

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química

Lara Vieira de Almeida Peçanha

**COMPLEXOS DE PALÁDIO(II) E PLATINA(II) COM OXADIAZOIS
FUNCIONALIZADOS COM DIAMINAS: síntese, caracterização e atividade
biológica**

Belo Horizonte

2024

UFMG/ICEX/DQ. 1.628
D.885

Lara Vieira de Almeida Peçanha

**COMPLEXOS DE PALÁDIO(II) E PLATINA(II) COM OXADIAZOIS FUNCIONALIZADOS COM
DIAMINAS: síntese, caracterização e atividade biológica**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Heveline Silva

Belo Horizonte

2024

Ficha Catalográfica

P358c
2024
D Peçanha, Lara Vieira de Almeida.
Complexos de paládio(II) e platina(II) com oxadiazóis funcionalizados com
diaminas [manuscrito] : síntese, caracterização e atividade biológica / Lara Vieira de
Almeida Peçanha. 2024.
84 f. : il., gráfs., tabs.

Orientadora: Heveline Silva.

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

Bibliografia: f. 73-81.

Apêndice: f. 82-84.

1. Química bioinorgânica – Teses. 2. Complexos metálicos – Teses. 3. Ligantes
(Bioquímica) – Teses. 4. Agentes antineoplásicos – Teses. 5. DNA – Teses. 6.
Albumina – Teses. 7. Absorção (Fisiologia) – Teses. 8. Paládio – Teses. 9. Platina –
Teses. I. Silva, Heveline, Orientadora. II. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



"Complexos de Paládio(II) e Platina(II) com Oxadiazóis Funcionalizados com Diaminas: Síntese, Caracterização e Atividade Biológica"

Lara Vieira de Almeida Peçanha

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Heveline Silva - Orientadora
UFMG

Prof. Gilson de Freitas Silva
UFMG

Prof. Guilherme Ferreira de Lima
UFMG

Belo Horizonte, 25 de outubro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Heveline Silva, Servidor(a)**, em 25/10/2024, às 14:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



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

Documento assinado eletronicamente por **Gilson de Freitas Silva, Professor do Magistério Superior**, em 25/10/2024,



às 16:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3669806** e o código CRC **228FDC4B**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar a Deus, por ter guiado meu caminho até aqui. Agradeço por me dar sabedoria, capacidade, força e coragem para superar todos os desafios encontrados nos últimos anos.

Aos meus pais Alcione e Josias, por todas as palavras de incentivo e acolhimento nos momentos em que eu precisava. Obrigada por acreditarem em mim e nos meus sonhos!

À minha irmã Lívia, que sempre foi minha inspiração e orgulho. Obrigada pelo apoio, estímulo e por sempre cuidar de mim. Sou muito grata por ter me dado o Luke, o melhor sobrinho que eu poderia ter! E obrigada ao meu Lulu por tantas alegrias.

À toda minha família, em especial aos meus primos Arthur e Piero, por sempre tornarem meus dias melhores.

À minha família do coração Rejane, Júnior, Levi e Matias, por me incentivarem a estar aqui e por sempre acreditarem em mim.

À minha orientadora Heveline, por ter me aceitado como aluna, pela paciência, cuidado e ensinamentos que vão além do âmbito acadêmico. Toda minha admiração, respeito e agradecimento!

Agradeço a todos os amigos do SibLab e do DQ, Aléxia, Miguel, Ana, Júlia, Alice, Gustavo M., Leandro, Gustavo W., Patrick, e em especial às minhas amigas Katherine, Patrícia e Thaiz, por me aguentarem nos meus melhores e piores dias e por todo auxílio ao longo da pesquisa. Vocês fizeram esses dois anos serem os melhores possíveis!

À Camille e à professora Mara Rúbia pela doação dos ligantes. À professora Juliana e à Bruna pela colaboração nos estudos computacionais.

Aos professores Gilson e Guilherme, pela leitura deste trabalho e contribuições.

Às agências de fomento CAPES, CNPQ e FAPEMIG pelo apoio financeiro para execução deste trabalho. Ao LCPnano, ao LAREMAR e à Facility BioAnalítica NEPS-DQ da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo suporte com análises (bio)químicas.

À UFMG, universidade pública e gratuita de qualidade. Aos funcionários e professores do DQ. A todos aqueles que colaboraram para minha formação e para concretização do meu sonho.

“Nossas maiores conquistas não podem ficar para trás, porque nosso destino está a nossa frente.”
Interestelar

RESUMO

O câncer é a segunda maior causa de mortes no mundo. De acordo com a OMS, foram registrados aproximadamente 20 milhões de novos casos apenas em 2022. Apesar do grande sucesso da cisplatina no tratamento de diversos tipos de câncer, seus efeitos adversos contribuem e evidenciam a necessidade de novos fármacos mais eficazes para o tratamento da doença. Complexos metálicos são muito estudados devido aos bons resultados obtidos em estudos *in vitro* e *in vivo*. Ademais, a utilização de ligantes funcionais biologicamente ativos podem contribuir para a diminuição da toxicidade dos complexos, aumentando sua ação antitumoral, sem prejudicar as células saudáveis. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver quatro complexos inéditos de paládio(II) e platina(II) contendo ligantes formados por tiofeno, oxadiazol e diaminas com o objetivo de se obter potenciais agentes antitumorais. As classes de ligantes utilizadas já apresentam atividades biológicas comprovadas na literatura e se mostram promissores candidatos para o tratamento do câncer. Os ligantes foram caracterizados por ressonância magnética nuclear e espectroscopia vibracional na região do Infravermelho para confirmação de suas estruturas e estabilidade. Os complexos foram caracterizados além das técnicas citadas anteriormente, por análise elementar, espectroscopia Raman e espectrometria de massas. Os resultados evidenciam a obtenção de complexos neutros do tipo $[M^II L_2 Cl_2]$, com bom rendimento e grau de pureza satisfatórios. A atividade citotóxica dos compostos obtidos foi avaliada frente às linhagens tumorais MDA-MB-231 (adenocarcinoma metastático de mama humana) e 4T1 (células de carcinoma mamário murino) e à linhagem saudável MCF-10 (células normais de glândulas mamárias), mostrando que para três dos quatro complexos sintetizados, a complexação com o metal melhora a atividade antiproliferativa. A fim de se entender a relação estrutura-atividade, foi avaliada a interação entre os complexos e as biomoléculas DNA e BSA, por meio de estudos espectrofotométricos e por eletroforese em gel de agarose. Os estudos por titulação espectrofotométrica mostraram interação moderada entre DNA-complexos e interação forte entre BSA-complexos. O experimento de eletroforese mostrou que três dos quatro complexos interagem com o DNA, alterando a conformação do plasmídeo. Estudos teóricos de otimização e estabilidade por RMN foram feitos para investigar o comportamento dos complexos de platina no solvente DMSO. Por fim, estudos ADME *in silico* também foram realizados para todos os complexos sintetizados e mostraram que todos seguem as regras de Lipinski, possuem boa lipofilicidade e inibem enzimas CYP.

Palavras-chave: complexos metálicos; ligantes *N,N*-bidentados; antitumorais; DNA; BSA; ADME.

ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death worldwide. According to the WHO, approximately 20 million new cases were reported in 2022 alone. Despite the great success of cisplatin in treating various types of cancer, its adverse effects highlight the need for new, more effective drugs for treating the disease. Metal complexes have been extensively studied due to the promising results in both in vitro and in vivo studies. Moreover, the use of biologically active functional ligands can help reduce the toxicity of these complexes, enhancing their antitumor activity without harming healthy cells. Therefore, this study aimed to develop four novel Palladium(II) and Platinum(II) complexes containing ligands composed of thiophene, oxadiazole, and diamines, with the goal of obtaining potential antitumor agents. The ligand classes used have already demonstrated proven biological activities in the literature and as promising candidates for cancer treatment. The ligands were characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) and infrared vibrational spectroscopy to confirm their structures and stability. In addition to the techniques mentioned above, the complexes were also characterized by elemental analysis, Raman spectroscopy, and mass spectrometry. The results obtained indicate the formation of neutral complexes of the type $[M(II)L_2Cl_2]$, with good yield and satisfactory purity for the described syntheses. The cytotoxic activity of the synthesized compounds was evaluated against the tumor cell lines MDA-MB-231 (human metastatic breast adenocarcinoma) and 4T1 (murine mammary carcinoma) and the healthy cell line MCF-10 (normal mammary gland cells). Three of the four synthesized complexes showed that metal coordination improved antiproliferative activity. To understand the structure-activity relationship, the interaction between the complexes and the biomolecules DNA and BSA was evaluated through spectrophotometric studies and agarose gel electrophoresis. Spectrophotometric titration studies showed moderate interaction between DNA-complexes and strong interaction between BSA-complexes. The electrophoresis experiment revealed that three of the four complexes interact with DNA, altering the conformation of the plasmid. Theoretical optimization and stability studies by NMR were performed to investigate the behavior of the platinum complexes in DMSO solvent. Finally, in silico ADME studies were also conducted for all synthesized complexes and showed that all comply with Lipinski's rules, possess good lipophilicity, and inhibit CYP enzymes.

Keywords: metal complexes; *N,N*-bidentate ligands; antitumor agents; DNA; BSA; ADME.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da cisplatina. Fonte: Elaborado pela autora.	16
Figura 2 - Medicamentos contendo Pt(II) liberados para uso comercial. Fonte: Elaborado pela autora.	17
Figura 3 - Mecanismos de ação da cisplatina. Fonte: Adaptado da referência [28] e elaborado com BioRender.com.	18
Figura 4 - Representação do mecanismo de resistência da cisplatina, uptake, reatividade e efluxo celular. Fonte: Adaptado da referência [28] e elaborado com BioRender.com.....	19
Figura 5 - Representação da estrutura das albuminas séricas. A) HSA (código: 1AO6) e B) BSA (código: 4F5S). Fonte: Protein Data Bank (PDB).....	20
Figura 6 - Isômeros dos oxadiazol. Fonte: Elaborado pela autora.....	21
Figura 7 - Medicamentos contendo oxadiazóis. Fonte: elaborado pela autora.	21
Figura 8 - Estrutura do tiofeno. Fonte: Elaborado pela autora.....	22
Figura 9 - Exemplos de diaminas. Fonte: Elaborado pela autora.	22
Figura 10 - Representação da síntese dos ligantes. Fonte: Elaborado pela autora.	25
Figura 11 - Representação da síntese dos complexos de platina (1a , 1b) e de paládio (2a , 2b). Fonte: Elaborado pela autora.	26
Figura 12 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o ligante a e os complexos 1a e 2a . Análises realizadas em KBr.	36
Figura 13 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o ligante b e os complexos 1b e 2b . Análises realizadas em atr.	37
Figura 14 - Espectro Raman para o complexo 2a	39
Figura 15 - Espectro Raman para o complexo 2b	39
Figura 16 - A) Espectro de ESI-MS para o complexo 1a em metanol no modo positivo; B) Espectro simulado no Chemcalc.....	40
Figura 17 - A) Espectro de ESI-MS para o complexo 2a em metanol no modo positivo; B) Espectro simulado no Chemcalc.....	41
Figura 18 - A) Espectro de ESI-MS para o complexo 1b , em metanol no modo negativo; B) Espectro simulado no Chemcalc.....	41
Figura 19 - A) Espectro de ESI-MS para o complexo 2b , em metanol no modo negativo; B) Espectro simulado no Chemcalc.....	42
Figura 20 - Espectro de RMN de ¹ H do ligante a , 400 MHz e 25 °C, em DMSO-d ₆	43
Figura 21 - Espectro de RMN de ¹ H do complexo 1a , 400 MHz e 25 °C, em DMSO-d ₆	44
Figura 22 - Espectro de RMN de ¹ H do complexo 2a , 400 MHz e 25 °C, em DMSO-d ₆	44

Figura 23 - Numeração dos átomos de carbono do ligante a	45
Figura 24 - Espectro de RMN de ^{13}C para o ligante a os complexos 1a e 2a , 100 MHz e 25 °C, em DMSO- d_6	46
Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H do ligante b , 400 MHz e 25 °C, em DMSO- d_6	47
Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H do complexo 1b , 400 MHz e 25 °C, em DMSO- d_6	48
Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H do complexo 2b , 400 MHz e 25 °C, em DMSO- d_6	48
Figura 28 - Numeração dos átomos de carbono do ligante b	49
Figura 29 - Espectro de RMN de ^{13}C para o ligante b os complexos 1b e 2b , 100 MHz e 25 °C, em DMSO- d_6	50
Figura 30 - Espectro de RMN de ^{195}Pt do complexo 1a , 125 MHz e 25 °C, em DMSO- d_6	51
Figura 31 - Espectro de RMN de ^{195}Pt do complexo 1b , 125 MHz e 25 °C, em DMSO- d_6	52
Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H para o complexo 1a , em diferentes tempos, 400 MHz e 25 °C, em DMSO- d_6	53
Figura 33 - Espectro de ESI-MS para o complexo 1a após 26 dias em DMSO. Análise feita em metanol no modo positivo; B) Espectro simulado no Chemcalc.....	54
Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H para o complexo 1a , em diferentes tempos, 400 MHz e 25 °C, em DMF- d_7	54
Figura 35 - Gráfico de barras dos valores de IC_{50} dos ligantes a , b e dos complexos 1a , 2a , 1b e 2b , nas linhagens 4T1, MDA-MB-231 e MCF-10.....	56
Figura 36 - Espectros de absorção de <i>ct</i> -DNA na ausência e presença de concentrações crescentes dos complexos a 25 °C. A) Complexo 1a , B) Complexo 2a , C) Complexo 1b , D) Complexo 2b . (Gráficos de regressão linear inseridos à direita).....	57
Figura 37 - Espectros de emissão de fluorescência do sistema BE- <i>ct</i> -DNA na ausência e presença de concentrações crescentes dos complexos a 25 °C. A) Complexo 1a , B) Complexo 2a , C) Complexo 1b , D) Complexo 2b . (Gráficos de regressão linear inseridos à direita).....	59
Figura 38 - Representação das principais conformações assumidas pelo DNA plasmidial. Fonte: Elaborado com BioRender.com.....	61
Figura 39 - Estudos de interação de DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose, com cisplatina, ligantes a e b (100 μM) e complexos 1a - 2b (100 e 10 μM).....	61
Figura 40 - Espectro de emissão de fluorescência da BSA na ausência e presença de concentrações crescentes dos complexos 1a-2b , a 25 °C. A) Complexo 1a , B) Complexo 2a , C) Complexo 1b , D) Complexo 2b . (Gráficos de regressão linear inseridos à direita).....	63
Figura 41 - Conformações analisadas para o complexo 1b com diferentes sítios de coordenação: A) O,N, B) N,N, C) S,N.....	65
Figura 42 - Curva de ajuste para simulações do deslocamento do RMN ^{195}Pt	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa molar e dados de análise elementar de CHN para os complexos sintetizados.	35
Tabela 2 - Atribuição das principais bandas observadas nos espectros de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) dos ligantes e respectivos complexos.....	38
Tabela 3 - Atribuições dos espectros de RMN ^1H para o ligante a e complexos 1a e 2a	43
Tabela 4 - Atribuições dos espectros de RMN ^{13}C para o ligante a e complexos 1a e 2a	45
Tabela 5 - Atribuições dos espectros de RMN ^1H para o ligante b e complexos 1b e 2b	47
Tabela 6 - Atribuições dos espectros de RMN ^{13}C para o ligante b e complexos 1b e 2b	49
Tabela 7 - Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1} \pm \text{SD}$) e índice de seletividade (IS) obtidos pelo ensaio com MTT para os ligantes a e b e complexos 1a , 2a , 1b e 2b , nas linhagens 4T1, MDA-MB-231 e MCF-10.	55
Tabela 8 - Constantes de ligação intrínseca (K_b), e coeficientes de determinação (R^2) para os sistemas DNA-complexos.....	58
Tabela 9 - Constantes de supressão (K_{SV}), velocidade bimolecular de supressão K_q , constante de intercalação aparente, K_{app} e coeficientes de determinação (R^2) para os sistemas DNA-complexos.	60
Tabela 10 - Constantes de supressão (K_{SV}), constante velocidade bimolecular de supressão K_q , constante de intercalação aparente, K_{app} , número de sítios de ligação n e coeficientes de determinação (R^2) para os sistemas DNA-complexos.....	64
Tabela 11 - Possíveis Estruturas para o complexo 1a , simulações de deslocamento para RMN ^{195}Pt e Energia Livre de Gibbs.....	65
Tabela 12 - Estruturas dos complexos com as possibilidades de coordenação e valores de deslocamento do RMN ^{195}Pt	67
Tabela 13 - Predições dos parâmetros ADME para os complexos sintetizados.	70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SUAS DEFINIÇÕES

δ' – Deformação angular

δ – Deslocamento Químico (ppm)

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

λ - Comprimento de Onda (nm)

μ - Micro (10^{-6})

ν - Frequência de vibração

ΔG - Energia Livre de Gibbs

4T1 - Linhagem celular de carcinoma mamário murino

Å - Angström (10^{-10} m)

A - Absorbância

ADME - Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção

BE - Brometo de Etídio

BSA - Albumina Bovina Sérica, *Bovine Serum Albumine*

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CHN - Experimento de dosagem de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio

CRTI - Centro Regional para o Desenvolvimento e Tecnológico e Inovação

ct-DNA - Ácido Desoxirribonucleico de Timo de Bezerro, *calf-thymus deoxyribonucleic acid*

DMF - Dimetilformamida

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico, *Deoxyribonucleic Acid*

EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético

EMAR - Espectrometria de Massas de Alta Resolução

ESI - Ionização por Eletrospray, *Electron Spray Ionization*

F - Intensidade Relativa de Fluorescência

FBS - Soro Fetal Bovino

HSA - Albumina de Soro Humano

IC_{50} - Concentração Inibitória a 50%, *half-maximal inhibitory concentration*

IS - Índice de Seletividade

IV - Infravermelho

J - Constante de acoplamento (Hz)

K_{app} - Constante aparente de ligação

K_b - Constante de ligação

K_{sv} - Constante de Supressão de Stern-Volmer

K_q - Constante de velocidade bimolecular de supressão

KCl - Cloreto de potássio

KH₂PO₄ - Fosfato monopotássico

LAREMAR - Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução

LCPnano - Laboratório de Caracterização e Processamento de Nanomateriais

MCF-10 - Linhagem celular de mama humana não tumoral

MDA-MB-231 - Linhagem celular de adenocarcinoma mamário triplo negativa humana

M - Concentração em quantidade de substância (mol L⁻¹)

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

NaCl - Cloreto de Sódio

Na₂HPO₄ - Hidrogenofosfato dissódico

n – Número de sítios de ligação

nm - nanômetro (10⁻⁹ metro)

OCT - Transportadores de Cátion Orgânico, *organic cation transporter*

OMS - Organização Mundial da Saúde

ONG - Organização não Governamental

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

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

pH - Potencial Hidrogeniônico

ppm - Parte por milhão

R² - Coeficiente de Determinação Linear

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN de ¹⁹⁵Pt - Ressonância Magnética Nuclear de Platina

rpm - rotação por minuto

RPMI 1640 - Meio de cultura do Instituto Memorial Roswell Park, *Roswell Park Memorial Institute*

SD - Desvio Padrão, *standard deviation*

TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA

TRIS - Tampão tris(hidroximetil)aminometano

u.a. - Unidade Adimensional

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UFG - Universidade Federal de Goiás

UNIFEI - Universidade Federal de Itajubá

UV-VIS - Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta e Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	CÂNCER E QUIMIOTERAPIA	15
1.2	COMPLEXOS METÁLICOS E AÇÃO ANTITUMORAL	17
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3	PARTE EXPERIMENTAL	24
3.1	MATERIAIS.....	24
3.1.1	Síntese dos ligantes e complexos de platina(II) e paládio(II)	24
3.1.2	Sínteses dos complexos de Platina(II)	25
3.1.3	Síntese dos complexos de Paládio(II)	26
3.2	MÉTODOS INSTRUMENTAIS	26
3.2.1	Análise Elementar (CHN)	26
3.2.2	Espectroscopia vibracional na Região do Infravermelho (IV)	27
3.2.3	Espectroscopia Vibracional RAMAN	27
3.2.4	Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR)	27
3.2.5	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	27
3.2.6	Espectroscopia Eletrônica na região do Ultravioleta-visível (UV-VIS)	28
3.2.7	Espectroscopia de Fluorescência	28
3.2.8	Ensaio de Citotoxicidade	28
3.2.9	Estudos de interação <i>ct</i>-DNA por titulações espectrofotométricas	29
3.2.10	Estudos de competição com <i>ct</i>-DNA por medidas de fluorescência	29
3.2.11	Eletroforese de DNA em gel de agarose	30
3.2.12	Estudos de interação com BSA por medidas de fluorescência	30
3.3	ESTUDOS TEÓRICOS	31
3.3.1	Estudo de otimização <i>in silico</i>	31
3.3.2	Estudo ADME <i>in silico</i>	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	32

4.1.1	Análise Elementar (CHN)	35
4.1.2	Espectroscopia vibracional na Região do Infravermelho (IV).....	36
4.1.3	Espectroscopia Vibracional Raman	38
4.1.4	Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR)	40
4.1.5	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	42
4.2	ESTUDO COM BIOMOLÉCULAS	55
4.2.1	Ensaio de citotoxicidade	55
4.2.2	Estudos de interação <i>ct</i> -DNA por titulações espectrofotométricas.....	56
4.2.3	Estudos de competição com <i>ct</i> -DNA por medidas de fluorescência.....	58
4.2.4	Eletroforese de DNA em gel de agarose	60
4.2.5	Estudos de interação com BSA por medidas de fluorescência	62
4.3	ESTUDOS TEÓRICOS	64
4.3.1	Estudos de otimização <i>in silico</i>	64
4.3.2	Estudo ADME <i>in silico</i>	69
5	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS.....	73
	APÊNDICE A – ESTUDO DE ESTABILIDADE EM DMF-D ₇ POR RMN	82
	APÊNDICE B – ESTUDO DE ESTABILIDADE EM DMF-D ₇ POR RMN	83
	APÊNDICE C – ESTUDO DE ESTABILIDADE EM DMF-D ₇ POR RMN.....	84
	APÊNDICE D – CURVA DE AJUSTE	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER E QUIMIOTERAPIA

O termo câncer refere-se a uma categoria de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células anormais, que têm a capacidade de formar tumores (neoplasias), disseminar-se pelo corpo e invadir diferentes tecidos e órgãos [1,2]. Os tumores podem ser classificados em benignos e malignos. Tumores benignos crescem lentamente e ficam confinados em sua região de origem, geralmente não apresentam riscos à saúde. Tumores malignos crescem rapidamente, comprometem o funcionamento correto de órgãos e tecidos podendo se espalhar pelo corpo, processo conhecido como metástase [3,4]. A replicação exacerbada das células pode ser causada por fatores intrínsecos: mutações genéticas e epigenéticas, e por fatores externos: tabagismo, consumo exagerado de álcool, alimentação incorreta e exposição a substâncias carcinogênicas como poluição, raios ultravioleta e alguns compostos químicos [5].

O câncer é a segunda maior causa de morte no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), somente no ano de 2022 foram registrados aproximadamente 20 milhões de novos casos da doença, resultando em 9,7 milhões de óbitos. Estima-se que uma a cada cinco pessoas desenvolva câncer durante a vida, e aproximadamente um em cada nove homens e uma a cada doze mulheres morram devido a ele [6,7]. O ponto de origem da doença é o que diferencia os diversos tipos de câncer: os carcinomas iniciam-se a partir de tecidos epiteliais, os adenocarcinomas originam-se em tecidos glandulares, os sarcomas têm origem em tecidos conjuntivos, os linfomas surgem no sistema linfático, a leucemia inicia na medula óssea e mielomas têm origem nos plasmócitos, um tipo específico de célula presente na medula óssea [1,2].

No Brasil, os cânceres mais incidentes incluem os carcinomas de mama e próstata, e os adenocarcinomas de cólon e reto e de pulmão. O câncer de mama é o que mais mata mulheres (16,4%) e o câncer de próstata é o que mata mais homens (13,5%) [1,8,9]. Estudos mostram que para o triênio 2023 - 2025, surjam 704 mil novos casos de câncer por ano no país [8]. Segundo uma pesquisa realizada pelo Instituto Oncoguia (ONG de apoio a pacientes com câncer no Brasil), 42% dos brasileiros relacionam a palavra “câncer” a “morte” ou “morrer” [10]. A alta taxa de mortalidade das doenças neoplásicas pode estar relacionada com o diagnóstico tardio, tratamentos efetivos limitados, além de fatores como idade, gênero e localização geográfica [11].

Existem diferentes tipos de tratamento para o câncer, sendo os mais comuns a cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia, podendo também ser utilizada uma combinação desses métodos. A quimioterapia consiste no uso de agentes citotóxicos que matam células que se dividem descontroladamente, sendo cancerosas ou não. A administração das drogas pode ser via oral ou

intravenosa. Alguns medicamentos funcionam melhor quando aplicados em conjunto, por isso é comum o uso combinado de dois ou mais agentes terapêuticos [12,13]. Apesar de ser o método de tratamento mais utilizado, a quimioterapia apresenta limitações, tais como, a resistência inata ou adquirida ao tratamento e efeitos adversos como queda de cabelo, náuseas e cansaço [14].

O grande sucesso na quimioterapia do câncer, foi a descoberta da ação antitumoral da cisplatina (*cis*-diamindicloretoplatina(II)) por Rosenberg e colaboradores em 1969 [15]. A cisplatina apresenta geometria quadrática plana, com o átomo central platina(II) ligado por ligação covalente a dois átomos de cloro e dois grupos NH₃ (Figura 1).

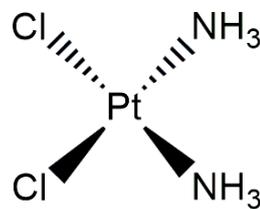


Figura 1 - Estrutura da cisplatina. Fonte: Elaborado pela autora.

A cisplatina foi aprovada para uso clínico em 1979 e permanece até hoje como um dos medicamentos mais utilizados contra neoplasias. Administrado em conjunto com outras drogas, a cisplatina tem uma considerável taxa de sucesso no tratamento dos cânceres de testículo (90%), ovário, bexiga e melanomas [16,17]. Após o êxito no tratamento de alguns tipos de câncer, novos medicamentos contendo Pt(II) foram descobertos e aprovados para uso, entre eles a carboplatina e a oxaliplatina (liberados mundialmente), nedaplatina (liberada no Japão), lobaplatina (liberado na China) e heptaplatina (liberado na Coreia) [17,18] (Figura 2).

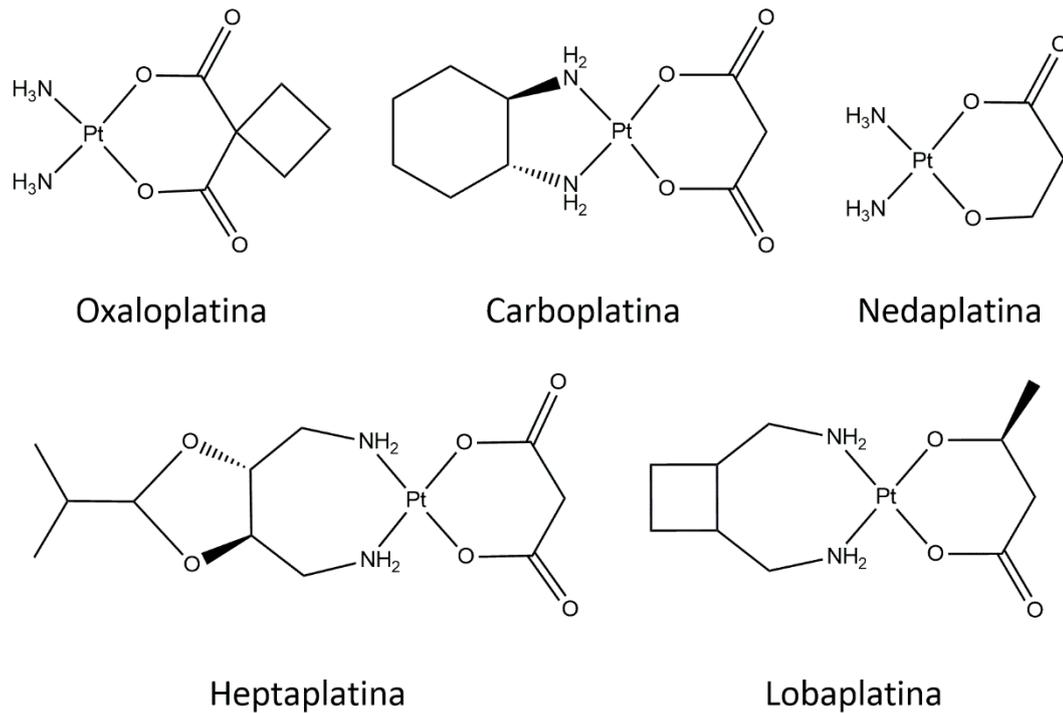


Figura 2 - Medicamentos contendo Pt(II) liberados para uso comercial. Fonte: Elaborado pela autora.

1.2 COMPLEXOS METÁLICOS E AÇÃO ANTITUMORAL

Os bons resultados de moléculas contendo a platina despertaram o interesse em estudar complexos de outros metais. Desde então, existem estudos sobre a atividade antitumoral de diversos complexos metálicos, entre eles, complexos de ouro, cobre, zinco, paládio, rutênio, gálio e prata [19–25]. Os complexos de paládio vêm sendo muito estudados devido à similaridade entre a platina(II) e o paládio(II), apresentando resultados citotóxicos promissores como mostra o estudo de Scattolin e colaboradores [26]. O paládio, assim como a platina no estado de oxidação 2+, apresenta configuração eletrônica d^8 e favorece a formação de complexos quadráticos planos. A similaridade estrutural entre os complexos e a cisplatina, indica que a forma de atuação dos compostos pode ser análoga.

A cisplatina tem como alvo biológico o DNA e se torna ativa após a entrada na célula. O processo de *uptake* celular pode ocorrer por três maneiras principais: por difusão passiva transmembrana, por meio de transportadores de cobre (CTR1) ou de transportadores de cátions orgânicos (OCTs). Uma vez dentro das células, onde a concentração de cloreto é cerca de dez vezes mais baixa que no ambiente extracelular, a cisplatina passa pelo processo de hidrólise, em que a perda de um ou dois dos ligantes cloreto, se tornando a espécie reativa $cis\text{-[Pt(NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$. Após a ativação, a cisplatina se liga covalentemente ao DNA por meio dos pares de elétrons livres do nitrogênio N7 da guanina em substituição ao ligante aqua. Uma segunda ligação pode ocorrer entre a cisplatina e outra base nitrogenada, podendo ser na mesma fita de DNA (intrafita) ou em uma fita

adjacente (interfita). A formação dos adutos mais estáveis é entre duas fitas adjacentes de resíduos de guanina, conhecido como 1,2-d(GpG), porém outros adutos podem ocorrer, intrafita entre adeninas e guaninas adjacentes, (1,2-d(ApG)), ou entre guaninas não adjacentes (1,3-d(GpTpG)). Essas ligações cruzadas dobram o DNA, cerca de 30 a 60° em direção ao sulco maior e desenrola a dupla hélice, cerca de 23°, essas distorções na estrutura do DNA, inibem a replicação e transcrição do DNA, causando a morte celular por apoptose e necrose [17,18,27,28]. O mecanismo de ação da cisplatina é representado na Figura 3.

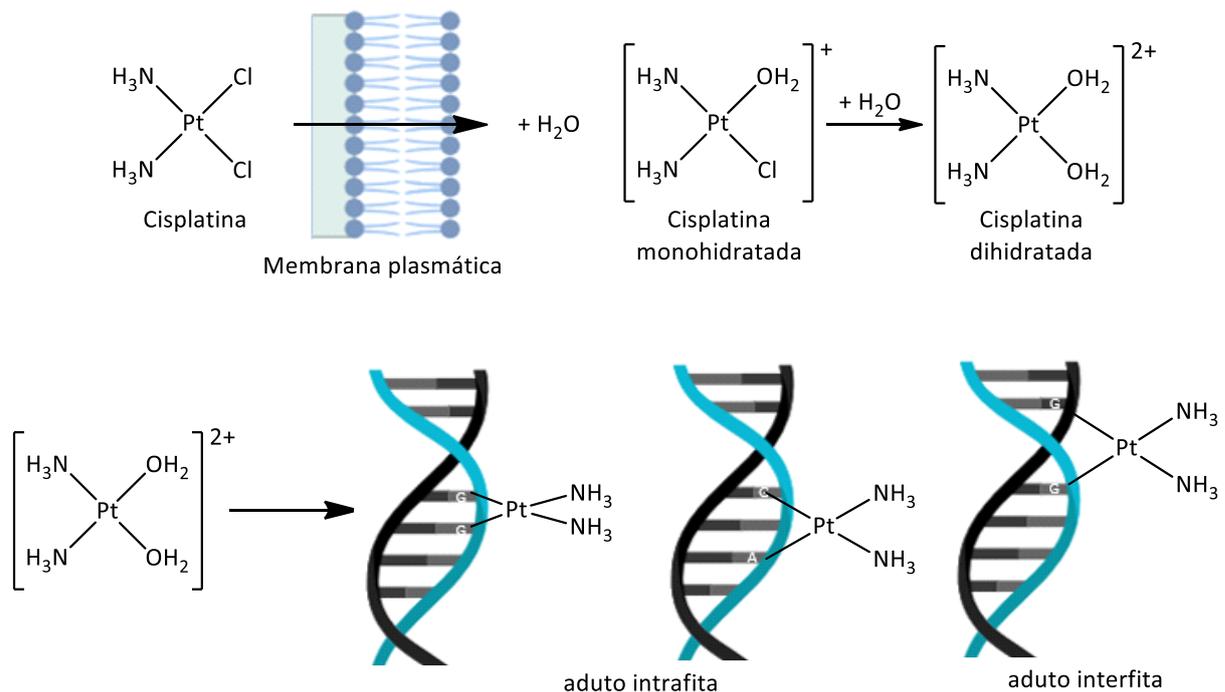


Figura 3 - Mecanismos de ação da cisplatina. Fonte: Adaptado da referência [28] e elaborado com BioRender.com.

Além da ligação covalente, outros fármacos podem apresentar diferentes modos de interação com o DNA. As interações não-covalentes podem ser interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas no sulco menor do DNA ou interações de intercalação do tipo π - π *stacking* [29].

A cisplatina, assim como outras drogas antitumorais, possui aplicações limitadas devido a problemas enfrentados durante seu uso. A resistência intrínseca ou adquirida durante o tratamento e os diversos efeitos colaterais indesejados são os maiores desafios no uso dos compostos a base de platina(II). Os três principais mecanismos de resistência a cisplatina são: i) diminuição na absorção da droga e/ou aumento no efluxo; ii) degradação e desativação por grupos tióis (interação com glutatona e outras proteínas); iii) melhora no reparo ou tolerância dos adutos cisplatina-DNA (Figura 4). Os efeitos colaterais são devidos à entrada do medicamento em todas as células com multiplicação

acelerada, incluindo células saudáveis como as células tronco e devido à ação do corpo em excretar o medicamento. Os efeitos colaterais podem incluir nefrotoxicidade (redução da função renal), neurotoxicidade (danos ao sistema nervoso), ototoxicidade (perda auditiva, desequilíbrio e zumbido), mielossupressão (redução da atividade da medula óssea causando anemia e outras doenças do sangue) [17,18,27,28].

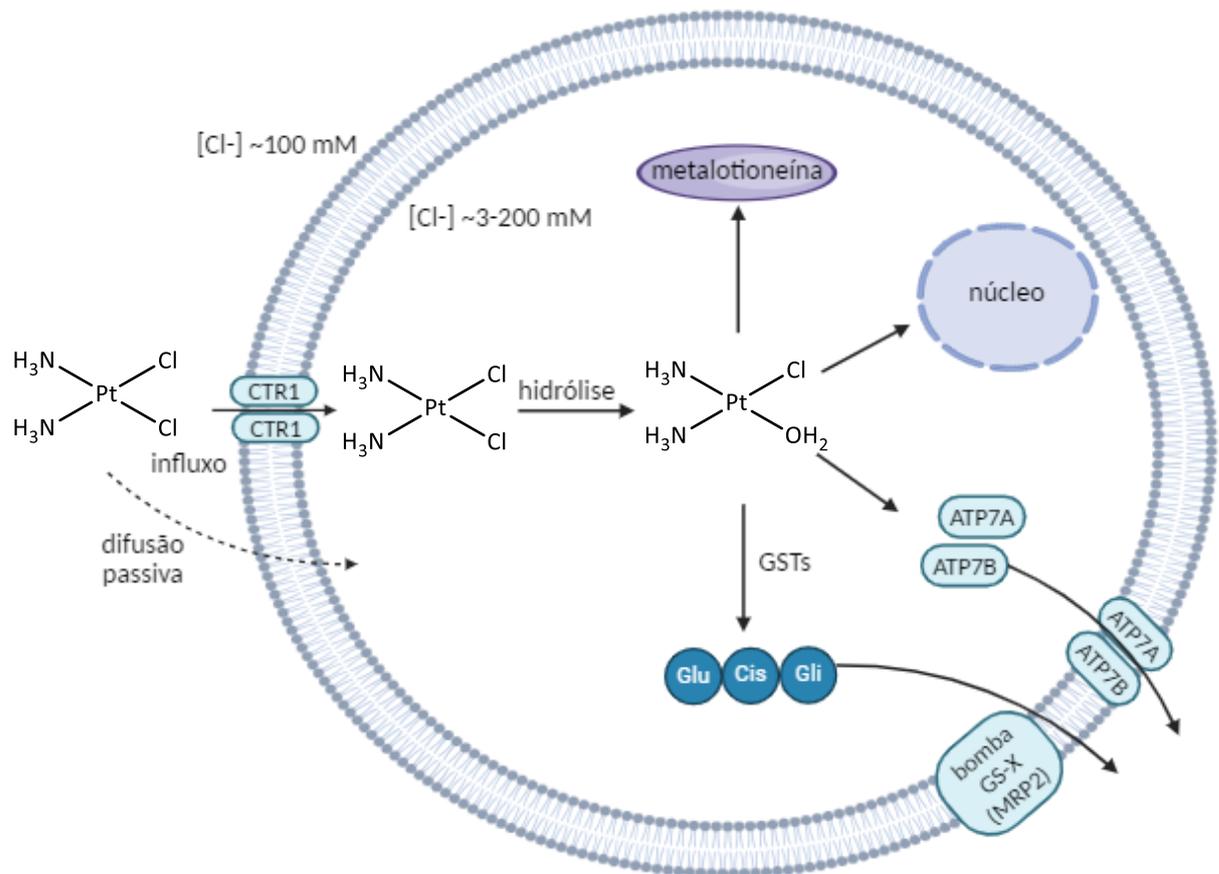


Figura 4 - Representação do mecanismo de resistência da cisplatina, uptake, reatividade e efluxo celular. Fonte: Adaptado da referência [28] e elaborado com BioRender.com.

Estudos mostram que apenas 1 a 10% de toda cisplatina presente nas células conseguem chegar ao DNA, a maior parte pode interagir com outras moléculas (alvos secundários) presentes nas células, como a albumina sérica e a glutatona. A interação da cisplatina com outras macromoléculas pode influenciar sua toxicidade e biodisponibilidade. Entre as biomoléculas que podem interagir com a cisplatina, as albuminas de soro são as principais. A albumina sérica humana (HSA) (Figura 5A) é a proteína encontrada em maior concentração no plasma sanguíneo (0,6 mM). A HSA é uma proteína globular que atua em várias funções fisiológicas do corpo humano, entre elas, transporte e distribuição de fármacos e compostos como aminoácidos, íons metálicos, esteroides e ácidos graxos de cadeia longa [30]. Analogamente a HSA, a albumina de soro bovino (BSA) (Figura 5B), é encontrada no plasma

sanguíneo de bovinos e atua nos mesmos processos fisiológicos, sendo um bom modelo para estudos biológicos [31].

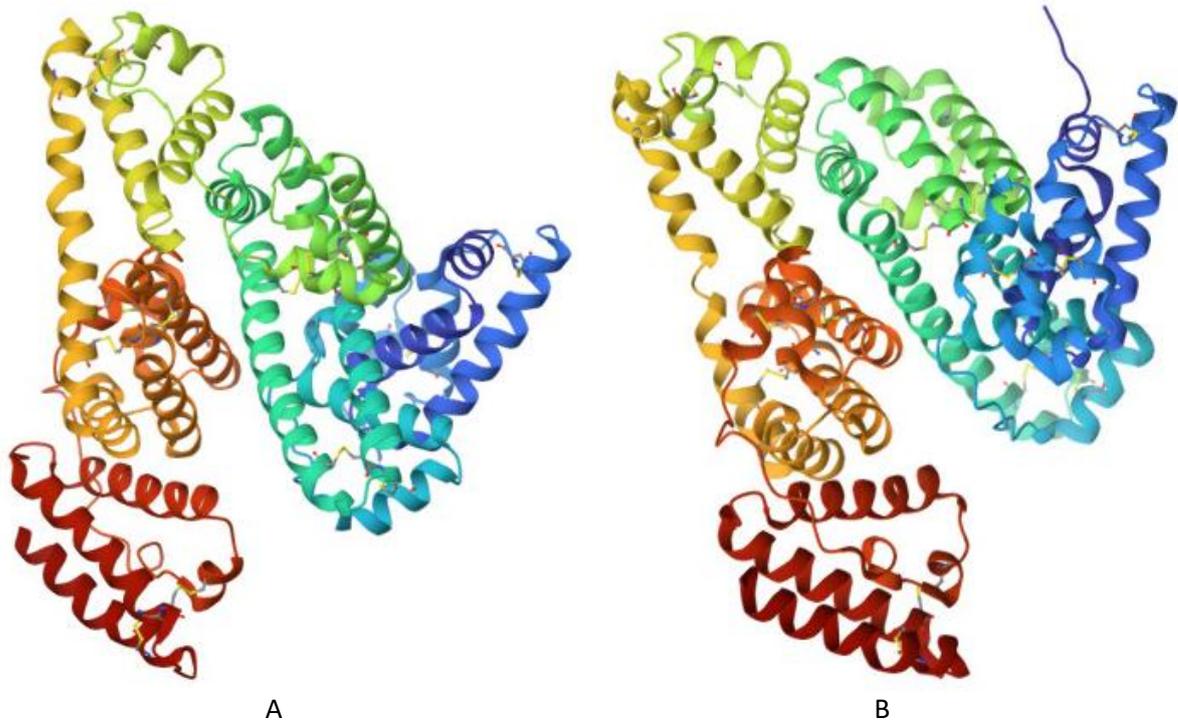


Figura 5 - Representação da estrutura das albuminas séricas. A) HSA (código: 1AO6) e B) BSA (código: 4F5S). Fonte: Protein Data Bank (PDB)

Os vários caminhos e dificuldades que a cisplatina pode encontrar quando presente no corpo humano, evidenciam a necessidade da busca por medicamentos mais ativos, mais seletivos, menos tóxicos e com melhor biodisponibilidade celular. Sendo assim, muitos estudos são conduzidos visando a obtenção de melhores compostos antitumorais. Entre as estratégias utilizadas, se destaca a modulação de complexos metálicos por meio da incorporação de ligantes orgânicos com atividades biológicas já conhecidas [32].

O design inteligente de novos fármacos visa potencializar os efeitos terapêuticos das novas drogas sintetizadas. O uso de ligantes multifuncionais pode melhorar a ligação com os íons metálicos e a interação com os alvos biológicos. Além disso, ligantes com funções específicas podem potencializar o *uptake* celular, a eficiência do medicamento e diminuir sua toxicidade. Uma técnica que vem sendo muito estudada é a combinação de duas ou mais classes de ligantes em um único composto [33]. Algumas classes de ligantes com atividades biológicas já comprovadas são os oxadiazóis, tiofenos e diaminas.

Os oxadiazóis são heterociclos aromáticos de cinco membros com dois átomos de carbonos dois átomos de nitrogênio e um de oxigênio. Eles podem existir na forma de 4 isômeros diferentes, dependendo da posição dos átomos nitrogênios como mostra a Figura 6. Essa classe vem sendo muito

Uma segunda classe de ligantes orgânicos que também vem se destacando atualmente é a dos tiofenos. O tiofeno (Figura 8) é um ciclo aromático de cinco membros, sendo constituído por um átomo de enxofre e quatro átomos de carbono, ele pode ser encontrado na natureza em derivados de petróleo e está presente em vários compostos com atividades biológicas comprovadas, entre elas, atividade anti-inflamatória, antialérgica, antidepressiva, antiaterosclerótica, antibacteriana e anticâncer [37–41].

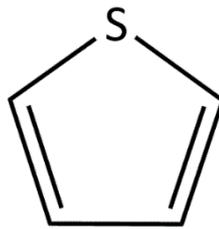


Figura 8 - Estrutura do tiofeno. Fonte: Elaborado pela autora.

As diaminas fazem parte de outra classe de ligantes orgânicos muito importantes no contexto dos compostos biologicamente ativos. Estas moléculas possuem dois grupos amino unidos por átomos de carbono e podem ser de cadeia aberta ou fechada. A etilenodiamina e a piperazina (Figura 9) são duas diaminas muito estudadas e que apresentam bons resultados referentes às suas atividades anticâncer. Além disso, a piperazina é conhecida também por apresentar atividades antituberculose, antimicrobiana, antifúngica e anti-inflamatória [42–47].

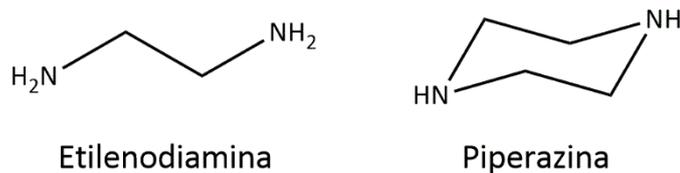


Figura 9 - Exemplos de diaminas. Fonte: Elaborado pela autora.

Diante da necessidade de medicamentos mais efetivos contra o câncer, é de suma importância o estudo e descoberta de novas moléculas com ação antitumoral aprimorada por meio do design inteligente de fármacos. Novos compostos de platina e paládio contendo diferentes ligantes biologicamente ativos podem contribuir para o entendimento da relação estrutura-atividade e fornecer dados complementares para as ferramentas de design de fármacos com atividade anticâncer.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi sintetizar e caracterizar complexos de platina(II) e paládio(II) contendo ligantes que possuem os grupos funcionais tiofeno, oxadiazol e diamina e ainda investigar sua atividade citotóxica e a interação com as biomoléculas DNA e BSA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar dois complexos de platina(II) e dois complexos de paládio(II) contendo os ligantes derivados de 1,2,4-oxadiazol funcionalizados com tiofeno e diaminas;
- Caracterizar os complexos obtidos por: espectroscopia na região do infravermelho e Raman; espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e ^{195}Pt ; espectrometria de massas, análise elementar;
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos ligantes e complexos obtidos frente às linhagens de células tumorais (MDA-MB-231 e 4T1) e uma linhagem não-tumoral (MCF-10);
- Avaliar a capacidade de interação dos compostos com albumina e DNA por meio das constantes de ligação.

3 PARTE EXPERIMENTAL

Nesta seção serão apresentados os materiais e métodos utilizados neste trabalho.

3.1 MATERIAIS

Os solventes e reagentes utilizados foram obtidos de fontes comerciais das marcas Vetec, Merck, Fmaia, Êxodo Científica, Synth e Sigma Aldrich, utilizados sem purificação prévia.

3.1.1 Síntese dos ligantes e complexos de platina(II) e paládio(II)

Os ligantes **a** e **b** (Figura 10). foram sintetizados pelo grupo de pesquisa da professora Mara Rubia Costa Couri do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora [48]. Primeiramente, tratou-se o 2-tiofenilcarbonitrila (40 mmol) com cloridrato de hidroxilamina (60 mmol) e bicarbonato de sódio (64 mmol) em 80 mL de metanol para obtenção da amidoxima. O oxadiazol foi então obtido a partir da reação da amidoxima (35 mmol) com bromo acetila (47,2 mmol) e carbonato de potássio (35 mmol) em 30 mL de clorofórmio. Por fim, em duas reações distintas, o oxadiazol (5 mmol) foi adicionado lentamente com o auxílio de um funil de adição, à diamina comercial (etilenodiamina e piperazina; 10 mmol) e carbonato de potássio (12,5 mmol) em 25 mL de acetonitrila, sob agitação magnética e refluxo. As reações ocorreram por 3 horas e foram acompanhadas por CCD (eluente: 9:1 diclorometano/metanol; revelador: luz ultravioleta). Os ligantes foram obtidos com rendimentos de 65% para o ligante **a** e 68% para o ligante **b**. Os compostos foram reavaliados por RMN de ^1H e ^{13}C e por espectroscopia na região do infravermelho para verificação de pureza e estabilidade.

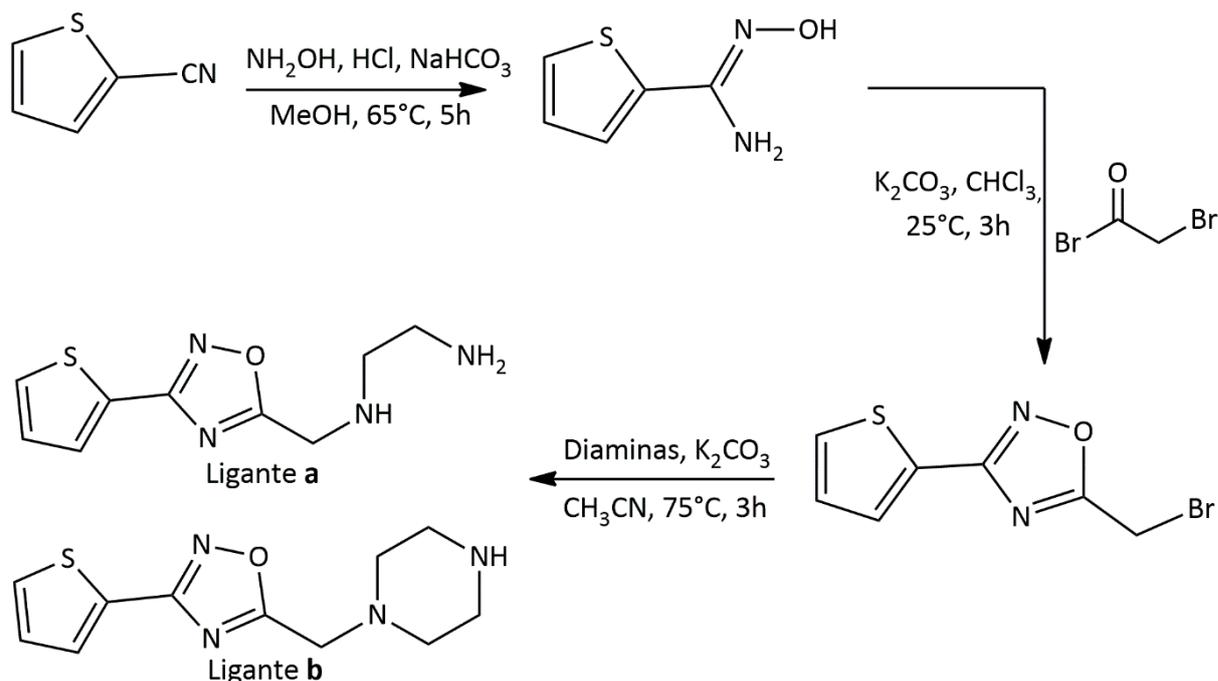


Figura 10 - Representação da síntese dos ligantes. Fonte: Elaborado pela autora.

3.1.2 Sínteses dos complexos de Platina(II)

As sínteses dos complexos de platina foram realizadas com base na experiência prévia do nosso grupo de pesquisa e como descrito por Querino e colaboradores [49]. Para as sínteses dos complexos **1a** e **1b**, separadamente, foram utilizados 0,55 mmol do sal K_2PtCl_4 (228 mg) solubilizados em 5 mL de água destilada. A estas soluções foram adicionados gota a gota 0,5 mmol dos ligantes **a** (112 mg) e **b** (125 mg), solubilizados em 5 mL de metanol. As reações foram mantidas por até 72 horas sob agitação constante e foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se cromatofolhas de sílica gel sobre lâminas de alumínio. Como eluente, utilizou-se soluções de diclorometano/metanol nas proporções 9:1 e 8:2. Os reveladores utilizados foram luz ultravioleta e vapores de iodo.

Os complexos obtidos foram centrifugados por 5 minutos a 2000 rpm, para separação do sólido e água mãe. Ao sólido foi então adicionado 5 mL de água destilada, para remoção de impurezas, a seguir, a mistura foi submetida a nova centrifugação. O processo de lavagem foi realizado também com metanol e diclorometano (três vezes cada solvente), sendo feita a suspensão e centrifugação a cada ciclo de lavagem. Após a lavagem os complexos foram secos e armazenados em dessecador. Os rendimentos das sínteses foram 75% (**1a**) e 77% (**1b**). A síntese está representada na Figura 11.

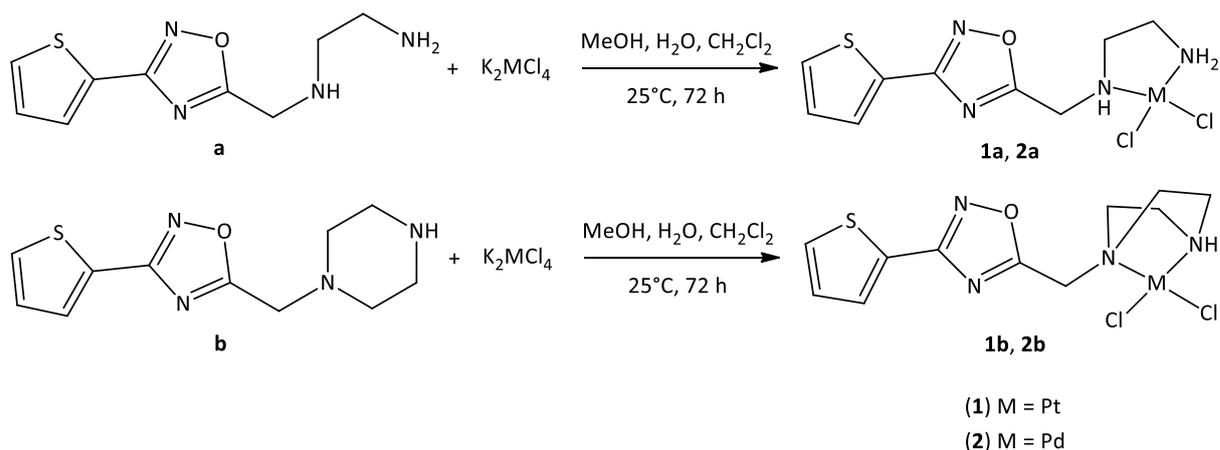


Figura 11 - Representação da síntese dos complexos de platina (**1a**, **1b**) e de paládio (**2a**, **2b**). Fonte: Elaborado pela autora.

3.1.3 Síntese dos complexos de Paládio(II)

As sínteses dos complexos de paládio, **2a** e **2b** foram realizadas de forma similar aos de platina da seção anterior. A uma solução de K_2PdCl_4 (179 mg, 0,55 mmol) em 5 mL de água destilada, foram adicionados gota a gota os ligantes **a** (112 mg, 0,5 mmol) ou **b** (125 mg, 0,5 mmol) solubilizados em 5 mL de metanol. As reações foram mantidas por até 72 horas sob agitação constante e acompanhadas por CCD (eluente: soluções 9:1 e 8:2 de diclorometano/metanol; reveladores: luz ultravioleta e vapores de iodo).

Os produtos foram centrifugados e lavados como descrito anteriormente. Primeiramente, centrifugados por 5 minutos a 2000 rpm e o sólido obtido foi submetido a lavagens sequenciais com 5 mL de água destilada, metanol e diclorometano (três vezes cada solvente), sendo feita a suspensão e centrifugação a cada ciclo de lavagem. Os rendimentos das sínteses foram 50% (**2a**) e 76% (**2b**). A síntese está representada na Figura 11.

3.2 MÉTODOS INSTRUMENTAIS

3.2.1 Análise Elementar (CHN)

As medidas de determinação dos teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre foram realizadas em Analisador CHNS/O 2400 Series II Perkin-Elmer, no Departamento de Química da UFMG, utilizando gás oxigênio para combustão e gás hélio para o arraste de gases gerados durante a combustão das amostras.

3.2.2 Espectroscopia vibracional na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em equipamento Perkin Elmer modelo Frontier na região 400 - 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . Foi utilizado o modo ATR ou pastilha de KBr, quando conveniente. Os espectros foram tratados com o software OriginPro 9.0.

3.2.3 Espectroscopia Vibracional RAMAN

As análises foram realizadas em Espectrômetro micro-Raman acoplado a AFM - Witec alpha300 RA, no Laboratório de Caracterização e Processamento de Nanomateriais, LCPnano, do Departamento de Física da UFMG. Foi utilizado o laser de 532 nm com potência de 10 μW e um microscópio óptico Nikon com objetiva de 50x. Foram feitas 6 leituras de cada amostra com tempo de 120 segundos e a partir da média das leituras, foi obtido um único espectro. Os espectros foram tratados com o software OriginPro 9.0.

3.2.4 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR)

O estudo de espectrometria de Massas de Alta Resolução foi realizado pelo Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CRTI) da Universidade Federal de Goiás - UFG. As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em metanol e em seguida diluídas a uma concentração de 70 ppm em metanol. Os espectros foram adquiridos por infusão direta das amostras, utilizando-se um espectrômetro de massas Q-Exactive (ThermoScientific), com fonte H-ESI, operando em modo positivo e negativo nas seguintes condições: full scan m/z 200 - 850 (variando dentro desta faixa conforme a m/z de interesse para cada amostra), resolução 140.000, spray voltage 2,0 e 5,0 kV, fluxo de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, gás de bainha 10, gás auxiliar 0, temperatura do capilar 300 $^{\circ}\text{C}$, temperatura do gás auxiliar 37 $^{\circ}\text{C}$, s-lens 50 e 80.

3.2.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (^1H), carbono (^{13}C), e platina (^{195}Pt) foram realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química da UFMG, utilizando o espectrômetro Bruker AVANCE III Nanobay com frequência de 400 MHz. Os solventes utilizados foram DMSO- d_6 e DMF- d_7 .

3.2.6 Espectroscopia Eletrônica na região do Ultravioleta-visível (UV-VIS)

Os espectros de absorção eletrônica na região do ultravioleta-visível foram obtidos no espectrofotômetro CARY 100Conc em cubetas de quartzo de caminho ótico de 1 cm no Departamento de Química da UFMG.

3.2.7 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 ótico e fendas de excitação e emissão de 5 nm. Para o experimento de competição com *ct*-DNA, foi usado $\lambda_{\text{excitação}} = 526$ nm e faixa de análise 530 - 800 nm. Para estudo de interação com BSA, usou-se $\lambda_{\text{excitação}} = 280$ nm e faixa de análise 290 - 550 nm.

3.2.8 Ensaios de Citotoxicidade

Para determinação da viabilidade celular foram utilizadas as linhagens: MDA-MB-231 (adenocarcinoma metastático de mama humana); 4T1 (células de carcinoma mamário murino); MCF-10 (células normais de glândulas mamárias). As células foram distribuídas em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino (FBS) 10% v/v, sendo $1,5 \times 10^3$ células/poço/100 μL em placas com 96 poços que foram devidamente incubadas a 37 °C em atmosfera umedecida a 5% de CO_2 por 24 horas para total aderência.

Nos poços da placa contendo as células já aderidas, foram distribuídos 100 μL de concentrações decrescentes (100, 50, 10, 5 e 1 μM) dos complexos e ligantes a serem testados, em quadruplicatas. As soluções estoques dos compostos foram preparadas em DMF e diluídas em meio de cultura com no máximo 1% v/v de DMF. Para controle negativo foi utilizado 100 μL de meio de cultura suplementado com 10% de FBS. Como controle positivo foi utilizado cisplatina.

Após a exposição aos compostos sob avaliação por 72 horas, as células foram incubadas com MTT (5 $\mu\text{g}/10$ $\mu\text{L}/\text{poço}$) durante 4 horas. A seguir, todo o líquido sobrenadante foi removido por aspiração e foram adicionados 100 μL de DMSO/poço, sendo a viabilidade celular (proporcional à concentração dos sais de formazan - produto da redução mitocondrial do MTT nas células viáveis) determinada pela medida de absorbância a 570 nm em espectrofotômetro de microplacas[50]. Os dados obtidos através dos ensaios colorimétricos com MTT foram normalizados considerando-se a viabilidade celular do controle negativo como 100% utilizando o software GraphPad Prism 8.0. Foram realizados dois experimentos independentes para cada composto e linhagem celular.

3.2.9 Estudos de interação *ct*-DNA por titulações espectrofotométricas

Para estudo da interação entre o *ct*-DNA e os complexos, foram realizadas titulações espectrofotométricas utilizando uma solução de *ct*-DNA. A solução de DNA de timo de bezerro (sigma D1501), [*ct*-DNA] = 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi feita em tampão fosfato-salino (PBS, NaCl 1,4 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 2 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4), tendo sua concentração determinada através da espectroscopia na região UV-VIS, utilizando a lei de Lambert-Beer ($A = \epsilon bc$), onde A é a absorbância, b é o caminho óptico (1 cm), c é a concentração em mol L^{-1} e ϵ é a absorvidade molar do DNA (6600 $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{L}$ em 260 nm).

As titulações foram realizadas empregando-se duas cubetas: na cubeta 1 foram adicionados 1960 μL do tampão PBS pH 7,4 e 40 μL de DMF, correspondendo ao branco; e na cubeta 2 foram adicionados 1960 μL do tampão PBS pH 7,4, 20 μL de DMF e 20 μL da solução do composto ($10^{-3} \text{mol L}^{-1}$) em DMF. Em seguida, foram realizadas sucessivas adições de 1 μL de *ct*-DNA em ambas cubetas, a cada adição as soluções foram homogeneizadas manualmente com auxílio de micropipeta por 2 minutos e então, eram obtidos os espectros da cubeta 1 (branco) e cubeta 2 (amostra).

A partir dos espectros adquiridos, foi possível calcular as constantes de interação (K_b) entre os compostos e o *ct*-DNA, utilizando a equação de Scatchard (Equação 1) [51,52].

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad \text{Equação 1}$$

em que, ϵ_a , ϵ_f , e ϵ_b correspondem respectivamente, ao coeficiente de absorvidade molar em cada adição de *ct*-DNA, ao coeficiente do complexo livre e ao coeficiente do complexo totalmente ligado ao *ct*-DNA. A constante de interação K_b é a razão entre os coeficientes angular e linear do gráfico $\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)}$ vs [DNA].

3.2.10 Estudos de competição com *ct*-DNA por medidas de fluorescência

O experimento de deslocamento do brometo de etídio (BE) foi conduzido para avaliar a capacidade dos complexos sintetizados de atuarem como intercaladores eficazes de DNA.

Para tal, foram utilizadas a solução de *ct*-DNA citada anteriormente (item 3.2.9) e uma solução de brometo de etídio de concentração 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, ambas em tampão fosfato-salino PBS, pH 7,4.

Durante o experimento, a mistura dessas soluções foi titulada com adições sucessivas dos complexos preparados neste trabalho, na faixa de concentração de 0 - 100 μM , não ultrapassando o

volume de 60 μL (2% DMF). Os espectros foram registrados na faixa de 530 - 800 nm, com $\lambda_{\text{excitação}} = 526$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 601$ nm a fim de se observar alguma supressão da fluorescência característica de BE-*ct*-DNA que sugere um mecanismo de interação por intercalação.

Os espectros foram ajustados ao modelo matemático Stern-Volmer [53] (Equação 2), sendo possível assim, calcular as constantes de supressão (K_{sv}) entre os complexos e o *ct*-DNA.

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

em que, F_0 e F são as intensidades relativas de fluorescência do aduto *ct*-DNA-BE, na ausência e na presença do complexo, respectivamente. K_q é constante de velocidade bimolecular de supressão, τ_0 é o tempo de vida de fluorescência média do aduto *ct*-DNA-BE excitado ($23,0 \times 10^{-9}$ s) [53], $[Q]$ é a concentração do complexo e K_{sv} é a constante de supressão de Stern-Volmer. Esta constante é considerada a constante de ligação referente ao aduto *ct*-DNA-composto titulante e é obtida da regressão linear de $\frac{F}{F_0}$ vs $[Q]$.

3.2.11 Eletroforese de DNA em gel de agarose

A possibilidade de os complexos interagirem com o DNA plasmidial foi estudada por eletroforese em gel de agarose. Foi utilizado o plasmídeo PSP72. Assim, 10 μL do plasmídeo (100 ng) em tampão Tris-HCl (pH 7,2) foram incubados com 10 μL dos ligantes a 200 μM (concentração final de 100 μM) e 10 μL dos complexos em concentrações de 200 e 20 μM em DMF (5% v/v) (concentração final de 10 e 100 μM) por 24 horas a 37 °C. A razão complexo/DNA resultante é de (20 e 2 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% v/v azul de bromofenol, 50% v/v 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 70 V por 1 hora. O gel foi visualizado e fotografado em transiluminador UV após incubação em solução de brometo de etídio (2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 horas.

3.2.12 Estudos de interação com BSA por medidas de fluorescência

Para estudo da interação com a albumina do soro bovino (BSA), preparou-se uma solução em tampão fosfato-salino PBS, pH 7,4. Sua concentração foi calculada por espectroscopia na região UV-

VIS, utilizando a lei de Lambert-Beer, em que ϵ é a absorvidade molar da BSA ($43824 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$ em 228 nm).

As titulações foram realizadas diretamente na cubeta. A uma cubeta foram adicionados $2905 \mu\text{L}$ de tampão PBS e $80 \mu\text{L}$ de BSA a $3,7 \mu\text{M}$, uma medida foi realizada correspondendo ao ponto zero. Em seguida, foram feitas adições sucessivas dos complexos deste trabalho, na faixa de concentração de $0 - 12 \mu\text{M}$ preparadas em DMF, correspondendo a $7,5 \mu\text{L}$ (não ultrapassando 1% de DMF para garantir a integridade da proteína[54]). Cada adição foi homogeneizada manualmente com auxílio de micropipeta por 2 minutos seguidos da aquisição dos espectros. Os espectros foram registrados na faixa de $290 - 550 \text{ nm}$, com $\lambda_{\text{excitação}} = 280 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 344 \text{ nm}$ a fim de se observar alguma supressão da fluorescência característica de BE-ct-DNA que sugere um mecanismo de interação por intercalação.

Os espectros foram ajustados ao modelo matemático Stern-Volmer [53] (Equação 2), sendo τ_0 , o tempo de vida de fluorescência média do fluoróforo excitado ($\tau_0 = 1 \times 10^{-8} \text{ s}$) [55] .

3.3 ESTUDOS TEÓRICOS

3.3.1 Estudo de otimização *in silico*

O estudo de estabilidade das possíveis conformações dos ligantes e dos complexos obtidos foi realizado pelo grupo de pesquisa da professora Juliana Fedoce Lopes da Universidade Federal de Itajubá - UNIFEI. Foram realizados cálculos de otimização e frequência utilizando o software Gaussian09 e DFT com o funcional M06-2x e função de base 6-31g(d,p).

3.3.2 Estudo ADME *in silico*

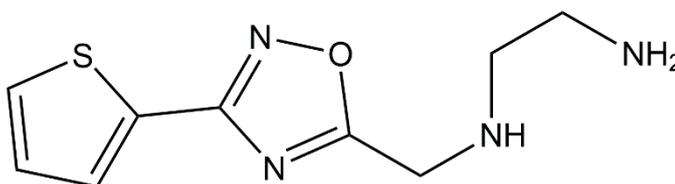
Para simulação dos parâmetros farmacológicos e farmacocinéticos dos complexos estudados neste trabalho utilizou-se a ferramenta *on-line* e gratuita SwissADME[56]. Estruturas SMILES foram criadas utilizando Chemdraw Ultra 12.0 para todos os complexos sintetizados e adicionados à base de dados do *software* para avaliação das propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

Os complexos sintetizados apresentam coloração amarelo pálido e são estáveis em solução de DMF. As análises e caracterizações realizadas comprovaram as formações dos complexos do tipo $[M^II L_2 Cl_2]$, em que $M = Pt^{2+}$ e Pd^{2+} e $L =$ ligantes **a** e **b**. Os dados dos ligantes e dos complexos são listados a seguir.

Ligante a



Nome IUPAC: N-((3-(tiofen-2-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)metil)etano-1,2-diamina.

Fórmula molecular: $C_9H_{12}N_4OS$.

Massa molar: $224,28 \text{ g mol}^{-1}$.

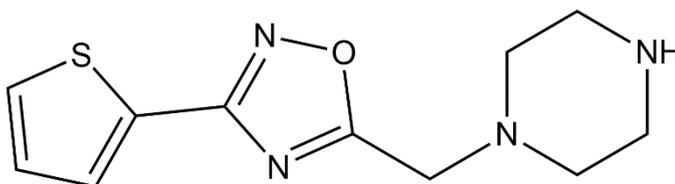
Característica física: óleo amarelo.

IV (cm^{-1}): 3344, 3094, 2926, 1556, 1422, 708.

RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C) δ : 7,87 (d, $J = 5,0, 0,9 \text{ Hz}$, 1H), 7,80 (d, $J = 3,6, 1,0 \text{ Hz}$, 1H), 7,26 (t, $J = 4,9, 3,8 \text{ Hz}$, 1H), 4,05 (s, 2H), 2,62 (d, $J = 3,6 \text{ Hz}$, 4H).

RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C) δ 179,48 (N=C-O), 163,56 (C-C=N), 130,66 (S-CH-CH), 129,82 (CH-CH-CH), 128,56 (CH-CH-C), 127,49 (CH-C-S), 50,90 (C-CH $_2$ -NH $_2$), 44,07 (NH-CH $_2$ -CH $_2$), 40,80 (CH $_2$ -CH $_2$ -NH).

Ligante b



Nome IUPAC: 5-(piperazin-1-ilmetil)-3-(tiofen-2-il)-1,2,4-oxadiazol.

Fórmula molecular: $C_{11}H_{14}N_4OS$.

Massa Molar: $250,32 \text{ g mol}^{-1}$.

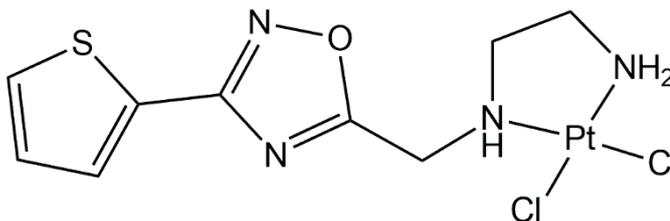
Característica física: óleo amarelo.

IV (cm^{-1}): 3370, 3027, 2918, 1553, 1429, 724.

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C) δ : 7,88 (d, $J = 3,9$ Hz, 1H), 7,80 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 7,26 (t, $J = 4,8$, 3,7 Hz, 1H), 3,95 (s, 2H), 2,87 – 2,76 (m, 4H), 2,57 – 2,52 (m, 4H).

RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C) δ : 176,92 (N=C-O), 163,66 (C-C=N), 130,84 (S-CH-CH), 130,04 (CH-CH-CH), 128,64 (CH-CH-C), 127,33 (CH-C-S), 52,32 (C-CH₂-N), 52,11 (N-CH₂-CH₂), 51,89 (N-CH₂-CH₂), 50,82 (CH₂-CH₂-N), 44,59 (CH₂-CH₂-N).

Complexo 1a



Nome IUPAC: N-((3-(tiofen-2-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)metil)etano-1,2-diamindicloroplatina(II).

Fórmula molecular: $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OSPt}$.

Massa Molar: 490,27 g mol^{-1} .

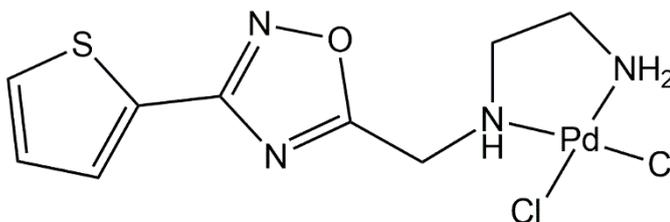
Característica física: sólido amarelo.

IV (cm^{-1}): 3284, 3091, 2948, 1567, 1339, 721.

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C) δ : 7,88 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H), 7,83 (d, $J = 3,2$ Hz, 1H), 7,27 (t, $J = 4,3$ Hz, 1H), 7,15 (s, 1H), 5,41 (d, $J = 19,1$ Hz, 2H), 4,73 (d, $J = 15,5$ Hz, 1H), 4,33 (dd, $J = 15,6$, 9,3 Hz, 1H), 2,68 (dd, $J = 32,6$, 6,3 Hz, 2H), 2,40 (d, $J = 40,1$ Hz, 2H).

RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C) δ : 174,62 (N=C-O), 163,49 (C-C=N), 130,84 (S-CH-CH), 130,03 ((CH-CH-CH), 128,42 (CH-CH-CH), 126,79 (CH-C-S), 56,25 (C-CH₂-NH₂), 46,29 (2C, NH-CH₂-CH₂-NH).

Complexo 2a



Nome IUPAC: N-((3-(tiofen-2-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)metil)etano-1,2-diamindicloropaládio(II)

Fórmula molecular: $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OSPd}$.

Massa Molar: 401,61 g mol^{-1} .

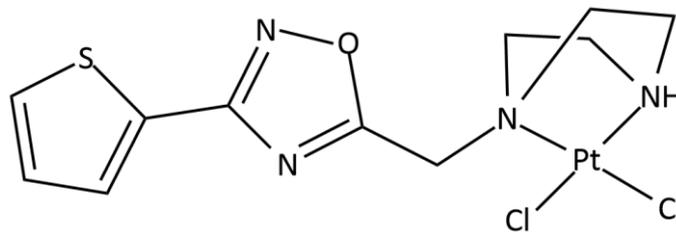
Característica física: sólido amarelo.

IV (cm^{-1}): 3301, 3090, 2952, 1566, 1340, 731.

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C) δ : 7,91 (dd, $J = 5,0, 1,0$ Hz, 1H), 7,86 (dd, $J = 3,6, 1,0$ Hz, 1H), 7,29 (dd, $J = 4,9, 3,8$ Hz, 1H), 6,76 (s, 1H), 4,97 (s, 2H), 4,59 (dd, $J = 15,9, 2,1$ Hz, 1H), 4,37 (dd, $J = 15,9, 9,3$ Hz, 1H), 2,77-2,69 (m, 2H), 2,49 – 2,30 (m, 2H).

RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C) δ : 174,89 (N=C-O), 163,70 (C-C=N), 131,05 (S-CH-CH), 130,34 (CH-CH-CH), 128,63 (CH-CH-CH), 127,03 (CH-C-S), 54,47 (C-CH₂-NH₂), 45,70 (NH-CH₂-CH₂), 44,74 (CH₂-CH₂-NH).

Complexo 1b



Nome IUPAC: 5-(piperazin-1-ilmetil)-3-(tiofen-2-il)-1,2,4-oxadiazolplatina(II).

Fórmula molecular: $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OSPt}$.

Massa Molar: 516,31 g mol⁻¹.

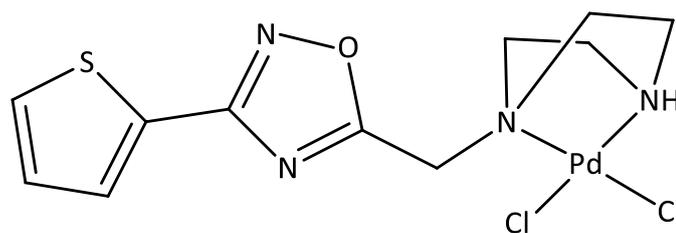
Característica física: sólido amarelo.

IV (cm^{-1}): 3462, 3076, 2966, 1563, 1419, 718.

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C) δ : 8,65 (s, 1H), 7,92 – 7,87 (m, 1H), 7,81 (dd, $J = 3,6, 1,2$ Hz, 1H), 7,27 (dd, $J = 8,6, 4,8$ Hz, 1H), 4,08 (s, 1H), 3,96 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 3,14 (d, $J = 17,5$ Hz, 4H), 2,87 – 2,68 (m, 4H).

RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25 °C) δ : 176,84 (N=C-O), 164,19 (C-C=N), 131,41 (S-CH-CH), 130,51 (CH-CH-CH), 129,10 (CH-CH-C), 127,69 (CH-C-S), 53,30 (C-CH₂-N), 51,88 (N-CH₂-CH₂), 51,44 (N-CH₂-CH₂), 49,00 (CH₂-CH₂-N), 43,34 (CH₂-CH₂-N).

Complexo 2b



Nome IUPAC: 5-(piperazin-1-ilmetil)-3-(tiofen-2-il)-1,2,4-oxadiazolpaládio(II).

Fórmula molecular: $C_{11}H_{14}Cl_2N_4OSPd$.

Massa Molar: 427,65 g mol⁻¹.

Característica física: sólido amarelo.

IV (cm⁻¹): 3486, 3087, 2956, 1576, 1418, 729.

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C) δ: 7,91 – 7,87 (m, 1H), 7,81 (dd, *J* = 3,6, 1,1 Hz, 1H), 7,27 (dd, *J* = 5,1, 3,7 Hz, 1H), 4,09 (s, 1H), 3,91 (s, 1H), 3,24 – 2,56 (m, 8H).

RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C) δ: 176,86 (N=C-O), 164,07 (C=C=N), 131,27 (S-CH-CH), 130,47 (CH-CH-CH), 129,05 (CH-CH-C), 127,80 (CH-C-S), 52,10 (C-CH₂-N), 51,98 (N-CH₂-CH₂), 49,85 (N-CH₂-CH₂), 49,00 (CH₂-CH₂-N), 43,42 (CH₂-CH₂-N).

4.1.1 Análise Elementar (CHN)

A determinação dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas para os quatro complexos sintetizados. Além disso, para os complexos **1b** e **2b**, também se determinou o teor de enxofre. Para o complexo **2a** foi considerado a presença de diclorometano e para o **2b**, a presença de água. Todos os dados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Para o cálculo das porcentagens de C, H, N e S esperadas, levou-se em conta a proposta de complexos neutros com a presença de um núcleo metálico, um ligante (**a** e **b**) e dois ligantes cloretos. Utilizou-se o software Jasper 2.0 - JavaScript Percentage Elemental Results Calculator como auxílio.

Tabela 1 - Massa molar e dados de análise elementar de CHN para os complexos sintetizados.

Complexo	Fórmula molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	%C	%H	%N	%S
1a	C ₉ H ₁₂ Cl ₂ N ₄ OSPt.0,5CH ₂ Cl ₂	458,21	21,42 (21,51)	2,46 (2,29)	10,52 (10,65)	-
2a	C ₉ H ₁₂ Cl ₂ N ₄ OSPd.0,4CH ₂ Cl ₂	401,61	25,92 (26,12)	2,96 (2,74)	12,86 (12,97)	-
1b	C ₁₁ H ₁₄ Cl ₂ N ₄ OSPt	516,31	25,59 (25,31)	2,74 (2,96)	10,85 (10,74)	6,21 (6,07)
2b	C ₁₁ H ₁₄ Cl ₂ N ₄ OSPd.1,25H ₂ O	427,65	29,35 (28,82)	3,69 (3,12)	12,45 (12,38)	7,12 (7,12)

Nota: Valores experimentais entre parênteses.

As porcentagens obtidas experimentalmente estão de acordo com as estruturas propostas com limites de precisão absoluto de até 0,28% para carbono, 0,13% para nitrogênio e 0,23% para hidrogênio.

4.1.2 Espectroscopia vibracional na Região do Infravermelho (IV)

As Figuras 12 e 13 apresentam os espectros de absorção na região do IV dos ligantes e seus respectivos complexos. Os espectros foram obtidos na região de 4000 a 400 cm^{-1} . As atribuições das bandas observadas foram baseadas em dados descritos anteriormente na literatura [57] e estão descritas na Tabela 2.

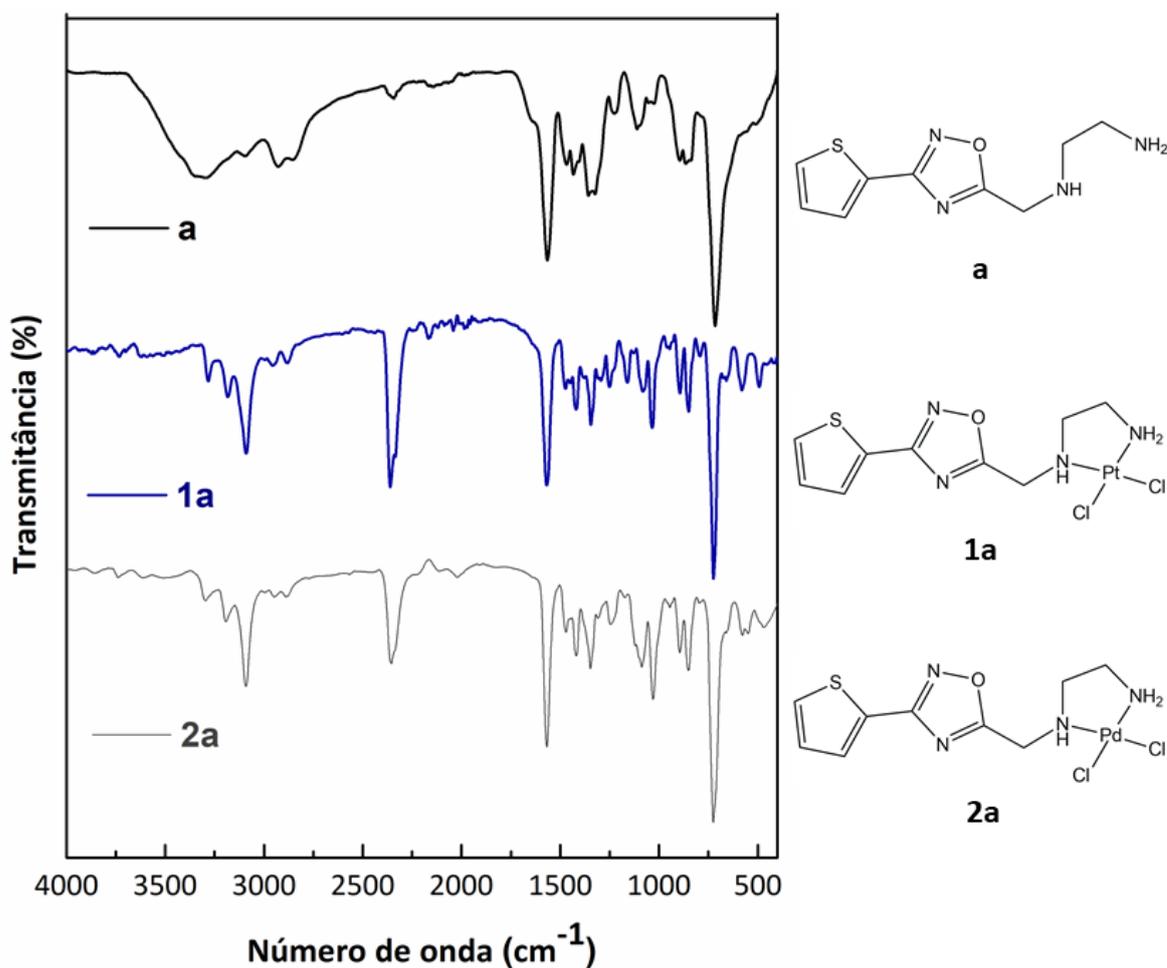


Figura 12 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o ligante **a** e os complexos **1a** e **2a**. Análises realizadas em KBr.

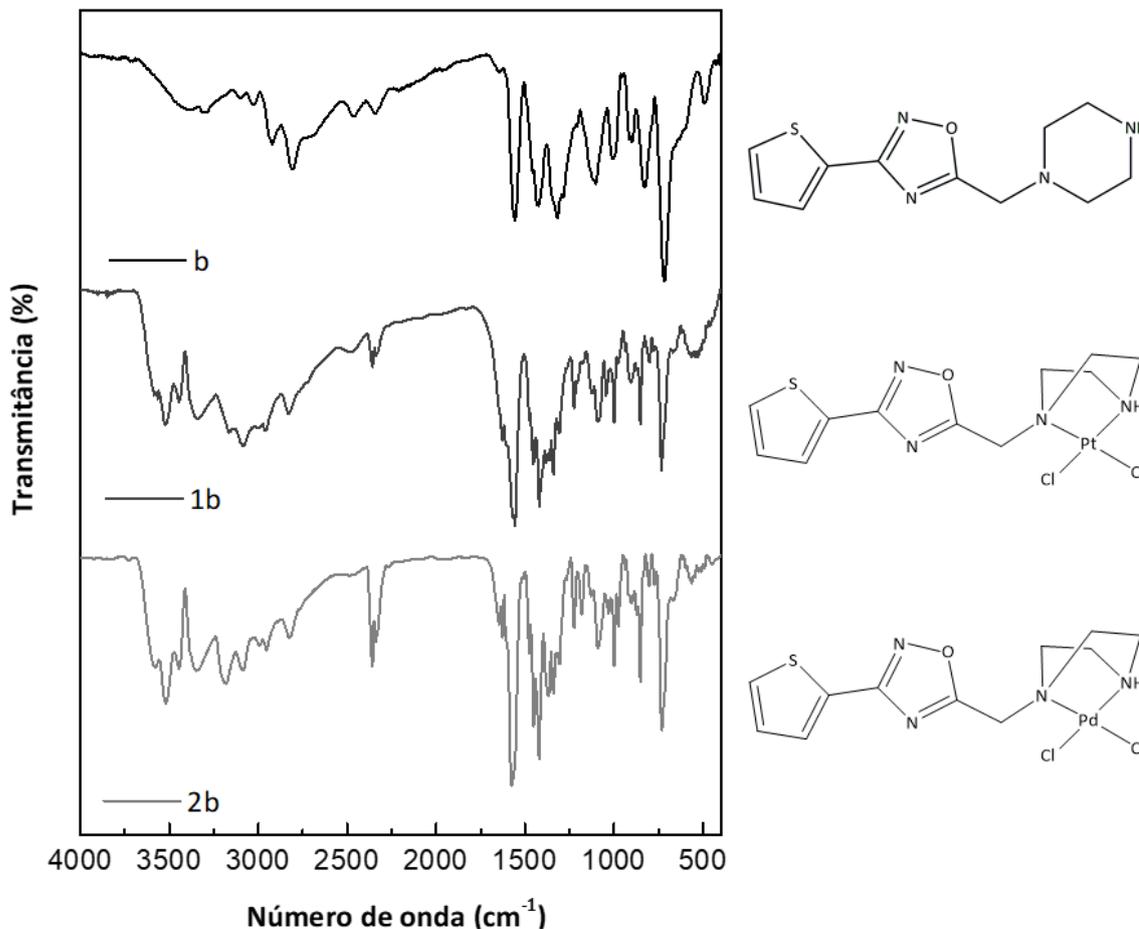


Figura 13 - Espectro de absorção na região do infravermelho para o ligante **b** e os complexos **1b** e **2b**. Análises realizadas em atr.

As bandas atribuídas ao estiramento N-H, apresentam características distintas para o ligante livre em comparação aos complexos. No ligante livre **a**, derivado da etilenodiamina, a banda em 3344 cm⁻¹ é larga, indicando a presença de elétrons livres no nitrogênio que podem realizar ligações de hidrogênio que causam esse alargamento. Já para os complexos **1a** e **2a**, as bandas em 3284 e 3301 cm⁻¹ são mais definidas, visto que a complexação pode envolver os elétrons do nitrogênio, impedindo a formação das ligações de hidrogênio. No ligante **b**, a banda referente ao estiramento da ligação N-H aparece em 3370 cm⁻¹ e nos complexos a banda é levemente deslocada para 3462 cm⁻¹ para o complexo **1b** e 3486 cm⁻¹ para o **2b**. O aumento no número de onda indica um aumento na energia de ligação. As bandas referentes às ligações C-H, tanto de grupos aromáticos como alifáticos, ocorreram na região próxima a 3000 cm⁻¹ para os seis compostos. Os estiramentos atribuídos a ligação C=N ocorrem na região 1550 cm⁻¹ para os ligantes e em 1560 - 1570 cm⁻¹ para os complexos. Já para a ligação C-N, observa-se uma diminuição na frequência de vibração dos complexos em relação ao ligante livre. A diferença entre as frequências e os perfis das bandas indica que a complexação dos metais, platina e paládio, respectivamente, pode ter ocorrido via par de elétrons não-ligantes dos nitrogênios das

diaminas, já que a ligação M-N enfraquece a ligação N-H [57]. Esta informação está de acordo com os dados obtidos no RMN de ^{195}Pt para os complexos **1a** e **1b**.

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

Atribuição	a	1a	2a	b	1b	2b
$\nu\text{N-H}$	3344	3284	3301	3370	3462	3486
$\nu\text{C-H}_{\text{Ar}}$	3094	3091	3090	3027	3076	3087
$\nu\text{C-H}_{\text{Al}}$	2926	2948	2952	2918	2966	2956
$\nu\text{C=N}$	1556	1567	1566	1553	1563	1576
$\nu\text{C-N}$	1422	1339	1340	1429	1419	1418
$\delta'\text{CH}_2$	708	721	734	724	718	729

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

4.1.3 Espectroscopia Vibracional Raman

A espectroscopia vibracional Raman é muito utilizada para obtenção de informações estruturais de compostos químicos em regiões menores que 400 cm^{-1} . Essas informações são úteis pois as ligações entre metal-ligante, aparecem nesta região. Como o paládio não é um núcleo ativo para RMN, os espectros Raman foram obtidos para os complexos **2a** e **2b**, para verificar a ligação Pd-Cl. Os espectros obtidos são mostrados nas Figuras 14 e 15.

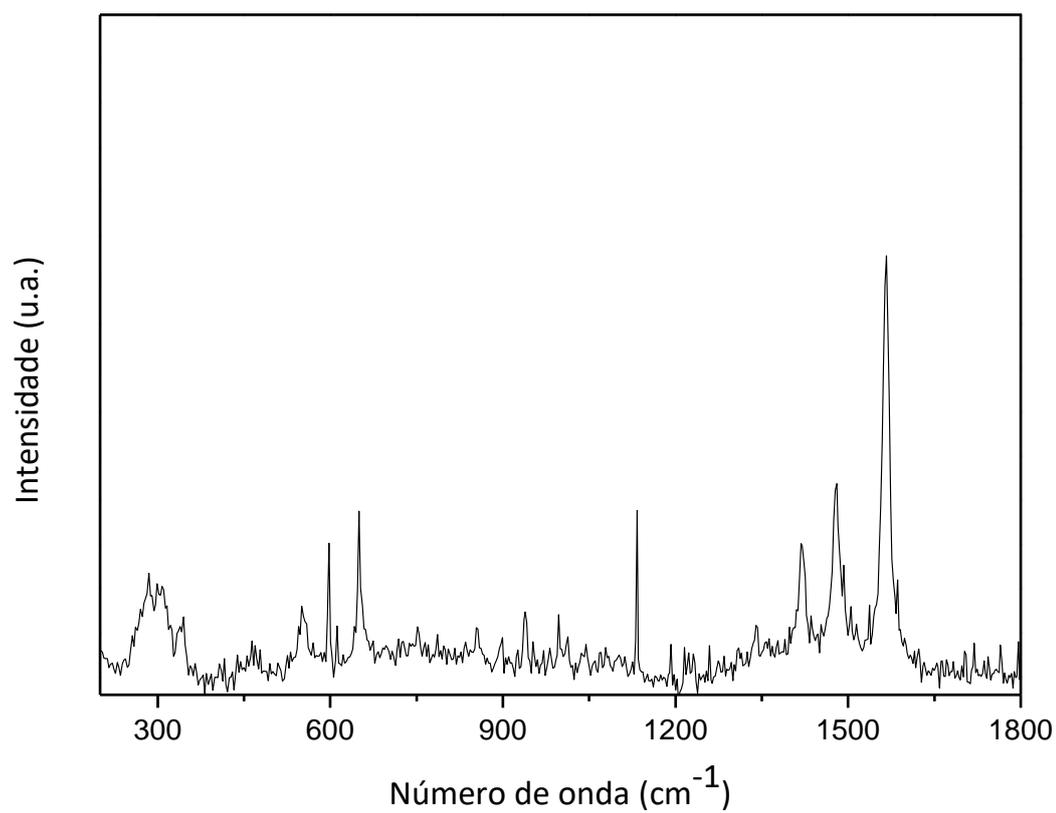


Figura 14 - Espectro Raman para o complexo **2a**.

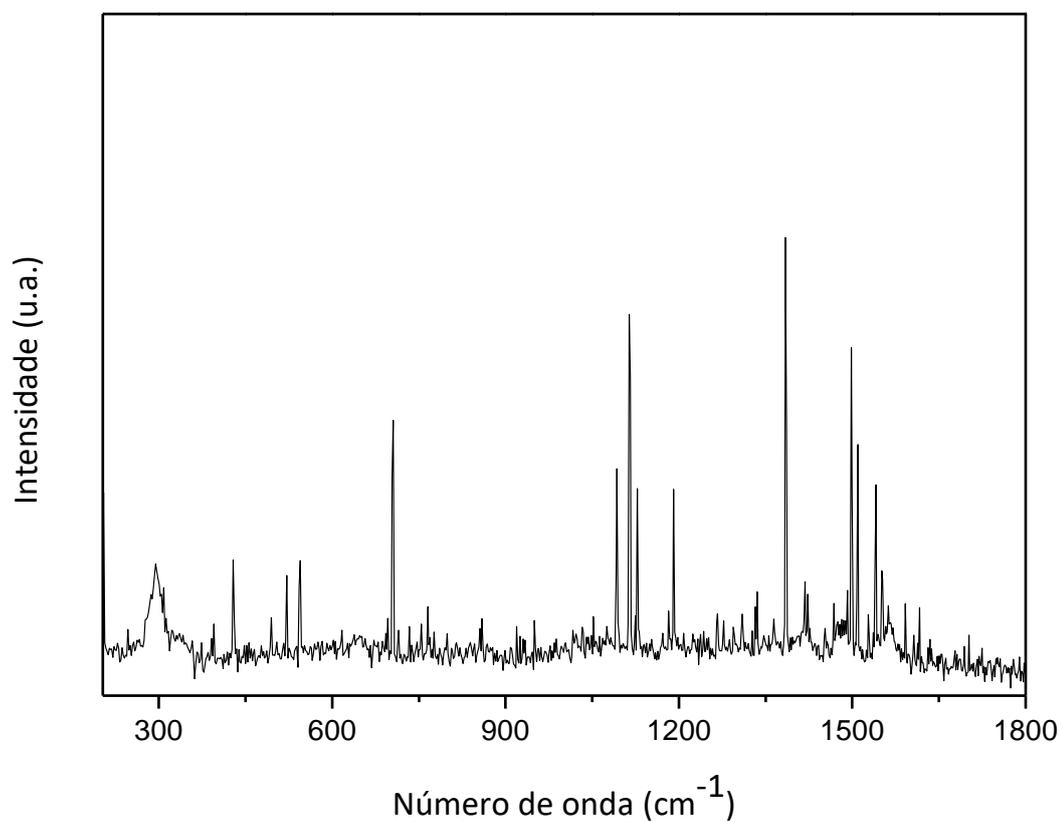


Figura 15 - Espectro Raman para o complexo **2b**.

Para o complexo **2a**, podemos observar bandas em 300, 551, 1420, 1480 e 1565 cm^{-1} . A banda em 300 cm^{-1} corresponde a ligação Pd-Cl, e a banda em 551 cm^{-1} pode ser referente a ligação Pd-N. Já as bandas em 1420, 1480 e 1565 cm^{-1} são referentes as ligações C=N, C-N e C=C. Para o complexo **2b**, podemos identificar a banda característica da ligação Pd-Cl em 298 cm^{-1} . Bandas nessas regiões foram também encontradas para complexos de paládio pelos grupos de pesquisa de Kindermann [58] e pelo grupo de Fernandes Knupp [59].

4.1.4 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR)

A espectrometria de massas foi realizada com ionização por eletrospray em modo positivo e negativo (ESI-MS). Foi possível determinar os picos base para todos os complexos. Para efeito de comparação, foi feita a simulação dos espectros de distribuição isotópica dos complexos no software ChemCalc[60].

Para o complexo **1a**, foi observado o sinal referente a molécula cationizada em m/z 511,96488 (Figura 16), esse valor é compatível com o íon aduto $[M+Na]^+$. O íon aduto simulado foi m/z 511,9654, o que condiz com o resultado experimental com um erro de 0,00010%.

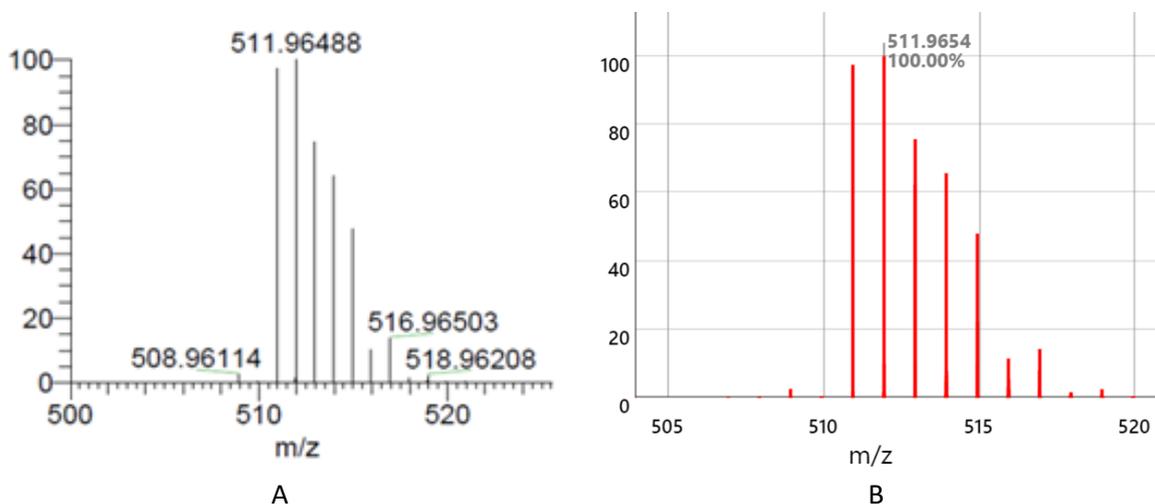


Figura 16 - A) Espectro de ESI-MS para o complexo **1a** em metanol no modo positivo; B) Espectro simulado no Chemcalc.

O pico encontrado para o complexo **2a** em m/z 364,94497, corresponde ao fragmento $[M-Cl]^+$, com o complexo menos um ligante cloreto. O resultado experimental está de acordo com a simulação, que mostra o íon molecular em m/z 364,9455 (Figura 17) e com erro de 0,00014%.

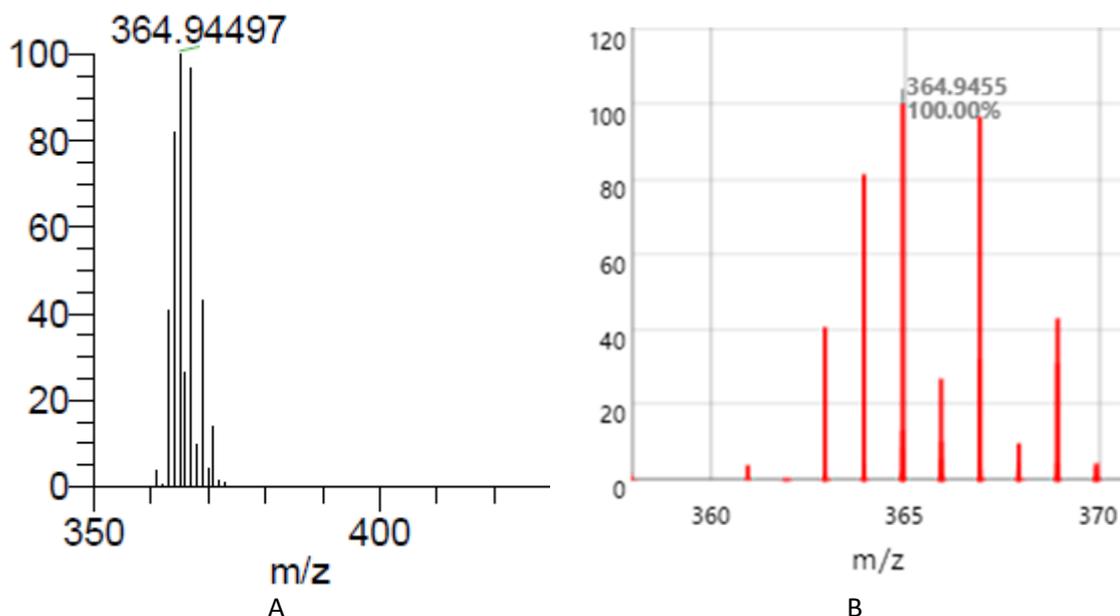


Figura 17 - A) Espectro de ESI-MS para o complexo **2a** em metanol no modo positivo; B) Espectro simulado no Chemcalc.

Para os complexos **1b** e **2b**, os íons moleculares foram observados em m/z 514,99076 e m/z 426,93730, correspondendo aos fragmentos $[M-H^+]$, ou seja, o complexo menos um íon hidrogênio. As simulações novamente confirmaram os resultados experimentais obtidos, mostrando os íons moleculares em m/z 514,9913 e m/z 426,9379, Figuras 18 e 19, respectivamente.

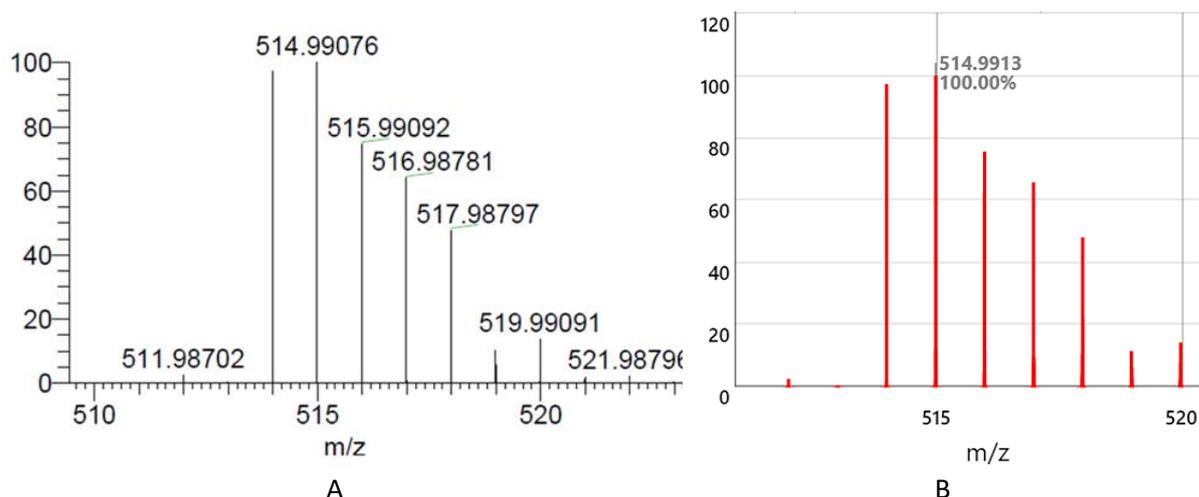


Figura 18 - A) Espectro de ESI-MS para o complexo **1b**, em metanol no modo negativo; B) Espectro simulado no Chemcalc.

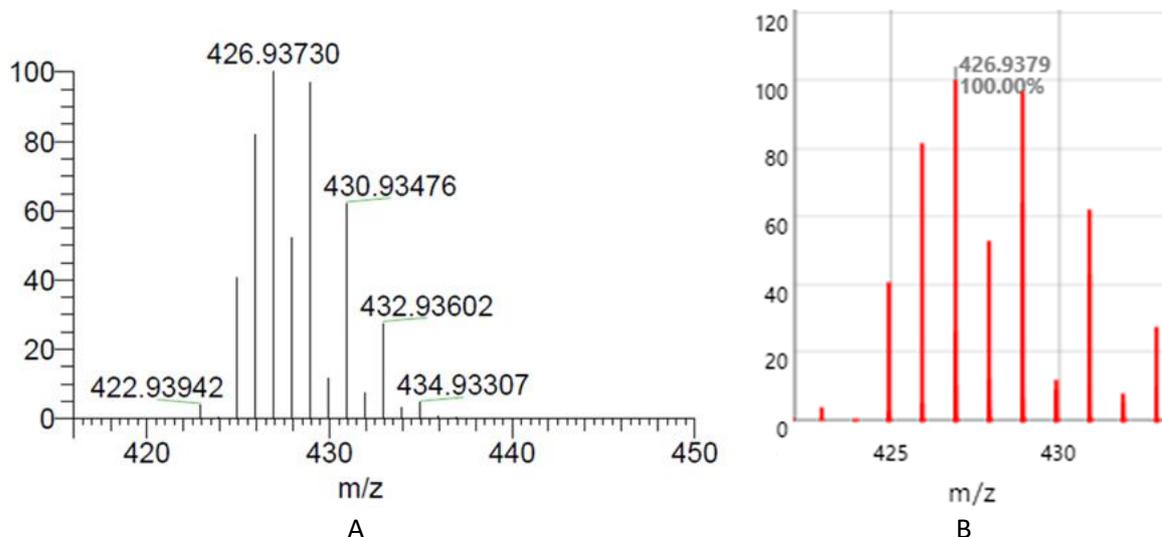


Figura 19 - A) Espectro de ESI-MS para o complexo **2b**, em metanol no modo negativo; B) Espectro simulado no Chemcalc.

4.1.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN dos ligantes e complexos foram realizados em DMSO- d_6 e em DMF- d_7 , para estudo de estabilidade. Os sinais de ^1H foram atribuídos com base nos deslocamentos químicos, multiplicidades e dados da literatura. Os átomos de carbono foram identificados com base no deslocamento e por experimento DEPT-135. Os espectros dos ligantes e seus respectivos complexos apresentam similaridades. Os deslocamentos, multiplicidade e constantes de acoplamento para o ligante **a** e os complexos **1a** e **2a** estão mostrados na Tabela 3.

Para o ligante **a**, os átomos de hidrogênio da parte aromática da molécula (H_a , H_b e H_c) apresentaram sinais em 7,87, 7,80 e 7,26 ppm, para o complexo **1a**, os sinais apareceram em 7,88, 7,83, 7,27 ppm e para o complexo **2a**, em 7,91, 7,86 e 7,29 ppm. A complexação do metal altera levemente os deslocamentos dos sinais. Os dois átomos de hidrogênio do carbono ligado diretamente a diamina ($\text{H}_{d,d'}$), se apresenta como um simpleto no ligante mas se desdobra em dois sinais após a complexação. Esse fenômeno ocorre, pois o átomo de nitrogênio da diamina se torna um centro quiral após se ligar ao metal, assim, os hidrogênios próximos a ele passam a ser diastereotópicos[61]. Os quatro átomos de hidrogênio da diamina ($\text{H}_{e,e'}$ e $\text{H}_{f,f'}$), aparecem como um único sinal para o ligante e se separam para os complexos. Essa mudança é um dos indícios da complexação do metal pelos nitrogênios da diamina, já que a presença do metal altera toda a densidade de carga da estrutura, principalmente em sua vizinhança imediata, devido à alta densidade eletrônica dos metais. Os átomos de hidrogênio ligados diretamente aos nitrogênios (H_g e $\text{H}_{h,i}$) são visíveis apenas nos complexos.

Os espectros de RMN ^{13}C para o ligante **a** e os complexos **1a** e **2a**, também apresentaram similaridades e as identificações foram realizadas de maneira análoga aos espectros de ^1H . Os átomos de carbono foram identificados em ordem crescente na estrutura do ligante, como mostrado na Figura 23. A mesma numeração foi usada para os complexos.

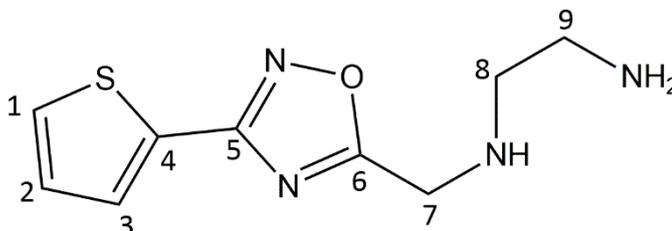


Figura 23 - Numeração dos átomos de carbono do ligante **a**.

As principais mudanças ocorreram nos átomos de carbono da diamina e naqueles próximos a ela, como mostra na Tabela 4, evidenciando, mais uma vez, a complexação dos metais pelos nitrogênios da diamina.

Tabela 4 - Atribuições dos espectros de RMN ^{13}C para o ligante **a** e complexos **1a** e **2a**.

Carbonos	Ligante a (δ)	Complexo 1a (δ)	Complexo 2a (δ)
1	130,66	130,84	131,05
2	129,82	130,03	130,34
3	128,56	128,42	128,63
4	127,49	126,79	127,03
5	163,56	163,49	163,70
6	179,48	174,62	174,89
7	50,90	56,25	54,47
8	44,07	46,29	45,70
9	40,80	46,29	44,74

A Figura 24 mostra uma comparação entre os espectros de RMN ^{13}C para o ligante **a** e os complexos **1a** e **2a**.

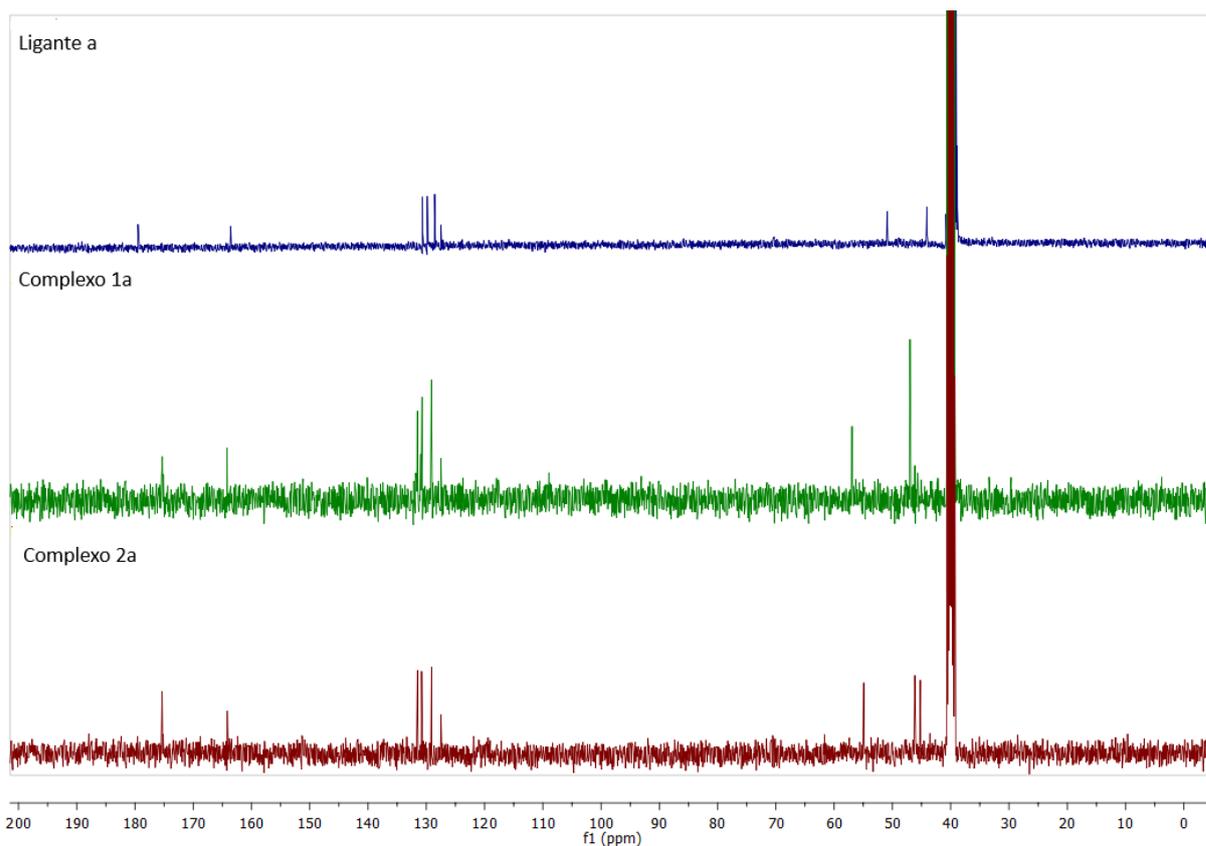


Figura 24 - Espectro de RMN de ^{13}C para o ligante **a** os complexos **1a** e **2a**, 100 MHz e 25 °C, em DMSO- d_6 .

Os deslocamentos, multiplicidade e constantes de acoplamento para o ligante **b** e os complexos **1b** e **2b** estão mostrados na Tabela 5.

Para o ligante **b**, os átomos de hidrogênio da parte aromática da molécula (H_a , H_b e H_c) apresentaram sinais em 7,88, 7,80 e 7,26 ppm, para o complexo **1b**, os sinais apareceram em 7,92-7,87, 7,81, 7,27 ppm e para o complexo **2b**, em 7,91-7,87, 7,81 e 7,27 ppm. O desdobramento desses sinais, pode estar relacionado a complexação dos metais, tornando os átomos de hidrogênio magneticamente diferentes e aumentando a complexidade dos acoplamentos spin-spin. Esse fenômeno é observado também nos átomos de hidrogênio da piperazina. Os dois átomos de hidrogênio do carbono ligado diretamente a diamina ($\text{H}_{d,d'}$) também se dividiram em dois sinais após a complexação, da mesma forma que ocorreu para o ligante **a**. Os quatro átomos de hidrogênio da piperazina ($\text{H}_{e,e'}$ e $\text{H}_{f,f'}$), aparecem como dois sinais de 4H cada para o ligante e para o complexo **1b**. Porém, para o complexo **2b**, a complexidade dos sinais dos átomos de hidrogênio da piperazina não permite sua identificação de forma discriminada. Essa mudança também é um indício da complexação pelo anel da piperazina. O hidrogênio ligado diretamente ao nitrogênio (H_g), é visível apenas para o ligante e o complexo **1b**. O deslocamento de um sinal para um átomo de hidrogênio ligado a um

nitrogênio, pode variar devido a vários fatores, dentre eles, a complexidade de sua vizinhança, solvente utilizado, concentração da amostra e temperatura [62].

Tabela 5 - Atribuições dos espectros de RMN ^1H para o ligante **b** e complexos **1b** e **2b**.

Hidrogênios	Ligante b	Complexo 1b	Complexo 2b
		(δ , m, J (Hz))	
H_a	7,88, d, J = 3,9 Hz	7,92 – 7,87, m	7,91 - 7,87, m
H_b	7,26, t, J = 4,8, 3,7 Hz	7,27, dd, J = 8,6, 4,8 Hz	7,27, dd, J = 5,1, 3,7 Hz,
H_c	7,80, d, J = 2,6 Hz	7,81, dd, J = 3,6, 1,2 Hz	7,81, dd, J = 3,6, 1,1 Hz
H_d		4,08, s,	4,09, s,
H_{d'}	3,95, s	3,96, d, J = 7,2 Hz	3,91, s
H_{e,e'}	2,87 - 2,76, m	3,14, d, J = 17,5	3,24 - 2,56, m
H_{f,f'}	2,57 - 2,52, m	2,87 - 2,68, m	
H_g	2,42, s	8,65, s	

Os espectros de RMN ^1H para o ligante **b**, complexo **1b** e complexo **2b** são mostrados nas Figuras 25, 26 e 27 a seguir.

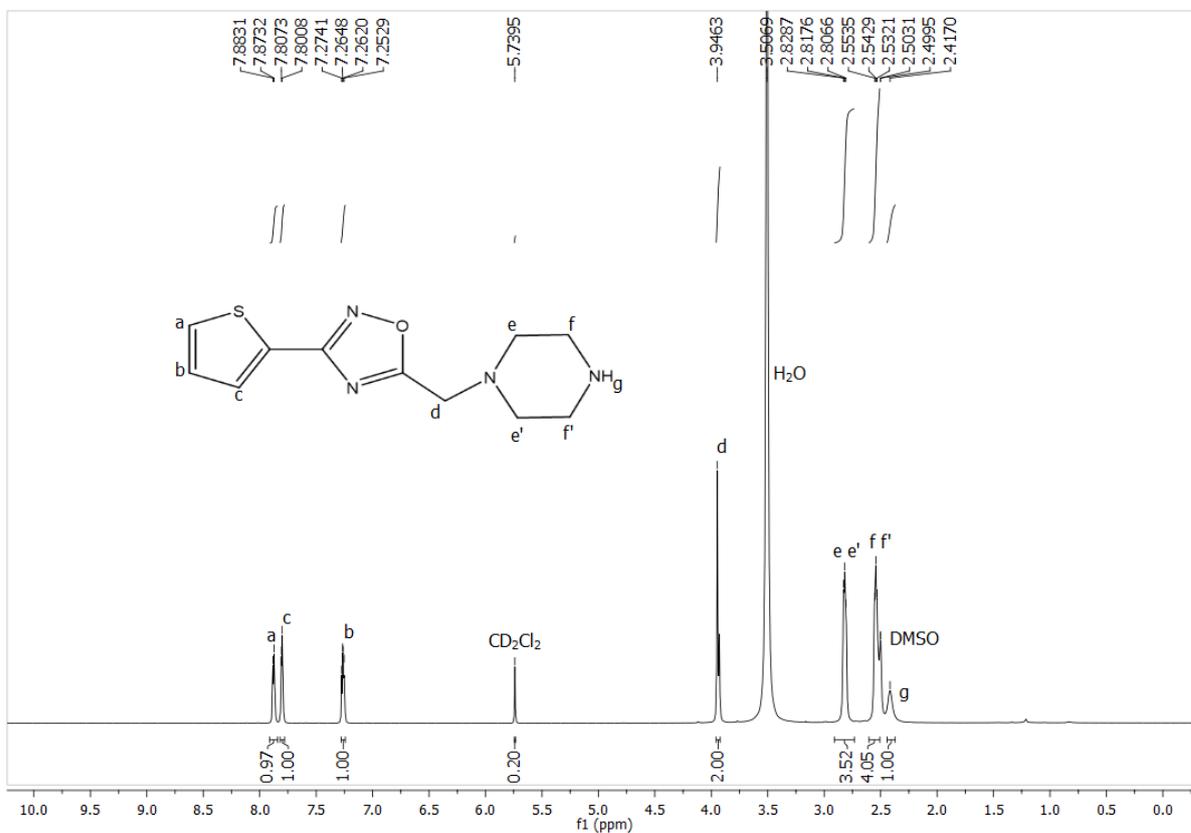


Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H do ligante **b**, 400 MHz e 25 °C, em $\text{DMSO-}d_6$.

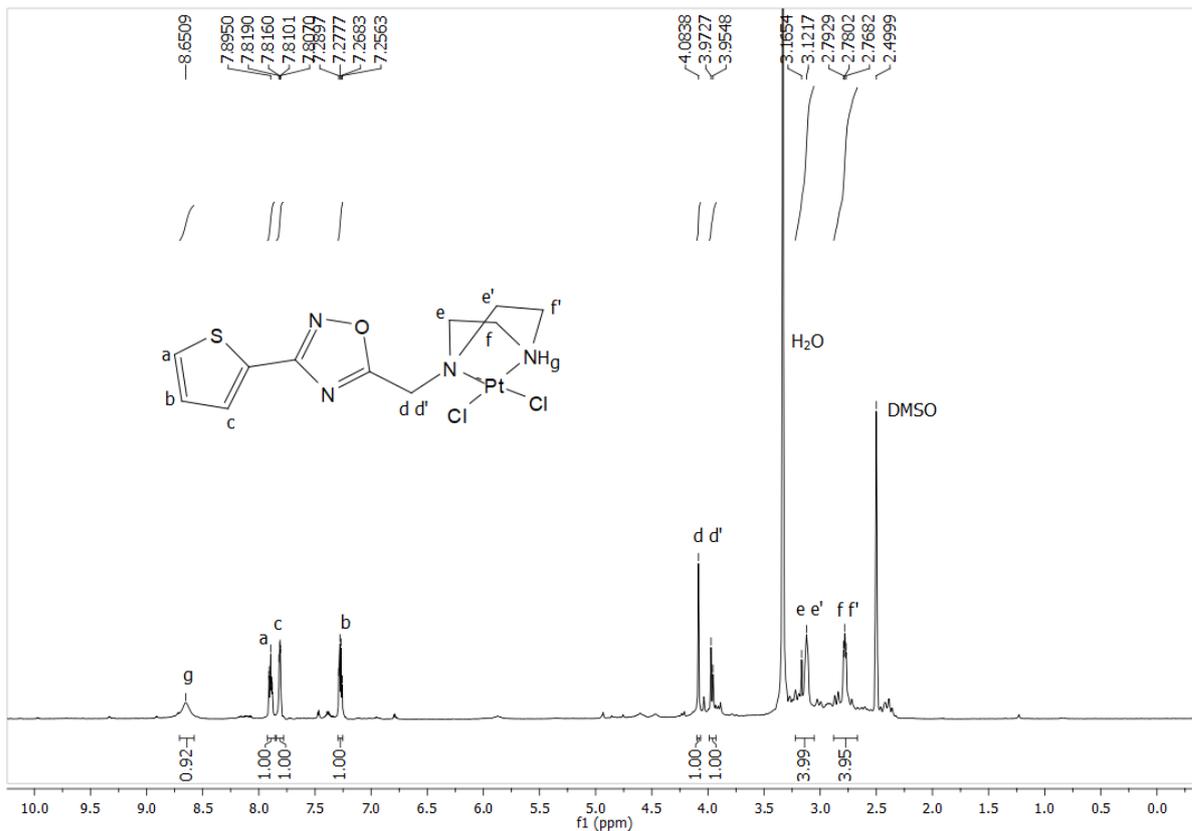


Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H do complexo **1b**, 400 MHz e 25 °C, em DMSO- d_6 .

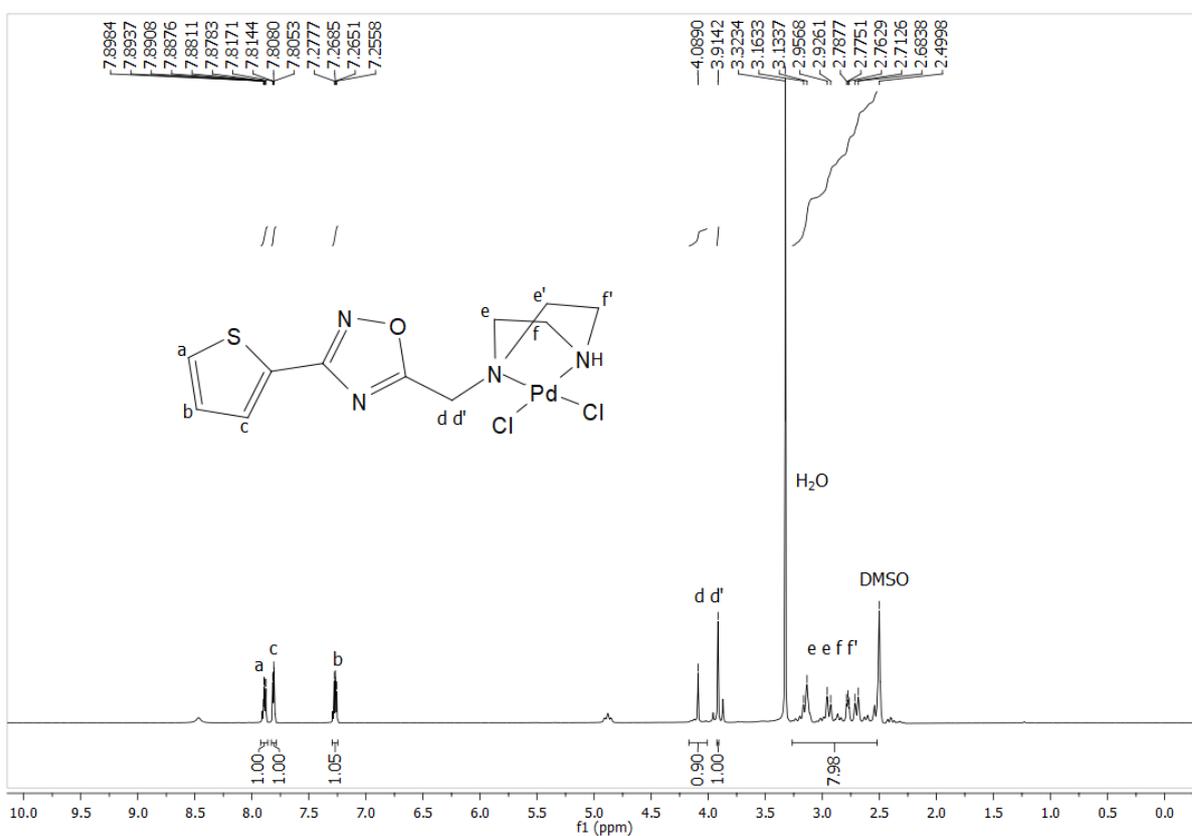


Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H do complexo **2b**, 400 MHz e 25 °C, em DMSO- d_6 .

Os espectros de RMN de ^{13}C para o ligante **b** e os complexos **1b** e **2b**, também apresentaram similaridades e as identificações foram realizadas de maneira análoga aos espectros de ^1H . Os átomos de carbono foram identificados em ordem crescente na estrutura do ligante, como mostrado na Figura 28. A mesma numeração foi usada para os complexos.

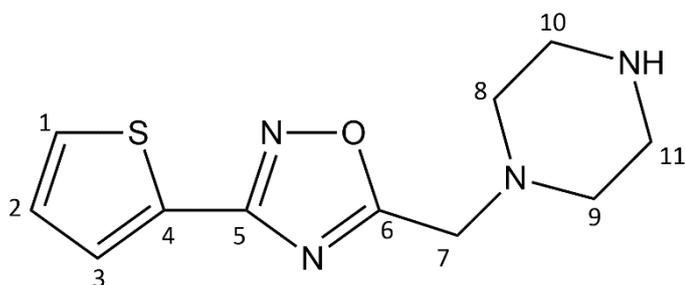


Figura 28 - Numeração dos átomos de carbono do ligante **b**.

As principais mudanças ocorreram nos átomos de carbono da piperazina, como mostra a Tabela 6 evidenciando, mais uma vez, a complexação dos metais pelos nitrogênios da diamina.

Tabela 6 - Atribuições dos espectros de RMN ^{13}C para o ligante **b** e complexos **1b** e **2b**.

Carbonos	Ligante b (δ)	Complexo 1b (δ)	Complexo 2 (δ)
1	130,84	131,41	131,27
2	130,04	130,51	130,47
3	128,64	129,10	129,05
4	127,33	127,69	127,80
5	163,66	164,19	164,07
6	176,92	176,84	176,86
7	52,33	53,30	52,10
8	52,11	51,88	51,98
9	51,89	51,44	49,85
10	50,82	49,00	49,00
11	44,59	43,34	43,42

A Figura 29 mostra uma comparação entre os espectros de RMN de ^{13}C para o ligante **b** e os complexos **1b** e **2b**.

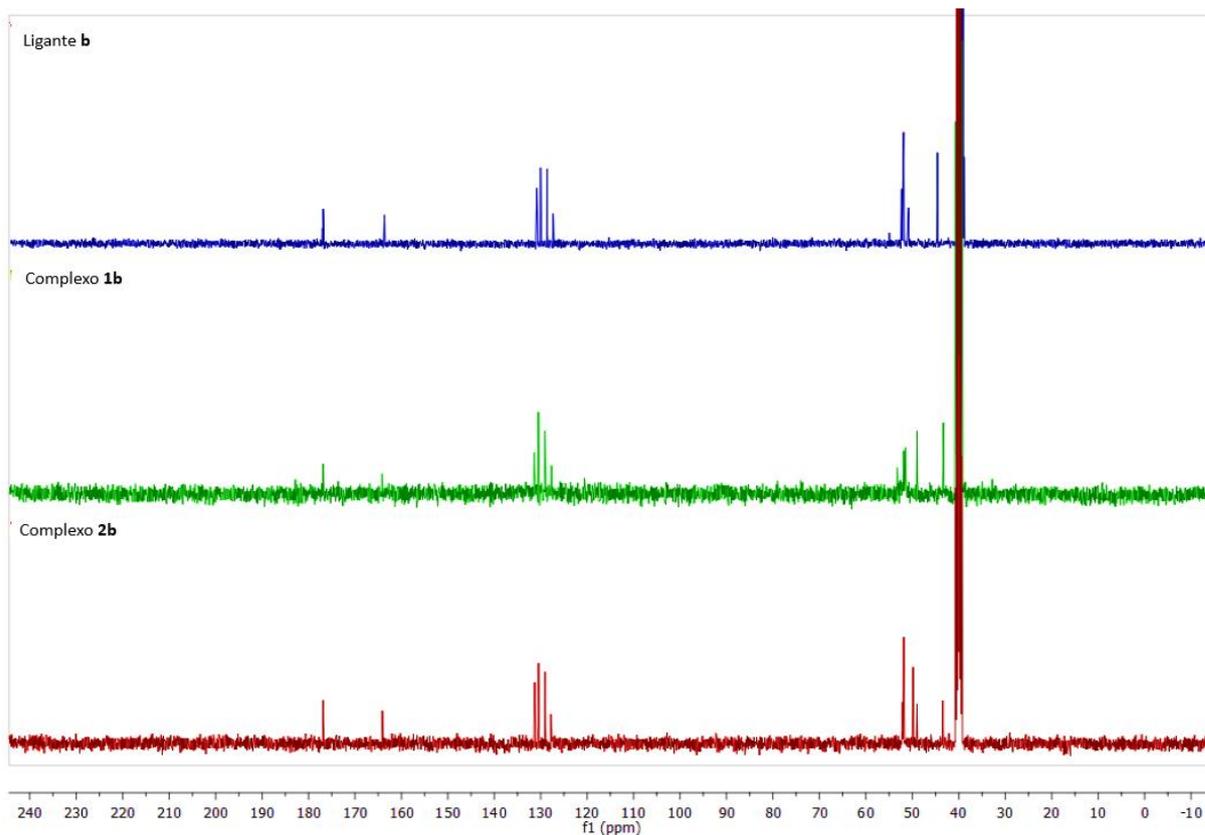


Figura 29 - Espectro de RMN de ^{13}C para o ligante **b** os complexos **1b** e **2b**, 100 MHz e 25 °C, em $\text{DMSO-}d_6$.

O RMN de ^{195}Pt foi realizado para verificar a formação do complexo proposto. O sinal da platina pode aparecer em uma larga faixa dependendo dos átomos ligados a ela. Para complexos do tipo $[\text{PtL}_2\text{X}_2]$, com $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$ e I e $\text{L} =$ ligantes contendo $\text{N}, \text{P}, \text{As}, \text{Sb}, \text{S}, \text{Se}$ e Te , a faixa em que o sinal pode aparecer é -1500 a -5500 ppm [63]. A Figura 30 mostra o RMN de ^{195}Pt para o complexo **1a**, o sinal em -2356 é compatível com esfera de coordenação do tipo PtN_2Cl_2 [64] e está de acordo com a simulação teórica realizada em que foi encontrado um deslocamento de -2360,15 ppm, como mostrado na Tabela 11 do item 4.3.1 Estudos de Otimização *in silico*.

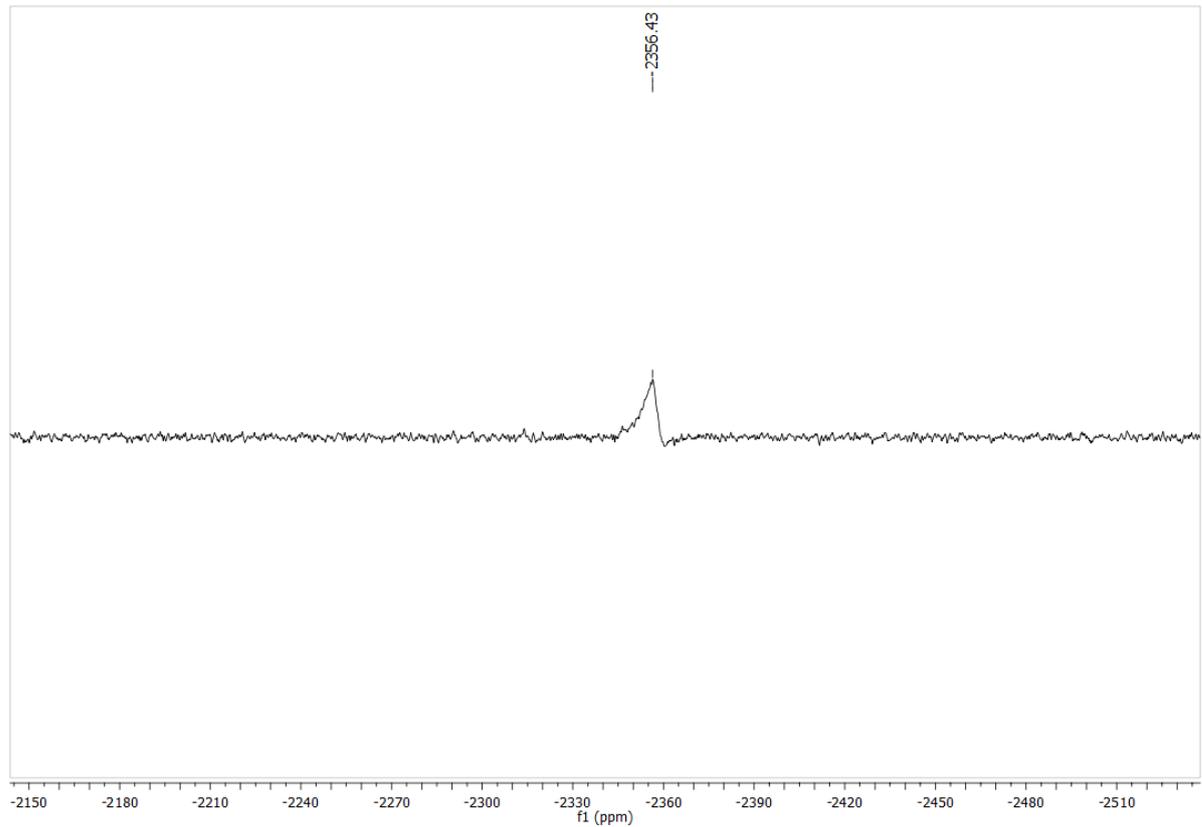


Figura 30 - Espectro de RMN de ^{195}Pt do complexo **1a**, 125 MHz e 25 °C, em $\text{DMSO-}d_6$.

A Figura 31 mostra o RMN de ^{195}Pt para o complexo **1b**, com sinal em $-2963,18$ ppm. Paschoal e colaboradores demonstraram que o deslocamento químico da ^{195}Pt no RMN de um complexo metálico em que a platina está ligada diretamente a dois átomos de enxofre e dois átomos de cloro é deslocada para valores próximos a -3295 ppm. Para complexos que a platina está diretamente ligada a um átomo de cloro, um nitrogênio e um enxofre, o deslocamento se aproxima de -3067 ppm e para complexos com a platina ligada a um enxofre e três átomos de cloro, o deslocamento cai para -3014 ppm [65]. Para confirmar o sítio de coordenação deste complexo, foram realizadas simulações teóricas com a inclusão do solvente DMSO em conjunto com um ajuste para garantir a melhor relação entre os valores experimentais e teóricos.

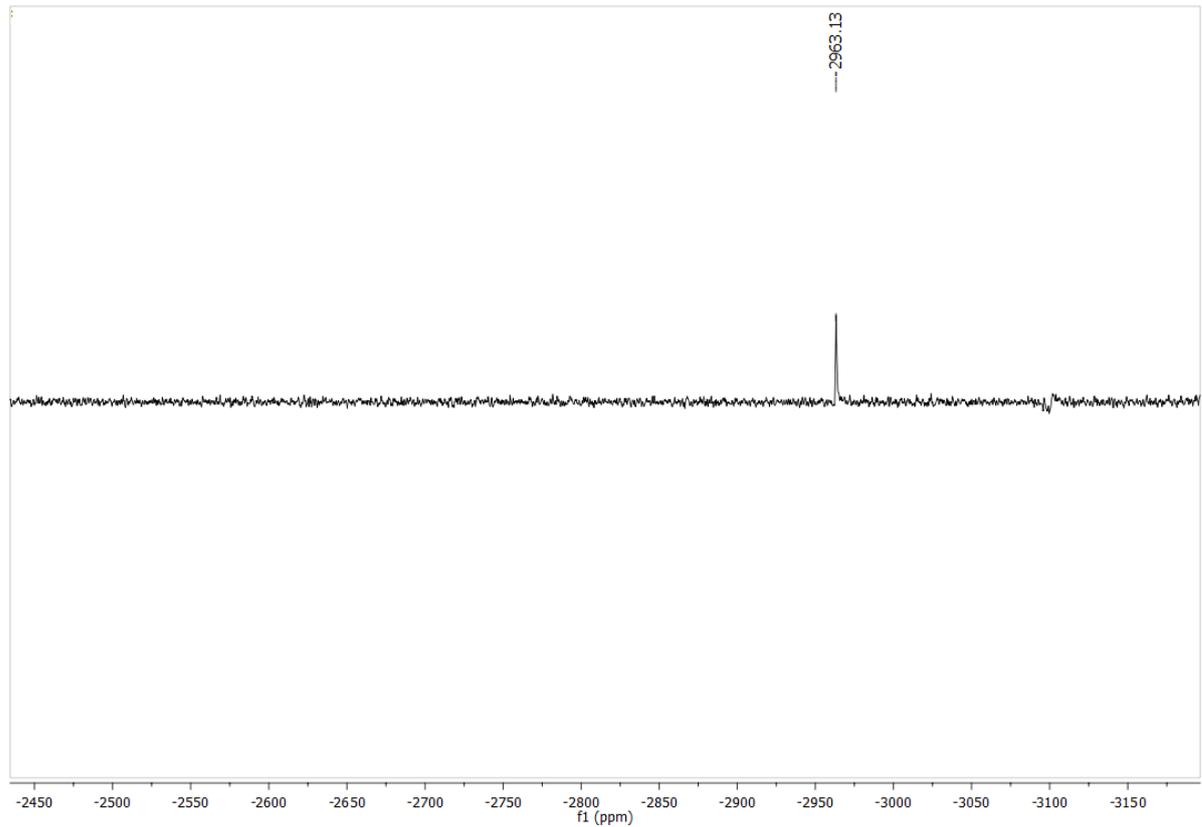


Figura 31 - Espectro de RMN de ^{195}Pt do complexo **1b**, 125 MHz e 25 °C, em $\text{DMSO-}d_6$.

Com base nos cálculos realizados, concluímos que a estrutura que melhor representa o RMN de ^{195}Pt do complexo **1b**, é a estrutura em que a platina está ligada pelos átomos de nitrogênio da piperazina e um átomo de cloro é substituído por uma molécula de DMSO.

4.1.5.1 Estudos de Estabilidade em RMN

O estudo de estabilidade dos complexos em solução foi realizado para definir o melhor solvente a ser utilizado nos testes de citotoxicidade e interação com as biomoléculas. Os complexos **2a**, **1b** e **2b**, se mostraram estáveis em DMSO, já o complexo **1a**, não foi estável neste solvente por longos períodos (mais que 24 horas), como pode ser visto na Figura 32.

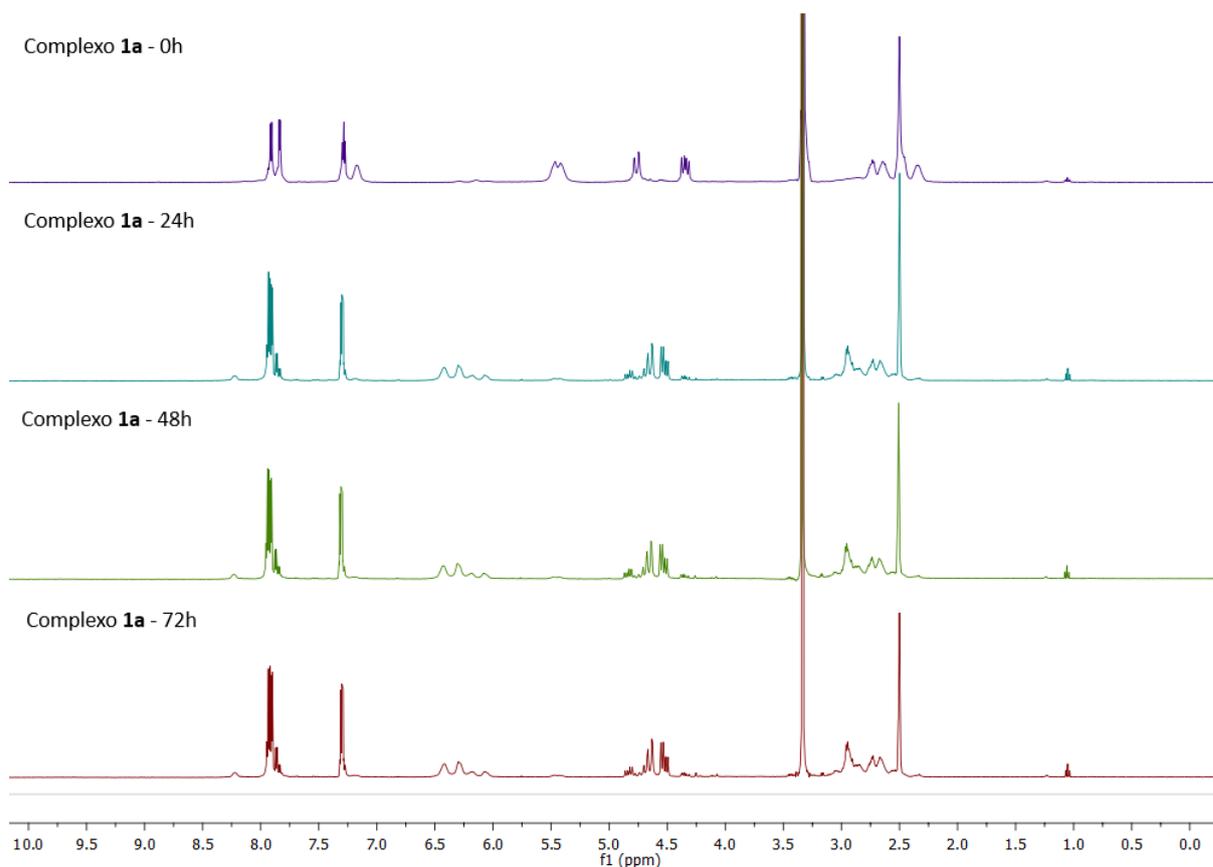


Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H para o complexo **1a**, em diferentes tempos, 400 MHz e 25 °C, em $\text{DMSO-}d_6$.

Ao se analisar os espectros do complexo **1a** em DMSO, podemos observar mudanças na posição dos sinais referentes aos átomos de hidrogênio da diamina. Os átomos de hidrogênio ligados aos átomos de carbono se deslocam para a esquerda e os hidrogênios ligados diretamente aos nitrogênios desaparecem. Podemos supor então que o DMSO pode deslocar um ligante cloreto ligado à platina e entrar na esfera de coordenação do metal, alterando todo o ambiente químico a sua volta. Para confirmar essa suposição, realizou-se a análise de espectrometria de massas para a mesma amostra do complexo **1a** dissolvida em DMSO após alguns dias. O resultado obtido mostrou que de fato houve a substituição de um ligante cloreto por uma molécula de DMSO na esfera de coordenação do complexo (Figura 33). O pico base em m/z 538,05786, indica a massa do complexo, menos um ligante cloreto e um íon hidrogênio e mais uma molécula de DMSO.

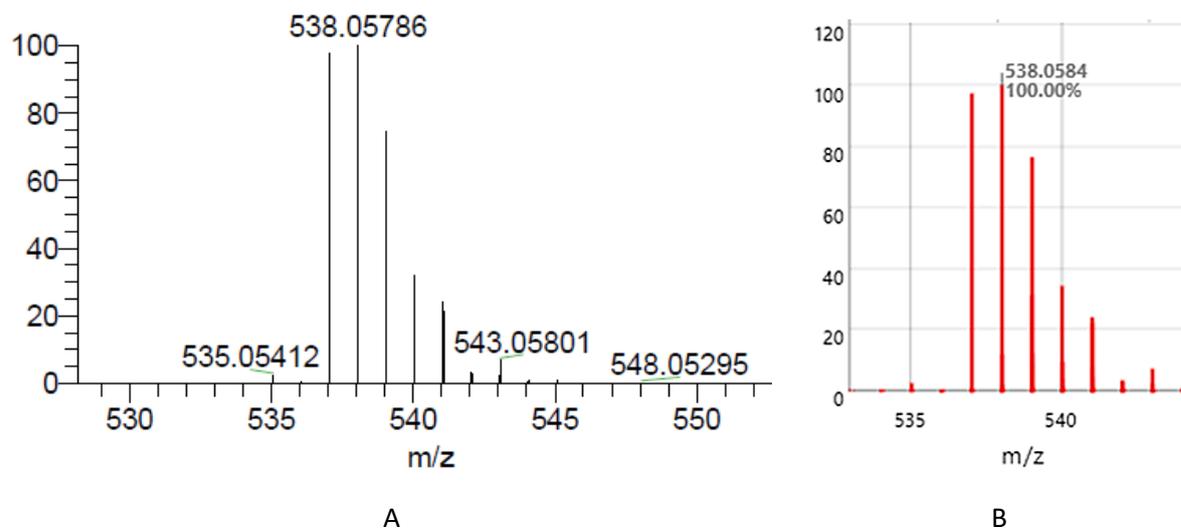


Figura 33 - Espectro de ESI-MS para o complexo **1a** após 26 dias em DMSO. Análise feita em metanol no modo positivo; B) Espectro simulado no Chemcalc.

Para padronizar as análises que seriam realizadas, testou-se a estabilidade dos complexos no solvente DMF- d_7 . Todos os complexos mantiveram estabilidade em DMF- d_7 por até 72 horas. O estudo de estabilidade do complexo **1a** em DMF- d_7 está representado na Figura 34 e dos demais complexos estão nas Figuras A1-3 do apêndice.

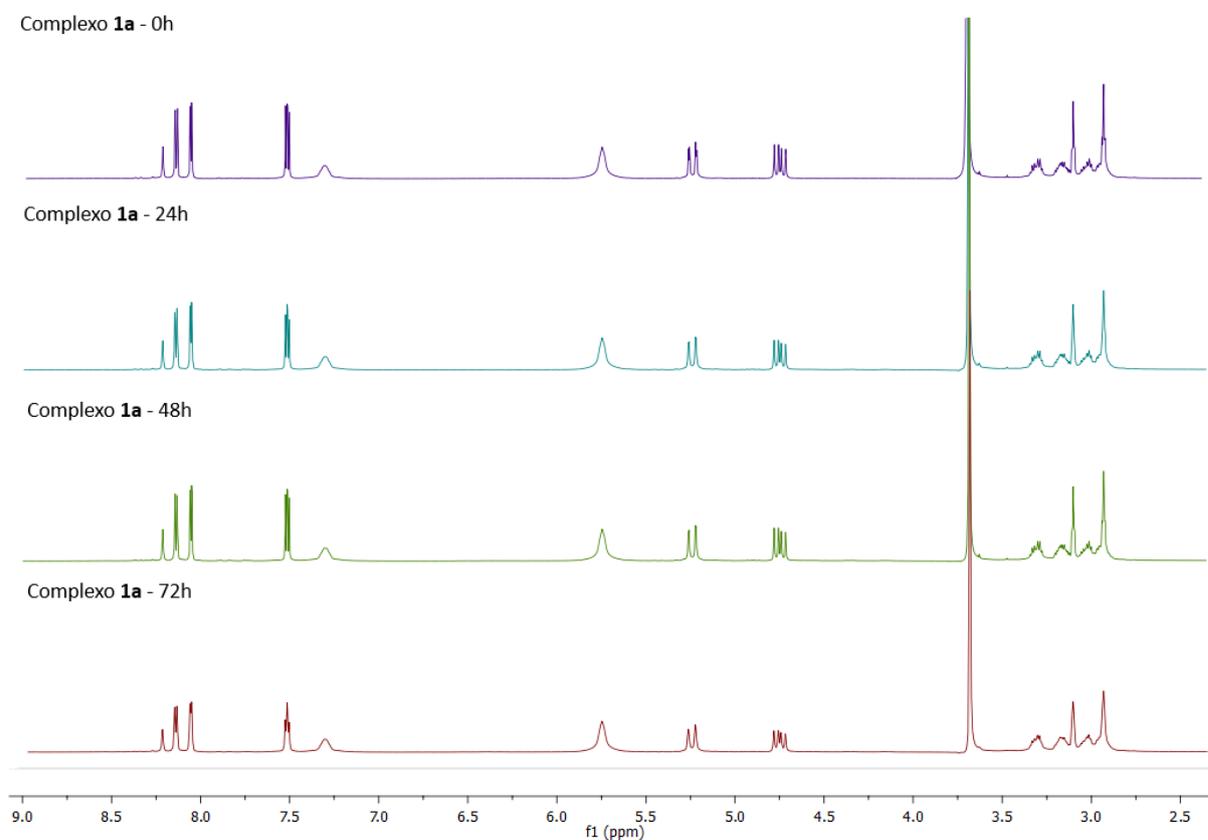


Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H para o complexo **1a**, em diferentes tempos, 400 MHz e 25 °C, em DMF- d_7 .

4.2 ESTUDO COM BIOMOLÉCULAS

4.2.1 Ensaios de citotoxicidade

O estudo de viabilidade celular é muito utilizado para entender o potencial biológico de diferentes compostos com possíveis atividades antiproliferativas [66–68]. O ensaio com MTT foi realizado a fim de se determinar a citotoxicidade dos ligantes e dos complexos sintetizados neste trabalho. Ao tratar células cancerosas e células saudáveis com diferentes concentrações das moléculas estudadas, é possível calcular o IC₅₀ destas moléculas, ou seja, a concentração que inibe o crescimento de 50% das células.

O ensaio foi realizado frente às linhagens tumorais MDA-MB-231 (adenocarcinoma metastático de mama humana) e 4T1 (células de carcinoma mamário murino) e células não tumorais MCF-10 (células normais de glândulas mamárias) a fim de se avaliar a seletividade dos compostos. A cisplatina foi utilizada como fármaco de referência. Os valores encontrados de IC₅₀ são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores de IC₅₀ ($\mu\text{mol L}^{-1} \pm \text{SD}$) e índice de seletividade (IS) obtidos pelo ensaio com MTT para os ligantes **a** e **b** e complexos **1a**, **2a**, **1b** e **2b**, nas linhagens 4T1, MDA-MB-231 e MCF-10.

Compostos	Células Tumorais				Célula não tumoral
	4T1		MDA-MB-231		MCF-10
	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀
Ligante a	91,0 ± 4,3	0,7	59,2 ± 1,1	1,1	63,4 ± 2,2
Complexo 1a	45,6 ± 0,1	1,2	25,0 ± 0,7	2,1	53,2 ± 2,3
Complexo 2a	82,6 ± 3,3	0,7	59,6 ± 0,9	0,9	54,9 ± 1,6
Ligante b	97,0 ± 2,1	0,6	75,3 ± 4,1	0,8	56,6 ± 0,3
Complexo 1b	58,1 ± 0,4	0,9	55,8 ± 0,1	0,9	51,2 ± 0,2
Complexo 2b	99,5 ± 0,4	0,9	81,7 ± 3,8	0,7	56,9 ± 1,7
Cisplatina	3,4 ± 0,1	4,4	9,6 ± 0,7	1,5	14,7 ± 2,1

Nota: SD = desvio padrão; quadruplicatas de dois experimentos diferentes

Os ligantes **a** e **b** apresentam valores de IC₅₀ maiores que seus respectivos complexos de Platina (**1a** e **1b**), confirmando a suposição de que a complexação com a platina melhora a citotoxicidade da molécula. Esta melhora pode estar relacionada a vários fatores, dentre eles, a capacidade dos metais de interagirem com biomoléculas. O tipo de metal, estado de oxidação, geometria e reatividade, interferem diretamente na atividade antiproliferativa de moléculas, como mostra Abdolmaleki e colaboradores [69]. Os complexos de platina, **1a** e **1b** apresentaram melhor atividade que os

complexos de paládio **2a** e **2b**, resultado também observado por Schleser e colaboradores [70] e Bakalova e colaboradores [71]. A tendência geral, pode ser melhor observada na Figura 35.

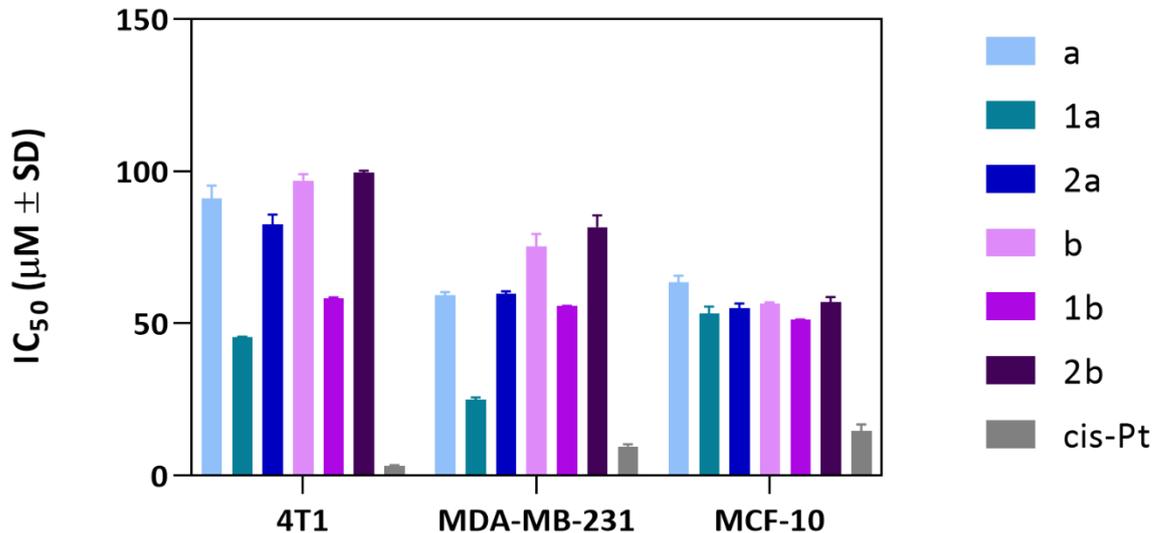


Figura 35 - Gráfico de barras dos valores de IC₅₀ dos ligantes **a**, **b** e dos complexos **1a**, **2a**, **1b** e **2b**, nas linhagens 4T1, MDA-MB-231 e MCF-10.

O complexo **1a** se mostrou o mais ativo entre todas moléculas analisadas. Inclusive frente a linhagem MDA-MB-231, um tipo de câncer de mama triplo negativo, com um perfil altamente agressivo, elevado potencial metastático e poucas opções terapêuticas disponíveis[72]. Vale ressaltar também que o índice de seletividade para essa linhagem foi bastante alto (2,1), maior até mesmo que a cisplatina nesta mesma linhagem (1,5). Além do efeito do metal, o ligante também interfere na atividade citotóxica visto que ele pode interferir na reatividade e lipofilicidade do complexo. Esse resultado está de acordo com os dados obtidos no RMN, já que o complexo **1a** foi o único que sofreu interferência na presença de DMSO. Para que a molécula seja eficiente, é importante que seja suficientemente estável para percorrer todo o caminho até o alvo biológico, ao mesmo tempo em que mantém a capacidade de interagir com o mesmo adequadamente.

4.2.2 Estudos de interação *ct*-DNA por titulações espectrofotométricas

Espectros de absorção eletrônica na região ultravioleta-visível são muito utilizados para verificar interações entre compostos e DNA. As interações podem ocorrer por interação eletrostática com o grupo fosfato ou por ligações em seus sulcos. As interações são estudadas por meio da alteração do máximo de absorção do DNA em 260 nm, que representa a transição eletrônica dos grupos cromóforos da purina e pirimidina [73].

A Figura 36 mostra todos os espectros de absorção dos complexos na ausência e presença do *ct*-DNA. Nos espectros de UV-VIS observa-se o efeito hipocrômico (diminuição do máximo de absorção) para todos os complexos, além disso, para o complexo **1a**, é visível também o deslocamento da banda mais intensa para maiores valores de comprimento de onda (efeito batocrômico).

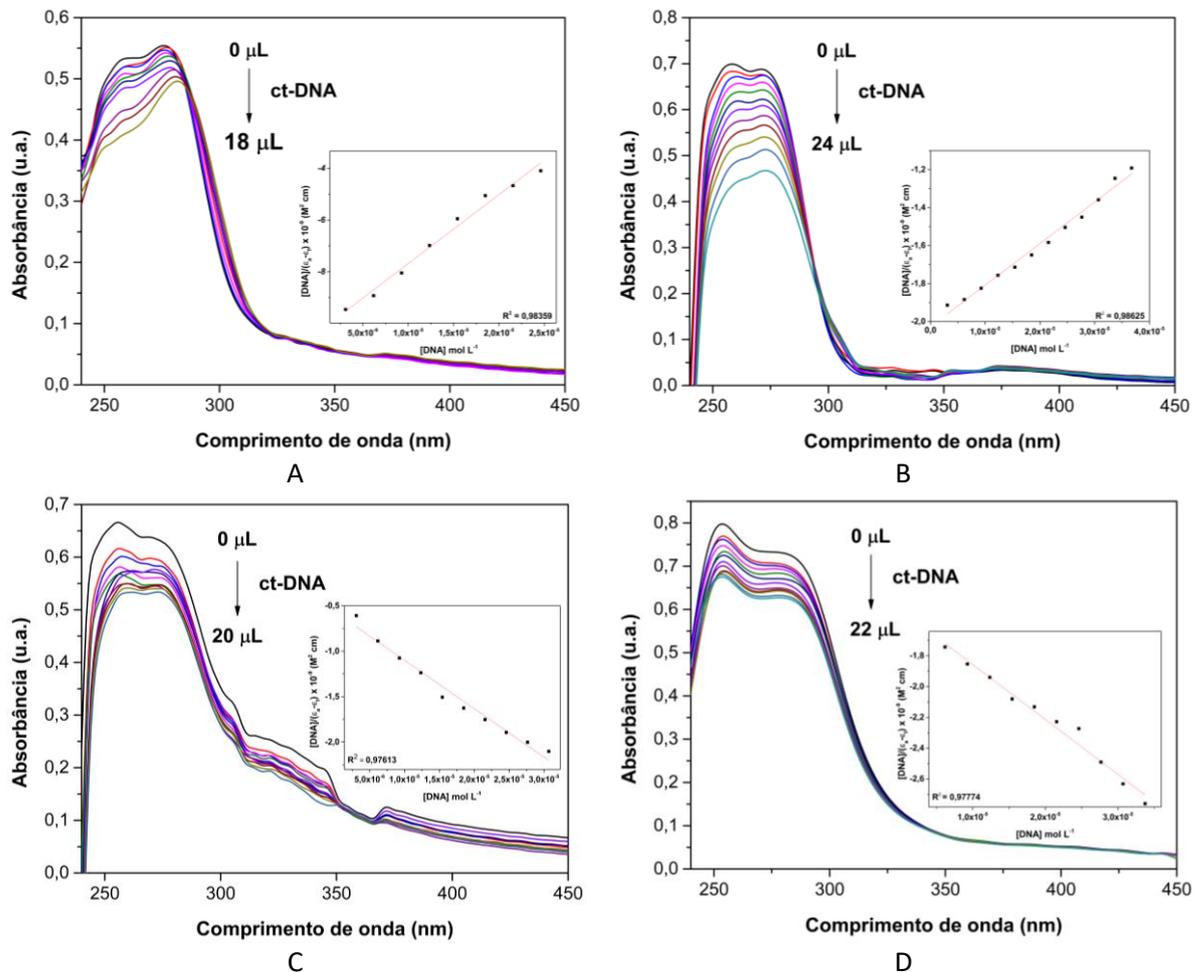


Figura 36 - Espectros de absorção de *ct*-DNA na ausência e presença de concentrações crescentes dos complexos a 25 °C. A) Complexo **1a**, B) Complexo **2a**, C) Complexo **1b**, D) Complexo **2b**. (Gráficos de regressão linear inseridos à direita).

É possível observar por meio dos gráficos que o decaimento da absorbância para os complexos com o ligante **b**, ocorreu em menor intensidade a cada adição de *ct*-DNA, ou seja, a diferença ($\epsilon_a - \epsilon_f$) se torna cada vez menor. Assim, a razão $\frac{[DNA]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)}$ diminui à medida que a concentração de DNA aumenta.

Os valores das constantes de ligação DNA-composto (K_b), listados na Tabela 8 foram obtidos pelo monitoramento das mudanças ocorridas na absorbância em, aproximadamente, 275 nm para os compostos em pH 7,4 após sucessivas adições dos complexos e utilizando-se a equação Scatchard (Equação 1).

Tabela 8 - Constantes de ligação intrínseca (K_b), e coeficientes de determinação (R^2) para os sistemas DNA-complexos.

Complexo	K_b (10^4 L mol ⁻¹)	R^2
1a	2,4	0,98359
2a	1,1	0,98625
1b	9,4	0,97613
2b	3,3	0,97774

Valores de K_b na ordem 10^4 foram encontrados por outros grupos de pesquisa [49,74,75] e indicam interação moderada entre os complexos e o DNA, sendo comparável com a constante de ligação da cisplatina ($K_b = 3,20 \times 10^4$) [76]. O complexo **1a** foi o único a apresentar batocromismo e hipocromismo, efeito consistente a ligações por intercalação [73]. Os outros complexos apresentaram apenas o efeito hipocrômico, indicando interações eletrostáticas com o DNA que devem ocorrer sem perturbação da dupla hélice do DNA [77,78].

4.2.3 Estudos de competição com ct-DNA por medidas de fluorescência

O DNA é susceptível a interações com outras moléculas em condições fisiológicas. Estas interações podem ocorrer por diversos mecanismos, sendo um deles a intercalação, que ocorre por meio de ligações do tipo π - π *stacking* [79]. Como os complexos sintetizados apresentam uma parte aromática plana, é pertinente a realização de tal estudo. O brometo de etídio é um corante catiônico plano e agente intercalante muito utilizado em testes de interação com DNA. Quando o BE se intercala ao DNA por meio dos pares de bases, o sistema emite uma intensa banda em 610 nm que é usada para monitorar as mudanças que podem ocorrer [80]. Os complexos **1b**, **2a** e **2b**, apresentaram comportamentos semelhantes durante a titulação espectrofotométrica. Para estes complexos, observa-se que a fluorescência decaiu em torno de 70%. O complexo **1a** também apresentou o decaimento da fluorescência, porém em menor intensidade (60%). Todos os espectros podem ser vistos na Figura 37. A supressão da fluorescência indica que os complexos interagem com o DNA, provocando o deslocamento do brometo de etídio [29,74].

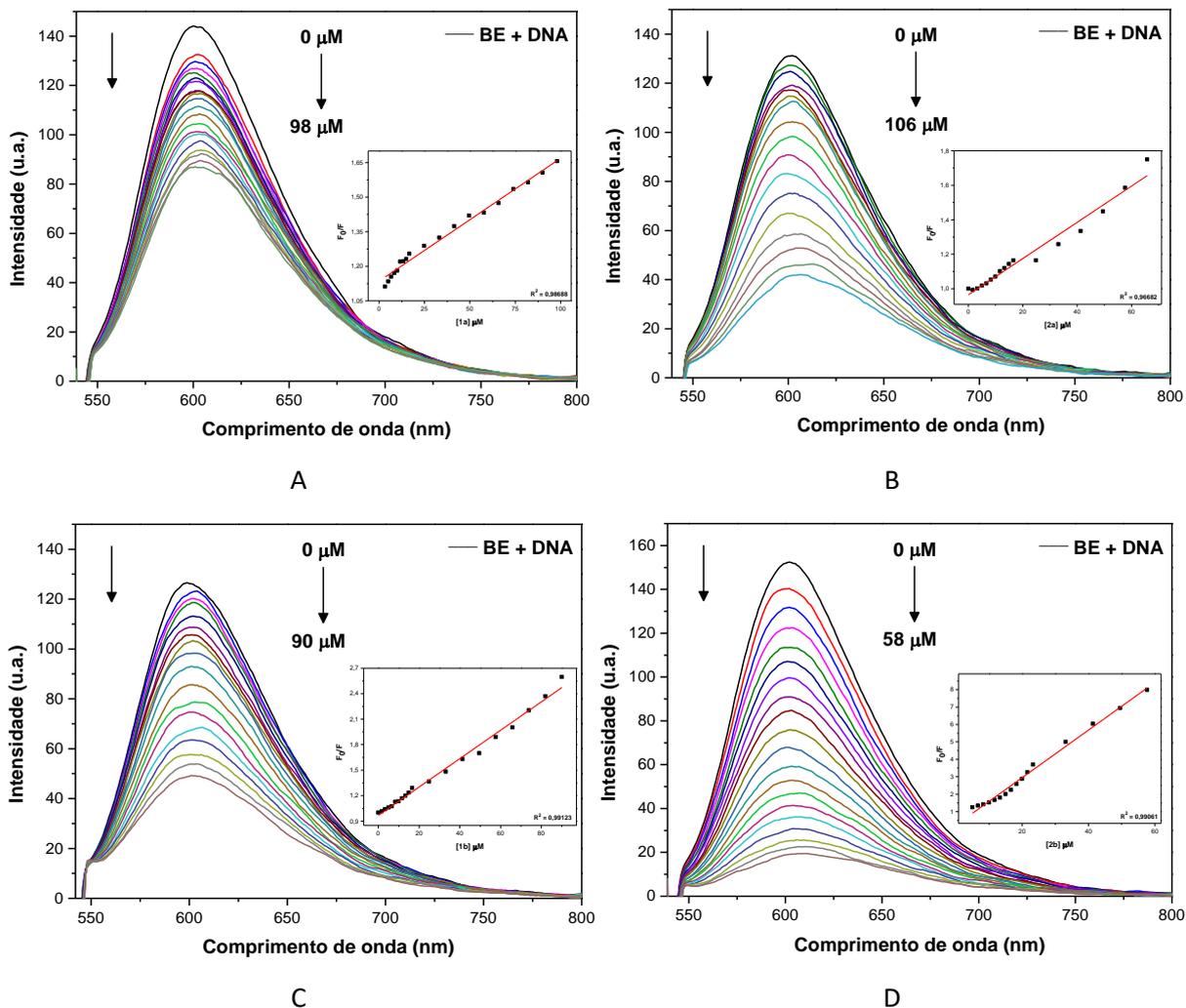


Figura 37 - Espectros de emissão de fluorescência do sistema BE-ct-DNA na ausência e presença de concentrações crescentes dos complexos a 25 °C. A) Complexo **1a**, B) Complexo **2a**, C) Complexo **1b**, D) Complexo **2b**. (Gráficos de regressão linear inseridos à direita).

As constantes de supressão K_{SV} apresentaram mesma ordem de magnitude para todos os complexos, 10^4 L mol^{-1} . Quanto mais alto o valor de K_{SV} , maior é a eficiência na supressão da fluorescência. Também foi calculado a constante de velocidade bimolecular de supressão, K_q , sendo $K_q = K_{SV}/\tau_0$. Valores como os encontrados para K_{SV} e K_q são mencionados na literatura e mostram que os complexos intercalam com o DNA de maneira moderada, por mecanismo que pode ser estático ou dinâmico [49,81,82]. Como os complexos **1b**, **2a** e **2b** suprimiram mais de 50% da fluorescência, é possível calcular a constante de intercalação aparente, K_{app} (Equação 3) [83,84]. A Tabela 9 apresenta os valores de K_{SV} , K_q , K_{app} e os coeficientes de determinação (R^2).

$$K_{BE}[BE] = K_{app}[\text{complexo}] \quad \text{Equação 3}$$

em que, $K_{BE} = 1,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $[BE] = 5 \text{ }\mu\text{M}$ e $[\text{complexo}]$ é a concentração do complexo que reduziu a fluorescência em 50%.

Tabela 9 - Constantes de supressão (K_{SV}), velocidade bimolecular de supressão K_q , constante de intercalação aparente, K_{app} e coeficientes de determinação (R^2) para os sistemas DNA-complexos.

Complexo	$K_{SV} (10^4 \text{ L mol}^{-1})$	$K_q (10^{11} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$K_{app} (10^6 \text{ L mol}^{-1})$	R^2
1a	0,5	2,3	-	0,98688
2a	1,1	4,8	1,5	0,96682
1b	1,7	7,4	0,9	0,99123
2b	1,4	6,1	3,3	0,99457

A K_{app} , indica a força da ligação entre o complexo estudado e o DNA. Todos os complexos apresentaram $K_{app} < K_{BE}$ e como o BE é considerado um bom intercalador do DNA, os complexos **2a-2b** podem interagir com o DNA, mas a intercalação não deve ser o principal mecanismo de ligação.

4.2.4 Eletroforese de DNA em gel de agarose

A eletroforese em gel é uma técnica simples, eficiente e muito utilizada para separar fragmentos de DNA [85]. A corrida no gel depende do tamanho e formato da molécula, podendo distinguir as diferentes conformações dos fragmentos. Para testes biológicos, utiliza-se normalmente o DNA plasmidial dupla fita circular, frequentemente obtido de bactérias devido sua fácil extração e manipulação genética, além de sua estabilidade e diversas aplicações. O DNA plasmidial pode assumir três conformações principais, a forma *supercoiled* (SC), círculo relaxado ou *open circle* (OC) e linear (Figura 38). A migração do plasmídeo depende do seu peso e da forma em que ele se encontra. A forma *supercoiled*, por ser a mais compacta, migra com maior velocidade pelo gel, seguida da forma linear e *open circle* [86].

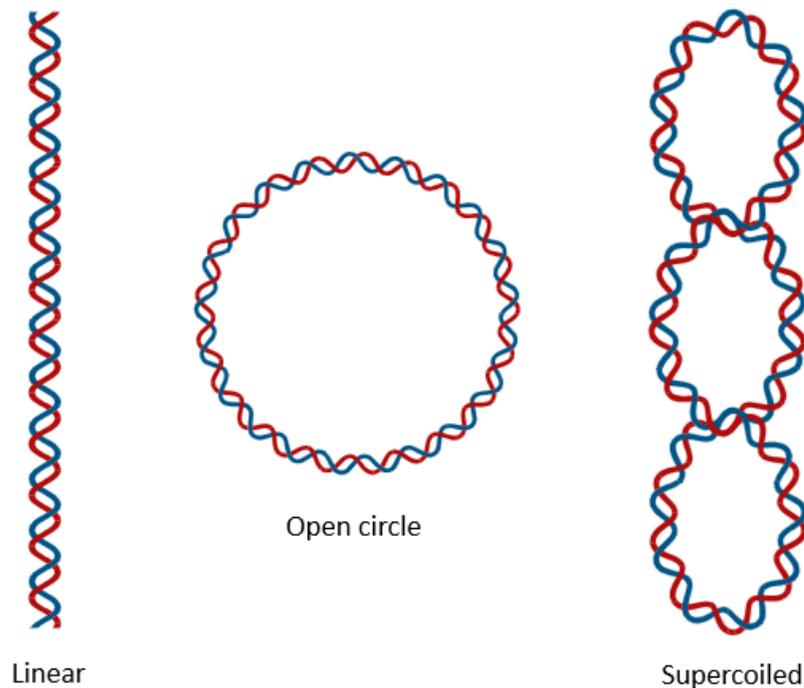


Figura 38 - Representação das principais conformações assumidas pelo DNA plasmidial. Fonte: Elaborado com BioRender.com.

A relação entre velocidade de migração/forma do DNA, só é constante em condições específicas afetadas por fatores como corrente, pH e tamanho do poro do gel. Por isso, o experimento foi primeiramente otimizado para encontrar as melhores condições de visualização da interação entre as moléculas investigadas e o plasmídeo utilizado.

A corrida eletroforética ocorreu após a incubação dos compostos com DNA por 24 horas a 37 °C. Para os ligantes e o controle, foi empregada a concentração de 100 μM e para os complexos, concentrações de 10 e 100 μM . A Figura 39 mostra o gel após a corrida.

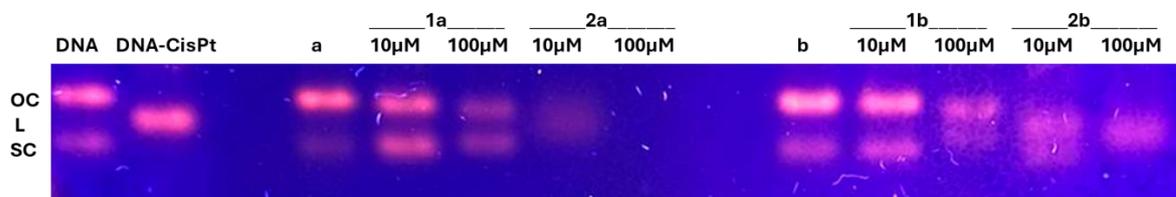


Figura 39 - Estudos de interação de DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose, com cisplatina, ligantes **a** e **b** (100 μM) e complexos **1a** - **2b** (100 e 10 μM).

Nota: Linha 1: marcador de peso molecular do DNA; linha 2: controle: plasmídeo livre; linha 3: plasmídeo + cisplatina a 100 μM ; linhas 5-9: ligante **a** (100 μM) e complexos **1a** e **2a** (10 e 100 μM); linhas 11-15: ligante **b** (100 μM) e complexos **1b** e **2b** (10 e 100 μM).

Para o plasmídeo livre, podemos observar a presença de duas formas do DNA, sendo a open circle, presente em maior quantidade. Na linha 2, observa-se que a cisplatina interagiu com o DNA,

clivando-o e convertendo-o para a forma linear (irreversível). Os ligantes **a** e **b**, apresentam padrão de corrida mais próximo ao DNA livre, indicando que sua presença não deve alterar a forma do DNA. O complexo de platina **1a** apresenta uma pequena mudança na conformação do DNA, aumentando a concentração da forma supercoiled, ou seja, parte do DNA *open circle* foi convertido a *SC*. O complexo **2a** se assemelha ao comportamento da cisplatina, indicando que o composto deve clivar o DNA transformando-o em sua forma *L*. Para o complexo **1b** ocorre transformação apenas quando o complexo está presente em maior concentração, onde pode-se observar a conversão do DNA para a forma *L*. O complexo **2b** converte o DNA *OC* para *L*, sendo o efeito mais pronunciado na concentração mais alta, indicando uma relação direta com a ligação do complexo ao DNA. Os complexos de paládio, **2a** e **2b**, foram os que provocaram maiores mudanças na conformação do DNA, sendo o complexo **2b**, com o padrão mais semelhante ao fármaco de referência. Pode-se concluir então, que os complexos **1a**, **2a** e **2b** devem interagir com o DNA isolado formando ligações covalentes, já que os três complexos converteram o DNA para sua forma linear.

4.2.5 Estudos de interação com BSA por medidas de fluorescência

As albuminas séricas são as proteínas encontradas em maior abundância no plasma sanguíneo, correspondendo a 52-60% das proteínas plasmáticas [87]. A albumina sérica humana, HSA e a albumina sérica bovina, BSA, são amplamente estudadas devido suas propriedades carreadoras e seu papel na determinação da biodisponibilidade de agentes farmacológicos [88]. Por questões de acessibilidade, e devido a sua semelhança, normalmente utiliza-se a albumina bovina para estudos de interação. A variante bovina apresenta similaridade estrutural de 80% quando comparada a albumina humana. As estruturas cristalinas das albuminas mostram que a HSA possui 585 resíduos de aminoácidos, sendo 17 resíduos de tirosina e apenas um resíduo de triptofano, já a BSA, possui 582 resíduos de aminoácidos, 20 resíduos de tirosina e 2 resíduos de triptofano [31].

O espectro UV-VIS da BSA apresenta uma banda intensa de absorção em 280 nm, correspondente aos resíduos de aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina [31,88]. Assim, o estudo dos espectros de fluorescência da BSA, é muito útil para análise de mudanças conformacionais que podem ocorrer na proteína devido a interação ou formação de aduto BSA-composto. Para todos os complexos foi observado a supressão da fluorescência (Figura 40).

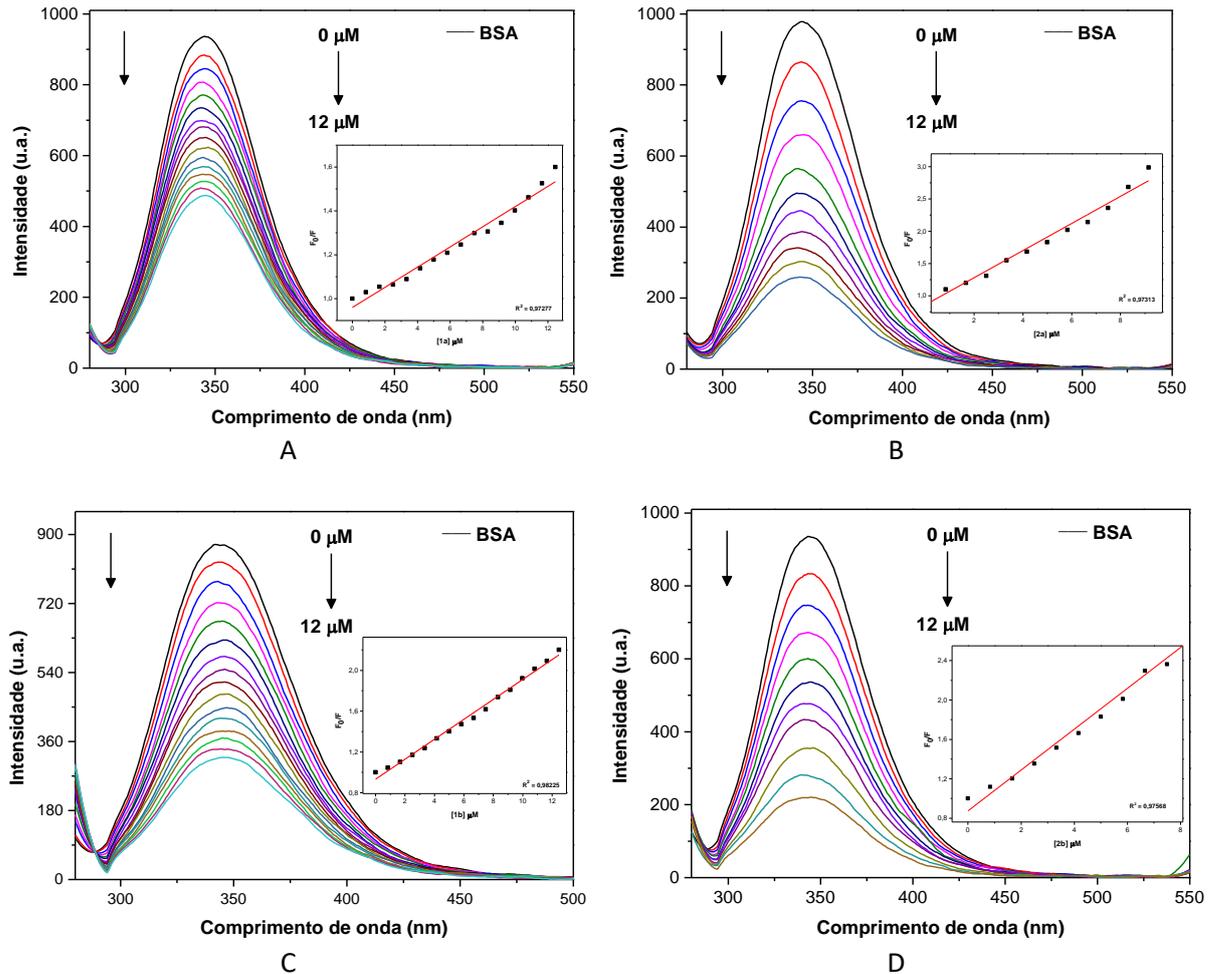


Figura 40 - Espectro de emissão de fluorescência da BSA na ausência e presença de concentrações crescentes dos complexos **1a-2b**, a 25 °C. A) Complexo **1a**, B) Complexo **2a**, C) Complexo **1b**, D) Complexo **2b**. (Gráficos de regressão linear inseridos à direita).

O complexo **1a** apresentou a menor redução da fluorescência e também a menor constante de ligação. Como os complexos **1b**, **2a** e **2b** suprimiram mais de 50% da fluorescência, foi possível calcular a constante de ligação aparente, K_{app} e o número de sítios de ligações, n , utilizando a Equação 4 [89].

$$\log \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \log K_{app} + n \log [\text{complexo}] \quad \text{Equação 4}$$

em que, F_0 e F são as intensidades da fluorescência na ausência e presença do complexo e $[\text{complexo}]$ é a concentração do complexo estudado. Todos os resultados obtidos para os complexos são mostrados na Tabela 10.

Os valores de F_0 e F foram corrigidos considerando o Efeito de Filtro Interno (EFI), utilizando a equação 5 [105].

$$F_{cor} = F_{obs} \times 10^{(A_{exc}+A_{em})/2}$$

em que F_{cor} e F_{obs} são as intensidades de fluorescência corrigidas e observadas, respectivamente; A_{exc} e A_{em} são as absorvâncias nos comprimentos de onda de excitação (280 nm) e de emissão (344 nm), respectivamente. A correção do EFI deve ser realizada, pois a intensidade de fluorescência de um composto é proporcional à energia absorvida por ele. Ao aplicar o EFI, a interferência causada por outras moléculas, como os complexos em estudo, é minimizada, permitindo captar apenas o sinal emitido pelo composto alvo, BSA, aumentando a seletividade da detecção.

Tabela 10 - Constantes de supressão (K_{SV}), constante velocidade bimolecular de supressão K_q , constante de intercalação aparente, K_{app} , número de sítios de ligação n e coeficientes de determinação (R^2) para os sistemas BSA-complexos.

Complexo	K_{SV} (10^5 L mol ⁻¹)	K_q (10^{12} L mol ⁻¹ s ⁻¹)	K_{app} (10^5 L mol ⁻¹)	n	R^2
1a	0,5	5,0	-	-	0,97277
2a	2,1	0,2	1,9	1,0	0,97313
1b	1,0	0,1	0,6	1,0	0,98225
2b	2,1	0,2	30,0	1,2	0,97568

A constante de ligação deve ser forte o suficiente para permitir o transporte do composto pelo organismo, mas também deve ser fraca o suficiente para liberar o composto para entrar nas células, sendo 10^5 mol L⁻¹, a ordem ideal para esta constante [90]. Os valores de K_{SV} encontrados, estão de acordo com resultados publicados na literatura para complexos metálicos e indicam uma interação relativamente forte entre a proteína e os complexos estudados [74,91]. Segundo Ferreira e colaboradores [92] e Guo e colaboradores [93], valores de K_q na ordem 10^{12} L mol⁻¹ s⁻¹, indicam que a interação não ocorre de maneira dinâmica, e sim estática, pela formação de aduto BSA - complexo metálico. A concordância entre os valores encontrados para K_{app} e n para cada complexo, indica a relação direta entre o número de sítios de ligação do complexo e a constante aparente [94].

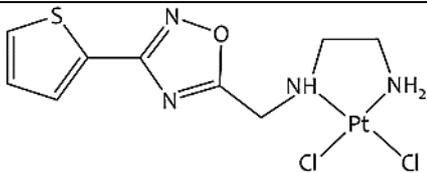
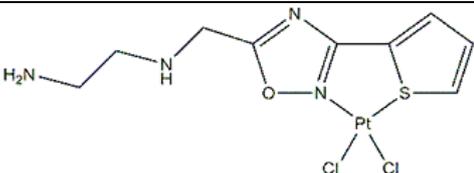
4.3 ESTUDOS TEÓRICOS

4.3.1 Estudos de otimização *in silico*

Foram realizados cálculos de otimização de geometria com a finalidade de se encontrar as estruturas de mais baixa energia, para os possíveis complexos de platina obtidos. Os cálculos de análise vibracional são feitos para verificar se as estruturas são mínimos de energia (produtos ou reagentes de uma reação química) ou máximos de energia (estados de transição de uma reação).

Para o complexo **1a**, a estrutura que apresentou a menor energia de Gibbs (estabelecido como $\Delta G = 0$) e por consequência, maior estabilidade, foi a estrutura esperada, em que a coordenação ocorre nos átomos de nitrogênio da etilenodiamina. A Tabela 11 mostra dois possíveis isômeros para o complexo **1a**, sendo a estrutura A com coordenação N-Pt-N e estrutura B com coordenação N-Pt-S e os deslocamentos simulados para o RMN de ^{195}Pt .

Tabela 11 - Possíveis Estruturas para o complexo **1a**, simulações de deslocamento para RMN ^{195}Pt e Energia Livre de Gibbs

Estrutura A	Estrutura B
	
$\delta\text{Pt}_{\text{teórico}} = -2360,15 \text{ ppm}$	$\delta\text{Pt}_{\text{teórico}} = -2485,01 \text{ ppm}$
$\Delta G = 0 \text{ kcal/mol}$	$\Delta G = 14 \text{ kcal/mol}$
$\delta\text{Pt}_{\text{experimental}} = -2356,43$	

Para o complexo **1b**, foram analisadas diferentes conformações, em que a platina se coordenava em diferentes sítios. A Figura 41 mostra três das diferentes conformações estudadas. Todas as estruturas apresentadas são mínimos de energia, podendo representar os potenciais produtos da reação de síntese.

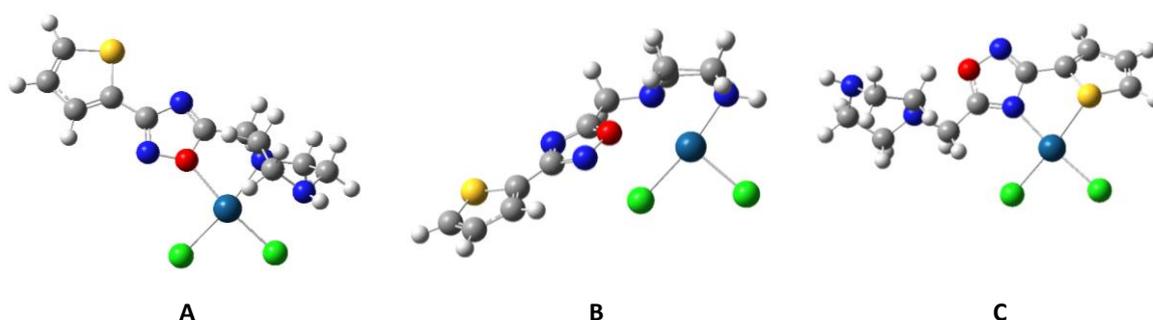


Figura 41 - Conformações analisadas para o complexo **1b** com diferentes sítios de coordenação: **A)** O,N, **B)** N,N, **C)** S,N.

As previsões de estabilidade mostraram que o complexo coordenado pelo anel piperazínico, possui menor energia eletrônica, sendo ajustado como $\Delta G = 0$, o que demonstra que é a estrutura mais estável e, teoricamente, o melhor candidato ao complexo obtido.

Para confirmar o sítio de coordenação deste complexo, foram realizadas simulações teóricas com a inclusão do solvente DMSO. As simulações foram realizadas por meio do formalismo do IEFPCM,

que representa o solvente por sua constante dielétrica. Os deslocamentos químicos foram calculados pelo formalismo GIAO. Após esses cálculos, um ajuste foi realizado para garantir a melhor relação entre os valores experimentais e teóricos. Essa abordagem computacional foi utilizada para otimizar o tempo computacional. Para esse fim, os efeitos relativísticos e a dinâmica do solvente foram negligenciados, porém, para descrever adequadamente os valores, uma série de complexos já relatados na literatura medidos em DMSO, foram utilizados para descrever a solvólise. A Tabela A1 do apêndice mostra os resultados utilizados para o ajuste.

O ajuste obtido gerou o gráfico apresentado na Figura 42 com função de ajuste $y = 4,1817 \cdot 10^{-8} e^{-x/141,67057} - 299,49482$. A partir da função de ajuste comparamos os valores calculados para o complexo **1b**, inserindo o valor experimental -2963,13 ppm em nossa curva de ajuste, o valor teórico calculado estimado seria de -248,8073 ppm.

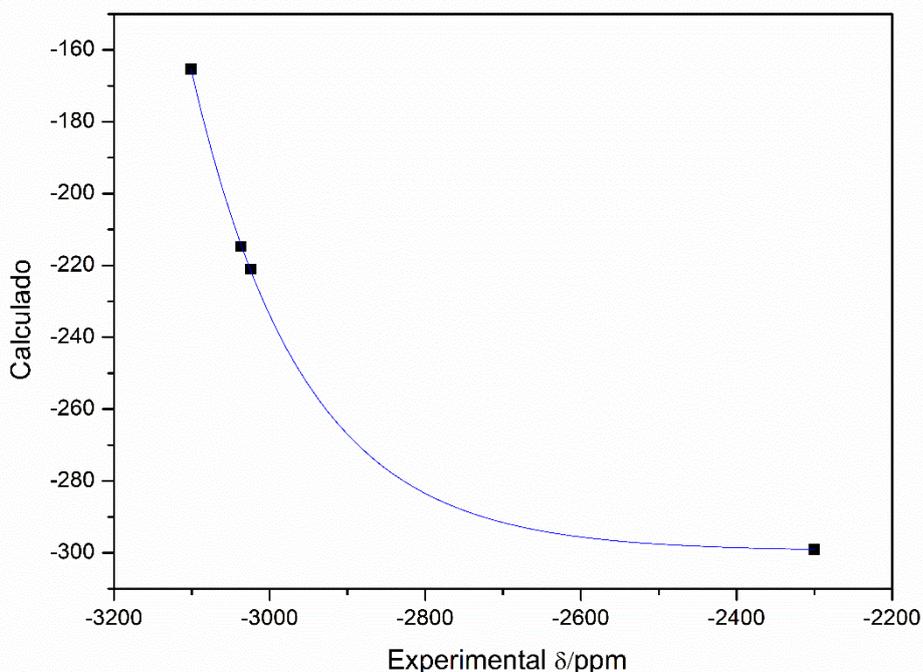
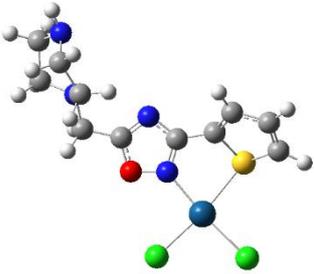
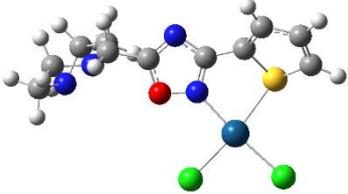
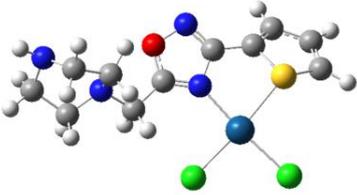
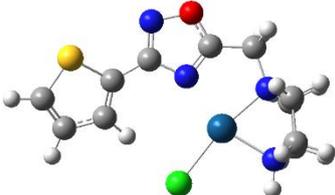


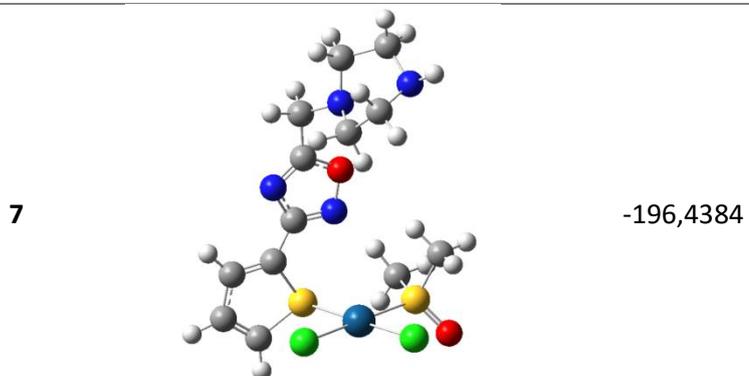
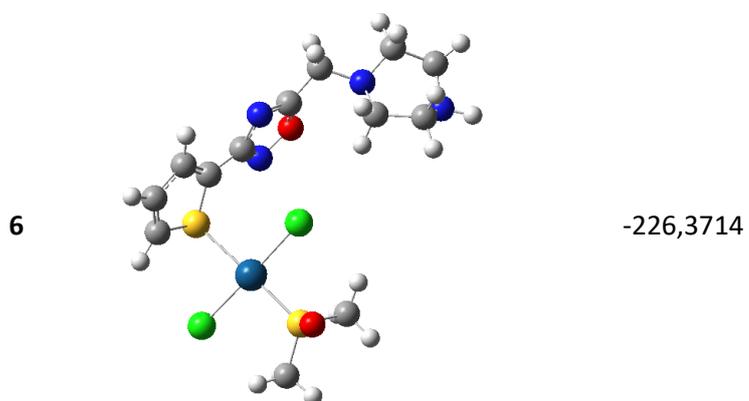
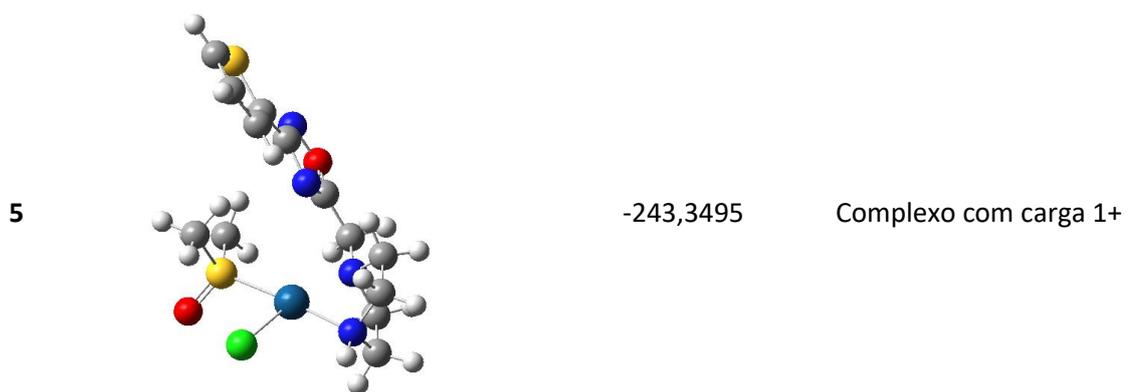
Figura 42 - Curva de ajuste para simulações do deslocamento do RMN ^{195}Pt .

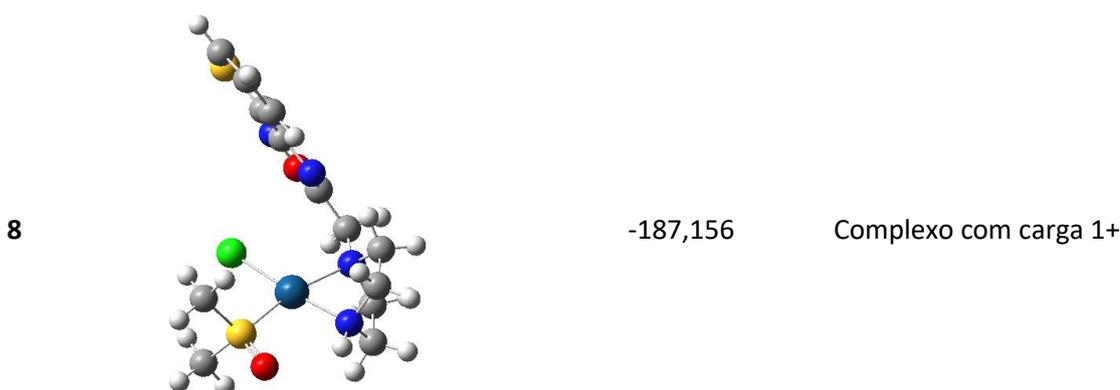
Na literatura, esse deslocamento é frequentemente relatado quando a Pt tem em seu ambiente químico, a coordenação com o enxofre, como mostrado no item 4.1.5. Consideramos, então, a possibilidade de solvólise com o DMSO, e também a possibilidade de coordenação com o enxofre do grupo tiofeno do ligante. Além desses fatores, o ligante piperazina também pode apresentar variações conformacionais importantes, por meio das ligações entre os grupos piperazina e o oxadiazol, assim como entre este último e o tiofeno. Os complexos com as possibilidades de coordenação estão apresentados na Tabela 12. Com base nos cálculos realizados, concluímos que a estrutura que melhor

representa o valor experimental obtido e, considerando as referências para troca de ligantes cloreto com DMSO, é a estrutura 5, em que o cloreto que permanece na esfera de coordenação está trans ao nitrogênio do grupo piperazina, mais próximo da substituição com o grupo oxadiazol, com o valor calculado de -243,3495 ppm.

Tabela 12 - Estruturas dos complexos com as possibilidades de coordenação e valores de deslocamento do RMN ^{195}Pt .

1	Estrutura	^{195}Pt δ /ppm (valor calculado)	Observações
		-375,4524	
		-366,8361	
		-359,5687	
		-332,7683	Complexo tridentado inspirado na referência [95]; estável, mas não compatível com o resultado de RMN





Com base nos cálculos realizados, o complexo que melhor representa o valor experimental obtido é a estrutura 5, nela um cloreto é substituído por uma molécula de DMSO e o cloreto que permanece na esfera de coordenação está trans ao nitrogênio do grupo piperazina, com o valor calculado de -243,3495 ppm que segundo Figura 42, leva ao sinal de RMN de ^{195}Pt próximo de -2900 ppm compatível com o valor experimental encontrado (-2963,18 ppm) mostrado na Figura 31. Isto confirma a instabilidade do composto em DMSO justificando a realização dos experimentos utilizando DMF.

4.3.2 Estudo ADME *in silico*

Um dos grandes desafios no desenvolvimento de novos fármacos envolve a dificuldade de obtenção de drogas com parâmetros farmacocinéticos adequados. Nesse sentido, vem se popularizando o uso de ferramentas *in silico* para avaliação de propriedades como absorção, distribuição, metabolismo e excreção. A plataforma SwissADME, foi lançada para ser usada como aliada no desenvolvimento de novos fármacos. A ferramenta é usada para avaliar propriedades físico-químicas, prever parâmetros ADME, propriedades farmacocinéticas, natureza medicamentosa e compatibilidade química medicinal de diferentes moléculas [56]. A avaliação se baseia em diversos métodos como a regra de Lipinski[96], modelo iLOGP [97]e modelo do “ovo cozido”[98].

Os quatro complexos sintetizados apresentaram resultados positivos, sendo considerados potenciais candidatos a fármacos. Além de não violarem a regra de Lipinski, os outros parâmetros avaliados também se mostraram positivos, como mostrado na Tabela 13. A regra de Lipinski consiste em um conjunto de regras, sendo elas: i) massa molar deve ser menor que 500 g/mol; ii) número de doadores de ligação de hidrogênio deve ser igual ou menor que 5; iii) número de aceptores de ligação

de hidrogênio deve ser igual ou menor que 10; iv) log P deve ser menor ou igual a 5; um bom candidato a fármaco pode descumprir apenas uma dessas regras [96].

Tabela 13 - Predições dos parâmetros ADME para os complexos sintetizados.

Parâmetros	Complexos			
	1a	2a	1b	2b
Massa Molar (g mol⁻¹)	490,27	401,61	516,30	427,65
ALH	3	3	3	3
DLH	2	2	1	1
ASP (Å)	105,21	105,21	82,43	82,43
Log P_{o/a}	1,19	1,09	1,55	1,44
Solubilidade	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada
Lipinski (violação)	Sim (0)	Sim (0)	Sim (1, MM>500)	Sim (0)
Parâmetros farmacocinéticos				
AGI	Alta	Alta	Alta	Alta
BHE	Não	Não	Não	Não
Inibidor CYP1A2	Sim	Sim	Não	Não
Inibidor CYP2C19	Sim	Sim	Sim	Sim
Inibidor CYP2C9	Não	Não	Não	Não
Inibidor CYP2D6	Não	Não	Sim	Sim
Inibidor CYP3A4	Sim	Sim	Sim	Sim

Nota: ALH: aceptores de ligação de hidrogênio; DLH: doadores de ligação de hidrogênio, ASP: área superficial polar; Log P_{o/a}: coeficiente de partição octanol/água; AGI: absorção gastrointestinal; BHE: barreira hematoencefálica.

Segundo os resultados ADME Os quatro complexos analisados podem possuir solubilidade moderada, alta absorção gastrointestinal e área superficial polar inferior a 140 Å. Esses fatores, aliados aos baixos valores de log P (<6,8), sugerem que esses complexos poderiam ser administrados por via oral [98,99]. Ramezani e colaboradores [100], obtiveram resultados similares com novos complexos de platina(II) e ainda avaliaram os parâmetros ADME para a cisplatina, carboplatina e oxaliplatina, corroborando com a eficiência da predição *in silico*. Balakrishnan e colaboradores [101], realizaram o mesmo estudo para complexos contendo paládio(II) e obtiveram resultados similares. A inibição e indução dos citocromos P450, enzimas CYP, são o principal modo de interação entre as enzimas e os fármacos. A possível inibição das enzimas pelos complexos, pode indicar que tais complexos fazem

parte de seu metabolismo [99,102]. Apenas a enzima CYP2C9 não mostrou ser inibida por nenhum complexo, já as enzimas CYP2C19 e CYP3A4, são inibidas por todos os complexos estudados.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram sintetizados e caracterizados 4 complexos inéditos, contendo os metais platina(II) e paládio(II) e ligantes contendo diferentes grupos funcionais combinados. Todos os complexos foram obtidos com bom rendimento e grau de pureza satisfatório para as sínteses descritas.

A partir da análise dos resultados de caracterização, concluiu-se que houve a formação dos complexos neutros do tipo $[M^{\text{II}}L_2Cl_2]$. Os dados dos estudos teóricos de RMN ^{195}Pt , sugerem a coordenação pelos dois átomos de nitrogênio da diamina para os dois complexos **1a** e **1b**.

Os estudos de estabilidade mostraram que o complexo de platina **1a** é o mais reativo dentre os compostos sintetizados. Além disso, é o que possui a melhor atividade citotóxica, apresentando os menores valores de IC_{50} e os maiores valores de IS para as duas linhagens cancerosas estudadas. Os complexos **1a**, **2a** e **1b** tiveram sua atividade citotóxica melhorada em relação aos seus ligantes livres.

Os ensaios de interação com DNA realizados por espectroscopia na região UV-VIS indicaram que o complexo **1b** possui a maior constante de ligação composto-DNA, consistente com interações eletrostáticas e que o complexo **1a** pode apresentar alguma intercalação. Na eletroforese foi possível observar que os complexos **2a**, **1b** e **2b** interagiram com o DNA convertendo o plasmídeo para sua forma linear, indicando interação por ligação covalente.

O estudo de competição com brometo de etídio apresentou resultados semelhantes para os complexos. O complexo **1a** apresentou constante de Stern-Volmer na ordem 10^3 e os complexos **2a**, **1b** e **2b**, na ordem 10^4 . Esses valores indicam interação moderada e que a intercalação pode ocorrer, mas não deve ser a principal forma de interação entre os compostos e o DNA.

No experimento com a BSA, todos os complexos apresentaram K_{SV} na ordem 10^5 , resultados compatíveis com uma forte interação entre os compostos e a BSA. Os complexos de paládio apresentaram os maiores valores de K_{SV} , o que pode corroborar com os resultados observados na avaliação de citotoxicidade, já que a interação dos complexos com o BSA pode atrapalhar sua entrada na célula e comprometer sua ação antitumoral.

A avaliação ADME para os complexos mostrou que todos seguem as regras de Lipinski, podem possuir boa lipofilicidade e inibir enzimas CYP, responsáveis pela interação com fármacos no corpo humano, sendo assim, os complexos poderiam ser bons candidatos à fármacos e até administrados oralmente.

Como perspectivas futuras pretende-se aprofundar os estudos das estruturas dos complexos **1b** e **2b**. Realizar estudos de *docking* molecular e outros testes de interação com DNA utilizando iodeto de propídio, verde de metila e netropsina para melhor entendimento da ação dos complexos.

REFERÊNCIAS

- [1] **Câncer**. Instituto Nacional Do Câncer – INCA. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 2 set. 2024).
- [2] K.C. Howell, Review on Cancer. **Research & Reviews: Journal of Medical and Health Sciences**, 5, 41–46, 2016.
- [3] A. Patel. Benign vs Malignant Tumors. **JAMA Oncology**, 6, 2020. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.2592>.
- [4] T. Sinha, Tumors: Benign and Malignant, **Cancer Therapy & Oncology Internacional Journal**, 10, 001–003, 2018.
- [5] A.M. Lewandowska, M. Rudzki, S. Rudzki, T. Lewandowski, B. Laskowska, Environmental risk factors for cancer - review paper, **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, 26, 1–7, 2019. <https://doi.org/10.26444/aaem/94299>.
- [6] **Global cancer burden growing, amidst mounting need for services**. World Health Organization. 2024. Disponível em <<https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing-amidst-mounting-need-for-services>>. Acesso em 2 set. 2024).
- [7] **Cancer**. World Health Organization. 2024. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Acesso em: 2 set. 2024).
- [8] M. de O. Santos, F.C. da S. de Lima, L.F.L. Martins, J.F.P. Oliveira, L.M. de Almeida, M. de C. Cancela, Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023–2025, **Revista Brasileira de Cancerologia**, 69, 2023. <https://doi.org/10.32635/2176-9745.rbc.2023v69n1.3700>.
- [9] R.L.B. dos Santos, C.G.S. Osorio-de-Castro, M.J. Sobreira-da-Silva, V.L.E. Pepe, First use of antineoplastic agents in women with breast cancer in the state of Rio de Janeiro, Brazil, **Front Pharmacol**, 14, 2023. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1069505>.
- [10] A. Serrano. **Câncer: o que os brasileiros pensam sobre a doença?**. Estado de Minas. 2022. Disponível em: <https://www.em.com.br/app/noticia/bem-viver/2022/04/28/interna_bem_viver,1363006/cancer-o-que-os-brasileiros-pensam-sobre-a-doenca.shtml>. Acesso em 3 set. 2024.
- [11] J. Zhang, S.-F. Zhou, Can We Discover “Really Safe and Effective” Anticancer Drugs?, **Advances in Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, 1, 1–2, 2012.
- [12] K.M. Fischer, Cancer Treatment: Past, Present And Future, **Journal Of Cancer Research, Treatment & Prevention**, 2022. [https://doi.org/10.37191/mapsci-jcrtp-1\(1\)-1](https://doi.org/10.37191/mapsci-jcrtp-1(1)-1).
- [13] J, Jackson-Rose, et al., Chemotherapy Extravasation: Establishing a National Benchmark for Incidence Among Cancer Centers, **Clinical Journal of Oncology Nursing**, 21, 438–445, 2017
- [14] R.R. Love, H. Leventhal, D. V. Easterling, D.R. Nerenz, Side effects and emotional distress during cancer chemotherapy, **Cancer**, 63, 604–612, 1989. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19890201\)63:3<604::AID-CNCR2820630334>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19890201)63:3<604::AID-CNCR2820630334>3.0.CO;2-2).
- [15] B. Rosenberg, L. VanCamp, J.E. Trosko, Mansour. Virginia H, Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumor Agents, **Nature**, 222, 1969.

- [16] H. Sheikh, Ortiz Cindy, Arshad Tanzila, Padrón José, Khan Haroon, Advancements in steroidal Pt(II) & Pt(IV) derivatives for targeted chemotherapy (2000-2023), **European Journal of Medicinal Chemistry**, 271, 2024.
- [17] N.J. Wheate, S. Walker, G.E. Craig, R. Oun, The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials, **Dalton Transactions**, 39, 8113–8127. 2010.
<https://doi.org/10.1039/c0dt00292e>.
- [18] D. Gibson, Platinum(IV) anticancer agents; are we en route to the holy grail or to a dead end?, **Journal of Inorganic Biochemistry**, 217, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111353>.
- [19] N. Olmo, M. Maroto-Diaz, S. Quintana, R. Gomez, M. Holota, M. Ionov, M. Bryszewska, M.J. Carmena, P. Ortega, F.J. de la Mata, Heterofunctional ruthenium(II) carbosilane dendrons, a new class of dendritic molecules to fight against prostate cancer, **European Journal of Medicinal Chemistry**, 207, 2020.
- [20] E. Nyawade, N. Sibuyi, M. Meyer, R. Lalancette, M. Onani, Synthesis, characterization and anticancer activity of new 2-acetyl-5-methyl thiophene and cinnamaldehyde thiosemicarbazones and their palladium(II) complexes, **Inorganica Chimica Acta**, 515, 2021.
- [21] F.P. Andrew, P.A. Ajibade, Synthesis, characterization and anticancer studies of bis(1-phenylpiperazine dithiocarbamate) Cu(II), Zn(II) and Pt(II) complexes: Crystal structures of 1-phenylpiperazine dithiocarbamate-S,S0 zinc(II) and Pt(II), **Journal of Molecular Structure**, 1170, 24–29, 2018.
- [22] P. Collery, B. Keppler, C. Madoulet, B. Desoix, Gallium in cancer treatment, *Critical Reviews on Oncology/Hematology*, 42, 283–296, 2002.
- [23] J.R. Stenger-Smith, P.K. Mascharak, Gold Drugs with {Au(PPh₃)₃}⁺ Moiety: Advantages and Medicinal Applications, **ChemMedChem** 15, 2136–2145, 2020.
<https://doi.org/10.1002/cmdc.202000608>.
- [24] T. Babu, H. Ghareeb, U. Basu, H. Schueffl, S. Theiner, P. Heffeter, G. Koellensperger, N. Metanis, V. Gandin, I. Ott, C. Schmidt, D. Gibson, Oral Anticancer Heterobimetallic PtIV–AuI Complexes Show High In Vivo Activity and Low Toxicity, **Angewandte Chemie - International Edition**, 62, 2023. <https://doi.org/10.1002/anie.202217233>.
- [25] U. Kalinowska-Lis, A. Felczak, L. Chęcińska, I. Szabłowska-Gadomska, E. Patyna, M. Małecki, K. Lisowska, J. Ochocki, Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Silver(I) Complexes of Pyridine and (Benz)Imidazole Derivatives. X-ray Crystal Structure of [Ag(2,6-di(CH₂OH)py)₂]NO₃, **Molecules**, 21, 2016.
- [26] T. Scattolin, V.A. Voloshkin, F. Visentin, S.P. Nolan, A critical review of palladium organometallic anticancer agents, **Cell Reports Physical Science**, 2, 2021.
- [27] S. Dasari, P.B. Tchounwou, Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanism of action, **European Journal of Pharmacology**, 740, 364–378, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.
- [28] C.R.R. Rocha, M.M. Silva, A. Quinet, J.B. Cabral-Neto, C.F.M. Menck, DNA repair pathways and cisplatin resistance: An intimate relationship, **Clinics**, 73, 2018.
<https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e478s>.

- [29] C.V. Barra, A.V.G. Netto, Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores, **Revista Virtual de Química**, 7, 1998–2016, 2015. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150118>.
- [30] L. Massai, A. Pratesi, J. Gailer, T. Marzo, L. Messori, The cisplatin/serum albumin system: A reappraisal, *Inorganica Chimica Acta*, 495, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.118983>.
- [31] S. Naveenraj, S. Anandan, Binding of serum albumins with bioactive substances - Nanoparticles to drugs, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 14, 53–71, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2012.09.001>.
- [32] E. Bortolamiol, F. Visentin, T. Scattolin, Recent Advances in Bioconjugated Transition Metal Complexes for Cancer Therapy, **Applied Sciences** (Switzerland), 13, 2023. <https://doi.org/10.3390/app13095561>.
- [33] L. Chiang, M.R. Jones, C.L. Ferreira, T. Storr, Multifunctional Ligands in Medicinal Inorganic Chemistry-Current Trends and Future Directions. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 12, 122-144, 2012.
- [34] J. Boström, A. Hogner, A. Llinàs, E. Wellner, A.T. Plowright, Oxadiazoles in medicinal chemistry, **Journal of Medicinal Chemistry**, 55, 1817–1830, 2012. <https://doi.org/10.1021/jm2013248>.
- [35] J.J.R. De Freitas, E.E. Da Silva, J.L.L.F. Rgueira, S.A. De Andrade, P.M.M. Calvalcante, R.N. De Oliveira, J.R. De Freitas Filhoa, 1,2,4-Oxadiazoles: Synthesis and applications. **Revista Virtual de Química**, 4, 670–691, 2012. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20120051>.
- [36] K. Biernacki, M. Daško, O. Ciupak, K. Kubiński, J. Rachon, S. Demkowicz, Novel 1,2,4-oxadiazole derivatives in drug Discovery. **Pharmaceuticals**, 13, 2020. <https://doi.org/10.3390/ph13060111>.
- [37] S.A. El-Metwally, A.K. Khalil, A.M. El-Naggar, W.M. El-Sayed, Novel Tetrahydrobenzo [b] Thiophene Compounds Exhibit Anticancer Activity through Enhancing Apoptosis and Inhibiting Tyrosine Kinase. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, 18, 1761–1769, 2018. <https://doi.org/10.2174/1871520618666180813120558>.
- [38] M.S. Al-Said, M.S. Bashandy, S.I. Al-Qasoumi, M.M. Ghorab, Anti-breast cancer activity of some novel 1,2-dihydropyridine, thiophene and thiazole derivatives, **European Journal of Medicinal Chemistry**, 46, 137–141, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.10.024>.
- [39] Y.D. Wang, S. Johnson, D. Powell, J.P. McGinnis, M. Miranda, S.K. Rabindran, Inhibition of tumor cell proliferation by thieno[2,3-d]pyrimidin-4(1H)-one- based analogs, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 15, 3763–3766, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.05.127>.
- [40] K. Starčević, M. Kralj, I. Piantanida, L. Šuman, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, Synthesis, photochemical synthesis, DNA binding and antitumor evaluation of novel cyano- and amidino-substituted derivatives of naphtho-furans, naphtho-thiophenes, thieno-benzofurans, benzo-dithiophenes and their acyclic precursors, **European Journal of Medicinal Chemistry**, 41, 925–939, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.03.012>.

- [41] R. Mishra, K.K. Jha, S. Kumar, I. Tomer, Scholars Research Library Synthesis, properties and biological activity of thiophene: A review, **Der Pharma Chemica**, 38–54, 2011. www.derpharmachemica.com.
- [42] S. Fletcher, E.P. Keane, C.G. Cummings, M.A. Blaskovich, M.A. Hast, M.P. Glenn, S.Y. Chang, C.J. Bucher, R.J. Floyd, W.P. Katt, M.H. Gelb, W.C. Van Voorhis, L.S. Beese, S.M. Sebt, A.D. Hamilton, Structure-based design and synthesis of potent, ethylenediamine-based, mammalian farnesyltransferase inhibitors as anticancer agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, 53, 6867–6888, 2010. <https://doi.org/10.1021/jm1001748>.
- [43] M. Al-Ghorbani, M.A. Gouda, M. Baashen, O. Alharbi, F.A. Almalki, L. V. Ranganatha, Piperazine Heterocycles as Potential Anticancer Agents: A Review, **Pharmaceutical Chemical Journal**, 56, 29–37, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11094-022-02597-z>.
- [44] N. Pantelic, T.P. Stanojkovic, B.B. Zmejovski, T.J. Sabo, G.N. Kaluerovic, In vitro anticancer activity of gold(III) complexes with some esters of (S, S)-ethylenediamine-N, N g2-di-2-propanoic acid, **European Journal of Medicinal Chemistry**, 90, 766–774, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.12.019>.
- [45] I. Raya, D. Kartina, R.I. Wijaya, R. Irfandi, E.A. Abdalrazaq, P. Prihantono, S. Santi, E. Pratiwi, A.B. Khaerunnisa, D. Luthfiana, B. Musa, H. Natsir, M. Maming, Z.D. Zainuddin, R. Ramlawati, A. Fudholi, A.N. Usman, U. Supratman, M. Mazaya, S. Sufiandi, Novel Complex of Zinc (II) Dichloroethylenediamine: Synthesis, Characterization, In-silico, and In-vitro Evaluation against Cervical Cancer Cells, **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 24, 4155–4165, 2023. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2023.24.12.4155>.
- [46] L. Pulipati, P. Yogeewari, D. Sriram, S. Kantevari, Click-based synthesis and antitubercular evaluation of novel dibenzo[b,d]thiophene-1,2,3-triazoles with piperidine, piperazine, morpholine and thiomorpholine appendages. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 26, 2649–2654, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.04.015>.
- [47] J.M. Lazić, L. Vučićević, S. Grgurić-Šipka, K. Janjetović, G.N. Kaluderović, M. Misirkić, M. Gruden-Pavlović, D. Popadić, R. Paschke, V. Trajković, T.J. Sabo, Synthesis and in vitro anticancer activity of octahedral platinum(IV) complexes with cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-N,N'-diacetate- type ligands, **ChemMedChem**, 5, 881–889, 2010. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000058>.
- [48] C. Carvalho De Mendonça, Síntese e avaliação da ação antitumoral de derivados 1,2,4-oxadiazólicos em modelos in vitro de linhagens de tumores humanos e animais, Dissertação, Química Orgânica - Universidade Federal de Juiz de Fora, 2019.
- [49] A.L. de Andrade Querino, J.T. da Silva, J.T. Silva, G.M. Alvarenga, C.H. da Silveira, M.T.Q. de Magalhães, O.A. Chaves, B.A. Iglesias, R. Diniz, H. Silva, Mono and dinuclear platinum and palladium complexes containing adamantane-azole ligands: DNA and BSA interaction and cytotoxicity, **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 1087–1103, 24, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00775-019-01719-5>.
- [50] T. Mosmann, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, 65, 55-63, 1983. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

- [51] N. V Anantha, M. Azam, R.D. Sheardy, Porphyrin Binding to Quadruplexed T 4 G 4, **Biochemistry**, 37, 2709-2714, 1998. <https://doi.org/10.1021/bi973009v>
- [52] A.M. Pyle, J.P. Rehmann, R. Meshoyrer, C. V Kumar, N.J. Turro, J.K. Barton, Mixed-Ligand Complexes of Ruthenium(II): Factors Governing Binding to DNA. **Journal of the American Chemical Society**, 111, 3051-3058, 1989.
- [53] S. Bi, H. Zhang, C. Qiao, Y. Sun, C. Liu, Studies of interaction of emodin and DNA in the presence of ethidium bromide by spectroscopic method. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 69, 123–129, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.03.017>.
- [54] A. Pabbathi, S. Patra, A. Samanta, Structural transformation of bovine serum albumin induced by dimethyl sulfoxide and probed by fluorescence correlation spectroscopy and additional methods, **ChemPhysChem**, 14, 2441-2449, 2013. <https://doi.org/10.1002/cphc.201300313>.
- [55] U.S. Mote, S.L. Bhattar, S.R. Patil, G.B. Kolekar, Interaction between felodipine and bovine serum albumin: Fluorescence quenching study. **Luminescence**, 25, 1-8, 2010. <https://doi.org/10.1002/bio.1130>.
- [56] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, **Scientific Reports Nature**, 7, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- [57] K. Nakamoto, **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**, 3rd ed. Estados Unidos da América: Wiley Interscience, 1978.
- [58] M. Kindermann, V. Nagel, P. Scholz, C. Hahn, R. Taube, W. Kiefer, Difference of olefin coordination in mono- and di-cationic organometallic rhodium(I) and palladium(II) complexes studied by Raman spectroscopy, **Journal of Molecular Structure**, 482-483, 53-57, 1999.
- [59] V. Fernandes Knupp, I.C. Nicesio, F. De Magalhães Queiroz, R. Mendes Matos, B. De, F.T. Passos, Síntese e caracterização estrutural de complexos mono e bimetálicos de paládio e platina com ligantes contendo nitrogênio e enxofre. **Química Nova**, 20, 1997.
- [60] L. Patiny, A. Borel, ChemCalc: A building block for tomorrow's chemical infrastructure, **Journal of Chemical Information and Modeling**, 53, 1223–1228, 2013. <https://doi.org/10.1021/ci300563h>.
- [61] C. Van De Griend, J.J. Van De Vijver, M.A. Siegler, R.T. Dame, S. Bonnet, Ruthenium-Locked Helical Chirality: A Barrier of Inversion and Formation of an Asymmetric Macrocyclic. **Inorganic Chemistry**, 61, 16045–16054, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.2c02447>.
- [62] N.Y. Gorobets, S.A. Yermolayev, T. Gurley, A.A. Gurinov, P.M. Tolstoy, I.G. Shenderovich, N.E. Leadbeater, Difference between ¹H NMR signals of primary amide protons as a simple spectral index of the amide intramolecular hydrogen bond strength. **Journal of Physical Organic Chemistry**, 25, 287–295, 2012. <https://doi.org/10.1002/poc.1910>.
- [63] B.M. Still, P.G.A. Kumar, J.R. Aldrich-Wright, W.S. Price, ¹⁹⁵Pt NMR—theory and application, **Chemical Society Reviews**, 36, 665-686, 2007. <https://doi.org/10.1039/b606190g>.
- [64] E. Gabano, E. Marengo, M. Bobba, E. Robotti, C. Cassino, M. Botta, D. Osella, ¹⁹⁵Pt NMR spectroscopy: A chemometric approach. **Coordination Chemistry Reviews**, 250, 2158–2174, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.02.011>.

- [65] D. Paschoal, C.F. Guerra, M.A.L. de Oliveira, T.C. Ramalho, H.F. Dos Santos, Predicting Pt-195 NMR chemical shift using new relativistic all-electron basis set. **Journal of Computational Chemistry**, 37, 2360–2373, 2016. <https://doi.org/10.1002/jcc.24461>.
- [66] J. Comley, M. Rees, C. Turner, D. Jenkins, Colorimetric Quantitation of Filarial Viability, **International Journal of Parasitology**, 19, 77-83, 1989.
- [67] D. Soni, D. Wahi, S. Verna, In vitro study on anti-proliferative and anti-cancer activity of picosides in triple-negative breast cancer. **Medical Oncology** 41, 2024.
- [68] J. Stockert, R. Horobin, L. Colombo, A. Blázquez-Castro, Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. **Acta Histochemica**, 120, 159–167, 2018.
- [69] S. Abdolmaleki, S. Khaksar, A. Aliabadi, A. Panjehpour, E. Motieian, D. Marabello, M.H. Faraji, M. Beihaghi, Cytotoxicity and mechanism of action of metal complexes: An overview. **Toxicology**, 492, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2023.153516>.
- [70] S.W. Schleser, O. Krytovych, T. Ziegelmeier, E. Groß, J. Kasparkova, V. Brabec, T. Weber, R. Schobert, T. Mueller, Palladium and Platinum Complexes of the Antimetabolite Fludarabine with Vastly Enhanced Selectivity for Tumour over Non-Malignant Cells. **Molecules**, 28, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28135173>.
- [71] A. Bakalova, R. Buyukliev, G. Momekov, D. Ivanov, Synthesis and cytotoxic activity of new platinum and palladium complexes with 3-amino- α -tetralonespiro-5'-hydantoin. **Journal of Chemical Technology and Metallurgy**, 48, 631-636, 2013.
- [72] M. Liao, J. Zhang, G. Wang, L. Wang, J. Liu, L. Ouyang, B. Liu, Small-Molecule Drug Discovery in Triple Negative Breast Cancer: Current Situation and Future Directions, **Journal Medicinal Chemistry**, 64, 2382–2418 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01180>.
- [73] M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltammetry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 124, 1-19, 2013.
- [74] A.A. Franich, M.D. Živković, D. Čočić, B. Petrović, M. Milovanović, A. Arsenijević, J. Milovanović, D. Arsenijević, B. Stojanović, M.I. Djuran, S. Rajković, New dinuclear palladium(II) complexes with benzodiazines as bridging ligands: interactions with CT-DNA and BSA, and cytotoxic activity. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 24, 1009-1022, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00775-019-01695-w>.
- [75] Q. Wang, L. Yang, J. Wu, H. Wang, J. Song, X. Tang, Four mononuclear platinum(II) complexes: synthesis, DNA/BSA binding, DNA cleavage and cytotoxicity. **BioMetals**, 30, 17-26, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9984-7>.
- [76] F. Arjmand, F. Sayeed, M. Muddassir, Synthesis of new chiral heterocyclic Schiff base modulated Cu(II)/Zn(II) complexes: Their comparative binding studies with CT-DNA, mononucleotides and cleavage activity. **Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology**, 103, 166-179, 2011.
- [77] L.F.O. Bomfim Filho, R.S. Barbosa, A.E. Burgos C., B.L. Rodrigues, L.R. Teixeira, New isoxazole(3,5)substituted thiosemicarbazone: Synthesis, crystal structure and spectroscopic

- studies of the binding mode to protein and calf thymus DNA. **Journal of Molecular Structure**, 1150, 44-54, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.08.062>.
- [78] A.L. de A. Querino, K.B. Enes, O.A. Chaves, D. Dittz, M.R.C. Couri, R. Diniz, H. Silva, Modified pyrazole platinum(II) complex can circumvent albumin and glutathione: Synthesis, structure and cytotoxic activity, **Bioorganic Chemistry**, 100, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103936>.
- [79] F.R. Keene, J.A. Smith, J.G. Collins, Metal complexes as structure-selective binding agents for nucleic acids. **Coordination Chemistry Reviews**, 253, 2021–2035, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.004>.
- [80] R. Galindo-Murillo, T.E. Cheatam, Ethidium bromide interactions with DNA: an exploration of a classic DNA–ligand complex with unbiased molecular dynamics simulations. **Nucleic Acids Research**, 49, 3735–3745, 2021. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab143>.
- [81] N. Ramezani, M. Eslami Moghadam, M. Behzad, S. Zolghadri, Two new oral candidates as anticancer platinum complexes of 1,3-dimethyl pentyl glycine ligand as doping agents against breast cancer. *Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 251, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119415>.
- [82] J.E.F. Alves, J.F. de Oliveira, T.R.C. de Lima Souza, R.O. de Moura, L.B. de Carvalho Júnior, M. do C. Alves de Lima, S.M.V. de Almeida, Novel indole-thiazole and indole-thiazolidinone derivatives as DNA groove binders. **International Journal of Biological Macromolecules**, 170, 622–635, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.153>.
- [83] C.F.N. Da Silva, P.B.H. Chrispim, B. Possato, G.B. Portapilla, T.N. Rohrabough, L.C.B. Ramos, R. Santana Da Silva, S. De Albuquerque, C. Turro, S. Nikolaou, Anticancer and antitrypanosomal activities of trinuclear ruthenium compounds with orthometalated phenazine ligands. **Dalton Transactions**, 49, 16440–16452, 2020. <https://doi.org/10.1039/d0dt01035a>.
- [84] B. Possato, P.B.H. Chrispim, J.Q. Alves, L.C.B. Ramos, E. Marques, A.C. de Oliveira, R.S. da Silva, A.L.B. Formiga, S. Nikolaou, Anticancer activity and DNA interaction of ruthenium acetate clusters bearing azanaphthalene ancillary ligands. **Polyhedron**, 176, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2019.114261>.
- [85] D. Voytas, Resolution and recovery of DNA fragments Agarose Gel Electrophoresis. **Current Protocols in Immunology**, cap. 10, 2001. <https://doi.org/10.1002/0471142301.nsa01ns11>
- [86] Y.M. Chen, Y.C. Liu, J.Q. Wang, G.C. Ou, X.F. Wang, S.Q. Gao, K.J. Du, Y.W. Lin, Functional copper complexes with benzofurans tridentate ligand: Synthesis, crystal structure, DNA binding and anticancer studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 247, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2023.112330>.
- [87] Y. Dai, J. Gong, J. Cao, W. Chen, N. Fu, A deep-red fluorescent probe based on naphthalimide for discrimination of HSA from BSA and tracking HSA by bioimaging. **Dyes and Pigments**, 222, 111893, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2023.111893>.
- [88] V.D. Suryawanshi, L.S. Walekar, A.H. Gore, P. V. Anbhule, G.B. Kolekar, Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 6, 56-63, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.07.001>.

- [89] L.G. Tunes, R.E. Morato, A. Garcia, V. Schmitz, M. Steindel, J.D. Corrêa-Junior, H.F. Dos Santos, F. Frézard, M. V. de Almeida, H. Silva, N.S. Moretti, A.L.B. de Barros, R.L. do Monte-Neto, Preclinical Gold Complexes as Oral Drug Candidates to Treat Leishmaniasis Are Potent Trypanothione Reductase Inhibitors. *ACS Infectious Diseases*, 6, 1121-1139, 2020. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00505>.
- [90] T. Topală, A. Bodoki, L. Oprean, R. Oprean, Bovine serum albumin interactions with metal complexes. *Clujul Medical* 87(4), 215-219, 2014. <https://doi.org/10.15386/cjmed-357>.
- [91] R.O. Omondi, A.O. Fadaka, A.A. Fatokun, D. Jaganyi, S.O. Ojwach, Synthesis, substitution kinetics, DNA/BSA binding and cytotoxicity of tridentate N^EE^N (E = NH, O, S) pyrazolyl palladium(II) complexes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 27, 653-664, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00775-022-01959-y>.
- [92] R.C. Ferreira, O.A. Chaves, C.H.C.D.S. De Oliveira, S.B. Ferreira, V.F. Ferreira, C.M.R. Sant'Anna, D. Cesarin-Sobrinho, J.C. Netto-Ferreira, Drug-protein interaction: Spectroscopic and theoretical analysis on the association between HSA and 1, 4-Naphthoquinone Derivatives. *Revista Virtual de Quimica*, 10, 432-447, 2018. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180032>.
- [93] X. Guo, L. Zhang, X. Sun, X. Han, C. Guo, P. Kang, Spectroscopic studies on the interaction between sodium ozagrel and bovine serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 928, 114-120, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2009.03.023>.
- [94] P. Sathyadevi, P. Krishnamoorthy, R.R. Butorac, A.H. Cowley, N.S.P. Bhuvanesh, N. Dharmaraj, Effect of substitution and planarity of the ligand on DNA/BSA interaction, free radical scavenging and cytotoxicity of diamagnetic Ni(II) complexes: A systematic investigation. *Dalton Transactions*, 40, 9690-9702, 2011. <https://doi.org/10.1039/c1dt10767d>.
- [95] A.C.R. Gonçalves, Z.A. Carneiro, C.G. Oliveira, A. Danuello, W. Guerra, R.J. Oliveira, F.B. Ferreira, L.L.W. Veloso-Silva, F.A.H. Batista, J.C. Borges, S. de Albuquerque, V.M. Deflon, P.I.S. Maia, PtII, PdII and AuIII complexes with a thiosemicarbazone derived from diacetylmonooxime: Structural analysis, trypanocidal activity, cytotoxicity and first insight into the antiparasitic mechanism of action. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 141, 615-631, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.013>.
- [96] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 3-26, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0)
- [97] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, ILOGP: A simple, robust, and efficient description of n-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54, 3284-3301, 2014. <https://doi.org/10.1021/ci500467k>.
- [98] A. Daina, V. Zoete, A Boiled-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules, *ChemMedChem*, 11, 1117-1121, 2016. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>.
- [99] N.M.P. Natália Machado, G. de A. Cardoso, H. Silva, R.P. de Freitas, R.B. Alves, New purine-triazole hybrids as potential anti-breast cancer agents: synthesis, antiproliferative activity, and

- ADMET in silico study. **Medicinal Chemistry Research**, 32, 1816-1831, 2023.
<https://doi.org/10.1007/s00044-023-03115-w>.
- [100] N. Ramezani, M. Eslami Moghadam, M. Behzad, S. Zolghadri, Two new oral candidates as anticancer platinum complexes of 1,3-dimethyl pentyl glycine ligand as doping agents against breast cancer. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 251, 119415, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119415>.
- [101] N. Balakrishnan, J. Haribabu, R. Eshaghi Malekshah, S. Swaminathan, C. Balachandran, N. Bhuvanesh, S. Aoki, R. Karvembu, Effect of N-benzyl group in indole scaffold of thiosemicarbazones on the biological activity of their Pd(II) complexes: DFT, biomolecular interactions, in silico docking, ADME and cytotoxicity studies. **Inorganica Chimica Acta**, 534, 120805, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2022.120805>.
- [102] J. Hakkola, J. Hukkanen, M. Turpeinen, O. Pelkonen, Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update. **Archives of Toxicology**, 94, 3671-3722, 2020.
<https://doi.org/10.1007/s00204-020-02936-7>.
- [103] L.P., Oliveira, Í.P., Souza, D.A., Paixão, L.M., Souza, M.F., Lima, C.S., Pereira, H. Silva, H. Pereira-Maia, W. Guerra, Pt(II) complexes of the type trans-[PtCl₂(DMSO)(hydrazide)] and cis-[PtCl₂(hydrazide)₂]. **Journal of Molecular Structure**, 1192, 76-81, 2019.
- [104] M. Becker, R.E. Port, H.-J. Zabel, W.J. Zeller, P. Bachert, Monitoring Local Disposition Kinetics of Carboplatin in Vivo after Subcutaneous Injection in Rats by Means of ¹⁹⁵Pt NMR. **Journal of Magnetic Resonance**, 1, 115-122, 1998.
- [105] J. R. Lakowicz, **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3^a ed. Springer Science, 2006.

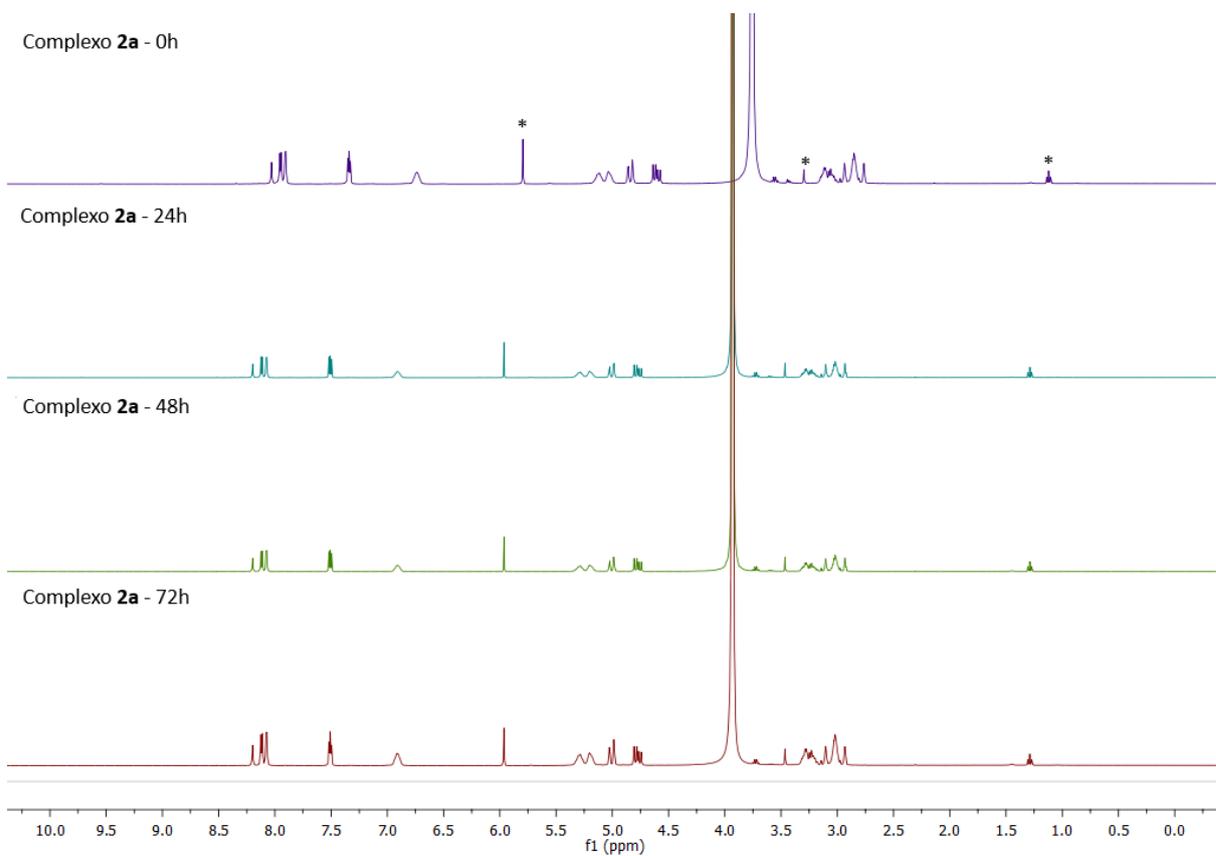
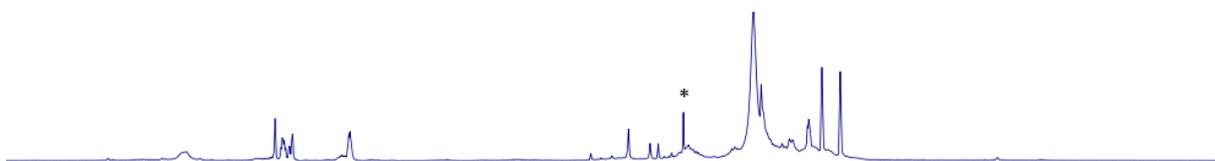
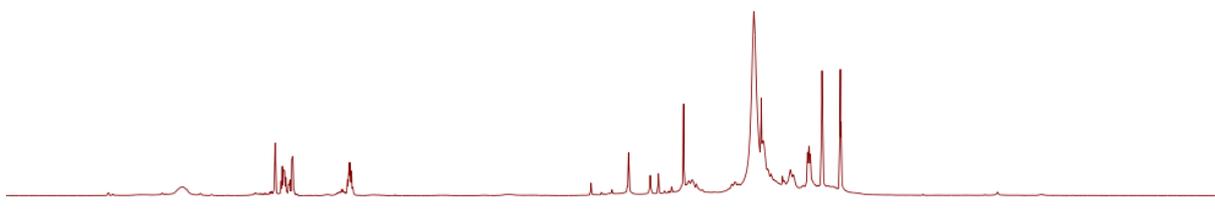
APÊNDICE A – ESTUDO DE ESTABILIDADE EM DMF-d₇ POR RMN

Figura A1 - Espectro de RMN de ¹H para o complexo 2a, em diferentes tempos, 400 MHz e 25 °C, em DMF-d₇. Nota: *Resíduo de diclorometano e metanol.

APÊNDICE B – ESTUDO DE ESTABILIDADE EM DMF- d_7 POR RMNComplexo **1b** - 0hComplexo **1b** - 24hComplexo **1b** - 48h

10.5 10.0 9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 -0.5
f1 (ppm)

Figura A2 – Espectro de RMN de ^1H para o complexo **1b**, em diferentes tempos, 400 MHz e 25 °C, em DMF- d_7 . Nota: *Resíduo de metanol.

APÊNDICE C – ESTUDO DE ESTABILIDADE EM DMF-d7 POR RMN

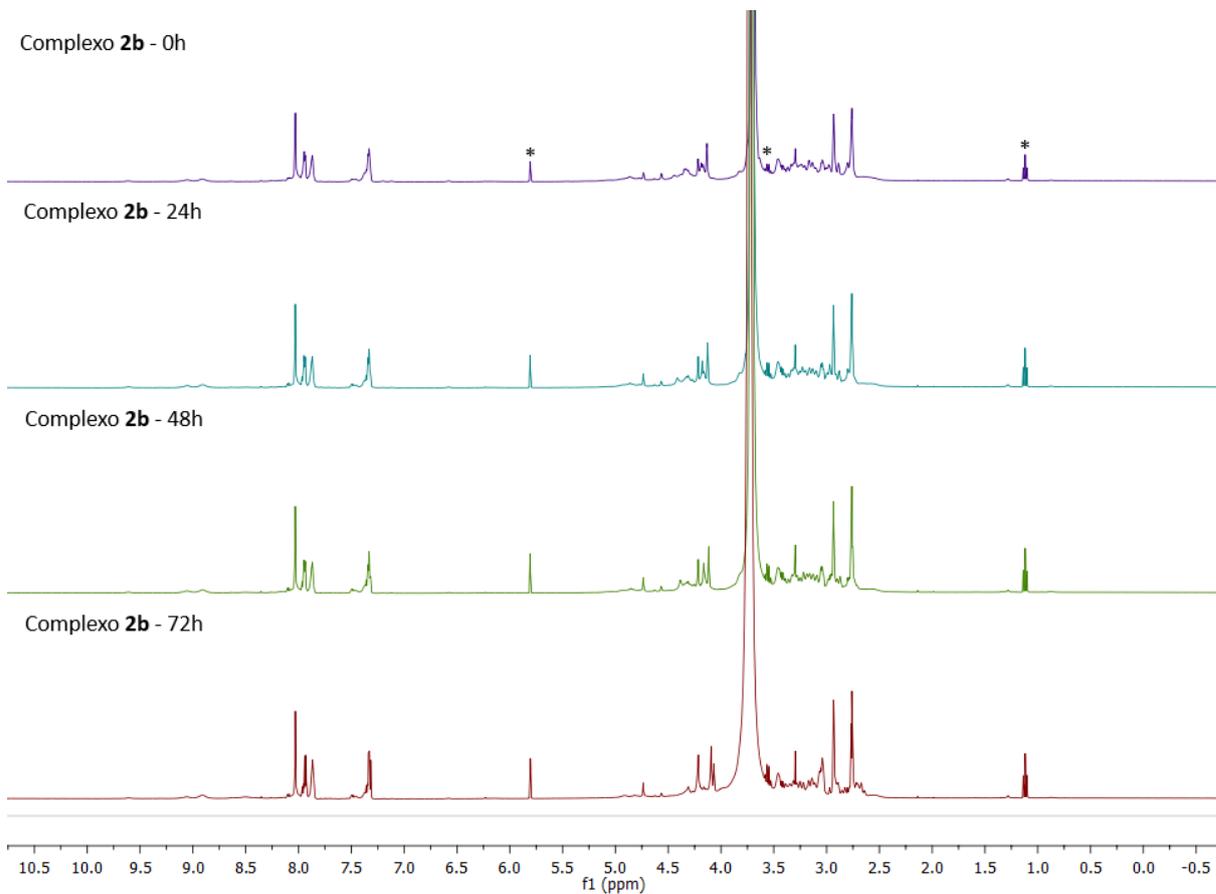


Figura A3 – Espectro de RMN de ^1H para o complexo **2b**, em diferentes tempos, 400 MHz e 25 °C, em DMF- d_7 . Nota: *Resíduo de diclorometano e metanol.

APÊNDICE D – CURVA DE AJUSTE

Tabela A1 – Valores utilizados para construção da curva de ajuste.

Complexo	Valor Experimental (ppm)	Valor Calculado (ppm)	Referência
<i>trans</i> -PtCl ₂ (BH)(DMSO)	-3037,0	-214,7371	[103]
<i>trans</i> -PtCl ₂ (4TF)(DMSO)	-3024	-221,0362	[103]
cisplatina	-2300	-299,0367	[104]
PtCl(SC ₇ H ₁₅ N ₄ O ₂)	-3100,94	-165,3505	[95]