-PrEt-κ ³ -C,N,S) ₄], B) [Pd ₄ (μ-S-PrCh-κ ³ -C,N,S) ₄], C) [Pt ₄ (μ-S-PrEt-κ ³ -C,N,S) ₄] e D) [Pt ₄ (μ-S-PrCh-κ ³ -C,N,S) ₄] em concentrações crescentes com DNA plasmidial (0,25 μg/μL).	145
Figura 77. Ensaio de relaxamento do DNA pela Top IB na presença de concentrações crescentes dos complexos A) [Pd ₄ (μ-S-PrEt-κ ³ -C,N,S) ₄], B) [Pd ₄ (μ-S-PrCh-κ ³ -C,N,S) ₄], C) [Pt ₄ (μ-S-PrEt-κ ³ -C,N,S) ₄] e D) [Pt ₄ (μ-S-PrCh-κ ³ -C,N,S) ₄].	145

LISTA DE FIGURAS

- Figura 78.** FL2-H histogramas obtidos por citometria de fluxo para análise de célula (**A**) Controle, células não tratadas; (**B**) Células tratadas usando o triplo da concentração de IC₅₀ do complexo **7**; (**C**) Células tratadas usando 0,4 µM do complexo **7**. Para todos os experimentos, o tempo de exposição ao composto foi de 24 horas. As células foram tratadas com RNase e marcadas com IP, CDDP: cisplatina. 146
- Figura 79.** Análise de citometria de fluxo para determinar as porcentagens de células apoptóticas, usando V-FITC versus o marcador IP, após a exposição a células A2780 com o complexo **7** e estaurosporina (controle positivo). O tempo de pré-incubação em meio livre de fármaco foi de 24 horas e o tempo de exposição ao fármaco foi de 24 horas. (■) Células tratadas utilizando 3 vezes a concentração de IC₅₀ do complexo **7**; (■) Células tratadas utilizando 0,4 µM do complexo **7**; (■) Controle..... 147
- Figura 80.** Mudanças na integridade da membrana celular de células A2780 na presença do complexo **7** exposto por 24h. O gráfico vermelho corresponde à células não tratadas (controle), gráfico azul células tratadas com concentração do IC₅₀ e gráfico amarelo células tratadas com 3 x a concentração de IC₅₀. 148
-

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntese dos ligantes tiosemicarbazonas.....	79
Esquema 2. Síntese dos complexos de Pd ^{II}	94
Esquema 3. Síntese dos complexos de Pt ^{II}	95
Esquema 4. Síntese dos complexos dinucleares de paládio.....	127
Esquema 5. Síntese dos tetrâmeros de paládio.	130
Esquema 6. Possíveis coprodutos formados nas rotas sintéticas descritas para obtenção dos tetranucleares de platina.	131

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comprimentos (Å) e Ângulos de ligações (°) selecionados para o ligante H ₂ PrEt	90
Tabela 2. Comprimentos (Å) e Ângulos de ligações (°) selecionados para os complexos 1, 2·MeOH (M = Pd ^{II}) 3 e (M = Pt ^{II}).....	105
Tabela 3. Testes de citotoxicidade dos compostos frente às células HepG2, B16-F10, K562, HL-60 e PBMC.....	108
Tabela 4. Valores de IC ₅₀ para os compostos em estudo. FR: fator de resistência. FS: fator de seletividade. Nd: não determinado, CDDP: cisplatina e CARB: carboplatina.....	109
Tabela 5. Comprimentos de ligação selecionados para o [Pt ₄ (μ-S-PrCh-κ ³ -C,N,S) ₄].	139
Tabela 6. Ângulos de ligação selecionados para o [Pt ₄ (μ-S-PrCh-κ ³ -C,N,S) ₄].....	140
Tabela 7. Distância entre átomos de platina na estrutura [Pt ₄ (μ-S-PrCh-κ ³ -C,N,S) ₄].....	141
Tabela 8. Testes de citotoxicidade dos tetranucleares frente às células HepG2, B16-F10, K562, HL-60 e PBMC. Os resultados dos precursores metálicos e ligantes livre se encontram na Tabela 3.	142
Tabela 9. Atividade antiproliferativa dos complexos 5, 6, 7, 8 e cisplatina em células A2780 e MRC-5. Os resultados são expressos como a média das triplicatas e o desvio padrão.....	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS e SÍMBOLOS

Abs	Absorbância
DMSO	Dimetilsulfóxido
MeOH	Metanol
MeCN	Acetonitrila
s	Simpleto
d	Dupleto
t	Tripleto
q	Quarteto
dq	Duplo quarteto
dd	Duplo dupleto
m	Multipleto
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
J	Acoplamento escalar
Et ₃ N	Trietilamina
IV	Espectroscopia na região do infravermelho
COD	Ciclooctadieno
TMS	Tetrametilsilano
TSC	Tiosemicarbazona
UV-Vis	Espectroscopia de absorção eletrônica na região do ultravioleta-visível
ν	Vibração de estiramento
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
Pr	Pireno
Top IB	Topoisomerase IB
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta performance)
LCMS	Liquid chromatography–mass spectrometry (Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas)
DDW	Double deionized water (Água duplamente ionizada)
CDDP	Cisplatina
DNA-CT	DNA – Calf thymus
ESI	Electro spray ionisation (Ionização por eletro <i>spray</i>)
IC ₅₀	50% da inibição da concentração de crescimento
ICP	Inductively coupled plasma (Plasma indutivamente acoplado)
OXA	Oxaliplatina
SRB	Sulforodamina B

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

TFA	Trifluoracetic acid (Ácido trifluoroacético)
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Capítulo 1: Introdução	1
1.1 Câncer.....	21
1.1.1 Base molecular do câncer	22
1.1.1.1 Instabilidade genética.....	22
1.1.1.2 Ativação da oncogene	23
1.1.1.3 Inativação do gene supressor de tumor.....	23
1.1.1.4 Ciclo celular em células neoplásicas	23
1.1.1.5 Angiogênese e metástase	25
1.1.1.6 Apoptose	26
1.2 Terapia do câncer	27
1.2.1 Cirurgia e outras terapias.....	27
1.2.2 Quimioterapia.....	28
1.2.3 Resistência aos quimioterápicos	28
1.3 Agentes anticancerígenos à base de metais	29
1.3.1 Fármacos à base de platina.....	29
1.3.1.1 Mecanismo de ação de fármacos à base de platina	31
1.3.1 Fármacos à base de paládio.....	32
1.4 Ligantes de Interesse.....	34
1.4.1 Tiossemicarbazonas	34
1.5 Enzima Topoisomerase	42
1.6 Proposta Deste Trabalho	46
Capítulo 2: Objetivos	49
Capítulo 3: Parte experimental	51
3.1 Materiais.....	52
3.2 Instrumentos	52
3.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) e condutimetria....	52
3.2.2 Análise elementar.....	52
3.2.3 Espectroscopia na região do ultravioleta (UV-Vis).....	52
3.2.4 Espectroscopia de emissão.....	53
3.2.5 Ressonância magnética nuclear (RMN)	53
3.2.6 Espectrometria de massas com ionização por <i>eletrospray</i> (ESI-MS)	53
3.2.7 CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)	54
3.2.8 LC-MS (Cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas, do inglês <i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>)	55
3.2.9 Determinações de Estruturas Cristalinas.....	55
3.2.10 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)	55
3.2.11 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)	56
3.2.12 Citometria de fluxo	56
3.2.13 Microscopia Confocal	56
3.3 Métodos	57
3.3.1 Determinação da citotoxicidade em linhagens de células tumorais <i>in vitro</i>	57
3.3.2 Preparo das amostras	57
3.3.3 Células	57
3.3.4 Ensaio de citotoxicidade.....	58
3.3.5 Acumulação de metais em células cancerígenas	62
3.3.6 Ciclo celular.....	63
3.3.7 Distribuição de metal em células cancerígenas.....	63
3.3.8 Integridade da membrana celular	64
3.3.9 Estudo de morte celular.....	64
3.3.10 Fusão do DNA-CT	65

SUMÁRIO

3.3.11 Dicroísmo linear (DL)	65
3.3.12 Estudos de inibição da Topoisomerase IB e interação com o DNA	65
3.3.13 Expressão e Purificação da topoisomerase humana IB.....	66
3.3.14 Dose-dependente.....	66
3.3.15 “Time Course”	67
3.3.16 Estudos de Interação com DNA	67
3.3.17 Estudo de cinética: clivagem e religação.....	68
3.3.17.1 Cinética de Clivagem.....	68
3.3.17.2 Cinética de Religação.....	68
3.4 Preparação dos compostos	69
3.4.1 Preparação dos agentes complexantes.....	69
3.4.2 Preparação dos complexos	71
Capítulo 4: Discussão dos Resultados	78
4.0 Agentes quelantes H ₂ PrR	79
4.1 Síntese e caracterização	79
5.0 Complexos do tipo [MCl(PPh ₃)(HPrR)]	93
5.1 Síntese e caracterização	93
5.2 Testes de estabilidade	105
5.3 Atividade antiproliferativa	107
5.4 Distribuição celular e uptake em células A2780	111
5.5 Interação com o DNA.....	112
5.4.1 Titulação de desnaturação do DNA.....	112
5.4.2 Dicroísmo linear	113
5.4.3 Eletroforese de DNA em gel.....	114
5.4.4 Ciclo celular.....	116
5.5 Topoisomerase	119
5.5.1 Testes de inibição com a enzima Topoisomerase IB.....	119
5.5.2 Estudos de cinética	124
6.0 Complexos polinucleares	127
6.1 Síntese e caracterização	127
6.2 Teste de estabilidade	141
6.3 Atividade antiproliferativa	142
6.4 Uptake em células A2780	143
6.5 Estudo de mecanismo	144
Capítulo 5: Conclusões	149
Capítulo 6: Referências Bibliográfica	154

Capítulo 1: Introdução

1.1 Câncer

Câncer, de acordo com a organização mundial da saúde (WHO), consiste no crescimento e propagação descontrolado de células. Em todos os tipos de câncer, as células do corpo começam a se dividir de forma incontrolável e a se espalhar pelos tecidos. Câncer é a segunda causa de morte global, sendo responsável por 8,8 milhões de mortes em 2015. Geralmente, quase 1 em cada 6 mortes é devido ao câncer.¹ As estatísticas atuais indicam que 1 em cada 3 pessoas irá desenvolver alguma forma de câncer durante o seu tempo de vida. Estima-se que até 2030 haverá 21,4 milhões de novos casos diagnosticados a cada ano.^{2,3} Segundo dados da organização mundial da saúde (WHO), somente no ano de 2014, no Brasil, mais de um milhão de pessoas (1.318.000) vieram a óbito em consequência do câncer, sendo a maioria dos casos ocorrentes em homens e aproximadamente 395,000 novos casos de cancer foram diagnosticados.⁴

A cancerogênese se caracteriza como o processo no qual as células normais se convertem em tecido neoplásico e perturba eventos celulares como proliferação, diferenciação e desenvolvimento, como consequência da falta de resposta aos mecanismos de controle normais nas células.⁵ Várias evidências indicam que a formação dos tumores em seres humanos é um processo de várias etapas e que essas etapas se desencadeiam em alterações genéticas que impulsionam a transformação progressiva de células humanas normais em derivados malignos, como mostrado por Hanahan e Weinberg.⁶ De acordo com este estudo, análises patológicas de órgãos revelam lesões que parecem representar os passos intermediários nos quais as células evoluem da normalidade através de uma série de estados pré-malignos até os cânceres invasivos. Sendo assim, o processo de progressão tumoral seria o resultado de seis eventos principais conhecidos nas células (**Figura 1**), incluindo: I) Auto-suficiência aos sinais de crescimento, II) insensibilidade aos anti-sinais de crescimento, III) evasão de apoptose, IV) replicação ilimitada, V) angiogênese sustentada e VI) metástase.⁷

A formação do tecido neoplásico tem sido ultimamente associada a vários fatores, incluindo ambientais, comportamentais e genéticos.⁸ No entanto, é sabido que o câncer é o resultado de causas multifatoriais. Logo, acelerar o processo contra o câncer requer uma investigação aprofundada da base molecular. Para tanto, como principal causa de morte, várias abordagens têm sido feitas para entender melhor a sua causa e cura.

INTRODUÇÃO

Figura 1. Progresso do tumor segundo Hanahan and Weinberg.

Figura adaptada da fonte⁷.

1.1.1 Base molecular do câncer

1.1.1.1 Instabilidade genética

A instabilidade genética (ou instabilidade de genoma) é um processo comum no desenvolvimento do câncer, pois se refere a uma elevada frequência de mutações.⁹ Estas mutações podem incluir alterações nas sequências de ácidos nucleicos, além de rearranjos cromossômicos que resultam na perda de integridade do DNA. A instabilidade genética está presente em todas as fases da doença, desde o estágio inicial da doença até casos mais avançados.¹⁰ Esta instabilidade é elevada no processo em que as lesões pré-cancerígenas acumulam mutações características de um estado canceroso.

As causas de instabilidade de genoma só começaram a ser elucidadas recentemente. A alta frequência de danos no DNA pode ser uma fonte de instabilidade do genoma, uma vez que os mesmos podem gerar uma síntese imprecisa após os danos ou erros no reparo, levando à mutação. Outras fontes de instabilidade do genoma podem ser de origem epigenética ou de reduções mutacionais na expressão de genes de reparo do DNA. A instabilidade

INTRODUÇÃO

cromossômica tem sido diretamente relacionada ao câncer. Esta é responsável por aproximadamente 80% de aneuploidia (célula que teve o seu material genético alterado) e por tumores epiteliais agressivos como pancreático, ovariano e pulmonar.¹¹ A ativação da oncogene, próximo tópico, é também uma das causas do câncer.

1.1.1.2 Ativação da oncogene

A Oncogênese é por definição um processo que codifica uma proteína capaz de transformar células ou induzir câncer.¹² Em outras palavras, é a denominação dada aos genes relacionados com o surgimento de tumores, bem como genes que quando deixam de funcionar normalmente, transformam uma célula normal numa célula cancerígena.¹³

1.1.1.3 Inativação do gene supressor de tumor

O gene supressor de tumor é um gene que protege a célula de desenvolver um câncer.¹⁴ Quando este gene sofre mutação por causa da perda ou redução em sua função, a célula pode progredir para câncer, geralmente em combinação com outras alterações genéticas.¹⁵ A perda destes genes pode ser ainda mais importante do que a ativação de proto-oncogene / oncogene para a formação de vários tipos de células cancerosas humanas. Mutações no gene p53 é o evento mais comum no câncer humano.¹⁶ Estes ocorrem em pelo menos 50% de todos os casos relatados.¹⁷ No tecido normal, a ativação de p53 permite que a célula responda ao estresse desencadeado por agentes prejudiciais ao DNA entre outros estímulos externos que resultam em apoptose.¹⁸ Os genes supressores de tumor envolvidos na regulação da proliferação celular são normalmente inativados durante a replicação de células cancerígenas.¹⁹ Sua reativação é a base do desenvolvimento de novas terapias contra o câncer.

1.1.1.4 Ciclo celular em células neoplásicas

A vida da célula compreende uma sequência de eventos cujo modelo é chamado de ciclo celular, o qual apresenta cinco fases: G₁, S, G₂ e M e G₀ (**Figura 2**). As células normais proliferam livremente e apenas saem do ciclo celular após sinais de privação de crescimento

INTRODUÇÃO

ou de inibição do crescimento. Todas as fases levam de volta à fase de repouso (G_0), no qual a célula ainda não começou a dividir. Nesta fase se encontram as células que deixaram o ciclo e pararam de dividir, sendo a fase de menor atividade metabólica. Quando a célula recebe um sinal para se reproduzir, ela se move para a fase G_1 . Na fase (G_1) se concentra basicamente a síntese de DNA, mediante a preparação de fosfatos, riboses, síntese dos nucleotídeos, aminoácidos, síntese de proteínas, enzimas, dentre outros. A síntese do DNA e RNA é fundamental para que a célula prossiga para a próxima fase. A fase S é responsável por desencadear uma proteína capaz de realizar a duplicação do DNA. Logo, o DNA é inteiramente duplicado nesta fase. Na fase G_2 , também conhecido como o período pré-mitótico, a síntese do DNA está completa e os cromossomos, em número dobrado, rearranjam-se, preparando o núcleo para a divisão celular. A fase M é curta e corresponde à mitose. O crescimento celular se cessa nesta fase e a energia celular é focada na divisão ordenada em duas células filhas.²⁰ Estas células, dependendo da sua função, podem morrer, entrar novamente no ciclo celular (Fase G_1) ou passar para a fase de repouso (G_0).

No ciclo celular, há uma série de pontos de verificação para garantir se há uma progressão/crescimento seguro e eficiente.²¹ A desregulamentação do ciclo celular é um evento comum no câncer humano.²² Nesse caso ocorre uma progressão persistente do ciclo celular, perdendo os controles que limitam a transição entre fases. Os pontos de controle dependem das cinases (também chamadas de quinases), enzimas catalíticas responsáveis pela fosforilação. A desregulação das cinases pode causar proliferação celular excessiva e, como resultado, gera instabilidade genética e cromossômica.²³ Assim, a célula tumoral ou transformada não finaliza o ciclo de replicação celular (não retorna à fase G_0) e passa da fase M para nova fase G_1 . A duração destas fases do ciclo celular varia consideravelmente nos diferentes tipos de células. Para uma célula humana de proliferação rápida típica o tempo de ciclo total dura normalmente 24 horas, a fase G_1 pode durar cerca de 11 horas, a fase S cerca de 8 horas, G_2 cerca de 4 horas e M cerca de 1 hora.

A origem das células cancerosas está associada a anomalias na regulação do ciclo celular, como alterações do funcionamento de genes controladores do mesmo em decorrência de mutações e perda de controle da mitose.²¹ Os fatores citados acima são relacionados ao surgimento de um câncer. As células cancerosas não proliferam mais rapidamente do que as células normais. A grande diferença é que as células normais, depois de terem criado um tecido normal, param de se multiplicar por causa dos sinais que recebem de que a construção

INTRODUÇÃO

do tecido está completa e que a proliferação celular é inadequada. As células cancerosas, em contraste, continuam a proliferar mesmo quando tal proliferação é inadequada. Assim, a perda do sinal de controle de células cancerígenas faz com que elas continuem a se proliferar.

Figura 2. Desenho ilustrativo do ciclo celular.

Figura adaptada da fonte²⁴

1.1.1.5 Angiogênese e metástase

Os intensos estudos na área da base molecular do câncer resultam em uma maior compreensão dos mecanismos da carcinogênese. Dentre estes, destaca-se a angiogênese. A angiogênese é o processo através no qual as células tumorais estimulam a formação dos novos vasos sanguíneos necessários para o fornecimento dos nutrientes essenciais para seu crescimento acelerado.²⁵ O ambiente dos tumores sólidos está geralmente associado à baixa oxigenação e baixo pH em consequência do metabolismo acelerado.^{26,27} Estudos recentes demonstraram alta correlação entre esse ambiente e a progressão agressiva do tumor. Como exemplo, a angiogênese acontece normalmente em locais com falta de oxigênio (hipoxia) ocasionando a formação de novos vasos sanguíneos.²⁸

A angiogênese e a metástase tumoral são processos inteiramente relacionados, uma vez que o crescimento de tumores está diretamente ligado com a geração de vascularização.²⁹ Os fármacos que inibem a angiogênese têm sido utilizados como agentes antitumorais. Um

exemplo é o Bevacizumab, fármaco usado para o tratamento de câncer colorretal.³⁰ As neoplasias tendem a se disseminar, deixando lesões e formando tumores secundários.

1.1.1.6 Apoptose

A necrose é o estado de morte de um grupo de células, tecido ou órgão, geralmente devido à ausência de suprimento sanguíneo. Este tipo de morte celular pode ocorrer devido à vários fatores, dentre eles agentes físicos como temperatura, radiação ou agentes químicos como drogas, álcool e ainda agentes biológicos tais como vírus, bactérias e parasitas.³¹ Diferentemente da necrose, a apoptose ou a morte celular programada é uma das respostas celulares aos estímulos de estresse.³² A morte celular é imprescindível para os organismos multicelulares. Nos tecidos de um ser humano saudável, a cada hora, bilhões de células ativam um programa de morte intracelular, por mecanismos celulares desconhecidos. Este processo é baseado em dados morfológicos e bioquímicos, podendo ser desencadeada por diversos fatores como, ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, falta de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (ROS). O processo de morte celular programada também tem a função de eliminar eventos cancerígenos. Nesse contexto, quando há um quadro característico de câncer, a apoptose é um dos processos mais comprometidos.³³ Isso ocorre porque ela seria um dos meios mais eficazes para se combater o câncer, já que ela eliminaria as células cancerígenas. No entanto, além de promover a neoplasia (crescimento e proliferação desenfreada de células), o câncer promove alterações no controle apoptótico do corpo, de maneira que dificulta a ocorrência apoptose.³² Do ponto de vista da bioquímica celular, a apoptose celular ocorre em várias etapas³⁴, como observado na **Figura 3**. Primeiramente, ocorre a retração celular, processo no qual há perda de aderência das células com suas vizinhas e com a matriz extra-celular. Logo em seguida, ocorre a condensação da cromatina em uma área próxima à carioteca, levando à fragmentação da célula. Então, a membrana plasmática emite projeções, evidenciando a existência de um colapso nuclear. Com isso, a membrana se rompe, havendo a formação de corpos apoptóticos e fagocitose.

Figura 3. Etapas da morte celular programada.

Figura adaptada da Fonte³⁵.

1.2 Terapia do câncer

1.2.1 Cirurgia e outras terapias

A cirurgia é o tratamento primário para tumores sólidos e envolve procedimentos para a remoção total de tecido neoplásico. Este tipo de intervenção depende em grande parte do tipo de câncer, do órgão afetado e do estágio da lesão diagnosticada. Este tratamento tem fortes limitações, especialmente para tumores agressivos, com alta taxa de metástase. As terapias alternativas incluem: terapia fotodinâmica, que envolve a administração de um pró-fármaco não tóxico e a sua ativação seletiva através da incidência de luz em um determinado comprimento de onda, sendo este tipo de terapia amplamente utilizada para tratar câncer de pele. A radioterapia, por outro lado, emprega radiações ionizantes para destruir células tumorais, gerando danos no DNA do tecido afetado. A radioterapia pode ser dividida em teleterapia, que utiliza feixes externos de radiação, ou braquiterapia, na qual as fontes radioativas entram contato direto com o tumor. Quando a taxa de crescimento de lesões neoplásicas é dependente de hormônios, como no câncer de mama e próstata, é possível empregar a terapia hormonal, a qual modula dos níveis hormonais no doente para tratar o câncer.³⁶

1.2.2 Quimioterapia

O tratamento à base de quimioterapia foi usado pela primeira vez por volta do século XX, quando o gás de mostarda foi usado para tratar linfomas.³⁷ A quimioterapia é baseada no tratamento que usa fármacos para parar o crescimento de células cancerosas, seja matando-as ou impedindo-as de se dividir. A quimioterapia pode ser administrada por via oral, por injeção, infusão ou sobre a pele, dependendo do tipo e estágio do câncer.³⁸ Desde então, uma extensa pesquisa relacionada ao uso de fármacos contra a proliferação de tecido maligno vem ocorrendo. Com o tempo, descobertas importantes permitiram a cura e/ou melhoria da expectativa de vida para pacientes com esta doença. A seletividade tem sido uma das grandes desvantagens desta forma de tratamento, principalmente devido aos efeitos colaterais indesejáveis. Além do mais, na prática, a seletividade é uma questão muito mais complexa, especialmente devido à falta de alvos moleculares únicos em células cancerígenas.

1.2.3 Resistência aos quimioterápicos

Um dos principais desafios no uso de quimioterapia para o tratamento do câncer é a resistência adquirida aos fármacos.³⁹ A resistência leva à falta de resposta na inibição do crescimento do tumor quando do uso do fármaco. A resistência aos medicamentos é dividida em duas principais categorias, resistência inerente e adquirida. Alguns dos mais importantes mecanismos moleculares de resistência incluem: aumento do efluxo do fármaco, mutações e alterações na metabolização dos fármacos⁴⁰, o que não se limita somente ao tratamento do câncer, sendo um fator crítico em outras doenças como a malária, a tuberculose e o HIV.⁴¹ A resistência inerente pode surgir de mutações espontâneas que inevitavelmente ocorrem na proliferação celular como parte da instabilidade genética. A resistência adquirida é desenvolvida após a exposição aos quimioterápicos. A resistência multidrogas, pode emergir como uma resposta celular aos agentes quimioterapêuticos.⁴² Os principais mecanismos incluem transporte de membrana modificado, alteração no alvo enzimático (por exemplo, mutações na enzima topoisomerase II), diminuição no grau de ativação do fármaco, glutathione aumentada, além de insuficiência de apoptose. O uso de terapias combinadas, utilizando diferentes classes de fármacos é uma das formas usadas para tentar superar a resistência.⁴³ Após a descoberta de resistência à platina, os pacientes são frequentemente medicados com

doxorrubicina, topotecano ou outras terapias hormonais, mas ainda assim a recaída é freqüente e associada à resistência a múltiplos medicamentos.

1.3 Agentes anticancerígenos à base de metais

1.3.1 Fármacos à base de platina

Apesar de existir um extenso estudo na busca de complexos metálicos para o tratamento à base de quimioterapia do câncer, até o momento, somente complexos de platina foram aprovados para uso clínico. A cisplatina (CDDP, **Figura 4**) foi o primeiro fármaco à base de platina aprovada pela FDA (Food and Drug Administration) com atividade antineoplásica (1978). A CDDP foi publicada pela primeira vez em 1845 por Perone e sua estrutura foi elucidada mais tarde, em 1893, por Werner.⁴⁴ No entanto, somente na década de 60 uma nova perspectiva para a química da platina e suas aplicações medicinais foram iniciadas por Rosemberg. Atualmente, seu uso é aceito em combinação com outros fármacos para tratar câncer de bexiga e colo do útero, os quais não podem ser tratados com cirurgia ou radioterapia, além de câncer de pulmão e ovário que estão avançados ou com grande chance de metástase. A CDDP é responsável pela cura de mais de 90% dos casos de câncer testicular e possui um papel vital no tratamento de câncer de ovário, cabeça, pescoço, câncer do colo do útero, melanoma, linfomas, dentre outros.⁴⁵

A descoberta da atividade antiproliferativa da cisplatina e seu sucesso clínico geraram um grande interesse no uso de compostos metálicos no tratamento do câncer.⁴⁶⁻⁴⁸ Desde então, centenas de compostos de platina têm sido preparados e avaliados como potenciais agentes quimioterápicos, embora poucos deles tenham sido efetivamente aprovados na terapia do câncer. Entre estes, dois derivados importantes foram aprovados pela FDA, a carboplatina em 1989⁴⁹ e oxaliplatina em 2002 (**Figura 4**).⁵⁰

Figura 4. Compostos de platina utilizados para o tratamento de câncer.

Adaptada da Fonte⁴⁴

INTRODUÇÃO

A carboplatina é um fármaco de segunda geração que se difere da cisplatina pela presença de um ligante dicarboxilato bidentado ao invés de ligantes cloridos lábeis. Esta troca tornou a cinética de ativação do complexo mais lenta que a da cisplatina, o que, conseqüentemente, diminuiu sua toxicidade, porém produzindo os mesmos adutos no meio celular. A maior estabilidade da carboplatina resulta em um maior tempo para o fármaco atingir o alvo. Devido a isso, a carboplatina tem uma meia-vida de 30 h. Um tempo de meia vida muito mais longo que a cisplatina. A carboplatina é usada principalmente para tratar câncer de ovário, mas atualmente é usada também para tratar tumores cerebrais, câncer na cabeça e pescoço, cérvix, testículos, mama, pulmão e bexiga.⁵¹

A oxaliplatina, fármaco aprovado em 2002, é um complexo de Pt^{II} contendo um ligante bidentado (1,2-diaminociclohexano), ao invés de duas aminas. A oxaliplatina não apresenta resistência cruzada com cisplatina e é ativa em combinação com 5-fluorouracilo e leucovorina para o tratamento do câncer colorretal, doença que a cisplatina e carboplatina não têm atividade clínica.⁵² Outra vantagem apresentada pela oxaliplatina é que o seu uso não foi associado a nefrotoxicidade e ototoxicidade.

Outros fármacos de platina usados para o tratamento de câncer, incluem a nedaplatina e a lobaplatina, aprovadas para uso no Japão e China, respectivamente. A nedaplatina (**Figura 5A**) tem os mesmos ligantes amina que a cisplatina, no entanto se difere por um ligante bidentado, o qual forma um anel de cinco membros com o íon de Pt^{II} . A nedaplatina forma espécies de platina reativas que se ligam a grupos nucleofílicos do DNA, resultando em apoptose e levando a célula a morte.⁵³ A lobaplatina (**Figura 5B**), fármaco da terceira geração da cisplatina, possui atividade anticâncer frente à vários tumores (câncer avançado de cabeça e pescoço e câncer de pulmão), além de apresentar atividade em células de câncer de ovário resistente à cisplatina.^{54,55}

Figura 5. Estruturas moleculares dos fármacos de A) Nedaplatina e B) Lobaplatina.

Adaptada da Fonte^{53,55}

Estudos apontam que a ligação da platina a proteínas pode ser uma das causas da sua forte toxicidade.⁴⁵ Após a administração intravenosa de fármacos de platina, eles podem interagir com componentes sanguíneos, um deles é a albumina (HSA). A HSA é a proteína mais abundante na corrente sanguínea humana e contém um resíduo de cisteína que pode interagir com vários complexos metálicos.⁵⁷ Verificou-se que as principais interações da cisplatina com HSA envolve a ligação Pt-S da cisteína. Logo, esta ligação é dita ser responsável pelos efeitos colaterais severos deste fármaco.⁵⁷

Apesar da ampla aplicação da cisplatina e seus derivados, estes fármacos apresentam grandes desvantagens. Sua administração acarreta efeitos secundários que incluem nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, náuseas, vômitos, entre outros. Esses efeitos colaterais são causados pela falta de seletividade dos mesmos.⁵⁹ Diante dos problemas apresentados pela cisplatina e seus derivados, vários complexos metálicos têm sido estudados com o objetivo de obter novos fármacos para tratar o câncer. Por exemplo, os complexos de rutênio ganharam recentemente atenção devido às atividades antitumorais promissoras. Dois complexos antineoplásicos de Ru^{III}, NAMI-A e KP1019, atingiram ensaios clínicos em humanos.^{60,61} Entretanto, a alta toxicidade apresentada nos estudos clínicos, tornam o futuro destes complexos indefinido.^{62,63} Desta forma, a busca por novos agentes antitumorais continua sendo necessária. Neste sentido, outros íons metálicos, como por exemplo, o Pd^{II}, se mostra interessante especialmente devido à semelhança com Pt^{II} e à consequente possibilidade de transposição da química de Pt^{II} para a química de paládio.

1.3.1 Fármacos à base de paládio

A semelhança significativa entre a química de coordenação dos compostos de Pd^{II} e Pt^{II} recomenda o uso de complexos de paládio como agentes antitumorais. Pd^{II} e Pt^{II} possuem configuração eletrônica d^8 e comumente formam complexos diamagnéticos com geometria quadrática planar. Ambos os íons metálicos são caracterizados como ácidos macios, formando ligações mais fortes com o átomo doador enxofre do que com átomo de oxigênio. Apesar da semelhança química entre os dois metais de transição, a cinética destes é particularmente diferente, sendo os complexos de Pd^{II} mais lábeis. A velocidade de hidrólise de complexos de Pd^{II} é cerca de 10^5 vezes mais rápida do que os análogos de Pt^{II} além de apresentarem melhor solubilidade em comparação com os complexos Pt^{II}. A interação do cispaládio *in vivo* com proteínas impedem este fármaco de atingir o DNA. Logo, concluiu-se que para um fármaco de Pd ser desenvolvido, ele deve ser estável o suficiente para manter a sua integridade estrutural *in vivo*.⁶⁴

Em busca de estabilidade química, recentemente têm-se preparado complexos de paládio com ligantes doadores de enxofre, por exemplo. Tais estudos mostram grande potencial relacionado à complexos de Pd^{II} para a terapia do câncer.⁶⁵ Das e Livingstone

INTRODUÇÃO

sugeriram que complexos de paládio derivados de ligantes quelatos contendo enxofre são agentes antitumorais mais eficazes do que com outros íons metálicos como Ni^{II} , Cu^{II} e Zn^{II} .⁶⁶

Jayabalakrishnan e colaboradores prepararam novos complexos de paládio como o $[\text{Pd}(\text{L})(\text{PPh}_3)]$ e o $[\text{Pd}(\text{L})(\text{AsPh}_3)]$ (**Figura 7**), utilizando o ácido 4-hidroxibenzóico (5-cloro-2-hidroxi-benzilideno)-hidrazida (H_2L).⁶⁷ Testes biológicos realizados para estes complexos mostraram uma citotoxicidade considerável *in vitro* para câncer de colo de útero e câncer de mama. O estudo de mecanismo para estes complexos revelou uma forte interação dos mesmos com o DNA, indicando que os complexos interagem com o DNA-CT através de intercalação.

Figura 7. Estrutura química dos complexos de paládio.

Fonte⁶⁷

Alguns complexos dinucleares de paládio também possuem estruturas interessantes e atividade antitumoral considerável. Como exemplo, temos complexo organometálico dinuclear de paládio contendo ligantes de bifosfina (**Figura 8A**), o qual mostrou uma potente atividade antiproliferativa *in vivo* em comparação com os seus correspondentes mononucleares.⁶⁸ Um complexo trinuclear de paládio [$\{trans\text{-PdCl}(\text{NH}_3)\}_2\text{-}m\text{-}\{trans\text{-Pd}(\text{NH}_3)(2\text{-hidroxipiridina})\}_2$] (**Figura 8B**) apresentou atividade anticâncer para a linhagem celular de carcinoma de ovário A2780 e para a linhagem parental resistente à cisplatina (A2780cisR).⁶⁸ Interessantemente, os complexos de paládio citados aqui apresentaram maior citotoxicidade que seus análogos de platina. Logo, os estudos encontrados na literatura mostram que complexos de paládio possuem um grande potencial como agentes anticâncer. Principalmente quando estes complexos são estabilizados por ligantes quelantes com átomos *N* e *S* doadores ou ligantes contendo fosfina.^{69,70}

INTRODUÇÃO

Figura 8. Estrutura química de complexos A) dinuclear e B) trinuclear de paládio ativos para linhagens de câncer

Adaptada da Fonte⁶⁸

Pensando na estabilidade de um fármaco de paládio, complexos contendo ligantes com átomos *N* e *S* doadores como tiossemicarbazonas se mostram interessantes. Uma introdução sobre esta classe de ligantes, sua química e mecanismo de ação são detalhados no próximo tópico.

1.4 Ligantes de Interesse

1.4.1 Tiossemicarbazonas

As propriedades dos complexos são em grande parte dependentes dos ligantes coordenados. Por isto, é importante a síntese de sistemas ligantes eficientes, flexíveis e que possam ser modificados em alguma parte da sua estrutura, de preferência, em uma região afastada dos sítios de coordenação. O número e a disposição de átomos doadores determinam a maneira com que as moléculas orgânicas se coordenam ao centro metálico. Com base neste fato, o nosso objetivo foi preparar novos complexos estruturalmente diferentes da cisplatina e que possuam potencial biológico interessante, de modo a superar ou amenizar os problemas atualmente encontrados na terapia do câncer. Neste trabalho as tiossemicarbazonas (TSCs) foram escolhidas como agentes quelantes devido às suas propriedades químicas e, especialmente, farmacológicas que serão discutidas abaixo.

As tiossemicarbazonas (**Figura 9**) são sistemas quelantes eficientes para diversos centros metálicos, incluindo Pd^{II} e Pt^{II}.^{71,72} O interesse pela química das tiossemicarbazonas e de seus complexos metálicos é devido as suas propriedades farmacológicas atraentes, que podem ser encontradas em vários estudos^{73,74}, as quais incluem a atividade antineoplásica.⁷⁵

INTRODUÇÃO

Além disso, é interessante destacar que as propriedades biológicas das TSCs são geralmente aumentadas após a complexação.^{74,75}

Figura 9. Fórmula geral das Tiossemicarbazonas.

Adaptada da Fonte⁷⁶

Algumas TSCs já estão sendo profundamente estudadas para o tratamento de tumores, como a Dp44mT⁷⁷ (di-2-piridilcetona-4,4-dimetil-3-tiosemicarbazona), a triapina⁷⁸ (E)-2-((3-aminopiridin-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (Tp) (**Figura 10**), as quais são capazes de inibir o crescimento celular em concentrações nanomolares. O Instituto Nacional do Câncer tem estudado a segurança e a eficácia da triapina adicionada à cisplatina em pacientes com câncer cervical.⁷⁹ Estudos indicam que a citotoxicidade da triapina é devido a sua reação de complexação com íon metálico de ferro. Experimentos de EPR mostraram que o complexo [Fe^{II}(Tp)₂] é capaz de reduzir H₂O₂, gerando radicais como HO• e formando [Fe^{III}(Tp)₂]. A triapina inibe a ribonucleotídeo redutase, a enzima limitante da velocidade responsável pela construção do DNA, e assim, aumenta a radioquimiossensibilidade, prolongando o tempo de reparação do DNA.⁸⁰

A princípio, estudos sugeriram que parte da citotoxicidade do Dp44mT é causada devido a não estabilização do complexo covalente formado entre a enzima topoisomerase IIα e o DNA.⁸⁰ No entanto, outros estudos têm demonstrado que, devido a Dp44mT ser um agente quelante eficiente, este composto é capaz de sequestrar o íon metálico de ferro, possuindo um mecanismo de ação similar ao da triapina. Especificamente, foi sugerido que a Dp44mT inibe a enzima ribonucleotídeo redutase através da sua capacidade de afetar sistemas contendo tióis cruciais para atividade enzimática mediada pela sua complexação ao íon metálico ferro e, consequentemente, ao sistema redox decorrente da formação do complexo de ferro, induzindo a apoptose celular.⁷⁷

INTRODUÇÃO

Figura 10. Estruturas moleculares da Dp44mT e triapina.

Fonte⁸⁰

Além do amplo perfil farmacológico das TSCs, as mesmas ainda possuem uma alta versatilidade química, o que permite várias modificações estruturais. Esses ligantes são polidentados, podendo coordenar-se via átomos de enxofre e/ou nitrogênio, dependendo da variação dos substituintes R_1 , R_2 , R_3 e R_4 nas tiosemicarbazidas, os quais trazem uma gama de possibilidades de variação sistemática. Tais variações podem alterar as propriedades físico-químicas dos ligantes, assim como a atividade biológica dos mesmos e de seus respectivos complexos. As tiosemicabazonas à base de aldeídos possuem hidrogênio como um dos substituintes (R_1), enquanto que o grupo R_2 pode ser um grupo alquil, aril ou um grupo heterocíclico. De modo semelhante, os substituintes no N_3 podem ser ambos átomos de hidrogênio, ou um hidrogênio, e um segundo alquil, ou grupo aril. Os ligantes tiosemicarbazonas existem como tautômeros de tione-tiol (formas 1 e 2), podendo se ligar a centros metálicos na forma neutra (forma 1) ou forma aniônica (forma 3). A forma aniônica é gerada após a desprotonação dos grupos N_2H ou SH ⁷⁶ (**Figura 11**).

Figura 11. Formas tautoméricas dos ligantes tiosemicarbazonas.

Adaptada da Fonte⁷⁶

INTRODUÇÃO

Vários modos de coordenação são observados para as tiossemicarbazonas no seu estado neutro ou monoaniônico. Os possíveis modos de coordenação já estabelecidos por esta classe de ligantes, de acordo com a literatura, são mostrados na **Figura 12**. As TSCs podem se coordenar na forma neutra, apenas através do átomo de S em modo κ^1 -S (**A**), μ -S (**B**), κ^2 -N₁,S (**C**), além de modo bidentado sendo o S-em ponte (**D**). No entanto, se o substituinte em C₁ for um doador, pode ainda haver um modo de ligação tridentado, sendo os modos de ligação adicionais observados κ^3 -X,N₁,S (**E**), μ -S- κ^3 -X,N₁,S (**F**) e μ -X- κ^3 -X,N₁,S (**G**).⁷⁶

Figura 12. Modos de coordenação conhecido para as TSCs.

Adaptada da Fonte⁷⁶

Diante do exposto, o uso de tiossemicarbazonas como ligantes é prontamente justificado, porém estas representam apenas parte do sistema ligante a ser utilizado neste trabalho. A outra parte deste será representada pelo grupo pireno (**Figura 13**), o qual deve ser acoplado às tiossemicarbazidas pensando em aumentar ainda mais a eficácia dos ligantes.

O pireno (**Figura 13**), um hidrocarboneto aromático policíclico, é um grupo fluoróforo que contém quatro anéis benzeno fundidos, sendo assim, um sistema altamente π conjugado, tornando este fragmento interessante devido às suas propriedades fluorescentes.⁸¹ Logo, o pireno pode ser usado como uma sonda luminescente para identificar a absorção de complexos numa variedade de linhagens celulares através da microscopia de fluorescência.⁸² Além disso, é previsto que as propriedades intercaladoras bem conhecidas do pireno podem ser utilizadas para inibir a replicação do DNA celular.⁸³ Assim, a combinação de uma tiossemicarbazona com o pireno se mostra promissora tanto para aplicações biológicas, como

INTRODUÇÃO

para identificação dos possíveis alvos no meio intracelular utilizando-se um microscópio confocal.

Figura 13. Estrutura molecular do pireno.

Fonte: A autora

As TSCs são agentes complexantes versáteis que permitem variados modos de coordenação. Os agentes quelantes utilizados neste trabalho (**Figura 14**) podem atuar de modo mono-, bi- ou tridentados, via átomos de carbono, nitrogênio e enxofre, como ligantes neutros, monoaniônicos ou dianiônicos. Artigos recentemente publicados mostram que pequenas modificações estruturais na estrutura das TSCs podem influenciar a atividade biológica.⁷⁵ Visando proporcionar um estudo sistemático, neste trabalho, foram feitas alterações nos grupos ligados ao nitrogênio N3 das TSCs pelos grupos –etil e –ciclohexil. Estudos envolvendo a variação de grupos substituintes em tiossemicarbazonas e suas consequências biológicas têm sido um dos pontos fortes do nosso grupo, como mostrado em trabalhos publicados anteriormente^{73,74}, trazendo consigo a experiência para o desenvolvimento deste trabalho.

Figura 14. Tiossemicarbazonas derivadas do pireno utilizadas neste trabalho, onde R = etil e ciclohexil.

Fonte: A autora

O estudo de complexação de tiossemicarbazonas contendo o fragmento pireno com os íons metálicos Ru^{II} , Rh^{II} e Ir^{II} já foi realizado⁸⁴ (**Figura 15**). Os complexos semi-sanduíche do tipo $[(\eta^6\text{-}p\text{-MeC}_6\text{H}_4\text{Pr})\text{Ru}(\text{L}^n)\text{Cl}]^+$ e $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)\text{M}(\text{L}^n)\text{Cl}]^+$, sendo $\text{M} = \text{Rh}, \text{Ir}$ e $\text{L}^1 =$

INTRODUÇÃO

pirenocarboxaldeído-3-tiossemicarbazona, L^2 = pirenocarboxaldeído-4-metil-3-tiossemicarbazona e L^3 = pirenocarboxaldeído-4-fenil-3-tiossemicarbazona, tiveram suas atividades biológicas testadas frente à varias linhagens celulares, como -549, DU-145, HeLa, MCF-7. Verificou-se que os complexos possuem valores de IC_{50} na faixa micromolar e baixa citotoxicidade em células não cancerosas (HEK-293). Os complexos de ródio, $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L^1)Cl]^+$ e $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L^3)Cl]^+$ são os dois melhores candidatos, pois apresentaram atividade antiproliferativa comparável à doxorubicina. O ciclo celular dos dois complexos de ródio foi estudado e verificou-se que estes inibem preferencialmente as fases G_2/M e sub G_1 do ciclo.⁸⁴

Figura 15. Estruturas químicas dos complexos de Ru^{II} , Rh^{II} e Ir^{II} contendo ligantes tiossemicarbazonas derivadas do pireno.

Fonte⁸⁴

Outro trabalho recente apresenta estudos de difração de raios X de complexos organometálicos de rutênio contendo o mesmo tipo de ligante citados acima. A estrutura mostra a coordenação tridentada do ligante tiossemicarbazonato em modo CNS ⁸⁵. Neste caso, ocorre a ativação do carbono do grupo pireno em posição orto à imina e consequente formação de um anel de 5 membros com o íon metálico, resultando em complexos carbonil ciclometalados de Ru^{II} , como mostrado na **Figura 16**.

Figura 16. Representação das elipsóides (30% de probabilidade) para o complexo *trans*-[Ru(L¹)(CO)(PPh₃)₂].

1.4.1.1 Complexos de paládio e platina contendo TSCs

O interesse por ligantes do tipo tiossemicarbazonas se justifica por serem ligantes versáteis, com alta deslocalização π , flexibilidade configuracional e por serem *N,S*-doadores, sendo adequados para paládio e platina. Além disso, o mecanismo de ação antitumoral das TSCs é diferente comparado ao da cisplatina. Portanto, complexação de tiossemicarbazonas com Pd e Pt é um tópico importante para Química Inorgânica Medicinal e vários artigos tratando sobre este tópico podem ser encontrados na literatura, dentre eles artigos de revisão.^{68,86,87} Em virtude dessa grande quantidade de artigos, esta revisão bibliográfica se trata somente dos trabalhos mais recentes e relacionados à atividade antitumoral destes complexos.

Um exemplo do uso desta estratégia já foi dado por nosso grupo de pesquisa ao desenvolver complexos de Pd^{II} do tipo [Pd(L)(PPh₃)]⁺ (onde L é um ligante TSC *N,N,S*-doador), os quais foram preparados e avaliados *in vitro* frente a linhagem celular de câncer de mama. Todos os complexos testados foram mais ativos do que as tiossemicarbazonas livres.⁷⁵ Diante destes resultados, pôde-se observar que, ao ancorar um agente quelante contendo enxofre e nitrogênio como átomos doadores de elétrons ao centro de Pd^{II}, os complexos tiveram atividades superiores. Outros exemplos de complexos de paládio derivados de

INTRODUÇÃO

tiossemicarbazonas que apresentaram atividade citotóxica promissora podem ser encontrados na literatura.^{88,89}

Reações de tiosemicarbazonas derivadas do 2-formil e 2-acetilpiridina contendo um anel azepano incorporado na posição N(4) com platina resultou em complexos promissores com atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*.⁹⁰ Os ligantes e respectivos complexos foram testados em 3 linhagens celulares: câncer de mama humano, células de câncer de bexiga e de pulmão. Os ligantes livres apresentaram elevada atividade antiproliferativa em todas as linhagens testadas, sendo que o ligante derivado do formil apresentou seletividade considerável contra as linhagens celulares MCF-7 e L-929, enquanto que o complexo de platina com o derivado da acetilpiridina exibiu alta seletividade em todas as linhagens testadas. A toxicidade aguda e a atividade antitumoral *in vivo* dos complexos foram avaliadas em ratos portadores de leucemia. O complexo de Pt contendo o ligante tiossemicarbazonato derivado do formil apresentou os resultados mais promissores *in vivo*.

Compostos de paládio são lábeis quando comparados aos de platina.⁴⁵ Este fato indica que compostos de paládio podem trocar seus ligantes facilmente em meio biológico. Esta troca comparativamente mais rápida pode ser o motivo de muitos compostos de paládio serem menos ativos em relação aos de platina, fato justificável pela dificuldade de atingir o alvo biológico.^{45,91} Neste sentido, complexos organometálicos de paládio e platina contendo tiossemicarbazonas como ligantes ganham destaque, primeiramente devido à habilidade de formar uma gama de complexos com estruturas diversificadas, incluindo oligômeros, e, principalmente, pelo aumento da estabilidade do complexo como um todo. Deste modo, um número considerável de complexos ortometalados de Pd^{II} e Pt^{II} têm sido estudados como agentes anticâncer.⁹²⁻⁹⁵ Por exemplo, Quiroga e colaboradores descreveram três complexos organometálicos de platina derivados de tiossemicarbazonas, os quais apresentaram uma considerável atividade citotóxica frente a três diferentes linhagens celulares, sendo considerados potenciais agentes antitumorais.⁹⁶

É encontrado também na literatura que complexos ortometalados de paládio e platina podem ser obtidos através de reações de sais de platina e paládio como K₂[PtCl₄] ou Li₂[PdCl₄] e tiossemicarbazonas contendo anel fenil com carbono orto livre para formação da ligação M–C, em modo C,N,S tridentado. Neste caso, a quarta posição fica livre para formação de pontes com um átomo de enxofre com um fragmento adjacente, podendo haver a formação de compostos diméricos, triméricos e tetraméricos.^{45,96} Um exemplo é o complexo

INTRODUÇÃO

tetramérico de Pd^{II} de fórmula geral $[\{\text{Pd}(\text{2-FC}_6\text{H}_3\text{C}(\text{Me})=\text{NN}=\text{C}(\text{S})\text{-NHMe})\}_4]$ apresentado na **Figura 17A**. O mesmo organometálico teve sua estrutura cristalina e molecular determinada por difração de raios X, como mostrado na **Figura 17B**. Este complexo apresentou atividade antitumoral relevante.⁸⁹

Além de complexos tetraméricos, compostos diméricos de Pd^{II} e Pt^{II} com haletos em ponte também são comuns na literatura. Geralmente, estes compostos dinucleares são usados como intermediários para a ortometalação, ou seja, esse tipo de composto seria a primeira etapa para acontecer a reação de ciclometalação.⁸⁹

Figura 17. A) Representação esquemática de um tetrâmero ortometalado de Pd^{II} derivado da 4-metil-3-tiossemicarbazida e B) Estrutura cristalina e molecular do tetrâmero de paládio.

Fonte⁸⁹

1.5 Enzima Topoisomerase

Além da atividade biológica, é necessário se pensar em um mecanismo de ação alternativo ao que a cisplatina apresenta. Neste ponto, as tiossemicarbazonas voltam a apresentar grandes vantagens para serem investigadas. É estabelecido que algumas TSCs são capazes de inibir Topoisomerases (Top), enzimas reguladoras da topologia do DNA durante a divisão celular.^{97,98} Estas enzimas são de extrema importância no ciclo celular, pois são responsáveis por manter o DNA na sua forma relaxada e não na forma enovelada (**Figura 18**). No entanto, a natureza da dupla hélice do DNA e a ancoragem de macroestruturas ao DNA nuclear resulta em problemas topológicos durante a replicação. Tais problemas levam o DNA a sua forma superenovelada, a qual está retorcida (ver **Figura 18**). Nas células eucarióticas, a topologia do DNA é restaurada pelas enzimas topoisomerases (Top). Estas enzimas são de

INTRODUÇÃO

suma importância uma vez que exercem funções como replicação, transcrição e reparo no DNA, desempenhando um papel crucial no controle de suas funções fisiológicas.

Figura 18. Desenho ilustrativo das formas relaxada e superenovelada do DNA.

Fonte⁹⁹

A **Figura 19** mostra a enzima topoisomerase IB atuando no ciclo catalítico do DNA de células eucarióticas. Nesta figura, vemos o DNA na sua forma relaxada e forma superenovelada, além da enzima Top (mostrada nas cores azul e roxa). Este ciclo pode ser dividido em quatro etapas principais: ligação, clivagem, religação e liberação. A primeira delas é referente à ligação não covalente do DNA à enzima Top e consequente formação do complexo enzima–DNA. Em seguida, a Top IB atua realizando a clivagem de uma fita do DNA e se ligando de maneira covalente ao mesmo, levando a formação de um intermediário covalente. Após a reação de clivagem, a enzima realiza uma rotação no DNA para, posteriormente conseguir efetuar o processo chamado religação. Após a rotação, a enzima liga a fita do DNA por meio de uma ligação não covalente, através de um processo de religação. Por fim, a enzima realiza o processo de liberação do DNA que por sua vez está na sua forma relaxada.¹⁰⁰

INTRODUÇÃO

Figura 19. Etapas do ciclo catalítico da topoisomerase IB do DNA em células eucarióticas.

Adaptada da Fonte¹⁰¹

As enzimas topoisomerases são divididas em duas classes: topoisomerase I (Top I) e topoisomerase II (Top II), as quais se diferem pelo mecanismo de ação. A topoisomerase II cliva e em seguida religa duas fitas do DNA, enquanto que a topoisomerase I possui a capacidade de clivar e religar somente uma fita da dupla hélice do DNA.^{102–104} Portanto, uma vez que os tumores mantêm um elevado nível de Topoisomerase¹⁰⁵, a inibição desta enzima impede a replicação de células danificadas uma vez que o DNA não é capaz de exercer sua função na forma superenovelada. A **Figura 20** ilustra a ação das enzimas Top I e Top II em uma célula cancerígena. Logo, se estas forem inibidas pela ação de um fármaco, o DNA não se replicará mais e este fato levará à morte celular.

INTRODUÇÃO

20. Esquema ilustrativo demonstrando a clivagem do DNA pelas enzimas top I e top II.

Adaptada da Fonte¹⁰⁶

As isoenzimas Top I e Top II podem ser subdividas em duas classes diferentes: tipo A e tipo B. Estas duas diferenciações se distinguem no resíduo do DNA ao qual a enzima se liga covalentemente. As enzimas do tipo A formam uma ligação covalente com a extremidade 5' do resíduo tirosina do DNA gerado após o processo de clivagem, enquanto que as do tipo B formam uma ligação covalente na extremidade 3' do mesmo resíduo. A enzima humana topoisomerase IB, em particular, é de grande interesse clínico. Esta enzima é o único alvo celular da camptotecina, composto natural extraído da casca e frutos de uma planta asiática.¹⁰⁴ A camptotecina, CPT (**Figura 21**) é um fármaco que apresenta uma considerável atividade antitumoral, cujo mecanismo de ação envolve a inibição da topoisomerase I, enzima presente em altas concentrações nos tumores. A camptotecina se liga covalentemente à Top I estabilizando a formação do complexo DNA-enzima, inibindo fortemente a reação de religação pela Top I. A citotoxicidade da CPT pode ser atribuída a interrupção da replicação pelo complexo DNA-enzima-fármaco estabilizado resultando no rompimento da dupla fita e finalmente na cessação da síntese de DNA. Assim, CPT é um fármaco que atua especificamente na fase S do ciclo celular. A camptotecina atua inibindo o processo de religação do complexo enzima-DNA, o que a torna um composto extremamente tóxico para a célula.

INTRODUÇÃO

Figura 21. Estrutura molecular da camptotecina.

Fonte²⁴

Entretanto, devido à sua instabilidade em meio fisiológico, baixa solubilidade em solução aquosa e a sua inativação, decorrente da abertura do anel lactônico, a administração intravenosa deste fármaco é limitada. Desta forma, dois derivados da camptotecina, o topotecano e irinotecan (**Figura 22**), foram aprovados pela FDA e estão atualmente em uso clínico para tratar câncer de ovário e câncer do colo do útero.^{107,108}

Figura 22. Compostos usados para tratamento de câncer de ovário e colo do útero.

Fonte¹⁰⁸

1.6 Proposta Deste Trabalho

O desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o combate ao câncer vem crescendo progressivamente nos últimos anos. Neste âmbito, a Química Inorgânica é uma das áreas mais produtivas, fato justificado pelos inúmeros artigos em revistas de alto impacto com este foco.^{65,109,110} Desta forma, além de escolher adequadamente os centros metálicos e o sistema ligante, os estudos atuais requerem que o suposto fármaco também seja seletivo, ou seja, possua uma ampla janela terapêutica. Isso porque os problemas encontrados na terapia do câncer, normalmente, são devido à baixa seletividade dos fármacos, o que resulta em uma elevada toxicidade e, conseqüentemente, a uma janela terapêutica restrita. Os acentuados

INTRODUÇÃO

efeitos colaterais ocorrem porque os agentes anticâncer não possuem seletividade direcionada somente no sentido do tumor, mas estes agentes também danificam células normais.¹¹¹ Com isso, células que se dividem rapidamente são naturalmente mais vulneráveis à ação citotóxica destes fármacos. Logo, fármacos mais seletivos resultariam em uma quimioterapia menos agressiva ao paciente.

Com base nesses fatos, compostos anticâncer que possuam novos mecanismos de ação são alternativas que podem resolver os problemas associados com a resistência adquirida aos fármacos de platina. Vários outros compostos metálicos com atividade antitumoral promissora contra uma vasta gama de tumores com novos mecanismos de ação têm sido relatados.^{62,112,113} Visando este objetivo, chegou-se a um consenso de que é necessário o desenvolvimento de complexos estruturalmente diferentes da tradicional cisplatina. Nesta direção, a mudança do centro metálico é uma alternativa interessante. Logo, complexos de paládio, devido à analogia química com platina, se mostram como uma escolha atraente para obtenção de compostos com novos mecanismos de ação. Além disso, mudanças nas estruturas dos ligantes podem levar a alterações nas propriedades físico-químicas e a um ajuste de estabilidade do complexo formado bem como a obtenção de compostos com mais de um mecanismo de ação.

Tiossemicarbazonas são ligantes muito interessantes para obtenção de complexos de Pd^{II} e Pt^{II} , apresentando uma química de coordenação bastante rica, pois estes agentes quelantes podem atuar em modos mono, bi- ou tridentado, além de serem estruturalmente diferentes dos ligantes que constituem os atuais fármacos derivados de platina usados no tratamento do câncer. Ademais, a funcionalização das tiossemicarbazonas através da combinação com grupos de potencial biológico pode potencializar a atividade biológica e proporcionar um mecanismo de ação antitumoral em múltiplos alvos.

Neste trabalho, estudamos a química de coordenação envolvendo o sistema ligante tiossemicarbazona, funcionalizada com o pireno, com os íons metálicos Pd^{II} e Pt^{II} visando verificar a influência do centro metálico na atividade antiproliferativa assim como as consequências da variação dos grupos periféricos do ligante na mesma. Além disso, almejou-se obter complexos que apresentem mecanismo de ação diferente da cisplatina. Neste contexto, além da síntese e caracterização, este trabalho também visou realizar o estudo do mecanismo de ação dos compostos mais promissores, identificando alguns alvos celulares e moleculares dos compostos obtidos. Logo, buscou-se obter compostos com propriedades mais adequadas para atuarem como agentes no tratamento do câncer, tais como atividade citotóxica

INTRODUÇÃO

em linhagens nas quais os fármacos de platina em uso clínico não apresentam atividade, maior seletividade e superação da resistência adquirida podendo, deste modo, atuar em combinação com cisplatina.

Capítulo 2: Objetivos

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral a síntese e caracterização de complexos de paládio e platina com ligantes tiossemicarbazonas contendo o grupo pireno em sua estrutura visando avaliar cada composto quanto a sua atividade citotóxica. Deste modo, os objetivos específicos deste trabalho são:

1. Sintetizar ligantes do tipo pirenocarboxaldeído-N(3)-R-tiossemicarbazona, realizando modificações estruturais no grupo R, utilizando um grupo menos volumoso, como o etil, e um grupo mais volumoso, como o ciclohexil, com o intuito de verificar as diferenças das propriedades dos mesmos;
2. Sintetizar complexos de Pd^{II} e Pt^{II} contendo os ligantes previamente sintetizados, em diferentes modos de coordenação;
3. Caracterizar todos os compostos preparados por vários métodos, como ponto de fusão, análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear de ¹H, espectrometria de massas e difração de raios X em monocristal;
4. Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* (IC₅₀) dos compostos frente às linhagens de células tumorais bem como em uma linhagem resistente à cisplatina;
5. Determinar a citotoxicidade (IC₅₀) dos compostos sobre a proliferação de células não cancerígenas, como PMBC e MRC5;
6. Investigar o mecanismo de ação dos complexos mais promissores, explorando o DNA como um possível alvo por meio de intercalação ou ligação covalente e investigar a atividade inibitória dos compostos frente à enzima topoisomerase IB, visando identificar possíveis alvos biológicos;
7. Obter imagens através da microscopia de fluorescência para determinação da citolocalização dos compostos.

Capítulo 3: Parte experimental

3.1 Materiais

Neste estudo, os solventes foram usados sem tratamento prévio. A 4-etiltiossemicarbazida, pirenocarboxaldeído e os complexos de partida $K_2[PtCl_4]$, $PdCl_2$, foram obtidos comercialmente (Sigma-Aldrich) e usados conforme recebidos. A 4-ciclohexil-3-tiossemicarbazida e o precursor $[PdCl_2(MeCN)_2]$ foram preparados segundo procedimento padronizados.^{114,115}

3.2 Instrumentos

3.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) e condutimetria

Os espectros na região do infravermelho foram medidos em pastilhas de KBr na faixa de 400 e 4000 cm^{-1} em um espectrofotômetro do tipo Shimadzu IRPrestige-21, com resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros analisados para a análise da região abaixo de 400 cm^{-1} foram realizados no laboratório do Professor Dr. Alzir Azevedo Batista em um espectrofotômetro BOMEM MICHELSON FT MB-102 com pastilhas de CsI. As condutividades de complexos representativos foram medidas em solventes variados (concentração usada 10^{-3} M) com um condutivímetro Orion Star Series.

3.2.2 Análise elementar

As análises elementares foram determinadas usando-se um aparelho Perkin-Elmer CHNS/O 2400 Series II, do Departamento de Química da Universidade Federal de Uberlândia ou em um analisador CE-440 Exeter pelo serviço analítico da Universidade de Warwick.

3.2.3 Espectroscopia na região do ultravioleta (UV-Vis)

Os espectros na região do UV-Visível foram medidos em um espectrofotômetro Shimadzu, em soluções de CH_2Cl_2 ou DMSO. Testes adicionais foram registrados em um Varian Cary 300 ou Cary 300Bio UV-Vis, utilizando cubetas de comprimento de 1 cm (600

μL) e os controladores de temperatura Peltier PTP1. Experimentos foram realizados a 298 K. Os espectros foram processados com o Origin Lab 8.1 (Origin, EUA).

3.2.4 Espectroscopia de emissão

Os espectros de excitação e emissão de fluorescência dos complexos foram realizados no laboratório do Professor Roberto Santana da Silva, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP, em um espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301 PC, usando cubetas de quartzo com os quatro lados polidos e com 1,0 cm de caminho óptico. Os parâmetros experimentais tais como solvente, temperatura, comprimento de onda e fendas usadas nos estudos foram determinados de acordo com o composto estudado, sendo as condições relatadas nos resultados e discussão.

3.2.5 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Nesta tese, os dados de RMN foram obtidos usando-se um equipamento Agilent 400/54 Premium Shielded da Central de Análises Químicas do IQSC-USP (CAQI), operando à 400 MHz para ^1H e à 162 MHz para ^{31}P . Durante o doutorado sanduíche, realizado no grupo do Professor Sadler, os espectros obtidos foram adquiridos no espectrômetro Bruker DPX-400 (^1H = 300,03 ou 400,00 MHz, ^{31}P = 121,49 MHz, ^{13}C = 150, ^{195}Pt = 500 MHz). Os espectros de ^1H RMN foram internamente referenciados em relação ao TMS (0 ppm), DMSO- d_6 (2,50 ppm), CD_2Cl_2 (5,32 ppm) ou CDCl_3 (7,26 ppm). Os espectros de RMN de ^{13}C foram medidos usando o método ATP (*attached proton test*). Este método é utilizado para auxiliar na atribuição dos sinais de carbonos com hidrogênios desacoplados. No experimento ATP os sinais de metino (CH) e metila (CH_3) são positivos, enquanto que carbonos quaternários (C) e metileno (CH_2) são negativos. Os deslocamentos nos espectros de ^{195}Pt foram referenciados em relação ao $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ ($\delta = -1628$ ppm). Os espectros foram processados usando o *software* ACDLabs.

3.2.6 Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS)

Os espectros de massa, com ionização em modo positivo (ESI-MS), foram medidos com um equipamento Agilent 6210 ESI-TOF da Central de Análises Químicas do IQSC-USP

PARTE EXPERIMENTAL

(CAQI) ou utilizando um espectrômetro de massas Bruker Esquire 2000 da Universidade de Warwick com método de ionização eletrospray. As amostras foram medidas utilizando soluções contendo mistura de solventes (75% de DCM, 25% de MeOH). Os dados dos espectros de massa são apresentados da seguinte forma: m/z , atribuição.

3.2.7 CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

Os estudos de HPLC foram realizados num sistema de HPLC HP 1100 Series (Agilent) utilizando uma coluna ZORBAX Eclipse Plus C-18. Neste sistema duas fases móveis foram usadas. A fase A foi constituída por água (categoria HPLC, Aldrich) contendo ácido trifluoroacético a 0,1% (TFA) e a fase B foi acetonitrila (categoria HPLC, Aldrich) também contendo 0,1% de TFA. A tabela abaixo representa o método de gradiente de solvente utilizado, com o fluxo de 1 mL / min.

Tempo	%	%
(min)	H₂O	MeCN
0	90	10
30	20	80
40	20	80
41	90	10
55	90	10

As amostras foram preparadas a uma concentração de 100 μ M em 100% de MeCN para os complexos do tipo $[MCl(PPh_3)(HPrR)]$ e em misturas de solventes 90% de MeCN / 10% de DMSO para os tetranucleares. As soluções foram filtradas em filtros Iso-DiscTM (PTFE-4-4 4 mm x 0,45 μ m) antes de serem injetadas. Os volumes de amostras de 50 μ L foram injetados e analisados a um comprimento de onda de detecção de 254 nm, com comprimentos de onda de referência ajustados para 360 nm e 510 nm. Os cromatogramas foram analisados usando o software ChemStation.

3.2.8 LC-MS (Cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas, do inglês *Liquid chromatography–mass spectrometry*)

A Cromatografia Líquida (LC) – Espectrometria de Massas (MS) foi realizada utilizando um instrumento Bruker Amazon X+ acoplado com um HPLC Agilent Technologies 1200 series. Uma coluna Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 250 x 4.6 mm com tamanho de poro de 5 μm foi usada para o HPLC. A fase móvel consistiu de (A) Água duplamente deionizada contendo 0,1 %TFA e (B) Acetonitrila de HPLC contendo 0,1 % TFA. Volumes não filtrados (<200 μL) foram injetados e analisados em um comprimento de onda de detecção de 254 nm. Os cromatogramas de HPLC obtidos foram analisados utilizando o programa *DataAnalysis*. Foram injetados um volume de 20 μL de amostra para a análise do espectro de massas. O espectrômetro de massas foi operado em modo positivo por eletropulverização com uma janela de varredura de 50-2000 m/z . O método de gradiente usado é o mesmo mencionado para o CLAE.

3.2.9 Determinações de Estruturas Cristalinas

A coleta de dados foi realizada a 296 K por aplicação de radiação Mo-K α ($\lambda = 71,073$ pm) utilizando um difractômetro Bruker Kappa APEX II. A coleta de dados do cristal referente ao complexo **8** foi feita à 200 K. O método multi-scan foi aplicado para correção de absorção. As estruturas foram resolvidas com o software SHELXS97 usando métodos diretos, e todos os átomos que não fossem hidrogênio foram refinados com parâmetros de deslocamento anisotrópicos em SHELXL2014. Os átomos de hidrogênio foram refinados com fatores de deslocamento térmicos isotrópicos individuais fixos, utilizando o método “riding model” do programa SHELXL2014.¹¹⁶

3.2.10 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)

As análises de Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) foram realizadas em um PerkinElmer Optima 5300 DV. A água (18,2 M $\Omega\cdot\text{cm}$) utilizada para análise foi duplamente desionizada (DDW) utilizando um sistema de purificação de água Millipore Milli-Q e um deionizador de água USF Elga UHQ. O ácido

nítrico ultra-puro (72% v / v) foi destilado antes da utilização. Os padrões de ICP para platina ($1001 \pm 2 \mu\text{g} / \text{ml}$, Fluka) e paládio ($1015 \mu\text{g} / \text{mL}$, Aldrich) foram diluídos com HNO_3 em DDW a 3,6% v / v para preparar novos calibradores a concentrações de 50-700 ppb, com adição padrão de cloreto de sódio (TraceSELECT) para corresponder ao teor de sal das amostras a analisar.

3.2.11 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

A espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado foi utilizada para quantificar o metal contido nas amostras celulares. Todas as análises de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) foram realizadas num instrumento ICP-MS Agilent Technologies 7500 series. Os padrões de ICP foram diluídos com 3,6% de HNO_3 DDW para preparar novos calibradores a concentrações de 0,1-1000 ppb. O instrumento ICP-MS foi configurado para detectar Pd e Pt com limites de detecção típicos de ca. 2 ppt usando modo sem gás e modo He-gas, com um padrão interno de calibração de Er (50 pp). Os experimentos com os equipamentos ICP-OES e ICP-MS foram realizados no departamento de Química da Universidade de Warwick.

3.2.12 Citometria de fluxo

Todos os experimentos de citometria de fluxo foram realizados utilizando um sistema Citómetro de Fluxo FACScan Becton Dickinson na *School of Life Science* na Universidade de Warwick. Mais detalhes dos procedimentos podem ser encontrados nos capítulos apropriados.

3.2.13 Microscopia Confocal

As células A2780 foram semeadas em lâminas de 8 poços (lâmina de Câmara Lab-TekII) durante 24 h. As células foram tratadas com os complexos em estudo ($20 \mu\text{M}$) durante 18 e 24 h. Após isto, as células foram lavadas três vezes com PBS e visualizadas imediatamente utilizando microscopia confocal (Zeiss LSM 880) com imersão de óleo 63x. O comprimento de onda de excitação para a excitação dos compostos foi 514 ou 405 nm.

3.3 Métodos

3.3.1 Determinação da citotoxicidade em linhagens de células tumorais *in vitro*

Parte dos estudos de citotoxicidade foram realizados pela FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, em cooperação com o Professor Dr. Daniel Pereira Bezerra. Ensaio citotóxicos adicionais foram realizados pela *School of life Science* da Universidade de Warwick.

3.3.2 Preparo das amostras

As substâncias foram diluídas em DMSO puro estéril na concentração de 5 mg/mL (para substâncias puras). As substâncias foram testadas em concentrações que variaram de 0,19-25 µg/mL.

3.3.3 Células

Foram utilizadas células tumorais B16-F10 (melanoma murino), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), K562 (leucemia mielocítica crônica humana), HL-60 (leucemia promielocítica humana) doadas pelo Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP, Brasil. As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI 1640 e suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células se despregassem das paredes das garrafas. As culturas de células apresentavam negativas para micoplasma, conforme avaliado pela colocação com Hoechst (Mycoplasma Stain Kit, Cat. MYC1, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA).

Para avaliar a citotoxicidade das substâncias sobre a proliferação de células não tumorais, PBMC (*peripheral blood mononuclear cells* – linfócitos e monócitos periféricos)

foram obtidas a partir de sangue periférico de voluntários saudáveis. A coleta do sangue foi realizada em frasco heparinizados por profissionais capacitados, nas dependências do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI-Fiocruz-Bahia), utilizando seringas esterilizadas e descartáveis com volume de 4 mL. As PBMC foram isoladas a partir de uma amostra de cerca de 3 mL de sangue, acrescida de 5 mL de salina. As etapas até o isolamento incluíram a adição de 3 mL de Ficoll, seguida por 15 minutos de centrifugação a 1.500 rpm, e feita a aspiração dos PBMC, presentes na região intermediária entre as hemácias e o plasma. A suspensão de PBMC foi transferida para outro tubo o qual foi acrescido com salina até o volume de 11 mL, sendo centrifugado por 5 minutos a 1.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de PBMC foi ressuspensionado em meio completo (RPMI 1640 acrescido de 20% de soro fetal bovino e 10 µg/mL de ConA) e contado em câmara de Neubauer para posterior diluição e plaqueamento.

As células A2780 e A2780cis de carcinoma do ovário humano utilizadas nos ensaios citotóxicos na Universidade de Warwick foram obtidas da *European Collection of Cell Cultures* (ECACC). Os fibroblastos de pulmão fetal humano MRC-5 também foram obtidos a partir da mesma fonte. Ambas as linhagens celulares foram cultivadas em meio de *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) suplementado com 10% de soro fetal de vitelo, 1% de glutamina 2 mM e penicilina / estreptomicina a 1%. Elas foram cultivadas como monocamadas aderentes a 310 K numa atmosfera humidificada com CO₂ a 5% e passadas a aproximadamente 70-80% de confluência.

3.3.4 Ensaio de citotoxicidade

3.3.4.1 Alamar blue

Para avaliar a citotoxicidade das substâncias, o ensaio do alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição com as substâncias teste. O alamar blue, identificado como resazurina¹¹⁷, é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como com os sais de tetrazólio, o alamar blue reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). A redução do alamar blue reflete a proliferação celular. Este foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos¹¹⁸ e atualmente apresenta várias aplicações.

Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 cavidades (100 µL/poço de uma solução de $0,3 \times 10^6$ células/mL para células em suspensão e $0,7 \times 10^5$ células/mL para células aderidas). Após 24 horas de incubação, as substâncias testes dissolvidas em DMSO foram adicionadas em cada poço e incubadas por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Quatro horas (vinte e quatro horas para o PBMC) antes do final do período de incubação, 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa.¹¹⁸

A proliferação celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % proliferação = $A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$. Onde, A_{LW} e A_{HW} são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R_0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $R_0 = AO_{LW}/AO_{HW}$. Onde, AO_{LW} e AO_{HW} são as absorbâncias do meio adicionado ao alamar blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente. A substância foi testada em diluição seriada, em duplicata ou triplicata. A porcentagem de inibição foi calculada e registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinado suas IC_{50} realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

3.3.4.2 Método SRB

A atividade antiproliferativa realizada para os compostos na Universidade de Warwick foi determinada pelo método sulforodamina B (SRB).¹¹⁹ Este ensaio foi inicialmente desenvolvido por Skeham em 1990 e baseia-se na capacidade da sulforodamina B (**Figura 23**) de se ligar eletrostaticamente aos resíduos de aminoácidos básicos de proteínas de células fixas. O processo é dependente do pH, a ligação ocorre sob condições ácidas moderadas, mas sob condições básicas suaves é possível liberar quantitativamente o corante. As medições de absorbância do corante solubilizado são lineares com a quantidade presente de proteína celular, permitindo a determinação da quantidade de células viáveis e não viáveis.

Figura 23. Estrutura da sulforodamina B.

Fonte¹²⁰

Tipicamente, os experimentos de citotoxicidade envolvem os seguintes tópicos:

- **Preparação celular:** células de carcinoma humano e fibroblastos foram cultivadas como indicada acima até se obter uma confluência de aproximadamente 80-90%. O meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS.) Esta etapa permitiu a remoção de células mortas no sobrenadante. Em seguida, o PBS foi removido e tripsina 2 mM ou tripsina / EDTA (2 mL) foi adicionada. O frasco de cultura foi deixado em repouso durante 3 min na incubadora. A tripsina ou tripsina / EDTA foi diluída utilizando o meio correspondente e a solução foi misturada para se obter uma suspensão de célula única. Um hemocítômetro foi utilizado para determinar a concentração de células em suspensão.
- **Proliferação celular:** a suspensão de células individuais obtida no tópico anterior foi diluída com meio de modo a disseminar uma placa de 96 poços com aproximadamente 5000 células por poço utilizando 180 µL por poço. A placa foi deixada na incubadora por dois dias.
- **Preparação da amostra:** uma solução 2 mM de cada composto a ser testado foi preparada utilizando uma mistura a 5% de DMSO e 95% (salina: PBS). Este estoque foi então utilizado para preparar seis soluções diferentes por diluição com PBS (2000, 1000, 500, 200, 50 e 1 µM). A faixa de concentrações destas soluções variou de acordo com a resultados de triagem para cada amostra em particular e foram ajustadas para alcançar três valores acima do IC₅₀ esperado e três valores abaixo.
- **Preparação de controle positivo:** preparou-se uma solução 2 mM de cisplatina utilizando 5% de DMSO e 95% de solução salina. Este estoque foi então usado para preparar soluções de 2000, 1000, 500, 200, 50 e 1 µM por diluição em PBS.

PARTE EXPERIMENTAL

- **Preparação do controle negativo:** o controle negativo foi obtido pela mistura de 5 % de DMSO e 95% e solução salina (PBS).
- **Adição do composto:** 20 μ L dos compostos, cisplatina (controle positivo) e soluções de controle negativo foram adicionadas à placa de 96 poços em triplicata. A placa foi deixada na incubadora durante 24 h.
- **Remoção do fármaco:** as soluções sobrenadantes foram removidas de cada poço por meio de sucção. Cada poço foi então lavado utilizando 100 μ L de PBS, após isto 200 μ L de meio fresco foram adicionados a cada poço. A placa foi deixada em repouso por 72 h na incubadora, para que a células se recuperassem.
- **Ensaio colorimétrico de sulforodamina B (SRB):** 50 μ L de solução gelada de ácido trifluoroacético (TCA) 10%, à 277 K, foi adicionada a cada poço da placa. A placa foi incubada durante 1 h a 277 K. O TCA foi removido e a placa foi lavada 10 vezes com água da torneira. O excesso de umidade foi removido e a placa foi deixada secar ao ar. Este passo é importante pois fixou as células à superfície dos poços. Alíquotas de 50 μ L de corante SRB a 0,4% (preparadas em ácido acético a 1%) foram adicionados a cada poço. Deixou-se a placa em repousar durante 30 min à temperatura ambiente. Este passo coloriu todos os poços. O excesso de corante foi removido por lavagem da placa 5 vezes com ácido acético 1%. O excesso de umidade foi removido e a placa foi deixada secar ao ar. Adicionaram-se alíquotas de Tris 10 mM (200 μ L, pH 10,5) a cada poço e a placa foi deixada em repouso à temperatura ambiente durante 1 h. Este passo solubilizou o corante ligado. A placa foi medida em leitor a 570 nm. Os poços com absorbância superior a 3,00 unidades foram diluídos em uma proporção 1: 6 e a absorbância foi novamente lida. Estas diluições foram por remoção de 150 μ L de cada um dos poços e adição de 250 μ L de 10 mM Tris base.
- **Determinação da viabilidade celular:** para cada composto testado, as porcentagens de sobrevivência foram obtidas dividindo-se os dados da média da absorbância das leituras de controle negativo e multiplicando por cem. Em seguida, os dados foram traçados como a porcentagem de sobrevivência versus o logaritmo da concentração utilizada expressa em mili unidades molares. Uma curva sigmoidal foi montada usando o software OriginPro 8.1 e o IC₅₀ foi determinado como a metade-máxima da concentração inibitória. Para validar os dados de cada placa, o IC₅₀ da cisplatina foi determinado.

3.3.5 Acumulação de metais em células cancerígenas

- **Proliferação celular:** Resumidamente, 4×10^6 células foram semeadas numa placa Petri P100 utilizando 10 ml de meio de cultura e incubadas a 310 K durante 24 h.
- **Preparação da amostra:** Preparou-se uma solução de 100 μM de cada composto em meio de cultura celular contendo 5% de DMSO. A concentração exata de Pt / Pd foi determinada por ICP-OES (utilizando padrões de calibração recentemente preparados, 50-700 ppb, com adição padrão de cloreto de sódio para corresponder à matriz da amostra). As soluções de reserva foram diluídas com meio de cultura para se obter uma concentração de trabalho final igual ao IC_{50} .
- **Adição do composto:** O sobrenadante foi removido e 10 mL de cada composto a ser testado foram adicionados às placas de Petri em triplicata. As células foram expostas aos complexos durante 24 h.
- **Remoção do composto:** O sobrenadante foi removido por sucção. As células foram lavadas com PBS e separadas utilizando-se tripsina / EDTA para se obter uma única suspensão de células utilizando o meio de cultura. As células foram contadas utilizando um hemocítmetro e centrifugadas (1000 rpm, 5 min, 277 K) para obter pastilhas de células inteiras.
- **Digestão da amostra:** As pastilhas celulares foram digeridas em ácido nítrico a 72% v / v utilizando um reator de microondas CEM Discovery SP (3 min, 393 K, 150 W, 250 psi) e depois diluído para uma concentração de ácido de 3,6% v / v. As amostras foram analisadas utilizando uma ICP-MS Agilent série 7500 no modo sem gás e no modo He-gas. As amostras frescas de calibração para Pt / Pd (0,1-1000 ppb) foram preparadas em ácido nítrico a 3,6% v / v. Os sólidos dissolvidos totais para análise de ICP-MS não excederam 0,1% p / v. A acumulação final de metal foi relatada como ng Pt / Pd x 10^6 células e os desvios padrão foram calculados.

3.3.6 Ciclo celular

Tipicamente, as células A2780 foram cultivadas em placas de Petri usando 4×10^6 células por placa. Os experimentos incluíram 24 h de pré-incubação em meios livres dos complexos à 310 K em atmosfera humidificada com CO₂, seguido de 24 h de exposição aos compostos nas mesmas condições. Depois disso, as amostras foram coletadas após a tripsinização, lavadas com PBS e coradas no escuro com uma mistura de iodeto de propídio e RNase. Após 30 min de coloração, as amostras de células foram lavadas e configuradas para leitura de citometria de fluxo no canal vermelho FL-2.

3.3.7 Distribuição de metal em células cancerígenas

Para estudar a distribuição de metal em células A2780 do complexo **1**, utilizou-se o kit FractionPREP da BioVision de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 4×10^6 células foram semeadas numa placa de Petri. Após 24 h de tempo de pré-incubação em meio isento de fármaco a 310 K, o complexo foi adicionado para dar uma concentração final igual ao valor de IC₅₀ e foi deixado com exposição a fármaco por mais 24 h. As células foram tratadas com tripsina, contadas e os sedimentos de células foram recolhidos após 5 min de centrifugação a 2000 rpm, 277 K. As amostras foram novamente suspensas no tampão de extração de citosol fornecido no kit (CEB, 400 µL) e mantidas em gelo durante 20 min para ser centrifugado a 277 K durante 10 min a 2000 rpm. Os sobrenadantes contendo as frações citosólicas foram recolhidos. As pastilhas foram novamente suspensas nos tampões de extração de membrana A (400 µL) e B (22 µL), também fornecidas no kit de fracionamento celular e submetidas a centrifugação durante 1 minuto antes de serem centrifugadas durante 5 min a 3400 rpm à 277 K. Os sobrenadantes contendo as frações de membrana foram recolhidos. As amostras foram ressuspensas no tampão de extração nuclear fornecido (NEB, 200 µL) e mantidas em gelo durante 40 min. Após este tempo, as pastilhas foram centrifugadas a 12000 rpm durante 10 min. Os sobrenadantes contendo as frações nucleares foram recolhidos e os restantes grânulos foram mantidos como as frações do citoesqueleto. As amostras foram armazenadas a 253 K até análise posterior. As amostras foram digeridas durante a noite em ácido nítrico concentrado (73%, 150 µL) a 353 K. As soluções resultantes foram diluídas com água duplamente destilada (a HNO₃ a 5%) e a quantidade de paládio

absorvida pelas células foi determinada por ICP-MS. Esta experiência foi realizada em triplicado e os desvios-padrão foram calculados.

3.3.8 Integridade da membrana celular

A integridade de membrana celular foi analisada por citometria de fluxo. A integridade das células A2780 causada pela exposição ao complexo **7** foi realizada utilizando o ensaio CytoPainter (Abcam) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as células A2780 foram semeadas em placas de seis poços ($1,0 \times 10^6$ células por poço), pré-incubadas durante 24 h em meio isento de fármaco a 310 K, depois ao complexo **7** (Concentração igual a IC_{50} e a 3 vezes o IC_{50}). As células foram colhidas utilizando tripsina e coradas no escuro utilizando CytoPainter Red (Ex / Em 583/603 nm), que reage com aminas de superfície celular em membranas comprometidas. Após coloração, as pastilhas celulares foram analisadas num citômetro de fluxo Becton Dickinson FACScan.

3.3.9 Estudo de morte celular

A análise de citometria de fluxo de populações apoptóticas de células A2780 causados pela exposição ao complexo **7**, foi realizada utilizando a anexina V-FITC apoptose Kit de detecção. Este kit, (Sigma Aldrich) foi utilizado de acordo com as instruções. Resumidamente, as células A2780 foram semeadas numa placa de 6 poços utilizando $1,5 \times 10^6$ células por poço. As células foram pré-incubadas em meio isento de fármaco a 310 K durante 24 h, após este tempo o composto foi adicionado utilizando concentrações de IC_{50} e $IC_{50} \times 3$. Após 24 h de exposição ao fármaco, os sobrenadantes foram removidos por sucção e as células foram lavadas com PBS (2 mL / poço). Finalmente as células foram colhidas utilizando tripsina (0,5 mL / poço). As amostras foram centrifugadas a 1000 rpm durante 4 min a 377 K. As pastilhas celulares foram lavadas com PBS (1 mL), recentrifugadas e o sobrenadante foi removido por sucção. Neste caso, as pastilhas celulares foram ressuspensas em 500 μ L de tampão de ligação contendo conjugado de Anexina V FITC (50 mg / mL Em Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo NaCl 100 mM) e uma solução de IP (100 mg / mL em 10 MM de fosfato de potássio, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM). Após a coloração das pastilhas durante 10 min à temperatura ambiente, estas foram lavados em PBS (2 mL) antes de serem analisadas num citômetro de

fluxo Becton Dickinson FACScan. Para os controlos de apoptose positiva as células A2780 foram expostas durante 2 h a estaurosporina (1 $\mu\text{g/mL}$). Células para estudos de apoptose foram utilizados sem um procedimento de fixação prévio a fim de evitar a ligação não Anexina V-FITC. Os dados foram processados usando o software Flowjo.

3.3.10 Fusão do DNA-CT

A estabilidade do DNA na presença dos complexos metálicos foi registada medindo se a absorbância em 260 nm aumentava ao se variar a temperatura entre 323 e 368 K. As curvas de fusão de DNA-CT não tratado e tratado foram registadas utilizando uma razão fixa de 1 : 1 Pd (II): CT-DNA (45 μM do complexo e DNA-CT). O valor da temperatura de fusão (T_m) é a temperatura em que 50% do DNA-CT presente de cadeia dupla converte em DNA-CT de cadeia simples. A temperatura foi determinada como o máximo correspondente através das derivações das curvas de fusão. Os complexos foram incubados durante 24 horas com DMSO a 5%.

3.3.11 Dicroísmo linear (DL)

Titulação de dicroísmo linear foram realizadas com o intuito de verificar se os complexos intercalam com o DNA. Para este experimento, todas as soluções foram preparadas em tampão Tris 1 mM (pH 7,6), contendo 5% de DMSO. A concentração de DNA-CT foi mantida constante ao longo do experimento a 100 μM , e a concentração do complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ aumentou de 0 a 100 μM . A concentração de DMSO foi mantida constante a 5%. O complexo foi incubado durante 24 horas com DNA antes de iniciar as medidas.

3.3.12 Estudos de inibição da Topoisomerase IB e interação com o DNA

Os estudos de inibição da enzima topoisomerase IB, experimentos de interação com o DNA e estudo de mecanismo de ação (clivagem e religação) foram realizados no laboratório do Professor Dr. Alessandro Desideri com o auxílio da Dra. Monize Martins da Silva pela Universidade de Roma Tor Vergata, Departamento de Biologia, Roma – Itália.

3.3.13 Expressão e Purificação da topoisomerase humana IB

Foram utilizados plasmídeos de cópias múltiplas, YCpGAL1-e-hTopIBwt para a transformação das células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* EKY3 (MAT α , ura3-52, his3 Δ 200, leu2 Δ 1, trp1 Δ 63, top1 Δ ::TRP1) como descrito anteriormente.¹⁰⁴ Os plasmídeos possuem um promotor indutível por galactose e uma sequência FLAG (DYKDDDDY) no N-terminal, indicado com "e". Esta sequência é reconhecida pelo anticorpo monoclonal M2 e a sua purificação foi realizada utilizando uma coluna de gel de afinidade anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich). As células transformadas cresceram durante uma noite em um complemento sintético (SC)-Uracilo mais 2% de dextrose. Após o crescimento foi realizada uma diluição 1:100 em (SC)-Uracilo mais Rafinose a 2%, e incubada por um período de 24 horas, por fim as células foram induzidas com galactose a 2% durante 6 h. Após a extração da enzima, os extratos foram colocados em uma coluna de gel de afinidade M2 anti-FLAG (Sigma-Aldrich), já equilibrada de acordo com as instruções do fabricante. A Top IB foi eluída da fusão com a coluna FLAG por competição utilizando cinco volumes de uma solução contendo 200 g / mL de peptídeo FLAG em TBS (50 mM de Tris-HCl, 150 mM de KCl, pH 7,4). Foram adicionados 40 % de glicerol em cada fração recolhidas. Todas as frações foram armazenadas a -20 °C.

3.3.14 Dose-dependente

A atividade de 1 μ L de TopIB foi analisada em uma reação cujo volume final foi de 30 μ L contendo: 0,25 μ g/ μ L de DNA super-enovelado pBlue-Script KSII(+) e 28 μ L do tampão (20 mM de Tris / HCl pH 7,5, 0,1 Na₂EDTA mM, 10 mM MgCl₂, 50 μ g / mL de BSA acetilado e KCl 150 mM). O efeito dos compostos sobre a atividade da enzima foi medido adicionando-se 1 μ L de diferentes concentrações dos compostos (0,75; 1,5; 3; 6; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 300 μ M); a análise de dose dependente foi realizada adicionando simultaneamente Top1 e o plasmídeo super-enovelado na presença de diferentes concentrações dos compostos e do DMSO como controle. A reação foi incubada por 30 minutos a 37°C e interrompidas pela adição de 7,5 μ L de SDS 4X STOP (25% Ficol 400, 2,5% SDS, 25 mM EDTA, 0,03% azul de bromofenol, 0,03% xilenocianol). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%) por 18 h a 30 V em tampão TBE (50 mM Tris, 45 mM

ácido bórico e 1 mM EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 g / ml), lavados com água destilada e fotografados sob iluminação UV.

3.3.15 “Time Course”

A atividade de 1 μ L de TopIB também foi estudada com relação ao tempo de relaxamento. Sendo assim foram realizadas 4 reações diferentes onde foram retiradas alíquotas das reações nos tempos de 1, 7,5, 15 e 30 minutos, as quais foram interrompidas pela adição de 7,5 μ L de SDS 4X STOP. A primeira reação foi na ausência do composto, utilizando o DMSO como controle; a segunda foi na presença do composto (em uma concentração determinada no experimento de dose dependente); a terceira foi realizada utilizando uma pré-incubação de 5 minutos da TopIB com o composto na ausência do DNA e a quarta reação utilizou-se uma pré-incubação de 5 minutos do composto com o DNA com a ausência da enzima. As alíquotas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%) por 18 h a 30 V em tampão TBE (50 mM Tris, 45 mM ácido bórico e 1 mM EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 g / ml), lavados com água destilada e fotografados sob iluminação UV.

3.3.16 Estudos de Interação com DNA

Utilizou-se como modelo de molécula de DNA o plasmídeo pBlue-Script KSII(+), extraído através do kit QIAGEN® Plasmid Maxi Kits. O plasmídeo (0,25 μ g/ μ L) foi incubado com diferentes concentrações dos complexos (0,75; 1,5; 3; 6; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 300 μ M), a 37°C por 30 minutos. Após o período de incubação as reações com DNA plasmidial foram interrompidas pela adição de 7,5 μ L de SDS 4X STOP (25% Ficol 400, 2,5% SDS, 25 mM EDTA, 0,03% azul de bromofenol, 0,03% xilenocianol). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%) por 18 h a 30 V em tampão TBE (50 mM Tris, 45 mM ácido bórico e 1 mM EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 g / ml), lavados com água destilada e fotografados sob iluminação UV.

3.3.17 Estudo de cinética: clivagem e religação

3.3.17.1 Cinética de Clivagem

O substrato oligonucleotídeo CL14 (5'-GAAAAAAGACTTAG-3') foi marcado radioativamente com [32P- γ] ATP na extremidade 5'. Foi utilizado como cadeia complementar CP25 (5'-TAAAAATTTTCTAAGTCTTTTTC-3') 5' fosforilado não marcado. Os dois fios foram emparelhados utilizando um excesso molar de 2 vezes de CP25 em relação ao CL14, criando um duplo substrato suicida (SS), o qual contém o local de clivagem preferida da enzima como já foi descrito anteriormente.¹²¹

A reação de clivagem foi realizada incubando 20 nM de substrato suicida (SS) com um excesso de TopIB na presença do buffer (20 mM Tris / HCl pH 7,5; Na₂EDTA 0,1 mM; MgCl₂ 10 mM, 50 μ g / mL de BSA acetilado e KCl 150 mM) a 37 °C. Em vários pontos de tempo (30''; 45''; 1'; 2'; 5'; 10'; 20' e 60') foram retiradas alíquotas de 5 μ L da reação e a mesma parada com 0,5% de SDS. Como controle foi utilizado DMSO, e a concentração do complexo utilizada foi definida no experimento de relaxação do DNA. Após finalizar a reação as amostras foram precipitadas com 300 μ L etanol 100%, 65 μ L de água destilada e 10 μ L de acetato de sódio 3M, e incubadas a -20°C por 24 horas.

Após este período centrifugou-se por 40 minutos a 14000 rpm para remover o líquido e lavou com 800 μ L de etanol 70%, em seguida deixou-se secar por 20 minutos. Posteriormente resuspendeu-se em 6 mL de tripsina 1 mg / mL, para degradar a proteína e incubou por 1 hora a 37 °C, a reação foi parada com SSdye. As amostras foram analisadas utilizando desnaturação - ureia 7 M / 20% poliacrilamida por eletroforese em gel utilizando tampão TBE. Os experimentos foram realizados pelo menos três vezes e um gel representativo é mostrado.

3.3.17.2 Cinética de Religação

Para cinética de religação, foi utilizado o oligonucleotídeo CL14 / CP25 (SS) (20 nM), preparado tal como foi explicado anteriormente. O substrato foi incubado com a enzima TopIB durante 30 min a 37 °C, utilizando o tampão (Tris 20 mM / HCl a pH 7,5, Na₂EDTA 0,1 mM, MgCl₂ 10 mM, 50 μ g / mL de BSA acetilado e KCl 150 mM), permitindo que a

enzima para efetuar a clivagem. Após a formação do complexo de clivagem, 5µL de amostra da reação foram retirados e utilizados como o ponto de tempo zero. A reação de religação foi iniciada pela adição de um excesso molar de 200 vezes de oligonucleotídeo R11 (5'-AGAAAAATTTT-3') ao longo da CL14 / CP25, na presença ou ausência de composto. Em vários pontos de tempo (30''; 45''; 1'; 2'; 5'; 10'; 20' e 60') foram retiradas alíquotas de 5 µL da reação e a mesma parada com 0,5% de SDS. Após finalizar as reações as amostras foram precipitadas com 300 µL etanol 100%, 65 µL de água destilada e 10µL de acetato de sódio 3M, e incubadas a -20°C por 24 horas. Após este período foram centrifugadas por 40 minutos a 14000 rpm para remover o líquido e lavadas com 800 µL de etanol 70%. Em seguida foram secadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente resuspendeu-se em 6 mL de tripsina 1 mg / mL, para degradar a proteína e foram incubadas por 1 hora a 37 ° C, a reação foi parada com SSdye. As amostras foram analisadas utilizando desnaturação - ureia 7 M / 20% poliacrilamida por eletroforese em gel utilizando tampão TBE. Os experimentos foram realizados pelo menos três vezes e um gel representativo é mostrado.

3.4 Preparação dos compostos

3.4.1 Preparação dos agentes complexantes

3.4.1.1 Agentes quelantes H₂PrR. Os ligantes H₂PrEt e H₂PrCh foram sintetizados misturando-se quantidades equimolares da tiossemicarbazida desejada (2 mmol) e do pirenocarboxaldeído (2 mmol), em solução de etanol com adição de três gotas de ácido clorídrico concentrado. As soluções resultantes foram mantidas à 70 °C com agitação constante durante 2 horas. Após este período foi observado a formação de precipitados de coloração amarela, os quais foram filtrados, lavados com *n*-hexano e secos sob vácuo. Cristais em formato de agulha foram obtidos após a recristalização dos sólidos em mistura de DCM/MeCN (1:1).

H₂PrCh (R = Ch). Cor: amarelo. Rendimento: 92% (709,35 mg). P.F.: 251 – 253 °C. Análise Calculada para C₂₄H₂₃N₃S (385,52 g/mol): C, 74,77; H, 6,01; N, 10,90 %. Encontrado: C, 75,21; H, 6,16; N, 10,90 % IV ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3329, 3134 $\nu(\text{N-H})$, 1591, 1541, 1519 $\nu(\text{C=N})$ + $\nu(\text{C=C})$, 844 $\delta(\text{C-H})_{\text{Pr}}$, 823 $\nu(\text{C=S})$. ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz; δ , ppm): 1,17 – 1,22 (m, 1H, Ch-H), 1,29 – 1,36 (m, 2H, Ch-H), 1,48 – 1,56 (m, 2H, Ch-H), 1,62 – 1,65 (m, 1H, Ch-H), 1,75 – 1,77 (m, 2H, Ch-H), 1,92 – 1,95 (m, 2H, Ch-H), 4,22 – 4,30 (m, 1H, Ch-CH), 8,11 (t, ³*J* = 8 Hz, 1H, Pr-H), 8,21 – 8,26 (m, 3H, Pr-H), 8,32 – 8,36 (m, 4H, Pr-H), 8,47 (d, ³*J* = 8 Hz, 1H, Pr-H), 8,87 (d, ³*J* = 8 Hz, 1H, -NHCh), 9,28 (s, 1H, N=CH), 11,53 (s, 1H, NH-C=S). ¹³C RMN (APT, DMSO-*d*₆, 200 MHz; δ , ppm): 25,42, 25,62, 32,29, 53,29 (CH-Ch), 121,98, 124,28, 124,52, 124,55, 125,57, 126,15, 126,47, 127,01, 127,32, 127,89, 128,66, 129,07, 129,19, 130,58, 131,31, 132,23 (CH-Pr), 140,54 (C=N), 176,08 (C=S). Dados de UV-Vis, solução de CH₂Cl₂ concentração: 7,3 x 10⁻⁶ M [$\lambda_{\max}$ (ϵ , L mol⁻¹ cm⁻¹)]:

407,00 nm (51 377), 381,00 nm (60 192), 281,00 (43 801). HPLC: tempo de retenção: 40,6 min (254 nm).

3.4.2 Preparação dos complexos

3.4.2.1 Síntese dos complexos do tipo [PdCl(PPh₃)(HPrR)]

Complexos [PdCl(PPh₃)(HPrR)]. Um equivalente do ligante H₂PrR (0,1 mmol) foi adicionado a um balão contendo quantidade equimolar do precursor metálico [PdCl₂(MeCN)₂] dissolvido em acetonitrila (10 mL). A solução foi mantida sob agitação constante por 24 h a temperatura ambiente. Após este tempo, um equivalente de trifenilfosfina (PPh₃), dissolvida em acetonitrila, foi adicionada a solução, que ficou sob agitação por mais 24 h. Os complexos [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] e [PdCl(PPh₃)(HPrEt)] precipitam durante a reação e o produto é filtrado, lavado com metanol e hexano. Os sólidos alaranjados resultantes foram recristalizados em mistura de diclorometano e metanol, na proporção 1:1, resultando na formação de cristais agulhas.

[PdCl(PPh₃)(HPrCh)] (1). Cor: Laranja. Rendimento: 40 mg (76%). P.F.: decompõe em 278 – 280 °C. Análise calculada para C₄₂H₃₈ClN₃PPdS (788,6 g/mol): C, 61,06; H, 4,76; N, 5,09 %. Found: C, 63,23; H, 4,65; N, 5,31 %. IV (v_{max} /cm⁻¹): 3394 v(N-H), 1583, 1517 v(C=N) + v(C=C), 1095 v(P-C), 746 v(C-S). IV (v_{max} /cm⁻¹): 3394 v(N-H), 1583, 1527 v(C=N) + v(C=C), 1095 v(P-C), 746 v(C=S). ¹H RMN (CD₂Cl₂): δ 1,05 – 1,28 (m, 6H, Ch-H), 1,65 – 1,69 (m, 2H, Ch-H), 2,00 – 2,03 (m, 2H, Ch-H), 3,48 – 3,55 (m, 1H, CH-Ch), 4,64 (s, 1H,

NH-Ch), 7,44 – 7,53 (m, 9H, PPh₃-H), 7,80 – 7,5 (m, 6H, PPh₃-H), 7,99 – 8,22 (m, 6H, Pr-H), 8,62 (d, 1H, ³J = 8 Hz, Pr-H), 9,15 (d, ³J = 8 Hz, 1H, Pr-H), 9,77 (d, ³J = 4 Hz, 1H, Pr-H). ³¹P RMN (CD₂Cl₂): δ 27,53. ¹³C NMR (APT, 125 MHz, CD₂Cl₂): δ 24,92 (CH₂), 25,63 (CH₂), 32,89 (CH₂), 55,75 (CH), 123,16 (CH), 123,91 (CH), 124,42 (C), 124,51 (C), 125,27 (C), 126,01 (CH), 126,05 (CH), 126,20 (CH), 127,26 (CH), 128,20 (CH), 128,34 (CH), 128,77 (CH), 128,94 (CH), 129,14 (CH), 129,91 (C), 130,56 (C), 130,63 (C), 131,11 (C), 131,13 (CH), 131,17 (CH), 131,24 (C), 132,73 (C), 134,54 (CH), 134,69 (CH), 150,51 (CH), 168,90 (C). UV – Vis, solução de CH₂Cl₂ concentração: 9,8 x 10⁻⁵ M [λ_{max} (ε, L mol⁻¹ cm⁻¹): 400,50 nm (41 430), 284,00 nm (32 448). MS (ESI⁺): m/z for C₄₂H₃₈ClN₃PPdS [M - Cl]⁺: calculado: 752,1490, encontrado: 752,1485. Condutividade molar (1 x 10⁻³ mol L⁻¹ em DMSO): 0,005 μS cm⁻¹. HPLC: Tempo de retenção: 40,5 min (254 nm).

[PdCl(PPh₃)(HPrEt)] (2). Cor: alaranjado. Rendimento: 38 mg (52%). Análise Calculada para C₃₈H₃₁ClN₃PPdS (734,59 g/mol): C, 62,13; H, 4,25; N, 5,72 %. Encontrado: C, 61,51; H, 4,10; N, 5,64 %. IV (v_{max}/cm⁻¹): 3421, 3161 v(N-H), 1584, 1527 v(C=N) + v(C=C), 1091 v(P-C), 756 v(C=S). ¹H RMN (CD₂Cl₂): δ 1.13 (t, ³J = 6.0 Hz, 3H, -CH₂CH₃), 3.31 (dq, ³J₁ = 6.0 Hz, ³J₂ = 3 Hz, 2H, -NHCH₂CH₃), 4,82 (s, 1H, NH-Et), 7,47 – 7,57 (m, 9H, PPh₃-H), 7,78 – 7,84 (m, 6H, PPh₃-H), 8,03 – 8,27 (m, 8H, Pr-H), 8,56 (d, 3J = 9 Hz, 1H, Pr-H), 9,18 (d, 3J = 9 Hz, 1H, Pr-H), 9,72 (d, 1H, ³J = 6 Hz, 1H, Pr-H). ³¹P RMN (CD₂Cl₂): δ 27,56. ¹³C NMR (APT, 125 MHz, CD₂Cl₂): δ 14,45 (CH₃), 41,41 (CH₂), 123,17 (CH), 124,02 (CH), 124,41 (C), 125,34 (C), 126,02 (CH), 126,05 (CH), 126,20 (CH), 127,26 (CH), 128,20 (CH), 128,35 (CH), 128,75 (CH), 128,95 (CH), 129,11 (CH), 129,88 (C), 130,56 (C), 130,61 (C), 131,11 (C), 131,15 (CH), 131,18 (CH), 132,72 (C), 134,54 (CH), 134,68 (CH), 150,94 (CH), 169,66 (C). UV – Vis, solução de CH₂Cl₂ concentração: 5.1 x 10⁻⁵ M [λ_{max} (ε, L mol⁻¹ cm⁻¹): 408,00 nm (15 128), 393,50 nm (15 326), 286,50 (13 702). MS (ESI⁺): m/z para C₃₈H₃₁ClN₃PPdS [M - Cl]⁺: calculado: 698,1019, encontrado: 698,1019. HPLC: tempo de retenção: 38,4 min (254 nm).

3.4.2.1 Síntese dos complexos do tipo [PtCl(PPh₃)(HPrR)]

Complexos [PtCl(PPh₃)(HPrR)]. Um equivalente do ligante HPrR (0,1 mmol), dissolvido em metanol (10 mL), foi adicionado a um balão contendo quantidade equimolar do precursor

PARTE EXPERIMENTAL

metálico $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ dissolvido em 1 mL de água. A solução foi mantida sob agitação constante por 24 h a temperatura ambiente. Após este tempo, um equivalente de trifenilfosfina (PPh_3) foi dissolvida em metanol e adicionada a solução. A solução fica sob agitação por mais 24 h. Após este tempo, o produto foi filtrado, lavado com metanol e *n*-hexano e seco sob bomba de vácuo. Devido à alta solubilidade dos complexos de platina em diclorometano e pouca solubilidade em metanol, cristais vermelhos do complexo $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ foram obtidos pela recristalização do produto na mistura diclorometano/metanol, 1:1.

$[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ (3): Cor: marrom. Rendimento: 54% (47,0 mg). P. F.: Decompõe em 274 – 276 °C. Análise Calculada para $\text{C}_{42}\text{H}_{37}\text{ClN}_3\text{P}_2\text{S}$ (877,34 g/mol) C, 57,50; H, 4,25; N, 4,79 %. Encontrado: C, 56,87; H, 4,14; N, 4,94 %. IV ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3392 $\nu(\text{NH})$, 1583, 1517 $\nu(\text{C}=\text{N}) + \nu(\text{C}=\text{C})$, 1097 $\nu(\text{P}-\text{C})$, 748 $\nu(\text{C}-\text{S})$. ^1H RMN (CDCl_3 ; 400 MHz; δ , ppm): 1,12 – 1,30 (m, 6H, $\text{CH}-\text{H}$), 1,67 – 1,72 (m, 2H, $\text{CH}-\text{H}$), 2,01 – 2,05 (m, 2H, $\text{CH}-\text{H}$), 3,59 – 3,61 (m, 1H, $\underline{\text{CH}}-\text{Ch}$), 4,90 (s, 1H, $\underline{\text{NH}}-\text{Ch}$), 7,43 – 7,55 (m, 10H, PPh_3-H), 7,78 – 7,83 (m, 5H, PPh_3-H), 8,04 – 8,11 (m, 2H, $\text{Pr}-\text{H}$), 8,18 – 8,27 (m, 4H, $\text{Pr}-\text{H}$), 8,60 (d, $^3J = 8$ Hz, 1H, $\text{Pr}-\text{H}$), 9,26 (d, $^3J = 8$ Hz, 1H, $\text{Pr}-\text{H}$), 9,96 (d, $^3J = 4$ Hz, 1H, $\text{Pr}-\text{H}$). ^{31}P RMN (CD_2Cl_2 ; 162 MHz; δ , ppm): 6,46 [$J(^{195}\text{Pt}-^{31}\text{P})$: 3476 Hz. Dados de UV-Vis, solução de CH_2Cl_2 concentração: $2,3 \times 10^{-5}$ M [λ_{max} (ϵ , $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 392,00 nm (28 636), 287,00 nm (23 272). Condutividade molar (1×10^{-3} mol L^{-1} DMSO): 0,007 $\mu\text{S cm}^{-1}$. HPLC: tempo de retenção: 35,0 min (254 nm).

$[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ (4): Cor: marrom. Rendimento: 45% (40,0 mg). P.F.: 198 – 201 °C. Análise Calculada para $\text{C}_{38}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{P}_2\text{S}$ (859,71 g/mol) C, 53,09; H, 3,75; N, 5,09 %. Encontrado: C, 54,12; H, 3,81; N, 4,89 %. IV ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3400 $\nu(\text{NH})$, 1566, 1517 $\nu(\text{C}=\text{N}) + \nu(\text{C}=\text{C})$, 1097 $\nu(\text{P}-\text{C})$, 752 $\nu(\text{C}-\text{S})$. ^1H RMN (CDCl_3 ; 400 MHz; δ , ppm): 1,12 (t, $^3J = 7,0$ Hz,

3H,–CH₂CH₃), 3,33 (dq, $^3J_1 = 7,0$ Hz, $^3J_2 = 6,0$ Hz, 2H,–NHCH₂CH₃), 4,77 (s, 1H, NHCH₂CH₃), 7,46 - 7,48 (m, 9H, PPh₃–H), 7,80 – 7,85 (m, 6H, PPh₃–H), 8,00 – 8,06 (m, 2H, Pr–H), 8,12 – 8,24 (m, 4H, Pr–H), 8,62 (d, $^3J = 8$ Hz, 1H, Pr–H), 9,19 (d, $^3J = 8$ Hz, 1H, Pr–H), 10,01 (d, $^3J = 4$ Hz, 1H, Pr–H). ^{31}P RMN (CD₂Cl₂; 162 MHz; δ , ppm): 6,38 [$J(^{195}\text{Pt}-^{31}\text{P})$: 3476 Hz. Dados de UV–Vis, solução de CH₂Cl₂ concentração: $1,96 \times 10^{-5}$ [λ_{max} (ϵ , L mol⁻¹ cm⁻¹): 395,00 nm (28 928), 276,00 nm (23 112). Condutividade molar (1×10^{-3} mol L⁻¹ em DMSO): 0,04 $\mu\text{S cm}^{-1}$. HPLC: tempo de retenção: 30,8 min (254 nm).

3.4.2.2 Síntese dos complexos do tipo [M₄(μ -S-PrR- κ^3 -C,N,S)₄]

Complexos do tipo [Pd₄(μ -S-PrR- κ^3 -C,N,S)₄]. Duas rotas sintéticas foram testadas para obter os complexos tetranucleares de paládio. Ambos os métodos A e B funcionam bem. No entanto, o método B proporciona um rendimento melhor.

Método A. O ligante livre H₂PrR (0,1 mmol) foi adicionado a uma solução de [PdCl₂(MeCN)₂] (0,1 mmol) dissolvido em 3 mL de MeCN. A mistura foi agitada por 24 horas à temperatura ambiente. Um precipitado laranja se formou durante esse tempo, o qual foi filtrado, lavado com hexano e seco sob vácuo. Em seguida, adicionou-se 2 mL de MeCN e Et₃N (0,5 mL) ao sólido e manteve-se a mistura resultante sob agitação e refluxo durante 5 horas. O solvente foi removido em vácuo e o resíduo foi lavado com metanol e depois filtrado. O sólido vermelho foi recristalizado numa mistura de clorofórmio/metanol (1: 1) proporcionando um pó cristalino.

Método B. A uma mistura de 0,1 mmol de [PdCl₂(MeCN)₂] e 0,1 mmol de 1-pirenocarboxaldeído R-tiosemicarbazona em MeCN (5 mL) adicionou-se 0,5 mL de Et₃N. A mistura foi então aquecida à 85° C durante 8 h. Obteve-se um pó cristalino como descrito no método A.

[Pd₄(μ-S-PrEt-κ³-C,N,S)₄] (5) (R = Et): Cor: marrom avermelhado. Rendimento (Método B): 75% (33 mg). P.F.: decompõe em 311°C. Análise Calculada para o monômero C₂₀H₁₅N₃PdS (435,83 g/mol): C, 55,12; H, 3,47; N, 9,64 %. Encontrado: C, 53,54; H, 3,37; N, 9,42%. IV (ν_{max} /cm⁻¹): 3398 ν(N-H), 1560, 1517 ν(C=N) + ν(C=C), 715 ν(C-S). Dados de UV-Vis, solução de CH₂Cl₂ concentração: 5,73 x 10⁻⁵ M [λ_{max} (ε, L mol⁻¹ cm⁻¹): 279,00 nm (11710), 352,50 nm (7015), 438,00 nm (6719), 491,50 nm (5445). ESI⁺ MS (*m/z*, atribuição): 1743,01 [M + H]⁺. Condutividade molar (1 x 10⁻³ mol L⁻¹ em DMSO): 0,02 μS cm⁻¹. HPLC: tempo de retenção: 28,18 min (254 nm).

[Pd₄(μ-S-PrCh-κ³-C,N,S)₄] (6) (R = Ch): Cor: marrom avermelhado. Rendimento (Método B): 81% (40 mg). P.F.: decompõe em 290 °C. Análise Calculada para o monômero C₂₄H₂₁N₃PdS (489,92 g/mol): C, 58,84; H, 4,32; N, 8,58 %. Encontrado: C, 58,06; H, 4,26; N, 8,57 %. IV (ν_{max}/cm⁻¹): 3392 ν(N-H), 1575, 1562, 1517 ν(C=N) + ν(C=C), 715 ν(C-S). Dados de UV-Vis, solução de CH₂Cl₂ concentração na ordem de 1,12 x 10⁻⁵ M [λ_{max} (ε, L mol⁻¹cm⁻¹): 280,50 nm (260 714), 353,50 nm (17232), 439,00 (15357), 495,00 (2857). ESI⁺ MS (*m/z*, atribuição): 1959,19 [M + H]⁺. Condutividade molar ((1 x 10⁻³ mol L⁻¹ em DMSO) em DMSO: 0,004 μS cm⁻¹. HPLC: tempo de retenção: 33,03 min (254 nm).

Complexos do tipo [Pt₄(μ-S-PrR-κ³-C,N,S)₄]. As rotas sintéticas testadas para obtenção dos tetranucleares de platina estão descritas abaixo. O **Método C** foi a melhor opção de rota sintética encontrada, visto que fornece maior pureza e não é observada a formação de subprodutos.

Método A. A um balão contendo um equivalente do [PtCl₂(COD)] dissolvido em 2 mL de acetonitrila, foi adicionada a mesma quantidade molar do ligante H₂PrR. A esta solução foi adicionado 0,5 mL de Et₃N e a solução foi deixada sob refluxo por 8 horas. Logo após a adição da base um precipitado vermelho se formou e depositou no fundo do balão. O precipitado foi filtrado, lavado com metanol, hexano e seco sob vácuo.

Método B. 0,1 mmol de H₂PrR dissolvido em etanol quente foi adicionado a uma solução do precursor de metal K₂[PtCl₄] (0,1 mmol) em 1 mL de água. Observou-se a formação de um precipitado de cor laranja. A reação foi mantida sob agitação constante à temperatura

PARTE EXPERIMENTAL

ambiente durante 24 horas na ausência de base. O precipitado foi filtrado, lavado com metanol, hexano e seco sob vácuo.

Método C. A uma solução contendo o precursor metálico $K_2[PtCl_4]$ (0,1 mmol) dissolvido em 1 mL de água, um equivalente do ligante H_2PrR dissolvido em 3 mL de mistura de DCM/MeCN (1:2) foi adicionado lentamente. Logo em seguida, 0.5 mL de trietilamina foi adicionado. Após algum tempo de reação, a solução tornou-se límpida e verificou-se a formação de um sólido vermelho. Esta solução foi mantida sob agitação constante e sob refluxo por 24 horas. A solução resultante foi deixada sob evaporação lenta, a qual propiciou a formação de um sólido microcristalino. O sólido vermelho foi filtrado, lavado com metanol, *n*-hexano e seco sob vácuo e depois reristalizado em mistura de clorofórmio / acetona (1:1).

[Pt₄(μ-S-PrEt-κ³-C,N,S)₄] (7) (R = Et): Cor: vermelho. Rendimento (Método C): 57% (30 mg). P.F.: 337 – 339 °C. Análise Calculada para o monômero C₂₀H₁₅N₃PtS (524,50 g/mol): C, 45,80; H, 2,88; N, 8,01; Encontrado: C, 45,29; H, 2,91; N, 8,04 %. IV (ν_{max} /cm⁻¹): 3398 ν(N-H), 1560, 1517 ν(C=N) + ν(C=C), 713 ν(C-S). Dados de UV-Vis, solução de CH₂Cl₂ concentração: 5,95 x 10⁻⁵ M [λ_{max} (ε, L mol⁻¹ cm⁻¹): 281,00 nm (4638), 383,00 nm (4184), 436,00 (3411), 465,00 (3058). ESI⁺ MS (*m/z*, atribuição) para C₂₀H₁₅N₃PtS [M + H]⁺: calcd 2096,25, encontrado 2098,76. ¹⁹⁵Pt RMN (CDCl₃): δ -3801,88 e -3815,21 ppm. Condutividade molar (1 x 10⁻³ mol L⁻¹ em DMSO): 0,003 μS cm⁻¹.

[Pt₄(μ-S-PrCh-κ³-C,N,S)₄] (8) (R = Ch): Cor: vermelho. Rendimento (Método C): 91% (53 mg). P.F.: 305 – 307 °C (decompõe antes de 234°C). Análise Calculada para o monômero C₂₄H₂₁N₃PtS (578,59 g/mol): C, 54,10; H, 3,11; N, 9,96. Encontrado: C, 55,29; H, 3,17; N, 9,74 %. IV (ν_{max} /cm⁻¹): 3392 ν(N-H), 1577, 1562 ν(C=N) + ν(C=C), 715 ν(C-S). Dados de UV-Vis, solução de CH₂Cl₂ concentração: 6,04 x 10⁻⁵ M [λ_{max} (ε, L mol⁻¹ cm⁻¹): 409,00 nm

PARTE EXPERIMENTAL

(12 135), 386 nm (12 466), 287,00 nm (13 476). ESI⁺ MS (*m/z*, atribuição) para C₉₆H₈₄N₁₂Pt₄S₄ [M + H]⁺: calcd 2313,44, encontrado 2313,43. ¹⁹⁵Pt RMN (CD₂Cl₂): δ - 4053,34 e -4080,67 ppm. Condutividade molar (1 x 10⁻³ mol L⁻¹ em DMSO): 0,009 μS cm⁻¹.

Capítulo 4: Discussão dos Resultados

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados serão discutidos para cada classe de compostos separadamente. Devido à analogia dos espectros obtidos, nem todos os dados discutidos nesta seção se encontram no texto corrido, mas foram adicionados aos apêndices da seguinte maneira: Espectros de absorção na região do Infravermelho (**Apêndice A**), Ressonância magnética nuclear (**Apêndice B**), Espectros de absorção na região do UV-Visível e fluorescência (**Apêndice C**), Espectrometria de massas (**Apêndice D**), Cromatogramas de HPLC (**Apêndice E**), Espectros de LCMS (**Apêndice F**), Imagens de microscopia confocal (**Apêndice G**), Difração de Raios X (**Apêndice H**) e Estudo de inibição da Topoisomerase IB (**Apêndice I**).

4.0 Agentes quelantes H₂PrR

4.1 Síntese e caracterização

Duas classes de ligantes foram utilizadas neste trabalho. A primeira é a classe da tiossemicarbazonas derivadas do pireno, cuja síntese é apresentada no **Esquema 1**. As tiossemicarbazonas foram preparadas através de reação de condensação, partindo-se de um equivalente da tiossemicarbazida desejada e um equivalente do pireno-carboxaldeído, em etanol, com a adição de HCl. As soluções foram deixadas em agitação constante e sob refluxo por 2 horas, havendo a precipitação de sólidos amarelos, que foram isolados em bons rendimentos. Os ligantes preparados são solúveis em diclorometano e DMSO e pouco solúveis em metanol e etanol. As tiossemicarbazonas preparadas, podem atuar como ligante bidentado *N,S*-doador em modo aniônico, ou tridentado *C,N,S*-doador em modo dianiônico (**Figura 24**). Os grupos R consistem em ciclohexil e etil, pois permitem uma variação das propriedades básicas dos compostos como solubilidade, polaridade e lipofilicidade.

Esquema 1. Síntese dos ligantes tiossemicarbazonas.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 24. Representação dos ligantes e códigos usados neste trabalho de acordo com a coordenação.

Fonte: A autora.

O espectro na região do infravermelho do ligante livre H₂PrEt é caracterizado por duas bandas de absorção fortes, em 3358 e 3151 cm⁻¹, referentes aos estiramentos $\nu(\text{NH})$, enquanto que os estiramentos $\nu(\text{C}=\text{N})$ aparecem como bandas intensas e finas em torno de 1537 cm⁻¹ (**Figura 25**). Com relação ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{S})$, nos espectros dos ligantes do tipo tiosemicarbazonas livres são esperados dois modos vibracionais diferentes que aparecem em duas regiões, uma em 1118-1074 cm⁻¹, relativa ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{S})$ acoplado com o fragmento N-C-N, e outra na faixa de 800-846 cm⁻¹ que representa melhor o estiramento $\nu(\text{C}=\text{S})$.¹²² Nos ligantes H₂PrR, a banda $\nu(\text{C}=\text{S})$ pura é observada em 818 e 823 cm⁻¹ para os ligantes H₂PrEt e H₂PrCh, respectivamente; enquanto a banda $\nu(\text{C}=\text{S} + \text{N}-\text{C}-\text{N})$ é encontrada em 1082 cm⁻¹ para o H₂PrEt e em 1113 cm⁻¹ para o H₂PrCh (Apêndice, **Figura A1**). Ainda com relação aos espectros de absorção na região do infravermelho para os ligantes livres, é interessante destacar que o estiramento $\nu(\text{N}-\text{H})$ do fragmento N-NHC(=S) é observado em maior número de onda para o H₂PrEt (3151 cm⁻¹) quando comparado ao ligante H₂PrCh (3134 cm⁻¹).

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 25. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) do ligante livre H_2PrEt em pastilha de KBr.

Os espectros de RMN de ^1H dos ligantes livres estão de acordo com as estruturas propostas. O espectro de RMN de ^1H para o ligante livre H_2PrEt se encontra na **Figura 26**. Na região de campo alto foram observados os sinais referentes aos grupos metil e metileno. O grupo metil aparece como um tripleto em 1,21 ppm com constante de acoplamento 3J igual a 6 Hz devido ao acoplamento com os hidrogênios vicinais CH_2 . A multiplicidade esperada para o grupo CH_2 é um duplo quarteto, justificada pelo acoplamento do CH_2 com os hidrogênios provenientes do grupo metila e do hidrogênio do grupo NH . No entanto, por apresentarem uma constante de acoplamento idêntica estes sinais se sobrepõem, aparecendo em 3,67 ppm como um pseudo quintupletto. Na região de campo baixo, observa-se que o hidrogênio referente ao grupo NH (NHCH_2CH_3) aparece em 8,75 ppm como um tripleto, como esperado para o acoplamento com os hidrogênios do metileno com constante de acoplamento 3J igual a 6 Hz. Sinais referentes ao grupamento pireno são observados na região de 8,00 – 9,00 ppm, com valor de integração igual a 9 hidrogênios. O sinal referente ao CH ($\text{N}=\text{CH}$) é observado como um simpleto em 9,28 ppm para o ligante livre H_2PrEt .

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 26. Espectro de RMN de ^1H do ligante livre H_2PrEt em solução de $\text{DMSO}-d_6$ (δ , ppm).

O espectro de ^1H RMN do ligante livre H_2PrCh (**Figura 27**) mostra um conjunto de sinais bem resolvidos, correspondentes ao grupo ciclohexil, como um multipeto entre 1,17 à 1,95 ppm com valor de integração igual à 10. Além disso, observa-se um multipeto em campo mais baixo, na faixa de 4,22 – 4,30 ppm, referente ao fragmento $\text{CH}-\text{NH}$. Este multipeto é justificado pelo acoplamento com o hidrogênio do grupo NH e com os metilenos vizinhos oriundos do grupo ciclohexil. O sinal referente ao próton NH ligado ao grupo ciclohexil ($\text{NH}-\text{Ch}$) aparece como um dupeto em 8,86 ppm devido ao acoplamento com o CH proveniente do grupo ciclohexil, com constante de acoplamento 3J igual a 4 Hz. O outro hidrogênio NH ($\text{NHC}=\text{S}$) é observado em 11,53 ppm. Observa-se também um conjunto de multipletos correspondentes ao grupo pireno na região de aromáticos na faixa de 8,09 à 8,45 ppm. O sinal referente ao CH ligado ao nitrogênio azometino ($\text{N}=\text{CH}$) aparece como um simpleto em 9,28 ppm para o H_2PrCh , assim como observado para o H_2PrEt .

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 27. Espectro de RMN de ^1H do ligante livre H_2PrCh em solução de $\text{DMSO}-d_6$ (δ , ppm).

A técnica de RMN de ^{13}C também foi realizada para a caracterização estrutural dos ligantes livres H_2PrEt e H_2PrCh em solução de $\text{DMSO}-d_6$. Os espectros de ^{13}C RMN são mostrados nas **Figuras 28 e 29**, respectivamente. O espectro do ligante H_2PrEt é caracterizado pela presença de sinais com deslocamentos químicos δ em 15,12 e 38,93 ppm, referentes à metila e ao metileno do grupo etil, respectivamente. Por outro lado, no espectro do ligante H_2PrCh , são observados quatro sinais referentes aos carbonos provenientes do grupo ciclohexil. Dois sinais relativos aos grupos CH_2 (**b** e **b'**) e (**c** e **c'**) quimicamente equivalentes (ver **Figura 29**) aparecem com deslocamentos químicos de 25,42 e 25,62 ppm. O carbono referente ao grupo metileno da extremidade do ciclohexil (**d**) é observado em 32,29 ppm, enquanto o carbono metínico (**a**) é encontrado em 53,29 ppm. Os carbonos associados ao grupo azometino ($\text{C}=\text{N}$) são encontrados em 140,12 ppm para o H_2PrEt e em 140,54 ppm para o H_2PrCh . O carbono quaternário $\text{C}=\text{S}$ é o que apresenta maior desblindagem, sendo encontrado em 177,05 ppm (para o H_2PrEt) e 176,08 ppm (para o H_2PrCh). Os carbonos relativos ao grupamento pireno são encontrados na faixa de 121,97 – 132,23 ppm para ambos os agentes quelantes.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C (δ em ppm) do ligante livre H_2PrEt em solução de $\text{DMSO-}d_6$.

Figura 29. Espectro de RMN de ^{13}C (δ em ppm) do ligante livre H_2PrCh em solução de $\text{DMSO-}d_6$.

Devido ao grupamento pireno ser um sistema π altamente conjugado e também um grupo cromóforo, absorções fortes na região do ultravioleta (UV) e no visível são esperadas.¹²³ O espectro eletrônico do ligante livre H_2PrCh (**Figura 30A**), obtido em solução de DMSO, apresenta um conjunto de bandas com máximos de absorção em 407, 382 e 282

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

nm. Estas bandas são atribuídas à uma combinação de transições eletrônicas do tipo $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$, sendo as $\pi \rightarrow \pi^*$ de maior intensidade, portanto encombrando as transições $n \rightarrow \pi^*$. Este conjunto de bandas apresentam coeficientes de absorvidade molar na faixa de 45000 – 60000 L mol⁻¹ cm⁻¹.

Para identificar as bandas provenientes do grupo pireno, foi realizado um espectro eletrônico em DMSO do pirenocarboxaldeído (**Figura 30B**), reagente precursor para a síntese do ligante. No geral, os espectros obtidos do pirenocarboxaldeído e dos ligantes são bastante semelhantes. Entretanto, é importante se destacar as variações observadas nos comprimentos de onda antes e após as reações de condensação para obtenção dos ligantes tiossemicarbazonas. No espectro do pirenocarboxaldeído observam-se três bandas com absorções fortes com máximos em 397, 364 e 290 nm e um ombro em 374 nm. As bandas de observadas são atribuídas à transições $\pi \rightarrow \pi^*$ referentes ao sistema conjugado de anéis.

Ao se comparar o espectro do ligante H₂PrCh com o do pirenocarboxaldeído, pode-se observar que as bandas mostradas no espectro do H₂PrCh em 407 e 382 nm são relativas ao grupo pireno, ou seja, absorções associadas a transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$. Essas bandas sofreram um deslocamento batocrômico em relação ao pirenocarboxaldeído. Por outro lado, a banda de maior energia (observada em 290 nm para o pirenocarboxaldeído) sofre um deslocamento hipsocrômico após a condensação e formação do ligante, aparecendo no espectro do H₂PrCh em 282 nm. O espectro eletrônico do ligante H₂PrEt encontra-se em **Apêndice C**.

Figura 30. Espectros de absorção na região do UV-Visível para o A) ligante livre H₂PrCh e para o precursor pirenocarboxaldeído. Ambos espectros realizados em DMSO.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Uma vez que os ligantes aqui estudados apresentam o pireno como grupo fluoróforo, a luminescência dos mesmos foi investigada. As medidas de luminescência, para os dois ligantes estudados foram conduzidas em um comprimento de onda de excitação de 415 nm, devido à maior intensidade de fluorescência apresentada pelos compostos neste comprimento de onda. A escolha do solvente também foi importante para a realização deste experimento, pois a fluorescência do sistema pode ser afetada por fatores como polaridade e viscosidade. A viscosidade, por exemplo, pode diminuir a taxa de colisões bimoleculares desativadoras de energia (*quenching*) pela diminuição da difusão de espécies. Este fato foi comprovado ao se realizar as medidas primeiramente em diclorometano, sendo que o espectro obtido neste solvente revelou compostos fracamente fluorescentes. Ao se repetir a medida na mesma concentração, porém em um solvente mais viscoso, DMSO, os complexos exibiram bandas de fluorescência relativamente mais intensas. Outro fator importante é a concentração da solução analisada, a qual influencia diretamente na intensidade da banda de emissão dos compostos. Isto ocorre, pois, a magnitude da desativação do estado excitado é proporcional à concentração do agente desativador e da sua capacidade de difusão no meio. Logo, substâncias presentes em maiores concentrações, reduzem a luminescência permitida por meio da reabsorção da fluorescência, gerando uma absorção secundária. No caso dos ligantes H₂PrEt e H₂PrCh, soluções diluídas da ordem 10⁻⁵ M mostraram-se mais fluorescentes. Este fato foi observado uma vez que as medidas de fluorescência foram realizadas inicialmente em maiores concentrações (10⁻⁴ e 10⁻³ M), para as quais os espectros apresentaram baixa intensidade de fluorescência. Os espectros de emissão para ambos ligantes, H₂PrCh e H₂PrEt, estão mostrados na **Figura 31**. Como pode ser observado no espectro do H₂PrEt, estes ligantes são altamente fluorescentes em solução de DMSO, com intensidade da emissão próxima de 1000. Ambos os espectros apresentam bandas bem resolvidas, com máximos de fluorescência em 429 e 448 nm, assim como observado para outros compostos contendo o grupo pireno.¹²⁴

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 31. Espectro de emissão de fluorescência dos ligantes livres **A)** H₂PrCh e **B)** H₂PrEt com concentração igual a 10⁻⁵ e $\lambda_{\text{exc}} = 415$ nm, fenda 5.

A pureza dos ligantes livres foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (HPLC/UV), sendo os solventes H₂O e MeCN usados na fase móvel, seguindo o método descrito na parte experimental. Os cromatogramas se encontram na **Figura 32**. Além da pureza, outras informações relevantes podem ser retiradas do cromatograma, como a relação tempo de retenção. Sobretudo, pode-se estabelecer uma relação do tempo de retenção com lipofilicidade. Neste método, usa-se dois solventes polares como fases móveis, um mais polar (H₂O) e outro menos polar (MeCN). O diferente grau de afinidade destes compostos com a fase móvel resulta em velocidades de migração distintas. Desta forma, o composto mais lipofílico ficará mais retido na coluna e, conseqüentemente, terá um maior tempo de retenção. Esta informação é importante, visto que as propriedades físico-químicas de um potencial fármaco também devem ser estudadas. Através dos cromatogramas obtidos, observou-se que os ligantes estão puros com tempos de retenção de 40,6 min para o H₂PrCh, enquanto que o do H₂PrET é 31,6 min. A partir dos tempos de retenção obtidos, podemos afirmar que o composto derivado do ciclohexil é mais lipofílico do que o derivado do etil, pois este elui por último.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 32. HPLC dos ligantes livres **A)** H₂PrCh e **B)** H₂PrEt.

Cristais amarelos em formato de agulhas foram obtidos para os compostos H₂PrEt e H₂PrCh através da recristalização de ambos em mistura de DCM/MeCN (1:1). Com isso, as estruturas dos ligantes puderam ser determinadas por estudos por difração de raios X em monocristal. A representação da estrutura cristalina e molecular das duas moléculas contidas na unidade assimétrica para o H₂PrEt é mostrada na **Figura 33**. Na **Tabela 1** encontram-se os comprimentos de ligação e ângulos selecionados para o ligante H₂PrEt. Detalhes sobre o refinamento da estrutura do H₂PrEt se encontram no **Apêndice H, Tabela H1**. O H₂PrEt cristalizou-se no sistema triclinico, com grupo espacial $P\bar{1}$. Uma das moléculas contidas na unidade assimétrica do H₂PrEt possui o grupamento pireno desordenado em duas posições, sendo cada uma delas com fator de ocupação de 50%. Ligações características de tiossemicarbazonas foram observadas para H₂PrEt, como por exemplo, a ligação dupla do nitrogênio imina N(11)-C(11) e N(12)-C(12), com distâncias de 1,275(3) e 1,263(3) Å, bem como a ligação S(11)-C(21) e S(12)-C(22), com comprimentos iguais a 1,686(3) e 1,682(3) Å respectivamente, valores esperados para uma dupla ligação. É observado ainda que as distâncias N(21)-C(21) e N(22)-C(22) possuem valores iguais a 1,350(3) e 1,351(3) Å, respectivamente, o que corresponde a um caráter intermediário entre ligação simples e dupla, uma vez que existe uma deslocalização π presente nesse sistema. Além disso, a deslocalização

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

π é estendida para as ligações N(31)-C(21) e N(32)-C(22), as quais apresentam valores de comprimento de ligação de 1,325(4) e 1,321(4) Å, respectivamente. Diferentemente dos dois últimos exemplos mostrados acima, as distâncias das ligações N(31)-C(31) e N(32)-C(32) possuem valores condizentes com ligações simples (1,464 e 1,462 Å, respectivamente).

Através da análise da planaridade da molécula não desordenada na unidade assimétrica do H₂PrEt, é possível verificar a existência de dois planos. O primeiro plano é formado pelos átomos N12, N22, C22, N32, S12 da porção tiossemicarbazona, com um desvio de ângulo rms de 0,0544 Å, sendo que os átomos relativos ao grupamento etil C32 e C42 se encontram 0,2272 e 1,6186 Å fora deste plano, respectivamente. O outro plano se inicia no átomo C(12) e é estendido ao longo do grupo pireno. Estes anéis fundidos possuem uma alta planaridade, visto que o desvio do valor Rms é bem próximo de zero (0,0216 Å).

Figura 33. Estrutura cristalina e molecular das duas moléculas presentes na unidade assimétrica do ligante H₂PrEt. O grupo pireno de uma das moléculas se encontra desordenado.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Tabela 1. Comprimentos (Å) e Ângulos de ligações (°) selecionados para o ligante H₂PrEt.

Comprimentos de ligação			
N(11)-C(11) / N(12)-C(12)	1,261(3) / 1,275(3)	N(31)-C(31) / N(32)-C(32)	1,485(4) / 1,458(4)
N(11)-N(21) / N(12)-N(22)	1,372(3) / 1,375(3)	C(5A)-C(11) / C(52)-C(12)	1,447(4) / 1,450(4)
S(11)-C(21) / S(12)-C(22)	1,678(3) / 1,685(3)	C(31)-C(41) / C(32)-C(42)	1,444(5) / 1,492(5)
N(21)-C(21) / N(22)-C(22)	1,350(3) / 1,351(3)	N(31)-C(21) / C(22)-N(32)	1,321(4) / 1,325(3)
Ângulos de ligação			
N(32)-C(22)-N(22)	116,1(3)	N(22)-C(22)-S(12)	118,6(2)
C(21)-N(31)-C(31)	126,1(3)	C(11)-N(11)-N(21)	116,7(3)
C(12)-N(12)-N(22)	116,1(2)	C(21)-N(21)-N(11)	120,8(3)
C(22)-N(22)-N(12)	119,9(2)	N(31)-C(21)-S(11)	125,0(2)
N(21)-C(21)-S(11)	119,7(3)	N(12)-C(12)-C(52)	121,4(3)
C(6A)-C(5A)-C(11)	114,5(4)	N(32)-C(22)-S(12)	125,3(2)
N(31)-C(21)-N(21)	115,3(3)	C(22)-N(32)-C(32)	125,4(3)
N(32)-C(32)-C(42)	111,2(3)	C(62)-C(52)-C(12)	119,2(2)

É possível observar ainda a protonação dos átomos de nitrogênio N2 e N3, como verificado anteriormente pelas técnicas de IV e ¹H RMN, pelo fato destes hidrogênios estarem envolvidos em ligações de hidrogênio. Estas ligações formam uma rede tridimensional de ligações intra- e intermoleculares (ver **Figura 34**). As ligações de hidrogênio intermoleculares envolvem os grupos N21 e N31 com o átomo de enxofre de uma molécula vizinha. Enquanto os átomos de nitrogênio N32 ou N31 interagem através de ligações de hidrogênio intramolecular através do H31 ou H32 com os nitrogênios N11 ou N12 da mesma molécula. As demais ligações intramoleculares presentes no H₂PrEt se encontram na legenda da **Figura 34**.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 34. Estrutura molecular e rede cristalina do H_2PrEt [$\text{N}(31) \cdots \text{S}(12)' = 3,453(3) \text{ \AA}$, $\text{N}(31) - \text{H}(31) \cdots \text{S}(12)' = 142,5^\circ$], [$\text{N}(22) \cdots \text{S}(11) = 3,497(3) \text{ \AA}$, $\text{N}(22) - \text{H}(22) \cdots \text{S}(11) = 161,2^\circ$], [$\text{N}(21) \cdots \text{S}(12) = 3,413(3) \text{ \AA}$, $\text{N}(21) - \text{H}(21) \cdots \text{S}(12) = 162,9^\circ$], [$\text{N}(31) \cdots \text{N}(11) = 2,617(3) \text{ \AA}$, $\text{N}(31) - \text{H}(31) \cdots \text{N}(11) = 109,0^\circ$], [$\text{N}(32) \cdots \text{N}(12) = 2,621(3) \text{ \AA}$, $\text{N}(31) - \text{H}(32) \cdots \text{N}(12) = 108,0^\circ$]. Operação de simetria usada $\bar{1}$: $x-1, y, z$.

A análise do monocristal medido permitiu confirmar a estrutura proposta (**Figura 35**). No entanto, os dados de refinamento obtidos foram insatisfatórios devido aos altos índices R finais. Por isso, não foi possível discutir os comprimentos e ângulos de ligações para este composto. Deste modo, os dados de refinamento para o H_2PrCh não foram apresentados.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 35. Estrutura cristalina e molecular do ligante H₂PrCh.

Uma vez que os ligantes tiossemicarbazonas H₂PrEt e H₂PrCh foram preparados e totalmente caracterizados, os mesmos foram utilizados na síntese de complexos de Pd^{II} e Pt^{II}, como discutido nos próximos tópicos deste trabalho.

O nosso estudo de complexação de Pd^{II} e Pt^{II} com ligantes TSCs derivados do pireno com dois diferentes substituintes (R = Et ou Ch) resultou em três diferentes tipos de complexos: (i) Complexos mononucleares contendo um ligante tiossemicarbazona (em modo monoaniônico), além de co-ligantes clorido e trifenilfosfano; (ii) complexos tetranucleares ortometalados contendo os ligantes tiossemicarbazonas na forma tridentada e dianiônica PrR²⁻, sendo que a metalação ocorre na posição orto da fenila ao qual o grupo imina está ligada. Deste modo, os diferentes tipos de complexos obtidos demonstram a versatilidade química dos ligantes preparados. Para facilitar a leitura os complexos foram divididos em tópicos de acordo com cada classe, sendo a primeira, complexos do tipo [MCl(PPh₃)(HPrR)] (M = Pd^{II} e Pt^{II}) (**tópico 5.0**) e a segunda, complexos oligoméricos do tipo [{M(μ-S-PrR-κ³-C,N,S)}₄] (M = Pd^{II} e Pt^{II}) (**tópico 6.0**).

5.0 Complexos do tipo $[MCl(PPh_3)(HPrR)]$

5.1 Síntese e caracterização

Compostos de paládio similares aos preparados neste tópico, contendo outros ligantes tiossemicarbazonas, estão descritos na literatura.^{125,126} No entanto, uma diferença interessante a se ressaltar é que os compostos já publicados são sintetizados a partir do precursor metálico $[PdCl_2(PPh_3)_2]$ e ao se seguir as rotas de síntese dos trabalhos citados acima é observada a formação de misturas. Deste modo, foi necessário se desenvolver uma nova rota sintética para formação dos complexos $[PdCl(PPh_3)(HPrCh)]$ (**1**) e $[PdCl(PPh_3)(HPrEt)]$ (**2**) (**Equema 2**). Estes compostos foram obtidos adicionando-se o ligante desejado H_2PrR a um balão contendo quantidade equimolar do precursor metálico $[PdCl_2(MeCN)_2]$ dissolvido em acetonitrila. Esta reação foi deixada sob agitação constante por 24 horas, ocorrendo a formação de um intermediário muito estável, passível de ser isolado. As análises realizadas sugerem a formação de uma espécie dimérica, a qual será discutida no próximo tópico. No entanto, para se obter os complexos contendo trifenilfosfano como ligante não é necessário isolar o intermediário, uma vez que, após as 24 h de reação, a adição de um equivalente de PPh_3 à solução contendo o ligante H_2PrR e o precursor metálico leva à clivagem da ligação $Pd-Cl$, como observado em trabalhos anteriores. Logo, seguindo a rota sintética descrita, é possível isolar os complexos $[PdCl(PPh_3)(HPrCh)]$ e $[PdCl(PPh_3)(HPrEt)]$ na forma pura.

Os valores de condutividade molar realizados para os complexos estão condizentes com a obtenção de compostos neutros, de composição $[PdCl(PPh_3)(HPrR)]$, o que está condizente com o valor de condutividade molar realizada em DMSO, próximo de zero. Os dados de análise elementar obtidos foram condizentes com a composição dos complexos de paládio, os quais indicaram a formação de complexos neutros, ambos os produtos são isolados em bons rendimentos.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Esquema 2. Síntese dos complexos de Pd^{II} .

Os complexos de platina foram obtidos através de reações dos ligantes H_2PrCh e H_2PrEt com o precursor metálico $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ em mistura de H_2O e MeOH , à temperatura ambiente, obtendo-se precipitados alaranjados de composição $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrR})]$ em bons rendimentos (**Esquema 3**).

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Esquema 3. Síntese dos complexos de Pt^{II} .

Todos os complexos foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho. Nos espectros dos complexos análogos $[PdCl(PPh_3)(HPrCh)]$ (**1**) (**Figura 36**) e $[PtCl(PPh_3)(HPrCh)]$ (**3**) (**Apêndice A, Figura A2**) foi observado o desaparecimento de uma das bandas $\nu(NH)$, como esperado pela deprotonação do ligante após a complexação com o centro metálico. O estiramento $\nu(C=N)$, cuja banda é encontrada em 1591 cm^{-1} no espectro do H_2PrCh livre, sofre um deslocamento para menores números de onda após a coordenação, sendo observado em 1583 cm^{-1} para ambos os derivados de Pd^{II} e Pt^{II} , de acordo com a coordenação via nitrogênio azometino. O estiramento $\nu(C=S)$, em 823 cm^{-1} no espectro do H_2PrCh , desloca-se para menores frequências após a complexação (746 cm^{-1} para o **1** e 748 cm^{-1} para o **3**), de maneira condizente com a coordenação via átomo de enxofre e consequente enfraquecimento da ligação CS. Na região de mais baixa frequência do espectro, observa-se uma banda fina e bastante intensa referente à deformação $\delta(CH)$ de aromático, em 842 cm^{-1} . Bandas características da trifenilfosfina também são observadas para ambos complexos. A banda relativa à deformação do anel (β -anel) é observada em torno de 692 cm^{-1} . O estiramento $\nu(P-C)$ aparece em 1095 cm^{-1} e 1097 cm^{-1} para os complexos **2** e **4**,

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

respectivamente, de maneira semelhante ao observado na literatura para compostos similares.⁷⁵

Figura 36. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) do complexo **1** em pastilha de KBr.

O comportamento dos complexos em solução foi analisado por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C , os quais apresentaram deslocamentos químicos similares. No espectro de RMN de ^1H para o ligante livre H_2PrCh , o sinal do hidrogênio NH, que aparece como um simpleto alargado em 11,53 ppm, desaparece no espectro dos seus respectivos complexos, $[\text{MCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ devido a deprotonação do ligante e coordenação em modo monoaniônico. Este fato também foi confirmado pelos dados de infravermelho, nos quais somente uma banda de NH foi observada. O sinal do hidrogênio referente ao fragmento $\text{HC}=\text{N}$, observado para ambos ligantes em 9,28 ppm, se desloca para campo baixo após a complexação evidenciando a coordenação via átomo de nitrogênio azometino. Entretanto, os valores de δ referentes a este hidrogênio não puderam ser identificados com precisão, pois aparecem na mesma região que os hidrogênios aromáticos dos grupos pireno e trifenilfosfina, sendo sobrepostos.

Os sinais relativos aos hidrogênios do metileno do grupo etila ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_3$) aparecem nos espectros dos complexos $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ e $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ como um duplo quarteto em 3,31 e 3,61 ppm, respectivamente. No entanto, diferentemente do observado para ligante livre H_2PrEt , os quartetos, embora sobrepostos, não coincidem no caso dos complexos. A multiplicidade deste sinal é consistente com o acoplamento dos átomos de hidrogênio do grupo CH_2 com o grupo NH, com constante de acoplamento 3J igual a 4,0 Hz e também com o grupo CH_3 com valor de 3J de 7,0 Hz para o complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$. Os demais deslocamentos químicos são encontrados nas regiões esperadas.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Nos espectros de RMN de ^1H dos complexos análogos, $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ (**1**) (**Apêndice B, Figura B1**) e $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ (**3**) (**Figura 37**), o sinal referente ao próton NH ($\text{NNHC}=\text{S}$), que aparece como um simpleto alargado em 11,53 ppm para o ligante livre H_2PrCh , não é observado, conforme esperado pela desprotonação do ligante e indicado pelos dados de infravermelho. O sinal do NH, proveniente do fragmento $\text{NH}-\text{Ch}$, sofre um deslocamento para campo alto após a coordenação, sendo encontrado para os complexos como um sinpleto alargado em 4,64 ppm (para o complexo **1**) e 4,90 ppm (para o complexo **3**). Foram observados ainda sinais relativos ao grupo ciclohexil como multipletos na faixa de 1,08 – 2,05 ppm, com valores de integração condizentes com o esperado. Ainda na região de campo alto, o hidrogênio referente ao CH do grupo Ch, aparece como um multiplete alargado em 3,48 – 3,55 (para **1**) e 3,58 – 3,62 ppm (para **3**). Os sinais dos hidrogênios do grupo pireno aparecem na faixa 7,43–9,79 ppm juntamente com os hidrogênios do co-ligante trifenilfosfina, com valor de integração igual a 24 hidrogênios (15H para PPh_3 e 9H para o pireno).

Figura 37. Espectro de ^1H -RMN do composto $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ (**3**) em solução de CD_2Cl_2 (δ em ppm).

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Espectros de RMN de ^{13}C em modo APT foram realizados para os complexos de paládio. Os espectros dos complexos $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ (**Figura 38**) e $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ (**Figura 39**) apresentam os sinais nas regiões esperadas. Para as tiossemicarbazonas livres, o sinal do carbono terciário $\text{C}=\text{N}$ para os dois ligantes aparece em torno de 140 ppm, enquanto que os sinais de carbono quaternário $\text{C}=\text{S}$ aparecem próximo de 177 ppm para os mesmos compostos. Após a coordenação e formação dos complexos, observa-se um deslocamento de cerca de 10 ppm para campo baixo (maior desblindagem) dos sinais $\text{C}=\text{N}$, enquanto que os sinais $\text{C}=\text{S}$ são deslocados para campo alto (maior blindagem), aparecendo em torno de 169 ppm, como observado para outras tiossemicarbazonas com modo de coordenação *N,S*-bidentado encontradas na literatura.¹²⁷

Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C (APT) do complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ (**1**) em solução de CD_2Cl_2 (δ em ppm).

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C (APT) do complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ (**2**) em solução de CD_2Cl_2 (δ em ppm).

Os espectros de RMN de ^{31}P dos complexos de paládio **1** e **2** mostram somente um simpleto referente ao ligante trifenilfosfano coordenado em 27,31 (**Apêndice B**) e 27,56 ppm, respectivamente (**Figura 40**). Espectros de ^{31}P RMN também foram realizados para os complexos de platina. Sendo a platina composta por uma mistura de isótopos, onde o isótopo ^{195}Pt apresenta abundância de 33,8% e spin nuclear $I = \frac{1}{2}$, espera-se que haja o acoplamento do fósforo bem como a formação de satélites.⁷ Logo, nos espectros de RMN de fósforo para os complexos **3** (**Figura 41**) e **4** (**Figura B5**), apresentaram sinais em 6,46 e 6,38 ppm, ambos com uma constante de acoplamento 3476 Hz. De acordo com a literatura, valores de acoplamento dessa magnitude são característicos para ligações Pt–P *trans* à ligação Pt–N.⁷⁵ Por fim, ao comparar os espectros de fósforo dos complexos de paládio **1** e **2** aos de platina **3** e **4**, observa-se que os sinais relativos ao átomo de fósforo se encontra em campo mais alto nos complexos de platina do que nos de paládio. Este fenômeno demonstra a maior força da retrodoação nos complexos de platina, causando uma maior blindagem do átomo de fósforo.¹²⁸

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 40. Espectro de ^{31}P -RMN do composto $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ (**2**) em solução de CD_2Cl_2 (δ em ppm).

Figura 41. Espectro de ^{31}P -RMN do composto $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ (**3**) em solução de CD_2Cl_2 (δ em ppm).

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os espectros eletrônicos dos complexos $[\text{MCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ e $[\text{MCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$, realizados em soluções de diclorometano, apresentam máximos de absorção em comprimentos de onda muito próximos. Além disso, são bastante semelhantes aos espectros dos ligantes livres. Apesar de transições $d-d$ serem esperadas para estes complexos, tais absorções não foram observadas. Este fato é devido a absorções de alta intensidade, causadas por bandas de transferência de carga na região do visível, que sobrepõem e interferem na observação das bandas esperadas.⁷⁵ Na **Figura 42A**, é mostrado o espectro eletrônico do complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$, como exemplo para esta classe dos compostos. As fortes absorções próximas à 400 nm são atribuídas à uma combinação de bandas transferência de carga do ligante para o metal (TCLM)⁷⁵ e transições intraligante do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, enquanto que a banda próximo de 285 nm é atribuída somente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$. Os espectros de absorção na região do UV-Vis dos complexos de platina $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ e $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ são praticamente idênticos, apresentando um máximo em torno de 392 nm e outro em 287 nm (ver **Apêndice C**).

Figura 42. A) Espectro de absorção na região do ultravioleta visível e B) espectro de emissão de fluorescência do complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$, em solução de DMSO com concentração na ordem de 10^{-5} e $\lambda_{\text{exc}} = 517$ nm..

Os complexos também tiveram a sua luminescência avaliada. A **Figura 42B** mostra o espectro de emissão para o composto $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ com uma banda com máximo em 540 nm. Por outro lado, o espectro de emissão para o composto $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ (**Apêndice, Figura C4**), quando excitado em 345 nm, apresenta três bandas de baixa intensidade baixa em 391, 425 e 477 nm.¹²⁹ A partir dos resultados obtidos, verifica-se que

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

com a complexação dos ligantes aos centros metálicos de Pd^{II} e Pt^{II}, a fluorescência decai claramente. A baixa fluorescência observada nos espectros dos complexos pode ser o resultado da retenção de parte da energia absorvida pelo centro metálico, havendo uma menor liberação para o meio quando comparados aos ligantes livres. Em alguns casos, por exemplo, o da porfirina de ferro, pode haver uma ausência total de fluorescência devido à total transferência da energia absorvida do anel porfirínico para o átomo de ferro.¹³⁰

Os complexos [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] e [PdCl(PPh₃)(HPrEt)] foram ainda caracterizados por espectrometria de massas (**Figura 43** e **Figura D1**, Apêndice). O pico do íon molecular para [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] não é observado, porém um pico de alta intensidade em m/z 752,1488, correspondente ao fragmento $[M-Cl]^+$, com a distribuição isotópica de acordo com o esperado, indica que a ligação Pd–Cl não é forte o bastante para ser mantida sob as condições experimentais.

Figura 43. Espectro de massas simulado (acima) e experimental (abaixo) ESI(+) para o complexo [PdCl(PPh₃)(HPrCh)].

Ambos os complexos de paládio e um dos complexos de platina tiveram sua estrutura cristalina determinada por difração de raios X em monocristal. A **Tabela 2** apresenta dados de comprimentos e ângulos de ligação selecionados para os complexos. A **Figura 44** mostra as estruturas cristalinas e moleculares dos complexos análogos [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] (**1**) e

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

[PtCl(PPh₃)(HPrCh)] (**3**) e de modo semelhante podemos avaliar na **Figura 45** a estrutura molecular do complexo de paládio [PdCl(PPh₃)(HPrEt)]·MeOH (**2**·MeOH). Todos os complexos analisados são neutros. Os ligantes tiossemicarbazونات, nesses complexos, estão coordenados aos centros de Pd^{II} e Pt^{II} em modo *N,S*-bidentado monoaniônico, através dos átomos de nitrogênio azometino e ao átomo de enxofre, formando um anel de cinco membros incluindo o íon metálico. As distâncias das ligações Pd–N para os complexos **1** e **2**·MeOH apresentam valores de 2,0875(16) e 2,101(2) Å, enquanto que os valores das distâncias Pd–S são 2,2379(5) e 2,2341(7) Å, respectivamente. Estas distâncias são bastante semelhantes para o complexo de platina (**3**), Pt–N igual a 2,088(2) Å e Pt–S igual a 2,2421(11) Å.

Os sítios de coordenação remanescentes são ocupados por um átomo de fósforo do ligante trifenilfosfano, além de um ligante clorido, que completa a esfera de coordenação. As distâncias das ligações Pd–N(1), Pd–S(1), Pd–Cl(1) e Pd–P(1) são similares às reportadas na literatura para compostos semelhantes.^{131–133} Após a complexação com o centro metálico observa-se um aumento no comprimento da ligação S(1)–C(2) com valores de 1,756(2) Å para **1** e 1,747(3) Å para **3**, distâncias visivelmente mais longas quando comparadas com a mesma ligação no ligante livre H₂PrEt [1,682(3) Å]. Este aumento na distância da ligação S(1)–C(2) é condizente com a coordenação via átomo de enxofre, sendo os valores característicos de uma ligação simples. Por outro lado, as distâncias das ligações N(2)–C(2), nos complexos **1** e **3** passam a possuir um maior caráter de dupla ligação após a complexação, com valores iguais a 1,294(3) Å e 1,305(4) Å, respectivamente. Esta observação está de acordo com a deslocalização π presente no anel quelato que se estende até os átomos de nitrogênio N3, da ligação C(2)–N(3) com distâncias de 1,349 Å e 1,353 Å para os complexos **1** e **3**, respectivamente.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 44. Estruturas cristalinas e moleculares dos complexos **A)** $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ e **B)** $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$.

A geometria de coordenação ao redor dos centros de Pd^{II} e Pt^{II} é mais bem definida como quadrática plana distorcida, com distorções nos ângulos das ligações $\text{N}(1)\text{--Pd--P}(1)$ e $\text{S}(1)\text{--Pt--Cl}(1)$ próximos de $175,73(5)^\circ$ e $173,04(3)^\circ$, respectivamente. É importante observar que, em todas as estruturas cristalinas obtidas para essa classe de complexos, o coligante clorido está coordenado *trans* ao átomo de enxofre, enquanto que o ligante remanescente, trifenilfosfano, está coordenada em posição *trans* ao átomo de nitrogênio da tiossemicarbazona, como observado para complexos similares já publicados.^{125,126} Os complexos análogos $[\text{MCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ ($\text{M} = \text{Pd}^{\text{II}}$ e Pt^{II}) não apresentam ligação de hidrogênio consideráveis pois não exibem distâncias $\text{H}\cdots\text{A}$ (átomo aceptor) menores que o raio de $\text{A} + 2,0 \text{ \AA}$ e ângulo entre os átomos doador e aceptor DHA maior que 110° .

Figura 45. Estrutura cristalina e molecular do complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]\cdot\text{MeOH}$ ($2\cdot\text{MeOH}$). Molécula de metanol omitida para maior clareza.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

É interessante ressaltar que mudanças significativas nas distâncias de ligações entre os átomos doadores e os centros metálicos não são observadas ao se comparar os complexos análogos $[MCl(PPh_3)(HPrCh)]$ ($M = Pd^{II}$ e Pt^{II}). A proximidade das distâncias das ligações que envolvem os átomos metálicos é condizente com o tamanho dos raios covalentes dos metais Pd^{II} e Pt^{II} sendo, 1,380 e 1,370, respectivamente. Embora seja comum encontrar complexos de paládio com ligantes tiossemicarbazونات bidentados e coligantes clorido e fosfina na literatura, todos os complexos estudados neste trabalho são inéditos.

Tabela 2. Comprimentos (Å) e Ângulos de ligações (°) selecionados para os complexos **1**, **2**·MeOH ($M = Pd^{II}$) **3** e ($M = Pt^{II}$).

	1	2·MeOH	3
<i>Comprimentos de ligação</i>			
M(1)–N(1)	2,0874(16)	2,101(2)	2,088(2)
M(1)–S(1)	2,2378(5)	2,2341(7)	2,2421(11)
M(1)–P(1)	2,2514(5)	2,2535(6)	2,2387(8)
M(1)–Cl(1)	2,3327(5)	2,3539(6)	2,3376(12)
S(1)–C(2)	1,756(2)	1,753(3)	1,747(3)
N(2)–C(2)	1,294(3)	1,302(3)	1,305(4)
<i>Ângulos de ligação</i>			
N(1)–M–S(1)	83,15(5)	83,41(6)	83,11(7)
N(1)–M–P(1)	175,73(5)	174,70(6)	177,07(7)
S(1)–M–P(1)	92,673(19)	91,48(2)	94,05(4)
N(1)–M–Cl(1)	94,65(5)	95,85(6)	93,27(7)
S(1)–M–Cl(1)	173,45(2)	176,34(3)	173,04(3)
P(1)–M–Cl(1)	89,599(19)	89,34(2)	89,63(4)

5.2 Testes de estabilidade

Complexos metálicos são geralmente instáveis em solução. Por esta razão é importante assegurar que o composto testado seja estável em DMSO e em meio aquoso. Um primeiro teste foi realizado com o intuito de verificar se os complexos desta classe poderiam reagir com o DMSO. Para tanto, a espectroscopia de absorção na região do UV–Visível foi realizada. Vários espectros de UV-Vis do complexo $[PtCl(PPh_3)(HPrEt)]$ foram medidos em solução de CH_2Cl_2 (**Figura 46**), entretanto, com adição de DMSO a cada dois minutos por

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

uma hora, observou-se que não houve a formação de um complexo diferente, já que a banda de absorção em 400 nm não sofreu deslocamento. Além deste, outro teste complementar foi realizado para o composto $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$. Este foi recristalizado em mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{DMSO}$. Após alguns dias, houve a formação de cristais em formato de losangos. Um cristal teve sua cela unitária coletada e foi verificado que os parâmetros de cela são idênticos aos dados coletados para o $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$, determinado anteriormente.

Figura 46. Espectro eletrônico para o $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ em CH_2Cl_2 com adição de alíquotas de DMSO (concentração na ordem de 10^{-5} M).

Para comprovar a estabilidade dos complexos testados, a estabilidade do complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ em solução $\text{DMSO}:\text{D}_2\text{O}$ (80%:20%), usado como modelo para os demais, foi testada através das técnicas de RMN de ^1H e ^{31}P durante pelo menos 24 horas. Como exemplo, na **Figura 47** está mostrado o espectro de RMN de ^{31}P . Foi necessário utilizar uma baixa concentração da solução na medida do espectro de fósforo, devido a baixa solubilidade do complexo em água. Devido à isso, os espectros apresentaram vários ruídos. Entretanto, é possível observar que estes permanecem inalterados durante o período de tempo do ensaio (24 horas). Os resultados encontrados para o RMN de ^{31}P e para o dado de condutimetria (realizada em DMSO e sem variação em relação ao solvente puro) sugerem que o composto é estável e não hidrolisa sob tais condições.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 47. Espectro de RMN de ^{31}P **A)** realizado com a solução fresca do complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ em $\text{DMSO}-d_6$ contendo 20% de D_2O e **B)** espectro da mesma solução realizado 24 horas depois.

5.3 Atividade antiproliferativa

Já é bem estabelecido que tiossemicarbazonas apresentam atividade biológica frente a vários tipos de linhagens celulares. Além da versatilidade química, o amplo perfil farmacológico desta classe de ligantes foi um dos principais motivos pelo qual as TSCs foram escolhidas para este trabalho. Em contrapartida, o grupo pireno foi selecionado para ser acoplado às TSCs devido a sua propriedade fluorescente e pela sua característica intercaladora do DNA. No entanto, sabe-se que a atividade biológica desses agentes quelantes pode ser influenciada pela coordenação, pois o íon metálico pode atuar de várias formas na atividade dos compostos. Portanto, após a obtenção e caracterização de duas séries de complexos inéditos e com potencial atividade citotóxica, estudos biológicos foram realizados em busca de encontrar possíveis alvos biológicos.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Testes de citotoxicidade foram realizados para os ligantes livres, precursores e complexos da série apresentada acima. Estes testes foram feitos frente às linhagens celulares B16-F10 (melanoma murino), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), K562 (leucemia mielocítica crônica humana), HL-60 (leucemia promielocítica humana) e PBMC (*peripheral blood mononuclear cell* ativados com ConA – linfoblastos normais). A Doxorubicina (Dox) foi usada como controle positivo. Os ligantes estudados não foram ativos nas linhagens celulares testadas, uma vez que apresentaram IC_{50} maior que 20 μM . Da mesma maneira, nenhum dos complexos derivados de ligantes tiossemicarbazonas preparados neste trabalho apresentou atividade biológica relevante frente às linhagens celulares testadas (**Tabela 3**).

Tabela 3. Testes de citotoxicidade dos compostos frente às células HepG2, B16-F10, K562, HL-60 e PBMC.

	IC_{50}				
	HepG2	B16-F10	K562	HL-60	PBMC
H ₂ PrEt	17,9/13,72/23,34	>25	>25	>25	>25
H ₂ PrCh	>25	>25	>25	>25	>25
[PdCl ₂ (MeCN) ₂]	>25	>25	>25	>25	>25
K ₂ [PtCl ₄]	>25	>25	>25	>25	>25
[PdCl(PPh ₃)(HPrCh)] (1)	>25	>25	>25	>25	>25
[PtCl(PPh ₃)(HPrCh)] (3)	>25	>25	>25	>25	>25
[PtCl(PPh ₃)(HPrEt)] (4)	>25	>25	>25	>25	>25

Novos experimentos foram realizados em colaboração com a Universidade de Warwick, com o intuito de encontrar atividade citotóxica frente à uma linhagem celular diferente. Para isto, estudos biológicos foram realizados utilizando a linhagem A2780 (carcinoma de ovário humano) para os ligantes livres e alguns dos complexos (**Tabela 4**). Os ligantes livres permanecem inativos, mesmo contra a linhagem celular A2780, apresentando valores de IC_{50} acima de 50 μM . A complexação dos ligantes ao centro de paládio eleva significativamente a atividade citotóxica. Além disso, a alteração dos grupos periféricos das tiossemicarbazonas revela um aumento considerável na citotoxicidade, cerca de dez vezes mais ao comparar o complexo [PdCl(PPh₃)(HPrEt)] (R = etil, IC_{50} = 0,74 μM) com o [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] (derivado ciclohexil, IC_{50} = 7,59 μM). Ao se trocar o metal no complexo [PdCl(PPh₃)(HPrEt)] para platina [PtCl(PPh₃)(HPrEt)] (IC_{50} = 72 μM), ocorre uma diminuição considerável na atividade. Devido a atividade promissora apresentada para os complexos de paládio nas células A2780, estes foram ainda avaliados contra A2780cis

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

(carcinoma do ovário humano resistente à cisplatina, valores na **Tabela 4**). Os experimentos utilizando a linhagem celular A2780Cis resistente à cisplatina mostraram que a atividade do complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ aumenta quando comparada com a observada em células A2780, com um valor de IC_{50} de $3,16 \pm 0,02 \mu\text{M}$. Por outro lado, o complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ perde a sua potência nas células A2780 resistentes à cisplatina, aumentando o valor de IC_{50} para $35,8 \pm 0,8 \mu\text{M}$. A partir dos resultados obtidos nas duas linhagens celulares é possível encontrar o valor do fator de resistência, calculado pela razão dos valores de IC_{50} em A2780Cis dividido pelo valor de IC_{50} na célula parental.

Os fatores de resistência dos complexos de paládio comparado à CDDP são apresentados na **Figura 48** (valores na **Tabela 4**). As barras são expressas como a razão entre os valores de IC_{50} na linha celular resistente dividida pelos valores de IC_{50} na linha celular parental. Estes resultados indicam que o complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ pode apresentar um mecanismo diferente com relação à CDDP na célula resistente, uma vez que este complexo aumenta a atividade nas células A2780Cis, com um fator de resistência igual a $0,41 \pm 0,01 \mu\text{M}$. Por outro lado, o fator de resistência do complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ foi muito elevado em comparação com o complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ e à cisplatina, devido à baixa atividade nas células A2780cis. Outro teste importante quando se investiga a atividade antiproliferativa dos candidatos a fármacos é a determinação de sua seletividade. Para este estudo, verificou-se seu comportamento dos complexos em relação à linhagem celular não cancerosa MRC-5, fibroblastos de pulmão embrionário humano (**Tabela 4**).

Tabela 4. Valores de IC_{50} para os compostos em estudo. FR: fator de resistência. FS: fator de seletividade. Nd: não determinado, CDDP: cisplatina e CARB: carboplatina.

	A2780 (μM)	A2780cis (μM)	FR	MRC5 (μM)	FS _{A2780}	FS _{A2780cis}
H₂PrEt	>50	nd	nd	nd	nd	nd
H₂PrCh	>50	nd	nd	nd	nd	nd
$[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$	$7,59 \pm 0,25$	$3,16 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,01$	>100	>13	>31,6
$[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$	$0,74 \pm 0,09$	$35,8 \pm 0,8$	48 ± 6	>100	>135	>2,8
$[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$	72 ± 2	nd	nd	nd	nd	nd
CDDP	$1,20 \pm 0,03$	$12,3 \pm 0,4$	$10,25 \pm 1,74$	$10,9 \pm 0,3$	$9,1 \pm 0,3$	0,88
CARB	$10,0 \pm 1,2$	nd	nd	nd	nd	nd

Os complexos exibem valores elevados de IC_{50} para fibroblastos humanos de MRC5, mostrando baixa citotoxicidade em células normais. Com estas informações, foi possível determinar o fator de seletividade (FS, **Tabela 4**) calculado pela razão IC_{50} de um dado

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

composto na linhagem de células de câncer e o valor de IC_{50} em células MRC5. Ambos os complexos de Pd^{II} não são tóxicos contra as células não cancerígenas resultando em altos valores de seletividade com relação às células A2780 ($FS_{A2780} > 13$ para o composto derivado de ciclohexil e $FS_{A2780} > 135$ para o composto derivado do etil), sendo mais seletivo que cisplatina ($FS = 9,1 \pm 0,3$). Considerando o cálculo do FS com relação às células A2780cis, por outro lado, observa-se um $FS_{A2780cis} > 31,6$ para o composto derivado de ciclohexil e $FS_{A2780} > 2,8$ para o composto derivado do etil. Portanto, os resultados obtidos até agora revelam o complexo $[PdCl(PPh_3)(HPrCh)]$ como um candidato promissor para contornar a resistência à cisplatina em células de câncer de ovário.

Figura 48. Fatores de resistência cruzada de CDDP em células A2780 quando tratados com complexos $[PdCl(PPh_3)(PrCh)]$ e $[PdCl(PPh_3)(PrEt)]$ durante um período de 24 h.

Frente aos resultados promissores apresentados pelos complexos de paládio, decidiu-se investigar a fundo o mecanismo de ação dos complexos. Para iniciar este estudo, os experimentos de distribuição e captação celular foram realizados com o intuito de verificar se os complexos são capazes de atravessar a membrana celular e qual organela eles estão citolocalizados. Detalhes destes experimentos se encontram no próximo tópico.

5.4 Distribuição celular e uptake em células A2780

A captação celular (*uptake*) dos complexos de paládio, em conjunto com a cisplatina e carboplatina, foi determinada em células A2780 visando fazer uma correlação com os valores de IC₅₀ apresentados nesta linhagem celular. A modificação estrutural do grupo ciclohexil pelo grupo etil mudou significativamente a captação celular. Os resultados indicam que o *uptake* para o complexo [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] é superior ao do complexo [PdCl(PPh₃)(HPrEt)], com aproximadamente 7 ng de Pd captados por 10⁶ células A2780 (**Figura 49A**). Estes dados estão de acordo com os valores esperados de captação máxima para os complexos **1** e **2**, que são de 10 ng e 1,1 ng de paládio, respectivamente. Os valores em nanogramas de paládio disponível no meio celular foram calculados a partir da concentração inicial usada no experimento de *uptake* e massa atômica do átomo de paládio. Assim, verificou-se que 70% do complexo **1** entra nas células A2780, enquanto que somente 18% do complexo **2** é capaz de atravessar a barreira celular em 24 horas. Os resultados mostraram que não há uma tendência que correlaciona a acumulação celular com as atividades antiproliferativas, uma vez que o complexo [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] é o mais lipofílico, conseqüentemente, apresenta a maior absorção, sendo menos potente quando comparado ao complexo [PdCl(PPh₃)(HPrEt)] frente às células A2780. A captação celular do complexo **1** também foi realizada por imagem de microscopia de fluorescência em linhagens celulares A2780. Foi possível observar que o complexo foi transportado para o interior das células, através da observação de uma luz verde fluorescente pouco intensa, quando o composto é excitado em 514 nm. No entanto, devido à baixa fluorescência do complexo no meio celular, as imagens não estavam claras (ver Apêndice, **Figura G1**). Muitas tentativas, como diferentes concentrações e tempo de incubação, foram testadas, sem sucesso.

O complexo **1** foi utilizado como representante para a avaliação da distribuição dos complexos de paládio. A **Figura 49B** mostra o gráfico de distribuição para o complexo **1** e abaixo a porcentagem de paládio em quatro frações celulares, citoplasma, membrana, núcleo e citoesqueleto. É notável que a maior quantidade de paládio é encontrada no citoesqueleto. No entanto, a concentração de paládio acumulado na fração nuclear é consideravelmente alta (aproximadamente 3%), uma vez que a quantidade de platina da cisplatina na porção nuclear é inferior a 1%.¹³⁴ Considerando a quantidade razoável de paládio no núcleo, decidimos realizar

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

alguns estudos de DNA, uma vez que o DNA é conhecido por ser o principal alvo da cisplatina.

Figura 49. (A) Tabela de captação celular de paládio (nanograma de metal por 10^6 células) juntamente com gráfico de correlação do uptake com os valores de IC_{50} (μM) dos complexos **1** e **2**. (B) Distribuição celular do complexo $[PdCl(PPh_3)(HPrCh)]$ nas células de ovário A2780. A concentração usada foi a mesma do IC_{50} . O tempo de pré-incubação em meio livre de fármaco foi de 24 h e o tempo de exposição ao fármaco foi de 24 h.

5.5 Interação com o DNA

5.4.1 Titulação de desnaturação do DNA

O DNA é um alvo bem conhecido de muitos fármacos que estão atualmente em uso clínico ou em ensaios clínicos avançados.¹³⁵ Para compreender o efeito dos complexos nas linhas celulares de câncer alguns estudos de interação com o DNA foram realizados. Desta forma, a desnaturação térmica de DNA-CT foi realizada utilizando os complexos de paládio em estudo. Devido à baixa solubilidade dos complexos em soluções tampão, as amostras utilizadas nas medições continham 5% de DMSO. Os resultados obtidos estão resumidos na **Figura 50**. Os dois complexos não afetaram efetivamente a estabilidade térmica do DNA devido a uma alteração mínima (diminuição) na temperatura de fusão com a incubação dos

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

complexos durante 24 horas. Além disso, essas diferenças estão próximas dos limites de detecção do instrumento, como evidenciado pelas barras de erro.

Figura 50. Comparação da temperatura de desnaturação T_m (K) do DNA-CT para os complexos $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ e $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ quando incubados com o DNA por 24 horas.

5.4.2 Dicroísmo linear

Com o objetivo de encontrar algum tipo de interação do DNA, decidimos estudar o dicroísmo linear (DL) do DNA na presença dos complexos metálicos em estudo. Esta técnica é muito informativa uma vez que as moléculas pequenas se ligam ao DNA, tornam-se alinhada e pode dar origem a novos sinais de DL.¹³⁶ A titulação DL do DNA com o complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ e a curva de titulação resultante é mostrada na **Figura 51**. As varreduras de dicroísmo foram executadas de 200 nm a 450 nm com 3 acumulações. Não foram observados picos de DL adicionais na parte visível do espectro. Na faixa do UV, o aparecimento de sinais fracos foi observado em altas concentrações de compostos, mas estes são basicamente obscurecidos pelos fortes sinais de DNA nessas regiões. A presença de novos sinais de DL demonstra que o composto se liga ao DNA por intercalação, neste caso, aumentando a estabilidade do DNA. Por outro lado, um modo de ligação não específico, como interações eletrostáticas, não resultaria num alinhamento.¹³⁷ Uma vez que os complexos de paládio contêm a unidade pireno nas suas estruturas, era esperado que os complexos pudessem aumentar os sinais do DL a 260 nm, uma vez que, para intercalação, geralmente

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

somente sinais negativos seriam esperados.¹³⁷ Os resultados das titulações deste experimento mostraram um pequeno aumento no sinal de DL apenas para as duas primeiras concentrações usadas, mais especificamente quando 10 e 20 μM de complexo foi adicionado. De 30 μM a 100 μM observou-se apenas uma ligeira diminuição no sinal DL, o que é um indicativo de dobra ou agregação ao ligar as cadeias de DNA.¹³⁷ Este fenômeno resulta em uma menor linearidade do DNA, causando uma diminuição ou mesmo a perda completa de sinal negativo em 260 nm. No entanto, as discretas alterações observadas nos espectros DL em comparação com o espectro na ausência de complexo (0 μM , linha preta) podem ser consideradas inconclusivas.

Figura 51. Espectros de dicroísmo linear (DL) de DNA (100 μM) com concentração crescente do complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$.

5.4.3 Eletroforese de DNA em gel

Devido à possível interação dos complexos com o DNA devido ao grupamento pireno, decidiu-se realizar também o estudo de interação dos complexos frente ao DNA plasmidial. O DNA plasmidial utilizado nos testes pode apresentar três conformações distintas em gel de agarose. A primeira conformação, F I, é a forma superenovelada do DNA plasmidial, altamente tensionada. Quando a F I sofre uma quebra simples (em apenas uma das fitas), esta quebra resulta em um afrouxamento da estrutura superenovelada e, conseqüentemente, o DNA plasmidial assume a forma circular aberta, conhecida como forma F II. Se houver uma segunda quebra na fita oposta, próxima à primeira quebra, há a formação de uma quebra dupla e o DNA plasmidial fica na sua forma linear, forma F III. A intercalação do composto com

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

DNA plasmidial é capaz de clivar a forma superenrolada, isto significa menos mobilidade, que pode ser facilmente visualizada por eletroforese em gel. Por outro lado, se ocorrer uma interação eletrostática do composto com DNA, não ocorrerá mudança significativa na forma superenovelada.¹³⁸

Nos experimentos de controle, no qual o complexo estava ausente (primeira linha) ou apenas DNA-DMSO (segunda linha) incubadas, a quebra do DNA não foi observada. Os estudos de interação do DNA foram realizados para o complexo de paládio [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] em diferentes concentrações (**Figura 52**). É possível observar que em baixas concentrações o complexo não apresenta uma forte interação com o DNA plasmidial. A eletroforese em gel realizada para o complexo [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] revelou uma forte interação em uma concentração elevada (300 µM), o qual é confirmado pela diminuição da quantidade da forma III. Deste modo, o complexo [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] é capaz de interagir com o DNA, mas apenas em concentrações elevadas.

Os resultados obtidos para os complexos de platina (ver Apêndice, **Figura II**) mostraram um comportamento similar comparado aos dados observados para os de paládio, sendo os de platina intercaladores mais fortes. O forte indício de mecanismo por intercalação é devido à perturbação observada na forma F I do DNA, a qual praticamente desaparece da imagem na concentração de 300 µM.

Figura 52. O brometo de etídio em gel de agarose corado (0,5 g / ml) de pBlue Script KSII (+) DNA plasmidial (0,25 ug / uL) na presença de uma maior concentração dos complexos após 30 min de incubação a 37 ° C: Linha 1, controle: DNA plasmidial; Linha 2, controle: DNA plasmidial + DMSO, Linhas 3-10, DNA plasmídial + complexo **1** à 1 a 0,75, 1,5, 3, 6, 12,5, 25, 50, 100, 200 e 300 µM. FI: DNA superenovelado, FII: circular aberta, FIII: DNA linear;

5.4.4 Ciclo celular

Os complexos de paládio $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ e $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ foram incubados em células de cancer de ovário A2780 para estudar seus efeitos sobre o ciclo celular (Ver esquema de ciclo celular na **Figura 2**, página 25). Para este experimento, as células foram coradas utilizando IP (**Figura 53**) como uma sonda fluorescente que interage com o DNA através da intercalação.¹³⁹ A fluorescência emitida pelo IP é aumentada (20-30 vezes) quando está ligado a ácidos nucleicos, permitindo a quantificação de DNA. Como IP é impermeável à membrana, é necessário fixar as células com etanol frio antes da coloração, este tratamento garante que o corante entre nos compartimentos intracelulares. Além disso, o IP pode também interagir com RNA, o que poderia causar falsas leituras de DNA. Para evitar tais problemas, as células também foram tratadas com RNA.

Figura 53. Estrutura do iodeto de propídio (IP).

Os dados obtidos por citometria de fluxo foram analisados usando o software Flowjo. Para todos os experimentos, os dados foram plotados usando um diagrama de dispersão de versus os histogramas para o canal FL2-H (IP é usado para ler a fluorescência). Como exemplo, na **Figura 54** são mostrados os histogramas de células não tratadas e células tratadas com a cisplatina.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 54. Histogramas FL2-H obtidos por citometria de fluxo para análise do ciclo celular (A) Controle de células não tratadas; (B) células tratadas com 0,4 μM de cisplatina. Para todos os experimentos, o tempo de exposição ao fármaco foi de 24 h. As células foram tratadas com RNA e coradas utilizando IP; (C) Tabela contendo aos dados do ciclo celular da cisplatina em três concentrações diferentes.

Para entender o efeito dos complexos de paládio na progressão do ciclo e no crescimento celular, experimentos de ciclo celular, na presença dos complexos **1** e **2**, foram realizados. Os histogramas do ciclo celular são mostrados na **Figura 55**. Apesar da semelhança estrutural dos complexos $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ e $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$, os resultados do ciclo celular indicaram diferentes fases de inibição. No experimento de controle, as fases G₂/M e S representam 7,86 % e 18,59 %, respectivamente, da atividade celular, mas no tratamento com os complexos **1** e **2** (células tratadas utilizando concentrações de IC₅₀) o ciclo celular foi parado mais na fase G₂/M para o complexo **1** e mais na fase S para o complexo **2**. A população em fase G₂/M aumenta após 24 h de exposição ao complexo **1** (7,86 a 29,88 %), juntamente com um ligeiro aumento da população na fase S (de 18,59% para 23,51%). Por outro lado, o complexo **2** causa uma maior acumulação na fase S, com um aumento de 18,59% para 38,17%. Estes resultados mostram que o complexo **2** induziu danos ao DNA e bloqueia as células na síntese de DNA que, consequentemente, induz a detenção (arrest) da fase S. Está bem estabelecido que a citotoxicidade da camptotecina está relacionada com um mecanismo de colisão entre os garfos de replicação e o complexo clivável da Top I, o que também leva a uma maior acumulação na fase S do ciclo celular.¹⁰⁴

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Esta colisão é consistente com a noção geralmente aceita de que a lesão do DNA leva à uma interferência na fase S causando a detenção do ciclo celular na fase G₂. Logo, quando o reparo de danos é difícil ou incompleto, as células sofrem apoptose.¹⁴⁰ Uma inibição similar do ciclo celular na fase G₂/M foi recentemente observada para complexos de rutênio contendo tiosemicarbazona.⁸⁴ Os detalhes do ensaio do ciclo celular para os complexos de paládio são apresentados na **Figura 55**.

Ao compararmos os resultados obtidos nos histogramas para os complexos **1** e **2** com o histograma da cisplatina (**Figura 54**), nota-se claramente que a CDDP causa acumulação do ciclo celular na fase S, devido à ligação covalente com o DNA. A população nesta fase aumenta após 24 h de exposição ao fármaco de platina (de $21,0 \pm 0,6\%$ para o controle versus $25,2 \pm 0,6\%$), juntamente com uma redução significativa da população na fase G₁ (de $59,9 \pm 0,9\%$ para $47,2 \pm 0,2\%$). Por outro lado, os complexos de paládio causam um maior aumento de população nas fases S (complexo **1**) e G₂/M (complexo **2**). As diferenças causadas nas fases do ciclo celular podem ser um forte indicativo de um mecanismo de ação diferente por parte dos complexos de paládio, especialmente para o complexo **1**, que apresenta uma maior população da fase G₂ comparado à cisplatina.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 55. **A)** Histogramas obtido por citometria de fluxo para análise do ciclo celular de células sem os compostos (gráfico em vermelho); células tratadas usando 7,5 μM do complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ (**1**); células tratadas usando 0,7 μM do complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ (**2**); **B)** Representação gráfica das fases para os complexos **1** e **2**. Para todos os experimentos, o tempo de exposição ao composto foi de 24h, as células foram tratadas com RNA e coradas utilizando IP.

5.5 Topoisomerase

5.5.1 Testes de inibição com a enzima Topoisomerase IB

Diante do fato que as células cancerígenas são caracterizadas por altos níveis de enzimas topoisomerase quando comparado à células normais, durante todos os estágios do ciclo celular, esta enzima se torna um importante alvo dos agentes terapêuticos. Um dos mecanismos de ação dessa classe de ligantes é a sua capacidade de inibir a enzima topoisomerase.⁹⁷ Sob condições fisiológicas, os processos de replicação, reparação e transcrição do DNA são significativamente controlados pelo Top IB. Deste modo, a atividade de inibição dos ligantes livres, complexo **1**, **3** e **4**, foi avaliada frente à Top IB.

Na **Figura 56** são apresentados os três pontos de controle usados no teste de inibição da TopIB. Nas duas primeiras colunas observa-se primeiramente o DNA livre, o qual possui a forma super-enovelada sem perturbação, enquanto a outra é relativa ao DNA com 300 μM do

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

composto em estudo. A terceira coluna contém DMSO juntamente com a enzima TopIB. Esta coluna é considerada como um controle, pois é possível verificar o DNA relaxado (ponto cheio de bandas) e a topoisomerase IB exercendo sua função. A partir do quarto ponto, o efeito da atividade da enzima é avaliado adicionando-se concentrações crescentes dos compostos desejados. Como a TopIB possui a função de relaxar o DNA, se ela for inibida, o DNA deixará de relaxar e, conseqüentemente, as bandas desaparecerão. Portanto, quando a concentração do composto é aumentada se for observada uma diminuição das bandas referente ao relaxamento do DNA, isso demonstrará que o composto possui atividade de inibição da topoisomerase IB.

Figura 56. - Imagem ilustrativa das três primeiras colunas usadas como controle para o teste de inibição da TopIB.

Os dois ligantes livres H₂PrEt e H₂PrCh não apresentaram atividade inibitória diante da enzima Topo IB mesmo em altas concentrações, uma vez que é possível observar o DNA relaxado em todas as concentrações testadas (**Figura 57**).

Figura 57. Ensaio de relaxamento do DNA pela Top IB com concentrações crescentes para os ligantes H₂PrEt e H₂PrCh.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Por outro lado, os complexos que tiveram a sua atividade de inibição investigada apresentaram resultados bastante significativos. Os quatro complexos avaliados mostraram capacidade de inibição da Top IB, como mostrado para o complexo de paládio estudado $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ (**Figura 58**). O complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ inicia a sua atividade de inibição na concentração de $0,75 \mu\text{M}$ e a inibição total ocorreu em aproximadamente $12,5 \mu\text{M}$. Além disso, em concentrações maiores, o complexo apresenta uma forte interação com DNA.

Figura 58. Ensaio de relaxamento do DNA pela Top IB na presença de concentrações crescentes dos complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$.

Os resultados de inibição obtidos para os complexos de platina $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ e $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ (**Figura 59**) revelaram dois potenciais inibidores da TopIB. O complexo $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ apresentou uma forte interação com o DNA devido ao desaparecimento da banda superenovelada na concentração de $300 \mu\text{M}$, como destacado na **Figura H1** (Apêndice). Este fato dificultou a interpretação dos resultados, pois não se sabe se o complexo inibiu totalmente a enzima ou se a interação com DNA perturbou o funcionamento da enzima, fazendo com que ela parasse de relaxar o DNA. Já o complexo $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ inibiu totalmente a atividade da Top IB na concentração de $100 \mu\text{M}$. No entanto, os complexos de platina não apresentaram atividade citotóxica efetiva ($\text{IC}_{50} > 25$).

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 59. Ensaio de relaxamento do DNA pela TopIB com concentrações crescentes dos complexos $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ e $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$.

A inibição da atividade da Top IB também foi estudada com relação ao tempo. Este tipo de teste é interessante, pois avalia se a inibição da enzima é reversível e se a capacidade inibitória aumenta com a pré-incubação. Para a realização deste experimento, utilizou-se uma concentração pré-definida (concentração que o composto apresenta pouca inibição da Top IB). Pode-se notar quatro reações diferentes: a primeira foi realizada na ausência do composto, utilizando o DMSO como controle. A segunda foi na presença do composto sem a pré-incubação. A terceira foi realizada utilizando uma pré-incubação de 5 minutos da Top IB com o composto na ausência do DNA e a quarta reação utilizou-se uma pré-incubação de 5 minutos do composto com o DNA com a ausência da enzima, sendo esta última adicionada posteriormente.

Para o complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ (**1**) (**Figura 60**), foram utilizadas concentrações de 1,5 μM e 0,75 μM, respectivamente. A partir dessa solução foram retiradas alíquotas em tempos de 1, 7,5, 15 e 30 minutos. Quando o complexo **1** foi incubado na presença da enzima foi possível notar que a atividade de inibição máxima foi no tempo de 1 minuto. Pode-se dizer ainda que o complexo **1** se liga de forma irreversível à enzima quando pré-incubado com a mesma. Essa afirmação é condizente com o não aparecimento das bandas de atividade da enzima nos tempos de 7,5, 15 e 30 minutos. Já na última reação, quando o complexo foi incubado com o DNA por 5 minutos antes da adição da enzima, não ocorreram mudanças significativas na inibição.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 60. Teste de inibição da Top IB dos complexos de paládio em função do tempo de incubação e da concentração, com e sem pré-incubação.

O teste de inibição da TopIB com relação ao tempo também foi realizado para os complexos de platina. Neste contexto, utilizou-se a concentração de 1,5 μM para o complexo [PtCl(PPh₃)(HPrEt)] e de 0,75 μM para o complexo [PtCl(PPh₃)(HPrCh)]. Os resultados obtidos, semelhantes aos observados para os complexos de paládio, mostraram maior atividade de inibição com a pré-incubação e a melhora na atividade foi mais significativa no tempo de 1 minuto (**Figura 61**).

A partir dos testes de pré-incubação, observamos que a capacidade inibitória dos complexos diminui com o aumento do tempo. Por isso, pode-se considerar que nos tempos de 7,5, 15 e 30 minutos ocorreu uma inibição parcial da Top IB, sugerindo que a inibição da enzima pode ser considerada reversível. No entanto, este resultado não é negativo, visto que nos demais tempos a atividade inibitória ainda é visualizada pelo desaparecimento das bandas.

Logo, os resultados apresentados para os ligantes livres e para os precursores metálicos avaliados (**Apêndice G, Figura I1 e I2**) demonstram que a coordenação aos centros metálicos de Pd^{II} e Pt^{II} gera um considerável impacto nos resultados de inibição da enzima Top IB e indicam uma forte interação com o DNA quando pré-incubado com a enzima.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 61. Teste de inibição da Top IB dos complexos de platina em função do tempo de incubação e da concentração, com e sem pré-incubação para **A**) $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ e **B**) $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$.

5.5.2 Estudos de cinética

Um estudo de cinética de clivagem e religação foi realizado para o complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$. Este teste fornece a informação do local exato de inibição da enzima Top IB (ver o ciclo da Top 21). A **Figura 62** mostra o experimento de cinética de clivagem onde é possível observar que o composto não inibe a clivagem uma vez que a porcentagem de DNA clivado é igual tanto no DMSO quanto na presença de 25 μM do complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$. Por outro lado, a **Figura 63** representa o experimento de cinética de religação do $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ na mesma concentração. A partir dos resultados, fica nítido que o complexo inibe a etapa de religação do DNA, uma vez que a proporção de DNA religado é menor na presença do complexo quando este é comparado com o DMSO. O estudo de quantificação desta inibição será realizado futuramente.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 62. (A) O substrato CL14 / CP25 utilizado para medir a cinética da clivagem da Top IB, com a clivagem preferida indicada pela seta. (B) Análise em gel da cinética de clivagem do substrato na presença de DMSO e de 25 μ M do complexo [PdCl(PPh₃)(HPrCh)].

Figura 63. (A) O substrato CL14 / CP25 e o oligonucleotídeo R11 complementar utilizado para medir a cinética da religação da TopIB. (B) Análise em gel da cinética de religação do substrato na presença de DMSO e de 25 μ M do complexo [PdCl(PPh₃)(HPrCh)].

Através dos resultados de cinética obtidos pode-se inferir que o complexo [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] inibi o processo de religação da Top IB, mesmo mecanismo de ação dos fármacos topotecano e irinotecan.¹⁰⁸ Os resultados biológicos *in vitro* mostraram citotoxicidade relevante para os complexos de paládio contra as linhas celulares de resistência A2780 e também A2780cis. O estudo de células não cancerosas levou à identificação de um complexo altamente seletivo para as linhagens celulares de câncer do ovário, [PdCl(PPh₃)(HPrCh)]. Estudos do ciclo celular em células de ovário A2780 mostraram que os complexos [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] e [PdCl(PPh₃)(HPrEt)] exibem citotoxicidade causando a acumulação das fases G₂/M e S.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Além disso, o estudo de mecanismo de ação dos complexos mostrou que a TopIB é um dos alvos do complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$. Desvantagens clínicas dos fármacos de platina, como a resistência, faz dos complexos de paládio potentes candidatos à quimioterapia. A atividade dos complexos de paládio em células de câncer de ovário resistente à cisplatina faz com estes complexos sejam uma alternativa interessante para serem utilizados como agentes antitumorais, uma vez que a resistência é um dos principais desafios a serem superados na quimioterapia. Assim, os complexos aqui estudados podem ser considerados candidatos promissores para a terapia do câncer.

6.0 Complexos polinucleares

6.1 Síntese e caracterização

Utilizando-se os ligantes H_2PrR descritos anteriormente, foi possível obter complexos organometálicos tetranucleares de paládio e platina. Dois métodos foram utilizados para preparar os tetrâmeros de paládio. No método A, descrito na seção experimental, isolou-se uma espécie dimérica, como intermediário. Nos complexos diméricos de paládio isolados, os ligantes clorido atuam em ponte entre dois centros metálicos, enquanto que o ligante tiossemicarbazonato se coordena em modo monoaniônico e bidentado, via átomos de nitrogênio e enxofre. As reações para obtenção dos dinucleares de paládio foram realizadas partindo-se do precursor metálico $[PdCl_2(MeCN)_2]$ com a adição de um equivalente do ligante desejado em acetonitrila (**Esquema 4**). Síntese pelo método B discutida a diante.

Esquema 4. Síntese dos complexos dinucleares de paládio.

Uma vez que os complexos diméricos de paládio puderam ser isolados, os mesmos também foram caracterizados. Os espectros de IV das espécies diméricas, $[Pd_2(\mu-Cl)_2(HPrEt)_2]$ (**Figura 64**) e $[Pd_2(\mu-Cl)_2(HPrCh)_2]$ (Apêndice, **Figura A4** e **A5**) apresentam absorções nos números de onda 326 e 335 cm^{-1} , respectivamente, atribuídas ao estiramento $\nu(Pd-Cl)$ (**Figura 65**). Essas bandas estão de acordo com compostos de paládio contendo halogênio em ponte encontrados na literatura.¹⁴¹ Os espectros de infravermelhos dos complexos $[Pd_2(\mu-Cl)_2(HPrEt)_2]$ e $[Pd_2(\mu-Cl)_2(HPrCh)_2]$ são bastante similares.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 64. Espectro de absorção na região do infravermelho para o $[\text{Pd}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{HPrEt})_2]$ até 200 cm^{-1} em pastilha de CsI.

Figura 65. Espectro de absorção na região do infravermelho para o $[\text{Pd}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{HPrEt})_2]$ até 200 cm^{-1} em pastilha de CsI.

A confirmação do complexo dimérico se deu a partir do espectro de massas do $[\text{Pd}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{HPrEt})_2]$ (**Figura 66**). O espectro, realizado em modo de detecção positivo, apresenta o pico referente ao íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 942,96 em acordo com a sua distribuição isotópica (simulado $m/z = 942,97$).

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 66. - Espectros de massa ESI(+) do complexo $[\text{Pd}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{HPrEt})_2]$ (acima) e o seu espectro simulado (abaixo).

Os dinucleares de paládio apresentam baixa solubilidade em praticamente todos os solventes orgânicos, exceto DMSO. Entretanto, os compostos dinucleares reagem com o solvente coordenante DMSO, o qual é capaz de clivar a ligação Pd–Cl e se ligar a centro metálico. Este fato foi verificado ao se dissolver uma pequena quantidade do composto em DMSO. Após alguns dias, observou-se a formação de um precipitado. Este sólido foi filtrado e analisado. Ao se realizar o espectro de infravermelho (**Apêndice A, Figura A6**), notou-se a presença de uma banda em 1097 cm^{-1} relativa ao estiramento $\nu(\text{S}=\text{O})$ referente à coordenação do dimetilsulfóxido. Esta banda está condizente com coordenação via átomo de enxofre do DMSO.

Como observado na literatura e já mencionado acima, os dinucleares com clorido em ponte, são intermediários para a obtenção dos complexos tetraméricos.⁸⁹ Baseado neste fato, observa-se que as tiossemicarbazonas preparadas neste trabalho são adequadas para formação de complexos ortometalados de Pd e Pt. O modo mais comum de coordenação das

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

tiossemicarbazonas estudadas geralmente é através dos átomos de nitrogênio azometino e de enxofre. O princípio das reações de metalação em sistemas aromáticos baseia-se na desprotonação orientada em posição *orto* ao grupo imina. Logo, a orientação do grupo pireno adjacente ao nitrogênio azometino parece ser apropriada para reações de *orto* metalação.

As reações para obtenção dos tetrâmeros de paládio e de platina foram realizadas a partir dos dímeros, isolados (no caso do paládio) ou formados *in situ* (no caso da platina). Particularmente, as reações para os tetranucleares de paládio podem ser realizadas tanto isolando o dímero ou o gerando *in situ* com posterior adição de base. Neste método (B), foi possível os tetranucleares de paládio em maiores rendimentos (**Esquema 5**).

Esquema 5. Síntese dos tetrâmeros de paládio.

Diferentemente dos tetrâmeros de paládio, para obtenção dos tetranucleares de platina o intermediário dinuclear é gerado *in situ*, não sendo passível de se isolar devido à formação de mistura dos compostos dinucleares e tetranucleares. Por isso, para a obtenção dos complexos tetraméricos de platina, diferentes rotas sintéticas foram testadas. A primeira delas está mostrada no **Esquema 6, Método A**, na qual foi utilizado o precursor metálico de platina $[\text{PtCl}_2(\text{COD})]$. À princípio, acreditou-se que havia se formado o tetranuclear de platina. No entanto, ao utilizar as técnicas de infravermelho e RMN de ^1H , houve uma indicação de que o ligante ciclooctadieno permaneceu na estrutura formando uma ponte entre os átomos de platina (ver **Método A**), fato já verificado em trabalho do nosso grupo.¹⁴² Diante destes fatos, verificou-se que a síntese utilizada no método A pode fornecer mistura de produtos. Portanto, decidiu-se modificar a rota sintética em busca de se obter o tetranuclear puro, sem a formação de coprodutos. Para isso, o próximo passo foi modificar o precursor metálico, como mostrado no **Método B (Esquema 6)**. No entanto, a reação entre o precursor $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ e os ligantes

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

H₂PrR, em mistura de H₂O e EtOH, também forneceu mistura de produtos, devido à presença dos solventes coordenantes H₂O e/ou EtOH. Em virtude do que foi mencionado, verificou-se que era necessário se trocar o solvente utilizado na reação. Com base nisso, a rota sintética mais eficaz testada para obtenção dos tetranúcleares é a mostrada no **Método C**.

Neste método, os tetranúcleares são obtidos a partir do dímero que é gerado *in situ*. Após algumas horas de reação, é observada a mudança de coloração do sólido que passa de alaranjado (dímero) para vermelho (tetranúcleo). Para garantir a formação de um único produto, 0,5 mL de trietilamina foi adicionada. A trietilamina usada como base suporte foi utilizada para desprotonar o carbono *orto* posicionado ao grupo imina, ocorrendo assim a ortometalação. Em consequência desta desprotonação e da saída do ligante clorido, a quarta posição de coordenação é ativada e passa a ser ocupada por um átomo de enxofre de um monômero vizinho.

Esquema 6. Possíveis coprodutos formados nas rotas sintéticas descritas para obtenção dos tetranúcleares de platina.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

No espectro de absorção na região do infravermelho para o composto $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ (**Figura 67**), pode-se observar o desaparecimento da banda em 3134 cm^{-1} referente ao estiramento $\nu(\text{N-H})$ presente no ligante livre. Esta banda desaparece, pois ao se coordenar ao metal de forma monoaniônica, o H_2PrCh sofre deprotonação. Logo, observa-se assim a presença de somente uma banda relativa ao estiramento $\nu(\text{N-H})$, em 3392 cm^{-1} , a qual sofre um deslocamento para maior número de onda após a complexação. A banda $\nu(\text{C=N})$ sofre um deslocamento batocrômico com relação ao ligante livre após a complexação, aproximadamente 30 cm^{-1} , devido a coordenação via nitrogênio azometino. A banda indicativa do estiramento $\nu(\text{C=S})$, observada em torno de 844 cm^{-1} no ligante livre, também sofre deslocamento após a coordenação, surgindo em torno de 820 cm^{-1} , condizente com a complexação do mesmo via átomo de enxofre. Os espectros de infravermelho para os demais complexos tetranucleares podem ser encontrados no apêndice (**Figura A7, A8 e A9**).

Figura 67. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) do composto $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ (**6**) realizado em pastilhas de KBr.

Os espectros de absorção na região do UV-Visível para os tetrâmeros de paládio $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrR-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$, realizados em diclorometano, são bastante similares, apresentando máximos de absorção em 495 nm , 439 nm , 353 nm e 280 nm . As três primeiras absorções observadas são atribuídas à uma combinação de bandas de transferência de carga do ligante para o centro metálico LMCT, as quais possuem valores de absortividade molar (ϵ) iguais a 2857 , 15357 e $17232\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. Bandas de transferência de carga são de grande intensidade e normalmente encobrem as bandas de transição $d-d$. Por este motivo, estas de transições não foram observadas para os complexos em estudo. A banda mais

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

energética, em 280 nm, é atribuída a uma transição intraligante $\pi \rightarrow \pi^*$, com absortividade molar de $26071 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os espectros dos complexos tetranucleares de platina $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrR-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ também são bastante semelhantes entre si, apresentando, em geral, máximos de absorção na faixa de 465–287 nm (ver **Apêndice C**).

As propriedades luminescentes dos complexos foram medidas em soluções de DMSO à temperatura ambiente, uma vez que apenas bandas de emissões muito fracas foram observadas em diclorometano. Ao se comparar os resultados obtidos entre os tipos de complexos apresentados neste trabalho, observa-se que os tetranucleares foram os que apresentaram maior fluorescência, em especial o $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ (**Figura 68**), o qual apresentou emissão comparável à do ligante livre, com uma banda de alta intensidade em 550 nm. De forma geral, a emissão máxima para os complexos é deslocada cerca de 270 nm para o azul, quando comparado a seus espectros de absorção. Os complexos de paládio mostraram emissão no verde em torno de 500 nm, enquanto os de platina apresentaram duas bandas de emissão com máximos próximos de 450 nm. Com base nesses grandes deslocamentos de Stokes, essas emissões são indicativas de fosforescência.¹⁴³ O grande acoplamento orbital de rotação, causado pelos centros de paládio e platina, geram um eficiente efeito de acoplamento spin-órbita, que é um pré-requisito para propriedades fosforescentes desses complexos organometálicos.⁸⁸ Além disso, supõe-se que a presença de um grupo fluoróforo aumente as propriedades de luminescência do complexo.¹⁴⁴ Após uma comparação das propriedades de emissão dos complexos, verifica-se que a energia de emissão não é influenciada pelos grupos R dos ligantes de tiossemicarbazonato, uma vez que ambos os grupos etil e ciclohexil possuem características doadoras de elétrons.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 68. A) Espectro de absorção na região do UV-Visível e B) Espectro de emissão de fluorescência do complexo $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$, com concentração igual a $2,3 \times 10^{-5}$ e $\lambda_{\text{exc}} = 515$ nm.

A **Figura 69** apresenta o espectro de RMN de ^1H do complexo **7**, realizado em solução de CDCl_3 , como exemplo para os demais. Este espectro mostra dois conjuntos de sinais, sugerindo que o complexo tetranuclear possui duas unidades de monômeros em ambientes químicos diferentes. O espectro de ^1H -RMN mostra dois conjuntos de picos na região de aromáticos das quatro unidades de pireno e dois conjuntos de hidrogênios alifáticos relativo ao grupo etil do ligante tiosemicarbazona. O espectro de RMN ^1H do complexo **8** se encontra no apêndice (**Figura B6**).

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 69. Espectro de ^1H -RMN do complexo $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ (**7**) em solução de CDCl_3 (δ em ppm).

Com o objetivo de se verificar a pureza dos complexos de platina, a espectroscopia de RMN de ^{195}Pt foi realizada para os dois tetranucleares de platina, uma vez que cada espécie deve apresentar apenas um sinal característico.¹⁴⁵ Todos os espectros de Pt foram referenciados com $\text{K}_2[\text{PtCl}_4] = -1628$ ppm. Os espectros de ^{195}Pt dos complexos **7** e **8** realizados à temperatura ambiente em CDCl_3 e CD_2Cl_2 , respectivamente, mostraram dois sinais alargados em $-3801,88$ e $-3815,21$ ppm para **7** e em $-4053,34$ e $-4080,67$ ppm para **8**. A observação de dois sinais é condizente com a obtenção de complexos tetraméricos que possuem dois monômeros equivalentes (**Figura 70**). Os deslocamentos químicos para os complexos quadráticos planos de Pt^{II} estão de acordo com uma esfera de coordenação PtCNS_2 ($\delta(^{195}\text{Pt})$ -4000 a -3000 ppm), o que está consistente com a literatura.¹⁴⁶

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 70. ^{195}Pt RMN dos complexos **A**) $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]\text{e}$ **B**) $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ em soluções de CDCl_3 e CD_2Cl_2 , respectivamente.

Os quatro complexos de metalociclos foram analisados por espectrometria de massas com ionização por nanospray (nESI), após dissolução dos sólidos microcristalinos dos complexos numa mistura DCM / MeOH (25% / 75%) + ácido fórmico a 0,3%. Tentativas foram feitas sem o ácido, mas as amostras não ionizaram bem (não houve observação de picos). Ambos os complexos **5** (**Figura 71**) e **6** (**Figura D3, Apêndice**) mostraram um pico protonado significativo em m/z 1743,01 e 1959,19 respectivamente, correspondentes ao $[\text{M}+\text{H}]^+$, que são consistentes com os picos dos íons moleculares propostos aos complexos tetranucleares de paládio. Por outro lado, o sistema solvente + ácido não funcionou bem com os complexos tetranucleares de platina. Foi possível observar os picos protonados para os complexos **7** e **8** (**Figura D4**) em m/z 2098,76 e 2313,43 respectivamente, de acordo com a formação dos tetrâmeros de platina, no entanto, outras espécies foram geradas.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 71. Espectro de massas nESI(+) do complexo $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$.

Cristais adequados obtidos por evaporação lenta de uma solução do complexo $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ foram estudados por difração de raios X e confirmaram os resultados até então obtidos. A estrutura da molécula está ilustrada na **Figura 72** e as distâncias de ligação selecionados estão resumidos na **Tabela 5**. A estrutura obtida por difração de raios X mostra a formação de compostos do tipo $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$, onde o ligante tiossemicarbazonato se coordena em modo *C,N,S*-tridentado dianiônico, formando dois anéis quelatos com o centro metálico de platina e constituem um dos monômeros. Os quatro monômeros ortometalados são mantidos unidos por pontes formadas com o segundo par de elétrons do átomo de enxofre, formando um anel central de oito membros alternados por átomos de platina e enxofre. Deste modo, cada centro de platina possui uma esfera de coordenação composta pelos átomos doadores do ligante tiossemicarbazona, um nitrogênio imina, um átomo de enxofre e um carbono *orto* do anel benzil ligado ao grupo imina e a quarta posição é ocupada por um átomo de enxofre de um ligante vizinho, resultando num modo tetradentado *CNSS*, sendo um ligante coordenado de forma tridentada (*CNS*) e outro em modo monoaniônico pelo átomo de enxofre.

Na estrutura do ligante livre H_2PrEt , observa-se um carácter de ligação dupla para a ligação $\text{C}=\text{S}$ (1,685(3) Å), enquanto que no complexo **8** o valor desta distância é de cerca de 1,820(14) Å. A ligação do átomo de enxofre do ligante dianiônico a dois centros de platina juntamente com a deprotonação do nitrogênio imínico faz com que ocorra um

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

enfraquecimento da ligação CS e consequente aumento no comprimento desta ligação, que apresenta valores de distâncias em torno de 1,800 Å para o tetranuclear de platina. As distâncias de ligação Pt-N de ~ 2,00 Å e Pt-C de ~ 2,03 Å no ortometalado de cinco membros são idênticas às encontradas em outros complexos semelhantes.¹⁴⁷ A influência *trans* do carbono metalado pode ser refletida no alongamento da distância Pt-S *trans* à este átomo de carbono, denominado Pt-S_{quelante} (na faixa de 2,35 Å), em relação à distância Pt-S *trans* para o nitrogênio imina, Pt-S_{ponte} (~ 2,03 Å). Esse fato também foi observado para outros complexos polinucleares com ligantes semelhantes.¹⁴⁸ Portanto, as duas ligações Pt-enxofre distintas, Pt-S_{quelante} e Pt-S_{ponte}, mostram que a ponte de enxofre é relativamente forte. A força da ligação Pt-S_{ponte} também foi confirmada pelo tratamento dos compostos tetranucleares com solventes coordenantes como DMSO, DMF e acetonitrila que não leva à abertura do anel Pt₄S₄ de oito membros da estrutura tetranuclear nem à clivagem do anel quelato, mostrando a estabilidade desses complexos. No entanto, trabalhos na literatura descreveram a clivagem da ligação M-S (M = Pt ou Pd) na reação de complexos tetranucleares TSC ortometalados após adição ligantes fosfínicos.¹⁴⁹ Os dois anéis quelatos de 5 membros formados são coplanares, sendo esta planaridade estendida até o de pireno. Além disso, é possível observar que a ligação entre os íons de platina e os átomos de enxofre em ponte forma uma cavidade no centro da estrutura (**Figura 73**). O núcleo Pt₄S₄ consiste num anel de oito membros de átomos Pt e S alternados numa conformação de barco. O tamanho desta cavidade pode ser medido pela distância entre dois centros de platina de monômeros paralelos. Neste caso, verificou-se que a distância Pt-Pt é de cerca de 3,37 Å. Outros dados de comprimento de ligação podem ser encontrados na **Tabela 7**. Este valor de ligação indica que pode haver uma interação fraca entre os centros de platina equivalentes Pt1, Pt2 e Pt3, Pt4. Esta observação está de acordo com os valores relatados para complexos tetranucleares com núcleo Pt₄ (entre 2,537(1)-3,507(1) Å).¹⁵⁰ A geometria em torno do íon metálico é quadrática planar distorcida, de acordo com os ângulos de ligação C115-Pt1-S120 [166,2(4)°], C315-Pt3-S320 [164,4(4)°], C215-Pt2-S220 [164,8(4)°], C415-Pt4-S420 [164,0(4)°]. Mais detalhes sobre os ângulos de ligação podem ser encontrados na **Tabela 6**. Além disso, os dois sinais observados nos estudos de ¹⁹⁵Pt RMN estão de acordo com a estrutura de raios X, que mostra os átomos de platina são dispostos dois a dois.

A estrutura cristalina é estabilizada por ligações de hidrogênio intermoleculares envolvendo os grupos NH com moléculas de solvente presentes na estrutura cristalina. As

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

distâncias e os ângulos relacionados às ligações de hidrogênio estão resumidos na **Tabela S4**. O átomo de nitrogênio N(221) interage com o átomo de oxigênio O(5), enquanto que o N(121) forma ligação de hidrogênio com outra molécula de acetona, átomo O(2). Ambas as interações de hidrogênio com distâncias de 3,040(16) e 2,994(14) Å, respectivamente. A sobreposição dos anéis pireno gera uma interação π stacking entre os pares de monômeros Pt1-Pt2 e Pt3-Pt4 com distâncias de 3,496 Å e 3,634 Å, respectivamente.

Figura 72. Estrutura cristalina e molecular para o $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$.

Tabela 5. Comprimentos de ligação selecionados para o $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$.

<i>Comprimentos de ligação (Å)</i>			
Pt1-C115 / Pt1-N118	2,035(14) / 2,002(10)	N(121)-C(122) / N(221)-C(222)	1,472(16) / 1,474(18)
Pt1-S120 / Pt1-S420	2,341(3) / 2,301(3)	N(321)-C(322) / N(421)-C(422)	1,498(19) / 1,41(3)
Pt2-C215 / Pt2-N218	2,078(13) / 2,007(11)	C(120)-S(120) / C(220)-S(220)	1,820(14) / 1,820(14)
Pt2-S220 / Pt2-S320	2,348(3) / 2,298(3)	C(320)-S(320) / C(420)-S(420)	1,805(14) / 1,797(15)
Pt3-C315 / Pt3-N318	2,001(12) / 2,002(10)	C(120)-N(121) / C(220)-N(221)	1,326(15) / 1,309(15)
Pt3-S320 / Pt3-S120	2,352(3) / 2,309(3)	C(320)-N(321) / C(420)-N(421)	1,362(16) / 1,323(16)
Pt4-C415 / Pt4-N418	2,002(13) / 2,006(11)	N(119)-C(120) / N(219)-C(220)	1,284(14) / 1,305(16)
Pt4-S420 / Pt4-S220	2,357(3) / 2,301(3)	N(319)-C(320) / N(419)-C(420)	1,300(15) / 1,305(16)

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 73. Vista do tetrâmero $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ para observação da cavidade central.

Tabela 6. Ângulos de ligação selecionados para o $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$.

<i>Ângulos de ligação (°)</i>			
C115-Pt1-S120	166,2(4)	C315- Pt3- S320	164,4(4)
C115-Pt1-S420	94,6(4)	C315- Pt3- S120	95,8(4)
N118-Pt1-C115	83,0(5)	N318-Pt3-C315	81,1(5)
N118-Pt1-C120	83,3(3)	N318- Pt3- S120	176,7(3)
N118-Pt1-S420	177,1(3)	N318- Pt3- S320	83,5(3)
S420 Pt1 S120	99,02(12)	S120- Pt3- S320	99,55(11)
C215-Pt2-S220	164,8(4)	C415- Pt4- S420	164,0(4)
C215-Pt2-S320	94,8(4)	C415- Pt4- S220	95,1(4)
N218- Pt2- C215	82,4(5)	N418-Pt4-C415	82,3(5)
N218- Pt2- S220	82,6(3)	N418- Pt4- S220	177,4(3)
N218- Pt2- S320	176,4(3)	N418- Pt4- S420	81,9(3)
S320- Pt2- S220	100,10(12)	S220-Pt4- S420	100,72(12)

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Tabela 7. Distância entre átomos de platina na estrutura $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$.

Distância de ligação dos átomos de platina	
Pt1 - Pt2	3,3494 (0,0008)
Pt1 - Pt3	3,7543 (0,0007)
Pt1 - Pt4	3,8237 (0,0007)
Pt2 - Pt3	3,7986 (0,0007)
Pt2 - Pt4	3,8179 (0,0007)
Pt3 - Pt4	3,3386 (0,0008)

6.2 Teste de estabilidade

Compostos à base de metais muitas às vezes são instáveis em solução. Por esta razão é importante assegurar que o composto testado seja estável em solução aquosa. Por conseguinte, como um sistema modelo, a estabilidade do complexo $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ foi investigada e monitorizada por espectrofotometria UV-Vis em H_2O com 5% de DMSO durante pelo menos 24 horas à 25 °C (**Figura 74**). Os espectros permanecem inalterados durante o período de tempo para o ensaio, sugerindo que o composto é estável nas condições do experimento de atividade biológica.

Figura 74. Teste de estabilidade do complexo $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ através do UV-Visível por 24 horas. Solução aquosa 50 μM contendo 5% de DMSO.

6.3 Atividade antiproliferativa

Os complexos **5**, **6** e **8** foram testados nas linhagens celulares B16-F10, K562, HL-60 e células saudáveis PBMC, os valores de IC₅₀ estão mostrados na **Tabela 8**. Em todos os casos, todos os complexos não apresentam atividade antiproliferativa (IC₅₀ > 25 µM) frente às linhagens celulares testadas, podendo ser considerados inativos.

Tabela 8. Testes de citotoxicidade dos tetranucleares frente às células HepG2, B16-F10, K562, HL-60 e PBMC. Os resultados dos precursores metálicos e ligantes livre se encontram na **Tabela 3**.

	IC ₅₀ (µM)				
	HepG2	B16-F10	K562	HL-60	PBMC
[Pd ₄ (µ-S-PrEt-κ ³ -C,N,S) ₄] (5)	>25	>25	>25	>25	>25
[Pd ₄ (µ-S-PrCh-κ ³ -C,N,S) ₄] (6)	>25	>25	>25	>25	>25
[Pt ₄ (µ-S-PrCh-κ ³ -C,N,S) ₄] (8)	>25	>25	>25	24,15	>25
Dox	0,51	0,36	1,00	0,27	0,88

A inibição da proliferação celular também foi avaliada em células de câncer de ovário A2780 dos complexos tetranucleares utilizando o método SRB, **Tabela 9**. Para fins de comparação, a cisplatina também foi testada nas mesmas condições experimentais. Em geral, a formação dos complexos ciclometalados resultou num aumento global da atividade contra a linha celular A2780, especialmente, para os complexos derivados do grupo etil **5** e **7**, em comparação com as tiossemicarbazonas livres (valores de IC₅₀ superiores à 50 uM), enquanto que os complexos de derivados de ciclohexil exibiram mais células viáveis mesmo em concentrações mais elevadas. Comparando os dois complexos análogos **5** e **7** obtidos neste trabalho, é notável que a simples troca de paládio por platina resultou em um aumento na atividade de quase cinco vezes, logo o [Pt₄(µ-S-PrEt-κ³-C,N,S)₄] (**7**) foi o mais potente, com IC₅₀ de 0,4 uM. A modificação estrutural do grupo R ciclohexil no ligante de tiossemicarbazona pelo grupo etil resultou também em um impacto significativo na atividade anticancerígena, sendo os derivados de ciclohexil menos ativos nas células A2780. Uma vez que o efeito antiproliferativo dos complexos **5** e **7** foi maior nas células A2780, esses complexos foram então utilizados para investigação adicional em fibroblastos de pulmão embrionário humano MRC5 (células não cancerosas). Estes resultados também são apresentados na **Tabela 11**. Estes dois complexos exibem elevados valores de IC₅₀ em

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

fibroblastos humanos MRC5 com melhoramento de cem vezes em comparação com as células A2780. Logo, os complexos **5** e **7** apresentam valores elevados do fator de seletividade (razão entre células A2780 e MRC5) > 78 e > 270 , respectivamente, indicando uma boa seletividade para células tumorais *versus* células normais. Estes resultados indicaram que os complexos tetranucleares são mais selectivos do que a cisplatina.

Tabela 9. Atividade antiproliferativa dos complexos **5**, **6**, **7**, **8** e cisplatina em células A2780 e MRC-5. Os resultados são expressos como a média das triplicatas e o desvio padrão.

	A2780 (μM)	MRC-5 (μM)	Fator de seletividade
$[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ (5)	$1,27 \pm 0,34$	>100	>78
$[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ (6)	45 ± 2	-	-
$[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ (7)	$0,37 \pm 0,11$	>100	>270
$[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ (8)	$28,1 \pm 0,9$	-	-
Cisplatina	$1,20 \pm 0,03$	$10,9 \pm 0,3$	$9,1 \pm 0,3$

6.4 Uptake em células A2780

A acumulação celular dos complexos de paládio e platina **5** e **7** foi determinada na linhagem celular ovariana A2780 de modo a relacionar a quantidade de metal acumulado com a citotoxicidade e com a lipofilicidade. Estes complexos foram selecionados devido a sua alta citotoxicidade em células A2780. Para este experimento, o tempo de exposição ao fármaco foi de 24 horas e não foi dado tempo para as células se recuperarem. Os valores são expressos como ng de Pd e Pt por milhão de células e foram determinados como duplicatas independentes de triplicatas. A acumulação celular para o complexo **5** $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ é $6,0 \pm 0,4$ ng de Pd por 10^6 células, enquanto que para o complexo $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ (**7**) é encontrado $3,4 \pm 0,2$ ng de Pt por 10^6 células (**Figura 75**). Ao se calcular os valores de captação máxima para os complexos **5** e **7**, a partir da concentração inicial usada, foi encontrado que 12,0 ng de Pd e 6,0 ng de Pt são disponibilizados para as células. Assim, verificou-se que 50% do complexo **5** entra nas células A2780, enquanto que 56% de Pt é encontrado nas células. Os resultados mostraram que há uma tendência que correlaciona a acumulação celular com as atividades antiproliferativas encontradas, uma vez que o complexo $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ é o que apresenta maior captação celular, conseqüentemente, é o mais potente quando comparado ao seu análogo de paládio.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 75. Resultados de acumulação celular dos complexos **5** e **7** em células de câncer de ovário.

Compostos	IC ₅₀	Ng Pt / Pd x 10 ⁶ células
Complexo 5	1,3 ± 0,4	6,0 ± 0,4
Complexo 7	0,4 ± 0,1	3,4 ± 0,2
CDDP	1,2 ± 0,2	0,51 ± 0,07

O experimento de captação celular também foi investigado por imagens de microscopia confocal em células da linhagem A2780 com complexo **5**. O complexo **5** foi escolhido para este experimento devido ao maior uptake encontrado em comparação com o complexo **7**. Não foi possível observar que o complexo foi transportado para o interior das células através das imagens obtidas (ver Apêndice, **Figura G2**). Acredita-se que este fato é devido à baixa fluorescência do complexo no meio. No entanto, o estudo de uptake confirma que os complexos entram nas células.

6.5 Estudo de mecanismo

Pouco se sabe sobre mecanismo de ação de complexos tetranucleares. Por este motivo, decidiu-se estudar um pouco mais a fundo o mecanismo dessa classe de complexos. Alguns testes com o DNA, como fusão, titulação do DNA e dicroísmo circular foram realizados, mas sem sucesso. A baixa solubilidade dos complexos foi um grande impedimento para a realização de tais testes, visto que grande parte deles são feitas em tampão. Diante disso, o experimento de eletroforese em gel foi realizado para os quatro tetranucleares (**Figura 76**), com intuito de verificar alguma interação dos complexos com o DNA plasmidial. No entanto, a partir dos resultados obtidos, verificou-se que não houve interação dos complexos com nenhuma das formas do DNA, mesmo na concentração máxima usada (300 μ M).

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Figura 76. Estudos de interação dos complexos **A)** $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$, **B)** $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$, **C)** $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ e **D)** $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ em concentrações crescentes com DNA plasmidial (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Buscando-se encontrar um alvo biológico para os tetranucleares, experimentos com a enzima topoisomerase IB também foram realizados. Os resultados mostraram que os quatro complexos testados não apresentaram atividade inibitória da enzima Topo IB mesmo em altas concentrações (300 μM), uma vez que é possível observar o DNA relaxado em todas as concentrações usadas (**Figura 77**). Interessantemente, ao avaliar a atividade inibitória da Top IB com e sem pré-incubação dos complexos, estes continuaram sem apresentar atividade inibitória da enzima (ver Apêndice).

Figura 77. Ensaio de relaxamento do DNA pela Top IB na presença de concentrações crescentes dos complexos **A)** $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$, **B)** $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$, **C)** $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ e **D)** $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Demos continuidade ao estudo de mecanismo dos tetranucleares realizando experimentos como ciclo celular e apoptose para o complexo **7**, devido à potente citotoxicidade apresentada por este tetranuclear de platina. O ciclo celular realizado para o complexo **7** está mostrado na **Figura 78**. O complexo **7** foi incubado em células ovarianas A2780 durante 24 horas. Para este estudo, as células foram coradas utilizando IP como uma sonda fluorescente que interage com o DNA através da intercalação. Em comparação com os dados da população de controle e o complexo **7** em duas concentrações distintas, apresentados na **Figura 78**, nota-se que não existe uma grande diferença em qualquer uma das fases. A população das fases G₁, G₂ / M e S basicamente não se altera após 24 h de exposição ao composto de platina (por exemplo, de $63,51 \pm 1,02\%$ para o controle *versus* $61,76 \pm 0,58\%$ para G₁ na maior concentração testada). Estes resultados são completamente diferentes para CDDP, que claramente causa a acumulação na fase S do ciclo celular, bem como dos complexos do tipo [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] discutidos anteriormente.

Figura 78. FL2-H histogramas obtidos por citometria de fluxo para análise de célula (A) Controle, células não tratadas; (B) Células tratadas usando o triplo da concentração de IC₅₀ do complexo **7**; (C) Células tratadas usando 0,4 µM do complexo **7**. Para todos os experimentos, o tempo de exposição ao composto foi de 24 horas. As células foram tratadas com RNase e marcadas com IP, CDDP: cisplatina.

Uma das respostas celulares aos estímulos de estresse é a morte celular programada (apoptose). Para compreender se o complexo tetranuclear de platina **7** pode levar células A2780 à apoptose, este experimento foi realizado. Anexina V (isotiocianato de fluoresceína) (FITC) e iodeto de propídio (IP) permitem a detecção de quatro diferentes populações de células: células viáveis, células não viáveis, fases iniciais e fases tardias de apoptose. A apoptose no estágio inicial é caracterizada por alterações na simetria da membrana

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

fosfolipídica e fase tardia por interrupção adicional da integridade da membrana celular, tornando-se permeável ao IP. A **Figura 79**, revela o estudo de morte celular causada pela exposição das células ao complexo **7** em duas diferentes concentrações. Nos dois casos nenhuma população de células em qualquer um destes dois estágios de apoptose foi detectada após 24 h, em outras palavras, a extensão das células apoptóticas não viáveis, precoces e tardias é próxima de zero (ver Tabela na **Figura 79**). Isto quer dizer que em um período de 24 horas grande parte das células se encontram na forma viável.

Figura 79. Análise de citometria de fluxo para determinar as porcentagens de células apoptóticas, usando V-FITC versus o marcador IP, após a exposição a células A2780 com o complexo **7** e estaurosporina (controle positivo). O tempo de pré-incubação em meio livre de fármaco foi de 24 horas e o tempo de exposição ao fármaco foi de 24 horas. (■) Células tratadas utilizando 3 vezes a concentração de IC₅₀ do complexo **7**; (■) Células tratadas utilizando 0,4 µM do complexo **7**; (■) Controle.

Na ausência de apoptose após 24 h de exposição ao complexo **7**, a citometria de fluxo foi utilizada para analisar integridade da membrana celular. Neste experimento, as células expostas ao complexo **7** mostrou baixa fluorescência na leitura do canal FL2 para CytoPainter vermelho, que reage com aminas expostas em membranas comprometidas (**Figura 80**). Os resultados obtidos indicaram a citotoxicidade do tetranuclear **7** o mecanismo de morte celular não envolve apoptose e nem danos à integridade da membrana de células A2780. O estudo de mecanismo que pode ser considerado no futuro incluem a repetição dos experimentos de

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

morte celular e integridade de membrana aumentando o tempo de incubação dos complexos. Porém também é possível que a morte celular induzida pelos complexos tetranucleares envolva novos caminhos e não pode ser simplesmente mapeado para mecanismos conhecidos.

Figura 80. Mudanças na integridade da membrana celular de células A2780 na presença do complexo **7** exposto por 24h. O gráfico vermelho corresponde à células não tratadas (controle), gráfico azul células tratadas com concentração do IC₅₀ e gráfico amarelo células tratadas com 3 x a concentração de IC₅₀.

Como resumo deste capítulo pode-se afirmar que foi possível preparar complexos ciclometalados via ativação da ligação C-H do anel pireno. As bases de Schiff obtidas a partir de aldeídos aromáticos monocíclicos proporcionaram complexos orto-metalizados com anéis de quelato com 5 membros. O estudo biológico revelou que entre os complexos de paládio e platina, o derivado de etil de platina apresenta a melhor atividade citotóxica, quando comparado aos derivados com ciclohexil. Além do mais, ambos os tetrâmeros de paládio e platina $[M_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})]$ apresentaram alta seletividade para células normais. Experimentos de mecanismo de ação como o ciclo celular, apoptose e integridade da membrana foram investigados com o objetivo de compreender a via os complexos tetranucleares matar células de ovário do câncer, mas, infelizmente, o mecanismo de ação detalhado desses complexos ainda não foi compreendido. Entretanto, os resultados de seletividade elevados apresentados pelos complexos $[Pd_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})]$ e $[Pt_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})]$ frente à linhagem A2780 são encorajadores, pois provavelmente estes complexos devem ser ativos em linhagens celulares de câncer resistentes à cisplatina.

Capítulo 5: Conclusões

CONCLUSÕES

Através dos dados obtidos e discutidos acima é possível destacar as seguintes conclusões deste trabalho:

1) Com relação às sínteses e estudos estruturais:

- ❖ Dois ligantes inéditos do tipo TSCs contendo o grupo pireno, e variações do R pelos grupos etil e ciclohexil, foram preparados com métodos relativamente simples e caracterizados estruturalmente;
- ❖ Os ligantes livres são altamente fluorescentes devido ao grupo fluoróforo pireno e como verificado pelos estudos de espectroscopia de emissão;
- ❖ Os métodos de síntese usados para a obtenção dos quatro complexos mononucleares $[MCl(PPh_3)(HPrR)]$ neste trabalho são diferentes dos procedimentos já relatados na literatura, sendo verificado que a escolha dos solventes, assim como a escolha dos precursores, influencia diretamente na formação do produto final da reação. Como, por exemplo, a mudança do precursor $[PdCl_2(PPh_3)_2]$ por $[PdCl_2(MeCN)_2]$ para a obtenção de complexos puros derivados de trifenilfosfano, $[MCl(PPh_3)(HPrR)]$;
- ❖ Os complexos do tipo $[MCl(PPh_3)(HPrR)]$, diferentemente dos ligantes livres, apresentaram baixa fluorescência nos espectros de emissão;
- ❖ Estudos por difração de raios X puderam confirmar a obtenção de complexos quadráticos planares análogos de Pd^{II} e Pt^{II} , com ligantes TSCs atuando em modo *N,S*-doador e coligantes clorido e trifenilfosfano, os quais foram obtidos com alta pureza;
- ❖ Reações de oligomerização foram realizadas com sucesso, as quais resultaram na formação de complexos dinucleares, nos quais os ligantes TSC se coordenam de forma bidentada e organometálicos tetranucleares em que os ligantes TSC possuem a esfera de coordenação *C,N,S,S*, sendo um ligante tridentado e outro monodentado, como confirmado pelo estudo de difração de raios X;
- ❖ Os complexos tetranucleares apresentaram maior intensidade de fluorescência quando comparado aos complexo mononucleares do tipo $[MCl(PPh_3)(HPrR)]$;

CONCLUSÕES

- ❖ De forma geral, as estruturas apresentadas para os todos os complexos estudados, tanto os complexos mononucleares quanto os polinucleares, são suportadas pelas diversas técnicas realizadas neste trabalho confirmando de as diferentes formas de coordenação do ligante TSC (bidentada/monoaniônica ou tridentada/dianiônica) e diferentes propriedades dos complexos obtidos;

2) Com relação aos estudos de atividade biológica e de mecanismo de ação:

- ❖ Os ligantes livres H_2PrEt e H_2PrCh , assim como os precursores metálicos $[PdCl_2(MeCN)_2]$ e $K_2[PtCl_4]$ utilizados nas sínteses, não apresentaram atividade citotóxica considerável nas linhagens HepG2, B16-F10, K562, HL-60. Este resultado corrobora com os experimentos à enzima topoisomerase IB, no qual os mesmos não mostraram capacidade inibitória significativa frente à enzima em nenhuma das concentrações testadas;
- ❖ Os complexos testados nas linhagens HepG2, B16-F10, K562, HL-60 não apresentaram atividade citotóxica relevante ($IC_{50} > 25$);
- ❖ Os dois complexos de paládio $[PdCl(PPh_3)(HPrCh)]$ e $[PdCl(PPh_3)(HPrEt)]$ foram altamente citotóxicos para a linhagem celular A2780. O complexo $[PdCl(PPh_3)(HPrCh)]$ merece destaque pois também apresentou atividade promissora para linhagem celular A2780 resistente à cisplatina;
- ❖ Os complexos de paládio não são tóxicos em células saudáveis, resultando em altos fatores de seletividade;
- ❖ A troca do centro metálico de platina por paládio resulta em uma diminuição da atividade antiproliferativa dos complexos do tipo $[MCl(PPh_3)(HPrR)]$;
- ❖ O experimento de distribuição celular para o complexo $[PdCl(PPh_3)(HPrCh)]$ revelou a presença de paládio no núcleo celular;
- ❖ Os estudos de interação com o DNA realizados para os complexos $[PdCl(PPh_3)(HPrR)]$ mostraram que o DNA não é alvo molecular direto dos complexos de paládio;

CONCLUSÕES

- ❖ O comportamento dos complexos de paládio [PdCl(PPh₃)(HPrR)] foi verificado no ciclo celular. Os resultados mostraram que o complexo [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] impede o ciclo preferencialmente na fase G₂/M, enquanto que o [PdCl(PPh₃)(HPrEt)] detem mais a fase S do ciclo celular;
- ❖ A acumulação do ciclo celular na fase G₂/M pelo complexo [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] tem uma relação direta com a atividade deste complexo nas células A2780Cis. Assim, o complexo [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] provavelmente apresenta um mecanismo diferente da cisplatina;
- ❖ Estudos de interação com a topoisomerase IB mostrou uma alta atividade de inibição enzimática por parte dos complexos do tipo [PdCl(PPh₃)(HPrR)]. Interessantemente, os complexo [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] é ativo em células A2780 na mesma concentração que apresenta atividade inibitória da topIB. Os complexos de platina do tipo [PtCl(PPh₃)(HPrR)] também apresentam uma forte inibição da enzima top IB, no entanto, foi verificado que estes complexos não apresentam atividade citotóxica em nenhuma das linhagens celulares testadas;
- ❖ A partir do teste de cinética de religação e clivagem realizado para o [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] verificou-se que este inibe o processo de religação da enzima Top IB, mesmo mecanismo de ação apresentado pelo fármaco topotecan e irinotecan;
- ❖ Baseado nos estudos realizados neste trabalho pode-se afirmar que um dos possíveis mecanismos de ação do complexo [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] é a inibição da enzima Top IB;
- ❖ Dois tetranucleares [M₄(μ-S-PrEt-κ³-C,N,S)₄], M = Pd^{II} e Pt^{II}, apresentaram uma potente atividade citotóxica frente às células A2780 e baixa citotoxicidade frente à células saudáveis, resultando em complexos altamente seletivos;
- ❖ O efeito da troca do íon metálico, por outro lado, foi claramente evidenciado na atividade biológica dos complexos tetranucleares, sendo o de platina mais ativo.

CONCLUSÕES

- ❖ Os quatro complexos tetranucleares avaliados frente ao DNA não apresentaram capacidade de interação nas concentrações testadas. Com isso, acredita-se que o DNA não é alvo molecular destes complexos;
- ❖ Estudos de morte celular, inibição da enzima top IB, integridade da membrana também foram realizados para os tetranucleares, buscando-se encontrar o alvo molecular. Porém, não foi possível encontrar o mecanismo de ação destes complexos;
- ❖ Apesar do mecanismo dos tetranucleares não terem sido identificados, é possível afimar que o alvo molecular destes complexos não é o DNA, e que provavelmente eles possuem um mecanismo de ação diferente da cisplatina;
- ❖ De forma geral, o efeito dos grupos R substituintes nos ligantes tiossemicarbazona resulta em uma diferença significativa na atividade antiproliferativa dos complexos, visto que os complexos derivados do grupo etil são mais eficazes (menores valores de IC_{50}) do que os contendo ciclohexil;
- ❖ Em todas as classes estudadas neste trabalho o centro metálico apresenta um papel importante na atividade. Isto foi verificado devido ao aumento da atividade biológica com a incorporação dos centros metálicos Pd^{II} e Pt^{II} aos ligantes tiossemicarbazonas derivadas do pireno;

Por fim, os objetivos propostos inicialmente para este trabalho foram atingidos. Acredita-se que a grande versatilidade dos ligantes tiossemicarbazonas foi mais uma vez demonstrada pelas diferentes características dos complexos obtidos. O presente trabalho apresenta grande potencial, pois trata do desenvolvimento de novos complexos de paládio e platina muito ativos e seletivos para células de câncer de ovário. Além do mais, os resultados claramente indicam que os complexos aqui estudados apresentam um mecanismo de ação diferente da cisplatina.

Capítulo 6: Referências Bibliográfica

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, p. 7–30, 2016.
2. RAHIB, L.; SMITH, B. D.; AIZENBERG, R.; ROSENZWEIG, A. B.; FLESHMAN, J. M.; MATRISIAN, L. M. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected Burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states. **Cancer Research**, v. 74, p. 2913–2921, 2014.
3. SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, p. 7–30, 2017.
4. BARBOSA, I. R.; DE SOUZA, D. L. B.; BERNAL, M. M.; COSTA, Í. DO C. C. Cancer mortality in Brazil. **Medicine (Baltimore)**, v. 94, p. 1-6, 2015.
5. CUNNINGHAM, S. The biological basis of cancer. **British Journal of Nursing**, v. 5, p. 869–874, 1996.
6. HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.
7. HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646–674, 2011.
8. COUCH, D. B. Carcinogenesis: basic principles. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 19, p. 133–148, 1996.
9. YAO, Y.; DAI, W. Genomic instability and cancer. **Journal of Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 5, p. 1-17, 2014.
10. NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, p. 220–228, 2010.
11. DRAVIAM, V. M.; XIE, S.; SORGER, P. K. Chromosome segregation and genomic stability. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 14, p. 120–125, 2004.
12. CROCE, C. M. Oncogenes and cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 502–511, 2008.
13. LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. **Cell**, v. 136, p. 823–837, 2009.
14. COOPER, G. M. Tumor suppressor genes. In: WAFIK, S.; EL-DEIRY, M. D (Ed.). **The cell: a molecular approach**. 2nd edition. Oxford: Sinauer Associates, 2000. p. 31.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

15. ZHU, K.; LIU, Q.; ZHOU, Y.; TAO, C.; ZHAO, Z.; SUN, J.; XU, H. Oncogenes and tumor suppressor genes: comparative genomics and network perspectives. **BMC Genomics**, v. 16, S8, p. 1-11, 2015.
16. RIVLIN, N.; BROSH, R.; OREN, M.; ROTTER, V. Mutations in the p53 tumor suppressor gene. **Genes Cancer**, v. 2, p. 466–474, 2011.
17. OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. TP53 Mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, p. 1-17, 2010.
18. MULLER, P. A. J.; VOUSDEN, K. H. Mutant p53 in Cancer: new functions and therapeutic opportunities. **Cancer Cell**, v. 25, p. 304–317, 2014.
19. FRIDMAN, J. S.; LOWE, S. W. Control of apoptosis by p53. **Oncogene**, v. 22, p. 9030–9040, 2003.
20. HUSTEDT, N.; DUROCHER, D. The control of DNA repair by the cell cycle. **Nature Cell Biology**, v. 19, p. 1–9, 2017.
21. KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, p. 316–323, 2004.
22. MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 153–166, 2009.
23. DESHPANDE, A.; SICINSKI, P.; HINDS, P. W. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. **Oncogene**, v. 24, p. 2909–2915, 2005.
24. GRANADA, A.; NEMEN, D.; DORA, C.L.; NECKEL, G.L.; LEMOS-SENNA, E. O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.2, p.129-139, 2007.
25. SILVA, T. H. Á.; BUTERA, A. P.; LEAL, D. H. S.; ALVES, R. J. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese - Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha_5\beta_1$. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 1–17, 2007.
26. YUN, Z.; LIN, Q. Hypoxia and regulation of cancer cell stemness. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 772, p. 41–53, 2014.
27. MINCHINTON, A. I.; TANNOCK, I. F. Drug penetration in solid tumours. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 583–592, 2006.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

28. NISHIDA, N.; YANO, H.; NISHIDA, T.; KAMURA, T.; KOJIRO, M. Angiogenesis in cancer. **Vascular Health and Risk Management**, v. 2, p. 213–219, 2006.
29. FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. **Seminars in Oncology**, v. 29, p. 15–18, 2002.
30. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Angiogenesis inhibitors**. 2011. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/angiogenesis-inhibitors-fact-sheet>>. Acesso em: 6 maio 2017.
31. FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 1907–1916, 2005.
32. ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 495–516, 2007.
33. LOWE, S. W.; LIN, A. W. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 485–495, 2000.
34. WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, p. 87, 2011.
35. TOOL MODULE. **Apoptosis (programmed cell death)**. 2017. Disponível em: <http://thebrain.mcgill.ca/flash/capsules/outil_bleu17.html>. Acesso em: 6 maio 2017.
36. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Types of cancer treatment**. 2017. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>>. Acesso em: 6 maio 2017.
37. CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 65–72, 2005.
38. ALLEN, T. M. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 750–763, 2002.
39. CHAKRABORTY, S.; RAHMAN, T. The difficulties in cancer treatment. **Ecancermedicalsecience**, v. 6, p. 1-5, 2012.
40. KOMAROVA, N. L.; WODARZ, D. Drug resistance in cancer: principles of emergence and prevention. **PNAS**, v. 102, p. 9714–9719, 2005.
41. VENTOLA, C. L. The Antibiotic resistance crisis. **P&T**, v. 40, p. 277–283, 2015.
42. DY, G. K.; ADJEI, A. A. Systemic cancer therapy: Evolution over the last 60 years. **Cancer**, v. 113, p. 1857–1887, 2008.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

43. HOUSMAN, G.; BYLER, S.; HEERBOTH, S.; LAPINSKA, K.; LONGACRE, M.; SNYDER, N.; SARKAR, S. Drug resistance in cancer: an overview. **Cancers (Basel)**, v. 6, p. 1769–1792, 2014.
44. DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 364–378, 2014.
45. GIELEN, M.; TIEKINK, E. R. T. **Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents the use of metals in medicine**. New York: John Wiley, 2005. p. 129.
46. ZHANG, P.; SADLER, P. J. Redox-active metal complexes for anticancer therapy. **European Journal of Pharmacology**, v. 2017, p. 1541–1548, 2017.
47. DESOIZE, B. Metals and metal compounds in cancer treatment. **Anticancer Research**, v. 24, p. 1529–1544, 2004.
48. FREZZA, M.; HINDO, S.; DAVENPORT, A.; SCHMITT, S.; TOMCO, D.; PING D. Q. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, p. 1813–1825, 2010.
49. KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 573–584, 2007.
50. GRAHAM, J.; MUHSIN, M.; KIRKPATRICK, P. Oxaliplatin. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 11–12, 2004.
51. WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 307–320, 2005.
52. JOHNSTONE, T. C.; SUNTHARALINGAM, K.; LIPPARD, S. J. The next generation of platinum drugs: targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery, and Pt(IV) prodrugs. **Chemical Reviews**, v. 116, p. 3436–3486, 2016.
53. SHIMADA, M.; ITAMOCHI, H.; KIGAWA, J. Nedaplatin: a cisplatin derivative in cancer chemotherapy. **Cancer Management and Research**, v. 5, p. 67–76, 2013.
54. KE, L. R.; XIA, W. X.; QIU, W. Z.; HUANG, X. J.; YANG, J.; YU, Y. H.; LIANG, H.; LIU, G. Y.; YE, Y. F.; XIANG, Y. Q.; GUO X.; LV, X. Safety and efficacy of lobaplatin combined with 5-fluorouracil as first-line induction chemotherapy followed by lobaplatin-radiotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma: preliminary results of a prospective phase II trial. **BMC Cancer**, v. 17, p. 2-9, 2017.
55. MCKEAGE, M. J. Lobaplatin: a new antitumour platinum drug. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 10, p. 119–128, 2001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

56. FUERTES, M. A.; ALONSO, C.; PÉREZ, J. M. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. **Chemical Reviews**, v. 103, p. 645–662, 2003.
57. TIMERBAEV, A. R.; HARTINGER, C. G.; ALEKSENKO, S. S.; KEPPLER, B. K. Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology. **Chemical Reviews**, v. 106, p. 2224–2248, 2006.
58. BUGARČIĆ, Ž. D.; BOGOJESKI, J.; PETROVIĆ, B.; HOCHREUTHER, S.; ELDIK, R. VAN. Mechanistic studies on the reactions of platinum(II) complexes with nitrogen- and sulfur-donor biomolecules. **Dalton Transitions**, v. 41, p. 12329–12345, 2012.
59. ASTOLFI, L.; GHISELLI, S.; GUARAN, V.; CHICCA, M.; SIMONI, E.; OLIVETTO, E.; LELLI, G.; MARTINI, A. Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: A retrospective evaluation. **Oncology Reports**, v. 29, p. 1285–1292, 2013.
60. ANTONARAKIS, E. S.; EMADI, A. Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 66, p. 1–9, 2010.
61. BRATSOS, I.; JEDNER, S.; GIANFERRARA, T.; ALESSIO, E. Ruthenium anticancer compounds: challenges and expectations. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 61, p. 692–697, 2007.
62. LEIJEN, S.; BURGERS, S. A.; BAAS, P.; PLUIM, D.; TIBBEN, M.; VAN, W. E.; ALESSIO, E.; SAVA, G.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. **Invest New Drugs**, v. 33, p. 201–214, 2015.
63. BAROLLI, J. P.; MAIA, P. I. S.; VEGAS, L. C.; MOREIRA, J.; PLUTIN, A. M.; MOCELO, R.; DEFLON, V. M.; COMINETTI, M. R.; MATHIAS, M. I. C.; BATISTA, A. A. Heteroleptic tris-chelate ruthenium(II) complexes of N,N-disubstituted-N'-acylthioureas: Synthesis, structural studies, cytotoxic activity and confocal microscopy studies. **Polyhedron**, v. 126, p. 33–41, 2017.
64. JONES, C.; THORNBACKE, J. **Medicinal applications of coordination chemistry**. 7^a edição. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2007. p. 222.
65. MONTAGNER, D.; GANDIN, V.; MARZANO, C.; ERXLEBEN, A. DNA damage and induction of apoptosis in pancreatic cancer cells by a new dinuclear bis(triazacyclonane) copper complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 145, p. 101–107, 2015.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

66. DAS, M. & LIVINGSTONE, S. E. Cytotoxic action of some transition metal chelates of Schiff bases derived from S-methyldithiocarbamate. **British Journal of Cancer**, v. 37, p. 466–469, 1978.
67. AYYANNAN, G.; VEERASAMY, P.; MOHANRAJ, M.; RAJA, G.; MANIMARAN, A.; VELUSAMY, M.; BHUVANESH, N.; NANDHAKUMAR, R.; JAYABALAKRISHNAN, C. Biological evaluation of organometallic palladium(II) complexes containing 4-hydroxybenzoic acid (3-ethoxy-2-hydroxybenzylidene)hydrazide: Synthesis, structure, DNA/protein binding, antioxidant activity and cytotoxicity. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 31, p. 1-13, 2016.
68. CUTILLAS, N.; YELLOL, G. S.; HARO, C.; VICENTE, C.; RODRÍGUEZ, V.; RUIZ, J. Anticancer cyclometalated complexes of platinum group metals and gold. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, p. 2784–2797, 2013.
69. KHAN, H.; BADSHAH, A.; SAID, M.; MURTAZA, G.; AHMAD, J.; JEAN-CLAUDE, B. J.; TODOROVA, M.; BUTLER, I. S. Anticancer metallopharmaceutical agents based on mixed-ligand palladium(II) complexes with dithiocarbamates and tertiary organophosphine ligands. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 27, p. 387–395, 2013.
70. MOTSWAINYANA, W. M.; ONANI, M. O.; MADIEHE, A. M.; SAIBU, M.; THOVHOGI, N.; LALANCETTE, R. A. Imino-phosphine palladium(II) and platinum(II) complexes: Synthesis, molecular structures and evaluation as antitumor agents. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 129, p. 112–118, 2013.
71. ARANCIBIA, R.; QUINTANA, C.; BIOT, C.; MEDINA, M. E.; CARRÈRE-KREMER, S.; KREMER, L.; KLAHN, A. H. Palladium (II) and platinum (II) complexes containing organometallic thiosemicarbazone ligands: Synthesis, characterization, X-ray structures and antitubercular evaluation. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 55, p. 139–142 2015.
72. TAVARES, T. T.; PASCHOAL, D.; MOTTA, E.V.S.; CARPANEZ, A.G.; LOPES, M.T.P.; FONTES, E.S.; SANTOS, H. F.; SILVA, H.; GRAZUL, R. M.; FONTES, A. P. S. Platinum(II) and palladium(II) aryl-thiosemicarbazone complexes: synthesis, characterization, molecular modeling, cytotoxicity, and antimicrobial activity. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 67, p. 956–968, 2014.
73. OLIVEIRA, C. G.; MAIA, P. I. DA S.; MIYATA, M.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; TONON DE ALMEIDA, E.; DEFLON, V. M. Cobalt(III) complexes with thiosemicarbazones as potential anti-Mycobacterium tuberculosis agents. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 1848–1856, 2014.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

74. OLIVEIRA, C. G.; MAIA, P. I. DA S.; SOUZA, P. C.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q.; VIANA, R. B.; BATISTA, A. A.; NASCIMENTO, O. R.; DEFLON, V. M. Manganese(II) complexes with thiosemicarbazones as potential anti-Mycobacterium tuberculosis agents. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 132, p. 21–29, 2014.
75. MAIA, P. I. DA S.; GRAMINHA, A.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; BATISTA, A. A.; BACK, D. F.; LANG, E. S.; ELLENA, J.; LEMOS, S. DE S.; SALISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; DEFLON, V. M. Palladium(II) complexes with thiosemicarbazones: syntheses, characterization and cytotoxicity against breast cancer cells and Anti-Mycobacterium tuberculosis activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1177–1186, 2010.
76. LOBANA, T. S.; SHARMA, R.; BAWA, G.; KHANNA, S. Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals—An overview. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 977–1055, 2009.
77. GUTIERREZ, E.; RICHARDSON, D. R.; JANSSEN, P. J. The anticancer agent di-2-pyridylketone 4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT) overcomes prosurvival autophagy by two mechanisms: persistent induction of autophagosome synthesis and impairment of lysosomal integrity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 33568–33589, 2014.
78. KUNOS, C. A.; SHERERTZ, T. M. Long-term disease control with triapine-based radiochemotherapy for patients with stage IB2–IIIB cervical cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 4, p. 1, 2014.
79. NANOTHERAPEUTICS. **NTO-1151. (Triapine®)**. 2017. Disponível em: <<http://www.nanotherapeutics.com/triapine/>>. Acesso em: 6 maio 2017.
80. YALOWICH, J. C.; WU, X.; ZHANG, R.; KANAGASABAI, R.; HORNBAKER, M.; HASINOFF, B. B. The anticancer thiosemicarbazones Dp44mT and triapine lack inhibitory effects as catalytic inhibitors or poisons of DNA topoisomerase II α . **Biochemical Pharmacology**, v. 84, p. 52–58, 2012.
81. IDZIK, K. R.; LEDWON, P.; LICHA, T.; KUZNIK, W.; LAPKOWSKI, M.; FRYDEL, J. Furyl derivatives of pyrene: Efficient synthesis and relevant optical properties. **Dyes and Pigments**, v. 103, p. 55–61, 2014.
82. LIM, S.; PRICE, K. A.; CHONG, S. F.; PATERSON, B. M.; CARAGOUNIS, A.; BARNHAM, K. J.; CROUCH, P. J.; PEACH, J. M.; DILWORTH, J. R.; WHITE, A. R.; DONNELLY, P. S. Copper and zinc bis(thiosemicarbazonato) complexes with a fluorescent tag: synthesis, radiolabelling with copper-64, cell uptake and fluorescence studies. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 15, p. 225–235, 2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

83. COLEMAN, A.; PRYCE, M. T. Synthesis, electrochemistry, and photophysical properties of a series of luminescent pyrene-thiophene dyads and the corresponding $\text{Co}_2(\text{CO})_6$ complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 47, p. 10980–10990, 2008.
84. RAJA, N.; DEVIKA, N.; GUPTA, G.; NAYAK, V. L.; KAMAL, A. NAGESH, N.; THERRIEN, B. Biological activities of pyrenyl-derived thiosemicarbazone half-sandwich complexes. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 794, p. 104–114, 2015.
85. PRABHU, R. N.; PAL, S. Cyclometallated ruthenium(II) carbonyl complexes with 1-pyrenaldehyde 4-R-3-thiosemicarbazones: Regioselective ruthenation of the 1-pyrenyl group. **Journal of Chemical Sciences**, v. 127, p. 589–596, 2015.
86. MATESANZ, A. I.; SOUZA, P. α -N-Heterocyclic thiosemicarbazone derivatives as potential antitumor agents: A structure-activity relationships approach. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 1389–1396, 2009.
87. BERALDO, H.; GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 31–39, 2004.
88. MARTÍNEZ, J.; ADRIO, L. A.; ANTELO, J. M.; ORTIGUEIRA, J. M.; PEREIRA, M. T.; FERNANDEZ, J. J.; FERNÁNDEZ, A.; VILA, J. M. Cyclometallated thiosemicarbazone palladium(II) compounds : The first crystal and molecular structures of mononuclear complexes with a η^1 -diphosphine ligand. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 691, p. 2721–2733, 2006.
89. QUIROGA, A. G.; NAVARRO RANNINGER, C. Contribution to the SAR field of metallated and coordination complexes: Studies of the palladium and platinum derivatives with selected thiosemicarbazones as antitumoral drugs. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 248, p. 119–133, 2004.
90. KOVALA-DEMERTZI D.; PAPAGEORGIOU, A.; PAPATHANASIS, L.; ALEXANDRATOS, A.; DALEZIS, P.; MILLER, J. R.; DEMERTZIS, M. A. In vitro and in vivo antitumor activity of platinum(II) complexes with thiosemicarbazones derived from 2-formyl and 2-acetyl pyridine and containing ring incorporated at N(4)-position: Synthesis, spectroscopic study and crystal structure of platinum(II) complexes with thiosemicarbazones, potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1296–1302, 2009.
91. QUIROGA, A. G.; CUBO, L.; MIGUEL, P. J. S.; MONEO, V.; CARNERO, A.; NAVARRO-RANNINGER, C. Isolation of an intermediate in the platination of p-nitroacetophenone 4-methylthiosemicarbazone: potential application as an antitumor drug. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2008, p. 1171–1171, 2008.

92. GASSER, G., OTT, I.; METZLER-NOLTE, N. Organometallic anticancer compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 3–25, 2011.
93. RUIZ, J.; LORENZO, J.; SANGLAS, L.; CUTILLAS, N.; VICENTE, C.; VILLA, M. D.; AVILÉS, F. X.; LÓPEZ, G.; MORENO, V.; PÉREZ, J.; BAUTISTA, D. Palladium(II) and platinum(II) organometallic complexes with the model nucleobase anions of thymine, uracil, and cytosine: antitumor activity and interactions with DNA of the platinum compounds. **Inorganic Chemistry**, v. 45, p. 6347–6360, 2006.
94. ALI, A. A.; NIMIR, H.; AKTAS, C.; HUCH, V.; RAUCH, U.; SCHÄFER, K. H.; VEITH, M. Organoplatinum(II) complexes with 2-acetylthiophene thiosemicarbazone: synthesis, characterization, crystal structures, and in vitro antitumor activity. **Organometallics**, v. 31, p. 2256–2262, 2012.
95. NASSAR, A. M. Bioactive palladium azomethine chelates, a review of recent research. **Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry**, v. 46, p. 1349–1366, 2016.
96. NAVARRO-RANNINGER, C.; LÓPEZ-SOLERA, I.; ALVAREZ-VALDÉS, A.; RODRÍGUEZ, J. H.; MASAGUER, J. R.; GARCÁ-RUANO, J. L.; SOLANS, X. Reaction of folded acetate-bridged ortho-palladated complexes with CH₂Cl₂. Crystal structure of [Pd(C₆H₅-CH₂-N=C-(COC₆H₅)-C₆H₄)(μ-Cl)]₂. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 476, p. 19–24, 1994.
97. BACHER, F.; ENYEDY, É. A.; NAGY, N. V.; ROCKENBAUER, A.; BOGNÁR, G. M.; TRONDL, R.; NOVAK, M. S.; KLAPPROTH, E.; KISS, T.; ARION, V. B. Copper(II) complexes with highly water-soluble l- and d-proline–thiosemicarbazone conjugates as potential inhibitors of topoisomerase IIα. **Inorganic Chemistry**, v. 52, p. 8895–8908, 2013.
98. NITISS, J. L. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 327–337, 2009.
99. MINSKY, A.; SHIMONI, E.; FRENKIEL-KRISPIN, D. Stress, order and survival. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, p. 50–60, 2002.
100. BELL, S. P.; DUTTA, A. DNA replication in eukaryotic cells. **Annual Review Biochemistry**, v. 71, p. 333–374, 2002.
101. STEWART, L., REDINBO, M. R., QIU, X., HOL, W. G.; CHAMPOUX, J. J. A model for the mechanism of human topoisomerase I. **Science**, v. 279, p. 1534–1541, 1998.
102. VIEIRA, S.; CASTELLI, S.; FALCONI, M.; TAKARADA, J.; FIORILLO, G.; BUZZETTI, F.; LOMBARDI, P.; DESIDERI, A. Role of 13-(di)phenylalkyl berberine derivatives in the modulation of the activity of human topoisomerase IB. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 68–75, 2015.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

103. LI, T. K.; LIU, L. F. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. **Annual Review Of Pharmacology And Toxicology**, v. 41, p. 53–77, 2001.
104. BJORNSTI, M. A.; BENEDETTI, P.; VIGLIANTI, G. A.; WANG, J. C. Expression of human DNA topoisomerase I in yeast cells lacking yeast DNA topoisomerase I: restoration of sensitivity of the cells to the antitumor drug camptothecin. **Cancer Research**, v. 49, p. 6318–6323, 1989.
105. GAUR, R.; MISHRA, L. Synthesis and characterization of Ru(II)–DMSO–Cl–chalcone complexes: DNA binding, nuclease, and topoisomerase II inhibitory activity. **Inorganic Chemistry**, v. 51, p. 3059–3070, 2012.
106. PINTEREST, **DNA**. 2017. Disponível em:
<<https://www.pinterest.com/pin/2744449743135063>>. Acesso em: 19 jun. 2017.
107. CASTELLI, S.; KATKAR, P.; VASSALLO, O.; FALCONI, M.; LINDER, S.; DESIDERI, A. A Natural anticancer agent thaspine targets human topoisomerase IB. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 356–363, 2013.
108. MATHIJSEN, R. H. J.; LOOS, W. J.; VERWEIJ, J.; SPARREBOOM, A. Pharmacology of topoisomerase I inhibitors irinotecan (CPT-11) and topotecan. **Current Cancer Drug Targets**, v. 2, p. 103–123, 2002.
109. GUERRERO, E.; MIRANDA, S.; LÜTTENBERG, S.; FRÖHLICH, N.; KOENEN, J. M.; MOHR, F.; CERRADA, E.; LAGUNA, M.; MENDÍA, A. Trans-thionate derivatives of Pt(II) and Pd(II) with water-soluble phosphane PTA and DAPTA ligands: antiproliferative activity against human ovarian cancer cell lines. **Inorganic Chemistry**, v. 52, p. 6635–6647, 2013.
110. BARREIRO, E.; CASAS, J. S.; COUCE, M. D.; SÁNCHEZ, A.; SORDO, J.; VÁZQUEZ-LÓPEZ, E. M. Heteronuclear gold(I)–silver(I) sulfanylcarboxylates: Synthesis, structure and cytotoxic activity against cancer cell lines. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 131, p. 68–75, 2014.
111. BEDNARSKI, P. J.; MACKAY, F. S.; SADLER, P. J. Photoactivatable platinum complexes. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 75–93, 2007.
112. MACKAY, F. S.; MOGGACH, S. A.; COLLINS, A.; PARSONS, S.; SADLER, P. J. Photoactive trans ammine/amine diazido platinum(IV) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 362, p. 811–819, 2009.
113. WANG, C.; JIANG, Y.; LI, X.; HU, L. Thioglucose-bound gold nanoparticles increase the radiosensitivity of a triple-negative breast cancer cell line (MDA-MB-231). **Breast Cancer**, v. 22, p. 413–420, 2015.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

114. LOBANA, T. S.; KUMARI, P.; HUNDAL, G.; BUTCHER, R. J.; CASTINEIRAS, A.; AKITSU, T. Metal derivatives of N1-substituted thiosemicarbazones: Synthesis, structures and spectroscopy of nickel(II) and cobalt(III) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 394, p. 605–615, 2013.
115. INKPEN, M. S.; WHITE, A. J. P.; ALBRECHT, T.; LONG, N. J. Rapid Sonogashira cross-coupling of iodoferrocenes and the unexpected cyclo-oligomerization of 4-ethynylphenylthioacetate. **Chemical Communications**, v. 49, p. 5663–5665, 2013.
116. SHELDRICK, G. M. **SHELXS-97 and SHELXL2014, programs for the solution and refinement of crystal structures**. Goettingen, 1997 e 2014. Programa de computador.
117. O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421–5426, 2000.
118. ANSAR AHMED, S.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, p. 211–224, 1994.
119. VICHAI, V. & KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1112–1116, 2006.
120. POLAT, B. E.; LIN, S.; MENDENHALL, J. D.; VANVELLER, B.; LANGER, R.; BLANKSCHTEIN, D. Experimental and Molecular Dynamics Investigation into the Amphiphilic Nature of Sulforhodamine B. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, p. 1394–1402, 2011.
121. SVEJSTRUP, J. Q.; CHRISTIANSEN, K.; GROMOVA, I. I.; ANDERSEN, A. H.; WESTERGAARD, O. New technique for uncoupling the cleavage and religation reactions of eukaryotic topoisomerase I. The mode of action of camptothecin at a specific recognition site. **Journal of Molecular Biology**, v. 222, p. 669–678, 1991.
122. WILES, D. M.; GINGRAS, B. A.; SUPRUNCHUK, T. The C=S stretching vibration in the infrared spectra of some thiosemicarbazones. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 45, p. 469–473, 1967.
123. MISHRA, P. M.; AVALDI, L.; BOLOGNESI, P.; PRINCE, K. C.; RICHTER, R.; KADHANE, U. R. Valence shell photoelectron spectroscopy of pyrene and fluorene: photon energy dependence in the far-ultraviolet region. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 118, p. 3128–3135, 2014.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

124. SAFRONOV, A. V.; SHLYAKHTINA, N. I.; EVERETT, T. A.; VANGORDON, M. R.; SEVRYUGINA, Y. V.; JALISATGI, S. S.; HAWTHORNE, M. F. Direct observation of bis(dicarbollyl)nickel conformers in solution by fluorescence spectroscopy: an approach to redox-controlled metallocarborane molecular motors. **Inorganic Chemistry**, v. 53, p. 10045–10053, 2014.
125. PAUL, P.; DATTA, S.; HALDER, S.; ACHARYYA, R.; BASULI, F.; BUTCHER, R. J.; PENG, S. M.; LEE, G. H.; CASTINEIRAS, A.; DREW, M. G.B. Syntheses, structures and efficient catalysis for C–C coupling of some benzaldehyde thiosemicarbazone complexes of palladium. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 344, p. 62–73, 2011.
126. LOBANA, T. S., BAWA, G., HUNDAL, G., BUTCHER, R. J. & CASTINEIRAS, A. The influence of substituents at C2 carbon of thiosemicarbazones on the bonding pattern of bis(diphenylphosphano)alkanes in palladium(II) complexes. **Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie**, v. 635, p. 1447–1453, 2009.
127. MAIA, P. I. S.; CARNEIRO, Z. A.; LOPES, C. D.; OLIVEIRA, C. G.; SILVA, J. S.; ALBUQUERQUE, S.; HAGENBACH, A.; GUST, R.; DEFLON, V. M.; ABRAM, U. Organometallic gold(III) complexes with hybrid SNS-donating thiosemicarbazone ligands: cytotoxicity and anti-Trypanosoma cruzi activity. **Dalton Transactions**, v. 46, p. 2559–2571, 2017.
128. KÜHL, O. **Phosphorus-31 NMR spectroscopy: a concise introduction for the synthetic organic and organometallic chemist**. Berlin: Springer-Verlag, 2008. v. 1. p. 45.
129. PANDEY, M. D.; MISHRA, A. K.; CHANDRASEKHAR, V.; VERMA, S. Silver-guided excimer emission in an adenine–pyrene conjugate: fluorescence lifetime and crystal studies. **Inorganic Chemistry**, v. 49, p. 2020–2022, 2010.
130. ALBANI, J. R. **Principles and applications of fluorescence spectroscopy**. Oxford: Blackwell, 2007. p. 89
131. PAUL, P.; SENGUPTA, P.; BHATTACHARYA, S. Palladium mediated C–H bond activation of thiosemicarbazones: Catalytic application of organopalladium complexes in C–C and C–N coupling reactions. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 724, p. 281–288, 2013.
132. CASAS, J. S.; CASTELLANO, E. E.; ELLENA, J.; TASENDE, M. S. G.; PARALLÉ, M. L. P.; SÁNCHEZ, A.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, Á.; SORDO, J.; TOUCEDA, Á. New Pd(II) and Pt(II) complexes with N,S-chelated pyrazolonate ligands: Molecular and supramolecular structure and preliminary study of their in vitro antitumoral activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 33–45, 2008.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

133. RUIZ, J.; VILLA, M. D.; CUTILLAS, N.; LÓPEZ, G.; HARO, C.; BAUTISTA, D.; MORENO, V.; VALENCIA, L. Palladium(II) and platinum(II) organometallic complexes with 4,7-dihydro-5-methyl-7-oxo[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine. Antitumor activity of the platinum compounds. **Inorganic Chemistry**, v. 47, p. 4490–4505, 2008.
134. BENEDETTI B. T.; PETERSON, E. J.; KABOLIZADEH, P.; MARTÍNEZ, A.; KIPPING, R.; FARRELL, N. P. Effects of noncovalent platinum drug-protein interactions on drug efficacy: use of fluorescent conjugates as probes for drug metabolism. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, p. 940–948, 2011.
135. HURLEY, L. H.; BOYD, F. L. DNA as a target for drug action. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 9, p. 402–407, 1988.
136. BETANZOS-LARA, S.; CHMEL, N. P.; ZIMMERMAN, M. T.; BARRÓN-SOSA, L. R.; GARINO, C.; SALASSA, L.; RODGER, A.; BRUMAGHIM, J. L.; GRACIA-MORA, I.; BARBA-BEHRENS, N. Redox-active and DNA-binding coordination complexes of clotrimazole. **Dalton Transitions**, v. 44, p. 3673–3685, 2015.
137. RODGER, A. How to study DNA and proteins by linear dichroism spectroscopy. **Science Progress**, v. 91, p. 377–396, 2008.
138. KUMAR, Y. P.; DEVI, C. S.; DEEPIKA, N.; GABRA, N. M. D.; JAIN, N.; SRISHAILAM, A.; REDDY, K. L.; SATYANARAYANA, S. Synthesis, characterization, DNA-binding, photocleavage, cytotoxicity and docking studies of Co(III) mixed ligand complexes. **Transition Metal Chemistry**, v. 38, p. 811–819, 2013.
139. BANERJEE, A.; MAJUMDER, P.; SANYAL, S.; SINGH, J.; JANA, K.; DAS, C.; DASGUPTA, D. The DNA intercalators ethidium bromide and propidium iodide also bind to core histones. **FEBS Open Bio**, v. 4, p. 251–259, 2014.
140. ZHIVOTOVSKY, B.; KROEMER, G. Apoptosis and genomic instability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, 752–762, 2004.
141. BOSCHI, T.; CROCIANI, B.; TONIOLO, L.; BELLUCO, U. Polynuclear complexes of palladium(II) with halogen and sulfur bridges. **Inorganic Chemistry**, v. 9, p. 532–537, 1970.
142. MAIA, P. I. S. **Complexos de interesse medicinal em terapia ou diagnóstico, envolvendo os elementos Au, Pd, Pt, Re e Tc, com tiossemicarbazonas S,N,S-tridentadas**. 2011. 326 f. Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) - Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
143. KISHIMURA, A.; YAMASHITA, T.; YAMAGUCHI, K.; AIDA, T. Rewritable phosphorescent paper by the control of competing kinetic and thermodynamic self-assembling events. **Nature Materials**, v. 4, p. 546–549, 2005.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

144. BAINS, G.; PATEL, A. B.; NARAYANASWAMI, V. Pyrene: a probe to study protein conformation and conformational changes. **Molecules**, v. 16, p. 7909–7935, 2011.
145. GABANO, E.; MARENGO, E.; BOBBA, M.; ROBOTTI, E.; CASSINO, C.; BOTTA, M.; OSELLA, D. ^{195}Pt NMR spectroscopy: A chemometric approach. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 250, p. 2158–2174, 2006.
146. BERNERS-PRICE, S. J.; RONCONI, L.; SADLER, P. J. Insights into the mechanism of action of platinum anticancer drugs from multinuclear NMR spectroscopy. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 49, p. 65–98, 2006.
147. YUAN, D.; HUYNH, H. V. A Comparative study on dinuclear and multinuclear Ni(II), Pd(II), and Pt(II) complexes of a thiolato-functionalized, benzannulated N-heterocyclic carbene ligand. **Inorganic Chemistry**, v. 52, p. 6627–6634, 2013.
148. QUIROGA, A. G.; PÉREZ, J. M.; LÓPEZ-SOLERA, I.; MASAGUER, J. R.; LUQUE, A.; ROMÁN, P.; EDWARDS, A.; ALONSO, C.; NAVARRO-RANNINGER, C. Novel tetranuclear orthometalated complexes of Pd(II) and Pt(II) derived from p-isopropylbenzaldehyde thiosemicarbazone with cytotoxic activity in cis-DDP resistant tumor cell lines. Interaction of these complexes with DNA. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 1399–1408, 1998.
149. LUCIO-MARTÍNEZ, F.; ADRIO, L. A.; POLO-CES, P.; ORTIGUEIRA, J. M.; FERNÁNDEZ, J. J.; ADAMS, H.; PEREIRA, T. M.; VILA, J. M. Palladacycle catalysis: an innovation to the Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction. **Dalton Transitions**, v. 45, p. 17598–17601, 2016.
150. HERNÁNDEZA, W.; PAZ, J.; VAISBERG, A.; SPODINE, E.; RICHTER, R.; BEYER, L. Synthesis, characterization, and in vitro cytotoxic activities of benzaldehyde thiosemicarbazone derivatives and their palladium(II) and platinum(II) complexes against various human tumor cell lines. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2008, p. 690952-690961, 2009.

APÊNDICE

Espectro de absorção na região do infravermelho (Apêndice A)

Figura A1. Espectro de absorção na região do infravermelho para o HPrCh (cm^{-1}) em pastilha de KBr.

Figura A2. Espectro de absorção na região do infravermelho para o $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{PrCh})]$ (cm^{-1}) em pastilha de KBr.

Figura A3. Espectro de absorção na região do infravermelho para o $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ (cm^{-1}) em pastilha de KBr.

Figura A4. Espectro de absorção na região do infravermelho para o $[\text{Pd}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{HPrCh})_2]$ (cm^{-1}) em pastilha de KBr.

Figura A5. Espectro de absorção na região do infravermelho para o $[\text{Pd}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{HPrCh})_2]$ até 200 cm^{-1} em pastilha de CsI.

Figura A6. Espectro de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) realizada após se isolar o precipitado da reação do dinuclear $[\text{Pd}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{HPrCh})_2]$ com DMSO em pastilhas de KBr.

Figura A7. Espectro de absorção na região do infravermelho para o $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ (cm^{-1}) em pastilha de KBr.

Figura A8. Espectro de absorção na região do infravermelho para o $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ (cm^{-1}) em pastilha de KBr.

Figura A9. Espectro de absorção na região do infravermelho para o $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ (cm^{-1}) em pastilha de KBr.

Ressonância Magnética Nuclear (Apêndice B)

Figura B1. Espectro de 1H -RMN do composto $[PdCl(PPh_3)(HPrCh)]$ (1) em solução de $CDCl_3$ (δ em ppm).

Figura B2. Espectro de ^{31}P -RMN do composto $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ (1) em solução de CD_2Cl_2 (δ em ppm).

Figura B3. Espectro de ^1H -RMN do composto $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ (2) em solução de CD_2Cl_2 (δ em ppm).

Figura B4. Espectro de ^1H -RMN do composto $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ (**3**) em solução de CDCl_3 (δ em ppm).

Figura B5. Espectro de ^{31}P -RMN do composto $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$ (**4**) em solução de CDCl_3 (δ em ppm)

Figura B6. Espectro de 1H -RMN do complexo tetranuclear de $[Pt_4(\mu-S-PrCh-\kappa^3-C,N,S)_4]$ (**8**) em solução de DMSO (δ em ppm).

Espectros de UV - Visível e Fluorescência (Apêndice C)

Figura C1. Espectro de absorção na região do ultravioleta visível do ligante livre H_2PrEt em DMSO.

Figura C2. **A)** Espectro de absorção na região do ultravioleta visível do complexo $[PdCl(PPh_3)(HPrEt)]$ e **B)** emissão de fluorescência do complexo $[PdCl(PPh_3)(HPrEt)]$ com concentração igual a $1,67 \times 10^{-5}$ e $\lambda_{exc} = 517$ nm.

Figura C3. A) Espectro de absorção na região do ultravioleta visível do complexo [PtCl(PPh₃)(HPrEt)] e B) Espectro de emissão de fluorescência do complexo [PtCl(PPh₃)(HPrEt)] com concentração na ordem de 10^{-5} e $\lambda_{\text{exc}} = 345$ nm em DMSO.

Figura C4. A) Espectro de absorção na região do ultravioleta visível do complexo [PtCl(PPh₃)(HPrCh)], B) Espectro de emissão de fluorescência do complexo [PtCl(PPh₃)(HPrCh)], em DMSO, com concentração igual a $1,29 \times 10^{-5}$ e $\lambda_{\text{exc}} = 346$ nm.

Figura C5. A) Espectro de absorção na região do ultravioleta visível do complexo A) $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ e B) Espectro de emissão do complexo $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ (5) realizado em DMSO. Concentração utilizada no espectro $1,43 \times 10^{-5}$ M. $\lambda_{\text{exc}} = 515$ nm.

Figura C6. Espectro de absorção na região do ultravioleta visível do complexo $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$.

Figura C7. A) Espectro de absorção na região do ultravioleta visível do complexo $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S)}_4]$ e B) Espectro de emissão do complexo $[\text{Pt}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S)}_4]$ (8) realizado em DMSO. Concentração utilizada no espectro $1,51 \times 10^{-5}$ e $\lambda_{\text{exc}} = 380$ nm.

Espectrometria de massas (Apêndice D)

Figura D1 - Espectro de massa ESI(+) do complexo $[PdCl(PPh_3)(HPrEt)]$ (**2**).

APÊNDICE

Figura D2 - Espectro de massa ESI(+) do complexo $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ (**1**).

Figura D3 - Espectro de massa ESI(+) do complexo $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$.

Figura D4. Espectro de massa ESI(+) experimental e simulado para o complexo $[Pt_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$.

Cromatogramas de HPLC (Apêndice E)

Figura E1. Cromatograma do complexo **2**. Tempo de retenção: 38,4 min

Figura E2. Cromatograma do complexo **3**. Tempo de retenção: 35,0 min

Figura E3. Cromatograma do complexo **4**. Tempo de retenção: 30,8 min.

Figura E4. Cromatograma do complexo $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$. Tempo de retenção: 28,18 min.

Figura E5. Cromatograma do complexo $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrCh-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$. Tempo de retenção: 33,03 min.

Espectros de LCMS (Apêndice F)

Figura F1. Espectro de LCMS do complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ A) espectro de HPLC e B) espectro de massas.

Figura F2. Espectro de LCMS do complexo $[\text{PtCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrEt})]$.

Imagens de microscopia confocal (Apêndice G)

Figura G1. Imagens de fluorescência do confocal para o complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(\text{HPrCh})]$ realizadas com 18 horas de incubação do complexo ($20\ \mu\text{M}$) em células de câncer de ovário (A2780), quando excitadas à $514\ \text{nm}$.

Figura G2. Imagens de fluorescência do confocal para o complexo $[\text{Pd}_4(\mu\text{-S-PrEt-}\kappa^3\text{-C,N,S})_4]$ realizadas com 24 horas de incubação do complexo ($20\ \mu\text{M}$) em células de câncer de ovário (A2780), quando excitadas à $514\ \text{nm}$.

APÊNDICE

Difração de raios X (Apêndice H)

Tabela H1. Dados de difração de raios X para H₂PrEt, [PdCl(PPh₃)(HPrCh)] (1), [PdCl(PPh₃)(HPrEt)]·MeOH (2·MeOH) e [PtCl(PPh₃)(HPrCh)] (3).

	H ₂ PrEt	1	2·MeOH	3
Fórmula	C ₄₀ H ₃₄ N ₆ S ₂	C ₄₂ H ₃₇ ClN ₃ PPdS	C ₁₅₄ H ₁₃₀ Cl ₄ N ₁₂ OP ₄ Pd ₄ S ₄	C ₈₄ H ₇₄ Cl ₂ N ₆ P ₂ Pt ₂ S ₂
Massa Molecular	662,85	788,63	2984,21	1754,63
Sistema Cristalino	Triclínico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo Espacial	P $\bar{1}$	C2/c	P21/c	C2/c
a (Å)	7.8769(3)	31.1556(6)	14.2704(11)	31.268(5)
b (Å)	8.6861(3)	10.4263(2)	12.0045(8)	10.413(5)
c (Å)	26.3559(10)	26.4258(5)	21.2465(16)	26.453(5)
α (°)	94.574(2)	90	90	90
β (°)	92.802(2)	120.4580(10)	109.283(2)	120.654(5)
γ (°)	112.551(2)	90	90	90
V (Å ³)	1653.88(11)	7399.5(2)	3435.5(4)	7409(4)
Z	2	8	1	4
ρ_{calcd} (Mg.m ⁻³)	1.331	1,416	1.442	1,573
μ (mm ⁻¹)	0.201	0,708	0.758	3.993
Alcance de Θ para coleta de dados (°)	1.56 à 25.08	1,66 à 25,10	1.512 à 26.420	1.51 à 26.39
Alcance dos índices	-9 $\leftarrow$ h $\leftarrow$ 9, -10 $\leftarrow$ k $\leftarrow$ 10, -31 $\leftarrow$ l $\leftarrow$ 31	-32 $\leftarrow$ h $\leftarrow$ 37, -12 $\leftarrow$ k $\leftarrow$ 12, -31 $\leftarrow$ l $\leftarrow$ 31	-17 $\leftarrow$ h $\leftarrow$ 17, -14 $\leftarrow$ k $\leftarrow$ 14, -26 $\leftarrow$ l $\leftarrow$ 26	-38 $\leftarrow$ h $\leftarrow$ 38, -13 $\leftarrow$ k $\leftarrow$ 10, -31 $\leftarrow$ l $\leftarrow$ 33
Reflexões coletadas	20426	21535	73175	27285
Reflexões independentes/R _{int}	5829/0,0343	6521/0,0194	7061/0.0298	7570/0,0235
Dados/restrições/param.	5829/0/526	6521/0/442	7061 / 19 / 418	7570/0/442
Correção de Absorção	Integração	Integração	Integração	Integração
Índices R finais [I>2 σ (I)]	R ₁ = 0.0500, wR ₂ = 0.1412	R ₁ = 0.0231, wR ₂ = 0.0566	R ₁ = 0.0305 wR ₂ = 0.0796	R ₁ = 0.0227, wR ₂ = 0.0528
Índices R (dados completos)	R ₁ = 0.0909, wR ₂ = 0.1718	R ₁ = 0.0285 wR ₂ = 0.0604	R ₁ = 0.0342 wR ₂ = 0.0831	R ₁ = 0.0292, wR ₂ = 0.0615
GOF em F ² , S	0,922	1,046	1,051	1,103

APÊNDICE

Tabela H2. Dados das estruturas de raios X para $[\{\text{Pt}(\text{PrCh})\}_4]$ (**8**).

	8
Fórmula	$\text{C}_{103}\text{H}_{95}\text{Cl}_3\text{N}_{12}\text{O}_2\text{Pt}_4\text{S}_4$
Massa Molecular	2547.85
Sistema Cristalino	Monoclínico
Grupo Espacial	$\text{P2}_1/\text{n}$
a (Å)	18.8631(8)
b (Å)	26.4584(12)
c (Å)	21.3233(8)
α (°)	90
β (°)	91.045(3)
γ (°)	90
V (Å³)	10640.4(8)
Z	4
ρ_{calcd} (Mg.m⁻³)	1,590
μ (mm⁻¹)	5.447
Alcance de Θ para coleta de dados (°)	2.454 à 52.886
Alcance dos índices	$-22 \leq h \leq 23, -30 \leq k \leq 33, -26 \leq l \leq 26$
Reflexões coletadas	87773
Reflexões independentes/R_{int}	21672/0.1224
Dados/restrições/param.	21672/216/1181
Correção de Absorção	Integração
Índices R finais [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0657$ $wR_2 = 0.1458$
Índices R (dados completos)	$R_1 = 0.1516,$ $wR_2 = 0.1768$
GOF em F^2, S	1,024

Figura H1. Representação das elipsoides (50% de probabilidade) para o ligante livre H₂PrEt.

Figura H2. Representação das elipsoides (50% de probabilidade) para o complexo 1.

Figura H3. Representação das elipsoides (50% de probabilidade) para o complexo 2. Molécula de metanol omitida para maior clareza.

Figura H4. Representação das elipsoides (50% de probabilidade) para o complexo **3**.

Figura H5. Representação das elipsoides (50% de probabilidade) para o complexo **8**. As moléculas de acetona e clorofórmio, átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza.

Estudos de inibição da Topoisomerase IB (Apêndice I)

Figura I1. - Estudos de interação dos complexos de platina em concentrações crescentes com DNA plasmidial (0,25 $\mu g/\mu L$).

Figura I2. Ensaio de relaxamento do DNA pela TopIB na presença de concentrações crescentes do precursor metálico $[PdCl_2(MeCN)_2]$.

Figura I3. Ensaio de relaxamento do DNA pela TopIB na presença de concentrações crescentes do precursor metálico $K_2[PtCl_4]$.

Figura I4. Teste de inibição da Top IB dos complexos **A)** $[\{Pd(PrEt)\}_4]$, **B)** $[\{Pd(PrCh)\}_4]$, **C)** $[\{Pt(PrEt)\}_4]$ e **D)** $[\{Pt(PrCh)\}_4]$ em função do tempo de incubação e da concentração, com e sem pré-incubação.