

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Exatas**  
**Departamento de Química**

**Luiza Magalhães Fiuza Gomes**

**Bases de Schiff com potenciais aplicações  
no tratamento da doença de Alzheimer  
e de Osteoporose**

**Belo Horizonte**

**2013**

**UFMG-ICE<sub>x</sub>/DQ. 967<sup>a</sup>**

**D. 530<sup>a</sup>**

**LUIZA MAGALHÃES FIUZA GOMES**

**BASES DE SCHIFF COM POTENCIAIS APLICAÇÕES NO  
TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER  
E DE OSTEOPOROSE**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química – Química Inorgânica.

**Belo Horizonte  
2013**

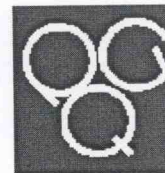
G633b      Gomes, Luiza Magalhães Fiuza  
2013      Bases de Schiff com potenciais aplicações no  
D      tratamento da doença de Alzheimer e de osteoporose. /  
Luiza Magalhães Fiuza Gomes. 2013.  
101 f. : il.

Orientador: Heloisa de Oliveira Beraldo.  
Co-Orientador: Eufrânio Nunes da Silva Junior

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais. Departamento de Química.  
Bibliografia

1. Química inorgânica - Teses 2. Bases de Schiff-  
Teses 3. Doença de Alzheimer - Teses 3. Osteoporose -  
Teses 4. Catepsina K - Teses I. Beraldo, Heloisa de  
Oliveira, Orientadora.II. Silva Junior, Eufrânio  
Nunes, Co-orientador III. Título.

CDU 043



**"Bases de Schiff com Potenciais Aplicações no Tratamento da Doença de Alzheimer e de Osteoporose"**

**Luiza Magalhães Fiuza Gomes**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profª. Heloisa de Oliveira Beraldo - Orientadora  
UFMG

Profª. Isolda Maria de Castro Mendes  
UFMG

Profª. Ynara Marina Idemori  
UFMG

Belo Horizonte, 03 de julho de 2013.

O trabalho descrito nessa dissertação  
foi realizado sob a orientação da  
Profa. Dra. Heloisa de Oliveira  
Beraldo e sob a co-orientação do  
Prof. Dr. Eufrânio N. da Silva Júnior.

## **Agradecimentos**

À Profa. Heloisa pela orientação, ensinamentos e paciência.

Ao Prof. Eufrânio pela coorientação e interesse.

À minha mãe e minha irmã, por todo apoio, paciência e carinho.

Aos meus primos Sofia, Felipe, André e Lorena, pela alegria de sempre.

Aos meus avós e tios, pelo apoio e oportunidades.

Aos colegas de laboratório Angel, Camila, Gabrieli, Jeferson, Karina, Lenka e Rafael pela amizade e ensinamentos.

Aos alunos de Iniciação Científica Ana Carolina, Mariany, Pedro e Sarah pelo auxílio e convivência.

À todos os meus amigos, pelo apoio e momentos de distração.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Química da UFMG, Paulete, Lilian e Tatiane, pela atenção durante todo o mestrado.

Aos professores e colegas do Departamento de Química pela amizade e ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

## RESUMO

No presente trabalho foram estudados novos derivados de bases de Schiff como protótipos a fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer e da osteoporose. Foram obtidos os seguintes compostos: 8-hidroxiquinolina-2-semicarbazona (8-HQS), 8-hidroxiquinolina-2-tiossemicarbazona (8-HQT) e 8-hidroxiquinolina-2-acetil hidrazona (8-HQH). Os estudos físico-químicos demonstraram que os compostos são neutros e estáveis em pH fisiológico. Foram igualmente sintetizados os complexos  $[\text{Cu}(8\text{-QH})_2]$ ;  $[\text{Cu}(8\text{-QS})_2]$ ;  $[\text{Cu}(8\text{-QTD})]$ ;  $[\text{Zn}(8\text{-HQH})_2] \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$ ;  $[\text{Zn}_2(8\text{-HQS})_3] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  e  $[\text{Zn}(8\text{-HQT})(\text{OAc}^-)] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ . Além disso, foi realizado um estudo de interação metal:ligante em solução em pH fisiológico.

As atividades das bases de Schiff em modelos *in vitro* da doença de Alzheimer (DA) foram avaliadas. 8-HQT não foi solúvel nas condições dos testes. A capacidade dos compostos de inibir a agregação do peptídeo  $\beta\text{A}$  induzida por Cu(II) e Zn(II) foi avaliada através do teste de turbidez, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e ensaios de fluorescência. No teste de turbidez, 8-HQS e 8-HQH mostraram atividade inibitória da agregação do peptídeo induzida pelos metais. Imagens de MET mostraram que 8-HQH apresentou maior capacidade de inibição do processo de agregação do peptídeo  $\beta\text{A}_{1-40}$  que 8-HQS. No teste de fluorescência, 8-HQH foi capaz de inibir a agregação do peptídeo  $\beta\text{A}_{1-40}$  sendo, no entanto, menos eficiente para inibir a ligação do peptídeo com tioflavina T quando comparado ao vermelho do congo. 8-HQS não apresentou solubilidade nas condições do teste. Os resultados sugerem que 8-HQH é um promissor protótipo de fármaco para o tratamento da DA. As bases de Schiff mostraram baixa atividade citotóxica, o que as torna interessantes como candidatos a fármacos contra a DA.

Uma vez que alguns inibidores de catepsina K apresentam o grupo nitrila e agem como candidatos a fármacos contra a osteoporose, foram também obtidos e caracterizados os compostos 4-formilbenzônitrila semicarbazona (4-FBS), 4-acetilbenzônitrila semicarbazona (4-ABS), 4-formilbenzônitrila tiossemicarbazona (4-FBT), 4-acetilbenzônitrila tiossemicarbazona (4-ABT), 4-formilbenzônitrila acetil hidrazona (4-FBH) e 4-acetilbenzônitrila acetil hidrazona (4-ABH), como protótipos de inibidores de catepsina K.

Os compostos foram testados quanto às suas atividades antifúngica, antibacteriana e antiproliferativa. Quando comparados aos controles positivos, os compostos não apresentaram atividade significativa em nenhum dos modelos testados. Estes resultados estabeleceram, de forma preliminar, um baixo perfil citotóxico dos compostos, tornando-os promissores candidatos à posterior avaliação da atividade inibitória frente a catepsina K, um modelo *in vitro* da osteoporose.

Como complexos de Pd(II) de tiossemicarbazonas possuem atividade antimicrobiana e antitumoral, foi obtido e caracterizado o complexo  $[\text{Pd}(4\text{-ABT})\text{Cl}_2]$ . O composto se mostrou inativo como agente citotóxico contra linhagens de células leucêmicas e de tumores sólidos. Foi

avaliada também sua atividade antifúngica e antibacteriana. Enquanto o ligante (4-ABT) foi inativo contra o crescimento de todos os microorganismos, o complexo apresentou atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida glabrata*.

A contribuição deste trabalho é importante no estudo de bases de Schiff como ferramentas da Química Medicinal, ou seja, compostos potencialmente úteis no tratamento da doença de Alzheimer e de osteoporose.

Palavras-chave: bases de Schiff, Doença de Alzheimer, Osteoporose, Catepsina K.

## ABSTRACT

In the present work we studied new Schiff bases derivatives as prototypes of drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease and osteoporosis. The following compounds were obtained: 8-hydroxyquinoline-2-semicarbazone (8-HQS), 8-hydroxyquinoline-2-thiosemicarbazone (8-HQT) and 8-hydroxyquinoline-2-acetyl hydrazone (8-HQH). The physicochemical studies demonstrated that the compounds are stable and neutral at physiological pH. Complexes  $[\text{Cu}(8\text{-QH})_2]$ ;  $[\text{Cu}(8\text{-QS})_2]$ ;  $[\text{Cu}(8\text{-QTD})]$ ;  $[\text{Zn}(8\text{-HQH})_2] \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$ ;  $[\text{Zn}_2(8\text{-HQS})_3] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  and  $[\text{Zn}(8\text{-HQT})(\text{OAc}^-)] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  were also synthesized. Additionally, a study of metal-ligand interaction in solution at physiological pH was conducted.

The activities of the Schiff bases in *in vitro* models of Alzheimer's disease (AD) were evaluated. 8-HQT was not soluble under the test conditions. The ability of the compounds to inhibit  $\text{A}\beta$  peptide aggregation induced by Cu(II) and Zn(II) was evaluated by the turbidity test, transmission electron microscopy (TEM) and fluorescence assays. In the turbidity test 8-HQH and 8-HQS showed inhibitory activity of the  $\text{A}\beta_{1-40}$  peptide aggregation induced by the metal ions. TEM images showed that 8-HQH presented higher capacity than 8-HQS to inhibit  $\text{A}\beta_{1-40}$  peptide aggregation. In the fluorescence test, 8-HQH was able to inhibit the  $\text{A}\beta_{1-40}$  peptide aggregation being, however, less effective to inhibit the binding of the peptide with thioflavin T when compared to Congo red. 8-HQS showed poor solubility under the test conditions. Results suggested that 8-HQH is a promising prototype of drug candidate for the treatment of AD. The Schiff bases showed low cytotoxic activity, which makes them interesting as drug candidates for the treatment of AD.

As some inhibitors of cathepsin K contain the nitrile group in their structure and act as drug candidate for the treatment of osteoporosis, the compounds 4-formylbenzotrile semicarbazone (4-FBS), 4-acetylbenzotrile semicarbazone (4-ABS), 4-formylbenzotrile thiosemicarbazone (4-FBT), 4-acetylbenzotrile thiosemicarbazone (4-ABT), 4-formylbenzotrile acetyl hydrazone (4-FBH) and 4-acetylbenzotrile acetyl hydrazone (4-ABH) were obtained and characterized as prototypes of cathepsin K inhibitors.

The compounds were tested for their antifungal, antibacterial and antiproliferative activities and did not show significant activity in any of the tested models when compared to the positive controls. These results established a preliminary low cytotoxic profile for the compounds, making them promising candidates for further evaluation of the inhibitory activity against cathepsin K, an *in vitro* model of osteoporosis.

Since Pd(II) complexes with thiosemicarbazone have antimicrobial and antitumor activity we obtained and characterized the  $[\text{Pd}(4\text{-ABT})\text{Cl}_2]$  complex. The compound was inactive as a cytotoxic agent against leukemic cell lines and solid tumors. We also evaluate its antifungal and antibacterial activities. Although the ligand (4-ABT) was inactive against the

growth of all microorganisms, the complex showed antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida glabrata*.

The present work is an important contribution to the study of the role of Schiff base derivatives in Medicinal Chemistry, since these compounds proved to be potentially useful for the treatment of Alzheimer's disease and osteoporosis.

Keywords: Schiff bases, Alzheimer's disease, Osteoporosis, Cathepsin K

## Índice de figuras

<b>Figura 1.1</b> – Estrutura do Salvarsan.....	2
<b>Figura 1.2</b> – Fórmula estrutural da cisplatina e carboplatina.....	2
<b>Figura 1.3</b> – Estrutura genérica de hidrazonas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas..	3
<b>Figura 1.4</b> – Estrutura do antibiótico estreptomicina.....	4
<b>Figura 1.5</b> – Representação esquemática comparando um cérebro normal com o cérebro de paciente de Alzheimer, na qual as placas $\beta$ A extracelulares e os emaranhados neurofibrilares intracelulares estão representados.....	6
<b>Figura 1.6</b> – Estruturas de deferrioxamina (DFO) e clioquinol.....	9
<b>Figura 1.7</b> – Mapa da Incidência de Fratura de Quadril na América Latina.....	10
<b>Figura 1.8</b> – Estrutura química geral de bisfosfonatos.....	11
<b>Figura 1.9</b> – Estruturas de AAE-581 e MK-0822, inibidores de catepsina K.....	12
<b>Figura 2.1</b> – Esquema de neutralização de cloridrato de semicarbazida com acetato de sódio.....	19
<b>Figura 2.2</b> – Esquema de síntese dos compostos 8-hidroxiquinolina-2-tiossemicarbazona (8-HQT), 4-formilbenzoni-trila tiossemicarbazona (4-FBT), 4-acetilbenzoni-trila tiossemicarbazona (4-ABT), 8-hidroxiquinolina-2-acetil hidrazona (8-HQH) 4-formilbenzoni-trila acetil hidrazona (4-FBH), 4-acetilbenzoni-trila acetil hidrazona (4-ABH), 8-hidroxiquinolina-2-semicarbazona (8-HQS), 4-formilbenzoni-trila semicarbazona (4-FBS) e 4-acetilbenzoni-trila semicarbazona (4-FBS).....	20
<b>Figura 2.3</b> – Estrutura do composto Vermelho do Congo (VC).....	25
<b>Figura 2.4</b> – Estrutura do composto tioflavina T.....	25
<b>Figura 3.1</b> – Estruturas de 8-hidroxiquinolina (8-HQ) e de clioquinol (CQ, 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina).....	26
<b>Figura 3.2</b> – Estrutura geral de bases de Schiff derivadas de 8-hidroxiquinolina: hidrazona ( $X = O$ ; $R = CH_3$ ), semicarbazona ( $X = O$ ; $R = NH_2$ ) e tiossemicarbazona ( $X = S$ ; $R = NH_2$ ), e seus possíveis sítios de coordenação.....	27
<b>Figura 3.3</b> – Tautomerismo ceto-enólico em solução para 8-HQH.....	29
<b>Figura 3.4</b> – Espectro de RMN de $^1H$ (500 MHz) de 8-HQH em DMSO- $d_6$ com ampliação nas regiões de 1,95 a 2,30 ppm e 7,0 a 11,8 ppm.....	29
<b>Figura 3.5</b> – Espectro de RMN de $^{13}C$ (500 MHz) de 8-HQH em DMSO- $d_6$ com ampliação nas regiões de 19,5 a 22,5 e 112 a 172 ppm.....	30

<b>Figura 3.6</b> – Isômeros <i>E</i> e <i>Z</i> para a semicarbazona (R = NH <sub>2</sub> ; X = O) e tiosemicarbazona (R = NH <sub>2</sub> ; X = S) derivadas de 8-hidroxiquinolina-2-aldeído.....	34
<b>Figura 3.7</b> – Mapa de contorno NOESY (200 MHz) de 8-HQS em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , evidenciando as correlações existentes e o isômero <i>E</i> relacionado.....	35
<b>Figura 3.8</b> – Diagrama ORTEP para 8-HQH com elipsóides térmicos com probabilidade de 50% e com átomos enumerados, exceto os de hidrogênio. Átomos de hidrogênio são desenhados como círculos de raios arbitrários.....	38
<b>Figura 3.9</b> – Vistas em perspectiva para empacotamento de cristal da 8-HQH. Em (A) as ligações de hidrogênio NH···O e CH···O em rede 2D estão presentes. Em (B) a projeção destacando a separação de camadas internas.....	38
<b>Figura 3.10</b> – Diagramas de especiação da 8-HQT (A; X = S; R = NH <sub>2</sub> ), 8-HQH (B; X = O; R = CH <sub>3</sub> ) e 8-HQS (C; X = O; R = NH <sub>2</sub> ). F <sub>L</sub> = fração das espécies; L = espécie neutra. Os diagramas foram simulados usando o programa HySS2009 (Protonic Software, UK).....	40
<b>Figura 3.11</b> – Espectros eletrônicos com o tempo do composto 8-HQH (40 μM em tampão PBS (pH 7,4)/5% de DMSO) à temperatura ambiente.....	41
<b>Figura 3.12</b> – Espectros eletrônicos com o tempo do composto 8-HQS (40 μM em tampão PBS (pH 7,4)/5% de DMSO) à temperatura ambiente.....	42
<b>Figura 3.13</b> – Espectros eletrônicos com o tempo do composto 8-HQT (40 μM em tampão PBS (pH 7,4)/5% de DMSO) à temperatura ambiente.....	42
<b>Figura 3.14</b> – Curva termogravimétrica para o complexo [Zn(8-QH) <sub>2</sub> ]·5/2H <sub>2</sub> O (4).....	44
<b>Figura 3.15</b> – Espectro no infravermelho de (A) 8-HQS e (B) [Zn <sub>2</sub> (8-QS) <sub>3</sub> ]·1/2H <sub>2</sub> O....	47
<b>Figura 3.16</b> – Espectro no infravermelho de (A) 8-HQT e (B) [Zn(8-QT)OAc <sup>-</sup> ]·1/2H <sub>2</sub> O.....	49
<b>Figura 3.17</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz) do complexo [Zn(8-QH) <sub>2</sub> ]·5/2H <sub>2</sub> O (4) em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> com ampliação nas regiões de 2,00 a 2,35 ppm e 6,40 a 12,00 ppm.....	51
<b>Figura 3.18</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz) do complexo [Zn <sub>2</sub> (8-QS) <sub>3</sub> ]·1/2H <sub>2</sub> O (5) em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> com ampliação na região de 6,6 a 11,0 ppm.....	52
<b>Figura 3.19</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz) do complexo [Zn(8-QT)(OAc <sup>-</sup> )]·1/2H <sub>2</sub> O (6) em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> com ampliação na região de 6,5 a 8,5 ppm.....	52
<b>Figura 3.20</b> – Proposta de formação de novo complexo em solução, evidenciando o deslocamento do acetato pelo DMSO, a partir de [Zn(8-QT)OAc <sup>-</sup> ]·1/2H <sub>2</sub> O.....	53
<b>Figura 3.21</b> – Espectro de RPE do complexo de Cu(II) dos derivados de 8-HQ sólidos á temperatura ambiente.....	55

<b>Figura 3.22</b> – Espectros de RPE dos complexos de Cu(II) dos derivados de 8-HQ: (1) [Cu(8-QH) <sub>2</sub> ]; (2) [Cu(8-QS) <sub>2</sub> ] e (3) [Cu(8-QTD)], em solução 1 mM DMSO á temperatura ambiente.....	56
<b>Figura 3.23</b> – Espectros de RPE dos complexos de Cu(II) dos derivados de 8-HQ: (1) [Cu(8-QH) <sub>2</sub> ]; (2) [Cu(8-QS) <sub>2</sub> ] e (3) [Cu(8-QTD)], em solução DMSO á 77 K.....	57
<b>Figura 3.24</b> – Proposta de estrutura para os complexos (1) [Cu(8-QH) <sub>2</sub> ] (R = CH <sub>3</sub> ) e (2) [Cu(8-QS) <sub>2</sub> ] (R = NH <sub>2</sub> ).....	58
<b>Figura 3.25</b> – Proposta de estrutura para o complexo (3) [Cu(8-QTD)].....	58
<b>Figura 3.26</b> – Proposta de estrutura para o complexo (4) [Zn(8-QH) <sub>2</sub> ].....	58
<b>Figura 3.27</b> – Proposta de estrutura para o complexo (5) [Zn <sub>2</sub> (8-QS) <sub>3</sub> ].....	59
<b>Figura 3.28</b> – Proposta de estrutura para o complexo (6) [Zn(8-QT)(AcO <sup>-</sup> )].....	59
<b>Figura 3.29</b> – Espectros eletrônicos na região do UV-vis para 8-HQH em 20% DMSO em tampão 7,4 com (A) acetato de Cu(II) e (B) acetato de Zn(II). Frações molares de íon metálico variando de 0 a 1.....	60
<b>Figura 3.30</b> – Espectros eletrônicos na região do UV-vis para 8-HQT em 20% DMSO em tampão 7,4 com (A) acetato de Cu(II) e (B) acetato de Zn(II). Frações molares de íon metálico variando de 0 a 1.....	61
<b>Figura 3.31</b> – Espectros eletrônicos na região do UV-vis para 8-HQH em DMSO com (A) acetato de Cu(II) e (B) acetato de Zn(II). Frações molares de íon metálico variando de 0 a 1.....	62
<b>Figura 3.32</b> – Espectros eletrônicos na região do UV-vis para 8-HQS em DMSO com (A) acetato de Cu(II) e (B) acetato de Zn(II). Frações molares de íon metálico variando de 0 a 1.....	63
<b>Figura 3.33</b> – Espectros eletrônicos na região do UV-vis para 8-HQT em DMSO com (A) acetato de Cu(II) e (B) acetato de Zn(II). Frações molares de íon metálico variando de 0 a 1.....	64
<b>Figura 3.34</b> – Diagrama de interação metal:ligante ( <i>Job Plot</i> ) da 8-HQH (424 nm), 8-HQS (420 nm) e 8-HQT (404 nm) com acetato de cobre (20% DMSO em tampão 7,4). $\chi$ = fração de Cu(II).....	65
<b>Figura 3.35</b> – Diagrama de interação metal:ligante ( <i>Job Plot</i> ) da 8-HQH (449 nm), 8-HQS (442 nm) e 8-HQT (431 nm) com acetato de cobre (DMSO). $\chi$ = fração de Cu(II).....	65
<b>Figura 3.36</b> – Diagrama de interação metal:ligante ( <i>Job Plot</i> ) da 8-HQH (438 nm), 8-HQS (434 nm) e 8-HQT (397 nm) com acetato de zinco (DMSO). $\chi$ = fração de Zn(II).....	66

<b>Figura 3.37</b> – Grau de agregação do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> determinado por meio de espectroscopia no UV-vis - Solução peptídica na presença de íons metálicos e ligantes. Os dados representam a média de absorvância de amostras em quadruplicata medidas a 405 nm. Valor de pH igual a 6,6 e 7,4 para Cu(II) e Zn(II), respectivamente. As barras de erro representam o desvio padrão do valor médio de absorvância. ADTP = ácido dietilenotriamino pentacético, controle positivo e Metal + Pep = (Cu(II) ou Zn(II)) + peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> , controle negativo.....	67
<b>Figura 3.38</b> – Imagens MET de amostras incubadas com 25 mM de $\beta$ A <sub>1-40</sub> , 25 mM de CuCl <sub>2</sub> e 50 mM de 8-HQH. As amostras foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Peptídeo $\beta$ A (A), $\beta$ A+8-HQH (B), $\beta$ A+Cu(II) (C), $\beta$ A+8-HQH+Cu(II) (D), $\beta$ A+Zn(II) (E), $\beta$ A+8-HQH+Zn(II) (F).....	68
<b>Figura 3.39</b> – Imagens MET de amostras incubadas com 25 mM de $\beta$ A <sub>1-40</sub> , 25 mM de CuCl <sub>2</sub> e 50 mM de 8-HQS. As amostras foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Peptídeo $\beta$ A (A), $\beta$ A+8-HQS (B), $\beta$ A+Cu(II) (C), $\beta$ A+8-HQS+Cu(II) (D), $\beta$ A+Zn(II) (E), $\beta$ A+8-HQS+Zn(II) (F).....	69
<b>Figura 3.40</b> – Inibição da agregação do peptídeo $\beta$ A por medida de fluorescência de tioflavina T na presença de 8-HQH (A) gráfico de fluorescência (446 nm) versus concentração ( $\mu$ M) e (B) gráfico de fluorescência (446 nm) versus Log <sub>[x]</sub> .....	70
<b>Figura 3.41</b> – Inibição da agregação do peptídeo $\beta$ A por medida de fluorescência de tioflavina T na presença de vermelho do congo. (A) Fluorescência (446 nm) versus concentração ( $\mu$ M) e (B) fluorescência (446 nm) versus Log <sub>[x]</sub> .....	71
<b>Figura 4.1</b> – Estrutura de AAE-581, inibidor de catepsina K.....	74
<b>Figura 4.2</b> – Estrutura de E-64, inibidor não específico e reversível de catepsina B.....	75
<b>Figura 4.3</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (200 MHz) de 4-ABS em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> com ampliação nas regiões de 1,90 a 2,50 ppm e 6,50 a 9,70 ppm.....	77
<b>Figura 4.4</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (200 MHz) de 4-FBT em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> com ampliação nas regiões de 7,92 a 8,12 ppm e 7,4 a 11,8 ppm.....	78
<b>Figura 4.5</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (200 MHz) de 4-ABH em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> com ampliação nas regiões de 2,0 a 10,5 ppm.....	79
<b>Figura 4.6</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (200 MHz) de 4-FBH em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> com ampliação nas regiões de 7,5 a 11,5 ppm e 2,25 a 1,95 ppm.....	79
<b>Figura 4.7</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (200 MHz) de 4-ABT em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> com ampliação na região de 105 a 185 ppm e 12,5 a 15,5 ppm.....	80
<b>Figura 4.8</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (200 MHz) de 4-FBS em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> com ampliação na região de 106 a 162 ppm.....	81

<b>Figura 4.9</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (200 MHz) de 4-ABH em $\text{DMSO-}d_6$ com ampliação na região de 110 a 175 ppm.....	82
<b>Figura 4.10</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (200 MHz) de 4-FBH em $\text{DMSO-}d_6$ com ampliação na região de 110 a 174 ppm e 19,5 a 22,0 ppm.....	82
<b>Figura 4.11</b> – Isômeros <i>E</i> e <i>Z</i> para semicarbazona ( $\text{R}_1 = \text{NH}_2$ ; $\text{X} = \text{O}$ ), tiosemicarbazona ( $\text{R}_1 = \text{NH}_2$ ; $\text{X} = \text{S}$ ) e acetil hidrazona ( $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ ; $\text{X} = \text{O}$ ) derivadas de 4-FB ( $\text{R}_2 = \text{H}$ ) e 4-AB ( $\text{R}_2 = \text{CH}_3$ ).....	85
<b>Figura 4.12</b> – Mapa de contorno NOESY (200 MHz) de 4-FBS em $\text{DMSO-}d_6$ , evidenciando as correlações existentes e o isômero <i>E</i> relacionado.....	86
<b>Figura 4.13</b> – Mapa de contorno NOESY (200 MHz) de 4-ABT em $\text{DMSO-}d_6$ , evidenciando as correlações existentes e o isômero <i>E</i> relacionado.....	86
<b>Figura 4.14</b> – Espectros eletrônicos de derivados de 4-AB em DMF.....	88
<b>Figura 4.15</b> – Espectros eletrônicos de derivados de 4-FB em DMF.....	88
<b>Figura 4.16</b> – Diagrama ORTEP para 4-FBT com elipsóides térmicos com probabilidade de 50% e com átomos enumerados, exceto os de hidrogênio. Átomos de hidrogênio são desenhados como círculos de raios arbitrários.....	89
<b>Figura 4.17</b> – Espectros eletrônicos do composto 4-ABH (40 $\mu\text{M}$ em 5% de DMSO) em tampão PBS (pH 7,4) com o tempo e a temperatura ambiente.....	90
<b>Figura 4.18</b> – Espectros eletrônicos do composto 4-ABS (40 $\mu\text{M}$ em 5% de DMSO) em tampão PBS (pH 7,4) com o tempo e a temperatura ambiente.....	90
<b>Figura 4.19</b> – Espectros eletrônicos do composto 4-ABT (40 $\mu\text{M}$ em 5% de DMSO) em tampão PBS (pH 7,4) com o tempo e a temperatura ambiente.....	91
<b>Figura 4.20</b> – Curva termogravimétrica para o complexo $[\text{Pd}(4\text{-ABT})\text{Cl}_2] \cdot 0,75\text{H}_2\text{O} \cdot 0,25\text{EtOH}$ .....	93
<b>Figura 4.21</b> – Espectro no infravermelho de (A) 4-ABT e (B) $[\text{Pd}(4\text{-ABT})\text{Cl}_2] \cdot 0,75\text{H}_2\text{O} \cdot 0,25\text{EtOH}$ .....	94
<b>Figura 4.22</b> – Proposta de formação de novo complexo em solução, evidenciando o deslocamento do cloreto pelo DMSO, a partir de $[\text{Pd}(4\text{-ABT})\text{Cl}_2]$ .....	95
<b>Figura 4.23</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz) de $[\text{Pd}(4\text{-ABT})\text{Cl}_2] \cdot 0,75\text{H}_2\text{O} \cdot 0,25\text{EtOH}$ em $\text{DMSO-}d_6$ com ampliação nas regiões de 0,50 a 8,0 ppm.....	96

## Índice de tabelas

<b>Tabela 2.1.</b> Atribuição de tipo de eletrólito em solução (DMF).....	15
<b>Tabela 2.2.</b> Atribuição de tipo de eletrólito em solução (DMSO).....	16
<b>Tabela 2.3.</b> Estudo de interação metal:ligante em solução. As soluções foram preparadas em DMSO e 20% DMSO em tampão HEPES, pH 6,6 para Cu(II) e pH 7,4 para Zn(II).....	19
<b>Tabela 2.4.</b> Concentrações das soluções estoque dos ligantes e VC em 5% DMSO em tampão PBS.....	25
<b>Tabela 3.1.</b> Faixa de fusão de 8-hidroxiquinolina-2-semicarbazona, tiossemicarbazona e acetil hidrazona (8-HQS, 8-HQT e 8-HQH, respectivamente).....	28
<b>Tabela 3.2.</b> Valores teóricos e experimentais de análise elementar para 8-hidroxiquinolina-2- acetil hidrazona (8-HQH).....	28
<b>Tabela 3.3.</b> Atribuições, multiplicidade (M), número de átomos (n <sup>o</sup> ) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de <sup>1</sup> H em DMSO-d <sub>6</sub> dos derivados de 8-HQ.....	32
<b>Tabela 3.4.</b> Atribuições, carbono (C) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de <sup>13</sup> C em DMSO-d <sub>6</sub> dos derivados de 8-HQ.....	33
<b>Tabela 3.5.</b> Bandas nos espectros no infravermelho (cm <sup>-1</sup> ) de 8-HQH, 8-HQS e 8-HQT. – suporte: KBr (4000-400 cm <sup>-1</sup> ).....	36
<b>Tabela 3.6.</b> Dados cristalográficos e de refinamento para 8-HQH.....	37
<b>Tabela 3.7.</b> Valores de distância de ligação (Å) e ângulos selecionados (°) da estrutura cristalina de 8-HQH.....	39
<b>Tabela 3.8.</b> Parâmetros para as interações intramoleculares e intermoleculares selecionadas [Å e °] observadas em 8-HQH.....	39
<b>Tabela 3.9.</b> Valores de pKa para os compostos 8-HQT, 8-HQH e 8-HQS. Os dados foram analisados usando o programa HypSpec (Protonic Software, UK).....	41
<b>Tabela 3.10.</b> Análise elementar (valores teóricos entre parêntesis), cor, condutividade molar ( $\Lambda_M$ ) e momento magnético dos complexos de Cu(II) e Zn(II) de 8-HQH, 8-HQS e 8-HQT.....	43
<b>Tabela 3.11.</b> Relação massa/carga m/z das espécies encontradas nos espectros de massas e a massa molar dos complexos de Cu(II) de 8-HQH, 8-HQS e 8-HQT.....	45
<b>Tabela 3.12.</b> Bandas nos espectros no infravermelho (cm <sup>-1</sup> ) de 8-HQH, 8-HQS e 8-HQT e seus complexos: (1) [Cu(8-QH) <sub>2</sub> ]; (2) [Cu(8-QS) <sub>2</sub> ]; (3) [Cu(8-QTD)]; (4) [Zn(8-QH) <sub>2</sub> ].5/2H <sub>2</sub> O; (5) [Zn <sub>2</sub> (8-QS) <sub>3</sub> ].1/2H <sub>2</sub> O e (6) [Zn(8-QT)OAc <sup>-</sup> ].1/2H <sub>2</sub> O. – suportes: KBr (4000-400 cm <sup>-1</sup> ); CsI (400-200cm <sup>-1</sup> ).....	50

<b>Tabela 3.13.</b> Atribuições, multiplicidade (M), número de átomos (n°) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C em DMSO-d <sub>6</sub> dos complexos de Zn(II) dos derivados de 8-HQ.....	54
<b>Tabela 3.14.</b> Parâmetros de RPE dos complexos de Cu(II) ): (1) [Cu(8-QH) <sub>2</sub> ]; (2) [Cu(8-QS) <sub>2</sub> ] e (3) [Cu(8-QTD)] (sólido a temperatura ambiente).....	56
<b>Tabela 3.15.</b> Parâmetros de RPE dos complexos de Cu(II): (1) [Cu(8-QH) <sub>2</sub> ]; (2) [Cu(8-QS) <sub>2</sub> ] e (3) [Cu(8-QTD)] (solução congelada a 77 K).....	57
<b>Tabela 3.16.</b> Determinação da CI <sub>50</sub> de 8-HQH e VC em ensaios de fluorescência de tioflavina T.....	72
<b>Tabela 3.17.</b> Determinação da CI <sub>50</sub> (µM) de [Cu(8-QTD)] e cisplatina em linhagens HL60, Jurkat, MCF-7 e MDA.....	72
<b>Tabela 4.1.</b> Faixa de fusão de derivados de 4-FB e 4-AB.....	76
<b>Tabela 4.2.</b> Atribuições, multiplicidade (M), número de átomos (n°) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C em DMSO-d <sub>6</sub> dos derivados de 4-FB e 4-AB.	83
<b>Tabela 4.3.</b> Atribuições, multiplicidade (M), número de átomos (n°) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C em DMSO-d <sub>6</sub> dos derivados acetil hidrazona de 4-FB e 4-AB.....	84
<b>Tabela 4.4.</b> Bandas nos espectros no infravermelho (cm <sup>-1</sup> ) dos derivados de 4-FB e 4-AB. – suporte: KBr (4000-400 cm <sup>-1</sup> ).....	87
<b>Tabela 4.5.</b> Bandas nos espectros eletrônicos (nm) dos derivados de 4-FB e 4-AB em DMF.....	89
<b>Tabela 4.6.</b> Porcentagem de inibição da proliferação celular em leucemia mieloide (HL60), leucemia linfóide (Jurkat) e carcinoma mamário (MDA-MB). Os valores representados são a média dos dois experimentos.....	92
<b>Tabela 4.7.</b> Análise elementar (valores teóricos entre parêntesis), massa molar e condutividade molar (Λ <sub>M</sub> ) do complexo de Pd(II) do composto 4-ABT.....	92
<b>Tabela 4.8.</b> Bandas nos espectros no infravermelho (cm <sup>-1</sup> ) do complexo de paládio de [Pd(4-ABT)Cl <sub>2</sub> ]·0,75H <sub>2</sub> O·0,25EtOH e 4-ABT. – suporte: KBr (4000-400 cm <sup>-1</sup> ).....	93
<b>Tabela 4.9.</b> Atribuições, multiplicidade (M), número de átomos (n°) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C em DMSO-d <sub>6</sub> de 4-ABT e [Pd(4-ABT)Cl <sub>2</sub> ]·0,75H <sub>2</sub> O·0,25EtOH.....	96
<b>Tabela 4.10.</b> Valores de CIM para o complexo [Pd(4-ABT)Cl <sub>2</sub> ].....	97

## Lista de Abreviaturas

- 4-ABH - 4-acetilbenzotriila acetil hidrazona  
4-ABS - 4-acetilbenzotriila semicarbazona  
4-ABT - 4-acetilbenzotriila tiossemicarbazona  
4-FBH - 4-formilbenzotriila acetil hidrazona  
4-FBS - 4-formilbenzotriila semicarbazona  
4-FBT - 4-formilbenzotriila tiossemicarbazona  
8-HQ - 8-hidroxi-2-quinolina  
8-HQH - 8-hidroxiquinolina-2-acetil hidrazona  
8-HQS - 8-hidroxiquinolina-2-semicarbazona  
8-HQT - 8-hidroxiquinolina-2-tiossemicarbazona  
8-QH - 8-hidroxiquinolina-2-acetil hidrazona desprotonado na hidroxila  
8-QS - 8-hidroxiquinolina-2-semicarbazona desprotonado na hidroxila  
8-QT - 8-hidroxiquinolina-2-tiossemicarbazona desprotonado na hidroxila  
8-QTD - 8-hidroxiquinolina-2-tiossemicarbazona duplamente desprotonado  
BHE - Barreira hemato-encefálica  
CI<sub>50</sub> - concentração inibitória 50%  
CIM - Concentração inibitória mínima  
CQ - Clioquinol  
DA - Doença de Alzheimer  
DACH - 1,2-diaminociclohexane  
DEPT - Distortionless Enhancement by Polarization Transfer  
DFO - desferrioxamina  
DMF - Dimetilformamida  
DMO - Densidade óssea mineral  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
DMSO-*d*<sub>6</sub> - Dimetilsulfóxido deuterado  
ESI-MS - Espectrometria de Massas por Ionização Electrospray  
HAcTSC - 2-acetilpiridina tiossemicarbazona  
HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Correlation  
HMQC - Heteronuclear Multiple Quantum Correlation  
I-CatK - Catepsina K  
IV - infravermelho  
MET - Microscopia eletrônica de transmissão  
PBS - Tampão Fosfato (*Phosphate Buffer Solution*)

pKa - constante de acidez

PPA - Proteína precursora de amiloide

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RPE - Ressonância Paramagnética Eletrônica

TG - Curva termogravimétrica

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

VC - Vermelho do Congo

$\beta$ A - peptídeo  $\beta$ -amiloide

## Sumário

<i>Capítulo 1. Introdução</i> .....	1
<b>1.1. Química Medicinal</b> .....	1
<b>1.2. Química Medicinal Inorgânica</b> .....	1
<b>1.3. Bases de Schiff e a química medicinal</b> .....	3
<b>1.4. Atividade antimicrobiana de fármacos</b> .....	4
<b>1.5. Doença de Alzheimer</b> .....	5
<b>1.5.1. Cobre e Zinco: propriedades e papel na Doença de Alzheimer</b> .....	7
<b>1.6. Osteoporose e Catepsina K</b> .....	9
<b>1.7. Paládio: atividade farmacológica e usos em medicina</b> .....	12
<b>1.8. Objetivos</b> .....	14
<i>Capítulo 2. Parte Experimental</i> .....	15
<b>2.1. Equipamentos, métodos e materiais</b> .....	15
<b>2.1.1. Reagentes e Solventes</b> .....	15
<b>2.1.2. Pesagens</b> .....	15
<b>2.1.3. Ponto de Fusão</b> .....	15
<b>2.1.4. Análises Condutimétricas</b> .....	15
<b>2.1.5. Análise Elementar</b> .....	16
<b>2.1.6. Análises térmicas</b> .....	16
<b>2.1.7. Suscetibilidade magnética</b> .....	16
<b>2.1.8. Difração de Raios X</b> .....	16
<b>2.1.9. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)</b> .....	17
<b>2.1.10. Ressonância magnética nuclear (RMN)</b> .....	17
<b>2.1.11. Espectrometria de Massas por Ionização Electrospray (ESI-MS)</b> ....	17
<b>2.1.12. Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)</b> .....	17
<b>2.1.13. Espectros eletrônicos no Ultravioleta-visível (UV-Vis)</b> .....	17
<b>2.1.14. Determinação dos valores de pH</b> .....	18
<b>2.1.15. Determinação das constantes de acidez (pKa) por UV-Vis</b> .....	18
<b>2.1.16. Estudo preliminar de estabilidade</b> .....	18
<b>2.1.17. Estudos de interação metal:ligante em solução (<i>Job Plot</i>)</b> .....	18
<b>2.2. Síntese de ligantes e complexos</b> .....	19
<b>2.2.1. Obtenção de 8-hidroxiquinolina-2-semicarbazona (8-HQS), 4-formilbenzonitrila semicarbazona (4-FBS) e 4-acetilbenzonitrila semicarbazona (4-ABS)</b> .....	19
	X

2.2.2. Obtenção de 8-hidroxiquinolina-2-tiossemicarbazona (8-HQT), 4-formilbenzotriazina tiossemicarbazona (4-FBT), 4-acetilbenzotriazina tiossemicarbazona (4-ABT), 8-hidroxiquinolina-2-acetil hidrazona (8-HQH), 4-formilbenzotriazina acetil hidrazona (4-FBH) e 4-acetilbenzotriazina acetil hidrazona (4-ABH).....	20
2.2.3. Complexos de Cu(II) e Zn(II) de 8-HQH, 8-HQS e 8-HQT.....	20
2.2.4. Complexo de Pd(II) de 4-ABT.....	21
2.3. Ensaios biológicos.....	21
2.3.1. Atividade antimicrobiana.....	21
2.3.2. Triagem celular nas linhagens celulares: HL60, Jurkat, MDA_MB e MCF-7.....	22
2.3.2.1. Preparo das amostras.....	22
2.3.2.2. Avaliação da atividade citotóxica em células leucêmicas (mieloide e linfóide) e tumor mamário.....	22
2.3.2.1. Avaliação da viabilidade e proliferação celular pelo ensaio de MTT.....	22
2.3.3. Ensaios <i>in vitro</i> para modelo de Alzheimer.....	23
2.3.3.1. Teste de Turbidez.....	23
2.3.3.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	24
2.3.3.3. Ensaios de fluorescência.....	24
Capítulo 3. 8-hidroxiquinolina-2-semicarbazona, tiossemicarbazona e acetil hidrazona: obtenção, propriedades físico-químicas e atividade em modelos <i>in vitro</i> da Doença de Alzheimer (DA).....	26
3.1. Obtenção de 8-hidroxiquinolina-2-semicarbazona, 8-hidroxiquinolina-2-tiossemicarbazona e 8-hidroxiquinolina-2-acetil hidrazona.....	27
3.1.1. Faixa de fusão e rendimento.....	27
3.1.2. Análise Elementar.....	28
3.1.3. Ressonância Magnética Nuclear.....	28
3.1.4. Espectroscopia no Infravermelho.....	35
3.1.5. Espectrometria de massas por eletrospray.....	36
3.1.6. Cristalografia de Raios X.....	36
3.1.7. Determinação das constantes de acidez (pKa) por espectroscopia UV-Vis.....	39
3.1.8. Estudo preliminar de estabilidade.....	41
3.2. Caracterização dos complexos de Cu(II) e Zn(II) dos derivados de 8-hidroxiquinolina-2-aldeído.....	43

3.2.1. Espectrometria de massas por eletrospray.....	44
3.2.2. Espectroscopia no infravermelho.....	45
3.2.3. Ressonância Magnética Nuclear.....	50
3.2.4. Ressonância Paramagnética Eletrônica.....	55
3.2.5. Proposta para as estruturas.....	57
3.2.6. Estudos da interação metal:ligante em solução ( <i>Job Plot</i> ).....	59
3.3. Ensaio biológico (Alzheimer): Teste de Turbidez, Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e ensaios de fluorescência.....	66
3.3.1. Teste de Turbidez.....	66
3.3.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	67
3.3.3. Ensaio de fluorescência.....	70
3.4. Atividade citotóxica.....	72
<i>Capítulo 4. Derivados de 4-formilbenzoni-trila e 4-acetilbenzoni-trila: obtenção, caracterização, atividades antiproliferativa e antimicrobiana.....</i>	<i>74</i>
4.1. Obtenção de 4-formilbenzoni-trila semicarbazona (4-FBS), 4-acetilbenzoni-trila semicarbazona (4-ABS), 4-formilbenzoni-trila tiossemicarbazona (4-FBT), 4-acetilbenzoni-trila tiossemicarbazona (4-ABT), 4-formilbenzoni-trila acetil hidrazona (4-FBH) e 4-acetilbenzoni-trila acetil hidrazona (4-ABH).....	76
4.1.1. Faixas de fusão e rendimento.....	76
4.1.2. Ressonância Magnética Nuclear.....	77
4.1.3. Espectroscopia no Infravermelho.....	87
4.1.4. Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	87
4.1.5. Cristalografia de Raios X.....	89
4.1.6. Estudo preliminar de estabilidade.....	89
4.2. Atividade antimicrobiana.....	91
4.3. Atividade citotóxica.....	91
4.4. Caracterização do complexo de Pd(II) de 4-acetilbenzoni-trila tiossemicarbazona (4-ABT).....	92
4.4.1. Espectroscopia no Infravermelho.....	93
4.4.2. Ressonância Magnética Nuclear.....	95
4.5. Atividade citotóxica.....	97
4.6. Atividade antimicrobiana.....	97
<i>Capítulo 5. Conclusões.....</i>	<i>98</i>
<b>Anexos.....</b>	<b>101</b>

## Capítulo 1. Introdução

### 1.1. Química Medicinal

A Química Medicinal é uma área da química que envolve aspectos das ciências biológicas, médica e farmacêutica. A missão é o planejamento, a descoberta, a identificação e a preparação de compostos biologicamente ativos, que levam o nome de protótipos, o estudo do metabolismo, interpretação do mecanismo de ação ao nível molecular e a construção das relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica (SAR)<sup>1</sup>.

### 1.2. Química Medicinal Inorgânica

A Química Medicinal Inorgânica é uma área que envolve o estudo de complexos metálicos ativos, íons metálicos e compostos quelantes como potenciais agentes terapêuticos ou auxiliares de diagnóstico. Com a descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina em 1965, surgiu um grande interesse por medicamentos à base de metais, e a Química Medicinal Inorgânica apareceu como área promissora<sup>2</sup>.

Os metais, como arsênio, ouro e ferro têm sido usados para tratar doenças desde a antiguidade<sup>3</sup>. No Egito, o cobre era usado para esterilizar água 3000 aC<sup>4</sup> e vários fármacos a base de ferro eram usados 1500 aC<sup>5</sup>. Os chineses e árabes já usavam ouro em uma série de medicamentos há mais de 3500 anos por acreditar que metais preciosos possuíam valor medicinal<sup>4</sup>. No século XVI, o médico suíço Theophrastus Paracelsus (1493- 1541) desenvolvia e usava medicamentos à base de arsênio e mercúrio<sup>6</sup>. No século XX, os trabalhos de Paul Ehrlich e Alfred Werner deram origem a atual Química Medicinal Inorgânica. Werner é considerado o pai da Química de Coordenação pelo desenvolvimento de sua teoria para explicar a estrutura e a ligação química nos complexos metálicos<sup>7</sup>. Ehrlich introduziu as primeiras ideias sobre relação estrutura-atividade com o desenvolvimento de compostos de arsênio para o tratamento da sífilis. O composto Arsfenamina, também conhecido como Salvarsan (Figura 1.1), foi utilizado durante algum tempo no tratamento da doença<sup>5</sup>. Paul Ehrlich é considerado o fundador da quimioterapia<sup>7</sup>.

---

<sup>1</sup> L. M. Lima, Química Nova, 6 (2007) 1456.

<sup>2</sup> T. Storr, K. H. Thompson, C. Orvig, Chemical Society reviews, 35 (2006) 534.

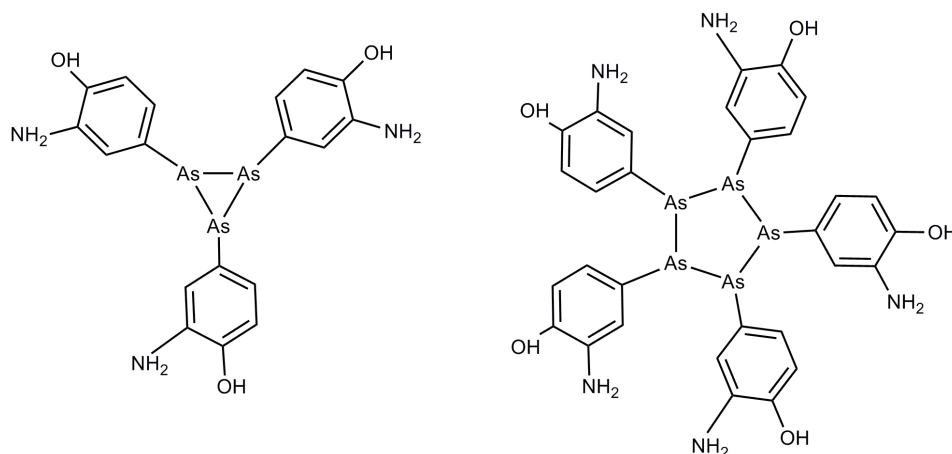
<sup>3</sup> R. R. Chrichton, Biological Inorganic Chemistry, an introduction. 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Elsevier, 2008.

<sup>4</sup> D. Gaynor, D. M. Griffith, Dalton Transactions, 41 (2012) 13239.

<sup>5</sup> C. Orvig, M. J. Abrams, Chemical Reviews, 99 (1999) 2201.

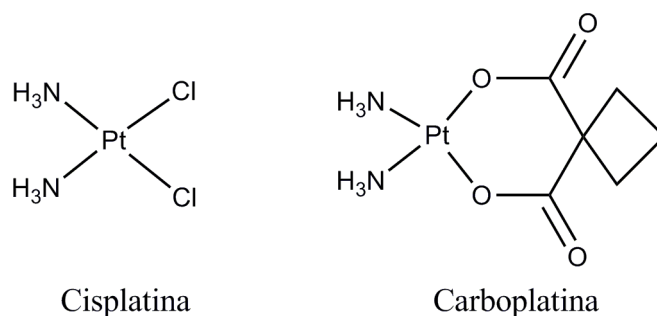
<sup>6</sup> H. Beraldo, Química Nova na Escola, Caderno Temático Química Inorgânica e Medicina, 6 (2005) 4-6.

<sup>7</sup> H. Beraldo, Química Nova, 3 (2004) 461-471.



**Figura 1.1** – Estrutura do Salvarsan.

Atualmente, alguns compostos metálicos têm uso clínico, como os de platina (cisplatina e carboplatina, Figura 1.2) empregados como agentes antitumorais; nitrato de gálio, empregado no tratamento de alguns tipos de câncer; agentes antimicrobianos contendo prata; complexos de ouro, como a auronofina [(2,3,4,6-tetra-*o*-acetil- $\beta$ -1-*D*-tiopiranosato-*S*)ouro(I)], usados no tratamento da artrite reumatoide; compostos de bismuto, empregados contra úlcera; compostos de antimônio, usados contra leishmania e o nitroprussiato de sódio  $2\text{Na}^+[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ , um complexo de ferro usado nas emergências hipertensivas, entre outros<sup>6</sup>.



**Figura 1.2** – Fórmula estrutural da cisplatina e carboplatina.

Os metais fazem parte de vários processos biológicos cruciais como transporte de oxigênio e de elétrons. Portanto, distúrbios na homeostase e biodisponibilidade de metais e toxicidade causada pelo excesso de metais são responsáveis por muitas doenças<sup>3</sup>. Um exemplo disso é a síndrome de Menkes, que está relacionada à deficiência de cobre, e a doença de Wilson, que está relacionada ao excesso deste metal, que é depositado nos rins, fígados e cérebro<sup>8</sup>.

Uma característica dos metais que os torna tão importantes é sua propensão em perder elétrons facilmente, formando íons com cargas positivas, que tendem a ser solúveis em fluidos biológicos. Esses íons metálicos podem interagir com biomoléculas tais como proteínas e DNA, que são ricas em elétrons<sup>8</sup>. Cada metal oferece geometrias características, números de

<sup>8</sup> A. M. C. Benite, S. P. Machado, E. J. Barreto, *Química Nova*, 30 (2007) 2062-2067.

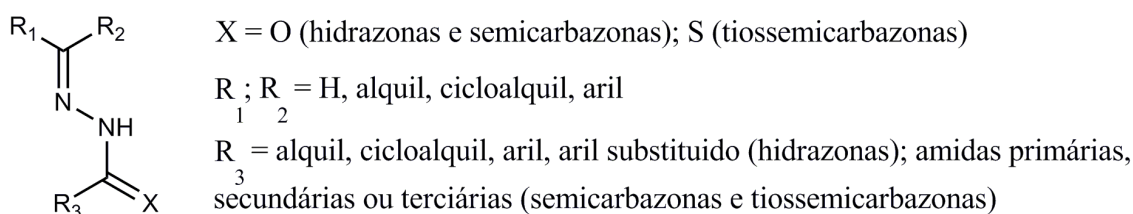
coordenação e estados redox diferenciados. A manipulação de tais variáveis, pela seleção de ligantes adequados pode levar ao ajuste fino das propriedades químicas e eletrônicas. A escolha do ligante também contribui muito para a diversidade estrutural, estabilidade e cinética de troca de ligante<sup>4</sup>.

Existe hoje uma enorme demanda por novos fármacos para o tratamento de diversas doenças e já se sabe que fármacos baseados em metais podem ter como alvo o DNA, proteínas e lipídios, proporcionando aos químicos inorgânicos medicinais uma grande variedade de alvos biomoleculares<sup>4</sup>.

### 1.3. Bases de Schiff e a química medicinal

Bases de Schiff são compostos provenientes da condensação de aminas primárias com compostos carbonílicos e foram primeiramente sintetizadas por Hugo Schiff, recebendo seu nome<sup>9</sup>. São classificadas pela IUPAC como bases de Schiff compostos que possuem grupos imina (C=N) contendo um grupo R diferente de hidrogênio ligado ao nitrogênio, com fórmula mínima  $R_2C=NR$ <sup>10</sup>. Representam uma classe importante de ligantes em química de coordenação e apresentam aplicação em diferentes campos<sup>11,12</sup>.

As bases de Schiff possuem alta afinidade por íons de metais de transição, geralmente são ligantes polidentados e seus complexos podem apresentar diferentes geometrias<sup>13</sup>. Complexos metálicos de bases de Schiff apresentam diversas propriedades interessantes, como atividades antitumoral e antimicrobiana<sup>14</sup>.



**Figura 1.3** – Estrutura genérica de hidrazonas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas.

Hidrazonas, tiossemicarbazonas e semicarbazonas (Figura 1.3) são bases de Schiff que apresentam uma ampla faixa de aplicações farmacológicas<sup>15</sup>. Nas semicarbazonas e tiossemicarbazonas R<sub>3</sub> é uma amina, sendo que a semicarbazona tem um átomo de oxigênio na posição X enquanto a tiossemicarbazona tem um átomo de enxofre. Esses compostos têm sido

<sup>9</sup> M. Tümer, H. Köksal, S. Serin, *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry*, 28 (1998) 1393–1404.

<sup>10</sup> União Internacional de Química Pura e Aplicada, IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology – the Gold Book*. Disponível em < <http://goldbook.iupac.org/S05498.html> > 22 abr 2013.

<sup>11</sup> M. H. Tarafder, N. Saravanan, K. A. Crouse, A. M. Ali, *Transition Metal Chemistry*, 26 (2001) 613-618.

<sup>12</sup> S. A. Shaker, Y. Farina, A. A. Salleh, *European Journal of Scientific Research*, 33 (2009) 702-709.

<sup>13</sup> G. G. Mohamed, M. M. Omar, A. M. Hindy, *Turkish Journal of Chemistry*, 30 (2006) 361 – 382.

<sup>14</sup> J. L. Hickey, P. J. Crouch, S. Mey, A. Caragounis, J.M. White, A.R. Whiteb, P.S. Donnelly, *Dalton Transactions*, 40 (2011) 1338.

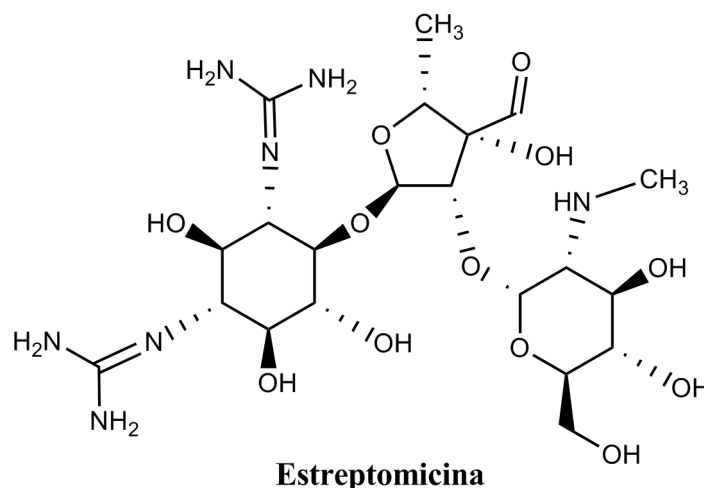
<sup>15</sup> H. Beraldo, D. Gambino, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 4 (2004) 159.

amplamente estudados em razão de suas atividades como agentes antitumorais, antivirais, antibacterianos, antimaláricos, antituberculose, fungicidas, antiparasitários e anticonvulsivantes<sup>7,16,17</sup>. Devido à sua capacidade quelante, o mecanismo de ação dessas bases de Schiff pode envolver a coordenação a metais, e seus complexos metálicos podem ter ação farmacológica própria. Além disso, agentes quelantes podem ser usados em terapias para doenças nas quais há o envolvimento de metais, como algumas doenças neurodegenerativas<sup>18</sup>.

A busca por novas semicarbazonas, tiossemicarbazonas e hidrazonas como agentes quelantes para o tratamento de doenças neurodegenerativas, e com possíveis atividades antimicrobianas, antitumorais faz parte deste trabalho.

#### 1.4. Atividade antimicrobiana de fármacos

Depois que Sir Alexander Fleming identificou o primeiro antibiótico, o desenvolvimento posterior de uma variedade de antibióticos e a melhoria no saneamento básico erradicaram muitas infecções. A descoberta da estreptomicina (Figura 1.4), o primeiro antibiótico contra a tuberculose, é um dos maiores marcos na história da Medicina. Os antibióticos têm melhorado significativamente o ambiente de vida dos seres humanos, reduzindo os casos de óbitos relacionados às infecções, quando comparados às demais patologias. No entanto, o uso excessivo de antibióticos levou ao surgimento de micro-organismos multi-resistentes<sup>19</sup>.



**Figura 1.4** – Estrutura do antibiótico estreptomicina.

Terapias combinatórias são regularmente utilizadas na clínica quando ocorrem infecções causadas por bactérias multi-resistentes. Combinações de dois, três ou até quatro substâncias diferentes representam a única opção terapêutica disponível nesses casos.

<sup>16</sup> H. Beraldo, Química Nova, 27 (2004) 461.

<sup>17</sup> D. X. West, A. Liberta, S. B. Padhye, R. C. Chikate, P. B. Sonawane, A. S. Kumbhar, R. G. Yerande, Coord. Chemical Reviews, 123 (1993) 49.

<sup>18</sup> A. Budimir, Acta Pharmaceutica, 61 (2011) 1–14.

<sup>19</sup> W. Aoki, K. Kuroda, M. Ueda, Journal of Bioscience and Bioengineering, 114 (2012) 365-370.

Entretanto, a terapia combinatória muitas vezes apresenta efeitos colaterais, dificultando a determinação correta das doses<sup>20</sup>.

A descoberta, o desenvolvimento e a aprovação de novos antibióticos estão estagnados, enquanto há aumento da morbidade e mortalidade associada a infecções causadas por bactérias multi-resistentes<sup>20</sup>. De fato, agentes patogênicos humanos importantes, tais como *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Staphylococcus aureus* possuem uma maior resistência contra quase todos os antibióticos convencionais<sup>19</sup>.

Os mecanismos de defesa mais importantes utilizados por bactérias para neutralizar a ação de antibióticos compreendem a regulação excessiva do efluxo ativo, a regulação negativa da permeabilidade da membrana externa, inibindo assim a acumulação intracelular do fármaco, a mutação no alvo de antibióticos, a desintoxicação enzimática do fármaco e as vias compensatórias que evitam o alvo terapêutico<sup>20</sup>.

Com o objetivo de desenvolver novos agentes terapêuticos capazes de driblar a resistência microbiana aos fármacos disponíveis no mercado, estudos de candidatos a protótipos de fármacos antimicrobianos das classes das semicarbazonas, tiosemicarbazonas e hidrazonas e seus complexos metálicos, têm sido realizados pelo nosso grupo há alguns anos<sup>21,22</sup>.

## 1.5. Doença de Alzheimer

Doenças neurodegenerativas são patologias que causam anormalidades cognitivas, definidas pela perda de população de células neurais, agregação de proteínas e evidência de estresse oxidativo extenso<sup>23,24</sup>. Fazem parte desse grupo a doença de Alzheimer (DA), a doença de Parkinson e a esclerose amiotrófica lateral.

O aumento da expectativa de vida mundial está diretamente relacionado ao aumento da incidência de doenças da senilidade, como a DA. Em 2010, a estimativa era que cerca de 35,6 milhões de pessoas em todo o mundo possuíam alguma doença neurodegenerativa. Estima-se que este número vai praticamente dobrar a cada 20 anos, chegando a 65,7 milhões em 2030 e a 115,4 milhões em 2050<sup>25</sup>. O aumento da incidência de doenças neurodegenerativas e a falta de métodos eficazes para diagnóstico e terapias para o tratamento fazem dessas doenças um dos principais temas de pesquisa da Química Medicinal atualmente<sup>26,27</sup>.

---

<sup>20</sup> M. Pieren, M. Tigges, *Current Opinion in Pharmacology*, 12 (2012) 551–555.

<sup>21</sup> G. L. Parrilha, J. G. da Silva, L. F. Gouveia, A. K. Gasparoto, R. P. Dias, W. R. Rocha, D. A. Santos, N. L. Speziali, H. Beraldo, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46 (2011) 1473-1482.

<sup>22</sup> A. A. Recio Despaigne, F. B. Da Costa, O. E. Piro, E. E. Castellano, S. R. W. Louro, H. Beraldo, *Polyhedron*, 38 (2012) 285-290.

<sup>23</sup> E. Gaggelli, H. Kozlowski, D. Valensin, G. Valensin, *Chemical Reviews*, 106 (2006) 1995–2044.

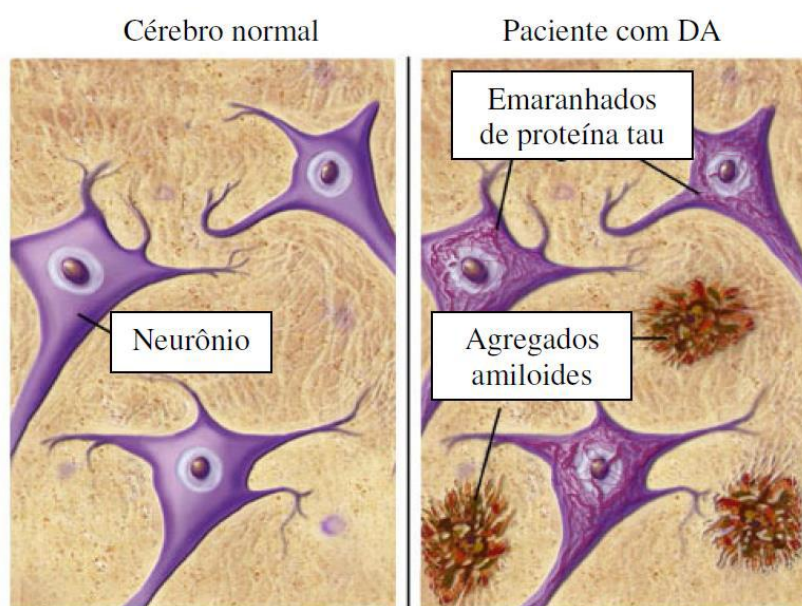
<sup>24</sup> K. J. Barnham, C. L. Masters, A. I. Bush, *Nature reviews. Drug discovery*, 3 (2004) 205–214.

<sup>25</sup> Alzheimer's Disease International. **Dementia statistics: numbers of people with dementia**. Disponível em <<http://www.alz.co.uk/research/statistics>> 03 dez 2012.

<sup>26</sup> D. J. Selkoe, *Nature Medicine*, 17 (2011) 1693–1695.

<sup>27</sup> M. R. Jones, E. L. Service, J. R. Thompson, M. C. Wang, I. J. Kimsey, A. S. Detoma, A. Ramamoorthy, M. H. Lim, T. Storr, *Metalomics*, 24 (2012) 910-20.

Uma das formas mais comuns de demência é a DA, representando cerca de 50 a 60% de todos os casos descritos<sup>28</sup>. É uma doença neurodegenerativa progressiva, com fases pré-sintomática e sintomática, provocando a falha sináptica e morte neuronal<sup>26,29</sup>. Os tratamentos da DA que apresentam maior êxito geralmente são realizados nos estágios iniciais do quadro clínico, quando a reversibilidade do processo degenerativo é maior<sup>26</sup>. Além da senilidade, outros fatores têm sido relacionados ao desenvolvimento da patologia. Dentre esses fatores, podem ser citados baixos índices de desenvolvimento intelectual e ocupacional principalmente nos primeiros períodos da vida do paciente e atividades física e mental reduzidas na terceira idade<sup>30,31</sup>. Dentre todos os fatores, destaca-se o fator genético, que demonstrou estar associado a cerca de 80% dos casos descritos<sup>32</sup>.



**Figura 1.5** – Representação esquemática comparando um cérebro normal com o cérebro de Alzheimer, na qual as placas  $\beta$ A extracelulares e os emaranhados neurofibrilares intracelulares estão representados.

O diagnóstico clínico da DA atualmente disponível é baseado na perda de memória progressiva e déficit em pelo menos uma área de cognição<sup>29</sup>. O diagnóstico definitivo da DA, por sua vez, requer exame do cérebro *post mortem*, ao contrário de outras formas de demência<sup>27</sup>. Por meio desse exame pode-se determinar a severidade das características neuropatológicas atribuídas à doença, como a presença de depósitos extracelulares de placas do peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) e emaranhados neurofibrilares intracelulares (Figura 1.5)<sup>23</sup>. As placas amiloides

<sup>28</sup> C. P. Ferri, M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P. R. Menezes, E. Rimmer, M. Sczufca, *Lancet*, 366 (2005) 2112–17.

<sup>29</sup> J. L. Hickey, P. S. Donnelly, *Coordination Chemistry Reviews*, 256 (2012) 2367–2380.

<sup>30</sup> R. Mayeux, *Annual Review of Neuroscience*, 26 (2003) 81–104.

<sup>31</sup> J. A. Mortimer, D. A. Snowden, W. R. Markesbery, *Journal Clinical Experimental Neuropsychology*, 25 (2003) 671–79.

<sup>32</sup> M. Gatz, C. A. Reynolds, L. Fratiglioni, B. Johansson, J. A. Mortimer, S. Berg, A. Fiske, N. L. Pedersen, *Archives of General Psychiatry*, 63 (2006) 168–74.

são compostas de um agregado insolúvel do peptídeo  $\beta$ A, um aminoácido derivado da proteína precursora de amiloide (PPA)<sup>29</sup>. O peptídeo  $\beta$ A é encontrado no cérebro nas formas solúvel, agregado ou associado a uma membrana. Em indivíduos saudáveis, a maior parte do peptídeo encontra-se associado às membranas, mas as frações do  $\beta$ A agregado e solúvel aumentam consideravelmente nos indivíduos com DA<sup>27</sup>. Estudos recentes mostram que os agregados de  $\beta$ A modificam as propriedades de neurônios vizinhos<sup>33</sup>.

Evidências experimentais sugerem que ocorre uma perda na regulação dos íons metálicos no processo fisiopatológico da DA, uma vez que concentrações elevadas de metais de transição, tais como Zn(II) e Cu(II), foram observados nos depósitos dos agregados<sup>34,35</sup>.

### 1.5.1. Cobre e Zinco: propriedades e papel na Doença de Alzheimer

Depois do ferro, o zinco é o segundo elemento traço mais abundante no corpo humano, sendo que 95% do zinco do organismo são encontrados no interior das células. O zinco está presente em mais de 300 enzimas, onde tem papel catalítico e estrutural. Esse metal também está envolvido na regulação e transcrição do código genético. O cobre, por sua vez, também está presente em diversas enzimas, e participa da transferência de elétrons, da ativação de oxigênio e em alguns invertebrados, do transporte de oxigênio<sup>3</sup>.

A química bioinorgânica do zinco é dominada por muitos fatores. O íon bivalente de zinco não sofre redução tão facilmente como ferro e cobre. Além disso, por ter configuração  $d^{10}$ , não apresenta transições  $d-d$  e com isso não tem espectro de absorção. Seus complexos não estão sujeitos a efeitos de estabilização de campo, o que faz com que o número de coordenação e a geometria do complexo dependam somente do tamanho e carga do ligante. O zinco pode se coordenar a oxigênio, nitrogênio e enxofre<sup>3</sup>.

O cobre pode ser encontrado nos estados de oxidação Cu(I) e Cu(II), formando complexos com número de coordenação de 2 a 4 e de 4 a 6, respectivamente. Os complexos de número de coordenação quatro são quadráticos para Cu(II) e tetraédricos para Cu(I). O Cu(II) é considerado duro e o Cu(I) macio e as duas formas tem altas taxas de troca de ligante<sup>3</sup>.

As concentrações intracelulares de cobre são mantidas em níveis extremamente baixos, provavelmente porque o seu metabolismo intracelular é caracterizado pelo uso de proteínas chaperonas de cobre para transportar o metal até as proteínas alvo<sup>3</sup>.

Muitos elementos traço requerem um balanço de sua homeostase suficiente para garantir que os processos celulares normais aconteçam e ao mesmo tempo evitar a acumulação

---

<sup>33</sup> M. A. Busche, G. Eichhoff, H. Adelsberger, D. Abramowski, K.-H. Wiederhold, C. Haass, M. Staufenbiel, A. Konnerth, O. Garaschuk, *Science*, 321 (2008) 1686–1689.

<sup>34</sup> A. S. DeToma, S. Salamekh, A. Ramamoorthy, M. H. Lim, *Chemical Social Reviews*, 41 (2012) 608–621.

<sup>35</sup> A. S. Pithadia, A. Kochi, M. T. Soper, M. W. Beck, Y. Liu, S. Lee, A. S. DeToma, B. T. Ruotolo, M. H. Lim, *Inorganic Chemistry*, 51 (2012) 12959–12967.

excessiva desses elementos<sup>36</sup>. A deficiência de zinco, por exemplo, causa acrodermatite enteropática, atrofia hipogonadal e problemas respiratórios. Mas quando esse se encontra em excesso, causa desordens pulmonares<sup>8</sup>. No caso do cobre, a síndrome de Menkes é uma doença relacionada à sua deficiência no corpo e a doença de Wilson relacionada ao excesso do metal, gerando depósitos de cobre no fígado, no cérebro e nos rins<sup>8</sup>.

O cérebro é um órgão especializado que necessita da presença de íons metálicos para diversos processos celulares importantes. O cérebro contém uma concentração relativamente elevada de uma série de metais de transição tais como Fe, Zn e Cu, os quais participam na atividade neuronal por meio das sinapses (Zn(II) em particular) e asseguram a função de várias metaloproteínas (citocromo C-oxidase, superóxido dismutase de Cu/Zn). No entanto, uma mudança nos mecanismos, ou a absorção de metais com função biológica desconhecida, alteram o equilíbrio iônico e podem resultar em um estado de doença, levando a várias doenças neurodegenerativas, tais como a DA.

Estudos demonstraram uma alta concentração de Cu(II) e Zn(II) em placas  $\beta$ A quando comparadas às concentrações normais extracelulares no cérebro<sup>18</sup>. Por meio da incubação de  $\beta$ A sintético com íons metálicos, observou-se que Zn(II) e Cu(II) poderiam induzir uma rápida precipitação do peptídeo<sup>37</sup>, revelando uma informação importante sobre as condições bioquímicas que podem promover a agregação do  $\beta$ A no cérebro<sup>38</sup>. Além disso, a interação metal- $\beta$ A inicia a formação de oligômeros, sugerindo a atuação dos metais na formação dessa forma tóxica móvel do  $\beta$ A<sup>39</sup>.

Como a interação de metais com  $\beta$ A contribui para a toxicidade e a deposição de  $\beta$ A no cérebro, a terapia quelante surge como estratégia terapêutica para o tratamento da DA<sup>38</sup>. Estudos realizados com agentes quelantes evidenciam a solubilização das placas  $\beta$ A após administração dos compostos<sup>40</sup>. O primeiro estudo *in vivo* foi publicado em 2001 e relatava a administração de clioquinol (CQ, Figura 1.6), um agente quelante bidentado, em modelos animais da DA utilizando rato Tg2576. Análise do cérebro dos ratos tratados com CQ mostrou uma diminuição de 41% da forma insolúvel de  $\beta$ A<sup>38</sup>. Um trabalho recente com o CQ, mostrou como a terapia quelante é promissora em modelos *in vivo* e também em ensaios clínicos<sup>41,42</sup>.

---

<sup>36</sup> P. de Bie, P. Muller, C. Wijmenga, L. W. J. Klomp, *Journal of Medical Genetics*, 44 (2007) 673–688.

<sup>37</sup> A. I. Bush, W. H. Pettingall, G. Multhaup, M. Paradis, J.-P. Vonsattel, J. F. Gusella, K. Beyreuther, C. L. Masters, R. E. Tanzi, *Science*, 265 (1994) 1464–1467.

<sup>38</sup> P. J. Crouch, K. J. Barnham, *Accounts of Chemical Research*, 45 (2012) 1604–1611.

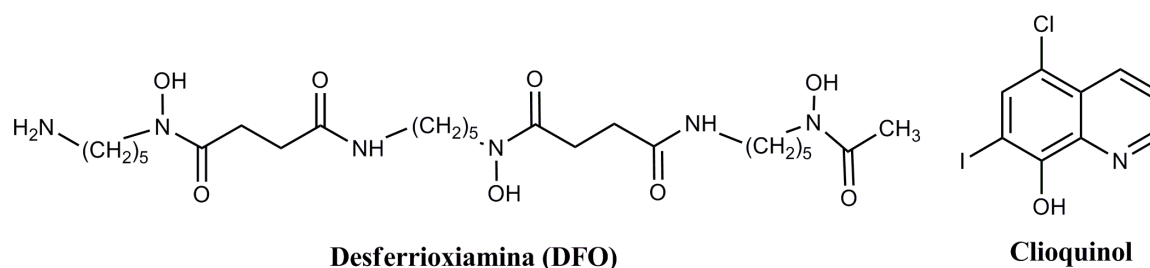
<sup>39</sup> D. J. Tew, S. P. Bottomley, D. P. Smith, G. D. Ciccotosto, J. Babon, M. G. Hinds, C. L. Masters, R. Cappai, K. J. Barnham, *Biophysical Journal*, 94 (2008) 2752–2766.

<sup>40</sup> T. Storr, M. Merkel, G. X. Song-Zhao, L. E. Scott, D. E. Green, M. L. Bowen, K. H. Thompson, B. O. Patrick, H. J. Schugar, C. Orvig, *Journal of the American Chemical Society*, 129 (2007) 7453–63.

<sup>41</sup> N. G. Faux, C. W. Ritchie, A. Gunn, A. Rembach, A. Tsatsanis, J. Bedo, J. Harrison, L. Lannfelt, K. Blennow, H. Zetterberg, M. Ingelsson, C. L. Masters, R. E. Tanzi, J. L. Cummings, C. M. Herd, A. I. Bush, *Journal of Alzheimer's Disease*, 20 (2010) 509–516.

<sup>42</sup> C. W. Ritchie, A. I. Bush, A. Mackinnon, S. Macfarlane, M. Mastwyk, L. MacGregor, L. Kiers, R. Cherny, Q.-X. Li, A. Tammer, D. Carrington, C. Mavros, I. Volitakis, M. Xilinas, D. Ames, S. Davis, K. Beyreuther, R. E. Tanzi, C. L. Master, *Archives of Neurology*, 60 (2003) 1685–1691.

Outro estudo clínico inicial foi realizado com a deferrioxamina (DFO) (Figura 1.6), um agente quelante eficaz, e mostrou diminuição significativa na taxa de declínio cognitivo dos pacientes tratados em comparação com o grupo controle em um período de 24 meses<sup>43</sup>.



**Figura 1.6** – Estruturas de deferrioxamina (DFO) e clioquinol.

Agentes quelantes devem apresentar certas propriedades para serem usados como potenciais agentes terapêuticos para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Em geral devem apresentar baixo peso molecular, baixa ou nenhuma carga para favorecer o transporte pela barreira hemato-encefálica (BHE) e devem ser estáveis. Além disso, devem ser seletivos com relação ao alvo metálico, porque uma forte ligação de maneira não-específica a íons metálicos resultaria na diminuição geral de sua concentração, incluindo metais de metaloenzimas, que são essenciais. Com agente quelante no cérebro, a molécula deve ser apta a complexar os íons metálicos presentes em excesso nos agregados de proteínas, de forma a permitir sua dissolução e eliminação. Finalmente, o tratamento bem sucedido com qualquer quelante requer baixa toxicidade e efeitos adversos toleráveis clinicamente<sup>18</sup>.

Neste contexto, a síntese de novos agentes quelantes, mais eficazes e menos tóxicos que os compostos atualmente disponíveis é uma abordagem promissora no desenvolvimento de protótipos de fármacos para o tratamento da DA.

## 1.6. Osteoporose e Catepsina K

A osteoporose é uma patologia que afeta cerca de 200 milhões de mulheres no mundo<sup>44</sup>. Fraturas osteoporóticas são causa frequente e importante de invalidez e altos custos médicos<sup>45</sup>. No Brasil há cerca de 10 milhões de pessoas com osteoporose<sup>44</sup>. Os custos com a fratura osteoporótica do fêmur para o sistema de saúde privado foi cerca de 12 milhões de reais no período de um ano, entre julho de 2003 e junho de 2004<sup>46</sup>, e a relação de incidência de fraturas no quadril por 100.000 habitantes para os países da América latina está representada na Figura 1.7<sup>44</sup>.

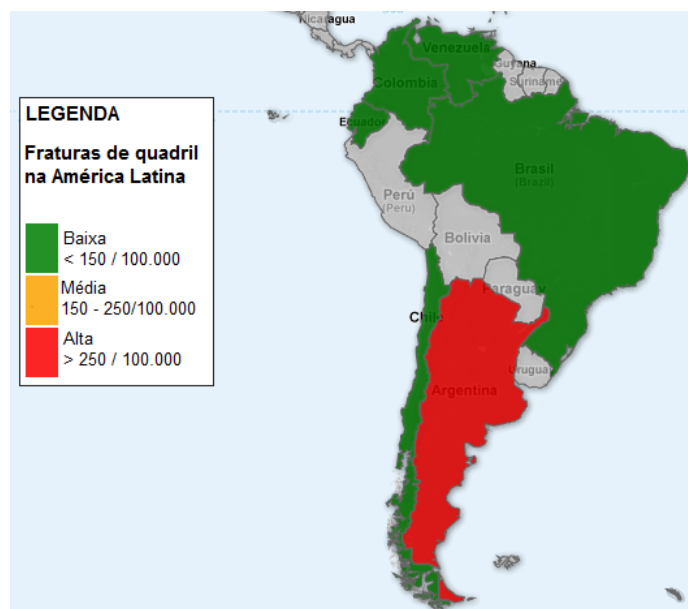
<sup>43</sup> D. R. Crapper McLachlan, A. J. Dalton, T. P. Kruck, M. Y. Bell, W. L. Smith, W. Kalow, D. F. Andrews, Lancet, 337 (1991) 1304–1308.

<sup>44</sup> International Osteoporosis Foundation. **Osteoporosis**. Disponível em <<http://www.iofbonehealth.org/osteoporosis>> 22 abr 2013.

<sup>45</sup> D. Y. Soung, M. A. Gentile, L. T. Duong, H. Drissi, Bone (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2013.02.010>

<sup>46</sup> D. V. Araujo, J. H. Oliveira, O. L. Bracco, Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 49 (2005) 897-901.

Existem muitos fatores de risco para a osteoporose, e eles podem ser classificados em duas classes: fixo e modificável. Alguns fatores, como a idade ou sexo, não podem ser alterados, ao contrário de fatores relacionados ao estilo de vida pessoal, como o tabagismo, consumo de álcool e dieta. Estima-se que uma em cada três mulheres e um em cada cinco homens acima dos 50 anos sofrerá uma fratura osteoporótica<sup>44</sup>.



**Figura 1.7** – Mapa da Incidência de Fratura de Quadril na América Latina<sup>47</sup>.

Atualmente, a abordagem terapêutica mais usada para a osteoporose se baseia na supressão da causa da doença, a destruição excessiva dos ossos pelos osteoclastos<sup>48</sup>. Bisfosfonatos (Figura 1.8) formam uma classe de substâncias químicas que apresentam uma ligação P-C-P e que vêm se destacando por agirem como inibidores de reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos<sup>49</sup>. Reduzem a reabsorção óssea de maneira dose-dependente, principalmente ao inibirem o recrutamento e promoverem a apoptose dos osteoclastos, além de estimularem a atividade osteoblástica<sup>50</sup>.

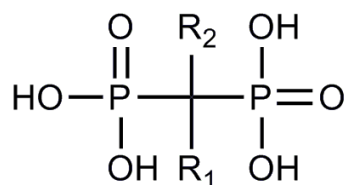
Os bisfosfonatos estão associados à irritação gastrointestinal e úlceras, e quando administrado por via intravenosa requerem hospitalização e causam febre e dor óssea<sup>47</sup>. Recentemente, diversos casos de osteonecrose maxilar têm sido associados ao uso de bisfosfonatos<sup>47,49</sup>. Além dos efeitos colaterais preocupantes, os bisfosfonatos apresentam vida média nos ossos maior que 12 anos, de maneira que a interrupção do tratamento pode não ser suficiente para interromper os efeitos colaterais<sup>47</sup>.

<sup>47</sup> J. A. Kanis e colaboradores em nome da Fundação Internacional de Osteoporose (International Osteoporosis Foundation - IOF) Epidemiology/Quality of Life Working Group. "A systematic review of hip fracture incidence and probability of fracture worldwide" Osteoporosis International 2012.

<sup>48</sup> U. B. Grabowska, T. J. Chambers, M. Shiroo, Current opinion in Drug Discovery & Development, 8 (2005) 619-630.

<sup>49</sup> V. M. R. Dos Santos, C. L. Donicci, J. B. N. DaCosta, J. M. R. Caixeiro, Quimica Nova, 30 (2007) 159-170.

<sup>50</sup> A. Gegler, K. Cherubini, M. A. Z. Figueiredo, L. S. Yurgel, A. A. Azambuja, Revista Brasileira de Cancerologia, 52 (2006) 25-31.



**Figura 1.8** – Estrutura química geral de bisfosfonatos.

Catepsinas são cisteína proteases, da família das papaínas e estão envolvidas em diferentes processos fisiológicos<sup>51</sup>. Sua função principal é a reciclagem de proteína de lisossomo, mas apresentam importante papel em processos como a cicatrização de feridas, remodelação óssea e também em doenças como asma brônquica, aterosclerose e artrite reumatoide. As catepsinas podem ter expressão, atividade proteolítica e localização adulteradas, e essa atividade desregulada pode ser a causa ou um fator contribuinte para essas doenças<sup>52</sup>.

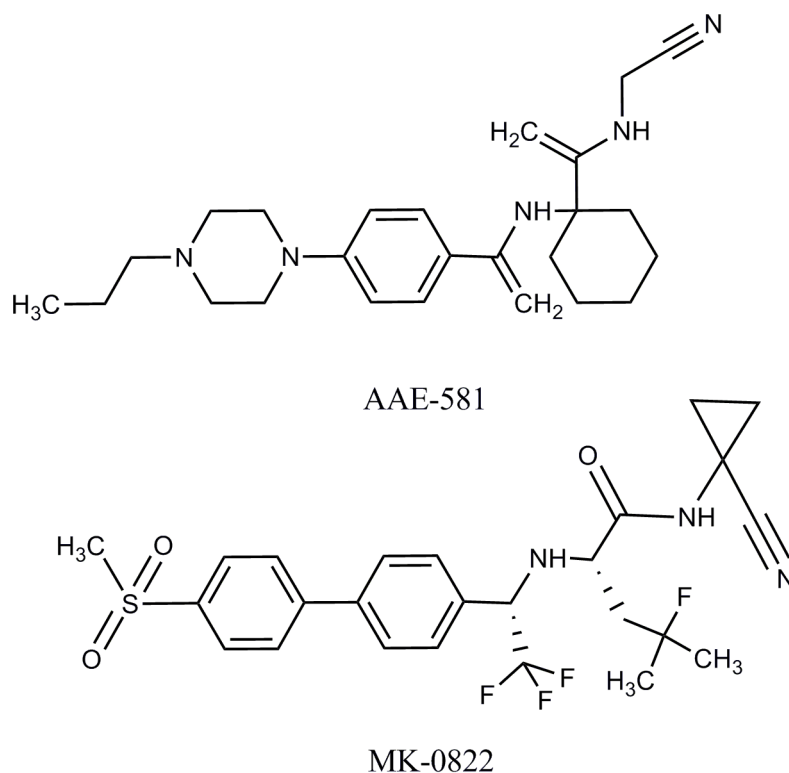
Estudos realizados no final da década de 1990 e início dos anos 2000 apresentaram evidências para a ação da catepsina no processo de destruição dos ossos. Um desses estudos mostrou através da avaliação dos sítios de reabsorção nos ossos de camundongos deficientes de catepsina K, que os osteoclastos foram depositados nas superfícies de osso desmineralizado e que a matriz extracelular foi desmineralizada normalmente, mas a sua degradação foi prejudicada. Em contraste, ratos transgênicos que expressam a catepsina K em excesso reduziram o volume de osso trabecular, como resultado da reabsorção óssea aumentada<sup>47</sup>.

A catepsina K é liberada de osteoclastos maduros para degradar o colágeno tipo I, a principal proteína óssea da matriz orgânica<sup>45</sup>, sendo assim essencial no processo de destruição dos ossos<sup>47</sup>. Com isso, tem um papel importante em doenças envolvendo ossos e cartilagens, como osteoporose, artrite reumatoide, osteoartrite, dentre outras doenças<sup>52</sup>.

Neste contexto, inibidores de catepsina K (I-CatK) tem tido grande destaque como novos protótipos de fármacos para o tratamento de osteoporose e tem se tornado alvo importante da Química Medicinal atual<sup>47</sup>. Usando modelos animais de osteoporose pós-menopausa, I-CatK impediram a perda de osso resultante de deficiência de estrogênio. Do mesmo modo, o tratamento com I-CatK a uma dose dependente aumentou a massa óssea, enquanto inibiu a reabsorção óssea em mulheres pós-menopáusicas osteopênicas. Ao contrário dos bisfosfonatos, o tratamento com I-CatK aumenta o número de osteoclastos, mantendo a taxa de formação óssea elevada nos animais ovariectomizados e em osteoporose pós-menopáusicas<sup>45</sup>.

<sup>51</sup> E. F. Marques, M. A. Bueno, P. D. Duarte, A. R. S. P. Silva, A. M. Martinelli, C. Y. dos Santos, R. P. Severino, D. Brömme, P. C. Vieira, A. G. Corrêa, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 54 (2012) 10-21.

<sup>52</sup> S. Conus, H-U. Simon, *Swiss Medical Weekly*, 140 (2010) w13042.



**Figura 1.9** – Estruturas de AAE-581 e MK-0822, inibidores de catepsina K.

Inibidores contendo nitrilas já foram descritos em diversas publicações<sup>47</sup>, como os compostos AAE-581 e MK-0822 (Figura 1.9) e demonstraram em ensaios clínicos um aumento na densidade mineral óssea (DMO) do quadril e da coluna lombar, com significativa redução nos marcadores de reabsorção óssea<sup>53</sup>. Portanto, a síntese de novos compostos contendo nitrilas, tais como bases de Schiff, é uma abordagem promissora no desenvolvimento de protótipos de fármacos para o tratamento da osteoporose.

### 1.7. Paládio: atividade farmacológica e usos em medicina

Em 1969, Barnett Rosenberg descobriu a atividade antitumoral do complexo *cis*[diaminodicloroplatina(II)], *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], conhecido como cisplatina<sup>54</sup>. Atualmente, a cisplatina e seus análogos, são os agentes quimioterápicos mais eficazes em uso clínico como primeira linha de tratamento em câncer de testículo e ovário<sup>55</sup>. Entretanto, a cisplatina e outros medicamentos à base de platina de segunda geração apresentam inconvenientes importantes, como toxicidade tecidual grave incluindo nefrotoxicidade e neurotoxicidade, a presença ou a aquisição de resistência ao tratamento, baixa solubilidade em água, e inatividade relativa contra certos tipos de tumores tais como tumores gastrointestinais<sup>54</sup>.

<sup>53</sup> D. K. Khajuria, R. Razdan, D. R. Mahapatra, Revista Brasileira de Reumatologia, 51 (2011) 365-82.

<sup>54</sup> E. Gao, C. Liu, M. Zhu, H. Lin, Q. Wu, L. Liu, Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 9 (2009) 356-368.

<sup>55</sup> J. Zhang, F. Zhang, H. Li, C. Liu, J. Xia, L. Ma, W. Chu, Z. Zhang, C. Chen, S. Li and S. Wang, Current Medicinal Chemistry, 19 (2012) 2957-2975.

Seguindo a descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina e complexos relacionados, o interesse pela descoberta de complexos mais eficientes com outros metais e ligantes foi intensificado. Dentre os primeiros compostos a serem usados em testes clínicos contra tumores estão os análogos de Pd(II) da cisplatina, como *cis*[Pd(en)Cl<sub>2</sub>] (en = etilenodiamina) e *cis*[Pd(DACH)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (DACH = 1,2-diaminociclohexano), por apresentarem semelhanças estruturais com a cisplatina e conterem um metal do mesmo grupo da platina. Tanto Pd(II) quanto Pt(II) são ácidos de Lewis macios e formam ligações mais fortes com ligantes contendo nitrogênio e enxofre (bases macias) do que com oxigênio (bases duras)<sup>56</sup>. Complexos de Pd(II) de derivados de ditiocarbamato-amina caracterizados por apresentar atividade antitumoral comparável a cisplatina são capazes de contornar a resistência cruzada à cisplatina<sup>54</sup>.

Entretanto, complexos de Pt(II) em geral são termodinamicamente e cineticamente mais estáveis que aqueles de Pd(II). Os complexos de Pd(II) sofrem troca de ligantes pela água 10<sup>5</sup> vezes mais rápidos do que os de Pt(II). Esta última propriedade explica a baixa atividade antitumoral de *cis*[Pd(en)Cl<sub>2</sub>] e *cis*[Pd(DACH)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] quando comparados aos complexos análogos de Pt(II), e também de sua toxicidade<sup>56</sup>. O problema da maior labilidade dos complexos de Pd(II) quando comparados com Pt(II) pode ser superado com o uso de ligantes mais fortes e estericamente impedidos<sup>57</sup>.

A atividade biológica de muitos complexos metálicos foi relatada como sendo devida à sua interação com o DNA, de formas covalente e não covalente<sup>54</sup>. Complexos com geometria quadrática podem formar adutos com o DNA, afetando sua integridade<sup>58</sup>. Muitos mecanismos da interação de Pd(II) com o DNA já foram propostos. Evidências experimentais e teóricas revelaram que mesmo ligantes planares grandes como hidroxipiridina em complexos de Pd(II) não inibiram a formação de adutos bifuncionais com o DNA. Entretanto, a atividade biológica de complexos *trans*-[PdCl<sub>2</sub>L<sub>2</sub>] contendo ligantes piridínicos depende fortemente da posição dos substituintes no anel da piridina e que a melhor atividade anti-tumoral foi reportada para o [PdCl<sub>2</sub>(2-OHPy)<sub>2</sub>]<sup>57</sup>.

Complexos de Pd(II) também podem apresentar atividade antimicrobiana, como por exemplo complexos como [Pd(AcTsc)Cl], [Pd(HAcTsc)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub>, [Pd(AcTsc)], (HAcTsc = 2-acetilpiridina tiossemicarbazona) que tiveram CI<sub>50</sub> inferior a 1 µg/mL contra *Staphylococcus aureus*, uma bactéria gram positiva. Outros complexos, como [Pd(L)Cl<sub>2</sub>], onde L é (ciclohexil-N-tio)-1,2-etilenodiamina, (ciclohexil-N-tio)-1,3-propanodiamina, 1,1-difenil-2-tiossemicarbazida, (1,1-difenil-2-tio)-1,3-propanodiamina, 1,1-difenil-2-tiossemicarbazida e

<sup>56</sup> A. Garoufis, S. K. Hadjikakou, N. Hadjiadis, Coordination Chemistry Reviews, 253 (2009) 1384–1397.

<sup>57</sup> A. Krogul, J. Cedrowski, K. Wiktorska, W. P. Oziminski, J. Skupnska, G. Litwinienko, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.02.058>.

<sup>58</sup> N. Miklášová, E. Fischer-Fodor, P. Lönnecke, C. I. Tomuleasa, P. Virag, M. P. Schrepler, R. Mikláš, I. S. Dumitrescu, E. Hey-Hawkins, European Journal of Medicinal Chemistry, 49 (2012) 41-47

(1,1-difenil-2-tio)-1,3-propanodiamina, também mostraram atividade antimicrobiana. O complexo  $[Pd(AMDTc)_2]$  (HAMDTc = ácido aminoditiocarbâmico) apresentou atividade contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* e *Pseudomonas aeruginosa*<sup>56</sup>.

As tiossemicarbazonas são usadas como ligantes doadores de N e S em complexos de Pd(II). Esses ligantes apresentam atividade antifúngica, antimicrobiana e antitumoral, e seu mecanismo de ação provavelmente envolve a inibição de ribonucleotídeo redutase, enzima que converte ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos durante a síntese do DNA. Portanto, a síntese de novos complexos de Pd(II) de tiossemicarbazonas é promissora no desenvolvimento de protótipos com possíveis atividades antitumorais e antimicrobianas.

## 1.8. Objetivos

O presente trabalho consistiu na preparação de duas classes de compostos orgânicos: bases de Schiff derivadas de 8-hidroxi-2-quinolina e bases de Schiff contendo nitrilas.

No primeiro caso o objetivo foi obter tiossemicarbazona, semicarbazona e hidrazona derivadas de 8-hidroxi-2-quinolina, contendo em sua estrutura uma porção que mimetiza o clioquinol. Este último mostrou-se eficaz *in vitro* e *in vivo* como agente quelante para o tratamento da DA. Constituiu também objetivo do presente trabalho o estudo dos complexos de Cu(II) e Zn(II) dos derivados de 8-hidroxi-2-quinolina e a investigação do efeito dos ligantes em modelos *in vitro* da DA.

A segunda classe de compostos estudados no presente trabalho constituiu-se de bases de Schiff contendo uma função nitrila que foram preparadas com o objetivo de obter novos candidatos a protótipos de fármacos para inibir a atividade de catepsina K em osteoporose. Uma vez que os compostos são agentes quelantes, fez-se também um estudo de suas interações com metais e uma investigação de suas propriedades antimicrobianas. De fato, uma vez que o efeito antimicrobiano de bases de Schiff é conhecido, pareceu-nos interessante testar os compostos contra cepas de fungos e bactérias.

Muitos complexos de Pd(II) de tiossemicarbazonas com atividades antimicrobiana e antitumoral já foram relatados na literatura. Por isso, a obtenção de complexos de Pd(II) de tiossemicarbazona contendo nitrila com possíveis atividades antifúngica, antibacteriana e citotóxica fez também parte dos objetivos desse trabalho.

## Capítulo 2. Parte Experimental

### 2.1. Equipamentos, métodos e materiais

#### 2.1.1. Reagentes e Solventes

Para as reações de síntese foram utilizados reagentes e solventes P.A. adquiridos de fontes comerciais (Aldrich, Fluka, Merck, Synth, Vetec, Quimex e Strem Chemicals). Foram utilizados solventes deuterados adquiridos de Cambridge Isotope Laboratories, Inc (CIL).

#### 2.1.2. Pesagens

Foram realizadas pesagens em uma balança analítica Mettler AE 163, precisão 0,0001 g.

#### 2.1.3. Ponto de Fusão

Os pontos de fusão dos compostos foram determinados utilizando-se o equipamento Mettler FP 90.

#### 2.1.4. Análises Condutimétricas

As medidas de condutividade molar foram obtidas por meio de um condutivímetro YSI Conductivity Bridge, modelo 31, com célula condutimétrica do mesmo fabricante, de constante  $0,088 \text{ cm}^{-1}$ . As medidas foram feitas a partir de soluções de concentração  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  dos compostos, utilizando-se dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. Os resultados foram analisados conforme a atribuição apresentada nas Tabelas 2.1 e 2.2.

**Tabela 2.1.** Atribuição de tipo de eletrólito em solução (DMF)<sup>59</sup>.

Solvente	$\Lambda_M (\text{cm}^2 \cdot \Omega^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})$	Tipo de eletrólito
DMF	65-90	1:1
	130-170	2:1
	200-240	3:1

<sup>59</sup> J. W. Geary, *Coordination Chemistry Reviews*, 7 (1971) 81.

**Tabela 2.2.** Atribuição de tipo de eletrólito em solução (DMSO).

Solvente	$\Lambda_M$ ( $\text{cm}^2 \cdot \Omega^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	Tipo de eletrólito	Soluções referência ( $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
<b>DMSO</b>	27,02 – 43,14	1:1	KCl (cloreto de potássio), NaCl (cloreto de sódio), $\text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}^+$ (acetato de sódio), $\text{LiClO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (perclorato de lítio triidratado), $\text{NH}_4\text{PF}_6$ (hexafluorofosfato de amônio)
	72,08 – 74,02	2:1	$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cloreto de bário diidratado), $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ (nitrato de bário)

### 2.1.5. Análise Elementar

Foram realizadas análises elementares em três locais diferentes: no Departamento de Química da UFMG, na Central Analítica do Instituto de Química da USP e no Departamento de Química na *Simon Fraser University*, Burnaby – Canadá\*. Em todos os casos, utilizou-se o equipamento CHN 2400, Perkin Elmer.

### 2.1.6. Análises térmicas

As curvas termogravimétricas (TG) foram obtidas na Termobalança Shimadzu-YGA50H do Laboratório de Análise Térmica do Departamento de Química da UFMG. Os experimentos foram realizados em atmosfera de  $\text{N}_2$ , com razão de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . A faixa de temperatura utilizada foi de 25 a  $750 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 2.1.7. Suscetibilidade magnética

Os valores de suscetibilidade magnética foram obtidos em uma balança Johnson Matthey MSB/AUTO a temperatura ambiente e como função da temperatura em um Susceptômetro Lake-Shore 7130.

### 2.1.8. Difração de Raios X

Foram determinadas estruturas cristalográficas em colaboração com os pesquisadores Dr. Nivaldo Speziali, do Departamento de Física da UFMG, e o Dr. Jeferson Gomes Da Silva, do Departamento de Química da UFMG. Os detalhes e as condições experimentais de cada medida estão descritos no capítulo correspondente ao composto.

### **2.1.9. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)**

Os espectros na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR System-Spectrum GX, localizado no Departamento de Química da UFMG. Os espectros foram registrados nas regiões 4000-400 e 710-200  $\text{cm}^{-1}$ , com o uso de pastilhas de KBr ou emulsões de nujol em janelas de CsI.

### **2.1.10. Ressonância magnética nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN foram obtidos por meio de espectrômetro Bruker DPX-200 (200 MHz) localizado no Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (Laremar) do Departamento de Química da UFMG e de espectrômetro Bruker AV-500 (500 MHz) localizado na *Simon Fraser University*, Burnaby – Canadá\*. As soluções foram preparadas utilizando-se DMSO- $d_6$  como solvente e TMS como referência interna em tubos de 5 mm de diâmetro externo.

### **2.1.11. Espectrometria de Massas por Ionização Electrospray (ESI-MS)**

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrofotômetro LCQFleet (ThermoScientific, San Jose, CA) com fonte de ionização por electrospray (ESI) operando no modo positivo. Foram obtidos espectros em uma média de 50 scans, de 0,2 segundos cada. As amostras foram introduzidas por injeção direta, com fluxo de 25  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . A temperatura do capilar foi de 285 °C, utilizando-se  $\text{N}_2$  como gás de arraste. A voltagem do spray foi de 5,0 kV e a voltagem do capilar foi de -38 V.

### **2.1.12. Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)**

Os espectros de RPE foram obtidos por meio de espectrômetro Bruker ESP300E com 100 kHz de frequência de modulação e uma amplitude de modulação de 0,4-1,0 mT. Os espectros a temperatura ambiente, das amostras em estado sólido e das amostras em solução DMSO (1 mmol  $\text{L}^{-1}$ ), foram obtidos em capilares de vidro de 1,2 mm de diâmetro interno. Os espectros em solução de DMSO a baixa temperatura foram adquiridos na temperatura do  $\text{N}_2$  líquido (77 K) em tubos de Teflon® de 3 mm de diâmetro. Os espectros de RPE foram medidos pela Dra. Sonia Louro, do Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

### **2.1.13. Espectros eletrônicos no Ultravioleta-visível (UV-vis)**

Os espectros eletrônicos em solução foram registrados em espectrofotômetros HP8453 diode array, acoplado a um banho termostaticado VWR1160A operando a  $25,0 \pm 0,1$  °C e 37,0

$\pm 0,1$  °C localizado no Departamento de Química da UFMG, utilizando-se uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico e um espectrômetro Varian CARY 5000 localizado na *Simon Fraser University*, Burnaby – Canadá\*, operando a 25 °C, utilizando-se uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico. Foram obtidos espectros eletrônicos a 5, 40 e 60 °C para as acetil hidrazonas para avaliar a interconversão de tautômeros em solução.

#### **2.1.14. Determinação dos valores de pH**

Foram determinados valores de pH utilizando um pHmetro de bancada Marte, modelo M-10/MB-10P, com eletrodo combinado de vidro para determinações em solução aquosa.

#### **2.1.15. Determinação das constantes de acidez (pKa) por UV-vis**

Foram obtidos espectros no UV-visível dos compostos em solução com valores de pH variáveis. A partir desses resultados foram obtidos os valores de pKa e os diagramas de especiação. Soluções dos compostos (40 mM) foram preparadas utilizando 5% DMSO em NaCl 0,1 M. Hidróxido de sódio foi utilizado para aumentar o valor de pH das soluções dos compostos até pH 12, o ponto de partida do teste. Alíquotas de HCl foram adicionadas à solução do ligante e, a cada valor de pH fixado, os espectros foram obtidos na faixa de 250 – 600 nm. Ao menos 30 espectros foram obtidos na faixa de pH 2-12. Os dados foram analisados utilizando o programa HypSpec (Protonic Software, UK). Os diagramas de especiação foram obtidos por simulação, utilizando o programa HySS2009 (Protonic Software, UK)<sup>27,60</sup>.

#### **2.1.16. Estudo preliminar de estabilidade**

Foram realizados estudos preliminares de estabilidade dos derivados de 8-hidroxiquinolina, 4-formilbenzonitrila e 4-acetilbenzonitrila em tampão fosfato (pH 7,4) por espectroscopia no ultravioleta. A concentração dos compostos utilizada foi igual a 40  $\mu$ M em 5% de DMSO em tampão fosfato (pH 7,4). Após o preparo da solução, os espectros foram obtidos nos tempos 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 120 minutos.

#### **2.1.17. Estudos da interação metal:ligante em solução (*Job Plot*)**

Foram realizados estudos de interação dos derivados de 8-hidroxiquinolina com Cu(II) e Zn(II) em solução. Foram preparadas 11 soluções, variando-se as concentrações conforme descrito na Tabela 2.3. Os máximos de absorvância atribuídos à interação metal-ligante foram

---

<sup>60</sup> X. He, H. M. Park, S. J. Hyung, A. S. DeToma, C. Kim, B. T. Ruotolo, M. H. Lim, Dalton Trans., 21 (2012) 6558.

determinados para cada solução e os resultados foram utilizados em conjunto para determinação da relação metal:ligante das espécies em solução<sup>61,62</sup>.

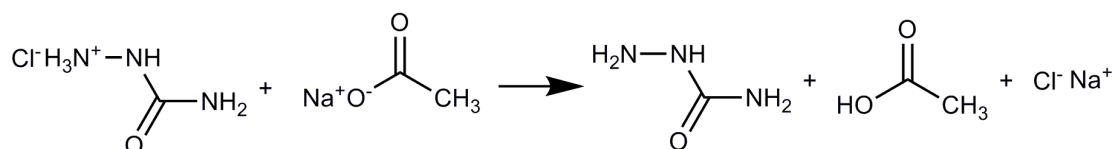
**Tabela 2.3.** Estudo de interação metal:ligante em solução. As soluções foram preparadas em DMSO e 20% DMSO em tampão HEPES, pH 6,6 para Cu(II) e pH 7,4 para Zn(II).

Solução	Concentração do ligante (mol. L <sup>-1</sup> )	Concentração do metal (mol. L <sup>-1</sup> )
1	4,0 x 10 <sup>-5</sup>	0
2	3,6 x 10 <sup>-5</sup>	4,0 x 10 <sup>-6</sup>
3	3,2 x 10 <sup>-5</sup>	8,0 x 10 <sup>-6</sup>
4	2,8 x 10 <sup>-5</sup>	1,2 x 10 <sup>-5</sup>
5	2,4 x 10 <sup>-5</sup>	1,6 x 10 <sup>-5</sup>
6	2,0 x 10 <sup>-5</sup>	2,0 x 10 <sup>-5</sup>
7	1,6 x 10 <sup>-5</sup>	2,4 x 10 <sup>-5</sup>
8	1,2 x 10 <sup>-5</sup>	2,8 x 10 <sup>-5</sup>
9	8,0 x 10 <sup>-6</sup>	3,2 x 10 <sup>-5</sup>
10	4,0 x 10 <sup>-6</sup>	3,6 x 10 <sup>-5</sup>
11	0	4,0 x 10 <sup>-5</sup>

## 2.2. Síntese de ligantes e complexos

### 2.2.1. Obtenção de 8-hidroxiquinolina-2-semicarbazona (8-HQS), 4-formilbenzonitrila semicarbazona (4-FBS) e 4-acetilbenzonitrila semicarbazona (4-ABS)

As semicarbazonas foram preparadas a partir da reação de condensação dos respectivos aldeídos: 8-hidroxi-2-quinolina aldeído, 4-formilbenzonitrila e 4-acetilbenzonitrila com cloridrato de semicarbazida previamente neutralizado com acetato de sódio (Figura 2.1 e 2.2), conforme o método descrito na literatura e por membros de nosso grupo<sup>63,64</sup>. Os produtos obtidos foram caracterizados por ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho e RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT, COSY e HMQC.



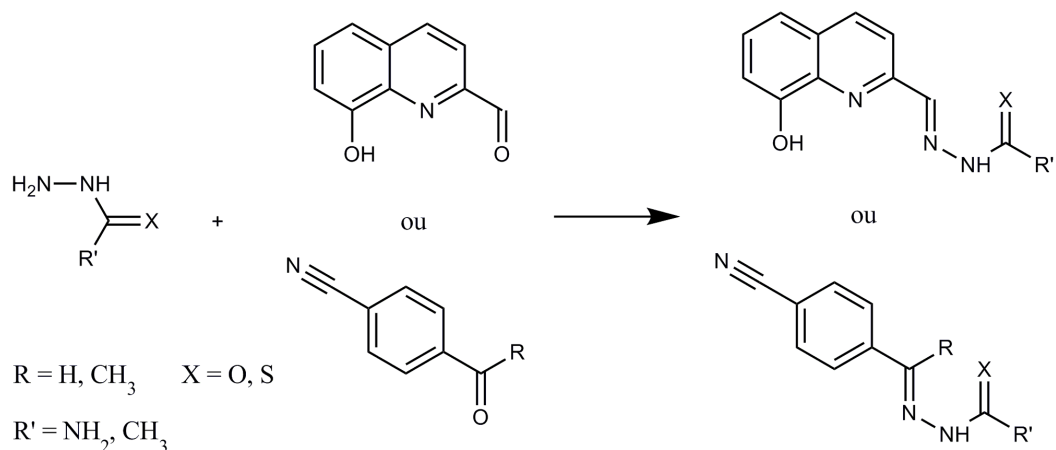
**Figura 2.1** – Esquema de neutralização de cloridrato de semicarbazida com acetato de sódio.

<sup>61</sup> P. Job, Ann. Chim., 9 (1928) 113.

<sup>62</sup> F. R. Mansour, N. D. Danielson, Microchemical Journal, 103 (2012) 74.

<sup>63</sup> H. Beraldo, R. D. Sinisterra, L. R. Teixeira, R. P. Vieira, M. C. Doretto, Biochemical and Biophysical Research Communications, 16 (2002) 241.

<sup>64</sup> R. P. Vieira, L. T.S. Rocha, L. R. Teixeira, R. D. Sinisterra, M. M. Coelho, H. Beraldo, Revista Virtual de Química, 2 (2010) 2.



**Figura 2.2** – Esquema de síntese dos compostos 8-hidroxiquinolina-2-tiossemicarbazona (8-HQT), 4-formilbenzotrila tiossemicarbazona (4-FBT), 4-acetilbenzotrila tiossemicarbazona (4-ABT), 8-hidroxiquinolina-2-acetil hidrazona (8-HQH), 4-formilbenzotrila acetil hidrazona (4-FBH), 4-acetilbenzotrila acetil hidrazona (4-ABH), 8-hidroxiquinolina-2-semicarbazona (8-HQS), 4-formilbenzotrila semicarbazona (4-FBS) e 4-acetilbenzotrila semicarbazona (4-FBS).

### 2.2.2. Obtenção de 8-hidroxiquinolina-2-tiossemicarbazona (8-HQT), 4-formilbenzotrila tiossemicarbazona (4-FBT), 4-acetilbenzotrila tiossemicarbazona (4-ABT), 8-hidroxiquinolina-2-acetil hidrazona (8-HQH), 4-formilbenzotrila acetil hidrazona (4-FBH) e 4-acetilbenzotrila acetil hidrazona (4-ABH)

As tiossemicarbazonas e acetil hidrazonas foram preparadas a partir da reação de condensação dos respectivos aldeídos: 8-hidroxi-2-quinolina aldeído, 4-formilbenzotrila e 4-acetilbenzotrila com tiossemicarbazida e acetil hidrazida (Figura 2.2) conforme o método descrito na literatura<sup>14</sup>. Os produtos obtidos foram caracterizados por ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho, RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT, COSY e HMQC, e para o caso de 8-HQH e 4-FBT por cristalografia de raios-x.

### 2.2.3. Complexos de Cu(II) e Zn(II) de 8-HQH, 8-HQS e 8-HQT

Os complexos de Cu(II) e Zn(II) foram preparados a partir da reação de 1 mmol do composto desejado com 1,2 mmol de acetato de Cu(II) ou acetato de Zn(II) em DMF. A reação foi mantida em agitação por 4 horas. Após este período, foram adicionadas 5 mL de água destilada ao meio reacional, simultaneamente à filtração a vácuo, para forçar a precipitação do sólido. O sólido filtrado foi lavado com água, álcool e éter etílico e secado sob vácuo<sup>14</sup>.

Os complexos de Cu(II) e de Zn(II) foram caracterizados por ponto de fusão, análise elementar, medidas de condutividade molar, TG, e espectros de massas (MS), infravermelho (IV), UV-Vis, RPE (para os complexos de Cu(II)) e RMN (para os complexos de Zn(II)).

#### 2.2.4. Complexo de Pd(II) de 4-ABT

O complexo de Pd(II) na proporção M:L 1:1 foram preparados como descrito na literatura<sup>65</sup>. Foi preparada uma solução de 1 mmol de 4-ABT em etanol (10 mL). Essa solução foi adicionada a solução aquosa de K<sub>2</sub>[PdCl<sub>4</sub>] (1,5 mmol) e a reação foi mantida sob refluxo por cerca de 7 horas. O sólido obtido foi filtrado, lavado com água e etanol a quente e secado sob vácuo. O complexo de Pd(II) foi caracterizado por ponto de fusão, análise elementar, medida de condutividade, TG, MS, IV, UV-Vis e RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H.

### 2.3. Ensaios biológicos

#### 2.3.1. Atividade antimicrobiana

Os testes de atividade antibacteriana e antifúngica foram realizados em nosso laboratório pelo método de macrodiluição em série<sup>66</sup>. Os testes de inibição de crescimento foram realizados seguindo os padrões do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS)<sup>67,68</sup>. Cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9057) foram inoculadas em caldo Mueller Hinton e as cepas dos fungos *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida glabrata* (ATCC 10231) inoculadas em caldo Sabouraud, ambas incubadas a 37° C por 18 a 24 horas.

A referência para a turbidez do inóculo foi medida pela análise do seu espectro de absorção na região ultravioleta, nos comprimentos de onda 530 nm e 625 nm, obtendo um valor entre 0,08 e 0,10 que corresponde a uma concentração do inóculo de 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônia (UFC). Foram retirados 100 µL do inóculo e transferidos para um tubo contendo 9,9 mL de caldo Mueller Hinton Broth, obtendo-se uma concentração de inóculo de 10<sup>6</sup> UFC. Foram acrescentados 200 µL deste inóculo aos tubos de diluição contendo 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5 e 0,25 µg mL<sup>-1</sup> dos compostos testados e do composto de referência, para uma concentração final de inóculo de 10<sup>5</sup> UFC. Como controle positivo usou-se a bactéria no meio de cultura e como controle negativo o meio de cultura. Tetraciclina, Cetoconazol,

<sup>65</sup> A. Casineiras, M. Gil, E. Bermejo, D. X. West, Zeitschrift für Naturforschung B: A Journal of Chemical Sciences, 55 (2000) 863.

<sup>66</sup> J. Pernak, J. Rogoza, I. Mirska, The European Journal of Medicine, 36 (2001) 313.

<sup>67</sup> National Committee for Clinical Laboratory Standards, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, in: NCCLS Document M7-A6, Pennsylvania, USA, 2003, ISBN: 1-56238-486-4.

<sup>68</sup> National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second edition. NCCLS document M27-A2 [ ISBN: 1-56238-469-4]. NCCLS, Pennsylvania, USA, (2002).

Ciprofloxacina e Fluconazol foram usados como referência para os testes. Após 20 horas de incubação em estufa a 37° C foram feitas as análises da inibição e determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos compostos.

### **2.3.2. Triagem celular nas linhagens celulares: HL60, Jurkat, MDA\_MB e MCF-7**

#### **2.3.2.1. Preparo das amostras**

As soluções estoque das amostras foram preparadas em DMSO na concentração de 20 mM, segundo especificações. Para minimizar a variabilidade entre os experimentos e a instabilidade, as amostras foram solubilizadas no momento do experimento. Após o uso, as amostras foram separadas em alíquotas e estocadas a -20°C. Para os ensaios com células, foi preparada uma solução de uso a 100 µM, deste modo as concentrações finais dos compostos nos ensaios de triagem foram de 10 µM, com uma concentração final de DMSO a 0,05%.

As linhagens celulares utilizadas nos ensaios foram: HL60 (leucemia mieloide), Jurkat (Leucemia linfóide), MCF-7 e MDA-MB (carcinomas mamários). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

Para a determinação da  $CI_{50}$ , fez-se diluição seriada, geralmente com oito concentrações diferentes, começando sempre de 100 µM. Este procedimento foi realizado para as amostras que inibiram em mais de 50% a proliferação celular quando utilizados a 10 µM.

#### **2.3.2.2. Avaliação da atividade citotóxica em células leucêmicas (mieloide e linfóide) e tumor mamário**

As suspensões de células Jurkat foram utilizadas na concentração de 100.000 células/poço (placas de 96 poços). Para a linhagem HL60 utilizou-se a concentração de 50.000 células/poço. Finalmente, utilizou-se a concentração de 10.000 células/poço para as linhagens MCF-7 e MDA-MB. Todas foram incubadas por 24h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> para estabilização. Após estabilização, todas as células foram incubadas com as substâncias por 48h em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e 100% de umidade, 37°C. Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando-se como controle positivo o etoposídeo, composto de uso clínico no tratamento do câncer. Foi realizado um controle do solvente (DMSO) na mesma concentração das amostras avaliadas.

#### **2.3.2.3. Avaliação de viabilidade e proliferação celular pelo ensaio de MTT**

O ensaio para avaliação de viabilidade e proliferação celular é baseado na redução metabólica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) a formazan<sup>69</sup> e

---

<sup>69</sup> A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campell, J. Mayo, M. J. Boyd, National Cancer Institute, 83 (1991) 757-766.

permite avaliar tanto a proliferação quanto a viabilidade celular. A metodologia utilizada foi descrita por Monks et al. (1991)<sup>69</sup>, com modificações. Faltando 4 horas para o final do período de incubação das culturas, foram adicionados 20 µL de uma solução de MTT (2,5 mg/mL) a cada poço (contendo 200 µL finais). Após as 4 horas de incubação e formação dos cristais de formazan, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado a vácuo. A cada poço foram adicionados 200 µL de uma solução de HCl 0,04 M em isopropanol. Após solubilização dos cristais de formazan formados pela metabolização do MTT pelas células viáveis, as placas foram lidas em leitor de ELISA a um comprimento de onda de 595 nm.

### **2.3.3. Ensaios *in vitro* para modelo de Alzheimer**

#### **2.3.3.1. Teste de Turbidez\***

Uma solução de peptídeo sintético humano β-amilóide (βA<sub>1-40</sub>, 21st Century Biochemicals) foi preparada imediatamente antes da realização do teste. Frascos contendo 0,25 mg de peptídeo foram dissolvidos em 290 mL de água deionizada, obtendo-se uma solução estoque de 200 µM. A solução foi submetida a um banho de ultrassom por 60 segundos, seguido de pausa de 30 segundos. O procedimento foi repetido duas vezes. Tampão HEPES 20 mM contendo 150 mM de NaCl e tratado com resina Chelex<sup>®</sup> foi preparado utilizando água deionizada. A resina Chelex<sup>®</sup> é usada para prevenir a presença de metais na solução tampão final, evitando assim interferências no resultado. Imediatamente antes dos testes o valor de pH da solução tampão foi ajustado para 6,6 nos ensaios com Cu(II) e 7,4 nos ensaios com Zn(II). As soluções tampão foram utilizadas no preparo das soluções estoque dos compostos e dos metais. Os testes foram realizados em placas de 96 poços, em quadruplicata para cada composto. Compostos, metais e peptídeo βA<sub>1-40</sub> foram pipetados para as placas de forma que suas concentrações finais em 200 µL de solução foram 150 mM, 25 mM e 25 mM, respectivamente. As soluções finais caracterizavam-se por apresentar uma concentração de 5% de DMSO em tampão. Soluções de cloreto de Cu(II) e cloreto de Zn(II) foram preparadas de padrões de absorção atômica (Sigma-Aldrich). A sequência na qual as soluções foram adicionadas à placa foi: metal – peptídeo – tampão – composto. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C em banho sob agitação constante e submetidas à leitura a 405 nm no Espectrofotômetro Synergy 4 BioTek. Também foram obtidas amostras em quadruplicata de brancos contendo o composto, metais e tampão e os valores médios e desvios padrão foram subtraídos dos valores médios e desvios padrão de poços correspondentes contendo o peptídeo. Para demonstrar a agregação do ligante na presença dos metais, poços contendo peptídeo e soluções dos metais foram utilizadas como controle negativo. Simultaneamente, poços contendo peptídeo, soluções dos metais e solução de ácido dietilenotriamino pentacético (ADTP) foram utilizados como controle positivo, para demonstrar a interferência de um agente quelante na

agregação do peptídeo promovida pelos metais em solução. Os controles também se constituíram de soluções 5% DMSO em tampão<sup>27,70</sup>.

### 2.3.3.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)\*

Para confirmar visualmente os resultados obtidos nos testes de turbidez foram obtidas imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), utilizando peptídeo sintético  $\beta A_{1-40}$ . Foram incubadas amostras com o peptídeo isoladamente (25  $\mu M$ ), na presença e na ausência de cloreto de Cu(II) e cloreto de Zn(II) (25  $\mu M$ ), na presença e na ausência de cada um dos compostos testados (50  $\mu M$ ) e das amostras contendo os compostos testado também na presença e ausência dos metais. As amostras foram submetidas a banho durante 24 horas a 37 °C. Telas utilizadas como suporte (*Formvar/Carbon 300-mesh grids*, Electron Microscopy Sciences) foram submetidas à descarga incandescente por 15 segundos para aumento da hidrofília. As amostras (10 mL) foram gotejadas sobre uma folha de Parafilm® e colocadas em contato com a tela por 5 minutos. Em seguida, as telas foram colocadas em contato com solução 5% de acetato de uranila. O procedimento foi repetido duas vezes. Para secagem, a tela foi mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Imagens foram obtidas a 200 kV, com aumento de 9000 vezes<sup>27,71</sup>.

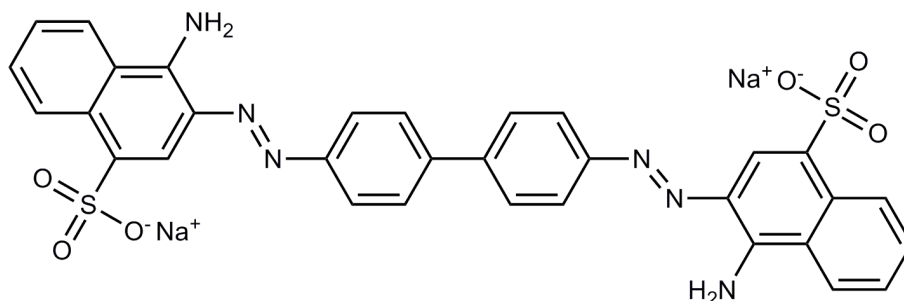
### 2.3.3.3. Ensaio de fluorescência\*

Uma solução estoque de 50  $\mu M$  do peptídeo sintético humano  $\beta$ -amilóide (0,25 mg em 1156  $\mu L$  de água destilada) foi preparada e submetida a um banho de ultrassom por 60 segundos, seguido de pausa de 30 segundos. Tampão fosfato (PBS - NaCl 137 mM, fosfato 10 mM e KCl 2,7 mM, pH 7,2) foi utilizado no ensaio para diluição das amostras. Vermelho do congo (VC, Figura 2.4) foi utilizado como controle positivo. Soluções estoque dos ligantes e VC em 5% DMSO em tampão PBS foram preparadas nas concentrações descritas na Tabela 2.4. Foram pipetados 25  $\mu L$  das amostras (VC ou ligante) e 25  $\mu L$  da solução estoque do peptídeo em uma placa de 96 poços Microtest BD Falcon de fundo chato e opaca (preta). O procedimento foi realizado em triplicata para cada concentração da amostra. A placa foi mantida a 25°C e ao abrigo de luz por 96 horas. Após o período de incubação, preparou-se uma solução contendo 5  $\mu M$  de tioflavina T (Figura 2.5) e 50 mM de glicina em água destilada pH 8,5 para realizar a leitura da fluorescência. Adicionou-se 150  $\mu L$  da solução de tioflavina T em cada poço e realizou-se imediatamente a leitura da fluorescência. A fluorescência foi medida no Espectrofotômetro Synergy 4 BioTek utilizando um comprimento de onda de excitação de

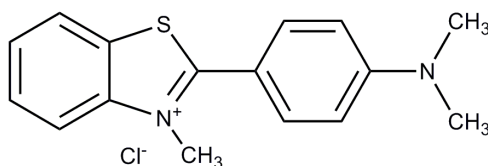
<sup>70</sup> L. E. Scott, M. Telpoukhovskaia, C. Rodriguez-Rodriguez, M. Merkel, M. L. Bowen, B. D. G. Page, D. E. Green, T. Storr, F. Thomas, D. D. Allen, P. R. Lockman, B. O. Patrick, M. J. Adam, C. Orvig, *Chem. Sci.*, 2 (2011) 642.

<sup>71</sup> A. M. Mancino, S. S. Hindo, A. Kochi, M. H. Lim, *Inorg. Chem.*, 48 (2009) 9596.

446 nm ( $\pm 5$  nm) e emissão de 490 nm ( $\pm 5$  nm). Os valores médios das medidas de fluorescência das triplicatas foram utilizados para fazer gráficos de fluorescência versus concentração. Os gráficos de fluorescência versus  $\text{Log}_{[x]}$  (logaritmo da concentração) e os valores de  $\text{CI}_{50}$  foram obtidos utilizando o programa DeltaGraph Prism (DeltaPoint, Inc)<sup>72</sup>.



**Figura 2.3** – Estrutura do composto Vermelho do Congo (VC).



**Figura 2.4** – Estrutura do composto tioflavina T.

**Tabela 2.4.** Concentrações das soluções estoque dos ligantes e VC em 5% DMSO em tampão PBS.

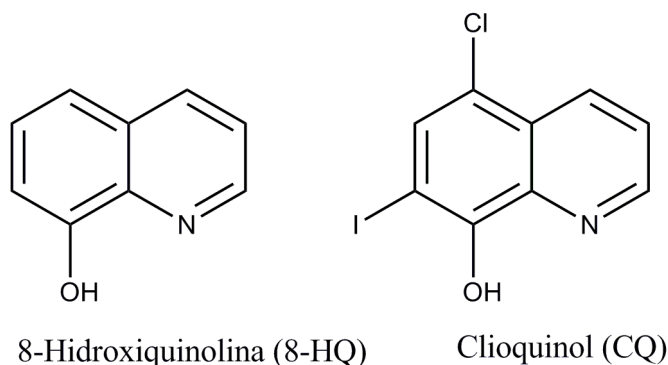
Concentração dos ligantes ( $\mu\text{M}$ )	Concentração de VC ( $\mu\text{M}$ )
2000	125
1000	62,5
500	31,25
250	15,63
125	7,81
62,5	3,91
31,25	1,95
15,625	0,98
-	0,49
-	0,24
-	0,12
-	0,06
-	0,03
-	0,015
-	0,007

\* os experimentos na *Simon Fraser University*, Burnaby – Canadá foram realizados pelo Doutor Rafael Pinto Vieira.

<sup>72</sup> J. E. Gestwick, G. R. Crabtree, I. A. Graef. *Science*, 306 (2004) 865.

### Capítulo 3. 8-hidroxiquinolina-2-semicarbazona, tiossemicarbazona e acetil hidrazona: obtenção, propriedades físico-químicas e atividade em modelos *in vitro* da Doença de Alzheimer (DA)

O clioquinol (CQ, Figura 3.1) é um derivado de 8-hidroxiquinolina (8-HQ, Figura 3.1) que começou a ser utilizado como anti-séptico e amebicida em casos de infecções intestinais em 1934. Na década de 1970, o CQ oral foi retirado do mercado, devido à sua suposta neurotoxicidade<sup>73</sup>. No entanto, formulações tópicas de CQ ainda estão disponíveis para o tratamento de infecções por fungos e parasitas<sup>74</sup>.



**Figura 3.1** – Estruturas de 8-hidroxiquinolina (8-HQ) e de clioquinol (CQ, 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina).

A atividade quelante do CQ e sua alta afinidade por Cu(II) e Zn(II) estimulou muitos pesquisadores a considerar seu uso para o tratamento da Doença de Alzheimer (DA)<sup>73</sup>. Segundo a hipótese da influência de metais na DA (“Metal hypothesis of AD”), Cu(II) e Zn(II) estariam diretamente relacionados à indução de agregação de peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $\beta$ A) *in vitro* e à formação de depósitos do peptídeo no cérebro, uma característica fisiopatológica da DA<sup>34,35</sup>. Estudos *in vivo* demonstraram que a administração de CQ diminuía a formação dos depósitos de peptídeo no cérebro e promovia ganhos cognitivos em animais experimentais<sup>42</sup>. Um estudo na fase II do CQ oral em pacientes com DA também demonstrou ganhos cognitivos nos pacientes após a administração do composto. Seus efeitos biológicos são atribuídos à sua lipofilicidade, essencial à transposição da barreira hemato-encefálica (BHE), e à sua habilidade em formar complexos relativamente estáveis com íons metálicos específicos<sup>41</sup>.

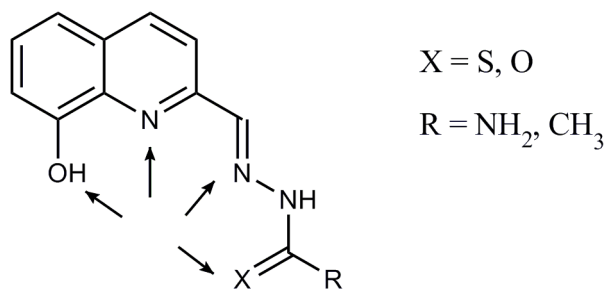
Hidrazonas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas derivadas de 8-hidroxiquinolina (Figura 3.2) são bases de Schiff que podem se coordenar a íons metálicos de forma bidentada, tridentada e tetradentada<sup>75</sup>. A tiossemicarbazona apresentada na Figura 3.2 e seu complexo de Cu(II) foram sintetizados por Zhang *et al* e testados frente a linhagens celulares de

<sup>73</sup> S. R. Bareggi, U. Cornelli, CNS Neuroscience and Therapeutics, 18 (2012) 41-46.

<sup>74</sup> X. Mao, A.D. Schimmer, Toxicology Letters, 182 (2008) 1.

<sup>75</sup> M. Albrecht, O. Osetka e R. Fröhlich, Dalton Transactions, (2005) 3757–3762.

neuroblastoma (NB) resistentes ao cisplatina. Apenas o complexo de Cu(II) apresentou atividade significativa<sup>76</sup>.



**Figura 3.2** – Estrutura geral de bases de Schiff derivadas de 8-hidroxiquinolina: hidrazona (X = O; R = CH<sub>3</sub>), semicarbazona (X = O; R = NH<sub>2</sub>) e tiossemicarbazona (X = S; R = NH<sub>2</sub>), e seus possíveis sítios de coordenação.

Neste trabalho, obtivemos as três bases de Schiff da Figura 3.2 acima e seus complexos de Cu(II) e Zn(II). A atividade das bases de Schiff em modelos *in vitro* da DA foi avaliada por meio de testes de turbidez, microscopia eletrônica de transmissão e teste de competição com tioflavina T na presença de peptídeo βA.

### 3.1. Obtenção de 8-hidroxiquinolina-2-semicarbazona, 8-hidroxiquinolina-2-tiossemicarbazona e 8-hidroxiquinolina-2-acetil hidrazona

Os derivados de 8-hidroxiquinolina-2-aldeído (8-HQ) foram obtidos conforme já descrito na literatura<sup>14</sup>. A caracterização dos compostos foi realizada por meio da determinação das suas faixas de fusão, por espectroscopia no IV, por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT e mapas de contorno HMQC (correlação heteronuclear múltiplo-quântica, <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H <sup>1</sup>J), HMBC (coerência heteronuclear <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H <sup>2</sup>J e <sup>3</sup>J) e NOESY (efeito espectroscópico nuclear Overhauser – correlação homonuclear) e por espectrometria de massas. A semicarbazona e a tiossemicarbazona derivadas de 8-hidroxiquinolina já haviam sido relatadas na literatura<sup>75,76</sup>. Já 8-hidroxiquinolina-2-acetil hidrazona (8-HQH) é um composto inédito cuja caracterização foi realizada também por meio de análise elementar e difração de Raios-X de monocristal, obtido da água mãe.

#### 3.1.1. Faixas de fusão e rendimento

Na tabela 3.1, estão listados os rendimentos na síntese, cor e os valores das faixas de fusão obtidos para os derivados de 8-HQ.

<sup>76</sup> H. Zhang, R. Thomas, D. Oupicky, F. Peng, Journal of Biological Inorganic Chemistry, 13 (2008) 47–55.

**Tabela 3.1.** Faixa de fusão de 8-hidroxiquinolina-2-semicarbazona, tiossemicarbazona e acetil hidrazona (8-HQS, 8-HQT e 8-HQH, respectivamente).

Composto	Rendimento (%)	Cor	Faixa de Fusão (°C)
8-HQH	89	Amarelo claro	224,1 a 224,6
8-HQS	92	Amarelo claro	227,4 a 228,3
8-HQT	96	Amarelo claro	234,3 a 235,7

Os valores obtidos para as faixas de fusão indicaram a pureza dos sólidos obtidos.

### 3.1.2. Análise Elementar

Na tabela 3.2 estão listadas as porcentagens obtidas na análise elementar do composto 8-HQH.

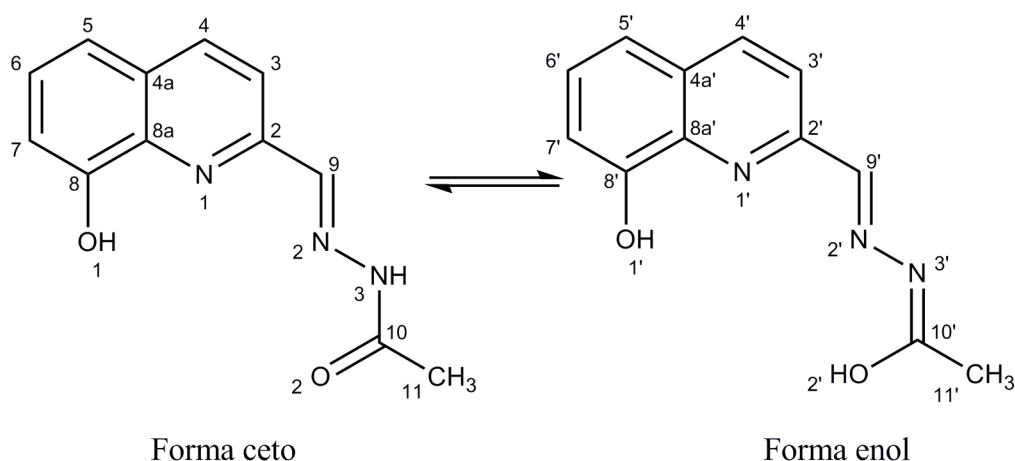
**Tabela 3.2.** Valores teóricos e experimentais de análise elementar para 8-hidroxiquinolina-2-acetil hidrazona (8-HQH).

	Carbono (%)	Hidrogênio (%)	Nitrogênio (%)
Teórico	62,87	4,84	18,33
Obtido	62,83	4,95	18,26

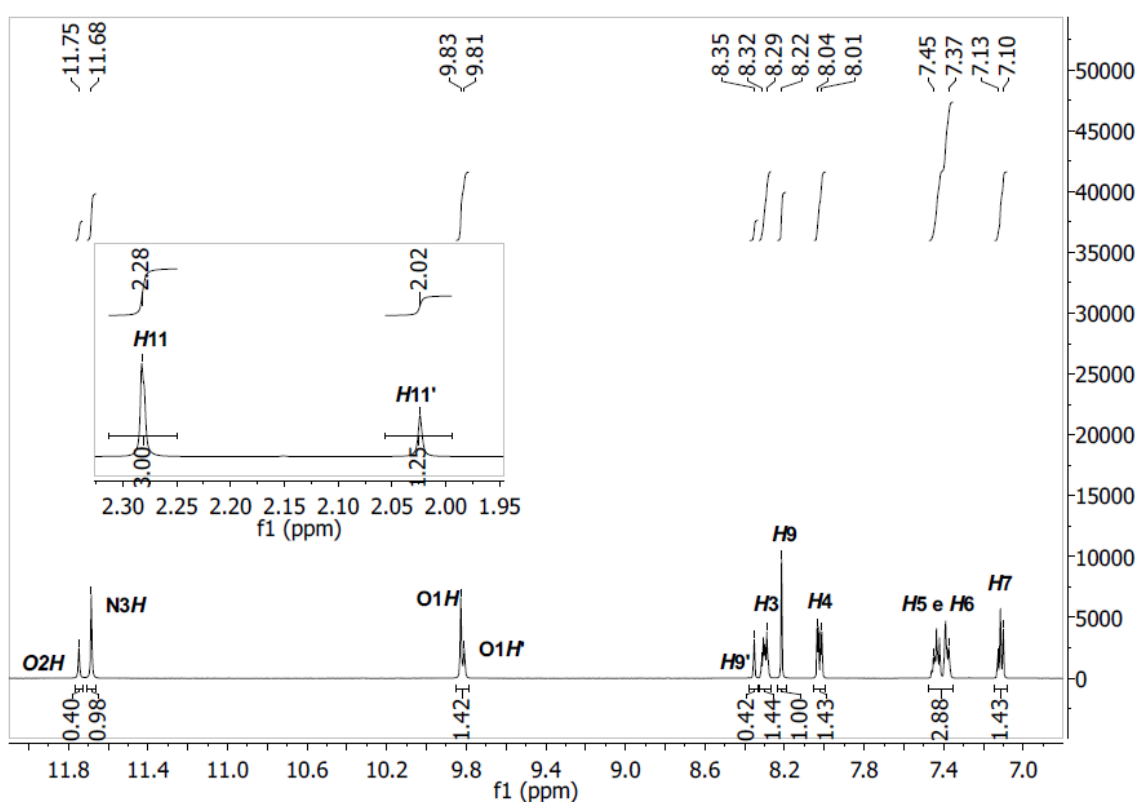
Os resultados apresentados foram compatíveis com a formação do composto esperado.

### 3.1.3. Ressonância Magnética Nuclear

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 8-HQH, representado na Figura 3.4, observa-se uma duplicidade de sinais que sugere a presença de tautomerismo ceto-enólico em solução, no qual o hidrogênio de N3 é transferido para o oxigênio da carbonila O2, conforme Figura 3.3. A integração dos sinais é condizente com a proporção 1:0,42 entre as formas ceto:enol. O sinal do hidrogênio N3H e o sinal do hidrogênio O2H são simpletos em  $\delta$  11,68 e  $\delta$  11,75, respectivamente. O sinal do hidrogênio O1H é um simpleto observado em  $\delta$  9,83 (ceto) e  $\delta$  9,81 (enol). Os hidrogênios H3, H4, H5, H6 e H7 apresentam sinais sobrepostos relacionados às formas tautoméricas. O sinal de H3 está na faixa  $\delta$  8,32 –  $\delta$  8,29 e o sinal do hidrogênio H4 na faixa  $\delta$  8,04 –  $\delta$  8,01. Os sinais dos hidrogênios H5 e H6 encontram-se sobrepostos na faixa  $\delta$  7,45 –  $\delta$  7,37. Os hidrogênios H7 para as duas formas encontradas apresentam-se na faixa de  $\delta$  7,13 –  $\delta$  7,10. O sinal de H9 apresenta-se duplicado, como um simpleto em  $\delta$  8,22 para a forma ceto e em  $\delta$  8,35 para a forma enólica. Finalmente, os hidrogênios H11 apresentam-se como simpleto em  $\delta$  2,02 (enol) e  $\delta$  2,28 (ceto).



**Figura 3.3** – Tautomerismo ceto-enólico em solução para 8-HQH.



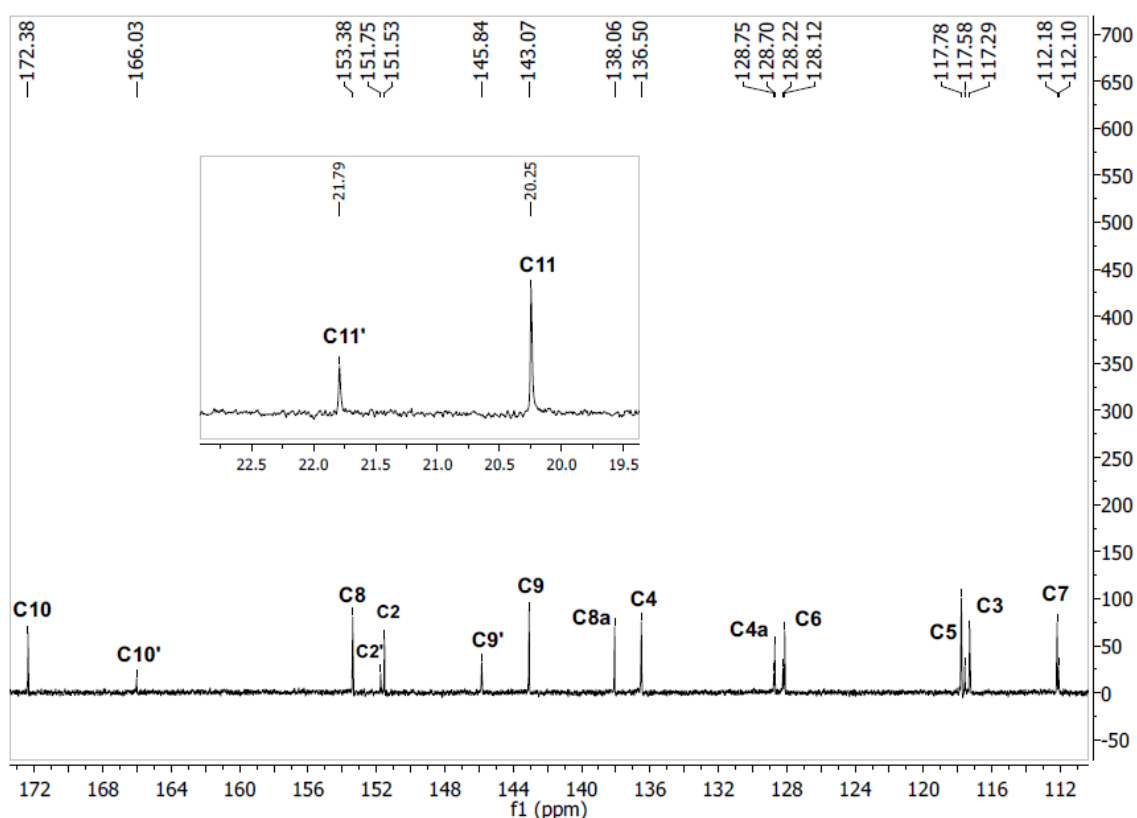
**Figura 3.4** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) de 8-HQH em  $\text{DMSO-}d_6$  com ampliação nas regiões de 1,95 a 2,30 ppm e 7,0 a 11,8 ppm.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 8-HQH (Figura 3.5), observou-se também a duplicidade de alguns sinais de carbono, atribuída ao tautomerismo ceto-enólico, no qual a diferença de deslocamento da forma ceto para o forma enol é de cerca de 7 ppm, como relatado anteriormente por outros membros do nosso grupo<sup>77,78</sup>. Os deslocamentos químicos do carbono C10, ligado ao oxigênio O2 que participa do tautomerismo, são de  $\delta$  172,38 para a forma ceto e

<sup>77</sup>A. A. R. Despaigne, L. F. Vieira, I. C. Mendes, F. B. da Costa, N. L. Speziali, H. Beraldo. J. Braz. Chem. Soc., (2010) 1247-1257.

<sup>78</sup>A. A. Recio Despaigne. Estudo do perfil farmacológico de novos complexos metálicos de hidrazonas derivadas de piridina e imidazóis (tese de doutorado), 2012, UFMG. Disponível em <http://hdl.handle.net/1843/SFSA-8ZBUS8>.

$\delta$  166,03 para a forma enol. Os deslocamentos químicos atribuídos a C9 para a forma ceto é  $\delta$  143,07 e para a forma enol é  $\delta$  145,84. Os deslocamentos atribuídos a C8 e C8a são observados em  $\delta$  153,38 e  $\delta$  138,06, respectivamente. O carbono C2, ligado ao nitrogênio da quinolina, possui os deslocamentos  $\delta$  151,33 para a forma ceto e  $\delta$  151,75 para a forma enol. Os carbonos aromáticos C3, C4, C4a, C5, C6 e C7 estão localizados na faixa de  $\delta$  136,50 –  $\delta$  112,18. O C11 apresenta os deslocamentos  $\delta$  20,25 para a forma ceto e  $\delta$  21,79 para a forma enol. O espectro de RMN de DEPT 135 e os mapas de contorno HMQC e HBQC confirmaram as atribuições do espectro de  $^{13}\text{C}$ .



**Figura 3.5** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (500 MHz) de 8-HQH em  $\text{DMSO-}d_6$  com ampliação nas regiões de 19,5 a 22,5 e 112 a 172 ppm.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 8-HQS o sinal do hidrogênio O1H é um simpleto observado em  $\delta$  9,72 e o sinal do hidrogênio N3H é um simpleto observado em  $\delta$  10,73. Os hidrogênios ligados a N4 apresentam-se como um simpleto largo em  $\delta$  6,74. Os sinais dos hidrogênios H3 e H4 são dois dupletos nas faixas  $\delta$  8,33 –  $\delta$  8,31 e  $\delta$  8,26 –  $\delta$  8,24, respectivamente. Os sinais dos hidrogênios H5 e H6 encontram-se sobrepostos na faixa  $\delta$  7,42 –  $\delta$  7,35. O sinal de H9 apresenta-se como um simpleto em  $\delta$  8,08. Finalmente, o hidrogênio H7 apresenta-se como um duplete duplo na faixa de  $\delta$  7,09 –  $\delta$  7,07. Os valores das integrações e o número de sinais estão de acordo com o número de hidrogênios da molécula.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 8-HQS, os deslocamentos químicos atribuídos à carbonila C10 e a C8 são  $\delta$  156,52 e  $\delta$  153,22, respectivamente. O deslocamento atribuído a C9 é observado em  $\delta$  139,79. Os carbonos C2 e C8a, ligados ao N da quinolina, possuem, respectivamente, os deslocamentos  $\delta$  152,23 e  $\delta$  137,92. Os carbonos aromáticos C3, C4, C4a, C5, C6 e C7 estão localizados na faixa de  $\delta$  136,04 a  $\delta$  111,90. O espectro de RMN de DEPT 135 e os mapas de contorno HMQC e HBQC confirmaram as atribuições do espectro de  $^{13}\text{C}$ .

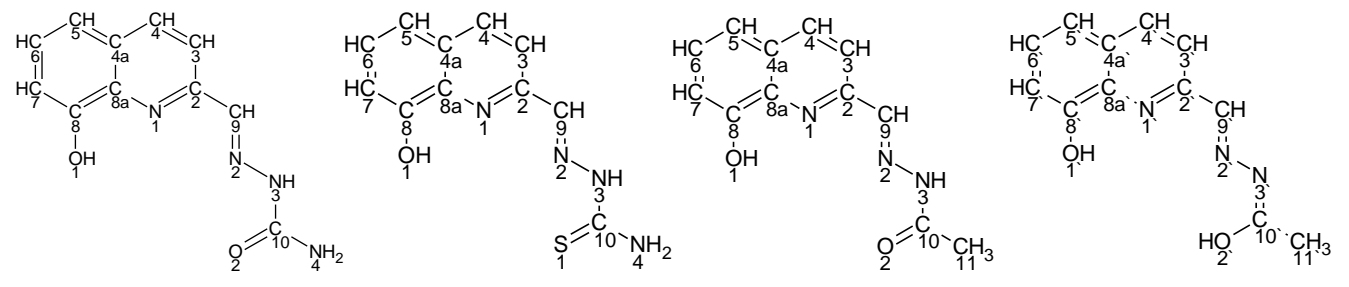
Para 8-HQT, no espectro de  $^1\text{H}$ , os sinais dos hidrogênios O1H e N3H são dois simples observados em  $\delta$  9,84 e  $\delta$  11,85, respectivamente. Os hidrogênios ligados a N4 apresentam dois deslocamentos diferentes, e cada hidrogênio está sobreposto com os hidrogênios H3 e H4 e os sinais observados são dois dupletos nas faixas  $\delta$  8,44 –  $\delta$  8,42 e  $\delta$  8,28 –  $\delta$  8,26, respectivamente. Os sinais dos hidrogênios H5 e H6 encontram-se sobrepostos na faixa  $\delta$  7,45 –  $\delta$  7,37. O sinal de H9 apresenta-se como um simples em  $\delta$  8,32 e o hidrogênio H7 apresenta-se como um duplete duplo na faixa de  $\delta$  7,10 –  $\delta$  7,09. Os valores das integrações e o número de sinais estão de acordo com o número de hidrogênios da molécula.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 8-HQT, os deslocamentos químicos atribuídos à C10 e a C8 são observados em  $\delta$  178,40 e  $\delta$  153,36, respectivamente. O deslocamento atribuído a C9 é observado em  $\delta$  142,37. Os carbonos C2 e C8a, ligados ao N da quinolina, possuem, respectivamente, os deslocamentos  $\delta$  151,79 e  $\delta$  138,09. Os carbonos aromáticos C3, C4, C4a, C5, C6 e C7 estão localizados na faixa de  $\delta$  136,11 a  $\delta$  112,07. O espectro de RMN de DEPT 135 e os mapas de contorno HMQC e HBQC confirmaram as atribuições do espectro de  $^{13}\text{C}$ .

As Tabelas 3.3 e 3.4 relacionam os deslocamentos químicos citados anteriormente para os derivados de 8-HQ.



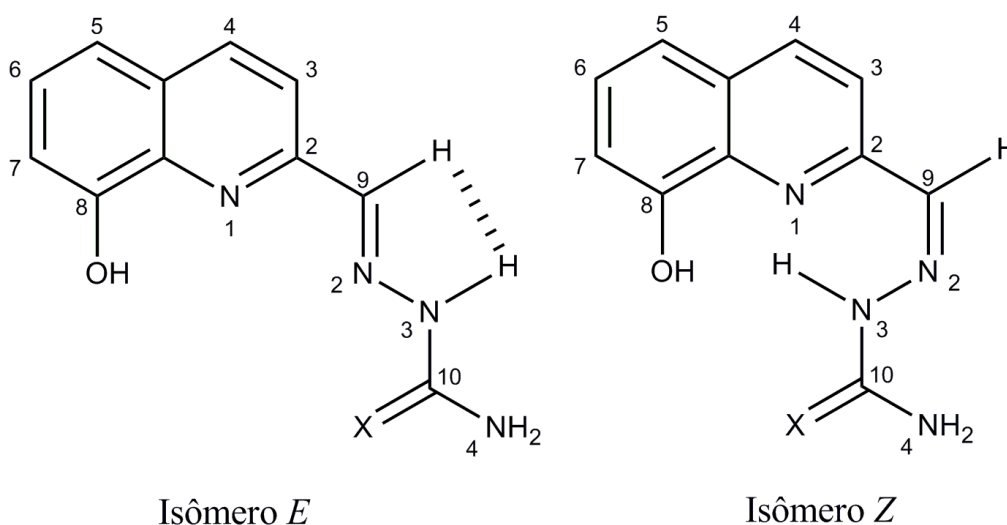
**Tabela 3.4.** Atribuições, carbono (C) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  em DMSO- $d_6$  dos derivados de 8-HQ.



The image shows four chemical structures of 8-HQ derivatives with carbon atoms labeled C1 through C11. 8-HQS is the starting material. 8-HQT is a thioamide derivative. 8-HQH (ceto) is a thioamide with a methyl group. 8-HQH (enol) is the enol form of 8-HQH (ceto).

Atribuição	Compostos							
	8-HQS	8-HQT		8-HQH (ceto)		8-HQH (enol)		
	$\delta$ (ppm)	C	$\delta$ (ppm)	C	Ceto	C	Enol	C
C2	152,23	C	151,83	C	151,33	C	151,75	C
C3	118,08	CH	118,43	CH	117,29	CH	117,58	CH
C4	136,04	CH	136,13	CH	136,50	CH	136,50	CH
C4a	128,48	C	128,78	C	128,70	C	128,75	C
C5	117,71	CH	128,07	CH	117,78	CH	117,78	CH
C6	127,69	CH	117,75	CH	128,12	CH	128,22	CH
C7	111,90	CH	112,09	CH	112,10	CH	112,18	CH
C8	153,22	C	153,41	C	153,38	C	153,38	C
C8a	137,92	C	138,24	C	138,06	C	138,06	C
C9	139,79	CH	142,37	CH	143,07	CH	145,84	CH
C10	156,52	C	178,45	C	172,38	C	166,03	C
C11	-	-	-	-	20,25	CH	21,79	CH

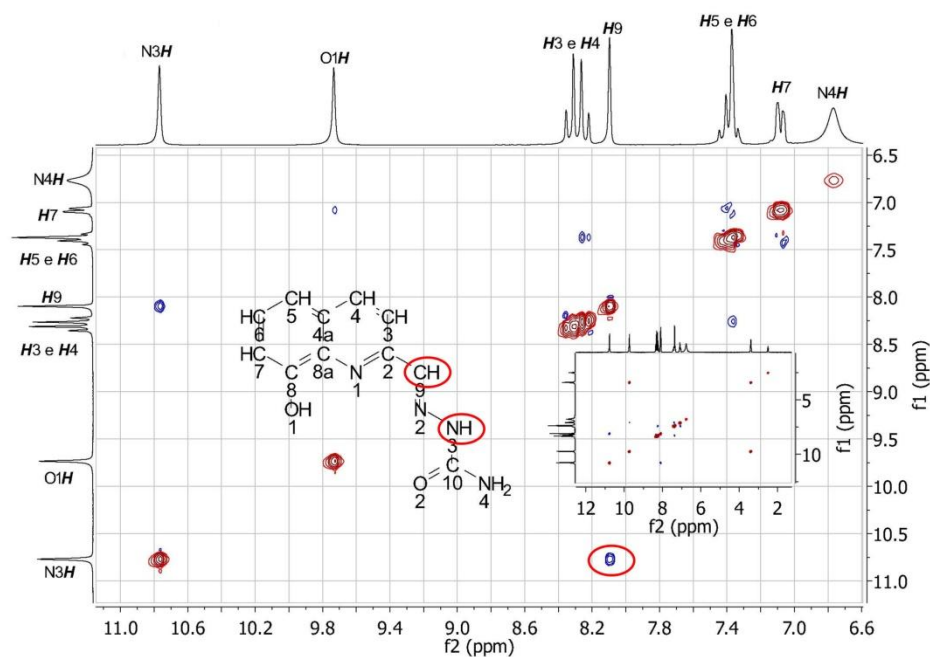
Derivados de 8-hidroxi-2-quinolina provenientes de reação de condensação com tiossemicarbazida podem apresentar também isômeros *E* e *Z*<sup>14</sup>, como exemplificado na Figura 3.6. Derivados de semicarbazidas e acetil hidrazidas podem se comportar da mesma maneira. Os espectros e mapas de contorno discutidos anteriormente evidenciaram a presença de apenas um dos isômeros para a 8-HQS e para a 8-HQT, uma vez que não foram observados sinais duplicados. Com o objetivo de definir os isômeros presentes em solução, foram obtidos os mapas de contorno NOESY para 8-HQS e 8-HQT. Como o composto 8-HQH apresenta mistura, a atribuição dos mapas de contorno é mais difícil.



**Figura 3.6** – Isômeros *E* e *Z* para a semicarbazona ( $R = NH_2$ ;  $X = O$ ) e tiossemicarbazona ( $R = NH_2$ ;  $X = S$ ) derivadas de 8-hidroxiquinolina-2-aldeído.

As correlações entre os hidrogênios aromáticos ( $H7$  com  $H6$ ,  $H5$  com  $H4$  e  $H4$  com  $H3$ ) e entre os hidrogênios  $O1H$  e  $H7$  foram observadas para 8-HQS (Figura 3.7).

Uma correlação entre os hidrogênios  $H9$  e  $N3H$  só é possível para o isômero *E*, sendo essa a correlação mais importante para a determinação da configuração da molécula. De forma semelhante à apresentada para 8-HQS, essa correlação foi observada para os três derivados de 8-HQ. As mesmas correlações foram observadas para 8-HQT.



**Figura 3.7** – Mapa de contorno NOESY (200 MHz) de 8-HQS em DMSO- $d_6$ , evidenciando as correlações existentes e o isômero *E* relacionado.

Portanto, evidenciou-se a presença apenas do isômero *E* em solução para a 8-HQS e 8-HQT.

### 3.1.4. Espectroscopia no Infravermelho

As principais bandas nos espectros no infravermelho dos derivados de 8-hidroxiquinolina-2-aldeído encontram-se na Tabela 3.5.

A vibração correspondente ao estiramento da hidroxila encontra-se em  $2928\text{ cm}^{-1}$  para 8-HQH e em  $3152\text{ cm}^{-1}$  para 8-HQS. A deformação de OH é observada em  $1386\text{ cm}^{-1}$  para 8-HQH e em  $1330\text{ cm}^{-1}$  para 8-HQS. As bandas em  $1678\text{ cm}^{-1}$  e em  $1720\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas ao estiramento do grupo C=O para 8-HQH e 8-HQS, respectivamente. As vibrações atribuídas ao estiramento do grupo C=N da imina e da quinolina são, respectivamente, observadas em  $1594$  e  $1632\text{ cm}^{-1}$  para 8-HQH e  $1572$  e  $1578\text{ cm}^{-1}$  para 8-HQS. As bandas referentes às deformações de CH e do anel da quinolina encontram-se, respectivamente, em  $840$  e  $720\text{ cm}^{-1}$  para 8-HQH e  $834$  e  $722\text{ cm}^{-1}$  para 8-HQS<sup>83</sup>.

Para 8-HQT as bandas  $3152\text{ cm}^{-1}$  e  $1326\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento da hidroxila e sua deformação, respectivamente. A banda em  $834\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao estiramento do grupo C=S. As vibrações atribuídas ao estiramento do grupo C=N da imina e da quinolina são, respectivamente, observadas em  $1538$  e  $1606\text{ cm}^{-1}$ . As bandas referentes às deformações de CH e do anel da quinolina encontram-se, respectivamente, em  $842$  e  $720\text{ cm}^{-1}$ <sup>76</sup>.

<sup>83</sup> C. C. Wagner, S. Calvo, M. H. Torre, E. J. Baran, *Journal of Raman Spectroscopy*, 38 (2007) 373-376.

**Tabela 3.5.** Bandas nos espectros no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) de 8-HQH, 8-HQS e 8-HQT. – suporte: KBr ( $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ).

Composto	8-HQH	8-HQS	8-HQT
$\nu(\text{NH})$	3404 m	3460 m	3386 F
$\nu(\text{OH})$	2928 m, l	3152 m, l	3152 m, l
$\nu(\text{CO})$	1678 F	1720 F	-
$\nu(\text{CS})$	-	-	834 m
$\nu(\text{CN})$ da imina	1594 F	1572 F	1538 F
$\nu(\text{CN})$ da quinolina	1632 m	1578 F	1606 F
$\delta(\text{OH})$	1386 F	1330 m	1326 m
$\delta(\text{CH})$ da quinolina	840 f	834 f	842 m
$\rho(\text{anel quinolina})$	720 f	722 f	720 f

F = forte; m = média; f = fraca; l = largo

### 3.1.5. Espectrometria de massas por electrospray

Espectros de massas por electrospray no modo positivo foram obtidos para 8-HQH, 8-HQS e 8-HQT. Os compostos foram primeiramente solubilizados em DMSO e em seguida em acetonitrila. Os picos atribuídos aos fragmentos  $[\text{8-HQH} + \text{H}^+]$ ,  $[\text{8-HQS} + \text{H}^+]$  e  $[\text{8-HQT} + \text{H}^+]$  aparecem com relação massa/carga  $m/z = 230,09$ ;  $m/z = 231,09$  e  $m/z = 247,06$ ; respectivamente. Estes resultados confirmam aqueles obtidos por espectroscopia de RMN e no infravermelho e, conseqüentemente, a obtenção dos compostos.

### 3.1.6. Cristalografia de Raios X

Cristais de 8-HQH foram obtidos da água mãe da reação de condensação de 8-hidroxiquinolina-2-aldeído com acetil hidrazida. A estrutura do cristal foi determinada usando Difração de Raios X de monocristal. As figuras do empacotamento e o mapa molecular foram preparados usando MERCURY<sup>84</sup> e ORTEP<sup>85</sup>, respectivamente. As Tabelas foram geradas usando WINGX suite<sup>86</sup>. Um resumo dos dados do cristal, detalhes da coleta de dados e refinamento dos resultados estão listados na Tabela 3.6.

<sup>84</sup> C.F. Macrae, I.J. Bruno, J.A. Chisholm, P.R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, J. van de Streek, P.A. Wood, *Journal of Applied Crystallography*, 41, (2008) 466.

<sup>85</sup> L.J. Farrugia, *Journal of Applied Crystallography*, 30, (1997) 565.

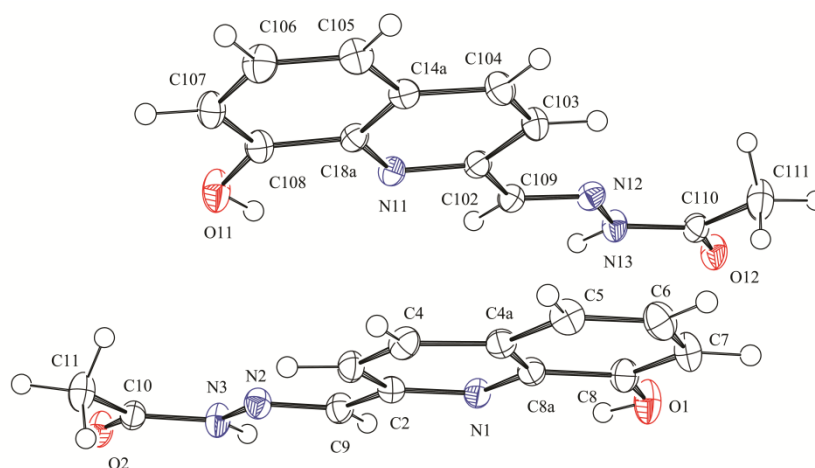
<sup>86</sup> L.J. Farrugia, *Journal of Applied Crystallography*, 32, (1999) 837.

O diagrama ORTEP de 8-HQH está representado na Figura 3.8. As distâncias e os ângulos de ligação intramolecular selecionados e parâmetros de ligação de hidrogênio na estrutura de 8-HQH estão representados nas Tabelas 3.7 e 3.8, respectivamente. A Figura 3.9 mostra o empacotamento do cristal em perspectiva.

**Tabela 3.6.** Dados cristalográficos e de refinamento para 8-HQH.

Composto		8-HQH
Fórmula Empírica		C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
Massa molecular		229,24
Temperatura, K		150(2)
Comprimento de onda, Å		0,71073
Sistema cristalino		Triclínico
Grupo Espacial		P $\bar{1}$
Dimensões da célula unitária	a, Å	8,6542(2)
	b, Å	10,2904(4)
	c, Å	12,6933(4)
	$\alpha$ , °	72,860(3)
Volume, Å <sup>3</sup>	$\beta$ , °	83,873(2)
	$\gamma$ , °	87,479(2)
		1073,94(6)
Z / Densidade calc., Mg/m <sup>3</sup>		4 / 1,418
Coeficiente de Absorção, mm <sup>-1</sup>		0,100
F(000)		480
Dimensões do cristal, mm		0,44 x 0,35 x 0,09
Faixa de $\theta$ para dados coletados, °		2.26 á 26.37°
Faixa de HKL		-10 $\leq$ h $\leq$ 10
		-12 $\leq$ k $\leq$ 12
		-15 $\leq$ l $\leq$ 15
Reflexões coletadas / únicas [R <sub>int</sub> ]		23878/ 4389 [R(int) = 0,0268]
Max. e min. de transmissão		0,9911 e 0,9573
Dado / restrições / parâmetros		4390 / 0 / 311
Qualidade do ajuste (S)		1,035
Índices R (todos)		R1 = 0,0363, wR2 = 0,1004
Índices R Final [I > 2 $\sigma$ (I)]		R1 = 0,0421, wR2 = 0,1059
Picos de densidade residual de carga, e Å <sup>-3</sup>		0,241 e -0,222

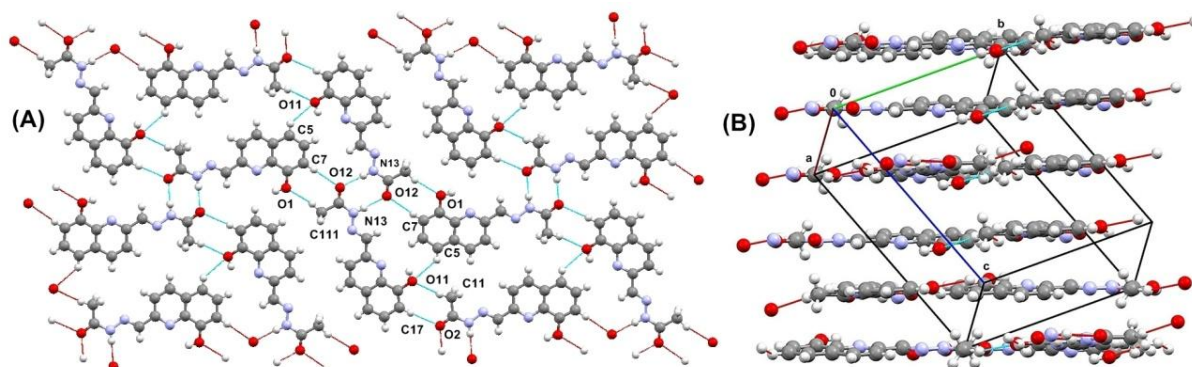
A 8-HQH se cristaliza em um sistema triclínico, com grupo espacial P $\bar{1}$ , com duas moléculas independentes (**A** e **B**) em uma unidade assimétrica (Figura 3.8). Na molécula **A** o átomo de oxigênio está numerado como N1 e na molécula **B** N11.



**Figura 3.8** – Diagrama ORTEP para 8-HQH com elipsóides térmicos com probabilidade de 50% e com átomos enumerados, exceto os de hidrogênio. Átomos de hidrogênio são desenhados como círculos de raios arbitrários.

Em **A** e **B** as ligações C9=N2, C109=N12, C10=O2 e C110=O12 são formalmente ligações duplas, como indicado pelos parâmetros geométricos (Tabela 3.7). O esqueleto C=N-N-C(=O)C é praticamente planar [desvio *rms* do plano de mínimos quadrados de 0,0066 Å e 0,0146 Å para **A** e **B**, respectivamente]. **A** e **B** adotam uma conformação *EE* em relação às ligações C9-N2 e N3-C10. Os ângulos de torção de C2-C9=N2-N3, C102-C109=N12-N13, N2-N3-C10-O2 e N12-N13-C110-O12 são 179,4(1), 179,0(1), 179,1(1) e 178,8(1)°, respectivamente.

No empacotamento de 8-HQH várias ligações de hidrogênio do tipo NH...O formando dímeros centrossimétricos foram observadas. As ligações de hidrogênio NH...O e CH...O (Tabela 3.8) envolvendo **A** e **B** levam a formação de uma infinita rede bidimensional (2D) (Figura 3.9). Além disso, interações  $\pi\cdots\pi$  de empacotamento entre camadas paralelas dessas redes com distância entre camadas internas de *c.a.* 3.4 Å foram observadas (Figura 3.9).



**Figura 3.9** – Vistas em perspectiva para empacotamento de cristal da 8-HQH. Em (A) as ligações de hidrogênio NH...O e CH...O em rede 2D estão presentes. Em (B) a projeção destacando a separação de camadas internas.

**Tabela 3.7.** Valores de distância de ligação (Å) e ângulos selecionados (°) da estrutura cristalina de 8-HQH.

Ligação (Å)			
N1–C2	1,328(2)	N11–C102	1,326(2)
C2–C9	1,464(2)	C102–C109	1,463(2)
C9–N2	1,280(2)	C109–N12	1,280(2)
N2–N3	1,363(2)	N12–N13	1,363(2)
N3–C10	1,358(2)	N13–C110	1,359(2)
C10–O2	1,230(2)	C110–O12	1,232(2)
C10–C11	1,502(2)	C110–C111	1,497(2)
C8–O1	1,358(2)	C108–O11	1,364(2)
Ângulos (°)			
O1–C8–C8A	118,0(1)	O11–C108–C18A	118,7(1)
C8–C8A–N1	116,5(1)	C108–C108A–N11	116,8(1)
N1–C2–C9	115,7(1)	N11–C12–C109	116,0(1)
C2–C9–N2	119,8(1)	C102–C109–N12	119,3(1)
C9–N2–N3	116,5(1)	C109–N12–N13	116,4(1)
N2–N3–C10	120,3(1)	N12–N13–C110	119,9(1)
N3–C10–O2	119,8(1)	N13–C110–O12	119,5(1)
N3–C10–C11	122,9(1)	N13–C110–C111	117,4(1)

**Tabela 3.8.** Parâmetros para as interações intramoleculares e intermoleculares selecionadas [Å e °] observadas em 8-HQH.

D–H...A	d(D–H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O1–H1...N1	0.84	2.18	2.667(1)	117
N3–H3A...O2 <sup>i</sup>	0.88	1.97	2.852(2)	175
O11–H11...N11	0.84	2.22	2.691(1)	116
N13–H13...O12 <sup>ii</sup>	0.88	2.00	2.878(1)	172
C5–H5...O11 <sup>iii</sup>	0.95	2.59	3.253(2)	127
C7–H7...O12 <sup>iv</sup>	0.95	2.55	3.490(2)	173
C111–H21A...O1 <sup>iv</sup>	0.98	2.45	3.401(2)	163
C11–H11A...O11 <sup>v</sup>	0.98	2.51	3.467(2)	166
C107–H107...O2 <sup>v</sup>	0.95	2.59	3.517(2)	166

Transformações de simetria utilizadas para gerar átomos equivalentes: i = -x-1,-y,-z+1; ii = -x,-y,-z+1; iii = x+1,y,z; iv = -x+1,-y,-z; v = -x-1,-y,-z.

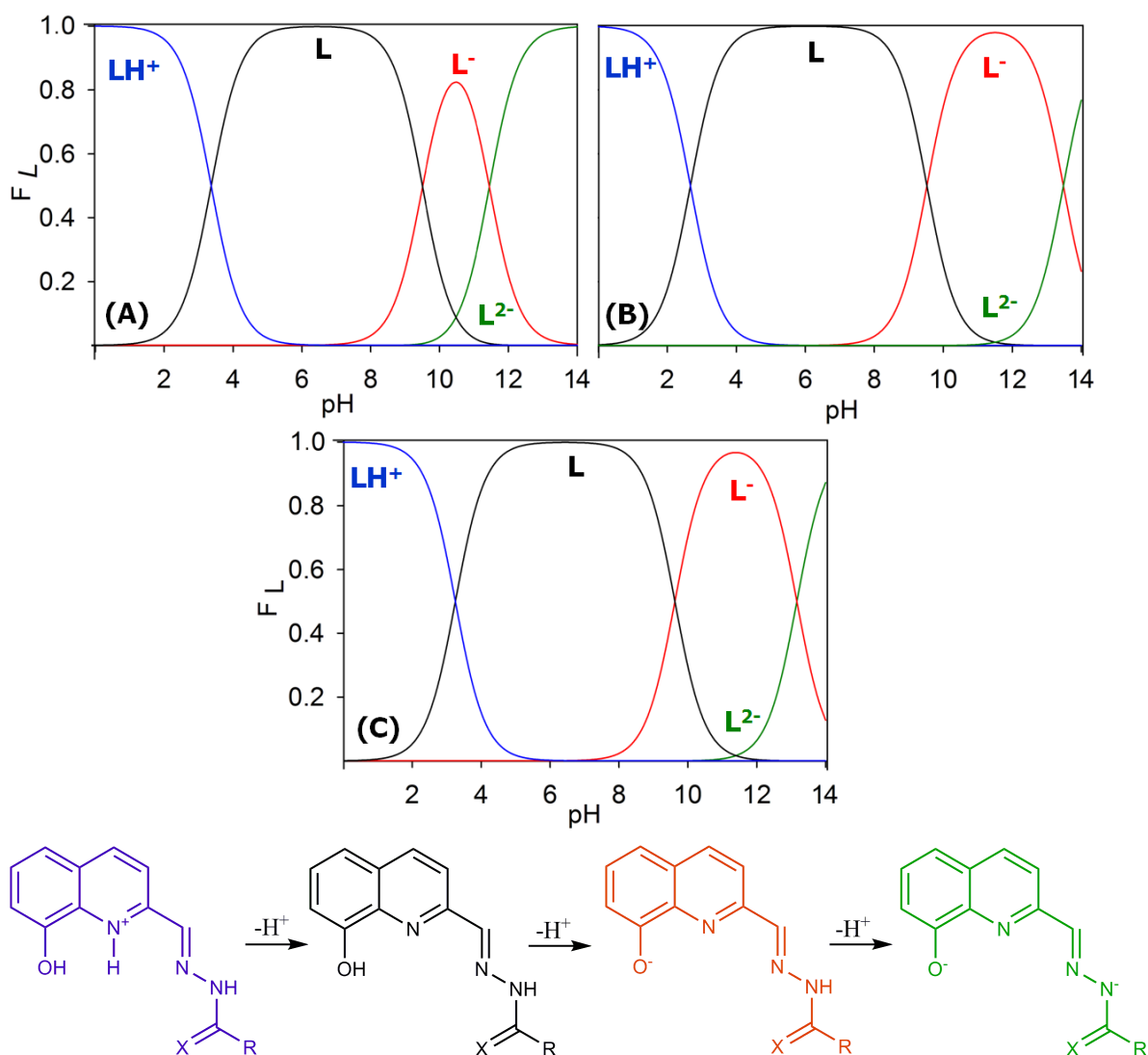
### 3.1.7. Determinação das constantes de acidez (pKa) por espectroscopia UV-vis

Foram realizados estudos de especiação e a determinação das constantes de acidez (pKa) para os compostos 8-HQH, 8-HQS e 8-HQT a 5% DMSO em NaCl 0,1 M. A faixa de pH em que os experimentos foram realizados foi de 2 a 12. Os diagramas de especiação para os compostos avaliados estão representados na Figura 3.10.

Na faixa de pH avaliada, existem quatro espécies possíveis para os compostos (LH<sup>+</sup>, L, L<sup>-</sup>, L<sup>2-</sup>, sendo L a espécie neutra). Os valores de pKa para os compostos estão apresentados na Tabela 3.9. Os compostos encontram-se em sua maior parte protonados na piridina (LH<sup>+</sup>) para

valores de pH próximos a 2. Em pH fisiológico (pH 7,4), a maior parte dos compostos está em sua forma neutra (L). Compostos neutros são capazes de ultrapassar membranas biológicas, o que é essencial para os processos de absorção *in vivo*. Esse é um requisito importante para protótipos de fármacos destinados ao tratamento da Doença de Alzheimer, uma vez que eles precisam atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) para atingir o local de ação.

Em valores de pH próximos a 12, a espécie desprotonada no oxigênio da 8-hidroxiquinolina (L<sup>-</sup>) está em maior proporção, sendo que os valores de pKa para 8-HQH e 8-HQS são semelhantes e maiores que o valor de pKa para a 8-HQT. Finalmente, em pH maior que 12 observa-se a formação do composto desprotonado também no nitrogênio N2 das bases de Schiff (L<sup>2-</sup>).



**Figura 3.10** – Diagramas de especiação da 8-HQT (A; X = S; R = NH<sub>2</sub>), 8-HQH (B; X = O; R = CH<sub>3</sub>) e 8-HQS (C; X = O; R = NH<sub>2</sub>).  $F_L$  = fração das espécies; L = espécie neutra. Os diagramas foram simulados usando o programa HySS2009 (Protonic Software, UK).

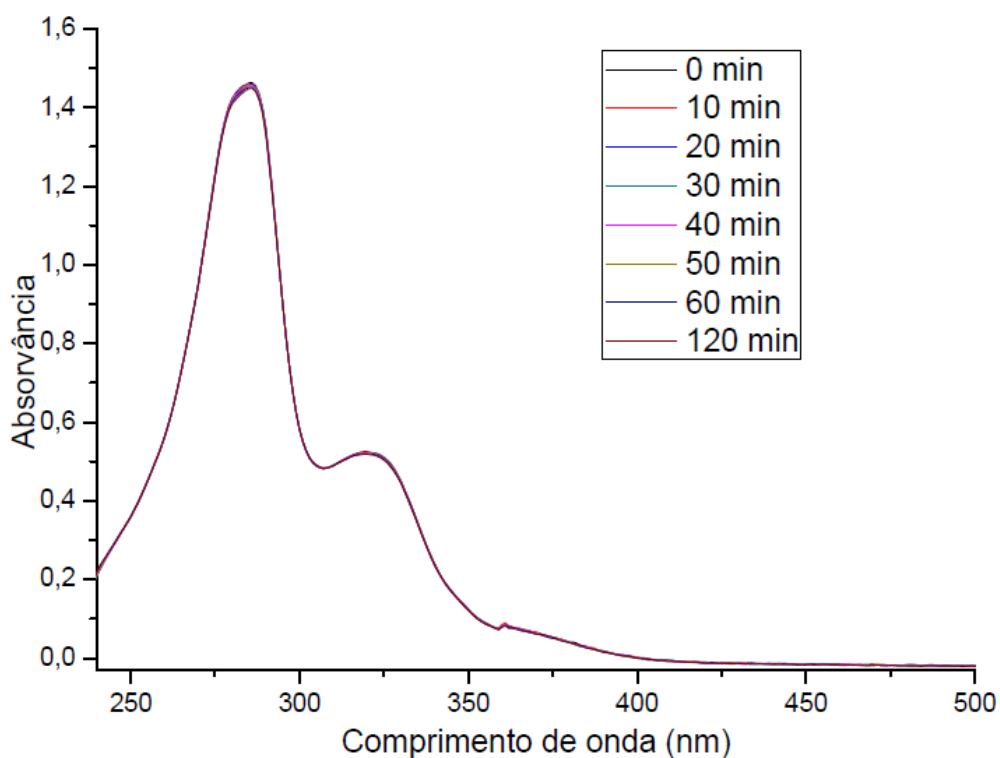
**Tabela 3.9.** Valores de pKa para os compostos 8-HQT, 8-HQH e 8-HQS. Os dados foram analisados usando o programa HypSpec (Protonic Software, UK).

Composto	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>	pKa <sub>3</sub>
8-HQT	3,36 (1)	9,51 (1)	11,75 (1)
8-HQH	2,87 (3)	9,53 (3)	13,50 (1)
8-HQS	3,25 (2)	9,63 (1)	13,16 (1)

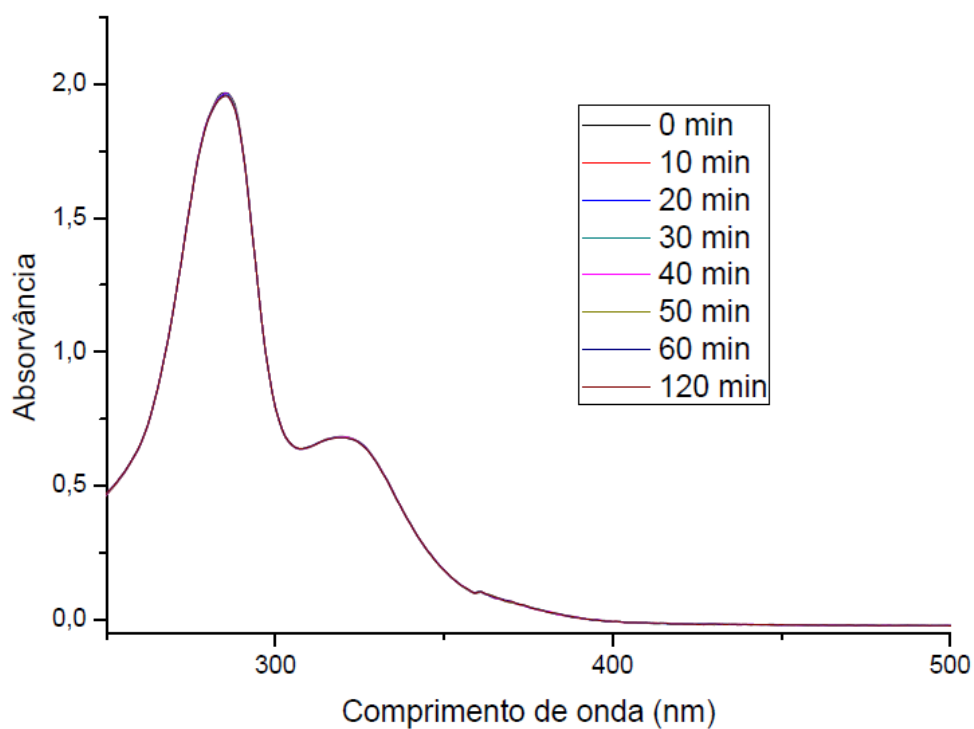
### 3.1.8. Estudo preliminar de estabilidade

Com o intuito de avaliar a estabilidade dos compostos 8-HQH, 8-HQS e 8-HQT com relação à hidrólise em meio fisiológico, um estudo preliminar por espectroscopia no ultravioleta em tampão PBS 5% de DMSO (pH 7,4) na concentração de 40 µM e em temperatura ambiente foi realizado.

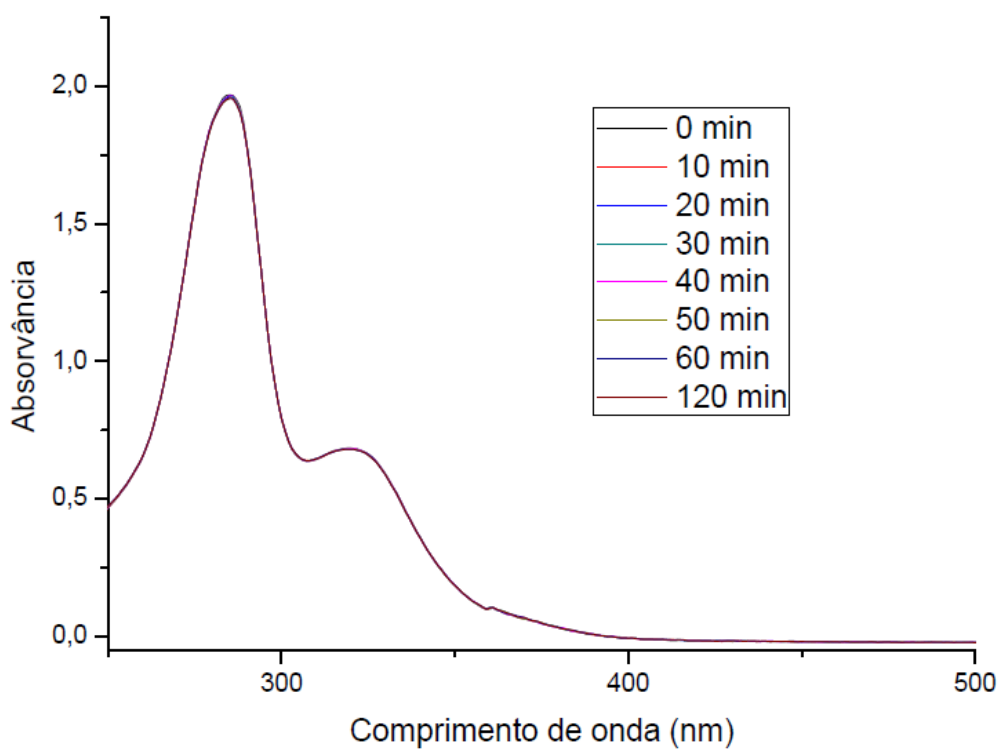
Os espectros eletrônicos de 8-HQH, 8-HQS e 8-HQT (Figuras 3.11 a 3.13) ao longo do tempo de 2 horas se sobrepõem, sugerindo que nas condições do experimento não houve hidrólise para esses compostos.



**Figura 3.11** – Espectros eletrônicos com o tempo do composto 8-HQH (40 µM em tampão PBS (pH 7,4)/5% de DMSO) à temperatura ambiente.



**Figura 3.12** – Espectros eletrônicos com o tempo do composto 8-HQS (40  $\mu$ M em tampão PBS (pH 7,4)/5% de DMSO) à temperatura ambiente.



**Figura 3.13** – Espectros eletrônicos com o tempo do composto 8-HQT (40  $\mu$ M em tampão PBS (pH 7,4)/5% de DMSO) à temperatura ambiente.

### 3.2. Caracterização dos complexos de Cu(II) e Zn(II) dos derivados de 8-hidroxiquinolina-2-aldeído

Os complexos de Cu(II) e Zn(II) dos compostos 8-HQH, 8-HQS e 8-HQT foram obtidos conforme descrito no item 2.2.3. A literatura descreve a formação de um complexo de 8-HQT com Cu(II), obtido por Zhang et. al, 2008<sup>76</sup>.

Os compostos obtidos nas sínteses com os derivados de 8-HQ foram caracterizados por análise elementar, medidas de condutividade, suscetibilidade magnética (para os complexos de Cu(II)), espectrometria de massas, por seus espectros no infravermelho e ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H para os complexos de Zn(II) e RPE para os complexos de Cu(II). Os complexos de Zn(II) também foram caracterizados por análise térmica (termogravimetria).

Os complexos de Cu(II) e Zn(II) dos derivados de 8-HQ apresentaram faixa de fusão superior a 300° C. Não se observou fusão nas faixas dos produtos de partida sugerindo a formação dos complexos.

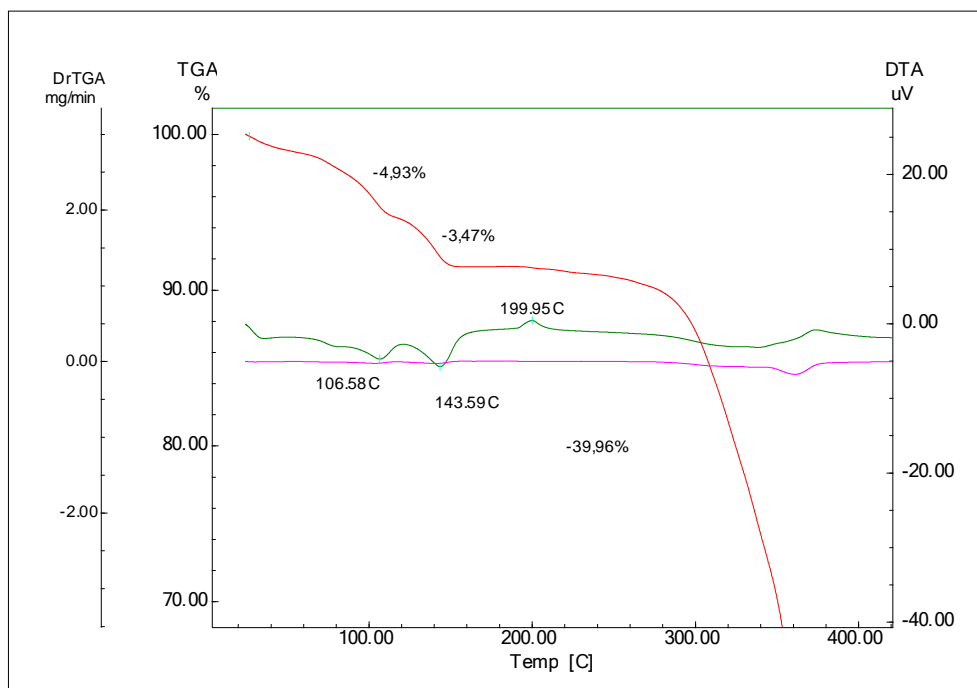
**Tabela 3.10.** Análise elementar (valores teóricos entre parêntesis), cor, condutividade molar ( $\Lambda_M$ ) e momento magnético dos complexos de Cu(II) e Zn(II) de 8-HQH, 8-HQS e 8-HQT.

Composto	Rendimento (%)	Cor	C (%)	H (%)	N (%)	$\Lambda_M^a$	$\mu_{\text{eff}}$ (MB)
[Cu(8-QH) <sub>2</sub> ] (1)	90	Vermelho	54,89 (55,43)	4,01 (3,88)	15,86 (16,16)	0,31	1,66
[Cu(8-QS) <sub>2</sub> ] (2)	99	Amarelo	50,04 (50,62)	3,64 (3,48)	20,93 (21,47)	1,84	1,89
[Cu(8-QTD)] (3)	95	Preto	42,15 (42,92)	2,68 (2,62)	17,61 (18,20)	1,22	1,65
[Zn(8-QH) <sub>2</sub> ] ·5/2H <sub>2</sub> O (4)	81	Amarelo	50,96 (50,67)	4,53 (4,78)	14,81 (14,77)	0,29	-
[Zn <sub>2</sub> (8-QS) <sub>3</sub> ] ·1/2H <sub>2</sub> O (5)	71	Amarelo	47,95 (47,90)	3,23 (3,41)	20,04 (20,31)	2,70	-
[Zn(8-QT)(AcO <sup>-</sup> )] ·1/2H <sub>2</sub> O (6)	89	Laranja	41,01 (41,23)	3,16 (3,46)	15,04 (14,79)	5,12	-

<sup>a</sup> $\Lambda_M$ : ( $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ ) DMF para os complexos de Cu(II) e DMSO para os complexos de Zn(II)  $\sim 1,0 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>.

Os resultados sugerem a formação dos complexos [Cu(8-QH)<sub>2</sub>] (1), [Cu(8-QS)<sub>2</sub>] (2) e [Cu(8-QTD)] (3). Em (1) e (2) o ligante está desprotonado no hidrogênio de O1 da 8-hidroxiquinolina (8-QH, 8-QS) e em (3) o ligante está duplamente desprotonado (8-QTD). As mesmas relações M:L também foram determinadas no estudo de interação metal:ligante em solução, discutido posteriormente. Formaram-se também os complexos [Zn(8-QH)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>·5/2H<sub>2</sub>O

(4),  $[\text{Zn}_2(8\text{-QS})_3] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  (5) e  $[\text{Zn}(8\text{-QT})(\text{AcO}^-)] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  (6). O complexo (5) é binuclear e contém três ligantes dianiônicos para dois cátions metálicos. Complexos de zinco já foram estudados por outros membros do nosso grupo e por outros grupos, nos quais o oxigênio fenólico faz ponte com dois átomos de zinco<sup>87,88</sup>, como sugerido para o complexo (5). Para o complexo (6), os resultados sugerem a formação de um composto neutro na proporção 1:1 metal ligante e as análises são compatíveis com a presença de uma molécula de acetato.



**Figura 3.14** – Curva termogravimétrica para o complexo  $[\text{Zn}(8\text{-QH})_2] \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$  (4).

A análise térmica (curva TG) do complexo (4) evidenciou duas perdas de massa de 4,93% e 3,47%, em 106,58 °C e 143,59 °C respectivamente (Figura 3.14). Isso corresponde a 8,40% e confirma a presença de 2,5 moléculas de água no complexo (valor teórico: 7,92%).

### 3.2.1. Espectrometria de massas por electrospray

Espectros de massa por electrospray no modo positivo foram obtidos para os complexos  $[\text{Cu}(8\text{-QH})_2]$ ;  $[\text{Cu}(8\text{-QS})_2]$  e  $[\text{Cu}(8\text{-QTD})]$ . Os complexos foram solubilizados primeiramente em DMSO e em seguida em acetonitrila. Foram detectados picos com relação massa/carga em  $m/z = 521,10$ ;  $m/z = 522,84$  e  $m/z = 308,98$ , atribuídos a  $([\text{Cu}(8\text{-QH})_2] + \text{H}^+)$ ;  $([\text{Cu}(8\text{-QS})_2] + \text{H}^+)$  e  $([\text{Cu}(8\text{-QTD})] + \text{H}^+)$ , respectivamente. A espécie  $[\text{L} + \text{Cu}]^+$  foi observada em  $m/z = 292,02$  e  $m/z = 293,01$  para  $[\text{Cu}(8\text{-QH})_2]$  e  $[\text{Cu}(8\text{-QS})_2]$ , respectivamente. Para o complexo  $[\text{Cu}(8\text{-QTD})]$ , o pico mais abundante aparece com relação massa/carga  $m/z = 307,98$ ,

<sup>87</sup> G. L. Parrilha, R. P. Vieira, A. P. Rebolledo, I. C. Mendes, L. M. Lima, E. J. Barreiro, O. E. Piro, E. E. Castellano, H. Beraldo, *Polyhedron*, 30 (2011) 1891–1898.

<sup>88</sup> I. García-Santos, J. Sanmartín, A. M. García-Deibe, M. Fondo, E. Gómez, *Polyhedron*, 28 (2009) 3055–3059.

atribuído ao fragmento correspondente a  $[\text{Cu}(8\text{-QTD})]^+$ . As atribuições e relações massa/carga estão descritas na Tabela 3.11. Nos espectros de massas de  $[\text{Zn}(8\text{-QH})_2] \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$  (**4**),  $[\text{Zn}_2(8\text{-QS})_3] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  (**5**) e  $[\text{Zn}(8\text{-QT})(\text{AcO}^-)] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  (**6**) não foram encontrados picos relativos aos complexos. Para (**4**) e (**5**), picos referentes ao ligante +  $\text{Na}^+$  foram observados em  $m/z = 252,34$  e  $m/z = 253,63$ . Os complexos podem não ser estáveis o suficiente para serem detectados pelo equipamento.

**Tabela 3.11.** Relação massa/carga  $m/z$  das espécies encontradas nos espectros de massas e a massa molar dos complexos de Cu(II) de 8-HQH, 8-HQS e 8-HQT.

Composto	Massa/carga			MM ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
	$\text{C}^+$	$\text{C} + \text{H}^+$	$(\text{L} + \text{M})^+$	
$[\text{Cu}(8\text{-QH})_2]$ ( <b>1</b> )	-	521,10	292,02	520,00
$[\text{Cu}(8\text{-QS})_2]$ ( <b>2</b> )	-	522,84	293,01	521,98
$[\text{Cu}(8\text{-QTD})]$ ( <b>3</b> )	307,98	308,98	-	307,82

### 3.2.2. Espectroscopia no Infravermelho

A Tabela 3.12 apresenta as atribuições das principais bandas nos espectros de infravermelho dos derivados de 8-hidroxiquinolina-2-aldeído e de seus complexos de Cu(II). Verificaram-se mudanças significativas nos espectro no infravermelho, sugerindo a complexação.

No complexo de  $[\text{Cu}(8\text{-QH})_2]$  (**1**) a banda referente ao modo  $\nu(\text{C}=\text{O})$  presente em  $1678 \text{ cm}^{-1}$  apresentou deslocamento de apenas  $4 \text{ cm}^{-1}$  ( $1674 \text{ cm}^{-1}$ ) sugerindo que esse oxigênio não se liga ao metal. A complexação ao Cu(II) provocou o deslocamento do modo  $\nu(\text{C}=\text{N})$  da imina ( $\text{N}_{\text{im}}$ ) de  $1594$  para  $1586 \text{ cm}^{-1}$ , sugerindo que o nitrogênio imínico não estaria envolvido na coordenação ao metal. O modo  $\nu(\text{C}=\text{N})$  da quinolina ( $\text{N}_{\text{qui}}$ ) passou de  $1632 \text{ cm}^{-1}$  no ligante livre para  $1696 \text{ cm}^{-1}$  no complexo, indicando que a coordenação ocorre através do nitrogênio heteraromático<sup>89</sup>. A vibração associada à deformação do anel da quinolina também se deslocou de  $720 \text{ cm}^{-1}$  para  $746 \text{ cm}^{-1}$ . Novas absorções em  $540$  e  $345 \text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas as vibrações  $\nu(\text{CuO})$  e  $\nu(\text{CuN})$ , respectivamente<sup>89</sup>. Dessa forma, os espectros no infravermelho sugeriram que o ligante se coordenou ao Cu(II) de modo bidentado, pelo sistema  $\text{O}-\text{N}_{\text{qui}}$ .

Para o complexo  $[\text{Zn}(8\text{-QH})_2]$  (**4**) a banda em  $1678 \text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao modo  $\nu(\text{C}=\text{O})$ ,

<sup>89</sup> S. Yurdakul, K. Arýcý. J. Mol. Struct. 691 (2004) 45-49.

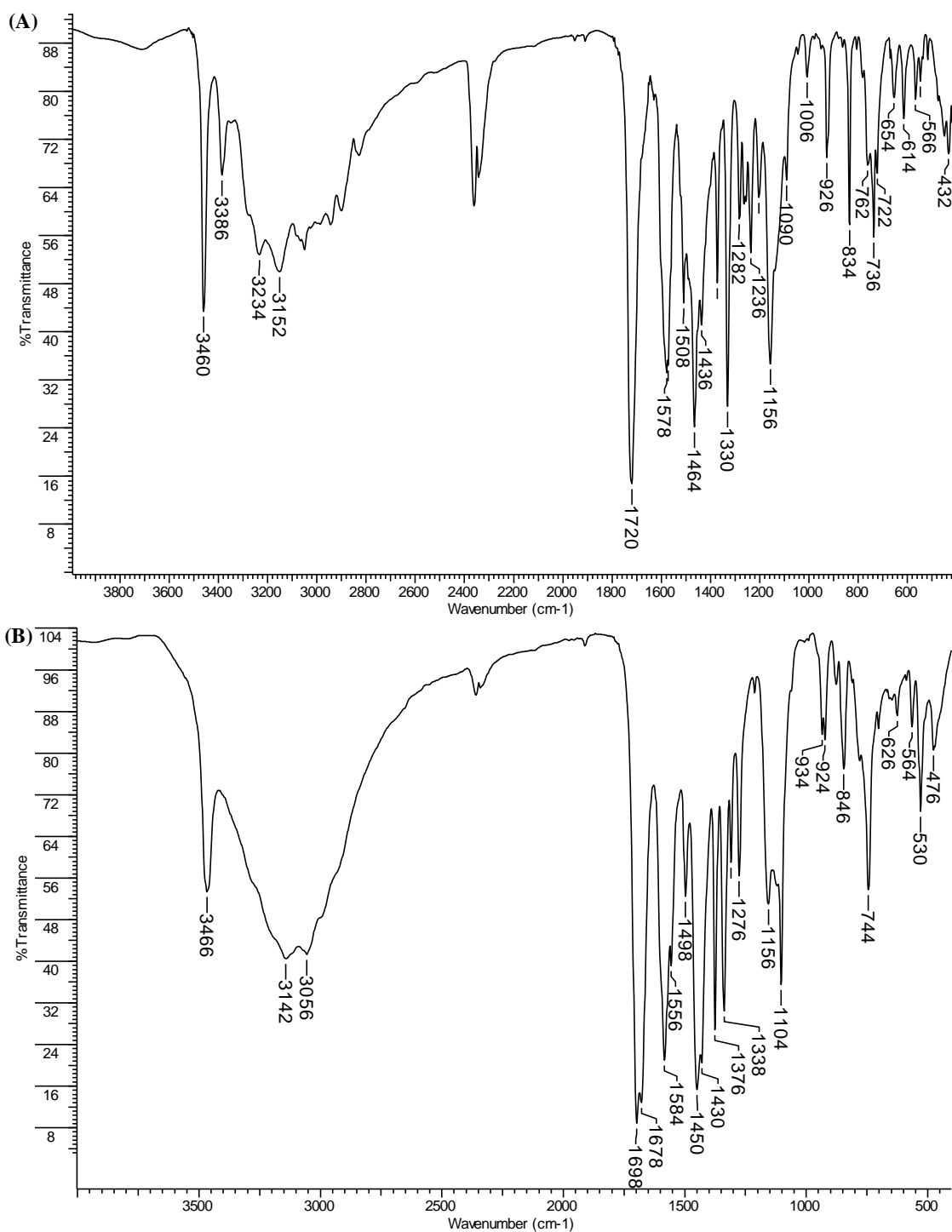
sofreu um pequeno deslocamento para uma região de maior energia ( $1682\text{ cm}^{-1}$ ), sugerindo que esse oxigênio não se liga ao metal. Com a complexação ao Zn(II) observou-se deslocamento do modo  $\nu(\text{C}=\text{N}_{\text{im}})$  de  $1594\text{ cm}^{-1}$  no ligante para  $1582\text{ cm}^{-1}$  no complexo, sugerindo que esse átomo não se liga ao metal. Observou-se também, o deslocamento do modo  $\nu(\text{C}=\text{N}_{\text{qui}})$  de  $1632\text{ cm}^{-1}$  no ligante para  $1652\text{ cm}^{-1}$  no complexo, de acordo com a coordenação do ligante ao zinco por meio do nitrogênio quinolínico<sup>89</sup>. A vibração referente à deformação do anel da quinolina se deslocou de  $720\text{ cm}^{-1}$  para  $738\text{ cm}^{-1}$ . Observou-se também o surgimento de novas bandas em  $449$  e  $376\text{ cm}^{-1}$ , que podem ser atribuídas aos modos  $\nu(\text{CuO})$  e  $\nu(\text{CuN})$ , respectivamente<sup>89,90</sup>, sugerindo a coordenação ao Zn(II) de modo bidentado, pelo sistema  $\text{O}-\text{N}_{\text{qui}}$ .

Para os complexos  $[\text{Cu}(\text{8-QS})_2]$  (**2**) e  $[\text{Zn}_2(\text{8-QS})_3] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  (**5**) (Figura 3.15), observou-se um deslocamento da banda referente ao modo  $\nu(\text{C}=\text{O})$  presente em  $1720\text{ cm}^{-1}$  no ligante para  $1666$  (**2**) e  $1698$  (**5**)  $\text{cm}^{-1}$ . No entanto a banda, nos dois casos, ainda se encontra na faixa de  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , sugerindo que esse oxigênio não se coordena ao metal. A banda em  $1572\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento  $\nu(\text{C}=\text{N}_{\text{im}})$  da imina foi deslocada no complexo de Zn(II) para  $1578\text{ cm}^{-1}$  e no complexo de Cu(II) para  $1584\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo que esse átomo não faz parte da coordenação. A complexação aos metais provocou o deslocamento do modo  $\nu(\text{C}=\text{N})$  da quinolina ( $\text{N}_{\text{qui}}$ ), de  $1578\text{ cm}^{-1}$  para  $1556\text{ cm}^{-1}$  para o complexo de Cu(II) e  $1678\text{ cm}^{-1}$  para o complexo de Zn(II), sugerindo a coordenação do ligante aos íons metálicos por meio do nitrogênio quinolínico<sup>89</sup>. Observou-se também o deslocamento da vibração associada à deformação do anel da quinolina de  $722\text{ cm}^{-1}$  para  $756$  (Cu(II)) e  $744$  (Zn(II))  $\text{cm}^{-1}$ .

As vibrações  $\nu(\text{CuO})$  e  $\nu(\text{CuN})$  foram atribuídas a bandas entre  $530$  e  $476\text{ cm}^{-1}$ . Os modos  $\nu(\text{ZnO})$  e  $\nu(\text{ZnN})$  foram atribuídos a bandas entre  $530$  e  $314\text{ cm}^{-1}$ . Portanto os espectros no infravermelho sugeriram que o ligante se coordenou ao Cu(II) e ao Zn(II) de modo bidentado, pelo sistema  $\text{O}_{\text{qu}}-\text{N}_{\text{qui}}$ .

---

<sup>90</sup> K. Nakamoto, Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds. 4th ed. New York: Wiley, c1986.



**Figura 3.15** – Espectro no infravermelho de (A) 8-HQS e (B)  $[\text{Zn}_2(8\text{-QS})_3] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ .

Para o complexo  $[\text{Cu}(8\text{-QTD})]$  (3) a banda referente ao modo  $\nu(\text{C}=\text{S})$  apresentou um deslocamento de  $834 \text{ cm}^{-1}$  para a região de menor energia de  $740 \text{ cm}^{-1}$ , sugerindo a coordenação pelo enxofre<sup>76</sup>. O deslocamento de  $94 \text{ cm}^{-1}$  é compatível com a passagem de uma ligação dupla  $\text{C}=\text{S}$  no ligante para uma ligação simples  $\text{C}-\text{S}^-$  após a complexação. Os modos  $\nu(\text{C}=\text{N}_{\text{im}})$  e  $\nu(\text{CN}_{\text{qui}})$ , situados em  $1538 \text{ cm}^{-1}$  e  $1606 \text{ cm}^{-1}$  no ligante livre, deslocaram-se para  $1592 \text{ cm}^{-1}$  e  $1628 \text{ cm}^{-1}$  no complexo, respectivamente, em concordância com a coordenação do ligante ao

Cu(II) por meio dos nitrogênios imínico<sup>91</sup> e quinolínico<sup>89</sup>. A banda atribuída à deformação do anel da quinolina se deslocou de 720 cm<sup>-1</sup> para 730 cm<sup>-1</sup>, em concordância com a coordenação do ligante ao Cu(II) por meio do nitrogênio quinolínico<sup>89</sup>. Novas bandas observadas para o complexo em 345 cm<sup>-1</sup> e 365 cm<sup>-1</sup> foram relacionadas ao modo  $\nu(\text{Cu-N})$  e a banda em 528 cm<sup>-1</sup> foi relacionada ao modo  $\nu(\text{Cu-O})$ , respectivamente. Com isso, os espectros de infravermelho sugeriram que o ligante coordenou-se ao Cu(II) de modo tetradentado, pelo sistema O-N<sub>qui</sub>-N<sub>im</sub>-S.

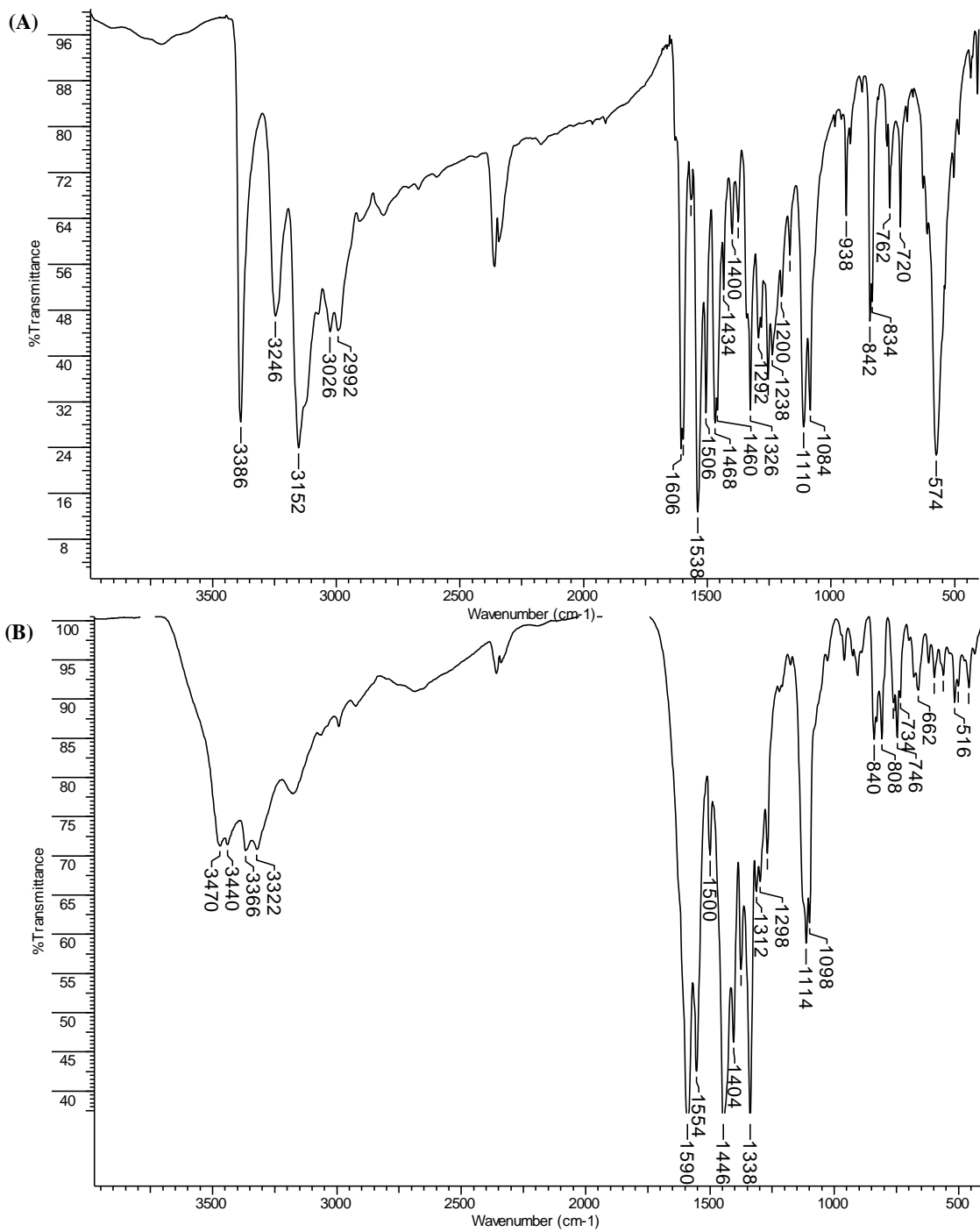
Com a complexação ao Zn(II) em [Zn(8-QT)(AcO<sup>-</sup>)] (**6**) (Figura 3.16) a banda  $\nu(\text{C=S})$  apresentou um deslocamento, de 834 cm<sup>-1</sup> no ligante para 808 cm<sup>-1</sup> no complexo, com diminuição da intensidade, sugerindo a coordenação pelo enxofre<sup>76</sup>. As bandas referentes aos modos  $\nu(\text{C=N}_{\text{im}})$  e  $\nu(\text{C=N}_{\text{qui}})$ , observadas em 1538 cm<sup>-1</sup> e 1606 cm<sup>-1</sup> para o ligante livre, deslocaram-se para 1554 cm<sup>-1</sup> e 1590 cm<sup>-1</sup> no espectro do complexo, respectivamente, em concordância com a coordenação do ligante ao Zn(II) por meio dos nitrogênios imínico<sup>91</sup> e quinolínico<sup>89</sup>. Além disso, a banda atribuída a deformação do anel da quinolina se deslocou de 720 cm<sup>-1</sup> para 734 cm<sup>-1</sup>, em concordância com a coordenação do ligante ao Zn(II) por meio do nitrogênio quinolínico<sup>89</sup>. Novas bandas observadas para o complexo em 516 cm<sup>-1</sup> e 459 cm<sup>-1</sup> foram relacionadas aos modos  $\nu(\text{Zn-O})$  e  $\nu(\text{Zn-N})$ , respectivamente. Com isso, os espectros de infravermelho sugeriram que o ligante coordenou-se ao Zn(II) de modo tetradentado, pelo sistema O-N<sub>qui</sub>-N<sub>im</sub>-S.

Para este complexo, o espectro de IV sugere também a participação do íon acetato na estrutura. A banda em 1590 cm<sup>-1</sup> está alargada, sugerindo a sobreposição de absorções na região em que uma vibração relacionada ao estiramento assimétrico de acetato apareceria. Além disso, outra banda próxima a 1445 cm<sup>-1</sup>, devida ao modo simétrico, é observada em 1446 cm<sup>-1</sup>, confirmando a proposta feita anteriormente através dos resultados de análise elementar.

Bandas de água de cristalização foram observadas para os complexos [Zn(8-QH)<sub>2</sub>] · 5/2 H<sub>2</sub>O (**4**); [Zn<sub>2</sub>(8-QS)<sub>3</sub>] · 1/2 H<sub>2</sub>O (**5**, Figura 3.15) e [Zn(8-QT)OAc<sup>-</sup>] · 1/2 H<sub>2</sub>O (**6**, Figura 3.16) em 3361 cm<sup>-1</sup>, 3142 cm<sup>-1</sup> e 3300 cm<sup>-1</sup>, respectivamente.

---

<sup>91</sup> A. P. Rebolledo, M. Vieites, D. Gambino, O. E. Piro, E. E. Castellano, C. L. Zani, E. M. Souza-Fagundes, L. R. Teixeira, A. A. Batista, H. Beraldo, J. Inorg. Biochem. 99 (2005) 698.



**Figura 3.16** – Espectro no infravermelho de (A) 8-HQT e (B) [Zn(8-QT)OAc]·1/2H<sub>2</sub>O.

**Tabela 3.12.** Bandas nos espectros no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) de 8-HQH, 8-HQS e 8-HQT e seus complexos: (1)  $[\text{Cu}(8\text{-QH})_2]$ ; (2)  $[\text{Cu}(8\text{-QS})_2]$ ; (3)  $[\text{Cu}(8\text{-QTD})]$ ; (4)  $[\text{Zn}(8\text{-QH})_2] \cdot 5/2 \text{H}_2\text{O}$ ; (5)  $[\text{Zn}_2(8\text{-QS})_3] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  e (6)  $[\text{Zn}(8\text{-QT})\text{OAc}^-] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ . – suportes: KBr ( $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ ); CsI ( $400\text{-}200\text{cm}^{-1}$ ).

Composto	$\nu(\text{CO})$	$\nu(\text{CS})$	$\nu(\text{CN}_{\text{im}})$	$\nu(\text{CN}_{\text{qui}})$	$\rho(\text{anel quinolina})$	$\nu(\text{MO})$	$\nu(\text{MN})$
<b>8-HQH</b>	1678 F	-	1594 F	1632 m	720 f	-	-
<b>8-HQS</b>	1720 F	-	1572 m	1578 F	722 f	-	-
<b>8-HQT</b>	-	834 m	1538 F	1606 F	720 f	-	-
(1)	1674 F	-	1586 m	1696 F	746 f	540 f	345 f
(2)	1666 F	-	1578 F	1556 m	756 m	530 m	476 f
(3)	-	740 m	1592 F	1628 F	730 f	528 f	345 f 365 f
(4)	1682 F	-	1582 F	1652 F	738 m	449 f	376 f
(5)	1698 F	-	1584 F	1678 F	744 m	530 f	314 f
(6)	-	808 m	1554 F	1590 F	734 f	516 f	459 f

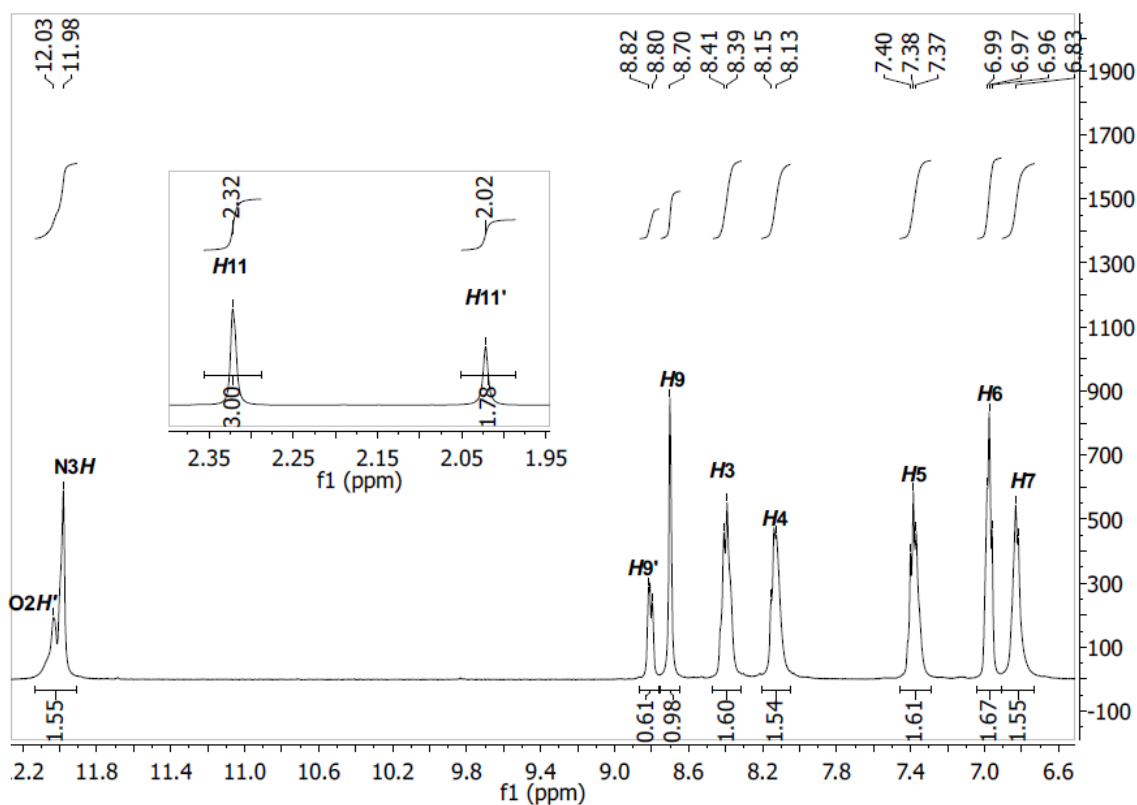
F = forte; m = média; f = fraco; mf = muito fraco; l = largo

### 3.2.3. Ressonância Magnética Nuclear

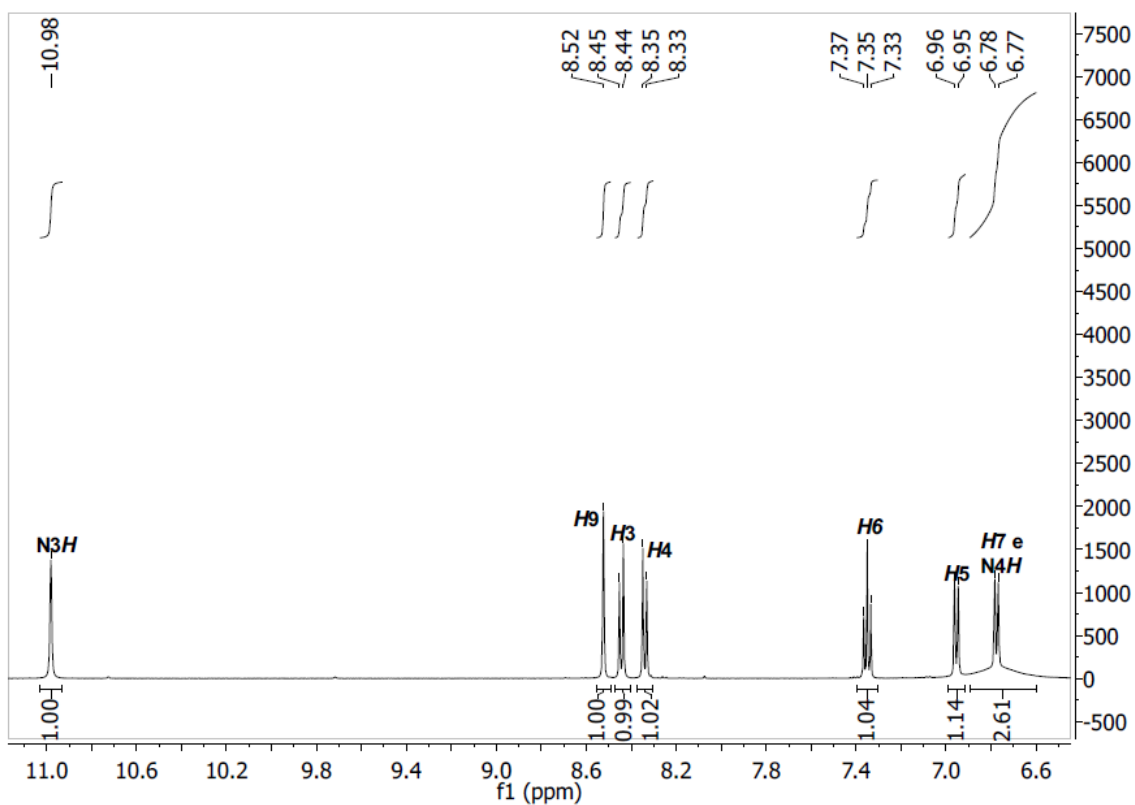
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo,  $[\text{Zn}(8\text{-QH})_2] \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$  (5), representado na Figura 3.17, observa-se novamente uma duplicidade de sinais que indica uma mistura dos dois tautômeros, com proporção entre as formas ceto-enol de 1,0:0,6. O sinal do hidrogênio  $\text{N3H}$  sofreu um deslocamento de 0,30 ppm, e do hidrogênio  $\text{O2H}$  de 0,28 ppm quando comparado ao ligante livre. O sinal do hidrogênio  $\text{O1H}$  desapareceu no espectro do complexo, indicando a desprotonação desse oxigênio e sugerindo a coordenação pelo oxigênio da 8-hidroxiquinolina. Os sinais dos hidrogênios  $\text{H3}$ ,  $\text{H4}$ ,  $\text{H5}$ ,  $\text{H6}$  e  $\text{H7}$  estão com as duas formas tautoméricas sobrepostas. O sinal do  $\text{H3}$  se desloca de  $\delta$  8,32 –  $\delta$  8,29 no ligante para  $\delta$  8,41 –  $\delta$  8,39 ppm no complexo e o sinal do  $\text{H4}$  de  $\delta$  8,04 –  $\delta$  8,01 para  $\delta$  8,15 –  $\delta$  8,12. Os sinais dos hidrogênios  $\text{H5}$  e  $\text{H6}$  que se encontravam sobrepostos na faixa  $\delta$  7,45 –  $\delta$  7,37 para o ligante apresentam-se separados nas faixas  $\delta$  6,99 –  $\delta$  6,97 e  $\delta$  7,40 –  $\delta$  7,37, respectivamente. O sinal do hidrogênio  $\text{H7}$  desloca de  $\delta$  7,13 –  $\delta$  7,10 no ligante livre para  $\delta$  6,83 –  $\delta$  6,82 no complexo. Com a complexação, o sinal de  $\text{H9}$  da forma ceto desloca de 0,48 ppm e o sinal da forma enol desloca de 0,46 ppm. Finalmente, para os hidrogênios  $\text{H11}$ , apenas a forma ceto se desloca de 0,04 ppm.

Os valores das integrações e o número de sinais estão de acordo com o número de hidrogênios da molécula.

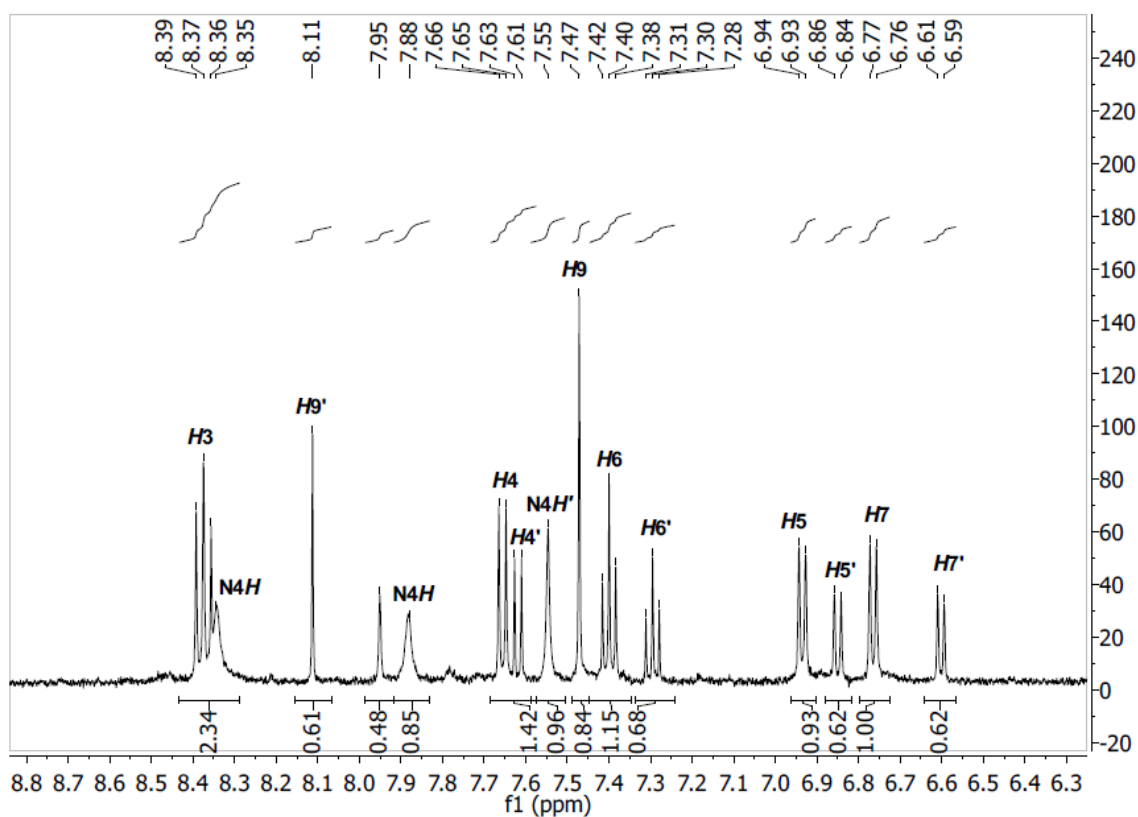
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo  $[\text{Zn}_2(8\text{-QS})_3] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  (**6**) (Figura 3.18) o sinal do hidrogênio  $\text{O1H}$  desaparece, sugerindo a desprotonação e a complexação pelo oxigênio da 8-hidroxiquinolina. O sinal do hidrogênio  $\text{N3H}$  se desloca de 0,25 ppm pela complexação. Os hidrogênios ligados a  $\text{N4}$  e o hidrogênio  $\text{H7}$  estão sobrepostos no espectro do complexo, o duplete do  $\text{H7}$  e o sinal largo do  $\text{N4H}$  são observados, em  $\delta$  6,78 –  $\delta$  6,77. Os sinais dos hidrogênios  $\text{H3}$  e  $\text{H4}$  são dois dupletos que se deslocam de  $\delta$  8,33 –  $\delta$  8,31 e  $\delta$  8,26 –  $\delta$  8,24 no espectro do ligante para  $\delta$  8,45 –  $\delta$  8,44 e  $\delta$  8,35 –  $\delta$  8,33, respectivamente, no espectro do complexo. Os sinais dos hidrogênios  $\text{H5}$  e  $\text{H6}$  que se encontravam sobrepostos na faixa  $\delta$  7,42 –  $\delta$  7,50 ppm no espectro do ligante livre, apresentam dois sinais distintos, um tripete para o  $\text{H6}$  na faixa  $\delta$  7,35 –  $\delta$  7,33 ppm e um duplete para o  $\text{H5}$  em  $\delta$  6,96 –  $\delta$  6,95 ppm. Finalmente, o sinal do hidrogênio  $\text{H9}$  desloca de 0,44 ppm. Os valores das integrações e o número de sinais estão de acordo com o número de hidrogênios da molécula.



**Figura 3.17** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) do complexo  $[\text{Zn}(8\text{-QH})_2] \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$  (**4**) em  $\text{DMSO-}d_6$  com ampliação nas regiões de 2,00 a 2,35 ppm e 6,40 a 12,00 ppm.

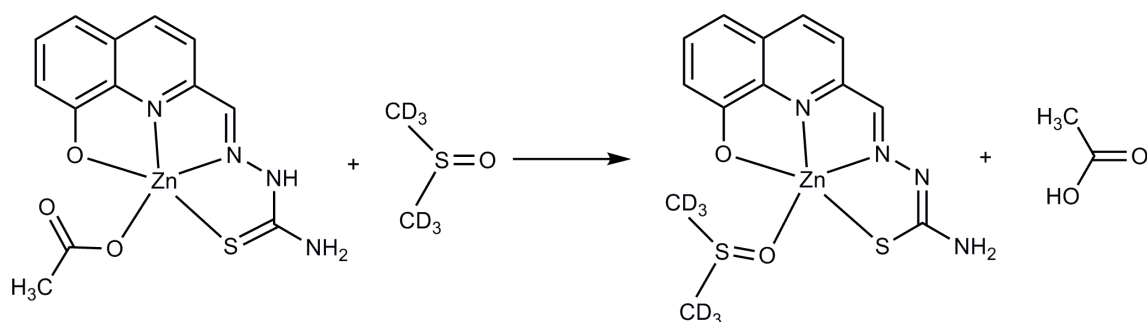


**Figura 3.18** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) do complexo  $[\text{Zn}_2(8\text{-QS})_3] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  (**5**) em  $\text{DMSO-}d_6$  com ampliação na região de 6,6 a 11,0 ppm.



**Figura 3.19** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) do complexo  $[\text{Zn}(8\text{-QT})(\text{OAc})] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  (**6**) em  $\text{DMSO-}d_6$  com ampliação na região de 6,5 a 8,5 ppm.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo  $[\text{Zn}(8\text{-QT})(\text{OAc})]\cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  (**6**) (Figura 3.19) os sinais dos hidrogênios  $\text{O1H}$  e  $\text{N3H}$  não são observados, sugerindo a desprotonação de  $\text{O1}$  e  $\text{N3}$ , e a complexação pelo oxigênio da 8-hidroxiquinolina. Além disso, observa-se a formação de duas espécies em solução, devido a duplicidade dos sinais. Os espectros foram obtidos em  $\text{DMSO-}d_6$ , um solvente coordenante, podendo ocorrer uma reação de troca, na qual o acetato é substituído pelo  $\text{DMSO-}d_6$  (Figura 3.20).



**Figura 3.20** – Proposta de formação de novo complexo em solução, evidenciando o deslocamento do acetato pelo  $\text{DMSO}$ , a partir de  $[\text{Zn}(8\text{-QT})\text{OAc}]\cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ .

Os hidrogênios ligados a  $\text{N4}$  apresentam dois deslocamentos para a espécie (A) em  $\delta$  7,88 e  $\delta$  8,35 e apenas um deslocamento para a espécie (A') em  $\delta$  7,55. Os sinais dos hidrogênios **H5**, **H6** e **H7** apresentam-se duplicados também, e são observados entre  $\delta$  6,59 –  $\delta$  7,42 como dupletos para **H5** e **H7** e tripletos para **H6**. Os sinais dos hidrogênios **H3** e **H4** são dupletos entre  $\delta$  8,39 –  $\delta$  8,36 e  $\delta$  7,61 –  $\delta$  7,66, respectivamente. O sinal de **H9** apresenta-se como dois simpleto em  $\delta$  7,47 (A) e  $\delta$  8,11 (A'). Os valores das integrações e o número de sinais estão de acordo com o número de hidrogênios da molécula.

Os complexos de zinco não apresentaram solubilidade em  $\text{DMSO-}d_6$  suficiente para a obtenção de espectros de  $^{13}\text{C}$  e DEPT. Os deslocamentos químicos citados anteriormente estão relacionados na Tabela 3.13.

**Tabela 3.13.** Atribuições, multiplicidade (M), número de átomos (n°) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C em DMSO-d<sub>6</sub> dos complexos de Zn(II) dos derivados de 8-HQ.

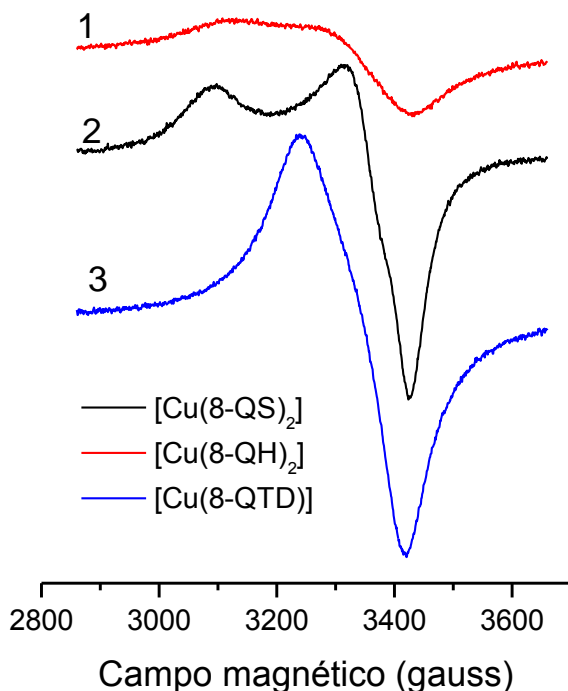
Atribuição	Compostos												
	[Zn(8-QT)OAc <sup>-</sup> ].1/2H <sub>2</sub> O ( <b>6</b> )					[Zn <sub>2</sub> (8-QS) <sub>3</sub> ].1/2H <sub>2</sub> O ( <b>5</b> )			[Zn(8-QH) <sub>2</sub> ].5/2H <sub>2</sub> O ( <b>4</b> )				
	δ (ppm)					δ (ppm)			δ (ppm)				
	A	n°	A'	n°	M/C		n°	M/C	Ceto	n°	Enol	n°	M/C
<b>H3</b>	8,39 – 8,37	1	8,37 – 8,36	0,6	d	8,33 – 8,31	1	d	8,41 – 8,39	1	8,41 – 8,39	0,6	ss
<b>H4</b>	7,66 – 7,65	1	7,63 – 7,61	0,6	d	8,26 – 8,24	1	d	8,15 – 8,12	1	8,15 – 8,12	0,6	ss
<b>H5</b>	6,94 – 6,93	1	6,86 – 6,84	0,6	d	7,42 – 7,35	1	ss	7,40 – 7,37	1	7,40 – 7,37	0,6	ss
<b>H6</b>	7,42 – 7,38	1	7,31 – 7,28	0,6	t	7,42 – 7,35	1	ss	6,99 – 6,97	1	6,99 – 6,97	0,6	ss
<b>H7</b>	6,77 – 6,76	1	6,61 – 6,59	0,6	d	7,09 – 7,07	1	dd	6,83 – 6,82	1	6,83 – 6,82	0,6	ss
<b>H9</b>	7,47	1	8,11	0,6	s	8,08	1	s	8,70	1	8,81	0,6	s
<b>H11</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	2,32	3	2,02	1,8	s
<b>N3H</b>	-	-	-	-	-	10,73	1	s	11,98	1	-	-	-
<b>N4H</b>	7,88 8,35	1,6	7,55	0,95	s	6,74	2	s	-	-	-	-	-
<b>O1H</b>	-	-	-	-	-	9,72	1	s	-	-	-	-	-
<b>O2H</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,03	0,6	s

s = simpleto; d = dupleto; t = tripleto; m = multipleto; ss = sobreposição de sinais.

### 3.2.4. Ressonância Paramagnética Eletrônica

Os espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) dos complexos [Cu(8-QH)<sub>2</sub>] (1); [Cu(8-QS)<sub>2</sub>] (2) e [Cu(8-QTD)] (3) foram obtidos no estado sólido (Figura 3.21) e em solução (Figura 3.22) a temperatura ambiente e em solução a 77K (Figura 3.23).

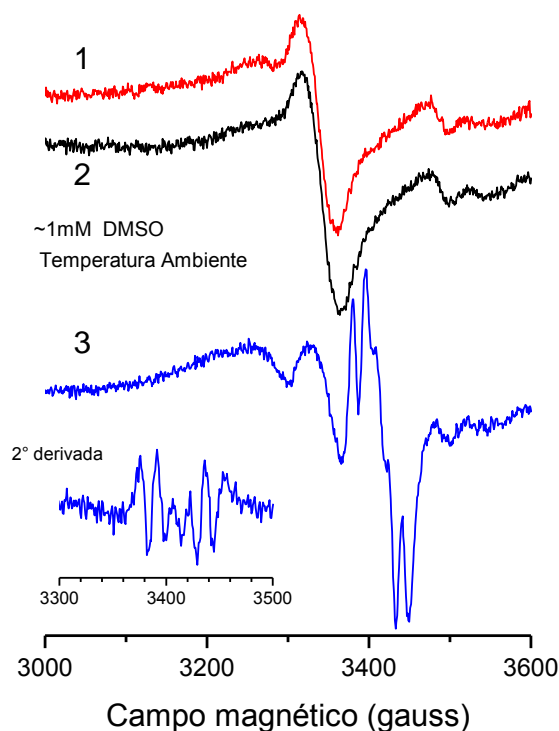
Os espectros dos complexos [Cu(8-QH)<sub>2</sub>] (1) e [Cu(8-QS)<sub>2</sub>] (2) a temperatura ambiente são característicos de simetria axial (Figura 3.21). Não apresentam o desdobramento hiperfino na região de  $g_1$ , devido à interação com o spin nuclear do cobre. Essa ausência de desdobramento hiperfino é frequentemente encontrada em complexos de cobre (II) na fase sólida, em que estão presentes interações de troca entre os elétrons desemparelhados. Já o espectro do complexo [Cu(8-QTD)] (3) apresenta uma linha larga centrada em  $g = 2,093$ . A forma distorcida dessa linha parece indicar uma superposição de duas linhas, características de spin  $S = 1$  de complexo binuclear.



**Figura 3.21** – Espectro de RPE do complexo de Cu(II) dos derivados de 8-HQ sólidos à temperatura ambiente.

Em solução, às vezes é possível obter espectros de RPE com maiores detalhes, já que o estreitamento das linhas pode ser observado devido ao movimento rápido da molécula. No entanto, esse não foi o caso dos complexos [Cu(8-QS)<sub>2</sub>] e [Cu(8-QH)<sub>2</sub>] em solução de DMSO (Figura 3.22). Já o espectro do complexo [Cu(8-QTD)] apresentou maior resolução, especialmente na linha em campo alto. Isso pode ser explicado pelo movimento mais rápido, já que [Cu(8-QTD)] é mais leve do que [Cu(8-QS)<sub>2</sub>] e [Cu(8-QH)<sub>2</sub>] e pode girar mais rapidamente.

A linha hiperfina de campo alto apresenta desdobramento devido à interação com núcleos de nitrogênio. O desdobramento em cinco linhas sugere interação com dois núcleos de spin  $I = 1$ .



**Figura 3.22** – Espectros de RPE dos complexos de Cu(II) dos derivados de 8-HQ: **(1)**  $[\text{Cu}(\text{8-QH})_2]$ ; **(2)**  $[\text{Cu}(\text{8-QS})_2]$  e **(3)**  $[\text{Cu}(\text{8-QTD})]$ , em solução 1 mM DMSO á temperatura ambiente.

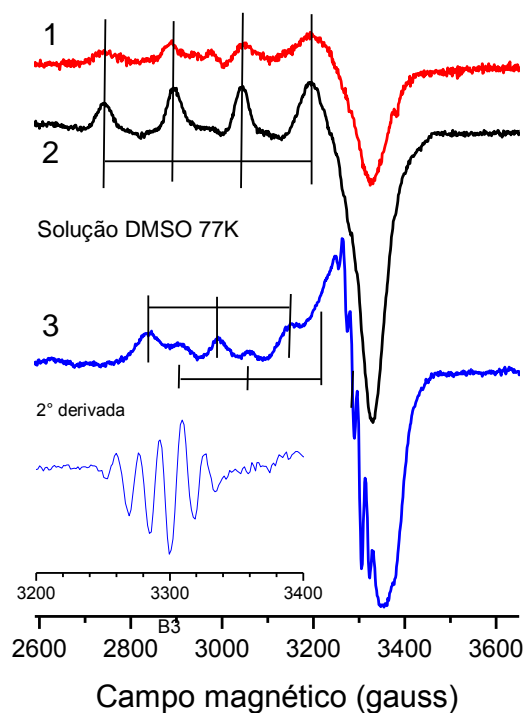
Os espectros das soluções congeladas são típicos de simetria axial, com desdobramento hiperfino na região de  $g_{\parallel}$ . Os complexos  $[\text{Cu}(\text{8-QS})_2]$  e  $[\text{Cu}(\text{8-QH})_2]$  apresentam os mesmos parâmetros (Tabela 3.15), mas a intensidade de  $[\text{Cu}(\text{8-QH})_2]$  é bem menor. O complexo  $[\text{Cu}(\text{8-QTD})]$  apresenta duas componentes (Tabela 3.15), sendo uma delas pelo menos duas vezes mais intensa. A região de  $g_{\perp}$  apresenta desdobramento superhiperfino devido à interação com núcleos de nitrogênio, com parâmetro  $A_N = 15,5$  G.

**Tabela 3.14.** Parâmetros de RPE dos complexos de Cu(II) ): **(1)**  $[\text{Cu}(\text{8-QH})_2]$ ; **(2)**  $[\text{Cu}(\text{8-QS})_2]$  e **(3)**  $[\text{Cu}(\text{8-QTD})]$  (sólido a temperatura ambiente).

Composto	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ (gauss)
<b>(1)</b>	2,089	2,247	0
<b>(2)</b>	2,086	2,262	155
<b>(3)</b>	2,093		

**Tabela 3.15.** Parâmetros de RPE dos complexos de Cu(II): (1) [Cu(8-QH)<sub>2</sub>]; (2) [Cu(8-QS)<sub>2</sub>] e (3) [Cu(8-QTD)] (solução congelada a 77 K).

Composto	$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ (gauss)	$A_N$ (gauss)
(1)	2,078	2,282	150	-
(2)	2,078	2,282	150	-
(3)	2,062	2,207	154	15,5
	2,062	2,158	154	-

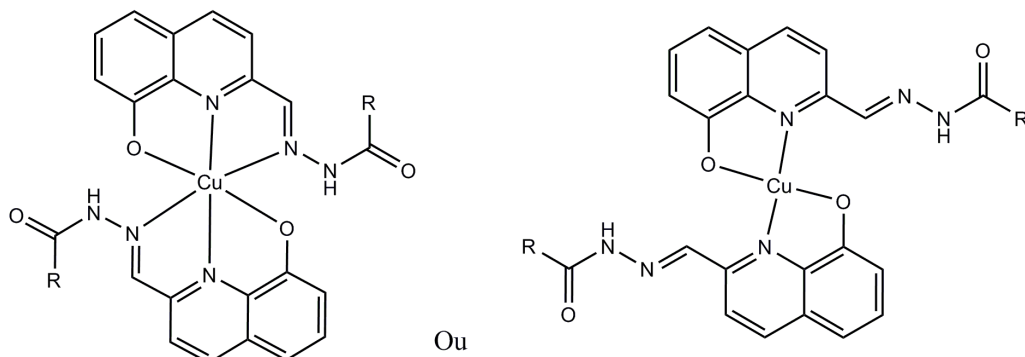


**Figura 3.23** – Espectros de RPE dos complexos de Cu(II) dos derivados de 8-HQ: (1) [Cu(8-QH)<sub>2</sub>]; (2) [Cu(8-QS)<sub>2</sub>] e (3) [Cu(8-QTD)], em solução DMSO á 77 K.

### 3.2.5. Proposta para as estruturas

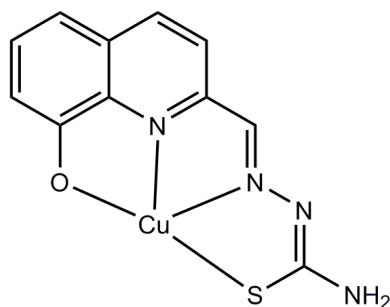
Nos complexos (1) [Cu(8-QH)<sub>2</sub>] e (2) [Cu(8-QS)<sub>2</sub>] os ligantes podem se coordenar ao metal de modo bidentado ou tridentado (Figura 3.24). Os espectros de RPE são típicos de complexos de Cu(II) de simetria axial. Poderiam ser esperados complexos de geometria octaédrica ou tetragonal, uma distorção da geometria octaédrica na qual as posições dos átomos no eixo z estão alongadas quando comparadas com os demais átomos. A geometria quadrática seria um limite da tetragonal, na qual as distâncias dos átomos ao longo do eixo z tendem a

infinito. Foi demonstrado na determinação da estrutura de 8-HQH por difração de Raios-X que o composto é praticamente plano. Com isso, um complexo de geometria tetragonal seria menos estável devido à rigidez do sistema. Com essas informações, sugerimos que os complexos formados teriam geometria quadrática, com os ligantes se coordenando de forma bidentada.

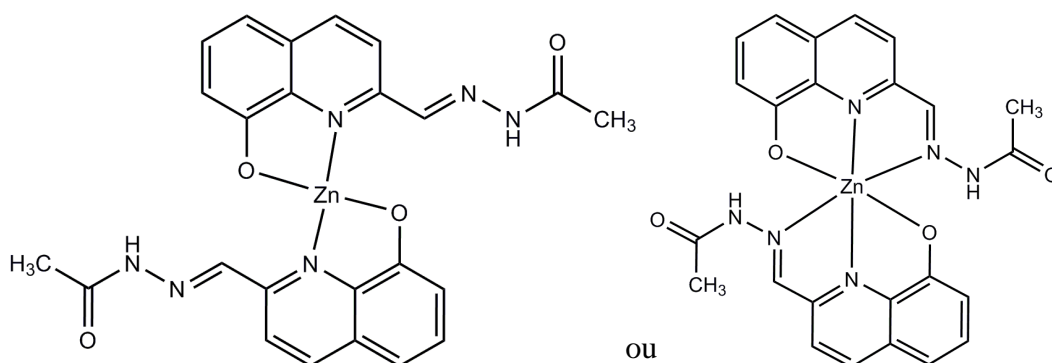


**Figura 3.24** – Proposta de estrutura para os complexos **(1)**  $[\text{Cu}(8\text{-QH})_2]$  ( $\text{R} = \text{CH}_3$ ) e **(2)**  $[\text{Cu}(8\text{-QS})_2]$  ( $\text{R} = \text{NH}_2$ ).

No complexo **(3)**  $[\text{Cu}(8\text{-QTD})]$  o ligante encontra-se duplamente desprotonado e se coordena ao metal de maneira tetradentada (Figura 3.25), como observado para outros complexos de  $\text{Cu}(\text{II})$  de tiossemicarbazonas semelhantes<sup>14</sup>.



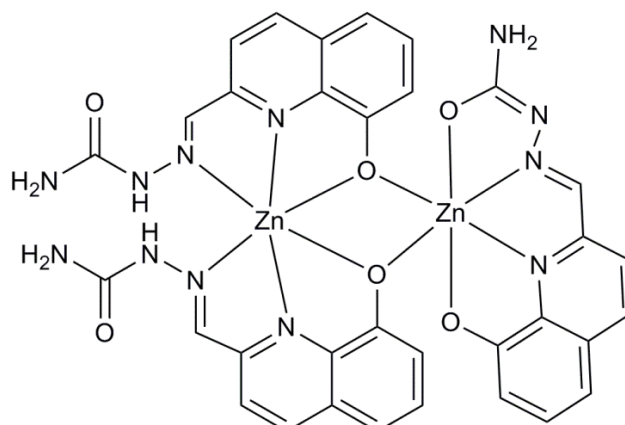
**Figura 3.25** – Proposta de estrutura para o complexo **(3)**  $[\text{Cu}(8\text{-QTD})]$ .



**Figura 3.26** – Proposta de estrutura para o complexo **(4)**  $[\text{Zn}(8\text{-QH})_2]$ .

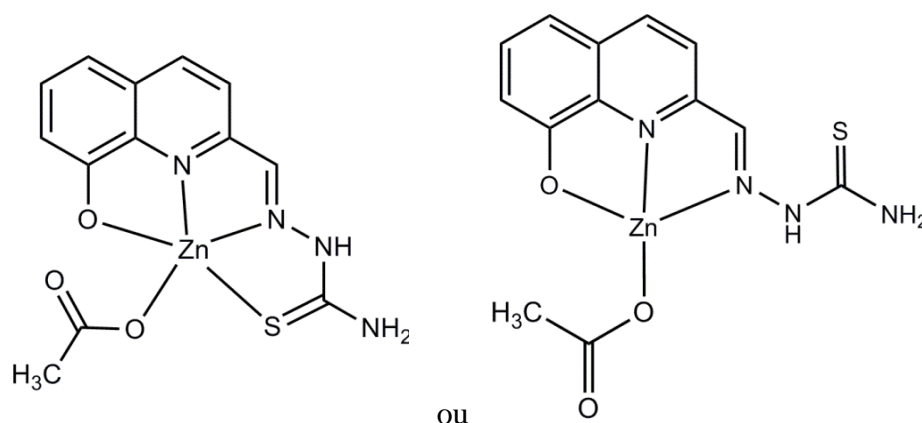
No complexo **(4)**  $[\text{Zn}(8\text{-QH})_2]$  (Figura 3.26), o ligante também pode se coordenar de maneira bidentada ou tridentada. Porém, o  $\text{Zn}(\text{II})$  é um metal  $d^{10}$ , no qual o número de coordenação e a geometria são definidos apenas pelos efeitos espaciais do ligante, fazendo com que as duas propostas sejam possíveis.

No complexo **(5)**  $[\text{Zn}_2(8\text{-QS})_3]$  (Figura 3.27), o ligante faz uma ponte entre dois átomos de Zn(II) através do oxigênio fenólico.



**Figura 3.27** – Proposta de estrutura para o complexo **(5)**  $[\text{Zn}_2(8\text{-QS})_3]$ .

No complexo **(6)**  $[\text{Zn}(8\text{-QT})(\text{AcO}^-)]$  (Figura 3.28), a tiossemicarbazona se liga ao metal na forma desprotonada em O1, podendo coordenar-se de maneira tetradentada ou tridentada. Além disso, um acetato se encontra na esfera de coordenação.

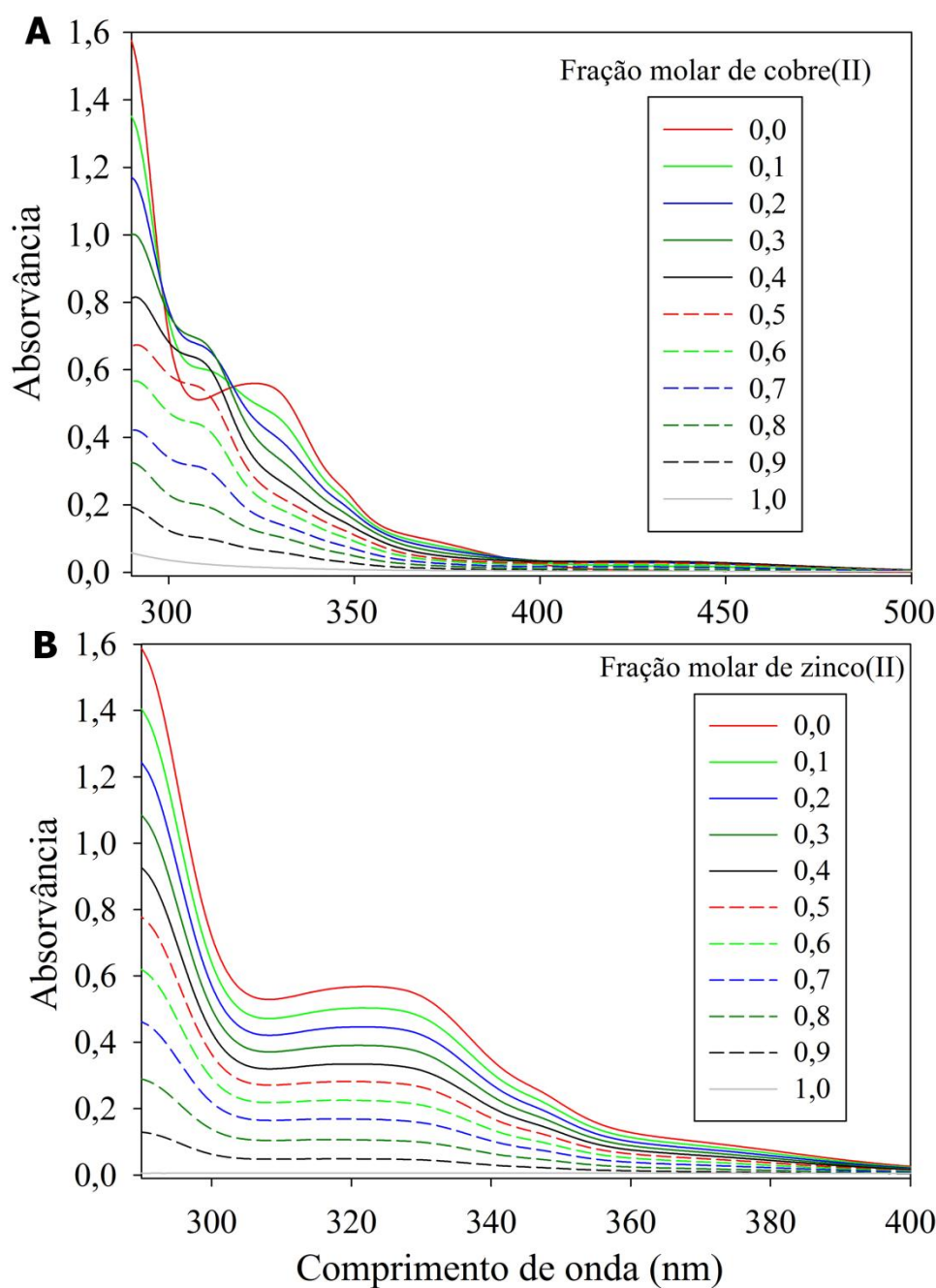


**Figura 3.28** – Proposta de estrutura para o complexo **(6)**  $[\text{Zn}(8\text{-QT})(\text{AcO}^-)]$ .

### 3.2.6. Estudos da interação metal:ligante em solução (*Job plot*)

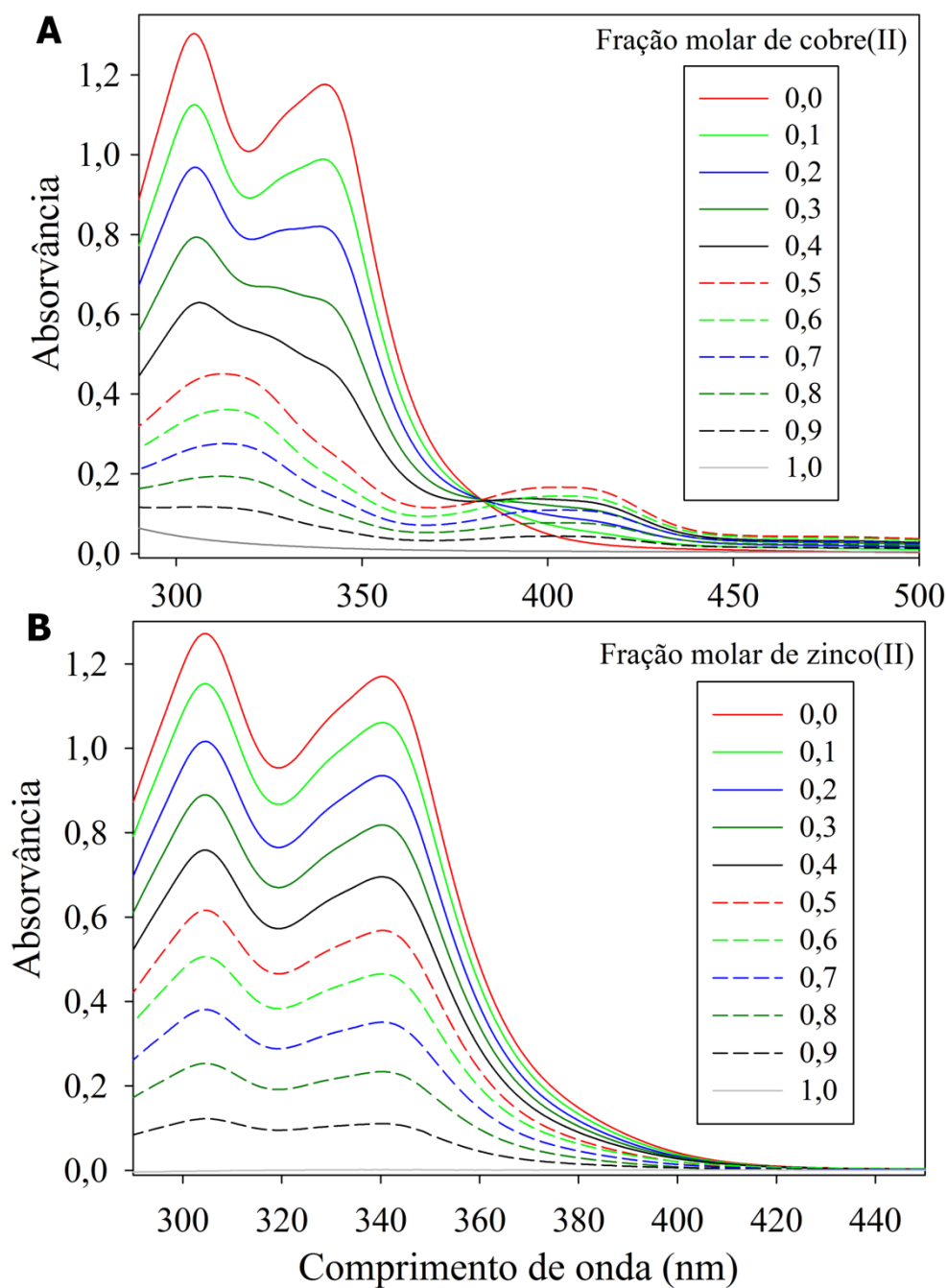
Os estudos de interação metal:ligante foram realizados em solução 20% DMSO em tampão HEPES 7,4 e em DMSO. Os espectros no ultravioleta-visível (UV-vis) foram obtidos com frações molares de íon metálico variando de 0 a 1.

Na Figura 3.29 estão representados os espectros no ultravioleta-visível (UV-vis) para 8-HQH em 20% DMSO em tampão HEPES 7,4. À medida que aumenta a fração molar de Cu(II) em **(A)** observa-se a formação de uma nova banda em 424 nm. O máximo dessa nova banda é observado para a fração molar de Cu(II) de aproximadamente 0,3, ou seja, forma-se um complexo  $\text{ML}_2$ . Já para o Zn(II) **(B)** não há a formação de nenhuma banda característica do complexo. Os espectros de UV-vis para 8-HQS são semelhantes ao de 8-HQH.



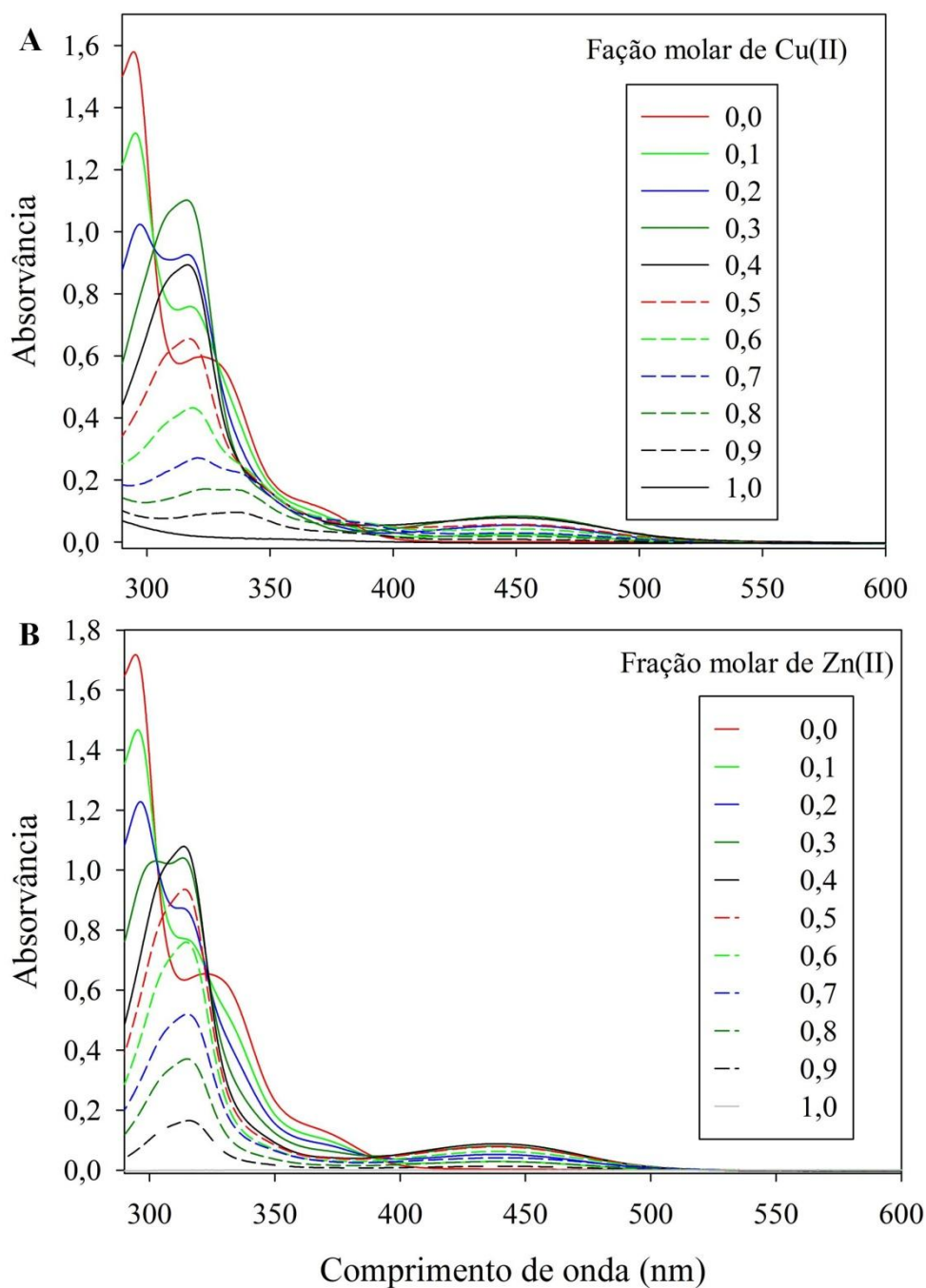
**Figura 3.29** – Espectros eletrônicos na região do UV-vis para 8-HQH em 20% DMSO em tampão 7,4 com (A) acetato de Cu(II) e (B) acetato de Zn(II). Frações molares de íon metálico variando de 0 a 1.

Os espectros eletrônicos de 8-HQT em 20% DMSO em tampão 7,4 em proporções variadas de ligante e íon metálico estão representados na Figura 3.30. Para os espectros na presença de Cu(II) (A) observa-se a formação de uma nova banda em 404 nm. O máximo dessa nova banda está relacionado à fração molar 0,5 de Cu(II), ou seja, forma-se um complexo do tipo ML. Nos espectros com Zn(II) (B) observa-se apenas a diminuição da absorvância das bandas do ligante sem o surgimento de uma nova banda.



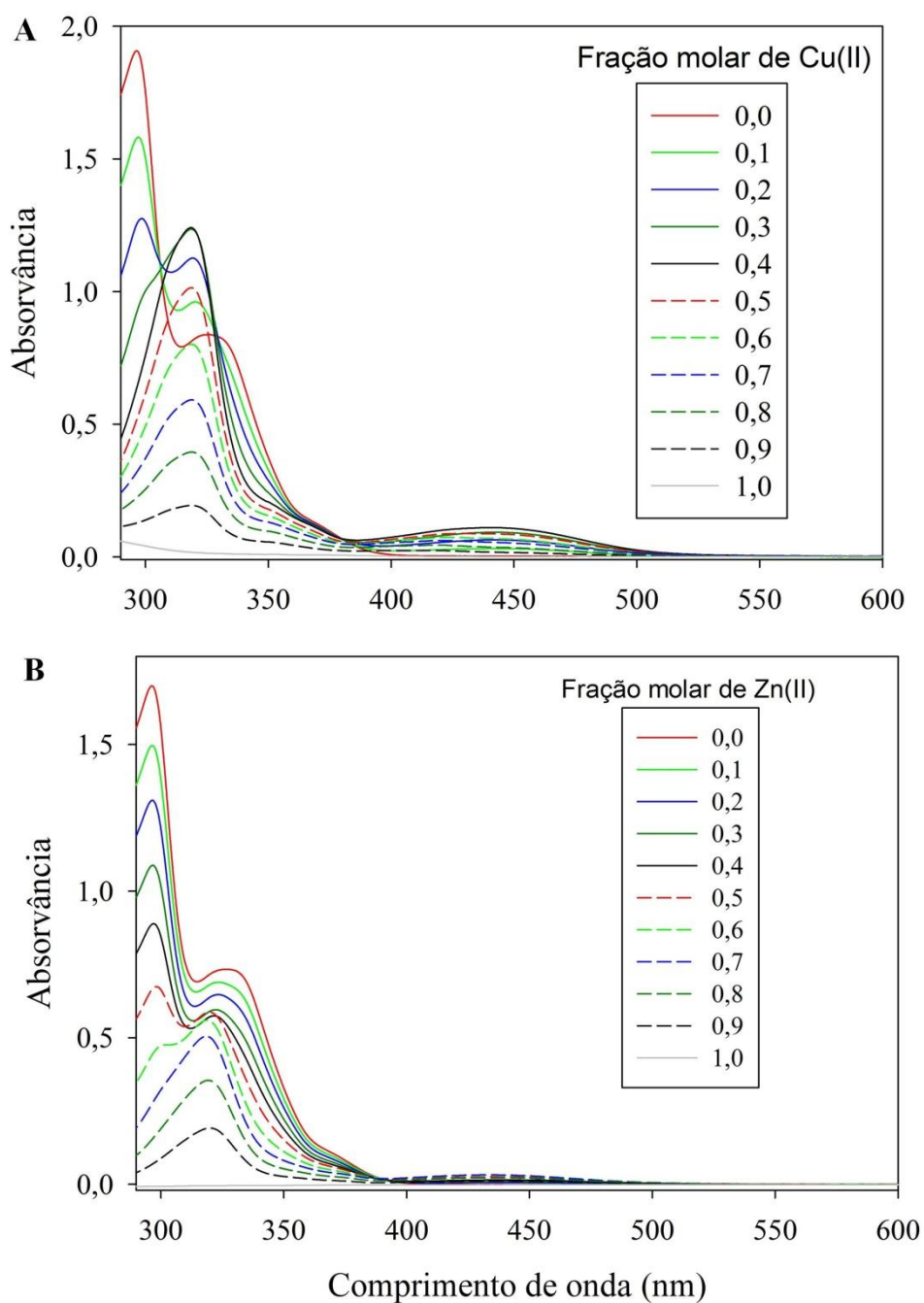
**Figura 3.30** – Espectros eletrônicos na região do UV-vis para 8-HQT em 20% DMSO em tampão 7,4 com (A) acetato de Cu(II) e (B) acetato de Zn(II). Frações molares de íon metálico variando de 0 a 1.

Os espectros no UV-Vis para 8-HQH em DMSO estão representados na Figura 3.31. Com o aumento da fração molar de íon metálico observa-se a formação de novas bandas em 449 nm para Cu(II) (A) e 438 nm para Zn(II) (B). Os máximos dessas novas bandas são observados para as frações molares dos íons metálicos de aproximadamente 0,35, indicando a formação de complexos do tipo  $ML_2$ .



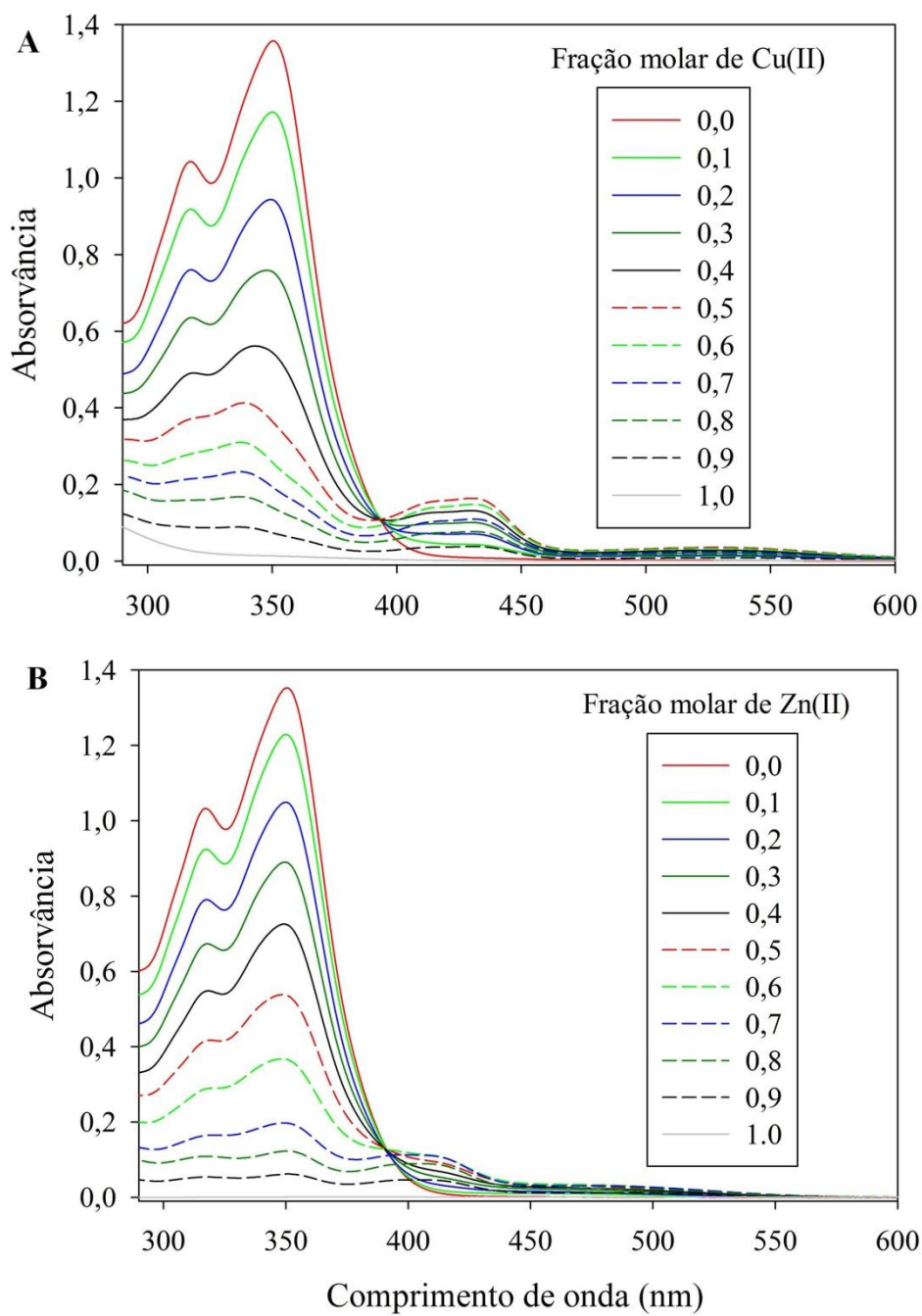
**Figura 3.31** – Espectros eletrônicos na região do UV-vis para 8-HQH em DMSO com (A) acetato de Cu(II) e (B) acetato de Zn(II). Frações molares de íon metálico variando de 0 a 1.

Nos espectros eletrônicos de 8-HQS em DMSO (Figura 3.32) observou-se a formação de novas bandas na presença de Cu(II) (442 nm, A) e Zn(II) (434 nm, B). Para Cu(II) o máximo dessa nova banda está relacionado à fração molar de aproximadamente 0,4 e para Zn(II) de aproximadamente 0,7. Como o DMSO é um solvente coordenante, torna-se difícil a interpretação desses dados, já que várias espécies poderiam estar sendo formadas em solução.

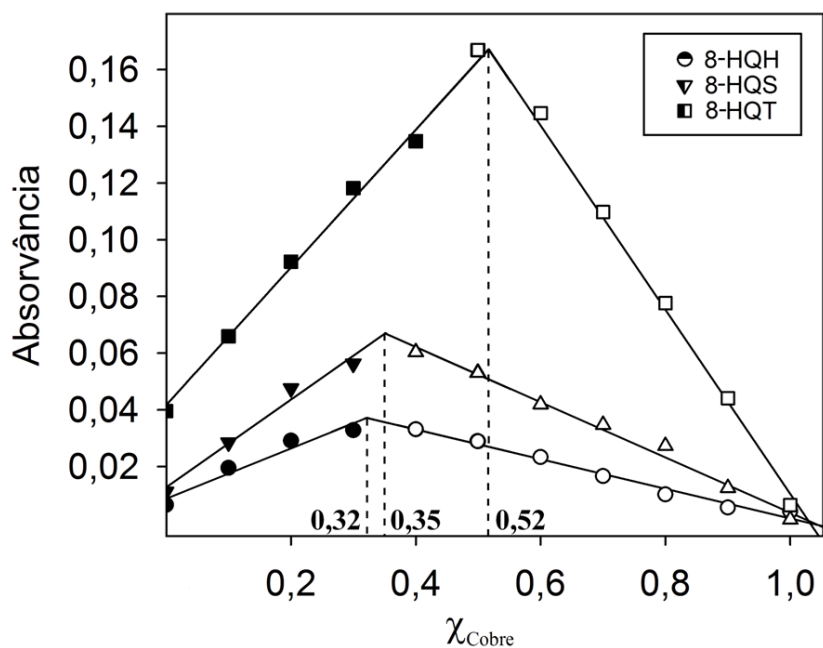


**Figura 3.32** – Espectros eletrônicos na região do UV-vis para 8-HQS em DMSO com (A) acetato de Cu(II) e (B) acetato de Zn(II). Frações molares de íon metálico variando de 0 a 1.

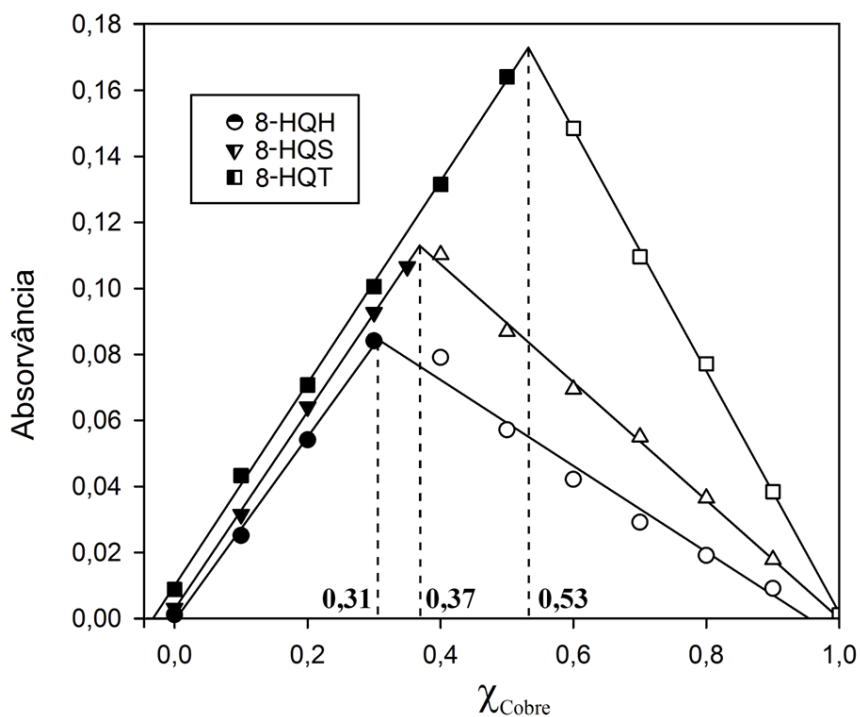
A formação de novas bandas também foi observada nos espectros eletrônicos de 8-HQT em DMSO (Figura 3.33). Para o Cu(II) a banda foi observada em 431 nm com máximo relacionado à fração molar de 0,53, sugerindo a presença de um complexo do tipo ML. Para o Zn(II) a banda foi observada em 397 nm com máximo relacionado à fração molar de 0,65, indicando a formação de uma espécie do tipo  $M_2L$ . Novamente, já que DMSO pode coordenar-se, é possível a formação de tal espécie, principalmente considerando-se que Zn(II) ( $d^{10}$ ) tem uma menor afinidade pelo ligante quinolínico do que Cu(II) ( $d^9$ ).



**Figura 3.33** – Espectros eletrônicos na região do UV-vis para 8-HQT em DMSO com (A) acetato de Cu(II) e (B) acetato de Zn(II). Frações molares de íon metálico variando de 0 a 1.



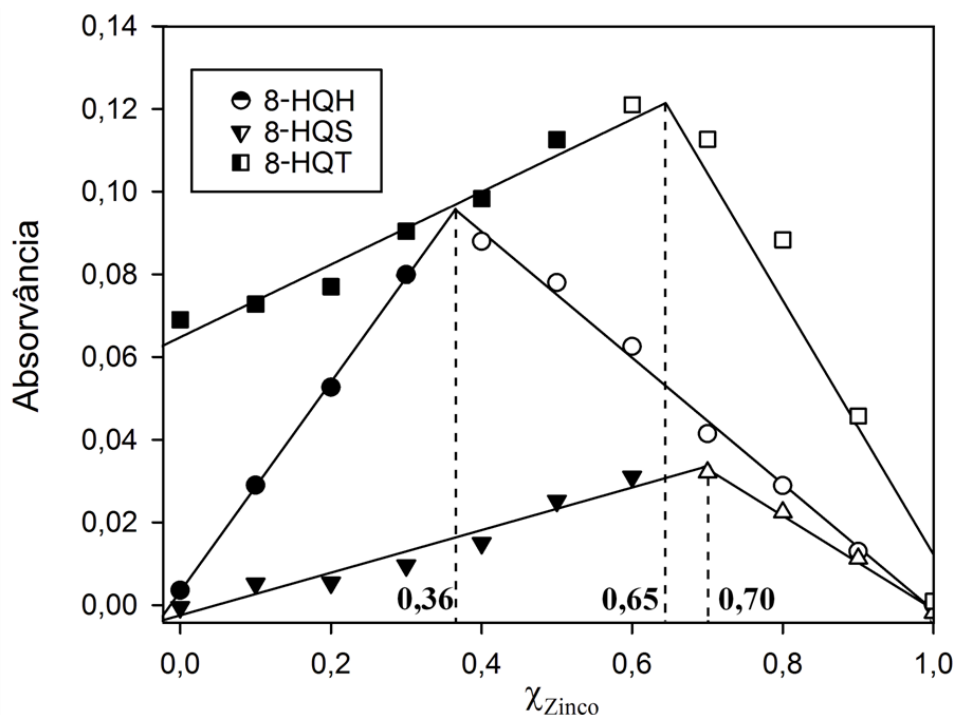
**Figura 3.34** – Diagrama de interação metal:ligante (*Job Plot*) de 8-HQH (424 nm), 8-HQS (420 nm) e 8-HQT (404 nm) com acetato de cobre (20% DMSO em tampão 7,4).  $\chi$  = fração de Cu(II).



**Figura 3.35** – Diagrama de interação metal:ligante (*Job Plot*) de 8-HQH (449 nm), 8-HQS (442 nm) e 8-HQT (431 nm) com acetato de cobre (DMSO).  $\chi$  = fração de Cu(II).

Os diagramas de interação metal:ligante foram obtidos através dos valores de absorção nos comprimentos de onda das novas bandas e as frações correspondentes dos íons metálicos (Cu(II) e Zn(II)). Nos diagramas em 20% DMSO em tampão 7,4 (Figura 3.34) e em DMSO

(Figura 3.35) para o Cu(II) pode-se inferir as proporções metal:ligante de 1:2 para 8-HQH e 8-HQS e 1:1 para 8-HQT. Em solução tampão pH 7,4 novas bandas para Zn(II) não foram evidentes, o que sugere que o agente quelante possui maior afinidade pelo Cu(II) quando comparado ao Zn(II), nas condições analisadas. Nos diagramas em DMSO para o Zn(II) observou-se a relação metal:ligante de 1:2 para 8-HQH, 2:1 para 8-HQS e 8-HQT (Figura 3.36), mostrando uma maior afinidade dos agentes quelantes em DMSO quando comparado com o experimento em tampão 7,4. Além disso, o DMSO é um solvente coordenante, dessa forma os complexos formados em solução podem apresentar DMSO em sua esfera de coordenação.



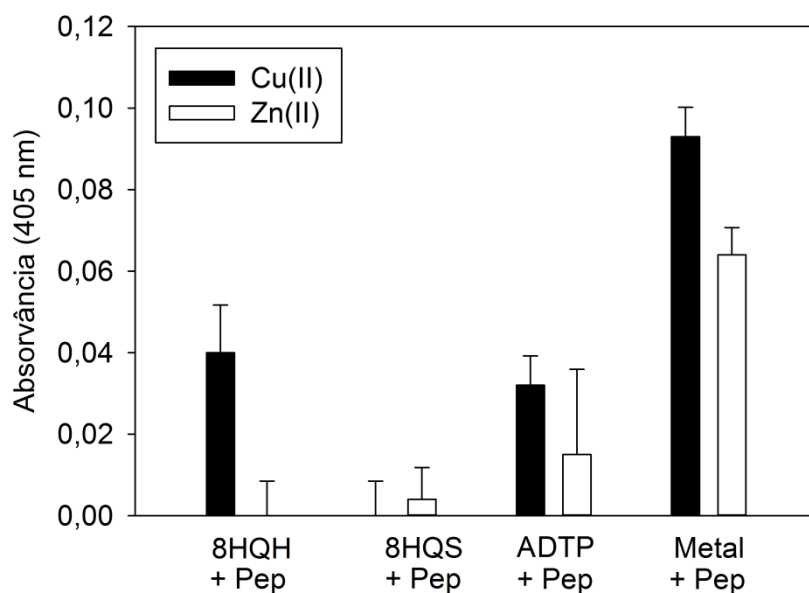
**Figura 3.36** – Diagrama de interação metal:ligante (*Job Plot*) de 8-HQH (438 nm), 8-HQS (434 nm) e 8-HQT (397 nm) com acetato de zinco (DMSO).  $\chi$  = fração de Zn(II).

### 3.3. Ensaios biológicos (Alzheimer): Teste de Turbidez, Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e ensaios de fluorescência

#### 3.3.1. Teste de Turbidez

O teste de turbidez foi realizado para avaliar a capacidade dos derivados de 8-HQ em modular ou mesmo abolir a agregação do peptídeo  $\beta A_{1-40}$  induzida por metais, fornecendo informações a respeito do grau de agregação do peptídeo em solução. Esse teste é feito por meio de medidas do espalhamento da luz a 405 nm. A tiossemicarbazona 8-HQT não foi solúvel nas condições do teste (5% v/v DMSO em tampão HEPES pH 7,4). Portanto, o teste foi feito apenas com a hidrazona 8-HQH e a semicarbazona 8-HQS (Figura 3.37). O valor de pH para Cu(II) foi

ajustado uma vez que a agregação induzida por cobre é otimizada em pH 6,6<sup>92</sup>. A agregação induzida por Cu(II) e Zn(II) com relação ao controle negativo (peptídeo + metais) foi significativamente inibida pelos compostos 8-HQH e 8-HQS (Figura 3.32). Além disso, houve diferença estatisticamente significativa entre os compostos avaliados (8-HQS para os dois metais e 8-HQH para o Zn(II)) e o ácido dietilenotriamino pentacético (ADTP, controle positivo) com relação à agregação, sugerindo que os compostos apresentam atividade inibitória maior do que o controle positivo nas condições do teste. O mesmo não foi observado para 8-HQH com relação ao Cu(II), cuja inibição é semelhante à observada para o ADTP, sugerindo que para o Cu(II) ambos mostram inibição de agregação equivalente nas condições do teste.

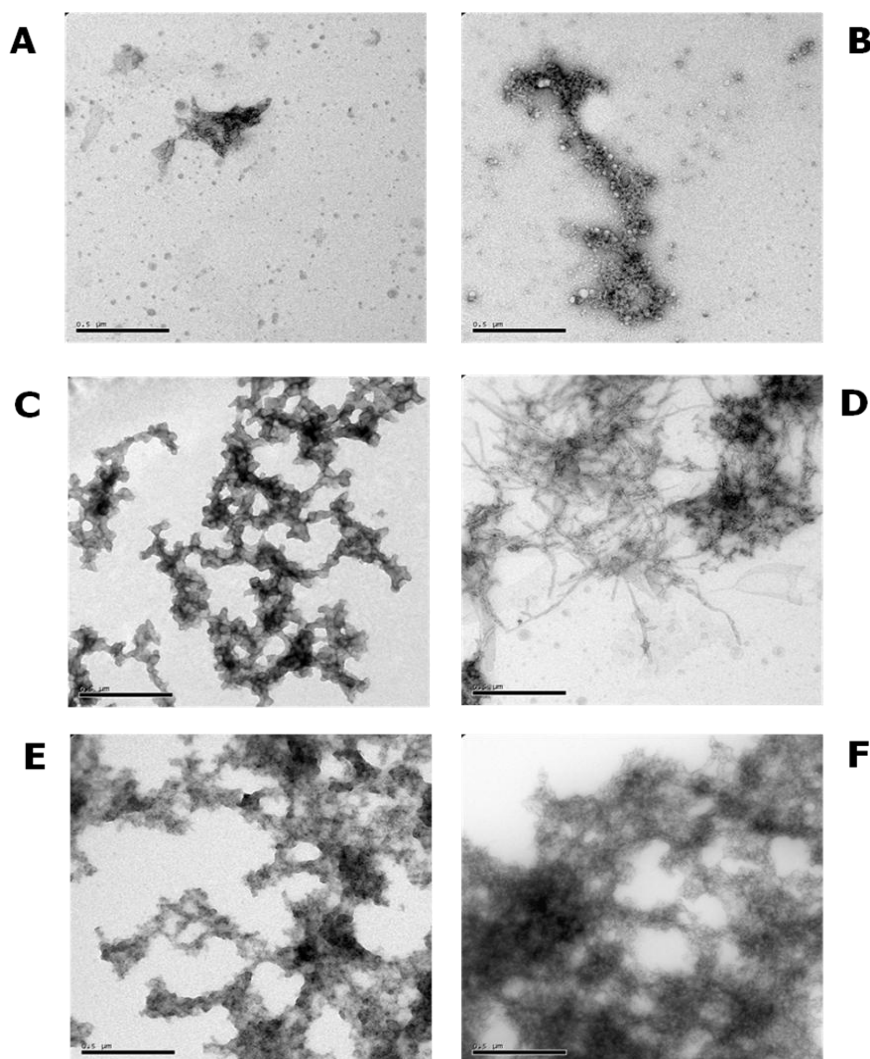


**Figura 3.37** – Grau de agregação do peptídeo A $\beta_{1-40}$  determinado por meio de espectroscopia no UV-vis - Solução peptídica na presença de íons metálicos e ligantes. Os dados representam a média de absorvância de amostras em quadruplicata medidas a 405 nm. Valor de pH igual a 6,6 e 7,4 para Cu(II) e Zn(II), respectivamente. As barras de erro representam o desvio padrão do valor médio de absorvância. ADTP = ácido dietilenotriamino pentacético, controle positivo e Metal + Pep = (Cu(II) ou Zn(II)) + peptídeo A $\beta_{1-40}$ , controle negativo.

### 3.3.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Com intuito de demonstrar visualmente a influência dos compostos 8-HQH e 8-HQS na agregação do peptídeo induzida por metais, revelada anteriormente no teste de turbidez, foram obtidas imagens de MET.

<sup>92</sup> C. S. Atwood, R. D. Moir, X. Huang, R. C. Scarpa, N. M. Bacarra, D. M. Romano, M. A. Hartshorn, R. E. Tanzi, A. I. Bush, *Journal of Biological Chemistry*, 273 (1998) 12817.

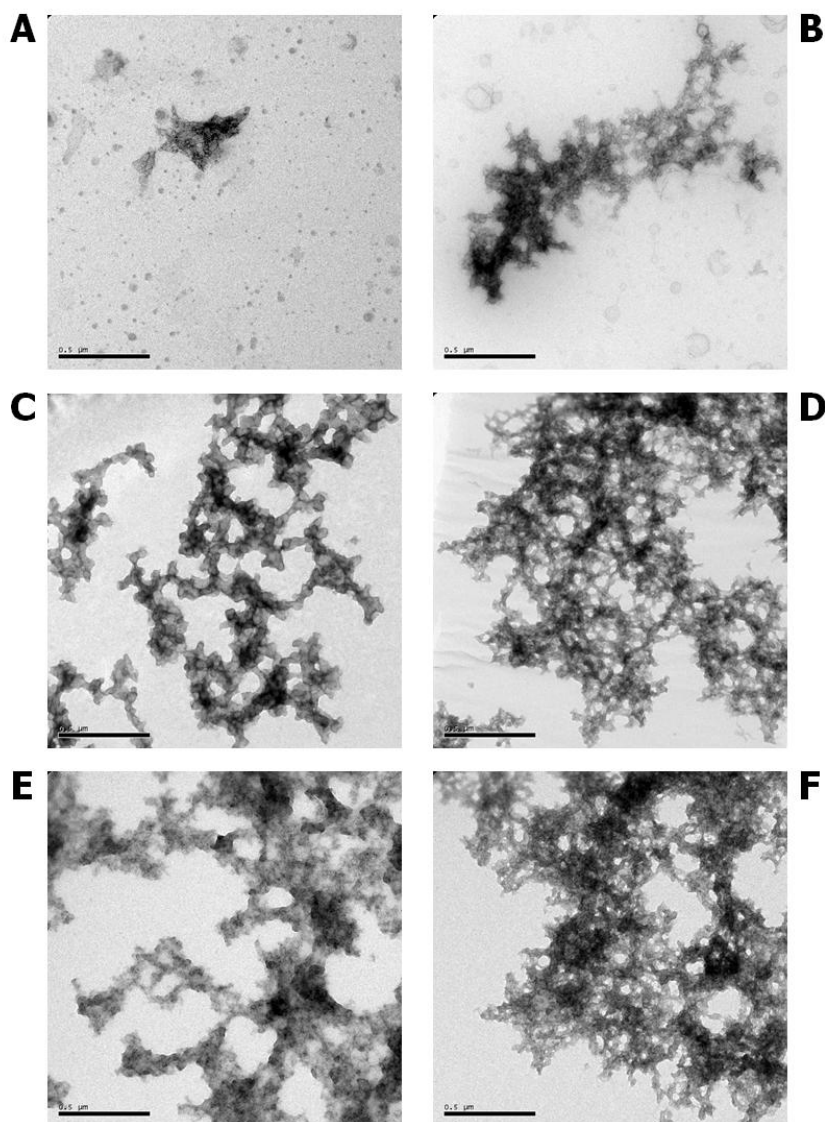


**Figura 3.38** – Imagens MET de amostras incubadas com 25 mM de  $\beta A_{1-40}$ , 25 mM de  $CuCl_2$  e 50 mM de 8-HQH. As amostras foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Peptídeo  $\beta A$  (A),  $\beta A+8-HQH$  (B),  $\beta A+Cu(II)$  (C),  $\beta A+8-HQH+Cu(II)$  (D),  $\beta A+Zn(II)$  (E),  $\beta A+8-HQH+Zn(II)$  (F).

As imagens de MET para 8-HQH estão mostradas na Figura 3.38. Pode ser observado que a agregação do peptídeo na presença dos íons metálicos  $Cu(II)$  (C) e  $Zn(II)$  (E) foi significativamente maior que para o peptídeo isolado (A). Dessa forma, confirmou-se a influência de metais na aceleração do processo de agregação de  $\beta A$ . O peptídeo na presença de 8-HQH (B) apresenta um padrão de agregação similar ao do peptídeo isolado (A). Na presença de  $Cu(II)$  e de 8-HQH observa-se a formação de fibras e diminuição da agregação do peptídeo, sugerindo que o composto, ao se coordenar com o metal, modula a agregação *in vitro* do peptídeo nas condições do teste. Finalmente, não foi observada influência do composto 8-HQH no processo de agregação do peptídeo promovido pelo  $Zn(II)$ , não havendo, sob as condições avaliadas, uma diferença visualmente significativa entre as amostras  $\beta A+Zn(II)$  (E) e  $\beta A+8-HQH+Zn(II)$  (F). Estes resultados sugerem que o agente quelante possui maior afinidade pelo

Cu(II) quando comparado ao Zn(II), confirmando os resultados obtidos nos estudos da interação metal:ligante em solução (*Job plot*).

Na presença de 8-HQS (Figura 3.39, **B**), o padrão de agregação é semelhante ao padrão do peptídeo isolado. Não houve diferença visualmente significativa no processo de agregação do peptídeo promovido pelo Cu(II) (**D**) e pelo Zn(II) (**F**) na presença de 8-HQS. Estes resultados mostram, que sob as condições avaliadas, 8-HQS não influencia na fibrilogênese do peptídeo  $\beta$ A.



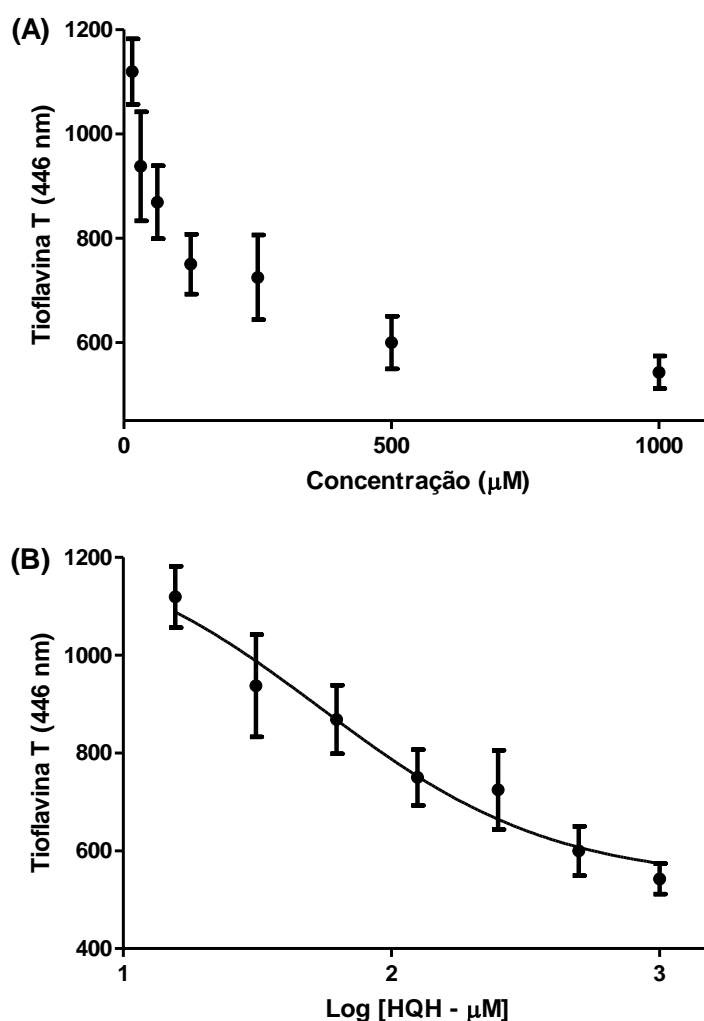
**Figura 3.39** – Imagens MET de amostras incubadas com 25 mM de  $\beta$ A<sub>1-40</sub>, 25 mM de CuCl<sub>2</sub> e 50 mM de 8-HQS. As amostras foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Peptídeo  $\beta$ A (**A**),  $\beta$ A+8-HQS (**B**),  $\beta$ A+Cu(II) (**C**),  $\beta$ A+8-HQS+Cu(II) (**D**),  $\beta$ A+Zn(II) (**E**),  $\beta$ A+8-HQS+Zn(II) (**F**).

A partir da caracterização das propriedades físico-químicas dos compostos e de suas atividades em modelos *in vitro* da DA, observou-se que o composto 8-HQH apresenta maior

influência no processo de agregação do peptídeo quando comparado a 8-HQS, sugerindo que 8-HQH é um promissor protótipo de fármaco para o tratamento da DA.

### 3.3.3. Ensaios de fluorescência

Os ensaios de fluorescência foram realizados por meio do teste da tioflavina T como uma segunda medida da inibição de agregação do peptídeo  $\beta$ A. Apenas o composto 8-HQH foi solúvel nas condições do teste (5% DMSO em tampão PBS 7,2). A fluorescência de tioflavina T aumenta da presença de agregados de  $\beta$ A, o que faz deste um ensaio muito interessante de triagem para inibidores<sup>72</sup>.

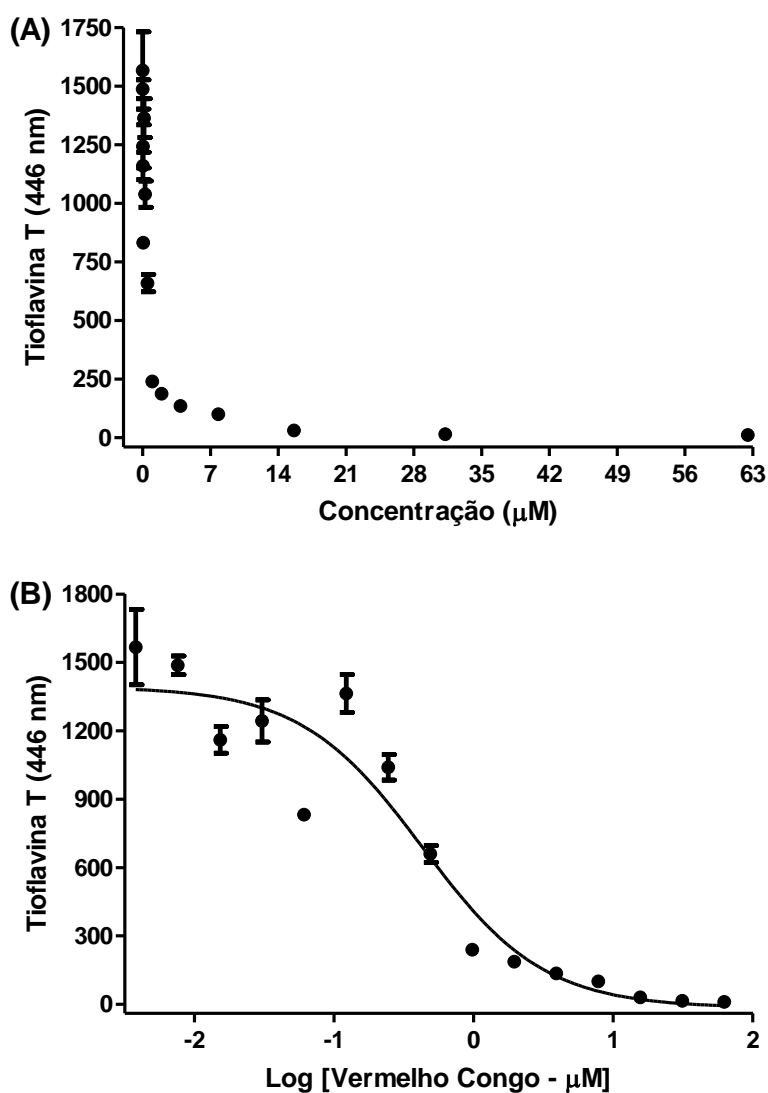


**Figura 3.40** – Inibição da agregação do peptídeo  $\beta$ A por medida de fluorescência de tioflavina T na presença de 8-HQH (A) gráfico de fluorescência (446 nm) versus concentração ( $\mu$ M) e (B) gráfico de fluorescência (446 nm) versus  $\text{Log}_{[x]}$ .

Muitos compostos orgânicos atuam como ligantes de peptídeos amiloides, sendo o vermelho do Congo (VC) um desses compostos. Mas esses compostos não são considerados

para uso terapêutico, pois são necessárias altas razões molares do composto para inibir a agregação<sup>72</sup>. Para avaliar a influencia de 8-HQH na inibição da agregação do peptídeo foi usado como controle positivo VC.

Nas Figuras 3.40 e 3.41 estão representadas as medidas de fluorescência de tioflavina T na presença do peptídeo  $\beta$ A em função de concentrações crescentes dos compostos 8-HQH e VC, respectivamente. 8-HQH foi solúvel na faixa de concentração 1000 a 0,061  $\mu$ M, já para o VC foram realizados experimentos na faixa de 62,5 a 0,0038  $\mu$ M. Observou-se uma diminuição na fluorescência da tioflavina T à medida que aumenta a concentração dos compostos.



**Figura 3.41** – Inibição da agregação do peptídeo  $\beta$ A por medida de fluorescência de tioflavina T na presença de vermelho do congo. (A) Fluorescência (446 nm) versus concentração ( $\mu$ M) e (B) fluorescência (446 nm) versus  $\text{Log}_{[x]}$ .

Os gráficos de fluorescência versus  $\text{Log}_{[x]}$  foram construídos a partir dos valores brutos de concentração através do programa DeltaGraph Prism (DeltaPoint, Inc) para se obter os

valores de  $CI_{50}$ . O valor de  $CI_{50}$  (Tabela 3.16) para 8-HQH pela diminuição da concentração de espécies de tioflavina T intercaladas ao peptídeo foi maior do que para o VC, sugerindo que o composto 8-HQH é menos eficiente para inibir a ligação do peptídeo com tioflavina T quando comparado ao VC. 8-HQH foi menos solúvel que VC, sendo que a concentração mais baixa para 8-HQH foi de 15,63  $\mu\text{M}$  e para o VC foi de 0,007  $\mu\text{M}$ . Portanto, a curva da 8-HQH apresentou menos pontos (7 pontos) que VC (15 pontos), o que faz com que o intervalo de confiança para 8-HQH seja maior.

**Tabela 3.16.** Determinação da  $CI_{50}$  de 8-HQH e VC em ensaios de fluorescência de tioflavina T.

	<b>8-HQH</b>	<b>VC</b>
<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	54,37	0,43
<b>Intervalo de confiança</b>	12,50 – 236,40	0,27 – 0,69

### 3.4. Atividade citotóxica

A atividade citotóxica foi avaliada para os derivados de 8-HQ e seus complexos de Cu(II) e Zn(II). Apenas um complexo foi ativo ([Cu(8-QTD)]), inibindo em mais de 50% a proliferação celular/viabilidade em leucemia mieloide (HL60), leucemia linfóide (Jurkat) e carcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB). O complexo [Cu(QH)<sub>2</sub>] apresentou atividade em células MDA-MB (carcinoma mamário), inibindo 41,49 % da proliferação celular, e parece ter uma seletividade maior em relação aos outros compostos. O potencial pro-apoptótico desta substância será avaliado.

A Tabela 3.17 mostra os valores de  $CI_{50}$  para o complexo de Cu(II) da 8-HQT em todas as linhagens. Os resultados estão apresentados em  $\mu\text{M}$  e a variação experimental pelo intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 3.17.** Determinação da  $CI_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) de [Cu(8-QTD)] e cisplatina em linhagens HL60, Jurkat, MCF-7 e MDA.

	<b>HL60</b>	<b>Jurkat</b>	<b>MCF-7</b>	<b>MDA-MB</b>
[Cu(8-QTD)]	0,85 (0,62 – 1,16)	1,39 (0,86 – 2,24)	2,90 (1,14 – 7,52)	1,75 (0,93 – 3,29)
Cisplatina	0,06 (0,04 – 0,12)	17,5 (8,9 – 34,5)	Inativa	75,35 (34,20 – 166)

O complexo de cobre da 8-HQT foi mais ativo para as linhagens Jurkat, MCF-7 e MDA-MB que a cisplatina, com valores de  $CI_{50}$  inferiores. É interessante ressaltar também, que

o ligante livre não apresentou atividade, indicando que a coordenação ao Cu(II) foi essencial para atividade citotóxica, como já demonstrado anteriormente por Zhang e colaboradores<sup>76</sup> em neuroblastomas.

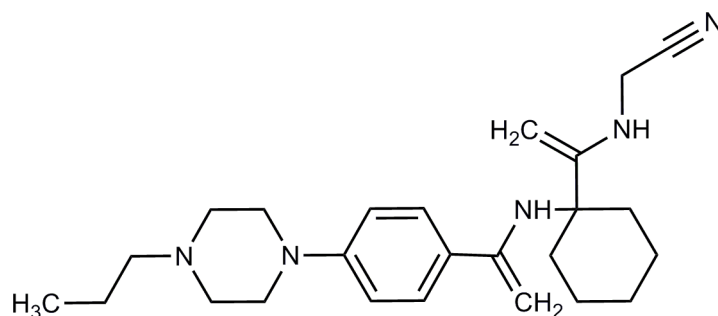
Os demais compostos não apresentaram atividade citotóxica, o que é importante para protótipos a fármaco para DA, já que compostos com atividade citotóxica podem apresentar efeitos colaterais não desejáveis.

## Capítulo 4. Derivados de 4-formilbenzonitrila e 4-acetilbenzonitrila: obtenção, caracterização, atividades antiproliferativa e antimicrobiana.

A remodelação óssea é um processo contínuo que ocorre durante a vida do ser humano, no qual dois tipos de células participam: os osteoclastos e os osteoblastos. Os osteoclastos são responsáveis pela dissolução de hidroxapatita e de matriz de colágeno, enquanto os osteoblastos constroem novos ossos. A remodelação contínua do esqueleto, realizada por essas células, é necessária para manter sua força mecânica. Entretanto, se um desequilíbrio causa uma excessiva reabsorção, leva à osteoporose, causando uma crescente propensão à fratura<sup>47</sup>.

O tratamento para osteoporose atualmente é feito através da supressão da causa da doença, a destruição excessiva de ossos por osteoclastos. Os compostos mais utilizados na clínica são os bisfosfonatos, mas estes estão relacionados a diversos efeitos adversos, estimulando a busca por compostos mais seguros e eficazes para o tratamento desse quadro patológico<sup>47</sup>.

A catepsina K, uma cisteína protease da família da papaína, é expressa seletivamente em osteoclastos, onde está envolvida na degradação da matriz extracelular e na remodelagem dos ossos<sup>52</sup>. Devido à importância da catepsina K em mediar a atividade de osteoclastos e por ser relativamente abundante e ter atividade enzimática seletiva quando comparada a collagenases celulares, inibidores dessa enzima têm sido desenvolvidos para o tratamento de osteoporose<sup>45</sup>.



AAE-581

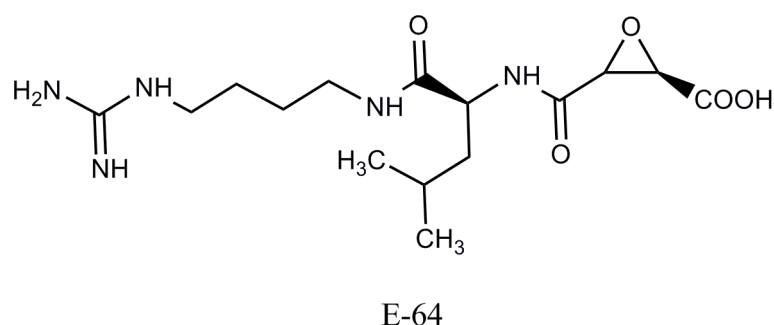
**Figura 4.1** – Estrutura de AAE-581, inibidor de catepsina K.

Inibidores de catepsina K contendo nitrila são conhecidos há algum tempo e estudos de seu mecanismo de ação mostraram que a reação de inibição da catepsina K ocorre de forma reversível<sup>92</sup>. Um estudo na fase II de AAE-581 (Figura 4.1), um inibidor de catepsina K demonstrou um aumento na densidade mineral óssea (DMO) do quadril e da coluna lombar, com uma significativa redução nos marcadores de reabsorção óssea<sup>93</sup>.

<sup>92</sup> E.C. Lucas, A. Williams. *Biochemistry*, 8, (1969) 5125-5135.

<sup>93</sup> Y. Yasuda, J. Kaleta, D. Bromme. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, (2005) 973-993.

Outra catepsina, a catepsina B, é capaz de degradar componentes da matriz extracelular, implicando sua participação em distrofia celular e artrite reumatoide. Sua expressão está localizada na borda externa de tumores sólidos sugerindo o seu envolvimento na degradação da matriz extracelular de tumores e um papel em metástase. Um aumento da expressão e secreção de catepsina B parece estar associado a vários tumores humanos e experimentais, e tem sido proposto como um marcador de prognóstico para vários tipos de câncer. O papel exato de catepsina B em tumores sólidos ainda precisa ser definido, mas foi proposto seu envolvimento em metástase, angiogênese e progressão de tumores. A invasão de células de carcinoma e metástases podem ser inibidas pelo inibidor não específico e reversível de cisteína protease E-64 (Fig. 4.2). Catepsina B é, então, um possível alvo terapêutico para controle de progressão de tumores<sup>94</sup>.



**Figura 4.2** – Estrutura de E-64, inibidor não específico e reversível de catepsina B.

A citotoxicidade de uma série de complexos ciclometalados de Pd(II) contra uma variedade de linhagens celulares tumorais humanas foi avaliada, sendo que a hipótese inicial era que o alvo molecular desses complexos seria o DNA. Mas, após outros estudos, observou-se que esses complexos podiam inibir catepsina B. Além disso, Bincoletto e colaboradores sintetizaram um complexo ciclopaladato N,N-dimetilamina com ponte *bis*(difenilfosfina) ferroceno [Pd<sub>2</sub>(C<sup>2</sup>,N-S(-)dmpa)<sub>2</sub>(μ-dppf)Cl<sub>2</sub>] (Dmpa = ácido dimetilolpropiônico) com atividade inibitória contra catepsina B<sup>94</sup>.

Já foram relatados na literatura complexos de Pd(II) com tiossemicarbazonas com elevada atividade antimicrobiana, como [Pd(AcTsc)Cl], [Pd(HAcTsc)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub>, [Pd(AcTsc)], (HAcTSC = 2-acetilpiridina tiossemicarbazona) com CI<sub>50</sub> inferior a 1 μg/mL contra *Staphylococcus aureus*<sup>56</sup>.

Neste trabalho, obtivemos seis bases de Schiff derivadas 4-formilbenzonitrila (4-FB) e 4-acetilbenzonitrila (4-AB) como protótipos de inibidores de catepsina K. Uma vez que fármacos para o tratamento de osteoporose não devem apresentar atividade antimicrobiana ou citotóxica, testamos suas atividades antifúngica, antibacteriana e antiproliferativa, a fim de

<sup>94</sup> S. P. Fricker. *Metallomics*, 2, (2010) 366–377.

determinar seus perfis citotóxicos e potenciais usos como protótipos de fármacos para o tratamento da osteoporose.

Obtivemos também o complexo de Pd(II) de 4-acetilbenzoni-trila tiossemicarbazona (4-ABT) como protótipo de antitumoral, com possível atuação em catepsina B, e testamos sua atividade antifúngica, antibacteriana e citotóxica.

#### **4.1. Obtenção de 4-formilbenzoni-trila semicarbazona (4-FBS), 4-acetilbenzoni-trila semicarbazona (4-ABS), 4-formilbenzoni-trila tiossemicarbazona (4-FBT), 4-acetilbenzoni-trila tiossemicarbazona (4-ABT), 4-formilbenzoni-trila acetil hidrazona (4-FBH) e 4-acetilbenzoni-trila acetil hidrazona (4-ABH)**

Os derivados de 4-formilbenzoni-trila (4-FB) e 4-acetilbenzoni-trila (4-AB) foram obtidos conforme descrito nos itens 2.2.1 e 2.2.2. A caracterização foi realizada por meio da determinação das suas faixas de fusão, por espectroscopia de IV, UV-vis e por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT e mapas de contorno HMQC (correlação heteronuclear múltiplo-quântica,  $^{13}\text{C}-^1\text{H} \ ^1\text{J}$ ), HMBC (coerência heteronuclear  $^{13}\text{C}-^1\text{H} \ ^2\text{J}$  e  $^3\text{J}$ ) e NOESY (efeito espectroscópico nuclear Overhauser – correlação homonuclear). Um monocristal de 4-formilbenzoni-trila tiossemicarbazona (4-FBT) foi obtido em água mãe e sua estrutura resolvida por Difração de Raios-X.

##### **4.1.1. Faixas de fusão e rendimento**

Na tabela 4.1, estão listados os rendimentos na síntese, cor e os valores das faixas de fusão obtidos para os derivados de 4-FB e 4-AB.

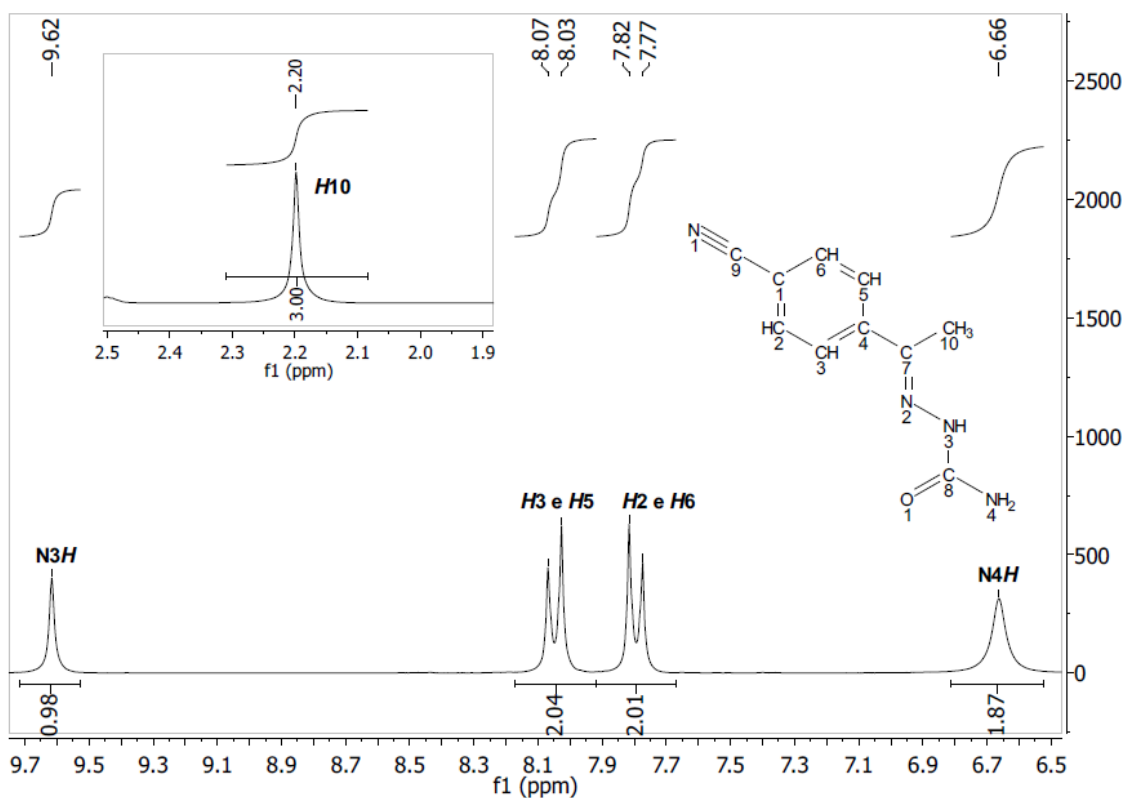
**Tabela 4.1.** Faixa de fusão de derivados de 4-FB e 4-AB.

<b>Composto</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Cor</b>	<b>Faixa de Fusão (°C)</b>
4-ABH	80	Branco	222,3 – 224,2
4-ABS	79	Branco	231,9 – 233,7
4-ABT	93	Branco	230,3 – 231,2
4-FBH	89	Branco	240,0 – 241,5
4-FBS	97	Branco	233,8 – 235,6
4-FBT	94	Branco	234,9 – 236,2

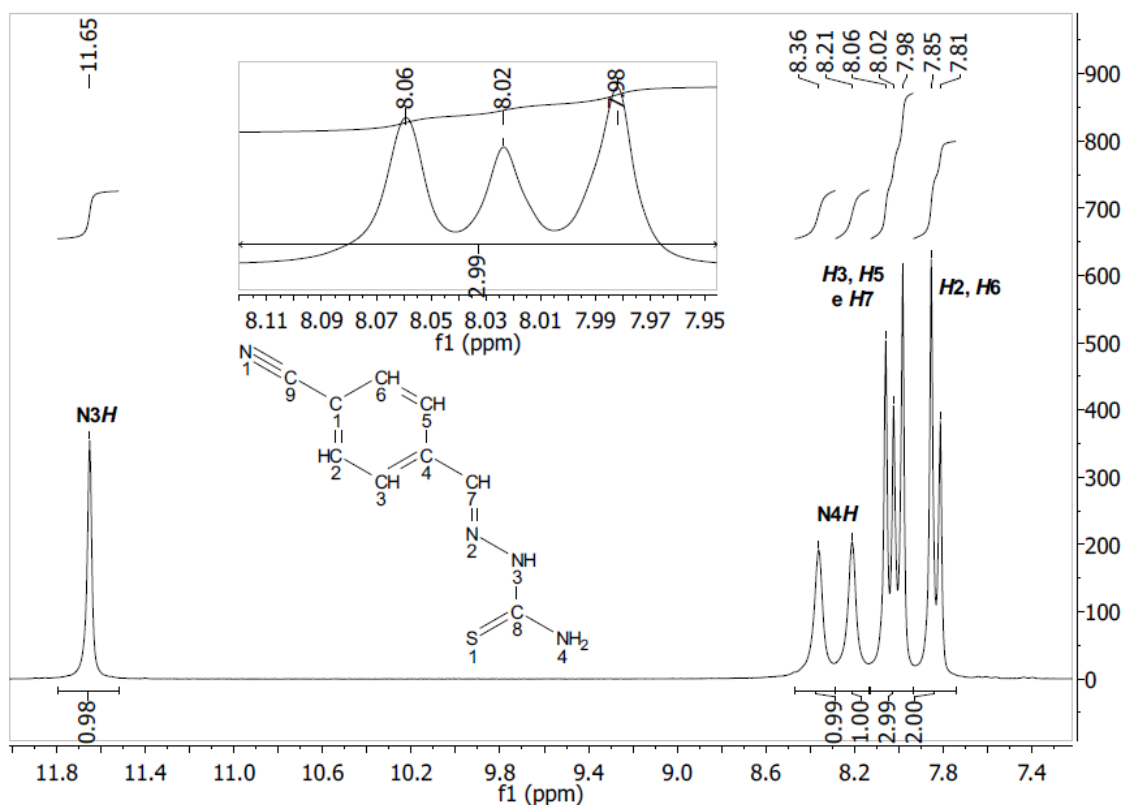
Para que os compostos fossem considerados razoavelmente puros as faixas de fusão teriam que variar no máximo 1,0 °C.

### 4.1.2. Ressonância Magnética Nuclear

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das semicarbazonas e tiossemicarbazonas derivadas de 4-FB e 4-AB (Figuras 4.3 e 4.4) os sinais do hidrogênio  $\text{N3H}$  são simpletos observados entre  $\delta$  9,62 –  $\delta$  11,65. Os hidrogênios ligados a  $\text{N4}$  apresentam-se como um simpleto largo para as semicarbazonas  $\delta$  6,66 (4-ABS) e  $\delta$  6,67 (4-FBS) e dois simpletos entre  $\delta$  6,66 –  $\delta$  8,43 para as tiossemicarbazonas. Os hidrogênios  $\text{H2}$ ,  $\text{H3}$ ,  $\text{H5}$  e  $\text{H6}$  são sistemas  $\text{aa'}$   $\text{bb'}$  observados entre  $\delta$  7,77 –  $\delta$  8,15. Os sinais do hidrogênio  $\text{H7}$  são simpletos observados em  $\delta$  7,86 (4-FBS) e  $\delta$  8,06 (4-FBT). Finalmente, o hidrogênio  $\text{H10}$  apresenta-se como um simpleto em  $\delta$  2,20 (4-ABS) e  $\delta$  2,30 (4-ABT). Os valores das integrações e o número de sinais estão de acordo com o número de hidrogênios da molécula.

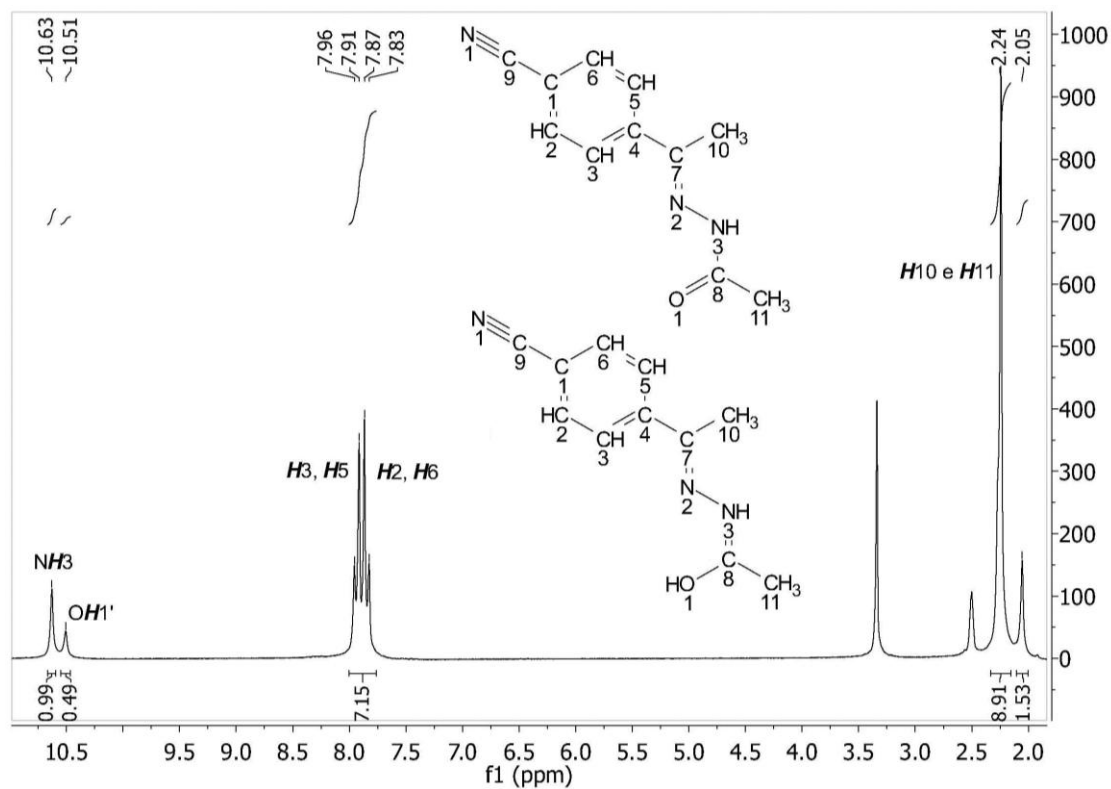


**Figura 4.3** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz) de 4-ABS em  $\text{DMSO-}d_6$  com ampliação nas regiões de 1,90 a 2,50 ppm e 6,50 a 9,70 ppm.

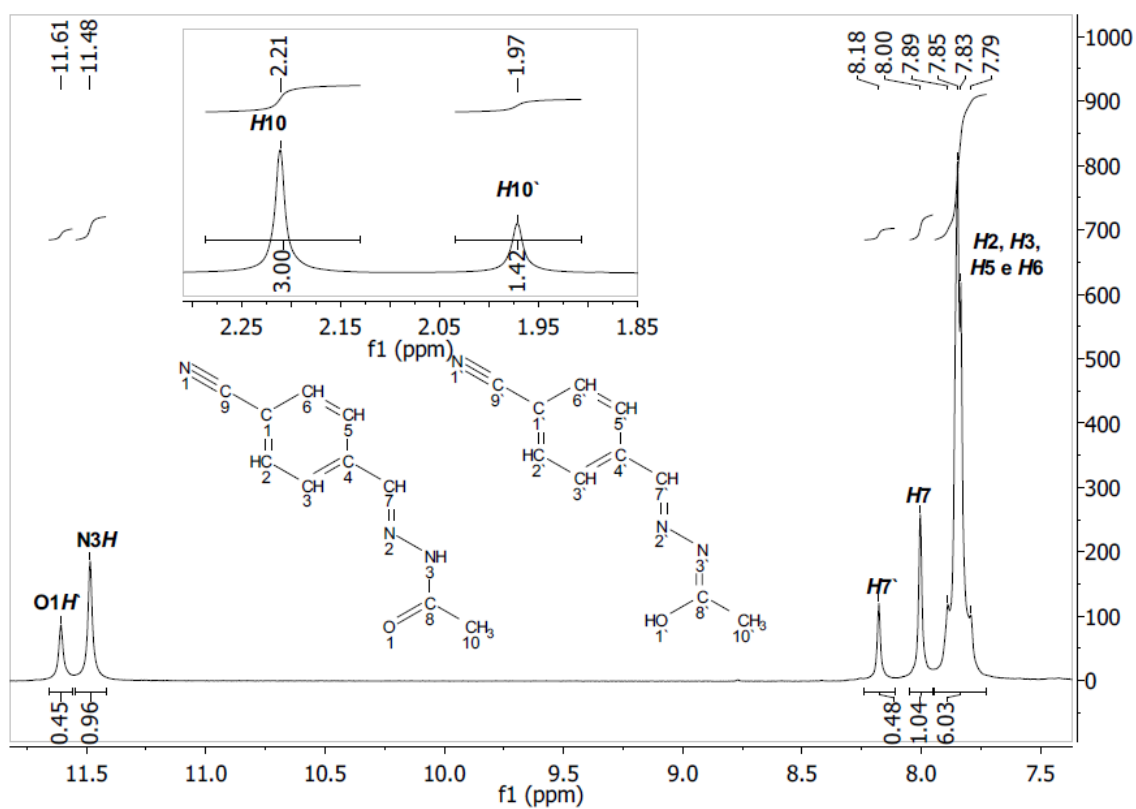


**Figura 4.4** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz) de 4-FBT em  $\text{DMSO-}d_6$  com ampliação nas regiões de 7,92 a 8,12 ppm e 7,4 a 11,8 ppm.

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das acetil hidrazonas derivadas de 4-AB (Figura 4.5) e 4-FB (Figura 4.6) observa-se uma duplicidade nos sinais de  $\text{N3H}$ , de  $\text{H7}$ , de  $\text{H10}$  e de  $\text{H11}$ , sugerindo a presença de tautomerismo ceto-enólico em solução, observado também para a acetil hidrazona descrita anteriormente no Capítulo 3. Os sinais dos hidrogênios  $\text{N3H}$  para 4-ABH e 4-FBH estão em  $\delta$  10,63 e  $\delta$  11,48, respectivamente. Os sinais de  $\text{O1H}$  estão em  $\delta$  10,51 (4-ABH) e  $\delta$  11,61 (4-FBH). Os hidrogênios  $\text{H2}$ ,  $\text{H3}$ ,  $\text{H5}$  e  $\text{H6}$  são sistemas  $a^a b^b$  observados entre  $\delta$  7,79 –  $\delta$  7,96. Os sinais do hidrogênio  $\text{H7}$ , observados para 4-FBH, são simples em  $\delta$  8,00 (ceto) e  $\delta$  8,18 (enol). Os sinais de  $\text{H10}$  para 4-ABH e 4-FBH apresentam-se como simples em  $\delta$  2,24 (ceto),  $\delta$  2,05 (enol) e  $\delta$  2,21 (ceto),  $\delta$  1,97 (enol), respectivamente. Finalmente, o hidrogênio  $\text{H11}$  em 4-ABH apresenta-se como um simples em  $\delta$  2,24. Os valores das integrações e o número de sinais estão de acordo com o número de hidrogênios da molécula.

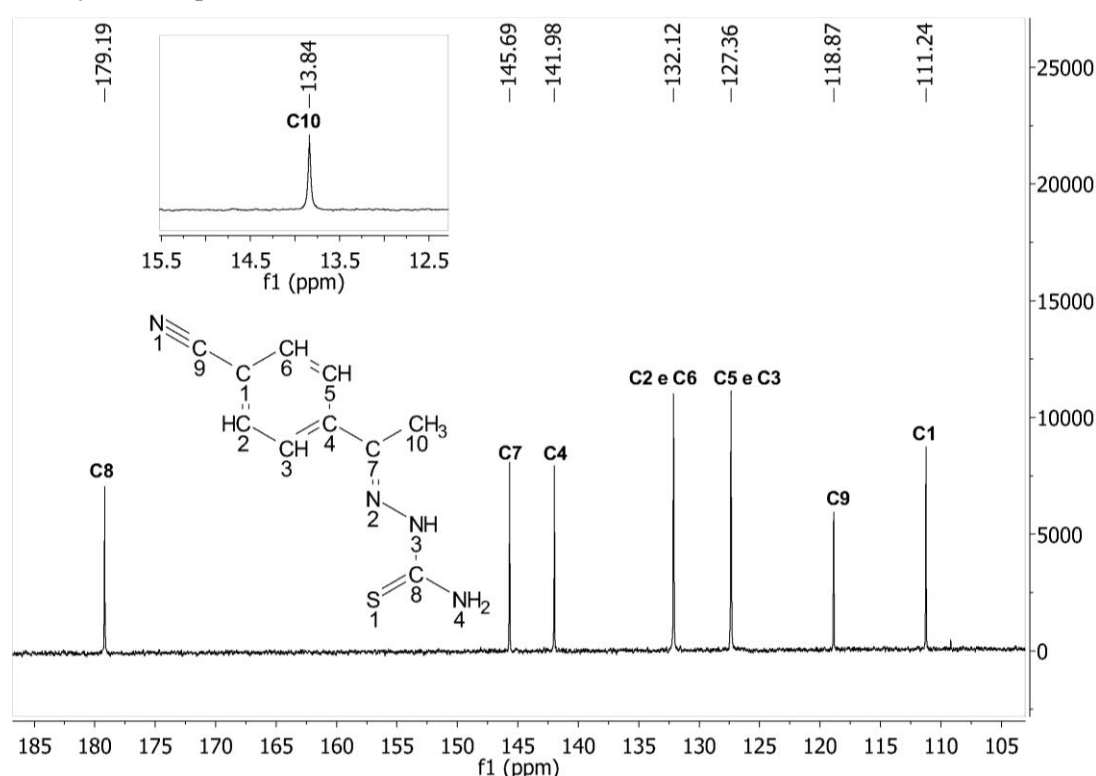


**Figura 4.5** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz) de 4-ABH em  $\text{DMSO-}d_6$  com ampliação nas regiões de 2,0 a 10,5 ppm.

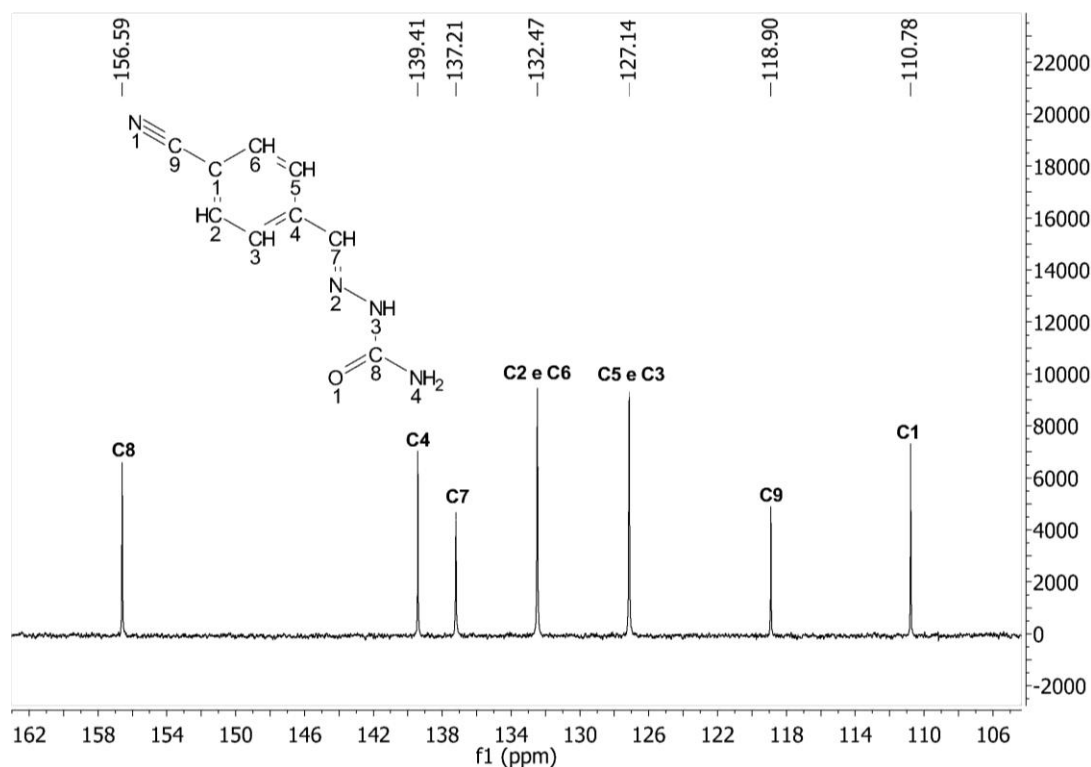


**Figura 4.6** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz) de 4-FBH em  $\text{DMSO-}d_6$  com ampliação nas regiões de 7,5 a 11,5 ppm e 2,25 a 1,95 ppm.

Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das semicarbazonas e tiossemicarbazonas derivadas de 4-FB e 4-AB (Figuras 4.7 e 4.8), os deslocamentos químicos atribuídos a C2 e C6 estão localizados entre  $\delta$  132,10 e  $\delta$  132,50. Os carbonos C3 e C5 possuem deslocamentos químicos entre  $\delta$  126,71 e  $\delta$  127,85. Os deslocamentos atribuídos a C1 e a C4 são observados em  $\delta$  110,50 a  $\delta$  111,52 e  $\delta$  139,41 a  $\delta$  142,13, respectivamente. Os carbonos C7 e C9 possuem, respectivamente, deslocamentos de  $\delta$  137,21 a  $\delta$  145,69 e  $\delta$  118,79 a  $\delta$  118,97. O carbono C8 é observado em regiões distintas para semicarbazonas ( $\delta$  156,59 a  $\delta$  157,18) e tiossemicarbazonas ( $\delta$  178,38 a  $\delta$  179,19), por estar ligado ao oxigênio no primeiro caso e ao enxofre no segundo. O espectro de RMN de DEPT 135 e os mapas de contorno HMQC e HBQC confirmaram as atribuições do espectro de  $^{13}\text{C}$ .

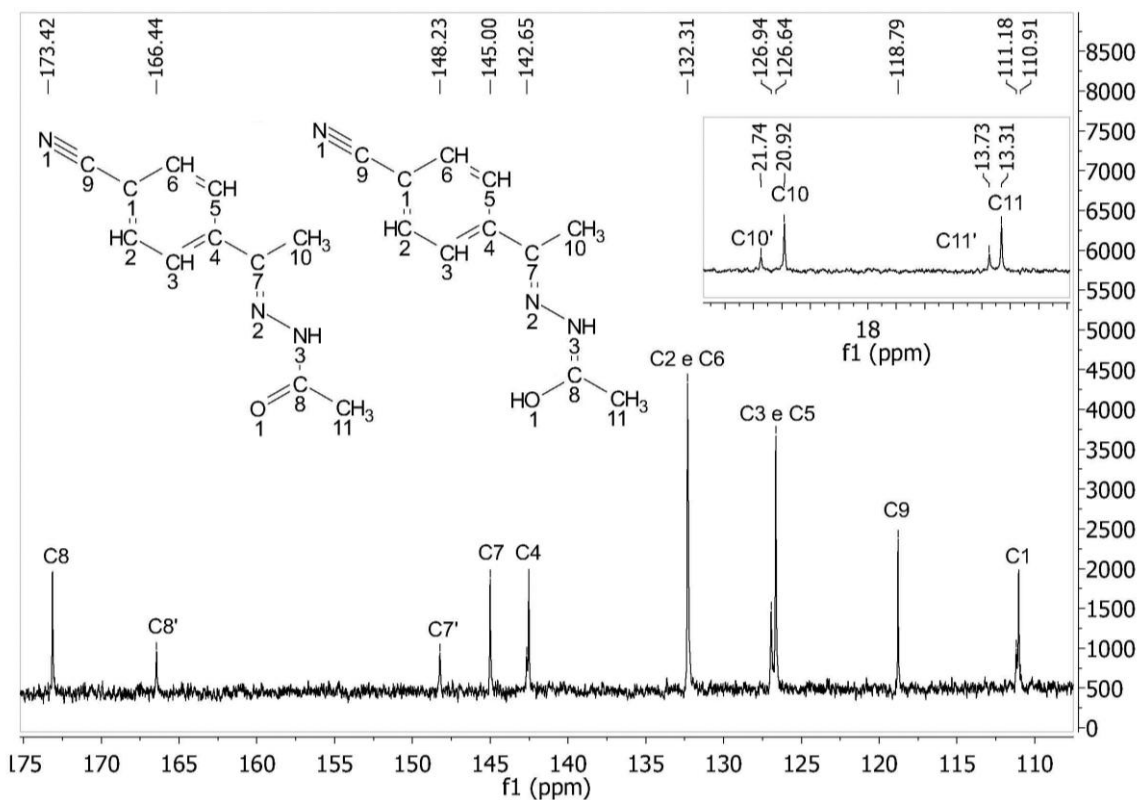


**Figura 4.7** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (200 MHz) de 4-ABT em  $\text{DMSO-}d_6$  com ampliação na região de 105 a 185 ppm e 12,5 a 15,5 ppm.

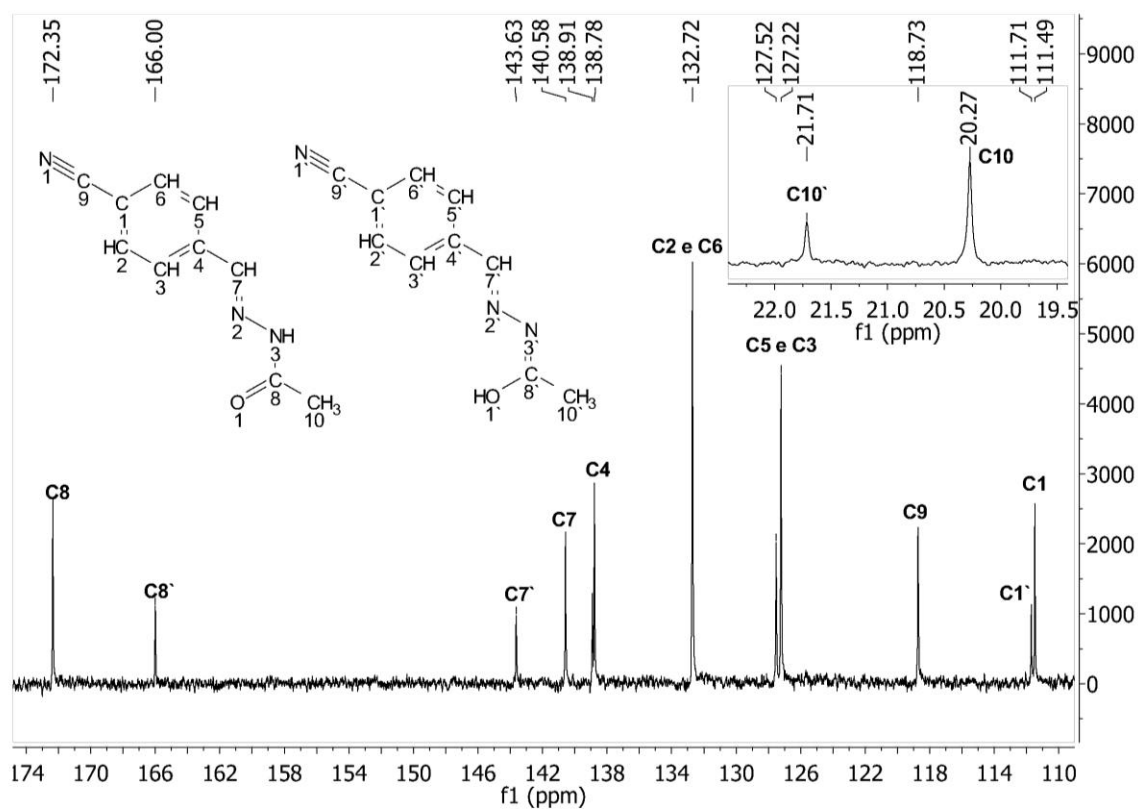


**Figura 4.8** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (200 MHz) de 4-FBS em  $\text{DMSO-}d_6$  com ampliação na região de 106 a 162 ppm.

Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das acetil hidrazonas derivadas de 4-AB e 4-FB (Figuras 4.9 e 4.10), podemos observar através dos valores de deslocamento para o carbono C8 a presença de tautomerismo ceto-enólico, como já foi observado para acetil hidrazona no capítulo 3. Os deslocamentos observados foram  $\delta$  173,42 (ceto) e  $\delta$  166,44 (enol) para 4-ABH e  $\delta$  172,35 (ceto) e  $\delta$  166,00 (enol) para 4-FBH. Os deslocamentos químicos atribuídos a C2 e C6 estão localizados em  $\delta$  132,31 e  $\delta$  132,72, para 4-ABH e 4-FBH respectivamente. Os carbonos C3 e C5 possuem deslocamentos químicos entre  $\delta$  126,64 e  $\delta$  127,52. Os deslocamentos atribuídos a C1 e a C4 são observados, respectivamente, de  $\delta$  110,91 a  $\delta$  111,91 e  $\delta$  138,78 a  $\delta$  142,65. O carbono C7 apresenta sinais duplicados para os dois compostos, que são observados entre  $\delta$  140,58 e  $\delta$  148,23. O carbono C9 possui deslocamentos  $\delta$  118,79 e  $\delta$  118,71, para 4-ABH e 4-FBH respectivamente. O carbono C10 é observado entre  $\delta$  20,27 e  $\delta$  21,74. Finalmente, o carbono C11 (somente para 4-ABH) é observado em  $\delta$  13,31 (ceto) e  $\delta$  13,73 (enol). O espectro de RMN de DEPT 135 e os mapas de contorno HMQC e HBQC confirmaram as atribuições do espectro de  $^{13}\text{C}$ .



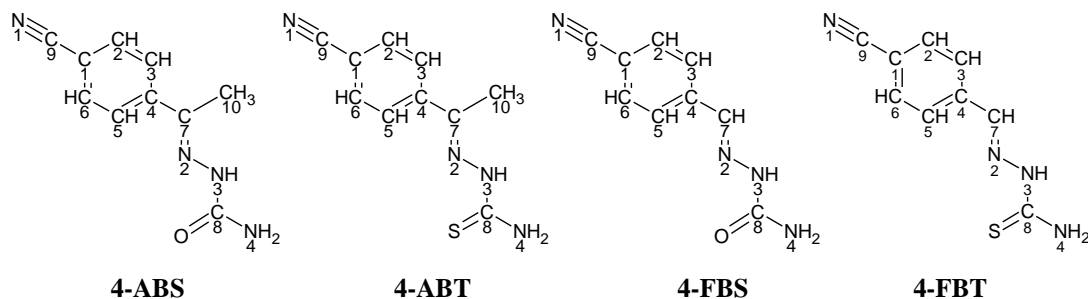
**Figura 4.9** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (200 MHz) de 4-ABH em  $\text{DMSO-}d_6$  com ampliação na região de 110 a 175 ppm.



**Figura 4.10** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (200 MHz) de 4-FBH em  $\text{DMSO-}d_6$  com ampliação na região de 110 a 174 ppm e 19,5 a 22,0 ppm.

As Tabelas 4.2 e 4.3 relacionam os deslocamentos químicos citados anteriormente para os derivados de 4-FB e 4-AB.

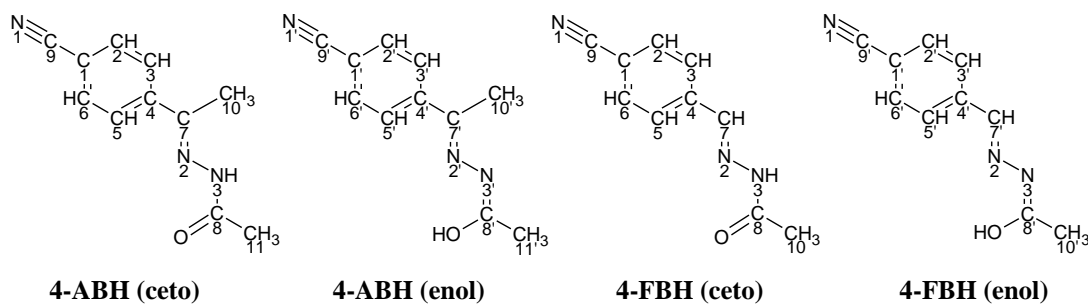
**Tabela 4.2.** Atribuições, multiplicidade (M), número de átomos (n°) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em DMSO- $d_6$  dos derivados de 4-FB e 4-AB.



Atribuição	Compostos $\delta$ (ppm)											
	4-ABS	n°	M	4-ABT	n°	M	4-FBS	n°	M	4-FBT	n°	M
<i>H2</i>	7,82 - 7,77	1	aa`	7,83 - 7,79	1	aa`	7,89 - 7,79	1	aa`	7,85 - 7,81	1	aa`
<i>H3</i>	8,07 - 8,03	1	bb`	8,15 - 8,11	1	bb`	7,95 - 7,99	1	bb`	8,02 - 7,98	1	bb`
<i>H5</i>	8,07 - 8,03	1	bb`	8,15 - 8,11	1	bb`	7,95 - 7,99	1	bb`	8,02 - 7,98	1	bb`
<i>H6</i>	7,82 - 7,77	1	aa`	7,83 - 7,79	1	aa`	7,89 - 7,79	1	aa`	7,85 - 7,81	1	aa`
<i>H7</i>	-	-	-	-	-	-	7,86	1	s	8,06	1	s
<i>H10</i>	2,20	3	s	2,30	3	s	-	-	-	-	-	-
<i>N3H</i>	9,62	1	s	10,40	1	s	10,55	1	s	11,65	1	s
<i>N4H</i>	6,66	2	s	8,15 - 8,11 8,43	1 1	s	6,67	2	s	8,36 8,21	2	s
<i>C1</i>	110,50	1	C	111,24	1	C	110,78	1	C	111,52	1	C
<i>C2</i>	132,10	1	CH	132,12	1	CH	132,47	1	CH	132,50	1	CH
<i>C3</i>	126,71	1	CH	127,36	1	CH	127,14	1	CH	127,85	1	CH
<i>C4</i>	142,13	1	C	141,98	1	C	139,41	1	C	140,05	1	C
<i>C5</i>	126,71	1	CH	127,36	1	CH	127,14	1	CH	127,85	1	CH
<i>C6</i>	132,10	1	CH	132,12	1	CH	132,47	1	CH	132,50	1	CH
<i>C7</i>	143,55	1	C	145,69	1	C	137,21	1	C	138,81	1	C
<i>C8</i>	157,18	1	C	179,19	1	C	156,59	1	C	178,39	1	C
<i>C9</i>	118,97	1	C	118,87	1	C	118,90	1	C	118,79	1	C
<i>C10</i>	13,05	1	CH	13,84	1	CH	-	-	-	-	-	-

s = simpleto

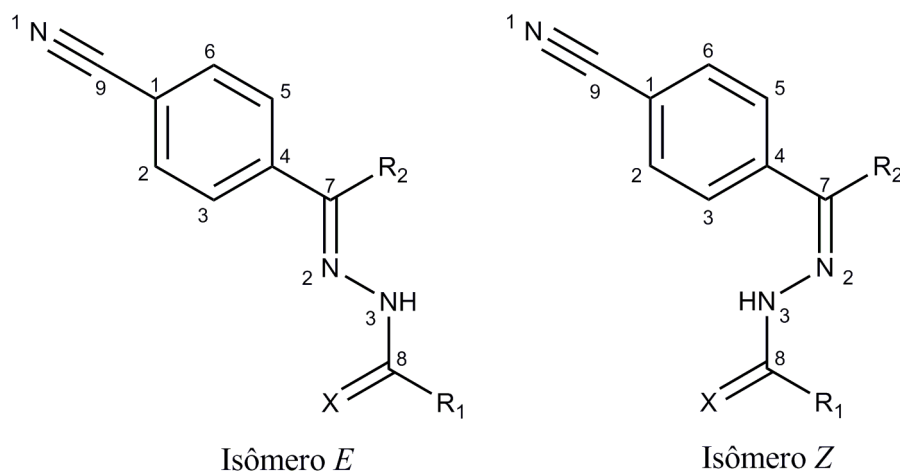
**Tabela 4.3.** Atribuições, multiplicidade (M), número de átomos (n°) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em  $\text{DMSO-d}_6$  dos derivados acetil hidrazona de 4-FB e 4-AB.



Atribuição	Compostos $\delta$ (ppm)									
	4-ABH					4-FBH				
	Ceto	n°	Enol	n°	M	Ceto	n°	Enol	n°	M
<b>H2</b>	7,87 – 7,83	1	7,87 – 7,83	0,5	aa`	7,89 – 7,79	1	7,89 – 7,79	0,5	aa`
<b>H3</b>	7,96 – 7,91	1	7,96 – 7,91	0,5	bb`	7,89 – 7,79	1	7,89 – 7,79	0,5	bb`
<b>H5</b>	7,96 – 7,91	1	7,96 – 7,91	0,5	bb`	7,89 – 7,79	1	7,89 – 7,79	0,5	bb`
<b>H6</b>	7,87 – 7,83	1	7,87 – 7,83	0,5	aa`	7,89 – 7,79	1	7,89 – 7,79	0,5	aa`
<b>H7</b>	-	-	-	-	-	8,00	1	8,18	1	s
<b>H10</b>	2,24	3	2,05	1,43	s	2,21	3	1,97	1,42	s
<b>H11</b>	2,24	3	2,24	1,43	-	-	-	-	-	-
<b>N3H/ O1H</b>	10,63	1	10,51	0,5	s	11,48	1	11,61	0,5	s
<b>C1</b>	110,91	1	111,18	1	C	111,49	1	111,71	1	C
<b>C2</b>	132,31	1	132,31	1	CH	132,72	1	132,72	1	CH
<b>C3</b>	126,94	1	126,64	1	CH	127,22	1	127,52	1	CH
<b>C4</b>		1	142,65	1	C	138,78	1	138,91	1	C
<b>C5</b>	126,94	1	126,64	1	CH	127,22	1	127,52	1	CH
<b>C6</b>	132,31	1	132,31	1	CH	132,72	1	132,72	1	CH
<b>C7</b>	145,00	1	148,23	1	C	140,58	1	143,63	1	C
<b>C8</b>	173,42	1	166,44	1	C	172,35	1	166,00	1	C
<b>C9</b>	118,79	1	118,79	1	C	118,71	1	118,71	1	C
<b>C10</b>	20,92	1	21,74	1	CH	20,27	1	21,71	1	CH
<b>C11</b>	13,31	1	13,73	1	CH	-	-	-	-	-

s = simpleto

Como já foi mencionado anteriormente no Capítulo 3, bases de Schiff podem apresentar isômeros *E* e *Z* (Figura 4.11). Os espectros e mapas de contorno discutidos anteriormente evidenciam a presença de apenas um dos isômeros para as semicarbazonas e para as tiossemicarbazonas, uma vez que não foram observados sinais duplicados. Já as acetil hidrazonas apresentam sinais duplicados sugerindo a interconversão de tautômeros em solução<sup>95,96</sup>. Com o objetivo de definir os isômeros existentes em solução, foram obtidos os mapas de contorno NOESY para os compostos.

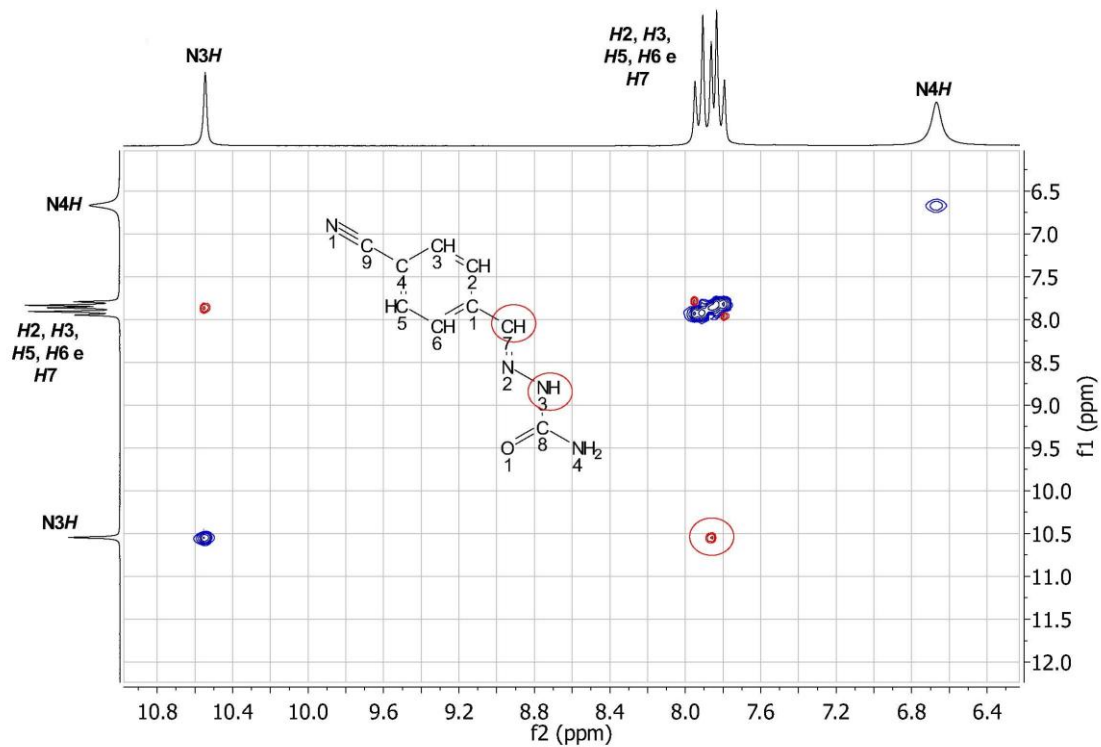


**Figura 4.11** – Isômeros *E* e *Z* para semicarbazona ( $R_1 = \text{NH}_2$ ;  $X = \text{O}$ ), tiossemicarbazona ( $R_1 = \text{NH}_2$ ;  $X = \text{S}$ ) e acetil hidrazona ( $R_1 = \text{CH}_3$ ;  $X = \text{O}$ ) derivadas de 4-FB ( $R_2 = \text{H}$ ) e 4-AB ( $R_2 = \text{CH}_3$ ).

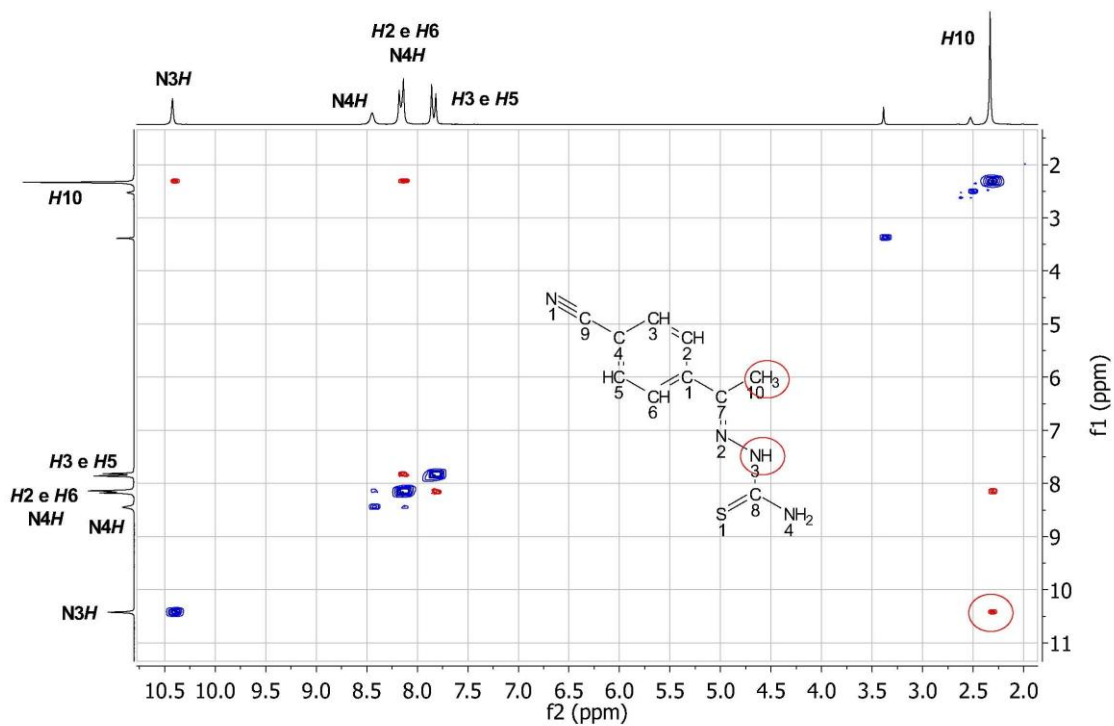
Para o isômero *E*, deve-se observar uma correlação entre *H7* e *N3H* (derivados de 4-FB) ou *H10* e *N3H* (derivados de 4-AB), sendo esta a correlação mais importante para a determinação da configuração da molécula. Essas correlações foram observadas nos mapas de contorno NOESY para 4-FBS e 4-ABT (Figuras 4.12 e 4.13), além de correlações entre os hidrogênios aromáticos (*H2* com *H3*, *H5* com *H6*). Os compostos 4-FBT, 4-FBH, 4-ABS e 4-ABH apresentam mapas de contorno NOESY semelhantes aos apresentados abaixo, mostrando também as correlações do isômero *E*.

<sup>95</sup> X-C Chen, T. Tao, Y-G Wang, Y-X Peng, W. Huang, H-F Qian. Dalton Trans. 41 (2012) 11107–11115.

<sup>96</sup> A. Kakanejadifard, F. Azarbani, A. Zabardasti, S. Kakanejadifard, M. Ghasemian, F. Esna-ashari, S. Omidi, S. Shirali, M. Rafieefar. Dyes and Pigments, 97 (2013) 215-221.



**Figura 4.12** – Mapa de contorno NOESY (200 MHz) de 4-FBS em DMSO- $d_6$ , evidenciando as correlações existentes e o isômero *E* relacionado.



**Figura 4.13** – Mapa de contorno NOESY (200 MHz) de 4-ABT em DMSO- $d_6$ , evidenciando as correlações existentes e o isômero *E* relacionado.

### 4.1.3. Espectroscopia no Infravermelho

As principais bandas nos espectros no infravermelho dos derivados de 4-FB e 4-AB encontram-se na Tabela 4.4.

As bandas referentes ao estiramento de N-H para o N4 encontram-se entre 3390 e 3466  $\text{cm}^{-1}$  para as semicarbazonas e tiossemicarbazonas. As vibrações correspondentes ao estiramento N-H para o N3 são observadas entre 2968 e 3252  $\text{cm}^{-1}$ . As vibrações atribuídas ao estiramento  $\text{C}\equiv\text{N}$  estão entre 2220 e 2232  $\text{cm}^{-1}$ . Para as hidrazonas e semicarbazonas as bandas entre 1676 e 1698  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento do grupo  $\text{C}=\text{O}$  e para as tiossemicarbazonas as bandas em 842 e 838  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento do grupo  $\text{C}=\text{S}$ . Para as tiossemicarbazonas foi observada também uma banda em 1582 e 1536  $\text{cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento de CSC. Finalmente, os estiramentos do grupo  $\text{C}=\text{N}$  são observados entre 1578 e 1618  $\text{cm}^{-1}$ .

**Tabela 4.4.** Bandas nos espectros no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) dos derivados de 4-FB e 4-AB. – suporte: KBr (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ).

Composto	4-ABH	4-ABS	4-ABT	4-FBH	4-FBS	4-FBT
$\nu(\text{NH}_2)$	-	3474 F	3390 m	-	3466 F	3418 m
$\nu(\text{NH})$	3182 f	3196 m	3252 m	2968 m	3148 m	3152 m
$\nu(\text{C}\equiv\text{N})$	2222 m	2226 m	2232 m	2225 F	2228 F	2220 m
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1676 F	1698 F	-	1682 F	1690 F	-
$\nu(\text{CSC})$	-	-	1582 F	-	-	1536 F
$\nu(\text{C}=\text{S})$	-	-	842 F	-	-	838 m
$\nu(\text{C}=\text{N})$	1598 m	1578 m	1618 F	1600 F	1582 F	1602 F

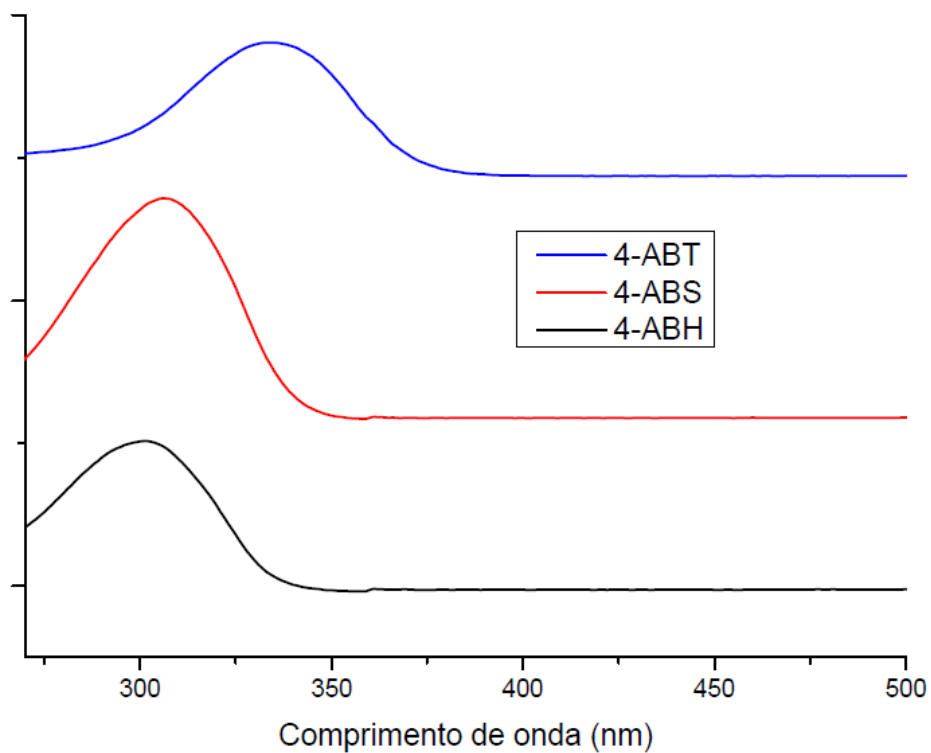
F = forte; m = média; f = fraca

### 4.1.4. Espectroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-vis)

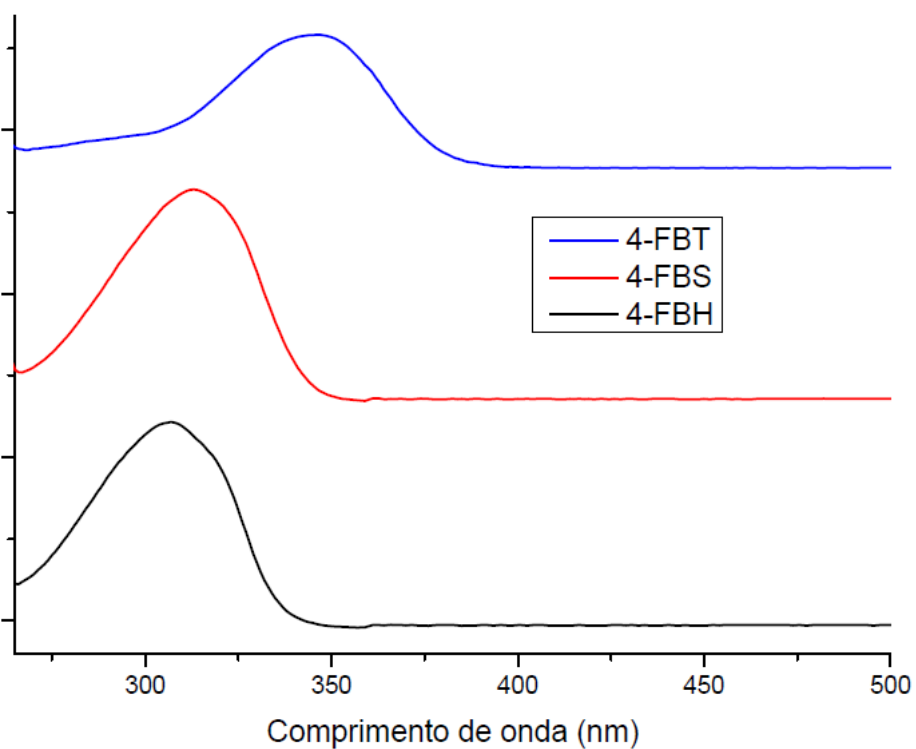
Os espectros eletrônicos dos derivados de 4-AB e 4-FB foram obtidos em DMF. Com a condensação do aldeído com hidrazida, semicarbazida e tiossemicarbazida observa-se um deslocamento batocrômico da banda primária ( $\pi-\pi^*$  do anel aromático) do espectro eletrônico do aldeído (266 nm 4-FB e 267 nm 4-AB)<sup>97</sup>. As bandas das transições  $\pi-\pi^*$  do anel aromático e as transições  $n-\pi^*$  apresentam-se sobrepostas e foram observadas entre 301 - 361 nm (Figuras

<sup>97</sup> R. L. Hinmani. Ultraviolet spectra of hydrazones of aromatic aldehydes, 25, (1960) 1775-1778.

4.14 e 4.15). Os valores dos comprimentos de onda nos máximos de absorvância estão na Tabela 4.5.



**Figura 4.14** – Espectros eletrônicos de derivados de 4-AB em DMF.



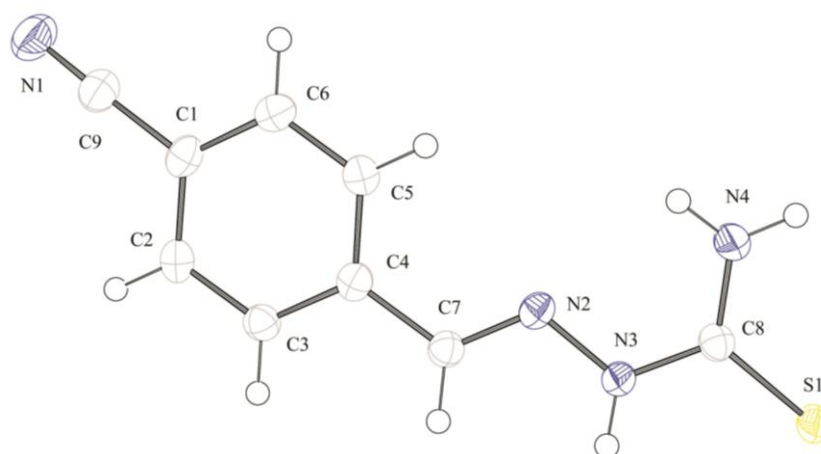
**Figura 4.15** – Espectros eletrônicos de derivados de 4-FB em DMF.

**Tabela 4.5.** Bandas nos espectros eletrônicos (nm) dos derivados de 4-FB e 4-AB em DMF.

Composto	4-ABH	4-ABS	4-ABT	4-FBH	4-FBS	4-FBT
$\pi$ - $\pi^*$	301	306	335	307	313	346
n- $\pi^*$	301	306	360	318	320	361

#### 4.1.5. Cristalografia de Raios X

Cristais de 4-FBT foram obtidos da água mãe da reação de condensação de 4-formilbenzonitrila com tiossemicarbazida. A estrutura do cristal foi determinada usando Difração de Raios X de monocristal. Figuras do empacotamento e o mapa molecular foram preparados usando MERCURY<sup>84</sup> e ORTEP<sup>85</sup>, respectivamente. As Tabelas foram geradas usando WINGX suíte<sup>86</sup>. A estrutura já havia sido obtida por Wu et al 2009<sup>98</sup>. O diagrama ORTEP de 4-FBT está representado na Figura 4.16. A molécula apresenta configuração *E*, como observado nos espectros de RMN.



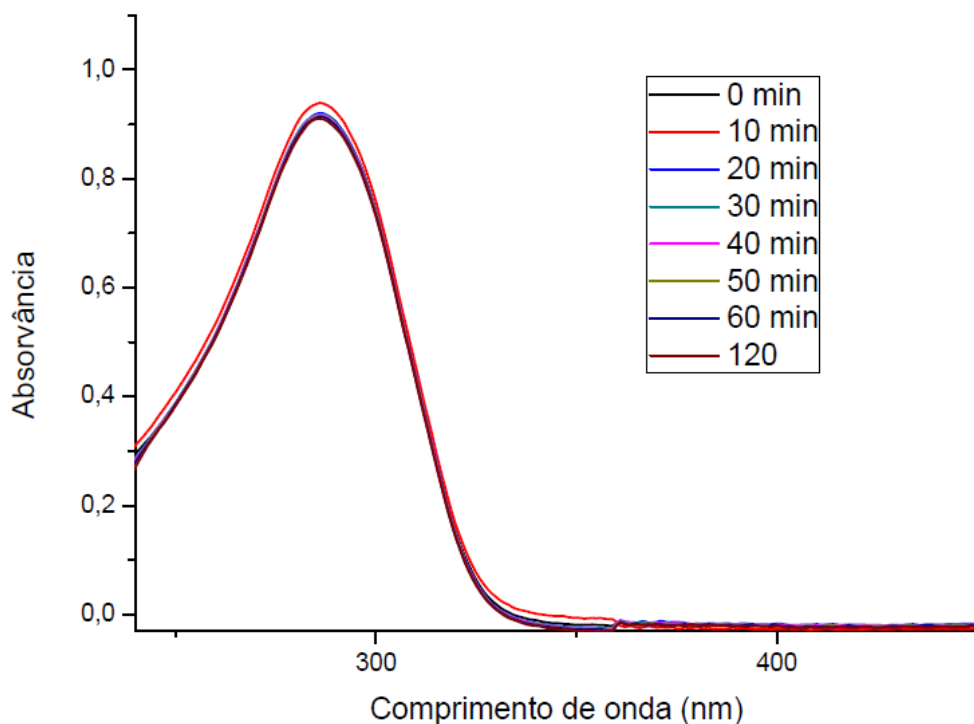
**Figura 4.16** – Diagrama ORTEP para 4-FBT com elipsóides térmicos com probabilidade de 50% e com átomos enumerados, exceto os de hidrogênio. Átomos de hidrogênio são desenhados como círculos de raios arbitrários.

#### 4.1.6. Estudo preliminar de estabilidade

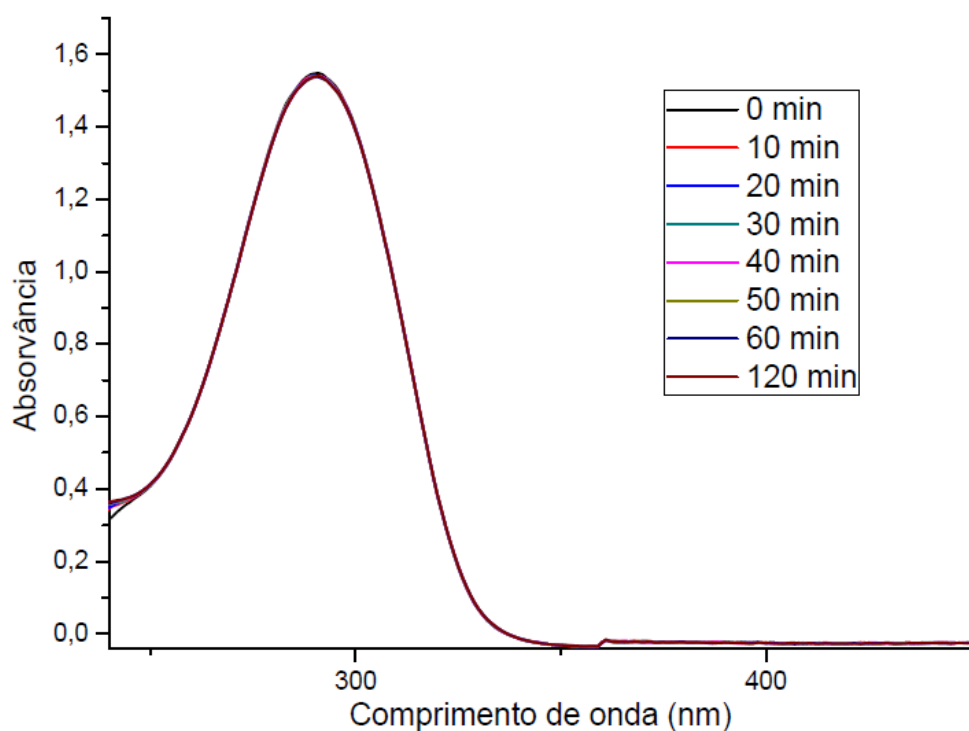
Para avaliar a estabilidade dos derivados de 4-AB e 4-FB em meio fisiológico foi feito um estudo preliminar por espectroscopia no ultravioleta em tampão PBS (pH 7,4) na concentração de 40  $\mu$ M em 5% de DMSO e temperatura ambiente.

<sup>98</sup> D.-H. Wu, Y.-H. Zhang, Z.-F. Li, Y.-H. Li, Acta Crystallographica (2009). E65, o107. Doi:10.1107/S1600536808041792

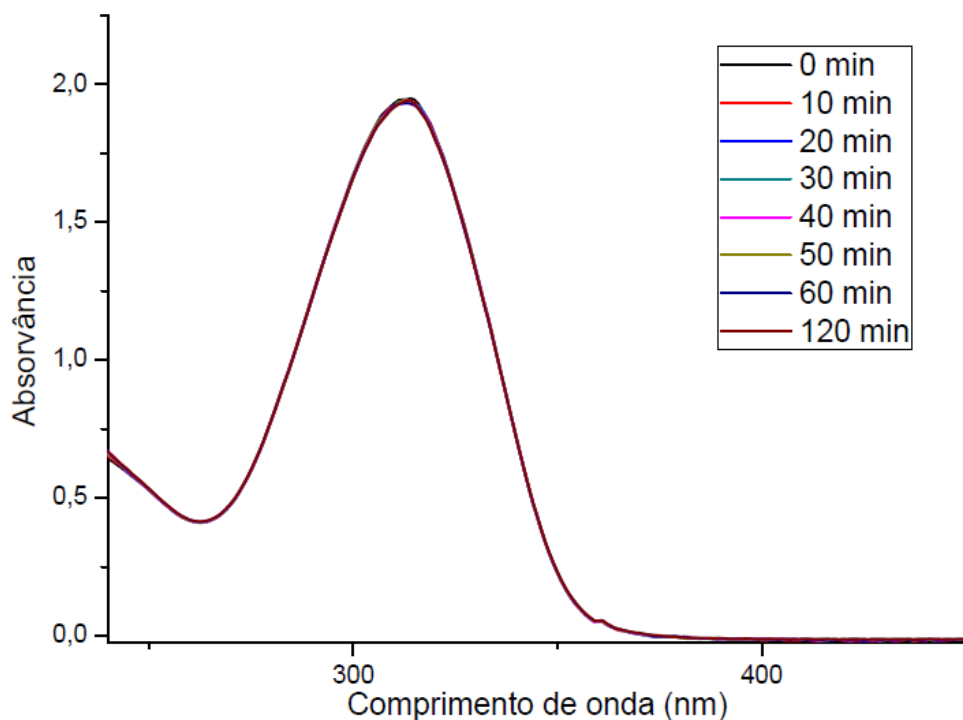
Os espectros eletrônicos dos derivados de 4-AB e 4-FB (Figuras 4.17 a 4.19) ao longo do tempo (2 horas) se sobrepõem, sugerindo que nas condições do experimento não houve hidrólise para esses compostos.



**Figura 4.17** – Espectros eletrônicos do composto 4-ABH (40  $\mu$ M em 5% de DMSO) em tampão PBS (pH 7,4) com o tempo e a temperatura ambiente.



**Figura 4.18** – Espectros eletrônicos do composto 4-ABS (40  $\mu$ M em 5% de DMSO) em tampão PBS (pH 7,4) com o tempo e a temperatura ambiente.



**Figura 4.19** – Espectros eletrônicos do composto 4-ABT (40  $\mu\text{M}$  em 5% de DMSO) em tampão PBS (pH 7,4) com o tempo e a temperatura ambiente.

#### 4.2. Atividade antimicrobiana

Todos os compostos foram testados contra o crescimento de bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e de fungos *Candida albicans* e *Candida glabrata*. Os compostos não apresentaram atividade significativa quando comparados aos controles positivos (fluconazol (*C. albicans*), cetoconazol (*C. glabrata*), tetraciclina (*P. aeruginosa* e *S. aureus*) e ciprofloxacina (*S. epidermidis* e *E. faecalis*) e se mostraram aptos a serem avaliados como possíveis compostos para tratamento da osteoporose por meio da inibição de Catepsina K.

#### 4.3. Atividade citotóxica

A atividade citotóxica foi avaliada para os derivados de 4-FB e 4-AB em leucemia mieloide (HL60), leucemia linfoide (Jurkat) e carcinomas mamários (MCF-7 e MDA-MB). A porcentagem de inibição da proliferação celular para os compostos está representada na Tabela 4.6.

Os compostos não apresentaram atividade citotóxica frente às linhagens de células analisadas. Para que esses compostos sejam testados como inibidores de catepsina K, espera-se que eles sejam seletivos, agindo somente sobre a catepsina K. Portanto, o resultado obtido

também é promissor para dar continuidade aos estudos em catepsina K, que serão feitos posteriormente.

**Tabela 4.6.** Porcentagem de inibição da proliferação celular em leucemia mieloide (HL60), leucemia linfóide (Jurkat) e carcinoma mamário (MDA-MB). Os valores representados são a média dos dois experimentos.

Composto	HL60	Jurkat	MDA-MB
4-ABH	inativo	inativo	15,00
4-ABS	inativo	5,00	9,53
4-ABT	inativo	8,00	11,95
4-FBH	inativo	inativo	inativo
4-FBS	inativo	inativo	inativo
4-FBT	inativo	inativo	inativo

#### 4.4. Caracterização do complexo de Pd(II) com 4-acetilbenzotriazina tiossemicarbazona (4-ABT)

O complexo de Pd(II) do composto 4-ABT foi obtido conforme descrito no item 2.2.4. O complexo foi caracterizado por análise elementar, medidas de condutividade, por seus espectros no infravermelho, ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e termogravimetria.

O complexo apresentou faixa de fusão superior a  $300^\circ\text{C}$ . Não se observou fusão nas faixas temperatura dos produtos de partida.

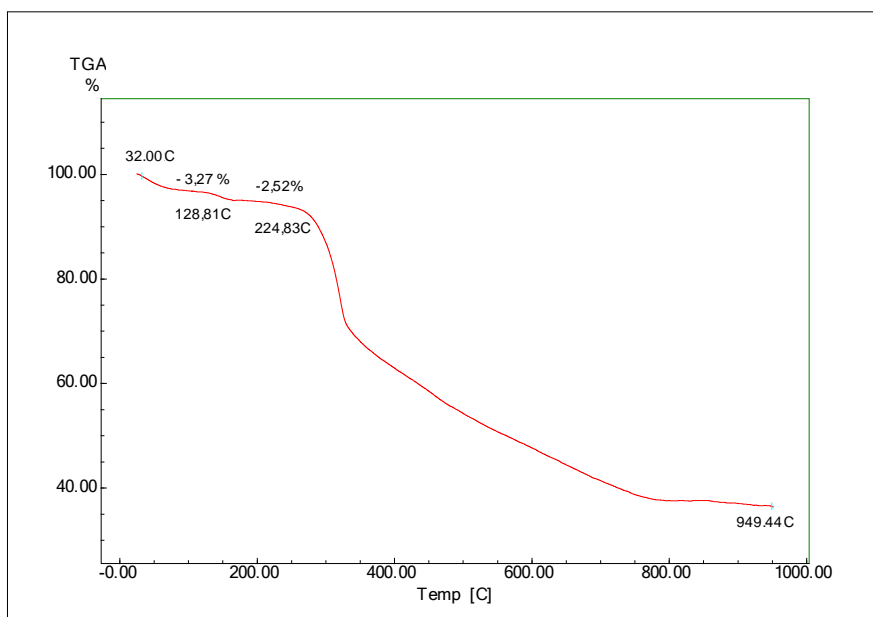
**Tabela 4.7.** Análise elementar (valores teóricos entre parêntesis), massa molar e condutividade molar ( $\Lambda_M$ ) do complexo de Pd(II) do composto 4-ABT.

Composto	Rendimento (%)	C (%)	H (%)	N (%)	MM (g.mol <sup>-1</sup> )	$\Lambda_M^a$
[Pd(4-ABT)Cl <sub>2</sub> ] ·0,75H <sub>2</sub> O·0,25EtOH (1)	94	29,81 (30,06)	2,43 (2,88)	13,34 (13,35)	417,30	6,30

<sup>a</sup> $\Lambda_M$ : ( $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ ) DMF~ $1,0 \times 10^{-3}\text{mol.L}^{-1}$ .

Os resultados sugerem a formação do complexo neutro [Pd(4-ABT)Cl<sub>2</sub>]·0,75H<sub>2</sub>O·0,25EtOH. O resultado da análise térmica (curva TG) do complexo (1) evidenciou duas perdas de massa de 3,27% e 2,52%, em  $128,81^\circ\text{C}$  e  $224,83^\circ\text{C}$ , respectivamente (Figura

4.20), confirmando a presença de 0,75 moléculas de água (valor teórico: 3,22%) e 0,25 moléculas de etanol (valor teórico: 2,74%) no complexo.



**Figura 4.20** – Curva termogravimétrica para o complexo  $[Pd(4-ABT)Cl_2] \cdot 0,75H_2O \cdot 0,25EtOH$ .

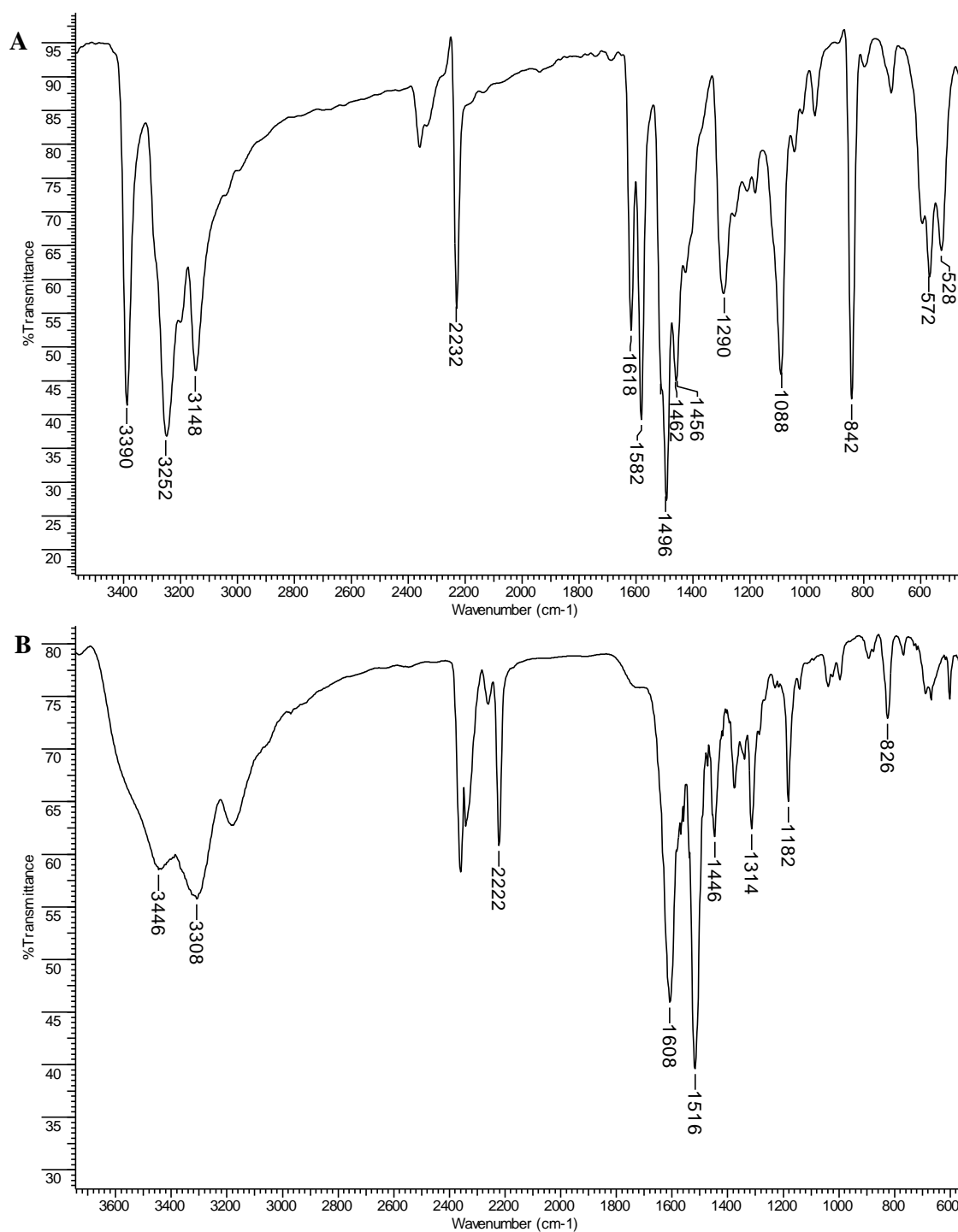
#### 4.4.1. Espectroscopia no Infravermelho

As principais bandas nos espectros no infravermelho do complexo  $[Pd(4-ABT)Cl_2] \cdot 0,75H_2O \cdot 0,25EtOH$  (Figura 4.21, **B**) e do respectivo ligante (4-ABT, Figura 4.21 **A**) encontram-se na Tabela 4.8.

**Tabela 4.8.** Bandas nos espectros no infravermelho ( $cm^{-1}$ ) do complexo de paládio de  $[Pd(4-ABT)Cl_2] \cdot 0,75H_2O \cdot 0,25EtOH$  e 4-ABT. – suporte: KBr ( $4000-400\ cm^{-1}$ ).

Composto	4-ABT	$[Pd(4-ABT)Cl_2] \cdot 0,75H_2O \cdot 0,25EtOH$
$\nu(NH_2)$	3390 m	3446 m
$\nu(NH)$	3252 m	3308 m
$\nu(OH)$	-	3308 m
$\nu(C \equiv N)$	2232 m	2222 m
$\nu(C=S)$	1582 F	1516 F
$\nu(C=S)$	842 F	826 m
$\nu(C=N)$	1618 F	1608 F

F = forte; m = média



**Figura 4.21** – Espectro no infravermelho de (A) 4-ABT e (B)  $[\text{Pd}(4\text{-ABT})\text{Cl}_2] \cdot 0,75\text{H}_2\text{O} \cdot 0,25\text{EtOH}$ .

No complexo, a banda referente ao modo  $\nu(\text{NH})$  presente em  $3252 \text{ cm}^{-1}$  se deslocou para  $3308 \text{ cm}^{-1}$ , se sobrepondo a banda referente a  $\nu(\text{OH})$  da água. A vibração atribuída ao estiramento  $\text{C}\equiv\text{N}$  sofreu um deslocamento de  $10 \text{ cm}^{-1}$ , passando de  $2232 \text{ cm}^{-1}$  a  $2222 \text{ cm}^{-1}$ .

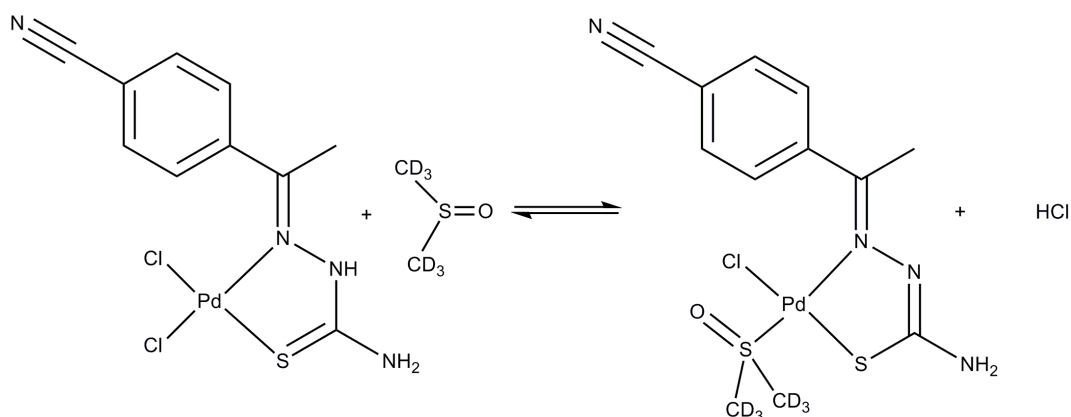
A complexação ao Pd(II) também provocou o deslocamento do modo  $\nu(\text{C}=\text{N})$ , de  $1618 \text{ cm}^{-1}$  no ligante para  $1608 \text{ cm}^{-1}$ , sugerindo a coordenação ao paládio por meio do

nitrogênio imínico<sup>90</sup>. As bandas atribuídas a  $\nu(\text{C}=\text{S})$  e  $\nu(\text{CSC})$  também se deslocaram de  $842\text{ cm}^{-1}$  e  $1582\text{ cm}^{-1}$  para  $826$  e  $1516\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo a coordenação do ligante pelo enxofre.

Dessa forma, os espectros no infravermelho sugeriram que o ligante se coordenou ao Pd(II) de modo bidentado, pelo sistema NS. Além disso, uma nova banda referente ao modo  $\nu(\text{OH})$  é observada no espectro do complexo em  $3308\text{ cm}^{-1}$ , confirmando a presença de água sugerida anteriormente.

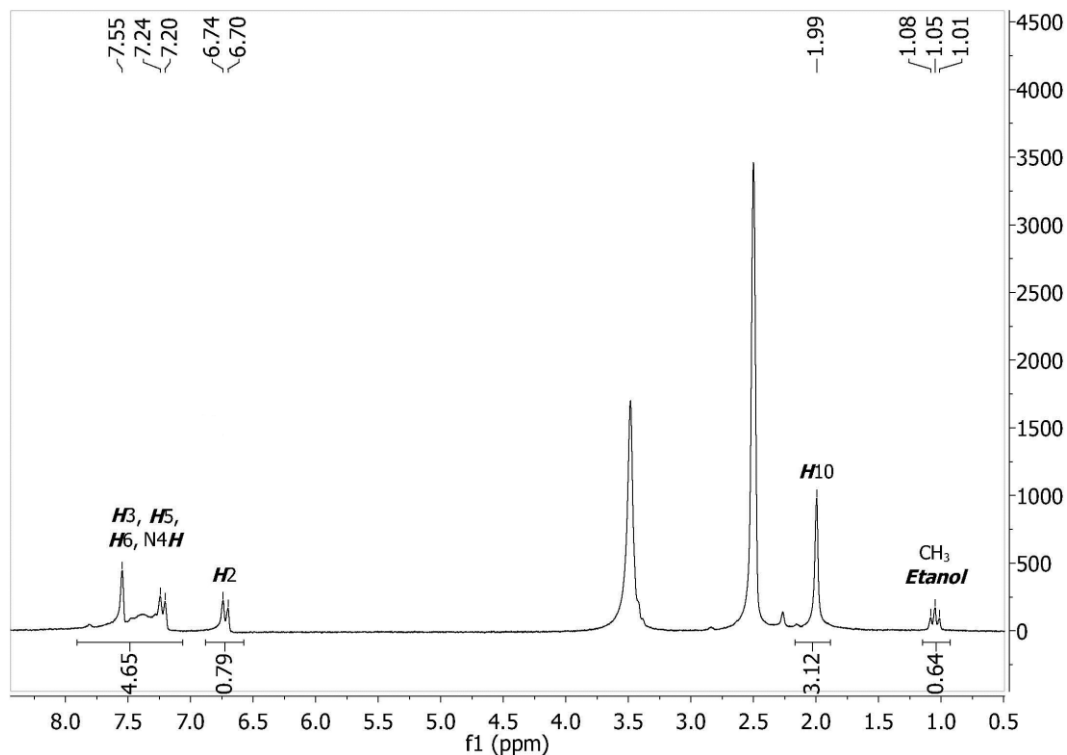
#### 4.4.2. Ressonância Magnética Nuclear

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo  $[\text{Pd}(4\text{-ABT})\text{Cl}_2] \cdot 0,75\text{H}_2\text{O} \cdot 0,25\text{EtOH}$  (Figura 4.23) o sinal do hidrogênio  $\text{N3H}$  desaparece, sugerindo a desprotonação desse nitrogênio. Porém, para que ele esteja desprotonado deveríamos observar apenas um cloreto coordenado ao Pd(II). O espectro foi obtido em DMSO, um solvente coordenante, portanto pode ocorrer uma reação de substituição na qual ocorre a saída de um cloreto e a entrada de um DMSO (Figura 4.22). Os hidrogênios ligados a  $\text{N4}$  apresentam-se como um simpleto em  $\delta 7,55$ . Os hidrogênios  $\text{H2}$  e  $\text{H3}$  são observados como dupletos para o complexo em  $\delta 6,74 - \delta 6,70$  e  $\delta 7,24 - \delta 7,21$ , respectivamente. Os hidrogênios  $\text{H5}$  e  $\text{H6}$  estão em ambientes diferentes e não fazem mais parte do sistema aa` bb` com os hidrogênios  $\text{H2}$  e  $\text{H3}$ . Seus sinais não são bem definidos e estão entre  $\delta 7,20 - \delta 7,55$ . Finalmente, o hidrogênio  $\text{H10}$  se desloca de  $\delta 2,30$  para  $\delta 2,00$ . Os valores das integrações e o número de sinais estão de acordo com o número de hidrogênios da molécula. Um sinal é observado para o etanol, um tripleto centrado em  $\delta 1,05$ , em concordância com a proposta anterior. A proporção observada na integração dos sinais é de 1:0,2 complexo:etanol, também em concordância com a proposta anterior.



**Figura 4.22** – Proposta de formação de novo complexo em solução, evidenciando o deslocamento do cloreto pelo DMSO, a partir de  $[\text{Pd}(4\text{-ABT})\text{Cl}_2]$ .

A Tabela 4.9 relaciona os deslocamentos químicos citados anteriormente para o complexo  $[\text{Pd}(4\text{-ABT})\text{Cl}_2] \cdot 0,75\text{H}_2\text{O} \cdot 0,25\text{EtOH}$  e o respectivo ligante.



**Figura 4.23** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz) de  $[\text{Pd}(4\text{-ABT})\text{Cl}_2]\cdot 0,75\text{H}_2\text{O}\cdot 0,25\text{EtOH}$  em  $\text{DMSO-}d_6$  com ampliação nas regiões de 0,50 a 8,0 ppm.

**Tabela 4.9.** Atribuições, multiplicidade (M), número de átomos ( $n^\circ$ ) e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em  $\text{DMSO-}d_6$  de 4-ABT e  $[\text{Pd}(4\text{-ABT})\text{Cl}_2]\cdot 0,75\text{H}_2\text{O}\cdot 0,25\text{EtOH}$ .

Atribuição	Compostos $\delta$ (ppm)					
	4-ABT	$n^\circ$	M	$[\text{Pd}(4\text{-ABT})\text{Cl}_2]\cdot 0,75\text{H}_2\text{O}\cdot 0,25\text{EtOH}$	$n^\circ$	M
<i>H2</i>	7,83 – 7,79	1	aa`	6,74 – 6,70	1	d
<i>H3</i>	8,15 – 8,11	1	bb`	7,24 – 7,20	1	d
<i>H5</i>	8,15 – 8,11	1	bb`	7,55 – 7,20	1	m
<i>H6</i>	7,83 – 7,79	1	aa`	7,55 – 7,20	1	m
<i>H10</i>	2,30	3	s	1,99	1	s
N3 <i>H</i>	10,40	1	s	-	-	-
N4 <i>H</i>	8,15 – 8,11 8,43	1 1	s	7,55	2	s
Etanol	-	-	-	1,08 – 1,01	0,64	t

s = simpleto, m = multipeto, d = dupeto, t = tripleto.

#### 4.5. Atividade citotóxica

A atividade citotóxica foi avaliada para o complexo [Pd(4-ABT)Cl<sub>2</sub>] em leucemia mieloide (HL60), leucemia linfóide (Jurkat) e carcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB). O complexo não apresentou atividade citotóxica frente às linhagens de células analisadas.

#### 4.6. Atividade antimicrobiana

O complexo [Pd(4-ABT)Cl<sub>2</sub>] foi testado contra o crescimento de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*), gram-negativa (*Pseudomonas aeruginosa*) e de fungos *Candida albicans* e *Candida glabrata* de acordo com procedimento descrito na parte experimental.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas e estão descritas na Tabela 4.10. O composto foi inativo contra o crescimento de *Candida albicans*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*.

O composto 4-ABT foi inativo contra o crescimento de todos os microorganismos. Observou-se uma melhora na atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa* e *S. aureus* pela complexação a Pd(II) e uma leve melhora de atividade contra *C. glabrata*.

**Tabela 4.10.** Valores de CIM para o complexo [Pd(4-ABT)Cl<sub>2</sub>].

	CIM (μmol L <sup>-1</sup> )					
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>
<b>4-ABT</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>[Pd(4-ABT)Cl<sub>2</sub>] 0,7H<sub>2</sub>O·0,2EtOH</b>	29,66	NA	30,55	NA	NA	122,21
<b>Cetoconazol</b>	-	-	-	-	-	2,35
<b>Fluconazol</b>	-	-	-	-	NA	NA
<b>Tetraciclina</b>	0,002	-	0,001	-	-	-
<b>Ciprofloxacina</b>	-	0,001	-	0,001	-	-

## Capítulo 5. Conclusões

No presente trabalho, foi realizado o preparo, a determinação das propriedades físico-químicas e a avaliação da atividade biológica de novos derivados de bases de Schiff, como protótipos a fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer e da osteoporose.

Foram obtidas as seguintes bases de Schiff derivadas de 8-hidroxi-2-quinolina aldeído: 8-hidroxiquinolina-2-acetil hidrazona (8-HQH, composto inédito), 8-hidroxiquinolina-2-tiossemicarbazona (8-HQT) e 8-hidroxiquinolina-2-semicarbazona (8-HQS). Os compostos foram caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas, no estado sólido e em solução. Os espectros de RMN e dados cristalográficos disponíveis confirmam a formação do isômero *E*. Para 8-HQH, observou-se também a presença de tautomerismo ceto-enólico em solução, através da duplicidade de sinais nos espectros de RMN. Os estudos físico-químicos demonstraram que os compostos analisados são neutros e estáveis em pH fisiológico (7,4).

Complexos de Cu(II) e Zn(II) com as bases de Schiff foram obtidos, caracterizados e avaliados quanto a seus perfis citotóxicos. Os resultados mostraram que as bases de Schiff formam os complexos inéditos  $[Cu(8-QH)_2]$ ;  $[Cu(8-QS)_2]$ ;  $[Zn(8-HQH)_2] \cdot 5/2 H_2O$ ;  $[Zn_2(8-HQS)_3] \cdot 1/2 H_2O$  e  $[Zn(8-HQT)(OAc^-)] \cdot 1/2 H_2O$ ; e a reprodução do complexo  $[Cu(8-QTD)]$ .

Foi realizado um estudo, pelo método de Job, de interação metal:ligante em DMSO e em solução 20% DMSO em tampão HEPES 7,4. Foi observada a relação 1:1 para 8-HQT e 1:2 para 8-HQS e 8-HQH com Cu(II), mas não foi observada banda de absorção no espectro no UV-Vis para os complexos de Zn(II) no estudo de interação metal:ligante, sugerindo maior afinidade dos ligantes ao íon Cu(II). Pela série de Irving-Williams, complexos de Cu(II) apresentam maior estabilidade que complexos de Zn(II). Isso acontece devido à energia de estabilização pelo campo cristalino dos ligantes que ocorre nos complexos de Cu(II) mas não nos de Zn(II), e também em parte devido à diferença de tamanho entre os dois íons.

No estudo realizado em DMSO, observou-se a formação de bandas novas para os dois íons metálicos, com relação metal:ligante 1:1 para 8-HQT e 1:2 para 8-HQS e 8-HQH com Cu(II), e 1:2 para 8-HQH, 2:1 para 8-HQS e 8-HQT com Zn(II).

As atividades das bases de Schiff em modelo *in vitro* da doença de Alzheimer (DA) foram avaliadas. O composto 8-HQT não foi solúvel nas condições dos testes. A capacidade dos compostos selecionados de inibir a agregação do peptídeo  $\beta A$  induzida por Cu(II) e Zn(II) foi avaliada através do teste de turbidez, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e ensaios de fluorescência. Ambos os compostos mostraram atividade inibitória nas condições do teste de inibição da agregação do peptídeo  $\beta A_{1-40}$  induzida pelos metais através do teste de turbidez. A fim de demonstrar visualmente a influência de 8-HQH e 8-HQS na agregação do peptídeo, foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET). O composto 8-HQH

apresentou maior influência no processo de agregação do peptídeo quando comparado a 8-HQS. O composto 8-HQS não apresentou solubilidade nas condições do teste de fluorescência. O composto 8-HQH foi avaliado quanto à inibição da agregação do peptídeo  $\beta A_{1-40}$  induzida pelos metais pelo teste de fluorescência, mas apresentou baixa solubilidade e com isso observou-se um intervalo de confiança alto quando comparado ao controle positivo, vermelho congo (VC). O composto 8-HQH foi menos eficiente para inibir a ligação do peptídeo com tioflavina T quando comparado ao VC, ainda assim apresentando atividade inibitória. Os resultados sugerem que 8-HQH é um promissor protótipo de fármaco para o tratamento da DA.

Foi avaliada também, a atividade citotóxica *in vitro* dos compostos e seus complexos de Cu(II) e Zn(II) em leucemia mieloide (HL60), leucemia linfóide (Jurkat) e carcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB). Apenas o complexo [Cu(8-QTD)] apresentou atividade quando comparado com o controle (cisplatina). Por apresentarem baixa citotoxicidade, os compostos 8-HQH e 8-HQS e seus complexos de Cu(II) e Zn(II), a princípio, não apresentariam risco no seu uso em tratamentos da DA.

Os compostos estudados demonstraram potencial como agentes quelantes na terapêutica da DA. No entanto, é necessário o aprimoramento de suas características físico-químicas, como solubilidade, como parte importante da avaliação desses compostos como potenciais protótipos de fármacos.

Uma vez que alguns inibidores de catepsina K apresentam o grupo nitrila, foram obtidas, também, bases de Schiff derivadas de 4-formilbenzônitrila e 4-acetilbenzônitrila como protótipos a inibidores de catepsina K para o tratamento de osteoporose. Os compostos 4-formilbenzônitrila semicarbazona (4-FBS), 4-acetilbenzônitrila semicarbazona (4-ABS), 4-formilbenzônitrila tiossemicarbazona (4-FBT), 4-acetilbenzônitrila tiossemicarbazona (4-ABT), 4-formilbenzônitrila acetil hidrazona (4-FBH) e 4-acetilbenzônitrila acetil hidrazona (4-ABH) foram caracterizados quanto as suas propriedades físico-químicas. Através dos resultados de RMN e dados cristalográficos disponíveis a formação do isômero *E* foi confirmada. Para as acetil hidrazonas, também foi observada a presença de tautomerismo cetoenólico em solução, por meio da duplicidade de sinais nos espectros de RMN. Os testes preliminares de estabilidade em pH 7,4 sugerem que os derivados de 4-AB e 4-FB são estáveis nas condições utilizadas.

Os compostos foram testados quanto às suas atividades antifúngica, antibacteriana e antiproliferativa. Quando comparados aos controles positivos, os compostos não apresentaram atividade significativa em nenhum dos modelos testados. Estes resultados estabeleceram, de forma preliminar, um baixo perfil citotóxico dos compostos avaliados, tornando-os promissores candidatos à posterior avaliação da atividade inibitória frente a catepsina K, um modelo *in vitro* da osteoporose.

Como complexos de Pd(II) de tiossemicarbazonas possuem atividade antimicrobiana e antitumoral, foi obtido e caracterizado o complexo [Pd(4-ABT)Cl<sub>2</sub>].

Foi avaliada a atividade citotóxica do complexo frente às linhagens de leucemia mieloide (HL60), leucemia linfoide (Jurkat) e carcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB). O complexo, quando comparado ao controle positivo, se mostrou inativo contra todas as linhagens de células. Foi avaliada também a atividade antifúngica e antibacteriana do composto contra o crescimento de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*), gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) e de fungos *Candida albicans* e *Candida glabrata*. Enquanto o ligante (4-ABT) foi inativo contra o crescimento de todos os microorganismos, o complexo apresentou atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. glabrata*.

A contribuição deste trabalho é importante no estudo de bases de Schiff como ferramentas da Química Medicinal, ou seja, compostos potencialmente úteis no tratamento da doença de Alzheimer e de osteoporose.

## **ANEXOS**

## 8-Hydroxyquinoline Schiff-bases as Therapeutics for Alzheimer's Disease: physicochemical properties and *in vitro* biological screening

Gomes, L. M. F.<sup>1</sup>; Vieira, R. P.<sup>1</sup>; Jones, M.<sup>2</sup>; Da Silva, J. G.<sup>1</sup>; Orvig, C.<sup>3</sup>; Storr, T.<sup>2\*</sup>; Beraldo, H.<sup>1\*</sup>  
[tim\\_storr@sfu.ca](mailto:tim_storr@sfu.ca), [hberaldo@ufmg.br](mailto:hberaldo@ufmg.br)

1. Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

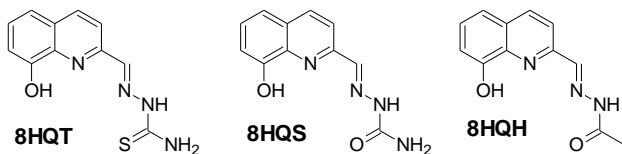
2. Department of Chemistry, Simon Fraser University, V5A-1S6, Burnaby, BC, Canada

3. Department of Chemistry, University of British Columbia, V6T-1Z4, Vancouver, BC, Canada

Keywords: 8-hydroxyquinoline, metals, Alzheimer's disease

### Introduction

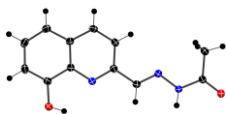
Alzheimer's disease (AD) is related to amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) aggregation in brain,<sup>1</sup> and metal ions such as copper(II) and zinc(II) are known to accelerate this aggregation<sup>2,3</sup>. In parallel, metal binding agents promote the disaggregation of A $\beta$  plaques, and have shown promise as AD therapeutics<sup>4</sup>. In this study, three 8-hydroxyquinoline Schiff-bases (Fig. 1) were prepared and their physicochemical properties and biological activities were evaluated.



**Figure 1.** 8-hydroxyquinoline derivatives - thiosemicarbazone (8HQT), semicarbazone (8HQS) and hydrazone (8HQH).

### Results and Discussion

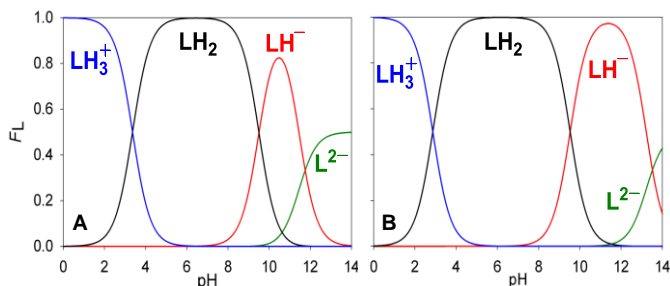
The compounds were prepared and characterized by NMR, IR, MS, UV-vis, and in the case of HQH by X-ray crystallography (Fig. 2).



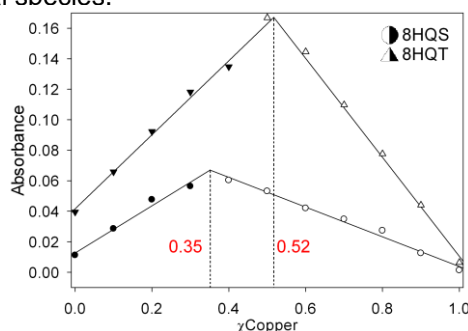
**Figure 2.** Molecular structure of 8HQH

Speciation diagrams of the Schiff-bases were obtained by variable pH UV-vis titrations (Fig. 3) and the pKa values (Table 1) showed that the three compounds are neutral at pH 7.4. The Cu(II) and Zn(II) binding properties of the ligands were studied by UV-vis in solution. Job's plot analyses suggest a 1:1 metal:ligand complex for 8HQT and a 1:2 complex for 8HQS and 8HQH (Fig. 4). A preliminary aggregation inhibition assay<sup>5</sup> using A $\beta$ <sub>1-40</sub> peptide (25  $\mu$ M) was performed via turbidity measurements by light scattering measurements at 405 nm. Results showed that 8HQS and 8HQH (150  $\mu$ M) inhibited peptide aggregation in the presence of metals (Cu(II), Zn(II) - 25  $\mu$ M). 8HQT was not soluble in the assay conditions.

6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry – BrazMedChem2012



**Figure 3.** Speciation diagrams of 8HQT (A) and 8HQH (B). Diagrams of 8HQS and 8HQH presented the same profile.  $F_L$  = fraction of species.  $LH_2$  = neutral species.



**Figure 4.** Job's plots of 8HQS (420 nm) and 8HQT (404 nm) with copper acetate (20% DMSO in buffer 7.4). Job's plots of 8HQH and 8HQS presented the same profile.  $\chi$  = fractions of copper(II).

**Table 1.** pKa values of compounds (L).

Compound	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>	pKa <sub>3</sub>
8HQT	3.36 (1)	9.51 (1)	11.75 (1)
8HQS	3.251 (2)	9.63 (1)	13.16 (1)
8HQH	2.868 (3)	9.529 (3)	13.5 (1)

### Conclusions

8HQS and 8HQH are promising compounds for metal binding therapy of AD according to their physicochemical and anti-aggregating properties.

### Acknowledgements

CNPq, FAPEMIG, INCT-Inofar, NSERC (Canada), Alzheimer Society of Canada, LabCri-UFMG.

<sup>1</sup> Blennow, K.; de Leon, M. J. and Zetterberg, H. *Lancet* **2006**, *368*, 387.

<sup>2</sup> Atwood, C.S. *et al. J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 12817.

<sup>3</sup> Bush, A.I. *et al. Science* **1994**, *5177*, 1464.

<sup>4</sup> Crouch, P.J. *et al. J. Neurochem.*, **2011**, *119*, 220.

<sup>5</sup> Scott, L.E. *et al. Chem Sci* **2011**, *2*, 642.