UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE QUÍMICA – Araraquara

Dissertação de Mestrado

ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS DE PALÁDIO(II)

Araraquara
2010

FILLIPE VIEIRA ROCHA

Estudo da atividade biológica de compostos de paládio(II)

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

Orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto

Coorientadora: Profª. Drª. Regina Célia Galvão Frem Di Nardo

Araraquara
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Rocha, Fillipe Vieira
R672e Estudo da atividade biológica de compostos de paládio(II) / Fillipe Vieira Rocha. - Araraquara : [s.n], 2010
90 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Adelino Vieira da Godoy Netto
Coorientador: Regina Célia Galvão Frem Di Nardo

1. Química inorgânica. 2. Espectroscopia. 3. Atividade antitumoral. 4. Complexos de Pd(II). I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: Fillipe Vieira Rocha
Data de Nascimento: 07 de novembro de 1985
Naturalidade: Juiz de Fora – MG
Nacionalidade: Brasileiro
Filiação:
Pai – Luiz Carlos Rocha
Mãe – Suely Vieira Baio Rocha
Documento de Identidade: MG – 13.733.534
Endereço para Correspondência:
Av. Alberto Toloi, 185/43 – Bloco 5
Bairro: Quitandinha – CEP: 14800-105
Araraquara - SP
e-mail: filliperocha@iq.unesp.br

FORMAÇÃO

Acadêmica

GRADUAÇÃO

Bacharel e Licenciado em Química
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)
Concluído em dezembro de 2007.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

01. ROCHA, F. V.; BARRA, C. V.;NETTO, A. V. G.; MAURO, A. E.; FREM, R. C. G.; QUILLES, M. B.; CARLOS, I. Z. "Síntese, caracterização e estudo da atividade biológica de complexos de paládio(II) contendo ligantes pirazólicos". In: **17° Encontro da SBQ – Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti**, Araraquara-SP, de 18 a 20 de outubro de 2009.

02. ROCHA, F. V.; BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G.; MAURO, A. E.; FREM, R. C. G.; QUILLES, M. B.; CARLOS, I. Z. "Complexos de paládio(II) contendo o ligante 4-metilpirazol: Síntese, caracterização e avaliação da atividade antitumoral". In: **17°**

Encontro da SBQ – Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, Araraquara-SP, de 18 a 20 de outubro de 2009.

03. ROCHA, F. V.; BARRA, C. V.; SILVA, H.; SIQUEIRA, L. M. S.; LOPES, M. T. P.; FONTES, A. P. S. "Effect of leaving group on cytotoxic activity of long aliphatic chain diamine platinum complexes". In: **I Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry**, Foz do Iguaçu-PR, 31 de agosto a 4 de setembro de 2008.

04. ROCHA, F. V.; BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G.; MAURO, A. E.; FREM, R. C. G.; ANANIAS, S. R.; STEVANATO, A.; ROCHA, M. C.; CARLOS, I. Z. "Synthesis and antitumour properties of palladium(II) containing N,S-based ligands". In: **I Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry**, Foz do Iguaçu-PR, 31 de agosto a 4 de setembro de 2008.

05. ROCHA, F. V.; BARRA, C. V.; SHIMURA, B.; NETTO, A. V. G.; MAURO, A. E.; FREM, R. C. G.; ANANIAS, S. R.; CARLOS, I. Z. "Palladium(II) pyrazolyl complexes: Synthesis, characterization and biological studies". In: **I Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry**, Foz do Iguaçu-PR, 31 de agosto a 4 de setembro de 2008.

06. ROCHA, F. V.; BARRA, C. V.; SILVA, H.; FONTES, A. P. S "Novos complexos de platina(II) contendo ligantes N-alquilados de cadeia longa derivados da etilenodiamina e oxalato". In: **XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia-SP, 26 a 29 de maio de 2008.

07. ROCHA, F. V.; BARRA, C. V.; SILVA, H.; FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E.T.; LOPES, M. T. P. "Estudos "in vitro" de atividade citotóxica de complexos de platina (II) contendo oxalato e derivados da etilenodiamina como ligantes". In: **XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia-SP, 31 de maio a 3 de junho de 2007.

08. ROCHA, F. V.; BARRA, C. V.; SILVA, H.; FONTES, A. P. S. "Síntese e caracterização de complexos de platina (II) com ligantes diaminados e carboxilatos". In: **XIII Seminário de Iniciação Científica da UFJF**, Juiz de Fora-MG, 3 a 5 de outubro de 2007.

09. ROCHA, F. V.; BARRA, C. V.; SILVA, H.; FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E.T.; ALMEIDA, M. V. "Síntese e caracterização de novos complexos de platina (II) contendo oxalato e derivados da etilenodiamina como ligantes". In: **XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia-SP, 19 a 22 de maio de 2006.

PUBLICAÇÕES

01. TREU-FILHO, O. ; ROCHA, F. V. ; NETTO, A. V. G. ; PINHEIRO, JOSÉ C. ; UTUNI, VEGNER H. S. ; KONDO, ROGÉRIO T. ; MAURO, A. E. *"Molecular structures and vibrational frequencies for [PdX_2(tdmPz)] (X=Cl^-, SCN^-): A DFT study"*. **Journal of Molecular Structure**, v. 921, p. 239-243, 2009.

02. ROCHA, F. V.; BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G.; MAURO, A. E.; CARLOS, I. Z.; FREM R. C. G.; ANANIAS, S. R.; QUILLES, M. B.; STEVANATO, A.; ROCHA, M. C. *"3,5-dimethyl-1-thiocarbamoylpyrazole and its Pd(II) complexes. Synthesis, spectral studies and antitumor activity"*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, submetido.

03. BARRA, C. V.; ROCHA, F. V.; NETTO, A. V. G.; SHIMURA, B.; DA SILVA, D.A.M.; FREM R. C. G.; MAURO, A. E.; CARLOS, I. Z.; ANANIAS, S. R.; QUILLES, M. B. *"New palladium(II) complexes with pyrazole ligands: Synthesis, spectral studies and antitumor evaluation"*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, submetido.

04. TREU-FILHO, O.; BARRA, C.V.; ROCHA, F.V.; NETTO, A.V.G; MAURO, A.E; FREM, R.C.G.; PINHEIRO, J.C.; KONDO, R.T. *"Experimental and DTF study on the compounds [$PdCl_2L_2$] (L = 4-methylpyrazole, 4-iodopyrazole)".* Em preparação.

05. SILVA, H.; BARRA, C. V.; ROCHA, F. V.; ALMEIDA, M. V.; CÉSAR, E.T.; SIQUEIRA, L. M. S.; LOPES, M. T. P.; FONTES, A. P. S. *"Synthesis, characterization, and cytotoxic activity of novel platinum(II) complexes derived from N-benzylethylenediamine and oxalato".* **Chemical Biology & Drug Design**, submetido.

06. SILVA, H.; BARRA, C. V.; ROCHA, F. V.; LOPES, M. T. P.; FONTES, A. P. S. *"Novel platinum(II) complexes of long chain aliphatic diamine ligands with oxalato as the leaving group. Comparative citotoxic activity relative to chloride precursors".* **Journal of the Brazilian Chemical Society**, submetido.

PRÊMIOS E TÍTULOS

XIII Seminário de Iniciação Científica da UFJF, com o trabalho "Síntese e caracterização de complexos de platina (II) com ligantes diaminados e carboxilatos", Juiz de Fora-MG, 3 a 5 de outubro de 2007.

ESTÁGIOS, BOLSAS E AUXÍLIOS

Estágio docente no Colégio de Aplicação João XXIII de Juiz de Fora-MG ministrando o módulo optativo “Reações em Química Orgânica” de agosto a dezembro de 2007.

Bolsa de Mestrado (MS) concedida pelo CNPq de março de 2008 a março de 2010.

Bolsa de Iniciação Científica (IC) concedida pelo CNPq de agosto de 2005 a agosto de 2007.

FILLIPE VIEIRA ROCHA

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

Araraquara, 24 de fevereiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Eder Tadeu Gomes Cavalheiro
Instituto de Química de São Carlos – USP, São Carlos

“Tudo que um homem pode imaginar,
outros poderão realizar.”

“A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade.”

Júlio Verne

Agradecimentos

Ao Professor Adelino, pela orientação, boa vontade, bom humor e, principalmente, por seu otimismo em todos os aspectos, sendo acadêmicos ou não. Muito obrigado pelo incentivo e ensinamentos.

À Professora Regina, pela coorientação e pelo convívio no Departamento.

À Professora Marisa Spirandeli Crespi pelas sugestões no meu exame de qualificação.

Ao Nivaldo pelas sugestões no meu exame de qualificação, pela obtenção e dicas com os espectros de RMN.

Ao Professor Mauro pelos conselhos, amizade e ótimas conversas sobre a rodada do brasileirão.

À Professora Vânia pela ajuda no estágio de docência e pelo convívio no Departamento.

Ao Treu pelos cálculos computacionais e pelo convívio no Departamento.

Aos professores Luiz Antonio e Stanlei e à funcionária Valéria pelo convívio no Departamento de Química Geral e Inorgânica.

À Professora Iracilda Zeppone Carlos, à técnica Marisa Polesi e do laboratório de Imunologia Clínica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, a mestranda Marcela Bassi pela realização dos testes biológicos.

À Irene, pelas boas conversas e pelos espectros de infravermelho.

Às funcionárias da pós-graduação e da biblioteca pela prestatividade e atenção.

Agradecimentos

Aos meus colegas do laboratório de Química de Coordenação e Organometálicos: Alexandre, Alessandra, Carolina, Cris, Gislaine, Ian, Katinha, Natália, Rodrigo, Silmar, e em especial, Patrícia e Sahra pela ajuda e pelas muitas conversas e distração.

À Professora Ana Paula (UFJF) e ao Professor Eloi (UFJF) pela orientação durante a iniciação científica.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional constante em todos os momentos da minha vida, sempre acreditando e incentivando minhas decisões.

Aos meus irmãos, Léo e Raphael, por sempre me animarem perdendo no video game.

À minha vó Zenir por ser uma segunda mãe para mim.

À Beatriz, Helder e Júlia por me tratarem tão bem e com tanto carinho fazendo com que me sentisse parte integrante da família desde sempre.

Aos meus grandes amigos, Xurume, Cabeção, Ge, Fred, Luis, Mico e Marcelo (não dá pra colocar seu apelido aqui né), pela companhia e pelo divertimento imensurável que vocês me proporcionam.

À Carol pela amizade, companhia, incentivo e por sempre acreditar em mim, mesmo quando nem eu acredito mais. Obrigado pelo convívio, dedicação e por me amar (mesmo eu sendo irresistível). É maravilhoso construir uma vida com você. Te amo muito.

E a Deus.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Lista de Figuras

Figura 1. Transformação de uma célula normal em cancerosa. 22
Figura 2. Estágio de progressão. 22
Figura 3. Estimativa de novos casos de câncer no mundo por região. 23
Figura 4. Fórmula estrutural da cis-diaminodicloroplatina(II). 25
Figura 5. Fórmulas estruturais da carboplatina e da oxaloplatina. 26
Figura 6. Interação Pt-DNA. 27
Figura 7. Fórmulas estruturais dos complexos [MCl(ESDT)(Nor)] (a) e [MCl(ESDT)(Syn)] (b). 29
Figura 8. (a) Teste MTT sobre as células HL60; (b) Teste MTT sobre as células HeLa. Legendas: [Pd(ESDT)(Syn)Cl] (■); [Pd(ESDT)(Nor)Cl] (▲);[Pt(ESDT)(Syn)Cl] (▼); [Pt(ESDT)(Nor)Cl]( ); cisplatina (●). 29
Figura 9. Estrutura do composto trans-$[PdCl_2(L)_2]$ (L = 2-cloro-6-[(2-metoxibenzil)-amino]-9-isopropilpurina). 30
Figura 10. Estrutura do composto$[Pd(N\text{-}N)\text{-}(C_6F_5)(1\text{-}Mecyt)]ClO_4$ [N-N = bis(3,5-dimetilpirazol-1-il)metano (bpzm*)], (1-Mecyt = 1-metilcitosina) 31
Figura 11. Imagens da MFA: (a) imagem do plasmídeo pBR322; (b) aduto pBR322-cisplatina; (c) aduto pBR322-$[Pd(N\text{-}N)\text{-}(C_6F_5)(1\text{-}Mecyt)]ClO_4$ 32
Figura 12. Fórmula estrutural do composto cloro-(pirimidina-2-tiolato)(clorodifenilfosfina)paládio(II). 33
Figura 13. Estrutura do complexo $[PdL^4]$.DMF (H_2L^4 = benzil bis(tiosemicarbazona). 33
Figura 14. Fórmula estrutural dos complexos $[MCl_2L]$ {M = Pd, Pt; L = p-TSCN}. 34
Figura 15. Estruturas dos complexos: (a) $[Pd(L^1)(PPh_3)$; (b) $[Pd(L^2)(pic)]$ 35
Figura 16. Fórmula estrutural geral dos complexos $[Pd(asme)_2]$ e $[Pd(asbz)_2]$. 35
Figura 17. Fórmulas estruturais do pirazol, Celebra® e Fipronil®. 37
Figura 18. Fórmula estrutural do composto $[PdCl_2(L^2)_2]$. 38
Figura 19. Fórmula estrutural do complexo cis-$[Pt_2(\mu\text{-}Pz)(\mu\text{-}OH)(NH_3)_4](NO_3)_2$ 38
Figura 20. Estrutura geral dos complexos $[PdCl_2(L)_2]$ e $[PtCl_2(L)_2]$ [L = pirazol (**1**) e (**3**); 3,5-dimetilpirazol (**2**) e (**4**).] 39
Figura 21. Fórmula estrutural do ligante tdmPz. 39
Figura 22. Estrutura do composto $[Co(L^2)_3]$ (L^2 = 3,5-dimetil-1-(N-etil)tiocarbamoilpirazol). 40
Figura 23. Estrutura do complexo $[Ni(C_8H_{12}N_3S)_2]$. 40
Figura 24. Estrutura do composto $[Co_2^{II}Cl_4(L)_2]$ (L = 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol) 41

Figura 25. Estrutura do composto [$HgCl_2(tdmPz)_2$]. 41
Figura 26. Estrutura do ligante 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol 42
Figura 27. Esquema de decomposição do tdmPz em soluções básicas. 42
Figura 28. Fórmulas estrututais dos compostos de Pd(II) derivados 1-N-substituido tiocarbamoil-3,5-difenil-2-pirazol....43
Figura 29. Fórmulas estruturais dos complexos [Pd(5-fenil-3-oxo-2-tiocarbamoilpirazolonato)$_2$] (L^2); [Pd(4-etil-5-metil-3-oxo-2-tiocarbamoilpirazolonato)$_2$] (L^5)....43
Figura 30. Inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de tioglicolato de sódio a 3,0 %. 52
Figura 31. Redução do MTT pelas redutases mitocondriais das células vivas. 53
Figura 32. Solubilização dos cristais de formazana pelo isopropanol.....53
Figura 33. Espectros vibracionais na região de 4000-400 cm^{-1} do IV para o ligante e os compostos **1**, **2**, **3** e **4**.....58
Figura 34. Esquema de numeração adotado na atribuição dos sinais de RMN. 60
Figura 35. Espectro de RMN de ^1H do composto tdmPz em dmso-d_6. 61
Figura 36. Espectros de RMN de ^1H do composto [$PdCl_2(tdmPz)$] (**1**) em dmso-d_6.....62
Figura 37. Espectro de RMN de ^1H do composto [$PdBr_2(tdmPz)$] (**2**) em dmso-d_6.....62
Figura 38. Espectro de RMN de ^1H do composto [$PdI_2(tdmPz)$] (**3**) em dmso-d_6. 63
Figura 39. Espectro de RMN de ^1H do composto [$Pd(SCN)_2(tdmPz)$] (**4**) em dmso-d_6.....63
Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C do tdmPz. 65
Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C do [$PdCl_2(tdmPz)$].....65
Figura 42. Espectro de RMN de ^{13}C do [$Pd(SCN)_2(tdmPz)$].....66
Figura 43. Espectro NOESY 1D com irradiação no H-4 do tdmPz. 67
Figura 44. Espectro NOESY 1D com irradiação no H-4 do complexo **1**. 67
Figura 45. Espectro HMQC do ligante livre em dmso-d_6.....68
Figura 46. Espectro HMQC do tdmPz ampliado na região de correlação entre os hidrogênios das metilas e seus carbonos. 69
Figura 47. Espectro HMQC do [$PdCl_2(tdmPz)$] em dmso-d_6. 69
Figura 48. Espectro HMQC do [$PdCl_2(tdmPz)$] ampliado na região de correlação entre os hidrogênios das metilas e seus carbonos. 70
Figura 49. Curvas TG/DTA do compostos tdmPz.....71
Figura 50. Curvas TG/DTA do compostos [$PdCl_2(tdmPz)$] (**1**). 72
Figura 51. Curvas TG/DTA do compostos [$PdBr_2(tdmPz)$] (**2**).....73
Figura 52. Curvas TG/DTA do composto [$PdI_2(tdmPz)$] (**3**).....74
Figura 53. Curvas TG/DTA do composto [$Pd(SCN)_2(tdmPz)$] (**4**). 75

Figura 54. Difratograma de raios X, método do pó, do Pd^0 obtido no final da termodecomposição do composto $[PdCl_2(tdmPz)]$ (**1**). 77
Figura 55. Ficha cristalográfica número 005-0681, referente ao paládio metálico. 77
Figura 56. Fórmulas estruturais propostas para os compostos $[PdCl_2(tdmPz)]$ (**1**), $[PdBr_2(tdmPz)]$ (**2**), $[PdI_2(tdmPz)]$ (**3**) e $[Pd(SCN)_2(tdmPz)]$ (**4**). 78

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estimativas, para o ano 2008, de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária. 24
Tabela 2. IC_{50} dos complexos [Pd(L^n)(D)] frente as linhagens HL-60 e U-937. 34
Tabela 3. Citotoxicidade (IC_{50}) dos ligantes HL^2 e HL^5, dos complexos de Pd(II) e Pt(II) e da cisplatina contra as células tumorais humanas de câncer de ovário. 44
Tabela 4. Procedência de solventes e reagentes: 46
Tabela 5. Freqüências vibracionais referentes ao ligante livre, complexo **1** e o $[Co_2Cl_4(tdmPz)_2]$ [71]. 56
Tabela 6. Freqüências vibracionais referentes aos complexos **2**, **3** e **4**. 57
Tabela 7. Deslocamento químicos de RMN de ^1H para os compostos tdmPz, **1**, **2** ,**3** e **4**. 61
Tabela 8. Deslocamento químicos de RMN de ^{13}C para os compostos tdmPz, **1** e **4**. 65
Tabela 9. Dados de Espectroscopia de Correlação Heteronuclear (HMQC) para o tdmPz e o complexo **1** em dmso-d_6 obtidos na faixa espectral de δ 1-13 (^1H)/ δ 10-230 (^{13}C). 70
Tabela 10. Perdas de massa (%) e intervalos de temperatura observados nas curvas TG/DTA dos complexos **1**-**4**. 76
Tabela 11. Valores de IC_{50} do tdmPz, dos compostos **1**-**4** e da cisplatina contra as células tumorais murinas LM3, LMM3 e LP07, e os macrófagos após 24 h de exposição. 80

Lista de Abreviaturas

CD_{50} – Concentração mínima capaz de reduzir a absorção da células tratadas em 50 % comparado às células não tratadas

dec. – decomposição

dmso – dimetilsulfóxido

dmso-d_6 – dimetilsulfóxido deuterado

DNA – Ácido desoxirribonucléico

IC_{50} – Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular

LM3 – Linhagem tumoral de adenocarcionama mamário

LMM3 – Linhagem tumoral de adenocarcionama mamário com metástase no pulmão

LP07 – Linhagem tumoral de adenocarcionama pulmonar

MEM – (Modified Eagle Médium): meio essencial mínimo (mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular)

AFM – Microscopia de Força Atômica

MTT – Sal brometo de 3–(4,5–dimetiltiazol–2–il)–2–5–difeniltetrazólio

PBS – Tampão salino fosfato

RPMI – Meio de cultura RPMI (mistura de sais enriquecidos com aminoácidos,

vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular)

tdmPz – 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol

Sumário

1 Introdução: 21
1.1 Câncer: 21
1.2 Compostos de platina como quimioterápicos: 25
1.3 Compostos de Pd(II) com atividade antitumoral: 27
1.4 Pirazóis: 36
1.5 Ligante 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol (tdmPz): 39
2 Objetivos: 45
3 Parte Experimental: 46
3.1 Procedência de reagentes e solventes: 46
3.2 Sínteses: 46
3.2.1 Síntese do 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol (tdmPz) [64]: 46
3.2.2 Síntese do $[PdCl_2(MeCN)_2]$: 46
3.2.3 Síntese do $[PdCl_2(tdmPz)]$ (1): 47
3.2.4 Síntese do $[PdBr_2(tdmPz)]$ (2): 47
3.2.5 Síntese do $[PdI_2(tdmPz)]$ (3): 48
3.2.6 Síntese do $[Pd(SCN)_2(tdmPz)]$ (4): 48
3.3 Métodos Experimentais: 49
3.3.1 Análise Elementar: 49
3.3.2 Ponto de fusão: 49
3.3.3 Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho: 49
3.3.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear: 49
3.3.5 Análise Termogravimétrica: 49
3.3.6 Difração de Raios X – Método do pó: 50
3.4 Atividade Biológica: 50

Sumário

3.4.1 Preparo das soluções: 50

3.4.2 Linhagem Celular e meio de cultura empregado: 51

3.4.3 Animais: 51

3.4.4 Ensaios Biológicos *in vitro*: 51

4 Resultados e Discussão: 55

4.1 Caracterização: 55

4.1.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho: 55

4.1.2 Espectroscopia de RMN de ^{1}H e ^{13}C: 60

4.1.3 Análise Térmica dos compostos $[PdX_2(tdmPz)]$ ($X = Cl^-, Br^-, I^-, SCN^-$): 71

4.2 Proposição Estrutural: 78

4.3 Investigação das Propriedades Biológicas: 79

4.3.1 Determinação da viabilidade celular das linhagens tumorais LM3, LMM3 e LP07, e de macrófagos de camundongos normais pela técnica do MTT: 79

5 Conclusão: 82

Referências 83

Resumo

Quatro complexos mononucleares inéditos de Pd(II) do tipo $[PdX_2(tdmPz)]$ {X = Cl^- (**1**), Br^- (**2**); I^- (**3**); SCN^- (**4**); tdmPz = 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol} foram sintetizados. O composto **1** foi formado a partir da substituição da acetonitrila do complexo $[PdCl_2(MeCN)_2]$ pelo 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol. Os demais compostos foram obtidos através da substituição dos íons cloreto por brometo (**2**), iodeto (**3**) e tiocianato (**4**). Todos os complexos foram isolados, purificados e caracterizados por análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H e $^{13}C\{^1H\}$. Os dados experimentais sugerem que, em todos os casos, a coordenação do tdmPz ocorreu através do átomo de enxofre do grupo tiocarbamoil e pelo nitrogênio piridínico do anel pirazólico.

O comportamento térmico dos compostos foi investigado por termogravimétria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA). Pela temperatura inicial de decomposição, a estabilidade térmica dos complexos pode ser ordenada da seguinte maneira: **3** < **4** ≡ **2** < **1**. O produto final da termodecomposição foi caracterizado como paládio metálico por difração de raios X de pó.

Os complexos, o ligante e a cisplatina tiveram sua citotoxicidade investigada, *in vitro*, pelo método do MTT frente a 3 linhagens de células cancerosas murinas: adenocarcinoma mamário (LM3 e LMM3) e adenocarcinoma pulmonar (LP07), bem como frente a macrófagos peritoneais murinos. Efeitos citotóxicos promissores *(in vitro)* foram encontrados para o $[PdI_2(tdmPz)]$ (**3**), mostrando valor de IC_{50} = 24.5 µM frente a linhagem LM3, para $[PdBr_2(tdmPz)]$ (**2**) com IC_{50} = 28.7 µM frente as células LP07, e para $[Pd(SCN)_2(tdmPz)]$ (**4**) que se mostrou mais seletivo e citotóxico que a cisplatina frente a linhagem LMM3.

Palavras-chave: complexos de Pd(II); 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol; espectroscopia; atividade antitumoral.

Abstract

Four new mononuclear Pd(II) complexes of the type [PdX_2(tdmPz)] {X = Cl^- (**1**), Br^- (**2**); I^- (**3**); SCN^- (**4**); tdmPz = 1-thiocarbamoyl-3,5-dimethylpyrazole} have been synthesized. Compound **1** is formed by the displacement of acetonitrile from [$PdCl_2(CH_3CN)_2$] by the 1-thiocarbamoyl-3,5-dimethylpyrazole. Complex **2**, **3** and **4** were readily obtained by metathesis of the chloride from [$PdCl_2$(tdmPz)$_2$] (**1**) by the bromide, iodide and thiocyanate ions, respectively. Both complexes have been isolated, purified and characterized by means of elemental analysis, IR spectroscopy, ^{1}H and ^{13}C{^{1}H}-NMR experiments. The experimental data suggested that in all cases the coordination of the tdmPz takes place through the sulfur atom from the thioamide moiety and the pyridine-like nitrogen from the pyrazolyl ring.

The thermal behavior of the complexes **1**-**4** has been investigated using thermogravimetry (TG) and differential thermal analysis (DTA). From the initial decomposition temperatures, the thermal stability of the complexes can be ordered in the sequence: **3** < **4** ≡ **2** < **1**. The final products of the thermal decompositions were characterized as metallic palladium by X-ray powder diffraction.

All the complexes and the ligand together with cisplatin have been tested *in vitro* by MTT assay for their cytotoxicity against three murine cancer cell lines: mammary adenocarcinoma (LM3 and LMM3) and lung adenocarcinoma (LP07) as well towards normal murine peritoneal exsudate cells (PEC). Promising *in vitro* cytotoxic effect has been found for [PdI_2(tdmPz)] (**3**), showing the IC_{50} value of 24.5 μM against LM3, for [$PdBr_2$(tdmPz)] (**2**) with the IC_{50} value of 28.7 μM against LP07, and [$Pd(SCN)_2$(tdmPz)] (**4**) which was more selective and cytotoxic than cisplatin against the cell line LMM3.

Keywords: Pd(II) complexes; 1-thiocarbamoyl-3,5-dimethylpyrazole; spectroscopy; antitumor activity.

1 Introdução:

1.1 Câncer:

Câncer é um conjunto de doenças caracterizadas por células que crescem e se dividem sem respeitar os limites normais, invadem e destroem tecidos adjacentes, podendo se espalhar para lugares distantes no corpo, através de um processo chamado metástase[1]. Este processo consiste na formação de uma nova lesão tumoral a partir da primeira, mas sem continuidade entre as duas. Isto implica que as células neoplásicas se desprendem do tumor primário, sendo levadas para um local distante onde formam uma nova colônia.

Estas propriedades malignas do câncer o diferenciam dos tumores benignos, que são auto-limitados em seu crescimento e não invadem tecidos adjacentes (embora alguns tumores benignos sejam capazes de se tornarem malignos). O câncer pode afetar pessoas de todas as idades, mas o risco para a maioria dos tipos de câncer aumenta com o acréscimo da idade[2].

Quase todos os cânceres são causados por anomalias no material genético de células transformadas. Estas anomalias podem ser resultado dos efeitos de carcinógenos, como o tabagismo, radiação, hábitos alimentares, medicamentos, alcoolismo, etc[3]. Outros tipos de anormalidades genéticas podem ser adquiridas através de erros na replicação do DNA, ou são herdadas, e conseqüentemente presente em todas as células ao nascimento, mas este tipo de alteração representa uma minoria dos casos de câncer. As interações complexas entre carcinógenos e o genoma hospedeiro podem explicar porque somente alguns desenvolvem câncer após a exposição a um carcinógeno conhecido.

O câncer é geralmente classificado de acordo com o tecido de qual as células cancerígenas se originaram, assim como o tipo normal de célula com que mais se parecem. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma. Além desta característica, outras podem ser usadas na diferenciação dos diversos tipos de doenças causadas por esta perturbação no organismo. São elas, a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes[1].

O processo de formação de câncer, se dá lentamente, podendo levar vários anos para que a célula cancerosa se multiplique e dê origem a um tumor. Este desenvolvimento ocorre em três etapas principais[4]. São elas:

- Estágio de iniciação; as células normais sofrem uma ação de agentes cancerígenos que lhes causam modificações genéticas.

- Estágio de promoção; as células geneticamente alteradas são transformadas em células malignas (Figura 1), de forma lenta e gradual. Para que isto ocorra, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor.

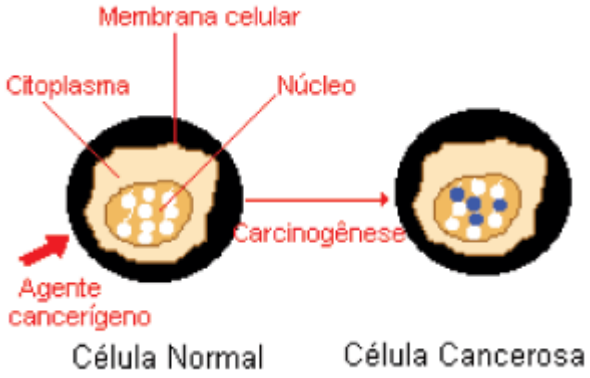


Figura 1. Transformação de uma célula normal em cancerosa.

- Estágio de progressão; as células malignas se multiplicam descontroladamente e se acumulam nos tecidos, dando origem ao tumor (Figura 2). Nesta etapa a doença já está instalada e evoluindo.

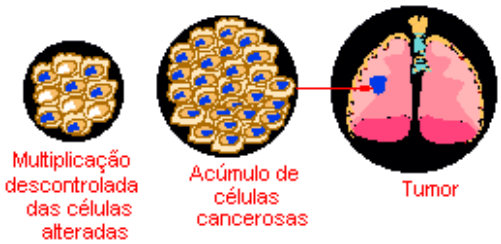


Figura 2. Estágio de progressão.

As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções do que as suas correspondentes normais. Conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções. Por exemplo, a invasão dos pulmões gera alterações respiratórias, a invasão do cérebro pode gerar dores de cabeça, convulsões, alterações da consciência, etc[1].

Um relatório da Sociedade Norte-Americana de Câncer, divulgado em dezembro de 2007, mostrou uma estimativa que, naquele ano, seriam diagnosticados mais 12 milhões de novos casos da doença (Figura 3), e que os vários tipos de câncer causariam a morte de aproximadamente 7,6 milhões de pessoas, ou cerca de 20 mil por dia[5].



1 Leste africano (290.100)	6 Caribe (73.500)	11 Sudeste asiático (618.800)	16 Sul europeu (675.000)
2 África central (87.800)	7 América central (184.800)	12 Centro-Sul asiático (1.451.700)	17 Oeste europeu (950.500)
3 Norte africano (142.100)	8 América do Sul (733.100)	13 Oeste asiático (225.900)	18 Australia/Nova Zelândia (117.700)
4 Sul africano (78.100)	9 América do Norte (1.745.400)	14 Leste europeu (939.500)	19/20/21 Polinêsia (9.300)
5 Oeste africano (166.300)	10 Leste asiático (3.313.600)	15 Norte europeu (448.700)	Total Mundial (12.332.300)

Figura 3. Estimativa de novos casos de câncer no mundo por região.

Capítulo 1 Introdução

No Brasil foram estimados mais de 460 mil novos casos de câncer em 2008, segundo localização primária, sendo os mais comuns o câncer de próstata para os homens e o de mama para as mulheres (Tabela 1)[6].

Tabela 1. Estimativas, para o ano 2008, de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária.

Localização Primária	**Estimativa de casos novos**		
Neoplasia Maligna	**Masculino**	**Feminino**	**Total**
Próstata	49.530	-	49.530
Mama Feminina	----	49.400	49.400
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.810	9.460	27.270
Cólon e Reto	12.490	14.500	26.990
Estômago	14.080	7.720	21.800
Colo do Útero	-	18.680	18.680
Cavidade Oral	10.380	3.780	14.160
Esôfago	7.900	2.650	10.550
Leucemias	5.220	4.320	9.540
Pele Melanoma	2.950	2.970	5.920
Outras Localizações	55.610	62.270	117.880
Subtotal	**175.970**	**175.750**	**351.720**
Pele não Melanoma	55.890	59.120	115.010
Todas as Neoplasias	**231.860**	**234.870**	**466.730**

A maior dificuldade do tratamento do câncer consiste em fazer a distinção entre as células malignas e as células normais do corpo, pois ambas são provenientes da mesma origem e são muito semelhantes. Os principais tratamentos utilizados atualmente são:

1. Cirurgia; envolve a remoção total do tumor, porém se o tumor estiver espalhado ou em órgãos vitais é impossível realizar tal procedimento.

2. Radioterapia; utilizam-se radiações para destruir um tumor ou impedir que suas células aumentem.

3. Quimioterapia; se baseia no uso de medicamentos, geralmente injetáveis, que atuam no DNA das células e as matam. Contudo, poderão acontecer efeitos colaterais nas células normais.

O câncer é a causa de aproximadamente 13 % de todas as mortes no mundo sendo os cânceres de pulmão, estômago, fígado, cólon e mama os que mais matam[7]. Por isso a necessidade de novas pesquisas com ênfase no desenvolvimento dos tratamentos.

1.2 Compostos de platina como quimioterápicos:

A descoberta da atividade antitumoral da cis-diaminodicloroplatina(II), {*cis*-$[PtCl_2(NH_3)_2]$}, nos anos 60 por Rosemberg[8] e seu subsequente sucesso cliníco[9], tornou a cisplatina (Figura 4) um dos agentes quimioterápicos mais utilizados atualmente. Ela vem sendo usada, há decadas, no tratamento de vários tipos de neoplasias, como de pulmão, cabeça, esôfago, estômago, linfomas, melanoma, osteossarcoma, mama e cérvix[10-12], com grandes percentuais de cura.

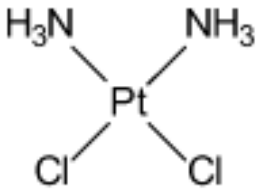


Figura 4. Fórmula estrutural da *cis*-diaminodicloroplatina(II).

Por este motivo houve um grande interesse na síntese de novos compostos de coordenação de platina visando o tratamento do câncer. Muitos complexos foram sintetizados e tiveram suas propriedades antitumorais estudadas, mas poucos possuem uso clínico. A carboplatina (Figura 5), [diamino(1,1-ciclobutanodicarboxilato)platina(II)], é amplamente usada no tratamento de câncer de ovário, por ser menos nefrotóxica, que a cisplatina[13,14]. A oxaloplatina (Figura 5), *cis*-[1,2-diaminocicloexanooxalato)platina(II)], tem atuação contra o câncer coloretal, no qual a droga cisplatina não se apresenta ativa[15-17].

Estes dois compostos são exemplos de medicamentos comercializados, mas ainda atuam como agentes suplementares no tratamento administrado com cisplatina, devido à menor atividade biológica.

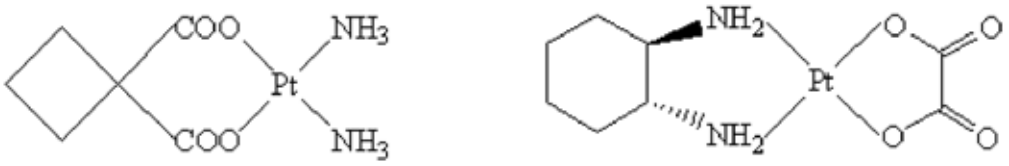


Figura 5. Fórmulas estruturais da carboplatina e da oxaloplatina.

A cisplatina entra na célula por difusão passiva ou transporte ativo[18], os ligantes cloreto são substituídos por moléculas de água dando origem a moléculas positivamente carregadas, *cis*-diaminoaquocloroplatina(II) e *cis*-diaminodiaquoplatina(II)[19]. Este processo de hidrólise é de fundamental importância no mecanismo de ação da droga, uma vez que serão estas espécies que interagirão efetivamente com o DNA.

A ação citotóxica da cisplatina se baseia na interação do metal com as bases nitrogenadas do DNA das células cancerosas, provocando-lhe uma distorção. Essa mudança é reconhecida por algumas proteínas que poderão atuar de duas maneiras: reparando o DNA distorcido ou provocando a morte dessa célula, processo conhecido como apoptose[20,21].

Os adutos Pt-DNA formados envolvem principalmente os átomos de nitrogênio (N7) da guanina e adenina, pois estes estão mais disponíveis para a coordenação[22,23]. Porém vários tipos de adutos podem ser formados, os que envolvem duas fitas do DNA, coordenação interfita e os que envolvem apenas uma fita do DNA, intrafita. Estudos mostram que o principal aduto formado pela cisplatina com o DNA e, consequentemente responsável por sua ação antitumoral, é o 1,2-intrafita (Figura 6), formado pela ligação do metal a duas guaninas adjacentes[23-25].

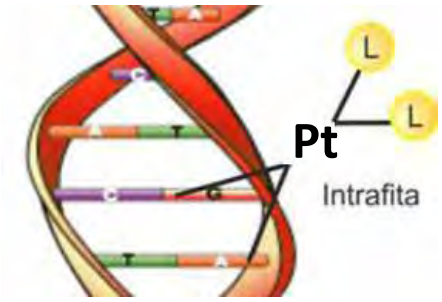


Figura 6. Interação Pt-DNA.

Infelizmente, alguns problemas são encontrados no tratamento com a cisplatina. Um deles é a vulnerabilidade ao ataque de substâncias encontradas no plasma sanguíneo, especialmente aquelas que possuem um grupo tiol, como albumina e cisteína. Isto ocorre devido a preferência de coordenação da platina, um ácido mole, ao enxofre, uma base mole, ao invés do nitrogênio da amina, que é uma base dura[26]. Estudos demonstram que após 1 dia de a droga ter sido administrada, 65 a 98% do composto foi desativado, ou seja, a cisplatina se ligou a esses compostos, portanto somente o restante irá agir no DNA das células[27].

Além disso, a droga em questão apresenta efeitos colaterais consideráveis, tais como: nefrotoxicidade, neurotoxicidade, náuseas, vômitos, dificuldade na audição; dentre outros. Outra desvantagem envolve a resistência de alguns tumores à droga. Esta resistência pode se dar de uma maneira intrínseca ou pode ser adquirida no decorrer do tratamento[28].

Assim, há um grande interesse no desenvolvimento de novos compostos de coordenação de platina e mais recentemente com outros íons metálicos. Geralmente para uma metalo-droga ter seu uso clínico aprovado ela deve apresentar pelo menos uma vantagem clínica em relação à cisplatina, dentre elas: atividade contra tumores resistentes à cisplatina; efeitos colaterais mais brandos; administração oral[28].

1.3 Compostos de Pd(II) com atividade antitumoral:

Dentre os íons metálicos mais promissores na síntese de novos compostos de coordenação com atividade antitumoral, o que mais se destaca é o Pd(II), pois sua química de coordenação é muito similar a do íon Pt(II), além de apresentarem praticamente o mesmo raio iônico[29].

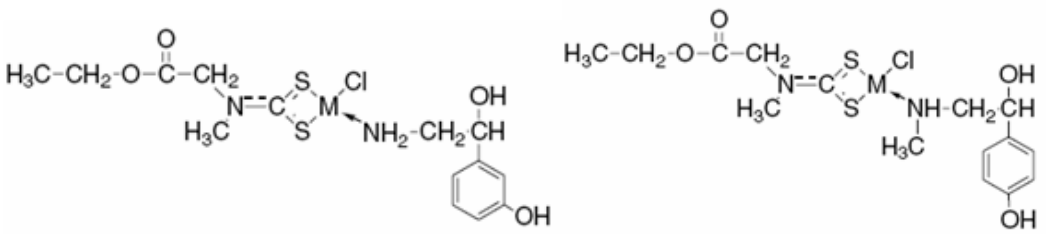
Capítulo 1 Introdução

O íon Pd(II) tem configuração eletrônica $_{46}Pd^{2+}$: $1s^2\ 2s^2\ 2p^6\ 3s^2\ 3p^6\ 4s^2\ 3d^{10}\ 4p^6\ 4d^8$. Apesar do íon paládio(II) ser paramagnético, todos os seus complexos são diamagnéticos e apresentam coloração vermelha, marrom ou amarela. O complexo $[Pd(H_2O)_4]^{2+}$ é formado em solução aquosa e é diamagnético. Essa mudança de comportamento se deve ao emparelhamento de elétrons e sua geometria é considerada como sendo quadrado planar. De fato, todos os complexos de Pd(II) são diamagnéticos, exceto o íon paramagnético $[PdCl_4]^{2-}$ que é formado em ácido clorídrico[30]. São conhecidos complexos de paládio em vários estados de oxidação, variando desde o estado zero (0) até (+IV). O estado de oxidação mais importante é o Pd(II), que pode ser encontrado na forma de óxido, haletos, nitratos e sulfatos, entre outros.

Os primeiros ensaios de citotoxicidade envolvendo os compostos de paládio(II) não foram muito promissores pois mostraram que os mesmos eram bem menos ativos em relação aos compostos de Pt(II). Muitos autores sugeriram que os avanços nesta área seriam limitados provavelmente em função de parâmetros cinéticos, uma vez que complexos de Pd(II) reagem ≈ 10^5 vezes mais rapidamente que seus análogos de Pt(II). Assim, a baixa atividade antitumoral de parte dos complexos de Pd(II) foi atribuída aos rápidos processos de hidrólise que conduziam à dissociação dos grupos abandonadores em solução e, consequentemente, à formação de espécies muito reativas, incapazes de atingir seus alvos farmacológicos[31].

Nos últimos anos, o interesse no emprego de complexos de Pd(II) no tratamento do câncer foi renovado com a publicação de vários trabalhos científicos, os quais relataram propriedades antitumorais muito promissoras desta classe de compostos[32]. Complexos de Pd(II) são candidatos em potencial no desenvolvimento de metalo-drogas, pois esses compostos podem materializar uma idéia de "alvo tumoral" que poderia resultar em drogas com outro espectro de atividade e ausência da resistência celular cruzada quando comparado às drogas de platina[33].

Por exemplo, Alverdi *et al.*[34] descreveram a síntese, caracterização e avaliação da atividade citotóxica de complexos mistos de fórmula geral [MCl(ESDT)(L)] {M = Pd(II), Pt(II); ESDT = S-metil(etilsarcosineditiocarbamato); L = álcool 4-hidróxi-α-(metilaminometil)benzílico (Syn), cloridrato do álcool α-aminometil-3-hidróxibenzílico (Nor)}, cujas estruturas planas estão ilustradas na Figura 7.



(a) (b)

Figura 7. Fórmulas estruturais dos complexos [MCl(ESDT)(Nor)] (a) e [MCl(ESDT)(Syn)] (b).

As propriedades citotóxicas dos complexos de Pd(II) e Pt(II) foram testadas contra uma série de linhagens de cânceres humanos utilizando o ensaio MTT[35]. As células foram tratadas por 48 h empregando-se soluções dos compostos testados sob diversas concentrações (μM). A cisplatina também foi avaliada nas mesmas condições. A Figura 8 mostra as curvas de viabilidade celular (a) e (b) obtidas para as células leucêmicas HL-60 e células de câncer cervical HeLa, ambas humanas, respectivamente.

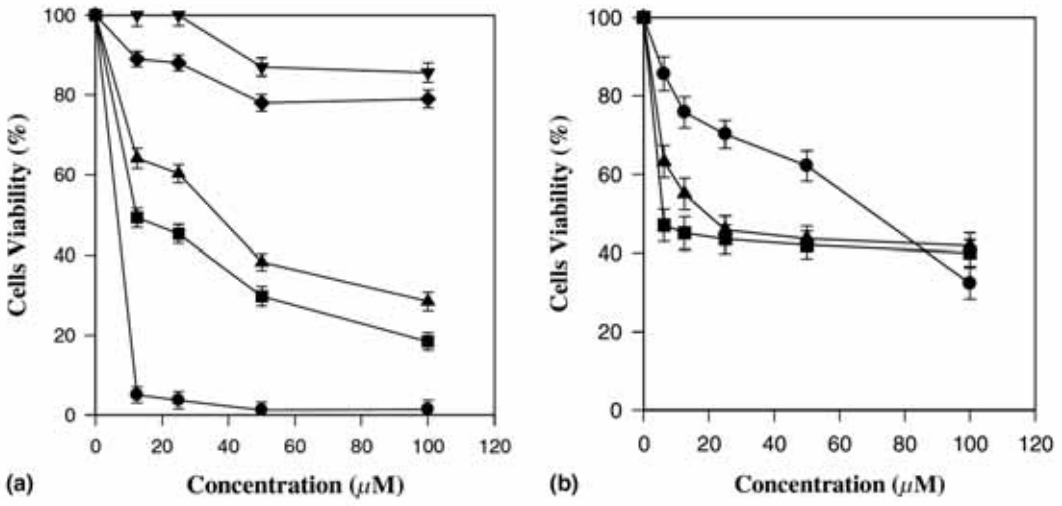


Figura 8. (a) Teste MTT sobre as células HL60; (b) Teste MTT sobre as células HeLa. Legendas: [Pd(ESDT)(Syn)Cl] (■); [Pd(ESDT)(Nor)Cl] (▲);[Pt(ESDT)(Syn)Cl] (▼); [Pt(ESDT)(Nor)Cl]( ); cisplatina (●).

Notou-se que o efeito inibitório satisfatório dos complexos de Pd(II) na proliferação das células HL-60 é dependente da concentração. Frente à linhagem HeLa, a atividade citotóxica dos complexos de Pd(II) atingiu o valor máximo de 50 μM, sendo comparável ao da cisplatina. A citotoxicidade dos complexos de Pd(II) e Pt(II) também foi avaliada frente às

células cancerosas humanas 2008 sensíveis à cisplatina e à variante C13* resistente à cisplatina. Os derivados de Pd(II) mostraram ser mais citotóxicos que a cisplatina frente à linhagem de carcinoma ovariano C13* resistentes à cisplatina, o que mostra a inexistência da resistência cruzada à cisplatina. Já para a linhagem de adenocarcinoma humano 2008, a cisplatina mostrou-se ser mais ativa que os compostos de Pd(II).

Outro aspecto importante envolvendo os complexos de Pd(II) está relacionado ao fato de que a configuração *trans* de dois grupos abandonadores na esfera de coordenação quadrado-planar do paládio(II) não exclui sua atividade anti-proliferativa, já que alguns agentes antitumorais muito promissores foram encontrados para complexos de Pt(II) de configuração *trans*[36-41];

Trávnícek *et al.*[42] descreveram a síntese de um complexo de paládio(II) de fórmula *trans*-$[PdCl_2(L)_2]$ (L = 2-cloro-6-[(2-metoxibenzil)-amino]-9-isopropilpurina) (Figura 9) e investigaram a ação antitumoral deste composto frente às células cancerosas de melanoma (G361). O efeito citotóxico *in vitro* obtido foi significativo, com valor de IC_{50} = 15 μM.

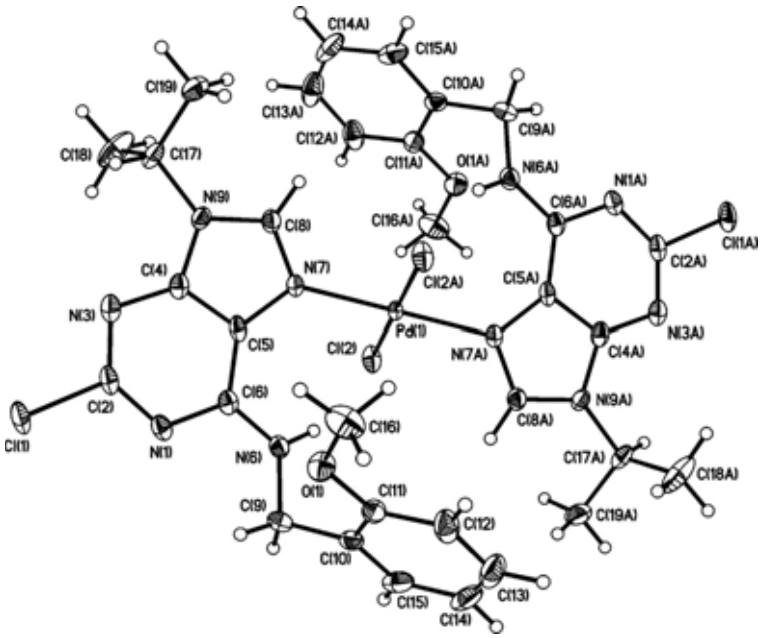


Figura 9. Estrutura do composto *trans*-$[PdCl_2(L)_2]$ (L = 2-cloro-6-[(2-metoxibenzil)-amino]-9-isopropilpurina).

Um outro item importante no uso de complexos de Pd(II) como candidatos a metalo-drogas diz respeito ao fato destes compostos serem capazes de interagir com o DNA, inibindo sua síntese e também induzindo a apoptose[43,44].

Ruiz *et al.*[45] descrevem a síntese, atividade antitumoral e a interação com o DNA do complexo [Pd(N-N)-(C_6F_5)(1-Mecyt)]ClO_4 [N-N = bis(3,5-dimetilpirazol-1-il)metano (bpzm*)], (1-Mecyt = 1-metilcitosina) (Figura 10).

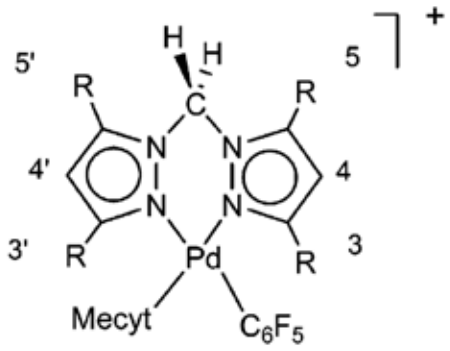


Figura 10. Estrutura do composto[Pd(N-N)-(C_6F_5)(1-Mecyt)]ClO_4 [N-N = bis(3,5-dimetilpirazol-1-il)metano (bpzm*)], (1-Mecyt = 1-metilcitosina).

A interação deste complexo com o DNA foi estudada através da Microscopia de Força Atômica (MFA) e os resultados obtidos indicaram que a conformação do DNA foi alterada de maneira similar à aquela provocada pela cisplatina (Figura 11). Além disto, este trabalho apresenta estudos que mostram que o principal tipo de morte celular causada por estes complexos, é a indução da apoptose. O composto em questão é mais citotóxico frente às células leucêmicas HL-60 do que a cisplatina, apresentando valores de IC_{50} = 10, 80 µM e IC_{50} = 15,60 µM, respectivamente.

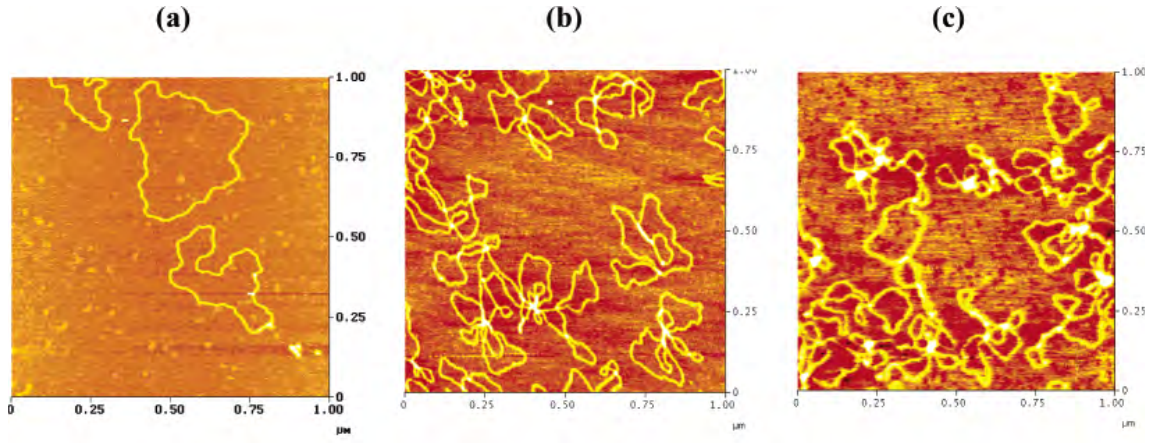


Figura 11. Imagens da MFA: (a) imagem do plasmídeo pB*R*322; (b) aduto pB*R*322-cisplatina; (c) aduto pB*R*322-[Pd(N-N)-(C_6F_5)(1-Mecyt)]ClO_4.

Uma das alternativas para suprimir a elevada reatividade dos compostos de Pd(II) envolve o uso de ligantes quelantes, gerando assim compostos menos lábeis e com grande potencial antitumoral[46].

Nas últimas décadas, o interesse em complexos de Pd(II) e Pt(II) contendo ligantes N,S-doadores aumentou significativamente sob o intuito de se obter metalo-fármacos de elevada atividade antitumoral aliado à baixa citotoxicidade, com relação à cisplatina e seus análogos[47]. Além destas vantagens, a utilização de ligantes bidentados é uma maneira de conferir uma maior estabilidade aos complexos de Pd(II) e prevenir uma possível isomerização *cis-trans* destes compostos.

Cabe salientar que a utilização de moléculas sulfuradas como quimioprotetores na terapia mediada por compostos de platina(II), constitui um alvo recente de investigação científica. Particularmente, o uso de grupos doadores tiocarbonílicos e tiólicos mostrou propriedades promissoras na modulação da nefrotoxicidade da cisplatina[48]. Levando em consideração que a inativação da cisplatina envolve sua interação frente a biomoléculas sulfuradas, muitos autores empregaram e testaram ligantes sulfurados sob o intuito de reduzir a resistência celular frente à cisplatina. Assim, o emprego de ligantes quelantes N,S-doadores na obtenção de complexos de Pd(II) tem como objetivo diminuir a inativação da droga causada pela concentração intracelular de glutationa e possibilitar também gerar compostos menos lábeis bem como de nefrotoxicidade mais baixa[49].

Shaheen *et al.*[50] descreveram a síntese, a caracterização e o estudo biológico de uma série de compostos de paládio do tipo $[PdCl(L)_n(R'R_2P)]$ (L = Pym2SH (pirimidina-2-tiolato), Pur6SH (purina-6-tiolato), Py2SH (piridina-2-tiolato), R_3P = PPh_3, P(*o*-toluil)$_3$, PPh_2Cl), n = 1, 2). Dentre eles o composto cloro-(pirimidina-2-tiolato)(clorodifenilfosfina)paládio(II) (Figura 12) apresentou uma atividade antitumoral superior à da cisplatina frente às células EVSA-T (câncer de mama) e H226 (câncer de pulmão).

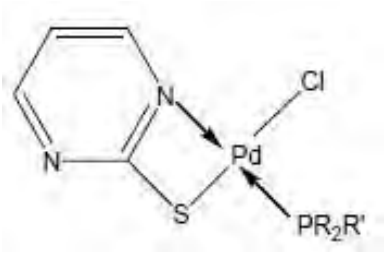


Figura 12. Fórmula estrutural do composto cloro-(pirimidina-2-tiolato)(clorodifenilfosfina)paládio(II).

Matesanz *et al.*[33] relataram estudos envolvendo a atividade antitumoral de um complexo de paládio derivado da benzil bis(tiosemicarbazona), de fórmula [PdL].DMF (H_2L = benzil bis(tiosemicarbazona) (Figura 13), o qual apresentou valores de concentração inibitória de 50 % (IC_{50}) similares as da cisplatina quando comparado a culturas celulares sensíveis a droga, além de se mostrar ativo em tumores resistentes à cisplatina. O complexo em questão provoca mudanças conformacionais na estrutura do DNA diferentes daquelas induzidas pela cisplatina.

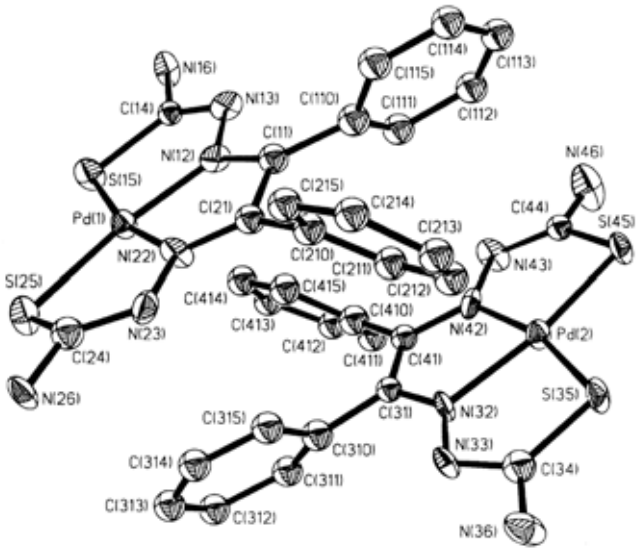


Figura 13. Estrutura do complexo $[PdL^4]$.DMF (H_2L^4 = benzil bis(tiosemicarbazona).

Quiroga *et al.*[49] apresentaram *cis* complexos de fórmula geral [MX_2(p-TSCN)] (M = Pd, Pt; p-TSCN = p-isolpropilbenzaldeído-tiosemicarbazona), cuja fórmula estrutural está mostrada na Figura 14. Esses compostos são mais ativos que a cisplatina na inibição do crescimento das células cancerosas epidérmicas murinas resistentes à cisplatina, Pam-ras e as células leucêmicas Jurkat. Os resultados obtidos mostraram que estes compostos podem ser considerados como agentes antitumorais em potencial não somente pelo bom índice terapêutico apresentado, mas também pelos valores baixos de IC_{50} encontrados frente aos tumores resistentes à cisplatina.

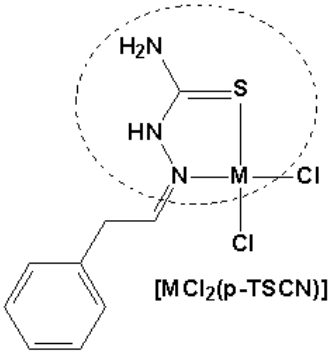
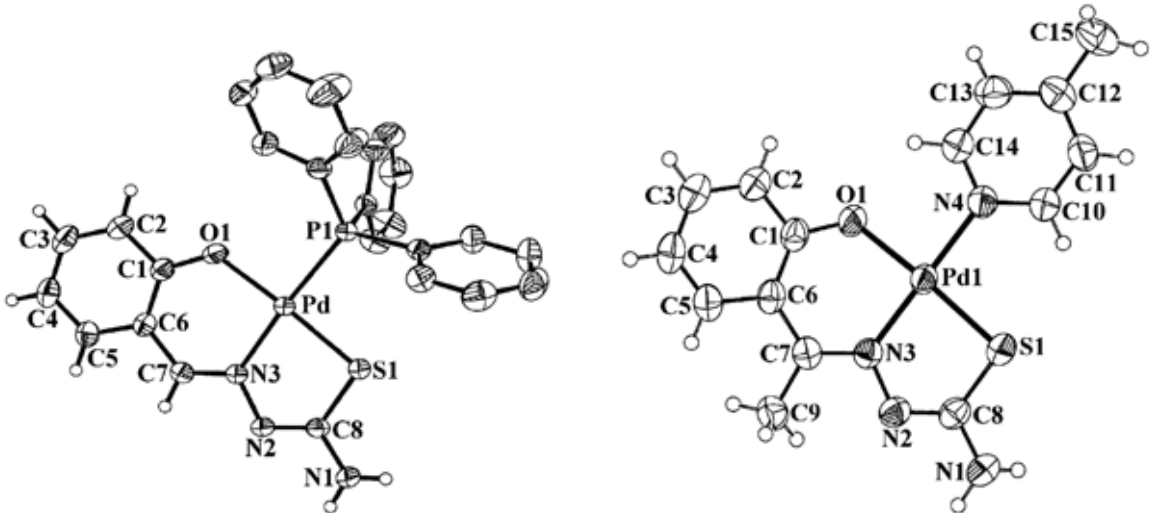


Figura 14. Fórmula estrutural dos complexos [MCl_2L] {M = Pd, Pt; L = p-TSCN}.

Halder *et al*.[51] descreveram a síntese, estrutura e o efeito citotóxico frente às linhagens HL-60 (leucemia) e U-937 (linfoma histoicitico) (Tabela 2) de seis complexos de paládio(II) com ligantes derivados da tiossemicarbazona de fórmula geral [Pd(L^n)(D)] (L^1 = salicilaldeido tiossemicarbazona; L^2 = 2-hidroxiacetofenona tiossemicarbazona; L^3 = 2-hidroxinaftaldeido tiossemicarbazona) [D = trifenilfosfina ou picolina (pic)] (Figura 15). Quatro destes complexos se mostraram mais eficazes que a cisplatina frente as células leucêmicas e o composto [Pd(L^2)(PPh_3)] se mostrou mais eficiente também frente a linhagem celular U-937 apresentando um valor de IC_{50} = 1,3 µM.

Tabela 2. IC_{50} dos complexos [Pd(L^n)(D)] frente as linhagens HL-60 e U-937.

Compostos	IC_{50} (µM)	
	HL-60	U-937
[Pd(L^1)(PPh_3)]	2,5	4,8
[Pd(L^2)(PPh_3)]	0,6	1,3
[Pd(L^3)(PPh_3)]	203,0	231,6
[Pd(L^1)(pic)]	16,2	7,3
[Pd(L^2)(pic)]	7,1	6,6
[Pd(L^3)(pic)]	6,5	7,7
Cisplatina	7,0	3,2



(a) (b)

Figura 15. Estruturas dos complexos: (a) [Pd(L^1)(PPh_3); (b) [Pd(L^2)(pic)]

A atividade antitumoral das bases de Schiff Hasme (R = CH_3) e Hasbz (R = $CH_2C_6H_5$) e de seus complexos de Pd(II) (Figura 16) frente às células humanas T-linfoblásticas leucêmicas foram testadas por Ali *et al.*[52].

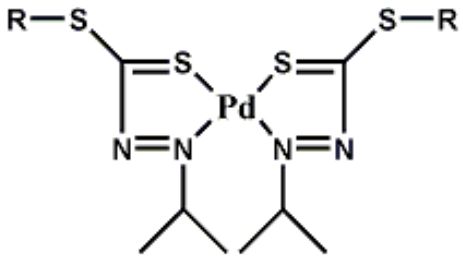


Figura 16. Fórmula estrutural geral dos complexos [Pd(asme)$_2$] e [Pd(asbz)$_2$].

Os resultados indicaram que a base Hasme é fracamente citotóxica enquanto que a Hasbz é inativa. Entretanto, a quelação destes ligantes ao Pd(II) aumenta consideravelmente a atividade antitumoral. Os complexos [Pd(asme)$_2$] e [Pd(asbz)$_2$] apresentaram elevada atividade citotóxica contra células leucêmicas com valores de CD_{50} de 2,5 e 2,9 μg cm^{-3}, respectivamente. De acordo com Shier[53], valores de CD_{50} no intervalo de 10-25 μg cm^{-3} são considerados como atividade antitumoral fraca, valores menores que 5,00 μg cm^{-3} são considerados de forte atividade. Por outro lado, valores entre 5,00-10,00 μg cm^{-3} indicam atividade moderada. Baseado neste critério, os dois complexos de paládio são considerados

como altamente citotóxicos contra leucemia T-linfoblástica, sendo mais ativos que a droga padrão tamoxifen. O composto [Pd(asme)$_2$] também apresenta atividade significativa contra a linhagem 9KB (carcinoma humano da epiderme da nasofaringe). Logo, é necessário que este composto seja mais investigado devido ao seu potencial como droga anticâncer de amplo espectro. O análogo [Pt(asme)$_2$] mostrou ser muito pouco ativo enquanto que o [Pt(asbz)$_2$] é totalmente inativo contra contra células T-leucêmicas.

Após a investigação da atividade antitumoral de um grande número de quelatos metálicos contendo bases de Schiff[54], se concluiu que dentre os quelatos em que o ligante bidentado apresenta, no mínimo, um átomo de enxofre, os de Pd(II) são agentes antitumorais mais efetivos que os quelatos de outros metais. Segundo os autores, os quelatos de Ni(II), Cu(II) e Zn(II) são menos estáveis termodinamicamente que os compostos Pd(II) e Pt(II). Entretanto, os quelatos de Pt(II) são cineticamente mais inertes que os de Pd(II), o que os tornariam mais adequados para a interação e destruição das células cancerosas.

Tendo em vista estes e muitos outros exemplos encontrados na literatura, fica evidente a importância da síntese de compostos quelatos de Pd(II) com potencial atividade antitumoral.

1.4 Pirazóis:

Pirazóis, heterociclos aromáticos com dois átomos de nitrogênio dispostos na posição 1,2 de um anel de cinco membros, têm uma longa história de aplicações nas indústrias farmacêutica e agroquímica[55]. Em 1884, ao tentar sintetizar derivados de quinolina com atividade antipirética, o químico alemão Ludwig Knorr obteve acidentalmente a antipirina, substância com acentuada atividade antiinflamatória, analgésica e antitérmica. Desde então, vários derivados pirazólicos com propriedades biológicas foram desenvolvidos. Atualmente, alguns pirazóis são comercializados como princípios ativos de fármacos e participam da composição de bactericidas, herbicidas e inseticidas[56]. A Figura 17 mostra as fórmulas estruturais do pirazol, do Celebra® (antiinflamatório) e do Fipronil® (inseticida).

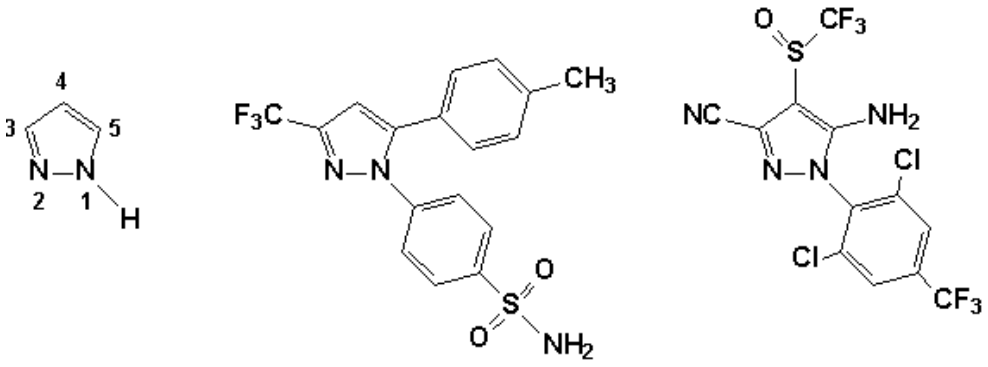


Figura 17. Fórmulas estruturais do pirazol, Celebra® e Fipronil®.

Semelhantemente aos seus análogos orgânicos, compostos pirazólicos contendo metais de transição são conhecidos há muito tempo quando Buchner descreveu a síntese do complexo $[Ag(\mu\text{-}Pz)]_n$, em 1889. Entretanto, somente a partir de 1972 os complexos pirazólicos receberam a devida atenção com a publicação do trabalho de revisão de Trofimenko sobre a química de coordenação dos pirazóis[57]. Desde então, os complexos pirazólicos atraem cada vez mais interesse da comunidade científica no que diz respeito às suas propriedades físicas, químicas e biológicas, sendo o tema de muitas publicações nos principais periódicos internacionais.

A atividade biológica é uma característica importante desta classe de compostos de Pd(II) e Pt(II). Budzisz *et al.*[58] testaram a citotoxicidade de complexos de fórmula geral $[MCl_2L_2]$ {M = Pd(II), Pt(II); L = 5-(2-hidróxifenil)-1,3-dimetil-4-(dimetóxi)fosfonil-1H-pirazol (L^1); 5-(2-hidróxifenil)-1,3-dimetil-4-metóxicarbonil-1H-pirazol (L^2)} (Figura 18) frente às linhagens de células leucêmicas HL-60 e NALM-6. Dentre os complexos testados, a maior citotoxicidade foi observada para o $[PdCl_2(L^2)_2]$, embora seja menos citotóxico que a cisplatina e a carboplatina.

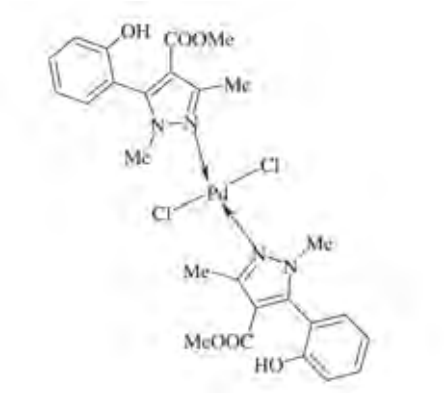


Figura 18. Fórmula estrutural do composto $[PdCl_2(L^2)_2]$.

Komeda *et al.*[59] compararam a citotoxicidade de quatro complexos azólicos de Pt(II), $[\{cis\text{-}Pt(NH_3)_2\}_2(\mu\text{-}OH)\text{-}(\mu\text{-}pz)][NO_3]_2$; $[\{cis\text{-}Pt(NH_3)_2\}_2(\mu\text{-}OH)\text{-}(\mu\text{-}1,2,3\text{-}ta)][NO_3]_2$; [{Pt(R,R-dach)}(μ-OH)(μ-pz){Pt(S,S-dach)}][NO_3]$_2$; $[\{Pt(R,R\text{-}dach)\}(\mu\text{-}1,2,3\text{-}ta)_2\{Pt(S,S\text{-}dach)\}][NO_3]_2$ [(1,2,3-ta) 1,2,3-triazolato); dach = 1,2-diaminociclohexano, pz = pirazolato) com a cisplatina frente às linhagens de células humanas cancerosas MCF7 e EVSA-T (câncer de bexiga), WIDR (câncer de cólon), IGROV (câncer de ovário), M19 (melanoma), A498 (câncer renal) e H226 (câncer de células pulmonares). Dentre os investigados, destaca-se o complexo catiônico *cis*-$[Pt_2(\mu\text{-}Pz)(\mu\text{-}OH)(NH_3)_4](NO_3)_2$ (Figura 19) que demonstrou ser 39 vezes mais efetivo que a cisplatina frente à linhagem MCF7 e 37 vezes mais citotóxico do que a cisplatina frente à M19.

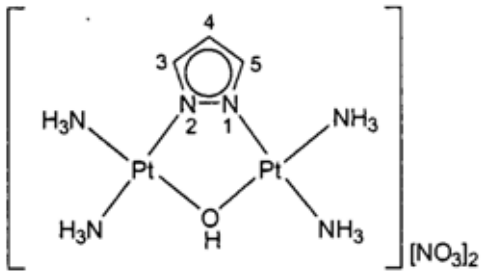


Figura 19. Fórmula estrutural do complexo *cis*-$[Pt_2(\mu\text{-}Pz)(\mu\text{-}OH)(NH_3)_4](NO_3)_2$.

Keter *et al.*[60] apresentaram estudos biológicos de complexos de Pd(II) e Pt(II) com os ligantes pirazol e 3,5-dimetilpirazol (Figura 20) como agentes anticancer. O composto diclorobis(3,5-dimetilpirazol)platina(II) o que se demonstrou ser mais citotóxico e pró-

apoptótico, sendo até três vezes mais eficaz do que a cisplatina. Este resultado fortalece o potencial uso dos pirazóis no desenvolvimento de novos agentes anticâncer.

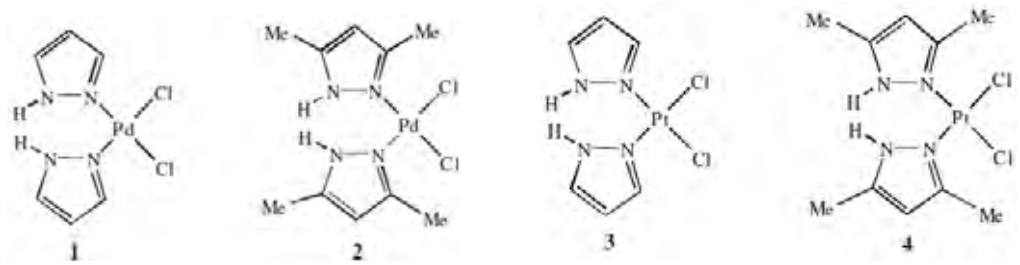


Figura 20. Estrutura geral dos complexos $[PdCl_2(L)_2]$ e $[PtCl_2(L)_2]$ [L = pirazol (**1**) e (**3**); 3,5-dimetilpirazol (**2**) e (**4**).]

1.5 Ligante 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol (tdmPz):

Tendo em vista unir as vantagens apresentadas pelos ligantes N,S-doadores e pirazólicos, foi utilizado neste trabalho o ligante tdmPz (Figura 21) com a finalidade de preparar complexos de paládio(II) com elevada atividade citotóxica.

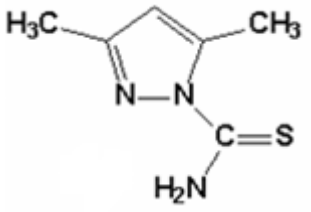


Figura 21. Fórmula estrutural do ligante tdmPz.

O ligante tdmPz possui o grupo tiocarbamoil ligado na posição 1 do anel pirazólico o que lhe proporciona diversos modos de coordenação. Barik *et al.*[61] relatam a síntese e a estrutura de dois compostos de Co(III) com os ligantes 3,5-dimetil-1-(N-metil/etil)tiocarbamoilpirazol (HL^1 = N-metil; HL^2 = N-etil) de fórmula $[Co(L)_3]$ (Figura 22). As reações foram realizadas em meio básico, o que levou à desprotonação dos ligantes, fazendo com que a coordenação ao metal se desse de maneira aniônica bidentada via átomo de nitrogênio do grupo tiocarbamoil e pelo nitrogênio piridínico do anel pirazólico.

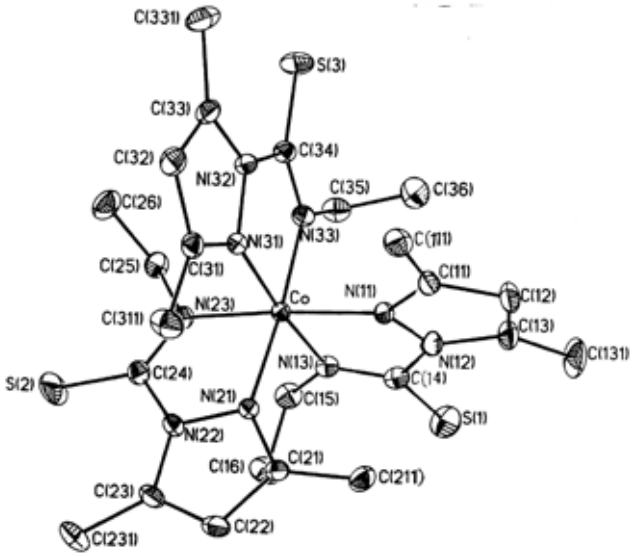


Figura 22. Estrutura do composto $[Co(L^2)_3]$ (L^2 = 3,5-dimetil-1-(N-etil)tiocarbamoilpirazol).

Um outro modo de coordenação encontrado para o ligante 3,5-dimetil-1-(N-etil)tiocarbamoilpirazol é observado na estrutura do complexo $[Ni(C_8H_{12}N_3S)_2]$ (Figura 23)[62], em que o ligante se coordena ao metal de maneira aniônica via átomo de enxofre do grupo tiocarbamoil e pelo átomo de nitrogênio piridínico do anel pirazólico.

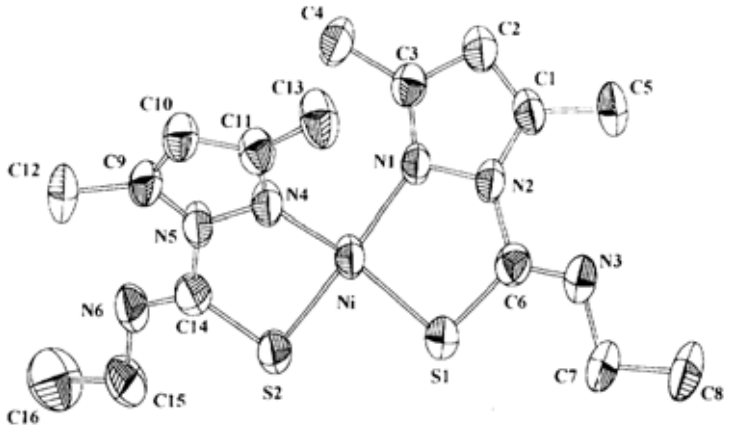


Figura 23. Estrutura do complexo $[Ni(C_8H_{12}N_3S)_2]$.

Evans *et al.*[63] relataram a síntese e a estrutura de três compostos inéditos de fórmulas $[Cu_2^{II}Cl_4(L)_2]$, $[Cu_2^{I}Br_2(L)_2]$ e $[Co_2^{II}Cl_4(L)_2]$ (L = 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol) (Figura 24) que apresentam o ligante tdmPz coordenado de forma neutra bidentada via átomos de enxofre do grupo tiocarbamoil e nitrogênio do anel pirazólico.

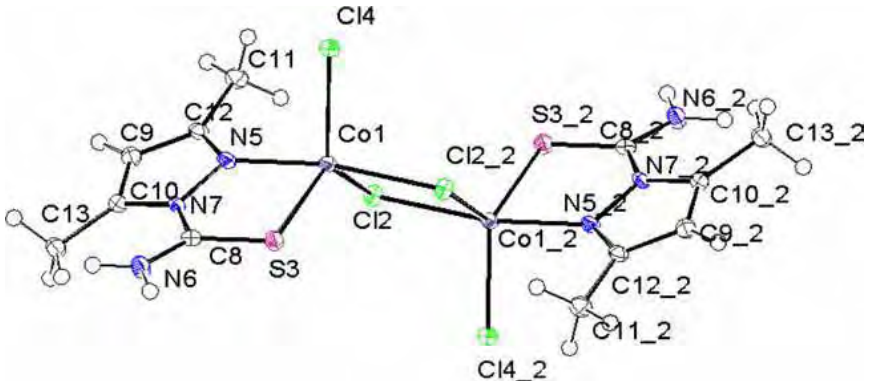


Figura 24. Estrutura do composto $[Co_2^{II}Cl_4(L)_2]$ (L = 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol).

Além destes modos de coordenação já apresentados, o ligante tdmPz também pode se coordenar de maneira neutra monodentada via átomo de enxofre, como foi apresentado por Kovacs *et al*.[64] no complexo $[HgCl_2(tdmPz)_2]$ (Figura 25). Neste trabalho também foi discutida e determinada a estrutura do ligante 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol por difratometria de raios X (Figura 26).

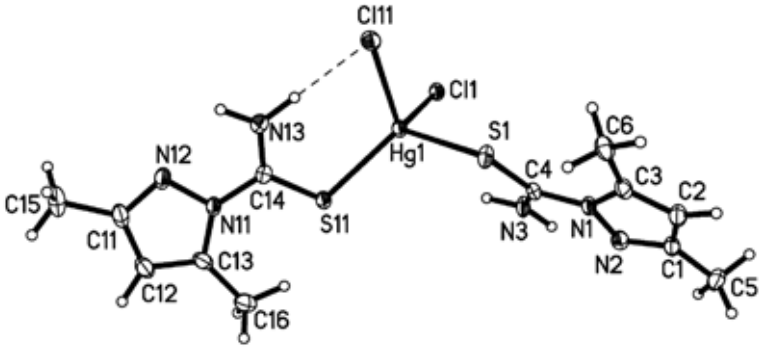


Figura 25. Estrutura do composto $[HgCl_2(tdmPz)_2]$.

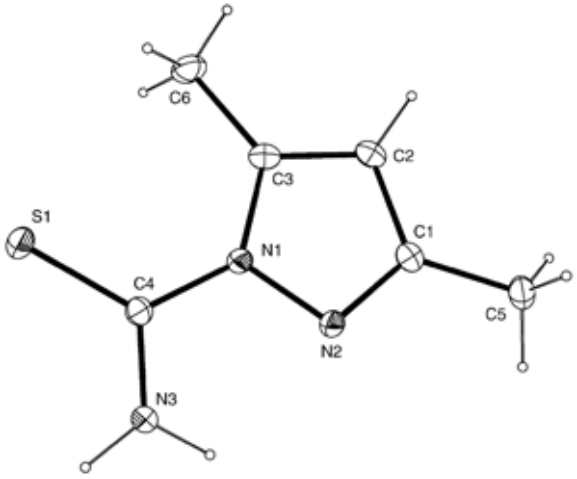


Figura 26. Estrutura do ligante 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol

Uma propriedade química bastante interessante do tdmPz envolve a labilidade do grupo tioamida da posição N1. Apesar de a molécula ser estável a temperatura ambiente por meses, o 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol se decompõe em 3,5-dimetilpirazol e HNCS em temperaturas um pouco mais elevadas. O mesmo processo pode ocorrer em soluções básicas[65] (Figura 27).

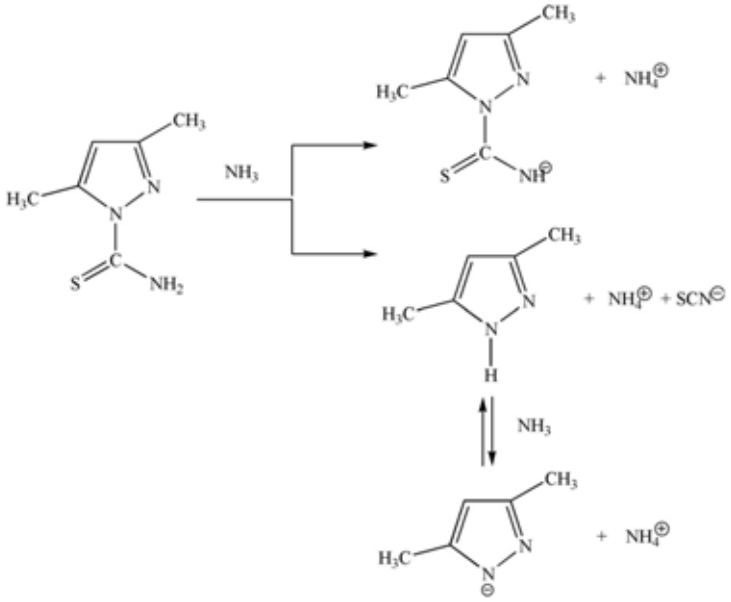


Figura 27. Esquema de decomposição do tdmPz em soluções básicas.

Compostos de paládio(II) contendo ligantes pirazólicos N,S-quelatos análogos ao tdmPz apresentaram atividade amebicida e antitumoral.

Azam *et al.*[66-68] relatam a síntese, caracterização e a investigação *in vitro* da atividade amebicida de complexos de paládio(II) com ligantes pirazólicos com diversos grupos substituintes no anel e no grupo tiocarbamoil (Figura 28). Os complexos apresentaram valores de concentrações inibitórias de 50 % frente ao protozoário, *Entamoeba histolytica,* causador da amebíase bem promissores superando em muitos os casos o valor encontrado para droga padrão metronidazol (IC_{50} = 1,82 µM).

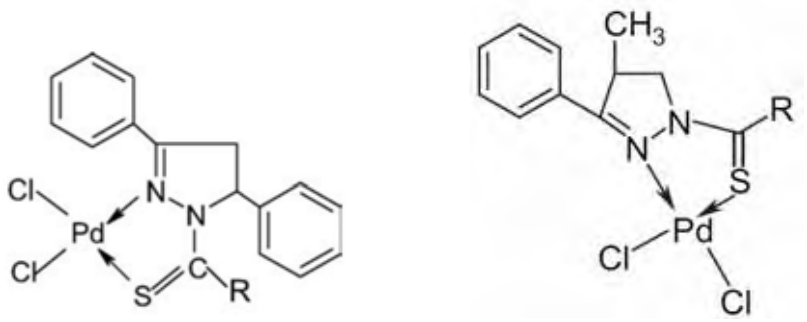
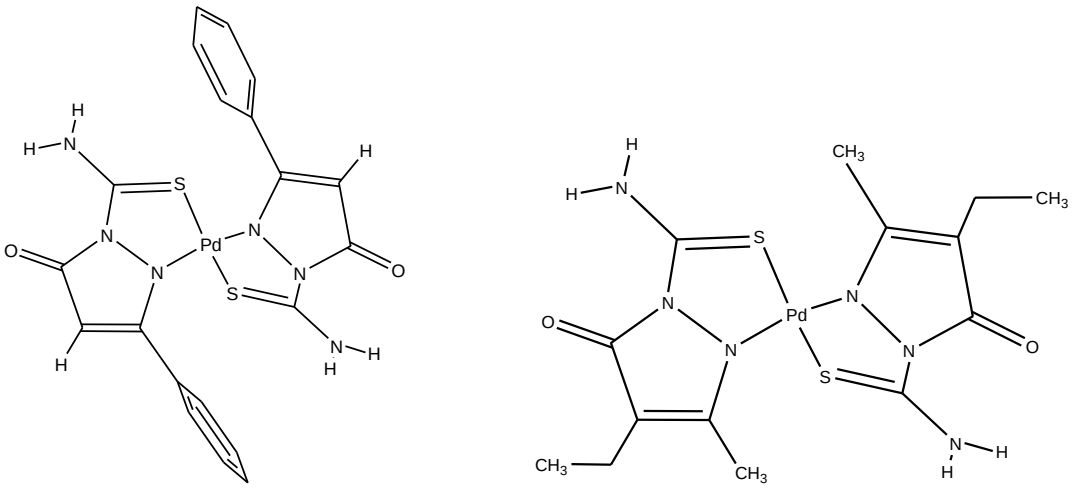


Figura 28. Fórmulas estrututais dos compostos de Pd(II) derivados 1-N-substituido tiocarbamoil-3,5-difenil-2-pirazol.

Casas *et al.*[69] descreveram a síntese, caracterização e a avaliação preliminar da atividade antitumoral de novos complexos de Pd(II) e Pt(II) com ligantes pirazólicos N,S-quelantes (Figura 29).



L^2 L^5

Figura 29. Fórmulas estruturais dos complexos [Pd(5-fenil-3-oxo-2-tiocarbamoilpirazolonato)$_2$] (L^2); [Pd(4-etil-5-metil-3-oxo-2-tiocarbamoilpirazolonato)$_2$] (L^5).

Estes compostos foram testados em linhagens de células cancerígenas humanas de ovário A2780, sensível à cisplatina e A2780cisR, resistente à cisplatina. Os complexos de paládio se apresentaram mais citotóxicos frente a estas células do que seus análogos de platina. Quando comparados a cisplatina, em relação a célula A2780, o composto [PdL^2_2] demonstrou resultado similar a droga, mas o [PdL^5_2] apresentou uma menor citotoxidade, já em relação a célula A2780cisR ambos os compostos demonstraram ser consideravelmente mais ativos que a cisplatina (Tabela 3).

Tabela 3. Citotoxicidade (IC_{50}) dos ligantes HL^2 e HL^5, dos complexos de Pd(II) e Pt(II) e da cisplatina contra as células tumorais humanas de câncer de ovário[69]

Compostos	IC50 (μM) ± SD	
	A2780	A2780cisR
HL^2	>100	>100
HL^5	23.0 ± 2	28.0 ± 3
PdL_2^2	0.44 ± 0.04	0.37 ± 0.03
PtL_2^2	16.0 ± 3	11.0 ± 1
PdL_2^5	1.4 ± 0.2	1.3 ± 0.3
PtL_2^5	>100	>100
Cisplatina	0.51 ± 0.03	5.8 ± 0.4

2 Objetivos:

O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

1. Síntese, caracterização espectroscópica e estrutural de complexos de paládio(II) com o ligante pirazólico, 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol (tdmPz), e os grupos aniônicos Cl^-, Br^-, I^- e SCN^-;

2. Investigação do comportamento térmico dos compostos sintetizados;

3. Determinação da viabilidade celular de culturas de macrófagos peritoneais murinos através do índice de citotoxicidade destes complexos.

4. Investigação da atividade antiproliferativa *in vitro* dos compostos frentes às linhagens tumorais de adenocarcinoma mamário murino (LM3), adenocarcinoma mamário murino com metástase no pulmão (LMM3) e adenocarcinoma pulmonar murino (LP07).

3 Parte Experimental:

3.1 Procedência de reagentes e solventes:

Todos os reagentes e solventes eram de grau analítico P.A. . Os solventes empregados nas sínteses foram tratados com peneiras moleculares para remoção de excesso de água e armazenados em frascos escuros de vidro. A Tabela 4 apresenta a procedência dos solventes e reagentes usados neste trabalho.

Tabela 4. Procedência de solventes e reagentes:

Reagentes	Procedência	Solventes	Procedência
Cloreto de paládio	Vetec	Acetonitrila	Mallinckrodt Chemicals
Tiocianato de potássio	Carlos Erba	Álcool metílico	Merck
2,5-Pentanodiona	Reagen	dmso-d_6	Aldrich
Tiosemicarbazida	Aldrich	Clorofórmio	Merck
Brometo de potássio	Merck	Ácido clorídrico	J. T. Baker
Iodeto de potássio	Merck		

3.2 Sínteses:

3.2.1 Síntese do 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol (tdmPz)[64]:

Em um erlenmeyer de 200 mL foram adicionados 1,00 g (10,9 mmols) de tiossemicarbazida (CN_3H_5S) dissolvida em uma mistura de 50 mL de água destilada e 0,20 mL de HCl, em seguida um volume de 1,0 mL (9,48 mmols) de 2,5-pentanodiona ($C_5H_8O_2$). A agitação magnética foi mantida durante 6 h. A suspensão foi filtrada e o precipitado branco foi lavado com água gelada e seco a temperatura ambiente. Rendimento: 80 %.

3.2.2 Síntese do $[PdCl_2(MeCN)_2]$:

Em um erlenmeyer de 200 mL de capacidade contendo 40 mL de acetonitrila foram adicionados 2,00 g (11,3 mmols) de cloreto de paládio anidro ($PdCl_2$). A suspensão foi aquecida a 100 ^oC sob intensa agitação magnética. Um precipitado amarelo foi formado após

30 min. de reação. O sólido foi isolado a partir de uma filtração simples. O composto obtido é solúvel em clorofórmio, diclorometano e acetona. Rendimento: 75%. Análise Elementar: obtido (calculado) %C=18,05 (18,52); %H=2,49 (2,34); %N=10,40 (10,80).

3.2.3 Síntese do $[PdCl_2(tdmPz)]$ (1):

Em um erlenmeyer de 25 mL contendo 0,050 g (0,19 mmol) de $[PdCl_2(MeCN)_2]$ suspenso em 10 mL de metanol foi gotejada uma solução contendo 0,033 g (0,21 mmol) de 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol em 0,5 mL de clorofórmio. A adição do heterociclo conduziu à formação de uma suspensão de cor castanho-amarelado. A agitação magnética foi mantida durante 2 h e o sólido formado foi isolado a partir de uma filtração simples e sucessivas lavagens com metanol. O composto é solúvel em dmso. Rendimento: 75%. Análise Elementar: obtido (calculado para $C_6N_3H_9SCl_2Pd$) %C=22,35 (21,67); %H=3,05 (2,73); %N=13,19 (12,66). Temperatura de decomposição = 217 ^oC.

3.2.4 Síntese do $[PdBr_2(tdmPz)]$ (2):

Em um erlenmeyer de 25 mL contendo 0,050 g (0,19 mmol) de $[PdCl_2(MeCN)_2]$ suspenso em 10 mL de metanol foi gotejada uma solução contendo 0,033 g (0,21 mmol) de 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol em 0,5 mL de clorofórmio. A adição do heterociclo conduziu à formação de uma suspensão de cor castanho-amarelado. Em seguida, adicionou-se ao meio reacional 0,049 g (0,41 mmol) de brometo de potássio dissolvidos em 1 mL de uma mistura de metanol/água 1:1, conduzindo à formação de um precipitado castanho. O complexo foi isolado a partir de uma filtração simples, seguido por sucessivas lavagens com metanol. O composto é solúvel em dmso. Rendimento: 70%. Análise Elementar: obtido (calculado para $C_6N_3H_9SBr_2Pd$) %C=17,53 (17,10); %H=2,28 (2,15); %N=10,37 (9,97). Temperatura de decomposição = 212 ^oC.

3.2.5 Síntese do [PdI_2(tdmPz)] (3):

Em um erlenmeyer de 25 mL contendo 0,050 g (0,19 mmol) de [$PdCl_2(MeCN)_2$] suspenso em 10 mL de metanol foi gotejada uma solução contendo 0,033 g (0,21 mmol) de 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol em 0,5 mL de clorofórmio. A adição do heterociclo conduziu à formação de uma suspensão de cor castanho-amarelado. Em seguida, adicionou-se ao meio reacional 0,067 g (0,41 mmol) de iodeto de potássio dissolvidos em 1 mL de uma mistura de metanol/água 1:1, conduzindo à formação de uma suspensão roxa-intensa. O complexo foi isolado a partir de uma filtração simples, seguido por sucessivas lavagens com metanol. O composto é solúvel em dmso. Rendimento: 60%. Análise Elementar: obtido (calculado para $C_6N_3H_9SI_2Pd$) %C=14,25 (13,98); %H=2,18 (1,76); %N=8,70 (8,15). Temperatura de decomposição = 178 ^oC.

3.2.6 Síntese do [$Pd(SCN)_2$(tdmPz)] (4):

Em um erlenmeyer de 25 mL contendo 0,050 g (0,19 mmol) de [$PdCl_2(MeCN)_2$] suspenso em 10 mL de metanol foi gotejada uma solução contendo 0,033 g (0,21 mmol) de 1-tiocarbamoil-3,5-dimetilpirazol em 0,5 mL de clorofórmio. A adição do heterociclo conduziu à formação de uma suspensão de cor castanho-amarelado. Em seguida, adicionou-se ao meio reacional 0,031 g (0,38 mmol) de tiocianato de sódio dissolvidos em 1 mL de uma mistura de metanol/água 1:1, conduzindo à formação de uma suspensão de cor laranja. O complexo foi isolado a partir de uma filtração simples, seguido por sucessivas lavagens com metanol. O composto é solúvel em dmso. Rendimento: 70%. Análise Elementar: obtido (calculado para $C_8N_5H_9S_3Pd$) %C=24,99 (25,43); %H=2,64 (2,40); %N=18,05 (18,54). Temperatura de decomposição = 206 ^oC.

3.3 Métodos Experimentais:

3.3.1 Análise Elementar:

As análises quantitativas dos elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio foram efetuadas no analisador automático da Perkin-Elmer, modelo 240, pertencente à Central Analítica do Instituto de Química da USP - São Paulo.

3.3.2 Ponto de fusão:

Intervalos de fusão foram determinados no aparelho MQAPF-302, que alcança a temperatura máxima de 350 °C.

3.3.3 Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho:

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

3.3.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear:

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C foram registrados no Espectrômetro multinuclear *VARIAN*, modelo *INOVA 500.* Utilizou-se dmso-d_6 para dissolução das amostras. Os deslocamentos químicos obtidos são referenciados pelo dmso-d_6.

3.3.5 Análise Termogravimétrica:

As curvas TG/DTA dos compostos foram obtidas empregando-se o módulo simultâneo SDTQ 600 TA – Instruments, utilizando-se cadinhos de α-alumina para amostra e referência,

que foram aquecidos desde a temperatura ambiente até 900 ^{o}C, obedecendo uma razão de aquecimento de 20 ^{o}C min^{-1}. Empregou-se o ar sintético como atmosfera de forno, com vazão média de 50 mL min^{-1}. A massa das amostras utilizadas foi de aproximadamente 5 mg.

3.3.6 Difração de Raios X – Método do pó:

Os difratogramas de raios X, pelo método de pó, dos resíduos formados nas termodecomposições, foram obtidos em um difratômetro Siemens D-5000 utilizando-se radiação CuKα (λ = 1.541 Å) monocromatizada por cristal de grafite, configurado com 40 KV e 30 mA, entre 5 e 70^{o} . Os picos foram identificados utilizando a base de dados ICDD[70].

3.4 Atividade Biológica:

3.4.1 Preparo das soluções:

As massas das amostras foram solubilizadas em dmso, quando necessário, tratado conforme os métodos convencionais, sendo que as soluções-mãe foram preparadas em concentração máxima de dmso de 4% v/v para ensaios com macrófagos e 0,4% v/v para testes com linhagens de células de adenocarcinoma mamário (LMM3 e LM3) e adenocarcinoma pulmonar (LP07). As soluções foram diluídas em meio de cultura apropriado a cada ensaio biológico (RPMI ou MEM) momentos antes da diluição e aplicação das amostras nos testes de citotoxicidade. As diluições foram realizadas empregando-se pipetas automáticas com capacidade variando de 1000 µL a 100 µL e de 100 µL a 0,5 µL e ponteiras descartáveis apropriadas a cada pipeta. Foram empregadas concentrações 1x10^{-3} mol L^{-1}, 1x10^{-4} mol L^{-1}, 1x10^{-5} mol L^{-1} e 1x10^{-6} mol L^{-1} nas investigações prévias. Posteriormente, foram empregadas soluções variando-se suas concentrações µmol L^{-1} para determinação da viabilidade celular frente a culturas de macrófagos e células tumorais.

3.4.2 Linhagem Celular e meio de cultura empregado:

Todas as linhagens tumorais foram cedidas pela Dra. Elisa Bal de Kier Joffé, do Instituto de Oncologia Angel H. Roffo – Buenos Aires – Argentina.

O cultivo celular foi mantido em meio MEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 4 μg mL^{-1} de gentamicina, em estufa a 37 ^{o}C, com atmosfera úmida e tensão constante de 7,5 % de CO_2. Foram realizados repiques de três vezes por semana. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco), utilizando corante azul de Tripan, a 0,04 % em PBS, e ajustado a uma concentração de 3.10^4 células mL^{-1} em meio MEM.

3.4.3 Animais:

Os camundongos do tipo Balb/C foram adquiridos do Biotério Central da Universidade de Campinas – Unicamp, Cemib (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica). Os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato, com água e ração (Purina) *ad libitum* em local climatizado (temperatura de 23 ± 2 ^{o}C, umidade relativa do ar igual a 56 ± 2 %) e controle de claro e escuro a cada período de 12 horas. A água, ração e maravalha foram autoclavadas antes do uso.

Os estudos envolvendo animais foram conduzidos de acordo com a legislação vigente envolvendo cuidados com animais.

3.4.4 Ensaios Biológicos *in vitro*:

- Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos:

Os animais foram previamente estimulados pela inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de tioglicolato de sódio a 3,0 % três ou quatro dias antes de serem sacrificados (Figura 30). Estes animais tiveram a pele da região abdominal retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar classe 100 e o peritônio exposto. Em seguida, foram inoculados intraperitonealmente 5,0 mL de PBS. Após massagem peritoneal para garantir que se

obtivessem as células peritoneais, o líquido peritoneal resultante foi coletado com seringa e agulha e transferido para um tubo cônico estéril e centrifugado a 2000 rpm durante 5 min., o sedimento celular obtido foi lavado três vezes com 3,0 mL de PBS. Após a última lavagem as células foram ressuspendidas em RPMI-1640-C para a contagem de células em câmara hemocitométrica tipo Neubauer utilizando-se corante vital líquido de Lázarus, e assim a suspensão celular foi ajustada à concentração de macrófagos por mL desejada para cada teste em meio RPMI-1640-C.



Figura 30. Inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de tioglicolato de sódio a 3,0 %.

- Determinação da viabilidade celular pelo método de MTT:

A viabilidade celular foi determinada em culturas de macrófagos de camundongos normais utilizando metodologia descrita na literatura[35].

Da suspensão de macrófagos peritoneais em RPMI-1640 completo, ajustada a uma concentração de $5x10^6$ células mL^{-1}, foram adicionados 100 µL em cada cavidade de placas para cultivo de tecidos de 96 cavidades (Corning). Após isto foram adicionados em triplicata, 100 µL dos compostos investigados em diferentes concentrações, 100 µL de solução de LPS a 10 µg mL^{-1} (Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4, Sigma) e o mesmo volume de RPMI completo para controle. A incubação das placas foi feita durante 24 h em estufa a 37 ^oC, com tensão constante de 7,5 % de CO_2. Após o período de incubação por 24 h, os sobrenadantes das culturas de macrófagos foram desprezados e 100 µL de uma solução de 3–(4,5–dimetiltiazol–2–il)–2–5–difeniltetrazólio (MTT) (Across Organics) diluído em tampão PBS a 5 mg mL^{-1} foram adicionados em cada cavidade da placa, que foi incubada por 3 h em estufa a 37 ^oC, com tensão constante a 7,5 % de CO_2. O sal de tetrazólio sofre metabolização pelas redutases mitocondriais das células vivas formando cristais de

formazana (Figura 31). Após a incubação foram adicionados 100 µL de isopropanol (Mallinckrodt Chemical) para solubilizar os cristais (Figura 32). A leitura da absorbância foi realizada no Fotocolorímetro multicanal UV-Vis Multiscan Ascent (Labsystems) a 540 nm com filtro de referência a 620 nm.

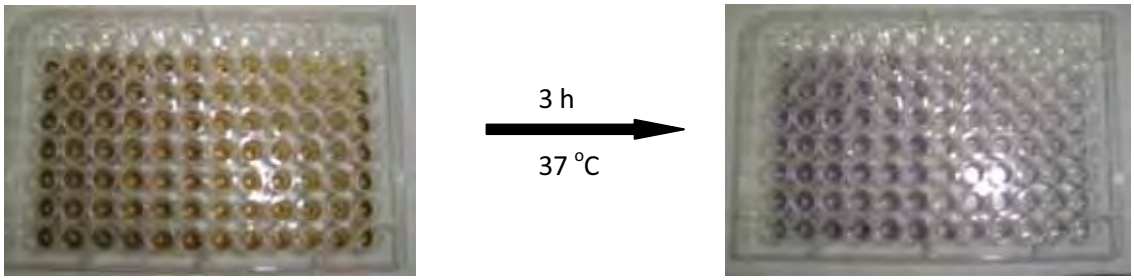


Figura 31. Redução do MTT pelas redutases mitocondriais das células vivas.



Figura 32. Solubilização dos cristais de formazana pelo isopropanol.

Os valores correspondentes à concentração que reduz em 50 % a viabilidade celular (IC_{50}) dos compostos foram quantificados através da regressão linear de uma curva dose-resposta Concentração da Amostra x Viabilidade Celular, realizada com 95% de confiabilidade. A equação da reta do tipo, Y= A + BX origina os valores de IC_{50}, na qual Y = Absorbância; X = Concentração.

- Determinação da atividade antiproliferativa dos compostos de Pd(II) sobre células tumorais:

O crescimento tumoral foi quantificado pela capacidade das células vivas reduzirem o MTT. As células tumorais LMM3, LM3 e LP07 foram adicionadas em placas de 96 orifícios em concentrações suficientes para cobrir 10 % de cada orifício. Após 24 h de incubação,

formado o tapete celular, os compostos investigados foram adicionados e incubados por mais 24 h. Após o período de incubação, o meio foi trocado por meio fresco contendo 1 mg mL^{-1} de MTT. Três horas depois, o conteúdo da placa foi novamente vertido e 100 µL de álcool isopropílico (Mallinckrodt) foram adicionados a cada orifício para solubilizar os cristais de formazana formados. Somente células e meio de cultura foram utilizados como controle, equivalendo a 100 % de viabilidade celular. A leitura da absorbância foi realizada no Fotocolorímetro multicanal UV-Vis Multiscan Ascent (Labsystems), em comprimento de onda de 540 nm e filtro de referência 620 nm.

4 Resultados e Discussão:

4.1 Caracterização:

4.1.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho:

As freqüências vibracionais do ligante tdmPz e do composto **1** estão representadas na Tabela 5. Para fins de comparação, a Tabela 5 também contempla os dados de espectroscopia no IV do complexo $[Co_2Cl_4(tdmPz)_2]$[71]. A Tabela 6 mostra as principais freqüências no IV dos compostos **2**, **3** e **4** e suas respectivas atribuições. Os espectros no IV do ligante livre e dos complexos **1**-**4** estão ilustrados pela Figura 33.

Tabela 5. Freqüências vibracionais referentes ao ligante livre, complexo **1** e o $[Co_2Cl_4(tdmPz)_2]$[71].

tdmPz	$[PdCl_2(tdmPz)]$ (**1**)	$[Co_2Cl_4(tdmPz)_2]$	Atribuições
3387 *F*	3510 *mF*	3338 *mF*	$\nu_{as}NH$
-	3441 *mF*	3265 *F*	$\nu_{as}NH$
3240 *mF*	3410 *mF*	3158 *F*	$\nu_{s}NH$
3132 *mF*	3130 *f*	3117 *mF*	νCH_{Pi}
2980 *f*	2947 *m*	2994 *f*	$\nu_{as}CH_3$
2922 *f*	2827 *f*	2958 *f*	$\nu_{as}CH_3$
1601 *F*	1647 *F*	1627 *F*	$\nu Pi + \delta_{sci}NH_2$
1576 *F*	1614 *mF*	1591 *mF*	$\delta_{sci}NH_2 + \nu C\text{-}NH_2$
1489 *m*	1520 *m*	1500 *mF*	$\nu Pi + \delta_{s}CH_3 + \nu C\text{-}CH_3$
1454 *m*	1466 *m*	1482 *mF*	$\nu_{as}CH_3 + \nu Pi$
1406 *mF*	1400 *m*	-	$\delta_{s}CH_3$
1389 *mF*	1386 *mF*	1376 *F*	$\delta_{s}CH_3 + \nu Pi$
1342 *F*	1356 *m*	1343 *F*	$\delta_{r}NH_2 + \nu N_{Pi}\text{-}C + \nu C{=}S$
-	1273 *m*	1271 *m*	$\beta CH_{Pi} + \nu C\text{-}C(Pi)$
-	1211 *f*	1201 *f*	$\nu N\text{-}N(Pi)$
1147 *m*	1157 *f*	1154 *m*	$\beta CH_{Pi} + \nu C\text{-}CH_3$
1093 *m*	1118 *f*	1087 *m*	$\nu N\text{-}N(Pi) + \delta_{r}CH_3$
1030 *m*	1053 *m*	1045 *m*	$\delta_{r}CH_3$
972 *m*	993 *f*	996 *m*	$\nu Pi + \delta_{r}CH_3$
879 *F*	872 *f*	843 *mF*	$\nu C{=}S + \delta_{r}NH_2$
808 *m*	829 *f*	825 *mF*	$w\ CH_{Pi}$
-	785 *f*	776 *mF*	βPi
727 *mF*	748 *f*	711 *f*	$\nu C\text{-}CH_3 + \beta Pi$
656 *m*	629 *f*	645 *m*	τPi
590 *f*	582 *f*	574 *m*	$\tau Pi + \beta Pi + \nu C\text{-}CH_3$
496 *f*	500 *f*	528 *f*	$\beta C\text{-}NH_2 + \beta C\text{-}CH_3$

ν_{as} = estiramento assimétrico, ν_s = estiramento simétrico, β = deformação no plano, δ_{as} = deformação angular assimétrica no plano, δ_{sci} = deformação angular tesoura γ = deformação fora do plano, w = deformação wagging, τ = torsa, Pi = anel pirazólico. Intensidades: F = forte, mF = média-forte, m = média, mf = média-fraca, f = fraca.

Tabela 6. Freqüências vibracionais referentes aos complexos **2**, **3** e **4**.

$[PdBr_2(tdmPz)]$ (**2**)	$[PdI_2(tdmPz)]$ (**3**)	$[Pd(SCN)_2(tdmPz)]$ (**4**)	Atribuições
3500 *m*	3431 *m*	3440 *F*	$\nu_{as}NH$
3425 *mF*	-	3259 *m*	$\nu_{as}NH$
3259 *mF*	3271 *f*	3141 *F*	$\nu_{s}NH$
3132 *mF*	3136 *f*	-	νCH_{Pi}
3097 *mF*	-	-	νCH_{Pi}
-	2982 *f*	-	$\nu_{as}CH_3$
-	2920 *f*	-	$\nu_{as}CH_3$
-	-	2114 *F*	$\nu_{as}(SCN)$
-	-	2098 *F*	$\nu_{as}(SCN)$
-	-	2068 *f*	$\nu_{as}(NCS)$
-	1660 *f*	1614 *F*	$\nu Pi + \delta_{sci}NH_2$
1618 *F*	1576 *mF*	1583 *m*	$\delta_{sci}NH_2 + \nu C\text{-}NH_2$
1500 *m*	1500 *mF*	1473 *m*	$\nu Pi + \delta_{s}CH_3 + \nu C\text{-}CH_3$
1466 *m*	1469 *m*	1444 *m*	$\nu_{as}CH_3 + \nu Pi$
-	1408 *mF*	1402 *f*	$\delta_{s}CH_3$
1389 *mF*	1381 *mF*	1380 *m*	$\delta_{s}CH_3 + \nu Pi$
1358 *F*	1350 *F*	1317 *m*	$\delta_{r}NH_2 + \nu N_{Pi}\text{-}C + \nu C{=}S$
1271 *m*	1273 *f*	1294 *m*	$\beta CH_{Pi} + \nu C\text{-}C(Pi)$
1198 *f*	1209 *f*	1201 *f*	$\nu N\text{-}N(Pi)$
1157 *m*	-	1155 *f*	$\beta CH_{Pi} + \nu C\text{-}CH_3$
1119 *f*	1124 *f*	1103 *m*	$\nu N\text{-}N(Pi) + \delta_{r}CH_3$
1055 *m*	1067 *f*	1051 *m*	$\delta_{r}CH_3$
993 *m*	989 *f*	995 *f*	$\nu Pi + \delta_{r}CH_3$
862 *f*	867 *f*	864 *f*	$\nu C{=}S + \delta_{r}NH_2$
808 *m*	800 *m*	810 *m*	$w\ CH_{Py}$
746 *f*	754 *f*	748 *f*	$\nu C\text{-}CH_3 + \beta Pi$
627 *f*	644 *f*	694 *m*	τPi
582 *f*	584 *f*	588 *f*	$\tau Pi + \beta Pi + \nu C\text{-}CH_3$
498 *f*	497 *f*	460 *f*	$\beta C\text{-}NH_2 + \beta C\text{-}CH_3$

ν_{as} = estiramento assimétrico, ν_s = estiramento simétrico, β = deformação no plano, δ_{as} = deformação angular assimétrica no plano, δ_{sci} = deformação angular tesoura γ = deformação fora do plano, w = deformação wagging, τ = torsa, Pi = anel pirazólico. Intensidades: F = forte, mF = média-forte, m = média, mf = média-fraca, f = fraca.

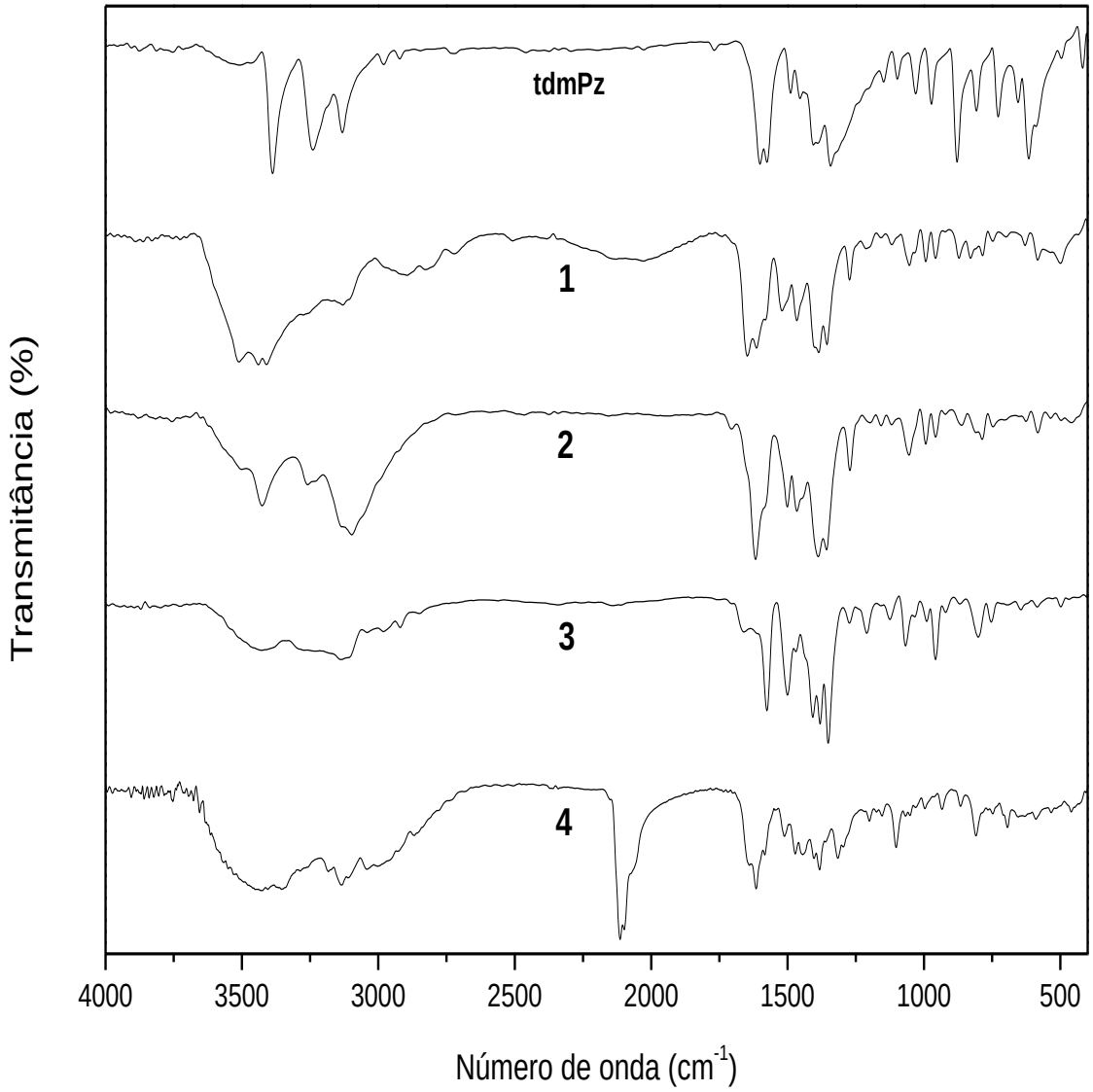


Figura 33. Espectros vibracionais na região de 4000-400 cm^{-1} do IV para o ligante e os compostos **1**, **2**, **3** e **4**.

Observando o espectro do ligante livre, tdmPz, nota-se duas bandas intensas em região de alta frequência, uma em 3387 cm^{-1} e a outra em 3240 cm^{-1}, atribuídas aos estiramentos assimétrico e simétrico do grupo NH_2, respectivamente. A banda referente ao estiramento assimétrico do grupo C-H do anel pirazólico ocorre em 3131 cm^{-1}. As bandas em 2980 e 2922 cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos assimétricos do grupo CH_3. Outras bandas são importantes para a análise dos modos vibracionais do ligante: 1601 cm^{-1} (deformação angular tesoura do grupo NH_2); 1576 cm^{-1} (estiramento da ligação C-NH_2); 879 cm^{-1} (estiramento da ligação C=S).

Nota-se claramente uma mudança em relação ao espectro do ligante livre quando comparado aos demais espectros dos compostos, indicando a coordenação do tdmPz ao metal.

As freqüências observadas no IV na região de 3400 – 3100 cm^{-1} decorrentes dos estiramentos assimétricos e simétricos do grupo NH_2 estão mais alargadas e deslocadas para frequências mais altas nos compostos **1**, **2** e **3**, indicando a presença de ligações de hidrogênio intermolecular do tipo NH---Cl, NH---Br e NH---I, respectivamente. A coordenação do pseudo-haleto SCN^- em **4** torna as bandas νNH menos definidas.

São esperadas algumas mudanças nos modos vibracionais envolvendo os átomos de enxofre e nitrogênio do anel pirazólico como resultado da interação entre o ligante e o metal. O principal efeito observado foi o aparecimento de duas novas bandas nos espectros dos quatro complexos. Uma ocorrendo na região entre 1294 – 1271 cm^{-1} atribuídas ao estiramento N-N do anel pirazólico e a outra na região entre 1211 – 1198 cm^{-1} referente a deformação no plano da ligação C-H(Pi) e ao estiramento da ligação C-C(Pi).

No ligante, 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol, o estiramento C=S aparece em 879 cm^{-1}, este modo vibracional tem um decréscimo em sua energia devido à interação Pd-S, que enfraquece a ligação C=S, deslocando as bandas referentes a este estiramento para região de mais baixa energia, aparecendo por volta de 867 cm^{-1} nos complexos. Em contrapartida há um fortalecimento da ligação C-NH_2 deslocando a banda νC-NH_2 nos espectros dos compostos (1618 – 1576 cm^{-1}) para uma região de frequência mais alta em relação ao tdmPz (1576 cm^{-1}). Porém, deve-se lembrar que as vibrações relacionadas aos átomos de S e N que estão coordenados ao metal aparecem geralmente acopladas fortemente com outras bandas, principalmente devido à formação do metalociclo e sendo assim, não possuem um valor que permita diagnosticá-la precisamente[71].

O íon tiocianato possui vários modos de coordenação. Ele pode coordenar-se a um único metal (coordenação terminal) ou a dois ou mais centros metálicos (coordenação em ponte). Além de poder se coordenar tanto pelo átomo de nitrogênio (NCS^-) como pelo átomo de enxofre (SCN^-), isotiocianato e tiocianato, respectivamente. De acordo com os conceitos de Pearson[72,73], o nitrogênio terminal deste íon é uma base dura enquanto o enxofre terminal é uma base mole. Consequentemente, a ligação pelo nitrogênio é esperada ocorrer com íons

metálicos duros e a coordenação via átomo de enxofre deve se realizar com íons metálicos moles.

Os metais do grupo da platina formam complexos com uma grande variedade de tipos de coordenação com o íon tiocianato. Embora a coordenação M-SCN seja observada na maioria dos casos, ambos M-SCN e M-NCS podem ocorrer simultaneamente.

A formação da ligação Pd-NCS é caracterizada pelas presenças das bandas ν_{as}(NCS) e ν_{s}(NCS) na região de 2090 – 2060 cm^{-1} e 830 – 854 cm^{-1}, respectivamente. Quando coordenado pelo átomo de enxofre (Pd-SCN), a banda ν_{as}(SCN) localiza-se em torno de 2100 – 2120 cm^{-1} e a ν_{s}(SCN) encontra-se no intervalo espectral de 696 – 711 cm^{-1}. Atuando como ponte, a banda ν_{as}(SCN) desloca-se para regiões acima de 2130 cm^{-1} [74].

No espectro no IV do complexo **4** nota-se duas bandas e um ombro, uma em 2114 cm^{-1}, outra em 2098 cm^{-1} atribuídas ao modo normal de vibração ν_{as}SCN do tiocianato[75]. A ocorrência destas duas bandas indica que os grupos tiocianatos estão coordenados ao metal em uma configuração *cis*. Esta absorção se faz em uma região espectral típica da coordenação terminal do tiocianato ocorre via átomo de enxofre (2130 – 2085 cm^{-1}). Já o ombro que ocorre em 2068 cm^{-1} é atribuído à presença de um isômero no qual a coordenação do grupo tiocianato ocorre via átomo de nitrogênio de maneira *trans* ao enxofre do tdmPz.

4.1.2 Espectroscopia de RMN de ^{1}H e ^{13}C:

Os sinais de RMN de ^{1}H e ^{13}C foram atribuídos de acordo com a numeração do esquema representado pela Figura 34.

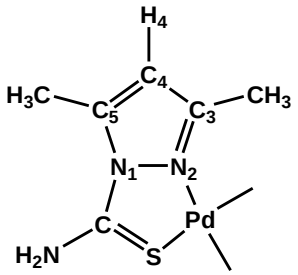


Figura 34. Esquema de numeração adotado na atribuição dos sinais de RMN.

Os espectros de RMN de ^{1}H dos compostos tdmPz, [$PdCl_2$(tdmPz)] (**1**), [$PdBr_2$(tdmPz)] (**2**), [PdI_2(tdmPz)] (**3**) e [$Pd(SCN)_2$(tdmPz)] (**4**), obtidos em dmso-d_6, estão representados pelas

Figuras 35-39, respectivamente. Os valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H estão contidos na Tabela 7.

Tabela 7. Deslocamento químicos de RMN de ^{1}H para os compostos tdmPz, **1**, **2** ,**3** e **4**.

Compostos	tdmPz	1	2	3	4
3-CH_3	2,14 *s* [3H]	2,59 *s* [3H]	2,59 *s* [3H]	2,57 *s* [3H]	2,60 *s* [3H]
H-4	6,16 *s* [3H]	6,51 *s* [3H]	6,54 *s* [3H]	6,53 *s* [3H]	6,49 *s* [3H]
5-CH_3	2,62 *s* [3H]	2,57 *s* [3H]	2,58 *s* [3H]	2,57 *s* [3H]	2,56 *s* [3H]
NH_2	9,54 *s* [1H] / 9,13 *s*[1H]	-	-	-	-

s = singleto; [] = integração

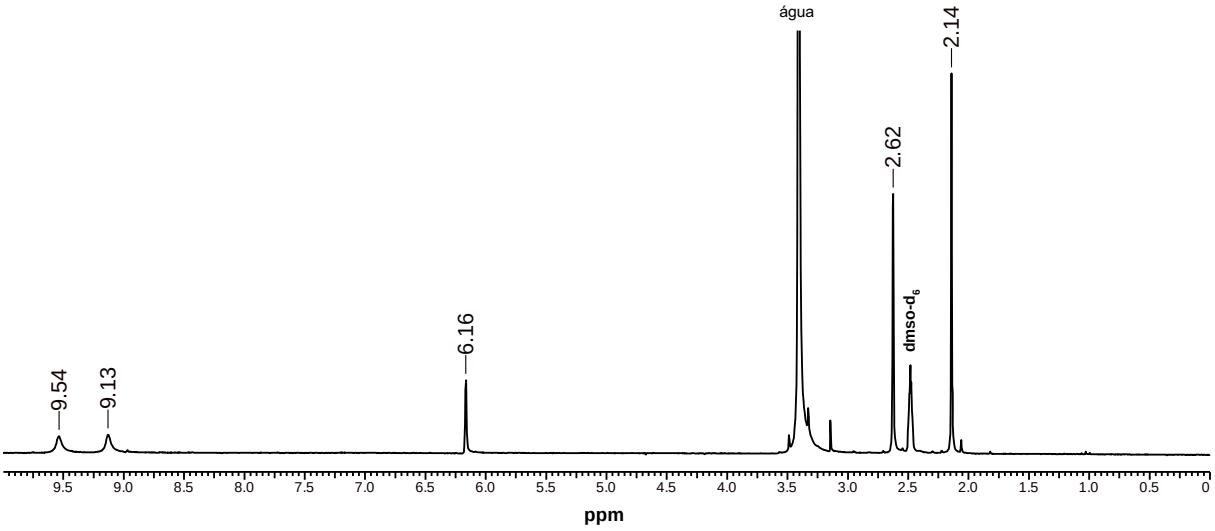


Figura 35. Espectro de RMN de ^{1}H do composto tdmPz em dmso-d_6.

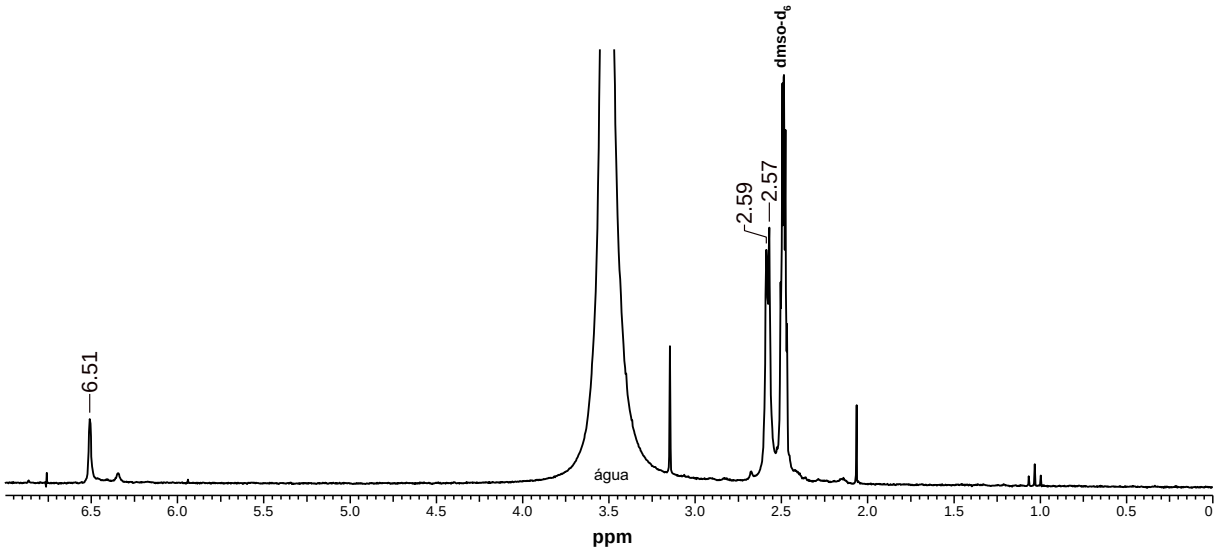


Figura 36. Espectros de RMN de ^{1}H do composto $[PdCl_2(tdmPz)]$ (**1**) em dmso-d_6.

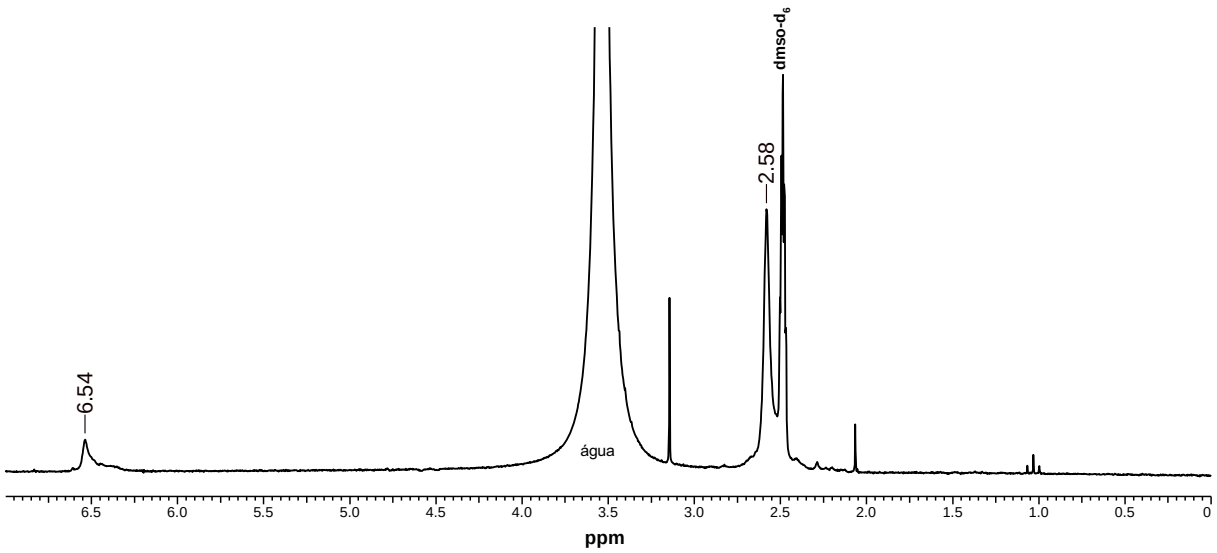


Figura 37. Espectro de RMN de ^{1}H do composto $[PdBr_2(tdmPz)]$ (**2**) em dmso-d_6.

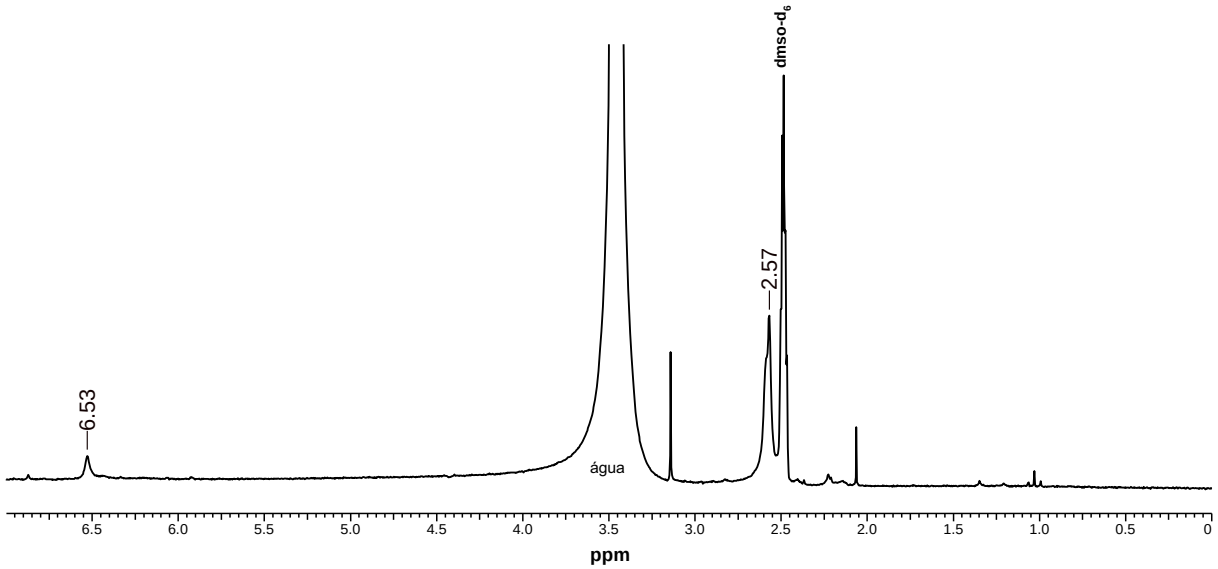


Figura 38. Espectro de RMN de ^{1}H do composto $[PdI_2(tdmPz)]$ (**3**) em dmso-d_6.

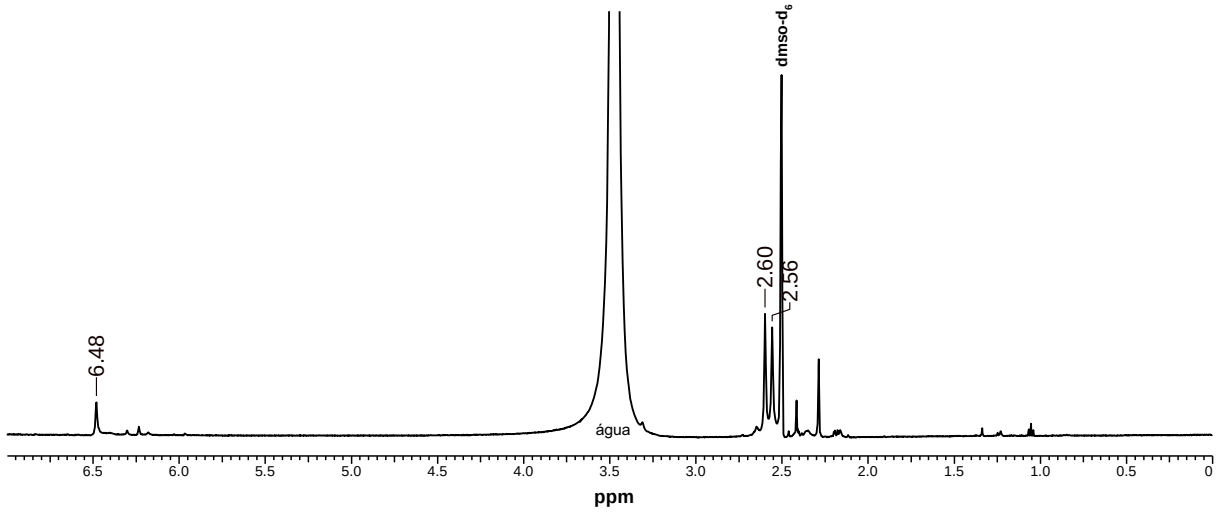


Figura 39. Espectro de RMN de ^{1}H do composto $[Pd(SCN)_2(tdmPz)]$ (**4**) em dmso-d_6.

Analisando o espectro de ressonância magnética nuclear de ^{1}H do ligante livre (Figura 35) pode-se notar os cinco sinais referentes aos hidrogênios da molécula. Dois singletos em campo baixo são observados em 9,54 e 9,13 ppm e atribuídos aos deslocamentos químicos dos hidrogênios do grupo NH_2. O sinal observado em 6,16 ppm é atribuído ao H-4 do anel pirazólico e os singletos dos hidrogênios metílicos ocorrem em 2,62 ppm (5-CH_3) e 2,14 ppm (3-CH_3). Os hidrogênios da metila da posição 5 encontram-se mais desprotegidos quando comparados aos hidrogênios da metila 3, devido à sua proximidade ao grupo tiocarmaboil. O sinal intenso em 3,5 ppm é referente ao deslocamento químico dos hidrogênios das moléculas de água encontradas no solvente utilizado. E o sinal em 2,5 ppm é atribuído ao dmso-d_6.

Os espectros de RMN de ^{1}H dos complexos se diferenciam do espectro do tdmPz pelo deslocamento químico dos sinais. A coordenação do ligante é indicada pelo deslocamento do sinal atribuído ao átomo de hidrogênio H-4 em 6,16 ppm (tdmPz) para regiões de campo mais baixo, 6,52 ppm aproximadamente, nos espectros dos complexos. O deslocamento para campo mais baixo do singleto referente aos hidrogênios da metila mais próxima do centro metálico, de 2,14 ppm (tdmPz) para ~ 2,59 ppm (**1**-**4**), também evidencia a coordenação do ligante. Dois singletos também são esperados para os átomos de hidrogênio magneticamente não-equivalentes dos grupos metílicos das posições 3 e 5 do anel pirazólico do ligante após a coordenação. Porém, coincidentemente, os núcleos de hidrogênio das metilas 3 e 5 absorvem praticamente na mesma frequência em todos os espectros dos complexos.

Os valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C estão contidos na Tabela 8. Os espectros de RMN de ^{13}C do tdmPz e dos compostos [$PdCl_2$(tdmPz)] (**1**) e [$Pd(SCN)_2$(tdmPz)] (**4**) estão representados pelas Figura 40-42. Não foi possível a obtenção dos espectros de RMN de ^{13}C dos compostos [$PdBr_2$(tdmPz)] (**2**) e [PdI_2(tdmPz)] (**3**), pois eles se mostraram pouco solúveis nos solventes deuterados disponíveis para realização do experimento (clorofórmio, água, acetona e dimetilsufóxido).

Tabela 8. Deslocamento químicos de RMN de ^{13}C para os compostos tdmPz, **1** e **4**.

Compostos	tdmPz	**1**	**4**
C-3	148,69	145,47	145,41
C-4	112,02	114,82	114,13
C-5	144,41	145,47	145,41
3-CH_3	13,14	15,50	15,13
5-CH_3	16,98	13,50	13,62
C=S	178,41	161,53	160,28
SCN	-	-	118,85

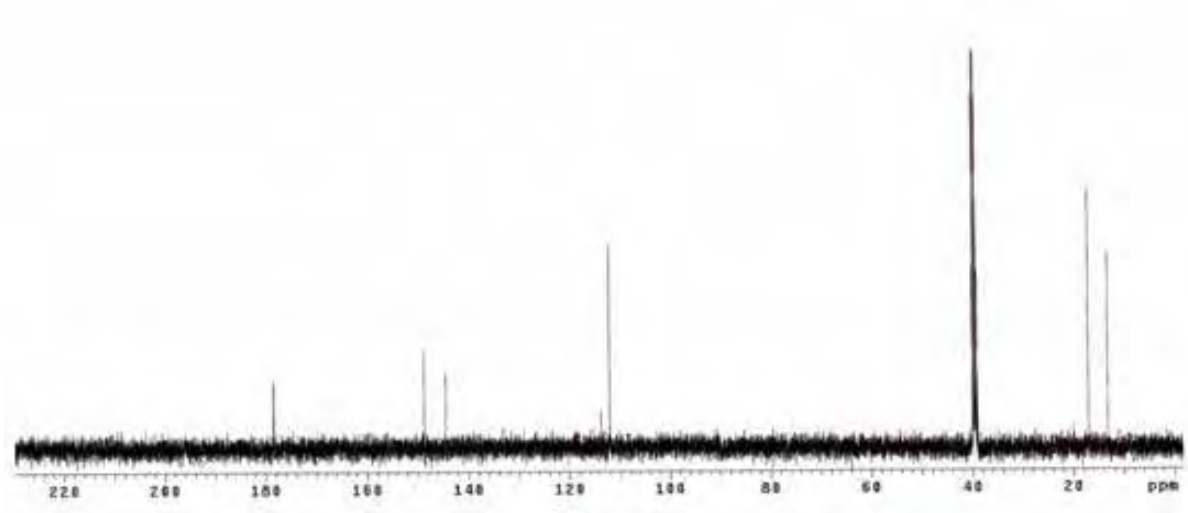


Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C do tdmPz.

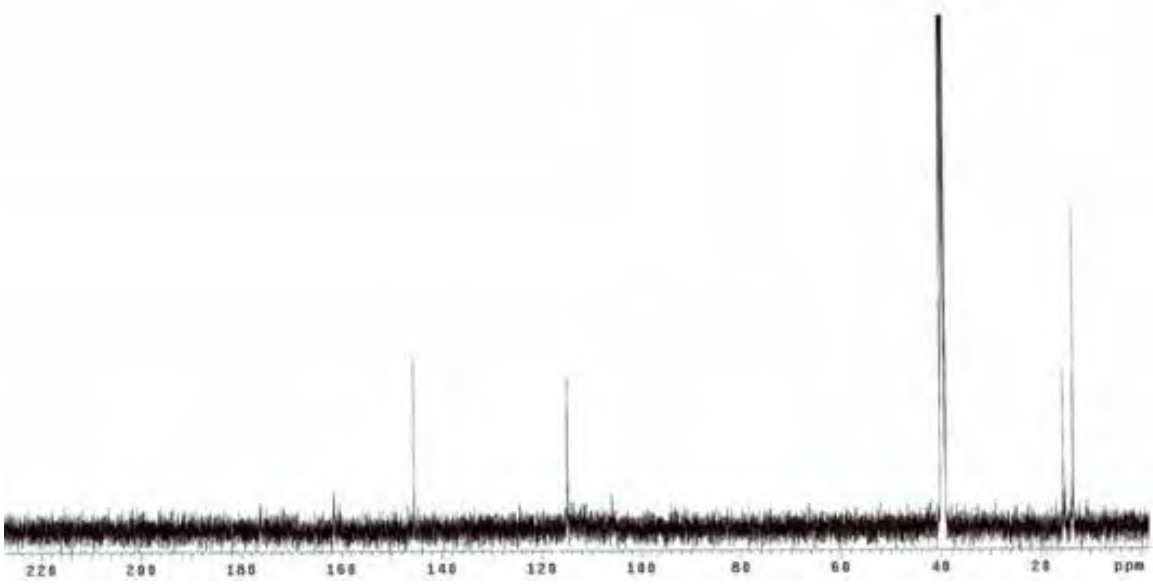


Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C do [$PdCl_2$(tdmPz)].

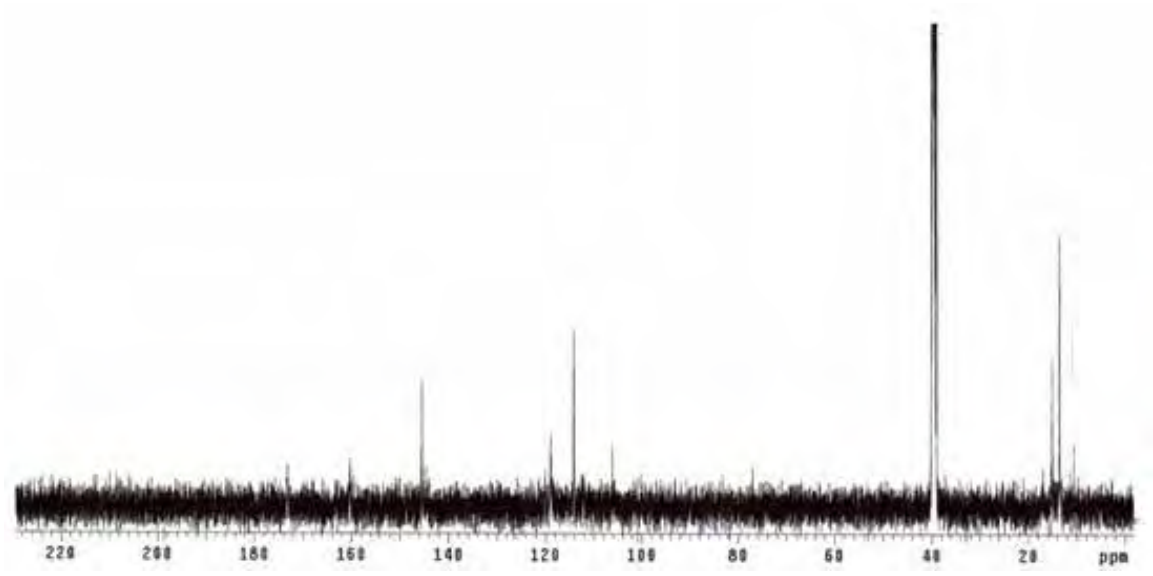


Figura 42. Espectro de RMN de ^{13}C do $[Pd(SCN)_2(tdmPz)]$.

Analisando o espectro de RMN de ^{13}C do ligante pode-se perceber a presença de seis sinais representando todos os carbonos magneticamente não equivalentes da molécula. Em campo alto, encontram-se os sinais referentes aos carbonos das duas metilas 5-C_{metil} (16,98 ppm) e 3- C_{metil} (13,14 ppm). O sinal atribuído ao C-4, aparece em 112,02 ppm, enquanto que os sinais dos átomos do C-3 e C-5 ocorrem em 148,69 e 144,41 ppm, respectivamente. O pico referente ao carbono do grupo tiocarbamoil aparece em região de campo baixo em 178,41 ppm.

Nos espectros de RMN de ^{13}C dos complexos **1** e **4**, os sinais referentes aos carbonos 3-C_{metil} e C-4 são deslocados aproximadamente 2,0 ppm para campo mais baixo quando comparados com o ligante livre. Este deslocamento pode ser atribuído à remoção da densidade eletrônica do ligante para o paládio via doação σ do átomo de nitrogênio piridínico. Esta remoção eletrônica provoca uma alteração no nível de desproteção dos carbonos das metilas quando comparados com o tdmPz. Um deslocamento de 18,0 ppm para campo mais alto é observado para o pico referente ao carbono do grupo tiocarbamoil dos complexos. Este fato é atribuído à diminuição na força da dupla ligação entre o carbono e o enxofre, evidenciando a formação da ligação Pd-S. No espectro do complexo $[Pd(SCN)_2(tdmPz)]$ além dos sinais esperados da coordenação do tdmPz, aparece um pico adicional em 118,85 ppm característico do modo de coordenação do grupo tiocianato pelo

átomo de enxofre de maneira terminal. Uma vez que o experimento foi realizado em dimetilsufóxido, o que favorece a coordenação M-SCN[76,77].

O ligante 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol e o complexo [$PdCl_2$(tdmPz)] (**1**) foram investigados também pelo experimento NOESY 1D, o qual é capaz de mostrar a interação espacial entre átomos de hidrogênios próximos[78]. Sabendo-se que a distância entre o núcleo H_4 e os hidrogênios das metilas 3 e 5 é da ordem de 2,6 Å, o experimento NOESY 1D permite atribuir de forma inequívoca os sinais das metilas a partir da irradiação no núcleo H_4. Vale destacar que a região espectral onde estão localizados os sinais dos grupos CH_3 é próxima do multipleto do dmso-d_6 e, neste experimento, não se observava os sinais do solvente.

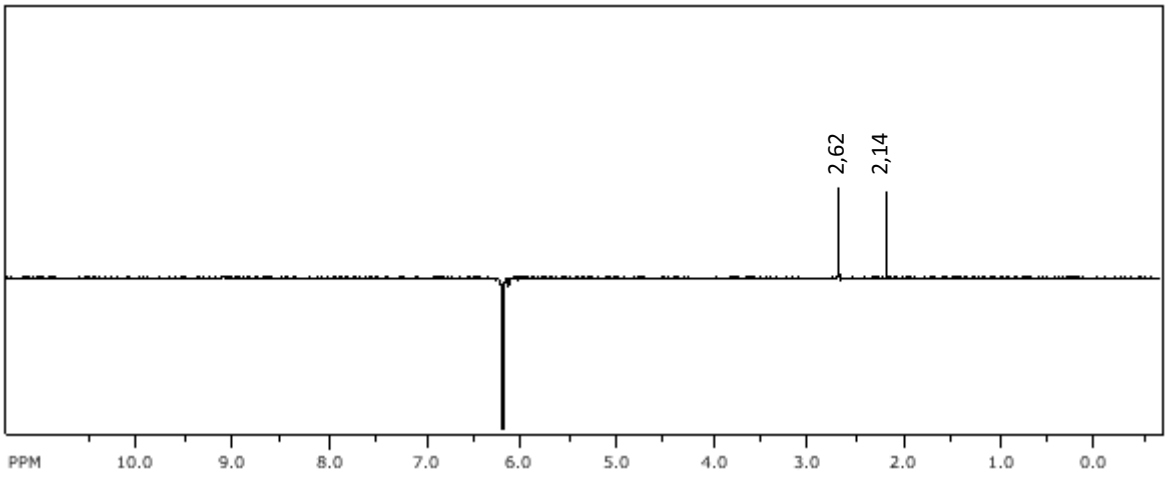


Figura 43. Espectro NOESY 1D com irradiação no H-4 do tdmPz.

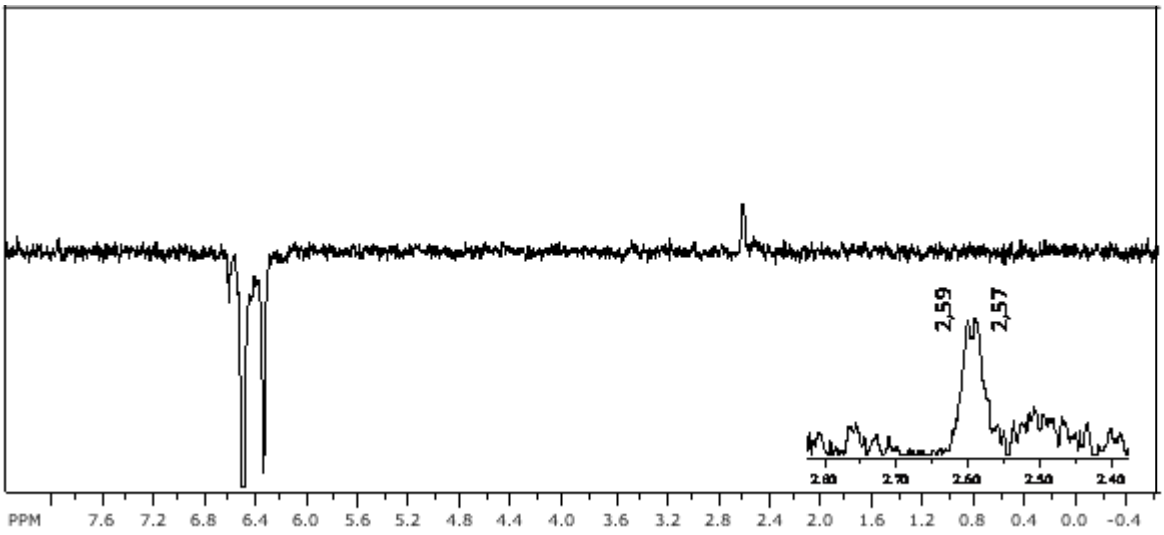


Figura 44. Espectro NOESY 1D com irradiação no H-4 do complexo **1**.

Através da interação espacial existente entre o H-4 e os hidrogênios das metilas ligadas ao anel pirazólico é possível verificar que os sinais dos grupos CH_3 das posições 3 e 5 do composto **1** são muito próximos entre si.

Além desta técnica, o complexo [$PdCl_2$(tdmPz)] e o ligante livre foram investigados mediante a Espectroscopia de Correlação Heteronuclear (HMQC)[78]. A correlação ^{1}H-^{13}C é mostrada por um contorno de correlação na intersecção da linha horizontal a partir do pico (ou multiplete) correspondente ao hidrogênio e da linha vertical a partir do pico do carbono (Figura 45-48). Estes espectros auxiliam muito nas atribuições dos picos, pois conhecendo a identidade dos hidrogênios pode-se realizar as atribuições dos carbonos ligados a eles mais facilmente. A Tabela 9 apresenta os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos envolvidos nas correlações bem como suas respectivas atribuições.

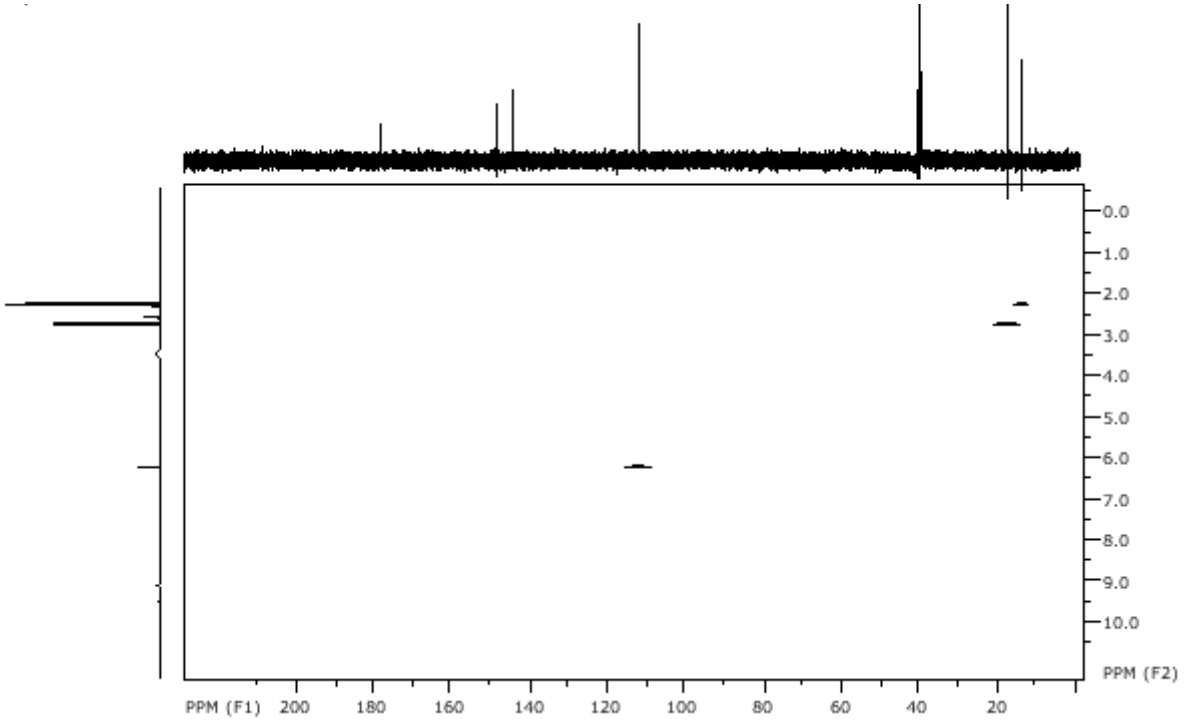


Figura 45. Espectro HMQC do ligante livre em dmso-d_6.

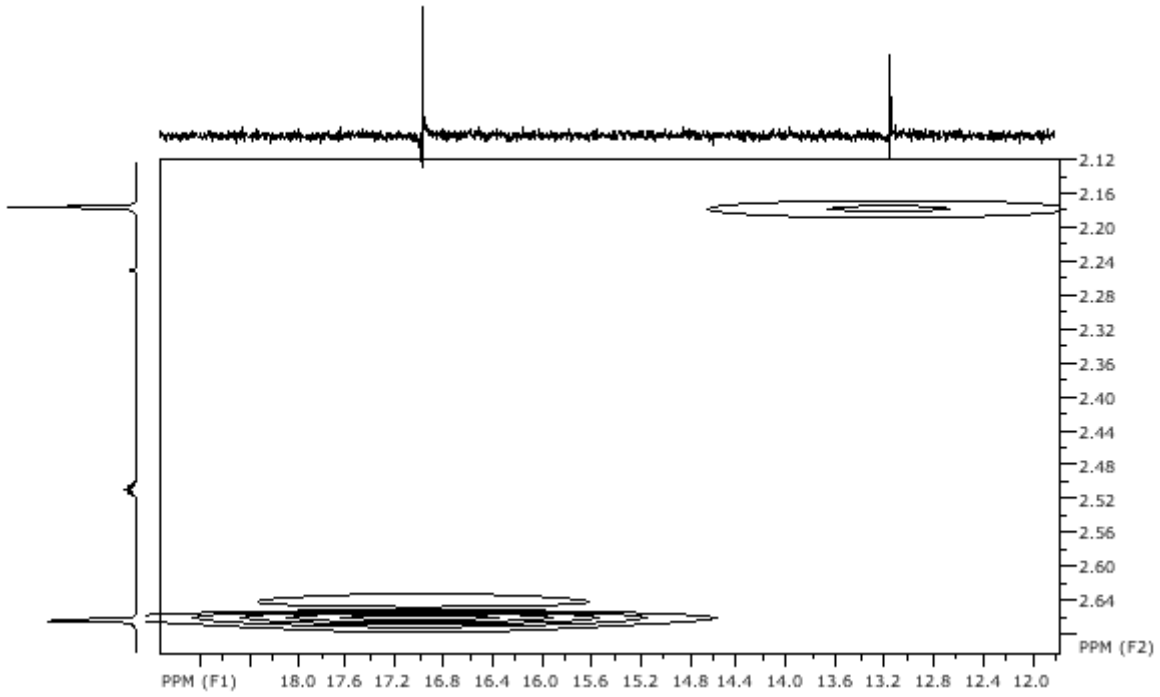


Figura 46. Espectro HMQC do tdmPz ampliado na região de correlação entre os hidrogênios das metilas e seus carbonos.

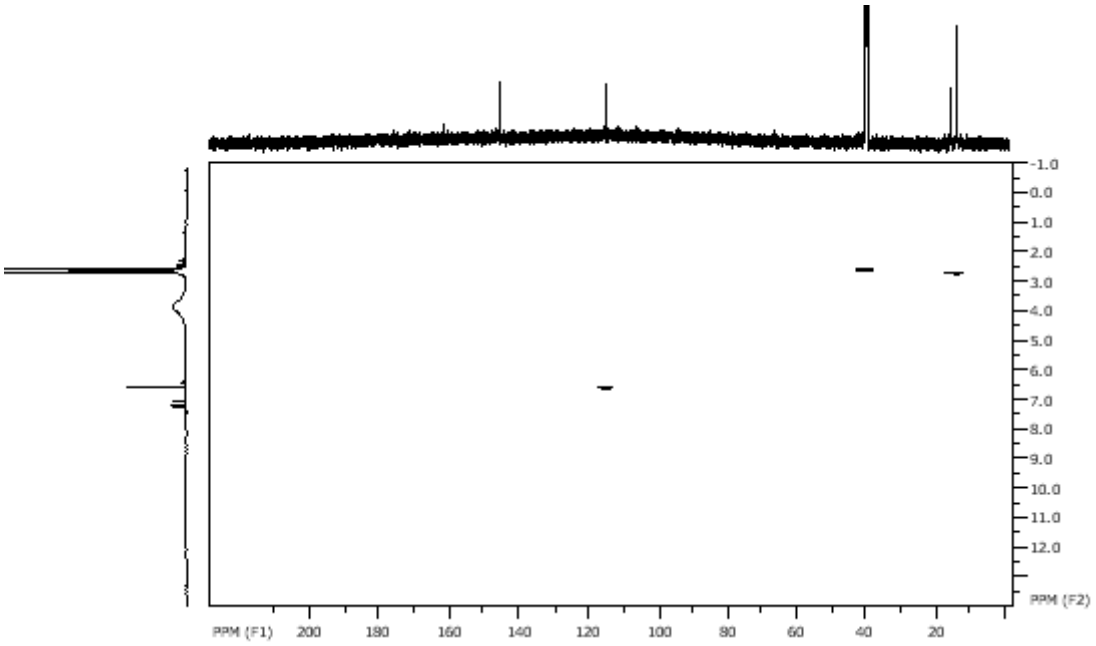


Figura 47. Espectro HMQC do [$PdCl_2$(tdmPz)] em dmso-d_6.

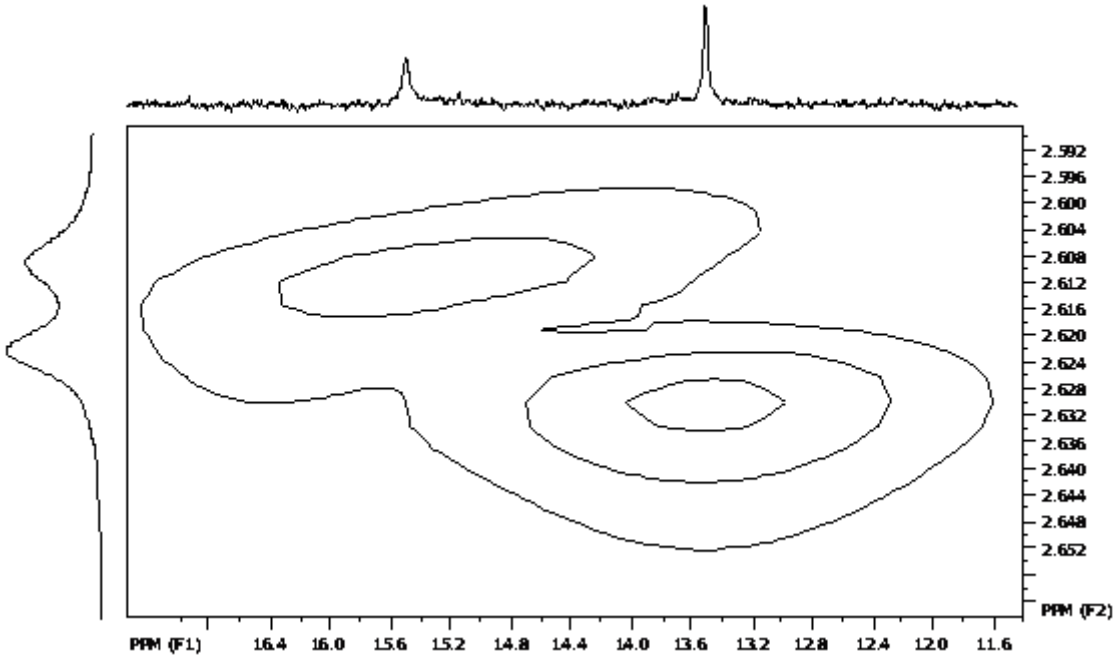


Figura 48. Espectro HMQC do [$PdCl_2$(tdmPz)] ampliado na região de correlação entre os hidrogênios das metilas e seus carbonos.

Tabela 9. Dados de Espectroscopia de Correlação Heteronuclear (HMQC) para o tdmPz e o complexo **1** em dmso-d_6 obtidos na faixa espectral de δ 1-13 (^{1}H)/ δ 10-230 (^{13}C).

tdmPz		**[$PdCl_2$(tdmPz)]**	
Hidrogênio	Carbono	Hidrogênio	Carbono
5-CH_3	5-C_{metil}	5-CH_3	5-C_{metil}
2,62	16,98	2,57	13.50
3- CH_3	3-C_{metil}	3- CH_3	3-C_{metil}
2,14	13,14	2,59	15,50
H-4	C-4	H-4	C-4
6,16	112,02	6,16	114,82

4.1.3 Análise Térmica dos compostos $[PdX_2(tdmPz)]$ ($X = Cl^-, Br^-, I^-, SCN^-$):

Os principais dados obtidos a partir das curvas TG/DTA dos complexos estão apresentados na Tabela 10. Considerando as temperaturas iniciais de termodecomposição dos compostos, propõe-se a seguinte ordem de estabilidade térmica: **3** < **4** ≡ **2** < **1**.

- Curvas TG/DTA do composto tdmPz:

A curva TG do tdmPz mostrou que a sua decomposição térmica (Figura 49), ocorreu em três processos consecutivas, entre 66-555 ^{o}C . Estes eventos estão associados aos picos endotérmicos em 99 ^{o}C e 194 ^{o}C e ao sinal exotérmico em 240 ^{o}C, referente a queima do material carbonáceo. Não se observa resíduo desta decomposição revelando a perda total de massa do composto.

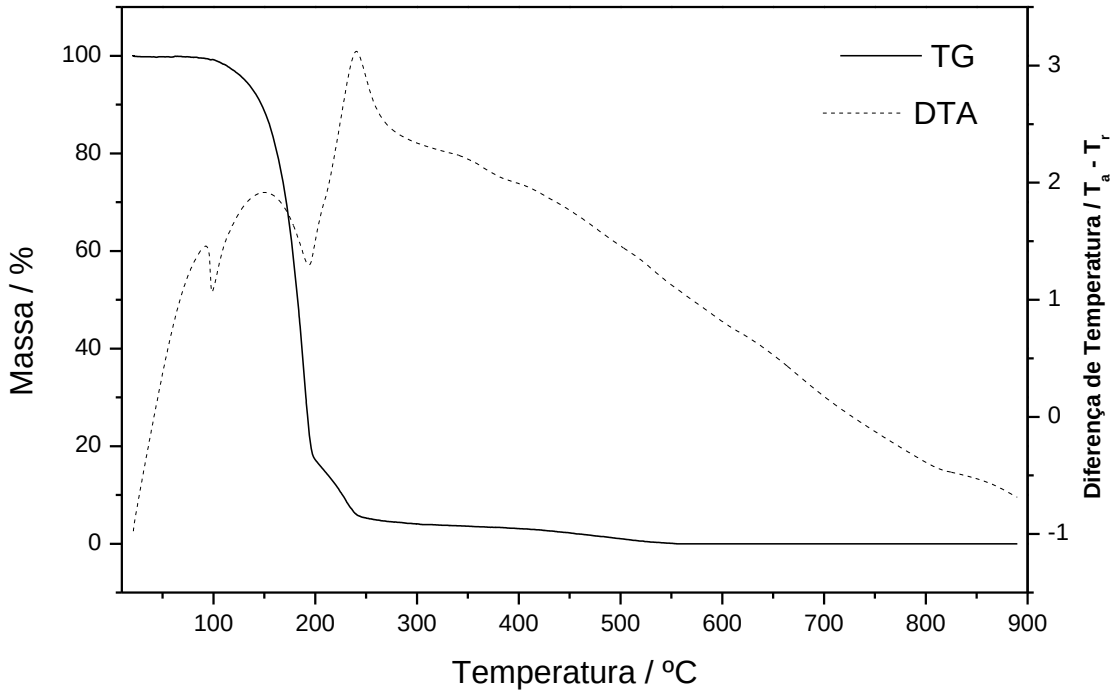


Figura 49. Curvas TG/DTA do compostos tdmPz.

- Curvas TG/DTA do composto $[PdCl_2(tdmPz)]$ (**1**):

A curva TG mostrou que a decomposição térmica do complexo **1** (Figura 50), tem inicio em 126 ^{o}C, com a saída do ligante tdmPz, dos dois átomos de cloro e o ganho do oxigênio necessário para a oxidação quase que completa do paládio ao seu óxido. Estes eventos estão associados ao pico endotérmico em 225 ^{o}C e aos sinais exotérmicos em 385 ^{o}C e 443 ^{o}C. No intervalo entre 462-797 ^{o}C, observa-se um pequeno ganho de massa de 0,58 % de corrente da conversão do restante do paládio em PdO. Na última etapa (797-844 ^{o}C), ocorre uma perda de massa referente a eliminação do oxigênio envolvido na decomposição do PdO a paládio metálico. Este processo está associado ao pico endotérmico em 824 ^{o}C na curva DTA.

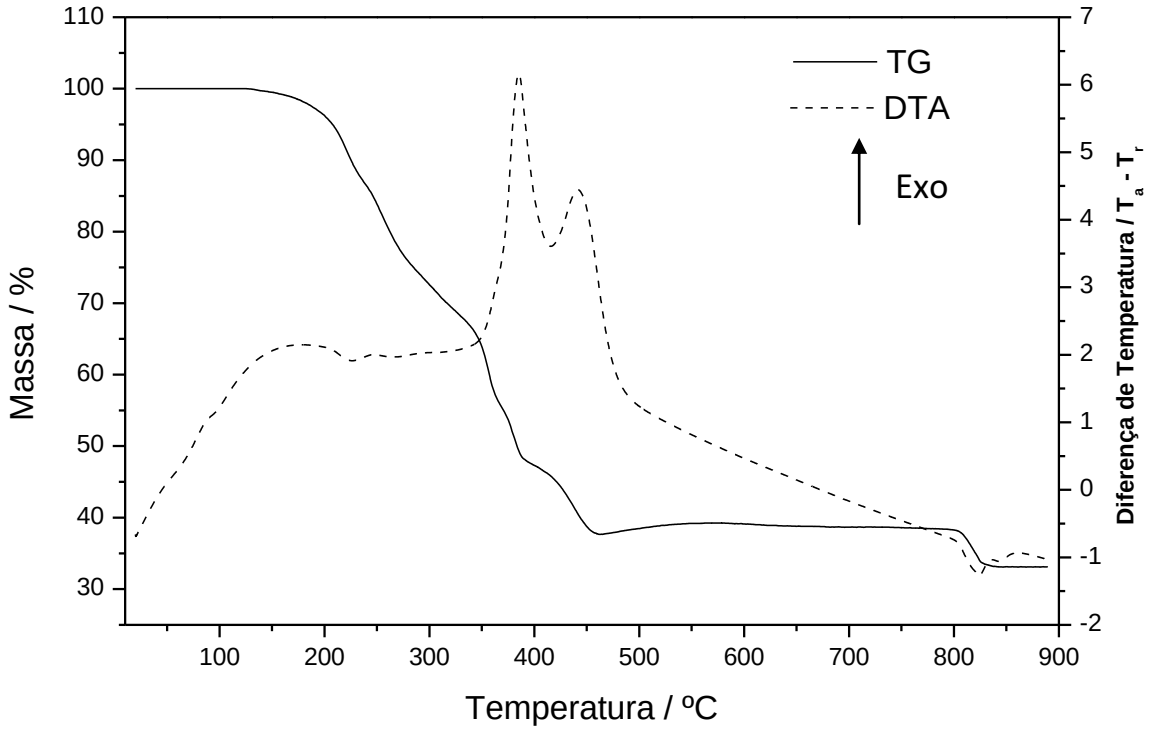


Figura 50. Curvas TG/DTA do composto $[PdCl_2(tdmPz)]$ (**1**).

- Curva TG/DTA do composto [$PdBr_2$(tdmPz)] (**2**):

A decomposição térmica do complexo **2** (Figura 51) se dá de maneira bem semelhante a do composto **1**. Porém ele se apresenta menos estável termicamente, pois sua primeira etapa se inicia a uma temperatura menor (101 ^oC). Os primeiros eventos consecutivos de decomposição (101-671 ^oC) são atribuídos a perda do 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol, dois átomos de bromo e o ganho de aproximadamente 0,5 O_2. Neste intervalo de temperatura, a curva DTA mostra um evento endotérmico em 226 ^oC e dois exotérmicos em 374 e 663 ^oC. No intervalo entre 671-787 ^oC, observa-se um pequeno ganho de massa de 0,28 % de corrente da conversão do restante do paládio em PdO. A ultima etapa de decomposição (787-830 ^oC) é caracterizada pela conversão total do PdO a Pd e é acompanhada pelo pico endotérmico em 823 ^oC.

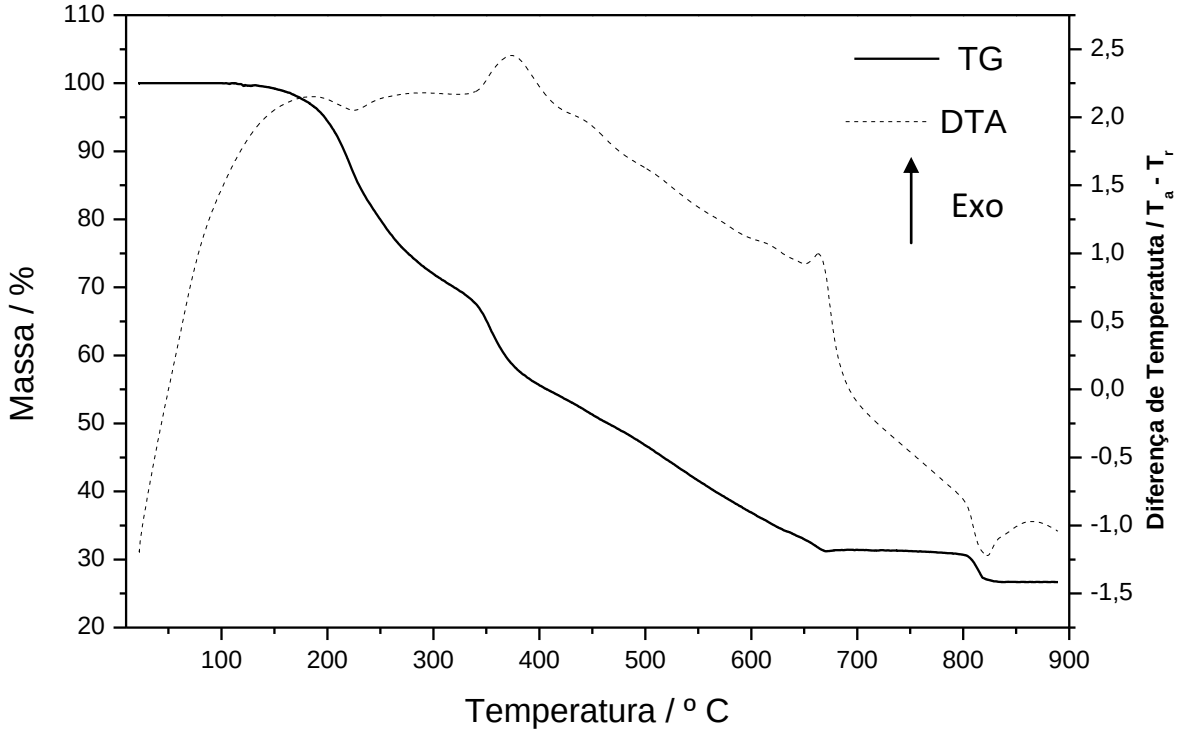


Figura 51. Curvas TG/DTA do compostos [$PdBr_2$(tdmPz)] (**2**).

• Curvas TG/DTA do composto [PdI_2(tdmPz)] (**3**):

O mesmo perfil de decomposição foi observado para o [PdI_2(tdmPz)] (**3**) (Figura 52). As perdas consecutivas da primeira etapa (71-530 ^oC) são associadas à eliminação dos ligantes e incorporação de O_2. A estes processos são atribuídos um pico endotérmico em 202 ^oC e dois picos exotérmicos em 386 ^oC e 464 ^oC. A segunda etapa ocorre entre 804-860 ^oC e se caracteriza pela decomposição de PdO a Pd^0. A este fenômeno se associa o pico endotérmico em 834 ^oC da curva DTA.

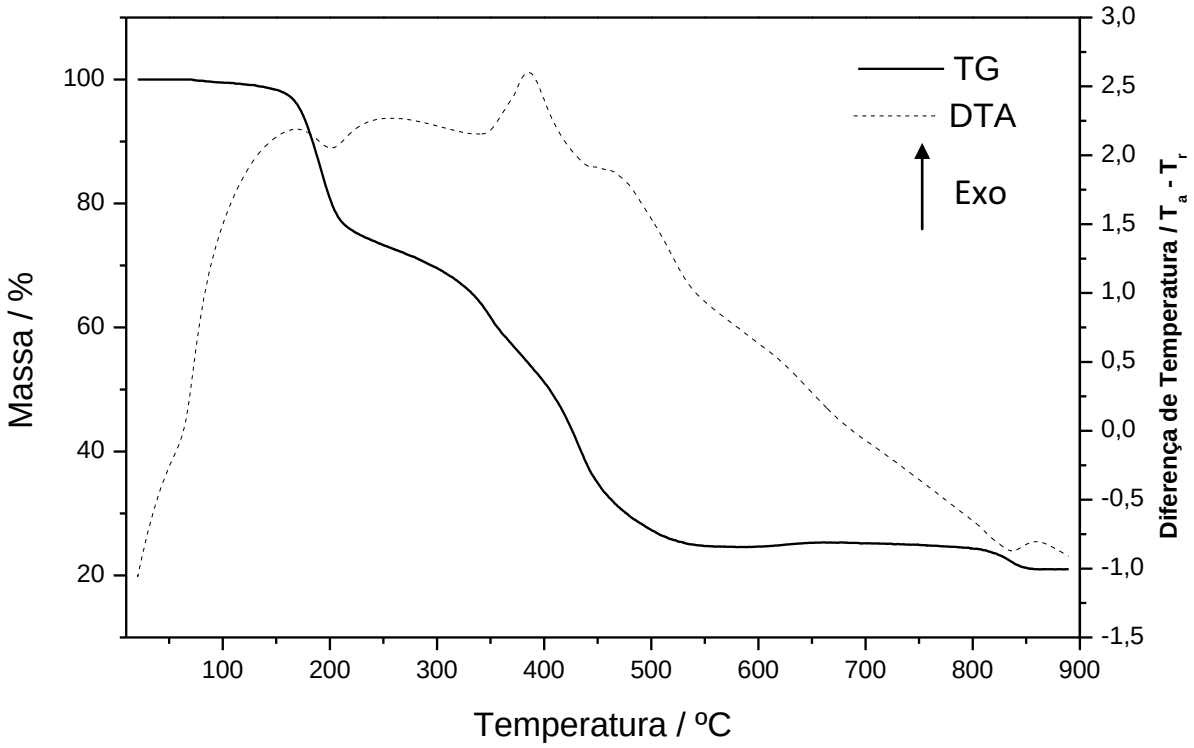


Figura 52. Curvas TG/DTA do composto [PdI_2(tdmPz)] (**3**).

- Curvas TG/DTA do composto $[Pd(SCN)_2(tdmPz)]$ (**4**):

A curva TG mostrou que a decomposição térmica do complexo **4** (Figura 53) ocorreu entre 101-530 °C e 788-830 °C. As perdas de massa simultâneas e consecutivas observadas durante o primeiro intervalo de 101-530 °C são atribuídas à eliminação das duas moléculas de tiocianato e do ligante tdmPz, além da incorporação de oxigênio necessário para a oxidação do paládio a PdO. Estes eventos estão associados ao pico endotérmico em 210 °C e ao pico exotérmico em 482 °C. No intervalo de 788-830 °C ocorreu uma perda de massa referente à eliminação do oxigênio envolvido na decomposição do óxido de paládio a Pd^0. Este processo está associado ao pico endotérmico em 813 °C na curva DTA.

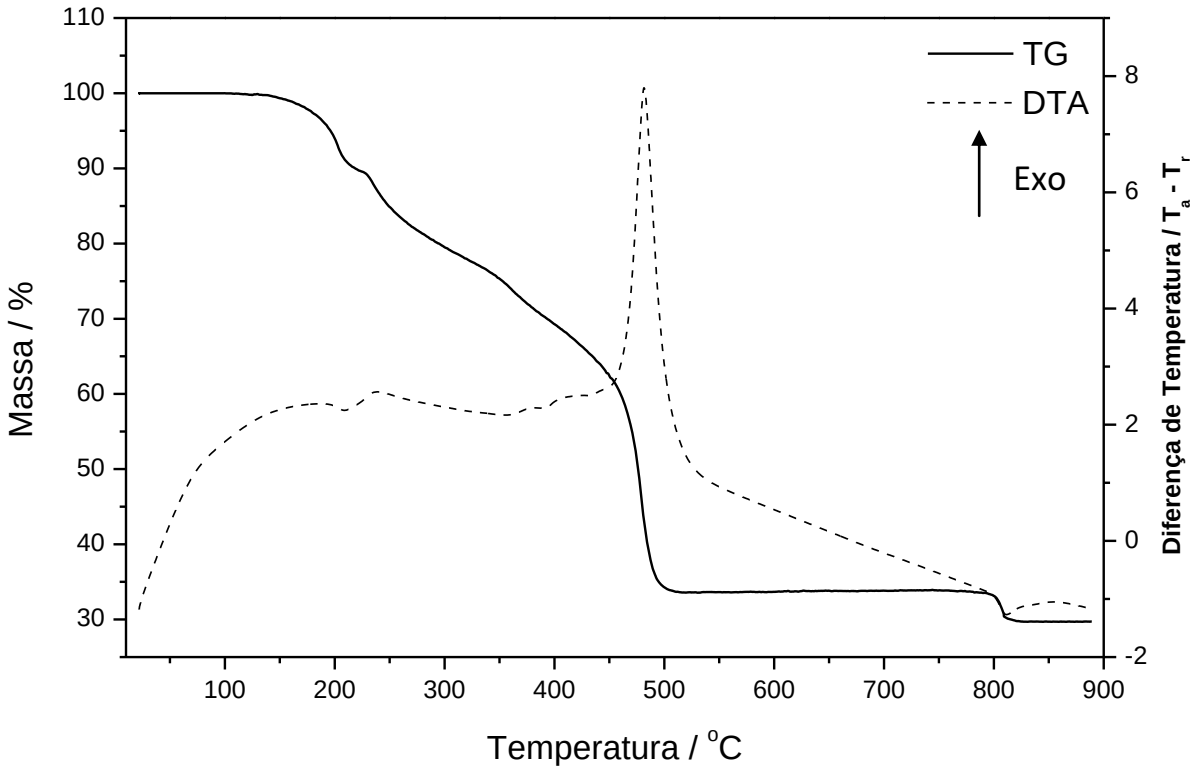


Figura 53. Curvas TG/DTA do composto $[Pd(SCN)_2(tdmPz)]$ (**4**).

Tabela 10. Perdas de massa (%) e intervalos de temperatura observados nas curvas TG/DTA dos complexos **1**-**4**.

Complexo	Etapa	ΔT/ºC	Δm/%		Picos DTA/ºC		Atribuição
			Obt.	Calc.	endo	Exo	
1	1	126-462	-62,34	-63,19	225	385, 443	$-2Cl^-$, -tdmPz, $+0,5O_2$
	2	797-844	-5,10	-4,81	824	-	$-0,5O_2$
	Resíduo		33,10	32,00			Pd^0
2	1	101-671	-68,79	-70,95	226	374, 663	$-2Br^-$, -tdmPz, $+0,5O_2$
	2	787-830	-4,23	-3,8	823	-	$-0,5O_2$
	Resíduo		26,78	25,25			Pd^0
3	1	71-530	-75,43	-76,25	202	386, 464	$-2I^-$, -tdmPz, $+0,5O_2$
	2	804-860	-3,31	-3,10	834	-	$-0,5O_2$
	Resíduo		21,00	20,65			Pd^0
4	1	101-530	-66,44	-67,60	210	482	$-2SCN^-$, -tdmPz, $+0,5O_2$
	2	788-830	-3,88	-4,23	813	-	$-0,5O_2$
	Resíduo		29,68	28,17			Pd^0

As curvas termogravimétricas das espécies obtidas mostram decomposições térmicas consecutivas em várias etapas, levando à formação de paládio metálico após atingir a temperatura aproximada de 800 ^oC, na qual o PdO anteriormente originado sofre decomposição. Vale destacar que o teor de paládio metálico obtido para todas as termodecomposições está em concordância com o valor calculado para as fórmulas $[PdX_2(tdmPz)]$.

A identificação do resíduo final das termodecomposições como paládio metálico foi realizada através da difração de raios X pelo método do pó, mostrando valores de distâncias interplanares d(hkl) e intensidades (I%) característicos desse composto (Figura 55)[70]. A Figura 54 mostra o difratograma de raios X de pó do resíduo final da decomposição térmica do composto $[PdCl_2(tdmPz)]$, sendo esta figura representativa também para os demais resíduos finais formados pelos complexos $[PdBr_2(tdmPz)]$, $[PdI_2(tdmPz)]$ e $[Pd(SCN)_2(tdmPz)]$.

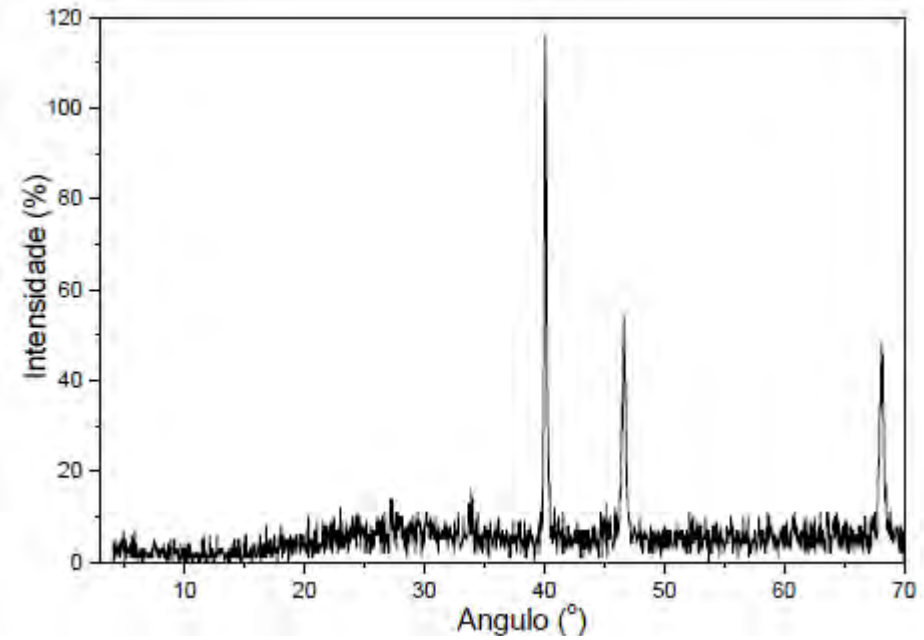


Figura 54. Difratograma de raios X, método do pó, do Pd^0 obtido no final da termodecomposição do composto $[PdCl_2(tdmPz)]$ (**1**).

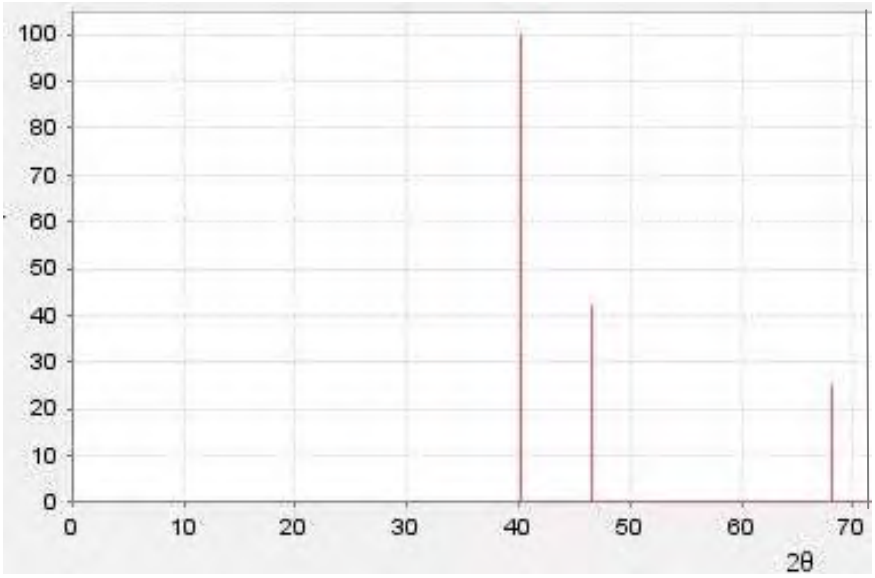


Figura 55. Ficha cristalográfica número 005-0681, referente ao paládio metálico.

4.2 Proposição Estrutural:

Com base nos resultados obtidos a partir das espectroscopias no infravermelho e de RMN, em concordância com os resultados de análise elementar e análise térmica sugere-se as seguintes estruturas para os compostos **1**-**4** (Figura 53).

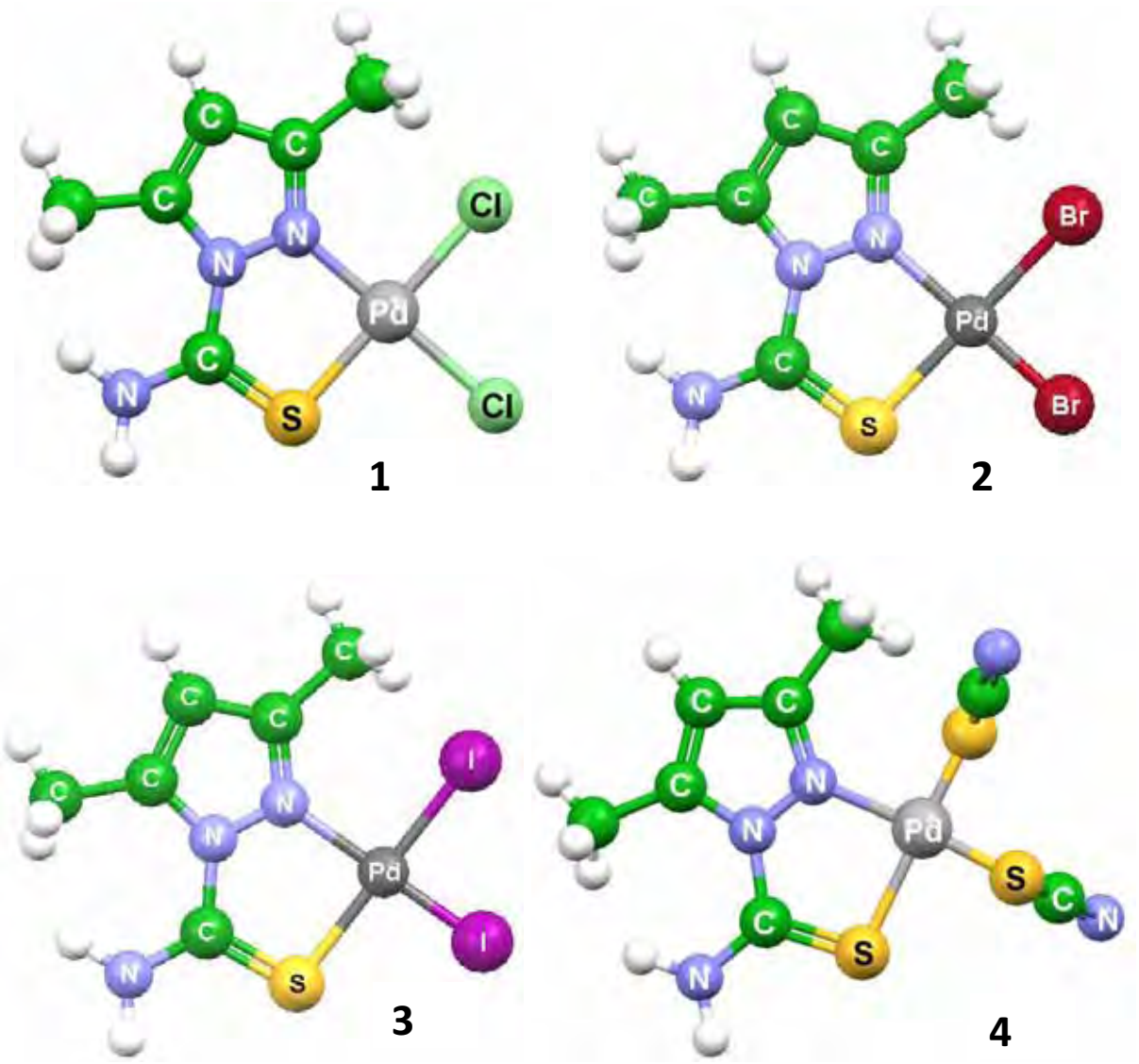


Figura 56. Fórmulas *e*struturais propostas para os compostos [$PdCl_2$(tdmPz)] (**1**), [$PdBr_2$(tdmPz)] (**2**), [PdI_2(tdmPz)] (**3**) e [$Pd(SCN)_2$(tdmPz)] (**4**).

Espera-se um ambiente quadrado planar ao redor do átomo de paládio, com seus sítios de coordenação ocupados por dois átomos de cloro (**1**), bromo (**2**), iodo (**3**) ou dois grupos S-tiocianatos terminais (**4**) e por uma molécula de 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol coordenada via átomo de enxofre e nitrogênio piridínico, resultando em complexos isoestruturais de configuração *cis*.

4.3 Investigação das Propriedades Biológicas:

Os complexos $[PdCl_2(tdmPz)]$, $[PdBr_2(tdmPz)]$, $[PdI_2(tdmPz)]$ e $[Pd(SCN)_2(tdmPz)]$ foram submetidos a ensaios biológicos visando avaliar seus potenciais citotóxicos frente aos macrófagos (células de defesa) de camundongos sadios e, concomitantemente, analisou-se a atividade antiproliferativa destes compostos frente a células tumorais murinas: LM3 (adenocarcinoma mamário), LMM3 (adenocarcinoma mamário com metástase no pulmão) e LP07 (adenocarcinoma pulmonar). Estes dois tipos de testes foram realizados a fim de se investigar a seletividade dos compostos frente a células tumorais em relação aos macrófagos (células normais).

As concentrações de dmso nas soluções-mãe e nas respectivas diluições finais das espécies investigadas não foram significativamente citotóxicas ($p>0,05$) aos macrófagos peritoneais, às linhagens tumorais, portanto não influenciando sua citotoxicidade sobre os mesmos.

4.3.1 Determinação da viabilidade celular das linhagens tumorais LM3, LMM3 e LP07, e de macrófagos de camundongos normais pela técnica do MTT:

Os valores dos índices de citotoxicidade (IC_{50}), concentração necessária para induzir a morte de 50 % das celulas, observados para tdmPz, complexos **1**-**4** e a cisplatina frente aos macrófagos dos camundongos BalB/C normais, e as células tumorais estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Valores de IC_{50} do tdmPz, dos compostos **1**-**4** e da cisplatina contra as células tumorais murinas LM3, LMM3 e LP07, e os macrófagos após 24 h de exposição.

Composto	IC_{50} (μM) ± DP			
	Macrófagos	LM3	LMM3	LP07
$[PdCl_2(tdmPz)]$ (**1**)	33,15 ± 9,29	90,24 ± 2,55	98,76 ± 5,64	62,45 ± 1,19
$[PdBr_2(tdmPz)]$ (**2**)	29,30 ± 2,61	100,51 ± 0,94	20,73 ± 4,99	42,45 ± 2,70
$[PdI_2(tdmPz)]$ (**3**)	50,24 ± 3,06	24,54 ± 2,27	>140	28,70 ± 3,40
$[Pd(SCN)_2(tdmPz)]$ (**4**)	83,98 ± 3,71	41,69 ± 0,98	83,34 ± 5,64	56,63 ± 2,33
tdmPz	>140	>140	>140	>140
Cisplatina	49,80 ± 2,90	30,30 ± 3,72	>140	4,34 ± 0,45

[1-] $5x10^6$ células / cavidade; [2-] Os valores acima são dados como média ± DP de cinco animais em triplicata, valores determinados por uma curva dose-resposta, expressos em μM.

Observa-se que a citotoxidade dos haleto-complexos **1** e **2** é maior que a da cisplatina para os macrófagos de camundongos normais, para as concentrações de IC_{50} após 24h de exposição. Estes resultados indicam que eles induzem a morte celular usando uma menor concentração para induzir a morte de 50 % das células. Isto não é interessante para o que se deseja, uma vez que esses compostos devem atuar frente as células tumorais e agir minimamente nas células normais. O composto **3** se apresentou tão citotóxico quanto a droga padrão. Vale destacar o complexo **4**, que apresentou a menor citotoxicidade frente aos macrófagos durante 24 h de exposição.

Os resultados obtidos com os ensaios frente à linhagem tumoral LM3 mostram que a citotoxicidade do composto $[PdI_2(tdmPz)]$ é comparável à da cisplatina na inibição do crescimento destas células, após o período de 24 h de exposição. Apesar do valor de IC_{50} frente à linhagem LM3 do complexo **4** ser um pouco maior que a droga de referência, novamente é importante ressaltar que o mesmo se mostrou ser o menos citotóxico aos macrófagos, uma vez que a seletividade é um requisito muito importante para que um composto se apresente como candidato à metalo-droga.

Analisando os resultados encontrados para as células tumorais murinas de adenocarcinoma mamário com metástase no pulmão, LMM3, verifica-se maior citotoxidade para o composto **2**, com valor de IC_{50} = 20,73 μM. Além deste, outros dois complexos (**1** e **4**) apresentaram maior citotoxidade do que a droga padrão, cisplatina. O interessante de se

observar é o fato do complexo **2** ser o menos citotóxico frente às células LM3, que também são de adenocarcinoma mamário. Além dele, percebe-se também a inversão de atividade antitumoral no complexo **3** e na cisplatina, que se mostraram inativos frente às células LMM3, e são os mais citotóxicos contra as células LM3.

Frente à linhagem de adenocarcinoma pulmonar, LP07, todos os compostos apresentam valores de IC_{50} na faixa de 28-63 μM, porém se mostraram menos citotóxicos do que a droga padrão, cisplatina. Observa-se um aumento na atividade citotóxica dos complexos de acordo com o grupo aniônico: Cl ≅ SCN < Br < I. Estudos posteriores devem ser desenvolvidos para se determinar a relação entre a atividade do composto e o grupo aniônico coordenado ao metal.

Dentre os complexos testados, destaca-se o composto **4**, pois o mesmo é o menos citotóxico frente aos macrófagos e mais eficiente em relação à cisplatina frente às células LMM3. Analisando os experimentos realizados, nota-se que em todos casos o ligante, 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol (tdmPz), não apresentou atividade citotóxica quando em concentrações menores que 140 μM, por isso foi considerado inativo frente a essas linhagens. Os elevados valores de IC_{50} encontrados para o ligante tdmPz em relação aos compostos de Pd(II) mostram que a coordenação ao metal potencializa a citotoxicidade do composto formado.

Com os dados de viabilidade celular obtidos até o momento, é muito difícil fazer uma relação estrutura-atividade. Estudos mais aprimorados envolvendo a interação entre complexo-DNA devem ser realizados para se entender o mecanismo de ação destes compostos.

5 Conclusão:

Quatro novos complexos de paládio(II) foram sintetizados a partir do precursor $[PdCl_2(MeCN)_2]$ [bisacetonitriladicloropaládio(II)] com o ligante pirazólico 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol (tdmPz) e os íons Cl^-, Br^-, I^-, SCN^-, formando assim os compostos $[PdCl_2(tdmPz)]$ (**1**); $[PdBr_2(tdmPz)]$ (**2**); $[PdI_2(tdmPz)]$ (**3**); $[Pd(SCN)_2(tdmPz)]$ (**4**).

A caracterização dos respectivos complexos foi feita através das técnicas espectroscópicas no infravermelho, que sugeriu a coordenação do ligante de maneira bidentada via átomo de enxofre e nitrogênio piridínico, devido à alterações nos modos vibracionais das ligações em que estes átomos estão presentes. A ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C confirmou a idéia da coordenação do ligante de forma bidentada, mostrando principalmente o deslocamento químico referente ao carbono quaternário do grupo tiocarmaboil para regiões de campo alto nos espectros dos compostos. Também foram usados os experimentos NOESY 1D e HMQC para auxiliar nas atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos das moléculas. A estrutura proposta para os complexos, pressupõe um ambiente quadrado planar em torno do átomo de paládio com seus sítios de coordenação ocupados por dois átomos de cloro (**1**), bromo (**2**), iodo (**3**) ou dois grupos S-tiocianatos terminais (em solução) (**4**) e por uma molécula de 3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol, resultando em complexos isoestruturais de configuração *cis*.

Os dados resultantes da análise termogravimétrica dos compostos **1**-**4** concordaram com as estequiometrias $[PdX_2(tdmPz)]$. Os teores de paládio metálico encontrado em todas as curvas apresentaram boa concordância com os valores calculados. De acordo com as temperaturas iniciais de termodecomposição, a estabilidade térmica varia de acordo com o grupo aniônico, seguindo a ordem **I** < **SCN** ≡ **Br** < **Cl**.

Os resultados dos ensaios biológicos indicam que complexos neutros de paládio(II) com o ligante tdmPz são ativos frente às linhagens testadas. Dentre os complexos, destaca-se o $[Pd(SCN)_2(tdmPz)]$ (**4**), que se mostrou mais citotóxico do que a cisplatina frente a linhagem de adenocarcinoma mamário murino com metástase no pulmão (LMM3) e menos tóxico frente aos macrófagos. Porém como já foi comentado, uma investigação mais minuciosa e profunda da atuação destes compostos no organismo deve ser desenvolvida, para que se possa aprimorar ainda mais a ação antitumoral destes compostos.

Referências

1 ALMEIDA, V. L. de; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásticos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com DNA: uma introdução. **Quím. Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

2 REINO UNIDO. Cancer Research UK. **UK cancer incidence statistics by age**. Disponível em: <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/incidence/age/>. Acesso em: 30 set. 2009.

3 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **O que é o câncer**?. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 30 set. 2009.

4 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Como é o processo de carcinogênese**?. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319>. Acesso em: 30 set. 2009.

5 Estados Unidos da América. American Cancer Society. **Global cancer facts and figures 2007**. Disponível em: <http://www.cancer.org/docroot/STT/stt_0_2007.asp?sitearea=STT&level=1>. Acesso em: 30 set. 2009.

6 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Incidência de câncer no Brasil e estimativa 2008**. Disponível em: <www.inca.gov.br/estimativa/2008>. Acesso em: 30 set. 2009.

7 SUÍÇA. World Health Organization. **Global burden of cancer**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em: 30 set. 2009.

8 ROSEMBERG, B.; VANCAMP, L.; TROSKO, J. E.; MANSOUR, H. V. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature**, v. 222, p. 385-386, 1969.

9 ROSEMBERG, B.; VAN CAMP, L. The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds. **Cancer Res.**, v. 30, p. 1799-1802, 1970.

10 HAMBLEY, T. W. The influence of structure on activity and toxicity of Pt anti-cancer drugs. **Coord. Chem. Rev.**, v. 166, p. 181-223, 1997.

11 WONG, E.; GIANDOMENICO, C. M. Current status of platinum-based antitumor drugs. **Chem. Rev.**, v. 99, p. 2451-2466.

12 FIORENTINO, M. V.; GHIOTTO, C. Exploitation of platinum for human solid tumors. **Inorg. Chim. Acta**, v. 137, p. 59-61, 1987.

13 DE LENA, M.; LORUSSO, V.; PARADISO, A.; TOMMASI, S. Therapeutic efficacy of various dosages and modalities of administration. **Inorg. Chim. Acta**, v. 137, p. 91-97, 1987.

14 CVITKOVIC, E.; SPAULDING, J.; BETHUNE, V.; MARTIN, J.; WHITMORE, W. F. Improvement of cis-dichlorodiammineplatinum (NCS 119875): therapeutic index in an animal model. **Cancer**, v. 39, p. 1357-1361, 1977.

15 FUERTES, M. A.; ALONSO, C.; PÉREZ, J. M. Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. **Chem. Rev.**, v. 103, p. 645-662, 2003.

16 KIDANI, Y.; INAGAKI, K.; IIGO, M.; HOSHI, A.; KURETANI, K. Antitumor activity of 1,2-diaminocyclohexane-platinum complexes against sarcoma-180 ascites form. **J. Med. Chem.**, v. 21, p. 1315-1318, 1978.

17 RAYMOND, E.; FAIVRE, S.; CHANEY, S.; WOYNAROWSKI, J.; CVITKOVIC, E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. **Mol. Cancer Ther.**, v. 1, p. 227-235, 2002.

18 MAIA, E. P.; SUILLEROT A. G. Impaired hydrolysis of cisplatin derivatives to aquated species prevents energy-dependent uptake in GLC4 cells resistant to cisplatin. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 8, p. 626-634, 2003.

19 GREEN, M.; GARNER, M.; ORTON, D. M. Cisplatin—the last five years. **Transition Met. Chem.**, v. 17, p. 164-176, 1992.

20 FONTES, A. P. S.; GAMA, S.; NADER, L. Compostos de platina em quimioterapia do câncer. **Quím. Nova**, v. 20, p. 398-406 1997.

21 JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. **Chem. Rev.**, v. 99, p. 2467-2498, 1999.

Referências

22 BANERJEE, P. Interaction of nitrogen bases with some platinum(II) and palladium(II) complexes—usual and unusual features. **Coord. Chem. Rev.**, v. 190-192, p. 19-28, 1999.

23 REEDIJK, J. Why does cisplatin reach guanine-N7 with competing S-donor ligands available in the cell?. **Chem. Rev.**, v. 99, p. 2499-2510, 1999.

24 CHANEY, S. G.; CAMPBELL, S. L.; TEMPLE, B.; BASSETT, E.; WU, Y.; FALDU, M. Protein interactions with platinum–DNA adducts: from structure to function. **J. Inorg. Biochem.**, v. 98, p. 1551-1559, 2004.

25 TAKAHARA, P. M.; ROSENZWEIG, A. C.; FREDERICK, C. A.; LIPPARD, S. J. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. **Nature**, v. 377, p. 649-652, 1995.

26 JONES, C. J. **A química dos elementos dos blocos *d* e *f***. Porto Alegre: Bookman, 2002. 184 p.

27 IVANOV, A. I.; CHRISTODOULOU, J.; PARKINSON, J. A.; BARNHAM, K. J.; TUCKER, A.; WOODROW, J.; SADLER, P. J. Cisplatin binding sites on human albumin. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 14721-14730, 1998.

28 REBECCA, A. A.; MATTHEW, D. H.; TREVOR, W. H. The discovery and development of cisplatin. **J. Chem. Education**, v. 83, p. 728-734, 2006.

29 RUIZ, J.; CUTILLAS, N.; VICENTE, C.; VILLA, M. D.; LÓPEZ, G. New palladium(II) and platinum(II) complexes with the model nucleobase 1-methylcytosine: antitumor activity and Interactions with DNA. **Inorg. Chem.**, v. 44, p. 7365-7376, 2005.

30 LEE, J. D. **Química inorgânica não tão concisa**. 5. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2000. 527 p.

31 QUIROGA, A. G.; PÉREZ, J. M.; MONTERO, E. I.; MASAGUER, J. R.; ALONSO, C.; NAVARRO-RANNINGER, C. Palladated and platinated complexes derived from phenylacetaldehyde thiosemicarbazone with cytotoxic activity in *cis*-DDP resistant tumor cells. Formation of DNA interstrand cross-links by these complexes. **J. Inorg. Biochem.**, v. 70, p. 117-123, 1998.

Referências

32 ABU-SURRAH, A. S.; AL-SA´DONI, H. H.; ABDALLA, M. Y. Palladium-based chemotherapeutic agents: routes towards complexes with good antitumor activity. **Cancer Ther**., v. 6, p. 1-10, 2008.

33 MATESANS, A. I.; PEREZ, J. M.; NAVARRO, P.; MORENO, J. M.; COLACIO, E.; SOUZA P. J. Synthesis and characterization of novel palladium(II) complexes of bis (thiosemicarbazone). Structure, cytotoxic activity and DNA binding of Pd (II)-benzyl bis(thiosemicarbazonate). **Inorg. Biochem**., v. 76, p. 29-37, 1999.

34 ALVERDI, V.; GIOVAGNINI, L.; MARZANO, C.; SERAGLIA, R.; BETTIO, F.; SITRAN, S.; GRAZIANI, R.; FREGONA, D. Characterization studies and cytotoxicity assays of Pt(II) and Pd(II) dithiocarbamate complexes by means of FT-IR, NMR spectroscopy and mass spectrometry. **J. Inorg. Biochem**., v. 98, p. 1117-1128, 2004.

35 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunological Methods**., v. 65, p. 55-63, 1983.

36 MONTERO, E. I.; DÍAZ, S.; GONZÁLEZ-VADILLO, A. M.; PÉREZ, J. M.; ALONSO, C.; NAVARRO-RANNINGER, C. Preparation and characterization of novel trans-[$PtCl_2$(amine)(isopropylamine)] compounds: cytotoxic activity and apoptosis induction in ras-transformed cells. **J. Med. Chem.**, v. 42, p. 4264-4268, 1999.

37 NATILE, G.; COLUCCIA, M. Current status of trans-platinum compounds in cancer therapy. **Coord. Chem. Rev.**, v. 216/217, p. 383-410, 2001.

38 AL-ALLAF, T. A. K.; RASHAN, L. J. Cis- and trans- platinum and palladium complexes: a comparative study review as antitumour agents. **Bolletino Chim. Farm**., v. 140, p. 205-210, 2001.

39 FARRELL, N.; HA, T. T. B.; SOUCHARD, J. P.; WIMMER, F. L.; CROSS, S.; JOHNSON, N. P. Cytostatic trans-platinum(II) complexes. **J. Med. Chem**., v. 32, p. 2240-2241, 1989.

40 COLLUCIA, M.; NASSI, A.; LOSETO, F.; BOCCARELLI, A.; MARIGGIO, M. A.; GIORDANO, D.; INTINI, F. P.; CAPUTO, P.; NATILE, G. A trans-platinum complex showing higher antitumor activity than the Cis Congeners. **J. Med. Chem**., v. 36, p. 510-512, 1993.

41 AL-ALLAF, T. A. K.; RASHAN, L. J. Synthesis and cytotoxic evaluation of the first trans-palladium(II) complex with naturally occurring alkialoid harmine. **Eur. J. Med. Chem**., v. 33, p. 817-820, 1998.

42 TRÁVNÍCEK, Z.; SZUCOVÁ, L.; POPA, I. Synthesis, characterization and assessment of the cytotoxic properties of cis and trans-[Pd(L)2Cl2] complexes involving 6- benzylamino-9-isopropylpurine derivatives. **J. Inorg. Biochem**., v. 101, p. 477-492, 2007.

43 QUIROGA, A. G.; PEREZ, J. M.; MONTERO, E. I.; WEST, D. X.; ALONSO, C.; NAVARRO-RANNINGER, C. Synthesis and characterization of Pd(II) and Pt(II) complexes of p-isopropylbenzaldehyde N-protected thiosemicarbazones. Cytotoxic activity against ras-transformed cells. **J. Inorg. Biochem**., v. 75, p. 293-301, 1999.

44 KOVALO-DEMERTZI, D.; DOMOPOULOU, A.; DEMERTZI, M. A.; VALLE, G.; PAPAGEORGIU, A. Palladium(II) complexes of 2-acetylpyridine N(4)-methyl, N(4)-ethyl and N(4)-phenyl-thiosemicarbazones. Crystal structure of chloro(2- acetylpyridine N(4)-methylthiosemicarbazonato) palladium(II). Synthesis, spectral studies, *in vitro* and *in vivo* antitumour activity. **J. Inorg. Biochem**., v. 68, p. 147-155, 1997.

45 RUIZ, J.; CUTILLAS, N.; VICENTE, C.; VILLA, M. D.; LÓPEZ, G. New palladium(II) and platinum(II) complexes with the model nucleobase 1-methylcytosine: antitumor activity and interactions with DNA. **Inorg. Chem**., v. 44, p. 7365-7376, 2005.

46 KUDUK-JAWORSKA, J.; PUSZKO, A.; KUBIAK, M.; PEŁCZYNSKA, M. Synthesis, structural, physico-chemical and biological properties of new palladium(II) complexes with 2,6-dimethyl-4-nitropyridine. **J. Inorg. Biochem**., v. 98, p. 1447-1456, 2004.

47 FARAFLIA, G.; FREGONA, D.; SITRAN, S.; GIOVAGNINI, L.; MARZANO, C.; BACCICHETTI, F.; CESELLATO, U.; GRAZIANI, R. Platinum(II) and palladium(II) complexes with dithiocarbamates and amines: synthesis, characterization and cell assay. **J. Inorg. Biochem**., v. 83, p. 31-40, 2001.

48 DORR, R. T. A review of the modulation of cisplatin toxicities by chemoprotectants. In: PINEDO, H. M., SCHORNAGEL, J. H. (Ed.) **Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy.** New York: Plenum Press, 1996. v. 2, p. 131-154.

49 QUIROGA, A. G.; RANNINGER, C. N. Contribution to the SAR field of metallated and coordination complexes studies of the palladium and platinum derivatives with selected thiosemicarbazones as antitumoral drugs. **Coord. Chem. Rev.**, v. 248, p. 119-133, 2004.

50 SHAHEEN, F.; BADSHAH, A.; GIELEN, M.; GIECK, C.; JAMIL, M.; DE VOS, D. Synthesis, characterization, *in vitro* cytotoxicity and anti-inflammatory activity of palladium(II) complexes with tertiary phosphines and heterocyclic thiolates: crystal structure of $[PdC_{28}H_{19}N_8PS_2]$. **J. Organomet. Chem**., v. 693, p. 1117-1126, 2008.

51 HALDER, S.; PENG, S.; LEE, G.; CHATTERJEE, T.; MUKHERJEE, A.; DUTTA, S.; SANYALD, U.; BHATTACHARYA, S. Synthesis, structure, spectroscopic properties and cytotoxic effect of some thiosemicarbazone complexes of palladium. **New J. Chem.**, v. 32, p. 105-114, 2008.

52 ALI, M. A.; MIRZA, A. H.; BUTCHER, R. J.; TARAFDER, M. T. H.; KEAT, T. B.; ALI, A. M. Biological activity of palladium(II) and platinum(II) complexes of the acetone Schiff bases of S-methyl- and S-benzyldithiocarbazate and the X-ray crystal structure of the $[Pd(asme)_2]$ (asme5anionic form of the acetone Schiff base of S-methyldithiocarbazate) complex. **J. Inorg. Biochem**., v. 92, p. 141-148, 2002.

53 SHIER, W. T. **Mammalian Cell Culture on $5 a day**: A Lab Manual of Low Cost Methods. Los Baños: University of the Philippines, 1991. 64 p.

54 GAROUFIS, A.; HADJIKAKOU, S. K.; HADJILIADIS, N. Palladium coordination compounds as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents. **Coord. Chem. Rev.**, v. 253, p. 1384–1397, 2009.

55 ELGUERO, J. Pyrazoles and their benzo derivatives. In: KATRITZKY, A. R.; REES, C. W. (Ed.). **Comprehensive heterocyclic chemistry**: the structure, reactions, synthesis and uses of heterocyclic compounds. Oxford: Pergamon Press, 1984. v. 5. cap. 404, p.167-302.

56 TANITAME, A.; OYAMADA, Y.; OFUJI, K.; FUJIMOTO, M.; SUZUKI, K.; UEDA, T.; TERAUCHI, H.; KAWASAKI, M.; NAGAI, K.; WACHI, M.; YAMAGISHI, J. Synthesis and antibacterial activity of novel and potent DNA gyrase inhibitors with azole ring. **Bioorg. Med. Chem**., v. 12, p. 5515-5524, 2004.

57 TROFIMENKO,S. The coordination chemistry of pyrazole-derived ligands. **Chem. Rev**., v. 72, p. 497-509, 1972.

58 BUDZISZ, E.; KRAJEWSKAB, U.; ROZALSKIB, M.; SZULAWSKAC, A.; CZYZC, M.; NAWROTD, B. Biological evaluation of novel Pt(II) and Pd(II) complexes with pyrazole-containing ligands. **Eur. J. Pharm**., v. 502, p. 59-65, 2004.

59 KOMEDA, S.; LUTZ, M.; SPEK, A. L.; CHIKUMA, M.; REEDIJK, J. New antitumor-active azole-bridged dinuclear platinum(II) complexes: synthesis, characterization, crystal structures, and cytotoxic studies. **Inorg. Chem**., v. 39, p. 4230-4236, 2000.

60 KETER, F. K.; KANYANDA, S.; LYANTAGAYE, S. S. L.; DARKWA, J.; REES, D. J. G.; MEYER, M. *In vitro* evaluation of dichloro-bis(pyrazole)palladium(II) and dichloro-bis(pyrazole)platinum(II) complexes as anticancer agents. **Cancer Chemother. Pharmacol**., v. 63, p. 127-138, 2008.

61 BARIK, A. K.; PAUL, S.; BUTCHER, R. J.; KAR, S. K. Synthesis and characterization of two tris-chelate complexes of cobalt(III) with 3,5-dimethyl-1-(N-methyl/ethyl)thiocarbamyl-pyrazole (HL1, HL2) — biologically important bidentate ligands with one ambidentate donor site. **Polyhedron,** v. 19, p. 2651-2655, 2000.

62 BARIK, A. K.; BANDYOPADHYAYB, P.; KAR, S. K. Copper(II) and nickel(II) complexes of pyrazole derived ligands: synthesis, characterization and coordinating properties of two substituted thiocarbamyl pyrazoles, 3,5-dimethyl-1-N-methyl/ethyl thiocarbamyl pyrazole (HL_1, HL_2), potential ligands for biological interest. X!ray crystallographic studies of $Ni(L^2)_2{}^1$. **Polyhedron**, v. 18, p. 1-6, 1999.

63 EVANS, I. R.; HOWARD, J. A. K.; HOWARD, L. E. M.; EVANS, J. S. O.; JAIMOVIC´, Z. K.; JEVTOVICC, V. S.; LEOVAC, V. M. Transition metal complexes with pyrazole based ligands, part 18: new binuclear Cu(I), Cu(II) and Co(II) complexes with 3,5-dimethyl-1-thiocarboxamide pyrazole: synthesis, structural and magnetic studies. **Inorg. Chim. Acta**, v. 357, p. 4528-4536, 2004.

64 KOVÁCS, A.; NEMCSOK, D.; POKOL, G.; SZÉCSÉNYI, K. M.; LEOVAC, V. M.; JACIMOVIC, Z. K.; EVANS, I. R.; HOWARD, J. A. K.; TOMIC, Z. D.; GIESTER, G. Structural, spectroscopic and computational studies of the HgL_2Cl_2 complex (L = 3,5-dimethyl-1-thiocarboxamide pyrazole) and the crystal structure of L. **New J. Chem**., v. 29, p. 833-840, 2005.

65 KOVÁCS, A.; SZÉCSÉNYI, K. M.; LEOVAC, V. M.; TOMIC, Z. D.; POKOL, G. Synthesis under self-controlled reaction conditions: reaction of tetraamminezinc(II) chloride with 3,5-dimethyl-1-thiocarboxamide pyrazole. **J. Organomet. Chem**., v. 692, p. 2582-2592, 2007.

66 BUDAKOTI, A.; ABID, M.; AZAM, A. Synthesis and antiamoebic activity of new 1-N-substituted thiocarbamoyl-3,5-diphenyl-2-pyrazoline derivatives and their Pd(II) complexes. **Eur. J. Med. Chem**., v. 42, p. 63-70, 2006.

67 BUDAKOTI, A.; ABID, M.; AZAM, A. Syntheses, characterization and *in vitro* antiamoebic activity of new Pd(II) complexes with 1-N-substituted thiocarbamoyl- 3,5-diphenyl-2-pyrazoline derivatives. **Eur. J. Med. Chem**., v. 42, p. 544-551, 2007.

68 HUSAIN, K.; ABID, M.; AZAM, A. Novel Pd(II) complexes of 1-N-substituted 3-phenyl-2-pyrazoline derivatives and evaluation of antiamoebic activity. **Eur. J. Med. Chem**., v. 43, p. 393-403, 2008.

69 CASAS, J. S.; CASTELLANO, E. E.; ELLENA, J.; GARCÍA-TASENDE, M. S.; PÉREZ-PARALLÉ, M. L.; SÁNCHEZ, A.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, A.; SORDO, J.; TOUCEDA, A. New Pd(II) and Pt(II) complexes with N,S-chelated pyrazolonate ligands: molecular and supramolecular structure and preliminary study of their in vitro antitumoral activity. **J. Inorg. Biochem**., v. 102, p. 33-45, 2008.

70 INTERNATIONAL CENTER FOR DIFFRACTION DATA. **Powder diffraction file**: release 1999. Newtown Square, 1999. 1 CD-ROM. PDF n. 46-1043.

71 NEMCSOK, D.; KOVÁCS, A.; SZÉCSÉNYI, K. M.; LEOVAC, V. M. Vibrational spectroscopic and theoretical study of 3,5-dimethyl-1-thiocarboxamide pyrazole (L) and the complexes $Co_2L_2Cl_4$, $Cu_2L_2Cl_4$ and $Cu_2L_2Br_2$. **Chem. Phys**., v. 328, p. 85-92, 2006.

72 PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. **J. Amer. Chem. Soc**., v. 85, p. 3533-3539, 1963.

73 PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases, HSAB, Part II. **J. Chem. Educ.**, v. 45, p. 643-648, 1968.

74 BAILEY, R. A.; KOZAK, S. L.; MICHELSEN, T. W.; MILLS, W. N. Infrared spectra of complexes of the thiocyanate and related ions. **Coord. Chem. Rev**., v. 6, p. 407-445, 1971.

75 NAKAMOTO, K. **Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds**. 5th ed. New York: John Wiley, 1997. 2v.

76 PALENIK, G. J.; CLARK, G. R. Crystal and molecular structure of isothiocyanatothiocyanato-(1- diphenylphosphino-3-dimethylaminopropane)palladium(II). **Inorg. Chem**., v. 9, p. 2754-2760, 1970.

Referências

77 BURMEISTER, J. L.; HASSEL, R. L.; PHELAN R. J. Solvent-induced linkage isomerizations. **Inorg. Chem**., v. 10, p. 2032-2038, 1971.

78 SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 6. ed. Rio de Janeiro: LCT, 2000.