



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GUSTAVO DUARTE DE SOUZA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
CITOTÓXICA DE COMPLEXOS DE PLATINA(II) E PALÁDIO(II)
CONTENDO HIDRAZONAS.**

Uberlândia

Julho de 2012

GUSTAVO DUARTE DE SOUZA

**SÍNTESSE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
CITOTÓXICA DE COMPLEXOS DE PLATINA(II) E PALÁDIO(II)
CONTENDO HIDRAZONAS.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Química, área de concentração Química Inorgânica, sob orientação do Prof. Dr. Wendell Guerra.

Uberlândia

Julho de 2012



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em
Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 147/COPGQ.

DATA: 16/07/2012

DISCENTE: Gustavo Duarte de Souza

MATRÍCULA: 11022QMI004

TÍTULO DO TRABALHO: Síntese, caracterização e avaliação da atividade citotóxica de complexos de platina(II) e paládio(II) contendo hidrazonas.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Química Bioinorgânica

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Síntese, caracterização e estudo da atividade citotóxica de complexos de platina(II), platina(IV) e paládio(II) contendo hidrazidas.

Às quatorze horas do dia dezesseis de julho do ano dois mil e doze, na Sala 307 do Bloco 5R-A, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Claudio dos Santos Ferreira, da Universidade Federal de Viçosa, Gustavo Von Poelhsitz, do Instituto de Química da UFU e Wendell Guerra, professor orientador e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa apresentou o candidato e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 01/2010/COPGQ. Em seguida, o presidente da mesa concedeu a palavra ao candidato para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o apresentador. A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e aprovou o candidato. Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será mantido.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de quinze dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 16 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Claudio dos Santos Ferreira

Prof. Dr. Claudio dos Santos Ferreira – UFV

Gustavo Von Poelhsitz
Prof. Dr. Gustavo Von Poelhsitz – IQUFU

Wendell Guerra

Orientador: Prof. Dr. Wendell Guerra – IQUFU

Dedico este trabalho aos meus pais Mário e Adélia,
que tanto me ajudaram.

“A simplicidade é o último degrau da sabedoria”

Khalil Gibran

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente a Deus, por ter me iluminado nesta caminhada! Agradeço a ti Senhor, por ter me dado três bênçãos: vida, saúde e força. Obrigado pelos momentos em que salvaste minha vida.

À minha mãe que muito me ajudou nesta trajetória.

Ao meu pai, exemplo de humildade e perseverança. Uma pessoa sempre disposta a ajudar nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wendell Guerra, pela oportunidade concedida, pela atenção, paciência, vontade, perseverança e pelo auxílio dado neste trabalho. A minha admiração ao pesquisador, competente e dedicado. Obrigado por me ajudar!

Agradeço à aluna de iniciação científica Mônica A. Rodrigues, pelas valiosas informações, além de ter me ajudado na síntese dos complexos usados neste trabalho.

Aos professores Gustavo Von Poelhsitz e Renata Cristina de Lima pelas valiosas sugestões apresentadas durante o exame de Qualificação.

Ao ex-professor do Instituto de Química, Sebastião de Paula Eiras, por ter concedido alguns dos reagentes utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Ruggiero por ter me ajudado em todo o processo de qualificação.

A Prof.^a Elene Cristina Pereira Maia e sua aluna de doutorado Priscila Pereira Silva por terem realizados os testes de atividade citotóxica.

Ao Instituto de Química, e principalmente ao prof. Manuel que tanto nos ajudou, inclusive disponibilizando reagentes e vidrarias de seu laboratório de pesquisa. Fica com Deus!

AGRADECIMENTOS

A Prof.^a Dr. Sandra Terezinha de Farias Furtado.

Ao Prof.Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Munoz.

Aos professores Kátia e Eduardo Franca pelas colaborações.

Aos demais Professores do Programa de Pós-Graduação em Química pela contribuição em minha formação científica, muitos até foram meus docentes na época de graduação, ou seja, me acompanharam em mais de uma etapa da minha vida acadêmica. A estes, os meus sinceros agradecimentos.

Ao Técnico Roni Marcos dos Santos, por ter realizado as análises termogravimétricas.

A Secretaria da pós-graduação Mayta Mamede Negreto Peixoto, pela atenção e eficácia no repasse das informações solicitadas.

Aos colegas de laboratório Leandro e João Fernando, por terem me auxiliado na realização dos espectros de absorção na região do ultravioleta visível, além me instruir dentro do laboratório.

Aos colegas de laboratório Lucianno, Jéssica e Jerhorgyelly.

À FAPEMIG e a Universidade Federal de Uberlândia pelo suporte financeiro.

À Julia, por ter me ensinado a operar o infravermelho.

Aos funcionários do Instituto de Química.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Alguns compostos de platina(II), como por exemplo, a cisplatina, a oxaloplatina e a carboplatina, têm sido utilizados como agentes quimioterápicos no tratamento de alguns tipos de câncer, sendo que vários outros complexos deste íon metálico encontram-se em fase de testes clínicos. Entretanto, estes fármacos apresentam diversos efeitos colaterais severos e, além disso, tem sido observado o aparecimento de resistência celular. Nesse sentido, vários grupos de pesquisa têm buscado a síntese de novos complexos de platina que sejam mais eficazes e que apresentem uma diminuição dos efeitos indesejáveis associados à utilização destes na medicina. Assim, neste trabalho seis novos complexos de platina(II) e paládio(II) foram isolados com os ligantes 4-nitrobenzóico hidrazida(4-NH), ácido 2-furóico hidrazida(FH) e 2,4 dinitrofenilhidrazina(2,4-DNPH). Esses complexos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas e, os resultados mostram que os ligantes estão coordenados ao íon platina ou paládio via nitrogênio (NH_2) e possuem a fórmula geral $[\text{M}(\text{L})_2\text{X}_2] \cdot \text{nH}_2\text{O}$, em que $\text{M} = \text{Pt}^{2+}$ ou Pd^{2+} , $\text{X} = \text{Cl}^-$ ou I^- e $\text{n} = 0$ ou 1 . As análises de infravermelho foram feitas na região de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, salvo os complexos com o ligante 2,4-dinitrofenilhidrazina que começaram na faixa de 200 cm^{-1} . Além disso, a espectroscopia na região do UV-visível foi feita na faixa de $200\text{-}800\text{ nm}$. A estabilidade térmica dos complexos contendo os ligantes ácido 2-furóico hidrazida e 2,4-dinitrofenilhidrazina foi avaliada no intervalo de temperatura compreendido entre $25\text{-}900^\circ\text{C}$.

A atividade antitumoral dos compostos sintetizados foi estudada contra a linhagem celular tumoral K562. O composto $[\text{Pt}(4\text{-NH})_2\text{I}_2]$ exibe uma ótima atividade antiproliferativa ($\text{IC}_{50} = 0,96\text{ }\mu\text{mol/L}$) e, se comparado à cisplatina, é cerca de cinco vezes mais ativo.

Palavras-chave: Platina, Cisplatina, Carboplatina e Agentes antitumorais.

ABSTRACT

Platinum compounds, such as cisplatin, oxaloplatin and carboplatin, have been used as chemotherapeutic agents for the treatment of various types of cancer. Several other complexes of this metallic ion are also under clinical evaluation. However, the utilization of platinum compounds as antitumor agents is associated with many severe effects and cellular resistance has also been observed. Therefore, many research groups have been working to synthesize new platinum complexes that are more efficient and show fewer undesired effects associated with their use in medicine. Thus in this work, six new complexes of platinum and palladium were isolated with 4-nitrobenzoic hydrazide(4-NH), acid 2-furoic hydrazide(FH) and 2,4-dinitrophenylhydrazine(2,4-DNPH). These complexes were characterized by spectroscopic techniques and the results have shown that the ligands are coordinated to platinum or palladium by the basic nitrogen of NH₂ group and have the general formula [M(L)₂X₂].nH₂O where M= Pt²⁺ or Pd²⁺, X = Cl⁻ or I⁻ and n = 0 or 1. Infrared Analyses were made in the region of 400 - 4000 cm⁻¹, except the complex with the ligand 2,4 - dinitrophenylhydrazine which began in the range of 200 cm⁻¹. In addition, UV spectroscopy was performed on-visible range of 200-800 nm. The thermal stability of the complexes containing acid 2-furoic hydrazide and 2, 4-dinitrophenylhydrazine was analyzed in the temperature range 25–900 °C.

The antitumor activity of the synthesized compounds has been studied. The compound [Pt(4-NH)₂I₂], was found to display cytotoxicity (IC₅₀ = 0.96 µmol/L) against K562 tumoral cell line and, when compared to cisplatin, it was five times more active.

Keywords: Platinum, Cisplatin, Carboplatin and Antitumor agents.

LISTA DE ABREVIACÕES

2,4-DNPH = 2,4-dinitrofenilhidrazina

4-NH = 4-nitrobenzeno hidrazida

FH = Ácido 2-furóico hidrazida

MeOH = Metanol

DNA = Ácido desoxirribonucléico

^1H RMN= Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

^{13}C RMN= Ressonância magnética nuclear de carbono 13

DMSO = Dimetilsulfóxido

d_6 -DMSO = Dimetilsulfóxido deuterado

DMF = Dimetilformamida

s = singlet

d = duplet

δ = Deslocamento químico

M.M.= Massa molar

μM = micromolar

UV-vis = Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta Visível

I.V.= Infravermelho

ν = Freqüência

Hz = Hertz

TG = Termogravimetria

DTA = Análise termogravimétrica diferencial

Λ_M = Condutividade molar

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Estrutura do taxol	06
Figura 02- Reações de hidrólise da cisplatina	07
Figura 03- Interação da platina com a guanina	08
Figura 04- Principais tipos de adutos formados entre a platina e o DNA	09
Figura 05- Estrutura da cisplatina e de seus análogos utilizados na clínica médica. Entre parênteses o ano de entrada no mercado farmacêutico	11
Figura 06- Complexo ZDO473	12
Figura 07- Isoniazida	14
Figura 08- Ligantes utilizados neste trabalho	25
Figura 09- Complexos obtidos neste trabalho	26
Figura 10- Curva TG/DTA do complexo V	28
Figura 11- Curva TG/DTA do complexo VI	29
Figura 12- Espectro de absorção na região do infravermelho do complexo II e do ligante 4-NH na região de 3000-3400 cm ⁻¹	31
Figura 13- Espectro de absorção na região do infravermelho do complexo VI e do ligante FH na região compreendida entre 1700-400 cm ⁻¹	31
Figura 14- Espectros no infravermelho na região de 1200-800 cm ⁻¹ . (A) complexo IV (B) 2,4-DNPH	32

Figura 15- Espectros de absorção na região do UV-Vis do ligante 4-NH e seus respectivos complexos_____	33
Figura 16- Espectros de absorção na região do UV-Vis do ligante FH e seu respectivo complexo_____	33
Figura 17- Espectro de ^1H RMN do ligante 4-nitrobenzóico hidrazida_____	35
Figura 18- Espectro de ^1H RMN do complexo I na Faixa compreendida entre 1 e 9 ppm_____	36
Figura 19- Espectro de ^{13}C RMN do ligante 4-NH_____	36
Figura 20- Espectro de ^{13}C RMN do complexo I_____	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Principais causas de morte no mundo em 2011_____	05
Tabela 02- Dados de análise elementar para os complexos obtidos_____	27
Tabela 03- Valores de IC ₅₀ para os complexos e ligantes livres_____	39

SUMÁRIO

<i>Capítulo I</i>	3
1. INTRODUÇÃO	4
1. 1. CÂNCER E QUIMIOTERAPIA	4
1.1.2. Mecanismo de ação da cisplatina	7
1. 2. COMPOSTOS DE PLATINA	9
1.2.1. Ligantes	13
<i>Capítulo II</i>	16
2 . OBJETIVOS	17
<i>Capítulo III</i>	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3. 1. MEDIDAS FÍSICAS	19
3. 2. CÉLULAS E CULTURA	20
3. 3. REAGENTES E SOLVENTES	21
3. 4. SÍNTESE DOS COMPLEXOS	21
<i>Capítulo IV</i>	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	24

4. 1. ANÁLISE TÉRMICA	28
4. 2. ESPECTROS DO IV	29
4. 3. ESPECTROS ELETRÔNICOS DOS COMPOSTOS I, II, III E VI	32
4. 4. ESPECTRO DE ^1H RMN	34
4. 5. ATIVIDADE CITOTÓXICA	37
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	46

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

1. 1. CÂNCER, QUIMIOTERAPIA E A DESCOBERTA DA CISPLATINA

O câncer, do latim caranguejo (esse nome se deve a semelhança entre as pernas do crustáceo e os vasos do tumor, que se infiltram nos tecidos sadios do corpo), é uma doença caracterizada pela disseminação e multiplicação descontrolada de formas anômalas de células do próprio corpo (FONTES; CÉSAR; BERALDO, 2005). Tumor ou neoplasia, que significa “novo crescimento”, pode ser caracterizado como maligno ou benigno. Os tumores malignos são caracterizados por possuir um crescimento descontrolado, mas os últimos não conseguem manter a proliferação, diferenciação, invasão e metástase. As células que sofreram transformação neoplásica proliferam excessivamente e formam tumores locais que podem comprimir ou invadir estruturas normais adjacentes (INCA,2012).

As estimativas envolvendo casos de câncer no Brasil são extremamente alarmantes, o que incentiva a produção de novos fármacos. Para o ano de 2012, o Ministério da Saúde e Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2012) estimam que em todo Brasil sejam registrados 520.000 novos casos de câncer e mais de 150.000 óbitos, sendo os cânceres de pele, próstata, mama, pulmão, cólon e reto os mais incidentes. A realidade não é muito diferente nos demais países industrializados, onde segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2012) o câncer é a segunda causa de morte (Tabela 1). Por sua vez, no mundo, estima-se que em 2012 serão registrados cerca de 27 milhões de novos casos de câncer e aproximadamente 17 milhões de mortes decorrentes da doença. Diante desse cenário, percebe-se a necessidade e a urgência da continuidade das pesquisas para se obterem fármacos capazes de reverter essa situação (INCA,2012).

Atualmente, os principais tipos de tratamento para o câncer são: radioterapia, cirurgia, quimioterapia, hormonioterapia e a imunoterapia. É importante ressaltar que a quimioterapia tem sido objeto de estudo nas últimas décadas.

Tabela 1: Principais causas de morte no mundo em 2011.

Países de alta renda (industrializados)	Morte	% de
	em milhões	mortes
Doença cardíaca isquêmica	1,42	15,6%
Acidentes vasculares cerebrais e outras doenças cerebrovasculares	0,79	8,7%
Câncer de traqueia, brônquios e pulmões	0,54	5,9%
Alzheimer e outras demências	0,37	4,1%
Infecções do trato respiratório inferior	0,35	3,8%
Doença pulmonar obstrutiva crônica	0,32	3,5%
Câncer de cólon e de reto	0,30	3,3%
<i>Diabetes mellitus</i>	0,24	2,6%
Doença cardíaca hipertensiva	0,21	2,3%
Câncer de mama	0,17	1,9%

Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS, 2012).

A quimioterapia do câncer utiliza-se tanto de compostos orgânicos, como por exemplo, o taxol (Taylor et al., 1971), figura 1, quanto de compostos inorgânicos, como os complexos de platina, que podem ser administrados sozinhos ou em associação com outras drogas (WILLIAMS; WHITEHOUSE, 1979; PERDICARIAS, 1993; ROSENBERG; VAN CAMP, 1970).

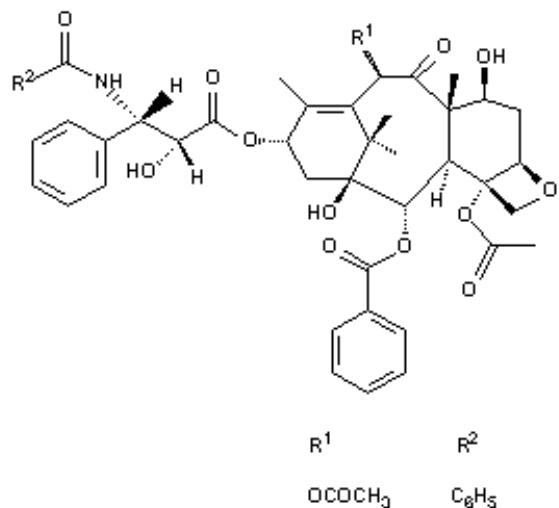


Figura 01- Estrutura do taxol.

Contudo, o envolvimento de compostos inorgânicos na medicina, principalmente aqueles contendo metais, foi muito limitado até a demonstração da atividade antitumoral de complexos contendo platina por Rosenberg e colaboradores em meados do século XX(ROCHA et al., 2011; ROSENBERG et al., 1969; SANTOS JUNIOR, 1997). Antes dessas publicações, a maior parte das pesquisas estavam concentradas no possível potencial carcinogênico desses compostos, e não em qualquer propriedade anticancerígena (ROCHA et al., 2011).

Rosenberg, ao passar uma corrente elétrica através de um eletrodo de platina imerso em cultura de *Escherichia coli*, observou uma inibição da divisão celular e, como consequência, as bactérias somente crescam, produzindo enormes filamentos (SILVA et al., 2011; RONCONI; SADLER, 2007; FONTES; CÉSAR; BERALDO, 2005). Esse efeito não era devido à corrente elétrica, mas aos produtos da eletrólise gerados no eletrodo de platina (ROCHA et al., 2011; ROSENBERG et al., 1969; ROSENBERG; VAN CAMP, 1970). Após a identificação de tais espécies e estudos posteriores, observou-se que apenas um tinha uma ótima atividade antitumoral, o complexo *cis*-diaminodicloroplatina(II) ou simplesmente *cisplatina* (ROCHA et al., 2011; ROSENBERG et al., 1969; RVIG; ABRAMS, 1999; GUERRA; SILVA; ALMEIDA; FONTES, 2006). É importante ressaltar que a descoberta de Rosenberg é considerada nos meios científicos "um acaso" ("serendipity", em inglês), pois a farmacologia do composto foi evidenciada enquanto estudavam o efeito de uma corrente elétrica no crescimento bacteriano de *Escherichia coli* (DONNICI et al., 2005). A descoberta desse importante fármaco ajudou a estabelecer um novo campo de estudo, denominado

química inorgânica medicinal (SILVA et al., 2011; FONTES; CÉSAR; BERALDO, 2005). A química inorgânica medicinal exerce um papel importante na medicina moderna no que se refere à terapia e diagnóstico de doenças. Essa área de pesquisa situa-se na interface de várias disciplinas como a química, a biologia, a farmacologia dentre outras. (INCA, 2012) Uma das utilizações mais importantes e promissoras de complexos metálicos é no tratamento do câncer, devido ao aumento da sobrevida de pacientes tratados com antitumoriais a base de platina(II) (FURST; HARO, 1969; FONTES; ALMEIDA; NADER, 1997; WILTSCHAW; CARR, 1974; DIAS, 1989).

1.1.2 MECANISMO DE AÇÃO DA CISPLATINA

Em solução aquosa a cisplatina sofre hidrólise, conforme mostra o esquema da figura 2. O mesmo ocorre no organismo após a entrada na célula, que pode ser por difusão passiva e/ou transporte ativo (PEREIRA-MAIA; GARNIER-SUILLEROT, 2003). Mais especificamente, estudos apontam que a cisplatina, ao entrar na célula sofre hidrólise gerando as espécies ativas $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ e $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ que podem reagir mais rapidamente com alvos celulares. Neste aspecto, a baixa concentração de íons cloreto dentro da célula favorece a hidrólise, de modo que do lado de fora da célula a estrutura da cisplatina conserva-se neutra.

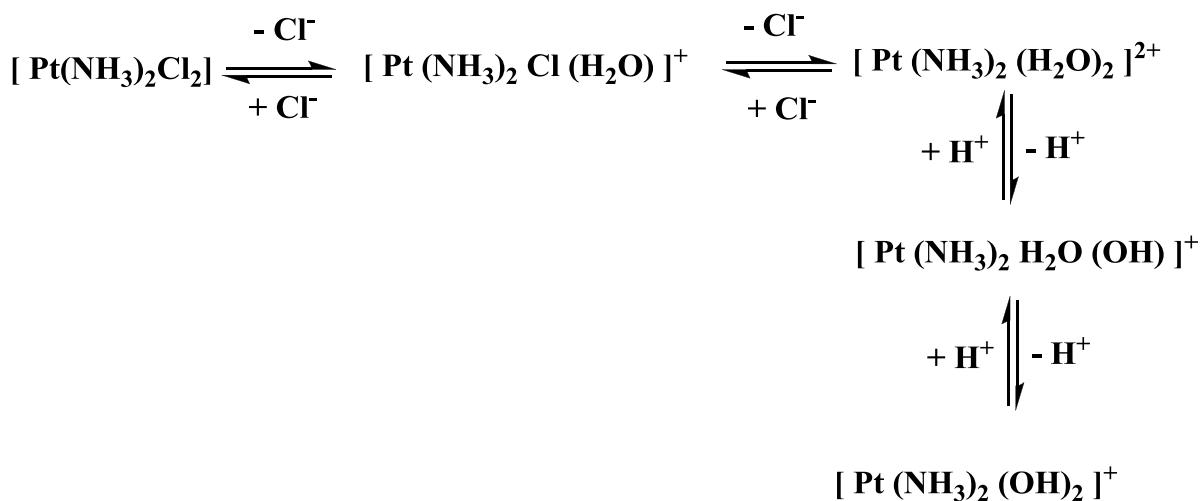


Figura 02- Reações de hidrólise da cisplatina

Uma vez dentro da célula, as espécies ativas provenientes da hidrólise podem reagir prontamente com o DNA, formando adutos monofuncionais e bifuncionais (onde cada átomo de platina pode se ligar a duas posições do DNA). As formações desses adutos geram lesões ao nível molecular (GREEN; GARDEN; ORTON, 1992). Então, atualmente, há um consenso de que a cisplatina, após sofrer hidrólise, se liga preferencialmente aos nitrogênios N₇ das bases guanina. A grande estabilidade da ligação no aduto Pt-N₇G se deve não só à grande basicidade deste átomo de nitrogênio, mas também a uma estabilização adicional devido à ligação de hidrogênio do grupo NH₃ da cisplatina com o oxigênio da guanina, Figura 03. Em termos de estrutura x atividade este fato explicaria a necessidade da presença de pelo menos um átomo de hidrogênio no grupo não abandonador na cisplatina (NH₃) e em seus análogos (-NH-).

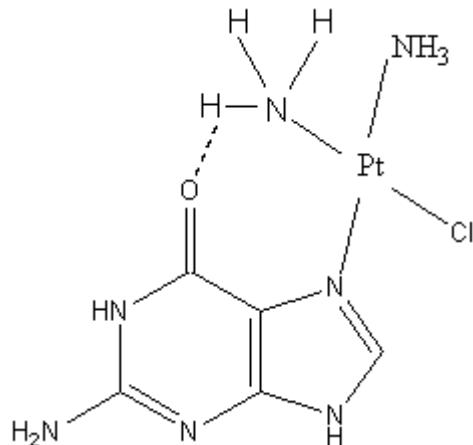


Figura 03- Interação da platina com a guanina.

Embora possa ocorrer ligação do tipo intrafita e interfita da cisplatina com a guanina, resultados de vários experimentos apontam que a maior quantidade de aduto (47-50%) formado entre a cisplatina e o DNA é o que corresponde à ligação 1,2-intrafita envolvendo bases guanina adjacentes (aduto 4), cis-[Pt(NH₃)₂{d(GpG)}] (FICHTINGER-SCHEPMAN et al., 1985). Vários outros experimentos sugerem que a ligação 1,2-intrafita GG deve ser a maior responsável pela atividade antitumoral da cisplatina, provocando lesões mais difíceis de serem reparadas (PEREIRA-MAIA; GARNIER-SUILLEROT, 2003).

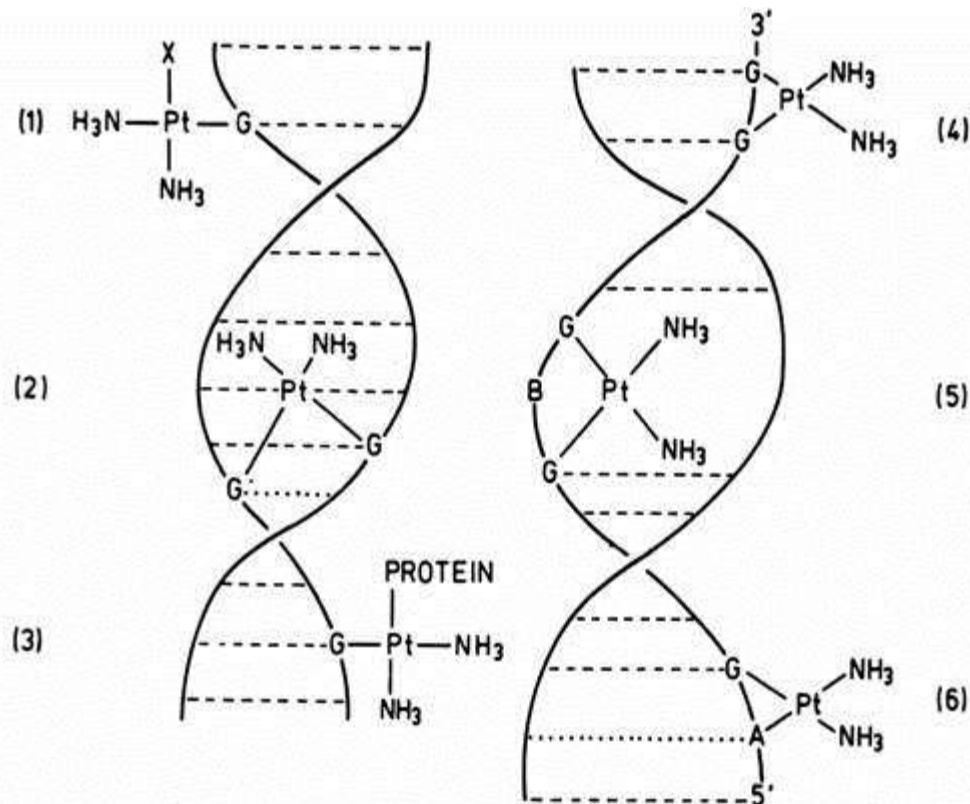


Figura 04- Principais tipos de adutos formados entre a platina e o DNA.

1. 2. COMPOSTOS DE PLATINA E PALÁDIO.

Compostos de platina(II) tais como, a oxaloplatina, cisplatina, carboplatina, lobaplatina e nedaplatina (Fig. 5), têm sido utilizados como agentes quimioterapêuticos para o tratamento de vários tipos de câncer, sendo que muitos outros estão sob avaliação clínica (GUERRA; SILVA; ALMEIDA; FONTES, 2006). De fato, já no inicio da década de 70, a cisplatina passou a ter uso clínico em pacientes terminais e posteriormente, em tumores sólidos como o câncer de testículo e ovário (TAKAGAKI; MARINHO, 2008; RVIG; ABRAMS, 1999; GUERRA; SILVA; ALMEIDA; FONTES, 2006). Na época a taxa de cura para câncer de testículo era de 10% e com o advento da cisplatina subiu para 90%. Atualmente, a cisplatina é também utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer, como o de pulmão, cabeça, estômago, esôfago, pescoço, linfomas, osteossarcoma, melanoma, mama e cérvix (RIOS; ANTUNES; BIANCHI, 2009; MACHADO et al., 2007). A cisplatina é, sobretudo, utilizada em associações com outras drogas em vários esquemas terapêuticos (KOSTOVA, 2006; FIORENTINO; GHIOOTTO, 1987). Apesar disso, a utilização da cisplatina apresenta alguns pontos negativos, como o aparecimento de resistência

celular, a pouca solubilidade em água e efeitos colaterais graves (PASINI; ZUNINO, 1987; CVITKOVIC et al., 1977).

Alguns efeitos adversos, como a nefrotoxicidade, foram minimizados com o desenvolvimento de procedimentos clínicos (CVITKOVIC et al., 1977; DE LENA et al., 1987). Esses efeitos colaterais se devem à interação entre a cisplatina, proteínas e oligonucleotídeos do organismo, como por exemplo, a glutationa, o que leva a um acúmulo do complexo de platina no organismo e, consequentemente, à toxicidade (SILVA et al., 2011; PEREZ, 1998).

Após o lançamento comercial da cisplatina em 1978, as pesquisas subsequentes foram direcionadas no sentido de se produzir compostos com efeitos colaterais mais brandos e com maior espectro de atividade. Então, já na década posterior, novos compostos de platina foram sendo lançados, dentre os quais se destacam a carboplatina e oxaloplatina, que são drogas utilizadas no mundo todo. Na figura 5, disponibilizamos os fármacos a base de platina utilizada na terapia do câncer.

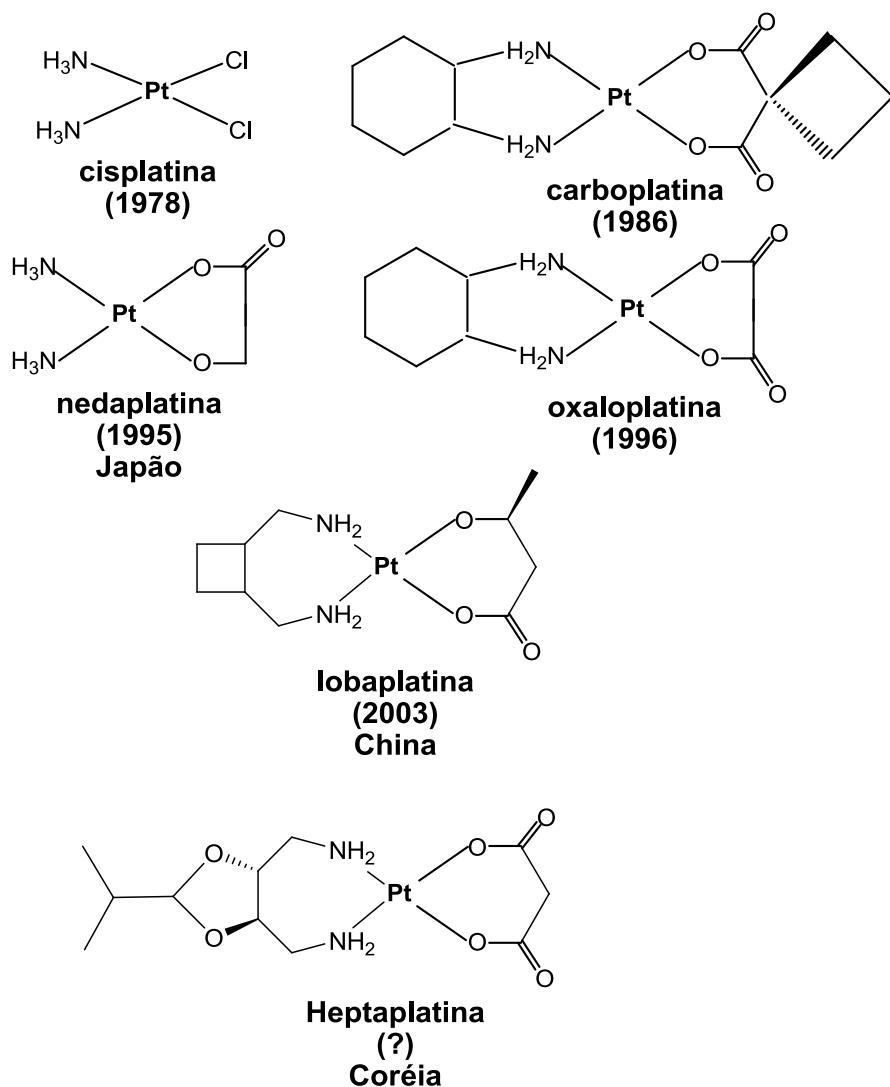


Figura 05- Estrutura da cisplatina e de seus análogos utilizados na clínica médica. Entre parênteses, o ano de entrada no mercado farmacêutico.

Em relação à cisplatina, a grande vantagem da carboplatina e da oxaloplatina diz respeito à diminuição da nefrotoxicidade, permitindo o uso de doses maiores (WILLIAMS; WHITEHOUSE, 1979; PEREZ, 1998; SIDDIK ZH, 2003). Entretanto, quanto ao espectro de atividade, elas são um pouco menos eficientes do que a cisplatina. Por sua vez, a oxaloplatina é essencialmente indicada para o tratamento do câncer de cólon e reto em estágio avançado (FONTES; ALMEIDA; NADER, 1997). Quando usada conjuntamente com outras drogas, como por exemplo, o fluoracil, há diferentes mecanismos de ação e toxicidade, porém há um aumento da resposta ao tratamento produzindo excelentes resultados (FONTES; ALMEIDA; NADER, 1997;

DESOIZE; MADOULET, 2002). Por sua vez, o fármaco nedaplatina produziu melhores resultados do que a cisplatina em estudos pré-clínicos, o que posteriormente não se confirmou em estudos clínicos (SIDDIK ZH, 2003). Este composto apresenta menor toxicidade quando comparado à cisplatina, mas também não obtém um espectro de atividade melhor e, além disso, mostra menor resposta ao tratamento. No Japão, este fármaco é utilizado no tratamento de câncer de cabeça, pescoço, testículo e cérvix (RAYNAUD et al., 1997). Por fim, recentemente a lobaplatina foi aprovada para uso clínica na China nos casos envolvendo câncer de ovário, cabeça, pescoço e pulmão. Curiosamente, a droga não causa alopecia e um ponto negativo na sua utilização é que causa trombocitopenia (redução do número de plaquetas no sangue). (WHEATE et al., 2010). Juntos, na última década, estes seis fármacos representaram um mercado anual da ordem de um bilhão de dólares (SILVA; VARGAS, 2012).

Em relação aos complexos promissores, como exemplo, um complexo análogo à cisplatina que está chamando a atenção é o complexo denominado ZDO473 ou picoplatina (Fig. 06), que apresenta em sua estrutura o ligante 2-metil-piridina, e que entrou em fase III de testes clínicos (GELMON et al., 2003; ZOCOLI,R.; REICHOW; ZOCOLI,A., 2003). Esse complexo em combinação com adriamicina está sendo avaliado no tratamento de câncer de ovário, onde outras drogas antitumorais semelhantes à cisplatina e paclitaxel não tiveram efeito. Quanto à toxicidade, durante a fase II de testes clínicos não foi observado para esta droga nefrotoxicidade, neurotoxicidade periférica e ototoxicidade (HYPPOLITO; OLIVEIRA, 2005; FONTES et al., 2004). Efeitos como náuseas, vômitos e gosto metálico na boca foram considerados brandos (PASINI; ZUNINO, 1987; CVITKOVIC et al., 1977). A ausência de efeitos colaterais severos é importante, pois permite que a droga seja administrada em doses maiores.

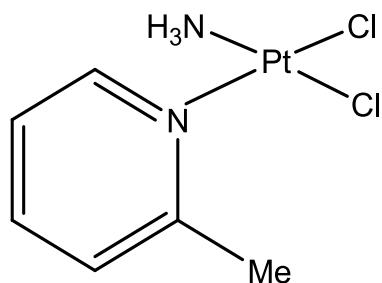


Figura 06- Complexo ZDO473 (picoplatina).

Devido à sua semelhança química com a platina, alguns complexos de paládio têm sido estudados visando à obtenção de fármacos. Da mesma forma que alguns complexos de platina, há compostos de paládio que possuem boa atividade antitumoral e, além disso, são promissores agentes anti-infecciosos (MARTINEZ et al., 1988). Como exemplo, alguns complexos de paládio com ligantes orgânicos, como tiossemicarbazonas, têm-se mostrado ativos em células tumorais resistentes à cisplatina. Investigações a respeito do mecanismo de ação sugerem que esses compostos se ligam ao DNA através de coordenação interfitas, ao contrário da cisplatina, que se liga predominantemente a duas guaninas na mesma fita, ou seja, através de coordenação intrafita. Acredita-se que seria esta a razão pelas quais os complexos de paládio contendo tiossemicarbazonas sejam ativas nas células resistentes a cisplatina (GAROUFIS; HADJIKAKOU; HADJILIADIS, 2009). No entanto, apesar das intensas pesquisas e o fato desses complexos serem bastante promissores, esses não são ainda utilizados nas práticas médicas.

1.2.1. Ligantes

Considerando a necessidade de obtenção de novos fármacos, a utilização de diferentes tipos de ligantes pode modificar a atividade biológica dos complexos e, por essa razão, o uso de hidrazidas/hidrazinas é muito interessante. (GELMON et al., 2003; ZOCOLI,R.; REICHOW; ZOCOLI,A., 2003).

As propriedades de hidrazidas são de grande interesse devido às suas inúmeras atividades biológicas e a sua utilização como agentes de extração de metais. Por exemplo: a hidrazida do ácido isonicotínico (isoniazida), Figura 07, tem elevada atividade inibitória *in vivo* para *M. tuberculosis* H37Rv. Hidrazidas têm demonstrado possuir, entre outras, atividades antibacteriana, antifúngica e antitumoral. A formação de complexos metálicos desempenha um papel importante no aumento da atividade biológica. Hidrazidas são eficientes agentes quelantes, pois possuem vários grupos que podem coordenar-se ao metal, como por exemplo, os grupos C=O, NH e NH₂. Portanto, complexos metálicos contendo hidrazidas têm sido sintetizados e caracterizados (HYPOLLITO;OLIVEIRA, 2005; FONTES, 2004; SAH; PEOPLES, 1954).

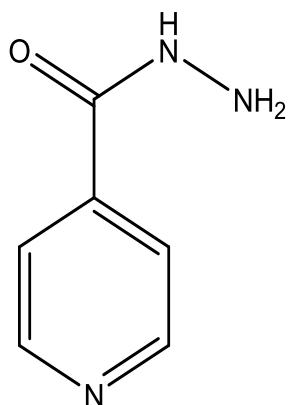


Figura 07: Isoniazida.

Complexos metálicos contendo hidrazidas possuem atividade fungicida e bactericida e, particularmente, complexos de platina(II) contendo derivados de hidrazidas do ácido benzóico mostraram um forte efeito inibitório no crescimento de células de leucemia in vitro, o que não foi verificado para o ligante livre (DODOFF; GRANHAROV; SPASSOVSKA, 1995; SUR et al., 1995).

Complexos de Pt(II) coordenados às hidrazidas, do tipo *cis*-[PtX₂(L)₂] e *cis*-[PtX₂NH₃(L)], em que X= Cl⁻, Br⁻ e I⁻ e L = ácido ciclohexilcarboxílico hidrazida (chcah) e ácido ciclopentilcarboxílico hidrazida (cpcah) foram relatados como tendo boa atividade antitumoral (KUSHEV, 1997; KUSHEV et al., 1999; KUSHEV et al., 2002; KUSHEV et al., 2003). Um complexo ternário de Cu(II) contendo os ligantes 1,10-fenantrolina e a hidrazida do ácido 2-furóico foi obtido por nosso grupo de pesquisa (SILVA et al., 2009). Os testes de atividade citotóxica frente a uma linhagem celular tumoral (K562) resultaram num valor de IC₅₀ igual a 2,15 µmol. L⁻¹. Estudos envolvendo DNA têm sido realizados por alguns de nós e, acredita-se que esta atividade citotóxica esteja relacionada às suas interações com o DNA, que é um importante alvo de drogas antitumorais.

Quanto ao efeito antibacteriano, complexos de Co(II) e Ni(II) contendo derivados de hidrazida foram mais ativos contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* do que os ligantes livres. Este efeito foi associado a um maior caráter lipofílico dos complexos quando comparados aos ligantes não coordenados, o que favorece sua permeação através da camada lipídica de microrganismos (CHOHAN; SHERAZI; PRAVEEN, 1998).

Considerando a atividade antitumoral de complexos de platina e os estudos envolvendo complexos de paládio, acreditamos que a interação entre síntese e a avaliação biológica de novos compostos pode conduzir à descoberta de importantes

fármacos e nesse aspecto, hidrazidas são bastante interessantes para serem utilizadas como ligantes na obtenção de novas metalodrogas. A escolha dos ligantes também se baseou na estratégia que tem sido usada por nosso grupo de pesquisa, que é aliar propriedades farmacológicas de alguns íons metálicos a de outras substâncias, que possuam sítios de coordenação em sua estrutura (ROLLAS; GÜLERMAN; ERDENIZ, 2002; SAVINI et al., 2004).

Como descrito anteriormente, um dos maiores obstáculos para o tratamento do câncer na atualidade é o aparecimento de resistência aos medicamentos utilizados na clínica médica. A necessidade de se reverter este problema tem estimulado em muito a pesquisa nesta área. Várias estratégias têm sido empregadas entre as quais podemos citar a síntese de novos fármacos que não sejam reconhecidos pelos mecanismos de resistência celular. Como a principal aplicação de complexos metálicos na medicina é no tratamento do câncer, propomos neste trabalho algumas sínteses objetivando obter compostos ativos. A nossa estratégia para desenvolvimento de novos fármacos é a de coordenar hidrazidas que se mostraram bioativas aos íons platina(II) e paládio(II) que também possuem propriedades farmacológicas. A interação entre a síntese química e a avaliação biológica de novos compostos pode conduzir à descoberta de importantes fármacos (KUSHEV et al., 2003; KETER et al., 2008).

Capítulo II

2. OBJETIVOS

Tendo em vista o uso de complexos de platina na terapia do câncer e as atividades biológicas de hidrazidas e seus compostos de coordenação, este trabalho tem como objetivo principal a síntese e caracterização de novos complexos de paládio(II) e platina(II) como agentes antitumorais.

Mais especificamente os objetivos iniciais propostos são:

- i) Preparar e caracterizar novos complexos de platina(II) e paládio(II).
- ii) Determinação da IC₅₀ (concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50%) dos novos compostos em células tumorais de origem humana.

Capítulo III

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. 1. MEDIDAS FÍSICAS

a. Microanálises

As análises elementares (porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio) foram realizadas na Central Analítica da Universidade de São Paulo, utilizando um aparelho Perkin-Elmer 2400. As análises por absorção atômica foram realizadas num espectrofotômetro Hitachi 8200.

b. Análise condutimétrica

As análises de condutividade molar foram realizadas com um medidor de condutividade Digimed DM 31, utilizando uma célula de constante $1,00\text{ cm}^{-1}$, tendo como solvente dimetilformamida grau espectroscópico (Merck) ($\Lambda_M = 1,20\text{ }\mu\text{s/cm}^{-1}$) e brometo de tetraetilâmônio ($\Lambda_M = 78,39\text{ }\mu\text{S/cm}^{-1}$) como padrão.

c. Análise termogravimétrica

As análises termogravimétricas (TG/DTA) foram realizadas em um aparelho Shimadzu TG-50, utilizando aproximadamente 6,0 mg de amostra acondicionadas em um cadinho de alumina. Essas foram aquecidas a 10°C/min partindo da temperatura ambiente até 900°C , em uma atmosfera dinâmica de nitrogênio (vazão = 200 ml/ min). As análises foram feitos na região de $0\text{-}900^\circ\text{C}$.

d. Espectrômetro na região do Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram registrados em um espectrômetro Shimadzu FTIR-Irprestige-21 utilizando pastilhas de KBr. As análises foram feitos na região de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. Além disso, os espectros do 2,4-dinitrofenilhidrazina foram feitos na região de $200\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, usando CsI como suporte.

e. Espectrofômetro na região do ultravioleta-visível

Para as medições de absorção foi utilizado um espectrofômetro UV-2501 PC Shimadzu. As análises foram feitas na região de 200 a 800nm.

f. Ressonância magnética nuclear

Os espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN foram obtidos utilizando um aparelho Bruker Avance DPX 200 espetrômetro (UFMG) utilizando tetrametilsilano como padrão interno. O solvente utilizado nas análises foi o d_6 -DMSO. O complexo I foi possível obter o espectro de ^{13}C RMN. Além disso, enquanto no espectro de ^1H RMN a faixa de absorção magnéticas dos prótons varia de 0 a 14 ppm, no espectro de ^{13}C RMN a faixa varia de 0 a 240 ppm.

3. 2. CÉLULAS E A CULTURA

A linhagem celular K562 utilizada nos testes de citotoxicidade, foi comprada no Banco Celular do Rio de Janeiro (número CR083 da coleção RJCB). Essa linhagem celular foi estabelecida a partir de um derrame pleural de um indivíduo de 53 anos de idade, do sexo feminino, com leucemia mielóide crônica em crise blástica terminal. As células foram cultivadas em RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.) em meio suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, São Paulo, Brasil) a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. As culturas cresceram exponencialmente (de 10⁵ células.ml⁻¹ para cerca de 8 x 10⁵ células. ml⁻¹) em três dias. A viabilidade celular foi verificada por exclusão, utilizando corante Azul de Tripan. O número de células foi determinado por análise Coulter balcão. Para a avaliação de citotoxicidade, 1 x 10⁵ células.ml⁻¹ foram cultivados por 72h na ausência e presença de diferentes concentrações dos compostos testados. A sensibilidade para o complexo foi avaliada pela concentração que inibe o crescimento celular em 50%, IC₅₀. Soluções estoque dos compostos foram preparadas usando uma mistura DMSO/água.

3. 3. REAGENTES E SOLVENTES

Todos os reagentes (ligantes e sais metálicos) foram adquiridos comercialmente (Aldrich). Todos os outros produtos químicos e reagentes utilizados, tanto para as sínteses quanto para as análises, possuíam grau analítico, adquiridos de diferentes fontes e usados sem purificação adicional.

3. 4. SÍNTESE DOS COMPLEXOS.

Para a síntese do complexo **III**, o precursor K_2PtI_4 foi preparado adicionando-se 4 mmol de iodeto de potássio a 1 mmol de K_2PtCl_4 previamente dissolvido em 10 mL de água.

Todos os complexos foram sintetizados seguindo o mesmo procedimento geral. Dessa forma, descreveremos a seguir apenas a síntese do complexo de Pt(II) contendo o ligante 4-nitrobenzóico hidrazida, complexo **I** ou $[Pt(4-NH)_2Cl_2]$. 0,2075g de K_2PtCl_4 (0,5 mmol) previamente dissolvido em 5 ml de água foram adicionados em 5 ml de uma solução metanólica de 4-nitrobenzóico hidrazida (1,0 mmol). A mistura foi agitada por 24 horas e após este tempo, o sólido formado foi separado por filtração, lavado com água e seco sob vácuo.

Complexo I - $[Pt(4-NH)_2Cl_2]$:

Rendimento: 82 %. Cor: castanho. Espectro de IV, KBr, ν (cm^{-1}): 3296, 3175, 3090, 1670, 1602, 1570, 1484, 1340, 1296, 1234, 1117, 1020, 962, 946, 868, 850, 713, 564, 505, 458, 423.

1H RMN (200 MHz; d_6 -DMSO): δ 7,88 (s, 2H, -NH₂); δ 8,08 e 8,33 (2d, 4H, Har); δ 11,23 (s, H, - NH).

^{13}C NMR (100 MHz; d_6 -DMSO): 124,3; 129,50; 137,46; 149,69 (CAr); δ 164,27 (C=O).

Complexo II- [Pd(4-NH)₂Cl₂]:

Rendimento: 87 %. Cor: Amarelo. Espectro de IV em KBr, ν (cm⁻¹): 3309, 3209, 3111, 3072, 1656, 1600, 1537, 1352, 1327, 1315, 1296, 1260, 1117, 1020, 962, 946, 877, 854, 715, 541, 516, 492, 426.

¹H RMN (200 MHz; d₆-DMSO): δ 7,08 (s, 2H, -NH₂); δ 8,06 e 8,29 (2d, 4H, Har); δ 10,74 (s, H, - NH).

Complexo III - [Pt(4-NH)₂I₂]:

Rendimento: 91 %. Cor: marrom. Espectro de IV em KBr, ν (cm⁻¹): 3301, 3277, 3181, 3105, 3078, 1669, 1600, 1570, 1523, 1484, 1347, 1326, 1298, 1234, 1117, 1020, 962, 946, 868, 850, 716, 537, 504, 457, 417.

Complexo IV - [Pt(2,4-DNPH)₂Cl₂]. H₂O:

Rendimento: 59 %. Cor: marrom. Espectro IV em KBr, ν (cm⁻¹): 3323, 3297, 3232, 3178, 3101, 3086, 3009, 1644, 1626, 1615, 1590, 1444, 1323, 1280, 1220, 1130, 1105, 1058, 978, 923, 829, 741, 631, 531, 506, 439, 420.

Complexo V - [Pd(2,4-DNPH)₂Cl₂]. H₂O:

Rendimento: 68 %. Cor: marrom. Espectro IV em KBr, ν (cm⁻¹): 3275, 3158, 3101, 3064, 1614, 1582, 1513, 1415, 1336, 1279, 1242, 1138, 1097, 1054, 924, 833, 739, 679, 631, 551, 510, 423.

Complexo VI [Pd(FH)₂Cl₂]:

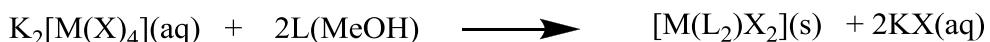
Rendimento: 91 %. Cor: amarelo. Espectro de IV em KBr, ν (cm⁻¹): 3295, 3256, 3197, 3086, 1661, 1596, 1562, 1526, 1469, 1316, 1253, 1234, 1180, 1144, 1016, 953, 884, 865, 773, 751, 640, 543, 505, 498, 417. ¹H RMN (200 MHz; d₆-DMSO): δ 6,91 (s, 2H, -NH₂); δ 6,63 - 7,80 (3d, 3H, Har); δ 9,60 (s, H, - NH).

Capítulo IV

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Seis novos complexos de platina(II) e paládio(II) contendo os ligantes 4-nitrobenzóico hidrazida (4-NH), ácido 2-furóico hidrazida (FH) e 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) foram preparados pela adição lenta do ligante previamente dissolvido em metanol a uma solução aquosa de K_2PdCl_4 , K_2PtCl_4 ou K_2Ptl_4 . As relações estequiométricas utilizadas nas sínteses dos complexos foram de um mmol de precursor metálico para dois mmol de ligante (ver esquema abaixo). Após 24 horas de agitação, sólidos de cor amarela, castanho ou laranja foram isolados por filtração, lavados com água e metanol e secos sob vácuo durante pelo menos três dias. Após este período, esses complexos foram devidamente caracterizados por análise elementar, condutimétrica, térmica (TG/DTA), espectroscopia na região do infravermelho, do ultravioleta visível e por 1H RMN.

Em todas as reações, as hidrazonas atuam como ligantes monodentados substituindo dois cloretos ou dois iodetos (complexo **III**) dos precursores metálicos (saís de partida) gerando complexos neutros. As reações foram realizadas na ausência de luz, sob condições brandas e com bons rendimentos (> 50%). Todos são estáveis ao ar, à luz, solúveis em DMSO, acetonitrila e DMF. No que se refere às estruturas dos complexos obtidos, pode-se observar que os mesmos são análogos da cisplatina, uma vez que apresentam dois cloretos moderadamente lábeis e dois outros ligantes coordenados à platina pelos átomos de nitrogênio (geometria quadrado plano). Baseando-se no efeito *trans* pode-se antecipar que os complexos obtidos terão isomeria do tipo *cis* e não *trans*. Veremos adiante que espectros de infravermelho confirmam nossas previsões. As estruturas químicas dos ligantes (figura 08) e seus respectivos complexos (figura 09) são apresentados a seguir.



$x = Cl$ ou I $L =$ Ligante
 $M = Pt$ ou Pd

Esquema 1: Método geral de obtenção dos complexos.

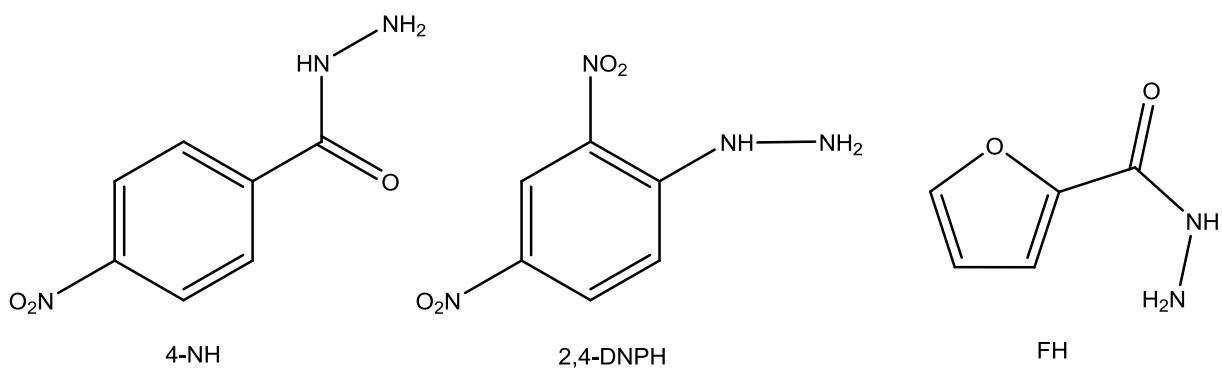


Figura 08- Ligantes utilizados neste trabalho.

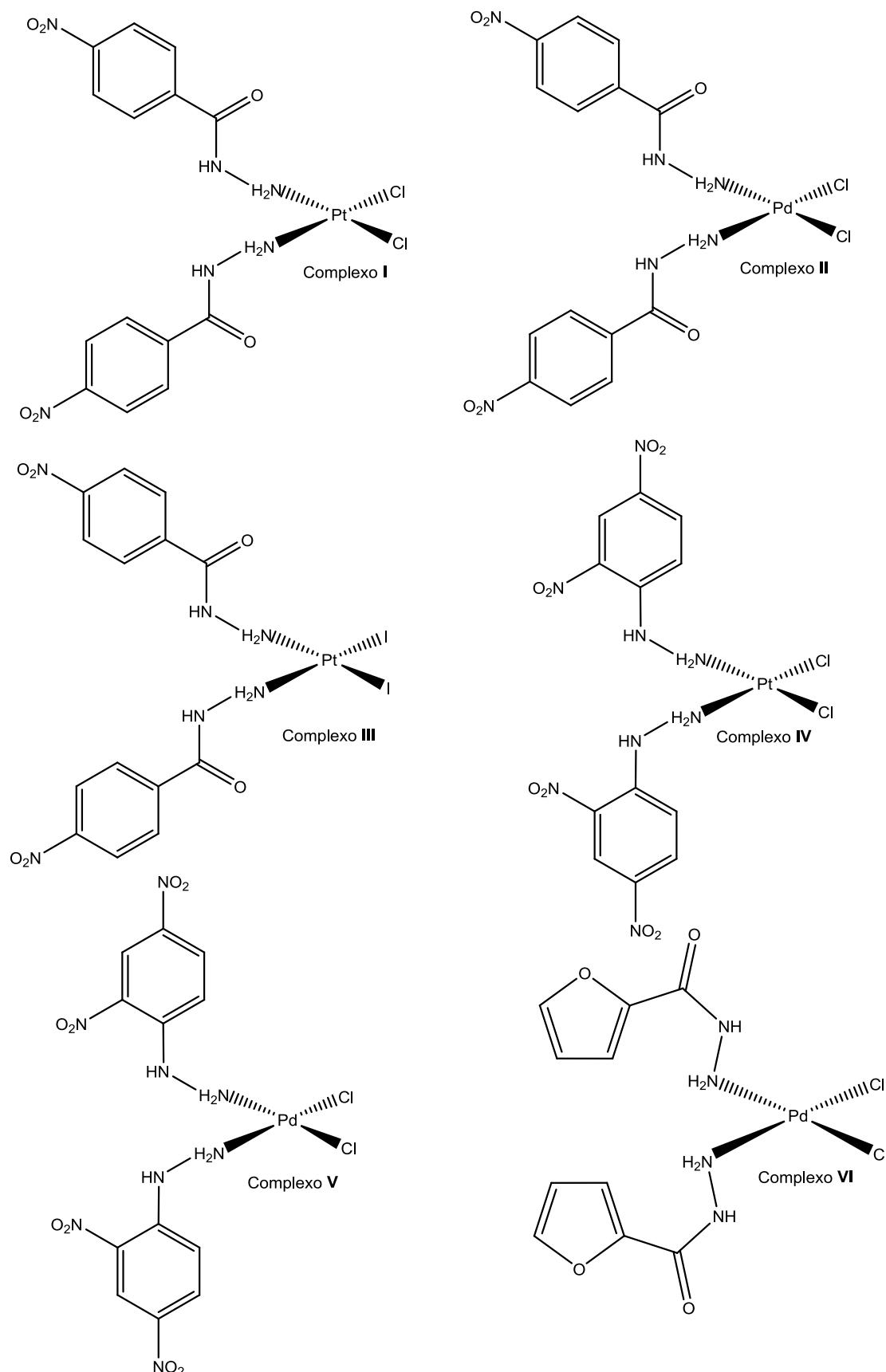


Figura 09- Complexos obtidos neste trabalho.

Os resultados provenientes das análises elementares (C, H, N) estão em conformidades com as estruturas propostas.

Tabela 02- Dados resultantes das análises de CHN para os complexos obtidos.

Complexos	C (%) _{teor.}	C (%)_{exp.}	H (%) _{teor.}	H (%)_{exp.}	N (%) _{teor.}	N (%)_{exp.}
Complexo I C₇H₇Cl₂N₄O₂Pt	26,82	26,74	2,50	2,43	13,08	13,10
Complexo II C₇H₇Cl₂N₄O₂Pd	31,18	30,88	2,62	2,78	14,96	15,11
Complexo III C₇H₇I₂N₄O₂Pt	22,50	21,09	1,90	1,67	11,25	10,40
Complexo IV C₆H₆Cl₂N₄O₄Pt	21,16	20,18	1,76	1,65	16,46	15,99
Complexo V C₆H₆Cl₂N₄O₄Pd	23,61	23,01	1,96	1,69	18,37	18,26
Complexo VI C₄H₃Cl₂N₂O₂Pd	27,96	27,92	2,82	2,78	13,04	12,98

Os complexos contendo o ligante 2,4- DNPH foram submetidos à análise de teor de metal e os resultados confirmam a fórmula proposta. Complexo **IV** (% Pt = 28,67); achado, 28,13%; Complexo **V** (%Pd = 17,98); achado, 17,74%.

Os valores de condutividade molar de uma solução (DMSO) 10^{-3} molL⁻¹ para todos os complexos foram muito abaixo do eletrólito padrão 1:1, indicando que estes não são carregados (em geral menor ou igual a $10 \mu\text{S.cm}^{-1}$). O mesmo padrão foi observado quando os complexos foram dissolvidos em uma mistura contendo água / DMSO, mesmo após 30 minutos, indicando que estes compostos são neutros e são estáveis neste sistema.

4. 1. ANÁLISE TÉRMICA

A estabilidade térmica dos complexos da 2,4-dinitrofenilhidrazina e do ácido 2-furóico hidrazida foi avaliada na faixa de temperatura compreendida entre 25-900 °C. Para os complexos contendo a 2,4-dinitrofenilhidrazina, os eventos observados nas curvas termogravimétricas dos complexos são bem semelhantes entre si e apenas a curva TG do complexo de paládio **V** ($\text{Pd}(\text{2,4-DNPH})_2\text{Cl}_2$) será discutida.

A curva TG/DTA do complexo **V** (Fig.10) mostra uma série de eventos de perda de massa. O primeiro, na faixa compreendida entre 30-90°C (evento endotérmico), corresponde à perda de uma molécula de água.

Uma série de eventos ocorrendo entre 130-750°C podem ser atribuídos à decomposição térmica (saída dos ligantes) do complexo que estão descritos na curva de TG, como eventos exotérmicos e endotérmicos. Próximo a 850°C há um resíduo (paládio elementar) correspondendo a 17,89% (Calculado: 17,98%). Para o complexo **IV** ($\text{Pt}(\text{2,4-DNPH})_2\text{Cl}_2$), a 700°C há um resíduo (platina elementar) correspondendo a 27,71% (Calculado: 28,67%). Nos dois casos, a porcentagem de metal está condizente com a fórmula proposta.

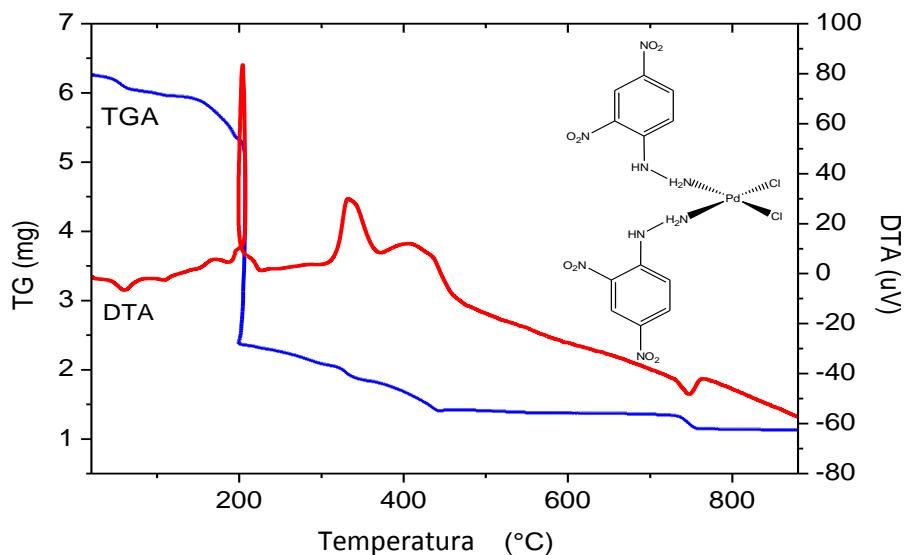


Figura 10- Curva TG/DTA do complexo **V**.

Para o complexo **VI** ($\text{Pd}(\text{FH})_2\text{Cl}_2$), a curva TG/DTA (Fig.11) indica uma série de eventos de perda de massa ocorrendo entre 170 e 408°C que podem ser atribuídos à

decomposição térmica do complexo (saída do ligante), nesta parte da curva há eventos endotérmicos e exotérmicos. A 420°C observa-se um resíduo, atribuído ao paládio elementar. A porcentagem de resíduo encontrado experimentalmente corresponde a 24,90%, (valor calculado: 24,77%). Esse resultado corrobora com a estrutura proposta para o complexo, uma vez que o percentual de metal encontrado no experimento está condizente com o valor teórico.

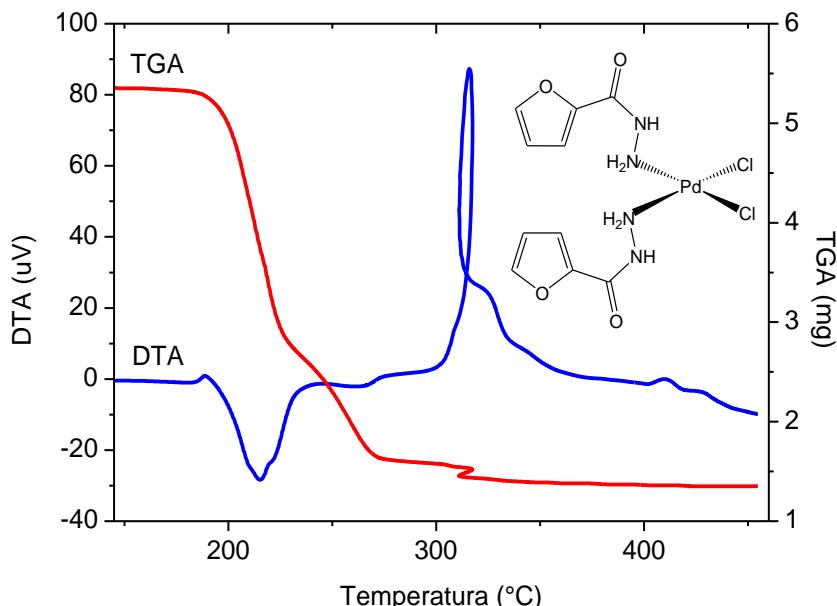


Figura 11- Curva TG/DTA para o complexo VI.

4. 2. ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Os espectros no infravermelho dos ligantes livres foram obtidos para comparação com os correspondentes complexos isolados. Absorções características na região de 3330-3000 cm⁻¹ foram observadas, correspondendo a vNH₂, vNH e vCH (aromáticos).

O espectro do ligante FH (Fig.13) apresenta uma banda intensa por volta de 1650 cm⁻¹, atribuída ao vC=O. Para os ligantes contendo o grupo nitro, 4-NH e 2,4-DNPH, também observamos duas bandas próximas a 1515 e 1343 cm⁻¹ que correspondem aos estiramentos assimétrico e simétrico, respectivamente, característico do grupo NO₂.

Os espectros na região do infravermelho dos complexos (Fig.12) apresentam absorções correspondentes aos estiramentos dos grupos NH e NH₂ por volta de 3330

cm^{-1} (NH_2) e 3100 cm^{-1} (NH). Os picos referentes aos estiramentos do grupo NH_2 foram deslocados para número de ondas menores nos complexos quando comparados aos ligantes livres. Assim, é possível verificar que em todos os casos a coordenação aos íons metálicos em todos os ligantes ocorre via átomo de nitrogênio do grupo NH_2 . A posição da banda referente ao grupo NH permaneceu praticamente inalterada nos complexos, excluindo sua participação na coordenação aos íons metálicos. Nos espectros de IV dos complexos contendo carbonila, os estiramentos referentes ao grupo C=O apareceram quase no mesmo número de onda do ligante livre. Portanto, descartamos a participação desse grupo na coordenação aos íons metálicos.

Uma importante observação (ver Figura 14) é a de que os picos devidos aos $\nu\text{N-N}$, que aparecem próximos a 975 cm^{-1} nos ligantes, deslocam-se para número de ondas maiores nos complexos de paládio e platina.

Novas bandas em $530\text{-}515 \text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos contendo o ligante 4-nitrobenzóico hidrazida podem ser atribuídas à formação da ligação metal-nitrogênio.

As bandas restantes características dos ligantes livres não foram afetadas pelo processo de complexação e estes resultados sugerem que os ligantes coordenam-se aos íons metálicos através do grupo NH_2 .

Para os complexos contendo o ligante 2,4-DNPH, foram realizados seus espectros no infravermelho até 200 cm^{-1} usando CsI como suporte. Assim, foi possível observar, como exemplo, que a banda característica referente ao $\nu\text{Pt-Cl}$ ocorreu em 323 cm^{-1} , desdobrada, indicando que o complexo IV deve ter geometria *cis*, de acordo com o que realmente era esperado, considerando-se o efeito *trans*(BASOLO, 1964;SHRIVER; ATKINS, 2003).

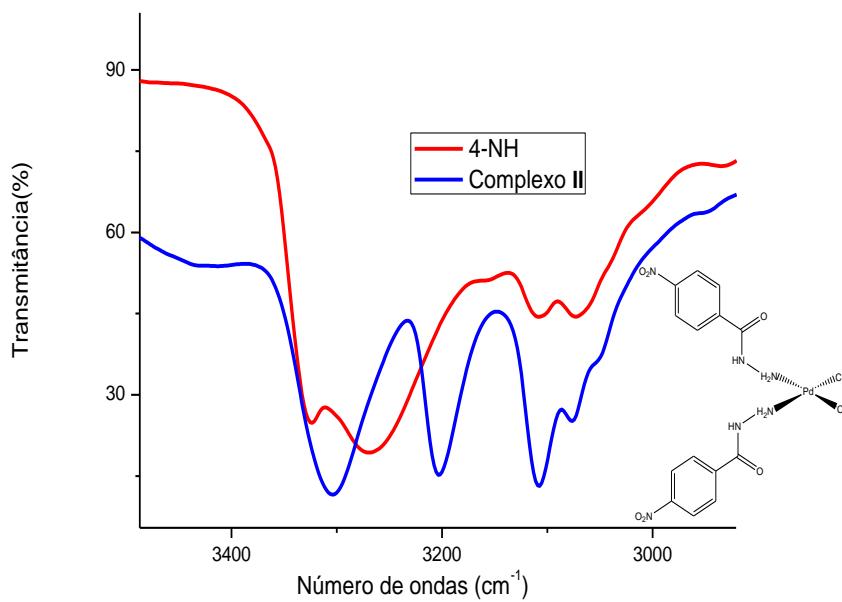


Figura 12- Espectro no infravermelho do complexo **II** e do ligante 4-NH na região de 3000-3400 cm⁻¹.

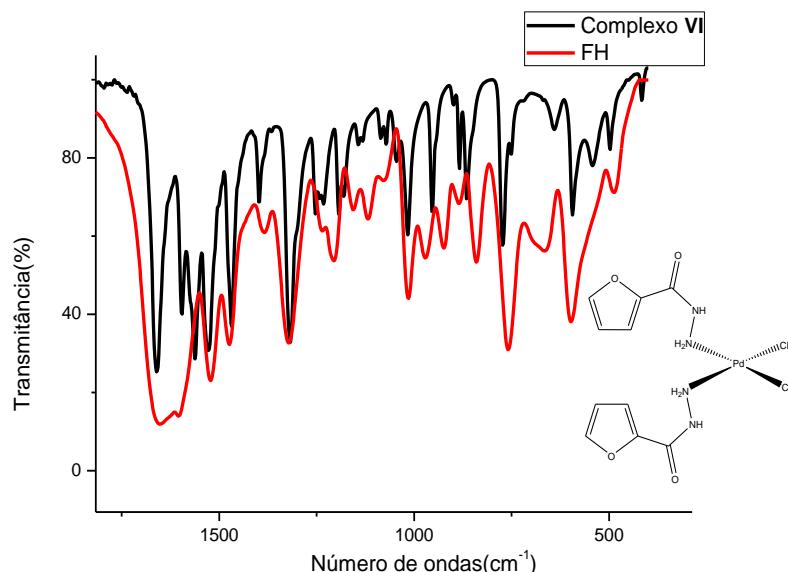


Figura 13- Espectro no infravermelho do complexo **VI** e do ligante FH na região compreendida entre 1700-400 cm⁻¹.

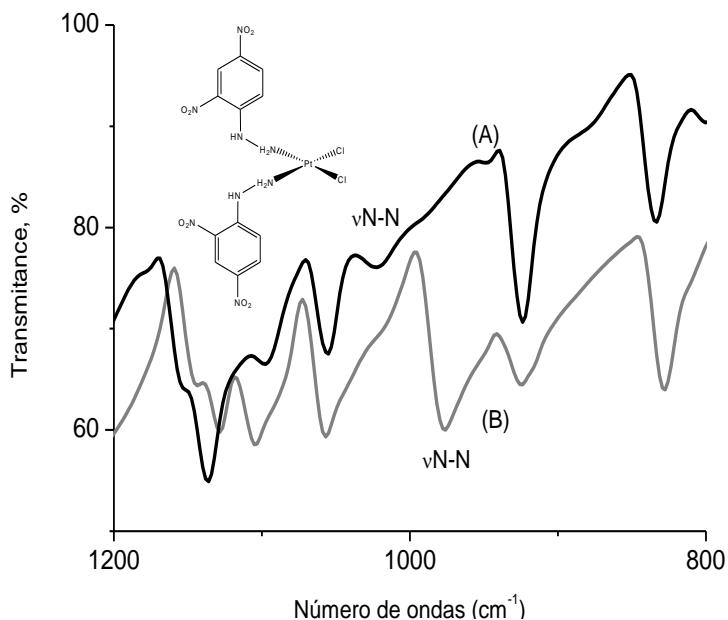


Figura 14- Espectros no infravermelho na região de 1200-800 cm⁻¹. (A) complexo **IV** (B) 2,4-DNPH.

4. 3. ESPECTROS ELETRÔNICOS DOS COMPLEXOS I, II, III E VI.

A fim de confirmar a coordenação dos metais aos ligantes, analisamos os espectros nas regiões do UV-visível em acetonitrila.

O espectro de absorção UV-visível do ligante 4-NH (Fig.15) exibe uma banda centrada em 264 nm. Por sua vez, o ligante FH (Fig.16) exibe uma banda centrada em 249 nm.

Os espectros eletrônicos de todos os complexos apresentaram dois ou três picos na região do ultravioleta. Os desdobramentos observados nos espectros dos complexos são consistentes com a coordenação do ligante aos íons metálicos.

Para os complexos, as bandas abaixo de 320 nm são atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$. Para os complexos III e VI, uma absorção por volta de 350 nm foi assinalada como sendo uma banda de transferência de carga (MLCT), como previamente observada para complexos similares. (WIBERG; HOLLEMAN; WIBERG, 2001)

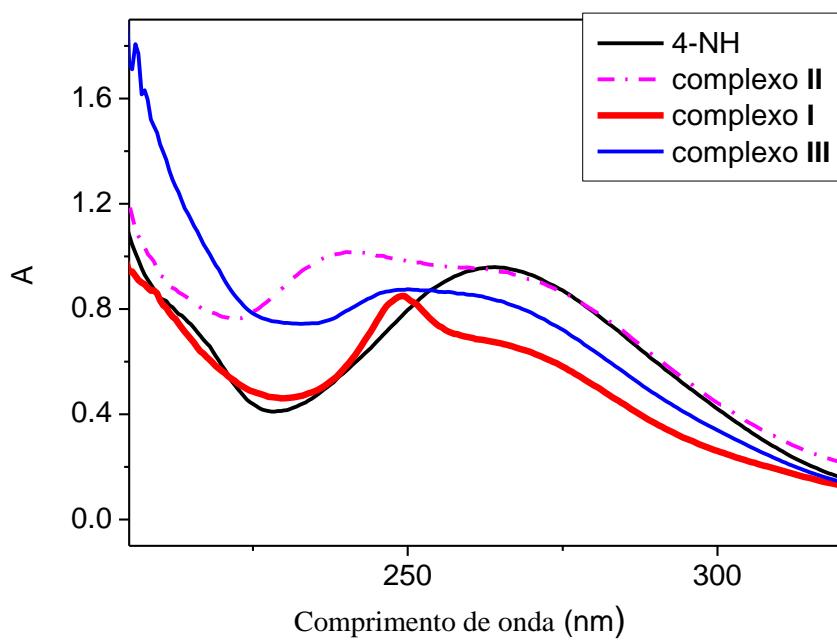


Figura 15- Espectros de absorção na região do UV-Vis do ligante 4-NH e seus respectivos complexos em acetonitrila (10^{-4} M).

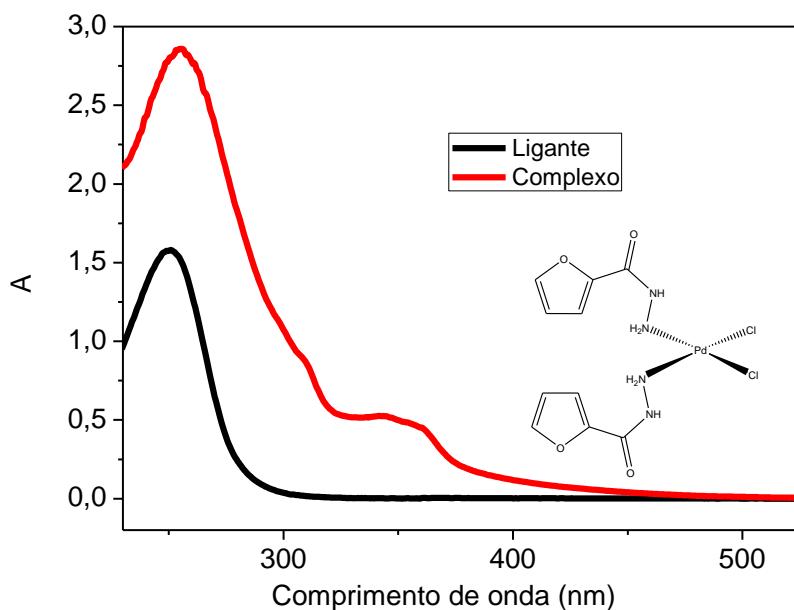


Figura 16- Espectros de absorção na região do UV-Vis do ligante FH e seu respectivo complexo e acetonitrila (10^{-4} M).

4. 4. ESPECTROS DE ^1H RMN E ^{13}C RMN

Os espectros de ^1H RMN dos complexos (**I-VI**) e respectivos ligantes foram registrados em d_6 -DMSO. Os complexos **III**, **IV** e **V** sofreram solvólise total em DMSO e os dados obtidos não permitiram atribuir o sítio de coordenação ocupado pelo íon metálico. Nos espectros de ^1H RMN desses complexos, foi observado o aparecimento de sinais em torno de 3,5 ppm, que podem ser atribuídos à presença de DMSO coordenado aos íons metálicos.

Os resultados encontrados para os complexos contendo os ligantes 4-NH e FH foram semelhantes e discutiremos apenas os espectros dos complexos **I** e **II**.

No espectro do ligante livre 4-NH, Figura 17, os prótons pertencentes ao grupo NH_2 aparecem como um singuleto, em torno de δ 4,65. Nos complexos este sinal encontra-se deslocado para valores maiores, δ 7,88 para o complexo **I** ou $[\text{Pt}(4\text{-NH})_2\text{Cl}_2]$, Figura 18, e em torno de δ 7,27 para o complexo **II** ou $[\text{Pd}(4\text{-NH})_2\text{Cl}_2]$, indicando a coordenação do nitrogênio do grupo NH_2 aos metais. Todos os complexos mostram um singuleto próximo de δ 11,00 ppm, referente ao próton NH, sugerindo uma natureza neutra do ligante. Os sinais dos prótons do grupo NH foram muito menos afetados quando comparados com os prótons do grupo NH_2 , excluindo a participação desse grupo na coordenação. Finalmente, sinais adicionais referentes aos prótons dos grupos NH_2 e NH foram acompanhados por outros picos menores, devido à solvólise dos complexos, que ocorre numa pequena extensão. Nesse processo, um átomo de cloro é substituído por uma molécula de solvente. Os sinais adicionais presentes estão em conformidade com os resultados encontrados por Kerrison e Sadler para solvólise de complexos de platina em DMSO (ROLLA; KÜÇÜKGÜZE, 2007; BERALDO, 2004). As ressonâncias relacionadas com os prótons aromáticos não são afetadas e essa observação confirma que a coordenação ocorre no grupo NH_2 .

O complexo **I** é bastante solúvel em DMSO, portanto, seu espectro de ^{13}C RMN pode ser realizado (Figura 19) e comparado ao espectro do ligante livre (Figura 20). Um sinal em δ 164 é atribuído ao grupo carbonila. Esse sinal manteve-se praticamente inalterado no complexo, excluindo a coordenação do ligante ao metal através do grupo C=O. Também se observa um desdobramento de sinais devido à solvólise como já discutido neste texto. Sinais encontrados na região entre δ 124 e δ 165 ppm são referentes aos carbonos do anel aromático. Assim, considerando os resultados obtidos com os espectros de ^1H RMN, propõe-se a coordenação dos

ligantes aos metais via grupo NH₂ (BERALDO,2004; ABD EL WAHED et al., 2004; CAIRES et al., 1999).

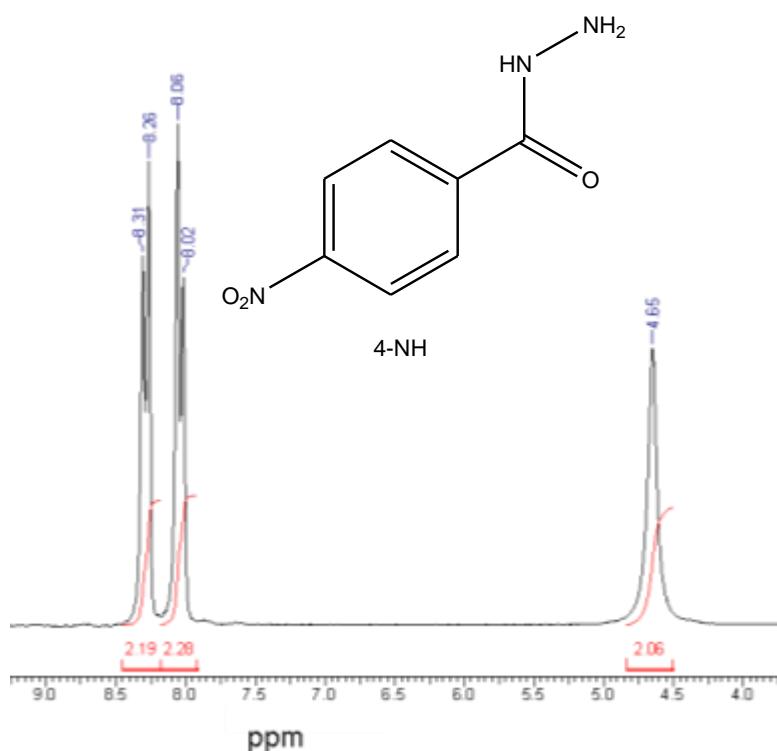


Figura 17- Espectro de ¹H RMN do ligante 4-nitrobenzóico hidrazida.

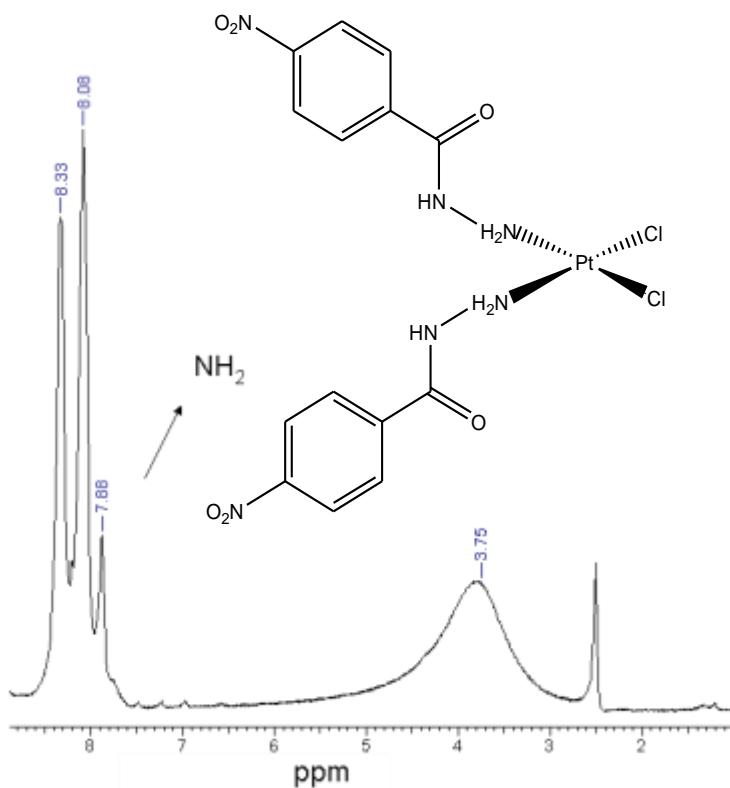


Figura 18- Espectro de ^1H RMN do complexo I na faixa compreendida entre 1 e 9 ppm.

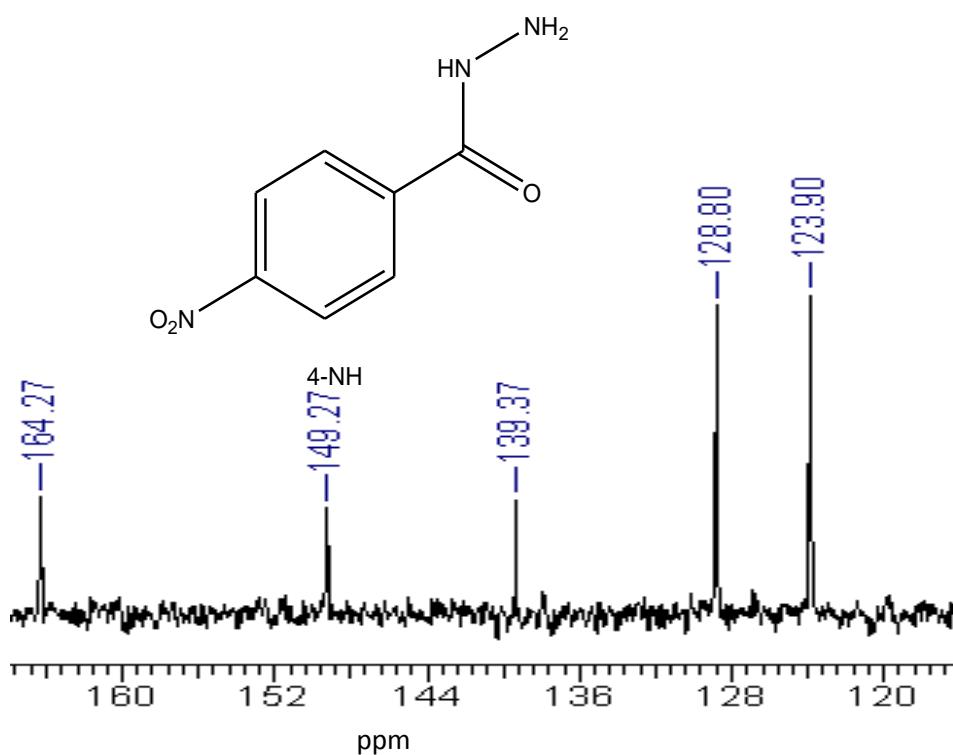


Figura 19- Espectro de ^{13}C RMN do ligante 4-NH.

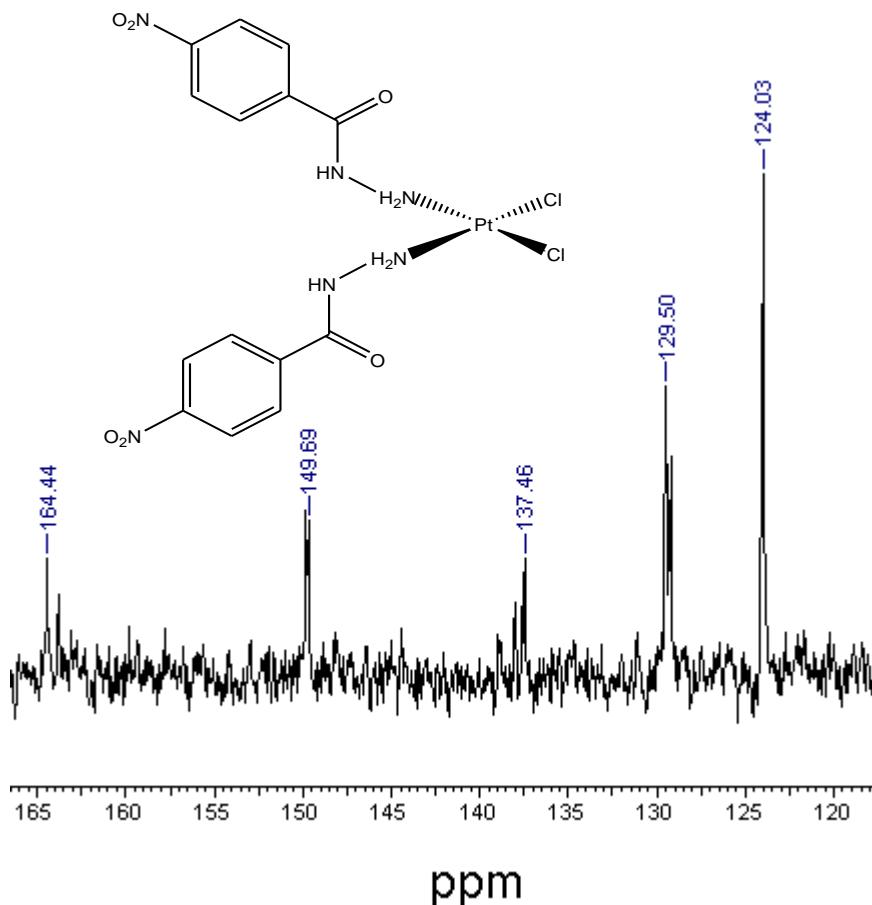


Figura 20- Espectro de ¹³C RMN do complexo I.

4. 5. ATIVIDADE CITOTÓXICA

As atividades citotóxicas dos ligantes e de seus respectivos complexos foram examinadas em células K562 (eritroleucemia mielóide crônica). Todos os complexos inibiram o crescimento de células K562 com valores de IC₅₀ entre 0,96 e 255,9 μmolL⁻¹. Na tabela 3, também disponibilizamos os valores obtidos de IC₅₀ dos ligantes livres para fins de comparação. De acordo com os resultados encontrados, o complexo **III** é o mais ativo e, em todos os casos, a atividade dos complexos de platina é superior a dos ligantes livres correspondentes. Curiosamente, os complexos de paládio são menos ativos do que os ligantes livres, exceto o complexo **VI** que é duas vezes mais ativo. Por sua vez, como esperado, os complexos de paládio foram menos ativos do que os correspondentes complexos de platina, resultados que concordam com estudos prévios de outros complexos de paládio divulgados na literatura (Keter et al.2008; Lippert, 1999).

No entanto, considerando que valores de IC₅₀ maiores que 100 μmolL⁻¹ são atribuíveis a compostos inativos, concluímos que o complexo **VI** e seu respectivo ligante exibem uma fraca atividade antiproliferativa.

Os resultados mais importantes se devem à coordenação do íon Pt(II) aos ligantes 4-NH e 2,4-DNPH, em que uma melhora significativa na atividade citotóxica em células K562 foi observada. A atividade do complexo **III** é cerca de dez vezes superior a do ligante livre correspondente e o complexo **IV** é quatro vezes mais ativo do que 2,4-DNPH não coordenado. Um dado importante é que os complexos **I**, **II** e **IV** são mais ativos que a cisplatina e, exceto o ligante FH, seu respectivo complexo de paládio e complexo **II**, todos os demais compostos testados foram mais ativos que a carboplatina. Estes resultados são importantes e fazem com que esses compostos sejam candidatos a estudos posteriores.

Tabela 3 - Valores de IC₅₀ para os complexos e ligantes livres. ^aIC₅₀ é a concentração requerida para inibir 50% das células tumorais, depois de 3 dias de incubação.

Compostos	IC ₅₀ ^a (μmolL ⁻¹)
4-NH	10,5
[Pt (4-NH) ₂ Cl ₂] (I)	3,8
[Pd (4-NH) ₂ Cl ₂] (II)	77,0
[Pt (4-NH) ₂ I ₂] (III)	0,96
2,4-DNPH	18,2
[Pt (2,4-DNPH) ₂ Cl ₂] (IV)	4,60
[Pd (2,4-DNPH) ₂ Cl ₂] (V)	24,4
FH	455,6
[Pd (FH) ₂ Cl ₂] (VI)	255,9
Carboplatina	60 ^b
Cisplatina	14,6 ^b

^bValores retirados da referência [CARLAND et al., 2005].

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, as reações que deram origem aos complexos foram conduzidas de maneira simples, sob condições brandas e apresentaram rendimentos satisfatórios. Mais especificamente, seis novos complexos contendo hidrazonas foram preparados e caracterizados por técnicas espectroscópicas e térmicas. As técnicas espectroscópicas mostraram que os ligantes estão coordenados aos íons platina ou paládio pelo nitrogênio básico do grupo NH₂ e que os complexos obtidos têm a seguinte fórmula geral *cis*-[M(L)₂X₂]. As técnicas de espectroscopia no infravermelho em consonância com as análises térmica e elementar (C, H, N e metal) indicam a adição de uma molécula de água para os complexos isolados com 2,4-DNPH. Além disso, este trabalho é o primeiro a descrever a atividade citotóxica de complexos contendo o ligante 2,4-DNPH.

A eficácia citotóxica dos ligantes e seus complexos foram examinados em células K562 e, dos compostos analisados, os complexos **I**, **III** e **IV** exibiram atividade antitumoral promissora contra células K562, sendo inclusive mais ativo do que os fármacos carboplatina e cisplatina. Estudos sobre mecanismos de ação e citotoxicidade destes complexos em outras linhagens celulares serão investigados no futuro.

REFERÊNCIAS

- 1 ABD EL WAHED,M.G. et. al. Physico-chemical studies of some aminobenzoic acid hydrazide complexes. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 64, n. 4, p.255-264, 2004.
- 2 BARNARD, C. F.; CLEARE, M. J.; HYDES, P. C. Second generation of anticancer platinum compounds. **Chemistry in Britain**, v. 22, p. 1001-1004, Nov. 1986.
- 3 BASOLO, F. Coordination Chemistry; The Chemistry of Metal Complexes. London: Benjamin-Cummings. Pub. Co., 1964.
- 4 BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**, v.27, n. 3, May/June 2004.
- 5 CAIRES, A.C.F.et.al. Síntese e atividade citotóxica de alguns azido-Ciclopaldados estabilizados com ligantes bifosfínicos. **Química Nova**, v.22, n.3,1999.
- 6 CARLAND, M.et.al. Syntheses, crystal structure and cytotoxicity of diamine platinum (II) complexes containing maltol. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 8, p.1738-1743, Aug 2005.
- 7 CHOCHAN, Z.; SHERAZI, S.K.A.; PRAVEEN, M. Synthesis, Ligational and Biological Properties of Cobalt (II), Copper (II), Nickel (II) and Zinc (II) Complexes with Pyrazinedicarboxaimide Derived Furanyl, Thienyl and Pyrrolyl Compounds. **Metal-Based Drugs**, v.5, n.6, p.347-354, 1998.
- 8 CLARKE, M .J.; SADLER, P. J. (Ed.). **Metallopharmaceuticals I: DNA interactions**. Berlin: Springer-Verlag, 1999. v. 1.
- 9 CVITKOVIC, E.et.al. Improvement of cis-dichlorodiammineplatinum (NSC 119875): therapeutic index in an animal model., **Cancer**, v.39, n.4, p.1357-1361, Apr. 1977.
- 10 DE LENA, M.et.al. Therapeutic efficacy of various dosages and modalities of administration. **Inorganica Chimica Acta**, Lausanne, v.137, p.91-97, Jul. 1987.
- 11 DESOIZE, B.; MADOULET, C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.42, n.3, p.317-325, Jun. 2002.
- 12 DIAS, G.H.M. Cisplatina e análogos: Drogas inorgânicas anticancerígenas. **Química Nova**, v. 12, n.1, p.57-59, 1989.
- 13 DODOFF, N.; GRANHAROV, K.; SPASSOVSKA, N. Platinum (II) complexes of 4-methoxy and 4-chlorobenzoic acid hydrazidas.synthesis, characterization and cytotoxic effect. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 60, n.4, p.257-266, Dec 1995.
- 14 DONNICI, C.L.et.al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

- 15 FARREL, N. Metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents. In: WARD, M. D. **Comprehensive coordination chemistry II**. Elsevier, v. 9, p. 809-840, 2003.
- 16 FICHTINGER-SCHEPMAN, A. M. J. et.al. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (II) with DNA: formation, identification, and quantitation. **Biochemistry**, v. 24 , n.3, p.707-713, Jan 1985.
- 17 FIORENTINO, M. V.; GHIOTTO, C. Exploitation of platinum for human solid tumors. **Inorganica Chimica Acta**, v.137, p. 59-61, Jul. 1987.
- 18 FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p.13-18, jul. 2005.
- 19 FONTES, A. P. S. et.al. New copper (II) complexes containing 2-furoic hydrazide and 5-nitro-2-furoic hydrazide ligands: synthesis, thermal, magnetic and spectroscopic characterization. **Transition Metal Chemistry**, v.29, p.382-387, 2004.
- 20 FONTES, A.P.S.; ALMEIDA, S.G. DE; NADER. L.A.de. Compostos de platina em quimioterapia do câncer. **Química Nova**, v.20, n.4, p.398-406, July/Aug. 1997.
- 21 FURST, A.; HARO, R. T. A survey of metal carcinogenesis. **Progress in Experimental Tumor Research**, v.12,p. 103-133, 1969.
- 22 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, maio 2009.
- 23 GELMON, K. A. et.al. A phase II study of ZD0473 givenas a short infusion every 3 weeks to patients with advanced or mestastic breast cancer: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Trial. **Annals of Oncology**, v. 14, n.4, p.543-548, 14 Jan 2003.
- 24 GREEN, M.; GARNER, M.; ORTON, D. M.; Literature highlights—29 Cisplatin—the last five years. **Transition Metal Chemistry**, v.17, n.2 ,p.164-176,1992.
- 25 GUERRA, W. et.al. Síntese e caracterização de complexos de platina (II) contendo iodeto e derivados do furano como ligantes. **Eclética Química**, vol.31, n. 1, p.39-43, 2006.
- 26 HIGBY, D. J.; WALLACE, H. G.; HOLLAND, J. F. Cis- diamminedichloroplatinum (NSC-119875): a phase I study. **Cancer Chemotherapy Reports Part 2**, v.4, n.2, p.127-132, 1973.
- 27 HYPPOLITO, M.A. OLIVEIRA, J.A.A.de. Ototoxicidade, otoproteção e autodefesa das células ciliadas da cóclea. **Medicina**, v.38.n.3-4, p. 279-289, jul./dez. 2005.
- 28 INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). **O que é o Câncer?** Rio de Janeiro. [2012]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 17 maio 2012.

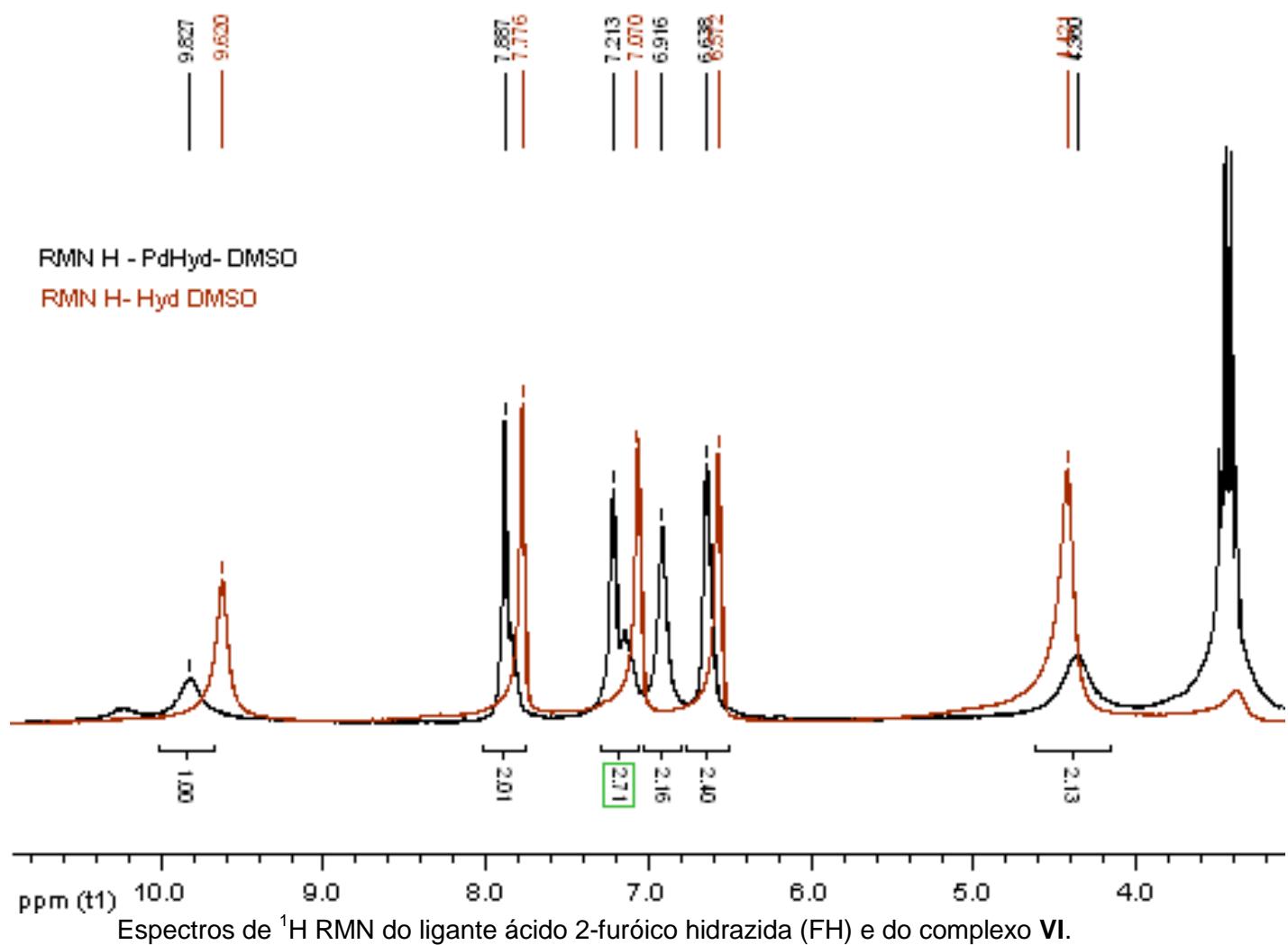
- 29 J. MARTINEZ, A.et.al. Synthesis, thermal and spectral study of oxovanadium(IV) complexes with benzoic acid hydrazine and p-hydroxybenzoic acid hydrazide. **Synthesis Reactivity in Inorganic Metal-Organic Chemistry**, v.18,n.9,p.881-901,1988.
- 30 KETER, F. K.et.al In vitro evaluation of dichloro-bis (pyrazole) palladium (II) and dichloro-bis (pyrazole) platinum (II) complexes as anticancer agents. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 63, n.1, p.127-138, 2008.
- 31 KOSTOVA, I. Platinum complexes as anticâncer agents. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 1, n. 1, p. 1-22, Jan. 2006.
- 32 KUSHEV, D.et.al. Synthesis, cytotoxicity and antitumor activity of platinum (II) complexes of cyclopentanecarboxylic acid hydrazide. **Biological Chemistry**, v.380, n.11, p.1287-1294, Nov 1999.
- 33 KUSHEV, D.et.al. Synthesis, cytotoxicity, antibacterial and antitumor activity of platinum (II) complexes of 3- aminocyclohexanespiro-5-hydantoin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.89, n.3-4, 28 Apr. 2002.
- 34 KUSHEV, D.N.et.al. Cytotoxic and antitumor activity of platinum (II) complexes of aromatic and cycloalkanecarboxylic acid hidrazides. **Z Naturforsch.**, v. 52c, p.49-54, 1997.
- 35 KUSHEV,D.et.al. Synthesis and cytotoxic of platinum(II) complexes of 3- aminocyclopentanespiro-5-hydantoin and 3-aminocycloheptanespiro-5-hydantoin. **Z. Naturforsch.**, v. 58 C, n. 1-2, p.103-108, 2003.
- 36 LIPPERT, B. **Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of Leading Anticancer Drugs**, 1rd edition (Wiley-VCH, Germany 1999).
- 37 MACHADO, S. P. de. et.al. Considerações sobre a química bioinorgânica medicinal. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, p.131-142, nov. 2007.
- 38 PASINI, A; ZUNINO, F. New cisplatin analogues—On the way to better antitumor agents. **Angewandte Chemie International Edition**., v. 26, n. 7, p.615-624, Jul. 1987.
- 39 PERDICARIAS, A. A. M. et al. **Controle do câncer**: uma proposta de integração ensino-serviço. 2. Ed. rev. atual. Rio de Janeiro: Pro-Onco. 1993.
- 40 PEREIRA-MAIA, E.; GARNIER-SUILLEROT, A. Impaired hydrolysis of cisplatin derivatives to aquated species prevents energy-dependent uptake in GLC4 cells resistant to cisplatin. **Journal of biological inorganic chemistry**, v. 8, n. 6, p.626-634, 2003.
- 41 PEREZ, R.P. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. **European Journal of Cancer**, v.34, n.10, p.1535-1542, September 1998.
- 42 RAYNAUD, F. I. et.al. Cis-Amminedichloro (2-methylpyridine) platinum (II) (AMD473), a novel sterically hindered platinum complex: in vivo activity, toxicology, and pharmacokinetics in mice. **Clinical Cancer Research**, v. 3, n. 11, p.2063-2074, Nov. 1997.

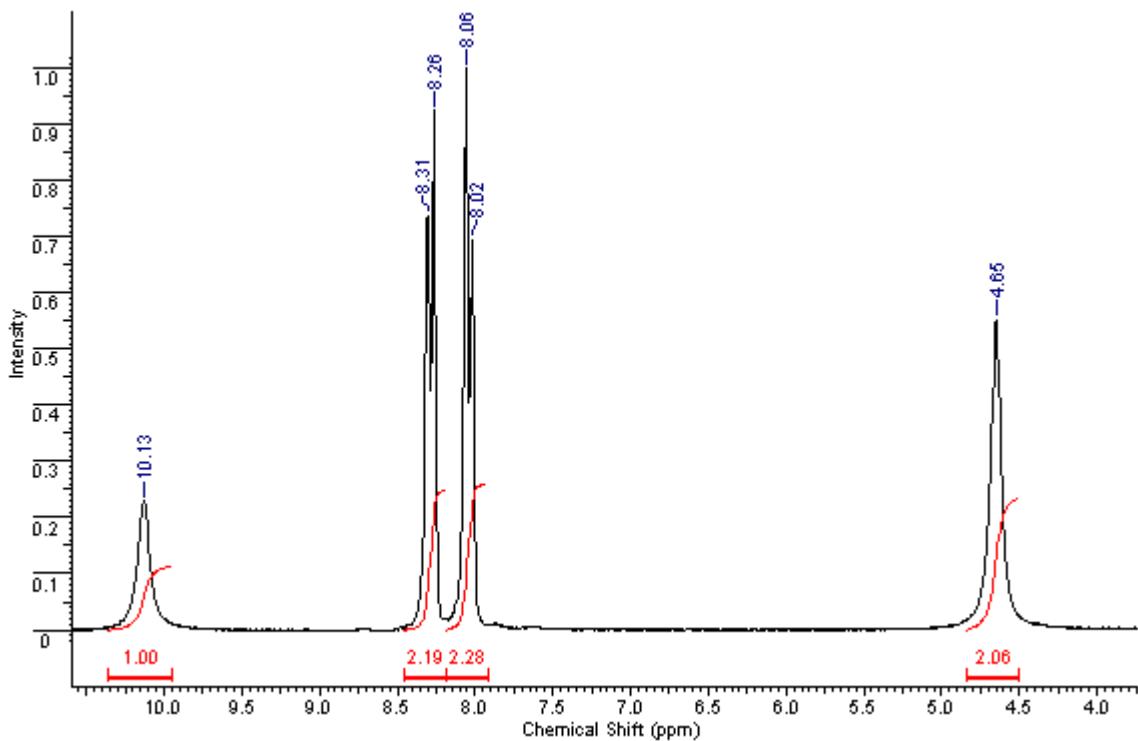
- 43 RIOS, A.O.de; ANTUNES, L.M.G. BIANCHI, M.L.P.de. Proteção de carotenoides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. **Alimentos e Nutrição**, v.20, n.2, p. 343-350, jan./mar. 2009.
- 44 ROCHA, D. P. et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 111-118, 2011.
- 45 ROLLAS, S.; GÜLERMAN, N.; ERDENIZ, H. Synthesis and antimicrobial activity of some new hydrazones of 4-fluorobenzoic acid hydrazide and 3-acetyl-2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazolines. **Farmaco**, v.57, n.2, p.171-174,2002.
- 46 ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, G. Biological activities of hydrazone derivaties. **Molecules**, v.12, n.e, p.1910-1939, Aug 2007.
- 47 RONCONI, L.; SADLER, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, n. 13-14, p.1633-1648, Jul. 2007.
- 48 ROSENBERG, B. et al. Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents. **Nature**, v. 222, n. 5191, p. 385-386, 1969.
- 49 ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L. The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds. **Cancer Research**, v. 30, p.1799-1802, jun. 1970.
- 50 RVIG, C.; ABRAMS, M. J. Medicinal inorganic chemistry: introduction. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2201-2204, 8 Sep 1999.
- 51 SAH, P.P.T.; Peoples, S.A. Isonicotinyl hydrazones as antitubercular agents and derivatives for identification of aldehydes and ketones. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v.43, n.9, p. 513-524, 1954.
- 52 SANTOS JUNIOR, J. C. M. dos. Tratamento coadjuvante do câncer do reto: II – quimioterapia. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v.12, n. 2, p.143-149,1997.
- 53 SAVINI, L.et.al. New α -heterocyclichydrazones : evaluation of anticancer, anti-HIV and antimicrobial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.39, n.2, p.113-122, 2004.
- 54SHRIVER, D. F.; ATKINS, P.W. **Química Inorgânica**. 3. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2003.
- 55 SIDDIK ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v.22, n.47, p. 7265-7279, 20 Oct 2003.
- 56 SILVA, A. P. R. de et.al. **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2011.
- 57 SILVA, G. B.; VARGAS, M. D. Complexos de Pt⁴⁺: Estratégia Molecular no Combate ao Câncer. **Revista Virtual de Química**, v.4, n.2, p.102-117, 2012.
- 58 SILVA, P. P.et.al. Determinação estrutural, estudo da atividade citotóxica e interações com o DNA de um novo complexo ternário de cobre (II). ENCONTRO REGIONAL DA SBQ, 23., **Anais...** Juiz de Fora: SBQ, 2009.

- 59 SUR.P.et.al. Nitrofuran derivatives of fatty acid hydrazides induce differentiation in human myeloid leukaemic cell lines. **Cancer Letters**, v.94, n.1, p.27-32, Jul. 1995.
- 60 TAKAGAKI, T. Y.; MARINHO, F. C. A.de. Hipercoagulabilidade e câncer de pulmão. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 5, maio 2008.
- 61 TAYLOR, H.L .et.al. Plant antitumor agentes. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia. **Journal of The American Chemical Society**, v.93, n. 9, p.2325-2327, May 1971.
- 62 WHEATE, N.J.et.al. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Dalton Transactions**, v.39, n.35, p.8097-8340, 21 Sep. 2010.
- 63 WIBERG,E.; HOLLEMAN, A.F.; WIBERG, N. **Inorganic Chemistry**, ed.1, 2001.
- 64 WILLIAMS, C. J.; WHITEHOUSE, J. M. Cis-platinum: a new anticancer agent. **British Medical Journal**, v.1, p. 1689-1691, 1979.
- 65 WILTSASHAW, E.; CARR, B. **Recent results in cancer Research**: platinum coordination complex in cancer chemotherapy, Connors, T. A.; Roberts, J. J.; Eds.; Springer- Verlag, p. 178, 1974.
- 66 WORLD HEALTH ORGANIZATION (Suiça) The top 10 causes of death. Suiça [2012]. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>>. Acesso em: 20/06
- 67 ZOCOLI, R.; REICHOW, S.L.; ZOCOLI, A.M.F. Emissões otoacústica x cisplatina: detecção precoce da ototoxicidade em pacientes oncológicos. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, v.69, n.2, Mar./Apr. 2003.

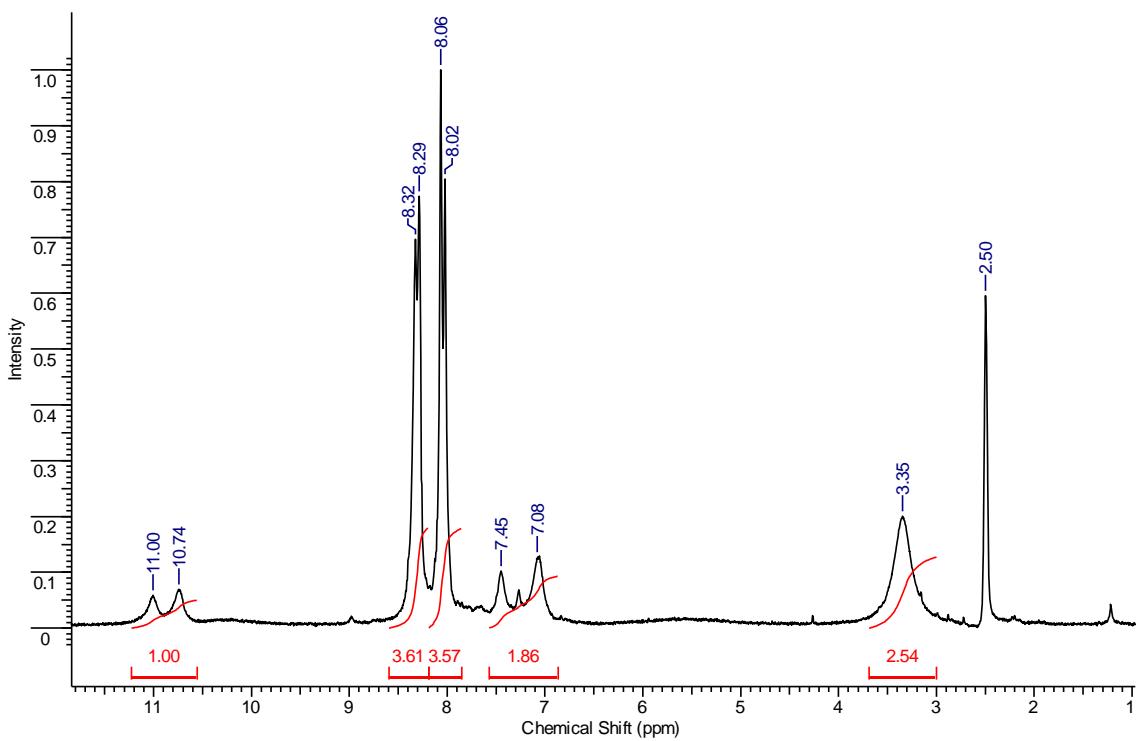
Anexos (espectros)

Espectros de RMN





^1H RMN do ligante 4-NH.



^1H RMN do complexo NHPd.