

**AMADEU MOURA BEGO**

**Complexos triazólicos de Pd(II):  
Síntese, caracterização e atividade biológica.**

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

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dra. Regina Célia Galvão Frem Di Nardo

**Co-orientadores:** Prof. Dr. Antonio Eduardo Mauro  
Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto

**Araraquara  
2007**

---

---

# Agradecimentos

*Ao Instituto de Química de Araraquara – UNESP, por toda minha formação acadêmica, intelectual e humana;*

*À CAPES pela bolsa concedida;*

*À Prof<sup>a</sup>. Regina C. G. Frem. Pessoa singular em caráter e afeto! Obrigado por todo apoio, incentivo e compreensão; por seu papel fundamental ao longo de minha formação acadêmica e por proporcionar todas as condições necessárias para realização deste trabalho;*

*Ao Prof. Antônio Eduardo Mauro, pela amizade e confiança; pelos objetivos e indispensáveis conselhos, pelo convívio e por seu papel essencial na co-orientação deste trabalho;*

*Ao Prof. Adelino Viera de Godoy Netto, pelos anos de amizade e companheirismo; pelas horas e horas de inúmeras discussões; por todo incentivo, dedicação e por seu papel indispensável na co-orientação deste trabalho;*

*Aos Professores Luiz Antonio Andrade de Oliveira e Stanlei Ivair Klein, pelas sugestões no exame de qualificação, pelo convívio e por participarem de minha formação acadêmica;*

*Às funcionárias Irene e Valéria pela atenção, auxílio, carinho e convivência no departamento de Química Geral e Inorgânica;*

*A todos os integrantes do grupo de Química de coordenação e Organometálicos: Adriana, Adriano, Alessandra, Alexandre, Antônio Carlos (Tonho), Iolanda, João Régis, Juliana, Katinha, Maristela, Nathália. Patrícia, Rafael, Rodrigo, Silmar, Talita e Tiago, pelo convívio, colaboração e pelos momentos de descontração;*

*Ao Ernesto Gasparetto Júnior (Gaspar), pela amizade e pela confecção de painéis para apresentação em congressos;*

*Aos funcionários Alberto e Nivaldo, pela amizade e pela obtenção dos espectros de RMN; pelas frutíferas dicas e discussões;*

*Ao Pedro (Kita), Adriano e Prof. Massao, pela amizade e pela obtenção das curvas TG.*

*À Prof<sup>a</sup>. Iracilda e Sandrinha, pela amizade e por tornar possível a realização dos ensaios imunológicos;*

*À Prof<sup>a</sup>. Queico e ao Fernando, pela amizade e pela realização dos ensaios microbiológicos;*

---

---

---

---

*A todos os funcionários do Instituto de química, pelo suporte e auxílio;*

*A todos os professores, funcionários e alunos dos colégios COC e Objetivo, por todos os aprendizados e pelo convívio;*

*A todos da família licenciatura 2000, pelo amor e amizade; pelos anos de convivência, luta e suor; pelos momentos de descontração e alegria;*

*A todos da família Nova União: Cleiton, Eduardo, Erick, Giovane, Juliana, Richard (Fiotão), Thiago. Por todos estes anos de amizade e companheirismo; pelos momentos de alegria e dor; pelas dificuldades e conquistas. Meu refúgio e tesouro;*

*A todos meus amigos (Graças a Deus são muitos): “quem encontra um amigo, descobre um tesouro”;*

*Aos amigos e irmãos Daniel e Magno, pelos sentimentos de amizade, lealdade e sinceridade construídos ao longo destes anos; pelo incentivo e conselhos fundamentais durante todo este processo acadêmico; pelos momentos de descontração e pelas memoráveis peripécias vividas;*

*À minha namorada Pâmela, por todos estes anos de carinho e atenção; pelas palavras vitais de incentivo e consolo; por estar a meu lado durante os momentos bons e ruins; por nossa história vivida e por toda que ainda viveremos...*

*A meu tio Lenilton, pelo amor, carinho, dedicação e por todos os momentos de descontração;*

*Aos meus avós Anna, Lélío, Maria, por tudo aquilo que fizeram por mim desde o primeiro instante de vida e pelo amor incondicional;*

*Aos meus irmãos Thiago e Mariana, pelo amor fraterno; pelo crescimento e aprendizagem constante durante tudo o que vivemos; pelas horas de dor, alegria, derrotas, vitórias, lágrimas, sorrisos; por tudo aquilo que significam pra mim...*

*Aos meus pais Hélio e Marilene, figuras ímpares em minha vida. Obrigado por toda formação, educação e caráter transmitidos; pelo amor incondicional e por tudo que fizeram por mim desde o primeiro choro. Com certeza nada disso seria possível sem vocês!*

*A Deus, por conceder-me a vida e ser minha razão de existência.*

---

---

---

---

“ O conhecimento é, sem dúvida,  
o mais sublime dos vícios.”

Nicolau de Montaignou

---

---

---

---

## RESUMO

O 1,2,4-triazol é um composto heterocíclico aromático contendo três átomos de nitrogênio dispostos nas posições 1, 2 e 4 de um anel de cinco membros. O interesse nos complexos contendo este ligante iniciou-se em meados de 1965, quando as propriedades magnéticas de vários sistemas triazólicos foram estudadas. Comparado aos pirazóis e imidazóis, o 1,2,4-triazol apresenta um átomo de nitrogênio a mais, o que lhe confere uma maior diversidade de modos de coordenação. Este trabalho contemplou inicialmente a síntese, a caracterização espectroscópica e o estudo do comportamento térmico de complexos de Pd(II) contendo o ligante 1,2,4-triazol. Ênfase foi dada à investigação da influência de diversas rotas sintéticas no tipo de complexo formado. As metodologias gerais de síntese dos complexos envolveram preferencialmente a reação de substituição da acetonitrila na esfera de coordenação do precursor  $[\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2]$  pelos ligantes 1,2,4-triazol (Htrz) e trifenilfosfina ( $\text{PPh}_3$ ) e a utilização do complexo  $[\text{H}_2\text{PdCl}_4]$  como precursor alternativo. Quando foi utilizada a razão molar 1  $[\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2]$  : 2Htrz : 2  $\text{PPh}_3$  houve apenas a formação do complexo mononuclear  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ , não sendo observada portanto a coordenação do triazol. No entanto, com a proporção molar 1  $[\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2]$  : 2Htrz : 1  $\text{PPh}_3$ , em uma condição experimental de excesso de triazol, a coordenação deste ligante foi favorecida, gerando o complexo trinuclear  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$  com o ânion triazolato coordenado nos modos bi e tridentado. Durante a coordenação, o triazol é facilmente desprotonado, o que privilegia a coordenação do ânion triazolato, resultando em complexos onde o mesmo pode atuar nos modos bi e/ou tridentado. Entretanto, isto pode ser evitado acidificando o meio reacional. Sendo assim, em meio ácido, as reações conduziram impreterivelmente à coordenação bidentada do ligante triazol, com a formação de compostos de fórmula mínima  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]$ . Foi possível, também, controlar o modo de coordenação bidentada do triazol através do tipo de precursor utilizado, pois partindo-se do precursor  $[\text{H}_2\text{PdCl}_4]$  ocorreu a coordenação do triazol no modo *N1,N2*-bidentado, enquanto que a coordenação *N2,N4*-bidentado foi preferencialmente observada quando o complexo  $[\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2]$  foi utilizado como composto de partida. Foram ainda sintetizados os compostos inéditos  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$ ,  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$ ,  $[\text{PdI}_2(\text{Htrz})]_n$ ,  $[\text{Pd}_2\text{Br}_4(\text{Htrz})_2]$ . Uma segunda etapa do trabalho contemplou a realização de ensaios biológicos visando a determinação do índice de citotoxicidade de alguns dos complexos de Pd(II) obtidos frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC – 27194 causadora da tuberculose. Todos os ensaios de atividade biológica foram realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, em colaboração com Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iracilda Z. Carlos, Dr<sup>a</sup>. Sandra R. Ananias and Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarice Q. F. Leite. A determinação da citotoxicidade pela técnica de MTT indicou que os macrófagos peritoneais de camundongos são sensíveis ao potencial tóxico de  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$ ,  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$  e do ligante 1,2,4-triazol (Htrz). Além dos complexos  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$ ,  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$  serem os menos citotóxicos frente aos macrófagos dentre os compostos testados, ambos estimulam níveis de NO e  $\text{H}_2\text{O}_2$  significativos após 24h de exposição. Os macrófagos peritoneais obtidos de camundongos normais Balb/C são sensíveis ao potencial tóxico dos compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$ ,  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$ , bem como para o ligante Htrz e o padrão-cis-platina. Apesar do composto  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$  ser menos citotóxico em relação ao  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$ , foi aquele que mais estimulou a liberação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no período de 24 h enquanto que o 1,2,4-triazol inibiu a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  neste mesmo período. Os compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$  e  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$  estimularam a liberação de níveis de NO superiores ao do ligante Htrz. Os complexos  $[\text{Pd}_2\text{Cl}_4(\text{Htrz})_2]$ ,  $[\text{Pd}_2\text{Br}_4(\text{Htrz})_2]$  e  $[\text{PdI}_2(\text{Htrz})]_n$  submetidos a testes de inibição do crescimento da *Mycobacterium tuberculosis* apresentaram valores de CIM superiores a 125  $\mu\text{g/mL}$ , mostrando-se pouco eficientes na inibição da multiplicação da micobactéria causadora da tuberculose, já que atividade com CIM acima de 31,25  $\mu\text{g/mL}$  para substâncias sintéticas é considerada pouco promissora.

**Palavras-chaves:** complexos de Pd(II), 1,2,4-triazol, polímeros de coordenação, espectroscopias eletrônica, vibracional e RMN, atividade biológica.

---

---

---

---

## ABSTRACT

1,2,4-triazole is an aromatic heterocyclic compound bearing three nitrogen atoms in the 1,2,4 positions of a five-membered ring. The interest on their complexes has begun in 1965 when magnetic properties of some 1,2,4-triazolyl systems were studied. The fact that 1,2,4-triazole possesses an additional nitrogen atom, when compared to pyrazoles and imidazoles, confers a wide variety of coordination modes. This work has dealt with the synthesis, spectroscopic characterization, and the study of thermal behavior of Pd(II) compounds containing the 1,2,4-triazole ligand. The influence of the synthetic route on the resulting complexes was investigated. The general synthetic procedure involved the displacement of acetonitrile from the coordination sphere of  $[\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2]$  precursor by the ligands 1,2,4-triazole (Htrz) and triphenylphosphine ( $\text{PPh}_3$ ) as well the use of  $[\text{H}_2\text{PdCl}_4]$  as an alternative precursor. The 1,2,4-triazole did not coordinate on employing the molar ratio 1  $[\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2]$  : 2Htrz : 2  $\text{PPh}_3$ , affording only the mononuclear  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  compound. However, the coordination of 1,2,4-triazole was verified when the molar ratio 1  $[\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2]$  : 2Htrz : 1  $\text{PPh}_3$  was used, yielding the trinuclear  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$  complex in which the triazolato anion acts as bidentate and tridentate ligand. 1,2,4-triazole is easily deprotonated which favours the bi- and tridentate coordination modes. Nevertheless, the deprotonation is avoided by acidifying the reaction media. Therefore, compounds of general formulae  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]$  with the 1,2,4-triazole ligand in the bidentate mode were obtained in acid media and, depending on the precursor employed, the bidentate fashion can be controlled. When the  $[\text{H}_2\text{PdCl}_4]$  precursor is used, the heterocyclic ligand acts in the *N1,N2* mode whereas the *N2,N4* fashion is achieved on employing the  $[\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2]$  complex. Following the afore mentioned routes, the new compounds  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$ ,  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$ ,  $[\text{PdI}_2(\text{Htrz})]_n$ ,  $[\text{Pd}_2\text{Br}_4(\text{Htrz})_2]$  were obtained. The biological assays involving some Pd(II) compounds synthesized in this work was carried out at Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, in collaboration with Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iracilda Z. Carlos, Dr<sup>a</sup>. Sandra R. Ananias and Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarice Q. F. Leitte. The cytotoxicity determination via MTT assay showed that  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$  and  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$  are less toxic than 1,2,4-triazole and cisplatin to peritoneal murine macrophages. Besides that,  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$  and  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$  also stimulated the production of high levels NO and  $\text{H}_2\text{O}_2$  by macrophages *in vitro*. The antibacterial activity of the complexes  $[\text{Pd}_2\text{Cl}_4(\text{Htrz})_2]$ ,  $[\text{Pd}_2\text{Br}_4(\text{Htrz})_2]$  and  $[\text{PdI}_2(\text{Htrz})]_n$  towards *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC – 27194 were carried out, showing CIM values superior of 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Keywords:** complexes of Pd(II), 1,2,4-triazole, coordination polymers, electronic, vibrational and e RMN spectroscopy, biological activity.

---

---

---

---

## Abreviaturas, símbolos e siglas.

$C_{2v}$  e  $C_s$  – Grupos pontuais de simetria que diferem em relação a seus elementos de simetria.

$CDCl_3$  - clorofórmio deuterado.

CIM - concentração inibitória mínima

dmba - N,N-dimetilbenzilamina.

$DMSO-d_6$  - dimetilsulfóxido deuterado.

$D_2O$  – água deuterada.

dppp - 1,3-bis(difenilfosfina)propano.

DSC - calorimetria exploratória diferencial.

HMPT – hexametilfosforamida.

Htrz – 1,2,4-triazol.

$H_2trz$  – cátion triazólico.

IC25 – concentração de composto que reduz em 25% a viabilidade celular.

IC50 – concentração de composto que reduz em 50% a viabilidade celular.

IV - infravermelho.

LPS - lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4

MeCN - acetonitrila.

Mecyt - 1-metilcitosinato.

MHz - megahertz.

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio.

NaOD – hidróxido de sódio deuterado.

nm – nanômetro.

NCS - tiocianato.

PBS – tampão fosfato.

Pd (II) - paládio com número de oxidação +2.

PMA – Phorbol 12-myristate 13- acetate

$PPh_3$  - trifenilfosfina.

Ppm – partes por milhão.

RMN de  $^1H$  - ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

RMN de  $^{13}C$  - ressonância magnética nuclear de carbono.

RMN de  $^{31}P$  - ressonância magnética nuclear de fósforo.

RPMI - Mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular. Age como uma solução nutritiva em cultivo celular.

TG - termogravimetria.

TMP - trimetilfosfito.

TMS - tetrametilsilano.

trz – ânion triazolato. UV – Ultravioleta.

---

---

---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Configuração $d^8$ num campo octaédrico fraco.....	14 -
<b>Figura 2.</b> Esquema de níveis de energia para os orbitais moleculares <sup>2</sup> de complexos metálicos quadrado-planares em que os ligantes não têm orbitais $\pi$ que participam de ligações com o centro metálico. ....	16 -
<b>Figura 3.</b> Esquema de níveis de energia para os orbitais moleculares <sup>2</sup> de complexos metálicos quadrado-planares em que os ligantes têm orbitais $\pi$ que participam de ligações com o centro metálico.....	16 -
<b>Figura 4.</b> Estruturas moleculares tautômeras do 1,2,4-triazol .....	17 -
<b>Figura 5.</b> Modos de coordenação do 1,2,4-triazol no estado neutro (a-c) e na forma aniônica (d-g). ....	18 -
<b>Figura 6.</b> Coordenação monodentada do 1,2,4-triazol no complexo $[\text{Mn}(\text{Htrz})(\text{H}_2\text{O})_4\text{SO}_4]$ . ...	19 -
<b>Figura 7.</b> Coordenação monodentada do triazolato nos complexos: a) $[\text{Au}(\text{trz})(\text{PPh}_3)_2]_2$ e b) $[\text{Ag}(\text{trz})(\text{PPh}_3)_2]_n$ . ....	19 -
<b>Figura 8.</b> Geometria do modo de coordenação em ponte N1,N2. ....	20 -
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática da estrutura do complexo $[\text{Cu}(\text{Htrz})\text{Cl}_2]$ . ....	20 -
<b>Figura 10.</b> Fórmula estrutural do composto $[\text{M}_2(\mu\text{-trz})_2(\text{L}_2)_2]$ (M = Rh, Ir, Pd; L = $\frac{1}{2}$ diolefinas, $\text{PPh}_3$ , CO) .....	21 -
<b>Figura 11.</b> Geometria do modo de coordenação em ponte N2,N4. ....	21 -
<b>Figura 12.</b> Estrutura cristalina do composto $[\text{M}(\text{Htrz})_2(\text{NCS})_2]$ (M=Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn). ....	21 -
<b>Figura 13.</b> Fórmula estrutural do polímero $\{[\text{Cu}_3(\mu_3\text{-O})(\mu_3\text{-trz})(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_6]\}_n$ . ....	22 -
<b>Figura 14.</b> Representação estrutural do composto $[\text{Zn}(\text{trz})\text{Cl}]$ . ....	22 -
<b>Figura 15.</b> Fórmula estrutural do composto $\text{trans}\{-[(\text{NH}_2\text{Me})_2\text{Pt}(\text{mecyt})_2\text{Pd}]_2(\mu\text{-trz})\}(\text{NO}_3)_3$ . -	23 -
<b>Figura 16.</b> Fórmula estrutural do composto $[\text{Rh}_2\text{M}_2(\mu_3\text{-trz})_2\text{Cl}_2(\text{L}_2)_4]$ (M = Rh, Ir, Pd; L = $\frac{1}{2}$ diolefinas, $\text{PPh}_3$ , CO). ....	23 -
<b>Figura 17.</b> Diagrama esquemático da interação do 1,2,4-triazol com compostos de Pd(II). ...	24 -
<b>Figura 18.</b> Fórmula estrutural do complexo $\{[\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2]_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-1,2,3-trz})\}(\text{NO}_3)_2$ . ...	26 -
<b>Figura 19.</b> Fórmula estrutural dos complexos $(\text{H}_2\text{trz})[\text{cis-RuCl}_4(\text{Htrz})_2]$ e $(\text{H}_2\text{trz})[\text{trans-RuCl}_4(\text{Htrz})_2]$ . ....	27 -
<b>Figura 20.</b> Fórmula estrutural das drogas antitumorais a base de Pt(II) de uso clínico....	29 -
<b>Figura 21.</b> Diagrama esquemático das rotas sintéticas utilizadas neste trabalho para a preparação de compostos triazólicos de Pd(II). ....	32 -
<b>Figura 22.</b> Espectros vibracionais na região de 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ do IV para os ligantes livres 1,2,4-triazol e trifenilfosfina.....	46 -
<b>Figura 23.</b> Estrutura cristalina do triazol a $-160^\circ\text{C}$ . Projeção da estrutura ao longo do eixo c.-	46 -
<b>Figura 24.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para o 1,2,4-triazol em $\text{CDCl}_3$ .....	48 -
<b>Figura 25.</b> Transições de campo ligante permitidas por spin para complexos quadrado-planares de Pd(II). ....	50 -
<b>Figura 26.</b> Espectro de reflectância difusa do ligante Htrz. ....	50 -
<b>Figura 27.</b> Espectros vibracionais no IV para os compostos de fórmula mínima $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$ , X=Cl (1); Br (2), I (3). ....	52 -
<b>Figura 28.</b> Ampliação do espectro vibracional no IV na região de 800-400 $\text{cm}^{-1}$ para o composto $[\text{PdI}_2(\text{Htrz})]_n$ . ....	53 -
<b>Figura 29.</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ para os compostos $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$ , X = Cl (1); Br (2). -	53 -
<b>Figura 30.</b> Espectros de reflectância difusa dos compostos $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$ , X = Cl (1); Br (2); I (3). ....	54 -
<b>Figura 31.</b> Curva TG do composto $[\text{Pd}_2\text{Cl}_4(\text{Htrz})_2]$ (1).....	56 -

---

---



---

<b>Figura 32.</b> Difratoograma do resíduo da termodecomposição do complexo $[Pd_2Cl_4(Htrz)_2]$ (método do pó). .....	- 57 -
<b>Figura 33.</b> Curva TG do composto $[Pd_2Br_4(Htrz)_2]$ . .....	- 58 -
<b>Figura 34.</b> Curva TG do composto $[PdI_2(Htrz)]_n$ . .....	- 59 -
<b>Figura 35.</b> Proposta estrutural para os compostos de fórmula geral $[Pd_2X_4(Htrz)_2]$ , onde X = Cl (1), Br (2). .....	- 60 -
<b>Figura 36.</b> Proposta estrutural para o composto $[PdI_2(Htrz)]_n$ (3). .....	- 60 -
<b>Figura 37.</b> Espectros vibracionais no IV para os polímeros de fórmula mínima $[PdX_2(Htrz)]$ , onde X=Cl(1)e Br(2). .....	- 62 -
<b>Figura 38.</b> Ampliação dos espectros vibracionais no IV na região de $800-400\text{ cm}^{-1}$ para os polímeros de fórmula mínima $[PdX_2(Htrz)]$ , onde X= Cl e Br.....	- 63 -
<b>Figura 39.</b> Espectros de reflectância difusa dos polímeros de fórmula mínima $[PdX_2(Htrz)]$ , onde X= Cl (1) e Br (2). .....	- 64 -
<b>Figura 40.</b> Curva TG do composto $[PdCl_2(Htrz)]_n$ . .....	- 65 -
<b>Figura 41.</b> Curva TG do composto $[PdBr_2(Htrz)]_n$ . .....	- 66 -
<b>Figura 42.</b> Proposição estrutural para os compostos de fórmula geral $[PdX_2(Htrz)]_n$ , onde X = Cl e Br.....	- 67 -
<b>Figura 43.</b> Relação dose-efeito do composto Htrz para macrófagos peritoneais de camundongos após exposição por 24 h. Para cada ensaio biológico foram utilizados 5 animais e realizado em triplicata. Cada ponto do gráfico representa a média e o desvio padrão de um animal numa determinada concentração. O resultado é significativamente diferente do controle de células em meio RPMI (viabilidade 100%). .....	- 67 -
<b>Figura 44.</b> Relação dose-efeito do composto $[PdCl_2(Htrz)]_n$ para macrófagos peritoneais de camundongos após exposição por 24 h. Para cada ensaio biológico foram utilizados 5 animais e realizado em triplicata. Cada ponto do gráfico representa a média e o desvio padrão de um animal numa determinada concentração. O resultado é significativamente diferente do controle de células em meio RPMI (viabilidade 100%). .....	- 68 -
<b>Figura 45.</b> Relação dose-efeito do composto $[PdBr_2(Htrz)]_n$ para macrófagos peritoneais de camundongos após exposição por 24 h. Para cada ensaio biológico foram utilizados 5 animais e realizado em triplicata. Cada ponto do gráfico representa a média e o desvio padrão de um animal numa determinada concentração. O resultado é significativamente diferente do controle de células em meio RPMI (viabilidade 100%). .....	- 68 -
<b>Figura 46.</b> Relação dose-efeito do composto cis- $[PtCl_2(NH_3)_2]$ para macrófagos peritoneais de camundongos após exposição por 24 h. Para cada ensaio biológico foram utilizados 5 animais e realizado em triplicata. Cada ponto do gráfico representa a média e o desvio padrão de um animal numa determinada concentração. O resultado é significativamente diferente do controle de células em meio RPMI (viabilidade 100%). .....	- 69 -
<b>Figura 47.</b> Efeitos dos compostos na produção de peróxido de hidrogênio em culturas de macrófagos peritoneais. As células peritoneais de animais normais foram cultivadas em vermelho de fenol completo (controle negativo, C-) e com o PMA (controle positivo, C+). Os macrófagos dos camundongos normais foram incubados com os compostos Htrz, $[PdCl_2(Htrz)]_n$ (Cl), $[PdBr_2(Htrz)]_n$ (Br) e da cis-platina por 24h com os valores de $IC_{25}$ (Fig. 47a) e $IC_{50}$ (Fig. 47b). A reação foi interrompida, e a seguir foram lidas em espectrofotômetro a 620nm. Os resultados foram expressos em $\text{nanomols de H}_2\text{O}_2/2 \times 10^5$ células, como a média $\pm$ desvio-padrão de triplicatas de 5 animais. ***p < 0,001, **p < 0,01 estatisticamente significativo. ....	- 72 -

---

---

---

**Figura 48.** Produção de óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais. Os macrófagos peritoneais de animais normais foram cultivados em meio RPMI-1640-C (controle negativo, C-) e com o LPS (controle positivo, C+). Os macrófagos dos animais normais foram incubados com os compostos Htrz,  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$  (Cl),  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$  (Br) e da cis-platina por 24h com os valores de  $\text{IC}_{25}$  (Fig. 48a) e  $\text{IC}_{50}$  (Fig. 48b). Aos sobrenadantes das culturas, adicionou-se o reagente de Griess, e após 10 min. a placa foi lida em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de nitrito foi obtida de uma reta padrão com quantidades conhecidas de  $\text{NaNO}_2$ . Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio-padrão de triplicatas de 5 animais. \*\*\* $p < 0,001$  estatisticamente significativo. .... - 75 -

**Figura 49.** Espectros vibracionais no IV para os compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  e  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ . .... - 79 -

**Figura 50.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para os compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  e  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ . .... - 81 -

**Figura 51.** Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  para os compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  (Padrão  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (80%)) e  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$  (Padrão TMP). .... - 81 -

**Figura 52.** Espectros de reflectância difusa dos compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  e  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ . .... - 83 -

**Figura 53.** Proposta estrutural para o composto  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ . .... - 84 -

**Figura 54.** Propostas estruturais para os dois isômeros em solução do composto  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ . .... - 84 -

---

---

---

---

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Constantes físicas do 1,2,4-triazol. ....	- 17 -
<b>Tabela 2.</b> Medicamentos derivados de s-triazol. ....	- 25 -
<b>Tabela 3.</b> Formulação do meio LJ. ....	- 41 -
<b>Tabela 4.</b> – Número de onda de absorção no infravermelho, em $\text{cm}^{-1}$ , e atribuições para os ligantes Htrz e $\text{PPh}_3$ . ....	- 45 -
<b>Tabela 5.</b> – Dados de RMN para 1,2,4-triazol (Htrz) e triazolato (trz). ....	- 49 -
<b>Tabela 6.</b> – Propriedades físicas e análise elementar dos complexos de fórmula mínima $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$ , onde X= Cl, Br e I. ....	- 51 -
<b>Tabela 7.</b> Dados obtidos por espectroscopia no IV dos compostos de fórmula mínima $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$ X=Cl (1); Br (2), I (3) e suas respectivas atribuições. ....	- 52 -
<b>Tabela 8.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (ppm) para os compostos de fórmula mínima $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$ X=Cl (1) e Br (2). ....	- 54 -
<b>Tabela 9.</b> Dados obtidos por espectroscopia de reflectância difusa, em nm, dos compostos de fórmula mínima $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$ X=Cl (1), Br (2) e I (3), e suas respectivas atribuições. ...	- 55 -
<b>Tabela 10.</b> Perdas de massa e intervalos de temperatura observados nas curvas TG dos complexos de fórmula mínima $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$ X=Cl (1), Br (2) e I(3). ....	- 56 -
<b>Tabela 11.</b> Concentração Inibitória Mínima (CIM) de compostos triazólicos de Pd(II) frente a Mycobacterium tuberculosis pela técnica do MABA (Microplate Alamar Blue Assay). ....	- 61 -
<b>Tabela 12.</b> – Propriedades físicas e análise elementar dos polímeros triazólicos de fórmula mínima $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$ , onde X= Cl e Br. ....	- 61 -
<b>Tabela 13.</b> Dados obtidos por espectroscopia no IV dos polímeros de fórmula mínima $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$ , onde X= Cl (1) e Br (2), e suas respectivas atribuições. ....	- 62 -
<b>Tabela 14.</b> Dados obtidos por espectroscopia de reflectância difusa, em nm, dos polímeros de fórmula mínima $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$ , onde X= Cl (1) e Br (2), e suas respectivas atribuições. ....	- 64 -
<b>Tabela 15.</b> Perdas de massa e intervalos de temperatura observados nas curvas TG dos polímeros de fórmula mínima $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$ , onde X=Cl(1)e Br(2). ....	- 65 -
<b>Tabela 16.</b> Índice citotóxico de $\text{IC}_{50}$ e $\text{IC}_{25}$ , em $\mu\text{molL}^{-1}$ (a) ou $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$ (b), observados para Htrz e os compostos $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$ , $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$ e cisplatina para macrófagos com 24h de exposição. ....	- 69 -
<b>Tabela 17.</b> Efeitos dos compostos, nmol de $\text{H}_2\text{O}_2/2 \times 10^5$ células, na produção de $\text{H}_2\text{O}_2$ em culturas de macrófagos de camundongos normais. ....	- 73 -
<b>Tabela 18.</b> Efeitos dos compostos na produção de NO ( $\mu\text{mol/mL}$ ) em culturas de macrófagos de camundongos normais. ....	- 76 -
<b>Tabela 19.</b> Porcentagem de inibição dos compostos sobre a produção de $\text{H}_2\text{O}_2$ em macrófagos de camundongos normais após exposição aos $\text{IC}_{25}$ e $\text{IC}_{50}$ por 24 h. ....	- 77 -
<b>Tabela 20.</b> Porcentagem de inibição dos compostos sobre a produção de NO em macrófagos de camundongos normais após exposição aos $\text{IC}_{25}$ e $\text{IC}_{50}$ por 24 h. ....	- 77 -
<b>Tabela 21.</b> – Propriedades físicas e análise elementar dos complexos $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ e $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ . ....	- 78 -
<b>Tabela 22.</b> Dados obtidos por espectroscopia no IV dos compostos $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ e $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ e suas respectivas atribuições. ....	- 80 -
<b>Tabela 23.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ , em ppm, para os compostos $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ e $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ . ....	- 82 -
<b>Tabela 24.</b> Dados obtidos por espectroscopia de reflectância difusa, em nm, dos compostos $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ e $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ e suas respectivas atribuições. ....	- 83 -

---

---

---

---

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	- 14 -
1.1	- A química de coordenação do paládio .....	- 14 -
1.2	- A química de coordenação dos triazóis .....	- 17 -
1.2.1	- Coordenação terminal.....	- 19 -
1.2.2	- Coordenação em ponte N1,N2 .....	- 20 -
1.2.3	- Coordenação em ponte N1,N4 e N2,N4 .....	- 21 -
1.2.4	- Coordenação em ponte N1,N2,N4.....	- 22 -
1.3	- A química de coordenação de complexos triazólicos de Pd(II).....	- 23 -
1.4	- Atividade biológica de complexos triazólicos. ....	- 24 -
1.5	- O papel dos macrófagos e o sistema imunológico .....	- 27 -
1.5.1	- Resposta imunológica.....	- 28 -
1.5.2	- Ativação de macrófagos mediada por compostos de paládio e platina... -	29 -
2.	OBJETIVOS .....	- 31 -
3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	- 31 -
3.1	<b> Materiais</b> .....	- 31 -
3.2	<b> Metodologia de Síntese</b> .....	- 31 -
3.3	<b> - Preparação dos Complexos</b> .....	- 32 -
3.3.1	- Preparação do composto $[Pd_2Cl_4(Htrz)_2]$ . ....	- 32 -
3.3.2	- Preparação do composto $[Pd_2Br_4(Htrz)_2]$ . ....	- 32 -
3.3.3	- Preparação do composto $[PdI_2(Htrz)]_n$ . ....	- 33 -
3.3.4	- Preparação do polímero $[PdCl_2(Htrz)]_n$ . ....	- 33 -
3.3.5	- Preparação do polímero $[PdBr_2(Htrz)]_n$ . ....	- 33 -
3.3.6	- Preparação do composto $[PdCl_2(PPh_3)_2]$ . ....	- 34 -
3.3.7	- Preparação do composto $[Pd_3Cl_4(trz)_2(PPh_3)_3]$ . ....	- 34 -
3.4	<b> - Ensaios de Atividade Imunológica.</b> ....	- 34 -
3.4.1	- Preparação das soluções dos compostos $Htrz$ , $[PdCl_2(Htrz)]_n$ , $[PdBr_2(Htrz)]_n$ . -	35 -
3.4.2	- Animais .....	- 35 -
3.4.3	- Obtenção das células do exsudato peritoneal .....	- 36 -
3.4.4	- Técnica Colorimétrica do MTT-tetrazólio .....	- 36 -
3.4.5	- Determinação de Peróxido de Hidrogênio .....	- 37 -
3.4.6	- Determinação de Óxido Nítrico (NO) .....	- 38 -
3.4.7	- Determinação da atividade inibitória dos compostos em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos quanto à produção de $H_2O_2$ e NO.....	- 39 -
3.5	<b> - Ensaios de inibição do crescimento da <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.</b> ... -	40 -
3.5.1	- Testes Microbiológicos para Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) -	40 -
3.5.2	- Preparação do caldo 7H <sub>9</sub> .....	- 40 -
3.5.3	- Preparação do meio de LJ .....	- 40 -
3.5.4	- Preparação da solução reveladora .....	- 41 -
3.5.5	- Preparação da suspensão bacteriana .....	- 41 -
3.5.6	- Determinação da CIM em microplaca utilizando Alamar Blue como revelador -	41 -
3.5.7	- Leitura e obtenção dos resultados .....	- 42 -
4.	MÉTODOS INSTRUMENTAIS .....	- 43 -
4.1	- Análise Elementar .....	- 43 -
4.2	- Intervalo de Fusão .....	- 43 -
4.3	- Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho.....	- 43 -
4.4	- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear .....	- 43 -

---

---

---

---

4.5	– Espectroscopia de Reflectância Difusa.....	- 43 -
4.6	– Análise Térmica .....	- 43 -
4.7	– Difractometria de Raios X. ....	- 44 -
5.	– RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	- 45 -
5.1	– Considerações espectroscópicas no IV sobre 1,2,4-triazol e trifenilfosfina..	- 45 -
5.1.1	– <i>Investigação espectroscópica de IV dos modos de coordenação do 1,2,4-triazol.</i> - 47 -	
5.2	– Considerações espectroscópicas de RMN do 1,2,4-triazol. ....	- 48 -
5.2.1	– <i>Investigação espectroscópica de RMN dos modos de coordenação do 1,2,4-triazol.</i> .....	- 49 -
5.3	– Considerações espectroscópicas na região do UV-Visível do Pd(II) e do 1,2,4-triazol. ....	- 49 -
5.4	– Complexos de fórmula mínima [PdX <sub>2</sub> (Htrz)], onde X = Cl, Br e I. ....	- 51 -
5.4.1	– <i>Propriedades físicas e análise elementar.</i> .....	- 51 -
5.4.2	– <i>Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho.</i> .....	- 51 -
5.4.3	– <i>Espectroscopia de RMN.</i> .....	- 53 -
5.4.4	– <i>Espectroscopia de Reflectância Difusa.</i> .....	- 54 -
5.4.5	– <i>Análise térmica.</i> .....	- 55 -
5.4.6	– <i>Proposição estrutural.</i> .....	- 59 -
5.4.7	– <i>Ensaio de inibição do crescimento da Mycobacterium tuberculosis.</i> ....	- 60 -
5.5	– Polímeros de Pd(II) e triazol. ....	- 61 -
5.5.1	– <i>Propriedades físicas e análise elementar.</i> .....	- 61 -
5.5.2	– <i>Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho.</i> .....	- 61 -
5.5.3	– <i>Espectroscopia de RMN.</i> .....	- 63 -
5.5.4	– <i>Espectroscopia de Reflectância Difusa.</i> .....	- 63 -
5.5.5	– <i>Análise térmica.</i> .....	- 64 -
5.5.6	– <i>Proposição estrutural.</i> .....	- 66 -
5.5.7	– <i>Determinação da viabilidade celular de macrófagos de camundongos normais pela técnica de MTT (MOSSMAN, 1983).</i> .....	- 67 -
5.6	– Compostos [PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] e [Pd <sub>3</sub> Cl <sub>4</sub> (trz) <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ]. ....	- 78 -
5.6.1	– <i>Propriedades físicas e análise elementar.</i> .....	- 78 -
5.6.2	– <i>Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho.</i> .....	- 78 -
5.6.3	– <i>Espectroscopia de RMN.</i> .....	- 80 -
5.6.4	– <i>Espectroscopia de Reflectância Difusa.</i> .....	- 82 -
5.6.5	– <i>Proposição estrutural.</i> .....	- 84 -
6.	– CONCLUSÕES.....	- 86 -
7.	REFERÊNCIAS .....	- 89 -

---

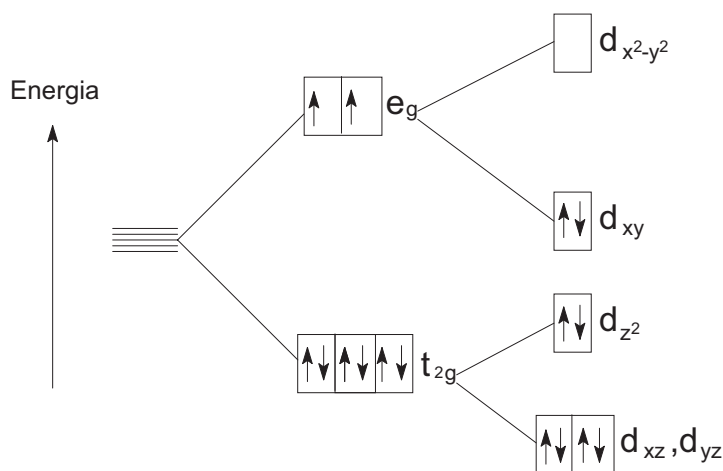
---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 - A química de coordenação do paládio

O íon Pd(II) forma óxidos, haletos, nitratos e sulfatos. Tem configuração eletrônica  $_{46}\text{Pd}^{2+}$ :  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^{10} 4p^6 4d^8$ . O íon Pd(II) é paramagnético, mas todos os seus complexos são diamagnéticos e apresentam principalmente coloração vermelha, marrom ou amarela. O complexo  $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$  é formado em solução aquosa e é diamagnético. Como nesse complexo todos os elétrons estão emparelhados, supõe-se que tenha uma estrutura quadrado-planar. De fato, todos os complexos de Pd(II) são diamagnéticos, exceto o íon paramagnético  $[\text{PdCl}_4]^{2-}$  que é formado em ácido clorídrico <sup>1</sup>.

Quando um íon metálico central de um complexo tiver uma configuração  $d^8$  em campo octaédrico, seis elétrons ocuparão os orbitais  $t_{2g}$  e dois elétrons ocuparão os orbitais  $e_g$  (Figura 1). O arranjo é o mesmo num complexo com ligantes de campo fraco ou forte. Os orbitais são preenchidos simetricamente.



**Figura 1.** Configuração  $d^8$  num campo octaédrico fraco.

O elétron isolado do orbital  $d_{x^2-y^2}$  será repellido por quatro ligantes, enquanto que o elétron no orbital  $d_{z^2}$  será repellido por somente dois ligantes. Portanto, a energia do orbital  $d_{x^2-y^2}$  aumenta com relação à do  $d_{z^2}$ . Se o campo ligante for suficientemente forte, a diferença de energia entre esses dois orbitais se torna maior que a energia necessária para emparelhar os elétrons. Nessas condições, forma-se um arranjo mais estável se os dois elétrons  $e_g$  se emparelharem, passando a ocupar o orbital menos energético  $d_{z^2}$ . Com isso, o orbital  $d_{x^2-y^2}$  fica vazio e quatro ligantes podem agora se aproximar sem dificuldade,

segundo as direções +x, -x, +y e -y. Contudo, os ligantes que se aproximarem segundo as direções +z e -z encontrarão forças repulsivas muito fortes, visto que o orbital  $d_z^2$  estará totalmente preenchido (Figura 1). Assim, somente quatro ligantes conseguem ligar-se ao metal, formando um complexo quadrado-planar; não tendo êxito a tentativa de se formar um complexo octaédrico<sup>1</sup>.

Os íons metálicos que formam complexos quadrado-planares com ligantes simples têm uma configuração eletrônica  $nd^8$ . Nestes complexos, os cinco orbitais  $d$ , degenerados em um íon livre, são desdobrados em quatro níveis diferentes. O tipo de desdobramento depende do arranjo simétrico dos ligantes<sup>2</sup>. Assim, três parâmetros de orbitais são necessários para descrever o campo ligante dos orbitais  $d$  em um complexo quadrado-planar, frequentemente denotados como  $Dq$ ,  $Ds$  e  $Dt$ <sup>3</sup>.

Vários esforços foram feitos para elucidar os níveis de energia dos orbitais  $d$  em complexos metálicos quadrado-planares<sup>4-8</sup>. Harry B. Gray e C. J. Ballhausen desenvolveram uma teoria de orbital molecular para estes complexos. Propriedades espectrais e magnéticas de complexos quadrado-planares típicos foram consideradas originando valores consistentes para as energias dos orbitais moleculares. Os esquemas gerais para os níveis de energia dos orbitais moleculares<sup>2</sup> são mostrados nas Figuras 2 e 3.

---

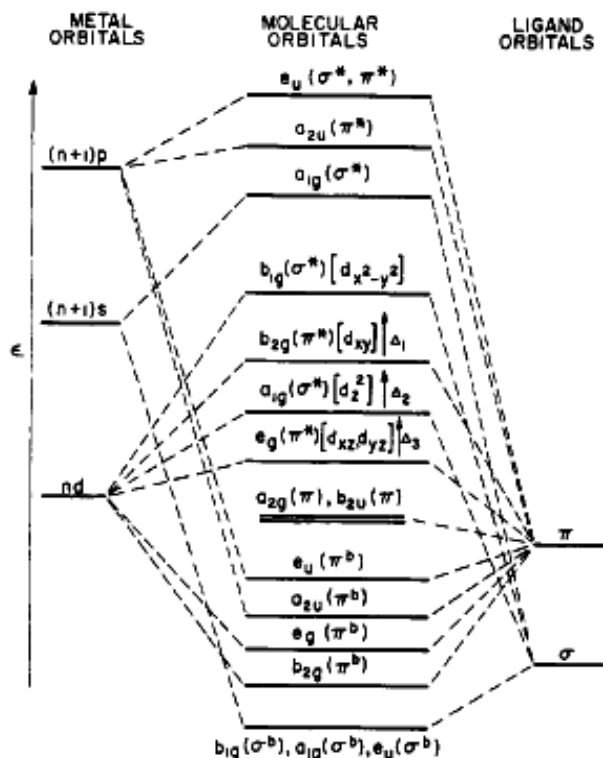


Figura 2. Esquema de níveis de energia para os orbitais moleculares<sup>2</sup> de complexos metálicos quadrado-planares em que os ligantes não têm orbitais  $\pi$  que participam de ligações com o centro metálico.

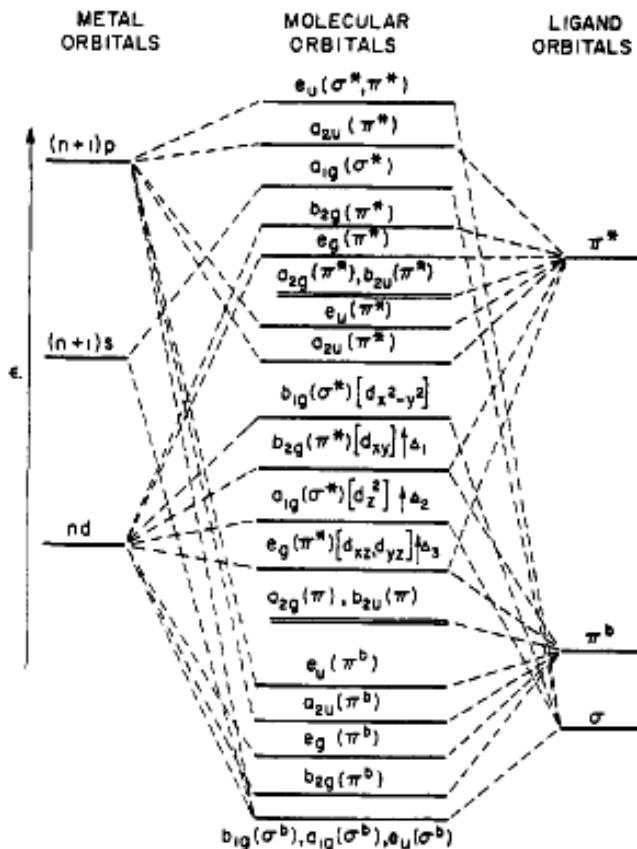


Figura 3. Esquema de níveis de energia para os orbitais moleculares<sup>2</sup> de complexos metálicos quadrado-planares em que os ligantes têm orbitais  $\pi$  que participam de ligações com o centro metálico.



## 1.2 - A química de coordenação dos triazóis

O nome triazol foi primeiramente sugerido por Bladin em princípios de 1885. No período compreendido entre 1925 e 1946 não houve interesse quanto ao estudo desta classe de heterociclos. Com a descoberta das ações convulsivante e herbicida no início da década de 50, ocorreu uma retomada dos estudos referentes aos diversos sistemas triazólicos condensados ou não. Todos os triazóis são de origem sintética e não há indícios de que estes heterociclos sejam encontrados na natureza.

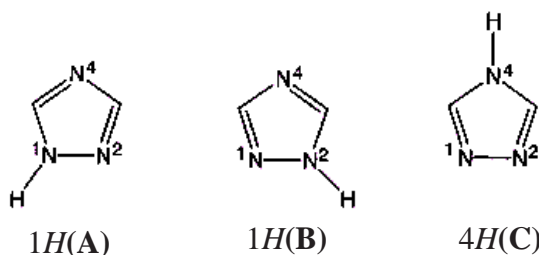
O 1,2,4-triazol é um heterociclo aromático contendo três átomos de nitrogênio dispostos nas posições 1, 2 e 4 de um anel de cinco membros, é bastante solúvel em solventes polares e pouco solúvel em solventes apolares, especialmente quando há grupos substituintes no átomo de nitrogênio.

Algumas constantes físicas deste ligante<sup>9</sup> são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Constantes físicas do 1,2,4-triazol.

Composto	P.f. / °C	P.e. / °C	Momento de dipolo / D	pKa
1,2,4-triazol	121	260	3,84	2,55 (NH); 10,1 (CH)

São conhecidas três formas tautoméricas para o 1,2,4-triazol, as quais diferem-se nas posições do grupo relativamente ácido NH, conforme ilustra a Figura 4.

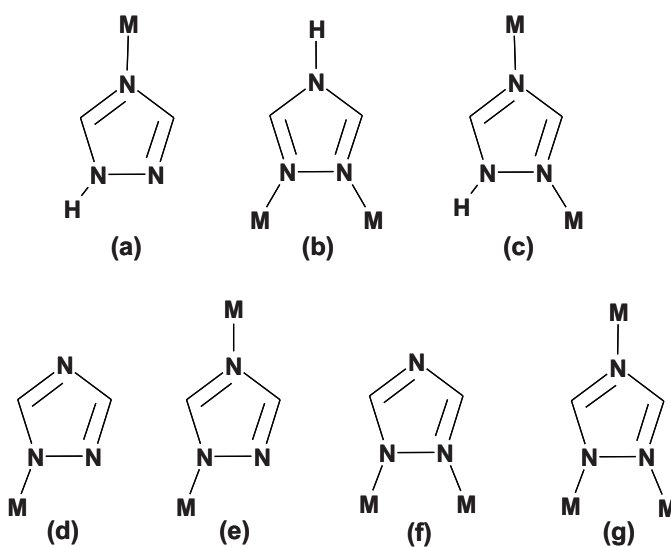


**Figura 4.** Estruturas moleculares tautômeras do 1,2,4-triazol

As espécies 1H(A) e 1H(B) são estatisticamente distintas, mas energeticamente equivalentes; isto implica que o 1H-tautômero é duas vezes mais provável que o 4H-tautômero. Medidas de momento de dipolo do 1,2,4-triazol em dioxano indicaram a presença de certa quantidade do 4H-tautômero em solução. Analogamente, estudos de RMN com <sup>15</sup>N mostraram a presença de cerca de 40% do 4H-tautômero em soluções concentradas de 1,2,4-triazol em metanol<sup>10</sup>.

Também conhecidos como azóis superiores (triazóis e tetrazóis) são ligantes extremamente versáteis exibindo variados modos de coordenação em ponte. Comparado aos pirazóis e imidazóis, o 1,2,4-triazol apresenta um átomo de nitrogênio a mais, o que lhe confere uma maior diversidade de modos de coordenação. O 1,2,4-triazol é capaz de atuar como ligante em ponte, com ou sem desprotonação.

A Figura 5 mostra o ligante neutro coordenado no modo monodentado através de *N4* (Figura 5a), em ponte com o 4*H*-tautômero (Figura 5b) de maneira análoga ao ânion pirazolato, assim como o 1*H*-tautômero (Figura 5c) com configuração similar ao do ânion imidazolato. Similarmente o ânion 1,2,4-triazol desprotonado pode se coordenar no modo monodentado através de *N1* (Figura 5d), em ponte através dos nitrogênios *N1,N2* ou *N2,N4* ou atuar como um ligante tridentado utilizando os três nitrogênios (Figura 5e-5g)<sup>11</sup>.

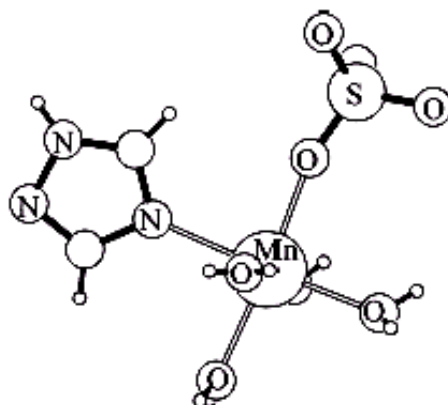


**Figura 5.** Modos de coordenação do 1,2,4-triazol no estado neutro (a-c) e na forma aniônica (d-g).

Apesar do 1,2,4-triazol ser uma molécula simples e de baixo custo, poucas estruturas moleculares de seus derivados metálicos são atualmente conhecidas. Mais de 200 estruturas elucidadas através de difração de raios-X são bem documentadas, das quais somente 10% são referentes a complexos metálicos do 1,2,4-triazol não substituído. Muito provavelmente isso é causado pelo fato de que o ligante quase sempre produz um precipitado insolúvel e microcristalino na presença de íons de metais de transição<sup>4</sup>.

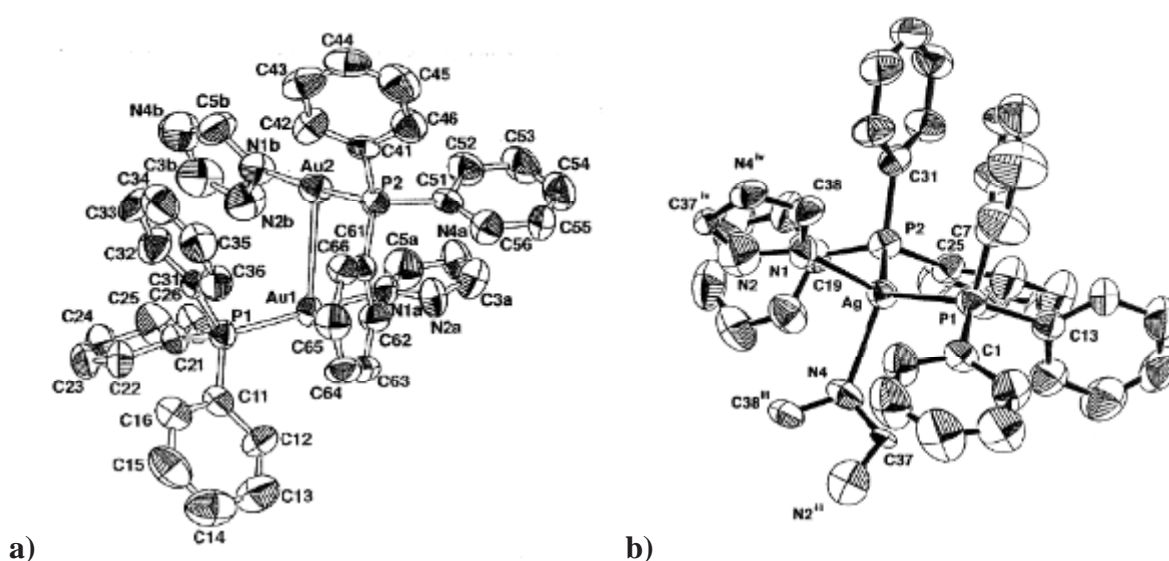
### 1.2.1 - Coordenação terminal

Raramente o 1,2,4-triazol não substituído atua como ligante monodentado. Neste caso, o ligante geralmente se coordena através do nitrogênio *N4*, quando neutro. Este tipo de coordenação é evidenciado na estrutura molecular do complexo  $[Mn(Htrz)(H_2O)_4SO_4]^{12}$ . (Figura 6)



**Figura 6.** Coordenação monodentada do 1,2,4-triazol no complexo  $[Mn(Htrz)(H_2O)_4SO_4]$ .

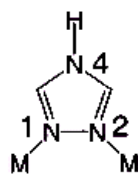
Quando o ânion triazolato atua como um ligante monodentado, a coordenação ocorre através do nitrogênio *N1*, como ilustrado nos trabalhos de Nomiya *et al.*<sup>13,14</sup>, onde complexos triazólicos de Au e Ag foram obtidos com o ânion triazolato monodentado. (Figura 7)



**Figura 7.** Coordenação monodentada do triazolato nos complexos: a)  $[Au(trz)(PPh_3)_2]_2$  e b)  $[Ag(trz)(PPh_3)_2]_n$ .

### 1.2.2 - Coordenação em ponte N1,N2

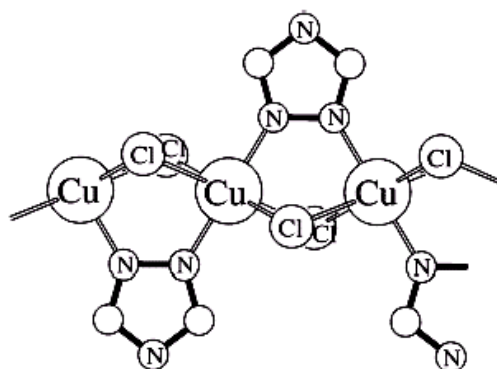
A coordenação em ponte *N1,N2* é o modo de coordenação usualmente encontrado para triazóis substituídos na posição *N4*. No modo *N1,N2*, dois íons metálicos são mantidos unidos numa distância de aproximadamente 400 pm (Figura 8) <sup>14</sup>.



340 - 410 pm

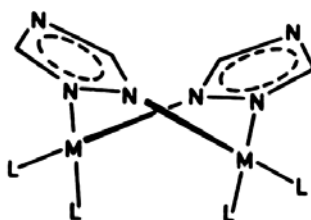
**Figura 8.** Geometria do modo de coordenação em ponte *N1,N2*.

A primeira estrutura de um complexo de triazol determinada por difração de raios-X de monocristal <sup>15</sup> refere-se ao complexo  $[\text{Cu}(\text{Htrz})\text{Cl}_2]$ , que foi preparado dissolvendo-se a quente o triazolato de cobre(II) em ácido clorídrico concentrado. Neste polímero, os átomos de cobre são conectados por pontes de triazol do tipo *N1,N2* e duas pontes assimétricas do tipo  $\mu\text{-Cl}$ , conforme ilustrado na Figura 9.



**Figura 9.** Representação esquemática da estrutura do complexo  $[\text{Cu}(\text{Htrz})\text{Cl}_2]$ .

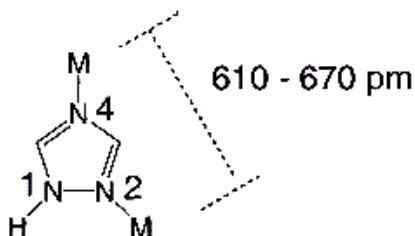
A coordenação em ponte *endo*-bidentada através de *N1,N2* também pode ser encontrada para o ânion triazolato, como ilustrado na estrutura molecular do complexo  $[\text{M}_2(\mu\text{-trz})_2(\text{L}_2)_2]$  ( $\text{M} = \text{Rh}, \text{Ir}, \text{Pd}$ ;  $\text{L} = \frac{1}{2}$  diolefinas,  $\text{PPh}_3$ ,  $\text{CO}$ ) <sup>16</sup>. (Figura 10)



**Figura 10.** Fórmula estrutural do composto  $[M_2(\mu\text{-trz})_2(L_2)_2]$  ( $M = \text{Rh, Ir, Pd}$ ;  $L = \frac{1}{2}$  diolefinas,  $\text{PPh}_3$ ,  $\text{CO}$ )

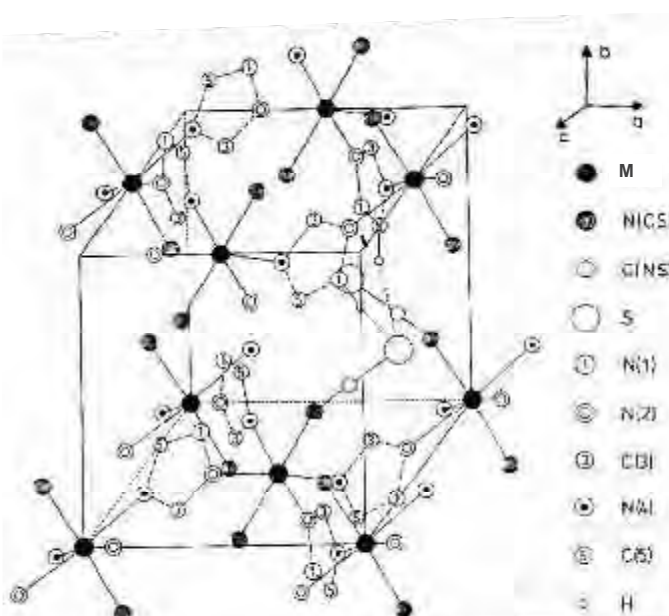
### 1.2.3 - Coordenação em ponte N1,N4 e N2,N4.

Pontes de triazóis nos modos N1,N4 e N2,N4 mantêm os íons metálicos afastados a uma distância entre 610-670 pm (Figura 11). Este modo de coordenação conduz à obtenção de compostos de estrutura bidimensionais estendidas.



**Figura 11.** Geometria do modo de coordenação em ponte N2,N4.

Os complexos de composição  $[M(\text{Htrz})_2(\text{NCS})_2]$  ( $M = \text{Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn}$ )<sup>14</sup> são redes poliméricas de íons metálicos conectados a centros metálicos vizinhos via triazóis neutros em ponte N2,N4. (Figura 12)

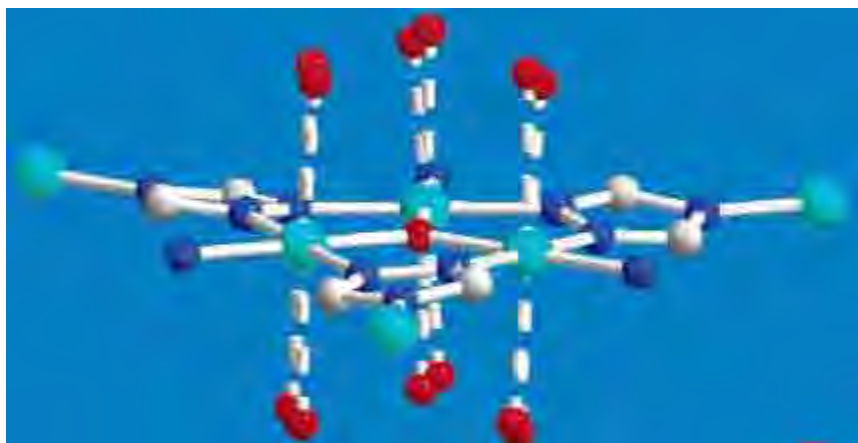


**Figura 12.** Estrutura cristalina do composto  $[M(\text{Htrz})_2(\text{NCS})_2]$  ( $M = \text{Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn}$ ).

A coordenação em ponte *exo-bidentada* através de *N1,N4* do ânion triazolato foi observada em *trans*--{[(NH<sub>2</sub>Me)<sub>2</sub>Pt(mecyt)<sub>2</sub>Pd]<sub>2</sub>(μ-trz)}(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>17</sup> e no polímero helicoidal [Ag(trz)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>n</sub><sup>16</sup>.

#### 1.2.4 - Coordenação em ponte *N1,N2,N4*

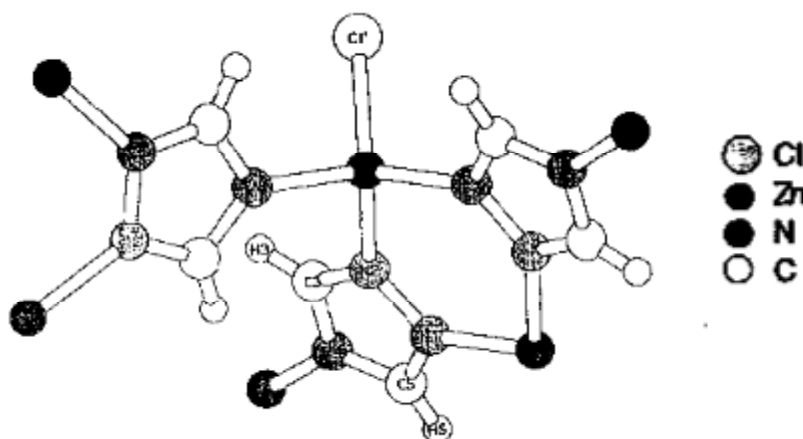
O 1,2,4-triazol aniônico é encontrado nos sistemas planares onde conecta três íons metálicos. Este tipo de coordenação é uma combinação dos modos *N1,N2* e *N2,N4*. Um exemplo típico deste modo de coordenação encontra-se no composto {[Cu<sub>3</sub>(μ<sub>3</sub>-O)(μ<sub>3</sub>-trz)(OH)(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sub>n</sub> (Figura 13) descrito no trabalho de Ding *et al.*<sup>18</sup>.



**Figura 13.** Fórmula estrutural do polímero {[Cu<sub>3</sub>(μ<sub>3</sub>-O)(μ<sub>3</sub>-trz)(OH)(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sub>n</sub>.

Código das esferas: branca = carbono; vermelha = oxigênio; azul = nitrogênio; ciano = cobre.

No composto [Zn(trz)Cl] preparado por Krober *et al.*, obtido através da reação entre ZnCl<sub>2</sub> e Htrz, o ânion triazolato liga-se à átomos de zinco através de seus três nitrogênios, conduzindo a uma estrutura de camadas<sup>19</sup>. (Figura 14)



**Figura 14.** Representação estrutural do composto [Zn(trz)Cl].

### 1.3 - A química de coordenação de complexos triazólicos de Pd(II).

Apesar da química de coordenação dos triazóis estar bastante desenvolvida, investigações envolvendo os complexos de Pd(II) ainda são escassas na literatura. Pichierri *et al.*<sup>20</sup> sintetizaram e caracterizaram cristalograficamente o complexo heterotetrametálico *trans*-{[(NH<sub>2</sub>Me)<sub>2</sub>Pt(mecyt)<sub>2</sub>Pd]<sub>2</sub>(μ-trz)}(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Figura 15) em que o ânion triazolato atua como ponte dupla do tipo N1,N4 entre os átomos de paládio e de platina.

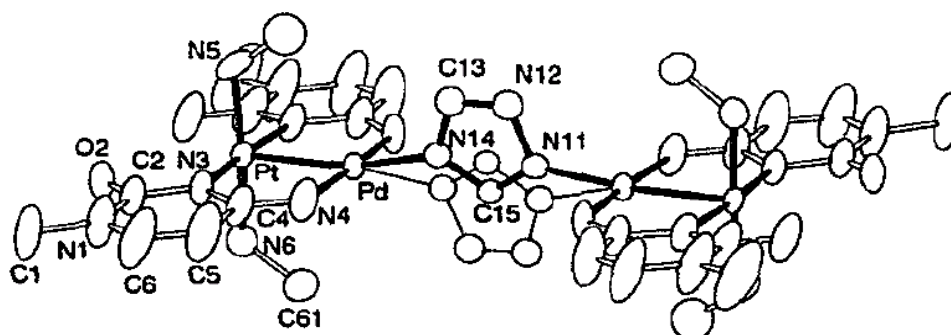


Figura 15. Fórmula estrutural do composto *trans*-{[(NH<sub>2</sub>Me)<sub>2</sub>Pt(mecyt)<sub>2</sub>Pd]<sub>2</sub>(μ-trz)}(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.

Complexos binucleares de fórmula geral [M<sub>2</sub>(μ-trz)<sub>2</sub>(L<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] (M = Rh, Ir, Pd; L = ½ diolefinas, PPh<sub>3</sub>, CO) foram preparados por Oro *et al.*<sup>19</sup>. A reação entre alguns destes compostos contendo ródio como centro metálico frente aos dímeros [M<sub>2</sub>(μ-Cl)<sub>2</sub>(L<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] (M = Rh, Ir, Pd) conduziram à obtenção de espécies polimetálicas do tipo [Rh<sub>2</sub>M<sub>2</sub>(μ<sub>3</sub>-trz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(L<sub>2</sub>)<sub>4</sub>] (Figura 16).

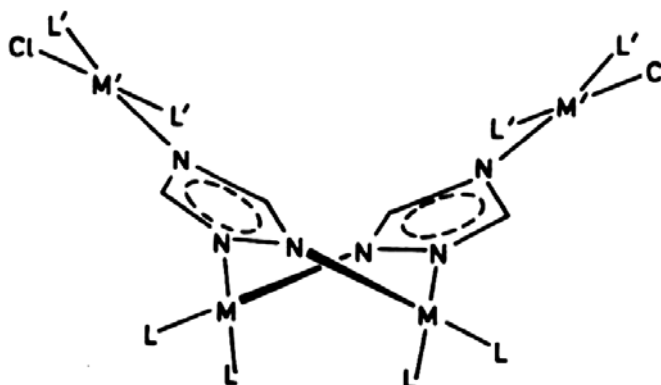


Figura 16. Fórmula estrutural do composto [Rh<sub>2</sub>M<sub>2</sub>(μ<sub>3</sub>-trz)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(L<sub>2</sub>)<sub>4</sub>] (M = Rh, Ir, Pd; L = ½ diolefinas, PPh<sub>3</sub>, CO).

No trabalho de Grap *et al.*<sup>20</sup> quatro complexos binucleares com 1,2,4-triazol foram sintetizados, suas estruturas foram determinadas e discutidas com base em seus espectros vibracionais. O diagrama esquemático ilustrando as reações efetuadas entre o ligante 1,2,4-triazol e compostos de Pd(II) é apresentado na Figura 17.

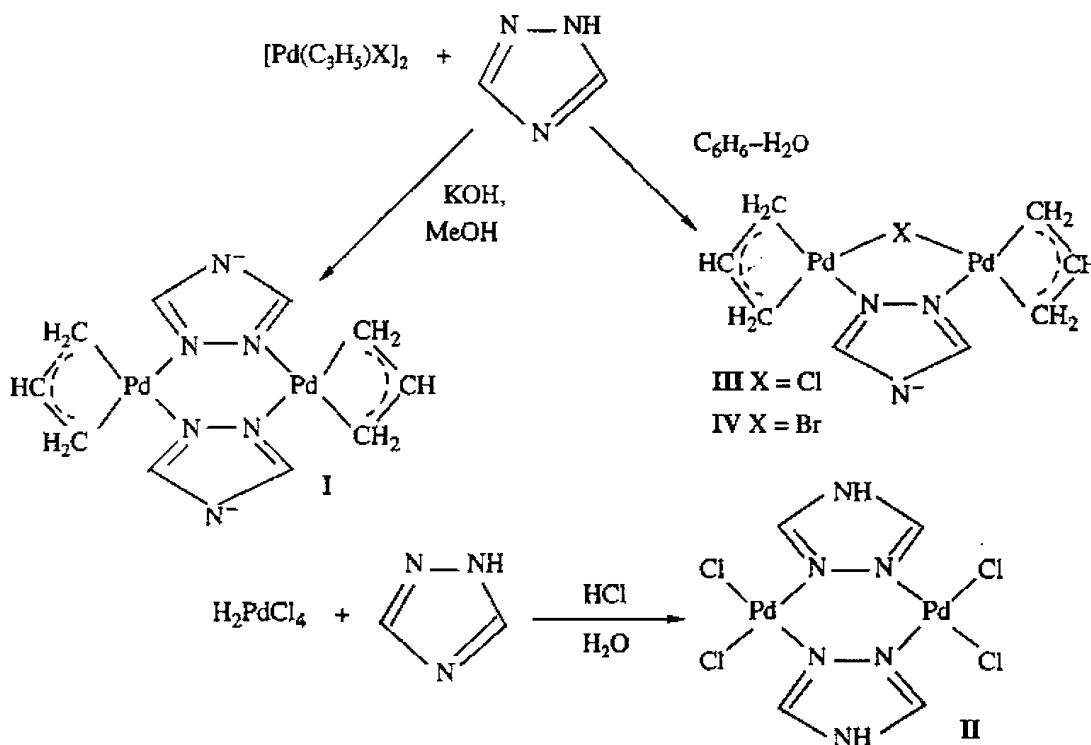


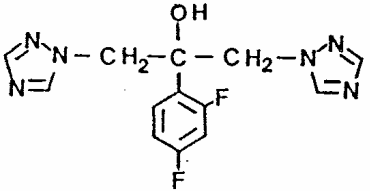
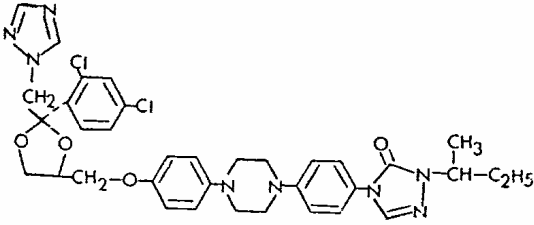
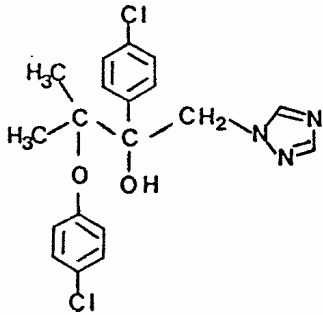
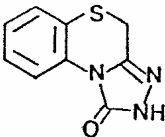
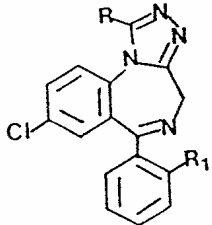
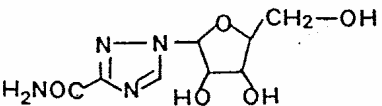
Figura 17. Diagrama esquemático da interação do 1,2,4-triazol com compostos de Pd(II).

#### 1.4 – Atividade biológica de complexos triazólicos.

Nos últimos anos os triazóis têm sido utilizados intensivamente tanto como produtos farmacêuticos quanto como produtos químicos agrícolas. A Tabela 2 agrupa os principais medicamentos derivados de s-triazóis<sup>21</sup>.



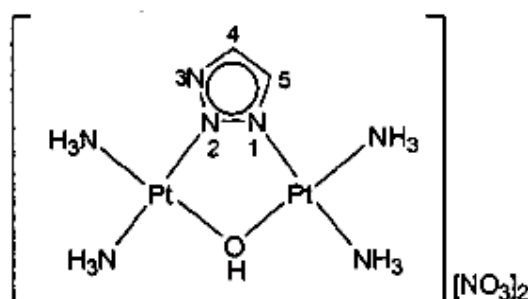
Tabela 2. Medicamentos derivados de s-triazol.

Estrutura	Nome	Atividade
	Fluconazol (Triflucan)	Antifúngica
	Itrazonazol	Antifúngica tripanossomicida
	BAY-P6617	Antimicótica, tripanossomicida
	IDPH-791	Miorelaxante
 <p>a) <math>R = CH_2-N(CH_3)_2</math>; <math>R_1 = H</math>  b) <math>R = CH_3</math>; <math>R_1 = Cl</math>  c) <math>R = H</math>; <math>R_1 = H</math></p>	a) Adinazolan (Deracyn)  b) Triazolan (Halcion)  c) Estazolan (Virasole)	Antidepressivo  Sedativa, anticonvulsivante  Sedativa, hipnótica
	Virasol (Virasole)	Antiviral

No que diz respeito a complexos bioativos contendo este ligante, Nomiya *et al.*<sup>22</sup> sintetizaram e testaram a atividade biológica de complexos de ouro(I) de fórmula geral  $[\text{Au}(\text{L})(\text{PPh}_3)]$  (L = pirazol, triazol, imidazol). Os compostos apresentaram atividade seletiva e efetiva frente a duas bactérias *Gram*-positivas (*B. subtilis*, *S. Aureus*) e atividade modesta frente à levedura *S. cerevisiae*.

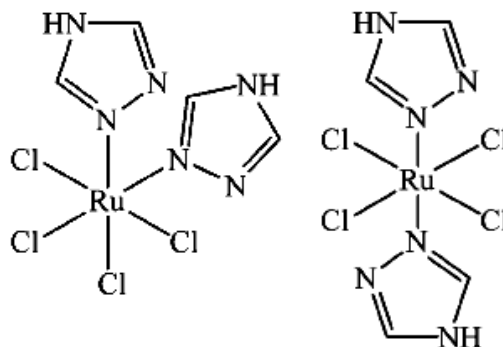
O polímero de coordenação  $[\text{Ag}(\text{trz})]_n$  apresentou um amplo espectro de atividade contra as bactérias *E. coli*, *B. subtilis*, *S.aureus* e *P. aeruginosa*, as leveduras *C. albicans* e *S. cerevisiae* e os bolores *A. niger* e *P. citrinum*<sup>16</sup>.

Além das propriedades bactericidas, compostos triazólicos também têm demonstrado atividade antitumoral promissora. Por exemplo, o composto  $[\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2]_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-1,2,3-trz})(\text{NO}_3)_2$  (Figura 18) foi testado *in vitro* frente à linhagem de células humanas cancerosas MCF-7 (câncer de bexiga), demonstrando citotoxicidade efetiva 26 vezes superior à da cisplatina<sup>23</sup>.



**Figura 18.** Fórmula estrutural do complexo  $[\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2]_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-1,2,3-trz})(\text{NO}_3)_2$ .

Complexos de Ru(III) contendo 1,2,4-triazol foram sintetizados através da reação entre  $\text{RuCl}_3$  e excesso de Htrz. Os isômeros  $(\text{H}_2\text{trz})[\text{cis-RuCl}_4(\text{Htrz})_2]$  e  $(\text{H}_2\text{trz})[\text{trans-RuCl}_4(\text{Htrz})_2]$  (Figura 19) foram testados *in vitro* frente às células humanas cancerosas SW480, HT29 (câncer de cólon) e SK-BR-3 (câncer de mama). O estudo revelou que ambos os compostos exibiram atividade antiproliferativa, além de serem significativamente mais solúveis em água do que os derivados do indazol  $(\text{Hind})[\text{cis-RuCl}_4(\text{ind})_2]$ , o que os potencializa para o desenvolvimento de drogas anticancerígenas<sup>23</sup>.



**Figura 19.** Fórmula estrutural dos complexos  $(H_2trz)[cis-RuCl_4(Htrz)_2]$  e  $(H_2trz)[trans-RuCl_4(Htrz)_2]$ .

### 1.5 – O papel dos macrófagos e o sistema imunológico

As propriedades farmacológicas de um número crescente de complexos inorgânicos são avaliadas constantemente com o objetivo de alcançar curas para várias enfermidades. A diversidade de compostos de coordenação e organometálicos permite não só investigar novos quimioterápicos contra diversos tipos de câncer, como o tratamento para outras doenças como a artrite, hipertensão, diabetes mellitus, desordens psiquiátricas, além de serem empregados como agentes antimicrobianos e inibidores de metaloenzimas. Portanto, a compreensão da química envolvida nos mecanismos de ação de espécies inorgânicas é de suma importância para os estágios iniciais da formulação de novas drogas. Além disso, análises empíricas e racionais são cruciais na seleção e desenvolvimento de compostos promissores<sup>23</sup>. No contexto atual, a compreensão do funcionamento de alguns dos componentes do sistema imunológico é também de igual importância, com a finalidade de corroborar suas ações com a atividade das substâncias sob investigação, e em caso de êxito, realizar uma terapia combinada<sup>24,25</sup>.

Nos mamíferos, a imunidade inata é atribuída a dois tipos de glóbulos brancos conhecidos: os granulócitos e os macrófagos. Estas células, assim como outras, têm como progenitoras as células-tronco hematopoiéticas da medula óssea<sup>24</sup>. Efetivamente elas policiam o corpo, sendo capazes de mover-se através dos espaços intercelulares, circulando no sangue e num sistema especializado de vasos, denominado sistema linfático. Elas combatem uma ampla variedade de bactérias, sem exigir exposição prévia às mesmas, atuando do mesmo modo em todos os indivíduos normais.

Os macrófagos peritoneais de camundongos oferecem vantagens especiais como uma ferramenta experimental. Camundongos inaptos e congênitos

são uma fonte disponível de células diplóides geneticamente homogêneas, podendo ser mantidas sob condições de cultivo, com uma população celular uniforme e estável que não sofre síntese de DNA ou mitose *in vitro*. Ao contrário de muitos outros tipos de células, os macrófagos permanecem diferenciados e continuam a expressar as características específicas das células na cultura, portanto prestando-se a estudos de controle de crescimento celular e diferenciação<sup>23-25</sup>.

Os macrófagos constituem um dos principais componentes do sistema imunológico e são as primeiras células a serem ativadas para participar de uma resposta imunológica, propriamente dita, quando o organismo é exposto a fatores exógenos, como por exemplo bactérias, vírus, fungos, venenos, dentre outros. Estas células podem ser ativadas, portanto, por uma variedade de estímulos e suas principais funções incluem fagocitose das partículas estranhas, produção de citocinas e de mediadores químicos<sup>23-24</sup> organizados durante a fagocitose, tais como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o radical NO•<sup>24</sup>.

### **1.5.1 - Resposta imunológica**

A resposta imunológica constitui-se de mecanismos de defesa desde a prevenção e combate a infecções até a sobrevivência do hospedeiro mediante identificação e eliminação de células aberrantes que podem originar neoplasias. Qualquer desafio à integridade do indivíduo, tais como substâncias irritantes, toxinas, agentes infecciosos e células neoplásicas ativam os mecanismos imunológicos apropriados incluindo inflamação, fagocitose, síntese de anticorpos ou ativação de linfócitos T com liberação de citocinas<sup>26</sup>.

Quando apropriadamente ativadas, linhagens de monócitos e macrófagos podem destruir células nucleadas de mamíferos extracelularmente<sup>27</sup>. A atividade citotóxica é exercida preferencialmente sobre células neoplásicas em relação às normais. Os macrófagos apresentam uma marcante capacidade de distingui-las, provavelmente via moléculas de superfície. A expressão ótima da atividade tumoricida dos macrófagos normalmente requer contato entre o alvo celular e a célula efetora, exceto nos casos de células tumorais extremamente suscetíveis à lise por mediadores solúveis liberados por fagócitos mononucleares<sup>28,29</sup>.

A citotoxicidade mediada por macrófagos pode, portanto, depender de mecanismos envolvendo as membranas das células-alvo, dos macrófagos ou de

---

ambos<sup>30</sup>. O contato entre células-alvo e macrófagos representa uma firme ligação entre estas células e provavelmente é o primeiro passo na destruição citolítica dessas<sup>31</sup>.

### 1.5.2 - Ativação de macrófagos mediada por compostos de paládio e platina

O *cis*-diamindicloroplatina(II) (cisplatina) é um composto de coordenação hidrossolúvel<sup>32</sup> que teve a sua capacidade antitumoral estabelecida em 1970 por Rosenberg *et al.*<sup>33–36</sup>. Desde então, tem sido usada no tratamento de vários tipos de cânceres. Os efeitos colaterais, a resistência intrínseca e a adquirida limitam o perfil organotrópico da droga e nestes casos outras drogas são utilizadas como a oxaliplatina e a carboplatina<sup>37</sup> (Figura 19).

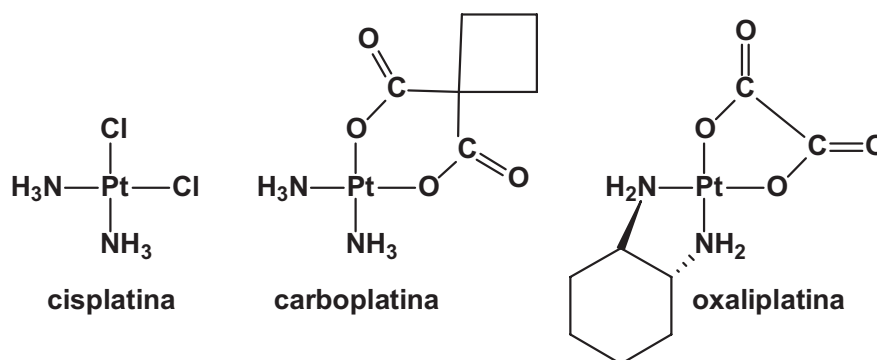


Figura 20. Fórmula estrutural das drogas antitumorais a base de Pt(II) de uso clínico.

A Cisplatina foi aprovada para comercialização em 1978. Após a administração, a Cisplatina atravessa a membrana celular. Uma vez dentro da célula, a molécula sofre hidrólise, e os grupos cloreto são substituídos por grupos hidroxila, dando origem a forma ativa que pode ligar-se a ácidos nucleicos ou proteínas. Assim, a Cisplatina inibe a replicação do DNA, transcrição do RNA e a síntese de Proteínas. A droga forma ligações cruzadas inter e intrafitas em seqüências específicas de bases nitrogenadas do DNA e a extensão destas ligações correlaciona-se bem com seus níveis de citotoxicidade. A Cisplatina é uma droga imunossupressora e radiosensibilizadora. Este mecanismo de ação explica tanto o seu efeito terapêutico como o efeito tóxico em tecidos normais.

Vários compostos análogos à cisplatina têm sido testados, mas é estimado que mais de 10.000 compostos precisam ser triados a fim de se obter uma nova

droga efetiva contra o câncer<sup>38</sup>.

Muitos autores demonstraram que a cisplatina também pode ser usada como um modificador da resposta biológica na modulação da resposta imune celular contra neoplasias<sup>39–44</sup>. Macrófagos de murinos tratados com cisplatina adquirem uma capacidade maior em lisar células tumorais *in vitro*, produzir uma quantidade maior de interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF), reativos intermediários do oxigênio (ROI), reativos intermediários do nitrogênio (RNI), lisozima e arginase<sup>45</sup>.

Recentemente, organometálicos de Pd(II) de fórmula geral [Pd(dmba)X(dppp)] {X= Cl, N<sub>3</sub>, NCO, NCS} foram testados pelo nosso grupo de pesquisa na ativação de macrófagos murinos *in vitro*<sup>46</sup>. Todos os complexos testados estimularam os macrófagos a liberar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo a dose resposta inferior àquela provocada pelo Zimosan (300 nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ 2.10<sup>5</sup> macrófagos).

---

## 2. OBJETIVOS

O trabalho contempla a síntese, a caracterização espectroscópica e o estudo do comportamento térmico de complexos de Pd(II) contendo o ligante 1,2,4-triazol. A preparação dos complexos triazólicos envolveu também a utilização do ligante trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>) sob diferentes condições experimentais. Ênfase foi dada à investigação da influência de diversas rotas sintéticas no tipo de complexo formado.

Uma segunda etapa do trabalho envolveu a realização de ensaios biológicos no tocante à determinação da viabilidade celular de macrófagos de camundongos sadios pela técnica de MTT para os compostos [PdCl<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> e [PdBr<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub>. Foram realizados, ainda, experimentos com os compostos [Pd<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>(Htrz)<sub>2</sub>], [Pd<sub>2</sub>Br<sub>4</sub>(Htrz)<sub>2</sub>] e [PdI<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> no que diz respeito a uma possível inibição do crescimento da *Mycobacterium tuberculosis* causadora da tuberculose.

## 3. PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 Materiais

Os reagentes (p.a.) foram utilizados sem purificação prévia.

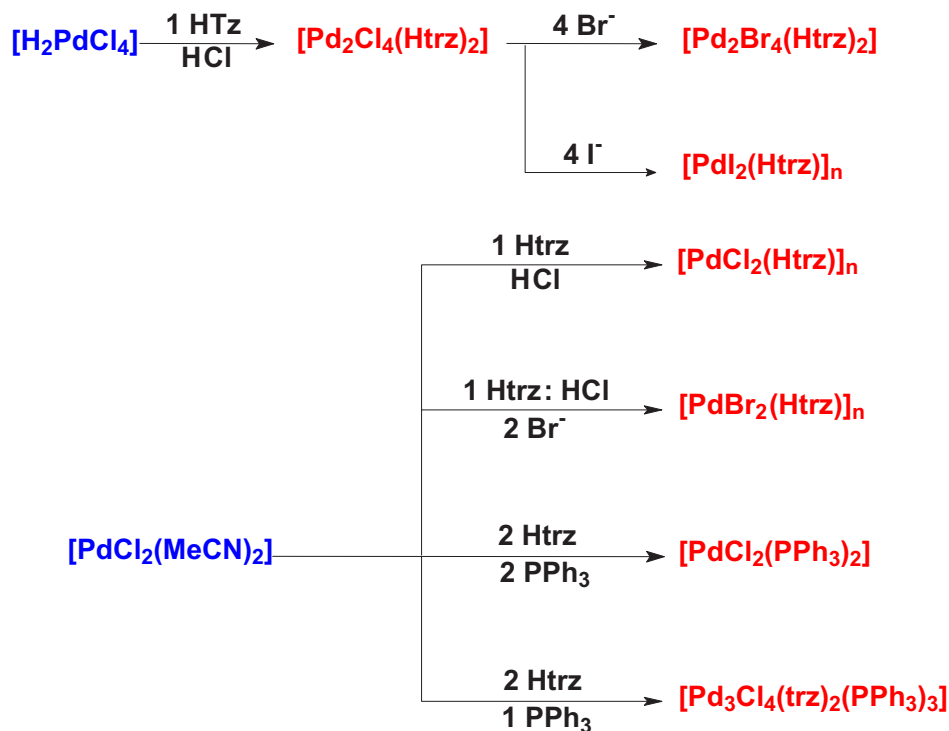
Reagentes	Procedência	Solventes	Procedência
1,2,4-triazol	Acros	Clorofórmio	Baker
PPh <sub>3</sub>	Merck	Álcool etílico	Merck
HCl	Mallinckrodt	Álcool metílico	Synth
PdCl <sub>2</sub>	Degussa S.A.	Pentano	Synth
KBr	Merck	Éter etílico	Synth
KI	Merck	DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Aldrich

### 3.2 Metodologia de Síntese

Os compostos de paládio (II) são estáveis ao ar e, portanto, não requerem o uso de técnicas específicas nem de atmosfera inerte em suas sínteses, manuseio e armazenamento.

A preparação dos complexos de Pd(II) envolveu a utilização de dois precursores. Utilizou-se um complexo de Pd(II) preparado conforme o procedimento descrito por Grap *et al.*<sup>20</sup>, a partir do qual átomos de cloro de sua esfera de coordenação fossem substituídos pelos haletos bromo e iodo. Outra rota sintética utilizada foi a reação de substituição da acetonitrila na esfera de coordenação do precursor [PdCl<sub>2</sub>(MeCN)<sub>2</sub>] pelos ligantes 1,2,4-triazol (Htrz) e trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>).

A Figura 21 ilustra as representações esquemáticas das principais rotas sintéticas utilizadas neste trabalho.



**Figura 21.** Diagrama esquemático das rotas sintéticas utilizadas neste trabalho para a preparação de compostos triazólicos de Pd(II).

### 3.3 – Preparação dos Complexos

#### 3.3.1 – Preparação do composto $[Pd_2Cl_4(Htrz)_2]$ .

Em um erlenmeyer de 50 mL de capacidade contendo 2,0 mL de uma mistura  $H_2O : HCl$  (1:1) foram adicionados 0,1772 g ( $9,992 \times 10^{-4}$  mol) de  $PdCl_2$ . A esta solução foi gotejada uma solução contendo 0,1044 g ( $1,505 \times 10^{-3}$  mol) de triazol em 15 mL de água destilada. A adição do ligante triazol conduziu à formação de uma suspensão de cor creme. A agitação magnética foi mantida durante  $\frac{1}{2}$  hora a 50 °C. O sólido creme foi isolado a partir de uma filtração simples, seguido por sucessivas lavagens com água, etanol, éter e seco sob vácuo à 60°C. O composto é solúvel em DMSO, insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos.

#### 3.3.2 – Preparação do composto $[Pd_2Br_4(Htrz)_2]$ .

Em um erlenmeyer de 50 mL de capacidade contendo 10,0 mL de metanol foram adicionados 0,1000 g ( $2,029 \times 10^{-4}$  mol) de  $[Pd_2Cl_4(Htrz)_2]$ . A esta suspensão foi



---

---

gotejada uma solução contendo 0,0990 g ( $8,319 \times 10^{-4}$  mol) de KBr em 5 mL de metanol. A adição do composto iônico conduziu à formação de uma suspensão amarelo-alaranjada. A agitação magnética foi mantida durante ½ hora a 50 °C. O sólido creme-alaranjado foi isolado a partir de filtração simples, seguido por sucessivas lavagens com metanol, éter e seco sob vácuo à 60°C. O composto é solúvel em DMSO, insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos.

### **3.3.3 – Preparação do composto $[\text{PdI}_2(\text{Htrz})]_n$ .**

Em um erlenmeyer de 50 mL de capacidade contendo 10,0 mL de metanol foram adicionados 0,1000 g ( $2,029 \times 10^{-4}$  mol) de  $[\text{Pd}_2\text{Cl}_4(\text{Htrz})_2]$ . A esta suspensão foi gotejada uma solução contendo 0,1381 g ( $8,319 \times 10^{-4}$  mol) de KI em 5 mL de metanol. A adição do composto iônico conduziu à formação de uma suspensão marrom. A agitação magnética foi mantida durante ½ hora a 50 °C. O sólido marrom foi isolado a partir de filtração simples, seguido por sucessivas lavagens com metanol, éter e seco sob vácuo à 60°C. O composto é pouco solúvel em DMSO, insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos.

### **3.3.4 – Preparação do polímero $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$ .**

Em um erlenmeyer de 50 mL de capacidade contendo 2,0 mL de uma mistura  $\text{H}_2\text{O} : \text{HCl}$  (1:1) foram adicionados 0,0878 g ( $1,271 \times 10^{-3}$  mol) de triazol. A esta solução foram adicionados 0,3000 g ( $1,156 \times 10^{-3}$  mol) de  $[\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2]$  sólido e 15 mL de água destilada. A adição do complexo conduziu à formação de uma suspensão amarela. A agitação magnética foi mantida durante ½ h a 50 °C. O sólido amarelo foi isolado a partir de filtração simples, seguido por sucessivas lavagens com água, etanol, éter e seco sob vácuo à 60°C. O composto é pouco solúvel em DMSO, insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos.

### **3.3.5 – Preparação do polímero $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$ .**

Em um erlenmeyer de 50 mL de capacidade contendo 2,0 mL de uma mistura  $\text{H}_2\text{O} : \text{HCl}$  (1:1) foram adicionados 0,0878 g ( $1,271 \times 10^{-3}$  mol) de triazol. A esta solução foram adicionados 0,3000 g ( $1,156 \times 10^{-3}$  mol) de  $[\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2]$  sólido e foi gotejada uma solução contendo 0,3440 g ( $2,891 \times 10^{-3}$  mol) de KBr em 15 mL de água destilada. A adição do complexo e do composto iônico conduziu à formação de uma suspensão laranja. A agitação magnética foi mantida durante ½ h a 50 °C. O

---

---

sólido amarelo-alaranjado foi isolado a partir de filtração simples, seguido por sucessivas lavagens com água, etanol, éter e seco sob vácuo à 60°C. O composto é pouco solúvel em DMSO, insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos.

### **3.3.6 – Preparação do composto [PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>].**

Em um erlenmeyer de 50 mL de capacidade contendo 20,00 mL de clorofórmio foram adicionados 0,0500 g ( $1,93 \times 10^{-4}$  mol) de [PdCl<sub>2</sub>(MeCN)<sub>2</sub>]. A esta solução foi gotejada uma solução contendo 0,0280 g ( $4,05 \times 10^{-4}$  mol) de triazol em 5 mL de clorofórmio e uma solução contendo 0,1062 g ( $4,05 \times 10^{-4}$  mol) de trifenilfosfina em 5 mL de clorofórmio. A adição do heterociclo e da trifenilfosfina conduziu à formação de uma solução amarelo-alaranjada. A agitação magnética foi mantida durante 1 h e o composto foi precipitado adicionando-se pentano sobre a solução-mãe concentrada, obtendo-se um sólido amarelo-gema. O complexo foi isolado a partir de filtração simples, seguido por sucessivas lavagens com pentano e seco sob vácuo. O sólido é solúvel em clorofórmio, insolúvel em etanol e água.

### **3.3.7 – Preparação do composto [Pd<sub>3</sub>Cl<sub>4</sub>(trz)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>].**

Em um erlenmeyer de 50 mL de capacidade contendo 20,00 mL de clorofórmio foram adicionados 0,0500 g ( $1,93 \times 10^{-4}$  mol) de [PdCl<sub>2</sub>(MeCN)<sub>2</sub>]. A esta solução foi gotejada uma solução contendo 0,0280 g ( $4,05 \times 10^{-4}$  mol) de triazol em 5 mL de clorofórmio e uma solução contendo 0,0556 g ( $2,12 \times 10^{-4}$  mol) de trifenilfosfina em 5 mL de clorofórmio. A adição do heterociclo e da trifenilfosfina conduziu à formação de uma solução castanha. A agitação magnética foi mantida durante 1 h e a solução adquiriu uma coloração laranja. O composto foi precipitado adicionando-se pentano sobre a solução-mãe concentrada, obtendo-se um sólido creme. O complexo foi isolado a partir de filtração simples, seguido por sucessivas lavagens com pentano e seco sob vácuo à 60°C. O composto é solúvel em clorofórmio, insolúvel em etanol e água.

## **3.4 - Ensaio de Atividade Imunológica.**

Os ensaios de atividade imunológica foram realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, em colaboração com a Profa. Dra. Iracilda Z. Carlos e a Dra. Sandra R. Ananias

---

---

---

### **3.4.1 - Preparação das soluções dos compostos Htrz, $[PdCl_2(Htrz)]_n$ , $[PdBr_2(Htrz)]_n$ .**

Todas as dispersões foram preparadas momentos antes da aplicação das amostras nos testes imunológicos. Os compostos foram suspensos de DMSO e diluídos em meio de cultura RPMI com concentração máxima de 1% v/v de DMSO / meio de cultura. As diluições foram realizadas a partir da solução-mãe empregando-se pipetadores automáticos com capacidades variando de 1000  $\mu$ L a 100  $\mu$ L e de 100  $\mu$ L a 0,5  $\mu$ L e ponteiros descartáveis apropriadas para cada pipetador.

#### **3.4.1.1 - Preparação da solução-mãe do Htrz.**

Um volume de 7500  $\mu$ L da solução-mãe do ligante livre 1,2,4-triazol (Htrz) foi obtido dissolvendo-se  $1,1 \times 10^{-2}$  g de Htrz em 75  $\mu$ L de DMSO e posterior diluição com 7425  $\mu$ L de meio de cultura RPMI. Foram empregadas concentrações de 200, 100, 90, 80, 70, 60 e 50  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup> para determinação da viabilidade celular frente a culturas de macrófagos.

#### **3.4.1.2 - Preparação da solução-mãe do complexo $[PdCl_2(Htrz)]_n$ .**

Um volume de 5000  $\mu$ L da solução-mãe do  $[PdCl_2(Htrz)]_n$  foi obtido dissolvendo-se  $2,5 \times 10^{-2}$  g de  $[PdCl_2(Htrz)]_n$  em 50  $\mu$ L de DMSO e posterior diluição com 4950  $\mu$ L de meio de cultura RPMI. Foram empregadas concentrações de  $5 \times 10^{-4}$ ,  $4 \times 10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ ,  $2,5 \times 10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$  mg. $\mu$ L<sup>-1</sup> para determinação da viabilidade celular frente a culturas de macrófagos.

#### **3.4.1.3 - Preparação da solução-mãe do complexo $[PdBr_2(Htrz)]_n$ .**

Um volume de 5000  $\mu$ L da solução-mãe do  $[PdBr_2(Htrz)]_n$  foi obtido dissolvendo-se  $2,5 \times 10^{-2}$  g de  $[PdBr_2(Htrz)]_n$  em 50  $\mu$ L de DMSO e posterior diluição com 4950  $\mu$ L de meio de cultura RPMI. Foram empregadas concentrações de  $5 \times 10^{-4}$ ,  $4 \times 10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ ,  $2,5 \times 10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$  mg. $\mu$ L<sup>-1</sup> para determinação da viabilidade celular frente a culturas de macrófagos.

### **3.4.2 - Animais**

Foram utilizados camundongos isogênicos Balb/C de 6 semanas, pesando entre 18 e 25 g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – campus de Araraquara. Os animais foram mantidos em

---

---

---

gaiolas de policarbonato, com água e ração Purina® *ad libitum* em local climatizado (Temperatura =  $23 \pm 2^\circ \text{C}$ , Umidade relativa do ar =  $56 \pm 2\%$ ), com controle de claro e escuro a cada período de 12 horas.

### **3.4.3 - Obtenção das células do exsudato peritoneal**

Os procedimentos foram seguidos conforme descrito na literatura, com pequenas modificações. Os animais foram previamente inoculados intraperitonealmente com 3,0 mL de tioglicolato de sódio a 3%. Depois de decorridos 3 a 4 dias de estímulo, eles foram sacrificados por imersão em atmosfera de  $\text{CO}_2$ . Logo em seguida expôs-se o peritônio, abrindo-se a pele do animal, no qual inoculou-se 5,0 mL de solução salina tamponada de fosfato estéril com pH 7,2 e fez-se leve massagem manual no peritônio. As células foram colhidas do peritônio com a mesma seringa e dispensadas em tubo cônico estéril para o preparo da suspensão celular. Esta suspensão foi centrifugada de 3 a 4 vezes a 2000 rpm durante 5 min, separando assim, as células do exsudato peritoneal. As células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino, 1U/mL de estreptomicina, 1U/mL de penicilina e  $5 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol, sendo então assim designado como RPMI Completo (RPMI-1640-C). Em seguida, as células foram contadas em câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco), empregando corante vital líquido de *Lazarus*, sendo ajustado à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL em meio de RPMI Completo para os testes de viabilidade celular.

### **3.4.4 - Técnica Colorimétrica do MTT-tetrazólio**

As técnicas utilizadas na determinação da toxicidade geral de um agente químico normalmente avaliam viabilidade ou condições funcionais celulares. Testes colorimétricos versáteis e quantitativos foram idealizados utilizando um micro fotocolorímetro multicanal que mede um grande número de amostras. Estes testes utilizam um substrato incolor que é modificado para produto corado pelas células vivas, mas não por células mortas ou através de uma modificação em constituintes do meio de cultivo<sup>47</sup>.

A técnica colorimétrica do MTT-tetrazólio desenvolvida por Mosmann em 1983<sup>48</sup>, tem sido empregada na avaliação da viabilidade de células do sistema imune<sup>49,50</sup>. O teste do MTT é baseado na redução do brometo de 3-(4,5-

---

---

dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, por enzimas microsomais e pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial de células viáveis, gerando um produto insolúvel de cor azul, a formazana<sup>51 54</sup>, permitindo avaliar a relação dose-efeito de diversas substâncias sobre vários tipos celulares<sup>55</sup>.

#### **3.4.4.1 Determinação da viabilidade celular**

Da suspensão de macrófagos peritoneais em meio RPMI, ajustados a uma concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL foram adicionados 100  $\mu$ L em cada cavidade de placas para cultivo de tecidos de 96 cavidades (Corning). Sobre essas células, foram adicionados em triplicata, 100  $\mu$ L das suspensões dos compostos Htrz em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$  e  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$  em  $\text{mg. } \mu\text{L}^{-1}$  nas diferentes concentrações, a serem testadas e 100  $\mu$ L de RPMI completo como controle de células. A incubação das placas foi feita durante 24 horas em estufa a  $37^\circ \text{C}$ , com tensão constante de 7,5% de  $\text{CO}_2$ . Após esse período, os sobrenadantes das culturas foram descartados e 100  $\mu$ L de uma solução de MTT diluído em tampão PBS a 5mg/mL e posteriormente em meio RPMI-1640-C na proporção 1:5, foram adicionados em cada cavidade da placa, que foi incubada por 3 horas ( $37^\circ \text{C}$ , 7,5 % de  $\text{CO}_2$ ). O sal de tetrazólio, nessas condições, é metabolizado pelas proteinases mitocondriais das células vivas formando cristais de formazana. Após a incubação, foi adicionado 100  $\mu$ L de isopropanol para solubilizar os cristais. A leitura da absorbância foi realizada no fotocolorímetro multicanal UV-Vis Multiscan Ascent (Labsystems) a 620 nm.

Os valores correspondentes à concentração dos compostos que reduz em 50% a viabilidade celular (IC50), foram quantificados graficamente via regressão linear de uma curva dose-resposta (Concentração da Amostra x Viabilidade Celular) obtida através de análise de regressão linear com limite de confiança de 95% e o IC50 definido através de equação da reta gerada utilizando programa Microcal<sup>TM</sup> Origin<sup>TM</sup> versão 5.0<sup>56</sup>.

#### **3.4.5 Determinação de Peróxido de Hidrogênio**

A produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi determinada segundo o método descrito por Pick e Keisari<sup>57</sup> e adaptado por Pick e Mizel<sup>58</sup>. Foram acrescentados 100 $\mu$ L de uma suspensão de macrófagos ajustados à concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL em tampão fosfato contendo 140 mM de NaCl, 10 mM de tampão fosfato de potássio

---

(pH7,0), 5,5 mM de dextrose, 0,56 mM de vermelho de fenol e peroxidase de raiz forte, tipo II (0,01 mg/mL, Sigma), em placas de cultura de tecidos de 96 cavidades.

A cada poço de 96 cavidades, foram acrescentados 100 µL da suspensão celular juntamente com 50 µL dos compostos e da *cis*-Pt na concentração do IC<sub>50</sub> de 24 ou 48h por 1h a 37°C com estufa (Forma Scientific, EUA) com tensão constante de 7,5% de CO<sub>2</sub>. Como controles negativo foram utilizados somente células em solução completa de vermelho de fenol adicionados de 50 µL de uma solução de PMA a 0,2 µM (Sigma Chemical. Co., EUA). Decorrido o prazo de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de NaOH 5M (Sigma Chemical. Co., EUA), e a seguir foi realizada leitura em colorímetro UV/visível de microplacas (Mutiskan Ascent Labsystems) a 620nm. As amostras foram analisadas em triplicata. Os resultados foram expressos em nanomol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/2x10<sup>5</sup> células peritoneais, a partir de curva padrão previamente estabelecida, constituída de concentrações molares conhecidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão vermelho de fenol.

#### **3.4.6 Determinação de Óxido Nítrico (NO)**

O óxido nítrico, quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura, foi medido colorimetricamente utilizando o reagente de Griess com NaNO<sub>2</sub> como padrão (Green *et al.*<sup>59</sup>). A suspensão celular foi ajustada a 5x10<sup>6</sup> células/mL em meio de RPMI-1640. Dessa suspensão celular foram adicionados 100 µL em placas de 96 cavidades estéreis (Corning Inc., EUA) a 37°C. Em algumas cavidades da placa, foram adicionados 100 µL dos compostos diluídos em meio RPMI-1640 e em outras 100 µL de meio RPMI-1640 à suspensão celular, como controle negativo e 100 µL de solução de LPS a 10 µg/mL (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4, Sigma Chemical. Co., EUA), como controle positivo. A placa assim constituída foi incubada por 24 horas em estufa a 37°C, com tensão constante de 7,5% de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific, EUA). Após a incubação foram retiradas alíquotas de 50 µL de cada amostra, transferida para uma outra placa não estéril e adicionados mais 50 µL de reagente de Griess, constituído de 0,1% de N-1-naftil-etilenodiamina e 1% de sulfamilamida em solução de ácido fosfórico a 2,5%. Após 10 minutos ao abrigo da luz à temperatura ambiente, as placas foram lidas em leitor de microplacas UV/Visível (Multiskan Ascent Labssystem) com filtro de 540 nm. A concentração de NO liberado foi calculada a partir de uma curva padrão previamente estabelecida

---

com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio em meio RPMI-1640. Os testes foram realizados em triplicatas e os valores expressos em micromols de NO/5x10<sup>6</sup> células.

### **3.4.7 Determinação da atividade inibitória dos compostos em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos quanto à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO.<sup>60</sup>**

#### **3.4.7.1 Quanto à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Os macrófagos (2x10<sup>6</sup> células/mL) foram incubados com 50µL de forbol miristato acetato (PMA) a 0,2µM e 50µL dos compostos na concentração do IC<sub>50</sub> de 24 ou 48 h durante 1 hora em estufa (Forma Scientific, EUA) a 37°C com tensão constante de 7,5% de CO<sub>2</sub>. A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi medida espectrofotometricamente conforme descrito no item 3.4.5.

#### **3.4.7.2 Quanto à produção de NO**

Os macrófagos (5x10<sup>6</sup> células/mL) foram incubados com 100µL de solução de LPS a 10µg/mL (Sigma Chemical Co., EUA) e 100µL dos compostos na concentração do IC<sub>50</sub> de 24 ou 48 h. A incubação foi feita por 24 ou 48 h em estufa (Forma Scientific, EUA) a 37°C com tensão constante de 7,5% de CO<sub>2</sub>. A produção de NO foi medida espectrofotometricamente através do acúmulo de nitrito no meio de cultura com a utilização do reagente de Griess de acordo com o item 3.4.6.

#### **3.4.7.3 Cálculo da porcentagem de inibição**

Foram calculadas as porcentagens de inibição mediante comparação com os controles negativos. Nos experimentos em que os compostos apresentaram efeitos inibitórios sobre a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO, a seguinte equação foi utilizada para o cálculo:

,

$$Inibição(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100, \text{ onde:}$$

<b>Testes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Testes de NO</b>
<b>A=</b> cultura celular + tampão fosfato incompleto + PMA composto (-)	<b>A=</b> cultura celular + RPMI-C + LPS
<b>B=</b> cultura celular + composto + PMA	<b>B=</b> cultura celular + composto + LPS

#### **3.4.7.4 Análise Estatística**

A análise e comparação dos resultados obtidos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA), sendo 5% o nível de significância adotado. Para a realização desta análise foi utilizado teste de Tukey por meio do programa Graph Pad Instat<sup>61</sup>.

### **3.5 – Ensaios de inibição do crescimento da *Mycobacterium tuberculosis*.**

#### **3.5.1 Testes Microbiológicos para Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)<sup>62</sup>**

Em colaboração com a Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP e Dra. Daisy Nakamura Sato do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, foram realizados ensaios microbiológicos com os complexos [Pd<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>(Htrz)<sub>2</sub>], [Pd<sub>2</sub>Br<sub>4</sub>(Htrz)<sub>2</sub>] e [PdI<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> com o intuito de determinar sua capacidade de inibir a reprodução da *Mycobacterium tuberculosis* causadora da tuberculose.

#### **3.5.2 Preparação do caldo 7H<sub>9</sub>**

Uma massa de 4,7 g do meio 7H<sub>9</sub> foi diluída em 900 mL de água destilada, acrescentando-se 2,0 mL de glicerol. Após homogeneização, o meio foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Após resfriamento, adicionou-se ao meio a mistura enriquecedora (OADC).

#### **3.5.3 Preparação do meio de LJ**

O meio de LJ é uma mistura preparada para proporcionar a produção das bactérias que são usadas nos testes. Ovos caipiras frescos, esterilizados com álcool 70%, foram quebrados e adicionados à base do meio, que possui a formulação apresentada na Tabela 3.



**Tabela 3.** *Formulação do meio LJ.*

<b>Componente</b>	<b>Massa (g) ou volume (mL)</b>
<i>Fosfato monopotássico</i>	2,5 g
<i>Sulfato de magnésio</i>	0,24 g
<i>Citrato de magnésio</i>	0,60 g
<i>L-asparagina</i>	3,6 g
<i>Água destilada</i>	600 mL
<i>Glicerol</i>	12,0 mL
<i>Corante verde malaquita</i>	0,40 g

A base do meio foi esterilizada a 120 °C durante 15 minutos. Após o resfriamento, 1000 mL de ovos caipiras foram adicionados. O meio foi transferido para tubos de rosca e coagulado a 85 °C por 40 minutos.

#### **3.5.4 Preparação da solução reveladora**

Foi preparada uma mistura 1:1 v/v contendo Alamar Blue (ACCUMED INTERNATIONAL) e solução de Tween 80 (INTERLAB) a 10%. Esta mistura foi preparada imediatamente antes da adição aos orifícios da microplaca.

#### **3.5.5 Preparação da suspensão bacteriana**

Foi transferida uma alçada cheia de bactérias, proveniente do meio de LJ, para um tubo de ensaio contendo esferas de vidro e 0,50 mL de água destilada estéril (120°C, em autoclave). Após agitação para a desagregação da massa celular, foi adicionado um volume adicional de 2,0 – 3,0 mL de água estéril. Após nova agitação, gotas desta suspensão foram transferidas para um outro tubo contendo água, até turvação equivalente à escala McFarland n<sup>o</sup> 1. A partir desta suspensão, foram feitas diluições sucessivas, conforme descrito a seguir: para uma diluição igual a 10<sup>-1</sup>, um volume de 0,50 mL desta suspensão foi transferido para um tubo contendo 4,50 mL de água estéril; para uma diluição igual a 10<sup>-2</sup>, foi transferido um volume de 0,50 mL da suspensão obtida anteriormente para outro tubo contendo 4,5 mL de água estéril e assim sucessivamente até obtenção das diferentes diluições da suspensão.

#### **3.5.6 Determinação da CIM em microplaca utilizando Alamar Blue como revelador**

A determinação da CIM frente às cepas padrões de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv foi realizada segundo técnica proposta por Franzblau<sup>66</sup>. Em uma

microplaca estéril BECTON DICKINSON de 96 orifícios, distribuídos em oito fileiras horizontais e doze verticais, foram depositados 200 µL de água destilada estéril em todos os orifícios da periferia da microplaca, para evitar a evaporação durante a incubação na estufa. Cada orifício recebeu um volume total igual a 200 µL entre o meio 7H<sub>9</sub>, o complexo sólido e a suspensão bacteriana. Os orifícios restantes foram usados para os controles necessários: controle do meio (200 µL de meio 7H<sub>9</sub>, sem bactérias), controle positivo (100 µL de meio 7H<sub>9</sub> + 100 µL de suspensão bacteriana) e controle da droga (150 µL de meio 7H<sub>9</sub> + 50 µL da droga a ser testada). As placas foram, então, seladas com parafilme e incubadas a 37 °C, e após o quinto dia de incubação, foram adicionados 25 µL do indicador azul de Alamar em cada um dos orifícios que continha o controle positivo.

### **3.5.7 *Leitura e obtenção dos resultados***

#### **3.5.7.1 *Método da microdiluição em placa***

A manutenção da cor azul nos orifícios é interpretada como ausência de crescimento bacteriano, enquanto que o desenvolvimento de uma coloração rósea, como presença de crescimento bacteriano. Isto significa que quando as bactérias aeróbicas estão vivas e, portanto, consumindo oxigênio molecular, o indicador azul de Alamar adquire a cor rosa, pois está em sua forma reduzida. Por outro lado, se ocorrer a inibição do crescimento bacteriano, o meio de cultura estará rico em O<sub>2</sub>, que irá, então, oxidar o indicador e este adquirirá a cor azul. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é, então, definida como a menor concentração da droga capaz de impedir a mudança de cor de azul para rosa.

#### **3.5.7.2 *Avaliação da ação bactericida ou bacteriostática***

Baseando-se nos valores de CIM obtidos após o período de experimentação, foi inoculada uma alçada da primeira solução, onde não foi observado crescimento bacteriano, em um tubo contendo o meio de LJ. Após o período de incubação necessário, foi observado o aparecimento ou a ausência de colônias de micobactérias.

---

## **4. MÉTODOS INSTRUMENTAIS**

### **4.1 – Análise Elementar**

As análises quantitativas dos elementos carbono, hidrogênio, nitrogênio foram efetuadas no analisador automático EA 1110 CHNS-O da CE-Instruments pertencente ao Instituto de Química de Araraquara – UNESP e no analisador automático Perkin-Elmer modelo 240 pertencente à Central Analítica do Instituto de Química da USP-(São Paulo).

### **4.2 – Intervalo de Fusão**

Intervalos de fusão foram determinados no aparelho Mettler FP-2, que alcança a temperatura máxima de 300 °C.

### **4.3 – Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho**

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no espectrofotômetro Nicolet Impact 400 (4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ ), utilizando pastilhas de KBr.

### **4.4 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear**

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro multinuclear Bruker, modelo AC-200, operando a 200 MHz para Hidrogênio, 50 MHz para carbono e 30 MHz para fósforo, utilizando-se  $\text{CDCl}_3$  ou  $\text{DMSO-d}_6$  para a dissolução das amostras. Os deslocamentos químicos obtidos são relativos ao TMS ( $^1\text{H}$ ),  $\text{H}_3\text{PO}_4$  80% e TMP ( $^{31}\text{P}$ ).

### **4.5 – Espectroscopia de Reflectância Difusa**

Os espectros de reflectância difusa para os compostos foram obtidos no espectrofotômetro Cary 5000, utilizando-se o acessório de reflectância difusa e como referência, óxido de magnésio.

### **4.6 – Análise Térmica**

As curvas termogravimétricas para os compostos de fórmula mínima  $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$  (onde X = Cl, Br e I) foram obtidas empregando-se os equipamentos da Shimadzu TGA-50 (TG). As curvas TG foram obtidas em cadinhos de platina para

---

amostra e referência, que foram aquecidas desde a temperatura ambiente até 900°C, obedecendo a uma razão de aquecimento de 20°C.min<sup>-1</sup> e ar sintético foi utilizado como atmosfera do forno, com vazão média de 100 mL.min<sup>-1</sup>.

As curvas termogravimétricas para os compostos [PdCl<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> e [PdBr<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> foram obtidas empregando-se os equipamentos da Mettler Toledo TG-50. As curvas TG foram obtidas em cadinhos de α-alumina para amostra e referência, que foram aquecidas desde a temperatura ambiente até 900°C, obedecendo a uma razão de aquecimento de 20°C.min<sup>-1</sup> e ar seco foi utilizado como atmosfera do forno, com vazão média de 100 mL.min<sup>-1</sup>.

#### **4.7 – Difratomia de Raios X.**

Na difratometria de raios X, foi utilizado um Difrátômetro Semens D 5000 utilizando-se tubo de cobre, submetido a 40 kV, corrente de 20 mA,  $\lambda_{\text{CuK}\alpha} = 1.544 \text{ \AA}$ . A amostra é colocada em suporte de vidro próprio do equipamento e exposta à radiação sob ângulos  $5^\circ \leq 2\theta \leq 70^\circ$ .

---

## 5. – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 – Considerações espectroscópicas no IV sobre 1,2,4-triazol e trifenilfosfina.

A Tabela 4 contempla dados de espectroscopia vibracional no IV e respectivas atribuições com base nos trabalhos de Bougeard *et al*<sup>63</sup> para o 1,2,4-triazol e Frem<sup>64</sup> para a trifenilfosfina.

**Tabela 4.** – Número de onda de absorção no infravermelho, em  $\text{cm}^{-1}$ , e atribuições para os ligantes Htrz e  $\text{PPh}_3$ .

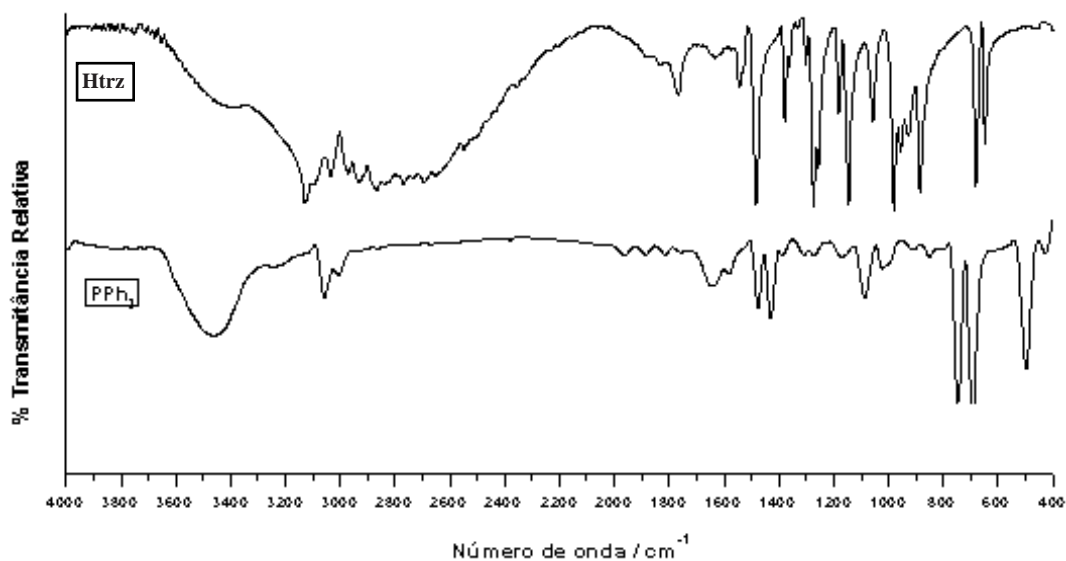
1,2,4-triazol	Atribuições	$\text{PPh}_3$	Atribuições
3123 m	$\nu(\text{CH})$	3065 F	$\nu(\text{CH})$
2730 F, l	$\nu(\text{NH})$	1586 m	$\phi$ (respiração do anel)
1531 F	$\rho_1$	1480 F	$\nu(\text{anel})_1$
1484 MF	$\rho_2$	1436 F	$\nu(\text{anel})_2$
1379 F	$\rho_3$	1182 f	$\beta(\text{CH})$
1272 F	$\delta(\text{CH})$	1094 F	q
1258 F	$\rho_4$	999 m	$\nu(\text{anel})_3$
1181 F	$\delta(\text{NH})$	854 f	$\gamma(\text{CH})_1$
1146 MF	$\rho_5$	750 MF	$\gamma(\text{CH})_2$
1058 MF	$\delta(\text{CH})_2$	697 MF	$\gamma(\text{anel})$
982 MF	$\rho_6$	498 MF	y
956 m	$\rho_7$	426 m	t
926 F	$\gamma(\text{NH})$		
892 f, l	$\gamma(\text{CH})_1$		
885 F	$\gamma(\text{CH})_2$		
684 MF	$\tau_1$		
651 MF	$\tau_2$		

MF: muito forte; F: forte; m: média; f: fraca; mf: muito fraca; l: largo; o: ombro.

$\nu$ : estiramento;  $\delta$ : deformação no plano;  $\gamma$ : deformação fora do plano;  $\rho$ : vibração do anel no plano (estiramento e deformação);  $\tau$ : torção do anel;  $\beta$ : deformação no plano; q e t são vibrações que, além de envolverem movimentos dos átomos de carbono e hidrogênio, contêm contribuições significativas de estiramento da ligação P-fenil enquanto que o modo y apresenta contribuições da deformação da ligação P-fenil.

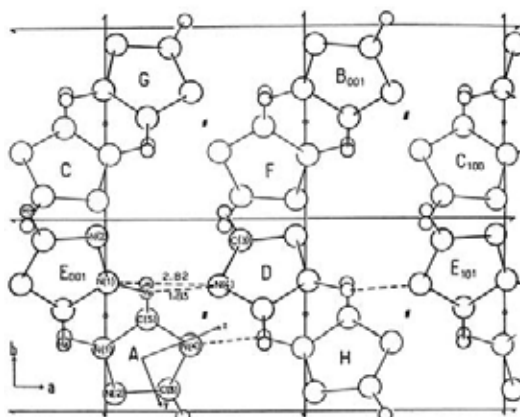
Comparou-se os dados presentes na Tabela 4, a fim de estabelecer um conjunto de bandas que fossem típicas do 1,2,4-triazol, já que algumas bandas intensas da trifenilfosfina encontram-se em regiões do espectro muito próximas às do 1,2,4-triazol, podendo sobrepô-las.

A Figura 22 mostra os espectros do 1,2,4-triazol e da trifenilfosfina obtidos experimentalmente em pastilhas de KBr.



**Figura 22.** Espectros vibracionais na região de  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  do IV para os ligantes livres 1,2,4-triazol e trifenilfosfina.

Desta forma, fica evidente que a presença do ligante 1,2,4-triazol pode ser caracterizada por intermédio do seguinte conjunto de bandas:  $3150\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$   $\nu(\text{CH})$ ;  $1540\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$   $\rho_1$ ;  $1300\text{-}1270\text{ cm}^{-1}$   $\delta(\text{CH})$ ;  $1160\text{-}1140\text{ cm}^{-1}$   $\rho_2$ ;  $910\text{-}880\text{ cm}^{-1}$   $\gamma(\text{CH})$ ;  $680\text{-}630\text{ cm}^{-1}$   $\tau$ . Além dessas absorções, o espectro do 1,2,4-triazol mostra múltiplas bandas intensas na região de  $3300\text{-}2300\text{ cm}^{-1}$  que caracterizam a existência de ligações de hidrogênio intensas no estado sólido. Este fato é verificado no trabalho de Gosdestein *et al.*<sup>65</sup>, no qual a estrutura cristalina do 1,2,4-triazol foi determinada por difração de raios X de monocristal (Figura 23).



**Figura 23.** Estrutura cristalina do triazol a  $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Projeção da estrutura ao longo do eixo c.

---

O cristal é ortorrômbico e pertence ao grupo espacial  $Pbca (D_{2h}^{15})$  com oito moléculas por célula unitária. Existem infinitas cadeias de moléculas planas ligadas por ligações de hidrogênio NH...N relativamente curtas (2,82 Å).

### **5.1.1 – Investigação espectroscópica de IV dos modos de coordenação do 1,2,4-triazol.**

O 1,2,4-triazol geralmente atua como ligante bidentado, resultando em compostos polinucleares, mas também são conhecidos compostos mononucleares com o triazol atuando como ligante monodentado. Informações sobre o modo de coordenação do 1,2,4-triazol podem com freqüência serem obtidas através da análise das bandas correspondentes aos modos de deformação fora do plano que são encontradas entre 600-700  $\text{cm}^{-1}$ . Estas vibrações são úteis para diferenciar a coordenação mono da bidentada <sup>66</sup>.

Há uma notável diferença entre os espectros no IV do triazol atuando como ligante bidentado através de  $N1,N2$  e através de  $N2,N4$ . A principal diferença surge por causa das regras de seleção do grupo de simetria local do ligante <sup>67</sup>. Espera-se  $6A_1$ ,  $5B_1$ ,  $2A_2$  e  $2B_2$  modos normais quando se tem a simetria  $C_{2v}$  (Eixo  $y$  perpendicular ao plano da molécula) e  $11A'$  e  $4A''$  modos quando a simetria é  $C_s$ . Como os modos  $A_2$  são inativos no IV, compostos com simetria  $C_{2v}$  e  $C_s$  para heterociclos de 5 membros irão mostrar uma distinta diferença em seus espectros no IV <sup>68</sup>. Os ligantes triazólicos têm simetria  $C_{2v}$  quando são  $N1,N2$ -bidentados ou  $N1,N2,N4$ -tridentados. Isto é claramente evidenciado pela ausência ou forte redução da intensidade de uma das duas bandas de vibração de torção do anel ( $\tau_1$  ou  $\tau_2$ ) no espectro. Por outro lado, a coordenação bidentada para o triazol sem simetria  $C_{2v}$  somente pode ser através de  $N2,N4$  ou  $N1,N4$  (simetria  $C_s$ ), neste caso as bandas de torção do anel não sofrem alterações significativas <sup>69</sup>. O mesmo é verdadeiro para os três modos ( $N1$ ,  $N2$  e  $N4$ ) de coordenação monodentada. Além disso, duas vibrações de torção de anel podem ser ativas no IV, quando o complexo contém Htrz juntamente com trz. Portanto, a presença de duas vibrações de torção do anel não é conclusiva para os modos de coordenação mono ou  $N2,N4$ -bidentado <sup>67</sup>.

Outra informação relevante é que quando o próton N-H está localizado na posição 4 do anel triazólico, aparece uma forte absorção em 622  $\text{cm}^{-1}$  e uma fraca em 682  $\text{cm}^{-1}$ . Agora, se o próton está localizado na posição 1, resultam duas

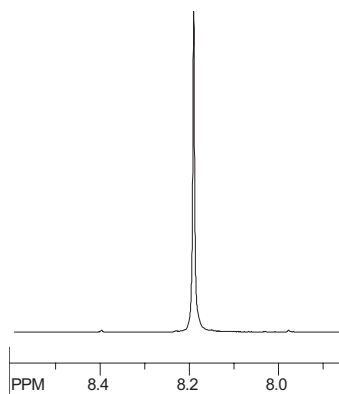
---

vibrações de igual intensidade em 630 e 690  $\text{cm}^{-1}$ . A desprotonação do Htrz influencia fortemente a posição destas bandas, sendo que a banda em 622  $\text{cm}^{-1}$  no complexo de Htrz muda para 676  $\text{cm}^{-1}$  após a desprotonação. Os espectros de triazolatos ligados a metais (II) de transição possuem uma forte absorção em torno de 670  $\text{cm}^{-1}$  provocada pela vibração de torção do anel ativa no IV<sup>19</sup>. Já a presença de uma banda em torno de 680  $\text{cm}^{-1}$  sinaliza a coordenação monodentada do trz<sup>66</sup>.

Triazóis monodentados são facilmente reconhecidos pela semelhança entre seus espectros vibracionais e os do triazol sólido, esta semelhança é muito maior do que as do triazol em outros modos de coordenação. Geralmente, triazóis monodentados apresentam uma forte absorção em torno de 670  $\text{cm}^{-1}$  e uma média em torno de 640  $\text{cm}^{-1}$ . A diferença em relação ao triazol *N2,N4*-bidentado encontra-se no fato de que para este a segunda absorção é sempre encontrada abaixo de 640  $\text{cm}^{-1}$  e muito mais intensa<sup>67</sup>.

## 5.2 – Considerações espectroscópicas de RMN do 1,2,4-triazol.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H do 1,2,4-triazol obtido experimentalmente em  $\text{CDCl}_3$  a temperatura ambiente está representado na Figura 24.



**Figura 24.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H para o 1,2,4-triazol em  $\text{CDCl}_3$ .

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H do 1,2,4-triazol verifica-se a presença de um único singleto em 8,2 ppm, atribuídos aos átomos de hidrogênio ligados nas posições 3 e 5 do anel triazólico. O hidrogênio ligado ao nitrogênio é difícil de ser detectado devido à troca muito rápida na escala temporal do RMN entre seus tautômeros em solução.



Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o triazol e triazolato livres, em diferentes condições experimentais, são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** – Dados de RMN para 1,2,4-triazol (Htrz) e triazolato (trz).

Composto	Solvente	Temperatura / °C	NH <sup>a</sup>	CH <sup>a</sup>	C3,5 <sup>a</sup>
1,2,4-triazol	Puro <sup>70</sup>	125	13,9	7,85	--
	DMSO-d <sub>6</sub> (3,8%) <sup>70</sup>	37	13,9	8,25	--
	HMPT (4,3%) <sup>70</sup>	37	15,1	8,17	--
	CDCl <sub>3</sub> <sup>71</sup>	--	--	8,3	--
	--	--	--	--	147,8 <sup>36</sup>
triazolato	CDCl <sub>3</sub> <sup>72</sup>	--	--	8,19	--
	NaOD/D <sub>2</sub> O <sup>71</sup>	--	--	8,19	--

a: em ppm relativo a TMS.

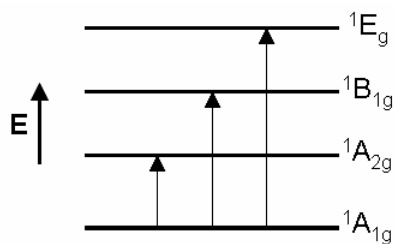
### 5.2.1 – Investigação espectroscópica de RMN dos modos de coordenação do 1,2,4-triazol.

A espectroscopia de RMN de hidrogênio pode ser uma ferramenta útil para o estudo de complexos triazólicos. Para muitos compostos, dois singletos distintos são observados entre 8,5 e 7,5 ppm<sup>68</sup>, dependendo da natureza do ligante triazólico. Quando os triazóis estão coordenados no modo monodentado, a equivalência dos dois prótons, observada no espectro do ligante livre, é removida fazendo com que estes prótons apareçam como um par de singletos.

Solventes próticos podem interagir através de ligação de hidrogênio com o nitrogênio livre do anel triazólico, o que afeta muito os dois hidrogênios triazólicos. A ligação de hidrogênio irá reduzir a densidade eletrônica no anel e, portanto, desproteger tais núcleos<sup>73</sup>. Tal efeito é também observado nos espectros de pirazóis<sup>74</sup> e outros compostos heterocíclicos<sup>75</sup>.

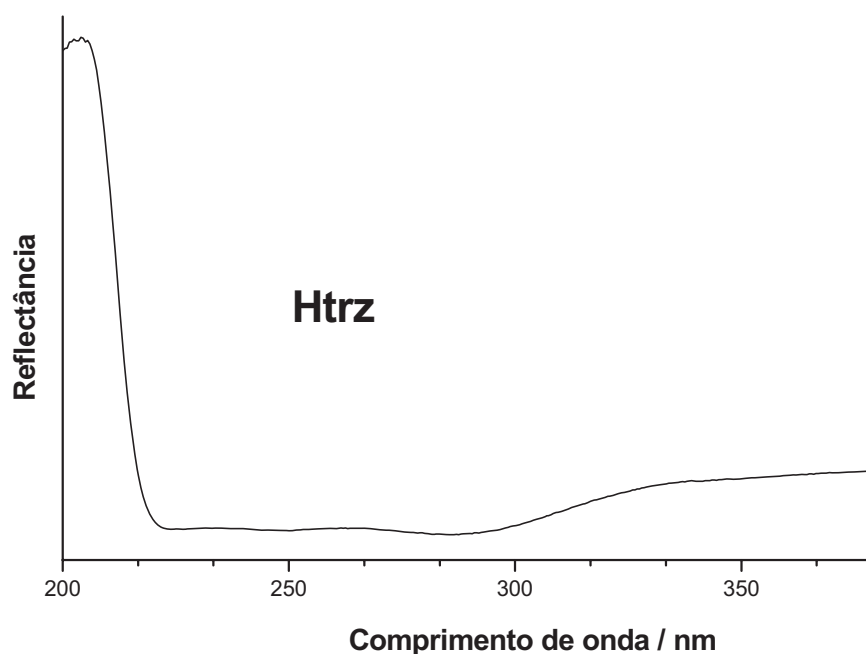
### 5.3 – Considerações espectroscópicas na região do UV-Visível do Pd(II) e do 1,2,4-triazol.

Para a região do visível no espectro eletrônico de complexos quadrado-planares de Pd(II) são esperadas três transições *d-d* permitidas por spin. O estado fundamental é o  $^1\text{A}_{1g}$  e os estados excitados correspondentes a estas três transições são  $^1\text{A}_{2g}$ ,  $^1\text{B}_{1g}$  e  $^1\text{E}_g$ , em ordem crescente de energia, conforme ilustrado na Figura 25<sup>76</sup>.



**Figura 25.** Transições de campo ligante permitidas por spin para complexos quadrado-planares de Pd(II).

No que diz respeito ao ligante orgânico, o espectro de reflectância difusa obtido para o 1,2,4-triazol (Figura 26) revela a presença de uma única banda, bastante intensa, centrada em 204 nm.



**Figura 26.** Espectro de reflectância difusa do ligante Htrz.

De acordo com o trabalho de Staab <sup>77</sup>, esta banda pode ser atribuída a uma transição intraligante do tipo  $n \rightarrow \pi^*$  do anel triazólico.

O 1,2,4-triazol, quando coordenado no modo *N1,N2*, é um ligante de campo intermediário. Na série espectroquímica, estaria localizado entre a etilenodiamina e a bipyridina, enquanto que, na série nefelauxética, é comparado a dimetilformamida <sup>64</sup>.

## 5.4 – Complexos de fórmula mínima [PdX<sub>2</sub>(Htrz)], onde X = Cl, Br e I.

### 5.4.1 – Propriedades físicas e análise elementar.

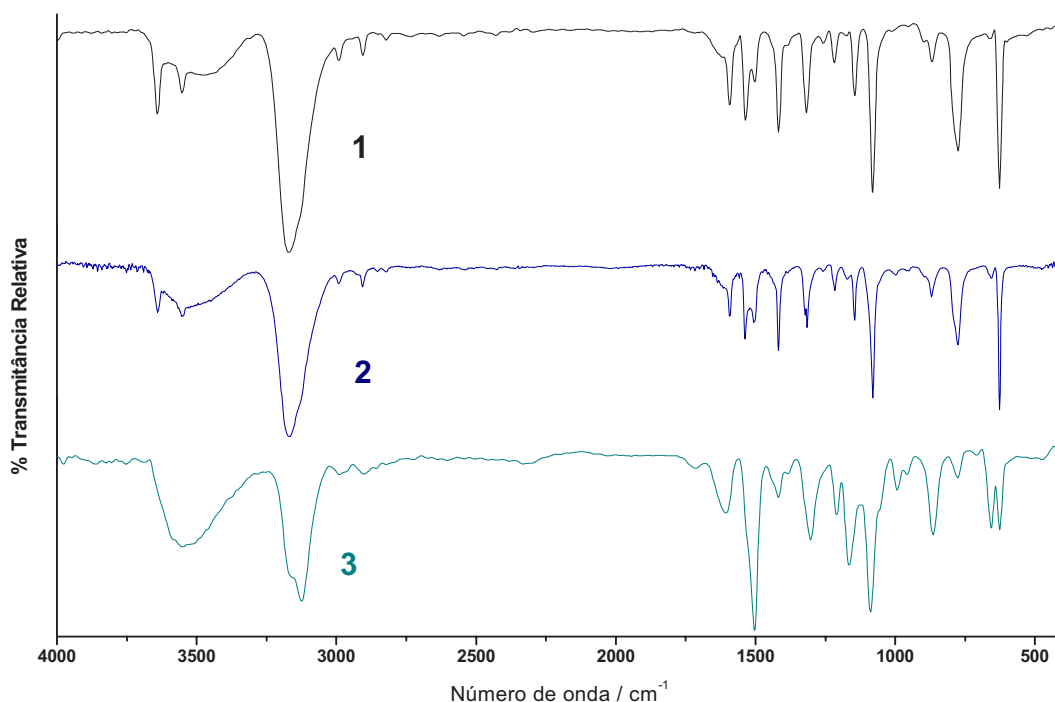
As propriedades físicas bem como os dados de análise elementar para os compostos de fórmula mínima [PdX<sub>2</sub>(Htrz)] encontram-se listados na Tabela 6.

**Tabela 6.** – Propriedades físicas e análise elementar dos complexos de fórmula mínima [PdX<sub>2</sub>(Htrz)], onde X= Cl, Br e I.

Composto	Cor	P.f. / °C	Análise elementar obtido(calculado)
[Pd <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> (Htrz) <sub>2</sub> ] <sup>20</sup> (1)	Creme	> 350	%C=9,74(9,75); %H=0,81(1,23); %N=16,34(17,05)
[Pd <sub>2</sub> Br <sub>4</sub> (Htrz) <sub>2</sub> ] (2) <i>Inédito</i>	Creme alaranjado	> 350	%C=9,61(7,16); %H=0,81(0,9); %N=15,47(12,53)
[PdI <sub>2</sub> (Htrz)] <sub>n</sub> (3) <i>Inédito</i>	marrom	> 350	%C=7,20(5,60); %H=0,47(0,70); %N=9,81(9,79)

### 5.4.2 – Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho.

A análise dos espectros no IV (Figura 27) dos compostos de fórmula mínima [PdX<sub>2</sub>(Htrz)] permitiu evidenciar a coordenação do triazol devido à presença de suas bandas características na região de 3170-3124, ν(CH); 1535-1533, ρ<sub>1</sub>; 1506-1502, ρ<sub>2</sub>; 1418-1417, ρ<sub>3</sub>; 1317, δ(CH); 1146, ρ<sub>4</sub>; 1087-1080, δ(CH); 777-775, γ(NH); 627 cm<sup>-1</sup>, τ<sub>1</sub>. As frequências vibracionais presentes nos espectros no IV dos compostos foram atribuídas<sup>63</sup> e encontram-se listadas na Tabela 7.



**Figura 27.** Espectros vibracionais no IV para os compostos de fórmula mínima  $[PdX_2(Htrz)]$ ,  $X=Cl$  (1);  $Br$  (2),  $I$  (3).

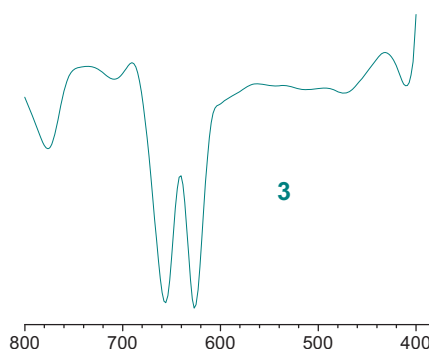
**Tabela 7.** Dados obtidos por espectroscopia no IV dos compostos de fórmula mínima  $[PdX_2(Htrz)]$   $X=Cl$  (1);  $Br$  (2),  $I$  (3) e suas respectivas atribuições.

$\bar{\nu} \text{ cm}^{-1}$			Atribuições
1	2	3	
3171 MF	3169 MF	3167 o	$\nu_{CH}$ (Htrz)
----	----	3124 MF	$\nu_{CH}$ (Htrz)
2991 f	2991 f	2989 f	$\nu_{NH}$ (Htrz)
2905 f	2906 f	2900 f	$\nu_{NH}$ (Htrz)
1535 F	1533 F	---	$\rho_1$ (Htrz)
1502 m	1506 m	1504 MF	$\rho_2$ (Htrz)
1418 F	1417 F	1417 f	$\rho_3$ (Htrz)
1317 F	1317 F	1302 m	$\delta_{CH}$ (Htrz)
1217 f	1217 f	1209 f	$\rho_4$ (Htrz)
1080 MF	1082 MF	1088 MF	$\delta_{CH}$ (Htrz)
868 f	869 f	864 m	$\gamma_{CH}$ (Htrz)
775 F	777 F	777 f	$\gamma_{NH}$ (Htrz)
----	----	656 m	$\tau_2$ (Htrz)
627 MF	627 MF	627 m	$\tau_1$ (Htrz)

A presença de apenas uma das bandas de torção do anel em  $627 \text{ cm}^{-1}$  sugere a coordenação  $N1,N2$ -bidentada ou  $N1,N2,N4$ -tridentada do triazol para os compostos **1** e **2**. Além disso, existem quatro bandas relacionadas aos modos de vibração do anel ( $\rho$ ) ao invés de duas, tais absorções são sempre encontradas no

modo *N1,N2*-bidentado, mas nunca para os modos *N2,N4* ou monodentado para o triazol <sup>19</sup>. As bandas típicas  $\nu(\text{NH})$  e  $\gamma(\text{NH})$  foram observadas, o que torna pouco provável a presença do íon triazolato nestes compostos.

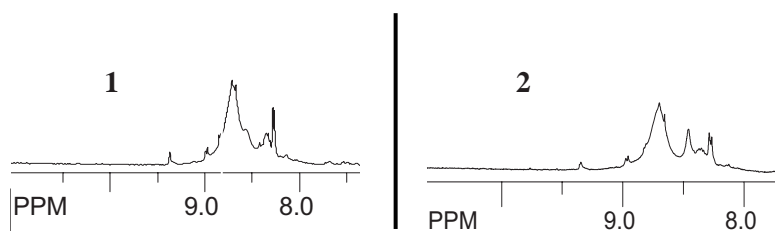
O espectro do composto **3** apresentou um comportamento diferente da série. São observadas duas bandas de torção (Figura 28) e a ausência das quatro bandas associadas ao modo  $\rho$  do anel triazólico, o que indica a presença deste ligante no modo de coordenação *N2,N4*-bidentado. Este comportamento atípico pode ser explicado pelo aumento do raio atômico dos halogênios durante a substituição. À medida que o raio atômico do halogênio aumenta, a configuração *cis*, onde o triazol atua no modo *N1,N2*-bidentado, se torna menos estável, pois há grandes interações por repulsão. Desta forma, pode ocorrer a mudança do modo de coordenação do triazol que passa atuar no modo *N2,N4*-bidentado, onde os átomos do halogênio configuram-se na forma *trans*, minimizando estas interações de repulsão.



**Figura 28.** Ampliação do espectro vibracional no IV na região de 800-400  $\text{cm}^{-1}$  para o composto  $[\text{PdI}_2(\text{Htrz})]_n$ .

### 5.4.3 – Espectroscopia de RMN.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos compostos **1** e **2** estão representados na Figura 29. Os valores referentes aos deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  para estes compostos estão contidos na Tabela 8.



**Figura 29.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para os compostos  $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$ , X = Cl (**1**); Br (**2**).

**Tabela 8.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (ppm) para os compostos de fórmula mínima  $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$  X=Cl (1) e Br (2).

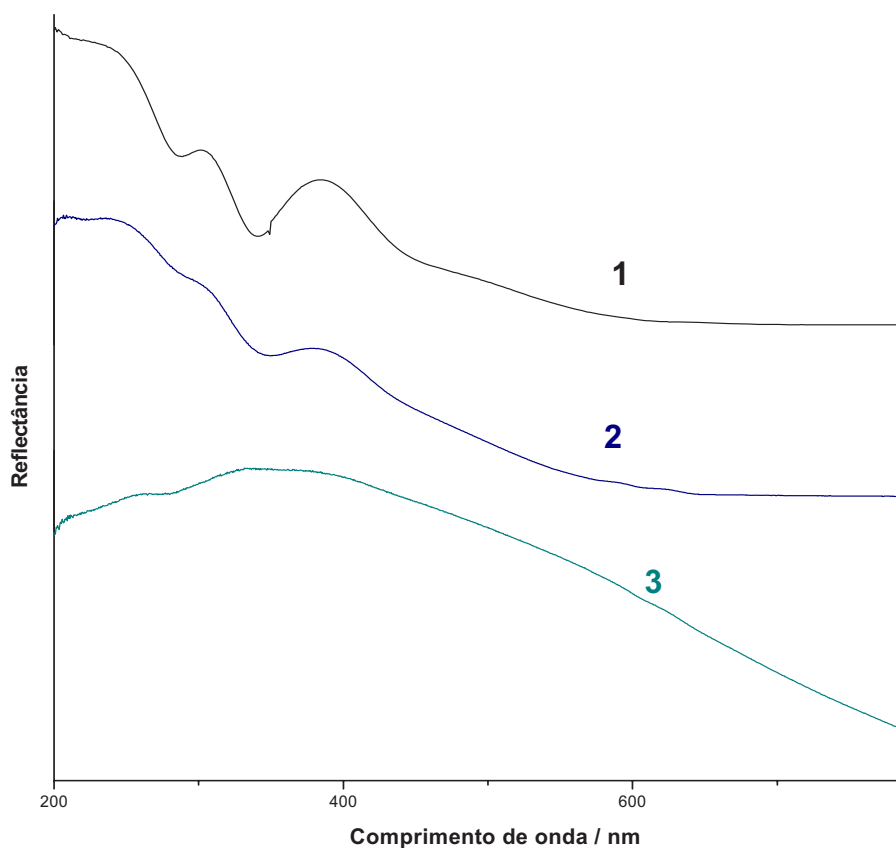
Composto	$H_{3,5\text{-trz}}$
1	8,67 s
2	8,70 s

multiplicidade: s=singlete

A coordenação do triazol é confirmada pela presença dos sinais largos em 8,67 e 8,70 ppm nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos complexos **1** e **2**, respectivamente. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o composto **3** não pode ser obtido devido à sua baixa solubilidade, o que ratifica seu comportamento atípico em relação à série.

#### 5.4.4 – Espectroscopia de Reflectância Difusa.

Os espectros de reflectância difusa dos compostos de fórmula mínima  $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$ , X=Cl (1), Br (2) e I (3), obtidos na região de 200-800 nm, estão representados na Figura 30. Os dados referentes às bandas observadas nos espectros e suas respectivas transições associadas estão contidos na Tabela 9.



**Figura 30.** Espectros de reflectância difusa dos compostos  $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$ , X = Cl (1); Br (2); I (3).

**Tabela 9.** Dados obtidos por espectroscopia de reflectância difusa, em nm, dos compostos de fórmula mínima  $[PdX_2(Htrz)]$  X=Cl (1), Br (2) e I (3), e suas respectivas atribuições.

Compostos	IL (Htrz)	LMCT ( $\pi_X \rightarrow d_{Pd}$ )	MLCT ( $d_{Pd} \rightarrow \pi^*_{Htrz}$ )	CL ( ${}^1A_{1g} \rightarrow {}^1A_{2g}$ )
1	201	298	385	458 om
2	209	301	381	a
3	209	332	379	a

a = não observada.

Os espectros de reflectância dos compostos **1**, **2** e **3** apresentam uma banda intensa na região de 201-209 nm atribuída a transições IL do ligante Htrz. Nota-se ainda o aparecimento de bandas LMCT do tipo  $\pi_X \rightarrow d_{Pd}$  (X = Cl, Br, I) no intervalo espectral de 298-332 nm, além de bandas de transferência de carga metal-ligante ( $d_{Pd} \rightarrow \pi^*_{Htrz}$ ) na região de 379-385 nm.

Bandas de transferência de carga do metal para o ligante são comumente observadas em complexos com ligantes que possuem orbitais  $\pi^*$  de baixa energia, especialmente ligantes aromáticos. O íon metálico que possui baixo estado de oxidação terá seus orbitais *d* com uma energia relativamente alta, assim esta transição irá ocorrer com baixa energia. A família de ligantes que frequentemente apresenta transições MLCT são as que possuem um ou mais átomos de N doador<sup>78</sup>. Estas transições são geralmente observadas em torno de 400 nm e se deslocam para valores de maior energia na presença de solventes polares<sup>60,79</sup>.

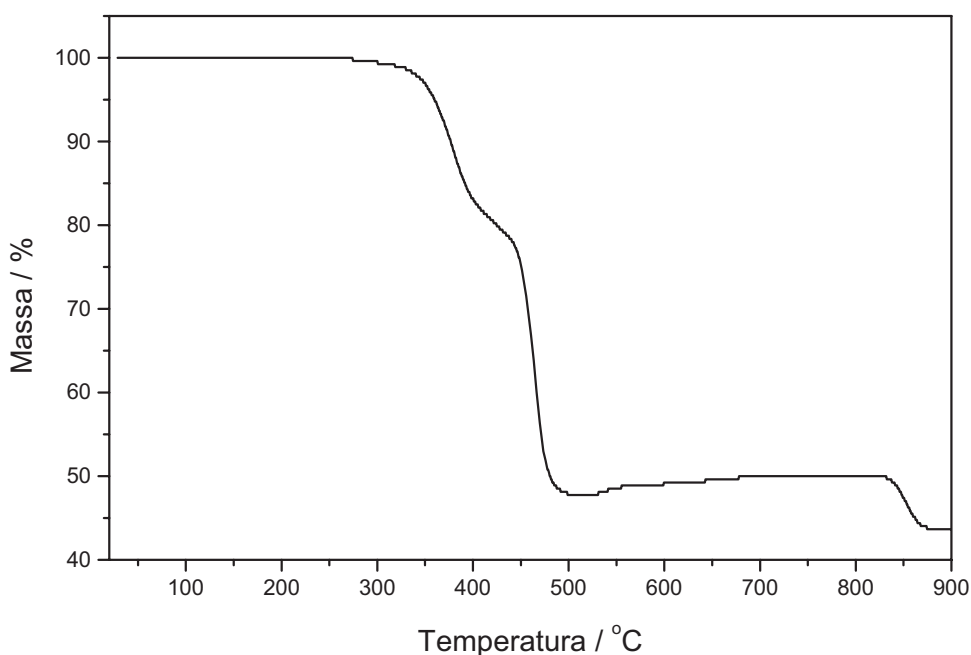
No que se refere às transições de campo ligante, pudemos observar apenas no espectro do composto **1**, na forma de uma banda larga, pouco intensa, centrada em cerca de 460 nm, e pouco encoberta pela banda MLCT de maior intensidade. Essa banda deve estar provavelmente associada a uma transição  ${}^1A_{1g} \rightarrow {}^1A_{2g}$ , característica de sistemas eletrônicos  $d^8$  quadrado-planares<sup>71</sup>.

#### 5.4.5 – Análise térmica.

As perdas de massa e intervalos de temperatura observados nas curvas TG dos compostos de fórmula mínima  $[PdX_2(Htrz)]$  X=Cl (**1**), Br (**2**) e I (**3**) estão apresentados na Tabela 10. As Figuras 30, 32 e 33 representam as curvas TG obtidas para os complexos **1**, **2** e **3**, respectivamente, sob atmosfera dinâmica de ar sintético ( $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) e razão de aquecimento de  $20^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ .

**Tabela 10.** Perdas de massa e intervalos de temperatura observados nas curvas TG dos complexos de fórmula mínima  $[PdX_2(Htrz)]$  X=Cl (1), Br (2) e I(3).

Composto	Etapa	$\Delta T$ (°C)	$\Delta m$ (%)		Atribuição
			Obt.	calc.	
1	1	275-531	-52,24	-52,26	- 4 Cl, -2 Htrz, +0,7 O <sub>2</sub>
	2	531-832	+2,24	+1,95	+0,3 O <sub>2</sub>
	3	832-874	-6,34	-6,50	-1,0 O <sub>2</sub>
	Resíduo		43,66	43,19	Pd <sup>0</sup>
2	1	281-547	-65,99	-65,88	- 4 Br, -2 Htrz, +0,5 O <sub>2</sub>
	2	547-841	+3,74	+2,39	+0,5 O <sub>2</sub>
	3	841-871	-5,10	-4,77	-1,0 O <sub>2</sub>
	Resíduo		32,65	31,74	Pd <sup>0</sup>
3	1	154-374	-11,89	-11,82	-0,2 I <sub>2</sub>
	2	374-560	-61,24	-61,15	- 1,0 Htrz, -0,8 I <sub>2</sub> , +0,5 O <sub>2</sub>
	3	560-816	+3,36	+1,49	+0,5 O <sub>2</sub>
	4	816-875	-4,14	-3,73	-1,0 O <sub>2</sub>
	Resíduo		26,09	24,79	Pd <sup>0</sup>



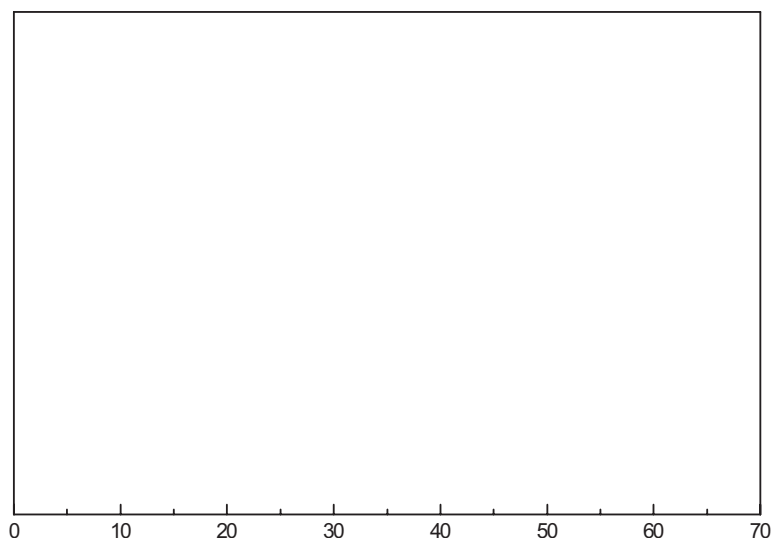
**Figura 31.** Curva TG do composto  $[Pd_2Cl_4(Htrz)_2]$  (1).

A curva TG mostrou que a decomposição térmica do composto **1** a paládio metálico ocorre em 3 etapas (Figura 31). O composto é estável termicamente até 275°C, ocorrendo então a primeira perda de massa no intervalo de 275-531 °C, associada à eliminação total dos triazóis, dos grupos Cl e a assimilação de 0,7 mols de O<sub>2</sub>, resultando em uma mistura de Pd e PdO. No intervalo de 531-832 °C, nota-se um ganho de massa de  $\Delta m = +2,24\%$  referente à oxidação do paládio metálico



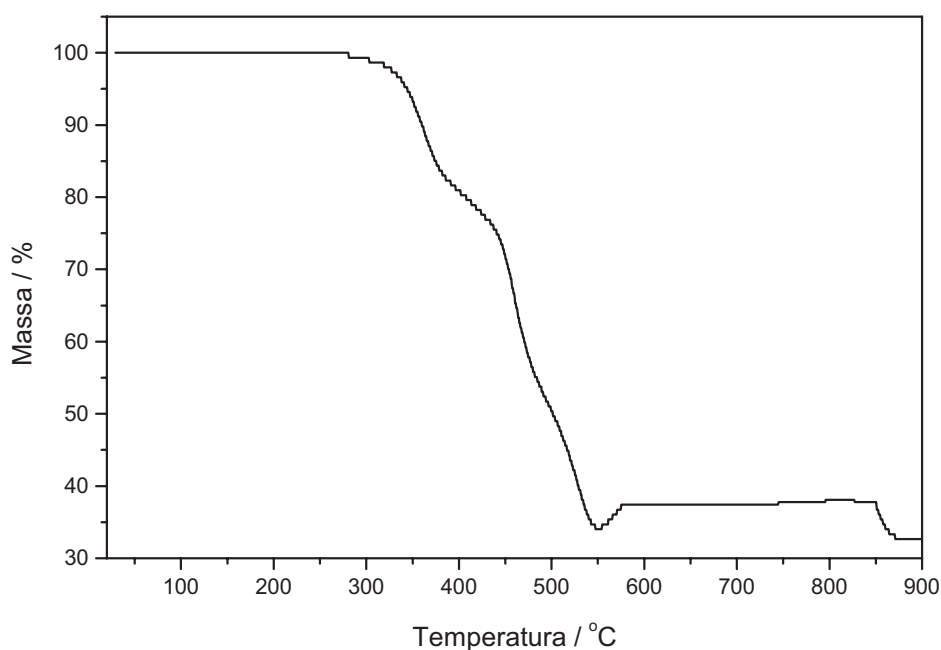
remanescente a óxido de paládio. Na última etapa, 832-874 °C, observa-se a decomposição de óxido de paládio a paládio metálico.

O difratograma de raios X (Figura 32) obtido do resíduo da termodecomposição do composto **1** pelo método do pó apresentou reflexões  $2\theta$  (Int.%) em 47.05 (100%) e 54.87 (49.26%). Estes valores estão em concordância com as reflexões  $2\theta$  (Int.%) em 45.94 (100%) e 54.76 (42%), tabeladas para o paládio metálico ( $\text{Pd}^\circ$ ) (ficha nº 7440-05-3)<sup>80</sup>.



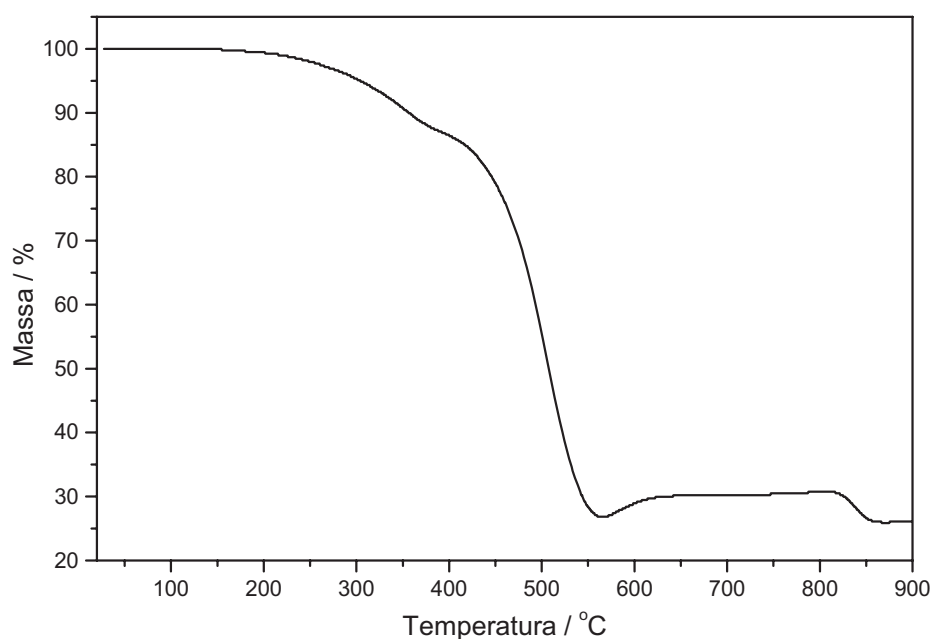
**Figura 32.** Difratograma do resíduo da termodecomposição do complexo  $[\text{Pd}_2\text{Cl}_4(\text{Htrz})_2]$  (método do pó).

Os difratogramas de raios X dos resíduos da termodecomposição dos demais complexos não serão ilustrados, pois todos indicam as reflexões correspondentes ao paládio metálico.



**Figura 33.** Curva TG do composto  $[Pd_2Br_4(Htrz)_2]$ .

Empregando-se a termogravimetria foi possível notar que o complexo **2** decompõe-se a paládio metálico em 3 etapas (Figura 32), adotando um perfil de termodecomposição semelhante ao do composto **1**. Durante a primeira etapa (281-547 °C) é observada uma perda abrupta de 65,99 % da massa total, associada à pirólise total dos ligantes Htrz e Br, resultando em uma mistura de paládio metálico e óxido de paládio. No intervalo de 547-841 °C verifica-se a oxidação do paládio metálico remanescente pelo ganho de massa de  $\Delta m = +3,74$  %. O óxido de paládio formado decompõe-se em paládio metálico na última etapa pela perda de massa de  $\Delta m = -5,10$  % no intervalo de 841-871 °C.

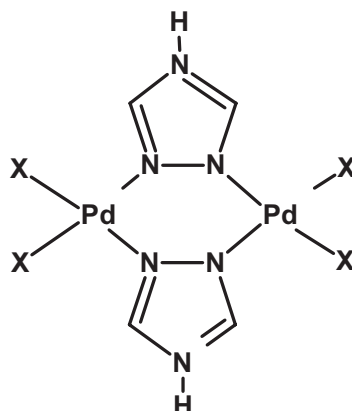


**Figura 34.** Curva TG do composto  $[PdI_2(Htrz)]_n$ .

Observando a curva TG obtida para o composto **3** (Figura 33), nota-se que sua termodecomposição a paládio metálico ( $Pd^0$ ) ocorre em 4 etapas. No intervalo de 154-374°C verifica-se uma perda gradual de massa de -11,89% atribuída à eliminação parcial do ligante iodo. Observa-se no intervalo de 374-560°C a segunda perda de massa ( $\Delta m_2 = -61,24\%$ ), associada à eliminação total dos ligantes triazólicos e de grupos iodeto bem como a incorporação de  $O_2$ , gerando uma mistura de  $Pd^0$  e  $PdO$ . A terceira etapa entre 560-816°C envolvendo um ganho de massa de +3,36% ( $\Delta m_3$ ) é característica da oxidação do  $Pd^0$  a  $PdO$ . Durante a quarta etapa em 816-875°C ( $\Delta m_4 = -4,14\%$ ) nota-se a decomposição do  $PdO$  a  $Pd^0$ .

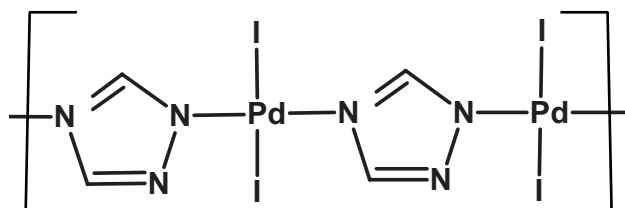
#### **5.4.6 – Proposição estrutural.**

Com os dados obtidos a partir das espectroscopias no infravermelho, de RMN, de reflectância difusa, dos resultados de análise térmica e em concordância com a análise elementar sugerem-se para os compostos **1** e **2** estruturas diméricas (Figura 35), nas quais os centros de paládio quadrado-planares estão conectados por dois ligantes triazólicos coordenados através do modo N1,N2-bidentado.



**Figura 35.** Proposta estrutural para os compostos de fórmula geral  $[Pd_2X_4(Htrz)_2]$ , onde X = Cl (1), Br (2).

Já para o composto **3**, em concordância com a análise elementar e os dados obtidos a partir das espectroscopias no infravermelho e de reflectância difusa, sugere-se uma estrutura polimérica, na qual os ligantes iodo estão sob configuração *trans* e o anel triazólico encontra-se coordenado através do modo *N2,N4*-bidentado (Figura 36).



**Figura 36.** Proposta estrutural para o composto  $[PdI_2(Htrz)]_n$  (3).

#### 5.4.7 – Ensaio de inibição do crescimento da *Mycobacterium tuberculosis*.

Os complexos  $[Pd_2Cl_4(Htrz)_2]$ ,  $[Pd_2Br_4(Htrz)_2]$  e  $[PdI_2(Htrz)]_n$  foram submetidos a testes de inibição do crescimento da *Mycobacterium tuberculosis*. Os valores encontrados para a concentração inibitória mínima (CIM) estão apresentados na Tabela 11 e representa a menor concentração da droga capaz de impedir a multiplicação da micobactéria.

**Tabela 11.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) de compostos triazólicos de Pd(II) frente a *Mycobacterium tuberculosis* pela técnica do MABA (Microplate Alamar Blue Assay).

Composto	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )
$[\text{Pd}_2\text{Cl}_4(\text{Htrz})_2]$	125
$[\text{Pd}_2\text{Br}_4(\text{Htrz})_2]$	>125
$[\text{PdI}_2(\text{Htrz})]_n$	>125

Os valores de CIM obtidos para os complexos triazólicos de Pd(II) são muito superiores àqueles determinados para algumas drogas sintéticas, como os derivados da hidrazida do ácido benzóico e compostos de prata com mandelato ou tartarato, cuja CIM está na faixa de 4-16  $\mu\text{g/mL}$ <sup>81</sup>. São considerados como valores promissores quando o valor de CIM para extratos vegetais  $\leq 100 \mu\text{g/mL}$ , e para frações ou substâncias sintéticas  $\leq 31,25 \mu\text{g/mL}$ . Portanto, os compostos de Pd(II) investigados neste trabalho não mostraram-se eficientes na inibição da multiplicação da micobactéria causadora da tuberculose, já que atividade com CIM acima de 31,25  $\mu\text{g/mL}$  para substâncias sintéticas é considerada pouco promissora.

## 5.5 – Polímeros de Pd(II) e triazol.

### 5.5.1 – Propriedades físicas e análise elementar.

As propriedades físicas bem como os dados de análise elementar para os polímeros triazólicos de Pd(II) encontram-se listados na Tabela 12.

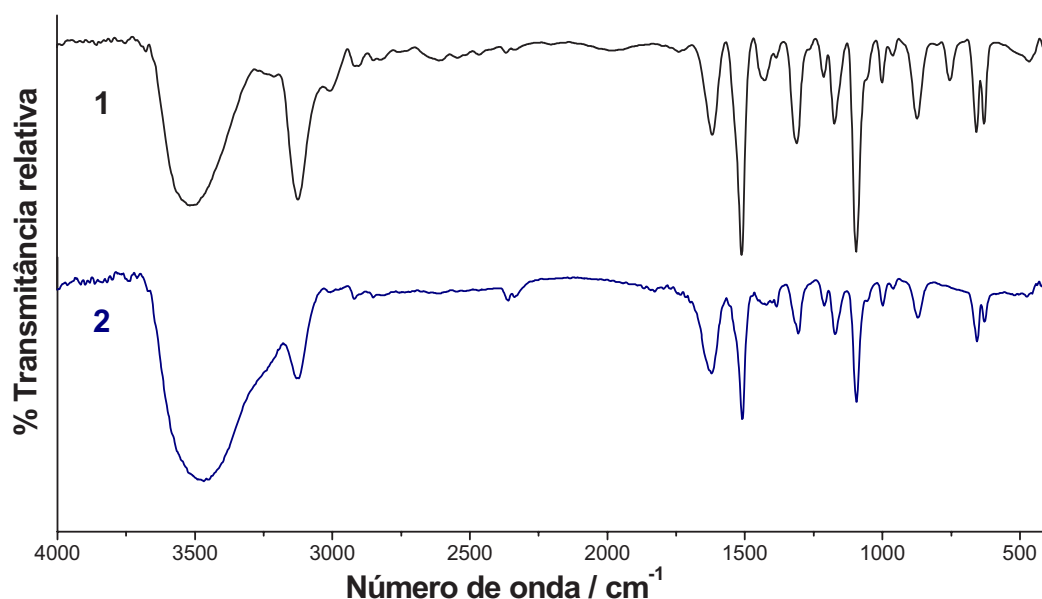
**Tabela 12.** – Propriedades físicas e análise elementar dos polímeros triazólicos de fórmula mínima  $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]_n$ , onde X= Cl e Br.

Composto	Cor	P.f. / °C	Análise elementar obtido(calculado)
$[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$ (1) <i>Inédito</i>	Amarelo	> 350	%C=10,74(9,75); %H=0,81(1,23); %N=17,36(17,05)
$[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$ (2) <i>Inédito</i>	Amarelo-alaranjado	> 350	%C=9,51(7,16); %H=1,78(0,90); %N=14,36(12,53)

### 5.5.2 – Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho.

A análise dos espectros no IV (Figura 37) dos compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$  e  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$  permitiu evidenciar a coordenação do triazol devido à presença de suas bandas características na região de 3130-3124,  $\nu(\text{CH})$ ; 1510,  $\rho_1$ ; 1310-1305,  $\delta(\text{CH})$ ; 1173-1172,  $\rho_2$ ; 999,  $\gamma(\text{CH})$ ; 656,  $\tau_1$ ; 629  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\tau_2$ . As frequências vibracionais

presentes nos espectros no IV foram atribuídas<sup>63</sup> e encontram-se listadas na Tabela 13.

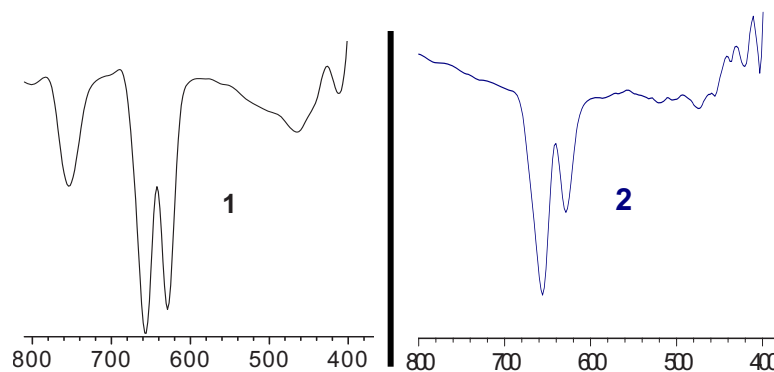


**Figura 37.** Espectros vibracionais no IV para os polímeros de fórmula mínima  $[PdX_2(Htrz)]$ , onde  $X=Cl(1)$  e  $Br(2)$ .

**Tabela 13.** Dados obtidos por espectroscopia no IV dos polímeros de fórmula mínima  $[PdX_2(Htrz)]$ , onde  $X= Cl (1)$  e  $Br (2)$ , e suas respectivas atribuições.

$\bar{\nu} \text{ cm}^{-1}$		Atribuições
1	2	
3124 F	3130 F	$\nu_{CH}$ (Htrz)
1510 MF	1510 F	$\rho_1$ (Htrz)
1310 m	1305 m	$\delta_{CH}$ (Htrz)
1173 m	1172 m	$\rho_4$ (Htrz)
1094 MF	1095 F	$\delta_{CH}$ (Htrz)
999 f	----	$\gamma_{CH}$ (Htrz)
871 m	871 f	$\gamma_{CH}$ (Htrz)
656 m	656 m	$\tau_2$ (Htrz)
629 m	629 m	$\tau_1$ (Htrz)

A presença de duas bandas de torção do anel em 656 e 629  $\text{cm}^{-1}$  nos espectros dos compostos **1** e **2** (Figura 38) sugere a coordenação do 1,2,4-triazol com simetria  $C_s$ , podendo portanto ter se coordenado através dos modos  $N2, N4$ -bidentado ou monodentado. Cabe destacar que a diferença entre esses dois modos de coordenação encontra-se no fato de que neste último, a segunda banda de torção do anel é encontrada em regiões acima de 640  $\text{cm}^{-1}$  e é menos intensa<sup>67</sup>.



**Figura 38.** Ampliação dos espectros vibracionais no IV na região de  $800\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  para os polímeros de fórmula mínima  $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$ , onde  $X = \text{Cl}$  e  $\text{Br}$ .

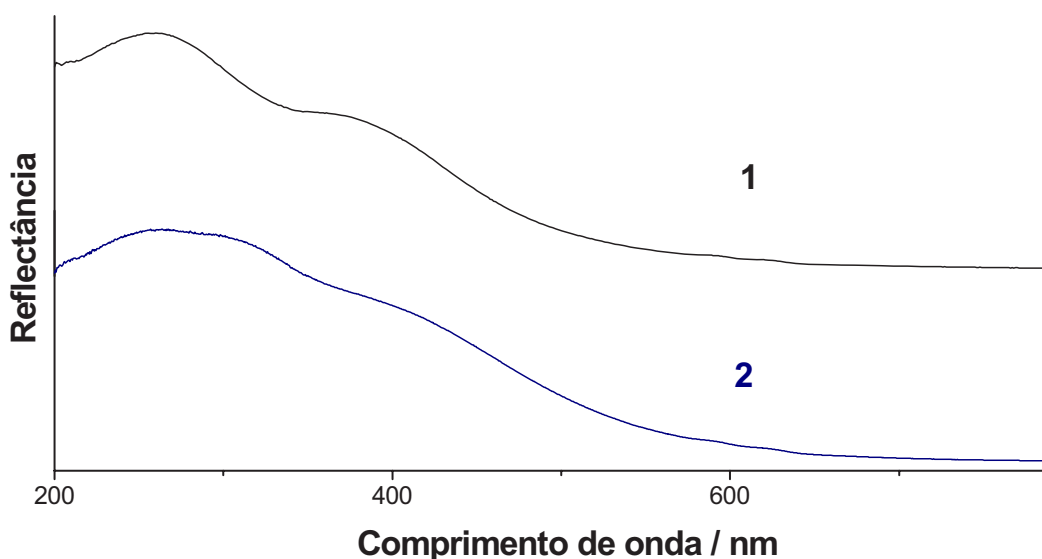
Embora a banda típica  $\nu(\text{NH})$  apareça muito fraca nos espectros dos compostos **1** e **2**, a presença do triazolato é pouco provável devido às condições em que as reações foram processadas (meio ácido). Portanto, sugere-se que o 1,2,4-triazol esteja coordenado através do modo  $N2, N4$ -bidentado nestes compostos.

### 5.5.3 – Espectroscopia de RMN.

Devido à baixa solubilidade em  $\text{DMSO-}d_6$  não foi possível a obtenção dos espectros de RMN para os polímeros.

### 5.5.4 – Espectroscopia de Reflectância Difusa.

Os espectros de reflectância difusa dos compostos de fórmula mínima  $[\text{PdX}_2(\text{Htrz})]$ , onde  $X = \text{Cl}$  (**1**) e  $\text{Br}$  (**2**), obtidos na região de  $200\text{-}800\text{nm}$ , estão representados na Figura 39. Os valores dos comprimentos de ondas de absorção e respectivas transições associadas estão contidos na Tabela 14.



**Figura 39.** Espectros de reflectância difusa dos polímeros de fórmula mínima  $[PdX_2(Htrz)]$ , onde  $X = Cl$  (1) e  $Br$  (2).

**Tabela 14.** Dados obtidos por espectroscopia de reflectância difusa, em nm, dos polímeros de fórmula mínima  $[PdX_2(Htrz)]$ , onde  $X = Cl$  (1) e  $Br$  (2), e suas respectivas atribuições.

Compostos	IL (Htrz)	LMCT ( $\pi_X \rightarrow d_{Pd}$ )	MLCT ( $d_{Pd} \rightarrow \pi^*_{Htrz}$ )	CL
1	a	258	345	a
2	a	262	340	a

a = não observada.

Nos espectros de reflectância dos compostos **1** e **2** podem ser observadas bandas de transferência de carga  $\pi_X \rightarrow d_{Pd}$  ( $X = Cl, Br$ ) no intervalo espectral de 258-262 nm, além de bandas MLCT do tipo  $d_{Pd} \rightarrow \pi^*_{Htrz}$  na região de 340-345 nm. As transições de campo ligante nos espectros dos complexos não se apresentam resolvidas, provavelmente por se encontram encobertas pelas bandas de transferência de carga, mais intensas.

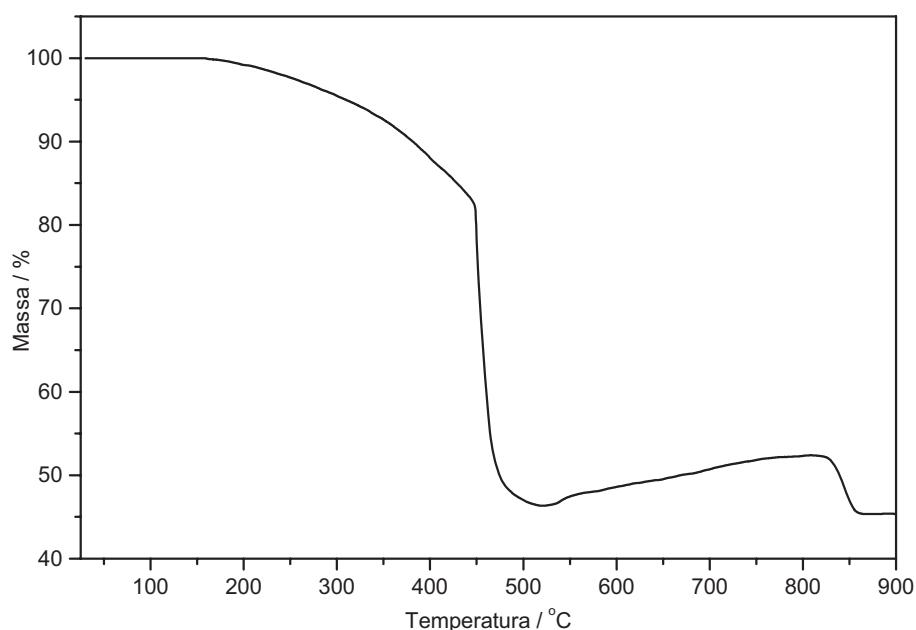
### 5.5.5 – Análise térmica.

As perdas de massa e intervalos de temperatura observados nas curvas TG dos polímeros de fórmula mínima  $[PdX_2(Htrz)]$ , onde  $X = Cl$ (1) e  $Br$ (2) estão apresentados na Tabela 15. As Figuras 40 e 41 representam as curvas TG obtidas para os complexos **1** e **2**, respectivamente, sob atmosfera dinâmica de ar sintético ( $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) e razão de aquecimento de  $20^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ .



**Tabela 15.** Perdas de massa e intervalos de temperatura observados nas curvas TG dos polímeros de fórmula mínima  $[PdX_2(Htrz)]_n$ , onde X=Cl(1) e Br(2).

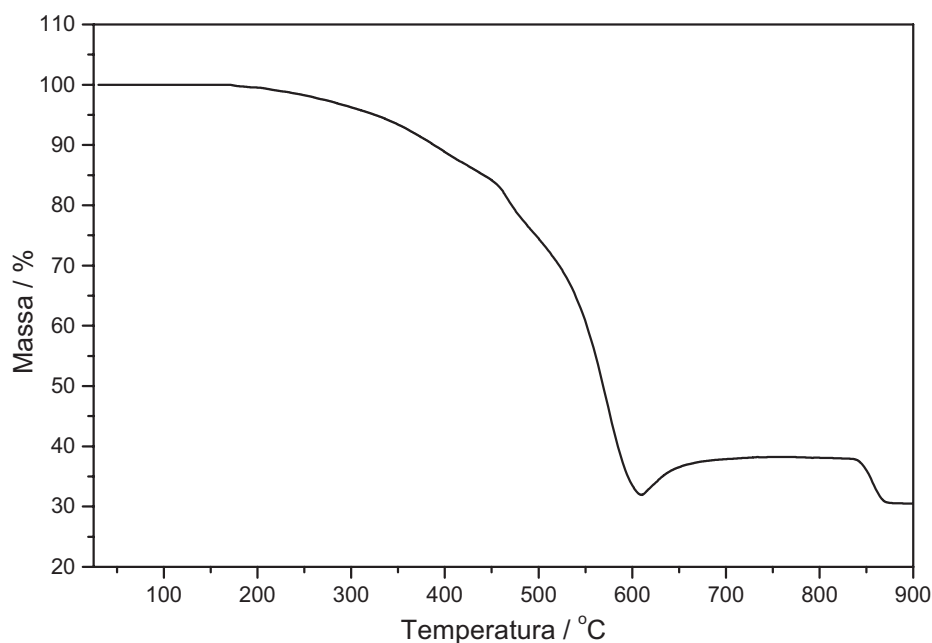
Composto	Etapa	$\Delta T$ (°C)	$\Delta m$ (%)		Atribuição
			Obt.	calc.	
1	1	158-448	-17,66	-17,25	-0,6 Cl <sub>2</sub> -1,0 Htrz, -0,4 Cl <sub>2</sub> , +0,15 O <sub>2</sub> +0,35 O <sub>2</sub> -0,5 O <sub>2</sub> Pd <sup>o</sup>
	2	448-522	-36,00	-37,60	
	3	522-809	+6,05	+4,54	
	4	809-873	-7,03	-6,49	
	Resíduo		45,36	43,19	
2	1	169-610	-68,09	-66,84	-2 Htrz, +0,15 O <sub>2</sub> +0,35 O <sub>2</sub> -0,5 O <sub>2</sub>
	2	610-830	+6,04	+3,35	
	3	830-881	-7,39	-4,77	
	Resíduo		30,56	31,74	



**Figura 40.** Curva TG do composto  $[PdCl_2(Htrz)]_n$ .

A curva TG mostrou que a decomposição térmica do composto  $[PdCl_2(Htrz)]_n$  a paládio metálico ocorre em 4 etapas (Figura 40). O composto é estável termicamente até 158°C, ocorrendo então a primeira perda de massa no intervalo de 158-448 °C, associada à eliminação parcial de ligantes cloro. Uma perda de massa mais abrupta é observada na segunda etapa (448-522 °C), atribuída a pirólise total dos ligantes e assimilação de 0,15 mols de O<sub>2</sub>, resultando em uma mistura de Pd e PdO. No intervalo de 522-809 °C, nota-se um ganho de massa de  $\Delta m = +6,05\%$  referente a oxidação do paládio metálico remanescente da mistura a óxido de

paládio. Na última etapa, 809-873 °C, observa-se a decomposição de óxido de paládio a paládio metálico.

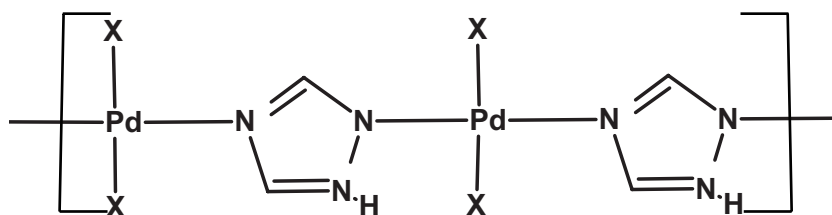


**Figura 41.** Curva TG do composto  $[PdBr_2(Htrz)]_n$ .

Empregando-se a termogravimetria foi possível notar que o complexo  $[PdBr_2(Htrz)]_n$  decompõe-se a paládio metálico em 3 etapas (Figura 41). Durante a primeira etapa (169-610 °C) é observada uma perda contínua de 68,09 % da massa total, associada à pirólise total dos ligantes Htrz e Br bem como assimilação de  $O_2$ , resultando em uma mistura de paládio metálico e óxido de paládio. No intervalo de 610-830 °C verifica-se a oxidação do paládio metálico remanescente da mistura pelo ganho de massa de  $\Delta m = +6,04$  %. O óxido de paládio formado decompõe-se em paládio metálico na última etapa pela perda de massa de  $\Delta m = -7,39$  % no intervalo de 830-881 °C.

### **5.5.6 – Proposição estrutural.**

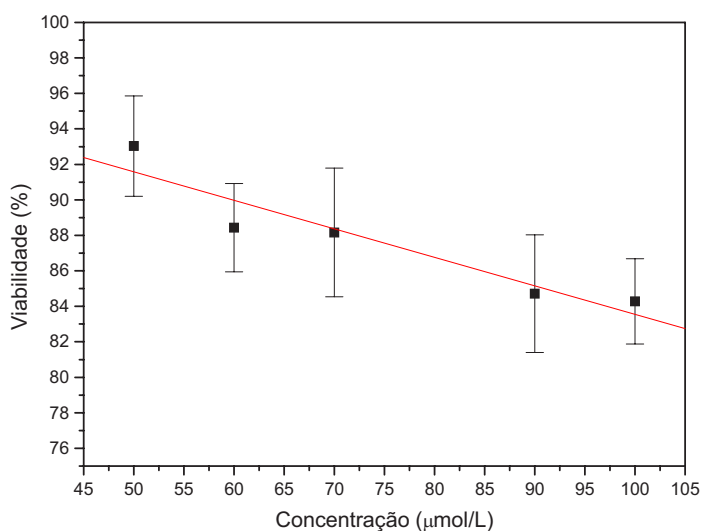
Com os dados obtidos a partir das espectroscopias no infravermelho e de reflectância difusa e em concordância com a análise elementar, sugere-se para estes compostos, estruturas poliméricas nas quais os halogênios estão configurados na forma *trans* e o anel triazólico coordenado através do modo *N2,N4*-bidentado, conforme ilustrado na Figura 42.



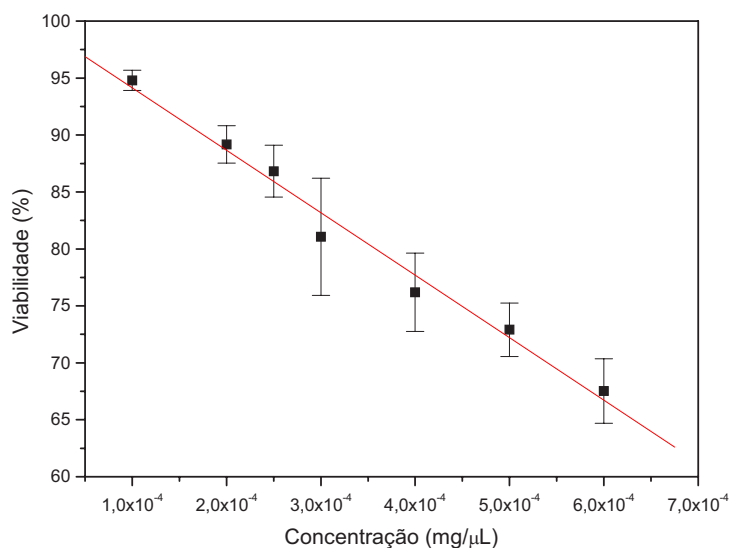
**Figura 42.** Proposição estrutural para os compostos de fórmula geral  $[PdX_2(Htrz)]_n$ , onde  $X = Cl$  e  $Br$ .

### 5.5.7 Determinação da viabilidade celular de macrófagos de camundongos normais pela técnica de MTT<sup>48</sup>.

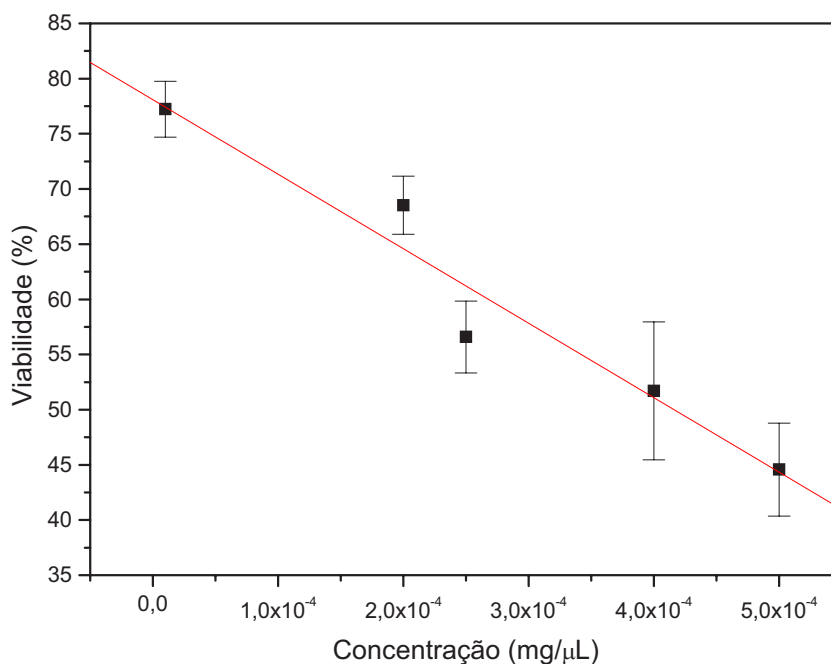
A relação viabilidade celular (%) x concentração ( $\mu\text{molL}^{-1}$  ou  $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$ ) dos compostos Htrz,  $[PdCl_2(Htrz)]_n$ ,  $[PdBr_2(Htrz)]_n$  e da droga padrão, a cis-platina (*cis*-DDP), obtida para macrófagos expostos por 24 horas está representada nas Figuras 43-46.



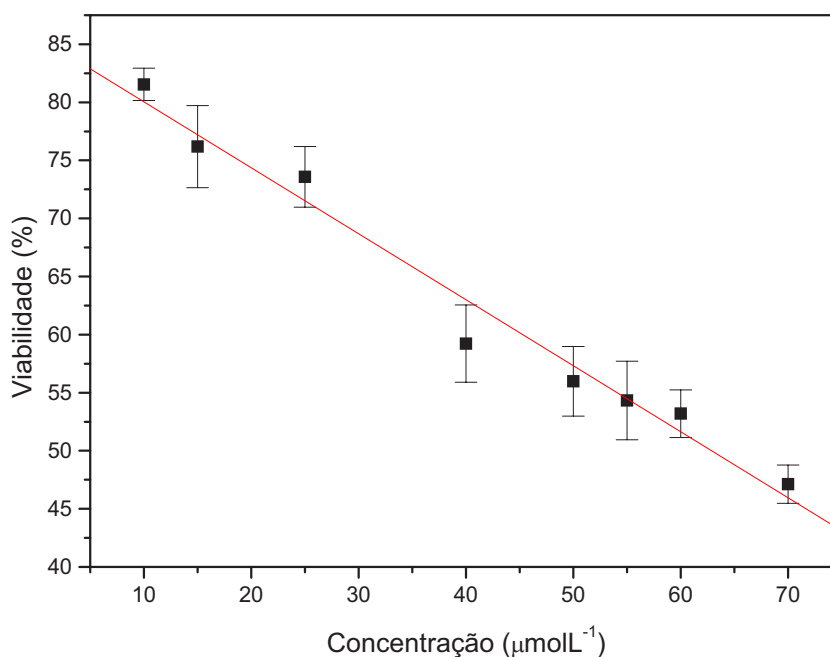
**Figura 43.** Relação dose-efeito do composto Htrz para macrófagos peritoneais de camundongos após exposição por 24 h. Para cada ensaio biológico foram utilizados 5 animais e realizado em triplicata. Cada ponto do gráfico representa a média e o desvio padrão de um animal numa determinada concentração. O resultado é significativamente diferente do controle de células em meio RPMI (viabilidade 100%).



**Figura 44.** Relação dose-efeito do composto  $[PdCl_2(Htrz)]_n$  para macrófagos peritoneais de camundongos após exposição por 24 h. Para cada ensaio biológico foram utilizados 5 animais e realizado em triplicata. Cada ponto do gráfico representa a média e o desvio padrão de um animal numa determinada concentração. O resultado é significativamente diferente do controle de células em meio RPMI (viabilidade 100%).



**Figura 45.** Relação dose-efeito do composto  $[PdBr_2(Htrz)]_n$  para macrófagos peritoneais de camundongos após exposição por 24 h. Para cada ensaio biológico foram utilizados 5 animais e realizado em triplicata. Cada ponto do gráfico representa a média e o desvio padrão de um animal numa determinada concentração. O resultado é significativamente diferente do controle de células em meio RPMI (viabilidade 100%).



**Figura 46.** Relação dose-efeito do composto  $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$  para macrófagos peritoneais de camundongos após exposição por 24 h. Para cada ensaio biológico foram utilizados 5 animais e realizado em triplicata. Cada ponto do gráfico representa a média e o desvio padrão de um animal numa determinada concentração. O resultado é significativamente diferente do controle de células em meio RPMI (viabilidade 100%).

Nos ensaios para determinação da citotoxicidade, verificou-se que os macrófagos de camundongos normais são sensíveis ao potencial tóxico do ligante Htrz e dos compostos,  $[PdCl_2(Htrz)]_n$ ,  $[PdBr_2(Htrz)]_n$  e da droga padrão, a cis-platina (*cis*-DDP).

Os valores dos índices de citotoxicidade correspondentes a 50% e 25%,  $IC_{50}$  e  $IC_{25}$ , respectivamente, para macrófagos obtidos de animais normais por 24 h de exposição, estão apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16.** Índice citotóxico de  $IC_{50}$  e  $IC_{25}$ , em  $\mu molL^{-1}$  (a) ou  $mg\mu L^{-1}$  (b), observados para Htrz e os compostos  $[PdCl_2(Htrz)]_n$ ,  $[PdBr_2(Htrz)]_n$  e cisplatina para macrófagos com 24h de exposição.

Composto	$IC_{25}$	$IC_{50}$
Htrz <sup>a</sup>	153,09 ± 1,32 $\mu mol/L$ (10,6x10 <sup>-6</sup> mg/ $\mu L$ )	308,50 ± 1,32 $\mu mol/L$ (21,3x10 <sup>-6</sup> mg/ $\mu L$ )
$[PdCl_2(Htrz)]_n$ <sup>b</sup>	4,49x10 <sup>-4</sup> ± 1,37 mg/ $\mu L$	9,05x10 <sup>-4</sup> ± 1,37 mg/ $\mu L$
$[PdBr_2(Htrz)]_n$ <sup>b</sup>	4,57x10 <sup>-4</sup> ± 3,53 mg/ $\mu L$	4,16x10 <sup>-4</sup> ± 3,53 mg/ $\mu L$
Cisplatina <sup>a</sup>	18,88 ± 2,14 $\mu mol/L$ (5,66x10 <sup>-6</sup> mg/ $\mu L$ )	62,88 ± 2,14 $\mu mol/L$ (18,9x10 <sup>-6</sup> mg/ $\mu L$ )

Observando os dados expressos na Tabela 16, verifica-se que o potencial citotóxico do 1,2,4-triazol, [PdCl<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub>, [PdBr<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> e da cisplatina frente aos macrófagos peritoneais murinos é dependente da concentração. Os índices de IC<sub>25</sub> e IC<sub>50</sub> mostraram claramente que os compostos [PdCl<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> e [PdBr<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> são menos citotóxicos em relação ao triazol e a droga padrão *cis*-DDP. Quanto à influência do haleto no potencial citotóxico, nota-se que o cloro-complexo é significativamente menos citotóxico (IC<sub>25</sub> = 4,49x10<sup>-4</sup> ± 1,37 mg/μL; IC<sub>50</sub> = 9,05x10<sup>-4</sup> ± 1,37 mg/μL) comparado ao bromo-derivado (IC<sub>25</sub> = 4,57x10<sup>-5</sup> ± 3,53 mg/μL; IC<sub>50</sub> = 4,16x10<sup>-4</sup> ± 3,53 mg/μL).

#### **5.5.7.1 Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por macrófagos de camundongos normais.**

Os macrófagos respondem a um grande espectro de estímulos endógenos e exógenos, sendo que em particular, os estimulantes LPS (lipopolissacarídeo, uma endotoxina), o lipídio monofosforil A, muramildipeptídeo (N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina) de micobacteria e derivados deste como muramiltripeptídeo fosfatidil-etanolamina (MTP-PE) possuem um potencial de uso clínico. Os efeitos provocados pelos muramilpeptídeos e derivados, bem como pelo LPS, são exemplos de aumento na produção de citocinas como fator de necrose tumoral (TNF), intérféron-γ (INF-γ), interleucina-1 (IL-1), expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), secreção de óxido nítrico (NO<sup>\*</sup>), ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, além de regularem a adesão de moléculas à superfície dos macrófagos<sup>82,83</sup>.

Os produtos de redução do oxigênio (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>\*</sup>), conhecidos na literatura científica como Intermediários Reativos de Oxigênio (ROIs), bem como o oxigênio singlete <sup>1</sup>O<sub>2</sub><sup>\*</sup> (produto de excitação), constituem-se em componentes importantes dos mecanismos oxigênio-dependentes pelos quais as células invasoras são destruídas por leucócitos<sup>83</sup>.

Embora o radical ânion superóxido possa contribuir para a morte microbiana, outras espécies reativas do oxigênio, mais potentes, são geradas rapidamente a partir desse precursor. O peróxido de hidrogênio é formado por dismutação espontânea e/ou ação catalítica da superóxido dismutase. Em células que contêm em seus grânulos uma haloperoxidase, a mieloperoxidase (MPO), como os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é utilizado como substrato pela

MPO e oxida o  $\text{Cl}^-$  à  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$ , sendo este um potente oxidante de ação bactericida.

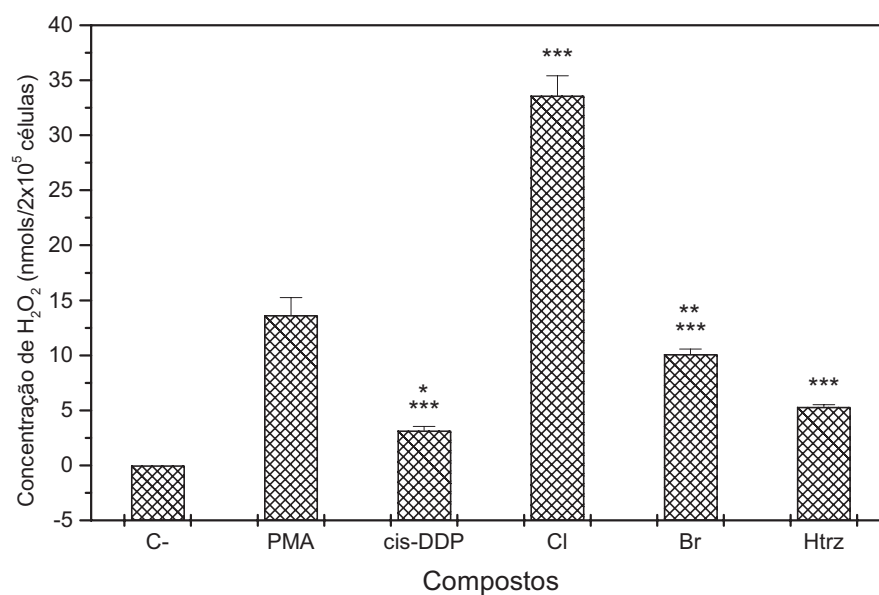
As espécies reativas de oxigênio podem também lesar o tecido do hospedeiro especialmente na vizinhança do sítio inflamatório. De fato, essas espécies reativas estão envolvidas em danos teciduais associados com um número de doenças inflamatórias incluindo artrite reumatóide, aterosclerose, desordens imunológicas, catarata, diabetes mellitus, câncer, doenças hepáticas e psoríase<sup>83</sup>.

A geração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é um processo celular natural, resultante de várias reações específicas essenciais à atividade celular. No entanto, a liberação de quantidades consideráveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  induz a quebra de fita de DNA e/ou perturbação no citoesqueleto da membrana, levando à morte celular<sup>84,85</sup>.

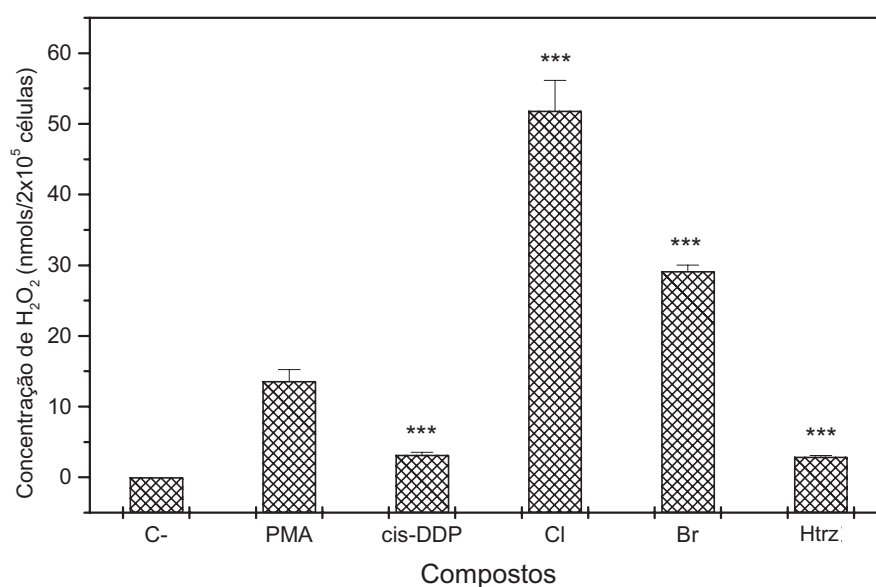
Ramasarma<sup>85</sup> observou que a molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem um papel na regulação celular, e que a exposição prolongada a altas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode destruir as estruturas biológicas e conduzir a lesões irreversíveis. Provavelmente tais ações líticas são iniciadas por espécies reativas de oxigênio como a observada na fagocitose. Sob condições fisiológicas normais, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é produzido em pequenas quantidades e é rapidamente utilizado ou degradado. Atualmente está claro que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberado não é somente usado como substrato para peroxidases ou como fonte redox para oxidação de grupamentos tióis nas proteínas. A utilização de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na regulação celular constitui um fato de pequena magnitude quando comparando seu grande potencial em modificar proteínas e, conseqüentemente, modular suas atividades.

Os macrófagos dos camundongos normais foram incubados em triplicata com os compostos Htrz,  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$ ,  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$  e *cis*-platina nas concentrações do  $\text{IC}_{25}$  (Figura 47a) e  $\text{IC}_{50}$  (Figura 47b), além do PMA (controle positivo, C+) e tampão completo de vermelho de fenol (controle negativo, C-) e os resultados encontram-se contemplados na Tabela 17.

---



(a)



(b)

**Figura 47.** Efeitos dos compostos na produção de peróxido de hidrogênio em culturas de macrófagos peritoneais. As células peritoneais de animais normais foram cultivadas em vermelho de fenol completo (controle negativo, C-) e com o PMA (controle positivo, C+). Os macrófagos dos camundongos normais foram incubados com os compostos Htrz,  $[PdCl_2(Htrz)]_n$  (Cl),  $[PdBr_2(Htrz)]_n$  (Br) e da cis-platina por 24h com os valores de IC<sub>25</sub> (Fig. 47a) e IC<sub>50</sub> (Fig. 47b). A reação foi interrompida, e a seguir foram lidas em espectrofotômetro a 620nm. Os resultados foram expressos em nanomols de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/2x10<sup>5</sup> células, como a média ± desvio-padrão de triplicatas de 5 animais. \*\*\*p < 0,001, \*\*p < 0,01 estatisticamente significativo.



**Tabela 17.** Efeitos dos compostos, nmol de  $H_2O_2/2 \times 10^5$  células, na produção de  $H_2O_2$  em culturas de macrófagos de camundongos normais.

Composto	IC <sub>25</sub>	IC <sub>50</sub>
Htrz	5,32 ± 0,19	2,89 ± 0,20
[PdCl <sub>2</sub> (Htrz)] <sub>n</sub>	33,62 ± 1,78	51,84 ± 4,31
[PdBr <sub>2</sub> (Htrz)] <sub>n</sub>	10,09 ± 0,48	29,16 ± 0,89
PMA	13,64 ± 1,61	13,64 ± 1,61
Cis-DDP	3,17 ± 0,38	3,18 ± 0,34

Sob as concentrações de IC<sub>25</sub>, os compostos Htrz, [PdCl<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> e [PdBr<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> demonstraram produzir níveis de  $H_2O_2$  estatisticamente significativos ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle negativo do animal normal. A produção de  $H_2O_2$  induzida pelos compostos [PdCl<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> e [PdBr<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> foi superior em relação ao controle positivo e estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ), conforme se observa na Figura 47a. Ainda pode-se verificar que o 1,2,4-triazol induziu a produção de níveis de  $H_2O_2$  estatisticamente significativos ( $p < 0,001$ ), sendo maior em relação ao controle negativo e em menor quantidade em relação ao controle positivo. Cabe mencionar que o índice de  $H_2O_2$  liberado na concentração de IC<sub>25</sub> para os compostos [PdCl<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> e [PdBr<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> é superior em relação às demais substâncias testadas.

Os compostos [PdCl<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> e [PdBr<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> induziram a produção de níveis de  $H_2O_2$  estatisticamente significativos ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle negativo do animal normal em suas respectivas concentrações de IC<sub>50</sub> (Figura 47b). Entretanto, o padrão *cis*-DDP e o Htrz, induziram níveis de  $H_2O_2$  que não são estatisticamente significativos ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle negativo do animal normal. A produção de  $H_2O_2$  induzida pelos complexos [PdCl<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> e [PdBr<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> novamente foi superior em relação ao controle positivo. Ainda pode-se observar que, sob as concentrações de IC<sub>50</sub>, o 1,2,4-triazol demonstra produzir níveis de  $H_2O_2$  estatisticamente significativos ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle positivo sendo inferiores aos compostos de paládio(II) testados.

A produção de  $H_2O_2$  é dependente da concentração das espécies utilizadas, pois se observa que para as concentrações de IC<sub>25</sub> a produção de  $H_2O_2$  é menor que para as doses de IC<sub>50</sub>.

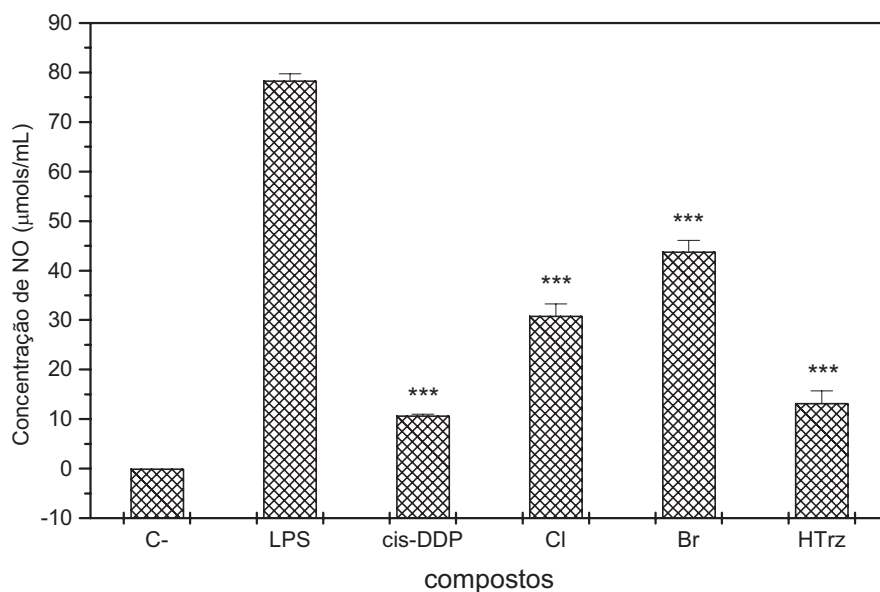
### **5.5.7.2 Produção de NO por macrófagos de camundongos normais**

O óxido nítrico (NO) e seus metabólitos, os reativos intermediários de nitrogênio (RNIs), desempenham um papel importante em diversos eventos celulares, constituindo-se numa das moléculas que exerce ação citotóxica contra células tumorais <sup>86</sup>. O NO é formado nos macrófagos ativados como o produto da conversão da L-citrolina em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Esta reação envolve o consumo de oxigênio. O excesso de NO causa estresse oxidativo, dano ao DNA, e interrupção do metabolismo energético, homeostase do cálcio e função mitocondrial. Todos esses distúrbios podem levar à morte celular por apoptose ou necrose, dependendo da severidade do dano <sup>87,88</sup>.

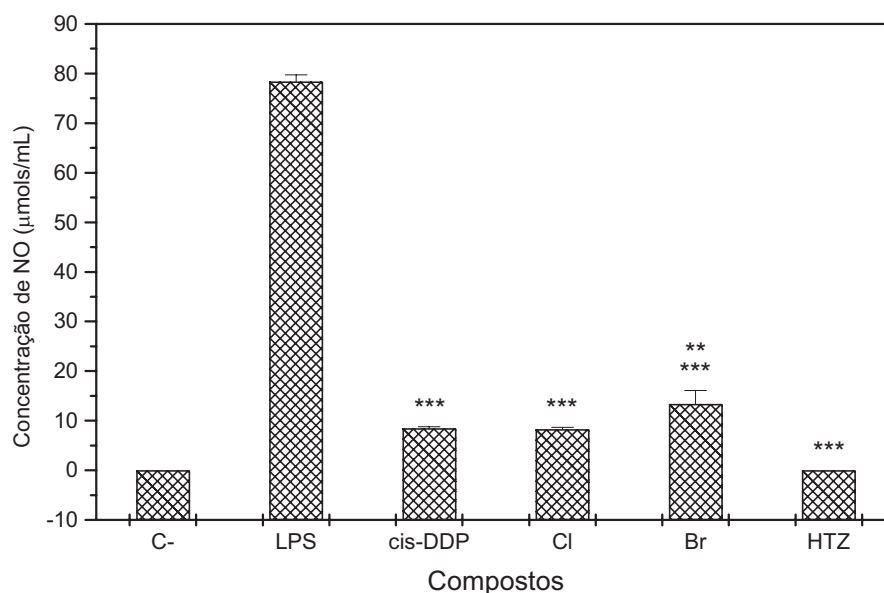
O NO possui atividade antitumoral dado que mostrou promover inibição da proliferação, promoção da diferenciação e redução da progressão metastática de alguns tipos de células tumorais <sup>88</sup>. Conjuntamente, TNF e NO são considerados os mediadores mais importantes envolvidos diretamente na morte de células tumorais <sup>89</sup>. Constatou-se que o crescimento tumoral associado com a inflamação é dependente da ativação endotelial e da infiltração de leucócitos induzidos pelas citocinas geradas pelo endotélio ativado. As primeiras citocinas secretadas na resposta imunológica, interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), determinam a adesão ao endotélio e a migração trans-endotelial dos leucócitos <sup>90</sup>. Sugere-se que essas duas citocinas formam uma rede de fatores relacionados que podem afetar a progressão celular tumoral de uma maneira cooperativa <sup>91</sup>.

Os macrófagos dos camundongos normais foram incubados em triplicata com os compostos Htrz, [PdCl<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub>, [PdBr<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> e a droga padrão, *cis*-DDP nas concentrações do IC<sub>25</sub> (Figura 48a) e IC<sub>50</sub> (Figura 48b) por 24h, além do LPS (controle positivo) e meio RPMI-1640-C (controle negativo), e os resultados encontram-se expressos na Tabela18.

---



(a)



(b)

**Figura 48.** Produção de óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais. Os macrófagos peritoneais de animais normais foram cultivados em meio RPMI-1640-C (controle negativo, C-) e com o LPS (controle positivo, C+). Os macrófagos dos animais normais foram incubados com os compostos Htrz,  $[PdCl_2(Htrz)]_n$  (Cl),  $[PdBr_2(Htrz)]_n$  (Br) e da cis-platina por 24h com os valores de  $IC_{25}$  (Fig. 48a) e  $IC_{50}$  (Fig. 48b). Aos sobrenadantes das culturas, adicionou-se o reagente de Griess, e após 10 min. a placa foi lida em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de nitrito foi obtida de uma reta padrão com quantidades conhecidas de  $NaNO_2$ . Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio-padrão de triplicatas de 5 animais. \*\*\* $p < 0,001$  estatisticamente significativo.

**Tabela 18.** Efeitos dos compostos na produção de NO ( $\mu\text{mol/mL}$ ) em culturas de macrófagos de camundongos normais.

Composto	IC <sub>25</sub>	IC <sub>50</sub>
Htrz	13,22 $\pm$ 2,45	0,00 $\pm$ 0,00
[PdCl <sub>2</sub> (Htrz)] <sub>n</sub>	30,85 $\pm$ 2,42	8,25 $\pm$ 0,41
[PdBr <sub>2</sub> (Htrz)] <sub>n</sub>	43,85 $\pm$ 2,26	13,37 $\pm$ 2,70
LPS	78,36 $\pm$ 1,36	78,36 $\pm$ 1,36
cis-DDP	10,74 $\pm$ 0,22	8,45 $\pm$ 0,32

Nas concentrações de IC<sub>25</sub>, os compostos [PdCl<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> e [PdBr<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> demonstraram produzir níveis de NO estatisticamente significativos ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle negativo do animal normal. A produção de NO induzida pelo padrão *cis*-DDP é estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle negativo e inferior aos valores observados para os compostos [PdCl<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> e [PdBr<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> (Figura 48a). Os níveis de NO produzidos na presença do 1,2,4-triazol são estatisticamente significativos em relação ao controle negativo do animal normal ( $p < 0,001$ ) e inferiores aos índices observados para os complexos de Pd(II).

Nas concentrações de IC<sub>50</sub>, os complexos [PdCl<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub>, [PdBr<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> e o padrão *cis*-DDP também produziram níveis de NO estatisticamente significativos ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle negativo do animal normal (Figura 48b). Ainda pode-se observar que os níveis de NO produzidos pelo composto [PdCl<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> e [PdBr<sub>2</sub>(Htrz)]<sub>n</sub> não são estatisticamente significativos em relação a *cis*-DDP ( $p > 0,05$ ). Os níveis de NO produzidos pelo Htrz não são estatisticamente significativos ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle negativo do animal normal.

A produção de NO é dependente da concentração das espécies utilizadas, pois se observa que para as concentrações de IC<sub>50</sub> a produção de NO é menor que para as doses de IC<sub>25</sub>. O ligante, os compostos e a cisplatina embora induzam a produção de NO, estes níveis são menores do que aquele produzido pelo agente estimulante LPS.

### 5.5.7.3 Determinação da inibição da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Os dados obtidos da inibição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir da incubação dos macrófagos por 24 h com as concentrações de IC<sub>25</sub> e IC<sub>50</sub> dos compostos, na presença de PMA, estão contidos na Tabela 19.

**Tabela 19.** Porcentagem de inibição dos compostos sobre a produção de  $H_2O_2$  em macrófagos de camundongos normais após exposição aos  $IC_{25}$  e  $IC_{50}$  por 24 h.

Compostos	$H_2O_2$ ( $IC_{25}$ )	$H_2O_2$ ( $IC_{50}$ )
Htrz	$15,06 \pm 0,85$	$15,19 \pm 0,20$
$[PdCl_2(Htrz)]_n$	0,00	0,00
$[PdBr_2(Htrz)]_n$	0,00	0,00
cis-DDP	100	100

A droga padrão cisplatina inibe em 100% a produção de  $H_2O_2$ . O ligante Htrz inibe a produção de  $H_2O_2$  em apenas 15%. Os compostos  $[PdCl_2(Htrz)]_n$  e  $[PdBr_2(Htrz)]_n$  não inibiram a produção de  $H_2O_2$  após 24 h de incubação.

#### 5.5.7.4 Determinação da inibição de NO

As porcentagens de inibição dos compostos sobre a produção de NO estão ilustradas na Tabela 20.

**Tabela 20.** Porcentagem de inibição dos compostos sobre a produção de NO em macrófagos de camundongos normais após exposição aos  $IC_{25}$  e  $IC_{50}$  por 24 h.

Compostos	NO ( $IC_{25}$ )	NO ( $IC_{50}$ )
Htrz	$82,18 \pm 1,94$	$89,81 \pm 0,14$
$[PdCl_2(Htrz)]_n$	$48,87 \pm 2,64$	$77,19 \pm 1,44$
$[PdBr_2(Htrz)]_n$	$11,74 \pm 2,37$	$58,86 \pm 0,45$
cis-DDP	$66,09 \pm 2,59$	$73,11 \pm 1,10$

Os compostos levam a inibição do NO em menos de 50% utilizando as doses de  $IC_{25}$ , sendo que somente a droga padrão (cisplatina) supera este valor. Para as concentrações de  $IC_{50}$  dos compostos, estes inibem o NO em mais de 50%, sendo o mais efetivo o  $[PdCl_2(Htrz)]_n$  que apresenta porcentagem de inibição similar à droga padrão.

## 5.6 – Compostos $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ e $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ .

### 5.6.1 – Propriedades físicas e análise elementar.

As propriedades físicas bem como os dados de análise elementar para os compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  e  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$  encontram-se listados na Tabela 21.

**Tabela 21.** – Propriedades físicas e análise elementar dos complexos  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  e  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ .

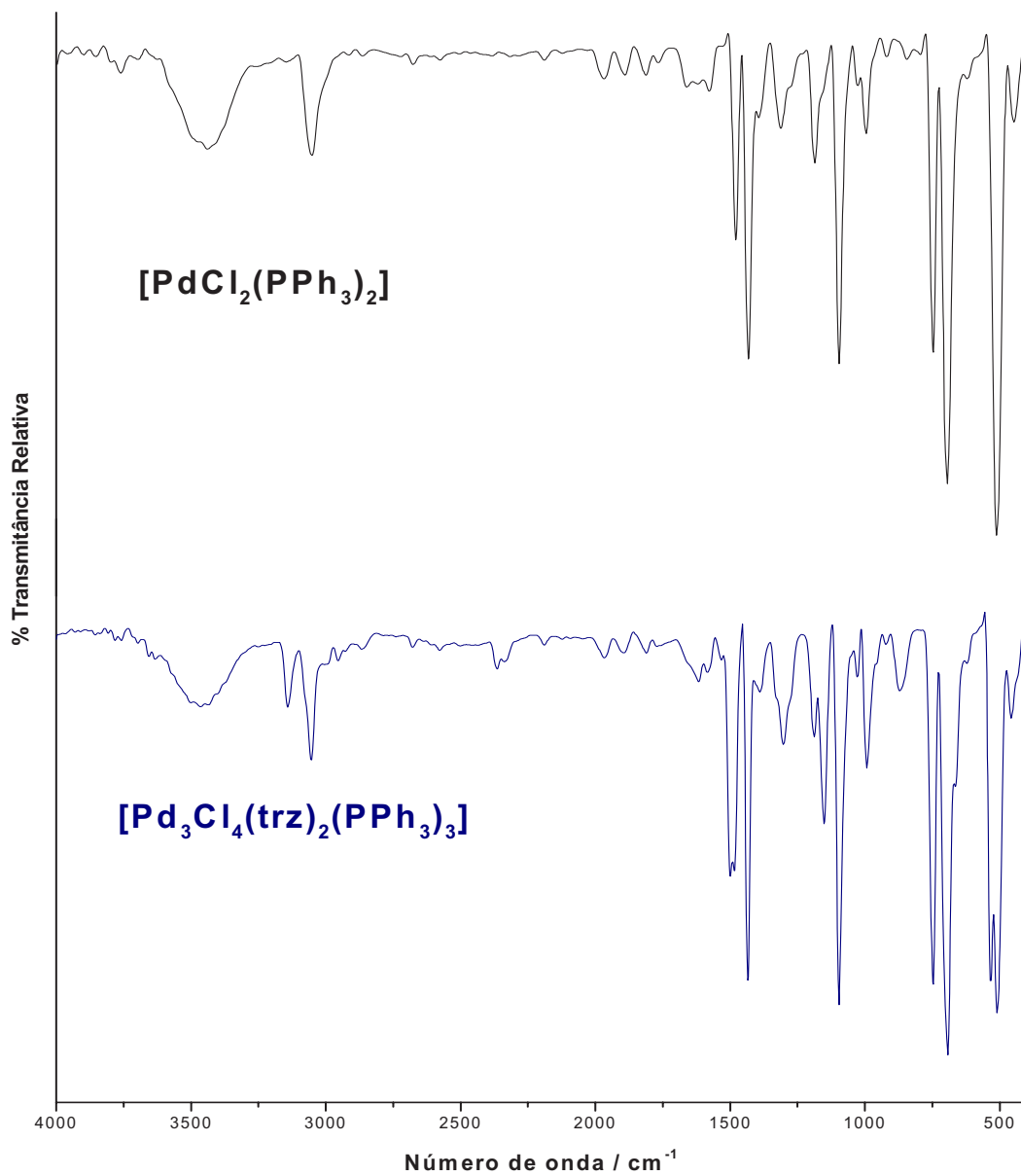
Composto	Cor	P.f. / °C	Análise elementar obtido(calculado)
$[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ <sup>93</sup>	Amarelo-gema	275 (dec.)	%C=60,68(61,60); %H=3,43(4,31)
$[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ <b>Inédito</b>	Creme	223-225	%C=9,61(7,16); %H=0,81(0,9); %N=15,47(12,53)

### 5.6.2 – Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho.

A análise do espectro no IV (Figura 49) do composto  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  evidenciou a não coordenação do 1,2,4-triazol devido à ausência de suas bandas características. A coordenação da trifenilfosfina ( $\text{PPh}_3$ ) foi diagnosticada devido à presença de suas bandas características na região de 1479,  $\nu(\text{CC})$ ; 1434, q; 746,  $\gamma(\text{CH})$  e 692  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\gamma(\text{anel})$ .

Já a análise do espectro no IV (Figura 49) do composto  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$  permitiu evidenciar a coordenação do triazol devido à presença de suas bandas características na região de 3140,  $\nu(\text{CH})$ ; 1500,  $\rho_1$ ; 1302,  $\delta(\text{CH})$ ; 1151,  $\rho_2$ ; 993,  $\gamma(\text{CH})$ ; 665  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\tau$ . A coordenação da trifenilfosfina ( $\text{PPh}_3$ ) também foi confirmada pela presença de suas bandas características na região de 1498,  $\nu(\text{CC})$ ; 1435, q; 744  $\gamma(\text{CH})$  e 692  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\gamma(\text{anel})$ .

As frequências vibracionais presentes nos espectros no IV dos compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  e  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$  foram atribuídas<sup>63,64</sup> e encontram-se listadas na Tabela 22.



**Figura 49.** Espectros vibracionais no IV para os compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  e  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ .

**Tabela 22.** Dados obtidos por espectroscopia no IV dos compostos  $[PdCl_2(PPh_3)_2]$  e  $[Pd_3Cl_4(trz)_2(PPh_3)_3]$  e suas respectivas atribuições.

$\bar{\nu}$ $cm^{-1}$		Atribuições
$[PdCl_2(PPh_3)_2]$	$[Pd_3Cl_4(trz)_2(PPh_3)_3]$	
----	3140 m	$\nu$ CH (Htrz)
3051 m	3053 m	$\nu$ CH (PPh <sub>3</sub> )
----	1583 f	$\phi$ respiração do anel (PPh <sub>3</sub> )
----	1500 F	$\rho_1$ (Htrz)
1479 m	1498 F	$\nu$ anel <sub>1</sub> (PPh <sub>3</sub> )
1433 F	1435 MF	$\nu$ anel <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> )
----	1301 m	$\delta$ CH (Htrz)
1186 m	1188 m	$\beta$ CH (PPh <sub>3</sub> )
----	1151 F	$\rho_2$ (Htrz)
1095 F	1095 MF	q (PPh <sub>3</sub> )
995 m	----	$\nu$ (anel) <sub>3</sub> (PPh <sub>3</sub> )
----	993 m	$\gamma$ (CH)
----	870 f	$\gamma$ CH (Htrz)
746 F	746MF	$\gamma$ CH <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> )
694 MF	692 MF	$\gamma$ anel (PPh <sub>3</sub> )
----	665 m	$\tau_1$ (Htrz)
511 MF	509 F	y (PPh <sub>3</sub> )
447 m	457 m	t (PPh <sub>3</sub> )

Os modos de coordenação *N2,N4*-bidentado e monodentado para o 1,2,4-triazol são pouco prováveis, pois as duas absorções de torção do anel não estão presentes no espectro vibracional do composto  $[Pd_3Cl_4(trz)_2(PPh_3)_3]$ . A presença de apenas uma das bandas de torção do anel em  $665\text{ cm}^{-1}$  sugere a coordenação *N1,N2*-bidentada ou *N1,N2,N4*-tridentada do triazolato. Além disso, a banda típica  $\nu$ (NH) não foi observada, o que ratifica a possível presença do triazolato.

### 5.6.3 – Espectroscopia de RMN.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  dos compostos  $[PdCl_2(PPh_3)_2]$  e  $[Pd_3Cl_4(trz)_2(PPh_3)_3]$  estão representados nas Figuras 50 e 51, respectivamente. Os valores dos deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  estão contidos na Tabela 23.



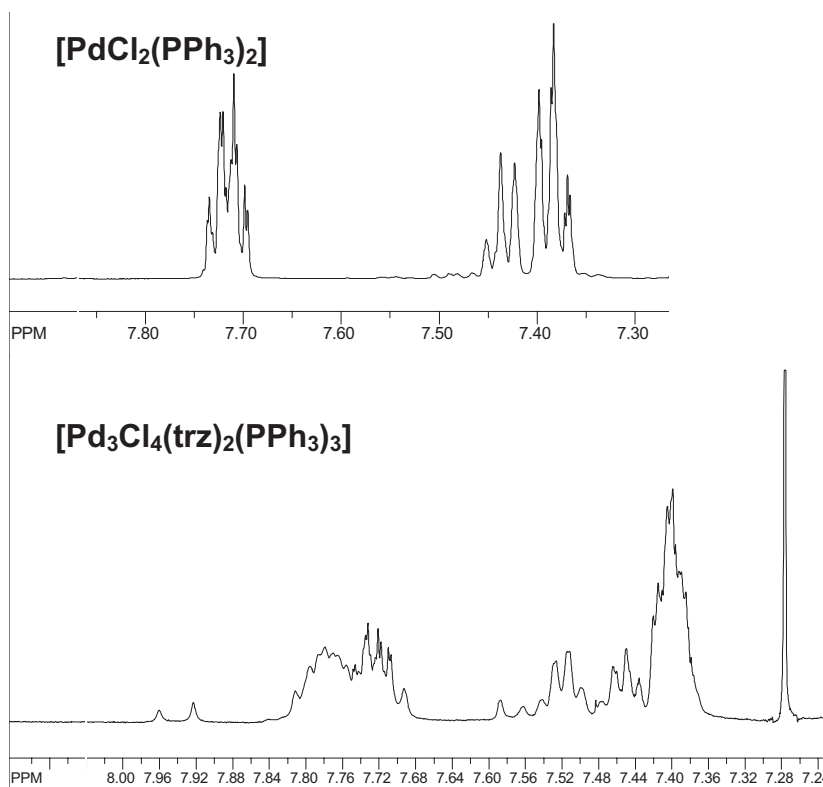


Figura 50. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  para os compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  e  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ .

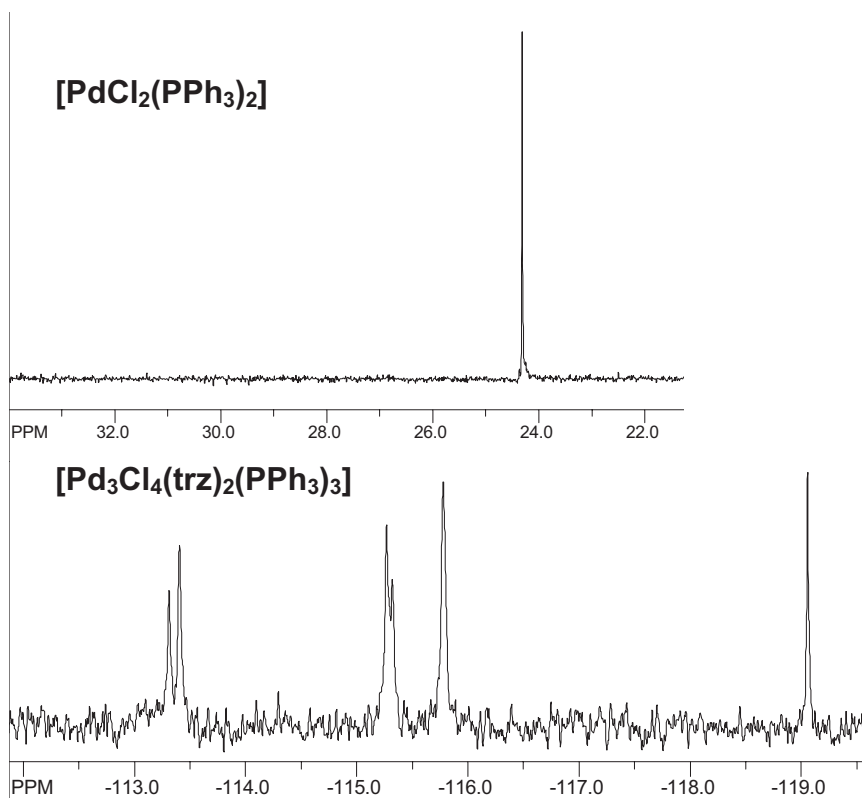


Figura 51. Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  para os compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  (Padrão  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (80%)) e  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$  (Padrão TMP).

**Tabela 23.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ , em ppm, para os compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  e  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ .

Compostos	$[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$	$[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$
$H_{\text{fenil}}$	7,45-7,36 m; 7,73-7,69 m	7,38-7,59 m; 7,69-7,81 m
$H_{3,5\text{-trz}}$	----	7,92s e 7,96s
$^{31}\text{P}$	24,32 <sup>a</sup>	-119,06 <sup>b</sup> (21,94 <sup>a</sup> ); -115,78 (25,22); -115,27 (25,73); -113,41 (27,59); -113,34 (27,66)

a. Padrão  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (80%) / b. Padrão TMP

A coordenação da trifenilfosfina no composto  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  é confirmada pela presença de intensos multipletos em torno de 7,0 - 8,0 ppm no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  bem como pelo aparecimento de um único sinal em 24,32 ppm no espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$ .

Já a coordenação da trifenilfosfina no complexo  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$  é confirmada pela presença de intensos multipletos em torno de 7,0 - 8,0 ppm nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e pela existência de sinais de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  entre 21,94 e 27,66 ppm. A coordenação do triazol é evidenciada pela presença de dois singletos em 7,92 e 7,96 ppm no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

A presença de dois singletos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$  em 7,92 e 7,96 ppm indica a existência de ambientes químicos não equivalentes para os prótons do 1,2,4-triazol. Como a coordenação pelos modos  $N1,N2$ -bidentado e monodentada são pouco prováveis e na simetria  $C_{2v}$  o triazol possui os dois prótons (C3,5) em ambientes químicos equivalentes, é razoável atribuir estes sinais ao triazol nos modos bi e tridentado. A existência de cinco sinais de  $^{31}\text{P}$  no espectro de RMN do complexo  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$  entre -119,06 e -113,34 ppm pode indicar a presença de isômeros em solução.

#### 5.6.4 – Espectroscopia de Reflectância Difusa.

Os espectros de reflectância difusa dos compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  e  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ , obtidos na região de 200-800 nm, estão representados na Figura 52. Os valores dos comprimentos de ondas de absorção e as transições correspondentes estão contidos na Tabela 24.

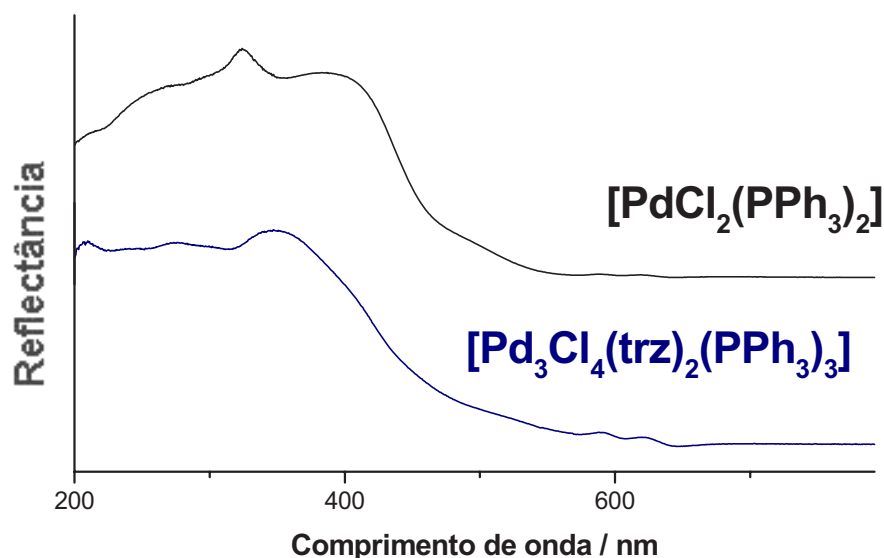


Figura 52. Espectros de reflectância difusa dos compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  e  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ .

Tabela 24. Dados obtidos por espectroscopia de reflectância difusa, em nm, dos compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  e  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$  e suas respectivas atribuições.

Compostos	IL (Htrz)	IL (PPh <sub>3</sub> )	MLCT	CL ( $^1A_{1g} \rightarrow ^1A_{2g}$ )
$[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$	a	268	387( $d_{\text{Pd}} \rightarrow \pi^*_{\text{PPh}_3}$ )	460 om
$[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$	209	274	348( $d_{\text{Pd}} \rightarrow \pi^*_{\text{trz}}$ )	a

a = não observada.

Os espectros de reflectância dos compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  e  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$  apresentaram bandas na região de 268-274 nm atribuídas a transições IL do ligante  $\text{PPh}_3$ <sup>92</sup>. Nota-se ainda o aparecimento de bandas de transferência de carga  $d_{\text{Pd}} \rightarrow \pi^*_{\text{PPh}_3}$  (MLCT) em 387 nm para o composto  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ , bem como bandas de transferência de carga  $d_{\text{Pd}} \rightarrow \pi^*_{\text{trz}}$  (MLCT) em 348 nm para o composto  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ . No composto  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  nenhuma banda de absorção IL do ligante Htrz foi observada, o que confirma a não coordenação do mesmo, já no composto  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$  a coordenação do ânion triazolato é ratificada pela presença da absorção em 209 nm atribuída a uma transição IL deste ânion.

A transição de campo ligante no espectro eletrônico do composto  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$  não se apresentou totalmente resolvida, pois se encontra pouco encoberta pelas bandas intensas de TC; foi observado apenas um ombro na região de 460 nm atribuído a transições  $d-d$  do tipo  $^1A_{1g} \rightarrow ^1A_{2g}$ , que são características de sistemas eletrônicos  $d^8$  quadrado-planares<sup>71</sup>.

### 5.6.5 – Proposição estrutural.

Para o complexo no qual não foi possível a coordenação do triazol, os dados de análise elementar e suas propriedades físicas indicam que a fórmula mínima seja  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]^{93}$ . A Figura 50 ilustra a fórmula estrutural para este composto, no qual os ligantes adotam uma configuração *trans*, com o intuito de diminuir o impedimento estérico causado pela trifenilfosfina que é um ligante bastante volumoso, arranjando-se na configuração mais estável.

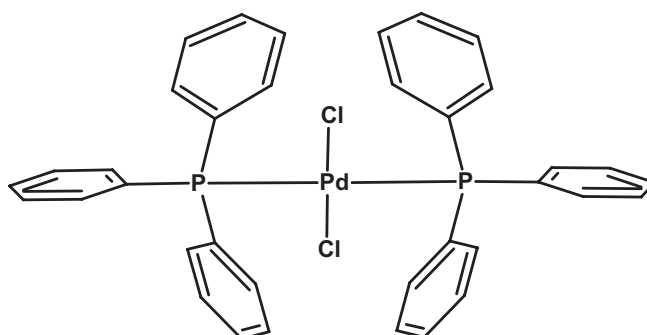


Figura 53. Proposta estrutural para o composto *trans*-  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ .

De acordo com os dados de análise elementar e com as evidências da presença do triazolato com simetria  $C_{2v}$  foram feitas propostas estruturais para os possíveis isômeros em solução para o composto  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ . (Figura 51)

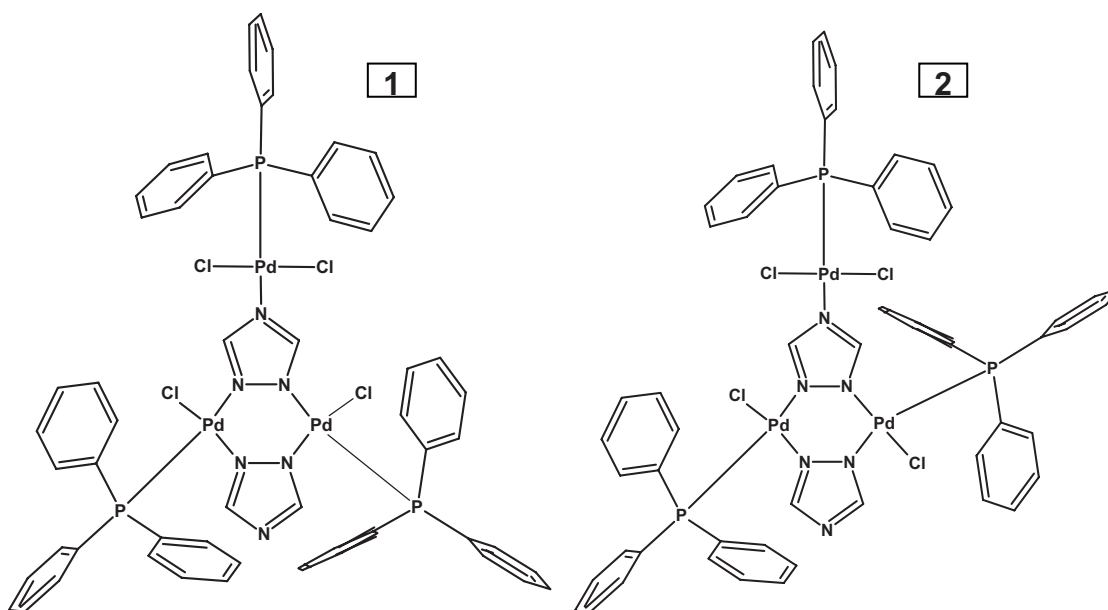


Figura 54. Propostas estruturais para os dois isômeros em solução do composto  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$ .

Para a *proposta 1* seriam esperados dois sinais de  $^{31}\text{P}$ , visto que dois dos três átomos de fósforo estão em ambientes químicos equivalentes, o que não é verdade para a *proposta 2*, onde os três átomos de fósforo encontram-se em ambientes químicos distintos, resultando em três sinais de  $^{31}\text{P}$ . Assim, os cinco sinais observados no espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  sugerem a coexistência dos dois isômeros em solução.

## 6. – CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu verificar a influência das condições experimentais de síntese – particularmente a variação na razão molar metal : ligante e natureza do precursor – no tipo de produto formado. Verificou-se que as proporções  $1[\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2] : 2\text{Htrz} : 2\text{PPh}_3$  não geram ambiente satisfatório para a coordenação do 1,2,4-triazol, muito provavelmente por causa da competição com o ligante  $\text{PPh}_3$ , conduzindo neste caso à formação do complexo mononuclear  $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ . Entretanto, em uma condição experimental de excesso de triazol, sua coordenação é favorecida. Sendo assim, utilizando uma proporção molar igual a  $1[\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2] : 2\text{Htrz} : 1\text{PPh}_3$  foi obtido o complexo trinuclear  $[\text{Pd}_3\text{Cl}_4(\text{trz})_2(\text{PPh}_3)_3]$  com a coordenação do ânion triazolato nos modos bi e tridentado. Portanto, durante a coordenação, o triazol pode ser facilmente desprotonado, o que privilegia a coordenação do ânion triazolato, resultando em complexos onde o mesmo pode atuar nos modos bi e/ou tridentado. Entretanto, isto pode ser evitado acidificando o meio reacional. Em meio ácido ocorre a coordenação do triazol no modo bidentado. Além disso, utilizando-se condições experimentais idênticas, mas partindo de precursores distintos o triazol pode se coordenar de diferentes modos. Partindo-se do precursor  $\text{H}_2\text{PdCl}_4$  foram obtidos os dímeros  $[\text{Pd}_2\text{Cl}_4(\text{Htrz})_2]$  e  $[\text{Pd}_2\text{Br}_4(\text{Htrz})_2]$  com o triazol coordenado no modo  $N1,N2$ . Já quando o precursor utilizado foi  $[\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2]$  foram obtidos os polímeros  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$  e  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$ , onde o triazol está  $N2,N4$ -coordenado.

Estes fatos ilustram a grande variedade de modos de coordenação que o triazol pode assumir durante a síntese de complexos metálicos. A espectroscopia no IV é uma valiosa ferramenta na investigação da natureza de coordenação do triazol. Informações sobre o modo de coordenação do 1,2,4-triazol podem ser obtidas através da análise das bandas de torção do anel encontradas entre  $600$  e  $700\text{ cm}^{-1}$ . Quando o triazol atua no modo  $N1,N2$ -bidentado ou  $N1,N2,N4$ -tridentados ocorre a ausência ou forte redução da intensidade de uma das duas bandas de vibração de torção do anel ( $\tau_1$  ou  $\tau_2$ ), o que é claramente evidenciado em seu espectro no IV. Agora quando coordenação bidentada ocorre através de  $N2,N4$ , as bandas de torção do anel não sofrem alterações significativas. Além disso, a presença do íon triazolato pode ser facilmente reconhecida no espectro, pois a desprotonação do Htrz influencia fortemente a posição das bandas de torção do anel, sendo que a

banda próxima a  $625\text{ cm}^{-1}$  no complexo de Htrz muda para uma região entre  $670\text{--}680\text{ cm}^{-1}$  no complexo de trz.

Uma diferença significativa foi observada entre os espectros de reflectância difusa dos compostos diméricos ( $[\text{Pd}_2\text{Cl}_4(\text{Htrz})_2]$  e  $[\text{Pd}_2\text{Br}_4(\text{Htrz})_2]$ ) e dos polímeros  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$  e  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$ , uma vez que os espectros destes últimos apresentaram bandas mais largas e menos resolvidas. De fato, os polímeros apresentam um maior número de centros metálicos e, conseqüentemente, uma quantidade maior de níveis de energia, assim um número maior de transições pode ocorrer, fazendo com que bandas discretas se fundam, obtendo-se, então, bandas largas, diminuindo consideravelmente a resolução do espectro. Isto tornou-se evidente no espectro de reflectância do composto  $[\text{PdI}_2(\text{Htrz})]_n$  (ver Figura 29, composto **3**) que, embora tenha sido sintetizado a partir do mesmo precursor que os dímeros  $[\text{Pd}_2\text{Cl}_4(\text{Htrz})_2]$  e  $[\text{Pd}_2\text{Br}_4(\text{Htrz})_2]$ , apresentou um comportamento diferente da série, com o triazol coordenando-se no modo *N2,N4*-bidentado, gerando desse modo uma estrutura polimérica.

Com relação aos experimentos biológicos, foi observado que os macrófagos peritoneais obtidos de camundongos normais Balb/C são sensíveis ao potencial tóxico dos compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$ ,  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$ , bem como para o ligante 1,2,4-triazol (Htrz) e o padrão-cis-platina. Apesar do composto  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$  ser menos citotóxico em relação ao  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$ , foi aquele que mais estimulou a liberação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no período de 24 h enquanto que o 1,2,4-triazol inibiu a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  neste mesmo período. Os compostos  $[\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$  e  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n$  estimularam a liberação de níveis de NO superiores ao do ligante 1,2,4-triazol (Htrz).

Com base nos dados obtidos, sugere-se que a capacidade de liberação de NO e  $\text{H}_2\text{O}_2$  por macrófagos peritoneais *in vitro* seja potencializada quando o 1,2,4-triazol coordena-se ao Pd(II). Considerando que os complexos são isoestruturais, em que variou-se apenas a natureza do haleto coordenado ao centro metálico, foi possível verificar a influência destes ligantes na quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberada e detectada. Assim, resulta a seguinte ordem crescente:  $[\text{PdBr}_2(\text{Htrz})]_n < [\text{PdCl}_2(\text{Htrz})]_n$ .

Os complexos  $[\text{Pd}_2\text{Cl}_4(\text{Htrz})_2]$ ,  $[\text{Pd}_2\text{Br}_4(\text{Htrz})_2]$  e  $[\text{PdI}_2(\text{Htrz})]_n$  submetidos a testes de inibição do crescimento da *Mycobacterium tuberculosis* apresentaram valores de CIM superiores a  $125\text{ }\mu\text{g/mL}$ , mostrando-se pouco eficientes na inibição

da multiplicação da micobactéria causadora da tuberculose, já que atividade com CIM acima de 31,25 µg/mL para substâncias sintéticas é considerada pouco promissora.



---

## 7. REFERÊNCIAS

---

- 1 LEE, J. D. **Química inorgânica não tão concisa**. 5. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2000. 527 p.
  - 2 GRAY, H. B.; BALLHAUSEN, C. J. A molecular orbital theory for square planar metal complexes. **Journal of the American Chemical Society**, New York, v. 85, n. 3, p. 260-265, Feb. 1963.
  - 3 FENSKE, R. F.; MARTIN, D. S.; RUEDENBERG, K. Ligand field theory of square-planar platinum(II) complexes. **Inorganic Chemistry**, Iowa, v. 1, n. 3, p. 441-452, Aug. 1962.
  - 4 HAASNOOT, J. G. Mononuclear, oligonuclear and polynuclear metal coordination compounds with 1,2,4-triazole derivatives as ligands. **Coordination Chemistry Reviews**, Leiden, v. 200-202, p. 131-185, Jan. 2000.
  - 5 PERUMAREDDI, J. R.; LIEHR, A. D.; ADAMSON, A. W. Ligand field theory of transition metal cyanide complexes. Part I. The zero, one and two electron or hole configurations. **Journal of the American Chemical Society**, New York, v. 85, n. 3, p. 249-259, Feb. 1963.
  - 6 FERGUSON, J. Crystal spectra of metal coordination compounds. III. Nickel complexes with salicylaldehyde and its imines. **Journal of Chemical Physics**, v. 34, n. 2, p. 615, Feb. 1961.
  - 7 HARRIS, C.; LIVINGSTONE, M. S. E.; REECE, I. H. Spectrophotometric evidence for the solvation of halogenopalladate(II). Ions by various polar solvents. **Journal of Chemical Society**, p. 1505-1510, Apr. 1959.
  - 8 GANGOPADHAYAY, A. K.; CHAKRAVORTY, A. Charge transfer spectra of some gold(III) complexes. **Journal of Chemical Physics**, Calcutta, v. 35, n. 6, p. 2206-2209, Dec. 1961.
  - 9 POTTS, K. T. The chemistry of 1,2,4-triazoles. **Chemical Reviews**, Adelaide, v. 61, n. 2, p. 87-127, Apr. 1961.
  - 10 WITANOWSKI, M. et al. Nitrogen-14 nuclear magnetic-resonance of azoles and their benzo derivatives. **Tetrahedron**, Warszawa, v. 28, n. 3, p. 637-653, 1972.
  - 11 SCHRODER, M. et al. **Comprehensive coordination chemistry**. Oxford: Pergamon, 1987. 277 p.
  - 12 GORTER, S.; ENGELFRIET, D. W. 1,2,4-triazole complexes .15. The structure of tetraaqua-sulphato(1,2,4-triazole)manganese(II). **Acta Crystallographica. Section B-Structural Science**, v. 37, p. 1214-1218, June 1981.
  - 13 NOMIYA, K.; TSUDA, K.; KASUGA, N. C. Synthesis and X-ray characterization of helical polymer complexes [Ag(1,2,3-L)(PPh<sub>3</sub>)(2)](n) and [Ag(1,2,4-L)(PPh<sub>3</sub>)(2)](n) (L = triazole) and their antimicrobial activities. **Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions**, Cambs, v. 21, n. 10, p. 1653-1659, May 1998.
-

---

14 NOMIYA, K. et al. Synthesis and crystal structure of gold(I) complexes with triazole and triphenylphosphine ligands: monomeric complex  $[\text{Au}(1,2,3\text{-L})(\text{PPh}_3)]$  and dimeric complex  $[\text{Au}(1,2,4\text{-L})(\text{PPh}_3)]_2$  (HL = triazole) through an Au-Au bond in the solid state. **Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions**, Cambs, v. 21, n. 24, p. 4101-4108, Dec. 1998.

15 JARVIS, J. A. J. Crystal structure of a complex of cupric chloride and 1,2,4-triazole. **Acta Crystallographica**, Manchester, v. 15, p. 964-966, Oct. 1962.

16 ORO, L. A.; PINILLOS, M. T.; TEJEL, C. J. ETA-3-Allyl rhodium complexes with azolate ligands - crystal-structures of the trinuclear 1,2,4-triazolate. complexes  $[\text{Rh}_3(\text{Mu-trz})_3(\text{ETA-3-C}_3\text{H}_5)_6]$  and  $[\text{Rh}_3(\text{Mu-3-trz})(\text{Mu-Cl})\text{Cl}(\text{ETA-3-C}_3\text{H}_5)_2(\text{CO})_4].0,5\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$ . **Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions**, Cambs, v. 10, p. 2193-2200, Oct. 1986.

17 PICHIERRI, F. et al. Qualitative EH-FMO interpretation of the Pt-195 NMR shifts in heterobimetallic complexes containing the Pt-Pd-Y core: an inverse halogen dependence. **Inorganica Chimica Acta**, Lausanne, v. 264, n. 1/2, p. 109-116, Nov. 1997.

18 DING, B. et al. Synthesis and characterization of a 3D coordination polymer based on trinuclear triangular Cu-II as secondary building units. **Inorganic Chemistry**, Washington, v. 45, n. 15, p. 5799-5803, July 2006.

19 KROBER, J. et al. Crystal-structure of  $\text{Zn}(\text{trz})\text{Cl}$  (trz=1,2,4-Triazolato) - A layered compound with triply bridging triazolato groups. **Inorganica Chimica Acta**, Lausanne, v. 230, n. 1/2, p. 159-163, Mar. 1995.

20 GRAP, S. R.; KURBAKOVA, A. P.; EFIMENKO, I. A. Binuclear palladium(II) complexes with 1,2,4-triazole. **Zhurnal Neorganicheskoi Khimii**, Moscow, v. 40, n. 2, p. 250-253, Feb. 1995.

21 GARSKE, J. E. L. **Síntese de 1,2,4-triazóis derivados do benzotiazol e trazol e seus intermediários potenciais agentes quimioterápicos**. 1991. f. 27-28. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.

22 NOMIYA, K. et al. Synthesis, crystal structure and antimicrobial activities of two isomeric gold(I) complexes with nitrogen-containing heterocycle and triphenylphosphine ligands,  $[\text{Au}(\text{L})(\text{PPh}_3)]$  (HL = pyrazole and imidazole). **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 78, n. 4, p. 363-370, Mar. 2000.

23 BAKHTIAR, R.; OCHIAI, E. I. Pharmacological applications of inorganic complexes. **General Pharmacology**, Huntingdon, v. 32, n. 5, p. 525-540, May 1999.

24 JANEWAY, C. J. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999.

25 ERBERHARDT, M. K. **Reactive oxygen metabolites: chemistry and medical consequences**. Boca Raton: CRC Press, 2001. 590 p.

26 SHEEHAN, C. The scope of immunology. In: \_\_\_\_\_. **Principles and laboratory diagnosis clinical immunology**. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1990. cap. 1, p. 1-3.

---

- 
- 27 ALEXANDER, P.; EVANS, R. Endotoxin and double stranded RNA render macrophages cytotoxic. **Nature-New Biology**, Hampshire, v. 232, n. 29, p. 76, 1971.
- 28 MELTZER, M. S. Macrophage activation for tumor cyto-toxicity - characterization of priming and trigger signals during lymphokine activation. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 127, n. 1, p. 179-183, 1981.
- 29 MANTOVANI, A.; DEJANA, E. Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial-cells. **Immunology Today**, Oxon, v. 10, n. 11, p. 370-375, Nov. 1989.
- 30 SODHI, A.; SARNA, S. Ultrastructural observations on the effect of cis-dichlorodiammine platinum (ii) on the cells of fibrosarcoma in swiss white mice. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 17, n. 1, p. 1-8, 1979.
- 31 PIESENS, W. F. Increased binding of tumor-cells by macrophages activated in vitro with lymphocyte mediators. **Cellular Immunology**, San Diego, v. 35, n. 2, p. 303-317, Feb. 1978.
- 32 CHABNER, B. A. et al. Agentes antineoplásicos. In: \_\_\_\_\_. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Espanha: McGraw-Hill, 1996. cap. 51, p. 909.
- 33 ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, London, v. 205, n. 4972, p. 698-699, Feb. 1965.
- 34 ROSENBERG, B. et al. Platinum compounds - a new class of potent antitumour agents. **Nature**, London, v. 222, n. 5191, p. 385, 1969.
- 35 ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L. Successful regression of large solid sarcoma 180-tumors by platinum compounds. **Cancer Research**, Birmingham, v. 30, n. 6, p. 1799, 1970.
- 36 KOCIBA, R.; SLEIGHT, S. D.; ROSENBERG, B. Inhibition of dunning ascitic leukemia and walker 256-carcinoma with cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875). **Cancer Chemotherapy Reports Part 1**, Georgetown, v. 54, n. 5, p. 325, 1970.
- 37 JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. **Chemical Reviews**, Cambridge, v. 99, n. 9, p. 2467-2498, Apr. 1999.
- 38 HAMBLEY, T. W. The influence of structure on the activity and toxicity of Pt anti-cancer drugs. **Coordination Chemistry Reviews**, Sydney, v. 166, p. 181-223, Nov. 1997.
- 39 KLEINERMAN, E. S.; ZWELLING, L. A.; MUCHMORE, A. V. Enhancement of naturally-occurring human spontaneous monocyte-mediated cyto-toxicity by cis-diamminedichloroplatinum(II). **Cancer Research**, Philadelphia, v. 40, n. 9, p. 3099-3102, 1980.
- 40 ROSENBERG, B. Fundamental-studies with cisplatin. **Cancer**, New York, v. 55, n. 10, p. 2303-2316, 1985.
- 41 FIDLER, I. J.; SCHROIT, A. J. Recognition and destruction of neoplastic-cells by activated macrophages - discrimination of altered self. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 948, n. 2, p. 151-173, Nov. 1998.
-

---

42 BARTHOLEYNS, J.; LOPEZ, M.; ANDREESEN, R. Adoptive immunotherapy of solid tumors with activated macrophages - experimental and clinical-results. **Anticancer Research**, Athens, v. 11, n. 3, p. 1201-1204, May 1991.

43 SON, K.; KIM, Y. M. In-vivo cisplatin-exposed macrophages increase immunostimulant-induced nitric-oxide synthesis for tumor-cell killing. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 55, n. 23, p. 5524-5527, Dec. 1995.

44 KORBELIK, M.; NARAPARAJU, V. R.; YAMAMOTO, N. Macrophage-directed immunotherapy as adjuvant to photodynamic therapy of cancer. **British Journal of Cancer**, Midlothian, v. 75, n. 2, p. 202-207, 1997.

45 SHISHODIA, S.; SODHI, A.; SHRIVASTAVA, A. Cisplatin-induced activation of murine bone marrow-derived macrophages require protein tyrosine phosphorylation. **International Journal of Immunopharmacology**, Oxford, v. 19, n. 11/12, p. 683-690, Nov. 1997.

46 DE ALMEIDA, E. T. et al. Activation of mice peritoneal macrophages by palladium(II) organometallic mononuclear compounds. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 405-408, May 2005.

47 BARILE, F. A.; DIERICKX, P. J.; KRISTEN, U. In-vitro cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. **Cell Biology and Toxicology**, Dordrecht, v. 10, n. 3, p. 155-162, June 1994.

48 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1/2, p. 55-63, 1983.

49 CHIOU, W. F. et al. Inhibitory effect of dehydroevodiamine and evodiamine on nitric oxide production in cultured murine macrophages. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 60, n. 7, p. 708-711, July 1997.

50 CRUZ, W. S. et al. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates NNMU-induced alveolar injury in vivo. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, Bethesda, v. 273, n. 9, p. 1167-1173, Dec. 1997.

51 DAMOUR, O. et al. Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes. **Burns**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 479-485, Dec. 1992.

52 VISTICA, D. T. et al. Tetrazolium-based assays for cellular viability - a critical-examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 51, n. 10, p. 2515-2520, May 1991.

53 BERRIDGE, M. J. Microdomains and elemental events in calcium signalling. **Cell Calcium**, Midlothian, v. 20, n. 2, p. 95-96, Aug. 1996.

54 ISHIYAMA, M. et al. A combines assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 19, n. 11, p. 1518-1520, Nov. 1996.

---

---

55 WILSON, M.; LINDOW, S. E. Relationship of Total Viable and Culturable Cells in Epiphytic Populations of *Pseudomonas-Syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 12, p. 3908-3913, Dec. 1992.

56 MICROCAL ORIGIN MICROCAL SOFTWARE. **Microcal™ Origin™**. Northampton, MA, 1997. Versão 5.0 (Data Analysis and Technical Graphics).

57 PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cell in culture. **Journal of Immunological Methods**, v. 38, p. 161-170, 1980.

58 PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassay of measurement of superoxide and hydrogen producties. **Journal of Immunological Methods**, v. 46, p. 211-226, 1981.

59 GREEN, L. C. et al. Anaysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

60 LOPES, F. C. M. et al. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF- $\alpha$  production in peritoneal macrophages by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 1726-1730, 2005.

61 GRAPH INSTAT SOFTWARE. **GraphPad Instat™**. Northampton, MA, 2000. Versão 3.05 CA.

62 FRANZBLAU, S. G. Rapid, low-technology MIC determination with clinical mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate alamar blue assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 362-366, 1998.

63 BOUGEARD, D. et al. 1,2,4-Triazole - Vibrational-spectra, normal coordinate calculations, and hydrogen-bonding. **Journal of Chemical Physics**, New York, v. 64, n. 12, p. 5152-5164, 1976.

64 FREM, R. C. G. **Complexos de níquel(0)**: síntese, reatividade e fotoluminescência. 1992. 252 f. Tese (Doutorado em Química Inorgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1992.

65 GOLDSTEIN, P.; LADELL, J.; ABOWITZ, G. Refinement of crystal and molecular structure of 1,2,4-triazole (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>) at low temperature. **Acta Crystallographica Section B-Structural Crystallography and Crystal Chemistry B.**, Copenhagen, v. 25b, n. 1, p. 135, 1969.

66 VOS, J. G.; HAASNOOT, J. G.; VOS, G. Ruthenium(II) bis(2,2'-bipyridyl) complexes of some 1,2,4-triazoles. **Inorganica Chimica Acta-Articles**, Lausanne, v. 71, p. 155-162, May 1983.

67 HAASNOOT, J. G.; VOS, G.; GROENEVELD, W. L. 1,2,4-Triazole complexes, III. complexes of transition metal (II) nitrates and fluoroborates. **Zhurnal Naturforsch**, Leinden, v. 32b, p. 1421-1430, Sept. 1977.

---

---

68 VANHOUTEN, R.; VOS, J. G.; GROENEVELD, W. L. Pyrazolato and related anions .6. vibrational and electronic-spectra of salts of 1,2,4-triazole and 3-bromo-1,2,4-triazole.

**Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society**, Amsterdam, v. 98, n. 7/8, p. 425-431, July 1979.

69 HAASNOOT, J. G.; VOS, G.; GROENEVELD, W. L. Complexes of transition metal(II) thiocyanates with 1,2,4-triazole. **Zhurnal Naturforsch**, Leiden, v. 32b, p. 533-536, Feb. 1977.

70 CREAGH, L. T.; TRUITT, P. Nuclear magnetic resonance studies of triazoles .I. tautomerism of 1,2,4-triazole. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 33, n. 7, p. 2956, 1968.

71 KATRITZKI, A. R. **Handbook of heterocyclic chemistry**. Oxford: Pergamon Press, 1985. 542 p.

72 BARLIN, G. B.; BATTERHAM, T. J. Proton magnetic resonance spectra of some diazoles triazoles and tetrazoles. **Journal of the Chemical Society B-Physical Organic**, Cambs, p. 516-518, 1967.

73 KELLY, J. M.; LONG, C.; VOS, J. G. Group VI metal pentacarbonyl complexes of 1,2,4-triazoles. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 221, n. 2, p. 165-176, June 1981.

74 CARLSSON, L. O. Solvent effects in H-1 NMR-spectra of pyrazoles. **Acta Chemica Scandinavica Series B-Organic Chemistry and Biochemistry**, Copenhagen, v. 29B, n. 3, p. 325-331, 1975.

75 EMSLEY, J. M.; FEENEY, J.; SUTCLIFFE, L. H. **Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy**. Oxford: Pergamon Press, 1967. v. 3.

76 LEVER, A. B. P. **Inorganic electronic spectroscopy**. Amsterdam : Elsevier, 1968. 420 p.

77 STAAB, H. A. Transacylierungen .1. N-acyl-verbindungen stickstoffhaltiger heterocyclen. **Chemische Berichte-Recueil**, Deerfield Beach, v. 89, n. 8, p. 1927-1940, 1956.

78 SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W.; LANGFORD, C. H. **Inorganic chemistry**. Oxford: Oxford, 1994. 597 p.

79 DAAMEN, H. et al. Bonding properties of group VIB metal pentacarbonyl azole complexes studied by electronic absorption, photoelectron, <sup>13</sup>C NMR and vibrational spectroscopy. **Inorganica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 34, n. 2, p. 253-260, Oct. 1979.

80 INTERNATIONAL CENTER OF DIFFRACTION DATA. **Powder diffraction file of the joint committee on powder diffraction standards**: sets 1-32. Swarthmore, 1982. PA 19081. CD-ROM

81 SATO, D. N. **Avaliação rápida do perfil de sensibilidade do agente da tuberculose às drogas sintéticas ou extratos vegetais empregando Mycobacterium tuberculosis contendo o gene da luciferase**. 2003. f. 75. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

---

82 KLIMP, A. H. et al. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews In Oncology Hematology**, v. 44, n. 2, p. 143-161, Nov. 2002.

83 EBERHARDET, M. K. **Reactive oxygen metabolites**: chemistry and medical consequences. Boca Rotan: CRC Press, 2001. 590 p.

84 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: principles of biochemistry. New York: Worth Publishers, 2004. 602 p.

85 RAMASARMA, T. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has a role in cellular-regulation. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, New Delhi, v. 27, n. 5, p. 269-274, Oct. 1990.

86 WINK, D. A.; MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v. 25, n. 4/5, p. 434-456, Sept. 1998.

87 MARCINKIEWICKZ, J. Nitric oxide and antimicrobial activity of reactive oxygen intermediates. **Immunopharmacology**, v. 37, p. 35-41, 1997.

88 GALLI, S. et al. Decreased mitochondrial nitric oxide synthase activity and hydrogen peroxide relate persistent tumoral proliferation to embryonic behavior. **Cancer Research**, Birmingham, v. 63, n. 19, p. 6370-6377, Oct. 2003.

89 OBERLING, F. Monocyte/macrophages as effector cells in cancer immunotherapy. **Transfusion Science**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 243-250, June 1997.

90 NATH, A. et al. Macrophage inflammatory protein (MIP)1 alpha and MIP1 beta differentially regulate release of inflammatory cytokines and generation of tumoricidal monocytes in malignancy. **Cancer Immunology Immunotherapy**, New York, v. 55, n. 12, p. 1534-1541, Dec. 2006.

91 BEM-BARUCH, A. Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. **Breast Cancer Research**, London, v. 5, n. 1, p. 31-36, 2003.

92 FREM, R. C. G. et al. Syntheses and luminescent properties of tetrahedral nickel(0) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, São Paulo, v. 255, p. 53-58, 1997.

93 MANN, F. G.; PURDIE, D. The constitution of complex metallic salts. Part IV. The constitution of certain bridged dipalladium derivatives. A novel type of tautomerism. **Journal of the Chemical Society**, Cambridge, p. 873-890, Apr. 1936.

---

---