

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química

Júlia Resende Lopes Silva

**SÍNTESE E REATIVIDADE DE COMPLEXOS DE Pt(II) COM ANÁLOGOS DE
PURINAS: interação com proteínas-alvo e potencial terapêutico contra
leucemia mieloide crônica**

Belo Horizonte
2024

UFMG/ICEX/DQ. 1.627

D. 884

Júlia Resende Lopes Silva

**SÍNTESE E REATIVIDADE DE COMPLEXOS DE Pt(II) COM ANÁLOGOS DE
PURINAS: interação com proteínas-alvo e potencial terapêutico contra
leucemia mieloide crônica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Ciências Exatas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Química.

Orientadora: Prof^a. Elene Cristina Pereira
Maia

Belo Horizonte
2024

Ficha Catalográfica

S586s
2024
D
Silva, Júlia Resende Lopes.
Síntese e reatividade de complexos de Pt(II) com análogos de purinas [manuscrito] :
interação com proteínas alvo e potencial terapêutico contra leucemia mieloide crônica /
Júlia Resende Lopes Silva. 2024.
85 f. : il., gráfs., tabs.

Orientadora: Elene Cristina Pereira Maia.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de
Química.

Bibliografia: f. 77-85.

1. Química inorgânica – Teses. 2. Purinas – Teses. 3. Platina – Teses. 4. Complexos metálicos – Teses. 5. Agentes antineoplásicos – Teses. 6. Ressonância magnética nuclear – Teses. 7. Espectroscopia de ultravioleta – Teses. 8. Dicroísmo circular – Teses. 9. Espectroscopia de absorção atômica – Teses. 10. Leucemia mieloide de fase crônica – Teses. I. Maia, Elene Cristina Pereira, Orientadora. II. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

UFMG

Programa de Pós-Graduação em Química
Departamento de Química - ICEX



"Síntese e Reatividade de Complexos de Pt(II) com Análogos de Purinas: Interação com Proteínas-Alvo e Potencial Terapêutico Contra Leucemia Mieloide Crônica"

Júlia Resende Lopes Silva

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Elene Cristina Pereira Maia - Orientadora

UFMG

Prof. Wendell Guerra

UFU

Prof. Guilherme Ferreira de Lima

UFMG

Belo Horizonte, 24 de outubro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Elene Cristina Pereira Maia, Professora do Magistério Superior**, em 24/10/2024, às 13:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wendell Guerra, Usuário Externo**, em 24/10/2024, às 13:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Ferreira de Lima, Professor do Magistério Superior**, em 25/10/2024, às 14:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3665812** e o código CRC **E28F05E8**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser a luz que guia cada passo dessa jornada e por sempre estar presente em todos os meus projetos.

Agradeço, de forma muito especial, minha orientadora e “mãe-científica”, professora Elene, que me acompanhou desde a graduação até o mestrado, compartilhando conhecimentos preciosos e me oferecendo apoio constante. Sua confiança, carinho e incentivo foram fundamentais para que eu pudesse trilhar esse caminho.

Agradeço ao meu pai, Luciano, pela sua sabedoria e apoio em todas as minhas decisões, e à minha mãe, Sônia, por seu amor incondicional e sua presença diária, que sempre me motivaram. A força de ambos é uma inspiração constante, e sou imensamente grata por sempre acreditarem em mim.

À minha irmã, Luísa, minha grande companheira e amiga, que sempre esteve ao meu lado, compreendendo minhas necessidades e estando disposta a ajudar sem hesitar.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Amanda, Bruno, Elisa, Samara, Lucas e Antônio, agradeço pela colaboração, pelas risadas e por tornarem os dias de trabalho mais leves e divertidos.

À toda minha família e aos meus amigos de longa data que me acompanharam ao longo da vida, minha gratidão por fazerem parte dessa jornada.

Agradeço também ao professor Adolfo H. Moraes, por fornecer a proteína Abl, que foi importante para desenvolvimento dessa pesquisa.

Sou imensamente grata à Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Departamento de Química, por oferecer uma educação de excelência e toda a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

Aos professores que cruzaram o meu caminho, muito obrigada pelos ensinamentos essenciais para minha formação acadêmica e pessoal.

Por fim, agradeço à CAPES pelo suporte financeiro, que permitiu minha dedicação integral ao mestrado.

*“É preciso que eu suporte duas
ou três larvas se quiser conhecer as
borboletas.”*

Saint-Exupéry (O Pequeno Príncipe)

RESUMO

Complexos metálicos de Pt(II) têm papel central no tratamento do câncer, mas a resistência celular e os efeitos colaterais limitam seu sucesso. A estratégia desse trabalho foi aliar as propriedades dos complexos de Pt(II) às de análogos de purinas, que bloqueiam enzimas cruciais para a síntese de ADN e ARN. Assim, três complexos inéditos de Pt(II) foram sintetizados com fludarabina, cladribina e vidarabina, complexos **1**, **2** e **3**, respectivamente, e caracterizados por RMN de ¹H mono e bidimensional, espectrometria de absorção no UV-Vis e dicroísmo circular, confirmando a formação de complexos do tipo 1:1 pela coordenação do íon Pt(II) ao N7 dos análogos de bases purínicas. A atividade citotóxica foi avaliada em células de leucemia mieloide crônica (K562) e em células não cancerosas (HaCat). A fludarabina, a cladribina e seus complexos de Pt(II) foram altamente ativos nas células K562 com valores de CI₅₀ na faixa de 8-33 nM, enquanto a vidarabina e seu complexo apresentaram CI₅₀ na faixa de 8-10 μM. O efeito dos complexos na linhagem não cancerosa foi muito menor, com índices de seletividade de 120 a 12.000. A incorporação dos **1** e **2** pelas células K562 foi acompanhada por espectrometria de absorção atômica, revelando uma boa correlação entre a atividade citotóxica e a concentração intracelular de platina. Todos os complexos interagiram com a albumina sérica bovina e apresentaram alta afinidade pela proteína Abl, que está associada ao desenvolvimento de leucemia mieloide crônica. A complexação aumentou a afinidade pela Abl em cerca de 7 mil vezes para o complexo **1** e 30 vezes para o **2** em relação aos ligantes livres. Esse resultado é extremamente relevante uma vez que o tratamento da leucemia mieloide crônica é feito com inibidores da proteína Abl, até o aparecimento de resistência celular, que limita o sucesso da terapia. Portanto, o fato de os complexos de Pt(II) com análogos de purinas se ligarem à Abl com uma afinidade muito maior do que os medicamentos atualmente em uso, revela seu grande potencial terapêutico como alternativa aos tratamentos quimioterápicos em alguns tipos de câncer.

Palavras-chave: análogos de purina; platina (II); proteína Abl; BSA; citotoxicidade; anticancerígenos.

ABSTRACT

Pt(II) metal complexes play a central role in cancer treatment, however, cellular resistance and side effects limit their success. This work aimed to ally the properties of Pt(II) complexes with those of purine analogs, which block key enzymes involved in DNA and RNA synthesis. Thus, three novel Pt(II) complexes were synthesized with fludarabine, cladribine, and vidarabine, complexes **1**, **2**, and **3**, respectively, and characterized using one- and two-dimensional ^1H NMR, molecular absorption in the UV-Vis, and circular dichroism spectroscopy, confirming the formation of 1:1 complexes through Pt(II) coordination to the N7 of purine analogues. Cytotoxic activity was evaluated in chronic myeloid leukemia cells (K562) and non-cancerous cells (HaCat). Fludarabine and cladribine showed high activity in leukemia cells, as did their Pt(II) complexes, with CI_{50} values in the range of 8-33 nM, while vidarabine and its complex displayed CI_{50} in the range of 8-10 μM . The effect of the complexes in the non-cancerous cell line was much lower, with selectivity indices ranging from 120 to 12,000. The uptake of **1** and **2** by K562 cells was monitored by atomic absorption spectrometry, revealing a good correlation between cytotoxic activity and intracellular platinum concentration. All complexes interacted with bovine serum albumin and showed high affinity for the Abl protein, which is associated with the development of chronic myeloid leukemia. The affinity for Abl was approximately 7,000 times higher for complex **1** and 30 times higher for complex **2** than those of the free ligands. This result is extremely relevant since chronic myeloid leukemia is treated with Abl inhibitors, until the appearance of cellular resistance, which limits the success of the therapy. Therefore, the fact that Pt(II) complexes with purine analogues bind to Abl with a much higher affinity than do the drugs currently in use reveals their great therapeutic potential as an alternative treatment for some types of cancer.

Keywords: purine analogs; platinum (II); Abl protein; BSA; cytotoxicity; anticancer agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da interação entre a cisplatina e o ADN.....	19
Figura 2: Estrutura dos complexos polinucleares de platina(II), <i>Triplatin</i> (BBR346) e <i>TriplatinNC</i> (AH78).....	24
Figura 3: Estrutura dos complexos de Pd e Pt com fludarabina.....	24
Figura 4: Estrutura da fludarabina.....	27
Figura 5: Estrutura da cladribina.....	28
Figura 6: Estrutura da vidarabina.....	29
Figura 7: Espectro bidimensional (COSY) de ¹ H RMN da fludarabina em D ₂ O, pD = 6,0...41	41
Figura 8: Espectro bidimensional (COSY) de ¹ H RMN da cladribina em D ₂ O, pD = 6,0....42	42
Figura 9: Espectro bidimensional (COSY) de ¹ H RMN da vidarabina em D ₂ O, pD = 6,0....43	43
Figura 10: Espectros de ¹ H RMN da fludarabina [1×10 ⁻³ mol L ⁻¹] em D ₂ O, pD = 6,0 na ausência e presença de crescentes concentrações de Pt, [2×10 ⁻⁴ a 1×10 ⁻² mol L ⁻¹] imediatamente (a) e 24 horas (b) após a preparação.....	45
Figura 11: Espectros de ¹ H RMN da cladribina [1×10 ⁻³ mol L ⁻¹] em D ₂ O, pD = 6,0 na ausência e presença de crescentes concentrações de Pt, [2×10 ⁻⁴ a 1×10 ⁻² mol L ⁻¹] imediatamente (a) e 24 horas (b) após a preparação.....	47
Figura 12: Espectros de ¹ H RMN da vidarabina [1×10 ⁻³ mol L ⁻¹] em D ₂ O, pD = 6,0 na ausência e presença de crescentes concentrações de Pt, [2×10 ⁻⁴ a 1×10 ⁻² mol L ⁻¹] imediatamente (a) e 24 horas (b) após a preparação.....	49
Figura 13: Espectro eletrônico da fludarabina [5×10 ⁻⁵ mol L ⁻¹] em H ₂ O, pH = 6,0 na ausência e presença de crescentes concentrações de Pt, [2×10 ⁻⁴ a 1×10 ⁻² mol L ⁻¹] após 24 horas da preparação.....	51
Figura 14: Espectro eletrônico da cladribina [5×10 ⁻⁵ mol L ⁻¹] em H ₂ O, pH = 6,0 na ausência e presença de crescentes concentrações de Pt, [2×10 ⁻⁴ a 1×10 ⁻² mol L ⁻¹] após 24 horas da preparação.....	51
Figura 15: Espectro eletrônico da vidarabina [5×10 ⁻⁵ mol L ⁻¹] em H ₂ O, pH = 6,0 na ausência e presença de crescentes concentrações de Pt, [2×10 ⁻⁴ a 1×10 ⁻² mol L ⁻¹] após 24 horas da preparação.....	52
Figura 16: Espectro de dicroísmo circular da fludarabina [1×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹] em H ₂ O, pH = 6,0 na ausência e presença de crescentes concentrações de Pt, [2×10 ⁻⁴ a 5×10 ⁻³ mol L ⁻¹] após 24 horas da preparação.....	54
Figura 17: Espectro de dicroísmo circular da cladribina [1×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹] em H ₂ O, pH = 6,0 na ausência e presença de crescentes concentrações de Pt, [2×10 ⁻⁴ a 5×10 ⁻³ mol L ⁻¹] após 24 horas da preparação.....	54

Figura 18: Espectro de dicroísmo circular da vidarabina [1×10^{-4} mol L ⁻¹] em H ₂ O, pH = 6,0 na ausência e presença de crescentes concentrações de Pt, [2×10^{-4} a 5×10^{-3} mol L ⁻¹] após 24 horas da preparação.....	54
Figura 19: Citotoxicidade do complexo 1 e da fludarabina livre nas células de leucemia mieloide crônica.....	55
Figura 20: Citotoxicidade do complexo 2 e da cladribina livre nas células de leucemia mieloide crônica.....	56
Figura 21: Citotoxicidade do complexo 3 e da vidarabina livre nas células de leucemia mieloide crônica.....	56
Figura 22: Relação entre a concentração intracelular de platina e a porcentagem de inibição do crescimento celular após tratamento da linhagem celular K562 com o complexo 1	58
Figura 23: Relação entre a concentração intracelular de platina e a porcentagem de inibição do crescimento celular após tratamento da linhagem celular K562 com o complexo 2	59
Figura 24: Citotoxicidade do complexo 1 e da fludarabina livre nas células de queratinócitos não cancerosas (HaCat).....	60
Figura 25: Citotoxicidade do complexo 2 e da cladribina livre nas células de queratinócitos não cancerosas (HaCat).....	60
Figura 26: Espectros de emissão de fluorescência da BSA [$1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹] (λ excitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes do complexo 1 ($5,0 \times 10^{-7}$ a $9,3 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹). Gráficos de F_0/F vs [composto] e de $\log[(F_0-F)/F]$ vs \log [composto].....	63
Figura 27: Espectros de emissão de fluorescência da BSA [$1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹] (λ excitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes da fludarabina livre ($1,5 \times 10^{-5}$ a $5,9 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹). Gráficos de F_0/F vs [composto] e de $\log[(F_0-F)/F]$ vs \log [composto].....	64
Figura 28: Espectros de emissão de fluorescência da BSA [$1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹] (λ excitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes do complexo 2 ($1,0 \times 10^{-6}$ a $6,4 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹). Gráficos de F_0/F vs [composto] e de $\log[(F_0-F)/F]$ vs \log [composto].....	64
Figura 29: Espectros de emissão de fluorescência da BSA [$1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹] (λ excitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes da cladribina livre ($2,0 \times 10^{-6}$ a $2,1 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹). Gráficos de F_0/F vs [composto] e de $\log[(F_0-F)/F]$ vs \log [composto].....	65
Figura 30: Espectros de emissão de fluorescência da BSA [$1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹] (λ excitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes do complexo 3 ($2,0 \times 10^{-6}$ a $1,6 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹). Gráficos de F_0/F vs [composto] e de $\log[(F_0-F)/F]$ vs \log [composto].....	65
Figura 31: Espectros de emissão de fluorescência da BSA [$1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹] (λ excitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes da vidarabina livre ($8,3 \times 10^{-6}$ a $3,1 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹). Gráficos de F_0/F vs [composto] e de $\log[(F_0-F)/F]$ vs \log [composto].....	66
Figura 32: Espectros de emissão de fluorescência da BSA [$1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹] (λ excitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes de K ₂ PtCl ₄ livre ($1,2 \times 10^{-5}$ a $1,9 \times 10^{-4}$	

mol L ⁻¹). Gráficos de F ₀ /F vs [composto] e de log[(F ₀ -F)/F] vs log[composto].....	66
Figura 33: Espectros de emissão de fluorescência da Abl [1,0×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹] (λexcitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes do complexo 1 (8,0×10 ⁻⁷ a 7,7×10 ⁻⁵ mol L ⁻¹). Gráfico de log[(F ₀ -F)/F] vs log[composto].....	69
Figura 34: Espectros de emissão de fluorescência da Abl [1,0×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹] (λexcitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes da fludarabina livre (1,8×10 ⁻⁶ a 5,0×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹). Gráfico de log[(F ₀ -F)/F] vs log[composto].....	70
Figura 35: Espectros de emissão de fluorescência da Abl [1,0×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹] (λexcitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes do complexo 2 (1,0×10 ⁻⁶ a 5,6×10 ⁻⁵ mol L ⁻¹). Gráfico de log[(F ₀ -F)/F] vs log[composto].....	70
Figura 36: Espectros de emissão de fluorescência da Abl [1,0×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹] (λexcitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes da cladribina livre (1,5×10 ⁻⁶ a 3,5×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹). Gráfico de log[(F ₀ -F)/F] vs log[composto].....	71
Figura 37: Espectros de emissão de fluorescência da Abl [1,0×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹] (λexcitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes do complexo 3 (5,0 x 10 ⁻⁵ a 1,2 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹). Gráfico de log[(F ₀ -F)/F] vs log[composto].....	71
Figura 38: Espectros de emissão de fluorescência da Abl [1,0×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹] (λexcitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes da vidarabina livre (1,5×10 ⁻⁶ a 4,5×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹). Gráfico de log[(F ₀ -F)/F] vs log[composto].....	72
Figura 39: Espectros de emissão de fluorescência da Abl [1,0×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹] (λexcitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes de K ₂ PtCl ₄ (3,5×10 ⁻⁶ a 5,3×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹). Gráfico de log[(F ₀ -F)/F] vs log[composto].....	72
Figura 40: Espectros de emissão de fluorescência da Abl [1,0×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹] (λexcitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes de cisplatina (5,0×10 ⁻⁵ a 1,4×10 ⁻³ mol L ⁻¹). Gráfico de log[(F ₀ -F)/F] vs log[composto].....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Preparo das soluções dos complexos em diferentes razões molares.....	33
Tabela 2: Atribuições dos sinais dos espectros de ¹ H RMN dos ligantes.....	40
Tabela 3: Valores de CI ₅₀ dos ligantes livres, complexos e cisplatina na linhagem celular K562.....	57
Tabela 4: Valores de CI ₅₀ dos complexos e ligantes livres nas linhagens celulares HaCat (não cancerosa) e K562 (câncer de leucemia) e Índice de seletividade.....	61
Tabela 5: Constantes de Stern-Volmer (K _{sv}), constante de velocidade bimolecular de supressão (k _q), constante de ligação (K _b), número de sítios de ligação (n) e coeficientes de determinação da regressão linear (r ²) para a interação dos compostos com a BSA.....	67
Tabela 6: Constantes de ligação (K _b), número de sítios de ligação (n) e coeficientes de determinação da regressão linear (r ²) para a interação dos compostos com a Abl.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abl – Abelson tirosina quinase

ADN – Ácido desoxirribonucleico

BCR – *Breakpoint cluster region protein* (região de ponto de quebra – gene localizado no cromossomo 22)

BSA – *Bovine Serum Albumin* (Albumina Sérica Bovina)

Cl₅₀ – Concentração capaz de inibir em 50% o crescimento celular

cla – Cladribina (2-cloro-2'-deoxyadenosine)

D₂O – Óxido de deutério

DMSO – Dimetil sulfóxido

FDA – *Food and Drug Administration*

flu – Fludarabina (2-fluoroadenine-9-β-D-arabinofluranoside)

HaCat – Linhagem celular de queratinócitos humanos imortalizados

INCA – Instituto Nacional do Câncer

J – Constante de acoplamento

K562 – Linhagem celular de leucemia mieloide crônica

LMC – Leucemia Mieloide Crônica

MTT – brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RPMI – *Roswell Memorial Park Institute medium* (meio de cultura celular)

TMS – Tetrametilsilano

UV-Vis – Radiação ultravioleta-visível

vid – Vidarabina (adenid-9- β -D-arabinofuranoside)

ϵ – Coeficiente de absorvidade molar

λ – Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVO	21
3. REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1. Leucemia Mieloide Crônica	22
3.2. Complexos de platina para o tratamento de câncer	22
3.3. Análogos de purinas como agentes terapêuticos	25
3.3.1. Fludarabina	26
3.3.2. Cladribina	28
3.3.3. Vidarabina	29
3.4. Interação de compostos metálicos com proteínas	31
4. PARTE EXPERIMENTAL	32
4.1 Preparo dos complexos	32
4.2 Estudos espectroscópicos	33
4.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H	33
4.2.2 Espectroscopia de absorção na região ultravioleta-visível	34
4.2.3 Espectroscopia de Dicroísmo Circular	34
4.3 Avaliação da Atividade Citotóxica	34
4.3.1 Atividade citotóxica em células de leucemia mieloide crônica – linhagem K562	34
4.3.2 Determinação da concentração intracelular de complexo nas células tumorais	35
4.3.3 Atividade citotóxica em células não cancerosas, queratinócitos - linhagem HaCat	36
4.4 Estudo da interação dos complexos com proteínas	36
4.4.1 Interação com a proteína Albumina Sérica Bovina	36
4.4.2 Interação com a proteína Abl	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39

5.1	Preparo dos complexos	39
5.2	Estudos espectroscópicos	39
5.2.1	Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H	39
5.2.2	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível	50
5.2.3	Espectroscopia de Dicroísmo Circular	52
5.3	Avaliação da Atividade Citotóxica	55
5.3.1	Atividade citotóxica em células de leucemia mieloide crônica – K562	55
5.3.2	Determinação da concentração intracelular nas células tumorais	57
5.3.3	Atividade citotóxica em células de queratinócitos não cancerosas – HaCat	59
5.4	Estudo da interação com proteínas	62
5.4.1	Interação com a proteína Albumina Sérica Bovina	62
5.4.2	Interação com a proteína Abl	68
6.	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	77

1. INTRODUÇÃO

O câncer permanece como uma das principais causas de morte no mundo, sendo caracterizado pelo crescimento desordenado de células malignas que formam tumores, capazes de invadir tecidos adjacentes e provocar metástases (INCA, 2022). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer compreende um conjunto de doenças de origem genética, desencadeadas por mutações no ADN das células, que podem ser resultantes de fatores hereditários, ambientais ou de hábitos de vida, como tabagismo e alcoolismo. Embora avanços significativos tenham sido feitos em relação às terapias, o câncer continua a representar um grande desafio clínico (INCA, 2022).

Entre os diferentes tipos de câncer, a leucemia mieloide crônica (LMC) se destaca por sua relação direta com uma alteração genética específica, a translocação cromossômica que gera o gene de fusão BCR-Abl (*breakpoint cluster region protein*). Esse gene codifica uma proteína tirosina quinase, responsável pela proliferação descontrolada das células leucêmicas. A proteína Abl (Abelson tirosina quinase), por sua vez, é um alvo molecular importante para novas terapias, uma vez que desempenha um papel central na regulação do ciclo celular e sua desregulação está associada à progressão da LMC (CORTES; PAVLOVSKY; SAUBELE, 2021).

No tratamento do câncer, diversas estratégias terapêuticas são utilizadas, incluindo cirurgias, radioterapia e quimioterapia. Dentre essas abordagens, os compostos metálicos ganharam destaque com a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina na década de 1960 (ROSENBERG *et al.*, 1969). Esse composto, que possui a platina como centro metálico, é amplamente utilizado em quimioterapias, especialmente em tumores sólidos, como os de testículo, ovário e pulmão. A cisplatina age ligando-se ao ADN, formando adutos que provocam alterações estruturais significativas, levando à inibição da replicação e à apoptose celular (JAMIESON; LIPPARD, 1999). Os adutos formados mais comuns envolvem ligações cruzadas intrafita entre duas guaninas (*cis*-GG) ou entre uma adenina e uma guanina adjacentes (*cis*-AG): $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{d}(\text{GpG})\}]$ e $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{d}(\text{ApG})\}]$ (figura 1). Pesquisas utilizando espectroscopia de RMN e difração de raios X em monocristais

demonstraram que o local de ligação da platina nas purinas é o nitrogênio N7. Além disso, uma ligação de hidrogênio entre um ligante amônia da cisplatina e o oxigênio do grupo 5'-fosfato contribui para a estabilização dos adutos formados. (LIPPARD; WANG., 2005). No entanto, a eficácia do tratamento com cisplatina é limitada pela resistência adquirida pelas células tumorais e pelos seus efeitos adversos, como nefrotoxicidade e neurotoxicidade.

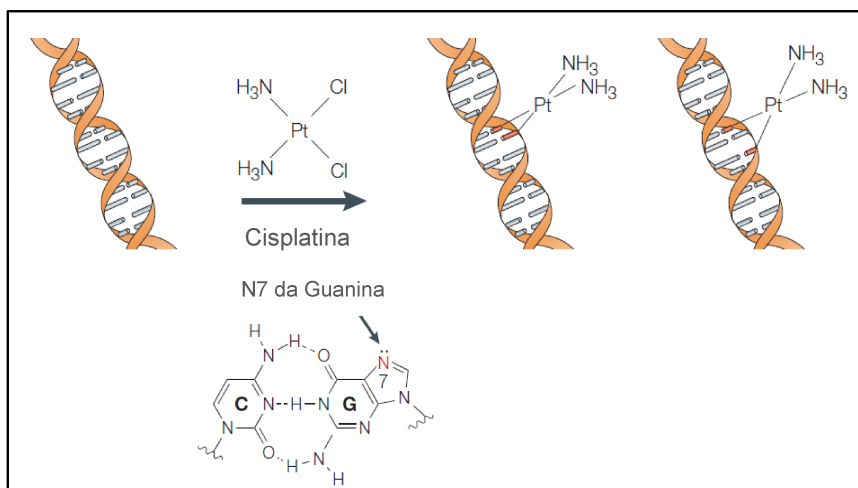


Figura 1: Esquema da interação entre a cisplatina e o ADN. [Adaptado de (LIPPARD; WANG., 2005)]

Com o intuito de superar essas limitações, pesquisas recentes têm se voltado para o desenvolvimento de novos complexos metálicos, capazes de atuar de maneira mais eficaz e seletiva.

Outra classe de drogas muito promissoras são os análogos de purinas, antimetabólitos que mimetizam a estrutura das purinas metabólicas (HRUBA *et al.*, 2023); (HARROP; POLLIACK; TAM, 2021); (LAMANNA; WEISS, 2004). A FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) aprovou três destes análogos, a saber, pentostatina, fludarabina (figura 4) e cladribina (figura 5), para o tratamento de malignidades do sangue (ROBAK *et al.*, 2009); (KREITMAN; ARONS, 2018). Esses agentes interferem na síntese de ADN inibindo as ADN polimerases e a ribonucleotídeo redutase e também desencadeando o processo de apoptose.

No processo de planejamento de um novo medicamento uma etapa inicial envolve o estudo de interação dos fármacos com proteínas, como por exemplo a

albumina. Interações com a albumina são cruciais pois essa proteína desempenha um papel fundamental no transporte e distribuição de fármacos no organismo (HU *et al.*, 2022). A estabilidade da ligação de um composto à albumina sérica é importante para estimar a sua utilidade como agente terapêutico. A ligação de um fármaco à albumina deve ser forte o suficiente para permitir o seu transporte, mas dentro de uma faixa de estabilidade que permita a liberação da droga nos meios celulares. Os níveis eficazes de um fármaco devem basear-se no teor da forma livre na circulação porque a ligação à albumina sérica impediria a ligação ao seu receptor (MELO *et al.*, 2019); (JING *et al.*, 2022).

A interação de complexos metálicos com proteínas celulares também é um fator crucial para o sucesso de terapias anticâncer. Uma proteína importante é a tirosina cinase Abl por ser responsável pelo aparecimento e progressão da leucemia mieloide crônica (LMC) (MINCIACCHI; KUMAR; KRAUSE, 2021); (BADGER *et al.*, 2016). O tratamento da LMC é feito com agentes inibidores da proteína Abl, como o imatinibe (LI *et al.*, 2012). Para se ter uma ideia da relevância desse estudo, uma busca feita no portal “PubMed” em setembro de 2024 com a palavra “ABL” em resultou em mais de 32.000 artigos (PUBMED, 2024).

A estratégia utilizada neste trabalho foi aliar as propriedades antitumorais de compostos de platina(II) às de análogos de purina visando encontrar melhores agentes antitumorais que tenham menos efeitos colaterais e, ao mesmo tempo, atividade em linhagens celulares resistentes.

A disseminação de resistência aos medicamentos atualmente em uso e os efeitos colaterais provocados fazem com que seja de extrema importância desenvolver novos complexos que possuam amplo espectro de ação, apresentem menos efeitos colaterais e, ao mesmo tempo, que sejam ativos em linhagens celulares resistentes (ROTHENBURGER *et al.*, 2021).

Neste contexto, foram sintetizados e caracterizados novos complexos metálicos de platina (II) com os seguintes análogos de purinas: fludarabina, cladribina e vidarabina. Foram também avaliadas as interações biológicas com as proteínas BSA e Abl, além da atividade citotóxica em células de leucemia mieloide crônica.

2. OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho é sintetizar e caracterizar novos complexos de platina(II) com os análogos de purina (fludarabina, cladribina e vidarabina) e avaliar sua citotoxicidade em células cancerosas e não cancerosas. Além disso, busca-se investigar a reatividade desses complexos com proteínas, como a BSA e Abl, a fim de explorar seu potencial como agentes antitumorais mais eficazes e menos tóxicos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Leucemia Mieloide Crônica

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica causada pela fusão dos genes *BCR* e *ABL1*, que resulta na expressão de uma tirosina cinase hiperativa, levando à proliferação descontrolada de células progenitoras mieloides. O principal marcador molecular da LMC é o cromossomo Filadélfia, uma translocação entre os cromossomos 9 e 22. A tirosina quinase *BCR-ABL* promove a sinalização intracelular aberrante, interferindo com as vias normais de regulação do ciclo celular e apoptose, e resulta em proliferação descontrolada de células malignas (MINCIACCHI; KUMAR; KRAUSE, 2021).

Atualmente, o tratamento padrão para LMC envolve o uso de inibidores da tirosina quinase *ABL* como o imatinibe, que bloqueiam a atividade da *BCR-ABL*. Contudo, a resistência ao tratamento, muitas vezes associada a mutações no gene *ABL*, representa um grande desafio clínico. Assim, há uma demanda crescente por terapias alternativas que possam superar esses obstáculos, motivando pesquisas sobre compostos antitumorais inovadores (CORTES; PAVLOVSKY; SAUßELE, 2021).

3.2. Complexos de platina para o tratamento de câncer

Compostos de platina entraram na clínica médica como agentes anticâncer quando a cisplatina, *cis*-diaminodicloridoplatina(II), foi aprovada pela agência estadunidense *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) em 1978. Até os dias de hoje, os medicamentos à base de platina continuam entre os agentes anticâncer mais amplamente utilizados (ROTTENBERG; DISLER; PEREGO, 2021). Os três compostos predominantes continuam sendo a cisplatina, a carboplatina e a oxaliplatina. Estes compostos entram nas células e atingem diversos alvos intracelulares, tais como o ADN e proteínas contendo tióis. Acredita-se que o principal

mecanismo da ação antitumoral seja a formação de mono-adutos ou de ligações cruzadas intra- e interfitas com o ADN. A ligação ao ADN se dá através da coordenação da Pt(II) principalmente ao N7 ou O6 nas bases púricas (LIPPARD, 1982).

Compostos de platina(II), por serem ácidos macios, possuem grande afinidade por proteínas contendo cisteínas. Recentemente, um novo alvo da cisplatina foi identificado, a proteína metionina aminopeptidases 1 (MetAP1), que remove uma metionina N-terminal de proteínas (WANG; ZHANG; WANG, 2023).

Apesar do sucesso dos compostos de platina na quimioterapia, o aparecimento de resistência celular pode levar ao fracasso do tratamento. Entre as possíveis causas de resistência celular aos compostos de platina, podemos citar: i) diminuição da concentração de droga que entra dentro das células resistentes para um nível inferior ao necessário para a atividade citotóxica; ii) aumento no nível intracelular de tióis, como a glutatona ou a metalotioneína, que podem se coordenar à platina e iii) aumento das atividades de reparo de danos causados pela cisplatina ao ADN (HALL *et al.*, 2008); (PEREIRA-MAIA; GARNIER-SUILLEROT, 2003).

Por muito tempo, foi afirmado que a cisplatina entra nas células por difusão passiva, apesar de relatos da ocorrência de mecanismos mediado por transportadores. Pereira-Maia e Garnier-Suillerot realizaram um estudo do uptake da cisplatina e da espécie aquahidroxo nas células e mostraram que, na verdade, a espécie $[Pt(H_2O)(OH)(NH_3)_2]^+$ se acumula dentro das células em torno de 40 vezes mais rapidamente do que a espécie neutra (PEREIRA-MAIA; GARNIER-SUILLEROT, 2003). Há estudos que propõem que a cisplatina entra nas células através do transportador de cobre CTR1 (SAFAEI, 2006); (ARNESANO; NATILE, 2021) ou de transportadores de cátions orgânicos (OCTs) ou canais aniônicos reguladores de volume (ROTTENBERG; DISLER; PEREGO, 2021).

A necessidade de se encontrar compostos ativos contra células resistentes e com menos efeitos tóxicos indesejáveis tem estimulado o desenvolvimento de uma quantidade significativa compostos de platina (ZHANG *et al.*, 2022); (RADOMSKA *et al.*, 2024). O grupo de pesquisa do professor Nicholas Farrell sintetizou complexos polinucleares de platina com atividade antitumoral (figura 2), que representam um

Outra abordagem proposta consiste na síntese de supramoléculas pela associação de compostos de platina acalixarenos, ciclodextrinas, lipossomas, polímeros etc (JOGADI; ZHENG, 2023).

3.3. Análogos de purinas como agentes terapêuticos

Proteínas quinases regulam processos celulares importantes incluindo a fosforilação reversível de proteínas. Recentemente, a inibição dessas enzimas surgiu como um potencial alvo para medicamentos anticâncer. Análogos de purina - antimetabólitos que mimetizam a estrutura das purinas metabólicas - agem como potentes inibidores de quinase. Esses agentes antimetabólitos competem com nucleosídeos fisiológicos interferindo na síntese de ADN e inibindo as ADN polimerases e a ribonucleotídeo redutase (SHARMA *et al.*, 2016). Três desses agentes, a pentostatina, a cladribina e a fludarabina foram aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) para o tratamento de malignidades do sangue (ROBAK *et al.*, 2009).

A pentostatina inibe a enzima adenosina desaminase, que catalisa a hidrólise da 2'-desoxiadenosina. Essa inibição leva a um acúmulo de 2'-desoxiadenosina que é, por sua vez, um inibidor da ribonucleotídeo redutase. A enzima ribonucleotídeo redutase é essencial para a biossíntese do ADN, pois catalisa a conversão de ribonucleotídeos em 2'-desoxiribonucleotídeos. A cladribina, que possui um átomo de cloro como substituinte no anel de purina, é resistente à degradação pela adenosina desaminase, o que aumenta o período de residência intracelular do pró-fármaco cladribina. A fosforilação subsequente da cladribina em sua forma ativa de trifosfato, 2-cloro-desoxiadenosina-trifosfato, ocorre de modo particularmente eficiente nos linfócitos, devido aos seus níveis altos de desoxicitidina cinase e relativamente baixos de 5'-nucleotidase. A forma trifosfato resiste à degradação e acumula-se em níveis citotóxicos dentro das células, o que interrompe a síntese do ADN, impede o reparo do ADN e induz a apoptose, ou morte celular programada. Uma metanálise feita

através das bases de dados PubMed, EMBASE e Cochrane Library apontou que tratamentos clínicos com cladribina foram eficazes e bem tolerados em pacientes com leucemia mieloide aguda recém-diagnosticada (ZHOU *et al.*, 2019).

Combinações de análogos de purina com agentes alquilantes como a cisplatina aumentam a atividade antitumoral (JOHNSON; THOMAS, 2000). Lundberg e Chitambar também mostraram que a combinação de fludarabina com sais de Ga(III) potencializa a atividade antitumoral contra linfomas (LUNDBERG; CHITAMBAR, 1990). A atividade antitumoral de complexos metálicos com nucleosídeos naturais também foi descrita. Por exemplo, Charalabopoulos e colaboradores mostraram que um complexo de Pt(II) com inosina apresenta atividade antitumoral significativa em modelo animal de tumor sem ser muito tóxico (CHARALABOPOULOS *et al.*, 2002).

3.3.1. Fludarabina

A fludarabina (2-fluoroadenina-9-β-D-arabinofuranosídeo) (figura 4) é um análogo de purina derivado da adenosina, desenvolvido para interferir na síntese de ADN, e se destaca como um agente antitumoral importante em tratamentos de câncer hematológico, como a leucemia linfocítica crônica (LLC) e linfoma não-Hodgkin. Seu mecanismo de ação envolve a transformação em seu metabólito ativo, o trifosfato de fludarabina (F-ara-ATP), dentro das células, onde atua como nucleosídeo falso, inibindo enzimas essenciais à replicação do ADN e promovendo a morte celular programada das células malignas (GANDHI, PLUNKETT, 2002). Essa inibição também bloqueia a ribonucleotídeo redutase, que é fundamental para a produção de ADN e ARN, e o ADN polimerase, impactando diretamente a viabilidade das células leucêmicas (LUKENBILL, KALAYCIO, 2013).

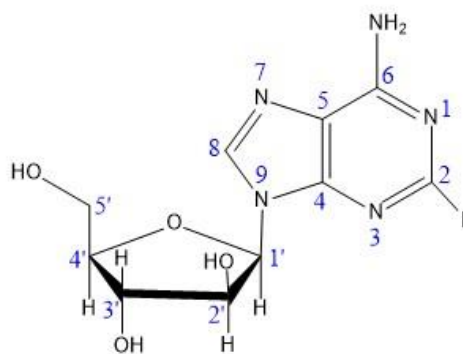


Figura 4: Estrutura da fludarabina.

A fludarabina é vantajosa devido à sua alta especificidade para células malignas e por ter uma ação bem tolerada em comparação a outras quimioterapias, sendo administrada tanto por via oral quanto intravenosa (RICCI *et al.*, 2009). No entanto, um dos seus principais inconvenientes é a mielossupressão, que afeta a produção de células sanguíneas, comprometendo a resposta imunológica e aumentando o risco de infecções graves em pacientes imunossuprimidos (ROBAK *et al.*, 2005)(JOHNSON, 2000). Esse efeito imunossupressor também eleva o risco de infecções oportunistas e de reativação de infecções virais, exigindo monitoramento constante e intervenções profiláticas, se necessário (KEATING *et al.*, 1998).

Os efeitos adversos mais comuns incluem fadiga, náusea, febre e infecções, sendo que, em casos mais graves, podem ocorrer anemia hemolítica autoimune e neurotoxicidade (LUKENBILL, KAYLAYCIO, 2013). A neurotoxicidade da fludarabina pode se manifestar como neuropatia periférica e fraqueza muscular, podendo até causar alterações cognitivas em casos mais graves (ROBAK *et al.*, 2005).

A fludarabina é fundamental no tratamento de LLC e linfoma não-Hodgkin, especialmente quando combinada com outros agentes, como a ciclofosfamida e o rituximabe, que potencializam seu efeito. Estudos mostram que essas combinações aumentam significativamente a resposta ao tratamento, inclusive atingindo remissão completa em alguns pacientes (THOMPSON *et al.*, 2016). Esses esquemas terapêuticos têm sido eficazes em reduzir a progressão da doença e aumentar a sobrevida dos pacientes com câncer hematológico.

3.3.2. Cladribina

A cladribina (2-cloro-2'-desoxiarabinosídeo de adenina) (figura 5) é um análogo da desoxiadenosina, notável por sua aplicação no tratamento de doenças hematológicas, como leucemia de células pilosas (*hairy cell leukemia*) e, mais recentemente, esclerose múltipla (LILJEMARK, 1997);(MALTBY, 2021). A cladribina age por meio da inibição da síntese de ADN, sendo inicialmente fosforilada por enzimas intracelulares e convertida em seu metabólito ativo, a cladribina trifosfato (2-CdATP), que se incorpora ao ADN, interferindo na replicação e levando à apoptose celular (HERMANN *et al.*, 2021). Essa droga é especialmente eficaz em células com baixa expressão de desoxicitidina quinase e alta expressão de adenosina deaminase, características que favorecem sua toxicidade seletiva para células de rápida divisão, como as células leucêmicas (KREITMAN, 2012).

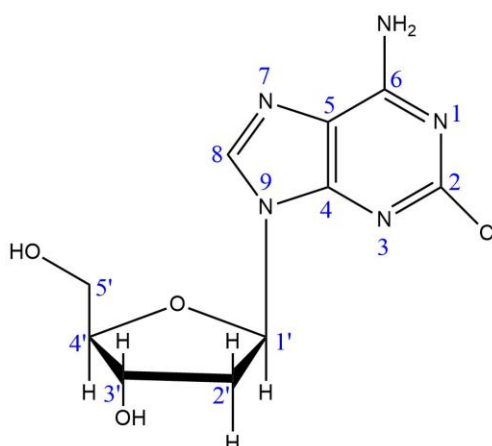


Figura 5: Estrutura da cladribina.

Uma das principais vantagens da cladribina é sua alta especificidade para células hematológicas malignas, o que permite o uso de doses relativamente baixas, reduzindo a toxicidade global do tratamento (VON ROHR *et al.*, 2002). Sua meia-vida prolongada nas células permite efeitos duradouros mesmo após o fim do tratamento, uma vantagem importante no tratamento de leucemias. No entanto, como desvantagem, a cladribina, assim como a fludarabina, apresenta uma ação mielossupressora, especialmente em tratamentos de longa duração, o que

compromete o sistema imunológico e aumenta o risco de infecções graves (JOHNSON, 2000).

Entre os principais efeitos adversos da cladribina, destacam-se a mielossupressão, fadiga, febre, além de manifestações gastrointestinais leves, como náusea e diarreia. Em alguns casos, pode haver ocorrência de neurotoxicidade e hepatotoxicidade, exigindo monitoramento rigoroso durante o tratamento (NELSON, HOGAN, 1995).

A cladribina revolucionou o tratamento de várias neoplasias hematológicas, como leucemias e linfomas de baixo grau, e é especialmente útil no tratamento da leucemia de células pilosas, sendo frequentemente usada em terapias combinadas com outros agentes antineoplásicos (KREITMAN, 2012). Além disso, a cladribina é eficaz na esclerose múltipla por reduzir seletivamente os linfócitos B e T, responsáveis pela resposta autoimune, sem comprometer excessivamente o sistema imunológico (MALTBY *et al.*, 2021). Esse perfil terapêutico torna a cladribina um fármaco essencial no contexto das doenças hematológicas malignas e das desordens autoimunes.

3.3.3. Vidarabina

A vidarabina (adenina-9- β -D-arabinofuranosídeo) (figura 6), historicamente usada como antiviral, foi um dos primeiros análogos de nucleosídeos a demonstrar eficácia clínica contra infecções virais, especialmente aquelas causadas pelo herpes-vírus. Como antiviral, atua bloqueando a síntese do ADN viral ao se incorporar ao material genético durante a replicação viral, o que leva à interrupção da cadeia de ADN (NAHATA, 1987). Mais tarde, descobriu-se que a vidarabina também possui propriedades antitumorais, funcionando de forma semelhante a outros análogos de purinas, como a fludarabina e a cladribina, interferindo na replicação do ADN em células cancerosas e promovendo citotoxicidade (SHARMA, *et al.* 2015).

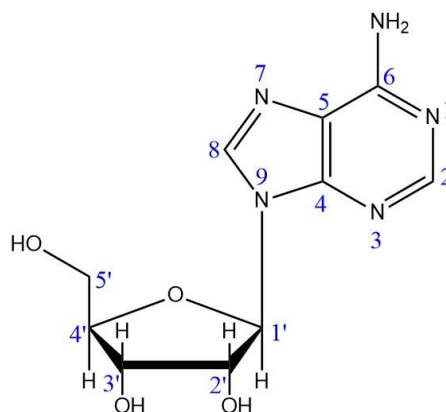


Figura 6: Estrutura da vidarabina.

A vidarabina é metabolizada intracelularmente em sua forma ativa, a vidarabina trifosfato, que inibe várias enzimas relacionadas à síntese de ADN, como a ADN polimerase. Uma vantagem significativa da vidarabina é sua seletividade, já que seu efeito tóxico é mais forte em células infectadas por vírus ou de rápida divisão, como as células cancerosas. No entanto, a vidarabina possui uma meia-vida curta no organismo, o que pode limitar sua eficácia e requerer administração frequente (WHITLEY, *et al.*, 1980). Além disso, sua eficácia antitumoral é inferior em comparação a outros análogos de purinas, limitando sua aplicabilidade em oncologia e tornando-a menos usada para esse fim (SHARMA, *et al.*, 2015).

Os efeitos adversos mais comuns da vidarabina incluem náusea, vômito, diarreia e, em alguns casos, neurotoxicidade com sintomas como tremores e desorientação, especialmente em doses elevadas (WHITLEY, *et al.*, 1980). Seu uso prolongado também pode causar efeitos hematológicos, como supressão da medula óssea, neurotoxicidade e mutagenicidade, aumentando o risco de infecções (SUNWEN, 1984).

Embora atualmente a vidarabina seja menos utilizada para tratar câncer, seu potencial como agente antitumoral tem sido investigado em leucemias e linfomas, dado seu mecanismo de ação contra a síntese de ADN e sua habilidade em induzir apoptose celular (LEE *et al.*, 1960). Em comparação com a fludarabina e a cladribina, a vidarabina é menos potente, mas pode servir como uma alternativa terapêutica em combinações de tratamentos para potencializar os efeitos antitumorais em determinados tipos de câncer hematológico.

3.4. Interação de compostos metálicos com proteínas

As proteínas não atuam nos organismos vivos de maneira isolada, mas, frequentemente, na forma de complexos metálicos ou de complexos proteína-proteína. Íons metálicos, além de influenciar a atividade das proteínas, também mediam interações proteína-proteína preservando a homeostase dos metais dentro da célula (WITKOWSKA; ROWIŃSKA-ŻYREK, 2019). O estudo de complexos metálicos como agentes anticâncer foi regido inicialmente pelo paradigma de seu direcionamento ao ADN, mas, na atualidade, proteínas têm sido investigadas como alvo (MEGGERS, 2009).

Complexos metálicos baseados em rutênio, ouro, gálio e platina podem ser seletivos e, especificamente, atingir proteínas (WANG; LI; SUN, 2019). O medicamento antirreumático auranofina tem como alvo a tioredoxina reductase e o proteasoma (SKOS *et al.*, 2023). Um composto organorutênio mostrou seletividade de alvo inesperada para plectina (MEIER *et al.*, 2017). A oxaliplatina mata as células cancerosas induzindo estresse na biogênese do ribossomo (BRUNO *et al.*, 2017). Íons metálicos podem interagir com proteínas através de ligações não covalentes ou coordenando-se diretamente em sítios disponíveis na estrutura. O conhecimento da estrutura da proteína, na forma livre e na forma complexada, preferencialmente em solução, auxilia no esclarecimento do mecanismo da atividade de íons e complexos metálicos que têm por alvo proteínas.

4. PARTE EXPERIMENTAL

Os procedimentos experimentais deste trabalho foram todos realizados no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.1 Preparo dos complexos

Foram preparados três complexos de platina(II) com diferentes análogos de purinas: fludarabina (Flu) (2-fluoroadenine-9- β -D-arabinofluranoside) para o complexo **1**, cladribina (Cla) (2-cloro-2'-deoxyadenosine) para o complexo **2** e vidarabina (Vid) (adenid-9- β -D-arabinofuranoside) para o complexo **3**, em solução aquosa.

Foram preparadas soluções estoques de tetracloridoplatinato(II) de potássio (K_2PtCl_4) a 5×10^{-2} mol L⁻¹ e de cada um dos ligantes a 1×10^{-3} mol L⁻¹ em água duplamente desionizada. Os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Para avaliar a interação da platina com cada análogo de purina, foram preparadas soluções com diferentes razões molares de platina e ligante. As soluções estoques dos ligantes foram aliqüotadas e diferentes volumes da solução estoque de K_2PtCl_4 foram adicionados a cada alíquota, conforme descrito na Tabela 1. Após a adição, cada solução foi agitada com auxílio do vortex por dois minutos, e o pH ajustado para 6,0 utilizando-se hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol L⁻¹ ou ácido clorídrico (HCl) 1% (m/v). Após 24 h da mistura, o pH foi novamente medido e reajustado, se necessário.

Para os testes biológicos, foram utilizadas soluções com razão molar metal:ligante = 1:1.

Tabela 1: Preparo das soluções dos complexos em diferentes razões molares.

Razão molar (Pt:Lig)	[Pt]/mol L ⁻¹	[Ligante]/mol L ⁻¹	V/ μ L K ₂ PtCl ₄ [5 \times 10 ⁻² mol L ⁻¹]	V/ μ L Ligante [1 \times 10 ⁻³ mol L ⁻¹]
0:1	0	1 \times 10 ⁻³	0	1500
1:5	2 \times 10 ⁻⁴	1 \times 10 ⁻³	6	1494
1:1	1 \times 10 ⁻³	1 \times 10 ⁻³	30	1470
2:1	2 \times 10 ⁻³	1 \times 10 ⁻³	60	1440
5:1	5 \times 10 ⁻³	1 \times 10 ⁻³	150	1350
8:1	8 \times 10 ⁻³	1 \times 10 ⁻³	240	1260
10:1	1 \times 10 ⁻²	1 \times 10 ⁻³	300	1200

4.2 Estudos espectroscópicos

4.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de ¹H

Os espectros de RMN de ¹H e COSY foram adquiridos utilizando o espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker AVANCE DRX400, na frequência de 400 MHz, à temperatura ambiente. A preparação dos complexos seguiu a mesma metodologia de complexação descrita anteriormente, porém com o uso de dióxido de hidrogênio deuterado (D₂O) como solvente, contendo TMS como padrão de referência. Para o ajuste de pH, utilizou-se HCl 1%(m/v) diluído em D₂O e uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ também diluída em D₂O.

Os espectros foram adquiridos imediatamente após o preparo das soluções dos três complexos nas razões molares Pt:ligante 0:1, 1:5, 1:1, 2:1, 5:1, 8:1 e 10:1, e novamente, após 24 horas de reação, nas razões molares de 0:1 a 2:1, devido à precipitação do composto nas amostras com maior excesso de platina.

4.2.2 Espectroscopia de absorção na região ultravioleta-visível

Os espectros de absorção eletrônica dos ligantes livres e dos complexos foram registrados em soluções aquosas, pH 6,0, contendo as razões molares Pt:ligante de 1:5; 1:1, 2:1, 5:1 e 10:1 na faixa de 200 e 450 nm, utilizando cubeta de quartzo de 1,0 cm em um espectrofotômetro Cary 50. Os espectros foram obtidos 24 horas após a preparação das soluções estoque concentradas, em pH 6,0 e, no momento da análise, as soluções foram diluídas em água duplamente desionizada, com o pH previamente ajustado para 6,0, até atingir a concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

4.2.3 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram registrados no aparelho JASCO J-815 na faixa de 200 a 300 nm. As medições foram realizadas 24 horas após o preparo das soluções de razão molar Pt:ligante de 0:1 a 5:1, em pH 6,0. No momento da análise, as soluções foram diluídas em água duplamente desionizada para a concentração de 1×10^{-4} mol L⁻¹ e o pH foi novamente aferido e reajustado quando necessário, para 6,0.

4.3 Avaliação da Atividade Citotóxica

4.3.1 Atividade citotóxica em células de leucemia mieloide crônica – linhagem K562

A atividade citotóxica dos compostos foi avaliada em células da linhagem K562, derivada de uma paciente com leucemia mieloide crônica em fase blástica terminal, adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo L-glutamina, suplementado com 1% de antibiótico e 10%

de soro fetal bovino, sendo mantidas a 37°C em uma atmosfera umidificada e com 5% de CO₂.

Os complexos foram preparados na razão molar 1:1 de platina e ligante, conforme descrito no protocolo de síntese, e diluídos em água duplamente desionizada ajustada para pH 6,0, no momento do ensaio. A citotoxicidade dos compostos foi determinada pela concentração capaz de inibir em 50% o crescimento celular (CI₅₀).

Para o ensaio, 1×10⁵ células mL⁻¹ foram incubadas por 72 horas na ausência e presença de concentrações crescentes dos complexos testados e dos ligantes livres. Foi feita também a análise da atividade do sal de partida, K₂PtCl₄, na concentração máxima utilizada nos complexos, para confirmar que efeito observado não é da platina livre. Após o período de incubação, as células foram contadas, a porcentagem de inibição do crescimento celular foi determinada utilizando a equação 1, em que C corresponde a concentração de células por mL em cada amostra analisada. Os valores de CI₅₀ de cada composto foram determinados a partir do gráfico de dose-resposta com auxílio do software Origin8.5, utilizando-se um ajuste sigmoidal (Boltzmann).

$$\%inibição\ do\ crescimento = \frac{(C_{células\ no\ branco} - C_{células\ em\ análise}) \times 100}{(C_{células\ no\ branco} - 1 \times 10^5)} \quad (1)$$

4.3.2 Determinação da concentração intracelular de complexo nas células tumorais

A concentração intracelular dos complexos **1** e **2**, que apresentaram menores valores de CI₅₀ e, portanto, maior atividade citotóxica, foi determinada nas células tumorais.

Após 72 horas de incubação com diferentes concentrações dos complexos, as células foram removidas do meio RPMI, ressuspensas em ácido nítrico a 33% (m/v),

e a concentração intracelular de platina foi medida por um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite, modelo Varian AA240Z.

4.3.3 Atividade citotóxica em células não cancerosas, queratinócitos - linhagem HaCat

A citotoxicidade dos complexos, assim como seus ligantes livres, foi avaliada em células não cancerosas da linhagem HaCat (queratinócitos humanos imortalizados). Para medir a viabilidade celular, foi utilizado o ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) que se baseia na redução do sal de tetrazólio, que possui coloração amarela, para cristais de formazan, de coloração arroxeadada, por células metabolicamente ativas.

As células HaCat, que são aderentes, foram preparadas na concentração de 1×10^5 células mL^{-1} e incubadas em placas de cultura por 24 horas, a 37°C e 5% de CO_2 , para aderirem. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos e reincubadas por 72 horas. Após esse período, o MTT foi adicionado e, após 4 horas de incubação, o sobrenadante foi removido, e o formazan resultante dissolvido em dmsO. A absorvância foi medida em 570 nm para determinar a concentração que inibe 50% da viabilidade celular (CI_{50}).

4.4 Estudo da interação dos complexos com proteínas

4.4.1 Interação com a proteína Albumina Sérica Bovina

A interação dos complexos com albumina sérica bovina (BSA) foi investigada por espectroscopia de fluorescência, na faixa de 300 a 480 nm, com excitação em 280 nm. Os complexos foram preparados 24 horas antes do experimento na razão molar 1:1, conforme descrito anteriormente no tópico 4.1. A solução de BSA foi preparada em tampão Tris-HCl (20 mmol L^{-1} , pH 7,2) a uma concentração de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Para cada experimento, 2,5 mL da solução de BSA foram adicionados a uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm, e titulações foram realizadas com alíquotas das soluções dos complexos, sob agitação magnética, avaliando a supressão de fluorescência dos triptofanos, presentes na proteína, após adição dos complexos. Foram analisados, também, os ligantes fludarabina, cladribina, vidarabina e o tetracloroplatinato(II) de potássio livres para fins de comparação.

Os dados de fluorescência foram plotados no software Origin8.5 e analisados utilizando as equações de Stern-Volmer (equações **2** e **3**) para determinar as constantes de afinidade. Nas equações, F_0 e F representam as intensidades relativas de fluorescência da BSA na ausência e presença do quencher, respectivamente; kq é a constante de velocidade de quenching; τ_0 é o tempo de vida médio do fluoróforo na ausência de quencher (10^{-8} s); $[Q]$ é a concentração do quencher. O produto $kq\tau_0$ é conhecido como constante de Stern-Volmer K_{sv} , K_b é a constante de ligação e n é o número de sítios de ligação.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + kq\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad (2)$$

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K_b + n \log[Q] \quad (3)$$

4.4.2 Interação com a proteína Abl

A interação dos compostos com a proteína Abl, que também possui triptofanos em sua estrutura, foi estudada de maneira similar à descrita no tópico 4.4.1, com a diferença de que foi utilizada a proteína Abl, gentilmente cedida pelo Professor Adolfo H. Moraes.

A concentração da solução concentrada de proteína Abl foi determinada por espectrometria de absorção no UV-Vis, utilizando a lei de Lambert-Beer ($\epsilon = 95230 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em $\lambda = 280 \text{ nm}$). Posteriormente, a solução foi diluída a $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão Tris-HCl 20 mmol L^{-1} , pH 7,2. Em seguida, 2,5 mL dessa solução foram titulados com alíquotas das soluções dos complexos na razão molar 1:1, assim como

dos ligantes livres, do tetracloroplatinato(II) de potássio (1×10^{-2} mol L⁻¹ em água) e da cisplatina (cis-diaminodicloridoplatina(II)) (1×10^{-3} mol L⁻¹ em água) para comparação. As constantes de ligação (K_b) foram determinadas utilizando a equação de Stern-Volmer (Equação 3).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparo dos complexos

Os complexos **1**, **2** e **3** foram preparados conforme descrito no tópico 4.1. Foram preparadas soluções aquosas nas seguintes razões molares platina:ligante: 0:1, 1:5, 1:1, 2:1, 5:1, 8:1 e 10:1, utilizando fludarabina, cladribina e vidarabina como ligantes para os complexos **1**, **2** e **3** respectivamente. Após 24 horas, observou-se a formação de precipitado nas soluções com razões molares 5:1, 8:1 e 10:1 para todos os complexos, devido ao excesso de platina, indicando que nessas condições as soluções não se mantiveram estáveis. Para os testes biológicos, foram utilizadas as soluções com razão molar metal:ligante de 1:1.

5.2 Estudos espectroscópicos

5.2.1 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

Foram adquiridos espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H para os ligantes fludarabina, cladribina e vidarabina, tanto na ausência quanto na presença de concentrações crescentes de platina (2×10^{-4} a 1×10^{-2} mol L $^{-1}$), com o objetivo de investigar a interação entre o íon metálico e os ligantes. Os espectros das soluções contendo os complexos em diferentes razões molares de platina/ligante foram registrados logo após a preparação das soluções e, novamente, após 24 horas, para avaliar a cinética da reação de complexação.

As atribuições dos sinais foram realizadas com auxílio dos espectros bidimensionais de ^1H RMN (COSY) dos ligantes livres (Figuras **7**, **8** e **9**), cujas atribuições, constantes de acoplamento (J) e multiplicidades estão descritas na Tabela **2**.

Tabela 2: Atribuições dos sinais dos espectros de ^1H RMN dos ligantes.

Ligante	H atribuído	δ (ppm) Shift	δ (ppm) Sinais	Multiplicidade	J (Hz)
Fludarabina	H8	8.3051	8.3051	Singleto (s)	-
	H1'	6.3126	6.3196; 6.3057	Dupleto (d)	5.5615
	H2'	4.5569	4.5711; 4.5573; 4.5427	Tripleto (t)	5.6816
	H3'	4.3679	4.3832; 4.3673; 4.3524	Tripleto (t)	6.1417
	H4'	4.0629	4.0812; 4.0740; 4.0690; 4.0641; 4.0615; 4.0569; 4.0519; 4.0446	Duplo dupleto duplo (ddd)	J₁:2.9313 J₂: 4.9097 J₃: 6.8288
	H5'	3.9623	3.9819; 3.9744; 3.9500; 3.9425	Duplo dupleto (dd)	J₁:2.9908 J₂: 12.7835
	H5''	3.8883	3.9104; 3.8974; 3.8787; 3.8664	Duplo dupleto (dd)	J₁:5.0814 J₂: 12.5324
Cladribina	H8	8.2859	8.2859	Singleto (s)	-
	H1'	6.4129	6.4301; 6.4129; 6.8919	Tripleto (t)	6.8919
	H2'	2.8242	2.8590; 2.8430; 2.8238; 2.8050; 2.7895	Quinteto (qui)	2.8242
	H2''	2.5554	2.5849; 2.5766; 2.5692; 2.5609; 2.5498; 2.5412; 2.5343; 2.5259	Duplo dupleto duplo (ddd)	J₁:3.3535 J₂: 6.2187 J₃: 14.0475
	H3'	4.6498	4.6648; 4.6573; 4.6498; 4.6419; 6.6351	Quinteto (qui)	2.9742
	H4'	4.1900	4.2029; 4.1943; 4.1847; 4.1771	Quarteto (qua)	3.4432
	H5'	3.8569	3.8767; 3.8687; 3.8450; 3.8371	Duplo dupleto (dd)	J₁: 3.1809 J₂:12.6635
	H5''	3.7903	3.8113; 3.8098; 3.7795; 3.7695	Duplo dupleto (dd)	J₁: 4.1011 J₂:12.6235
Vidarabina	H8	8.3857	8.3857	Singleto (s)	-
	H2	8.2622	8.2622	Singleto (s)	-
	H1'	6.4458	6.4528; 6.4388	Dupleto (d)	6.4458
	H2'	4.5836	4.5977; 4.5838; 4.5695	Tripleto (t)	5.6562
	H3'	4.3896	4.4049; 4.3897; 4.3744	Tripleto (t)	6.0965
	H4'	4.0949	4.1127; 4.1051; 4.1004; 4.0969; 4.0932; 4.0896; 4.0845; 4.0769	Duplo dupleto duplo (ddd)	J₁:2.9780 J₂: 4.9400 J₃: 6.3591
	H5'	3.9813	4.0010; 3.9934; 3.9692; 3.9617	Duplo dupleto (dd)	J₁: 3.0290 J₂:12.7033
	H5''	3.9049	3.9266; 3.9144; 3.8949; 3.8828	Duplo dupleto (dd)	J₁: 4.9124 J₂:12.8161

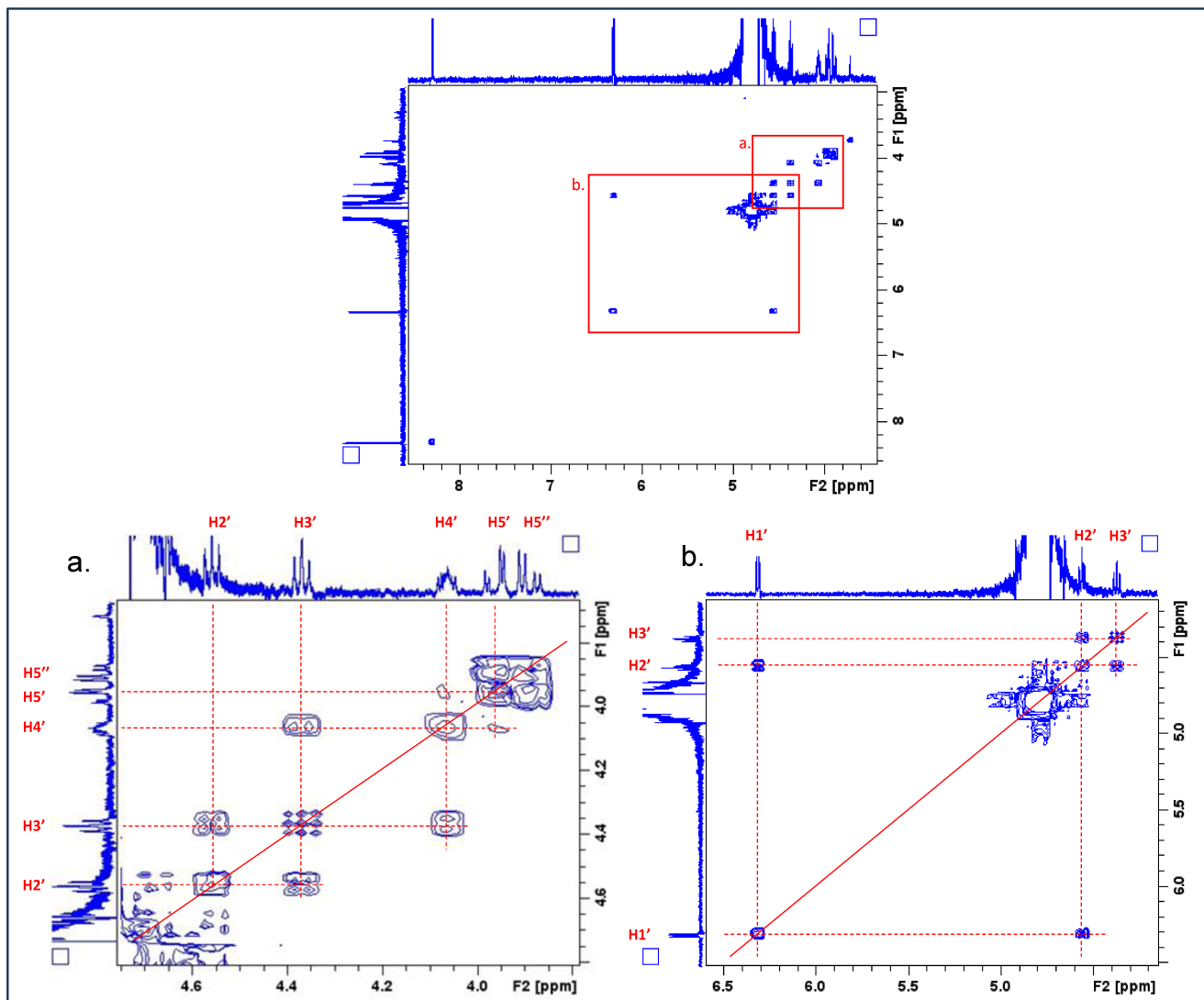


Figura 7: Espectro bidimensional (COSY) de ¹H RMN da fludarabina em D₂O, pH = 6,0.

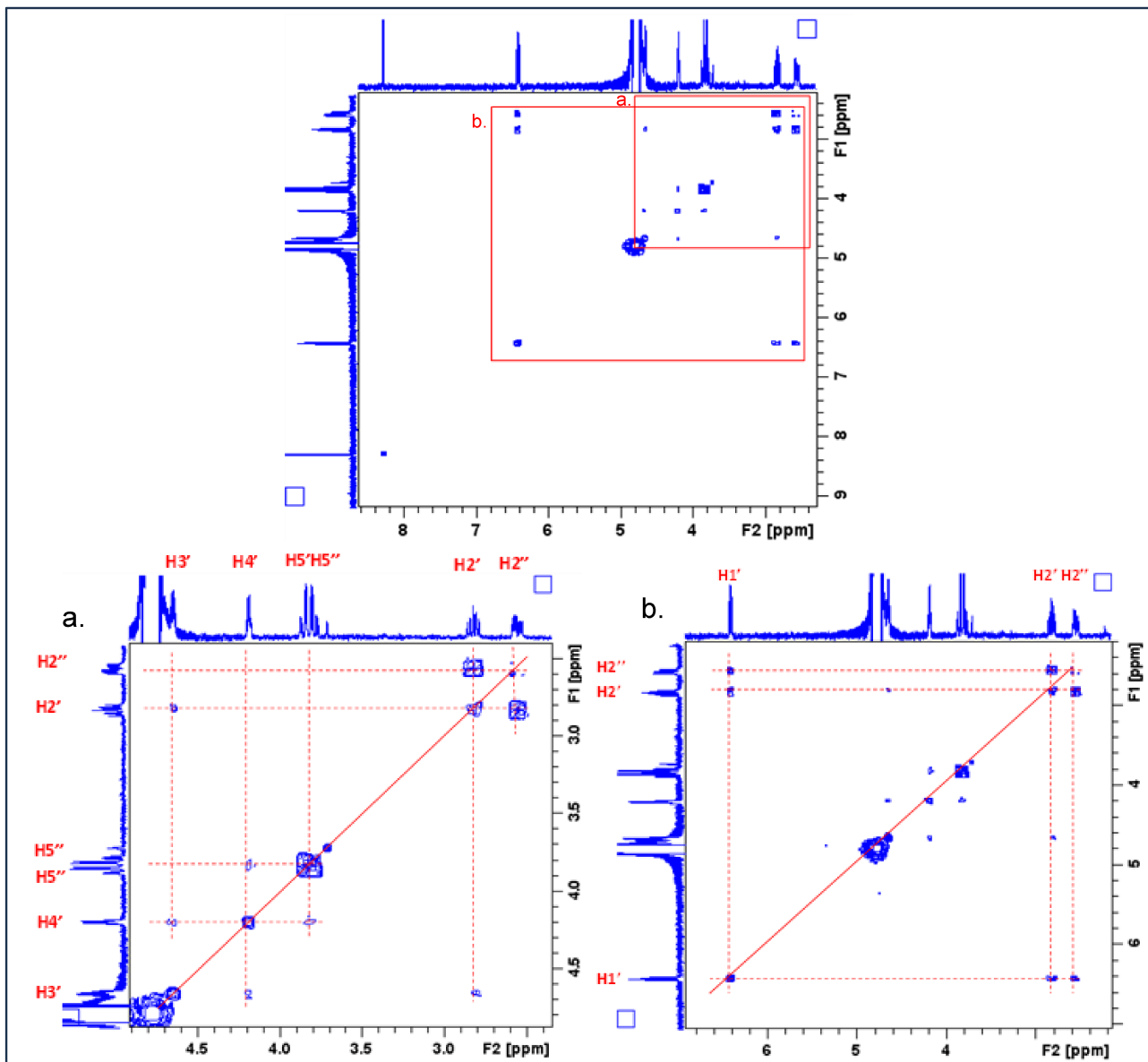


Figura 8: Espectro bidimensional (COSY) de ¹H RMN da cladribina em D₂O, pD = 6,0.

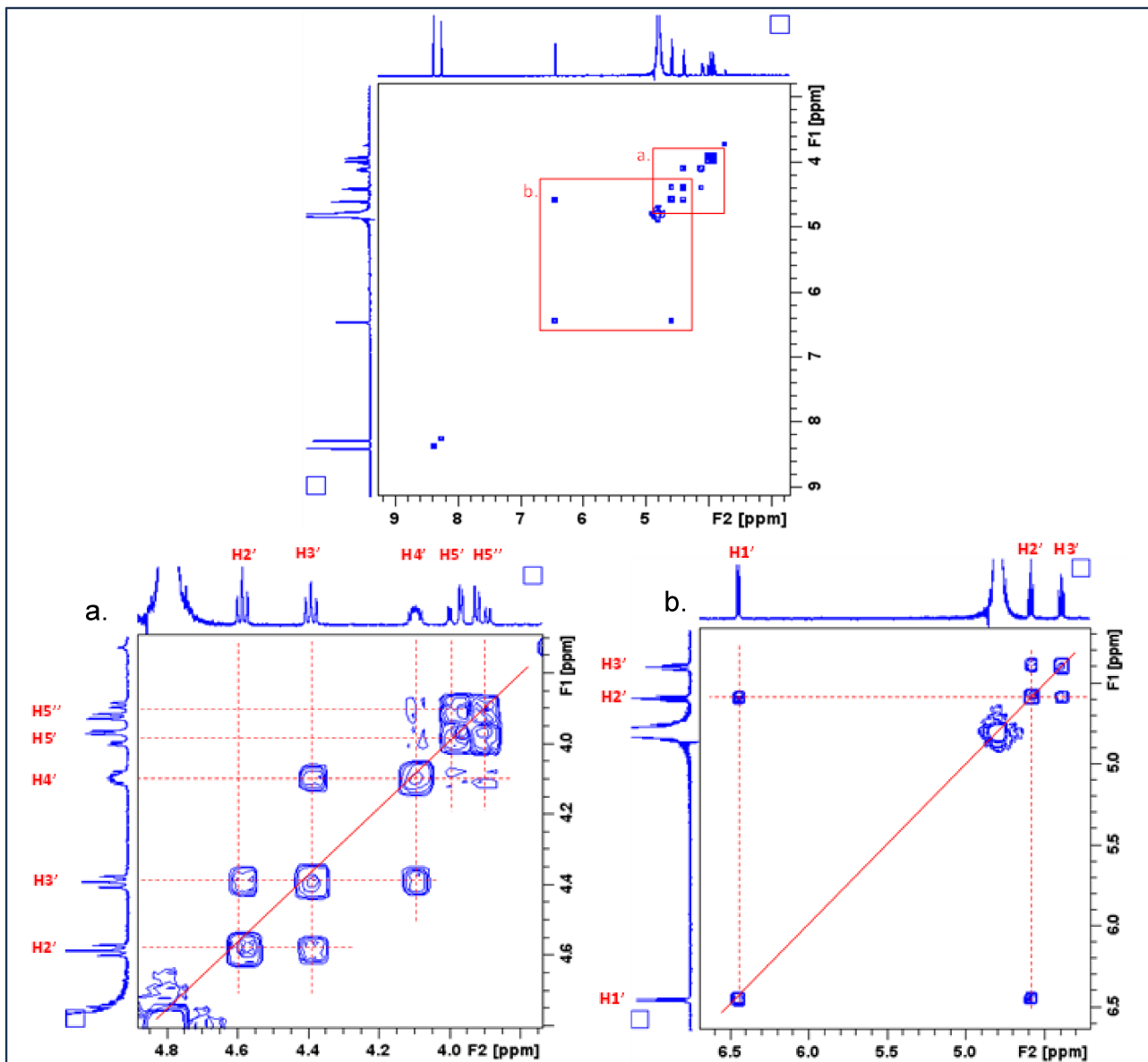


Figura 9: Espectro bidimensional (COSY) de ^1H RMN da vidarabina em D_2O , $\text{pD} = 6,0$.

Para a fludarabina (figura 10), as principais mudanças observadas após a adição de Pt(II) foram o desaparecimento do pico em δ 8,305, identificado com H8_a (referente ao H8 da base nitrogenada da fludarabina livre), e o surgimento de um novo pico em δ 8,778, identificado como H8_b, sugerindo a coordenação da platina no nitrogênio N7. Além disso, o duplete centrado em δ 6,313, identificado como H1'_a, (referente ao H1' do açúcar da fludarabina livre) com a coordenação desloca-se para δ 6,366, (H1'_b). Observou-se também um pequeno deslocamento do pico centrado em δ 4,062, atribuído ao H4', para δ 4,096, à medida em que a concentração de Pt(II) aumentava, sugerindo uma alteração conformacional no açúcar da molécula (POLISSIOU *et al.*, 1981); (FARRELL, 1991); (MELLISH *et al.*, 1997). Nas soluções contendo menor teor de platina (de 0:1 a 2:1 Pt/ligante), essas mudanças se tornaram mais evidentes após 24 horas de reação na proporção metal:ligante = 1:1, quando se observa o aparecimento de um sinal centrado em δ 8,766, devido à presença de uma espécie complexa, e o desaparecimento do sinal em H8_a, indicando que a reação de complexação não foi imediata, mas se completou após esse período.

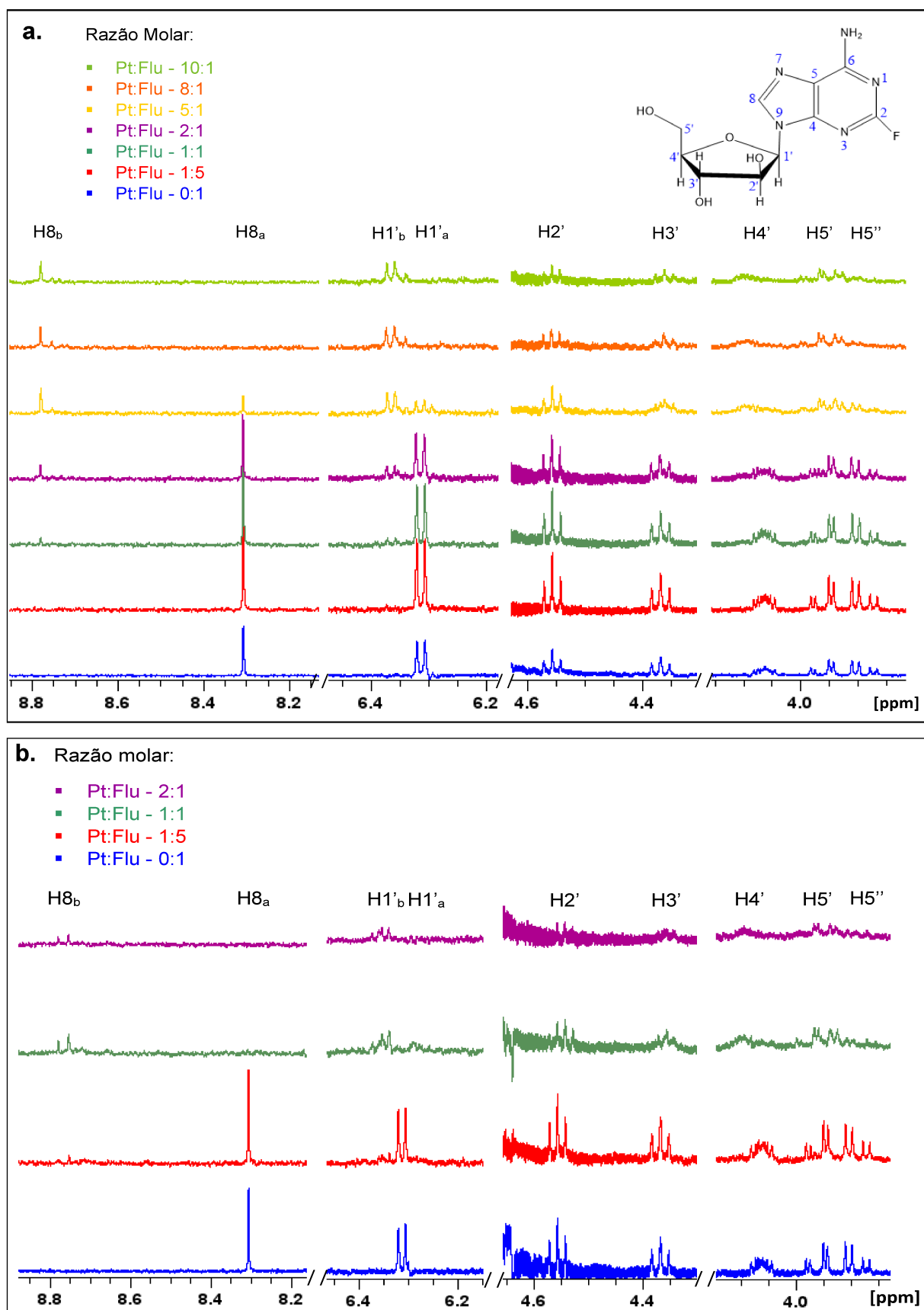


Figura 10: Espectros de ^1H RMN da fludarabina [$1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$] em D_2O , $\text{pD} = 6,0$ na ausência e presença de crescentes concentrações de Pt, [2×10^{-4} a $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$] imediatamente (a) e 24 horas (b) após a preparação.

Para o complexo **2** (figura **11**), as modificações foram semelhantes às observadas para a fludarabina, com o desaparecimento do pico em δ 8,287 (H8_a) atribuído ao H8 da base nitrogenada da cladribina livre, e o surgimento de um novo sinal centrado em δ 8,776 (H8_b), indicando a complexação da platina no nitrogênio N7. Houve ainda um deslocamento do pico correspondente ao H1' do açúcar da cladribina livre, de δ 6,415 para δ 6,449, devido a uma alteração conformacional na ribose, resultante da complexação. Após 24 horas de reação, na relação metal:ligante = 1:1 o sinal de H8_a em δ 8,287 não é mais visível. Acima da razão molar metal:ligante = 2:1, o excesso de platina provocou a precipitação do composto, levando ao desaparecimento dos picos no espectro.

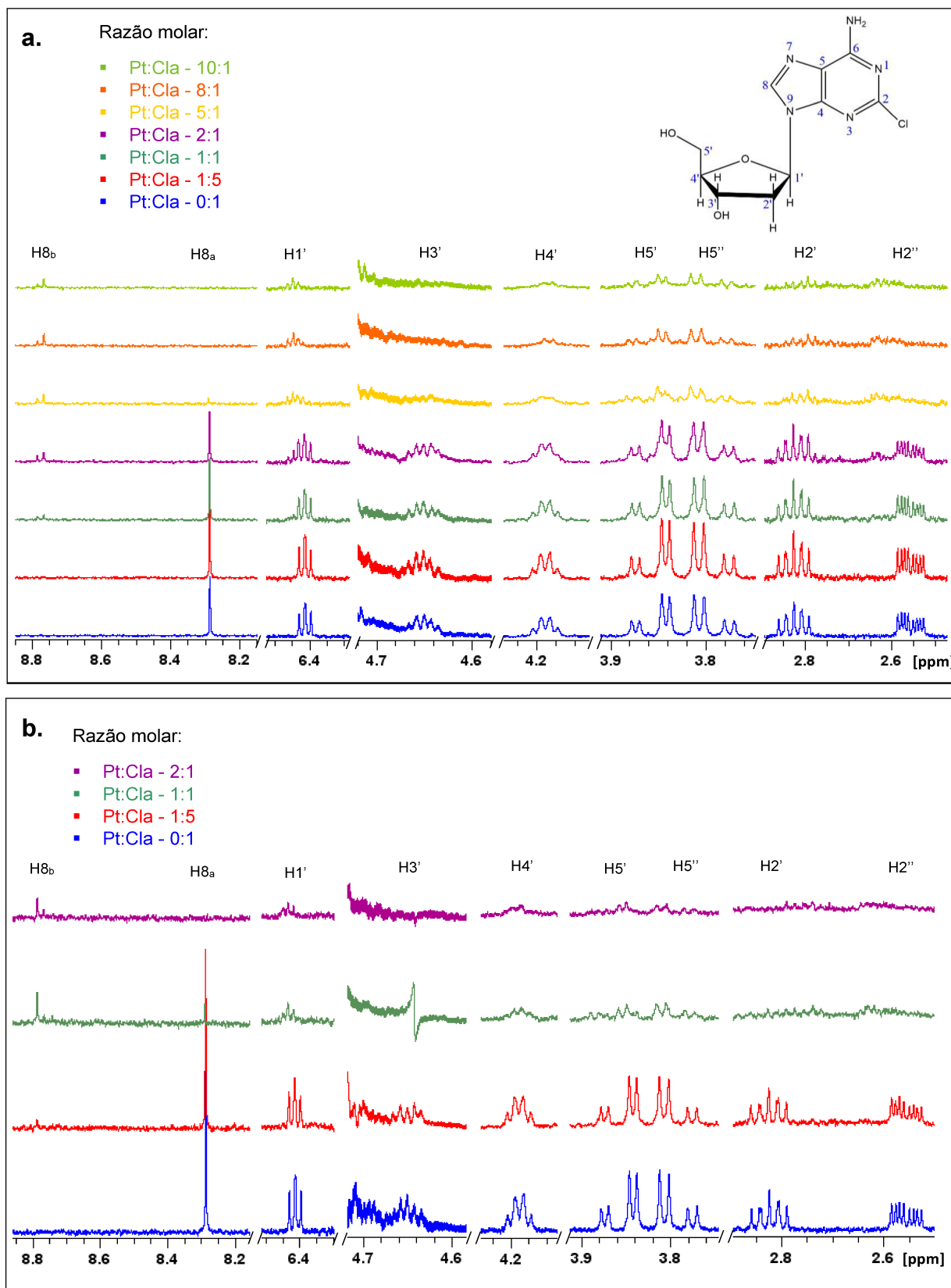


Figura 11: Espectros de ^1H RMN da cladribina [1×10^{-3} mol L^{-1}] em D_2O , $\text{pD} = 6,0$ na ausência e presença de crescentes concentrações de Pt, [2×10^{-4} a 1×10^{-2} mol L^{-1}] imediatamente (a) e 24 horas (b) após a preparação.

A vidarabina (figura 12), diferentemente da fludarabina e da cladribina, possui em sua estrutura um hidrogênio em C2, que ressona em δ 8,25. No caso do complexo 3, além dos sinais em H2 e H8 dois novos sinais são observados em δ 8,321 e em δ 8,714, atestando a presença de duas espécies em equilíbrio: a vidarabina livre e uma espécie coordenada à platina. Também houve uma redução na intensidade do duplete centrado em δ 6,446 (H1'_a, referente ao H1' do açúcar da vidarabina livre) e o aparecimento de um novo duplete em δ 6,487(H1'_b) devido à presença de duas espécies em equilíbrio: ligante livre e complexo metálico. A alteração no deslocamento químico do H1' pode ser devida a uma mudança conformacional no açúcar. Nesse caso, os sinais atribuídos ao ligante livre ainda podem ser vistos nas soluções contendo excesso de Pt(II) e mesmo após 24 horas, indicando uma menor estabilidade do complexo formado com relação aos ligantes anteriores.

A coordenação de íons tetracloroplatinato(II) com a fludarabina, a cladribina e a vidarabina foi acompanhada por RMN de ¹H. Estudos de substituição dos ligantes cloreto por água no [PtCl₄]²⁻ mostraram que a espécie predominante em solução aquosa é a [PtCl₃(H₂O)]⁻ (POLISSIOU *et al.*, 1981). Para os três sistemas estudados, a coordenação à Pt(II) ocasionou o deslocamento do hidrogênio em C8 para regiões de maior energia. Esse resultado indica a coordenação da platina(II) ao nitrogênio na posição 7, acarretando uma polarização na ligação C-H8, que fica elétron-deficiente. Alterações observadas em hidrogênios do açúcar indicam que a coordenação à platina(II) ocasiona uma mudança conformacional. A adição de Pt(II) alterou os espectros até a relação estequiométrica 1:1, indicando que a espécie predominante na solução deve ser [PtCl₃(L)]⁻, onde L representa os três análogos de nucleosídeos estudados. As variações observadas nos espectros de ¹H indicam que a ligação da Pt(II) à vidarabina é mais fraca do que à fludarabina e à cladribina.

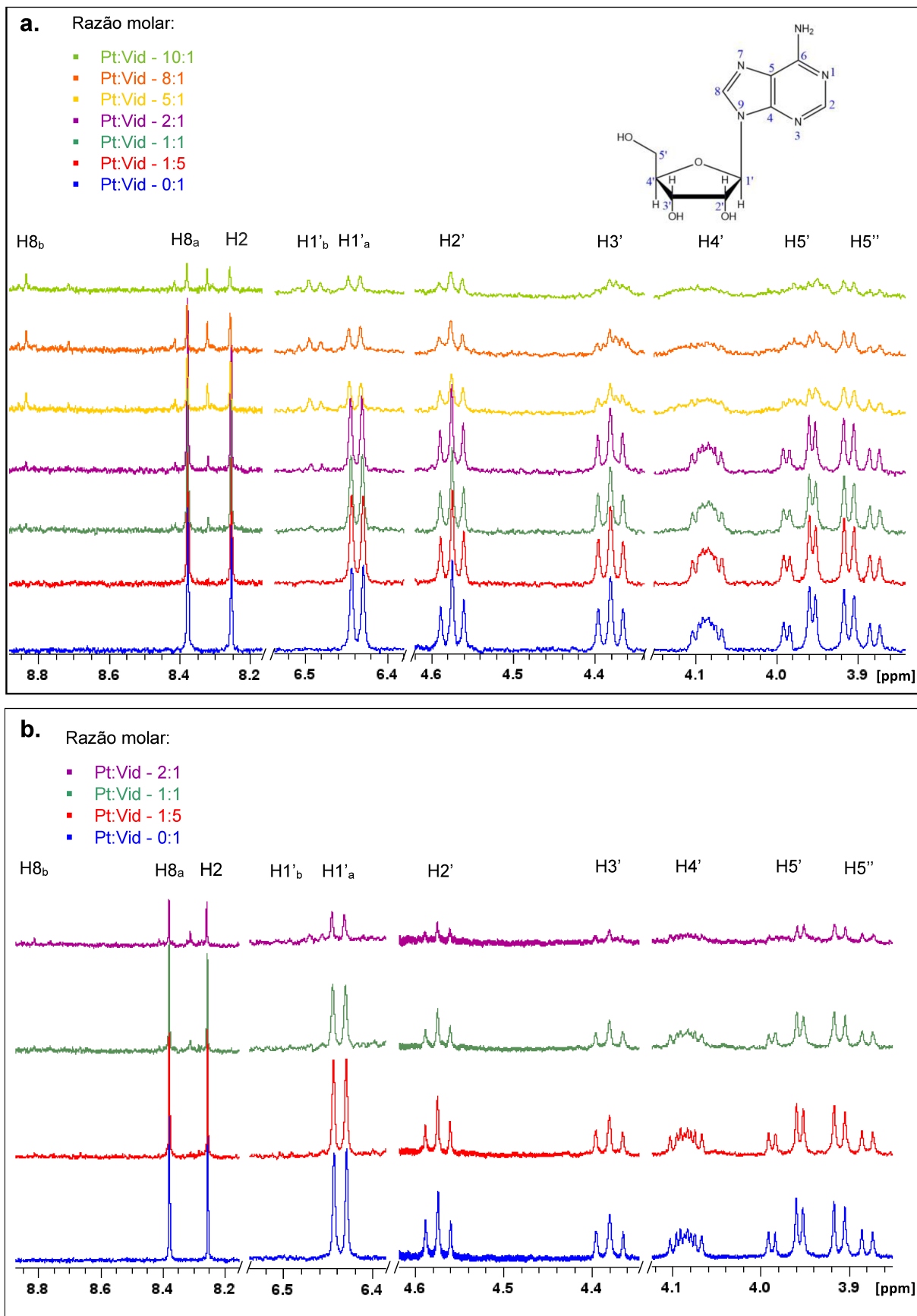


Figura 12: Espectros de ^1H RMN da vidarabina [1×10^{-3} mol L^{-1}] em D_2O , $\text{pD} = 6,0$ na ausência e presença de crescentes concentrações de Pt, [2×10^{-4} a 1×10^{-2} mol L^{-1}] imediatamente (a) e 24 horas (b) após a preparação.

5.2.2 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

A complexação da platina com os ligantes também foi estudada por espectrometria de absorção molecular na região do UV-Vis. Foram obtidos espectros eletrônicos dos ligantes, tanto na ausência quanto na presença de concentrações crescentes de platina. A adição do íon metálico modificou significativamente os espectros dos ligantes, evidenciando a formação das espécies complexas em solução.

Os ligantes livres exibem uma banda centrada em 260 nm, atribuída a uma transição intraligante do tipo $\pi-\pi^*$. Com a adição de platina, observou-se uma diminuição progressiva da intensidade dessa banda, até o seu desaparecimento completo, juntamente com o surgimento de uma nova banda em 320 nm, relacionada à transferência de carga do metal para o ligante (MLCT, $d-\pi^*$) (Figuras **13**, **14** e **15**).

A adição de Pt(II) provoca um efeito hipocrômico na banda em 260 nm e o aparecimento e intensificação de uma banda centrada em 320 nm, até a razão molar 1:1. Pode-se observar um pequeno deslocamento batocrômico da banda em 260 nm, que diminui na ordem: complexo da fludarabina, cladribina e vidarabina. Além disso, a ocorrência de um ponto isobéstico atesta para a presença de duas espécies que absorvem em solução: o ligante livre e um complexo do tipo 1:1. A adição de excesso de íon metálico causa a diminuição da intensidade das duas bandas, provavelmente devido à precipitação dos complexos.

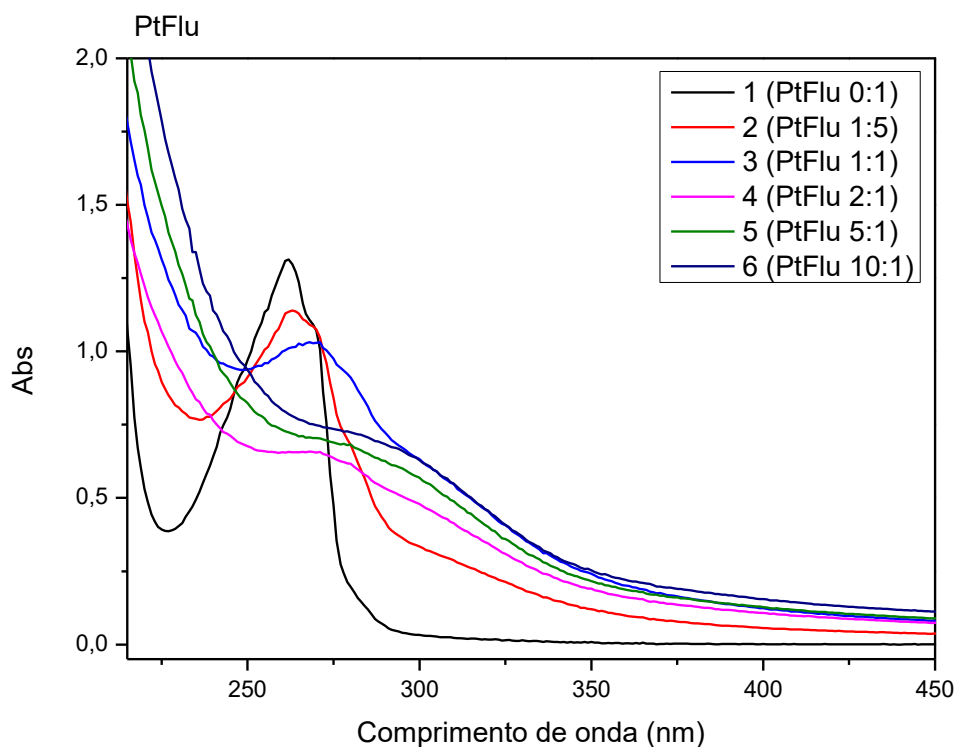


Figura 13: Espectro eletrônico da fludarabina [$5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$] em H_2O , $\text{pH} = 6,0$ na ausência e presença de crescentes concentrações de Pt, [2×10^{-4} a $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$] após 24 horas da preparação.

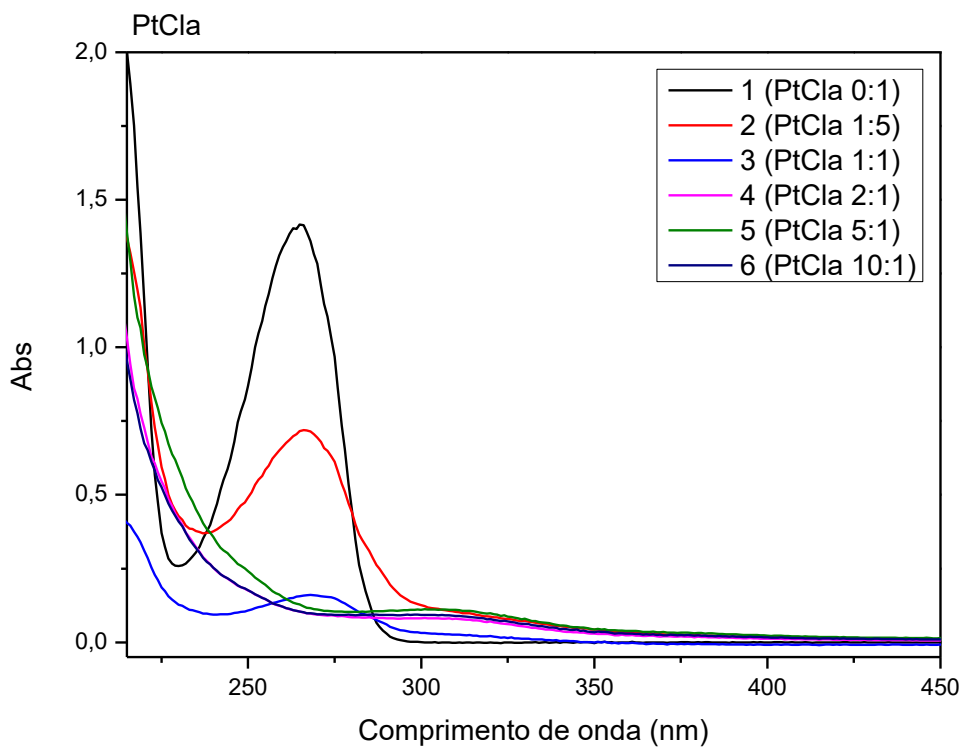


Figura 14: Espectro eletrônico da cladribina [$5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$] em H_2O , $\text{pH} = 6,0$ na ausência e presença de crescentes concentrações de Pt, [2×10^{-4} a $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$] após 24 horas da preparação.

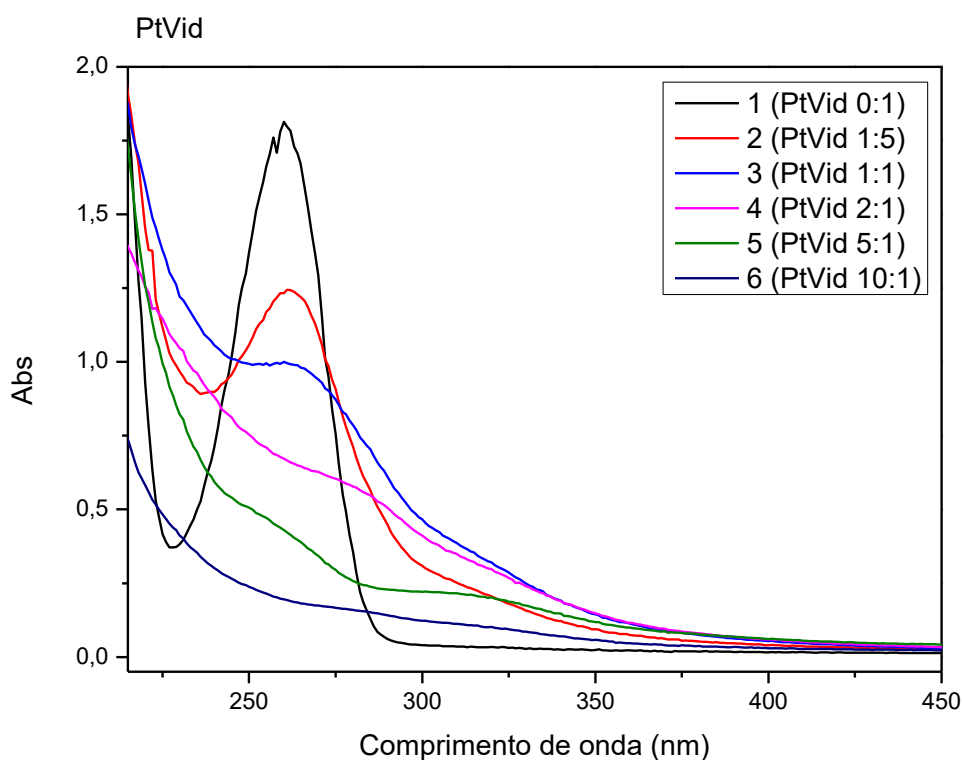


Figura 15: Espectro eletrônico da vidarabina [$5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$] em H_2O , $\text{pH} = 6,0$ na ausência e presença de crescentes concentrações de Pt, [2×10^{-4} a $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$] após 24 horas da preparação.

5.2.3 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular dos três análogos de purina foram registrados na ausência e na presença de diferentes concentrações íons Pt(II), figuras **16**, **17** e **18**.

A posição do açúcar com relação à da base, em torno da ligação glicosídica, define duas conformações designadas como anti e sin. As estruturas representadas nesse trabalho correspondem à conformação anti, que é mais estável em solução. Os sinais dos efeitos Cotton nessas moléculas são controlados pela disposição do anel de furanose em relação à base, que por sua vez é controlada principalmente pela configuração em C-1'. De modo geral, os ligantes apresentam 3 bandas nos espectros de dicroísmo circular na região analisada: uma banda positiva em torno de 210-220,

uma banda negativa em torno de 250-260 nm e outra positiva em aproximadamente 290 nm.

A adição de Pt(II) a uma solução aquosa de vidarabina, causou uma leve intensificação das bandas. No caso da fludarabina, a adição de platina leva a uma diminuição das bandas descritas sem, contudo, chegar a inverter os sinais. O resultado mais acentuado foi observado para o sistema Pt(II)-cladribina: na proporção molar metal-ligante de 5:1, observa-se a inversão dos sinais das bandas, o que indica uma mudança na conformação da desoxirribose.

Esses resultados estão de acordo com os deslocamentos dos sinais correspondentes aos H1' dos açúcares observados nos espectros de RMN de ^1H .

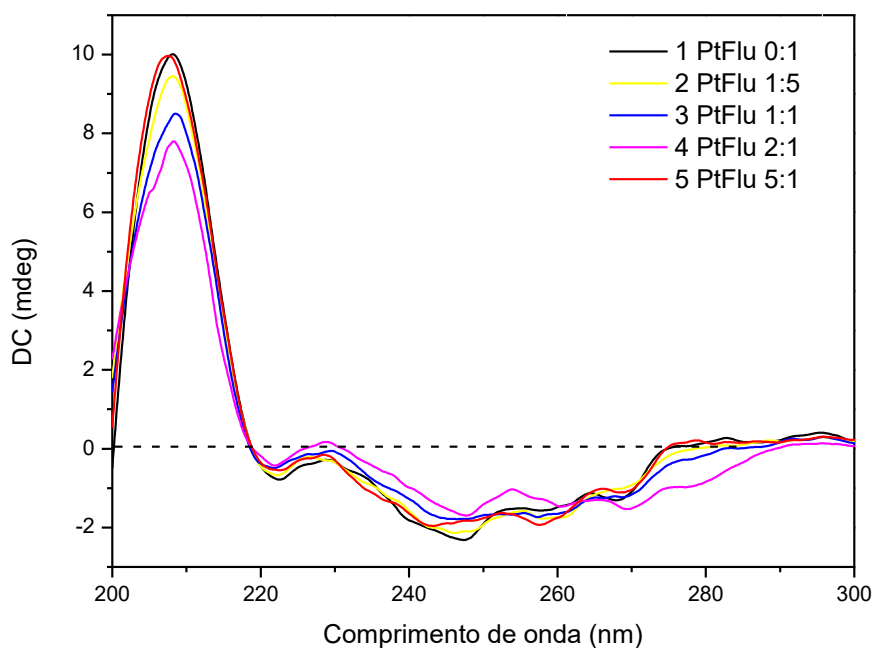


Figura 16: Espectro de dicroísmo circular da fludarabina [1×10^{-4} mol L^{-1}] em H_2O , pH = 6,0 na ausência e presença de crescentes concentrações de Pt, [2×10^{-4} a 5×10^{-3} mol L^{-1}] após 24 horas da preparação.

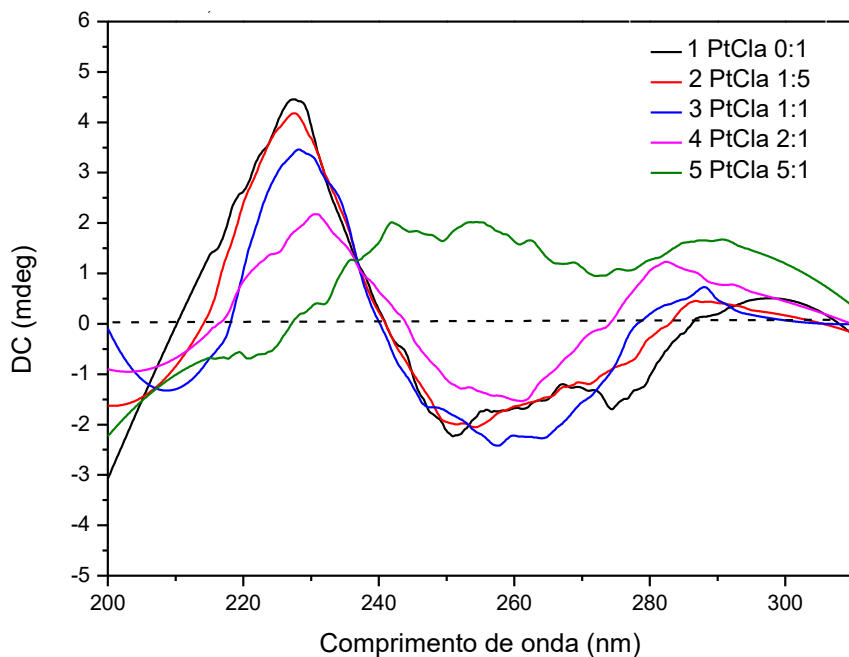


Figura 17: Espectro de dicroísmo circular da cladribina [1×10^{-4} mol L $^{-1}$] em H₂O, pH = 6,0 na ausência e presença de crescentes concentrações de Pt, [2×10^{-4} a 5×10^{-3} mol L $^{-1}$] após 24 horas da preparação.

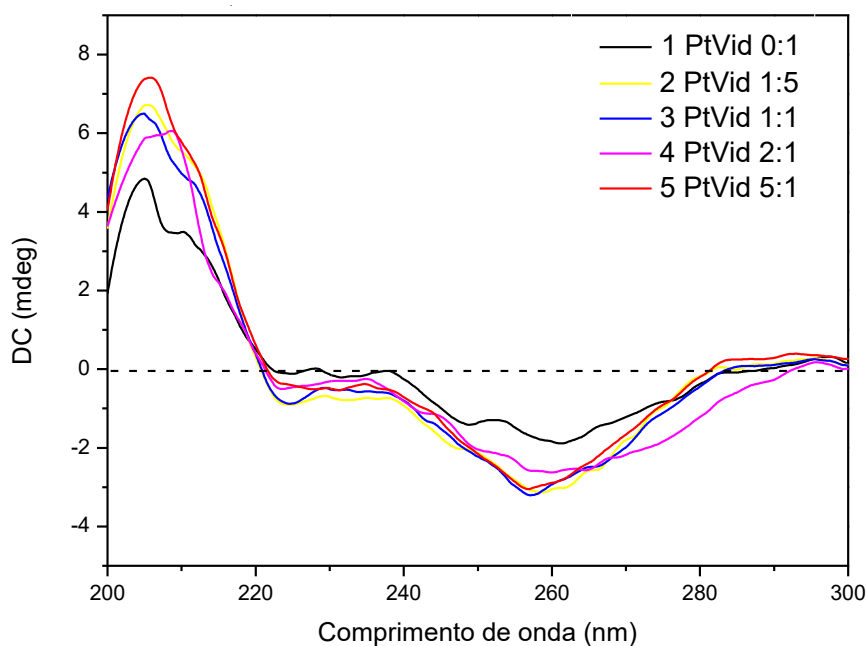


Figura 18: Espectro de dicroísmo circular da vidarabina [1×10^{-4} mol L $^{-1}$] em H₂O, pH = 6,0 na ausência e presença de crescentes concentrações de Pt, [2×10^{-4} a 5×10^{-3} mol L $^{-1}$] após 24 horas da preparação.

5.3 Avaliação da Atividade Citotóxica

5.3.1 Atividade citotóxica em células de leucemia mieloide crônica – K562

Os ensaios *in vitro* fornecem dados relevantes importantes sobre a citotoxicidade de compostos, sendo uma etapa preliminar na avaliação de seu potencial antitumoral. Com base nisso, os complexos sintetizados em solução na estequiometria metal-ligante 1:1 foram avaliados quanto à sua atividade citotóxica em células de leucemia mieloide crônica (linhagem K562), assim como os seus ligantes livres, utilizando o ensaio de viabilidade celular.

As curvas dose-respostas (figuras 19, 20 e 21) mostraram que todos os compostos apresentaram efeito inibitório no crescimento celular de maneira dependente da concentração. Os valores obtidos de CI_{50} de cada composto estão apresentados na Tabela 3, juntamente com o valor obtido para a cisplatina, para efeito de comparação.

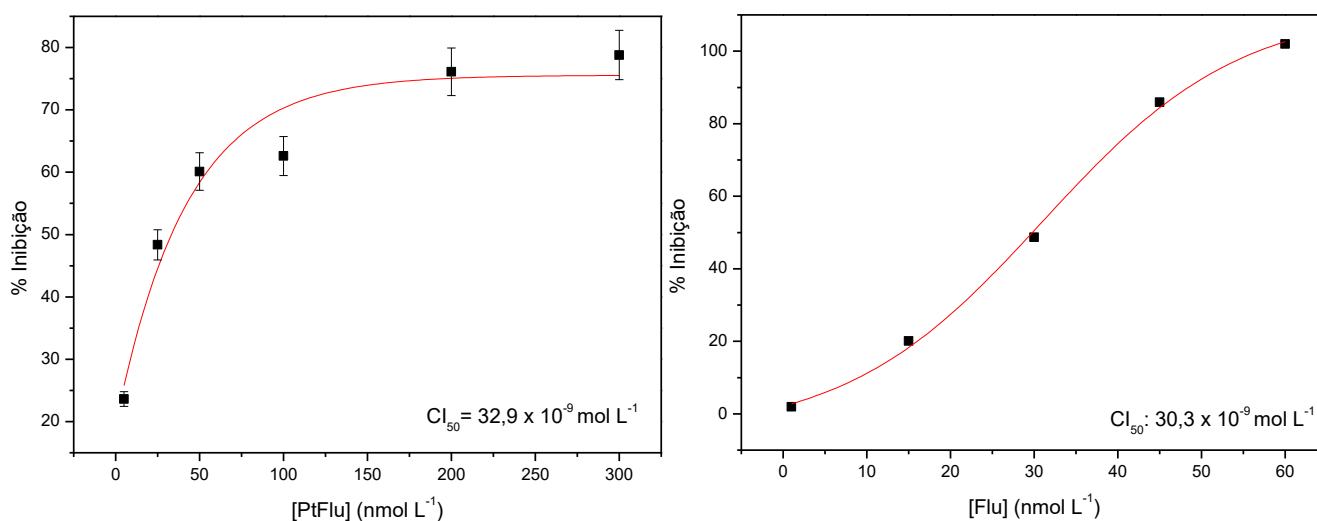


Figura 19: Citotoxicidade do complexo 1 e da fludarabina livre nas células de leucemia mieloide crônica.

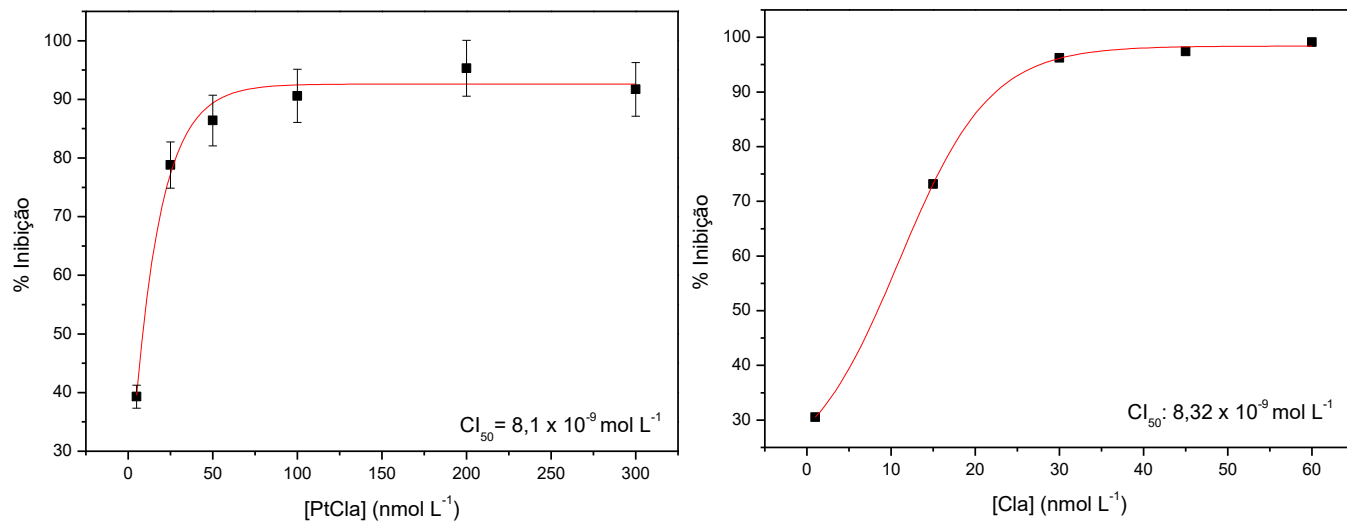


Figura 20: Citotoxicidade do complexo **2** e da cladribina livre nas células de leucemia mieloide crônica.

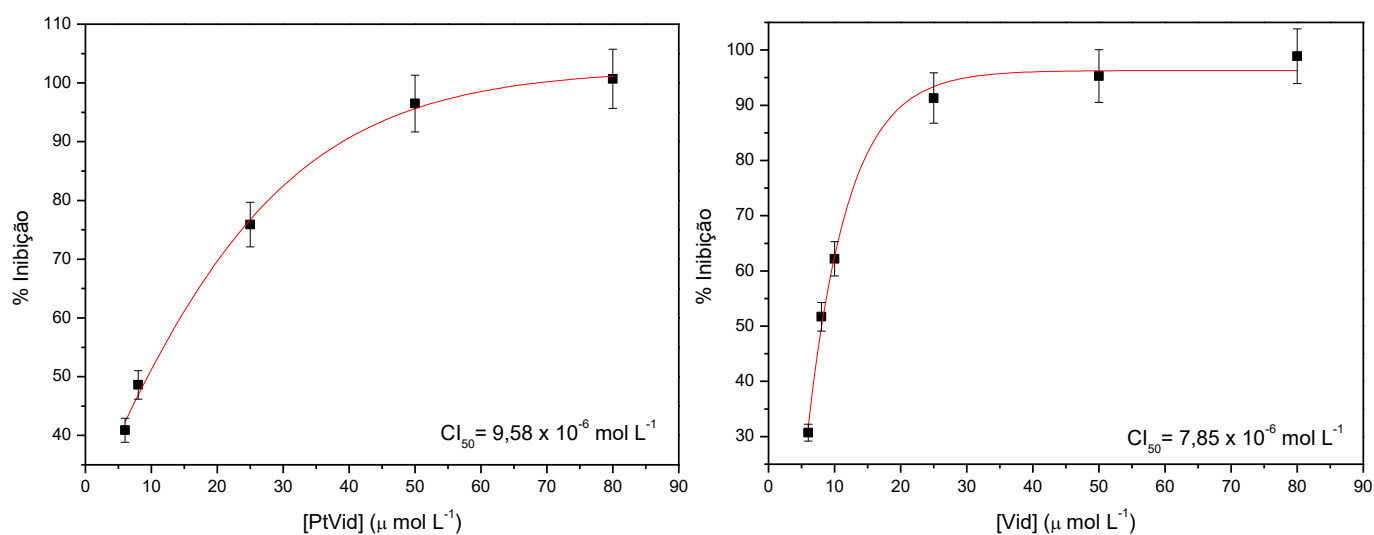


Figura 21: Citotoxicidade do complexo **3** e da vidarabina livre nas células de leucemia mieloide crônica.

Tabela 3: Valores de CI_{50} dos ligantes livres, complexos e cisplatina na linhagem celular K562.

Composto	CI_{50} (mol L ⁻¹)
Fludarabina	$30,3 \times 10^{-9}$
Complexo 1	$32,9 \times 10^{-9}$
Cladribina	$8,32 \times 10^{-9}$
Complexo 2	$8,10 \times 10^{-9}$
Vidarabina	$7,85 \times 10^{-6}$
Complexo 3	$9,85 \times 10^{-6}$
Cisplatina	$1,00 \times 10^{-6}$

Os resultados das CI_{50} indicaram que a complexação da platina não aumentou a citotoxicidade em relação aos ligantes livres. No entanto, tanto os complexos quanto os ligantes livres demonstraram alta citotoxicidade, sendo o complexo **1** cerca de trinta vezes e o complexo **2** cerca de cento e vinte vezes mais ativo que a cisplatina, enquanto que para o complexo **3**, a citotoxicidade foi aproximadamente dez vezes menor, nas mesmas condições experimentais. Esses resultados são promissores para o planejamento de novos fármacos que possam reduzir a resistência celular, pois mostram que a complexação mantém a eficiência citotóxica dos ligantes.

5.3.2 Determinação da concentração intracelular nas células tumorais

Para verificar a capacidade dos complexos de atravessar a membrana celular e a existência ou não de uma correlação entre a atividade citotóxica e a concentração intracelular de complexo, foi realizada a dosagem da concentração de platina nas células, após 72 horas de incubação das células de leucemia mieloide crônica com os complexos mais ativos: complexos **1** e **2**.

A análise dos gráficos (figuras **22** e **23**), que relacionam a inibição do crescimento celular com a concentração intracelular de platina, mostrou que o efeito citotóxico dos complexos está associado à sua acumulação dentro das células. As concentrações de platina no interior das células, quando incubadas com as

concentrações de CI_{50} foram de $7,4 \times 10^{-18}$ e $2,1 \times 10^{-17}$ mol célula⁻¹ para os complexos **1** e **2**, respectivamente.

Estudos anteriores (PEREIRA-MAIA; GARNIER-SUILLEROT, 2003) demonstraram que a incubação de células de câncer de pulmão (GLC4) com cisplatina e carboplatina resultou em níveis intracelulares de platina semelhantes, cerca de $9,8 \times 10^{-17}$ mol célula⁻¹. Esses resultados corroboram com os dados obtidos neste estudo.

Os resultados obtidos para os complexos inéditos de Pt(II) com a fludarabina e a cladribina são muito importantes, pois evidenciam que a alta eficácia medida nos ensaios de citotoxicidade está relacionada com a quantidade de complexo metálico incorporada pelas células cancerosas.

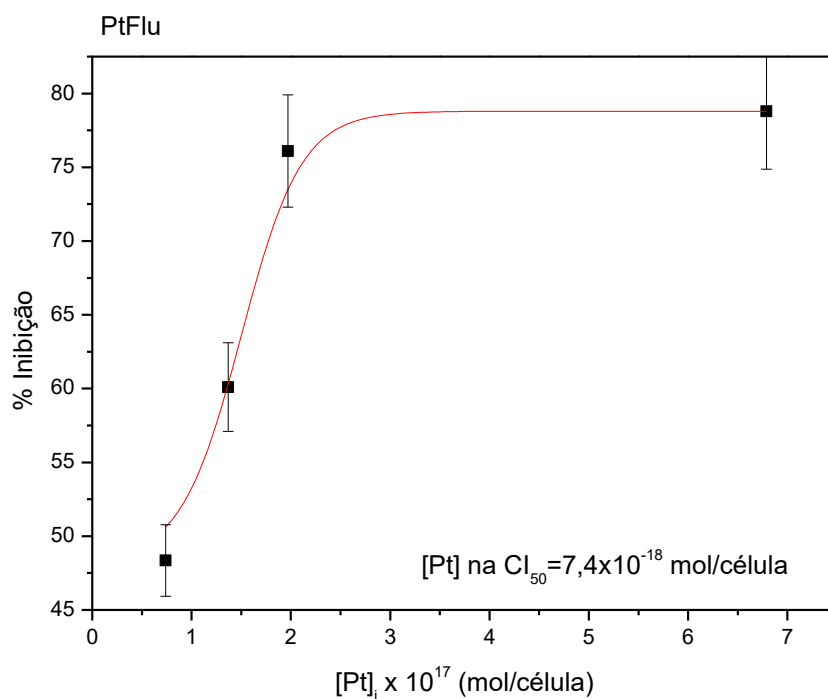


Figura 22: Relação entre a concentração intracelular de platina e a porcentagem de inibição do crescimento celular após tratamento da linhagem celular K562 com o complexo **1**.

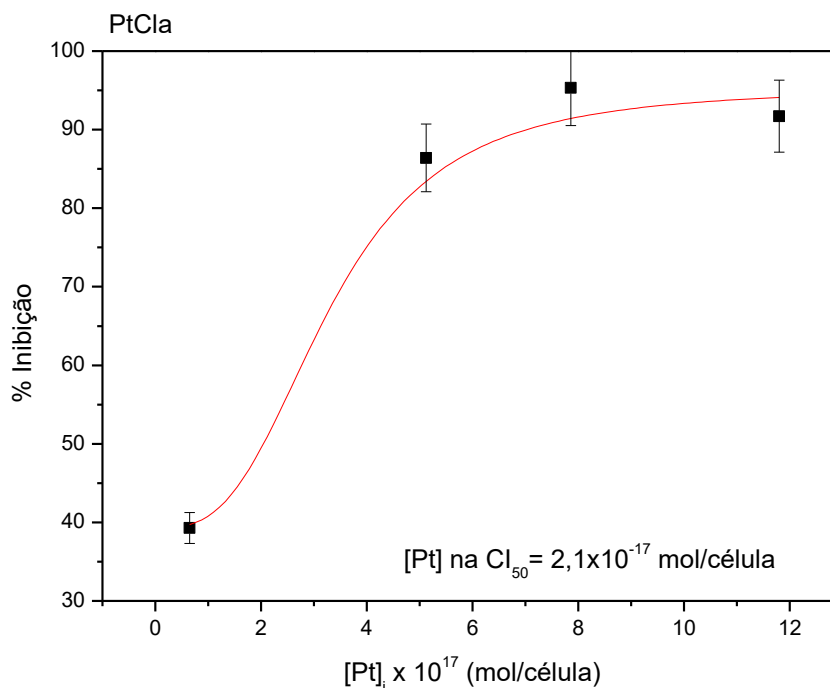


Figura 23: Relação entre a concentração intracelular de platina e a porcentagem de inibição do crescimento celular após tratamento da linhagem celular K562 com o complexo **2**.

5.3.3 Atividade citotóxica em células de queratinócitos não cancerosas – HaCat

Com o objetivo de avaliar a toxicidade dos complexos em células não cancerosas e verificar uma possível seletividade, a linhagem de células de queratinócitos não cancerosos (HaCat) foi tratada com os complexos **1**, **2** e **3** e seus ligantes livres, conforme a metodologia detalhada no tópico 4.3.3.

As curvas dose-resposta, representando a porcentagem de viabilidade celular em função da concentração dos compostos (figuras **24** e **25**), foram geradas para cada um. Os valores de CI_{50} obtidos para os complexos e ligantes livres na linhagem HaCat estão listados na tabela **4**, juntamente com valores de CI_{50} para as células de leucemia mieloide crônica (K562). Os valores obtidos para a cisplatina também estão indicados, para fins de comparação.

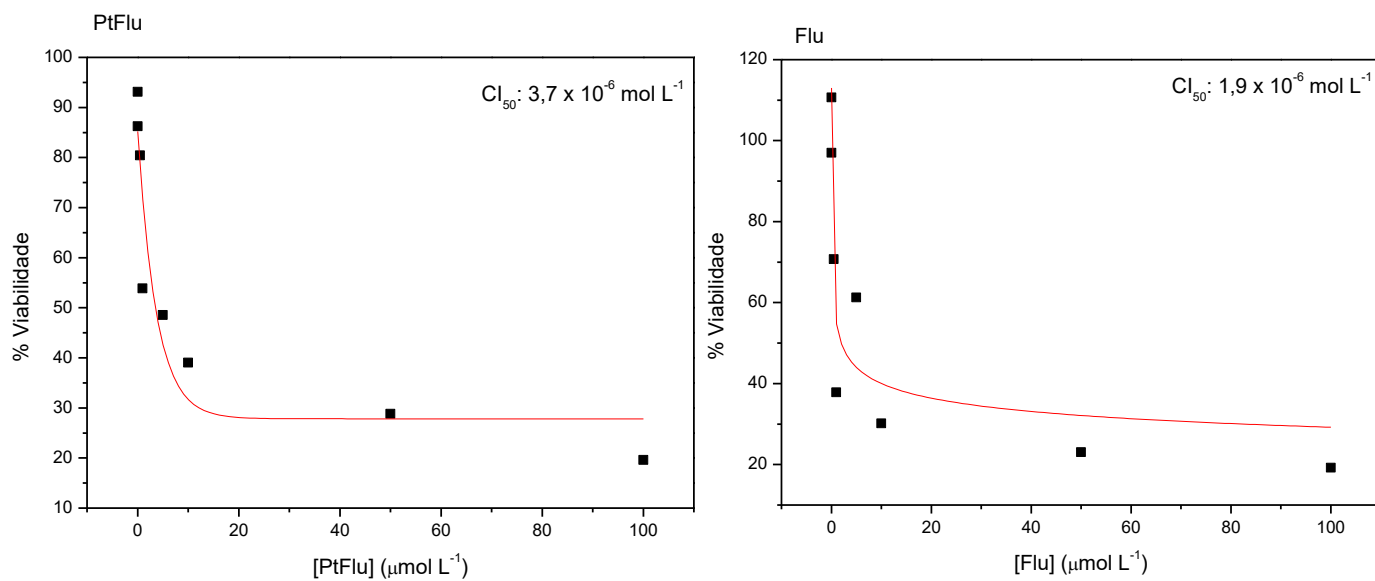


Figura 24: Citotoxicidade do complexo 1 e da fludarabina livre nas células de queratinócitos não cancerosas (HaCat).

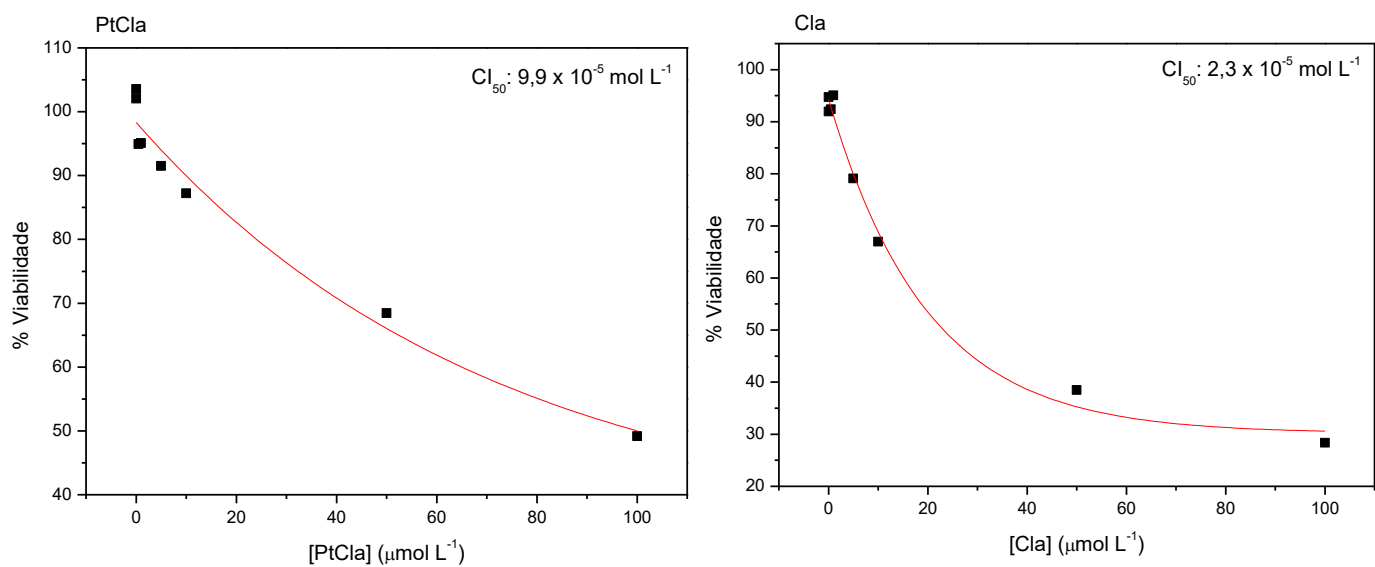


Figura 25: Citotoxicidade do complexo 2 e da cladribina livre nas células de queratinócitos não cancerosas (HaCat).

Tabela 4: Valores de CI_{50} dos complexos e ligantes livres nas linhagens celulares HaCat (não cancerosa) e K562 (câncer de leucemia) e Índice de seletividade.

Composto	CI_{50} em célula não cancerosa – HaCat (mol L ⁻¹)	CI_{50} em célula de leucemia – K562 (mol L ⁻¹)	Índice de seletividade*
Complexo 1	$3,7 \times 10^{-6}$	$32,9 \times 10^{-9}$	112,5
Flu	$1,9 \times 10^{-6}$	$30,3 \times 10^{-9}$	62,7
Complexo 2	$9,9 \times 10^{-5}$	$8,10 \times 10^{-9}$	12.222,2
Cla	$2,3 \times 10^{-5}$	$8,32 \times 10^{-9}$	2.764,4
Complexo 3	$>1,0 \times 10^{-4}$	$9,58 \times 10^{-6}$	$>10,4$
Vid	$>1,0 \times 10^{-4}$	$7,85 \times 10^{-6}$	$>12,7$
Cisplatina	$5,63 \times 10^{-6}$ [a]	$1,00 \times 10^{-6}$	5,6

[a] Dado retirado da literatura, realizado seguindo o mesmo protocolo de MTT (MIRZADEH *et al.*, 2019). *Índice de seletividade= CI_{50} em célula não cancerosa/ CI_{50} em célula de leucemia.

Os resultados indicam que a complexação com platina reduziu a toxicidade dos compostos em células não cancerosas em comparação com seus ligantes livres. Além disso, as concentrações necessárias para inibir o crescimento das células cancerosas K562 foram significativamente menores que aquelas que afetam as células HaCat. Observou-se que as CI_{50} para os queratinócitos foram 112,5 vezes maiores para o complexo 1 e 12.222 vezes maiores para o complexo 2, em relação às células de leucemia, sugerindo uma alta seletividade dos complexos para células cancerosas. Para o complexo 3 e seu ligante livre, as células não cancerosas não foram atingidas até a concentração de $1,0 \times 10^{-4}$.

Esses resultados são promissores, indicando que os complexos têm potencial para reduzir os efeitos colaterais em células saudáveis, mantendo a eficácia citotóxica nas células leucêmicas. Isso destaca o potencial dos complexos como candidatos para tratamentos mais seletivos e menos tóxicos no combate ao câncer.

5.4 Estudo da interação com proteínas

5.4.1 Interação com a proteína Albumina Sérica Bovina

No desenvolvimento de novos medicamentos, uma etapa crucial é estudar a interação dos compostos com proteínas plasmáticas, como a albumina sérica bovina (BSA), para avaliar a estabilidade e o potencial terapêutico. A BSA emite uma forte fluorescência devido à presença dos resíduos de triptofano (Trp134 e Trp212), com pico de emissão em 340 nm após excitação a 280 nm. A interação dos complexos com a BSA pode suprimir essa fluorescência, indicando uma ligação entre o composto e a proteína (DE MELO *et al.*, 2017); (DE MELO *et al.*, 2019); (CORREA *et al.*, 2015).

As interações dos complexos com a BSA foram analisadas por espectroscopia de fluorescência, comparando-os com seus ligantes livres e com o tetracloridoplatinato(II) de potássio (K_2PtCl_4). Os espectros de fluorescência (figuras **26 a 32**) mostraram que a supressão de fluorescência dos triptofanos ocorreu de forma dependente da concentração dos compostos, evidenciando uma interação entre ambos.

A partir dos dados de fluorimetria, foram construídos gráficos de F_0/F vs [composto] para determinar as constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) e as taxas de supressão de colisão (k_q) dos complexos, utilizando a equação 2. Além disso, os gráficos de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log[\text{composto}]$ e a equação 3 foram utilizados para calcular as constantes de ligação (K_b) e os números de sítios de ligação (n). Os resultados encontrados foram apresentados na Tabela 5.

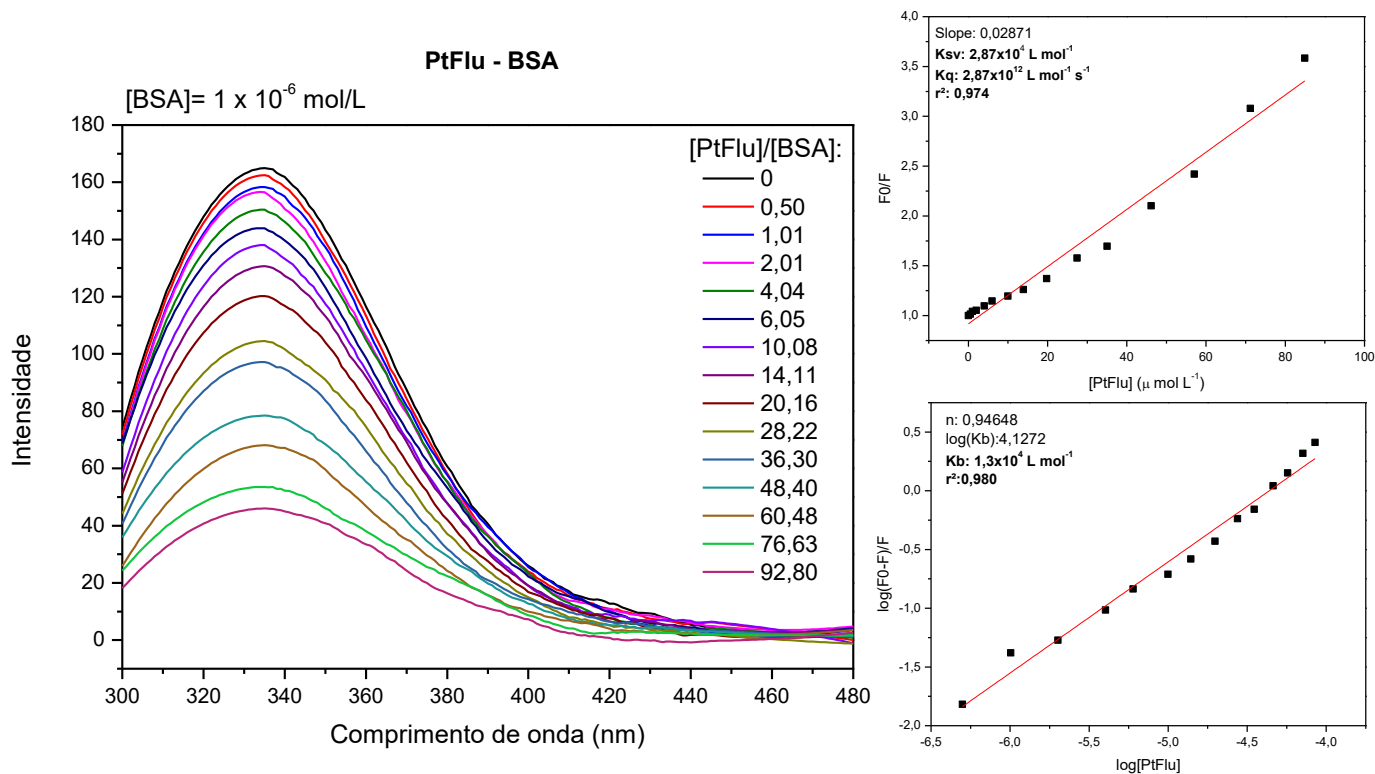


Figura 26: Espectros de emissão de fluorescência da BSA [$1,0 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$] ($\lambda_{excitação} = 280$ nm) na presença de concentrações crescentes do complexo 1 ($5,0 \times 10^{-7}$ a $9,3 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$). Gráficos de F_0/F vs [composto] e de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log[\text{composto}]$.

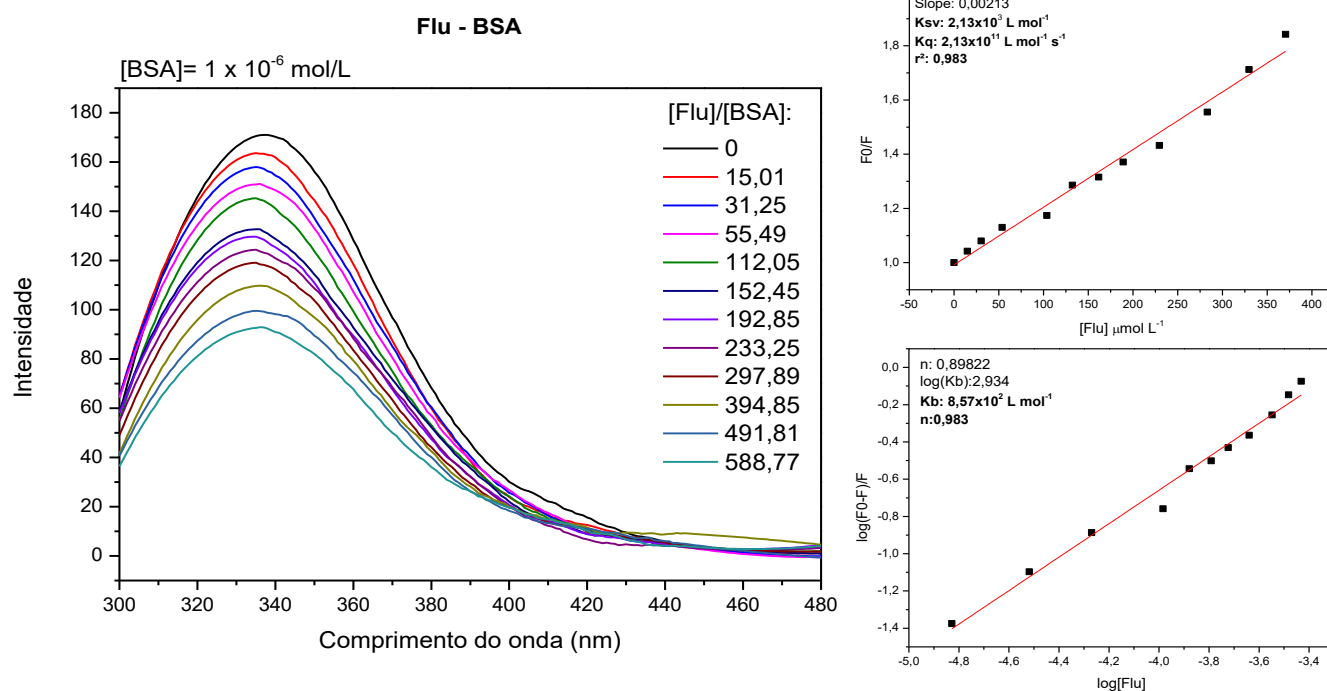


Figura 27: Espectros de emissão de fluorescência da BSA [$1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹] (λ excitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes da fludarabina livre ($1,5 \times 10^{-5}$ a $5,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). Gráficos de F_0/F vs [composto] e de $\log[(F_0-F)/F]$ vs \log [composto].

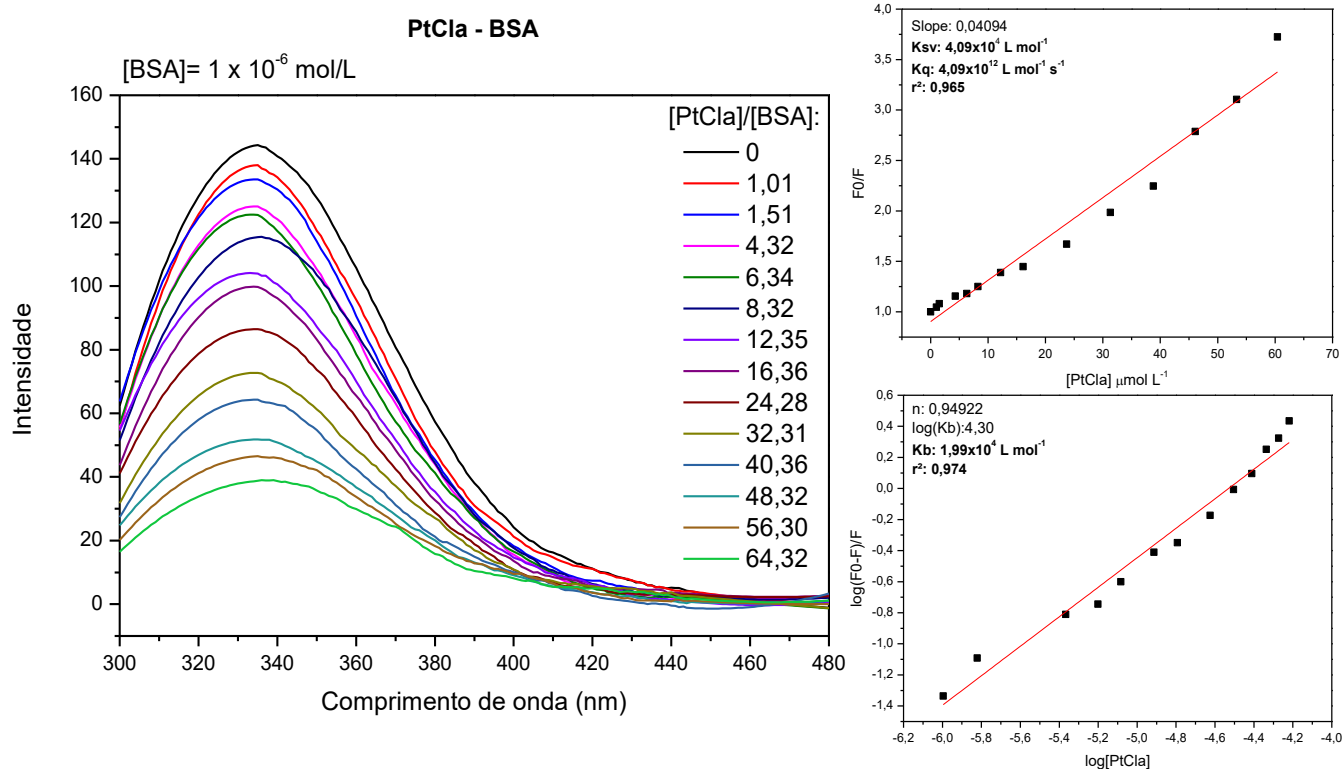


Figura 28: Espectros de emissão de fluorescência da BSA [$1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹] (λ excitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes do complexo **2** ($1,0 \times 10^{-6}$ a $6,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). Gráficos de F_0/F vs [composto] e de $\log[(F_0-F)/F]$ vs \log [composto].

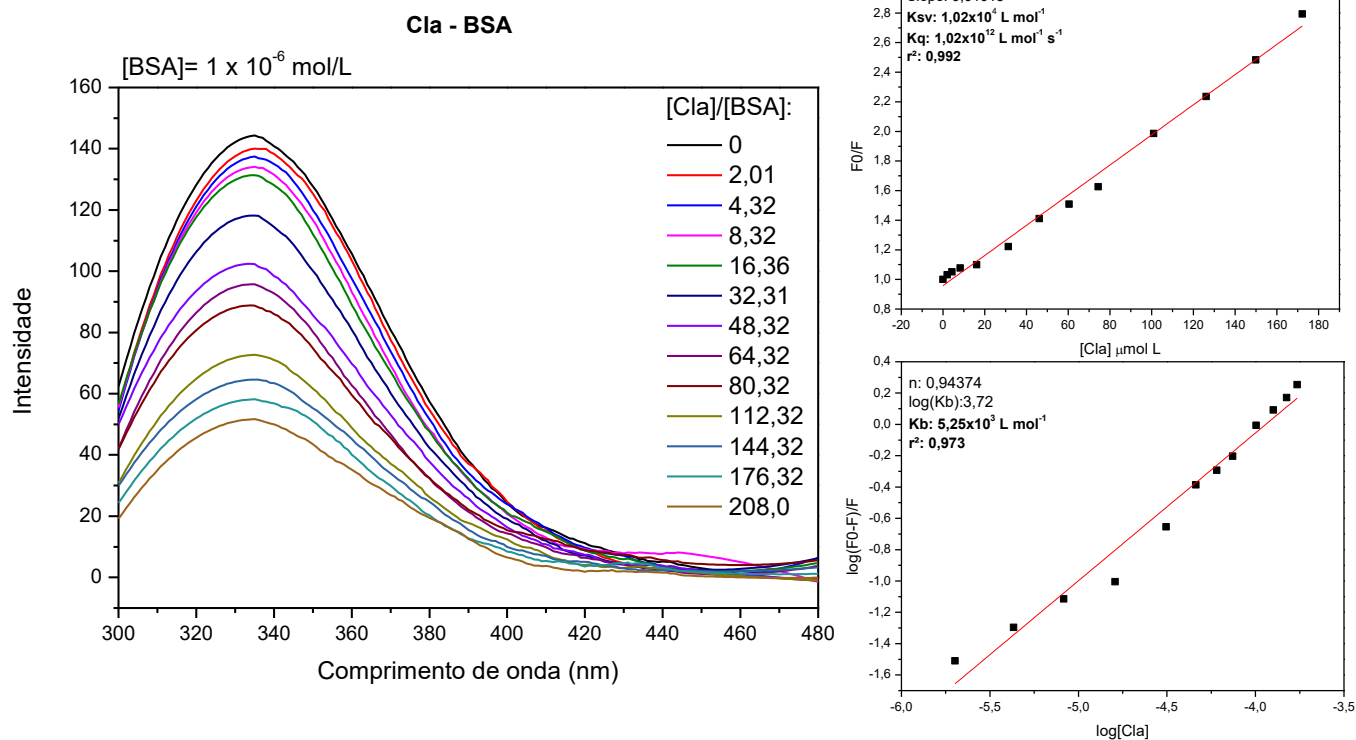


Figura 29: Espectros de emissão de fluorescência da BSA [$1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹] ($\lambda_{excitação} = 280$ nm) na presença de concentrações crescentes da cladiribina livre ($2,0 \times 10^{-6}$ a $2,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). Gráficos de F_0/F vs [composto] e de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log[composto]$.

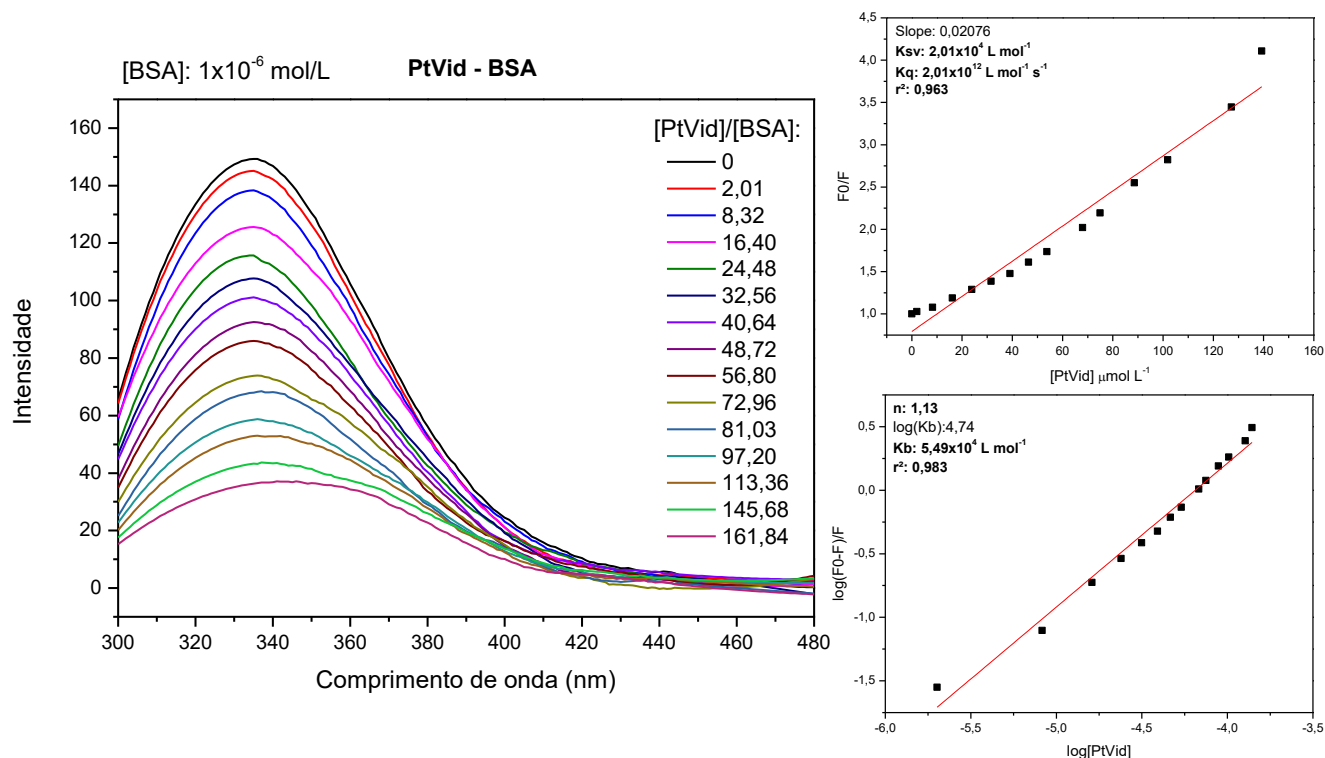


Figura 30: Espectros de emissão de fluorescência da BSA [$1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹] ($\lambda_{excitação} = 280$ nm) na presença de concentrações crescentes do complexo **3** ($2,0 \times 10^{-6}$ a $1,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). Gráficos de F_0/F vs [composto] e de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log[composto]$.

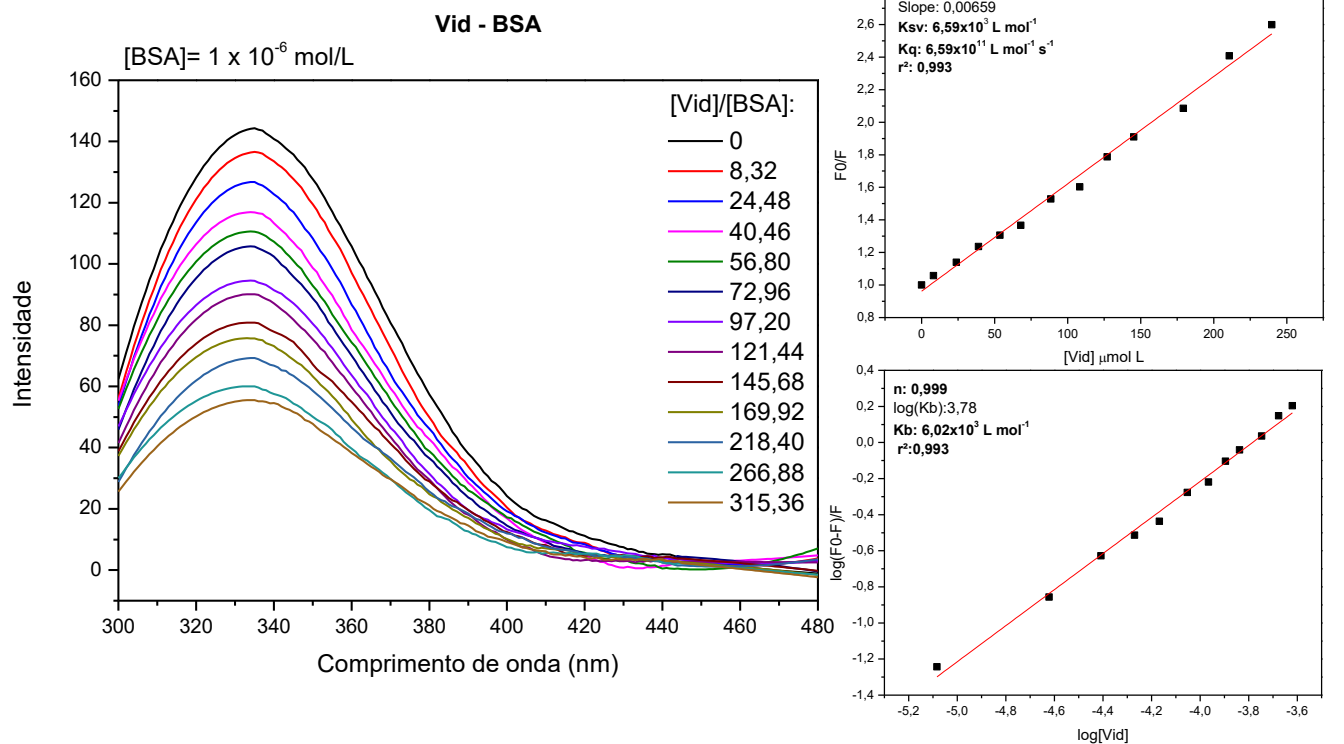


Figura 31: Espectros de emissão de fluorescência da BSA [$1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹] (λ excitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes da vidarabina livre ($8,3 \times 10^{-6}$ a $3,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). Gráficos de F_0/F vs [composto] e de $\log[(F_0-F)/F]$ vs \log [composto].

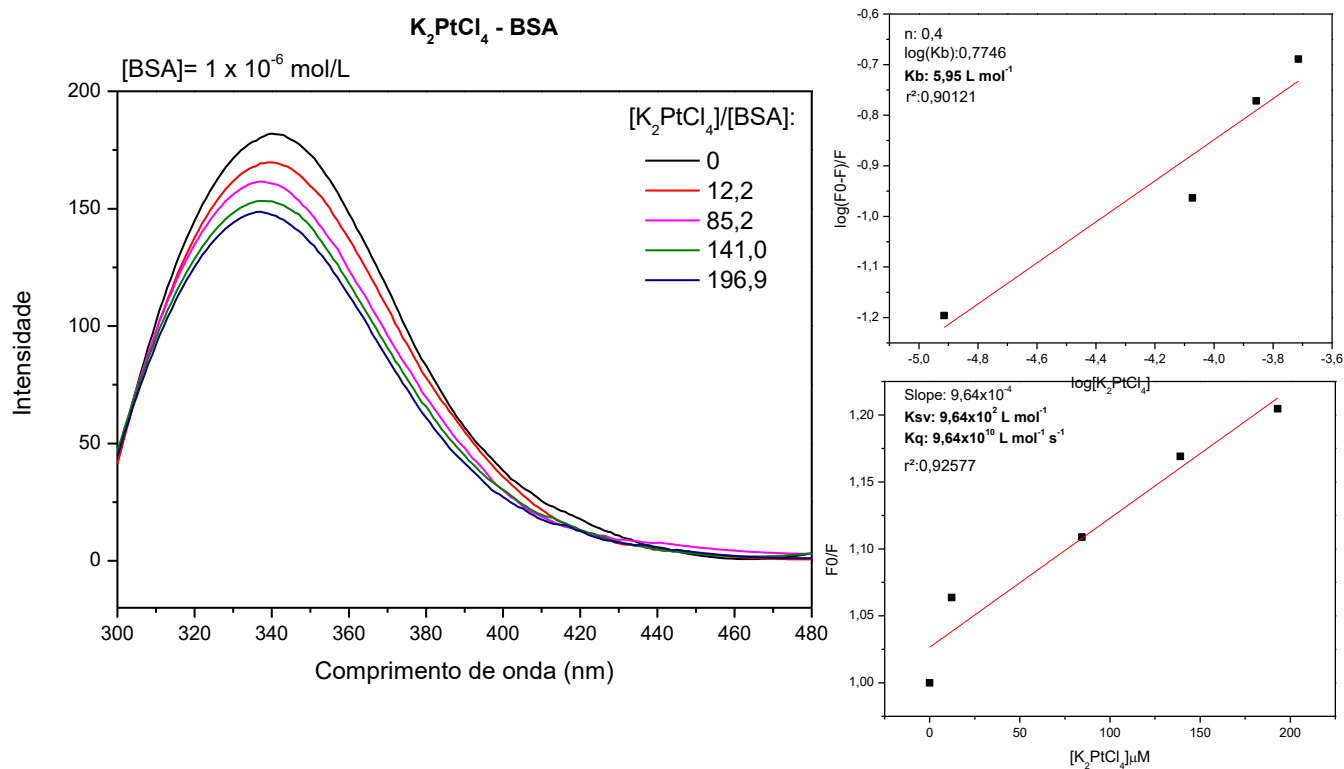


Figura 30: Espectros de emissão de fluorescência da BSA [$1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹] (λ excitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes de K_2PtCl_4 livre ($1,2 \times 10^{-5}$ a $1,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). Gráficos de F_0/F vs [composto] e de $\log[(F_0-F)/F]$ vs \log [composto].

Tabela 5: Constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de velocidade bimolecular de supressão (k_q), constante de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) e coeficientes de determinação da regressão linear (r^2) para a interação dos compostos com a BSA.

Composto	K_{sv} (L mol ⁻¹)	K_q (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	r^2	K_b (L mol ⁻¹)	n	r^2
Complexo 1	$2,87 \times 10^4$	$2,87 \times 10^{12}$	0,974	$1,20 \times 10^4$	0,946	0,980
Flu	$2,13 \times 10^3$	$2,13 \times 10^{11}$	0,983	$8,57 \times 10^2$	0,898	0,983
Complexo 2	$4,09 \times 10^4$	$4,09 \times 10^{12}$	0,965	$1,99 \times 10^4$	0,949	0,974
Cla	$1,02 \times 10^4$	$1,02 \times 10^{12}$	0,992	$5,25 \times 10^3$	0,944	0,973
Complexo 3	$2,01 \times 10^4$	$2,01 \times 10^{12}$	0,963	$5,49 \times 10^4$	1,130	0,983
Vid	$6,59 \times 10^3$	$6,59 \times 10^{11}$	0,993	$6,02 \times 10^3$	0,999	0,993
K_2PtCl_4	$9,64 \times 10^2$	$9,64 \times 10^{10}$	0,926	5,95	0,400	0,901

Os resultados demonstraram que a complexação com a platina favorece a interação dos compostos com a BSA. As constantes de ligação (K_b) foram significativamente maiores para os complexos, em comparação com os ligantes livres e o K_2PtCl_4 , que mostrou uma interação muito fraca com a proteína. Esses dados indicam que a complexação potencializa a afinidade dos compostos pela albumina, o que pode ter implicações importantes na distribuição e biodisponibilidade desses compostos no plasma.

Além disso, os valores de k_q foram consideravelmente superiores ao limite típico de extinção dinâmica, de $2,0 \times 10^{10}$ L mol⁻¹ s⁻¹, isso sugere que a supressão da fluorescência da BSA pelos complexos ocorre predominantemente por um mecanismo de extinção estática, causada pela complexação da proteína aos compostos, e não por um processo dinâmico de colisão (SURYAWANSHI *et al.*, 2016).

Para todos os compostos, o número de sítios de ligação encontrado foi próximo de 1, indicando que apenas uma molécula se liga à proteína.

Para um fármaco ser eficaz, sua constante de ligação com a albumina deve garantir um transporte eficiente no plasma, mas também permitir sua liberação para o alvo terapêutico. Estudos anteriores sugerem que compostos que se ligam de forma

reversível à BSA possuem afinidades moderadas com a proteína, com constantes de ligação (K_b) na faixa de $1 - 15 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ (DUFOR; DANGLES, 2005); (SURYAWANSHI *et al.*, 2016). Os valores de K_b observados para os complexos neste estudo variaram entre $1,20 \times 10^4$ e $5,49 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, indicando afinidade adequada para transporte e liberação dos complexos, enquanto que os ligantes livres apresentam afinidade significativamente inferior.

5.4.2 Interação com a proteína Abl

A interação de compostos bioativos com proteínas-alvo desempenha um papel essencial no desenvolvimento de novos fármacos, especialmente para o tratamento de doenças como a leucemia mieloide crônica (LCM). Essa patologia é caracterizada pela presença do gene de fusão BCR-Abl, que codifica uma tirosina quinase desregulada, direcionada ao citoplasma, responsável pela proliferação descontrolada das células leucêmicas. A proteína Abl, normalmente regulada negativamente pelos domínios SH2 e SH3, desempenha um papel importante no controle do crescimento celular e mutações ou fusões gênicas que comprometem essa regulação são determinantes na LMC (CORTES; PAVLOVSKY; SAUßELE, 2021); (LOSCOCCO *et al.*, 2019); (BUSCHBECK *et al.*, 2005).

Dada a alta citotoxicidade apresentada pelos complexos sintetizados na linhagem celular de leucemia mieloide crônica (K562), investigou-se a interação desses compostos com a proteína Abl, que está presente nessa linhagem celular. Foi utilizada a técnica de espectroscopia de fluorescência para avaliar essas interações, uma vez que a proteína Abl, quando excitada em 280 nm, emite uma forte fluorescência em torno de 350 nm, devido aos resíduos de triptofano em sua estrutura.

Para avaliar a interação dos compostos com a proteína, foi monitorada a supressão de fluorescência da Abl causada pela adição dos compostos. Além dos complexos, também foram avaliados a interação dos ligantes livres, do tetracloridoplatinato(II) de potássio e da cisplatina.

A análise permitiu observar que a intensidade de fluorescência diminuiu com a adição dos compostos, indicando a interação com a proteína (figuras 33 a 40). As constantes de ligação (K_b) dos compostos com a Abl foram determinadas utilizando a equação 3 e os gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log[\text{composto}]$, assim como os número de sítios de ligação (n). Os resultados obtidos foram apresentados na Tabela 6.

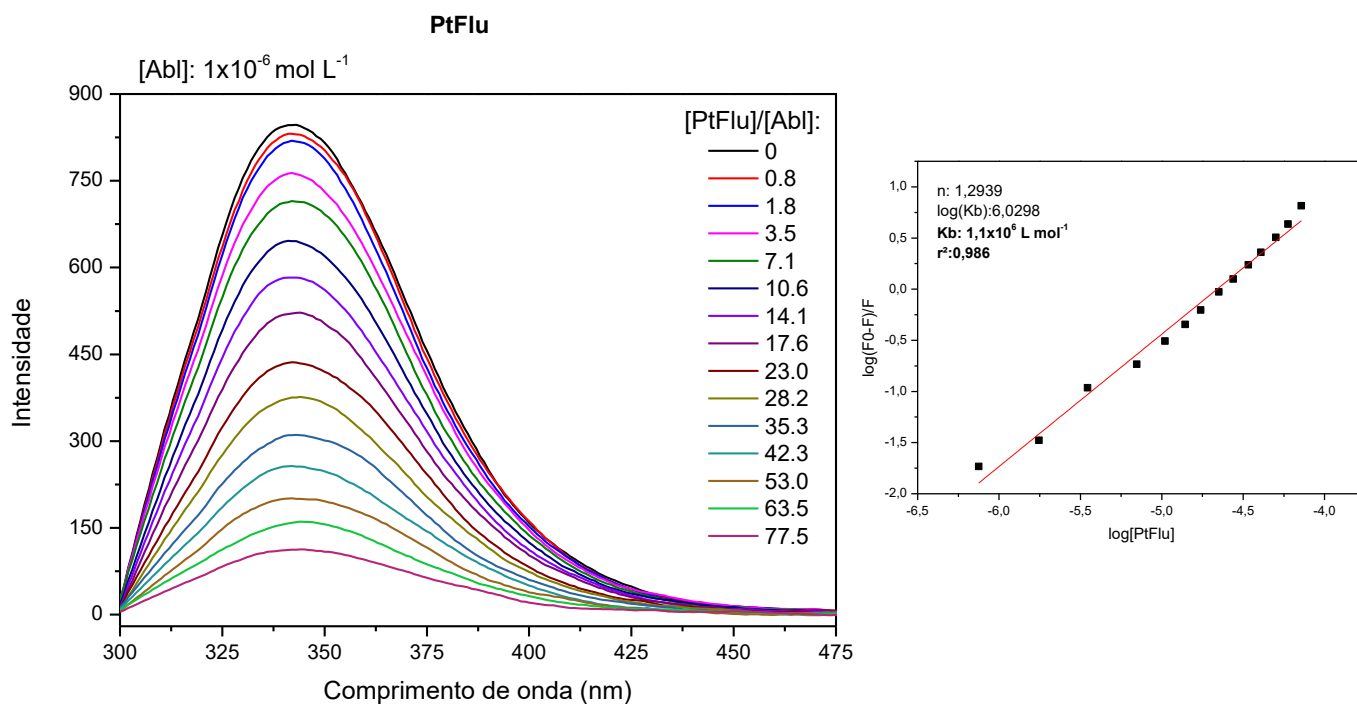


Figura 33: Espectros de emissão de fluorescência da Abl [$1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$] (λ excitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes do complexo 1 ($8,0 \times 10^{-7}$ a $7,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log[\text{composto}]$.

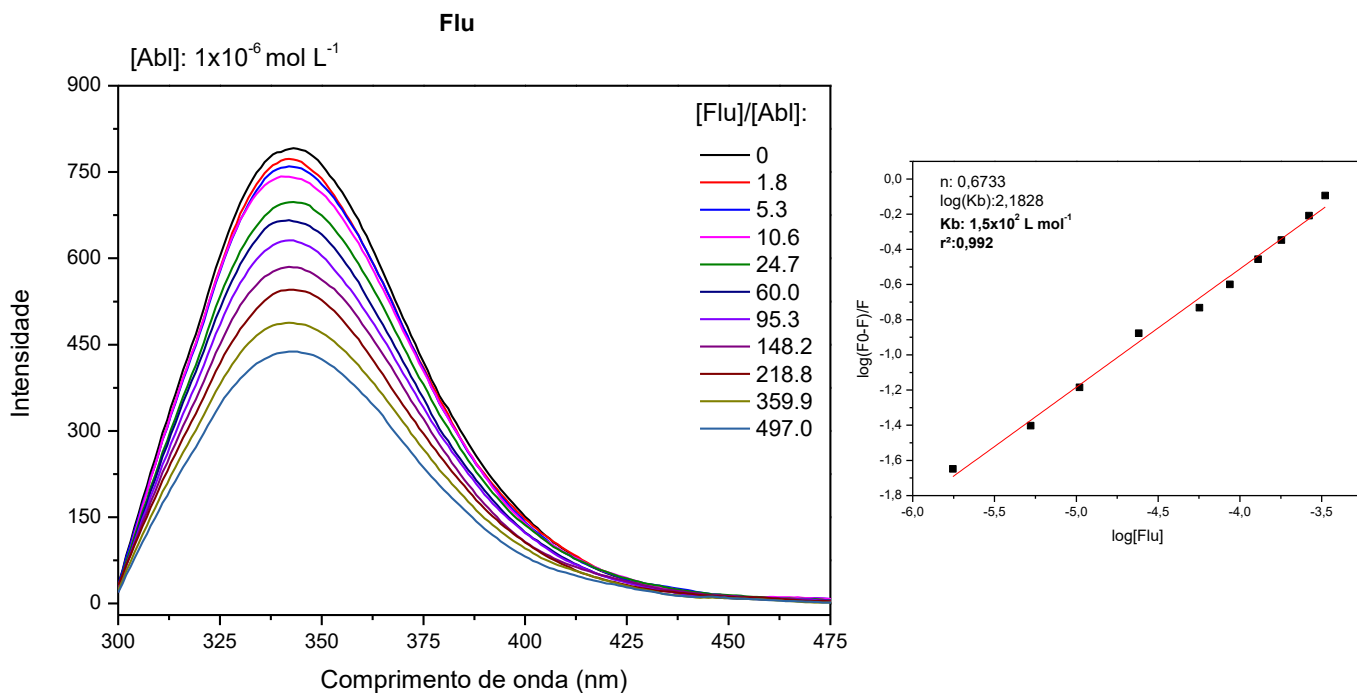


Figura 34: Espectros de emissão de fluorescência da Abl [$1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$] (λ excitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes da fludarabina livre ($1,8 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log[\text{composto}]$.

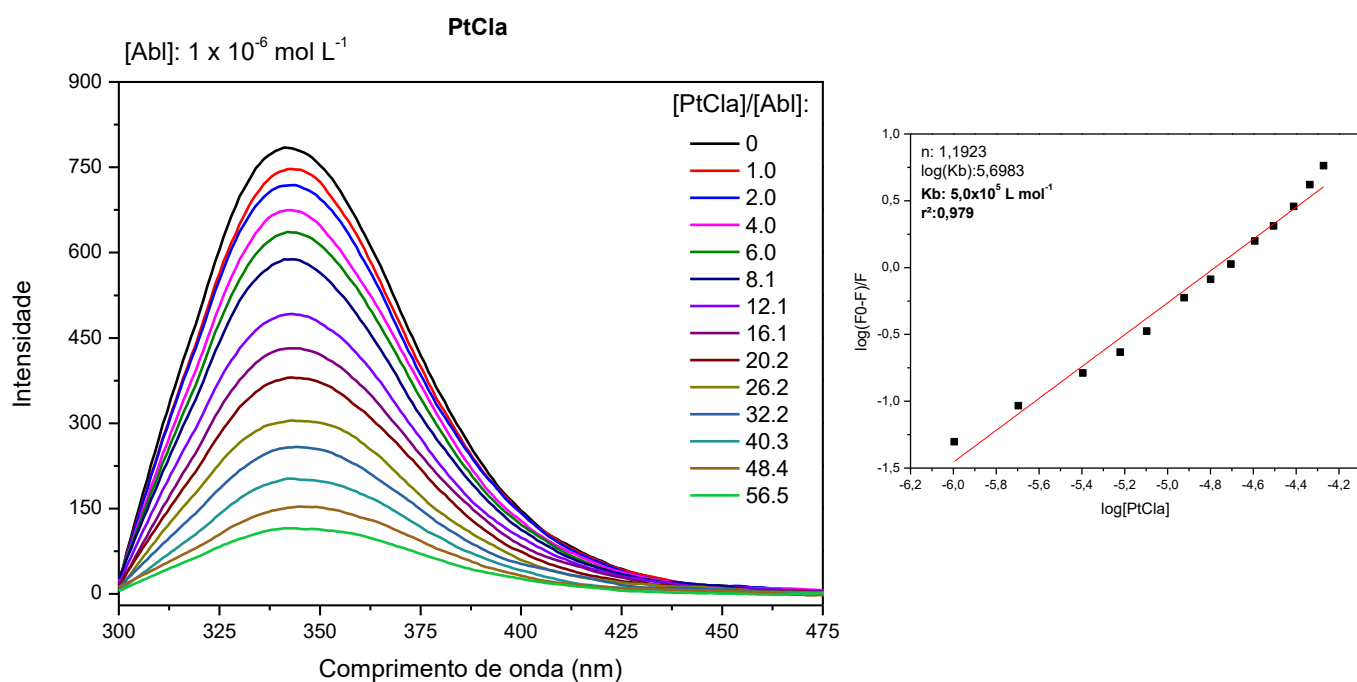


Figura 35: Espectros de emissão de fluorescência da Abl [$1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$] (λ excitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes do complexo 2 ($1,0 \times 10^{-6}$ a $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log[\text{composto}]$.

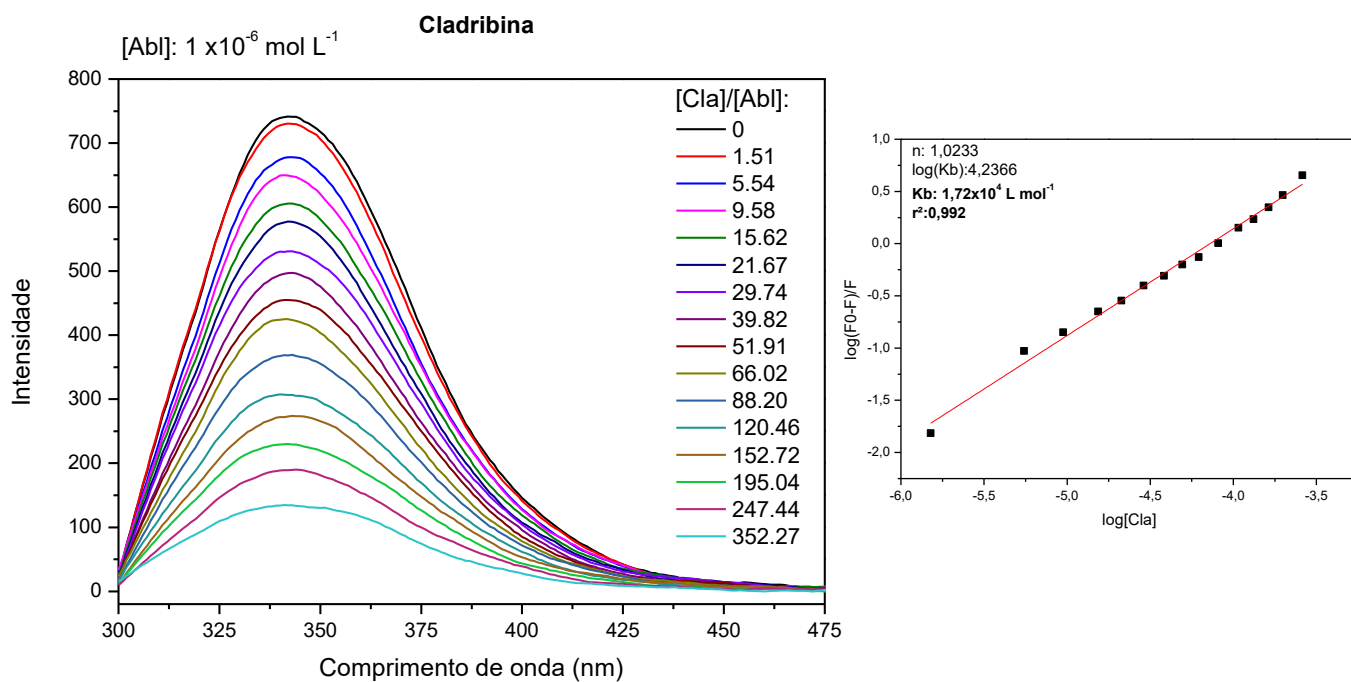


Figura 36: Espectros de emissão de fluorescência da AbI [$1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$] (λ excitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes da cladribina livre ($1,5 \times 10^{-6}$ a $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log[\text{composto}]$.

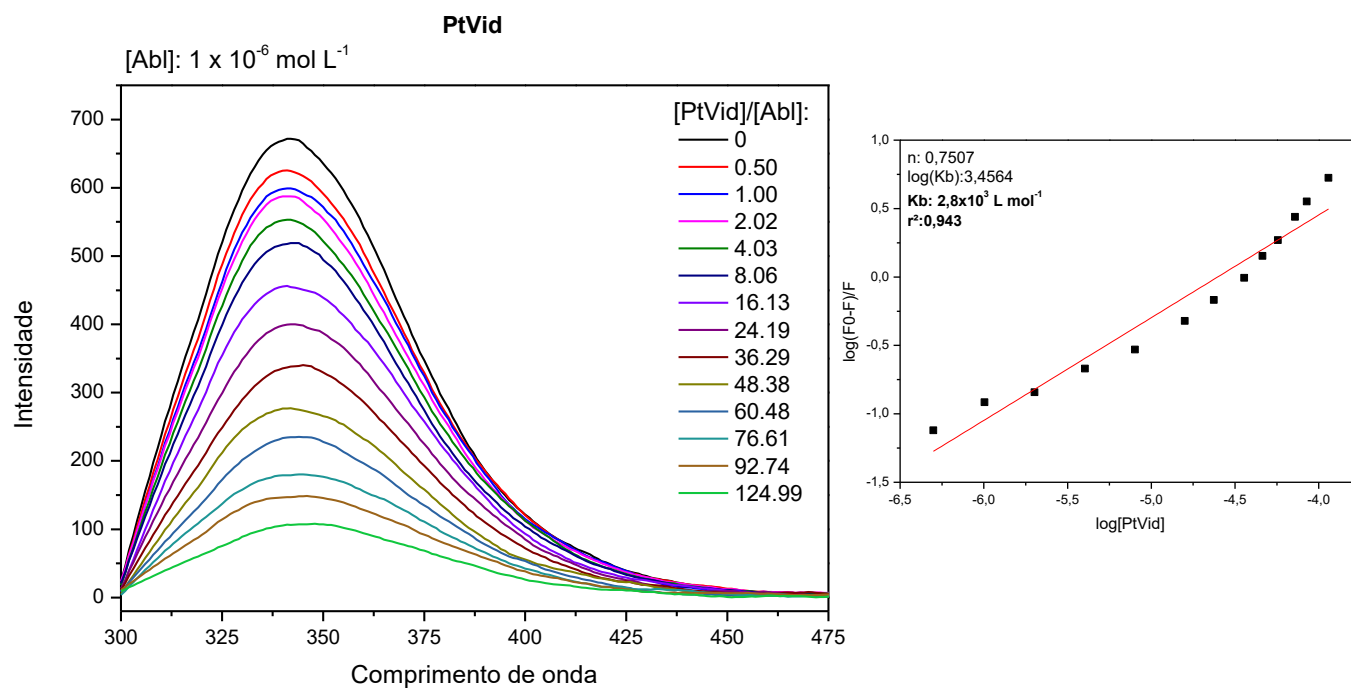
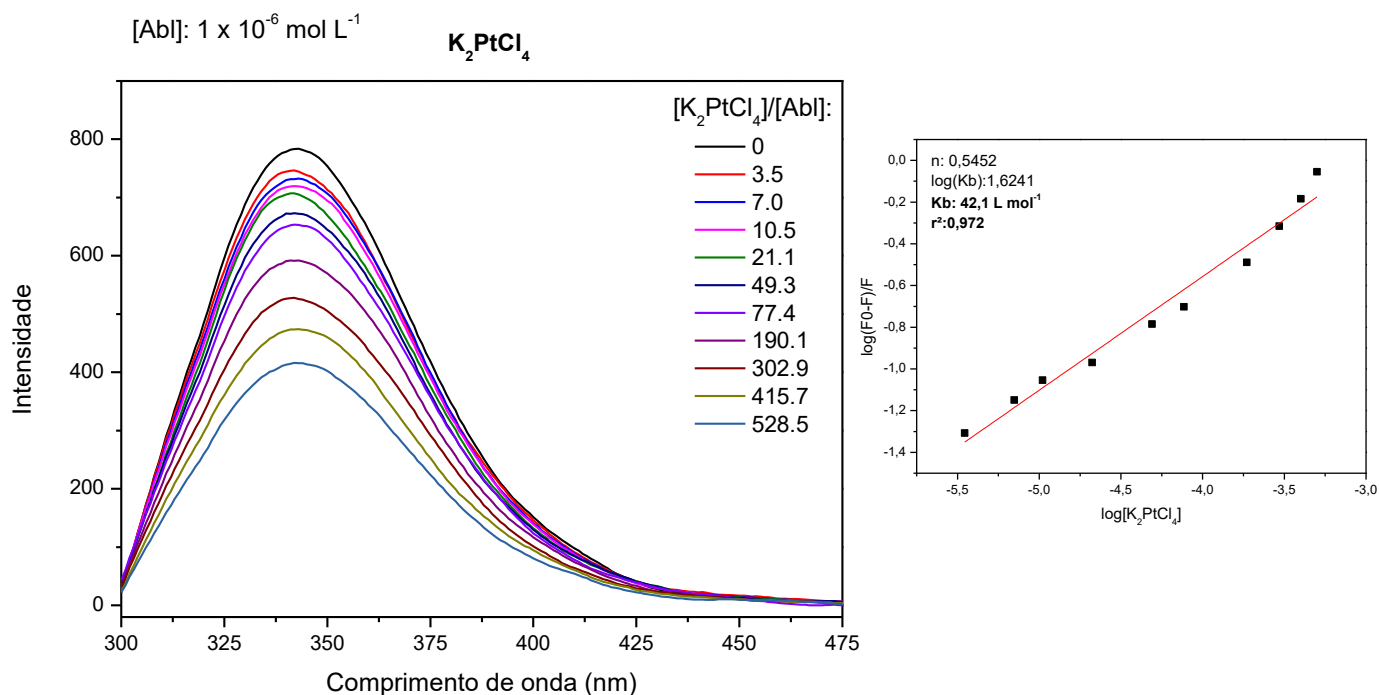
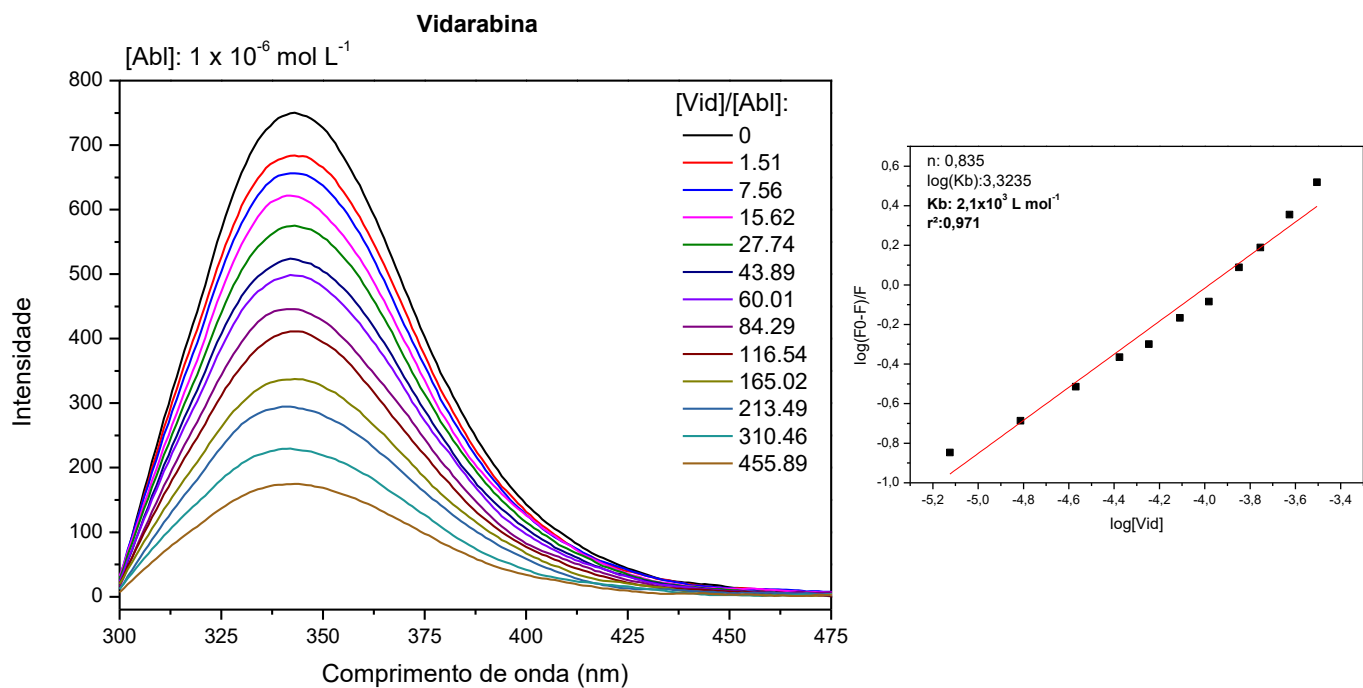


Figura 37: Espectros de emissão de fluorescência da AbI [$1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$] (λ excitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes do complexo **3** ($5,0 \times 10^{-5}$ a $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log[\text{composto}]$.



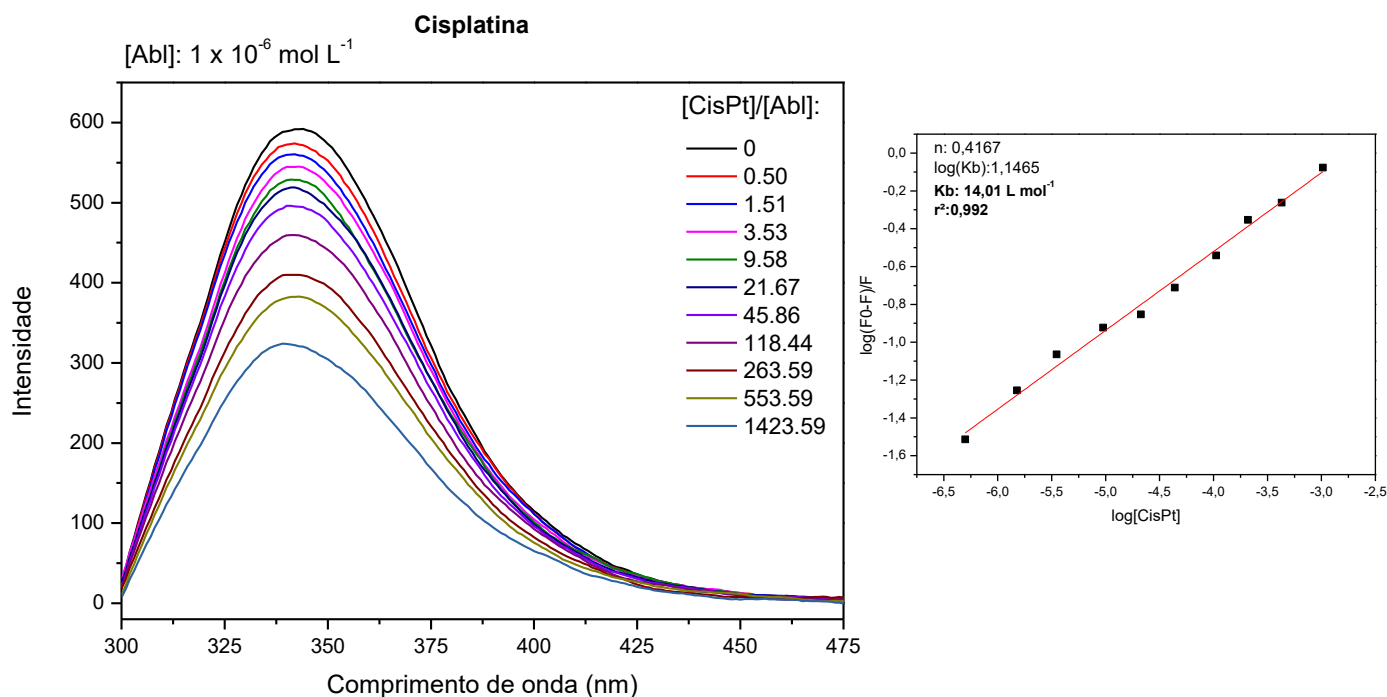


Figura 40: Espectros de emissão de fluorescência da Abl [$1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$] (λ excitação = 280 nm) na presença de concentrações crescentes de cisplatina ($5,0 \times 10^{-5}$ a $1,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $\log[\text{composto}]$.

Tabela 6: Constantes de ligação (K_b), número de sítios de ligação (n) e coeficientes de determinação da regressão linear (r^2) para a interação dos compostos com a Abl.

Composto	K_b (L mol^{-1})	n	r^2
Complexo 1	$1,1 \times 10^6$	1,294	0,986
Flu	$1,5 \times 10^2$	0,673	0,992
Complexo 2	$5,0 \times 10^5$	1,192	0,979
Cla	$1,7 \times 10^4$	1,023	0,992
Complexo 3	$2,8 \times 10^3$	0,751	0,943
Vid	$2,1 \times 10^3$	0,835	0,971
K_2PtCl_4	42,1	0,545	0,972
Cisplatina	14,0	0,417	0,992

Os resultados obtidos evidenciaram que a complexação dos ligantes com a platina aumentou significativamente a afinidade da fludarabina e da cladribina com a proteína Abl. O complexo 1 apresentou uma constante de afinidade aproximadamente

7 mil vezes maior que o ligante livre ($K_b = 1,1 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$). Esses resultados mostram que a coordenação com a platina gera interações mais fortes com a proteína Abl, o que é muito relevante para inibir a atividade desregulada de tirosina quinase na LMC.

A afinidade do complexo **2** também foi aumentada em cerca de 30 vezes em relação ao seu ligante livre, evidenciando o impacto positivo da complexação da platina com a cladribina. Para a vidarabina, no entanto, a complexação não promoveu alterações significativas, com a constante de afinidade do complexo ($K_b = 2,8 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$) se mantendo próxima à do ligante livre.

Além disso, tanto o K_2PtCl_4 quanto a cisplatina apresentaram baixa afinidade pela proteína Abl, com valores de K_b de $42,1 \text{ L mol}^{-1}$ e $14,0 \text{ L mol}^{-1}$, respectivamente, sugerindo que esses compostos não possuem interação significativa com a proteína-alvo, em contraste com os complexos aqui descrito de fludarabina e cladribina.

Esses resultados indicam que a interação dos compostos com a proteína Abl pode ter importantes implicações terapêuticas. Os altos valores de constantes de ligação à proteína Abl indica que esses complexos inibem a atividade quinase da proteína Abl, oferecendo uma nova abordagem para o tratamento da leucemia mieloide crônica.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram preparados e caracterizados em solução aquosa três novos complexos de Pt(II) com os análogos de purina fludarabina, cladribina e vidarabina, com o objetivo de avaliar seu potencial terapêutico contra a leucemia mieloide crônica (LMC). As análises espectroscópicas, incluindo RMN de ^1H , UV-Vis, e dicróismo circular, demonstraram a formação desses complexos, com evidências de coordenação dos ligantes aos íons de Pt(II) através do N7 da base púrica.

Os resultados de citotoxicidade indicaram que tanto os complexos quanto os ligantes demonstraram uma alta atividade citotóxica. O complexo **1** foi cerca de trinta vezes e o complexo **2** cerca de cento e vinte vezes mais ativo que a cisplatina, enquanto para o complexo **3**, a citotoxicidade foi aproximadamente dez vezes menor, nas mesmas condições experimentais.

Os testes de dosagem de platina intracelular revelaram a existência de uma boa correlação entre a atividade citotóxica e a concentração de composto incorporada pelas células: maior a concentração intracelular, maior o efeito citotóxico. Isso reforça a importância dos complexos inéditos de Pt(II) com fludarabina e cladribina, já que a eficácia observada nos ensaios de citotoxicidade está diretamente relacionada à quantidade de complexo metálico que foi absorvida pelas células.

Além disso, os complexos mostraram alta seletividade ao comparar as CI_{50} em células não cancerosas HaCat e células de leucemia. As concentrações necessárias para inibir o crescimento das células cancerosas K562 foram significativamente menores do que as necessárias para os queratinócitos. A CI_{50} em células não cancerosas foi aproximadamente 120 vezes maior para o complexo **1** e cerca de 12.000 vezes maiores para o complexo **2**, em relação às células de leucemia. Esses resultados indicam que os complexos possuem alta seletividade para células cancerosas, o que sugere um potencial promissor para reduzir os efeitos colaterais em células saudáveis, mantendo a eficácia citotóxica nas células leucêmicas.

A interação com a BSA foi favorecida pela complexação. Vale a pena ressaltar que os complexos de Pt(II) com fludarabina e cladribina aumentaram a afinidade

pela proteína Abl em relação aos ligantes livres. Esses resultados são extremamente importantes pois sugerem que os complexos de Pt(II) com análogos de purinas podem inibir a atividade dessa proteína, que é responsável pelo o desenvolvimento da LMC.

Os compostos obtidos nesse trabalho são promissores para o desenvolvimento de novos fármacos que possam reduzir a resistência celular, uma vez que a complexação com platina manteve a eficiência citotóxica dos ligantes.

Em suma, os complexos sintetizados mostram-se promissores agentes antitumorais com alta seletividade. Os dados obtidos reforçam a relevância de continuar investigando o potencial terapêutico desses compostos em tratamentos mais eficazes contra a leucemia mieloide crônica e outros tipos de câncer.

REFERÊNCIAS

- ABED, A.; DERAKHSHAN, M.; KARIMI, M.; SHIRAZINIA, M.; MAHJOUBIN-TEHRAN, M.; HOMAYONFAL, M.; HAMBLIN, M. R.; MIRZAEI, S. A.; SOLEIMANPOUR, H.; DEHGHANI, S.; DEHKORDI, F. F.; MIRZAEI, H.. **Platinum nanoparticles in biomedicine: preparation, anti-cancer activity, and drug delivery vehicles**. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 797804, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.797804>.
- ARNESANO, F.; NATILE, G.. **Interference between copper transport systems and platinum drugs**. *Seminars in Cancer Biology*, v. 76, p. 173-188, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.05.023>.
- BADGER, J.; GROVER, P.; SHI, H.; PANJARIAN, S. B.; ENGEN, J. R.; SMITHGALL, T. E.; MAKOWSKI, L. **c-Abl Tyrosine Kinase Adopts Multiple Active Conformational States in Solution**. *Biochemistry*, v. 55, n. 23, p. 3251-3260, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00202>.
- BRUNO, P. M.; LIU, Y.; PARK, G. Y.; MURAI, J.; KOCH, C. E.; EISEN, T. J.; PRITCHARD, J. R.; POMMIER, Y.; LIPPARD, S. J.; HEMANN, M. T. **A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress**. *Nature Medicine*, v. 23, p. 461-471, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.4291>.
- BUSCHBECK, M.; HOFBAUER, S.; DI CROCE, L.; KERI, G.; ULLRICH, A. **Abl-kinase-sensitive levels of ERK5 and its intrinsic basal activity contribute to leukaemia cell survival**. *EMBO Reports*, v. 6, p. 63-69, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400316>.
- CHARALABOPOULOS, K.; KARKABOUNAS, S.; IOACHIM, E.; PAPALIMNEOU, V.; SYRIGOS, K.; EVANGELOU, A.; AGNANTIS, N.; HADJILIADIS, N. **Antitumour and toxic effects on Wistar rats of two new platinum complexes**. *European Journal of Clinical Investigation*, v. 32, n. 2, p. 129-133, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2002.00932.x>.
- CORREA, R. S.; DE OLIVEIRA, K. M.; DELOLO, F. G.; ALVAREZ, A.; MOCELO, R.; PLUTIN, A. M.; COMINETTI, M. R.; CASTELLANO, E. E.; BATISTA, A. A.. **Ru(II)-based complexes with N-(acyl)-N',N'-(disubstituted)thiourea ligands: Synthesis, characterization, BSA- and DNA-binding studies of new cytotoxic agents against lung and prostate tumour cells**. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 150, p. 63-71, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.04.008>.

CORTES, J.; PAVLOVSKY, C.; SAUßELE, S. **Chronic myeloid leukaemia**. The Lancet, v. 398, n. 10314, p. 1914-1926, 2021. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01204-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01204-6).

DE MELO, A. C. C.; SANTANA, J. M. S. V. P.; NUNES, K. J. R. C.; MARQUES, M. A.; DE OLIVEIRA, G. A. P.; MORAES, A. H.; PEREIRA-MAIA, E. C.. **Interactions of ruthenium(II) compounds with sulfasalazine and *N,N'*-heterocyclic ligands with proteins**. Inorganica Chimica Acta, 467, p. 385-390, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.08.037>.

DE MELO, A. C. C.; SANTANA, J. M. S. V. P.; NUNES, K. J. R. C.; RODRIGUES, B. L.; CASTILHO, N.; GABRIEL, P.; MORAES, A. H.; MARQUES, M. A.; OLIVEIRA, G. A. P.; SOUZA, I. P.; TERENCE, H.; PEREIRA-MAIA, E. C.. **New heteroleptic ruthenium(II) complexes with sulfamethoxypyridazine and diimines as potential antitumor agents**. Molecules, v. 24(11), p. 2154, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24112154>.

DUFOUR, C.; DANGLES, O.. **Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, v. 1721(1-3), p. 164-173, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.10.013>.

FARRELL, N.. **Platinum formulations as anticancer drugs: clinical and pre-clinical studies**. Current Topics in Medicinal Chemistry, v. 11, p. 2623-2631, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2174/156802611798040714>.

FARRELL, N.; QU, Y. **Interaction of bis(platinum) complexes with the mononucleotide 5'-guanosine monophosphate. Effect of diamine linker and the nature of the bis(platinum) complex on product formation**. Journal of the American Chemical Society, v. 113, p. 4841-4857, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja00013a021>.

GANDHI, V., PLUNKETT, W. **Cellular and Clinical Pharmacology of Fludarabine**. Clin Pharmacokinet, v. 41, p. 93-103, 2002. DOI: <https://doi.org/10.2165/00003088-200241020-00002>.

HALL, M. D.; OKABE, M.; SHEN, D.; LIANG, X.; GOTTESMAN, M. M.. **The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy**. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, v. 48, p. 495, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.080907.180426>.

HARROP, S.; POLLIACK, A.; TAM, C. S. **Chronic lymphoproliferative disorders and secondary cancers in the era of purine analogues and beyond**. Leukemia and Lymphoma, v. 62, n. 4, p. 771-778, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/10428194.2020.1849682>.

HERMANN R, KRAJCSI P, FLUCK M, SEITHEL-KEUTH A, BYTYQI A, GALAZKA A, MUNAFO A. **Review of Transporter Substrate, Inhibitor, and Inducer Characteristics of Cladribine.** Clin Pharmacokinet, v. 60, n. 12, p.1509-1535, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40262-021-01065-3>.

HRUBA, L.; DAS, V.; HAJDUCH, M.; DZUBAK, P. **Nucleoside-based anticancer drugs: mechanism of action and drug resistance.** Biochemical Pharmacology, v. 215, p. 115741, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115741>.

HU, Huiyu; QUINTANA, Jeremy; WEISSLEDER, Ralph; PARANGI, Sareh; MILLER, Miles. **Deciphering albumin-directed drug delivery by imaging.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 185, p. 114237, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114237>.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA (Brasil). Ministério da Saúde. **Como surge o câncer?** 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer>. Acesso em: 05 set. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA (Brasil). Ministério da Saúde. **O que é câncer?** 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 05 set. 2024.

JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. **Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts.** Chemical Reviews, v. 99, p. 2467-2498, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr980421n>.

JING, P. P.; LI, Y. X.; SU, Y. H.; LIANG, W. L.; LENG, Y. X. **The role of metal ions in the behavior of bovine serum albumin molecules under physiological environment.** Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 267, p. 120604, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120604>.

JOGADI, W.; ZHENG, Y. R.. **Supramolecular platinum complexes for cancer therapy.** Current Opinion in Chemical Biology, v. 73, p. 102276, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2023.102276>.

JOHNSON, S.A. **Clinical Pharmacokinetics of Nucleoside Analogues.** Clin Pharmacokinet, v. 39, p. 5–26, 2000. DOI: <https://doi.org/10.2165/00003088-200039010-00002>

JOHNSON, S. A.; THOMAS, W. **Therapeutic potential of purine analogue combinations in the treatment of lymphoid malignancies.** Hematol Oncol. 18(4), p. 141-153, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1002/1099-1069\(200012\)18:4<141::aid-hon666>3.0.co;2-#](https://doi.org/10.1002/1099-1069(200012)18:4<141::aid-hon666>3.0.co;2-#).

KEATING M.J., O'BRIEN S., LERNER S., KOLLER C., BERAN M., ROBERTSON L.E., FREIREICH E. J., ESTEY E., KANTARJIAN H., **Long-Term Follow-Up of Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Receiving Fludarabine Regimens as Initial Therapy**, *Blood*, v. 92, n. 4, p. 1165-1171, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V92.4.1165>.

KREITMAN, R.J. **Immunoconjugates and new molecular targets in hairy cell leukemia**. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. v. 2012, p. 660-6, 2012, DOI: <https://doi.org/10.1182/asheducation-2012.1.660>.

KREITMAN, R. J.; ARONS, E. **Update on hairy cell leukemia**. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*, v. 16, n. 3, p. 205-215, 2018. PMCID: [PMc6290912](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35890451005-0/).

LAMANNA, N.; WEISS, M. **Purine Analogs in Leukemia**. *Advances in Pharmacology*, v. 51, p. 107-125, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(04\)51005-0](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(04)51005-0).

LEE W. W., BENITEZ A., GOODMAN L., BAKER B. R., **Potential Anticancer Agents. Synthesis of the β -anomer of 9-(D-arabinofuranosyl)-Adenine.**, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 82, n. 10, p. 2648–2649, 1960. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja01495a070>.

LI, S.; YAO, Z.; ZHAO, Y.; CHEN, W.; WANG, H.; KUANG, X.; ZHAN, W.; YAO, S.; YU, S.; HU, W. **Design, synthesis and biological evaluation of novel acrylamide analogues as inhibitors of BCR–ABL kinase**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 22, p. 5279-5282, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.06.044>.

LILIEMARK, J. **The Clinical Pharmacokinetics of Cladribine**. *Clin-Pharmacokinet*, v. 32, p. 120–131, 1997. DOI: <https://doi.org/10.2165/00003088-199732020-00003>

LIPPARD, S. J.. **New chemistry of an old molecule: cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂]**. *Science*, v. 218, p. 1075-1082, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.6890712>.

LIPPARD, S. J.; WANG, D. **Cellular processing of platinum anticancer drugs**. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, n. 4, p. 307-320, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd1691>.

LÓPEZ RUIZ, A.; VILLASECO ARRIBAS, E.; MCENNIS, K.. **Poly(lactic-co-glycolic acid) encapsulated platinum nanoparticles for cancer treatment**. *Materials Advances*, v. 3, p. 2858-2870, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1039/D1MA01155C>.

LOSCOCCO, F.; VISANI, G.; GALIMBERTI, S.; CURTI, A.; ISIDORI, A. **BCR-ABL independent mechanisms of resistance in chronic myeloid leukemia**. *Frontiers in Oncology*, v. 9, p. 939, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00939>.

LUKENBILL J., KALAYCIO M., **Fludarabine: A review of the clear benefits and potential harms**, *Leukemia Research*, v.37, n. 9, p. 986-994, 2013, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2013.05.004>.

LUNDBERG, J. H.; CHITAMBAR, C. R. **Interaction of Gallium Nitrate with Fludarabine and Iron Chelators: Effects on the Proliferation of Human Leukemic HL60 Cells**. *Cancer Research*, v. 50, p. 6466-6470, 1990. Online ISSN: 1538-7445.

MALTBY V.E., LEA R.A., MONIF M., FABIS-PEDRINI M.J., BUZZARD K., KALINCIK T., KERMODE A.G., TAYLOR B., HODGKINSON S., MCCOMBE P., BUTZKUEVEN H., BARNETT M., LECHNER-SCOTT J. **Efficacy of Cladribine Tablets as a Treatment for People With Multiple Sclerosis: Protocol for the CLOBAS Study (Cladribine, a Multicenter, Long-term Efficacy and Biomarker Australian Study)**. *JMIR Res Protoc.*; v. 10, n. 10, p. 24969, 2021 DOI: <https://doi.org/10.2196/24969>.

MEGGERS, E. **Targeting proteins with metal complexes**. *Chemical Communications*, v. 9, p. 1001-1010, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1039/B813568A>.

MEIER, S. M.; KREUTZ, D.; WINTER, L.; KLOSE, M. H. M.; CSEH, K.; WEISS, T.; BILECK, A.; ALTE, B.; MADER, J. C.; JANA, S.; CHATTERJEE, A.; BHATTACHARYYA, A.; HEJL, M.; JAKUPEC, M. A.; HEFFETER, P.; BERGER, W.; HARTINGER, C. G.; KEPPLER, B. K.; WICHE, G.; GERNER, C. **An organoruthenium anticancer agent shows unexpected target selectivity for plectin**. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 56, p. 8267-8271, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201702242>.

MELLISH, K. J.; QU, Y.; SCARSDALE, N.; FARRELL, N.; **Effect of geometric isomerism in dinuclear platinum antitumour complexes on the rate of formation and structure of intrastrand adducts with oligonucleotides**. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 6, p. 1265-1271, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/25.6.1265>.

MELO, A. C. C.; SANTANA, J. M. S. V. P.; NUNES, K. J. R. C.; RODRIGUES, B. L.; CASTILHO, N.; GABRIEL, P.; MORAES, A. H.; MARQUES, M. A.; OLIVEIRA, G. A. P.; SOUZA, I. P.; TERENCE, H.; PEREIRA-MAIA, E. C. **New Heteroleptic Ruthenium(II) Complexes with Sulfamethoxypyridazine and Diimines as Potential Antitumor Agents**. *Molecules*, v. 24, n. 11, p. 2154, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24112154>.

MINCIACCHI, V. R.; KUMAR, R.; KRAUSE, D. S. **Chronic Myeloid Leukemia: A Model Disease of the Past, Present and Future**. *Cells*, v. 10, n. 117, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10010117>.

MIRZADEH, N.; REDDY, T. S.; PRIVÉR, S. H.; BHARGAVA, S. K. **Synthesis, anti-proliferative and apoptosis-inducing studies of palladacycles containing a diphosphine and a Sn,As-based chelate ligand**. Dalton Transactions, v. 48, n. 16, p. 5183–5192, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1039/c8dt03875a>.

NAHATA, M. C., **Antiviral Drugs: Pharmacokinetics, Adverse Effects, and Therapeutic Use**. Journal of Pharmacy Technology, v. 3, n. 3, p. 100–108, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1177/875512258700300305>.

NELSON MC, HOGAN DK. **The role of cladribine in the treatment of lymphoid malignancies**. Oncol Nurs Forum., v. 22, n. 9, p. 1395-400, 1995; PMID: 8539180.

PEREIRA-MAIA, E. C.; GARNIER-SUILLEROT, A. **Impaired hydrolysis of cisplatin derivatives to aquated species prevents energy-dependent uptake in GLC4 cells resistant to cisplatin**. Journal of Biological Inorganic Chemistry, v. 8, p. 626-634, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00775-003-0458-3>.

POLISSIOU, M.; PHAN VIET, M.T.; ST-JACQUES, M.; THEOPHANIDES, T.; **High resolution nuclear magnetic resonance studies of platinum(II) – guanosine-5'-monophosphate interactions in aqueous solutions**. Canadian Journal of Chemistry, v. 59, p. 3297-3301, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1139/v81-486>.

PUBMED. **ABL**. 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=ABL>. Acesso em: 17 set. 2024.

RADOMSKA, D.; SZEWCZYK-ROSZCZENKO, O. K.; MARCINIEC, K.; KSIĄŻEK, M.; KUSZ, J.; ROSZCZENKO, P.; SZYMANOWSKA, A.; RADOMSKI, D.; BIELAWSKI, K.; CZARNOMYSY, R.. **Evaluation of anticancer activity of novel platinum(II) bis(thiosemicarbazone) complex against breast cancer**. Bioorganic Chemistry, v. 148, p. 107486, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2024.107486>.

RICCI, F., TEDESCHI, A., MORRA, E., & MONTILLO, M. **Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review**. Therapeutics and Clinical Risk Management, v. 5, p. 187–207, 2009. DOI: <https://doi.org/10.2147/tcrm.s3688>.

ROBAK, T.; KORYCKA, A.; LECH-MARANDA, E.; ROBAK, P. **Current status of older and new purine nucleoside analogues in the treatment of lymphoproliferative diseases**. Molecules, v. 14, n. 3, p. 1183-1226, 2009. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules14031183>.

ROBAK T, KORYCKA A, KASZNICKI M, WRZESIEN-KUS A, SMOLEWSKI P., **Purine nucleoside analogues for the treatment of hematological malignancies: pharmacology and clinical applications**. Curr Cancer Drug Targets, v. 5, n.6, p.421-44, 2005. DOI: <https://doi.org/10.2174/1568009054863618>.

- ROSA, N.; FERREIRA, F. H.; FARRELL, N.; COSTA, L. A.. **TriplatinNC and biomolecules: building models based on non-covalent interactions**. *Frontiers in Chemistry*, v. 7, p. 307, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00307>.
- ROSENBERG, B. *et al.* **Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents**. *Nature*, n. 222, p. 385-386, 1969. DOI: <https://doi.org/10.1038/222385a0>.
- ROTHENBURGER, T.; THOMAS, D.; SCHREIBER, Y.; WRATIL, P. R.; PFLANTZ, T.; KNECHT, K.; DIGIANANTONIO, K.; TEMPLE, J.; SCHNEIDER, C.; BALDAUF, H. M.; MCLAUGHLIN, K. M.; ROTHWEILER, F.; BILEN, B.; FARMAND, S.; BOJKOVA, D.; COSTA, R.; FERREIRÓS, N.; GEISLINGER, G.; OELLERICH, T.; XIONG, Y.; KEPPLER, O. T.; WASS, M. N.; MICHAELIS, M.; CINATL, J. **Differences between intrinsic and acquired nucleoside analogue resistance in acute myeloid leukaemia cells**. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 40, n. 1, p. 317, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02093-4>.
- ROTTENBERG, S.; DISLER, C.; PEREGO, P.. **The rediscovery of platinum-based cancer therapy**. *Nature Reviews Cancer*, v. 21, p. 37-50, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00308-y>.
- SAFAEI, R.. **Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum-containing drugs**. *Cancer Letters*, v. 234, n. 1, p. 34-39, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.07.046>.
- SHARMA S, MEHNDIRATTA S, KUMAR S, SINGH J, BEDI PM, NEPALI K. **Purine Analogues as Kinase Inhibitors: A Review**. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.*, v. 10, n. 3, p. 308-41, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2174/1574892810666150617112230>.
- SUNWEN C., M.D, **Advances in Antiviral Therapy**, *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 8, n. 1, 1984.
- SCHLESER, S. W.; KRYTOVYCH, O.; ZIEGELMEIER, T.; GROß, E.; KASPARKOVA, J.; BRABEC, V.; WEBER, T.; SCHOBERT, R.; MUELLER, T.. **Palladium and platinum complexes of the antimetabolite fludarabine with vastly enhanced selectivity for tumour over non-malignant cells**. *Molecules*, v. 28, p. 5173, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28135173>.
- SHARMA, S.; SINGH, J.; OJHA, R.; SINGH, H.; KAUR, M.; BEDI, P. M. S.; NEPALI, K. **Design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for purines as kinase inhibitors**. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 112, p. 298-346, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.02.018>.

SKOS, L.; BORUTZKI, Y.; GERNER, C.; MEIER-MENCHES, S. M. **Methods to identify protein targets of metal-based drugs**. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 73, p. 102257, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2022.102257>.

SURYAWANSHI, V. D.; SONAWANE, M. M.; KHADE, S. K.; CHASKAR, M. G.; BAVISHI, A.; SHINDE, S. R.; MAHAJAN, U. N.. **Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin**. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 6(1), p. 56-63, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.07.001>.

THOMPSON P.A., T.A.M. CS, O'BRIEN S.M., WIERDA W.G., STINGO F., PLUNKETT W., SMITH S.C., KANTARJIAN H.M., FREIREICH E.J., KEATING M.J. **Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia**, *Blood*, v.127, n.3, p. 303-9, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-667675>.

VON ROHR A.; SCHMITZ S.F.H.; TICHELLI A.; HESS U.; PIGUET D.; WERNLI M.; FRICKHOFEN N.; KONWALINKA G.; ZULIAN G.; GHIELMINI M.; RUFENER B.; RACINE C.; FEY M.F.; CERNY T.; BETTICHER D.; TOBLER A. **Treatment of hairy cell leukemia with cladribine(2-chlorodeoxyadenosine) by subcutaneous bolus injection:a phase II study**, *Annals of Oncology*, v. 13, n. 10, p. 1641 – 1649, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf272>.

WANG, X.; ZHANG, Y.; WANG, C.. **Discovery of cisplatin-binding proteins by competitive cysteinome profiling**. *RSC Chemical Biology*, v. 4, p. 670, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1039/d3cb00042g>.

WANG, Y.; LI, H.; SUN, H. **Metalloproteomics for unveiling the mechanism of action of metallodrugs**. *Inorganic Chemistry*, v. 58, p. 13673-13685, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01199>.

WHITLEY, R., ALFORD, C., HESS, F, BUCHANAN. R., **Vidarabine: A Preliminary Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use**. *Drugs*, v. 20, p. 267–282, 1980. DOI: <https://doi.org/10.2165/00003495-198020040-00002>.

WHITLEY RJ, TUCKER BC, KINKEL AW, BARTON NH, PASS RF, WHELCHER JD, COBBS CG, DIETHELM AG, BUCHANAN RA. **Pharmacology, tolerance, and antiviral activity of vidarabine monophosphate in humans**. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 8, n. 5, p. 709-15, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.18.5.709>.

WITKOWSKA, D.; ROWIŃSKA-ŻYREK, M. **Biophysical approaches for the study of metal-protein interactions**. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 199, p. 110783, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110783>.

ZHANG, C.; XU, C.; GAO, X.; YAO, Q.. **Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies**. *Theranostics*, v. 12, n. 5, p. 2115-2132, 2022. DOI: <https://doi.org/10.7150/thno.69424>.

ZHOU, A.; HAN, Q.; SONG, H.; ZI, J.; MA, J.; GE, Z. **Efficacy and toxicity of cladribine for the treatment of refractory acute myeloid leukemia: a meta-analysis**. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 13, p. 1867-1878, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S207425>.