

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Ana Luiza de Andrade Querino

**COMPLEXOS DIFENIL-PIRAZÓLICOS
DE PLATINA: ESTRUTURA, INTERAÇÃO COM
BIOMOLÉCULAS E CITOTOXICIDADE**

Belo Horizonte

2020

UFMG/ICEx/DQ 1.390
D. 758

Ana Luiza de Andrade Querino

**COMPLEXOS DIFENIL-PIRAZÓLICOS DE PLATINA:
ESTRUTURA, INTERAÇÃO COM BIOMOLÉCULAS E
CITOTOXICIDADE**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em Química.

Orientadora: Prof^a Dr^a Heveline Silva

Belo Horizonte

2020

Ficha Catalográfica

Q311h Querino, Ana Luiza de Andrade
2020 Complexos difenil-pirazólicos de platina
D [manuscrito] : estrutura, interação com biomoléculas e
citotoxicidade / Ana Luiza de Andrade Querino. 2020.
[xix], 98 f. : il.

Orientadora: Heveline Silva.

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

Inclui bibliografia.

1. Química inorgânica - Teses 2. Complexos
metálicos - Teses 3. Ligantes (Bioquímica) - Teses 4.
Agentes antineoplásicos - Teses 5. DNA - Teses 6.
Albumina - Teses 7. Glutathione - Teses I. Silva,
Heveline, Orientadora II. Título.

CDU 043



"Complexos Difenil - Pirazólicos de Platina: Estrutura, Interação com Biomoléculas e Citotoxicidade"

Ana Luiza de Andrade Querino

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Heveline Silva - Orientadora
UFMG

Profa. Priscila Pereira Silva Caldeira
CEFET-MG

Profa. Dayse Carvalho da Silva Martins
UFMG

Belo Horizonte, 21 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Penha e Carlinhos, ao meu irmão Lu, minha sobrinha Rafaela e minha vó Alzira: vocês me dão o amor e apoio necessários pra que eu queira ser melhor.

À prof. Heveline pela presença e apoio constantes, e pelo conhecimento compartilhado generosamente nesses anos todos.

Aos amigos do DQ: Jojô, Ruth, Nathany, Marina, Carol, Mateus, Toninho, Lorena, Lucius, Carolzinha, Izabela pelo incentivo, pelos cafés, happy hours, e longas horas de estudo que se tornaram muito mais agradáveis com vocês.

Aos Labs amigos 281, 238, 280 e 290, à prof. Renata, ao Lucas do RMN, aos funcionários do DQ (dona Santa, seu Luiz, Ivana): por me ensinarem tanto.

Ao futsal, minha grande paixão.

À universidade pública e gratuita.

À ciência e às mulheres da ciência (Rosalind, Dorothy, Henrietta Lacks), pelo comprometimento com a verdade e inspiração.

Ao universo por permitir que eu esteja aqui, nesse exato momento.

Ao Caos: e ao princípio próprio e escondido das coisas.

“Caminante, no hay camino, se hace camino al andar.”

(Llosa, M. V.)

Resumo

Complexos difenil-pirazólicos de platina: estrutura, interação com biomoléculas e citotoxicidade

Fármacos baseados em platina(II) são bem conhecidos e amplamente utilizados na quimioterapia do câncer desde a descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina. No entanto, efeitos colaterais tóxicos e resistência celular intrínseca ou adquirida por alguns pacientes decorrentes da administração destes compostos comprometem a sua eficácia e estimulam a busca por análogos com um perfil de efeitos mais favorável. Este trabalho apresenta a síntese e caracterização estrutural de três complexos inéditos de platina(II), de fórmula geral $[Pt^{II}(Pz)_2Cl_2]$, em que Pz são ligantes derivados do difenil-pirazol, visando a obtenção de potenciais agentes antitumorais. Derivados do heterociclo pirazol são biologicamente relevantes apresentando uma ampla gama de bioatividades relatadas na literatura. Os ligantes difenil-pirazol utilizados neste trabalho possuem modificações estruturais nos grupos fenil, sendo um *para*-fluorofenil e o outro *para*-substituído pelos grupos R - CH₃, -F ou -Cl (**L1**, **L2** e **L3**, respectivamente), a fim de se investigar a relação estrutura-atividade. As caracterizações foram realizadas por meio de análise elementar, condutimetria, análise termogravimétrica, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e do UV-vis, espectroscopia de RMN de ¹H, ¹³C e ¹⁹⁵Pt, espectrometria de massas e difração de raios X por monocristal. Também foi avaliada a interação dos complexos sintetizados com o DNA e a BSA (albumina do soro bovino) por meio de ensaios espectrofotométricos, em que estes apresentam constantes de interação similares ou superiores às apresentadas pelos ligantes livres. Além disso, o experimento de eletroforese em gel de agarose utilizando DNA plasmidial demonstrou a capacidade dos complexos interagirem com o DNA e alterarem sua mobilidade eletroforética. A atividade antiproliferativa dos compostos foi avaliada frente às linhagens celulares tumorais B16F10 e 4T1, e não tumoral BHK21, por meio da qual foi demonstrada a potencialização da ação citotóxica dos complexos sobre os ligantes. Os complexos apresentaram atividade promissora, principalmente os complexos **C1** e **C3**, apesar da baixa seletividade. Foi avaliada, também, a capacidade de biomoléculas como BSA e GSH (glutaciona)

interagirem com os complexos em meio biológico e afetarem a atividade citotóxica dos mesmos frente à linhagem B16F10, sendo que o complexo **C3** não sofreu perturbação. Por fim, os complexos foram devidamente obtidos e as análises bioinorgânicas sugerem que o complexo **C3** tem melhor interação com o DNA (principal alvo celular) conseguindo driblar biomoléculas como BSA e GSH que possam causar sua desativação.

Palavras-chave: Complexos metálicos; Ligantes nitrogenados; Antitumorais; DNA; Albumina; Glutathione

Abstract

Platinum diphenyl-pyrazole complexes: structure, interaction studies with biomolecules and cytotoxicity

Platinum(II)-based drugs are well known and widely used in cancer chemotherapy since the serendipitous discovery of the antitumor properties of cisplatin. However, toxic side effects and intrinsic or acquired cell resistance by some patients under cisplatin treatment can compromise its efficacy and have been stimulating the search for analog compounds with a more promising effects profile. This work presents the synthesis and structural characterization of platinum complexes of general formula $[Pt^{II}(Pz)_2Cl_2]$, where Pz are diphenyl-pyrazole derived ligands, aiming to obtain potential antitumor agents. Pyrazole heterocycle derivatives are biologically relevant for their wide range of bioactivities reported in the literature. The diphenyl-pyrazole ligands used in this work have structure modifications on aryl groups, one is a *para*-fluorophenyl and the other phenyl is *para*-substituted by R groups (-CH₃, -F or -Cl), **L1**, **L2** e **L3** respectively, in order to investigate their structure-activity relationships. The complexes were characterized by elemental, conductivity and thermogravimetric analysis, FTIR, electronic, NMR and mass spectrometry, as well as single-crystal X-ray diffraction. The interaction of synthesized compounds with DNA and BSA through spectrophotometric assay was also evaluated, resulting in similar or superior binding ability compared to the free ligands. In addition, agarose gel electrophoresis with plasmid DNA revealed that complexes are capable of interaction with DNA and modify its electrophoretic mobility. Antiproliferative activities were assessed against tumor (B16F10 and 4T1) and non-tumor (BHK21) cell lines, and the cytotoxicity of the compounds was strongly increased after metal complexation displaying promising activity, especially complexes **C1** and **C3**, despite its low selectivity. It was also assessed the ability of BSA and GSH biomolecules to decrease the cytotoxicity of the complexes against B16F10. It can be highlighted here that the **C3** activity was not disturbed in those conditions. Lastly, complexes were properly obtained and bioinorganic analysis suggest that **C3** has better interaction with DNA (the main biological target), managing to circumvent biomolecules such as BSA and GSH that can cause its deactivation.

Keywords: Metallic complexes; Nitrogen Ligands; Antitumor; DNA; Albumin; Glutathione.

Lista de Figuras

Figura 1 – Estruturas químicas dos fármacos de platina e derivados que alcançaram a triagem clínica.....	18
Figura 2 – Etapas do mecanismo de ação da cisplatina. (i) Uptake celular, (ii) Aquecimento/ativação, (iii) Ligação ao DNA através de bases nitrogenadas, (iv) Ligações cruzadas que levam às distorções na estrutura e apoptose. Adaptado da Referência 77.....	20
Figura 3 – Representação da estrutura do DNA (Código PDB: 3BSE).	21
Figura 4 – Distorções na estrutura do DNA causadas pela ligação covalente entre a cisplatina e o N7 das bases nitrogenadas a) Ligação cruzada do tipo 1,2-d(GpG) intrafita, (b) Ligação cruzada do tipo 1,3-d(GpTpG) intrafita e (c) Ligação cruzada interfita. Adaptado da Referência 23.....	22
Figura 5 – Representação da estrutura terciária da BSA. Código PDB: 4F5S.	23
Figura 6 – Estrutura química da glutatona (GSH).....	24
Figura 7 – Os caminhos possíveis para a cisplatina, antes e depois de entrar na célula Adaptado da Referência 13.....	24
Figura 8 – Estrutura química do heterociclo pirazol.	25
Figura 9 – Estrutura química de alguns derivados de pirazol usados como medicamentos.	26
Figura 10 – Modos de coordenação possíveis para complexos de ligantes pirazol, em que M representa um íon metálico.....	26
Figura 11 – Complexos de platina(II) sintetizados por Sakai e colaboradores ³⁸	27
Figura 12 – Complexos binucleares de platina(II) sintetizados por Komeda e colaboradores ³⁹	27
Figura 13 – Reação de redução do MTT que ocorre na mitocôndria de células viáveis.	32
Figura 14 – Estrutura geral dos compostos 3,5-difenil pirazol utilizados como ligantes neste trabalho.....	34
Figura 15 – Esquema de síntese dos complexos de platina(II) com ligantes difenil-pirazólicos.....	35
Figura 16 – Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante L1 e complexo C1	42

Figura 17 – Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante L2 e complexo C2	42
Figura 18 – Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante L3 e complexo C3	43
Figura 19 – Formas tautoméricas resultantes do prototropismo do núcleo pirazólico substituído nas posições 3- e 5-.....	45
Figura 20 –Espectro de RMN de ^1H do ligante L2 livre em solução de DMSO- d_6 (δ em ppm) em 400 MHz.	45
Figura 21 – Espectro de RMN de ^{13}C do ligante L2 livre em solução de DMSO- d_6 (δ em ppm) em 400 MHz.	46
Figura 22 – Espectro de RMN de ^1H do complexo C2 em solução de DMF- d_7 (δ em ppm) em 400 MHz.....	47
Figura 23 –Espectro de RMN de ^{13}C do complexo C2 em solução de DMF- d_7 (δ em ppm) em 400 MHz.....	48
Figura 24 – Espectro de RMN de ^{195}Pt dos complexos C1 , C2 e C3 , respectivamente, em soluções de DMF- d_7 (δ em ppm) em 43 MHz.	50
Figura 25 – Representação ORTEP da unidade assimétrica dos complexos com elipsoides de vibração térmica em nível de probabilidade de 50%......	51
Figura 26 – Representação da unidade assimétrica de C1 , C2 e C3 , respectivamente, evidenciando a não-planaridade dos anéis presentes nos ligantes. Átomos de hidrogênio omitidos para maior clareza.	54
Figura 27 – Ligação de hidrogênio $\text{N4}—\text{H4}^{\cdots}\text{O1}$ entre uma molécula de DMF e o complexo na estrutura de C1	54
Figura 28 – Cálculo de distância dos centroides nas estruturas de A) C1 , B) C2 e C) C3	56
Figura 29 – Curvas de viabilidade celular do ensaio colorimétrico MTT nas linhagens 4T1 (adenocarcinoma mamário murino), B16F10 (melanoma metastático murino) e BHK-21 (célula normal de rim de hamster) tratadas com os complexos C1 , C2 e C3 por 72 h. Cada ponto no gráfico representa uma concentração (1, 5, 10, 50, 100 μM). Resultados foram expressos como média \pm DP da triplicata de dois experimentos independentes.....	59
Figura 30 – Curvas de viabilidade celular do ensaio colorimétrico com MTT na linhagem B16F10 em três diferentes condições: meio sem alterações (\square), meio suplementado com 25	

mg mL⁻¹ de BSA (○) e meio suplementado com 1 mM de GSH (▲). As células foram tratadas com os complexos **C1**(A), **C2**(B) e **C3**(C) por 72 h. Cada ponto no gráfico representa uma concentração (1, 5, 10, 50, 100 μM). Resultados foram expressos como média ± DP da triplicata de dois experimentos independentes.....60

Figura 31 – O espectro de absorção no UV-vis da BSA livre em pH 7,4 na concentração de $2,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.....62

Figura 32 – A) O espectro de absorção no UV-vis da BSA na ausência e na presença de concentrações crescentes de **C1**, em 25 °C. B) Recorte evidenciando a banda em 280 nm. A concentração da BSA, inicialmente, de $2,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e do complexo variando de 0 a $7,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. C) Gráfico de A/A_0 versus $1/[C1]$, obedecendo a equação de Benesi-Hildebrand.....63

Figura 33 - O espectro de absorção no UV-vis da BSA na ausência e na presença de concentrações crescentes dos complexos e ligantes a 25 °C.64

Figura 34 – Espectros eletrônicos em solução aquosa $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em pH=7,4 dos complexos **C1**, **C2** e **C3**, respectivamente; $l=1$ cm.65

Figura 35 – Espectro UV-vis de **C1** e concentrações crescentes de ctDNA. Inset: Gráfico da equação de Benesi-Hildebrand.66

Figura 36 – Espectros no UV-vis dos complexos e ligantes, na presença de concentrações crescentes de ctDNA (0-20 μM). A seta destaca as mudanças no máximo de absorção, resultando em um efeito hipocrômico.....67

Figura 37 – O espectro de emissão de fluorescência do sistema EB-ctDNA na ausência e na presença de concentrações crescentes de **C3**, em 25 °C. Inset: Razão I/I_0 versus $[C3]$68

Figura 38 – Representação esquemática das três formas principais das moléculas de DNA plasmidial²².69

Figura 39 – Estudos de interação de DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose, com concentrações decrescentes do complexos **C1**, **C2** e **C3**, após 24 horas de incubação a 37 °C. Linha 1: marcador de peso molecular do DNA; Linha 2, controle: DNA plasmidial; Linhas 3-6, 7-10 e 11-14: DNA plasmidial + complexos a a) 100, b) 50, c) 20 e d) 10 mmol Pt/ gDNA. OC: forma relaxada, L: linear e SC: superenovelada.....70

Figura 40 – Espectro ESI(-)-MS do complexo **C1** em metanol.....79

Figura 41 – Espectro ESI(-)-MS do complexo **C2** em metanol.....79

Figura 42 – Espectro ESI(-)-MS do complexo C3 em metanol.....	80
Figura 43 – Análise termogravimétrica do complexo C1 em atmosfera inerte e taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	80
Figura 44 – Análise termogravimétrica do complexo C2 em atmosfera inerte e taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	81
Figura 45 – Análise termogravimétrica do complexo C3 em atmosfera inerte e taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	81
Figura 46 – Espectro de ¹ H-RMN do ligante L1 em DMSO-d ₆ (δ em ppm) em 400 MHz.....	82
Figura 47 – Espectro de ¹³ C-RMN do ligante L1 em DMSO-d ₆ (δ em ppm) em 100 MHz.....	82
Figura 48 – Espectro de ¹ H-RMN do ligante L3 em DMSO-d ₆ (δ em ppm) em 400 MHz.....	83
Figura 49 – Espectro de ¹³ C-RMN do ligante L3 em DMSO-d ₆ (δ em ppm) em 100 MHz.....	83
Figura 50 – Espectro de ¹ H-RMN do complexo C1 em DMF-d ₇ (δ em ppm) em 400 MHz..	84
Figura 51 – Espectro de ¹³ C{ ¹ H} e DEPT 135 do complexo C1 em DMF-d ₇ , 100 MHz (δ em ppm).....	84
Figura 52 – Espectro COSY do complexo C1 em DMF-d ₇	85
Figura 53 – Espectro de ¹³ C{ ¹ H} e DEPT 135 do complexo C2 em DMF-d ₇ , 100 MHz (δ em ppm).....	85
Figura 54 – Espectro COSY do complexo C2 em DMF-d ₇	86
Figura 55 – Espectro de ¹ H-RMN do complexo C3 em DMF-d ₇ (δ em ppm) em 400 MHz..	86
Figura 56 – Espectro de RMN de ¹³ C{ ¹ H} e DEPT 135 do complexo C3 em DMF-d ₇ , 100 MHz (δ em ppm).....	87
Figura 57 – Vista ao longo de a na célula unitária de C1	87
Figura 58 – Vista ao longo de b na célula unitária de C2	88
Figura 59 – Vista ao longo de c na célula unitária de C3	88
Figura 60 – Espectro de emissão de fluorescência dos complexos C1 , C2 e C3 em solução 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ em DMF. λ _{excitação} = 269 nm.....	89
Figura 61 – Curvas obtidas pelo método de Benesi-Hildebrand para a variação espectral da BSA durante a titulação com os compostos.....	89

Figura 62 - Curvas obtidas pelo método de Benesi-Hildebrand para a variação espectral dos compostos durante a titulação com o ctDNA. 90

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Massa molar e análise elementar de CHN dos complexos de platina(II).	40
Tabela 2 – Atribuição das principais bandas observadas nos espectros de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) dos ligantes e respectivos complexos.	44
Tabela 3 – Distâncias e ângulos de ligação na esfera de coordenação da platina(II) dos complexos sintetizados neste trabalho.	52
Tabela 4 – Distâncias e ângulos de ligação selecionados de um anel pirazol em C1	53
Tabela 5 – Parâmetros geométricos para as ligações de hidrogênio (Å , $^\circ$) presentes nas estruturas dos complexos de Pt(II) sintetizados. (D = átomo doador, A = átomo receptor)	55
Tabela 6 – Dados relacionados à coleta, resolução e refinamento dos complexos sintetizados	57
Tabela 7 – Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) obtidos pelo ensaio MTT nas linhagens 4T1, B16F10 e BHK-21.	58
Tabela 8 – Valores das constantes de ligação intrínseca (K_b) e magnitude do coeficiente de determinação (R^2) obtidos para os ligantes e complexos com a BSA.	65
Tabela 9 – Valores das constantes de ligação intrínseca (K_b) e magnitude do coeficiente de determinação (R^2) obtidos para os ligantes e complexos com ctDNA.	66

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SUAS DEFINIÇÕES

α – Ângulo entre os eixos cristalográficos *b* e *c*

β – Ângulo entre os eixos cristalográficos *a* e *c*

γ – Ângulo entre os eixos cristalográficos *a* e *b*

δ' – Deformação angular

δ – Deslocamento Químico de RMN em ppm

ϵ – Absortividade Molar ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)

λ – Comprimento de Onda (nm)

μ – Micro (10^{-6})

ν – Número de Onda (cm^{-1})

4T1 – Linhagem celular de carcinoma mamário murino

Å – Angström (10^{-10} m)

B16F10 – Linhagem celular de melanoma murino

BE – Brometo de etídio

BHK21 – Linhagem celular de rim de hamster

BSA – Albumina Bovina Sérica, *Bovine Serum Albumine*

CHN – Experimento de dosagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio

cm – centímetro (10^{-2} metro)

COSY – Espectroscopia de Correlação, *Correlated Spectroscopy*

ctDNA – Ácido Desoxirribonucleico de Timo de Bezerro, *calf-thymus deoxyribonucleic acid*

Ctr1, Ctr2 – Transportadores de cobre 1 e 2, *Copper Import Transporters 1 and 2*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico, *Deoxyribonucleic Acid*

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DQ-UFMG – Departamento de Química na Universidade Federal de Minas Gerais

ESI(MS) – Ionização por Eletro Spray, *Electron Spray Ionization*

FBS – Soro Fetal Bovino

FDA – *Food and Drug Administration*

GSH – Glutathione-S-Transferase

IC₅₀ – Concentração Inibitória a 50%

IV – Espectroscopia na região do Infravermelho

J – Constante de Acoplamento (Hz)

L – Litro

μ – Micro (10⁻⁶)

MeOH – Metanol

MM – Massa molar

MTT – Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Il)2,5-Difeniltetrazólio

NaCl – Cloreto de Sódio

nm – nanômetro (10⁻⁹ metro)

OCTs – Transportadores catiônicos orgânicos, *Organic Cations Transporters*

Ortep – Gráfico de Elipsoides Térmicos de Oak Ridge, *Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot*

PBS – Tampão Fosfato-Salino, *Phosphate buffered Saline*

PDB – Banco de Dados de Proteínas, *Protein Data Bank*

pH – Potencial Hidrogeniônico

Phe – Fenilalanina

Pz – Ligantes derivados do pirazol

r^2 – Coeficiente de Determinação Linear

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Desacoplado de Hidrogênio

RMN de $^{195}\text{Pt}\{^1\text{H}\}$ – Ressonância Magnética Nuclear de Platina Desacoplado de Hidrogênio

RPMI – Meio de cultura do Instituto Memorial Roswell Park, *Roswell Park Memorial Institute Medium*

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

TG/DTA – Análise Termogravimétrica e Análise Térmica Diferencial

TMS – Tetrametilsilano

TRIS – Tampão Tris(hidroximetil)aminometano

Trp – Triptofano

Tyr – Tirosina

u.a. – Unidades de Absorbância (Arbitrária)

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

USP – Universidade de São Paulo

UV-vis – Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível

V – Volume da célula unitária

Z – Número de unidades assimétricas por célula unitária

WHO – Organização Mundial da Saúde, *World Health Organization*

Sumário

1. Introdução.....	16
2. Técnicas experimentais.....	29
2.1. Temperatura de Fusão	29
2.2. Análise Elementar	29
2.3. Análise Térmica.....	29
2.4. Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho (IV).....	29
2.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C e ^{195}Pt	29
2.6. Difração de raios X por monocristal	30
2.7. Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	30
2.8. Espectroscopia de Fluorescência.....	30
2.9. Condutividade.....	30
2.10. Espectrometria de Massas	31
2.11. Ensaio de citotoxicidade	31
2.12. Estudos da interação com biomoléculas	32
2.12.1. Estudos de interação com BSA por titulações espectrofotométricas	32
2.12.2. Estudos de interação com DNA por titulações espectrofotométricas	33
2.12.3. Estudos de intercalação com ctDNA por medidas de fluorescência.....	33
2.12.4. Eletroforese de DNA em gel de agarose	34
2.13. Ligantes derivados do difenil-pirazol.....	34
2.14. Síntese dos complexos de platina(II) com derivados difenil-pirazólicos.....	35
3. Resultados e discussão	36
3.1. Caracterização dos compostos.....	36
3.1.1. Análise elementar de CHN, Condutividade Molar, TG/DTG e Massas	39
3.1.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	41
3.1.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	44
3.1.4. Análise cristalográfica por difração de raios X de monocristal.....	50
3.2. Investigação das propriedades biológicas	58
3.2.1. Ensaio de citotoxicidade	58
3.2.2. Ensaio de citotoxicidade em meio suplementado com BSA e GSH.....	60
3.2.3. Interação com a BSA	61
3.2.4. Interação com ácido desoxirribonucleico (ctDNA).....	65

3.2.5 Interação com o sistema BE-ctDNA.....	68
3.2.6 Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial	68
4. Considerações Finais e Conclusões	71
Referências	74
Apêndice	78
Anexos	91

1. Introdução

Doenças neoplásicas e a Quimioterapia do Câncer

Câncer é o termo usado para um grupo de doenças que se caracterizam pelo crescimento desordenado de células anormais, que podem invadir tecidos saudáveis próximos e/ou metastatizar para outros pontos do organismo. Esta proliferação anormal de células é conhecida como neoplasia, podendo formar tumores malignos, que são de multiplicação exacerbada, comprometendo as funções fisiológicas de um, ou vários órgãos, na ocorrência de metástase. No caso de tumores benignos, estes se multiplicam morosamente e não acarretam tantos riscos ao indivíduo. O câncer é uma doença potencialmente fatal que acomete uma grande parcela da população mundial, atrás apenas de doenças cardiovasculares, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*). Em termos globais, a taxa de mortalidade representa quase 21% dos óbitos. Os tipos de câncer mais incidentes no mundo são de pulmão, mama, intestino e próstata. O Instituto Nacional do Câncer¹ publica, bienalmente, estimativas para a incidência de câncer no Brasil, segundo gênero, região geográfica e tipo de neoplasia. Para o biênio 2018-2019, estimou-se a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer, para cada ano, sendo os cânceres de próstata em homens e mama em mulheres os mais frequentes (68 mil e 60 mil, respectivamente)^{1,2}.

Esse cenário de mortalidade pode ser amenizado através de diferentes intervenções ou combinação das mesmas. As principais formas de tratamento contra o câncer envolvem cirurgia, radioterapia ou quimioterapia. A quimioterapia consiste da utilização de fármacos para controlar, inibir e até mesmo destruir células cancerosas que formam o tumor, a fim de curar ou atenuar o mesmo. Tal tratamento pode ser viabilizado através de, principalmente, administração oral e intravenosa. Existem, entretanto, problemas relacionados ao uso dos medicamentos antitumorais existentes, por agirem de forma inespecífica, atingindo também células normais. Assim, efeitos colaterais como perda de cabelo, náuseas, vômitos, dentre outros, são comuns aos pacientes submetidos ao tratamento. Além disso, as células cancerosas podem desenvolver mecanismos de resistência, diminuindo o efeito

citotóxico dos compostos. Dessa forma, a necessidade de fármacos antitumorais mais eficazes é extremamente relevante dentro do contexto citado^{1,3}.

Contribuições da Química Bioinorgânica na quimioterapia

No contexto da quimioterapia do câncer, complexos de platina têm sido amplamente estudados desde a descoberta das propriedades citotóxicas da cisplatina por Rosenberg e colaboradores na década de 1960, quando estudavam o crescimento de uma colônia de *Escherichia coli* na presença de campo elétrico⁴. Em seus experimentos foi observado que compostos formados, a partir do eletrodo de platina, durante a eletrólise, interrompiam a divisão celular e induziam o crescimento de filamentos de bactérias. Dentre esses compostos, o complexo *cis*-diaminodichloroplatina(II), conhecido como cisplatina (**Figura 1**), foi identificado como o mais ativo. Essa descoberta deu origem ao renascimento da química inorgânica medicinal, antes utilizada apenas de forma empírica⁵. A cisplatina foi aprovada em 1978 para o tratamento de câncer de próstata, atingindo 90% de taxa de cura para casos detectados em estágios iniciais. Esse fármaco também se mostra altamente eficaz para outros tipos de câncer, como câncer de ovário, esôfago, pulmão, entre outros^{6,7}. A administração de cisplatina, no entanto, leva a efeitos adversos, como nefrotoxicidade e neurotoxicidade. Além disso, pacientes podem desenvolver resistência severa ao medicamento, o que limita significativamente seu uso e resulta em baixa eficácia contra alguns tipos de tumores^{8,9}.

Assim, esforços no sentido de amenizar esses efeitos foram fundamentais na descoberta de análogos da cisplatina com menor toxicidade. Compostos como a carboplatina e oxaliplatina (**Figura 1**), foram racionalmente desenvolvidos e demonstraram boas atividades antitumorais. Esses compostos foram aprovados para uso clínico como quimioterápicos em diversos países, em 1989 e 2002, respectivamente, com a proposta de diminuir os efeitos colaterais, preservando a atividade antineoplásica. A carboplatina foi sintetizada segundo a hipótese de que compostos contendo dicarboxilatos como grupos abandonadores, em contraste com os lábeis ligantes cloretos, reteriam melhor as propriedades anticâncer, além de serem menos tóxicos. Ela apresenta, basicamente, o mesmo espectro de atividade que a cisplatina, com menor incidência de efeitos colaterais, porém, ineficiente frente às células tumorais resistentes. Sua utilização se dá, principalmente, no

tratamento de câncer de ovários e pequenas células de pulmão. Pesquisas no sentido de aumentar o espectro de atividade de agentes anticâncer baseados em platina levaram à aprovação do uso da oxaliplatina. Esta se mostra eficaz contra câncer de cólon e câncer gastrointestinal, para os quais cisplatina e carboplatina não respondem adequadamente. Adicionalmente à cisplatina, carboplatina e oxaliplatina, que receberam aprovação mundial no tratamento de câncer, a nedaplatina foi aprovada para tratamento no Japão, e lobaplatina foi aprovada para tratamento na China, além de outros compostos ao redor do mundo^{9,10} (**Figura 1**).

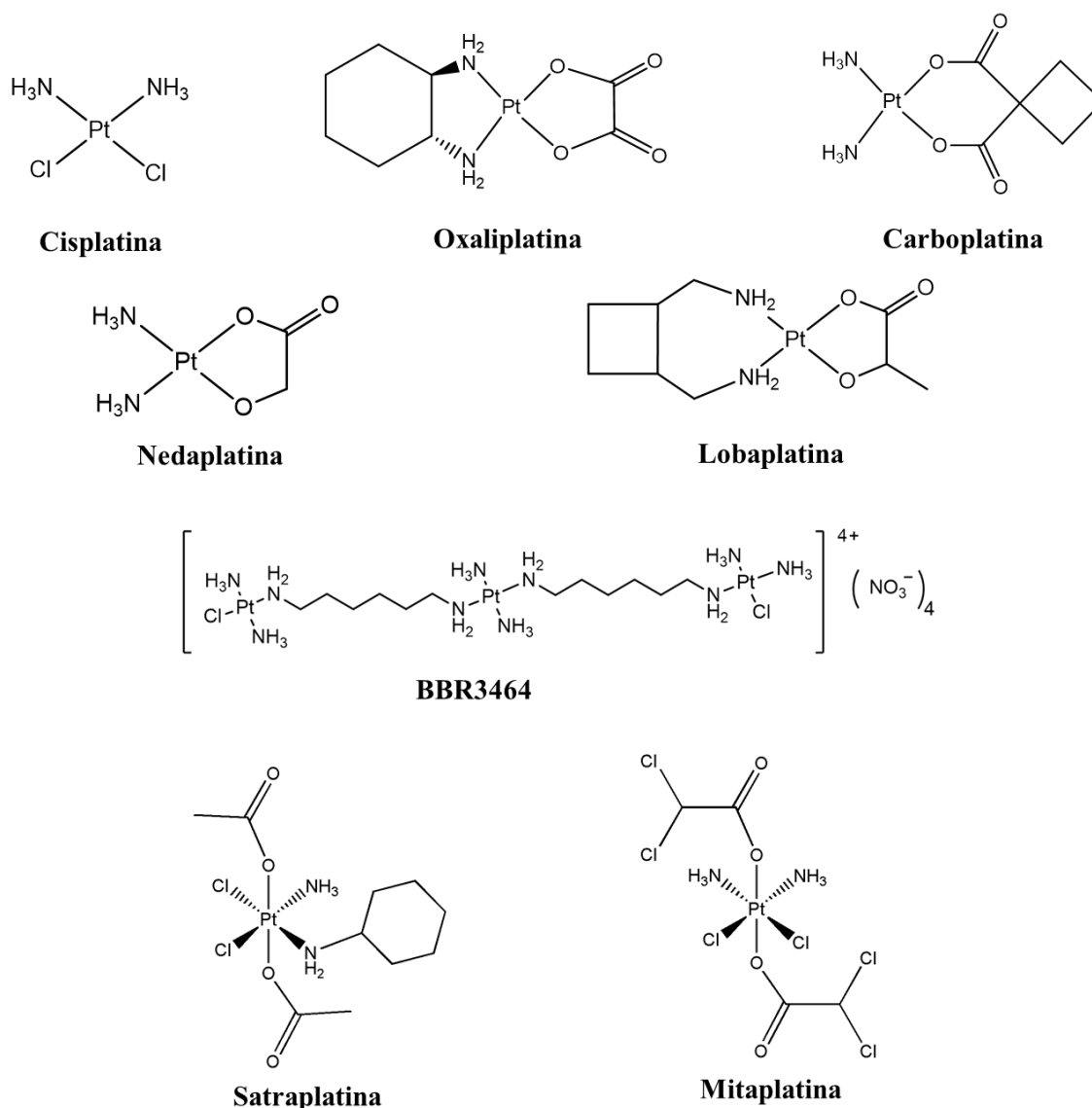


Figura 1 – Estruturas químicas dos fármacos de platina e derivados que alcançaram a triagem clínica.

Diversos outros trabalhos explorando o potencial citotóxico de compostos baseados em platina têm sido relatados. Farrell e colaboradores descreveram uma nova classe de compostos citotóxicos de Pt(II): os polinucleares, como o trisplatina BBR3464 (**Figura 1**). Esses compostos contêm unidades do tipo *trans*-[Pt(NH₃)₂Cl], com ligantes alcanodiaminos em ponte, em um *design* projetado para favorecer ligações cruzadas intra- e interfita de longa distância, formando adutos não convencionais. O BBR3464 é mais citotóxico que a cisplatina, *in vitro* e *in vivo*, e exibe atividade antitumoral contra células resistentes e é o último derivado de platina submetido a testes clínicos desde 1999¹¹⁻¹³.

Compostos de platina(IV) também têm sido descritos como possíveis antitumorais, principalmente como pró-droga. Eles possuem propriedades interessantes e diferentes de análogos da cisplatina, como maior solubilidade em água e maior estabilidade da esfera de coordenação frente à substituição de ligantes, uma vez que são compostos octaédricos e coordenativamente saturados. Essas propriedades podem permitir o transporte da droga intacta (“pró-droga”), com menos reações indesejadas, até a entrega ao alvo biológico, diminuindo, portanto, efeitos tóxicos indesejados. A reação de redução da platina(IV) para platina(II), ao mesmo tempo em que perde dois ligantes axiais, é considerada essencial para a atividade citotóxica desses compostos. A forma divalente resultante pode se ligar ao DNA, analogamente aos derivados da cisplatina. Alguns compostos de platina(IV) estão em triagem clínica, como a mitaplatina e a satraplatina, demonstrados na **Figura 1**¹⁴⁻¹⁶.

Outras estratégias promissoras como sistemas de veiculação de drogas (lipossomas, ciclodextrinas, nanopartículas, etc) têm recebido esforços na tentativa de aumentar o espectro de atividade citotóxica e a seletividade dos derivados de platina, além da redução de efeitos colaterais e da resistência intrínseca ou adquirida em pacientes oncológicos. A resistência pode estar envolvida com a desativação da droga através de reações paralelas que podem ocorrer dentro ou fora da célula, antes de atingirem o alvo, ou relacionada ao tipo de *uptake* celular^{13,17,18}.

Os processos bioquímicos envolvidos na entrada da cisplatina nas células apontam para dois mecanismos principais. A difusão passiva transmembrana é um

processo que depende do tamanho e balanço hidrofílico/hidrofóbico da molécula, de forma que é esperado que a cisplatina atravessa a bicamada lipídica passivamente. Estudos envolvendo membranas-modelo corroboram essa proposta de *uptake* celular. A alta concentração de íons cloreto em meio extracelular previne que reações de substituição de ligantes ocorram na cisplatina. No meio intracelular, onde a concentração de íons cloreto é, aproximadamente, dez vezes mais baixa, essas reações ocorrem mais rapidamente, produzindo espécies mais reativas, como o *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl(H₂O)]⁺ (**Figura 2**). Transportadores ativos presentes em membranas são outra forma de internalização da cisplatina. Transportadores de cobre como Ctr1, Ctr2, transportadores de cátions orgânicos (OCTs) entre outros, estão associados à regulação de cisplatina em células de mamíferos. No entanto, o mecanismo de interação não foi totalmente elucidado^{7,9,16,19,20}.

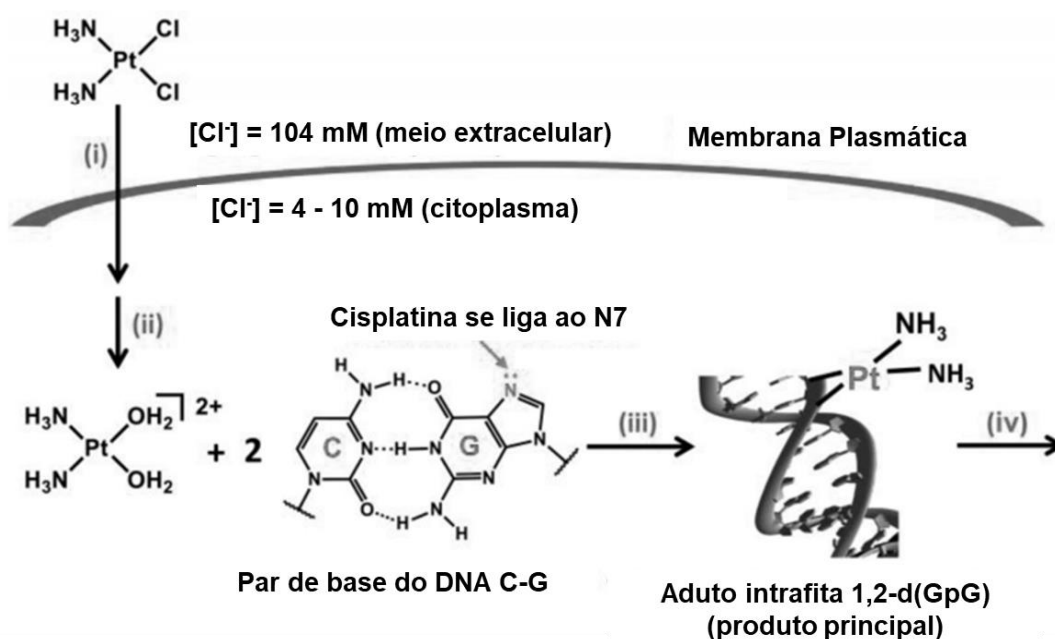


Figura 2 – Etapas do mecanismo de ação da cisplatina. (i) *Uptake* celular, (ii) Ativação/ativação, (iii) Ligação ao DNA através de bases nitrogenadas, (iv) Ligações cruzadas que levam às distorções na estrutura e apoptose. Adaptado da Referência 77.

Principais alvos biológicos de metalofármacos

O mecanismo de ação de compostos baseados em platina tem sido largamente estudado, embora não esteja completamente elucidado. Evidências apontam que o produto de aquação da cisplatina, $cis\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$, é atraído para o núcleo celular, devido às cargas negativas dos grupos fosfato do DNA, tornando-o o principal alvo biológico dessa classe de compostos (**Figura 3**). A molécula de água como ligante pode ser substituída por uma base nitrogenada, sendo que os átomos de nitrogênio N7 das bases purinas são os sítios mais nucleofílicos e acessíveis, levando à formação de adutos do tipo cisplatina-DNA. Adicionalmente, em uma segunda reação, o ligante cloreto pode ser substituído por uma segunda base nitrogenada, resultando em ligações cruzadas no DNA. Essas ligações cruzadas podem ocorrer na mesma fita do DNA ou em fitas adjacentes, sendo chamadas de intrafita e interfita, respectivamente. Os adutos mais comuns são formados de ligações 1,2-intrafita por resíduos de guanina adjacentes, $cis[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{d(\text{GpG})\}]$ ou 1,2-d(GpG), **Figura 4a**, mas podem ocorrer, também, outros tipos como intrafita entre adeninas e guaninas adjacentes, 1,2-d(ApG), ou entre guaninas não-adjacentes, 1,3-d(GpTpG), **Figura 4b**, além de poderem ocorrer interfita, ou seja, em fitas diferentes, **Figura 4c**.^{7,21}

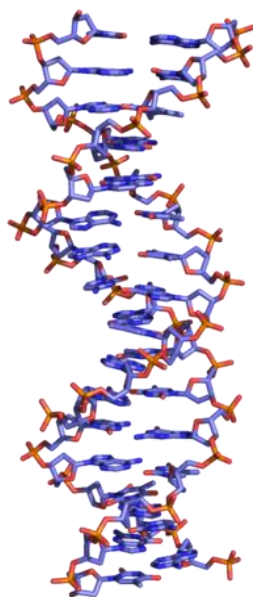


Figura 3 – Representação da estrutura do DNA (Código PDB: 3BSE).

Essas ligações cruzadas têm forte caráter covalente, no entanto, outras interações podem ocorrer a depender da estrutura do composto antitumoral interagente com o DNA (**Figura 3**). O mecanismo de interações não covalentes pode ser do tipo eletrostático (entre complexos catiônicos e os grupos fosfato do DNA), ligações de hidrogênio, ligação nos sulcos maiores ou menores do DNA, ou por interações de intercalação do tipo π - π *stacking* entre bases nitrogenadas por moléculas aromáticas planas²². Esses adutos formados por complexo-DNA causam distorções significativas na estrutura helicoidal da biomolécula (**Figura 4**), interferindo no reconhecimento do DNA por componentes celulares e resultam em inibição da replicação e transcrição, desencadeando a morte celular por apoptose e necrose^{20,23}.

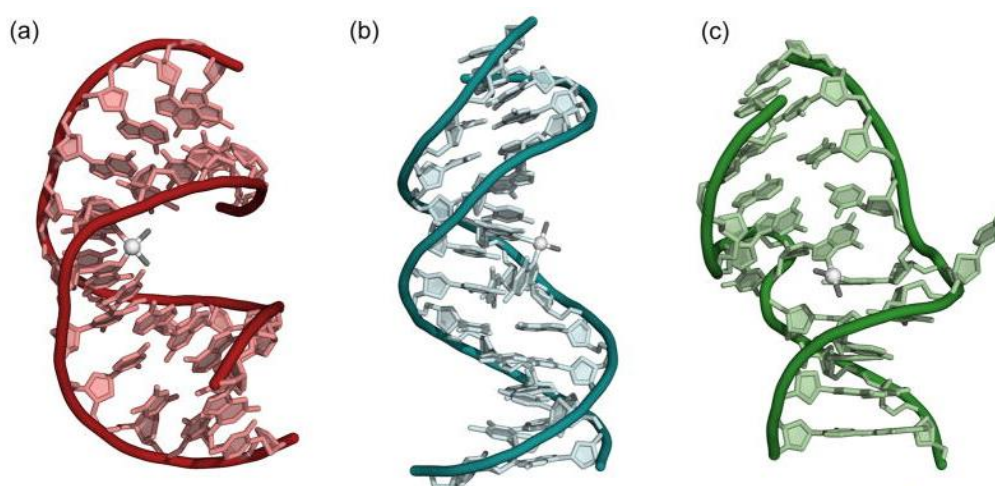


Figura 4 – Distorções na estrutura do DNA causadas pela ligação covalente entre a cisplatina e o N7 das bases nitrogenadas a) Ligação cruzada do tipo 1,2-d(GpG) intrafita, (b) Ligação cruzada do tipo 1,3-d(GpTpG) intrafita e (c) Ligação cruzada interfita. Adaptado da Referência 23.

Embora o DNA continue sendo o alvo biológico primário para a cisplatina, reações deste composto com outras macromoléculas biológicas são, também, de grande interesse, pois podem indicar efeitos de toxicidade, eficácia e biodistribuição da droga. Existe clara evidência de que a cisplatina se liga às albuminas de soro, principalmente através de resíduos de cadeias laterais de histidina e metionina, formando adutos e afetando o comportamento farmacocinético da mesma^{24,25}. As albuminas de soro, como as albuminas de soro humano (HSA) ou bovino (BSA) (**Figura 5**), são as proteínas mais abundantes do plasma sanguíneo destes

mamíferos, com concentrações de aproximadamente 0,6 mM, e desempenham muitas funções fisiológicas. Elas agem no transporte e distribuição de compostos como aminoácidos, íons metálicos, bem como fármacos e outros, sendo capazes de se ligar a uma variedade de moléculas exógenas, de forma que é interessante estudar os comportamentos de interação de antitumorais promissores com as albuminas de soro²⁶.

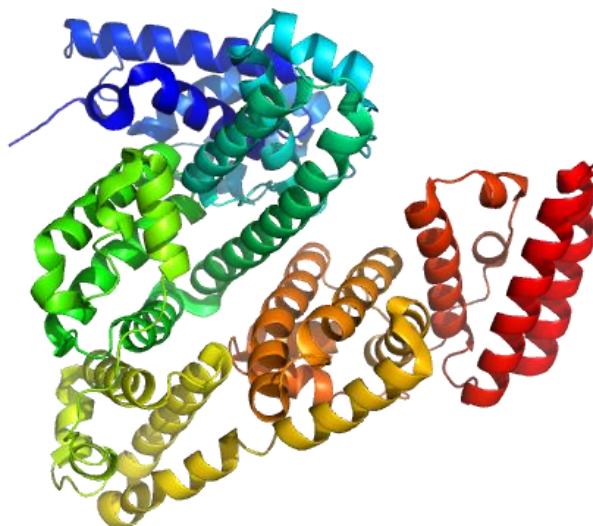


Figura 5 – Representação da estrutura terciária da BSA. Código PDB: 4F5S.

Devido à grande afinidade de platina(II) por grupos sulfurados, em acordo com teoria de ácidos e bases de Pearson, a espécie ativada da cisplatina (formada como produto de aquação no citoplasma) reage com moléculas contendo grupos sulfidríla, como a glutatona. A glutatona (GSH), **Figura 6**, é um tripeptídeo constituído de ácido glutâmico, cisteína e glicina (Glu-Cys-Gly), presente em células mamíferas, em meio intra- e extra- celular, em concentrações na faixa de 1-10 mM. É uma das mais importantes defesas do organismo contra os danos oxidativos causadas por espécies reativas de oxigênio, servindo como substrato para a ação da glutatona peroxidase na remoção de H₂O₂. Esse peptídeo faz parte, portanto, do eficiente sistema antioxidante das células, juntamente com a superóxido dismutase, NADPH, vitaminas C e E, dentre outros²⁷. A inativação da cisplatina pode ocorrer através do aumento intracelular de GSH, que se liga ao centro metálico, formando adutos que são rapidamente excretados do meio. Esse processo diminui a disponibilidade do composto no citoplasma para que se ligue ao DNA, diminuindo consideravelmente, também a sua eficácia²⁸. Além disso, algumas linhagens de

células resistentes à cisplatina apresentam teores elevados de glutatona e metalotioneínas, indicando uma correlação entre a concentração de tióis e a resistência celular^{8,16}.

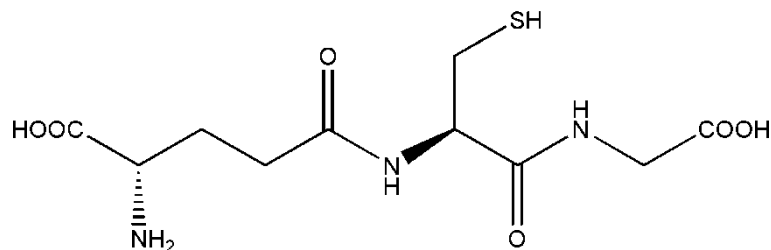


Figura 6 – Estrutura química da glutatona (GSH).

Sendo assim, a atividade citotóxica de um fármaco antitumoral baseado em platina(II) está intrinsecamente relacionada às suas habilidades de superar os mecanismos paralelos passíveis de ocorrer dentro ou fora célula que afetem sua biodisponibilidade no núcleo celular (**Figura 7**). Em virtude disso, é motivada a busca por compostos análogos à cisplatina com variações estruturais que minimizem os efeitos adversos de um metalofármaco e promova uma atividade seletiva inclusive em células resistentes à cisplatina.

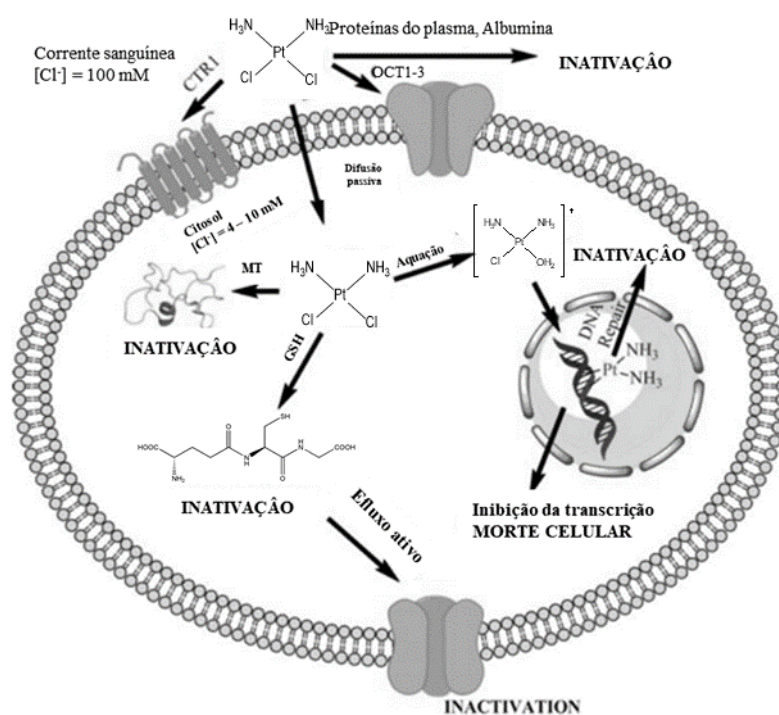


Figura 7 – Os caminhos possíveis para a cisplatina, antes e depois de entrar na célula. Adaptado da Referência 13.

Ligantes com potencial bioativo utilizados nesse trabalho: pirazóis

A escolha de ligantes para o *design* racional de complexos metálicos visando aplicações biológicas pode ser feita estrategicamente, utilizando-se compostos que tem capacidade e versatilidade de coordenação a centros metálicos, bem como interação com alvos biológicos. Assim, pode-se esperar efeitos sinérgicos e potencializados. Outras estratégias estão no uso de ligantes que possibilitam o transporte do metal ao sítio de atuação, ligantes que modulem a cinética de interação do metal, ou ainda quando o complexo atua como pró-droga para ligantes ativos, dentre outras²⁹⁻³¹.

Dentre os possíveis ligantes que atendem a estas características estão os azóis, que são heterociclos aromáticos contendo um átomo de nitrogênio e um outro heteroátomo dispostos na posição-1,2 de um anel de cinco membros. Os pirazóis (**Figura 8**) são compostos em que o heteroátomo é um outro átomo de nitrogênio. O nitrogênio 1 (N1) é do tipo pirrólico, porque seu par de elétrons não-ligado está em conjugação com o sistema aromático, enquanto o nitrogênio 2 (N2) é do tipo piridínico e o par de elétrons encontra-se no orbital sp^2 no plano do anel. Além de serem capazes de doar ou aceitar H^+ , o sítio básico do pirazol pode agir como um receptor de ligação de hidrogênio e o grupo N-H pode ser um doador de ligação de hidrogênio, o que os tornam importantes em química supramolecular³².

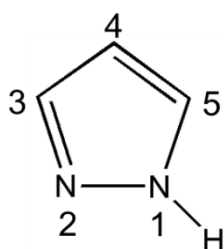


Figura 8 – Estrutura química do heterociclo pirazol.

Os pirazóis podem ser encontrados e isolados de fontes naturais como, por exemplo, extraídos de algumas plantas e de sementes de melancia³³. Para alguns derivados sintéticos de pirazol já foram demonstradas propriedades biológicas interessantes como atividade analgésica, anti-inflamatória, bactericida, antifúngica, antiviral, antituberculose, bem como atividade antitumoral^{34,35}, atraindo bastante

atenção por seu amplo espectro de atividade. Sendo assim, não é surpresa que esses compostos sejam amplamente utilizados no desenvolvimento de drogas, podendo citar a dipirona e o sildenafil como exemplos mais populares utilizados como medicamentos^{35,36}, entre outros (**Figura 9**).

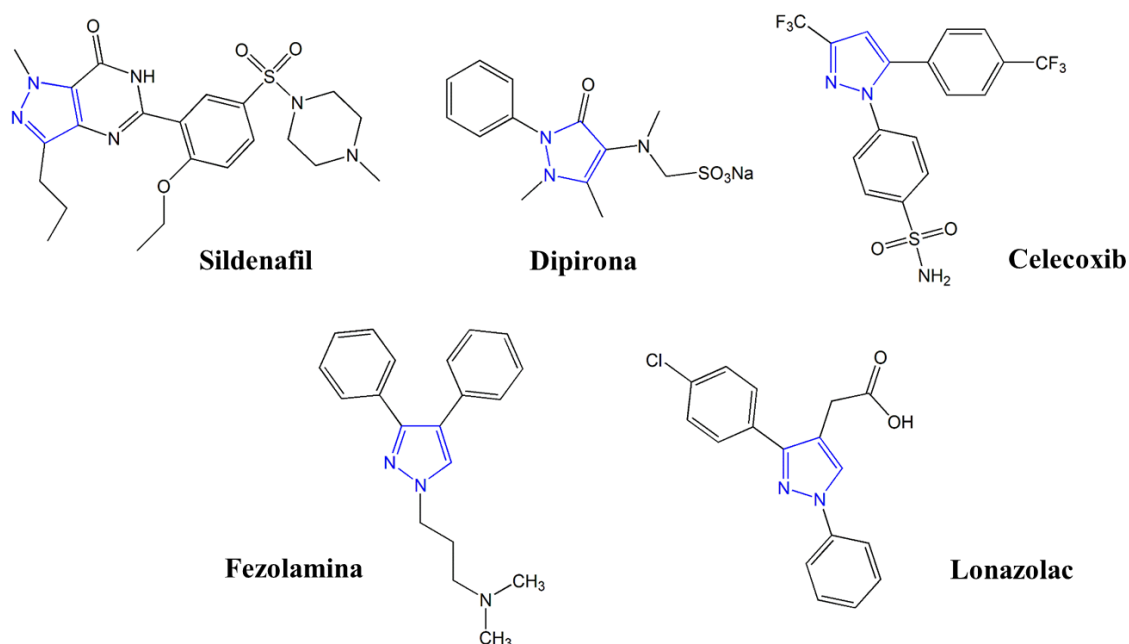


Figura 9 – Estrutura química de alguns derivados de pirazol usados como medicamentos.

Do ponto de vista da química de coordenação, os pirazóis são extremamente versáteis, a depender do tipo de metal utilizado, do pH do meio, entre outros fatores^{32,35} e, assim, constituem uma atraente classe de ligantes (**Figura 10**).

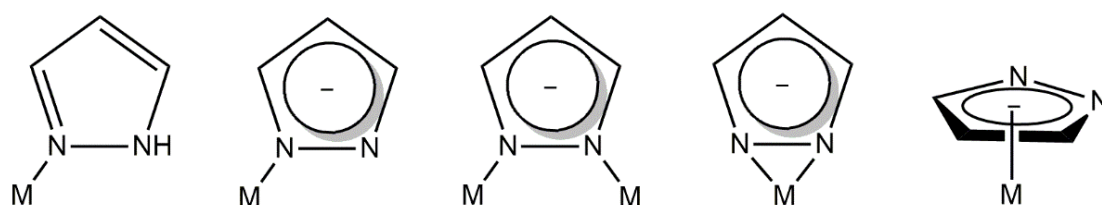


Figura 10 – Modos de coordenação possíveis para complexos de ligantes pirazol, em que M representa um íon metálico.

Complexos metálicos contendo ligantes pirazóis (Pz) são descritos na literatura em uma variedade enorme de contextos, devido às diferentes características estruturais, como tautomerismo e o diferente comportamento dos mesmos em meios básicos ou ácidos³². No que concerne à atividade biológica de complexos pirazólicos, essa versatilidade estrutural é estrategicamente explorada,

levando a complexos estruturalmente diversos, apesar de ainda encontrar-se em desenvolvimento, comparando-se com outros ligantes doadores de nitrogênio. Nesse contexto, complexos contendo ligantes derivados do pirazol e centros metálicos variados (Pt(II), Pd(II), Au(I), Au(III), Ag(I) etc) foram relatados como possuindo atividade bactericida, antiparasitária e antiviral³⁷. Na quimioterapia do câncer, esses compostos foram introduzidos por Sakai e colaboradores, que reportaram as atividades citotóxicas dos complexos *trans*-PtCl₂(pzH)₂ e *trans*-PtCl₂(3-CO₂H,5-CO₂KpzH)₂, (**Figura 11**), contra as linhagens tumorais DLD-1, HCT15 e HT29 (adenocarcinoma de colo-retal humano), e AGS (adenocarcinoma gástrico). O primeiro complexo mostrou-se ativo contra as quatro linhagens estudadas, sendo sua citotoxicidade comparável à da cisplatina, enquanto o segundo complexo mostrou-se inativo³⁸.

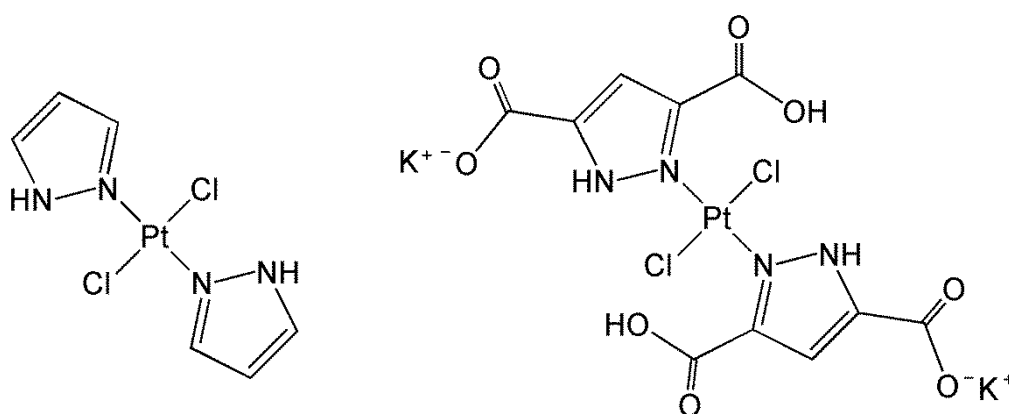


Figura 11 – Complexos de platina(II) sintetizados por Sakai e colaboradores³⁸.

Komeda e colaboradores verificaram que o complexo binuclear [(NH₃)₂Pt(μ-pz)(μ-OH)Pt(NH₃)₂](NO₃)₂ (**Figura 12**) é altamente eficaz e mais citotóxico que a cisplatina frente à algumas linhagens cancerosas, com IC₅₀ da ordem de 1 μM³⁹.

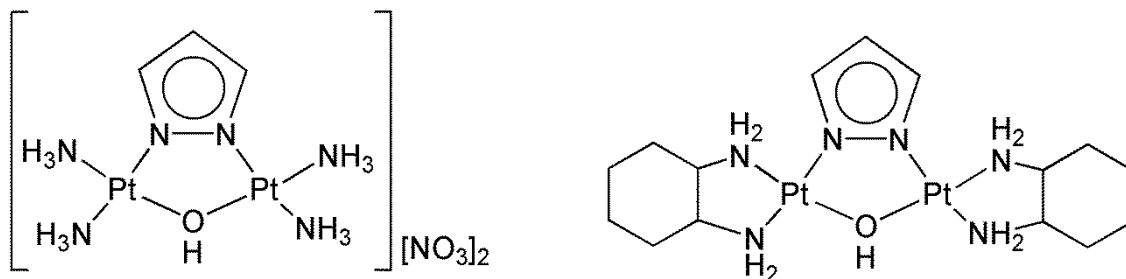


Figura 12 – Complexos binucleares de platina(II) sintetizados por Komeda e colaboradores³⁹.

Tendo em vista o desenvolvimento de compostos baseados em platina como antitumorais e o potencial biológico de derivados pirazóis, representado pelo amplo espectro de bioatividades relatado, é interessante, portanto, estudar os efeitos sinérgicos que podem ser observados em complexos Pt-pirazol. A variação estrutural através de grupos químicos associados aos ligantes pirazóis, nas posições 3 e 5, pode ser uma estratégia interessante para funcionalizá-lo sistematicamente e aumentar a atividade farmacológica dos mesmos. Alguns substituintes são capazes de modular o caráter hidrofílico/hidrofóbico, alterar propriedades eletrônicas nos anéis, além de interagir seletivamente com diversos alvos biológicos e, assim, potencializar as propriedades biológicas inerentes a esses compostos^{36,40}.

Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi sintetizar complexos de platina(II) usando ligantes da classe dos pirazóis. Investigar suas propriedades antitumorais e estudar seus prováveis mecanismos de ação através de ensaios com biomoléculas como DNA, albumina e glutathione.

Objetivos específicos

- Sintetizar novos complexos de platina(II) com ligantes difenil-pirazóis;
- Caracterizar os complexos obtidos através de técnicas físico-químicas como análise elementar, espectrometria de massas, condutimetria, análise termogravimétrica, espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e difração de raios X por monocristal;
- Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* dos ligantes e complexos obtidos frente às linhagens de células tumorais e uma linhagem não-tumoral, bem como a interferência de biomoléculas como glutathione e BSA na citotoxicidade;
- Investigar o mecanismo de ação dos compostos, explorando possíveis interações reversíveis e irreversíveis com alvos biológicos como DNA e BSA.

2. Técnicas experimentais

Os complexos foram caracterizados quanto a suas temperaturas de fusão ou decomposição, condutividade molar, análise termogravimétrica, análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio, espectroscopia vibracional na região do infravermelho, RMN de ^1H , ^{13}C e ^{195}Pt e espectrometria de massas. Cristais dos complexos **C1**, **C2** e **C3** foram obtidos de solução de DMF e tiveram suas estruturas determinadas por difração de raios X por monocristal.

2.1. Temperatura de Fusão

As medidas de faixa de fusão/decomposição dos compostos foram realizadas em um aparelho digital MicroQuímica modelo MQAPF-302 no Departamento de Química da UFMG.

2.2. Análise Elementar

Os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio nos compostos foram determinadas no aparelho PE 2400 CHN Elemental Analyzer no Departamento de Química da UFMG, sendo utilizado gás oxigênio para a combustão e gás nitrogênio para o arraste dos gases gerados na combustão das amostras.

2.3. Análise Térmica

As análises termogravimétricas foram realizadas no Departamento de Química da UFMG utilizando uma termobalança Shimadzu DTG60 e fluxo de nitrogênio, em uma razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ em cadinho de alumina.

2.4. Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho dos ligantes e complexos sintetizados foram obtidos em um equipamento Perkin Elmer modelo Frontier no modo ATR na região de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ (resolução espectral de 4 cm^{-1}).

2.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C e ^{195}Pt

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C e ^{195}Pt foram realizados nos espectrômetros Bruker AVANCE DPX200 para experimentos com frequência de 200 MHz e Bruker DRX400 com frequência de 400 MHz no Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química da UFMG, utilizando-se $\text{DMSO-}d_6$ ou $\text{DMF-}d_7$ como

solventes e sinais residuais dos solventes ou TMS como referência interna. Para os espectros de $^{195}\text{Pt}\{^1\text{H}\}$ foi utilizado o $[\text{K}_2\text{PtCl}_6]$ em D_2O como referência. A caracterização se deu através de experimentos de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, DEPT-135 e mapas de contorno COSY.

2.6. Difração de raios X por monocristal

Os monocristais foram difratados no Laboratório de Cristalografia (LabCri) do Departamento de Física da UFMG, pela Prof. Dr^a. Renata Diniz, e no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), pelo doutor Cris Hebert de Jesus Franco. Na UFMG utilizou-se um difratômetro Oxford-Rigaku-Diffraction GEMINI-Ultra, e na UFJF o difratômetro Supernova Agilent-Rigaku. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente, utilizando radiação $\text{K}\alpha$ do Molibdênio. Os dados foram refinados pelo programa CrysAllisPro⁴¹. As estruturas foram resolvidas e refinadas utilizando o programa SHELX-2014⁴², enquanto as figuras foram obtidas nos programas Ortep-3⁴³ e Mercury⁴⁴.

2.7. Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

As medidas de absorção eletrônica molecular na região do UV-Vis dos compostos foram realizadas no equipamento modelo UV-2600 da Shimadzu com cubetas de quartzo e caminho óptico de 1 cm no Departamento de Química da UFMG. As leituras foram realizadas em solução de DMF na região de 200 a 700 nm.

2.8. Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de emissão dos compostos foram obtidos em um espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse no Departamento de Química da UFMG. As análises foram realizadas em cubetas de quartzo com 1,0 centímetro de caminho óptico, $\lambda_{\text{excitação}} = 269 \text{ nm}$ e fendas de excitação e emissão de 10 nm.

2.9. Condutividade

A condutividade molar foi avaliada utilizando-se um condutivímetro HighMed modelo HMCDB-150 e concentrações de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ dos compostos em DMF. O aparelho foi calibrado com uma solução aquosa de KCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e as medidas foram efetuadas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.10. Espectrometria de Massas

Os espectros de massa, com ionização por spray de elétrons operado em modo negativo (ESI-MS), foram obtidos em equipamento Thermo Scientific, modelo LCQ-FLEET, com analisador de massas de baixa resolução do tipo *Ion Trap*, via injeção direta. As amostras foram analisadas em soluções de MeOH na faixa de 100 – 2000 m/z.

2.11. Ensaios de citotoxicidade

A citotoxicidade *in vitro* dos compostos foi determinada a partir de testes de viabilidade celular, no Laboratório de Substâncias Antitumorais - LSAT, no Instituto de Ciências Biológicas (ICB - UFMG). Utilizaram-se as linhagens de células tumorais de carcinoma mamário murino-4T1, melanoma metastático murino-B16F10 e uma linhagem não tumoral de rim de hamster BHK-21.

As células foram cultivadas a 37 °C em garrafas de 25 cm² em meio de cultura RPMI 1640 suplementadas com 10% (v/v) de soro fetal bovino em pH 7,4, atmosfera úmida a 5% de CO₂. As células foram distribuídas em placas de 96 poços com densidades que variaram de 0,5 a 2,0 x 10³ célula/poço, por um período de incubação de 24 horas para adesão. Soluções-estoque dos compostos foram preparadas (10⁻² M em DMF) e diluídas em meio de cultura em diferentes concentrações, onde a porcentagem de DMF máxima foi de 1%. Em seguida, adicionaram-se essas diferentes soluções às placas para concentrações finais de 100, 50, 10, 0,5 e 0,1 µM. Depois de 72 horas de exposição aos compostos, as células foram incubadas com MTT (Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Il)2,5-Difeniltetrazólio) a 50 µg/10 µL/poço por 4 horas. Finalmente, o meio de cultura foi removido e o produto de metabolização do MTT pelas células viáveis (Formazan, **Figura 13**) foi solubilizado em DMSO (100µL/poço) e medido por leitura espectrofotométrica (absorbância em 570 nm). Os valores de IC₅₀ (concentração inibitória de 50% da viabilidade celular) foram calculados considerando o grupo controle negativo (100%) e tratados nos programas Excel e GraphPad Prism 5. A cisplatina foi utilizada como droga de referência. Um experimento de viabilidade celular com MTT em B16F10 também foi realizado utilizando-se as mesmas condições descritas acima, a diferir apenas pelo meio de cultura suplementado com BSA (25 mg mL⁻¹) ou GSH (1mM) em concentrações extracelulares^{45,46}, com o

objetivo de verificar a interferência dessas biomoléculas na citotoxicidade dos compostos.

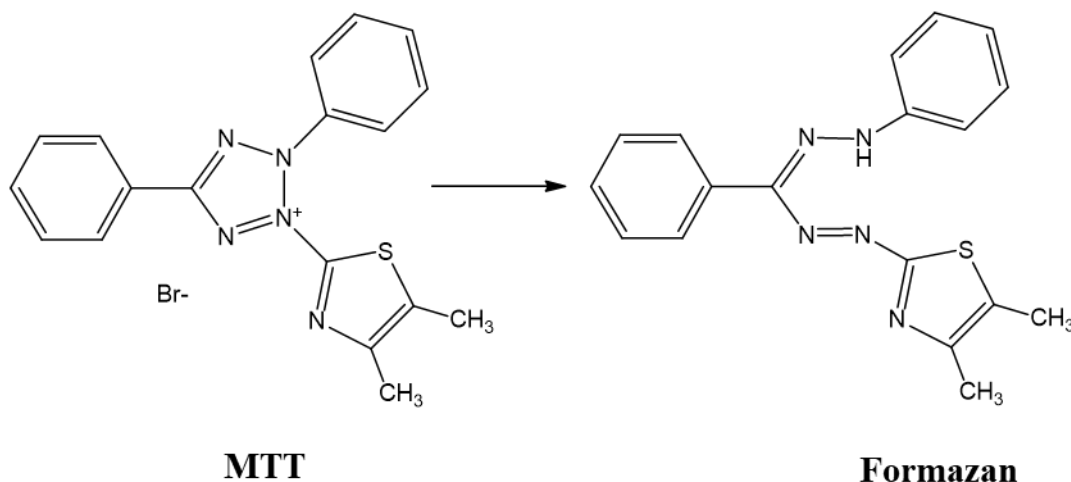


Figura 13 – Reação de redução do MTT que ocorre na mitocôndria de células viáveis.

2.12. Estudos da interação com biomoléculas

2.12.1. Estudos de interação com BSA por titulações espectrofotométricas

Preparou-se uma solução de BSA (albumina do soro bovino, Sigma Aldrich) em tampão Tris-HCl pH 7,4 (4,5 mmol L⁻¹ Tris-HCl; 0,5 mmol L⁻¹ Tris-base; 50 mmol L⁻¹ NaCl). A concentração da solução foi determinada por espectroscopia na região do UV-vis, sabendo-se que a absorvidade molar (ϵ) da BSA em 280 nm é 43.824 mol⁻¹ cm⁻¹ L e utilizando-se a lei de Beer – Lambert ($A = \epsilon bc$), onde A é absorvância, b o caminho óptico (cm) e c a concentração (mol L⁻¹). As titulações foram realizadas da mesma forma como foram realizados os estudos com ctDNA. Na cubeta 1, foram adicionados 2.040 μ L do tampão pH 7,4, correspondendo ao branco, enquanto na cubeta 2, foram adicionados 2.000 μ L do tampão pH 7,4, e 40 μ L de solução-estoque de BSA ($1,13 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). Em seguida, foram realizadas sucessivas adições de 10 μ L (10^{-4} mol L⁻¹) dos compostos em ambas as cubetas, em que a cada adição as soluções foram homogeneizadas por cerca de 1 minuto seguido da obtenção dos espectros da cubeta 1 (branco) e cubeta 2 (amostra). Os espectros obtidos foram ajustados ao modelo matemático linear de Benesi-Hildebrand⁴⁷ (**Equação 1**), o que possibilitou o cálculo das constantes de interação (K_b) entre os compostos e a BSA.

$$\frac{A}{A - A_0} = \frac{\epsilon_G}{\epsilon_{H-G} - \epsilon_G} + \frac{\epsilon_G}{\epsilon_{H-G} - \epsilon_G} \times \frac{1}{K_b[\text{composto titulante}]} \quad (\text{Equação 1}),$$

em que A_0 é a absorvância no comprimento de onda estudado na ausência do composto titulante, A é a absorvância após sucessivas adições do titulante durante o experimento, ϵ_G é o coeficiente de absorvidade molar no comprimento de onda estudado, ϵ_{H-G} é o coeficiente de absorvidade molar para o aduto formado biomolécula-composto e K_b é a constante de ligação referente ao aduto biomolécula-composto. Do gráfico $\frac{A}{A-A_0}$ versus $\frac{1}{K_b[\text{composto titulante}]}$ e da razão entre os coeficientes angular e linear da reta obtém-se a constante de ligação K_b .

2.12.2. Estudos de interação com DNA por titulações espectrofotométricas

Preparou-se uma solução de ctDNA (DNA de timo de bezerro, Sigma Aldrich) em tampão Tris-HCl pH 7,4 (4,5 mmol L⁻¹ Tris-HCl; 0,5 mmol L⁻¹ Tris-base; 50 mmol L⁻¹ NaCl). A concentração da solução foi determinada por espectroscopia na região do UV-vis, sabendo-se que a absorvidade molar (ϵ) do ctDNA em 260 nm é 6.600 mol⁻¹ cm⁻¹ L e utilizando-se a lei de Beer – Lambert ($A = \epsilon bc$). As titulações foram realizadas empregando-se duas cubetas: na cubeta 1 foram adicionados 1.900 μ L do tampão pH 7,4 e 110 μ L de DMF, correspondendo ao branco, enquanto na cubeta 2 foram adicionados 1.900 μ L do tampão pH 7,4, 100 μ L de DMF e 10 μ L da solução do composto (10⁻³ mol L⁻¹) em DMF. Em seguida, foram realizadas sucessivas adições de 40 μ L de ctDNA em ambas cubetas, em que a cada adição as soluções foram homogeneizadas por cerca de 1 minuto seguido da obtenção dos espectros da cubeta 1 (branco) e cubeta 2 (amostra).

Os espectros obtidos também foram ajustados à equação de Benesi-Hildebrand (**Equação 1**), o que possibilitou o cálculo das constantes de interação (K_b) entre os compostos e o ctDNA.

2.12.3. Estudos de intercalação com ctDNA por medidas de fluorescência

A interação entre o DNA e compostos por um mecanismo intercalativo, ou seja, através de interações do tipo π - π *stacking* foi investigada através do estudo de ligação competitiva entre brometo de etídio (BE) e os compostos pelos sítios do DNA. Para tanto, foram utilizadas soluções de [ctDNA] = 10 μ mol L⁻¹ e [BE] = 10 μ mol L⁻¹, ambas em tampão Tris-HCl, pH = 7,2. Durante o experimento, a mistura dessas soluções foi titulada com adições sucessivas dos ligantes e complexos deste trabalho, na faixa de concentração de 0 – 100 μ M. Os espectros foram registrados na

faixa de 550 – 800 nm, com $\lambda_{\text{excitação}} = 546 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 610 \text{ nm}$ a fim de se observar alguma supressão da fluorescência característica de BE-DNA que sugere um mecanismo de interação por intercalação.

2.12.4. Eletroforese de DNA em gel de agarose

A habilidade dos complexos de se ligar ao DNA plasmidial foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. Foi utilizado o plasmídeo pSpZEO. Assim, 10 μL do plasmídeo (100 ng) em tampão Tris-HCl (pH = 7,2) foram incubados com 20 μL de diferentes concentrações dos complexos (500 μM , 250 μM , 100 μM e 50 μM) em DMF (5% v/v) por 24 horas a 37 °C. A proporção complexo:DNA resultante é de (100, 50, 20 e 10 mmol Pt/g DNA). Após incubação, as reações foram interrompidas pela adição de 5 μL de tampão de carregamento (5 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 0,01% azul de bromofenol, 50% glicerol) às reações. As misturas foram submetidas à eletroforese em gel de 0,7% agarose (m/v), em tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato, 0,5 mol L⁻¹ EDTA pH 8,0) a 110 V por 45 minutos. O gel foi visualizado e fotografado sob iluminação UV em câmara reveladora após incubação em solução de brometo de etídio (2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 30 minutos.

2.13. Ligantes derivados do difenil-pirazol

Os ligantes utilizados neste trabalho foram obtidos pela doutoranda Karine Braga Enes orientada pela professora Mara Rubia Costa Couri em colaboração com o PPG-Química da Universidade Federal de Juiz de Fora. As estruturas dos mesmos, aqui chamados de **L1**, **L2** e **L3**, encontram-se na **Figura 14**.

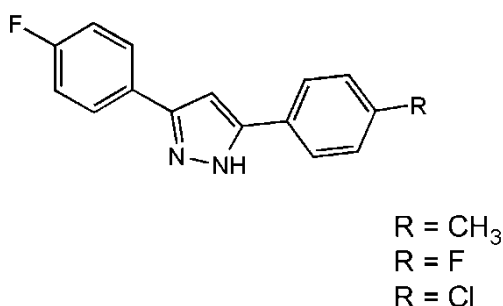


Figura 14 – Estrutura geral dos compostos 3,5-difenil pirazol utilizados como ligantes neste trabalho.

2.14. Síntese dos complexos de platina(II) com derivados difenil-pirazólicos

Os complexos **C1**, **C2** e **C3** foram preparados pela adição de uma solução aquosa (1 mL) de K_2PtCl_4 (0,2 mmol) a uma solução metanólica (5 mL) do respectivo ligante (0,4 mmol). O precursor metálico foi adicionado lentamente e a reação foi protegida da luz e mantida sob agitação constante por 5 dias à temperatura ambiente. Os sólidos obtidos de coloração amarelada a bege foram filtrados, lavados com H_2O e metanol, e secos a vácuo. O esquema de síntese está representado na **Figura 15**.

Cristais dos complexos **C1**, **C2** e **C3** foram obtidos de uma solução de DMF concentrada e as estruturas foram determinadas por difração de raios-X por monocristal.

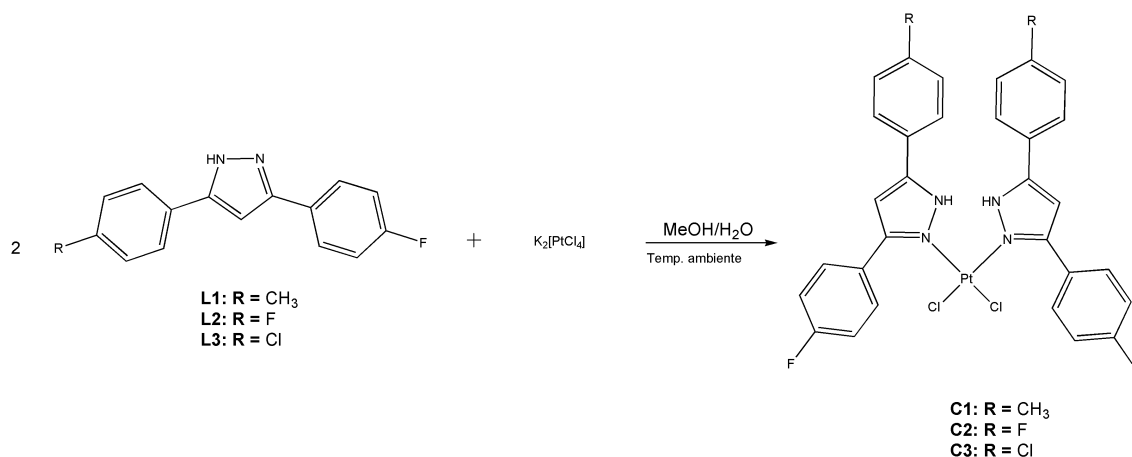


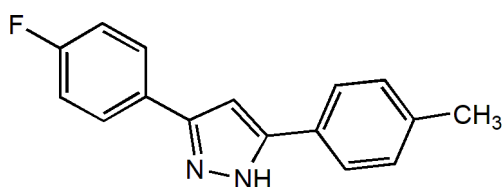
Figura 15 – Esquema de síntese dos complexos de platina(II) com ligantes difenil-pirazólicos.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização dos compostos

Os complexos formados apresentam coloração amarela e se mostraram estáveis e em solução de DMF quando estocados. As microanálises corroboram a formação de complexos do tipo $[Pt^{II}(Pz)_2Cl_2]$, em que dois ligantes cloreto na estrutura do sal metálico são substituídos pelos respectivos ligantes em isomeria *cis*. A fim de compará-los, os ligantes foram caracterizados nas mesmas condições que os respectivos complexos, sempre que possível. Os dados dos compostos utilizados (**L1**, **L2** e **L3**) e sintetizados (**C1**, **C2** e **C3**) neste trabalho estão listados a seguir.

L1



Nome IUPAC: 3-(4-fluorofenil)-5-*p*-toluil-1*H*-pirazol

Fórmula molecular: $C_{16}H_{13}FN_2$

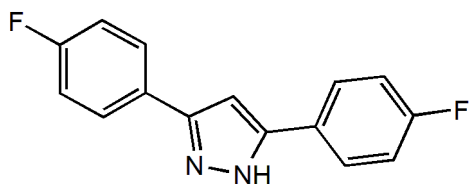
Massa molar: $252,29 \text{ g mol}^{-1}$

Característica física: sólido branco

IV (cm^{-1}): 3220, 3086, 1610, 1530, 1446, 1222, 1048, 986, 786

RMN ^1H (DMSO- d_6) δ : 2,33 (s, 3H, **CH**₃), 7,03 (s, 1H, **CH**), 7,27 (m, 4H, **Ph**), 7,71 (m, 2H, **Ph**), 7,87 (m, 2H, **Ph**), 13,20 (s, **NH**)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 20,80 (**CH**₃), 99,24 (**CH**), 115,6 (d, $J = 26 \text{ Hz}$), 125,04, 127,08 (d, $J = 8 \text{ Hz}$), 129,39, 161,72 (d, $J_{\text{C,F}} = 243 \text{ Hz}$)

L2

Nome IUPAC: 3,5-bis(4-fluorofenil)-1*H*-pirazol

Fórmula molecular: C₁₅H₁₀F₂N₂

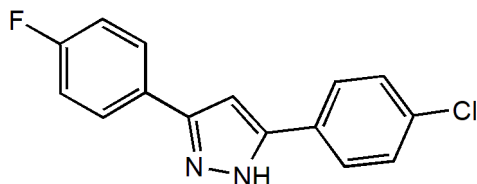
Massa molar: 256,25 g mol⁻¹

Característica física: sólido branco

IV (cm⁻¹): 3238, 3182, 1613, 1502, 1450, 1234, 1056, 970, 784

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 7,16 (s, 1H, **CH**), 7,27-7,37 (m, 4H, **Ph**), 7,85-7,88 (m, 4H, **Ph**), 13,37 (s, **NH**)

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 99,64 (**CH**), 115,67, 115,84, 127,11, 127,18, 161,8 (d, J_{C,F} = 243 Hz)

L3

Nome IUPAC: 5-(4-clorofenil)-3-(4-fluorofenil)-1*H*-pirazol

Fórmula molecular: C₁₅H₁₀ClFN₂

Massa molar: 272,70 g mol⁻¹

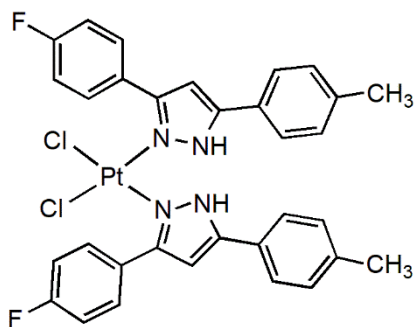
Característica física: sólido branco

IV (cm⁻¹): 3238, 3086, 1614, 1502, 1444, 1226, 1052, 970, 780, 616

RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ : 7,20 (s, 1H, **CH**), 7,29 (d, 2H, **Ph**), 7,52 (d, 2H, **Ph**), 7,86 (s, 4H, **Ph**), 13,43 (s, **NH**)

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 99,92 (CH), 115,56 (d, J = 21 Hz), 116,05 (d, J = 21 Hz), 126,84, 127,20 (d, J = 17 Hz), 128,73, 129,12, 131,98, 132,49, 142,64 (d, J = 40 Hz), 150,44 (d, J = 40 Hz), 161,93 (d, $J_{\text{C,F}}$ = 245 Hz)

C1



Fórmula molecular: $\text{C}_{32}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{F}_2\text{N}_4\text{Pt}$

Massa molar: $770,56 \text{ g mol}^{-1}$

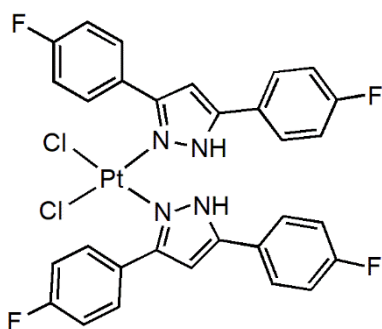
Característica física: sólido bege

IV (cm^{-1}): 3141, 3094, 1608, 1502, 1460, 1220, 1042, 958, 794

RMN ^1H (DMF- d_7) δ : 2,08, 2,40, 6,69, 6,75, 7,13, 7,36, 7,64, 7,81, 7,95, 8,14, 13,77, 13,89

RMN ^{13}C (DMF- d_7) δ : 20,77, 102,94, 103,05, 115,89, 126,63, 126,76, 127,71, 128,98, 129,07, 129,35, 129,59, 130,03, 138,45, 139,56, 145,08, 146,28, 151,93, 153,31, 164,57.

C2



Fórmula molecular: $C_{30}H_{20}Cl_2F_4N_4Pt$

Massa molar: $778,48 \text{ g mol}^{-1}$

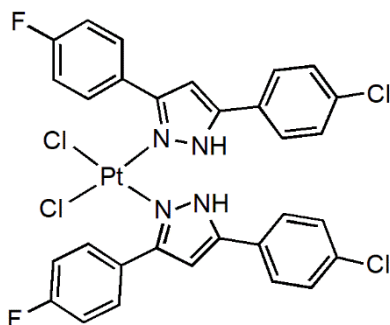
Característica física: sólido bege

IV (cm^{-1}): 3134, 3110, 1612, 1500, 1460, 1240, 1014, 958, 796

RMN ^1H (DMF- d_7) δ : 6,78, 7,11, 7,33, 7,84, 8,10, 14,02

RMN ^{13}C (DMF- d_7) δ : 103,18, 115,46, 115,84, 124,08, 127,15, 128,83, 129,85, 145,12, 152,11, 162,63, 163,12.

C3



Fórmula molecular: $C_{30}H_{20}Cl_4F_2N_4Pt$

Massa molar: $811,39 \text{ g mol}^{-1}$

Característica física: sólido bege

IV (cm^{-1}): 3136, 3086, 1610, 1500, 1458, 1226, 1014, 956, 796, 620

RMN ^1H (DMF- d_7) δ : 6,85, 6,88, 7,13, 7,34, 7,56, 7,87, 7,97, 8,08, 14,01, 14,12

RMN ^{13}C (DMF- d_7) δ : 100,14, 103,60, 115,68, 115,90, 116,12, 127,21, 128,46, 128,94, 129,79, 130,01, 134,40, 145,31, 152,18, 162,85, 164,59.

3.1.1. Análise elementar de CHN, Condutividade Molar, TG/DTG e Massas

Os dados de análise elementar, condutividade molar e temperatura de fusão dos complexos sintetizados estão apresentados na **Tabela 1**. Os valores calculados para porcentagem de C, H e N na análise elementar levam em consideração a proposta de estrutura de complexos neutros de fórmula $[Pt^{II}(Pz)_2Cl_2]$, estando os valores experimentais em acordo com o proposto (para **C3** foi considerada a

presença de MeOH). As condutividades molares dos complexos foram obtidas a partir de uma solução de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em DMF a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Os valores de condutividade determinados estão abaixo do intervalo para eletrólitos 1:1 ($37 - 122 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) neste solvente⁴⁸, o que está em conformidade com as estruturas neutras propostas para os compostos.

As curvas TG estão disponíveis no Apêndice (**Figuras 43 - 45**). Pela curva TG/DTA de **C1** percebe-se que o complexo é termicamente estável até $200 \text{ }^\circ\text{C}$, iniciando-se, então, sua decomposição térmica. As perdas dos ligantes pirazóis e cloretos ocorrem entre $200 - 520 \text{ }^\circ\text{C}$, quando são observadas três perdas sucessivas e sobrepostas de massa que equivalem a $74,87\%$ (calculado = $74,68\%$). Acima de $520 \text{ }^\circ\text{C}$ nota-se um resíduo termicamente estável até as condições de temperatura aplicadas. Esse resíduo final de $25,13\%$ de massa está de acordo com a porcentagem de platina metálica esperada para **C1** ($25,31\%$). A curva TG/DTA para **C2** é similar àquela obtida para **C1**, sendo três perdas de massas sucessivas, com porcentagens de perda e faixas de temperatura semelhantes. Analogamente, não foi possível atribuir as perdas parciais aos ligantes, no entanto, a porcentagem de $73,17\%$ observada está de acordo com a perda de dois ligantes pirazol e dois ligantes cloretos (calculada = $74,94\%$), entre $200 - 510 \text{ }^\circ\text{C}$. O resíduo final ($26,83\%$) é termicamente estável até a temperatura de $750 \text{ }^\circ\text{C}$ e corresponde ao esperado para platina metálica (calculado = $25,06\%$). O complexo **C3** apresenta perfis de curva TG/DTA diferentes dos outros compostos, sendo possível observar duas perdas sucessivas que iniciam em $150 \text{ }^\circ\text{C}$, mas não estabilizam até $650 \text{ }^\circ\text{C}$, quando o experimento é finalizado. Até este ponto a perda corresponde a $72,07\%$ e a perda de massa dos ligantes foi estimada em $75,96\%$, o que exige um experimento com maiores temperaturas.

Tabela 1 – Massa molar e análise elementar de CHN dos complexos de platina(II).

	Fórmula Molecular	MM (g mol⁻¹)	Temp. de Fusão (°C)	Condutividade (S cm² mol⁻¹)	%C	%H	%N
C1	$\text{C}_{32}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{F}_2\text{N}_4\text{Pt}$	770,56	> 300	9,10	49,88 (48,98)	3,40 (3,24)	7,27 (7,09)
C2	$\text{C}_{30}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{F}_4\text{N}_4\text{Pt}$	778,48	210	7,97	46,28 (45,29)	2,59 (2,47)	7,20 (6,98)

C3	$C_{30}H_{20}Cl_4F_2N_4Pt$	811,39	230	7,34	44,14* (46,40)	2,87* (3,19)	6,64* (6,67)
-----------	----------------------------	--------	-----	------	-------------------	-----------------	-----------------

Valores experimentais entre parênteses.

*Considerando 1 molécula de metanol.

Os complexos **C1**, **C2** e **C3** foram ainda caracterizados por espectrometria de massas e os espectros estão disponíveis no Apêndice (**Figuras 40 - 42**), de forma que todos apresentam um padrão similar. O pico do íon molecular para os complexos foram observados em m/z 768,74, 776,72 e 808,64 para **C1**, **C2** e **C3**, respectivamente, correspondente aos fragmentos $[M-H]^+$, isto é, complexo menos um íon hidrogênio.

3.1.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Os ligantes derivados do pirazol apresentam várias possibilidades de coordenação ao íon metálico. A análise dos resultados obtidos por espectroscopia vibracional na região do infravermelho dos compostos permitiu obter informações relevantes acerca da coordenação dos ligantes à platina e a estrutura dos complexos. As **Figuras 16-18** apresentam os espectros de absorção dos ligantes, em comparação com seus respectivos complexos na região de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} . Na **Tabela 2** estão apresentadas as atribuições de algumas frequências observadas, em cm^{-1} , referentes às bandas características envolvendo os ligantes livres e os complexos metálicos. As atribuições das bandas observadas nos espectros foram baseadas em dados anteriormente descritos na literatura^{49,50}. Em todos os espectros são observadas bandas acima de 3500 cm^{-1} , que, de acordo com a literatura, representam estiramentos de OH livre, indicando a presença de metanol proveniente de síntese. Os estiramentos atribuídos a ν_{NH} do anel pirazol em $3238\text{--}3220\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos ligantes livres foram observados em $3141\text{--}3134\text{ cm}^{-1}$ para os complexos, indicando a presença de ligantes neutros, ou seja, a coordenação via par de elétrons não-ligantes do nitrogênio piridínico nos complexos sintetizados. A presença dessa banda também indica o modo de coordenação monodentado, uma vez que para os outros modos de coordenação possíveis no anel pirazol seria esperada a ausência da ligação NH. Os estiramentos de grupos aromáticos CH ocorrem próximas a 3000 cm^{-1} para todas as espécies. Bandas referentes às vibrações ν_{NN} aparecem na região de 1050 cm^{-1} nos ligantes livres e são deslocadas para menores energias nos espectros dos complexos. Esse discreto deslocamento da

banda para menores energias é sugestivo da coordenação, já que a complexação à platina deve causar enfraquecimento dessa ligação. De um modo geral, pouca variação é observada ao se comparar os espectros dos ligantes livres e seus respectivos complexos, o que era esperado para a coordenação ao nitrogênio piridínico do anel pirazol, levando a pouca variação estrutural.

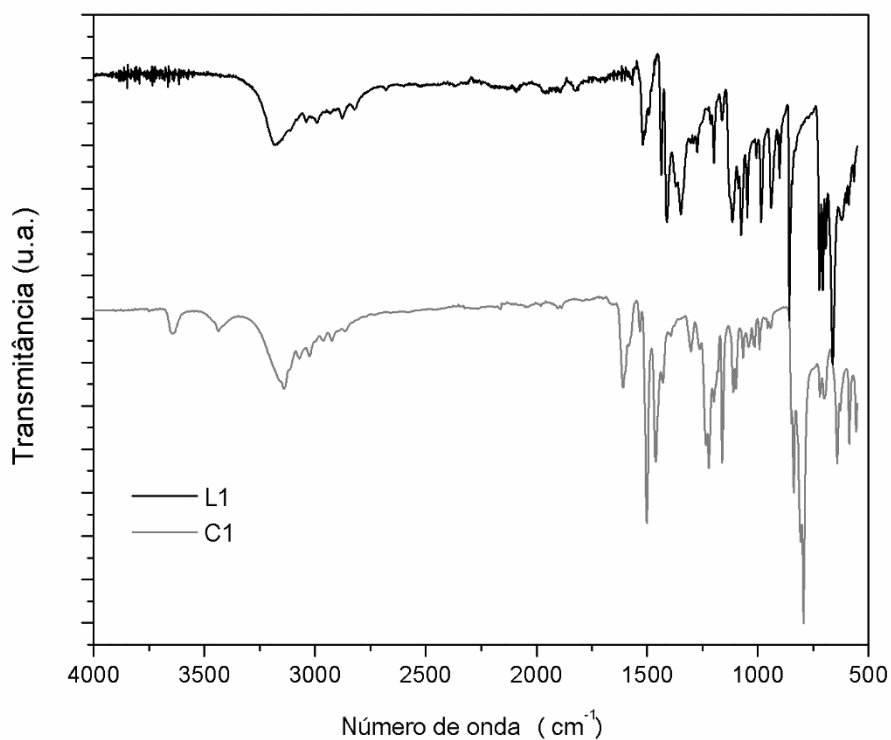


Figura 16 – Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante **L1** e complexo **C1**.

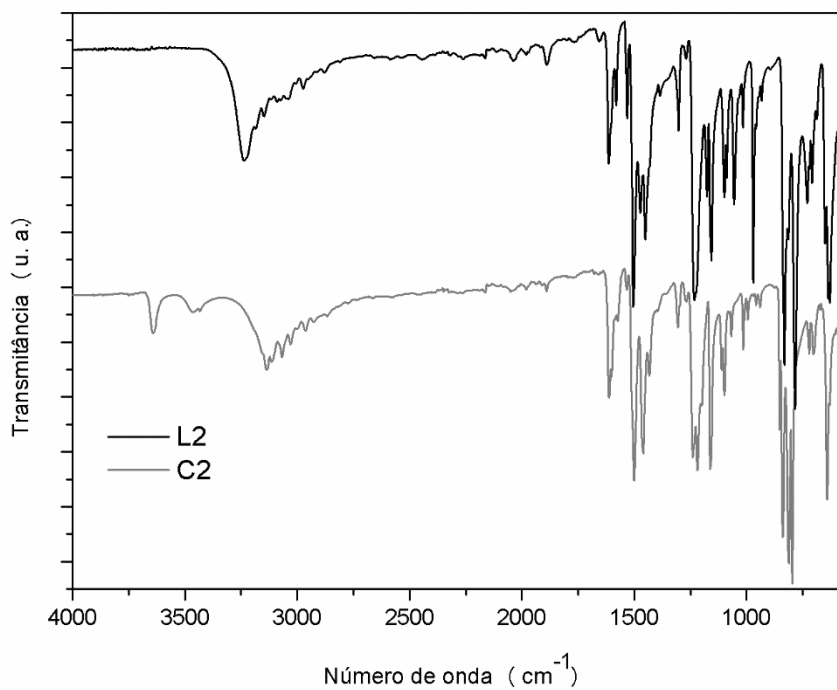


Figura 17 – Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante **L2** e complexo **C2**.

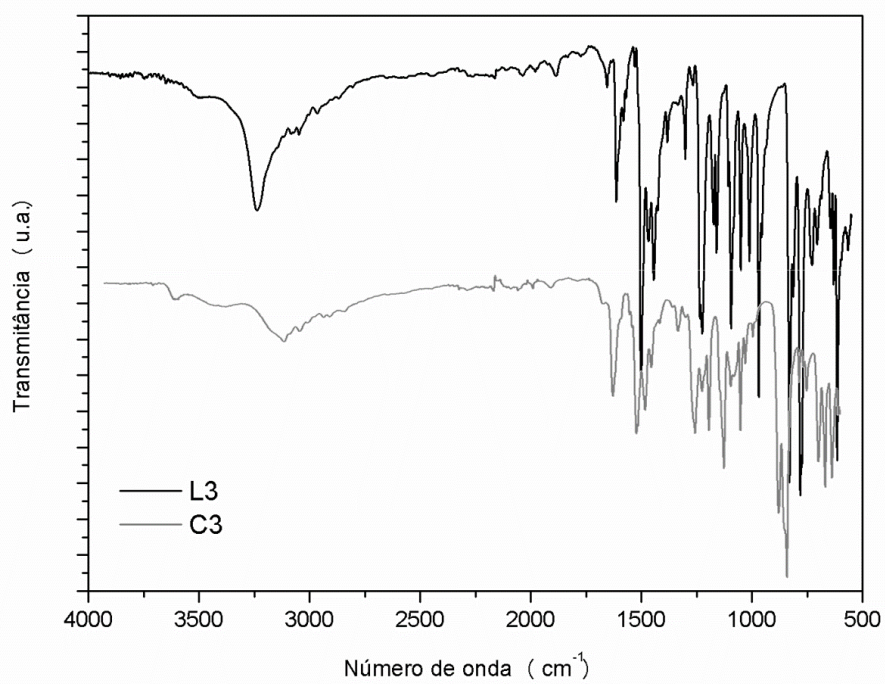


Figura 18 – Espectro de absorção na região do infravermelho do ligante **L3** e complexo **C3**.

Tabela 2 – Atribuição das principais bandas observadas nos espectros de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) dos ligantes e respectivos complexos.

L1	C1	L2	C2	L3	C3	Atribuição
3220	3141	3238	3134	3238	3136	νNH
3086-2842	3094-2842	3182-2886	3110-2940	3086-2842	3086-2842	νCH_{Ar}
1610	1608	1613	1612	1614	1610	νCN
1530	1502	1502	1500	1502	1500	νCC_{Ar}
1446	1460	1450	1460	1444	1458	$\delta'\text{NH}$
1222	1220	1234	1240	1226	1226	νCF
1048	1042	1056	1014	1052	1014	νNN
986	958	970	958	970	956	νCN
786	794	784	796	780	796	$\delta'\text{CH}_{\text{Ar}}$
-	-	-	-	616	620	νCCl

Nota: ν = estiramento; δ' = deformação angular; Ar = aromático.

3.1.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN dos ligantes derivados de pirazóis foram obtidos em $\text{DMSO-}d_6$, enquanto os seus complexos de platina(II) mostraram-se solúveis apenas em DMF e tiveram seus espectros registrados em $\text{DMF-}d_7$. Os sinais de ^1H foram atribuídos baseando-se nos deslocamentos químicos, multiplicidades, acoplamento homo e heteronuclear com ^{19}F e com o auxílio de experimentos de correlações homonucleares COSY. Os tipos de carbono (C, CH e/ou CH_3) foram determinados por experimento de DEPT-135.

Começando pelos compostos mais simétricos (com substituintes F nos dois grupos fenil ligados ao pirazol), tem-se o espectro de ^1H do ligante **L2** que apresentou sinais que estão em acordo com os valores descritos na literatura (AEGURLA, 2017). Em 7,16 ppm tem-se o sinal simpleto do CH do anel pirazol. Em 7,85-7,88 ppm e 7,22-7,33 ppm, dois multipletos são observados e atribuídos aos átomos de hidrogênio aromático dos dois anéis fenil-substituídos, sendo os sinais em campo mais alto referentes aos hidrogênios em posição *meta* ao flúor e os sinais em campo baixo referentes aos hidrogênios *orto* (^3J) ao flúor (maior desblindagem). Em 13,37 ppm tem-se um sinal simpleto atribuído ao N-H. Observa-se que, em solução, o ligante pode existir em duas formas tautoméricas possíveis^{32,51},

decorrente do fenômeno de prototropismo tautomérico (**Figura 19**). Em um sistema simétrico, ou seja, quando os grupos R são iguais (como para o **L2**), os dois tautômeros são considerados equivalentes ou degenerados. Quando os substituintes nas posições 3- e 5- são diferentes em um sistema assimétrico, os dois tautômeros são não-equivalentes e seus sinais podem ser observados no RMN a baixas temperaturas⁵².



Figura 19 – Formas tautoméricas resultantes do prototropismo do núcleo pirazólico substituído nas posições 3- e 5-.

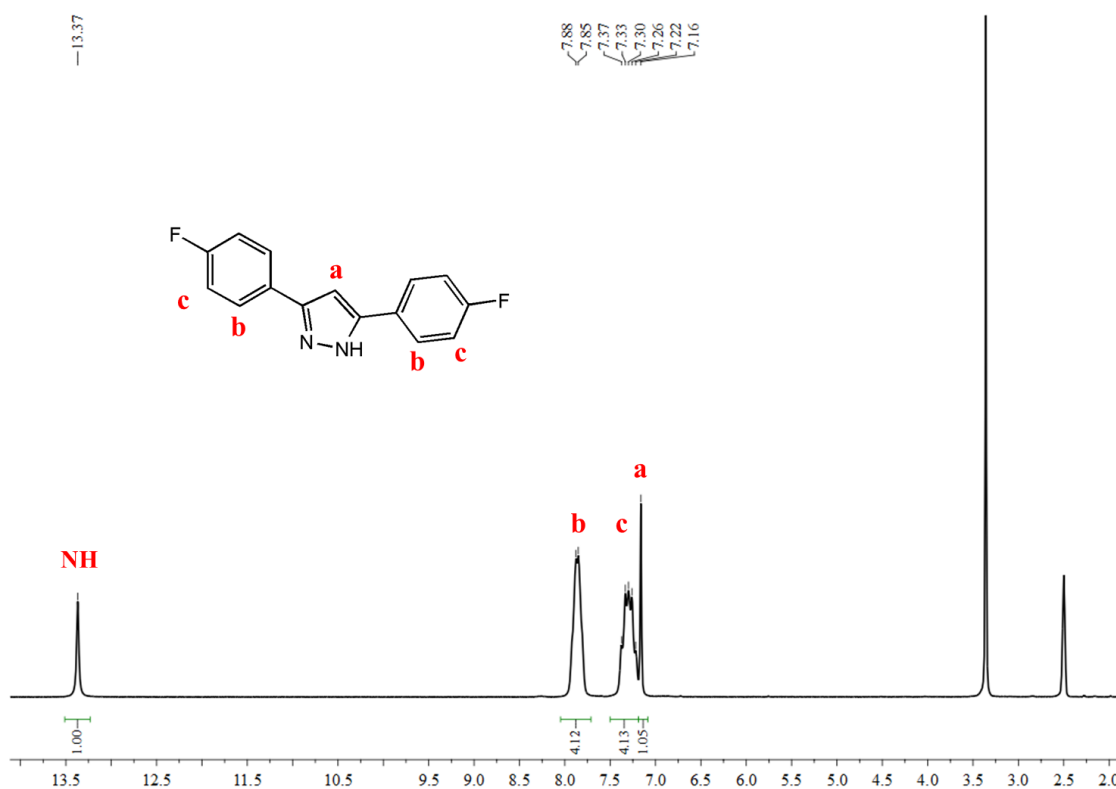


Figura 20 –Espectro de RMN de ^1H do ligante **L2** livre em solução de DMSO-d_6 (δ em ppm) em 400 MHz.

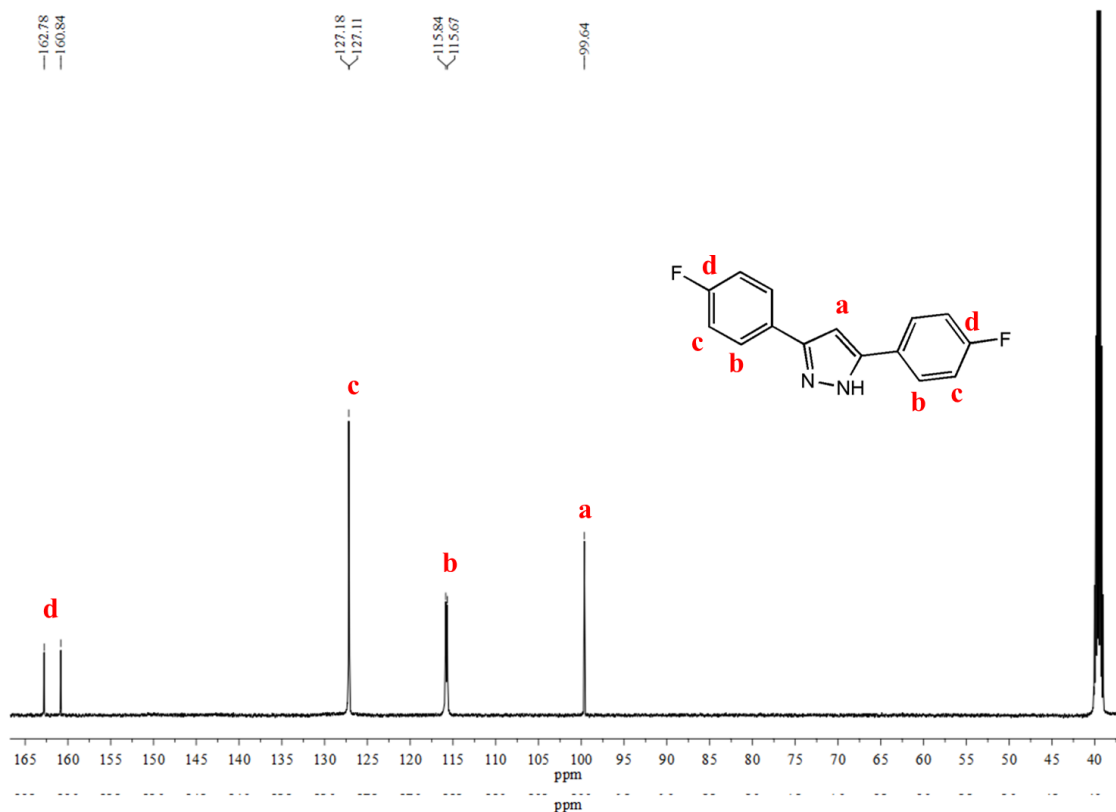


Figura 21 – Espectro de RMN de ^{13}C do ligante **L2** livre em solução de DMSO-d_6 (δ em ppm) em 400 MHz.

No espectro de ^1H do complexo **C2** é observado que o simpleto relativo ao CH do anel pirazol é levemente blindado (6,78 ppm) após a complexação e isso pode ser devido à anisotropia do anel aromático quando coordenado ao íon metálico. Em 7,11 e 7,33 ppm tem-se os sinais tripletos referentes aos hidrogênios vizinhos (³) ao átomo de flúor. Tem-se, em 7,82 e 8,10 ppm, dois sinais de duplo duplo para os hidrogênios em posição *meta* (⁴) ao átomo de flúor. É observado o sinal simpleto do NH em 14,02 ppm com baixa intensidade, mais desblindado em comparação com o ligante, possivelmente devido à coordenação do átomo de N-piridínico ao átomo de Pt(II). Além disso, esse deslocamento para campo mais baixo, em comparação ao ligante livre, pode indicar ligações de hidrogênio mais fortes nas moléculas presentes em solução de DMF-d_7 ^{53,54}.

Observa-se que, em solução, os ligantes livres encontram-se em ambientes químicos semelhantes, decorrente do tautomerismo previsto pra esse tipo de molécula. No entanto, em **C2**, os anéis fenil-substituídos encontram-se em

ambientes químicos diferentes devido à quebra de simetria a partir da complexação à Pt(II) através do nitrogênio piridínico, de forma que os hidrogênios perdem a equivalência magnética aparecendo como sinais separados e independentes.

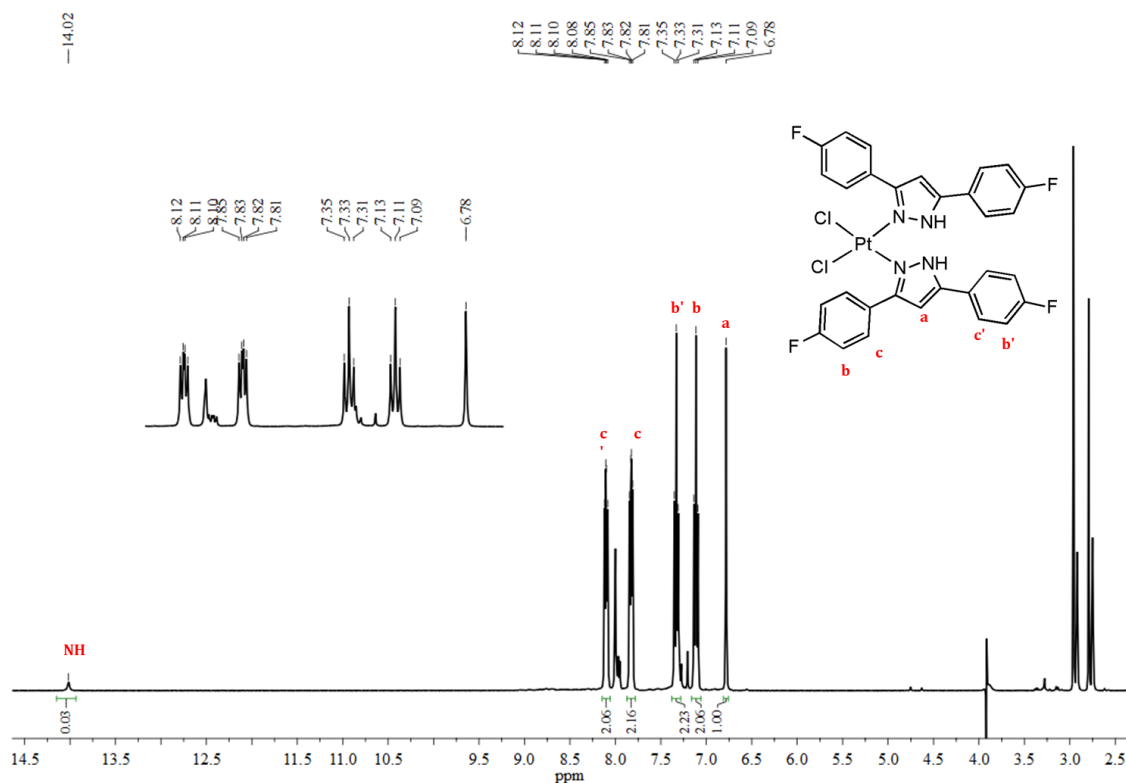


Figura 22 – Espectro de RMN de ^1H do complexo **C2** em solução de DMF-d_7 (δ em ppm) em 400 MHz.

No espectro de ^{13}C do complexo **C2** é observado em 103,18 ppm o sinal do CH do anel pirazol (sinal positivo no DEPT-135). Em 115,46 e 115,84 ppm tem-se dois dupletos (positivo no DEPT-135) referentes aos carbonos *orto* ao flúor ($^2J_{\text{C-F}} = 22$ Hz). Em 124,08 e 127,155 ppm tem-se dois dupletos (ausentes no DEPT-135) referentes aos carbonos quaternários dos anéis fenil-substituídos ($^4J_{\text{C-F}} = 4$ Hz, $^4J_{\text{C-F}} = 3$ Hz, respectivamente). Em 128,83 e 129,855 ppm tem-se dois dupletos referentes aos carbonos *meta* ao flúor ($^3J_{\text{C-F}} = 8$ Hz, $^3J_{\text{C-F}} = 9$ Hz, respectivamente). Em 145,12 e 152,11 ppm são observados dois simpletos ausentes no DEPT-135, atribuídos aos carbonos 3 e 5 do anel pirazol. Em 162,63 e 163,12 ppm são observados dois dupletos (ausentes no DEPT-135) de carbonos não-hidrogenados, portanto, referentes aos carbonos ligados aos átomos de flúor ($^1J_{\text{C-F}} = 245$ Hz)⁵⁵.

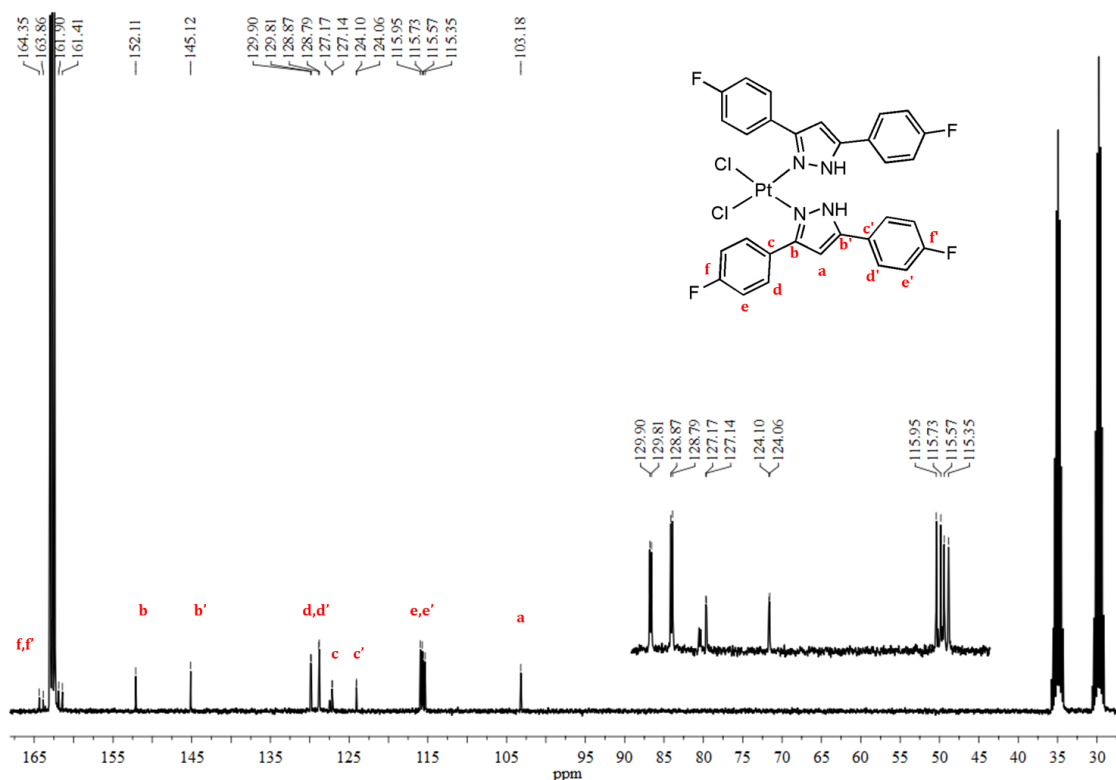


Figura 23 –Espectro de RMN de ^{13}C do complexo **C2** em solução de DMF-d_7 (δ em ppm) em 400 MHz.

A assimetria dos ligantes **L1** e **L3** decorrente dos grupos R diferentes e da complexação à Pt(II), torna os hidrogênios não-equivalentes magneticamente e leva à desdobramentos dos sinais em todas as regiões. Além disso, nos espectros de ^1H de **C1** e **C3** observa-se um aumento na complexidade da multiplicidade observada para todos os hidrogênios aromáticos devido aos desdobramentos dos sinais relativos ao acoplamento spin-spin dos núcleos de hidrogênio e flúor. Estes espectros se encontram no Apêndice (**Figuras 46-56**).

Mais detalhadamente, no espectro de ^1H do ligante **L1** é observado em campo mais alto (2,33 ppm) o simpleto correspondendo aos hidrogênios $-\text{CH}_3$ do grupo substituinte metila. Em 7,26 ppm são atribuídos os hidrogênios aromáticos do anel metilbenzeno e em 7,09 ppm tem-se o sinal simpleto do CH do anel pirazol. Em 7,87 ppm tem-se o multipletto correspondente aos hidrogênios *meta* ao átomo de ^{19}F , enquanto em 7,70 ppm tem-se o sinal dos hidrogênios em *orto*. Em 13,37 ppm o sinal simpleto é atribuído ao N1-H. No espectro de ^{13}C , em 20,80 ppm, tem-se o sinal do carbono $-\text{CH}_3$. Em 99,24 ppm tem-se o sinal do C-1H. Em 115,60 ppm tem-se dupletto

do carbono *meta* ao C-F ($^3J_{C-F} = 26$ Hz). Em 127,08 ppm tem-se o duplete do carbono *orto* ao C-F ($^2J_{C-F} = 8$ Hz) e em 161,72 ppm, tem-se o duplete do carbono ligado diretamente ao flúor ($^1J_{C-F} = 243$ Hz).

Na análise de RMN de 1H do composto **C1** são observados dois sinais em 2,05 e 2,40 ppm sendo estes os simpletos relativos aos grupos CH_3 . Em 6,65 e 6,71 ppm tem-se dois sinais atribuídos aos hidrogênios *CH* do pirazol. Os sinais relativos aos hidrogênios aromáticos são observados em 7,13 – 7,94 ppm, no entanto, a multiplicidade dos mesmos não pôde ser identificada. Em campo mais alto, dois simpletos com deslocamentos químicos de 13,77 e 13,89 ppm podem atribuídos aos hidrogênios da ligação NH, corroborando a proposta de estrutura do complexo **C1**.

Para o espectro de ^{13}C do **C1** e **C3** é possível observar um grande aumento na complexidade observada para todos os sinais de carbonos aromáticos, devido aos acoplamentos com os átomos de flúor, que são realizados a longa distância e, conseqüentemente, com pequenas constantes de acoplamento, dificultando a atribuição do sinal. Além disso, a rotação dos ligantes em torno das ligações Pt-N em solução pode contribuir para a complexidade do espectro, considerando que o ligante é assimétrico (R = CH_3 para **C1** e R = Cl para **C3**), **Figura 15**, diferentemente do que ocorre para o complexo **C2** em solução.

Com o objetivo de se verificar a formação dos complexos propostos, bem como a natureza dos átomos diretamente ligados ao íon metálico, a espectroscopia de RMN de ^{195}Pt foi realizada, uma vez que cada composto deve apresentar um sinal característico, resultado de uma bem definida esfera de coordenação ao redor da platina(II)⁵⁶. Os espectros ^{195}Pt em DMF- d_7 são mostrados na **Figura 24**. Os complexos apresentam um único sinal na região de -1950 ppm, sendo -1949,4 ppm para **C1**, -1957,8 ppm para **C2** e - 1955,2 ppm para **C3**. Os deslocamentos químicos estão de acordo com o centro metálico de platina(II) em uma esfera de coordenação do tipo PtN_2Cl_2 , com dois átomos de nitrogênio e dois ligantes cloretos, segundo a literatura⁵⁷.

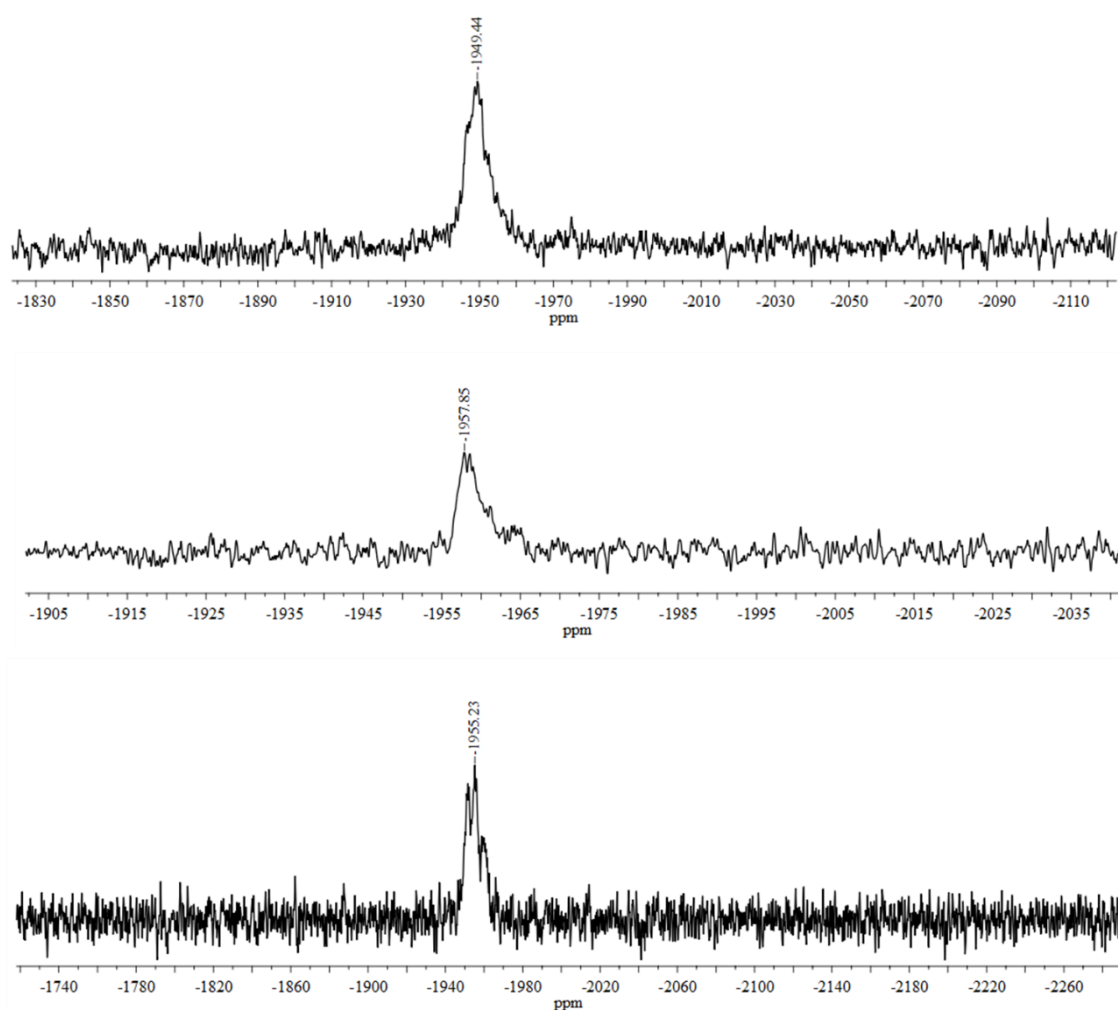


Figura 24 – Espectro de RMN de ^{195}Pt dos complexos **C1**, **C2** e **C3**, respectivamente, em soluções de DMF-d_7 (δ em ppm) em 43 MHz.

3.1.4. Análise cristalográfica por difração de raios X de monocristal

Monocristais dos complexos **C1**, **C2** e **C3**, adequados para o experimento de difração de raios X por monocristal, foram obtidos após recristalização em DMF e evaporação lenta do solvente em temperatura ambiente após 5 dias. As estruturas resolvidas estão apresentadas na **Figura 25**. Para todas as estruturas são observadas moléculas de DMF junto à rede cristalina. A **Tabela 3** apresenta os ângulos e comprimentos de ligação na esfera de coordenação da platina(II) para os três complexos.

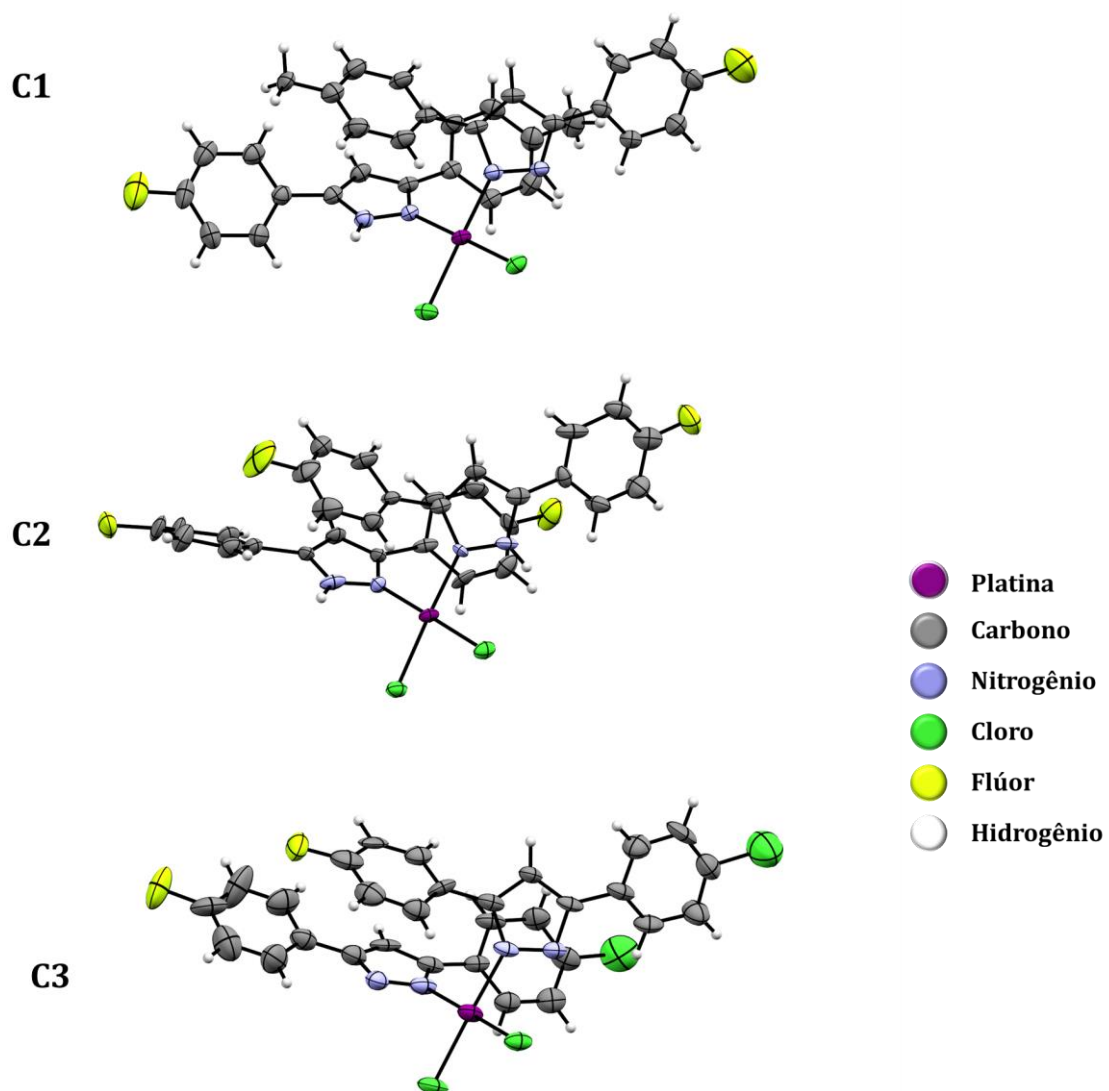


Figura 25 – Representação ORTEP da unidade assimétrica dos complexos com elipsoides de vibração térmica em nível de probabilidade de 50%.

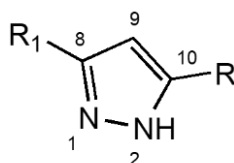
Tabela 3 – Distâncias e ângulos de ligação na esfera de coordenação da platina(II) dos complexos sintetizados neste trabalho.

Composto	C1	C2	C3
Distâncias de ligação (Å)			
Pt1-N1	2,016(4)	2,021(1)	2,049(1)
Pt1-N3	2,017(4)	2,026(1)	2,024(2)
Pt1-Cl1	2,294(1)	2,296(5)	2,293(5)
Pt1-Cl2	2,282(1)	2,303(3)	2,288(6)
Ângulos de ligação (°)			
Cl2—Pt1—N1	176,74(2)	174,49(3)	174,35(5)
Cl2—Pt1—N3	88,94(1)	90,56(3)	91,78(4)
Cl1—Pt1—Cl2	90,71(6)	90,90(1)	90,79(2)

As medidas de difração de raios X indicaram que os compostos **C1**(P2₁/n) e **C2**(C2/c) cristalizaram no sistema monoclinico, enquanto **C3**(Pbcm) cristalizou-se no sistema ortorrômbico. **C1** apresenta 4 unidades assimétricas por célula unitária, enquanto **C2** e **C3** apresentam 8 unidades (**Figuras 57-59 do Apêndice**). Em todas as estruturas apresentadas pode-se observar que a platina(II) encontra-se tetracoordenada, em geometria quadrática plana pouco distorcida, onde dois ligantes pirazóis encontram-se em isomeria *cis*. Os sítios de coordenação remanescentes são ocupados por ligantes cloretos, o que está de acordo com o sinal observado nos estudos de ¹⁹⁵Pt RMN. A coordenação nos ligantes derivados dos pirazóis ocorre de forma monodentada, a partir do nitrogênio piridínico. As distâncias de ligação para Pt1—N1 e Pt1—N3 são próximas de 2,01 Å e 2,02 Å, enquanto para **C3** essas distâncias são de 2,05 e 2,03 Å. Já as ligações Pt1—Cl1 e Pt1—Cl2 têm entre 2,28 e 2,30 Å, aproximadamente, sendo que estes valores estão de acordo com distâncias de ligação de complexos análogos descritos na literatura^{39,58}. Os ângulos entre átomos vizinhos na esfera de coordenação dos complexos têm, aproximadamente, 90°. Os ângulos entre ligantes em posição *trans* apresentam discretos desvios da geometria quadrática planar perfeita, como em Cl1—Pt1—N1 para todos os complexos, onde o ângulo médio é de 174,9°. Outros dados de comprimentos e ângulos de ligação podem ser observados na **Tabela 3**. É

importante notar que os ligantes pirazóis se encontram protonados, preservando seu nitrogênio pirrólico, uma vez que as estruturas obtidas são neutras e as distâncias de ligação características deste heterociclo são bastante próximas às distâncias encontradas em ligantes similares livres⁵⁹. Além disso, os grupos NH encontram-se envolvidos em ligações de hidrogênio, reforçando o que foi anteriormente verificado pelas técnicas de IV e ¹H-RMN quanto à presença do mesmo. As ligações N1—N2 e N1—C8 possuem distâncias de, aproximadamente, 1,34 Å, o que corresponde a um caráter intermediário de ligação simples e dupla, compatível com a deslocalização π presente nesse sistema. Essa deslocalização π é, ainda, estendida para as ligações C8—C9, C9—C10 e C10—N2, como mostra a **Tabela 4**.

Tabela 4 – Distâncias e ângulos de ligação selecionados de um anel pirazol em **C1**.



Composto	Distâncias de ligação (Å)	Ângulos (°)
C1	N1—N2	1,348(7) N1—N2—C10 111,8(5)
	N1—C8	1,343(7) N2—N1—C8 106,4(5)
	C8—C9	1,392(9) N1—C8—C9 108,8(5)
	C9—C10	1,373(8) C8—C9—C10 107,7(5)
	C10—N2	1,359(7) C9—C10—N2 105,4(5)

A não-planaridade relativa dos ligantes na estrutura cristalina dos complexos, **Figura 26**, pode ser avaliada a partir dos ângulos diedro formados pelos dois anéis fenil com o anel pirazol, além dos ângulos entre os próprios anéis fenil no respectivo ligante. Esses ângulos variam consideravelmente entre os complexos. Para **C1**, esses ângulos são de 36,09° e 34,42° para um ligante, e 39,74° e 25,85° para o outro. Os ângulos entre os planos dos anéis fenil são 11,92° e 63,14°, respectivamente. Para **C2**, 20,51° e 40,0° para um ligante e 31,16° e 29,47° para o outro, 55,79° e 58,55°, entre os anéis fenil, respectivamente. Para **C3**, 47,82° e 22,60° para um ligante, 16,56°, 40,72° para o outro ligante e 24,28° e 67,37° entre os planos dos anéis fenil.

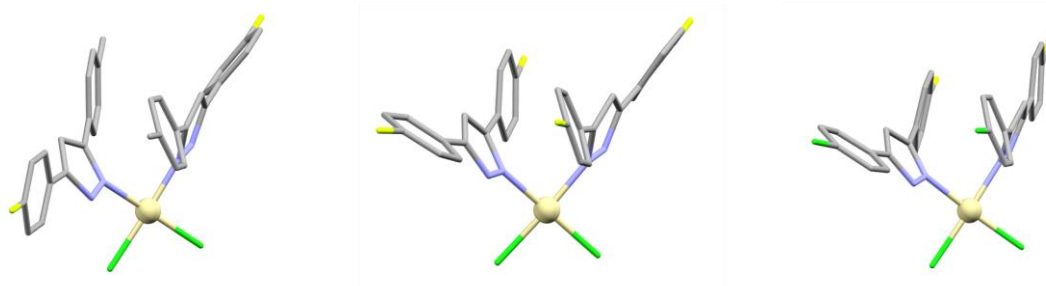


Figura 26 – Representação da unidade assimétrica de **C1**, **C2** e **C3**, respectivamente, evidenciando a não-planaridade dos anéis presentes nos ligantes. Átomos de hidrogênio omitidos para maior clareza.

Na **Tabela 5** tem-se os parâmetros geométricos para as ligações de hidrogênio, clássicas e não-clássicas, determinadas para os complexos. As moléculas de solvente presentes nas redes cristalinas têm papel importante na estabilização das mesmas. Os resíduos de DMF formam ligações de hidrogênio clássicas com os ligantes pirazol, através do átomo de oxigênio, receptor da ligação, e do fragmento N—H, doador da ligação (N3—H3···O1), **Figura 27**. Essas ligações podem ser consideradas de força moderada, uma vez que as distâncias entre doador-receptor é de, aproximadamente, 2,7 Å. Além disso, ligações de hidrogênio fracas e não-clássicas são observadas na rede, envolvendo os halogênios como receptores da ligação e fragmentos N—H e C—H como doadores⁶⁰.

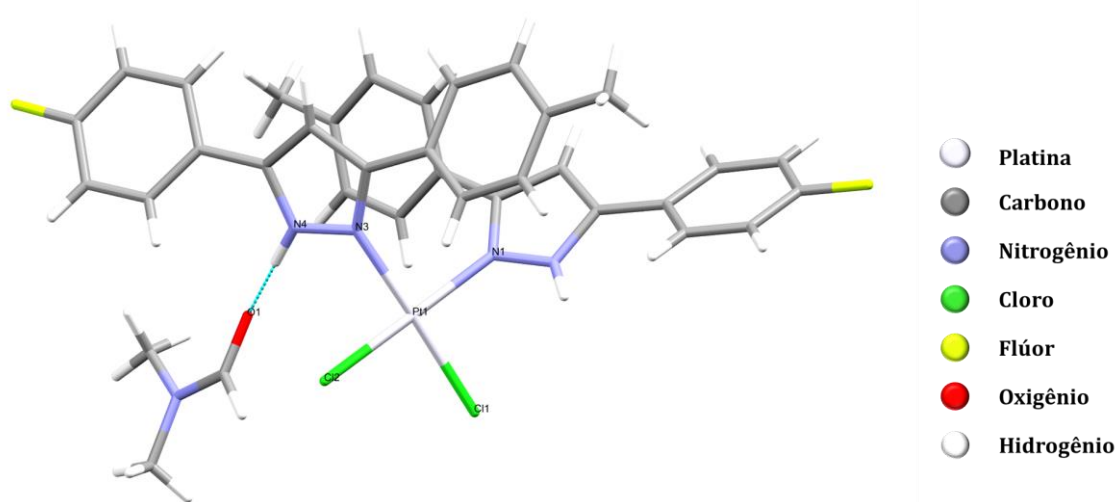


Figura 27 – Ligação de hidrogênio N4—H4···O1 entre uma molécula de DMF e o complexo na estrutura de **C1**.

Tabela 5 – Parâmetros geométricos para as ligações de hidrogênio (Å, °) presentes nas estruturas dos complexos de Pt(II) sintetizados. (D = átomo doador, A = átomo receptor)

	Distância (Å)				Ângulo (°)
	D—H...A	D—H	H...A	D...A	D—H...A
C1	N2—H2...Cl1 ⁱ	0,860	2,676	3,355	151,32
	N4—H4...O1 ⁱⁱ	0,860	1,937	2,745	155,92
	C29—H29...Cl1 ⁱⁱⁱ	0,930	2,975	3,816	151,19
	C36—H36A...Cl2 ^{iv}	0,960	2,793	3,723	163,51
	C16—H16...Cl2 ^v	1,125	2,909	3,574	117,68
C2	N4—H4...O1	0,860	1,933	2,787	171,63
	N2—H2...Cl1 ⁱ	0,860	2,461	3,293	162,93
	O2—H2B...Cl1	0,850	2,821	3,311	118,42
	C17—H17...Cl2 ⁱⁱ	0,930	2,861	3,763	163,84
	C32—H32B...F2 ⁱⁱⁱ	0,960	2,309	3,108	140,24
	C6—H6...F2 ^{iv}	0,930	2,575	3,320	137,48
	C31—H31...Cl2	0,930	2,932	3,576	127,62
C3	C16—H16...Cl2 ⁱ	0,930	2,864	3,509	127,56
	C20—H20...Cl1 ⁱⁱ	0,930	2,810	3,682	156,66
	C12—H12...N3 ⁱ	0,930	2,691	3,519	148,68
	C29—H29...Cl4 ⁱⁱⁱ	0,930	2,940	3,820	158,26

C1: i: [-x+1, -y, -z+1], ii: [-x+3/2, y-1/2, -z+3/2], iii: [x+1/2, -y+1/2, z+1/2], iv: [x-1/2, -y+1/2, z+1/2], v: [-x+3/2, y+1/2, -z+3/2]; **C2:** i: [-x, y, -z+1/2], ii: [-x+1/2, y-1/2, -z+1/2], iii: [x, y+1, z], iv: [x-1/2, -y-1/2, z-1/2]; **C3:** i: [-x+1/2, y+1/2, z], ii: [x+1/2, -y+1/2, -z+1], iii: [x, -y+1/2, z-1/2].

Também observa-se interações do tipo π *stacking* devido às sobreposições dos anéis aromáticos do tipo fenil e pirazol na rede cristalina dos complexos, com distâncias de **C1** = 3,56 e 3,60 Å, **C2** = 3,70 e 3,73 Å e **C3** = 3,55 e 3,81 Å, como mostrados na **Figura 28**. Os dados referentes à coleta e refinamento estão dispostos na **Tabela 6**.

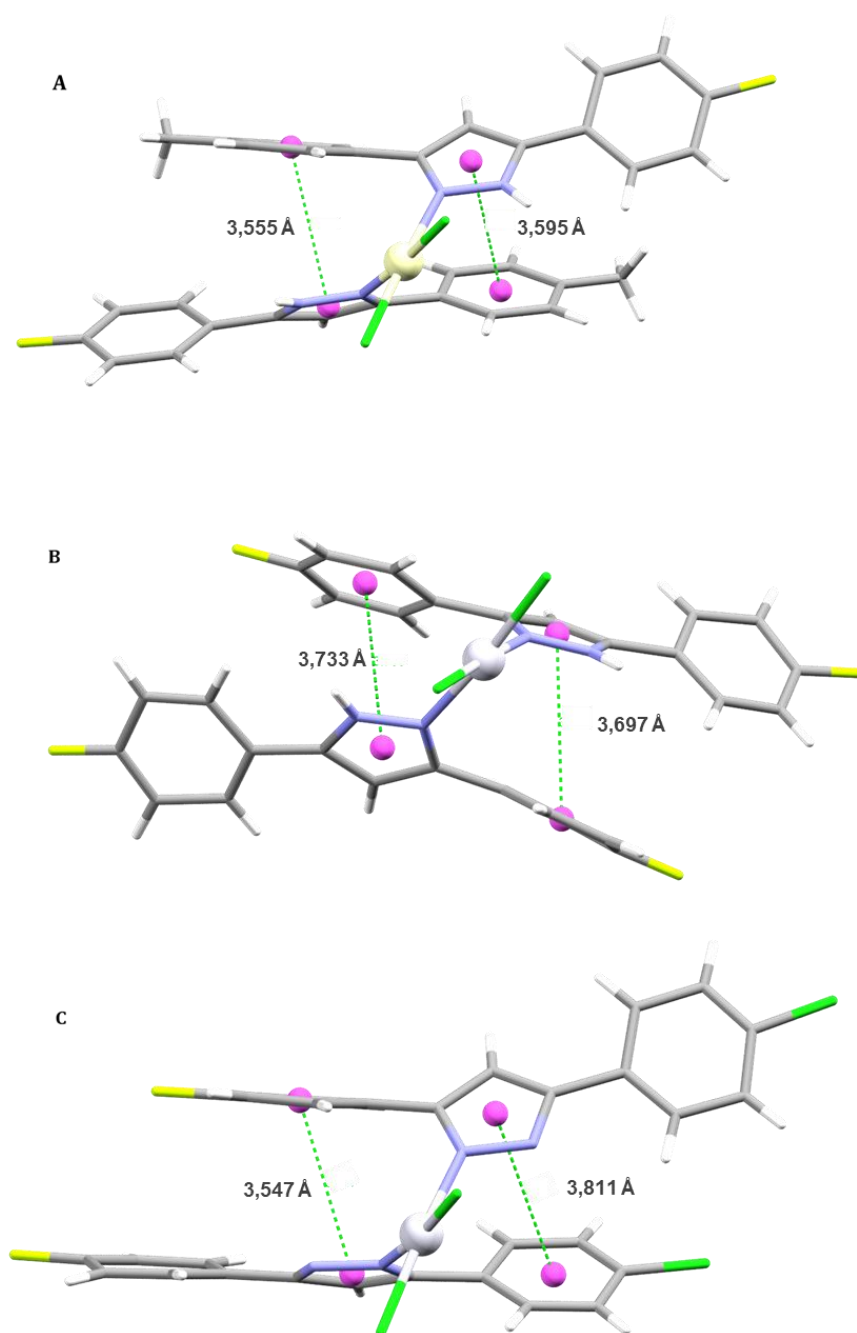


Figura 28 – Cálculo de distância dos centroides nas estruturas de A) C1, B) C2 e C) C3.

Tabela 6 – Dados relacionados à coleta, resolução e refinamento dos complexos sintetizados

Composto	C1·DMF	C2·DMF·H₂O	C3·DMF
Fórmula empírica	C ₃₅ H ₃₃ Cl ₂ F ₂ N ₅ O Pt	C ₃₃ H ₂₇ Cl ₂ F ₄ N ₅ O Pt	C ₃₃ H ₂₇ Cl ₄ F ₂ N ₅ O Pt
Massa molecular (g mol⁻¹)	770,56	778,48	811,39
Temperatura (K)	298,15	298,15	298,15
λ (Å)	0,71073	0,71073	0,71073
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, P2 ₁ /n	Monoclínico, C2/c	Ortorrômbico, Pbcm
a, b, c (Å)	13,4347(5), 13,8157(3), 18,5540(5)	25,2004(14), 10,5215(3), 26,3170(16)	15,0553(3), 13,5297(3), 34,0616(12)
α, β, γ (°)	90, 100,757(3), 90	90, 111,226(7), 90	90, 90, 90
V (cm³)	3383,29(20)	6504,47(190)	6938,13
Z	4	8	8
ρ_{calc.} (g cm⁻³)	1,66	1,76	1,69
μ (mm⁻¹)	4,352	4,539	4,398
F(000)	1664	3368	3432
Reflexões coletadas	41481	21183	98312
Reflexões independentes	6914	5547	7104
R_{int}	0,071	0,094	0,059
Parâmetros refinados	419	418	409
S	1,036	1,364	1,200
R(F); R_w (F²) [I > 2σ(I)]	0,042; 0,095	0,088; 0,264	0,105; 0,269
R(F); R_w (F²)	0,064; 0,108	0,114; 0,327	0,118; 0,279
Δρ_{max}; Δρ_{min} (e Å⁻³)	1,583; -1,007	3,745; -5,915	2,58; -2,143

3.2. Investigação das propriedades biológicas

3.2.1. Ensaio de citotoxicidade

As células viáveis são capazes de reduzir o MTT (de cor amarela) a formazan (de cor violeta), devido ao processo redox do ciclo metabólico dos cofatores NADH e NADPH. Sendo assim, por um ensaio colorimétrico é possível correlacionar a quantidade de células viáveis e a quantidade do produto de redução do MTT. Ao se utilizar diferentes concentrações do composto avaliado tem-se percentuais de resposta diferente caso o composto apresente citotoxicidade do tipo concentração-dependente. Ao normalizar os valores com as células não tratadas (consideradas 100% viáveis) pode-se traçar a curva de viabilidade celular e estimar a concentração que inibe 50% desta viabilidade, conhecido como IC₅₀. As citotoxicidades dos complexos de platina(II) estão demonstradas nas curvas de viabilidade celular na **Figura 29** e os valores de IC₅₀ estão listados na **Tabela 7**. Esses ensaios foram realizados frente às linhagens tumorais B16F10 (melanoma metastático murino) e 4T1 (adenocarcinoma mamário murino), e frente à linhagem de célula normal BHK21 (rim de hamster). As células foram expostas a cada composto por um período de incubação de 72 horas em diferentes concentrações (100, 50, 10, 5 e 1 µM), e foi usada como referência padrão a cisplatina. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

Tabela 7 – Valores de IC₅₀ (µmol L⁻¹) obtidos pelo ensaio MTT nas linhagens 4T1, B16F10 e BHK-21.

Composto	IC ₅₀ (µmol L ⁻¹)		
	4T1 (adenocarcinoma)	B16F10 (melanoma)	BHK-21 (normal)
L1	> 100	45 ± 2	> 100
L2	> 100	> 100	> 100
L3	38 ± 2	> 100	40 ± 2
C1	7,5 ± 0,1	8,3 ± 0,2	5,9 ± 0,3
C2	23 ± 1	17,7 ± 0,9	9,5 ± 0,5
C3	21 ± 2	15 ± 1	12 ± 1
Cisplatina*	6 ± 1	6 ± 2	8 ± 2

*Fármaco de referência.

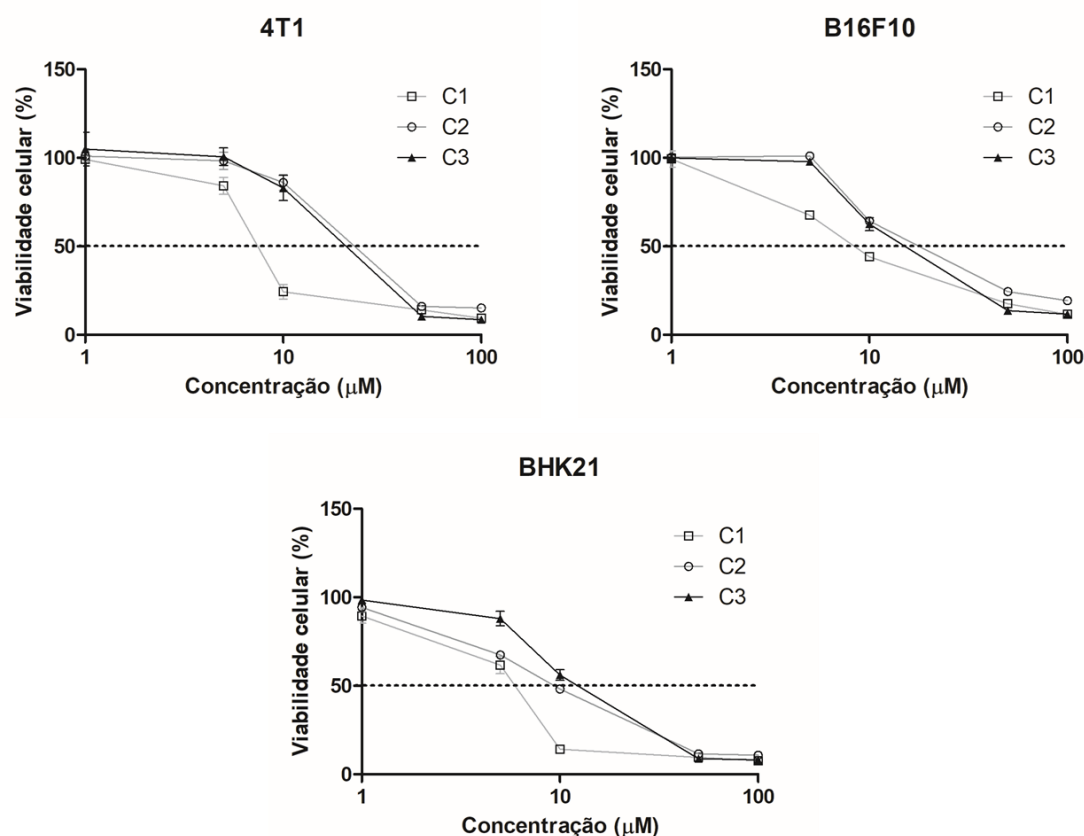


Figura 29 – Curvas de viabilidade celular do ensaio colorimétrico MTT nas linhagens 4T1 (adenocarcinoma mamário murino), B16F10 (melanoma metastático murino) e BHK-21 (célula normal de rim de hamster) tratadas com os complexos **C1**, **C2** e **C3** por 72 h. Cada ponto no gráfico representa uma concentração (1, 5, 10, 50, 100µM). Resultados foram expressos como média ± DP da triplicata de dois experimentos independentes.

Observa-se que todos os ligantes possuem baixa atividade citotóxica frente às linhagens estudadas, enquanto os complexos possuem atividade antiproliferativa significativa. É notável, portanto, que a ação citotóxica dos pirazóis foi aumentada com a coordenação à platina(II). Esse efeito favorável na citotoxicidade pode ser devido a um balanço adequado na lipofilicidade do composto, interações reversíveis ou irreversíveis com biomoléculas, dentre outros. Convém destacar, também, que os complexos não se mostraram seletivos quando se avalia os resultados nas células normais (BHK21), o que é desfavorável para uma substância antitumoral em potencial. Dentre os três complexos, é notável que o composto **C1**, que possui, além do átomo de F, o substituinte metil (-CH₃), é mais ativo que os derivados de -F (**C2**)

ou -Cl (**C3**) mostrando que o substituinte pode ter papel relevante da atividade citotóxica.

3.2.2 Ensaios de citotoxicidade em meio suplementado com BSA e GSH

Sabe-se que a albumina (BSA) e a glutathiona (GSH) são alvos bem estabelecidos de substâncias antitumorais, especialmente metalofármacos, e compostos que potencialmente se ligam a esses alvos podem ter sua atividade antitumoral diminuída. Por isso, a fim de se avaliar o efeito dessas biomoléculas no potencial biológico dos compostos, o ensaio de viabilidade celular foi realizado empregando-se meio de cultura suplementado com BSA e GSH na linhagem celular de B16F10. As curvas de viabilidade celular dos complexos **C1**, **C2** e **C3** estão apresentadas na **Figura 30** (A, B e C) respectivamente, onde é possível observar o efeito dessas biomoléculas na citotoxicidade dos compostos **C1** e **C2**, sendo que a glutathiona foi mais significativa na diminuição do potencial biológico que a albumina. Diferentemente de **C1** e **C2**, o complexo **C3** não foi afetado pela presença dessas biomoléculas. Um gráfico de barras com os resultados de IC₅₀ extraídos das curvas de viabilidade celular pode ser observado na **Figura 30D** para melhor visualização da interferência da GSH na citotoxicidade dos complexos.

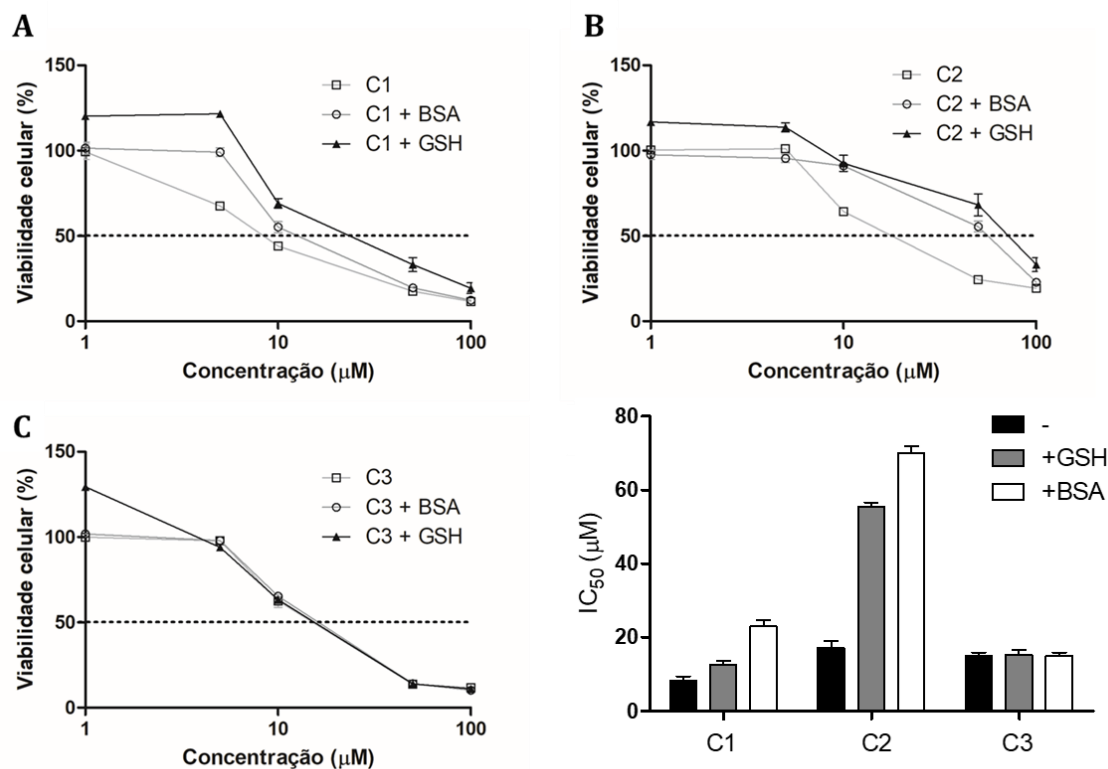


Figura 30 – Curvas de viabilidade celular do ensaio colorimétrico com MTT na linhagem B16F10 em três diferentes condições: meio sem alterações (\square), meio suplementado com 25 mg mL^{-1} de BSA (\circ) e meio suplementado com 1 mM de GSH (\blacktriangle). As células foram tratadas com os complexos **C1**(A), **C2**(B) e **C3**(C) por 72 h. Cada ponto no gráfico representa uma concentração (1, 5, 10, 50, 100 μM). Resultados foram expressos como média \pm DP da triplicata de dois experimentos independentes.

3.2.3 Interação com a BSA

Devido à importância das albuminas de soro no transporte de drogas, essas proteínas têm sido amplamente estudadas, assim como as interações com potenciais agentes biológicos, sejam ligantes orgânicos ou complexos de coordenação. A variante bovina dessas proteínas (BSA) apresenta grandes similaridades com a albumina do soro humano (HSA), de forma que constitui um bom modelo para o estudo dessas interações. O espectro de ambas as albuminas revelam duas bandas de absorção características no UV-vis: uma banda em 220 nm de alta intensidade devido à estrutura terciária da proteína, constituída principalmente das ligações peptídicas em α -hélice, e a banda de absorção próxima a 280 nm, devido à transição

$\pi \rightarrow \pi^*$ de alguns aminoácidos aromáticos da BSA, incluindo Phe, Tyr e Trp. O espectro UV-Vis da BSA está representado na **Figura 31**. Sendo assim, a espectroscopia de absorção no UV-vis pode ser usada para estudar as mudanças conformacionais na estrutura da albumina, bem como a formação de complexos entre proteína-droga, por inspeção das variações das bandas citadas através da titulação desta com os compostos em questão⁶¹. O estudo de espectroscopia de fluorescência da BSA é uma eficiente técnica para análise de mudanças conformacionais na estrutura da proteína e sensível a diferentes tipos de interação, porém, os compostos aqui apresentados possuem forte banda de emissão em região próxima à banda de emissão da BSA, o que impossibilitou o aprofundamento deste estudo (**Figura 60**, do Apêndice).

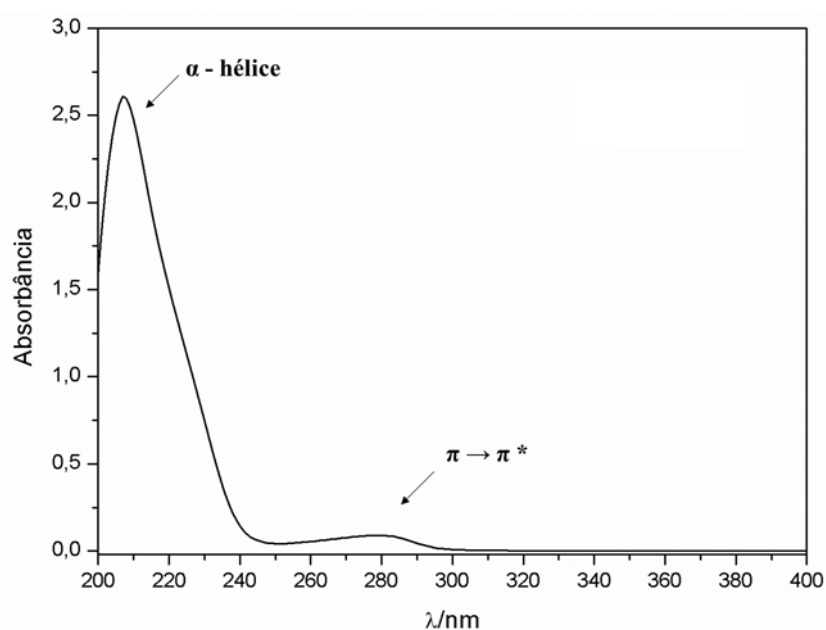


Figura 31 – O espectro de absorção no UV-vis da BSA livre em pH 7,4 na concentração de $2,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Cada composto foi acrescentado à BSA em sucessivas adições até alcançar uma relação 1:3 (BSA:complexo). Com relação a banda em 220 nm e a titulação dos compostos na BSA, um significativo efeito hipocrômico é observado, como evidenciado na **Figura 32A**, provavelmente devido à uma perturbação induzida pelos compostos à estrutura terciária da proteína. Este efeito pode ser observado para a titulação da BSA com o composto **C1** no espectro da **Figura 32B**, onde também é possível notar um aumento na banda de absorção próxima a 280 nm, devido

à transição $\pi \rightarrow \pi^*$, resultando num efeito hipercrômico, revelando que o microambiente dos aminoácidos aromáticos foi afetado e um complexo de **C1**-BSA foi formado. Além disso, um discreto deslocamento para maiores comprimentos de onda (efeito hipsocrômico), de 284 nm para 280 nm, sugere um aumento na hidrofobicidade perto dos resíduos de aminoácidos aromáticos, como o triptofano. Baseando-se na variação da absorvância da banda próxima a 280 nm, a constante de ligação intrínseca (K_b) dos compostos com a BSA pode ser determinada de acordo com a equação de Benesi-Hildebrand (Equação 1, do item 2.10.1), como mostra a **Figura 32C**.

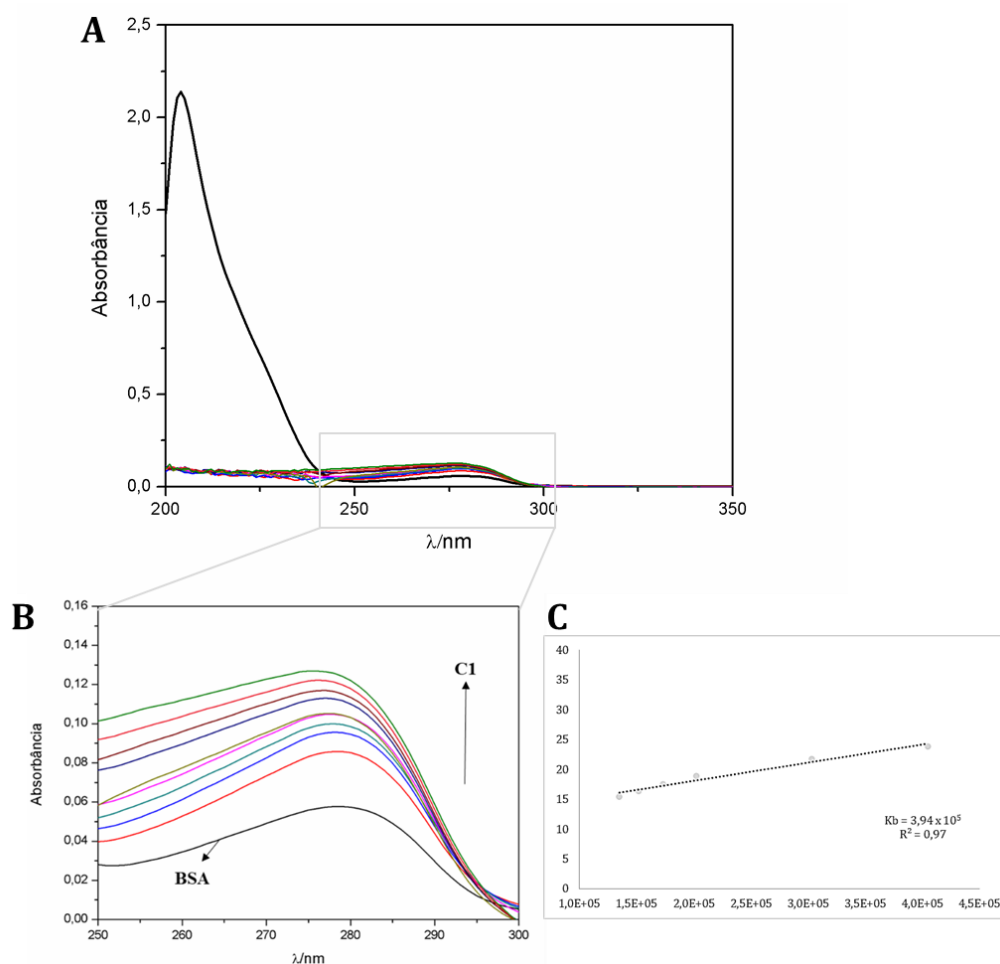


Figura 32 – A) O espectro de absorção no UV-vis da BSA na ausência e na presença de concentrações crescentes de **C1**, em 25 °C. B) Recorte evidenciando a banda em 280 nm. A concentração da BSA, inicialmente, de $2,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e do complexo variando de 0 a $7,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. C) Gráfico de A/A_0 versus $1/[C1]$, obedecendo a equação de Benesi-Hildebrand.

Os espectros de absorção no UV-vis da BSA na ausência e na presença dos ligantes e complexos estão apresentados na **Figura 33**. Os gráficos correspondentes à equação de Benesi-Hildebrand, utilizada para o cálculo de K_b para cada composto encontram-se na **Figura 61** do Apêndice.

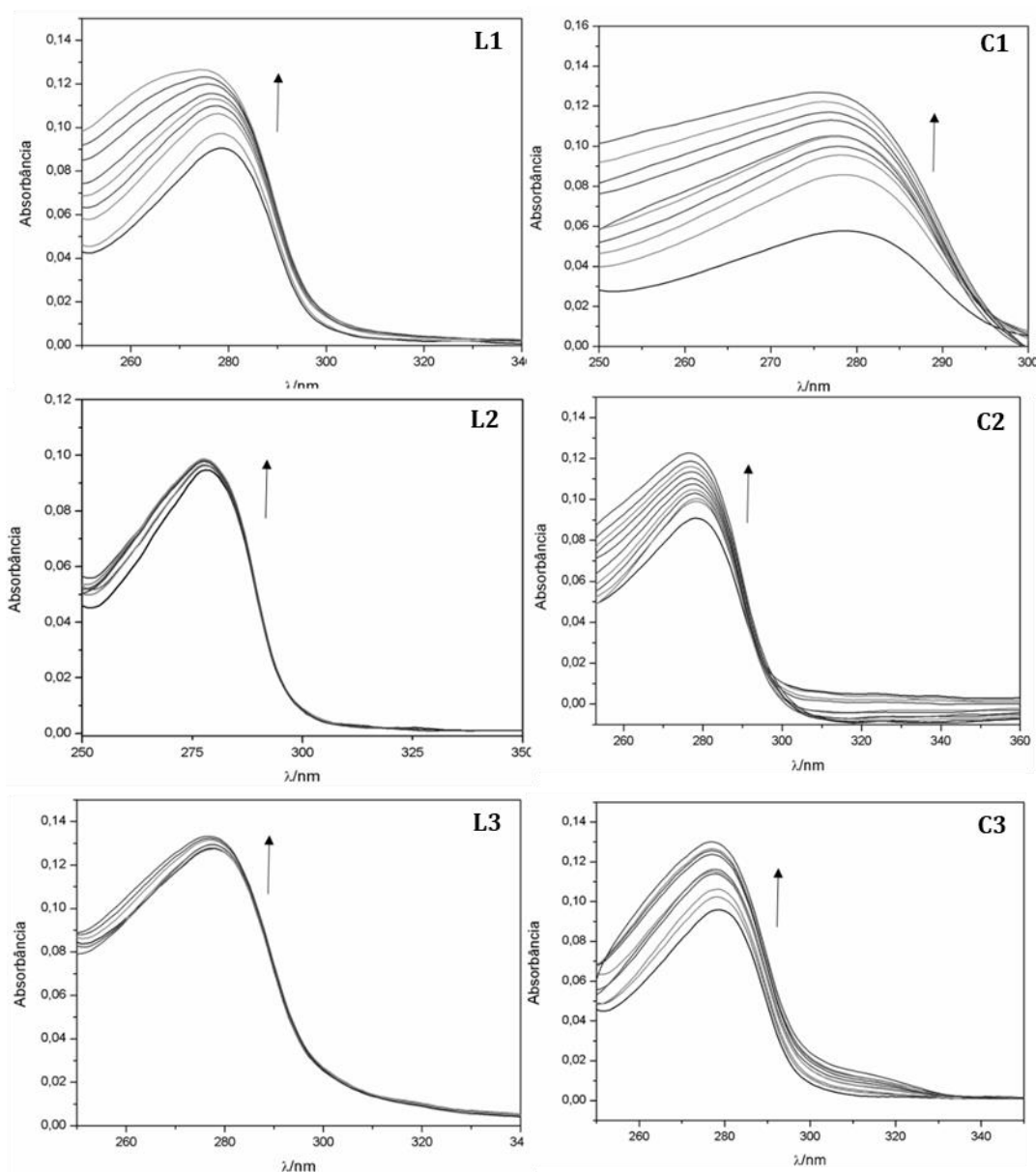


Figura 33 - O espectro de absorção no UV-vis da BSA na ausência e na presença de concentrações crescentes dos complexos e ligantes a 25 °C.

Os valores de K_b (**Tabela 8**) demonstraram relativa interação com a BSA, para os complexos **C1** e **C2** que apresentam constante de interação K_b crescentes nesta ordem, porém, os ligantes **L2**, **L3** e o complexo **C3** não apresentaram grande interação.

A não interação da BSA com o complexo **C3** já havia sido observada na cultura de células e foi confirmada com a proteína isolada. A BSA pode ser considerada um bom carreador ou até mesmo um retentor de substâncias, o que interfere na atividade biológica dos compostos em organismos complexos (*in vivo*).

Tabela 8 – Valores das constantes de ligação intrínseca (K_b) e magnitude do coeficiente de determinação (R^2) obtidos para os ligantes e complexos com a BSA.

Composto	K_b (10^5 L mol ⁻¹)	R^2
Ligante 1	2,2	0,93
Complexo 1	3,94	0,97
Ligante 2	0,49	0,93
Complexo 2	1,61	0,96
Ligante 3	0,76	0,99
Complexo 3	0,60	0,99

3.2.4. Interação com ácido desoxirribonucleico (ctDNA)

Os possíveis modos de interação dos compostos com o ctDNA foram investigados por espectroscopia de absorção e fluorescência, sendo esta última utilizando-se o brometo de etídio (BE), um conhecido agente de intercalação.

A espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-vis é uma das técnicas mais simples e eficientes no estudo de possíveis interações entre complexos e DNA, *in vitro*. Nesse contexto, os espectros de absorção na região do UV-vis dos compostos foram obtidos em Tris-HCl e apresentaram bandas atribuídas principalmente à transição eletrônica do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ intraligante em comprimentos de onda na região do ultravioleta ($\lambda = 255$ nm), conforme apresentado na **Figura 34**.

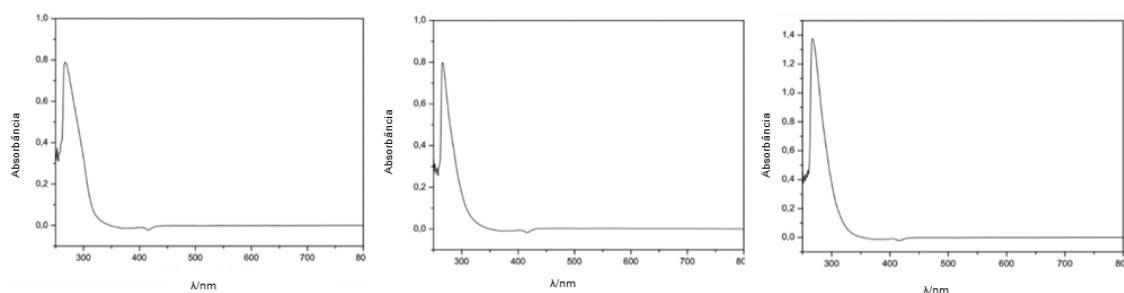


Figura 34 – Espectros eletrônicos em solução aquosa $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em pH=7,4 dos complexos **C1**, **C2** e **C3**, respectivamente; $l=1$ cm.

Os valores das constantes de ligação DNA-composto (K_b), listados na **Tabela 9**, foram obtidos pelo monitoramento das mudanças ocorridas na absorvância em, aproximadamente, 255 nm para os compostos em pH 7,4 após sucessivas adições de ctDNA e utilizando-se a equação de Benesi-Hildebrand (**Equação 1**, do item **2.10.1**), como exemplificado para o composto **C1** na **Figura 35**. Os demais espectros de monitoramento desta interação para os ligantes e respectivos complexos estão apresentados na **Figura 36**. Os gráficos correspondentes à equação de Benesi-Hildebrand para cada composto encontram-se na **Figura 62** do Apêndice.

Tabela 9 – Valores das constantes de ligação intrínseca (K_b) e magnitude do coeficiente de determinação (R^2) obtidos para os ligantes e complexos com ctDNA.

Composto	K_b (10^4 L mol^{-1})	R^2
Ligante 1	1,2	0,98
Complexo 1	6,1	0,98
Ligante 2	4,3	0,99
Complexo 2	6,7	0,97
Ligante 3	2,4	0,98
Complexo 3	0,8	0,99

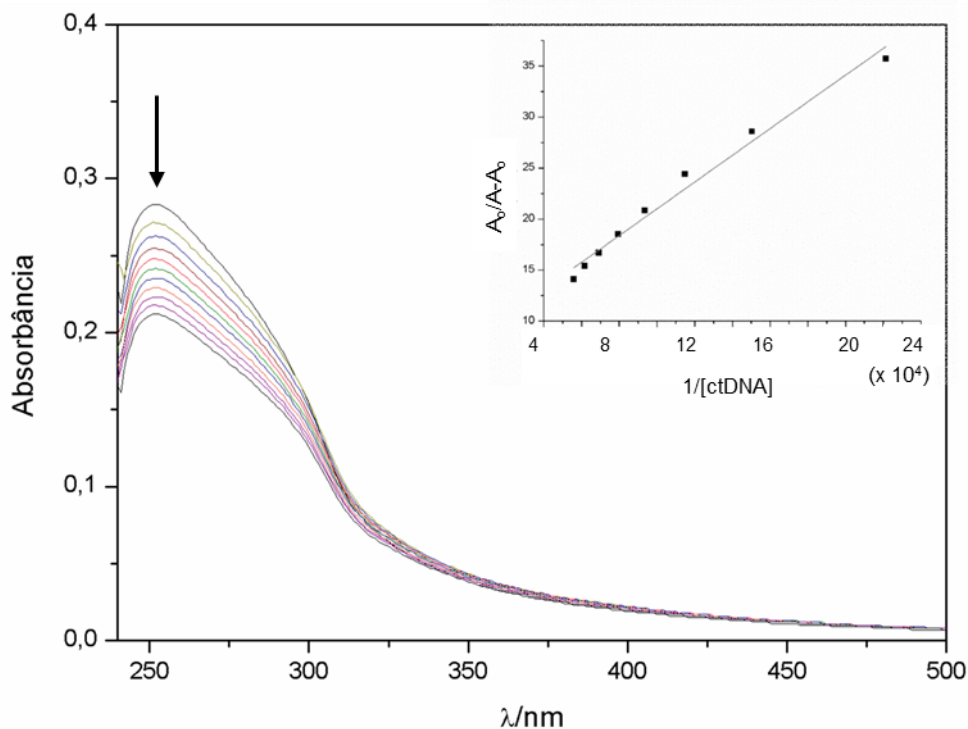


Figura 35 – Espectro UV-vis de **C1** e concentrações crescentes de ctDNA. *Inset*: Gráfico da equação de Benesi-Hildebrand.

Observa-se que todos os complexos possuem valores de K_b semelhantes, da ordem 10^4 L mol^{-1} e, portanto, interagem reversivelmente com o DNA com força moderada. Complexos que interagem fortemente com o DNA apresentam constantes de interação da ordem de 10^5 L mol^{-1} , como o brometo de etídio, que é considerado um forte intercalador de DNA. A intensidade das bandas de absorção dos ligantes e de seus complexos diminui, após a adição de alíquotas sucessivas de ctDNA, resultando em hipocromismo, indicando que a interação com DNA pode ocorrer, em certa extensão, por interações do tipo $\pi \rightarrow \pi$ stacking entre os cromóforos aromáticos dos ligantes pirazol e os pares de base do ctDNA.

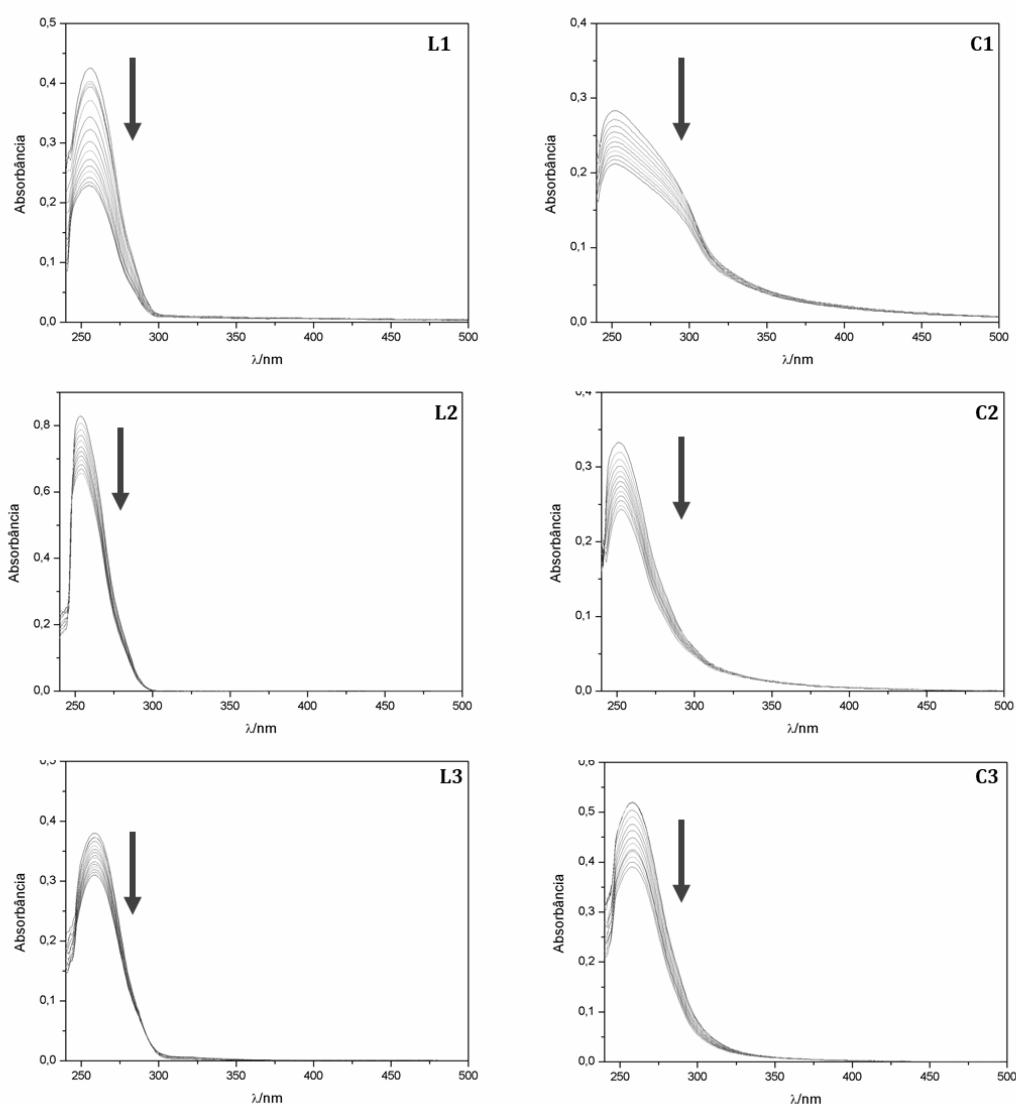


Figura 36 – Espectros no UV-vis dos complexos e ligantes, na presença de concentrações crescentes de ctDNA (0-20 μM). A seta destaca as mudanças no máximo de absorção, resultando em um efeito hipocrômico.

3.2.5 Interação com o sistema BE-ctDNA

Embora não seja possível observar planaridade na estrutura dos complexos sintetizados em estado sólido, a interação com os pares de base do DNA não pode ser descartada. Sendo assim, o sistema BE-ctDNA foi utilizado para avaliar a extensão das interações do tipo π - π *stacking* que pode ocorrer entre os complexos e o DNA. Este sistema, quando excitado em 550 nm, mostra uma intensa banda de emissão em 610 nm. A emissão fluorescente do sistema permanece aproximadamente constante depois de sucessivas adições dos complexos, o que

indica que eles não são suficientemente capazes de deslocar o BE nas condições avaliadas, e a interação do tipo intercalação não é relevante. Na **Figura 37** é mostrado o sistema contendo **C3** e a razão I/I_0 versus $[C3]$, o que demonstra a discreta diminuição na intensidade de fluorescência de EB-ctDNA. Para todos os outros compostos foi observado o mesmo comportamento de não suprimir significativamente a fluorescência do sistema em questão.

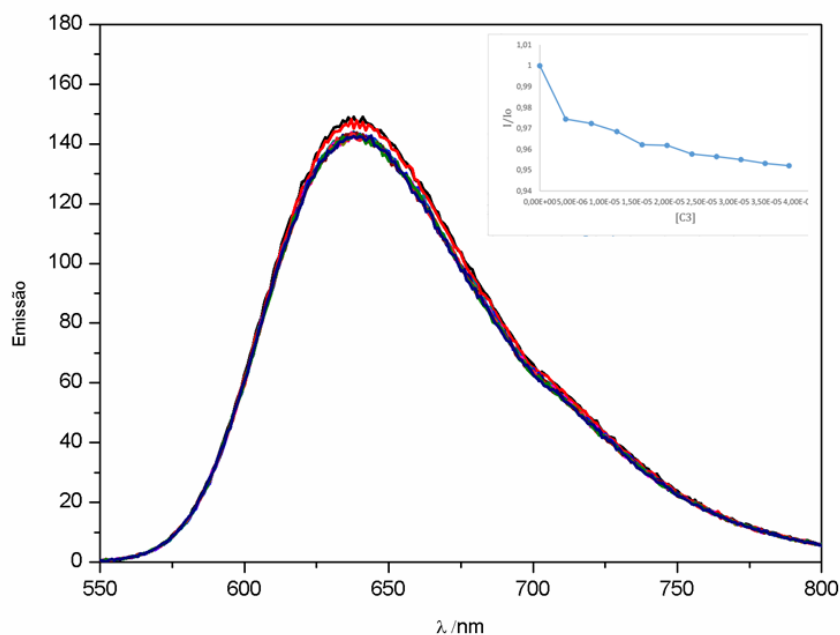


Figura 37 – O espectro de emissão de fluorescência do sistema EB-ctDNA na ausência e na presença de concentrações crescentes de **C3**, em 25 °C. *Inset*: Razão I/I_0 versus $[C3]$.

3.2.6 Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial

Devido ao fato que a migração da molécula de DNA depende do tamanho e formato da molécula de interesse, a análise do DNA pode ser útil pela variedade de conformações que a molécula de DNA pode assumir. Um DNA plasmidial é um DNA circular que pode existir como três isômeros conformacionais²²: “supercoiled” (SC), círculo relaxado (OC), e linear (L), como representado na **Figura 38**. Em termos de mobilidade relativa através da matriz do gel, a Forma OC deve ser a mais lenta pois seu formato não é compacto como a SC, e seguida da forma L que tem baixa mobilidade por ser a mais comprida, o que também gera certa retenção. De modo geral, a mobilidade deve ser: $SC > L > OC$. Mas essa relação é constante apenas em algumas circunstâncias, sendo influenciada por tamanho do poro, corrente, peso

molecular, pH e tampão. Também, em casos que o gel é corrido na presença de BE, a Forma SC pode ser induzida a assumir a Forma OC pela intercalação do corante nas bases nitrogenadas e com isso diminuir sua mobilidade eletroforética.

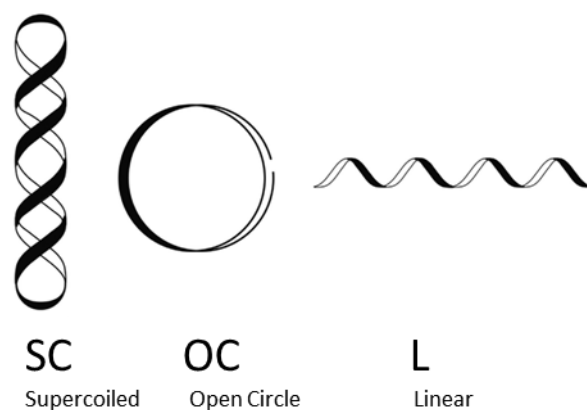


Figura 38 – Representação esquemática das três formas principais das moléculas de DNA plasmidial²².

Diante disso, o experimento de eletroforese em gel de agarose foi primeiramente otimizado para investigar interações dos compostos com o DNA plasmidial. Para tanto, os complexos **C1**, **C2** e **C3** foram aplicados em diferentes concentrações: 500, 250, 100 e 50 μM . A **Figura 39** apresenta a corrida eletroforética para os compostos incubados com DNA plasmidial por 24 horas a 37 °C. No experimento controle, no qual apenas o DNA estava presente (0), observa-se as três formas do DNA, sendo a Forma SC presente em maior quantidade. Para os experimentos contendo os complexos revelou-se uma alteração na quantidade relativa entre as formas do DNA, em comparação com o experimento controle, indicando que os compostos interagem com o DNA plasmidial. No geral, é possível observar que os compostos **C2** e **C3** podem conduzir mudanças na forma do DNA plasmidial gerando a estrutura linear (irreversível) que não foi observada para **C1** sob as mesmas condições. O complexo **C1** mostrou que apenas em altas concentrações (a) é capaz de converter a forma SC a OC. Em concentrações menores (b-d) este apresenta algum OC DNA mas sua maioria continua na forma SC. Para o complexo **C2** em todas as concentrações foi possível observar um aumento de OC DNA mas ainda existe SC DNA. No entanto, o complexo **C3** na menor concentração (d) pode conduzir a forma SC DNA à total conversão a OC e L DNA. Em concentrações intermediárias (b e c) o composto C3 não converte todo DNA o que sugere ocorrer

uma reversão à forma SC que no máximo de concentração (a) volta a converter o SC DNA a OC DNA. Este efeito é observado para cisplatina e carboplatina⁶² quando estas estão na razão de 16 mmol Pt/ g DNA. No caso do **C3** este efeito foi observado a 10 mmol Pt/ g DNA.

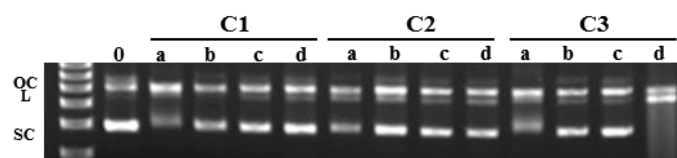


Figura 39 - Estudos de interação de DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose, com concentrações decrescentes do complexos **C1**, **C2** e **C3**, após 24 horas de incubação a 37 °C. Linha 1: marcador de peso molecular do DNA; Linha 2, controle: DNA plasmidial; Linhas 3-6, 7-10 e 11-14: DNA plasmidial + complexos a a) 100, b) 50, c) 20 e d) 10 mmol Pt/ gDNA. OC: forma relaxada, L: linear e SC: superenovelada.

Diante das diversas variações ocorridas na corrida eletroforética do DNA plasmidial na presença dos complexos, pode-se concluir que o substituinte R no anel aromático do ligante influencia a interação dos compostos, não apenas com a BSA e a GSH, mas também com este tipo de DNA. Tal influência foi também observada para o complexo **C3** no estudo de interação com ctDNA no UV-Vis.

4. Considerações Finais e Conclusões

Este trabalho descreve a síntese de três complexos inéditos de platina(II) com ligantes difenil-pirazol diferenciados por substituintes CH₃, F e Cl em um dos grupos fenil. A estrutura dos complexos foi estabelecida baseada nos resultados das análises físico-químicas que esclarecem diversos pontos importantes desta elucidação estrutural.

Os resultados de análise elementar de C, H e N bem como a condutividade molar evidenciam a formação de complexos neutros do tipo [Pt^{II}(Pz)₂Cl₂], sugerindo que a coordenação do ligante derivado do pirazol ocorre de forma monodentada. Os espectros de infravermelho corroboram o modo de coordenação proposto, e sugerem que a ligação Pt-N se dá por meio do átomo de nitrogênio piridínico (não hidrogenado) aos dois ligantes na estrutura dos complexos. Tal conclusão é evidenciada pela ausência de diferenças significativas nos espectros dos complexos em comparação com os espectros dos ligantes livres e à presença da banda referente ao estiramento da ligação NH. Outro importante resultado que corrobora com esta estrutura são os resultados obtidos da resolução de suas estruturas por difração de raios X de monocristal que confirmou não apenas a coordenação monodentada neutra ao redor do átomo de platina, como também a manutenção da aromaticidade do anel pirazol evidenciado pelas distâncias de ligação.

Os espectros de RMN de ¹H, ¹³C{¹H} e DEPT 135 mostraram que os complexos apresentam, em solução, rotação em torno das ligações Pt-N, bem como acoplamento heteronuclear entre os átomos de hidrogênio, carbono e flúor, o que resultou em espectros complexos. Além disso, o RMN de ¹⁹⁵Pt{¹H} em solução de DMF-*d*₇ resultou em um sinal para os complexos na região de -1950 ppm, o que está de acordo com a esfera de coordenação da platina em geometria quadrática plana, com dois ligantes nitrogenados e dois cloretos, confirmada pela estrutura de raios X. Também foi observada a presença de moléculas de solventes de cristalização na rede cristalina dos três complexos, que são importantes na estabilização das mesmas, através de ligações de hidrogênio clássicas e não-clássicas de forças moderada a fraca. Além disso, analisando-se os ângulos interplanares nota-se que os fragmentos fenil não se encontram planares em relação ao anel pirazólico ou entre si na estrutura dos complexos.

A não-planaridade entre os ligantes observada nas estruturas cristalográficas dos complexos dão indício da impossibilidade de se estabelecer interações significativas do tipo π - π *stacking* entre os complexos e as bases nitrogenadas do DNA. O estudo da interação dos ligantes e complexos com ctDNA através de titulações espectrofotométricas e espectrofluorométricas mostraram interações reversíveis de força moderada com ctDNA pelo sulco maior, descartando-se a interação do tipo intercalação por não haver competição com o brometo de etídio nas condições avaliadas. Outras interações irreversíveis com DNA foram investigadas a partir do experimento de eletroforese em gel de agarose, que demonstraram a capacidade dos complexos em alterar a estrutura desta importante biomolécula, de forma dose-dependente e ainda dependente do substituinte fenil no ligante, especialmente no **C3**. Dessa maneira, podemos entender que o DNA é, possivelmente, o alvo biomolecular destes complexos de platina(II) e pode estar relacionado à citotoxicidade dos mesmos, assim como a cisplatina.

Para interações com a BSA, os estudos espectrofotométricos revelam prováveis interações hidrofóbicas na região dos resíduos de triptofano da proteína, com constantes de ligação da ordem de 10^5 L mol⁻¹ para **C1** e **C2** sugerindo que podem interagir de forma moderada, sendo transportados ou retidos pela BSA. Porém, **C3** se diferencia dos demais apresentando K_b 10 vezes menor, o que caracteriza uma fraca interação com a BSA, podendo o complexo driblar esta molécula rica em tiol e aumentar a disponibilidade ao alvo. Ensaios de viabilidade celular mostraram que os complexos são citotóxicos às linhagens de carcinoma mamário murino 4T1 (**C1**: IC₅₀ = 7,5 μ M, **C2**: IC₅₀ = 22,9 μ M, **C3**: IC₅₀ = 20,8 μ M), melanoma metastático murino B16F10 (**C1**: IC₅₀ = 8,3 μ M, **C2**: IC₅₀ = 17,7 μ M, **C3**: IC₅₀ = 14,9 μ M) e fibroblastos de rim de hamster BHK-21 (**C1**: IC₅₀ = 5,9 μ M, **C2**: IC₅₀ = 9,5 μ M, **C3**: IC₅₀ = 12,4 μ M, célula normal), sendo o complexo **C1** mais ativo, com valores próximos à cisplatina. De modo geral, a linhagem B16F10 foi aquela que apresentou menor atividade proliferativa frente aos compostos. Dentre os ligantes, o **L2** e **L3** apresentaram alguma atividade inibitória nas condições avaliadas. Importante notar que o potencial biológico dos ligantes é sistematicamente aumentado a partir da coordenação ao átomo de platina. No entanto, os complexos não apresentaram seletividade, o que pode limitar seu uso como agentes antitumorais.

A fim de se investigar a influência de biomoléculas conhecidas como alvos biológicos de alguns fármacos, como BSA e GSH (outra importante fonte de tiol), na citotoxicidade dos complexos, foi realizado estudo de viabilidade celular na linhagem mais promissora, a B16F10. Os resultados mostraram que os complexos **C1** e **C2** sofrem a diminuição do potencial citotóxico, tanto na presença de BSA quanto GSH adicionadas exogenamente ao meio de cultura, enquanto a atividade antiproliferativa de **C3** permaneceu inalterada neste ensaio. Pode-se concluir, portanto, que **C3** não interage significativamente com estas biomoléculas. Além disso, para os complexos foi demonstrada a capacidade de interagirem com o DNA plasmidial e alterarem a quantidade relativa dos isômeros conformacionais da biomolécula. **C3** foi capaz de conduzir praticamente toda a forma SC às formas OC e L, na mais alta e mais baixa concentrações experimentais.

Em suma, os objetivos inicialmente propostos foram alcançados: os complexos de platina(II) e ligantes derivados do pirazol foram obtidos e caracterizados. Os ligantes, apesar de inativos na sua forma livre nas linhagens utilizadas, mostraram importante papel na relação estrutura-atividade dos complexos, em que o complexo **C3** tem comportamento bastante distinto dos demais. O DNA pode ser considerado um provável alvo biológico para os complexos, assim como a BSA e a GSH prováveis interferentes ou carreadores para os complexos **C1** e **C2**, mas não para **C3**. Assim sendo, como perspectivas futuras pretende-se verificar através de estudos computacionais, como o *docking* molecular, os mecanismos de ação sugeridos neste trabalho e a melhor identificação da influência do substituinte no ligante. Além disso, espera-se obter complexos de ligantes derivados do pirazol com outros centros metálicos bioativos, como o paládio e ouro.

Referências

- (1) INCA. INCA. 2017.
- (2) Ferlay, J.; Soerjomataram I Fau - Dikshit, R.; Dikshit R Fau - Eser, S.; Eser S Fau - Mathers, C.; Mathers C Fau - Rebelo, M.; Rebelo M Fau - Parkin, D. M.; Parkin Dm Fau - Forman, D.; Forman D Fau - Bray, F.; Bray, F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012.
- (3) Almeida, V. L. de; Leitão, A.; Reina, L. del C. B.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L.; Lopes, M. T. P. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos Que Interagem Com o DNA: Uma Introdução. *Quim. Nova* **2005**, *28*, 118–129.
- (4) Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia Coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* **1965**, *205* (4972), 698–699. <https://doi.org/10.1038/205698a0>.
- (5) Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature* **1969**, *222* (5191), 385–386. <https://doi.org/10.1038/222385a0>.
- (6) Rosenberg, B. Fundamental Studies with Cisplatin. *Cancer* **1985**, *55* (10), 2303-16. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19850515\)55:10<2303::aid-cncr2820551002>3.0.co;2-l](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19850515)55:10<2303::aid-cncr2820551002>3.0.co;2-l).
- (7) Jamieson, E. R.; Lippard, S. J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2467–2498. <https://doi.org/10.1021/cr980421n>.
- (8) Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Pérez, J. M. Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (3), 645–662. <https://doi.org/10.1021/cr020010d>.
- (9) Kelland, L. The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **2007**, *7* (8), 573–584. <https://doi.org/10.1038/nrc2167>.
- (10) Victoria, C.; Miguel, A. F.; Josefina, C.; Carlos, A.; Celia Quevedo and Jose, M. P. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2007**, *7* (1), 3–18. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/187152007779314044>.
- (11) Brabec, V.; Kašpárková, J.; Vrána, O.; Nováková, O.; Cox, J. W.; Qu, Y.; Farrell, N. DNA Modifications by a Novel Bifunctional Trinuclear Platinum Phase I Anticancer Agent. *Biochemistry* **1999**, *38* (21), 6781–6790. <https://doi.org/10.1021/bi990124s>.
- (12) Hegmans, A.; Berners-Price, S. J.; Davies, M. S.; Thomas, D. S.; Humphreys, A. S.; Farrell, N. Long Range 1,4 and 1,6-Interstrand Cross-Links Formed by a Trinuclear Platinum Complex. Minor Groove Preassociation Affects Kinetics and Mechanism of Cross-Link Formation as Well as Adduct Structure. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (7), 2166–2180. <https://doi.org/10.1021/ja036105u>.
- (13) Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J. The Next Generation of

- Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem Rev* **2016**, *116* (5), 3436–3486. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00597>.
- (14) Kenny, R. G.; Chuah, S. W.; Crawford, A.; Marmion, C. J. Platinum(IV) Prodrugs – A Step Closer to Ehrlich’s Vision? *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017* (12), 1596–1612. <https://doi.org/10.1002/ejic.201601278>.
- (15) Gibson, D. Multi-Action Pt(IV) Anticancer Agents; Do We Understand How They Work? *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *191*, 77–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.11.008>.
- (16) *Metallo-Drugs: Development and Action of Anticancer Agents*; Sigel, A., Sigel, H., Freisinger, E., Sigel, R. K. O., Eds.; Royal Society of Chemistry, **2018**; Vol. 18.
- (17) Gidwani, B.; Vyas, A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, 15. <https://doi.org/10.1155/2015/198268>.
- (18) Browning, R. J.; Reardon, P. J. T.; Parhizkar, M.; Pedley, R. B.; Edirisinghe, M.; Knowles, J. C.; Stride, E. Drug Delivery Strategies for Platinum-Based Chemotherapy. *ACS Nano* **2017**, *11* (9), 8560–8578. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04092>.
- (19) Ishida, S.; Lee, J.; Thiele, D. J.; Herskowitz, I. Uptake of the Anticancer Drug Cisplatin Mediated by the Copper Transporter Ctr1 in Yeast and Mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**, *99* (22), 14298–14302. <https://doi.org/10.1073/pnas.162491399>.
- (20) Jung, Y.; Lippard, S. J. Direct Cellular Responses to Platinum-Induced DNA Damage. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (5), 1387–1407. <https://doi.org/10.1021/cr068207j>.
- (21) Fichtinger-Schepman Am Fau - van der Veer, J. L.; van der Veer JI Fau - den Hartog, J. H.; den Hartog Jh Fau - Lohman, P. H.; Lohman Ph Fau - Reedijk, J.; Reedijk, J. Adducts of the Antitumor Drug Cis-Diamminedichloroplatinum(II) with DNA: Formation, Identification, and Quantitation. *Biochemistry.* **1985**, *24* (3), 707–713. <https://doi.org/10.1021/bi00324a025>
- (22) Kellett, A.; Molphy, Z.; Slator, C.; McKee, V.; Farrell, N. P. Molecular Methods for Assessment of Non-Covalent Metallodrug–DNA Interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48* (4), 971–988. <https://doi.org/10.1039/C8CS00157J>.
- (23) Todd, R. C.; Lippard, S. J. Structure of Duplex DNA Containing the Cisplatin 1,2-{Pt(NH₃)₂}₂+d(GpG) Cross-Link at 1.77Å Resolution. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104* (9), 902–908. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.04.005>.
- (24) Timerbaev, A. R.; Hartinger, C. G.; Aleksenko, S. S.; Keppler, B. K. Interactions of Antitumor Metallodrugs with Serum Proteins: Advances in Characterization Using Modern Analytical Methodology. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (6), 2224–2248. <https://doi.org/10.1021/cr040704h>.
- (25) Massai, L.; Pratesi, A.; Gailer, J.; Marzo, T.; Messori, L. The Cisplatin/Serum Albumin System: A Reappraisal. *Inorg. Chim. Acta.* **2019**, (495), 118983–118989. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.118983>

- (26) Bal, W.; Sokolowska, M.; Kurowska, E.; Faller, P. Binding of Transition Metal Ions to Albumin: Sites, Affinities and Rates. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1830* (12), 5444–5455. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.018>.
- (27) Benzi, G.; Moretti, A. Are Reactive Oxygen Species Involved in Alzheimer's Disease? *Neurobiol Aging* **1995**, *16* (4), 661–674. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)00066-n](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)00066-n).
- (28) Xiaoyong Wang and Zijian, G. The Role of Sulfur in Platinum Anticancer Chemotherapy. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2007**, *7* (1), 19–34. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/187152007779314062>.
- (29) Chiang, L.; Jones, M. R.; Ferreira, C. L.; Storr, T. Multifunctional Ligands in Medicinal Inorganic Chemistry--Current Trends and Future Directions. *Curr Top Med Chem* **2012**, *12* (3), 122–144. <https://doi.org/10.2174/156802612799078973>.
- (30) Klein, A. V.; Hambley, T. W. Platinum-Based Anticancer Agents. In *Ligand design in medicinal inorganic chemistry*; 2014. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118697191.ch2>.
- (31) Areas, E. S.; de Assunção Paiva, J. L.; Ribeiro, F. V.; Pereira, T. M.; Kummerle, A. E.; Silva, H.; Guedes, G. P.; Cellis do Nascimento, A. C.; da Silva Miranda, F.; Neves, A. P. Redox-Activated Drug Delivery Properties and Cytotoxicity of Cobalt Complexes Based on a Fluorescent Coumarin- β -Keto Ester Hybrid. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2019**, *2019* (37), 4031–4039. <https://doi.org/10.1002/ejic.201900734>.
- (32) Pérez, J.; Riera, L. Pyrazole Complexes and Supramolecular Chemistry. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, *2009* (33), 4913–4925. <https://doi.org/10.1002/ejic.200900694>.
- (33) LC, B.; R, F.; CH, J. *Chemistry of Heterocyclic Compounds: Pyrazoles, Pyrazolines, Pyrazolidines, Indazoles and Condensed Rings*; **1967**; Vol. 22.
- (34) Faria, J. V.; Vegi, P. F.; Miguita, A. G. C.; Dos Santos, M. S.; Boechat, N.; Bernardino, A. M. R. Recently Reported Biological Activities of Pyrazole Compounds. *Bioorg Med Chem* **2017**, *25* (21), 5891–5903. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.035>.
- (35) Karrouchi, K.; Radi, S.; Ramli, Y.; Taoufik, J.; Mabkhot, Y. N.; Al-Aizari, F. A.; Ansar, M. Synthesis and Pharmacological Activities of Pyrazole Derivatives: A Review. *Molecules* **2018**, *23* (1). <https://doi.org/10.3390/molecules23010134>.
- (36) Ansari, A.; Ali, A.; Asif, M.; Shamsuzzaman. Review: Biologically Active Pyrazole Derivatives. *New J. Chem.* **2017**, *41* (1), 16–41. <https://doi.org/10.1039/C6NJ03181A>.
- (37) Keter, F. K.; Darkwa, J. Perspective: The Potential of Pyrazole-Based Compounds in Medicine. *BioMetals* **2012**, *25* (1), 9–21. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9496-4>.
- (38) Sakai, K.; Tomita, Y.; Ue, T.; Goshima, K.; Ohminato, M.; Tsubomura, T.; Matsumoto, K.; Ohmura, K.; Kawakami, K. Syntheses, Antitumor Activity, and Molecular Mechanics Studies of Cis-PtCl₂(PzH)₂ (PzH=pyrazole) and Related

- Complexes. Crystal Structure of a Novel Magnus-Type Double-Salt [Pt(PzH)₄][PtCl₄][Cis-PtCl₂(PzH)₂]₂ Involving Two Perpendicularly Aligned 1D Chain. *Inorganica Chim. Acta* **2000**, 297 (1), 64–71. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(99\)00287-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0020-1693(99)00287-X).
- (39) Komeda, S.; Lutz, M.; Spek, A. L.; Chikuma, M.; Reedijk, J. New Antitumor-Active Azole-Bridged Dinuclear Platinum(II) Complexes: Synthesis, Characterization, Crystal Structures, and Cytotoxic Studies. *Inorg. Chem.* **2000**, 39 (19), 4230–4236. <https://doi.org/10.1021/ic000273v>.
- (40) Naim, M. J.; Alam, O.; Nawaz, F.; Alam, M. J.; Alam, P. Current Status of Pyrazole and Its Biological Activities. *J Pharm Bioallied Sci* **2016**, 8 (1), 2–17. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.171694>.
- (41) Rigaku Oxford Diffraction. CrysAlis PRO. Agilent. CrysAlis PRO. Agilent Technologies Ltd, Yarnton, Oxfordshire, England. **2014**.
- (42) Sheldrick, G. SHELXT - Integrated Space-Group and Crystal-Structure Determination. *Acta Crystallogr. Sect. A* **2015**, 71 (1), 3–8.
- (43) Barnes, C. ORTEP-3 for Windows - a Version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI) by J. Farrugia. *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, 30 (5), 568.
- (44) Macrae, C. F.; Edgington, P. R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Shields, G. P.; Taylor, R.; Towler, M.; van de Streek, J. Mercury: Visualization and Analysis of Crystal Structures. *J. Appl. Crystallogr.* **2006**, 39 (3), 453–457.
- (45) Meister, A. Selective Modification of Glutathione Metabolism. *Science* **1983**, 220 (4596), 472–477. <https://doi.org/10.1126/science.6836290>.
- (46) Neuhoff, S.; Artursson, P.; Zamora, I.; Ungell, A.-L. Impact of Extracellular Protein Binding on Passive and Active Drug Transport across Caco-2 Cells. *Pharm. Res.* **2006**, 23 (2), 350–359. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-9304-3>.
- (47) Benesi, H. a.; Hildebrand, J. H. A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71 (8), 2703–2707. <https://doi.org/10.1021/ja01176a030>.
- (48) Velho, R. G. Medida de Condutividade Na Caracterização de Complexos Inorgânicos: Um Levantamento Bibliográfico, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, 2006.
- (49) Krishnakumar, V.; Jayamani, N.; Mathammal, R. Molecular Structure, Vibrational Spectral Studies of Pyrazole and 3,5-Dimethyl Pyrazole Based on Density Functional Calculations. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2011**, 79 (5), 1959–1968. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.05.100>.
- (50) Zerbi, G.; Alberti, C. Infrared Spectra of Pyrazoles—I: Pyrazoles Mono-Alkyl Substituted. *Spectrochim. Acta* **1962**, 18 (3), 407–423. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0371-1951\(62\)80149-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0371-1951(62)80149-0).
- (51) Raczyńska, E. D.; Kosińska, W.; Ośmiałowski, B.; Gawinecki, R. Tautomeric Equilibria in Relation to Pi-Electron Delocalization. *Chem. Rev.* **2005**, 105 (10), 3561–3612. <https://doi.org/10.1021/cr030087h>.
- (52) Claramunt, R. M.; López, C.; García, M. de los A.; Pierrot, M.; Giorgi, M.; Elguero,

- J. 3(5)-(1-Adamantyl)Pyrazoles: Chemistry and Molecular Structure. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, No. 10, 2049–2053. <https://doi.org/10.1039/B004690F>.
- (53) Aguilar-Parrilla, F.; Cativiela, C.; de Villegas, M. D. D.; Elguero, J.; Foces-Foces, C.; Laureiro, J. I. G.; Cano, F. H.; Limbach, H.-H.; Smith, J. A. S.; Toiron, C. The Tautomerism of 3(5)-Phenylpyrazoles: An Experimental (¹H, ¹³C, ¹⁵N NMR and X-Ray Crystallography) Study. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1992**, No. 10, 1737–1742. <https://doi.org/10.1039/P29920001737>.
- (54) Definition of the Hydrogen Bond (IUPAC Recommendations 2011). *Pure and Applied Chemistry*. **2011**, p 1637. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-01-02>.
- (55) Pretsch, E. P. B. C. A. *Structure Determination of Organic Compounds*; Springer, Berlin, Heidelberg, **2009**. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-93810-1>.
- (56) Gabano, E.; Marengo, E.; Bobba, M.; Robotti, E.; Cassino, C.; Botta, M.; Osella, D. ¹⁹⁵Pt NMR Spectroscopy: A Chemometric Approach. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250* (15), 2158–2174. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.02.011>.
- (57) Paschoal, D.; Guerra, C. F.; de Oliveira, M. A. L.; Ramalho, T. C.; Dos Santos, H. F. Predicting Pt-195 NMR Chemical Shift Using New Relativistic All-Electron Basis Set. *J. Comput. Chem.* **2016**, *37* (26), 2360–2373. <https://doi.org/10.1002/jcc.24461>.
- (58) Akatsu, S.; Kanematsu, Y.; Kurihara, T.; Sueyoshi, S.; Arikawa, Y.; Onishi, M.; Ishizaka, S.; Kitamura, N.; Nakao, Y.; Sakaki, S.; et al. Syntheses and Luminescent Properties of 3,5-Diphenylpyrazolato-Bridged Heteropolynuclear Platinum Complexes. The Influence of Chloride Ligands on the Emission Energy Revealed by the Systematic Replacement of Chloride Ligands by 3,5-Dimethylpyrazolate. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (15), 7977–7992. <https://doi.org/10.1021/ic202663q>.
- (59) Wang, D.-J.; Zheng, C.-Y.; Fan, L. Synthesis, Characterization, and Crystal Structures of New 3,5-Diaryl-1H-Pyrazoles. *J. Mol. Struct.* **2009**, *938* (1), 311–315. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2009.10.001>.
- (60) Jonathan W Steed, J. L. A. *Supramolecular Chemistry*, 2^a; Wiley, 2009.
- (61) Rada, J. P.; Bastos, B. S. M.; Anselmino, L.; Franco, C. H. J.; Lanznaster, M.; Diniz, R.; Fernández, C. O.; Menacho-Márquez, M.; Percebom, A. M.; Rey, N. A. Binucleating Hydrazonic Ligands and Their μ -Hydroxodicopper(II) Complexes as Promising Structural Motifs for Enhanced Antitumor Activity. *Inorg. Chem.* **2019**, *58* (13), 8800–8819. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01195>.
- (62) Knox, R. J.; Friedlos, F.; Lydall, D. A.; Roberts, J. J. Mechanism of Cytotoxicity of Anticancer Platinum Drugs: Evidence That Cis-Diamminedichloroplatinum(II) and Cis-Diammine-(1,1-Cyclobutanedicarboxylato)Platinum(II) Differ Only in the Kinetics of Their Interaction with DNA. *Cancer Res.* **1986**, *46* (4 Pt 2), 1972–1979.

Apêndice

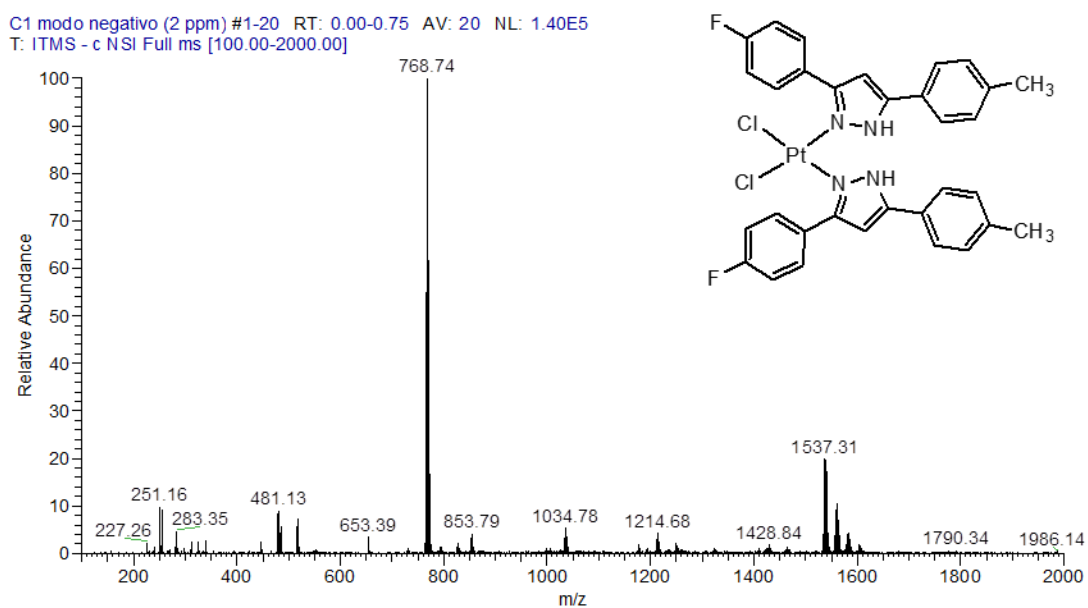


Figura 40 – Espectro ESI(-)-MS do complexo **C1** em metanol.

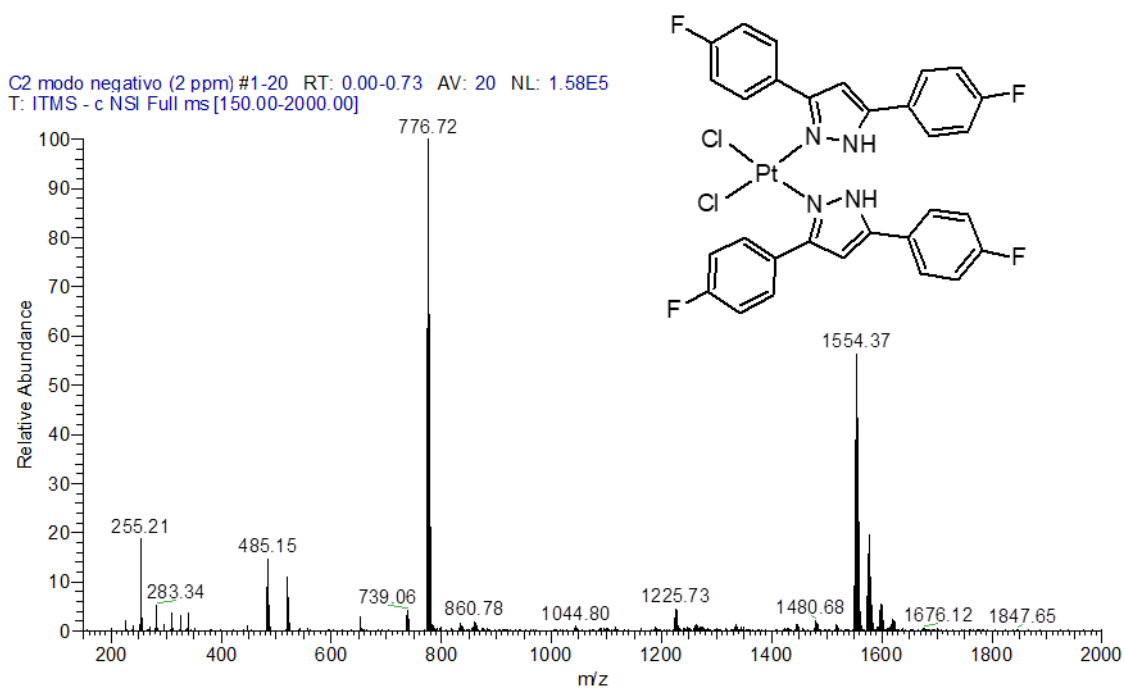


Figura 41 – Espectro ESI(-)-MS do complexo **C2** em metanol.

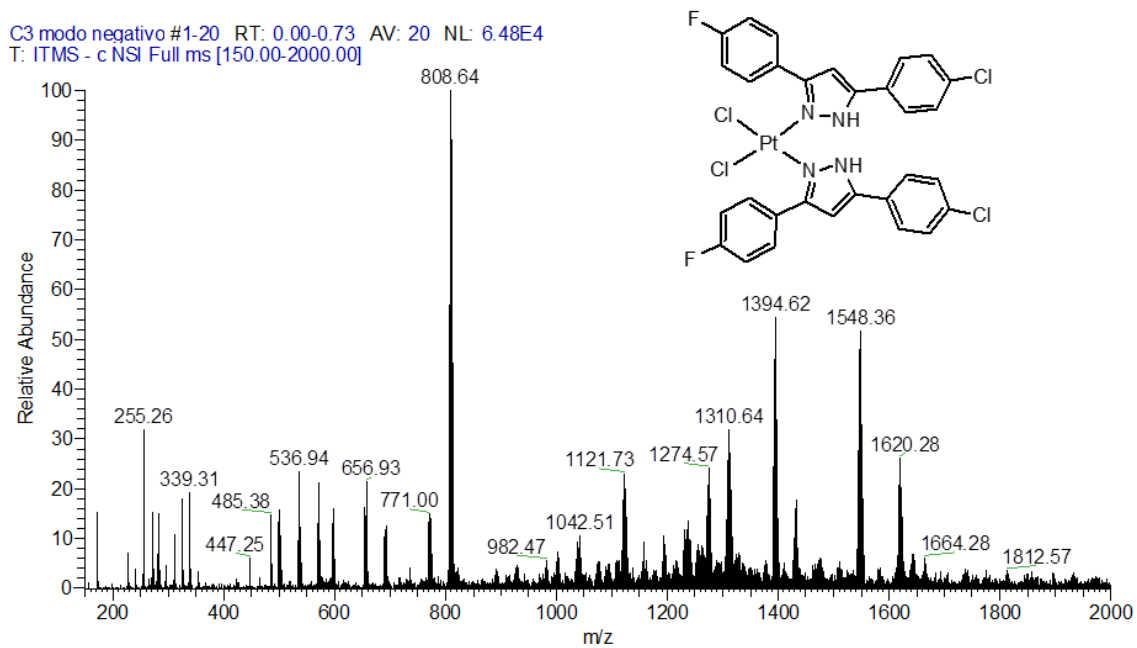


Figura 42 – Espectro ESI(-)-MS do complexo C3 em metanol.

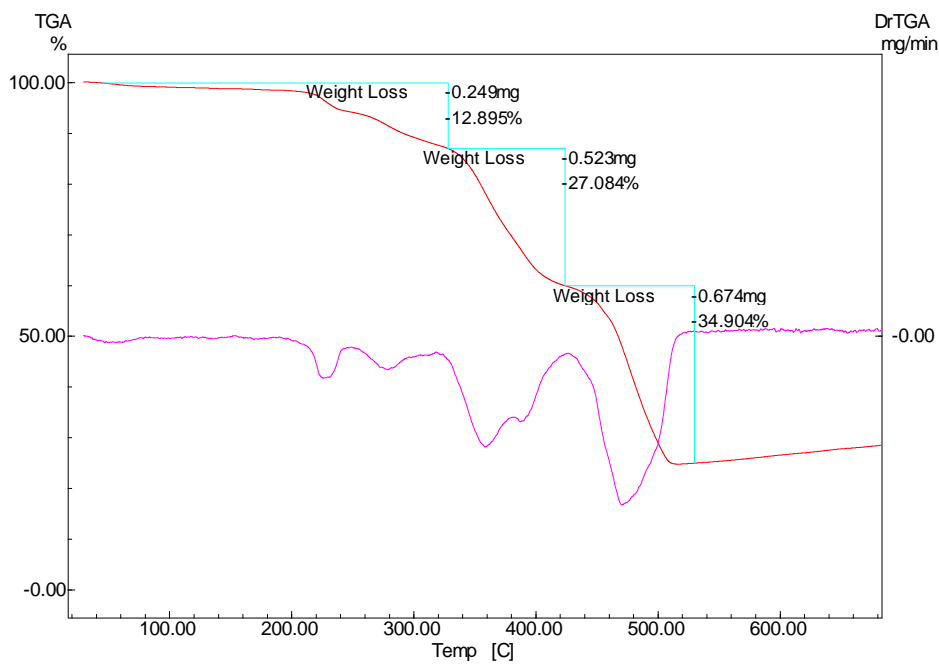


Figura 43 – Análise termogravimétrica do complexo C1 em atmosfera inerte e taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

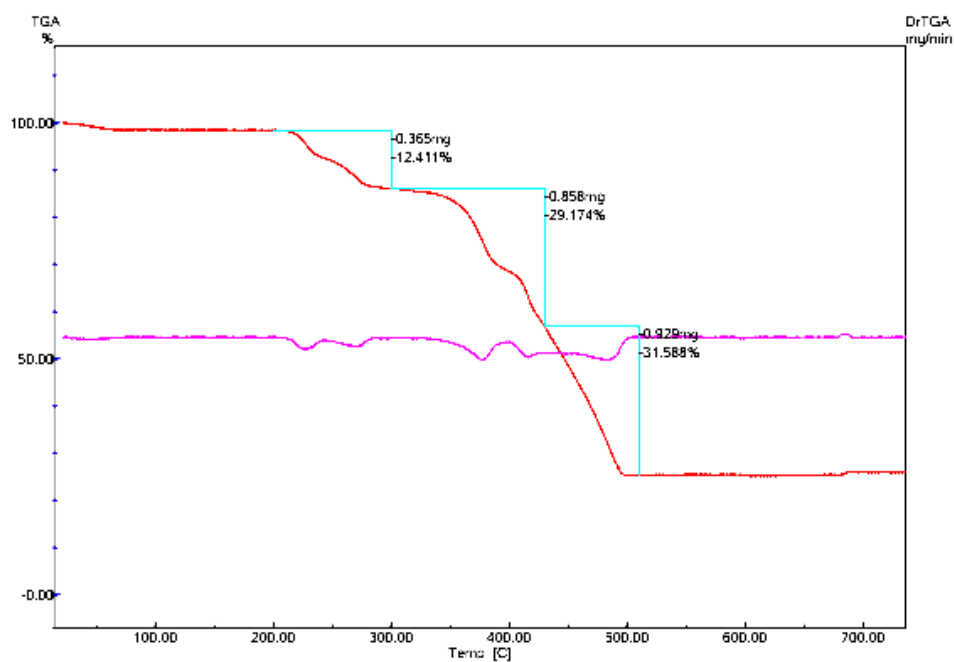


Figura 44 – Análise termogravimétrica do complexo **C2** em atmosfera inerte e taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

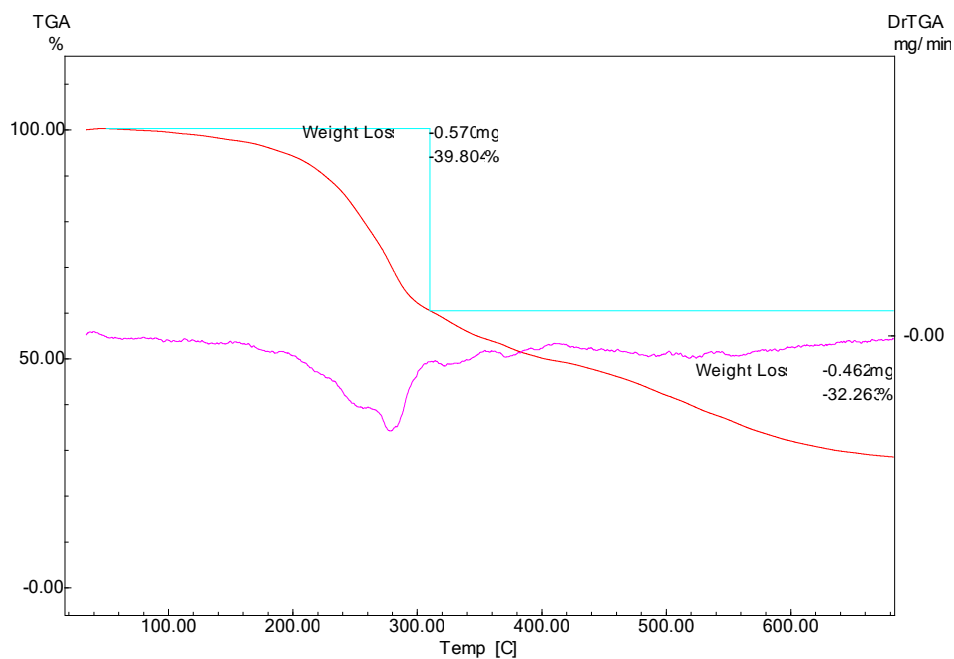


Figura 45 – Análise termogravimétrica do complexo **C3** em atmosfera inerte e taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

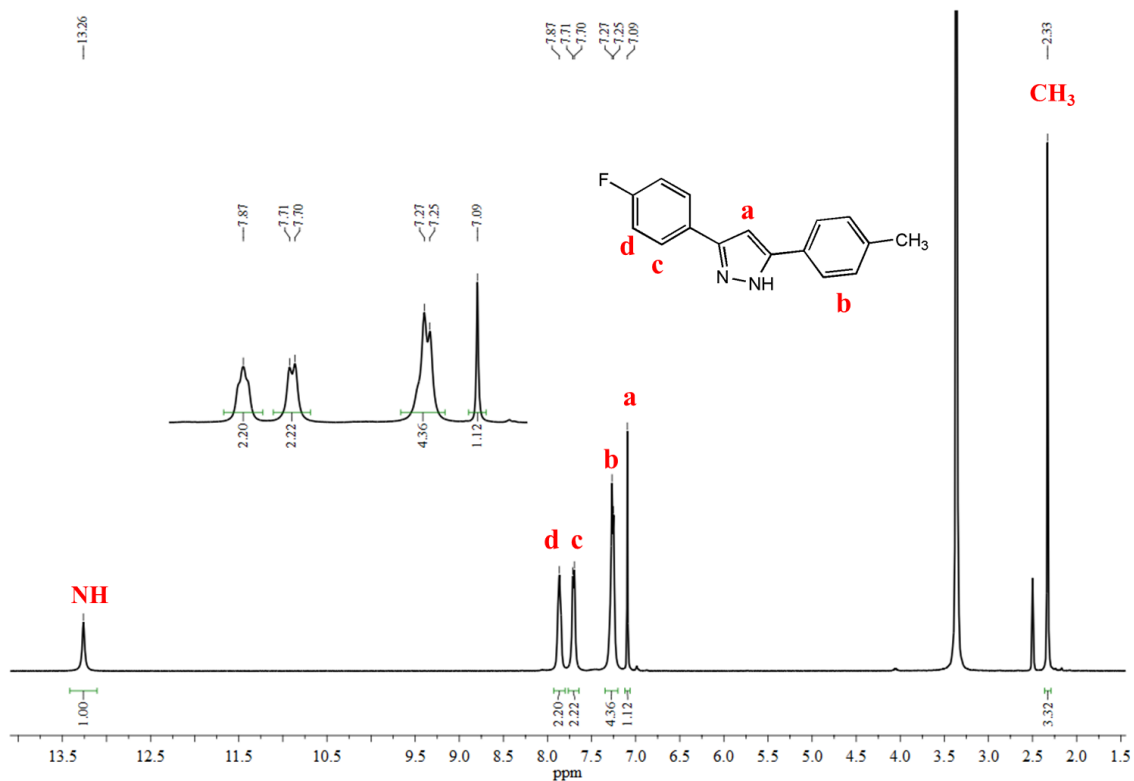


Figura 46 – Espectro de ¹H-RMN do ligante L1 em DMSO-d₆ (δ em ppm) em 400 MHz.

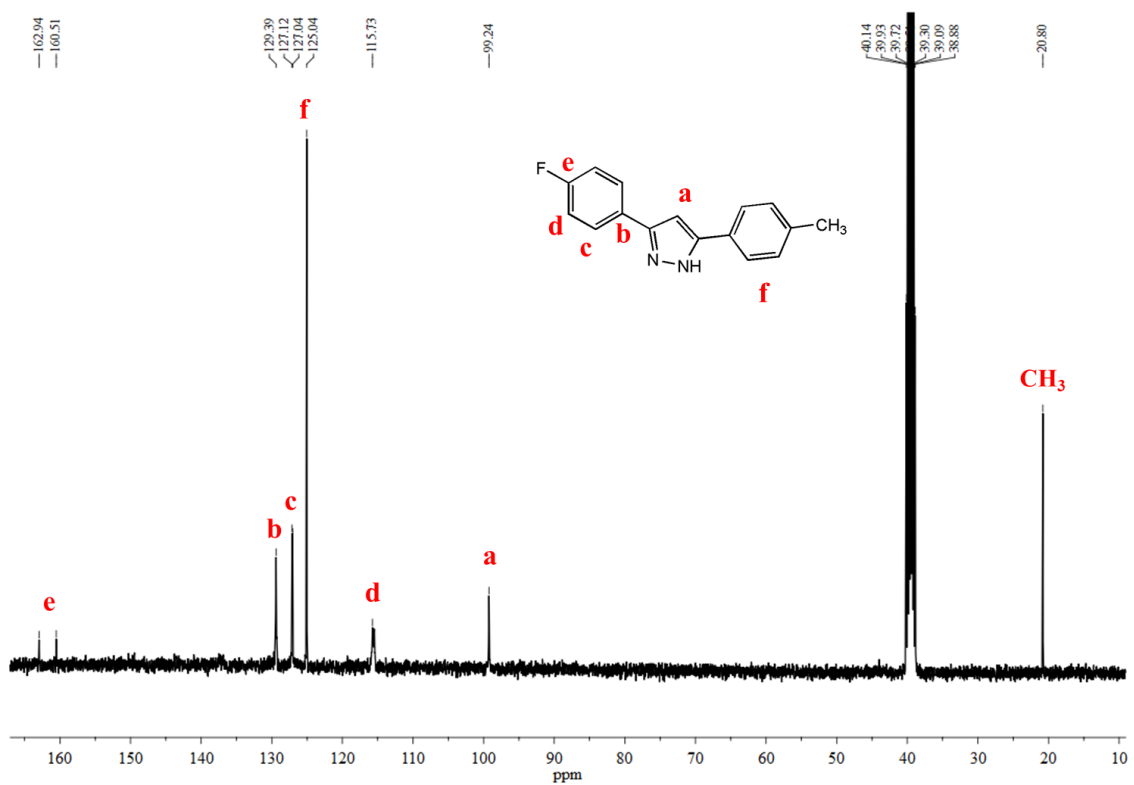


Figura 47 – Espectro de ¹³C-RMN do ligante L1 em DMSO-d₆ (δ em ppm) em 100 MHz.

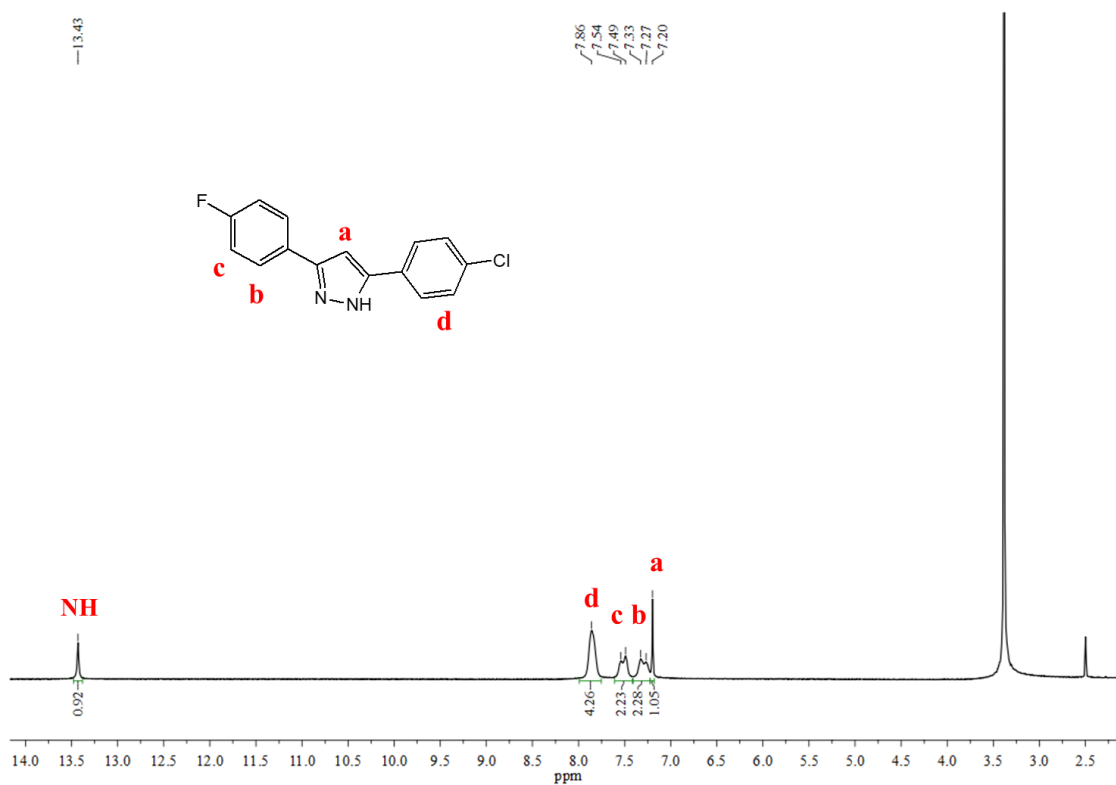


Figura 48 - Espectro de ^1H -RMN do ligante L3 em DMSO- d_6 (δ em ppm) em 400 MHz.

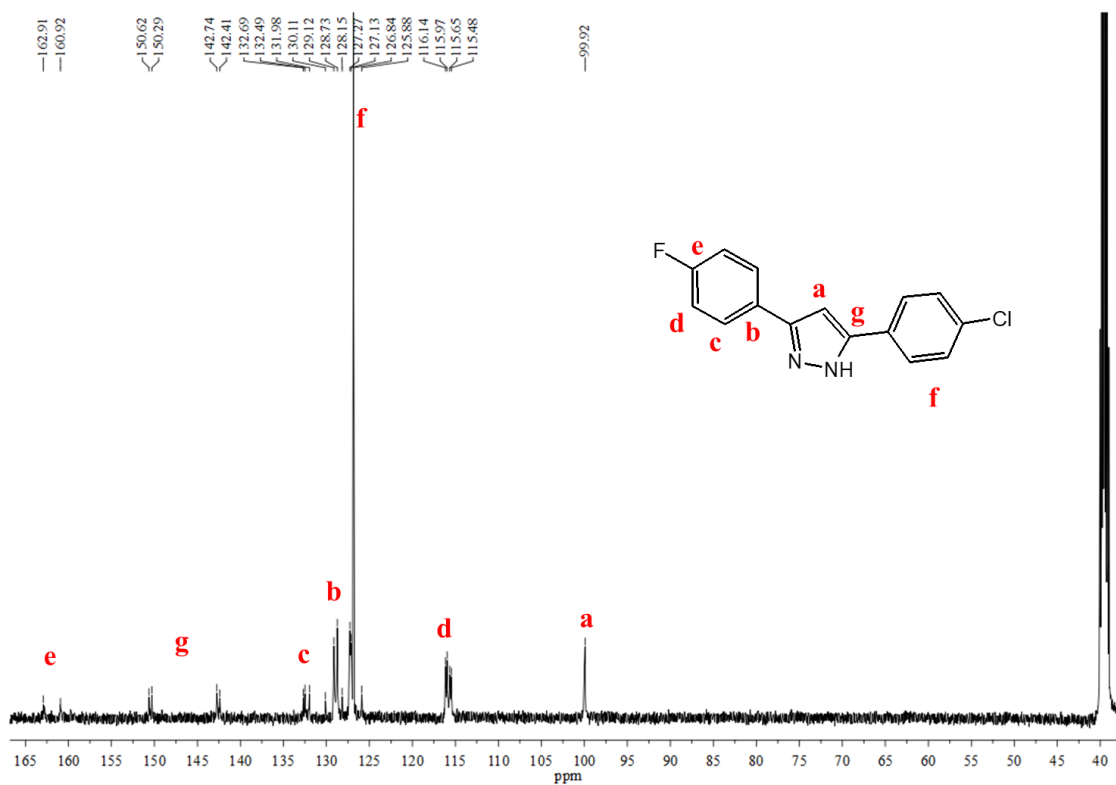


Figura 49 - Espectro de ^{13}C -RMN do ligante L3 em DMSO- d_6 (δ em ppm) em 100 MHz.

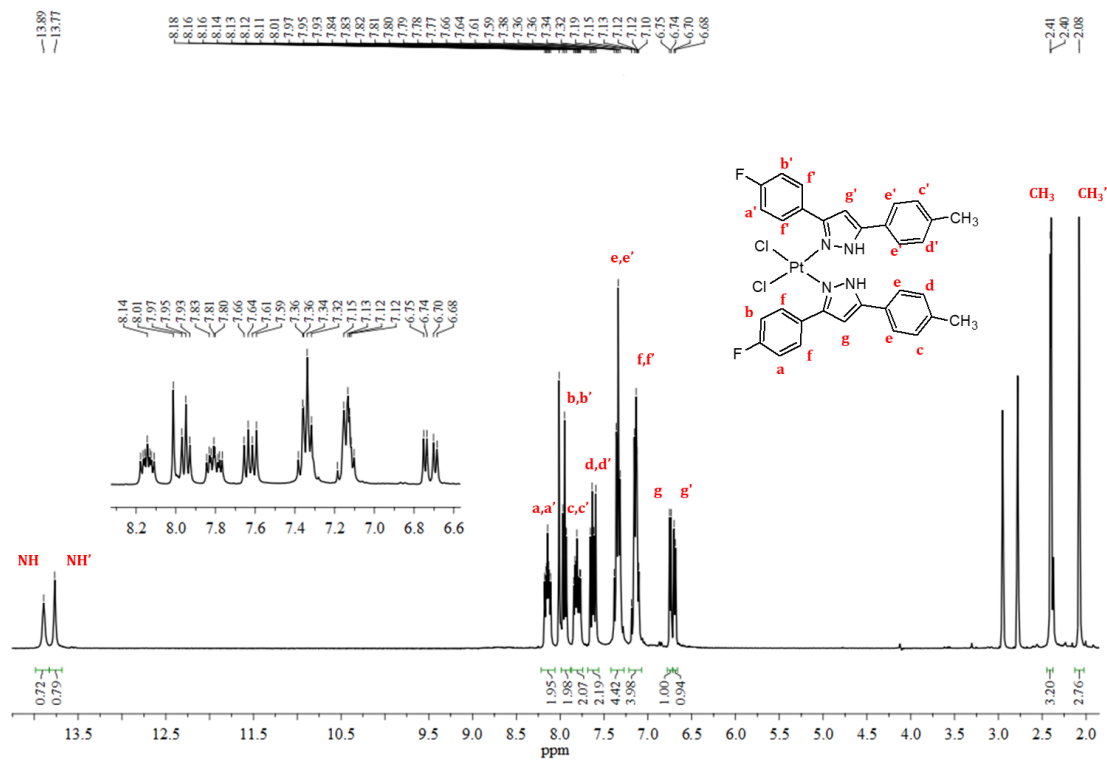


Figura 50 – Espectro de ^1H -RMN do complexo **C1** em DMF- d_7 (δ em ppm) em 400 MHz.

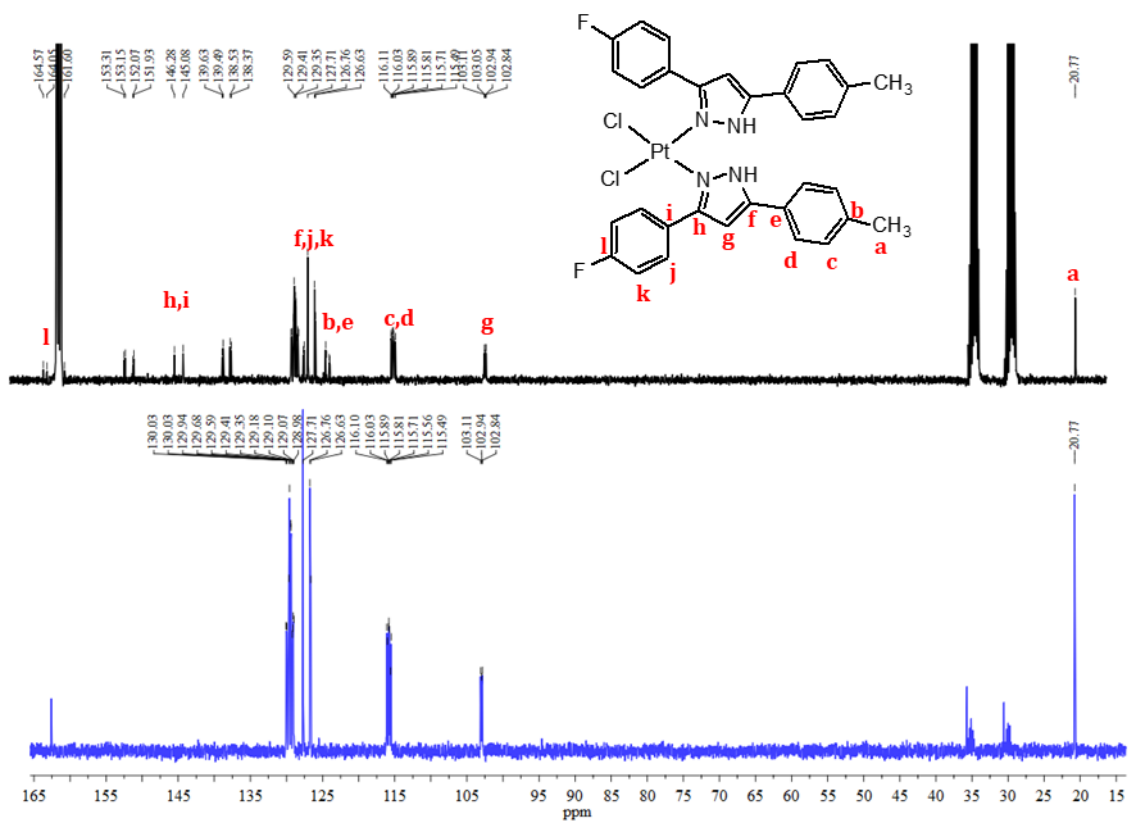


Figura 51 – Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT 135 do complexo **C1** em DMF- d_7 , 100 MHz (δ em ppm).

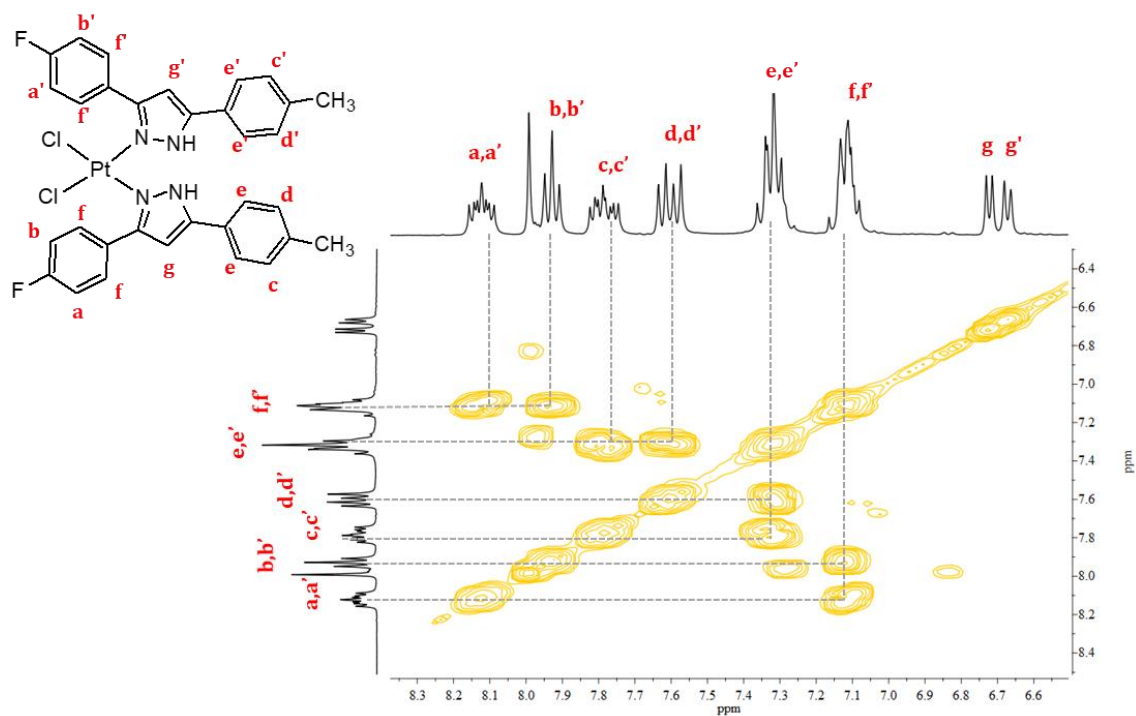


Figura 52 – Espectro COSY do complexo C1 em DMF-d₇.

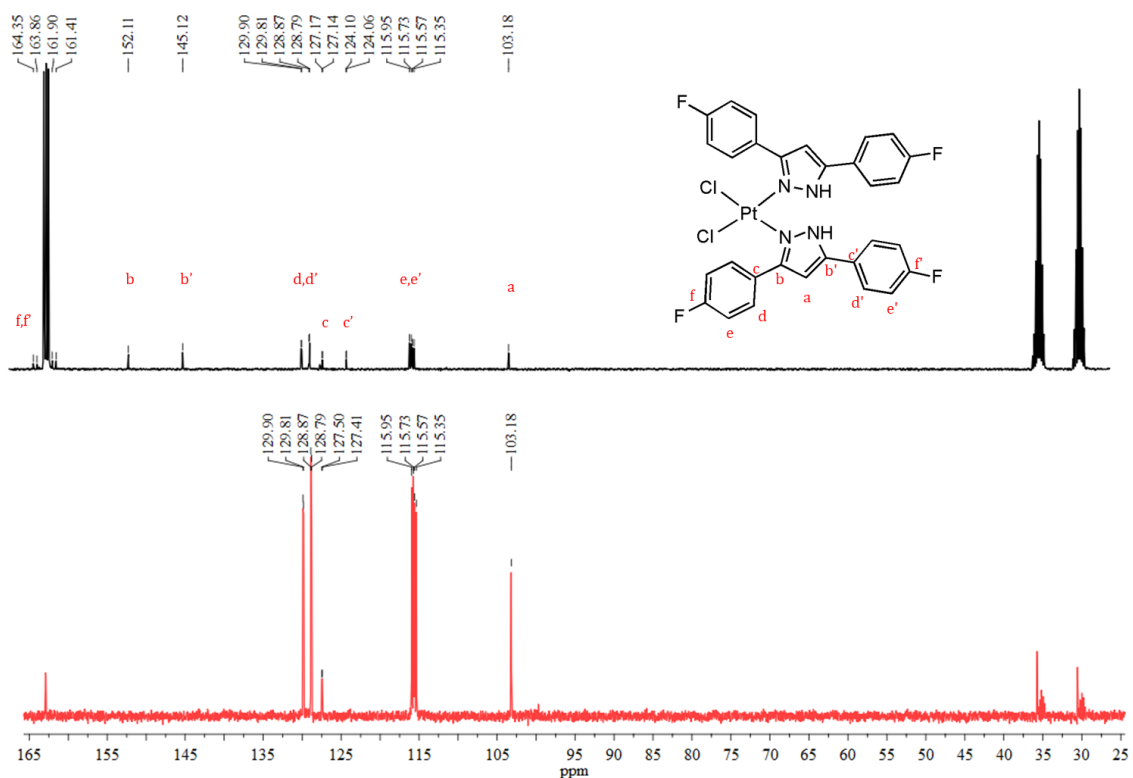


Figura 53 – Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT 135 do complexo C2 em DMF-d₇, 100 MHz (δ em ppm).

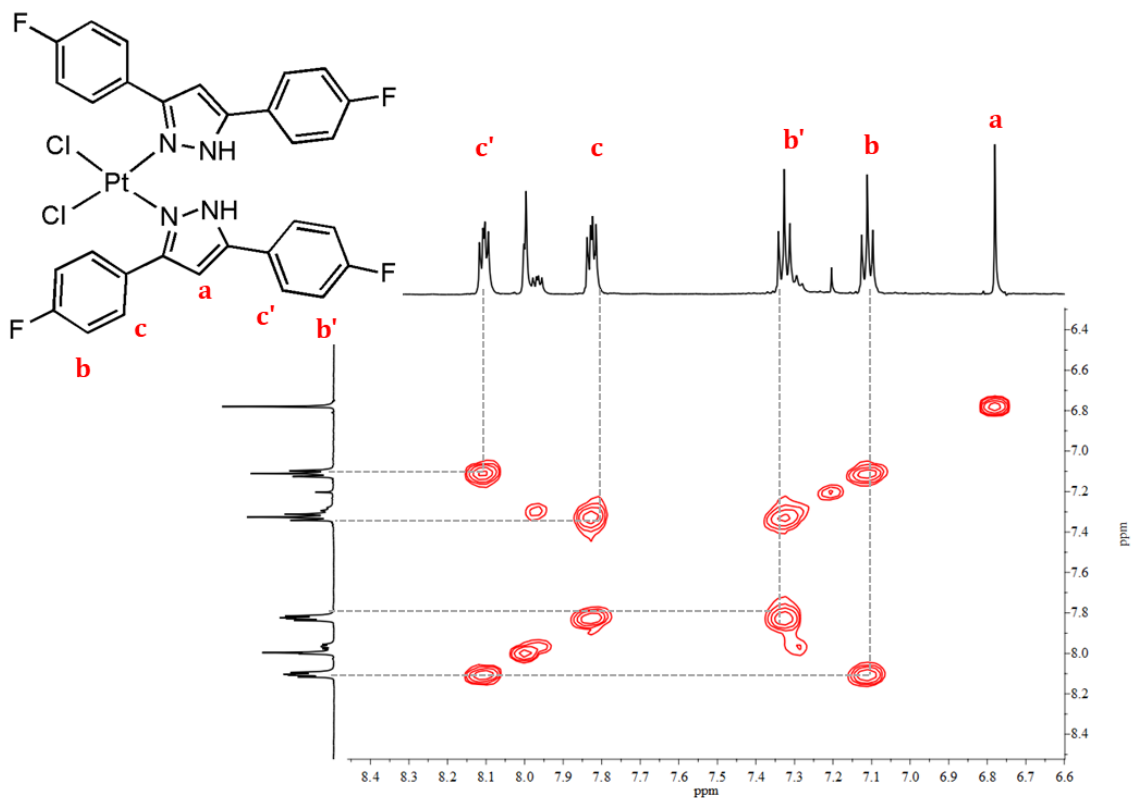


Figura 54 – Espectro COSY do complexo C2 em DMF- d_7 .

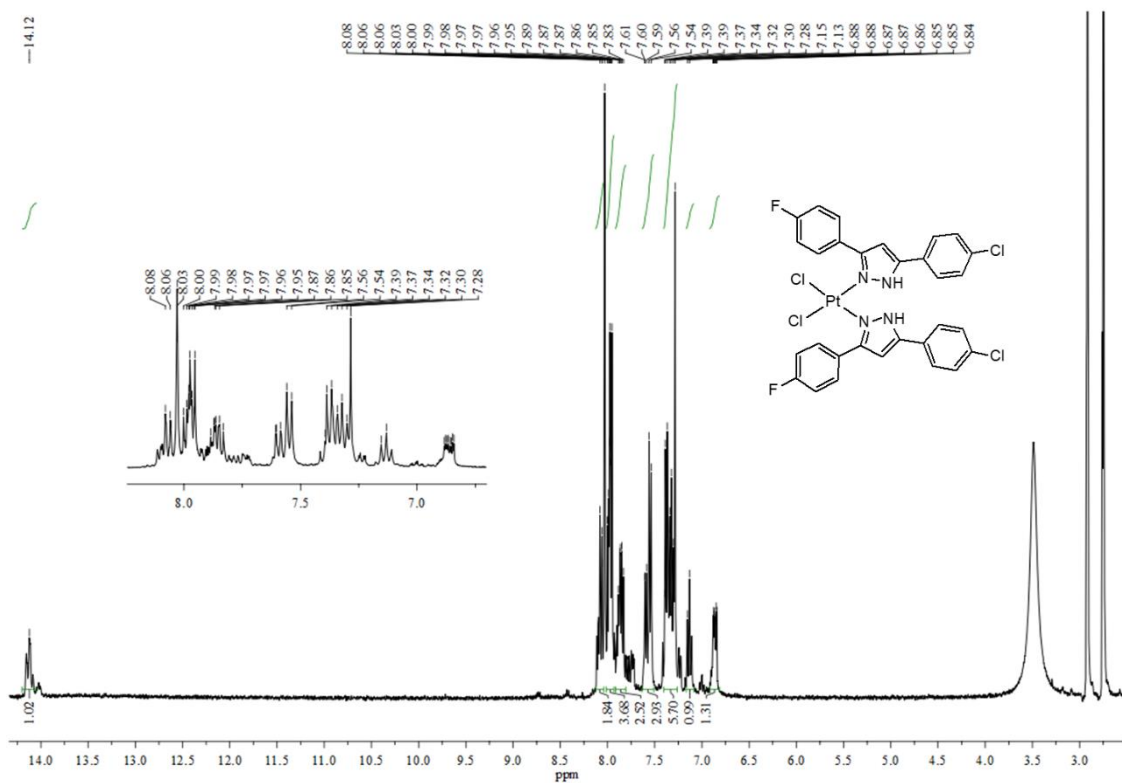


Figura 55 – Espectro de ^1H -RMN do complexo C3 em DMF- d_7 (δ em ppm) em 400 MHz.

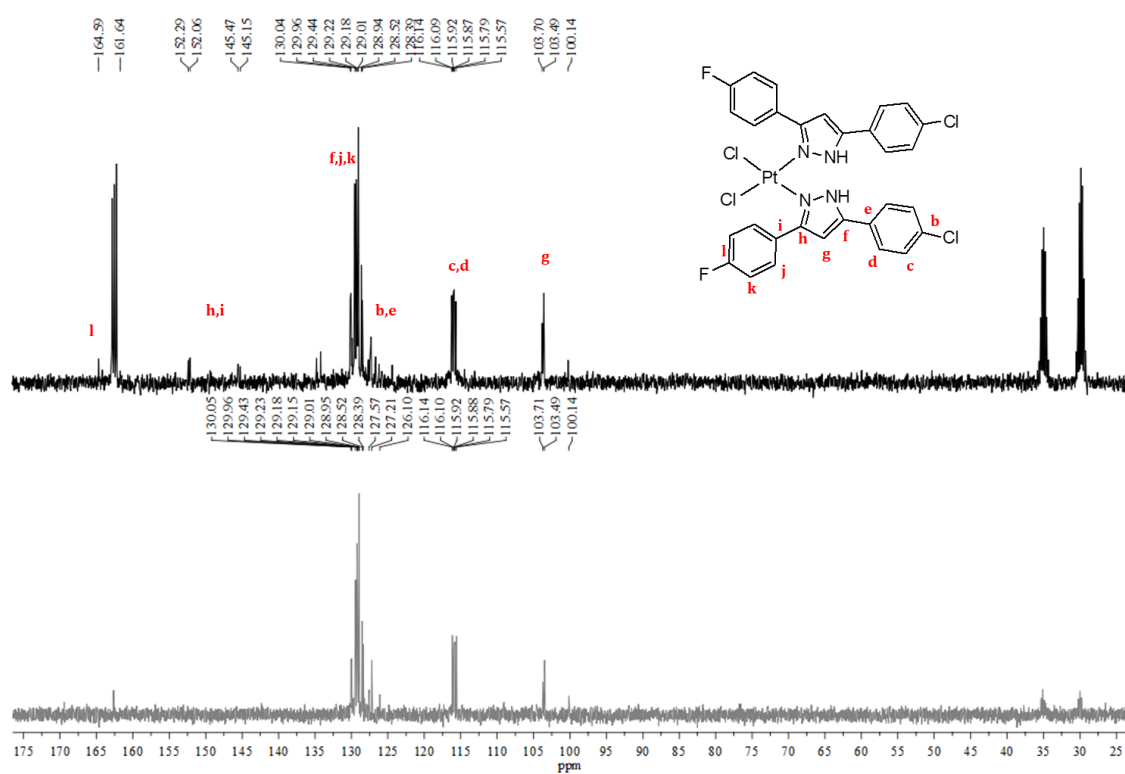


Figura 56 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT 135 do complexo C3 em DMF- d_7 , 100 MHz (δ em ppm).

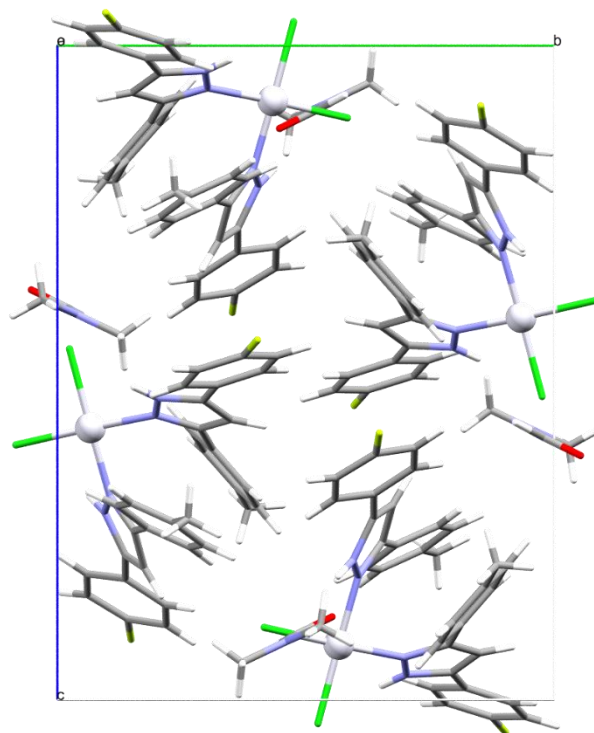


Figura 57 – Vista ao longo de a na célula unitária de C1.

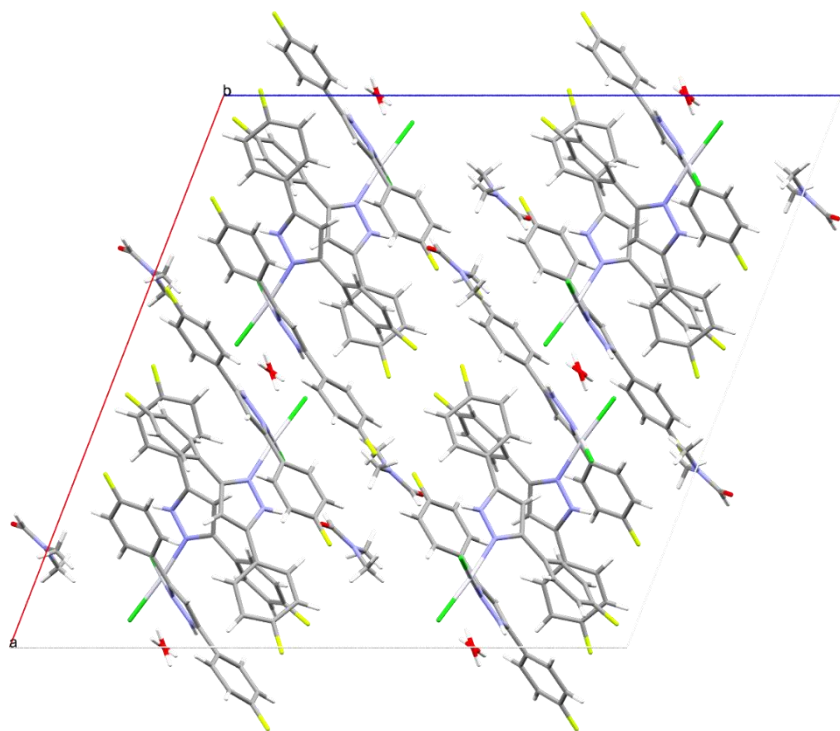


Figura 58 – Vista ao longo de *b* na célula unitária de C2.

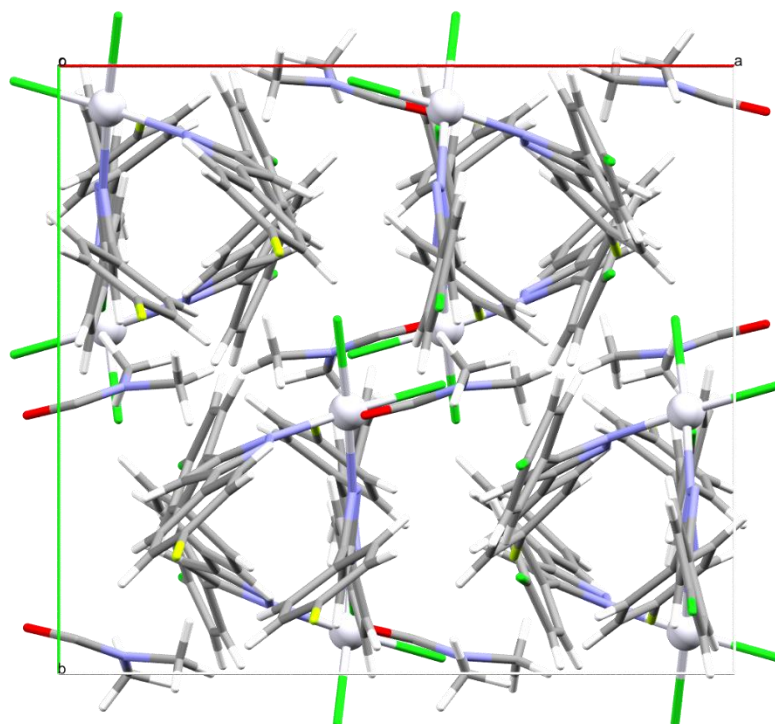


Figura 59 – Vista ao longo de *c* na célula unitária de C3.

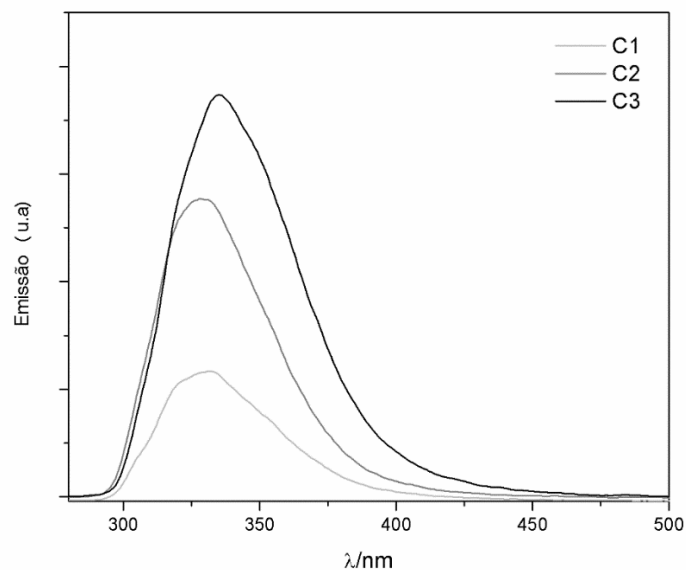


Figura 60 – Espectro de emissão de fluorescência dos complexos **C1**, **C2** e **C3** em solução $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em DMF. $\lambda_{\text{excitação}} = 269 \text{ nm}$.

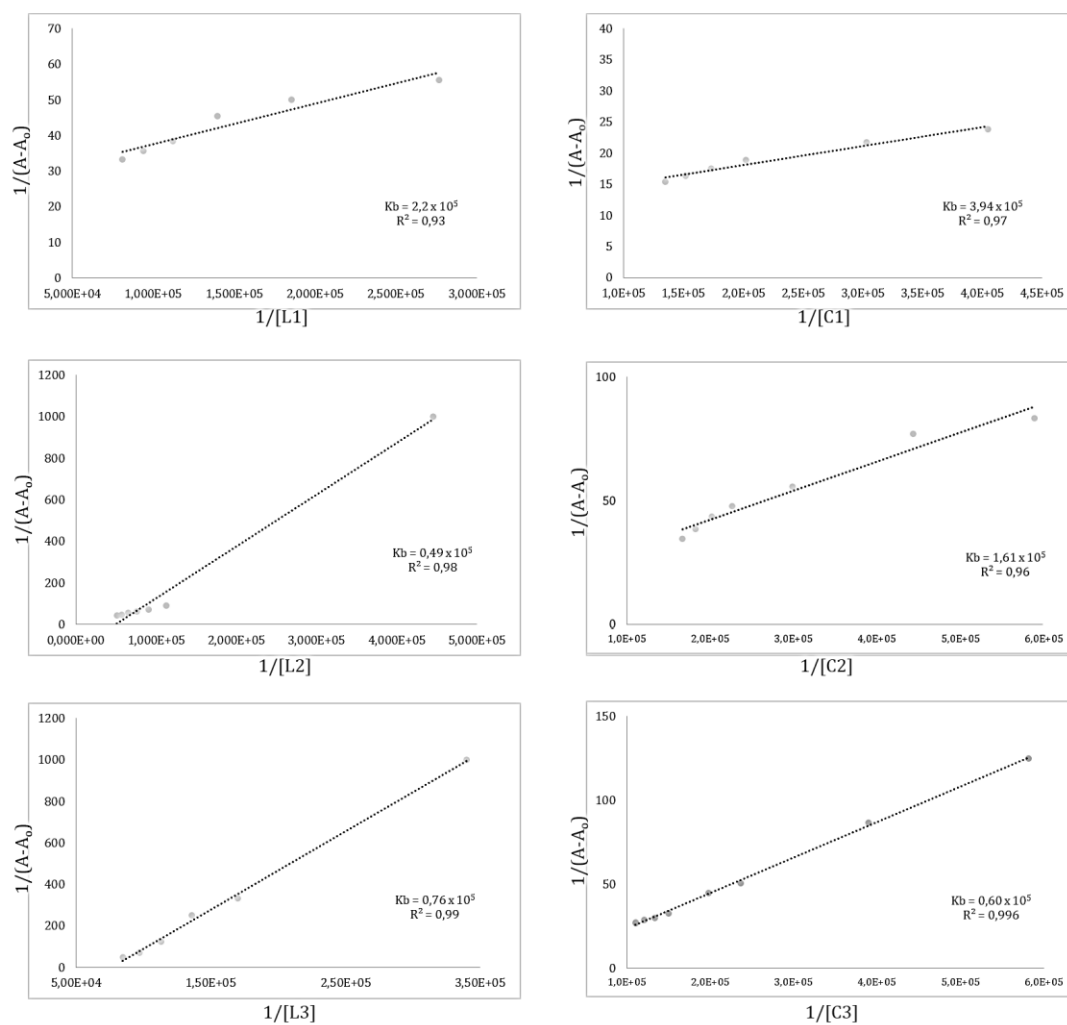


Figura 61 – Curvas obtidas pelo método de Benesi-Hildebrand para a variação espectral da BSA durante a titulação com os compostos.

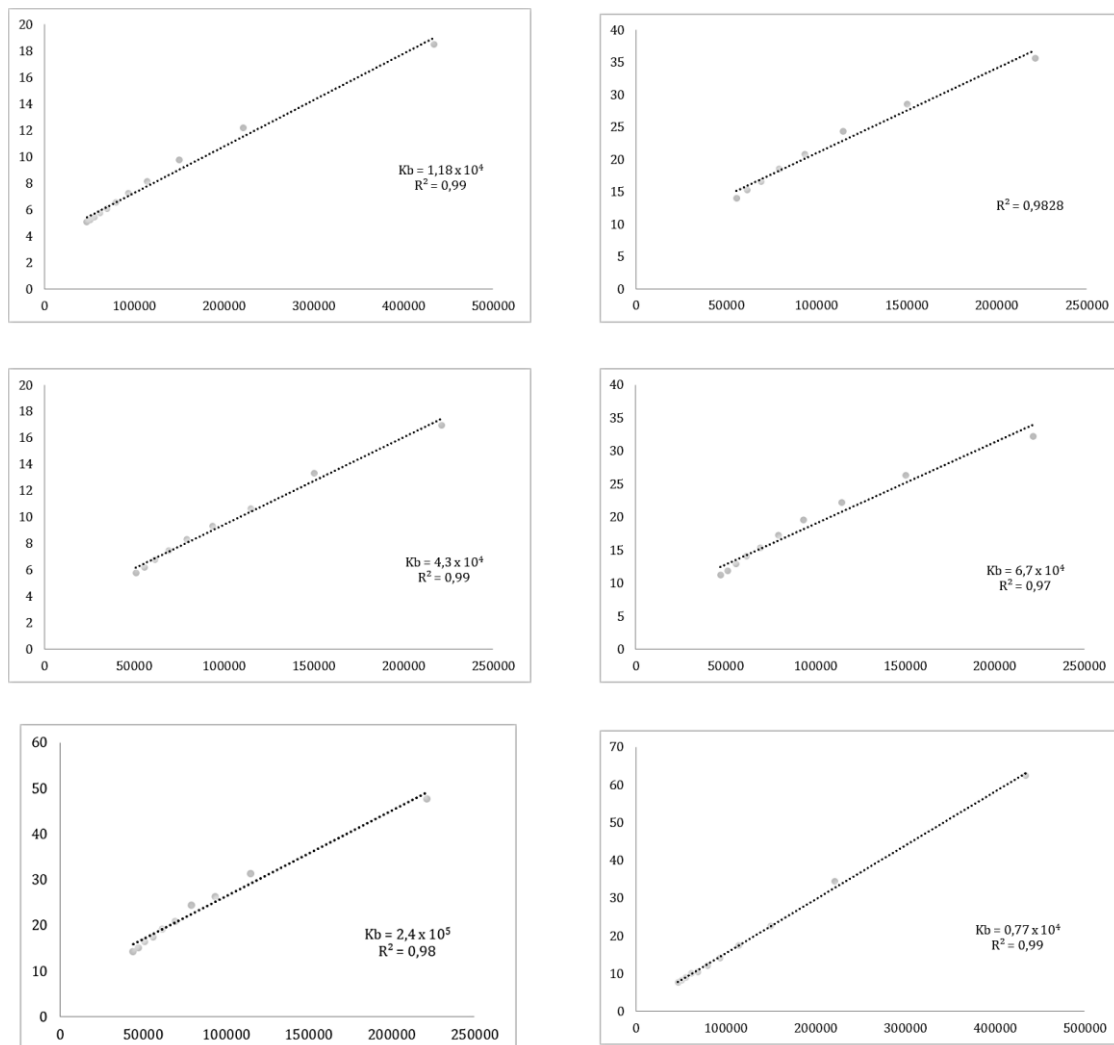


Figura 62 - Curvas obtidas pelo método de Benesi-Hildebrand para a variação espectral dos compostos durante a titulação com o ctDNA.

Anexos

Trabalhos apresentados em congressos

1. **QUERINO, A. L. A.; ENES, K. B.; COURI, M. R. C.; DINIZ, R.; SILVA, H.** Structure and cytotoxic activity of platinum(II) complexes with phenyl-pyrazole ligands. **XXXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química de Minas Gerais, 2018, Juiz de Fora, MG.**
2. **QUERINO, A. L. A.; SILVEIRA, C. H.; DINIZ, R.; IGLESIAS, B. A.; SILVA, H.** Platinum(II)-pyrazole complexes: structure and DNA binding evaluation. **42^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2019, Joinville, SC.**