



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA – Araraquara**



Tese de Doutorado

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL DE COMPLEXOS DE PALÁDIO(II) COM
LIGANTES SULFURADOS E TRIFENILFOSFINA**

Fillipe Vieira Rocha

Araraquara
2013

FILLIPE VIEIRA ROCHA

Síntese, caracterização e estudo da atividade antitumoral de complexos de paládio(II) com ligantes sulfurados e trifenilfosfina

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

Orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto
Coorientador: Prof. Dr. Antonio Eduardo Mauro

Araraquara
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

R672s Rocha, Fillipe Vieira
Síntese, caracterização e estudo da atividade antitumoral de complexos de paládio(II) com ligantes sulfurados e trifenilfosfina / Fillipe Vieira Rocha. – Araraquara : [s.n], 2013
145 f. : il.

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

1. Química inorgânica. 2. Atividade antitumoral.
3. Paládio(II). 4. Inibição de enzimas. 5. Espectroscopia.
I. Título.

FILLIPE VIEIRA ROCHA

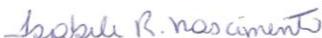
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Araraquara, 06 de dezembro de 2013.

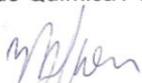
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. ADELINO VIEIRA DE GODOY NETTO
Instituto de Química / UNESP / Araraquara.



Profª. Drª. ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO
Instituto de Química / UNESP / Araraquara.



Prof. Dr. VICTOR MARCELO DEFLON
Instituto de Química / USP / São Carlos.



Profª. Drª. ANA MARIA DA COSTA FERREIRA
Instituto de Química / USP / São Paulo.



Prof. Dr. ADRIANO BOF DE OLIVEIRA
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia / UFS / São Cristovão.

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Fillipe Vieira Rocha

Data de Nascimento: 07 de novembro de 1985

Naturalidade: Juiz de Fora – MG

Nacionalidade: Brasileira

Filiação:

Pai – Luiz Carlos Rocha

Mãe – Suely Vieira Baio Rocha

Endereço para Correspondência:

Av. Alberto Toloi, 185/43 – Bloco 5

Bairro: Quitandinha – CEP: 14800-105

Araraquara - SP

e-mail: passaras47@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2008-2010 Mestrado em Química

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

Projeto: Estudo da atividade biológica de compostos de paládio(II).

Orientador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto

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

2004-2007 Bacharelado e Licenciatura em Química

Universidade Federal de Juiz de Fora

Projeto: Síntese e caracterização de complexos de platina(II) e paládio(II) com ligantes derivados da 6-mercaptopurina.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Soares Fontes

PUBLICAÇÕES

01. BARRA, C. V.; ROCHA, F. V.; GAUTIER, A.; MOREL, L.; QUILLES, M. B.; CARLOS, I.Z.; TREU-FILHO, O.; FREM, R. C. G.; MAURO, A. E.; NETTO, A. V. G. Synthesis, cytotoxic activity and DNA interaction of Pd(II) complexes bearing N'-methyl-3,5-dimethyl-1-thiocarbamoylpyrazole. **Polyhedron**, v. 65, p. 214-220, 2013.
02. ROCHA, F. V.; BARRA, C. V.; MAURO, A. E.; CARLOS, I.Z.; NAUTON, L.; EL GHOZZI, M.; GAUTIER, A.; MOREL, L.; NETTO, A. V. G. Synthesis, characterization, X-ray structure, DNA cleavage and cytotoxic activities of palladium(II) complexes of 4-phenyl-3-thiosemicarbazide and triphenylphosphine. **Eur. J. Inorg. Chem.**, v. 2013, p. 4499-4505, 2013.

-
03. BARRA, C. V.; ROCHA, F. V.; NETTO, A. V. G.; SHIMURA, B.; 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 and thermal studies and antitumor evaluation. Part I. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 106, p. 483-488, 2011.
 04. BARRA, C. V.; ROCHA, F. V.; NETTO, A. V. G.; SHIMURA, B.; 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 and thermal studies and antitumor evaluation. Part II. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 106, p. 489-494, 2011.
 05. ROCHA, F. V.; BARRA, C. V.; FRANCHI, S. J. S.; NETTO, A. V. G.; MAURO, A. E.; FREM R. C. G. Study on the thermal behavior of the complexes of the type $[PdX_2(tdmPz)]$ ($X = Cl^-, Br^-, I^-, SCN^-$). **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 106, p. 385-389, 2011.
 06. 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. **Eur. J. Med. Chem.**, v.45, p. 1698-1702, 2010.
 07. 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. **Chem. Biol. Drug Des.**, v. 75, p. 407-411, 2010.
 08. 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. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, p. 1961-1967, 2010.
 09. 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.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

01. BARRA, C. V.; ROCHA, F. V.; MAURO, A. E.; GARRIDO, S. S.; CARLOS, I. Z.; ELLENA, J. A.; GAUTIER, A.; MOREL, L.; NETTO, A.V.G. "Structure, cytotoxicity, DNA interaction and Topoisomerase II inhibition of Pd(II) complexes bearing N,S-donor ligand and triphenylphosphine". **9th International Congress on Pharmaceutical Sciences – CIFARP 2013**, Ribeirão Preto-SP, 20 a 23 de novembro de 2013.
02. BARRA, C. V. ; ROCHA, F.V. ; MAURO, A.E. ; FREM, R.C.G. ; MOREL, L. ; GAUTIER, A. ; NETTO, A.V.G. "DNA binding and citotoxicity of Pd(II) complexes bearing 1,10-phenanthroline and thioureas ligands". **International Conference on Bioinorganic Chemistry - ICBIC16**, Grenoble – França, 22 a 26 de julho de 2013.

-
03. ROCHA, F.V. ; BARRA, C. V. ; MAURO, A. E. ; GARRIDO, S. S. ; CARLOS, I.Z. ; NAUTON, L. ; GHOZZI, M. E. ; GAUTIER, A. ; MOREL, L. ; NETTO, A.V.G. "Palladium(II) complexes with N,S-donor ligand: Synthesis, cytotoxicity, DNA interaction and topoisomerase II inhibition". **International Conference on Bioinorganic Chemistry - ICBI16**, Grenoble – França, 22 a 26 de julho de 2013.
 04. ROCHA, F.V. ; BARRA, C. V. ; NETTO, A.V.G. ; MAURO, A.E. ; FREM, R.C.G. ; GAUTIER, A.; MOREL, L. "Síntese, caracterização e estudo de interação com o DNA de complexos catiônicos de paládio(II)". **36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia-SP, 25 a 28 de maio de 2013.
 05. BARRA, C. V. ; LEMOS, S. C. ; ROCHA, F. V. ; NOVAKOVA, O. ; ZERZANKOVA, L. ; LISKOVA, B. ; BRABEC, V. ; NETTO, A. V. G. ; MAURO, A.E. ; FREM, R.C.G. "Structure, cytotoxic activity and DNA binding of Pd(II) complexes bearing N-methyl-1-thiocarbamoyl-3,5-dimethylpyrazole". **International Symposium on Metal Complexes 2012**, Lisboa – Portugal, 18 a 22 de junho de 2012.
 06. ROCHA, F. V. ; BARRA, C. V. ; NETTO, A. V. G. ; MAURO, A. E. ; FREM, R. C. G. "Síntese e caracterização de novos complexos de paládio(II) do tipo [PdX(PPh₂)(TAAA)] (TAA= tioacetamida; X = Cl⁻, Br⁻, I⁻)". **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Florianópolis-SC, 23 a 26 de maio de 2011.
 07. BARRA, C. V. ; ROCHA, F. V. ; NETTO, A. V. G. ; MAURO, A. E. ; FREM, R. C. G. ; QUILLES, M. B. ; CARLOS, I. Z. "Síntese, caracterização e atividade antitumoral de complexos de paládio(II) contendo o ligante 3,5-dimetil-1-metiltiocarbamolpirazol". **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Florianópolis-SC, 23 a 26 de maio de 2011.
 08. BARRA, C. V. ; ROCHA, F. V. ; NETTO, A. V. G. ; MAURO, A. E. ; FREM, R. C. G. ; QUILLES, M. B. ; CARLOS, I. Z. "Complexos pirazólicos de paládio(II): síntese, caracterização e estudo da atividade antitumoral". **33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia-SP, de 28 a 31 de maio de 2010.
 09. BARRA, C. V. ; ROCHA, F. V. ; NETTO, A.V.G. ; MAURO, A.E. ; FREM, R.C.G. ; QUILLES, M.B. ; CARLOS, I. Z. "Investigação do comportamento térmico e atividade biológica de complexos pirazólicos de Pd(II)". **VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria**, São Pedro-SP, 25 a 28 de abril de 2010.
 10. BARRA, C. V. ; ROCHA, F. V. ; NETTO, A. V. G. ; MAURO, A. E. ; FREM, R. C. G. ; QUILLES, M. B. ; CARLOS, I. Z. "Complexos de Pd(II) contendo o ligante 4-metilpirazol: Síntese, estudo do comportamento térmico e atividade biológica". **VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria**, São Pedro-SP, 25 a 28 de abril de 2010.
 11. ROCHA, F. V. ; BARRA, C. V. ; Franchi, S. J. S. ; NETTO, A. V. G. ; MAURO, A. E. ; FREM, R. C. G. "Estudo do comportamento térmico de complexos de paládio(II) do tipo [PdX₂(tdmPz)] (X = Cl⁻, Br⁻, I⁻, SCN⁻)". **VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria**, São Pedro-SP, 25 a 28 de abril de 2010.

-
12. BARRA, C. V.; ROCHA, F. 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". **17º Encontro da SBQ – Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti**, Araraquara-SP, de 18 a 20 de outubro de 2009.
 13. BARRA, C. V.; ROCHA, F. 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". **17º Encontro da SBQ – Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti**, Araraquara-SP, de 18 a 20 de outubro de 2009.
 14. SILVA, H.; BARRA, C. V.; ROCHA, F. V.; 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". **I Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry**, Foz do Iguazu-PR, 31 de agosto a 4 de setembro de 2008.
 15. 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". **I Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry**, Foz do Iguazu-PR, 31 de agosto a 4 de setembro de 2008.
 16. BARRA, C. V.; SHIMURA, B.; ROCHA, F. V.; 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". **I Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry**, Foz do Iguazu-PR, 31 de agosto a 4 de setembro de 2008.
 17. BARRA, C. V.; ROCHA, F. V.; SILVA, H.; FONTES, A. P. S. "Novos complexos de platina(II) contendo ligantes N-alkilados de cadeia longa derivados da etilenodiamina e oxalato". **XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia-SP, 26 a 29 de maio de 2008.
 18. BARRA, C. V.; SILVA, H.; ROCHA, F. V.; 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". **XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia-SP, 31 de maio a 3 de junho de 2007.
 19. BARRA, C. V.; ROCHA, F. V.; SILVA, H.; FONTES, A. P. S. "Síntese e caracterização de complexos de platina (II) com ligantes diaminados e carboxilatos". **XIII Seminário de Iniciação Científica da UFJF**, Juiz de Fora-MG, 3 a 5 de outubro de 2007.
 20. SILVA, H.; BARRA, C. V.; ROCHA, F. V.; 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". **XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia-SP, 19 a 22 de maio de 2006.

ESTÁGIOS

Estágio de doutorado no exterior realizado no Laboratório SEESIB (Synthèse et Étude de Systèmes à Intérêt Biologique), no “Institut de Chimie de Clermont-Ferrand”, em Clermont-Ferrand (França) sob supervisão do Dr. Arnaud Gautier no período de 01/03/2012 a 31/07/2012.

Estágio-docência realizado junto à disciplina Fundamentos de Química, oferecida aos alunos do 1º ano do curso de Farmácia e Bioquímica da UNESP de Araraquara, período noturno, durante o 1º semestre do ano letivo de 2011 e ministrada pelo professor Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto. A carga horária do estágio foi de 4 horas semanais.

Estágio-docência realizado junto à disciplina Química Fundamental, oferecida aos alunos do 1º ano do curso de Bacharelado em Química da UNESP de Araraquara, período diurno, durante o 1º semestre do ano letivo de 2009 e ministrada pela professora Dra. Vânia Martins Nogueira. A carga horária do estágio foi de 6 horas semanais.

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

ORIENTAÇÕES

Iniciação científica. Thales Reggiani de Moura. Complexos de paládio(II) contendo tiocarbamoilpirazóis: síntese, caracterização e investigação da atividade biológica. 2013. Bolsa Fapesp.

BOLSAS

Bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) concedida pela Capes de março a julho de 2012.

Bolsa de Doutorado (DR) concedida pela CAPES de março de 2010 a fevereiro de 2014.

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

Bolsa de Iniciação Científica (IC) concedida pela UFJF de agosto de 2005 a julho de 2007.

Agradeço...

Ao Prof. Dr. Adelino, pela orientação, boa vontade, bom humor, dedicação, disponibilidade, otimismo e amizade. Muito obrigado pelo incentivo e ensinamentos.

Ao Dr. Arnaud Gautier, pela orientação, dicas, conselhos e por abrir completamente as portas de seu laboratório durante meu doutorado sanduiche na Université Blaise Pascal em Clermont-Ferrand, França. Seus ensinamentos foram de grande ajuda na construção deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mauro pela coorientação, conselhos, conversas acadêmicas e futebolísticas, amizade e idas ao estádio.

Ao Prof. Dr. Saulo por disponibilizar seu laboratório e confiar em meu trabalho, pela grande ajuda na realização dos ensaio de inibição das DNA-Topoisomerases e pelas sugestões no meu exame de qualificação.

À Profa. Dra. Regina, pelas sugestões no meu exame de qualificação.

Ao Dr. Nivaldo, pela obtenção e dicas com os espectros de RMN.

Ao Dr. Oswaldo Treu-Filho pelos cálculos computacionais e pelo convívio no Departamento.

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

Ao Professor Dr. Flávio Henrique da Silva do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos por disponibilizar o seu laboratório para a realização dos ensaios de inibição da catebisina B.

Ao Rafael, pelos espectros de IV e por sua boa vontade em ajudar em todos os aspectos no laboratório.

Aos funcionários da pós-graduação e da biblioteca pela prestatividade e atenção.

Aos meus colegas do Instituto de Química, Cris, Gislaine, Katinha, Rodrigo, Silmar, Patrícia, Saha, Thales, Jader, Antônio, Daniel, Igor e em especial, Elaine e Marcelo pelas muitas conversas e distrações na sala dos alunos.

Aos amigos, Thaisa e Laudemir pela companhia e por fazer a distância de casa ficar menor.

Aos meus pais (Suely e Luiz) e meus irmãos (Léo e Rapha), pelo apoio incondicional constante em todos os momentos da minha vida, sempre acreditando e incentivando minhas decisões.

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, Fábio, Ge, Fred, Luis, Mico e Marcelo, pela companhia e pelo divertimento imensurável que vocês me proporcionam.

Aos amigos feitos na França, Carlos, Pierre, Pierre Joly, Muriel, Nadia, Nicolas, Cedric, Polo, Federico, Francis e em especial a Virginie e Clementine, vocês fizeram minha estadia na França maravilhosa, queria ter ficado um pouco mais, muito obrigado! Saudades de todos.

Ao Zizu, meu amigo canino e companheiro de escrita, com certeza suas lambidas e abanos de rabo ajudaram a aliviar a tensão destes dias.

E por último e mais importante, à minha esposa Carol pelo apoio descomunal, amizade, amor, companheirismo e dedicação. Muito obrigado, sem você ao meu lado nada tem sentido. Te amo demais.

À Capes pela bolsa concedida.

*“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho
mais certo de vencer é tentar mais uma vez.”*

(Thomas Edson)

*“Você precisa fazer aquilo que pensa
que não é capaz de fazer.”*

(Eleanor Roosevelt)

RESUMO

Nos últimos anos o interesse na obtenção de novos fármacos a base de metais vem aumentando consideravelmente. Desde a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina na década de 60 inúmeros complexos de Pt(II) foram sintetizados, mas poucos chegaram aos testes clínicos. Por este motivo, o íon Pd(II) vem sendo usado sistematicamente no planejamento de novos compostos biologicamente ativos, pois apresenta a configuração eletrônica d^8 e a mesma geometria quadrado planar dos compostos de platina, além de exibir outros modos de ação frente aos seus alvos biológicos.

Neste trabalho foram sintetizados e caracterizados novos complexos de paládio(II) do tipo $[PdX_2(TAA)(PPh_3)]$ e $[PdX(L)(PPh_3)]X$ [$X = Cl^-$, Br^- , I^- , SCN^- ; TAA = tioacetamida; L = 4-metil-3-tiossemicarbazida (4-MeT) ou 4-fenil-3-tiossemicarbazida (4-PhT)]. Os complexos foram caracterizados pelas técnicas de IV, RMN, análise elementar e análise termogravimétrica.

As estruturas moleculares dos complexos $[PdI(4-MeT)(PPh_3)]I$ (**3**), $[Pd(SCN)(4-MeT)(PPh_3)](SCN)$ (**4**) e $[PdI(4-PhT)(PPh_3)]I$ (**7**) foram determinadas via difração de raios X de monocristal, indicando um ambiente quadrático plano ao redor do metal, com seus sítios de coordenação ocupados pela trifenilfosfina, pela tiossemicarbazida coordenada de maneira bidentada e o I ou SCN.

A citotoxicidade *in vitro* de todos os complexos foi avaliada pelo método do MTT, frente as culturas celulares de tumores murinos LM3 (adenocarcinoma mamário) e LP07 (adenocarcinoma pulmonar). Os compostos mais promissores tiveram sua capacidade de interação com o DNA investigada. Os resultados demonstraram que o DNA não é o alvo principal, uma vez que os complexos só interagiram com a biomolécula em altas concentrações. Diante disto, outros possíveis alvos foram investigados.

A capacidade dos complexos em inibir as enzimas topoisomerases foi avaliada pela técnica de eletroforese em gel de agarose e os dados mostraram que quase todos os compostos inibem a topoisomerase II entre 5-25 μM . Além disso, os compostos **3** e **7**, os mais promissores, tiveram sua capacidade inibitória frente a enzima catepsina B avaliada, apresentando valores de $IC_{50} = 5,83$ e $8,81 \mu M$, respectivamente. Estes resultados mostraram a potencialidade deste sistema na obtenção de compostos inibidores das enzimas topo II e catepsina B com atividade antitumoral.

Palavras-chave: Complexos de paládio(II), atividade antitumoral, interação com DNA, inibição das DNA-topoisomerases.

ABSTRACT

In the last years the interest in obtaining new metal drugs has increased considerably. Since the discovery of the antitumor activity of cisplatin in the 60's, many Pt(II) complexes were synthesized, but only few reached the clinical trials. For this reason, the Pd(II) ion has been used systematically in the design of new biologically active compounds. Palladium complexes display the same electron configuration and square planar geometry of platinum compounds, furthermore these complexes can interact through different way towards pharmacological targets.

In this work new palladium(II) complexes of the type $[\text{PdX}_2(\text{TA})(\text{PPh}_3)]$ and $[\text{PdX}(\text{L})(\text{PPh}_3)]\text{X}$ [$\text{X} = \text{Cl}^-$, Br^- , I^- , SCN^- ; TAA = thioacetamide, L = 4-methyl-3-thiosemicarbazide (4-MeT) or 4-phenyl-3-thiosemicarbazide (4-PhT)], were synthesized and characterized. All the compounds were characterized by infrared, nuclear magnetic resonance spectroscopy, elemental analysis and thermogravimetric analysis.

The structures of three complexes $[(\text{PdI}(4\text{-MeT})(\text{PPh}_3))\text{I}]$, $[\text{Pd}(\text{SCN})(4\text{-MeT})(\text{PPh}_3)](\text{SCN})$ and $[(\text{PdI}(4\text{-PhT})(\text{PPh}_3))\text{I}]$ were determined by single crystal X-ray diffraction and was observed a square planar environment around the metal center, with the coordination sites occupied by triphenylphosphine, the N,S-donors ligand and iodine atom or thiocyanate group.

The *in vitro* cytotoxicity of the complexes were evaluated against the murine tumor cells LM3 (breast adenocarcinoma) and LP07 (lung adenocarcinoma). The most promising compounds were further evaluated by their ability to interact with a purine base and the DNA. The results showed that DNA is not the primary target of these compounds because they only interacted with this biomolecule at high concentrations. Thus, others potential targets were investigated.

The capacity of the complexes to inhibit topoisomerase enzymes was evaluated by electrophoresis, and the data showed that almost all the compounds inhibit this enzyme at a concentration range of 5-25 μM . Moreover, the compounds $[(\text{PdI}(4\text{-MeT})(\text{PPh}_3))\text{I}]$ and $[(\text{PdI}(4\text{-PhT})(\text{PPh}_3))\text{I}]$, had their inhibitory ability to inhibit cathepsin B investigated, with a IC_{50} value of 5.83 and 8.81 μM , respectively. These system showed high potentiality in obtaining topo II and cathepsin B inhibitors with antitumor activity.

Keywords: palladium(II) complexes, antitumor activity, DNA interactio, DNA-topoisomerases inhibition.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1</i> - Tipos de interações entre pequenas moléculas e o DNA.....	24
<i>Figura 2</i> - Modos de interação covalente entre a cisplatina e o DNA.....	25
<i>Figura 3</i> - Mecanismo associativo de substituição de ligantes em complexos d^8	27
<i>Figura 4</i> - Esquema representativo da ligação entre metais e ligantes fosfínicos terciários.....	28
<i>Figura 5</i> - Estruturas dos complexos de Pt(II) e Pd(II) contendo timina ou timidina e trifenilfosfina.....	28
<i>Figura 6</i> - Estrutura molecular dos complexos $[Pd(Dmtu)_2(PPh_3)_2]Cl_2 \cdot (CH_3OH)_{0.5} \cdot H_2O$ e $[Pd(Mpy)_2(PPh_3)_2]$	30
<i>Figura 7</i> - Estrutura dos complexos e esquema de reação de formação dos adutos bifuncionais.....	32
<i>Figura 8</i> - Ciclo catalítico da topoisomerase II. Domínios da ATPase estão mostrados em azul claro, o domínio nuclear está representado por azul escuro.....	33
<i>Figura 9</i> - Formas estruturais: (A) doxorrubicina; (B) etopósido; (C) mitoxantrona.....	34
<i>Figura 10</i> - Rotas da formação do complexo DNA – topo – droga.....	35
<i>Figura 11</i> - Estruturas químicas: (A) aclarrubicina; (B) ICRF – 187.....	35
<i>Figura 12</i> - Estrutura proposta para o composto TSC24.....	36
<i>Figura 13</i> - Ensaio de inibição da topo-II (A) e da topo-I (B) para o compostos TSC24.....	37
<i>Figura 14</i> - Docagem molecular entre a molécula do TSC24 e o domínio da ATPase.....	37
<i>Figura 15</i> - Estrutura dos ligantes tiossemicarbazonas e seus complexos de zinco.....	38
<i>Figura 16</i> - Fórmula estrutural das tiossemicarbazonas sintetizadas.....	40
<i>Figura 17</i> - Estruturas dos complexos $[Pd(aptsc)(PPh_3)](NO_3) \cdot H_2O$ (A); $[Pd(apmtsc)(PPh_3)](NO_3)$ (B); $[Pd(apptsc)(PPh_3)](NO_3) \cdot H_2O$ (C).....	41
<i>Figura 18</i> - Estruturas dos ligantes PPh_3 , TAA, 4-MeT e 4-PhT.....	42
<i>Figura 19</i> - Estruturas do MTT e formazana envolvidas no processo de quantificação da viabilidade celular.....	53
<i>Figura 20</i> - Competição dos elétrons do íon de Pd(II).....	57
<i>Figura 21</i> - Espectro vibracional da trifenilfosfina na região do infravermelho.....	58

<i>Figura 22</i> - Espectros vibracionais na região de 4000-400 cm ⁻¹ do IV para o ligante e os compostos 1-4	61
<i>Figura 23</i> - Espectros vibracionais na região de 4000-400 cm ⁻¹ do IV para o ligante e os compostos 5-8	64
<i>Figura 24</i> - Esquema de numeração para os espectros de ressonância magnética nuclear de ¹ H.....	65
<i>Figura 25</i> - Espectro de RMN de ¹ H do ligante 4-MeT em dms _o -d ₆	66
<i>Figura 26</i> - Espectro de RMN de ¹ H do complexo [PdCl(PPh ₃)(4-MeT)]Cl em dms _o -d ₆	67
<i>Figura 27</i> - Espectro de RMN de ¹ H do complexo [PdBr(PPh ₃)(4-MeT)]Br em dms _o -d ₆ ...	68
<i>Figura 28</i> - Espectro de RMN de ¹ H do complexo [PdI(PPh ₃)(4-MeT)]I em dms _o -d ₆	68
<i>Figura 29</i> - Espectro de RMN de ¹ H do complexo [Pd(SCN)(PPh ₃)(4-MeT)](SCN) em dms _o -d ₆	69
<i>Figura 30</i> - Efeito anisotrópico causado pelos elétrons da ligação C=NH.....	70
<i>Figura 31</i> - Esquema de numeração para os espectros de ressonância magnética nuclear de ¹ H.....	70
<i>Figura 32</i> - Espectro de RMN ¹ H do ligante 4-fenil-3-tiossemicarbazida em dms _o -d ₆	71
<i>Figura 33</i> - Espectro de RMN ¹ H do complexo [PdCl(PPh ₃)(4-PhT)]Cl em dms _o -d ₆	72
<i>Figura 34</i> - Espectro de RMN ¹ H do complexo [PdBr(PPh ₃)(4-PhT)]Br em dms _o -d ₆	72
<i>Figura 35</i> - Espectro de RMN ¹ H do complexo [PdI(PPh ₃)(4-PhT)]I em dms _o -d ₆	73
<i>Figura 36</i> - Espectro de RMN ¹ H do complexo [Pd(SCN)(PPh ₃)(4-PhT)](SCN) em dms _o -d ₆	73
<i>Figura 37</i> - Curvas TG e DTA do [PdCl(PPh ₃)(4-MeT)]Cl.H ₂ O (1) (m = 10 mg).....	75
<i>Figura 38</i> - Curvas TG e DTA do [PdBr(PPh ₃)(4-MeT)]Br.1,5H ₂ O (2) (m = 10 mg).....	76
<i>Figura 39</i> - Curvas TG e DTA do [PdI(PPh ₃)(4-MeT)]I (3) (m = 10 mg).....	77
<i>Figura 40</i> - Curvas TG e DTA do [Pd(SCN)(PPh ₃)(4-MeT)](SCN).H ₂ O (4) (m = 10 mg).....	78
<i>Figura 41</i> - Curvas TG e DTA do [PdCl(PPh ₃)(4-PhT)]Cl.H ₂ O (5) (m = 10 mg).....	79
<i>Figura 42</i> - Curvas TG e DTA do [PdBr(PPh ₃)(4-PhT)]Br.1/2H ₂ O (6) (m = 10 mg).....	80
<i>Figura 43</i> - Curvas TG e DTA do [PdI(PPh ₃)(4-PhT)]I.1/2H ₂ O (7) (m = 10 mg).....	81
<i>Figura 44</i> - Curvas TG e DTA do [PdSCN(PPh ₃)(4-PhT)]SCN.H ₂ O (8) (m = 10 mg).....	82
<i>Figura 45</i> - Estrutura do complexo [PdI(PPh ₃)(4-MeT)]I (3).....	85
<i>Figura 46</i> - Estrutura do complexo [Pd(SCN)(PPh ₃)(4-MeT)]SCN.CHCl ₃ (4).....	86

<i>Figura 47</i> - Estrutura do complexo [PdI(PPh ₃)(4-PhT)]I.C ₄ H ₁₀ O (7).....	87
<i>Figura 48</i> - Espectros vibracionais na região de 4000-400 cm ⁻¹ do IV para o ligante e os compostos 9-11	89
<i>Figura 49</i> - Espectro de RMN de ¹ H do ligante tioacetamida em dms _o -d ₆	91
<i>Figura 50</i> - Espectro de RMN de ¹ H do complexo [PdCl ₂ (PPh ₃)(TAA) em CDCl ₃	92
<i>Figura 51</i> - Espectro de RMN de ¹ H do complexo [PdBr ₂ (PPh ₃)(TAA) em CDCl ₃	92
<i>Figura 52</i> - Espectro de RMN de ¹ H do complexo [PdI ₂ (PPh ₃)(TAA) em dms _o -d ₆	93
<i>Figura 53</i> - Espectro de RMN de ¹³ C do TAA em dms _o -d ₆	94
<i>Figura 54</i> - Espectro de RMN de ¹³ C do complexo [PdCl ₂ (PPh ₃)(TAA) em CDCl ₃	94
<i>Figura 55</i> - Espectro de RMN de ³¹ P da trifenilfosfina em CDCl ₃	95
<i>Figura 56</i> - Espectro de RMN de ³¹ P do complexo 9 em CDCl ₃	96
<i>Figura 57</i> - Espectro de RMN de ³¹ P do complexo 10 em CDCl ₃	96
<i>Figura 58</i> - Curva TG para o complexo [PdCl ₂ (PPh ₃)(TAA) .H ₂ O (m = 10 mg).....	98
<i>Figura 59</i> - Curva TG para o complexo [PdBr ₂ (PPh ₃)(TAA) (m = 10 mg).....	99
<i>Figura 60</i> - Curva TG para o complexo [PdI ₂ (PPh ₃)(TAA) (m = 10 mg).....	100
<i>Figura 61</i> - Difratoograma de raios-x, pelo método do pó, para a termod decomposição do complexo [PdCl ₂ (PPh ₃)(TAA)].....	101
<i>Figura 62</i> - Proposta estrutural para os complexos de 9-11	101
<i>Figura 63</i> - Estrutura otimizada do complexo [PdCl ₂ (PPh ₃)(TAA)] (9).....	102
<i>Figura 64</i> - Gráfico de IC ₅₀ dos complexos de 1-8 e da cisplatina frente à linhagem LM3, o desvio padrão foi omitido em todos os casos.....	105
<i>Figura 65</i> - Estrutura e valores de IC ₅₀ de complexos de Pt(II) e Pd(II) com ligantes N4 substituídos.....	106
<i>Figura 66</i> - Gráfico de IC ₅₀ dos complexos de 1-8 e da cisplatina frente à linhagem LP07, o desvio padrão foi omitido em todos os casos.....	107
<i>Figura 67</i> - Estrutura da guanosina.....	109
<i>Figura 68</i> - Espectro de RNM de ¹ H da guanosina em MeOD-d ₄	109
<i>Figura 69</i> - Espectro de RNM de ¹ H da reação de 1 com a guanosina em MeOD-d ₄	110
<i>Figura 70</i> - Espectro de RNM de ¹ H representativo dos complexos de 1-4 após a reação com a guanosina em MeOD-d ₄	112

<i>Figura 71</i> - Espectro de RNM de ^1H representativo dos complexos de 5-8 após a reação com a guanosina.....	112
<i>Figura 72</i> - Espectro de massas representativo dos complexos de 1-4 após a reação com a guanosina.....	113
<i>Figura 73</i> - Espectro de massas MS/MS sobre o pico $m/z = 755$, representativo para complexos de 1-4 após a reação com a guanosina.....	114
<i>Figura 74</i> - Expansão e simulação do pico $m/z = 755$ dos complexos de 1-4 após a reação com a guanosina.....	114
<i>Figura 75</i> - Espectro de massas representativo dos complexos de 5-8 após a reação com a guanosina.....	115
<i>Figura 76</i> - Expansão e simulação do pico $m/z = 817$ dos complexos de 5-8 após a reação com a guanosina.....	116
<i>Figura 77</i> - Incubação do plasmídeo com os complexos 1-4 e cisplatina por 24 h. Linha 1: plasmídeo em água. Linha 2: plasmídeo em água/dmf (2.5%). Linha 3: cisplatina (20 μM). Linha 4: 1 (10 μM). Linha 5: 1 (100 μM). Linha 6: 2 (10 μM). Linha 7: 2 (100 μM). Linha 8: 3 (10 μM). Line 9: 3 (100 μM)/ Linha 10: 4 (10 μM). Linha 11: 4 (100 μM).....	118
<i>Figura 78</i> - Incubação do plasmídeo com os complexos 5-8 e cisplatina por 24 h. Linha 1: plasmídeo em água. Linha 2: plasmídeo em água/dmf (2.5%). Linha 3: cisplatina (20 μM). Linha 4: 5 (10 μM). Linha 5: 5 (100 μM). Linha 6: 6 (10 μM). Linha 7: 6 (100 μM). Linha 8: 7 (10 μM). Line 9: 7 (100 μM). Linha 10: 8 (10 μM). Linha 11: 8 (100 μM).....	119
<i>Figura 79</i> - Incubação do plasmídeo com o complexo 7 pré-tratado com AgNO_3 e cisplatina por 24 h. Linha 1: plasmídeo em água. Linha 2: plasmídeo em água/dmf (2.5%). Linha 3: cisplatina (20 μM). Linha 4: 7 pré-tratado com AgNO_3 (10 μM). Linha 5: 7 pré-tratado com AgNO_3 (100 μM).....	120
<i>Figura 80</i> - Incubação do plasmídeo com os complexos 5-8 e cisplatina por 15 min. Linha 1: plasmídeo em água. Linha 2: plasmídeo em água/dmf (2.5%). Linha 3: cisplatina (20 μM). Linha 4: 5 (10 μM). Linha 5: 5 (100 μM). Linha 6: 6 (10 μM). Linha 7: 6 (100 μM). Linha 8: 7 (10 μM). Line 9: 7 (100 μM). Linha 10: 8 (10 μM). Linha 11: 8 (100 μM).....	120

<i>Figura 81</i> - Incubação do plasmídeo com os complexos 1-8 e a topo I por 40 min. Linha 1: controle positivo (DNA + topo I). Linha 2: controle negativo (DNA). Linha 3: 1 . Linha 4: 2 . Linha 5: 3 . Linha 6: 4 . Linha 7: 5 . Linha 8: 6 . Line 9: 7 . Linha 10: 8	122
<i>Figura 82</i> - Incubação do plasmídeo com os complexos 1 e 2 e a topo II por 40 min em diferentes concentrações, C-, controle negativo e C+, controle positivo.....	123
<i>Figura 83</i> - Incubação do plasmídeo com os complexos 3 e 4 e a topo II por 40 min em diferentes concentrações, C-, controle negativo e C+, controle positivo.....	124
<i>Figura 84</i> - Incubação do plasmídeo com os complexos 5 e 6 e a topo II por 40 min em diferentes concentrações, C-, controle negativo e C+, controle positivo.....	124
<i>Figura 85</i> - Incubação do plasmídeo com os complexos 7 e 8 e a topo II por 40 min em diferentes concentrações, C-, controle negativo e C+, controle positivo.....	125
<i>Figura 86</i> - Estrutura tridimensional da catepsina B. O resíduo de cisteína do sítio ativo é mostrado na representação <i>ball-and-stick</i>	128
<i>Figura 87</i> - Curvas dose resposta do complexo 3	129
<i>Figura 88</i> - Curvas dose resposta do complexo 7	130

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1</i> - Valores de IC ₅₀ da inibição da reação de PCR e do crescimento das células K562.....	29
<i>Tabela 2</i> - Procedência de reagentes e solventes.....	44
<i>Tabela 3</i> - Dados obtidos por espectroscopia no IV da trifenilfosfina e suas respectivas atribuições.....	59
<i>Tabela 4</i> - Principais freqüências na região do infravermelho do ligante 4-MeT e dos complexos 1-4	62
<i>Tabela 5</i> - Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H para os compostos 4-metil-3-tiossemicarbazida, 1-4	66
<i>Tabela 6</i> - Deslocamento químicos de RMN de ¹ H para os compostos 4-fenil-3-tiossemicarbazida, 5, 6, 7 e 8	74
<i>Tabela 7</i> - Principais dados cristalográficos dos complexos 3, 4 e 7	84
<i>Tabela 8</i> - Principais valores de distância de ligação e ângulos da estrutura de 3	85
<i>Tabela 9</i> - Principais valores de distância de ligação e ângulos da estrutura de 4	86
<i>Tabela 10</i> - Principais valores de distância de ligação e ângulos da estrutura de 7	87
<i>Tabela 11</i> - Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H para os compostos tioacetamida, 9-11	91
<i>Tabela 12</i> - Deslocamento químicos de RMN de ¹³ C para os compostos TAA e 9	94
<i>Tabela 13</i> - Ângulos da molécula envolvendo o átomo de Pd.....	103
<i>Tabela 14</i> - Distância de ligação envolvendo o átomo de Pd.....	103
<i>Tabela 15</i> - Valores de IC ₅₀ dos complexos de 1-11 , dos ligantes 4-MeT e 4-PhT e da cisplatina frente as linhagens LM3 e LP07.....	104
<i>Tabela 16</i> - Valores de IC ₅₀ de complexos de Pd(II) sintetizados pelo grupo.....	108
<i>Tabela 17</i> - Valores de IC ₅₀ para a inibição da catepsina B dos complexos 3 e 7	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-MeT – 4-metil-3-tiossemicarbazida

4-PhT – 4-fenil-3-tiossemicarbazida

ATD – adenosina difosfato

ATP – adenosina trifosfato

DNA – Ácido desoxirribonucléico

IC₅₀ – Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular

LM3 – Linhagem tumoral de adenocarcionoma mamário

LMM3 – Linhagem tumoral de adenocarcionoma mamário com metástase no pulmão

LP07 – Linhagem tumoral de adenocarcionoma pulmonar

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

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

PBS – Tampão salino fosfato

PPh₃ – Trifenilfosfina

TAA – Tioacetamida

Topo I – Enzima Topoisomerase do tipo I

Topo II – Enzima Topoisomerase do tipo II

Tris – tris(hidroximetil)aminometano

SUMÁRIO

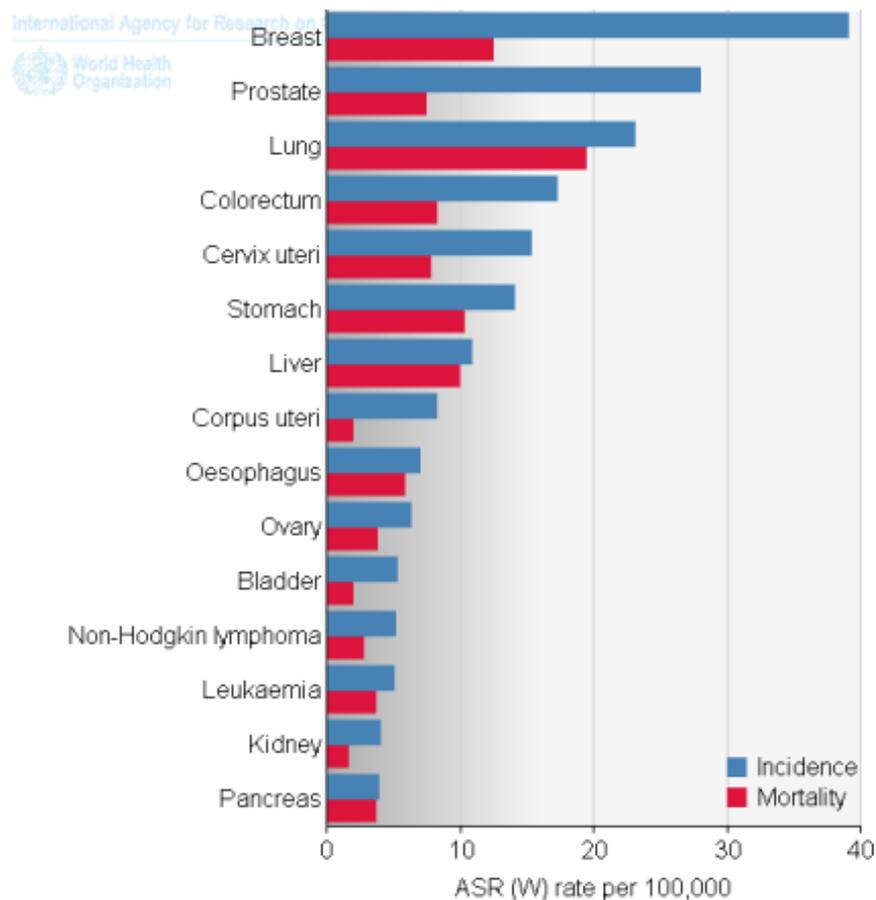
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivo Geral.....	43
2.2 Objetivos Específicos.....	43
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	44
3.1 Procedência de reagentes e solventes.....	44
3.2 Sínteses.....	44
3.2.1 Síntese do $[\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2]$	44
3.2.2 Síntese do $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(4\text{-MeT})]\text{Cl}$ (1).....	45
3.2.3 Síntese do $[\text{PdBr}(\text{PPh}_3)(4\text{-MeT})]\text{Br}$ (2).....	45
3.2.4 Síntese do $[\text{PdI}(\text{PPh}_3)(4\text{MeT})]\text{I}$ (3).....	45
3.2.5 Síntese do $[\text{Pd}(\text{SCN})(\text{PPh}_3)(4\text{-MeT})]\text{SCN}$ (4).....	46
3.2.6 Síntese do $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(4\text{-PhT})]\text{Cl}$ (5).....	46
3.2.7 Síntese do $[\text{PdBr}(\text{PPh}_3)(4\text{-PhT})]\text{Br}$ (6).....	47
3.2.8 Síntese do $[\text{PdI}(\text{PPh}_3)(4\text{-PhT})]\text{I}$ (7).....	47
3.2.9 Síntese do $[\text{Pd}(\text{SCN})(\text{PPh}_3)(4\text{-PhT})]\text{SCN}$ (8).....	47
3.2.10 Síntese do $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ (9).....	48
3.2.11 Síntese do $[\text{PdBr}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ (10).....	48
3.2.12 Síntese do $[\text{PdI}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ (11).....	48
3.3. Métodos Experimentais.....	49
3.3.1 Análise Elementar.....	49
3.3.2 Ponto de Fusão.....	49
3.3.3 Condutividade Molar.....	49
3.3.4 Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho.....	49
3.3.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	49
3.3.6 Espectrometria de Massa.....	50
3.3.7 Análise Termogravimétrica.....	50
3.3.8 Difração de Raios X – Método do pó.....	50

3.3.9 Difração de Raios X de monocristal.....	50
3.3.10 Estratégia Computacional.....	51
3.3.11 Atividade citotóxica.....	51
3.3.12 Reação com a guanosina.....	53
3.3.13 Interação com plasmídeo superenovelado.....	53
3.3.14 Inibição das enzimas DNA-Topoisomerases I e II.....	54
3.3.15 Inibição da enzima Catepsina B.....	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1. Síntese e Caracterização dos compostos 1-8	56
4.1.1 Sínteses.....	56
4.1.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	58
4.1.3 Espectroscopia de RMN ¹ H.....	65
4.1.4 Análise Térmica.....	75
4.1.5 Difração de raios X de monocristal.....	83
4.2 Síntese e Caracterização dos compostos de 9-11	88
4.2.1 Sínteses.....	88
4.2.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	89
4.2.3 Espectroscopia de RMN de ¹ H, ¹³ C e ³¹ P.....	90
4.2.4 Análise termogravimétrica.....	97
4.2.5 Proposição Estrutural.....	101
4.2.6 Otimização das estruturas.....	102
4.3 Investigação das Propriedades Biológicas.....	103
4.3.1 Determinação da citotoxicidade.....	103
4.3.2 Interação com a guanosina.....	108
4.3.3 Interação com o plasmídeo superenovelado.....	116
4.3.4 Inibição das enzimas topoisomerases I e II.....	121
4.3.5 Inibição da enzima catepsina B.....	127
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	132
REFERÊNCIAS.....	135

1. Introdução

Câncer é um termo genérico para um grande número de doenças que podem afetar praticamente qualquer parte do corpo. Uma característica comum a todas estas doenças é a rápida proliferação de células anormais que crescem além dos seus limites usuais podendo invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos (metástase)¹. O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, responsável por cerca de 13 % de todos os óbitos, sendo os tipos com maior mortalidade o câncer de pulmão, de esôfago, de fígado, de pâncreas, leucemia e de estômago² (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Incidência (azul) e mortalidade (vermelho) de diversos tipos de câncer por 100.000 pessoas.



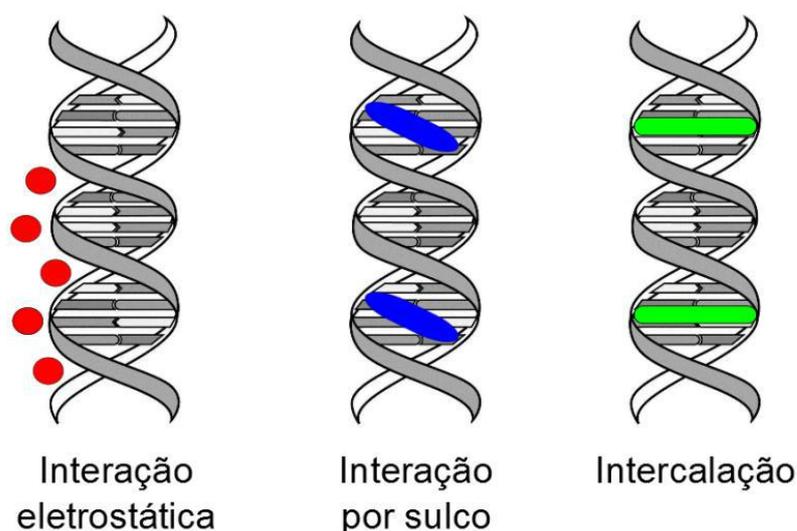
Fonte: World Health Organization²

Uma das maiores dificuldades no 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. Outro grande problema é a capacidade de alguns tumores em realizar a metastase, assim, mesmo curando o primeiro tumor, surgem no organismo tumores secundários, dificultando e estendendo o tratamento. Uma das formas mais usuais no combate de neoplasias se baseia na utilização de medicamentos, a chamada quimioterapia. Estes fármacos são aplicados, em sua maioria, na veia, podendo também ser administrados por via oral, intramuscular e subcutânea. Os medicamentos se misturam com o sangue e são levados a todas as partes do corpo, destruindo as células doentes que estão formando o tumor e impedindo, também, que elas se espalhem pelo corpo.

O DNA é o alvo farmacológico de vários fármacos usados atualmente em terapias medicinais ou em fase de investigação clínica avançadas no combate ao câncer. A idéia de atingir o DNA para regular as funções celulares a partir da modulação da expressão gênica ou da interferência na replicação é muito interessante. Pequenas moléculas, como complexos metálicos, ligam-se ao DNA preferencialmente de três formas identificáveis (Figura 1)^{3,4}.

Figura 1 - Tipos de interações entre pequenas moléculas e o DNA



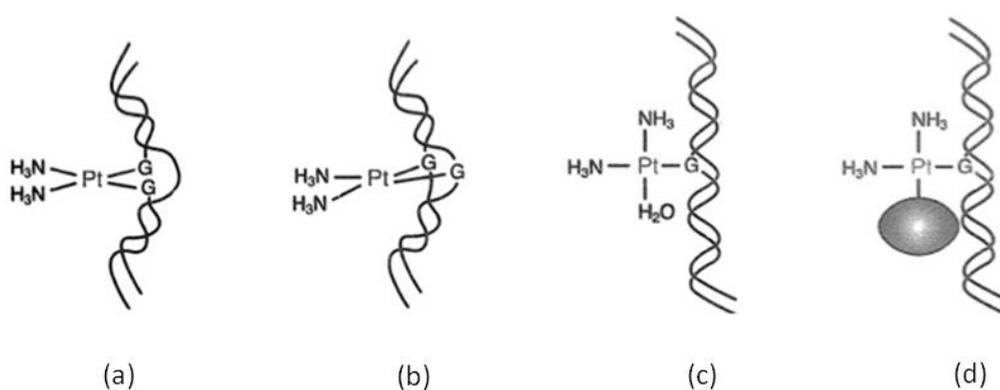
Fonte: DERVAN³.

Uma delas, é interação eletrostática não específica dos complexos com metais carregados positivamente e o esqueleto carbono-fosfato do DNA carregado negativamente. Esta forma de interação é a mais fraca.

Outra forma de interação é a intercalação de moléculas planares entre os pares de base do DNA. Este tipo de interação não covalente com a inserção de um heterocíclico aromático entre bases de pares da dupla hélice do DNA foi proposto pela primeira vez por Lerman⁵ para explicar a forte afinidade entre as acridinas, corantes aromáticos heterocíclicos, e o DNA. A intercalação estabiliza, alonga, enrijece e desenrola a dupla hélice do DNA⁶. O grau de desenrolamento varia dependendo do intercalador. Estas modificações estruturais podem levar a alterações funcionais, frequentemente à inibição da replicação e transcrição e processos de reparo do DNA, que fazem intercaladores potentes mutagênicos⁷.

A maneira amplamente mais investigada é a ligação aos sulcos do DNA por interações covalentes, como ocorre no caso da cisplatina (Figura 2). Esta ligação pode ocorrer de vários modos, dependendo da estrutura molecular do complexo. Podendo ser monofuncionais: cada átomo do metal faz uma ligação com uma base nitrogenada, ou bifuncionais [cada metal se liga em duas posições ao DNA, estas ligações podem ocorrer na mesma fita do DNA (intrafita) ou em fitas diferentes (interfita)]. Uma maneira diferente de ligação bifuncional é a intermolecular, na qual cada átomo metálico se liga ao DNA em uma posição e a segunda ligação seria feita com outras biomoléculas como proteínas e aminoácidos^{8,9}.

Figura 2 - Modos de interação covalente entre a cisplatina e o DNA



Fonte: Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy¹⁰

Os adutos Pt-DNA formados envolvem principalmente os átomos de nitrogênio (N7) da guanina e adenina, pois estes são mais nucleofílicos, uma vez que o par de elétrons está mais disponível, e mais acessível para a coordenação¹¹⁻¹³. Porém vários tipos de adutos podem ser formados, os que envolvem duas fitas do DNA, coordenação interfita e os que

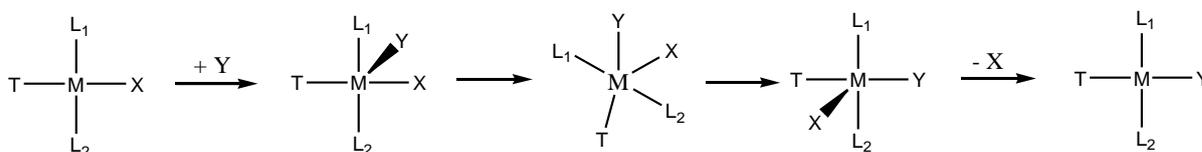
envolvem apenas uma fita do DNA, intrafita. Estudos mostram que o principal aduto formado pela cisplatina com o DNA e, conseqüentemente responsável por sua ação antitumoral, é o 1,2-intrafita (Figura 2 a), formado pela ligação do metal a duas guaninas adjacentes¹³⁻¹⁵. Sendo encontrado em aproximadamente 96 % dos casos.

Um dos maiores problemas encontrados para a cisplatina é a resistência de alguns tumores ao fármaco. Esta resistência pode se dar de uma maneira intrínseca ou pode ser adquirida no decorrer do tratamento¹⁶. Desta maneira a busca de compostos que atuem de maneira diferente da cisplatina se torna cada vez mais interessante e imprescindível.

Nos últimos anos, um número cada vez maior de compostos metálicos têm mostrado propriedades biológicas e biomédicas muito interessantes e promissoras. O papel do metal de transição incorporado na estrutura molecular dessas novas substâncias é muito variado¹⁷⁻²⁰. Dentre os conhecidos, destacam-se os papéis: i) funcional (a atividade resulta da ligação direta do metal ao alvo biológico); ii) estrutural (o metal impõe uma forma ao composto e a ligação ao alvo biológico se dá por forças não-covalentes); iii) transportador: o metal é um transportador de ligantes ativos que são entregues *in vivo*.

Dentre os íons metálicos mais promissores na síntese de novos compostos de coordenação com atividade antitumoral, o Pd se destaca, pois faz parte do grupo da platina e sua química de coordenação é muito similar a Pt²¹. O estado de oxidação mais importante para este grupo é sem dúvida o 2+. Geralmente, complexos de Ni(II) são paramagnéticos e octaédricos, ao passo que complexos de Pd(II) e Pt(II) são quadráticos planos e diamagnéticos. O níquel assume uma geometria quadrado planar apenas na presença de ligantes com requisitos estéricos e eletrônicos específicos. Por causa do baixo número de oxidação, o mecanismo de substituição de ligantes nestes complexos quadrado planares ocorre pelo mecanismo associativo²² (Figura 3), há a formação de um complexo intermediário com número de coordenação elevado acomodando 5 ligantes, após a formação da ligação com o novo ligante ocorre a liberação do grupo abandonador.

Figura 3 - Mecanismo associativo de substituição de ligantes em complexos d^8

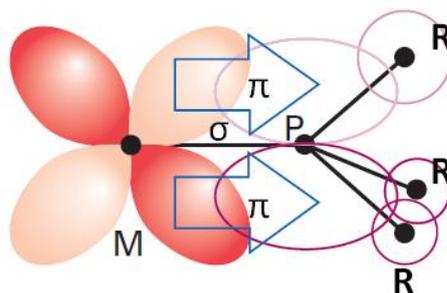


Fonte: Autor

A oxidação de $M(II)$ a $M(IV)$ é geralmente mais difícil para o Pd do que para Pt, mas a oxidação de $Ni(II)$ a (IV) é ainda muito mais difícil, devido à maior electronegatividade do níquel (1,75) em comparação com o paládio (1,35) e a platina (1,44). Estudos comparativos sobre as velocidades de substituição de ligantes em complexos idênticos de $Ni(II)$, $Pd(II)$ e $Pt(II)$ mostraram que as velocidades são 5×10^6 (Ni), 1×10^5 (Pd) e 1 (Pt). Por isso, é interessante a incorporação de ligantes menos lábeis e volumosos (ex. PPh_3) no arcabouço molecular de complexos de $Pd(II)$, pois dificultam a formação do intermediário pentacoordenado, diminuindo assim a cinética de substituição pelo mecanismo associativo. Desta forma, acredita-se que estes complexos tenham maiores chances de atingirem seus alvos farmacológicos.

A utilização de ligantes fosfínicos terciários é bastante promissora, uma vez que estas moléculas apresentam caráter π -aceitador e σ -doador, o que os tornam bons ligantes espectadores, já que a ligação metal-fósforo é fortalecida pela retrodoação de densidade eletrônica dos orbitais d , preenchidos do metal, para os orbitais d vazios do átomo de fósforo²³, como está demonstrado pela Figura 4. Além disso, a inserção da trifenilfosfina na estrutura molecular do complexo aumenta a lipofilicidade e, conseqüentemente, pode auxiliar a sua permeabilidade através da membrana celular²⁴, este ligante tem a capacidade de ocupar bolsões hidrofóbicos nos sítios de várias enzimas, o que auxilia na estabilização do complexo composto de paládio-enzima²⁵⁻²⁷, e ainda possui citotoxicidade frente a alguns tumores²⁸.

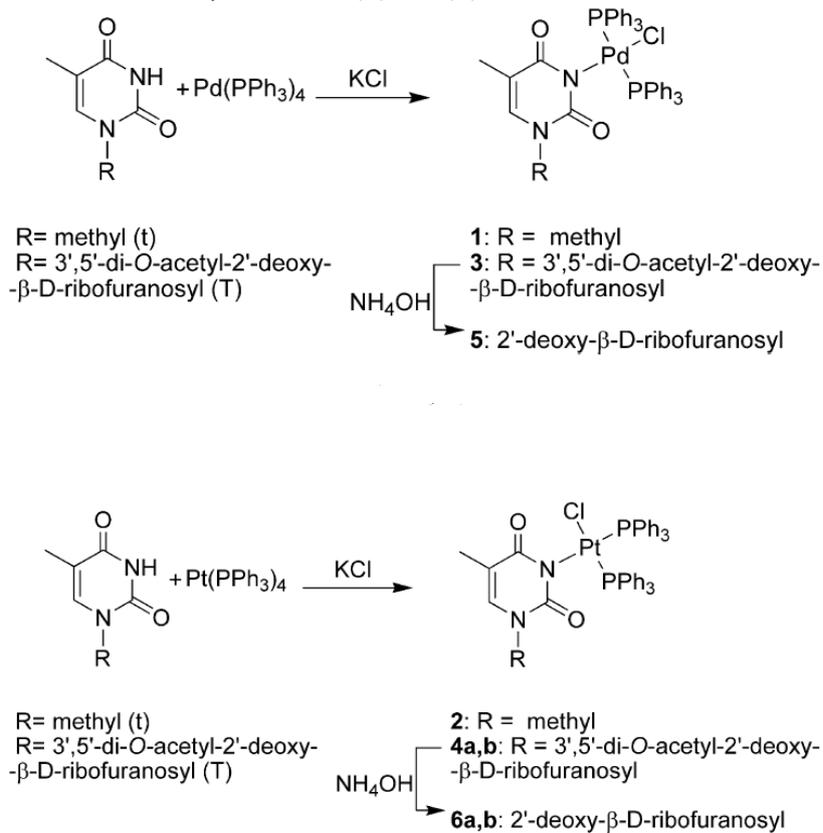
Figura 4 - Esquema representativo da ligação entre metais e ligantes fosfínicos terciários



Fonte: Autor

Evidenciando o grande potencial de complexos de paládio(II) com ligantes fosfínicos, Messere *et al.*²⁸ sintetizaram e avaliaram a capacidade de inibição da reação em cadeia de polimerase e a atividade antiproliferativa de complexos de Pt(II) e Pd(II) contendo ligantes derivados da timina e timidina e a trifenilfosfina (Figura 5).

Figura 5 - Estruturas dos complexos de Pt(II) e Pd(II) contendo timina ou timidina e trifenilfosfina



Fonte: Messere *et al.*²⁸

Os complexos **3-6** foram capazes de inibir a reação em cadeia da polimerase (PCR) em menores concentrações do que a cisplatina, indicando, preliminarmente, a habilidade de interagirem com o DNA. Este teste se baseou na incubação prévia do DNA com os complexos e a cisplatina em diversas concentrações, em seguida as PCR foram conduzidas e analisadas por eletroforese em gel de agarose. Além disso, com exceção dos compostos **1** e **2**, todos os outros foram mais citotóxicos do que a cisplatina frente a linhagem tumoral humana de leucemia mieloide crônica, K562, como pode ser observado pela Tabela 1, mostrando que a atividade antiproliferativa destes compostos vem, em maior parte, da capacidade inibitória da replicação do DNA. Em todos os casos, os complexos de paládio(II) foram mais eficientes que seus análogos de platina(II), tanto na inibição da replicação do ácido desoxirribonucleico quanto na inibição de crescimento das células tumorais K562, demonstrando a potencialidade de novos complexos contendo o íon metálico de Pd(II).

Tabela 1 - Valores de IC₅₀ da inibição da reação de PCR e do crescimento das células K562

Compound	Inhibition of PCR (IC ₅₀ , μM)	Inhibition of cell growth (IC ₅₀ , μM)
Cisplatin	8.5 ± 1.5	2.10 ± 0.91
1	15.0 ± 5.8	4.25 ± 1.10
2	25.5 ± 3.5	28.25 ± 8.20
3	3.5 ± 0.8	2.25 ± 0.62
4	7.0 ± 1.7	3.73 ± 0.81
5	1.5 ± 0.3	0.58 ± 0.12
6	3.1 ± 0.9	2.95 ± 1.11

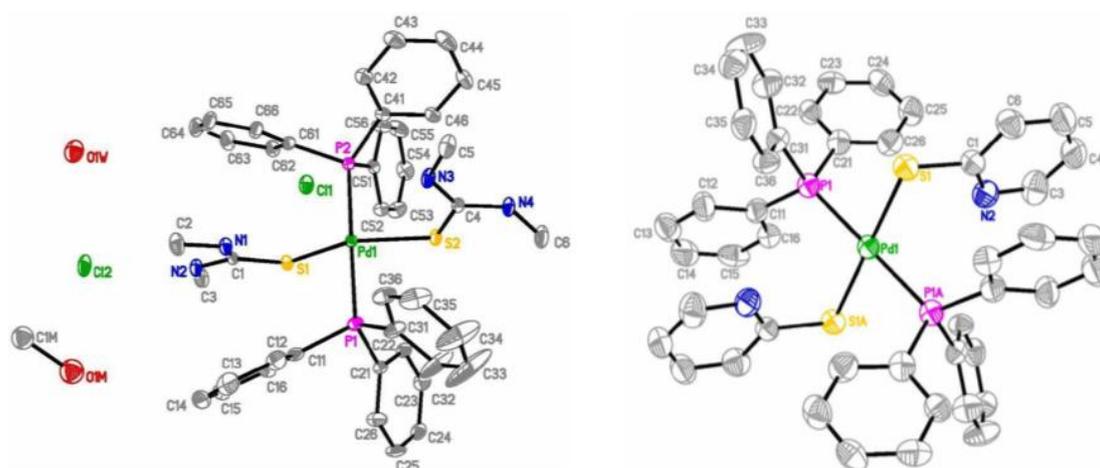
Fonte: Messere *et al.*²⁸

A nefrotoxicidade e inativação da cisplatina estão relacionadas com a ligação do metal a enzimas contendo o grupo tiol²⁹. Por este motivo, moléculas contendo ligantes com enxofre foram exaustivamente estudadas como inibidores da ação nefrotóxica da cisplatina, e algumas delas conseguiram diminuir os danos renais causados pelo fármaco³⁰. Em particular, grupos tiocarbonílicos e tíois mostraram propriedades químicas promissoras na modulação da nefrotoxicidade da cisplatina^{31,32}. Tendo isto em vista, o uso de ligantes, S-doador, é uma estratégia interessante na obtenção de complexos com toxicidade reduzida. Além disso, alguns complexos de paládio(II) contendo este tipo de ligante mostraram

significativa atividade antitumoral, com uma menor taxa de resistência celular e, por serem menos mutagênicos, apresentaram menos efeitos colaterais (menor nefrotoxicidade) do que a cisplatina^{33, 34}. Por ser uma base mole, ou seja, mais polarizável, átomos de enxofre possuem uma grande afinidade pelo íon de paládio(II), um ácido mole, desta forma a ligação entre estes átomos é relativamente forte, gerando complexos menos lábeis e termodinamicamente mais estáveis³⁵.

Exemplificando a importância da utilização de ligantes sulfurados e a trifenilfosfina, Nadeem *et al.*³⁶ apresentaram um trabalho descrevendo a síntese, estrutura cristalina e o estudo das atividades antibacteriana e antitumoral de complexos de paládio(II) contendo estes ligantes (Figura 6).

Figura 6 - Estrutura molecular dos complexos $[Pd(Dmtu)_2(PPh_3)_2]Cl_2 \cdot (CH_3OH)_{0.5} \cdot H_2O$ e $[Pd(Mpy)_2(PPh_3)_2]$



Fonte: Nadeem *et al.*³⁶

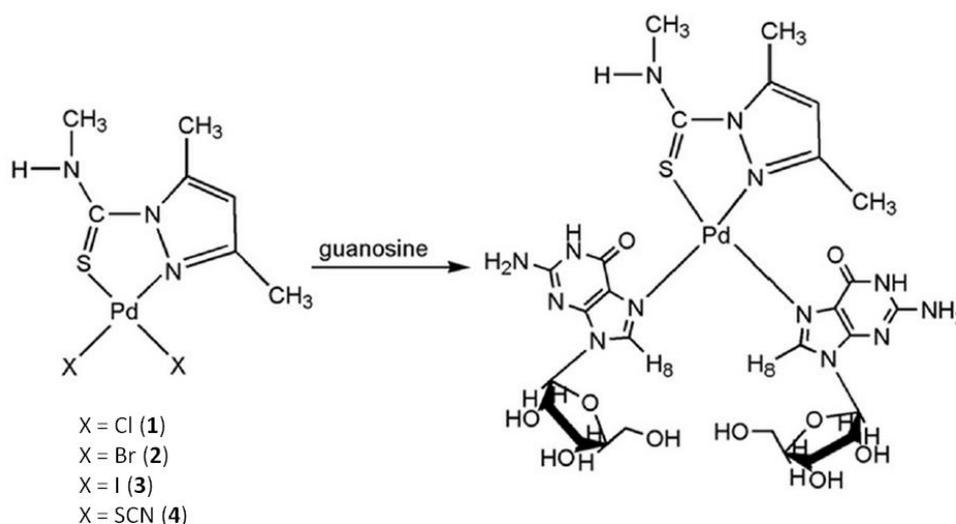
Estes complexos tiveram sua citotoxicidade testada frente à linhagem de câncer de próstata humano e comparada com o da doxorrubicina. A concentração de IC_{50} foi calculada a partir da curva dose-resposta obtida depois de 72 horas de incubação. Os resultados encontrados mostraram que os compostos $[Pd(Tu)_2(PPh_3)_2]Cl_2$, $[Pd(Dmtu)_2(PPh_3)_2]Cl_2$ e $[Pd(Mpm)_2(PPh_3)_2]Cl_2$ (Tu = tiourea; Dmtu = N,N'-dimetiltiourea; Mpm = 2-mercaptopirimidina) exibiram uma boa atividade citotóxica *in vitro* com valores de IC_{50} de $18,30 \pm 1,22$, $5,80 \pm 0,57$, $8,17 \pm 0,47$ μM , respectivamente. No entanto, apresentaram uma menor atividade do que o fármaco doxorrubicina ($IC_{50} = 0,912 \pm 0,12$).

Vale resaltar, que inicialmente, complexos com a configuração *trans* foram negligenciados, devido a falta de citotoxicidade da transplatina. No entanto, recentemente, trabalhos científicos mostraram a capacidade de *trans* complexos em se ligarem e danificarem o DNA causando dano suficiente para que ele não se repare e ocorra a apoptose da célula. Deste modo, esta configuração não é mais um impedimento para a boa citotoxicidade. Além disso, o modo de interação com o DNA destes complexos pode ser diferente do encontrado para a cisplatina, desta maneira, eles podem atuar em células tumorais que são resistentes aos fármacos utilizados atualmente^{37,38}.

Outra maneira de diminuir ainda mais a velocidade de substituição de ligantes em complexos de Pd(II) e conseqüentemente aumentar seu acúmulo próximo ao seu alvo é a utilização de ligantes quelatos. A formação do anel metálico de cinco membros aumenta consideravelmente a sua estabilidade termodinâmica³⁹. Particularmente, uma área de pesquisa muito rica e ativa na Química Medicinal Inorgânica se desenvolveu nas propriedades farmacológicas de complexos metálicos contendo ligantes N, S-doadores⁴⁰⁻⁴³, muitos dos quais mostram atividade citotóxica promissora frente a linhagens tumorais⁴⁴⁻⁵⁰.

Barra *et al.*⁵¹ relataram a síntese, caracterização, citotoxicidade e interação com o DNA de complexos de Pd(II) contendo o ligante N'-metil-3,5-dimetil-1-tiocarbamoilpirazol. Estes compostos mostraram capacidade de interação com o DNA e citotoxicidade mais elevada que a cisplatina frente a linhagem tumoral LM3 (adenocarcinoma mamário). Inicialmente, reações com uma base purina e ensaios de eletroforese em gel de agarose com plasmídeo circular foram realizados. Os resultados demonstraram que tais compostos podem se ligar a duas bases purinas, indicando que estes complexos devem atuar como agentes bifuncionais (Figura 7).

Figura 7 - Estrutura dos complexos e esquema de reação de formação dos adutos bifuncionais



Fonte: Barra *et al.*⁵¹

Os dados de citotoxicidade revelaram a grande potencialidade de compostos de Pd(II) contendo este tipo de ligante, uma vez que os complexos foram aproximadamente 10 vezes mais ativos do que o metalo-fármaco padrão, apresentando valores de IC₅₀ entre 2,53 e 3,40 μM, enquanto a cisplatina possui um valor de 30,3 μM.

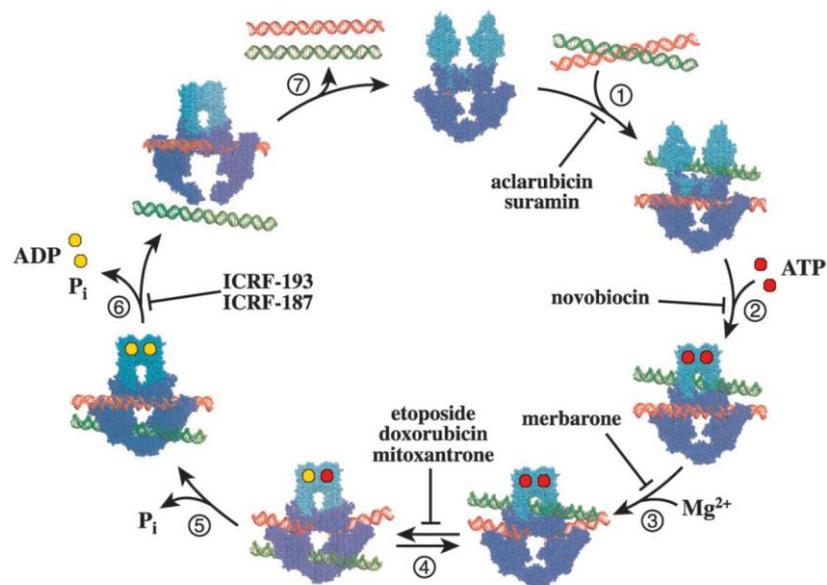
Outro importantíssimo alvo farmacológico dos agentes antineoplásicos são as enzimas DNA-topoisomerasas, uma vez que estão presente em maior quantidade em células de rápida proliferação⁵², principalmente em células tumorais de pulmão, mama (neoplasias mais recorrentes), próstata, sarcomas e neoplasias hematológicas⁵³. Como as células tumorais se multiplicam mais rapidamente que as células normais, a ideia de atingir estas enzimas está vinculada à maior seletividade destes agentes e, conseqüentemente, uma diminuição nos efeitos colaterais apresentados pela grande maioria dos fármacos utilizados atualmente.

As topoisomerasas constituem uma família de enzimas nucleares essenciais para todas as células vivas. Estas enzimas participam na replicação do DNA, condensação dos cromossomos e segregação cromossômica⁵⁴. Existem duas classes de topoisomerasas, conhecidas como tipo I e tipo II. A topoisomerase I (topo I) produz uma quebra simples em uma das fitas do DNA permitindo seu relaxamento e sua replicação. Posteriormente, esta fita é religada, restaurando a dupla fita⁵⁵. Vale ressaltar que nenhum cofator de energia é necessário para realizar esta reação. A topoisomerase II (topo II) produz quebras nas duas

fitas da dupla hélice do DNA e o passa através de outra hélice intacta e em seguida restaura as fitas cortadas⁵⁵. Diferentemente da topo I, este mecanismo é dependente de ATP (adenosina trifosfato). Existem duas isoformas da topoisomerase II, alfa e beta, que se diferem, principalmente, pela sua produção durante o ciclo celular. A topo II α é encontrada quase exclusivamente nos tecidos de proliferação rápida, indicando que esta isoforma possui a responsabilidade principal por eventos associados com a replicação do DNA e da segregação dos cromossomas. Em contra partida, a concentração da topo II β geralmente é independente dos ciclos de crescimento celular⁵⁴.

Em sua maioria, os fármacos que visam as topoisomerases atuam no tipo II α ⁵⁶, pois esta isoforma está diretamente relacionada com a transcrição e replicação do DNA. Estes agentes são capazes de interferir em, pelo menos, uma etapa do ciclo catalítico da enzima (Figura 8).

Figura 8 - Ciclo catalítico da topoisomerase II. Domínios da ATPase estão mostrados em azul claro, o domínio nuclear está representado por azul escuro



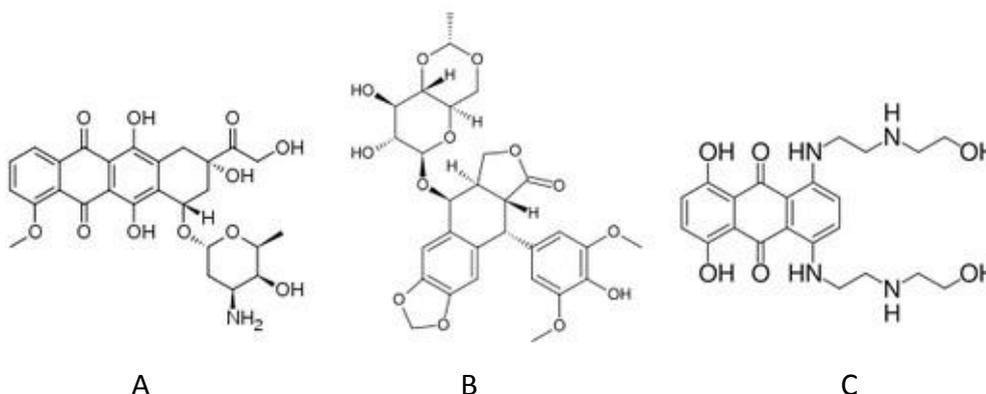
Fonte: Larsen *et al.*⁵³

O ciclo inicia-se com a ligação da enzima a dois segmentos de dupla fita do DNA, chamados de segmento G (vermelho) e segmento T (verde) (etapa 1). Em seguida, duas moléculas de ATP se ligam à enzima, isto está associado à dimerização do domínio da ATPase (etapa 2). Posteriormente, o segmento G é clivado (etapa 3) e o segmento T é transportado

através de G rompido, o que é acompanhado pela hidrólise de uma molécula de ATP (etapa 4). O segmento G é religado e a molécula de ATP restante é hidrolisada (etapa 5). Após a dissociação das duas moléculas de ADP (adenosina difosfato), o segmento de T é transportado através do domínio nuclear aberto (etapa 6). Por fim, o domínio nuclear é fechado e os domínios da ATPase reabrem, permitindo a dissociação do DNA (etapa 7)^{53, 57}.

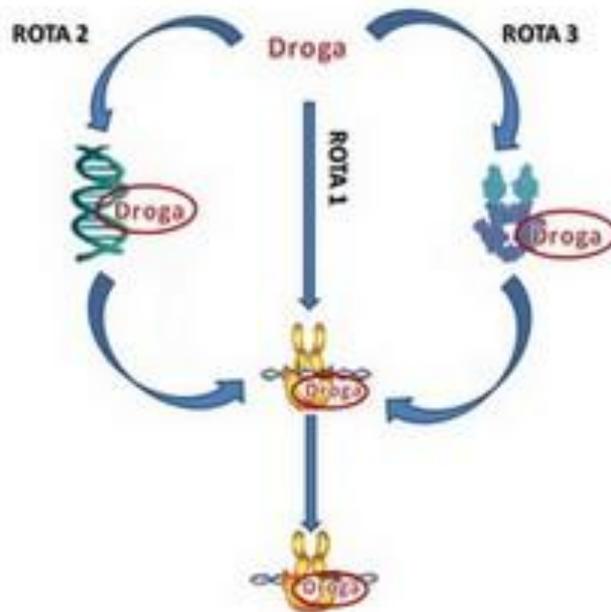
Os agentes clinicamente ativos são divididos em duas classes. A primeira atua estabilizando e aumentando os níveis dos complexos covalentes topo II – DNA dentro das células. A elevada concentração destes complexos pode causar danos ao DNA e induzir a apoptose. Estes fármacos são conhecidos como venenos da topo II, visto que convertem a enzima em uma potente toxina celular. Dentre eles estão o etopósido, a doxorubicina e a mitoxantrona (Figura 9)⁵⁸. A formação do complexo DNA – topo – fármaco pode ocorrer por três rotas (Figura 10). Os agentes podem se associar diretamente ao complexo binário DNA – topo, tendo assim interações mínimas com o DNA ou a enzima separadamente (rota 1); ou podem interagir primeiramente com o DNA (rota 2) ou a topoisomerase (rota 3).

Figura 9 - Formas estruturais: (A) doxorubicina; (B) etopósido; (C) mitoxantrona



Fonte: Pommier *et al.*⁵⁸

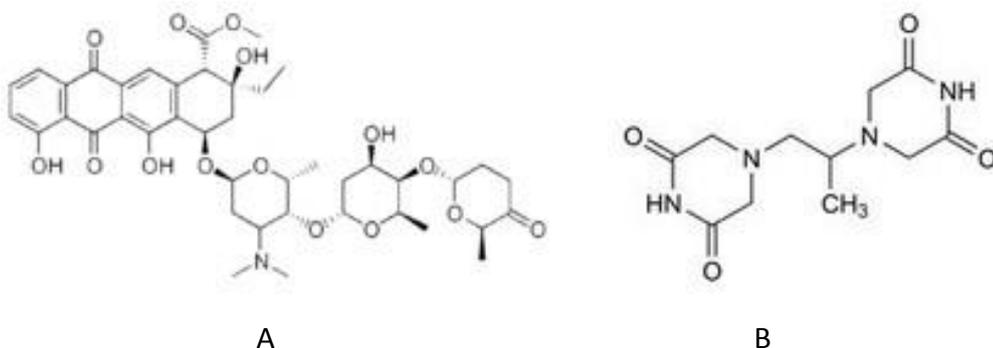
Figura 10 - Rotas da formação do complexo DNA – topo – droga



Fonte: Autor

A segunda classe age em qualquer das outras etapas do ciclo enzimático e estes são conhecidos como inibidores catalíticos (Figura 11)⁵³. Os inibidores catalíticos da topoisomerase II é um grupo heterogêneo de compostos que pode interferir na ligação entre o DNA e a topo II (aclarrubicina e suramina), estabilizar complexos não covalentes topo II – DNA (ICRF-187) ou inibir a ligação ATP – topo II (novobiocina).

Figura 11 - Estruturas químicas: (A) aclarrubicina; (B) ICRF – 187



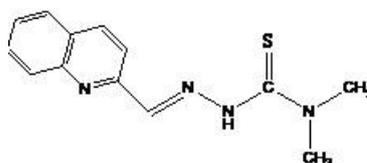
Fonte: Larsen *et al.*⁵³

Infelizmente, os medicamentos usados no combate destas neoplasias que atuam na topo II apresentam sérias limitações. Por exemplo, os problemas relacionados ao emprego

do etopósido incluem a mielossupressão, baixa solubilidade em água e desenvolvimento de resistência pelas células tumorais^{59, 60}. Já a cardiotoxicidade é um dos principais efeitos colaterais que limitam o uso da doxorubicina⁶¹. Nesse sentido, um objetivo importante da pesquisa presente e futura nessa área é o de maximizar a eficácia terapêutica dos agentes que possuem a topoisomerases como alvos e minimizar os riscos de tumores secundários e outras toxicidades.

Recentemente, Huang *et al.*⁶² sintetizaram uma extensa série de novas tiossemicarbazonas derivadas de carboxaldeídos heterocíclicos e tiossemicarbazidas. Alguns compostos apresentaram a capacidade de inibir a topoisomerase II α e atividade antitumoral excepcional frente a várias linhagens humanas, com valores de IC₅₀ na ordem de nanomolar. O composto que mais se destacou foi o N,N-dimetil-2-(quinolina-2-ilmetileno)hidrazinacarbotioamida (TSC24) (Figura 12), pois apresentou um amplo espectro de atividade biológica frente às linhagens testadas, câncer gástrico (SGC7901), leucemia (HL-60), câncer cervical (HeLa) e carcinoma de cólon (HT-29), com valores de IC₅₀ de 0,03 μ M; 0,05 μ M; 0,09 μ M; 0,02 μ M, respectivamente.

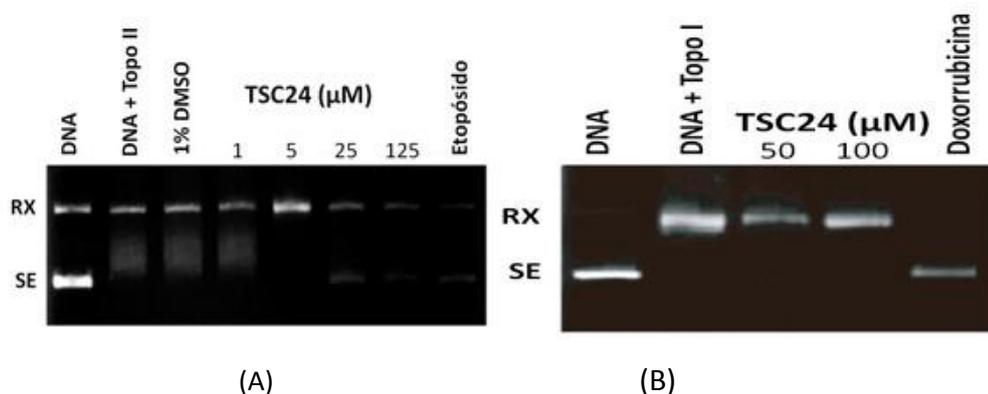
Figura 12 - Estrutura proposta para o composto TSC24



Fonte: Huang *et al.*⁶²

Visto a potencialidade exibida pelo TSC24, a sua capacidade em inibir as enzimas topoisomerase I e II foi investigada. Os resultados demonstraram que o TSC24 induziu uma inibição quase completa da topo II na concentração de 25 μ M, porém ele mostrou-se incapaz de inibir a ação da topo I (Figura 13).

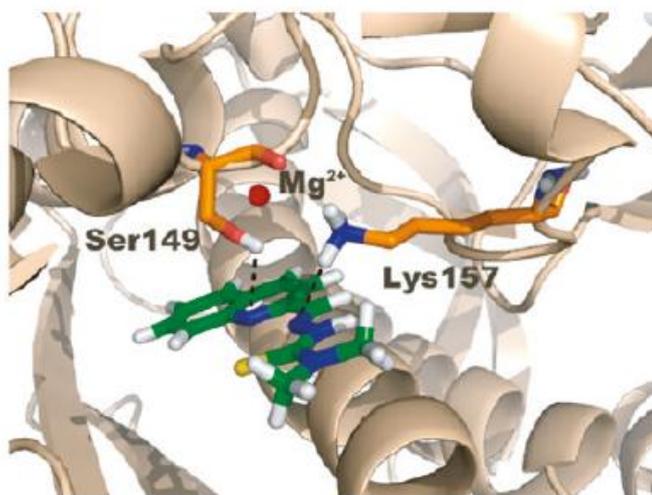
Figura 13 - Ensaio de inibição da topo-II (A) e da topo-I (B) para o compostos TSC24



Fonte: Huang *et al.*⁶²

Assim, para se determinar o mecanismo básico da ação inibitória do composto TSC24 sobre a topo II α , seu efeito em cada etapa do processo catalítico da enzima foi monitorado. A tiossemicarbazona em questão se mostrou eficaz em etapas que envolvem a necessidade do ATP, o que explica em parte, o motivo da sua incapacidade de inibir a topo I, que age sem a necessidade destas moléculas. Isto é um indício de que o composto atua no domínio da ATPase. Por isso, testes comparativos entre a reatividade do TSC24 e a molécula de ATP com o domínio da ATPase foram realizados, demonstrando que a tiossemicarbazona possui mais afinidade com o domínio que o ATP. Cálculos de docagem molecular foram realizados para uma melhor compreensão de como ocorrem as interações entre o TSC24 e a enzima (Figura 14).

Figura 14 - Docagem molecular entre a molécula do TSC24 e o domínio da ATPase

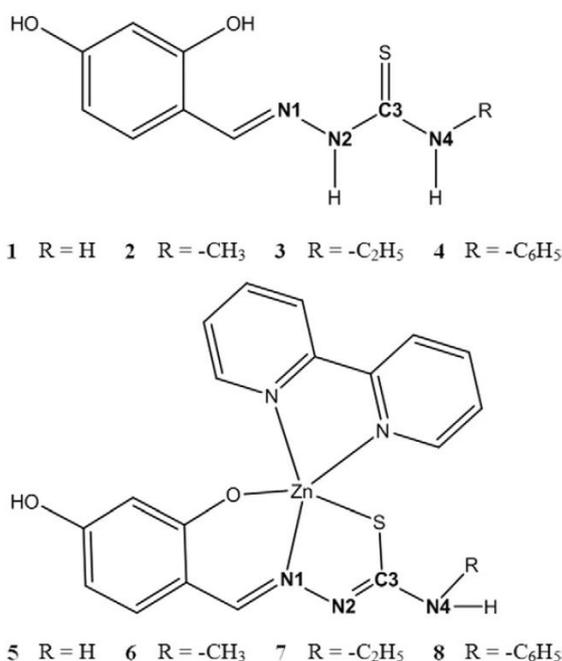


Fonte: Huang *et al.*⁶²

O estudo mostrou que os anéis quinolínicos da tiossemicarbazona se posicionam no meio da cavidade da enzima e ocorrem interações hidrofóbicas fortes entre o composto e os aminoácidos Asp 94, Lys 157 e Thr 159, presentes neste espaço. O átomo de nitrogênio da quinolina forma ligações de hidrogênio com o grupo hidroxil da Ser 149. Já o sistema (NR-NH-CS-N(Me)₂) se posiciona na entrada do sítio ativo da enzima e um átomo de N do TSC24 realiza fortes interações de hidrogênio com a cadeia lateral NH da lisina 157.

Complexos metálicos contendo ligantes N,S-doadores também se mostraram ativos contra as enzimas DNA-topoisomerasas. Tan *et al.*⁶³ sintetizaram 4 novas tiossemicarbazonas a partir da reação entre o 2,4-dihidroxibenzaldeído e as tiossemicarbazidas N4 substituídas apropriadas (L1 = N4-H; L2 = N4-CH₃; L3 = N4-C₂H₅; L4 = N4-C₆H₅), com estes ligantes foram obtidos 4 complexos de zinco contendo a 2,2'-bipiridina atuando como co-ligante (Figura 15).

Figura 15 - Estrutura dos ligantes tiossemicarbazonas e seus complexos de zinco



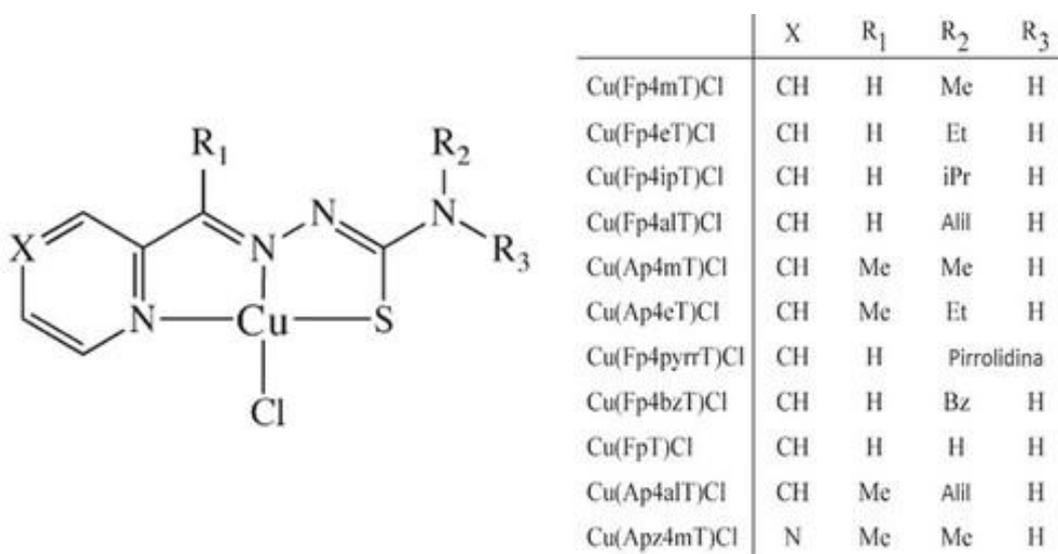
Fonte: Tan *et al.*⁶³

Todos os 8 compostos tiveram sua citotoxicidade investigada frente as linhagens celulares de próstata normal (RWPE-1) e tumoral (PC3). Estas células foram selecionadas, pois a quantidade de topo I em células tumorais de próstata é de 2 a 10 vezes maior do que

em células normais de próstata de um mesmo paciente. Os resultados mostraram que os complexos 6, 7 e 8 foram muito ativos contra a linhagem tumoral e bem brandos frente as células normais, sendo o composto 8 o mais promissor, com valores de IC_{50} de 0,84 (PC3) e 85,63 (RWPE-1) μ M. Os demais compostos foram não citotóxicos. A capacidade de todos os compostos em inibir a ação da topo I foi investigada, e os resultados demonstraram que somente o complexo 8 foi capaz de impedir a relaxação do DNA. Tal característica pode estar relacionada a maior seletividade apresentada pelo composto, uma vez que a enzima topoisomerase I está em maior expressão nas células cancerígenas do que nas células normais. Estes resultados demonstram a potencialidade de complexos contendo ligantes N,S-doadores que visam as enzimas topoisomerasas como alvos farmacológicos. Além disso, este trabalho mostra a influência causada pela presença de diferentes grupos na posição N4 da tiossemicarbazona. A alteração dos substituintes nesta posição implicou em modificações significativas na atividade antiproliferativa bem como na inibição da enzima.

Nesse contexto, Zeglis *et al.*⁶⁴ mostraram a potencialização da inibição da topo II α e da atividade antiproliferativa frente a linhagens de células tumorais de mama humana de tiossemicarbazonas quando complexadas ao íon de cobre(II). Os complexos sintetizados apresentam a geometria quadrática plana (Figura 16), sendo este um requisito fundamental para acentuar a interação entre a molécula e a o sitio ativo da enzima topo II, segundo os autores. Os resultados de citotoxicidade demonstraram que as tiossemicarbazonas sintetizadas possuem uma boa atividade antitumoral com valores de IC_{50} entre 4,3 e 8,1 μ M frente a células SK-Br-3. Porém, quando são capazes de inibirem a topoisomerase, o fazem apenas em altas concentrações (76 – 94 μ M). Em contrapartida, os complexos de Cu(II) apresentam uma faixa de concentração de inibição enzimática muito menor que a dos ligantes livres entre 0,3 – 7,2 μ M, tais valores são comparáveis ao do fármaco doxorubicina (1 -5 μ M) e muito melhores que o do etoposídeo (50 – 90 μ M), ambos usados atualmente no tratamento contra o câncer. Vale ressaltar também que a metalação contribuiu para um aumento significativo da atividade antiproliferativa.

Figura 16 - Fórmula estrutural das tiossemicarbazonas sintetizadas

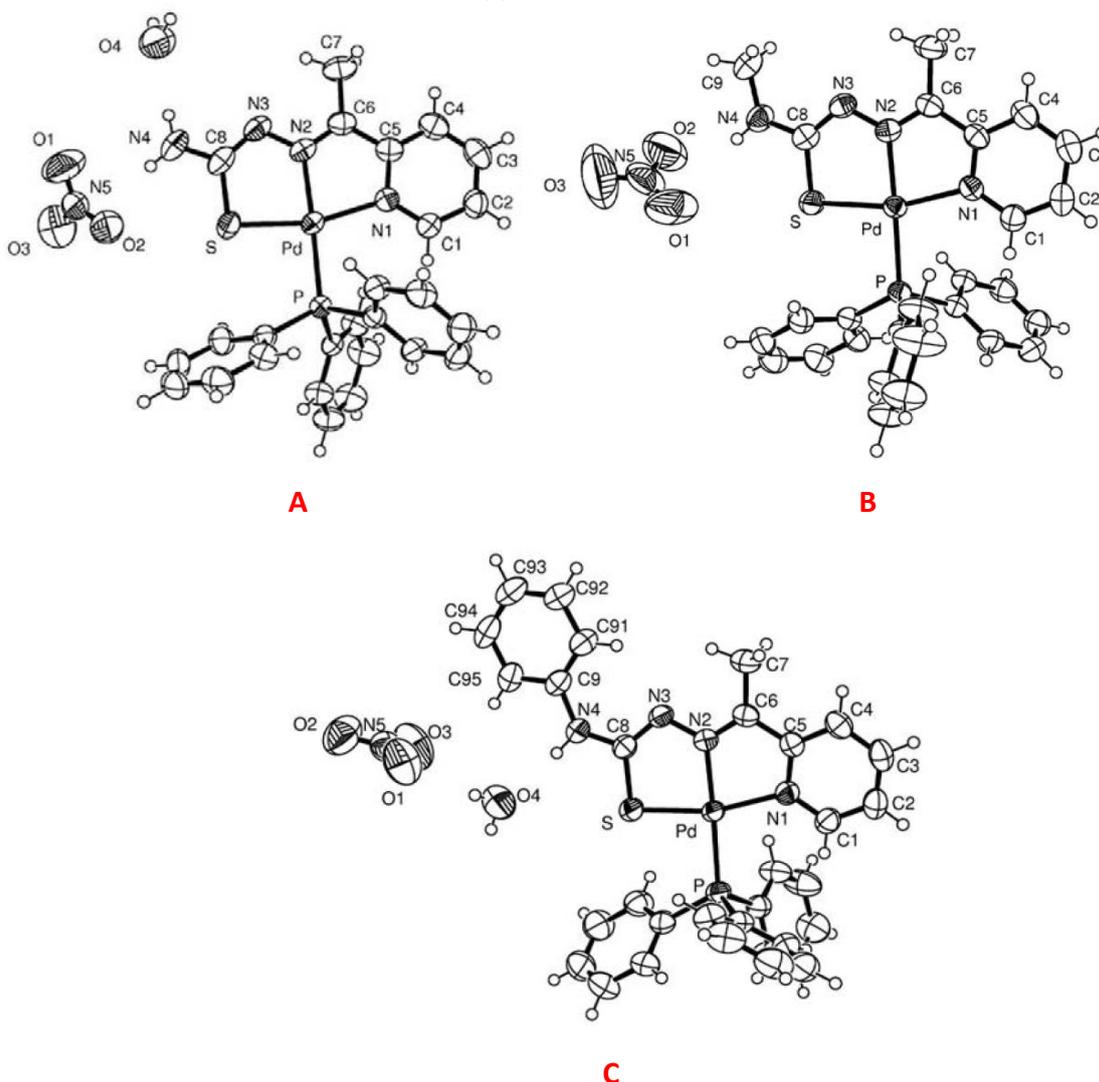


Fonte: Zeglis *et al.*⁶⁴

Acredita-se que estes complexos atuem no domínio da ATPase competindo com as moléculas de ATP e impedindo a ação enzimática. Os autores atribuem, em parte, o aumento da capacidade de inibição dos complexos em relação às tiossemicarbazonas livres à rigidez apresentada pela geometria quadrática plana imposta pelo íon Cu(II), uma vez que a planaridade é responsável pela melhor acomodação dos compostos na cavidade do sítio alvo.

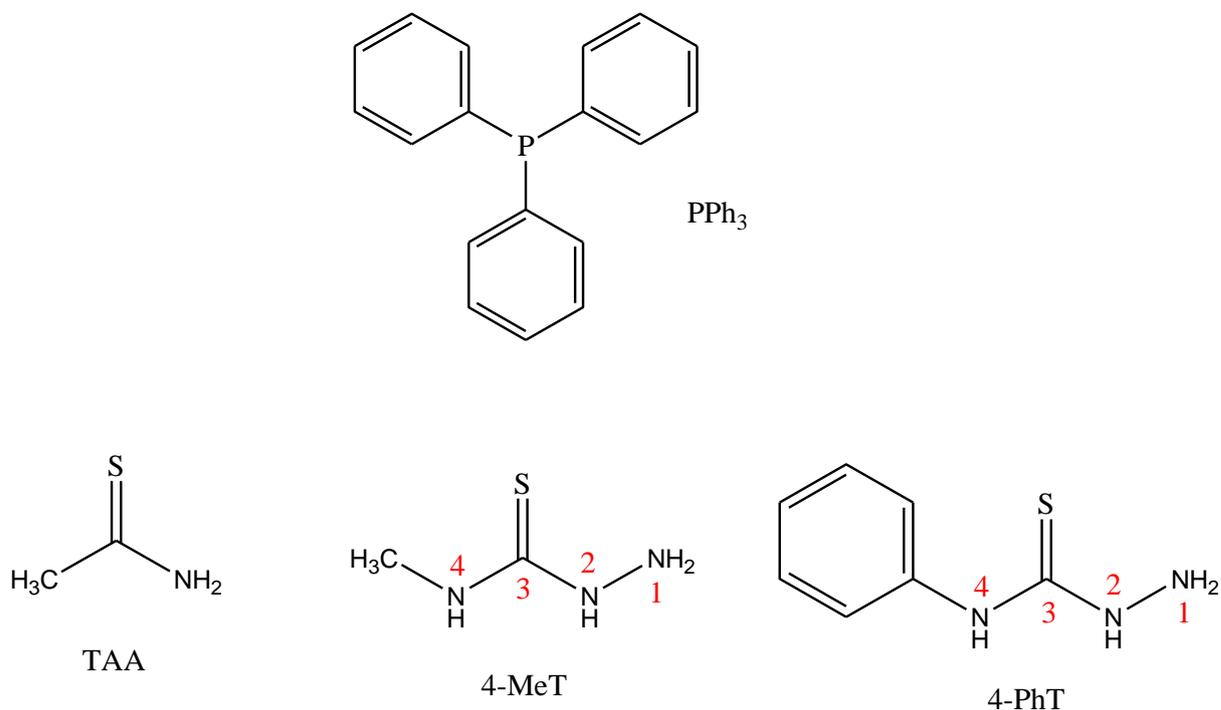
A incorporação de ligantes N, S-doadores e trifenílfosfina no arcabouço molecular de complexos de Pd(II) também vem demonstrando ser uma estratégia interessante no design de compostos biologicamente ativos. Neste contexto, Maia *et al.*⁶⁵ apresentaram o estudo da citotoxicidade de uma série de complexos de paládio(II) (Figura 17) com ligantes derivados de tiossemicarbazonas e a trifenílfosfina frente à células mamárias cancerígenas, MDA-MB231. A cisplatina foi usada como droga padrão nos testes. Os resultados encontrados foram promissores, uma vez que os compostos se mostraram muito mais ativos que o medicamento de referência, apresentando valores de IC₅₀ entre 4,9 e 5,5 µM, já a cisplatina apresentou um IC₅₀ > 200 µM. Os valores similares de citotoxicidades encontrados para os complexos indicam um mecanismo bioquímico de ação bem semelhante entre os três, no entanto diferente quando comparado aquele apresentado pela cisplatina, devido à inatividade da droga neste caso.

Figura 17 - Estruturas dos complexos $[\text{Pd}(\text{aptsc})(\text{PPh}_3)](\text{NO}_3)\cdot\text{H}_2\text{O}$ (A); $[\text{Pd}(\text{apmtsc})(\text{PPh}_3)](\text{NO}_3)$ (B); $[\text{Pd}(\text{apptsc})(\text{PPh}_3)](\text{NO}_3)\cdot\text{H}_2\text{O}$ (C)



Fonte: Maia *et al.*¹⁷

Tendo em vista as potencialidades biológicas e estruturais apresentadas pelos ligantes sulfurados, fosfínicos e o íon de paládio (II), pretende-se realizar o estudo da atividade citotóxica e a ação frente a possíveis alvos farmacológicos de complexos do tipo $[\text{PdX}_2(\text{S})(\text{PPh}_3)]$ e $[\text{PdX}(\text{S})(\text{PPh}_3)]^+$, sendo S = ligantes sulfurados (tioacetamida, 4-metil-3-tiossemicarbazida, 4-fenil-3-tiossemicarbazida) apresentados na Figura 18; PPh_3 = trifenilfosfina; X = Cl^- , Br^- , I^- e SCN^- .

Figura 18 - Estruturas dos ligantes PPh₃, TAA, 4-MeT e 4-PhT

Fonte: Autor

A escolha da trifenilfosfina como ligante se baseou na sua capacidade de aumentar a lipofilicidade dos complexos, de estabelecer fortes ligações com o Pd(II), por sua citotoxicidade frente a alguns tumores e pela sua capacidade de ocupar bolsões hidrofóbicos nos sítios de várias enzimas. Já a utilização dos ligantes tioacetamida, 4-metil-3-tiossemicarbazida e 4-fenil-3-tiossemicarbazida se mostrou interessante devido a maior estabilidade termodinâmica de seus complexos, bem como pela possibilidade de gerarem compostos com menos efeitos colaterais. A utilização destes ligantes possibilitará a obtenção de informações sobre a diferença no comportamento biológico de complexos de Pd(II) contendo ligantes S-doador (monodentado) e N, S-doadores (bidentados). Além disso, pretende-se investigar o efeito causado por diferentes substituintes na posição N4 na atividade biológica dos complexos, uma vez que estudos mostraram que alterações feitas nesta posição interferem de uma maneira mais efetiva na modulação da citotoxicidade destes compostos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral:

Face ao exposto, o objetivo principal deste trabalho envolve o planejamento de novos complexos de Pd(II) contendo tiossemicarbazidas bidentadas ou o ligante monodentado tioacetamida e a trifenilfosfina com potencial atividade citotóxica frente à células tumorais.

2.2. Objetivos específicos:

- ✓ Preparação e caracterização dos novos complexos de Pd(II);
- ✓ Investigação da citotoxicidade frente às linhagens de tumor mamário e pulmonar murino;
- ✓ Avaliação da diferença na citotoxicidade dos compostos contendo ligantes N, S-doadores ou S-doador;
- ✓ Investigar a influência dos ligantes na citotoxicidade;
- ✓ Compreensão da influência do substituinte na posição N4 dos ligantes N, S-doadores em relação as atividades biológicas dos complexos;
- ✓ Reatividade com a guanosina;
- ✓ Interação com o DNA;
- ✓ Avaliação da capacidade inibitória dos complexos frente às enzimas DNA-topoisomerasas I e II;
- ✓ Capacidade de inibição da enzima catepsina B.

3. Parte Experimental

3.1. Procedência de reagentes e solventes:

Todos os reagentes e solventes utilizados no trabalho eram de grau analítico P.A., sua procedência está representada na Tabela 2. Os solventes empregados nas sínteses foram tratados com peneiras moleculares para remoção de excesso de água e armazenados em frascos escuros de vidro.

Tabela 2 - Procedência de reagentes e solventes

Reagentes	Procedência	Solventes	Procedência
Cloreto de paládio	Vetec	Acetonitrila	Mallinckrodt
Brometo de potássio	Carlos Erba	Álcool Metílico	Merck
Iodeto de potássio	Merck	Clorofórmio	Merck
Tiocianato de potássio	Merck	Pentano	Merck
Trifenilfosfina	Merck	Éter Dietílico	Sigma-Aldrich
Guanosina	Aldrich	DMF	Sigma-Aldrich
MTT	Across Organics	Álcool isopropílico	Mallinckrodt
Nitrato de prata	Aldrich	Clorofórmio-d ₁	CIL
Perclorato de potássio	Aldrich	Metanol-d ₄	Aldrich
Brometo de Etídio	Sigma-Aldrich	DMSO-d ₆	CIL
4-fenil-3-tiossemicarbazida	Sigma-Aldrich		
4-metil -3-tiossemicarbazida	Sigma-Aldrich		

Fonte: Autor

3.2. Sínteses:

3.2.1. Síntese do [PdCl₂(MeCN)₂]:

Em um erlenmeyer de 200 mL de capacidade contendo 40 mL de acetonitrila a 80 °C foram adicionados, lentamente, 2,00 g (11,3 mmols) de cloreto de paládio anidro (PdCl₂). A suspensão foi mantida sob intensa agitação magnética por 4 horas. Após este período um precipitado amarelo foi formado. 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 para $C_4H_6Cl_2N_2Pd$) % C=18,05 (18,52); % H=2,49 (2,34); % N=10,40 (10,80).

3.2.2. Síntese do $[PdCl(PPh_3)(4-MeT)]Cl$ (1):

Em um erlenmeyer de 25 mL contendo 0,050 g (0,19 mmol) de $[PdCl_2(MeCN)_2]$ suspenso em 10 mL de clorofórmio foi gotejada uma solução contendo 0,051 g (0,19 mmol) de trifenilfosfina e 0,020 g (0,019 mmol) de 4-metil-3-tiossemicarbazida em 3,0 mL de uma mistura clorofórmio/metanol em proporção 1:2. A adição dos ligantes deu origem a uma solução de cor amarela. A agitação magnética foi mantida durante 2 h. Após este período, o volume da solução foi reduzido com auxílio de um rotaevaporador e depois filtrado sobre um béquer contendo pentano, em uma razão 1:3 clorofórmio/pentano. Em seguida, foi observada a formação de uma suspensão amarela, que foi filtrada e o sólido obtido foi lavado e seco. Rendimento: 75%. Análise Elementar: obtido (calculado para $C_{20}H_{22}Cl_2N_3PSPd.1/2H_2O$) %C=43,13 (43,38); %H=4,44 (4,19); %N=7,41 (7,59). Condutividade molar, em dmf, $49,7 \Omega cm^2M$.

3.2.3. Síntese do $[PdBr(PPh_3)(4-MeT)]Br$ (2):

Para a síntese deste complexo o mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado obtendo-se assim o composto **1**, em seguida, *in situ*, se adicionou ao meio reacional 0,045 g (0,38 mmol) de brometo de potássio dissolvidos em 2,0 mL de uma mistura de metanol/água 4:1. A reação foi agitada magneticamente por mais 6 h. Após este período a solução apresentava uma coloração laranja, esta por sua vez reduzida com auxílio de um rotavapor e foi filtrada sobre um béquer contendo pentano, em uma razão 1:3 clorofórmio/pentano. Em seguida, observou-se a formação de uma suspensão amarela escura, que foi filtrada e o sólido obtido foi lavado e seco. Rendimento: 75%. Análise Elementar: obtido (calculado para $C_{20}H_{22}Br_2N_3PSPd$) %C= 37,24 (37,91); %H= 3,88 (3,50); %N= 6,63 (6,31). Condutividade molar, em dmf, $58,0 \Omega cm^2M$.

3.2.4. Síntese do $[PdI(PPh_3)(4-MeT)]I$ (3):

Em um erlenmeyer de 25 mL contendo 0,050 g (0,19 mmol) de $[PdCl_2(MeCN)_2]$ suspenso em 10 mL de clorofórmio foi gotejada uma solução contendo 0,051 g (0,19 mmol) de trifenilfosfina e 0,020 g (0,019 mmol) de 4-metil-3-tiossemicarbazida em 3,0 mL de uma

mistura clorofórmio/metanol em proporção 1:2. A adição dos ligantes deu origem a uma solução de cor amarela. A agitação magnética foi mantida durante 2 h. Em seguida, se adicionou ao meio reacional 0,064 g (0,38 mmol) de iodeto de potássio dissolvidos em 2,0 mL de uma mistura de metanol/água 4:1. A reação ficou sob agitação magnética por mais 1 h. Após este período a solução apresentava uma coloração vermelha, esta por sua vez foi filtrada sobre um béquer contendo pentano, em uma razão 1:3 clorofórmio/pentano. Logo após, observou-se a formação de uma suspensão vermelha, que foi filtrada e os cristais obtidos foram lavados e secos. Rendimento: 80%. Análise Elementar: obtido (calculado para $C_{20}H_{22}I_2N_3PSPd$) %C= 32,17 (33,01); %H= 3,09 (3,05); %N= 5,73 (5,77). Condutividade molar, em dmf, $63,2 \Omega cm^2 M$.

3.2.5. Síntese do $[Pd(SCN)(PPh_3)(4-MeT)]SCN$ (**4**):

O complexo **4** foi preparado como descrito para o composto **3**, pela reação entre $[PdCl_2(MeCN)_2]$ (0,050 g, 0,19 mmol), trifenilfosfina (0,051 g, 0,19 mmol), 4-metil-3-tiossemicarbazida (0,020 g, 0,019 mmol) e tiocianato de potássio (0,038 g, 0,38 mmol). Observou-se a formação de uma suspensão laranja, que foi filtrada e os cristais obtidos foram lavados e secos. Rendimento: 70%. Análise Elementar: obtido (calculado para $C_{22}H_{22}N_5PS_3Pd.H_2O$) %C= 43,17 (43,46); %H= 3,75 (3,98); %N= 11,13 (11,52). Condutividade molar, em dmf, $66,0 \Omega cm^2 M$.

3.2.6. Síntese do $[PdCl(PPh_3)(4-PhT)]Cl$ (**5**):

Em um erlenmeyer de 25 mL contendo 0,050 g (0,19 mmol) de $[PdCl_2(MeCN)_2]$ suspenso em 10 mL de clorofórmio foi gotejada uma solução contendo 0,051 g (0,19 mmol) de trifenilfosfina e 0,032 g (0,019 mmol) de 4-fenil-3-tiossemicarbazida em 3,0 mL de uma mistura clorofórmio/metanol em proporção 1:2. A adição dos ligantes deu origem a uma solução límpida de cor amarela. A agitação magnética foi mantida durante 2 h. Após este período, o volume da solução foi reduzido com auxílio de um rotaevaporador e depois filtrado sobre um béquer contendo pentano, em uma razão 1:3 clorofórmio/pentano. Após a redução do solvente foi observada a formação de uma suspensão, esta por sua vez foi filtrada, dando origem a um sólido amarelo, que foi lavado e seco. Rendimento: 75 % (88,0

mg). Análise Elementar: obtido (calculado para $C_{25}H_{24}Cl_2N_3PSPd$, $\frac{1}{2} H_2O$) %C=48,71 (48,76); %H=4,23 (4,09); %N=6,93 (6,82). Condutividade molar, em dmf, $65,6 \Omega cm^2 M$.

3.2.7. Síntese do $[PdBr(PPh_3)(4-PhT)]Br$ (**6**):

Sintetizou-se o composto **5**, em seguida, *in situ*, se adicionou ao meio reacional 0,046 g (0,38 mmol) de brometo de potássio dissolvidos em 2,0 mL de uma mistura de metanol/água 4:1. A reação foi deixada sob agitação magnética por mais 6 h. Após este período a solução apresentava uma coloração laranja, esta por sua vez foi filtrada sobre um béquer contendo pentano, em uma razão 1:3 clorofórmio/pentano. Depois da redução do solvente, observou-se a formação de uma suspensão amarela escura, esta foi filtrada, originando um sólido laranja que foi lavado e seco. Rendimento: 75% (94,0 mg). Análise Elementar: obtido (calculado para $C_{25}H_{24}Br_2N_3PSPd$) %C= 43,56 (43,16); %H= 3,51 (3,48); %N= 6,10 (6,04). Condutividade molar, em dmf, $58,5 \Omega cm^2 M$.

3.2.8. Síntese do $[PdI(PPh_3)(4-PhT)]I$ (**7**):

Após a formação do composto **5**, adicionou-se ao meio reacional 0,064 g (0,38 mmol) de iodeto de potássio dissolvidos em 2,0 mL de uma mistura de metanol/água 4:1. A reação foi deixada sob agitação magnética por mais 2 h. Após este período a solução apresentava uma coloração vermelha, esta por sua vez foi filtrada sobre um béquer contendo pentano, em uma razão 1:3 clorofórmio/pentano. Em seguida, observou-se a formação de uma suspensão vermelha, que foi filtrada e o sólido obtido foi lavado e seco. Rendimento: 80 % (122 mg). Análise Elementar: obtido (calculado para $C_{25}H_{24}I_2N_3PSPd$) %C= 38,52 (38,02); %H= 3,24 (3,06); %N= 5,34 (5,32). Condutividade molar, em dmf, $70,4 \Omega cm^2 M$.

3.2.9. Síntese do $[Pd(SCN)(PPh_3)(4-PhT)]SCN$ (**8**):

O complexo **8** foi sintetizado analogamente aos demais. Preparando o composto **5** e *in situ*, adicionou-se ao meio 0,038 g (0,38 mmol) de tiocianato de potássio dissolvidos em 2,0 mL de uma mistura de metanol/água 4:1. A reação foi deixada sob agitação magnética por mais 2 h. Após este período a solução apresentava uma coloração laranja, esta por sua vez foi filtrada sobre um béquer contendo pentano, em uma razão 1:3 clorofórmio/pentano.

Após a redução do solvente, observou-se a formação de uma suspensão laranja, que foi filtrada e o sólido obtido foi lavado e seco. Rendimento: 75% (88,0 mg). Análise Elementar: obtido (calculado para $C_{27}H_{24}N_5PS_3Pd$) %C= 49,79 (49,73); %H= 3,77 (3,71); %N= 10,34 (10,74). Condutividade molar, em dmf, $62,8 \Omega cm^2 M$.

3.2.10. Síntese do $[PdCl_2(PPh_3)(TAA)]$ (**9**):

Em um erlenmeyer de 25 mL contendo 0,050 g (0,19 mmol) de $[PdCl_2(MeCN)_2]$ suspenso em 10 mL de clorofórmio foi gotejada uma solução contendo 0,051 g (0,19 mmol) de trifenilfosfina e 0,015 g (0,019 mmol) de tioacetamida em 1,0 mL de uma mistura clorofórmio/metanol em proporção 1:1. A adição dos ligantes deu origem a uma solução de cor amarela. A agitação magnética foi mantida durante 2 h. Após este período, o volume da solução foi reduzido, e depois foi filtrada sobre um béquer contendo pentano, em uma razão 1:3 clorofórmio/pentano. Imediatamente foi observada a formação de uma suspensão amarela, que foi filtrada e o sólido foi lavado e seco. Rendimento: 80 % (79 mg). Análise Elementar: obtido (calculado para $C_{20}NH_{20}PSCl_2Pd$) %C=46,75 (46,67); %H=4,09 (3,92); %N=2,26 (2,72). P.f. (°C) = 133. Condutividade molar, em dmf, $16,1 \Omega cm^2 M$.

3.2.11. Síntese do $[PdBr_2(PPh_3)(TAA)]$ (**10**):

Após a formação do composto **9**, como descrito anteriormente, adicionou-se, *in situ*, 0,045 g (0,38 mmol) de brometo de potássio dissolvidos em 1,0 mL de uma mistura de metanol/água 4:1. A reação foi deixada sob agitação magnética por mais 6 h. Após este período, o volume da solução foi reduzido, e depois foi filtrada sobre um béquer contendo pentano, em uma razão 1:3 clorofórmio/pentano. Imediatamente foi observada a formação de uma suspensão laranja, que foi filtrada e o sólido foi lavado e seco. Rendimento: 75% (87 mg). Análise Elementar: obtido (calculado para $C_{20}NH_{20}PSBr_2Pd$) %C=41,72 (40,79); %H=3,75 (3,34); %N=2,07 (2,32). P.f. (°C) = 120. Condutividade molar, em dmf, $28,0 \Omega cm^2 M$.

3.2.12. Síntese do $[PdI_2(PPh_3)(TAA)]$ (**11**):

Analogamente, para a obtenção de **11**, adicionou-se ao meio reacional, contendo o complexo **9**, 0,064 g (0,38 mmol) de iodeto de potássio dissolvidos em 1,0 mL de uma

mistura de metanol/água 4:1. A reação foi deixada sob agitação magnética por mais 2 h. Após este período, o volume da solução foi reduzido, e depois foi filtrada sobre um béquer contendo pentano, em uma razão 1:3 clorofórmio/pentano. Imediatamente foi observada a formação de uma suspensão vermelha, que foi filtrada e o sólido foi lavado e seco. Rendimento: 75% (101 mg). Análise Elementar: obtido (calculado para $C_{20}NH_{20}PSI_2Pd$) %C=34,40 (34,34); %H=3,22 (2,89); %N=1,91 (2,01). P.f. ($^{\circ}C$) = 131. Condutividade molar, em dmf, $23,7 \Omega cm^2 M$.

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 $350^{\circ}C$.

3.3.3. Condutividade Molar:

A condutividade dos complexos foi medida com o condutivímetro Digimed-DM-31 usando soluções de dmf de $1 \times 10^{-3} M$.

3.3.4. Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho:

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos no Espectrofotômetro Nicolet IS5 Thermo Scientific, em um intervalo de número de onda entre $4000 - 400 cm^{-1}$, usando pastilhas de KBr.

3.3.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear:

Os espectros de ressonância magnética nuclear de 1H , ^{13}C e ^{31}P foram registrados no Espectrômetro multinuclear VARIAN, modelo INOVA 500 e Espectrômetro Bruker AVANCE 400. Utilizou-se $dmsO-d_6$, $MeOD-d_4$ e $CDCl_3$ para dissolução das amostras. Os deslocamentos químicos obtidos foram referenciados pelos solventes. O campo magnético utilizado foi de 11,7 T.

3.3.6. Espectrometria de Massa:

Os espectros foram obtidos com ionização por electrospray em modo positivo (ESI⁺) em um espectrômetro Qtof-micro WATERS (3000V) e utilizando calibração interna (H₃PO₄).

3.3.7. 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 1200 °C, obedecendo uma razão de aquecimento de 20 °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 10 mg.

Estes experimentos foram realizados na Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL, sob a supervisão do Prof. Dr. Eduardo Tonon de Almeida.

3.3.8. 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 CuK α ($\lambda = 1.541 \text{ \AA}$) monocromatizada por cristal de grafite, configurado com 40 KV e 30 mA, entre 5 e 70°. Os picos foram comparados com aqueles descritos na base de dados ICDD⁶⁶.

3.3.9. Difração de Raios X de monocristal:

Monocristais de tamanhos adequados de 3 complexos (**3**, **4** e **7**) foram selecionados manualmente. Para os compostos **3** e **4**, os monocristais foram obtidos diretamente da saturação da solução reacional. O monocristal do complexo **7**, foi obtido pela recristalização através da difusão de vapor do éter dietílico a 4 °C em uma solução saturada do composto em metanol. Os dados de **7** foram coletados em um difratômetro modelo Bruker APEX-II CCD, instalado na Université Blaise Pascal – Clermont-Ferrand, França. As medidas foram realizadas usando radiação K α de Mo monocromada por grafite, $\lambda = 0,7107 \text{ \AA}$. Os dados foram corrigidos através de efeitos de polarização de Lorentz e correções empíricas de absorção usando o SCALE3 ABSPACK. A estrutura foi resolvida por métodos diretos utilizando-se o programa SHELXS e refinada com o SHELXS-97⁶⁷. Os dados de **3** e **4** foram coletados em um difratômetro modelo Enraf-Nonius Kappa-CCD instalado no Departamento

de Física e Informática – Grupo de Cristalografia de Pequenas Moléculas, do Instituto de Física de São Carlos do Prof. Dr. Javier Ellena. As medidas foram realizadas usando radiação $K\alpha$ de Mo monocromada por grafite, $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$. O programa COLLECT⁶⁸ foi utilizado para a realização das coletas de dados e o sistema de programas HKL Denzo-Scalepack⁶⁹ para a indexação e integração das reflexões. O programa SHELXS-97⁶⁷ foi utilizado para resolver as estruturas, refinadas com a matriz completa de mínimos quadrados em F^2 com o SHELXS-97⁷⁰. A validação de cada estrutura foi feita utilizando-se o programa PLATON⁷¹ e dentro do programa WingX⁷² os programas MERCURY⁷³ e ORTEP-3⁷⁴ foram utilizados para gerar as imagens.

3.3.10. Estratégia Computacional:

Neste trabalho, a abordagem de química quântica empregada para se determinar as estruturas moleculares foi a de modificação de troca funcional de Becke pelo método Handy OPTX^{75,76}, com a correlação funcional (III) de Vosko, Wilk e Nusair⁷⁷. A base fixa usada para os cálculos foram: 4s para H (²S)⁷⁸, [5s4p] para C (³P), N (⁴S), O (³P)⁷⁸, [9s, 7p] para P (⁴S) [11s7p] para Cl (²P)⁷⁹, [15s11p6d] para Br (²P), [16s9p5d]⁸⁰ para I (²P)⁸⁰, [14s8p] para S (³P) e [12s8p5d] para Pd (¹S)⁷⁸. As funções difusas para o átomo de paládio (¹S) foram calculadas de acordo com o processo descrito literatura^{78,81}, e esses valores são: $\alpha_s = 0,020546$, $\alpha_p = 0,1004328$, $\alpha_d = 0,5954813$. A fim de melhor descrever as propriedades do composto na aplicação dos cálculos, foi necessário incluir funções de polarização^{78,82} para todos os átomos dos compostos.

As funções de polarização são: $\alpha_p = 0.33353749$ para H (²S), $\alpha_d = 0,72760279$, $\alpha_d = 0,35416230$, $\alpha_d = 0,36059494$, $\alpha_d = 0,37832563$, $\alpha_d = 0,47236655$, $\alpha_f = 0,42912802$, $\alpha_f = 0,51068618$, para C (³P), N (⁴S), O (³P), P (⁴S), Cl (²P), Br (²P), I (²P), respectivamente, e $\alpha_f = 0.14057699$ para átomo de Pd (¹S). O papel de um conjunto de base é um ponto crucial em estudos teóricos de complexos de metais, uma vez que a descrição da configuração do metal no complexo difere do estado neutro.

A otimização da geometria foi calculada utilizando o algoritmo otimizado de Berny⁸³ e a geometria resultante é mostrada pelo software GaussView 5.0.2 W⁸⁴.

3.3.11. Atividade citotóxica:

As linhagens tumorais LM3 e LP07 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 $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina, em estufa a 37°C , com atmosfera úmida e tensão constante de 7,5% de CO_2 . Foram realizados repiques três vezes por semana. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco), utilizando corante azul de Tripán, a 0,04 % em PBS, e ajustado a uma concentração de 3.10^4 células mL^{-1} em meio MEM.

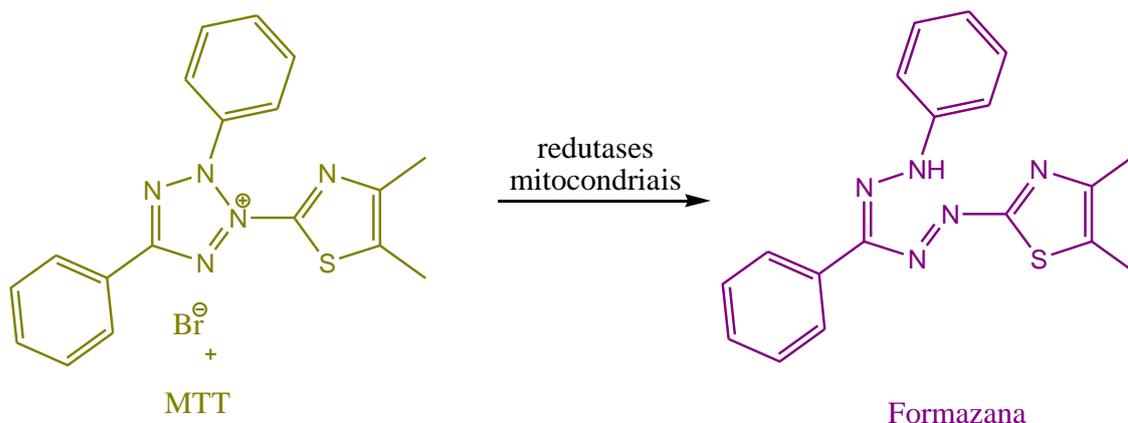
As soluções-mãe foram preparadas em concentração máxima de dmsó de 2,5% v/v, conforme os métodos convencionais. As soluções foram diluídas em meio de cultura apropriado (MEM) momentos antes da diluição e aplicação das amostras nos testes de citotoxicidade.

A determinação da citotoxicidade dos compostos de Pd(II) sobre células tumorais (LM3 e LP07) foi quantificado pela capacidade das células vivas reduzirem o MTT⁸⁵. As células tumorais LM3 e LP07 foram adicionadas em placas de 96 poços 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. O sal de tetrazólio sofre metabolização pelas redutases mitocondriais das células vivas formando cristais de formazana (Figura 19). Três horas depois, o conteúdo da placa foi novamente vertido e $100 \mu\text{L}$ de álcool isopropílico foram adicionados a cada orifício para solubilizar os cristais 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.

Os valores correspondentes à concentração que reduz em 50% a viabilidade celular (IC_{50}) dos compostos foram quantificados através de curvas dose-resposta Concentração da Amostra x Viabilidade Celular. O experimento foi realizado em quintuplicata.

Esta parte do trabalho foi desenvolvida no Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP), com a colaboração da Profa. Dra. Iracilda Z. Carlos.

Figura 19 - Estruturas do MTT e formazana envolvidas no processo de quantificação da viabilidade celular



Fonte: Autor

3.3.12. Reação com a guanosina:

Os complexos de **1-8** (0,033 mmol, 1,0 equiv.) foram dissolvidos em dmf (2,0 mL), em seguida, foram adicionados a estas soluções 2,0 equivalentes de nitrato de prata (11,0 mg) dissolvidos em dmf (1,0 mL). As misturas reacionais ficaram sob agitação por 4 horas sob o abrigo da luz. Depois disto, os sólidos formados foram filtrados através de filtros Millipore gerando soluções límpidas amarelas. A estas soluções foram adicionados 2,0 equiv. de guanosina (9,0 mg, 0,066 mmol), dissolvida em dmf a quente. As reações foram agitadas por 16 h. Posteriormente, o solvente foi eliminado com o auxílio de uma bomba de vácuo e o produto resultante foi redissolvido em metanol e analisado por RMN de ^1H e espectrometria de massas.

Esta parte do trabalho foi desenvolvida no “Laboratoire SEESIB (Synthèse et Étude de Systèmes à Intérêt Biologique)”, na Université Blaise Pascal, em Clermont-Ferrand (França) sob supervisão do Dr. Arnaud Gautier.

3.3.13. Interação com plasmídeo superenovelado:

Para a realização dos experimentos de interação com o DNA foram feitas soluções estoques de 2000 μM e 200 μM dos complexos em dmf/ H_2O , 1:1 v/v. 1 μL de cada solução foi adicionado em 1 μL de plasmídeo pNFkB-luc na presença de 18 μL de KClO_4 (10^{-2}M), em seguida, estas amostras foram incubadas por 15 minutos e 24 horas. Após este período, foi adicionado 1 μL do corante blue/Orange loading dye (Promega), para auxiliar a inserção dos compostos no gel. Em seguida, as amostras nas concentrações 10 μM e 100 μM foram

analisadas pela eletroforese em gel de agarose (1%) a 100 V. O gel foi revelado com brometo de etídio (BET) sobre luz ultra-violeta.

Esta parte do trabalho foi desenvolvida no “Laboratoire SEESIB (Synthèse et Étude de Systèmes à Intérêt Biologique)”, na Université Blaise Pascal, em Clermont-Ferrand (França) sob supervisão do Dr. Arnaud Gautier.

3.3.14. Inibição das enzimas DNA-Topoisomerases I e II:

Reações entre o DNA pBR322 superenovelado (0,5 μL), topoisomerase II (1 μL) e os compostos em diversas concentrações (24,5 μL) foram efetuadas em tampão de ensaio (3,0 μL) contendo 50 mmolL^{-1} de Tris.HCl, pH = 7,5, 125 mM de NaCl, 10 mM de MgCl_2 , 5 mM de ditioneitol (DTT) e 100 mgmL^{-1} de albumina, na presença de moléculas de ATP (1 μL). Controles negativo (plasmídeo sem a presença da enzima e dos compostos) e positivo (plasmídeo na presença da enzima sem os compostos) foram feitos para comparação e avaliação da eficácia dos compostos.

As amostras foram incubadas por 40 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 3 μL de SDS (dodecil sulfato de sódio), 15 μL de STEB (40% de sacarose, 100 mM de Tris.HCl, pH = 7,5, 1 mM de EDTA, 0,5 mgmL^{-1} de azul de bromofenol) e 60 μL da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v). Em seguida as amostras foram centrifugadas e com o sobrenadante foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1%, em solução tampão de TBE 1x (Tris/Borato/EDTA) pH = 8,2 a 60 V por 2 h. O gel foi corado em uma solução de brometo de etídio (1 mgmL^{-1}), revelado e analisado em luz ultravioleta pelo Alpha Imager EP System da Cell Biosciences.

O procedimento do teste de inibição para a topo I é análogo ao descrito anteriormente, no entanto não é necessária a adição do ATP para que a enzima realize a quebra de uma fita do DNA.

Esta parte do trabalho foi desenvolvida no Departamento de Bioquímica e Tecnologia do Instituto de Química de Araraquara (UNESP), com a colaboração do Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido.

3.3.15. Inibição da enzima Catepsina B:

A atividade inibitória dos complexos selecionados **3** e **7**, foi medida frente a enzima catepsina B de fígado humano, usando o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA (MCA) (Calbiochem)⁸⁶. Primeiramente, 1 μL da enzima foi diluído em 500 μL de tampão de acetato

de sódio (100 mM, pH = 5,5), em seguida, foram adicionados 2,5 μ L de ditionitrieto (DTT) (500 μ M). Esta solução ficou incubada por 3 minutos a 37 °C, seguidamente, foram adicionados 2 μ L de substrato MCA e a fluorescência do 7-amino,4-metilcumarina liberado do substrato, após hidrólise, foi medida usando um Espectrofotômetro Hitachi F-2500 (λ_{ex} = 380 nm e λ_{em} = 460 nm), imediatamente, foi-se adicionando os complexos em diversas concentrações e a fluorescência resultante monitorada pelo espectrofotômetro.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados de IC₅₀, foram obtidos através de curvas dose-resposta, % de inibição x concentração dos complexos.

Esta parte do projeto foi desenvolvida no Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, com a colaboração do Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva.

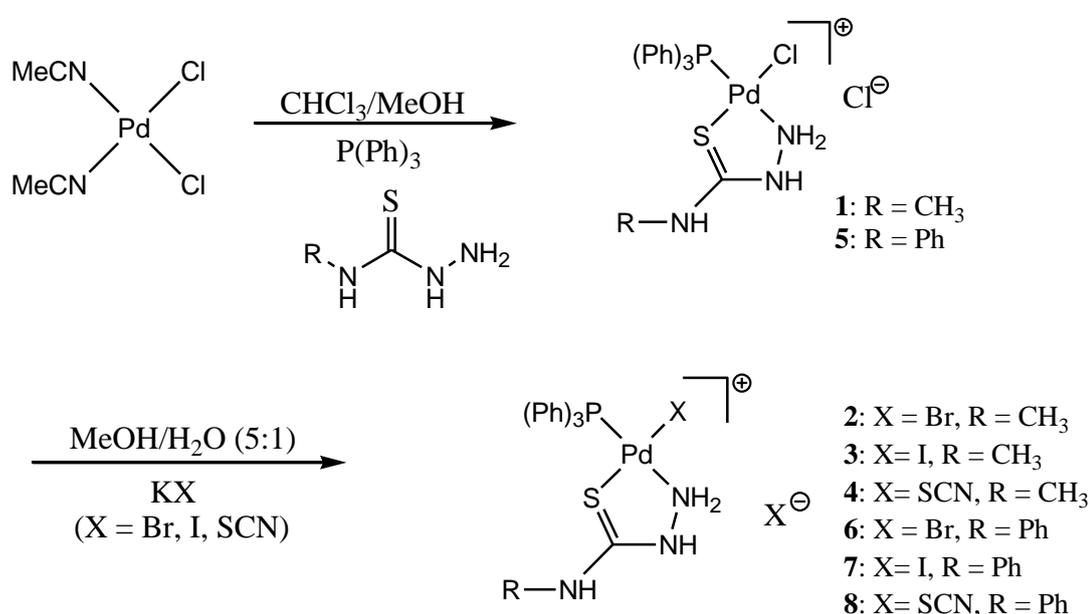
4. Resultados e Discussão

4.1. Síntese e Caracterização dos compostos 1-8:

4.1.1. Sínteses:

Os complexos de **1-8** desejados foram obtidos a partir de sínteses em duas etapas, partindo do composto precursor bis(acetonitrila)dicloropaládio(II) como é mostrado no esquema 1.

Esquema 1 - Rota sintética dos complexos **1-8**



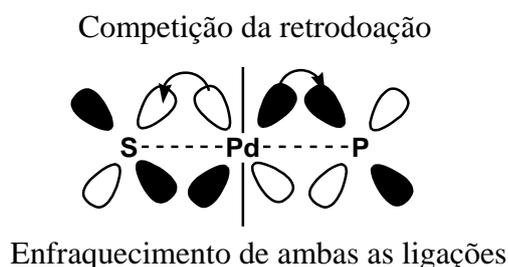
Fonte: Autor

Durante a reação, ambos os ligantes, tiossemicarbazidas e a trifenilfosfina deslocaram os ligantes lábeis acetonitrila e um dos átomos de cloro gerando os compostos **1** ($\text{R}=\text{CH}_3$) e **5** ($\text{R}=\text{Ph}$). Com a coordenação dos ligantes quelatos, N,S-doadores, formou-se um anel de cinco membros na estrutura dos compostos, o que resulta em um aumento da estabilidade termodinâmica. Sugere-se que a presença de grupos volumosos (anéis aromáticos) da fosfina nas adjacências do poliedro de coordenação do íon Pd(II) deve diminuir a cinética das reações de troca de ligantes no meio biológico por dificultar a formação do intermediário pentacoordenado. Dessa forma, o composto apresentaria uma resistência maior aos processos de hidrólise e/ou troca de ligantes em solução, aumentando

as chances do composto de atingir seu(s) alvo(s) farmacológico(s) com sua estrutura molecular relativamente intacta.

Espera-se que a trifenilfosfina se posicione trans ao átomo de nitrogênio, uma vez que a situação inversa geraria uma competição entre os átomos de S e P pelos elétrons disponíveis na subcamada d do átomo metálico, enfraquecendo as duas ligações Pd-S e Pd-P (Figura 20)⁸⁷. Na segunda etapa reacional, o íon de cloro restante é facilmente substituído pelo bromo (**2 e 6**), iodo (**3 e 7**) e tiocianato (**4 e 8**), pela adição de dois equivalentes do sal de potássio apropriado. Esta fácil substituição ocorre devido a maior nucleofilicidade apresentada por estes ligantes em relação ao cloro⁸⁸. E também por serem bases de Pearson mais moles que o Cl, visto que o íon de Pd(II) é um ácido mole possuindo uma maior tendência em se ligar a bases moles³⁵.

Figura 20 - Competição dos elétrons do íon de Pd(II)



Fonte: Autor

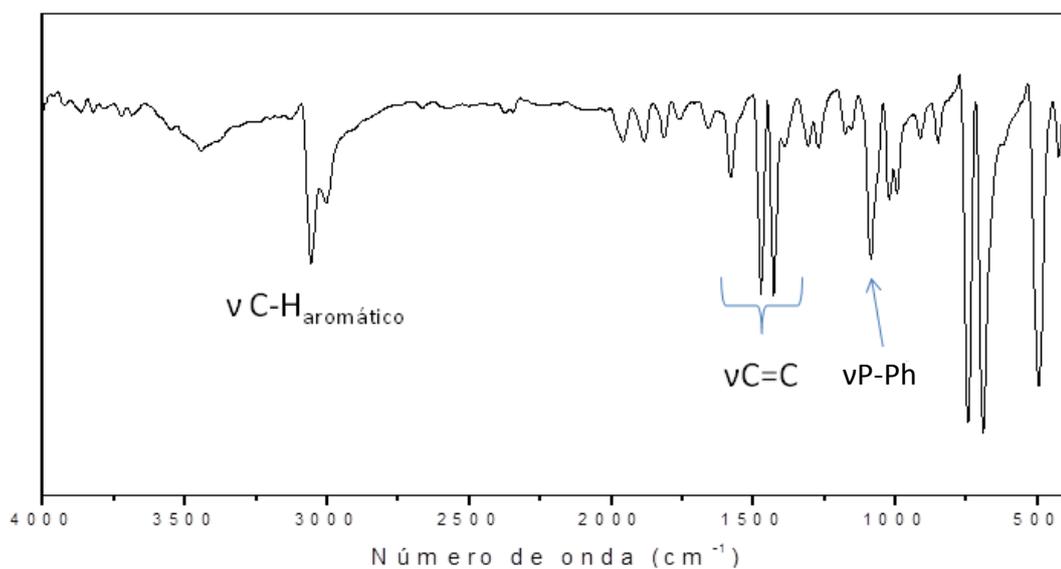
Sugere-se que o mecanismo de substituição destes ligantes aniônicos envolva a formação de um intermediário pentacoordenado (mecanismo associativo)²², sendo típico, principalmente, em reações que envolvem complexos d^8 , como é o caso do Pd(II). Após a associação do novo ligante, ocorre a eliminação, no caso, do íon cloreto.

Todos os compostos são sólidos, estáveis ao ar e possuem coloração que varia do amarelo ao vermelho. São parcialmente solúveis em metanol, etanol, acetona e clorofórmio e bem solúveis em dmf e dmsu. A condutividade molar dos complexos de **1-8** em dmf está entre $50 - 71 \Omega\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ de acordo com a natureza de eletrólitos do tipo 1:1⁸⁹⁻⁹¹.

4.1.2. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho:

O espectro no IV do ligante trifenilfosfina (PPh_3) está ilustrado na Figura 21. Os principais modos vibracionais da molécula de PPh_3 foram atribuídos e encontram-se na Tabela 3.

Figura 21 - Espectro vibracional da trifenilfosfina na região do infravermelho



Fonte: Autor

As moléculas polifenílicas do tipo $\text{E}(\text{Ph}_3)_n$, apresentam 30 modos vibracionais, dos quais 24 envolvem somente átomos de hidrogênio e carbono. Já as bandas em 1088 cm^{-1} e 426 cm^{-1} são referentes as vibrações que além de envolverem movimentos dos átomos de carbono e hidrogênio, contêm contribuições significativas de estiramento da ligação P-fenil. Enquanto que a banda em 498 cm^{-1} apresenta contribuições da deformação da ligação P-fenil⁹².

Tabela 3 - Dados obtidos por espectroscopia no IV da trifenilfosfina e suas respectivas atribuições

ν (cm ⁻¹)	Atribuição
3057; 3005	ν CH
1580; 1474; 1429; 1392	ν C=C
1273; 1178; 1155; 1027	β CH
1088	ν P-Ph
995	ν_{anel}
914; 851; 746	γ CH
692	γ_{anel}
622	β_{anel}
498	γ P-Ph
426	ν P-Ph

ν = estiramento simétrico, β = deformação no plano, γ = deformação fora do plano.

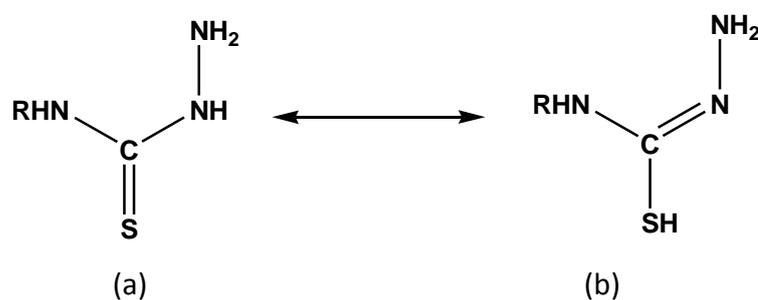
Fonte: Autor

Compostos orgânicos portadores do grupo tioamida (HNCS) dão origem a quatro bandas características no espectro no IV⁹³. A banda **Tioamida I** localizada em aproximadamente 1500 cm⁻¹ possuindo contribuições dos modos vibracionais δ NH e ν C=N. A banda **Tioamida II** aparece na região de 1300-1200 cm⁻¹ e apresenta contribuições dos modos vibracionais ν C=N + δ NH + δ CH. Espera-se em 1000 cm⁻¹ a presença da banda **Tioamida III** com significativa contribuição dos modos vibracionais ν C=N + ν C=S. A banda **Tioamida IV**, com forte contribuição do modo ν C=S, é encontrada no intervalo espectral de 850-700 cm⁻¹.

As variações encontradas para essas bandas serão de suma importância no entendimento do modo de coordenação dos ligantes utilizados neste trabalho. Sabe-se que as tiosemicarbazidas se coordenam preferencialmente de maneira bidentada, via átomo de enxofre e nitrogênio hidrazinico, podendo ser de forma neutra ou aniônica⁹⁴⁻⁹⁶. Em raros casos encontram-se complexos com o ligante coordenado de maneira neutra monodentado, via átomo de enxofre⁹⁷.

A estrutura das tioamidas apresentam contribuições das estruturas canônicas de ressonância tiona-tiol, como exemplificado no Esquema 2.

Esquema 2 - Estruturas canônicas de ressonância da tiossemicarbazida tiona(a)-tiol(b)

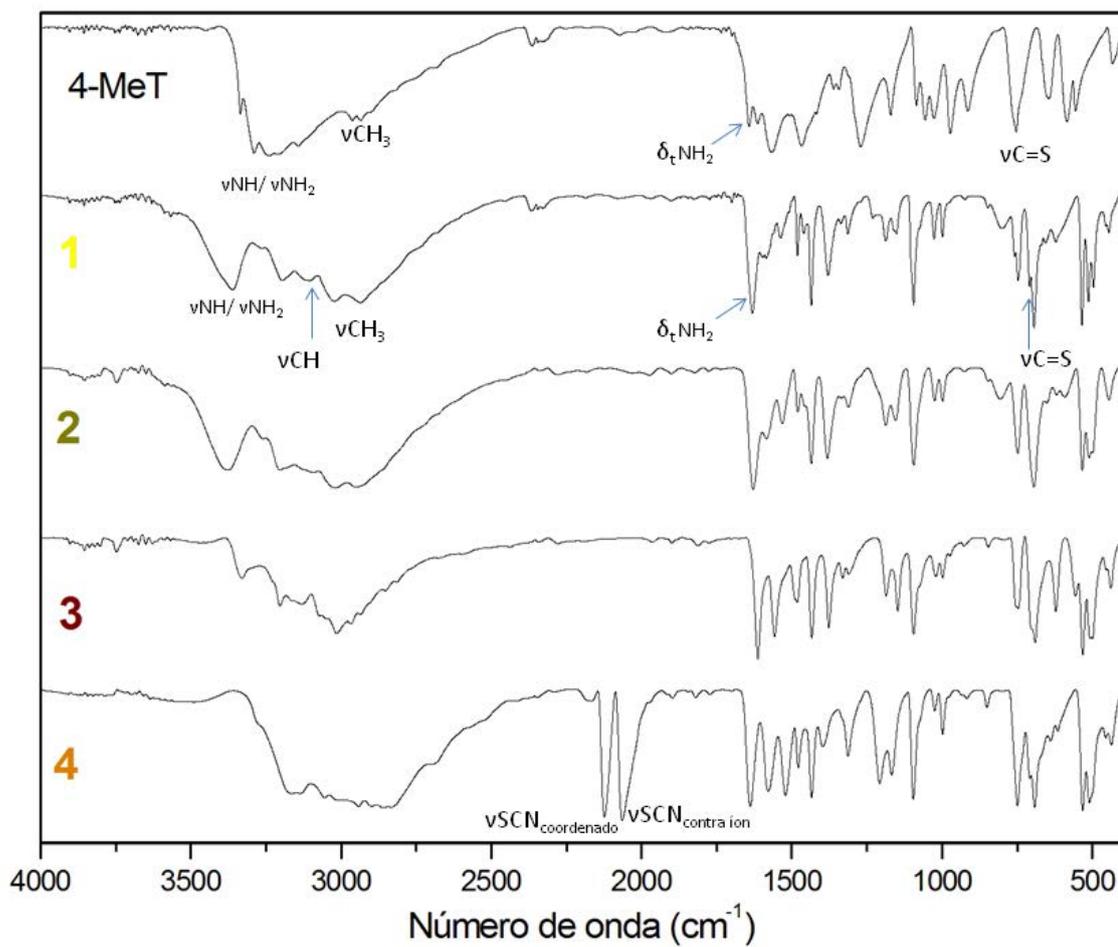


Fonte: Autor

Tendo como base o equilíbrio acima, se a coordenação ocorre via átomo de enxofre, as contribuições da estrutura “b” aumentam, devido à doação de um par de elétrons do enxofre ao metal, provocando um enfraquecimento da ligação C=S e produzindo um caráter parcial de ligação C=N ao nitrogênio da tioamida⁹⁸.

Os espectros do ligante 4-metil-3-tiossemicarbazida e dos complexos **1-4** estão apresentados na Figura 22. Os principais modos vibracionais das moléculas foram atribuídos e encontram-se na Tabela 4.

Figura 22 - Espectros vibracionais na região de 4000-400 cm^{-1} do IV para o ligante e os compostos 1-4



Fonte: Autor

Tabela 4 - Principais frequências na região do infravermelho do ligante 4-MeT e dos complexos 1-4

4-MeT	1	2	3	4	Atribuição
3290	3361	3376	3330	-	vNH
3238	3265	3259	-	-	vNH
3211	3196	3203	3203	3166	v _{as} NH ₂
3143	3105	3093	3131	3136	v _s NH ₂
-	3023	3018	3014	3054	vCH _{aromático}
2963	-	2953	2967	-	v _{as} CH ₃
2935	2936	-	2935	2942	v _s CH ₃
-	-	-	-	2124	vSCN
-	-	-	-	2065	vSCN _{livre}
1642	1631	1628	1613	1638	δ _t NH ₂
-	1481	1480	1482	1479	vCC _{aromático}
-	1095	1094	1095	1096	Modo q
-	747	748	754	749	γCH _{aromático}
754	709	-	701	708	vCS

v_{as} = estiramento assimétrico, v_s = estiramento simétrico, δ_{as} = deformação angular assimétrica no plano δ_t = deformação tesoura, γ = deformação fora do plano

Fonte: Autor

As principais frequências observadas no espectro do ligante livre, 4-metil-3-tiossemicarbazida (4-MeT), são: a) as duas bandas atribuídas aos estiramentos -NH, ocorrendo em 3289 e 3238 cm⁻¹; b) os estiramentos assimétrico e simétrico do grupo -NH₂, ocorrendo em 3211 e 3143 cm⁻¹, respectivamente; c) os estiramentos do grupo -CH₃ (2963 cm⁻¹ e 2935 cm⁻¹); d) a deformação “tesoura” do -NH₂ (1642 cm⁻¹); e) o estiramento C-NH (**Tioamida II** em 1362 cm⁻¹); f) o estiramento característico da banda da **Tioamida IV** (C=S) em 754 cm⁻¹.

A análise dos espectros no IV dos compostos 1-4 (Figura 22) permitiu evidenciar a coordenação da trifenilfosfina devido à presença de suas bandas características na região de 1481 (vCC), 1095 (q) e 747 cm⁻¹ (γCH)⁹⁹, bem como a do ligante 4-metil-3-tiossemicarbazida, mesmo tendo grande parte de suas bandas encobertas pelas absorções da PPh₃, pois suas

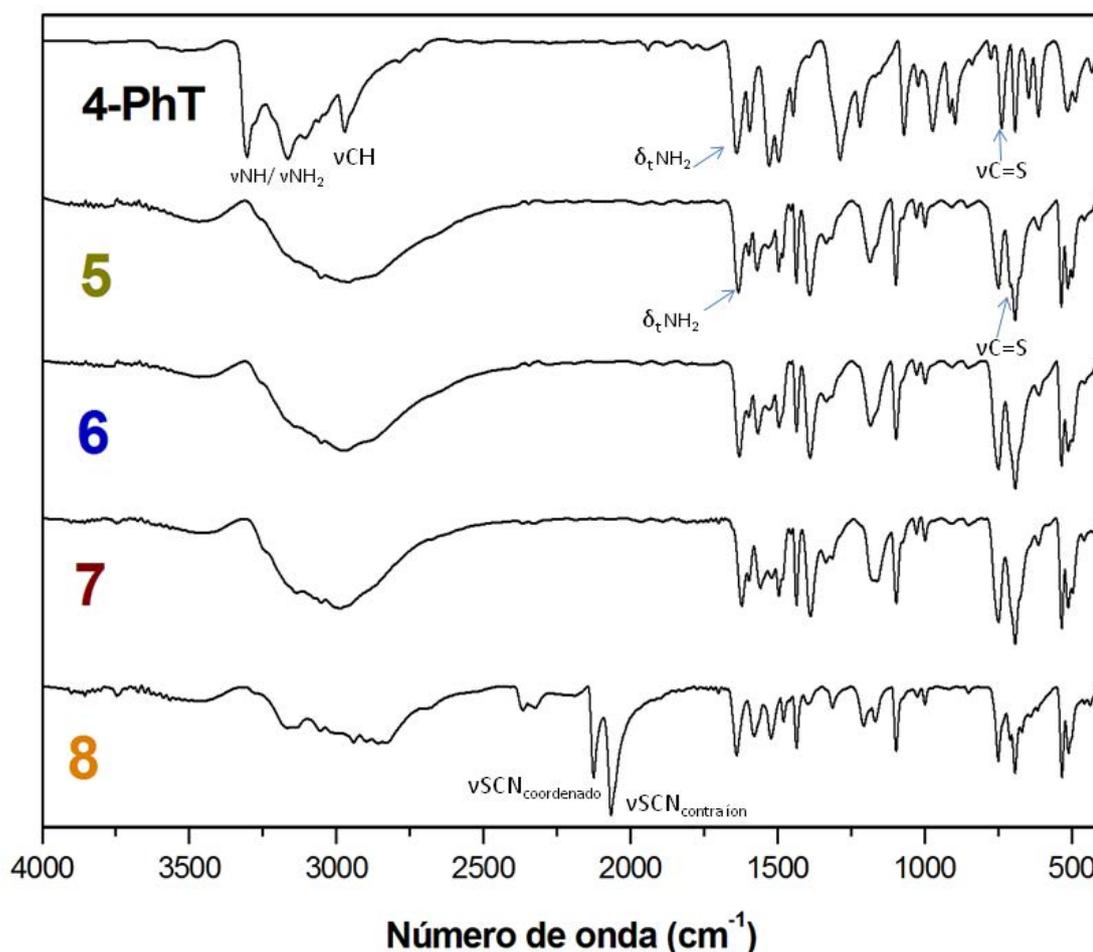
bandas são muito menos intensas. As principais bandas deslocadas nos espectros dos complexos que nos permite evidenciar a coordenação do ligante quelato são: os estiramentos assimétricos e simétricos do grupo -NH_2 ocorrendo entre $3203\text{-}3136\text{ cm}^{-1}$ e $3131\text{-}3055\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. Nota-se que em todos os espectros houve um deslocamento para frequências menores indicando uma possível coordenação pelo átomo de nitrogênio. O mesmo fenômeno acontece com a deformação tesoura do grupo NH_2 que ocorre entre $1631\text{-}1613\text{ cm}^{-1}$, nos complexos e em 1642 cm^{-1} no ligante livre. Outra importante banda que sofre deslocamento para baixa frequência é atribuída ao estiramento $\nu\text{C}=\text{S}$ ocorrendo em $709\text{-}701\text{ cm}^{-1}$ para os complexos e em 754 cm^{-1} para o ligante. O deslocamento destas bandas evidencia a coordenação do ligante 4-metil-3-tiossemicarbazida de maneira bidentada ao átomo de paládio via átomo de enxofre e pelo átomo de nitrogênio do grupo NH_2 . Tais deslocamentos podem ser explicados pelo enfraquecimento das ligações $\text{C}=\text{S}$ e N-H_2 nos complexos, devido à ligação ao paládio.

Com relação ao tiocianato complexo **4**, é importante salientar que este pseudo-haleto 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). A formação da ligação Pd-NCS é caracterizada pelas presenças das bandas $\nu_{\text{as}}(\text{SCN})$ e $\nu_{\text{s}}(\text{SCN})$ na região de $2090\text{-}2060\text{ cm}^{-1}$ e $854\text{-}830\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. Quando coordenado pelo átomo de enxofre (Pd-SCN), a banda $\nu_{\text{as}}(\text{SCN})$ localiza-se em torno de $2100\text{-}2120\text{ cm}^{-1}$ e a $\nu_{\text{s}}(\text{SCN})$ encontra-se no intervalo espectral de $696\text{-}711\text{ cm}^{-1}$. Atuando como ponte, a banda $\nu_{\text{as}}(\text{SCN})$ desloca-se para regiões acima de 2130 cm^{-1} ¹⁰⁰.

No espectro do composto **4** aparecem duas bandas bem intensas, uma em 2124 cm^{-1} atribuída ao estiramento assimétrico do grupo tiocianato (SCN) quando ele está coordenado pelo átomo de enxofre de modo terminal, e a outra ocorre em 2065 cm^{-1} referente ao $\nu_{\text{as}}(\text{SCN})$ que está presente na molécula como contra íon¹⁰¹, indicando que a coordenação do ligante 4-metil-3-tiossemicarbazida se dá de maneira neutra.

Os espectros dos complexos **5-8** e do ligante 4-fenil-3-tiossemicarbazida estão ilustrados na Figura 23.

Figura 23 - Espectros vibracionais na região de 4000-400 cm^{-1} do IV para o ligante e os compostos 5-8



Fonte: Autor

As principais frequências observadas no espectro do ligante livre, 4-fenil-3-tiosemicarbazida (4-PhT), são: a) a banda atribuída ao estiramento $-\text{NH}$ em 3303 cm^{-1} ; b) os estiramentos assimétrico e simétrico do grupo $-\text{NH}_2$, ocorrendo em 3164 e 3106 cm^{-1} , respectivamente; c) o estiramento $-\text{CH}$ aromático em 3060 cm^{-1} ; d) a deformação “tesoura” do $-\text{NH}_2$ (1638 cm^{-1}); e) os estiramentos $-\text{CC}$ do anel aromático entre $1594\text{-}1446 \text{ cm}^{-1}$; f) o estiramento da **Tioamida IV** $\text{C}=\text{S}$ em 737 cm^{-1} .

Analogamente aos complexos **1-4** a presença das bandas em 1095 (ν_{CH}) e 747 cm^{-1} (ν_{CH}) confirmam a ligação da trifenilfosfina ao metal. A coordenação do ligante 4-PhT é evidenciada principalmente pelos deslocamentos da deformação tesoura do grupo NH_2 , de 1638 cm^{-1} (ligante livre) para $1633\text{-}1621 \text{ cm}^{-1}$ (complexos) e pelo deslocamento para baixa frequência do estiramento $\nu_{\text{C}=\text{S}}$ ocorrendo em $709\text{-}706 \text{ cm}^{-1}$ nos espectros no IV dos complexos e em 737 cm^{-1} para o ligante. O deslocamento destas bandas sugere uma

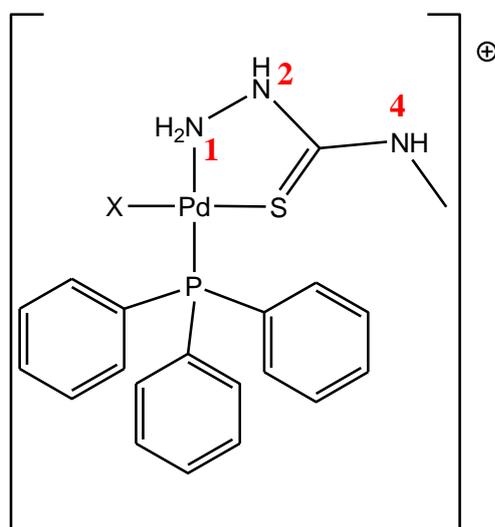
coordenação do ligante 4-fenil-3-tiossemicarbazida de maneira bidentada ao átomo de paládio via átomo de enxofre e pelo átomo de nitrogênio do grupo NH_2 ¹⁰². Tais deslocamentos podem ser explicados pelo enfraquecimento das ligações C=S e N-H₂ nos complexos, devido à ligação ao paládio. A região entre 3400-2800 cm^{-1} mostra que os complexos estão hidratados, devido a presença de uma banda bem alargada, característica do estiramento O-H de moléculas de água. Além disso, o alargamento destas bandas também pode ser resultado de ligações de hidrogênio entre as moléculas do composto.

No espectro do composto **8** aparecem duas bandas bem intensas, semelhante ao composto **4**, uma em 2128 cm^{-1} atribuída ao estiramento assimétrico do grupo tiocianato (SCN) quando ele está coordenado pelo átomo de enxofre, e a outra ocorre em 2066 cm^{-1} referente ao $\nu_{\text{as}}(\text{SCN})$ atuando como contra íon¹⁰¹.

4.1.3. Espectroscopia de RMN de ^1H :

Os sinais de RMN de ^1H dos complexos de **1-4** foram atribuídos de acordo com a numeração do esquema representado pela Figura 24.

Figura 24 - Esquema de numeração para os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H



Fonte: Autor

Os espectros de RMN de ^1H do ligante 4-MeT e dos compostos, $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(4\text{-MeT})]\text{Cl}$ (**1**), $[\text{PdBr}(\text{PPh}_3)(4\text{-MeT})]\text{Br}$ (**2**), $[\text{PdI}(\text{PPh}_3)(4\text{-MeT})]\text{I}$ (**3**) e $[\text{Pd}(\text{SCN})(\text{PPh}_3)(4\text{-MeT})]\text{SCN}$ (**4**),

obtidos em $\text{dmso-}d_6$ estão representados pelas Figuras 25-29, respectivamente. Os deslocamentos químicos e suas respectivas atribuições estão compilados na Tabela 5.

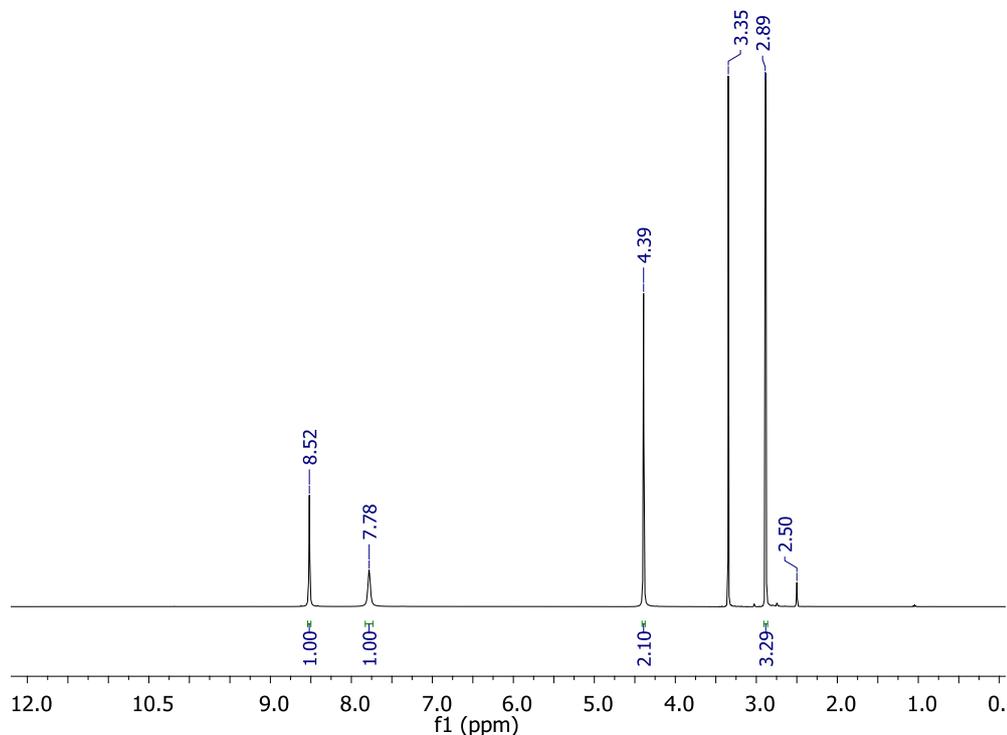
Tabela 5 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H para os compostos 4-metil-3-tiossemicarbazida, **1-4**

4-MeT	1	2	3	4	Atribuição
2,89 (s) [3H]	2,70 (s) [3H]	2,71 (s) [3H]	2,72 (s) [3H]	2,74 (s) [3H]	H _{metila}
-	7,54-7,64 (m) [15H]	7,54-7,64 (m) [15H]	7,54-7,66 (m) [15H]	7,60-7,63 (m) [15H]	H _{aromáticos}
4,39 (s) [2H]	8,49 (s) [2H]	8,49 (s) [2H]	8,46 (s) [2H]	8,29 (s) [2H]	H1
7,78 (s) [1H]	9,14 (s) [1H]	9,17 (s) [1H]	9,19 (s) [1H]	9,18 (s) [1H]	H4
8,52 (s) [1H]	11,14 (s) [1H]	11,06 (s) [1H]	11,06 (s) [1H]	-	H2

s = singlete; m = multipleteo; [] = integração

Fonte: Autor

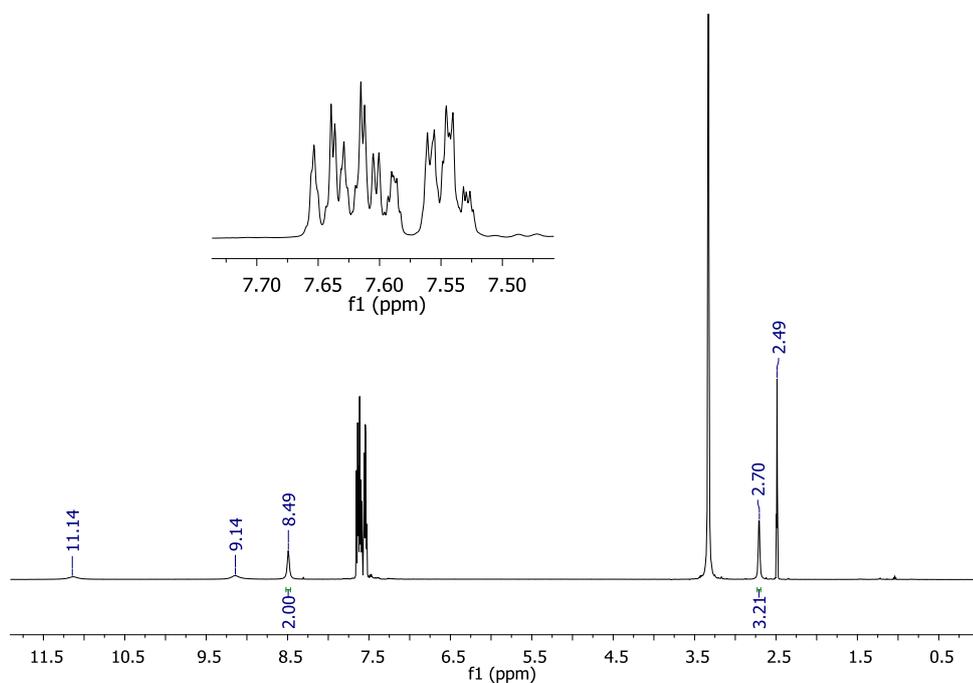
Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H do ligante 4-MeT em $\text{dmso-}d_6$



Fonte: Autor

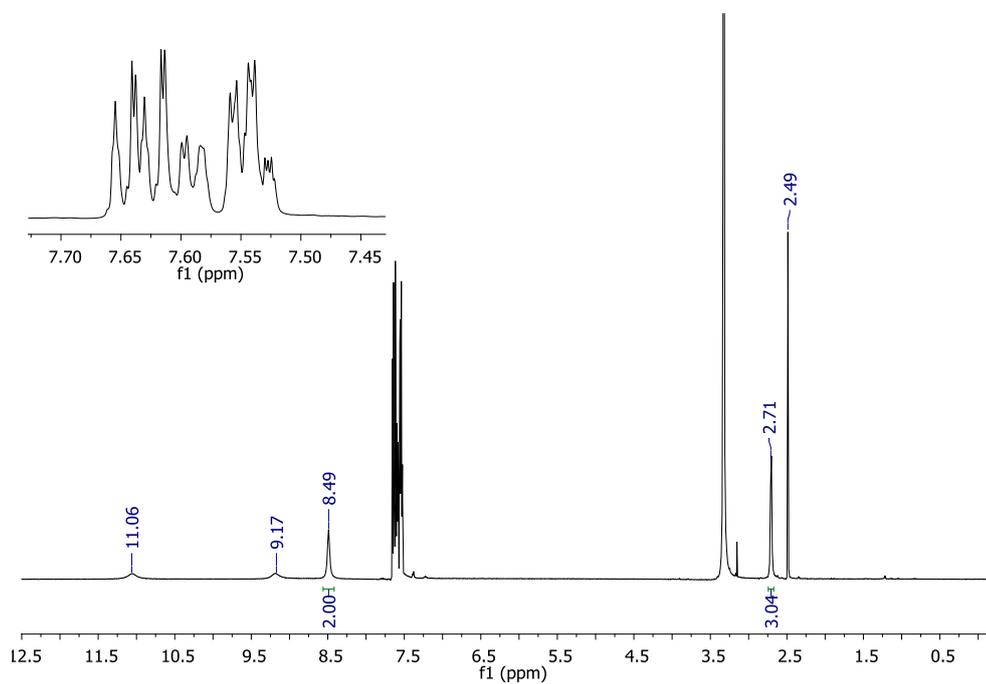
Analisando o espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H do ligante livre (Figura 25) notam-se quatro sinais referentes aos hidrogênios da molécula. Dois singletos em campo baixo atribuídos aos hidrogênios dos grupos NH, ocorrendo em 8,52 ppm para o H2 e 7,78 ppm para o H4. O singlete em 4,39 ppm se refere aos dois hidrogênios do grupo NH_2 e em campo mais alto aparece o singlete referente aos hidrogênios da metila (2,89 ppm). Além destes sinais o espectro apresenta outros dois, um bem intenso em 3,35 ppm referente ao deslocamento químico dos hidrogênios das moléculas de água encontradas no solvente utilizado e o sinal em 2,5 ppm é atribuído ao próprio solvente, o $\text{dms}\text{-}d_6$ ¹⁰³.

Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H do complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(4\text{-MeT})]\text{Cl}$ em $\text{dms}\text{-}d_6$



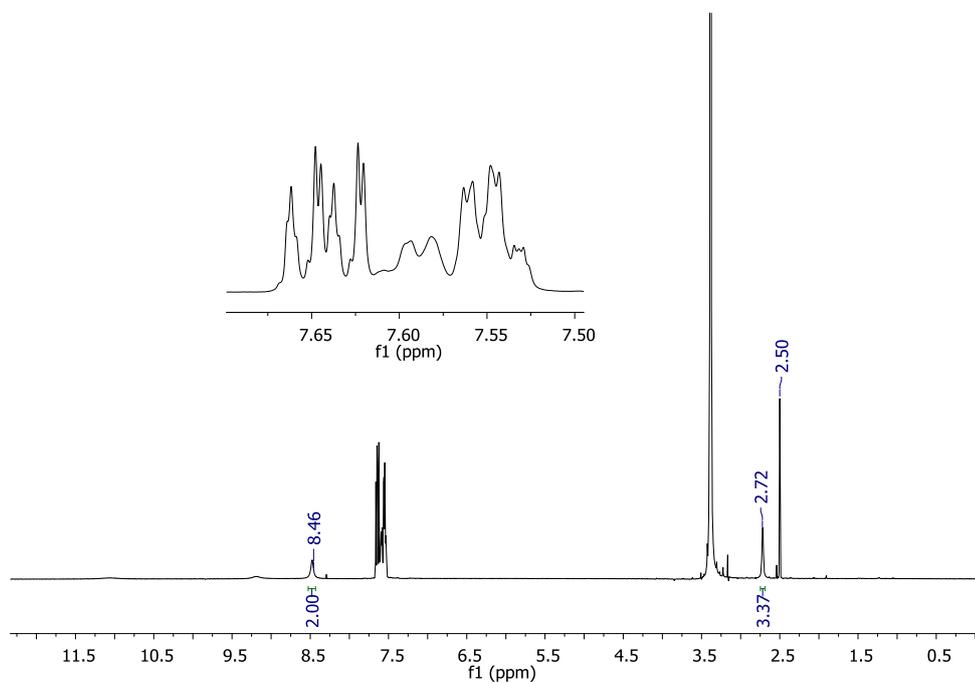
Fonte: Autor

Figura 27 - Espectro de RMN ^1H do complexo $[\text{PdBr}(\text{PPh}_3)(4\text{-MeT})]\text{Br}$ em $\text{dms}\text{-d}_6$



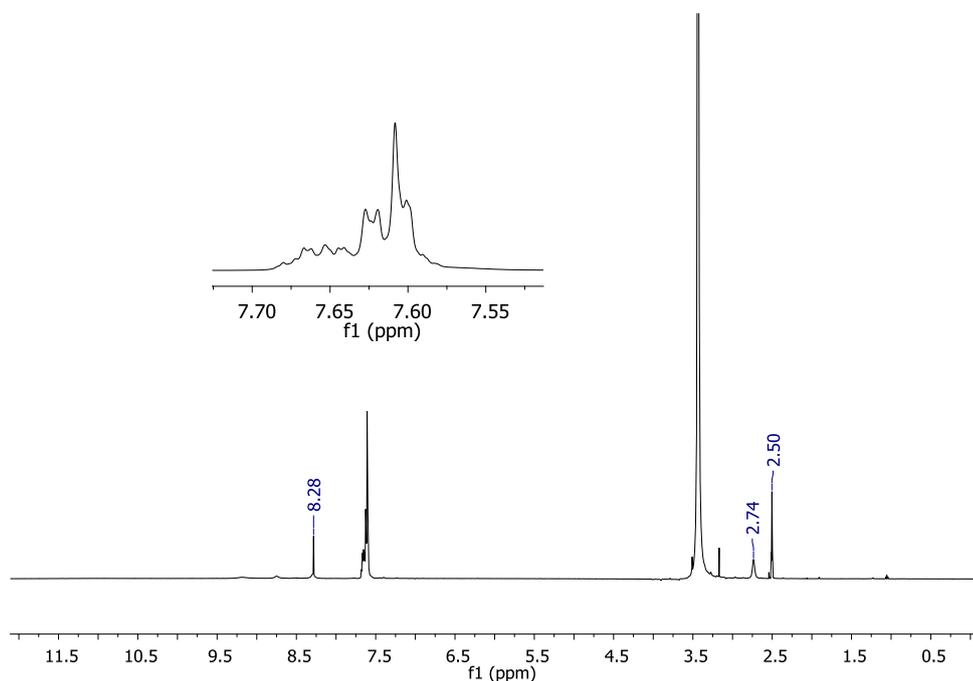
Fonte: Autor

Figura 28 - Espectro de RMN ^1H do complexo $[\text{PdI}(\text{PPh}_3)(4\text{-MeT})]\text{I}$ em $\text{dms}\text{-d}_6$



Fonte: Autor

Figura 29 - Espectro de RMN ^1H do complexo $[\text{Pd}(\text{SCN})(\text{PPh}_3)(4\text{-MeT})](\text{SCN})$ em $\text{dms}\text{-d}_6$

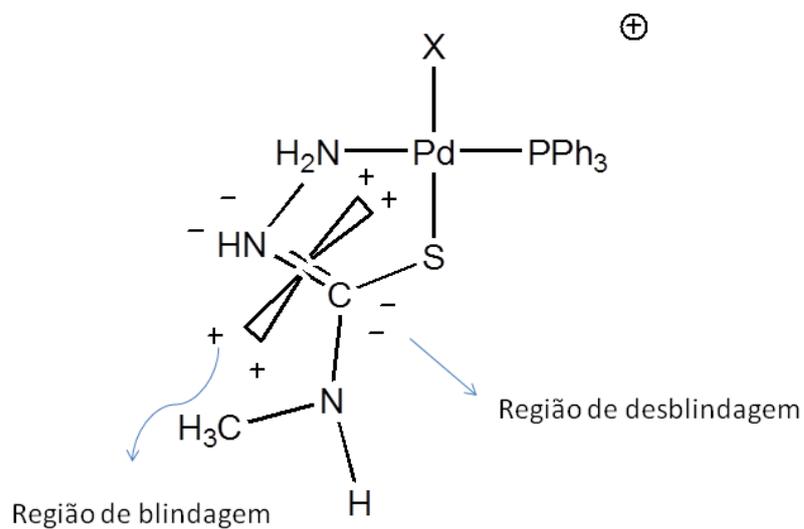


Fonte: Autor

Os espectros de RMN de ^1H dos complexos são bem semelhantes e indicam a coordenação dos ligantes ao metal, devido a presença dos quatro sinais referentes aos hidrogênios do ligante 4-MeT, porém deslocados e o multipletto referente aos sinais de hidrogênios aromáticos do ligante trifenilfosfina que ocorre entre 7,54-7,66 ppm. Em todos os espectros observa-se um deslocamento dos sinais dos hidrogênios H1, H2 e H4 para regiões de campo baixo, 4,39 ppm para 8,49 ppm, 7,78 ppm para 9,14 ppm e 8,52 ppm para 11,06 ppm, respectivamente, isto porque a coordenação ao átomo de paládio(II) retira densidade eletrônica do ligante, provocando uma desblindagem nos átomos de hidrogênio. Nota-se que o maior deslocamento ocorre com os hidrogênios H1, uma vez que o ligante está coordenado via átomo de nitrogênio do grupo NH_2 , sendo assim estes hidrogênios estão mais próximos do Pd(II) e por isso sofrem mais o efeito da desblindagem. Outra observação importante que auxilia na compreensão da coordenação do ligante 4-metil-3-tiossemicarbazida é inferida pelo deslocamento de $\approx 0,2$ ppm do sinal atribuído aos átomos de hidrogênio do grupo CH_3 para campo alto. Isto ocorre, devido ao aumento do caráter de dupla ligação entre o carbono e o nitrogênio (N4) da tiossemicarbazida. Com o aumento do caráter π desta ligação, o efeito anisotrópico causado por estes elétrons também aumenta

fazendo com que a metila se encontre em uma região de blindagem e conseqüentemente o sinal referente a estes hidrogênios se desloca para campo alto (Figura 30).

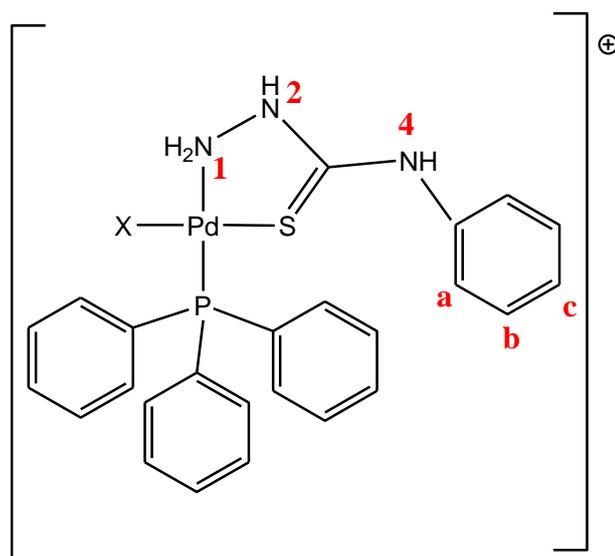
Figura 30 - Efeito anisotrópico causado pelos elétrons da ligação C=NH



Fonte: Autor

A Figura 31 representa a numeração dos hidrogênios encontrados nos espectros de RMN de ^1H do ligante 4-fenil-3-tiossemicarbazida e de seus complexos **5-8**.

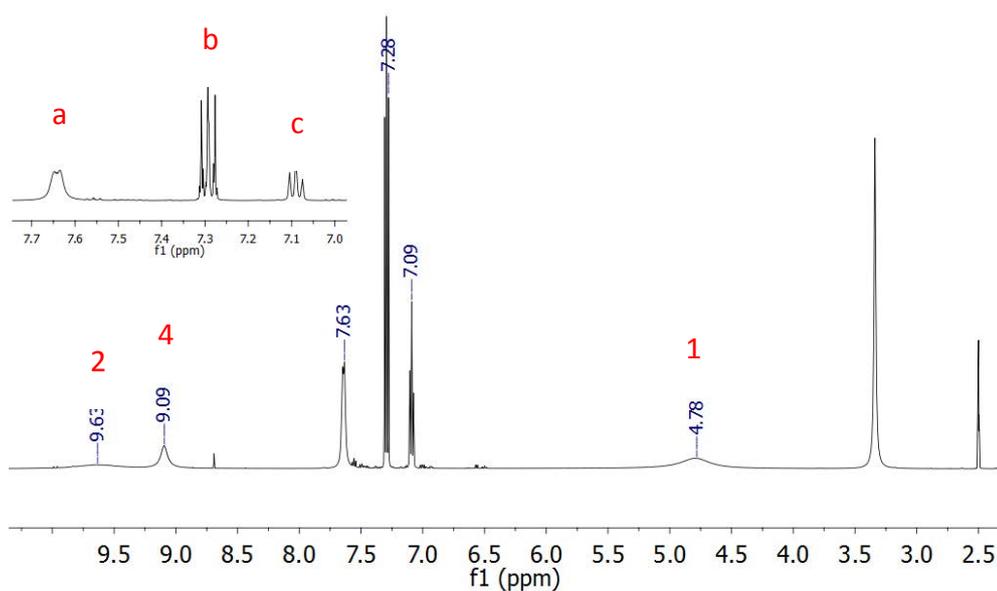
Figura 31 - Esquema de numeração para os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H



Fonte: Autor

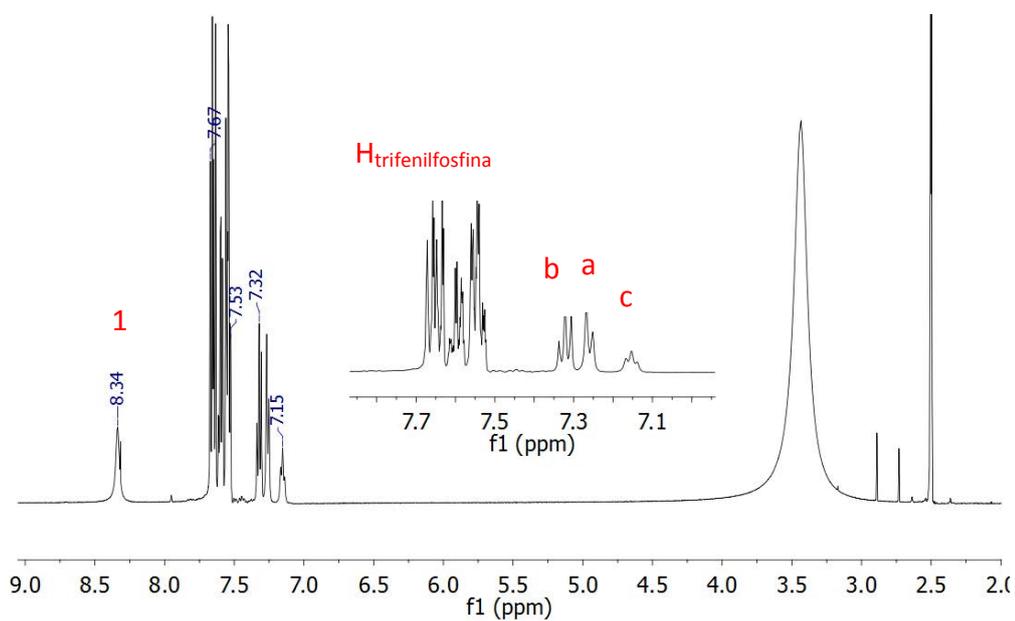
Os espectros de RMN de ^1H do ligante 4-PhT e dos compostos, $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(4\text{-PhT})]\text{Cl}$ (**5**), $[\text{PdBr}(\text{PPh}_3)(4\text{-PhT})]\text{Br}$ (**6**), $[\text{PdI}(\text{PPh}_3)(4\text{-PhT})]\text{I}$ (**7**), $[\text{Pd}(\text{SCN})(\text{PPh}_3)(4\text{-PhT})](\text{SCN})$ (**8**), obtidos em $\text{dms}\text{-}d_6$ estão representados pelas Figuras 32-36, respectivamente. Os deslocamentos químicos dos sinais de todos os compostos estão exibidos na Tabela 6.

Figura 32 - Espectro de RMN ^1H do ligante 4-fenil-3-tiossemicarbazida em $\text{dms}\text{-}d_6$



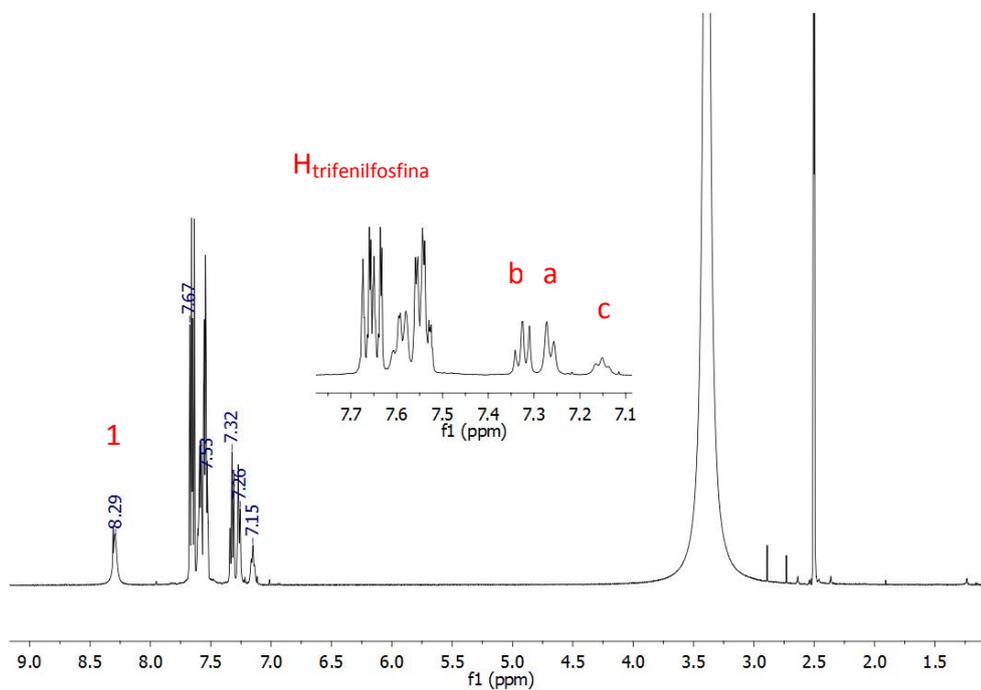
Fonte: Autor

Figura 33 - Espectro de RMN ^1H do complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(4\text{-PhT})]\text{Cl}$ em $\text{dms}\text{-d}_6$



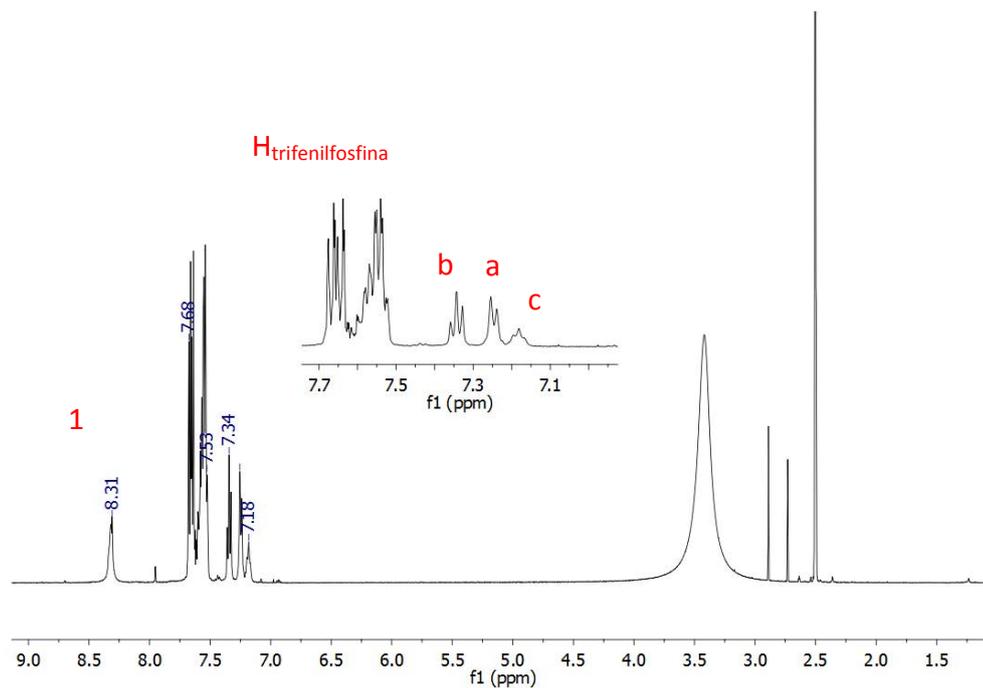
Fonte: Autor

Figura 34 - Espectro de RMN ^1H do complexo $[\text{PdBr}(\text{PPh}_3)(4\text{-PhT})]\text{Br}$ em $\text{dms}\text{-d}_6$



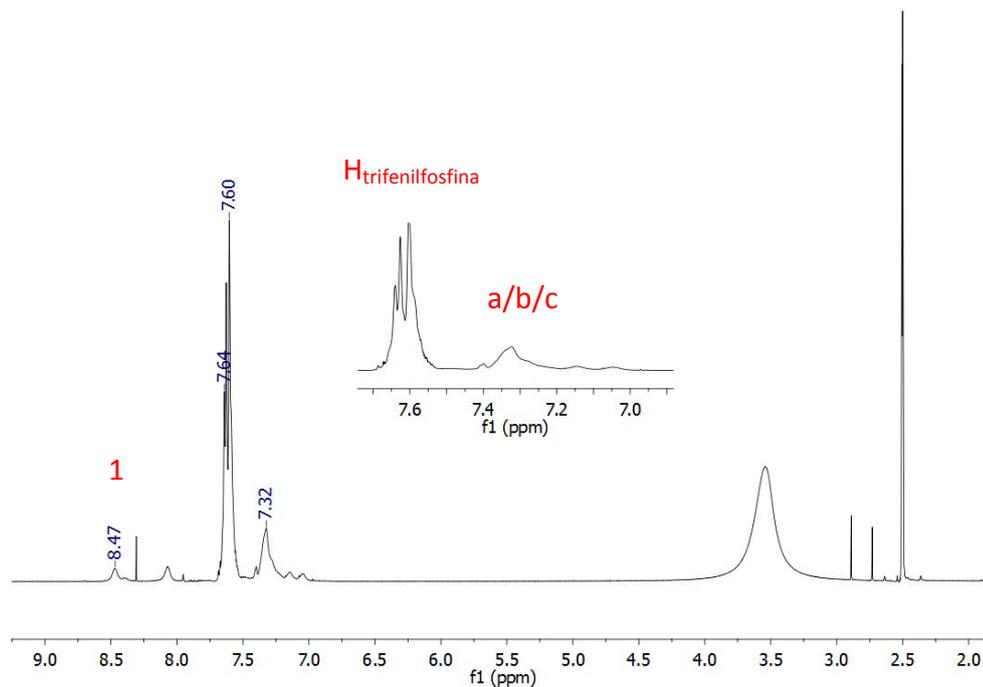
Fonte: Autor

Figura 35 - Espectro de RMN ^1H do complexo $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)(4\text{-PhT})]\text{I}$ em $\text{dms}\text{-d}_6$



Fonte: Autor

Figura 36 - Espectro de RMN ^1H do complexo $[\text{Pd}(\text{SCN})(\text{PPh}_3)(4\text{-PhT})](\text{SCN})$ em $\text{dms}\text{-d}_6$



Fonte: Autor

Tabela 6 - Deslocamento químicos de RMN de ^1H para os compostos 4-fenil-3-tiossemicarbazida, **5**, **6**, **7** e **8**

4-PhT	5	6	7	8	Atribuição
7,64 <i>m</i> [2H]	7,26 <i>m</i> [2H]	7,27 <i>m</i> [2H]	7,25 <i>m</i> [2H]	7,32	H(a)
7,29 <i>m</i> [2H]	7,32 <i>m</i> [2H]	7,32 <i>m</i> [2H]	7,34 <i>m</i> [2H]	7,32	H(b)
7,09 <i>m</i> [1H]	7,15 <i>m</i> [1H]	7,15 <i>m</i> [1H]	7,18 <i>m</i> [1H]	7,32	H(c)
4,78 <i>s</i> [2H]	8,34 <i>s</i> [2H]	8,29 <i>s</i> [2H]	8,31 <i>s</i> [2H]	8,47 <i>s</i> [2H]	H(1)
9,09 <i>s</i> [1H]	-	-	-	-	H(4)
9,63 <i>s</i> [1H]	-	-	-	-	H(2)
-	7,53/7,67 <i>m</i> [15H]	7,52/7,67 <i>m</i> [15H]	7,53/7,68 <i>m</i> [15H]	7,60/7,64 <i>m</i> [15H]	H _{trifenilfosfina}

s = singlete; *m* = multiplete; [] *integração*

Fonte: Autor

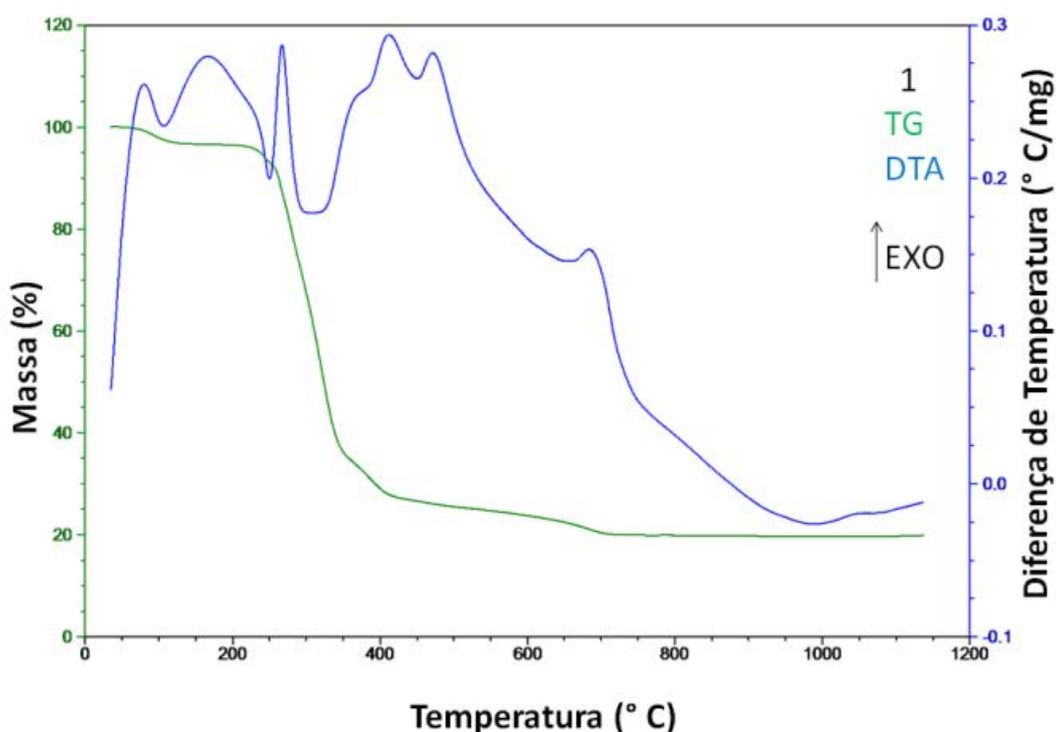
Observando o espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H do ligante livre (Figura 32) notam-se seis sinais referentes aos hidrogênios da molécula. Dois singletos em campo baixo atribuídos aos hidrogênios dos grupos NH, ocorrendo em 9,63 ppm para o H2 e 9,09 ppm para o H4. Três sinais entre 7,09 e 7,64 ppm referentes aos 5 hidrogênios do grupo fenil e o singlete em 4,78 ppm atribuído aos dois hidrogênios do grupo NH_2 .

Os espectros de RMN de ^1H dos complexos são semelhantes entre si, como o esperado, e indicam a coordenação dos ligantes ao metal, devido a presença dos sinais referentes aos hidrogênios do ligante 4-PhT, porém deslocados e o multiplete referente aos sinais de hidrogênios aromáticos do ligante trifenilfosfina que ocorre entre 7,52-7,68 ppm. Nos espectros dos complexos **5-8** observa-se um deslocamento muito significativo do sinal do hidrogênio H1 para região de campo baixo, de 4,78 ppm, no ligante livre, para 8,29-8,47 ppm, nos complexos. O átomo de paládio retira densidade eletrônica do ligante deixando os hidrogênios do grupo NH_2 , os quais estão mais próximos ao metal, mais desprotegidos. Esta mudança indica uma coordenação do ligante 4-PhT também via átomo de nitrogênio (NH_2) corroborando com os dados obtidos no IV.

4.1.4. Análise Térmica:

As curvas TG/DTA de todos os compostos **1-8** estão apresentadas pelas Figuras 37-44, respectivamente. Pelo perfil de decomposição térmica dos 8 compostos podemos observar a similaridade deste comportamento. As saídas dos ligantes ocorrem em uma ou duas etapas consecutivas e ou simultâneas, gerando como resíduo final paládio metálico¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ ou óxido de paládio¹⁰⁷.

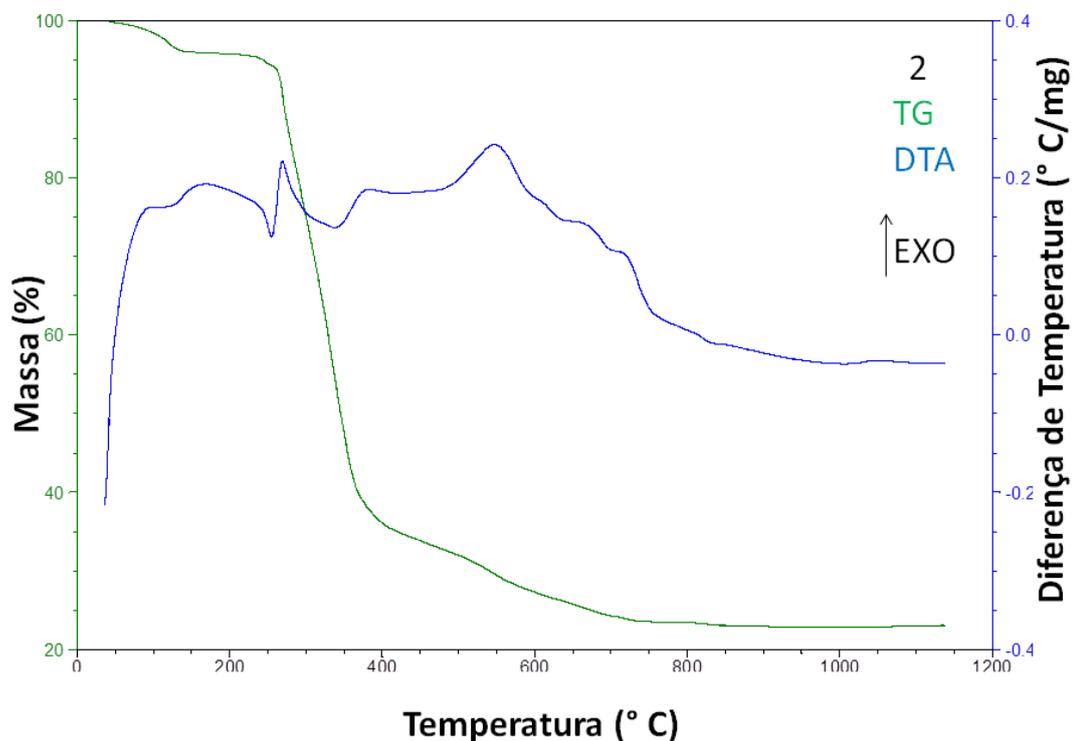
Figura 37 - Curvas TG e DTA do $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(4\text{-MeT})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**1**) (m = 10 mg)



Fonte: Autor

O complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(4\text{-MeT})]\text{Cl}$ possui uma perda de massa entre 60-214 °C de 3,64%, correspondente a uma molécula de H_2O de hidratação. O pico endotérmico em 107 °C é atribuído a este fenômeno. A segunda perda de massa, está relacionada a saída dos ligantes aniônicos e orgânicos, ocorrendo entre 214-755 °C. Quatro picos exotérmicos na curva DTA são atribuídos a estas eliminações, 265, 413, 473, 683 °C. Como resultado da decomposição encontra-se 19,80 %, referente ao paládio metálico, condizente com o resultado esperado de 18,91 %, confirmando a estequiometria do complexo.

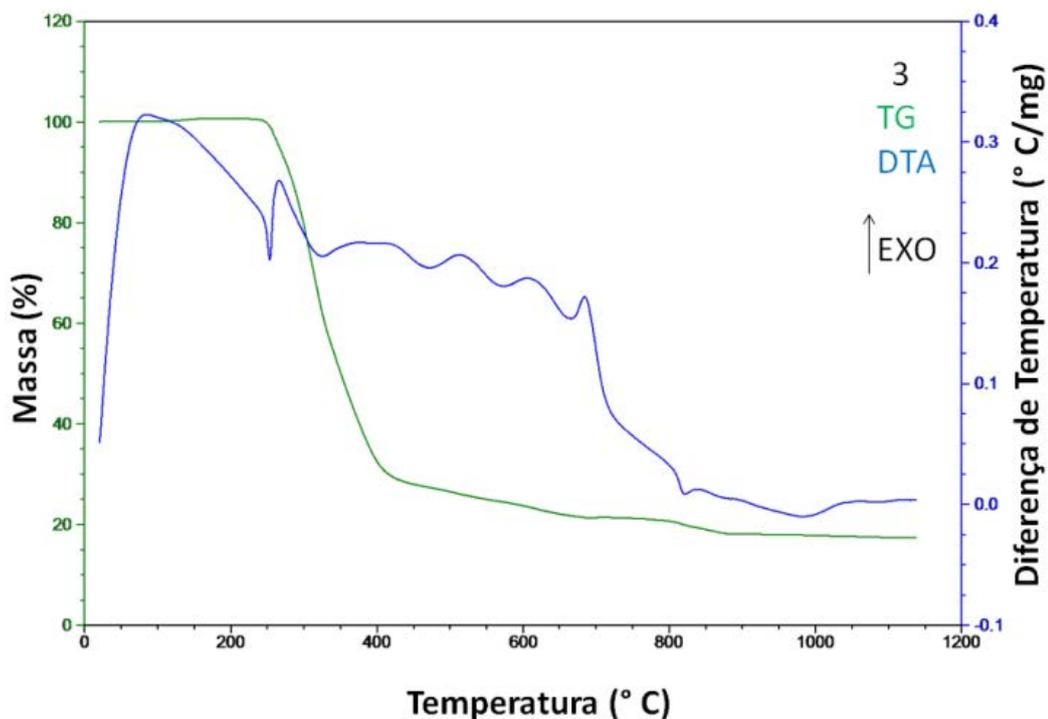
Figura 38 - Curvas TG e DTA do [PdBr(PPh₃)(4-MeT)]Br.1,5H₂O (**2**) (m = 10 mg)



Fonte: Autor

O composto **2** também apresenta uma perda de massa, 3,74 %, relacionada a saída de 1,5 moléculas de água, ocorrendo até 134 °C, novamente, observa-se um pico endotérmico em 119 °C referente a esta perda. Entre 134-236 °C o composto se mostra estável. A segunda etapa da decomposição inicia-se a 236 °C com a saída de todos os ligantes em perdas de massa consecutivas e simultâneas, gerando um resíduo de óxido de paládio (20,94%), concordante com o resultado teórico 19,59%.

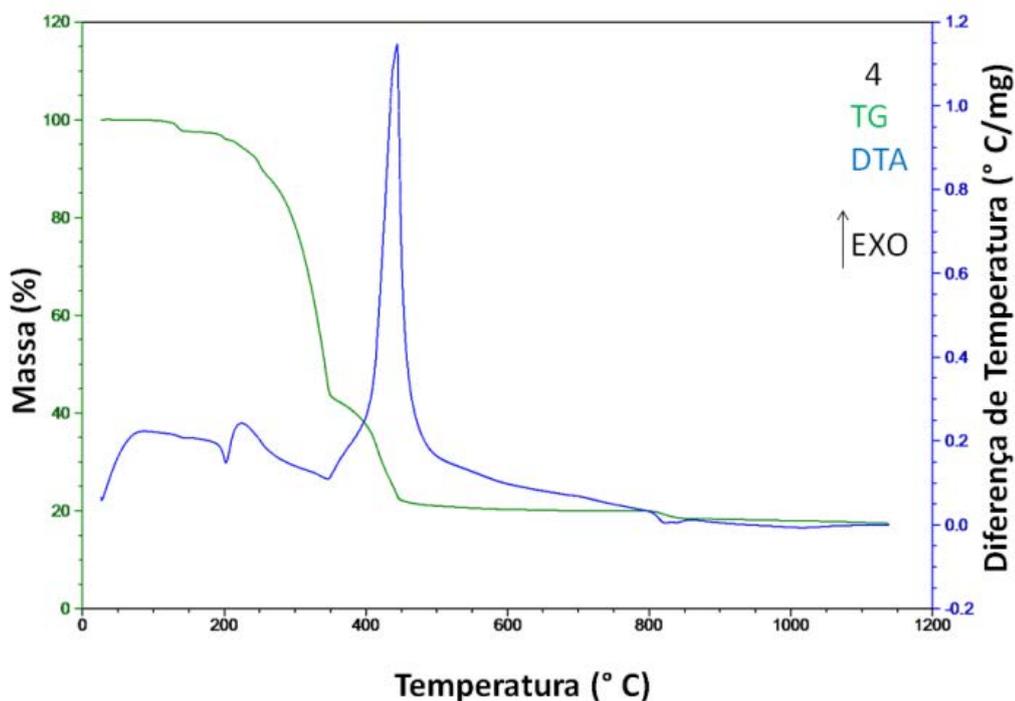
Figura 39 - Curvas TG e DTA do [PdI(PPh₃)(4-MeT)]I (**3**) (m = 10 mg)



Fonte: Autor

Na curva TG do composto **3** notam-se perdas consecutivas de massa, referentes a liberação de todos os ligantes. A decomposição térmica inicia-se em 240 °C e termina em 954 °C, dando origem ao resíduo de 17,70 % composto de uma mistura de Pd e PdO. Pela curva DTA pode-se constatar a presença de dois picos endotérmicos em 253 °C e 822 °C, este ultimo bem característico da conversão de parte do PdO em Pd. Além destes, outros 4 picos exotérmicos aparecem na curva DTA, ocorrendo em 392, 516, 602 e 687 °C.

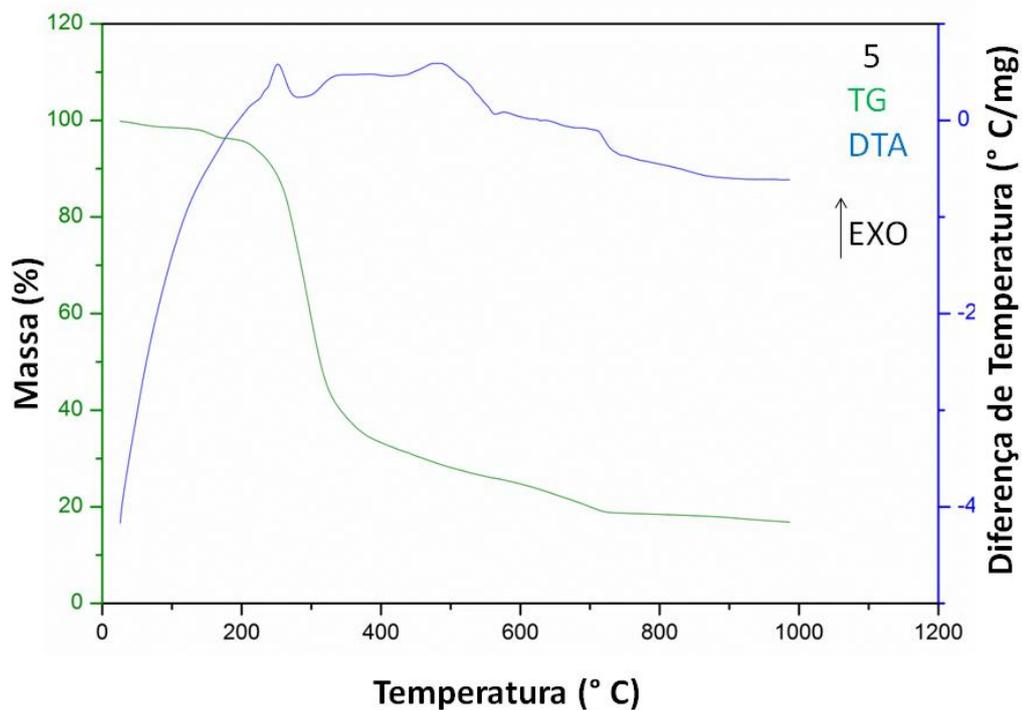
Figura 40 - Curvas TG e DTA do $[\text{Pd}(\text{SCN})(\text{PPh}_3)(4\text{-MeT})](\text{SCN})\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**4**) ($m = 10$ mg)



Fonte: Autor

O complexo **4** apresenta um comportamento bem semelhante aos demais compostos. A primeira etapa acontece até 136 °C com a saída de 2,95 % de massa, correspondente a H_2O de hidratação. O composto se mostra estável até 187 °C, em seguida, ocorrem duas perdas de massa consecutivas até 450 °C, representando a liberação de todos os ligantes, correspondente a estes eventos um pico exotérmico bem pronunciado é observado na curva DTA em 444 °C. Entre 450-798 °C não ocorre nenhum fenômeno, porém, entre 798-905 °C acontece a redução do óxido de paládio em paládio metálico, isto é acompanhado por uma perda de massa de 3,04 % e um pico endotérmico em 824 °C, sendo o resíduo obtido condizente com o esperado, 18,29 % e 17,50 %, respectivamente.

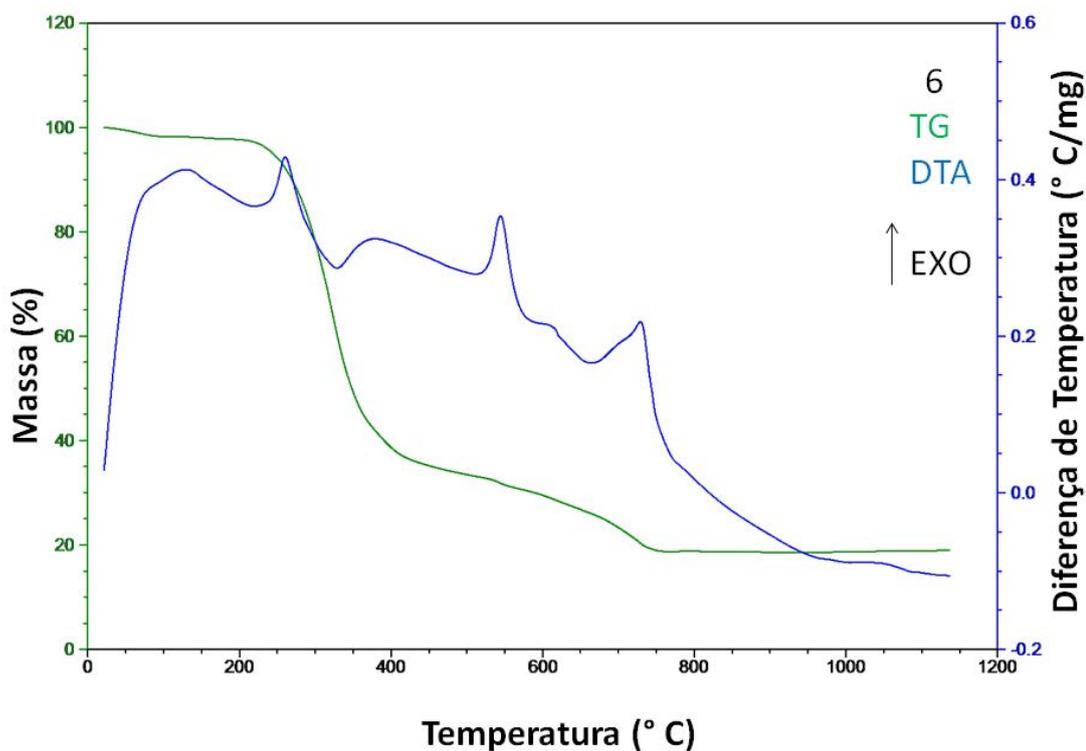
Figura 41 - Curvas TG e DTA do [PdCl(PPh₃)(4-PHT)]Cl.H₂O (**5**) (m = 10 mg)



Fonte: Autor

As curvas TG/DTA do composto **5** demonstram a similaridade no perfil de decomposição térmica encontrado entre as duas famílias, primeiro, ocorre a liberação de uma molécula de água (3,02 %) até 172 °C, logo em seguida, observa-se a saída de todos os ligantes até 873 °C, referente a estes eventos notam-se 3 picos exotérmicos em 252, 479, 705 °C. Como resíduo encontra-se uma porcentagem de massa no valor de 18,03 %, atribuído a paládio metálico, confirmando a estequiometria proposta [PdCl(PPh₃)(4-MeT)]Cl.H₂O (Pd = 17,03 %).

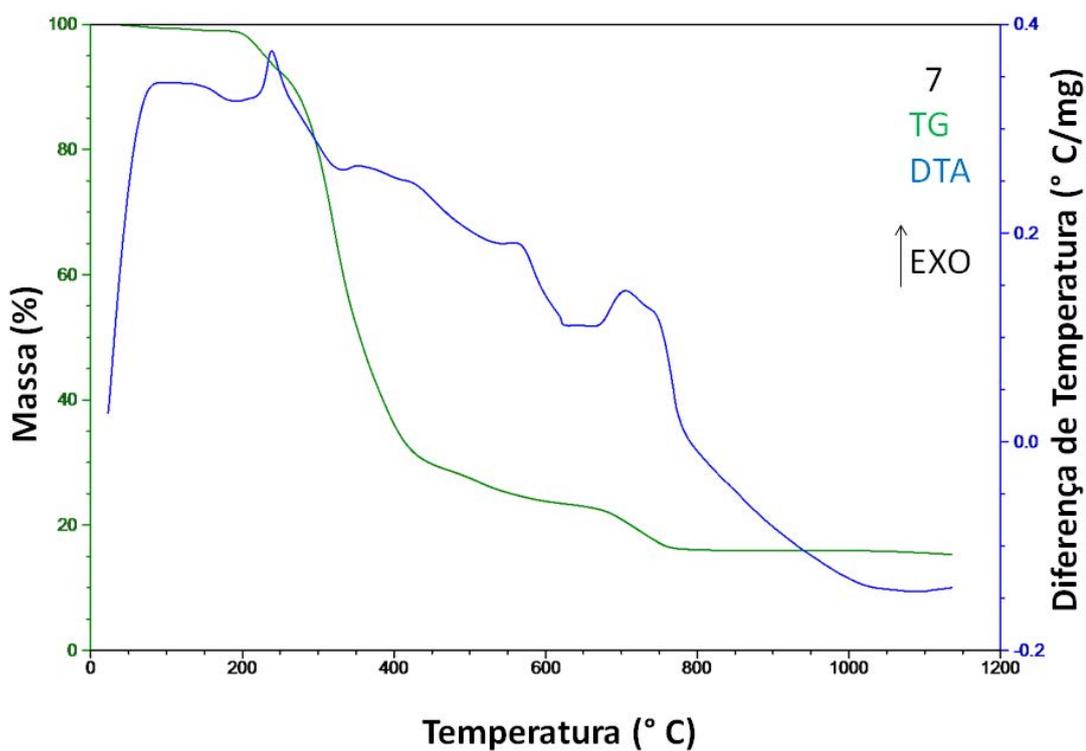
Figura 42 - Curvas TG e DTA do [PdBr(PPh₃)(4-PhT)]Br.1/2H₂O (**6**) (m = 10 mg)



Fonte: Autor

O complexo **6** perde 1,3 % de massa até 97 °C, relacionado a saída de 1/2 H₂O. Entre 97-209 °C o composto se mostra estável, sem alteração de massa. A partir desta temperatura iniciam-se processos, consecutivos e simultâneos, relacionados a liberação dos ligantes, ocorrendo até 803 °C, 3 picos na curva DTA estão associados a estes fenômenos (261, 544, 729 °C). Analogamente ao complexo **2**, que também contém bromo, o resíduo encontrado é atribuído ao óxido de paládio, 18,67 %, concordante com o calculado (17,87 %).

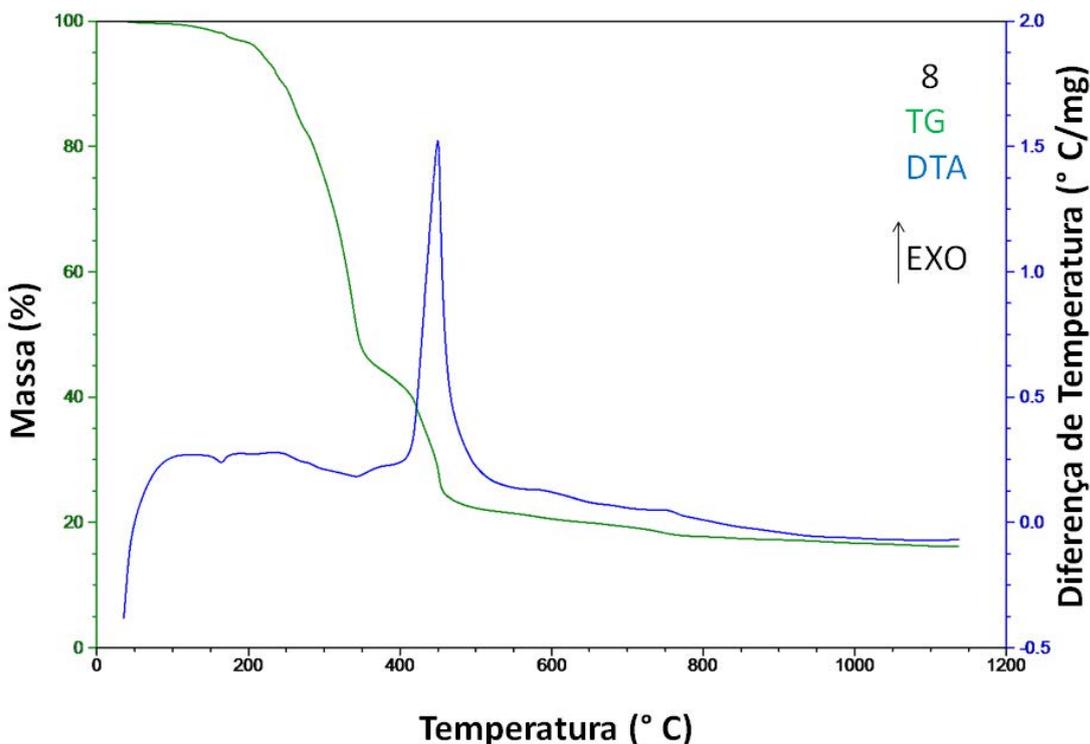
Figura 43 - Curvas TG e DTA do $[\text{PdI}(\text{PPh}_3)(4\text{-PhT})]\text{I} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ (**7**) ($m = 10 \text{ mg}$)



Fonte: Autor

O composto **7** inicia sua decomposição térmica com a eliminação de $1/2 \text{ H}_2\text{O}$ de hidratação até $196 \text{ }^\circ\text{C}$, posteriormente todos os ligantes são liberados gerando 3 picos exotérmicos, em 240 , 562 e $702 \text{ }^\circ\text{C}$. O resíduo encontrado é atribuído ao PdO , $16,04 \%$, sendo o valor calculado igual a $15,29 \%$.

Figura 44 - Curvas TG e DTA do $[\text{PdSCN}(\text{PPh}_3)(4\text{-PhT})]\text{SCN}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**8**) (m = 10 mg)



Fonte: Autor

As curvas do complexo **8** apresentam um perfil extremamente semelhante ao do composto **4**, indicando como os grupos aniônicos influenciam neste processo de decomposição. Até 169 °C ocorre a saída de 1 molécula de H_2O , correspondente a perda de 2,12 % de massa. Na curva DTA observa-se um pico endotérmico em 165 °C associado a este evento. Em seguida, ocorre a eliminação gradual dos ligantes entre 197-1087 °C, para estes eventos, somente um pico bem intenso na curva DTA, é observado em 450 °C. O resíduo obtido de 16,32 % foi atribuído sendo Pd^0 (valor calculado, 15,88 %).

Pela análise termogravimétrica pode-se constatar que os compostos, após a eliminação da água de hidratação, são estáveis no mínimo até 172°C. Foi possível estabelecer um padrão na ordem de estabilidade térmica em conformidade com os grupos aniônicos das moléculas, de acordo com as temperaturas iniciais de decomposição: portanto, em ordem crescente de estabilidade **4** < **1** < **2** < **3** e **8** < **5** < **7** < **6**. Assim pode-se notar que os complexos contendo SCN^- (**4** e **8**) e Cl^- (**1** e **5**), são termicamente menos estáveis que os complexos com Br^- (**2** e **6**) e I^- (**3** e **7**), em ambas as famílias. E mais, os complexos **1**, **4**, **5** e **8** apresentam como resíduo final paládio metálico, enquanto para os compostos **2**, **3**, **6** e

7 o resíduo obtido foi o óxido de paládio. Com isso, a influência destes grupos tanto na estabilidade térmica quanto no resíduo final gerado após a decomposição é evidenciada.

Outra conclusão que se chega com a análise destes dados é a maior estabilidade dos complexos que apresentam a metila como substituinte no N4 da tiossemicarbazida quando comparados aos seus análogos com a fenil, uma vez que **1** > **5**, **2** > **6**, **3** > **7** e **4** > **8**.

4.1.5. Difração de raios X de monocristal:

A estrutura de três complexos foi elucidada pela difração de raios X de monocristal. Os dados cristalográficos obtidos e refinados (Tabela 7) revelaram a formação de compostos mononucleares. As Figuras 45-47 mostram o diagrama ORTEP dos compostos **3**, **4** e **7**, respectivamente. Em todos os casos, pelos valores de ângulos de ligação, o átomo de paládio apresenta uma geometria quadrática plana distorcida (vide Tabelas 8, 9 e 10). Sua esfera de coordenação é constituída por uma molécula do ligante 4-metil-3-tiossemicarbazida (**3** e **4**) ou 4-fenil-3-tiossemicarbazida (**7**), coordenada de maneira neutra bidentada pelos átomos de enxofre e nitrogênio do grupo NH₂, uma molécula de trifenilfosfina, coordenada *trans* ao nitrogênio, como o esperado, e o quarto sítio de coordenação é ocupado por um átomo de iodo (**3** e **7**) ou tiocianato (**4**). Além disso, está presente na estrutura outro átomo de iodo ou tiocianato, que atua como contra íon. No caso dos complexos **4** e **7** uma molécula de solvato é observada, sendo clorofórmio para **4** e éter para **7**, pois foram os solventes utilizados na cristalização e recristalização, respectivamente. Lembrando que os monocristais dos compostos **3** e **4**, foram obtidos diretamente do meio reacional e que o monocristal do complexo **7** foi obtido através de uma difusão de vapor do éter dietílico a 4 °C.

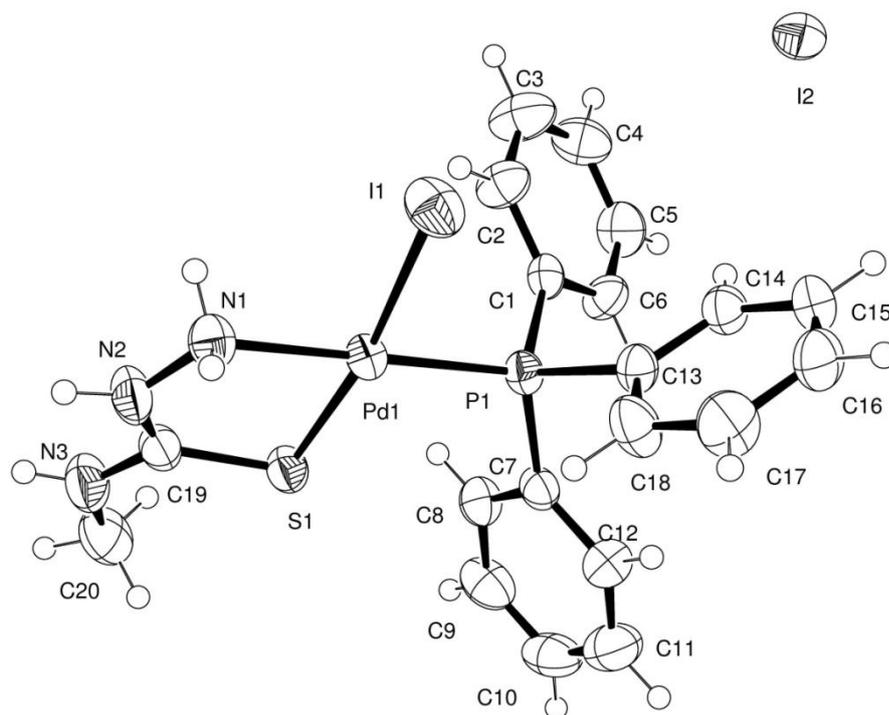
As principais distâncias de ligação e ângulos dos complexos [PdI(PPh₃)(4-MeT)]I (**3**) (Tabela 8), [Pd(SCN)(PPh₃)(4-MeT)]SCN.CHCl₃ (**4**) (Tabela 9) e [PdI(PPh₃)(4-PhT)]I.C₄H₁₀O (**7**) (Tabela 10) estão de acordo com os valores esperados para este sistema^{108,109}. Todos os complexos possuem valores de distância de ligação similares entre os átomos de Pd(1)-S(1) [2,292 (Å) (**3**), 2,282 (Å) (**4**) e 2,290 (Å) (**7**)], Pd(1)-N(1) [2,097 (Å) (**3**), 2,099 (Å) (**4**) e 2,094 (Å) (**7**)] e Pd(1)-P(1) [2,263 (Å) (**3**), 2,262 (Å) (**4**) e 2,249 (Å) (**7**)], sendo tais distâncias bem próximas às encontradas por Kalaivani *et al.*¹⁰⁹ para os complexos [Pd(H-Msal-mtsc)(PPh₃)] (H-Msal-mtsc = 3-metoxisalicilaldeido 4(N)-metiltiossemicarbazona) e [Pd(H-Msal-

etsc)(PPh₃)] (H-Msal-etsc = 3-metoxisalicilaldeido 4(N)-etiliossemicarbazona) com valores de distância de ligação Pd-S, Pd-N e Pd-P iguais a 2,249 (Å) e 2,248 (Å), 2,103(Å) e 2,115 (Å), 2,259 (Å) e 2,269 (Å), respectivamente. Já o valor encontrado para a distância de ligação Pd-I está bem coerente com o valor médio encontrado para esta ligação [2,596 (Å)] quando *trans* ao iodo encontra-se um átomo de I, N ou S¹⁰⁸.

Tabela 7. Principais dados cristalográficos dos complexos 3, 4 e 7.

	3	4	7
Fórmula Empírica	C ₂₀ H ₂₂ N ₃ P I Pd S, I	C ₂₃ H ₂₂ N ₅ PS ₃ Cl ₃ Pd	C ₂₅ H ₂₄ IN ₃ PPdS, C ₄ H ₁₀ O, I
Massa Molecular	727,64	708,35	863,83
Sistema Cristalino	Monoclínico	Triclínico	Triclínico
Grupo Espacial	P2 _{1/c}	P -1	P -1
a (Å)	14,2322(2)	10,3160(3)	9,4700(4)
b (Å)	19,0239(3)	12,5470(4)	10,8156(4)
c (Å)	9,21890(10)	12,7300(4)	16,8376(7)
α (°)		80,180(2)	97,765(2)
β (°)	105,6780(10)	77,381(2)	93,150(2)
γ (°)		68,214(2)	99,312(2)
Tamanho (mm)	0,23 x 0,10 x 0,07	0,4 x 0,35 x 0,16	-
Temperatura (K)	293(2)	293(2)	296
Z (cela unitária)	4	2	2
λ (Å)	0,71073	0,71070	0,71073
V (Å ³)	2403,17(6)	1485,77(8)	1681,03(12)
Theta máx.	26,40	25,419	31,230
h, k, l máx.	17, 23, 11	11, 14, 11	13, 15, 24
Reflexões (I>2σ(I))	R1 = 0.0402, wR2 = 0.0822	R1 = 0.0475, wR2 = 0.1316	R1 = 0,0521 wR2 = 0,2009

Figura 45 - Estrutura do complexo $[Pd(PPh_3)(4-MeT)]I$ (**3**)



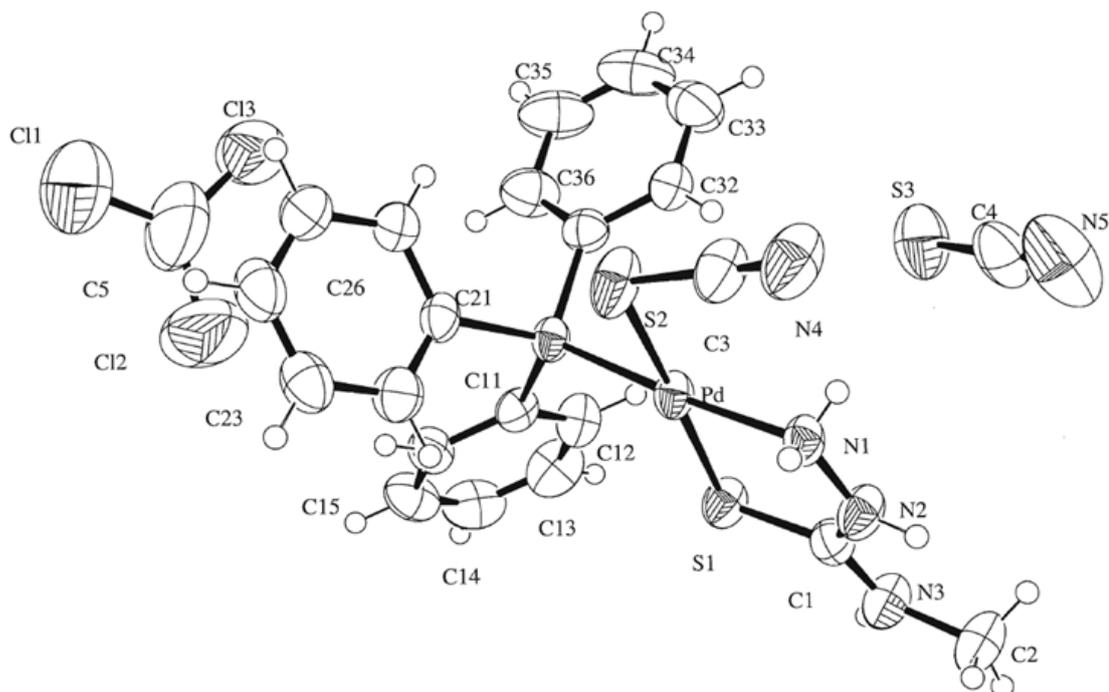
Fonte: Autor

Tabela 8 - Principais valores de distância de ligação e ângulos da estrutura de **3**

Ligação	Distância (Å)
Pd(1)-N(1)	2,097
Pd(1)-P(1)	2,263
Pd(1)-S(1)	2,292
Pd(1)-I(1)	2,599
Ângulo	(°)
N(1)-Pd(1)-P(1)	179,8
N(1)-Pd(1)-S(1)	84,3
N(1)-Pd(1)-I(1)	87,4
P(1)-Pd(1)-S(1)	95,6
P(1)-Pd(1)-I(1)	92,7
S(1)-Pd(1)-I(1)	171,2

Fonte: Autor

Figura 46 - Estrutura do complexo $[\text{Pd}(\text{SCN})(\text{PPh}_3)(4\text{-MeT})]\text{SCN} \cdot \text{CHCl}_3$ (**4**)



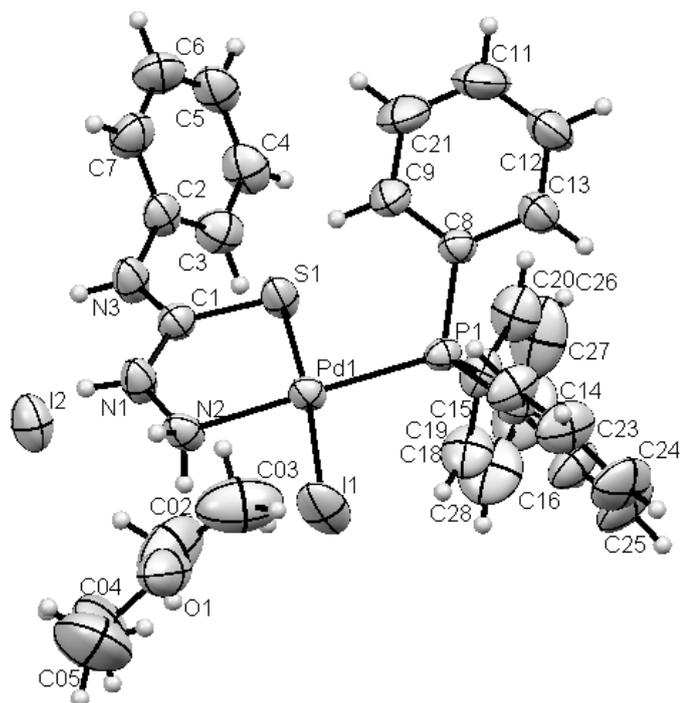
Fonte: Autor

Tabela 9 - Principais valores de distância de ligação e ângulos da estrutura de **4**

Ligação	Distância (Å)
Pd(1)-N(1)	2,099
Pd(1)-P(1)	2,262
Pd(1)-S(1)	2,282
Pd(1)-S(2)	2,348
Ângulo	(°)
N(1)-Pd(1)-P(1)	174,7
N(1)-Pd(1)-S(1)	84,4
N(1)-Pd(1)-S(2)	94,4
P(1)-Pd(1)-S(1)	95,4
P(1)-Pd(1)-S(2)	86,1
S(1)-Pd(1)-S(2)	176,9

Fonte: Autor

Figura 47 - Estrutura do complexo $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)(4\text{-PhT})]\cdot\text{I}\cdot\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ (**7**)



Fonte: Autor

Tabela 10 - Principais valores de distância de ligação e ângulos da estrutura de **7**

Ligação	Distância (Å)
Pd(1)-N(2)	2,094
Pd(1)-P(1)	2,249
Pd(1)-S(1)	2,290
Pd(1)-I(1)	2,579
Ângulo	(°)
N(2)-Pd(1)-P(1)	173,3
N(2)-Pd(1)-S(1)	84,7
N(2)-Pd(1)-I(1)	89,4
P(1)-Pd(1)-S(1)	91,1
P(1)-Pd(1)-I(1)	94,6
S(1)-Pd(1)-I(1)	174,1

Fonte: Autor

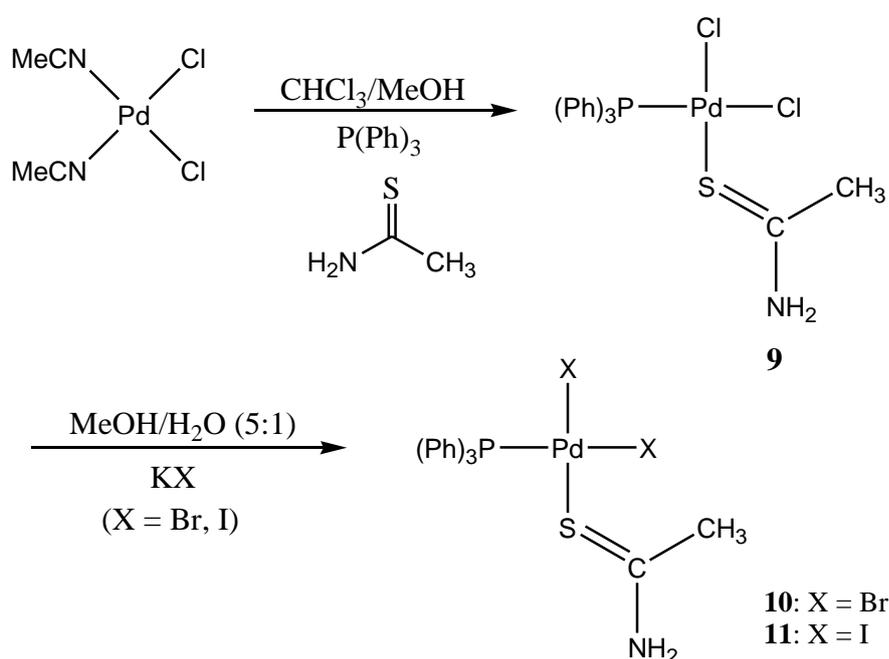
Com base nos resultados obtidos a partir da espectroscopia no infravermelho, RMN de ^1H e com os resultados de análise elementar e termogravimétrica espera-se que os compostos **1** e **2** apresentem a mesma geometria quadrática plana encontrada para os complexos **3** e **4**. E que seus sítios de coordenação estejam ocupados pelos ligantes 4-MeT e PPh_3 de forma análoga a descrita anteriormente. Acredita-se que os compostos **5**, **6** e **8**, possuam estruturas semelhantes ao do complexo **7**.

4.2. Síntese e Caracterização dos compostos de 9-11:

4.2.1. Sínteses:

O complexo **9** foi sintetizado a partir da reação direta do precursor $[\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2]$ com os ligantes trifenilfosfina e tioacetamida. Os compostos **10** e **11** foram obtidos pela substituição dos íons de cloro por bromo e iodo, respectivamente (Esquema 3).

Esquema 3 - Rota sintética para obtenção dos complexos 9-11



Fonte: Autor

Na primeira etapa, os ligantes tioacetamida e trifenilfosfina deslocam as moléculas de acetonitrila, formando o complexo **9**, presumi-se, que estes ligantes assumam uma configuração *cis*, uma vez que pode ocorrer uma competição entre os átomos de S e P pelos

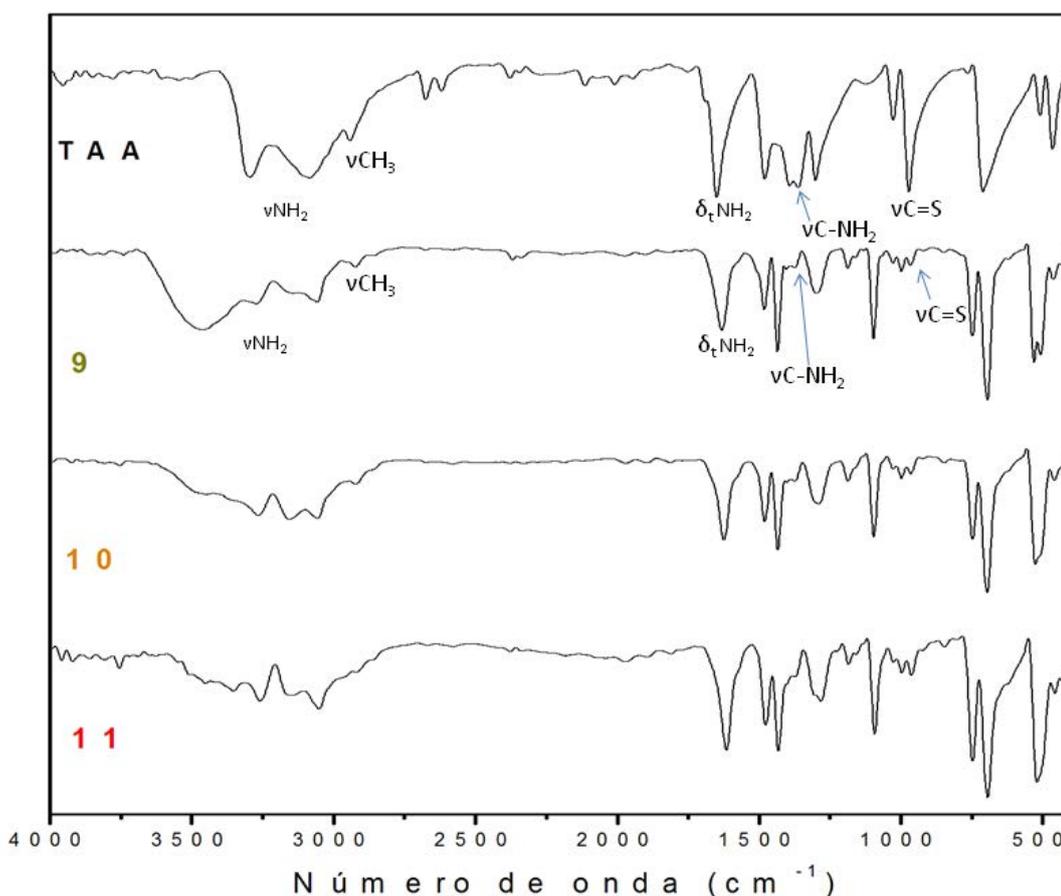
elétrons disponíveis para a retrodoação do Pd, enfraquecendo ambas as ligações, visto que ambos os átomos são σ doadores e π aceitadores⁸⁷. A segunda etapa consiste na substituição dos íons cloretos por brometo e iodeto, para isso, adicionou-se o sal de potássio apropriado para a obtenção de **10** e **11**.

Todos os compostos são sólidos, estáveis ao ar e possuem coloração amarelo (**9** e **10**) ou marrom (**11**). São insolúveis em metanol, etanol e acetona e solúveis em dmf, dmsO e clorofórmio. A condutividade molar dos complexos de **9-11** em dmf está entre 16 – 28 $\Omega\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ de acordo com a sua natureza não eletrolítica⁵¹.

4.2.2. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho:

Os espectros dos complexos **9-11** e do ligante tioacetoamida estão apresentados na Figura 48.

Figura 48 - Espectros vibracionais na região de $4000-400\text{ cm}^{-1}$ do IV para o ligante e os compostos **9-11**



Fonte: Autor

As principais frequências observadas no espectro do ligante livre, tioacetamida (TAA), são atribuídas aos estiramentos assimétrico e simétrico do grupo -NH_2 , ocorrendo em 3294 e 3082 cm^{-1} , respectivamente, estiramento do grupo -CH_3 (2941 cm^{-1}), deformação “tesoura” do -NH_2 (1649 cm^{-1}), estiramento C-NH_2 (**Tioamida II** 1391 cm^{-1}) e estiramento característico de **Tioamida IV** (C=S) em 972 e 710 cm^{-1} .

Os espectros no IV dos compostos **9-11** (Fig. 4) permitiram evidenciar a coordenação da trifenilfosfina (PPh_3) devido à presença de suas bandas características na região de 1478 (ν_{CC}), 1095 (ν_{C}) e 746 cm^{-1} (ν_{CH}). Porém, somente algumas bandas associadas ao ligante tioacetamida foram observadas quando estas não eram encobertas pelas absorções do ligante PPh_3 , uma vez que as bandas do ligante fosfínico são muito mais intensas. São elas, a deformação tesoura do grupo NH_2 que ocorre entre $1635\text{-}1614\text{ cm}^{-1}$, a banda em 1404 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação C-NH_2 , que nos complexos aparece deslocada para frequências mais altas do que no ligante livre (1391 cm^{-1}), pois a coordenação ao metal Pd da tioacetamida via átomo de enxofre fortalece esta ligação, deixando-a com um maior caráter de dupla ligação. Em contrapartida, ocorre o enfraquecimento da ligação C=S , comprovado pelo deslocamento da banda $\nu_{\text{C=S}}$ para regiões de frequências mais baixas nos complexos ($966\text{-}962\text{ cm}^{-1}$).

4.2.3 Espectroscopia de RMN de ^1H , ^{13}C e ^{31}P :

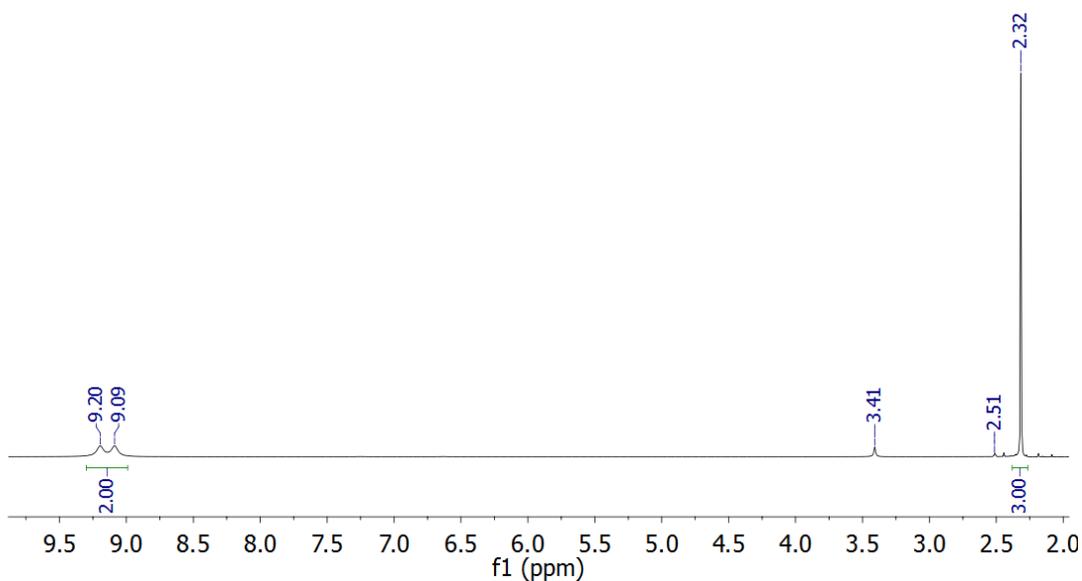
Os espectros de RMN de ^1H dos complexos $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ (**9**), $[\text{PdBr}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ (**10**), $[\text{PdI}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ (**11**) e do ligante tioacetamida foram obtidos em $\text{dms-}d_6$ e clorofórmio de acordo com a solubilidade de cada composto. As Figuras 49-52 representam os espectros do ligante livre e dos complexos **9-11**, respectivamente. Os valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H estão contidos na Tabela 11.

Tabela 11 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H para os compostos tioacetamida, 9-11

TAA	9	10	11	Atribuição
2,32 s [3H]	2,02 s [3H]	2,03 s [3H]	2,08 s [3H]	H CH ₃
-	7,69-7,38 m [15H]	7,71-7,34 m [15H]	7,71-7,48 m [15H]	H _{trifenilfosfina}
9,20 s [1H] / 9,09 s[1H]	10,00 s [1H] / 9,31 s [1H]	9,53 s [1H] / 9,03 s[1H]	10,20 s [1H] / 9,76 s[1H]	NH ₂
dms _o -d ₆	CDCl ₃	CDCl ₃	dms _o -d ₆	solvente

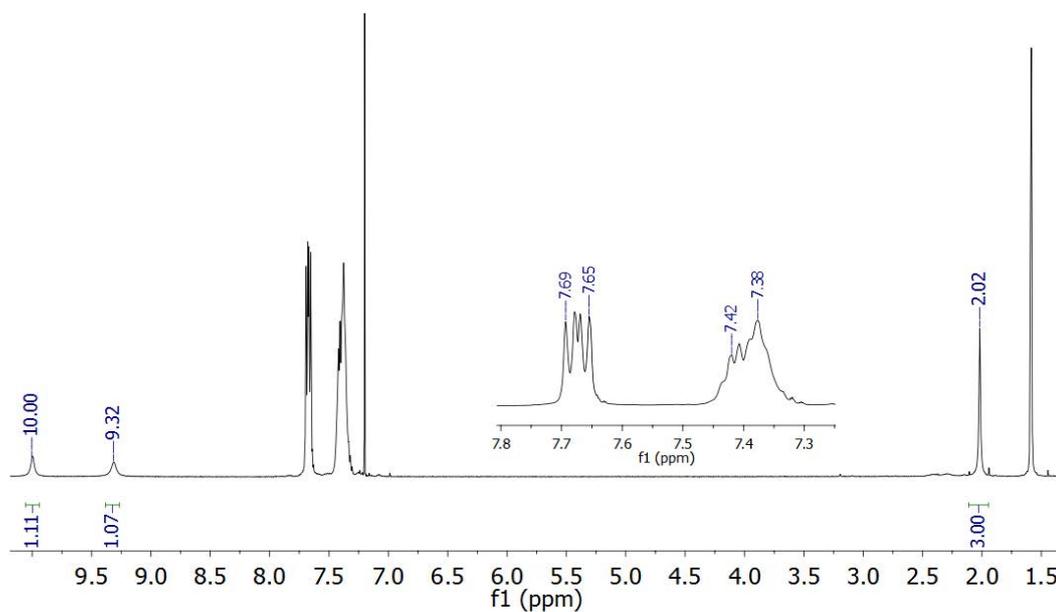
s = singlete; d = dubleto; m = multiplete; [] integração

Fonte: Autor

Figura 49 - Espectro de RMN de ^1H do ligante tioacetamida em dms_o-d₆

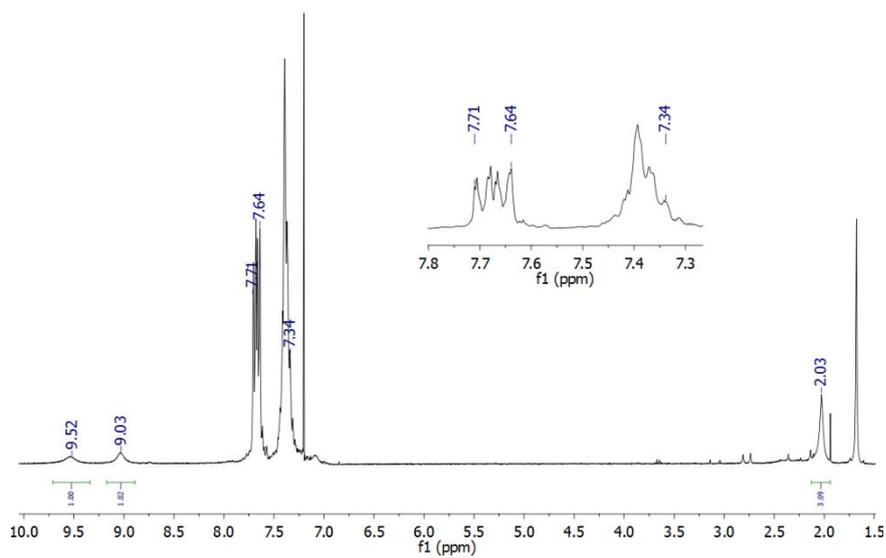
Fonte: Autor

Figura 50 - Espectro de RMN de ^1H do complexo $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ em CDCl_3



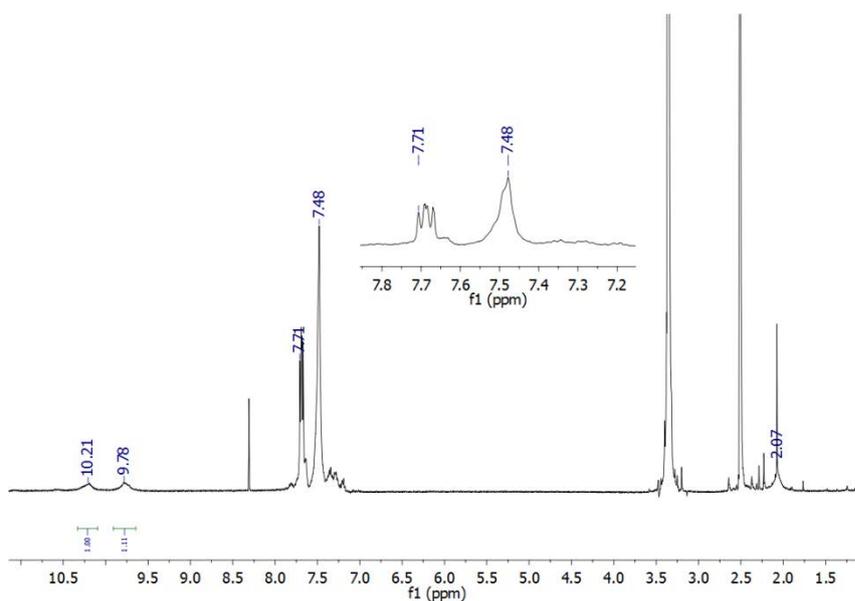
Fonte: Autor

Figura 51 - Espectro de RMN de ^1H do complexo $[\text{PdBr}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ em CDCl_3



Fonte: Autor

Figura 52 - Espectro de RMN de ^1H do complexo $[\text{PdI}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ em $\text{dms}\text{-}d_6$



Fonte: Autor

O ligante livre apresenta em seu espectro de RMN de ^1H (Figura 49) dois singletos em campo baixo em 9,20 e 9,09 ppm, atribuídos aos hidrogênios do grupo NH_2 . Outro singlete é observado, em 2,32 ppm, referente aos hidrogênios da metila da tioacetamida. O sinal em aproximadamente 3,5 ppm é referente ao deslocamento químico dos hidrogênios das moléculas de água encontradas no solvente utilizado enquanto que o sinal em 2,5 ppm é atribuído ao $\text{dms}\text{-}d_6$.

Os espectros de RMN de ^1H dos complexos $[\text{PdX}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ se diferenciam do espectro da tioacetamida pelo deslocamento dos sinais atribuídos aos hidrogênios da TAA e por apresentar picos adicionais entre 8-7 ppm referentes aos hidrogênios aromáticos da trifenilfosfina, também coordenada ao metal. A coordenação do ligante tioacetamida é atribuída pelo deslocamento de 0,3 ppm do sinal referente aos átomos de hidrogênio do grupo CH_3 para campo alto. Novamente, este fenômeno é causado pelo efeito anisotrópico, devido ao aumento do caráter de dupla ligação entre C-NH_2 , blindando os hidrogênios da metila.

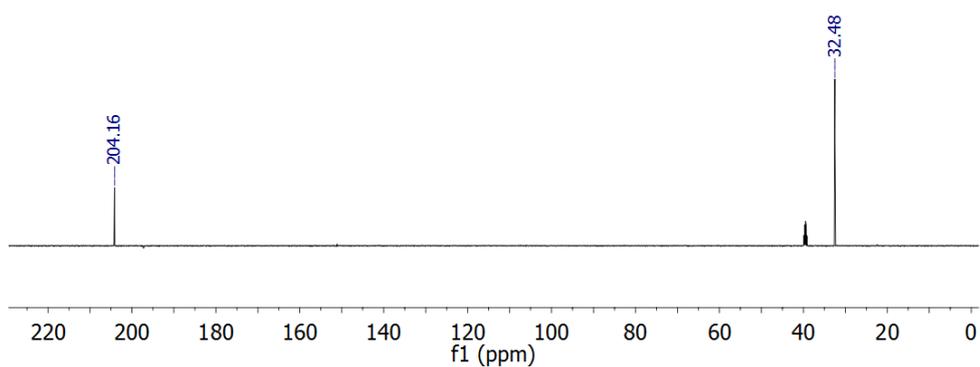
Os valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e os espectros do ligante TAA e do complexo $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ (**9**) estão representados na Tabela 12 e pelas Figuras 53 e 54. Não foi possível a obtenção dos espectros demais compostos devido a baixa solubilidade.

Tabela 12 - Deslocamento químicos de RMN de ^{13}C para os compostos TAA e **9**

	TAA	1
C=S	204,16	196,28
CH ₃	32,48	27,37

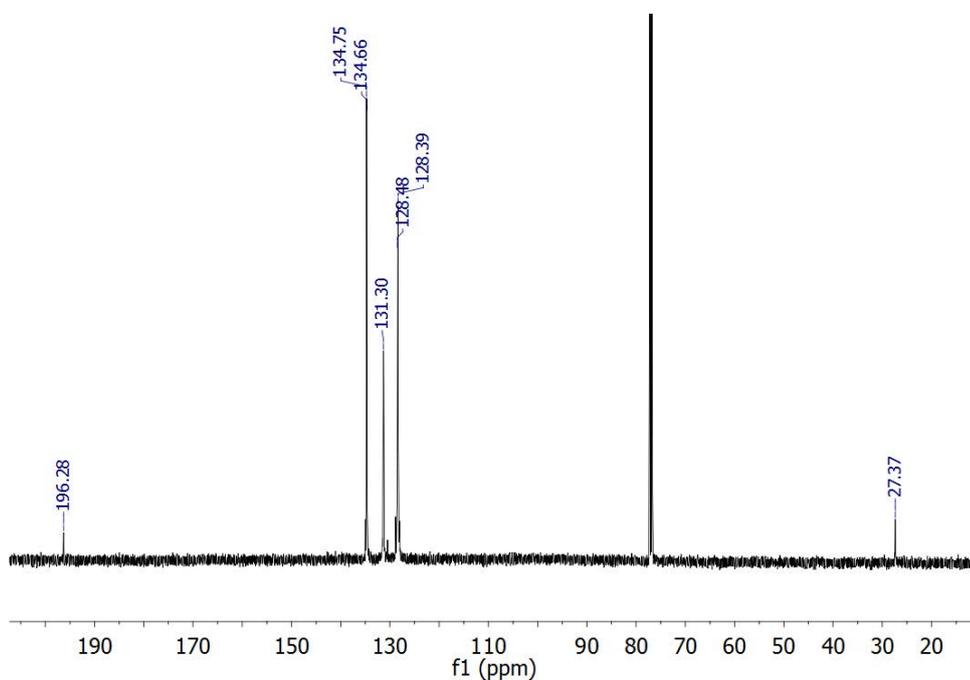
Fonte: Autor

Figura 53 - Espectro de RMN de ^{13}C do TAA em $\text{dms}\text{-d}_6$



Fonte: Autor

Figura 54 - Espectro de RMN de ^{13}C do complexo $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ em CDCl_3



Fonte: Autor

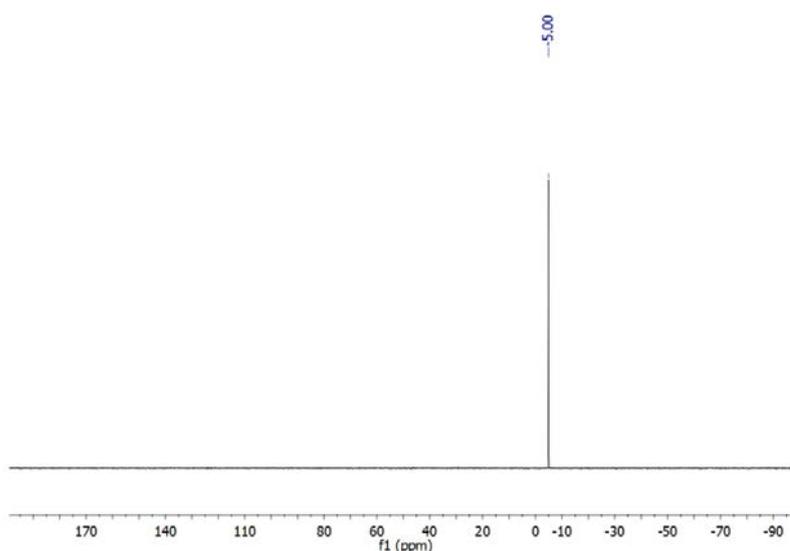
Observando o espectro de RMN de ^{13}C do ligante livre pode-se perceber a presença de dois sinais representando os carbonos da molécula. Em campo alto, encontra-se o sinal

referente ao carbono da metila (32,42 ppm). O sinal atribuído ao C=S, aparece em 204,16 ppm. O sinal em 39,60 ppm é atribuído ao solvente deuterado utilizado, no caso $\text{dms-}d_6$.

No espectro de RMN de ^{13}C do complexo **9**, o sinal referente ao carbono da metila do ligante TAA aparece deslocado aproximadamente 5,0 ppm para campo mais alto quando comparado com o ligante livre. Este deslocamento pode ser atribuído ao efeito anisotrópico causado pelo aumento do caráter de dupla ligação entre o carbono e o nitrogênio da tioacetamida. Um deslocamento de 8,0 ppm para campo mais alto é observado para o pico referente ao carbono ligado ao enxofre, este fato é atribuído à diminuição na força da dupla ligação entre estes átomos, evidenciando a formação da ligação Pd-S. Além destes dois sinais, o espectro mostra picos adicionais na região entre 125-140 ppm referentes aos carbonos aromáticos da trifenilfosfina e o sinal em 77,12 ppm atribuído ao clorofórmio, solvente utilizado.

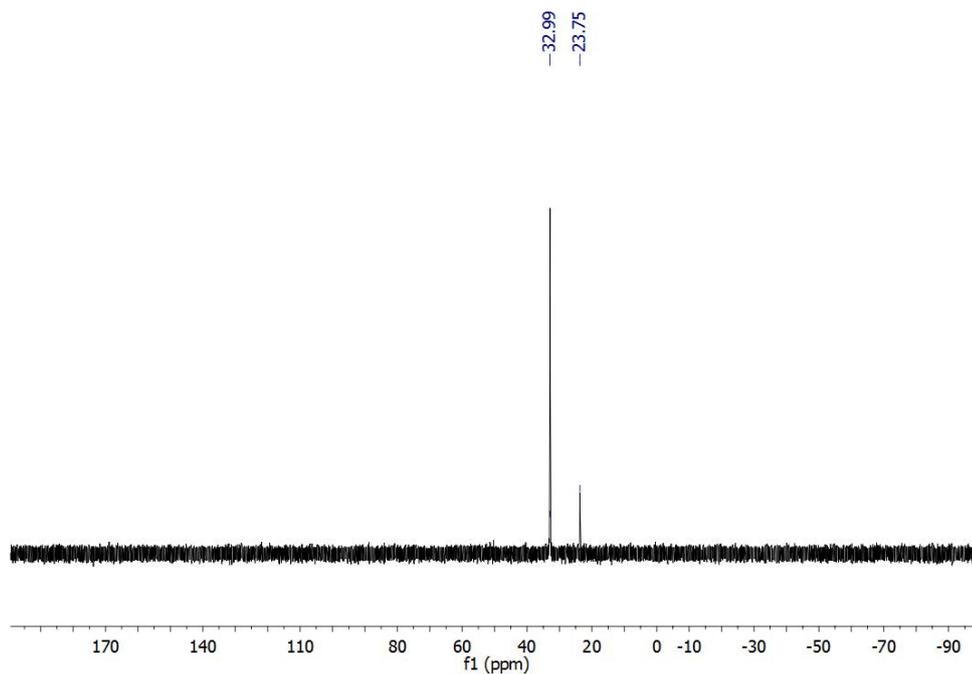
Espectros de RMN de ^{31}P também foram realizados, porém só foi possível a obtenção dos espectros para os complexos **9** e **10** (Figuras 56 e 57), visto que o composto **11** se mostrou pouco solúvel no solventes deuterados disponíveis. A Figura 55 apresenta o espectro para a trifenilfosfina livre.

Figura 55 - Espectro de RMN de ^{31}P da trifenilfosfina em CDCl_3



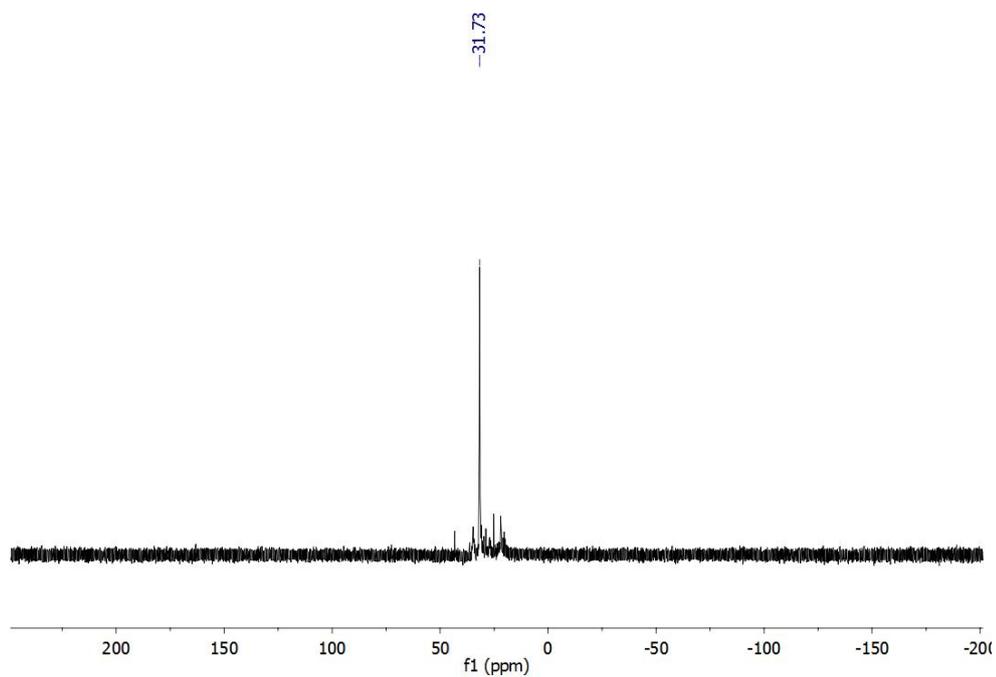
Fonte: Autor

Figura 56 - Espectro de RMN de ^{31}P do complexo **9** em CDCl_3



Fonte: Autor

Figura 57 - Espectro de RMN de ^{31}P do complexo **10** em CDCl_3



Fonte: Autor

Pelo grande deslocamento químico para campo baixo do sinal do fósforo nos complexos (≈ 30 ppm) comprova-se a coordenação da trifenilfosfina ao paládio, este

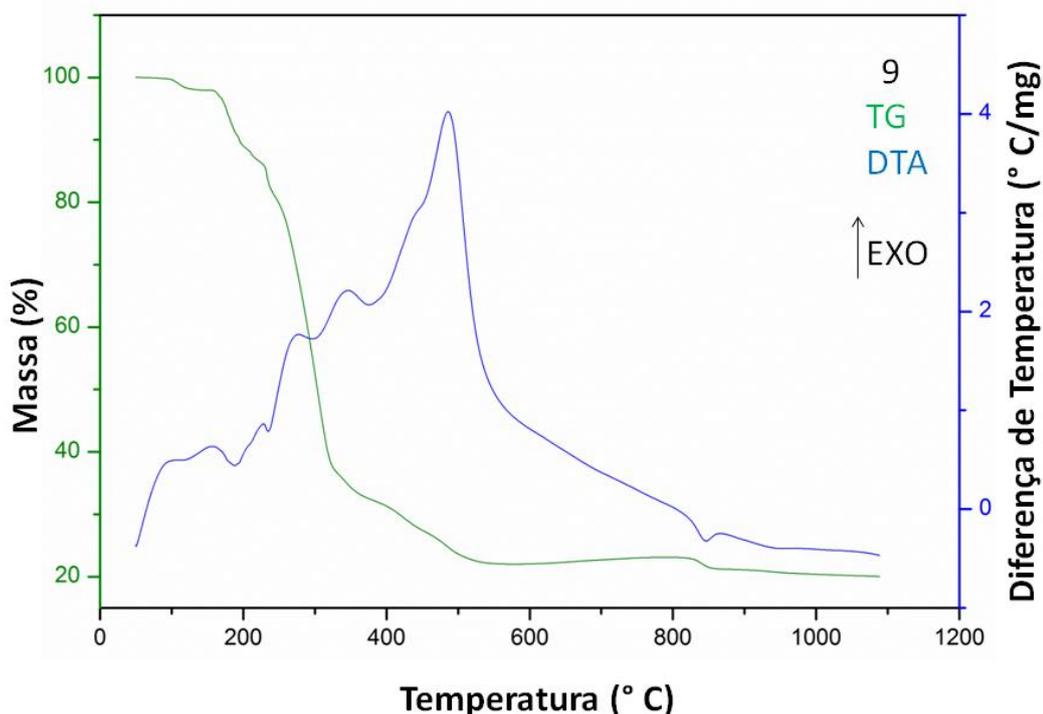
deslocamento tão pronunciado ocorre devido a retirada de densidade eletrônica e consequentemente a desblindagem do átomo de P após a coordenação ao metal. A presença de dois sinais referentes a átomos de P no espectro do composto **9** em 33 e 24 ppm, sugere a ocorrência de isômeros estruturais em solução entre as formas *cis* e *trans*, respectivamente^{110, 111}. O mesmo não acontece com o complexo **10**, observa-se apenas um sinal para o átomo de fósforo na molécula, isto possivelmente ocorre devido ao fato do bromo ser menos lábil e a sua ligação ao paládio ser mais forte do que o cloro, evitando a troca de posição.

4.2.4 Análise termogravimétrica:

Curva TG/DTA do composto [PdCl₂(PPh₃)(TAA)] (**9**):

A curva TG mostrou que a decomposição térmica do complexo **9** (Figura 58), tem início em 104 °C, com a perda de 2,18% em massa. No intervalo entre 160-324 °C, observa-se uma grande perda de massa de 60,00 %, em seguida ocorre mais uma saída de ligantes equivalente a 15,80 %. Na etapa posterior (534-793 °C) acontece um pequeno ganho de massa de 1,10 % decorrente da conversão do restante do paládio, gerado a partir da decomposição do complexo, em PdO. Na última etapa (793-1000 °C), ocorre uma perda de massa referente a eliminação do oxigênio envolvido na decomposição do PdO a paládio metálico. Dando origem a um resíduo de 21,04 %, condizente com o cálculo de paládio contido na amostra (20,67%). Na curva DTA pode-se observar picos exotérmicos consecutivos na região de 275-487 °C relativos à queima do ligante orgânico e um pico endotérmico em 841 °C atribuído à redução do paládio.

Figura 58 - Curva TG para o complexo $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})\cdot\text{H}_2\text{O}$ ($m = 10 \text{ mg}$)

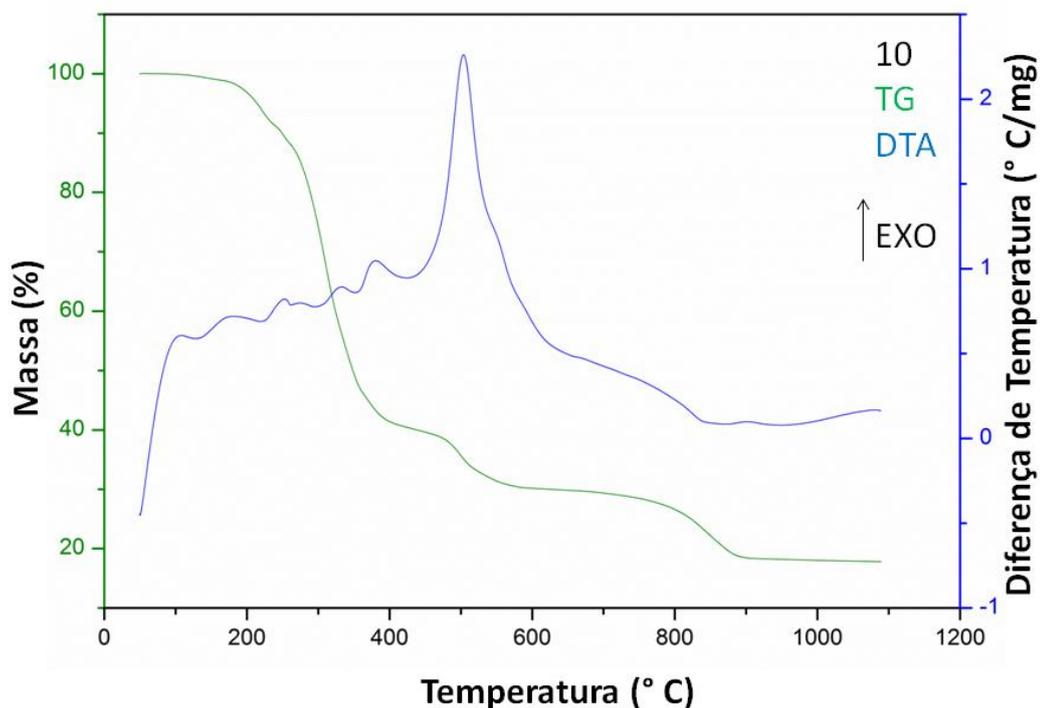


Fonte: Autor

Curva TG/DTA do composto $[\text{PdBr}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ (**10**):

A decomposição térmica do complexo **10** (Figura 59) se dá em apenas 3 etapas, a primeira acontece no intervalo de 90 a 393 °C, tendo um desprendimento de massa de 58,15 %. As outras duas etapas ocorrem consecutivamente nos intervalos entre 393-571 °C e 571-1000 °C, com perdas de massa de 11,23 % e 12,61 % respectivamente. Dando origem ao resíduo de 18,01 % referente ao paládio metálico da amostra (Pd^0 calculado = 17,63%). A curva DTA mostra uma série de picos exotérmicos entre 172-503 °C atribuídos a queima dos ligantes e um pico endotérmico referente a decomposição do PdO a Pd^0 .

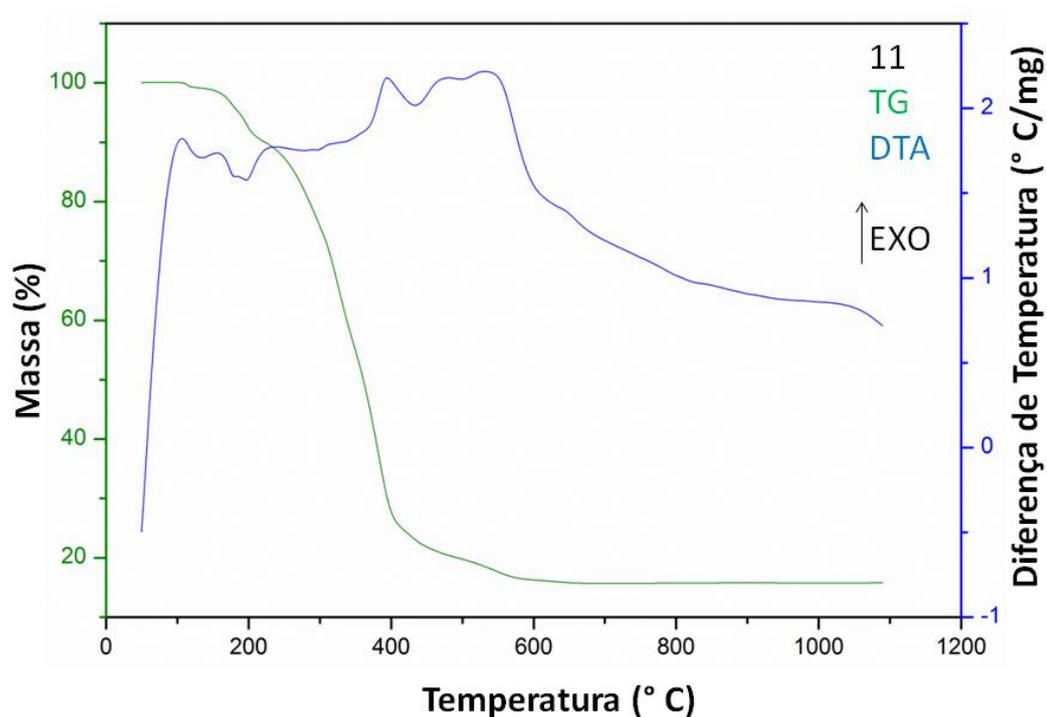
Figura 59 - Curva TG para o complexo $[\text{PdBr}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ ($m = 10 \text{ mg}$)



Fonte: Autor

Curva TG/DTA do composto $[\text{PdI}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ (**11**):

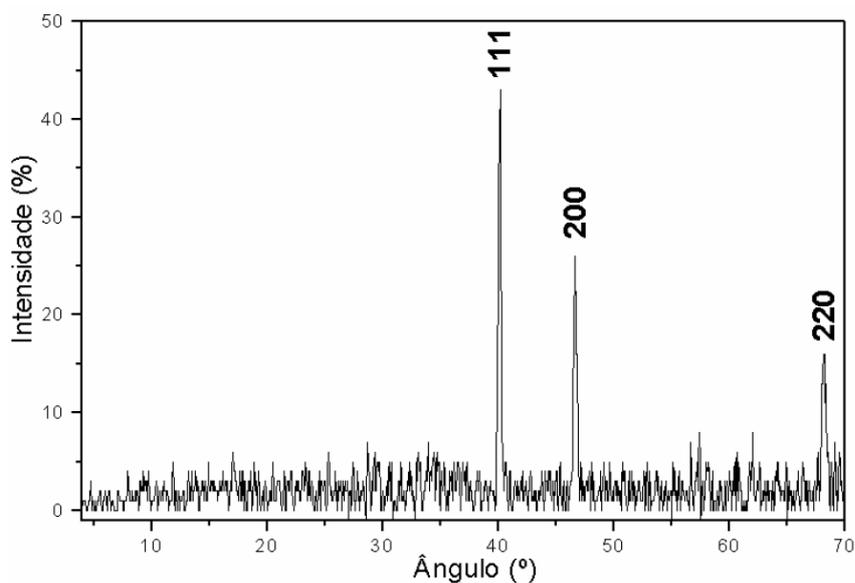
O mesmo perfil de decomposição apresentado pelo complexo **9** foi observado para o $[\text{PdI}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ (**11**) (Figura 60). As três perdas consecutivas de massa ocorrem entre 109-217 °C (9,61 %), 217-409 °C (64,73 %) e 409-671 °C (9,94 %). Novamente como resíduo encontramos a porcentagem referente ao Pd^0 (15,72 % obtido; 15,25 % calculado). A curva DTA do composto **11** apresenta um pico endotérmico em 189 °C e um pico exotérmico em 388 °C.

Figura 60 - Curva TG para o complexo $[\text{PdI}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ ($m = 10 \text{ mg}$)

Fonte: Autor

As curvas termogravimétricas das espécies obtidas mostraram decomposições térmicas consecutivas em várias etapas, levando à formação de paládio metálico como resíduo final em todas elas, o difratograma do complexo **9**, representativo também para os demais complexos, se encontra na Figura 61. Vale destacar que o teor de paládio metálico obtido para todas as termodecomposições está em concordância com o valor calculado para as fórmulas $[\text{PdX}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ ($X = \text{Cl}^-, \text{Br}^-, \text{I}^-$). Considerando as temperaturas iniciais de termodecomposição dos compostos, propõe-se a seguinte ordem de estabilidade térmica: **9** \equiv **11** < **10**.

Figura 61 - Difratoograma de raios-x, pelo método do pó, para a termodecomposição do complexo $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$

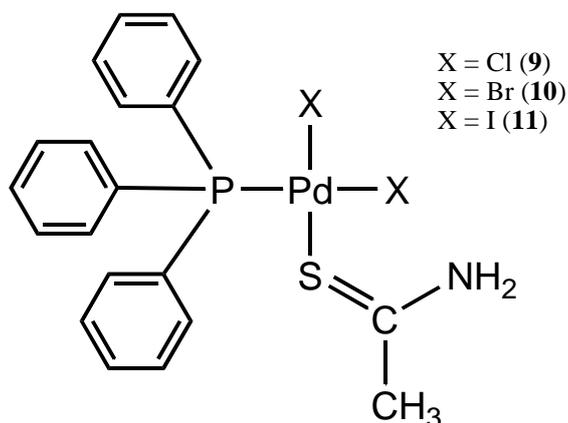


Fonte: Autor

4.2.5 Proposição Estrutural

Com base nos resultados obtidos a partir da espectroscopia no infravermelho e RMN de ^1H , ^{13}C e ^{31}P , juntamente com os resultados de análise elementar e análise térmica, sugerem-se as seguintes estruturas para os compostos **9-11** (Figura 62).

Figura 62 - Proposta estrutural para os complexos de **9-11**



Fonte: Autor

Espera-se um ambiente quadrado planar ao redor do átomo de paládio, com seus sítios de coordenação ocupados por dois átomos de cloro (**9**), bromo (**10**) e iodo (**11**),

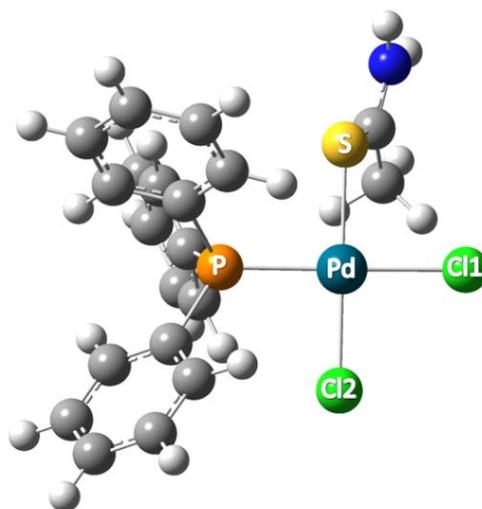
assumindo uma configuração *cis*. Uma molécula de tioacetamida coordenada via átomo de enxofre e uma molécula de trifenilfosfina coordenada via átomo de fósforo completam os sítios de coordenação do metal. O complexo **9** apresentou os dois isômeros geométricos em solução, como foi visto no RMN de ^{31}P . Já o composto **10**, foi observado somente o isômero *cis* no espectro de RMN ^{31}P e espera-se o mesmo resultado para o composto **11**, uma vez que o iodo se liga ainda mais forte ao Pd evitando a isomerização.

Estes dados estão de acordo com o que esperávamos dos resultados das sínteses, devido a competição pelos elétrons d livres do metal, entre os átomos de S e P em uma possível configuração *trans*.

4.2.6 Otimização das estruturas:

Como a estrutura molecular dos complexos não pode ser determinada pela técnica de difração de raios X de monocristal, a otimização da geometria do complexo **9** foi calculada usando o algoritmo otimizado de Berny⁸³. A estrutura obtida está ilustrada na Figura 63.

Figura 63 - Estrutura otimizada do complexo $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)(\text{TAA})]$ (**9**)



Fonte: Autor

Com base nos dados do cálculo computacional, observou-se uma geometria quadrado planar levemente distorcido em volta do átomo de paládio como é previsto pelos

valores dos ângulos encontrados na Tabela 13. Os valores de distância de ligação que envolvem o átomo de paládio estão descritos na Tabela 14.

Tabela 13 - Ângulos da molécula envolvendo o átomo de Pd

Ângulos (°)
S-Pd-Cl1 = 91
P-Pd-Cl1 = 177
Cl1-Pd-Cl2 = 93
S-Pd-P = 87
S-Pd-Cl2 = 183
Fonte: Autor

Tabela 14 - Distância de ligação envolvendo o átomo de Pd

Distância de ligação (Å)
Pd-S = 2,44
Pd-Cl1 = 2,40
Pd-Cl2 = 2,36
Pd-P = 2,36
Fonte: Autor

4.3. Investigação das Propriedades Biológicas:

4.3.1. Determinação da citotoxicidade:

Ensaio biológico pelo método do MTT do efeito inibitório de crescimento celular causado por todos os complexos, os ligantes 4-MeT e 4-PhT e a cisplatina foram realizados *in vitro* frente a duas linhagens tumorais murinas, LM3 de adenocarcinoma mamário e LP07 de adenocarcinoma pulmonar. Os valores de IC₅₀ estão apresentados na Tabela 15.

As concentrações de dmsO nas soluções-mãe (5%) e nas respectivas diluições finais (0,5-0,05%) das espécies investigadas não foram significativamente citotóxicas às linhagens tumorais, portanto não influenciam na citotoxicidade dos compostos¹¹².

Tabela 15 - Valores de IC₅₀ dos complexos de **1-11**, dos ligantes 4-MeT e 4-PhT e da cisplatina frente as linhagens LM3 e LP07

Compostos	IC ₅₀ (μM)	
	LM3	LP07
[PdCl(PPh ₃)(4-MeT)]Cl (1)	5,92±0,59	5,61±1,32
[PdBr(PPh ₃)(4-MeT)]Br (2)	6,05±0,76	6,98±0,71
[PdI(PPh ₃)(4-MeT)]I (3)	3,22±0,84	4,69±0,14
[Pd(SCN)(PPh ₃)(4-MeT)]SCN (4)	5,55±0,20	4,83±0,91
[PdCl(PPh ₃)(4-PhT)]Cl (5)	8,57±1,21	7,11±0,64
[PdBr(PPh ₃)(4-PhT)]Br (6)	8,84±2,80	3,58±0,16
[PdI(PPh ₃)(4-PhT)]I (7)	2,79±0,58	3,72±0,71
[Pd(SCN)(PPh ₃)(4-PhT)]SCN (8)	4,61±1,69	3,56±0,31
4-MeT	>100	>100
4-PhT	>100	>100
[PdCl ₂ (PPh ₃)(TAA)] (9)	96,80 ± 2,89	>100
[PdBr ₂ (PPh ₃)(TAA)] (10)	>100	>100
[PdI ₂ (PPh ₃)(TAA)] (11)	>100	>100
Cisplatina	30,3±3,7	4,3±0,4

Fonte: Autor

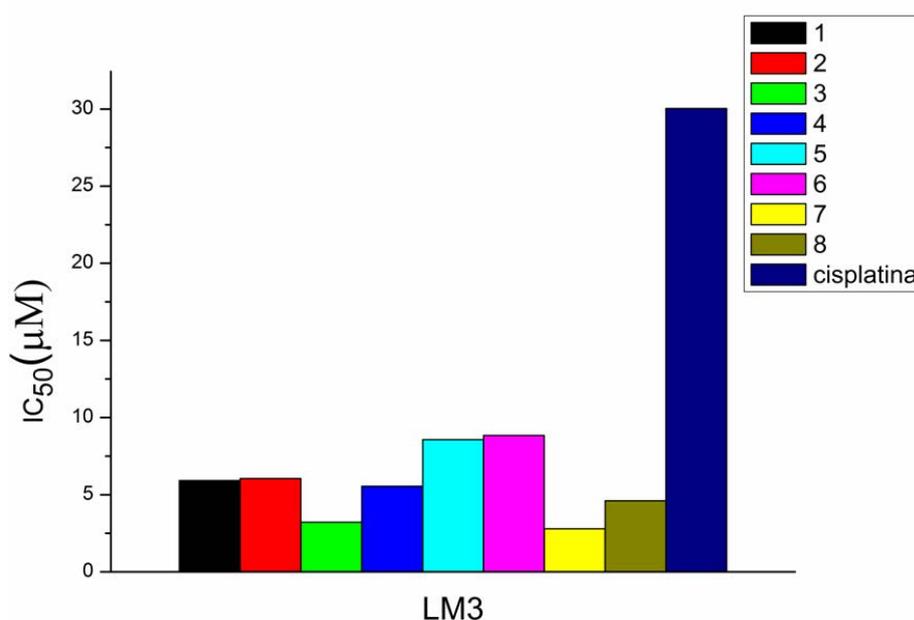
Os complexos de **1-8** demonstraram ser citotóxicos frente as linhagens testadas, enquanto os compostos de **9-11** mostraram pouca atividade ou inatividade. Com isso, conclui-se que a presença do ligante quelato na estrutura dos complexos de paládio(II) contribui significativamente para grande citotoxicidade apresentada pelos complexos de **1-8**.

Apesar dos promissores resultados recentes contendo complexos *cis/trans*^{113,114}, tanto de platina(II) como de Pd(II), com ligantes monodentados, o sistema apresentado contendo tioacetamida e trifenilfosfina em uma configuração *cis* se mostrou ineficaz na destruição das células cancerígenas, indicando que apenas a presença de ligantes menos lábeis não foi suficiente para que os compostos de Pd(II) apresentem uma boa atividade. Lembrando que a velocidade de saída dos ligantes é um fator importantíssimo na possível ação anticancerígena dos compostos.

Observando os resultados para a linhagem LM3 (Figura 64) mais detalhadamente, evidencia-se a potencialidade destes compostos, visto que a atividade de todos eles foi

consideravelmente maior do que a da cisplatina. Vale a pena destacar que os compostos **3** e **7** apresentam valores de citotoxicidades 9,5 e 11 vezes maior do que o fármaco de referência, respectivamente. Estes resultados sugerem que a presença de diferentes contra íons afetam significativamente a citotoxicidade dos complexos, indicando que a força da ligação Pd-X possui um papel importante na atividade dos compostos. A substituição do cloro por bromo, iodo ou tiocianato, átomos ou grupos mais volumosos e macios, diminuiu o valor de IC₅₀, mostrando que, neste caso, uma ligação mais forte entre o metal e o haleto ou pseudo-haleto confere em uma maior atividade. Sendo assim, os iodo-complexos apresentaram uma citotoxicidade mais elevada em ambas as famílias.

Figura 64 - Gráfico de IC₅₀ dos complexos de **1-8** e da cisplatina frente à linhagem LM3, o desvio padrão foi omitido em todos os casos



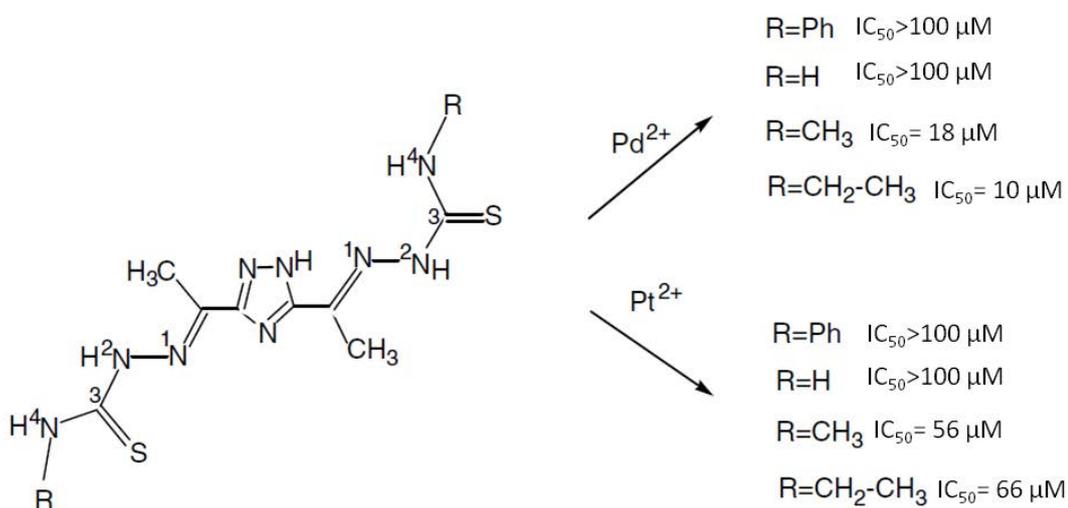
Fonte: Autor

Esta constatação também foi feita por Sadler *et al.*¹¹⁵ em complexos organometálicos de rutênio(II) e ósmio(II). Os cloro-complexos apresentavam uma citotoxicidade intermediária, com valores de IC₅₀ entre 9,3-12,1 µM, porém a substituição do cloro pelo iodo, resultou em iodo-complexos com uma eficácia impressionante frente a linhagem MCF7 de câncer de mama humano. Além disso, eles demonstraram que os complexos contendo iodo são mais seletivos que os seus análogos de cloro e também que a cisplatina.

Entretanto, diferente do esperado, a presença da metila ou fenila no N4 da tiossemicarbazida pouco influenciou no resultado de IC₅₀ frente a estas linhagens. Porém mais testes deverão ser realizados em linhagens diferentes para a confirmação deste dado.

Matesanz *et al.*¹¹⁶ sintetizaram uma série de compostos de Pd(II) e Pt(II) contendo tiossemicarbazonas N4 substituídas derivadas do 3,5-diacetil-1,2,4-triazolbis(tiossemicarbazona) [(Tz-NHRTSC)₂] que comprovam a influência do substituinte nesta posição na atividade dos complexos (Figura 65).

Figura 65 - Estrutura e valores de IC₅₀ de complexos de Pt(II) e Pd(II) com ligantes N4 substituídos

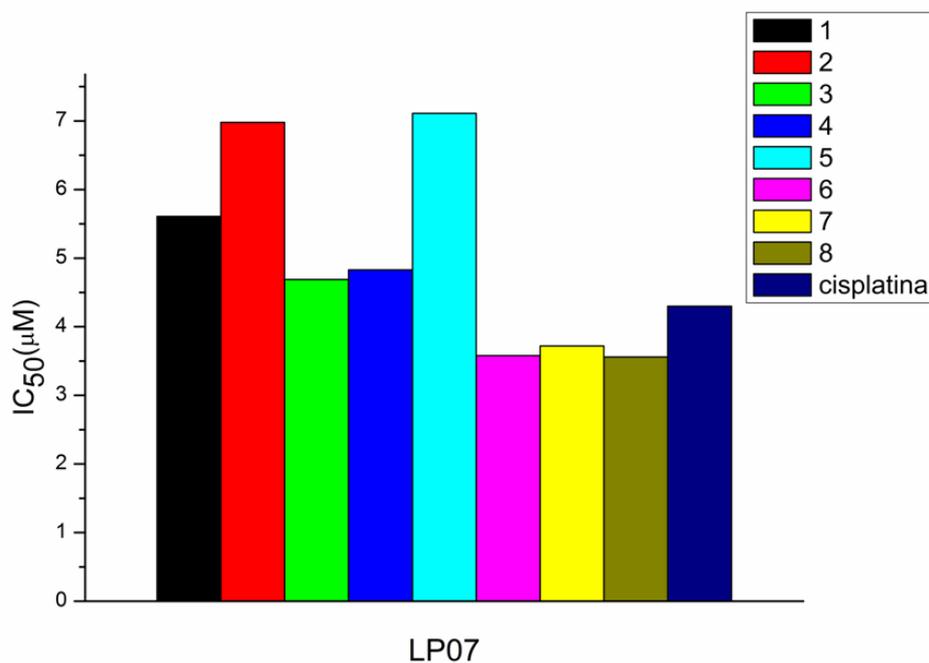


Fonte: Matesanz *et al.*¹¹⁶

Neste trabalho foi observado que os complexos que possuem a 4-metiliossemicarbazona foram os mais ativos frente a linhagem A2780cisR de câncer de ovário humano resistente a cisplatina. Destaca-se ainda a maior citotoxicidade dos complexos de paládio(II) comparado com seus análogos de Pt(II), enfatizando o porque de nossa escolha neste metal.

Frente à linhagem LP07, os complexos 1-8 apresentaram atividade similar à cisplatina, como pode ser visto pelo gráfico da Figura 66.

Figura 66 - Gráfico de IC₅₀ dos complexos de **1-8** e da cisplatina frente à linhagem LP07, o desvio padrão foi omitido em todos os casos



Fonte: Autor

Os complexos **6-8** apresentaram uma citotoxicidade levemente mais acentuada do que o fármaco padrão frente a linhagem LP07. Comparando estes resultados com outros trabalhos do grupo em que complexos de paládio foram testados frente as mesmas linhagens tumorais, pode-se notar que o uso das tiossemicarbazidas e trifenilfosfina se mostrou uma boa estratégia para se obter compostos com elevada ação anticancerígena (Tabela 16).

Tabela 16 - Valores de IC₅₀ de complexos de Pd(II) sintetizados pelo grupo

Compostos	IC ₅₀ (μM)	
	LM3	LP07
[PdI ₂ (HmPz) ₂] ¹⁰⁴	>140	>140
[PdI ₂ (HdmIPz) ₂] ¹⁰⁵	>140	>140
<i>Trans</i> -[Pd(SCN) ₂ (isn) ₂] ¹¹⁷	325,73 ± 9,47	317,93 ± 8,14
[PdI ₂ (tdmPz)] ⁴⁶	24,54 ± 2,24	28,70 ± 3,40
[Pd(dmba)(I)Tu] ¹¹⁸	14,4 ± 1,9	50,8 ± 2,2
[Pd(dmba)(μ-I) ₂] ¹¹⁸	36,3 ± 3,2	60,7 ± 2,2
<i>Trans</i> -[PdCl ₂ (PPh ₃)(TAA)] (9)	96,80 ± 2,89	>100
[PdI(PPh ₃)(4-PhT)]I (7)	2,79 ± 0,58	3,72 ± 0,71
Cisplatina	30,3±3,7	4,3±0,4

Fonte: Autor

Por possuir apenas um grupo abandonador e ser catiônico acredita-se que estes complexos formem monoaddutos com o DNA atuando de maneira diferente da cisplatina ou mesmo capazes de interagir com outros alvos. E talvez por isso, tenham apresentado um eficácia tão superior ao fármaco frente a linhagem LM3.

Diante destes resultados, somente os complexos de **1-8** foram selecionados para a realização de estudos em possíveis alvos farmacológicos.

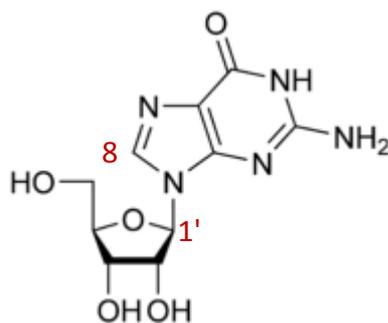
4.3.2. Interação com a guanosina:

Devido a atividade citotóxica promissora dos compostos **1-8** contra as células tumorais das linhagens testadas se mostra necessário uma maior elucidação do mecanismo de ação ou mesmo do alvo biológico destes complexos. O principal alvo dos compostos de platina atualmente utilizados como agentes antitumorais é o DNA. Sendo assim, se torna natural a escolha deste alvo como sendo o principal responsável pela citotoxicidade dos complexos sintetizados neste trabalho.

O primeiro passo realizado para provar que tais compostos interagem com o DNA foi a realização de reações com uma base purina, no caso a guanosina, como um sistema modelo (Figura 67). Uma vez que se os complexos forem capazes de se ligarem a esta base purina, será muito provável a sua capacidade de interagir com as bases purinas do DNA. Todas as reações realizadas foram monitoradas por RMN de ¹H em CD₃OD. Quando

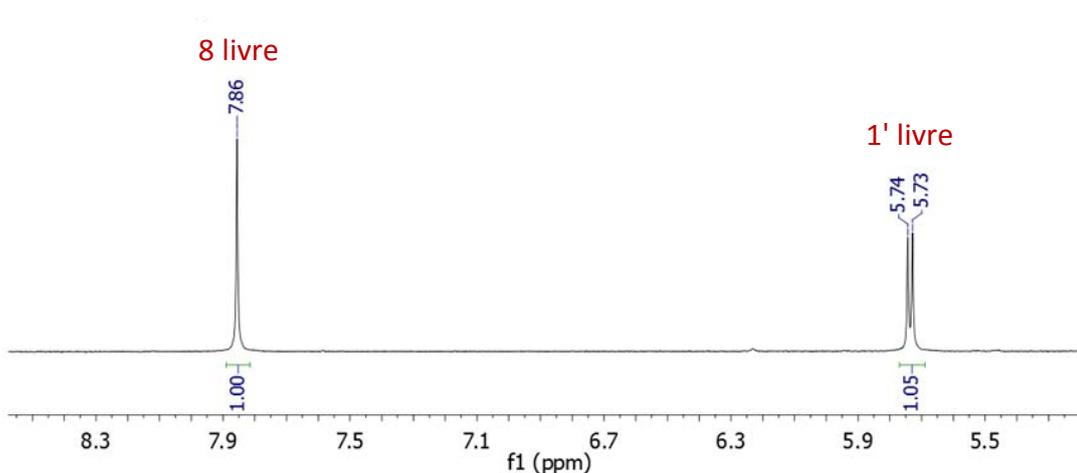
coordenada ao metal o sinal referente ao H8 da guanósina se desloca em $\approx 0,5$ ppm, para campo baixo^{119, 120}. A Figura 68 apresenta o espectro de RMN de ^1H da guanósina livre.

Figura 67 - Estrutura da guanósina



Fonte: Autor

Figura 68 - Espectro de RMN de ^1H da guanósina em MeOD-d_4



Fonte: Autor

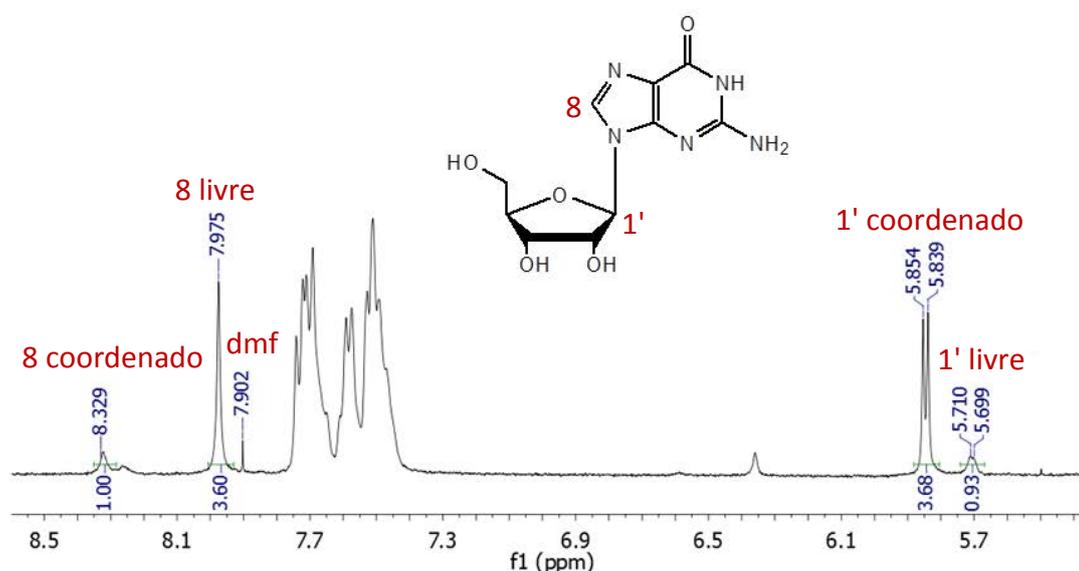
Inicialmente, tentou-se a reação dos complexos suspensos em água com a adição de uma solução aquosa contendo a guanósina, em uma razão 1:2 metal/ligante. Após 24 h, não foi observado nenhuma alteração do sinal referente ao H8 no espectro de RMN de ^1H do complexo.

No segundo ensaio houve a tentativa de ativar os compostos, formando o aqua complexo, como ocorre no mecanismo de ação da cisplatina, substituindo os grupos aniônicos por moléculas de H_2O , através de reações com o nitrato de prata e posterior

reação com a guanosina¹²¹. Novamente, nenhuma mudança foi observada no espectro de RMN de ¹H do composto.

Então, devido a baixa solubilidade dos complexos em água e a tentativa fracassada de ativá-los em meio aquoso, a solução foi alterar o solvente, a escolha mais adequada para a situação foi a utilização de dmf. Assim, a reação direta entre os complexos e a base purina foi realizada da mesma forma citada anteriormente. Depois de 24 h, o solvente foi eliminado com o auxílio de uma bomba de vácuo e o produto resultante foi redissolvido em metanol, filtrado e analisado por RMN de ¹H. O espectro apresenta sinais referentes a duas espécies de guanosina em solução, como pode ser observado na Figura 69, um conjunto de sinais atribuídos ao ligante coordenado e outro para o ligante livre, indicando que a reação não ocorreu completamente.

Figura 69 - Espectro de RNM de ¹H da reação de **1** com a guanosina em MeOD-d₄



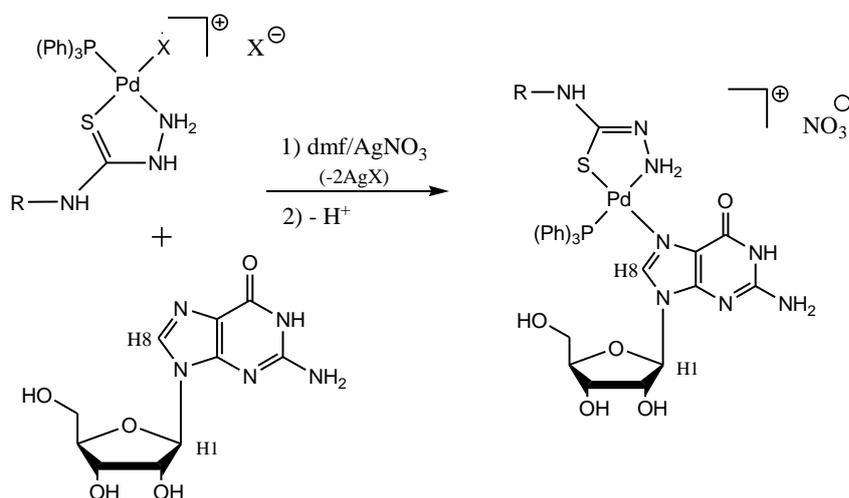
Fonte: Autor

Diante deste resultado, variações no tempo e temperatura reacional foram feitas, porém o espectro pouco se alterou. Perante tal fato, foi decidido a realização da reação em dmf com a ativação prévia dos complexos.

Para isso, os haletos e o grupo tiocianado foram removidos da molécula pelo método AgNO₃/dmf, desenvolvido por Lippert *et al.*¹²², em uma reação sob o abrigo da luz, na razão 1:2 metal-nitrato. A formação de um complexo intermediário contendo ligantes oxigenados

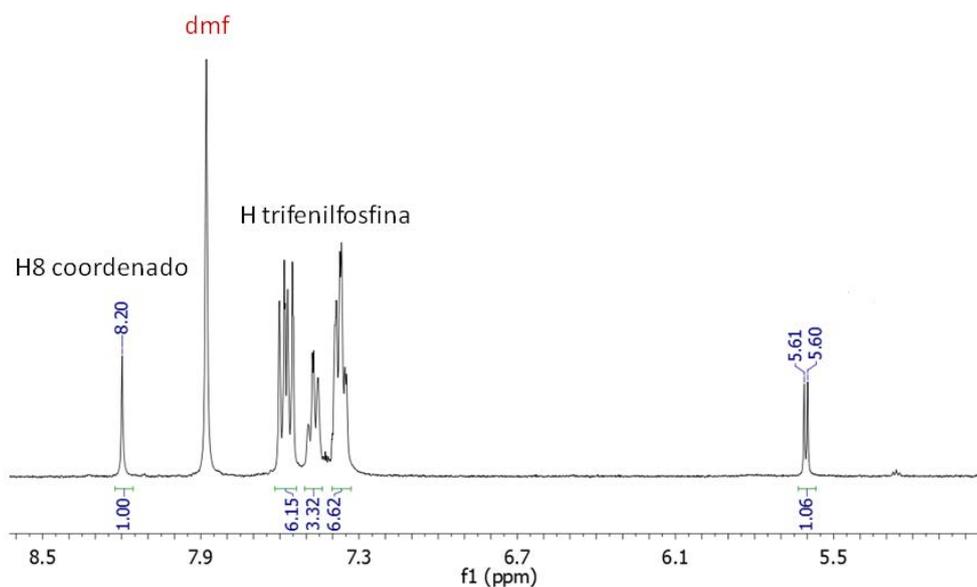
[Pd(Od)(PPh₃)(4-RT)]NO₃ (Od = O1-DMF, NO₃⁻) conduz a uma substituição mais rápida do que com os haletos ou tiocianato, ou seja, estes ligantes são bons grupos abandonadores, deixando os complexos mais suscetíveis a reação com a guanosina. O sal de prata formado, AgX (X= Cl, Br, I, SCN), foi retirado do meio reacional por filtração e então se adicionou a base purina em uma razão molar 1:2 metal-ligante. A reação ficou sob agitação magnética por 16 h (Esquema 4). Em seguida o solvente foi eliminado com o auxílio de uma bomba de vácuo e o produto resultante foi redissolvido em metanol, filtrado e analisado por RMN de ¹H (Figuras 70 e 71) e espectrometria de massas (Figuras 72-76).

Esquema 4 - Reação entre os complexos **1-8** e a guanosina



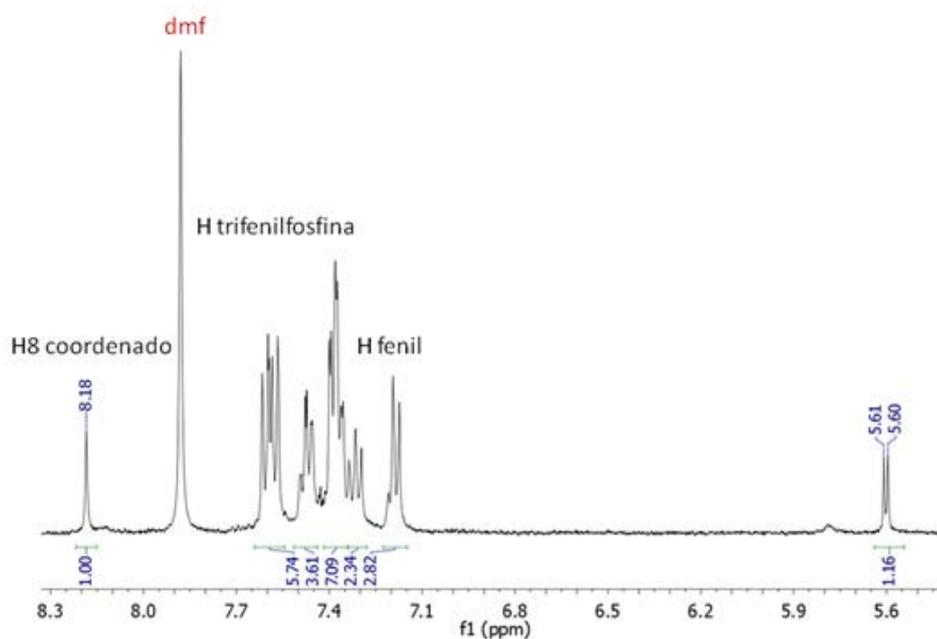
Fonte: Autor

Figura 70 - Espectro de RNM de ^1H representativo dos complexos de **1-4** após a reação com a guanosina em MeOD-d_4



Fonte: Autor

Figura 71 - Espectro de RNM de ^1H representativo dos complexos de **5-8** após a reação com a guanosina em MeOD-d_4



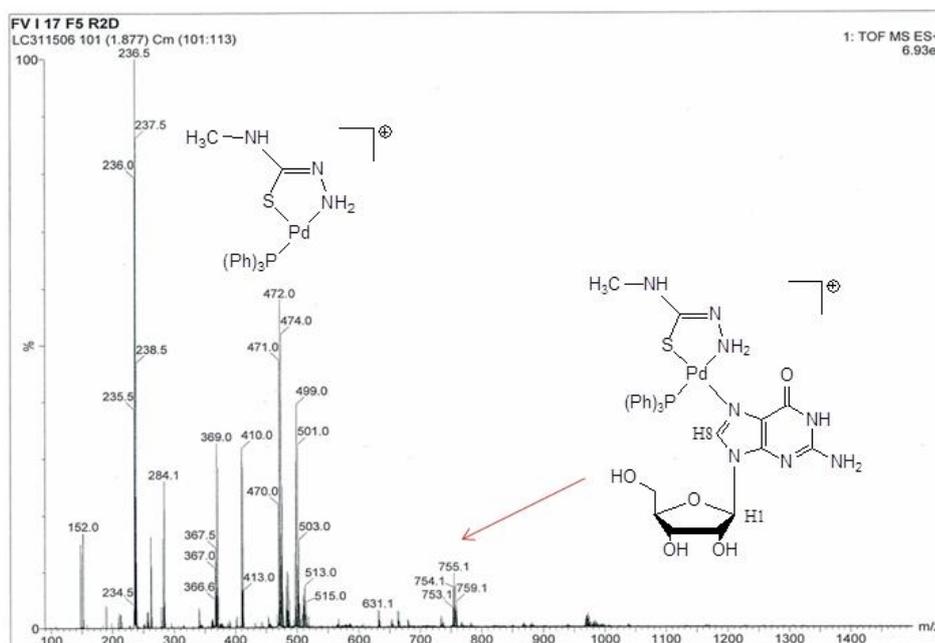
Fonte: Autor

O espectro de RNM de ^1H dos complexos exibem um deslocamento de 0,4 ppm para campo baixo referente ao sinal do H8 da guanosina, esta mudança é típica para a

coordenação do ligante através do N7²². Este mesmo comportamento é observado na interação da cisplatina com a guanosina do DNA, sendo que a cisplatina se liga a duas bases nitrogenadas, enquanto os complexos apresentados mostraram que podem formar apenas monoaddutos.

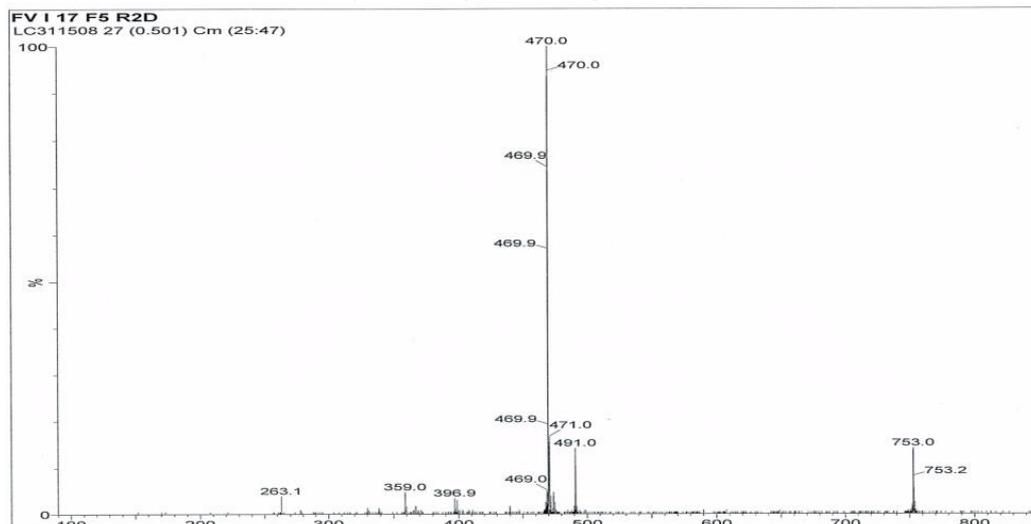
Reforçando a ideia da coordenação do ligante ao centro metálico, o espectro de massas apresenta um pico molecular m/z 755 correspondente ao monoadduto com carga 1+, para os complexos de **1-4** (Figura 72), o pico intenso em m/z 472 pertence ao fragmento do complexo formado sem a guanosina. Para provar tal afirmação, foi realizado o experimento pela técnica de espectrometria de massas sequencial (MS/MS). Esta técnica se baseia na fragmentação controlada do analito de interesse através de um gás, em geral Ar ou N₂. Assim, foi observado que o fragmento correspondente ao pico em m/z 472 provém realmente do complexo Pd-guanosina e não do composto original [PdX(PPh₃)(4-MeT)]X (Figura 73). Além desta técnica, também foi simulado na região do pico do íon molecular, o espectro de massas para o composto em questão e seu resultado foi comparado com o obtido (Figura 74), mostrando a concordância entre ambos.

Figura 72 - Espectro de massas representativo dos complexos de **1-4** após a reação com a guanosina



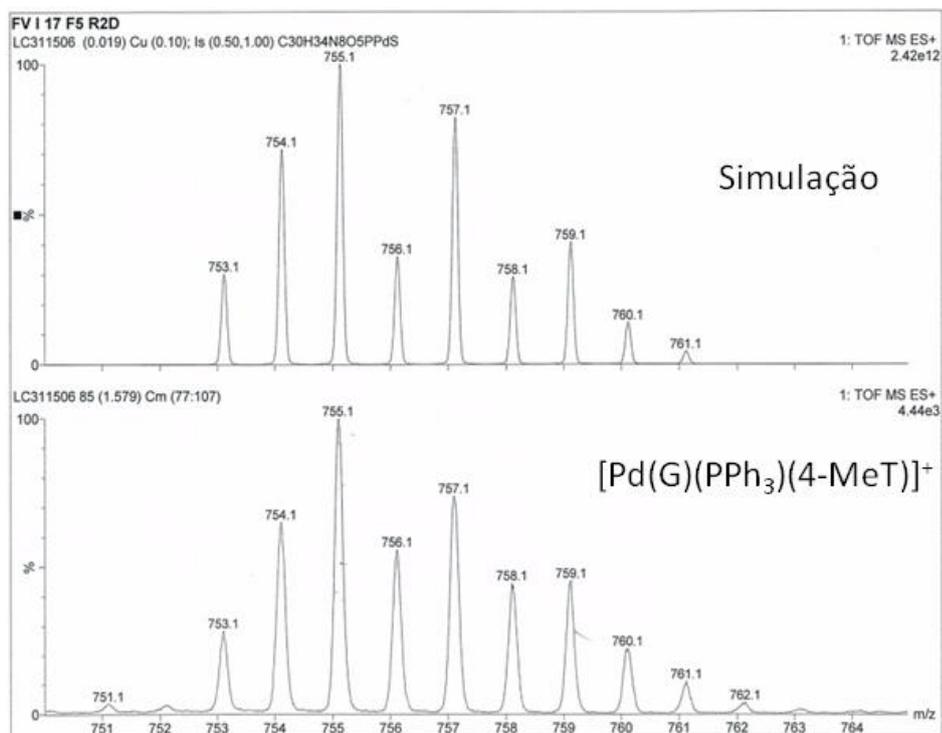
Fonte: Autor

Figura 73 - Espectro de massas MS/MS sobre o pico m/z 755, representativo para complexos de **1-4** após a reação com a guanosina



Fonte: Autor

Figura 74 - Expansão e simulação do pico m/z 755 dos complexos de **1-4** após a reação com a guanosina

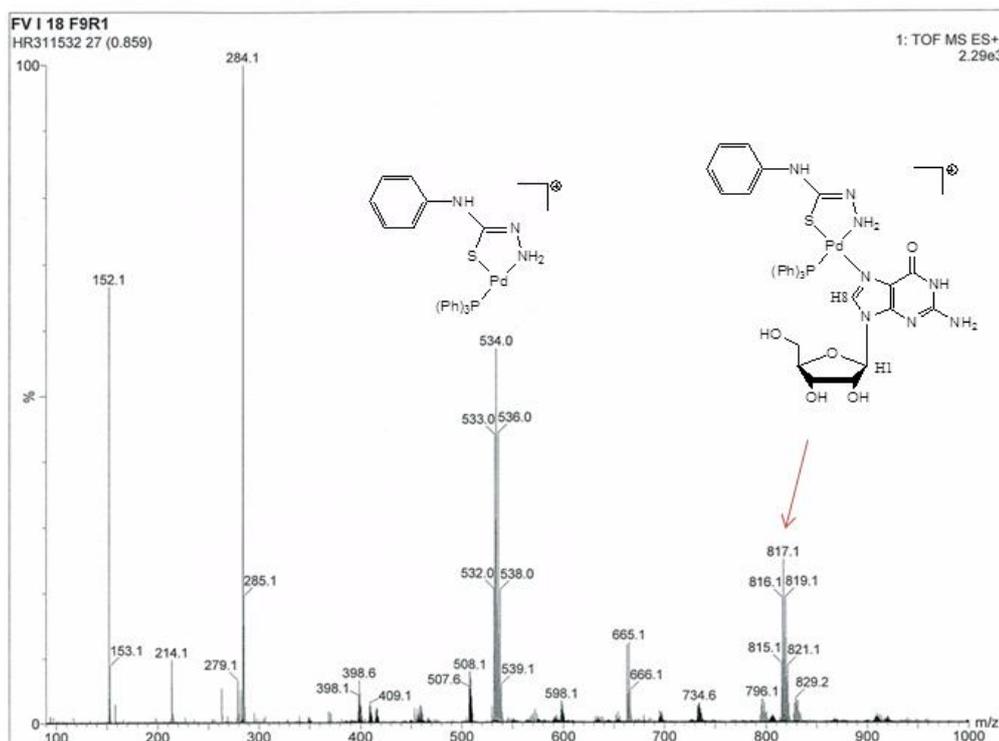


Fonte: Autor

Após a reação, os complexos de **5-8** apresentam um pico do íon molecular em m/z 817, também correspondente ao monoaduto com carga 1+ (Figura 75). Em virtude da semelhança entre as famílias não foi realizado o experimento de espectrometria de massas

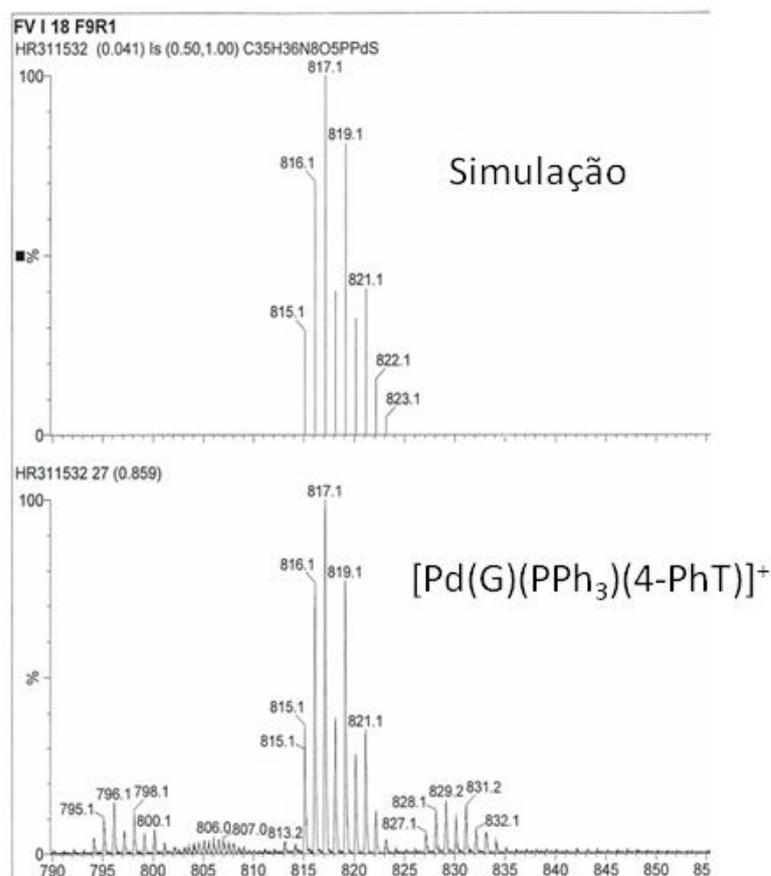
sequencial. Sugere-se que o pico em m/z 534 pertença ao fragmento do complexo formado sem a guanosina. A simulação e expansão do espectro da molécula sintetizada na região do pico do íon molecular, foram realizados, apresentando um resultado bem coerente com o espectro obtido (Figura 76).

Figura 75 - Espectro de massas representativo dos complexos de 5-8 após a reação com a guanosina



Fonte: Autor

Figura 76 - Expansão e simulação do pico m/z 817 dos complexos de **5-8** após a reação com a guanosina



Fonte: Autor

Estes resultados mostram que a trifenilfosfina, como esperávamos, não é substituída pela segunda molécula de guanosina, permanecendo na estrutura dos compostos. Desta maneira, fica claro que os compostos só podem interagir com o DNA formando monoaddutos. Também pode-se concluir, que ocorre a eliminação de um próton durante a complexação da base nitrogenada, provavelmente o próton ácido da tiossemicarbazida, deixando este ligante aniônico, e os complexos continuam com carga 1+, mesmo com a saída dos haletos ou pseudohaletos.

4.3.3. Interação com o plasmídeo superenovelado:

A análise de DNA por eletroforese é uma das técnicas mais utilizadas nos laboratórios de pesquisa e de diagnóstico. Seu princípio se baseia no fato da molécula de DNA possuir carga negativa em valores de pH neutro ou alcalino e conseqüentemente, quando aplicado ou imerso em uma matriz de gel e submetida a um campo elétrico, migra em direção ao pólo

positivo (ânodo). A velocidade da migração depende do tamanho da molécula. Por isso em um dado momento da eletroforese moléculas de tamanhos distintos se encontram em diferentes pontos do gel.

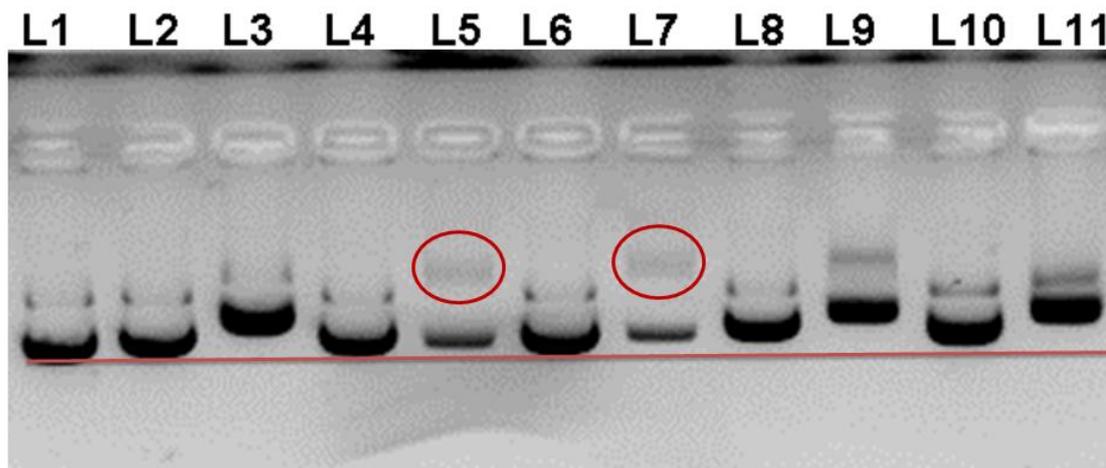
Uma molécula de DNA migra na matriz de agarose com mobilidade inversamente proporcional ao \log_{10} de sua massa molecular, que, por sua vez, é função do tamanho e da forma da molécula. Assim, o tamanho do fragmento do DNA em pares de base, ou seja, sua sequência linear, é o fator que, em princípio, deveria influenciar a migração no gel. Entretanto, nem sempre o DNA encontra-se linear e descondensado e tais fatores podem alterar a migração do fragmento no gel, pois interferem na passagem da molécula de DNA pelos poros¹²³.

As moléculas de DNA circular, utilizadas neste trabalho, podem assumir formas como: relaxada ou superenovelada. Estas formas não migram de acordo com o tamanho do DNA durante a eletroforese. No entanto, quando estas moléculas circulares são linearizadas, ou seja, são clivadas em um ponto e assumem uma forma linear, então a corrida na eletroforese obedece ao tamanho da molécula. Sabe-se que a forma circular superenovelada migra mais rapidamente que a forma relaxada^{124,125}.

Uma vez que os complexos de **1-8** se mostraram reativos frente a uma base purina, acredita-se que serão capazes de interagirem com o DNA. Para isso foi realizado medidas de eletroforese em gel de agarose para se determinar a influência destes compostos na estrutura terciária do DNA e como isso afetará a mobilidade eletroforética do plásmideo circular pNFkB-luc. O mesmo procedimento foi realizado com a cisplatina para fins comparativos, visto que esta droga é capaz de relaxar a estrutura superenovelada do DNA e ou diminuir sua mobilidade¹²⁶.

Primeiro, incubou-se os complexos, em duas concentrações (10 μ M e 100 μ M), com o plasmídeo por 24 horas. Após este período as amostras foram analisadas em gel de agarose 1% a 100 V. Em seguida, o gel foi revelado utilizando-se brometo de etídio sobre luz ultravioleta. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 77 e 78, para os complexos de **1-4** e **5-8**, respectivamente.

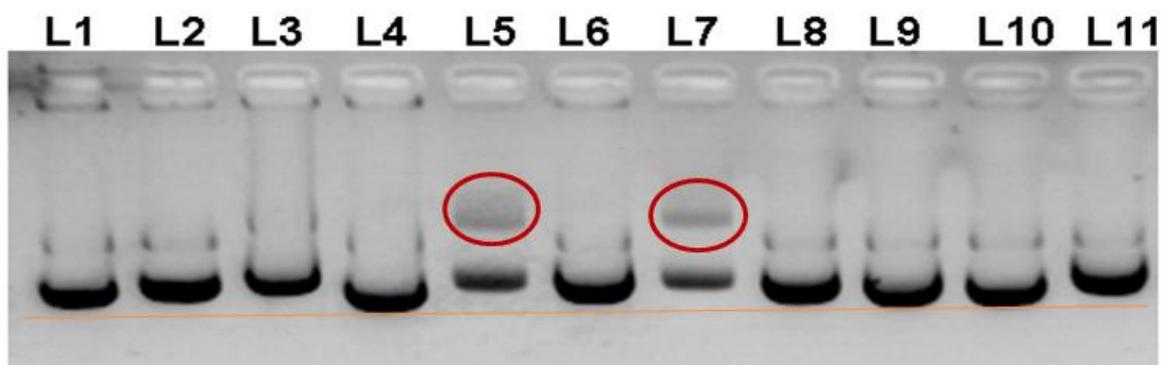
Figura 77 - Incubação do plasmídeo com os complexos **1-4** e cisplatina por 24 h. Linha 1: plasmídeo em água. Linha 2: plasmídeo em água/dmf (2.5%). Linha 3: cisplatina (20 μM). Linha 4: **1** (10 μM). Linha 5: **1** (100 μM). Linha 6: **2** (10 μM). Linha 7: **2** (100 μM). Linha 8: **3** (10 μM). Line 9: **3** (100 μM)/
Linha 10: **4** (10 μM). Linha 11: **4** (100 μM)



Fonte: Autor

Pela análise do gel revelado, observa-se que todos os complexos foram capazes de modificar a mobilidade eletroforética do DNA circular, no entanto, isto só ocorre em concentrações elevadas a 100 μM . Para os compostos **1** e **2**, nota-se o aparecimento de uma outra estrutura de DNA no gel, representada pela leve banda destacada em vermelho, acredita-se que seja a forma relaxada do plasmídeo. Já os complexos **3** e **4**, além de apresentarem esta banda, também afetam o plasmídeo da mesma forma que a cisplatina, nesta concentração, reduzindo sua mobilidade.

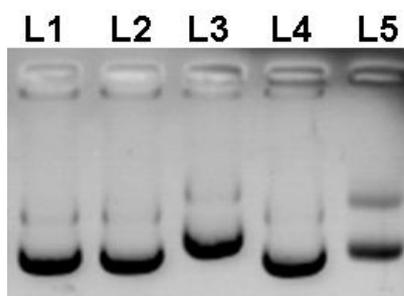
Figura 78 - Incubação do plasmídeo com os complexos **5-8** e cisplatina por 24 h. Linha 1: plasmídeo em água. Linha 2: plasmídeo em água/dmf (2.5%). Linha 3: cisplatina (20 μ M). Linha 4: **5** (10 μ M). Linha 5: **5** (100 μ M). Linha 6: **6** (10 μ M). Linha 7: **6** (100 μ M). Linha 8: **7** (10 μ M). Line 9: **7** (100 μ M)/
Linha 10: **8** (10 μ M). Linha 11: **8** (100 μ M)



Fonte: Autor

Quando analisamos o gel dos complexos **5-8**, são encontradas algumas diferenças em relação aos seus análogos contendo a metila na posição N4. Neste caso, somente os complexos **5**, **6** e **8** interagiram com o DNA, novamente, isto só ocorreu em altas concentrações. Repara-se também que os compostos **5** e **6** afetam a estrutura do plasmídeo de uma maneira muito mais efetiva que o composto **8**. Além de que, são capazes de relaxar o DNA, devido ao aparecimento dos sinais com menor mobilidade. Já o complexo [PdI(PPh₃)(4-PhT)]I (**7**) se mostrou incapaz de reduzir a mobilidade eletroforética do DNA, bem como em danificar a sua estrutura. Por isso, para verificar se a falta de reatividade de **7** em relação ao DNA está relacionada com a força de ligação Pd-I, foi realizada a ativação do complexo, através da remoção do iodo, mediada por AgNO₃ e posterior avaliação da sua capacidade de interação com o DNA, após uma incubação de 24 horas (Figura 79).

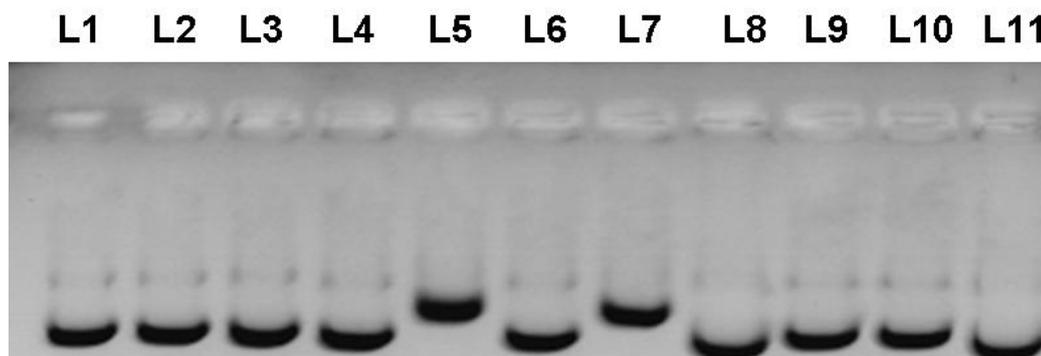
Figura 79 - Incubação do plasmídeo com o complexo **7** pré-tratado com AgNO_3 e cisplatina por 24 h. Linha 1: plasmídeo em água. Linha 2: plasmídeo em água/dmf (2.5%). Linha 3: cisplatina (20 μM). Linha 4: **7** pré-tratado com AgNO_3 (10 μM). Linha 5: **7** pré-tratado com AgNO_3 (100 μM)



Fonte: Autor

Como pode ser observado na Figura 79, o complexo ativado reagiu com o DNA na concentração de 100 μM , indicando que a força de ligação metal-halogênio possui grande influência na sua capacidade de interagir ou não com o DNA. Para nos auxiliar nesta discussão, um experimento com os complexos de **5-8** incubados com o plasmídeo por apenas 15 minutos foi realizado e seu resultado encontra-se na Figura 80.

Figura 80 - Incubação do plasmídeo com os complexos **5-8** e cisplatina por 15 min. Linha 1: plasmídeo em água. Linha 2: plasmídeo em água/dmf (2.5%). Linha 3: cisplatina (20 μM). Linha 4: **5** (10 μM). Linha 5: **5** (100 μM). Linha 6: **6** (10 μM). Linha 7: **6** (100 μM). Linha 8: **7** (10 μM). Linha 9: **7** (100 μM). Linha 10: **8** (10 μM). Linha 11: **8** (100 μM)



Fonte: Autor

Ao analisarmos o gel, conclui-se que apenas os complexos **5** (linha 5) e **6** (linha 7) são capazes de interagir com o DNA, porém diferentemente de quando foram incubados por 24 horas, eles não conseguiram relaxar a estrutura superenovelada, somente diminuíram sua mobilidade. Estes resultados demonstram que a maior labilidade dos átomos de cloro e

bromo quando comparados com o iodo e a molécula do tiocianato afeta na velocidade de interação com o alvo. Curiosamente, a cisplatina (20 μM) não diminuiu a mobilidade do plasmídeo neste tempo de incubação.

Diante destes dados pode-se concluir que a maioria dos compostos interage diretamente com o DNA, mas apenas em concentrações altas, o que vai de encontro com os resultados obtidos na avaliação da citotoxicidade destas moléculas, uma vez que o IC_{50} varia entre 2,79-8,84 μM e 3,56-7,11 μM frente as células tumorais LM3 e LP07, respectivamente. Desta maneira, deve-se descartar o DNA como alvo principal responsável pela ação anticancerígena destes complexos.

Sendo assim, chegamos a um dilema para a continuação do trabalho, visto que os complexos possuem boa atividade, porém interagem pouco com o alvo instintivo para este tipo de complexo. Através de buscas na literatura a respeito destes tipos de células, foi encontrada uma característica que nos chamou a atenção, células tumorais de uma maneira geral, e principalmente, de mama e pulmão possuem uma elevada expressão das enzimas DNA-topoisomerasas. Além disso, estas enzimas são o alvo de alguns fármacos no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo as neoplasias aqui estudadas. Sendo assim, a capacidade de inibição destas enzimas pelos 8 complexos sintetizados foi avaliada.

4.2.4. Inibição das enzimas topoisomerases I e II:

Existem dois tipos de topoisomerasas humanas de acordo com suas funções catalíticas. A topo I liga-se a uma das fitas do DNA, formando uma ligação covalente enzima-DNA entre um resíduo de tirosina e a 3'-fosfato do DNA clivado, sem a necessidade de energia (ATP). A topo II liga-se a dupla fita do DNA através de uma reação de substituição nucleofílica, clivando as 2 fitas complementares com necessidade de ATP¹²⁷.

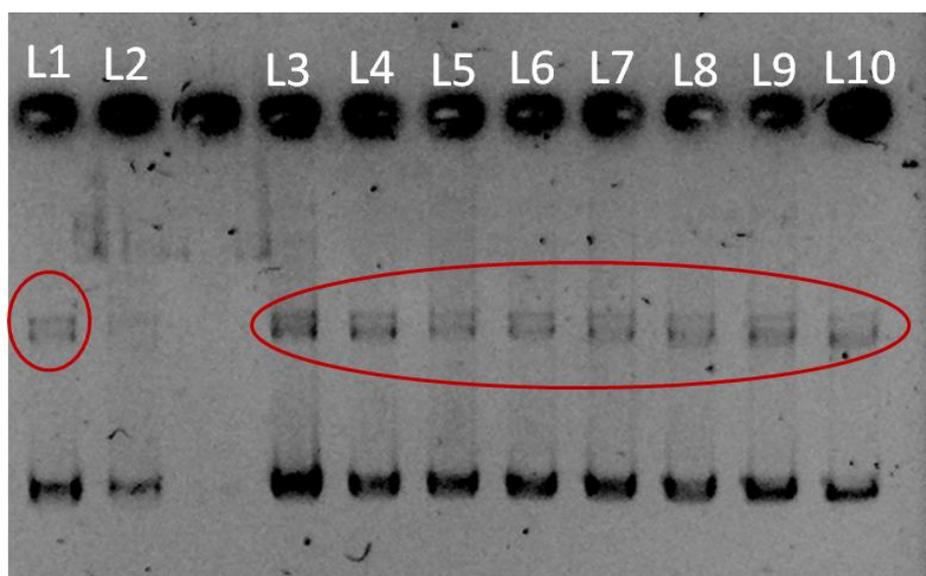
Devido ao papel importante desenvolvido por essas enzimas na manutenção e replicação do DNA durante a proliferação celular, elas passaram a ser um alvo interessante na quimioterapia anticâncer¹²⁸. Além disso, como foi mencionado anteriormente a expressão das DNA-topoisomerasas é muito maior em células tumorais do que nas células normais de metabolismo, reforçando a ideia destas enzimas como um promissor e seletivo alvo.

O experimento de inibição das enzimas foi feito através de eletroforese e foi realizado de acordo com a literatura¹²⁹. As enzimas quando incubadas com a estrutura do

DNA superenovelada podem relaxá-la, produzindo a forma cortada com migração mais lenta na corrida eletroforética. Se um determinado composto tem a capacidade de inibir esta ação deve-se observar no gel uma migração semelhante a encontrada para o DNA sozinho, impedindo a ação da enzima.

Os complexos de **1-8** tiveram sua habilidade de inibição contra a topo I avaliada na concentração de 50 μ M. Os complexos foram incubados por 40 minutos juntamente com o DNA superenovelado e a enzima. Controle positivo (DNA + topo I), e controle negativo (DNA), foram feitos para fins comparativos. Os resultados obtidos se encontram na Figura 81.

Figura 81 - Incubação do plasmídeo com os complexos **1-8** e a topo I por 40 min. Linha 1: controle positivo (DNA + topo I). Linha 2: controle negativo (DNA). Linha 3: **1**. Linha 4: **2**. Linha 5: **3**. Linha 6: **4**. Linha 7: **5**. Linha 8: **6**. Line 9: **7**. Linha 10: **8**



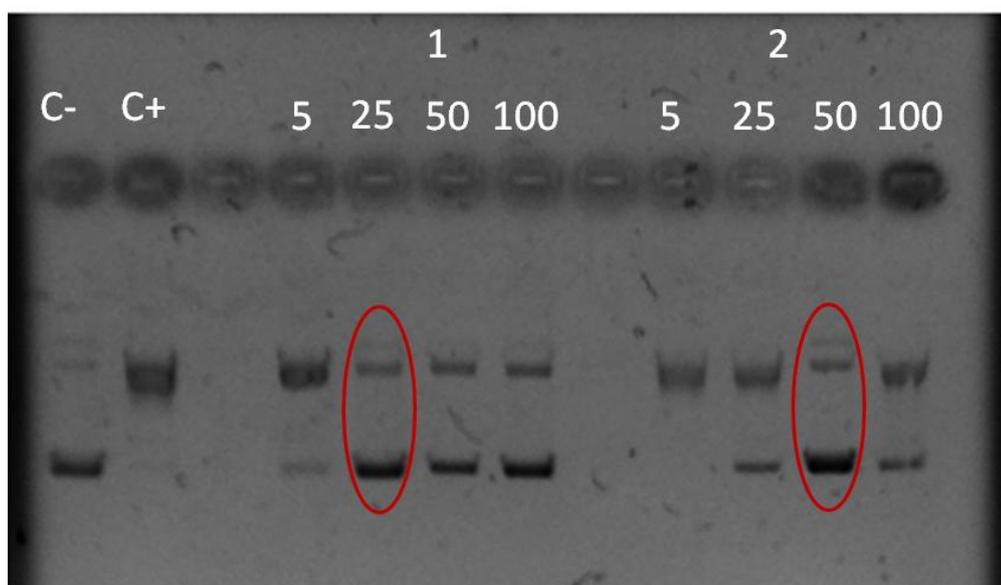
Fonte: Autor

Observa-se na linha 1 que o controle positivo, ou seja, a enzima em contato com o plasmídeo, apresenta apenas uma ação parcial frente ao DNA, isto significa que a enzima em questão mostra pouca atividade. Com isso, somente parte do DNA superenovelado teve uma de suas fitas clivadas, isto pode ser notado pela aparição de um sinal com menor mobilidade eletroforética, demarcado em vermelho e a persistência do sinal referente ao DNA superenovelado. Em contra partida, o controle negativo, linha 2, não apresenta os sinais atribuídos ao DNA clivado, validando o ensaio, mesmo com uma baixa atividade enzimática.

Nas demais linhas (3 a 10) observa-se um comportamento similar ao encontrado para o controle positivo, indicando que todos os compostos falharam em inibir a ação da topoisomerase I na concentração de 50 μM .

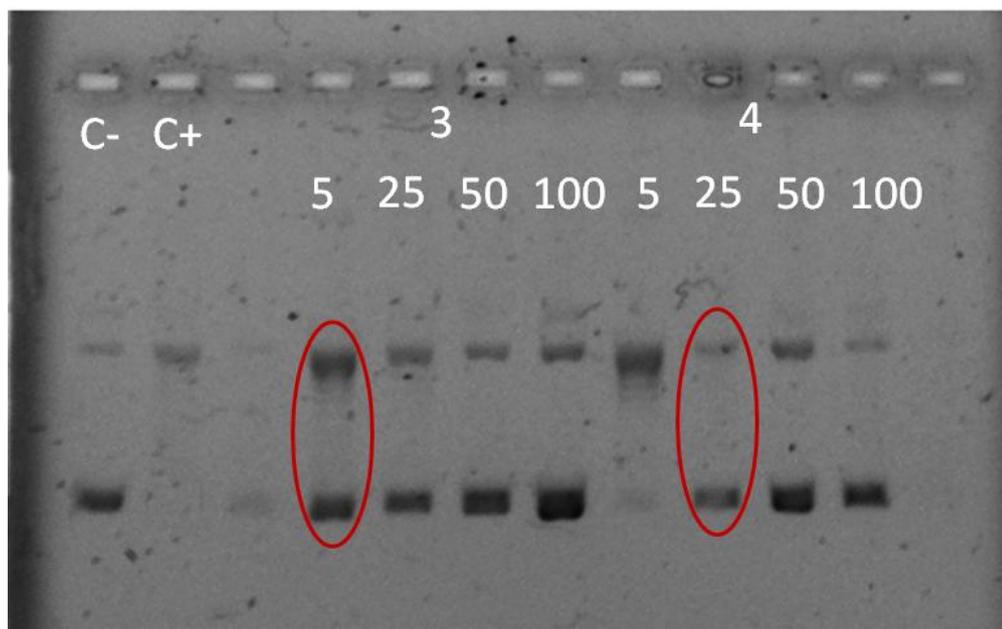
Uma vez que vários compostos apresentam somente atividade contra um tipo de topoisomerase, foi decidido realizar ensaios para avaliar se os compostos de **1** a **8** eram capazes de inibir a topo II α , mesmo após o resultado negativo frente a topo I. Para isso, foram feitas soluções dos complexos em 4 concentrações diferentes, 5, 25, 50 e 100 μM . Estas soluções foram colocadas em contato com o plasmídeo superenovelado, ATP e a topo II, por 40 minutos. Lembrando que diferentemente da topo I a topoisomerase II requer energia para realizar a clivagem das duas fitas do DNA e por isso a necessidade da presença do ATP. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 82-85, novamente foram realizados testes controles, negativo, C- (DNA sozinho), e positivo, C+ (DNA + ATP + enzima).

Figura 82 - Incubação do plasmídeo com os complexos **1** e **2** e a topo II por 40 min em diferentes concentrações, C-, controle negativo e C+, controle positivo



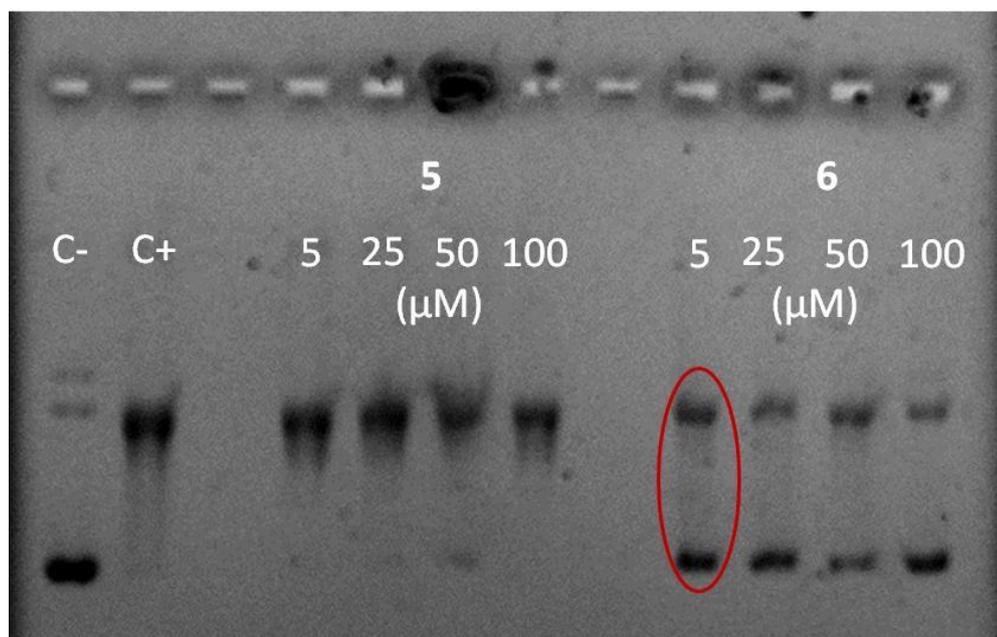
Fonte: Autor

Figura 83 - Incubação do plasmídeo com os complexos **3** e **4** e a topo II por 40 min em diferentes concentrações, C-, controle negativo e C+, controle positivo



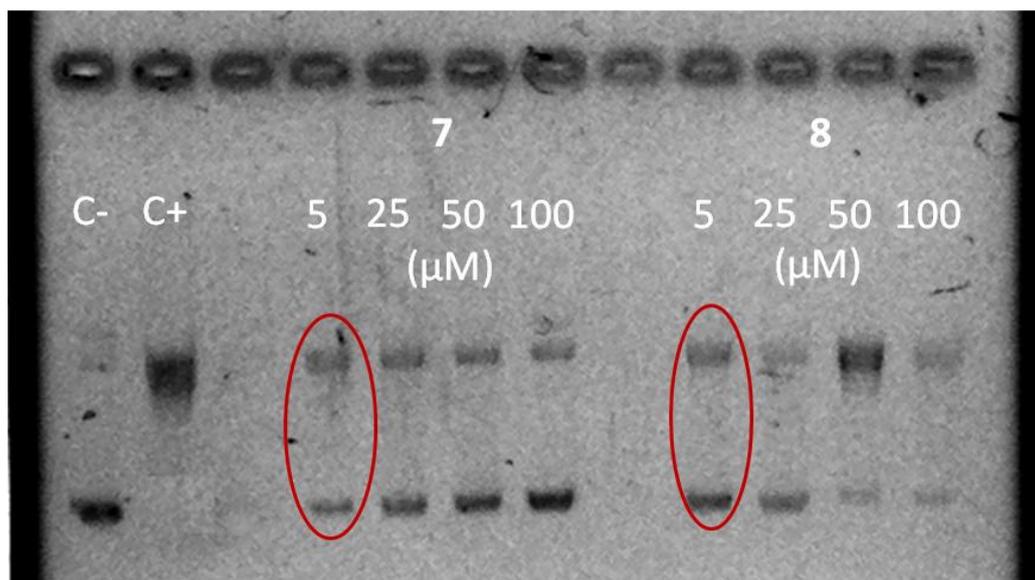
Fonte: Autor

Figura 84 - Incubação do plasmídeo com os complexos **5** e **6** e a topo II por 40 min em diferentes concentrações, C-, controle negativo e C+, controle positivo



Fonte: Autor

Figura 85 - Incubação do plasmídeo com os complexos **7** e **8** e a topo II por 40 min em diferentes concentrações, C-, controle negativo e C+, controle positivo



Fonte: Autor

Os resultados mostraram que com exceção do composto **5** todos os outros complexos foram capazes de interromper a ação da enzima topoisomerase II sobre a estrutura super enrolada do DNA em concentrações entre 5-25 μM . O complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(4\text{-MeT})]\text{Cl}$ (**1**) mostrou uma pequena capacidade inibitória a 5 μM , com a presença de um leve sinal com maior mobilidade, referente ao DNA superenovelado. Porém a 25 μM , percebe-se uma inibição total da ação desta enzima, sendo assim este complexo pode inibir a topo II em sua totalidade em concentrações entre 5-25 μM . O composto **2** se mostrou menos eficaz, pois só inibiu a enzima totalmente a 50 μM (Figura 82). Já o complexo **3**, um dos mais citotóxicos, foi eficiente na inibição da ação de clivagem da enzima em 5 μM . Isto é um forte indicio que pelo menos parte da citotoxicidade apresentada para estes complexos está relacionada de algum modo com essa capacidade inibitória, uma vez que o interrompimento da ação desta enzima pode levar a apoptose da célula. O composto $[\text{Pd}(\text{SCN})(\text{PPh}_3)(4\text{-MeT})]\text{SCN}$ (**4**) não apresentou atividade significativa a 5 μM , inibindo a topo II em 25 μM . Novamente, fica evidente que a alteração do ânion ligado ao metal influencia a capacidade do complexo em interagir, com maior ou menor intensidade, com a enzima. No entanto, ainda não se sabe ao certo como ocorre esta interação, provavelmente

a força de ligação entre Pd-X e a velocidade de saída dos ligantes estão relacionados com o mecanismo de ação frente a topo II.

Na Figura 84, pode-se ver os resultados encontrados para os complexos **5** e **6**. Inesperadamente, o complexo $[\text{PdCl}(\text{PPh}_3)(4\text{-PhT})]\text{Cl}$ (**5**) se mostrou incapaz de inibir a topoisomerase II em qualquer das concentrações testadas. De algum modo a presença do íon cloreto e o substituinte fenil na molécula desativa a ação inibitória do complexo. No entanto, os complexos **6-8** mostraram excelente eficácia inibitória, já a 5 μM não se observa mais a clivagem do DNA super enrolado. Mais uma vez, fica exemplificado que a atividade citotóxica destes compostos pode está fortemente relacionada com a capacidade de inibir a ação da enzima DNA-topoisomerase II α tão importante em vários processos celulares. Porém, diferentemente, da citotoxicidade a presença dos grupos metil e fenil na molécula orgânica possuem grande influência na inibição da enzima, visto que os complexos **6-8** foram capazes de inibir a ação enzimática em até 5 μM , enquanto os complexos de **1-4**, com exceção do complexo **3**, inibiram a enzima somente em concentrações maiores que 5 μM .

Diante destes resultados concluí-se que os compostos sintetizados são incapazes em inibir a ação da topo I, porém, em geral, são bem eficientes em impedir a ação da topo II em concentrações até 25 μM , dados estes mais coerentes com aqueles encontrados para o IC₅₀, indicando que a topoisomerase II α é um alvo em potencial destes complexos.

Vale ainda destacar que estes complexos apresentaram valores de inibição bem interessantes, entre 5-25 μM , superando valores encontrados para fármacos já utilizados no combate do câncer que visam a topo II como alvo. Como é o caso do etopósido utilizado contra tumores de pulmão, testículo e linfoma, que possui um valor de inibição de 50 % da atividade enzimática na concentração de 32 μM .

Uma tentativa de começar a se compreender o mecanismo de ação destes complexos frente a topo II e o que também explicaria a falta de atividade frente a topo I está relacionada a presença do ATP no ciclo catalítico da enzima do tipo II. Acredita-se que estes complexos atuem como competidores do ATP pelo domínio ATPase da enzima. Com a entrada dos complexos neste domínio a inserção do ATP seria inviabilizada e conseqüentemente o ciclo enzimático interrompido, causando a apoptose da célula. Por este mecanismo de ação os complexos seriam classificados como inibidores catalíticos, uma vez que não atuam estabilizando o complexo formado DNA – TOPO (veneno da

topoisomerase), mecanismo que ocorre para a maioria dos fármacos utilizados atualmente no combate contra o câncer que possuem a topo II como alvo. Esta possível característica é mais um fator positivo encontrado nestes complexos para o desenvolvimento de novos fármacos que apresentem um espectro de atividade diferente dos atuais.

Diante destes resultados esperamos que nossos complexos atuem de forma semelhante ao TSC24, apresentado por Huang et al.⁶² (pagina 35), competindo com as moléculas de adenosina trifosfato pelo domínio ATPase, uma vez que ambos inibiram a topo II, mas foram ineficientes frente a topo I. Vale ainda ressaltar que até o momento na literatura são escassos os estudos de complexos de Pd(II) que inibam a ação das topoisomerasas e estes quando inibem a ação enzimática o fazem em concentrações bem maiores do que os complexos sintetizados neste trabalho¹³⁰, demonstrando o seu grande potencial e que ainda existe muito a se explorar nesta área.

4.3.5. Inibição da enzima catepsina B:

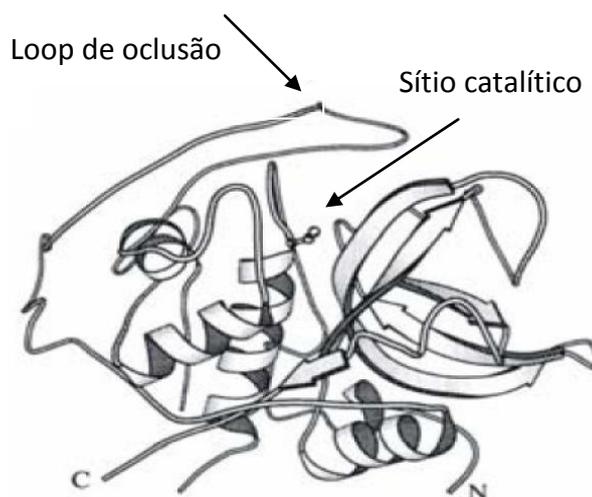
As catepsinas estão distribuídas entre as famílias das aspartil peptidases (catepsinas D e E), serino peptidases (catepsinas A e G), e cisteíno peptidases (catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, W), e estão envolvidas no processo de degradação de proteínas intracelulares¹³¹.

As cisteíno peptidases lisossomais têm a função primária de degradar, de forma não seletiva, proteínas dentro dos lisossomos. No entanto, recentemente ficou demonstrado que muitas dessas enzimas não são estritamente encontradas nos lisossomos, podendo acumular-se em diferentes organelas e participar de processos celulares mais especializados levando a processos patológicos como artrite reumatóide e osteoporose, progressão de tumores malignos, distrofia muscular e doença de Alzheimer¹³².

A catepsina B (Cat B) é responsável pelo rompimento das células cancerosas e o consequente espalhamento do material tumoral na corrente sanguínea, levando à disseminação do câncer por todo organismo. Sua ligação com o processo de progressão e invasão tumoral está baseada em observações de que seus níveis de atividade e secreção são aumentados em tumores, sendo que os tumores malignos apresentam os maiores níveis de atividade desta enzima. A detecção de níveis elevados de catepsina B em casos de câncer de pulmão pode ser correlacionada com prognóstico de pouca sobrevivência¹³³.

A catepsina B possui uma estrutura tridimensional bilobal, com o sítio catalítico posicionado na reentrância entre os dois lobos e encoberto por uma sequência de aminoácidos que formam uma alça de oclusão, protegendo o sítio ativo. A alça de oclusão lhe permite atuar como endo ou exo-peptidase, sendo esta uma característica individual da catepsina B¹³⁴ (Figura 86).

Figura 86 - Estrutura tridimensional da catepsina B. O resíduo de cisteína do sítio ativo é mostrado na representação *ball-and-stick*



Fonte: Fujishima *et al.*¹³⁵.

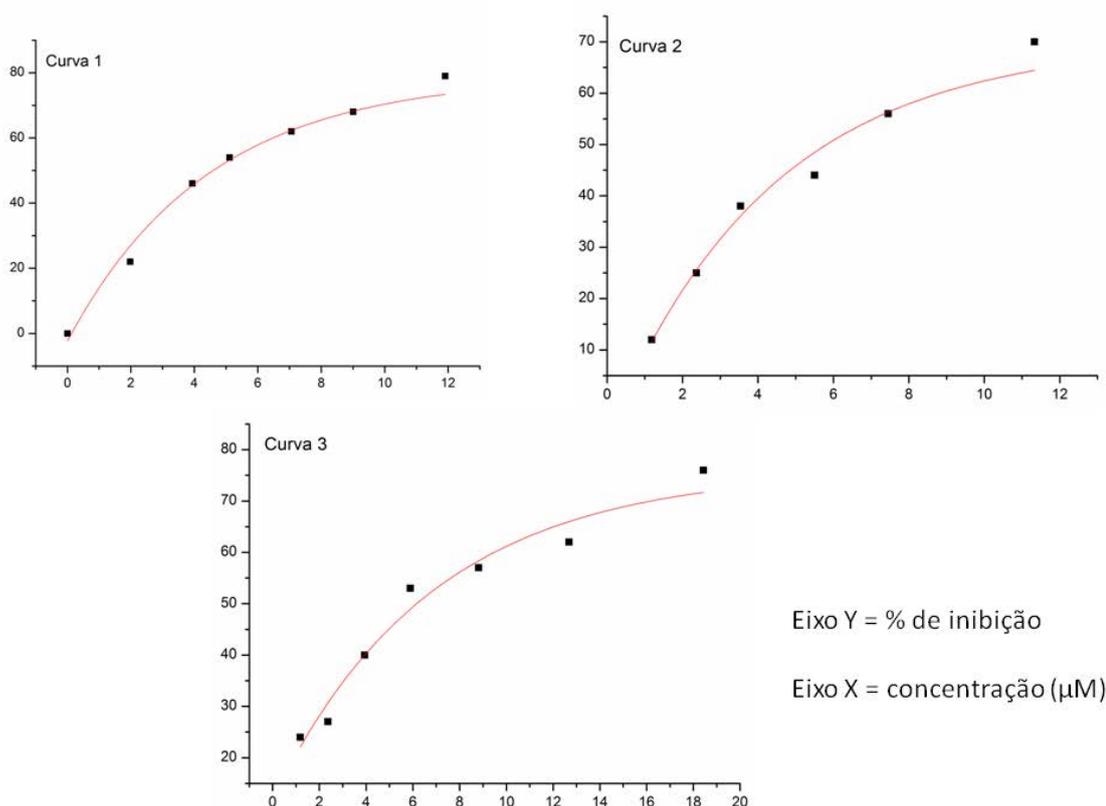
Assim, o desenvolvimento de um inibidor para a catepsina B que possua uma boa atividade antitumoral frente as células de câncer de pulmão é extremamente desejável, uma vez que ele causará a morte das células tumorais, bem como impedirá que elas se espalhem.

O grupo tiol presente no sítio ativo é considerado como um alvo interessante no design de novos inibidores dessas enzimas e levando em conta que o átomo de paládio possui uma grande afinidade por átomos de enxofre, espera-se que os complexos sintetizados neste trabalho interajam com este sítio ativo da enzima.

Buscando uma maior compreensão dos possíveis alvos destes complexos, ensaios de inibição da catepsina B foram realizados com o intuito de sabermos se eles são capazes de inibir a proliferação de tumores. Os complexos **3** e **7** por serem os mais citotóxicos de cada família frente a linhagem de adenocarcinoma pulmonar (LP07) foram selecionados para a realização dos testes.

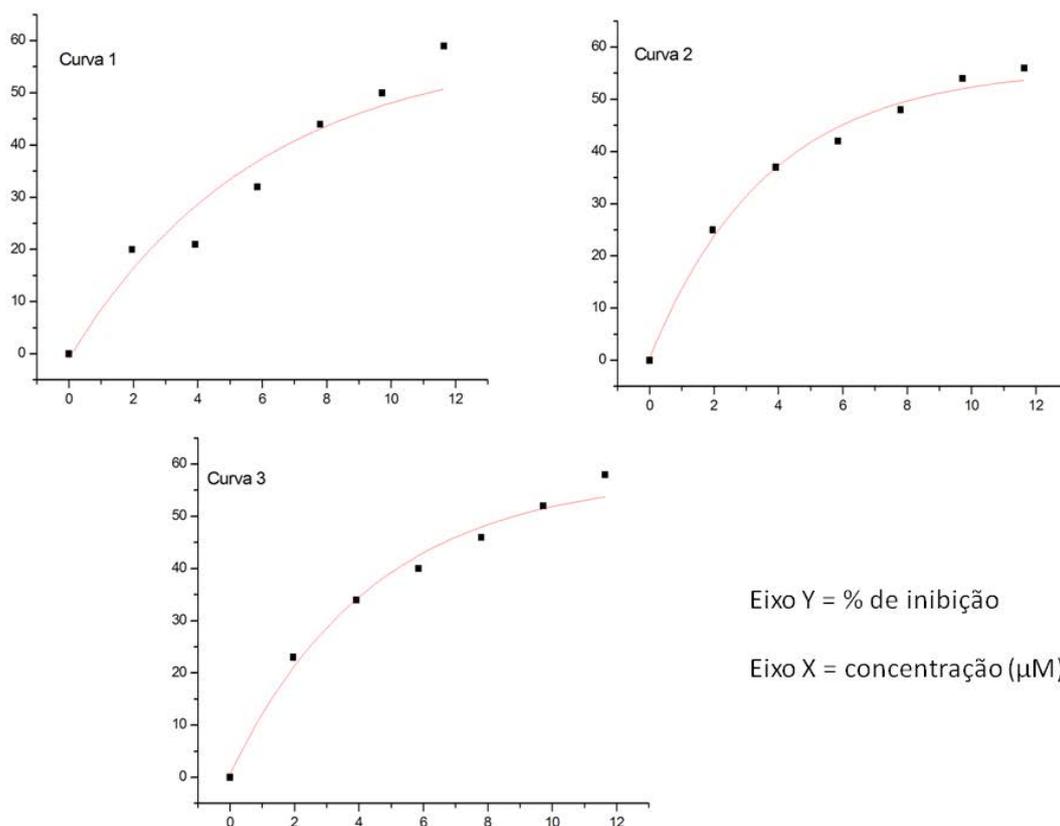
Após a ativação da enzima, realizada pelo DTT, e incubação por 3 minutos, adiciona-se o substrato sintético Z-Phe-Arg-MCA. Depois de hidrolisado pela enzima este substrato libera a molécula de 7-amino-4-metilcoumarina e a sua fluorescência é registrada em espectrofotômetro Hitachi F-2500. Em seguida, adicionam-se alíquotas dos complexos, gerando diversas concentrações e registra-se a ação dos compostos frente a enzima pela alteração na fluorescência obtida pela hidrólise ou não do substrato. Então, se obtêm curvas dose-resposta (Figuras 87 e 88), % de inibição x concentração dos complexos, e consequentemente o valor de IC_{50} é encontrado. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 17.

Figura 87 - Curvas dose resposta do complexo 3



Fonte: Autor

Figura 88 - Curvas dose resposta do complexo 7



Fonte: Autor

Tabela 17 - Valores de IC_{50} para a inibição da catepsina B dos complexos 3 e 7

Complexo	IC_{50} (μM)
[PdI(PPh ₃)(4-MeT)]I (3)	5,53 ± 0,66
[PdI(PPh ₃)(4-PhT)]I (7)	8,81 ± 0,80

Fonte: Autor

Estes resultados preliminares mostraram que os complexos são capazes de inibir 50 % da atividade da enzima até 8,81 μM. O composto 3 apresentou uma inibição significativamente maior do que o composto 7. Pela similaridade estrutural, sugere-se que a presença do grupo metil favoreça a inserção do composto no sítio catalítico e conseqüentemente, aumente a probabilidade de interação entre o complexo 3 e a enzima alvo. No entanto, mais ensaios deverão ser realizados para se comprovar tal hipótese. Outro interessante aspecto a se estudar é a influência dos haletos ou pseudohaletos na molécula

quanto a inibição da catepsina B, uma vez que provavelmente a causa da inibição da atividade enzimática provem da ligação Pd-tiolato.

Achamos estes resultados promissores, visto que estes complexos foram citotóxicos frente a duas linhagens tumorais e ainda possuem a característica de inibir em pelo menos 50 % a proliferação de tumores metastáticos em concentrações relativamente baixas.

5. Considerações Finais

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que 11 novos complexos de paládio(II) foram sintetizados e caracterizados com sucesso. As espectroscopias de IV e RMN contribuíram significativamente para a proposta estrutural. Três complexos tiveram sua estrutura molecular determinadas pela difração de raios X de monocristal, confirmando a obtenção de complexos com geometria quadrado planar distorcido com os sítios de coordenação do metal sendo ocupados pelo ligante bidentado, atuando de maneira neutra, trifenilfosfina e por um átomo de iodo ou grupo tiocianato.

Após a caracterização completa, a citotoxicidade de todos os complexos foi avaliada frente as linhagens tumorais de adenocarcinoma mamário (LM3) e pulmonar (LP07). Os resultados mostraram que os compostos contendo ligantes quelatos tiveram um ótimo desempenho em destruir as células cancerosas, chegando a ser 11 vezes mais ativo do que a cisplatina frente a linhagem LM3. No entanto os complexos contendo somente ligantes monodentados não apresentaram atividade significativa, indicando que neste caso a presença do ligante bidentado foi fundamental para a citotoxicidade dos complexos. Sugere-se que a maior estabilidade termodinâmica dos complexos do tipo $[PdX(N,S)(PPh_3)]X$ seja um dos fatores responsáveis pela manutenção da integridade estrutural dos compostos por mais tempo, aumentando assim sua biodisponibilidade. Outra importante informação obtida a partir destes dados é a influência da força de ligação Pd-X na atividade antiproliferativa dos compostos. Foi observado que a substituição do cloro por ligantes mais macios e volumosos gerou complexos mais ativos. Neste trabalho, em ambas as famílias, os iodo-complexos se mostraram os mais promissores.

A partir dos resultados obtidos para a citotoxicidade, somente os complexos ativos tiveram sua interação com seus possíveis alvos biológicos investigada. Primeiramente, por reações entre os compostos e a guanosina ficou evidente que estes complexos podem se ligar a uma base purina do DNA, dado comprovado pelas técnicas de RMN e espectrometria de massas, no espectro de ressonância magnética nuclear de 1H foi constatado a mudança de deslocamento químico do H8 da molécula da guanosina para regiões de campo baixo, comportamento típico observado quando a guanosina está coordenada. No espectro de massas encontrou-se o pico do íon molecular do monoadduto formado. Esta idéia de interação com o DNA foi reforçada pela capacidade de interação dos compostos com o

plasmídeo circular, detectada pela eletroforese em gel de agarose, porém, os complexos só conseguiram danificar a estrutura terciária do DNA em altas concentrações, indicando que a citotoxicidade apresentada por eles não envolve o DNA. Mais uma vez ficou perceptível a influência da ligação Pd-X na atividade dos compostos, uma vez que cloro- e bromo-complexos interagiram mais rapidamente com o DNA do que os iodo- e tiocianato-complexos.

A avaliação da capacidade inibitória destes complexos frente as enzimas topoisomerase nos forneceu dados importantíssimos sobre um possível modo de ação. Primeiramente os compostos foram testados frente a topoisomerase do tipo I em uma concentração de 50 μM . Após a revelação do gel, ficou comprovado a ineficiência destes complexos em inibir a ação enzimática. Porém, diante da topo II os compostos foram capazes de inibir a enzima em concentrações mais baixas do que o fármaco etopósido, apresentando uma capacidade inibitória já a 5 μM para alguns complexos, novamente foi evidenciado que a força de ligação entre o átomo metálico e os grupos aniônicos possui um papel fundamental em uma maior ou menor interação com a enzima.

Outra constatação relevante é que neste caso a presença do substituinte na posição N4 das tiossemicarbazidas afetou consideravelmente a capacidade inibitória dos complexos, já que os complexos **6-8** inibem a topo II a 5 μM , enquanto seus análogos com a metila inibem a enzima entre 5-50 μM . Por inibir somente a topoisomerase II, sugere-se que estes complexos atuem no domínio da ATPase, competindo com as moléculas de ATP necessário para a conclusão do sítio catalítico da topo II. Vale lembrar que as enzimas do tipo I não possuem este domínio, uma vez que elas não precisam de energia para realizar suas funções. Diante destes dados acredita-se que pelo menos parte da citotoxicidade apresentada pelos complexos esteja relacionada a esta ação inibitória.

Por último, os complexos mais promissores de cada família, no caso, os iodo-complexos, tiveram sua ação frente a catepsina B investigada. Os compostos **3** e **7** inibiram 50% da atividade enzimática a 5,83 e 8,81 μM , respectivamente, indicando que além de citotóxicos estes complexos podem inibir a metastase.

Perante os resultados aqui apresentados, fica claro que a utilização de ligantes N,S-doadores e da trifetilfosfina é muito interessante no design de novos fármacos de Pd(II),

pois conferem uma atividade antiploriferativa promissora e parecem atuar de modo diferente dos fármacos a base de metais usados atualmente.

Referências

- 1 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **O que é o câncer?** Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 10 out. 2013.
- 2 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global burden of cancer.** Disponível em: <http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/index.html/>. Acesso em: 11 out. 2013.
- 3 DERVAN, P. B. Molecular recognition of DNA by small molecules. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 2215-2235, 2001.
- 4 ZEGLIS, B. M.; PIERRE, V. C.; BARTON, J. K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. **Chemical Communications**, n. 44, p. 4565-4579, 2007.
- 5 LERMAN, L. S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. **Journal of Molecular Biology**, v.3, p. 18-30, 1961.
- 6 WHEATE, N. J. et al. DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 627-648, 2007.
- 7 WARING, M. J. DNA modification and cancer. **Annual Review of Biochemistry**, v. 50, p. 159-192, 1981.
- 8 BUGARČIĆ, Ž. D. et al. Mechanistic studies on the reactions of platinum(II) complexes with nitrogen- and sulfur-donor biomolecules. **Dalton Transactions**, v. 41, p. 12329-12345, 2012.
- 9 BOULIKAS, T. et al. Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. **Cancer Therapy**, v. 5, p. 537-583, 2007.
- 10 WESTERN KENTUCKY UNIVERSITY. **Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy.** Disponível em: <<http://bioweb.wku.edu/courses/Biol588/Bishopl.html>>. Acesso em: 15 ago. 2013.
- 11 BANERJEE, P. Interaction of nitrogen bases with some platinum(II) and palladium(II) complexes - usual and unusual features. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 190/192, p. 19-28, 1999.
- 12 BOYSEN, G. et al. The formation and biological significance of N7-guanine adducts. **Mutation Research**, v. 678, p. 76-94, 2009.
- 13 REEDIJK, J. Why does cisplatin reach guanine-N7 with competing S-donor ligands available in the cell? **Chemical Reviews**, v. 99, p. 2499-2510, 1999.

-
- 14 CHANEY, S. G. et al. Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 1551-1559, 2004.
- 15 TAKAHARA, P. M. et al. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. **Nature**, v. 377, p. 649-652, 1995.
- 16 REBECCA, A. A.; MATTHEW, D. H.; TREVOR, W. H. The discovery and development of cisplatin. **Journal of Chemical Education**, v. 83, p. 728-734, 2006.
- 17 CHE, C-M.; SIU, F-M. Metal complexes in medicine with a focus on enzyme inhibition. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, p. 255-261, 2010.
- 18 BRUIJNINCX, P. C. A.; SADLER, P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, p. 197-206, 2008.
- 19 SINGH, K. B. G. et al. Transition metal based anticancer drugs. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 521-542, 2011.
- 20 GAROUFIS, A.; HADJIKAKOU, S. K.; HADJILIADIS, N. Palladium coordination compounds as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 1384-1397, 2009.
- 21 RAU, T.; VAN ELDIK, R. Mechanistic insight from kinetic studies on the interaction of model palladium (II) complexes with nucleic acid components. **Metal Ions in Biological Systems**, v. 32, p. 339-378, 1996.
- 22 HUHEEY, J. E.; KEITER, E. A.; KEITER, R. L. Coordination chemistry: reactions, kinetics and mechanisms. In: _____. **Inorganic chemistry: principles of structure and reactivity**. 4 th ed. New York: HarperCollins College Publishers, 1993. Cap. 13, p. 537-576.
- 23 GODOY NETTO, A. V. de. **Síntese e caracterização estrutural de compostos de coordenação de paládio(II) contendo pirazóis e pseudohaletos**. 1999. 132 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1999.
- 24 QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Complexos fosfínicos e suas aplicações na medicina. **Química Nova**, v. 19, p. 651-659, 1996.
- 25 GUNATILLEKE, S. S.; BARRIOS, A. M. Inhibition of lysosomal cysteine proteases by a series of Au(I) complexes: a detailed mechanistic investigation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 3933-3937, 2006.
- 26 GUNATILLEKE, S. S.; BARRIOS, A. M. Tuning the Au(I)-mediated inhibition of cathepsin B through ligand substitutions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 555-563, 2008.
- 27 GUNATILLEKE, S. S. et al. Inhibition of cathepsin B by Au(I) complexes: a kinetic and computational study. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, p. 555-561, 2008.

-
- 28 MESSERE, A. et al. Antiproliferative activity of Pt(II) and Pd(II) phosphine complexes with thymine and thymidine. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, p. 254-260, 2007.
- 29 BODENNER, D. L. et al. Effect of diethyldithiocarbamate on cis-diamminedichloroplatinum(II)- induced cytotoxicity, DNA cross-linking, and gamma-glutamyl transpeptidase inhibition. **Cancer Research**, v. 46, p. 2745-2750, 1986.
- 30 HIDAKA, S. et al. Protective effects of dithiocarbamates against renal toxicity of cis-diamminedichloroplatinum in rats. **Renal Failure**, v. 16, p. 337-349, 1994.
- 31 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.
- 32 FARRELL, N. Transition metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents. In: JAMES, B.R.; UGO R. (Ed.). **Catalysis by metal complexes**. Dordrecht: Reidel-Kluwer, 1989. v. 11, p. 44-46.
- 33 ESPÓSITO, B. P.; NAJJAR, R. Interactions of antitumoral platinum group metallodrugs with albumin. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 232, p. 137-149, 2002.
- 34 BORCH, R. F.; PLEASANTS, M. E. Inhibition of cisplatin nephrotoxicity by diethyldithiocarbamate rescue in a rat model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 76, p. 6611-6614, 1979.
- 35 PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: fundamental principles. **Journal of Chemical Education**, v. 45, p. 581-587, 1968.
- 36 NADEEM, S. et al. Synthesis, crystal structures and, antibacterial and antiproliferative activities *in vitro* of palladium(II) complexes of triphenylphosphine and thioamides. **Inorganica Chimica Acta**, v. 363, p. 3261-3269, 2010.
- 37 PÉREZ, J. M. et al. Current status of the development of *trans*-platinum antitumor drugs. **Critical Reviews in Oncology: Hematology**, v. 35, p. 109-120, 2000.
- 38 ARIS, S. M.; FARRELL, N. P. Towards antitumor active trans-platinum compounds. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2009, p. 1293-1302, 2009.
- 39 ATKINS, P. et al. **Inorganic chemistry**. 5 th ed. Oxford: Oxford University Press, 2010. p. 218-219.
- 40 PRABHAKARAN, R. et al. Topoisomerase II inhibition activity of new square planar Ni(II) complexes containing N-substituted thiosemicarbazones: synthesis, spectroscopy, X-ray crystallography and electrochemical characterization. **Inorganica Chimica Acta**, v. 374, p. 647-653, 2011.

-
- 41 KOVALA-DEMERTZI, D. et al. Synthesis, structure, spectroscopic studies and cytotoxic effect of novel palladium(II) complexes with 2-formylpyridine-4-Nethyl-thiosemicarbazone: potential antitumour agents. **Polyhedron**, v. 52, p. 1096-1102, 2013.
- 42 KUMAR, S.; KUMAR, N. Synthesis and biological activity of acetylacetone thiosemicarbazone and their metallic complexes. **International Current of Pharmaceutical Journal**, v. 2, p. 88-91, 2013.
- 43 DEMORO, B. et al. Screening organometallic binuclear thiosemicarbazone ruthenium complexes as potential anti-tumour agents: cytotoxic activity and human serum albumin binding mechanism. **Dalton Transactions**, v. 42, p. 7131-7146, 2013.
- 44 PADHYE, S. et al. Antitumor metallothiosemicarbazones: structure and antitumor activity of palladium complex of phenanthrenequinone thiosemicarbazone. **Inorganic Chemistry**, v. 44, p. 1154-1156, 2005.
- 45 MATESANZ, A. I. et al. 3,5-diacetyl-1,2,4-triazol bis(⁴N-substituted thiosemicarbazone) palladium(II) complexes: synthesis, structure, antiproliferative activity and low toxicity on normal kidney cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, p. 1613-1622, 2011.
- 46 ROCHA, F. V. et al. 3,5-dimethyl-1-thiocarbamoylpyrazole and its Pd(II) complexes: synthesis, spectral studies and antitumor activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 1698-1702, 2010.
- 47 MATESANZ, A. I. et al. Synthesis and characterization of novel palladium(II) complexes of bis(thiosemicarbazone). Structure, cytotoxic activity and DNA binding of Pd(II)-benzyl bis(thiosemicarbazone). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 76, p. 29-37, 1999.
- 48 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. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 248, p. 119-133, 2004.
- 49 SHAHEEN, F. et al. Synthesis, characterization, *in vitro* cytotoxicity and anti-inflammatory activity of palladium(II) complexes with tertiary phosphines and heterocyclic thiolates: crystal structure of [PdC₂₈H₁₉N₈PS₂]. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 693, p. 1117-1126, 2008.
- 50 CASAS, J. S. et al. 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. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 33-45, 2008.
- 51 BARRA, C. V. et al. Synthesis, cytotoxic activity and DNA interaction of Pd(II) complexes bearing N'-methyl-3,5- dimethyl-1-thiocarbamoylpyrazole. **Polyhedron**, v. 65, p. 214-220, 2013.

-
- 52 FORTUNE, J. M.; OSHEROFF, N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 64, p. 221-253, 2000.
- 53 LARSEN, A. K.; ESCARGUEIL, A. E.; SKLADANOWSKI, A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, p. 167-181, 2003.
- 54 POMMIER, Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. **ACS Chemical Biology**, v. 8, p. 82-95, 2013.
- 55 McCLENDON, A. K.; OSHEROFF, N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.623, p. 83-97, 2007.
- 56 CHEN, W.; QIU, J.; SHEN, Y. Topoisomerase II α , rather than II β , is a promising target in development of anti-cancer drugs. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 6, p. 230-237, 2012.
- 57 BAILLY, C. Contemporary challenges in the design of topoisomerase II inhibitors for cancer chemotherapy. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 3611-3640, 2012.
- 58 POMMIER, Y. et al. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. **Chemistry & Biology**, v. 17, p. 421-433, 2010.
- 59 HANDE, K. R. Topoisomerase II inhibitors. **Update on Cancer Therapeutics**, v. 3, p. 13-26, 2008.
- 60 MARTIN, M. et al. Clinical activity of chronic oral etoposide in previously treated metastatic breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 12, p. 986-991, 1994.
- 61 MONSUEZ, J. et al. Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. **International Journal of Cardiology**, v. 144, p. 3-15, 2010.
- 62 HUANG, H. et al. A Series of α -heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones inhibit topoisomerase II α catalytic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 3048-3064, 2010.
- 63 TAN, K. W. et al. Towards a selective cytotoxic agent for prostate cancer: interaction of zinc complexes of polyhydroxybenzaldehyde thiosemicarbazones with topoisomerase I. **Polyhedron**, v. 38, p. 275-284, 2012.
- 64 ZEGLIS, B. M.; DIVILOV, V.; LEWIS, J. S. Role of metalation in the topoisomerase II α inhibition and antiproliferation activity of a series of α -heterocyclic-N⁴-substituted thiosemicarbazones and their Cu(II) complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 2391-2398, 2011.

-
- 65 MAIA, P. I. S. et al. Palladium(II) complexes with thiosemicarbazones. Syntheses, characterization and cytotoxicity against breast cancer cells and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1177-1186, 2010.
- 66 INTERNATIONAL CENTER FOR DIFFRACTION DATA. **Powder diffraction file**: release 1999. Newtown Square, 1999. 1 CD-ROM. PDF n. 46-1043.
- 67 SHELDRICK, G. M. **Shelxs-97**: program for crystal structure resolution. PC version. Göttingen: University of Göttingen, 1997.
- 68 ENRAF-NONIUS. **Collect**: Nonius BV. PC version. Delft, 1997-2000.
- 69 OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W.; DENZO, H. K. L. Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. In: CARTER, C. W. Jr.; SWEET, R. M. (Ed.). **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1997. v. 276.
- 70 SHELDRICK, G. M. **Shelxl-97**: program for crystal structure analysis, PC version. Göttingen: University of Göttingen, 1997.
- 71 SPEK, A. L. Single-crystal structure validation with the program *PLATON*. **Journal of Applied Crystallography**, v. 36, p. 7-13, 2003.
- 72 FARRUGIA, L. J. WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography. **Journal of Applied Crystallography**, v. 32, p. 837-838, 1999.
- 73 BRUNO, I. J. et al. New software for searching the Cambridge Structural Database and visualizing crystal structures. **Acta Crystallographica B**, v. 58, p. 389-397, 2002.
- 74 WEBER, S. XRDIF: simulation of X-ray diffraction patterns. **Journal of Applied Crystallography**, v. 30, p. 565-566, 1997.
- 75 HANDY, N. C.; COHEN, A. J. Left-right correlation energy. **Molecular Physics**, v. 99, p. 403-412, 2001.
- 76 HOE, W.-M.; COHEN, A.; HANDY, N. C. Assessment of a new local exchange functional OPTX. **Chemical Physics Letters**, v. 341, p. 319-328, 2001.
- 77 VOSKO, S. H.; WILK, L.; NUSAIR, M. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. **Canadian Journal of Physics**, v. 58, p. 1200-1211, 1980.
- 78 TREU FILHO, O. et al. Experimental and theoretical study of the compound [Pd(dmba)(NCO)(imz)]. **Journal of Molecular Structure**, v. 829, p. 195-201, 2007.
- 79 TREU FILHO, O. et al. Molecular structures and vibrational frequencies for cis-[PdCl₂(tmen)] and cis-[Pd(N₃)₂(tmen)]: a DFT study. **Inorganic Chemistry Communication**, v. 100, p. 1501-1504, 2007.

80 LEMOS, S. C. et al. Synthesis, characterization, thermal studies, and DFT calculations on Pd(II) complexes containing N-methylbenzylamine. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, p. 391-397, 2011.

81 TREU FILHO, O. et al. Gaussian basis sets to the theoretical study of the electronic structure of perovskite (LaMnO₃). **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 631, p. 93-99, 2003.

82 TREU FILHO, O.; PINHEIRO, J. C.; KONDO, R. T. Designing Gaussian basis sets to the theoretical study of the piezoelectric effect of perovskite (BaTiO₃). **Journal of Molecular Structure**, v. 671, p. 71-75, 2004.

83 SCHELEGEL, H. B. Some practical suggestions for optimizing geometries and locating transition states. In: BERTRAN, J. (Ed). **New theoretical concepts for understanding organic reactions**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989. p. 33-53.

84 DENNINGTON, R.; KEITH, T.; MILLAM, J. **GaussView**. Version 5.0.8. Shawnee Mission: Semichem, 2000-2008.

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

86 VALADARES, N. F. et al. Molecular determinants of improved cathepsin B inhibition by new cystatins obtained by DNA shuffling. **BMC Structural Biology**, v. 10, p. 30, 2010.

87 MEEK, D. W.; NICPON, P. E.; MEEK, V. I. Mixed thiocyanate bonding in palladium (II) complexes of bidentate ligands. **Journal of the American Chemical Society**, v. 92, p. 5351-5359, 1970.

88 ATKINS, P. et al. **Inorganic chemistry**. 5 th ed. Oxford: Oxford University Press, 2010. p. 512-514.

89 FERNÁNDEZ, D. et al. Influence on reactivity of chloro ligand substitution in mononuclear cationic Pd(II) and Pt(II) triphos complexes: X-ray structure of the nitrate derivatives. **Inorganica Chimica Acta**, v. 312, p.40-52, 2001.

90 PNEUMATIKAKIS, G.; HADJILIADIS, N.; THEOPHANIDES, T. Complexes of inosine, cytosine, guanosine with palladium(II). **Inorganic Chemistry**, v. 17, p. 915-922, 1978.

91 GEARY, W. J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds. **Coordination Chemistry Review**, v. 7, p. 81-122, 1971.

92 GODOY NETTO, A. V. **Aplicação de pseudo-haletos e pirazóis como unidades estruturais na formação de espécies mono e polinucleares de paládio (II). Emprego de polímeros de coordenação em sistema hóspede-hospedeiro.** 2003. 120 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

93 SINGH, B.; THAKUR, K. P. Thioamide bands and nature of bonding – II. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, v. 36, p. 1735-1737, 1974.

94 MISHRA, A. K. et al. Platinum(IV) and palladium(II) thiosemicarbazide and thiodiamine complexes: a spectral and antibacterial study. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 60, p. 1923-1932, 2007.

95 BHOWMIK, S. R.; GANGOPADHYAY, S.; GANGOPADHYAY, P. K. Platinum coordination compounds of thiosemicarbazide derivatives: a new class of platinum blues. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 58, p. 795-801, 2005.

96 JAYASOORIYA, U. A.; POWELL, D. B. Vibrational spectra of thiosemicarbazide complexes of copper(II), nickel(II), palladium(II) and platinum(II) and the use of the metal isotope natural abundance in their assignment together with supporting evidence from incoherent inelastic neutron scattering spectroscopy. **Inorganic Chemistry**, v. 21, p. 1054-1061, 1982.

97 CAMPBELL, M. J-M. Transition metal complexes of thiosemicarbazide and thiosemicarbazones. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 15, p. 279-319, 1975.

98 AINSCOUGH, E. W. et al. The interaction of 1-methylimidazole-2(3H)-thione with copper(II) salts. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions: Inorganic Chemistry**, n. 1, p. 39-42, 1989.

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

100 NAKAMOTO, K. **Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds.** 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1986. 484 p.

101 BAILEY, R. A. et al. Infrared spectra of complexes of the thiocyanate and related ions. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 6, p. 407-445, 1971.

102 ARENDSE, M. J.; GREEN, I. R.; KOCH, K. R. Synthesis and spectral studies of platinum complexes of para-substituted 4-phenylthiosemicarbazides. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 53, p. 1537-1545, 1997.

103 SILVERSTEIN, R. M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 490 p.

-
- 104 BARRA, C. V. et al. New palladium(II) complexes with pyrazoles ligands: synthesis, spectral and thermal studies and antitumor evaluation. Part I. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, p. 483-488, 2011.
- 105 BARRA, C. V. et al. New palladium(II) complexes with pyrazoles ligands: synthesis, spectral and thermal studies and antitumor evaluation. Part II. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, p. 489-494, 2011.
- 106 ROCHA, F. V. et al. Study on the thermal behavior of the complexes of the type $[PdX_2(tdmPz)]$ ($X = Cl^-, Br^-, I^-, SCN^-$). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, p. 385-389, 2011.
- 107 PRASAD, K. S. et al. Palladium(II) complexes as biologically potent metallo-drugs: synthesis, spectral characterization, DNA interaction studies and antibacterial activity. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 107, p. 108-116, 2013.
- 108 MATHEW, M.; PALENIK, G. J. Structure of *trans*-diiodobis(triphenylstibine)palladium(II) and observations on the Pd-I bond length. **Acta Crystallographica Section C**, v. 43, p. 21-24, 1987.
- 109 KALAIVANI, P. et al. Influence of terminal substitution on structural, DNA, protein binding, anticancer and antibacterial activities of palladium(II) complexes containing 3-methoxy salicylaldehyde-4(N) substituted thiosemicarbazones. **Dalton Transactions**, v.41, p. 2486-2499, 2012.
- 110 KOMOROSKI, R. A.; MAGISTRO, A. J.; Nicholas, P. P. ^{31}P and ^{13}C Solid-state NMR of tertiary phosphine-palladium complexes bound to silica. **Inorganic Chemistry**, v. 25, p. 3917-3925, 1986.
- 111 REDFIELD, D. A.; NELSON, J. H. Equilibrium energetics of cis-trans isomerization for two square-planar palladium(II)-phosphine complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 12, p. 15-19, 1973.
- 112 VIOLANTE, G. da. et al. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 1600-1603, 2002.
- 113 BARTEL, C. et al. Cellular accumulation and DNA interaction studies of cytotoxic trans-platinum anticancer compounds. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 17, p. 465-474, 2012.
- 114 ABU-SURRAH, A. S.; AL-SA'DONI, H. H.; ABDALLA, M. Y. Palladium-based chemotherapeutic agents: routes towards complexes with good antitumor activity. **Cancer Therapy**, v. 6, p. 1-10, 2008.

115 ROMERO-CANELÓN, I.; SALASSA, L.; SADLER, P. J. The contrasting activity of iodido versus chlorido ruthenium and osmium arene azo- and imino-pyridine anticancer complexes: control of cell selectivity, cross-resistance, p53 dependence, and apoptosis pathway. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, p. 1291-1300, 2013.

116 MATESANZ, A. I.; SOUZA, P. Palladium and platinum 3,5-diacetyl-1,2,4-triazol bis(thiosemicarbazones): chemistry, cytotoxic activity and structure-activity relationships. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, p. 245-253, 2007.

117 SOUZA, R. A. de. et al. Antimycobacterial and antitumor activities of palladium(II) complexes containing isonicotinamide (isn): X-ray structure of trans-[Pd(N₃)₂(isn)₂]. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 4863-4868, 2010.

118 MORO, A. C. **Espécies moleculares e supramoleculares de Pd(II) com ligantes mono, bi e polidentados**: caracterização estrutural e atividades biológicas. 2011. 129 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

119 ZHU, S. et al. Binding of palladium(II) complexes to guanine, guanosine or guanosine 5'-monophosphate in aqueous solution: potentiometric and NMR studies. **Inorganica Chimica Acta**, v. 357, p. 411-420, 2004.

120 CHEN, Z. et al. Selective guanosine binding and cytotoxicity of a benzimidazole derived dinickel complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, p. 1894-1902, 2007.

121 CHEVRY, A. et al. Click chelators - the behavior of platinum and palladium complexes in the presence of guanosine and DNA. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 22 p. 3513-3519, 2010.

122 LIPPERT, B.; PFAB, R.; NEUGEBAUER, D. The role of N(1) coordinated thymine in 'platinum thymine blue'. **Inorganica Chimica Acta**, v. 37, p. L495-L497, 1979.

123 SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

124 GAO, E-J. et al. Synthesis, characterization, interaction with DNA and cytotoxicity *in vitro* of the complexes [M(dmphen)(CO₃)]·H₂O [M = Pt(II), Pd(II)]. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 311-316, 2010.

125 PRASADA, K. S. et al. Palladium(II) complexes as biologically potent metallo-drugs: synthesis, spectral characterization, DNA interaction studies and antibacterial activity, **Spectrochimica Acta Part A**, v. 107, p. 108-116, 2013.

126 SUN, Y. et al. Synthesis and *in vitro* antiproliferative activity of platinum(II) complexes with N-monoalkyl 1R,2R-diaminocyclohexane as ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 297-306, 2012.

-
- 127 SABOURIN, M.; OSHEROFF, N. Sensitivity of human type II topoisomerases to DNA damage: stimulation of enzyme-mediated DNA cleavage by abasic, oxidized and alkylated lesions. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 1947-1954, 2000.
- 128 CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 369-413, 2001.
- 129 BARBOSA, L. C. B. et al. Design and synthesis of peptides from bacterial ParE toxin as inhibitors of topoisomerases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 591-596, 2012.
- 130 CHEN, J. et al. The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 197, p. 40-48, 2004.
- 131 VARGAS, P. A. O. **Genes de cisteíno proteases (catepsina L-like) de trypanosoma rangeli**: polimorfismo, relações filogenéticas e alvos para diagnóstico e genotipagem. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- 132 CHAFFMAN, M. et al. Auranofin. **Drugs**, v. 27, p. 378-424, 1984.
- 133 EBERT, W. et al. Prognostic value of increased lung tumor tissue cathepsin B. **Anticancer Research**, v. 14, p. 895-900, 1994.
- 134 MORT, J. S.; BUTTLE, D. J. Cathepsin B. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 29, p. 715-720, 1997.
- 135 FUJISHIMA, A. et al. The crystal structure of human cathepsin L complexed with E-64. **FEBS Letters**, v. 407, p. 47-50, 1997.