

**SAHRA CAVALCANTE LEMOS**

**Compostos de paládio(II): síntese, caracterização e  
investigação da atividade antitumoral**

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

Orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Eduardo Mauro

Araraquara

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

L557c Lemos, Sahra Cavalcante  
Compostos de paládio(II): síntese, caracterização e  
investigação da atividade antitumoral / Sahra Cavalcante  
Lemos. – Araraquara : [s.n], 2012  
140 f. : il.

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

1. Química inorgânica. 2. Ciclometalação. 3. Reações  
com DNA. I. Título.

## SAHRA CAVALCANTE LEMOS

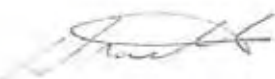
Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Química.

Araraquara, 30 de julho de 2012.

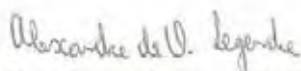
### BANCA EXAMINADORA



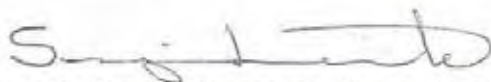
Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto (Orientador)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Dr. Nivaldo Boralle  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Alexandre de Oliveira Legendre  
Centro de Ciências Exatas – UFES, Vitória-ES



Prof. Dr. Sérgio Roberto de Andrade Leite  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Pedro Paulo Corbi  
Instituto de Química – UNICAMP, Campinas

## DADOS CURRICULARES

### 1. Dados Pessoais

Nome: Sahra Cavalcante Lemos

Endereço Residencial: Avenida Alberto Toloi, 185, Jardim Quitandinha

Araraquara-SP, CEP: 14800-105

Telefone: (16) 3397-2335

Celular: (16) 8157-4776

Rua Buenos Aires, 726, Jardim das Américas

Cuiabá-MT, CEP: 16800-000

Telefone: (65) 3627-2418

sahralemos@iq.unesp.br

sahralemos@yahoo.com.br

### 2. Formação Acadêmica

**2008-2012**      Doutorado em Química – Área de Concentração: Inorgânica

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IQ-UNESP,  
Araraquara

**2006-2008**      Mestrado em Química – Área de Concentração: Analítica

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IQ-UNESP,  
Araraquara

**2002-2006**      Bacharelado em Química

Universidade Federal do Mato Grosso  
Cuiabá

### 3. Atividades Científicas

#### 3.1. Supervisão de Trabalho de Iniciação Científica

Supervisão do trabalho de Iniciação Científica do aluno do curso de Bacharelado em Química, Caio César Furuno, entre novembro 2010 e abril de 2011. Título do projeto: Compostos de Pd(II) contendo ligantes sulfurados: síntese, caracterização e investigação da atividade biológica (bolsa PIBIC-CNPq).

#### 3.2. Artigos Completos Publicados em Periódicos

LEMOS, S. C.; FRANCHI, S. J. S.; NETTO, A. V. G.; MAURO, A. E.; TREU-FILHO, O.; FREM, R. C. G.; DE ALMEIDA, E. T.; TORRES, C. Synthesis, characterization, thermal studies and DFT calculations on Pd(II) complexes containing N-methylbenzylamine. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, p. 391-397, 2011.

SANTANA, A. M.; FERREIRA, J. G.; MORO, A. C.; LEMOS, S. C.; MAURO, A. E.; NETTO, A. V. G.; FREM, R. C. G.; SANTOS, R. H. A. Self-assembly of cyclometallated Pd(II) compounds directed by C-H... $\pi$  interactions: a structural evidence for metalloaromaticity in a cyclopalladated ring. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 14, p. 83-86, 2011.

LIMA, L. S.; WEINERT, P. L.; LEMOS, S. C.; SEQUINEL, R.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Na environmentally friendly reflectometric method for ranitidine determination in pharmaceuticals and human urine. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, p. 1999-2004, 2009.

SANTINI, A. O.; LEMOS, S. C.; PEZZA, H. R.; CARLONIFILHO, J.; PEZZA, L. Development of a potentiometric sensor for the determination of saccharin in instant powders, diet, soft drinks and strawberry dietetic jams. **Microchemical Journal**, v. 90, p. 124-128, 2008.

### 3.3. Estágio de Doutorando no Exterior

Estágio de doutorando realizado no Instituto de Biofísica da Academia de Ciências da República Tcheca, na cidade de Brno, sob supervisão do Prof. RNDr. Viktor Brabec (setembro de 2011 a janeiro de 2012), com bolsa PDEE – CAPES.

Processo nº: 2698-11-0.

### 3.4. Trabalhos apresentados em Congressos

BARRA, C. V.; LEMOS, S. C.; ROCHA, F.V.; NOVAKOVA, O.; ZERZANKOVA, L.; LISKOVA, B.; BRABEC, V.; NETTO, A. V. G.; MAURO, A. E.; FREM, R. C. G. Structure, cytotoxic activity and DNA binding of Pd(II) complexes bearing *N*'-methyl-1-thiocarbamoyl-3,5-dimethylpyrazole. **International Symposium on Metal Complexes**, 2012, Lisboa, Portugal.

LEMOS, S. C.; Netto, A. V. G. ; Mauro, A. E. ; FREM, R. C. G.; FRANCHI, S. J. S. Síntese e caracterização de complexos de paládio(II) contendo 2-imidazolidinona. In: **33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2010, Águas de Lindóia.

Ferreira, J. G.; Santana, A. M. ; Moro, A. C. ; LEMOS, S. C.; Netto, A. V. G. ; Santos, R. H. A. . Self-assembly of cyclopalladated compounds directed by C-H pi interactions: the first structural evidency for metalloaromaticity in a cyclopalladated ring. In: **XV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry**, 2010, Angra dos Reis - RJ.

LEMOS, S. C. ; FRANCHI, S. J. S.; Netto, A. V. G.; Mauro, A. E. . Síntese e caracterização de complexos de paládio(II) contendo N-metilbenzilamina. In: **17º Encontro da SBQ Regional**, 2009, Araraquara. 17º Encontro da SBQ Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 2009.

LEMOS, S. C. ; Pezza, H. R. ; PEZZA, L. . Determinação de nitrito em águas superficiais por espectroscopia de reflectância difusa. In: **14º Encontro Nacional de Química Analítica**, 2007, João Pessoa (apresentação oral).

LEMOS, S. C.; NOGUEIRA, J. S. Estudo de sementes oleaginosas da flora do estado de Mato Grosso. In: **XII Econtro de Iniciação Científica**, 2004, Cuiabá.

*Dedico este trabalho aos mais pais Olga e  
Ajuricaba, pelo amor e sacrifícios realizados por  
mim, por minhas irmãs Manoela e Calíope e pelos  
meus sobrinhos Ártemís e Lucas.*

*E, se erraste, não tombes em desespero, mas, trabalhando e servindo, receberás de Deus a oportunidade da retificação e da paz.*

*Meimei*



## AGRADECIMENTOS

Muitíssimo obrigada ao meu orientador, Adelino Vieira de Godoy Netto, por confiar no meu trabalho, me incentivar a ir sempre em frente, vencendo obstáculos ou medos e me ensinar muito.

Agradeço aos professores Antonio Eduardo Mauro, Massao Ionashiro e Nivaldo Boralle pelos valiosos conselhos e préstimos de socorro à minha pessoa, sempre que necessário.

Ao pessoal do grupo de pesquisa do Laboratório de Organometálicos, professores Stanlei Ivair Klein, Regina Célia Galvão Frem e Vânia Nogueira e aos meus colegas e amigos de trabalho Carol, Fillipe, Cristiana, Patrícia, Rodrigo, Homer, Silmar, Gislaine, Noelle, Ana Paula, Caio, Elaine, Antonio, Alesssandra, Natália, Marcelo, Chico e Valéria pela convivência divertida e pela participação direta ou indireta no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo T. de Almeida (UNIFAL) pela obtenção das curvas TGA-DTA e a Prof. Dr. Iracilda Zeppone Carlos e Marisa C. P. Placeres (UNESP) pelos ensaios de citotoxicidade.

Aos amigos que eu tive a sorte de conhecer em Araraquara, Nayane Borges, Fabrícia Gasparini, Liliane Spazzapam Lima, Thaísa Carvalho, Geraldo Magela, Jardes Figueiredo e Íris Gabriella. A amizade de vocês faz toda a diferença na minha vida.

A todos os funcionários do Instituto de Química, pois todos eles contribuíram também para a realização deste trabalho.

A Laudemir Varanda pelo apoio e boas lembranças.

À minha família, que mesmo estando longe, não me deixa desistir e me apoia incondicionalmente. Especialmente aos meus pais, Olga e Ajuricaba Cavalcante Lemos.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À Deus.

## RESUMO

Compostos ciclometalados de paládio(II) contendo ligantes derivados das oximas são bastante empregados em catálise, entretanto, pouco se sabe ainda sobre as suas potencialidades biológicas. Em nosso grupo de pesquisa, diversos complexos ciclometalados com ligantes nitrogenados como a *N,N*-dimetilbenzilamina ou *N*-benzilidenoanilina foram sintetizados e empregados em ensaios biológicos, apresentando resultados promissores frente a diferentes linhagens celulares tumorais. Destacam-se também os complexos contendo ligantes fosforados e sulfurados, como as fosfinas e as tiouréias.

Sendo assim, o presente trabalho descreve a síntese e caracterização de compostos ciclometalados binucleares de Pd(II) do tipo  $[Pd(bzox)(\mu-X)]_2$ , nos quais bzox = benzaldeidoximato e X = Cl (**S1**), Br (**S2**) ou SCN (**S3**), compostos ciclometalados mononucleares neutros do tipo  $[Pd(bzox)X(im)]$ , em que im = imidazolidina-2-tiona e X = Cl(**S4**), Br (**S5**) ou I (**S6**), compostos ciclometalados mononucleares catiônicos do tipo  $[Pd(bzox)(L)_2]Cl$  nos quais L = tiouréia (**S7**), dimetiltiouréia (**S8**) ou bipyridina (**S9**) e compostos de coordenação do tipo  $[PdX_2(im)(PPh_3)]$ , onde  $PPh_3$  = trifenilfosfina e X = Cl (**S10**), Br (**S11**), I (**S12**) ou SCN (**S13**). As estruturas de tais complexos foram propostas com base em medidas de análise elementar, espectroscopia vibracional no infravermelho e ressonância magnética nuclear. Os complexos **S7-S9** não puderam ter as suas estruturas completamente elucidadas, uma vez que não foi possível a obtenção dos espectros de RMN de  $^1H$  e bidimensionais dos compostos. Quanto aos complexos **S10-S13** não foi possível obter os espectros de RMN de  $^{31}P$ .

O comportamento térmico dos complexos **S1-S3** e **S10-S13** foi investigado por termogravimetria e análise térmica diferencial e as quantidades de resíduos obtidos estão de acordo com as quantidades calculadas de  $Pd^0$  para cada estrutura proposta.

A citotoxicidade dos complexos **S1** e **S4-S6** foi determinada frente às células de adenocarcinoma mamário murino MM3. Destacaram-se os complexos **S4-S6** por serem mais ativos do que a cisplatina (fármaco padrão) frente a este tipo linhagem celular. Os complexos **S10-S13** tiveram o seu índice de citotoxicidade avaliado frente a células de glioblastoma cerebral humano U87MG. Ainda não existe uma droga capaz de proporcionar tratamento eficaz para este tipo de câncer. O complexo **S10** mostrou ser ativo frente a esta linhagem, porém em concentrações consideradas altas para um tratamento eficiente.

Os complexos **S7–S9** foram submetidos a ensaios para verificação da ocorrência de ligação ao DNA, *in vitro*. A análise da velocidade de ligação mostrou que os compostos são capazes de formar ligações com o DNA em solução após um período relativamente curto na presença do biopolímero, provavelmente por interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio com a cadeia de fosfatos do DNA.

**Palavras-chave:** ciclopaladado, composto de coordenação de Pd(II), citotoxicidade, ligação ao DNA *in vitro*.

## ABSTRACT

Cyclopalladated compounds bearing oximes derivatives are frequently used as catalysts, however their biological relevance is not well documented. In our research group, many cyclometallated complexes bearing nitrogen donor ligands, such as *N,N*-dimethylbenzylamine and *N*-benzilideneaniline, were synthesized and used in biological investigations towards a variety of tumoral cell lines. Promising results were obtained not only for cyclopalladated complexes, but also for coordination compounds bearing phosphines or thiourea derivatives.

Thus, this work describes the synthesis and characterization of Pd(II) binuclear cyclometallated compounds of the type  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-X})]_2$  (bzoX = benzaldehydoxime, X = Cl (S1), Br (S2) or SCN (S3)), neutral mononuclear cyclometallated compounds of the type  $[\text{Pd}(\text{bzoX})\text{X}(\text{im})]$  (im = imidazolidine-2-thione, X = Cl (S4), Br (S5) or I (S6)), cationic cyclometallated compounds of the type  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\text{L})_2]\text{Cl}$  (L = thiourea (S7), dimethylthiourea (S8) or bipyridine (S9) and coordination compounds of the type  $[\text{PdX}_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$  ( $\text{PPh}_3$  = triphenylphosphine, X = Cl (S10), Br (S11), I (S12) or SCN (S13). Structure proposals were suggested based on results of C, H, N elemental analysis, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. The NMR spectra of complexes 7-9 could not be obtained and consequently, their structures could not be completely elucidated. The  $^{31}\text{P}$  NMR spectra were not recorded either.

The thermal behavior of complexes S1–S3 and S10–S13 was investigated by thermogravimetry and differential thermal analysis. Important information was obtained from residual mass values from each analysis, supporting the stoichiometry proposed for the structures of the complexes.

The cytotoxicity of compounds S1 and S4–S6 towards MM3 cell line (murine mammary adenocarcinoma) was determined by MTT assay. Complexes S4-S6 were more active than cisplatin to this cell line. Coordination compounds S10-S13 had their cytotoxicity determined by XTT assay towards U87MG cells (human cerebral glioblastom). There is no efficient chemotherapeutic treatment for this type of cancer yet. Complex S10 was active towards U87MG cells, although at high concentrations.

DNA binding essays *in vitro* were performed with complexes S7–S9. Kinetics investigations suggests a fast interaction between palladium complexes and DNA in solution,

probably due to hydrogen bonding and electrostatic interactions between the backbone of the double-stranded biopolymer.

**Key-words:** Pd(II) coordination compounds, cyclopalladated complexes, cytotoxicity, DNA binding *in vitro*.

## NOTAÇÕES E ABREVIATURAS

HbzoX = benzaldeidoxima

bzoX = benzaldeidoximato

im = imidazolidina-2-tiona

tu = tiouréia

dmtu = dimetiltiouréia

bipy = 2,2-bipiridina

PPh<sub>3</sub> = trifenilfosfina

IC<sub>50</sub> = concentração necessária para inibir em 50% o crescimento celular

LM3 = adenocarcinoma mamário

U87MG = glioblastoma cerebral

CT-DNA = DNA extraído de células de timo de bezerro

DNA (SC) = dupla-fita de DNA superenovelada

DNA (OC) = dupla-fita de DNA na forma circular

CisDDP = cisplatina

Meio MEM = meio mínimo essencial (Modified Eagle Medium) para cultura de células

Meio HAM F10 = meio de cultura apropriado para células de glioblastoma

PBS = tampão fosfato de sódio

Solução Hanks 1x = solução salina apropriada para lavagem de células em experimentos de citotoxicidade.

TAE = tris-acetato EDTA

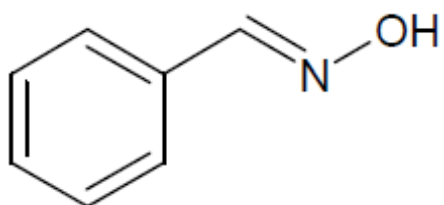
EtBr = brometo de etídio

r<sub>b</sub> = razão molar entre os complexos de Pd(II) e os nucleóides de DNA

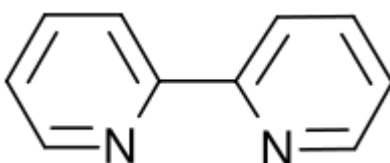
r<sub>i</sub> = razão molar inicial entre os complexos de Pd(II) e os nucleotídeos de DNA

t<sub>m</sub> = temperatura de desnaturação térmica do DNA

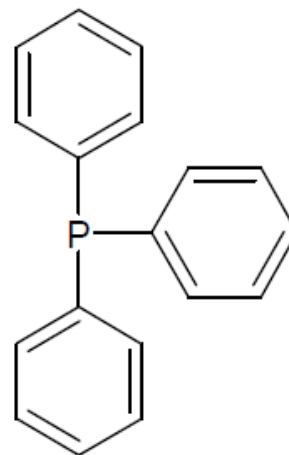
## ESTRUTURAS DOS LIGANTES



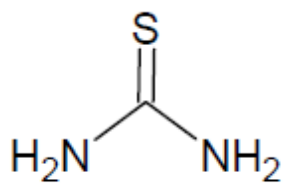
Benzaldeidoxima (HbzoX)



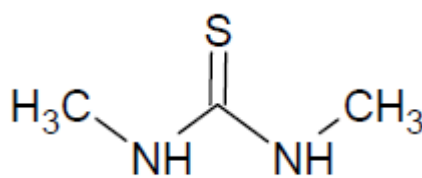
Bipiridina (bipy)



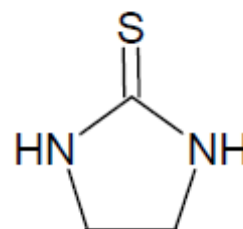
Trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>)



Tiouréia (tu)

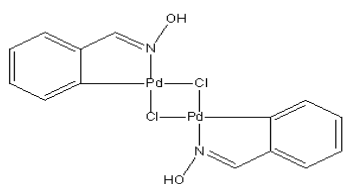


N,N-Dimetiltiouréia (dmTu)

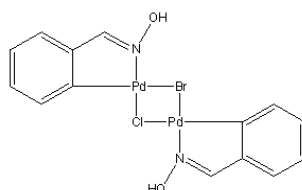


Imidazolidina-2-tiona  
(im)

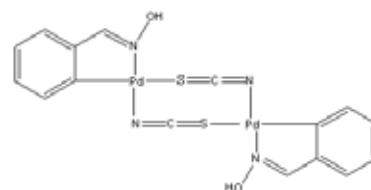
## ESTRUTURAS DOS COMPLEXOS



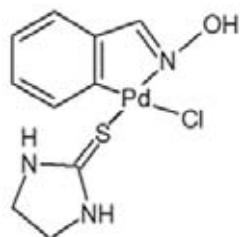
[Pd(bzox)(μ-Cl)]<sub>2</sub> (S1)



[Pd<sub>2</sub>(bzox)<sub>2</sub>(μ-Br)(μ-Cl)] (S2)



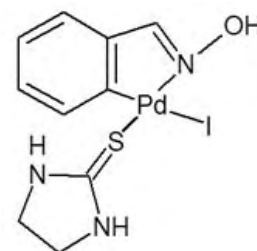
[Pd(bzox)(μ-I)]<sub>2</sub> (S3)



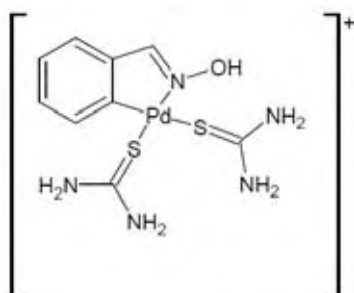
[Pd(bzox)Cl(im)] (S4)



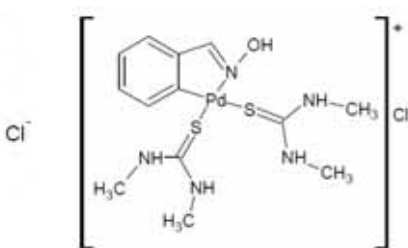
[Pd(bzox)Br(im)] (S5)



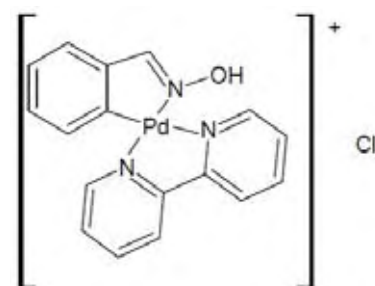
[Pd(bzox)I(im)] (S6)



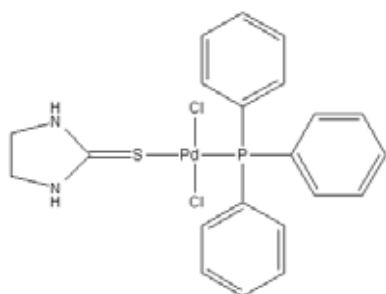
[Pd(bzox)(tu)<sub>2</sub>]Cl (S7)



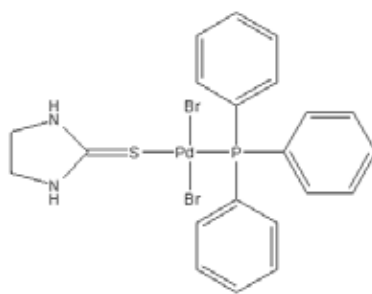
[Pd(bzox)(dmtu)<sub>2</sub>]Cl (S8)



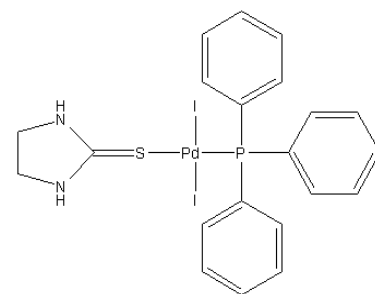
[Pd(bzox)(bipy)]Cl (S9)



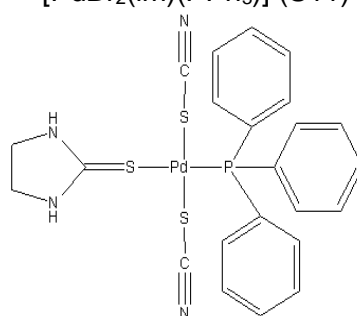
[PdCl<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S10)



[PdBr<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S11)



[PdI<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S12)



[Pd(SCN)<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S13)



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura da cisplatina (a). Ligação intrafitas com o DNA (b). Ligação interfitas com o DNA (c). Fonte: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em: 16 mar. 2012..... 25
- Figura 2.** Estruturas de outros fármacos utilizadas para o tratamento do câncer: carboplatina (a), taxol (b) e vimblastina (c). Fonte: <http://qnint.sbgq.org.br/qni/visualizarTema.php?idTema=31>. Acessado em: 25/06/2012. .... 27
- Figura 3.** Cadeia de nucleotídeos unida por ligações dos grupos fosfatos aos carbonos de pentoses subsequentes (A) [7] e duas cadeias de DNA unidas por interações de hidrogênio formadas entre pares de bases complementares A-T e C-G (B). Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/conteúdos/Citologia2/AcNucleico.php>. .... 28
- Figura 4.** Três formas bem conhecidas de DNA: B-DNA e A-DNA, ambos com voltas helicais direcionadas para a direita. Ambos podem ser encontrados nos sistemas biológicos, sendo o B-DNA a forma mais comum, devido a umidade relativa do meio intracelular. Z-DNA, com h hélices voltadas para a esquerda, sintetizado em laboratório. Fonte: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:A-DNA,\\_B-DNA\\_and\\_Z-DNA.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:A-DNA,_B-DNA_and_Z-DNA.png). .... 29
- Figura 5.** Valores de IC50 de organopaladados frente a algumas linhagens tumorais humanas [19]. .... 31
- Figura 6.** Estrutura do complexo dimérico ciclopaladado  $[\{PdCl(dmpa)\}_2(dppf)]$  [20]. .... 32
- Figura 7.** Estrutura do complexo ciclometalado  $[Pd(dmba)(\mu-SCN)]_2$  (dmba = *N,N*-dimetilbenzilamina) [21]. .... 33
- Figura 8.** Complexos ciclopaladados com atividade catalisadora em reações de Pauso-Khad (A). Esquema da reação de Pauson-Khad (B) [23]. .... 34
- Figura 9.** Estrutura do complexo ciclopaladado cloro[2-(1-(hidroxilimino)metil)fenil-C',N](piridina)paládio(II) [25]. .... 34
- Figura 10.** Interações hidrofóbicas entre os anéis aromáticos planos fundidos das unidades de complexo de paládio(II) com 2-benzoilpiridina-N-metil-N-fenilhidrazona [27]. .... 35
- Figura 11.** Estrutura do anel ciclometalado formado com o ligante 9-aminoacridina (A). Estrutura molecular do complexo ciclopaladado  $[Pd(9-AA)(\mu-Cl)]_2 \cdot 2DMF$  [28]. .... 36
- Figura 12.** Estrutura geral dos complexos  $[Pd(II)(DT)(PR_3)Cl]$ . Complexo 1: DT = dimetilditiocarbamato,  $PR_3$  = benzildifenilfosfina; 2: DT = dietilditiocarbamato,  $PR_3$  = difenil-

2-metoxifenilfosfina; 3: DT = dietilditiocarbamato,  $PR_3$  = difenil-p-toluilfosfina; 4: DT = dicicloexilditiocarbamato,  $PR_3$  = difenil-m-toluilfosfina; 5: DT = dimetilditiocarbamato,  $PR_3$  = tricicloexilfosfina; 6: DT = bis(2-metoxietilditiocarbamato),  $PR_3$  = difenil-2-piridilfosfina [32]. 37

**Figura 13.** Estrutura dos complexos de fórmula geral  $[PdX_2(tdmPz)]$ , X = Cl (1), Br (2), I (3), SCN (4) [33]. 37

**Figura 14.** Estrutura das aciltiouréias derivadas da imidazolidina-2-tiona [34]. R = 4-clorobenzoil (1j); 3,4-diclorobenzoil (1n); 3,4,5-trimetoxibenzoil (1q); 2-furoil (1s), dentre outros. 38

**Figura 15.** Estrutura molecular do complexo  $[Pd(im)_2(PPh_3)_2].Cl_2.3,5H_2O$  [37]. 39

**Figura 16.** Estruturas propostas para os complexos  $[Pd(bzan)(SCN)(dppf)]$ ,  $[Pd(bzan)(SCN)(dppet)]$  e  $[Pd(bzan)(NCO)(dppet)]$  [39] (X = SCN ou NCO). 40

**Figura 17.** Exemplo de complexos ciclopaladados. Fonte: [40]. 41

**Figura 18.** Ciclopaladados do tipo CY (A) e pinça (B). Fonte: [40]. 41

**Figura 19.** Ciclopaladados diméricos nas conformações: cisóide (A) e transóide (B). Fonte: [40] 42

**Figura 20.** Exemplos de produtos de reações obtidas por clivagem de compostos ciclometalados por ligantes aniônicos, neutros ou catiônicos. Fonte: autor. 42

**Figura 21.** Modificação da estrutura terciária do DNA causada pelo aduto funcional formado com a cisplatina, impedindo a ação correta de enzimas sobre a sua cadeia. Fonte: <http://pubs.acs.org/cen/coverstory/83/8325/8325cisplatin.html>. 46

**Figura 22.** Complexo metalintercalador inserido entre pares de bases adjacentes do DNA e provocando uma modificação na estrutura terciária do biopolímero, no local onde ocorre a inserção [67]. 47

**Figura 23.** O sal de tetrazólio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) sofre metabolização pelas proteinases mitocondriais das células vivas formando cristais de formazana [39]. 57

**Figura 24.** Espectro no IV do dímero ciclopaladado  $[Pd(\mu-Cl)(dmba)]_2$ . Fonte: autor. 61

**Figura 25.** Espectro de RMN de  $^1H$  do complexo dimérico  $[Pd(\mu-Cl)(dmba)]_2$  em  $CDCl_3$ . Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor. 62

**Figura 26.** Espectros na região do infravermelho do ligante benzaldeidoxima e complexos S1, S2 e S3. Fonte: autor. 65

**Figura 27.** Modos de coordenação mais comuns do íon tiocianato (SCN). Fonte: autor. .... 66

<b>Figura 28.</b> Estrutura molecular do complexo $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-SCN})_2]$ [51], no qual se observa o grupo tiocianato atuando em ponte ento-to-end.....	67
<b>Figura 29.</b> Estrutura da syn-benzaldeidoxima. Fonte: autor. ....	68
<b>Figura 30.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do ligante HbzoX livre. Deslocamentos químicos em ppm. Solvente: DMSO. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor.....	69
<b>Figura 31.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do ligante bzoX livre. Deslocamentos químicos em ppm. Solvente: DMSO. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor.....	69
<b>Figura 32.</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ dos complexos $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-Cl})_2]$ (S1) e $[\text{Pd}_2(\text{bzoX})_2(\mu\text{-Br})(\mu\text{-Cl})]$ (S2). Deslocamento químico em ppm. Solvente: DMSO. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor. ....	71
<b>Figura 33.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (A) do complexo $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-SCN})_2]$ (S3). Deslocamento químico em ppm. Solvente: DMSO. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor.....	72
<b>Figura 34.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-SCN})_2]$ (S3). Deslocamento químico em ppm. Solvente: DMSO. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor.....	73
<b>Figura 35.</b> Curvas TGA e DTA dos complexos $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-Cl})_2]$ (S1), $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-Br})(\mu\text{-Cl})_2]$ (S2) e $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-SCN})_2]$ (S3). Fonte: autor.....	77
<b>Figura 36.</b> Estruturas propostas para os complexos $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-Cl})_2]$ (S1), $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-Br})(\mu\text{-Cl})_2]$ (S2) e $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-SCN})_2]$ (S3). Fonte: autor.....	78
<b>Figura 37.</b> Estrutura molecular dos complexos $[\text{Pd}_2(\mu\text{-Cl})(\text{dmba})_2(\mu\text{-N}_3)]$ (A) e $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{dmba})_2]$ . Fonte: [73].....	79
<b>Figura 38.</b> Formas tautoméricas do ligante orgânico imidazolidina-2-tiona (im). Fonte: autor. ....	80
<b>Figura 39.</b> Espectros nos IV do ligante imidazolidina-2-tiona livre e dos complexos $[\text{Pd}(\text{bzoX})\text{Cl}(\text{im})]$ (S4), $[\text{Pd}(\text{bzoX})\text{Br}(\text{im})]$ (S5) e $[\text{Pd}(\text{bzoX})\text{I}(\text{im})]$ (S6). Fonte: autor. ....	81
<b>Figura 40.</b> Espectros no IV dos complexos $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-Cl})_2]$ (S1) e $[\text{Pd}(\text{bzoX})\text{Cl}(\text{im})]$ (S4). Fonte: autor. ....	82
<b>Figura 41.</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ (A) e RMN de $^{13}\text{C}$ (B) do ligante im livre. Deslocamento químico em ppm. Solvente: DMSO. Campo magnético: 11, 7 T. Fonte: autor.....	85
<b>Figura 42.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do complexo $[\text{Pd}(\text{bzoX})\text{Cl}(\text{im})]$ (S4). Solvente: acetona. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor.....	87
<b>Figura 43.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do complexo S4. Solvente: acetona. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor. ....	89

<b>Figura 44.</b> Mapa de contorno do experimento gHMQC obtido para do composto S4 e expansão da região selecionada. Deslocamentos químicos em ppm. Solvente: acetona. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor.....	91
<b>Figura 45.</b> Espectros envolvendo irradiações seletivas via desacoplamento homonuclear (HOMODEC). Deslocamento químico em ppm. Solvente: DMSO. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor. ....	92
<b>Figura 46.</b> Mapa de contorno do experimento gHMBC para o composto S4. Solvente: acetona. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor. ....	94
<b>Figura 47.</b> Estruturas propostas para os complexos S4 (A), S5 (B) e S6 (C). Fonte: autor..	97
<b>Figura 48.</b> Estrutura molecular [38] do complexo [Pd(dmba)Br(tu)]. ....	97
<b>Figura 49.</b> Espectros no infravermelho dos ligantes tiouréia, <i>N,N</i> -dimetiltiouréia e 2,2'-bipiridina e dos complexos [Pd(bzox)(tu) <sub>2</sub> ]Cl (S7), [Pd(bzox)(dmtu) <sub>2</sub> ]Cl (S8) e [Pd(bzox)(bipy)]Cl (S9). Fonte: autor.....	100
<b>Figura 50.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do complexo [Pd(bzox)(dmtu) <sub>2</sub> ]Cl, no estado sólido. Deslocamento químico em ppm. (*) = sinais laterais gerados pela ressonância em 176,41 ppm. (**) = sinais laterais geradas pelos sinais alargados em 129,93 e 126,74 ppm. Fonte: autor. ....	103
<b>Figura 51.</b> Curvas: porcentagem de complexo de paládio ligado ao DNA em função do tempo. Curva A: [Pd(bzox)(bipy)]Cl (S9); curva B: [Pd(bzox)(dmtu) <sub>2</sub> ]Cl (S8). Experimentos realizados em quadruplicata. Fonte: autor. ....	106
<b>Figura 52.</b> Medidas de absorbância em 260 nm em função da temperatura (°C) de soluções de CT-DNA livre em 10 mM NaClO <sub>4</sub> (DNA), e na presença dos complexos [Pd(bzox)(bipy)]Cl (S7), [Pd(bzox)(tu) <sub>2</sub> ]Cl (S8) e [Pd(bzox)(dmtu) <sub>2</sub> ]Cl (S9). Na parte B: primeira derivada das curvas em A. Fonte: autor.....	108
<b>Figura 53.</b> Micrografia de DNA plasmideal na forma circular relaxada (A). Representação: mudança de conformação do DNA na forma circular relaxada (B) para a forma superenovelada (C). Fonte: <a href="http://www.hardmob.com.br">http://www.hardmob.com.br</a> . ....	109
<b>Figura 54.</b> Gel de agarose 1% após corrida eletroforética. SC = “supercoiled” ou forma superenovelada do DNA; OC = “open circular” ou forma circular relaxada do DNA. Amostras: DNA + <b>S9</b> (rb = 0,09); DNA + <b>S8</b> (rb = 0,09); DNA + <b>S7</b> (rb = 0,07); DNA + cisDDP (rb = 0,10); ); DNA controle. Experimento feito em quadruplicata. Fonte: autor.....	110
<b>Figura 55.</b> Ensaios com as enzimas endonucleases restritivas BanHI e NdeI. Linhas 1: controle negativo (DNA); linhas 2: controle positivo (DNA + enzima); linhas 3, 4 e 5: misturas	

reacionais de DNA com os complexos S7, S8 e S9, respectivamente, na presença das enzimas. $r_b = 0,09$ para todas as misturas. Fonte: autor.....	113
<b>Figura 56.</b> Espectro no IV da trifenilfosfina livre. Fonte: autor. ....	116
<b>Figura 57.</b> Espectros no IV do ligante imidazoldina-2-tiona e dos complexos $[PdCl_2(im)(PPh_3)]$ (S10), $[PdBr_2(im)(PPh_3)]$ (S11), $[PdI_2(im)(PPh_3)]$ (S12) e $[Pd(SCN)_2(im)(PPh_3)]$ (S13). Fonte: autor. ....	118
<b>Figura 58.</b> Espectros de RMN de $^1H$ dos complexos $[PdCl_2(im)(PPh_3)]$ (S10), $[PdBr_2(im)(PPh_3)]$ (S11) e $[Pd(SCN)_2(im)(PPh_3)]$ (S13). Deslocamento químico em ppm. Solvente: DMSO. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor.....	119
<b>Figura 59.</b> Curvas de termodecomposição e DTA dos complexos $[PdCl_2(im)(PPh_3)]$ , (S10), $[PdBr_2(im)(PPh_3)]$ (S11) e $[Pd(SCN)_2(im)(PPh_3)]$ (S13). Fonte: autor. ....	120
<b>Figura 60.</b> Estruturas propostas para os complexos $[PdCl_2(im)(PPh_3)]$ (S10), $[PdBr_2(im)(PPh_3)]$ (S11), $[PdI_2(im)(PPh_3)]$ (S12) e $[Pd(SCN)_2(im)(PPh_3)]$ (S13). Fonte: autor. ....	123
<b>Figura 61.</b> Estrutura molecular [38] do complexo $[PdCl_2(PPh_3)(tu)]$ .....	124
<b>Figura 62.</b> Resposta aos tratamentos (24 h) com cinco concentrações dos complexos S10, S11, S12 e S13 e dos ligantes imidazolidina-2-tiona (im) e trifenilfosfina ( $PPh_3$ ) (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu M$ ) realizados para a linhagem de glioblastoma U87MG. As células foram colhidas 24 h após o tratamento. Foram realizados três experimentos independentes. Fonte: autor. ....	125
<b>Figura 63.</b> Resposta aos tratamentos (120 h) com cinco concentrações dos complexos S10, S11, S12 e S13 e dos ligantes imidazolidina-2-tiona (im) e trifenilfosfina ( $PPh_3$ ) (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu M$ ) realizados para a linhagem de glioblastoma U87MG. Foram realizados três experimentos independentes. Fonte: autor. ....	126

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais solventes utilizados nas sínteses.....	49
<b>Tabela 2.</b> Principais reagentes utilizados nas sínteses.....	50
<b>Tabela 3.</b> Resultado de análise elementar e pontos de fusão dos complexos [Pd(bzox)( $\mu$ -Cl)] <sub>2</sub> (S1), [Pd <sub>2</sub> (bzox) <sub>2</sub> ( $\mu$ -Cl)( $\mu$ -Br)] (S2) e [Pd(bzox)( $\mu$ -SCN)] <sub>2</sub> (S3).....	63
<b>Tabela 4.</b> Principais absorções no IV dos complexos S1, S2 e S3 e da benzaldeidoxima livre.....	65
<b>Tabela 5.</b> Intervalos aproximados dos modos normais de vibração (cm <sup>-1</sup> ) para os diferentes tipos de coordenação do tiocianato.....	66
<b>Tabela 6.</b> Principais deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de <sup>1</sup> H do ligante livre benzaldeidoxima e dos complexos [Pd(bzox)( $\mu$ -X)] <sub>2</sub> , X = Cl, Br ou SCN. ....	70
<b>Tabela 7.</b> Principais deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de <sup>1</sup> H e as correlações encontradas nos mapas de contorno de gHMQC e gHMBC do complexo S3...	74
<b>Tabela 8.</b> Etapas de decomposição dos complexos. ....	76
<b>Tabela 9.</b> Resultado de análise elementar e pontos de decomposição dos complexos [Pd(bzox)Cl(im)] (S4), [Pd(bzox)Br(im)] (S5) e [Pd(bzox)I(im)] (S6). ....	80
<b>Tabela 10.</b> Principais absorções observadas no IV para a imidazolidina-2-tiona (im) e para os complexos [Pd(bzox)( $\mu$ -Cl)] <sub>2</sub> (S1), [Pd(bzox)Cl(im)] (S4), [Pd(bzox)Br(im)] (S5) e [Pd(bzox)I(im)] (S6).....	84
<b>Tabela 11.</b> Principais correlações encontradas no mapa de contorno do experimento gHMQC para o complexo S4. ....	90
<b>Tabela 12.</b> Relação de sinais observados (parte aromática do complexo) nos espectros de RMN de <sup>1</sup> H e RMN de <sup>13</sup> C com os núcleos de origem. Numeração realizada de acordo com o Esquema 5.....	93
<b>Tabela 13.</b> Principais correlações encontradas nos mapas de contorno de gHMBC para S4. ....	95
<b>Tabela 14.</b> Citotoxicidade dos complexos ciclometalados S1, S4-S6, dos ligantes im e bzox e da cisplatina contra a linhagem LM3. ....	98
<b>Tabela 15.</b> Resultado de análise elementar e pontos de decomposição dos complexos [Pd(bzox)(tu) <sub>2</sub> ]Cl (S7), [Pd(bzox)(dmtu) <sub>2</sub> ]Cl (S8) e [Pd(bzox)(bipy)]Cl (S9).....	99

<b>Tabela 16.</b> Principais frequências de absorção no infravermelho dos ligantes tiouréia, dimetiltiouréia e bipyridina e dos complexos [Pd(bzox)(tu) <sub>2</sub> ]Cl (S7), [Pd(bzox)(dmtu) <sub>2</sub> ]Cl (S8) e [Pd(bzox)(bipy)]Cl (S9). .....	101
<b>Tabela 17.</b> Valores de concentração obtidos pela análise da mistura reacional após incubação por 24 horas (37 °C) e após diálise em meio contendo 10 mM de NaClO <sub>4</sub> . .....	105
<b>Tabela 18.</b> Resultados de análise elementar para os complexos S10-S13 e seus respectivos pontos de fusão. ....	115
<b>Tabela 19.</b> Principais absorções observadas nos espectros no infravermelho dos complexos [PdCl <sub>2</sub> (im)(PPh <sub>3</sub> )] (S10), [PdBr <sub>2</sub> (im)(PPh <sub>3</sub> )] (S11), [PdI <sub>2</sub> (im)(PPh <sub>3</sub> )] (S12) e [Pd(SCN) <sub>2</sub> (im)(PPh <sub>3</sub> )] (S13). ....	117
<b>Tabela 20.</b> Dados de análise térmica para os complexos [PdCl <sub>2</sub> (im)(PPh <sub>3</sub> )] (S10), [PdBr <sub>2</sub> (im)(PPh <sub>3</sub> )] (S11) e [Pd(SCN) <sub>2</sub> (im)(PPh <sub>3</sub> )] (S13). ....	121
<b>Tabela 21.</b> Dados relativos a concentração mínima para inibir o crescimento de 50% das células de glioma (U87MG), 120 h após o tratamento. O R <sup>2</sup> corresponde ao coeficiente de adequação dos dados em relação à função dose resposta de cada complexo. As substâncias PPh <sub>3</sub> e im não seguem um padrão de dose resposta. ....	127

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1. O câncer e o DNA .....	25
1.2. Compostos de coordenação de paládio(II) como agentes citotóxicos.....	30
1.3. Considerações sobre os complexos ciclopaladados.....	40
1.3.1 Definição .....	41
1.3.2. Síntese dos ciclopaladados: ativação da ligação C-H em grupos arila e transciclometalação .....	43
1.4. Principais modos de interação entre os complexos metalo-orgânicos e o DNA.....	45
2. OBJETIVOS.....	48
3. PARTE EXPERIMENTAL .....	49
3.1 Reagentes e solventes .....	49
3.2 Metodologia.....	51
3.2.1 Sínteses .....	51
3.2.2 Purificação.....	51
3.3 Caracterização dos compostos .....	51
3.3.1 Medidas de temperatura de fusão ou decomposição.....	51
3.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) .....	51
3.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) .....	51
3.4.3 Análise elementar de C, H, N.....	52
3.3.5 Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial .....	52
3.4 Sínteses .....	52
3.4.1 Síntese do complexo precursor ciclopaladado $[Pd(\mu-Cl)(dmba)]_2$ [69] .....	52
3.4.2 Síntese dos complexos ciclopaladados binucleares $[Pd(bzox)(\mu-X)]_2$ , X = Cl, Br, SCN (S1-S3) [58] .....	53
3.4.3 Síntese dos complexos $[Pd(bzox)X(im)]_2$ , X = Cl, Br, I (S4-S6) .....	53
3.4.4 Síntese dos complexos $[Pd(bzox)(L)_2]Cl$ , L = tu, dmtu, bipy (S7-S9) .....	54
3.4.5 Síntese do complexo precursor $[PdCl_2(MeCN)_2]$ .....	54
3.4.6 Síntese dos complexos $[PdX_2(im)(PPh_3)]$ X = Cl, Br, I, SCN (S10-S13).....	54
3.5 Ensaaios biológicos.....	55
3.5.1 Preparo das soluções .....	55



3.5.2 Linhagem celular adenocarcinoma mamário de linhagem LM3 <i>in vitro</i> e meio de cultura empregado.....	55
3.5.3 Linhagem celular de glioblastoma U87MG .....	55
3.5.5 Determinação da viabilidade celular pela técnica do MTT [70] .....	56
3.5.6 Determinação da viabilidade celular pela técnica do XTT [71] .....	57
3.5.7 Análise estatística .....	58
3.6 Ensaio com DNA <i>in vitro</i> (complexos S7, S8 e S9) .....	58
3.6.1 Materiais e preparo de soluções .....	58
3.6.2 Reações do DNA com complexos de paládio(II) em meio extracelular .....	58
3.6.3 Determinação da velocidade de reação entre o DNA e os complexos de paládio(II) .....	59
3.6.4 Determinação da estabilidade térmica do DNA após reação com complexos de paládio .....	59
3.6.5 Desenrolamento da dupla-fita de DNA circular superenovelado (-) .....	59
3.6.6 Ensaio com enzimas endonucleases restritoras .....	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	61
4.1 Considerações espectroscópicas a respeito do composto precursor [Pd( $\mu$ -Cl)(dmba)] <sub>2</sub> .....	61
4.2 Considerações espectroscópicas sobre os complexos diméricos do tipo [Pd(bzox)( $\mu$ -X)] <sub>2</sub> , X = Cl (S1), Cl,Br (S2) ou SCN (S3) .....	63
4.3 Considerações espectroscópicas sobre os complexos ciclometalados do tipo [Pd(bzox)X(im)], X = Cl (S4), Br (S5) ou I (S6) .....	79
4.3.1.Citotoxicidade dos complexos S1, S4, S5 e S6 frente a células LM3 .....	97
4.4 Considerações espectroscópicas sobre os compostos de coordenação do tipo [Pd(bzox)(L) <sub>2</sub> ].Cl, L = tu (S7), dmtu (S8), bipy (S9).....	99
4.4.1.Ensaio com DNA.....	104
4.4.1.1.Ligação ao DNA em meio extracelular.....	104
4.4.1.2.Determinação da velocidade de ligação entre os complexos e o CT-DNA .....	105
4.4.1.3.Determinação da estabilidade térmica do DNA após reação com os complexos de paládio .....	107
4.4.1.4.Desenrolamento da dupla-fita de DNA plasmideal (pUC19) .....	109
4.4.1.5.Ensaio com enzimas endonucleases restritoras e DNA plasmideal (pUC19) .....	112
4.5 Considerações espectroscópicas sobre os compostos de coordenação do tipo [PdX(im)(PPh <sub>3</sub> )], X = Cl (S10), Br (S11), I (S12) e SCN (S13).....	114
4.5.1.Estudo da Citotoxicidade Frente à Linhagem U87MG e Sobrevivência Celular.....	124

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	128
6. PERSPECTIVAS .....	131
7. REFERÊNCIAS .....	132

## 1. INTRODUÇÃO

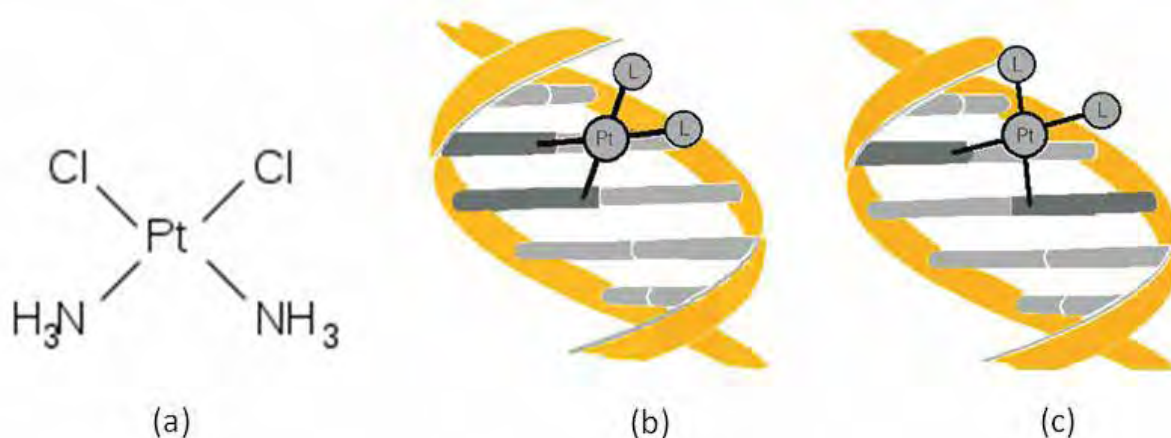
### 1.1. O câncer e o DNA

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado das células que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo [1]. O tratamento do câncer pode ser feito por diversos meios, tais como a cirurgia para retirada de tumor, radioterapia, imunoterapia, hormonoterapia ou quimioterapia.

A quimioterapia baseia-se no uso de medicamentos para destruir as células doentes que formam um tumor. Apesar de eficiente, este tipo de tratamento pode apresentar efeitos colaterais severos no paciente e, por isso, é sempre realizado quando não se tem a possibilidade de optar pela cirurgia ou radioterapia [1].

O complexo de coordenação com mais amplo espectro de ação conhecido até hoje é o cis-diamindicloroplatina(II), ou cisplatina [2]. A cisplatina possui dois ligantes cloro que são facilmente hidrolisados no meio intracelular. Cerca de 27% do medicamento absorvido atinge o núcleo da célula, resultando na formação de ligações covalentes entre a platina e a molécula de DNA. Estas ligações podem ser interfitas ou intrafitas, como mostrado na Figura 1.

**Figura 1.** Estrutura da cisplatina (a). Ligação intrafita com o DNA (b). Ligação interfita com o DNA (c). Fonte: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em: 16 mar. 2012.



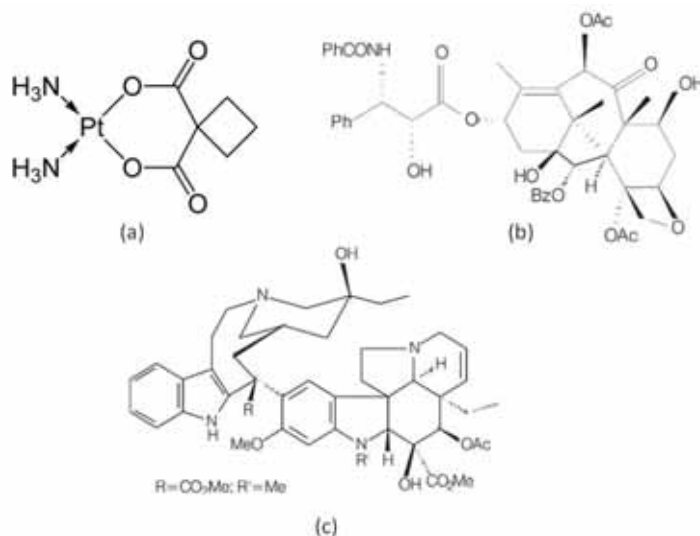
A Figura 1 (b) mostra a ligação intrafita entre um complexo de platina e o DNA. Este tipo de ligação ocorre com bases nitrogenadas adjacentes ou não, mas que pertencem à mesma fita do DNA. A Figura 1 (c) representa a ligação interfitas, na qual cada uma das bases nitrogenadas ligadas ao centro metálico pertence a uma fita diferente do DNA.

Para a cisplatina, o aduto majoritariamente encontrado é o que corresponde à ligação intrafita, envolvendo bases guaninas adjacentes, mais precisamente no N7 da base, o que sugere ser a formação deste aduto o maior responsável pela sua atividade anticancerígena. Quando se liga ao DNA, a cisplatina distorce a sua estrutura, interferindo assim no funcionamento normal deste biopolímero [3].

A cisplatina é utilizada com sucesso para o tratamento de câncer na cabeça, pescoço, pulmão, estômago, mama, ovário, testículo, próstata, entre outros. Porém, sérios efeitos colaterais são detectados durante o tratamento, tais como nefro, neuro e ototoxicidade (perda da audição), mielotoxicidade (supressão da medula óssea) e o desenvolvimento de resistência adquirida a certos tipos de câncer [4]. Estes fatores determinam a importância da investigação e descoberta de novos medicamentos, buscando-se reduzir a toxicidade dos novos fármacos frente a células normais - diminuindo assim os seus efeitos colaterais - e contornar o problema da resistência adquirida.

Existem no mercado diversos medicamentos para o tratamento de variados tipos de câncer. Dentre eles, podemos destacar a carboplatina e dois compostos orgânicos: a vimblastina e o taxol (Figura 2). Porém, os princípios ativos existentes no mercado ainda não são eficientes para o combate de todos os tipos de câncer.

**Figura 2.** Estruturas de outros fármacos utilizadas para o tratamento do câncer: carboplatina (a), taxol (b) e vimblastina (c). Fonte: <http://qnint.sbgq.org.br/qni/visualizarTema.php?idTema=31>. Acessado em: 25/06/2012.



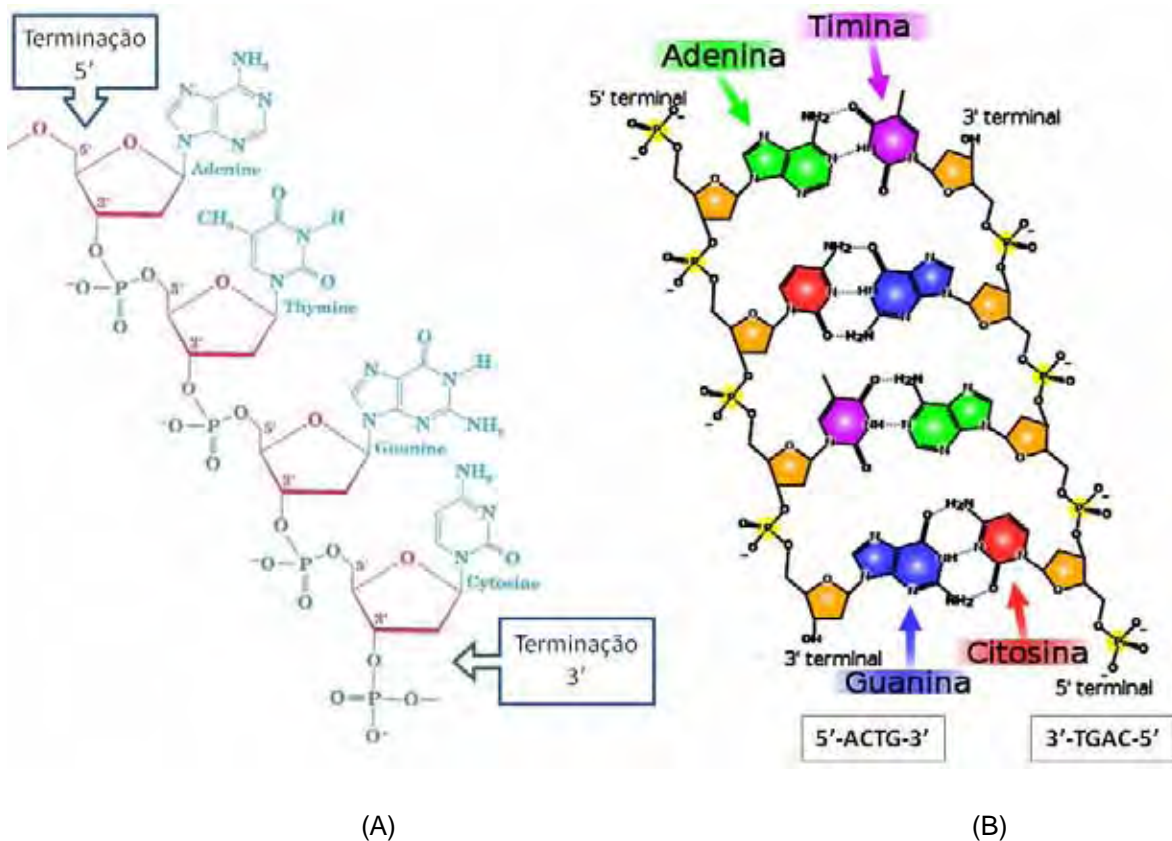
Sabe-se que alvo farmacológico da maioria das substâncias com propriedades antitumorais à base de platina e também de outros metais é a molécula de DNA [5].

O ácido desoxirribonucléico (DNA) é uma estrutura macromolecular cujas unidades básicas são chamadas de nucleotídeos. Nucleotídeos são fosfatos de nucleosídeos. Os nucleosídeos, por sua vez, são constituídos por uma molécula de pentose (2-desoxirribose) ligada a uma base nitrogenada. As bases nitrogenadas variam, porém todas são moléculas planares, podendo ser constituídas por anéis aromáticos de cinco átomos (pirimidinas) ou por dois anéis fundidos, sendo um de 6 e o outro de 5 átomos (purinas). As bases purínicas são a adenina (A) e a guanina (G) e as bases pirimidínicas são a citosina (C) e a timina (T) [6,7].

Os átomos de carbono da pentose são numerados como 1', 2', 3', 4' e 5', para distinguilos dos átomos das bases nucleotídicas, e os grupos fosfatos tem o papel de unir os nucleotídeos entre si, através de ligações de éster formadas com os carbonos 3' de uma pentose e 5' da pentose subsequente, como mostra a Figura 3 (A). No núcleo celular, o DNA é encontrado como uma dupla-fita, na qual as bases nitrogenadas se posicionam voltadas para o centro, envoltas pela cadeia de fosfato e açúcar, a qual se volta para o exterior do biopolímero. As bases nitrogenadas mantêm as duas fitas de DNA ligadas uma à outra por meio de interações de hidrogênio formadas entre A-T e C-G, como mostra a Figura 3 (B). É

convencional escrever uma sequência de ácidos nucleicos começando pela terminação 5' da molécula, usando letras maiúsculas para representar cada uma das bases nitrogenadas.

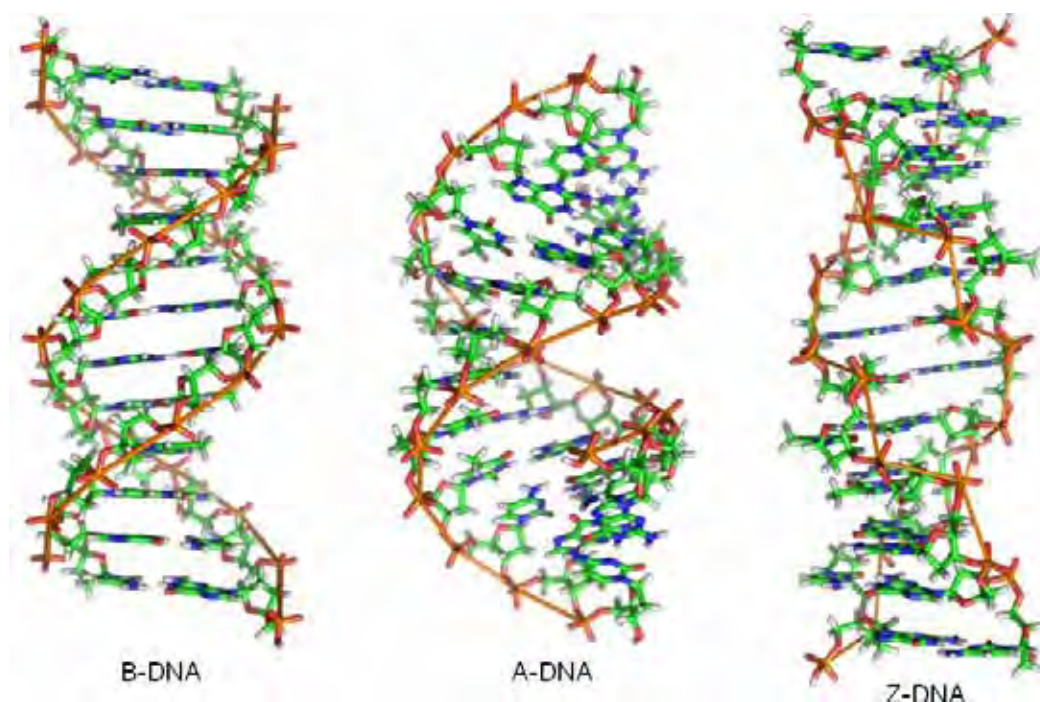
**Figura 3.** Cadeia de nucleotídeos unida por ligações dos grupos fosfatos aos carbonos de pentoses subsequentes (A) [7] e duas cadeias de DNA unidas por interações de hidrogênio formadas entre pares de bases complementares A-T e C-G (B). Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/conteúdos/Citologia2/AcNucleico.php>.



A estrutura de dupla-fita ou dupla-hélice do DNA foi elucidada por Watson e Crick há mais de cinquenta anos [8]. Tal estrutura, denominada B-DNA possui as duas cadeias açúcar-fosfato enroladas uma sobre a outra, formando uma dupla-hélice direcionada para a direita. A cadeia de açúcar-fosfato aniônica é hidrofílica e permanece em contato com a solução aquosa do meio intracelular, enquanto as bases nitrogenadas, que são planares e mais hidrofóbicas, permanecem no centro, em posição perpendicular ao eixo da hélice, empilhadas uma sobre a outra paralelamente, como degraus de uma escada, promovendo interações hidrofóbicas  $\text{p} \times \text{p}$  face a face, a uma distância regular de  $3,5 \text{ \AA}$  entre cada par complementar (Figura 4). Outras formas de DNA, tais como o A-DNA, mais comprimido em função da umidade relativa do meio em que se encontra, e o Z-DNA, com hélices

direcionadas para a esquerda, já foram observados cristalograficamente, porém o B-DNA é a forma que mais prevalece nos sistemas biológicos e, portanto, a mais importante [9].

**Figura 4.** Três formas bem conhecidas de DNA: B-DNA e A-DNA, ambos com voltas helicais direcionadas para a direita. Ambos podem ser encontrados nos sistemas biológicos, sendo o B-DNA a forma mais comum, devido a umidade relativa do meio intracelular. Z-DNA, com h hélices voltadas para a esquerda, sintetizado em laboratório. Fonte: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:A-DNA,\\_B-DNA\\_and\\_Z-DNA.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:A-DNA,_B-DNA_and_Z-DNA.png).



Uma fita de DNA de uma célula humana simples, quando esticada, pode medir dois metros de comprimento [10]. Entretanto, para caber no núcleo celular e interagir seletivamente com outras macromoléculas, a dupla-fita helicoidal se associa a certas proteínas, carregadas positivamente, para promover uma curvatura maior de suas fitas componentes, formando “nós”. Este arranjo permite uma grande compactação da molécula de DNA (cerca de 10.000 vezes), a qual atinge o tamanho de 3  $\mu\text{m}$  no interior do núcleo celular. Esta torção do DNA, que permite a sua intensa compactação, é chamada de **superenovelamento**. Para referir-se ao DNA superenovelado, é comum utilizar o símbolo DNA SC (do inglês, *supercoiling*). A fita de DNA se compacta dentro do núcleo celular para formar os cromossomos; os cromossomos são as estruturas condensadas que carregam os genes, os quais nada mais são do que sequências de ácidos nucleicos que carregam informações reconhecidas seletivamente por certas proteínas [6,10].

Os compostos com propriedades antitumorais conseguem fazer ligações com as bases nitrogenadas do DNA, modificando a estrutura do ácido desoxirribonucleico em sítios importantes de reconhecimento dos genes, impedindo assim a sua atividade normal dentro do núcleo celular, levando a célula tumoral à morte [11]. Entretanto, os efeitos colaterais continuam sendo um problema comum durante o tratamento da doença, devido à baixa ou insuficiente seletividade dos fármacos utilizadas, que terminam por envenenar células saudáveis do organismo. Além disso, há o problema da resistência adquirida e do alto número de reincidências, uma vez que os fatores causadores da doença (poluição, estresse, alguns hábitos como o fumo e a alimentação baseada em carnes vermelhas e embutidos) continuam presentes no dia-a-dia do paciente [12].

Pesquisas do Instituto Nacional do Câncer estimam 512.000 novos casos de câncer no Brasil em 2012, sendo que a maior incidência da doença ocorre na região sudeste (133.000 novos casos de câncer masculino e 139.000, feminino). O tipo de câncer masculino mais frequente é o de próstata (estimam-se 31.000 novos casos na região sudeste em 2012) e o feminino é o de mama (estimam-se 29.000 novos casos para este ano) [12]. Todas essas informações mostram a necessidade da constante investigação de novos princípios ativos bem como do mecanismo de ação dos mesmos.

## **1.2. Compostos de coordenação de paládio(II) como agentes citotóxicos**

O íon  $\text{Pd}^{2+}$  tem configuração  $d^8$  e é paramagnético. A maioria dos seus complexos possui arranjo quadrado-planar ao redor do centro metálico, sendo diamagnéticos [13].

A atividade biológica de complexos de Pd(II) tem sido alvo constante de muitas investigações uma vez que a química de coordenação do íon Pd(II) é muito parecida com a da platina(II) e ambas as espécies possuem praticamente o mesmo raio iônico ( $\text{Pt(II)} = 0,74 \text{ \AA}$  e  $\text{Pd(II)} = 0,78 \text{ \AA}$ ) [14].

De uma maneira geral, é bem estabelecido que muitos complexos de Pd(II) apresentam efeitos frequentemente mais brandos sobre as células cancerosas quando comparados aos compostos de Pt(II). Esta diferença ocorre provavelmente em função de parâmetros cinéticos, pois os complexos de paládio(II) reagem  $\approx 10^5$  vezes mais rapidamente que seus análogos de Pt(II) [15,16]. Dessa forma, a baixa atividade antitumoral de parte dos complexos de Pd(II) é atribuída aos rápidos processos de hidrólise, que conduzem à dissociação dos grupos abandonadores em solução e, conseqüentemente, à formação de espécies muito reativas e incapazes de atingir seus alvos farmacológicos [16]. Uma das estratégias empregadas no planejamento de metalo-fármacos de Pd(II)



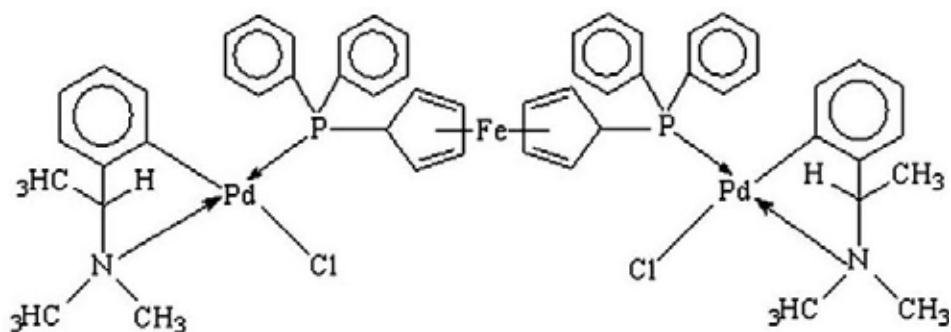
termodinamicamente mais estáveis e cineticamente inertes envolve a síntese de quelatos de paládio(II). A escolha apropriada dos ligantes é crucial, pois eles tem o papel de modificar a reatividade e a lipofilicidade do complexo, tornando-o apto a atingir o alvo biológico sem sofrer alterações estruturais que resultem na sua inatividade [17,18]. Neste contexto entram os complexos ciclometalados de paládio(II). No âmbito da pesquisa nacional, o primeiro estudo sobre a atividade citotóxica de ciclometalados de paládio(II) foi realizado pelo nosso grupo em 1999 em parceria com pesquisadores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR-UNESP) [19]. Resultados muito promissores foram obtidos na investigação da atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais humanas C6(glioma cerebral), Hep-2(orofaringe) e Hela(cólon de útero) empregando-se derivados mono e binucleares de Pd(II) contendo fosfinas (Figura 5), preparados a partir da reação entre o ciclometalado  $[Pd(C_2,N-dmba)(\mu-N_3)]_2$  e as difosfinas 1,3-bis(difenilfosfina)propano (dppp), 1,4-bis (difenilfosfina)butano (dppb); cis-1,2 bis(difenilfosfina)etileno (cis-dppet) e trans-1,2(difenilfosfina)etileno (trans-dppet).

**Figura 5.** Valores de IC50 de organopaladados frente a algumas linhagens tumorais humanas [19].

HeLa, 24,0 $\mu$ M	HeLa, 10,0 $\mu$ M	HeLa, > 30,0 $\mu$ M	HeLa, 1,0 $\mu$ M	HeLa, 1,75 $\mu$ M
Hep-2, 25,0 $\mu$ M	Hep-2, 7,5 $\mu$ M	Hep-2, > 30,0 $\mu$ M	Hep-2, 1,8 $\mu$ M	Hep-2, 2,20 $\mu$ M
C6, 15,5 $\mu$ M	C6, 7,0 $\mu$ M	C6, > 30,0 $\mu$ M	C6, < 0,5 $\mu$ M	C6, 0,85 $\mu$ M

BINCOLETTO C. e colaboradores [20] sintetizaram o complexo ciclopaladado dimérico, com *N,N'*-dimetil-1-fenetilamina (dmpa) e bis(difenilfosfina)ferroceno (dppf), este último coordenado em ponte (Figura 6).

**Figura 6.** Estrutura do complexo dimérico ciclopaladado  $[\{PdCl(dmpa)\}_2(dppf)]$  [20].

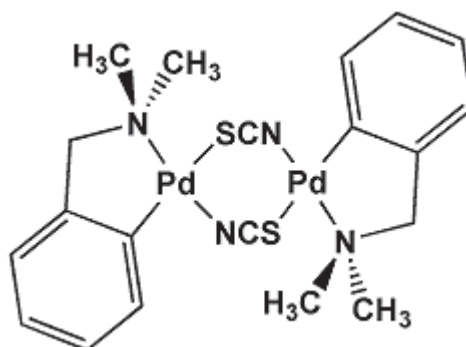


A atividade biológica deste complexo foi avaliada frente ao tumor de carcinoma mamário murino metastático Walker-256, *in vivo*. Neste experimento, os animais foram inoculados com as células tumorais na pata direita e inoculados com células tumorais juntamente com uma dose de 2,0 mg/kg do complexo ciclopaladado na pata esquerda. Após 12 dias, os tumores alcançaram um peso máximo de  $4,0 \pm 1,0$  g nas patas direitas (não-tratadas com nenhuma substância). Entretanto, os tumores localizados nas patas esquerdas dos animais, as quais receberam a dose contendo o complexo de paládio, tiveram o seu peso reduzido para  $0,3 \pm 0,1$  g. Verificou-se também que este composto reverteu em 90% dos casos os tumores Walker instalados.

O complexo  $[\{PdCl(dmpa)\}_2(dppf)]$  não apresentou atividade frente ao tumor não-metastático de Ehrlich, inoculado também em ratos. Neste estudo observou-se também a atividade biológica do complexo sobre a enzima lisossomal Catepsina B, envolvida em processos de proliferação de células endoteliais em angiogênese e metástase. Isto sugere que o alvo farmacológico deste composto não é o núcleo celular, mas sim o lisossomas e que o complexo ciclopaladado estudado aqui apresenta atividade antimetastática em tumores murinos. Investigações realizadas no fígado, baço e rins dos animais demonstraram que este composto não é tóxico a nenhum destes tecidos.

ROCHA M. C. e colaboradores [21] determinaram a atividade do complexo ciclometalado  $[Pd(dmba)(\mu-SCN)]_2$  frente a linhagem de células de tumor murino de Ehrlich (EAT), pelo ensaio de MTT. A estrutura do complexo é mostrada na Figura 7.

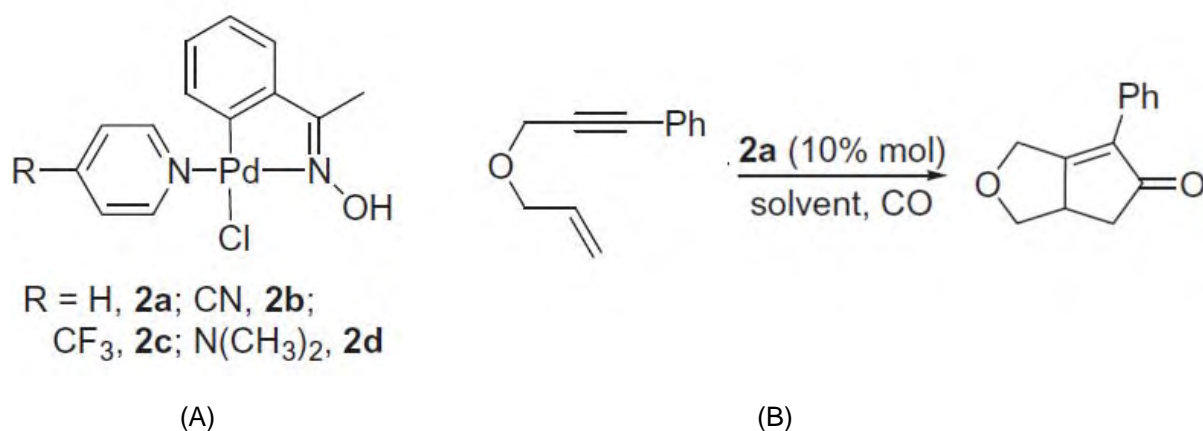
**Figura 7.** Estrutura do complexo ciclometalado  $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-SCN})]_2$  (dmba = *N,N*-dimetilbenzilamina) [21].



No ensaio de citotoxicidade, as células tumorais EAT foram tratadas com o complexo ciclopaladado ou com cisplatina durante 48 horas e o complexo mostrou atividade maior do que a da cisplatina, com  $\text{IC}_{50} = 5,29 \pm 3,89 \mu\text{M}$ , cerca de seis vezes menor do que o da droga padrão ( $\text{IC}_{50(\text{cis-DDP})} = 33,77 \pm 2,29 \mu\text{M}$ ).

Complexos ciclometalados de paládio(II) contendo oximas têm sido extensivamente investigados por suas propriedades catalíticas em reações orgânicas. São complexos geralmente estáveis na presença de oxigênio e umidade [22] e muito utilizados para a formação de ligações C-C ou C-heteroátomo, em reações de Heck e SuzukiMiyaura. Recentemente, três complexos ciclopaladados contendo um derivado da benzaldeidoxima foram utilizados ineditamente como catalisadores na reação de Pauson-Khad. Esta reação envolve a cicloadição de um alceno, um alcino e um monóxido de carbono levando a formação de ciclopentanonas utilizadas como intermediários nas sínteses de produtos naturais (Figura 8) [23].

**Figura 8.** Complexos ciclopaladados com atividade catalisadora em reações de Pauso-Khad (A). Esquema da reação de Pauson-Khad (B) [23].

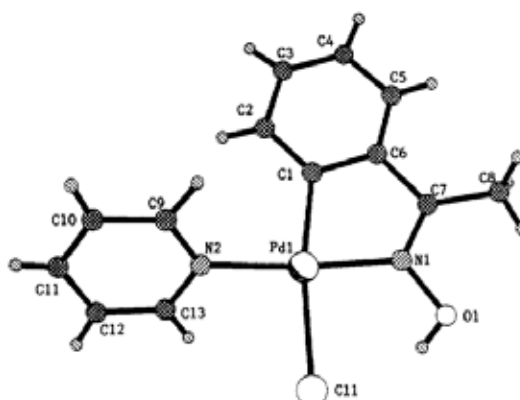


Apesar do frequente emprego de complexos ciclopaladados contendo derivados das oximas, como catalisadores ou pré-catalisadores eficientes, e acessíveis pouco se sabe sobre as potencialidades biológicas dos mesmos.

Estudos de citotoxicidade realizados por HIGGINS J. D. et al. [24] frente a diversas linhagens de células tumorais humanas mostraram que os complexos contendo metalociclos insaturados apresentam maior atividade do que os complexos metalociclicos saturados.

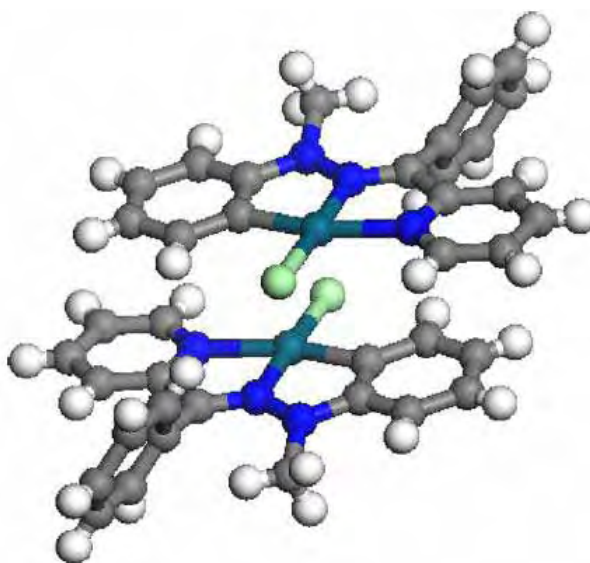
As benzaldeidoximas são capazes de formar complexos contendo metalociclos insaturados com o paládio(II), coordenando-se ao metal através do átomo de nitrogênio imínico e do átomo de carbono em posição *orto* no anel aromático, formando um metalociclo de cinco membros (Figura 9) [25].

**Figura 9.** Estrutura do complexo ciclopaladado cloro[2-(1-(hidroxilimino)metil)fenil-C',N](piridina)paládio(II) [25].



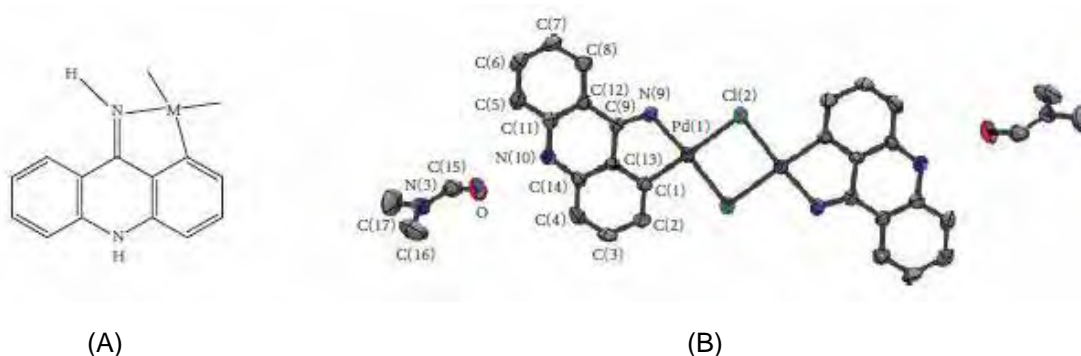
Estudos publicados na literatura por CEDER R. M. e colaboradores [26] mostraram que a aromaticidade dentro do metalociclo influencia diretamente na reatividade de todo o composto e que complexos contendo metalociclos aromáticos são menos reativos do que os não-aromáticos. É possível que a maior estabilidade conferida aos metalociclos aromáticos possa contribuir para a manutenção de sua estrutura mesmo dentro do meio biológico, até que atinja o alvo farmacológico nas células tumorais. Além disso, há relatos na literatura de que tais complexos, a exemplo do ciclopaladado com 2-benzoilpiridina-*N*-metil-*N*-fenilhidrazona são capazes de formar interações de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  entre os seus anéis, dentro do arranjo molecular (Figura 10) [27] e que portanto, podem também interagir com as bases nitrogenadas do DNA.

**Figura 10.** Interações hidrofóbicas entre os anéis aromáticos planos fundidos das unidades de complexo de paládio(II) com 2-benzoilpiridina-*N*-metil-*N*-fenilhidrazona [27].



De fato, RIERA X. [28] e colaboradores verificaram a intercalação do ciclopaladado contendo o ligante 9-aminoacridina (9-AA) (Figura 11) no DNA, por meio de ensaios de dicroísmo circular e mobilidade eletroforética.

**Figura 11.** Estrutura do anel ciclometalado formado com o ligante 9-aminoacridina (A). Estrutura molecular do complexo ciclopaladado  $[Pd(9-AA)(\mu-Cl)]_2 \cdot 2DMF$  [28].



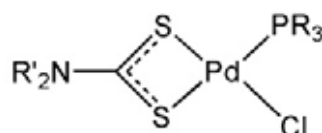
CUSUMANO M. e colaboradores [29] também verificaram a ocorrência de intercalação de ciclopaladados contendo o ligante 2,2'-bipiridina, por meio de espectroscopia eletrônica e dicroísmo circular. É importante ressaltar que tais complexos possuem metalociclos insaturados.

Tendo em vista as propriedades químicas dos complexos ciclopaladados contendo o ligante benzaldeidoxima e a ausência de informações a respeito de suas propriedades biológicas, essa classe de compostos tornou-se alvo de nossos estudos sobre síntese, caracterização e estudo da atividade citotóxica dos mesmos.

Ligantes orgânicos sulfurados têm sido alvos constantes de investigações, funcionando como quimioprotetores do organismo durante a quimioterapia a base de complexos de platina. Em particular, moléculas contendo os grupos tiocarbonila e tiol mostraram promissora atividade na modulação da nefrotoxicidade causada pela cisplatina [30]. Sabe-se que os ditiocarbamatos, por exemplo, removem seletivamente a platina de complexos enzima-tiol dentro das células, através de um ataque nucleofílico dos átomos quelantes de enxofre à platina. Tal seletividade reacional protege os tecidos normais sem inibir o efeito antitumoral do composto [31].

KHAN H. e colaboradores testaram a atividade biológica de cinco complexos de Pd(II) contendo diferentes ditiocarbamatos e derivados da fosfina, frente a linhagem celular DU145, de câncer de próstata, resistente ao tratamento com cisplatina [32]. A estrutura geral dos complexos é mostrada na Figura 12.

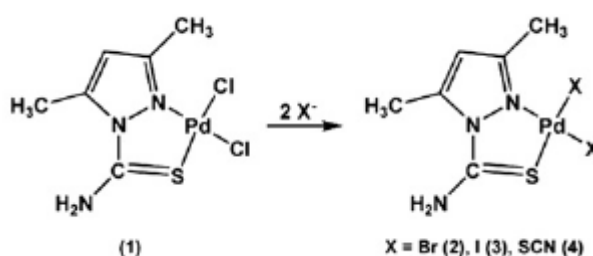
**Figura 12.** Estrutura geral dos complexos  $[\text{Pd(II)}(\text{DT})(\text{PR}_3)\text{Cl}]$ . Complexo 1: DT = dimetilditiocarbamato,  $\text{PR}_3$  = benzildifenilfosfina; 2: DT = dietilditiocarbamato,  $\text{PR}_3$  = difenil-2-metoxifenilfosfina; 3: DT = dietilditiocarbamato,  $\text{PR}_3$  = difenil-p-toluilfosfina; 4: DT = dicicloexilditiocarbamato,  $\text{PR}_3$  = difenil-m-toluilfosfina; 5: DT = dimetilditiocarbamato,  $\text{PR}_3$  = tricicloexilfosfina; 6: DT = bis(2-metoxietilditiocarbamato),  $\text{PR}_3$  = difenil-2-piridilfosfina [32].



As medidas de atividade dos complexos foram realizadas utilizando-se o ensaio com sulforrodamina B (SRB). Resultados promissores foram obtidos, observando-se valores de  $\text{IC}_{50}$  (índice de citotoxicidade ou concentração do composto capaz de matar 50% das células viáveis) entre 7 e 1  $\mu\text{M}$ . Os complexos 5 e 6 mostraram ser os mais ativos, com índices de citotoxicidade ( $\text{IC}_{50}$ ) iguais a 1,33 e 1,55  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

ROCHA F. V. *et al.* [33] investigaram a atividade citotóxica *in vitro* de quatro complexos de paládio(II) contendo o ligante 1-tiocarbamoil-3,5-dimetilpirazol (tdmPz), mostrados na Figura 13.

**Figura 13.** Estrutura dos complexos de fórmula geral  $[\text{PdX}_2(\text{tdmPz})]$ , X = Cl (1), Br (2), I (3), SCN (4) [33].

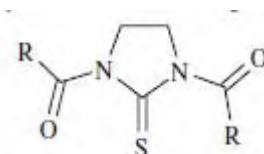


A atividade antitumoral destes complexos foi avaliada frente às linhagens LM3 e LMM3 de câncer mamário (sensível e resistente a cisplatina, respectivamente), através do ensaio colorimétrico com MTT. Resultados promissores foram observados para os complexos  $[\text{PdBr}_2(\text{tdmPz})]$  (2) e  $[\text{PdI}_2(\text{tdmPz})]$  (3). O complexo 2 apresentou um índice de citotoxicidade ( $\text{IC}_{50}$ ) igual a 24,5  $\mu\text{M}$  frente a linhagem LM3 (sensível ao fármaco padrão) e o complexo 3 apresentou  $\text{IC}_{50} = 20,7 \mu\text{M}$  frente a linhagem LMM3. Os índices de citotoxicidade da cisplatina frente a estas linhagens é de 30,3 e maior que 140  $\mu\text{M}$ , respectivamente,

sugerindo que os complexos sintetizados possuem atividade citotóxica satisfatória em menores concentrações do que a o composto antitumoral padrão. Além disso, a citotoxicidade destes complexos frente a células saudáveis retiradas do exudato peritoneal de ratos é significativamente menor do que a da cisplatina. Neste caso o  $IC_{50}$  observado para o complexo (2) foi de 29,3  $\mu\text{M}$ , o complexo (3), 50,2  $\mu\text{M}$  e a cisplatina, 62,8  $\mu\text{M}$ .

Cesarini S. *et al.* [34] investigaram a ação antiproliferativa de diversas aciltioureas (ATUs), derivadas da imidazolidina-2-tiona, frente a linhagem de células T linfoblastóides MT4. A estrutura básica das moléculas é mostrada na Figura 14.

**Figura 14.** Estrutura das aciltioureas derivadas da imidazolidina-2-tiona [34]. R = 4-clorobenzoil (1j); 3,4-diclorobenzoil (1n); 3,4,5-trimetoxibenzoil (1q); 2-furoil (1s), dentre outros.

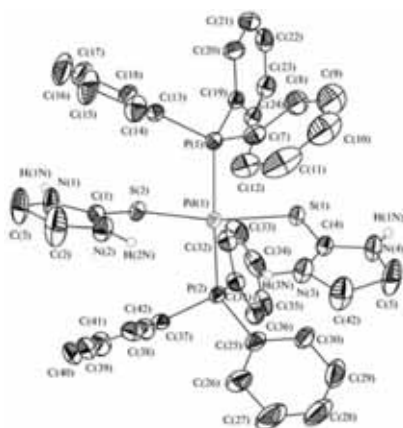


Os complexos sintetizados apresentaram valores de  $IC_{50}$  que variaram de 4,6 a 9,9  $\mu\text{M}$ . Além disso, o complexo 1s apresentou atividade inibidora do crescimento celular frente as linhagens DU-145 de câncer de próstata humano e MCF7 de câncer de mama humano, com  $GI_{50} = 2,7$  e 3,0  $\mu\text{M}$ , respectivamente ( $GI_{50}$  = concentração do composto capaz de produzir 50% de inibição do crescimento).

Diversos compostos de coordenação de paládio(II) contendo trifetilfosfina e tioamidas foram sintetizados por NADEEN S. e colaboradores [35]. A atividade antimicrobiana destes compostos de fórmula geral  $[\text{Pd}(\text{L})_2(\text{PPh}_3)_2]\text{Cl}$  foi testada frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, através do ensaio de difusão em gel de agar. Resultados promissores foram encontrados para o composto contendo a mercaptopiridina coordenada ao centro metálico de paládio(II), o qual apresentou zonas de inibição de 95, 100 e 85 % frente as três últimas cepas, respectivamente. A atividade antiproliferativa dos mesmos complexos foi testada frente a linhagem PC3 de câncer de próstata. O complexo contendo o ligante dimetiltiouréia apresentou um  $IC_{50}$  significativo, de 5,80  $\mu\text{M}$ . Os complexos contendo tiouréia ou mercaptopiridina apresentaram resultados menos significativos, com valores de  $IC_{50}$  de 18 e 80  $\mu\text{M}$ , respectivamente.



Complexos de paládio(II) contendo o derivado da tiouréia, imidazolidina-2-tiona (im), foram utilizados em estudos sobre atividade antibacteriana [36]. O complexo  $[\text{PdBr}_2(\text{im})_2]$  apresentou atividade moderada frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* no ensaio de difusão em gel de agarose (zona de inibição igual a aproximadamente 56 %). AHMAD S. e colaboradores [37] sintetizaram o complexo  $[\text{Pd}(\text{im})_2(\text{PPh}_3)_2]\cdot\text{Cl}_2\cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$ , o qual apresentou a concentração inibitória mínima (MIC) de  $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , considerado um valor promissor, frente a mesma cepa bacteriana. A estrutura do complexo é mostrada na Figura 15.



**Figura 15.** Estrutura molecular do complexo  $[\text{Pd}(\text{im})_2(\text{PPh}_3)_2]\cdot\text{Cl}_2\cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$  [37].

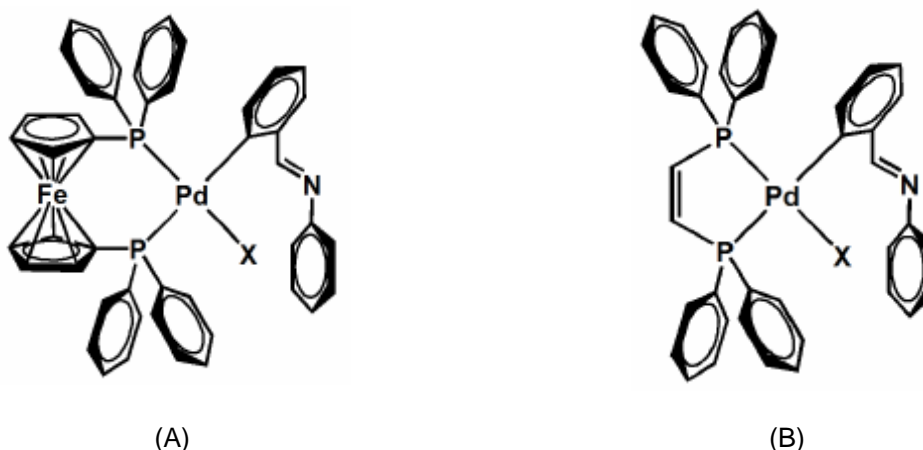
A estrutura do complexo mostra o ligante imidazolidina-2-tiona coordenada de forma neutra, via átomo de enxofre. As duas moléculas de Im encontram-se em posição trans uma em relação a outra, assim como as duas moléculas de  $\text{PPh}_3$ .

As informações sobre a atividade antitumoral de complexos contendo a imidazolidina-2-tiona ainda são muito escassas na literatura. Entretanto, resultados satisfatórios foram obtidos em nosso grupo de pesquisa com o estudo da atividade citotóxica de complexos contendo tiouréias, frente a linhagens celulares de adenocarcinoma mamário LM3 [38]. Os complexos  $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{N}_3)(\text{tu})]$  e  $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{I})(\text{tu})]$  apresentaram valores de  $\text{IC}_{50}$  de 14,9 e 14,4  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Estes valores são menores do que o  $\text{IC}_{50}$  observado para a cisplatina (30  $\mu\text{M}$ ). Porém, os complexos da mesma família contendo os haletos Cl ou Br como co-ligantes aniônicos não se mostraram tão eficientes frente à mesma linhagem ( $\text{IC}_{50} = 72$  e 29  $\mu\text{M}$ , respectivamente). Estes resultados, ao mesmo tempo que demonstram a potencialidade dos complexos de paládio(II) contendo ligantes com grupos  $\text{C}=\text{S}$  em sua estrutura, mostram também a grande diferença observada na atividade citotóxica dos complexos quando os seus co-ligantes são substituídos.

Além disso, complexos com ligantes fosforados também mostraram atividade promissora frente a linhagem LMM3 de câncer mamário metastático murino [39]. Os

complexos  $[\text{Pd}(\text{bzan})(\text{SCN})(\text{dppf})]$ ,  $[\text{Pd}(\text{bzan})(\text{SCN})(\text{dppet})]$  e  $[\text{Pd}(\text{bzan})(\text{NCO})(\text{dppet})]$  (bzan = *N*-benzilidenoanilina, dppf = 1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno, dppe = *cis* 1,2-bisdifenilfosfinaetileno) apresentaram valores de  $\text{IC}_{50}$  iguais a 28, 7,75 e 12,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente, os quais são significativamente menores do que o apresentado pela cisplatina (104  $\mu\text{M}$ ). As estruturas dos complexos foram propostas com base em dados de análise elementar, espectroscopia vibracional no infravermelho e RMN (Figura 16).

**Figura 16.** Estruturas propostas para os complexos  $[\text{Pd}(\text{bzan})(\text{SCN})(\text{dppf})]$ ,  $[\text{Pd}(\text{bzan})(\text{SCN})(\text{dppet})]$  e  $[\text{Pd}(\text{bzan})(\text{NCO})(\text{dppet})]$  [39] (X = SCN ou NCO).



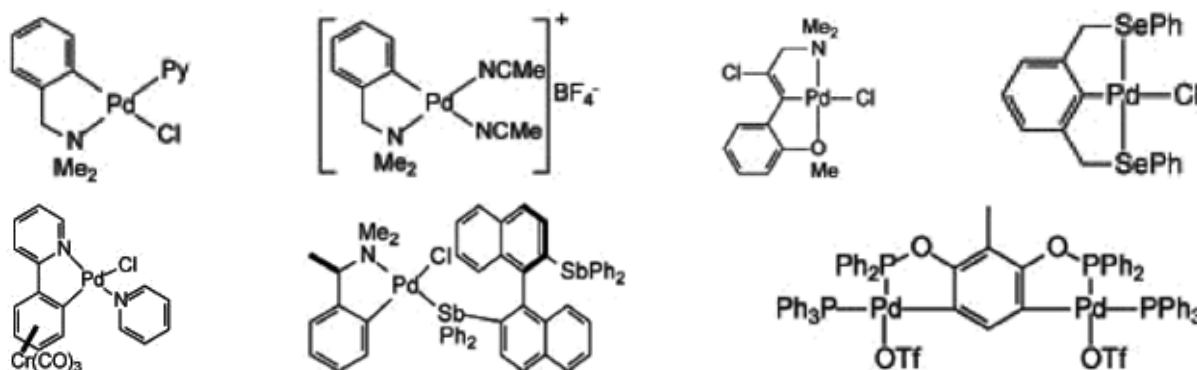
Estes valores encorajam a continuidade das investigações utilizando complexos de paládio(II) com derivados da tiouréia e fosfinas.

### 1.3. Considerações sobre os complexos ciclopaladados

O paládio pertence ao grupo da platina e possui configuração eletrônica  $[\text{Kr}] 4d^8$  nos compostos inorgânicos mais comuns de que faz parte. Nesses, seu estado de oxidação é +2, assumindo número de coordenação quatro e geometria quadrática-plana quase na totalidade dos casos.

Muitos artigos contemplam o envolvimento deste metal na composição de espécies organometálicas [40] (Figura 17) denominadas ciclopaladados.

**Figura 17.** Exemplo de complexos ciclopaladados. Fonte: [40].

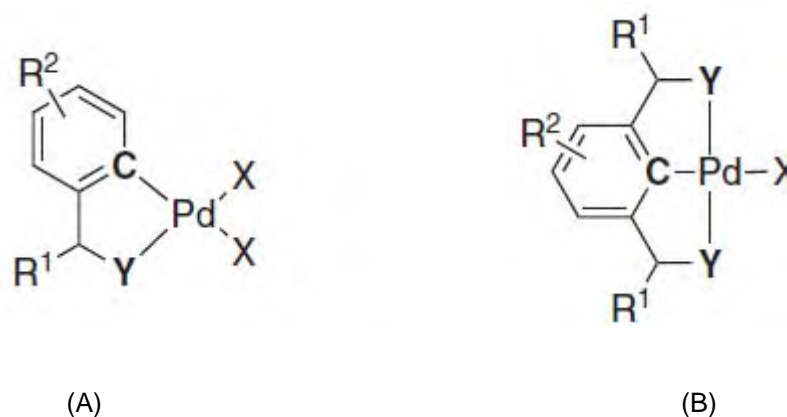


Os ciclopaladados encontram vasta aplicação como catalisadores em sínteses orgânicas [41-44], materiais líquido-cristalinos [45,46], em nanotecnologia [40] e na área biológica [47-50].

### 1.3.1 Definição

Ciclopaladado pode ser definido como qualquer composto de paládio que contenha uma ligação Pd-C, estabilizada intramolecularmente por um ou dois átomos doadores neutros (Y) [40]. Portanto, os complexos ciclopaladados podem ser do tipo CY ou do tipo YCY (Figura 18).

**Figura 18.** Ciclopaladados do tipo CY (A) e pinça (B). Fonte: [40].



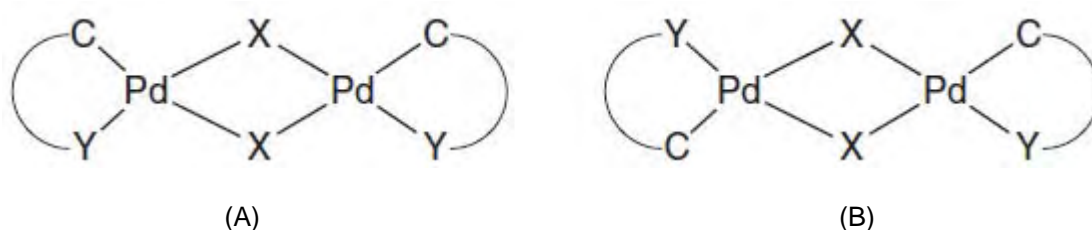
Y = NR<sub>2</sub>, PR<sub>2</sub>, AsR<sub>2</sub>, SeR<sub>2</sub>, etc.

R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = alquil, aril, etc.

X = Cl, Br, I, OAc, solvente, etc.

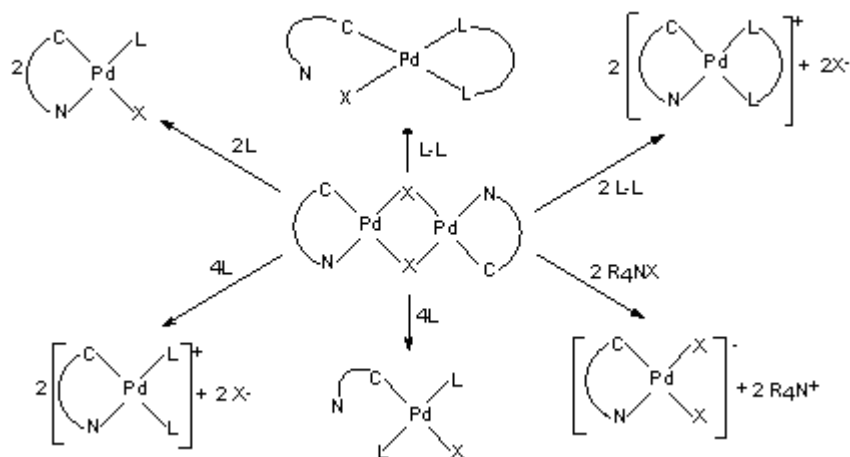
Os ciclopaladados do tipo CY são também chamados de ciclopaladados de quatro elétrons e podem ser neutros, aniônicos ou catiônicos. Além disso, podem existir também como dímeros, contendo halogênios ou pseudoalogênios ligados em ponte, nas conformações cisóide ou transóide (Figura 19).

**Figura 19.** Ciclopaladados diméricos nas conformações: cisóide (A) e transóide (B). Fonte: [40]



Os ciclopaladados fazem parte do grupo de espécies ciclometaladas e, portanto, a reatividade destes compostos pode resultar em uma ampla variedade de complexos. Por exemplo, a clivagem de ciclometalados contendo haletos em ponte por ligantes neutros como as piridinas e fosfinas [51,52] e ligantes aniônicos como a azida, cianato, tiocianato, entre outros [53,54], são reações clássicas dos compostos ciclometalados, como ilustrado pela Figura 20.

**Figura 20.** Exemplos de produtos de reações obtidas por clivagem de compostos ciclometalados por ligantes aniônicos, neutros ou catiônicos. Fonte: autor.



X = halogênio; L = fosfina; R = *n*-Bu.

### 1.3.2. 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  $M_2[PdCl_4]$ , ( $M = Li$  ou  $K$ ) ou  $Pd(OAc)_2$ , e um substrato orgânico que contenha um átomo de nitrogênio planar  $sp^2$  a três ligações químicas de distância de um fragmento C-H aromático. O produto resultante é uma espécie bimetálica na qual duas metades "(C,N)Pd" se encontram unidas por dois ânions X (Cl ou  $OAc^-$ ) [55]. Pode-se dizer que as espécies ciclometaladas binucleares são sempre os precursores dos complexos ciclometalados mononucleares, os quais são sintetizados por reações de clivagem dos complexos diméricos.

O método mais comumente utilizado para a síntese de ciclopaladados do tipo CY consiste na ativação da ligação C-H assistida por um heteroátomo. Geralmente, os ligantes utilizados são doadores bidentados  $4e^-$ , monoaniônicos Y,C<sup>-</sup> tais como aminas, iminas, fosfinas e tioéteres. Sendo assim, Y pode ser de natureza variada (N, P e S são os mais comuns) [40].

Para que a reação de ciclometalação se processe, primeiramente é necessário que se forme a ligação entre o heteroátomo Y e o átomo de paládio. A ocorrência desta ligação promove o arranjo do centro metálico e da ligação C-H em posições propícias para a ciclometalação. Sendo assim, existe a pré-organização dos componentes reativos, e esta é assistida pelo heteroátomo [40].

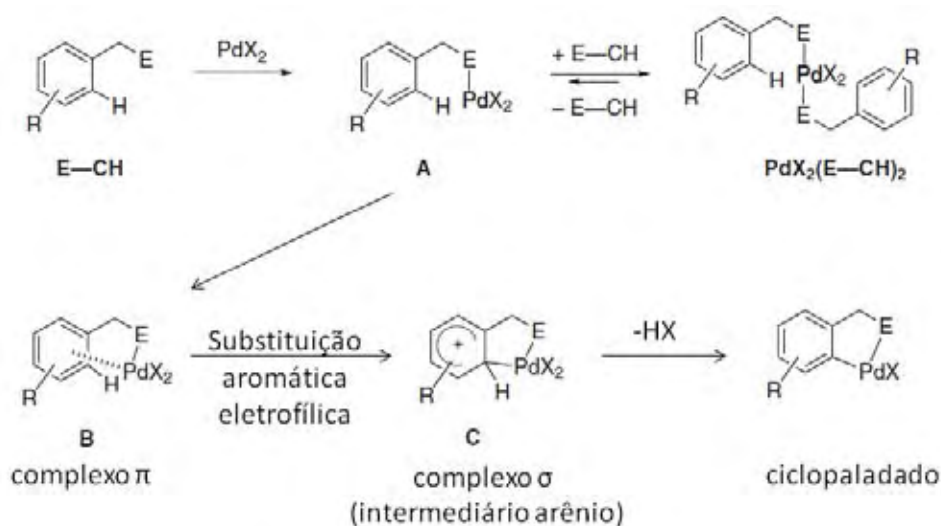
A formação final de anéis de cinco membros observada para a maioria dos complexos ciclopaladados permite que o átomo de Pd(II) se posicione em ângulos de ligação de  $90^\circ$  em relação aos ligantes, formando sua geometria quadrado-planar. Os outros átomos constituintes do metalociclo, com hibridização  $sp^2$  ou  $sp^3$ , se posicionam em ângulos de ligação entre  $109^\circ$ - $120^\circ$ .

Pode-se dizer que o heteroátomo do ligante exerce um efeito direcionador sobre a reação de ciclometalação, e que através da posição deste é possível prever qual o átomo de carbono que participa do metalociclo.

Mais de um mecanismo já foi proposto para esta reação. Entretanto, o mecanismo de substituição eletrofílica aromática é o mais aceito. Neste mecanismo, após a coordenação inicial do heteroátomo ao centro metálico, forma-se um complexo pi, que subsequentemente se rearranja em um intermediário arênio (complexo alfa) e, finalmente sofre uma abstração de próton para fornecer o produto ciclopaladado (Esquema 1). A densidade eletrônica na

ligação C-H do arênio é muito importante. Substituintes doadores de elétrons no grupo arênio facilitam a ciclometalação [40].

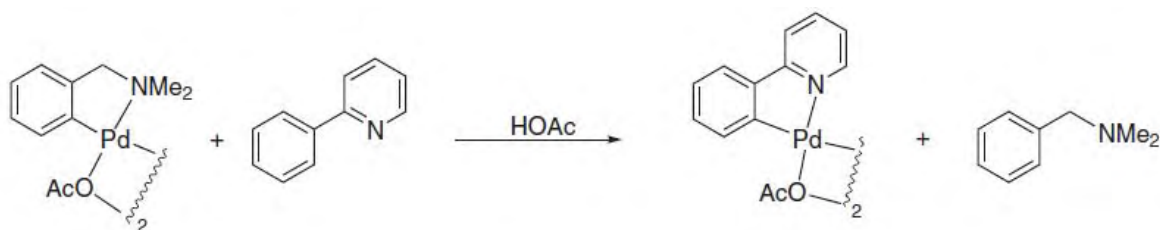
**Esquema 1.** Mecanismo de reação de formação de complexo ciclopaladado por ativação da ligação C-H. Fonte: [40].



Complexos ciclopaladados podem também ser obtidos por reações de transciclometalação. Este tipo de reação, que envolve a troca dos ligantes ciclometalados, já ligados ao centro metálico, constitui um caso particular de ativação da ligação C-H, no qual há o rompimento de uma ligação Pd-C e a formação de outra ligação Pd-C.

A reação de troca de ligantes ciclometalados em meio ácido mostrada no esquema abaixo foi investigada por Ryabov e colaboradores [56,57].

**Esquema 2.** Reação de transciclometalação em meio ácido. Fonte: RYABOV, A. D. [57].



Esta reação foi realizada em meio de ácido acético. Propõe-se um mecanismo dissociativo para a primeira parte da reação, na qual há o rompimento transiente da ligação

entre o átomo de nitrogênio da dimetilbenzilamina e o paládio. A protonação do grupo amínico livre desfavorece a recoordenação deste grupo ao centro metálico e, conseqüentemente, a formação do metalociclo original. O ligante agora ligado de forma monodentada ao paládio é mais suscetível a uma reação de acidólise, capaz de clivar a ligação Pd-C. Investigações cinéticas evidenciam a dissociação do complexo original, com formação de sal de paládio, seguida da reação de ciclometalação com o novo ligante, por meio do mecanismo já discutido anteriormente. É estabelecido que a substituição depende da basicidade do heteroátomo: o novo ligante deve possuir grupamento doador Y menos básico e mais macio do que o grupo que se retira do complexo [40,58].

Além disso, existe um certo nível de aromaticidade nos metalociclos de cinco membros envolvendo ligações conjugadas (C=N-C=C) e os orbitais d preenchidos do paládio, com simetria apropriada. A diferença no caráter aromático do anel ciclometalado de diversos complexos exerce influência direta sobre a reatividade dos mesmos. Estudos estruturais e experimentos de transciclometalação mostram que complexos contendo ligantes amínicos, por exemplo, possuem o metalociclo não-planar e não-aromático, sendo, conseqüentemente, mais reativos e facilmente substituídos por ligantes contendo grupos imínicos (Esquema 2) [55].

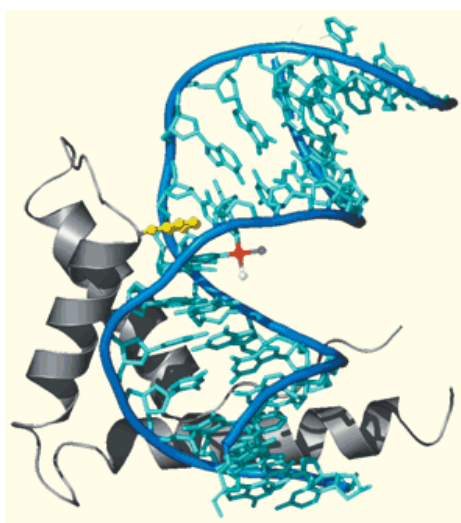
#### **1.4.Principais modos de interação entre os complexos metalo-orgânicos e o DNA**

Compostos de coordenação de diversos metais, tais como Pt, Pd, Ru, Rh, e Fe, dentre outros, já foram empregados em estudos sobre a interação com o DNA [5,9,59]. Dentre os diversos tipos de interação já observados entre complexos metálicos e o DNA destacam-se dois: ligação de coordenação do metal com as bases nitrogenadas e metalintercalação.

Um grande número dos fármacos de Pt já sintetizadas, contendo grupos abandonadores nas suas estruturas, tais como Cl, forma ligações majoritariamente bifuncionais e intrafitas com o N7 da base nitrogenada guanina. As ligações de coordenação entre os metais e a bases nucleotídicas do DNA acarretam certas modificações da sua conformação: um desenrolamento da dupla-hélice no local da ligação, por um ângulo definido, e uma torção da cadeia de fosfatos do DNA, fazendo com que o biopolímero seja dobrado (Figura 21) [60]. Tais mudanças na conformação do DNA alteram algumas de suas propriedades biofísicas, tais como a temperatura de desnaturação térmica ( $t_m$ ) [61-63] e a sua velocidade de migração em gel de agarose ou poliacrilamida, em experimentos de eletroforese [63-66]. Além disso, a ligação coordenada de complexos metálicos às bases

nitrogenadas do DNA pode impedir a ação enzimática de certas endonucleases restritoras [59], responsáveis por clivar o DNA em sítios contendo sequências de bases específicas, produzindo fragmentos menores da biomolécula [6].

**Figura 21.** Modificação da estrutura terciária do DNA causada pelo aduto funcional formado com a cisplatina, impedindo a ação correta de enzimas sobre a sua cadeia Fonte: <http://pubs.acs.org/cen/coverstory/83/8325/8325cisplatin.html>.



A metalintercalação ocorre quando complexos contendo ligantes aromáticos planares, tais como a 2,2'-bipiridina ou 1,10-fenantrolina, interagem com o DNA, primeiramente aproximando-se da sua cadeia por meio de uma interação eletrostática entre o centro metálico positivo do complexo e os grupos fosfatos, carregados negativamente no DNA, e em seguida, inserindo um dos seus ligantes aromáticos planares entre dois pares de bases adjacentes, do biopolímero (Figura 22) [67]. Este tipo de interação também modifica a estrutura terciária do DNA, causando um afastamento dos pares de bases onde se encontra inserido o ligante planar do complexo, aumentando assim a distância entre os pares de bases (de aproximadamente 3,5 Å para aproximadamente 7,0 Å) e, conseqüentemente, o tamanho total da cadeia do biopolímero. O desenrolamento da dupla-hélice no local de inserção também ocorre e o ângulo de torção provocado pode ser medido. As modificações na conformação do DNA, neste caso, modificam a viscosidade de uma solução da macromolécula em água, devido ao aumento do seu tamanho e provoca uma maior estabilização da dupla-hélice de DNA, aumentando assim a sua temperatura de desnaturação ( $t_m$ ) [68].



**Figura 22.** Complexo metalintercalador inserido entre pares de bases adjacentes do DNA e provocando uma modificação na estrutura terciária do biopolímero, no local onde ocorre a inserção [67].



Diante do exposto, esta tese apresenta a síntese e caracterização de compostos de coordenação de Pd(II) com ligantes sulfurados, fosforados e de complexos ciclometalados neutros e catiônicos, contendo os ligantes benzaldeidoxima e derivados da tiouréia. São também discutidos resultados de ensaios de citotoxicidade *in vitro*, de alguns dos compostos sintetizados, frente a duas linhagens de células tumorais (glioblastoma cerebral humano e tumor mamário murino), bem como os resultados dos estudos de interação de alguns dos complexos com o DNA.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

I) Síntese e caracterização espectroscópica de complexos de paládio(II), utilizando os haletos cloreto (Cl), brometo (Br) e iodeto (I) e o pseudo-haleto tiocianato (SCN) e os ligantes benzaldeidoxima (Hbzox), tiouréia (tu), dimetiltiouréia (dmtu), imidazolidina-2-tiona (im), bipyridina (bipy) e trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>).

II) A investigação do comportamento térmico dos complexos ciclopaladados diméricos de fórmula geral  $[\text{Pd}(\text{bzox})(\mu\text{-X})_2]$ , em que X = Cl, Br ou SCN, e dos compostos de coordenação contendo trifenilfosfina e imidazolidina-2-tiona, de fórmula geral  $[\text{PdX}_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$ , em que X = Cl, Br, I ou SCN .

III) Investigação do índice de citotoxicidade frente a células de glioblastoma cerebral humano e tumor mamário de murinos dos compostos de coordenação da família  $[\text{PdX}_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$  e  $[\text{PdX}(\text{im})(\text{bzox})]$ , respectivamente.

IV) Investigação da possível interação *in vitro* dos complexos ciclometalados  $[\text{Pd}(\text{bzox})(\text{tu})_2]\text{Cl}$ ,  $[\text{Pd}(\text{bzox})(\text{dmtu})_2]\text{Cl}$  e  $[\text{Pd}(\text{bzox})(\text{bipy})]\text{Cl}$  com a dupla-fita de DNA.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Reagentes e solventes

Em todas as sínteses foram utilizados reagentes P. A. Os principais solventes e reagentes estão listados nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1.** Principais solventes utilizados nas sínteses.

Solvente	Fórmula	Procedência
Acetona	$C_3H_6O$	Merck
Acetonitrila	$H_3CCN$	Merck
Ácido acético	$H_3CCOOH$	Synth
Álcool isopropílico	$C_3H_8O$	Mallinckrodt
Clorofórmio	$CHCl_3$	Tedia
Dietil éter	$C_4H_{10}O$	Mallinckrodt
Metanol	$CH_3OH$	Merck
Pentano	$C_5H_{12}$	Merck
Acetona deuterada	$C_3D_6O$	Aldrich
Clorofórmio deuterado	$CDCl_3$	Aldrich

**Tabela 2.** Principais reagentes utilizados nas sínteses.

Reagente	Fórmula	Procedência
Cloreto de paládio(II)	PdCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich
Cloreto de lítio	LiCl	Sigma Aldrich
Tiocianato de potássio	KSCN	Riedel-de Haen
Brometo de potássio	KBr	Merck
Iodeto de potássio	KI	Merck
Tiouréia (tu)	N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> CS	Aldrich
Metiltiouréia (metu)	CH <sub>5</sub> N <sub>2</sub> CS	Aldrich
N,N-dimetiltiouréia (dmtu)	C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> CS	Aldrich
Imidazolidina-2-tiona (im)	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> CS	Aldrich
Trifenilfosfina (PPh <sub>3</sub> )	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> P	Aldrich
N,N-dimetilbenzilamina (dmba)	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N	Aldrich
Benzaldeidoxima (HbzoX)	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> NOH	Aldrich
Trietilamina	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N	Carlo Erba
Sal de tetrazólio {3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2-5- difeniltetrazólio} (MTT)	C <sub>40</sub> H <sub>30</sub> N <sub>10</sub> O <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub>	Across Organics
Sal de tetrazólio {hidróxido de 2,3-bis(2-metoxil-4-nitro-5- sulfofenil)-5- [(fenilamino)carbonil]-2H- tetrazólio} (XTT)		Biological Industries
Brometo de etídio (EtBr)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> Br	Merck
CT-DNA		Sigma Aldrich
RPMI1640-C		Sigma

## 3.2 Metodologia

### 3.2.1 Sínteses

Um sistema de refluxo foi utilizado durante as sínteses em que foi necessária temperatura superior à ambiente (aproximadamente 30 °C). As demais sínteses foram realizadas em atmosfera aberta e à temperatura ambiente, em erlenmeyer com tampa esmerilhada. Não foram necessários cuidados especiais, como atmosfera inerte e nem abrigo da luz, já que os compostos são estáveis ao ar e à luz.

### 3.2.2 Purificação

Os compostos sintetizados foram isolados por meio de filtração e lavados em abundância com solventes apropriados para purificação.

## 3.3 Caracterização dos compostos

### 3.3.1 Medidas de temperatura de fusão ou decomposição

As temperaturas de decomposição foram medidas em um aparelho digital MQAPF-302 da Microquímica que opera até 350 °C.

### 3.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados no espectrômetro *NICOLET* modelo *SX-FT Impact 400*, na região de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando pastilha de KBr.

### 3.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $^1\text{H}$ ) foram registrados no espectrofotômetro multinuclear *VARIAN*, modelo *INOVA 500*, operando a 500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Utilizou-se clorofórmio, dimetilsulfóxido ou acetona deuterados para a dissolução das amostras.

### 3.4.3 Análise elementar de C, H, N

As análises quantitativas do teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas no analisador automático *Elemental analyser CHN*, modelo 2400 da *Perkin Elmer*, que permite a determinação das porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio com precisão de 0,01%, pertencente à Central Analítica do Instituto de Química de São Paulo – USP.

### 3.3.5 Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial

As curvas termogravimétricas (TGA) e de análise térmica diferencial (DTA) foram obtidas no equipamento *SDTQ 600*, fabricado pela *TA Instruments*. Cada amostra foi disposta em cadinho de  $\alpha$ -alumina, o qual foi submetido a um aquecimento desde a temperatura ambiente até 900 °C, com taxa de aquecimento de 20 °C min<sup>-1</sup>, sob atmosfera de ar sintético e fluxo de 50 mL min<sup>-1</sup>. (Massa inicial: 10 mg).

## 3.4 Sínteses

### 3.4.1 Síntese do complexo precursor ciclopaladado $[Pd(\mu\text{-Cl})(dmba)]_2$ [69]

Uma massa de 2,00 g (11,3 mmol) de cloreto de paládio(II) foi parcialmente solubilizada, sob aquecimento, em 200 mL de metanol. A esta solução, adicionou-se 0,96 g (22,6 mmol) 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 o resfriamento houve a adição, sob agitação, de 2,7 mL (11,3 mmol) de *N,N*-dimetilbenzilamina (Hdmba). Posteriormente adicionou-se, lentamente e sob agitação, 2,0 mL (14,4 mmol) de trietilamina diluídos em 10 mL de metanol. A solução foi mantida sob agitação por 8 horas, havendo a formação de um sólido amarelo, que foi filtrado, lavado com metanol e éter etílico e seco sob vácuo. Obteve-se ao final uma massa de 2,85 g, correspondente a aproximadamente 90% de rendimento. Análise elementar - % calc. (% enc.): C: 39,4 (39,2); H: 4,20 (4,38); N: 5,00 (5,07). Intervalo de decomposição: 158,6 – 160,9 °C.

### 3.4.2 Síntese dos complexos ciclopaladados binucleares $[Pd(bzox)(\mu-X)]_2$ , $X = Cl, Br, SCN$ (S1–S3) [58]

A 200 mg de  $[Pd(dmba)(\mu-Cl)]_2$  (0,363 mmol) suspensos em 10 mL de uma mistura de clorofórmio e ácido acético glacial (1:1) foram adicionados 4 mL de solução de benzaldeidoxima (92,3 mg ou 0,762 mmol) na mesma composição de solventes. A mistura foi mantida sob agitação magnética a temperatura constante de 50 °C por 24 horas. A suspensão resultante foi filtrada e o sólido obtido foi lavado com  $CHCl_3$ :ácido acético (1:1), éter dietílico e pentano e em seguida, seco sob vácuo. Obteve-se uma massa de 142 mg, correspondente a 71% de rendimento. O complexo  $[Pd(bzox)(\mu-Cl)]_2$  foi utilizado como precursor para a síntese dos complexos  $[Pd_2(bzox)_2(\mu-Br)(\mu-Cl)]$  e  $[Pd(bzox)(\mu-SCN)]_2$ . Estes complexos foram sintetizados através de reações de transciclometalação, solubilizando-se o precursor em acetona, a temperatura ambiente e sob agitação, e adicionando-se à mistura reacional soluções aquosas dos sais correspondentes (KBr ou KSCN). Ao final de 1 h de agitação constante, as misturas foram deixadas em repouso para evaporação do solvente. Os sólidos obtidos foram lavados com água e pentano. Os rendimentos obtidos com as duas reações foram de aproximadamente 100%.

### 3.4.3 Síntese dos complexos $[Pd(bzox)X(im)]_2$ , $X = Cl, Br, I$ (S4-S6)

Os complexos de fórmula geral  $[Pd(bzox)X(im)]_2$  foram sintetizados através de reações de clivagem do complexo precursor  $[Pd(bzox)(\mu-Cl)]_2$  com o ligante imidazolidina-2-tiona (im). A 100,0 mg de  $[Pd(bzox)(\mu-Cl)]_2$  (0,191 mmol) suspensos em 10 mL de uma mistura de metanol e acetona (1:1) foram adicionados 4 mL da solução de imidazolidina-2-tiona (40,9 mg ou 0,400 mmol) e a mistura resultante foi deixada em agitação a temperatura ambiente. Ao final de 1 hora, a solução obtida foi deixada em repouso para evaporação do solvente. O produto sólido amarelo obtido foi lavado com MeOH e seco sob vácuo. Rendimento: 53,6%. Os complexos com Br e I foram sintetizados por meio de reações de troca de ligantes, adicionando-se soluções aquosas dos sais correspondentes (KBr ou KI) à solução de  $[Pd(bzox)Cl(im)]$ , a temperatura ambiente, e deixando-se sob agitação durante 1 hora. Os rendimentos obtidos com as reações de troca de ligantes foram de aproximadamente 100%.

#### 3.4.4 Síntese dos complexos $[Pd(bzox)(L)_2]Cl$ , $L = tu, dmtu, bipy$ (S7-S9)

A 100 mg do complexo precursor  $[Pd(\mu-Cl)(bzox)]_2$  (0,19 mmol) suspensos em 10 mL de metanol foram adicionados 0,76 mmol dos ligantes tiouréia (tu), *N,N*-dimetiltiouréia (dmtu) ou bipyridina (bipy) em 5 mL de metanol. A solução resultante permaneceu sob agitação a temperatura ambiente durante 2 horas. As soluções obtidas foram deixadas em repouso para evaporação do solvente. Os sólidos resultantes foram secos sob vácuo para retirada de solvente. Rendimentos observados: 63% (S7), 61% (S8) e 45% (S9).

#### 3.4.5 Síntese do complexo precursor $[PdCl_2(MeCN)_2]$

Em um erlenmeyer de 200 mL de capacidade contendo 40 mL de acetonitrila foram adicionados 2,00 g (11,3 mmols) de cloreto de paládio(II) anidro. A suspensão foi aquecida a 100 °C sob intensa agitação magnética. Um precipitado amarelo foi formado após 30 minutos de reação. O sólido foi isolado a partir de uma filtração simples e seco sob vácuo. Rendimento: 75%. Análise elementar - % obt. (% calc.): C: 18,05 (18,52); H: 2,49 (2,34); N: 10,40 (10,80).

#### 3.4.6 Síntese dos complexos $[PdX_2(im)(PPh_3)]$ $X = Cl, Br, I, SCN$ (S10-S13)

Para a síntese do complexo  $[PdCl_2(im)(PPh_3)]$ , foram dissolvidos 50,0 mg (0,193 mmol) do composto de coordenação  $[PdCl_2(MeCN)_2]$  em 10 mL de metanol. Sob agitação constante, foi adicionada à esta mistura uma solução de trifenilfosfina (0,212 mmol) e imidazolidina-2-tiona (0,212 mmol) em 2 mL de metanol e 2 mL de clorofórmio. A mistura final permaneceu sob agitação por mais 60 minutos. Obteve-se uma suspensão amarela e o sólido foi isolado por meio de filtração simples e lavado com metanol, clorofórmio e pentano. O produto foi seco sob vácuo, fornecendo 80,0 mg de um sólido microcristalino amarelo (S10). Rendimento: 77%. Para a síntese dos demais complexos com Br, I e SCN foram realizadas reações de troca de ligantes, a partir do composto  $[PdCl_2(im)(PPh_3)]$ . Para tanto, foram adicionados a três soluções contendo 50,0 mg deste em metanol, a quantidade estequiométrica correspondente de cada sal de haleto/ pseudohaleto. As suspensões obtidas foram filtradas, e os sólidos lavados com água e pentano e secos sob vácuo. Os rendimentos obtidos foram: 82% (S11), 93,3% (S12) e 98% (S13).



### 3.5 Ensaios biológicos

#### 3.5.1 Preparo das soluções

Os complexos foram solubilizados em DMSO, sendo que as soluções-estoque foram preparadas em concentração máxima de DMSO 4% v/v, e meio MEM-C/DMSO (meio essencial mínimo) para testes com linhagem de células de câncer mamário (LM3) e MEM-C/DMSO + HAM F10 (nutriente para cultivo celular) para testes com linhagem de glioblastoma cerebral (U87MG). As soluções foram diluídas em meio de cultura apropriado a cada ensaio biológico (MEM para células LM3 e HAM F10 + MEM) para células U87MG).

#### 3.5.2 Linhagem celular adenocarcinoma mamário de linhagem LM3 *in vitro* e meio de cultura empregado

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, juntamente com doutorando Rodrigo Alves de Souza e supervisão da Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos. A linhagem tumoral de adenocarcinoma murino LM3, foi cedida pela Dra. Elisa Bal de Kier Joffé, do Instituto de Oncologia Angel H. Roffo - Buenos Aires – Argentina. Essa linhagem celular foi originada de adenocarcinoma mamário obtido em camundongos. O cultivo celular foi mantido em meio MEM (Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 4 µg mL<sup>-1</sup> de gentamicina, em estufa a 37 °C, com atmosfera úmida e tensão constante de 7,5 % de CO<sub>2</sub>. Foram realizados repiques três vezes por semana. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer, utilizando corante azul de Tripán, a 0,04% em PBS (tampão fosfato salino), e ajustando a uma concentração de 5 x 10<sup>4</sup> células mL<sup>-1</sup> em meio MEM.

#### 3.5.3 Linhagem celular de glioblastoma U87MG

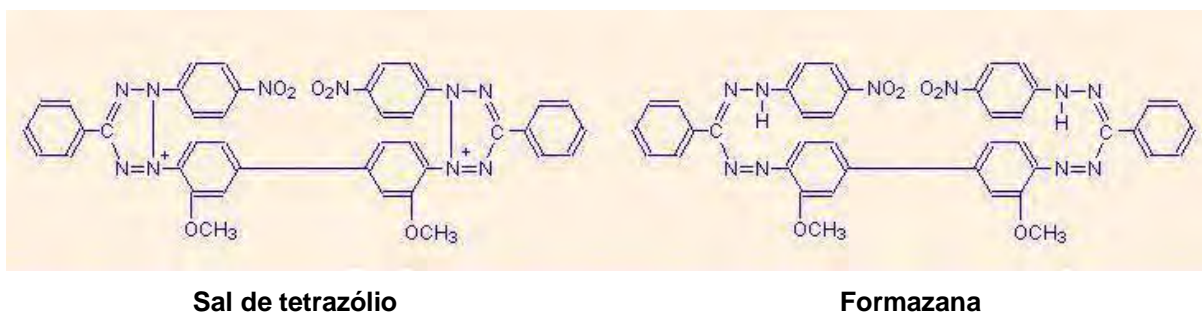
A linhagem celular de glioblastoma U87MG de câncer do cérebro foi cedida pelo professor Dr. Guido Lenz, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O cultivo celular foi mantido em meio HAM F10 + MEM, suplementado com 15% de soro fetal bovino, em estufa a 37 °C e tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi trocado e as células reincubadas a 37°C. O subcultivo foi iniciado após o estabelecimento do estado de confluência das células no interior

do frasco. O meio de cultura foi removido e as células foram lavadas e, em seguida, desprendidas do frasco com mistura de solução Hanks 1x + tripsina. A solução Hanks 1x possui uma mistura de sais apropriada para lavagem de células em experimentos de citotoxicidade. Após dois minutos, adicionou-se novamente o meio de cultura celular, de modo a desativar a atividade da tripsina. O material foi homogeneizado e uma pequena quantidade de células foi semeada em novos frascos de cultura, incubando-se novamente em meio completo a 37°C. O sub-cultivo foi realizado a cada 2-3 dias, em microplacas de 12 cavidades, para cultura de tecidos, e os experimentos realizados entre a 4ª e 10ª passagens. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer.

### *3.5.5 Determinação da viabilidade celular pela técnica do MTT [70]*

Em alíquotas de 100 µL das soluções de células LM3 contidas em cada poço de placas de cultivo de tecidos com 96 cavidades e ajustadas a uma concentração de  $5 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup> em meio RPMI1640-C, foram adicionados em triplicata, 100 µL de: cisplatina (**cisDDP**), utilizada como padrão, [Pd(bzox)(µ-Cl)]<sub>2</sub> (**S1**), [Pd(bzox)Cl(im)] (**S4**), [Pd(bzox)Br(im)] (**S5**), [PdI(bzox)(im)] (**S6**), Hbzox e im, em diferentes concentrações (µmol.L<sup>-1</sup>) e o mesmo volume de RPMIC como controle de células. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C, com tensão constante de 7,5% de CO<sub>2</sub> por 24 h para a formação do tapete celular. Após esse período, os sobrenadantes da cultura foram descartados e 100 µL da solução de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio) (MTT) diluído em tampão PBS a 5 mg.mL<sup>-1</sup> e posteriormente em meio RPMIC foram adicionados em cada cavidade da placa, por 3 h em estufa a 37 °C com tensão constante de 7,5% de CO<sub>2</sub>. O sal de tetrazólio sofre metabolização pelas proteinases mitocondriais das células vivas formando cristais de formazana (Figura 23). Após a incubação, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 µL de isopropanol para solubilização dos cristais. A absorbância foi medida em 540 nm em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, LabSystems, Finlândia).

**Figura 23.** O sal de tetrazólio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio) sofre metabolização pelas proteinases mitocondriais das células vivas formando cristais de formazana [39].



A determinação de 50% da concentração inibitória do composto ( $IC_{50}$ ), ou seja a concentração do agente que reduz em 50% a viabilidade celular foi quantificada através da regressão linear de uma curva dose-resposta (Concentração da Amostra x Viabilidade Celular), realizada com 95% de confiabilidade. A equação da reta do tipo  $Y = A + BX$  forneceu os valores de  $IC_{50}$ , na qual  $Y =$  Absorbância;  $X =$  Concentração.

### 3.5.6 Determinação da viabilidade celular pela técnica do XTT [71]

Em alíquotas de 500  $\mu$ L das soluções de células U87MG contidas em cada poço de placas de cultivo de tecidos com 96 cavidades e ajustadas a uma concentração de  $6 \times 10^4$  células para o ensaio de citotoxicidade e  $1,5 \times 10^4$  células para o ensaio de sobrevivência, em meio HAM F10 + MEM foram adicionados em triplicata, 500  $\mu$ L de:  $[PdCl_2(im)(PPh_3)]$  (**S10**),  $[PdBr_2(im)(PPh_3)]$  (**S11**),  $[PdI_2(im)(PPh_3)]$  (**S12**) e  $[Pd(SCN)_2(im)(PPh_3)]$  (**S13**), Im e  $PPh_3$ . As células foram novamente incubadas a 37°C por 24 horas ou 120 horas para os ensaios de citotoxicidade e sobrevivência, respectivamente. Após o período de incubação, o sobrenadante das soluções contidas nas cavidades foi descartado e 1000  $\mu$ L da solução de Hanks foi adicionado para lavagem das células.

Após o descarte da solução de lavagem, a cada poço 500  $\mu$ L de meio MEM sem vermelho de fenol, seguido de 60  $\mu$ L da solução de XTT. As células foram incubadas nestas condições novamente, em estufa a 37 °C por 30 minutos, seguindo-se então a leitura colorimétrica em um espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 492 e 690 nm.

Este teste é baseado na clivagem do sal de tetrazólio {hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazólio} para formar um corante formazan alaranjado. O XTT é convertido a formazan somente nas células viáveis. O ensaio

com XTT baseia-se no mesmo fundamento do ensaio com MTT, porém o produto formado com a metabolização das desidrogenases mitocondriais é solúvel em água, o que elimina a última etapa do teste (solubilização em álcool isopropílico).

### 3.5.7 Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados foi realizado empregando o programa Microcal™ Origin™ 8.0 para regressão linear e determinação dos índices de citotoxicidade (IC<sub>50</sub>).

## 3.6 Ensaios com DNA *in vitro* (complexos S7, S8 e S9)

### 3.6.1 Materiais e preparo de soluções

Nos experimentos aqui descritos, a cisplatina foi utilizada como fármaco padrão. Os complexos de paládio(II) foram solubilizados em água destilada para o preparo das soluções-estoque, as quais foram armazenadas no escuro, a temperatura ambiente. As concentrações das soluções estoque foram determinadas por espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite. Uma solução estoque de CT-DNA preparada em água duplamente destilada, na concentração de  $2,12 \times 10^{-3}$  M foi caracterizada por espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis, em um espectrofotômetro *Beckman*, modelo 7400 DU, em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm e cela com controle termoeletrônico. A solução foi sempre mantida em refrigerador. O plasmídeo pUC19 foi isolado seguindo-se o procedimento padrão. Outros materiais utilizados foram: régua de DNA prontas para uso em gel O'GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder Plus, da marca Fermentas UAB, endonucleases restritivas BanHI e NdeI (New England Biolabs), brometo de etídio (Merck) e gel de agarose (FMC BioProducts).

### 3.6.2 Reações do DNA com complexos de paládio(II) em meio extracelular

CT-DNA ou plasmídeos foram incubados com os complexos de paládio(II) a 37 °C, no escuro. Após 24 horas, as amostras foram dialisadas no meio apropriado, de acordo com os ensaios bioquímicos ou biofísicos subsequentes. Uma alíquota de cada uma destas amostras foi utilizada para a determinação do valor de  $r_b$  por espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite.  $r_b$  é definido como a razão entre o número de moléculas metalo-orgânicas de paládio que se encontram ligadas ao DNA e o número de resíduos de

nucleotídeo. A determinação da concentração de paládio(II) nas amostras foi realizada por espectroscopia de absorção atômica, utilizando-se o espectrofotômetro *Varian AA240Z Zeeman*, equipado com tubo de grafite GTA 120.

### *3.6.3 Determinação da velocidade de reação entre o DNA e os complexos de paládio(II)*

Amostras de CT-DNA incubadas com os complexos de paládio(II) ( $r_i = 0,1$ ), a 37° C foram precipitadas em determinados intervalos de tempo (0, 10, 20, 30 60, 120, 240 e 1440 minutos), pela adição de NaCl 1,5 M seguida da adição de etanol 70%. As amostras precipitadas foram mantidas em congelador por no mínimo 20 min para total precipitação do DNA. Em seguida, foram submetidas a centrifugação por 30 min, a velocidade de 150 G e temperatura 4 °C. Os sobrenadantes das amostras centrifugadas foram utilizados para a determinação de paládio(II) por espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite e as pastilhas de DNA foram lavadas com etanol 50% e ressolubilizadas em água para a determinação da concentração de DNA por espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta.

### *3.6.4 Determinação da estabilidade térmica do DNA após reação com complexos de paládio*

As curvas de estabilidade térmica dos CT-DNAs foram obtidas medindo-se a absorbância das soluções em 260 nm no espectrofotômetro. As soluções de CT-DNA foram preparadas em meio contendo 10 mM de NaClO<sub>4</sub> com 10 mM Tris-HCl/ 0,1 mM Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>EDTA, pH 7,4. O valor da temperatura de desnaturação térmica ( $t_m$ ) foi determinado no ponto máximo da curva correspondente à primeira derivada das curvas de desnaturação do DNA.

### *3.6.5 Desenrolamento da dupla-fita de DNA circular superenovelado (-)*

O desenrolamento da dupla-fita de DNA plasmideal pUC19, na forma circular superenovelada negativamente, foi verificado pelo ensaio de mobilidade eletroforética em gel de agarose. Amostras de plasmídeo pUC19 na concentração de  $1,56 \times 10^{-4}$  M foram incubadas com os complexos de paládio(II) ( $r_i = 0,1$ ) a 37 °C, no escuro, durante 24 h. Em seguida, um alíquota de cada amostra foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando-se solução tampão TAE (tris-acetato/EDTA), a 25°C. Ao final da corrida, o gel foi lavado com solução de EtBr (brometo de etídio) e fotografado com transiluminador. A outra alíquota foi precipitada com etanol, redissolvida em água duplamente destilada e submetida

a espectrofotometria na região do ultravioleta e medidas de absorção atômica em forno de grafite, para determinação de  $r_b$ .

### 3.6.6 *Ensaio com enzimas endonucleases restritoras*

A habilidade dos complexos de formar ligação com o DNA, impedindo a ação de enzimas restritoras sobre a sua longa cadeia, foi avaliada pelo ensaio de mobilidade eletroforética em gel de agarose. Amostras de DNA plasmídeoal circular superenovelado pUC19 (2686 pares de bases) na concentração de  $1,56 \times 10^{-4}$  M, foram incubadas com os complexos de paládio(II) ( $r_i = 0,1$ ) a  $37^\circ\text{C}$ , no escuro, durante 24 h. Em seguida, uma alíquota de  $10\ \mu\text{L}$  de cada amostra foi digerida pelas enzimas restritoras BanHI ou NdeI, a  $37^\circ\text{C}$ , durante 1 hora, nos tampões de clivagem recomendados pelo fabricante. As amostras foram então submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando-se solução tampão TAE (tris-acetato/EDTA), a  $25^\circ\text{C}$ . Ao final da corrida, o gel foi lavado com solução de EtBr (brometo de etídio) e fotografado com transiluminador. A outra alíquota ( $10\ \mu\text{L}$ ) foi precipitada com etanol, redissolvida em água duplamente destilada e submetida a espectrofotometria na região do ultravioleta e medidas de absorção atômica em forno de grafite, para determinação de  $r_b$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Considerações espectroscópicas a respeito do composto precursor $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{dmba})_2]_2$

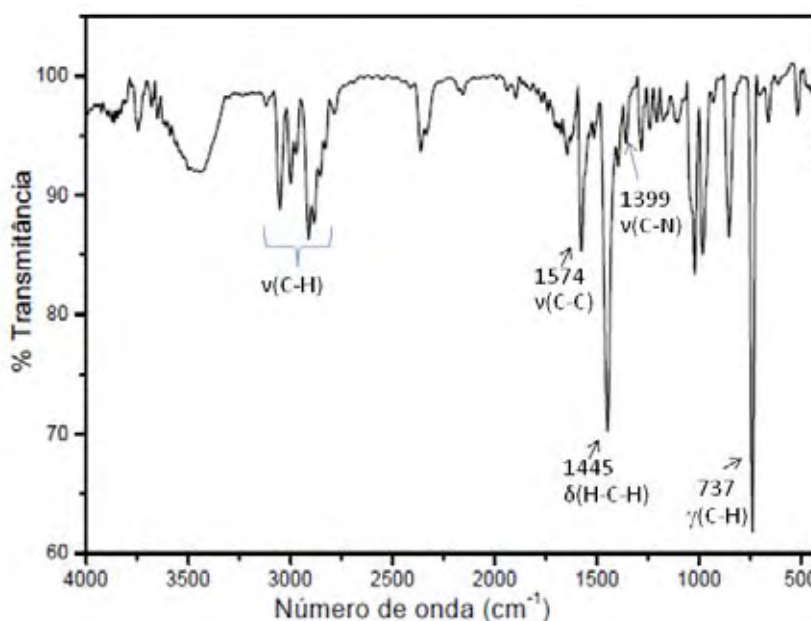
O complexo dimérico ciclometalado  $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-Cl})_2]$  é muito empregado em sínteses orgânicas e alguns estudos sobre a sua caracterização e usos encontram-se na literatura [53,72,73]. Ele foi utilizado neste trabalho com material de partida para a síntese dos compostos  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-X})_2]$ .

O precursor em questão foi sintetizado pelo método descrito por Cope e Friedrich [69] com pequenas modificações, sendo a principal delas, a troca de água pelo metanol, utilizado como solvente na síntese do intermediário  $\text{Li}_2[\text{PdCl}_4]$  [74]. Obteve-se um composto amarelo, cristalino, estável ao ar e solúvel em solventes orgânicos clorados.

Nosso grupo de pesquisa tem utilizado esse complexo como precursor na síntese de uma variedade de compostos organometálicos [38,39,73-75].

A Figura 24 **Figura 24** mostra o espectro de absorção do complexo  $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{dmba})_2]_2$  na região de alta frequência do infravermelho.

**Figura 24.** Espectro no IV do dímero ciclopaladado  $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{dmba})_2]_2$ . Fonte: autor.

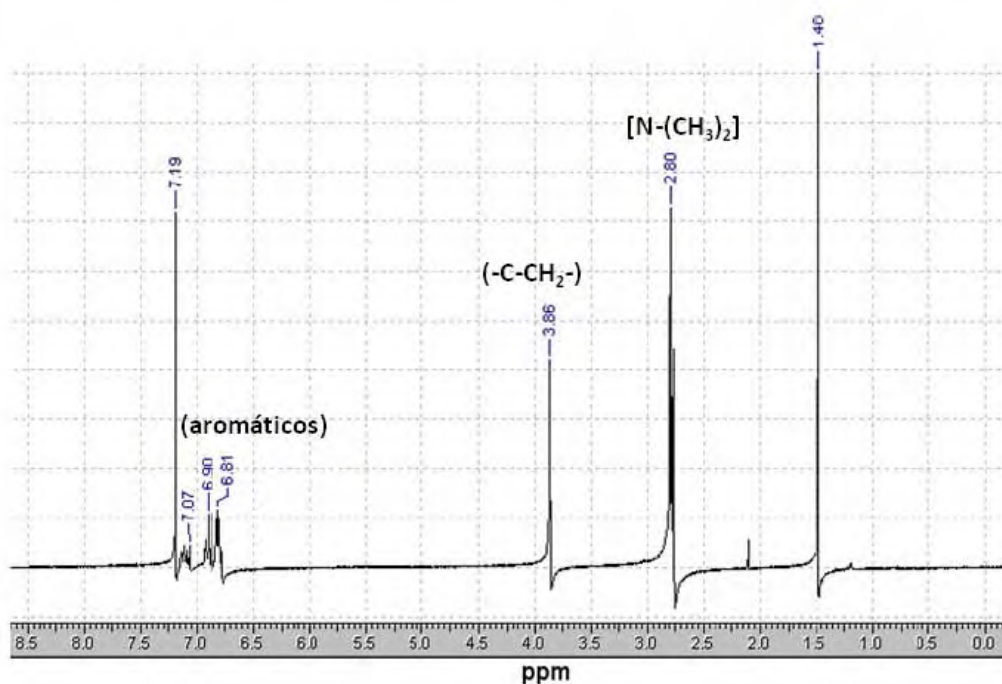


Observa-se uma banda de absorção em  $3051\text{ cm}^{-1}$ , referente a  $\nu(\text{C-H})$  do anel aromático e outras duas bandas em  $2910$  e  $2857\text{ cm}^{-1}$  referentes a  $\nu(\text{C-H})$  dos grupos alifáticos ( $-\text{N-CH}_3$ ) e ( $-\text{N-CH}_2-$ ), respectivamente. No espectro no IV do ligante Hdmba livre, as absorções dos modos vibracionais  $\nu(\text{C-H})$  ocorrem em  $3031$ ,  $2942$  e  $2772\text{ cm}^{-1}$ . Além disso, a banda de absorção de  $\delta(\text{H-C-H})$  do grupo ( $-\text{N-CH}_2-$ ) que aparece em  $1495\text{ cm}^{-1}$  no espectro da Hdmba, deslocou-se para  $1445\text{ cm}^{-1}$  após complexação com paládio(II).

No espectro do complexo, observa-se em  $1574\text{ cm}^{-1}$  a intensa absorção do grupo  $\nu(\text{C-C})$  do anel aromático e, em  $1399\text{ cm}^{-1}$ , a banda correspondente à absorção de  $\nu(\text{C-N})$ . Muito importante é a observação da banda de forte intensidade localizada em  $737\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde ao modo vibracional  $\gamma(\text{C-H})$  de sistemas aromáticos orto-substituídos, evidenciando a ocorrência da ciclometalação.

A Figura 25 apresenta o espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , em  $\text{CDCl}_3$  deste composto. Dois simples são observados em  $3,86\text{ ppm}$  ( $-\text{C-CH}_2-$ ) e  $2,80\text{ ppm}$  [ $-\text{N}-(\text{CH}_3)_2$ ]. Estes dados estão em concordância com os dados da literatura [73]. Os hidrogênios aromáticos apresentam deslocamentos químicos na faixa de  $6,81 - 7,11\text{ ppm}$ .

**Figura 25.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo dimérico  $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{dmba})_2]$  em  $\text{CDCl}_3$ . Campo magnético:  $11,7\text{ T}$ . Fonte: autor.





#### 4.2 Considerações espectroscópicas sobre os complexos diméricos do tipo $[\text{Pd}(\text{bzox})(\mu\text{-X})]_2$ , X = Cl (S1), Cl,Br (S2) ou SCN (S3)

Os dímeros  $[\text{Pd}(\text{bzox})(\mu\text{-Cl})]_2$  foram obtidos por meio de reações de troca de ligantes a partir do dímero  $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{dmba})]_2$ . A Tabela 3 mostra os pontos de fusão e os resultados obtidos de análise elementar para os complexos.

**Tabela 3.** Resultado de análise elementar e pontos de fusão dos complexos  $[\text{Pd}(\text{bzox})(\mu\text{-Cl})]_2$  (S1),  $[\text{Pd}_2(\text{bzox})_2(\mu\text{-Cl})(\mu\text{-Br})]$  (S2) e  $[\text{Pd}(\text{bzox})(\mu\text{-SCN})]_2$  (S3).

Composto	P. f. (°C)	Análise Elementar – obt. (calc.)		
		%C	%H	%N
S1	231	32,19 (32,09)	2,11 (2,31)	5,19 (5,25)
S2	216	31,11 (29,60)	2,33 (2,13)	4,96 (4,93)
S3	193	33,91 (33,70)	2,26 (2,12)	9,66 (9,84)

#### *Espectroscopia Vibracional no Infravermelho*

As bandas características da benzaldeidoxima livre, na região do IV, são:  $\nu(\text{O-H})$  próximo a  $3200 \text{ cm}^{-1}$  (banda bastante alargada em função da forte interação de hidrogênio entre as moléculas),  $\nu(\text{C=N})$  em  $1634 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\delta(\text{N-O-H})$  em  $1308 \text{ cm}^{-1}$  e  $\nu(\text{N-O})$  em  $984 \text{ cm}^{-1}$ . Por se tratar de uma oxima aromática, observa-se também a banda de  $\nu(\text{C-C})$  do anel aromático em  $1503 \text{ cm}^{-1}$ , bem como duas bandas, referentes à vibração  $\gamma(\text{C-H})$  da porção aromática da molécula, em  $755$  e  $691 \text{ cm}^{-1}$ , caracterizando anel monossustituído.

Nos espectros dos complexos S1, S2 e S3, as bandas referentes à  $\nu(\text{O-H})$  aparecem em aproximadamente  $3400 \text{ cm}^{-1}$ , sendo mais intensas e bem menos alargadas quando comparadas com a banda do ligante livre. Tanto o deslocamento da banda, como a diminuição de sua largura, sugerem que houve diminuição das interações de hidrogênio intermoleculares [76] o que pode ser explicado pela ocorrência da complexação.

A banda referente à vibração  $\nu(\text{C=N})$  deslocou-se para frequências menores nos espectros dos complexos, aparecendo entre  $1620$  e  $1626 \text{ cm}^{-1}$ . Tal deslocamento sugere a

coordenação do ligante ao centro metálico através do átomo de nitrogênio, o que tem por consequência a diminuição do caráter pi da ligação imínica (C=N).

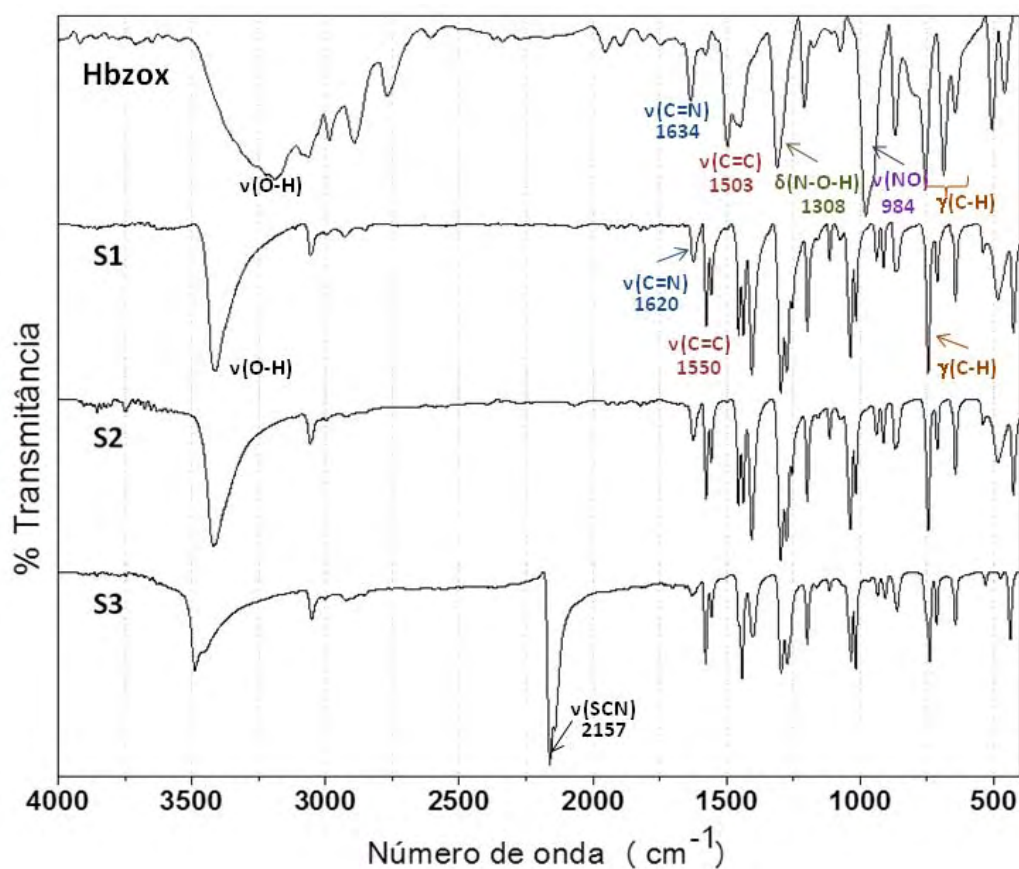
As absorções  $\nu(\text{C-C})$  de anel aromático deslocaram-se para frequências maiores nos espectros dos complexos, aparecendo acima de  $1550\text{ cm}^{-1}$ . A região do espectro compreendida entre  $1500$  e  $900\text{ cm}^{-1}$  é de difícil interpretação uma vez que diversas bandas com alguma contribuição da vibração  $\nu(\text{C=N})$  aparecem nesta faixa [76,77].

Os espectros no IV dos complexos mostraram uma importante modificação nas absorções referentes à vibração  $\gamma(\text{C-H})$  do anel aromático: os três espectros apresentaram somente uma banda de forte intensidade em torno de  $745\text{ cm}^{-1}$ , característica de anéis aromáticos 1,2-dissubstituídos [76,77], sendo esta uma forte evidência da ciclometalação.

Comparando-se os espectros dos complexos S1-S3 com o do dímero precursor  $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{dmba})]_2$ , observa-se o desaparecimento das bandas logo abaixo de  $3000\text{ cm}^{-1}$ , características de vibrações de  $\nu(\text{C-H})$  de carbono  $\text{sp}^3$ . A ausência de bandas nesta região evidencia a ocorrência da reação de transciclometalação, na qual os ligantes *N,N*-dimetilbenzilamina do complexo dimérico de Pd(II) foram substituídos por ligantes benzaldeidoxima, as quais não possuem nenhum átomo de carbono com hibridização  $\text{sp}^3$  em sua estrutura.

A Figura 26 mostra os espectros no IV do ligante livre (Hbzox) e dos complexos S1, S2 e S3, e a Tabela 4 mostra um resumo das principais absorções observadas nos espectros.

**Figura 26.** Espectros na região do infravermelho do ligante benzaldeidoxima e complexos S1, S2 e S3. Fonte: autor.



**Tabela 4.** Principais absorções no IV dos complexos S1, S2 e S3 e da benzaldeidoxima livre.

Frequências de absorção em $\text{cm}^{-1}$				
Benzaldeidoxima	S1	S2	S3	Atribuições
3186 <i>al</i>	3417 <i>F</i>	3418 <i>F</i>	3487 <i>F</i>	$\nu(\text{O-H})$
1634 <i>mf</i>	1623 <i>mf</i>	1620 <i>mf</i>	1626 <i>f</i>	$\nu(\text{C=N})$
1503 <i>F</i>	1580 <i>F</i> , 1558 <i>mF</i>	1572 <i>F</i> , 1551 <i>mF</i>	1579 <i>F</i> , 1551 <i>mF</i>	$\nu(\text{C-C})$
755 <i>F</i> , 691 <i>F</i>	747 <i>F</i>	743 <i>F</i>	743 <i>F</i>	$\gamma(\text{C-H})$
-	-	-	2157 <i>F</i>	$\nu_{\text{as}}(\text{SCN})$

*al* = alargado; *F* = forte; *mF* = médio-forte; *f* = fraco; *mf* = médio-fraco.  $\nu$  = estiramento;  $\gamma$  = deformação.

O coligante aniônico tiocianato pode se coordenar ao centro metálico de diversas formas, mostradas na Figura 27, a seguir.

**Figura 27.** Modos de coordenação mais comuns do íon tiocianato (SCN). Fonte: autor.



Os principais modos vibracionais no espectro no IV do íon  $\text{NCS}^-$  são: estiramento assimétrico  $\nu_{\text{as}}(\text{SCN})$ , estiramento simétrico  $\nu_{\text{s}}(\text{SCN})$  e deformação  $\delta\text{NCS}$  [78]. A formação da ligação Pd-NCS é caracterizada pela presença das bandas  $\nu_{\text{as}}(\text{SCN})$  e  $\nu_{\text{s}}(\text{SCN})$  na região de  $2090\text{-}2060\text{ cm}^{-1}$  e  $830\text{-}854\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Quando coordenado pelo átomo de enxofre (Pd-SCN), a banda  $\nu_{\text{as}}(\text{SCN})$  localiza-se em torno de  $2100\text{-}2120\text{ cm}^{-1}$  e a  $\nu_{\text{s}}(\text{SCN})$  encontra-se no intervalo espectral de  $696\text{-}711\text{ cm}^{-1}$ . Atuando como ponte, a banda  $\nu_{\text{as}}(\text{SCN})$  desloca-se para regiões acima de  $2130\text{ cm}^{-1}$ , enquanto que a  $\nu_{\text{s}}(\text{SCN})$  é pouco afetada neste modo de coordenação. A Tabela 5 apresenta os intervalos aproximados dos modos fundamentais para os diferentes tipos de coordenação do tiocianato.

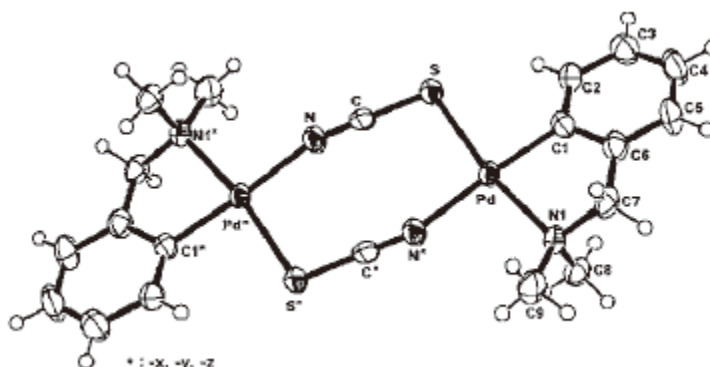
**Tabela 5.** Intervalos aproximados dos modos normais de vibração ( $\text{cm}^{-1}$ ) para os diferentes tipos de coordenação do tiocianato.

Coordenação	$\nu_{\text{as}}(\text{SCN})$	$\nu_{\text{s}}(\text{SCN})$	$\delta\text{NCS}$
$\text{NCS}^-$	2053	746	486, 471
M-NCS	2100-2050	870-820	485-475
M-SCN	2130-2085	760-700	470-430
M-NCS-M	2165-2065	800-750	470-440

As bandas de  $\nu_{\text{s}}(\text{SCN})$  e  $\delta\text{NCS}$  são frequentemente de difícil visualização, pois aparecem em regiões de absorção comuns a outros grupos funcionais. Entretanto, a absorção de  $\nu_{\text{as}}(\text{SCN})$  pode ser claramente identificada no espectro do composto S3, em  $2157\text{ cm}^{-1}$ , evidenciando a coordenação do ligante aniônico em ponte *end-to-end*. Um

complexo ciclopaladado dimérico de Pd(II), contendo o ligante dmmba e o ligante SCN atuando em ponte *end-to-end* entre os centros metálicos, foi sintetizado em nosso grupo de pesquisa e a sua estrutura determinada por difração de raios X (Figura 28) [51]. A banda referente a  $\nu_{as}(\text{SCN})$  deste complexo apareceu em  $2138\text{ cm}^{-1}$  em seu espectro no IV, portanto, dentro do mesmo intervalo observado para o composto S3.

**Figura 28.** Estrutura molecular do complexo  $[\text{Pd}(\text{dmmba})(\mu\text{-SCN})]_2$  [51], no qual se observa o grupo tiocianato atuando em ponte *ento-to-end*.

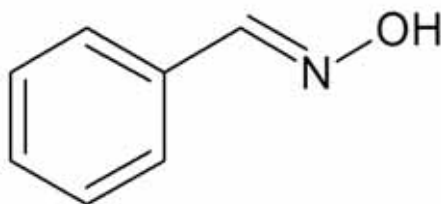


### Ressonância Magnética Nuclear

Os complexos S1, S2 e S3 e o ligante orgânico benzaldeidoxima foram dissolvidos em DMSO deuterado para a obtenção dos espectros de RMN. Devido a baixa solubilidade dos complexos nos solventes orgânicos testados, somente os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos para os complexos S1 e S2. Para o complexo S3 foi possível obter os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e os bidimensionais gHMQC e gHMBC.

As Figuras 29, 30 e 31 mostram a estrutura da *syn*-benzaldeidoxima e os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  do ligante livre, respectivamente.

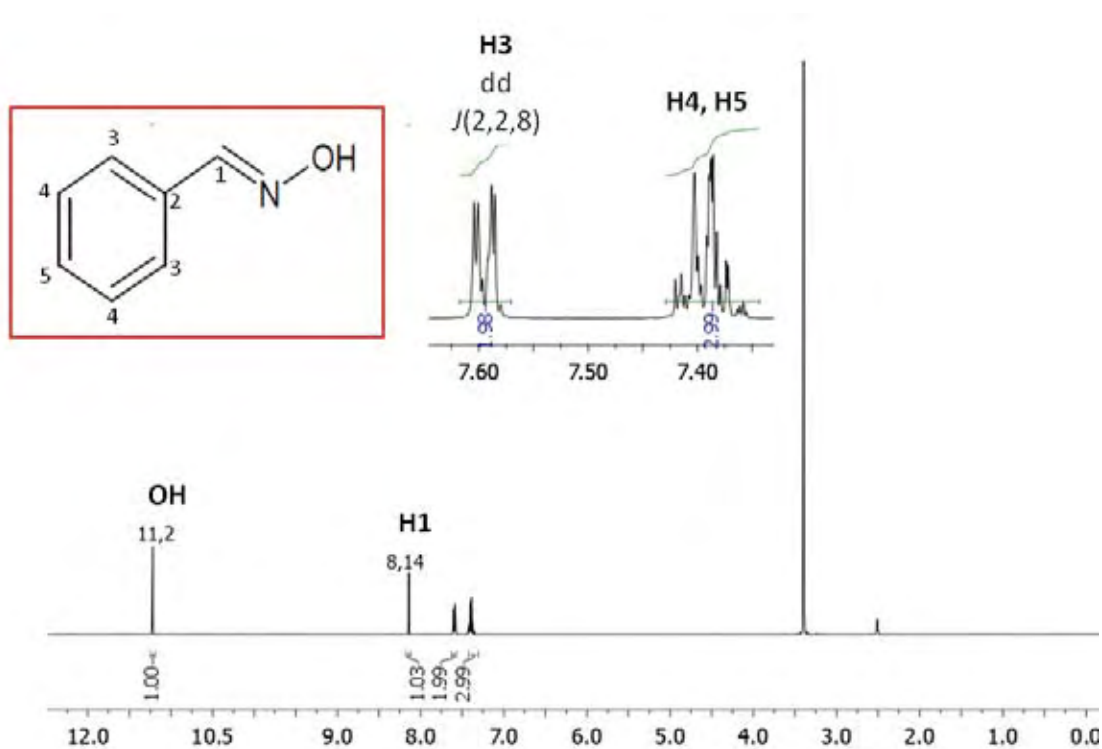
**Figura 29.** Estrutura da syn-benzaldeidoxima. Fonte: autor.



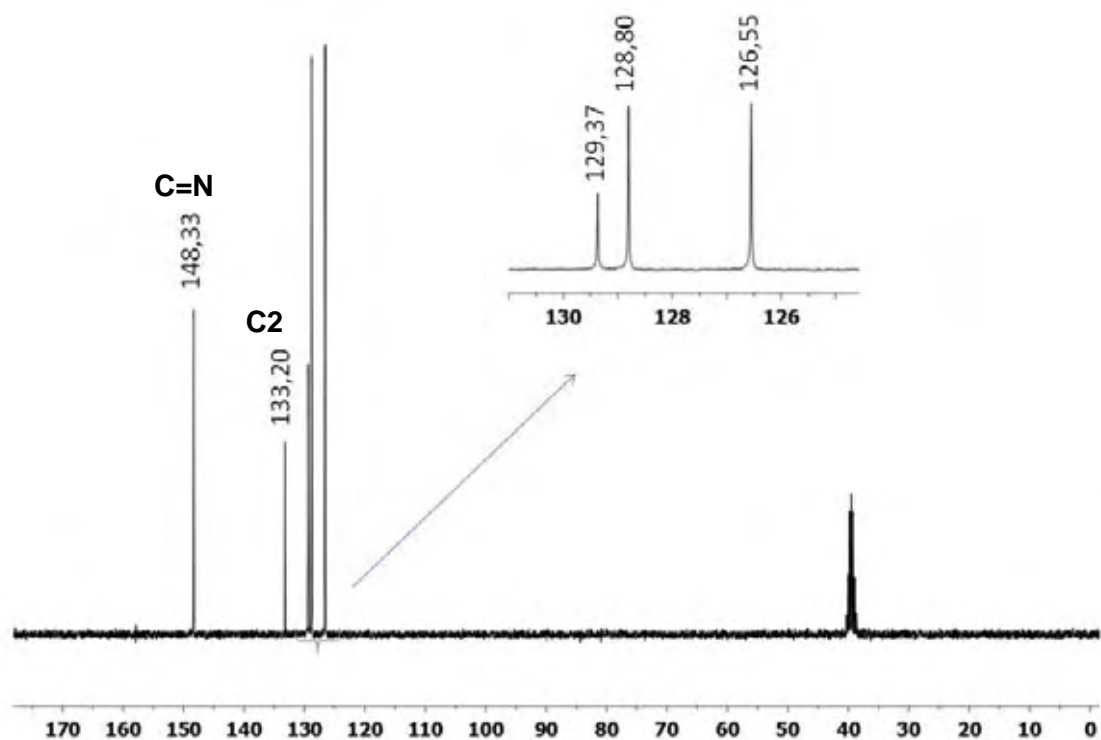
O espectro da benzaldeídoxima livre apresenta um simpleto em 11,2 ppm referente ao hidrogênio do grupo (-OH), um simpleto em 8,14 ppm atribuído ao hidrogênio do grupo imínico (HC=N-), um duplo-duplete em torno de 7,60 ppm,  $J(2,2,8)$ , referente aos hidrogênios em posição *orto* no anel aromático e um multiplete, centrado em 7,40 ppm, atribuído aos hidrogênios em posição *meta* e *para* do anel. Os hidrogênios *orto* aparecem em campo mais baixo do que os demais devido ao “cone de desproteção” gerado pela ligação dupla do grupo imínico. A integração do duplo-duplete resulta em 2H e a integração do multiplete resulta em 3H.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostra somente cinco sinais. Em 148,32 ppm, observa-se o sinal do carbono pertencente ao grupo imínico. Em 133,20 ppm, tem-se o sinal do carbono quaternário. O sinal em 129,37 é atribuído ao carbono *para*; em 128,90 ppm, tem-se o sinal atribuído aos carbonos *meta* e, em 126,55 ppm, o sinal dos carbonos *orto*.

**Figura 30.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ligante Hbzoz livre. Deslocamentos químicos em ppm. Solvente: DMSO. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor.



**Figura 31.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do ligante bzoz livre. Deslocamentos químicos em ppm. Solvente: DMSO. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor.



A Tabela 6 mostra os principais sinais de ressonância dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do ligante bzoX e dos complexos S1, S2 e S3.

**Tabela 6.** Principais deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do ligante livre benzaldeidoxima e dos complexos  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-X})_2]$ , X = Cl, Br ou SCN.

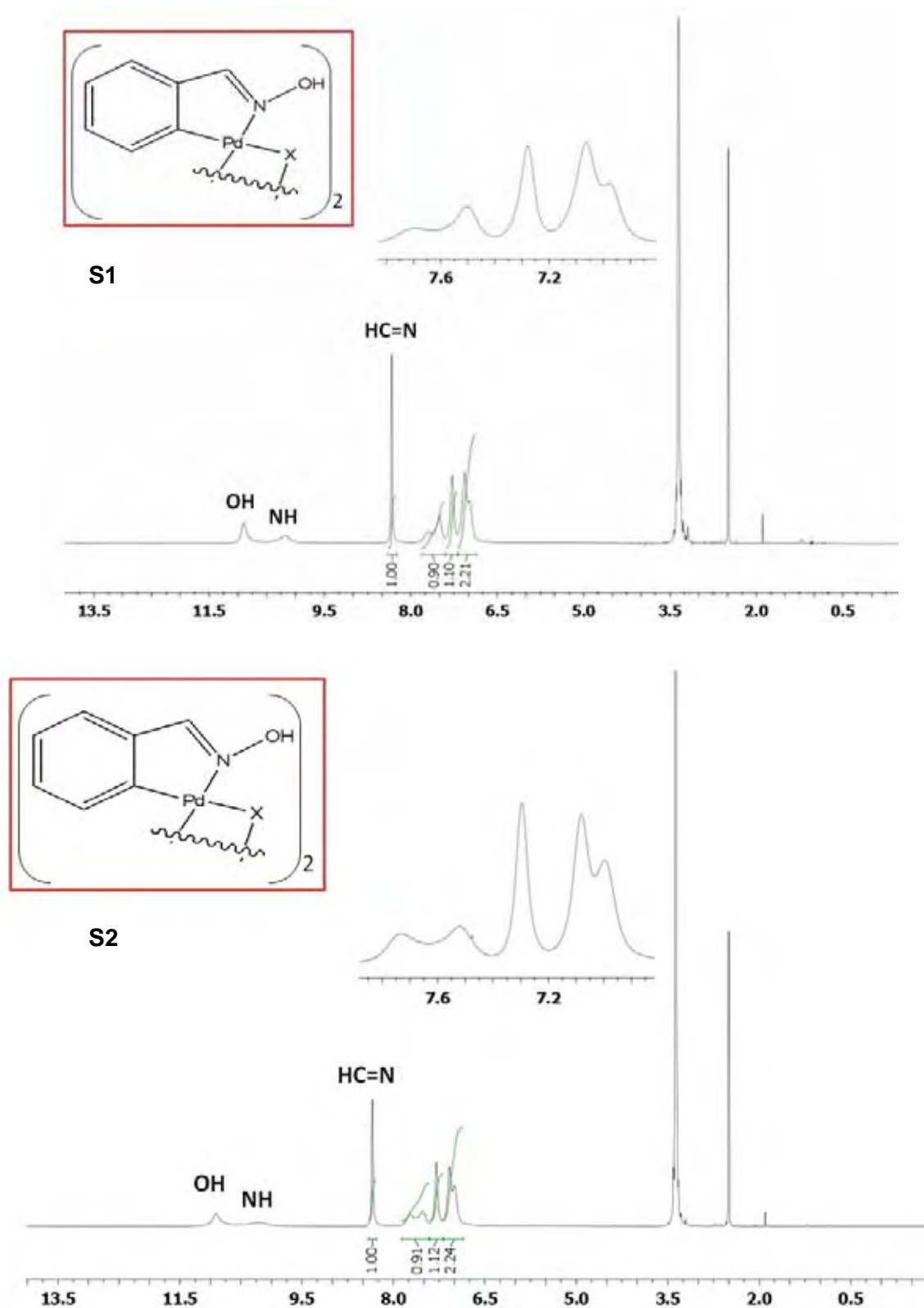
Deslocamentos Químicos em ppm (RMN- $^1\text{H}$ )			
Composto	$\delta(\text{H-O})$	$\delta(\text{H-C=N})$	$\delta(\text{H}_{\text{arom}})$
<b>BzoX</b>	11,2 [s, 1H]	8,14 [s, 1H]	7,60 [dd, $J(2,8)$ , 2H] ; 7,42- 7,38 [m, 3H]
<b>S1</b>	10,9 [al]	8,33 [s, 1H]	7,72 – 6,99 [m, 4H]
<b>S2</b>	10,9 [al]	8,35 [s, 1H]	7,70 – 7,00 [m, 4H]
<b>S3</b>	n.d.	8,31 [s, 1H]	7,31 [dd, $J(\text{n.d.}, 7)$ , 1H]; 7,09 [ddd, $J(1,8,8)$ , 1H]; 7,00 [ddd, $J(1,8,8)$ , 2H]

s = simpleto; d = duplete; t = tripleto; m = multiplete; al = sinal largo; n.d. = não detectado.

Nos espectros dos complexos, os deslocamentos dos sinais dos hidrogênios referentes aos grupos (HC=N-) para campo mais baixo - aproximadamente 8,30 ppm - são indicativos de coordenação do ligante ao centro metálico através do átomo de nitrogênio. Com a ocorrência da coordenação, o átomo de paládio primeiramente retira a densidade eletrônica do grupo (HC=N-), para depois devolvê-la por retrodoação envolvendo o sistema  $\pi^*$  imínico e o orbital  $d_{zx}$  do paládio [25]. O sinal referente ao hidrogênio do grupo hidroxila não sofre deslocamento significativo após a reação de coordenação, porém muda o seu aspecto, passando a ser pequeno e largo. Os sinais dos hidrogênios aromáticos dos complexos S1 e S2 aparecem como multipletos mal-resolvidos, que não permitem a identificação acurada dos prótons, porém a integração dos sinais indica a presença de 4 núcleos de hidrogênio do complexo. Os espectros dos complexos S1 e S2 são mostrados na Figura 32.

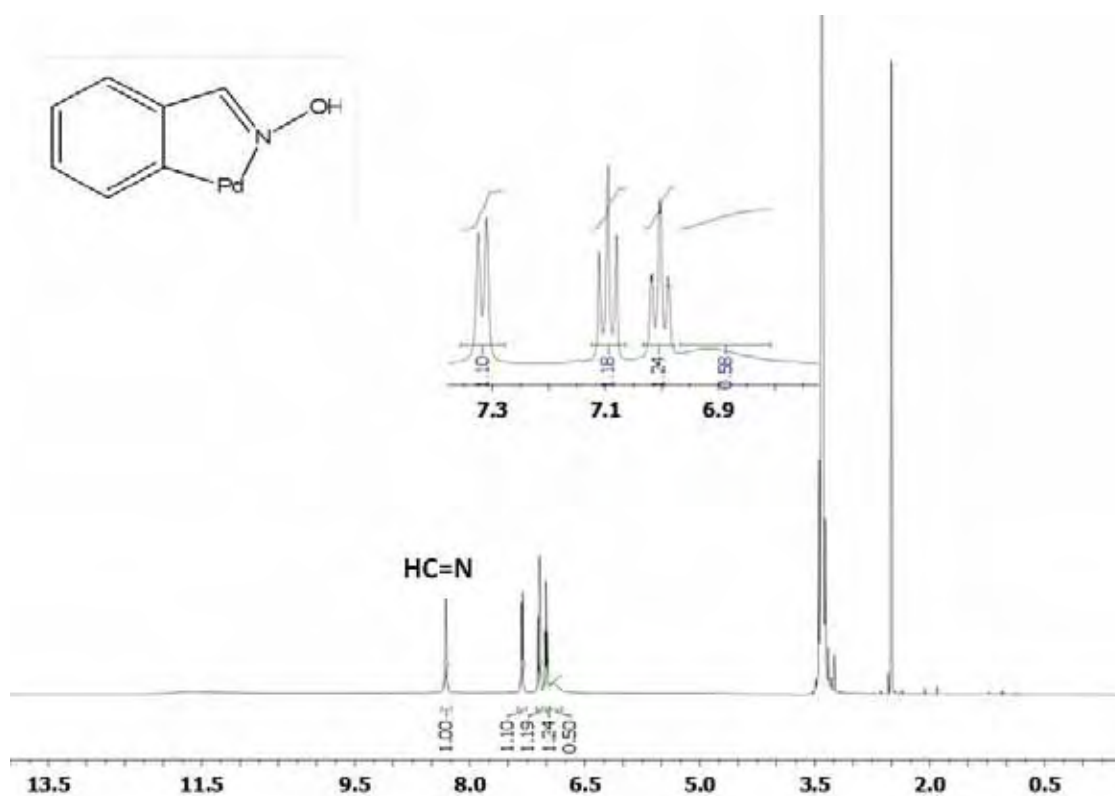


**Figura 32.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos complexos  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-Cl})]_2$  (S1) e  $[\text{Pd}_2(\text{bzoX})_2(\mu\text{-Br})(\mu\text{-Cl})]$  (S2). Deslocamento químico em ppm. Solvente: DMSO. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor.



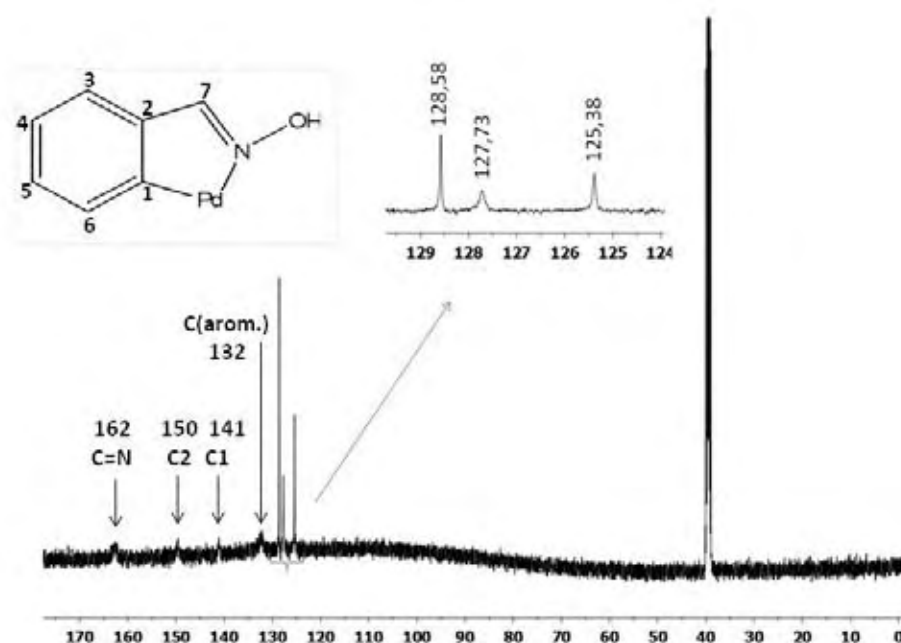
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo S3, mostrado na Figura 33, observam-se sinais bem resolvidos na região entre 7,30 e 7,00 ppm.

**Figura 33.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (A) do complexo  $[\text{Pd}(\text{bzox})(\mu\text{-SCN})_2]$  (S3). Deslocamento químico em ppm. Solvente: DMSO. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor.



No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo S3 não foi detectado o sinal do hidrogênio hidroxílico, porém o hidrogênio imínico apareceu em 8,31 ppm. Na Figura 33, observam-se três sinais distintos na região dos hidrogênios aromáticos: em aproximadamente 7,30 ppm [dd,  $J(\text{n.d.}, 7)$ ], em 7,09 [ddd,  $J(1, 8, 8)$ ] e 7,00 ppm [ddd,  $J(1, 8, 8)$ ]. Um quarto sinal fraco e alargado aparece em torno de 6,90 ppm. O resultado obtido das integrações de todos os sinais juntos foi 7, indicando que não foi possível detectar os sinais de todos os hidrogênios do anel aromático.

**Figura 34.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-SCN})]_2$  (S3). Deslocamento químico em ppm. Solvente: DMSO. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor.

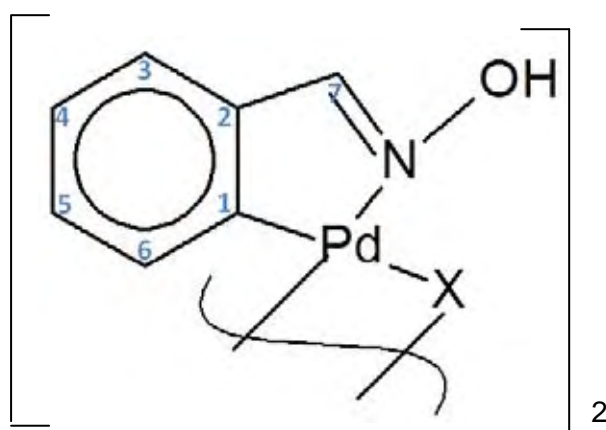


O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Fig. 34) mostrou 7 sinais; três destes sinais são atribuídos a três núcleos de carbonos aromáticos. Estes sinais apareceram em: 128,58, 127,73 e 125,38 ppm. Os outros quatro sinais, de baixa intensidade, apareceram em 132 (C aromático), 141 (C-Pd), 150 (C quaternário) e 162 ppm (C=N).

Para uma melhor elucidação desta estrutura, foram realizados os experimentos de gHMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) e gHMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence). O primeiro correlaciona os núcleos de  $^{13}\text{C}$  com os prótons que se encontram diretamente ligados a eles, ou  $^1J_{\text{HC}}$ . O segundo experimento correlaciona os núcleos hidrogênicos com os de  $^{13}\text{C}$  que se encontram a duas ou três ligações de distância ( $^2J_{\text{HC}}$ ) ou ( $^3J_{\text{HC}}$ ). Frequentemente, são detectadas também interações ( $^4J_{\text{HC}}$ ) [77].

A discussão dos espectros será feita com base no Esquema 3 e nos dados da Tabela 7.

**Esquema 3.** Benzaldeidoxima coordenada ao paládio. X = SCN (em ponte). Fonte: autor.



**Tabela 7.** Principais deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e as correlações encontradas nos mapas de contorno de gHMQC e gHMBC do complexo S3.

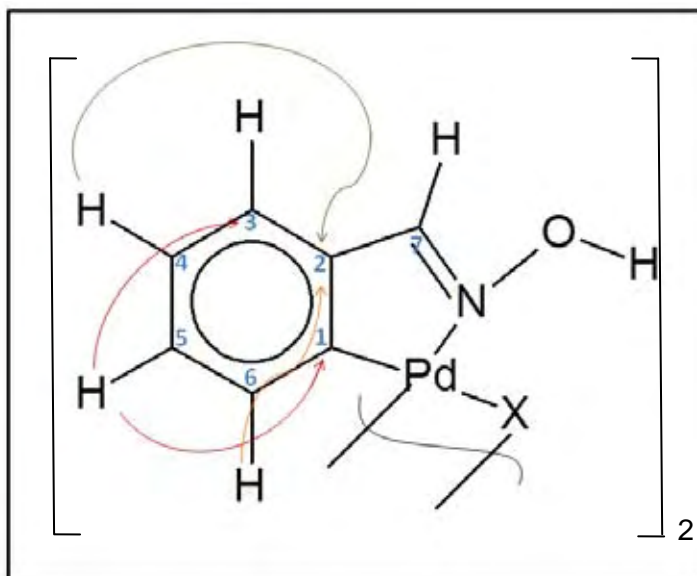
Prótons	$\delta$ (ppm)	gHMQC	gHMBC
3	n.d.	-	-
4	7,00 [ddd, $J(1,8,8)$ ]	128,58	127,67; 150,00
5	7,10 [ddd, $J(1,8,8)$ ]	125,38	127,67; 132,00; 141,00
6	7,30 [dd, $J(\text{n.d.},7)$ ]	127,67	128,58; 150,00
7	8,33	-	-

n.d. = não-detectado.

Os dados obtidos de gHMQC permitiram a identificação das correlações diretas ( $^1J_{\text{HC}}$ ) entre os sinais 7,00 ppm [ddd,  $J(1,8,8)$ ] e 128,58 ppm; 7,10 [ddd,  $J(1,8,8)$ ] e 125,38 ppm; 7,30 [ddd,  $J(1,8,8)$ ] e 127,67 ppm. O mapa de correlações gHMBC possibilitou a detecção dos deslocamentos químicos dos carbonos C1, C2 e C3. A correlação de longa distância  $^3J_{\text{HC}}$  entre 7,10 e 132,31 ppm sugere que este seja o deslocamento químico do C3, que se posicionaria próximo aos outros carbonos aromáticos não-substituídos no espectro. Portanto tal correlação seria **H7-C3**. As correlações  $^3J_{\text{CH}}$  dos sinais 7,00 e 7,30 ppm com 150,00 ppm e  $^4J_{\text{HC}}$  7,10 com 141,00 ppm possibilitaram a identificação dos carbonos quaternários C2 e C1, respectivamente. O sinal de C1 aparece em campo mais alto (141,00 ppm) do que o de C2 (150,00 ppm), possivelmente como consequência da retrodoação de elétrons do paládio em direção ao sistema  $\pi^*$  do carbono aromático, o que contribui para uma blindagem mais eficiente deste núcleo.

Um esquema mostrando as principais correlações observadas para o complexo **S3** é exposto abaixo:

**Esquema 4.** Principais correlações observadas em gHMBC para **S3**. Fonte: autor.



Algumas interações necessárias à conclusão da elucidação estrutural não apareceram nos espectros, possivelmente devido à baixa solubilidade do complexo no solvente utilizado. Entretanto, os espectros pertencentes aos compostos, originados da reação de clivagem do precursor dimérico  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-Cl})]_2$ , derivados dos ciclopaladados aqui apresentados, forneceram mais informações relevantes acerca do ligante benzaldeidoxima coordenado ao paládio. Esses espectros serão mostrados e discutidos na seção 4.3.

#### *Termogravimetria (TGA) e Análise Térmica Diferencial (DTA)*

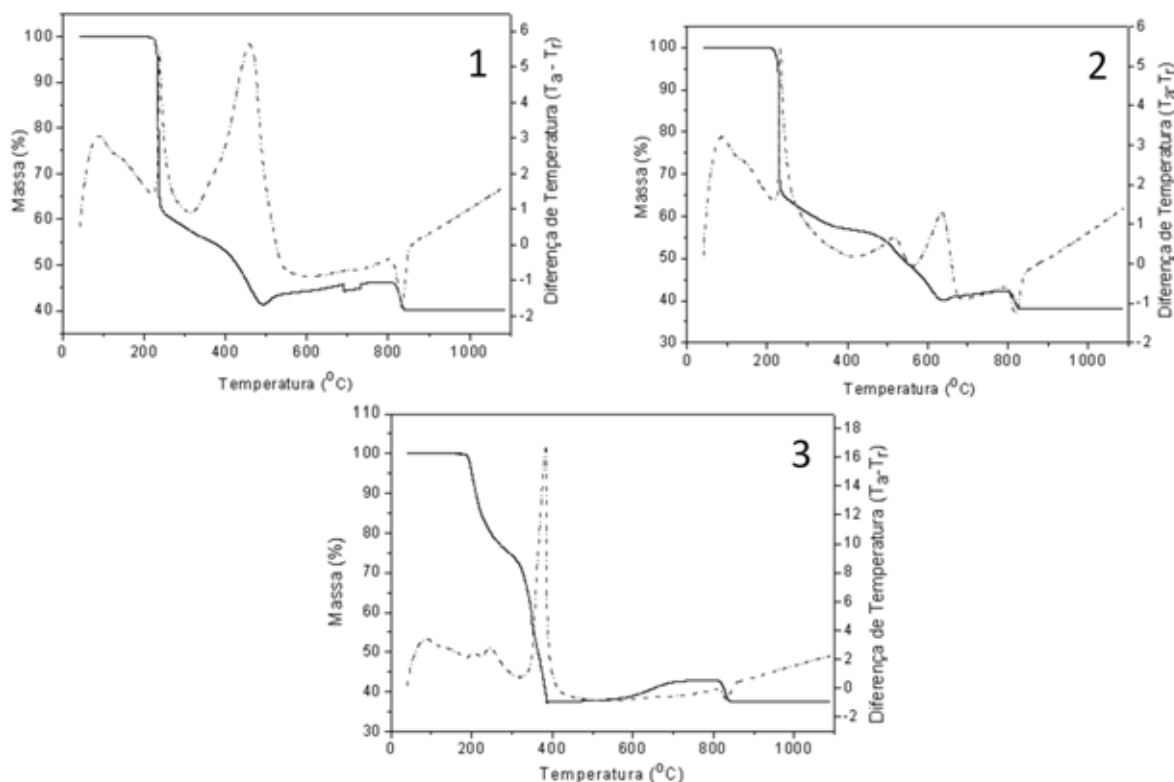
As etapas de decomposição dos complexos **S1**, **S2** e **S3** são mostradas na Tabela 8 e as curvas TGA-DTA, na Figura 35.

**Tabela 8.** Etapas de decomposição dos complexos.

Complexo	Etapa	(T <sub>i</sub> ,T <sub>f</sub> )/ °C	Δm/ %	DTA/ °C	
				endo.	exo.
<b>1</b>	1	211-242	-37,94	-	236
	2	242-487	-20,66	-	311-555
	3	487-809	+4,89	-	-
	4	809-839	-6,17	832	-
	Resíduo		40,23 (40,16)*		
<b>S2</b>	1	191-235	-34,11	-	233
	2	235-373	-9,85	-	-
	3	373-637	-15,84	-	517; 635
	4	637-803	+2,22	-	-
	5	803-836	-4,44	821	-
	Resíduo		37,90 (37,44)*		
<b>S3</b>	1	183-304	-26,00	-	-
	2	304-387	-36,81	-	384
	3	387-813	+5,79	-	-
	4	813-844	-5,59	832	-
	Resíduo		37,48 (37,33)*		

\*Obtido(calculado)

**Figura 35.** Curvas TGA e DTA dos complexos  $[\text{Pd}(\text{bzox})(\mu\text{-Cl})]_2$  (S1),  $[\text{Pd}(\text{bzox})(\mu\text{-Br})(\mu\text{-Cl})]_2$  (S2) e  $[\text{Pd}(\text{bzox})(\mu\text{-SCN})]_2$  (S3). Fonte: autor.



A decomposição térmica do complexo  $[\text{Pd}(\text{bzox})(\mu\text{-Cl})]_2$  (S1) acontece em duas etapas: na primeira, há uma perda de 37,94% em massa entre 211 e 242 °C, acompanhada por um pico exotérmico, na curva DTA, em 236 °C. Na segunda etapa há uma perda de massa de 20,66%, entre 242-487 °C. Este evento é acompanhado por um pico exotérmico entre 311 e 555°C. Essas duas etapas correspondem, provavelmente, à perda dos ligantes orgânicos e iônicos do complexo. Na etapa subsequente, há um ganho de massa correspondente a 4,89%, entre 487-809 °C que consiste, provavelmente, na conversão de parte da massa de paládio metálico a óxido de paládio(II). Finalmente, em 809 °C inicia-se a última etapa de decomposição com perda de 6,17% de massa. Esta etapa é acompanhada por um pico endotérmico em 832 °C. Obteve-se assim 40,23% de resíduo, que corresponde, por cálculo de massa, ao conteúdo de paládio metálico presente no complexo (40,16%).

A decomposição do complexo  $[\text{Pd}_2(\text{bzox})_2(\mu\text{-Br})(\mu\text{-Cl})]$  (S2) ocorre em três etapas. Na primeira etapa (191-235 °C) há uma perda de 34,11% em massa acompanhada por um pico exotérmico em 233 °C na curva DTA. Na segunda e terceira etapas, ocorrem duas perdas de massa de 9,85% e 25,85% nos intervalos de temperatura 235-373 °C e 373-637 °C, respectivamente. A terceira etapa é acompanhada por dois picos exotérmicos em 517 e 635

°C. As três primeiras etapas correspondem provavelmente à perda dos ligantes. A etapa seguinte (637-803 °C) consiste em um ganho de 2,22% em massa, que corresponde, provavelmente, ao ganho de O<sub>2</sub> suficiente para converter parte do Pd a PdO. A quinta e última etapa ocorre entre 803 e 836 °C, com uma perda de massa correspondente a 4,44% (pico endotérmico em 821 °C). A quantidade de resíduo obtido experimentalmente está de acordo com a quantidade calculada de paládio metálico presente no complexo (37,90% e 37,44%, respectivamente).

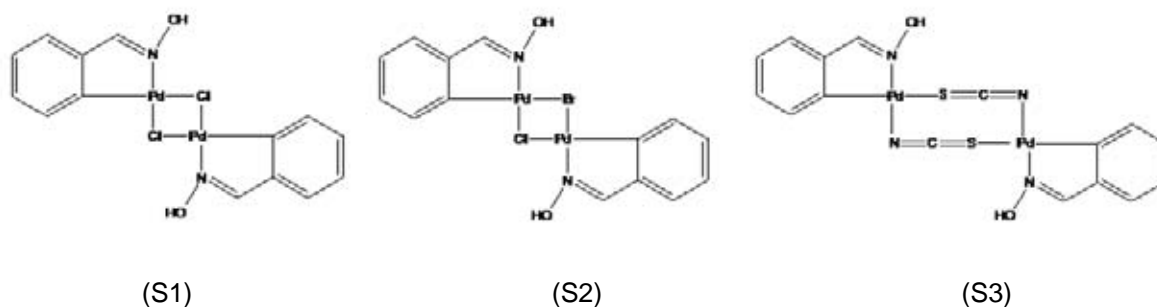
A termodecomposição do complexo [Pd(bzox)(μ-SCN)]<sub>2</sub> (S3) acontece em duas etapas. Na primeira etapa (183-304 °C) observa-se uma perda de massa de 26,00%. Na segunda etapa (304-387 °C), outra perda corresponde a 36,81%. Observa-se também um pico exotérmico em 384 °C. Sugere-se que nessas duas etapas ocorra a perda dos ligantes do complexo. Na etapa seguinte (387-813 °C) há um ganho de 5,79% de massa (provavelmente O<sub>2</sub>). A última etapa (813-844 °C) corresponde a uma perda de 5,59% de massa. A esta etapa associa-se um pico endotérmico em 832 °C. A massa de resíduo obtida (37,48%) está de acordo com o conteúdo calculado de paládio metálico na amostra (37,33%).

As porcentagens de massa dos resíduos obtidos nas três termodecomposições correspondem às porcentagens de massa de paládio metálico calculadas para os três complexos sintetizados, sugerindo que a estequiometria proposta está correta.

### Proposição Estrutural

Considerando-se os dados de análise elementar, os estudos espectroscópicos e de análise térmica, propõem-se as seguintes estruturas para os complexos (Figura 36):

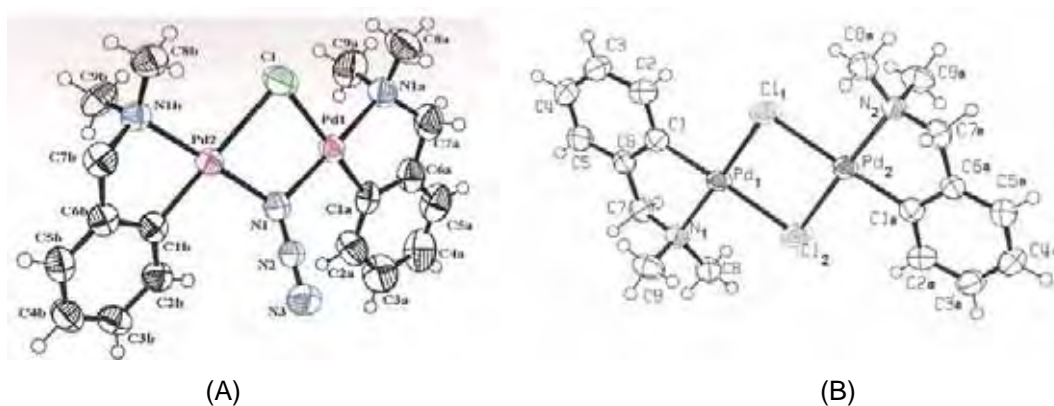
**Figura 36.** Estruturas propostas para os complexos [Pd(bzox)(μ-Cl)]<sub>2</sub> (S1), [Pd(bzox)(μ-Br)(μ-Cl)]<sub>2</sub> (S2) e [Pd(bzox)(μ-SCN)]<sub>2</sub> (S3). Fonte: autor.





Sugere-se a formação de espécies binucleares nas quais os átomos de Pd(II) encontram-se conectados entre si por pontes  $(\mu\text{-Cl})_2$ ,  $(\mu\text{-Cl}, \mu\text{-Br})_2$  e  $(\mu\text{-SCN})_2$ . Os sítios de coordenação remanescentes são ocupados por átomos de C e N provenientes do anel ciclometalado. As propostas estruturais dos complexos S1-S3 estão em concordância com as estruturas de ciclopaladados análogos determinadas por difração de raios X de monocristal [73]. A Figura 37 mostra as estruturas dos complexos  $[\text{Pd}_2(\mu\text{-Cl})(\text{dmba})_2(\mu\text{-N}_3)]$  (A) e  $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{dmba})_2]$ , determinadas por difração de raios X.

**Figura 37.** Estrutura molecular dos complexos  $[\text{Pd}_2(\mu\text{-Cl})(\text{dmba})_2(\mu\text{-N}_3)]$  (A) e  $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{dmba})_2]$ . Fonte: [73].



Os complexos mostrados acima foram obtidos em nosso grupo de pesquisa e apresentados na tese de doutorado de ALMEIDA, E. T. [73]. Observa-se que o complexo em (A) também apresenta dois ligantes diferentes, atuando em ponte entre os átomos de Pd(II): Cl e  $\text{N}_3^-$ . A estrutura mostrada em (B) apresenta os dois ligantes Cl atuando em ponte.

#### 4.3 Considerações espectroscópicas sobre os complexos ciclometalados do tipo $[\text{Pd}(\text{bzoX})\text{X}(\text{im})]$ , X = Cl (S4), Br (S5) ou I (S6)

O complexo  $[\text{Pd}(\text{bzoX})\text{Cl}(\text{im})]$  (S4) foi sintetizado através de uma reação de clivagem do precursor dimérico  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-Cl})_2]$  (1), com adição de 2 mols do ligante imidazolidina-2-tiona (im). Os complexos  $[\text{Pd}(\text{bzoX})\text{Br}(\text{im})]$  (S5) e (S6) foram sintetizados por reações de troca de ligantes, a partir com complexo **S4**.

A Tabela 9 mostra os valores dos intervalos de decomposição e os resultados de análise elementar para os complexos S4, S5 e S6.

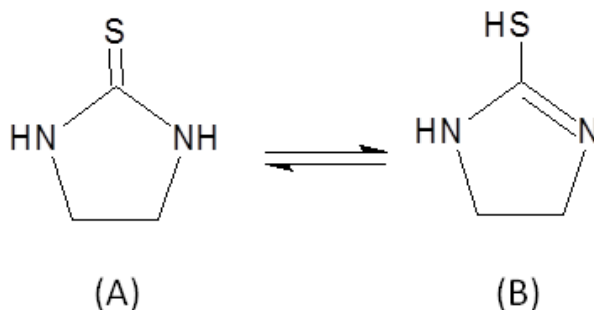
**Tabela 9.** Resultado de análise elementar e pontos de decomposição dos complexos [Pd(bzox)Cl(im)] (S4), [Pd(bzox)Br(im)] (S5) e [Pd(bzox)I(im)] (S6).

Composto	P. f. (°C)	Análise Elementar – obt. (calc.)		
		%C	%H	%N
<b>S4</b>	145 (dec)	32,44 (32,98)	3,46 (3,32)	11,17 (11,54)
<b>S5</b>	183 (dec)	29,01 (29,39)	3,17 (2,96)	10,13 (10,28)
<b>S6</b>	194 (dec)	26,79 (26,36)	2,60 (2,65)	9,72 (9,22)

#### *Espectroscopia Vibracional no Infravermelho*

Na estrutura do ligante imidazolidina-2-tiona observa-se um grupo tiocarbonil (C=S) diretamente associado a átomos de nitrogênio (Figura 38). Dessa forma, duas estruturas tautoméricas são possíveis para o ligante:

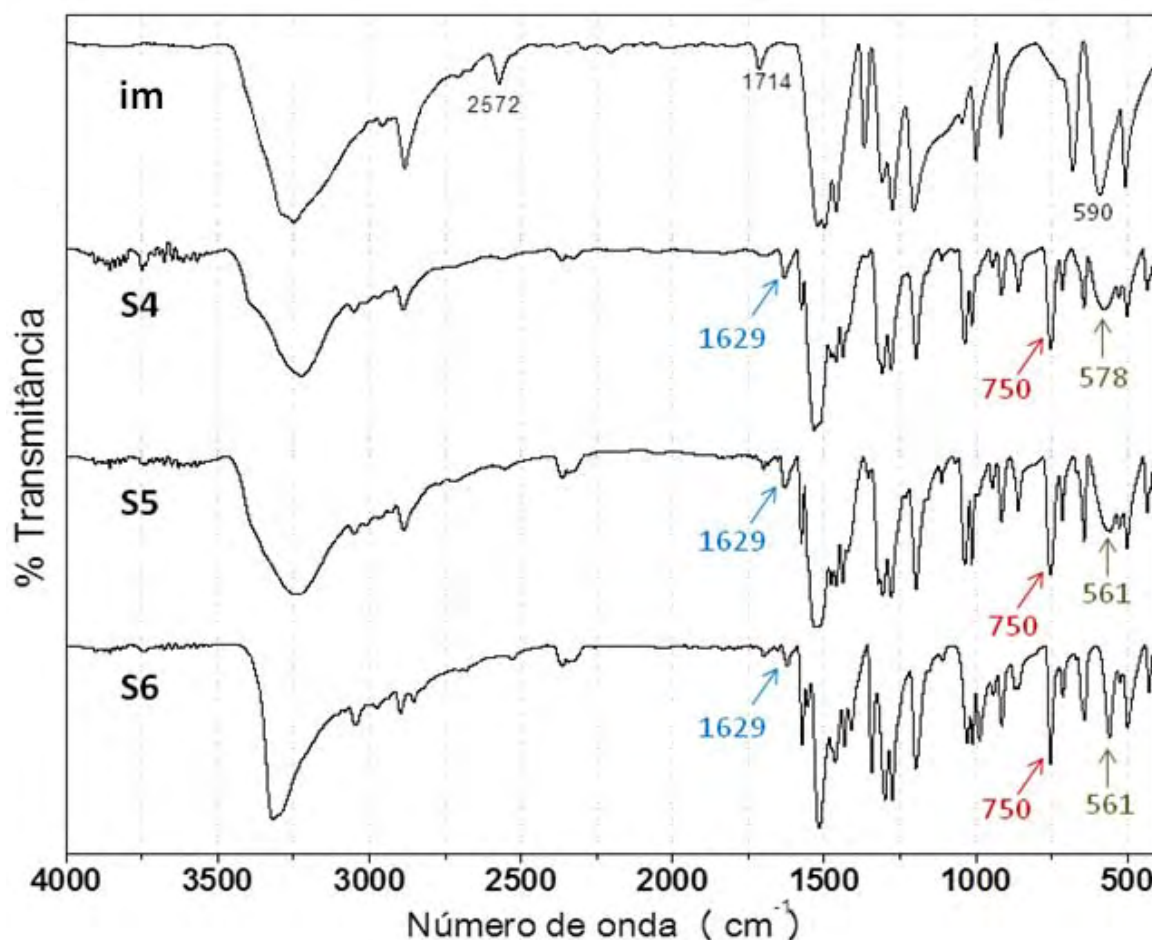
**Figura 38.** Formas tautoméricas do ligante orgânico imidazolidina-2-tiona (im). Fonte: autor.



As absorções características de tionas no IV são observadas nas seguintes frequências vibracionais:  $\nu(\text{N-H})$  próximo a  $3200 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\delta(\text{C-N-H})$  entre  $1675$  e  $1515 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C=S})$  em torno de  $600 \text{ cm}^{-1}$  [36,76]. Diversas absorções referentes a  $\nu(\text{C-N})$  ocorrem na região entre  $1500$  e  $900 \text{ cm}^{-1}$ , e todas elas possuem alguma contribuição de vibrações do grupamento C=S [76,77]. Isto ocorre nos casos de compostos em que o grupamento (C=S) está diretamente ligado a átomos de nitrogênio (tiouréias) e como consequência as vibrações de estiramento da porção (C=S) são fortemente acopladas com as vibrações de estiramento da porção (C-N) [76].

No espectro da imidazolidina-2-tiona livre, podem ser observadas também as vibrações de estiramento das ligações (-SH) e (-C=N), referentes à forma tautomérica B da molécula. Tais vibrações ocorrem em 2572 e 1714  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, como pode ser observado na Figura 39.

**Figura 39.** Espectros nos IV do ligante imidazolidina-2-tiona livre e dos complexos [Pd(bzox)Cl(im)] (S4), [Pd(bzox)Br(im)] (S5) e [Pd(bzox)I(im)] (S6). Fonte: autor.

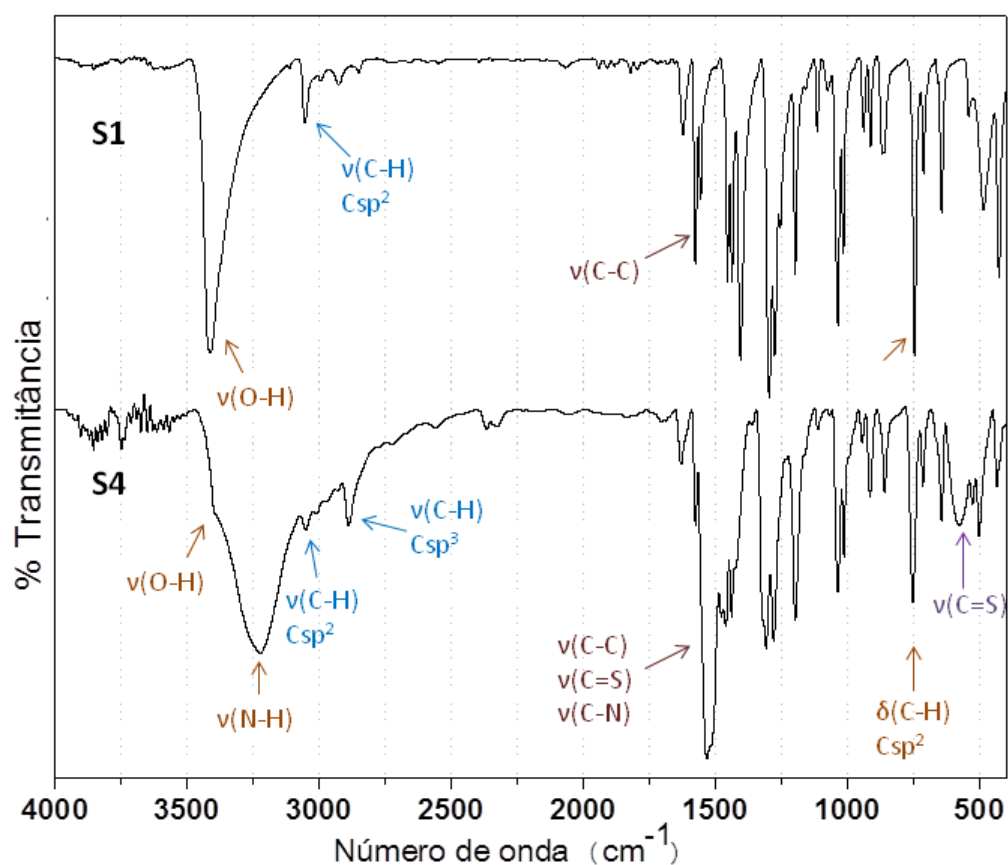


É possível observar o desaparecimento da banda em 2572  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída a  $\nu(\text{S-H})$ , nos espectros dos complexos, o que sugere que o ligante Im se coordena ao centro metálico majoritariamente na forma tautomérica A (tiona). Além disso, a banda em 1714  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída à vibração  $\nu(\text{C=N})$  da forma tautomérica B, desaparece. Observa-se uma nova banda em 1629  $\text{cm}^{-1}$  nos espectros de S4, S5 e S6. Tal frequência de absorção é característica de  $\nu(\text{C=N})$  das oximas aromáticas [76] e, portanto, ocorre nos espectros devido a presença do ligante ciclometalado bzox. A banda de absorção de  $\nu(\text{C=S})$ , que

aparece em  $590\text{ cm}^{-1}$  no espectro da imidazolidina-2-tiona livre, desloca-se para frequências mais baixas ( $578\text{ cm}^{-1}$  para S4 e  $561\text{ cm}^{-1}$  para S5 e S6) nos espectros dos complexos, sugerindo que o ligante imidazolidina-2-tiona coordena-se ao centro metálico por meio do átomo de enxofre, enfraquecendo assim a ligação C=S. Não se observam mudanças significativas nas frequências de absorção de  $\nu(\text{N-H})$  nos espectros de S4, S5 e S6, porém é possível perceber a presença da absorção em  $750\text{ cm}^{-1}$  nos três casos, a qual é atribuída a  $\gamma(\text{C-H})$  de anel aromático dissustituído em posição *orto*, sugerindo a manutenção da integridade do metalociclo  $\text{C}^2, \text{N}$ -benzaldeioxima.

A Figura abaixo mostra uma comparação entre os espectros no IV do complexo precursor 1 e do seu derivado com a imidazolidina-2-tiona, S4.

**Figura 40.** Espectros no IV dos complexos  $[\text{Pd}(\text{bzox})(\mu\text{-Cl})_2]$  (S1) e  $[\text{Pd}(\text{bzox})\text{Cl}(\text{im})]$  (S4).  
Fonte: autor.



No espectro de S1, observa-se a banda de forte intensidade em  $3417\text{ cm}^{-1}$ , atribuída à vibração  $\nu(\text{O-H})$  do ligante bzox. No espectro de S4, tal banda aparece em torno da

mesma frequência, juntamente com outra banda mais alargada e deslocada para frequências menores, em torno de  $3220\text{ cm}^{-1}$ . Esta segunda banda mais alargada é atribuída à absorção da vibração de  $\nu(\text{N-H})$ . Observa-se também a presença da absorção de fraca intensidade em  $2880\text{ cm}^{-1}$ , no espectro do complexo S4, ausente no espectro de S1. Esta banda é atribuída às vibrações de  $\nu(\text{C-H})$  dos grupos metilênicos presentes no ligante Im e, portanto, no complexo S4. A aparência das bandas localizadas em torno de  $1500\text{ cm}^{-1}$  também difere claramente nos dois espectros. Isso porque, em S1 tais absorções são relativas às vibrações de  $\nu(\text{C-C})$  do anel aromático presente no ligante bzox. No espectro de S4, essas absorções englobam as vibrações  $\nu(\text{C-C})$ ,  $\nu(\text{C-N})$  e  $\nu(\text{C=S})$ . Ambos os espectros apresentam uma banda de forte intensidade em  $750\text{ cm}^{-1}$ , referente à  $\gamma(\text{C-H})$  do anel aromático, porém somente em S4 observa-se a banda em torno de  $580\text{ cm}^{-1}$ , atribuída à vibração  $\nu(\text{C=S})$ .

Os dados de infravermelho evidenciam, portanto, a presença do ligante Im nos novos complexos formados, coordenado via átomo de enxofre, e a manutenção do anel ciclometalado de cinco membros, formado entre o ligante bzox e o centro metálico de paládio.

A Tabela 10 lista as principais absorções observadas nos espectros no IV do ligante Im e dos complexos S1, S4, S5 e S6.

**Tabela 10.** Principais absorções observadas no IV para a imidazolidina-2-tiona (im) e para os complexos [Pd(bzox)( $\mu$ -Cl)]<sub>2</sub> (S1), [Pd(bzox)Cl(im)] (S4), [Pd(bzox)Br(im)] (S5) e [Pd(bzox)I(im)] (S6).

Frequências de absorção (cm <sup>-1</sup> )					
Im	S1	S4	S5	S6	Atribuições
-	~ 3400 <i>F</i>	-	-	-	$\nu$ (O-H)
~ 3250 <i>F</i>	-	-	-	-	$\nu$ (N-H)
-	-	~ 3400- 3200 <i>F</i>	~ 3400 - 3200 <i>F</i>	~ 3400- 3200 <i>F</i>	$\nu$ (O-H) + $\nu$ (N-H)
-	3054 <i>f</i>	3054 <i>om</i>	3049 <i>om</i>	3049 <i>f</i>	$\nu$ (C-H) Csp <sup>2</sup>
2887 <i>mf</i>	-	2886 <i>f</i>	2886 <i>f</i>	2895 <i>f</i>	$\nu$ (C-H) Csp <sup>3</sup>
2572 <i>f</i>	-	-	-	-	$\nu$ (S-H)
1714 <i>f</i>	1621 <i>f</i>	1626 <i>f</i>	1626 <i>f</i>	1621 <i>om</i>	$\nu$ (C=N)
-	1578-1555 <i>F</i>	1578 <i>mf</i>	1573 <i>mf</i>	1573 <i>mf</i>	$\nu$ (C-C)
1518 <i>F</i> 1500 <i>F</i>	-	1530 <i>F(al)</i>	1525 <i>F(al)</i>	1518 <i>F</i>	$\nu$ (C-N) + $\nu$ (C=S)
-	750 <i>F</i>	750 <i>mF</i>	754 <i>mF</i>	754 <i>mF</i>	$\gamma$ (C-H) arom.
590 <i>F</i>	-	578 <i>mf</i>	566 <i>mf</i>	561 <i>mf</i>	$\nu$ (C=S)

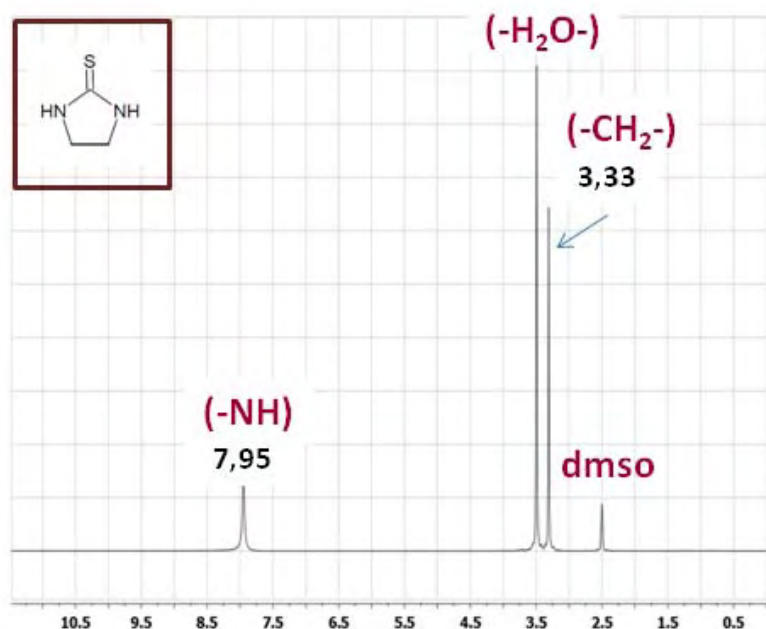
$\nu$  = estiramento,  $\gamma$  = deformação fora do plano. *F* = forte, *mF* = média-forte, *m* = média, *mf* = média-fraca, *f* = fraca, *om* = ombro, *al* = banda larga.

## Ressonância Magnética Nuclear

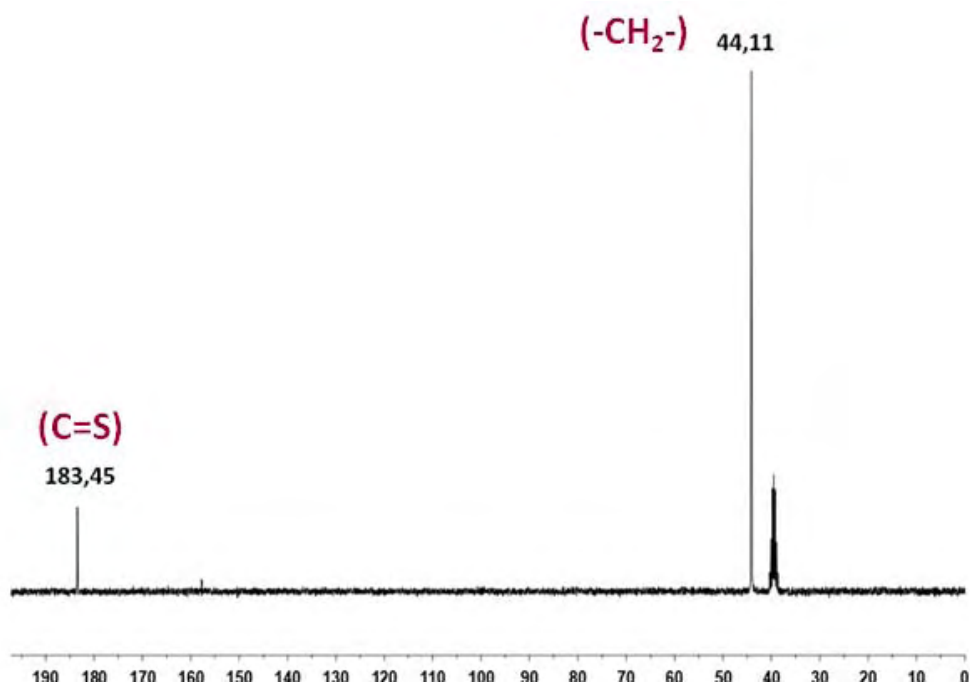
Para a obtenção dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , gHMQC, gHMBC e HOMODEC os complexos S4, S5 e S6 foram solubilizados em acetona deuterada e o ligante livre imidazolidina-2-tiona, em dimetilsulfóxido deuterado.

O ligante imidazolidina-2-tiona

**Figura 41.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (A) e RMN de  $^{13}\text{C}$  (B) do ligante im livre. Deslocamento químico em ppm. Solvente: DMSO. Campo magnético: 11, 7 T. Fonte: autor.



(A)



(B)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ligante imidazolidina-2-tiona livre, (Figura 41 (A)), apresenta os sinais do solvente DMSO em 2,50 ppm e água residual em 3,33 ppm. O sinal observado em 3,49 ppm é atribuído aos hidrogênios metilênicos e em 7,95 ppm, aos hidrogênios do grupo amino (-NH).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 41 (B)) mostra o septeto do solvente em 39,77 ppm, e os sinais dos grupos (-C=S) e (-CH<sub>2</sub>) em  $\delta$  183,45 e 44,11 ppm, respectivamente.

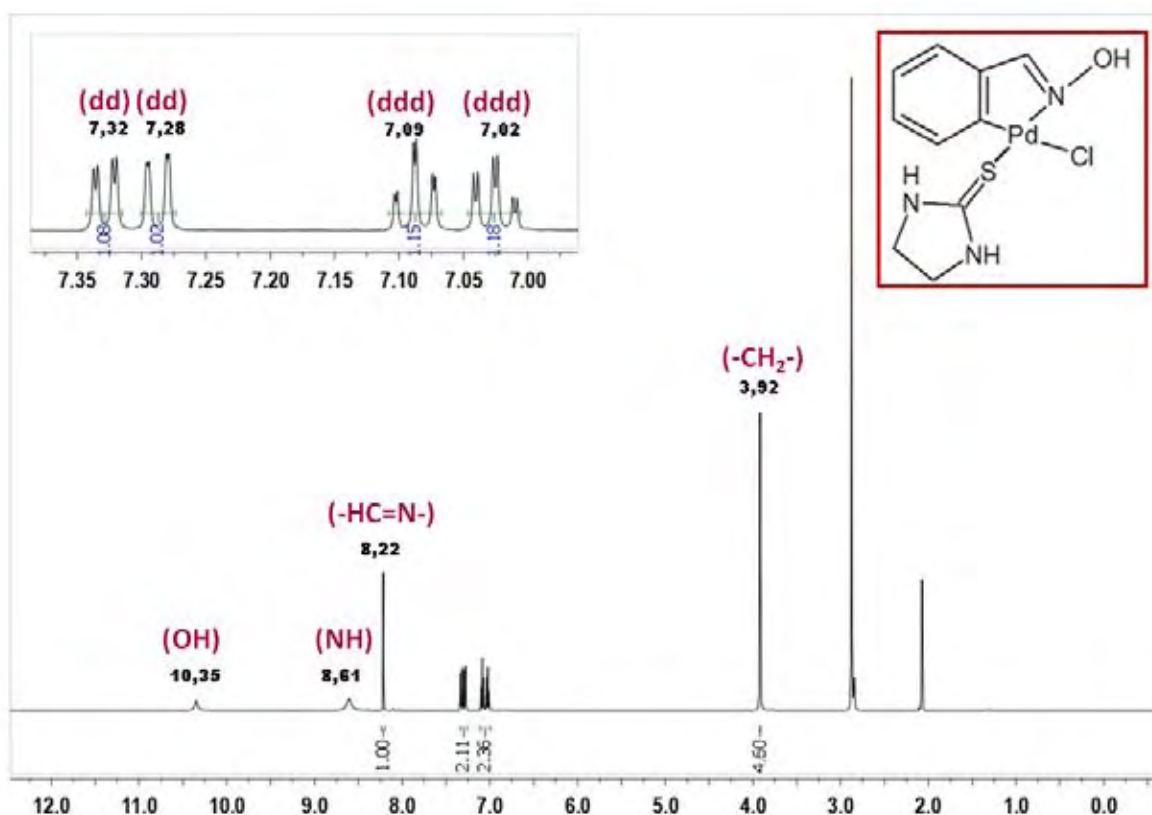
Os espectros da benzaldeidoxima livre já foram discutidos na seção 4.2.

#### Complexo $[\text{Pd}(\text{bzoX})\text{Cl}(\text{im})]$ (S4)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo S4 é mostrado abaixo:



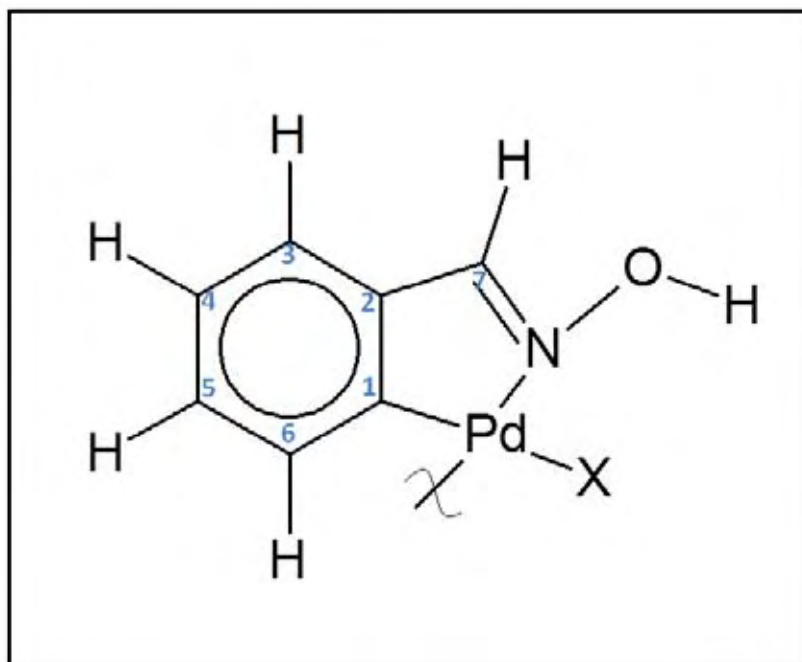
**Figura 42.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo  $[\text{Pd}(\text{bzoX})\text{Cl}(\text{im})]$  (S4). Solvente: acetona. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor.



Em, 2,07 ppm encontra-se o sinal do solvente (acetona) e em 2,88 ppm, o da água residual.

Os sinais observados em 10,35 e 8,61 ppm são atribuídos aos prótons pertencentes aos grupos  $-\text{OH}$  da benzaldeidoxima e  $-\text{NH}$  do ligante imidazolidina-2-tiona, respectivamente. Os hidrogênios dos grupos metilênicos pertencentes à Im absorveram em 3,92 ppm (s, 5H). Em  $\delta$  8,22 ppm (s, 1H) observa-se o sinal do hidrogênio imínico presente no metalociclo, o qual não foi desfeito com a reação de clivagem. Um conjunto de quatro sinais pode ser observado na região comum aos prótons aromáticos: 7,325 ppm (dd,  $J(1,5;8)$ , 1H],  $\delta$  7,290 ppm [(dd,  $J(1,5;8)$ , 1H], 7,025 ppm [ddd,  $J(1,5;8;8)$ , 1H] e 7,090 ppm [ddd,  $J(1,5;8;8)$ , 1H]. Com essas informações, podemos atribuir os duplo-dupletos aos prótons, H3 e H6 e os duplo-duplo-dupletos aos prótons H4 e H5 (Esquema 5), porém não é possível ainda correlacionar cada um dos sinais com o próton que lhe deu origem.

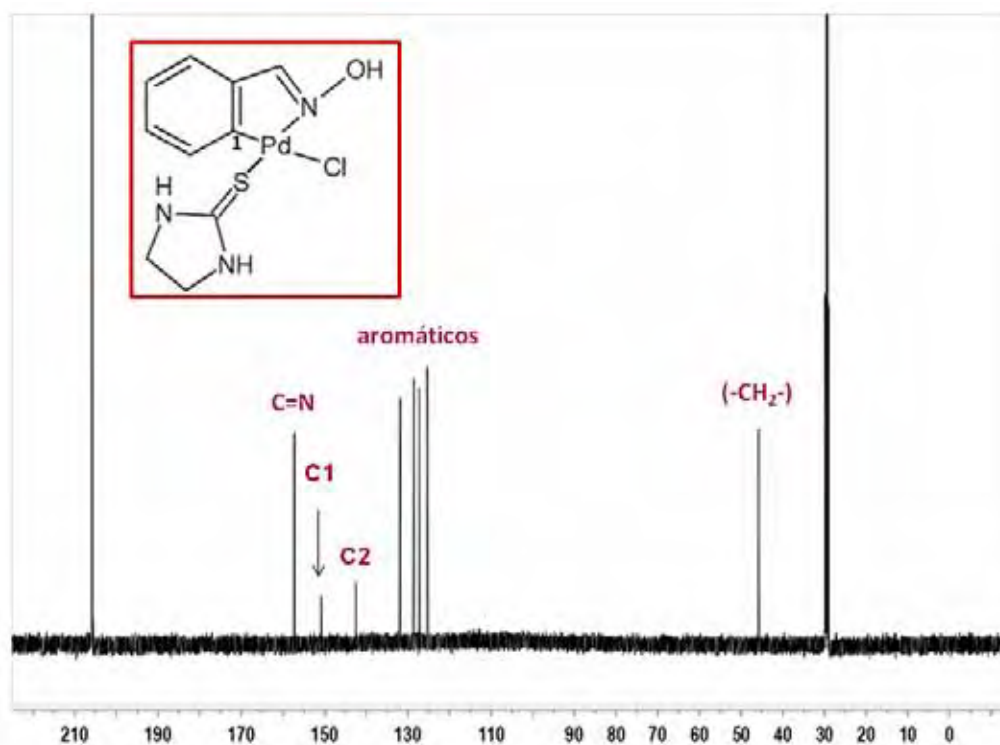
**Esquema 5.** Ligante bzoX coordenado ao centro metálico, formando um metalociclo e halogênio coordenado em posição terminal. Fonte: autor.



O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , mostrado na Figura 43, apresenta os sinais dos grupos (-CH<sub>3</sub>) e (-C=O) da acetona (solvente) em 29,37 (septeto) e 206 ppm, respectivamente.

Neste espectro observa-se o sinal dos carbonos metilênicos do ligante Im em 45,78 ppm, porém o sinal do grupo (C=S), pertencente ao mesmo ligante, não foi detectado. Em 157,39 ppm apresenta-se o sinal atribuído ao carbono do grupo imínico pertencente ao metalociclo formado com a benzaldeidoxima. Os sinais dos carbonos quaternários podem ser vistos em 150,47 e 142,45 ppm, sendo este último atribuído ao carbono ligado diretamente ao metal (C-Pd). Ambos os sinais deslocaram-se para frequência significativamente mais baixa após a coordenação do ligante, porém o núcleo diretamente ligado ao centro metálico tem a sua densidade eletrônica direcionada fortemente para o metal, ficando dessa forma mais blindado do que o núcleo que não se liga diretamente a ele. Os outros carbonos pertencentes ao anel aromático aparecem entre 131,67 e 125,42 ppm.

**Figura 43.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do complexo S4. Solvente: acetona. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor.



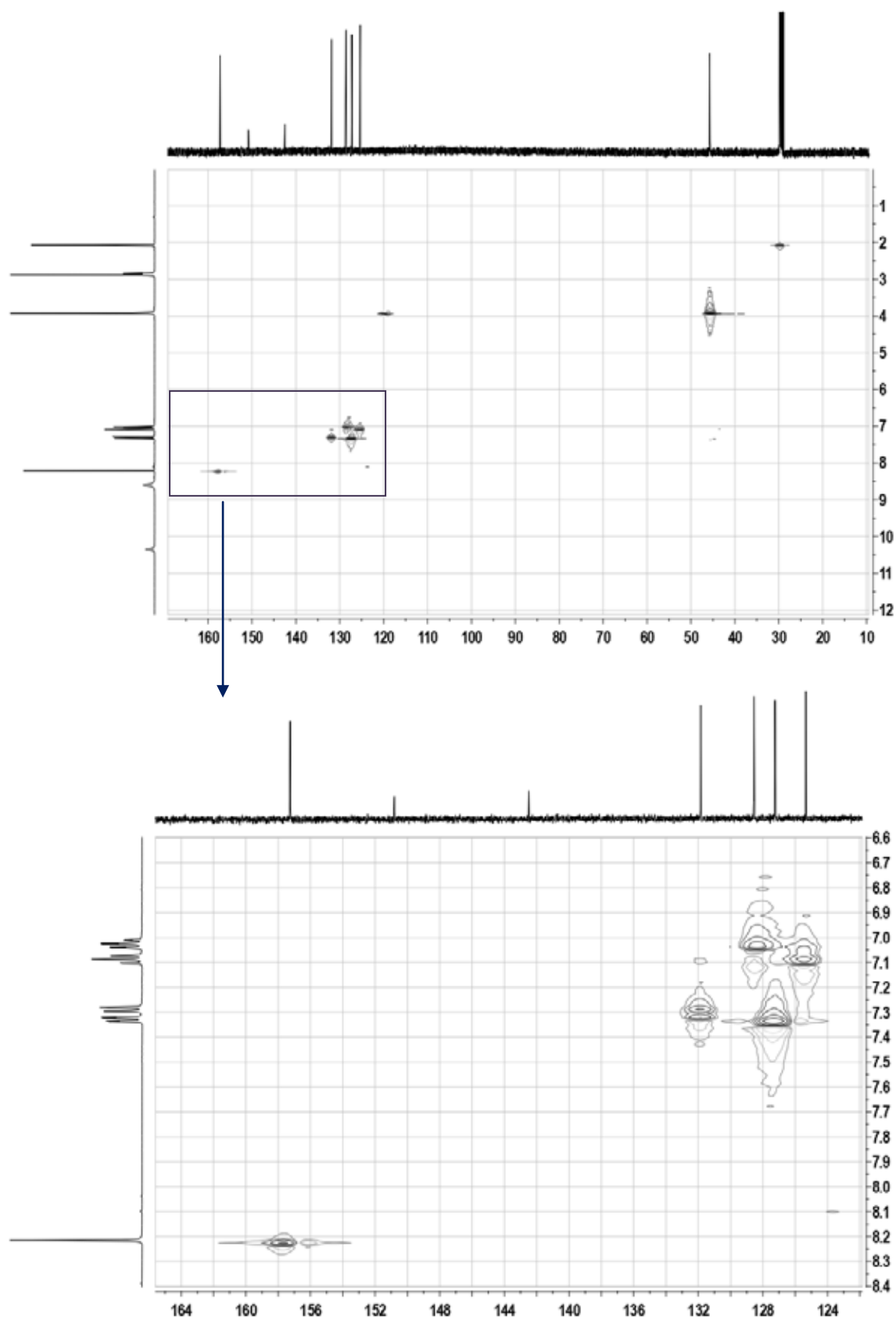
O mapa de contorno do experimento gHMQC (Figura 44) mostra a evidente correlação  $^1J_{\text{CH}}$  entre 3,92 (s, 4H) e 45,78 ppm, sinais pertencentes aos grupos metilênicos do ligante Im. Um sinal pode ser observado em 3,92 ppm (não há correlação com nenhum sinal do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ ). Este sinal é um defeito que ocorreu devido a falta de correção da fase. A correlação entre 8,22 e 157,39 ppm corrobora a atribuição destes sinais ao grupo imínico. No espectro expandido observam-se as correlações entre 7,32 (dd, 1H) e 127,22 ppm, 7,28 (dd, 1H) e 131,67 ppm, 7,09 (ddd, 1H) e 125,42 ppm e, finalmente, entre 7,03 (ddd, 1H) e 128,65 ppm. A Tabela 11 mostra as principais correlações observadas no mapa de contornos do experimento gHMQC.

**Tabela 11.** Principais correlações encontradas no mapa de contorno do experimento gHMQC para o complexo S4.

Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm		
Grupos químicos	( $\delta$ ) RMN de $^1\text{H}$	( $\delta$ ) RMN de $^{13}\text{C}$
-CH <sub>2</sub> -	3,92 (s, 4H)	45,78
-HC=N-	8,22 (s, 1H)	157,39
(C-H) aromático	7,32 (dd, 1H)	127,22
(C-H) aromático	7,28 (dd, 1H)	131,67
(C-H) aromático	7,09 (ddd, 1H)	125,42
(C-H) aromático	7,02 (ddd, 1H)	128,65

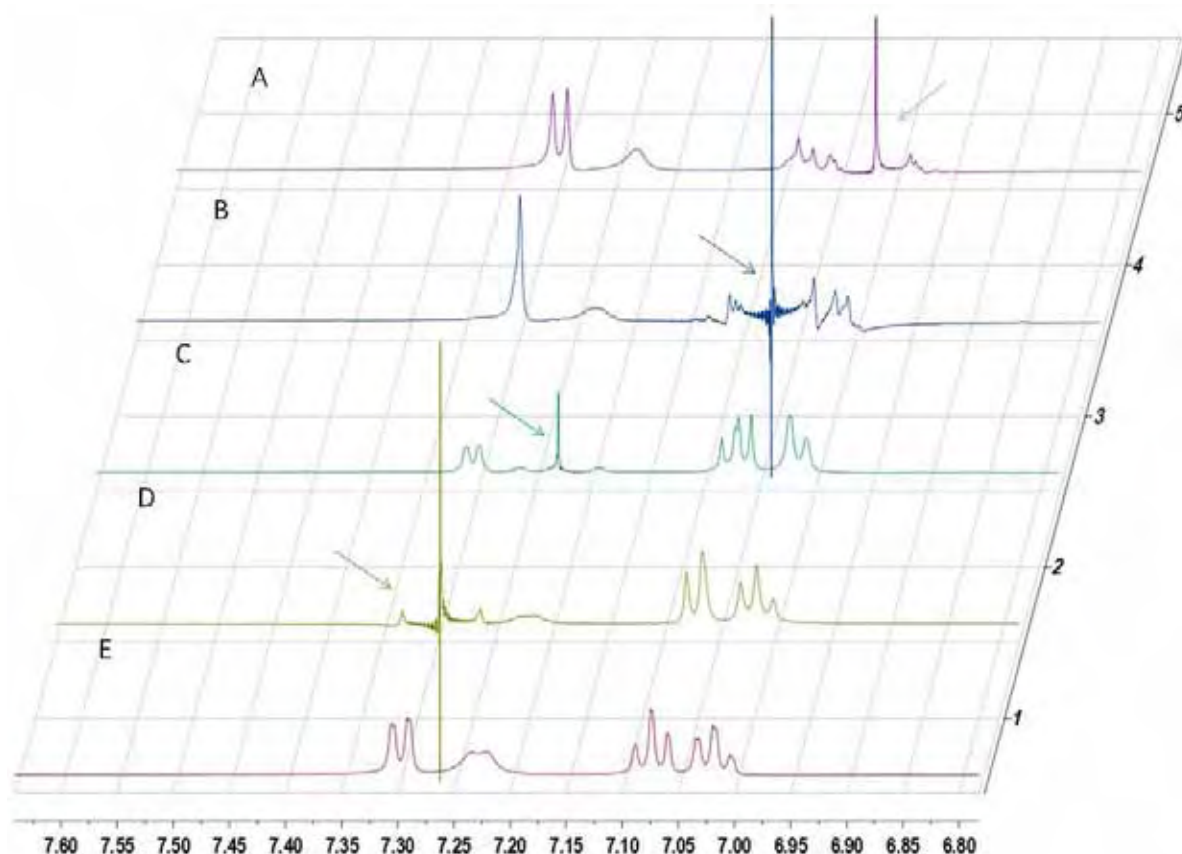
s = simpleto; dd = duplo-dupleto; ddd = duplo-duplo-dupleto.

**Figura 44.** Mapa de contorno do experimento gHMQC obtido para do composto S4 e expansão da região selecionada. Deslocamentos químicos em ppm. Solvente: acetona. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor.



O experimento HOMODEC (Homonuclear Decoupling) permite identificar dois sinais acoplados entre si. Para isso, irradia-se com uma potência de desacoplamento, de baixa energia, um único sinal de ressonância previamente selecionado do espectro. Este pulso deve retirar a influência desse sinal em todos os outros sinais de ressonâncias que estejam acoplados a ele. Comparando-se, então, o espectro resultante com o espectro original (sem os desacoplamentos), é possível identificar quais os sinais que estão acoplados àquele que foi irradiado. A Figura 45 mostra os mapas de contorno resultantes do experimento HOMODEC para S4.

**Figura 45.** Espectros envolvendo irradiações seletivas via desacoplamento homonuclear (HOMODEC). Deslocamento químico em ppm. Solvente: DMSO. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor.



No espectro desacoplado D, podemos observar que o sinal em 7,28 ppm (dd, 1H) está acoplado com o sinal em 7,02 ppm (ddd, 1H). Esta informação juntamente com a correlação  $8,22 \leftrightarrow 131,67$  ppm ( $^3J_{HC}$ ) encontrada no experimento gHMBC (Figura 46, Tabela 12) e a correlação  $7,28 \leftrightarrow 131,67$  ppm, encontrada em gHMQC (Figura 44, Tabela 13) sugerem que as ressonâncias em 7,28 e 131,67 ppm correspondam aos núcleos

posicionados em 3 (Esquema 5) e que o sinal em 7,02 ppm (ddd, 1H) corresponda, conseqüentemente, ao H4. No espectro desacoplado A verifica-se que a irradiação do sinal em 7,02 ppm provoca o desacoplamento das ressonâncias em 7,28 (dd, 1 H) e 7,09 (ddd, 1H), o que corrobora a sugestão anterior e indica que o sinal em 7,09 ppm corresponda ao H5. De fato, observa-se no espectro desacoplado B que a irradiação do sinal nesta posição provoca o desacoplamento de 7,32 (dd, 1H) e 7,02 (ddd, 1H). Finalmente, observa-se no espectro C o desacoplamento entre as ressonâncias 7,09 e 7,32 quando esta última é irradiada sendo, portanto, atribuída ao H6.

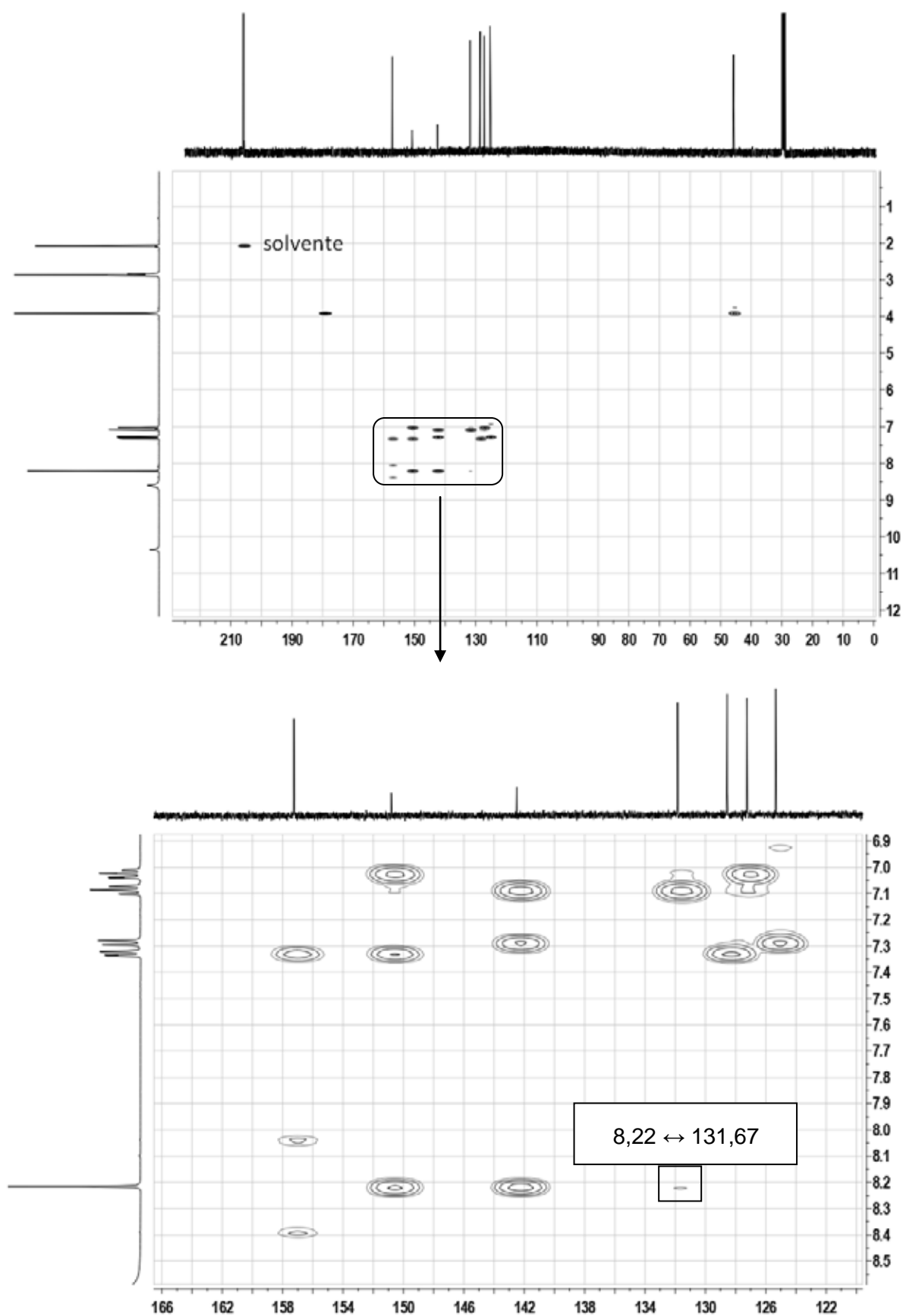
Desta forma, foi possível relacionar os sinais do anel aromático observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com os núcleos que lhes deram origem (Tabela 12).

**Tabela 12.** Relação de sinais observados (parte aromática do complexo) nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  com os núcleos de origem. Numeração realizada de acordo com o Esquema 5.

Deslocamento químico ( $\delta$ ) em ppm		
Núcleos	RMN de $^1\text{H}$	RMN de $^{13}\text{C}$
3	7,28 (dd, 1H)	131,67
4	7,02 (ddd, 1 H)	128,65
5	7,09 (ddd, 1H)	125,42
6	7,32 (dd, 1H)	127,22

A Figura 46 mostra os mapas de contorno do experimento gHMBC para o complexo S4 e a Tabela 13 lista as informações encontradas.

**Figura 46.** Mapa de contorno do experimento gHMBC para o composto S4. Solvente: acetona. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor.





**Tabela 13.** Principais correlações encontradas nos mapas de contorno de gHMBC para S4.

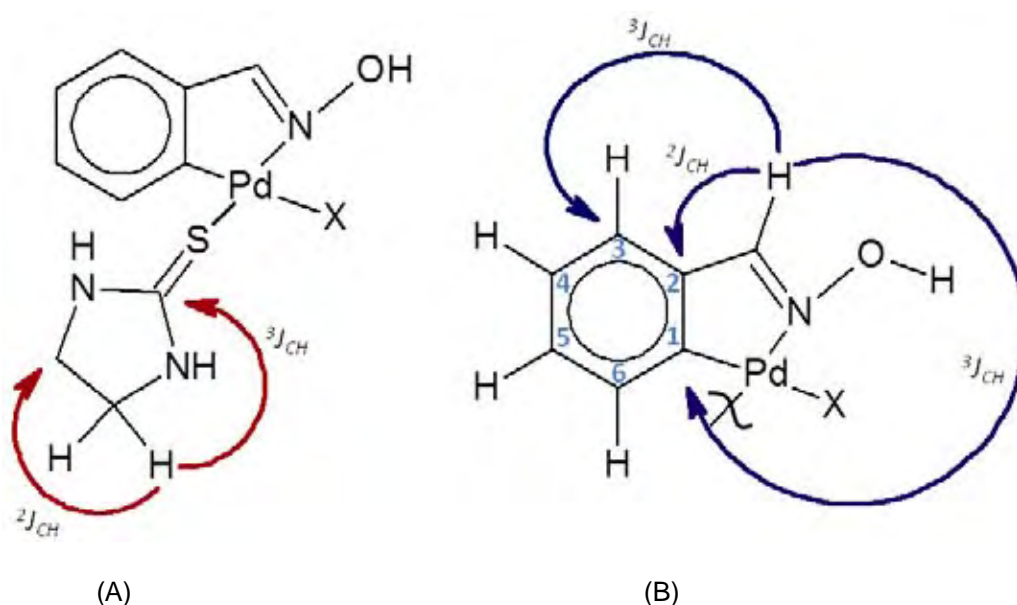
Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm			
( $\delta$ ) RMN de $^1\text{H}$	( $\delta$ ) RMN de $^{13}\text{C}$	Grupo	Acoplamento
3,92 [s, 4H] (-CH <sub>2</sub> -)	179,46	C=S	$^3J_{\text{CH}}$
	45,78	-CH <sub>2</sub> -	$^2J_{\text{CH}}$
8,22 [s, 1H] (-HC=N-)	131,67	C3	$^3J_{\text{CH}}$
	142,55	C-Pd	$^3J_{\text{CH}}$
	150,57	C4 <sup>ário</sup>	$^2J_{\text{CH}}$
	157,27	C=N	$^4J_{\text{CH}}$
7,32 [dd, 1H] (H <sub>arom</sub> )	150,57	C4 <sup>ário</sup>	$^3J_{\text{CH}}$
	128,65	C4	$^3J_{\text{CH}}$
	125,31	C5	$^3J_{\text{CH}}$
7,28 [dd, 1H] (H <sub>arom</sub> )	142,45	C-Pd	$^3J_{\text{CH}}$
	142,45	C-Pd	$^3J_{\text{CH}}$
7,09 [ddd, 1H] (H <sub>arom</sub> )	142,45	C-Pd	$^3J_{\text{CH}}$
	131,67	C3	$^3J_{\text{CH}}$
7,02 [ddd, 1H] (H <sub>arom</sub> )	150,57	C4 <sup>ário</sup>	$^3J_{\text{CH}}$
	127,22	C6	$^3J_{\text{CH}}$

s = simpleto; dd = duplo-dupleteo; ddd = duplo-duplo-dupleteo.

Nos mapas de contorno do experimento gHMBC observam-se as correlações entre os sinais do ligante Im 3,92  $\leftrightarrow$  45,78 ppm ( $^2J_{\text{CH}}$ ) e 3,92  $\leftrightarrow$  179,46 ppm ( $^3J_{\text{CH}}$ ). Esta última correlação é de elevada importância, pois permitiu a detecção do sinal do carbono C=S, deslocado para frequência levemente mais alta do que no espectro do ligante Im livre (183,45 ppm – RMN de  $^{13}\text{C}$ ). Os derivados de tiouréia comumente se coordenam ao paládio por meio do átomo de enxofre [78]. O deslocamento do sinal de C=S sugere que a coordenação do ligante Im ao centro metálico, via átomo de enxofre, desloca a densidade eletrônica da ligação *pi* do grupamento tionila, em direção ao metal; conseqüentemente, este núcleo torna-se mais blindado [36].

A região dos sinais dos grupos aromáticos e do grupo imínico foi expandida para melhor visualização. Observam-se dois sinais residuais em 157,27 ppm. O Esquema 6 ilustra as correlações mais importantes, que possibilitaram a identificação mais exata dos sinais encontrados nos espectros de RMN.

**Esquema 6.** Principais correlações observadas em gHMBC para o composto S4. Em (A) observam-se as correlações mais importantes no ligante (im). Em (B), observam-se as correlações mais importantes no ligante bzoX. Fonte: autor.

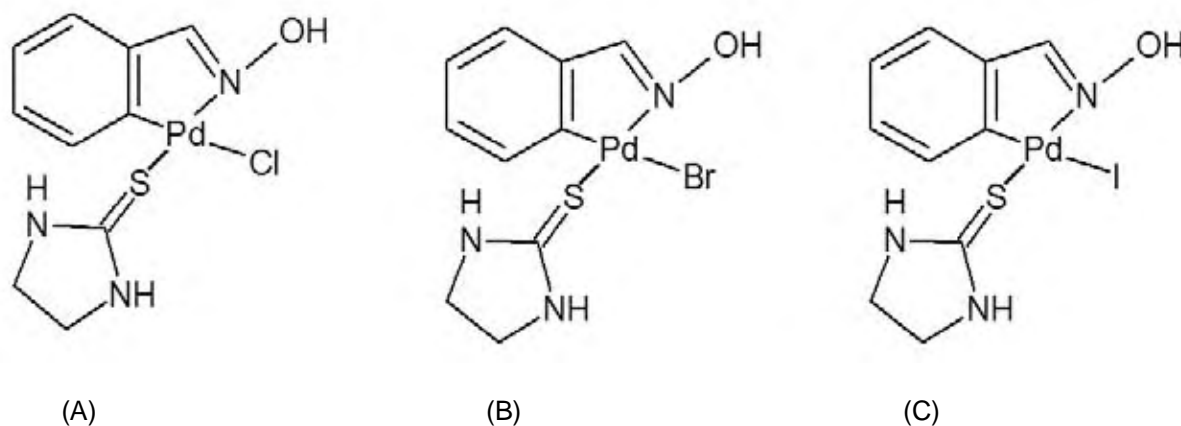


Os espectros dos complexos  $[Pd(bzoX)Br(im)]$  (S5) e  $[Pd(bzoX)I(im)]$  (S6) mostraram sinais muito semelhantes aos do composto S4 (Anexos). Assim, uma vez que a discussão dos resultados de RMN para o complexo S4 já foi realizada, torna-se desnecessária a discussão para os compostos S5 e S6.

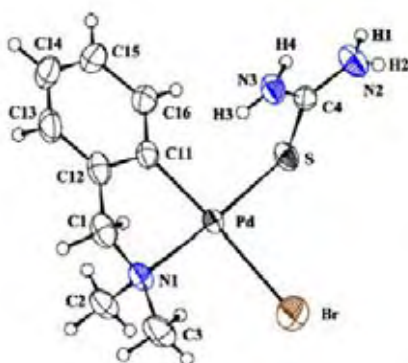
### Proposição Estrutural

Com base nos dados coletados por análise elementar, espectroscopia vibracional no IV e ressonância magnética nuclear, propõem-se as seguintes estruturas para os complexos S4, S5 e S6 (Figura 47):

**Figura 47.** Estruturas propostas para os complexos S4 (A), S5 (B) e S6 (C). Fonte: autor.



Sugere-se a formação de espécies mononucleares nas quais dois sítios de coordenação estão ocupados pelos átomos de C e N do anel quelato da benzaldeidoxima. Os grupos haletos ocupam sítios trans ao carbono metalado, enquanto que o átomo de S do ligante Im encontra-se trans ao átomo de nitrogênio. As propostas estruturais foram sugeridas a partir de estruturas moleculares de ciclopaladados análogos determinadas por DRX de monocristal [38]. A Figura abaixo mostra a estrutura do complexo ciclometalado de paládio(II), contendo os ligantes dmba, tu e Br, obtida por MORO, A. C. e apresentada em sua tese de doutorado.



**Figura 48.** Estrutura molecular [38] do complexo  $[Pd(dmba)Br(tu)]$ .

#### 4.3.1. Citotoxicidade dos complexos S1, S4, S5 e S6 frente a células LM3

A atividade citotóxica dos complexos ciclopaladados S1, S4-S6 dos ligantes bzox e Im e do fármaco padrão cisplatina foi avaliada frente a células murinas de adenocarcinoma mamário LM3. Para cada complexo utilizado, construiu-se uma curva dose-efeito. A equação da reta obtida pela regressão linear de cada curva

foneceu os valores de IC<sub>50</sub> (concentração que inibe em 50% a proliferação celular), mostrados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Citotoxicidade dos complexos ciclometalados S1, S4-S6, dos ligantes im e bzoX e da cisplatina contra a linhagem LM3.

Compostos	IC <sub>50</sub> (μmol L <sup>-1</sup> )
im	> 978
HbzoX	> 412
[Pd(bzoX)(μ-Cl)] <sub>2</sub> ( <b>S1</b> )	58,9 ± 4,27
[Pd(bzoX)Cl(im)] ( <b>S4</b> )	23,2 ± 1,77
[Pd(bzoX)Br(im)] ( <b>S5</b> )	19,9 ± 0,61
[Pd(bzoX)I(im)] ( <b>S6</b> )	18,2 ± 2,87
Cisplatina	30,3 ± 2,72

Os ligantes livres im e HbzoX não apresentam atividade citotóxica pronunciada frente a linhagem LM3, como pode ser visto nos valores de IC<sub>50</sub> apresentados (maiores que 978 e 412 μM, respectivamente). No entanto, todos os complexos mostraram-se significativamente mais ativos quando comparados com as moléculas orgânicas livres.

O complexo dimérico S1 apresentou IC<sub>50</sub> de 58,9 μM, valor este maior do que o encontrado para a droga-padrão, cisplatina (IC<sub>50</sub> = 30,3 μM). Resultados mais satisfatórios foram obtidos para os complexos S4, S5 e S6, pois todos se mostraram mais citotóxicos do que a cisplatina, com valores de IC<sub>50</sub> correspondentes a 23,2, 19,9 e 18,2 μM, respectivamente.

Os complexos S4-S6 possuem em sua estrutura, além do metalociclo formado com a benzaldeidoxima, o ligante sulfurado coordenado de forma neutra, imidazolidina-2-tiona. Estes resultados mostraram que a presença do ligante sulfurado incrementou significativamente a atividade biológica dos complexos. Desta forma, sugere-se que a atividade biológica é fortemente atribuída à presença de paládio(II), o qual pode ligar-se ao átomo de nitrogênio de bases nitrogenadas do DNA quer pela liberação do ligante X ou por quebra da ligação Pd-N do anel ciclometalado [79,80,81].

#### 4.4 Considerações espectroscópicas sobre os compostos de coordenação do tipo $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\text{L})_2]\cdot\text{Cl}$ , L = tu (S7), dmtu (S8), bipy (S9).

Os complexos S7, S8 e S9 foram sintetizados através de reações de clivagem do dímero  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-Cl})_2]$  (S1) pelos reagentes sulfurados tiouréia (S7), *N,N*-dimetiltiouréia (S8) ou 2,2'-bipiridina (S9).

A substituição dos ligantes Cl por moléculas sulfuradas ou ligantes *N,N*-bidentados objetivou:

- i) aumentar a solubilidade dos compostos em água, uma vez que os ensaios de ligação ao DNA são realizados em meio aquoso;
- ii) A substituição de grupos Cl coordenados ao centro metálico por ligantes N e S doadores diminui a probabilidade de formação de adutos covalentes entre o complexo e o receptor. Se a biomolécula do DNA for o receptor essas alterações objetivam maximizar as interações não-covalentes entre o ciclopaladado catiônico e a molécula de DNA negativamente carregada.

A Tabela 15 mostra os pontos de fusão e os resultados de análise elementar para os complexos sintetizados.

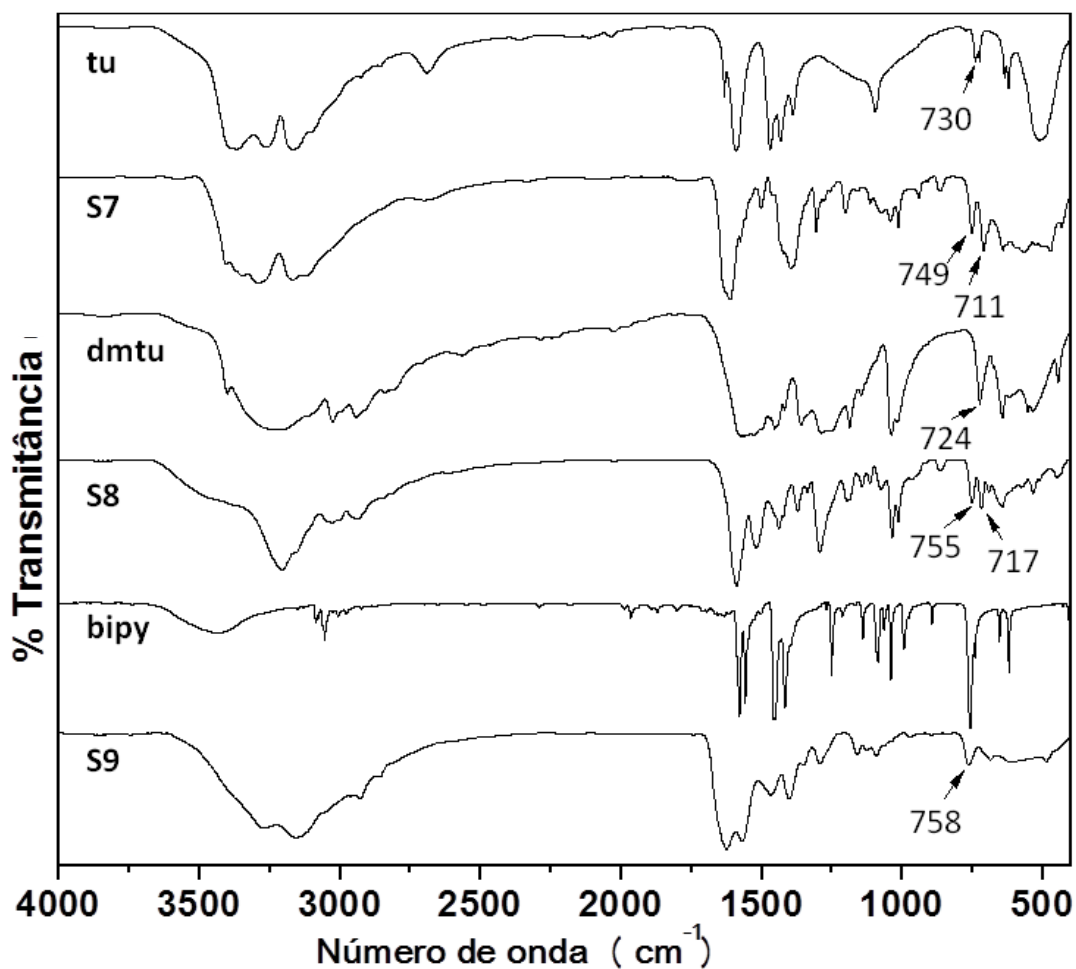
**Tabela 15.** Resultado de análise elementar e pontos de decomposição dos complexos  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\text{tu})_2]\text{Cl}$  (S7),  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\text{dmtu})_2]\text{Cl}$  (S8) e  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\text{bipy})]\text{Cl}$  (S9).

Composto	P. f. (°C)	Análise Elementar – obt. (calc.)		
		%C	%H	%N
S7	149	47,0 (48,8)	3,50 (3,37)	10,1 (9,65)
S8	142	26,1 (25,7)	3,40 (3,41)	16,9 (16,3)
S9	155	33,2 (32,5)	4,71 (4,70)	14,9 (14,7)

#### *Espectroscopia Vibracional no Infravermelho*

Os espectros dos ligantes livres tiouréia (tu), *N,N*-dimetiltiouréia (dmtu) e 2,2'-bipiridina (bipy) juntamente com os dos complexos S7, S8 e S9 são mostrados na Figura 49 e as principais absorções observadas nestes espectros são listadas na Tabela 16.

**Figura 49.** Espectros no infravermelho dos ligantes tiouréia, *N,N*-dimetiltiouréia e 2,2'-bipiridina e dos complexos [Pd(bzox)(tu)<sub>2</sub>]Cl (S7), [Pd(bzox)(dmtu)<sub>2</sub>]Cl (S8) e [Pd(bzox)(bipy)]Cl (S9). Fonte: autor.



**Tabela 16.** Principais frequências de absorção no infravermelho dos ligantes tiouréia, dimetiltiouréia e bipyridina e dos complexos [Pd(bzox)(tu)<sub>2</sub>]Cl (S7), [Pd(bzox)(dmu)<sub>2</sub>]Cl (S8) e [Pd(bzox)(bipy)]Cl (S9).

Frequência de absorção (cm <sup>-1</sup> )		
Tiouréia	[Pd(bzox)(tu) <sub>2</sub> ]Cl (S7)	Atribuições
-	3418-3251 <i>F</i>	v(O-H)
3373 – 3169 <i>F</i>	3187 – 3098 <i>F</i>	v(N-H)
1632 <i>m</i>	-	δ(HNH)
-	1612 <i>F</i>	v(C=N) + δ(HNH)
730 <i>f</i>	711 <i>m</i>	v(C=S)
-	750 <i>mf</i>	γ(C-H) <sub>arom</sub>
Dimetiltiouréia	[Pd(bzox)(dmu) <sub>2</sub> ]Cl (S8)	Atribuições
-	3208 <i>F</i>	v(O-H) + v(N-H)
3385 – 3053 <i>F</i>	-	v(N-H)
1581 <i>F</i>	-	δ(HNH)
-	1599	v(C=N) + δ(HNH)
724	717	v(C=S)
-	755	γ(C-H) <sub>arom</sub>
Bipyridina	[Pd(bzox)(bipy)]Cl (S9)	Atribuições
-	3270 <i>F</i>	v(O-H)
-	3159 <i>F</i>	v(N-H)
3053 <i>f</i>	(*)	v(C-H)
-	1626 <i>F</i>	v(C=N) <sub>bzox</sub>
1583 <i>F</i> /1585 <i>F</i>	1569 <i>F</i>	v(C=C)
1450 <i>F</i> /1408 <i>F</i>	1473 <i>m</i> / 1400 <i>m</i>	v(CN)
754 <i>F</i>	758 <i>f</i>	γ(C-H)

*v* = estiramento, *δ* = deformação, *γ* = deformação fora do plano. *F* = forte, *m* = média, *mf* = média-fraca, *f* = fraca. (\*) = encoberto.

No espectro da tiouréia livre, observam-se as fortes absorções entre 3373 e 3169  $\text{cm}^{-1}$ , bastante alargadas, atribuídas a  $\nu(\text{N-H})$ ; em 1632  $\text{cm}^{-1}$  observa-se a absorção atribuída a  $\delta(\text{HNN})$  e, em 729  $\text{cm}^{-1}$   $\nu(\text{C=S})$ . No espectro do complexo S7, aparecem as bandas fortes e alargadas entre 3418 e 3251  $\text{cm}^{-1}$  e 3187 e 3098  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas a  $\nu(\text{O-H})$  e  $\nu(\text{N-H})$ , respectivamente. Em 1612  $\text{cm}^{-1}$  observa-se uma banda relativamente larga e de forte intensidade, que foi atribuída a dois tipos de vibrações:  $\nu(\text{C=N})_{\text{bzox}}$  e  $\delta(\text{HNN})$ . A absorção de  $\nu(\text{C=S})$  deslocou-se para 711  $\text{cm}^{-1}$  no espectro do complexo, sugerindo que a molécula de tiouréia se coordena ao centro metálico via átomo de enxofre, enfraquecendo assim a ligação dupla. Neste espectro é possível também observar a banda referente ao anel aromático do ligante bzox em 749  $\text{cm}^{-1}$ .

No espectro da dimetiltiouréia livre a banda atribuída a  $\nu(\text{N-H})$  é também de forte intensidade e bastante alargada, devido às ligações de hidrogênio intermoleculares, e aparece entre 3385 e 3053  $\text{cm}^{-1}$ . A banda referente a  $\delta(\text{HNN})$ , também relativamente larga e de forte intensidade, aparece em 1581  $\text{cm}^{-1}$ . Observa-se a absorção de  $\nu(\text{C=S})$  em 724  $\text{cm}^{-1}$ . No espectro do complexo S8, a banda referente a  $\nu(\text{O-H})$  e  $\nu(\text{N-H})$  aparece em torno de 3208  $\text{cm}^{-1}$ . Esta banda bastante, alargada, é ainda menos larga do que a banda de  $\nu(\text{N-H})$  observada no espectro do ligante dmtu livre, sugerindo que há uma diminuição das interações de hidrogênio intermoleculares após a formação dos complexos. Em 1600  $\text{cm}^{-1}$  observa-se a banda atribuída às vibrações  $\nu(\text{C=N})_{\text{bzox}}$  e  $\delta(\text{HNN})$ . A absorção referente a  $\nu(\text{C=S})$  deslocou-se para frequências menores (717  $\text{cm}^{-1}$ ), sugerindo que a coordenação do ligante ocorre através do átomo de enxofre. Em 755  $\text{cm}^{-1}$  é possível também observar a banda referente a  $\gamma(\text{C-H})$  do anel aromático.

O espectro no infravermelho da bipyridina livre apresenta quatro absorções principais:  $\nu(\text{C-H})$  em 3053  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C=C})$  em 1583 e 1555  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{CN})$  em 1450 e 1408  $\text{cm}^{-1}$  e, finalmente,  $\delta(\text{C-H})$  em 754  $\text{cm}^{-1}$ . O espectro do complexo S9 mostra as bandas fortes e alargadas em 3270 e 3159  $\text{cm}^{-1}$  referentes a  $\nu(\text{O-H})$  e  $\nu(\text{N-H})$ , respectivamente. A banda de  $\nu(\text{C-H})$  é encoberta pela forte absorção de  $\nu(\text{N-H})$ . Em 1626  $\text{cm}^{-1}$  observa-se a absorção de  $\nu(\text{C=N})_{\text{bzox}}$  e em 1569  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C=C})$ . As bandas atribuídas a  $\nu(\text{CN})$  do ligante bipy deslocaram-se para 1473 e 1400  $\text{cm}^{-1}$ . É possível ainda observar a banda de  $\gamma(\text{C-H})$  em 758  $\text{cm}^{-1}$ .

### *Ressonância Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ no estado sólido*

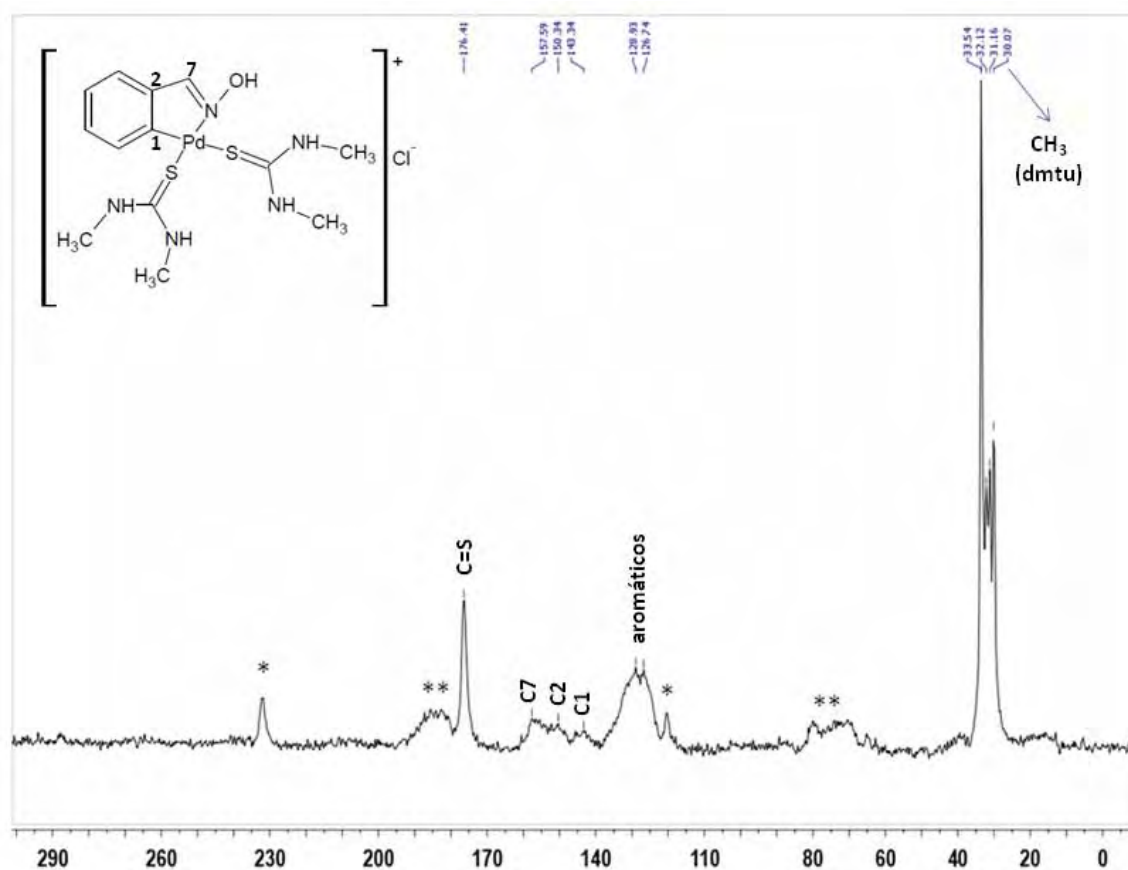
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do complexo  $[\text{Pd}(\text{bzox})(\text{dmtu})_2]\text{Cl}$  foi obtido em estado sólido. Neste espectro os sinais dos átomos que possuem menor liberdade de rotação, e formam uma estrutura mais rígida em determinada região do composto, aparecem mais



alargados. Os sinais dos átomos que apresentam maior fluxionalidade apresentam-se mais finos. A ressonância de certos átomos que fazem parte de grupos químicos com forte anisotropia magnética gera os chamados *sinais laterais*, que aparecem a uma distância proporcional ao parâmetro de giro da amostra, tanto do lado esquerdo como do lado direito do sinal de ressonância que o gerou.

A Figura 50 mostra o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para o complexo S8.

**Figura 50.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do complexo  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\text{dmu})_2]\text{Cl}$ , no estado sólido. Deslocamento químico em ppm. (\*) = sinais laterais gerados pela ressonância em 176,41 ppm. (\*\*) = sinais laterais gerados pelos sinais alargados em 129,93 e 126,74 ppm. Fonte: autor.



No espectro acima, observam-se quatro sinais entre 30,07 e 33,54 ppm atribuídos às quatro metilas pertencentes aos dois ligantes dmu, presentes no complexo. Foi possível detectar o sinal do grupo C=S em 176,41 ppm. Esta ressonância gerou os sinais laterais marcados com (\*). Todos os sinais pertencentes aos carbonos do ligante dmu são relativamente finos, indicando que estes núcleos possuem maior liberdade de rotação.

Dois sinais bastante alargados são observados em torno de 129,93 e 126,74 ppm. Estes sinais correspondem aos carbonos aromáticos não-quaternários do ligante bzoX (Esquema 5). A forte anisotropia magnética destes núcleos gera os sinais laterais marcados com (\*\*). O alargamento destes sinais sugere que tais átomos estejam arrançados em uma estrutura bastante rígida, na qual a liberdade relativa de rotação é baixa. É possível que os sinais dos outros dois carbonos não-quaternários presentes no anel aromático do complexo estejam contidos nesta região. É importante ressaltar que os sinais destes carbonos apareceram entre 125 e 132 ppm nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  em solução dos complexos 1 a 6. Além disso, observam-se três sinais largos e de baixa intensidade, em 157,59, 150,34 e 143,34 ppm, atribuídos aos carbonos C7 (-HC=N-), C2 (quaternário) e C1 (C-Pd), respectivamente (Esquema 5, pág 78). A largura destes sinais novamente indica uma região do complexo de baixa fluxionalidade pela rigidez da estrutura formada, indicando que a integridade do metalociclo foi mantida.

As informações obtidas do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido para este complexo sugerem a formação da espécie mononuclear contendo o metalociclo formado na síntese do complexo precursor e a presença dos dois ligantes dmtu, coordenados através do átomo de enxofre. Este complexo possui carga +1, a qual é estabilizada pela presença do contra-íon  $\text{Cl}^-$ .

#### 4.4.1. Ensaio com DNA

##### 4.4.1.1. Ligação ao DNA em meio extracelular

Soluções de dupla fita de CT-DNA na concentração de  $1 \times 10^{-4}$  M foram incubadas a 37 °C com os complexos de paládio, em 10 mM  $\text{NaClO}_4$ , no valor de  $r_i = 0,1$  ( $r_i$  é definido como a razão molar inicial entre os compostos metálicos livres e os nucleotídeos no início da incubação com o DNA). Após 24 horas de incubação, alíquotas das amostras foram exaustivamente dialisadas em solução de  $\text{NaClO}_4$  10 mM, por 24 horas. Ao final da diálise, as concentrações do DNA em cada amostra (dialisadas e não-dialisadas), foram medidas por espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta. Em seguida, o DNA das amostras foi precipitado por adição de etanol e o conteúdo de paládio pôde ser quantificado no sobrenadante das amostras, ou na pastilha de DNA ressolubilizada em água, por espectroscopia de absorção atômica. Desta forma, determinou-se o valor de  $r_b$  (razão entre a concentração molar dos complexos de paládio ligados e a concentração molar do DNA).

**Tabela 17.** Valores de concentração obtidos pela análise da mistura reacional após incubação por 24 horas (37 °C) e após diálise em meio contendo 10 mM de NaClO<sub>4</sub>.

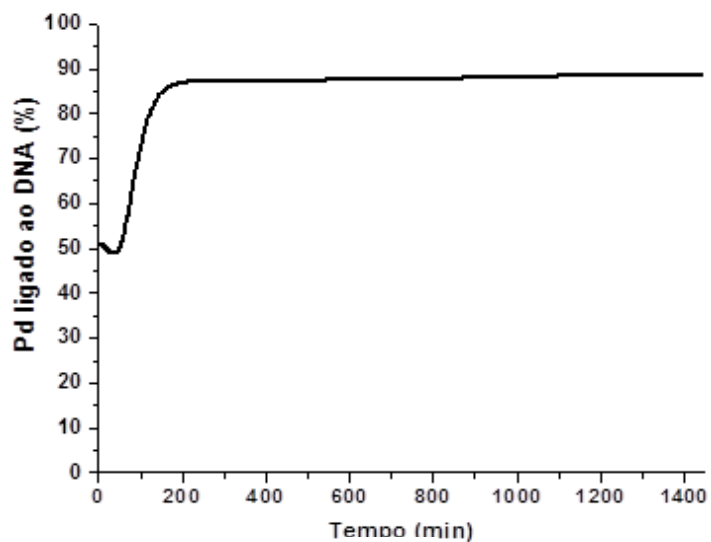
Complexo	Incubação 24 horas		Diálise 10mM NaClO <sub>4</sub>	
	[Pd] mol.L <sup>-1</sup>	r <sub>b</sub>	[Pd] mol.L <sup>-1</sup>	% Pd ligado ao DNA
<b>S7</b>	5,87 x 10 <sup>-5</sup>	0,08	5,26 x 10 <sup>-5</sup>	89,6
<b>S8</b>	8,16 x 10 <sup>-5</sup>	0,09	7,62 x 10 <sup>-5</sup>	93,4
<b>S9</b>	9,25 x 10 <sup>-5</sup>	0,08	8,65 x 10 <sup>-5</sup>	93,5

Os valores de r<sub>b</sub> encontrados para os complexos S7, S8 e S9 após a incubação foram de aproximadamente 0,1. Esta diferença ocorre devido a pipetagem. Após exaustiva diálise da mistura de DNA com os complexos, apenas 10% da quantidade total adicionada à mistura foi encontrada nos sobrenadantes, sugerindo uma forte afinidade entre os compostos sintetizados e o biopolímero, uma vez que 90% da quantidade de paládio adicionada continua ligada ao DNA, mesmo após exaustiva diálise (Tabela 17).

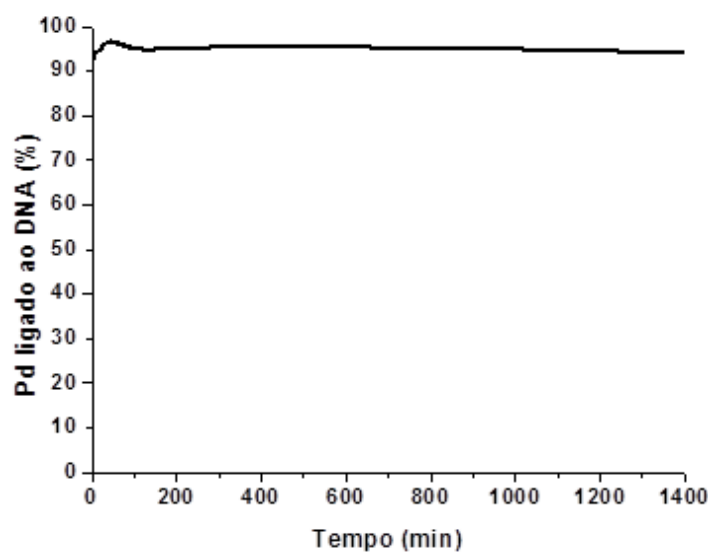
#### 4.4.1.2. Determinação da velocidade de ligação entre os complexos e o CT-DNA

Soluções de dupla fita de CT-DNA na concentração de 1 x 10<sup>-4</sup> M foram incubadas a 37 °C com os complexos de paládio, em 10 mM NaClO<sub>4</sub>, no valor de r<sub>i</sub> = 0,1. Alíquotas da mistura reacional foram tomadas em determinados intervalos de tempo e a reação foi interrompida pela adição de NaCl 1,5 M (10% do volume total). Em seguida, as alíquotas foram rapidamente resfriadas e o DNA foi precipitado por adição de etanol 70%. Os sobrenadantes destas alíquotas foram submetidos a medidas de absorção atômica em forno de grafite para determinação do conteúdo de paládio. O comportamento dos complexos frente ao DNA, em função do tempo, é mostrado na Figura 51:

**Figura 51.** Curvas: porcentagem de complexo de paládio ligado ao DNA em função do tempo. Curva A:  $[\text{Pd}(\text{bzox})(\text{bipy})]\text{Cl}$  (S9); curva B:  $[\text{Pd}(\text{bzox})(\text{dmtu})_2]\text{Cl}$  (S8). Experimentos realizados em quadruplicata. Fonte: autor.



(A)



(B)

A curva observada na Figura 51 (A) mostra o comportamento reacional do complexo **S9** frente ao CT-DNA. No instante inicial da mistura, cerca de 50% do conteúdo de complexo encontra-se ligado ao DNA. Esta quantidade cresce, gradativamente, atingindo 87% no tempo próximo a 4 horas de reação (220 minutos). Após este intervalo, a quantidade de Pd ligada ao DNA continua a crescer, porém, mais devagar, chegando a 89% no final de 24 horas. Este resultado não está em desacordo com os resultados obtidos no

experimento anterior, uma vez que ao final da diálise, encontrou-se ainda 89% do total de complexo S9 ligado ao DNA.

A curva do complexo **S7** não é mostrada, porque a quantidade de Pd detectada em todos os sobrenadantes das amostras do experimento de cinética deste composto foi de aproximadamente zero, indicando a ocorrência imediata de ligação com o DNA.

Comportamento semelhante é observado para o complexo **S8**, como se observa na Figura 51 (B). Aproximadamente 95% do conteúdo de paládio presente na mistura reacional se encontra ligado ao DNA logo nos primeiros 10 minutos de reação. Após 1 hora, esta quantidade aumenta para 96%, e, ao final de 24 horas, ela corresponde a 94% do conteúdo total de complexo de paládio. Estes resultados estão em concordância para com os obtidos no experimento de diálise.

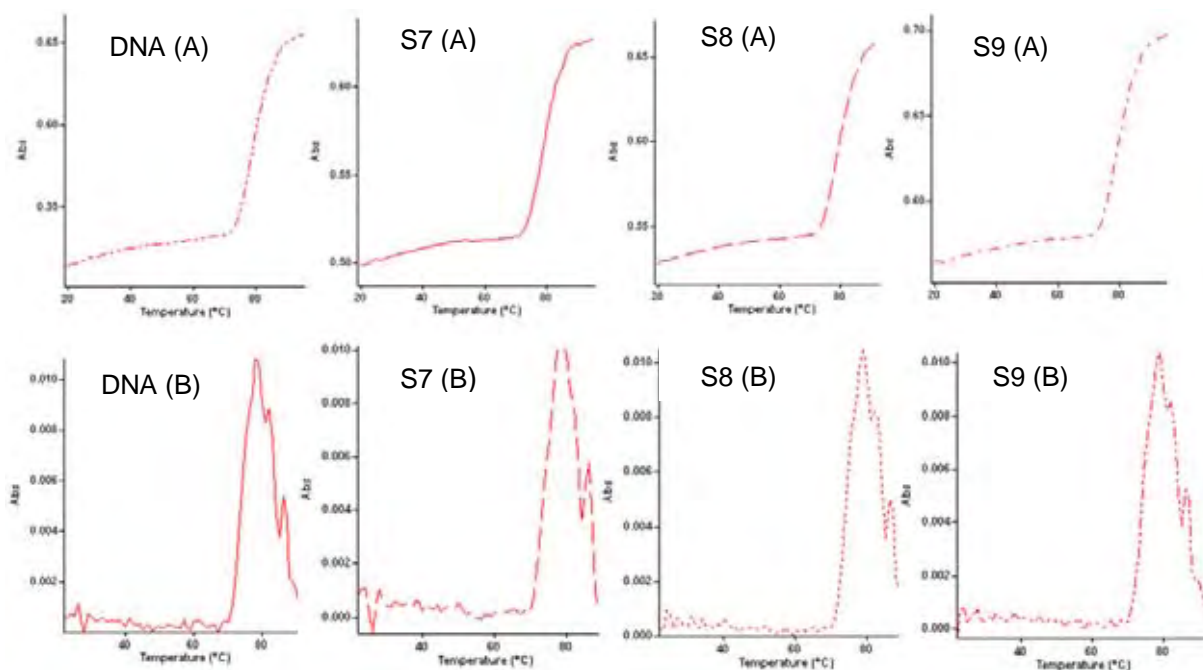
#### 4.4.1.3. Determinação da estabilidade térmica do DNA após reação com os complexos de paládio

As duas fitas complementares de DNA mantêm-se unidas devido as interações de hidrogênio entre bases nitrogenadas complementares e interações hidrofóbicas entre os pares de bases adjacentes enfileirados. Este tipo de interação é chamado de *base-stacking* [67,68]. Uma pequena quantidade de energia é suficiente para separar os pares de bases do DNA em duas fitas simples, entretanto, à temperatura ambiente, as fitas se unem novamente de forma espontânea [6].

Se uma solução de DNA for aquecida a aproximadamente 90 °C (ou mais) haverá energia cinética suficiente para que o biopolímero seja totalmente desnaturado, causando a separação completa de suas fitas. A desnaturação térmica do DNA pode ser acompanhada espectrofotometricamente, monitorando-se a absorbância da solução em 260 nm. As bases nucleotídicas, quando enfileiradas na dupla-fita absorvem menos energia do que quando estão livres do enfileiramento, em uma fita simples de DNA. Sendo assim, a absorbância do DNA a 260 nm aumenta conforme o DNA se torna desnaturado, ou seja, quando as fitas se separam ocorre um efeito hipercrômico no espectro de UV-Vis da solução.

Plotando-se a absorbância em 260 nm em função da temperatura da solução de DNA é possível determinar  $t_m$ , definido como a temperatura em que 50% do DNA é desnaturado [6,68]. A Figura 52 mostra as curvas de desnaturação obtidas para a solução de CT-DNA em 10 mM NaClO<sub>4</sub> e para as misturas reacionais com os complexos S7, S8 e S9. A concentração de DNA nas amostras é de aproximadamente  $7,5 \times 10^{-5}$  M e  $r_i = 0,1$ .

**Figura 52.** Medidas de absorvância em 260 nm em função da temperatura (°C) de soluções de CT-DNA livre em 10 mM NaClO<sub>4</sub> (DNA), e na presença dos complexos [Pd(bzox)(bipy)]Cl (S7), [Pd(bzox)(tu)<sub>2</sub>]Cl (S8) e [Pd(bzox)(dmtu)<sub>2</sub>]Cl (S9). Na parte B: primeira derivada das curvas em A. Fonte: autor.



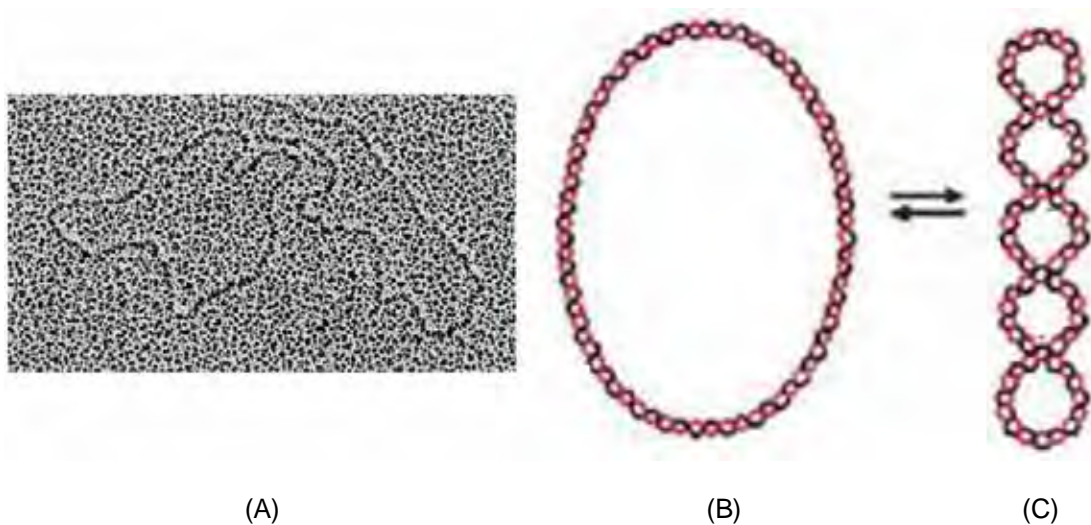
Observa-se na Figura 52 que os perfis das curvas de absorvância em função do aumento de temperatura das misturas de DNA com os complexos de paládio são muito semelhantes ao perfil da curva da solução de DNA livre. As derivadas das curvas de absorvância também mostraram que a temperatura de desnaturação térmica do DNA é a mesma (79 °C) tanto para a solução de DNA livre, como para as misturas de DNA com complexos. Este resultado sugere fortemente que os complexos não provocam nenhuma modificação na estrutura do DNA, e que portanto, não alteram a estabilidade das interações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas complementares que formam a dupla-fita. Sugere-se que a interação entre os complexos e o biopolímero é superficial, ocorrendo somente ao redor da cadeia de fosfatos do DNA, ou que a possível interação existente entre os complexos e as bases nitrogenadas do DNA seja rompida com o aumento da temperatura.

#### 4.4.1.4. Desenrolamento da dupla-fita de DNA plasmideal (pUC19)

Substâncias capazes de formar ligações com o DNA ou interações entre os seus pares de bases (intercalação) provocam certas modificações na sua estrutura. A cisplatina, por exemplo, ao formar os adutos bifuncionais, majoritariamente com o N7 das bases guanina, causa uma torção e um desenrolamento no local onde ocorre a ligação [64]. Tais modificações na estrutura do DNA podem ser detectadas pelo experimento de mobilidade eletroforética de DNA plasmideal em gel de agarose.

DNA plasmideal é o nome dado ao elemento de DNA extracromossômico, existente em várias bactérias [6]. É uma molécula circular, covalentemente fechada, que carrega genes para resistência a antibióticos ou metabolismo de substratos incomuns (Figura 53).

**Figura 53.** Micrografia de DNA plasmideal na forma circular relaxada (A). Representação: mudança de conformação do DNA na forma circular relaxada (B) para a forma superenovelada (C). Fonte: <http://www.hardmob.com.br>.

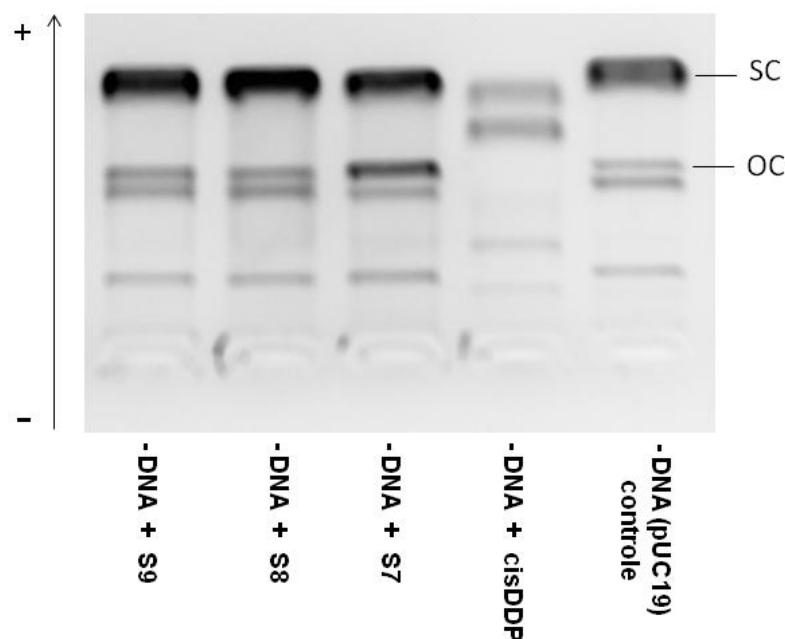


A eletroforese horizontal em gel é o método mais comumente utilizado para a separação quantitativa ou qualitativa de moléculas de DNA, de acordo com o seu tamanho ou a sua forma [6,10]. Geralmente, as amostras são aplicadas ao gel de agarose, seguida de coloração com brometo de etídio. Este corante liga-se ao DNA por inserção entre os seus pares de bases (intercalação), e exibe forte fluorescência vermelha quando iluminado por luz ultravioleta.

Muitos complexos, ao reagirem com o DNA, modificam a sua estrutura, como já foi dito anteriormente. A mudança de conformação da macromolécula geralmente envolve o desenrolamento da sua fita, no local da ligação. Este desenrolamento da dupla-fita provoca

uma diminuição no número de “nós” ou voltas super-helicoidais do DNA superenovelado, diminuindo assim a sua compactação e, portanto, a sua velocidade de migração entre as fibras formadas no gel [64]. Neste experimento, o DNA plasmideal pUC19 foi utilizado nas misturas reacionais com os complexos S7, S8, S9 e cisplatina. Uma solução contendo somente DNA plasmideal foi utilizada como controle. A Figura 54 mostra a foto do gel de agarose após a corrida eletroforética. Brometo de etídeo foi utilizado para a revelação das bandas com transiluminador.

**Figura 54.** Gel de agarose 1% após corrida eletroforética. SC = “supercoiled” ou forma superenovelada do DNA; OC = “open circular” ou forma circular relaxada do DNA. Amostras: DNA + **S9** (rb = 0,09); DNA + **S8** (rb = 0,09); DNA + **S7** (rb = 0,07); DNA + cisDDP (rb = 0,10); DNA controle. Experimento feito em quadruplicata. Fonte: autor.



A velocidade de locomoção das moléculas de DNA no gel de agarose apresenta relação direta com o tamanho, a forma e a carga elétrica líquida do biopolímero. A forma circular superenovelada (SC) do DNA é a mais compacta e, portanto, passa com mais facilidade entre as cavidades do gel, possuindo assim, maior velocidade de migração. Por outro lado, a forma circular relaxada (OC) se parece com um anel, sendo mais volumosa do que a forma (SC). Seu contato com as paredes fibrosas do gel é maior, o que causa um retardamento na mobilidade da molécula.

Em uma amostra de DNA plasmideal encontram-se sempre frações da molécula no arranjo (SC) e (OC), majoritariamente. Além disso, é possível também visualizar as bandas



mais finas e retardadas dos dímeros e multímeros de DNA (OC), que deslocam-se mais devagar no gel, por serem maiores.

Na Figura 54, destacam-se as bandas de DNA (SC) e (OC) da amostra controle, localizadas a uma distância maior do ponto de origem. A forma SC migra com maior velocidade e existe uma distância de separação significativa entre as formas (SC) e (OC).

Na linha 4 (DNA + cisDDP), é possível evidenciar a modificação da estrutura do DNA causada pela cisplatina, porque a banda referente ao DNA (SC) migrou com velocidade menor do que a esperada para o DNA não-modificado. Isso ocorre porque a cisplatina é capaz de causar torções e desenrolamentos na dupla-fita, nos locais onde as ligações com o biopolímero se formam. O desenrolamento da dupla-fita e as torções favorecem a descompactação da forma (SC) do DNA, o que influencia diretamente na sua velocidade de migração no gel (causa diminuição da sua mobilidade entre as fibras de agarose). Por outro lado, com o DNA (OC) ocorre o oposto: as ligações com a cisplatina favorecem uma maior compactação da forma (OC), uma vez que a tensão das torções causadas pelas ligações covalentes com a platina deforma a estrutura circular transformando-a em uma estrutura menos larga. Sendo assim, a velocidade de locomoção do DNA entre as fibras do gel aumenta e as formas (SC) e (OC) aproximam-se consideravelmente.

Nas linhas 1, 2 e 3 observam-se as bandas formadas pelas amostras de DNA na presença dos complexos S7, S8 e S9. Nas três linhas, a velocidade de migração do DNA (SC) e (OC) não sofreu alteração significativa pela presença dos complexos. Isso corrobora a hipótese de que os complexos se ligam à molécula de DNA apenas superficialmente, provavelmente interagindo somente com a cadeia de fosfatos e açúcares, sem modificar significativamente a sua estrutura, uma vez que não há ligação a nenhuma das bases nitrogenadas. Apenas, um pequeno retardamento de cada uma das bandas de DNA {(SC), (OC) e multímeros} ocorreu quando na presença dos complexos. Este leve retardamento pode ser explicado pela presença das cargas positivas dos centros metálicos de paládio, que neutralizam parte das cargas negativas dos fosfatos, diminuindo assim a carga elétrica líquida da cadeia e, conseqüentemente, sua velocidade de migração em direção ao pólo positivo do sistema.

#### 4.4.1.5. Ensaio com enzimas endonucleases restritoras e DNA plasmideal (pUC19)

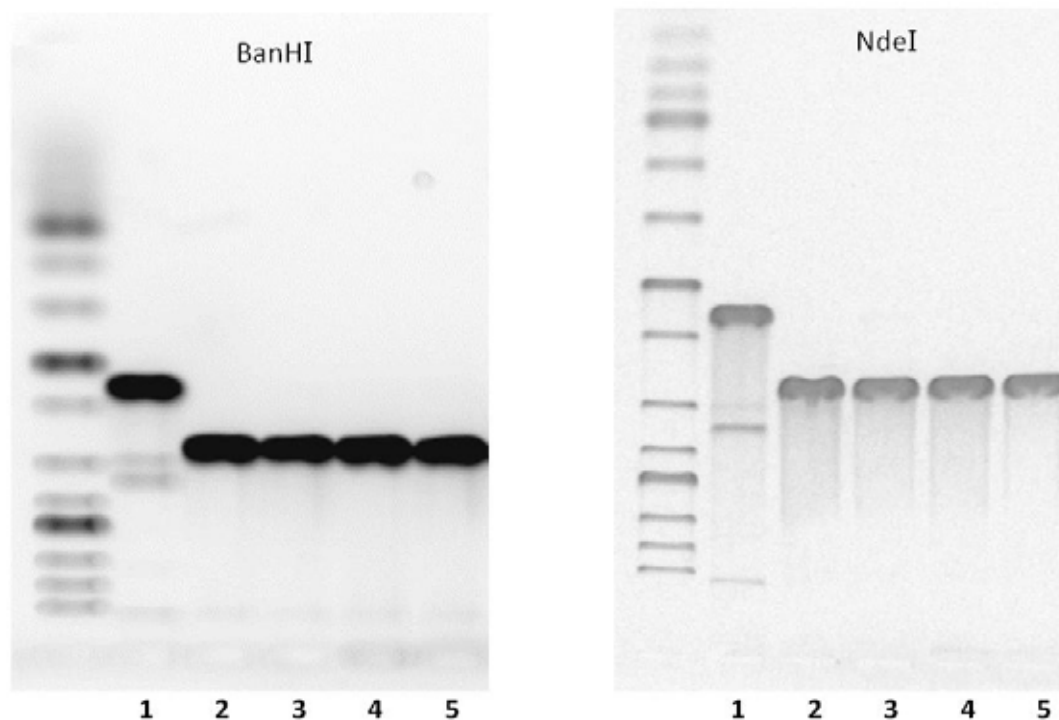
As enzimas endonucleases restritoras, observadas pela primeira vez em cepas de *Escherichia coli*, são enzimas responsáveis pela proteção da célula bacteriana contra a invasão de seres bacteriófagos. Neste caso, as endonucleases restritoras clivam o DNA invasor em diversos segmentos menores, impedindo o seu funcionamento metabólico normal, levando o invasor à inatividade. As reações de clivagem das enzimas são altamente específicas para determinadas sequências de nucleotídeos. O DNA celular da bactéria é protegido da ação das enzimas restritoras por uma metilação no sítio de clivagem [6].

Em virtude da sua alta especificidade no que diz respeito ao reconhecimento de sequências de nucleotídeos e de sua ação catalítica de clivagem do DNA, as endonucleases restritoras são largamente utilizadas para estudos de biotecnologia e biofísica. Elas são capazes de linearizar, por sua ação catalítica de clivagem, o DNA circular superenovelado plasmideal, nos seus sítios de reconhecimento específicos. Tais enzimas são capazes de reconhecer sequências de 4 a 6 pares de bases de comprimento do DNA e clivar o biopolímero, de maneira a mudar a sua conformação, o qual passa de circular fechado para linearizado.

Já foi mostrado na literatura que complexos metálicos ligados às bases nitrogenadas do DNA modificam a sua estrutura e impedem a ação catalítica das enzimas restritoras [59].

Buscando-se corroborar a hipótese de que os complexos S7, S8 e S9 não formam ligações com as bases nitrogenadas do DNA, examinou-se o efeito destes compostos na clivagem da dupla-fita de DNA plasmideal pUC19, contendo sítios de reconhecimento para ação das endonucleases restritoras BanHI e NdeI. A enzima BanHI reconhece a sequência nucleotídica GGATCC, promovendo a clivagem do cadeia do DNA exatamente no ponto entre as duas bases guaninas. A enzima NdeI reconhece a sequência CATATGA, clivando o sítio AT. Dessa forma, tornou-se possível avaliar o efeito dos complexos sobre qualquer das quatro bases nitrogenadas constituintes do DNA. Os produtos da reação do DNA com as enzimas restritoras, na presença ou ausência dos complexos de paládio foram analisados pelo ensaio de mobilidade eletroforética em gel de agarose. Os resultados desta análise são mostrados na Figura 55.

**Figura 55.** Ensaios com as enzimas endonucleases restritivas BanHI e NdeI. Linhas 1: controle negativo (DNA); linhas 2: controle positivo (DNA + enzima); linhas 3, 4 e 5: misturas reacionais de DNA com os complexos S7, S8 e S9, respectivamente, na presença das enzimas.  $rb = 0,09$  para todas as misturas. Fonte: autor.



Na figura acima, observa-se do lado esquerdo de cada foto a régua de DNA, a qual foi utilizada neste experimento apenas para facilitar a visualização das distâncias entre as bandas de DNA em cada linha. Nas linhas 1 de ambos os experimentos foram aplicadas as amostras de controle negativo (DNA em solução tampão, na ausência da enzima restritora e dos complexos). Por isso, nesta linha, observam-se as bandas de DNA (SC), mais distante da origem, seguida pelas bandas mais finas e fracas de DNA (OC) e dos dímeros de DNA circular aberto. Este comportamento é o esperado para uma solução de DNA livre, na ausência de modificadores, tais como a cisplatina.

Na linha 2, foram aplicadas as amostras de controle positivo, ou seja, DNA na presença das enzimas restritoras BanHI ou NdeI. Na ausência de qualquer molécula capaz de modificar a estrutura do DNA, ambas as enzimas reagiram com o DNA plasmideal, clivando a dupla-fita nos sítios de ação específicos para cada uma. O DNA circular superenovelado, por ação das endonucleases restritoras, tornou-se linearizado. O DNA linearizado possui maior superfície de contato com as paredes do gel de agarose, sendo

menos compacto do que a forma (SC). Conseqüentemente, a sua velocidade de migração no gel é menor.

Nas linhas 3, 4 e 5 de ambos os experimentos, observa-se comportamento semelhante ao do controle positivo; tal comportamento corrobora a hipótese de que os complexos não se ligam a nenhuma das bases nitrogenadas do DNA, uma vez que não foram capazes de impedir a ação das enzimas restritoras BanHI e NdeI sobre a cadeia de DNA plasmideal circular superenovelado. Todas as amostras de DNA incubadas com os complexos **S7**, **S8** ou **S9** foram linearizadas por ação de clivagem das endonucleases restritoras.

#### *Discussão dos resultados dos experimentos com DNA*

Os resultados expostos acima indicam que os complexos S7, S8 e S9 não formam ligações covalentes com o DNA, pois não foram detectadas modificações na conformação da biomolécula pelos ensaios bioquímicos. Sugere-se também que a parte aromática dos complexos não pode se intercalar completamente entre os pares de bases nitrogenadas complementares do DNA, uma vez que não foram observadas modificações na temperatura de desnaturação da dupla-fita ou desenrolamento do DNA plasmideal.

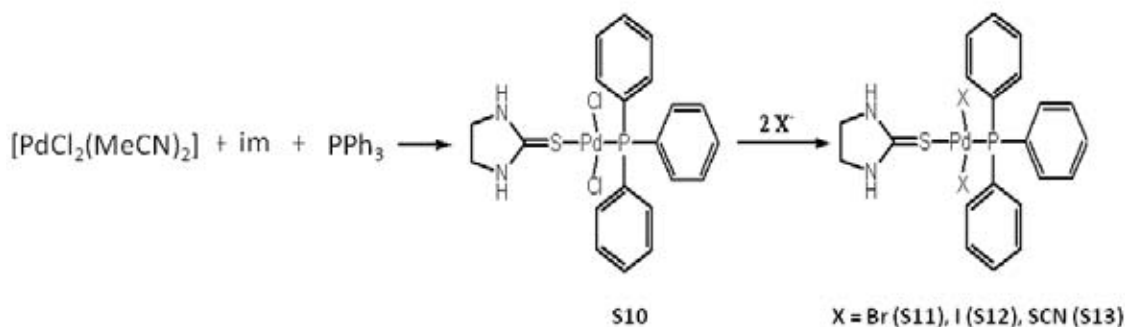
No entanto, a exaustiva diálise das amostras de DNA com os complexos, a precipitação do DNA e o experimento de cinética de ligação indicaram a existência de uma forte interação entre S7, S8 e S9 com o biopolímero.

É possível que os complexos interajam superficialmente com a dupla-fita de DNA, aproximando-se da sua cadeia de fosfatos por meio de interações eletrostáticas entre o metal carregado positivamente e os fosfatos carregados negativamente e que, em seguida, estabeleça ligações de hidrogênio entre os componentes dos ligantes e os átomos de oxigênio dos grupos fosfatos. Neste caso, não haveria modificação da conformação da cadeia de DNA e, portanto, os métodos bioquímicos seriam incapazes de detectar o seu modo de ação sobre a biomolécula. Interações deste tipo já foram observadas por difração de raios-X [82].

#### **4.5 Considerações espectroscópicas sobre os compostos de coordenação do tipo [PdX(im)(PPh<sub>3</sub>)], X = Cl (S10), Br (S11), I (S12) e SCN (S13)**

Os complexos S10-S13 possuem colorações que variam do amarelo escuro ao marrom e pontos de fusão entre 132 e 230 °C. Todos foram sintetizados através de reações de substituição, em meio de metanol, partindo-se do complexo precursor bis-acetonitriladictloropaládio(II). A síntese dos complexos S10-S13 é mostrada no Esquema 7.

**Esquema 7.** Reação de síntese dos complexos **S10 - S13**. Fonte: autor.



No esquema acima os complexos representados aparecem na forma *trans*. Entretanto, não foi possível caracterizar a conformação dos complexos pelos métodos utilizados na elucidação de suas estruturas. Existe a possibilidade de que sejam complexos *cis*.

A Tabela 18 mostra os resultados de análise elementar e os pontos de fusão dos compostos **S10-S13**.

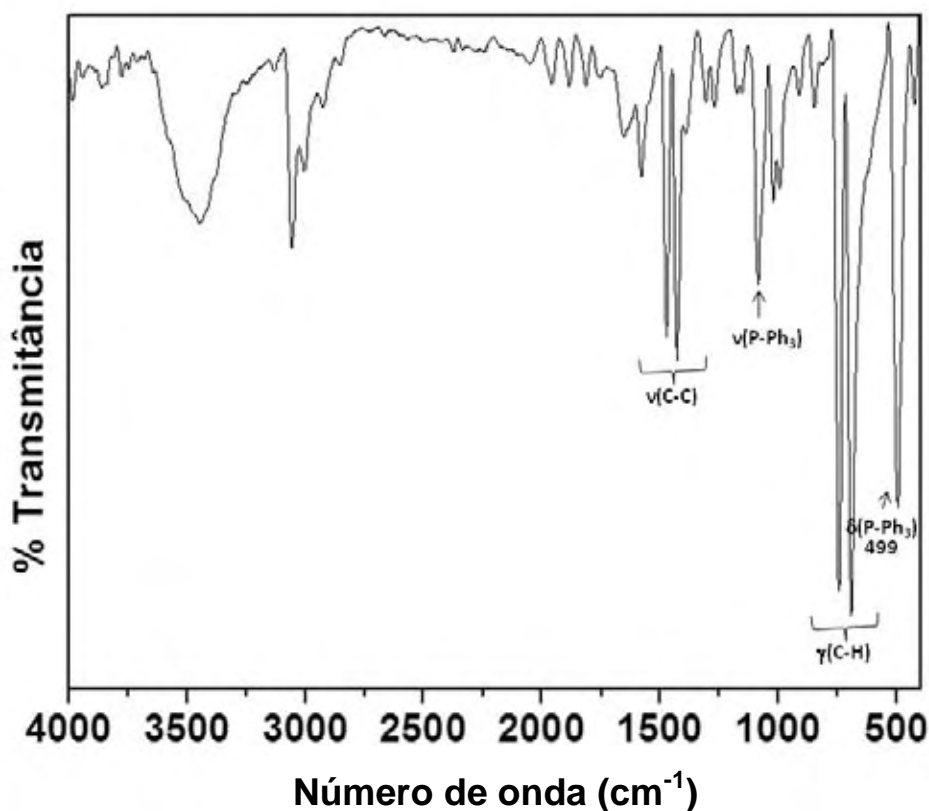
**Tabela 18.** Resultados de análise elementar para os complexos S10-S13 e seus respectivos pontos de fusão.

Compostos	P. f. (°C)	Análise Elementar – obt. (calc.)		
		%C	%H	%N
(S10) [PdCl <sub>2</sub> (im)(PPh <sub>3</sub> )]·MeOH	162	48,00 (46,05)	4,28 (4,29)	4,32 (4,88)
(S11) [PdBr <sub>2</sub> (im)(PPh <sub>3</sub> )]	138	39,50 (39,90)	3,62 (3,36)	4,44 (4,23)
(S12) [PdI <sub>2</sub> (im)(PPh <sub>3</sub> )]	132	35,42 (34,31)	3,05 (2,92)	3,76 (3,87)
(S13) [Pd(SCN) <sub>2</sub> (im)(PPh <sub>3</sub> )]·H <sub>2</sub> O	191	47,06 (45,66)	3,61 (3,83)	9,54 (9,26)

### *Espectroscopia Vibracional no Infravermelho*

As principais vibrações observadas no espectro da trifenilfosfina ( $\text{PPh}_3$ ) livre são:  $\nu(\text{C-C})$  do anel aromático em  $1469$  e  $1427\text{ cm}^{-1}$ ,  $\gamma(\text{C-H})$   $747$  e  $692\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{P-Ph}_3)$  em  $1086$  e  $426\text{ cm}^{-1}$  e, finalmente,  $\delta(\text{P-Ph}_3)$  em  $499\text{ cm}^{-1}$  (Figura 56). O espectro da imidazolidina-2-tiona livre já foi discutido na seção 4.2.

**Figura 56.** Espectro no IV da trifenilfosfina livre. Fonte: autor.



Nos espectros dos complexos S10–S13 (Figura 57), é possível observar o desaparecimento das bandas de  $\nu(\text{S-H})$  e  $\nu(\text{C=N})$  do ligante imidazolidina-2-tiona sugerindo que este esteja coordenado ao centro metálico pela forma tautomérica A (Figura 38). As fortes absorções entre  $3100$  e  $3400\text{ cm}^{-1}$ , referentes às vibrações  $\nu(\text{N-H})$  são também indicativas de coordenação do ligante Im ao paládio. Nos espectros dos complexos, tais bandas aparecem menos alargadas, sugerindo a diminuição das interações de hidrogênio intermoleculares após a coordenação.

Observam-se também as bandas em torno de  $1094\text{ cm}^{-1}$ , referentes à absorção de  $\nu(\text{P-Ph}_3)$  nos espectros dos complexos, evidenciando a presença do ligante  $\text{PPh}_3$ . Em aproximadamente  $745$  e  $700\text{ cm}^{-1}$  observam-se as duas bandas atribuídas à vibração  $\gamma(\text{C-H})$ , características dos seus anéis aromáticos monossustituídos. Além disso, as absorções em torno de  $3050$  e  $2890\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas a  $\nu(\text{C-H})$  de  $\text{C}(\text{sp}^2)$  e  $\nu(\text{C-H})$  de  $\text{C}(\text{sp}^3)$ , respectivamente, aparecem nos espectros dos quatro complexos sintetizados, sugerindo mais uma vez a presença de ambos os ligantes.

No espectro do complexo S13 observa-se a banda de absorção de  $\nu_{\text{as}}(\text{SCN})$  em  $2103\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo que o íon tiocianato coordenou-se ao centro metálico via átomo de enxofre.

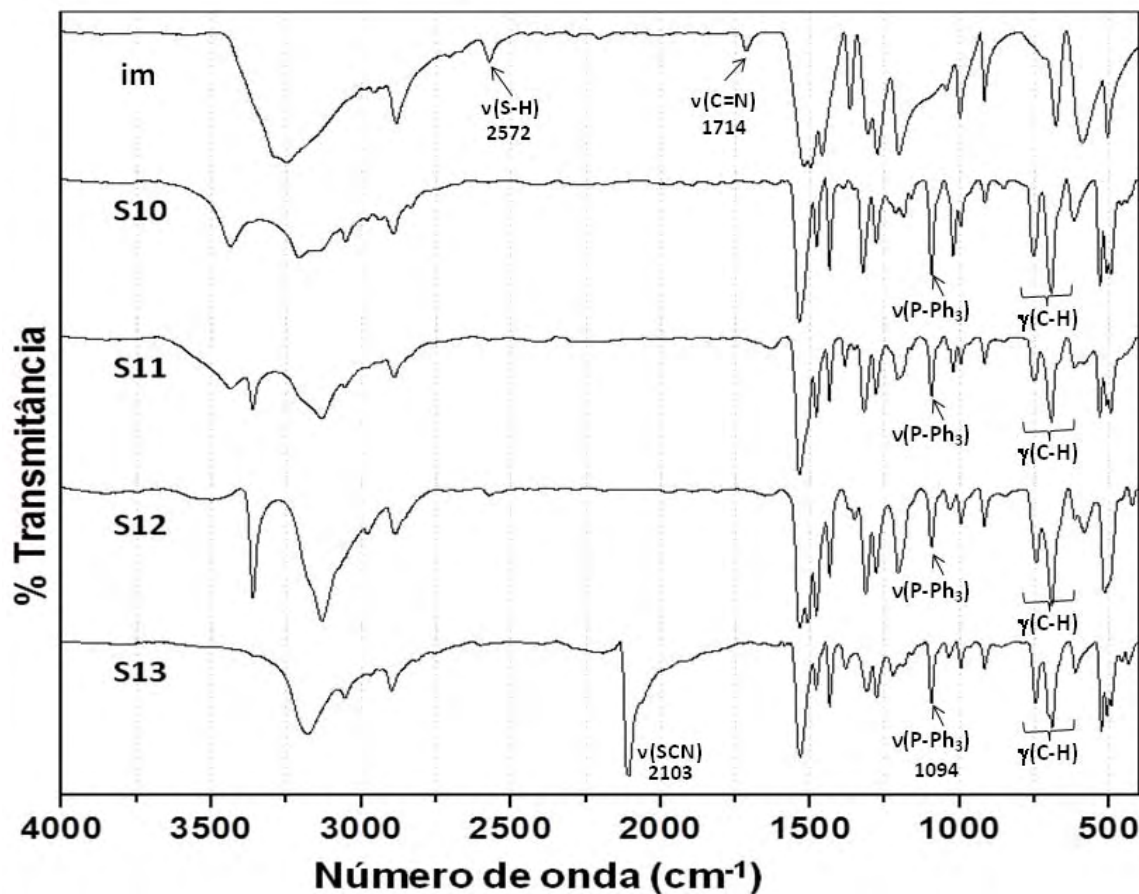
A Tabela 19 mostra as principais absorções observadas no espectros dos complexos S10-S13.

**Tabela 19.** Principais absorções observadas nos espectros no infravermelho dos complexos  $[\text{PdCl}_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$  (S10),  $[\text{PdBr}_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$  (S11),  $[\text{PdI}_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$  (S12) e  $[\text{Pd}(\text{SCN})_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$  (S13).

Frequências de absorção ( $\text{cm}^{-1}$ )				
S10	S11	S12	S13	Atribuições
3207; 3136 <i>mf</i>	3367; 3143 <i>mF</i>	3360; 3129 <i>F</i>	3182 <i>F</i>	$\nu(\text{N-H})$
3046 <i>om</i>	3053 <i>om</i>	2997 <i>om</i>	3049 <i>om</i>	$\nu(\text{C-H})$ , $\text{C}(\text{sp}^2)$
2895 <i>f</i>	2889 <i>f</i>	2882 <i>f</i>	2901 <i>f</i>	$\nu(\text{C-H})$ , $\text{C}(\text{sp}^3)$
-	-	-	2103 <i>F</i>	$\nu_{\text{as}}(\text{SCN})$
1096 <i>mF</i>	1094 <i>mF</i>	1093 <i>mF</i>	1095 <i>mF</i>	$\nu(\text{P-Ph}_3)$
755 <i>mF</i> ; 692 <i>F</i>	750 <i>m</i> ; 699 <i>mF</i>	743 <i>m</i> ; 693 <i>mF</i>	749 <i>m</i> ; 692 <i>mF</i>	$\gamma(\text{C-H})_{\text{arom}}$

$\nu$  = estiramento,  $\delta$  = deformação,  $\gamma$  = deformação fora do plano. *F* = forte, *m* = média, *mf* = média-fraca, *f* = fraca. (\*) = encoberto.

**Figura 57.** Espectros no IV do ligante imidazoldina-2-tiona e dos complexos  $[\text{PdCl}_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$  (S10),  $[\text{PdBr}_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$  (S11),  $[\text{PdI}_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$  (S12) e  $[\text{Pd}(\text{SCN})_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$  (S13). Fonte: autor.

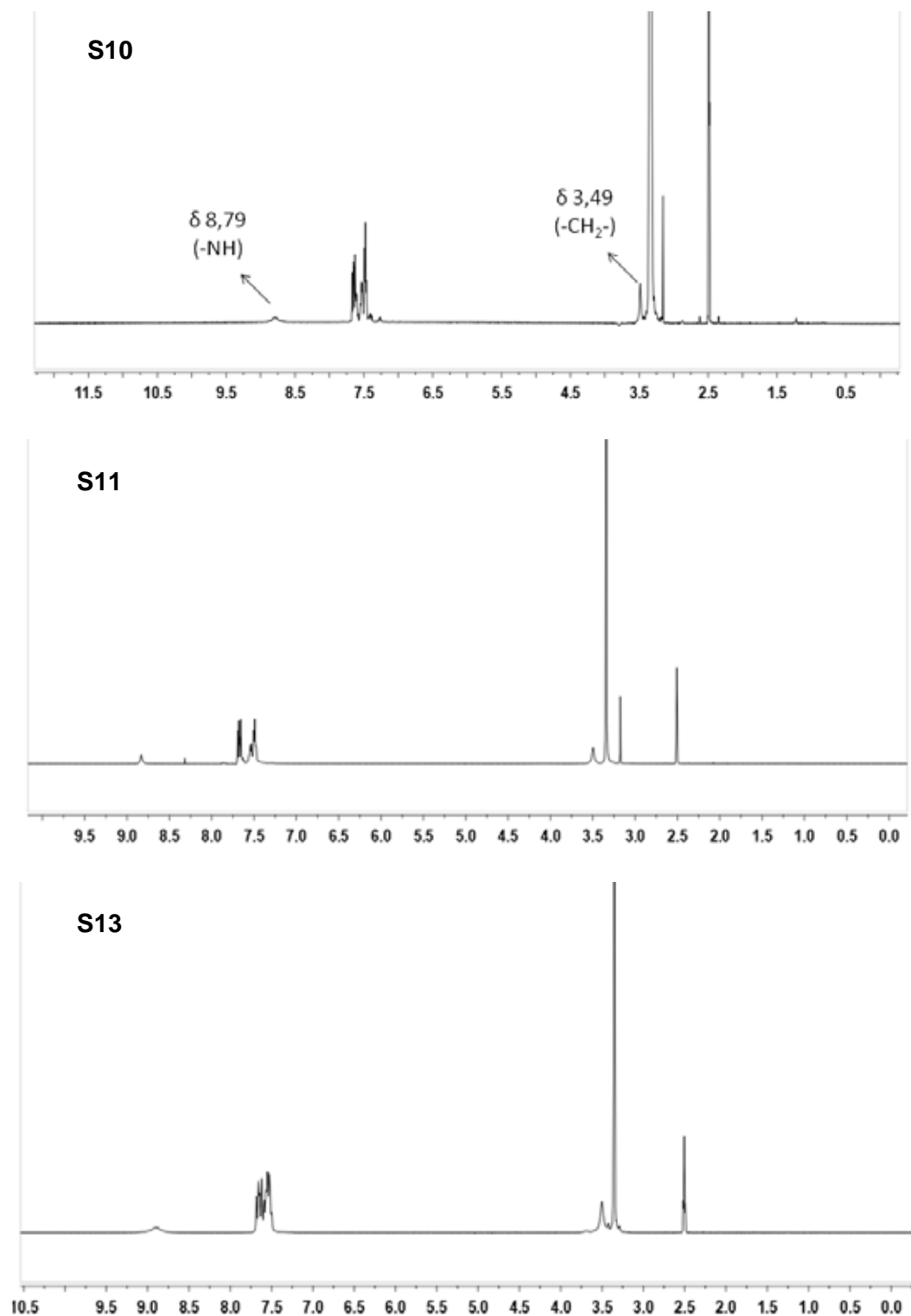


### Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN dos complexos S10, S11 e S13 foram obtidos utilizando-se DMSO deuterado como solvente. Não foi possível obter o espectro do complexo S12 ( $[\text{PdI}_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$ ) devido a baixa solubilidade do mesmo. Em 2,50 e 3,30 ppm observam-se os sinais do solvente deuterado e da água residual, respectivamente. A Figura 58 mostra os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos complexos S10, S11 e S13.



**Figura 58.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos complexos  $[\text{PdCl}_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$  (S10),  $[\text{PdBr}_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$  (S11) e  $[\text{Pd}(\text{SCN})_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$  (S13). Deslocamento químico em ppm. Solvente: DMSO. Campo magnético: 11,7 T. Fonte: autor.



Os espectros de **S10** e **S11** apresentam um simpleto em 3,15 ppm. Este sinal é referente ao grupo (-CH<sub>3</sub>) da molécula de metanol residual da reação.

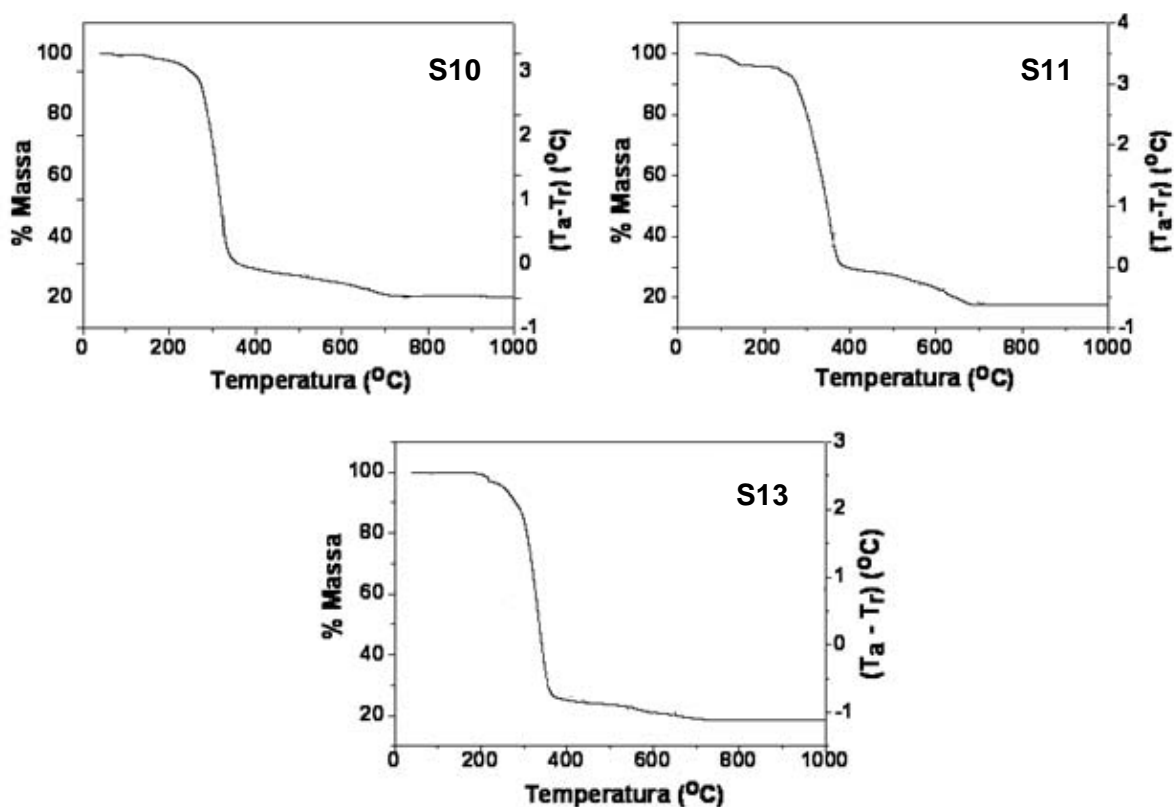
Nos três espectros, o sinal atribuído aos hidrogênios do grupo metileno do ligante Im apareceu em aproximadamente 3,50 ppm. O sinal alargado atribuído ao próton do grupo (-NH) aparece em 8,79, 8,82 e 8,90 ppm nos espectros dos complexos S10, S11 e S13, respectivamente. Em todos os espectros mostrados acima, observam-se multipletos na região entre  $\delta$  7,70 e 7,45, atribuídos aos hidrogênios dos anéis aromáticos da PPh<sub>3</sub>.

Devido a baixa solubilidade dos complexos nos solventes deuterados disponíveis, os espectros de RMN de <sup>13</sup>C não foram obtidos.

#### Termogravimetria (TGA)

A Figura 59 mostra as curvas TGA e a Tabela 20 apresenta os dados de termod decomposição dos complexos S10, S11 e S13:

**Figura 59.** Curvas de termod decomposição e DTA dos complexos [PdCl<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)], (S10), [PdBr<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S11) e [Pd(SCN)<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S13). Fonte: autor.



**Tabela 20.** Dados de análise térmica para os complexos [PdCl<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S10), [PdBr<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S11) e [Pd(SCN)<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S13).

Complexo	Etapa	(T <sub>i</sub> ,T <sub>f</sub> )/ °C	Δm / %
S10	1	100-353	-68,80
	2	353-726	-10,75
	Resíduo		20,43 (19,64)*
S11	1	74-149	-3,76
	2	149-381	-65,59
	3	381-688	-12,85
	Resíduo		17,80 (16,87)*
S13	1	178-225	-3,06
	2	225-370	-71,03
	3	370-789	-7,15
	Resíduo		18,76 (18,13)*

\*Obtido (calculado)

A decomposição do complexo S10 consiste em duas etapas: a primeira inicia-se a temperatura de 100 °C, finalizando-se em 353 °C. Nesta etapa ocorre a perda de 68,60% de massa do composto. A etapa seguinte ocorre entre 353-726 °C, com uma perda de massa equivalente a 10,75%. Esta decomposição resultou em uma massa de resíduo correspondente a 20,43 %, a qual consiste de Pd<sup>0</sup> e concorda com o valor calculado de resíduo de paládio metálico para este complexo (19,64%).

A termodecomposição dos complexos S11 e S13 ocorre em três etapas. Para o complexo S11, a primeira etapa acontece entre 74-149 °C, com perda de 3,76% de massa. A segunda etapa ocorre na faixa de temperatura de 149-381 °C, com uma redução de massa de 65,59%. Na faixa entre 381-688 °C ocorre uma terceira perda de massa (12,85%). O resíduo final desta decomposição é constituído por 17,80% de massa, correspondente ao conteúdo de Pd<sup>0</sup> na amostra, novamente de acordo com o valor calculado de paládio metálico para este complexo (16,87%).

A decomposição do complexo S13 inicia-se na temperatura de 178 °C. A primeira etapa se completa em 225 °C e observa-se uma perda de massa de 3,06%. A segunda etapa (225-370 °C) envolve uma perda de 71,03% de massa do composto. Finalmente,

entre 370-789 °C ocorre a última perda de massa (7,15%). Obteve-se, como resíduo final 18,66% de massa do complexo, correspondente ao conteúdo total de Pd<sup>0</sup> na amostra, a qual concorda com o valor calculado de paládio metálico em S13 (18,13%).

A estabilidade térmica dos compostos é proposta considerando o início de cada termodecomposição. Propõe-se, dessa maneira, uma ordem decrescente de estabilidade térmica considerando suas temperaturas iniciais de decomposição:

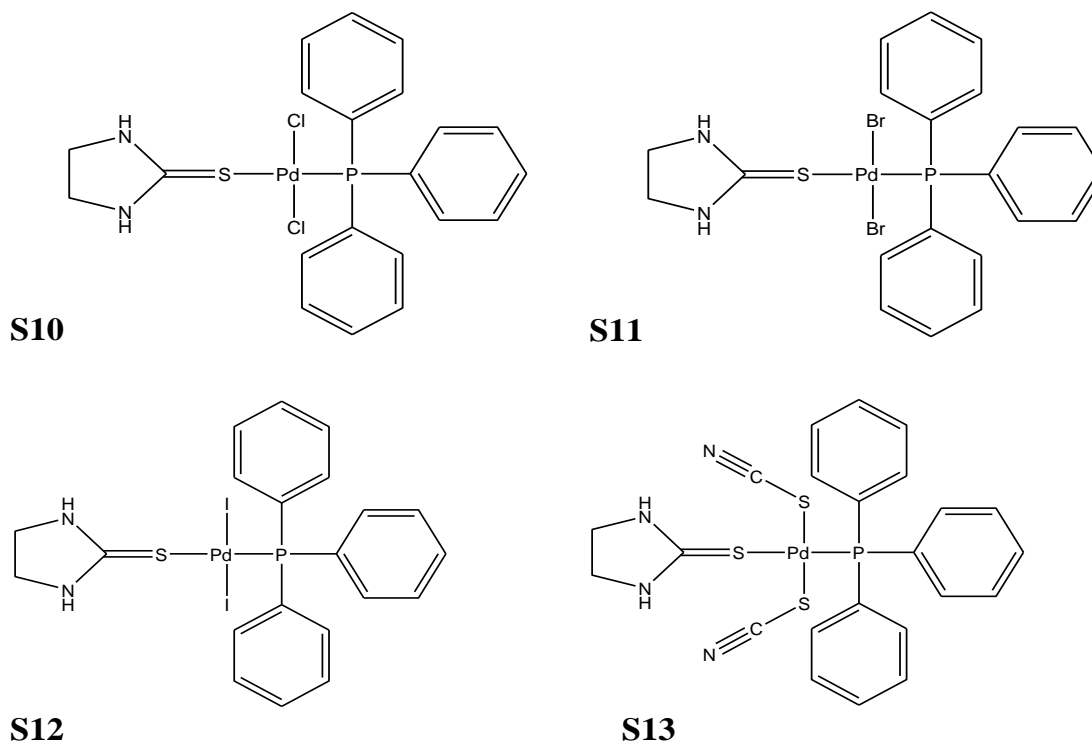
X = S13>S10>S11.

### *Proposição Estrutural*

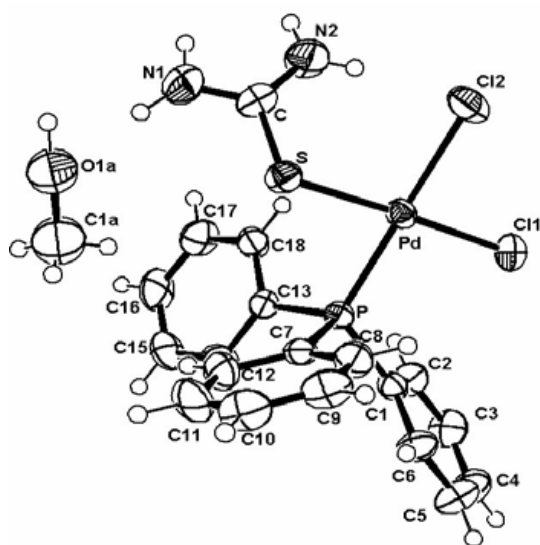
De acordo com os dados obtidos pela espectroscopia de absorção no IV, espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H, em correlação aos resultados de análise elementar e análise térmica, sugere-se que os compostos, no estado sólido, apresentem as estruturas mostradas na Figura 60.

Sugere-se que complexos sintetizados sejam mononucleares, com o ligante PPh<sub>3</sub> coordenado ao metal por meio do átomo de fósforo e o ligante Im coordenado através do átomo de nitrogênio. Os haletos (Cl, Br e I) e o pseudohaleto SCN ligam-se terminalmente ao átomo de paládio(II). Não há evidências de que os complexos, em estado sólido, apresentem a conformação *trans* ou *cis*.

**Figura 60.** Estruturas propostas para os complexos  $[\text{PdCl}_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$  (S10),  $[\text{PdBr}_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$  (S11),  $[\text{PdI}_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$  (S12) e  $[\text{Pd}(\text{SCN})_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$  (S13). Fonte: autor.



Cálculos teóricos realizados em nosso grupo de pesquisa apontam a conformação *trans* como sendo a mais estável (dados não-publicados). Entretanto, um complexo mononuclear de Pd(II), contendo os ligantes  $\text{PPh}_3$ , tu e Cl, sintetizado em nosso laboratório, teve a sua estrutura determinada por difração de raios X e apresentada na tese de doutorado de MORO, A. C [38]. O complexo  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)(\text{tu})]$  apresentou conformação *cis* no estado sólido (Figura 61).

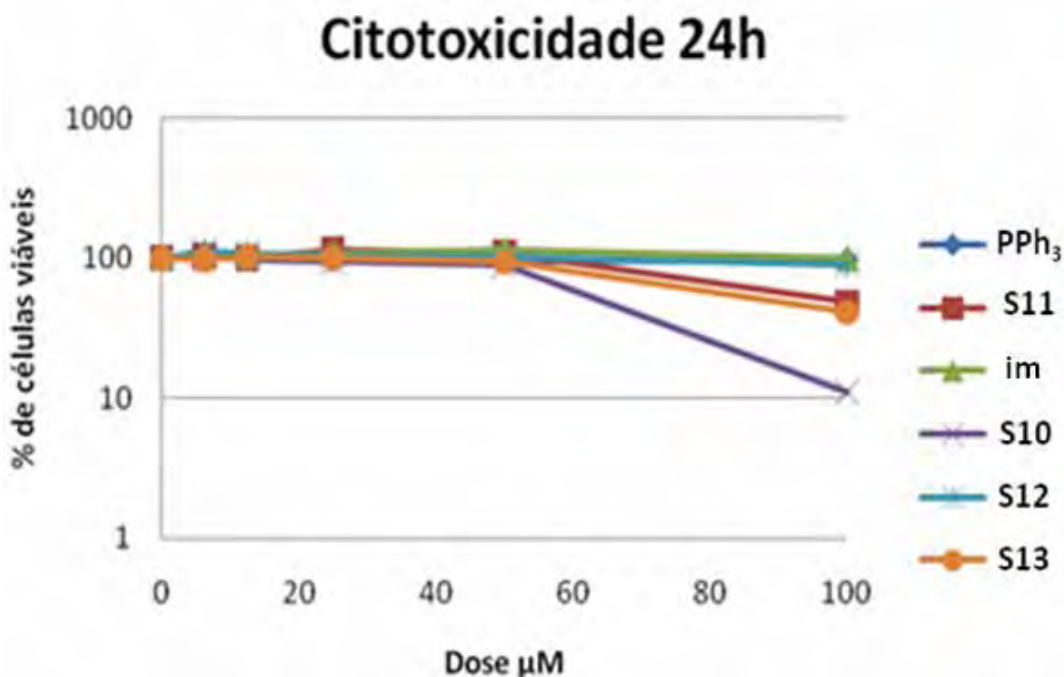


**Figura 61.** Estrutura molecular [38] do complexo  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)(\text{tu})]$ .

#### 4.5.1. Estudo da Citotoxicidade Frente à Linhagem U87MG e Sobrevivência Celular

Amostras dos complexos S10-S13, bem como dos ligantes Im e  $\text{PPh}_3$  livres, foram enviadas ao Laboratório de Citogenética e Mutagênese, do Departamento de Genética da USP – Campus de Ribeirão Preto. Nesse laboratório, o doutorando Paulo Roberto D’Auria Vieira de Godoy, sob orientação da professora Elza Tiemi Sakamoto Hojo, realizou os experimentos com a linhagem de glioblastoma U87MG (tumor cerebral humano) utilizando o Cell Proliferation Kit II (XTT) para analisar a citotoxicidade (24 h), Figura 62, e a sobrevivência celular (120 h), Figura 63, em resposta ao tratamento com diversas concentrações dos complexos S10-S13 e dos ligantes Im e  $\text{PPh}_3$  (100, 50, 25, 12,5 e 6,25  $\mu\text{M}$ ). Todas as soluções foram preparadas momentos antes da aplicação das amostras nos testes, em concentração máxima de DMSO de 5% v/v diluídas no meio de cultura.

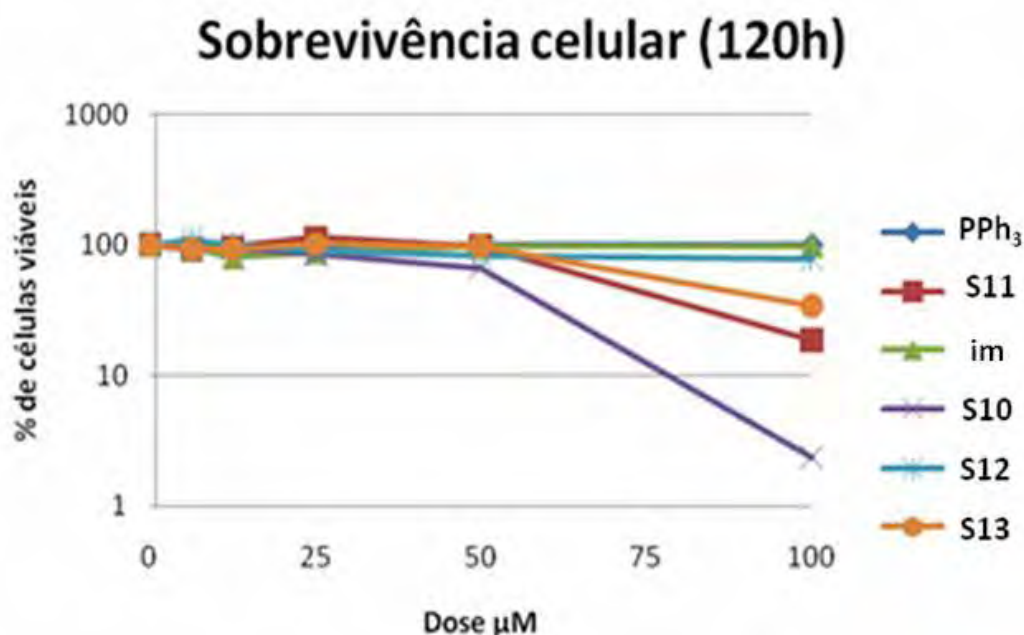
**Figura 62.** Resposta aos tratamentos (24 h) com cinco concentrações dos complexos S10, S11, S12 e S13 e dos ligantes imidazolidina-2-tiona (im) e trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>) (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 μM) realizados para a linhagem de glioblastoma U87MG. As células foram colhidas 24 h após o tratamento. Foram realizados três experimentos independentes. Fonte: autor.



É possível observar pelos gráficos que somente os complexos [PdCl<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S10), [PdBr<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S11) e [Pd(SCN)<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S13) apresentaram alguma atividade citotóxica imediata, destacando-se o complexo [PdCl<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)], cuja atividade é mais pronunciada na concentração de 100 μM (menos de 20% de células viáveis após 24 horas de exposição).

Os resultados obtidos a partir dos ensaios de sobrevivência celular (120 h de exposição) mostraram também que não houve diferenças significativas nas porcentagens de células viáveis em todas as concentrações testadas das soluções contendo as substâncias imidazolidina-2-tiona e trifenilfosfina, quando comparadas com as apresentadas pelo grupo controle. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas, em relação ao controle, para o tratamento com o composto [PdCl<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S10) na concentração de 100 μM, reduzindo significativamente a porcentagem de sobrevivência para aproximadamente 2%. Essa linhagem apresentou uma redução nas taxas de sobrevivência para 18% e 42% em resposta ao tratamento com os complexos [PdBr<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S11) e [Pd(SCN)<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S13), respectivamente (Figura 63).

**Figura 63.** Resposta aos tratamentos (120 h) com cinco concentrações dos complexos S10, S11, S12 e S13 e dos ligantes imidazolidina-2-tiona (im) e trifenílfosfina (PPh<sub>3</sub>) (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 μM) realizados para a linhagem de glioblastoma U87MG. Foram realizados três experimentos independentes. Fonte: autor.



Este resultado preliminar mostra que as moléculas orgânicas livres não possuem nenhuma atividade citotóxica frente a células tumorais de glioblastoma cerebral, porém os complexos de paládio(II) contendo as mesmas moléculas como ligantes coordenados podem apresentar toxicidade considerável. A investigação de diferentes haletos e pseudohaletos como ligantes auxiliares em complexos também possui importância fundamental no que diz respeito a atividade biológica, pois como evidenciado, a atividade citotóxica depende também da natureza dos co-ligantes aniônicos. No estudo descrito nesta tese, observa-se que o composto [PdI<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S12), contendo iodeto como co-ligante, não apresentou atividade significativa frente às células tumorais enquanto que os complexos [PdCl<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S10), [PdBr<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S11) e [Pd(SCN)<sub>2</sub>(im)(PPh<sub>3</sub>)] (S13) exerceram efeitos citotóxicos relevantes.

Para a determinação do IC<sub>50</sub> (Tabela 21), foi utilizado o software Graphpad prism 5, empregando-se o método de análise não linear entre a sobrevivência (escala log) e as concentrações (escala linear).



**Tabela 21.** Dados relativos a concentração mínima para inibir o crescimento de 50% das células de glioma (U87MG), 120 h após o tratamento. O  $R^2$  corresponde ao coeficiente de adequação dos dados em relação à função dose resposta de cada complexo. As substâncias  $PPh_3$  e im não seguem um padrão de dose resposta.

<b>Composto</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>(S10)</b>	56,01 ± 1,06	0,9306
<b>(S11)</b>	86,59 ± 0,16	0,9034
<b>(S12)</b>	213,5 ± 1,42	0,7070
<b>(S13)</b>	95,08 ± 1,07	0,7786

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Novos complexos ciclopaldados contendo o ligante benzaldeidoxima foram obtidos, partindo-se do precursor  $[\text{Pd}(\mu\text{-Cl})(\text{dmba})]_2$ . A reação de transciclometalação forneceu o complexo dimérico  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-Cl})]_2$  (S1) a partir do qual foram sintetizados, por reações de troca de ligantes, os complexos  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-X})]_2$ , X = Br (S2) ou SCN (S3). O complexo  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-X})]_2$  serviu ainda de precursor em outras reações de clivagem que produziram ciclopaldados mononucleares.

As estruturas dos complexos foram propostas com base em dados de análise elementar, espectroscopia no infravermelho e ressonância magnética nuclear 1D e 2D. Os espectros de RMN destes compostos evidenciam a troca dos ligantes dmbs por bzox, devido a ausência dos sinais atribuídos às metilas e ao grupo (-C-CH<sub>2</sub>) do ligante dmbs. As porcentagens de massa residual, obtidas ao final dos experimentos de termogravimetria, coincidem com os valores calculados para cada estrutura proposta, bem como os resultados de análise elementar de C, H e N. As informações obtidas com os espectros no IV indicam que houve a formação de ligação C-Pd, com o carbono em posição *orto* da bzox.

Os ciclopaldados do tipo  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\text{im})]$ , X = Cl (S4), Br (S5) ou I (S6), foram obtidos a partir de reações de clivagem do dímero  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-Cl})]_2$ . Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e bidimensionais evidenciaram a manutenção da integridade do metalociclo, formado com o átomo de nitrogênio e o C *orto* do ligante bzox, e a coordenação do ligante imidazolidina-2-tiona ao centro metálico através do átomo de enxofre. Todos os dados obtidos por análise elementar e espectroscopia no IV sugerem também a formação das estruturas propostas.

Os complexos  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\text{tu})_2]\text{Cl}$  (S7),  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\text{dmTu})_2]\text{Cl}$  (S8) e  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\text{bipy})]\text{Cl}$  (S9) não tiveram as suas estruturas totalmente elucidadas, porque não foi possível a obtenção dos espectros de RMN. Somente para o complexo  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\text{dmTu})_2]\text{Cl}$  o espectro de RMN de <sup>13</sup>C, no estado sólido foi obtido. Os sinais observados evidenciaram a manutenção da integridade do metalociclo no estado sólido, e a coordenação de duas unidades do ligante dimetiltiouréia, via átomo de enxofre.

Compostos de coordenação do tipo  $[\text{PdX}_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$ , X = Cl (S10), Br (S11), I (S12) e SCN (S13), foram sintetizados através de uma reação de troca de ligantes utilizando-se o precursor  $[\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2]$ , MeCN = acetonitrila. Os espectros no IV dos complexos sugerem a presença dos ligantes Im e PPh<sub>3</sub> em todos eles, bem como os espectros de RMN. Os dados de análise elementar e as porcentagens de massas residuais obtidas após os

experimentos de termogravimetria estão de acordo com os valores calculados para as estruturas propostas. No entanto, não foi possível esclarecer a isomeria dos complexos.

### Estudos de Citotoxicidade

A atividade citotóxica dos complexos  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\mu\text{-Cl})_2]$  (S1) e  $[\text{Pd}(\text{bzoX})\text{X}(\text{im})]$ , X = Cl (S4), Br (S5) ou I (S6), bem como dos ligantes Im e HbzoX, foram avaliadas frente a linhagem celular LM3 de adenocarcinoma mamário murino. Observou-se que a atividade dos ligantes livres foi muito menor do que a atividade dos complexos testados. Este fato ressalta a potencialização do efeito citotóxico dos compostos quando coordenados a um centro metálico. Além disso, os complexos ciclopaladados contendo o ligante imidazolidina-2-tiona (S4-S6) apresentaram valores de  $\text{IC}_{50}$  menores do que o da cisplatina, evidenciando novamente a importância desta classe de compostos nos estudos de atividade antitumoral.

Os complexos do tipo  $[\text{PdX}_2(\text{im})(\text{PPh}_3)]$  X = Cl (S10), Br (S11), I (S12) e SCN (S13) foram empregados em ensaios de que visavam avaliar a atividade citotóxica dos mesmos frente a linhagem celular U87MG, de glioblastoma cerebral humano. Destacou-se a atividade do complexo S10, que apresentou  $\text{IC}_{50} = 56 \mu\text{M}$ . Os glioblastomas são caracteristicamente resistentes ao tratamento com cisplatina e, frequentemente, apresentam resistência adquirida a outros fármacos [83,84]. Portanto, a investigação de novos compostos capazes de combater este tipo de câncer eficientemente é muito importante.

### Estudos de Ligação ao DNA

Os complexos  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\text{tu})_2]\text{Cl}$  (S7),  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\text{dmtu})_2]\text{Cl}$  (S8) e  $[\text{Pd}(\text{bzoX})(\text{bipy})]\text{Cl}$  (S9) foram submetidos a ensaios que visavam avaliar a interação entre os mesmos e o DNA. Estudos sobre a cinética de ligação mostraram que os complexos apresentam alta afinidade pelo biopolímero, ligando-se a ele em poucos minutos. Após 24 horas de incubação, mais de 80% da quantidade adicionada de complexo encontrava-se ligada ao DNA. Entretanto, os ensaios de temperatura de desnaturação térmica e de desenrolamento da dupla-fita de DNA plasmideal demonstraram que os complexos não foram capazes de modificar a estrutura do biopolímero. A presença dos compostos também não foi capaz de impedir a clivagem da dupla-fita por ação das enzimas endonucleases restritoras. Dessa forma, sugere-se que eles sejam capazes de interagir eletrostaticamente com a cadeia de fosfatos do DNA, através da aproximação entre o átomo de paládio carregado positivamente e os átomos de oxigênio carregados negativamente, e por meio de ligações de hidrogênio

entre os ligantes orgânicos dos complexos e os outros átomos presentes na cadeia de açúcar-fosfato do DNA. Este tipo de interação já foi observada para um complexo trinuclear de Pt [82].

## 6. PERSPECTIVAS

- Finalizar a caracterização por RMN 1D e 2D dos complexos S7-S13.
- Testar a atividade dos complexos S4-S7 e S10 frente a células saudáveis (não-tumorais) para a determinação do índice de seletividade (IS) e do índice terapêutico (IT).
- Realizar o Teste de Ames (ensaio de mutagenicidade) com o complexo S10, para verificar se a sua atividade biológica se deve à interação com o DNA.

## 7. REFERÊNCIAS

- 1 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Câncer**: o que é. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em: 16 mar. 2012.
- 2 KELLAND, L. R. Cisplatin based anticancer agents. In: FARREL, N. P. (Ed.). **Uses of inorganic chemistry in medicine**. Richmond: Royal Society of Chemistry, 1999. Cap. 7, p. 109-123.
- 3 FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A Química inorgânica na terapia do câncer. **Cad. Temát. Quím. Nova Esc.**, n. 6, p. 13-18, jul. 2005.
- 4 SHAHEEN, F. et al. *In vitro* assessment of cytotoxicity, antinflammatory, antifungal properties and crystal structures of metallacyclic palladium(II) complexes. **J. Organomet. Chem.**, v. 695, p. 315-322, 2010.
- 5 VAN RIJT, S. H.; SADLER, P. J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. **Drug Disc. Today**, v. 14, p. 1089-1097, 2009.
- 6 WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and techniques of biochemistry and molecular biology**. 7th ed. New York: Cambridge University Press, 2010.
- 7 SOLOMONS, T. W. G. **Fundamentals of organic chemistry**. 9th ed. New York: John Wiley & Sons, 2007.
- 8 WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: a structure of deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, p. 737-738, 1953.
- 9 HANNON, M. J. Supramolecular DNA recognition. **Chem. Soc. Rev.**, v. 36, p. 280-295, 2007.
- 10 CALLADINE, C. R. et al. **Understanding DNA: the molecule and how it works**. 3rd ed. Oxford: Elsevier Academic Press, 2004.
- 11 PINEDO, H. M.; SCHORNAGEL, J. H. (Ed.). **Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy 2**. New York: Plenum Press, 1996.
- 12 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Síntese de resultados e comentários**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5>>. Acesso em: 16 jun. 2012.
- 13 LEE, J. D. **Química inorgânica não tão concisa**. 5. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2003.
- 14 RUIZ, J. et al. New palladium(II) and platinum(II) complexes with the model nucleobases 1-methylcytosine: antitumor activity and interactions with DNA. **Inorg. Chem.**, v. 44, p. 7365-7376, 2005.
- 15 CLEARE, M. J.; HYDES, P. C. **Metal ions in biological systems**. New York: Marcel Decker, 1980.
- 16 ZHAO, G. et al. Ethylenediamine palladium(II) complexes with pyridine and its derivatives: synthesis, molecular study and initial antitumor studies. **J. Inorg. Biochem.**, v. 73, p. 145-149, 1999.
- 17 VUJIC, J. M. et al. Palladium(II) complexes with R<sub>2</sub>edda derived ligands. Part. IV. O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di(2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride and their palladium(II) complexes: synthesis, characterization and *in vitro* antitumoral activity against chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 3601-3606, 2010.

- 18 DAS, M.; LIVINGSTONE, S. E. Cytotoxic action of some transition metal chelates of Schiff bases derived from S-methyldithiocarbamate. **Br. J. Canc.**, v. 37, p. 466-469, 1978.
- 19 CAIRES, A. C. F. et al. Síntese e atividade citotóxica de alguns azido-ciclopaladados estabilizados com ligantes bifosfínicos. **Quím. Nova**, v. 22, p. 329-334, 1999.
- 20 BINCOLETTO, C. et al. Chiral cyclopalladated derived from N,N-dimethyl-1-phenethylamine with bridging bis(diphenylphosphine)ferrocene ligand as inhibitors of the cathepsin B activity as antitumoral agents. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 13, p. 3047-3055, 2005.
- 21 ROCHA, M. C. et al. Citotoxicity and immune response induced by organopalladium(II) compounds in mice bearing Ehrlich ascites tumor. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, p. 1473-1480, 2007.
- 22 ALACID, E. et al. Oxime palladacycles revisited: stone-stable complexes nonetheless very active catalysts. **Chem. Rec.**, v. 6, p. 117-132, 2006.
- 23 WANG, X. et al. Intramolecular Pauson-Khand reaction catalysed by oxime-derived palladacycles. **Tetrah. Let.**, v. 53, p. 589-592, 2012.
- 24 HIGGINS III, J. D.; NEELY, L.; FRICKER, S. Synthesis and cytotoxicity of some cyclometallated palladium complexes. **J. Inorg. Biochem.**, v. 49, p. 149-156, 1993.
- 25 RYABOV, A. D. et al. Synthesis by ligand exchange, structural characterization, and aqueous chemistry of ortho-palladated oximes. **Inorg. Chem.**, v. 31, p. 3083-3090, 1992.
- 26 CEDER, R. M.; GOMEZ, M.; SALES, J. Ligand-exchange reactions of N-donor ligands in cyclopalladated complexes. **J. Organomet. Chem.**, v. 361, p. 391-398, 1989.
- 27 GHEDIDNI, M. et al. Synthesis and solid state characterization of mononuclear 2-benzoylpyridine N-methyl-Nphenylhydrazone palladium(II) complexes. **Dalton Trans.**, v. 9, p. 1386-1392, 2004.
- 28 RIERA, X. et al. Complexes of palladium(II) and platinum(II) with 9-aminoacridine: reactions with DNA and studies of their antiproliferative activity. **Bioinorg. Chem. App.**, v. 2007, p. 1-15, 2007.
- 29 CUSUMANO, M. et al. The reaction of (bipyridil)palladium(II) complexes with thiourea – influence of DNA and other polyanions on the rate of reaction. **Eur. J. Inorg. Chem.**, v. 2005, p. 278-284, 2005.
- 30 ALVERDI, V. et al. Luminescent pH sensing and DNA binding properties of a novel ruthenium(II) complex. **J. Inorg. Biochem.**, v. 98, p. 1117-1128, 2004.
- 31 SHAHEEN, F. et al. *In vitro* assessment of cytotoxicity, antinflammatory, antifungal properties and crystal structures of metallacyclic palladium(II) complexes. **J. Organomet. Chem.**, v. 695, p. 315-322, 2010.
- 32 KHAN, H. et al. Synthesis, characterization and anticancer studies of mixed ligand dithiocarbamate palladium(II) complexes. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 46, p. 4071-4077, 2011.
- 33 ROCHA, F. V. et al. 3,5-Dimethyl-1-thiocarbamoilpyrazole and its Pd(II) complexes: synthesis, spectral studies and antitumor activity. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 1698-1702, 2010.
- 34 CESARINI, S. et al. N-Acylated and N,N`- diacylated imidazolidine-2-thione derivatives and N,N`- diacylated tetrahydropyrimidine-2(1H)-thione analogues: synthesis and antiproliferative activity. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, p. 1106-1118, 2009.
- 35 NADEEN, S. et al. Synthesis, crystal structures and antibacterial and antiproliferative activities *in vitro* of palladium(II) complexes of triphenylphosphine and thioamides. **Inorg. Chim. Acta**, v. 363, p. 3261-3269, 2010.

- 36 NADEEN, S. et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of palladium(II) bromide complexes of thioamides; X-ray structure of  $[\text{Pd}(\text{tetramethylthiourea})_4]\text{Br}_2$ . **Transit. Met. Chem.**, v. 35, p. 555-561, 2010.
- 37 AHMAD, S. et al. Synthesis, crystal structure, and antimicrobial studies of trans- $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2(\text{imidazolidina-2-tiona})_2]\text{Cl}_2 \cdot 3.5\text{H}_2\text{O}$ . **Russ. J. Coord. Chem.**, v. 36, p. 520-524, 2010.
- 38 MORO, A. C. **Espécies moleculares e supramoleculares de Pd(II) com ligantes mono, bi e polidentados**: caracterização estrutural e atividades biológicas. 2011. 127 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- 39 STEVANATO, A. **Investigação estrutural e efeitos imunológicos e tuberculostáticos de complexos de paládio(II)**. 2009. 177 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- 40 DUPONT, J.; PFEFFER, M. **Palladacycles**: synthesis, characterization and applications. Berlin: Wiley-VCH, 2008.
- 41 DUPONT, J.; CONSORTI, C. S.; SPENCER, J. The potential of palladacycles: more than just precatalysts. **Chem. Rev.**, v. 105, p. 2527-2571, 2005.
- 42 DUNINA, V. V. et al. Cyclopalladated complexes in enantioselective catalysis. **Russ. Chem. Rev.**, v. 80, p. 51-57, 2011.
- 43 YU, A. et al. Cyclopalladated ferrocenylimine as an efficient catalyst for the synthesis of diarylmethane derivatives. **Appl. Organomet. Chem.**, v. 26, p. 301-304, 2012.
- 44 CHEN, K. et al. Chiral cyclopalladated complex promoted asymmetric synthesis of diester-substituted P,N-ligands via stepwise hydrophosphination and hydroamination reactions. **Dalton. Trans.**, v. 41, p. 5391-5340, 2012.
- 45 SLATER, J. W.; LYDON, D. P.; ROURKE, J. P. Double cyclopalladated pyridazines: chiral liquid crystals. **J. Organomet. Chem.**, v. 645, p. 246-255, 2002.
- 46 CRISPINI, A.; GUEDINI, M.; PUCCI, D. Functional properties of metallomesogens modulated by molecular and supramolecular exotic arrangements. **Beilstein J. Org. Chem.**, v. 5, n. 54, 2009. DOI: 10.3762/bjoc.5.54.
- 47 SERRANO, F. A. et al. 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. 296-312, 2011.
- 48 CHELLAN, P. et al. Cyclopalladated complexes containing tridentate thiosemicarbazone ligands of biological relevance: structure and antimalarial activity. **J. Organomet. Chem.**, v. 695, p. 1-15, 2010.
- 49 QUIRÓGA, A. G.; RANNINGER, C. N. Contribution to the SAR field of metallated and coordination complexes: studies of the palladium and platinum derivatives with selected thiosemicarbazones as antitumoral drugs. **Coord. Chem. Rev.**, v. 248, p. 119-133, 2004.
- 50 MORO, A. C. et al. Binuclear cyclopalladated compounds with antitubercular activity: synthesis and characterization of  $[\{\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\text{X})\}_2(\mu\text{-bpp})]$  (X = Cl, Br, NCO, N<sub>3</sub>; bpp = 1,3-bis(4-pyridil)propane). **J. Coord. Chem.**, v. 65, p. 1434-1442, 2012.
- 51 SANTANA, A. M. et al. Crystal structure of  $\text{dl}[\mu(\text{N,S})\text{-thiocyanato-bis}[(\text{N-benzylideneaniline-C}^2, \text{N})\text{palladium(II)}], [\text{Pd}(\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{NC}_6\text{H}_5)(\mu\text{-SCN})]_2$ . **Z. Kristallogr.-NCS**, v. 217, p. 147-148, 2002.
- 52 ANANIAS, S. R.; MAURO, A. E.; DE LUCCA NETO, V. A. Cleavage of the dimeric cyclopalladated  $[\text{Pd}(\text{N,C}^2\text{-dmba})(\mu\text{-X})_2]$ , dmba = N,N'-dimethylbenzylamine; X = SCN and



NCO) by diphosphines. Palladium(II) compounds with distinct structures in the solid-state and in solution. **Trans. Met. Chem.**, v. 26, p. 570-573, 2001.

53 DE LUCCA NETO, V. A. et al. Synthesis, characterization and thermal behaviour of cyclopalladated compounds of the type  $[\text{Pd}(\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2(\mu\text{-X}))_2]$  (X = Cl, NCO, SCN, CN). **Polyhedron**, v. 18, p. 413-417, 1999.

54 SANTANA, A. M. et al. Thermal and spectroscopy investigation of cyclopalladated compounds of the type  $[\text{Pd}(\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N})(\mu\text{-X})_2]$ , (X = H<sub>3</sub>CCOO, NCO, SCN, CN). **J. Therm. Anal. Cal.**, v. 67, p. 425-431, 2002.

55 GUEDINI, M. et al. Azobenzenes and heteroaromatic nitrogen cyclopalladated complexes for advanced applications. **Coord. Chem. Rev.**, v. 250, p. 1373-1390, 2006.

56 RYABOV, A. D. Thermodynamics, kinetics, and mechanism of exchange of cyclopalladated ligands. **Inorg. Chem.**, v. 26, p. 1252-1260, 1987.

57 RYABOV, A. D.; YATSIMIRSKII, A. K. The exchange of cyclopalladated ligands in chloro-bridged palladium(II) complexes. **Inorg. Chem.**, v. 23, p. 789-790, 1984.

58 SELVAKUMAR, K.; VANCHEESAN, S.; VARGHESE, B. Synthesis and characterization of cyclopalladated complexes of oximes by ligand-exchange method. **Polyhedron**, v. 16, p. 2257-2262, 1997.

59 MALINA, J.; HANNON, M. J.; BRABEC, V. DNA binding of dinuclear iron(II) metallosupramolecular cylinders. DNA unwinding and sequence preference. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. 3630-3638, 2008.

60 LIPPERD, B. **Cisplatin**: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug. Zürich: Wiley-VCH, 1999.

61 ZALUDOVÁ, R. et al. DNA interactions of bifunctional dinuclear platinum(II) antitumor agents. **Eur. J. Biochem.**, v. 246, p. 508-517, 1997.

62 KOSTRHUNOVA, H. et al. DNA interactions of monofunctional organometallic osmium(II) antitumor complexes in cell-free media. **J. Med. Chem.**, v. 51, p. 3635-3643, 2008.

63 SUCHÁNKOVÁ, T. et al. DNA and glutathione interactions in cell-free media of asymmetric platinum(II) complexes cis- and trans- $[\text{PtCl}_2(\text{isopropylamine})(1\text{-methylimidazole})]$ : relations to their different antitumor effects. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 14, p. 75-87, 2009.

64 KECK, M. V.; LIPPARD, S. J. Unwinding of supercoiled DNA by platinum-ethidium and related complexes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 114, p. 3386-3390, 1992.

65 KASPARKOVÁ, J. et al. Cytotoxicity, cellular uptake, glutathione and DNA interactions of an antitumor large-ring Pt(II) chelate complex incorporating the cis-1,4-diaminocyclohexane carrier ligand. **Biochem. Pharmacol.**, v. 79, p. 552-564, 2010.

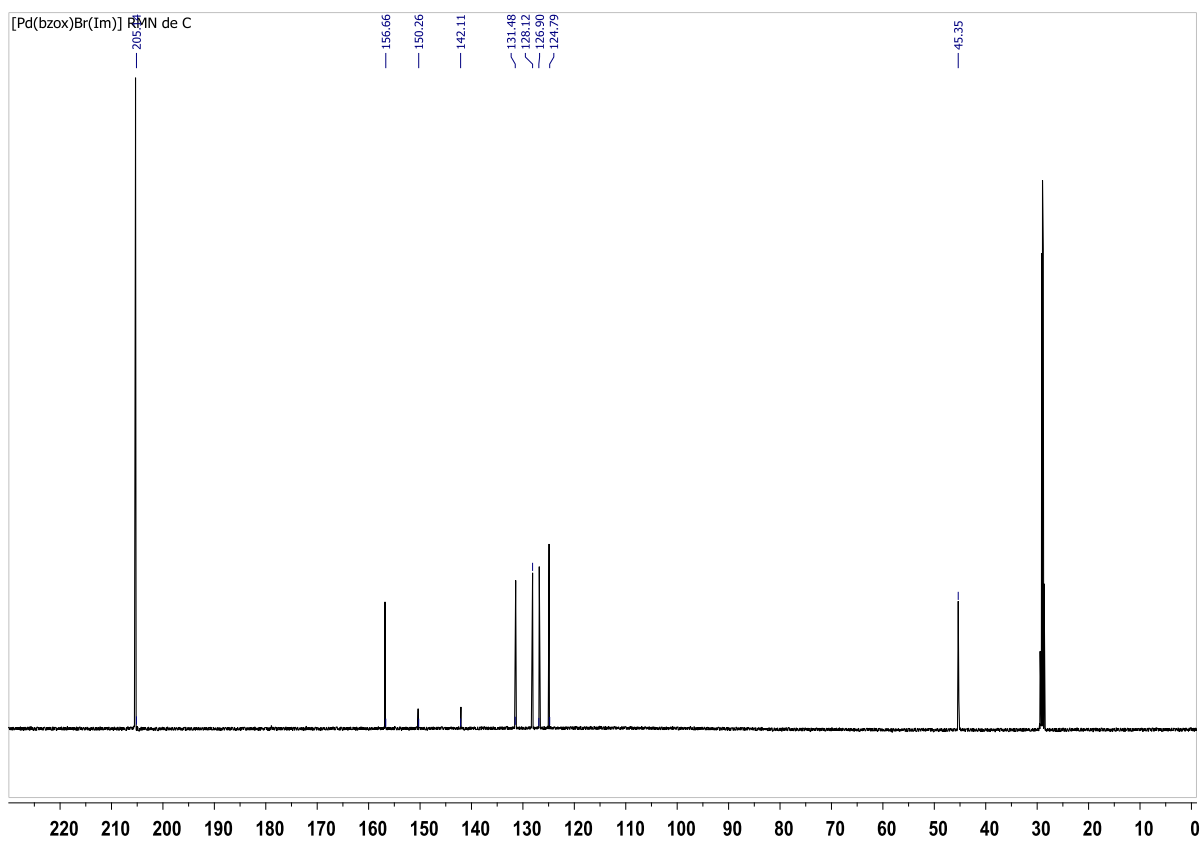
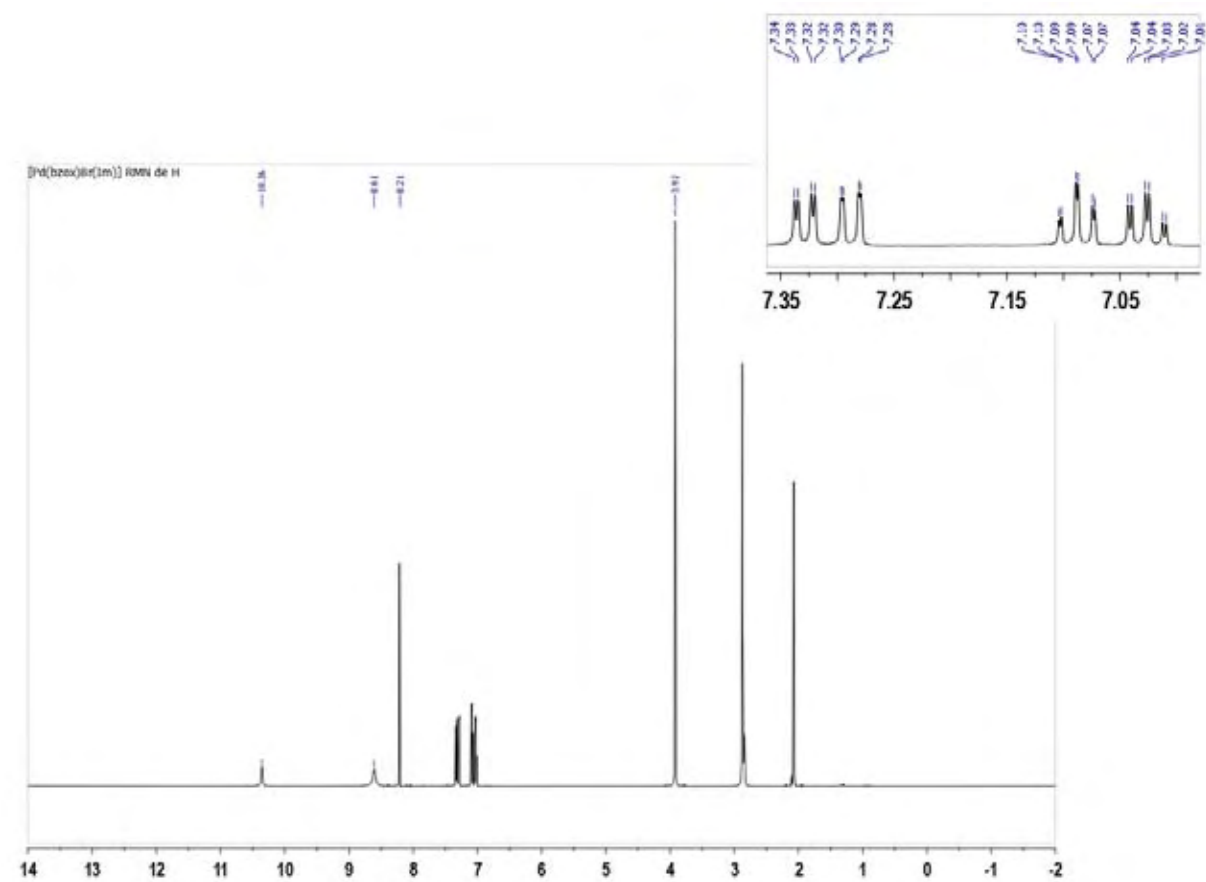
66 HALÁMIKOVA, A. et al. Cytotoxicity, mutagenicity, cellular uptake, DNA and glutathione interactions of lipophilic trans-platinum complexes tethered to 1-adamantylamine. **J. Inorg. Biochem.**, v. 102, p. 1077-1089, 2008.

67 ZEGLIS, B. M.; PIERRE, V. C.; BARTON, J. K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. **Chem. Commun.**, v. 44, p. 4565-4579, 2007.

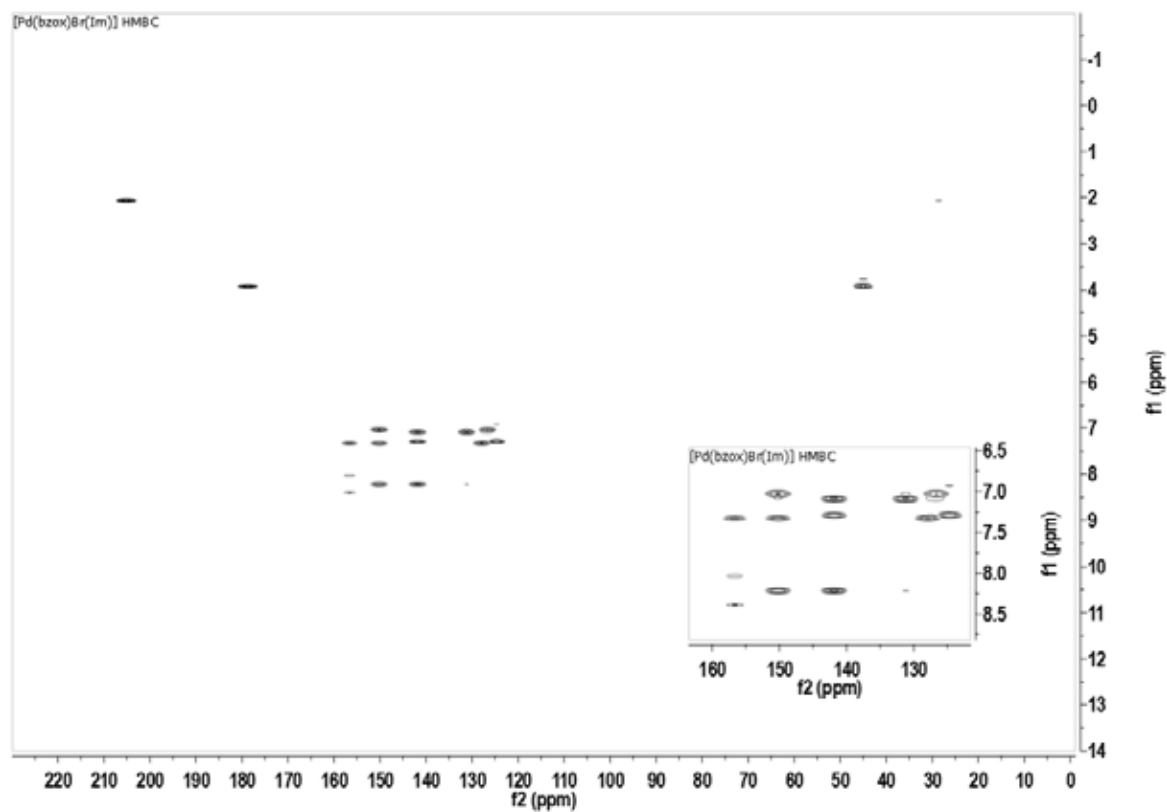
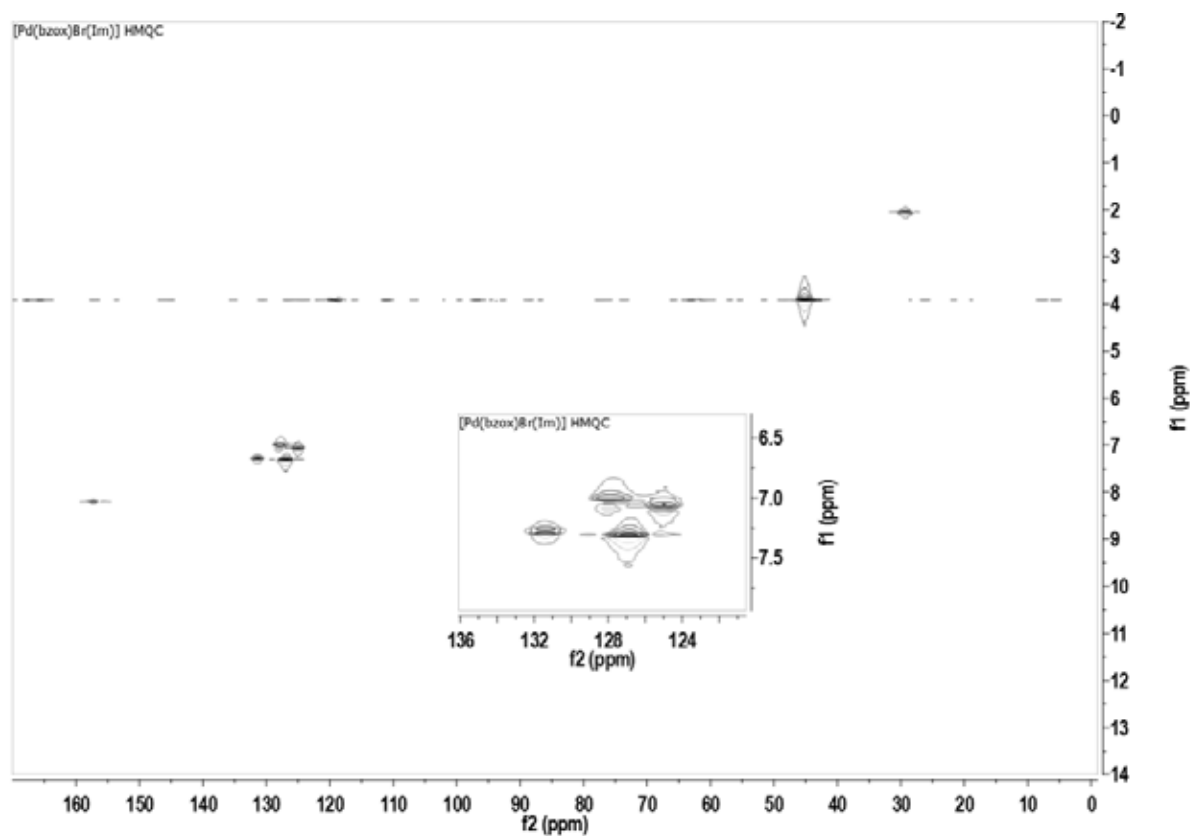
68 WHEAT, N. J. et al. DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. **MiniRev. Med. Chem.**, v. 7, p. 627-648, 2007.

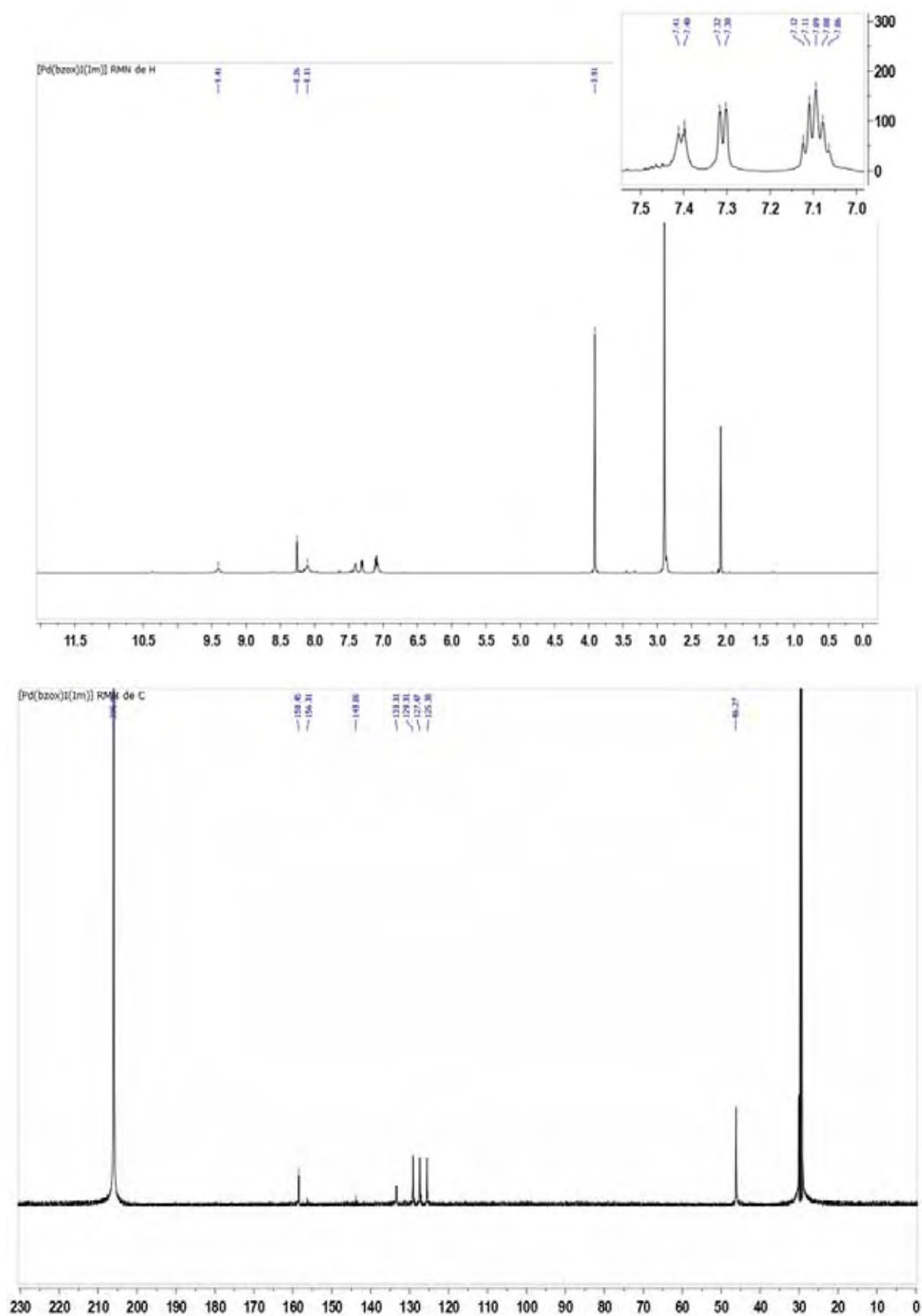
69 COPE, A. C.; FRIEDRICH, E. C. Electrophilic substitution reactions by platinum(II) and palladium(II) chlorides on N,N-dimethylbenzylamines. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 90, p. 909-913, 1968.

- 70 MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 37, p. 55-63, 1983.
- 71 HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **J. Immunol. Methods**, v. 119, p. 203-210, 1989.
- 72 MORO, A. C.; MAURO, A. E.; ANANIAS, S. R. Clivagem dos ciclopaladados diméricos  $[Pd(dmba)(\mu-X)]_2$  (dmba = N,N-dimetilbenzilamina; X = Cl, N<sub>3</sub>, NCO) por tiouréia. **Ecl. Quím.**, v. 29, p. 57-61, 2004.
- 73 ALMEIDA, E. T. **Compostos organometálicos de paládio(II):** investigação espectroscópica, comportamento térmico e aplicações biológicas. 2003. 148 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- 74 ANANIAS, S. R. **Investigação espectroscópica e comportamento térmico de espécies mono e polinucleares de paládio(II).** Aplicação de compostos polinucleares em sistemas hospede-hospedeiro. 2001. 229 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.
- 75 CAIRES, A. C. F. **Síntese, caracterização e reatividade do ciclometalado  $d\mu$ -azido-bis-N,N-dimetilbenzilamina-Z.** 1993. 262 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1993.
- 76 SOCRATES, J. **Infrared characteristic group frequencies.** 2nd ed. London: John Wiley & Sons, 1997.
- 77 SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds.** 7th ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.
- 78 NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds.** 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1986.
- 79 SPENCER, J. et al. Synthesis of a 1,4-benzodiazepine containing palladacycle with *in vitro* anticancer and cathepsin B activity. **Dalton Trans.**, v. 22, p. 4299-4303, 2009.
- 80 SOUZA, R. A. de; et al. Antimycobacterial and antitumor activities of palladium(II) complexes containing isonicotinamide (isn): X-ray structure of trans-[Pd(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(isn)<sub>2</sub>]. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 4863-4868, 2010.
- 81 MORO, A. C. et al. Antitumor and antimycobacterial activities of cyclopalladated complexes: X-ray structure of [Pd(C<sup>2</sup>,N-dmba)(Br)(tu)] (dmba = N,N'-dimethylbenzilamina, tu = thiourea). **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, p. 4611-4615, 2009.
- 82 KOMEDA, S. et al. A third mode of DNA binding: phosphate clamps by polynuclear platinum complex. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 128, p. 16092-16103, 2006.
- 83 XU, G. W.; MYRMRYK, J. S.; CAIRNCROSS, J. G. Inactivation of p53 sensitizes astrocytic glioma cells to BCNU and temozolomide, but not cisplatin. **J. Neuro-Oncol.**, v. 74, p. 141-149, 2005.
- 84 HAAR, C. P. et al. Drug resistance in glioblastoma: a mini review. **Neurochem. Res.**, v. 37, p. 1192-1200, 2012.

ANEXO A – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do complexo  $[\text{Pd}(\text{bzoX})\text{Br}(\text{im})]$ 

## ANEXO B – Espectros gHMQC e gHMBC do complexo [Pd(bzox)Br(im)]



ANEXO C – Espectros RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do complexo  $[\text{Pd}(\text{bzoX})\text{I}(\text{Im})]$ 

## ANEXO D – Espectros gHMQC e gHMBC do complexo [Pd(bzox)I(im)]

