

SÍNTESE E ATIVIDADE CITOTÓXICA DE ALGUNS AZIDO-CICLOPALADADOS ESTABILIZADOS COM LIGANTES BIFOSFÍNICOS

Antonio Carlos Fávero Caires*

Departamento de Química - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - Universidade de Mogi das Cruzes - UMC - Av. Dr. Cândido Xavier de Almeida e Souza, 200 - 08780-210 - Mogi das Cruzes - SP

Eduardo T. Almeida e Antonio E. Mauro*

Departamento de Química Geral e Inorgânica - Universidade Estadual Paulista - UNESP - CP 355 - 14801-970 - Araraquara - SP

Jefferson P. Hemerly e Sandro R. Valentini

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista - UNESP - CP 502 - 14801-902 - Araraquara - SP

Recebido em 31/3/98; aceito em 10/9/98

SYNTHESIS AND CYTOTOXICITY OF SOME CYCLOMETALLATED PALLADIUM(II) COMPLEXES CONTAINING COORDINATED AZIDE AND DIPHOSPHINES. Some cyclopalladated compounds containing the azido group ligand and the (C-N) ring of N,N-dimethylbenzylamine have been prepared by bridge opening reactions of dimer azide complex precursor with some diphosphines in different stoichiometric quantities. The neutral or ionic, mono or binuclear complexes synthesized were characterized by elemental analyses, I. R. spectroscopy and NMR techniques. The series of complexes was screened for cytotoxicity against a panel three human tumour cells lines (C6, Hep-2, HeLa). All complexes were found to be cytotoxic (IC₅₀) at μ M concentrations while one complex having the coordination bond N-Pd ruptured also displayed some differential cytotoxicity.

Keywords: azido-cyclopalladated compounds; antitumour agents; palladium (II) complexes.

INTRODUÇÃO

A eficácia da cisplatina *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] e da carboplatina [Pt(NH₃)₂(cbdca)], (*cbdca* = 1,1'-ciclobutanodicarboxilato) no tratamento clínico de tumores do ovário, dos testículos, da cabeça e do pescoço já é bem conhecida¹. Entretanto existe um grande interesse no desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos a base de metais de transição, especialmente de metais pertencentes ao grupo da platina, que sejam menos tóxicos e, ou possuam um espectro de atividade antitumoral mais amplo².

Embora o mecanismo de ação dessas drogas seja muito discutido é amplamente aceito no meio científico que tanto a cisplatina quanto a carboplatina possuem o mesmo tipo de atuação na inibição do DNA da célula tumoral, provocando o mesmo tipo de lesão nesta molécula, formando um aduto G-G entre as cadeias de nucleotídeos laterais, que configuram a sua estrutura de dupla hélice³⁻⁴. Assim sendo, segue que estes compostos apresentam um espectro de atividade similar.

Uma das estratégias básicas no desenvolvimento de novas drogas antitumorais a base de metais de transição consiste na síntese de complexos que, mesmo possuindo características estruturais similares a carboplatina ou a cisplatina, sejam capazes de provocar lesões diferentes e irreversíveis na molécula de DNA. No que concerne aos complexos de paládio, observa-se que os mesmos, em geral, possuem uma atividade antitumoral muito pequena quando comparado aos complexos de platina, devendo-se isto a alta labilidade exibida pelos compostos de paládio (II) em meio biológico⁵. Neste sentido, a classe dos compostos ciclopalladados tem despertado um recente e grande interesse na aplicação dos mesmos como agentes antineoplásicos, não só por produzirem complexos estáveis o suficiente para permitirem uma eficaz ação da droga no organismo em concentrações muito baixas, mas também por possuírem uma citotoxicidade consideravelmente menor que os compostos análogos de platina⁵⁻⁸.

O presente trabalho apresenta a síntese e a caracterização

estrutural de alguns azido - ciclopalladados estabilizados com bases moles de Lewis⁹, contendo átomos de fósforo doador, através da reação do ciclopalladado de natureza dimérica [Pd(dmmba)N₃]₂¹⁰ com as difosfinas 1,3-bis (difenilfosfina) propano (*dppp*); 1,4-bis (difenilfosfina)butano (*dppb*); *cis* - 1,2 bis(difenilfosfina)etileno (*cis-dppet*) e *trans* - 1,2(difenilfosfina) etileno (*trans-dppet*), produzindo espécies mono ou bi-nucleares de paládio (II) de natureza neutra, contendo o íon azida coordenado de forma terminal ao íon metálico central ou de natureza iônica, com este íon fora da esfera de coordenação do metal. Para o caso específico da reação do dímero de azida com a (*dppp*), um organometálico neutro de fórmula geral [Pd(C-dmmba)(N₃)(*dppp*)] foi produzido, onde a difosfina encontra-se ligada ao metal de forma bidentada e a ligação de coordenação N-Pd foi rompida, fato este comprovado por difração de raios-X¹¹. Também são apresentados neste trabalho os resultados dos testes da atividade citotóxica "in vitro", realizados com os novos complexos sintetizados, em três linhagens de células tumorais humanas; HeLa (colon do útero), Hep-2 (orofaringe) e C6 (glioma cerebral), sendo que o complexo [Pd(C-dmmba)(N₃)(*dppp*)] apresentou uma grande eficácia no combate às células da linhagem C6. Com base nos resultados dos testes biológicos foram feitas algumas correlações envolvendo a estrutura química e a atividade citotóxica.

EXPERIMENTAL

Síntese e Caracterização dos Complexos

Métodos Instrumentais Utilizados

Análise elementar (C, H, N)

As análises elementares de carbono, nitrogênio e hidrogênio dos complexos sintetizados foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo - SP.

Espectros de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos num espectrofotômetro "NICOLET" mod. 730 SX-FT, na região de 4000 a 400 cm^{-1} , utilizando técnica de pastilha de KBr e uma resolução de 4 cm^{-1} .

Espectros de Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e ^1H foram medidos em um equipamento multinuclear "BRUKER" mod. AC-200, utilizando-se CDCl_3 para a dissolução das amostras e TMS como padrão de referência interno nos espectros de ^1H . Para os espectros de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ utilizou-se $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{P}$ como referência externa. Foram utilizadas as frequências de 81 MHz, 50 MHz e 200 MHz, respectivamente.

Métodos de Síntese Utilizados

Os reagentes sólidos utilizados são de grau de pureza P. A. e distribuídos pela Aldrich, Riedel-de-Haen e Merck e foram utilizados sem qualquer purificação prévia. Os solventes utilizados também são de grau de pureza P. A. e distribuídos pela Merck. Estes solventes foram purificados conforme métodos descritos na literatura¹².

O composto ciclometalado de partida $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-N}_3)]_2$, onde *dmba* representa a N,N-dimetilbenzilamina, foi sintetizado conforme método anteriormente descrito¹⁰.

Síntese do Composto 1- $[\text{Pd}_2(\text{C}^2, \text{N-dmba})_2(\text{N}_3)_2(\mu\text{-trans-dppet})]$

Foram parcialmente dissolvidos 0,10 g (0,18 mmol) do dímero $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\mu\text{-N}_3)]_2$ em 50 mL de acetona em um erlenmeyer. À suspensão resultante, foram adicionados 0,07 g (0,18 mmol) de 1,2-trans-bis(difenilfosfina) etileno. Esta suspensão foi mantida em reação, sob agitação constante, à temperatura ambiente, por 1 h. Concentrou-se então a solução final, à pressão reduzida, até quase a secura e precipitou-se um sólido branco com a adição de pentano. Este sólido foi filtrado e lavado novamente com pentano e seco sob vácuo. **Rendimento:** 95%. **Análise Elementar:** Enc. % (Calc.): C:54,1(54,9); H:4,9(4,8); N:11,8(11,6). **IV**(cm^{-1}): $\nu_{\text{sim}}(\text{N}_3)$ 1276; $\nu_{\text{ass}}(\text{N}_3)$ 2027; $\delta(\text{CH-Ph})$ 744; $\nu(\text{CN})$ 1321; $\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$ 1420, 1439; $\nu(\text{CC})$ 1577; $\nu(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 2830, 2889; $\nu(\text{CH-Ph})$ 3051.

Síntese do Composto 2- $[\text{Pd}_2(\text{C}^2, \text{N-dmba})_2(\text{N}_3)_2(\mu\text{-dppb})]$

Foram parcialmente dissolvidos 0,10 g (0,18 mmol) do dímero $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\mu\text{-N}_3)]_2$ em 50 mL de acetona em um erlenmeyer. À suspensão resultante, foram adicionados 0,08 g (0,18 mmol) de 1,4-bis(difenilfosfina) butano. Esta suspensão foi mantida em reação sob agitação constante, à temperatura ambiente, por 1h. Concentrou-se então a solução final, à pressão reduzida, até quase a secura e precipitou-se um sólido branco com a adição de pentano. Este sólido foi filtrado e lavado novamente com pentano e seco sob vácuo. **Rendimento:** 95%. **Análise Elementar:** Enc. % (Calc.): C:55,5(55,7); H:5,4(5,3); N:10,8(11,6). **IV**(cm^{-1}): $\nu_{\text{sim}}(\text{N}_3)$ 1288; $\nu_{\text{ass}}(\text{N}_3)$ 2048. **RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (ppm):** -104,49(s). **RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (ppm):** 71,74(-CH₂N); 49,37(-N-CH₃); 149,31 (-C-Pd); 137,05 (-C*-CH₂-N); 123,14-136,01 (4C, Ph-dmba); 26,50 (P-C*H₂); 27,37 (PCH₂-C*H₂-); 129,79 (C-Ph-P, dppb); 128,47 (C-orto, Ph-dppb); 125,26 (C-meta, Ph-dppb); 137,05 (C-para, Ph-dppb). **RMN ^1H (ppm):** 3,79(s, 4H, -CH₂N-); 2,70(s, 6H, -N-CH₃); 2,72(s, 6H, -N-CH₃); 6,39-6,97(m, 8H, Ph-dmba); 7,31-7,82(m, 20H, Ph-dppb); 1,61 (m, 4H_{alif.} b); 2,11 (m, 4H_{alif.} dppb).

Síntese do Composto 3- $[\text{Pd}_2(\text{C}^2, \text{N-dmba})_2(\text{N}_3)_2(\mu\text{-dppp})]$

Foram parcialmente dissolvidos 0,10 g (0,18 mmol) do

dímero $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\mu\text{-N}_3)]_2$ em 50 mL de acetona em um erlenmeyer. À suspensão resultante, foram adicionados 0,15 g (0,18 mmol) de 1,3-bis(difenilfosfina) propano. Esta suspensão foi mantida em reação, sob agitação constante, à temperatura ambiente, por 1 h. Concentrou-se então a solução final, à pressão reduzida, até quase a secura e precipitou-se um sólido amarelo com a adição de pentano. Este sólido foi filtrado e lavado novamente com pentano e seco sob vácuo. **Rendimento:** 95%. **Análise Elementar:** Enc. % (Calc.): C:55,3(55,3); H:5,4(5,2); N:9,3(10,3). **IV**(cm^{-1}): $\nu_{\text{sim}}(\text{N}_3)$ 1264; $\nu_{\text{ass}}(\text{N}_3)$ 2034. **RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (ppm):** -106,90(s). **RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (ppm):** 72,30 (-CH₂N-); 49,70(-N-CH₃); 148,77 (-C-Pd); 137,27 (-C*-CH₂-N); 122,51-139,05 (4C, Ph-dmba); 22,19 (P-C*H₂); 29,23 (PCH₂-C*H₂-); 129,58 (C-Ph-P, dppp); 128,50 (C-orto, Ph-dppp); 125,32 (C-meta, Ph-dppp); 137,05 (C-para, Ph-dppp). **RMN ^1H (ppm):** 3,82(s, 4H, -CH₂N-); 2,63(s, 6H, -N-CH₃); 2,64(s, 6H, -N-CH₃); 6,28-7,66(m, 8H, Ph-dmba); 7,21-7,72(m, 20H, Ph-dppp); 1,95(t, 2H_{alif.}, -*CH₂-CH₂-P); 2,52(qui, 4H_{alif.}, -*CH₂-P).

Síntese do Composto 4- $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\text{N}_3)(\text{dppp})]$

Foram parcialmente dissolvidos 0,10 g (0,18 mmol) do dímero $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\mu\text{-N}_3)]_2$ em 50 mL de acetona em um erlenmeyer. À suspensão resultante foram adicionados 0,30 g (0,35 mmol) de 1,3-bis(difenilfosfina)propano. Esta suspensão foi mantida em reação sob agitação constante, à temperatura ambiente, por 1 h. Concentrou-se então a solução final, à pressão reduzida, até quase a secura e precipitou-se um sólido amarelo com a adição de pentano. Este sólido foi filtrado e lavado novamente com pentano e seco sob vácuo. **Rendimento:** 80%. **Análise Elementar:** Enc. % (Calc.): C:61,3(62,2); H:5,6(5,5); N:7,9(8,0). **IV**(cm^{-1}): $\nu_{\text{sim}}(\text{N}_3)$ 1268; $\nu_{\text{ass}}(\text{N}_3)$ 2040. **RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (ppm):** -104,54(s); -105,70(s). **RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (ppm):** 72,25 (-CH₂N-); 49,70(-N-CH₃); 151,01 (-C-Pd); 137,15 (-C*-CH₂-N); 122,35-137,15 (4C, Ph-dmba); 22,08 (P-C*H₂); 30,40 (PCH₂-C*H₂-); 148,31 (C-Ph-P, dppp); 128,28 (C-orto, Ph-dppp); 125,23 (C-meta, Ph-dppp); 137,15 (C-para, Ph-dppp). **RMN ^1H (ppm):** 3,80(s, 2H, -CH₂N-); 2,62(s, 6H, -N-CH₃); 7,19-7,63 (m, 4H, Ph-dmba); 7,15-7,78 (m, 20H, Ph-dppp); 1,88 (t, 2H_{alif.}, -*CH₂-CH₂-P); 2,62 (qui, 4H_{alif.}, -*CH₂-P).

Síntese do Composto 5- $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\text{cis-dppet})](\text{N}_3)$

Foram parcialmente dissolvidos 0,10 g (0,18 mmol) do dímero $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\mu\text{-N}_3)]_2$ em 50 mL de acetona em um erlenmeyer. À suspensão resultante foram adicionados 0,15 g (0,36 mmol) de 1,2-cis-bis(difenilfosfina)etileno. Esta suspensão foi mantida em reação, sob agitação constante, à temperatura ambiente, por 1 h. Concentrou-se então a solução final, à pressão reduzida, até quase a secura e precipitou-se um sólido amarelo com a adição de pentano. Este sólido foi filtrado e lavado novamente com pentano e seco sob vácuo. **Rendimento:** 85%. **Análise Elementar:** Enc. % (Calc.): C:61,1 (61,9); H:5,2 (5,0); N:8,1 (8,2). **IV**(cm^{-1}): $\nu_{\text{sim}}(\text{N}_3)$ 1281; $\nu_{\text{ass}}(\text{N}_3)$ 2030. **RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (ppm):** -77,62(s); -89,03(s). **RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (ppm):** 72,85 (-CH₂N); 51,45 (-N-CH₃); 147,99 (-C-Pd); 136,68 (-C*-CH₂N-); 124,30-136,60 (4C, Ph-dmba); 156,81 (PC*H=CHP); 159,13 (PCH=C*HP); 148,31 (C-Ph-P, dppp); 30,32 (C-orto, Ph-dppet); 127,43 (C-meta, Ph-dppet); 138,25 (C-para, Ph-dppet). **RMN ^1H (ppm):** 2,58 (s, 2H, -CH₂N-); 2,15(s, 3H, -N-CH₃); 2,32(s, 3H, -N-CH₃); 6,32-7,28(m, 4H, Ph-dmba); 7,11-7,65 (m, 20H, Ph-dppet); 6,4 (dd, 2H_{alif.}, PCH=CHP).

Testes Biológicos dos Compostos como Agentes Antitumorais

Material

Linhagens celulares

Células C6, HeLa e Hep-2 foram obtidas da American Type Culture Collection - ATCC (Rockville, MD, EUA).

Obtido da Cutilab Materiais para Cultura de Células, Campinas, São Paulo.

Meio de Cultura

DMEM- Dulbecco Modified Eagle's Medium, para cultivo celular. Gibco BRL - Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA.

Soluções

Todas as soluções foram preparadas a partir de reagentes de grau de pureza P. A., distribuídos pela Merck, Sigma e Gibco-BRL, seguindo formulações descritas na literatura¹³⁻¹⁴.

Métodos

Curvas de Crescimento

As células foram suspensas em **DMEM** contendo 5-10% **SFB** e distribuídas ($5,0 \times 10^4$ células/placa) em placas de Petri descartáveis de 35 mm de diâmetro em duplicata. As células foram expostas aos compostos de paládio (0,5-30,0 μM) e, ainda, ao dimetilsulfóxido, utilizado como solvente. Em intervalos de tempo regulares de 48 h, as células foram coletadas por tratamento com tripsina.

A contagem do número de células foi feita em hemocítmetro. Após contagem, o número de células por cm^2 foi obtido pelo cálculo da média aritmética da duplicata. Gráficos das curvas de crescimento foram construídos pelos valores do número de células/ cm^2 em função do tempo.

Curvas de Sobrevivência

As células foram suspensas em **DMEM** contendo 5-10% **SFB** e distribuídas ($2,5 \times 10^2$ células/placa) em placas de Petri descartáveis de 35 mm de diâmetro em duplicata. As células foram expostas aos compostos (0,5-30,0 μM) por um período de 24 horas e, ainda, ao dimetilsulfóxido, solvente dos compostos em estudo.

O meio de cultura foi trocado periodicamente até o aparecimento de colônias macroscópicas. As células foram fixadas em formaldeído 3,7% e coradas com solução de cristal violeta. A seguir, determinou-se o número de colônias por placa e a concentração inibitória 50% (IC_{50}).

Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado através de método colorimétrico através de metodologias descritas por Mosmann¹⁵, Denizot & Lang¹⁶ e Kim et al.¹⁷. Utilizou-se nas medidas um espectrofotômetro **Pharmacia LKB - Ultrospec III**.

As células suspensas foram distribuídas em placas de 24 orifícios na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/orifício, excetuando-se as células C6 cuja densidade foi o dobro, e incubadas a 37°C. Ao atingirem 60-70% da confluência foram expostas aos compostos por um período de 24 horas. Decorrido o tempo de exposição, adicionou-se aos orifícios uma solução de **MTT-tetrazólio**; [3-(4,5-dimetiazol-2il-2,5-brometo de difeniltetrazólio)] em PBS (solução tampão de fosfato padrão), na concentração de 5 mg/mL e as células foram incubadas por mais 3 horas. A seguir, foram removidos os meios de cultura e os orifícios lavados com PBS (2 vezes) e, em seguida, acrescidos de solução de isopropanol acidificado (0,04 N; HCl). A viabilidade celular foi determinada pelo valor da leitura de absorvância no comprimento de onda de 560 nm para as diferentes concentrações dos compostos. Este ensaio foi realizado em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reatividade de compostos ciclometalados de paládio(II) de natureza dimérica com difosfinas, formando espécies mono e binucleares, moleculares ou iônicas, já é conhecida^{18,19}. Entretanto nenhum aspecto da química destes compostos contendo o íon azida é relatado na literatura.

Nosso interesse no estudo desta classe de compostos reside no fato do íon azida coordenado a centros metálicos possuir uma reatividade ímpar²⁰⁻²², principalmente na geração de heterociclos, tornando possível a modificação estrutural do complexo metálico, característica esta, muito desejável quando se propõe a estudar os efeitos antitumorais destes compostos. Isto torna possível não só a formulação e o melhor entendimento de correlações envolvendo estrutura química e atividade biológica dos complexos como também proporciona uma maior versatilidade na alteração de algumas de suas propriedades físico-químicas. No tocante aos ligantes difosfínicos, os mesmos são bases moles de Lewis, dando origem à formação de complexos muito estáveis com paládio(II)⁹, o que permite o seu emprego como agentes antitumorais, pois impede a decomposição dos organometálicos por vias metabólicas até a sua ação sobre a molécula do DNA. A labilidade química dos organometálicos de paládio(II) tem praticamente impedido o emprego de outras classes de complexos deste metal com este mesmo fim. Além deste fator, os complexos metálicos com difosfinas apresentam comprovada citotoxicidade "in vitro" e uma grande atividade antitumoral "in vivo"²³, propriedades estas altamente dependentes da estrutura química dos seus complexos.

As estruturas dos compostos sintetizados e caracterizados neste trabalho estão representadas de forma esquemática na Figura 1.

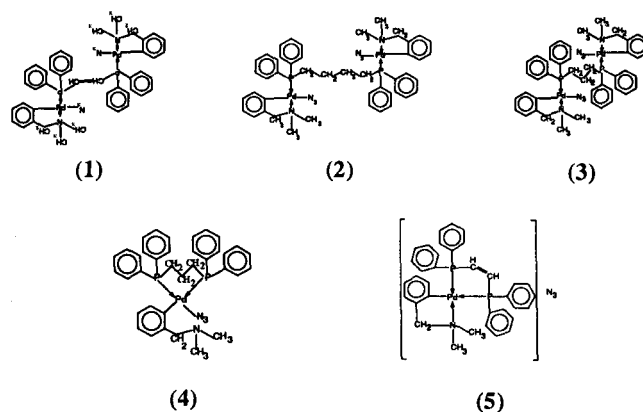


Figura 1. Complexos de paládio sintetizados.

O complexo 1, $[\text{Pd}_2(\text{C}^2, \text{N-dmba})_2(\text{N}_3)_2(\mu\text{-trans-dppet})]$, foi obtido pela reação do dímero de azida de partida com a *trans-dppet*, tanto em reações empregando-se razões molares (dímero/difosfina) de 1:1, quanto de 2:1, mostrando uma clara tendência desta difosfina em formar uma ponte entre as unidades $[\text{Pd}(\text{dmba})\text{N}_3]$ do dímero; devendo-se este fato tanto à rigidez da dupla ligação carbono-carbono da difosfina, quanto ao posicionamento *trans* de seus átomos de fósforo, o que torna difícil a sua atuação como ligante bidentado.

A alta insolubilidade apresentada pelo complexo 1 na maioria dos solventes orgânicos comerciais convencionais, tornou difícil a sua análise através de técnicas de RMN.

O espectro vibracional na região do IV deste composto apresenta na região de alta frequência bandas de intensidade média referentes aos estiramentos $\nu(\text{C-H})$ dos grupamentos N-CH_2 e N-CH_3 em 2830 cm^{-1} e 2889 cm^{-1} . Na região de baixa frequência do espectro, em 744 cm^{-1} , observa-se uma banda de forte intensidade de absorção, característica do modo normal de

deformação angular, $\delta(\text{CH})$, de sistemas aromáticos *orto-substituídos*²⁴, indicando a presença do anel ciclometalado da N,N-dimetilbenzilamina. Em 695 cm^{-1} verifica-se uma banda com baixa intensidade relativa ao modo normal de deformação angular das ligações entre carbono alifático-fósforo-carbono aromático, $\delta(\text{C-P-CPh})$. Em 1321 cm^{-1} e 1577 cm^{-1} verifica-se as bandas relativas aos modos normais de vibração $\nu(\text{C-N})$ e $\nu(\text{C-C})$, respectivamente. As bandas atribuídas aos modos normais de deformação angular $\delta(\text{C-H})$ dos grupos alifáticos da *dmba* (N-CH_2 e N-CH_3) são observadas em 1420 e 1439 cm^{-1} . Em 2027 cm^{-1} observa-se uma forte banda de estiramento $\nu_{\text{ass}}(\text{N}_3)$, característica de grupos azida coordenados ao metal de forma terminal²⁵⁻²⁷.

O complexo 2, $[\text{Pd}_2(\text{C}^2, \text{N-dmba})_2(\text{N}_3)_2(\mu\text{-dppb})]$, foi obtido pela reação do dímero de azida de partida com a *dppb*, tanto com a utilização de razões molares (dímero/difosfina) de 1:1, como de 2:1, evidenciando que a tendência quelante das difosfinas do tipo $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{Ph}_2$ decresce com o comprimento da cadeia, sendo muito grande quando $n=2$.

O espectro vibracional na região do IV deste complexo, apresenta na região de alta frequência bandas de absorção de intensidade média, relativas aos modos normais de vibração das ligações N-CH_2 e N-CH_3 em 2848 e 2913 cm^{-1} , respectivamente. Em 1332 e 1591 cm^{-1} , observa-se bandas de absorção de intensidade média, relativas aos estiramentos $\nu(\text{C-N})$ e $\nu(\text{C-C})$. Na região de baixa frequência do espectro nota-se em 749 cm^{-1} a presença de uma banda de absorção de forte intensidade, característica da deformação angular $\delta(\text{C-H})$ de anéis aromáticos *orto-substituídos*²³. As bandas relativas às deformações angulares dos grupos alifáticos da *dmba* N-CH_2 e N-CH_3 são observados em 1425 e 1440 cm^{-1} respectivamente. Em 2048 cm^{-1} observa-se uma forte banda de absorção relativa ao modo normal de vibração $\nu_{\text{ass}}(\text{N}_3)$, em região característica de grupos azida coordenados ao metal de forma terminal²⁴⁻²⁶. Em 1118 cm^{-1} verifica-se uma banda de absorção de média intensidade atribuída ao estiramento da ligação P-C e em 709 cm^{-1} , uma banda de fraca intensidade atribuída à deformação angular $\delta(\text{C-P-CPh})$.

O espectro de RMN de $^31\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo apresenta um único sinal na forma de singlete em $-104,49\text{ ppm}$, mostrando haver uma perfeita equivalência magnética entre os dois átomos de fósforo presentes na molécula do composto, indicando a formação de uma estrutura simétrica, com o ligante ligado em ponte, unindo duas unidades $[\text{Pd}(\text{dmba})\text{N}_3]$. O espectro do ligante livre apresenta um único sinal em $-154,27\text{ ppm}$, sendo o deslocamento químico observado devido a coordenação destes átomos ao íon de paládio(II).

No espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do complexo pode-se observar um sinal em $149,31\text{ ppm}$, atribuído ao átomo de carbono ligado ao metal.

O complexo 3, $[\text{Pd}_2(\text{C}^2, \text{N-dmba})_2(\text{N}_3)_2(\mu\text{-dppp})]$, foi obtido pela reação entre o dímero de azida de partida e a *dppp* na razão molar de 1:1 (dímero/difosfina). Com este ligante, a utilização de razão molar de 2:1 (dímero/difosfina) conduz à formação de um composto mononuclear onde a *dppp* atua como ligante bidentado e a ligação N-Pd é rompida, como será visto posteriormente.

No espectro vibracional na região do IV, observam-se na região de alta frequência, bandas de absorção de média intensidade, relativas aos estiramentos $\nu(\text{C-H})$ dos grupamentos N-CH_2 e N-CH_3 em 2893 e 2930 cm^{-1} e dos anéis aromáticos em 3052 cm^{-1} . Em 1330 e 1575 cm^{-1} observam-se bandas de absorção referentes aos estiramentos $\nu(\text{C-N})$ e $\nu(\text{C-C})$, respectivamente. Na região de baixa frequência do espectro observa-se uma banda de forte intensidade, característica da deformação angular, $\delta(\text{C-H})$, de anéis aromáticos *orto-substituídos*²³. As bandas de absorção referentes aos modos normais de deformação angular dos grupos alifáticos da *dmba* (N-CH_2 e N-CH_3) são observadas em 1435 e 1442 cm^{-1} . Em 2034 cm^{-1}

observa-se uma forte banda de absorção relativa ao modo normal de vibração $\nu_{\text{ass}}(\text{N}_3)$, em região característica de grupos azidas coordenados ao metal de forma terminal²⁴⁻²⁶.

O espectro de RMN de $^31\text{P}\{^1\text{H}\}$, a exemplo do complexo 2, apresenta um único sinal de ressonância em $-106,90\text{ ppm}$, indicando não só a equivalência dos átomos de fósforo na estrutura, como também a sua coordenação ao paládio, pois no ligante livre este sinal ocorre em $-157,93\text{ ppm}$.

No espectro de RMN de ^1H observa-se em $2,63$ e $2,64\text{ ppm}$ dois singletes correspondentes aos sinais dos quatro grupos metila da *dmba*. Em campos mais altos do espectro observa-se em $1,95\text{ ppm}$ um tripleto atribuído aos prótons $\text{H}_2\text{C}^*-\text{CH}_2-\text{P}$ e em $2,52\text{ ppm}$ um quintuplo atribuído ao deslocamento químico $\text{H}_2\text{C}^*-\text{P}$. Em $3,61\text{ ppm}$ observa-se o deslocamento químico dos quatro prótons referentes aos dois grupos N-CH_2 , na forma de um singlete, sendo este conjunto de prótons perfeitamente equivalentes.

No espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, observamos um sinal em $149,05\text{ ppm}$ atribuído ao carbono quaternário da *dmba* ligado ao paládio (*CPh-Pd*), bastante compatível com o valor obtido para ciclometalados similares²⁸.

O complexo 4, $[\text{Pd}(\text{C}^2\text{-dmba})(\text{N}_3)(\text{dppp})]$, foi obtido pela reação do dímero de azida de partida com a *dppp* na razão molar de 1:2 respectivamente. Nestas proporções dos reagentes verifica-se o grande potencial quelante das difosfinas, provocando neste caso uma descoordenação do átomo de nitrogênio do anel ciclometalado da *dmba* produzindo um complexo mononuclear. A quebra da ligação N-Pd deve-se possivelmente à formação de um complexo de paládio (II) intermediário pentacoordenado instável e foi confirmada anteriormente por estudos de difração de raios-X¹¹.

Devido a grande distância dos átomos na estrutura, o espectro de $^31\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo apresenta dois sinais em forma de singletes, em $-104,54$ e $-105,70\text{ ppm}$, mostrando também, a inequivalência destes átomos na molécula, sendo o sinal de menor frequência atribuído ao núcleo de fósforo *trans* ao carbono do anel ciclometalado ligado ao paládio¹⁹.

No espectro RMN de ^1H do composto observa-se em $2,62\text{ ppm}$ um sinal em forma de singlete correspondente a seis prótons, ou seja, dos dois grupos N-CH_3 existentes na molécula, perfeitamente equivalentes, indicando uma liberdade de rotação do eixo de ligação ($-\text{CH}_2-\text{N}-$) devido à quebra da ligação de coordenação N-Pd que dava origem ao anel ciclometalado.

No espectro IV do composto, observamos novamente em 2040 cm^{-1} uma banda de absorção de forte intensidade, atribuída ao modo normal de vibração $\nu_{\text{ass}}(\text{N}_3)$, característica de azidas coordenadas em forma terminal ao metal.

O complexo 5, $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\text{cis-dppet})(\text{N}_3)]$, apresentou uma condutividade $\Lambda\text{M}=87,3\text{ }\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ medida em nitrometano em um condutômetro *Metrohm Herisau* e um eletrodo EA 608-08, com constante de cela $c=0,7\text{ cm}^{-1}$. Esta condutância é característica de eletrólitos 1:1, neste solvente²⁹, tratando-se portanto de um complexo de caráter iônico.

O espectro de IV do composto apresenta em 2030 cm^{-1} uma forte banda de absorção correspondente, neste caso, ao modo normal de vibração assimétrico do grupo azida iônico.

O espectro de RMN de $^31\text{P}\{^1\text{H}\}$ do complexo mostra dois sinais em forma de singlete em $-77,62$ e $-89,03\text{ ppm}$, mostrando a inequivalência dos átomos de fósforo. O ligante livre apresenta um único sinal no espectro em $-161,42\text{ ppm}$, sendo o enorme deslocamento químico observado em relação ao ligante, devido à coordenação destes átomos ao íon metálico.

No espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ observamos dois sinais em campo baixo, em $159,13$ e $156,81\text{ ppm}$, correspondentes aos átomos de carbono da dupla ligação do ligante. Em $147,99\text{ ppm}$ observamos um sinal atribuído ao átomo de carbono ligado ao metal.

No espectro de RMN de ^1H observamos, centrado em $6,4\text{ ppm}$, um duplo dublete dos prótons não equivalentes ligados aos carbonos da dupla ligação da difosfina. Também notamos

uma inequivalência dos grupos N-CH₃ da molécula que se apresentam na forma de dois singletes em 2,15 e 2,32 ppm.

Muitos exemplos de complexos ciclopaladados foram descritos nos últimos 35 anos e sua química é muito bem compreendida³⁰.

Em muitos casos, as espécies monoméricas destes compostos são bastante solúveis e, indefinidamente estáveis, em solventes orgânicos comerciais convencionais, mas apenas levemente solúveis em água, o que muitas vezes se constitui num problema para os ensaios biológicos. Esta questão tem sido resolvida em parte com a síntese de paladociclos contendo em sua estrutura o íon acetato^{6,7} que aumenta a solubilidade dos complexos.

Nossa intenção, ao trabalharmos com estruturas contendo o íon azida, foi justamente a possibilidade de, em trabalhos futuros, modificarmos estruturalmente os compostos paladociclos, mediante a vasta reatividade apresentada pelo grupo azida coordenado, não só com vistas ao aumento da solubilidade dos compostos, como também de podermos obter importantes correlações envolvendo estrutura química e citotoxicidade. Estudos estereoquímicos sobre os complexos de paládio prevêem que os ciclopaladados sintetizados devem ter uma geometria de coordenação "quadrada-planar" em torno do íon metálico central, onde os íons azida, a exemplo dos íons cloreto ou acetato, devem ligar-se em posição *trans* ao átomo de carbono do anel ciclometalado coordenado ao metal³¹.

A estrutura molecular do complexo 4¹¹, no entanto, contraria este dado, pois o grupo azida está em posição *trans* a um dos átomos de fósforo coordenado.

As linhagens de células C6, Hep-2 e HeLa são representativas de tumores de diferentes tecidos, como do glioma cerebral, orofaringe e colon do útero, respectivamente. Todas estas células são transplantáveis em ratos, tornando possível a extrapolação dos estudos de citotoxicidade *in vitro* para a atividade antitumoral *in vivo*.

Na Tabela 1 são apresentadas as concentrações inibitórias (IC₅₀) dos complexos 1-5 nas três linhagens de células estudadas.

Na Figura 2 são apresentados os resultados da atividade citotóxica destes complexos em diversas concentrações, nas curvas de sobrevivência das células da linhagem C6. Os complexos foram dissolvidos em dimetil-sulfóxido para realização dos testes biológicos.

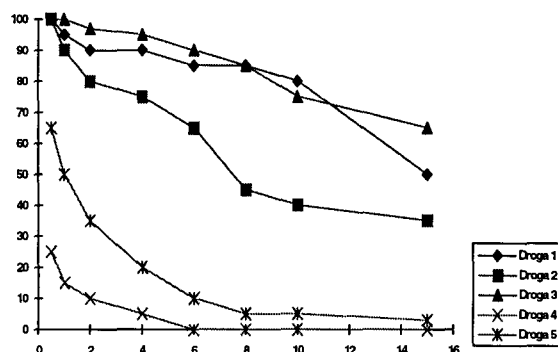


Figura 2. Curvas % Sobrevivência das Células da Linhagem C6 em Concentrações crescentes dos Complexos de Paládio(II) expressas [μM].

Tabela 1. Dose Inibitória 50%(IC₅₀) dos Compostos Ciclometalados de Paládio(II).

Linhagem Celular/Droga	Droga 1	Droga 2	Droga 3	Droga 4	Droga 5
HeLa	24,0 μM	10,0 μM	>30,0 μM	1,0 μM	1,75 (M
Hep-2	25,0 μM	7,5 μM	>30,0 μM	1,8 μM	2,20 μM
C6	15,5 μM	7,0 μM	>30,0 μM	< 0,5 μM	0,85 μM

Pelos estudos realizados ficou demonstrado que a natureza do anel orgânico ciclometalado não deve ter nenhum efeito sobre a citotoxicidade apresentada pelos complexos, uma vez que todos eles são derivados da N,N-dimetilbenzilamina.

A natureza mononuclear ou binuclear dos complexos, entretanto, parecem ter um importante papel no mecanismo de ação destas drogas, uma vez que os compostos 1,2,3 que possuem dois centros metálicos em suas estruturas tiveram indistintamente, nas três linhagens de células testadas, uma ação citotóxica menos eficaz que os compostos 4 e 5, que são mononucleares. Por consequência desta observação os diferentes ligantes difosfínicos utilizados também devem ter exercido pequena influência na atividade citotóxica dos complexos, sendo a ação biológica dos mesmos ligada diretamente ao fator estrutural. Isto pode ser explicado, provavelmente devido ao fato das ligações Pd-P serem muito inertes não permitindo a liberação do ligante bifosfínico tóxico no sítio alvo, a exemplo do que ocorre com o complexo [Pt(dppe)Cl₂]³², que é inativo devido a este fator. Fica muito claro também que o mecanismo de ação citotóxica dos paladociclos testados não se deve ao fato da liberação do ligante difosfínico tóxico no sítio alvo do DNA da célula, o que é verificado para vários complexos do gênero³². A importância do fator estrutural fica melhor evidenciado quando observamos que os compostos 4 e 5, apresentam uma maior atividade citotóxica para as linhagens de células testadas.

Embora todos os complexos estudados tenham apresentado citotoxicidade em maior ou menor grau, observa-se que o composto 4, que possui a ligação de coordenação N-Pd rompida, foi o mais eficaz, especialmente para as células da linhagem C6(glioma cerebral), apresentando uma concentração inibitória (IC₅₀) menor que 0,5 μM, correspondente a 0,3 μg/mL.

Como já descrito anteriormente⁵, é muito provável que a atividade citotóxica das drogas seja produto de uma ação combinada de fatores cinéticos, termodinâmicos, estruturais e farmacodinâmicos dos complexos metálicos. Sob este aspecto, o mecanismo de ação, mesmo de complexos convencionais de platina, é bastante amplo e muito diversificado³². Portanto, qualquer previsão sobre o mecanismo de ação das drogas aqui testadas seria prematura, devendo ser objeto de trabalhos futuros.

Neste trabalho procuramos demonstrar a importância que a classe dos ciclometalados de paládio (II) podem representar não só no desenvolvimento de novas drogas antineoplásicas, como também na grande contribuição que podem vir a dar sobre a elucidação dos mecanismos de ação das mesmas. Preocupamo-nos inicialmente com a influência do fator estrutural no mecanismo de ação dos ciclopaladados, o que nos possibilitou algumas conclusões importantes e a seleção de alguns compostos para a continuidade de nossos estudos, onde buscaremos a seletividade dos complexos metálicos como agentes antineoplásicos através de mudanças estruturais e com a realização de testes comparativos com células da linhagem 3T3(A31). Os fatores mecanísticos e estruturais relevantes também serão estudados com a realização de testes "in vivo".

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às Agências financiadoras FAPESP, CNPq, CAPES e FINEP pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Krakoff, H.; in *Platinum and Other Metal Coordination Compound in Cancer Chemotherapy: Clinical Applications of Platinum Complexes*, Nicolini, M.; Ed.; Martinus Nijhoff Publishing; Boston 1998, 351.
2. McKeage, M. J.; *Brit. J. Cancer*. **1991**, *64*, 788.
3. Shermam, S. E.; Lippard S. J.; *Chem. Rev.* **1987**, 1153.
4. Reedijk, J.; *Pure Appl. Chem.* **1987**, *59*, 181.
5. Navarro - Ranninger, C.; López-Solera, I.; Pérez, J. M.; Masaguer, J. R.; Alonso, C.; *Appl. Organometal. Chem.* **1993**, *7*, 57.
6. Higgins III, J. D.; Neely, L.; Fricker, S.; *J. Inorg. Biochem.* **1993**, *49*, 149.
7. Navarro - Ranninger, C.; López-Solera, I.; Pérez, J. M.; Rodrigues, J.; Garcia-Ruano, J. L.; Raithby, P. R.; Masaguer, J. R.; Alonso, C.; *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3795.
8. Hui-Xiang, L.; Zhi-Liang, L.; Gui-Lin, D.; Qiong-Si, B.; Ru-Qin, Y.; *Science in China(B)*. **1993**, *36*, 1216.
9. Drent, E.; *Pure and Appl. Chem.* **1990**, *62*, 661.
10. Caires, A. C. F.; Mauro, A. E.; Santos, R. H. A.; Gambardella, M. T. P.; Lechat, J. R.; *Gazz. Chim. Ital.* **1993**, *123*, 495.
11. Tonon, E. T.; Lucca Netto, V. A.; Caires, A. C. F.; Mauro, A. E.; Santos, R. H. A.; Gambardella, M. T. P.; *19ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*; Poços de Caldas-MG. 1996, *QI-055*.
12. Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. R.; *Purification of Laboratory Chemicals*; 2nd Ed.; Pergamon Press; Oxford. 1983.
13. Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, k; *Current protocols in Molecular Biology*; Greene Publ. Assoc. Inc; John Wiley & Sons Inc. 1993.
14. Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T.; *Molecular Cloning-a laboratory manual*, 2nd Ed; Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
15. Mosmann, T.; *J. Immunological Methods*. 1986, *89*, 271.
16. Denizot, F.; Lang, R.; *J. Immunological Methods*. **1983**, *65*, 55.
17. Kim, D. K.; Kim, H. T.; Cho, Y. B.; Tai, J. H.; Ahn, J. S.; Kim, T. S.; Hong, W. S.; Park, J. G.; *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1471.
18. Dehand, J.; Pfeffer, M.; Zinsius, M.; *Inorg. Chim. Acta* **1975**, *13*, 229.
19. Vila, J. M.; Gayoso, M.; Fernandez, J. J.; Ortigueira, J. M.; Suarez, A.; *Polyhedron* **1990**, *9*, 2741.
20. Parimal, P.; Chackladar, S.; Kamalaksha, N.; *Inorg. Chim. Acta* **1990**, *170*, 27.
21. Guillard, R.; Gergest, S. S.; Tabard, A.; Richard, P.; El Borai, M. A.; Lecomte, C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7228.
22. Parimal, P.; Kamalaksha, N.; *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 2969.
23. Queiroz, S. L.; Batista, A. A.; *Quím. Nova* **1996**, *19*, 651.
24. Pfeffer, M.; Goel, A. B.; *Inorg. Synth.* **1989**, *26*, 211.
25. Dori, Z.; Ziolo, R. F.; *Chem. Rev.* **1973**, *73*, 247.
26. Beck, W.; Fehlhammer, W. P.; Pollmann, P.; Schuierer, E.; Feldi, K.; *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 2335.
27. Werner, K. V.; Beck, W.; *Chem. Ber.* **1972**, *105*, 3209.
28. Garber, A. R.; Garrow, P. E.; Hartwell, G. E.; Smas, M. J.; Wilkinson, J. R.; Todd, L. J.; *J. Organometal. Chem.* **1975**, *86*, 219.
29. Geary, W. J.; *Coord. Chem. Rev.* **1972**, *7*, 81.
30. Caires, A. C. F.; Mauro, A. E.; *Quím. Nova* **1996**, *19*, 59.
31. Crociani, B.; Boschi, T.; Pietropaolo, R.; Bellucco, U.; *J. Chem. Soc. A* **1970**, 531.
32. Soares Fontes, A. P.; Almeida, S. G.; Nader, L. A.; *Quím. Nova* **1997**, *20*, 398.