

ANA PAULA ROGÉRIO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE COMPOSTOS CICLOPALADADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Instituto de Química da UNESP,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Campus de
Araraquara, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Química, Área de concentração
Química Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Eduardo Mauro

ARARAQUARA

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

R722s Rogerio, Ana Paula
Síntese, caracterização e investigação das
atividades
biológicas de compostos ciclopaladados /
Ana Paula Rogério. – Araraquara : [s.n], 2013
102 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual
Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Adelino Vieira de Godoy Netto
Coorientador: Antonio Eduardo Mauro

1. Química inorgânica. 2. Câncer. 3.
Leishmaniose.
4. Benzaldeídooxima. I. Título.

DADOS CURRICULARES

1. Dados Pessoais

Data de Nascimento: 13/01/1987
Nacionalidade: brasileira
Naturalidade: Taquaritinga-SP
Filiação: Lauro Luiz Rogério
Juraci Paes Pereira Rogério
Endereço Residencial: Rua dos Pazini, 40, Vila Rodrigues.
Cidade: Santa Ernestina/SP, CEP: 15970-000.
Telefone: (16) 3256-1260
Celular: (16) 9139-8186
ana-rogerio@hotmail.com

2. Formação Acadêmica

Graduação
Bacharel em Química Tecnológica
Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Concluído em dezembro de 2010.

3. Atividades Científicas

Iniciação Científica, junto ao Laboratório de Análise de Solos, IQ-UNESP, Araraquara.
Supervisão: Maria Cristina Passos Sartori
Período: maio/ 2007 a dezembro/ 2008

Iniciação Científica, junto ao Departamento de Físico-Química, IQ-UNESP, Araraquara.
Orientador: Profa. Hebe de las Mercedes Villulas
Período: fevereiro/ 2009 a dezembro/ 2009

4. Estágios, Bolsas e Auxílios

Estágio supervisionado na Usina São Martinho Pradópolis, SP.
Orientador: Prof. Dr. Leandro Martins

Bolsa de Mestrado (MS) concedida pela CAPES de março de 2011 a março de 2013.

5. Trabalhos em Congressos e Outros Eventos

Participação da 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Apresentação do trabalho “Ciclopaladados de oximas contendo ligantes derivados da tiouréia”.

Participação do Encontro de Pós-Graduação em Química do Interior Paulista – 2011.

ANA PAULA ROGÉRIO

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Araraquara, 19 de abril de 2013.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Rose Maria Carlos
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – UFSCAR, São Carlos



Prof. Dr. Wendel Andrade Alves
Centro de Ciências Naturais e Humanas – UFABC, Santo André

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível.

Aos meus pais, Lauro e Juraci, pelo apoio, dedicação, amor e carinho. A minha irmã Fernanda pelo companheirismo e pela ajuda que foi de grande importância. Ao Sam pelas horas de estudo.

E aos companheiros de faculdade pela amizade, convivência, conhecimentos compartilhados e pelos momentos que vivemos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas do meu convívio que acreditaram e contribuíram, mesmo que indiretamente, para a conclusão deste curso.

Agradeço ao professor Adelino Vieira de Godoy Netto pela orientação séria e competente, bem como pelas várias demonstrações de amizade e generosidade.

Ao Professor Mauro, pela coorientação e pelo convívio no Departamento.

A professora Regina pelo convívio no Departamento.

Ao Prof. Dr. Marcos José Marques, Prof. Dr. Eduardo Tonon e a Profa. Dr. Iracilda Zeppone Carlos pelos ensaios biológicos.

E a todos os professores do curso, pela dedicação, empenho e pela contribuição dentro de suas áreas.

Aos meus amigos Ronan, Gislaine, Tatiana, Noelle, Taciane, Caio e Maria pela dedicação, como também pelas inúmeras contribuições neste trabalho. Aos amigos do laboratório, Cristiana, Patrícia, Sahra, Carol, Fillipe, Silmar, Rodrigo, Daniel, Marcelo e Tales, pelas boas conversas e bom humor.

Ao Nivaldo pelas medidas dos espectros de ressonância magnética nuclear e pela ajuda.

A minha família pela compreensão e paciência.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iríamos ser, mas Graças a Deus, não somos o que éramos”.

Martin Luther King

RESUMO

Os compostos de coordenação de paládio(II) possuem extensas aplicações nas mais diferentes áreas da química. Nos últimos anos, eles estão sendo cada vez mais estudados para catálise homogênea, química supramolecular, materiais líquido-cristalinos e Medicina.

Dentre esses compostos de paládio(II) destacam-se os ciclopaladados, por apresentarem em alguns casos atividade antitumoral comparável ou superior a da cisplatina e recentemente atividade antileishmanicida.

Este trabalho teve como propósito sintetizar cinco novos complexos ciclopaladados mononucleares do tipo $[\text{PdCl}(\text{C}^2, \text{N-bzox})\text{L}]$, onde bzox = benzaldeidooxima e L = tiouréia (**1**), N,N'-dimetiltiouréia (**2**), N-metiltiouréia (**3**), N-feniltiouréia (**4**) e tioacetamida (**5**) através de reações entre o precursor dimérico $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{C}^2, \text{N-bzox})]_2$ e os ligantes.

Posteriormente os compostos foram caracterizados por Análise Elementar, Espectroscopia no IV (Infra-Vermelho), RMN (Ressonância Magnética Nuclear) e Espectrometria de Massas.

Os complexos e a cisplatina tiveram sua citotoxicidade investigada, *in vitro*, pelo método do MTT frente à linhagem celular LM3 (adenocarcinoma mamário), onde os compostos **1**, **2** e **4** apresentaram valores citotóxicos comparáveis a cisplatina.

Os compostos também foram testados frente ao protozoário do gênero *Leishmania* e a concentração inibitória, IC_{50} foi determinada. O composto **4** com o ligante feniltiouréia mostrou-se o mais ativo com um IC_{50} de $1,56 \mu\text{g mL}^{-1}$, inclusive quando comparado a droga de referência Anfotericina B ($\text{IC}_{50} = 6,95 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Palavras-chave: ciclopaladados, câncer, *leishmaniose*.

ABSTRACT

Palladium (II) compounds have been the subject of intense studies in various areas of chemistry, such as homogeneous catalysis, supramolecular chemistry, liquid crystalline materials and Bioinorganic chemistry.

Among them, special attention has been devoted to palladacycles, because of their promising cytotoxic activity towards tumor cells as well their some cases they have antitumor activity comparable or superior to cisplatin and antileishmanicidal activity.

This research aimed to synthesize five new mononuclear palladacycles complexes of the type $[\text{PdCl}(\text{C}^2, \text{N-bzox})\text{L}]$, where bzox = benzaldehydoxime and L = thiourea (**1**), N,N'-dimethylthiourea (**2**), N-methylthiourea (**3**) N-phenylthiourea (**4**) and thioacetamide (**5**) through bridge splitting reaction between the dimeric precursor $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{C}^2, \text{N-bzox})]_2$ and the ligands.

Subsequently the compounds were characterized by Elemental Analysis, IR spectroscopy (Infra-Red), NMR (Nuclear Magnetic Resonance) and Mass Spectrometry.

All the complexes and cisplatin have been tested *in vitro* by MTT assay for their cytotoxicity against the cell line LM3 (mammary adenocarcinoma), where the compounds **1**, **2** and **4** showed to be as cytotoxic as cisplatin. The compounds were also tested against the *Leishmania* protozoa and the inhibitory concentration, IC_{50} was determined. Compound **4** with the ligand phenylthiourea proved to be the most active with an IC_{50} of 1.56 mg mL^{-1} , even when compared to reference drug Amphotericin B ($\text{IC}_{50} = 6.95 \text{ mg mL}^{-1}$).

Keywords: palladacycles, cancer, *leishmaniasis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estágios do processo de carcinogênese.....	1
Figura 2. Fórmula estrutural da cisplatina, cis[Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂].....	3
Figura 3. Interações da platina a guanina	4
Figura 4. Fórmula estrutural da carboplatina.....	5
Figura 5. Representação esquemática do processo de ciclometalação.....	6
Figura 6. Estruturas de ciclopaladados com anéis de três (a), quatro (b), cinco (c), seis (d), sete (e), oito (f), nove (g) e dez (h) membros.	7
Figura 7. Fórmula Estrutural para os compostos cis (a) e trans (b)	8
Figura 8. Fórmulas dos organopaladados e suas as concentrações inibitórias (IC ₅₀) frente às linhagens Hela (A), Hep-2 (B) e C6 (C)	9
Figura 9. Representação estrutural de [Pd(C ² ,N-bzox)Cl(Im)], X = Cl, Br e I [75].	10
Figura 10. Fórmula estrutural do composto trans-[PdCl ₂ (HL-S) ₂].....	11
Figura 11. Estrutura da papaína com os domínios L e R	13
Figura 12. Mecanismo catalítico das cisteíno proteases	14
Figura 13. Principais funções biológicas das catepsinas	15
Figura 14. Estrutura da catepsina B.....	16
Figura 15. Compostos de telúrio (IV) testados como inibidores da catepsina B.	17
Figura 16. Representação estrutural dos compostos ciclopaladados [Pd ₂ (C ² ,N-R ₍₊₎ dmpa) ₂ (μ-dppf)Cl ₂] e [Pd ₂ (C ² ,N-S ₍₋₎ dmpa) ₂ (μ-dppf)Cl ₂].....	18
Figura 17. Formas flageladas (a) e aflageladas (b) da Leishmania.....	19
Figura 18. Ciclo biológico da Leishmania.....	20
Figura 19. Casos de LC e LV no Brasil no ano de 2007.	23
Figura 20. Complexo de Sb(V) com o ribonucleosídeo adenosina.....	24
Figura 21. Estrutura para os ligantes imínicos HLB e LB	25
Figura 22. Clivagem do dímero de paládio.....	30
Figura 23. Processo de transciclometalação para [Pd(μ-Cl) (C ² ,N-bzox)] ₂	34
Figura 24. Espectro no IV para o precursor e a bzox livre	35
Figura 25. Espectro no IV para os ligantes tu, dmtu, mtu, ftu e taa.....	36
Figura 26. Espectro no IV para os compostos 1, 2, 3, 4 e 5.....	37
Figura 27. Espectro de massas ESI/MS modo negativo do complexo 1 em MeOH..	39
Figura 28. Estruturas propostas da relação a carga/massa para o composto 1.....	40
Figura 29. Espectro de massas ESI/MS modo negativo do complexo 2 em MeOH..	40

Figura 30. Estruturas propostas da relação a carga/massa para o composto 2.....	41
Figura 31. Espectro de massas ESI/MS modo negativo do complexo 3 em MeOH..	41
Figura 32. Estruturas propostas da relação carga/massa para o composto 3.	42
Figura 33. Espectro de massas ESI/MS modo negativo do complexo 4 em MeOH..	42
Figura 34. Estruturas propostas para relação a carga/massa obtidas nos espectros de massas para o composto 4.	43
Figura 35. Espectro de massas ESI/MS modo negativo do complexo 5 em MeOH..	43
Figura 36. Estruturas propostas para relação a carga/massa obtidas nos espectros de massas para o composto 5.	44
Figura 37. Esquema de numeração adotado.	45
Figura 38. Espectro de RMN de ^1H para 1.	46
Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C para 1.....	47
Figura 40. Principais correlações observadas em HMBC para o composto 1.....	47
Figura 41. Espectro NOESY para o composto 1.....	48
Figura 42. Espectro expandido NOESY1D para o composto 1.....	48
Figura 43. Espectro de RMN de ^1H para 2.....	50
Figura 44. Espectro de RMN de ^{13}C para 2.....	51
Figura 45. Principais correlações encontradas em HMBC para o composto 2.....	51
Figura 46. Espectro HOMODEC para o composto 2. (a) Espectro de ^1H do complexo 2; (b) irradiando o sinal de H6 em $\delta 7,41$; (c) irradiando o sinal de H3 em $\delta 7,11$	52
Figura 47. Espectros de ^1H sem e com a adição de D_2O para 3.....	54
Figura 48. Isômeros conformacionais cis e trans da mtu.	54
Figura 49. Espectro de RMN de ^{13}C para 3.....	55
Figura 50. Principais correlações encontradas para o composto 3 e a bzoX.....	56
Figura 51. Espectro de RMN de ^1H para 4.	57
Figura 52. Espectro de RMN de ^{13}C para 4.....	57
Figura 53. Principais correlações encontradas em HMBC para o composto 4.....	58
Figura 54. Espectro TOCSY para o composto 4.	58
Figura 55. Espectro de RMN de ^1H para 5.	60
Figura 56. Espectro de RMN de ^{13}C para 5.....	61
Figura 57. Principais correlações encontradas em HMBC para o composto 5.....	61
Figura 58. Espectro COSY para o composto 5.	62
Figura 59. Estruturas propostas para os compostos de 1-5.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativas de novos casos para diferentes tipos de câncer no Brasil	2
Tabela 2. Concentrações inibitórias (IC ₅₀) frente a linhagens LM3 e LP07.	12
Tabela 3. Reagentes e solventes utilizados.	28
Tabela 4. Análise elementar e pontos de fusão para os complexos 1, 2, 3, 4 e 5.	34
Tabela 5. Freqüências vibracionais referentes a bzox e [Pd(μ -Cl)(C ² ,N-bzox)] ₂	35
Tabela 6. Principais frequências para os ligantes livres e complexos 1-5.	38
Tabela 7. Deslocamentos químicos (ppm) de ¹ H e ¹³ C das tiouréias.	44
Tabela 8. Dados de RMN para o composto 1.	49
Tabela 9. Dados de RMN para o composto 2.	53
Tabela 10. Dados de RMN de ¹ H para o bzox livre.	53
Tabela 11. Dados de RMN de ¹³ C para o bzox livre.	55
Tabela 12. Dados de RMN para o composto 3.	56
Tabela 13. Dados de RMN para o composto 4.	59
Tabela 14. Dados de RMN para o composto 5.	62
Tabela 15. Valores de IC ₅₀ para compostos de 1-5 frente à LM3.	64
Tabela 16. Valores de IC ₅₀ para atividade antileishmanicida dos compostos de 1-5.	65

LISTA DE ABREVIATURAS

bzox = benzaldeidooxima

dmtu = N,N'-dimetiltiouréia

tu = tiouréia

taa = tioacetamida

mtu = N-metiltiouréia

ftu = N-feniltiouréia

dmba = N,N-dimetilbenzilamina

PPh₃ = trifenilfosfina

dmpa = N, N-dimetil-1-fenetilamina

dppe = 1, 2- etanobis(difenilfosfina)

dppp = 1,3-bis(difenilfosfina)propano

dppf = 1,1'-Bis(difenilfosfina)ferroceno

AOc = acetato

IC₅₀ = concentração necessária para inibir 50% o crescimento celular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer.....	1
1.1.1 Compostos de coordenação como agentes citotóxicos à células tumorais.....	3
1.1.2 Compostos ciclopaladados como agentes citotóxicos à células tumorais.....	6
1.1.3 Atividade citotóxica de ciclopaladados contendo ligantes sulfurados frente à células tumorais.	10
1.1.4 Atividade inibitória da enzima catepsina B induzida por ciclopaladados em células tumorais	12
1.2 A <i>Leishmaniose</i>	19
1.2.1 Apresentação epidemiológica mundial e no Brasil da <i>Leishmaniose</i>	21
1.2.2 O tratamento da <i>Leishmaniose</i>	23
1.2.3 Ciclopaladados como novos agentes quimioterápicos às cisteína proteases de parasitas.....	24
2. OBJETIVOS	27
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	28
3.1 Reagentes e solventes	28
3.2 Sínteses	28
3.2.1 Síntese do precursor $[Pd(\mu-Cl)(C^2,N-dmba)]_2$ a partir da ativação da ligação C-H.....	28
3.2.2 Síntese do precursor $[Pd(\mu-Cl)(C^2,N-bzox)]_2$	29
3.2.3 Síntese dos complexos do tipo $[PdCl(C^2,N-bzox)(L)]$, L = tu (1), dmtu (2), mtu (3), ftu (4) e taa (5)	29
3.3 Caracterização dos compostos	30
3.4 Ensaio Biológicos	31
3.4.1 Antitumorais	31
3.4.2 Antileishmanicida	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Síntese dos ciclopaladados: ativação da ligação C-H em grupos arila e transciclometalação.....	33
4.2 Análise Elementar e Ponto de Fusão	34
4.3 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho	35
4.4 Espectrometria de Massas (ESI/MS)	38
4.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	44
4.6 Proposição Estrutural	63

4.7 Investigação das propriedades biológicas.....	64
4.7.1 Avaliação da citotoxicidade frente à células tumorais	64
4.7.2 Avaliação da citotoxicidade frente à formas promastigotas de <i>Leishmania</i>	65
5. CONCLUSÃO.....	67
6. REFERÊNCIAS.....	68
ANEXOS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer, um conjunto de mais de 100 doenças causadas pela multiplicação descontrolada de células anormais é a segunda causa de óbito no Brasil, atrás apenas das doenças cardiovasculares [1].

A formação do câncer é um processo de múltiplos passos denominado carcinogênese, que geralmente ocorre por anos para que uma célula cancerosa se torne um tumor. O processo de carcinogênese é dividido em três fases: iniciação; promoção e progressão [2]. O primeiro estágio da carcinogênese é o de iniciação, onde as células sofrem alterações em seu DNA provocadas por agentes cancerígenos. O estágio seguinte deste processo é a promoção em que as células geneticamente modificadas são transformadas em células malignas sob o efeito de agentes que não são mutagênicos, mas que promovem a multiplicação celular que contém a mutação inicial. Para que a promoção ocorra é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno. A progressão do tumor se manifestará em função do acúmulo destas mutações, ou seja, pela multiplicação descontrolada das células alteradas [3]. A figura abaixo apresenta os estágios do processo de carcinogênese.

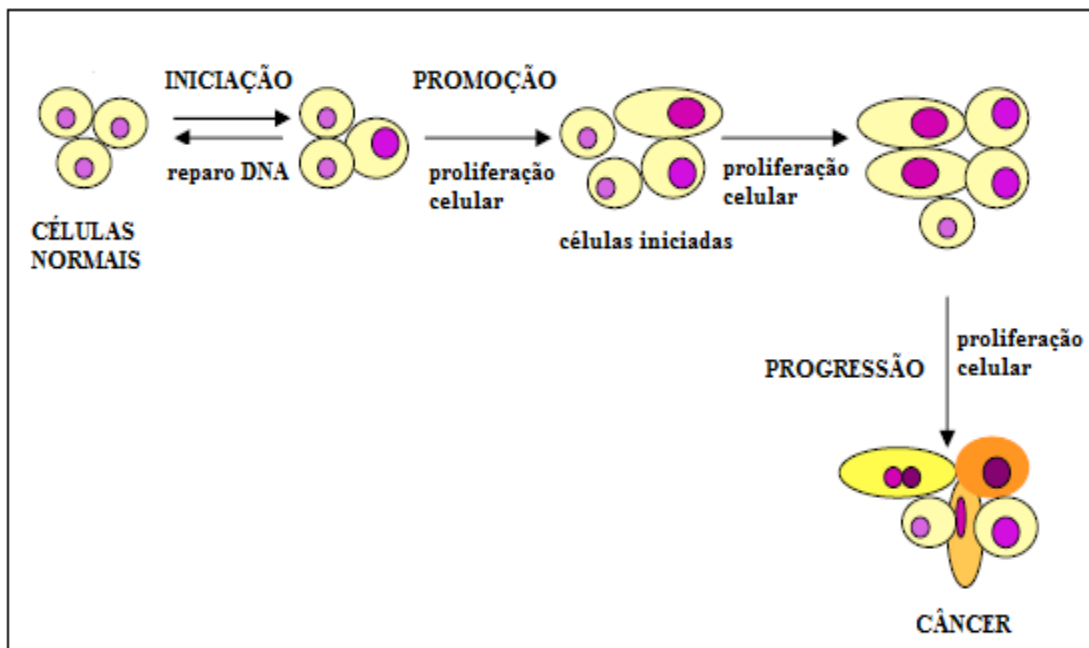


Figura 1. Estágios do processo de carcinogênese.

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, principalmente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento [5]. Em 2008, cerca de 7,6 milhões de pessoas morreram devido à doença, representando 13% do total de óbitos no mundo. Os tipos mais letais de cânceres são os de pulmão, fígado, cólon e mama [6]. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que mais de 11 milhões de pessoas morrerão em 2030 devido ao câncer [7]. No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, sendo os tipos mais incidentes os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para homens e para as mulheres serão os cânceres pele não melanoma, mama, cólon do útero, cólon e reto e glândula tireoide para as mulheres. Um total de 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. O câncer da pele do tipo não melanoma é o mais incidente na população brasileira com 134 mil novos casos, seguido pelos tumores de próstata com 60 mil e mama feminina com 53 mil [8]. A Tabela 1 apresenta as estimativas de novos casos para os anos de 2012 e 2013.

Tabela 1. Estimativas de novos casos para diferentes tipos de câncer no Brasil [8].

Localização Primária Neoplasia Maligna	Homens	Mulheres
	Casos	
Próstata	60.180	-
Mama Feminina	-	52.680
Colo do Útero	-	17.540
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	10.110
Cólon e Reto	14.180	15.960
Estômago	12.670	7.420
Cavidade Oral	9.990	4.180
Laringe	6.110	-
Bexiga	6.210	2.690
Esôfago	7.770	2.650
Ovário	-	6.190
Linfoma não Hodgkin	5.190	4.450
Glândula Tireoide	-	10.590
Sistema Nervoso Central	4.820	4.450
Leucemias	4.570	3.940
Corpo do Útero	-	4.520
Pele Melanoma	3.170	3.060
Outras Localizações	43.120	38.720
Pele não Melanoma	62.680	71.490
Todas as Neoplasias	257.870	260.640

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

A explicação para o crescimento da doença está relacionada, em geral, na maior exposição dos indivíduos a fatores de risco cancerígenos. O processo global de industrialização desencadeou a padronização das condições de trabalho, maus hábitos alimentares e consumismo exagerado, redefinindo assim os padrões de vida populacional e refletindo no perfil epidemiológico das populações. Alterações demográficas como redução das taxas de mortalidade e natalidade indicam o prolongamento da expectativa de vida e o envelhecimento populacional. Isso leva ao aumento da incidência de doenças crônico-degenerativas, especialmente as cardiovasculares e o câncer [9].

As principais formas de tratamento para o câncer são cirurgia, radioterapia, quimioterapia e transplante de medula óssea. A cirurgia consiste na remoção do tumor, porém nos casos em que o tumor já estiver espalhado ou se encontra em órgãos vitais, tal procedimento é inviável. A radioterapia é o tratamento no qual se utilizam radiações com objetivo de destruir o tumor ou para impedir que as células aumentem e se espalhem, muitas vezes ela está combinada à quimioterapia. Para a quimioterapia são utilizados medicamentos, na sua maioria injetáveis que atuam no DNA das células provocando sua morte [10].

A maior dificuldade do tratamento é a distinção das células normais das cancerosas, pois ambas são muito semelhantes e para a maioria dos casos, é preciso combinar mais de uma modalidade de tratamento.

1.1.1 Compostos de coordenação como agentes citotóxicos à células tumorais

Os compostos de coordenação têm desempenhado distintos e importantes papéis na Medicina. Contudo a aplicação terapêutica desses complexos metálicos na Medicina moderna foi iniciada pela descoberta das propriedades antitumorais da cis-diaminodichloroplatina(II), cisplatina (Figura 2) por Barnet Rosenberg [11].

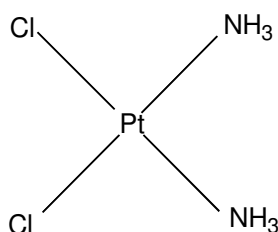


Figura 2. Fórmula estrutural da cisplatina, cis[Pt(NH₃)₂Cl₂].

A cisplatina pode reagir com muitas estruturas celulares e moléculas, tais como membranas, proteínas e RNA, mas o alvo principal é o DNA. É bem estabelecido que a cisplatina atua como um inibidor da replicação do DNA sugerindo que esse complexo causa a morte das células cancerosas ao não permitir sua replicação. Nesse complexo a platina liga-se ao DNA preferencialmente pelo átomo de nitrogênio da base guanina ou adenina, sendo que a primeira forma ligações mais estáveis devido às interações de hidrogênio entre o grupo amônia da cisplatina e o oxigênio da guanina, como representado abaixo [12].

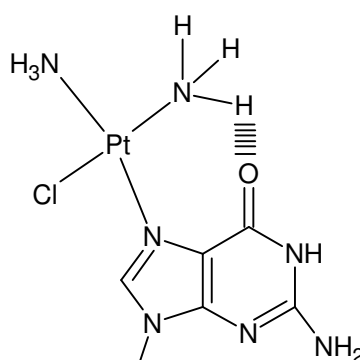


Figura 3. Interações da platina a guanina [12].

A cisplatina pode formar vários tipos de aduto com o DNA, podendo se ligar intrafita, quando as ligações ocorrem na mesma fita ou interfita onde a ligação ocorre em fitas diferentes, fazendo com que a estrutura do DNA seja distorcida interferindo no seu funcionamento normal [13]. A cisplatina foi aprovada para o tratamento do câncer de próstata em 1978, onde é altamente eficaz no tratamento desse tipo de câncer, podendo atingir 90% de cura nos casos diagnosticados na fase inicial [12]. Ela também pode atuar em outros tipos de cânceres, como de ovário, esôfago, cólon e reto, pulmão, linfoma, melanoma, entre outros. Entretanto o uso da cisplatina para o tratamento de câncer apresenta algumas limitações como o aparecimento de resistência adquirida celular e sua baixa solubilidade em água. Alguns fatores têm sido atribuídos à resistência à cisplatina, entre eles destacam-se a desativação do fármaco por proteínas e peptídeos contendo enxofre, ocorrência de reparo no DNA e diminuição do seu acúmulo na célula [12]. Além disso, o fármaco em questão apresenta vários efeitos colaterais, tais como neurotoxicidade, nefrotoxicidade, náuseas, vômitos, dificuldade na audição (ototoxicidade) e hipomagnesemia [14].

O uso da cisplatina no tratamento de câncer impulsionou as pesquisas de novos compostos que apresentem não somente efeitos colaterais mais brandos que a cisplatina, mas também um bom índice de citotoxicidade frente às células tumorais [15]. A carboplatina [cis-diamino-1,1-ciclobutanodicarboxilato-platina(II)] é um análogo de platina estruturalmente relacionado com a cisplatina. O composto foi desenvolvido para aprimorar a atividade terapêutica e reduzir os efeitos limitantes da cisplatina. A carboplatina, como a cisplatina, interage com o DNA formando adutos intrafitas e interfitas. A citotoxicidade da carboplatina é aumentada por hipotermia, o fármaco potencializa os efeitos da radiação sobre o crescimento do tumor e sua citotoxicidade é comparável a da cisplatina. A carboplatina apresenta diferentes propriedades farmacocinéticas em relação à cisplatina, como alta eliminação pelos rins, apresentando uma taxa de 50-75% do total de platina excretado na urina em 24 horas e menor interação com proteínas. A carboplatina foi o segundo fármaco de platina aprovado para uso clínico, a partir de 1985 [16].

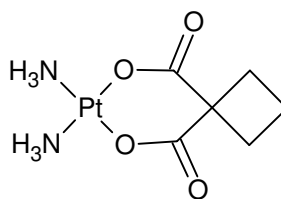


Figura 4. Fórmula estrutural da carboplatina.

Outros metais de transição também têm sido estudados e entre eles o emprego do íon paládio(II) no planejamento de compostos com potencial terapêutico é cada vez maior, uma vez que sua química de coordenação é semelhante a da platina(II), além de apresentarem raios iônicos muito próximos. O íon paládio(II) têm configuração [Kr]4d⁸ e apesar de ser paramagnético, a maioria dos seus compostos são diamagnéticos devido ao emparelhamento de elétrons e a geometria desses compostos é quadrado planar. Os primeiros ensaios de citotoxicidade envolvendo os compostos de paládio(II) indicaram que os mesmos são menos ativos que os compostos de platina(II), isto provavelmente ocorre em função de parâmetros cinéticos e a maior polarização do paládio, uma vez que complexos de paládio(II) reagem aproximadamente 10⁵ vezes mais rápidos que seus análogos de platina(II) [17]. Assim, a baixa atividade antitumoral de parte dos complexos de paládio(II) foi atribuída aos rápidos processos de hidrólise que conduzem à dissociação dos

grupos abandonadores em solução e, conseqüentemente, à formação de espécies muito reativas incapazes de atingir seus alvos farmacológicos [18, 19].

Uma das estratégias empregadas no planejamento de compostos de paládio(II) termodinamicamente mais estáveis e menos lábeis envolve a síntese de quelatos. Das e Livingstone [20] investigaram a atividade antitumoral de um grande número de quelatos metálicos e observaram que dentre os compostos testados, os de paládio(II) demonstraram ser agentes citotóxicos mais efetivos que os quelatos de outros metais. Segundo os autores, os quelatos de platina(II) demonstraram ser cineticamente mais inertes em meio biológico que os de paládio(II), o que tornariam os quelatos de paládio(II) mais adequados para estabelecer interações covalentes frente ao DNA e, conseqüentemente, conduzir a destruição das células cancerosas.

1.1.2 Compostos ciclopaladados como agentes citotóxicos à células tumorais

Os compostos ciclopaladados constituem uma classe de quelatos de paládio(II) que se destacam por apresentarem atividade citotóxica promissora frente às células tumorais. Os ciclopaladados são caracterizados por possuírem em sua estrutura um anel contendo uma ligação coordenada entre o paládio e um átomo doador Y, pertencente aos grupos 15 e 16 da tabela periódica e uma ligação metal-carbono [21]. Nesse processo a ligação metal-carbono é formada pelo rompimento de uma ligação carbono-hidrogênio, como representado na Figura 5 [22].

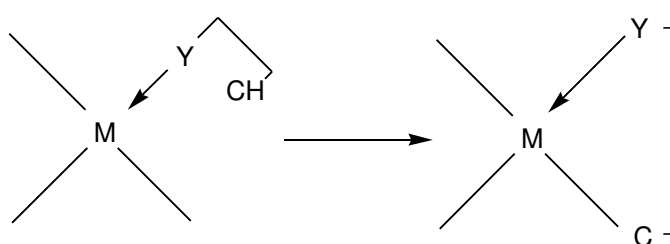


Figura 5. Representação esquemática do processo de ciclometalação.

Os anéis metalados podem variar de 3 a 11 membros, dependendo da posição da ligação carbono-hidrogênio com respeito ao átomo doador Y, porém os mais comuns e estáveis são os ciclopaladados de cinco e seis membros no anel. Ciclopaladados com três ou quatro membros são menos estáveis, conseqüentemente a obtenção dessas estruturas são mais raras [23]. As estruturas de alguns ciclopaladados

contendo anéis de três (a), quatro (b), cinco (c), seis (d), sete (e), oito (f), nove (g) e dez (h) membros estão apresentadas na Figura 6.

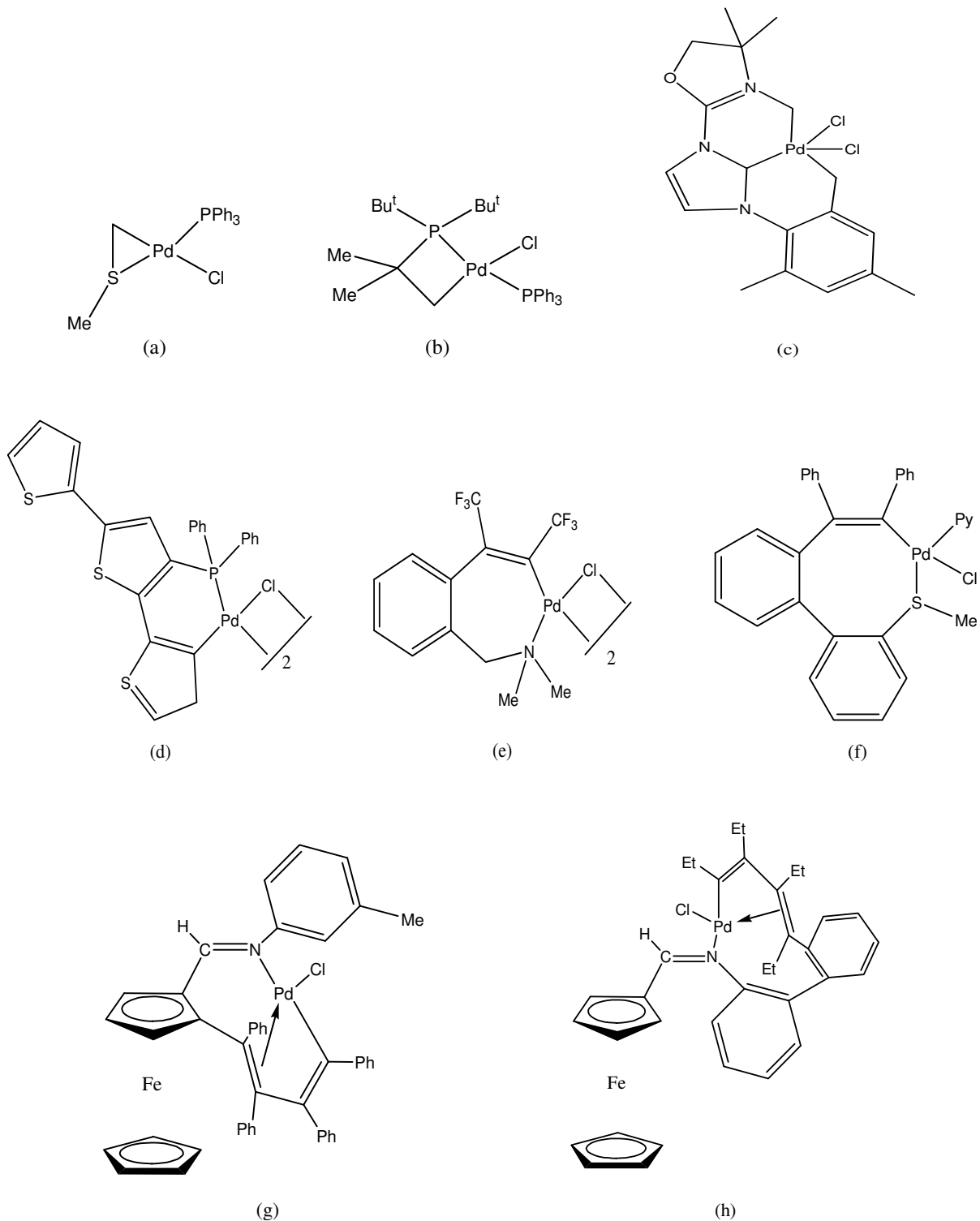


Figura 6. Estruturas de ciclopaladados com anéis de três (a), quatro (b), cinco (c), seis (d), sete (e), oito (f), nove (g) e dez (h) membros [23].

Os ciclopaladados constituem uma importante área na Química Inorgânica Medicinal. Newkome *et al.* [24] foram pioneiros nesta área e investigaram a capacidade dos complexos **a** e **b** (Figura 7) em introduzir quebras ao DNA superenovelado, utilizando um sistema de ensaio com base na filtração, em que o DNA desnaturado ou DNA de fita simples são seletivamente retidos. Estudos preliminares mostraram que o composto **a** era capaz de causar tais lesões ao DNA, enquanto o composto **b** era inativo, evidenciando que a geometria cis teria um papel fundamental nesta ação. Posteriormente foi que o composto **a** não causaria quebras na fita, mais que ele era capaz de se ligar ao DNA. Os autores sugerem que o mecanismo de intercalação seja o mais provável.

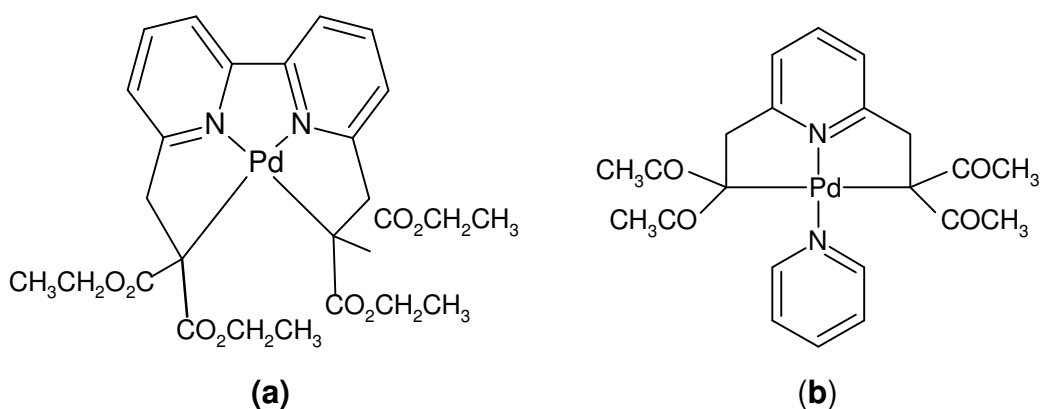


Figura 7. Fórmula Estrutural para os compostos cis (a) e trans (b) [24].

Ruiz *et al.* [15] investigaram a atividade citotóxica de uma série de complexos ortopaladados contendo o ligante N,N-dimetilbenzilamina (dmba). Dentre os diversos compostos estudados, o complexo [Pd(dmba)(PPh₃)₂]ClO₄ (PPh₃ = trifenilfosfina) apresentou um nível de citotoxicidade três vezes maior (IC₅₀ = 3,01 μM) do que quando comparado a da cisplatina (IC₅₀ = 15,61 μM) frente a linhagem de células HL-60 (leucemia humana).

Rodrigues *et al.* [25] sintetizaram alguns ciclopaladados com ligantes bifosfínicos e investigaram a atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* desses compostos frente a linhagem celular B16F10 de melanoma murino. Os testes *in vitro* mostraram que os complexos [Pd(S₍₋₎C²,N-dmpa)(dppe)]Cl e [Pd₂(S₍₋₎C²,N-dmpa)₂(μ-dppe)Cl₂] (dmpa = N, N-dimetil-1-fenetilamina e dppe = 1, 2- etanobis(difenilfosfina)) causaram a morte de 100% das células tumorais a uma concentração menor que 1,25 μM e que ainda

o complexo binuclear provocou um colapso na atividade respiratória com uma diminuição abrupta da acidificação extracelular, seguido pela degradação do DNA após 24 horas. O complexo $[\text{Pd}_2(\text{S}_{(-)}\text{C}^2, \text{N-dmpa})_2(\mu\text{-dppe})\text{Cl}_2]$ foi também o mais ativo *in vivo*, retardando o crescimento tumoral e prolongando a sobrevivência dos animais.

A investigação da atividade citotóxica de ciclometalados de paládio(II) e sua interação com o sistema imune é uma das principais frentes de pesquisa do grupo de Química de Coordenação e Organometálicos (IQAr-UNESP) em parceria com o Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Resultados promissores foram obtidos na investigação da atividade citotóxica, realizados com ciclopaladados mononucleares e binucleares contendo fosfinas frente às linhagens de células tumorais humanas C6 (glioma cerebral), Hep-2 (orofaringe) e Hela (côlon de útero) [26].

Os complexos **2**, **4** e **5** apresentaram os melhores índices citotóxicos frente às linhagens tumorais testadas, sendo que $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{N}_3)(\text{dppp})]$ (**4**, Figura 8) demonstrou ser o mais eficiente, especialmente no combate às células da linhagem C6, apresentando uma concentração inibitória (IC_{50}) correspondente a $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

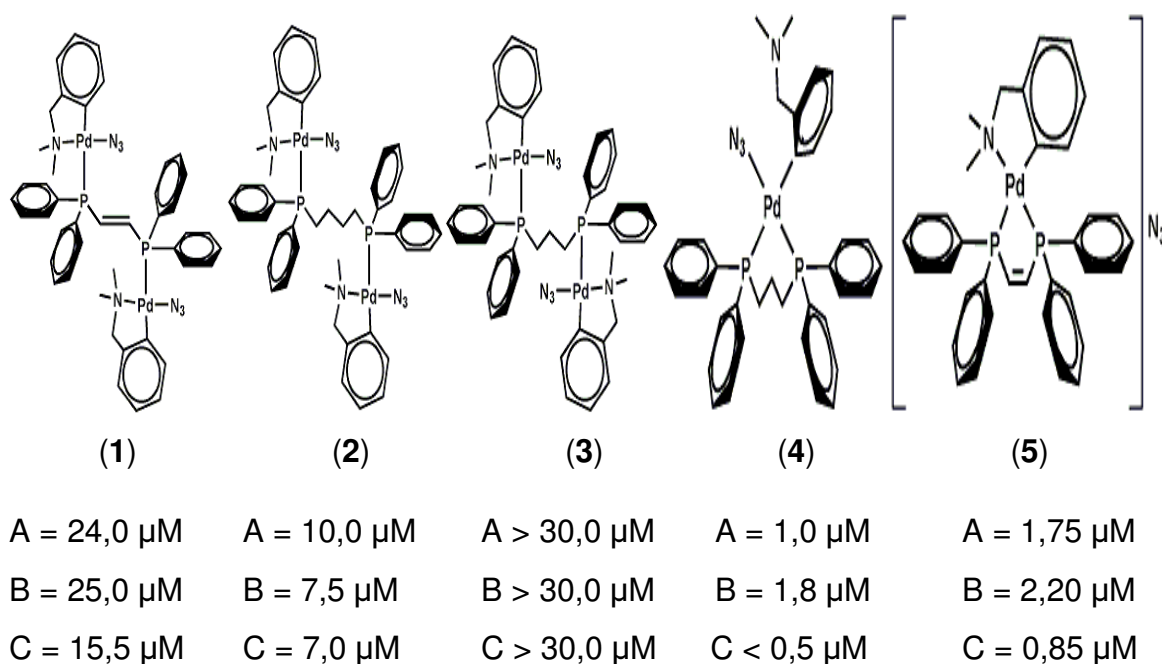


Figura 8. Fórmulas dos organopaladados e suas as concentrações inibitórias (IC_{50}) frente às linhagens Hela (A), Hep-2 (B) e C6 (C) [26].

A natureza mononuclear ou binuclear dos complexos parecem ter um importante papel no mecanismo de ação desses compostos, uma vez que os compostos binucleares tiveram ação citotóxica menos eficaz, mostrando que os ligantes devem ter exercidos pouca influência na atividade citotóxica, sendo a ação biológica dos complexos ligados a fatores estruturais. Nesse trabalho ficou demonstrada a grande potencialidade de aplicação medicinal dos compostos ciclopaladados.

Testes de citotoxicidade de compostos ciclopaladados formados a partir oximas também foram realizados pelo nosso grupo, onde foi possível observar a atividade desses compostos frente a linhagem tumoral LM3. Os três compostos sintetizados (Figura 9) apresentaram valores de concentração inibitória menores que a cisplatina, logo são mais ativos que a droga padrão [75].

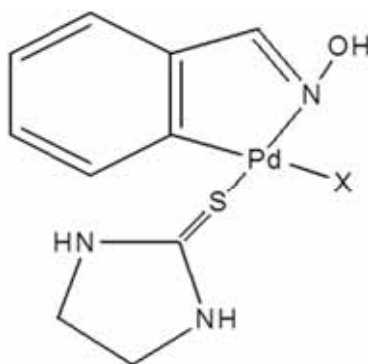


Figura 9. Representação estrutural de $[Pd(C^2,N\text{-bzox})Cl(Im)]$, X = Cl, Br e I [75].

1.1.3 Atividade citotóxica de ciclopaladados contendo ligantes sulfurados frente à células tumorais.

A utilização de moléculas sulfuradas no design de compostos potencialmente ativos de Pd(II) é também um alvo recente de investigação científica. O fato do enxofre estabelecer ligações bastante estáveis com esses metais oferece a oportunidade de ligar no esqueleto molecular de complexos grupos capazes de estabelecer interações não-covalentes adicionais com a biomolécula do DNA (ligações de hidrogênio, etc.) e/ou com o sítio ativo de enzimas. Dessa forma, a associação complexo-alvo farmacológico seria mais favorável, podendo afetar seu funcionamento nas células tumorais.

As tiouréias são ligantes sulfurados potencialmente muito versáteis, capazes de se coordenar em vários centros metálicos. A tiouréia e seus derivados tem atraído atenção principalmente por sua atividade biológica frente à células tumorais e

microorganismos patógenos [27]. A presença do nitrogênio “duro” e o enxofre “mole” (Princípio de Pearson) como átomos doadores nesses ligantes, fornece uma ampla possibilidade de ligações para essas moléculas. Com relação ao paládio(II), sua coordenação geralmente ocorre via átomo de enxofre, sendo ambos átomos moles, conforme o princípio de Pearson. A Figura 10 apresenta a estrutura do composto *trans*-[PdCl₂(HL-S)₂], onde HL = N,N-di-n-butil-N'-benzoiltiouréia determinada por cristalografia de raio-X, no qual pode ser observado a geometria quadrado planar do átomo de paládio central e a coordenação da tiouréia pelo átomo de enxofre [28].

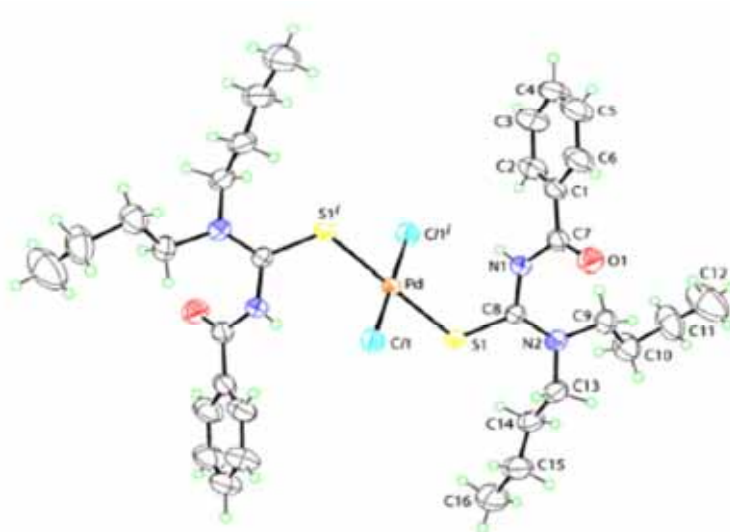


Figura 10. Fórmula estrutural do composto *trans*-[PdCl₂(HL-S)₂] [28].

Os complexos de Pd(II) coordenados às tiouréias são particularmente importantes porque alguns deles exibem atividade citotóxica. Nadeem *et al.* [29] sintetizaram vários complexos de Pd(II) coordenados a tiosemicarbazonas, onde foram testados em diferentes tipos de células. Esses compostos inibiram a síntese de DNA em células de leucemia P388 e induziram a apoptose em células tumorais nos quais são resistentes à cisplatina.

Nesse contexto, Moro *et al.* [30] investigaram a atividade citotóxica dos ciclometalados [PdCl(dmiba)(tu)] e [PdBr(dmiba)(tu)], (dmiba = N,N - dimetilbenzilama, tu = tiouréia) frente as linhagens de células tumorais murino LM3 e LP07. O complexo sintetizado [PdBr(dmiba)(tu)] apresentou um potencial citotóxico (IC₅₀) frente a linhagem LM3 comparável ao da cisplatina, cuja as concentrações inibitórias são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações inibitórias (IC₅₀) frente a linhagens LM3 e LP07.

Compostos	IC ₅₀ (μM) ± SD	
	LM3	LP07
[PdCl(C ² ,N-dmba)(tu)]	72,4 ± 3,92	76,6 ± 1,99
[PdBr(C ² ,N-dmba)(tu)]	29,6 ± 0,18	22,6 ± 1,93
Cisplatina	30,3 ± 3,72	4,34 ± 0,45

1.1.4 Atividade inibitória da enzima catepsina B induzida por ciclopaldados em células tumorais

As enzimas possuem papel fundamental no metabolismo dos seres vivos, sendo responsáveis por um grande número de reações químicas, porém adquirindo uma atividade anormal, elas podem contribuir com o aparecimento de várias doenças. Logo, a construção de moléculas com a capacidade de inibir a atividade de determinadas enzimas é essencial [31].

Uma classe de enzimas de grande importância é a das cisteíno proteases encontradas na maioria dos organismos, desde bactérias, fungos, protozoários, plantas e animais. A atividade das cisteíno proteases envolve resíduos dos aminoácidos cisteína e histidina e, dependendo da ordem desses resíduos as cisteíno proteases são classificadas em diversos clãs. O principal clã das cisteíno proteases é o CA (Cis-His) encontrado na maioria das cisteíno proteases descritas e apresenta como resíduos catalíticos cisteína, histidina e asparagina e, em alguns casos, ácido aspártico. Esse clã agrupa as catepsinas B, C, K, L e S dos mamíferos e outros organismos, inclusive protozoários [32]. A papaína pertencente ao clã CA foi a primeira cisteíno protease determinada através de técnicas cristalográficas de raio-X e diversas proteases com sequências, estruturas e atividades similares à papaína são denominadas “papain-*like*” e pertencem a família C1 [33]. Essas proteases apresentam estrutura bilobada com o sítio catalítico, localizado na reentrância dos domínios L (C-terminal) e R (N-terminal), conforme apresentado na Figura 11.

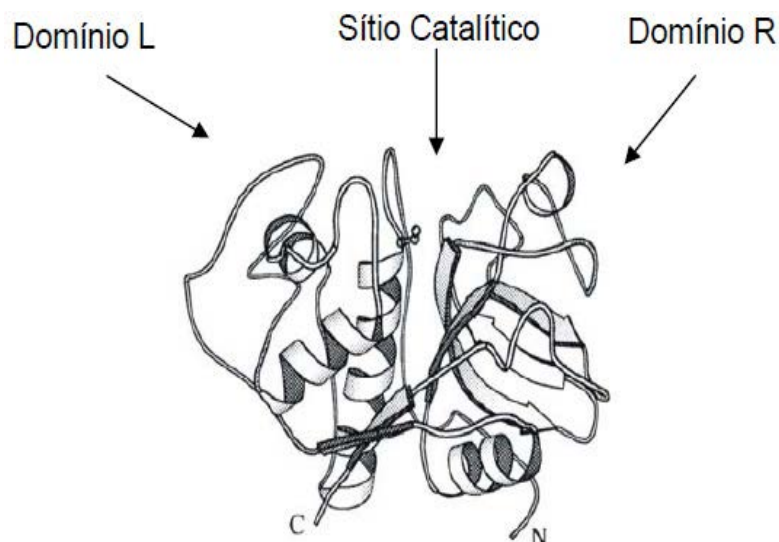


Figura 11. Estrutura da papaína com os domínios L e R [33].

O mecanismo catalítico geral das cisteíno protease (Figura 12) inicia-se com a ligação do substrato peptídico à enzima quando o grupo tiol do resíduo de cisteína da enzima reage com o grupo carbonílico do substrato. A alta nucleofilicidade do grupo tiol das cisteíno proteases tem papel fundamental em sua atividade catalítica. Na forma ativa da enzima ambos os resíduos são carregados formando o par tiol-imidazol. A próxima etapa envolve a acilação do intermediário formado que perde a porção C-terminal ($R-NH_2$). Esta acil-enzima reage com água para formar um segundo produto ($RCOOH$) através da deacilação, regenerando a estrutura enzimática que inicia o ciclo novamente.

As funções biológicas dessas enzimas podem ser bem variadas. Por exemplo, Yuan *et al.* [34] propuseram que as cisteíno proteases participavam da iniciação da morte celular programada. Outro processo celular que envolve estas proteases é a capacidade destas na degradação de proteínas em sementes [35].

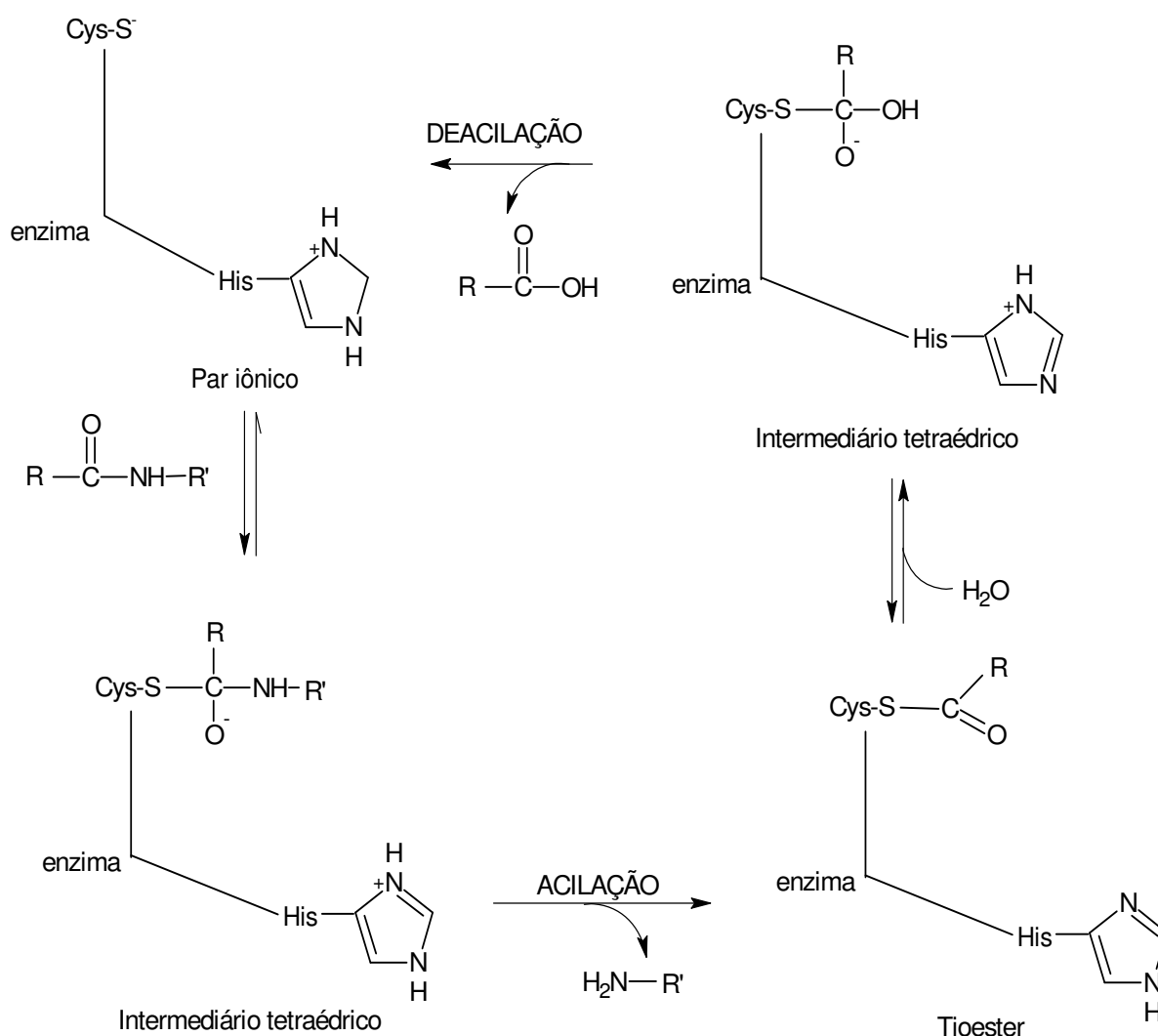


Figura 12. Mecanismo catalítico das cisteíno proteases [33].

Outros trabalhos avaliaram a seletividade da ação inibitória com base nas diferenças estruturais dos propeptídeos das cisteíno proteases da família C1, mostrando que estes são elementos reguladores da atividade destas enzimas.

As proteases também podem ser subdivididas de acordo com o tipo de reação que catalisam podendo ser exopeptidases, que clivam as ligações peptídicas próximas das porções amino ou carboxi-terminal e endopeptidases, que clivam ligações peptídicas na região interna da cadeia polipeptídica, neste grupo se enquadram as cisteíno proteases da família C1.

As catepsinas B, C, H, K, L, M, N, S, T, V e W são componentes importantes da família C1 que podem ser encontradas no interior dos lisossomos. As catepsinas L, B, D e H representam a maior parte das proteases lisossomais e determinam

primariamente a capacidade proteolítica dos lisossomos [32]. A maioria das cisteíno proteases lisossômicas possui apenas atividade de endopeptidase, entretanto a catepsina B possui ambas as atividades. As funções biológicas dessas catepsinas estão descritas na figura abaixo.

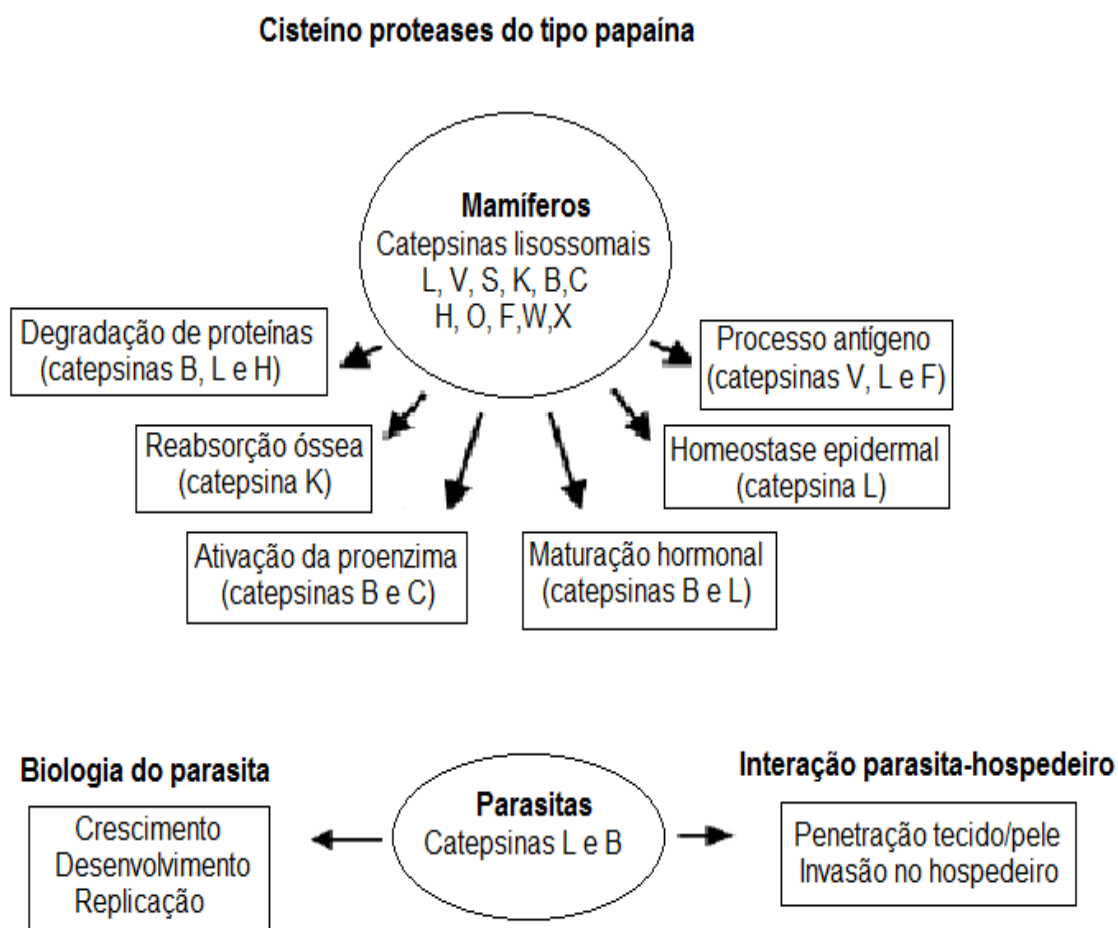


Figura 13. Principais funções biológicas das catepsinas [33].

As catepsinas B são as cisteíno proteases lisossomais de mamíferos mais bem estudadas e encontram-se na maioria das células e tecidos. Por ser uma enzima lisossomal, essa catepsina atua principalmente na degradação intracelular das proteínas. Porém, podem agir extracelularmente quando liberadas em determinadas circunstâncias, degradando componentes da matriz extracelular [33]. A catepsina B é significativamente maior do que a papaína (245 resíduos contra 212) por causa de inserções que são distribuídos ao longo da proteína. A expansão de loop mais evidente é de 18 resíduos entre os resíduos 90 e 91 de papaína (Figura 14). Esse trecho é referido como 104 a 126 para a catepsina B, que tem o seu próprio sistema

de numeração, devido ao seu menor parentesco com a papaína. Dentro desta região, dois resíduos de histidina (His110 e Hist111) foram apontados como sendo importantes para a atividade de exopeptidases da enzima [35].

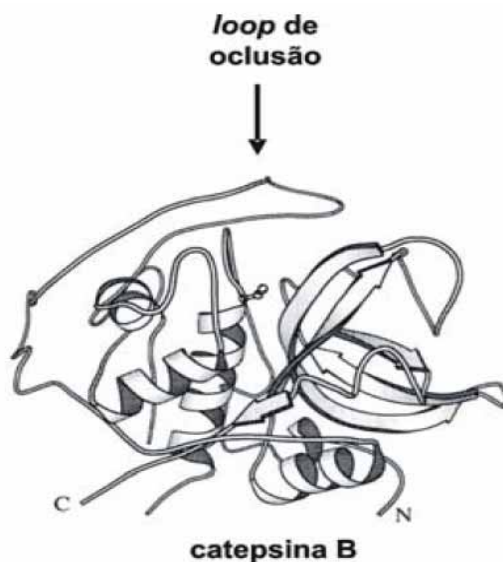


Figura 14. Estrutura da catepsina B [33].

Ao contrário das outras enzimas lisossomais, a catepsina B pode ser encontrada na forma de uma cadeia leve (47 resíduos) e uma cadeia pesada (205 resíduos) ligada por uma ponte dissulfeto. No entanto, o mais interessante é a disposição dos resíduos 104 a 126, denominado como *loop* de oclusão [35]. As cisteínas 108 e 119 formam uma ponte dissulfeto que gera sua estrutura circular, fechada e rígida. Essa inflexibilidade exerce um papel importante na diminuição da atividade da endopeptidase. A interação do loop de oclusão na catepsina B com o restante da molécula se dá por ligações deste nos subsítios S e S' da enzima. Essa interação bloqueia o acesso de determinados inibidores reversíveis, fazendo com que a inibição desta enzima se torne mais difícil.

A catepsina B também está relacionada diretamente com doenças que envolvem estados de remodelação de tecidos, tais como as metástases tumorais. A catepsina B contribui com o desenvolvimento da metástase através da degradação de vários componentes da matriz extracelular. Sugere-se que a maior produção e a liberação desta catepsina em células tumorais é resultado do desequilíbrio entre a expressão e/ou atividade da catepsina e seus respectivos inibidores endógenos, cuja atividade e concentração encontram-se significativamente reduzidas nas células cancerosas.

Assim, um inibidor para a catepsina B é desejável para o bloqueio de sua atividade. O grupo tiol presente no sítio ativo é considerado como um alvo interessante no design de novos inibidores dessas enzimas. Com este intuito, Cunha *et al.* [36] sintetizaram novos compostos de organotelúrios (IV) inibidores das cisteíno proteases. Todos os compostos testados (Figura 15) apresentaram altos valores de constantes de velocidade para a inativação da catepsina B, sendo que o composto E foi o melhor inibidor da série, mostrando uma constante na ordem de $36 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. A inativação da catepsina B por esses compostos pode ser devido ao elevado carácter nucleofílico do tiol residual no sítio ativo da catepsina B combinado com o carácter eletrofílico do átomo de telúrio.

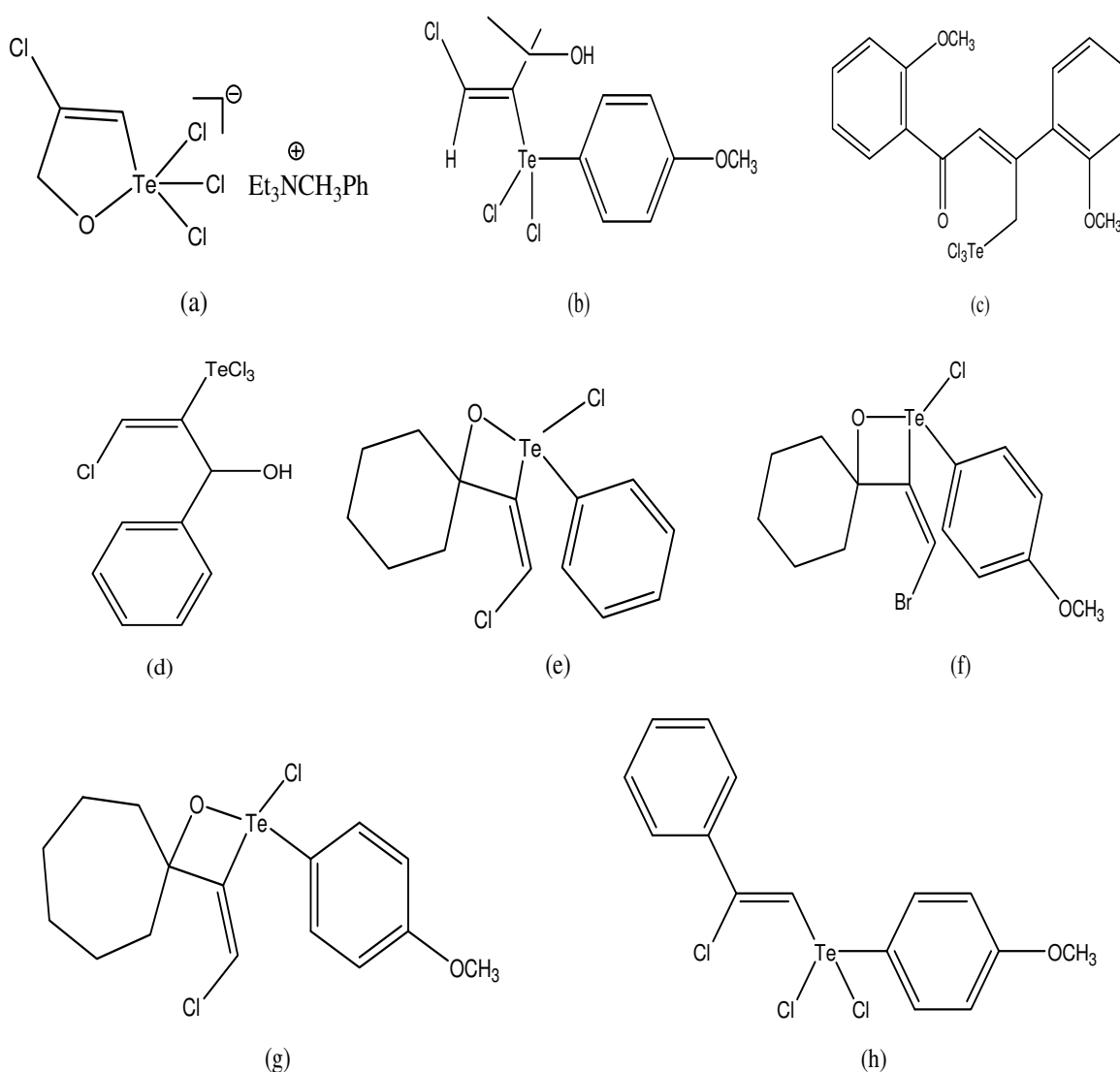


Figura 15. Compostos de telúrio (IV) testados como inibidores da catepsina B [36].

Gunatilleke *et al.* [37] reportaram a interação de complexos de ouro (I) com ligantes fosfínicos e tiolatos com a catepsina B. A capacidade de Au (I) em sofrer troca de ligantes facilmente indica que o ouro pode inibir a atividade das catepsinas, além disso o ouro tem grande afinidade com átomos de enxofre, com uma elevada afinidade para tiolatos com baixos valores de pKa, tais como os resíduos de cisteína ativados encontrados nos sítios ativos das catepsinas. Os complexos investigados apresentaram-se como inibidores competitivos e reversíveis com valores de IC₅₀ variando de 0,3 a 250 μM.

Considerando que o paládio(II) também tem grande afinidade por átomos de enxofre, é esperado que os seus compostos também interajam com o grupo tiol existente no sítio ativo da catepsina B. Nesse sentido estudos estão sendo realizados e alguns trabalhos tem mostrado que os ciclopaladados também podem induzir a inibição dessa enzima.

Bincoletto *et al.* [38] investigaram a interação dos ciclopaladados com ligantes bifosfínicos (Figura 16) como inibidores da catepsina B. Os ensaios mostraram que os complexos foram capazes de inibir a atividade enzimática de maneira reversível, apresentando uma concentração inibitória igual a 4 μM.

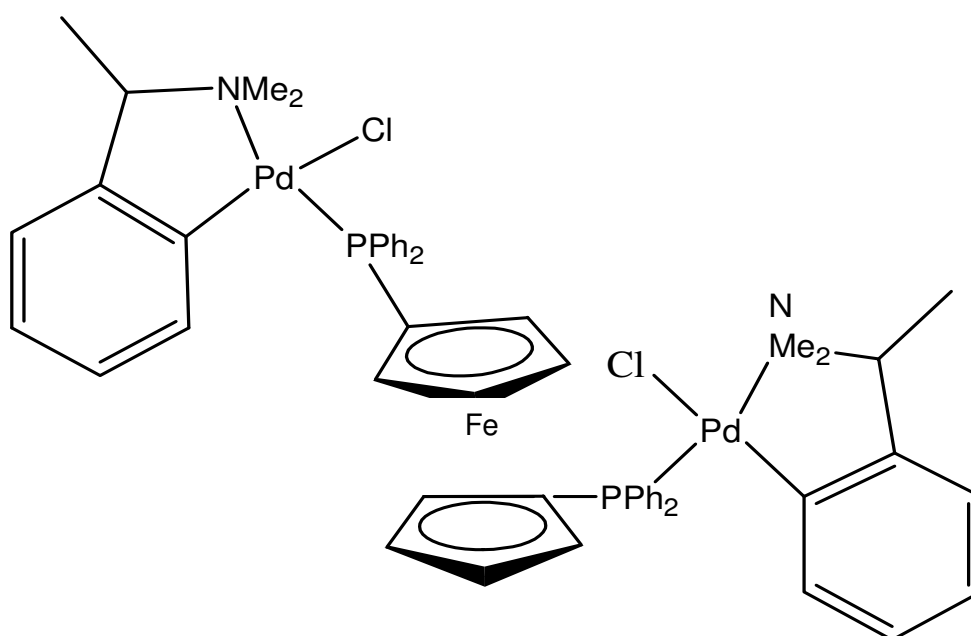


Figura 16. Representação estrutural dos compostos ciclopaladados $[\text{Pd}_2(\text{C}^2, \text{N-R}_{(+)}\text{dmpa})_2(\mu\text{-dppf})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Pd}_2(\text{C}^2, \text{N-S}_{(-)}\text{dmpa})_2(\mu\text{-dppf})\text{Cl}_2]$ [38].

Spencer *et al.* [39] investigaram a atividade de inibição da catepsina B de uma série de compostos ciclopaladados, onde o composto binuclear $[\{PdCl(C^2,N-L)\}_2(\mu-dppe)]$ contendo os ligantes 1-metil-5-fenil-1H-1,4-benzodiazepina-2(3H)-ona (L) e 1,2-etanobis(difenilfosfina) (dppe) apresentou uma atividade de inibição para a catepsina B e registrou uma concentração de $IC_{50} = 2,98 \mu M$.

1.2 A Leishmaniose

A *leishmaniose* é um conjunto de doenças causadas por cerca de 20 espécies de parasitas do gênero *Leishmania* patogênicas para o homem [40] que são encontradas especialmente em países tropicais e regiões de clima temperado. A *leishmaniose* é considerada a segunda protozoose mais importante do mundo, depois da malária segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), pois a cada dia o número de pessoas infectadas com a doença é maior [41]. Esse aumento nos casos de *Leishmaniose* se deve a alguns fatores relacionados ao homem, como condições de moradia inadequadas e a imunodeficiência causada pela AIDS e quimioterapia. De fato o risco de incidência da coinfeção AIDS-Leishmaniose tem aumentado, mudando a expressão da doença, proporcionando assim a disseminação do parasita [42]. A *leishmania* é um protozoário com duas formas principais, a flagelada ou promastigota e a aflagelada ou amastigota [43]. A forma flagelada (**a**, Figura 17) é encontrada no trato digestivo de hospedeiros invertebrados pertencentes à família *Psychodidae* de insetos hematófagos e a forma aflagelada (**b**, Figura 17) é observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, como roedores, canídeos e primatas.

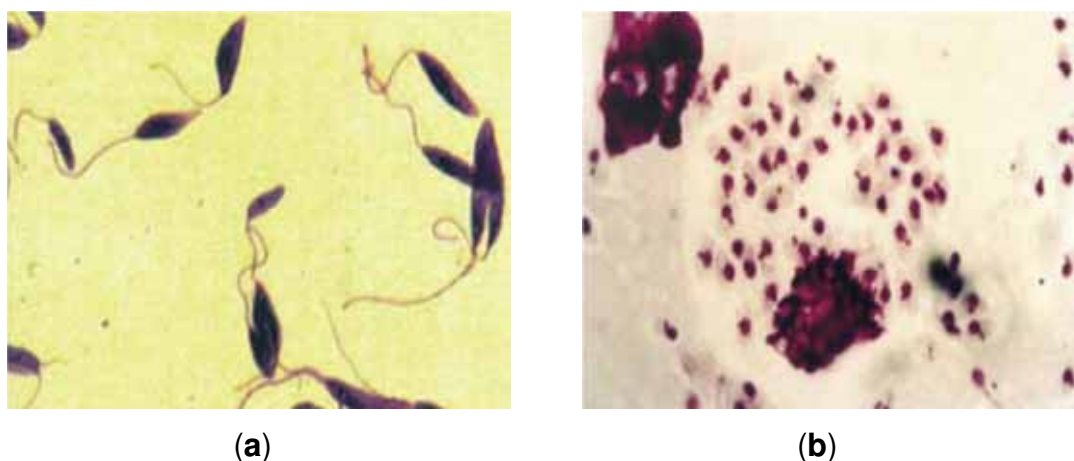


Figura 17. Formas flageladas (a) e aflageladas (b) da *Leishmania* [43].

O ciclo de vida da *Leishmania* envolve primeiramente a transmissão do parasita na forma promastigota para o hospedeiro vertebrado, quando o hospedeiro invertebrado alimenta-se do sangue do mamífero, inoculando junto com sua saliva as formas infectantes promastigotas metacíclicas presentes na probóscide.

Os parasitos que são então fagocitados perdem o flagelo passando para a forma amastigota [44], logo depois são fagocitados por macrófagos, onde são internalizados no fagossoma que em seguida sofre fusão com os lisossomos, formando o vacúolo fagolisossomal [45]. Dentro das células a *Leishmania* é capaz de inibir vários mecanismos de defesa, mesmo em ambientes hostis e multiplicar-se até a lise da célula infectada e liberar formas amastigotas que são fagocitadas por outros macrófagos [46].

A Figura 18 apresenta o ciclo biológico da *Leishmania* nos seus hospedeiros vertebrados e invertebrados [47].

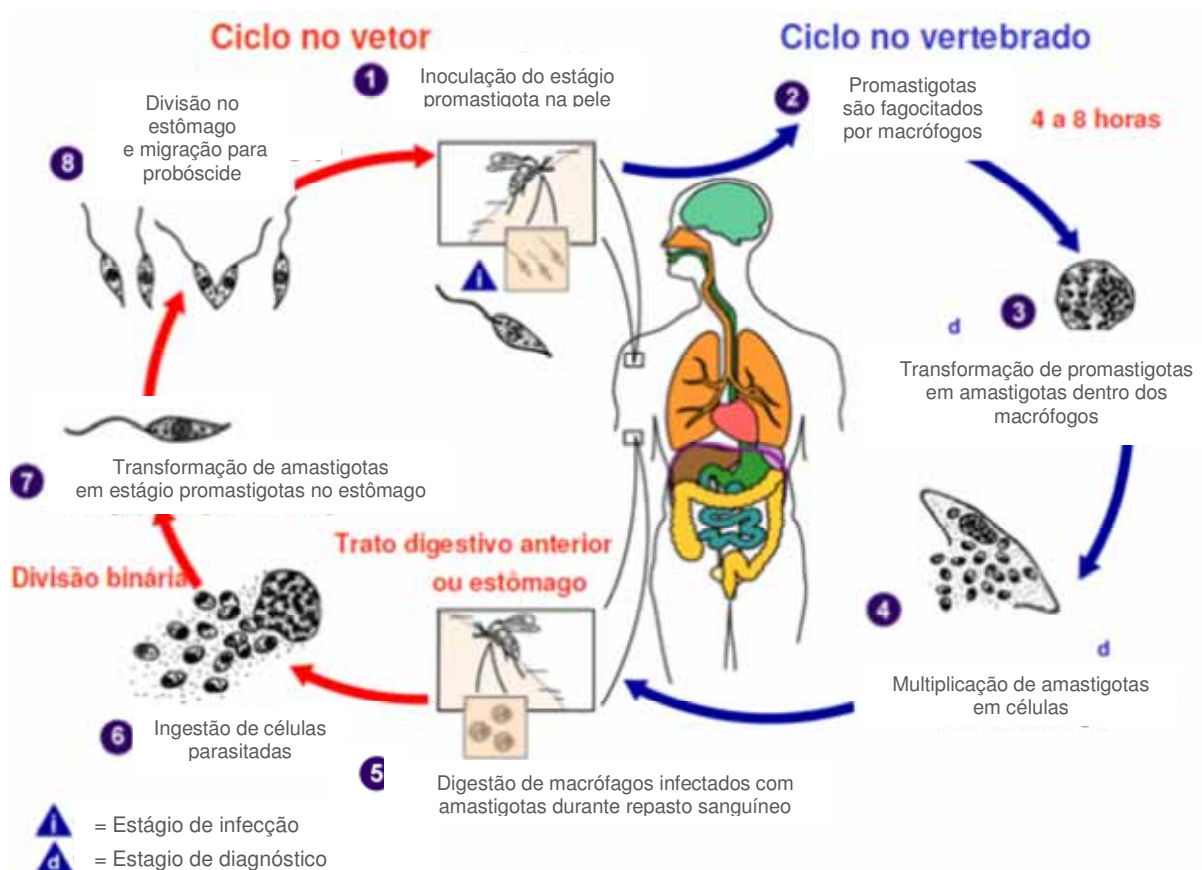


Figura 18. Ciclo biológico da *Leishmania* [47].

Como é de conhecimento, os ciclos de transmissão da *Leishmaniose* variam de acordo com a região geográfica, envolvendo uma diversidade de espécies de parasito, vetores, reservatórios e hospedeiros.

A *Leishmaniose* pode apresentar dois tipos distintos de infecção, tegumentar e visceral [48]. A *Leishmaniose* tegumentar (LT) é uma doença infecciosa que acometem lesões cutâneas e mucocutâneas. Ela é transmitida por vários parasitos, sendo que no Brasil os três principais são a *L. (V.) brasiliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonenses*, duas pertencentes ao subgênero *Viannia* e uma ao subgênero *Leishmania*, respectivamente [43].

A LT é conhecida por seu amplo espectro clínico variando de infecções assintomáticas com cura espontânea até graves doenças. As lesões causadas pela LT na pele são denominadas de *Leishmaniose* cutânea (LC). A LC é a forma mais frequente da doença, caracterizada pela formação de úlceras indolores em áreas expostas da pele que podem melhorar espontaneamente. As lesões encontradas nas regiões mucocutâneas são denominadas de *Leishmaniose* mucosa (LM). Clinicamente, a LM é caracterizada por lesões destrutivas nas mucosas de vias aéreas e estima-se que 3 a 5% dos casos de LC evoluam para LM [49].

A *leishmaniose* visceral (LV) é a mais grave forma de *leishmaniose* e quando não tratada leva a óbito em mais de 90% dos casos. A LV é uma zoonose caracterizada pela evolução crônica e comprometimento sistêmico. Nesta forma da doença, os parasitos apresentam tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear de órgãos como baço, fígado, medula óssea e tecidos linfoides [50]. Os principais sintomas da LV são febre, esplenomegalia e hepatomegalia, perda de peso, fadiga, sangramento, anemia e infecções bacterianas. A LV que primeiramente foi conhecida como doença rural agora vem se expandido para áreas urbanas de médio e grande porte. No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da LV, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, onde a primeira é considerada a principal espécie transmissora da *L. (L.) chagasi* [51].

1.2.1 Apresentação epidemiológica mundial e no Brasil da *Leishmaniose*

As *Leishmanioses* podem ser encontradas em países da Europa, Américas, África e Ásia. A doença representa um problema de saúde pública em vários países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Baseados em dados da OMS coletados entre 2007 a 2011, as taxas de incidência da doença estão entre 0,2 a 0,4 e 0,7 a

1,2 milhões de casos para LV e LT, respectivamente [52]. Entretanto, este valor é provavelmente inferior devido a não notificação da doença pelas pessoas.

Aproximadamente 90% dos casos de LV ocorrem em 6 países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. A distribuição da LT é maior quando comparada a LV e os 10 países com as mais elevadas contagens de casos estimados são Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, o Sudão do Norte, Costa Rica e Peru que juntos representam 70 a 75% de incidência global.

O Brasil é o país com mais casos de *Leishmaniose* da América do Sul e também um dos países com maior número de casos da doença. No entanto, a incidência caiu de 20,3 em 2000 para 10,5 por 10.000 habitantes em 2008 [53].

A LT é a forma mais comum da *Leishmaniose* no Brasil com uma média anual de 27.723 casos e uma incidência média de 17,3 casos por 100.000 habitantes. A LT é mais comum na região norte do país, sendo os estados do Amazonas e Pará os mais afetados. A VL representa um grave problema de saúde pública devido à sua escala e alcance geográfico com uma incidência de 1,85 casos por 100.000 habitantes. A doença é mais prevalente na parte nordeste do país, onde os estados do Maranhão e Ceará possuem o maior número de casos (Figura 19).

A notificação da *leishmaniose* é obrigatória no Brasil. Um programa nacional de controle da *leishmaniose* está em vigor desde 1985 e sua incidência vem diminuindo nos últimos anos.

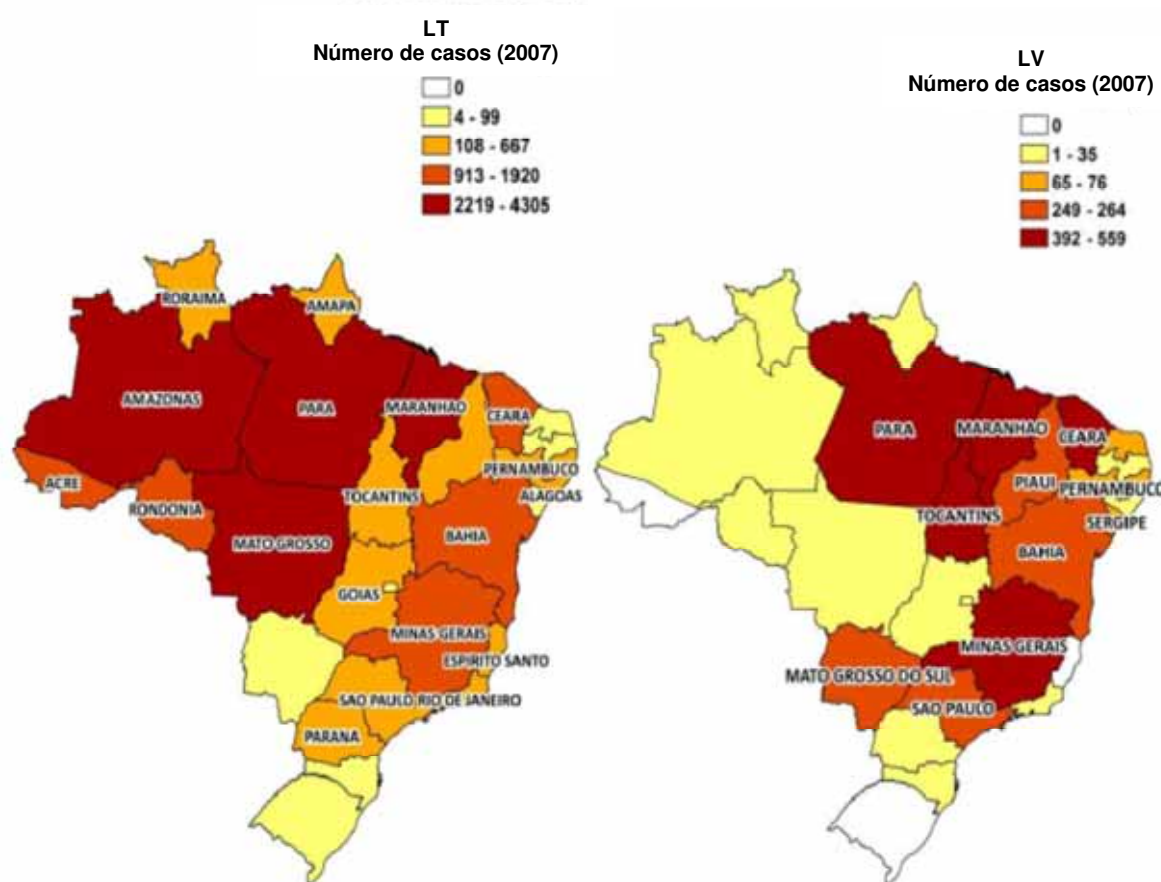


Figura 19. Casos de LC e LV no Brasil no ano de 2007 [53].

1.2.2 O tratamento da *Leishmaniose*

O composto antimônio trivalente (Sb^{III}), tártaro emético foi usado pela primeira vez no tratamento da *leishmaniose* pelo médico brasileiro Gaspar Vianna em 1913. Porém esses compostos apresentavam vários efeitos colaterais e logo foram substituídos pelos complexos pentavalentes de antimônio (Sb^V), pois estes são menos tóxicos quando comparados à Sb^{III} . Primeiramente foi proposto que o Sb^V seria reduzido a Sb^{III} por tióis no organismo, sendo esta a forma ativa e tóxica do antimônio. Posteriormente foi demonstrado que o Sb^V interage com ribonucleosídeos formando complexos (Figura 20) que poderiam ter implicações com o mecanismo de ação dos medicamentos antimoniais [54]. O mecanismo de ação dos compostos antimoniais pentavalentes ainda não foi completamente elucidado.

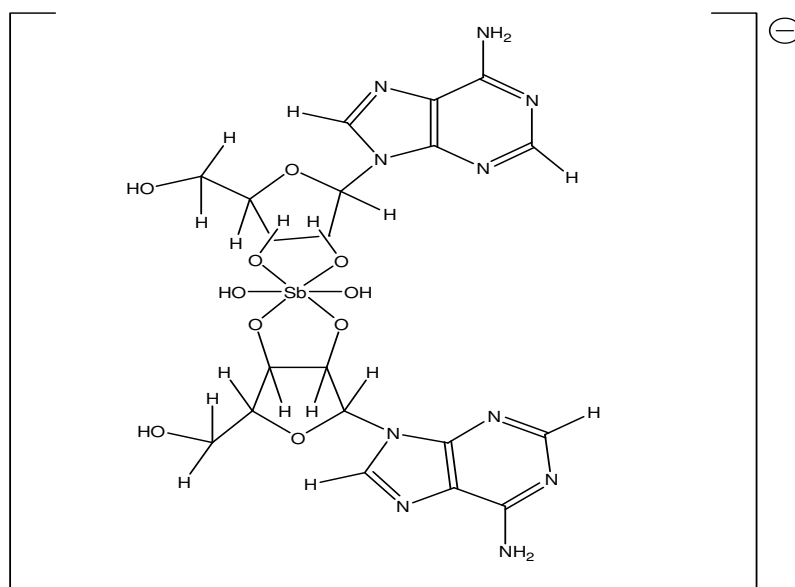


Figura 20. Complexo de Sb(V) com o ribonucleosídeo adenosina [54].

No Brasil emprega-se como segunda escolha no tratamento da *Leishmaniose*, a anfotericina B, um antibiótico antifúngico, utilizado apenas no tratamento de pacientes em estado grave, gestantes, reincidentes e nos casos de falha terapêutica. Ainda podem ser empregados outros fármacos como pentamidina e paramomicina [55]. Atualmente os medicamentos antimoniais continuam sendo empregados para a *leishmaniose*, entretanto, a resistência do parasita a esta classe de drogas é crescente, o que indica que em pouco tempo esse tratamento poderá ser obsoleto. Há relatos de resistência também para as drogas de segunda linha, como no caso da pentamidina [56]. O que evidencia a urgência e a importância das pesquisas de novos fármacos e alvos de atuação para o tratamento da *Leishmaniose*.

1.2.3 Ciclopaladados como novos agentes quimioterápicos às cisteína proteases de parasitas

Além de desempenharem um importante papel no desenvolvimento de tumores, as cisteína proteases participam do ciclo de vida de vários parasitas, tais como *Schistosoma*, *Plasmodium*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* [57]. Muitas das funções vitais desses parasitas são desempenhadas por elas, abrindo assim novas oportunidades de intervenção terapêutica às doenças causadas por esses microorganismos. No caso dos ciclopaladados, alguns trabalhos demonstraram que estes compostos foram eficientes na inibição da cisteíno

proteases catepsina B em células tumorais [38,39], logo em associação a estes trabalhos, muitos grupos de pesquisa têm investigado a capacidade desses compostos de perturbar ou interromper o funcionamento das proteases nesses parasitas.

Existe uma grande necessidade de novos tratamentos mais seguros, baratos e efetivos contra a *leishmaniose*. Na busca de novos agente terapêuticos antileishmanicida Franco *et al.* [55] avaliaram a capacidade de inibição do crescimento de complexos ciclopaladados contra promastigotas *L. amazonensis*. Nesse trabalho o composto $[Pd_4(HLB)_2(LB)Cl_4]$, onde HLB e LB são as formas mono e bianiônicas da imina N,N' -bis[(1E)-(4-metoxifenil)metileno]benzeno-1,2-diamino- H_2LB (Figura 21) apresentou um IC_{50} igual a $5,91 \mu g mL^{-1}$. Este valor pode ser comparado com a droga antileishmanicida anfotericina B com um valor igual a $6,95 \mu g mL^{-1}$.

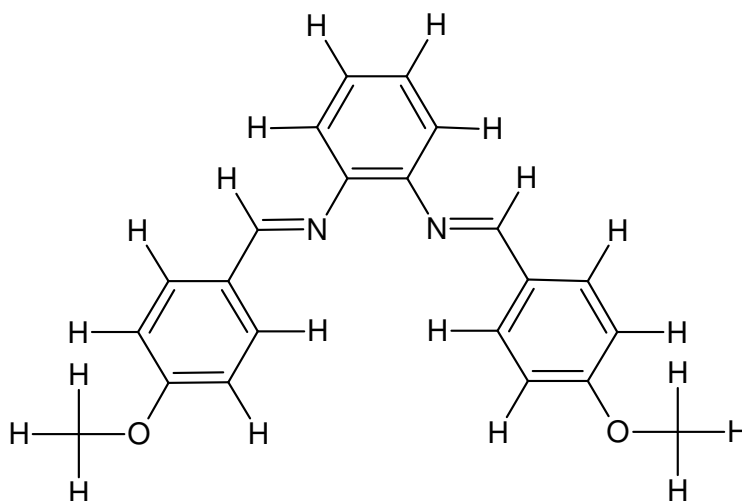


Figura 21. Estrutura para os ligantes imínicos HLB e LB

Paladi *et al.* [58] investigaram a atividade antileishmanicida de um ciclopaladado contendo como ligantes N,N -dimetil-1-fenilamina (dmpa) e 1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppe), $[Pd(C^2,N-dmpa)(dppe)]Cl$. Esse composto foi capaz de destruir promastigotas *L. amazonensis* em concentrações de IC_{50} de 2,13 nM enquanto que a dose de 128,35 nM foi suficiente para matar o parasita intracelular. A limitação do tratamento convencional da *Leishmaniose* e a capacidade dos compostos ciclopaladados em interagir com as cisteíno proteases também foram pontos importantes no planejamento dessa pesquisa.

A dedução de que associação entre ciclopaladados e ligantes tiocarbonilados poderiam conduzir a formação de compostos inéditos mais ativos frente à linhagens celulares tumorais foi um ponto importante no planejamento desta pesquisa, visto as potencialidades terapêuticas dos compostos de paládio(II).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Sintetizar compostos ciclopaladados mononucleares através de reações entre o orto-paladado precursor dimérico do tipo $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{benzaldeídooxima})]_2$ com ligantes tiocarbonilados;
- Caracterizar os compostos sintetizados através de técnicas de Análise Elementar, Espectroscopia no IV (Infra-Vermelho), RMN (Ressonância Magnética Nuclear) de ^1H e de ^{13}C e Espectrometria de Massas.
- Investigar a atividade citotóxica dos complexos de paládio(II) sintetizados frente a linhagens de células tumorais e formas promastigotas do parasita do gênero *Leishmania*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e solventes

Os reagentes (p.a) foram utilizados sem purificação prévia na realização das reações. Os solventes (p.a), empregados nas sínteses, foram tratados com peneiras moleculares para remoção de excesso de água e armazenados em frascos escuros de vidro. A Tabela 3 apresenta a procedência dos solventes e reagentes usados neste trabalho.

Tabela 3. Reagentes e solventes utilizados.

Nome do Reagente	Fórmula Molecular	Procedência
Benzaldeídooxima	C ₇ H ₇ NO	Signa-Aldrich
Cloreto de lítio	LiCl	J. T. Baker
Cloreto de paládio(II)	PdCl ₂	Synth
Feniltiouréia	C ₇ H ₈ N ₂ S	Carlo Erba
Metiltiouréia	C ₂ H ₆ N ₂ S	Aldrich
Dimetilbenzilamina	C ₉ H ₁₃ N	Fluka AG
Dimiltioureia	C ₃ H ₈ N ₂ S	Aldrich
Tiouréia	CH ₄ N ₂ S	Merck
Trietilamina	C ₆ H ₁₅ N	Carlo Erba
Metanol	CH ₃ OH	Merck
Cloroformio	CH ₃ Cl ₃	Merck
Acetona	C ₃ H ₆ O	Merck
Eter dietílico	C ₄ H ₁₀ O	Qhemis
Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	Synth
Pentano	C ₅ H ₁₂	Tedia
Tioacetamida	C ₂ H ₅ NS	Merck

3.2 Sínteses

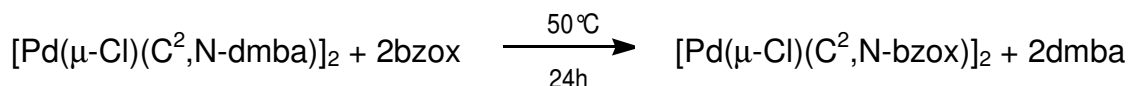
3.2.1 Síntese do precursor [Pd(μ -Cl)(C²,N-dmba)]₂ a partir da ativação da ligação C-H [59]

Uma massa de 2,00g (11,3 mmols) de cloreto de paládio(II) foi parcialmente solubilizada, sob aquecimento, em 200mL de metanol. Nesta solução adicionou-se 0,96g (22,6 mmols) de cloreto de lítio. A mistura permaneceu sob agitação e aquecimento até que a solução ficasse marrom avermelhada e límpida. A solução foi então filtrada e após resfriamento houve a adição, sob agitação, de 1,7mL (11,3 mmols) de N,N-dimetilbenzilamina. Posteriormente adicionou-se, lentamente e sob agitação, 2,0 mL (14,4 mmols) de trietilamina em 10mL de metanol. A solução foi

mantida sob agitação por 8h, havendo a formação de um sólido amarelo, que foi filtrado, lavado com metanol e éter dietílico e seco sob vácuo.

3.2.2 Síntese do precursor $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{C}^2,\text{N-bzox})]_2$

O composto $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{C}^2,\text{N-bzox})]_2$ foi sintetizado a partir da reação de transciclometalação entre o dímero $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{dmba})]_2$ e a bzox [60].



Nesta reação uma massa de 500mg (0,9mmol) de $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{dmba})]_2$ foi adicionado a um sistema de refluxo junto a uma solução 1:1 de clorofórmio e ácido acético (20mL) até a sua solubilização. O sistema de refluxo foi mantido em temperatura igual a 50°C e sobre agitação magnética constante. Após a solubilização do precursor, foi adicionado ao sistema 472mg (0,9mmol) de bzox, solubilizada em clorofórmio e ácido acético 1:1 (10mL) . O sistema foi mantido em refluxo por 24 horas até o aparecimento de um precipitado verde. Essa suspensão então foi filtrada e o sólido lavado com a solução 1:1 de clorofórmio-ácido acético, éter etílico e secado para uso posterior. Rendimento: 75%.

3.2.3 Síntese dos complexos do tipo $[\text{PdCl}(\text{C}^2,\text{N-bzox})(\text{L})]$, L = tu (1), dmtu (2), mtu (3), ftu (4) e taa (5)

Inicialmente, adicionou-se 100mg (0,191mmol) do complexo $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{C}^2,\text{N-bzox})]_2$ em 10mL de metanol. Em seguida, adicionou-se 0,382mmol do ligante que foi solubilizado previamente em 5 mL de metanol. As soluções permaneceram em agitação constante por 1h. Após este período, deixou-se evaporando até completa secagem. Os sólidos obtidos foram lavados e secados com água e etanol. A figura 22 apresenta a reação de clivagem entre o dímero precursor e o ligante. Rendimentos para os complexos **1**, **2**, **3** e **4** respectivamente: 72, 68, 83, 63 e 65%.

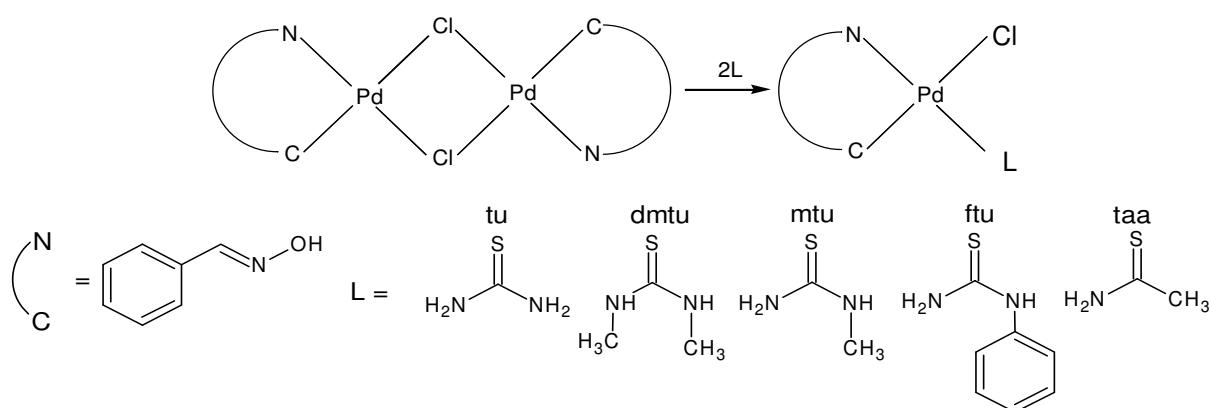


Figura 22. Clivagem do dímero de paládio.

3.3 Caracterização dos compostos

Medidas de temperatura de fusão ou decomposição

Os intervalos de temperatura de fusão foram medidos utilizando-se um aparelho METTLER modelo MQAPF – 302.

Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados no espectrofotômetro PERKIN ELMER modelo SPECTRUM 2000, na região de 4000 – 400 cm^{-1} , utilizando pastilha de KBr.

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registrados no Espectrômetro multinuclear VARIAN, modelo INOVA 500, operando a 500 MHz para hidrogênio.

Análise elementar de C, H, N

As análises elementares foram realizadas pela Central Analítica do IQ-USP-SP usando um ELEMENTAR ANALYZER CHN modelo 2400 da Perkin-Elmer, que permite a determinação de porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio com precisão de 0,01%.

Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas LCQ Fleet LC/MS - Thermo Analítica, operando no modo positivo ou negativo.

3.4 Ensaios Biológicos

3.4.1 Antitumorais

Ensaios antitumorais *in vitro*, envolvendo a linhagem LM3 – adenocarcinoma mamário murino –, foram conduzidos na UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, no Laboratório de Imunologia Clínica, pelo doutorando Rodrigo Alves de Souza e supervisão da Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos.

Preparo das soluções

As amostras [PdCl(C²,N-bzox)(tu)] (1), [PdCl(C²,N-bzox)(dmu)] (2), [PdCl(C²,N-bzox)(mtu)] (3), [PdCl(C²,N-bzox)(ftu)] (4) e [PdCl(C²,N-bzox)(taa)] (5) foram solubilizadas em DMSO, de tal modo que a diluição mais concentrada de cada amostra apresentasse, no máximo, 1 % deste solvente, numa relação volume/volume para o meio de cultura. Com essas concentrações limites de DMSO, não houve morte estatisticamente consideráveis das células. As concentrações dos compostos nos testes foram preparadas de forma seriada, de 100 até 1,562 µg mL⁻¹. Como padrão comparativo, utilizou-se a cisplatina [61].

Células LM3

O cultivo celular deu-se em meio MEM (*Modified Eagle Medium*), mantido em frascos plásticos estéreis. Após o repique, determinou-se o número de células em câmara hemocitométrica de Neubauer, utilizando-se corante azul de Tripán e ajustou-se, por fim, a uma concentração de 5×10^4 células/mL de MEM. Transferiu-se então um volume celular, que mantivesse tal concentração, para tubos cônicos estéreis, contendo meio MEM previamente suplementado com gamicina (80 mg/mL) e soro fetal bovino (10%). Assim, o meio de cultura passou a ser denominado MEM-completo (MEM-C). Em seguida, 100 µL da suspensão celular foram adicionados em cada poço, de uma placa estéril de poliestireno contendo 96 cavidades. O passo seguinte foi incubar a placa em estufa (37 °C, 5 % de CO₂), por 24 h. Transcorrido esse tempo, descartou-se a solução sobrenadante da placa e adicionaram-se alíquotas das diluições dos compostos que foram testados (200 µL em cada poço), exceto nas cavidades estabelecidas para o controle, preenchidas com 200 µL de MEM-C. Manteve-se então a placa contendo as células aderidas + as diluições dos compostos, incubada a 37 °C e 5 % de CO₂ [61].

Determinação da viabilidade celular pela técnica do MTT

Após 24 h de incubação da placa (composto + célula), a citotoxicidade foi determinada pelo ensaio de MTT [62]. Uma solução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), diluída em meio MEM-C (5 mg/mL), foi adicionada em cada poço. A placa foi incubada por mais 3 h nas mesmas condições apontadas anteriormente. Depois desse período, o sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram adicionados 100 µL de isopropanol, a fim de se solubilizar os cristais de formazana formados [63]. Por fim, a leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro UV-Visível (Multiskan Ascent, Labsystems), a 540 nm de filtro e 620 nm de referência. A intensidade da coloração, a partir da absorbância medida, era proporcional ao percentual de células vivas.

Todo o procedimento, desde o preparo das diluições até as determinações das viabilidades celulares, foi repetido mais duas vezes, para outros dois repiques celulares distintos.

3.4.2 Antileishmanicida

Ensaio antileishmanicida, foram conduzidos na UNIFAL, Universidade Federal de Alfenas, Laboratório de Parasitologia/Biologia Molecular de Microrganismos, pela mestrandia Letícia de Almeida e supervisão do Prof. Dr. Marcos José Marques.

Cultura da *Leishmania* e ensaio in vitro

Formas Promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269) foram cultivadas em uma placa com 24 cavidades em meio Drosophila de Schneider (Sigma, USA) suplementado com 10% (v/v) soro fetal bovino, previamente inativado por calor e 1% de penicilina (10000 UI/ mL)/ estreptomicina (10 mg/mL) (Sigma, USA). As células foram coletadas na fase exponencial de crescimento, resuspendidas em meio fresco, contadas na câmara de Neubauer e ajustadas a uma concentração de 1×10^6 células/mL. Os compostos **1**, **2**, **3**, **4** e **5** foram adicionados às culturas promastigotas, 1×10^6 células/mL, solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (a concentração usada foi 0.6%, v/v em todos os poços) e incubados a 25°C. Depois de 72 horas de incubação, a sobrevivência dos parasitas foi contada na câmara de Neubauer e comparada com os controles e DMSO em uma concentração de 0.6% v/v, para a determinação de 50.0% concentração inibitória de

crescimento (IC_{50}). Todos os testes foram realizados em triplicata e Anfotericina B (Eurofarma) foi usada como o fármaco de referência [64].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese dos ciclopaladados: ativação da ligação C-H em grupos arila e transciclometalação

Complexos ciclopaladados são obtidos através da reação entre um precursor de paládio(II), geralmente M_2PdCl_4 com $M = Li$ ou K , sendo o lítio o mais utilizado devido a alta estabilidade deste íon ou $Pd(OAc)_2$ mais um substrato orgânico que contenha um átomo de nitrogênio planar sp^2 a três ligações químicas de distância de um fragmento aromático. O produto resultante é uma espécie bimetálica na qual duas metades se encontram unidas por dois ânions.

O método mais comumente utilizado é a ativação da ligação C-H assistida por um heteroátomo. A maioria dos ligantes utilizados são doadores bidentados, monoaniônicos Y, tais como aminas, iminas, fosfinas e tioéteres. Sendo assim, Y pode ser de natureza variada, onde nitrogênio, fosforo e enxofre são os mais comuns. Para que a reação se processe é necessário que se forme a ligação entre o heteroátomo Y e o átomo de paládio. Esta ligação promove o arranjo do centro metálico e da ligação C-H em posições propícias para a ciclometalação ocorrendo a pré-organização dos componentes reativos. O carbono também participa como átomo doador nestes ligantes, onde é necessária a ativação da ligação C-H para a retirada do próton deixando o átomo de carbono com carga negativa, podendo assim se ligar ao centro metálico. A trietilamina é comumente usada para a ativação da ligação C-H nos ciclopaladados. A ciclometalação é fortemente preferida para a formação de anéis de cinco membros, esta geometria permite a acomodação do ângulo de ligação de 90° do paládio(II) quadrado planar e os ângulos de $109-120^\circ$ para os átomos ligantes hibridizados sp^3 e sp^2 , isto permite dizer que em um dado ligante a ligação C-H é a mais provável de ser estabilizada.

Complexos ciclopaladados também podem ser obtidos através da reação de transciclometalação (Figura 23). Esta reação envolve a troca do ligante ciclometalado do metal por outro ligante. Em todos os casos de trocas de ligantes nos ciclopaladados as reações são “começadas” pela adição do ácido acético para solubilizar o complexo e o ligante. Para entender esse mecanismo deve-se envolver

a clivagem proteolítica Pd-C e a ativação metal assistida das ligações C-H. Quando dois ligantes são reagidos com paládio(II) em ácido acético, o centro metálico tem preferência pelo ligante com um forte grupo doador de elétrons atuando como um eletrófilo.

Em um meio não prótico como o clorofórmio, núcleos ricos em elétrons também ativam a eletrofilicidade do paládio(II), além de participarem da ativação da ligação C-H. Resultados cinéticos e termodinâmicos mostraram que a troca de ligante ocorre devido a acidólise do ciclopaladado inicial. A primeira etapa é lenta e provavelmente ocorre a clivagem da ligação Pd-N seguido pela protólise da ligação Pd-C e a entrada do novo ligante.

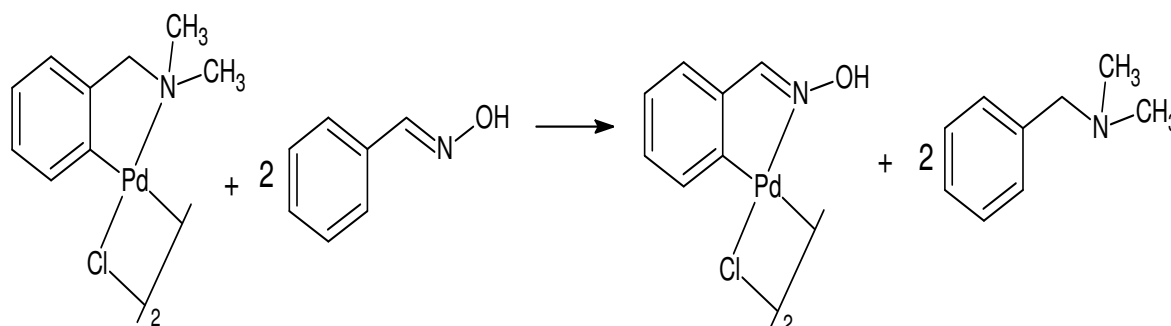


Figura 23. Processo de transciclometalação para $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{C}^2,\text{N-bzox})]_2$.

4.2 Análise Elementar e Ponto de Fusão

Os valores obtidos pela análise elementar e os pontos de fusão medidos para os compostos **1**, **2**, **3**, **4** e **5** estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 4. Análise elementar e pontos de fusão para os complexos **1**, **2**, **3**, **4** e **5**.

Compostos	P.F.(°C)	Obtido (Calculado)		
		%C	%H	%N
$[\text{PdCl}(\text{C}^2,\text{N-bzox})(\text{tu})]$	142	28,42 (28,42)	2,83 (2,98)	12,34 (12,43)
$[\text{PdCl}(\text{C}^2,\text{N-bzox})(\text{dm tu})]$	135	32,84 (32,80)	3,87 (3,85)	11,32 (11,48)
$[\text{PdCl}(\text{C}^2,\text{N-bzox})(\text{mtu})]$	>250	30,47 (30,70)	3,43 (3,43)	11,61 (11,93)
$[\text{PdCl}(\text{C}^2,\text{N-bzox})(\text{ftu})]$	138	40,57 (40,59)	3,30 (3,41)	10,10 (10,14)
$[\text{PdCl}(\text{C}^2,\text{N-bzox})(\text{taa})]$	140	31,95 (32,06)	3,16 (3,29)	7,92 (8,31)

Os dados obtidos na análise elementar concordam com a estequiometria proposta para $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{OPdS}$ (**1**), $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{OPdS}$ (**2**), $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{OPdS}$ (**3**), $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{OPdS}$ (**4**) e $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{OPdS}$ (**5**).

4.3 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

Nos espectros no IV do precursor $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{C}^2, \text{N-bzox})]_2$ e da bzox livre, Figura 24, observam-se para ambas bandas características de νOH e $\nu\text{C}=\text{N}$. O deslocamento de νOH do dímero (3416 cm^{-1}) aparece em um número de onda maior quando comparado à oxima livre (3197 cm^{-1}), enquanto para $\nu\text{C}=\text{N}$ foi observado apenas um ligeiro deslocamento, isto ocorre devido a doação do par de elétrons isolado do nitrogênio ao metal [65].

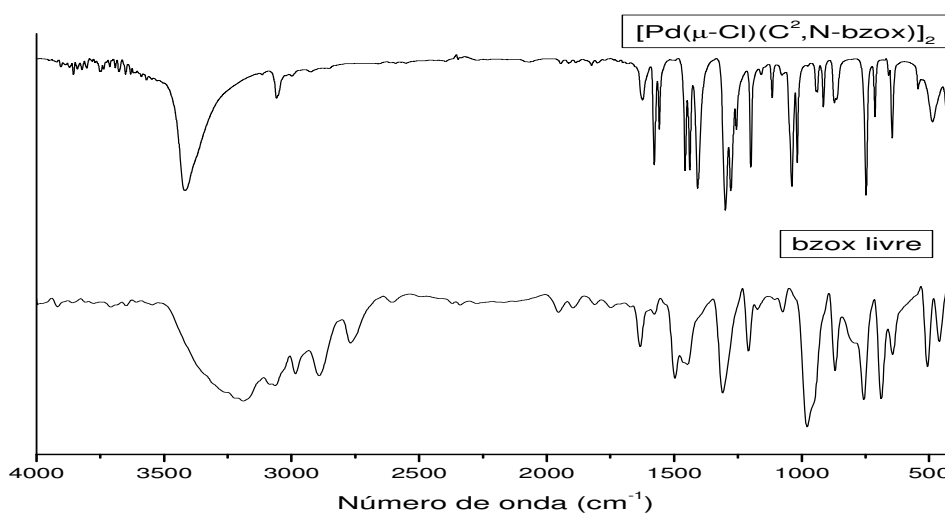


Figura 24. Espectro no IV para o precursor e a bzox livre

A Tabela 5 apresenta as principais frequências e atribuições do dímero precursor $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{C}^2, \text{N-bzox})]_2$ e bzox livre.

Tabela 5. Frequências vibracionais referentes a bzox e $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{C}^2, \text{N-bzox})]_2$.

bzox	$[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{C}^2, \text{N-bzox})]_2$	Atribuição
3197 <i>F</i>	3416 <i>F</i>	νOH
3062 <i>mF</i>	3054 <i>f</i>	$\nu\text{CH}(\text{sp}^2)$
1633 <i>m</i>	1623 <i>m</i>	$\nu\text{C}=\text{N}$
1578 <i>om</i> , 1497 <i>mF</i>	1576 <i>m</i> , 1555 <i>mf</i>	$\nu\text{C}=\text{C}$
1309 <i>F</i>	1297 <i>F</i>	βOH
1074 <i>f</i>	1037 <i>F</i>	$\nu\text{N-O}$
980 <i>F</i>	913 <i>f</i>	$\delta(\text{C-H})$
756, 688 <i>F</i>	746 <i>F</i>	$\delta(-\text{CH})$

ν = estiramento, β = deformação no plano, δ = deformação fora do plano.

Intensidades: *F* = forte, *mF* = média-forte, *m* = média, *mf* = média-fraca, *f* = fraca, *om* = ombro.

Espectros vibracionais na região do IV também foram obtidos para os ligantes livres (Figura 25) e os complexos mononucleares de fórmula geral $[\text{PdCl}(\text{C}^2, \text{N-bzox})(\text{L})]$, $\text{L} = \text{tu}$, dmtu , mtu e ftu (Figura 26).

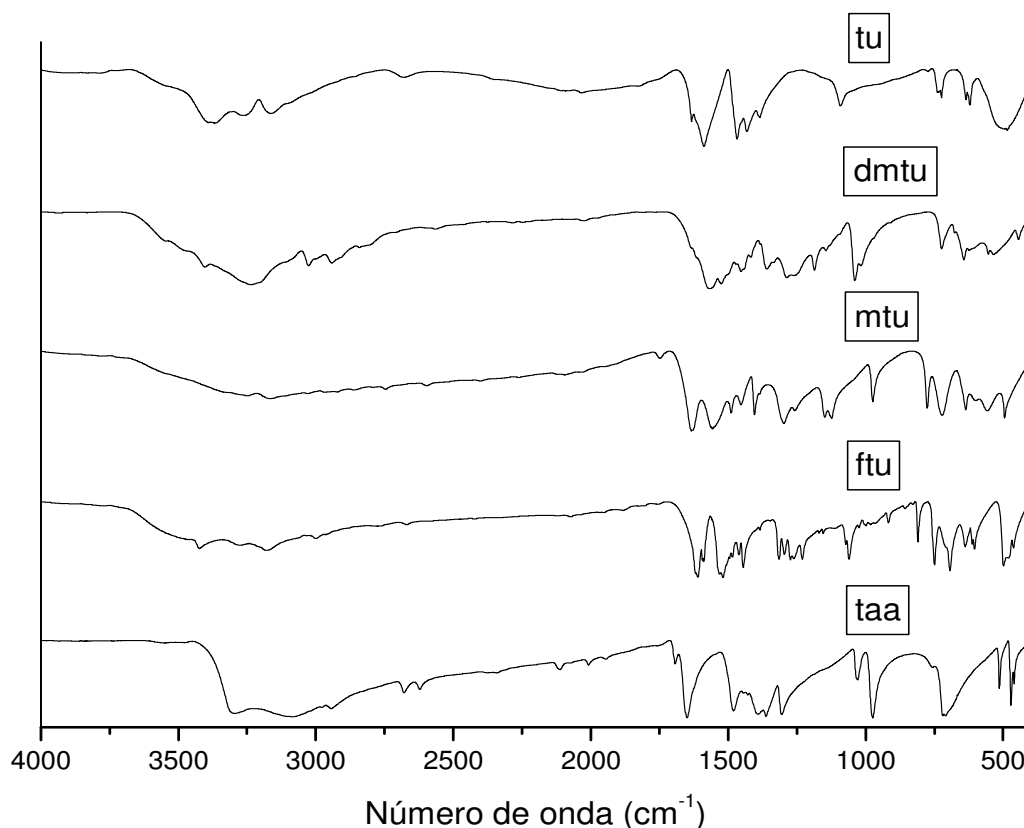


Figura 25. Espectro no IV para os ligantes tu, dmtu, mtu, ftu e taa.

No espectro das tiouréias, as bandas características são esperadas em três regiões, o $\nu\text{C}=\text{S}$ ocorre por volta de $600 - 700 \text{ cm}^{-1}$, as bandas de $\nu\text{C}-\text{N}$ aparecem por volta de 1500 cm^{-1} e $\nu\text{N}-\text{H}$ é observado próximo a 3200 cm^{-1} [66], este padrão também foi observado nos espectros obtidos. A deformação vibracional da ligação N-H aparece por volta de 1600 cm^{-1} para todos os ligantes. No espectro da mtu é observado uma banda alargada entre 3600 a 1900 cm^{-1} . Duas das principais frequências observadas no espectro da taa são as bandas atribuídas aos estiramentos NH_2 , ocorrendo em 3294 e 3082 cm^{-1} , respectivamente. Outras bandas importantes são νCH_3 em 2941 cm^{-1} e estiramento $\text{C}=\text{S}$ em 710 cm^{-1} .

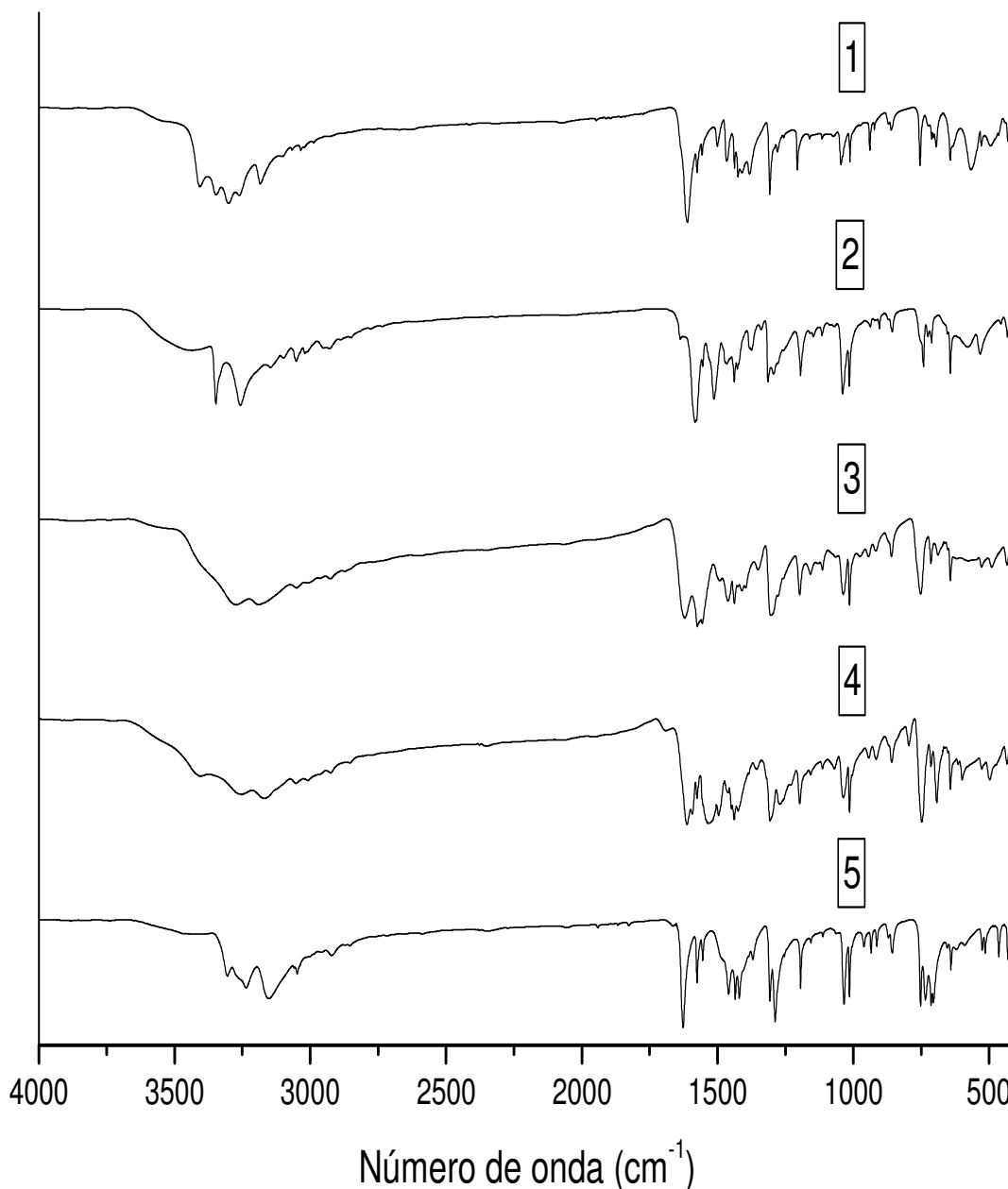


Figura 26. Espectro no IV para os compostos 1, 2, 3, 4 e 5.

Nota-se claramente uma mudança em relação ao espectro do precursor dimérico $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{C}^2, \text{N-bzox})]_2$ quando comparado aos espectros dos compostos **1**, **2**, **3**, **4** e **5** indicando a coordenação dos ligantes ao metal.

Observou-se na região entre $3500 - 3100 \text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos as bandas atribuídas aos estiramentos OH e NH da oxima e dos ligantes, respectivamente. O estiramento C=S para todos os complexos, com exceção do complexo **3**, aparece em frequências vibracionais menores quando comparado ao ligante livre, sugerindo a coordenação do metal pelo átomo de enxofre [67]. Este

modo vibracional tem um decréscimo em sua energia devido à interação Pd-S, que enfraquece a ligação C=S, deslocando as bandas referentes a este estiramento para região de mais baixa energia. Em contra partida há um acréscimo na interação C-N deslocando a banda relacionada a esta vibração nos compostos para uma região mais energética.

Porém, deve-se lembrar que as vibrações relacionadas aos átomos de S e N que estão coordenados ao metal aparecem geralmente acopladas fortemente com outras vibrações, principalmente devido à formação do ciclopaladado e sendo assim, não possuem um valor que permita diagnosticá-la precisamente [68].

A Tabela 6 apresenta as principais frequências vibracionais no IV e suas respectivas atribuições dos ligantes livres tiouréia (tu), N,N'-dimetiltiouréia (dmu), metiltiouréia (mtu), feniltiouréia (ftu) e tioacetamida (taa) dos complexos 1-5.

Tabela 6. Principais frequências para os ligantes livres e complexos 1-5.

Compostos	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu(\text{C=S})$	$\nu(\text{NH}_2, \text{NH})$	$\nu(\text{C-N})$	Referências
tu	-	-	730 f	3156 F , 3365 F	1473 F	29
1	3409 F	1614 F	709 mf	3183 F , 3299 F	1499 f	Autor
dmtu	-	-	754 m	3026 F , 3245 F	1521 F	69
2	3341 F	1634 m	641 mf	3143 F , 3266 F	1518 F	Autor
mtu	-	-	776 F	*	1490 mF	70
3	3416 F	1620 F	642 m	3163 F , 3245 F	1556 m	Autor
ftu	-	-	811 mF	3177 m , 3272 mF	1511 F	71
4	3402 F	1621 F	763 m	3167 mF , 3259 m	1518 F	Autor
taa	-	-	721 F	3082 F , 3294 F	1391 F	69
5	3303 F	1623 F	630 mf	3160 F , 3236 F	1423 F	Autor

ν =estiramento, (*)=banda encoberta.

Intensidades: F = forte, mF = média-forte, m = média, mf = média-fraca, f = fraca.

4.4 Espectrometria de Massas (ESI/MS)

Os compostos de paládio 1, 2, 3 e 4 também foram estudados pela técnica de espectrometria de massas, usando-se metanol como solvente.

Íons moleculares contendo paládio dão origem a um número característico de picos que mostra o percentual da distribuição isotópica natural de espécies contendo 1 ou mais átomos do metal. Os átomos de paládio são encontrados na natureza na forma de seis isótopos estáveis de abundância significativa. Os isótopos mais estáveis são

aqueles que possuem massa exata de 101,9 Da (abundância natural = 1%), 103,9 Da (11%), 104,9 Da (22,3%), 105,9 Da (27,3%), 107,9 Da (26,5%), 109,9 Da (11,7%) [72]. As massas dos compostos apresentados nesse trabalho são as massas que contém os isótopos estáveis e mais abundantes de cada elemento.

O espectro de massa ESI/MS modo negativo do composto **1** está ilustrado na Figura 27. Analisando o espectro de massa do composto **1**, pode ser observado a presença do íon molecular solvatado $[M+MeOH]^-$ pelo aparecimento do pico em m/z 373,79 e a posterior perda de solvente atribuído ao íon do pico molecular em m/z 337,99. Nota-se também a presença dos picos em m/z 300,14 atribuído à perda de cloreto $[M-Cl]^-$ e em m/z 262,21 associado à eliminação da tiouréia $[M-tu]^-$.

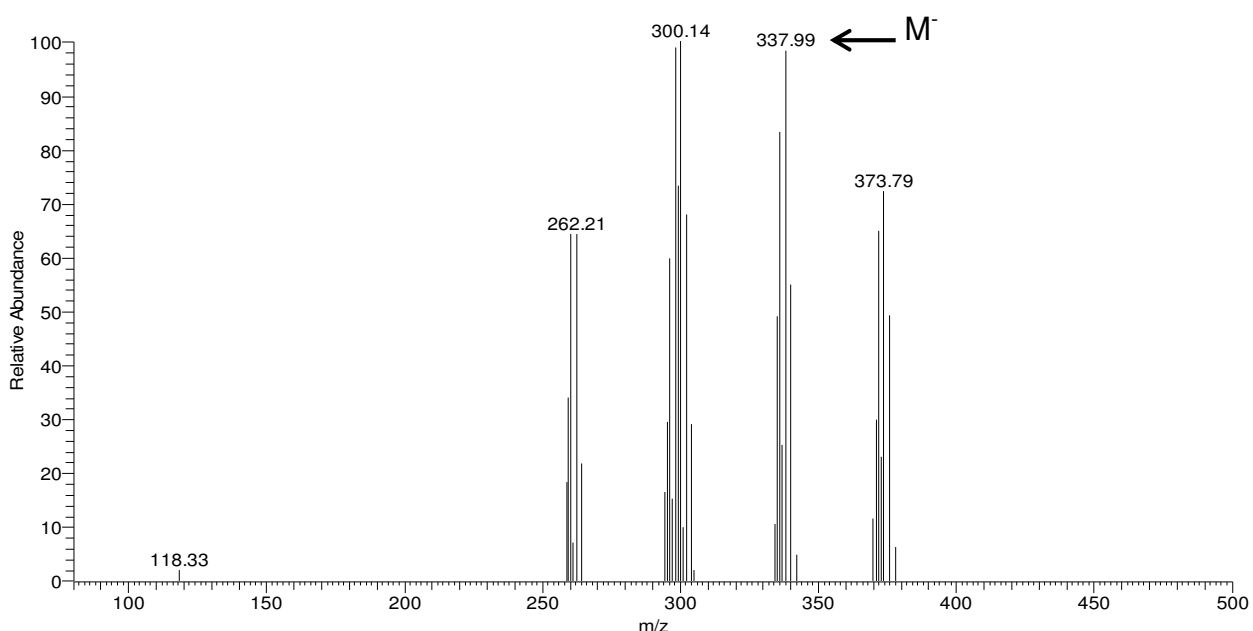


Figura 27. Espectro de massas ESI/MS modo negativo do complexo **1** em MeOH.

A Figura 28 apresenta o esquema das possíveis fragmentações para o composto **1** e as estruturas propostas de acordo com a relação carga/massa na espectrometria de massas.

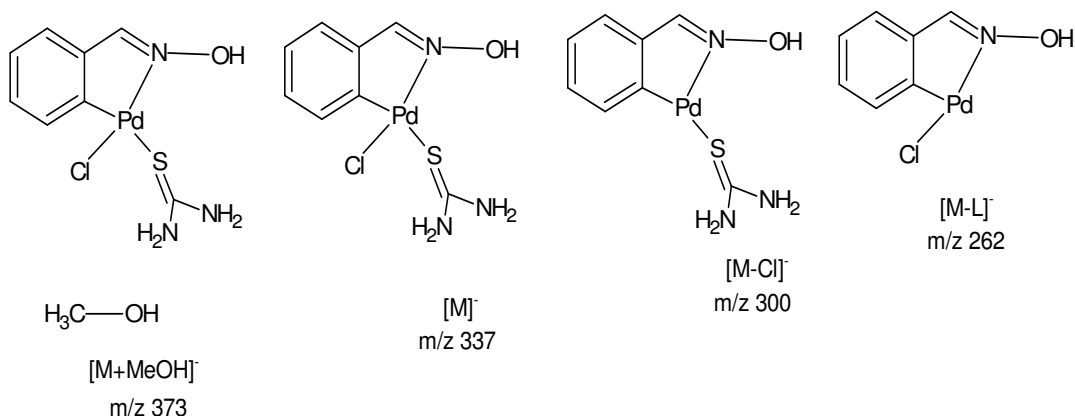


Figura 28. Estruturas propostas da relação a carga/massa para o composto 1.

A Figura 29 apresenta o espectro de massas do composto **2**, neste espectro o íon do pico molecular $[\text{M}]^-$ foi evidenciado pelo aparecimento do pico em m/z 365,79. Os sinais detectados em m/z 330,08 e m/z 262,24 estão associados à perda do íon cloro $[\text{M}-\text{Cl}]^-$ e do ligante $[\text{M}-\text{dmu}]^-$, respectivamente. O pico observado em m/z 298,07 foi atribuído às perdas dos grupos metila junto com o cloreto $[\text{M}-\text{Cl}-2\text{CH}_3]^-$.

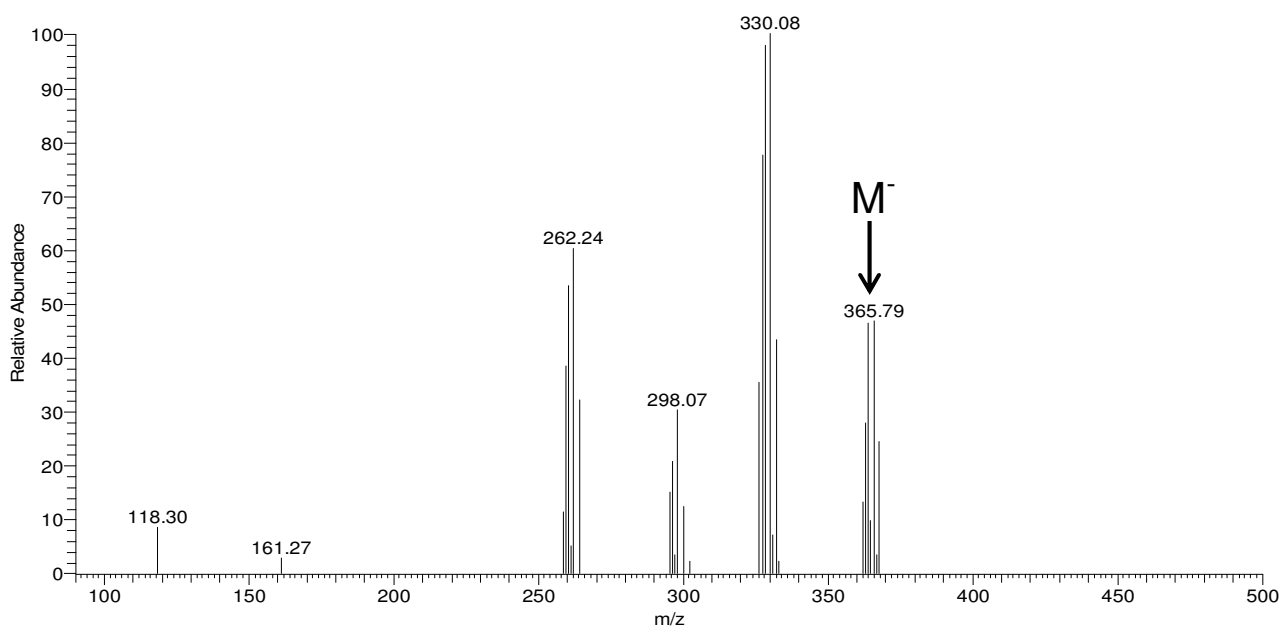


Figura 29. Espectro de massas ESI/MS modo negativo do complexo 2 em MeOH.

O esquema das possíveis fragmentações para o composto 2 e as estruturas propostas de acordo com a relação carga/massa obtidas na espectrometria de massas estão descrito na Figura 30.

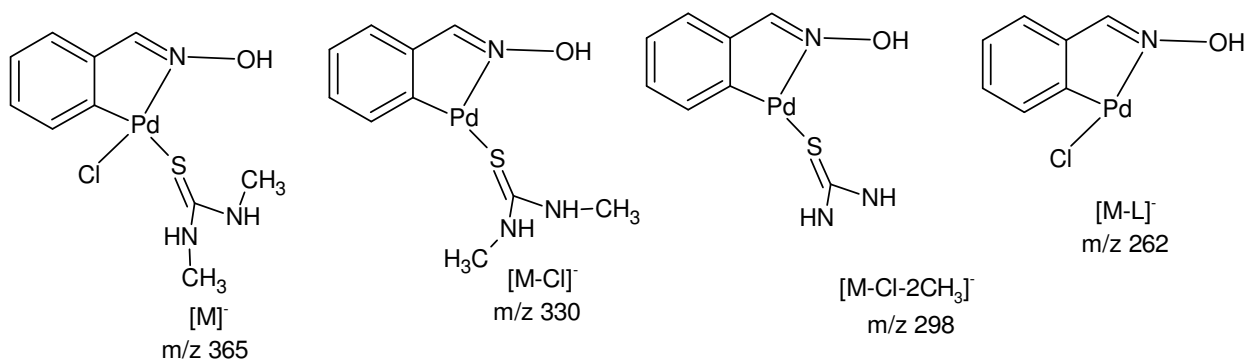


Figura 30. Estruturas propostas da relação a carga/massa para o composto 2.

Observando-se o espectro de massas do composto **3** (Figura 31), nota-se o aparecimento do pico em m/z 385,81 atribuído ao o íon molecular solvatado $[M+MeOH]^-$ e a posterior perda de solvente em m/z 351,89 atribuído ao íon do pico molecular $[M]^-$. De modo análogo ao comportamento observado em **2**, nota-se também uma primeira perda de cloreto em m/z 316,20 e uma subsequente perda do grupo metila em m/z 297,97, atribuído a formação da espécie $[M-Cl-CH_3]^-$. O sinal detectado em m/z 262,13 está associado à perda do ligante $[M-mtu]^-$.

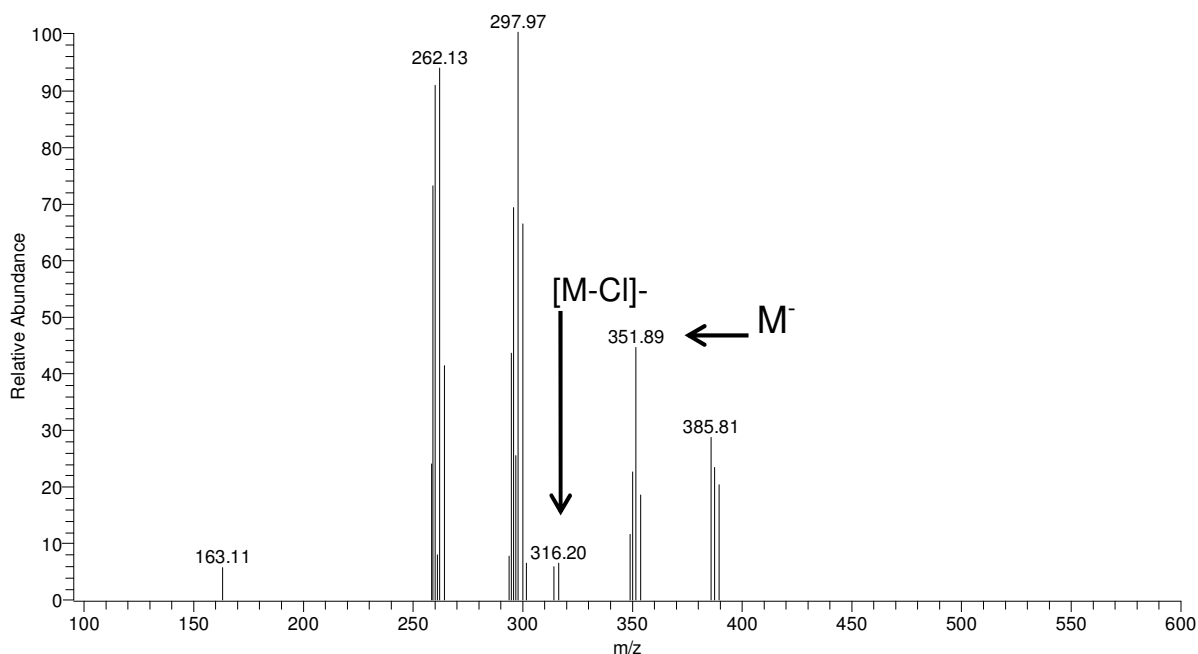


Figura 31. Espectro de massas ESI/MS modo negativo do complexo 3 em MeOH.

A Figura 32 apresenta o esquema das possíveis fragmentações para o composto 3 e as estruturas propostas de acordo com a relação carga/massa na espectrometria de massas.

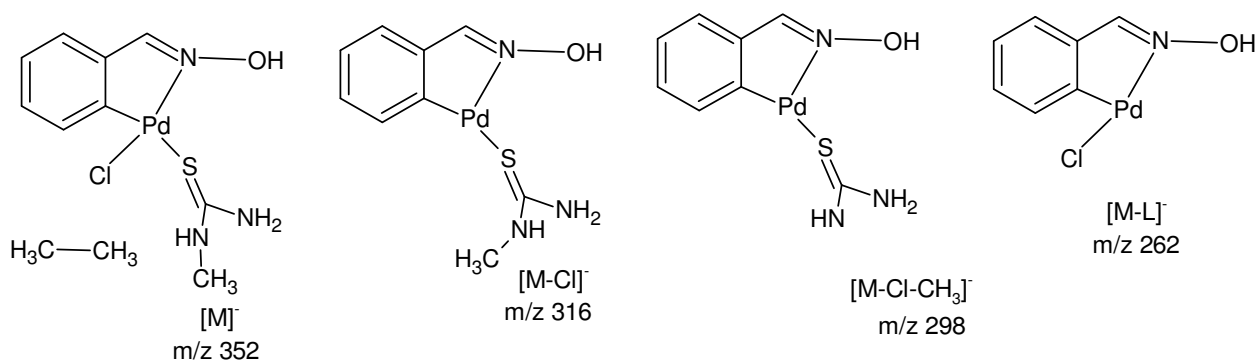


Figura 32. Estruturas propostas da relação carga/massa para o composto 3.

O espectro ESI/MS do composto 4 (Figura 33) mostra a presença do pico base em m/z 376,13 associado à formação da espécie $[M-Cl]^-$, enquanto que o pico em m/z 413,95 é atribuído ao íon molecular $[M]^-$. Vale destacar que o aparecimento do sinal em m/z 299,90 que foi associado à perda do anel aromático do ligante. Foi detectado ainda em m/z 262,12 à perda do ligante, formando a espécie $[M-ftu]^-$.

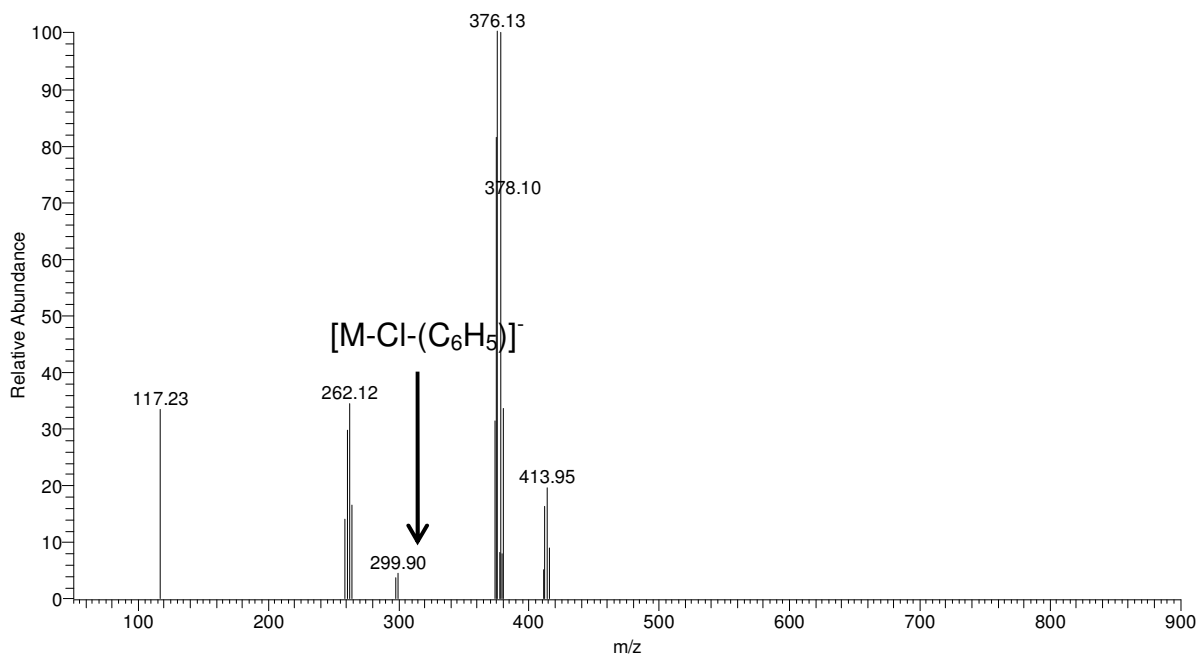


Figura 33. Espectro de massas ESI/MS modo negativo do complexo 4 em MeOH.

O esquema das possíveis fragmentações para o composto 4 e as estruturas propostas de acordo com a relação carga/massa obtidas na espectrometria de massas estão descrito na Figura 34.

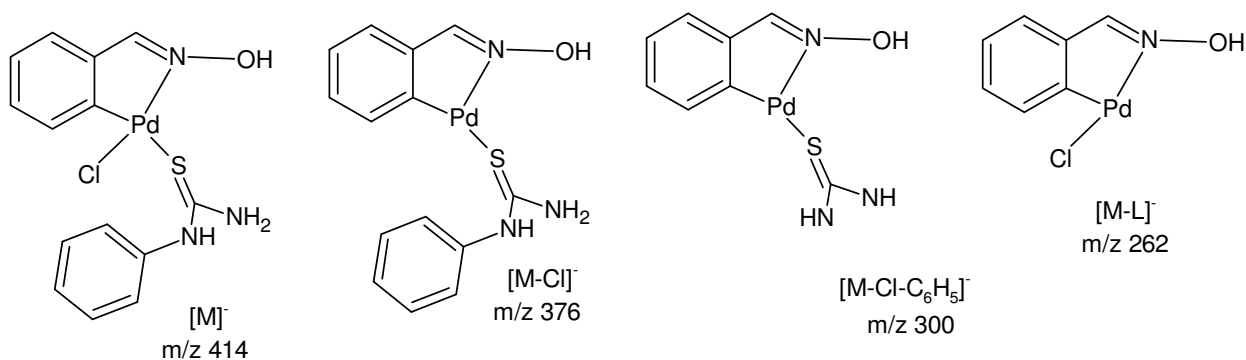


Figura 34. Estruturas propostas para relação a carga/massa obtidas nos espectros de massas para o composto 4.

Analisando o espectro de massa do composto **5**, Figura 35, foi evidenciada a fórmula molecular do composto pelo aparecimento do pico em m/z 336,95. Os sinais detectados em m/z 300,97 e m/z 262,07 correspondem à formação das espécies resultantes da perda de cloreto $[M-Cl]^-$ e do ligante $[M-L]^-$, respectivamente.

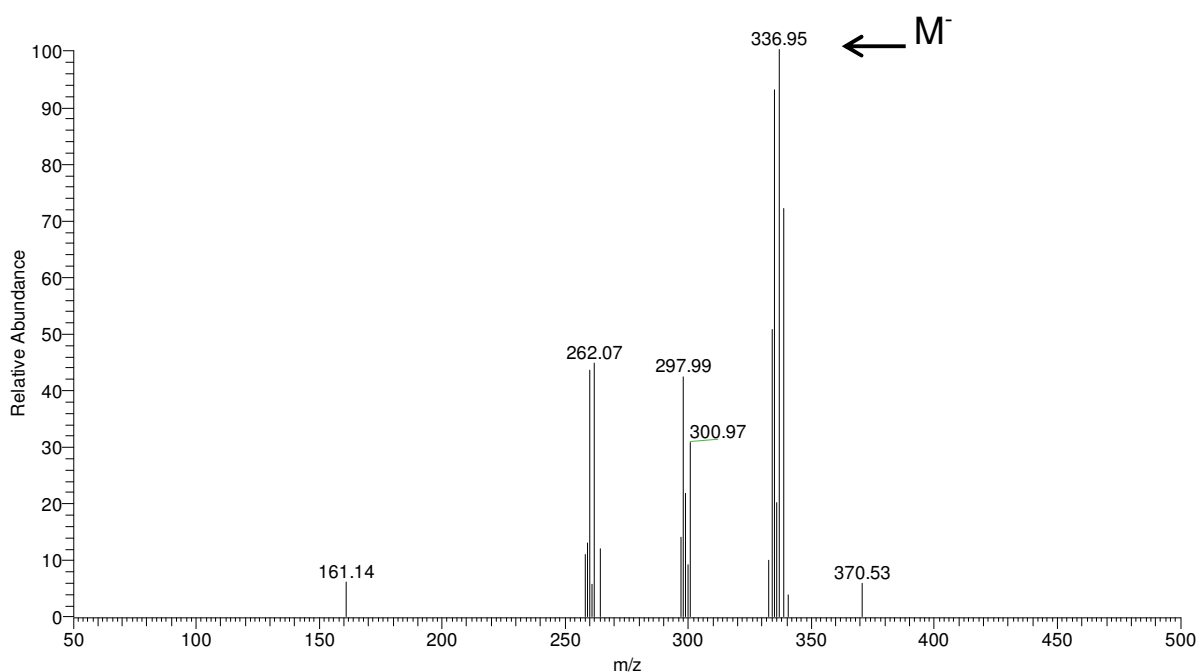


Figura 35. Espectro de massas ESI/MS modo negativo do complexo 5 em MeOH.

A Figura 36 apresenta o esquema das possíveis fragmentações para o composto 5 e as estruturas propostas de acordo com a relação carga/massa na espectrometria de massas.

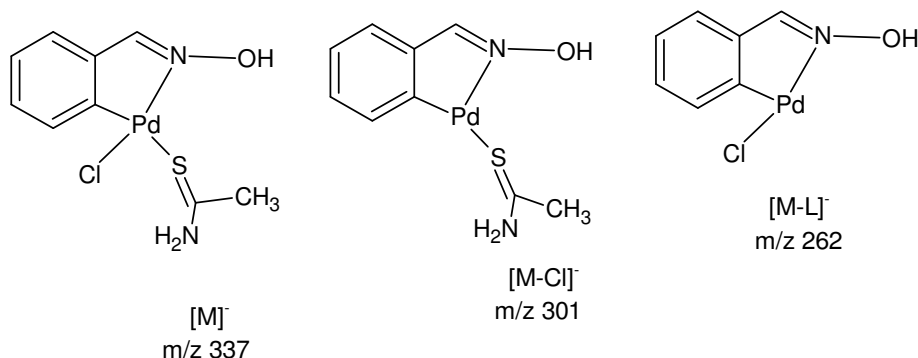


Figura 36. Estruturas propostas para relação a carga/massa obtidas nos espectros de massas para o composto 5.

Em todos os espectros pode ser detectado primeiramente a perda de cloro com a formação da espécie $[M-Cl]^+$. Também foi observado nos espectros ESI/MS dos compostos o pico em aproximadamente m/z 262,00 associado à formação da espécie $[M-L]^+$, ou seja, ocorre a perda do ligante. Isto reforça a ideia que todos os complexos apresentam uma composição semelhante.

4.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para os compostos **1**, **2**, **3** e **4** foram obtidos espectros de RMN de 1H , ^{13}C , HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence), HOMODEC, NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) e COSY, medidos em acetona ($(CD_3)_2CO$), clorofórmio ($CDCl_3$) e dimetilsulfóxido (DMSO- d_6) como solventes. Os principais deslocamentos químicos de 1H e ^{13}C para os ligantes tu [29], dmtu [29], mtu [29], ftu [73] e taa [74] já são conhecidos e estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Deslocamentos químicos (ppm) de 1H e ^{13}C das tiouréias.

Espécie	$\delta(^1H)$		$\delta(^{13}C)$		Referências
	N-H	CH3	C=S	CH3	
tu	6,98 - 7,25	-	183,81	-	29
dmtu	7,38	2,79	182,71	30,75	29
mtu	6,95 - 7,65	2,62; 2,81	181,10; 184,10	29,93; 31,10	29
ftu	6,95 - 9,66	-	181,04	-	73
taa	8,90 - 9,20	3,34	206,10	31,0	74

Os sinais de RMN de ^1H e ^{13}C foram atribuídos de acordo com a numeração do esquema representado pela Figura 37.

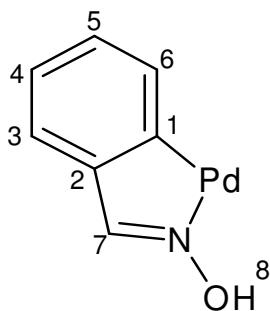


Figura 37. Esquema de numeração adotado.

Os átomos de hidrogênio H3, H4, H5 e H6 constituem um sistema de spin, sendo esperado um conjunto de 4 sinais no espectro de RMN- ^1H na região de aromáticos entre 6-8 ppm. Observando-se o esquema de numeração, espera-se que os átomos H3 e H6 apareçam como dupletos enquanto que os núcleos H4 e H5 apresentem seus sinais na forma de duplo duplo dupletos .

Para o composto **1** todos os espectros foram obtidos em dmsO-d6. No espectro de RMN- ^1H para **1** (Figura 38) foi possível verificar os sinais em aproximadamente $\delta 7,04$ dos átomos H4 e H5 que consistem em duplo duplo dupletos. A sobreposição dos sinais H3 e H6 também foi verificada em $\delta 7,28$. O aparecimento de um sinal alargado NH em $\delta 7,89$ condiz com a presença da tiouréia. Dois singletos em $\delta 10,23$ e $\delta 8,36$ foram atribuídos à hidroxila do ciclopaladado e ao grupo N=CH, respectivamente. Esses sinais localizam-se em campo mais baixo dentre todos os outros sinais devido à proximidade com o átomo de nitrogênio. Observou-se ainda um pico de água dissolvida em DMSO-d6 em $\delta 3,34$.

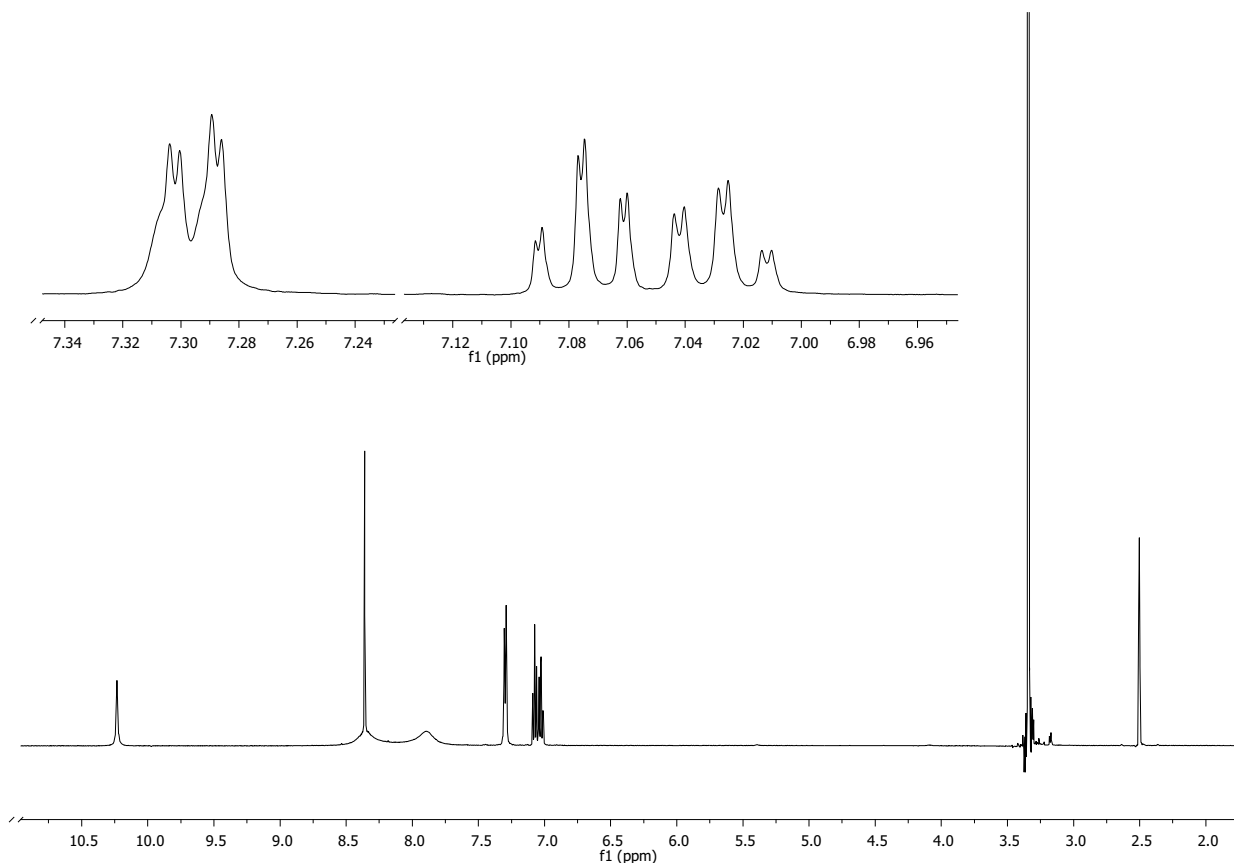


Figura 38. Espectro de RMN de ^1H para 1.

O espectro de ^{13}C (Figura 39) apresentou sinal em $\delta 177,17$ atribuído a $\text{C}=\text{S}$. Para o grupo $\text{N}=\text{CH}$ observou-se um pico em $\delta 157,85$. Os picos entre $\delta 151$ - 123 foram atribuídos ao anel aromático do composto. Com base no deslocamento químico de $\text{C}=\text{S}$ para campos mais altos no composto quando comparado ao do ligante livre (Tabela 7), propõe-se a coordenação da tiouréia pelo átomo de enxofre.

Com o intuito de distinguir os carbonos e hidrogênios do anel aromático para o composto **1**, foram realizados espectros HMQC, HMBC e NOESY. No espectro HMQC (Anexo 7) verifica-se uma correlação direta entre o singlete em $\delta 8,36$ e o sinal de ^{13}C em $\delta 157,85$. O duplo duplete em $\delta 7,29$ correlaciona-se com os sinais em $\delta 131,39$ e $\delta 127,13$ no ^{13}C . O ddd em $\delta 7,07$ está correlacionado ao sinal de ^{13}C em $\delta 124,86$, já o outro ddd em $\delta 7,03$ correlaciona-se com o carbono em $\delta 128,13$. Pode-se ainda prever que os carbonos em $\delta 150,66$ e $\delta 141,66$ são quaternários, pois não apresentam nenhuma correlação direta com os hidrogênios.

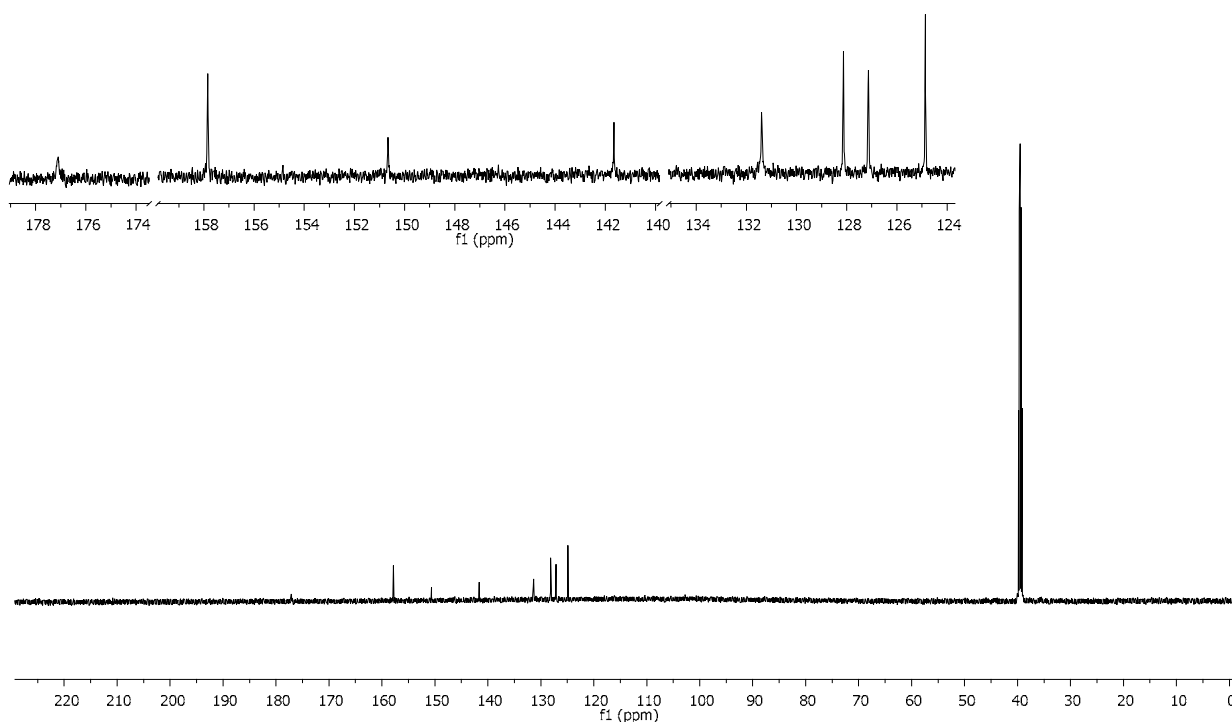


Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C para 1.

Com as análises dos mapas de contorno dos experimentos de HMBC (Anexo 8) foi possível observar a correlação entre o sinal em $\delta 7,30$ no ^1H e $\delta 157,85$ no ^{13}C , porém não foi possível a atribuição dos H3 e H6 por essa técnica. A Figura 40 apresenta as principais correlações encontradas no composto 1 pelo experimento de HMBC.

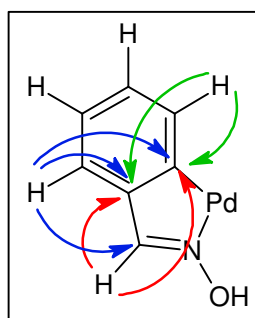


Figura 40. Principais correlações observadas em HMBC para o composto 1.

Anteriormente no espectro de RMN- ^1H foi observado à sobreposição desses hidrogênios, sendo ainda necessárias outras técnicas para sua determinação. Com o

intuito de distinguir H3 e H6, foi realizado o espectro NOESY e NOESY1D que estão representados nas figuras 41 e 42, respectivamente. O experimento NOESY correlaciona hidrogênios próximos uns dos outros através do espaço, com eles foi possível observar que os núcleos H4 e H5 correlacionam-se com H3 e H6, porém estes apareceram na mesma região espectral, com deslocamentos químicos muito próximos não sendo possível sua diferenciação.

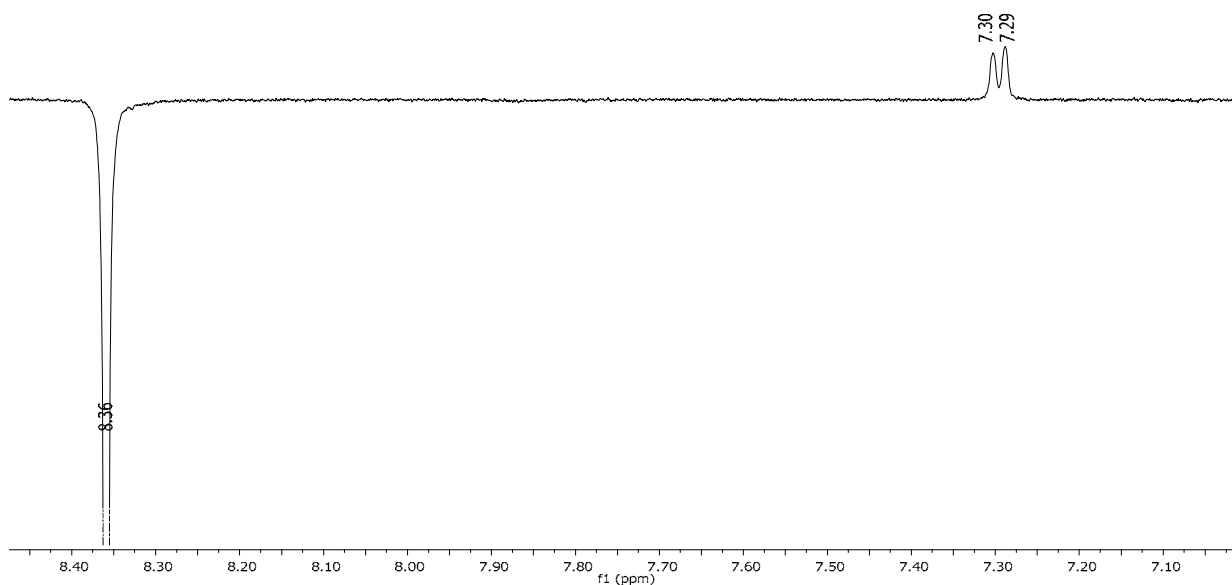


Figura 41. Espectro NOESY para o composto 1.

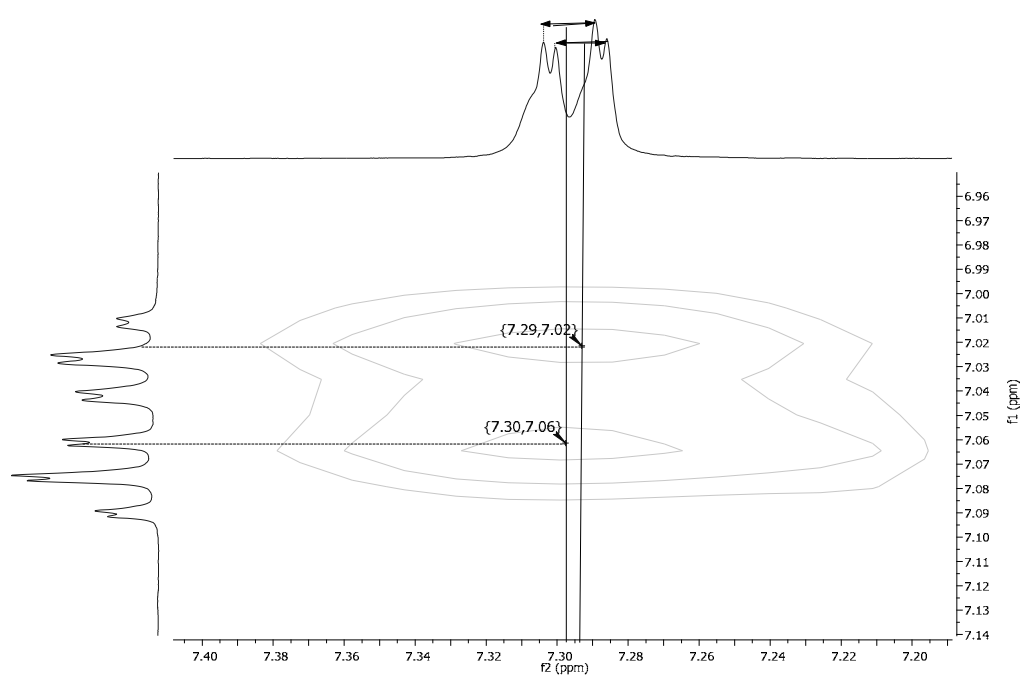


Figura 42. Espectro expandido NOESY1D para o composto 1

A atribuição dos carbonos e hidrogênios do composto **1** foi realizada em analogia aos do composto **2**, que será apresentado posteriormente. A tabela abaixo apresenta os valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C , HMQC e HMQC.

Tabela 8. Dados de RMN para o composto 1.

	δ (^1H)	δ (^{13}C) (gHMQC)	gHMBC
1	-	141,66	-
2	-	150,66	-
3	7,30 dd; [1H]	127,13	124,86;128,13; 157,85
4	7,03 ddd; [1H]; $J_{45}=7,75$ Hz, $J_{43}=7,25$ Hz, $J_{46}=2$ Hz	128,13	127,13; 150,66
5	7,07 ddd; [1H]; $J_{54}=7\text{Hz}$, $J_{56}=7,5\text{Hz}$, $J_{53}=1\text{Hz}$	124,86	131,39; 141,66
6	7,30 dd; [1H]	131,39	124,86
7	8,36 s; [1H]	157,85	141,66; 150,66
8	10,23 s; [1H]	-	-
C=S (tu)	-	177,17	-

multiplicidade: s=simpleto, d=dupleto, dd=duplo dupleto, t=tripleto, ddd=duplo duplo

Os espectros de RMN do composto 2 foram realizados em CDCl_3 . Em seu espectro de ^1H (Figura 43), observou-se que os sinais dos núcleos H4 e H5, aparecem na mesma região espectral, originando um multipeto em 6,99 ppm. Foi observado ainda dois singletos, um em δ 10,03 correspondente a hidroxila ligada ao nitrogênio e o outro em δ 7,85 pertencente ao H7. Em relação aos sinais correspondentes a dmtu observou-se um sinal alargado de N-H e um singlete em δ 3,47 atribuído ao grupo metila (CH_3). Um pico de água dissolvida em CDCl_3 , foi observado em δ 1,50.

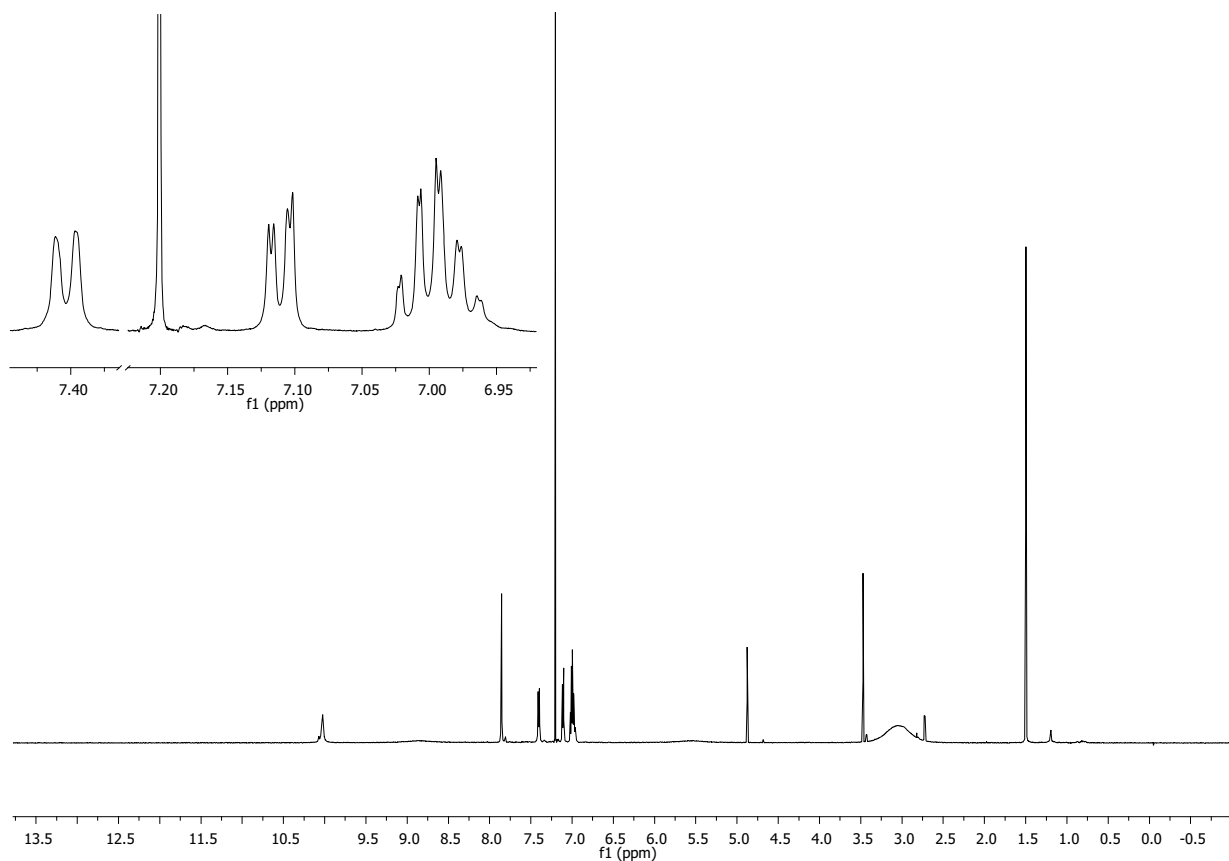


Figura 43. Espectro de RMN de ¹H para 2.

O espectro de ¹³C representado (Figura 44) apresentou sinais típicos do ligante em δ 176,39 e δ 39,31 para C=S e CH₃, respectivamente. Foi observado também no espectro de RMN de ¹³C um pico em δ 156,15 atribuído do grupo N=CH.

Com base no deslocamento químico de C=S para campos mais altos no espectro de RMN de ¹³C do composto quando comparado ao do ligante livre (tabela 7), propõe-se a coordenação da dmtu pelo átomo de enxofre.

No HMQC (Anexo 12) pode ser observado as correlações diretas entre o ¹H e ¹³C de alguns núcleos. Verifica-se que existe uma correlação entre o singlete em δ 7,85 e o sinal de ¹³C em δ 156,16. Outra correlação que foi observada está em δ 3,47 e δ 39,31. Já o duplete em δ 7,41 correlaciona-se com o sinal em δ 132,14 no ¹³C. O duplo duplete em δ 7,11 está associado ao sinal em δ 126,57, já o multiplete em δ 6,99 está correlacionado aos sinais de ¹³C em δ 128,48 e δ 125,22. Pode-se ainda predizer que os carbonos em δ 149,94 e δ 141,45 são quaternários, pois não apresentam nenhuma correlação.

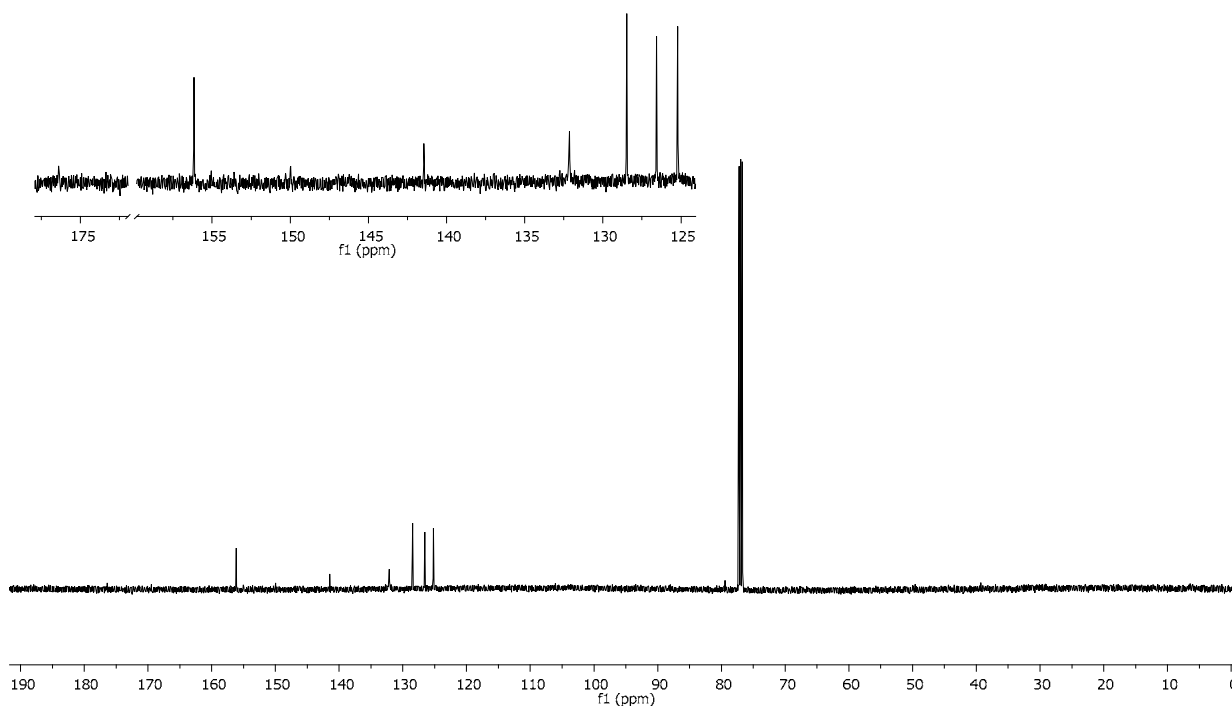


Figura 44. Espectro de RMN de ^{13}C para 2.

Foi observado pelo espectro HMBC (Anexo 13) a correlação entre o sinal em $\delta 7,11$ no ^1H e $\delta 156,15$ no ^{13}C , logo se pode prever que o hidrogênio em $\delta 7,11$ ocupa a posição H3 no composto, conseqüentemente H6 está em $\delta 7,41$. Observou-se também a correlação entre o carbono em $\delta 176,39$ (C=S) e o hidrogênio do grupo metila em $\delta 3,47$ ambos do ligante. A Figura 45 apresenta as principais correlações encontradas no composto 2 pelo experimento de HMBC.

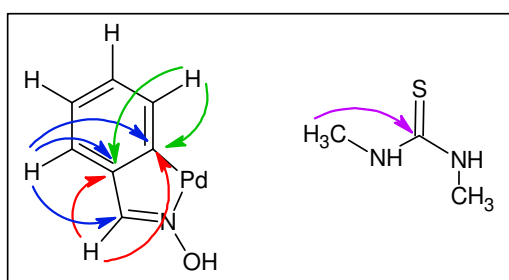


Figura 45. Principais correlações encontradas em HMBC para o composto 2.

O experimento HOMODEC (Figura 46) permitiu confirmar que o multipletto em 6,99 ppm está associado aos núcleos H4 e H5, pois irradiando-se os sinais dos dupletos H3 (a) e H6 (b), observa-se a alteração no padrão do sinal de H4 e H5.

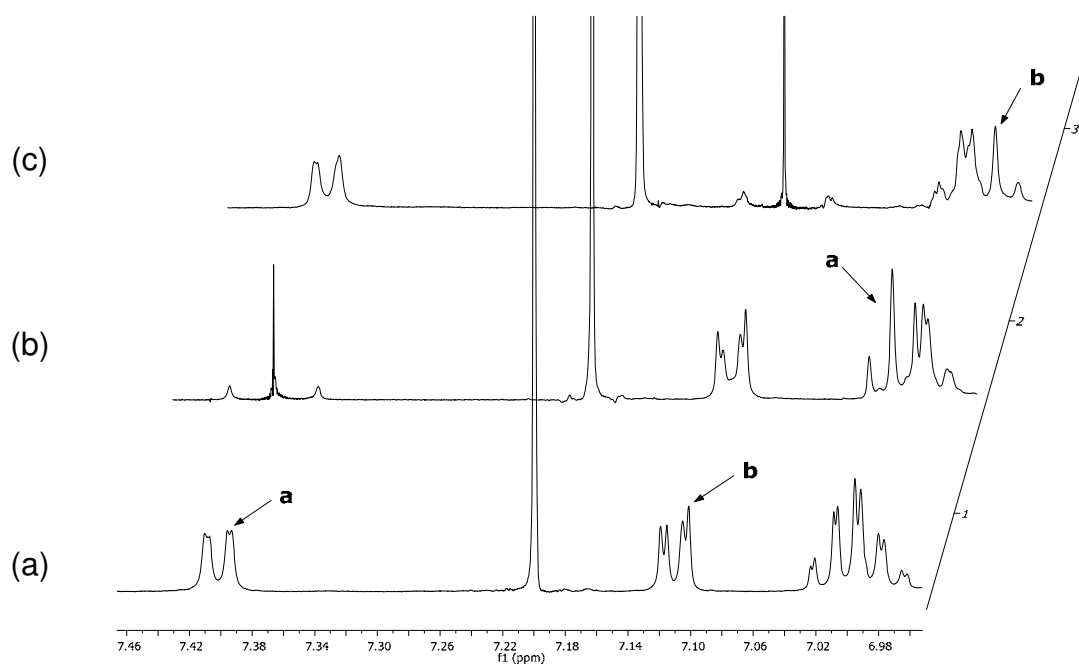


Figura 46. Espectro HOMODEC para o composto **2**. (a) Espectro de ^1H do complexo **2**; (b) irradiando o sinal de H6 em $\delta 7,41$; (c) irradiando o sinal de H3 em $\delta 7,11$.

Com os espectros de RMN foi possível a atribuição dos carbonos e hidrogênios presentes em **2**. A tabela 9 apresenta os valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H , ^{13}C , HMQC e HMQC com suas atribuições, segundo o esquema de numeração ilustrado na figura 37.

Tabela 9. Dados de RMN para o composto 2.

	δ (^1H)	δ (^{13}C) (gHMQC)	gHMBC
1	-	141,45	-
2	-	149,94	-
3	7,11dd; [1H]; $J_{34} = 7\text{Hz}$; $J_{35} = 2\text{Hz}$	126,57	128,48; 149,94; 156,15
4	6,99 m; [1H]	128,48	126,57; 149,94
5	6,99 m; [1H]	125,22	132,14; 141,45
6	7,41 d; [1H]; $J_{65} = 7\text{Hz}$	132,14	125,22; 141,45
7	7,85 s; [1H]	156,15	141,45; 149,94
8	10,03 s; [1H]	-	-
C=S (dmu)	-	176,39	-
CH ₃ (dmu)	3,47 s; [3H]	39,31	176,39

multiplicidade: s=simpleto, d=dupleto, dd=duplo dupleto, t=tripleto, ddd=duplo duplo, m=multiplato.

No espectro de RMN- ^1H para o composto 3 (Anexo 14A) foi possível verificar o aparecimento de dois sistemas, um com picos mais intensos e alargados e outro com picos mais definidos e menos intensos. Observou-se dois singletos em δ 11,22 e δ 10,23 que foram atribuídos ao grupo OH. Também foram observadas outras duplicações em δ 8,34 e δ 8,12 pertencentes a N=CH e na região de aromáticos entre δ 7,72-6,90. Esta duplicação está associada a processos que ocorrem em solução, pois pelos dados da análise elementar esse composto está puro. Acredita-se que em contato com dmsu ocorre a quebra de uma parte do composto liberando a bzo livre, formando assim duas espécies em solução (bzo e 3). Todos os picos duplicados estão condizentes com os valores encontrados no RMN de ^1H para a bzo livre (Tabela 10 e Anexo 1).

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H para o bzo livre.

Bzo	δ (^1H)
OH	11,2
N=CH	8,14
Anéis aromáticos	6,9-7,7

Acredita-se que os demais picos não atribuídos sejam de grupos NH e NH₂, que possui uma faixa muito ampla de deslocamento (3-12ppm). Neste sentido realizou-se um experimento no qual foi adicionado ao composto 3 solubilizado em dmsó-d₆ algumas gotas de D₂O (Anexo 14B). Este experimento faz com que os hidrogênios ligados a OH ou NH sejam trocados pelo deutério. A Figura 47 apresenta os espectros de ¹H sem e com a adição de D₂O.

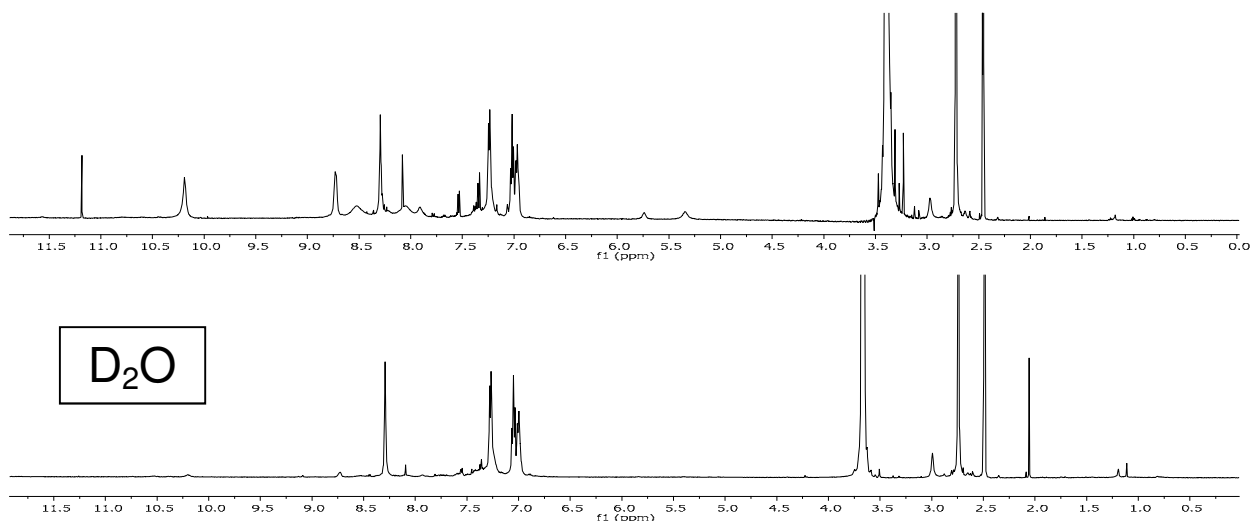


Figura 47. Espectros de ¹H sem e com a adição de D₂O para 3.

Já na região de alto campo observou-se dois sinais sobrepostos próximos a δ 2,70 atribuídos ao grupo metila do ligante, este efeito é causado pela rotação lenta da ligação C-N, devido a deslocalização eletrônica. Existem duas configurações possíveis para a mtu devido à rotação restrita da ligação C-N (Figura 48). Os sinais dos grupos metílicos dos isômeros cis e trans apresentam deslocamentos químicos diferentes devido aos efeitos diamagnéticos anisotrópicos da dupla ligação do grupo tionila. Logo, o sinal do grupo metila cis ao grupo tionila deve estar deslocado para campo mais alto em relação ao trans-relacionado [73].

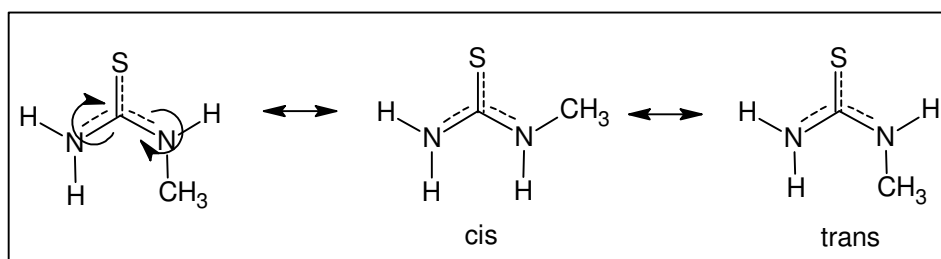


Figura 48. Isômeros conformacionais cis e trans da mtu.

O espectro de ^{13}C (Figura 49) também apresentou sinais finos atribuídos a bzoX e sinais alargados do composto. Com base nos deslocamentos químicos da bzoX livre (Tabela 10) e nos demais compostos, pode-se atribuir os sinais em $\delta 157,87$ e $\delta 148,22$ ao grupo $\text{N}=\text{CH}$ para 3 e bzoX, respectivamente. Atribuiu-se também os deslocamentos em $\delta 127,22$ para C2 do composto e $\delta 133,28$ para C2 da bzoX.

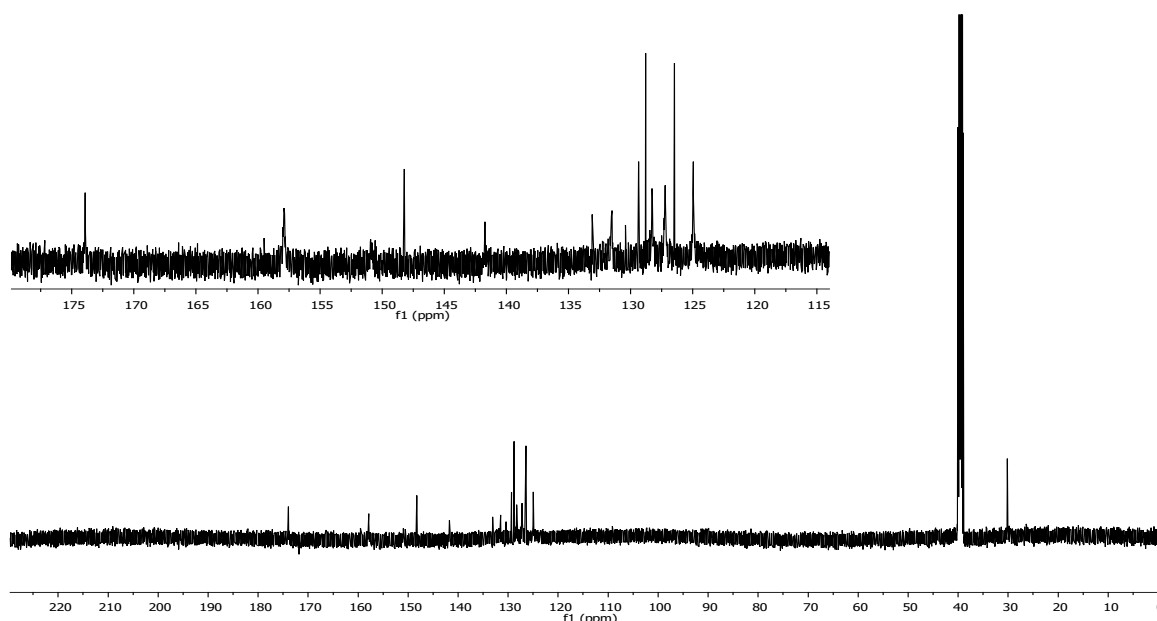


Figura 49. Espectro de RMN de ^{13}C para 3.

Tabela 11. Dados de RMN de ^{13}C para o bzoX livre.

Esquema	BzoX	
	$\delta (^{13}\text{C})$	
	1	148,3
	2	133,2
	3 a 6	126,6 - 127,9
	7	129,4

No espectro HMQC (Anexo 16) verificou-se a correlação direta entre o duplete em $\delta 2,76$ e o sinal de ^{13}C em $\delta 30,13$ associados a metila do ligante. O sinal em $\delta 7,29$ no ^1H correlaciona-se com outros dois sinais em $\delta 127,22$ e $\delta 131,50$ no ^{13}C . Com o experimento HMBC (Anexo 17) foi possível observar a correlação entre o sinal em $\delta 11,23$ e $\delta 148,15$ e em $\delta 8,12$ e $\delta 148,15$. Ainda foi possível observar o sinal em $\delta 8,34$ no ^1H correlacionando-se com outros dois sinais em $\delta 150,81$ e $\delta 141,71$ no ^{13}C . A

Figura 50 apresenta as principais correlações encontradas para o composto **3** e a bzoX livre.

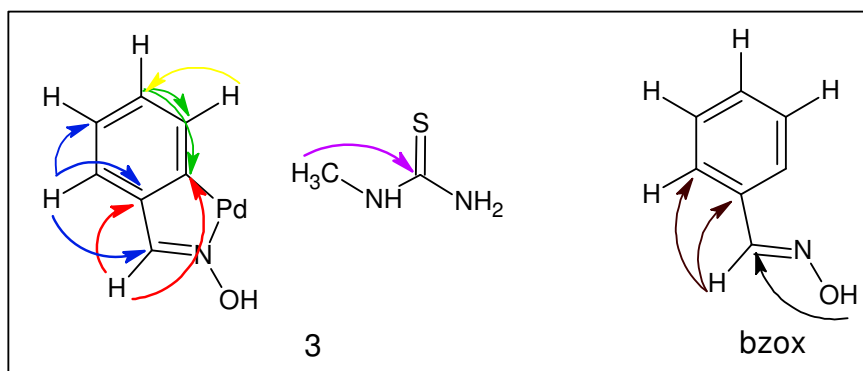


Figura 50. Principais correlações encontradas para o composto **3** e a bzoX.

A tabela 12 apresenta os valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H , ^{13}C , HMQC e HMBC com suas atribuições. Todos os espectros de RMN para **3** foram realizados em dmsO-d6. Não foi possível realizar o RMN em outros solventes, pois este composto não apresentou solubilidade suficiente.

Tabela 12. Dados de RMN para o composto **3**.

	δ (^1H)	δ (^{13}C) (gHMQC)	gHMBC
1	-	141,69	-
2	-	150,93	-
3	7,29m; [1H]	127,22	128,23; 150,93; 157,87
4	7,03 m; [1H]	128,26	127,22; 150,93
5	7,03 m; [1H]	124,96	-
6	7,29 m; [1H]	131,51	125,68; 142,91
7	8,34 s; [1H]	157,87	141,69, 150,93
8	10,23 s; [1H]	-	-
C=S	-	174,25	-
CH ₃ (mtu)	2,77d; [3H]	30,13	174,25

multiplicidade: s=simpleto, d=dupleto, dd=duplo dupleto, t=tripleto, ddd=duplo duplo, m=multipleto.

No espectro de RMN- ^1H para o composto **4** (Figura 51) foi possível atribuir o H8 em δ 10,36 e H7 em δ 8,24. Verificou-se também que os sinais próximos a δ 7,09 consistem em duplo duplo dupletos, característicos de H4 e H5. A região observada entre δ 7,33-7,55 foi atribuída aos demais hidrogênios do anel aromático do ciclopaladado e do ligante ftu.

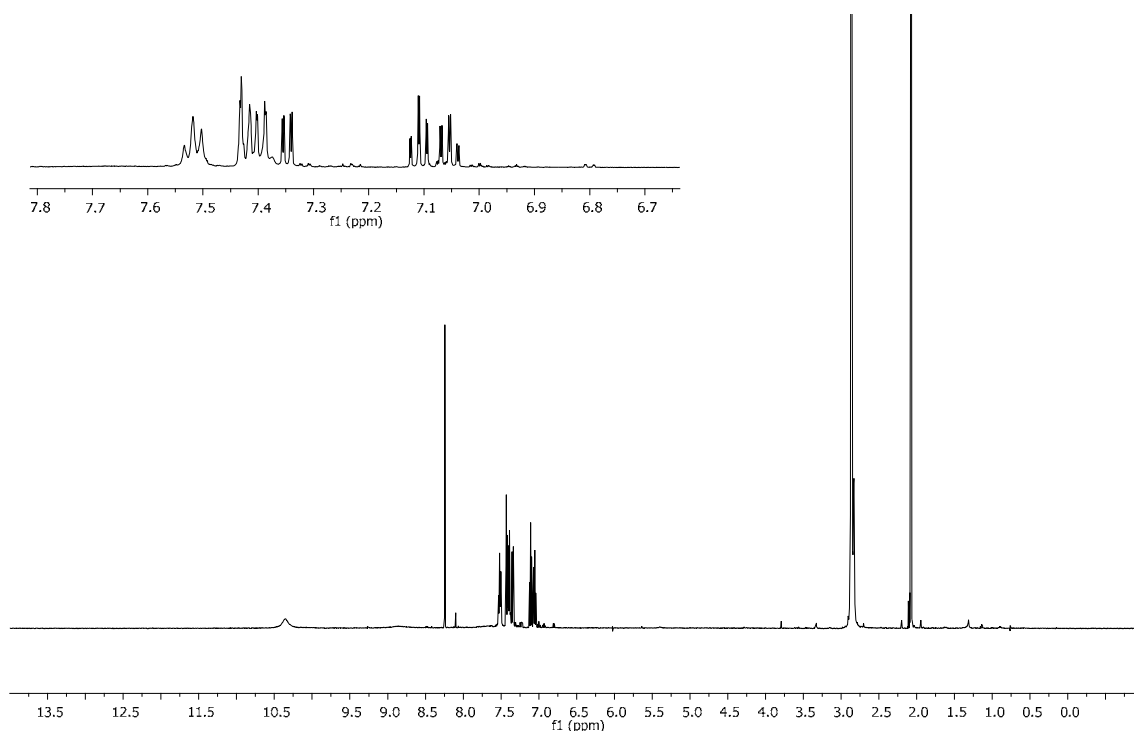


Figura 51. Espectro de RMN de ^1H para 4.

O espectro de ^{13}C (Figura 52) apresentou sinal em $\delta 157,69$ atribuído a C7. Os picos entre $\delta 160$ - 124 foram atribuídos aos anéis aromáticos do composto 4, ainda nesta região foi observado picos finos e também mais alargados, indicando a presença de dois sistemas de spin. Para este composto não foi possível observar C=S no ^{13}C .

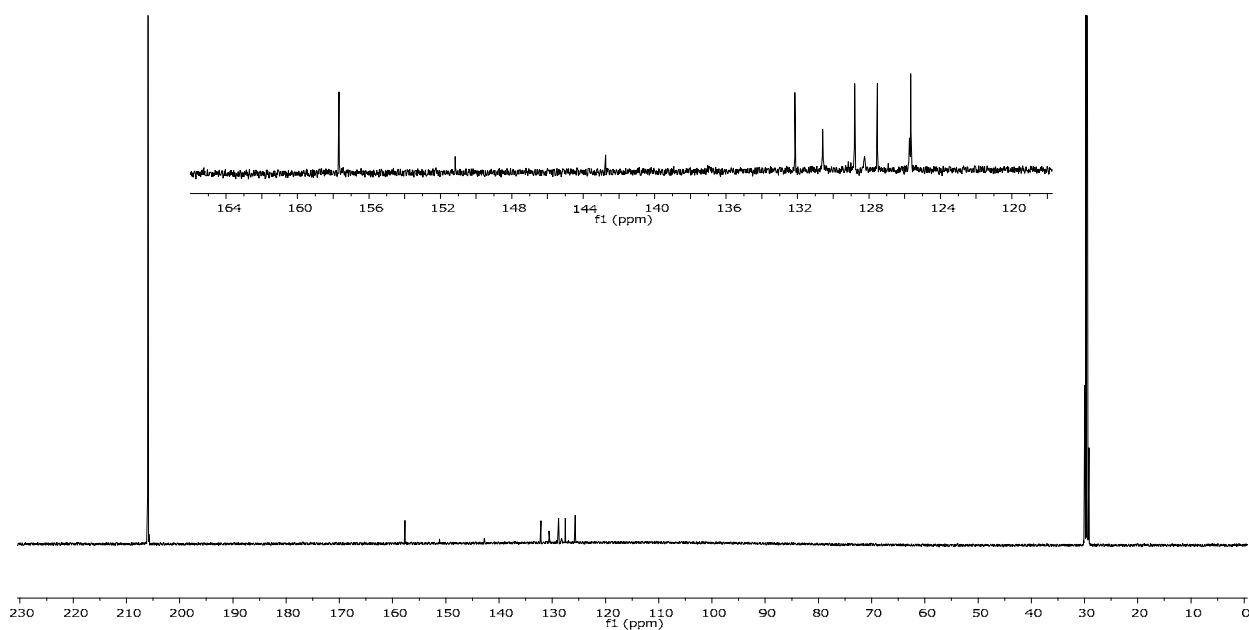


Figura 52. Espectro de RMN de ^{13}C para 4.

No espectro HMQC (Anexo 20) verifica-se uma correlação direta entre o singlete em $\delta 8,24$ (H7) e o sinal de ^{13}C em $\delta 157,69$ (C7). O duplo duplete em $\delta 7,11$ e $\delta 7,05$ correlacionam-se com os sinais em $\delta 125,68$ e $\delta 128,25$ no ^{13}C , respectivamente. Pode-se prever também que os carbonos em $\delta 151,32$ e $\delta 142,91$ são quaternários, pois não apresentam nenhuma correlação direta com os hidrogênios. Com as análises dos mapas de contorno dos experimentos de HMBC (Anexo 21) foi possível observar a correlação entre o sinal em $\delta 7,34$ no ^1H e $\delta 157,69$ no ^{13}C , podendo ser atribuído a H3. A Figura 53 apresenta as principais correlações encontradas no composto **4** pelo experimento de HMBC.

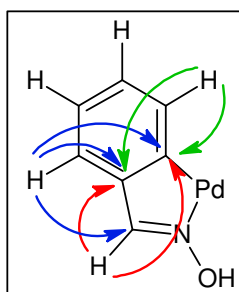


Figura 53. Principais correlações encontradas em HMBC para o composto **4**.

Para a identificação dos diferentes sistemas de spin no composto, foi realizado o espectro TOCSY (Figura 54).

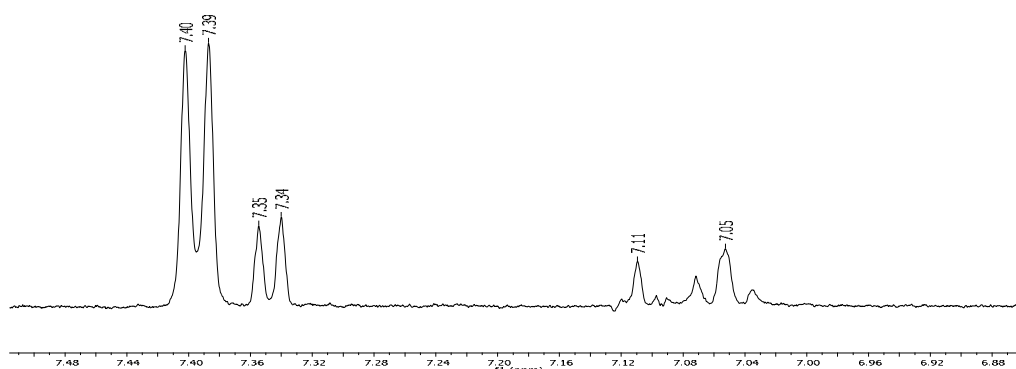


Figura 54. Espectro TOCSY para o composto **4**.

Com este espectro observou-se que os sinais em $\delta 7,34$ e $\delta 7,39$ pertencem ao mesmo sistema de spin que H4 e H5, assim os picos alargados no ^{13}C foram atribuídos ao anel do ligante e H6 ($\delta 7,39$) e H3 ($\delta 7,34$) ao ciclopalladado. A tabela 13 apresenta os valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H , ^{13}C , HMQC e HMBC com suas atribuições. Todos os espectros de **4** foram realizados em acetona.

Tabela 13. Dados de RMN para o composto 4.

	δ (^1H)	δ (^{13}C) (gHMQC)	gHMBC
1	-	142,91	-
2	-	151,32	-
3	7,11 dd; [1H]; $J_{34} = 7\text{Hz}$; $J_{35} = 2\text{Hz}$ e 1,5 Hz	127,54	128,48; 157,69; 151,32
4	7,05 ddd; [1H]; $J_{45}=7,0$ Hz, $J_{43}=8,0$ Hz, $J_{46}=2$ Hz e 1,5Hz	128,25	127,54; 151,32
5	7,11 ddd; [1H]; $J_{54}=7,5\text{Hz}$, $J_{56}=7,0\text{Hz}$, $J_{53}=1\text{Hz}$ e 1,5Hz	125,68	132,15; 1412,91
6	7,39 d; [1H]; $J_{65} = 7,5\text{Hz}$	132,15	125,68; 142,91
7	8,24 s; [1H]	157,69	142,91, 151,32
8	10,36 s; [1H]	-	-
ϕ (ftu)	7,38 - 7,58	-	-

multiplicidade: s=simpleto, d=dupleto, dd=duplo dupleto, t=tripleto, ddd=duplo duplo, m=multipleto.

Os espectros de RMN do composto 5 foram realizados em acetona-d6. Em seu espectro de ^1H (Figura 55), observou-se que os sinais dos núcleos H4 e H5, aparecem na mesma região espectral, originando um multipleteo em 7,11 ppm, o mesmo ocorre para os núcleos H3 e H6 com um dupleto em 7,36. Foi observado ainda dois singletos, um em δ 10,27 correspondente a hidroxila ligada ao nitrogênio e o outro em δ 8,29 pertencente ao H7. Em relação aos sinais correspondentes a taa observou-se dois sinais alargados de N-H entre δ 10 e δ 11 e um singleteo em δ 2,69 atribuído ao grupo metila (CH_3).

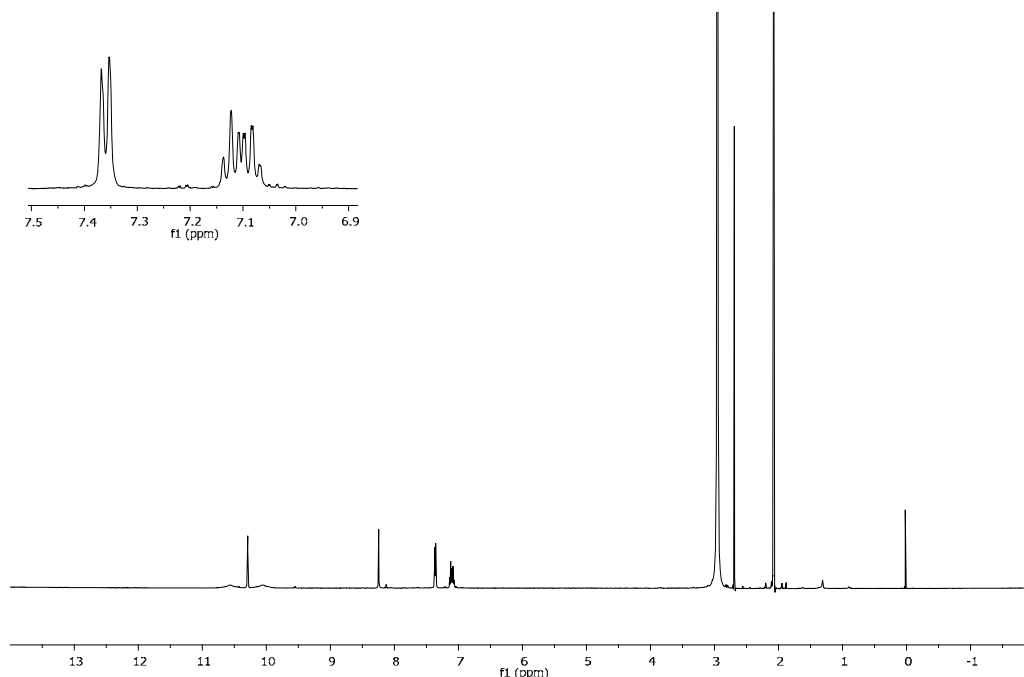


Figura 55. Espectro de RMN de ¹H para 5.

O espectro de ¹³C (Figura 56) apresentou menor resolução quando comparado aos espectros dos outros compostos devido a fatores de solubilidade, porém foi possível observar o sinal de C=S em δ 200,49 e com base no deslocamento químico de C=S para campos mais altos no composto quando comparado ao do ligante livre (tabela 7), propõe-se a coordenação da taa via átomo de enxofre. No HMQC (Anexo 24) verifica-se uma correlação entre o singlete em δ 8,29 e o sinal de ¹³C em δ 157,58. Outra correlação que foi observada está em δ 2,69 e δ 28,51. Já o multiplete em δ 7,11 correlaciona-se com os sinais em δ 128,85 e δ 125,61 no ¹³C. O duplete em δ 7,36 no espectro de ¹H está associado aos sinais em δ 131,74 e δ 127,54 no ¹³C.

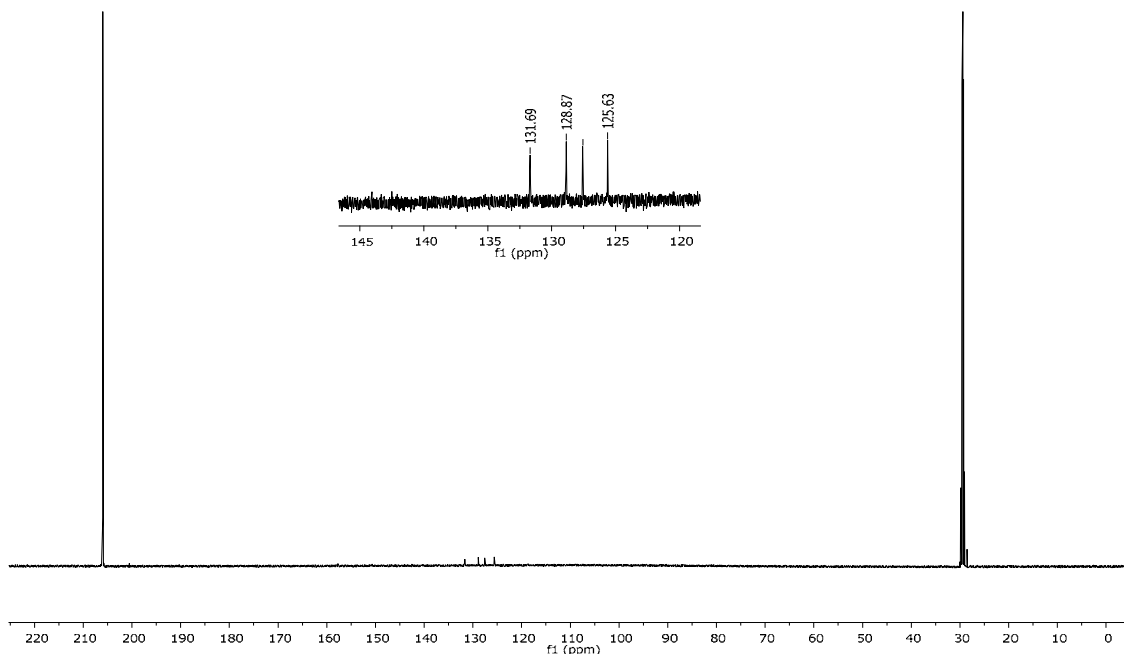


Figura 56. Espectro de RMN de ^{13}C para 5.

Foi observado pelo espectro HMBC (Anexo 25) a correlação entre o sinal em $\delta 10,27$ no ^1H e $\delta 157,58$ no ^{13}C , ou seja, uma correlação entre o hidrogênio do grupo OH da oxima e o carbono da posição 7. Observou-se também a correlação entre o carbono em $\delta 200,49$ ($\text{C}=\text{S}$) e os hidrogênios do grupo metila em $\delta 2,69$ ambos do ligante. Foi possível ainda atribuir os carbonos quaternários aos deslocamentos em $\delta 150,56$ e $\delta 142,59$, pois estes correlacionam-se com o sinal no ^1H em $\delta 8,29$ e também não apresentam correlação no espectro de HMQC. A Figura 57 apresenta as principais correlações encontradas no composto 5 pelo experimento de HMBC.

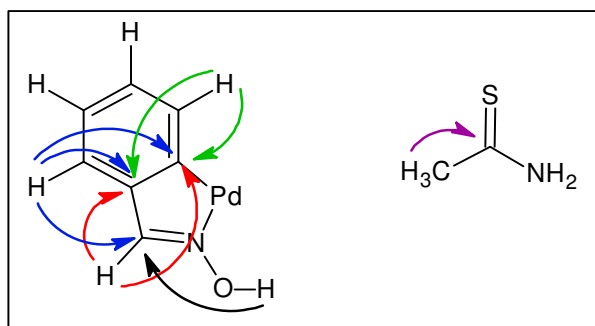


Figura 57. Principais correlações encontradas em HMBC para o composto 5.

O experimento COSY (Figura 58) foi realizado com o intuito de distinguir os hidrogênios nas posições 3 e 6 que aparecem sobrepostos com um duplete e 4 e 5,

que aparecem como multipletos no espectro de ^1H . No entanto, não foi possível distingui-los, mas observa-se pelo espectro que esses hidrogênios correlacionam entre si.

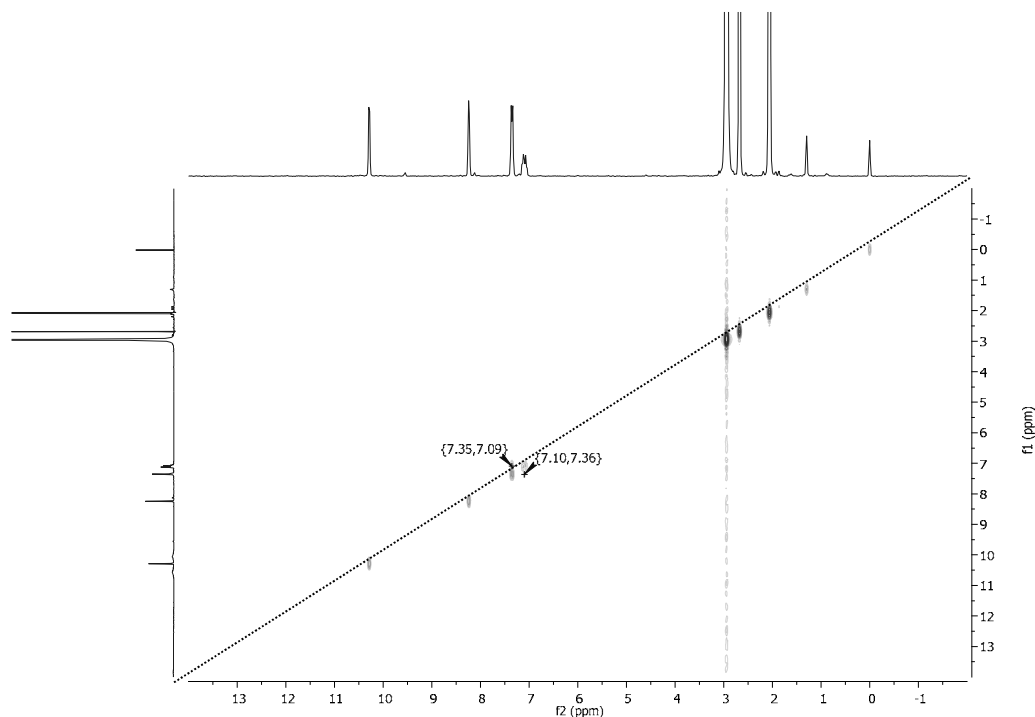


Figura 58. Espectro COSY para o composto 5.

A tabela abaixo apresenta os valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H , ^{13}C , HMQC e HMBC com suas atribuições, segundo Figura 37.

Tabela 14. Dados de RMN para o composto 5.

	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$ gHMQC	gHMBC
1	-	142,59	-
2	-	150,56	-
3	7,36 d; [2H]	131,74 ; 127,54	150,56; 142,59; 128,85; 125,61
6			
4	7,11 m; [2H]	128,85; 125,61	150,56; 142,59; 131,74; 127,54
5			
7	8,29 s; [1H]	157,58	150; 142
8	10,27 s; [1H]	-	157,68
C=S	-	200,49	-
CH3 (taa)	2,69 S; [3H]	28,51	200,49

multiplicidade: s=simpleto, d=dupleto, dd=duplo dupleto, t=tripleto, ddd=duplo duplo, m=multipleto.

4.6 Proposição Estrutural

Com base nos resultados obtidos a partir das espectroscopias no infravermelho e RMN, espectrometria de massas e em concordância com os resultados de análise elementar sugere-se as seguintes estruturas para os compostos 1-5. (Figura 59).

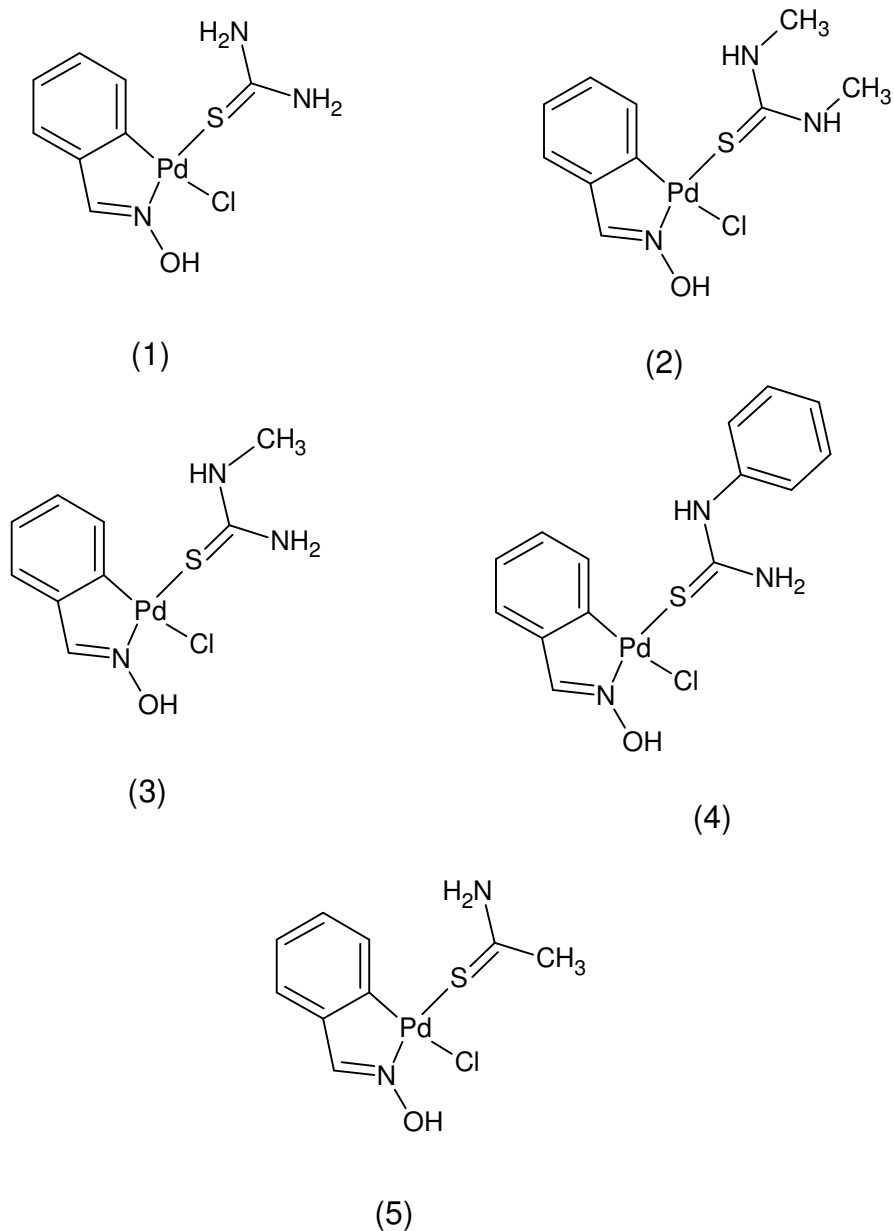


Figura 59. Estruturas propostas para os compostos de 1-5.

Espera-se um ambiente quadrado planar ao redor do átomo de paládio e com todos os ligantes coordenados via átomo de enxofre.

4.7 Investigação das propriedades biológicas

4.7.1 Avaliação da citotoxicidade frente à células tumorais

A atividade citotóxica dos complexos ciclopaladados de 1-5 foi avaliada frente às células murinas de adenocarcinoma mamário (LM3), cujos valores de IC₅₀ (concentração que inibe em 50% a proliferação celular) encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15. Valores de IC₅₀ para compostos de 1-5 frente à LM3.

Composto	Massa Molecular (g mol ⁻¹)	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Referência
Bzox livre	121,13	>412	75
[Pd(μ-Cl)(C ² ,N-bzox)] ₂	524,00	58,90 ±4,27	75
1	338,12	28,10 ±2,53	Autor
2	366,18	20,51 ±1,39	Autor
3	352,15	61,45 ±2,73	Autor
4	414,22	19,87 ±3,38	Autor
5	337,13	47,43 ±3,68	Autor

Padrão comparativo: CISPLATINA (IC₅₀= 30,26 ±3,72 μmol L⁻¹)

Os compostos **1**, **2** e **4** foram os mais citotóxicos da série sintetizada neste trabalho, com valores de IC₅₀ comparáveis ao da cisplatina. Todos os complexos, com exceção do **3**, mostraram ser mais ativos quando comparados ao dímero precursor e a bzox livre. O composto 3 foi o menos citotóxico dos compostos, anteriormente foi sugerido que na presença de DMSO esse complexo dissocia-se dificultando a identificação da espécie responsável pela sua atividade. Através dos valores obtidos foi possível observar também que os compostos derivados da tiouréia foram mais ativos que a tiacetoamida.

Estudos recentes tem mostrado que os ciclopaladados apresentam um mecanismo molecular de ação diferente daquele observado para a cisplatina e análogos. No caso da cisplatina, ocorre a formação de adutos intrafitas entre as bases guaninas adjacentes do DNA, resultando em uma distorção da dupla hélice. A morte celular é associada à ativação de vários mecanismos sinalizadores incluindo aqueles envolvidos no reconhecimento e reparo do dano ao DNA, interrupção do ciclo celular e apoptose. De acordo com Barbosa *et al.* [76], a apoptose via mecanismo lisossomal é o principal mecanismo de morte celular que decorre da atividade do ciclopaladado [Pd(C²,N-dmpa)(dppf)]Cl frente a células leucêmicas K562. O

composto organometálico induz a permeabilização da membrana lisossomal com liberação de enzimas lisossomais no citosol, principalmente a catepsina B que desempenha um papel chave na execução do programa apoptótico em muitas linhagens de células tumorais. Já o complexo $[\{PdCl(C^2, N-dmpa)\}_2(\mu-dppe)]$ ativa o mecanismo intrínseco de apoptose em células de melanoma murino B16F10-Nex2. Esse ciclopaladado interage com os grupos tióis das proteínas embebidas na membrana mitocondrial, causa a dissipação do potencial de membrana mitocondrial, induzindo a ativação das endonucleases [77].

4.7.2 Avaliação da citotoxicidade frente à formas promastigotas de *Leishmania*

A atividade citotóxica dos compostos também foi testada contra as formas Promastigotas de *Leishmania (L.) amazonenses* e para comparação, os valores de IC_{50} dos compostos 1-5 são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16. Valores de IC_{50} para atividade antileishmanicida dos compostos de 1-5.

Composto	Massa Molecular (g mol ⁻¹)	Promastigota IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	338,12	12,4
2	366,18	12,54
3	352,15	9,9
4	414,22	1,56
5	337,13	10,3

(Padrão comparativo: Anfotericina B ($IC_{50} = 6,95 \mu\text{g mL}^{-1}$))

Os valores obtidos contra as formas promastigota variaram pouco em relação os compostos **1**, **2**, **3** e **5** que apresentaram valores acima de $9 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já o composto **4** mostrou maior citotoxicidade entre os compostos sintetizados com um IC_{50} menor que a Anfotericina B. Portanto, pode-se sugerir uma possível ação desse composto com as cisteíno proteases da *Leishmania*, pois este também apresenta bons resultados frente a células tumorais.

Sabe-se que os ciclopaladados inibem as cisteíno proteases de parasitas, entretanto os complexos sintetizados neste trabalho foram menos ativos que o composto $[Pd(C^2, N-dmpa)(dppe)]Cl$ capaz de destruir as formas promastigotas *L. amazonensis* em concentrações de IC_{50} de 2,13 nM [58].

O composto **4** apresentou uma melhor atividade citotóxica dentre todos os compostos sintetizados neste trabalho, sendo este o mais promissor da série sintetizada. Sugere-se que o anel aromático da ftu no composto pode aumentar seu caráter apolar e assim o composto poderia atravessar a membrana celular mais facilmente do que os demais compostos. A hidrofobicidade parece ser uma das razões para a maior eficiência deste composto, pois o transporte do ciclopaldado para dentro da célula é influenciado pelo caráter hidrofóbico de uma substância [23].

5. CONCLUSÃO

Cinco novos complexos de paládio(II) foram sintetizados a partir da reação de clivagem entre o dímero precursor $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{C}^2, \text{N-bzox})]_2$ e os ligantes tiocarbonilados, formando assim os compostos $[\text{PdCl}(\text{C}^2, \text{N-bzox})(\text{tu})]$ (**1**), $[\text{PdCl}(\text{C}^2, \text{N-bzox})(\text{dmtu})]$ (**2**), $[\text{PdCl}(\text{C}^2, \text{N-bzox})(\text{mtu})]$ (**3**), $[\text{PdCl}(\text{C}^2, \text{N-bzox})(\text{ftu})]$ (**4**) e $[\text{PdCl}(\text{C}^2, \text{N-bzox})(\text{taa})]$ (**5**).

A caracterização dos respectivos complexos foi feita pela técnica de espectroscopia no infravermelho, sendo possível observar a presença das bandas características do precursor e do ligante. A partir dos dados da espectrometria de massas, observou-se o mesmo padrão de fragmentação para todos os compostos sendo detectadas as espécies $[\text{M-Cl}]^+$ e $[\text{M-L}]^+$ para todos os compostos, sugerindo que todos os compostos apresentam estrutura semelhante.

A ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C confirmou a coordenação dos ligantes via átomo de enxofre, pois estes apresentaram deslocamentos químicos para campo mais alto do $^{13}\text{C}=\text{S}$ quando comparados aos dos ligantes livres. Também foi possível observar por esses espectros que o composto **3** dissocia-se em DMSO. Foram utilizados ainda os experimentos NOESY, HOMODEC, HMQC, HMBC e COSY para auxiliar nas atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos das moléculas.

A estrutura proposta para os complexos pressupõe um ambiente quadrado planar em torno do átomo de paládio.

Os resultados dos ensaios biológicos para a atividade antitumoral indicam que os complexos $[\text{PdCl}(\text{C}^2, \text{N-bzox})(\text{tu})]$, $[\text{PdCl}(\text{C}^2, \text{N-bzox})(\text{dmtu})]$ e $[\text{PdCl}(\text{C}^2, \text{N-bzox})(\text{ftu})]$ são os ativos frente a linhagem testada LM3, adenocarcinoma mamário murino, com citotoxicidade comparável à cisplatina. Nesse teste foi possível observar que as tiouréias foram mais ativas que a tioacetamida.

Para a atividade antileishmanicida, apenas o composto $[\text{PdCl}(\text{C}^2, \text{N-bzox})(\text{ftu})]$ foi mais citotóxico que a droga padrão, Anfotericina B, contra as formas Promastigotas de *Leishmania (L.) amazonenses*, apresentando um IC_{50} de $1,56 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Pelos resultados dos ensaios biológicos pode-se concluir que o composto **4**, $[\text{PdCl}(\text{C}^2, \text{N-bzox})(\text{ftu})]$ foi o mais eficiente dos compostos.

6. REFERÊNCIAS

- 1 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **O que é o câncer?**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 18 jun. 2012.
- 2 OLIVEIRA, P. A.; COLAÇO, A.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; CRUZ, L. F.; LOPES, C. Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 593-616, 2007.
- 3 BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; TEXEIRA, V. R.; CHAMMAS, T. Aspectos moleculares da transformação celular: conceitos e implicações. In: WAITZBERG, D. L. (Ed.). **Dieta, nutrição e câncer**. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap. 6, p. 79-87.
- 4 GOMES-CARNEIRO, M. R.; RIBEIRO-PINTO, L. F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 13, n. 1, p. 27-38, 1997.
- 5 SILVA, R. C. F.; HORTALE, V. A. Cuidados paliativos oncológicos: elementos para o debate de diretrizes nesta área. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 10, p. 2055-2066, 2006.
- 6 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Diretrizes para a vigilância do câncer relacionado ao trabalho**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/diretrizes_cancer_ocupa.pdf>. Acesso em: 05 nov. 2012.
- 7 GUERRERO, G. P.; ZAGO, M. M. F.; SAWADA, N. O.; PINTO, M. H. Relação entre espiritualidade e câncer: perspectiva do paciente. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 64, n. 1, p. 53-59, 2011.
- 8 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=2>>. Acesso em: 30 set. 2012.
- 9 BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia. Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos. Integração de informações dos registros de câncer brasileiros. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 5, p. 865-868, 2007.
- 10 ROCHA, F. V. **Estudo da atividade biológica de compostos de paládio(II)**. 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

- 11 COHEN, S. M.; LIPPARD, S. J. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 67, p. 93-130, 2001.
- 12 FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p. 13-18, 2005.
- 13 NEVES, A. P.; VARGAS, M. P. Complexos de platina(II) na terapia do câncer. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, p. 196-209, 2011.
- 14 KELLAND, L. R. Cisplatin based anti-cancer agents. In: FARREL, N. P. (Ed.). **Uses of inorganic chemistry in medicine**. Richmond: Royal Society of Chemistry, 1999. Cap. 7, p. 109-123.
- 15 RUIZ, J.; CUTILLAS, N.; VICENTE, C.; VILLA, M. D.; LÓPEZ, G.; LORENZO, J.; AVILÉS, F. X.; MORENO, V.; BAUTISTA, D. New palladium (II) and platinum (II) complexes with the model nucleobases 1-methylcystosine: antitumor activity and interactions with DNA. **Inorganic Chemistry**, v. 44, n. 21, p. 7365-7376, 2005.
- 16 KEPLER, B. K. **Metal complexes in cancer chemotherapy**. New York: Wiley-VCH, 1993. 434 p.
- 17 QUIROGA, A. G.; PERÉZ, J. M.; MONTERO, E. L.; MASAQUER, J. R.; ALONSO, C.; NAVARRO-RANNINGER, C. Palladated and platinated complexes derived from phenylacetaldehyde thiosemicarbazone with cytotoxic activity in cis-DDP resistant tumor cells. Formation of DNA interstrand cross-links by these complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 117-123, 1998.
- 18 WIMMER, F. L.; WIMMER, S.; CASTAN, P.; CROS, S.; JOHNSON, N.; COLACIO-RODRIGUEZ, E. The antitumor activity of some palladium(II) complexes with chelating ligands. **Anticancer Research**, v. 9, n. 3, p. 791-793, 1989.
- 19 ZHAO, G.; LIN, H.; ZHU, S.; SUN, H.; CHEN, Y. Dinuclear palladium (II) complexes containing two monofunctional $[Pd(en)(pyridine)Cl]^+$ units bridged by Se or S. Synthesis, characterization, cytotoxicity and kinetic studies of DNA-binding. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 70, n. 3/4, p. 219-226, 1998.
- 20 DAS, M.; LIVINGSTONE, S. E. Cytotoxic action of some transition metal chelates of schiff bases derived from s-methyldithiocarbazate. **Brazilian Journal of Cancer**, v. 37, n. 3, p. 466-469, 1978.
- 21 DEHAND, J.; PFEFFER, M. Cyclometallated compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 18, n. 3, p. 327-352, 1976.
- 22 CAIRES, A. C. F.; MAURO, A. E. Compostos ciclometalados de coordenação intramolecular. **Química Nova**, v. 19, n. 1, p. 59-72, 1996.

- 23 DUPONT, J.; PFEFFER, M. **Palladacycles**: synthesis, characterization and applications. New York: WILEY-VCH, 2008. 431 p.
- 24 NEWKOME, G. R. Antitumor agents. Synthesis of novel cis-palladium complexes and their action on supercoiled DNA. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 102, n. 13, p. 4551-4552, 1980.
- 25 RODRIGUES, E. G.; SILVA, L. S.; FAUSTO, D. M.; HAYASHI, M. S.; DREHER, S.; SANTOS, E. L.; PESQUERO, J. B.; TRAVASSOS, L. R.; CAIRES, A. C. F. Cyclopalladated compounds as chemotherapeutic agents: antitumor activity against a murine melanoma cell line. **International Journal of Cancer**, v. 107, n. 3, p. 498-504, 2003.
- 26 CAIRES, A. C. F.; ALMEIDA, E. T.; MAURO, A. E.; HEMERLY, J. P.; VALENTINI, S. R. Síntese e atividade citotóxica de alguns azido-ciclopalladados estabilizados com ligantes bifosfínicos. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 329-334, 1999.
- 27 ARANTES, F. C. C.; MORO, A. C.; KLEIN, I. S.; SILVA, C.; GODOY NETTO, A. V.; MAURO, A. E.; NOGUEIRA, V. M. Thermal study of mononuclear Pd(II) complexes of the type $[Pd(X)_2(Rtu)(PPh_3)]$ ($X = Cl, SCN$; $Rtu = N$ -methylthiourea, N -phenylthiourea). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, n. 2, p. 379-383, 2010.
- 28 SELVAKUMARAN, N.; NG, S. W.; TIEKINK, E. R. T.; KARVEMBU, R. Versatile coordination behavior of N,N -di(alkyl/aryl)- N' -benzoylthiourea ligands: synthesis, crystal structure and cytotoxicity of palladium(II) complexes. **Inorganic Chimica Acta**, v. 376, n. 1, p. 278-284, 2011.
- 29 NADEEM, S.; RAUF, M. K.; AHMAD, S.; EDIHARA, M.; TIRMIZI, A.; BASHIR, S. A.; BADSHAH, A. Synthesis and characterization of palladium (II) complexes of thioureas. X-ray structures of $[Pd(N,N'$ -dimethylthiourea) $_4]Cl_2 \cdot 2H_2O$ and $[Pd(tetramethylthiourea)_4]Cl_2$. **Transition Metal Chemistry**, v. 34, n. 2, p. 197-202, 2009.
- 30 MORO, A. C.; MAURO, A. E.; GODOY NETTO, A. V.; ANANIAS, S. R.; QUILLES, M. B.; CARLOS, I. Z.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; HÖRNER, M. Antitumor and antimycobacterial activities of cyclopalladated complexes: X-ray structure of $[Pd(C^2,N$ -dmba)(Br)(tu)] (dmba = N,N -dimethylbenzylamine, tu = thiourea). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 4611-4615, 2009.
- 31 TRZESNIAK, D. **Modelagem quântica de inibidores enzimáticos**. 2002. 89 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- 32 VARGAS, P. A. O. **Genes de cisteíno proteases (catepsina L-like) de trypanosoma rangeli**: polimorfismo, relações filogenéticas e alvos para diagnóstico e genotipagem. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

- 33 DUARTE, S. M. **Produção recombinante e caracterização de uma cisteíno protease (tipo catepsina B) de cana-de-açúcar**. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- 34 YUAN, J.; SHAHAM, S.; LEDOUX, S.; ELLIS, H. M.; HORVITZ, H. R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. **Cell**, v. 75, n. 4, p. 641-652, 1993.
- 35 SCHLERETH, A.; STANDHARDT, D.; MOCK, H. P.; MÜNTZ, K. Stored cysteine proteinases start globulin mobilization in protein bodies of embryonic axes and cotyledons during vetch. (*Vicia sativa* L.) seed germination. **Planta**, v. 212, n. 5/6, p. 718-727, 2001.
- 36 CUNHA, R. L. O. R.; URANO, M. E.; CHAGAS, J. R.; ALMEIDA, P. C.; BINCOLETTO, C.; TERSARIOL, I. L. S.; COMASSETO, J. V. Tellurium-based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium(IV) compounds as inhibitors of human cathepsin B. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 3, p. 755-760, 2005.
- 37 GUNATILLEKE, S. S.; BARRIOS, A. M. Inhibition of lysosomal cysteine proteases by a series of Au(I) complexes: a detailed mechanistic investigation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 13, p. 3933-3937, 2006.
- 38 BINCOLETTO, C.; TERSARIOL, I. L. S.; OLIVEIRA, C. R.; DREHER, S.; FAUSTO, D. M.; SOUFEN, M. A.; NASCIMENTO, F. D.; CAIRES, A. C. F. Chiral cyclopalladated complexes derived from *N,N*-dimethyl-1-phenethylamine with bridging bis(diphenylphosphine)ferrocene ligand as inhibitors of the cathepsin B activity and as antitumoral agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 3047-3055, 2005.
- 39 SPENCER, J.; RATHNAM, R. P.; MOTUKURI, M.; KOTHA, A. K.; RICHARDSON, S. C. W.; HAZRATI, A.; HARTLEY, J. A.; MALE, L.; HURSTHOUSE, M. B. Synthesis of a 1,4-benzodiazepine containing palladacycle with in vitro anticancer and cathepsin B activity. **Dalton Transactions**, n. 22, p. 4299-4303, 2009.
- 40 CATORZE, M. G. B. Leishmaniose e SIDA. **Medicina Cutânea Ibero-Latino Americana**, v. 33, n. 6, p. 237-250, 2005.
- 41 RODRIGUES, A. C. E. **Características epidemiológicas e distribuição espacial da enzootia canina de leishmaniose visceral na cidade de Teresina - Piauí, no período de 2003 - 2006**. 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Teresina, 2008.

42 MORENO, J.; CAÑAVATE, C.; CHAMIZO, C.; LAQUINA, F.; ALVAR, J. HIV-*Leishmania infantum* co-infection: humoral and cellular immune responses to the parasite after chemotherapy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 328-332, 2000.

43 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2013.

44 EL-FADILI, A. K.; ZANGGER, H.; DESPONDS, C.; GONZALEZ, I. J.; ZALILA, H.; SCHAFF, C.; IVES, A.; MASINA, S.; MOTTRAM, J. C.; FASEL, N. Cathepsin B-like and cell death in the unicellular human pathogen *Leishmania*. **Cell Death and Disease**, v. 1, n. 9, p. 1-9, 2010.

45 CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, n. 2, p. 132-141, 2002.

46 PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008.

47 UNITED STATES OF AMERICA. Division of Parasitic Diseases and Malaria. *Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern*. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

48 MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. R. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil - emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Caderno de Saúde Pública**, v. 10, n. 2, p. 359-375, 1994.

49 COVAS, C. J. F.; CARDOSO, C. C.; GOMES-SILVA, A.; SANTOS, J. R. O.; CRUZ, A. M.; MORAES, M. O. Candidate gene case-control and functional study shows macrophage inhibitory factor (MIF) polymorphism is associated with cutaneous leishmaniasis. **Cytokine**, v. 61, n. 1, p. 168-172, 2012.

50 DINIZ, L. M. O.; DUANI, H.; FREITAS, C. R.; FIGUEIREDO, R. M.; XAVIER, C. C. Neurological involvement in visceral leishmaniasis: case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 743-745, 2010.

51 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose visceral**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_lv.pdf>. Acesso em: 06 dez. 2012.

- 52 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**: worldwide epidemiological and drug access update. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_worldwide_epidemiological_and_drug_access_update.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2012.
- 53 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Brazil**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/resources/BRAZIL.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2012.
- 54 DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F. Novas embalagens para medicamentos à base de antimônio usados no tratamento de leishmaniose e esquistossomose. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p. 24-30, 2005.
- 55 FRANCO, L. P.; GÓIS, E. P.; CODONHO, B. S.; PAVAN, A. L. R.; PEREIRA, I. O.; MARQUES, M. J.; ALMEIDA, E. T. Palladium (II) imine ligands cyclometallated complexes with a potential leishmanicidal activity on *Leishmania (L.) amazonensis*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 3, p. 1049-1056, 2013.
- 56 HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.
- 57 LECAILLE, F.; KALETA, J.; BROMME, D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4459-4488, 2002.
- 58 PALADI, C. S.; PIMENTEL, I. A. S.; KATZ, S.; CUNHA, R. L. O. R.; JUDICE, W. A. S.; CAIRES, A. C. F. BARBIÉRI, C. L. *In vitro* and *in vivo* activity of palladacycle complexes on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, p. 1-7, 2012.
- 59 COPE, A. C.; FRIEDRICH, E. C. Eletrophilic aromatic substitution reactions by platinum (II) and palladium (II) chlorides on *N,N*-dimethylbenzilamines. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 90, n. 4, p. 909-913, 1968.
- 60 SELVAKUMAR, K.; VANCHEESAN, S.; VARGHESE, B. Synthesis and characterization of cyclopalladated complexes of oxime by ligand-exchange method. **Polyhedron**, v. 16, n. 13, p. 2257-2262, 1997.
- 61 SOUZA, R. A.; STEVANATO, A.; TREU FILHO, O.; GODOY NETTO, A. V.; MAURO, A. E.; CASTELLANO, E. E.; CARLOS, I. Z.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F. Antimycobacterial and antitumor activities of palladium(II) complexes containing isonicotinamide (isn): X-ray structure of trans-[Pd(N₃)₂(isn)₂]. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 4863-4868, 2010.

- 62 MOSSMAN, T. J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1/2, p. 55-63, 1983.
- 63 CARLOS, I. Z.; CARLI, C. B. A.; MAIA, D. C. G.; BENZATTI, F. P.; LOPES, F. C. M.; ROESE, F. M.; WATANABE, M.; MICHELETTI, A. C.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; HONDA, N. K. Efeito imunoestimulante de compostos fenólicos de liquens na produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 847-852, 2009.
- 64 PEREIRA, I. O.; MARQUES, M. J.; PAVAN, A. L. R.; CODONHO, B. S.; BARBIÉRI, C. L.; BEIJO, L. A.; DORIGUETTO, A. C.; D'MARTIN, E. C.; SANTOS, M. H. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 339-345, 2010.
- 65 GRIGOR, B. A.; NIELSON, A. J. Cyclopalladation of vinylic oximes. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 439-443, 1977.
- 66 MALIK, M. R.; VASYLYEVA, V.; MERZ, K.; METZLER-NOLTE, N.; SALEEM, M.; ALI, S.; ISAB, A. A.; MUNAWAR, K. S.; AHMAD, S. Synthesis, crystal structures, antimicrobial properties and enzyme inhibition studies of zinc(II) complexes of thiones. **Inorganica Chimica Acta**, v. 376, n. 1, p. 207-211, 2011.
- 67 NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds**. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. 400 p.
- 68 NEMCSOK, D.; KOVÁCS, A.; SZÉCSÉNYI, K. M.; LEOVAC, V. M. Vibrational spectroscopic and theoretical study of 3,5-dimethyl-1-thiocarboxamide pyrazole (L) and the complexes $\text{Co}_2\text{L}_2\text{Cl}_4$, $\text{Cu}_2\text{L}_2\text{Cl}_4$ and $\text{Cu}_2\text{L}_2\text{Br}_2$. **Chemical Physics**, v. 328, n. 1/3, p. 85-92, 2006.
- 69 GOSAVI, R. K.; RAO, C. N. R. Infrared absorption spectra of metal complexes of alkylthioureas and some related ligands. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, v. 29, n. 8, p. 1937-1945, 1967.
- 70 MIDO, Y.; KITAGAWA, I.; HASHIMOTO, M.; MATSUURA, H. Vibrational spectra and normal coordinate analysis of *N*-methylthiourea and three deuterated analogues. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 55, n. 13, p. 2623-2633, 1999.
- 71 BADAWI, H. M. Structural stability, C-N internal rotations and vibrational spectral analysis of non-planar phenylurea and phenylthiourea. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 72, n. 3, p. 523-527, 2009.

72 BACH, S. B. H.; SEPEDA, T. G.; MERRILL, G. N.; WALMSLEY, J. A. Complexes of dibromo(ethylenediamine)-palladium(II) observed from aqueous solutions by electrospray mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, n. 9, p. 1461-1469, 2005.

73 ARANTES, F. C. C. **Síntese, caracterização e investigação da atividade biológica de complexos de cobre e paládio contendo ligantes N,S doadores**. 2009. 97 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

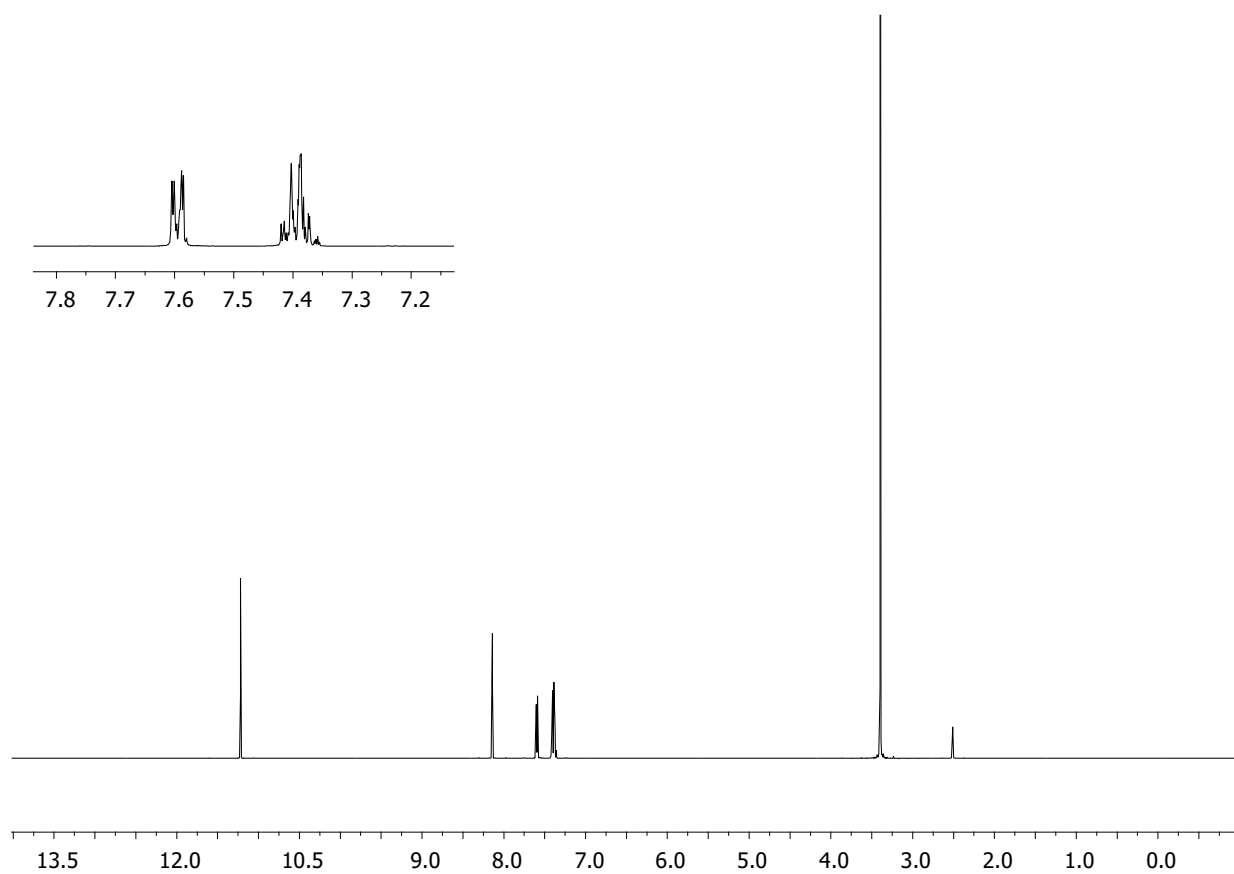
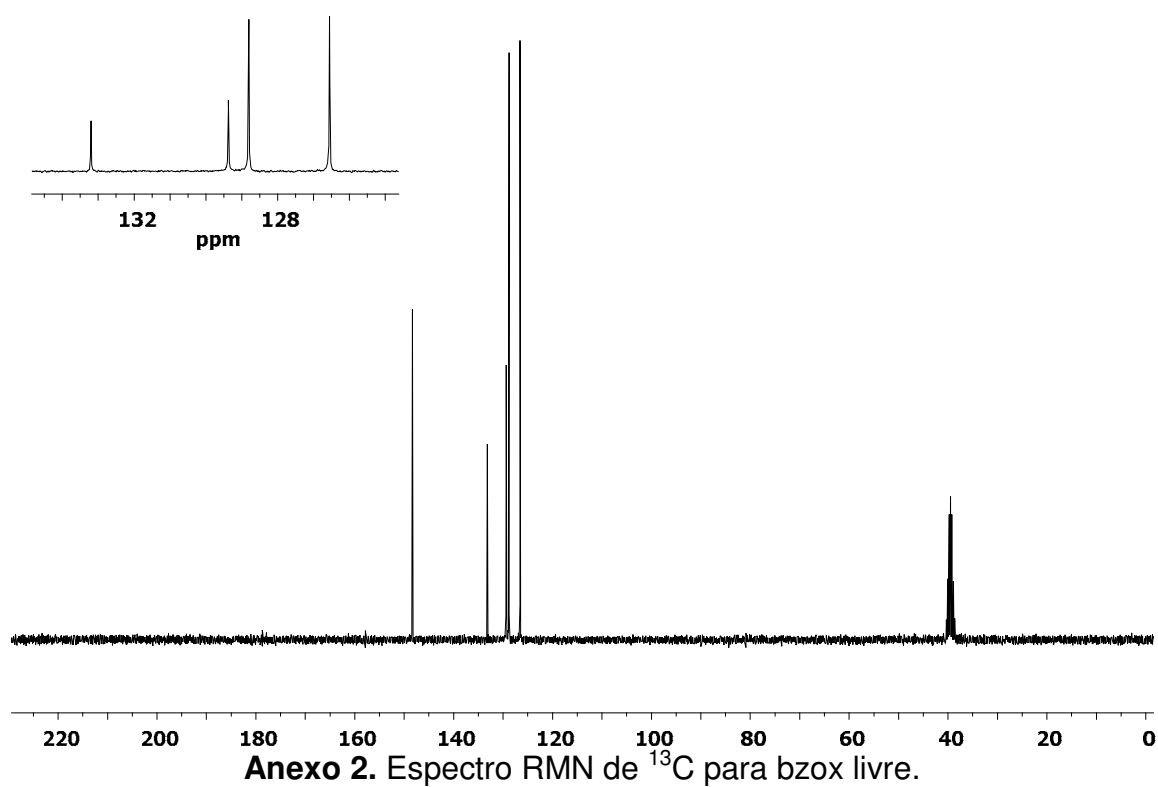
74 KABOUDIN, B.; MALEKZADEH, L. Ammonium phosphorodithioate: a mild, easily handled, efficient, and air-stable reagent for the conversion of amides into thioamides. **Synlett**, v. 2011, n. 19, p. 2807-2810, 2011.

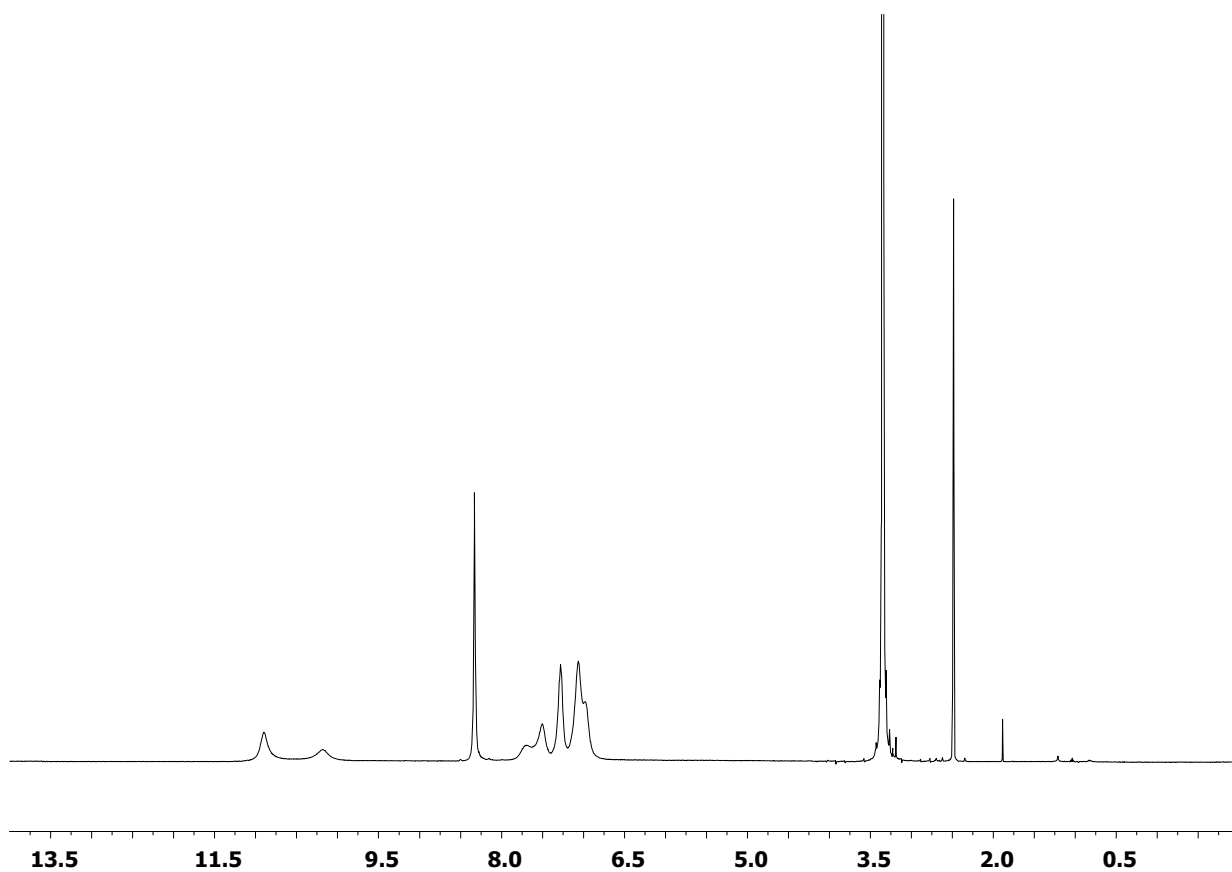
75 LEMOS, S. C. **Compostos de paládio (II): síntese, caracterização e investigação da atividade antitumoral**. 2012. 144 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

76 BARBOSA, C. M. V.; OLIVEIRA, C. R.; NASCIMENTO, F. D.; SMITH, M. C. M.; FAUSTO, D.; SOUFEN, M. A.; SENA, E.; ARAÚJO, R. C.; TERSARIOL, I. L. S.; BINCOLETTO, C.; CAIRES, A. C. F. Biphosphinic palladacycle complex mediates lysosomal membrane permeabilization and cell death in K562 leukemia cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 542, n. 1/3, p. 37-47, 2006.

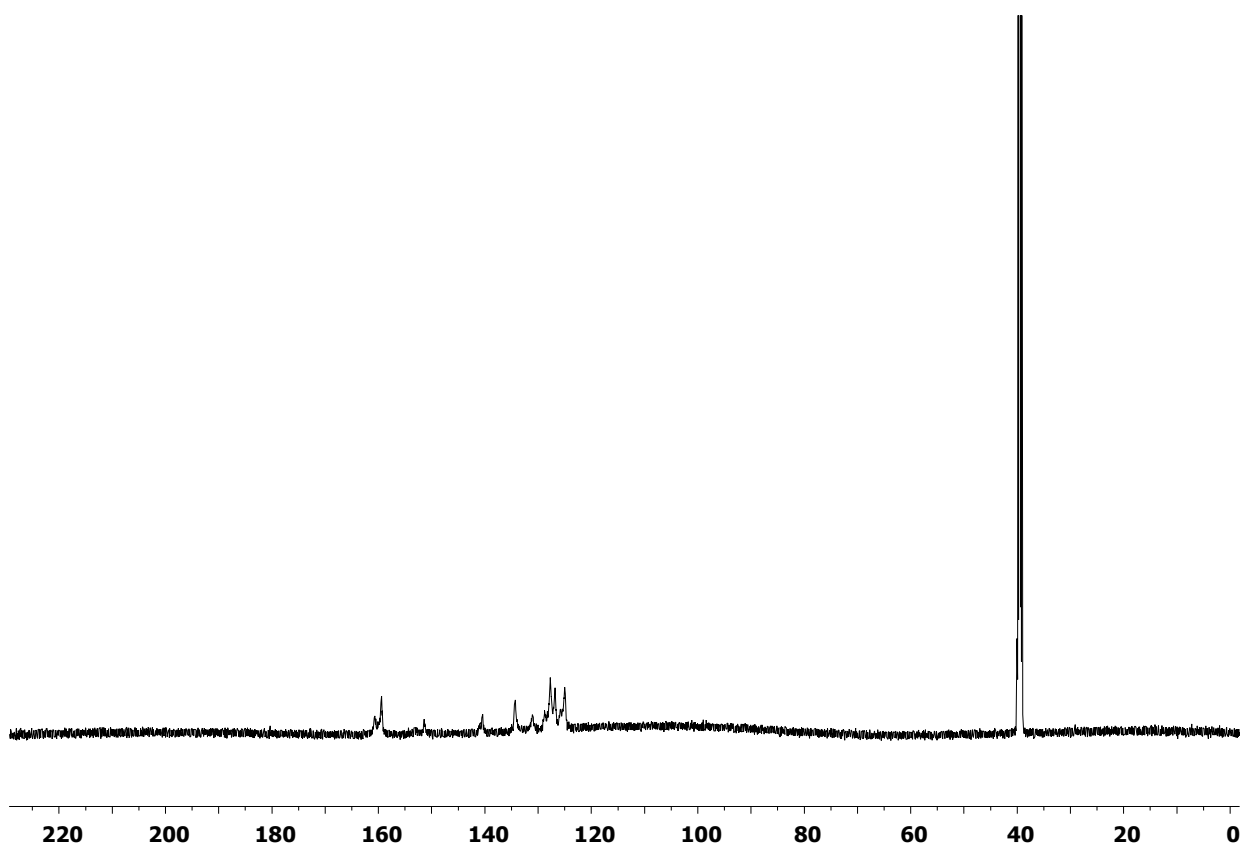
77 SERRANO, F. A.; MATSUO, A. L.; MONTEFORTE, P. T.; BECHARA, A.; SMAILI, S. S.; SANTANA, D. P.; RODRIGUES, T.; PEREIRA, F. V.; SILVA, L. S., MACHADO, J.; SANTOS, E. L.; PESQUERO, J. B.; MARTINS, R. M.; TRAVASSOS, L. R.; CAIRES, A. C. F.; RODRIGUES, E. G. A cyclopalladated complex interacts with mitochondrial membrane thiol-groups and induces the apoptotic intrinsic pathway in murine and cisplatin-resistant human tumor cells. **BMC Cancer**, v. 11, p. 296-301, 2011.

ANEXOS

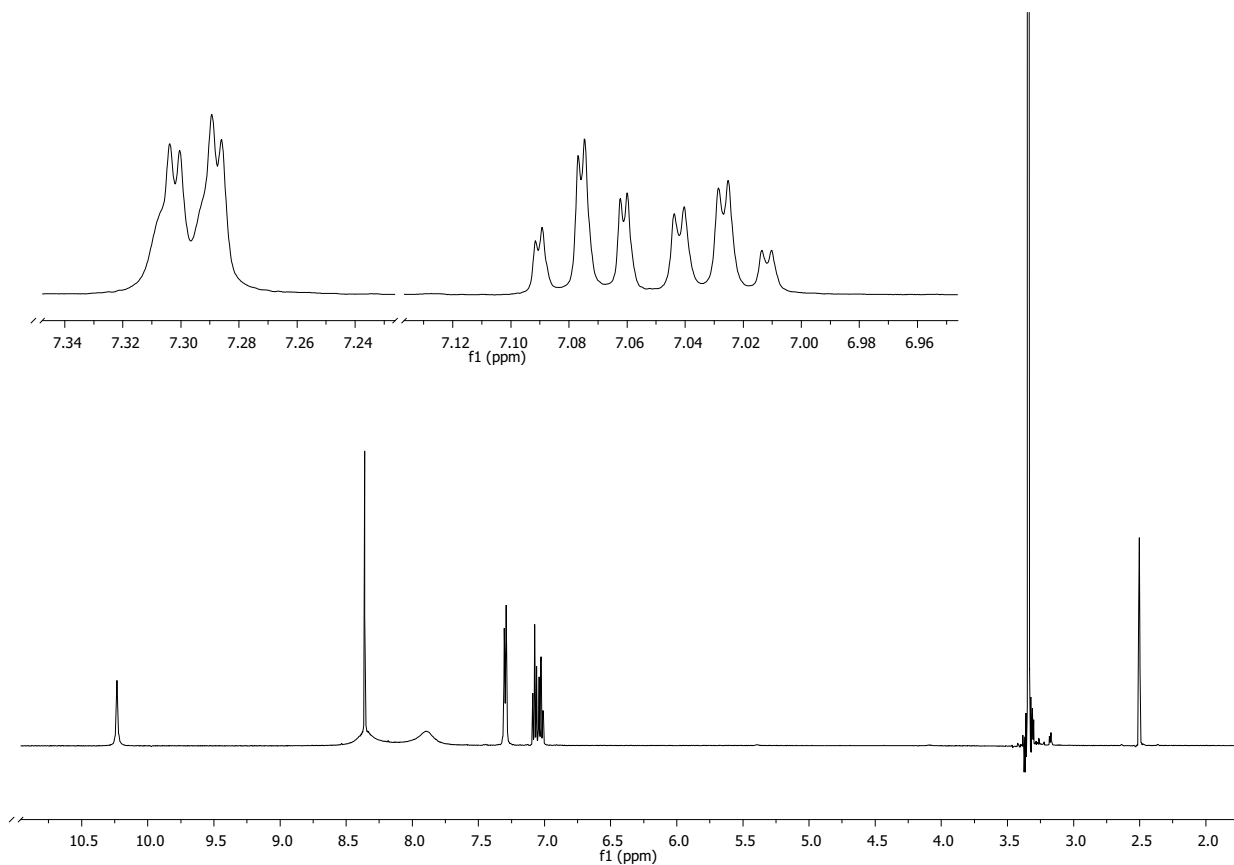
**Anexo 1.** Espectro RMN de ^1H para bzoX livre.



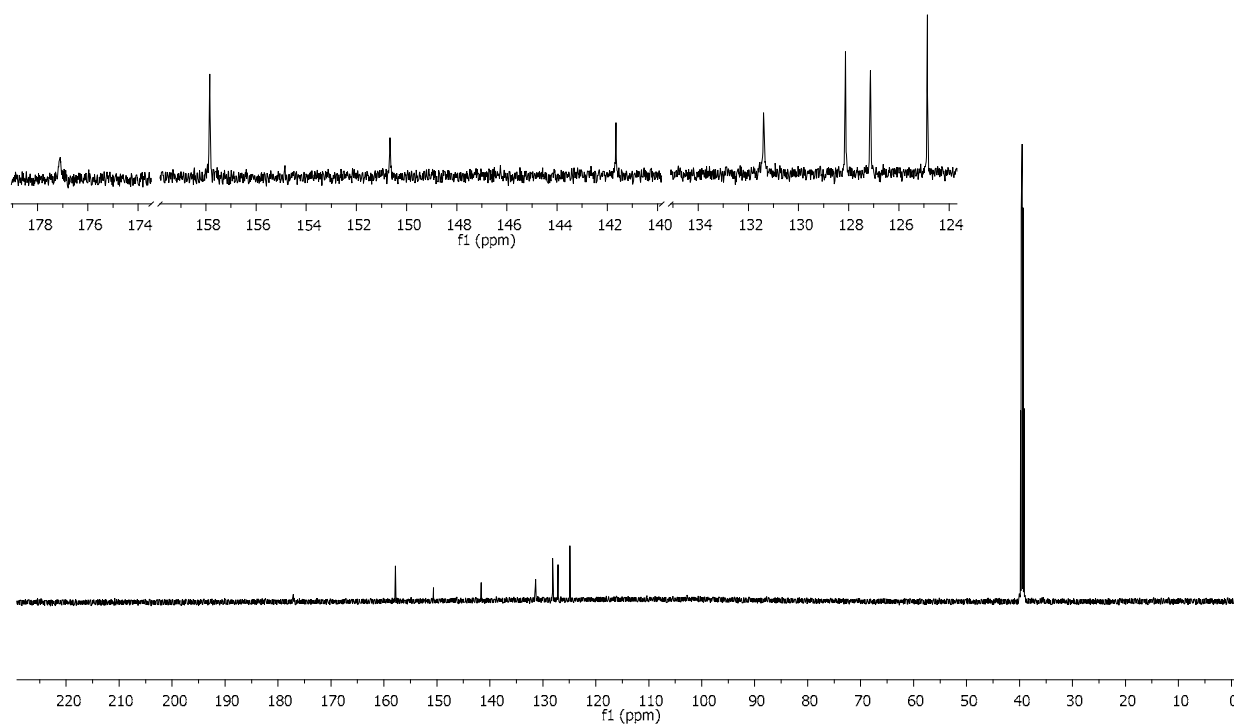
Anexo 3. Espectro de RMN de ^1H para $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{C}^2, \text{N}\text{-bzox})]_2$.



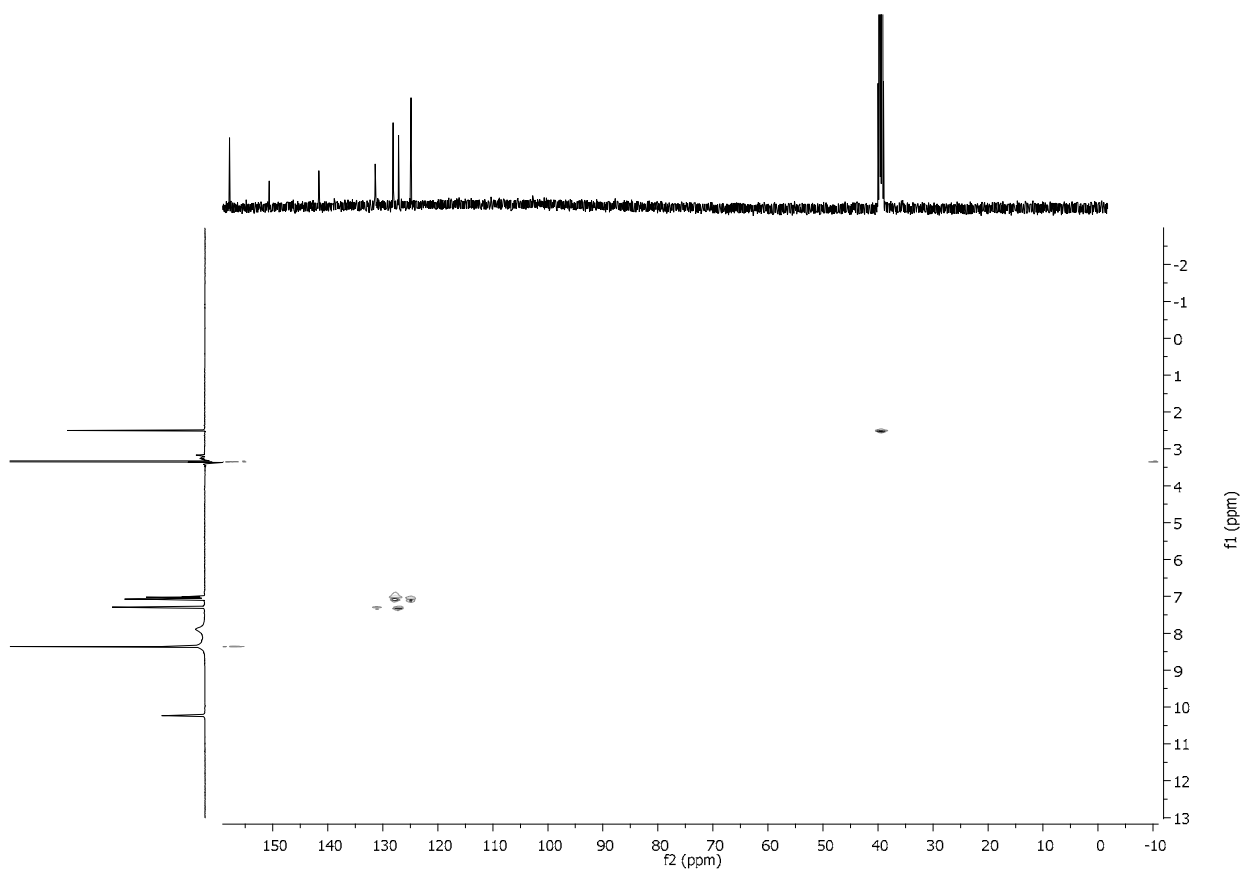
Anexo 4. Espectro de RMN de ^{13}C para $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{C}^2, \text{N}\text{-bzox})]_2$.



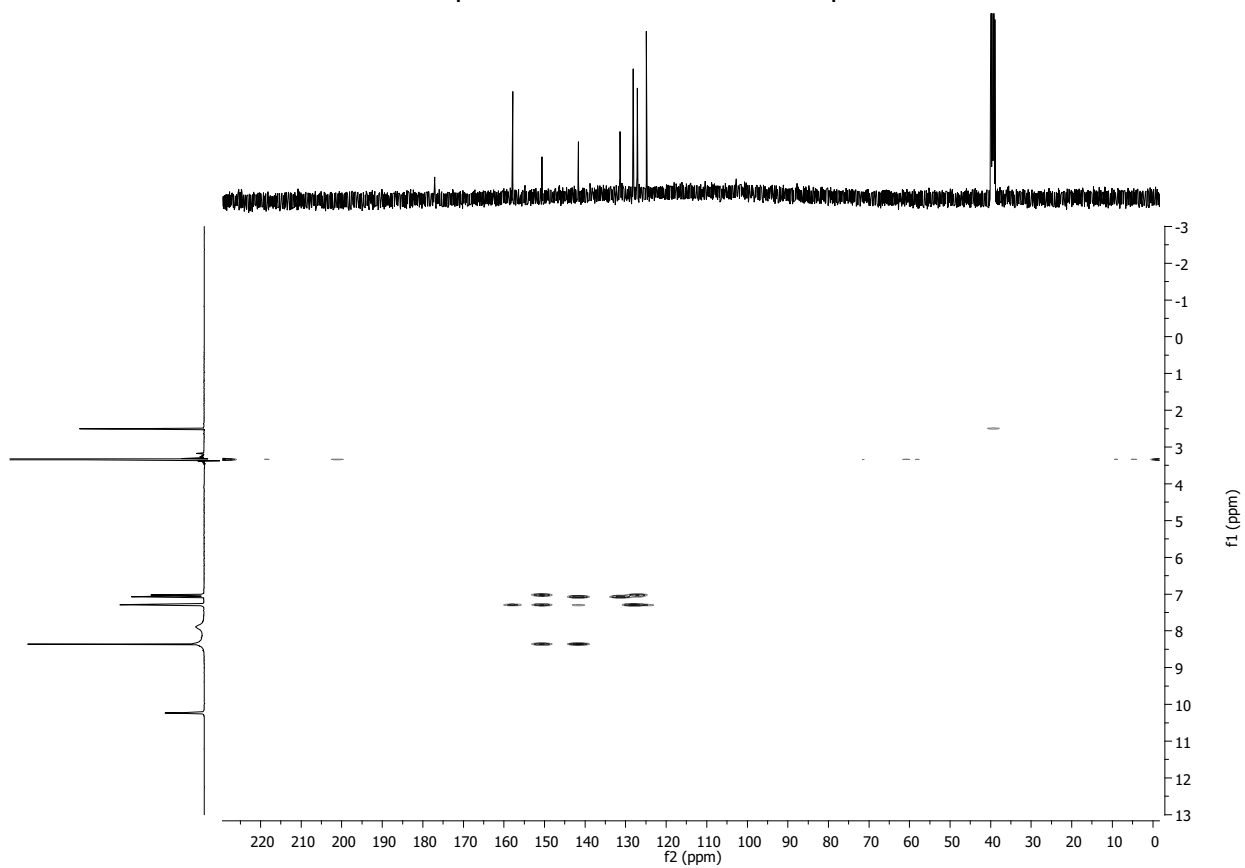
Anexo 5. Espectro de RMN de ^1H para 1.



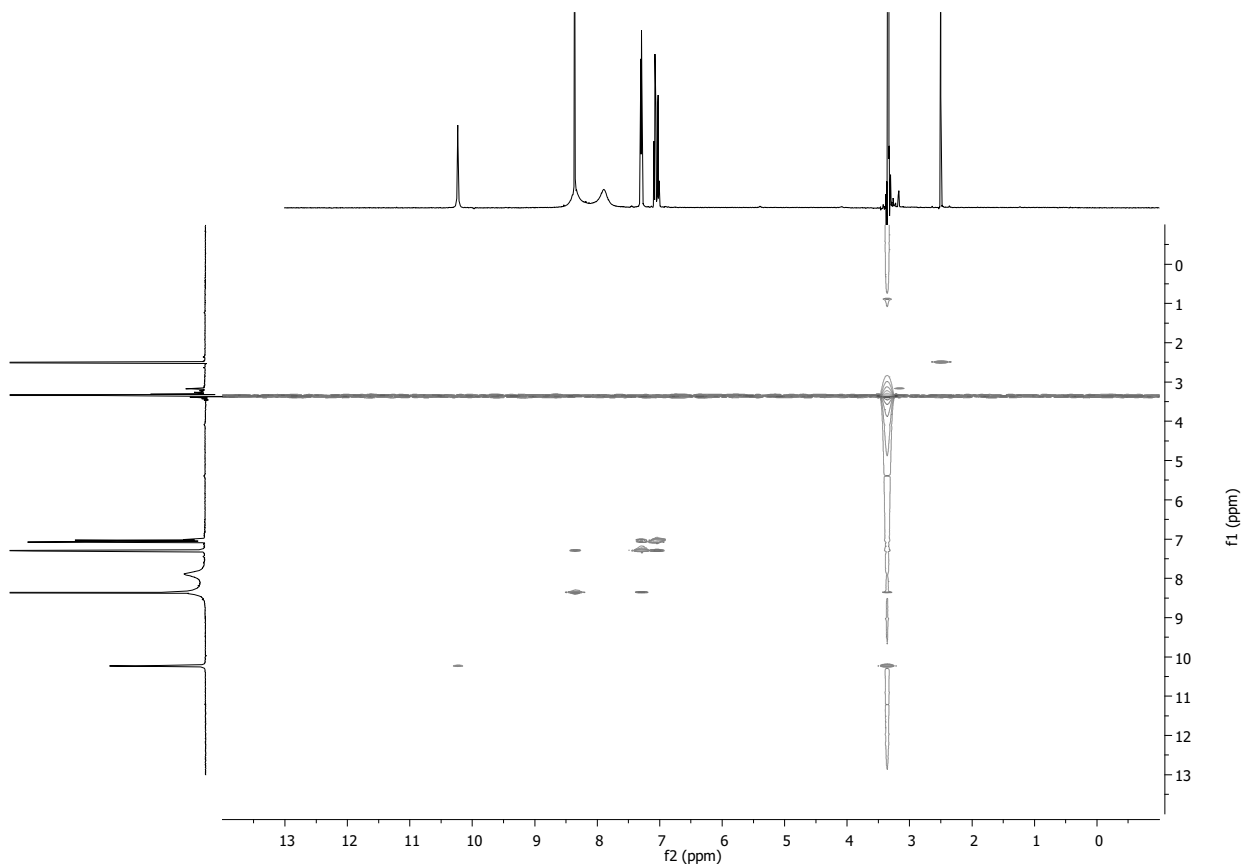
Anexo 6. Espectro de RMN de ^{13}C para 1.



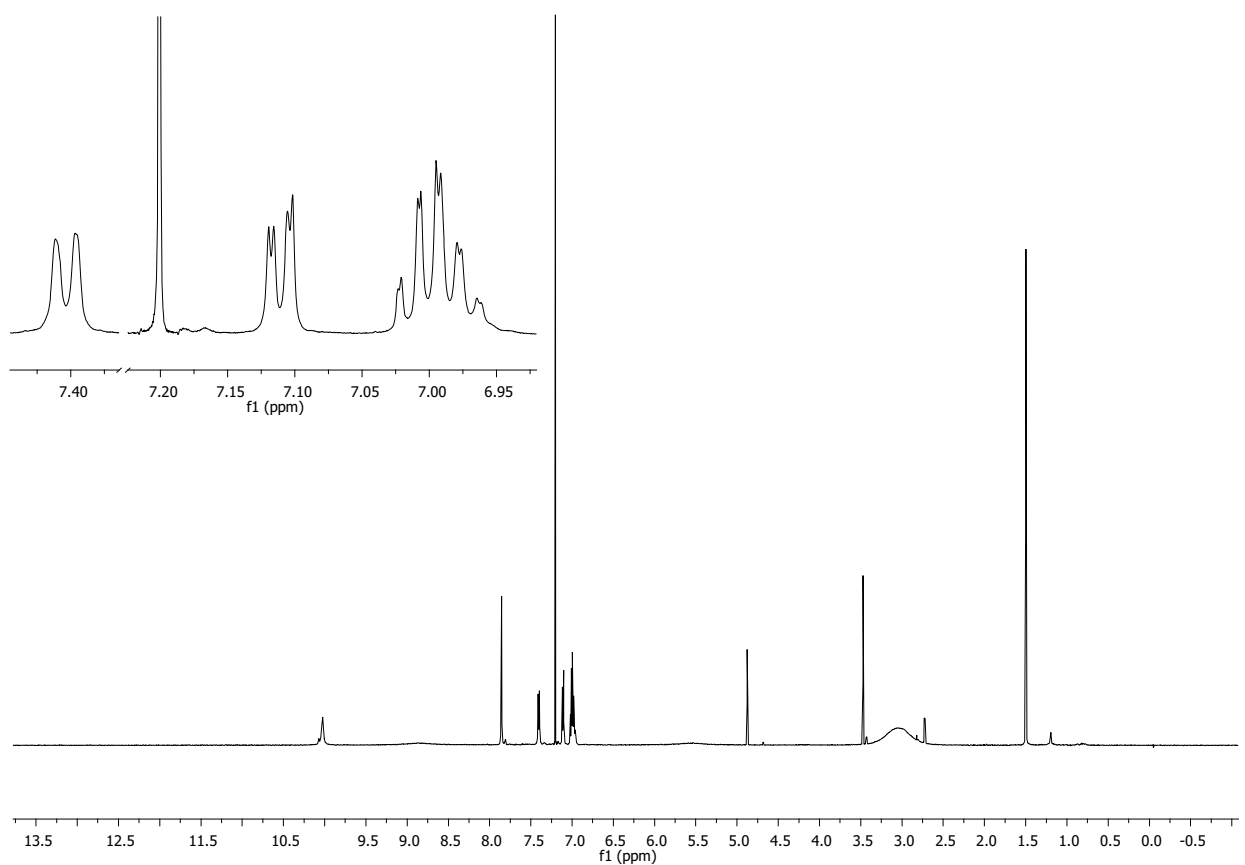
Anexo 7. Espectro de RMN de HMQC para 1.



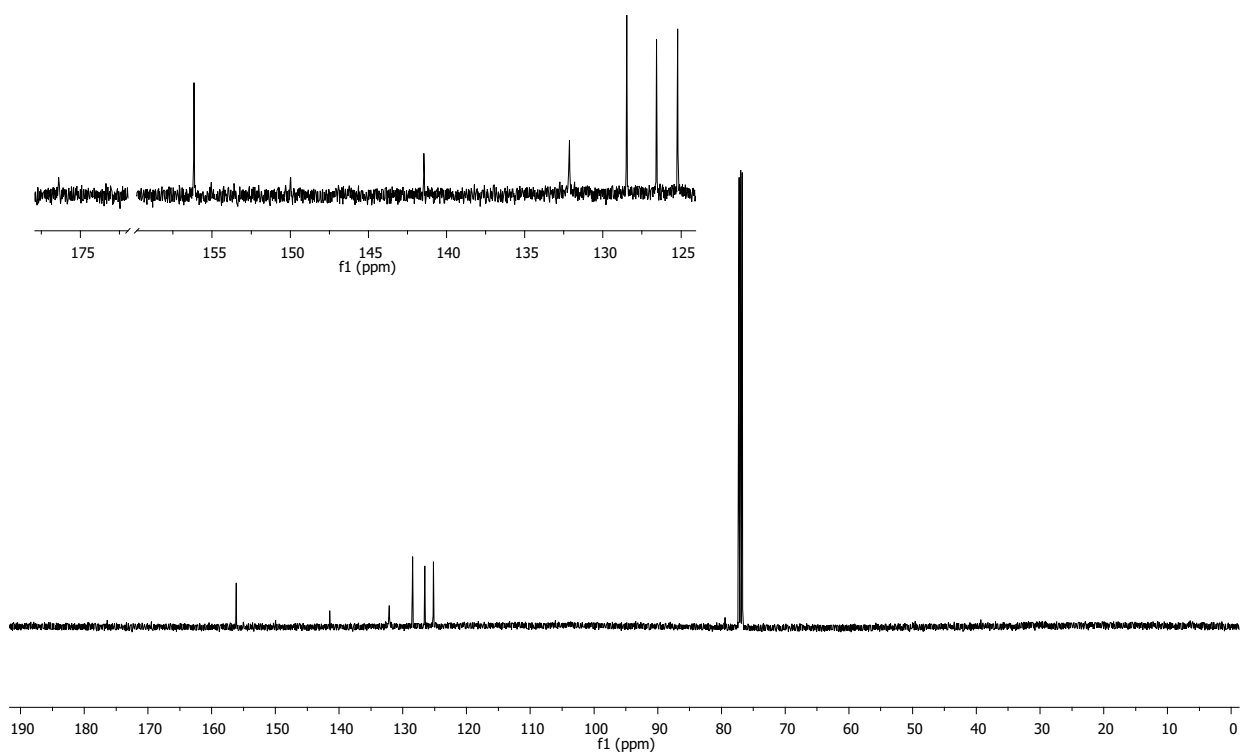
Anexo 8. Espectro de RMN de HMBC para 1.



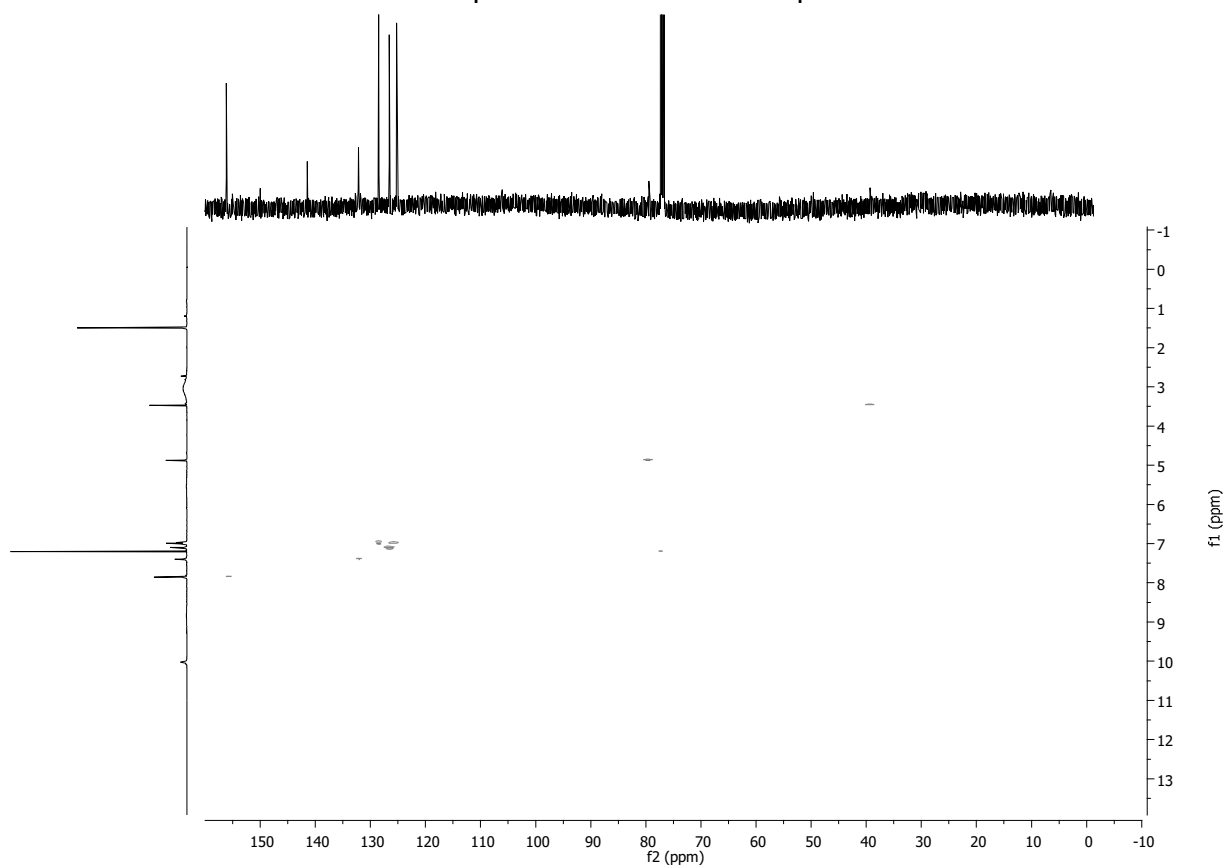
Anexo 9. Espectro de RMN de NOESY 1D para 1.



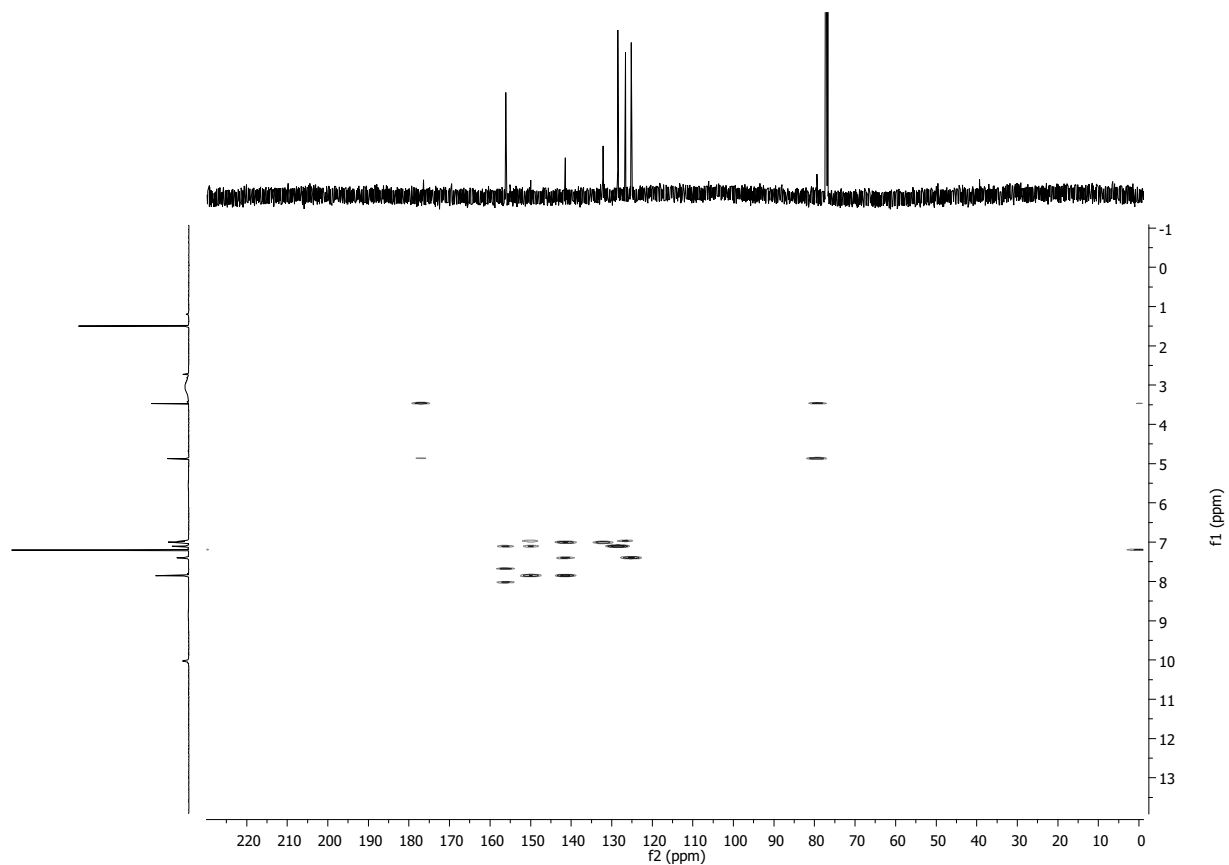
Anexo 10. Espectro de RMN de ^1H para 2.



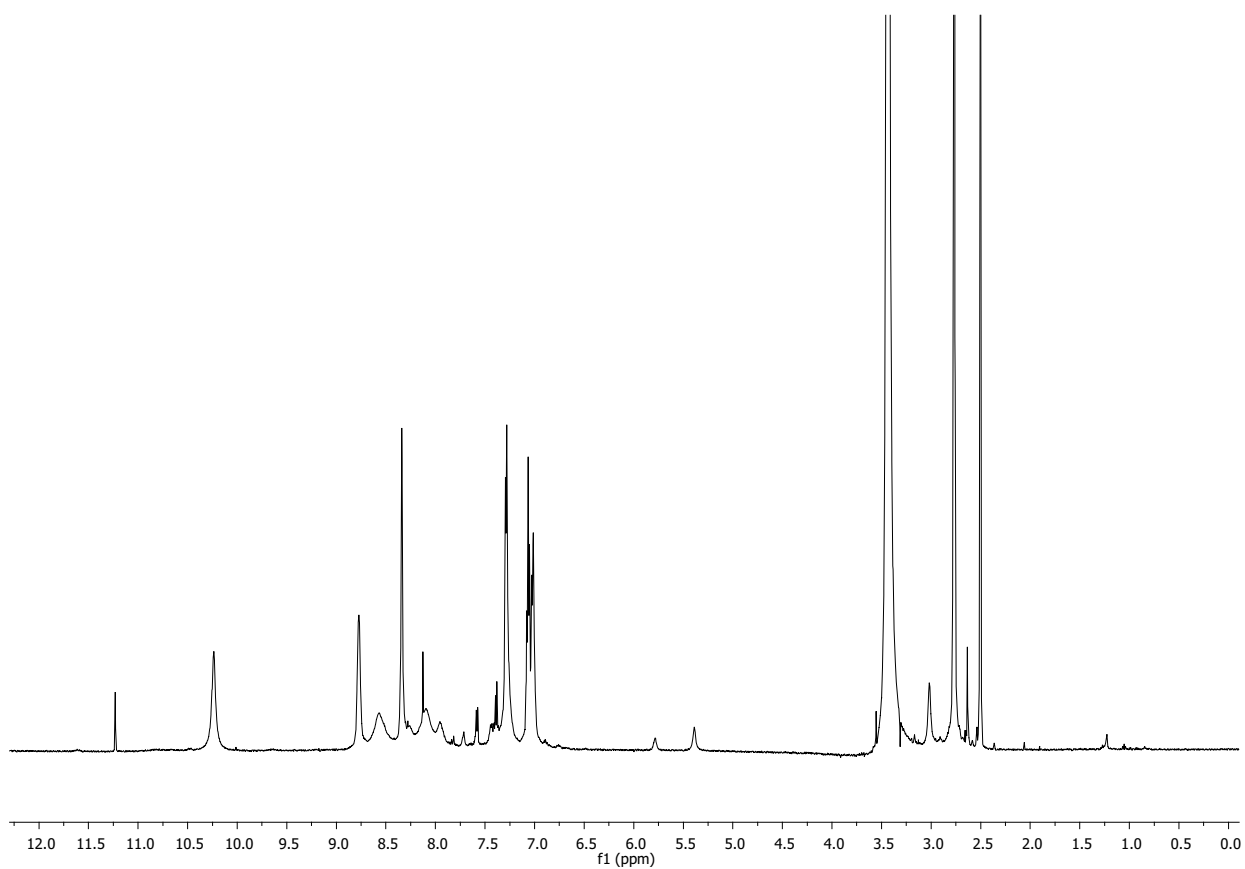
Anexo 11. Espectro de RMN de ^{13}C para 2.



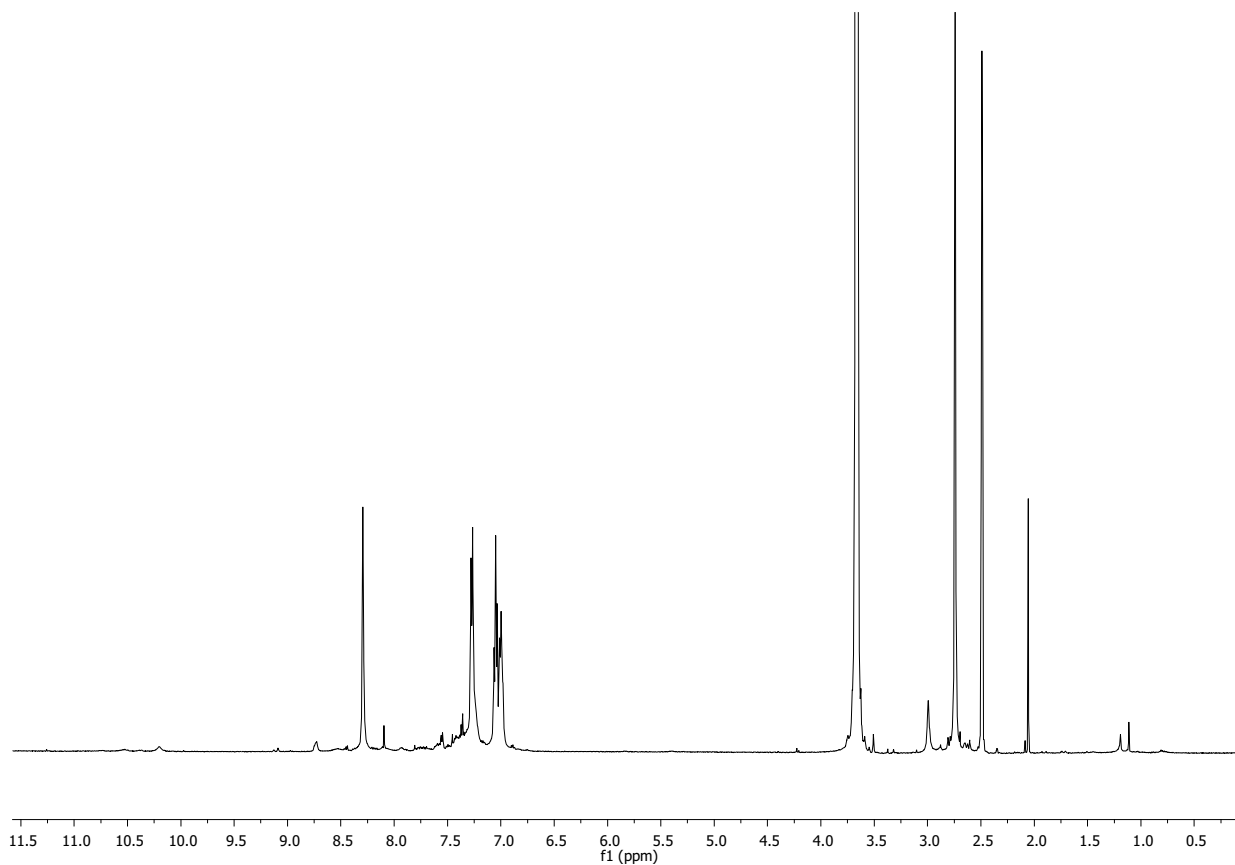
Anexo 12. Espectro de RMN de HMQC para 2.



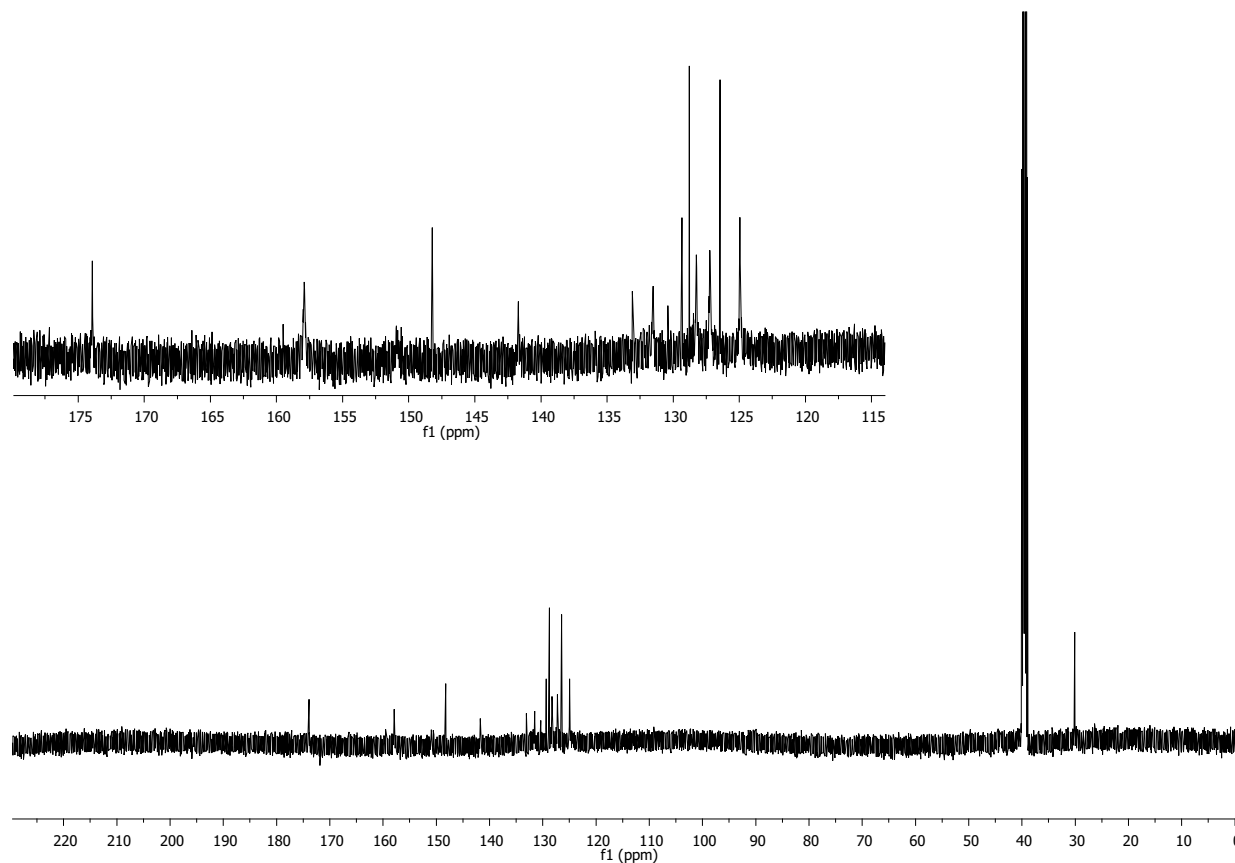
Anexo 13. Espectro de RMN de HMBC para 2.



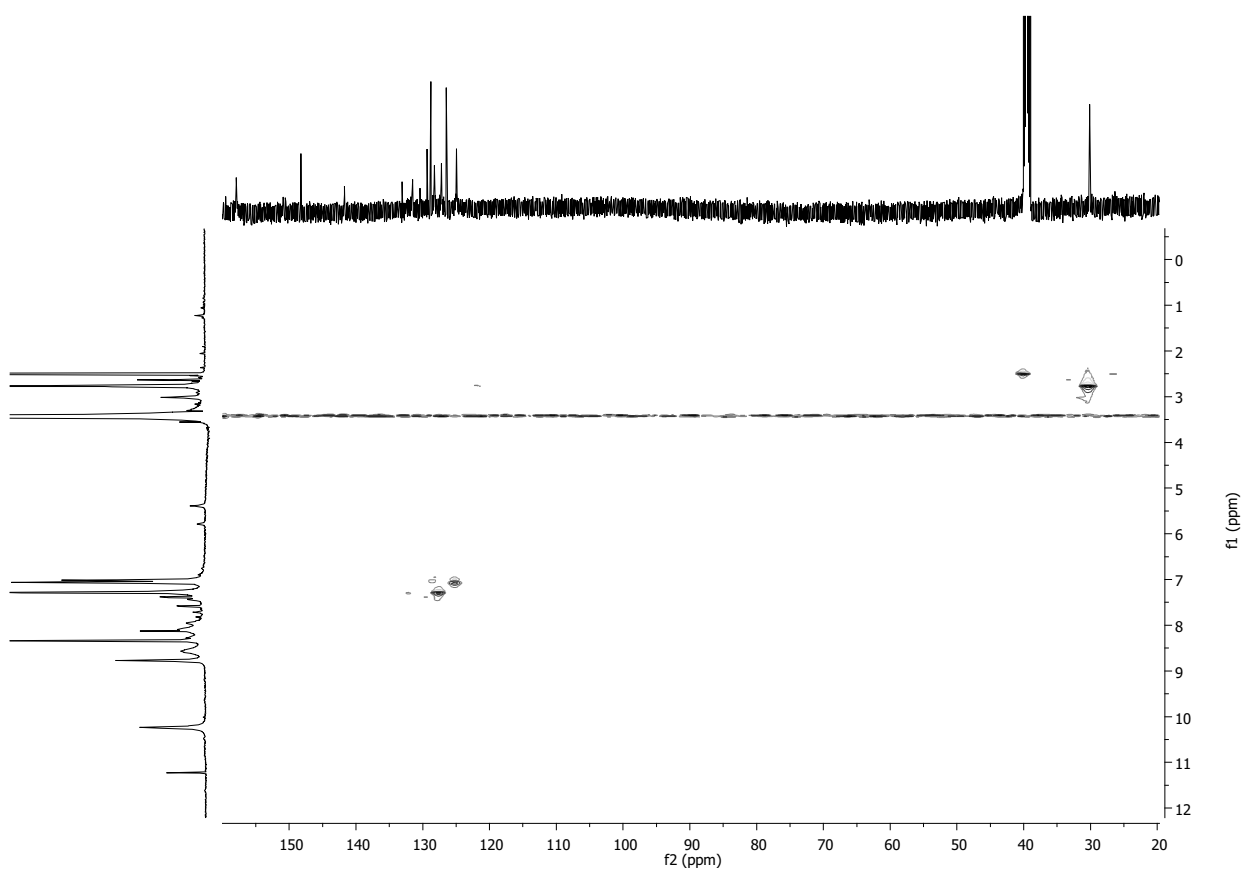
Anexo 14A. Espectro de RMN de ^1H para 3.



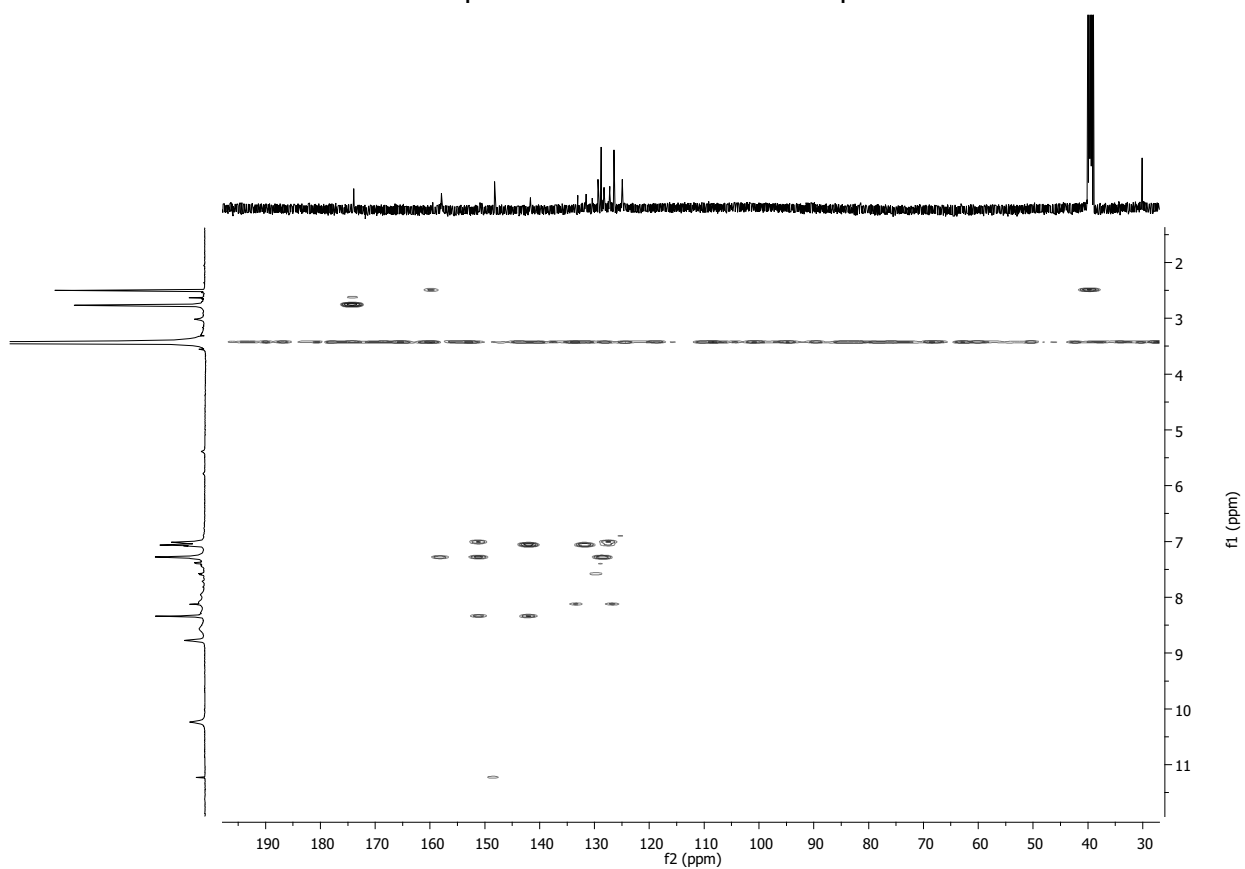
Anexo 14B. espectro de RMN de ^1H para 3.



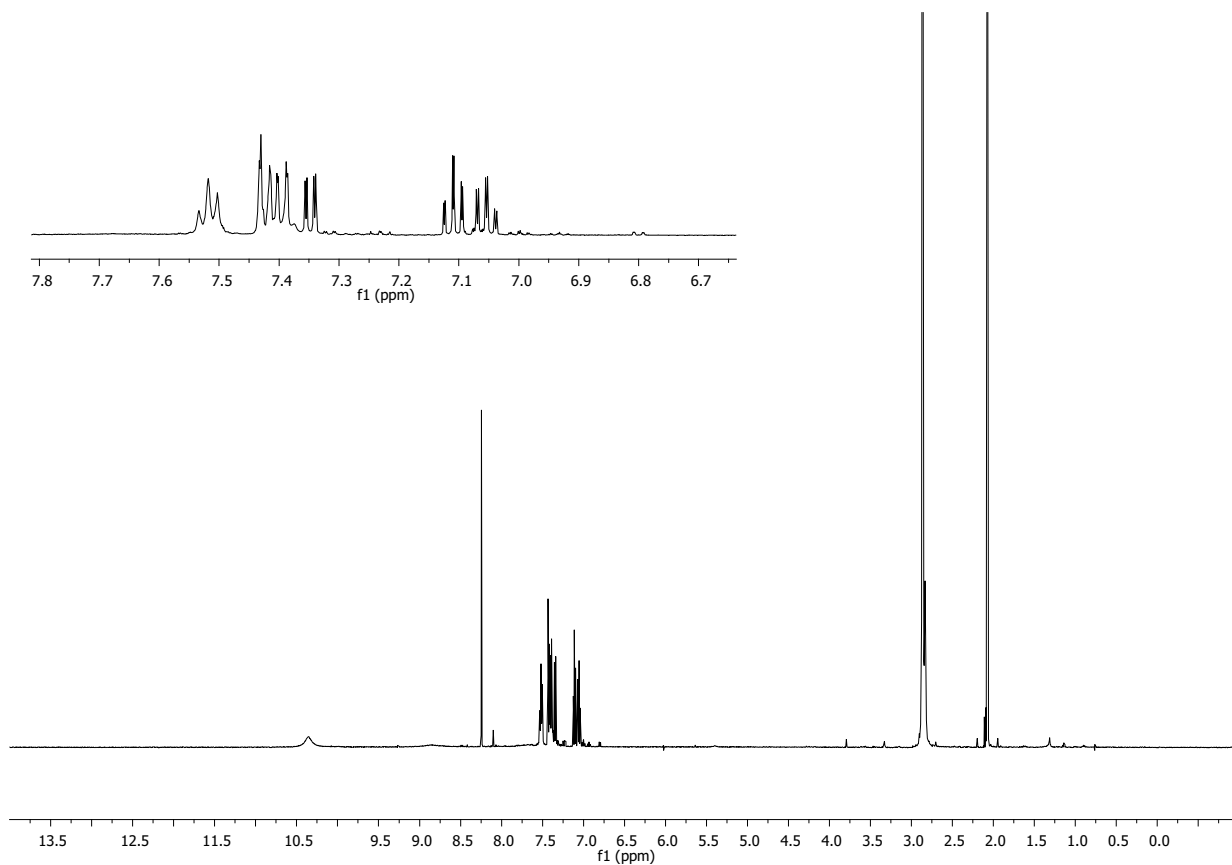
Anexo 15. Espectro de RMN de ^{13}C para 3.



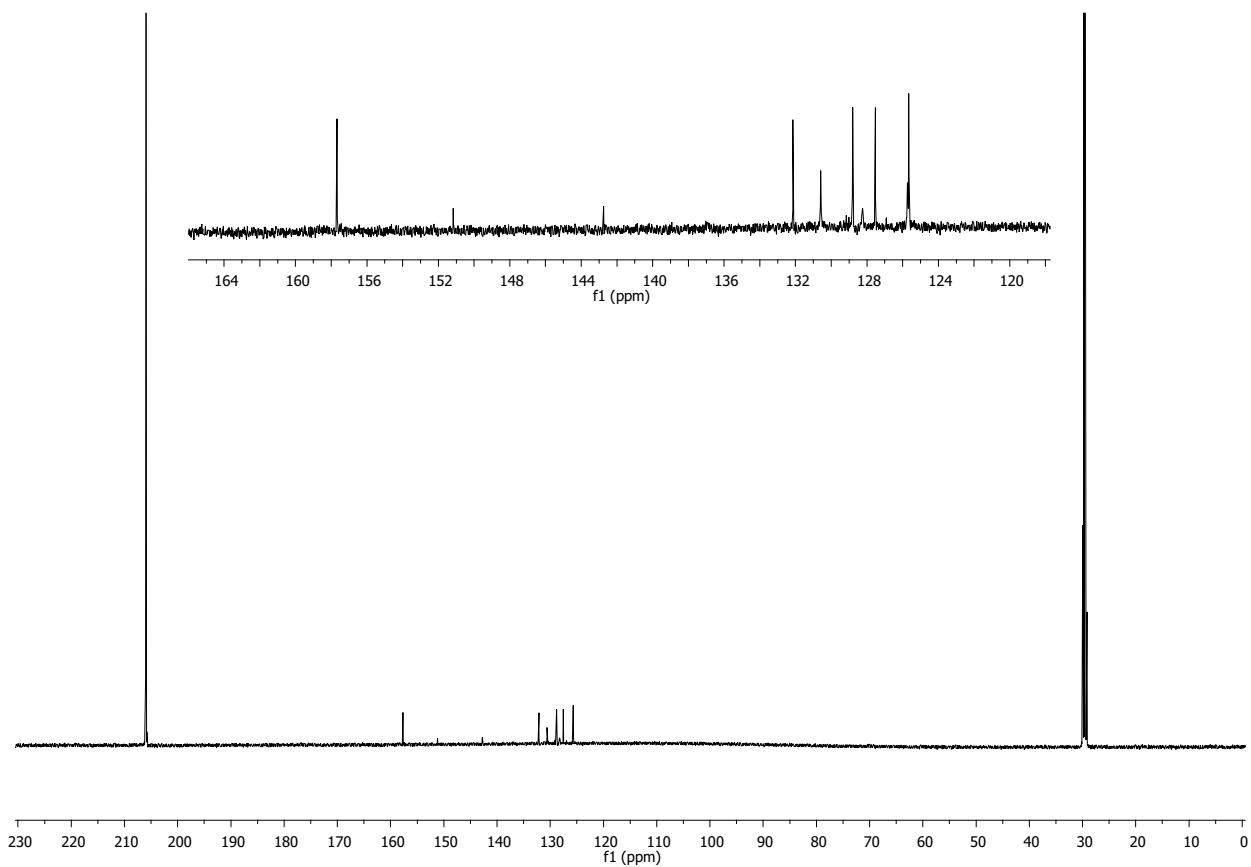
Anexo 16. Espectro de RMN de HMQC para 3.



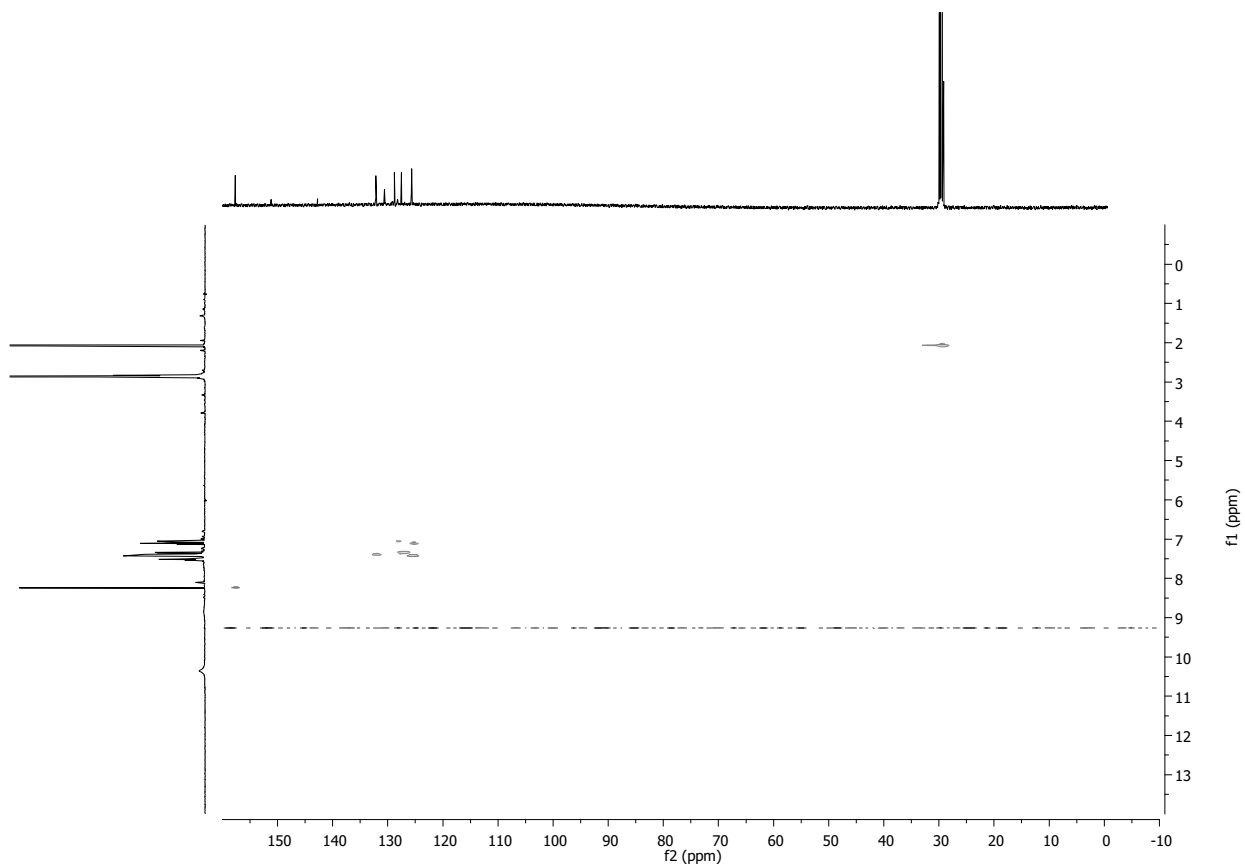
Anexo 17. Espectro de RMN de HMBC para 3.



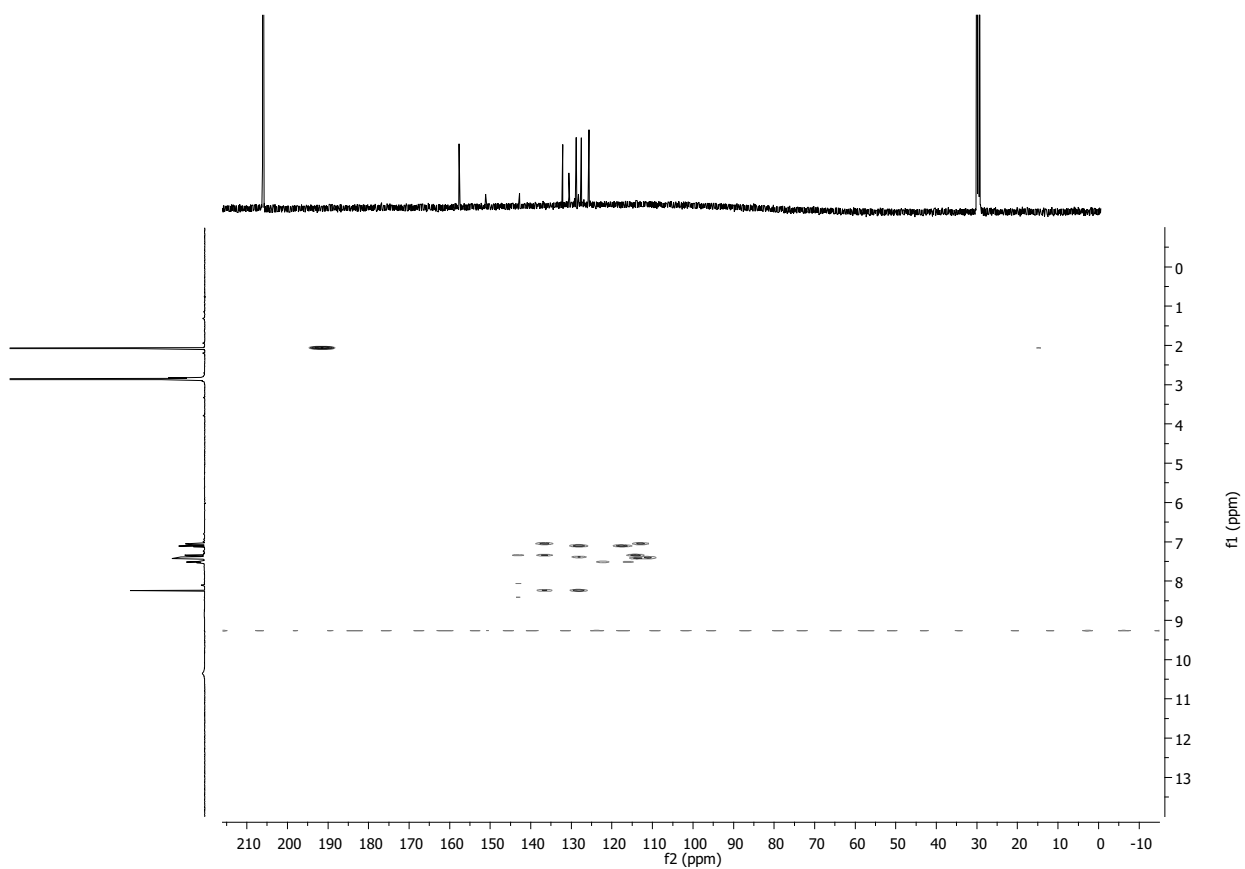
Anexo 18. Espectro de RMN de ^1H para 4.



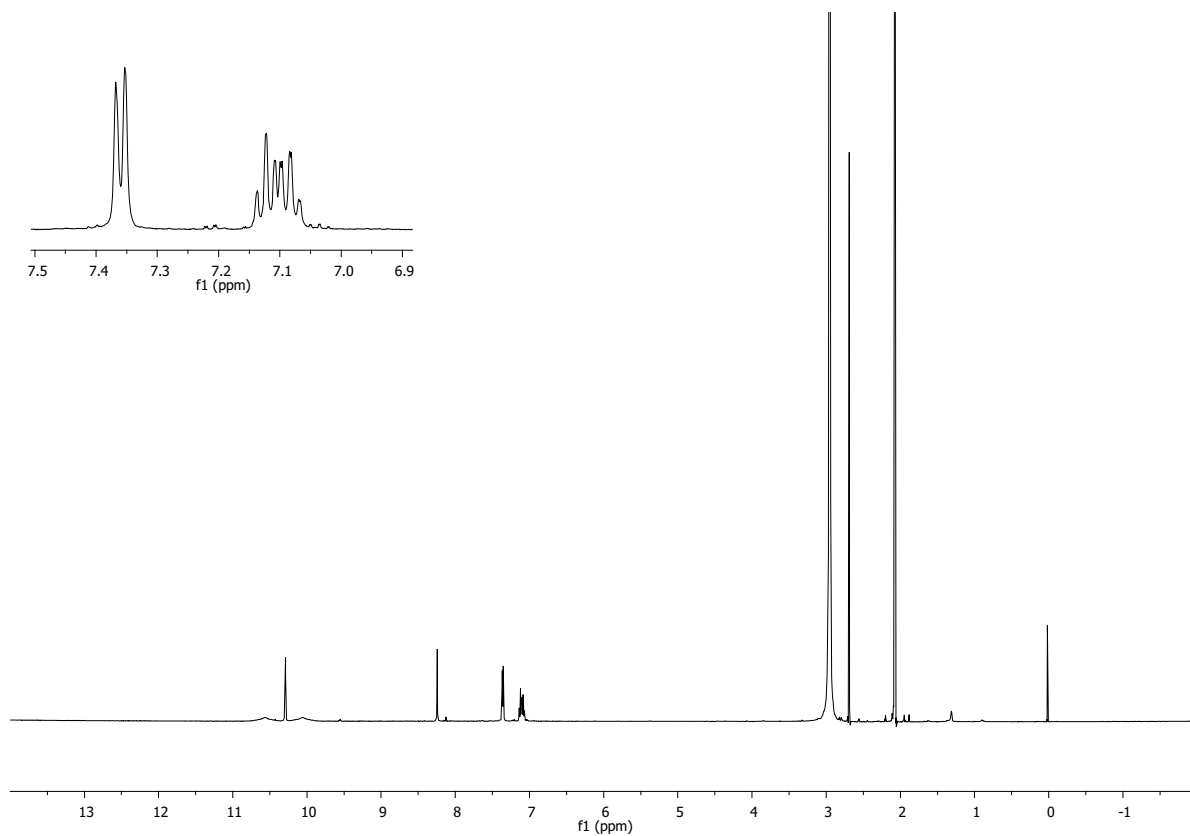
Anexo 19. Espectro de RMN de ^{13}C para 4.



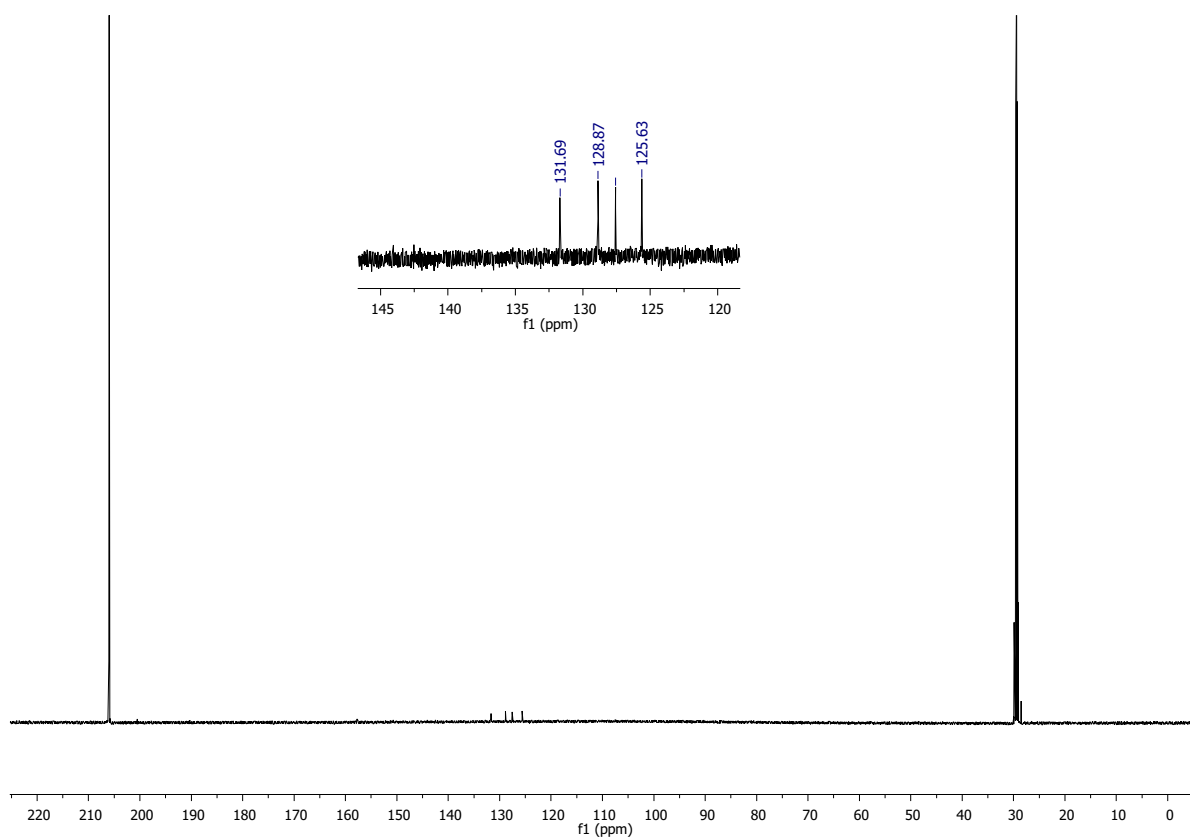
Anexo 20. Espectro de RMN de HMQC para 4.



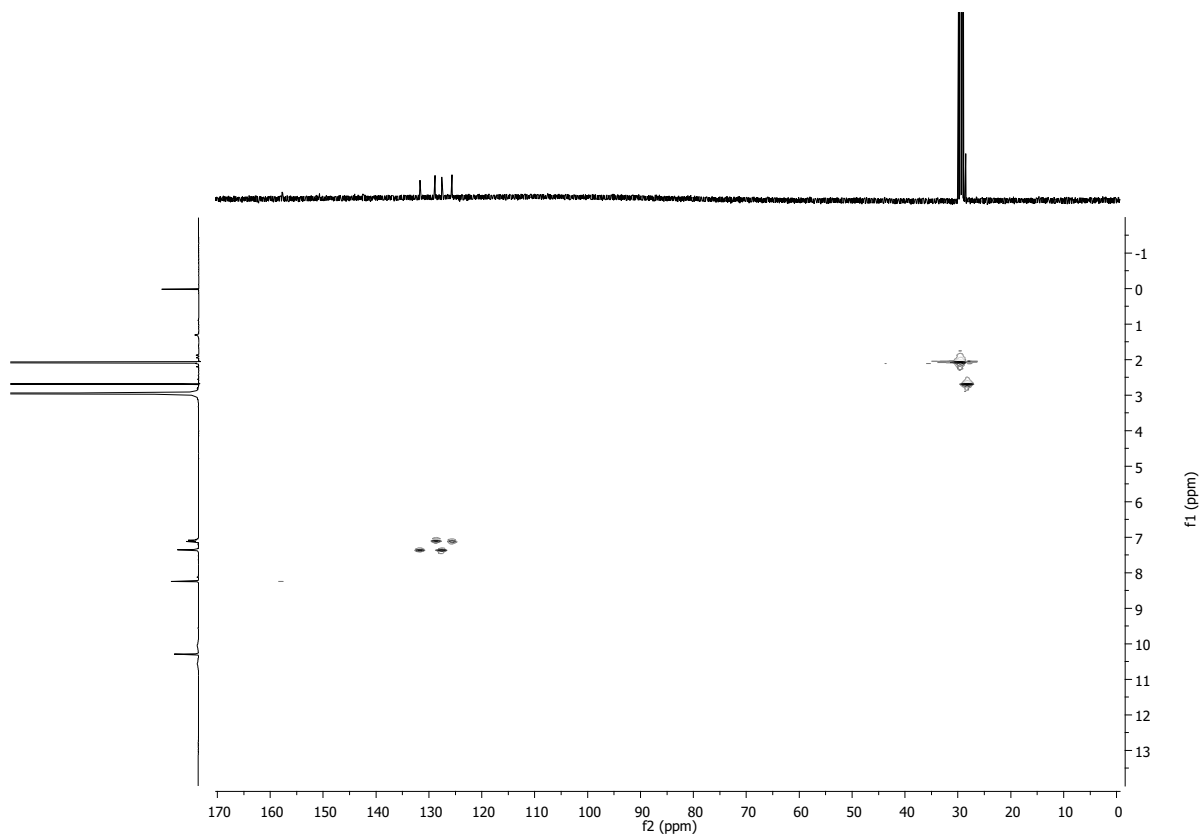
Anexo 21. Espectro de RMN de HMQC para 4.



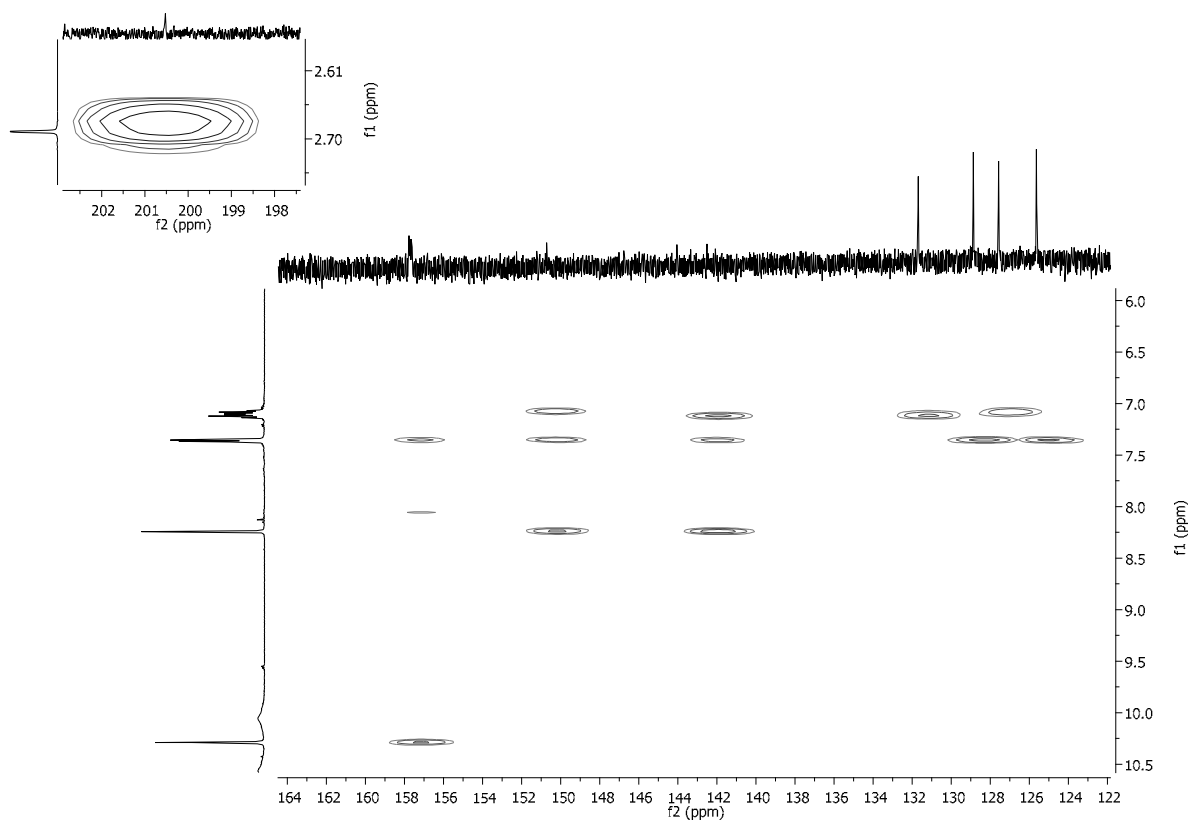
Anexo 22. Espectro de RMN de ^1H para 5.



Anexo 23. Espectro de RMN de ^{13}C para 5.



Anexo 24. Espectro de RMN de HMQC para 5.



Anexo 25. Espectro de RMN de HMBC para 5.