

 <p>UFAL</p>	<p>Universidade Federal de Alagoas</p> <p>Instituto de Química e Biotecnologia</p> <p><i>Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia</i> <i>PPGQB</i></p>	 <p>IQB</p>
---	---	---

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES
ANTIEPILÉPTICAS DE COMPLEXOS DE PALÁDIO(II) DERIVADOS DO
DIAZEPAM**

Walleska Bismaida Zacarias Galvão Barros Correia

**Maceió – Alagoas
2017**

Walleska Bismaida Zacarias Galvão Barros Correia

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES
ANTIEPILÉPTICAS DE COMPLEXOS DE PALÁDIO(II) DERIVADOS DO
DIAZEPAM**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti
Coorientador: Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino

**Maceió – Alagoas
2017**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

C824d Correia, Walleska Bismaida Zacarias Galvão Barros.
Síntese, caracterização e avaliação das propriedades antiepilépticas de complexos de paládio(II) derivados do diazepam /Walleska Bismaida Zacarias Galvão Barros Correia. – 2017.
92 f. : il.

Orientador: Mario Roberto Meneghetti.

Coorientador: Thiago Mendonça de Aquino.

Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 75-82.

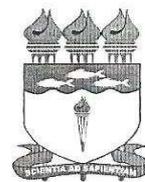
Apêndices: f. 83-92.

1. Paládio. 2. Diazepam. 3. Epilepsia. I. Título.

CDU: 546.98:616.853



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

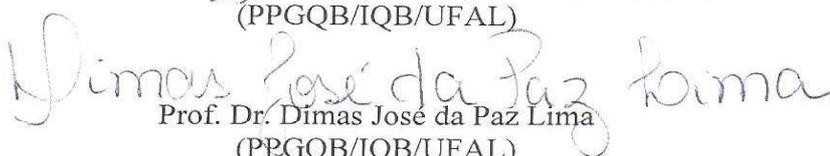
FOLHA DE APROVAÇÃO

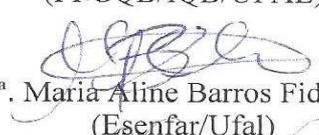
Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **Walleska Bismaida Zacarias Galvão Barros Correia** intitulada: **“SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIEPILÉPTICAS DE COMPLEXOS DE PALÁDIO(II) DERIVADOS DO DIAZEPAM”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 15 de agosto de 2017, às 9h30min, na Sala de Aulas do PPGQB, na Universidade Federal de Alagoas.

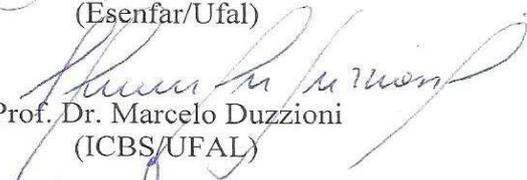
COMISSÃO JULGADORA

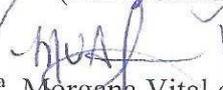

Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti - orientador
(PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino - coorientador
(PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Dimas José da Paz Lima
(PPGQB/IQB/UFAL)


Prof.ª. Dr.ª. Maria Aline Barros Fidelis de Moura
(Esenfar/Ufal)


Prof. Dr. Marcelo Duzzioni
(ICBS/UFAL)


Dr.ª. Morgana Vital de Araújo
(Esenfar/Ufal)


Prof. Dr. José Rui Machados Reys
(Esenfar/Ufal)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter abençoado a realização deste doutorado;

Ao meu esposo (Tiberio Teylon) por toda ajuda e pelo incentivo na realização deste doutorado;

Aos meus pais (Walbert Rommel e Maria Madalena), irmãos (Walbeska Betsaida e Willbert Bismarck) e cunhada (Kelma) por apoio;

Ao Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti por ter aceitado ser meu orientador e por tudo que me ensinou;

Ao Prof. Dr. José Rui Machado Reys por ter colaborado com o desenvolvimento deste trabalho e por sua participação na Banca Examinadora de qualificação e de defesa;

Ao Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior e à doutoranda Marlange, do Laboratório de Farmacologia Pré-clínica da Universidade Federal de Sergipe (LAPEC/UFS), pela colaboração com o desenvolvimento deste trabalho através da avaliação da atividade anticonvulsivante dos complexos sintetizados;

À Profa. Dra. Ana Mara de Oliveira e Silva, do Laboratório de Análises de Alimentos da UFS, pela colaboração com o desenvolvimento deste trabalho através da análise antioxidante dos complexos;

À Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira e à Dra. Morgana Vital de Araújo, do Laboratório de Farmacologia e Imunologia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), pela colaboração com o nosso trabalho através da realização do teste de citotoxicidade dos complexos; à Dra. Morgana por suas contribuições na Banca Examinadora da minha qualificação e defesa;

À Profa. Dra. Claudia C. Gatto, do Laboratório de Síntese Inorgânica e Cristalografia da Universidade de Brasília, pela realização do teste de difração de raios X do DIAZPdOAcD;

Ao Prof. Dr. Edson de Souza Bento e aos componentes do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UFAL por contribuírem com a caracterização dos nossos complexos;

À Central Analítica da Universidade de São Paulo e ao Centro de Tecnologia do Nordeste (CETENE), também por contribuírem com a caracterização dos nossos complexos;

À Profa. Dra. Aline Fidelis, da ESENFAR/UFAL, pela oportunidade de realização do estágio docência, por todos os ensinamentos e por suas contribuições ao participar da Banca Examinadora de defesa deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Dimas, do IQB/UFAL, por suas contribuições na Banca Examinadora de qualificação e defesa deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Marcelo, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFAL, por suas contribuições na Banca Examinadora de defesa deste trabalho;

Ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (PPGQB/IQB/UFAL), pela oportunidade de realização do doutorado;

Aos professores do PPGQB/IQB/UFAL por contribuírem com minha formação acadêmica;

A todos que fizeram ou fazem parte do Grupo de Catálise e Reatividade Química (GCaR) com quem tive o prazer de conviver, especialmente: Daniele, Rafael, Jéssica, Ana Soraya e Gabriela, grandes amigos;

A CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A epilepsia é uma doença neurológica que afeta aproximadamente 50 milhões de pessoas em todo o mundo e está relacionada ao estresse oxidativo, que desempenha um importante papel no dano neuronal induzido por convulsões. Os fármacos atuais utilizados no tratamento desta doença apresentam seu uso frequentemente limitado devido aos seus efeitos adversos; além disso, aproximadamente 30% dos pacientes epiléticos que estão recebendo tratamento medicamentoso não ficam totalmente livres de convulsões. Tais fatos motivaram o desenvolvimento deste trabalho que apresenta como objetivo sintetizar, caracterizar e avaliar complexos de paládio(II) derivados do diazepam com a finalidade de obter complexos que possam ser utilizados para o tratamento da epilepsia. Neste trabalho foram sintetizados cinco complexos de paládio(II) derivados do diazepam: dois na forma dimérica (DIAZPdOAcD e DIAZPdCID) e três na forma monomérica (DIAZPdOAcPPh₃, DIAZPdCIPPh₃, e DIAZPdCIPy). Todos esses complexos foram caracterizados por técnicas espectrométricas e análise elementar; e o dímero DIAZPdOAcD teve sua estrutura química elucidada através de difração de raios X. Além disso, todos os complexos foram avaliados quanto às atividades anticonvulsivante e antioxidante e à citotoxicidade. Através das técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho foi possível confirmar a formação de todos os complexos; cabe destacar que por meio do estudo de difração de raios X do DIAZPdOAcD observou-se a geometria quadrada plana distorcida do paládio(II), a ocorrência da ciclopaladação e a forma de livro aberto deste dímero. Com relação às atividades anticonvulsivante e antioxidante, observou-se que somente o dímero DIAZPdOAcD apresentou resultados significativos. No que se refere à citotoxicidade, todos os complexos apresentaram uma maior toxicidade quando comparados ao diazepam. No entanto, cabe salientar o efeito anticonvulsivante e o potencial efeito neuroprotetor desempenhados pelo DIAZPdOAcD, pois são características importantes de novos fármacos para o tratamento da epilepsia.

Palavras-chave: Paladaciclos. Diazepam. Epilepsia.

ABSTRACT

Epilepsy is a neurological disease that affects approximately 50 million people worldwide and is related to oxidative stress, which plays an important role in the neuronal damage induced by seizures. The current drugs used in the treatment of this disease have their use often limited due to their adverse effects; moreover, approximately 30% of epileptic patients who are receiving drug treatment are not totally free of seizures. These facts motivated the development of this work that aims to synthesize, characterize and evaluate palladium(II) complexes derived from diazepam in order to obtain complexes that can be used to treat epilepsy. In this work were synthesized five complexes of diazepam-palladium(II): two in dimeric form (DIAZPdOAcD and DIAZPdClD) and three in monomeric form (DIAZPdOAcPPh₃, DIAZPdClPPh₃ and DIAZPdClPy). All these complexes were characterized by spectrometric techniques and elemental analysis; the monomer DIAZPdOAcD had your chemical structure elucidated by X-ray diffraction. In addition, all complexes were evaluated for anticonvulsant and antioxidant activities and for cytotoxicity. Through the characterization techniques used in this work it was possible to confirm the formation of all the complexes; it is important to noted that the X-ray diffraction study of DIAZPdOAcD showed the distorted square-planar geometry of palladium(II), the occurrence of cyclopalladation and the open-book shape of this dimer. Regarding the anticonvulsant and antioxidant activities, it was observed that only the DIAZPdOAcD dimer presented significant results. With respect to cytotoxicity, all complexes showed more pronounced toxicity when compared to diazepam. However, the anticonvulsive effect and the potential neuroprotective effect performed by DIAZPdOAcD should be emphasized, since they are important characteristics of new drugs for the treatment of epilepsy.

Keywords: Palladacycles. Diazepam. Epilepsy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina trifosfato
BDZ	Benzodiazepínico
br sig	Sinal alargado (do inglês: <i>broad signal</i>)
CAT	Catalase
CETENE	Centro de Tecnologia do Nordeste
ERO	Espécies reativas de oxigênio
D	Dupleto
DFS	Departamento de Fisiologia
DIAZPdCID	<i>bis</i> [2-{(7-cloro-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -benzodiazepin-5-il)fenil- κ^2 - <i>C,N</i> }- μ_2 -cloropaládio(II)]
DIAZPdCIPPh₃	[2-{(7-cloro-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -benzodiazepin-5-il)fenil- κ^2 - <i>C,N</i> }-clorotrifetilfosfinopaládio(II)]
DIAZPdCIPy	[2-{(7-cloro-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -benzodiazepin-5-il)fenil- κ^2 - <i>C,N</i> }-cloropiridinopaládio(II)]
DIAZPdOAcD	<i>bis</i> [2-{(7-cloro-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -benzodiazepin-5-il)fenil- κ^2 - <i>C,N</i> }- μ_2 -acetatopaládio(II)]
DIAZPdOAcPPh₃	[2-{(7-cloro-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -benzodiazepin-5-il)fenil- κ^2 - <i>C,N</i> }-acetatotrifetilfosfinopaládio(II)]
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DZP	Diazepam
EEG	Eletroencefalográfico
F.M.	Fórmula molecular
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GCaR	Grupo de Catálise e Reatividade Química
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
IQB	Instituto de Química e Biotecnologia

IV	Infravermelho
J	Acoplamento de spin
LaboCrMM	Laboratório de Cristalografia e Modelagem Molecular
LAPEC	Laboratório de Farmacologia Pré-Clínica
m	Multiplete
MHz	Megahertz
M.M.	Massa molar
OAc	Acetato
PPh₃	Trifenilfosfina
ppm	Parte por milhão
PTZ	Pentilenotetrazol
Py	Piridina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Singleto
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFS	Universidade Federal de Sergipe

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 Epilepsia.....	15
3.1.1 Considerações gerais.....	15
3.1.2 Fisiologia.....	16
3.1.3 Classificação.....	19
3.1.4 Tratamento medicamentoso.....	21
3.1.4.1 Farmacologia dos benzodiazepínicos.....	22
3.1.5 Epilepsia e estresse oxidativo.....	25
3.2 Química Inorgânica Medicinal.....	27
3.3 Complexos metálicos derivados de benzodiazepínicos.....	30
4 EXPERIMENTAL.....	36
4.1 Atividades desenvolvidas e locais de realização.....	36
4.2 Reagentes e solventes.....	37
4.3 Instrumentação para caracterização.....	37
4.3.1 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN).....	37
4.3.2 Espectroscopia no infravermelho médio (IV).....	38
4.3.3 Difração de raios X.....	38
4.3.4 Análise Elementar.....	38
4.3.5 Espectrometria de Massas.....	38
4.4 Procedimentos de síntese.....	39
4.4.1 Síntese do <i>bis</i> [2-{(7-cloro-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -benzodiazepin-5-il)fenil- κ^2 -C,N}- μ_2 -cloropaládio(II)], DIAZPdClD.....	39
4.4.2 Síntese do [2-{(7-cloro-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -benzodiazepin-5-il)fenil- κ^2 -C,N}cloropiridinopaládio(II)], DIAZPdClPy.....	40
4.4.3 Síntese do [2-{(7-cloro-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -benzodiazepin-5-il)fenil- κ^2 -C,N}clorotrifetilfosfinopaládio(II)], DIAZPdClPPh ₃	41

4.4.4 Síntese do <i>bis</i> [2-{(7-cloro-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -benzodiazepin-5-il)fenil- κ^2 - <i>C,N</i> }- μ_2 -acetatopaládio(II)], DIAZPdOAcD.....	42
4.4.5 Síntese do [2-{(7-cloro-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -benzodiazepin-5-il)fenil- κ^2 - <i>C,N</i> }-acetatotrifetilfosfinopaládio(II)], DIAZPdOAcPPh ₃	43
4.5 Avaliação da atividade anticonvulsivante.....	44
4.6 Avaliação bioquímica dos biomarcadores de estresse oxidativo.....	45
4.6.1 Atividade da SOD.....	46
4.6.2 Atividade da GPx.....	46
4.6.3 Ensaio FRAP.....	46
4.6.4 Teor de GSH.....	47
4.7 Avaliação da citotoxicidade frente a macrófagos.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Síntese dos paladacilos.....	49
5.2 Caracterização dos paladacilos.....	51
5.2.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H (RMN de ¹ H).....	51
5.2.2 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C (RMN de ¹³ C).....	59
5.2.3 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ³¹ P (RMN de ³¹ P).....	59
5.2.4 Espectroscopia no Infravermelho Médio (IV).....	67
5.2.5 Difração de Raios X.....	67
5.2.6 Análise Elementar e Espectrometria de Massas.....	68
5.3 Avaliação da atividade anticonvulsivante.....	69
5.4 Avaliação bioquímica de biomarcadores de estresse oxidativo.....	70
5.5 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos.....	73
6 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICES.....	84
APÊNDICE A – Espectro de RMN de ¹ H do DIAZPdOAcD com piridina deuterada, em CDCl ₃	85
APÊNDICE B – Espectro de RMN de ¹ H do DIAZPdCID com piridina deuterada, em CDCl ₃	86
APÊNDICE C – Espectro de RMN de ¹³ C do diazepam em CDCl ₃	87
APÊNDICE D – Espectro na região do IV do DIAZPdOAcD.....	88
APÊNDICE E – Espectro na região do IV do DIAZPdCID.....	89

APÊNDICE F – Espectro na região do IV do DIAZPdClPy.....	90
APÊNDICE G – Espectro na região do IV do DIAZPdOAcPPh ₃	91
APÊNDICE H – Espectro na região do IV do DIAZPdClPPh ₃	92
APÊNDICE I – Espectro na região do IV do diazepam.....	93

1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma doença crônica do cérebro caracterizada por convulsões recorrentes, que afeta pessoas de todas as idades em todo o mundo. Aproximadamente 50 milhões de pessoas em todo mundo apresentam epilepsia, posicionando-a entre as doenças neurológicas mais comuns do planeta. A proporção estimada da população geral com epilepsia ativa em um determinado momento é entre 0,4 e 1%. Globalmente, cerca de 2,4 milhões de pessoas são diagnosticadas com epilepsia a cada ano (OMS, 2017).

Atualmente existe um amplo arsenal de fármacos antiepilépticos, incluindo medicamentos com diferentes mecanismos de ação, farmacocinética, eficácia e tolerabilidade (SANTULLI et al., 2016); no entanto, cerca de 30% dos casos de pacientes com epilepsia são refratários ao tratamento medicamentoso, ou seja, estes pacientes não ficam totalmente livres das convulsões (OMS, 2017). Além disso, os efeitos adversos continuam a ser uma das principais causas de falha no tratamento e um importante determinante do prejuízo na qualidade de vida de pessoas com epilepsia (PERUCCA; GILLIAM, 2012).

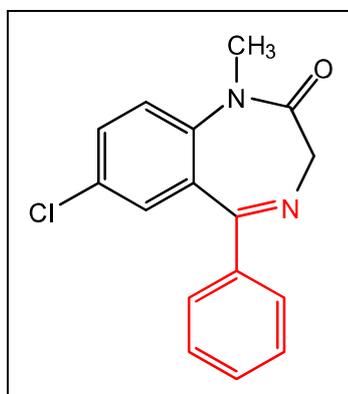
Cabe salientar que os fármacos que apresentam propriedades antioxidantes são importantes no tratamento da epilepsia, visto que o estresse oxidativo apresenta um papel fundamental na patogênese da epilepsia e contribui para o processo de epileptogênese subjacente (MAZHAR; MALHI; SIMJEE, 2017). Tais fatores nos mostram a importância do desenvolvimento de novos fármacos antiepilépticos mais eficazes contra a convulsão, com menos efeitos adversos e que apresentem propriedades antioxidantes.

Uma estratégia para o desenho de novos fármacos dentro da Química Inorgânica Medicinal consiste no desenvolvimento de complexos formados pela coordenação de metais a ligantes bioativos, com o objetivo de formar complexos mais potentes e/ou menos tóxicos (BERALDO, 2005). Utiliza-se essa estratégia pois os metais podem desempenhar um importante papel "passivo" no acompanhamento e/ou entrega de fármacos em direção a seus locais de ação e fora dos locais onde exercem mais toxicidade; além disso, a coordenação a um metal pode alterar a solubilidade e lipofilia de um ligante bioativo, resultando em mudanças na sua absorção, biodistribuição e biotransformação (HAMBLEY, 2007). Outra explicação consiste no fato do metal ser capaz de modificar a estereoquímica e as propriedades eletrônicas do ligante bioativo, podendo assim, alterar substancialmente sua atividade biológica (VIŠNJEVAC et al., 2002).

Neste trabalho, utilizou-se a estratégia citada anteriormente; para isso, selecionou-se como pré-ligante um fármaco com atividade anticonvulsivante, o diazepam, e um metal

passível de ligação a esse fármaco, o paládio. A escolha do paládio como metal foi realizada em função da estrutura do próprio diazepam, um 1,4-benzodiazepínico com um substituinte fenila no carbono-5 do anel (Figura 1.1). O diazepam em presença de sais de Pd(II) pode sofrer reação de ciclometalação via ativação da ligação C-H, formando composto organometálico, e coordenação intramolecular com o nitrogênio imínico; resultando na formação de um paladaciclo de cinco membros. A Figura 1.2 ilustra de maneira genérica a estrutura básica de um metalaciclo derivado de um *N*-benzilideneimino (OMAE, 2004).

Figura 1.1 – Estrutura química do diazepam com destaque em vermelho ao grupo de ligação do paládio



Fonte: Autora, 2017.

Figura 1.2 – Metalaciclos de 5 membros



M = Pd, Pt, Ni, Rh; Y = N, O, S, P, As.

Fonte: OMAE, 2004.

Diante dos dados fornecidos é possível observar a importância deste trabalho que tem como objetivo sintetizar, caracterizar e avaliar complexos de paládio(II) derivados do diazepam que possam atuar como novos protótipos de fármacos para o tratamento da epilepsia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a síntese e a caracterização, além de avaliar a atividade biológica de complexos de paládio(II) contendo diazepam como ligante, visando obter novas propostas terapêuticas para o tratamento da epilepsia.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar paladacilos derivados do diazepam provenientes de sais de PdCl_2 e $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, tanto em suas formas diméricas quanto monoméricas;
- Caracterizar estruturalmente os complexos sintetizados por meio de diversas técnicas (como RMN, IV, entre outras);
- Avaliar a atividade anticonvulsivante dos paladacilos através de bioensaio utilizando pentilenotetrazol como indutor das convulsões em roedores;
- Avaliar a atividade antioxidante dos complexos metálicos através da análise bioquímica de biomarcadores de estresse oxidativo;
- Avaliar a citotoxicidade dos paladacilos frente a macrófagos através do método do metil tiazol tetrazólio (MTT).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Epilepsia

3.1.1 Considerações gerais

A epilepsia apresenta registros escritos que datam de 4000 anos antes de Cristo, sendo uma das condições mais antigas reconhecida no mundo. A discriminação e o estigma social cercaram a epilepsia há séculos e, infelizmente, ainda é uma realidade em muitos países, podendo afetar a qualidade de vida não somente do paciente que apresenta epilepsia como também de toda sua família (OMS, 2017).

A epilepsia é um distúrbio da função cerebral caracterizado pela ocorrência periódica e imprevisível de convulsões; assim, um indivíduo que teve uma única convulsão não apresenta necessariamente epilepsia (MCNAMARA, 2005; GRIFFIN; LOWENSTEIN, 2009), até 10% das pessoas no mundo têm uma crise durante a vida (OMS, 2017). Cabe destacar que a convulsão se refere a uma breve alteração comportamental causada pela ativação desordenada, sincrônica e rítmica de grupos de neurônios cerebrais; em outras palavras, representa uma manifestação clínica da atividade elétrica anormal no cérebro (MCNAMARA, 2005; GRIFFIN; LOWENSTEIN, 2009).

Segundo a Liga Internacional Contra a Epilepsia, esta doença é caracterizada de forma prática por uma das seguintes condições: pelo menos duas crises não provocadas (ou duas crises reflexas) ocorrendo num intervalo superior a 24 horas; uma síndrome não provocada (ou uma crise reflexa) e chance de uma nova crise estimada em pelo menos 60%, e diagnóstico de síndrome epiléptica. Esta doença é considerada resolvida em indivíduos que tiveram uma síndrome epiléptica dependente da idade e agora passaram a idade aplicável ou naqueles que apresentaram a última crise há mais de 10 anos e estão há pelo menos 5 anos sem usar medicações antiepiléticas (FISHER et al., 2014).

Das pessoas com epilepsia, quase 80% vivem em países de baixa e média renda, como é o caso do Brasil; e cerca de três quartos destas pessoas não recebem o tratamento de que necessitam. Alguns fatores que podem explicar esta alta prevalência são: maior risco de doenças endêmicas nestes países, como neurocisticercose; maior incidência de lesões no trânsito; lesões relacionadas ao nascimento; e variações na infra-estrutura médica (OMS, 2017).

As convulsões podem variar de intensidade desde breves lapsos de atenção até convulsões severas e prolongadas. A frequência também pode variar desde uma convulsão por ano até várias convulsões por dia (OMS, 2017). Os sintomas são determinados pelo local da descarga primária e a extensão de seu espalhamento; o que se inicia como uma descarga anormal local, pode a seguir se espalhar para outras áreas do cérebro (RANG et al., 2004). Eles também dependem das funções normalmente realizadas pelo local no córtex cerebral no qual se produz a convulsão; por exemplo, uma convulsão que envolva o córtex motor se associa a um abalo clônico da parte do corpo controlada por essa região cortical (MCNAMARA, 2005).

O paciente epilético pode sofrer com convulsões que ocorrem de forma contínua ou repetida, sem recuperação completa da consciência, constituindo uma emergência médica denominada *Status Epilepticus* (ARANDAS; SENA, 2010). Como emergência médica, necessita de uma terapêutica eficaz, iniciada o mais precocemente possível (BENTES; PIMENTEL, 2003); quanto maior o tempo durante o qual o episódio de estado epilético permanecer sem tratamento, mais complicado será o seu controle, aumentando o risco de lesão cerebral permanente (MCNAMARA, 2005).

3.1.2 Fisiologia

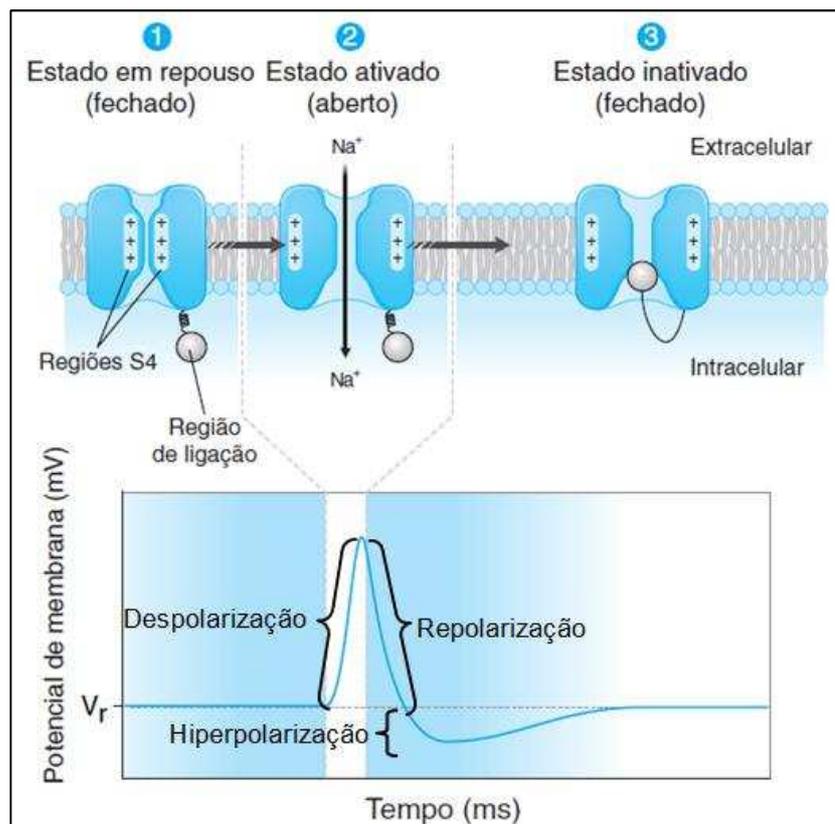
Estudos farmacológicos referentes às convulsões corroboram a tese que a redução da atividade inibitória sináptica ou o aumento da atividade excitatória sináptica desencadeia uma convulsão. Os neurotransmissores que medeiam grande parte da transmissão sináptica no cérebro dos mamíferos são aminoácidos, com o ácido gama-aminobutírico (GABA) e o ácido glutâmico, constituindo os principais neurotransmissores inibitórios e excitatórios, respectivamente (MCNAMARA, 2005).

Alterações agudas na disponibilidade de neurotransmissores excitatórios, causadas pela ingestão da toxina ácido domóico (análogo estrutural do ácido glutâmico) ou alterações no efeito dos neurotransmissores inibitórios propiciadas pela injeção de penicilina (um antagonista GABA_A), podem resultar em atividade convulsiva maciça no cérebro humano. Esses exemplos ilustram que os complexos circuitos no interior do cérebro se encontram em equilíbrio entre fatores excitatórios e inibitórios, e que a ocorrência de alterações em um desses mecanismos de controle pode causar disfunção significativa (GRIFFIN; LOWENSTEIN, 2009).

No sistema nervoso central, encontramos dois elementos importantes que, além de estarem envolvidos no controle preciso da sinalização neuronal, também funcionam para impedir a descarga repetitiva e sincrônica característica de uma convulsão. São eles (GRIFFIN; LOWENSTEIN, 2009):

1) **Em nível celular:** a inativação dos canais para Na^+ e a hiperpolarização mediada pelos canais para K^+ durante um potencial de ação induzem o “período refratário”, o que impede a descarga repetitiva anormal nas células neuronais. Após ser iniciado no cone de implantação, o potencial de ação é propagado através de canais iônicos sensíveis à voltagem, por correntes alternadas de influxo de Na^+ despolarizante e efluxo de K^+ hiperpolarizante. Durante um potencial de ação (Figura 3.1), os canais para Na^+ se apresentam em três estados diferentes: o estado em repouso (1), antes da despolarização; o estado ativado (2), durante a despolarização; e o estado inativado (3), pouco depois do pico de despolarização.

Figura 3.1 – Conformações do canal para sódio durante o potencial de ação



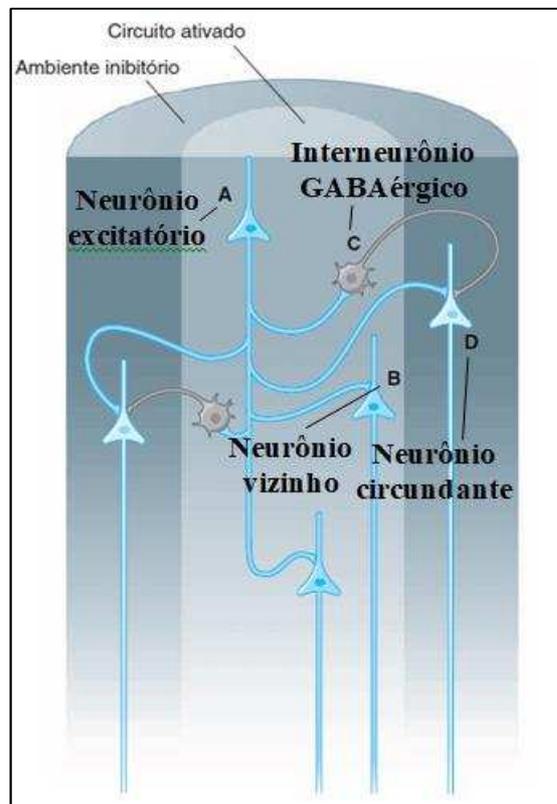
Fonte: Adaptado de GRIFFIN; LOWENSTEIN, 2009.

Como os canais para Na^+ adotam o estado inativado em resposta à despolarização até que a membrana seja suficientemente repolarizada, os potenciais de ação são intrinsicamente autolimitantes. A abertura dos canais para K^+ repolariza a célula, entretanto o elevado efluxo

de K^+ hiperpolariza transitoriamente a membrana celular além de seu potencial de repouso, aumentando ainda mais o intervalo de tempo antes que possa ser gerado um novo potencial de ação. Logo, em condições fisiológicas, as propriedades bioquímicas dos canais para Na^+ e para K^+ estabelecem um limite sobre a frequência de descarga, ajudando a evitar a descarga repetitiva que caracteriza muitos tipos de convulsões;

2) **Em nível das redes neurais:** as redes neurais garantem a especificidade da sinalização neuronal ao limitar os efeitos de determinado potencial de ação a uma área definida. Conforme observado na rede neural simplificada ilustrada na Figura 3.2, o neurônio (representado pela letra A) emite projeções excitatórias imediatamente para neurônios vizinhos (representados pela letra B) e para interneurônios GABAérgicos (representados pela letra C) que transmitem sinais inibitórios a neurônios circundantes (representados pela letra D). Esse contraste de amplificação local e inibição dos neurônios circundantes resulta na denominada inibição circundante, que é essencial para a função normal do sistema nervoso, pois esse fenômeno não apenas amplifica os sinais locais, como também proporciona um isolamento e uma proteção contra a sincronia observada em áreas circundantes. Vários distúrbios convulsivos parecem resultar da ruptura desse complexo equilíbrio.

Figura 3.2 – Inibição circundante em uma rede neural simplificada

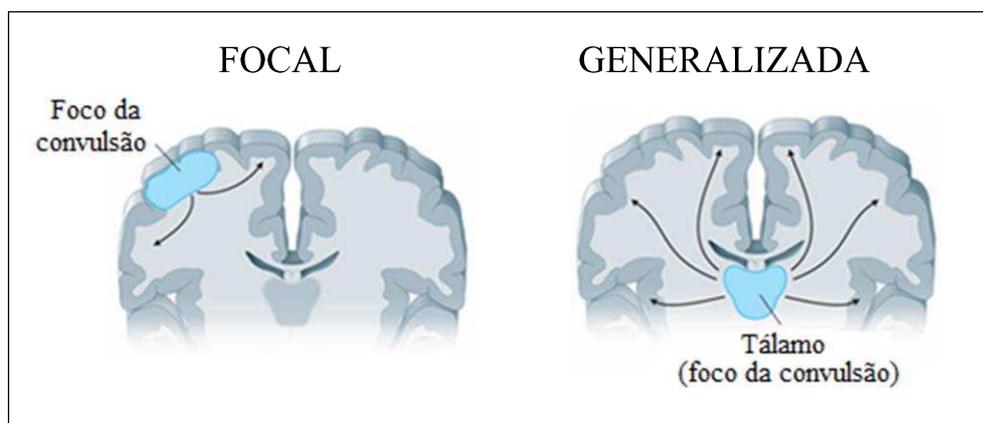


Em condições fisiológicas, esses dois elementos impedem a propagação rápida e descontrolada da atividade elétrica; no entanto, existem numerosas alterações potenciais no cérebro que podem enfraquecer essas forças inibitórias, como lesão e degeneração dos neurônios GABAérgicos, mutações gênicas que alteram a função dos canais e gradientes iônicos anormais induzidos por lesões expansivas (GRIFFIN; LOWENSTEIN, 2009).

3.1.3 Classificação

A classificação da epilepsia é importante pois informa os riscos de comorbidades, o risco de mortalidade e auxilia na seleção de terapias antiepilépticas (SCHEFFER et al.; 2017). As epilepsias são classificadas segundo o eixo topográfico em dois grandes grupos: focais e generalizadas. As epilepsias focais manifestam-se por crises epilépticas que iniciam de forma localizada numa área específica do cérebro, suas manifestações clínicas dependem do local de início e da velocidade de propagação da descarga epileptogênica. Estas crises podem ocorrer sem comprometimento da consciência, sendo denominadas de focais simples, ou com comprometimento da consciência, designadas de focais complexas. Já as epilepsias generalizadas manifestam-se por crises que apresentam início envolvendo ambos os hemisférios cerebrais de forma simultânea, geralmente são acompanhadas de alteração da consciência (BRASIL, 2015).

Figura 3.3 – Grupos principais de epilepsia



Fonte: Modificado de GRIFFIN; LOWENSTEIN, 2009.

As manifestações clínicas de alguns tipos de convulsão podem ser observadas a seguir (MCNAMARA, 2005):

1) Epilepsias focais:

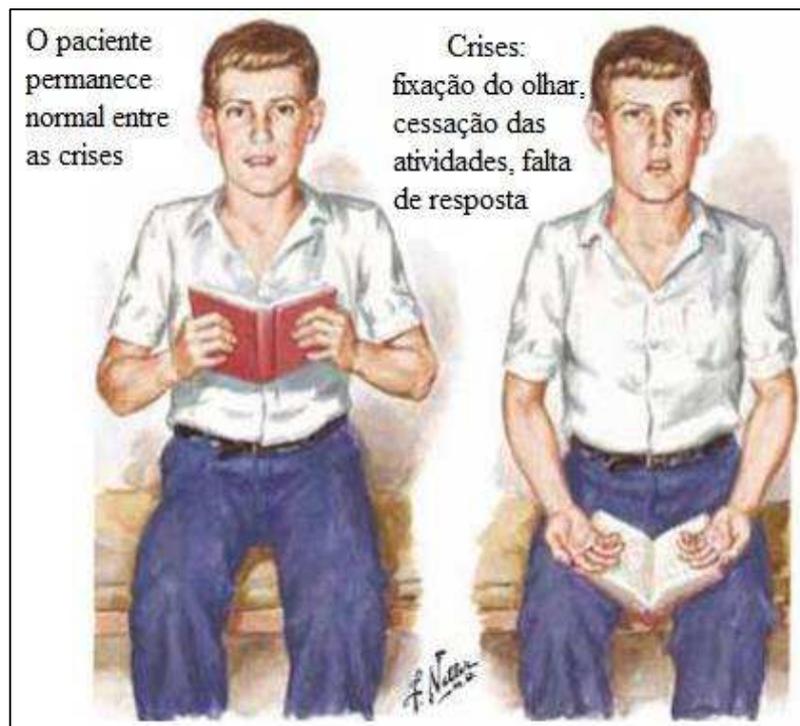
- Focal simples: várias manifestações determinadas pela região do córtex cerebral ativada pela convulsão, com duração de aproximadamente 20-60 segundos, por exemplo, no caso do córtex motor representar o polegar esquerdo, o resultado será o abalo clônico do polegar esquerdo; a principal característica é a preservação da consciência;

- Focal complexa: comprometimento da consciência durando de 30 segundos a 2 minutos, frequentemente associado a movimentos sem finalidade, por exemplo, contorcer as mãos;

2) Epilepsias generalizadas:

- Crise de ausência (Figura 3.4): início repentino de comprometimento da consciência associado à cessação das atividades e à fixação do olhar, geralmente durando menos de 30 segundos;

Figura 3.4 – Crise de ausência



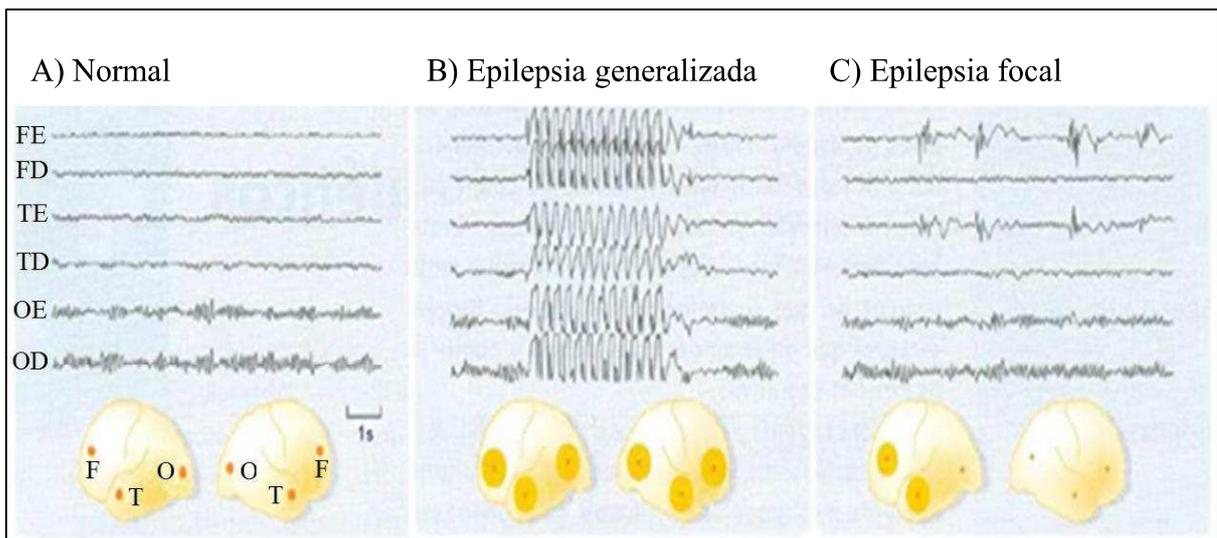
Fonte: Adaptado de RAFFA; RAWLS; BEYZAROV, 2008. Autor da ilustração: Frank H. Netter.

- Convulsão tônico-clônica: perda da consciência e contrações musculares (tônicas) de todos os músculos do corpo, seguidas de períodos de contração muscular alternando com períodos de relaxamento (clônico), durando geralmente de 1 a 2 minutos;

- Convulsão mioclônica: contração breve dos músculos, tipo choque, podendo ser generalizada ou limitada à parte de um membro.

A atividade elétrica durante uma convulsão pode ser detectada por registro eletroencefalográfico (EEG), a partir de eletrodos distribuídos por toda a superfície do couro cabeludo (RANG et al., 2004). Através do resultado do EEG é possível identificar o tipo de epilepsia apresentada pelo paciente. Como exemplo, na epilepsia generalizada, observa-se uma descarga rítmica característica durante o período da crise, o que podemos notar na Figura 3.5B, que mostra um registro EEG de atividade generalizada com descarga “ponta e onda”; na epilepsia focal, a descarga EEG normalmente é confinada a um hemisfério, como podemos observar na Figura 3.5C, que apresenta um registro EEG com descargas anormais sincrônicas nas regiões frontal e temporal esquerdas (SCHEFFER et al.; 2017).

Figura 3.5 – Registros eletroencefalográficos no cérebro normal e apresentando convulsão



F = região frontal, T = região temporal, O = região occipital, E = esquerda, D = direita.

Fonte: Adaptado de RANG et al., 2004.

3.1.4 Tratamento medicamentoso

O tratamento realizado utilizando-se os fármacos antiepilépticos tem por objetivo propiciar a melhor qualidade de vida possível para o paciente, através do controle adequado das crises epiléticas, com um mínimo de efeitos adversos (BRASIL, 2015). Infelizmente, os fármacos utilizados atualmente não controlam a convulsão de alguns pacientes e também causam efeitos adversos, cuja intensidade varia de mínima disfunção do SNC a morte por insuficiência hepática. De forma a atenuar os efeitos adversos, é preferível tratar o paciente

com um único fármaco. No entanto, o tratamento com vários fármacos pode ser necessário, especialmente quando o paciente apresenta dois ou mais tipos de epilepsia (MCNAMARA, 2012).

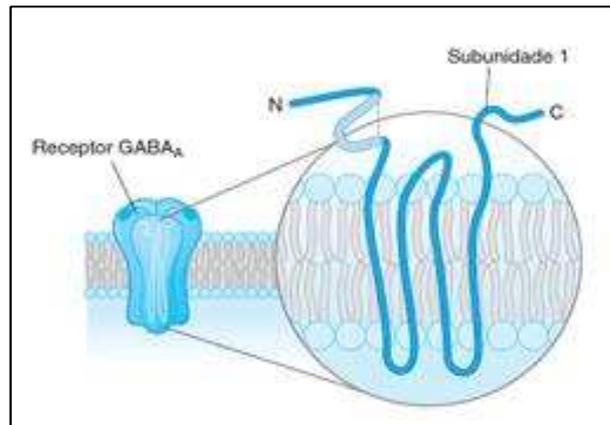
Além dos problemas relatados, cabe destacar que o uso de fármacos antiepiléticos resulta em problemas de grande importância para a saúde das mulheres, como: diminuição da eficácia de anticoncepcionais orais, que pode ser explicada pela aceleração do metabolismo dos anticoncepcionais causada pelos antiepiléticos que induzem as enzimas hepáticas; e efeitos teratogênicos potenciais, os bebês nascidos de mães epiléticas têm risco duas vezes maior de apresentar malformações congênitas graves do que os de mães não epiléticas (MCNAMARA, 2012).

A determinação do tipo de crise epilética que o paciente apresenta é importante na escolha do fármaco a ser utilizado, visto que os mecanismos de geração e propagação da crise diferem para cada situação e os fármacos antiepiléticos agem por diferentes mecanismos que podem ou não ser favoráveis ao tratamento (BRASIL, 2015). Os fármacos utilizados são classificados de acordo com o mecanismo de ação em quatro categorias principais: inibidores dos canais para Ca^{2+} , estimuladores da inibição mediada pelos canais para Na^+ , potencializadores da inibição mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) e inibidores dos receptores do ácido glutâmico (GRIFFIN; LOWENSTEIN, 2009). Dentre os fármacos que atuam potencializando a inibição mediada pelo GABA, encontram-se os benzodiazepínicos, classe a qual pertence o diazepam, que atua como ligante nos complexos estudados neste trabalho.

3.1.4.1 Farmacologia dos benzodiazepínicos

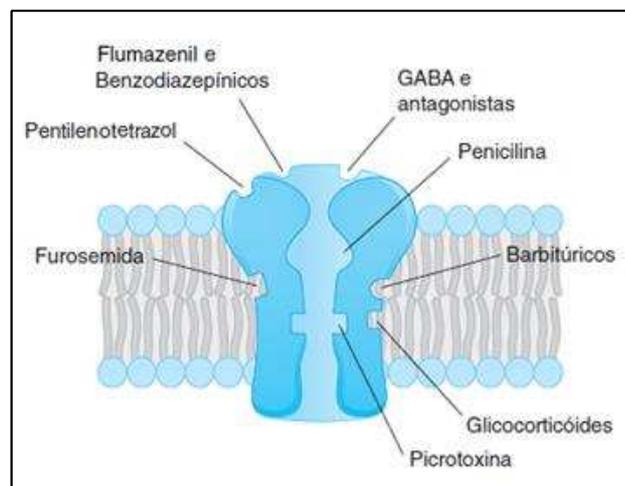
Os benzodiazepínicos aumentam a inibição mediada pelo GABA, agindo sobre receptores $GABA_A$ através da ligação direta a um local específico distinto daquele da ligação do GABA, atuando sobre o complexo receptor/canal iônico (CHARNEY; MIHIC; HARRIS, 2005). Os receptores $GABA_A$ são os mais abundantes dessa classe no sistema nervoso central, os quais correspondem a glicoproteínas transmembranas pentaméricas organizadas para formar um poro iônico central seletivo para o cloreto, (Figura 3.6), que é aberto quando ocorre a ligação de duas moléculas de GABA. Além do local de ligação do GABA e dos benzodiazepínicos, os receptores $GABA_A$ contêm vários sítios moduladores, onde ocorre ligação de outros ligantes endógenos e/ou outros fármacos (Figura 3.7), cuja localização definitiva desses sítios ainda precisa ser estabelecida (FORMAN et al., 2009).

Figura 3.6 – Estrutura pentamérica do receptor GABA_A



Fonte: FORMAN et al., 2009.

Figura 3.7 – Principais sítios de ligação no receptor GABA_A



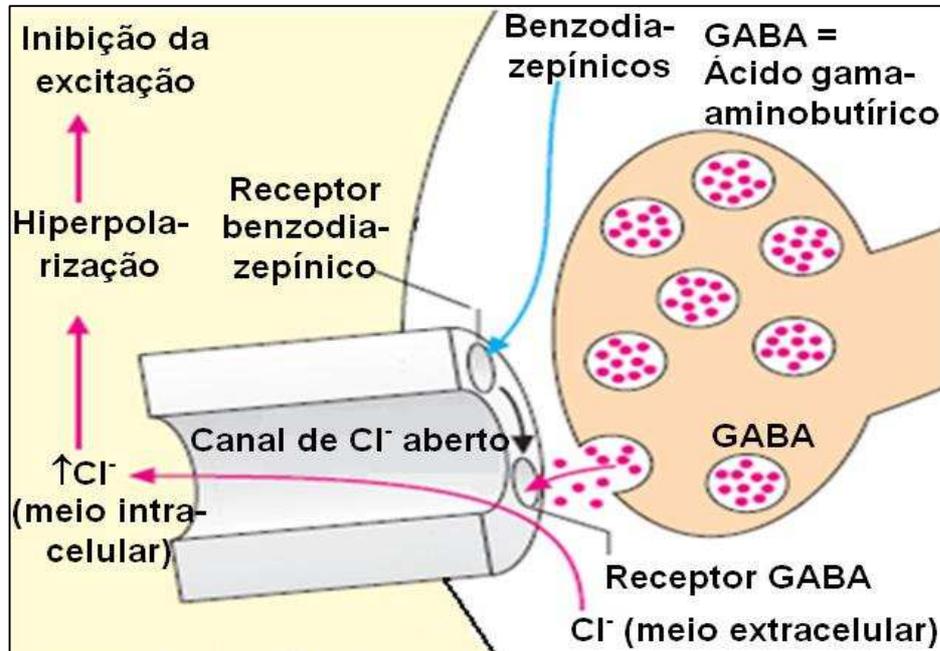
Fonte: Modificado de FORMAN et al., 2009.

É importante ressaltar que os benzodiazepínicos não substituem o GABA, mas aumentam os efeitos inibitórios deste neurotransmissor. Eles se ligam de forma alostérica ao receptor GABA_A aumentando a condutância do canal para cloreto através do aumento da frequência de abertura do canal fechado (RISS et al., 2008), resultando na hiperpolarização do neurônio pós-sináptico, levando a uma diminuição da excitabilidade neuronal (Figura 3.8) (DE WAELE et al., 2013).

Os benzodiazepínicos são utilizados no *Status Epilepticus*, assim como no tratamento de crises focais e generalizadas. Esses fármacos exibem tolerância e dependência, observando-se a existência de uma síndrome de retirada que pode significar uma acentuação da gravidade e da frequência das crises epilépticas (ARANDAS; SENA, 2010). Além disso, causam efeitos adversos proeminentes, incluindo sonolência, tontura e ataxia. Por isso, são

tipicamente utilizados apenas para interrupção aguda das convulsões (GRIFFIN; LOWENSTEIN, 2009).

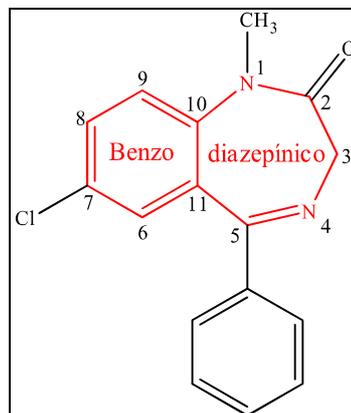
Figura 3.8 – Mecanismo de ação dos benzodiazepínicos



Fonte: Modificado de LÜLLMANN et al., 2000.

O fármaco de escolha para interromper as crises no *Status Epilepticus* é o diazepam (Figura 3.9), sua vantagem é que ele age muito rapidamente quando comparado com os outros fármacos anticonvulsivantes (RANG et al., 2004). No entanto, tem a desvantagem de apresentar uma ação anticonvulsivante não duradoura, sendo necessário administrar também fenitoína endovenosa (ARANDAS; SENA, 2010).

Figura 3.9 - Estrutura do diazepam, 7-Cloro-1-metil-2-oxo-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepina, com destaque ao anel benzodiazepínico



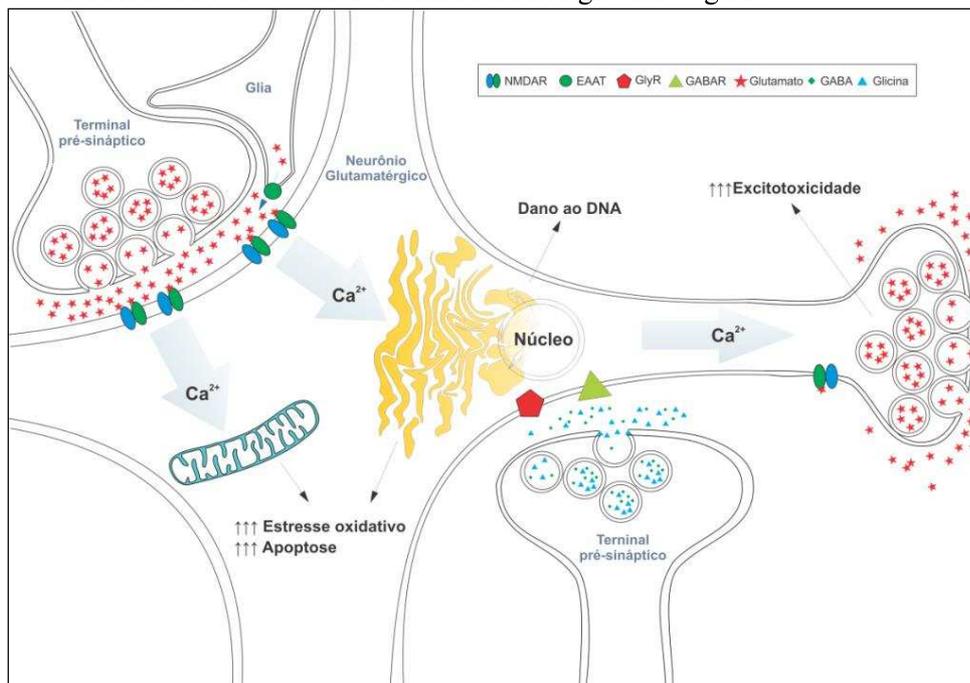
Fonte: Autora, 2017.

3.1.5 Epilepsia e estresse oxidativo

O excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO), causado pelo desequilíbrio entre geração e eliminação destas espécies, frequentemente resulta em danos celulares graves. Este fenômeno é conhecido como estresse oxidativo e está envolvido na patogênese de doenças neurodegenerativas como a epilepsia (OLIVEIRA et al., 2016).

Através de estudos experimentais verificou-se que as convulsões repetidas resultam em aumento do nível de ERO (MAZHAR; MALHI; SIMJEE, 2017) que desempenham um importante papel no dano neuronal induzido por convulsões (DEVI; MANOCHA; VOHORA, 2008). Este dano oxidativo parece resultar de mecanismos de excitotoxicidade, reconhecidos por participar de várias condições patológicas que levam ao desenvolvimento de convulsões, caracterizado pela ativação excessiva de receptores glutamatérgicos, especialmente os de N-metil-D-aspartato (NMDA), ver Figura 3.10. Este fenômeno levaria a um aumento de cálcio intracelular, resultando em disfunção mitocondrial e geração de ERO e de fatores pró-apoptóticos, fundamentais para o dano e morte celular (OLIVEIRA et al., 2016). Cabe salientar que o estresse oxidativo mitocondrial crônico e a disfunção resultante podem tornar o cérebro mais suscetível às crises epilépticas; além disso, vários distúrbios mitocondriais estão associados a um fenótipo epiléptico (DEVI; MANOCHA; VOHORA, 2008).

Figura 3.10 – Processo de excitotoxicidade em neurônios glutamatérgicos

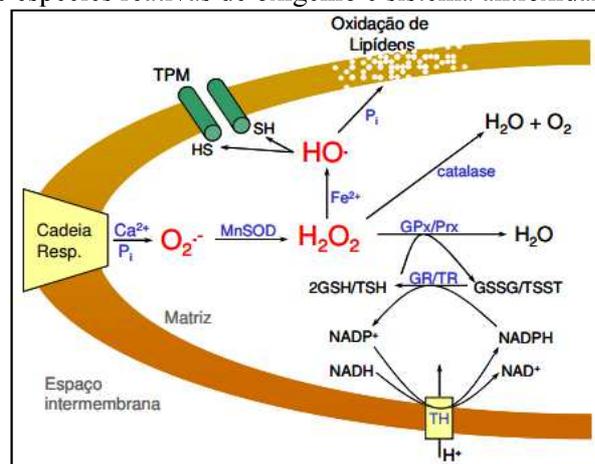


Fonte: PINTO; RESENDE, 2014.

A cadeia respiratória é uma das principais fontes de radicais livres prejudiciais no organismo humano. Os radicais livres que escapam dos complexos respiratórios podem reagir com o oxigênio molecular (O_2), resultando na formação de ânions superóxidos ($O_2^{\cdot-}$); estes, por sua vez, são rapidamente convertidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que ao reagir com íons de ferro (Fe^{+2}) ou cobre (Cu^{+2}), através da reação de Fenton, resultam na produção de radicais hidroxilas ($\cdot OH$), que são extremamente tóxicos. Os ânions superóxidos podem interagir com o NO levando também a produção de um ânion altamente tóxico, denominado ânion peroxinitrito (DEVI; MANOCHA; VOHORA, 2008). Os radicais $\cdot OH$ e o ânion peroxinitrito são bastante tóxicos porque causam a oxidação dos grupos sulfidrilas de proteínas e a oxidação de lipídios de membrana, alterando a permeabilidade da membrana (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001).

Existem vários mecanismos de defesa que neutralizam os radicais livres no organismo, estes mecanismos antioxidantes podem ser tanto enzimáticos quanto não-enzimáticos. As enzimas antioxidantes mais importantes são: superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). A nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) e a glutaciona reduzida (GSH) também apresentam papéis importantes nos mecanismos de defesa do organismo. A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido ao H_2O_2 . A CAT catalisa a degradação de H_2O_2 em água e oxigênio. A GPx atua sobre a GSH e H_2O_2 para produzir glutaciona oxidada (GSSG) e água. A coenzima NADPH é necessária para a redução de GSSG para GSH, esta reação é catalisada pela glutaciona redutase. A redução da glutaciona é importante para proteger os grupos sulfidrilas de proteínas e prevenir a peroxidação de lipídios de membrana (DEVI; MANOCHA; VOHORA, 2008). Ver Figura 3.11.

Figura 3.11 – Geração de espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidante.



Fonte: Adaptado de KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001.

Existem muitas evidências de estudos experimentais e clínicos que apoiam a ideia do envolvimento do estresse oxidativo na patogênese da epilepsia (MAZHAR; MALHI; SIMJEE, 2017). Um exemplo é o estudo desenvolvido por Rumià e colaboradores (2013), comparando biomarcadores de estresse oxidativo no neocórtex de pacientes epiléticos com o de pacientes não-epiléticos, no qual os resultados corroboram com os encontrados em modelos experimentais de animais e sugerem que o estresse oxidativo pode ser um fenômeno chave também na epilepsia humana. Além disso, o aumento substancial dos níveis de ânion superóxido e de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG, composto produzido pela oxidação do DNA) observado neste estudo, contribui para a conexão entre convulsões crônicas e danos neurais mediados por ERO.

Por causa desta relação entre estresse oxidativo e epilepsia, muitos estudos sustentam a ideia de que os medicamentos com ação antioxidante podem melhorar a atividade convulsiva e os danos neuronais (MAZHAR; MALHI; SIMJEE, 2017). Vários antioxidantes foram avaliados quanto à sua eficácia em diversos modelos de convulsões e os resultados mostraram que estes compostos apresentaram efeitos protetores contra as manifestações convulsivas e as alterações bioquímicas que acompanham as convulsões (DEVI; MANOCHA; VOHORA, 2008).

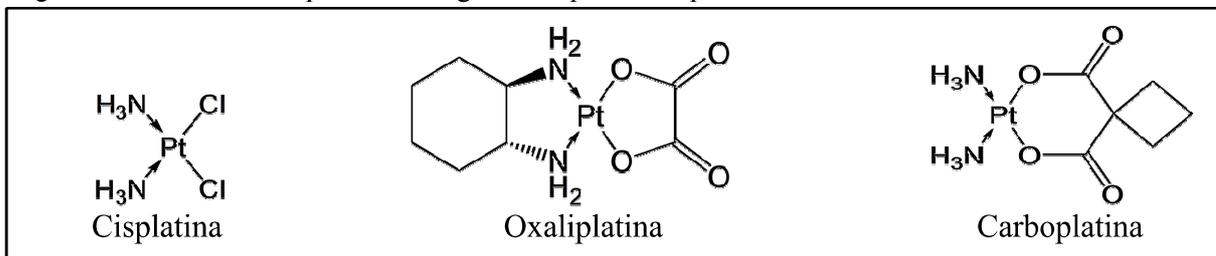
3.2 Química Inorgânica Medicinal

Geralmente, a primeira ideia que surge ao se pensar em fármacos é a de que os mesmos são compostos orgânicos; entretanto, vários destes apresentam metais em sua estrutura e são utilizados na clínica médica, estudados na área de Química Inorgânica Medicinal (BERALDO; MORTIMER, 2005), que combina elementos da Química, Bioquímica, Farmacologia e Química Medicinal (ROAT-MALONE, 2002). Um grande interesse por essa área foi despertado com a descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina, $cis[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ (Figura 3.12) pelo físico Barnett Rosenberg, em 1965. Esta espécie química, diferente da maioria dos fármacos, não apresenta nenhum átomo de carbono em sua estrutura, mas proporcionou, a partir de 1978, uma diminuição de cerca de 80% nas mortes de homens com tumor de testículo (BERALDO, 2005).

A cisplatina é utilizada, atualmente, em vários outros tipos de tumores, como câncer de pulmão, cabeça, estômago, esôfago e mama, sobretudo em associação com outros fármacos, em vários esquemas terapêuticos (FONTES; CÉSAR; BERALDO, 2005); além disso, outros complexos de platina, como oxaliplatina e carboplatina (Figura 3.12), são

utilizados no tratamento de tumores e estima-se que 50 a 70% dos pacientes com câncer recebam tratamento com complexos de platina (BERALDO, 2011).

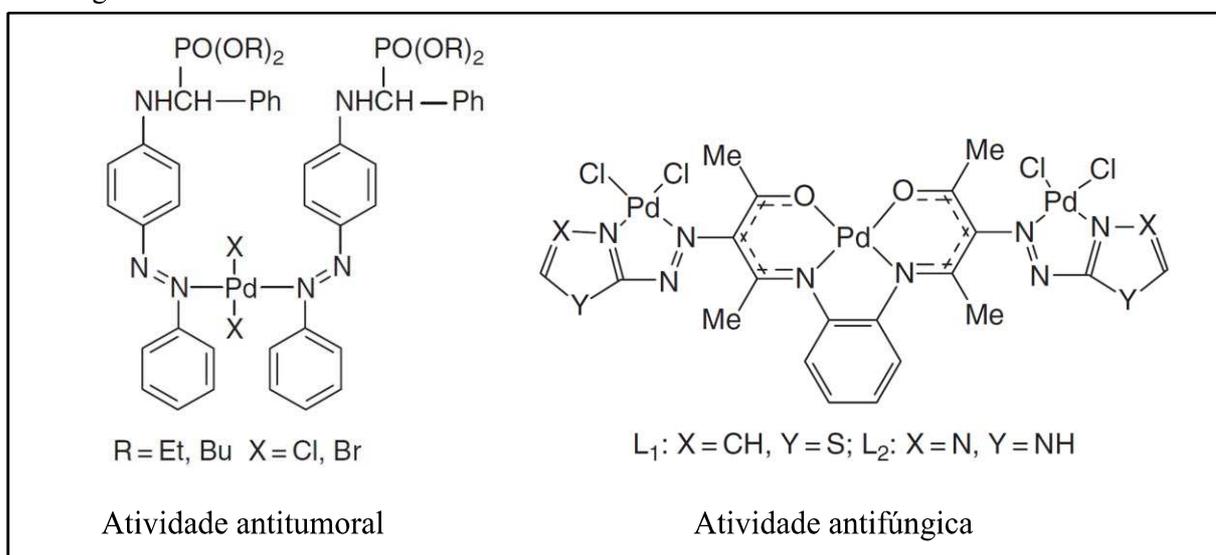
Figura 3.12 – Estrutura química de alguns complexos de platina com atividade antitumoral



Fonte: Autora, 2017.

Devido à semelhança química do paládio com a platina, alguns complexos de paládio têm sido estudados visando a obtenção de fármacos. Existe na literatura muitos compostos de paládio que possuem boa atividade antitumoral e, também, muitos apresentam atividade anti-infecciosa (Figura 3.13). No entanto, somente o isótopo radioativo de ¹⁰³Pd tem utilidade clínica, sendo empregado no tratamento do câncer de próstata em estágio avançado (ALVES; SILVA; GUERRA, 2010; SILVA; GUERRA, 2011).

Figura 3.13 – Estrutura química de alguns complexos de paládio com atividade antitumoral e antifúngica



Fonte: GAROUFIS; HADJIKAKOU; HADJILIADIS, 2005.

A partir da descoberta da cisplatina, deu-se início a uma corrida na busca por novos compostos metálicos com propriedades farmacológicas, metalofármacos, bem como, na investigação dos mecanismos de ação desses compostos e na tentativa de melhorar a atividade

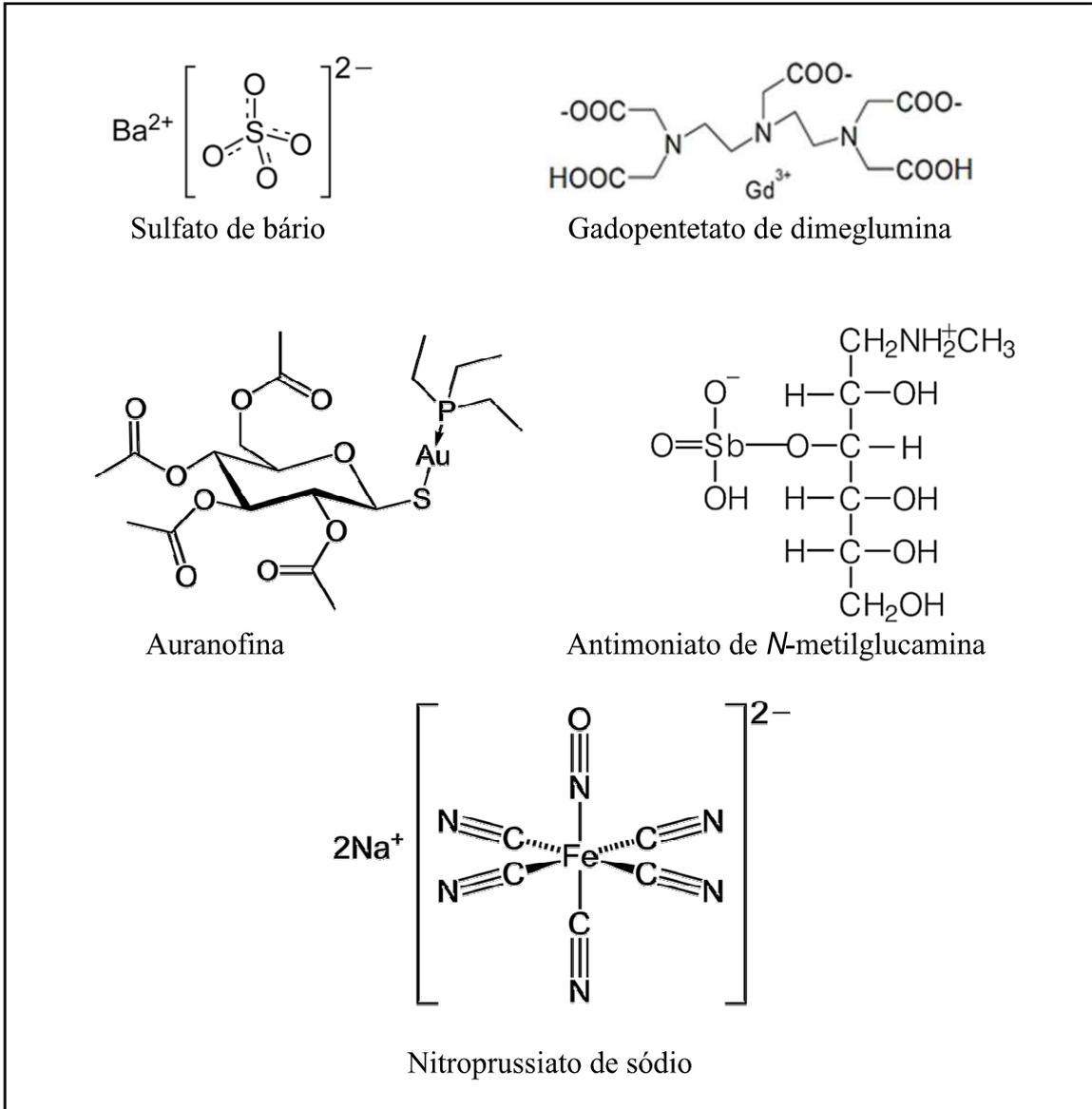
biológica de compostos puramente orgânicos com a adição de metais em sua estrutura; modificando, assim, o cenário encontrado em meados do século XX, no qual observamos o receio na elaboração de fármacos contendo metais em sua estrutura. De fato, com essa descoberta, retoma-se a utilização de compostos metálicos na Medicina, porém agora de forma menos empírica, tendo-se como base o conhecimento das estruturas moleculares e seus mecanismos de ação (BERALDO, 2005; RONCONI; SADLER, 2007).

Um dos principais desafios no desenvolvimento de metalofármacos consiste em modular a reatividade da porção metal que, apesar de desencadear as propriedades farmacológicas desejadas, muitas vezes relacionadas a seus diversos estados de oxidação e às reações que sofrem *in vivo*, tais como hidrólise e substituição de ligantes, está associada, por muitas vezes, à sua toxicidade. Porém, com um adequado planejamento racional de fármacos, pode-se realizar o *design* de moléculas a partir da escolha de metais e ligantes de forma a atingir as características desejadas de atividade e seletividade do composto elaborado, direcionando o fármaco para o local desejado, diminuindo os efeitos colaterais (BERALDO, 2011).

O emprego de ligantes com comprovada bioatividade pode ser uma interessante estratégia com o intuito de obter compostos mais potentes e/ou levar a um aumento de sua biodisponibilidade e/ou ainda à reversão da resistência celular. Como exemplos dessa estratégia, têm-se complexos de rutênio e cobre, investigados para o tratamento da doença de Chagas, e complexos de ouro com ligantes antimaláricos, que se revelaram promissores (BERALDO, 2011).

Mesmo diante de vários desafios, a elaboração de metalofármacos apresenta crescimento significativo tanto na medicina terapêutica quanto na medicina diagnóstica (RONCONI; SADLER, 2007). Como exemplos de compostos contendo metais utilizados na medicina terapêutica, podemos citar o nitroprussiato de sódio (complexo de ferro II), único complexo metal-nitrosila utilizado clinicamente para controlar a pressão arterial; o antimoniato de *N*-metilglucamina, complexo de antimônio(V), utilizado para o tratamento da leishmaniose; e a auranofina, complexo de ouro(I), utilizada para o tratamento da artrite reumatóide, Figura 3.14. E como exemplos de compostos contendo metais utilizados na medicina diagnóstica (Figura 3.14) têm-se o sulfato de bário, comumente utilizado como contrastante em Raios X do trato gastrointestinal; e o gadopentetato de dimeglumina, complexo de gadolínio(III), utilizado na detecção de anormalidades na circulação sanguínea do cérebro (BENITE; MACHADO; BARREIRO, 2007).

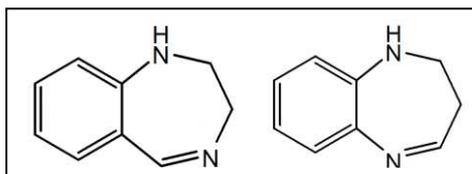
Figura 3.14 – Estrutura química de alguns metalofármacos



Fonte: BENITE; MACHADO; BARREIRO, 2007.

3.3 Complexos metálicos derivados de benzodiazepínicos

Os benzodiazepínicos são bem conhecidos por suas capacidades complexantes (SURESH et al., 2008). Existem relatos na literatura de complexos metálicos derivados de dois tipos de benzodiazepínicos: 1,4- e 1,5-benzodiazepínicos, exemplificados a seguir, cujas estruturas básicas podem ser visualizadas na Figura 3.15.

Figura 3.15 – Estrutura química básica dos 1,4- e 1,5-benzodiazepínicos, respectivamente

Fonte: Autora, 2017.

Há relatos na literatura da formação de complexos derivados de 1,5-benzodiazepínicos com diversos metais: paládio(II) (AVERSA et al., 1990); platina(II) (AVERSA et al., 1991); estanho(IV) (SURESH et al., 2008); ferro(II); e cobalto(II) (ZHANG et al., 2007). Estes fragmentos 1,5-benzodiazepínicos podem se apresentar coordenados ao centro metálico como ligantes monodentados ou bidentados, cuja ligação metal-ligante ocorre através de um ou dos dois nitrogênios do anel benzodiazepínico; em alguns casos eles estão ligados a dois metais através de átomos de nitrogênio.

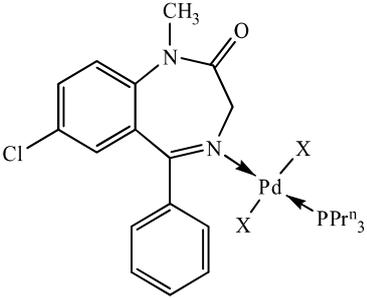
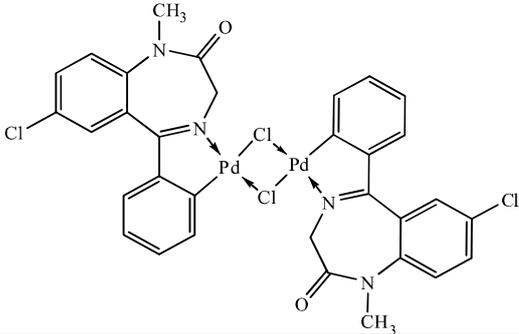
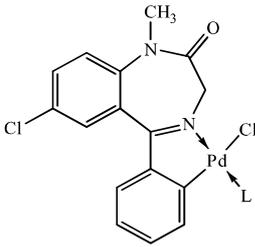
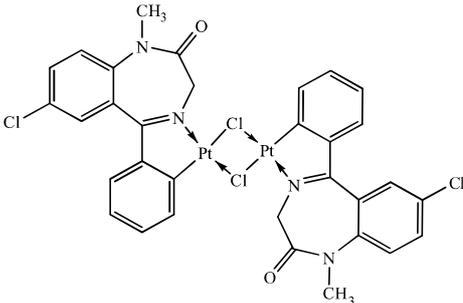
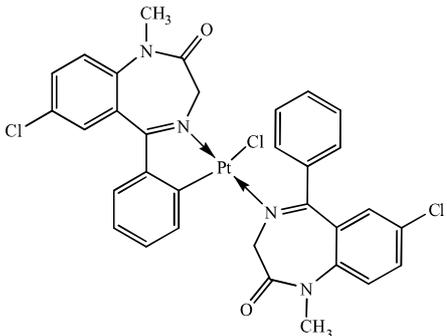
Os complexos derivados de 1,4-benzodiazepínicos relatados, com exceção dos que apresentam diazepam como ligante, são formados pela complexação com os seguintes metais: cobre(II) (FORIZS et al., 1997; FORIZS et al., 1999; VIŠNJEVAC et al., 2001); zinco(II) (VIŠNJEVAC et al., 2002); paládio(II) (CINELLU et al., 1991; VIŠNJEVAC et al., 2002; SPENCER et al., 2008; SPENCER et al., 2009); e platina(II) (AVERSA et al., 1991). Nesses casos, a estrutura do complexo metálico pode se apresentar de maneira monodentada, bidentada ou tridentada e cuja ligação metal-ligante ocorre através de somente um nitrogênio do anel benzodiazepínico ou também a um ou dois átomos pertencentes a grupos substituintes do anel diazepínico, mais especificamente ao nitrogênio, oxigênio e/ou carbono.

Todos os complexos derivados do diazepam encontrados na literatura podem ser visualizados no Quadro 3.1.

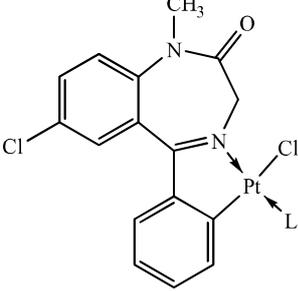
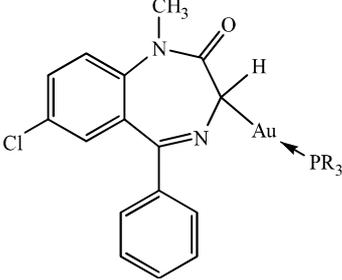
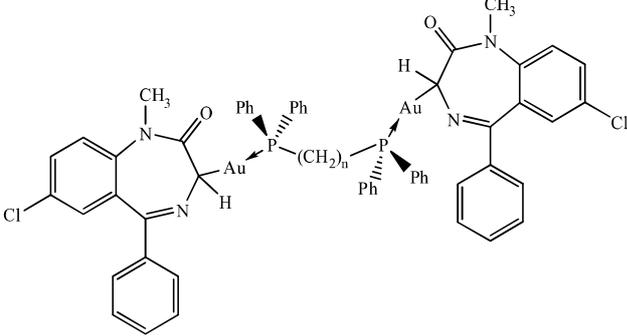
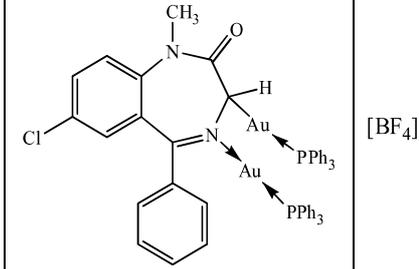
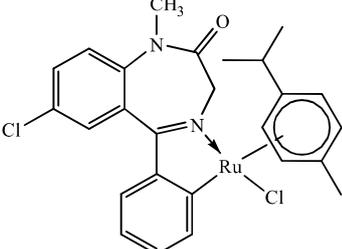
Quadro 3.1 – Complexos metálicos derivados do diazepam relatados na literatura

Metais	Complexos metálicos	Referências
Cobre(II)		Mosset et al., 1980

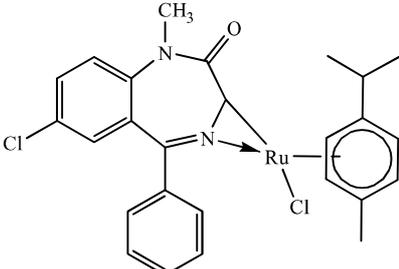
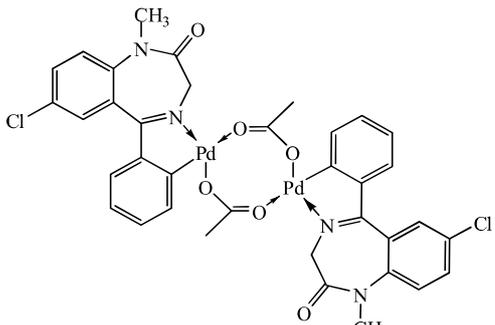
Continua

Metals	Complexos metálicos	Referências
Paládio(II)	 <p>Onde: X = Cl ou I</p>	Cusumano et al., 1991
Paládio(II)		Cinellu et al., 1991; Barros et al., 2016
Paládio(II)	 <p>Onde: L = PPh₃ ou CO</p>	Cinellu et al., 1991
Platina(II)		Stoccoro et al., 1994
Platina(II)		Stoccoro et al., 1994

Continua

Metals	Complexos metálicos	Referências
Platina(II)	 <p>Onde: L = PPh₃; 3,5-Me₂-py ou CO</p>	Stoccoro et al., 1994
Ouro(I)	 <p>Onde: R = C₆H₅; C₂H₅ ou C₆H₄CH₃-4</p>	Minghetti et al., 1998
Ouro (I)	 <p>Onde: n = 2 ou 3</p>	Minghetti et al., 1998
Ouro (I)	 <p>[BF₄]</p>	Minghetti et al., 1998
Rutênio(II)		Pérez et al., 2002

Continua

Metals	Complexos metálicos	Referências
Rutênio(II)		Pérez et al., 2002
Paládio(II)		Barros et al., 2016

Fonte: Autora, 2017.

Quanto ao estudo da atividade biológica desses complexos derivados de benzodiazepínicos, foram encontrados, até o momento, somente três artigos; no entanto, apenas o artigo que desenvolvemos anteriormente avaliou a atividade anticonvulsivante dos complexos (BARROS et al., 2016). Um dos artigos referidos apresenta estudos *in vitro* da atividade citostática e antiviral de complexos de Pd(II), Zn(II) e Cu(II) derivados de 1,4-benzodiazepínicos; um total de seis complexos (dois complexos de cada metal) foram analisados e os resultados revelaram que nenhum dos complexos apresentaram atividade citostática em concentrações terapeuticamente significativas e todos os complexos apresentaram nenhuma ou apenas atividade antiviral marginal (VIŠNJEVAC et al., 2002).

Outro artigo apresenta estudos *in vitro* de citotoxicidade contra uma linhagem celular de câncer humano e da atividade inibitória sobre a catepsina B (enzima envolvida em eventos relacionados ao câncer) bovina, onde foram analisados sete complexos de Pd(II) derivados de 1,4-benzodiazepínicos. Os resultados mostraram que três complexos apresentam boa atividade citotóxica (sendo dois desses, excelentes inibidores de catepsina B; e um desses, inibidor moderado), três apresentam moderada atividade citotóxica (dois desses também apresentaram moderada atividade inibitória sobre catepsina B e um desses apresentou-se como um fraco inibidor), e um foi essencialmente inativo com relação à citotoxicidade (e apresentou fraca atividade inibitória sobre a catepsina B) (SPENCER et al., 2009).

O artigo que desenvolvido por este grupo de pesquisa anteriormente apresenta resultados da avaliação da atividade anticonvulsivante de dois complexos diméricos de paládio(II) derivados do diazepam que se mostraram promissores (BARROS et al., 2016). Dando continuidade a esse trabalho, o presente estudo visa avaliar a atividade biológica dos dímeros de forma mais ampla, além de sintetizar e avaliar três monômeros, buscando novas propostas terapêuticas para o tratamento da epilepsia.

4 EXPERIMENTAL

4.1 Atividades desenvolvidas e locais de realização

As atividades desenvolvidas neste trabalho e seus respectivos locais de realização encontram-se no Quadro 4.1.

Quadro 4.1 – Locais de realização das atividades experimentais

Atividades	Locais de realização
Síntese dos dímeros e monômeros de paládio(II) derivados do diazepam	Laboratório do Grupo de Catálise e Reatividade Química (GCaR) do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (IQB/UFAL), Maceió/AL
Análises de espectrometria de ressonância magnética nuclear	Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do IQB/UFAL, Maceió/AL
Análises por espectroscopia na região do infravermelho médio	Laboratório da Central Analítica do IQB/UFAL, Maceió/AL
Análise por difração de raios-x	Laboratório de Síntese Inorgânica e Cristalografia do Instituto de Química da Universidade de Brasília, Brasília/DF
Análises elementares	Central Analítica da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP
Análises de Espectrometria de Massas - MALDI-TOF	Centro de Tecnologia do Nordeste (CETENE), Recife/PE
Avaliação da atividade anticonvulsivante	Laboratório de Farmacologia Pré-clínica (LAPEC) do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe (DFS/UFS), São Cristóvão/SE
Avaliação da atividade antioxidante	Laboratório de Análises de Alimentos do Departamento de Nutrição (DNUT) da UFS, São Cristóvão/SE
Avaliação da citotoxicidade	Laboratório de Farmacologia e Imunologia (LaFI) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da UFAL, Maceió/AL

Fonte: Autora, 2017.

4.2 Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados na síntese dos complexos estão presentes no Quadro 4.2, com sua procedência e a fórmula molecular.

Quadro 4.2 – Procedência e fórmula molecular dos reagentes e solventes

Reagentes e Solventes	Fórmula Molecular	Origem
Acetato de paládio (II)	C ₄ H ₆ O ₄ Pd	Aldrich
Ácidoacético	C ₂ H ₄ O ₂	Vetec
Cloreto de lítio	LiCl	Acros Organics
Cloreto de paládio (II)	PdCl ₂	Sigma-Aldrich
Clorofórmio P.A.	CHCl ₃	Dinâmica
Diazepam	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	União Química
Hexano P.A.	C ₆ H ₁₄	Dinâmica
Metanol P.A.	CH ₄ O	Dinâmica
Piridina P.A.	C ₅ H ₅ N	Quimibrás Indústrias Químicas S.A
Trifenilfosfina	C ₁₈ H ₁₅ P	Aldrich

Fonte: Autora, 2017.

4.3 Instrumentação para caracterização

4.3.1 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

As amostras foram preparadas em tubos para RMN e solubilizadas em solvente deuterado apropriado (CDCl₃ ou DMSO-*d*₆, Sigma-Aldrich). As amostras foram analisadas por colaboradores do laboratório de RMN/IQB/UFAL, sob a coordenação do Prof. Dr. Edson de Souza Bento. O equipamento utilizado para as análises foi o Espectrômetro Bruker Avance 400. Os espectros foram obtidos a temperatura ambiente e operando na frequência de 400,13 MHz para os núcleos de ¹H; 100,61 MHz para os núcleos de ¹³C e 162,00 MHz para os núcleos de ³¹P. Os deslocamentos químicos (δ) de ¹H e ¹³C foram medidos usando-se como padrão interno o tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0$) e os de ³¹P, usando-se como padrão externo o ácido fosfórico 85% (H₃PO₄, $\delta = 0$).

4.3.2 Espectroscopia no infravermelho médio (IV)

As análises por espectroscopia na região do infravermelho médio foram realizadas no Espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier, modelo IRPrestige-21, utilizando pastilhas de KBr contendo cerca de 1% da amostra. Os espectros abrangeram as regiões de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.3.3 Difração de raios X

A caracterização do monocristal de DIAZPdOAcD foi realizada pela Profa. Dra. Claudia C. Gatto, do Laboratório de Síntese Inorgânica e Cristalografia da UnB. O equipamento utilizado para este tipo de caracterização foi o difratômetro monocristalino Bruker CCD SMART APEX II. A coleta de dados foi realizada a uma temperatura de 296 K utilizando-se a radiação monocromática Mo $K\alpha$ ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). Os dados foram processados com SAINT (SMART; SAINT, 1999) e foram corrigidos para absorção usando SADABS (SHELDRICK, 1997). As estruturas foram resolvidas por métodos diretos usando SHELXS-97 e as análises de mapa de diferença de Fourier subsequentes renderam as posições dos átomos não-hidrogênio, o refinamento foi realizado usando SHELXL-97 (SHELDRICK, 2008). O gráfico molecular foi gerado com o software ORTEP-3 usado para preparar material para publicação, WinGX-Routine (FARRUGIA, 2012). O número de referência para o complexo dimérico é CCDC 1521341.

4.3.4 Análise Elementar

As análises elementares de C, H e N foram realizadas junto a Central Analítica da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, empregando-se uma unidade *Perkin-Elmer CHN 2400*.

4.3.5 Espectrometria de Massas

As análises de Espectrometria de Massas - MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) foram realizadas junto ao Centro de Tecnologia do Nordeste, CETENE, Recife/PE. As análises foram feitas sem o uso de matriz, utilizando-se um Espectrômetro de Massas AutoflexIII Maldi-TOF-TOF 200/Bruker Daltonics.

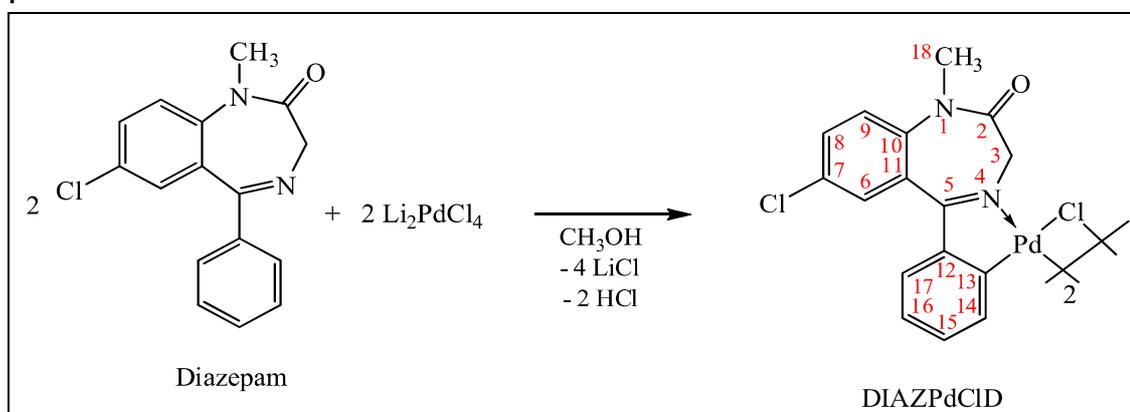
4.4 Procedimentos de síntese

Independente da fonte de paládio empregada para a preparação dos paladaciclos, os complexos diméricos foram sintetizados, de modo geral, sob agitação e refluxo enquanto que suas respectivas formas monoméricas foram sintetizadas a temperatura ambiente somente sob agitação.

4.4.1 Síntese do *bis*[2-{(7-cloro-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-benzodiazepin-5-il)fenil- κ^2 -*C,N*}- μ_2 -cloropaládio(II)], DIAZPdClD

Inicialmente, preparou-se uma solução metanólica de Li_2PdCl_4 a partir do seguinte procedimento: solubilizou-se o cloreto de lítio (0,1060 g; 2,50 mmol) em metanol (10 mL). Essa solução foi adicionada a um segundo frasco contendo cloreto de paládio(II) (0,1773 g; 1,00 mmol) que ficou sob agitação e aquecimento ($T = 60\text{ }^\circ\text{C}$) por 10 min. Logo após, filtrou-se o material, recuperando-se a solução de coloração castanho-escura de Li_2PdCl_4 . A essa solução foi adicionado o pré-ligante Diazepam, 7-Cloro-1-metil-2-oxo-5-fenil-3*H*-1,4-benzodiazepina, (0,2847 g; 1,00 mmol) sob agitação, seguido de aquecimento sob refluxo ($T \approx 75\text{ }^\circ\text{C}$) por 1 hora e 30 minutos, Esquema 4.1. Após esse tempo, separou-se o precipitado do sobrenadante por filtração. O sólido obtido foi lavado com metanol até que o filtrado ficasse incolor. Por fim, secou-se o material em uma bomba de alto vácuo, obtendo-se assim um sólido amarelo (0,3192 g; 0,375 mmol) em 75% de rendimento.

Esquema 4.1 – Síntese do DIAZPdClD



Fonte: Autora, 2017.

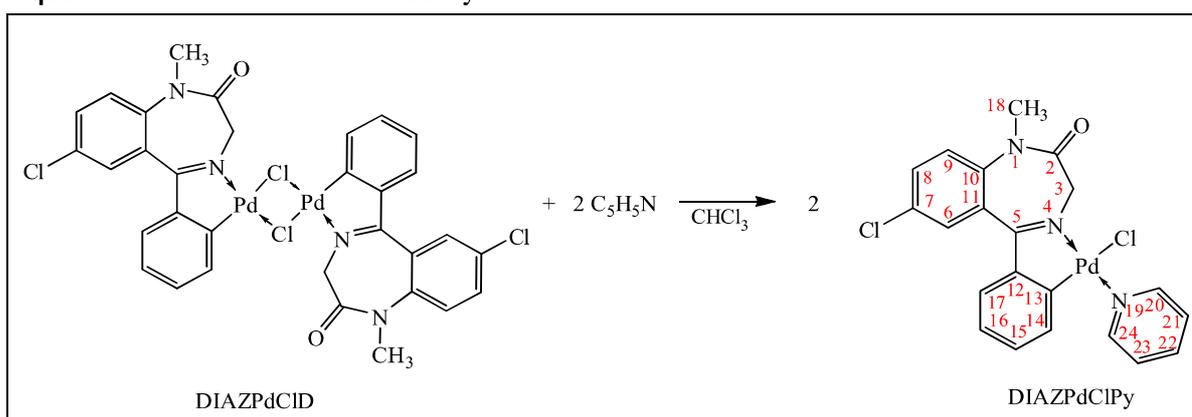
Fórmula molecular (F.M.): $\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{Cl}_4\text{N}_4\text{O}_2\text{Pd}_2$. Massa molar (M.M.): 851,21 g/mol. MALDI-TOF (sem matriz): m/z : 816 [M-Cl]. Anal. Elem. Teórico: C: 45,15; H: 2,84; N:

6,58. Experimental: C: 44,81; H: 2,89; N: 6,48. IV ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$, KBr): 3103-3021 (ν C–H aromático); 1683 (ν C=O e ν C=N). RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm): - Isômero transoide: 7,9–7,6 (m, 8H, H6, H8, H9 e H14); 7,3–6,9 (br sig, 6H, H15, H16 e H17); 5,52 e 4,63 (br sig e d, 2H, H3a, $J = 12,72$ Hz); 3,94 (d, 2H, H3b, $J = 12,72$ Hz); 3,30 (s, 6H, H18); - Isômero cisoide: 7,9–7,6 (m, 8H, H6, H8, H9 e H14); 7,3–6,9 (br sig, 6H, H15, H16 e H17); 4,41 (d, 2H, H3a, $J = 12,72$ Hz); 3,88 (d, 2H, H3b, $J = 12,72$ Hz); 3,16 (s, 6H, H18). RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 178,04 (C5); 167,07 (C2); 153,99 (C13); 145,43 (C11); 142,20 (C10); 136,61 (C6); 132,91 (C15); 130,55 (C8); 130,08 (C12); 129,37 (C16); 129,19 (C17); 128,82 (C7); 125,03 (C14); 124,45 (C9); 54,47 (C3); 35,02 (C18).

4.4.2 Síntese do [2-{(7-cloro-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-benzodiazepin-5-il)fenil- κ^2 -C,N}cloropiridinopaládio(II)], DIAZPdClPy

Preparou-se uma suspensão do DIAZPdClD (0,8514 g; 1,00 mmol) em clorofórmio (125 mL) e adicionou-se piridina (0,32 mL; 4,0 mmol), Esquema 4.2. A reação procedeu sob agitação em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, hexano foi adicionado à solução obtida até completa precipitação do composto, o qual foi separado do sobrenadante e seco a vácuo, obtendo-se assim um sólido amarelo claro (0,6965 g; 1,38 mmol) em 69% de rendimento.

Esquema 4.2 – Síntese do DIAZPdClPy



Fonte: Autora, 2017.

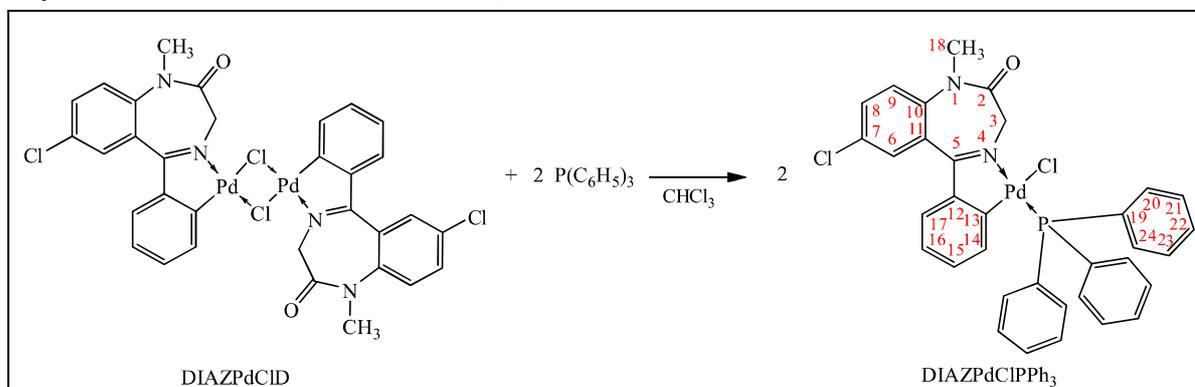
F.M.: $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{OPd}$. M.M.: 504,71 g/mol. Anal. Elem. Teórico: C: 49,97; H: 3,40; N: 8,33. Experimental: C: 43,43; H: 2,97; N: 6,68. IV ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$, KBr): 3107-3022 (ν C–H aromático); 1679 (ν C=O e ν C=N). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , ppm): 8,93 (d, 2H, H20 e H24, $J = 5,06$ Hz); 7,91 (t, 1H, H22, $J = 7,62$ Hz); 7,64 e 7,63 (s e d, 2H, H6 e H8, $J = 8,63$

Hz); 7,49 (t, 2H, H21 e H23, $J = 6,83$ Hz); 7,37 (d, 1H, H9, $J = 8,63$ Hz); 7,08 (m, 3H; H17, H16 e H15); 6,26 (d, 1H, H14, $J = 7,06$ Hz); 5,92 (d, 1H, H3b, $J = 12,56$ Hz); 3,82 (d, 1H, H3a, $J = 12,56$ Hz); 3,41 (s, 3H, H18). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , ppm): 180,50 (C5); 168,69 (C2); 158,70 (C13); 153,19 (C20 e C24); 145,54 (C11); 142,04 (C10); 138,19 (C6); 132,62 (C15 e C22); 131,61 (C8); 130,07 (C16); 129,99 (C12); 129,47 (C17); 126,39 (C7); 125,62 (C21 e C23); 124,38 (C14); 123,26 (C9); 55,93 (C3); 34,97 (C18).

4.4.3 Síntese do [2-{(7-cloro-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-benzodiazepin-5-il)fenil- κ^2 -C,*N*}clorotrifetilfosfinopaládio(II)], DIAZPdClPPh₃

Preparou-se uma suspensão do DIAZPdClD (0,8514 g; 1,00 mmol) em clorofórmio (70 mL) e adicionou-se uma solução de trifetilfosfina (0,5246 g; 2,00 mmol) em clorofórmio (10 mL), Esquema 4.3. A reação foi deixada sob agitação e à temperatura ambiente por 1 hora. Após esse tempo, adicionou-se hexano à solução obtida até completa precipitação do composto, o qual foi separado do sobrenadante e seco a vácuo, obtendo-se assim um sólido branco levemente amarelado (1,3620 g; 1,98 mmol) em 99% de rendimento.

Esquema 4.3 – Síntese do DIAZPdClPPh₃



Fonte: Autora, 2017.

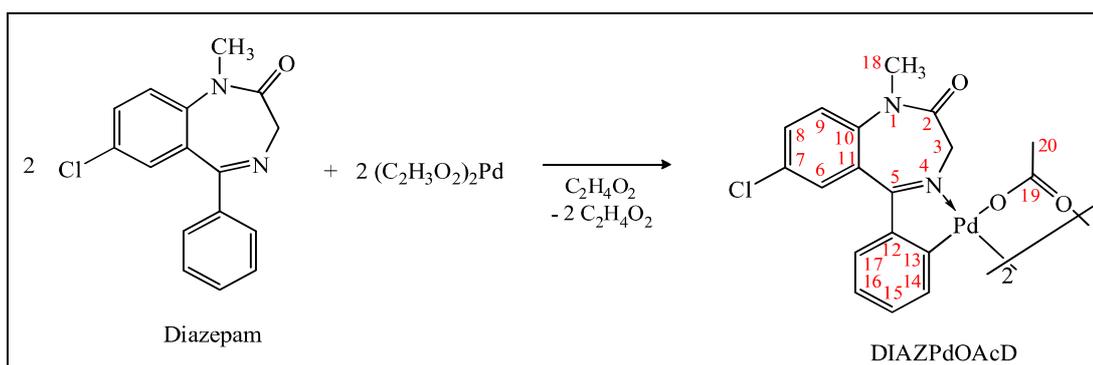
F.M.: $\text{C}_{34}\text{H}_{27}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{OPPd}$. M.M.: 687,89 g/mol. Anal. Elem. Teórico: C: 59,36; H: 3,96; N: 4,07. Experimental: C: 58,81; H: 3,87; N: 4,11. IV ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$, KBr): 3102-3004 (ν C-H aromático); 1686 (ν C=O e ν C=N). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , ppm): 7,78 (dd, 6H, H20, H24, $J = 11,55$ e 7,87 Hz); 7,70 (d, 1H, H6, $J = 2,28$ Hz); 7,62 (dd, 1H, H8, $J = 8,80$ e 2,33 Hz); 7,42 (m, 10H, H9, H21, H22, H23); 7,11 (d, 1H, H17, $J = 7,24$ Hz); 6,91 (t, 1H, H16, $J = 7,38$ Hz); 6,61 (t, 1H, H15, $J = 7,41$ Hz); 6,56 (m, 1H, H14); 6,16 (dd, 1H, H3b, $J_{\text{H-P}} = 12,42$ e 3,00 Hz); 3,77 (dd, 1H, H3a, $J_{\text{H-P}} = 12,43$ e 3,75 Hz); 3,39 (s, 3H, H18). RMN de

^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , ppm): 180,38 (d, 1C, C5, $J_{\text{C-P}} = 3,50$ Hz); 169,33 (s, 1C, C2); 159,37 (s, 1C, C13); 147,12 (s, 1C, C11); 142,33 (s, 1C, C10); 139,06 (d, 3C, C19, $J_{\text{C-P}} = 11,38$ Hz); 135,48 (d, 6C, C20, C24, $J_{\text{C-P}} = 12,00$ Hz); 132,46 (s, 1C, C6); 131,29 (s, 1C, C15); 130,82 (d, 3C, C22, $J_{\text{C-P}} = 2,60$ Hz); 130,73 (s, 1C, C8); 130,67 (s, 1C, C7); 129,85 (s, 1C, C16); 129,69 (s, 1C, C17); 128,11 (d, 6C, C21, C23, $J_{\text{C-P}} = 10,98$ Hz); 127,21 (d, 1C, C12, $J_{\text{C-P}} = 2,55$ Hz); 123,69 (s, 1C, C14); 123,10 (s, 1C, C9); 54,10 (s, 1C, C3); 34,86 (s, 1C, C18). RMN de ^{31}P (162 MHz, CDCl_3 , ppm): 42,54.

4.4.4 Síntese do *bis*[2-{(7-cloro-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-benzodiazepin-5-il)fenil- κ^2 -C,N}]- μ_2 -acetatopaládio(II)], DIAZPdOAcD

Preparou-se uma suspensão de acetato de paládio(II) (0,1998 g; 0,89 mmol) em ácido acético (15 mL) e, em seguida, adicionou-se o diazepam (0,2847 g; 1,00 mmol), Esquema 4.4. A reação procedeu sob agitação e refluxo ($T = 127^\circ\text{C}$) por 1 hora. Após esse tempo, filtrou-se o material obtido, o qual foi colocado sob vácuo para retirar todos os voláteis. Em seguida, ao material sólido, adicionou-se clorofórmio em quantidade suficiente para solubilizar o mesmo e hexano até completa precipitação do composto desejado. Por fim, separou-se o precipitado do sobrenadante e secou-se a vácuo, obtendo-se assim um sólido laranja (0,3358 g; 0,37 mmol) em 84% de rendimento.

Esquema 4.4 – Síntese do DIAZPdOAcD



Fonte: Autora, 2017.

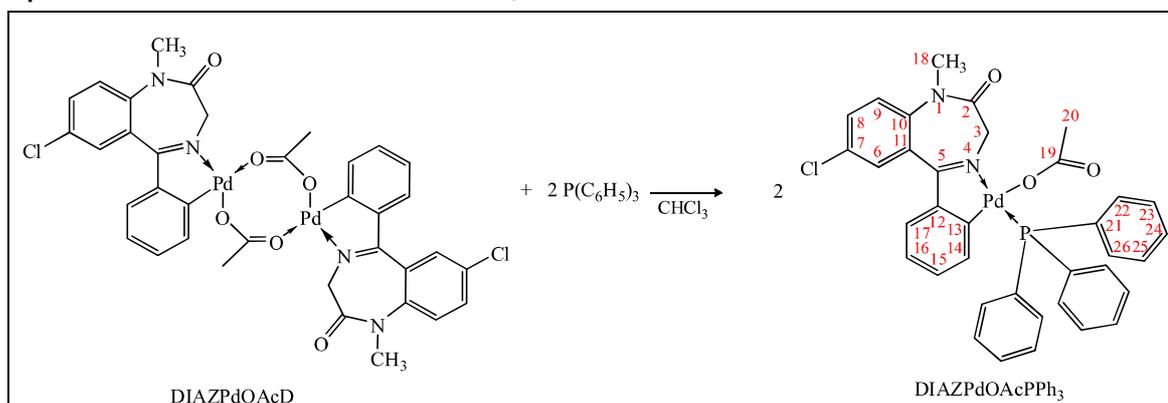
F.M.: $\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_6\text{Pd}_2$. M.M.: 898,39 g/mol. MALDI-TOF (sem matriz): m/z: 839 [M-OAc]. Anal. Elem. Teórico: C: 48,13; H: 3,37; N: 6,24. Experimental: C: 48,51; H: 3,58; N: 6,11. IV ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$, KBr): 3109-3012 (ν C-H aromático); 1687 (ν C=O e ν C=N); 1562 e 1417 (ν as/s COO). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , ppm): - Isômero transoide: 7,8–6,4 (hidrogênios aromáticos); 4,36 (d, 2H, H3a, $J = 12,80$ Hz); 3,32 (d, 2H, H3b, $J = 12,68$ Hz);

3,32 (s, 6H, H18); 2,25 (s, 6H, H20); - Isômero cisoide: 7,8–6,4 (hidrogênios aromáticos); 4,23 (d, 1H, H3a, $J = 12,93$ Hz); 3,80 (d, 1H, H3b, $J = 13,06$ Hz); 3,68 (d, 1H, H3c, $J = 12,93$ Hz); 3,26 e 3,16 (s, 6H, H18); 3,04 (d, 1H, H3d, $J = 12,93$ Hz); 2,32 e 2,31 (s, 6H, H20). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , ppm): 181,90 (C19); 177,96 (C5); 168,24 (C2); 156,59 (C13); 144,18 (C11); 141,34 (C10); 132,42 (C6); 132,32 (C15); 130,06 (C8); 129,57 (C12); 128,97 (C16); 128,81 (C17); 125,49 (C7); 124,05 (C14); 123,23 (C9); 55,70 (C3); 35,07 (C18); 24,59 (C20).

4.4.5 Síntese do [2-{(7-cloro-1-metil-2-oxo-2,3-dihidro-1*H*-benzodiazepin-5-il)fenil- κ^2 -C,N}acetatotrifetilfosfinopaládio(II)], DIAZPdOAcPPh₃

Preparou-se uma solução de DIAZPdOAcD (0,8985 g; 1,00 mmol) em clorofórmio (30 mL) e adicionou-se uma solução de trifetilfosfina (0,5246 g; 2,00 mmol) em clorofórmio (10 mL), Esquema 4.5. A reação procedeu sob agitação e à temperatura ambiente por 1 hora. Após esse tempo, adicionou-se hexano até completa precipitação de um composto marrom escuro. Em seguida, separou-se o sobrenadante do precipitado o qual foi seco a vácuo; obtendo-se assim um sólido amarelo (0,7399 g; 1,04 mmol) em 52% de rendimento.

Esquema 4.5 – Síntese do DIAZPdOAcPPh₃



Fonte: Autora, 2017.

F.M.: $\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{PPd}$. M.M.: 711,48 g/mol. Anal. Elem. Teórico: C: 60,77; H: 4,25; N: 3,94. Experimental: C: 59,85; H: 4,38; N: 3,88. IV ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$, KBr): 3093-3014 (ν C–H aromático); 1687 (ν C=O e ν C=N); 1574 e 1383 (ν as/s COO). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , ppm): 7,82 (dd, 6H, H22, H26, $J = 11,57$ e $7,85$ Hz); 7,69 (d, 1H, H6, $J = 2,05$ Hz); 7,41 (m, 10H, H9, H23, H24, H25); 7,18 (dd, 1H, H8, $J = 8,81$ e $1,59$ Hz); 7,10 (d, 1H, H17, $J = 7,69$ Hz); 6,90 (t, 1H, H16, $J = 7,40$ Hz); 6,61 (t, 1H, H15, $J = 7,37$ Hz); 6,56 (m, 1H,

H14); 4,92 (dd, 1H, H3b, $J_{H-P} = 12,50$ e $2,86$ Hz); 3,81 (dd, 1H, H3a, $J_{H-P} = 12,50$ e $3,53$ Hz); 3,40 (s, 3H, H18); 1,44 (s, 3H, H20). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , ppm): 179,60 (d, 1C, C19, $J_{C-P} = 3,31$ Hz); 177,22 (s, 1C, C5); 169,21 (s, 1C, C2); 156,56 (s, 1C, C13); 146,90 (s, 1C, C11); 142,26 (s, 1C, C10); 139,63 (d, 3C, C21, $J_{C-P} = 11,18$ Hz); 135,44 (d, 6C, C22, C26, $J_{C-P} = 12,28$ Hz); 132,46 (s, 1C, C6); 130,71 (d, 3C, C24, $J_{C-P} = 2,35$ Hz); 130,63 (s, 1C, C15); 130,51 (s, 1C, C8); 130,25 (s, 1C, C16); 130,02 (s, 1C, C17); 129,90 (s, 1C, C7); 128,26 (d, 6C, C23, C25, $J_{C-P} = 10,90$ Hz); 126,94 (d, 1C, C12, $J_{C-P} = 2,76$ Hz); 123,56 (s, 1C, C14); 123,13 (s, 1C, C9); 54,08 (s, 1C, C3); 35,02 (s, 1C, C18); 23,42 (s, 1C, C20). RMN de ^{31}P (162 MHz, CDCl_3 , ppm): - Majoritário: 40,59; - Minoritário: 42,54.

4.5 Avaliação da atividade anticonvulsivante

A avaliação da atividade anticonvulsivante foi realizada por colaboradores do LAPEC/DFS/UFS, sob orientação do Prof. Dr. Lucindo José Quintans-Júnior. Foi empregado um tipo de teste farmacológico *in vivo* por estimulação química, utilizando pentilenotetrazol (PTZ) como indutor das convulsões. Para a realização de tal teste, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, machos, albinos, pesando entre 25 – 35 gramas (Figura 4.1), procedentes do Biotério Setorial da UFS, selecionados e alojados em gaiolas de polipropileno, contendo no máximo cinco animais cada, mantidos sob condições controladas de temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas (fase clara: 06:00 – 18:00 horas), tendo livre acesso a alimentação (tipo pellets de ração da marca comercial Purina®) e água até 60 minutos antes dos experimentos.

Figura 4.1 – Camundongo Swiss (*Mus musculus*)



Fonte: <http://www.unifenas.br/pesquisa/bioterio/animais.asp>

Antes da realização dos protocolos experimentais, os animais foram colocados no ambiente de trabalho (laboratório), por pelo menos trinta minutos de antecedência à execução do experimento, visando à adaptação ao ambiente novo e evitar possíveis alterações

comportamentais dos animais. Cabe ressaltar que todos os protocolos experimentais propostos respeitaram os princípios éticos estabelecidos pela CONCEA - Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA) e Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA; além disso, o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Tiradentes, tendo como número do protocolo 010817.

Neste teste, grupos de seis camundongos machos (n=6, por grupo) foram pré-tratados com solução tween 80 a 0,2% em água destilada (controle); DIAZPdCID, DIAZPdOAcD, DIAZPdClPy, DIAZPdClPPh₃, DIAZPdOAcPPh₃ ou Diazepam (DZP) na dose de 21 µmol/kg por via intraperitoneal (i.p.).

Transcorridos 60 minutos dos pré-tratamentos, administrou-se em todos os animais, o PTZ na dose de 60 mg/kg (i.p.), conforme metodologia descrita por Smith, Wilcox e White (2007). Imediatamente após essa administração, cada animal foi colocado em caixas separadas para a observação do tempo de latência para o aparecimento das convulsões. Os animais foram observados individualmente durante um período de 15 minutos após a administração do agente convulsivante.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software GRAPH PAD PRISM®. Foram utilizados os testes de Análise de Variância (ANOVA) com uma classificação (one-way), seguido do Teste de Tukey. Os resultados só foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$.

4.6 Avaliação bioquímica dos biomarcadores de estresse oxidativo

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada sob orientação da Profa. Dra. Ana Mara de Oliveira e Silva do Laboratório de Análises de Alimentos do DNUT/UFS. Para a realização desta análise os camundongos foram tratados com solução tween 80 a 0,2% em água destilada (controle); DIAZPdCID, DIAZPdOAcD, DIAZPdClPy, DIAZPdClPPh₃ ou DIAZPdOAcPPh₃ na dose de 21 µmol/kg (i.p.) 1 h antes da administração de uma dose subconvulsivante de PTZ (30 mg/kg, i.p.) durante dois dias. Amostras de cérebro foram coletadas 1 h após o último tratamento com PTZ e mantidas a -80°C. O cérebro foi homogeneizado com tampão de potássio 0,1 M (pH 7) numa proporção de 1:10 (p/v) utilizando um manual ultraturrax (IKA, modelo T10 básico, Staufen, Alemanha) e depois centrifugou-se a 15.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante foi recolhido e utilizado para determinar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido

dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) e teste de FRAP e teor de glutathiona reduzida (GSH).

Para os resultados serem expressos em unidades por miligrama de proteína o teor de proteína dos homogeneizados foi determinado pelo método de Bradford (1976) utilizando reagente específico (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). As leituras foram realizadas em um leitor de microplacas Multi-Detection (Synergy HT, Bio-Tek Instruments Inc.) a 595 nm e para quantificação, foi utilizada uma curva padrão de albumina de soro cristalino bovino (BSA) (0,125-1 mg / mL).

4.6.1 Atividade da SOD

A atividade da SOD foi avaliada de acordo com os métodos descritos por McCord e Fridovich (1969), medindo a diminuição da taxa de redução do citocromo-C em um sistema xantina e xantina oxidase gerador de superóxido. Os resultados foram expressos como unidades por miligrama de proteína (U/mg de proteína). A unidade de atividade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a taxa de reação em 50% a 25 °C.

4.6.2 Atividade da GPx

A atividade da GPx foi determinada de acordo com o método descrito por Sies e colaboradores (1979). A GPx catalisa a oxidação da glutathiona por hidroperóxido de *tert*-butila. Os resultados foram expressos como unidades por miligrama de proteína (U/mg de proteína). Uma unidade da atividade da GPx foi designada como a quantidade de enzima catalisando a oxidação de 1 μ mol de NADPH por minuto a 30 °C (pH 7).

4.6.3 Ensaio FRAP

A capacidade da amostra para resistir ao dano oxidativo foi determinada usando ensaios FRAP (KATALINIC et al, 2005). Para o ensaio FRAP, 9 μ L de sobrenadante foram misturados com 27 μ L de água deionizada e 270 μ L de reagente FRAP recentemente preparado. A mistura reacional foi incubada a 37 °C durante 30 min e a absorbância foi medida a 595 nm. Os resultados foram equiparados a uma curva padrão de sulfato ferroso

(0,5-1,5 mM) para calcular a quantidade de Fe^{2+} produzida durante a redução de Fe^{3+} . Os resultados são expressos como Fe^{2+} produzido por mg de proteína.

4.6.4 Teor de GSH

Para determinar o teor de GSH, o homogenato foi misturado com 25 μL de solução de EDTA (10^{-3} M) em ácido tricloroacético a 5% e foi homogeneizado três vezes durante 15 min. A mistura foi centrifugada (15 min x 1500 g x 4 °C). O sobrenadante (20 μL) foi adicionado a 270 μL de tampão de potássio 0,1 M (pH 7) e 10 μL de DTNB 0,01 M. Após 5 min, a absorbância foi medida a 412 nm contra uma placa de reagente sem sobrenadante. Uma curva padrão foi realizada com GSH padrão. Os resultados são expressos como GSH nM por g de tecido (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

4.7 Avaliação da citotoxicidade frente a macrófagos

A avaliação da citotoxicidade foi realizada por colaboradores do LaFI/ICBS/UFAL, sob orientação da Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira. Esta avaliação foi realizada pelo método do MTT (brometo de 3-[4,5- dimetiliazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio) (HUSSAIN; NOURI; OLIVER, 1993), com oito substâncias: DIAZPdClD, DIAZPdOAcD, DIAZPdClPy, DIAZPdClPPh₃, DIAZPdOAcPPh₃, diazepam, PdCl₂ e Pd(OAc)₂; que foram analisadas em triplicata nas concentrações de 1, 10 e 100 μM . Os efeitos citotóxicos das substâncias citadas foram avaliados em macrófagos J774.A1. Para a realização deste teste as células foram semeadas em placas de 96 poços a 2×10^5 células por poço em meio RPMI-1640 a 37 °C. Após 1 h, os poços foram lavados com HBSS quente para remover células não aderentes, deixando aproximadamente 1×10^5 macrófagos aderentes. Foram adicionados 100 μL de todas as substâncias a serem testadas, diluídas em meio de cultura com 0,1% de DMSO. As células também foram cultivadas com meio livre de compostos, contendo somente o veículo (controle de crescimento basal) ou o meio com 0,1% de DMSO (controle do veículo). O controle positivo (células mortas) foi obtido por lise celular com 1% de Triton X-100 no meio de cultura. As placas foram mantidas em uma incubadora com 5% de CO₂ a 37 °C durante 48 horas; após esse tempo, o sobrenadante foi removido e as células foram incubadas com MTT (100 mL/poço; concentração de 5 mg/10 mL) durante 1 hora no escuro a 37 °C. Após esse período, a solução de MTT foi removida e foram adicionados 100 μL de DMSO a cada poço para solubilizar os cristais de formazano que tivessem sido formados. A

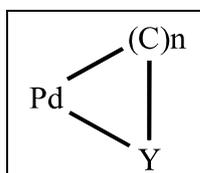
absorbância foi medida usando um leitor ELISA a 550 nm. Os dados obtidos foram expressos como a média \pm erro padrão da média, as diferenças estatísticas entre os grupos tratados e o grupo do veículo foram avaliadas por testes ANOVA e Dunnett post-hoc.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese dos paladaciclos

Os paladaciclos são complexos que apresentam em sua estrutura no mínimo um anel intramolecular envolvendo o paládio, pertencentes à classe dos metalaciclos, onde os complexos mais estáveis apresentam anel de cinco membros. Esses complexos podem apresentar coordenação intramolecular organometálica, ou seja, o paládio pode estar diretamente ligado a um átomo de carbono (Figura 5.1) (OMAE, 2004).

Figura 5.1 – Paladaciclos organometálicos



$n \geq 1$; Y = O, N, S, P, As

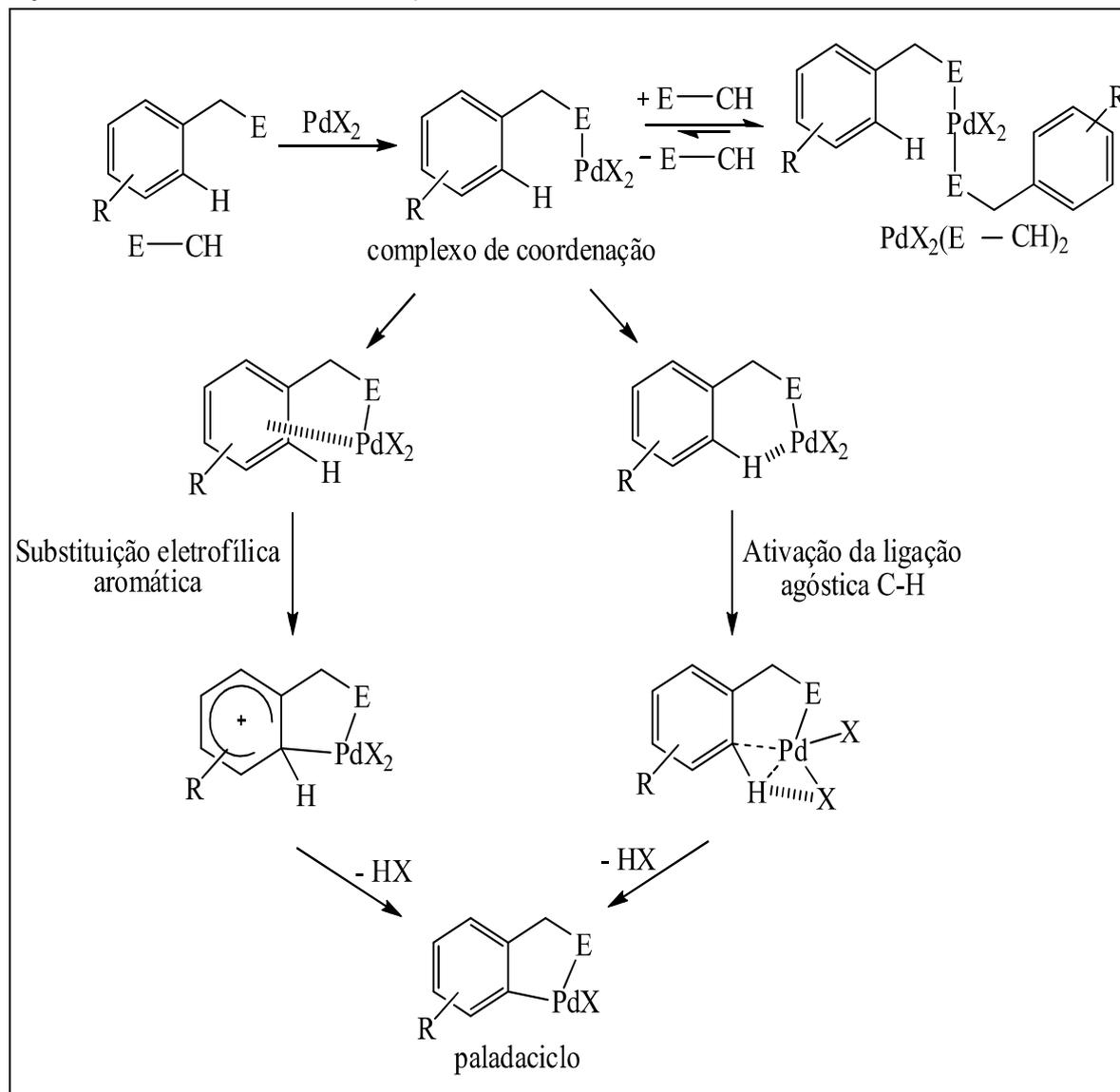
Fonte: Adaptado de OMAE, 2004.

A metodologia de síntese dos paladaciclos deste trabalho mostrou-se rápida, pois o tempo reacional não ultrapassou 1 hora e 30 minutos, e eficaz, pois foi possível obter os complexos desejados em bons rendimentos. Primeiramente, foram obtidos os paladaciclos diméricos através de reação de ciclometalação, envolvendo a ativação da ligação C-H, partindo dos sais PdCl_2 e $\text{Pd}(\text{OAc})_2$; e, a partir desses, foram sintetizados seus respectivos paladaciclos monoméricos, utilizando ligantes nitrogenado e fosforado (bases de Lewis), mais especificamente piridina e trifenilfosfina, respectivamente.

A reação de ciclopaladação envolvendo a ativação da ligação C-H, que resultou na formação dos complexos diméricos sintetizados, pode ser explicada por meio de dois mecanismos reacionais (Esquema 5.1): um consiste na reação de substituição eletrofílica aromática e o outro refere-se à reação envolvendo a formação de ligação agóstica. Na primeira etapa, em ambos os mecanismos reacionais, ocorre a coordenação do nitrogênio imínico (átomo coordenante) do diazepam ao paládio (centro metálico), o que aproxima o metal do substituinte 5-fenila do diazepam, mais especificamente dos carbonos β e γ , permitindo que as outras etapas ocorram. Posteriormente, no caso da reação de substituição eletrofílica aromática ocorre a formação de um complexo π , que em seguida se rearranja em um complexo σ ; finalizando, ocorre a formação do paladaciclo devido a abstração de um dos

prótons em orto do substituinte 5-fenila do diazepam. Já no outro mecanismo, após a coordenação do nitrogênio ao paládio, ocorre a formação de uma ligação agóstica entre o paládio e uma das ligações C_{orto} -H do substituinte 5-fenila do diazepam, seguido da formação de um complexo agóstico e, finalizando, do paladaciclo, que ocorre da mesma forma que no mecanismo anterior (OMAE, 2004; ALBRECHT, 2008).

Esquema 5.1 – Mecanismos de ativação C–H



Fonte: ALBRECHT, 2008.

Na literatura encontram-se relatos de metalacilos derivados do diazepam com os seguintes metais: Pd(II) (CINELLU et al., 1991; BARROS et al., 2016), Pt(II) (STOCCORO et al., 1994) e Ru(II) (PÉREZ et al., 2002). Cinellu e colaboradores (1991) já relataram a síntese dos complexos DIAZPdCID e DIAZPdCIPPh₃ descritos neste trabalho; contudo, não

realizaram nenhum ensaio biológico. Todos esses metalaciclos derivados do diazepam formam anel intramolecular de 5 membros por meio de ligação envolvendo o átomo de N(4) e um dos átomos de C *orto* do substituinte 5-fenila, da mesma maneira que os complexos descritos neste trabalho; com exceção de um complexo de Ru(II), que apresenta anel intramolecular de 3 membros, onde a ligação envolve o átomo de N(4), mesmo átomo de ligação dos outros complexos, e o átomo de C(3) do anel diazepínico. O maior número de complexos com anel intramolecular de cinco membros provavelmente ocorre por esses serem os metalaciclos mais estáveis, como dito anteriormente.

Todos os complexos sintetizados são sólidos à temperatura ambiente e apresentam coloração que varia do laranja ao amarelo. Quanto à solubilidade, todos são insolúveis em água e solúveis em dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), diclorometano e clorofórmio, no entanto, estes dois últimos não solubilizam o DIAZPdCID.

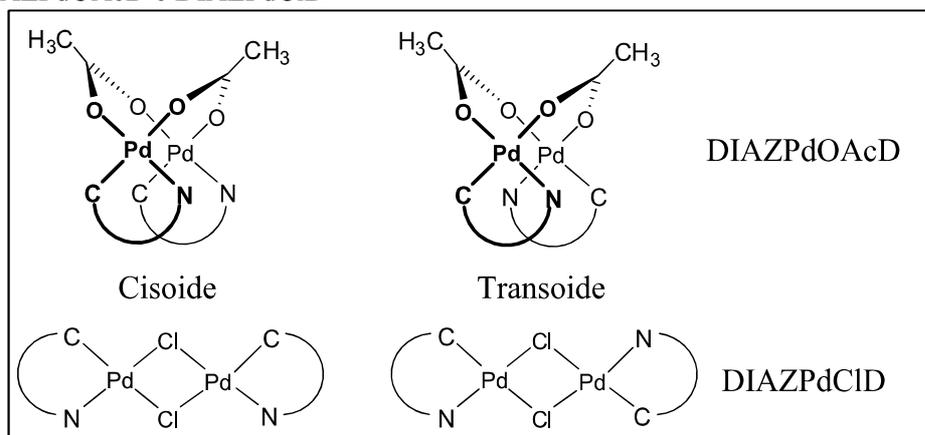
5.2 Caracterização dos paladaciclos

A caracterização de todos os complexos sintetizados foi realizada por RMN de ^1H e ^{13}C , análise elementar e IV. Além disso, os paladaciclos diméricos tiveram sua confirmação obtida também por meio de espectrometria de massas; os complexos monoméricos DIAZPdOAcPPh₃ e DIAZPdClPPh₃ tiveram sua formação evidenciada também por RMN de ^{31}P e o complexo DIAZPdOAcD foi caracterizado também por difração de raios X.

5.2.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H)

Os espectros de RMN de ^1H dos paladaciclos diméricos, observados nas Figuras 5.2 e 5.3, mostram-se de difícil resolução devido à alta fluxionalidade que estes complexos apresentam e à interconversão entre os isômeros *cis*oide e *trans*oide (Esquema 5.2) em solução, o que resulta em espectros com grande número de sinais superpostos e ou alargados. No entanto, foi possível atribuir os sinais referentes aos hidrogênios do grupo metila ligado ao nitrogênio 1 e aos hidrogênios metilênicos do anel benzodiazepínico, e no caso do DIAZPdOAcD, também foi possível atribuir os sinais singletos referentes aos hidrogênios da metila da ponte acetato ($\delta = 2,24 \text{ ppm}$); além disso, foi possível observar os sinais típicos referentes aos hidrogênios aromáticos do fragmento fenil-benzodiazepínico com deslocamentos químicos entre 7,8 e 6,4 *ppm* para o DIAZPdOAcD e entre 7,9 e 6,9 *ppm* para o DIAZPdCID.

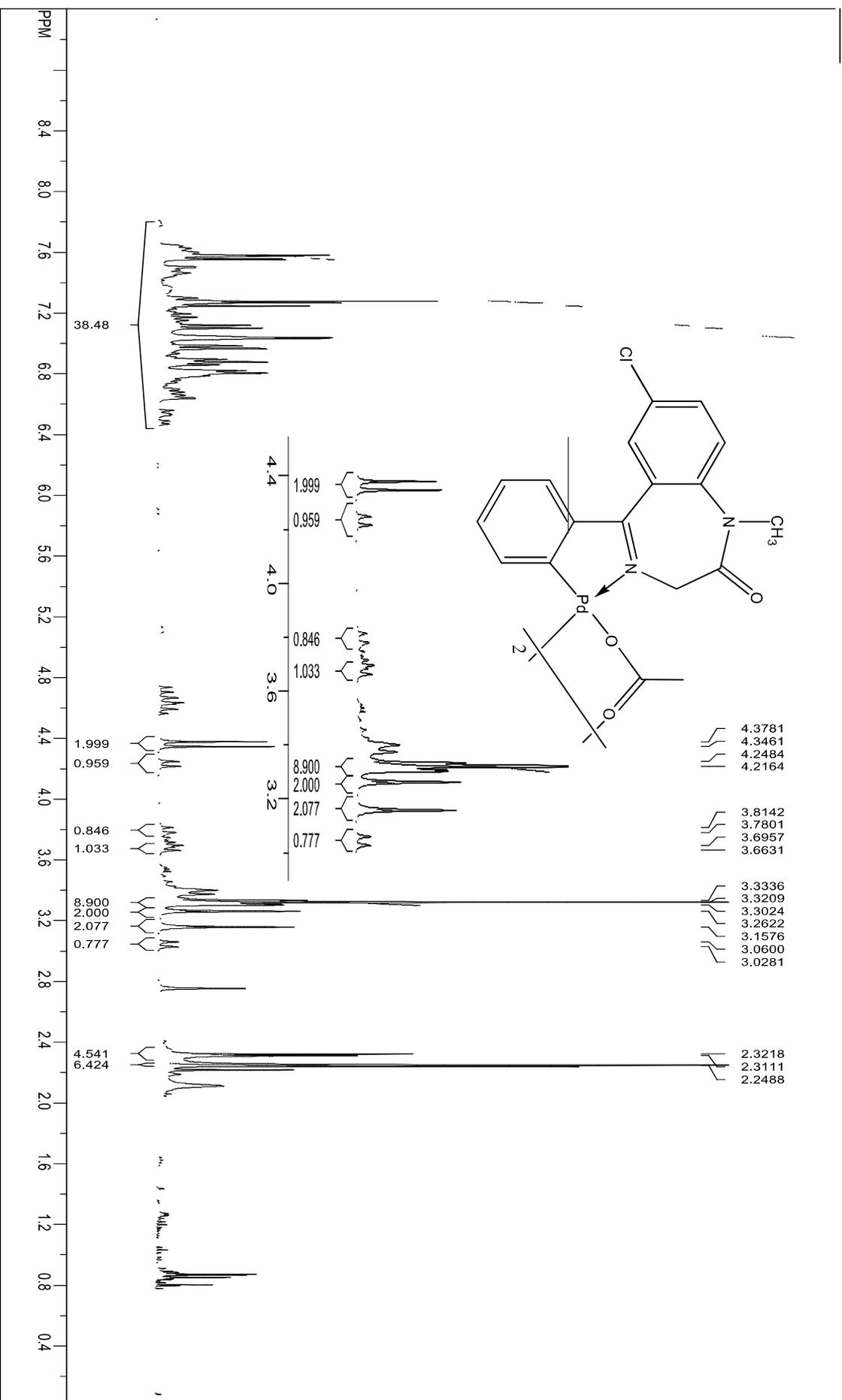
Esquema 5.2 – Representação esquemática dos dois possíveis isômeros cisoide e transoide dos dímeros DIAZPdOAcD e DIAZPdClD



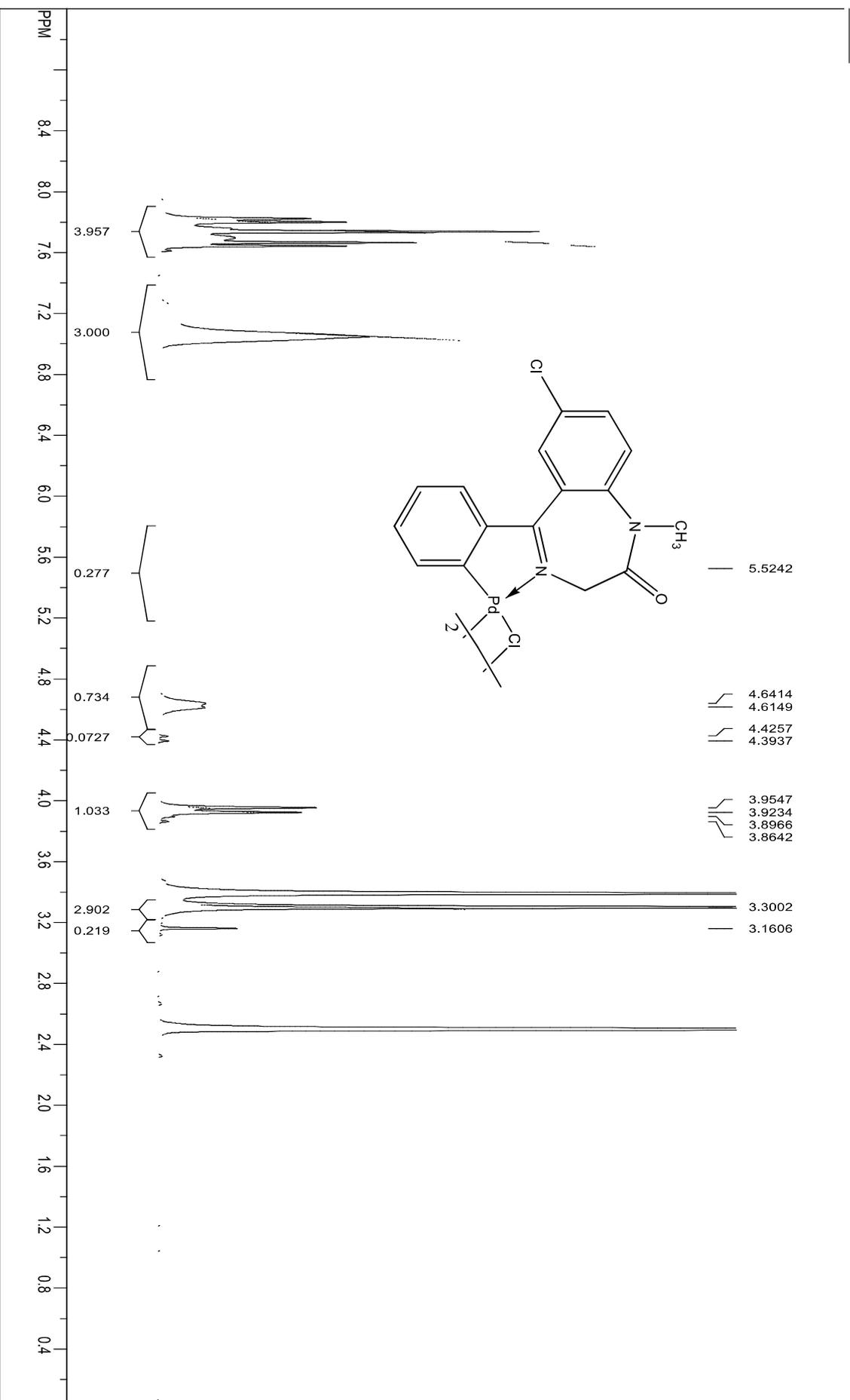
Fonte: Adaptado de BARROS et al., 2016.

A integração entre os sinais dos hidrogênios metilênicos H3a dos isômeros transoide e cisoide foi empregada para a constatação da proporção entre estes isômeros. Verificou-se que para o dímero DIAZPdOAcD existe uma razão de aproximadamente 1:1 e para o dímero DIAZPdClD há uma relação de aproximadamente 14:1, entre os isômeros transoide:cisoide. Notavelmente, para o complexo DIAZPdClD, os isômeros transoide e cisoide exibem um par de sinais diastereotópicos atribuíveis aos hidrogênios metilênicos do anel benzodiazepínico, bem como um sinal singletto relacionado aos hidrogênios da fração NCH₃. Para o complexo DIAZPdOAcD, padrões semelhantes foram observados para os grupos análogos de hidrogênios no isômero transoide; no entanto, para o isômero cisoide, foram observados dois pares de sinais diastereotópicos para os hidrogênios metilênicos e dois singletos para os hidrogênios da fração NCH₃. Além disso, verificamos que os hidrogênios das pontes acetato originaram um singletto para o isômero transoide, enquanto que para o isômero cisoide, dois singletos foram observados. Esta maior complexidade do isômero cisoide do complexo DIAZPdOAcD está relacionada à geometria deste dímero, comumente referida como um arranjo de livro aberto, como será observada posteriormente através do resultado da análise por difração de raios X do cristal deste dímero. Neste caso, o obstáculo estérico entre os dois planos formados pela geometria quadrada plana das porções de paládio provoca uma torção das duas imagens espelhadas do complexo dimérico. Isso resulta numa diminuição da simetria da molécula; dessa forma, a maioria dos hidrogênios equivalentes das duas partes se tornam magneticamente diferentes.

Figura 5.2 – Espectro de RMN de ^1H do DIAZPdOAcD em CDCl_3



Fonte: Autora, 2017.

Figura 5.3 – Espectro de RMN de ^1H do DIAZPdCID em DMSO-d_6 

Fonte: Autora, 2017.

A complexidade dos dados de RMN de ^1H dos dímeros foi drasticamente reduzida pela formação dos monômeros através da adição de piridina deuterada nos tubos de RMN em que estavam contidos os dímeros em clorofórmio deuterado. Dessa forma, através dos espectros de RMN de ^1H dos monômeros gerados em solução, derivados do DIAZPdOAcD e do DIAZPdCID (Apêndices A e B, respectivamente), foi possível observar todos os sinais dos hidrogênios do diazepam com exceção de um próton, o que indica a ocorrência da ligação organometálica entre o paládio e o diazepam, além do sinal do hidrogênio da metila do grupo acetato ($\delta = 2,28 \text{ ppm}$), no caso do monômero derivado do DIAZPdOAcD; deduzindo-se, assim, a formação dos paladaciclos diméricos. Ver Tabela 5.1.

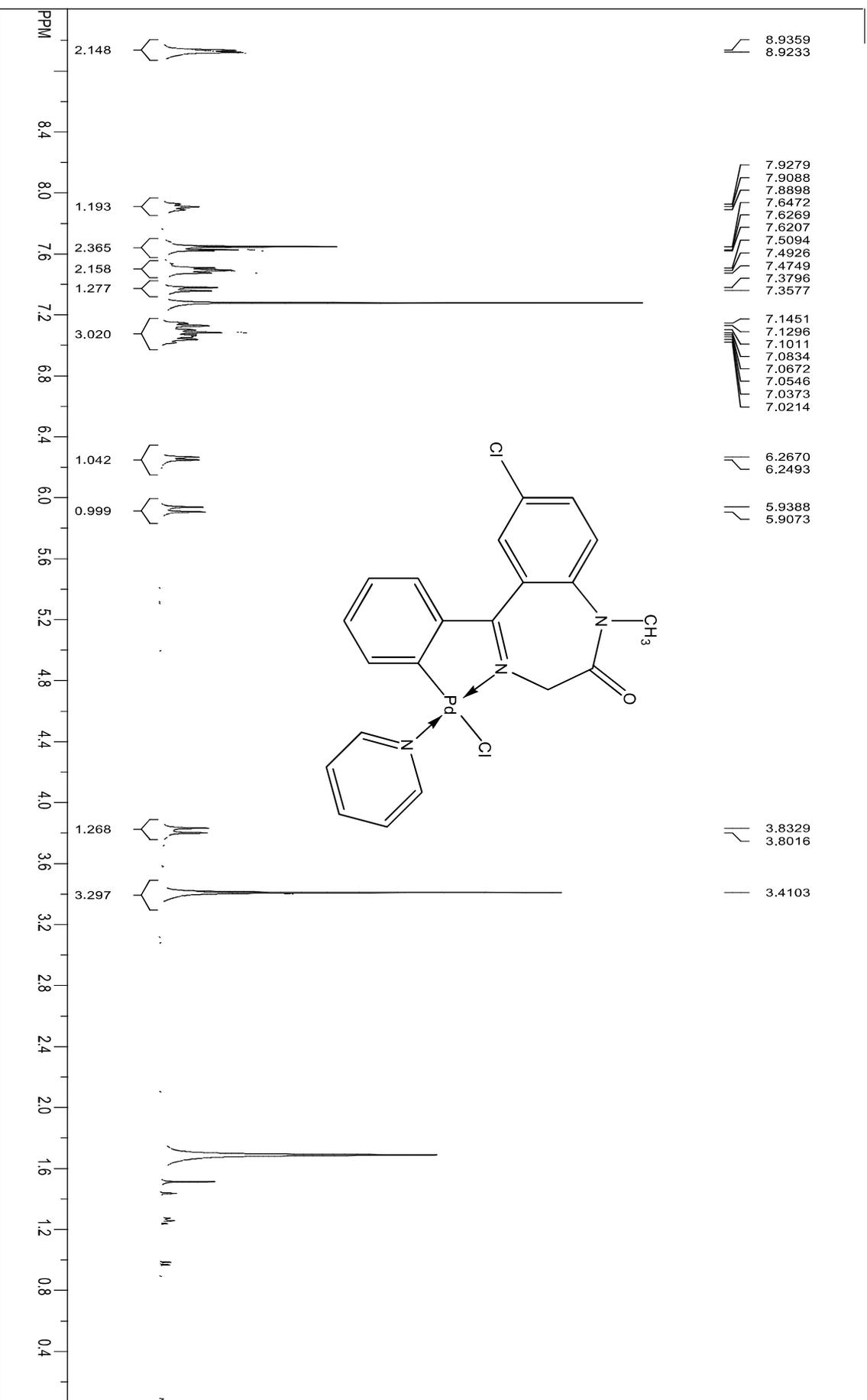
Tabela 5.1 – Dados de RMN de ^1H dos dímeros com piridina deuterada^a

Composto	H3	H6	H8	H9	H14	H15 e H16	H17	H18	H20
DIAZPdOAcD	3,81 (d) e 4,89 (d)	7,63 (s)	7,61 (d)	7,35 (d)	6,28 (d)	7,01 (m)	7,11 (d)	3,39 (s)	2,28 (s)
DIAZPdCID	3,79 (d) e 5,84 (br sig)	7,62 (s)	7,59 (d)	7,33 (d)	6,28 (br sig)	7,06 (m)	7,06 (m)	3,38 (s)	----

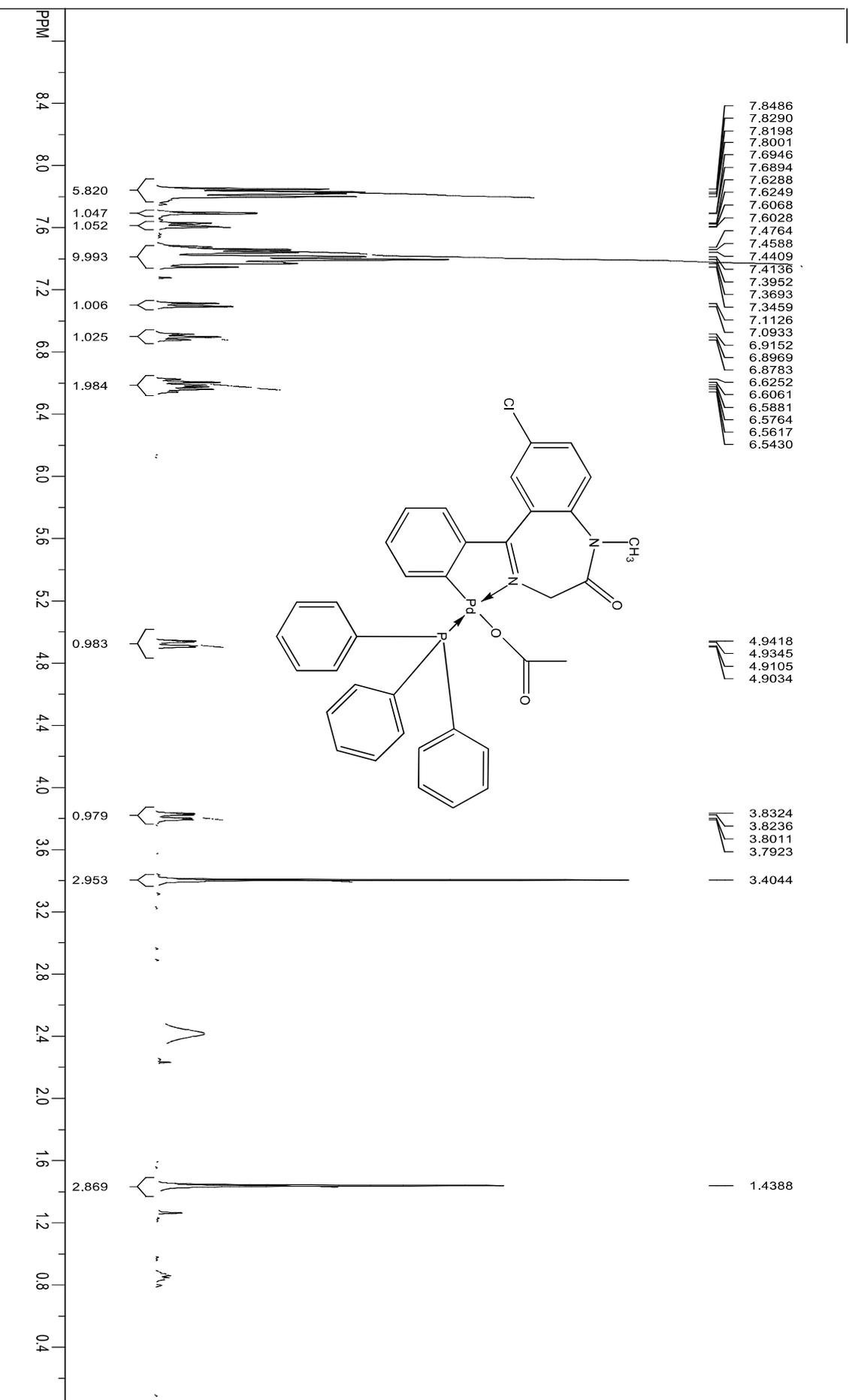
^a Em CDCl_3 , temperatura ambiente, deslocamentos químicos em ppm, multiplicidade fornecida entre parênteses.
Fonte: Autora, 2017.

Com relação aos monômeros sintetizados, nos espectros de RMN de ^1H é possível observar, além dos sinais referentes aos hidrogênios do diazepam desprotonado, o acréscimo de sinais típicos de hidrogênios aromáticos indicativos da piridina ou trifenilfosfina, dependendo do complexo. No caso do monômero DIAZPdClPy (Figura 5.4), é possível observar o acréscimo de três sinais: duplete com $\delta = 8,93 \text{ ppm}$ correspondente aos hidrogênios em *orto* da piridina, tripleto com $\delta = 7,90 \text{ ppm}$ referente ao hidrogênio em *para*, e tripleto $\delta = 7,49 \text{ ppm}$ relacionados aos hidrogênios em *meta*, na proporção de 2:1:2. Os espectros de RMN de ^1H dos paladaciclos monoméricos DIAZPdOAcPPh₃ (Figura 5.5) e DIAZPdClPPh₃ (Figura 5.6) apresentam o aparecimento de sinais com deslocamentos químicos entre 7,9 e 7,3 ppm que são referentes aos hidrogênios da trifenilfosfina; e, no caso do DIAZPdOAcPPh₃, também observa-se o sinal singlete relativo aos hidrogênios da metila do grupo acetato ($\delta = 1,44 \text{ ppm}$). Além disso, nos complexos com trifenilfosfina, é possível observar o acoplamento dos hidrogênios metilênicos diastereotópicos do diazepam com o fósforo e o acoplamento do hidrogênio *orto* à ligação C-Pd também com o fósforo. Todos esses sinais em conjunto, confirmam a formação destes monômeros.

Figura 5.4 – Espectro de RMN de ^1H do DIAZPdCIPy em CDCl_3

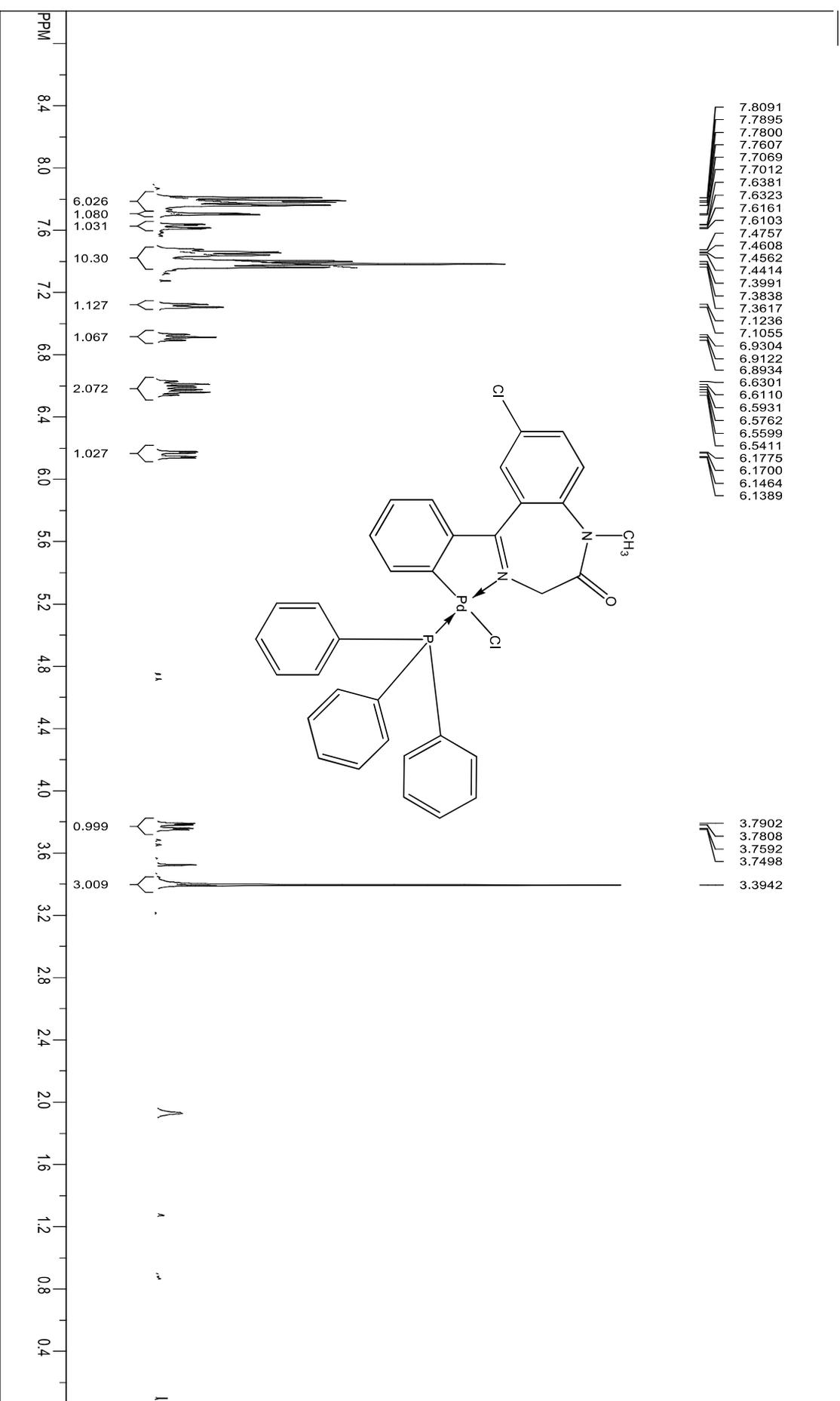


Fonte: Autora, 2017.

Figura 5.5 – Espectro de RMN de ^1H do DIAZPPdOAcPPh₃ em CDCl_3 

Fonte: Autora, 2017.

Figura 5.6 – Espectro de RMN de ^1H do DIAZPPdClPPH₃ em CDCl_3



Fonte: Autora, 2017.

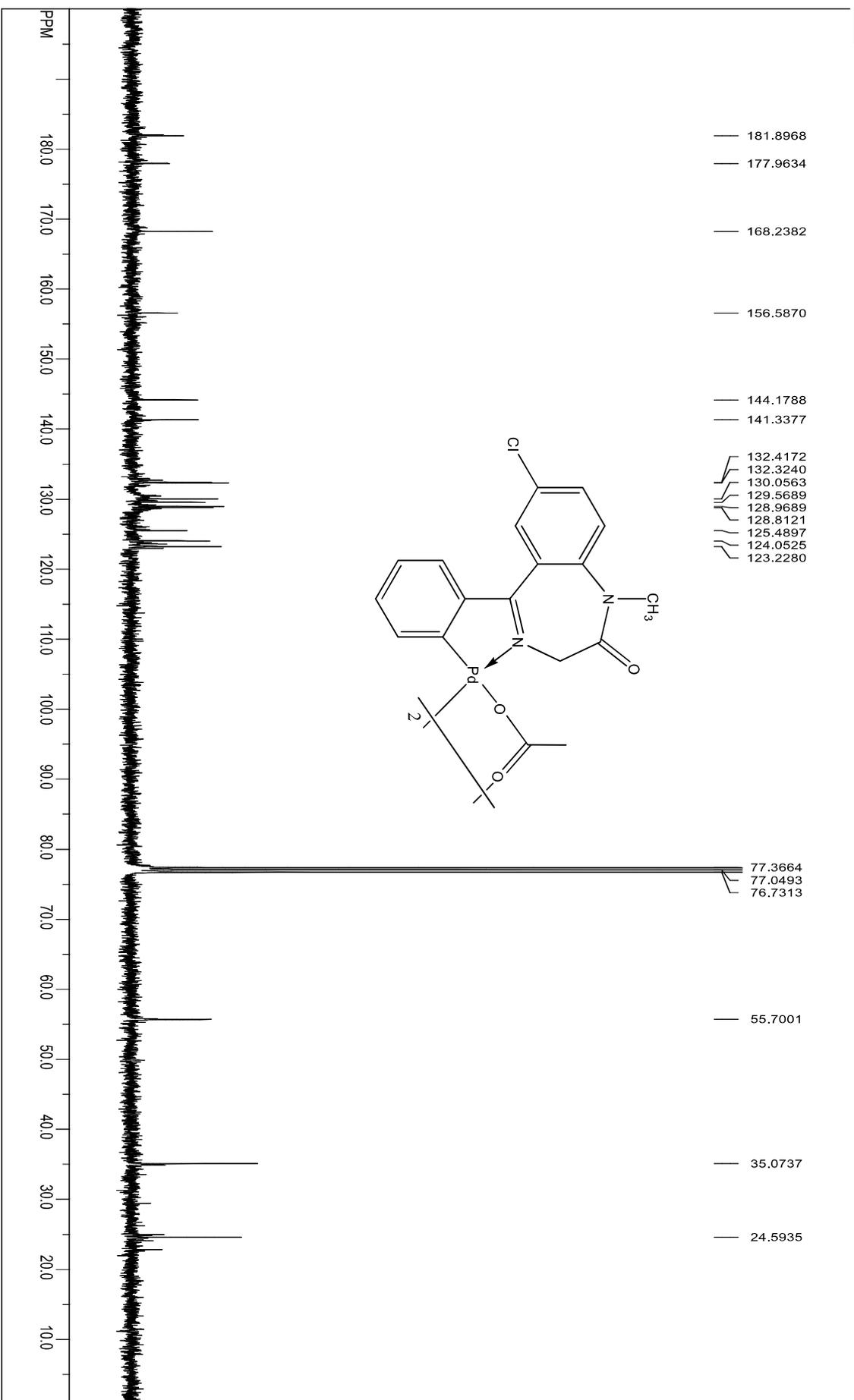
5.2.2 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN de ^{13}C)

Através da análise por RMN de ^{13}C de todos os complexos (Figuras 5.7 – 5.11) é possível identificar os sinais típicos de carbonila (δ entre 170 e 167 *ppm*) do diazepam e, naqueles que apresentam o grupo acetato (Figuras 5.7 e 5.10), é possível observar o sinal do carbono da metila (δ entre 25 e 23 *ppm*) e do carbono quaternário (δ entre 182 e 179 *ppm*) desse grupo. Além disso, comparando-se os espectros de RMN de ^{13}C dos complexos com o do ligante livre (Apêndice C), verifica-se o deslocamento dos sinais do C=N e de um dos átomos de carbono orto do substituinte 5-fenila para valores de frequência bem mais elevados (δ de ≈ 169 *ppm* para valores entre 181 e 177 *ppm*, e de ≈ 130 *ppm* para valores entre 160 e 153 *ppm*, respectivamente), indicando a ciclopaladação.

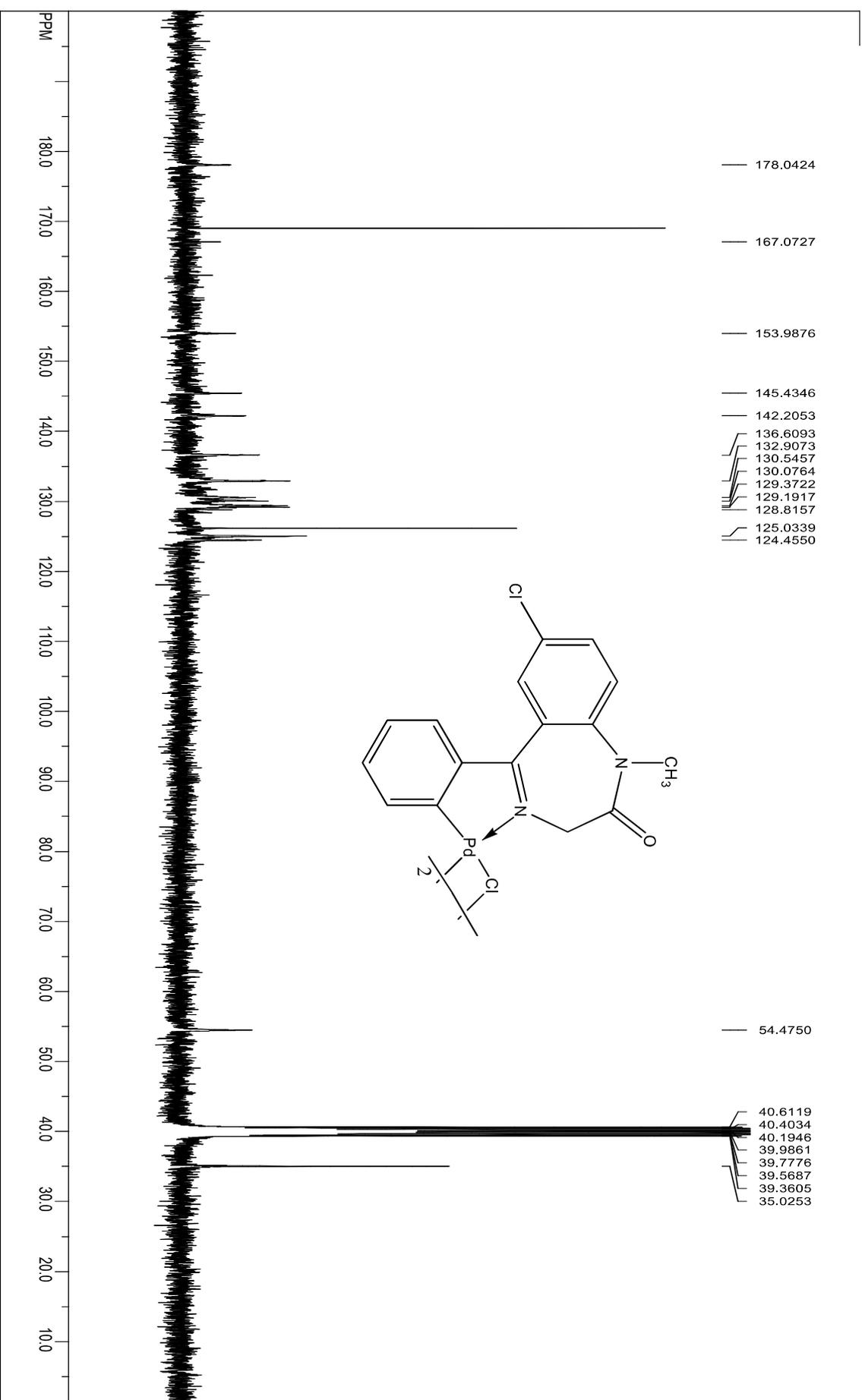
Existem particularidades referentes aos monômeros que cabem ser destacadas. Quanto ao DIAZPdClPy (Figura 5.9), através do seu espectro de RMN de ^{13}C é possível observar além dos sinais referentes ao diazepam, o acréscimo de sinais que são referentes à piridina: o sinal referente ao carbono quaternário que se encontra em *para* ao nitrogênio ($\delta = 132,62$ *ppm*) e os sinais dos carbonos terciários que se encontram em *orto* ($\delta = 153,19$ *ppm*) e em *meta* ($\delta = 125,62$ *ppm*) ao nitrogênio, estes últimos apresentam-se superpostos pois esses carbonos encontram-se em ambientes magnéticos equivalentes. Já os espectros dos complexos DIAZPdOAcPPh₃ (Figura 5.10) e DIAZPdClPPh₃ (Figura 5.11), mostram sinais referentes à trifenilfosfina, de forma mais específica é possível observar: dois sinais muito intensos referentes aos carbonos terciários em *orto* ($\delta \approx 135$ *ppm*) e em *meta* ($\delta \approx 128$ *ppm*), ambos como dupletos devido ao acoplamento com o átomo de fósforo; um sinal duplete referente aos carbonos quaternários ($\delta \approx 139$ *ppm*) que estão acoplados ao átomo de fósforo; e um sinal duplete de intensidade elevada referente aos carbonos terciários que se encontram em *para* ($\delta \approx 131$ *ppm*), que estão fracamente acoplados ao átomo de fósforo.

5.2.3 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^{31}P (RMN de ^{31}P)

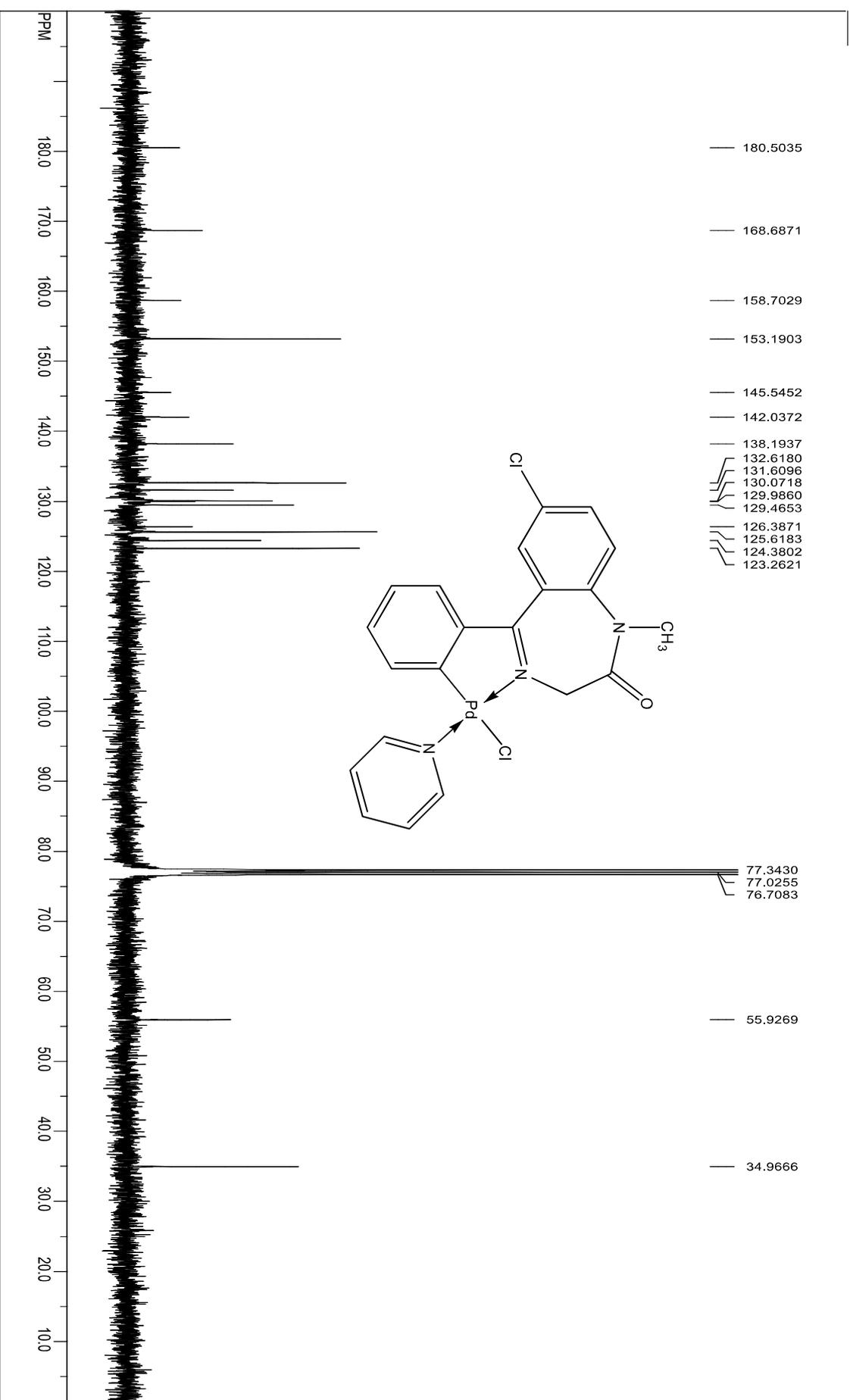
Através da análise por RMN de ^{31}P dos complexos DIAZPdOAcPPh₃ (Figura 5.12) e DIAZPdClPPh₃ (Figura 5.13) foi possível identificar, em ambos os espectros, sinais de fósforo que evidenciam a presença do ligante trifenilfosfina. No caso do espectro do DIAZPdOAcPPh₃ foi possível identificar dois sinais: um majoritário, referente ao complexo que apresenta uma relação *trans* entre as ligações N-Pd e Pd-P; e um minoritário, referente ao complexo que apresenta uma relação *cis* entre essas ligações.

Figura 5.7 – Espectro de RMN de ^{13}C do DIAZPDAOAcD em CDCl_3 

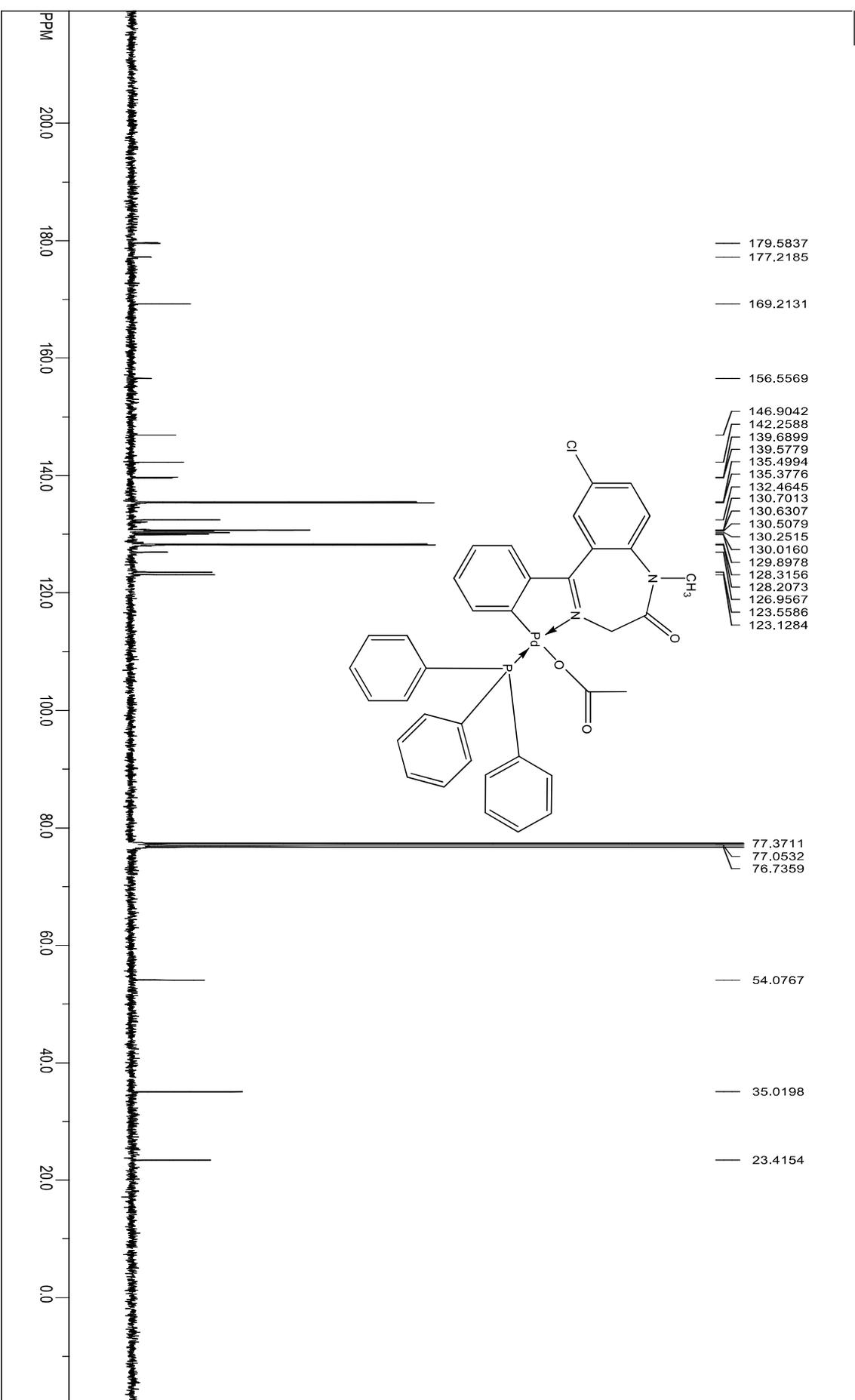
Fonte: Autora, 2017.

Figura 5.8 – Espectro de RMN de ^{13}C do DIAZPPCID em DMSO-d_6 

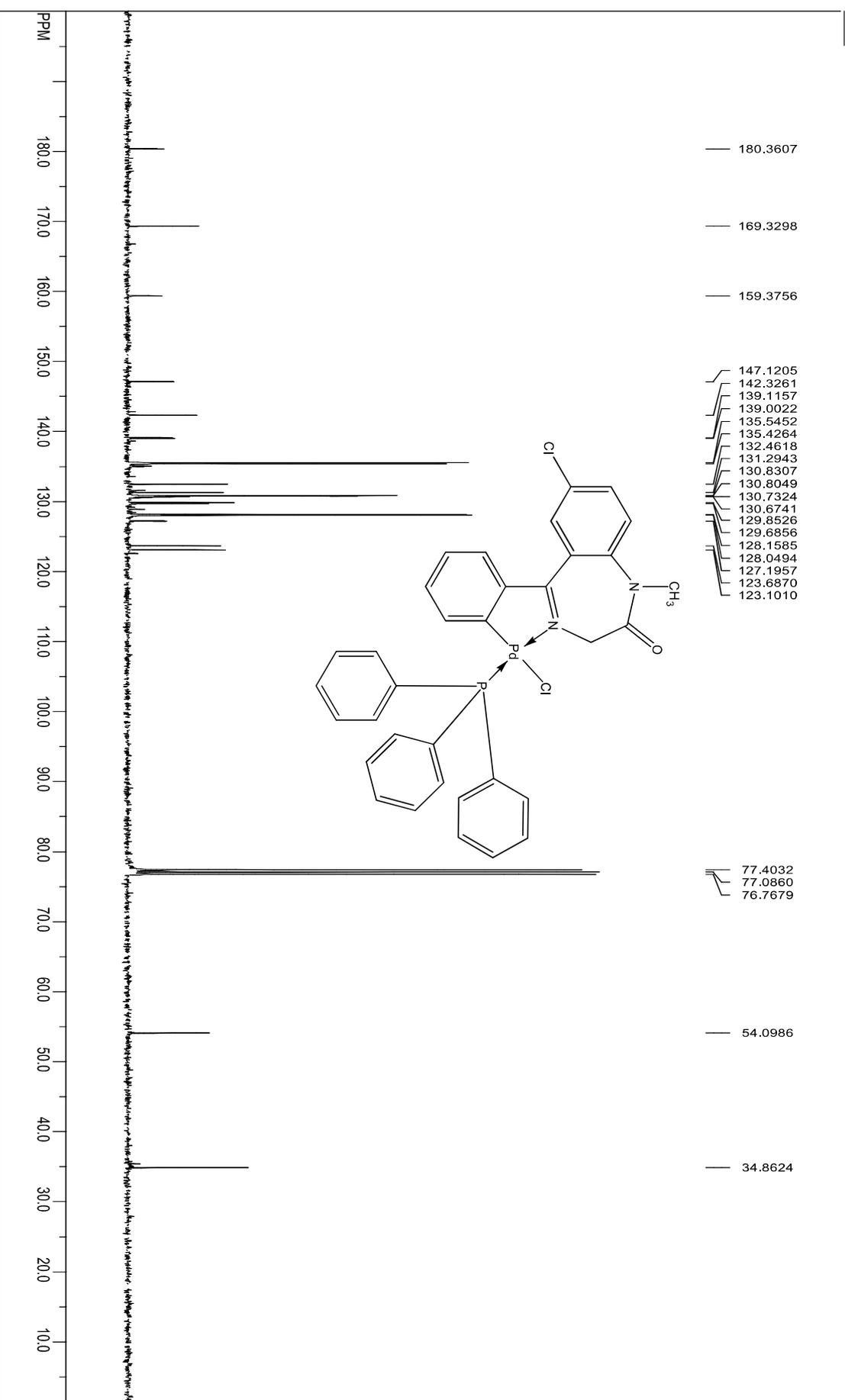
Fonte: Autora, 2017.

Figura 5.9 – Espectro de RMN de ^{13}C do DIAZPDClPy em CDCl_3 

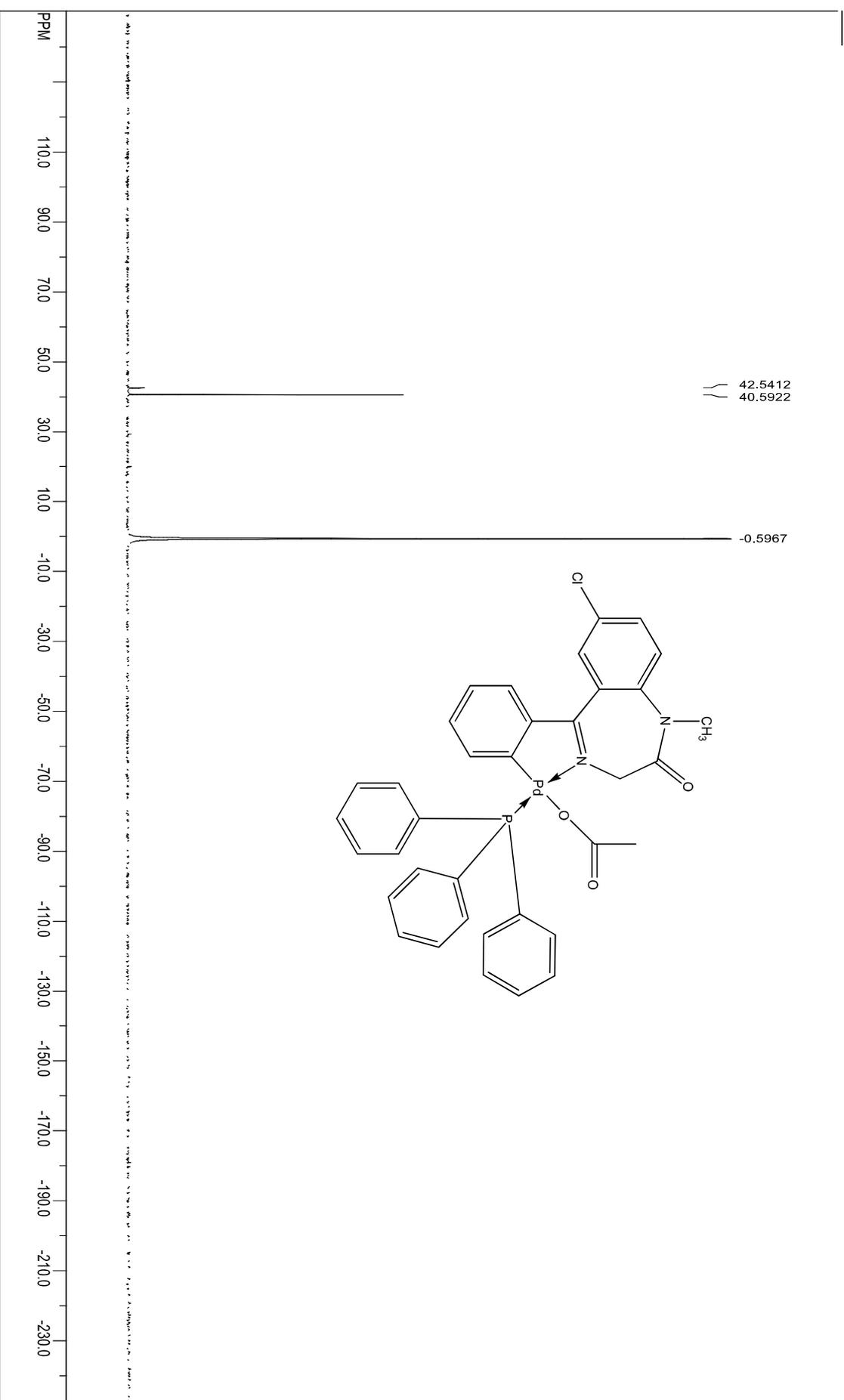
Fonte: Autora, 2017.

Figura 5.10 – Espectro de RMN de ^{13}C do DIAZPDAOcPPh₃ em CDCl_3 

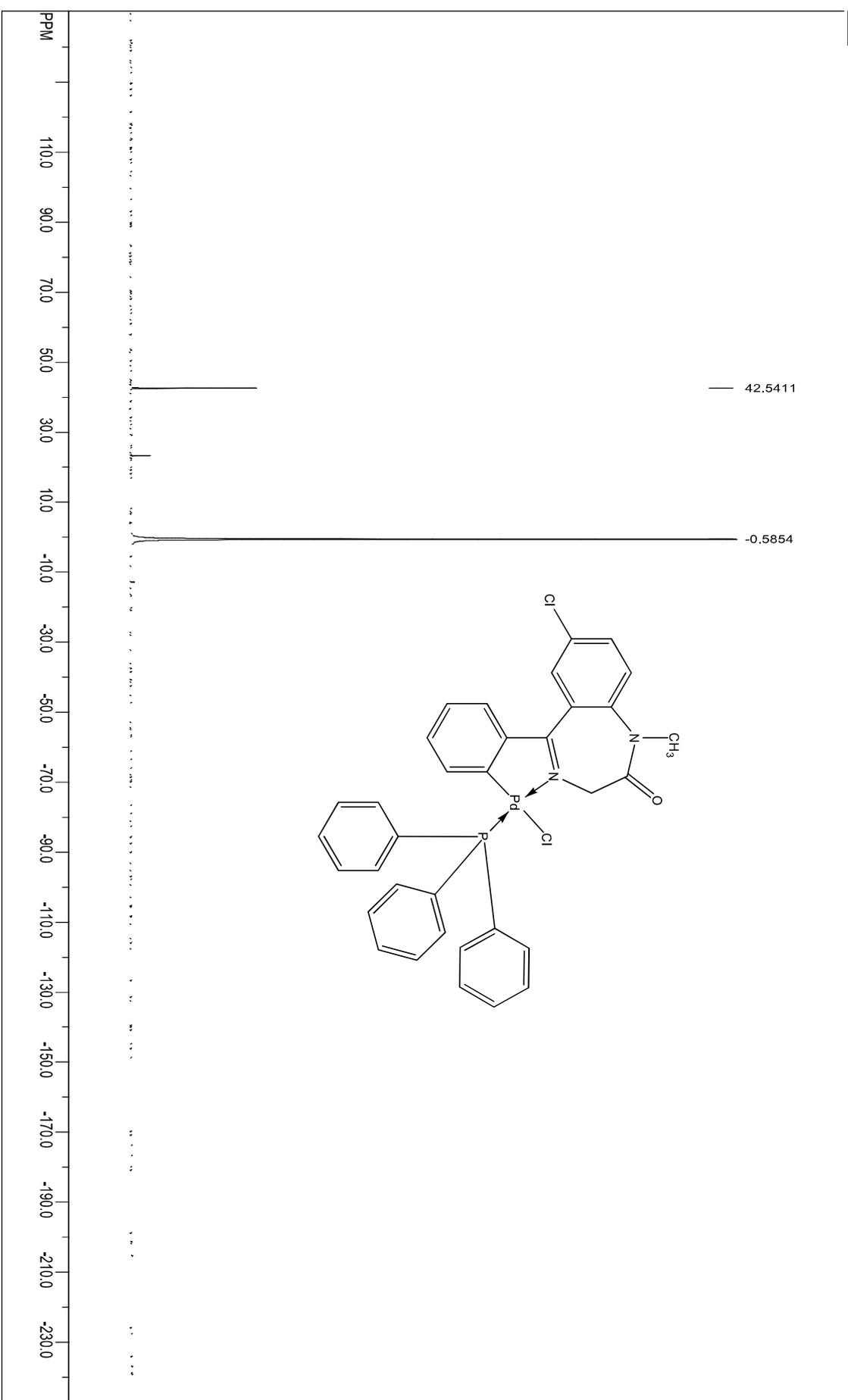
Fonte: Autora, 2017.

Figura 5.11 – Espectro de RMN de ^{13}C do DIAZPdClPPh₃ em CDCl_3 

Fonte: Autora, 2017.

Figura 5.12 – Espectro de RMN de ^{31}P do DIAZPdOAcPPh₃ em CDCl_3 

Fonte: Autora, 2017.

Figura 5.13 – Espectro de RMN de ^{31}P do DIAZPdClPPh₃ em CDCl_3 

Fonte: Autora, 2017.

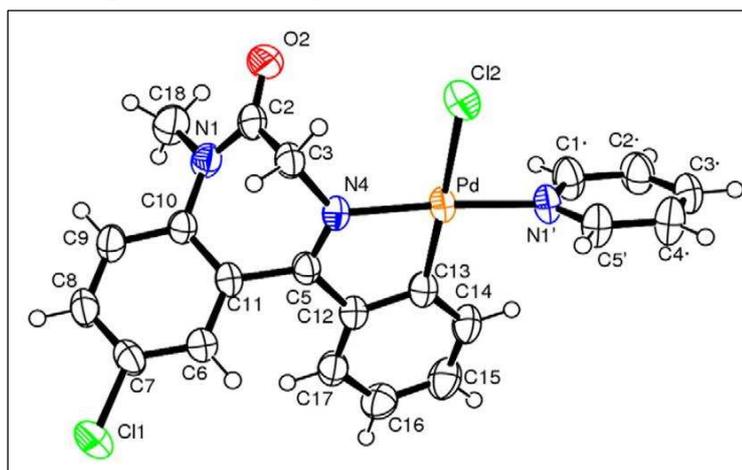
5.2.4 Espectroscopia no Infravermelho Médio (IV)

Os espectros de infravermelho dos dímeros (Apêndices D e E) e monômeros (Apêndices F, G e H) foram comparados com o do ligante livre (Apêndice I), observando-se assim todas as principais bandas características do diazepam como, por exemplo, a banda em $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ referente à carbonila e à imina do anel diazepínico. Além disso, nos espectros dos complexos DIAZPdOAcD e DIAZPdOAcPPh₃, foi possível observar as bandas características do grupo acetato. Esses resultados juntamente com a mudança observada na coloração dos dímeros e monômeros quando comparados ao ligante livre dão indícios da formação dos complexos.

5.2.5 Difração de Raios X

O monômero DIAZPdClPy teve sua estrutura química elucidada por difração de raios X em estudo que foi publicado previamente pelo grupo (BARROS et al., 2016), onde foi possível observar a formação do paladaciclo e relação *trans* entre a ligação Pd-N(4) e Pd-N(1'), como indicado na Figura 5.14.

Figura 5.14 – Projeção Ortep do DIAZPdClPy

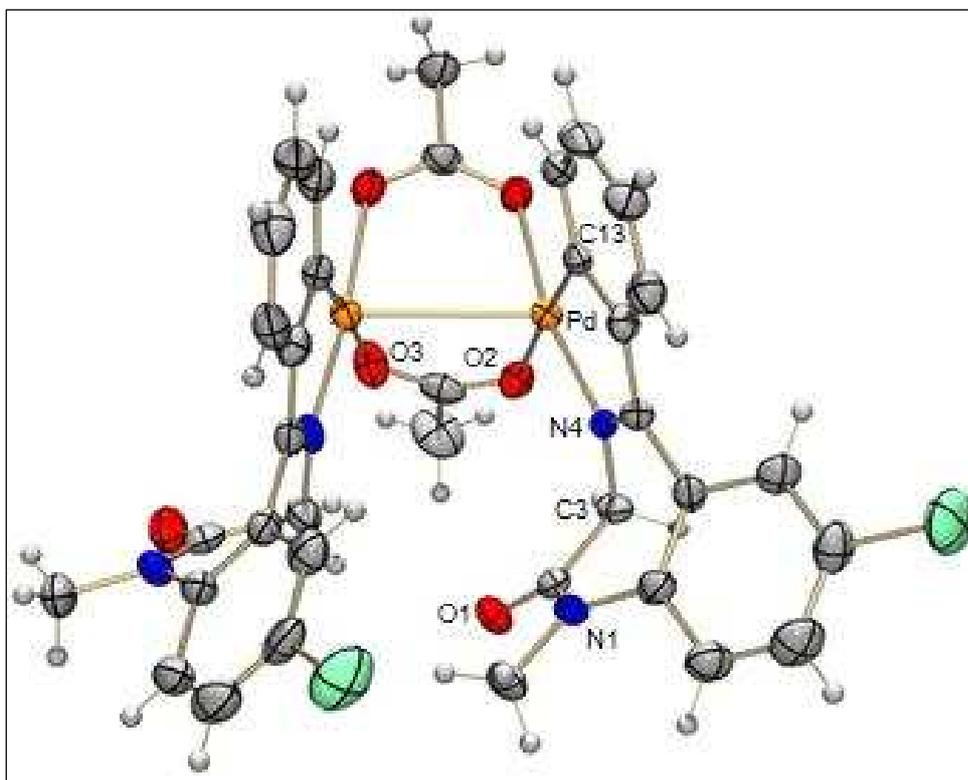


Fonte: BARROS et al., 2016.

A estrutura molecular do dímero DIAZPdOAcD também foi determinada por difração de raios X, ver Figura 5.15. Os cristais deste complexo foram obtidos pela cristalização lenta do dímero em uma solução etanol/água. Através da projeção ORTEP, é possível observar que os grupos acetato apresentam-se como ponte entre os dois paládios(II) presentes na molécula, além disto observa-se o arranjo de livro aberto do dímero e que o mesmo foi cristalizado na

conformação cisoide. Cada átomo de paládio apresenta geometria quadrada plana distorcida e, além de se ligar ao grupo acetato através do átomo de oxigênio, está ligado a um diazepam desprotonado através do átomo de nitrogênio imínico, N(4), do anel diazepínico e de um dos átomos de carbono *orto* do substituinte 5-fenila, C(13); formando o paladaciclo.

Figura 5.15 – Projeção Ortep do DIAZPdOAcD



Fonte: Autora, 2017.

5.2.6 Análise Elementar e Espectrometria de Massas

Os resultados obtidos através da análise elementar dos complexos sintetizados mostraram-se satisfatórios; com exceção, do resultado para o monômero DIAZPdCIPy que não foi condizente com sua fórmula molecular, o que pode ser explicado devido a presença de água e a decomposição deste complexo. Cabe salientar que o referido monômero foi bem caracterizado por infravermelho e RMN; além disso, ele teve sua estrutura química elucidada por difração de raios X (BARROS et al., 2016).

Através da análise dos dímeros DIAZPdCID e DIAZPdOAcD por espectrometria de massas foi possível observar a razão massa/carga do íon molecular, ou seja, do íon resultante da ruptura da ponte cloro e acetato, respectivamente.

5.3 Avaliação da atividade anticonvulsivante

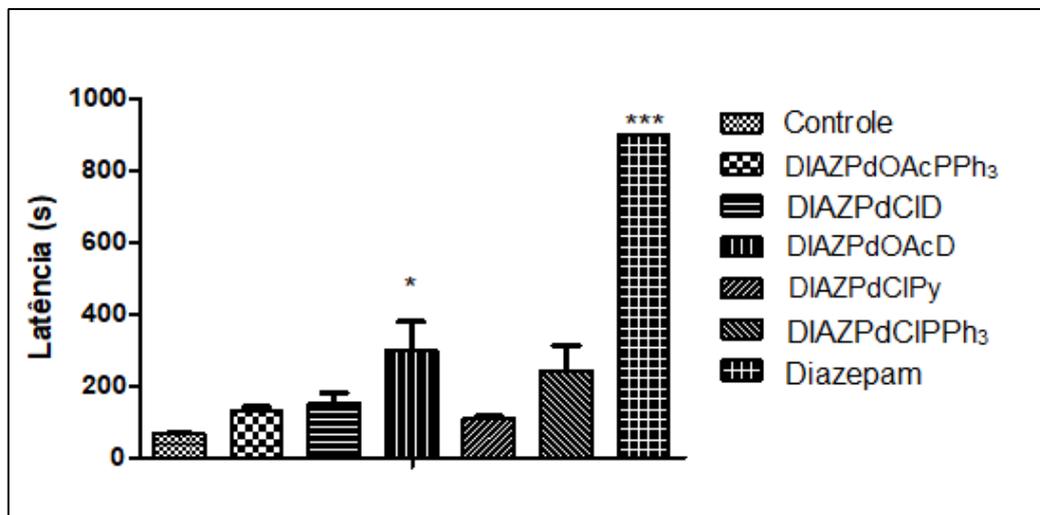
A avaliação da atividade anticonvulsivante dos paladacilos diméricos derivados do diazepam (DIAZPdOAcD e DIAZPdCID) foi realizada anteriormente através de um teste farmacológico utilizando o PTZ como indutor das convulsões em camundongos e mostrou resultados significativos (BARROS et al., 2016). Com o intuito de realizar uma comparação da atividade anticonvulsivante dos cinco complexos sintetizados no presente estudo e do diazepam, realizou-se o mesmo teste utilizado anteriormente; para isto administrou-se a dose de 21 $\mu\text{mol/kg}$ (dose de diazepam utilizada como padrão para este teste) dos compostos a serem testados e, após 60 minutos, administrou-se PTZ (60 mg/kg).

A escolha desse teste foi realizada por este ser um dos testes de triagem de fármacos anticonvulsivantes mais utilizado no mundo (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2008). O diazepam foi escolhido como fármaco padrão nesse teste pelo fato dos paladacilos serem derivados desse fármaco e, principalmente, por bloquear as convulsões atuando em canais para os íons cloreto associados ao GABA_A , facilitando assim a transmissão GABAérgica (LAMBERTY; GOWER; KLITGAARD, 2002).

O PTZ é um potente agente convulsivante, que atua induzindo convulsões por inibir canais para íons cloreto associados a receptores GABA_A se ligando a um sítio específico nesse canal iônico (LÖSCHER; SCHMIDT, 2002; 2006). Além disso, o PTZ pode ainda induzir convulsões por um efeito excitatório direto sobre as membranas neuronais (FAINGOLD, 1987).

De acordo com os resultados obtidos dos complexos sintetizados e do diazepam (Figura 5.16), somente o dímero com ponte acetato foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0,05$) o tempo de latência para o aparecimento de convulsões quando os complexos foram comparados ao grupo controle; no entanto, o diazepam mostrou-se mais eficaz que todos os complexos, pois foi o único que inibiu completamente o aparecimento das convulsões durante todo o tempo avaliado e quando comparado ao grupo controle apresentou $p < 0,001$. Como tentativa de aumentar a atividade do DIAZPdOAcD, pode-se realizar modificações em sua estrutura; além disso, é possível obter novos monômeros a partir deste dímero adicionando-se outros ligantes que também apresentem atividade anticonvulsivante com o intuito de obter um sinergismo deste efeito.

Figura 5.16 - Efeito do tratamento agudo com DIAZPdOAcD, DIAZPdClD, DIAZPdOAcPPh₃, DIAZPdClPPh₃, DIAZPdClPy ou diazepam na dose de 21 µmol/kg, no teste das convulsões induzidas pelo PTZ em camundongos^a



^a Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média de 6 camundongos por grupo, * p<0,05 e *** p<0,001: valores comparados ao grupo controle.

Fonte: Autora, 2017.

Estudos realizados previamente pelo grupo utilizando um teste no qual se administra flumazenil (antagonista competitivo específico dos receptores GABA_A-BDZ) antes dos pré-tratamentos com os dímeros em modelos de convulsão induzidos pelo PTZ, mostraram que os efeitos anticonvulsivantes dos dímeros foram antagonizados pelo pré-tratamento com o antagonista, sugerindo um possível efeito desses complexos no mesmo sítio de ligação nos receptores GABA_A-BDZ (BARROS et al., 2016).

5.4 Avaliação bioquímica de biomarcadores de estresse oxidativo

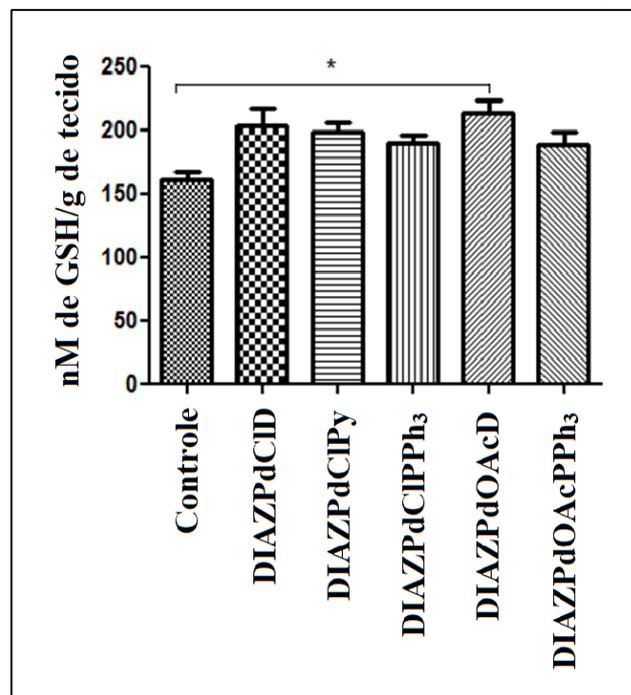
O estresse oxidativo, que é resultante da liberação excessiva de radicais livres, provavelmente está envolvido na iniciação e progressão da epilepsia; por isto, terapias antioxidantes destinadas a reduzir o estresse oxidativo estão recebendo atenção considerável no tratamento da epilepsia (SHIN et al., 2011).

Uma característica do estresse oxidativo é o desequilíbrio que ocorre no organismo humano entre as substâncias oxidantes e antioxidantes, assim, os níveis de antioxidantes endógenos provavelmente serão perturbados pela geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio induzidas pela convulsão (MAZHAR; MALHI; SIMJEE, 2017). Por isto, foram avaliados os níveis de GSH (antioxidante não-enzimático), a atividade de SOD e GPx (antioxidantes enzimáticos) e a capacidade antioxidante total (ensaio de FRAP). Os

complexos foram avaliados quanto ao efeito sobre estes biomarcadores de estresse oxidativo na mesma dose utilizada para o teste anticonvulsivante, ou seja, 21 $\mu\text{mol/kg}$ (i.p.).

Os resultados da avaliação dos níveis de GSH (Figura 5.17) mostraram que todos os complexos aumentaram os níveis deste antioxidante; no entanto, somente o DIAZPdOAcD promoveu um aumento de forma significativa ($p < 0,05$) destes níveis. Estudo realizado por Mazhar, Malhi e Simjee (2017), utilizando o modelo de abasamento com PTZ, que foi administrado em dias alternados por 34 dias, mostrou que o diazepam aumentou os níveis de GSH quando comparado ao controle no qual se administrou apenas PTZ.

Figura 5.17 - Efeito do tratamento com DIAZPdOAcD, DIAZPdCID, DIAZPdOAcPPh₃, DIAZPdCIPPh₃ ou DIAZPdCIPy, sobre a atividade da GSH em camundongos^a



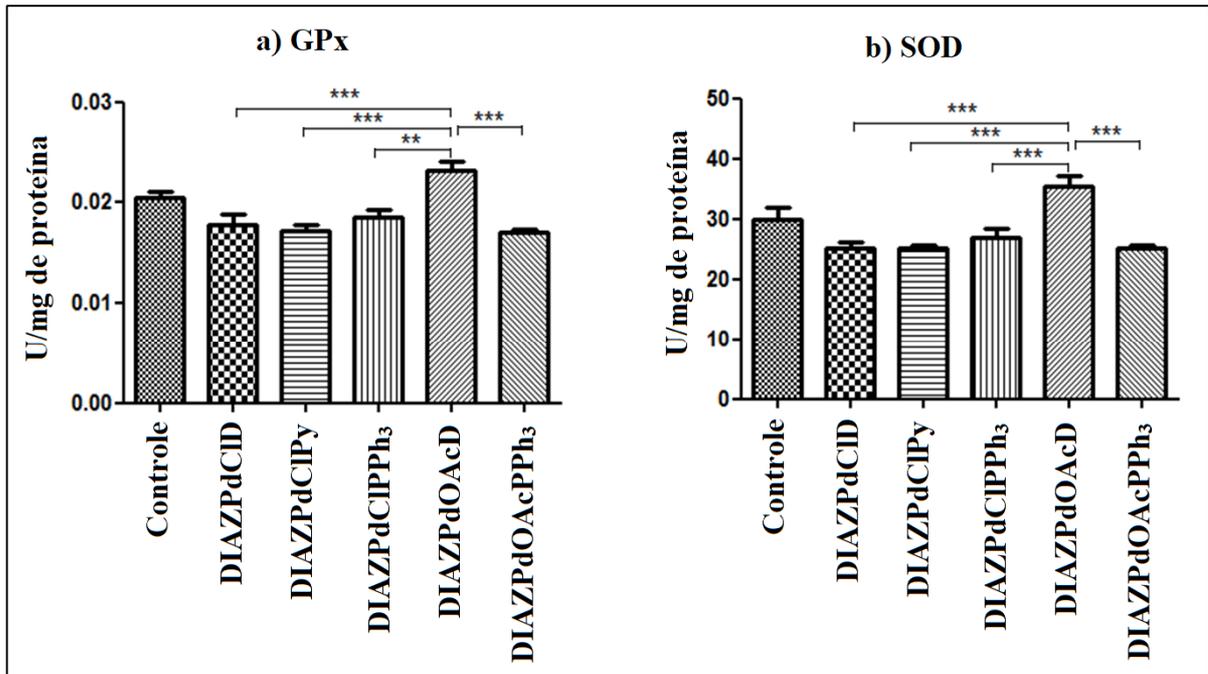
^a Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 6 camundongos por grupo, * $p < 0,05$: valores comparados entre grupos. Teste ANOVA de uma via seguido do teste post hoc de Tukey. Fonte: Autora, 2017.

Segundo Mazhar, Malhi e Simjee (2017), o aumento dos níveis de GSH indica que houve uma diminuição na geração de ERO; um possível mecanismo para este aumento de GSH esta relacionado ao aumento da absorção celular de cisteína, componente integral da GSH e fator limitante em sua biossíntese.

Quanto aos resultados da avaliação da atividade das enzimas GPx e SOD (Figura 5.18), o DIAZPdOAcD aumentou a atividade destas enzimas e os outros complexos promoveram uma diminuição na atividade das mesmas ao ser feita a comparação com o controle; no entanto, as diferenças não foram significativas. Estudo realizado por Mazhar,

Malhi e Simjee (2017), utilizando o modelo de abrasamento com PTZ, mostrou que o diazepam aumentou a atividade da enzima SOD quando comparado ao controle com PTZ, este aumento pode ser atribuído à propriedade de eliminação de radical.

Figura 5.18 - Efeito do tratamento com DIAZPdOAcD, DIAZPdCID, DIAZPdOAcPPh₃, DIAZPdCIPPh₃ ou DIAZPdCIPy, sobre a atividade das enzimas SOD e GPx em camundongos^a

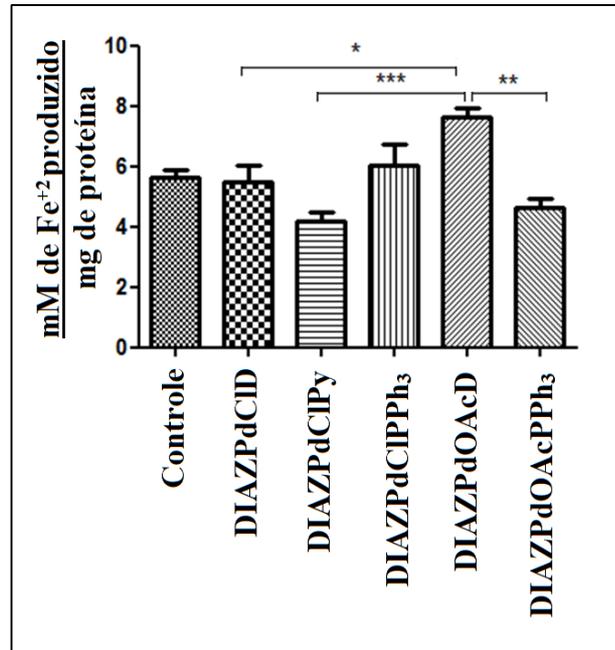


^a Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 6 camundongos por grupo e por experimento, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$: valores comparados entre grupos. Teste ANOVA de uma via seguido do teste post hoc de Tukey.

Fonte: Autora, 2017.

A capacidade antioxidante total dos complexos foi avaliada através do ensaio FRAP, que é capaz de medir o poder de redução do íon ferro baseando-se na produção de Fe^{2+} a partir da redução de Fe^{3+} (KATALINIC et al., 2005). Os resultados deste ensaio (Figura 5.19) mostraram que somente o tratamento com o dímero DIAZPdOAcD aumentou a capacidade antioxidante total quando comparado ao controle, no entanto, esta diferença não foi significativa. Este teste, diferentemente dos outros que foram citados anteriormente, não está relacionado com um antioxidante específico, indica apenas se a amostra apresenta potencial antioxidante. De acordo com Katalinic e colaboradores (2005), ele reflete com precisão os níveis plasmáticos de ácido ascórbico, ácido úrico e α -tocoferol, pequena moléculas que fazem parte do sistema de defesa antioxidante de organismos vivos.

Figura 5.19 - Efeito do tratamento com DIAZPdOAcD, DIAZPdCID, DIAZPdOAcPPh₃, DIAZPdCIPPh₃ ou DIAZPdCIPy, sobre a capacidade antioxidante total (ensaio FRAP) em camundongos^a



^a Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 6 camundongos por grupo. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$: valores comparados entre grupos. Teste ANOVA de uma via seguido do teste post hoc de Tukey. Fonte: Autora, 2017.

Com base nos resultados, o dímero DIAZPdOAcD apresentou um potencial efeito neuroprotetor, pois este complexo promoveu o aumento dos níveis de GSH de forma significativa; além disso, também aumentou a capacidade antioxidante total e a atividade das enzimas SOD e GPx. Tal efeito é desejável para substâncias que possam ser utilizadas no tratamento da epilepsia devido a relação entre estresse oxidativo e convulsão.

5.5 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos

A avaliação da citotoxicidade pelo método do MTT (Tabela 5.2), frente a macrófagos da linhagem J774.A1, foi realizada com os seguintes compostos: DIAZPdOAcD, DIAZPdCID, DIAZPdCIPy, DIAZPdCIPPh₃, DIAZPdOAcPPh₃, diazepam, PdCl₂ e Pd(OAc)₂. Este método quantifica por espectrofotometria os cristais de formazan, de cor azul e insolúveis em água, produzidos devido à redução metabólica do MTT pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase associada a NADPH e NADH; dessa forma, este método é capaz de medir a atividade metabólica das células (MOSMANN, 1983).

Tabela 5.2 – Determinação da citotoxicidade das amostras em macrófagos pelo Método do MTT^a

Tratamento	CI ₅₀ (μM) ^b	Citotoxicidade Máxima (%) ^c
Diazepam	> 100	ND ^d
PdCl ₂	> 100	ND
Pd(OAc) ₂	> 100	ND
DIAZPdOAcD	28 ± 0,6	100 ± 0***
DIAZPdClD	54 ± 0	100 ± 0***
DIAZPdOAcPPh ₃	4,8 ± 0	100 ± 0***
DIAZPdClPPh ₃	55 ± 0	100 ± 0***
DIAZPdClPy	36,3 ± 2,5	100 ± 0***

^a Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média, *** p <0,001: valores comparados ao grupo 0,1% DMSO. ^b Concentração Inibitória 50 (CI₅₀) calculada pelas curvas tóxicas concentração-resposta. ^c Citotoxicidade Máxima para a célula até a concentração de 100 μM comparada ao grupo DMSO. ^d ND: Não determinada.

Fonte: Autora, 2017.

Os resultados mostram que o ligante livre e os sais utilizados como fontes de paládio não foram deletérios para os macrófagos; no entanto, os complexos mostraram-se tóxicos para estas células. Este resultado é um ponto negativo para os complexos sintetizados; entretanto, não deve ser levado em consideração sozinho, cabe destacar que o DIAZPdOAcD, mostrou resultados significativos de atividade anticonvulsivante e antioxidante, desempenhando um papel neuroprotetor. Dessa forma, pode-se afirmar que modificações no DIAZPdOAcD, com o intuito de obter complexos com maior atividade e menor toxicidade que diazepam são interessantes na área de pesquisa por novas propostas para o tratamento da epilepsia.

5 CONCLUSÕES

Foram sintetizados cinco complexos de paládio(II) derivados do diazepam: DIAZPdClD, DIAZPdClPPh₃, DIAZPdClPy, DIAZPdOAcD e DIAZPdOAcPPh₃. A síntese de tais complexos mostrou-se rápida e eficaz, visto que através das técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho foi possível confirmar a formação dos mesmos. Através de estudos cristalográficos por difração de raios X foi possível obter a estrutura química do DIAZPdOAcD, onde se observou a geometria quadrada plana distorcida do paládio(II), a ocorrência da ciclopaladação e a forma de livro aberto deste dímero.

Por meio dos testes realizados para avaliação da atividade anticonvulsivante dos complexos sintetizados foi possível observar que o dímero DIAZPdOAcD promoveu um aumento no tempo de latência para o aparecimento das convulsões de forma significativa. Além disso, foi possível notar que apenas o DIAZPdOAcD mostrou atividade antioxidante significativa. O resultado da avaliação da citotoxicidade em macrófagos mostrou que todos os complexos foram tóxicos para estas células, o que não foi observado para o diazepam. No entanto, um destaque deve ser dado ao dímero DIAZPdOAcD, visto que, mesmo apresentando-se tóxico neste experimento realizado, ele apresentou um efeito protetor contra o aparecimento de convulsões e um potencial efeito neuroprotetor, que são pontos positivos para a descoberta de novos fármacos para o tratamento da epilepsia.

REFERÊNCIAS

ALBRECHT, M. C–H bond activation. In: DUPONT, J.; PFEFFER, M. **Palladacycles: synthesis, characterization and applications**. Weinheim: WILEY-VCH, 2008.

ALVES, F. E.; SILVA, P. P.; GUERRA, W. Metais do grupo da platina: história, propriedades e aplicações. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 119, p. 27-33, 2010.

ARANDAS, F. S.; SENA, E. P. Drogas antiepilépticas. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

AVERSA, M. C. et al. Metal complexes of benzodiazepines: part 1; synthesis, crystal structure, and characterization in solid and solution of *trans*-dichloro(7,8-dichloro-2,3-dihydro-2,2,4-trimethyl-1*H*-1,5-benzodiazepine)(tri-*n*-propylphosphine)-palladium(II). **Journal of Chemical Society, Dalton Transactions**, p. 2433-2436, 1990.

AVERSA, M. C. et al. Metal complexes of benzodiazepines: part 3; synthesis and characterization of organometallic complexes of platinum (II). **Journal of Chemical Society, Dalton Transactions**, p. 3431-3434, 1991.

BARROS, W. B. Z. G. et al. Palladium-benzodiazepine derivatives as promising metallodrugs for the development of antiepileptic therapies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 155, p. 129-135, 2016.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; BARREIRO, E. J. Considerações sobre a química bioinorgânica medicinal. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, p. 131-142, 2007.

BENTES, C. C.; PIMENTEL, J. G. Estado de mal convulsivo: aspectos fisiopatológicos e clínicos. **Acta Médica Portuguesa**, v. 16, p. 77-80, 2003.

BERALDO, H. Contribuições da química inorgânica para a química medicinal. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p. 4-6, 2005.

BERALDO, H. Tendências atuais e as perspectivas futuras da química inorgânica. **Ciência e Cultural**, v. 63, n. 1, p. 29-32, 2011.

BERALDO, H.; MORTIMER, E. F. Introdução. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p. 3, 2005.

BIOTÉRIO UNIFENAS. **Animais**. Disponível em:
<<http://www.unifenas.br/pesquisa/bioterio/animais.asp>>. Acesso em: 10 nov. 2011.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. Epilepsia**. Portaria SAS/MS nº 1319, de 25 de novembro de 2013. Retificada em 27 de novembro de 2015

CHARNEY, D. S.; MIHIC, S. J.; HARRIS, R. A. Hipnóticos e sedativos. In: GOODMAN; GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.

CINELLU, M. A. et al. Cyclometallated derivatives of palladium(II) with 1,4-benzodiazepin-2-ones: crystal structure of (L-H)Pd(PPh₃)Cl·CHCl₃ (L = prazepam: 7-chloro-1-cyclopropylmethyl-1,3-dihydro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one); synthesis of isoindolo[2,1-d][1,4]benzodiazepine derivatives by reaction of [(L-H)PdCl]₂ species with carbon monoxide. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 401, n. 3, p. 371-384, 1991.

CUSUMANO, M. et al. Metal complexes of benzodiazepines: part 2; the reaction of 1,4-benzodiazepines with halide-bridged complexes of palladium(II) [Pd₂X₄(PPrn₃)₂] (X = Cl or I). **Journal of Chemical Society, Dalton Transactions**, p.1581-1584, 1991.

DEVI, P. U.; MANOCHA, A.; VOHORA, D. Seizures, antiepileptics, antioxidants and oxidative stress: an insight for researchers. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 9, n. 18, p. 3169-3177, 2008.

DE WAELE, L. et al. First line management of prolonged convulsive seizures in children and adults: good practice points. **Acta Neurologica Belgica**, v. 113, n. 4, p. 375-380, 2013.

FAINGOLD, C. L. Seizures induced by convulsant drug. In: JOBE, P. C.; LAIRD II, H. E. (Eds.) **Neurotransmitters and Epilepsy**. The Humans Press, Clifton, p. 215-275, 1987.

FARRUGIA, L. J. WinGX and ORTEP for Windows: an update. **Journal of Applied Crystallography**, v. 45, n. 4, p. 849-854, 2012.

FISHER, R. S. et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475-482, 2014.

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, 2005.

FORIZS, E. et al. ESR study of some Cu(II)-oxazepam complexes. **Applied Magnetic Resonance**, v. 16, p. 499-506, 1999.

FORIZS, E. et al. IR and ESR study of Cu(II)-nitrazepam complexes. **Journal of Molecular Structure**, v. 408/409, p. 195-199, 1997.

FORMAN, S. A. et al. Farmacologia da Neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica. In: GOLAN, D. E. et al. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. [S.l.]: Guanabara Koogan, 2009.

GAROUFIS, A.; HADJIKAKOU, S. K.; HADJILIADIS, N. ⁴⁶Pd The use of palladium complexes in medicine. In: GIELEN, M.; TIEKINK, E. R. T. **Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents – the use of metals in medicine**. Chichester: John Wiley & Sons, 2005.

GRIFFIN, E. A.; LOWENSTEIN, D. H. Farmacologia da neurotransmissão elétrica anormal no sistema nervoso central. In: GOLAN, D. E. et al. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. [S.l.]: Guanabara Koogan, 2009.

HAMBLEY, T. W. Developing new metal-based therapeutics: challenges and opportunities. **Dalton Transactions**, p. 1–9, 2007.

HUSSAIN, R. F.; NOURI, A. M.; OLIVER, R. T. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. **Journal Immunological Methods**, 160, p. 89-96, 1993.

KATALINIC, V. et al. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 140, p. 47–52, 2005.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **Febs Letters**, v. 495, n. 1-2, p. 12-15, 2001

LAMBERTY, Y.; GOWER, A. J.; KLITGAARD, H. The new antiepileptic drug levetiracetam normalizes chlordiazepoxide withdrawal-induced anxiety in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 439, p. 101-106, 2002.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. **Epilepsy Research**, v. 50, n. 1-2, p. 3-16, 2002.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: Innovative strategies. **Epilepsy Research**, v. 69, n. 3, p. 183–272, 2006.

LÜLLMANN, H. et al. **Color atlas of pharmacology**. Ilustrações de Jürgen Wirth. 2. ed. New York: Thieme Stuttgart, 2000. p. 227, il. color.

MAZHAR, F.; MALHI, S. M.; SIMJEE, S.U. Comparative studies on the effects of clinically used anticonvulsants on the oxidative stress biomarkers in pentylenetetrazole-induced kindling model of epileptogenesis in mice. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 31-42, 2017.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase, an enzyme function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MCNAMARA, J. O. Fármacos eficazes no tratamento das epilepsias. In: GOODMAN; GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.

MCNAMARA, J. O. Farmacoterapia das epilepsias. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

MINGHETTI, G. et al. C(3) aurated 1,4-benzodiazepin-2-ones: synthesis and characterization; crystal structure of (L)Au[P(C₆H₄CH₃-4)₃] (HL = 7-chloro-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one, diazepam). **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 553, p. 405-415, 1998.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

MOSSET, A et al. Solution and solid-state structural study of the copper(II) complex of diazepam. **Inorganic Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 290-294, 1980.

OLIVEIRA, A. A. et al. Antioxidant properties of antiepileptic drugs levetiracetam and clonazepam in mice brain after *in vitro*-induced oxidative stress. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 14, p. 278-288, 2016

OMAE, I. Intramolecular five-membered ring compounds and their applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 248, n. 11-12, p. 995-1023, 2004.

OMS, Organização Mundial de Saúde. **Epilepsy**, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>>. Acesso em: 05 jun. 2017

PÉREZ, J. et al. Synthesis and structure of the first ruthenated benzodiazepines. **Organometallics**, v. 21, n. 24, p. 5437-5438, 2002.

PERUCCA, P.; GILLIAM, F.G. Adverse effects of antiepileptic drugs. **The Lancet Neurology**, v. 11, n. 9, p. 792-802, 2012.

PINTO, M. C. X.; RESENDE, R. R. Excitotoxicidade e doenças neurológicas. **Nanocell News**, v. 2, n. 4, 2014. Disponível em: < <http://www.nanocell.org.br/excitotoxicidade-e-doencas-neurológicas/>>. Acesso em: 01 jul. 2017.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Plants with anticonvulsant properties: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 798-819, 2008.

RAFFA, R. B.; RAWLS, S. M.; BEYZAROV, E. P. Fármacos utilizados en trastornos del sistema nervioso central y en el tratamiento del dolor. In: _____. **Netter farmacología ilustrada**. Ilustrações de Frank H. Netter et al. 1. ed. Barcelona: Elsevier Masson, 2008. cap. 3, p. 57-91.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5. ed. [S.l.]: Elsevier, 2004.

RISS, J. et al. Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 118, n. 2, p. 69-86, 2008.

ROAT-MALONE, R. M. Metals in medicine. **Bioinorganic chemistry: a short course**. New Jersey: John Wiley and Sons, 2002. Cap. 7. p. 265-335.

RONCONI, L.; SADLER, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, p. 1633-1648, 2007.

RUMIÀ, J. et al. Oxidative stress markers in the neocortex of drug-resistant epilepsy patients submitted to epilepsy surgery. *Epilepsy Research*, v. 107, p. 75-81, 2013.

SANTULLI, L. et al. The challenges of treating epilepsy with 25 antiepileptic drugs. **Pharmacological Research**, v. 107, p. 211–219, 2016.

SCHEFFER, I. E. et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 512-521, 2017.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192–205, 1968.

SHELDRIK, G. M. **SADABS, Program for Empirical Absorption Correction of Area Detector Data**. University of Göttingen: Germany, 1997.

SHELDRIK, G. M. A short history of SHELX. **Acta Crystallographica Section A: Foundations and Advances**, v. 64, n. 1, p. 112-122, 2008.

SHIN, E.-J. et al. Role of oxidative stress in epileptic seizures. **Neurochemistry International**, v. 59, p. 122-137, 2011.

SIES, H. et al. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Letters**, v.103, p.287-290, 1979.

SILVA, P. P.; GUERRA, W. Paládio. **Química Nova na Escola**, v. 33, n. 1, p. 65-66, 2011.

SMART; SAINT. **Area Detector Control Integration Software**; Bruker Analytical X-ray Instruments, Inc.: Madison Wisconsin, USA, 1999.

SMITH, M.; WILCOX, K. S.; WHITE, H. S. Discovery of antiepileptic drugs. **Neurotherapeutics**, v. 4, p. 12-17, 2007.

SPENCER, J. et al. C-H activations on a 1*H*-1,4-benzodiazepin-2(3*H*)-one template. **Tetrahedron**, v. 64, n. 26, p. 6082–6089, 2008.

SPENCER, J. et al. Excellent correlation between cathepsin B inhibition and cytotoxicity for a series of palladacycles. **Dalton Transactions**, v. 48, p. 10731-10735, 2009.

STOCCORO, S. et al. Cyclometallated derivatives of platinum(II) derived from 1,4-benzodiazepin-2-ones: crystal and molecular structure of Pt(L)(HL)Cl(HL=7-chloro-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one, diazepam), a molecule containing a neutral and a deprotonated 1,4-benzodiazepin-2-one. **Inorganica Chimica Acta**, v. 215, n. 1-2, p. 17-26, 1994.

SURESH et al. Synthetic, spectral and thermal studies of tin(IV) complexes of 1,5-benzodiazepines. **E-Journal of Chemistry**. v. 5, n. 3, p. 627-633, 2008.

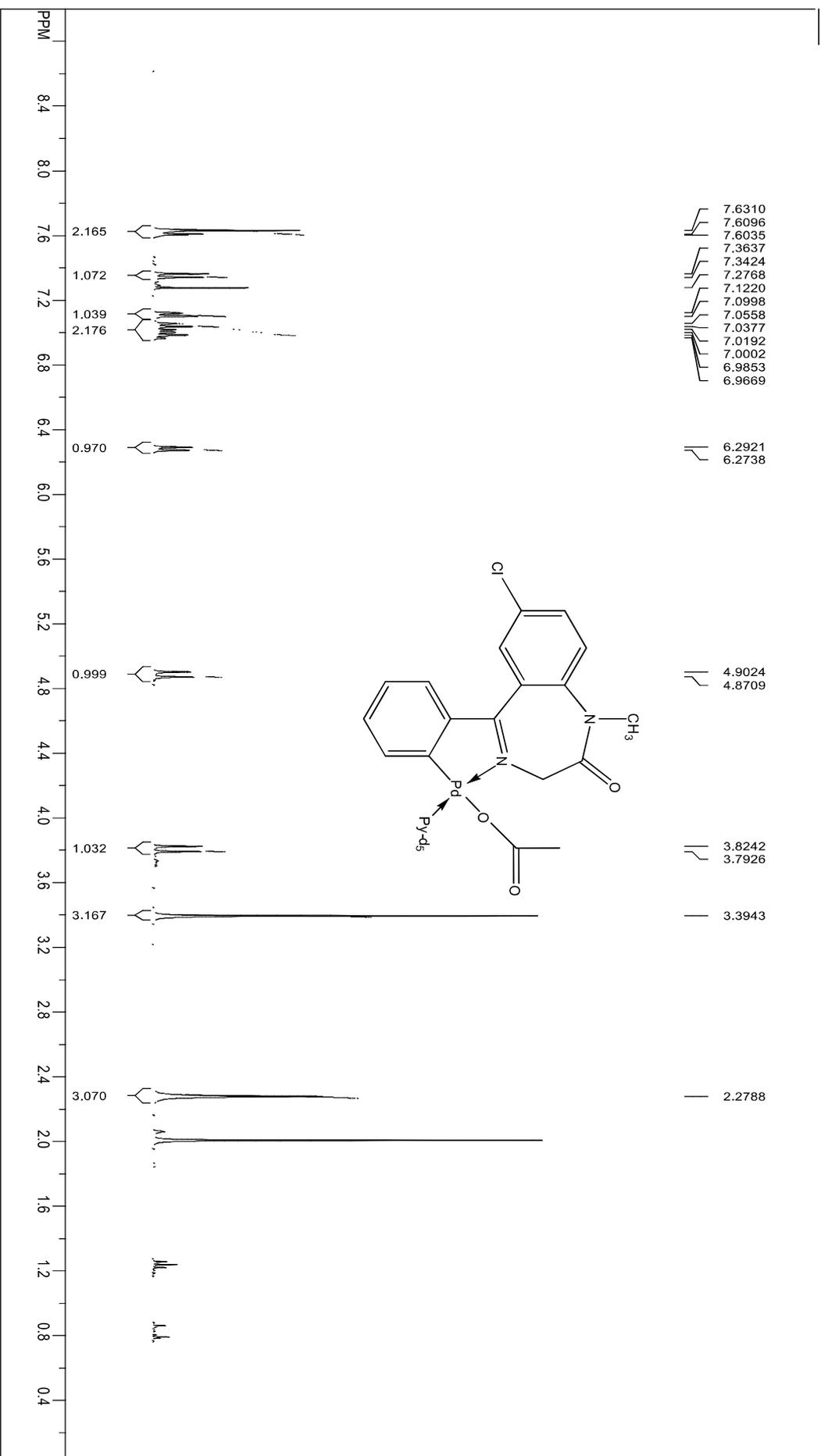
VIŠNJEVAC, A. et al. Copper(II)-promoted chemical transformations of 3-substituted 5-(2'-pyridyl)-1,4-benzodiazepin-2-one derivatives: crystal structures and spectroscopic characterization of metal complexes. **European Journal of Inorganic Chemistry**, p. 2647-2654, 2001.

VIŠNJEVAC, A. et al. Synthesis, structural characterisation and biological activity of Zn(II) and Pd(II) complexes of 3-substituted 5-(2'-pyridyl)-1,4-benzodiazepin-2-one derivatives. **Polyhedron**, v. 21, p. 2567-2577, 2002.

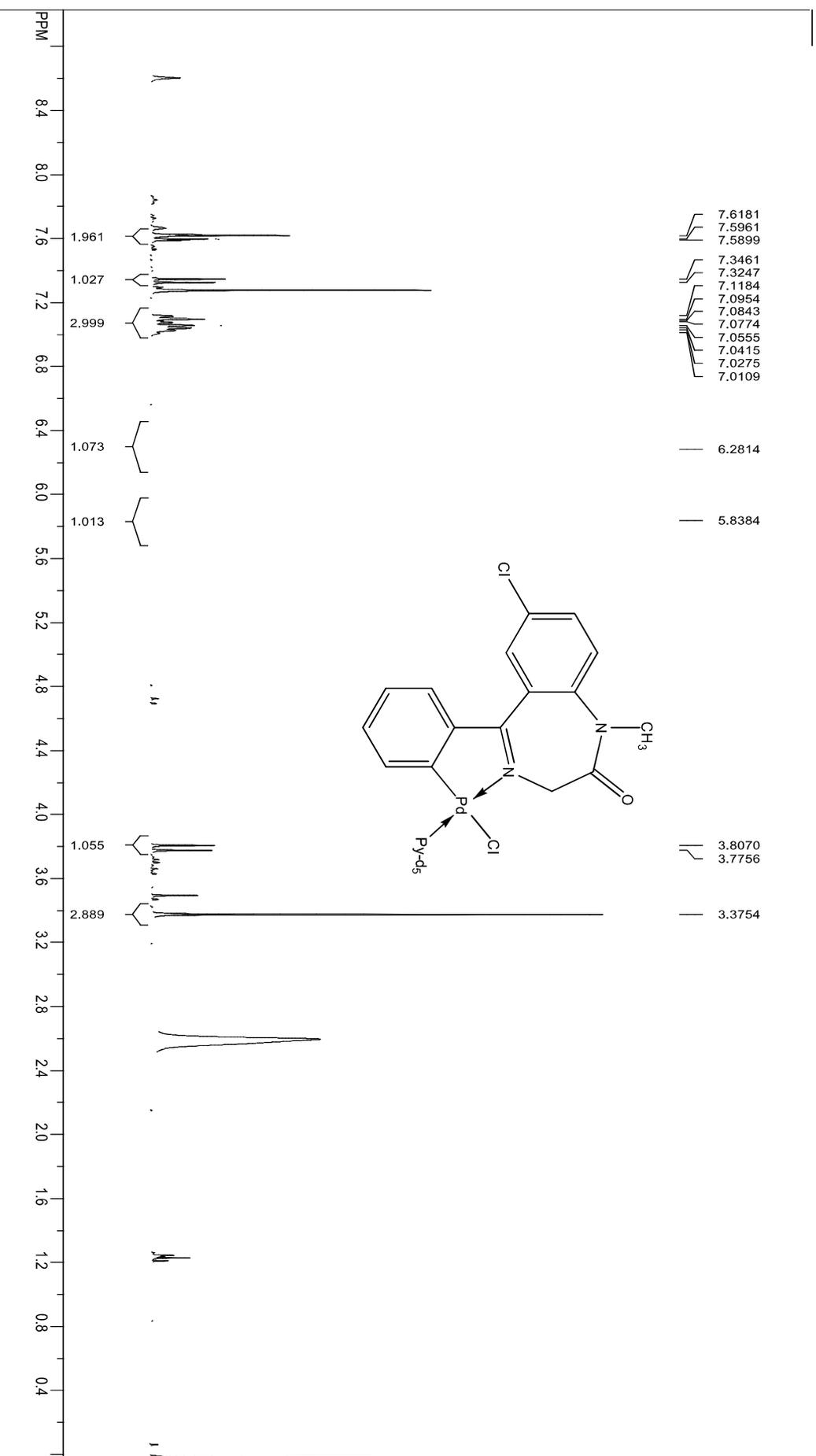
ZHANG, S. et al. Bimetallic (iron or cobalt) complexes bearing 2-methyl-2,4-bis(6-iminopyridin-2-yl)-1H-1,5-benzodiazepines for ethylene reactivity. **Organometallics**, v. 26, n. 9, p. 2456-2460, 2007.

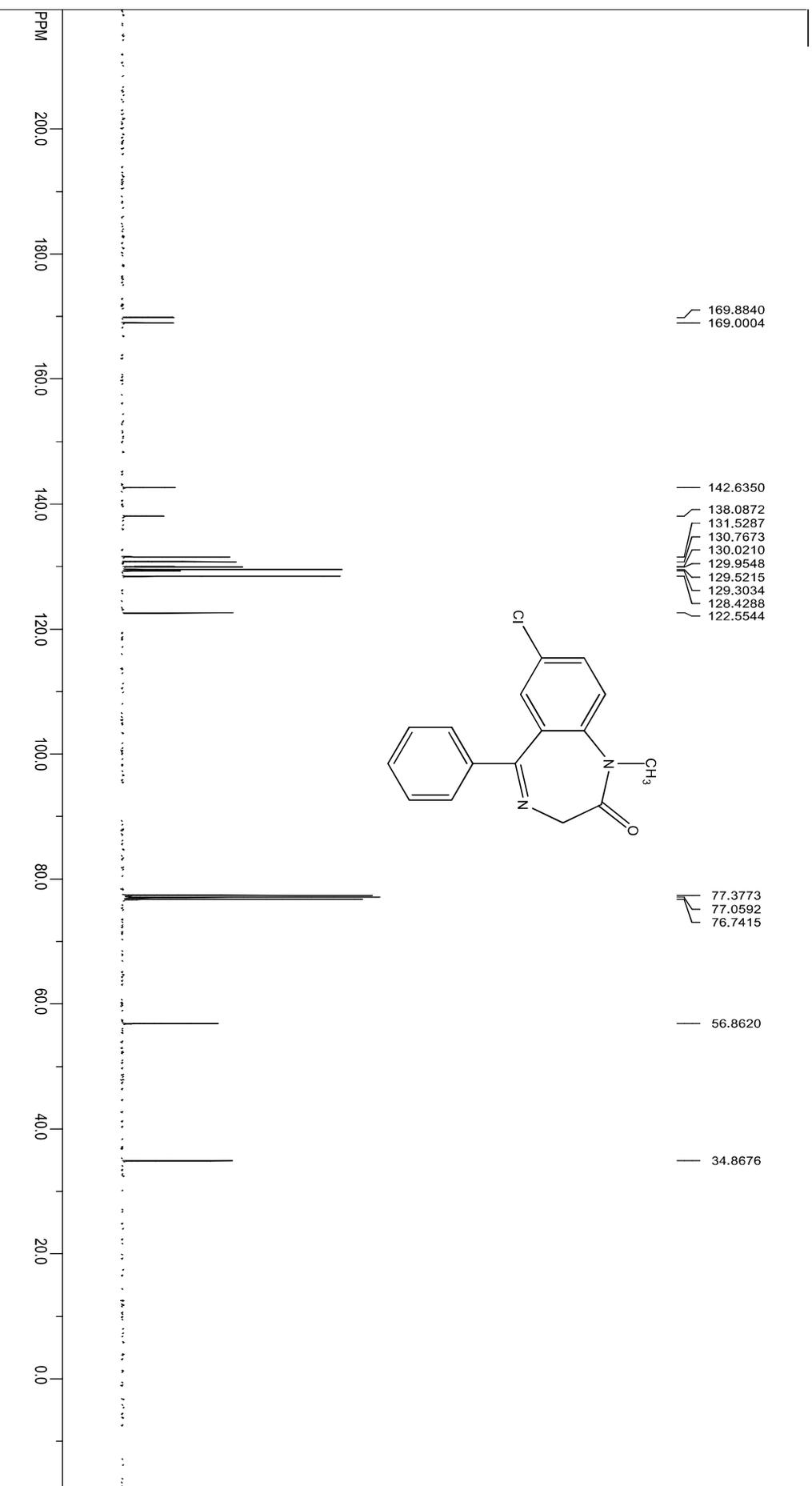
APÊNDICES

APÊNDICE A – Espectro de RMN de ^1H do DIAZPdOAcD com piridina deuterada, em CDCl_3

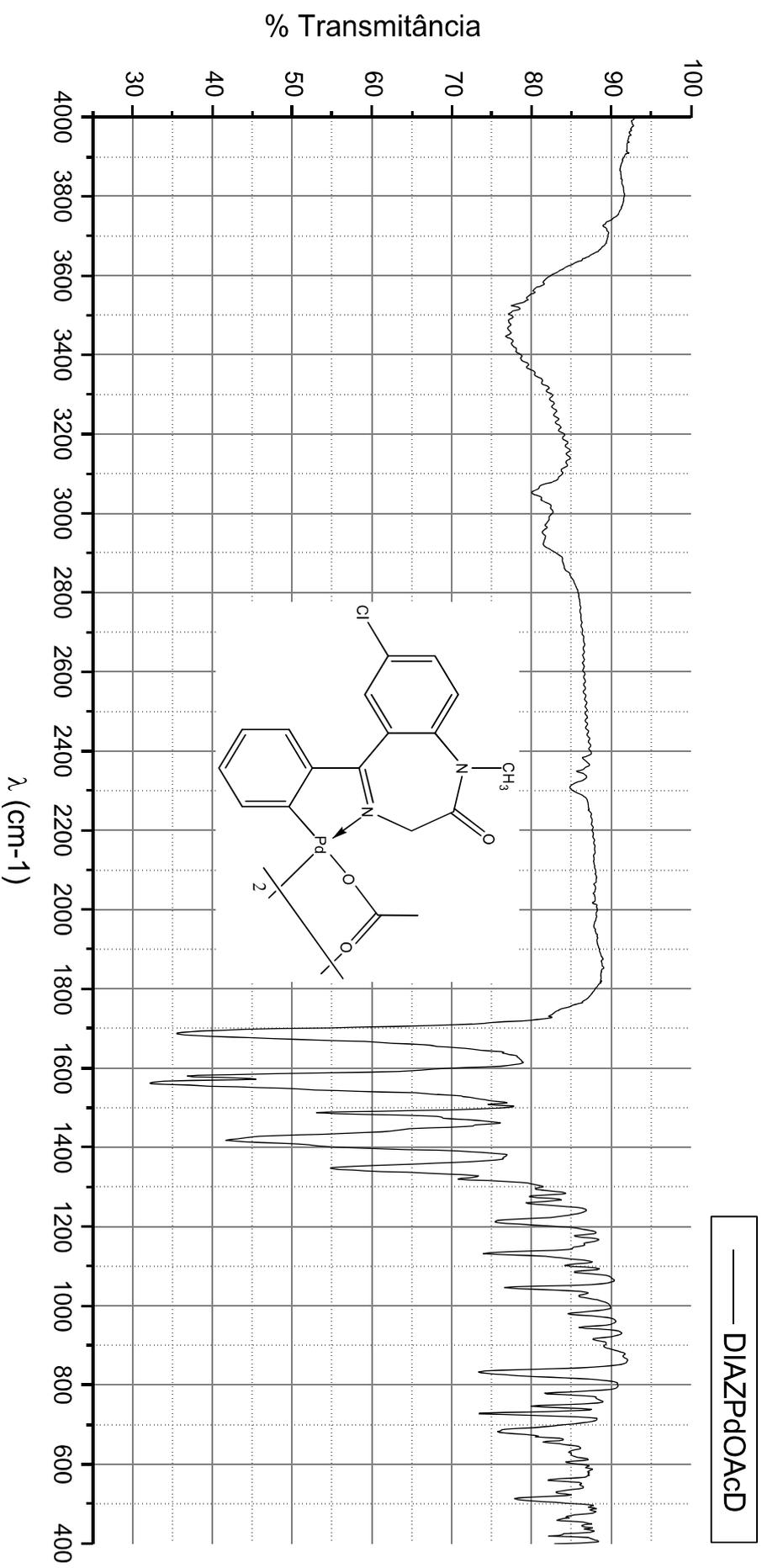


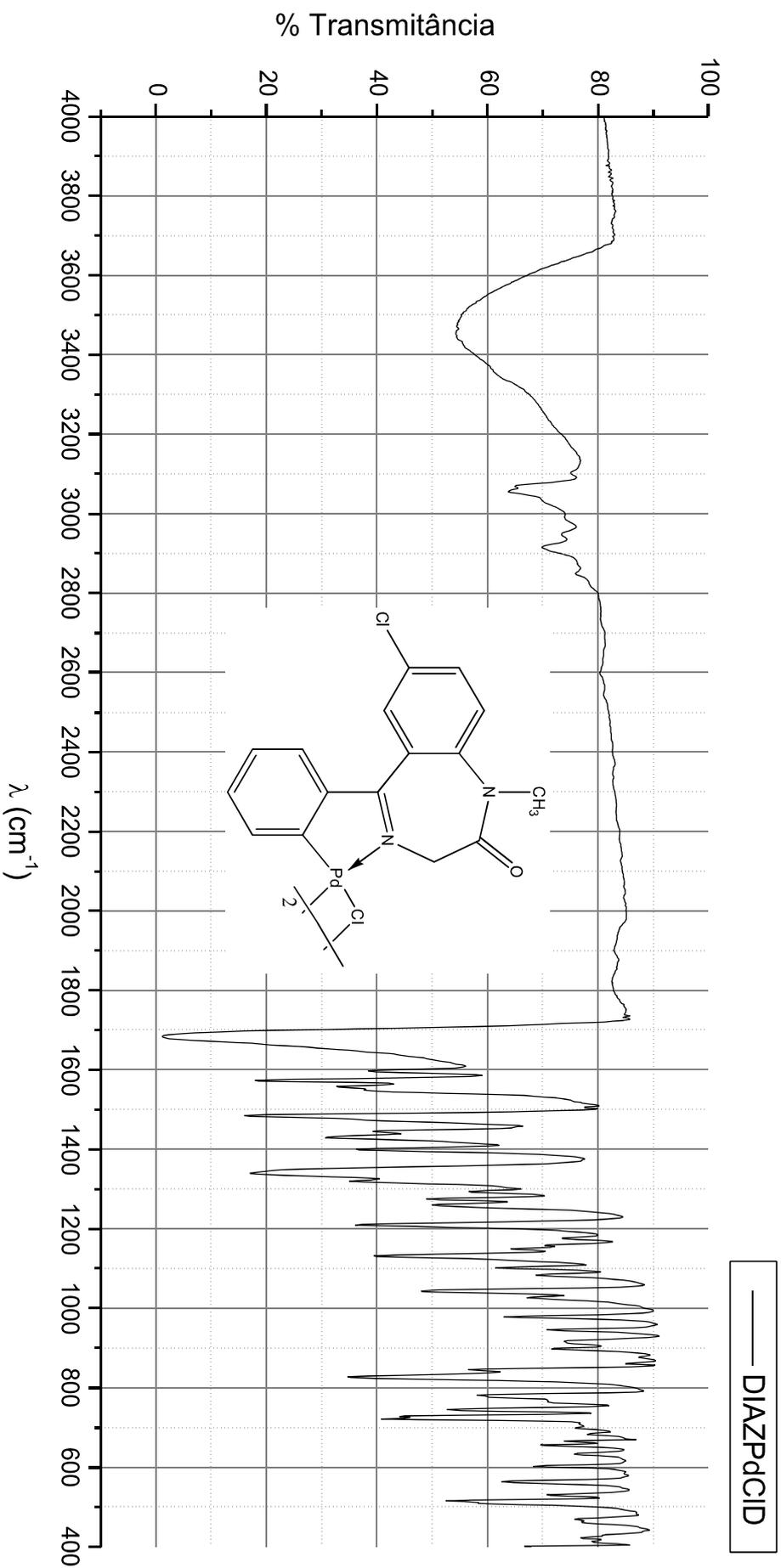
APÊNDICE B – Espectro de RMN de ^1H do DIAZPdClID com piridina deuterada, em CDCl_3



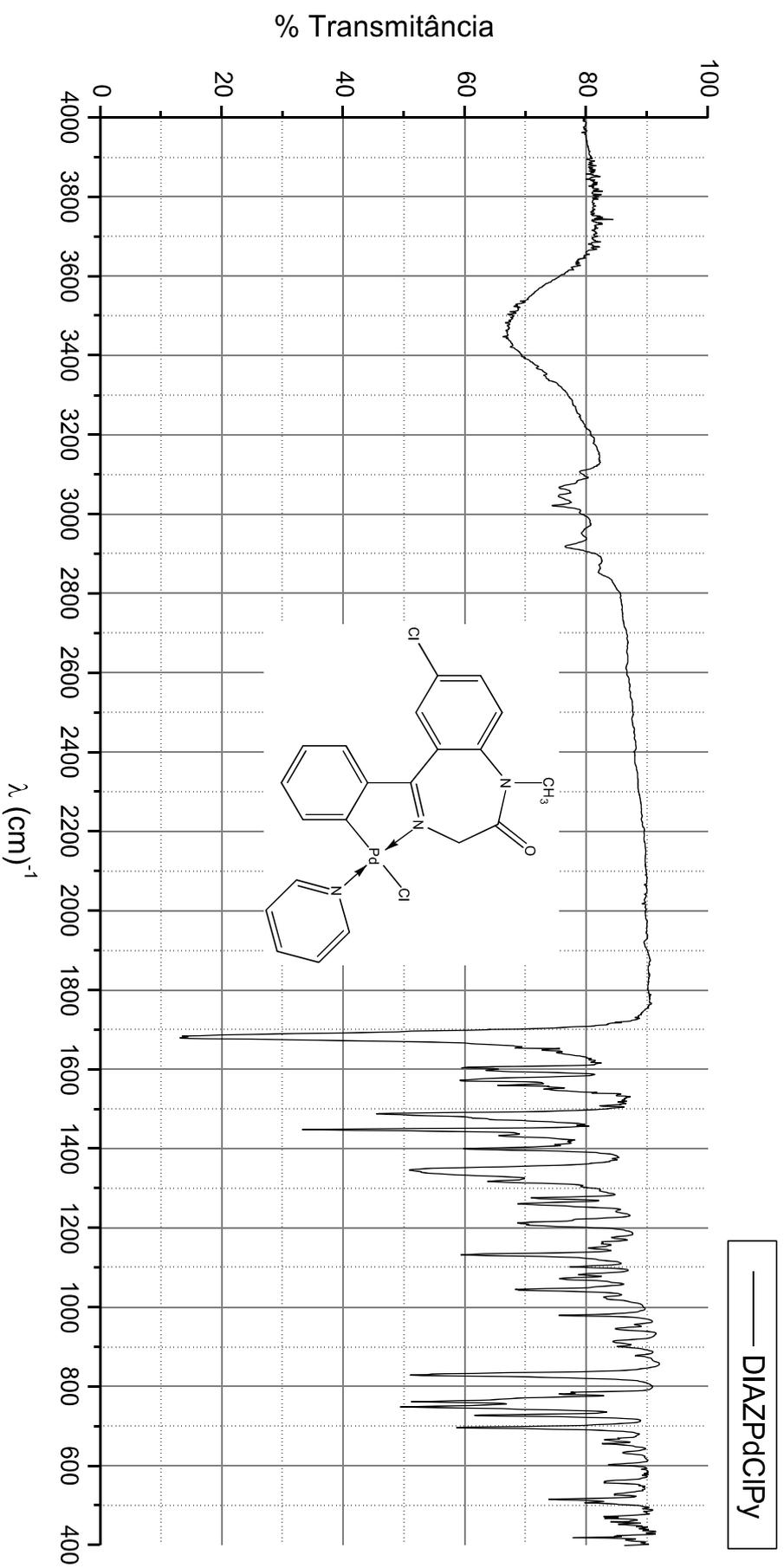
APÊNDICE C – Espectro de RMN de ^{13}C do diazepam em CDCl_3 

APÊNDICE D – Espectro na região do IV do DIAZPdOAcD

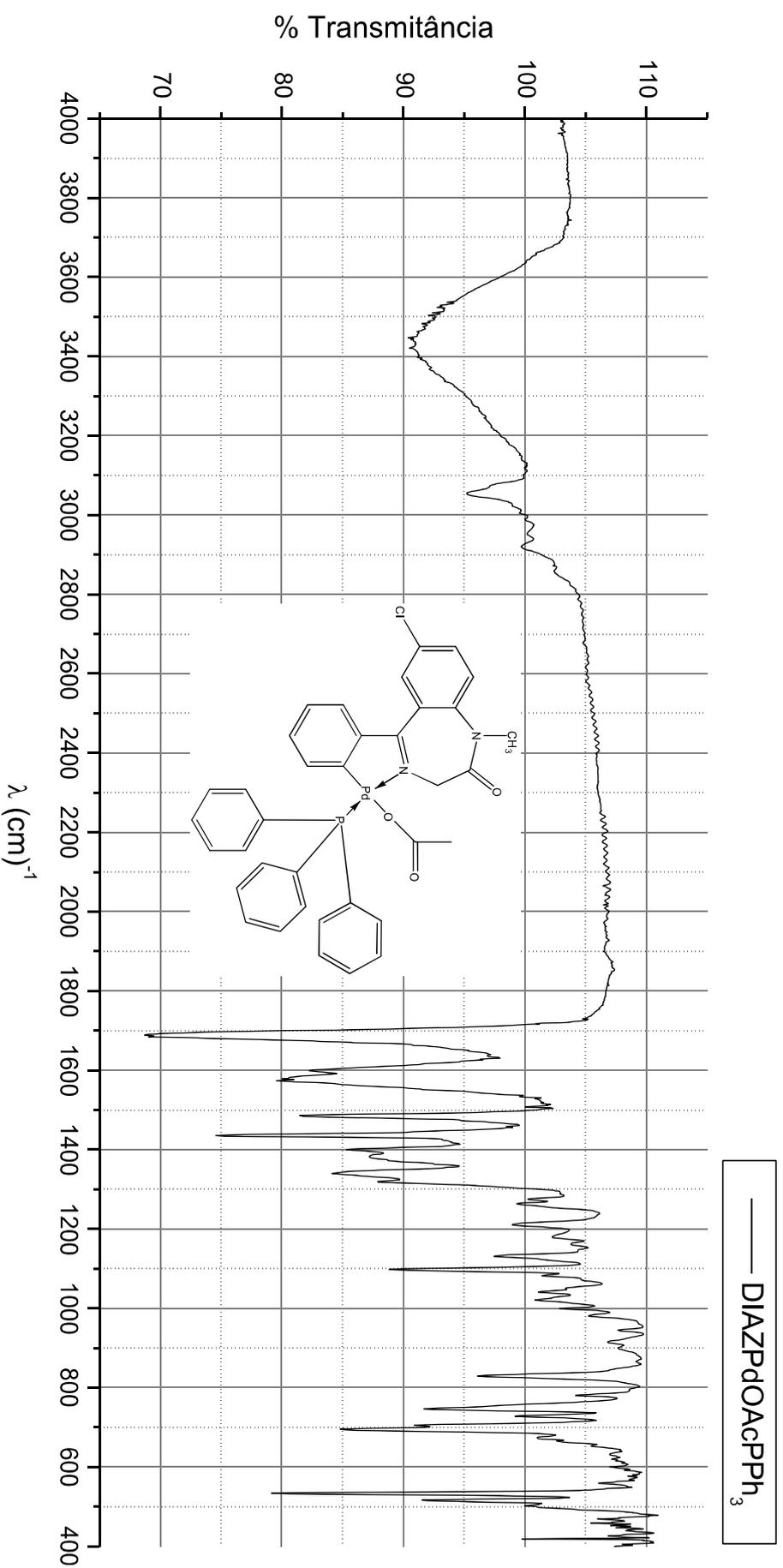


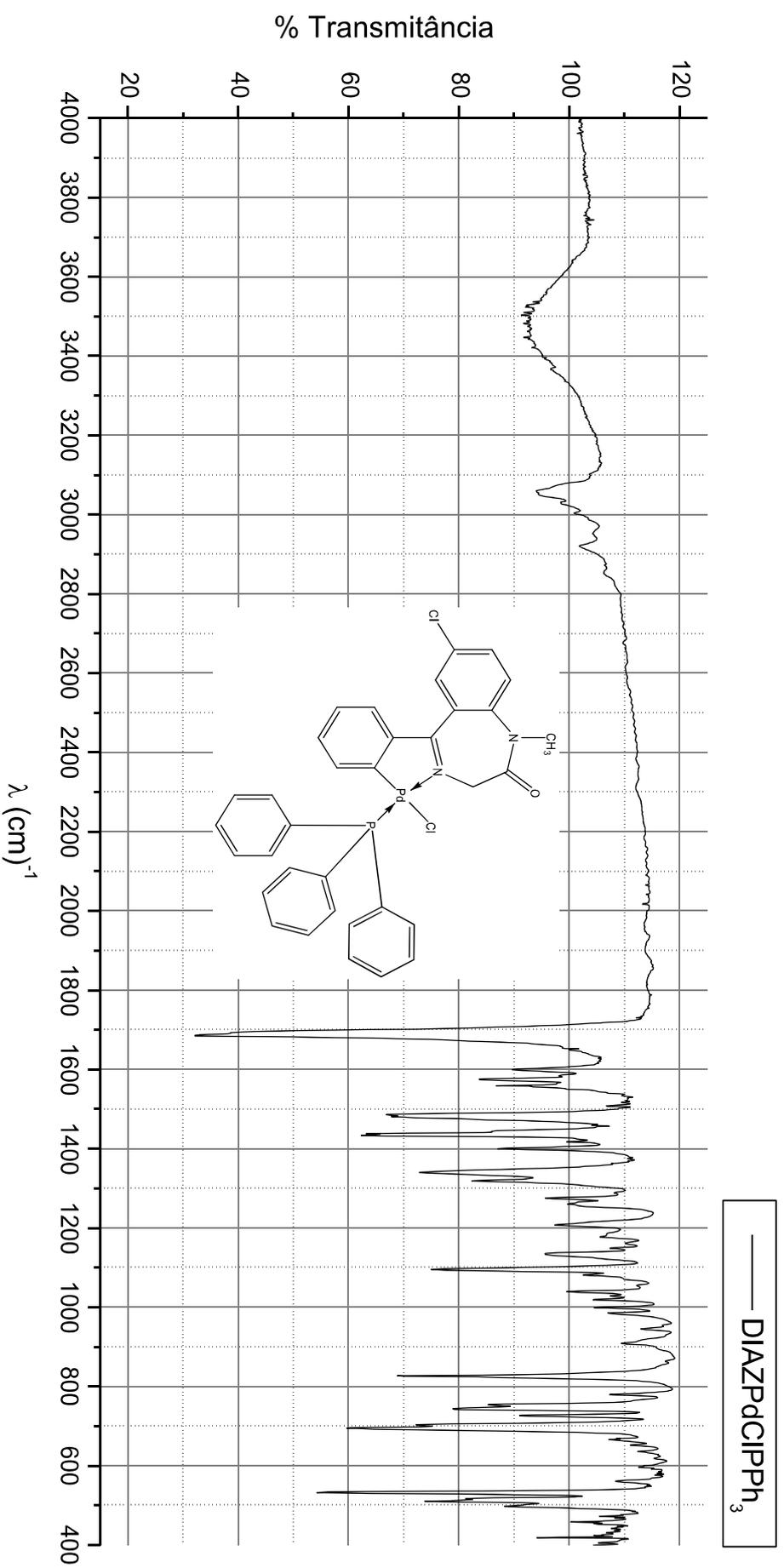
APÊNDICE E – Espectro na região do IV do DIAZPdCl₂D

APÊNDICE F – Espectro na região do IV do DIAZPdClPy



— DIAZPdClPy

APÊNDICE G – Espectro na região do IV do DIAZPdOAcPPh₃

APÊNDICE H – Espectro na região do IV do DIAZPdClIPPh₃

APÊNDICE I – Espectro na região do IV do diazepam