

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Lenka Victoria Tamayo López

Estudos de complexos metálicos de ligantes bioativos
derivados de estilbeno e de benzo-gama-pirona

Tese apresentada ao Departamento de Química do
Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal
de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção
do grau de Doutor em Ciências-Química

Belo Horizonte

2017

UFMG/ICEx/DQ. 1218^a

T. 548^a

Lenka Victoria Tamayo López

**Estudos de complexos metálicos de ligantes
bioativos derivados de estilbeno e de benzo-gama-
pirona**

Tese apresentada ao Departamento de Química do
Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal
de Minas Gerais como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciências-Química.

Belo Horizonte

2017

T153e
2017
T

Tamayo Lopez, Lenka Victoria

Estudos de complexos metálicos de ligantes bioativos derivados de estilbeno e de benzo-gama-pirona [manuscrito] / Lenka Victoria Tamayo Lopez. 2017. [xxxii], 187 f.: il.

Orientadora: Heloisa de Oliveira Beraldo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

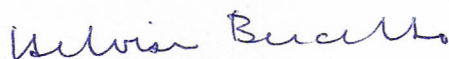
1. Química inorgânica - Teses 2. Ligantes (Bioquímica) - Teses 3. Complexos metálicos de transição - Teses 4. Schiff, Bases de - Teses 5. Agentes antibacterianos - Teses 6. Agentes antineoplásicos - Teses 7. Compostos de cobre - Teses 8. Prata - Teses I. Beraldo, Heloisa de Oliveira, Orientadora II. Título.

CDU 043

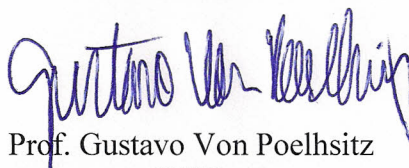
**"Estudos de Complexos Metálicos de Ligantes Bioativos Derivados de Estilbeno
e de Benzo-Gama-Pirona"**

Lenka Victoria Tamayo Lopez

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



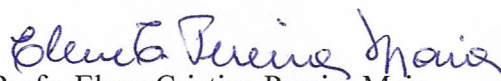
Profa. Heloisa de Oliveira Beraldo - Orientadora
UFMG



Prof. Gustavo Von Poelhsitz
UFU



Profa. Priscila Pereira Silva Caldeira
CEFET-MG



Profa. Elene Cristina Pereira Maia
UFMG



Profa. Heveline Silva
UFMG

Belo Horizonte, 14 de junho de 2017.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação
da Profa. Dra. Heloisa de Oliveira Beraldo.

“Os cientistas dizem que somos feitos de átomos, mas um passarinho me diz que somos feitos de histórias”

Eduardo Galeano

Agradecimentos

- A minha família e Mosel. A Anuar Houeha meu filho por ser a luz ao final do doutorado.
- À Profa Heloisa Beraldo pela orientação, dedicação, apoio durante todos esses anos.
- Aos pesquisadores Dra. Sonia R.W. Louro, Dr. Jefferson Gomes Da Silva, Dra. Isabella Pires Ferreira, Dr. Nivaldo Speziali, Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi, Dr. Adilson Kleber Ferreira, Dra. Miriam Teresa Paz Lopes, Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes, Dra. Luzia Valentina Modolo e Dr. Helio Duarte pela colaboração na realização deste trabalho.
- Ao programa CAPES- PEC-PG pelo apoio financeiro.
- As secretárias do Programa de Pós-graduação em Química da UFMG, Paulete e Alessandra, por sua atenção e boa vontade.
- Aos colegas e amigos do Laboratorio e do departamento de Química, em especial: Luiza, Ana, Anne, Fabricio, Angel, Jeferson, Isabella, Ligiane, Plinio, Ronniel, Anna C, Ariane, Demetrio, Gilvan, Isabel e Cleyde pela amizade, ajuda e carinho.
- Aos meus amigos Carolina, Diego, Andres, Luis Eduardo, Luis, Edgar, Luz, Carlos, Katherine, Adelia, Anayive, Maritza, Alexei, Omar, Marinela e Lina pela ajuda, apoio, força e momentos felizes que serão inesquecíveis.
- Aos funcionários do Departamento de Química pela ajuda e colaboração.

RESUMO

O presente trabalho envolveu o estudo de complexos de cobre(II) e prata(I) de ligantes bioativos derivados de estilbeno e de benzo- γ -pirona.

Foram sintetizadas *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-acetilhidrazona HStAc (1), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-fenilhidrazona HStPh (2), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-*para*-cloro-fenilhidrazona HStpClPh (3), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-*para*-nitro-fenilhidrazona HStpNO₂Ph (4), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-*para*-toluol-hidrazona HStpT (5), *trans*-4-estilbeno-carboxaldeído-benzilhidrazona HStBz (6) e *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-*para*-hidroxi-fenilhidrazona HStpOHPh (7) assim como os complexos [Cu(HStAc)₂Cl₂] (8), [Cu(HStpClPh)₂Cl₂] (9), [Cu(HStpNO₂Ph)₂Cl₂] (10), [Cu(HStpT)₂Cl₂] (11), [Cu(HStBz)₂Cl₂] (12) e [Cu(HStpOHPh)₂Cl₂] (13). Cálculos teóricos revelaram que os diferentes isômeros apresentam energias muito próximas, tornando inviável determinar qual seria a geometria mais provável para os complexos.

Os ligantes (1-7) e os complexos (8-13) apresentaram fraca atividade antimicrobiana e fraca atividade citotóxica contra células tumorais. As hidrazonas e seus complexos mostraram ser capazes de capturar *in vitro* espécies radicalares de nitrogênio e oxigênio. Os complexos (12) e (13) interagem com as albuminas do soro bovino (BSA) e do soro humano (HSA) sugerindo que poderiam ser transportados por essas proteínas.

Os complexos [Cu(Nar)(Fen)(OH₂)]₂·2ClO₄·2H₂O (17) e [Cu(Hsp)(Fen)(OH₂)]₂·2ClO₄ (18) contendo naringenina (Nar) ou hesperetina (Hsp) e o co-ligante 1,10-fenantrolina foram obtidos. Seus espectros de RPE no estado sólido sugerem tratar-se de espécies binucleares. Em solução de DMSO/água a 37 °C ocorre predominância de espécies mononucleares.

Os complexos (17) e (18) foram estudados quanto às suas atividades citotóxicas frente a células de carcinoma de pulmão A549 e não tumorais LL24 (fibroblastos de pulmão humano) e HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). O complexo (18) exibe maior atividade citotóxica contra células A549 do que o complexo (17). Ambos provocam alterações morfológicas típicas de apoptose em células A549. O tratamento de células A549 com os complexos não resultou em redução do potencial de membrana mitocondrial, demonstrado que os compostos agem através de mecanismo

independente de despolarização de mitocôndria. Células A549 tratadas com (17) e (18) apresentaram redução na produção de ROS, indicando que os compostos exibem atividade antioxidante. Os complexos interagem com o DNA, e com BSA e HSA. Os complexos (17) e (18) devem ser investigados como candidatos a fármacos antineoplásicos para o tratamento de adenocarcinoma do pulmão humano.

No presente trabalho foram também obtidas 3-formil-6-metilcromona-fenilhidrazona HCrPh (19) e 3-formil-6-metilcromona-*para*-cloro-fenilhidrazona HCrpClPh (20). As hidrazonas (19) e (20) não apresentaram atividade antimicrobiana e revelaram baixa citotoxicidade frente a células tumorais B16-F10 (melanoma metastático murino) e frente a células não tumorais Melan-a (melanócito murino). Após a complexação à prata(I), com formação de $[Ag(HCrPh)_2]NO_3 \cdot 2H_2O$ (21) e $[Ag(HCrpClPh)_2]NO_3$ (22) a ação antifúngica melhora consideravelmente. Os complexos (21) e (22) foram mais citotóxicos que os ligantes livres frente a células B16-F10, induzindo redução da viabilidade celular de 25 e 40% respectivamente. Nas mesmas condições a cisplatina e $AgNO_3$ induziram uma redução de 11% e 9% da viabilidade celular, respectivamente. Assim, a complexação das hidrazonas com prata(I) leva a um aumento da atividade citotóxica. Os complexos de prata(I) revelaram-se menos ativos frente às células sadias de melanócitos Melan-a em comparação com a cisplatina, indicando que provocam menos dano celular em células normais, o que é muito importante na busca de novos agentes quimioterápicos. Assim, a coordenação das hidrazonas à prata(I) constituiu importante estratégia para fazer aumentar a atividade citotóxica das hidrazonas frente a células tumorais sem contudo aumentar seu efeito citotóxico frente a células normais. O complexo (22) interage com DNA, BSA e HSA.

O presente trabalho representa uma importante contribuição à Química Medicinal Inorgânica na procura de novos compostos potencialmente úteis como candidatos a protótipos de fármacos e metalofármacos antimicrobianos e antitumorais.

Palavras-chaves: ligantes bioativos, hidrazonas, complexos metálicos, atividade citotóxica, atividade antimicrobiana

ABSTRACT

The present work comprised an investigation on copper(II) and silver(I) complexes containing bioactive ligands derived from stilbene and benzo- γ -pyrone.

Trans-4-stilbenecarboxaldehyde-acetylhydrazone HStAc (1), *trans*-4-stilbenecarboxaldehyde-phenylhydrazone HStPh (2), *trans*-4-stilbenecarboxaldehyde-*para*-chloro-phenylhydrazone HStpClPh (3), *trans*-4-stilbenecarboxaldehyde-*para*-nitro-phenylhydrazone HStpNO₂Ph (4), *trans*-4-stilbenecarboxaldehyde-*para*-toluic-hydrazone HStpT (5), *trans*-4-stilbenecarboxaldehyde-benzylhydrazone HStBz (6) and *trans*-4-stilbenecarboxaldehyde-*para*-hydroxy-phenylhydrazone HStpOHPh (7) were prepared, as well as complexes [Cu(HStAc)₂Cl₂] (8), [Cu(HStpClPh)₂Cl₂] (9), [Cu(HStpNO₂Ph)₂Cl₂] (10), [Cu(HStpT)₂Cl₂] (11), [Cu(HStBz)₂Cl₂] (12) and [Cu(HStpOHPh)₂Cl₂] (13). Due to the small differences in energy of the possible isomers theoretical calculations did not allow to determine the exact geometry of the complexes.

The ligands (1-7) and complexes (8-13) showed weak antimicrobial activity against bacteria and fungi as well as poor cytotoxic effects against tumor cells. The hydrazones and their complexes demonstrated *in vitro* free radical scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species.

Complexes (12) and (13) interact with bovine (BSA) and human serum (HSA), albumin indicating that they could be transported by these proteins.

Complexes [Cu(Nar)(Fen)(OH₂)₂·2ClO₄·2H₂O (17) and [Cu(Hsp)(Fen)(OH₂)₂·2ClO₄ (18) containing naringenin (Nar) or hesperetin (Hsp) and 1,10-phenanthroline as co-ligand were synthesized. The EPR spectra of complexes (17-18) in powder suggested formation of binuclear species. However, in DMSO solution the monomeric species should be largely predominant at 37 °C in DMSO/water.

The cytotoxic activities of complexes (17) and (18) were evaluated against A549 lung adenocarcinoma cells, normal lung fibroblasts (LL-24) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Complex (18) exhibited higher cytotoxic activity against A549 cells than complex (17). Both complexes promoted typical apoptotic morphological changes in A549 cells. A549 cells treated with the complexes did not show reduced mitochondrial membrane potential indicating that apoptosis induced by the complexes is not associated to mitochondrial depolarization. A549 cells treated

with the complexes showed reduction of ROS production, indicating that the compounds have antioxidant activity. The two complexes interact with DNA and with BSA and HSA. Thus, these complexes should be investigated as promising antineoplastic drugs candidates for the treatment of human lung adenocarcinoma.

In addition, in the present work, 3-formyl-6-methylchromone-phenyl hydrazone (HCrPh, 19) and 3-formyl-6-methylchromone-*para*-chloro-phenyl hydrazone (HCrpClPh, 20) were also obtained. Hydrazones (19) and (20) did not present antimicrobial activity and showed low cytotoxic activity against on B16-F10 (metastatic melanoma) and Melan-a (nontumorigenic melanocyte) cells. However, upon coordination to silver(I), with formation of $[Ag(HCrPh)_2]NO_3 \cdot 2H_2O$ (21) and $[Ag(HCrpClPh)_2]NO_3$ (22) improved antifungal activity was observed. Complexes (20) and (21) were more cytotoxic than the free ligands against B16-F10 cells, promoting reduction in cell viability of 25% and 40% respectively. Under the same conditions cisplatin and silver nitrate induced a reduction in cell viability of 11% and 9%, respectively.

Hence, complexation of 3-formyl-6-methylchromone derived-hydrazones with silver(I) improves cytotoxic activity against tumor cells. The silver(I) complexes were less active on non-malignant Melan-a cells than cisplatin, indicating that they induced less cell damage in normal cells, which is a very important characteristic of new chemotherapeutic drug candidates. Hence, coordination of the hydrazones to silver(I) constituted an important strategy for increasing cytotoxic activity against solid tumor cells without increasing cytotoxic effects against normal cells. Complex (22) interacts with DNA and with BSA and HSA.

The present work constitutes a relevant contribution to Medicinal Inorganic Chemistry in the development of new antimicrobial and antitumor drug candidates.

Keywords: bioactive ligands, hydrazones, metal complexes, cytotoxic activity, antimicrobial activity

Sumário

1.INTRODUÇÃO.	1
1.1 Química Medicinal Inorgânica	1
1.2 Hidrazonas como ligantes para candidatos a metalofármacos	2
1.2.1 Hidrazonas derivadas de estilbeno como ligantes para candidatos a metalofármacos	5
1.2.2 Hidrazonas derivadas de cromonas como ligantes para candidatos a metalofármacos	6
1.3 Flavonoides como ligantes para candidatos a metalofármacos	8
1.4 A escolha dos metais para o planejamento de metalofármacos	12
1.4.1 Compostos de cobre(II) como candidatos a metalofármacos	12
1.4.2 Compostos de prata(I) como candidatos a metalofármacos	13
1.5 Contribuições da Química Medicinal Inorgânica para o desenvolvimento de compostos anticâncer e antimicrobianos	16
1.6 Contribuições do presente trabalho à Química Medicinal Inorgânica	19
1.7 Objetivo Geral e objetivos específicos	20
Objetivos específicos	20
CAPÍTULO 2. PARTE EXPERIMENTAL	22
2.1 Equipamentos, materiais e procedimentos	22
2.2. Sínteses dos ligantes e complexos	25
2.2.1 Sínteses de <i>trans</i> -4-estilbenocarboxaldeído-acetilhidrazona (HStAc), <i>trans</i> -4-estilbenocarboxaldeído-fenilhidrazona (HStPh), <i>trans</i> -4-estilbenocarboxaldeído- <i>para</i> -cloro-fenilhidrazona (HStpClPh), <i>trans</i> -4-estilbenocarboxaldeído- <i>para</i> -nitro-fenilhidrazona (HStpNO ₂ Ph), <i>trans</i> -4-estilbenocarboxaldeído- <i>para</i> -toluil-hidrazona (HStpT), <i>trans</i> -4-estilbeno-carboxaldeído-benzilhidrazona (HStBz) e a <i>trans</i> -4-estilbenocarboxaldeído- <i>para</i> -hidroxi-fenilhidrazona (HStpOHPh).	25
2.2.2 Sínteses dos complexos de cobre(II) [Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8), [Cu(HStpClPh) ₂ Cl ₂] (9), [Cu(HStpNO ₂ Ph) ₂ Cl ₂] (10), [Cu(HStpT) ₂ Cl ₂] (11), [Cu(HStBz) ₂ Cl ₂] (12), e [Cu(HStpOHPh) ₂ Cl ₂] (13).	26

2.2.3 Sínteses dos complexos de cobre(II) com Naringenina e Hesperetina.	27
2.2.4 Sínteses de 3-formil-6-metilcromona-fenil hidrazona (HCrPh) e 3-formil-6-metilcromona- <i>para</i> -cloro-fenil hidrazona (HCrpClPh).	28
2.2.5 Sínteses dos complexos de $[Ag(HCrPh)_2]NO_3 \cdot 2H_2O$ (21) e $[Ag(HCrpClPh)_2]NO_3$ (22).	29
2.3 Testes Biológicos	30
2.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição	30
2.3.1.1 Triagem Microbiológica	31
2.3.1.2 Cálculo da Percentagem de Inibição	32
2.3.1.3 Determinações da Concentração Inibitória Mínima	32
2.3.2 Avaliação da atividade sequestradora de radicais DPPH [•] e ânions superóxido	34
2.3.2.1 Métodos DPPH [•]	35
2.3.2.2 Produção de ânions superóxido	36
2.3.3 Atividade citotóxica	37
2.3.4 Avaliação da apoptose pelo teste Anexina V/Iodeto de propídeo por citometria de fluxo para os compostos (17) e (18)	39
2.3.5 Avaliação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) para os compostos (17) e (18)	40
2.3.6 Avaliação da produção de ROS para os compostos (17) a (18)	40
2.3.7 Análises Estatísticas	41
2.4 Estudos de ligação ao DNA	41
2.4.1 Determinação da constante de ligação por espectroscopia de absorção eletrônica	41
2.4.2 Determinação da constante de ligação por Fluorescência	42
2.5 Interação com albumina sérica bovina (BSA) e com albumina do soro humano (HSA)	43
2.5.1 Estudos de interação com a Albumina Sérica Bovina (BSA) utilizando fluorescência	43
2.5.2 Estudos de interação com a Albumina Sérica Bovina (BSA) e Albumina Sérica Humana (HSA) por Ressonância paramagnética eletrônica (RPE)	44

2.6 Estudos teóricos	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
CAPÍTULO 3. HIDRAZONAS DERIVADAS DO <i>TRANS</i> -4-ESTILBENOCARBOXALDEÍDO.	47
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS HIDRAZONAS DERIVADAS DO <i>TRANS</i> -4-ESTILBENOCARBOXALDEÍDO.	48
3.1.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho	48
3.1.2 Ressonância Magnética Nuclear	49
3.1.3 Estruturas cristalográficas	52
3.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS	54
3.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição	54
3.2.2 Avaliações da atividade sequestradora de radicais DPPH• e ânions superóxido	55
CAPÍTULO 4. COMPLEXOS DE COBRE(II) DE HIDRAZONAS DERIVADAS DE <i>TRANS</i> -4-ESTILBENOCARBOXALDEÍDO.	59
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE COBRE(II) DE HIDRAZONAS DERIVADAS DE <i>TRANS</i> -4-ESTILBENOCARBOXALDEÍDO.	59
4.1.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)	60
4.1.2 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	64
4.1.3 Estudos Teóricos	66
4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS	69
4.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição	69
4.2.2 Avaliações da atividade sequestradora de radicais DPPH• e ânions superóxido	70
4.2.3 Avaliação da atividade citotóxica	73
4.3 Estudos de interação com a Albumina Sérica Bovina (BSA) e Albumina Sérica Humana (HSA) por ressonância paramagnética eletrônica (RPE)	74
CAPÍTULO 5. COMPLEXOS DE COBRE(II) DERIVADOS DE NARINGENINA E HESPERETINA.	78
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE COBRE(II) DERIVADOS DE NARINGENINA E HESPERETINA	79

5.1.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)	80
5.1.2 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	83
5.1.3 Análise termogravimétrica	85
5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS	86
5.2.1 Avaliações da atividade sequestradora de radicais DPPH• e ânions superóxido	86
5.2.2 Avaliação da atividade citotóxica pelo método de 3-(4,5dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)	88
5.2.2.1 Avaliação da apoptose pelo teste Anexina V/Iodeto de propídeo por citometria de fluxo	89
5.2.2.2 Avaliação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta m\Psi$)	91
5.2.2.3 Avaliação da produção de ROS para os compostos (17) e (18) por citometria de fluxo	93
5.2.3 Estudos de ligação ao DNA	94
5.2.3.1 Determinação da constante de ligação (K_b) por espectroscopia de absorção eletrônica	94
5.2.3.2 Estudos de ligação ao DNA por fluorescência.	96
5.2.4 Estudos de interação com a albumina do soro bovino (BSA) e com albumina do soro humano (HSA)	99
5.2.4.1 Estudos de interação com a Albumina Sérica Bovina (BSA) utilizando fluorescência	99
5.2.4.2 Estudos de interação com a Albumina Sérica Bovina (BSA) e Albumina Sérica Humana (HSA) por ressonância paramagnética eletrônica (RPE)	105
CAPÍTULO 6. HIDRAZONAS DERIVADAS DE 3-FORMIL-6-METILCROMONA.	108
6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS HIDRAZONAS DERIVADAS DE 3-FORMIL-6-METILCROMONA.	109
6.1.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho	109
6.1.2 Análises termogravimétrica	111
6.1.3 Ressonância Magnética Nuclear	111
6.1.4 Estruturas cristalográficas	113
6.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS	114

6.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição	114
6.2.2 Avaliação da atividade citotóxica	115
CAPÍTULO 7. COMPLEXOS DE PRATA(I) COM HIDRAZONAS DERIVADAS DE 3-FORMIL-6-METILCROMONA.	116
7.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE PRATA(I) DERIVADOS DE 3-FORMIL-6-METILCROMONA.	117
7.1.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)	117
7.1.2 Análise termogravimétrica	119
7.1.3 Ressonância Magnética Nuclear	119
7.1.4 Espectrometria de Massas por Ionização Electrospray (ESI-MS)	124
7.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS	124
7.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição	124
7.2.2 Avaliação da atividade citotóxica pelo método de 3-(4,5dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)	129
7.2.3 Estudos de ligação ao DNA	131
7.2.3.1 Estudos de ligação do complexo $[Ag(HCrpClPh)_2]NO_3$ (22) ao DNA por método fluorimétrico	131
7.3 Estudos de interação do complexo $[Ag(HCrpClPh)_2]NO_3$ (22) com a albumina sérica bovina (BSA) utilizando fluorescência	134
CAPÍTULO 8. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS.	137
ANEXOS	142
ANEXO Espectros de absorção na região do Infravermelho (IV)	143
ANEXO Espectros de RMN	157
ANEXO Dados cristalográficos	174
ANEXO Curvas de TG/DTG	181
ANEXO Espectros de massas	184
Artigos	189

Lista de Figuras

Figura 1.1	Mecanismo proposto para a reação entre a hidrazina e aldeído para formar hidrazonas.	3
Figura 1.2	<i>Trans</i> e <i>cis</i> -estilbeno.	5
Figura 1.3	Estrutura do resveratrol.	6
Figura 1.4	Estrutura da cromona.	6
Figura 1.5	Estrutura de 3-formilcromona.	7
Figura 1.6	Estrutura básica dos flavonóides consiste num núcleo benzo- γ -pirona (anel A e o anel C) e benzeno (anel B). As principais classes de flavonóides são flavonas, flavononóis, flavanonas, flavonóis e isoflavonas.	9
Figura 1.7	Estrutura das flavanonas naringenina e hesperetina.	10
Figura 1.8	Estrutura do composto sulfadiazina da prata(I).	15
Figura 2.1	Sínteses das hidrazonas derivadas do <i>trans</i> -4-estilbenocarboxaldeído.	25
Figura 2.2	Síntese dos complexos de cobre(II) com hidrazonas derivadas de <i>trans</i> -4-estilbenocarboxaldeído.	26
Figura 2.3	Sínteses das hidrazonas derivadas de 3-formil-6-metilcromona.	28
Figura 2.4	Síntese dos complexos de prata(I) com hidrazonas derivadas de 3-formil-6-metilcromona.	29
Figura 2.5	Preparação das microplacas da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição.	33
Figura 3.1	Estruturas genéricas das hidrazonas derivadas do <i>trans</i> -4-estilbenocarboxaldeído e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes.	47
Figura 3.2	Espectro na região do Infravermelho do composto HStAc (1) em pastilhas de KBr.	49
Figura 3.3	Representação do equilíbrio amido-iminol dos compostos HStAc (1) e HStBz (6).	50
Figura 3.4	Representação ORTEP da estrutura molecular de	52

	HStpNO ₂ Ph DMSO (4a). Elipsóides 50% de probabilidade para todos os átomos não hidrogenoides.	
Figura 3.5	Diagrama ORTEP da estrutura molecular de HStpT (5). Elipsoides com 50% de probabilidade para todos os átomos não hidrogenoides.	52
Figura 3.6	Empacotamento na estrutura de HStpT (5).	53
Figura 3.7	Triagem da atividade de sequestro de radicais DPPH• das hidrazonas HStAc (1), HStPh (2), HStpClPh (3), HStpNO ₂ Ph (4), HStpT (5), HStBz (6), HStpOHPh (7) derivadas de <i>trans</i> -4-estilbenocarboxaldeído a uma concentração de 320 µM.	56
Figura 3.8	Triagem das hidrazonas HStAc (1), HStPh (2), HStpClPh (3), HStpNO ₂ Ph (4), HStpT (5), HStBz (6), HStpOHPh (7) derivadas de <i>trans</i> -4-estilbenocarboxaldeído para a atividade sequestradora ânions superóxido a uma concentração de 320 µM.	57
Figura 4.1	Síntese geral dos complexos de cobre(II) (8) a (13).	59
Figura 4.2	Espectros de infravermelho de HStAc (1) (A) e seu [Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8) (B), em pastilhas de KBr.	63
Figura 4.3	Espectros de RPE dos complexos de cobre(II) [Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8), [Cu(HStpClPh) ₂ Cl ₂] (9), [Cu(HStpNO ₂ Ph) ₂ Cl ₂] (10), [Cu(HStpT) ₂ Cl ₂] (11), [Cu(HStBz) ₂ Cl ₂] (12) e [Cu(HStpOHPh) ₂ Cl ₂] (13) no estado sólido a temperatura ambiente.	64
Figura 4.4	Espectros de RPE dos complexos de cobre (II) [Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8), [Cu(HStpClPh) ₂ Cl ₂] (9), [Cu(HStpNO ₂ Ph) ₂ Cl ₂] (10), [Cu(HStpT) ₂ Cl ₂] (11), [Cu(HStBz) ₂ Cl ₂] (12) e [Cu(HStpOHPh) ₂ Cl ₂] (13) em DMSO a 77 K.	66
Figura 4.5	Estruturas otimizadas para o complexo [Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8).	68

Figura 4.6	Porcentagem de sequestro de DPPH• dos complexos [Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8), [Cu(HStpClPh) ₂ Cl ₂] (9), [Cu(HStpNO ₂ Ph) ₂ Cl ₂] (10), [Cu(HStpT) ₂ Cl ₂] (11), [Cu(HStBz) ₂ Cl ₂] (12) e [Cu(HStpOHPh) ₂ Cl ₂] (13) e o ligante HStAc (1) a uma concentração de 80 µM.	71
Figura 4.7	Porcentagem de sequestro de ânions superóxido dos complexos [Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8), [Cu(HStpClPh) ₂ Cl ₂] (9), [Cu(HStpNO ₂ Ph) ₂ Cl ₂] (10), [Cu(HStpT) ₂ Cl ₂] (11), [Cu(HStBz) ₂ Cl ₂] (12), [Cu(HStpOHPh) ₂ Cl ₂] (13) e os ligantes HStpNO ₂ Ph (4) e HStpOHPh (7) a uma concentração de 80 µM.	73
Figura 4.8	Estrutura de Raios X da HSA modificada do Z. Liu e colaboradores, ¹⁸⁶ ressaltando as regiões da Cys-34 e o sítio de N-terminal.	75
Figura 4.9	Espectros de RPE dos compostos [Cu(HStBz) ₂ Cl ₂] (12) e [Cu(HStpOHPh) ₂ Cl ₂] (13) na presença de BSA e HSA. A concentrações de dos compostos testes e das albuminas (BSA ou HSA) foram preparadas a 0,4 x 10 ⁻³ mol·L ⁻¹ em tampão de fosfato 0,010 M pH 7,4. Os espectros de RPE foram obtidos operando em banda X a 77 K.	76
Figura 5.1	Espectro na região do Infravermelho do infravermelho para o co-ligante 1,10-fenantrolina (16) em pastilhas de KBr.	81
Figura 5.2	Espectros de absorção na região do Infravermelho do infravermelho de Nar (14) (A) e do complexo [Cu(Nar)(Fen)(OH ₂) ₂].ClO ₄ (17) (B) em pastilhas de KBr.	83
Figura 5.3	Espectros de RPE dos complexos [Cu(Nar)(Fen)(OH ₂) ₂].ClO ₄ (17) e [Cu(Hsp)(Fen)(OH ₂)].ClO ₄ (18) em pó a temperatura ambiente.	84

Figura 5.4	Espectros de RPE dos complexos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18) em DMSO a 77 K.	85
Figura 5.5	Avaliação morfológica de apoptose através do teste de PI/Anexina V observado durante 24 h de tratamento dos compostos (17) e (18) em três diferentes concentrações. As imagens são representativas de três experimentos independentes. (Aumento x 100).	90
Figura 5.6	A. Citometria de fluxo das células A549 tratadas com PI/AnexinaV depois de 12 h em diferentes concentrações dos complexos (17) e (18). B. Gráficos de barra representativos da distribuição de porcentagem de células apoptóticas dos compostos (17) e (18). C. Histogramas representativos da distribuição de porcentagem de células necróticas dos compostos (17) e (18).	91
Figura 5.7	A. Histogramas representativos das células A549 tratadas com TMRE, controle (cinza) e células tratadas (branco). B. Gráficos de barra da intensidade de fluorescência do composto (17) e (18).	92
Figura 5.8	As células A549 foram tratadas com os compostos (17) e (18), coradas com DHE. Os resultados estão representados em histogramas com o controle (branco) e células tratadas (cinza). B. Gráficos de barra da intensidade de fluorescência dos complexos (17) e (18) e o controle positivo. C. Gráficos de barra da percentagem de viabilidade celular das células A549 pré-tratadas com 2 μM wortmanina e os complexos (17) e (18).	93
Figura 5.9	A. Espectro de absorção eletrônica do composto (18) na ausência e presença de concentrações crescentes de CT-DNA (período de incubação de 5 min). As setas mostram	95

as mudanças na absorção do composto após a adição de CT-DNA. **B.** Gráfico de $[\text{DNA}]/(\epsilon_f - \epsilon_a)$ vs $[\text{DNA}]$ $\{[\text{DNA}] = 0 - 1,6 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ e $[\text{Composto}] = 1,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$, a 25°C do composto (18).

- Figura 5.10** Espectros de emissão do BE-CT-DNA ($10 \mu\text{M}$ Tampão Tris-HCl, pH 7,20, $T = 25^\circ\text{C}$), na presença de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e $100 \mu\text{M}$ dos complexos (17) **A.** e (18) **B.** Na direita gráficos de I_0/I vs $[Q]$. As setas indicam o sentido das mudanças na intensidade em função do aumento da concentração dos complexos. ($\lambda_{\text{emi}} = 605 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 545 \text{ nm}$). 97
- Figura 5.11** Estrutura tridimensional das albuminas BSA e HSA com os resíduos de triptofano de A. Belatik e colaboradores (A. Belatik e colaboradores. PLoS One. 7(2012)5e36723). 100
227
- Figura 5.12** Espectros de emissão de BSA na presença de concentrações crescentes dos compostos naringenina (Nar) (14), hesperetina (Hsp) (15), $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2] \cdot \text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)] \cdot \text{ClO}_4$ (18) (esquerda). Reta inserida: $[(I_0 - I)]$ vs $[\text{composto}]$ dos composto (14), (15), (17) e (18). $\{[\text{BSA}] = 2,0 \mu\text{M}$ e $[\text{composto}] = 0 - 0,75 \mu\text{M}$, a 25°C . ($\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emi}} = 342 \text{ nm}$). 102
- Figura 5.13** Espectros de RPE dos compostos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2] \cdot \text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)] \cdot \text{ClO}_4$ (18) na presença de BSA e HSA. As soluções dos compostos testes e das albuminas (BSA ou HSA) foram preparadas a $0,4 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ em tampão de fosfato $0,010 \text{ M}$ pH 7,4. Os espectros de RPE foram obtidos operando em banda X a 77 K . 105

Figura 6.1	Estruturas de 3-formil-6-metilcromona-fenilhidrazona HCrPh (19) e 3-formil-6-metilcromona- <i>para</i> -cloro-fenilhidrazona HCrpClPh (20) e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes.	108
Figura 6.2	Espectros na região do Infravermelho para 3-formil-6-metilcromona-fenilhidrazona HCrPh (19) e 3-formil-6-metilcromona- <i>para</i> -cloro-fenilhidrazona HCrpClPh (20) em pastilhas de KBr.	110
Figura 6.3	Representação ORTEP da estrutura molecular de 3-formil-6-metilcromona- <i>para</i> -cloro-fenilhidrazona HCrpClPh DMSO (20a). Elipsoides com 50% de probabilidade; os átomos de hidrogênio foram omitidos para obter maior clareza nas imagens.	113
Figura 6.4	Visão das interações de hidrogênio para o composto HCrpClPh·DMSO (20a).	114
Figura 6.5	Atividade citotóxica de 3-formil-6-metilcromona-fenilhidrazona HCrPh (19) e 3-formil-6-metilcromona- <i>para</i> -cloro-fenilhidrazona HCrpClPh (20) contra células B16-F10 (melanoma murino) e Melan-a (melanócito murino) (Viabilidade celular medida através do método MTT).	115
Figura 7.1	Estrutura dos complexos de prata(I) (21) e (22) com as hidrazonas derivadas de 3-formil-6-metilcromona e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes.	116
Figura 7.2	Espectros na região do Infravermelho de HCrpClPh (20) (A) e de seu complexo [Ag(HCrpClPh) ₂]NO ₃ (22) (B) em pastilhas de KBr.	118
Figura 7.3	Espectros de RMN ¹ H (400 MHz em DMSO- <i>d</i> ₆) do ligante livre HCrpClPh (20) e o complexo [Ag(HCrpClPh) ₂]NO ₃ (22).	121

Figura 7.4	Efeito citotóxico das hidrazonas (19) e (20) derivadas de 3-formil-6-metilcromona e seus respectivos complexos de prata(I) (21) e (22) frente as linhagens celular BF6-B10-a nas concentrações de 10^{-8} a 10^{-5} M. A sobrevivência celular foi medida pelo método MTT.	130
Figura 7.5	Efeito citotóxico das hidrazonas (19) e (20) derivadas de 3-formil-6-metilcromona e seus respectivos complexos de prata(I) (21) e (22) frente as linhagens celular Melan-a nas concentrações de 10^{-8} a 10^{-5} M. A sobrevivência celular foi medida pelo método MTT.	131
Figura 7.6	A. Espectros de emissão do BE-CT-DNA 10 μ M Tampão Tris-HCl, pH 7,20, T = 25 °C), na presença de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 μ M do complexo (22) B. Na direita gráficos de I_0/I vs [Q]. As setas indicam o sentido das mudanças na intensidade em função do aumento da concentração do composto. (λ_{emi} = 605 nm, λ_{exc} = 545 nm).	133
Figura 7.7	A. Espectros de emissão da BSA (2,0 μ M, Tris-HCl, pH 7,2, T= 25 °C) em presença de 0 – 0,75 μ M do complexo $[Ag(HCrpClPh)_2]NO_3$ (22). A seta mostra a supressão da fluorescência após a adição de concentrações crescentes do complexo. B. Gráfico de (I_0/I) vs [complexo]]. C. Gráfico de $(\log [(I_0-I) / I])$ vs $\log[\text{complexo}]$. (λ_{exc} =285 nm; λ_{emi} = 342 nm).	134

Lista de Esquemas

Esquema 2.1	Sínteses dos complexos de cobre(II) $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2] \cdot \text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)] \cdot \text{ClO}_4$ (18).	27
Esquema 2.2	Reação do radical DPPH• com e um agente doador de H• (R-H).	34
Esquema 2.3	Formação do ânion superóxido pelo sistema riboflavina/metionina/iluminação.	35
Esquema 3.1	Proposta de mecanismo de captura do radical DPPH• para as hidrazonas (1) e (5).	57
Esquema 5.1	Sínteses e estruturas propostas para os compostos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2] \cdot \text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)] \cdot \text{ClO}_4$ (18).	81

Lista de Tabelas

Tabela 2.1	Atribuições de tipo eletrólito em solução.	22
Tabela 3.1	Formula molecular, temperatura de fusão, análises elementar*, massa molar e rendimentos das reações para as hidrazonas derivadas do <i>trans</i> -4-estilbenocarboxaldeído HStAc (1), HStPh (2), HStpClPh (3), HStpNO ₂ Ph (4), HStpT (5), HStBz (6) e HStpOHPh (7).	48
Tabela 3.2	Bandas selecionadas nos espectros de infravermelho (cm ⁻¹) das hidrazonas HStAc (1), HStPh (2), HStpClPh (3), HStpNO ₂ Ph (4), HStpT (5), HStBz (6), HStpOHPh (7).	49
Tabela 3.3	Atribuição, deslocamentos químicos e constantes de acoplamento <i>J</i> [], multiplicidade ^a dos principais sinais de RMN de ¹ H das hidrazonas (2), (3), (4) e (5).	51
Tabela 3.4	Valores de IC ₅₀ (μmolL ⁻¹) das hidrazonas HStAc (1), HStPh (2) HStpClPh (3), HStpNO ₂ Ph (4), HStpT (5), HStBz (6), HStpOHPh (7) pelo método de microdiluição.	54
Tabela 4.1	Formula molecular, análises elementares (valores calculados entre parênteses), temperaturas de fusão (°C) ^a , massas molar e condutividades molar (Λ _M , Ω ⁻¹ cm ² mol ⁻¹) ^b , momento magnético e porcentagens de rendimento, para os compostos [Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8), [Cu(HStpClPh) ₂ Cl ₂] (9), [Cu(HStpNO ₂ Ph) ₂ Cl ₂] (10), [Cu(HStpT) ₂ Cl ₂] (11), [Cu(HStBz) ₂ Cl ₂] (12) e [Cu(HStpOHPh) ₂ Cl ₂] (13).	61
Tabela 4.2	Principais bandas dos espectros de infravermelho (cm ⁻¹) das hidrazonas e dos complexos [Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8), [Cu(HStpClPh) ₂ Cl ₂] (9), [Cu(HStpNO ₂ Ph) ₂ Cl ₂] (10), [Cu(HStpT) ₂ Cl ₂] (11), [Cu(HStBz) ₂ Cl ₂] (12) e [Cu(HStpOHPh) ₂ Cl ₂] (13).	62
Tabela 4.3	Parâmetros dos espectros de RPE dos complexos [Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8), [Cu(HStpClPh) ₂ Cl ₂] (9),	65

[Cu(HStpNO₂Ph)₂Cl₂] (10), [Cu(HStpT)₂Cl₂] (11), [Cu(HStBz)₂Cl₂] (12) e [Cu(HStpOHPh)₂Cl₂] (13) no estado sólido a temperatura ambiente.

Tabela 4.4	Parâmetros dos espectros de RPE dos complexos [Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8), [Cu(HStpClPh) ₂ Cl ₂] (9), [Cu(HStpNO ₂ Ph) ₂ Cl ₂] (10), [Cu(HStpT) ₂ Cl ₂] (11), [Cu(HStBz) ₂ Cl ₂] (12) e [Cu(HStpOHPh) ₂ Cl ₂] (13) em DMSO a 77 K.	66
Tabela 4.5	Energias livres relativas, frequências vibracionais e parâmetros RPE calculados para o complexo [Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8).	68
Tabela 4.6	Valores de IC ₅₀ (μmolL ⁻¹) dos ligantes hidrazonas e seus complexos [Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8), [Cu(HStpClPh) ₂ Cl ₂] (9), [Cu(HStpNO ₂ Ph) ₂ Cl ₂] (10), [Cu(HStpT) ₂ Cl ₂] (11), [Cu(HStBz) ₂ Cl ₂] (12) e [Cu(HStpOHPh) ₂ Cl ₂] (13).	69
Tabela 4.7	Porcentagem de sequestro de DPPH• dos ligantes hidrazonas e seus complexos [Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8), [Cu(HStpClPh) ₂ Cl ₂] (9), [Cu(HStpNO ₂ Ph) ₂ Cl ₂] (10), [Cu(HStpT) ₂ Cl ₂] (11), [Cu(HStBz) ₂ Cl ₂] (12) e [Cu(HStpOHPh) ₂ Cl ₂] (13) nas concentrações de 80 e 320 μM.	70
Tabela 4.8	Porcentagem de sequestro de ânions superóxido dos ligantes hidrazonas e seus complexos [Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8), [Cu(HStpClPh) ₂ Cl ₂] (9), [Cu(HStpNO ₂ Ph) ₂ Cl ₂] (10), [Cu(HStpT) ₂ Cl ₂] (11), [Cu(HStBz) ₂ Cl ₂] (12) e [Cu(HStpOHPh) ₂ Cl ₂] (13) nas concentrações de 80 e 320 μM.	72
Tabela 4.9	Parâmetros de RPE do composto [Cu(HStpOHPh) ₂ Cl ₂] (13) na presença de BSA e HSA.	76
Tabela 5.1	Análise elementar (valores calculados entre parênteses), temperaturas de fusão ^a (°C), condutividades molares	80

(Λ_M , $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$)^b e porcentagem de rendimento, para os compostos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18).

Tabela 5.2	Principais bandas dos espectros de infravermelho (cm^{-1}) de naringenina (Nar) (14), hesperetina (Hsp) (15), 1,10-fenantrolina (Fen) (16) e dos complexos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18).	82
Tabela 5.3	Parâmetros obtidos dos espectros de RPE dos complexos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18) em pó a temperatura ambiente.	84
Tabela 5.4	Parâmetros obtidos dos espectros de RPE dos complexos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18) em DMSO a 77 K.	85
Tabela 5.5	Dados obtidos a partir da análise das curvas TG/DTG dos complexos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18).	86
Tabela 5.6	Porcentagem de sequestro de DPPH* dos compostos naringenina (Nar) (14), hesperetina (Hsp) (15), 1,10-fenantrolina (Fen) (16) e os complexos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18) a uma concentração de 320 μM .	87
Tabela 5.7	Porcentagem de sequestro de DPPH* do complexo $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18) a uma concentração de 80 μM .	87
Tabela 5.8	Porcentagem de sequestro de ânions superóxido dos compostos naringenina (Nar) (14), hesperetina (Hsp) (15), 1,10-fenantrolina (Fen) (16) e os complexos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17) e	87

	[Cu(Hsp)(Fen)(OH ₂)]·ClO ₄ (18) a uma concentração de 320 μM.	
Tabela 5.9	Porcentagem de sequestro de ânions superóxido para o [Cu(Nar)(Fen)(OH ₂) ₂]·ClO ₄ (17) uma concentração de 80 μM.	88
Tabela 5.10	Valores de IC ₅₀ (μM) ± DP para os complexos (17) e (18) frente às células A549 e células normais de carcinoma de pulmão LL-24 e HUVEC.	89
Tabela 5.11	Constante de ligação (K _b), coeficiente de regressão linear (R ²) para a interação do composto [Cu(Hsp)(Fen)(OH ₂)]·ClO ₄ (18) com o CT-DNA.	96
Tabela 5.12	Constantes de Stern-Volmer (K _{sv}) de ligação aparente (K _{app}) e coeficiente de determinação da regressão linear (R ²) dos complexos [Cu(Nar)(Fen)(OH ₂) ₂]·ClO ₄ (17) e [Cu(Hsp)(Fen)(OH ₂)]·ClO ₄ (18).	98
Tabela 5.13	Constantes de ligação (K _b) e número de sítios de ligação (n) obtidos para os compostos naringenina (Nar) (14), hesperetina (Hsp) (15), [Cu(Nar)(Fen)(OH ₂) ₂]·ClO ₄ (17) e [Cu(Hsp)(Fen)(OH ₂)]·ClO ₄ (18).	103
Tabela 5.14	Constantes de Stern-Volmer (K _{sv}), constante de velocidade de supressão (K _q) e coeficientes de determinação da regressão linear (R ²) obtidas para os compostos [Cu(Nar)(Fen)(OH ₂) ₂]·ClO ₄ (17) e [Cu(Hsp)(Fen)(OH ₂)]·ClO ₄ (18), naringenina (Nar) (14), hesperetina (Hsp) (15).	104
Tabela 5.15	Parâmetros de RPE dos compostos [Cu(Nar)(Fen)(OH ₂) ₂]·ClO ₄ (17) e [Cu(Hsp)(Fen)(OH ₂)]·ClO ₄ (18) na presença de BSA e HSA.	106
Tabela 6.1	Temperatura de fusão, análise elementar*, massa molar e rendimentos das reações para 3-formil-6-metilcromona-fenilhidrazona HCrPh (19) e 3-formil-6-	109

	metilcromona- <i>para</i> -cloro-fenilhidrazona HCrpClPh (20).	
Tabela 6.2	Bandas selecionadas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das hidrazonas HCrPh (19) e HCrpClPh (20).	110
Tabela 6.3	Atribuições, deslocamentos químicos e constantes de acoplamento J [], multiplicidade ^a dos principais sinais de RMN de ^1H das hidrazonas (19) e (20).	112
Tabela 6.4	Atribuições e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ^{13}C das hidrazonas (19) e (20).	113
Tabela 7.1	Formula molecular, temperatura de fusão ($^{\circ}\text{C}$), análises elementar*, condutimetria molar ^a , massa molar e rendimentos das reações para $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21) e $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22).	117
Tabela 7.2	Bandas selecionadas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das hidrazonas HCrPh (19), HCrpClPh (20) e seus complexos de prata(I) $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21) e $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22).	119
Tabela 7.3	Atribuições, deslocamento químico (δ , ppm), constantes de acoplamento J [] e multiplicidades dos principais sinais de RMN ^1H da hidrazona HCrPh (19) (400 MHz) e de seu complexo de prata(I) $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21) (400 MHz), em $\text{DMSO}-d_6$.	122
Tabela 7.4	Atribuições, deslocamento químico (δ , ppm), constantes de acoplamento J [] e multiplicidades dos principais sinais de RMN ^1H da hidrazona HCrpClPh (20) (400 MHz) e de seu complexo de prata(I) $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22) (400 MHz), em $\text{DMSO}-d_6$.	122
Tabela 7.5	Atribuições, deslocamento químico (δ , ppm) dos principais sinais de RMN ^{13}C e subespectro DEPT 135 da hidrazona HCrPh (19) (100 MHz) e de seu complexo de prata(I) $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21) (100 MHz), em $\text{DMSO}-d_6$.	123

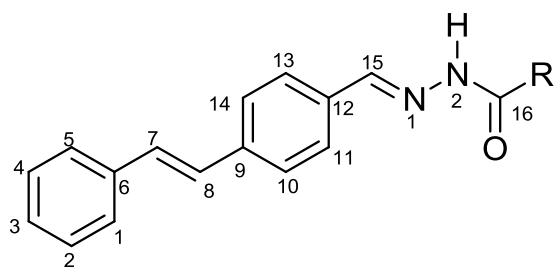
Tabela 7.6	Atribuições, deslocamento químico (δ , ppm) dos principais sinais de RMN ^{13}C e subespectro DEPT 135 da hidrazona HCrpClPh (20) (100 MHz) e de seu complexo de prata(I) $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22) (100 MHz), em $\text{DMSO-}d_6$.	123
Tabela 7.7	Relação massa/carga (m/z) das espécies encontradas nos espectros de massas dos complexos de prata(I) $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21) e $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22).	124
Tabela 7.8	Valores de IC_{50} (μmolL^{-1}) das hidrazonas derivadas de 3-formil-6-metilcromona (19), (20) e de seus complexos de $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21) e $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22) frente a bactérias <i>Gram</i> -positivas <i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus sanguinis</i> e <i>Gram</i> -negativas <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella entérica</i> e <i>Salmonella typhimurium</i> .	127
Tabela 7.9	Valores de IC_{50} (μmolL^{-1}) das hidrazonas derivadas de 3-formil-6-metilcromona (19), (20) e de seus complexos de $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21) e $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22) frente a fungos patogênicos <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida dubliniensis</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida lusitaniae</i> e <i>Candida glabrata</i> .	128
Tabela 7.10	Constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de (K_{app}) e coeficientes de determinação da regressão linear (R^2) obtidas para o complexo $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22).	133
Tabela 7.11	Constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de velocidade de supressão (K_q) e coeficientes de determinação da regressão linear (R^2) obtidas para o composto $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22).	135
Tabela 7.12	Constantes de ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n) obtidas para o composto $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22).	135

Lista de Abreviaturas

$\Delta m\Psi$	Potencial elétrico da membrana mitocondrial
ATCC	American Type Culture Collection
BE	Brometo de etídeo
BHI	Brain Heart Infusion
BSA	Albumina sérica bovina
CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CT-DNA	Ácido desoxirribonucléico (calf thymus)
d	Dupleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DHE	dihidroetídio
DMF	4,4-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Fen	1,10- fenantrolina
FDA	Food and Drugs Administration
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSA	Albumina sérica humana
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% da atividade
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
m	Multiplete
MHz	MegaHertz
MTT	3-(4,5dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NBT	Nitroazul de tetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PI	Iodeto de propídio
PBS	Solução de tampão fosfato
Ph	Fenila

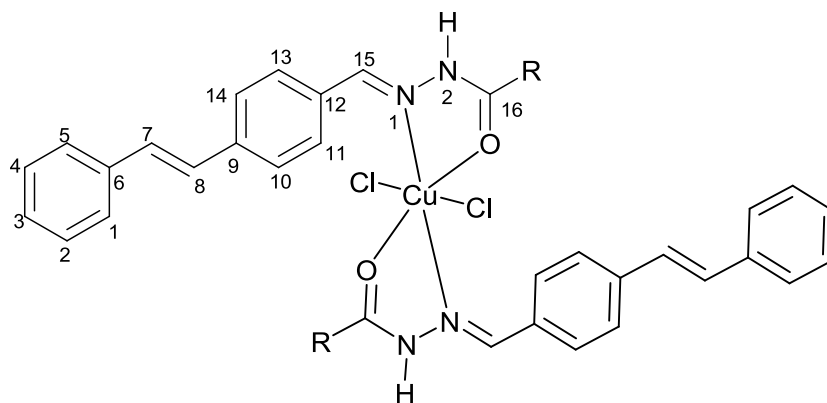
q:	Quarteto
RPE	Ressonância paramagnética eletrônica
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
ROS	Espécies reativas de oxigênio
s	Simpleto
SDB	Sabouraud Dextrose Broth
t	Tripleto
TAH	Transferência de um átomo de hidrogênio
TE	Transferência de um átomo de elétron
TMRE	Tetrametilrodamina etil éster
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado com aoTNF
UFC	Unidades formadoras de colônias

INDICE DE ESTRUTURAS



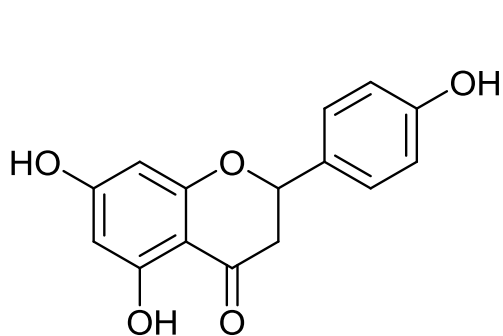
R=

CH ₃ ,	HStAc	(1)	<i>p</i> T,	HSt <i>p</i> T	(5)
Ph,	HStPh	(2)	Bz,	HStBz	(6)
<i>p</i> ClPh,	HSt <i>p</i> ClPh	(3)	<i>p</i> OHPh,	HSt <i>p</i> OHPh	(7)
<i>p</i> NO ₂ ,	HSt <i>p</i> NO ₂	(4)			

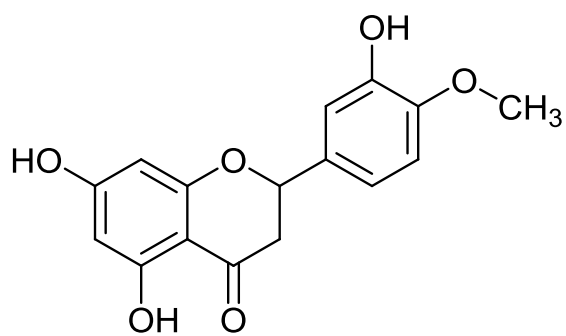


R=

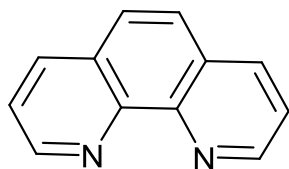
CH ₃ ,	[Cu(HStAc) ₂ Cl ₂]	(8)	<i>p</i> T,	[Cu(HSt <i>p</i> T) ₂ Cl ₂]	(11)
<i>p</i> ClPh,	[Cu(HSt <i>p</i> ClPh) ₂ Cl ₂]	(9)	Bz,	[Cu(HStBz) ₂ Cl ₂]	(12)
<i>p</i> NO ₂ ,	[Cu(HSt <i>p</i> NO ₂) ₂ Cl ₂]	(10)	<i>p</i> OHPh,	[Cu(HSt <i>p</i> OHPh) ₂ Cl ₂]	(13)



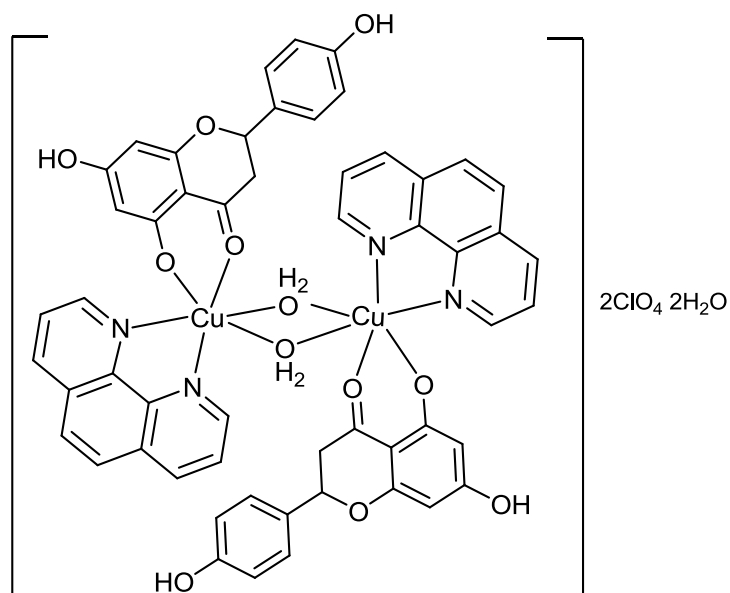
Nar (14)



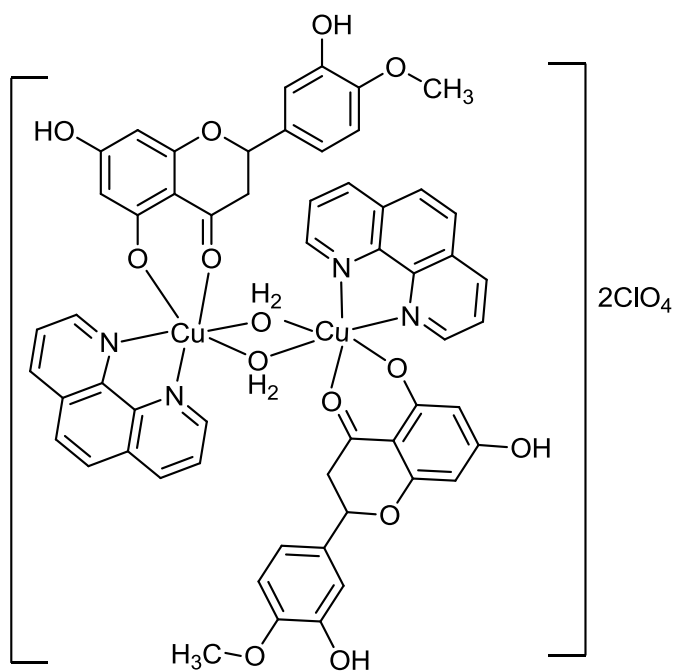
Hsp (15)



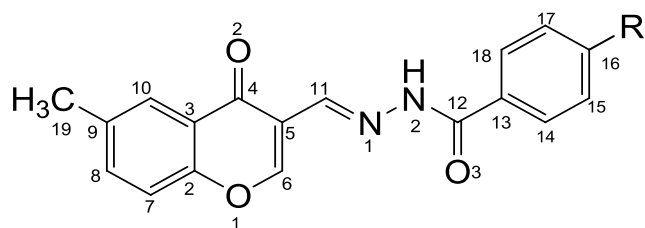
Fen (**16**)



$[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]_2 \cdot 2\text{ClO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**17**)



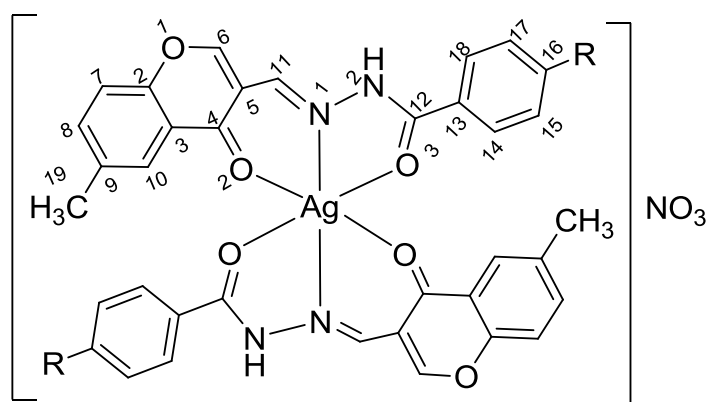
$[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]_2 \cdot 2\text{ClO}_4$ (**18**)



R=

H, HCrPh (19)

Cl, HCrpClPh (20)



R= H, [Ag(HCrPh)₂]NO₃·2H₂O (21)

Cl, [Ag(HCrpClPh)₂]NO₃ (22)

1. INTRODUÇÃO

1.1 Química Medicinal Inorgânica

Segundo a IUPAC a Química Medicinal é uma disciplina baseada na química, envolvendo aspectos das ciências biológica, médica e farmacêutica, cuja missão é o planejamento, a descoberta, a invenção, a identificação e a preparação de compostos biologicamente ativos (protótipos), o estudo do metabolismo, a interpretação do mecanismo de ação a nível molecular e a construção as relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica (SAR: Structure-Activity Relationships).^{1,2}

A Química Medicinal Inorgânica é uma área multidisciplinar, que combina Química Orgânica, Química Inorgânica, Farmacologia e Bioquímica³, e engloba o estudo de complexos metálicos ativos, íons metálicos, compostos como agentes potenciais de ligação a metais, e o uso dessas espécies como agentes terapêuticos ou como auxiliares de diagnóstico.⁴ A Química Inorgânica contribui à Química Medicinal no desenvolvimento de novos medicamentos com propriedades farmacológicas específicas a partir da escolha do metal devido a suas propriedades,³ tais como diversos estados de oxidação, números de coordenação, geometrias, como também efeitos termodinâmicos e cinéticos característicos de cada íon metálico.⁵ O planejamento de ligantes para metalofármacos ou para complexar metais tóxicos é também uma área de grande interesse na Química Medicinal Inorgânica.

Por outro lado, os íons metálicos têm um papel relevante nos seres vivos e estão envolvidos em uma grande variedade de funções como as seguintes:⁶

- ✓ Funções estruturais (exemplo: fosfatos de cálcio)
- ✓ Ativação e transporte de oxigênio (exemplo: hemoglobina e mioglobina)
- ✓ O transporte de elétrons (exemplos: as proteínas de Fe/S chamadas ferredoxinas)
- ✓ Funções em processos catalíticos redox (exemplos: oxidases dependentes de cobre)

¹L. M. Lima. Quim. Nova. 6(2007)1456.

² <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem>

³ H. Beraldo. Cadernos temáticos de Química Nova na Escola. 6(2005)4.

⁴ T. Storr, K. H. Thompson. C. Orvig. Chem. Soc. Rev. 35(2006)534.

⁵ P. C. A. Bruijninx, P. J. Sadle. Curr. Opin. Chem. Biol. 12(2008)197.

⁶ E. J Baran. Química Bionorgânica: Mc.Graw-Hill Interamericana de España S.A. 1995.

- ✓ Funções catalíticas em reações ácido-base das reações (exemplos: a urease dependente do zinco).

Além da importância biológica vale ressaltar que historicamente o emprego de metais na medicina e no tratamento de doenças é conhecido desde a antiguidade. O cobre era usado na esterilização da água cerca de 3000 a.C, o ouro era empregado na China e na Arábia nos anos 3500 a.C na produção de medicamentos. Na idade média compostos de arsênio, mercúrio, antimônio e ouro foram utilizados para o tratamento de doenças como por exemplo sífilis, tuberculose e leishmaniose.³

Apesar disso, a Química Medicinal Inorgânica só teve grande impulso pela descoberta, por Barnett Rosenberg e colaboradores em 1965, das propriedades antitumorais do *cis*-(diaminodiclouro)platina(II), conhecido como "cisplatina". Esta descoberta resultou no interesse para uso terapêutico de complexos metálicos, estudos de propriedades farmacológicas, assim como também de estratégias eficazes de vetorização de metalofármacos.⁷

Muitos compostos inorgânicos são empregados em uso clínico tais como a auranofina, contendo ouro(I), utilizada no tratamento de artrite reumatoide⁸, o antimoniato de meglumina usado contra leishmanioses⁹, o nitroprussiato de sódio, empregado em emergências hipertensivas,¹⁰ compostos de bismuto para o tratamento de distúrbios gástricos, compostos contendo tecnécio (^{99m}Tc), rênio (¹⁸⁶Re), cobre (⁶⁴Cu), índio (¹¹¹In), galio (⁶⁸Ga), ítrio (⁹⁰Y) usados como agentes de imagem e diagnóstico,¹¹ e complexos à base de lítio em psiquiatria com destaque para o tratamento de distúrbios maníaco-depressivos.¹²

1.2 Hidrazonas como ligantes para candidatos a metalofármacos

As hidrazonas constituem uma classe de compostos orgânicos azometínicos que apresentam como estrutura geral o esqueleto $R_2C=NNR_2$, e podem ser consideradas bases de Schiff derivadas de hidrazinas. As hidrazonas são obtidas comumente pela reação entre a hidrazina com cetonas ou aldeídos em pH

⁷ H. Beraldo. Cienc. Cult. 63 (2011) 29.

⁸ C. F. Shaw III, Chem Rev. 99 (1999) 2589

⁹ C. Demicheli, F. Frézard, M. Lecouvey, A. Garnier-Suillerot. B.B.A. 1570(2002)192.

¹⁰ D. G Hottinger, D. S Beebe, T. Kozhimannil, R. C Prielipp, K. G Belani. J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol. 30(2014)462. doi: 10.4103/0970-9185.142799.

¹¹ C. S. Cutler, H. M. Hennkens, N. Sisay, S. Huclier-Markai, S. S. Jurisso. Chem. Rev.113(2013) 858.

¹² P. S. Klein, D. A. Melton. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93(1996)8455.

ligeiramente ácido, como mostrado na Figura 1.1 para hidrazonas derivadas de aldeídos:^{13,14}

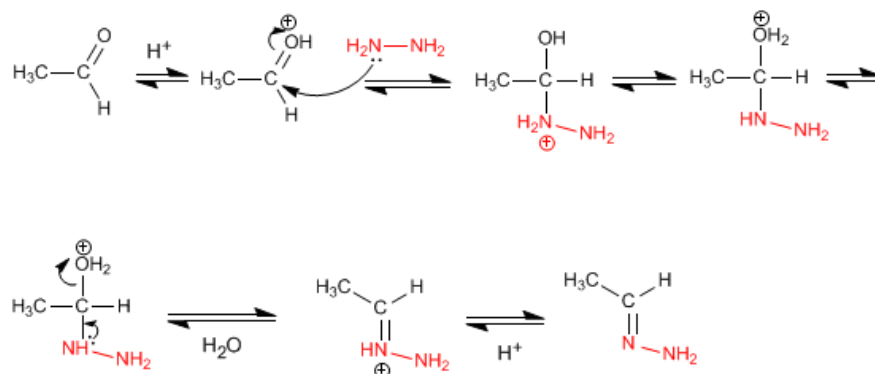


Figura 1.1- Mecanismo proposto para a reação entre a hidrazina e aldeído para formar hidrazonas.

As hidrazonas são usadas na análise qualitativa de grupos carbonila, na elaboração de padrões para espectrofotometria. Na indústria, podem ser utilizadas como plastificantes, estabilizadores de polímeros e iniciadores de polimerização.¹⁵

As hidrazonas têm sido intensamente investigadas em diversas áreas em razão de sua capacidade quelante e de suas aplicações biológicas¹⁶ como agentes bactericidas¹⁷ e bacteriestáticos,¹⁸ anticonvulsivantes,¹⁹ analgésicos,²⁰ anti-inflamatórios,²¹ antioxidantes,²² antituberculose²³ e antitumorais.²⁴ Neste sentido, tem sido alvo de estudo derivados hidrazônicos com metais, que demonstram que a

¹³ <http://www.quimicaorganica.org/aldeidos-y-cetonas/232-formacion-de-hidrazonas.html>

¹⁴ <http://www.quimicaorganica.net/hidrazonas.html>

¹⁵ G. A. Ibañez, G. M. Escandar, A. C. Olivieri. *J. Mol. Struct.* 605(2002)17.

¹⁶ G. Verma, A. Marella, M. Shaquiquzzaman, M. Akhtar, M. R. Ali, M. M. Alam. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 6(2014) 68.

¹⁷ S. G. Küçüküzümlü, A. Mazi, S. Sahin, S. Öztürk, J. Stables. *Eur. J. Med. Chem.* 38(2003)1005.

¹⁸ P. Sharma, A. Kumar, S. Sharma, N. Rane. *Bioorg. & Med. Chem. Letters.*, Issue 4, 15(2005)937.

¹⁹ J. R. Dimmock, S. C. Vashishtha, J. P. Stables. *Eur. J. Med. Chem.* 35(2000)241.

²⁰ A. R. Todeschini, A. L. P. de Miranda, K. C. M. da Silva, S. C. Parrini, E. J. Barreiro. *Eur. J. Med. Chem.* 33(1998)189.

²¹ K. O. Mohammed, Y. M. Nissan. *Chem. Biol. Drug. Des.* 84(2014)473.

²² M. Hermes-Lima, P. Ponka, H. M. Schulman. *Biochim. Biophys. Acta.* 1523(2000)154.

²³ K. Bedia, O. Elçin, U. Seda, K. Fatma, S. Nathaly, R. Sevim, A. Dimoglo. *Eur. J. Med. Chem.* 41(2006)1253.

²⁴ S. Rollas, Ş. G. Küçüküzümlü. *Molecules.* 12(2007)1910. doi:10.3390/12081910.

coordenação ao centro metálico acentua a ação farmacológica, incentivando a busca por novos complexos como agentes terapêuticos.²⁵

Os derivados de hidrazonas que contêm o grupo doador C=O são conhecidos como acil hidrazonas e apresentam como fórmula geral R-CO-NH-NH₂ e R-CO-NH-N=CHR. São ligantes muito atraentes na química de coordenação devido ao seu potencial quelante e podem comportar-se como ligantes neutros, aniônicos, bi-ou tridentados.²⁶ Além disso, seus complexos exibem um amplo perfil farmacológico como agentes antitumorais²⁷ e antioxidantes.²⁸

Vale salientar relatos na literatura sobre a sínteses, caracterização e estudos de atividade biológica de hidrazonas derivadas de salicilaldeído e seus complexos metálicos que têm apresentado muito interesse em diversos campos da química como catalisadores,²⁹ sondas luminescentes,³⁰ e sensores moleculares.³¹ Por outro lado, tem sido investigada a atividade de derivados de salicilaldeído benzoilhidrazonas para tratar desordens genéticas como a talassemia.³²

Além disso em nosso grupo de pesquisa foi demonstrado que hidrazonas derivadas de salicilaldeído e seus complexos de zinco(II) apresentam atividade anti-inflamatória e anti-nociceptiva, sendo que a coordenação ao metal resultou em maior atividade anti-nociceptiva.³³ Em outro trabalho de nosso grupo foi verificado que complexos de gálio(III) de hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina mostraram-se mais ativos como agentes citotóxicos contra células de tumores cerebrais humanos do que as hidrazonas livres.^{34,35}

²⁵ A. A. El-Sherif, M. M. Shoukry, M. M. A. Abd-Elgawad. *Spectrochim. Acta Part A: Molec. Biomol. Spectrosc.* 98(2012)307.

²⁶ D. Rogolino, M. Carcelli, A. Bacchi, C. Compari, L. Contardi, E. Fiscaro, A. Gatti, M. Sehic, A. Stevaert, L. Naesens. *J. Inorg. Biochem.* 150(2015)9.

²⁷ T. Nasr, S. Bondock, M. Youns. *Eur. J. Med. Chem.* 76(2014)539.

²⁸ Y. Harinath, D. Harikishor Kumar Reddy, B. Naresh Kumaa, Ch. Apparao, K. Sessaiah. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 101(2013)264.

²⁹ O. Pouralimardan, A. C. Chamayou, C. Janiak, H. Hosseini-Monfared. *Inorg. Chim. Acta.* 360(2007)1599.

³⁰ C. Basu, S. Chowdhury, R. Banerjee, H. S. Evans, S. Mukherjee. *Polyhedron.* 26(2007)3617.

³¹ M. Bakir, O. Green, W. H. Mulder. *J. Mol. Struct.* 873(2008)17.

³² J. L. Buss, M. Hermes-Lima, P. Ponka. *Iron Chelation Therapy.* Springer US. (2002)205.

³³ W. Bispo Júnior, M. S. Alexandre-Moreira, M. A. Alves, A. Perez-Rebolledo, G. L. Parrilha, E. E. Castellano, O. E. Piro 5, E. J. Barreiro, L. Moreira, H. Beraldo. *Molecules.* 16(2011)6902. doi:10.3390/molecules16086902.

³⁴ A. A. R. Despaigne, G. L. Parrilha, J. B. Izidoro, P. R. da Costa, R. G. dos Santos, O. E. Piro, E. E. Castellano, W. R. Rocha, H. Beraldo. *Eur. J. Med. Chem.* 50(2012)172.

³⁵ J. G. da Silva, L. S. Azzolini, S. M. S. V. Wardell, J. L. Wardell, H. Beraldo. *Polyhedron* 28(2009)2305.

1.2.1 Hidrazonas derivadas de estilbeno como ligantes para candidatos a metalofármacos

Os estilbenos são derivados de *cis* e *trans* 1,2-difeniletieno (Figura 1.2). Os estilbenóides são derivados hidroxilados de estilbenos que apresentam o esqueleto básico C6-C2-C6. Estilbenóides são produzidos por plantas³⁶ e fungos.³⁷

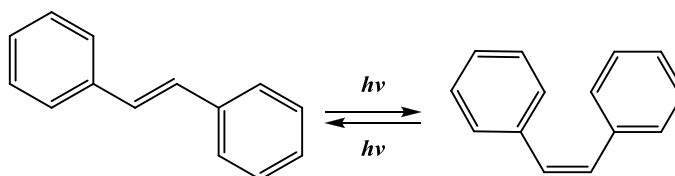


Figura 1.2-*Trans* e *cis*-estilbeno.

O composto mais importante da classe dos estilbenóides é o *trans*-resveratrol, um polifenol não flavonóide (Figura 1.3) que tem despertado muito interesse em razão de suas atividades antioxidante,^{38,39} anti-inflamatória,⁴⁰ anticancerígena,⁴¹ quimio-preventiva e cardioprotetora⁴² entre outras.^{43,44}

Por outro lado, derivados de estilbeno de tiossemicarbazonas radiomarcados estão sendo sugeridos para o diagnóstico por imagem para a Doença de Alzheimer por serem capazes de ter interações de tipo π - π stacking e se ligar às placas A β amiloides.⁴⁵ Além disso, derivados de estilbeno tem mostrado atividades antibacteriana, antifúngica e anticancerígena.⁴⁶

A literatura relata a síntese por química combinatória dos derivados *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-*para*-hidroxi-fenilhidrazona, *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-pironahidrazona, *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-*para*-amino-fenilhidrazona e *trans*-4-

³⁶ V. S. Sobolev, S. I. Khan, N. Tabanca, D. E. Wedge, S.P. Manly, S.J. Cutler, M.R. Coy, J. J. Becnel, S.A. Neff, J.B. Gloer. J. Agric. Food Chem.59(2011)1673. doi: 10.1021/jf104742n

³⁷ J. Wang, D. G. Cox, W. Ding, G. Huang, Y. Lin, C. Li. Mar. Drugs. 12(2014)2840. doi:10.3390/md12052840

³⁸ M. Singh, M. Arseneault, T. Sanderson, V. Murthy, C. Ramassamy. J. Agric. Food Chem. 56(2008)4855.

³⁹ J. H Jang, Y. J. Surh. Mutat. Res. 496(2001)181.

⁴⁰ C. A. de la Lastra, I. Villegas. Mol. Nutr. Food Res. 49(2005)405. doi: 10.1002/mnfr.200500022.

⁴¹ M. Jang, L. Cai, G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. Beecher, H. H Fong, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn, R. G. Mehta, R. C. Moon, J. M. Pezzuto. Science. 275(1997)218. doi: 10.1126/science.275.5297.218.

⁴² C. Nguyen, J. F. Savouret, M. Widerak, M. T. Corvol, F. Rannou. Nutrients 9(2017)45. doi:10.3390/nu9010045.

⁴³ A. S. Azmi, S. H. Bhat, S. M. Hadi. FEBS Letters. 579 (2005) 3131. doi: 10.1016/j.febslet.2005.04.077.

⁴⁴ F. Orsini, L. Verotta, K. Klimo, C. Gerhäuser. Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 349(2016)414.

⁴⁵ S. C. Lim, B. M. Paterson, M. T. Fodero-Tavoletti, G. J. O'Keefe, R. Cappai, K. J. Barnham, V. L. Villemagne, P. S. Donnelly. Chem. Commun. 46(2010)5437. doi: 10.1039/C0CC01175D.

⁴⁶ C. Rodríguez-Rodríguez, M. Telpoukhovskaia, C. Orvig. Coord. Chem. Rev. 256(2012)2308.

estilbenocarboxaldeído-*para*-amino-piridinahidrazona para estudos de interação fármaco-receptor de receptores de estrógeno.⁴⁷

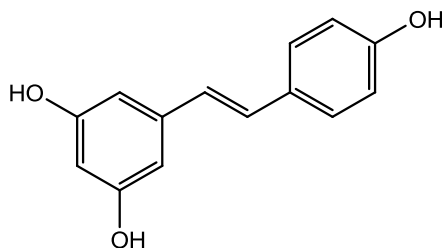


Figura 1.3- Estrutura do resveratrol.

No entanto, ainda há poucos trabalhos a respeito de estilbenos funcionalizados com hidrazonas, como desenvolvido no presente trabalho. Esses compostos reúnem dois grupos farmacofóricos e foram planejados como ligantes para complexos metálicos com potencial atividade farmacológica. A porção hidrazona adiciona um sistema quelante à molécula, permitindo a complexação com vários metais, entre os quais o cobre(II), com a formação de complexos bioativos.

1.2.2 Hidrazonas derivadas de cromonas como ligantes para candidatos a metalofármacos

As cromonas são compostos heterocíclicos derivados de benzopirano substituídos com um grupo cetona no anel pirano (Figura 1.4). Os benzopiranos são compostos orgânicos policíclicos que resultam da fusão de um anel benzeno com um anel pirano e são encontrados em compostos como os flavonoides, amplamente distribuídos na natureza, especialmente no reino vegetal.⁴⁸

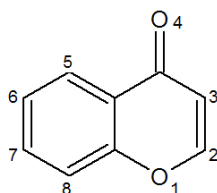


Figura 1.4- Estrutura da cromona.

⁴⁷ Y. Kim, M. Koh, D. K. Kim, H. S. Choi, S. Bum Park. J. Comb. Chem. 11(2009)928. doi: 10.1021/cc900081j.

⁴⁸ Y. Li, Z. Yang. J. Fluoresc. 20(2010)329. doi: 10.1007/s10895-009-0561-0.

Compostos que contêm a estrutura de cromona têm sido amplamente investigados na química orgânica e inorgânica devido às suas aplicações biológicas,⁴⁹ como agentes anti-inflamatórios, antibacterianos, antitumorais, antioxidantes,⁵⁰ anti-HIV,⁵¹ vasodilatadores, antivirais e antialérgicos.⁵² Vários derivados de cromonas foram reportados como inibidores da proteína quinase,⁵³ são capazes de se ligar a receptores de benzodiazepina e foram indicados como agentes farmacológicos para o tratamento de fibrose cística.

Além disso, os derivados de cromona têm sido utilizados como precursores para a síntese de compostos heterocíclicos de oxigênio.⁵⁴ As hidrazonas derivadas de cromonas e seus complexos metálicos também têm recebido considerável atenção nos últimos anos, em virtude de sua diversidade estrutural, propriedades biológicas e farmacêuticas.⁵⁵ Os derivados 3-formilcromona (Figura 1.5) proporcionam um novo farmacóforo para o desenho de fármacos para o tratamento de diabetes e obesidade,⁵⁶ como também de agentes antitumorais.⁵⁵ Em razão dessas bioatividades, uma série de derivados hidrazônicos de cromonas e seus complexos metálicos têm sido investigados, os quais apresentam diferentes aplicações farmacológicas.⁵⁷

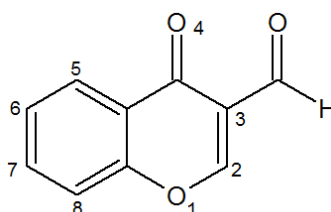


Figura 1.5- Estrutura de 3-formilcromona.

⁴⁹ G. W. Kabalka, A. R. Mereddy. *Tetrahedron Lett.* 46(2005)6315.

⁵⁰ N. Phosrithong, W. Samee, P. Nunthanavanit, J. Ungwitayatorn. *Chem. Biol. Drug .Des.* 79(2012)981. doi: 10.1111/j.1747-0285.2012.01368.x.

⁵¹ T. Zhou, Q. Shi, K. H. Lee. *Tetrahedron Lett.* 51(2010)4382.

⁵² W. A. Velema, M.van der Toorn, W. Szymanski, B. L. Feringa. *J. Med. Chem.* 56(2013)4456. doi:10.1021/jm400115k.

⁵³ C. Dyrager, L.N. Möllers, L. K. Kjäll, J. P. Alao, P. Dinér, F. K. Wallner, P. Sunnerhagen, M. Grøtli. *J. Med. Chem.* 54(2011)7427.

⁵⁴ V. Arjunan, S. Subramanian, S. Mohan. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 60(2004)995.

⁵⁵ S. A. Elsayed, I. S. Butler, B. J. Claude, S. I. Mostaf. *Transition. Met. Chem.* 40(2015)179.

⁵⁶ Y. S. Shim, K. C. Kim, D. Y. Chi, K. H. Lee, H. Cho. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13(2003)2561.

⁵⁷ P. Kavitha, M. Saritha, K.L. Reddy. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 102(2013)159.

Wang e colaboradores⁵⁸ sintetizaram um novo ligante derivado de hidrazona 6-hidroxicromona-3-carboxaldeído e seus complexos de lantânio(III) e samário(III). Os compostos foram avaliados frente às linhagens celulares de A549 (adenocarcinoma de pulmão) e HL-60 (leucemia mielóide aguda), onde os complexos apresentaram atividade citotóxica maior do que o ligante livre. Por outro lado, o ligante livre e os complexos mostraram atividade antioxidante significativa *in vitro* frente ao ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila ($\text{OH}^{\cdot}$) quando comparados com o manitol usado como controle.

Em 2009, Yang e colaboradores⁵⁹ avaliaram a atividade antioxidante *in vitro* frente ao ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila ($\text{OH}^{\cdot}$), como também estudos de ligação ao DNA por intercalação do ligante 7-metoxicromona-3-carboxaldeído benzoilhidrazona e seus respectivos complexos de lantânio(III) e európio(III). Os resultados sugerem que os compostos sintetizados interagem via intercalação com o DNA e apresentam apreciável atividade antioxidante.

Mais recentemente, Elsayed e colaboradores⁵⁵ testaram o ligante 3-formilcromona benzohidrazona e seus complexos de níquel(II), zinco(II), rutênio(II), rutênio(III), páladio(II), platina(II) e prata(I). Os compostos foram avaliados frente às linhagens celulares de câncer de mama humano (MDA-MB231) e ovário humano (OVCAR-8). Os complexos de níquel(II) e prata(I) foram os mais ativos frente às linhagens estudadas.

1.3 Flavonoides como ligantes para candidatos a metalofármacos

Com estrutura química relacionada àquela das cromonas, os flavonóides pertencem a um grande grupo de compostos que podem ser encontrados em frutas cítricas e vegetais.^{60,61} São polifenóis, isto é, possuem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados. Sua estrutura básica consiste em um núcleo fundamental, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C6-C3-C6), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia

⁵⁸ B. D. Wang, Z. Y. Yang, P. Crewdson, D. Q. Wang. J. Inorg. Biochem. 101(2007)1492.

⁵⁹ D. D. Qin, G. F. Qi, Z. Y. Yang, J. C. Wu, Y. C. Li. J. Fluoresc. 19(2009)409. doi: 10.1007/s10895-008-0427-x.

⁶⁰ I. Erlund. Nutr. Res. 24(2004)851.

⁶¹ A. Scalbert, I. T. Johnson, M. Saltmarsh. Am. J. Clin. Nutr. 81(2005)215S.

heterocíclica C) acoplado ao anel A (Figura 1.6).^{62,63} Os flavonóides são subdivididos em: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonóides.^{60,64}

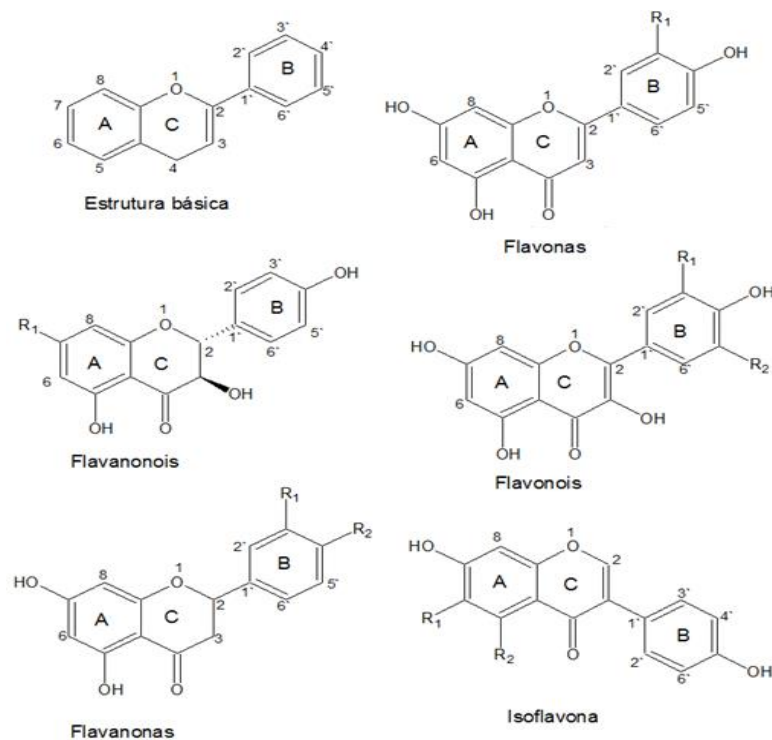


Figura 1.6- Estrutura básica dos flavonóides consiste num núcleo benzo -γ- pirona (anel A e o anel C) e benzeno (anel B). As principais classes de flavonóides são flavonas, flavononois, flavanonas, flavonóis e isoflavonas.

Desde a década de 1990 muitos trabalhos sobre as atividades biológicas dos compostos fenólicos têm despertado um amplo interesse, como também estudos epidemiológicos que tem sugerido que o consumo de alimentos ou bebidas ricas em polifenóis ajudam à prevenção de algumas doenças crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares.^{65,66} Além disso, nos últimos 10 anos, a investigação sobre os efeitos

⁶² W. C. Dornas, T. T. Oliveira, R. G. Rodrigues das Dores, A. F. Santos, T. J. Nagem. Rev. Ciênc. Farm. Básica. Apl. 28(2007)241.

⁶³ G. Di Carlo, N. Mascolo, A. A. Izzo, F. Capasso. Life Sci. 65(1999)337.

⁶⁴ L. Bravo. Nutr. Rev. 11(1998)317. doi: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x.

⁶⁵ C. Manach, A. Mazur, A. Scalbert. Curr. Opin. Lipidol. 16(2005)77.

⁶⁶ S. Duthie. J. Mol. Nutr. Food Res. 51(2007)665.

neuroprotetores dos polifenóis desenvolveu-se consideravelmente. Esses compostos são capazes de proteger células neuronais *in vivo* e *in vitro*.⁶⁷

Os flavonóides possuem atividade antioxidante, visto que são capazes de capturar espécies reativas de oxigênio e também atuam como agentes quelantes.⁶⁸ O efeito antioxidante demonstrado por alguns flavonóides despertou a atenção dos pesquisadores, devido a uma relação direta na produção excessiva de espécies reativas de oxigênio com várias doenças, como por exemplo o câncer.⁶³

Os antioxidantes reduzem o risco de artrite reumatóide,⁶⁹ em parte devido à sua capacidade de prevenir a oxidação de lipoproteínas. Os flavonóides apresentam efeitos antiproliferativos em diferentes linhagens de células tumorais, atividade antibacteriana e antiviral.⁷⁰

Dentre os flavonóides mais conhecidos, encontram-se a quercetina, o morin e a rutina, os quais possuem efeito hipolipidêmico, além de possuírem ação antioxidante.⁶⁰ Por outro lado, a naringenina (4,5,7-trihidroxiflavanona) e a hesperetina (5,7,3-trihidroxí-4-metoxi-flavanona) (Figura 1.7) são flavononas menos conhecidas, mas têm sido investigadas em razão de sua atividade anti-inflamatória,⁷¹ possíveis efeitos no metabolismo lipídico e atividade inibidora da proliferação *in vitro* de linhagens celulares de tumores de mama⁷² e de hepatoma humano HepG-2.^{60,73}

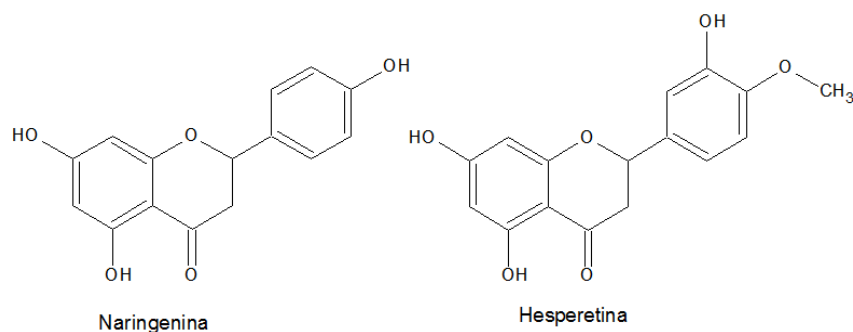


Figura 1.7- Estrutura das flavanonas naringenina e hesperetina.

⁶⁷ C. Ramassamy. Eur. J. Pharmacol. 545(2006)51.

⁶⁸ C. Morand, V. Crespy, C. Manach, C. Besson, C. Demigné, C. Remésy. Am. J. Physiol. 275(1998)R212.

⁶⁹ S. Mateen, S. Moin, A. Zafar, A. Q. Khan. Clin. Chim. Acta. 463(2016)4.

⁷⁰ A. V. Anand David, R. Arulmoli, S.Parasuraman. Pharmacogn. Rev. 20(2016)84. doi: 10.4103/0973-7847.194044.

⁷¹ J. A. Manthey, K. Grohmann, N. Guthrie. Curr. Med. Chem. 8(2001)135.

⁷² B. B. Chandrika, M. Steephan, T. R. Santhosh Kumar, A. Sabu, M. Haridas. Life Sci. 160(2016)47.

⁷³ L. Qin, L. Jin, L. Lu, X. Lu, C. Zhang, F. Zhang, W. Liang. Protein. Cell. 6(2011)507.

Por outro lado, estudos de complexos metálicos com flavonóides têm muita relevância, visto que os flavonóides como a quercetina, a rutina e a epicatequina, possuem um maior efeito de captura de radicais livres e anti-inflamatório quando formam complexos com metais de transição como ferro(II, III), cobre(II) e zinco(II),⁷⁴ demonstrando assim propriedades farmacológicas para o tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo.⁷⁵ Foi também objeto de estudo a atividade antioxidante do flavonóide morin e seus complexos com paládio(II) e platina(II), onde encontrou-se que o efeito antioxidante do complexo de platina(II) foi maior do que o complexo de paládio(II).⁷⁶

Estudos de atividade citotóxica de complexos de cobre(II) com a naringenina e a hesperetina em linhagens de células humanas de carcinoma hepatocelular (HepG-2), adenocarcinoma gástrico (SGC-7901) e câncer cervical (HeLa) demonstraram seletividade frente às linhagens SGC-7901 e HepG-2, e que a complexação com o íon metálico aumenta a atividade em comparação com os flavonóides livres.⁷⁷

Na literatura tem sido relatados estudos de complexos de cobre(II) com a naringenina, onde é avaliada sua atividade de captura de radicais ânions superóxidos ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e hidroxila ($\text{OH}^{\cdot}$), demonstrando que o complexo metálico aumenta o sequestro destes radicais em comparação com a naringenina livre.⁷⁸

Um estudo recente feito por Cominetti e colaboradores⁷⁹ reporta um complexo de cobre(II) com a naringenina e co-ligante 2,2-bipiridina, onde avaliou-se a atividade frente a células de câncer de mama (MDA-MB-231) e verificou-se que o complexo é mais ativo como agente citotóxico do que a naringenina livre.

Todos esses estudos demonstram claramente que as interações dos flavonóides com íons metálicos pode ter um papel importante no corpo humano e prevenir diversas doenças. Desta maneira, o presente trabalho pretendeu avaliar as possíveis

⁷⁴ D. Malešev, V. Kunti. J. Serb. Chem. Soc. 72(2007)921.

⁷⁵ S. A. Cherrak, N. Mokhtari-Soulmane, F. Berroukeche, B. Bensenane, A. Cherbonnel, H. Merzouk, M. Elhabiri. PLoS ONE. 11(2016)e0165575.

⁷⁶ M. Symonowicz, M. Kolanek. Biotechnol Food Sci. 76(2012)35.

⁷⁷ M. Tan, J. Zhu, Y. Pan, Z. Chen, H. Liang, H. Liu, H. Wang. Bioinorg. Chem. Appl. 2009(2009)347872. doi: 10.1155/2009/347872.

⁷⁸ H. L. Wang, Z. Y. Yang, B. Wang. Trans. Met. Chem. 31(2006)470. doi: 10.1007/s11243-006-0015-3.

⁷⁹ J. C. C. Filho, A. L. F. Sarria, A. B. Becceneri, A. M. Fuzer, J. R. Batalhão, C. M. Paranhos da Silva, R. M. Carlos, P. C. Vieira, J. B. Fernandes, M. R. Cominetti. PLoS ONE. 9(2014)e107058.

atividades biológicas de complexos de cobre(II) com naringenina e hesperetina usando como co-ligante a 1,10-fenantrolina.

1.4 A escolha dos metais para o planejamento de metalofármacos

1.4.1 Compostos de cobre(II) como candidatos a metalofármacos

O cobre é um biometal fundamental no meio biológico, sendo o terceiro metal de transição de maior abundância nos seres humanos e apresenta funções relevantes no sistema biológico,^{80,81} em especial na composição de algumas metaloproteínas e enzimas.⁸⁰

Os complexos de cobre(II) apresentam uma grande variedade de geometrias e números de coordenação.⁸² Essa versatilidade é atribuída à configuração eletrônica d^9 , onde o elétron desemparelhado em um orbital e_g ocasiona um forte efeito geométrico, como por exemplo, nos complexos hexa-coordenados, onde as distorções axiais são ocasionadas pelo efeito Jahn-Teller.

Vale ressaltar que níveis altos de cobre no corpo provocam vários distúrbios como por exemplo Doença de Wilson ou Doença de Menke.^{80,83} Além disso, dados atuais revelam que existe uma relação entre o metabolismo do cobre na doença de Alzheimer, mas o mecanismo molecular é desconhecido.⁸⁴

O papel que desempenham os íons cobre nos sítios ativos de um grande número de metaloproteínas, levou muitos pesquisadores a estudar complexos de cobre biomiméticos para assim entender melhor os sistemas biológicos e aplicações farmacológicas.⁸⁵ Complexos de cobre(II) apresentam várias atividades biológicas tais como antimicrobiana,⁸⁶ anti-inflamatória,⁸⁷ antitumoral,⁸⁰ anticonvulsivante,⁸⁸ anti-neurodegenerativa,⁸⁹ antioxidante,⁹⁰ anti-tuberculose⁹¹ dentre outras.

⁸⁰ I. Iakovidis, I. Delimaris, S. M. Piperakis. *Molec. Biol. Inter.* 2011(2011)594529. doi: 10.4061/2011/594529.

⁸¹ A. Hordyjewska, Ł. Popiołek, J. Kocot. *Biometals.* 27(2014)611. doi: 10.1007/s10534-014-9736-5.

⁸² M. Sutradhar, M. V. Kirillova, M. F. C. Guedes da Silva, C. M. Liuc, A. J. L. Pombeiro. *Dalton Trans.* 42(2013)16578. doi: 10.1039/c3dt52453a.

⁸³ H. Shim, Z. L. Harris. *J. Nutr.* 133(2003)1527S.

⁸⁴ S. Rivera-Mancía, I. Pérez-Neri, C. Ríos, L. Tristán-López, L. Rivera-Espinosa, S. Montes. *Chem.Biol Interact.* 186(2010)184.

⁸⁵ P. R. Reddy, S. Rajeshwar, B. Satyanarayana. *J. Photochem.Photobiol. B.* 160(2016)217.

⁸⁶ M. L. Low, L. Maigre, P. Dorlet, R. Guillot, J. M. Page, K. A. Crouse, C. Policar, N. Delsuc. *Bioconjugate Chem.* 25(2014)2269.

⁸⁷ C. Duncan, A. R. White. *Metallomics.* 4(2012)127.

⁸⁸ B. Viossat, F. T. Greenaway, G. Morgant, J. C. Daran, N. H. Dung, J.R. Sorenson. *J. Inorg. Biochem.* 99(2005)355.

Vale salientar que o íon cobre pode se ligar ao DNA através do N-7 da guanina e gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) mediante reações de oxidação-redução, resultando em dano ao DNA e apoptoses celular. Assim é de interesse investigar o uso de complexos de cobre(II) como possíveis agentes antitumorais.⁹²

Na busca de complexos de cobre(II) com diferentes bioatividades existem na literatura diversos estudos usando como co-ligantes moléculas N-heterocíclicas como por exemplo a 1,10-fenantrolina (Fen),⁸⁵ que podem interagir com sistemas biológicos, devido à capacidade de se ligar ao DNA e RNA. Neste sentido nas últimas décadas os complexos de cobre(II)-Fen têm sido objeto de estudos de atividade antitumoral,⁹³ antibacteriana e antifúngica⁹⁴ dentre outros,⁹⁵ incentivando um sem número de trabalhos de pesquisa.

1.4.2 Compostos de prata(I) como candidatos a metalofármacos

A prata é conhecida pelo homem desde a antiguidade, onde era usada para fazer moedas e peças decorativas. Na Idade Média compostos de prata começaram a ser utilizados como agentes terapêuticos principalmente como antimicrobianos.⁹⁶

A prata tem uma boa condutividade elétrica e térmica e sua configuração eletrônica externa é $[5s^1 4d^{10}]$. A prata possui quatro estados de oxidação, sendo +1 o mais comum.⁹⁶ O íon prata(I), apresenta configuração eletrônica d^{10} , e possui uma baixa densidade de carga o que permite que atue como ácido macio segundo a teoria de Pearson. Desse modo, tende a ter uma pequena afinidade com ligantes O-doadores (bases duras), e uma maior afinidade com ligantes S-doadores (bases macias), e uma moderada afinidade com ligantes N-doadores.

Por outro lado, é importante ressaltar que a química de coordenação dos complexos de prata(I) tornou-se muito atraente para o desenho molecular e

⁸⁹ C. Quintanova, R. S. Kerj, S. Chaves, M. A. Santos. J. Inorg. Biochem. 151(2015)58.

⁹⁰ E. Ferrari, R. Benassi, M. Saladini, G. Orteca, Z. Gazova, K. Siposova. Chem. Biol. Drug. Des. (2016)1. doi:10.1111/cbdd.12847.

⁹¹ J. Joseph, K. Nagashri, A. Suman J. Photochem. Photobiol. B. 162(2016)125.

⁹² Y. H. Liu, A. Li, J. Shao, C.Z. Xie, X.Q. Song, W.G. Bao, J. Y. Xu. Dalton Trans. 45(2016)8036. doi:10.1039/c6dt00451b.

⁹³ B. J. M. Leite Ferreira, P. Brandão, M. Meireles, F. Martel, A. Correia-Branco, D.M. Fernandes, T.M. Santos, V. Félix. J. Inorg. Biochem. 161(2016)9.

⁹⁴ S. N. Ng, M. J. Wu, C. E. Jones, J. R. Aldrich-Wright. J. Inorg. Biochem. 162(2016)62.

⁹⁵ S. Perontsis, A. G. Hatzidimitriou, O. A. Begou, A. N. Papadopoulos, G. Psomas. J. Inorg. Biochem. 162(2016)22.

⁹⁶ G. D. de Souza, M. A. Rodrigues, P. P. Silva, W. Guerra. Educ. quím. 24(2013)14.

caracterização estrutural.⁹⁷ A importância desses estudos motivou a desenvolver a química bioinorgânica dos complexos de prata(I) como novos agentes terapêuticos.⁹⁸ Na atualidade vários compostos de prata têm demonstrado diversas aplicações biomédicas como antissépticos,⁹⁹ antibacterianos¹⁰⁰, e recentemente como promissores agentes antitumorais.¹⁰¹

Dentre os compostos de prata(I) mais utilizados encontra-se o sal de nitrato de prata(I) (AgNO_3) que tem sido usado como medicamento durante séculos como agente antimicrobiano.¹⁰² Observou-se que seu uso apresentava alguns inconvenientes, como a rápida inativação através da formação de complexos com o íon cloreto no sangue do paciente, devido à alta solubilidade em água e sua baixa lipofilia,¹⁰³ o que ocasionou que sua aplicação diminuísse drasticamente quando os antibióticos foram introduzidos nas práticas médicas.⁹⁶

Entretanto, devido ao aumento de casos envolvendo resistência aos antibióticos, o nitrato de prata (AgNO_3) começou a ser utilizado de novo no tratamento de queimaduras e abscessos.¹⁰⁴ Esta situação impulsionou nos últimos anos, o interesse em desenvolver novos complexos de prata(I) com atividade antimicrobiana.¹⁰⁵

O sal sulfadiazina de prata(I) (Figura 1.8), foi introduzido na área médica por Fox e colaboradores¹⁰⁶ em 1968, e foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 1973 como um composto efetivo contra infecções.¹⁰¹ Desde sua aprovação, converteu-se em um fármaco para o tratamento de queimaduras¹⁰¹ e úlceras varicosas,¹⁰⁷ por ser indolor na aplicação. Apresenta ampla ação antimicrobiana frente

⁹⁷ L. Kyros, N. Kourkoumelis, M. Kubicki, L. Male, M. B. Hursthouse, I. I. Verginadis, E. Gouma, S. Karkabounas, K. Charalabopoulos, S. K. Hadjikakou. *Bioinorg. Chem. Appl.* (2010)12ID386860.

⁹⁸ L. Ortego, M. Meireles, C. Kasperc, A. Laguna, M. D. Villacampa, M. C. Gimeno. *J. Inorg. Biochem.* 156(2016)133.

⁹⁹ C. Pettinari, F. Marchetti, G. Lupidi, L. Quassinti, M. Bramucci, D. Petrelli, L.A. Vitali, M.F. da Silva, L.M. Martins, P. Smoleński, A.J. Pombeiro. *Inorg. Chem.* 50(2011)11173.

¹⁰⁰ W. K. Jung, H. C. Koo, K. W. Kim, S. Shin, S. H. Kim, Y. H. Park. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(2008)2171.

¹⁰¹ C. N. Banti, S. K. Hadjikakou. *Metallomics.* 5(2013)569.

¹⁰² B. S. Atiyeh, M. Costagliola, S. N. Hayek, S. A. Dibo. *Burns.* 33(2007)139.

¹⁰³ J. L. Clement, P. S. Jarrett. *Met Based Drugs.* 1(1994)467.

¹⁰⁴ M. Walker, D. Parsons. *Int. Wound. J.* 11(2014)496. doi:10.1111/j.1742-481X.2012.01115.x.

¹⁰⁵ J. Jimenez, I. Chakraborty, M. Rojas-Andrade, P.K. Mascharak. *J. Inorg. Biochem.* 168(2017)13.

¹⁰⁶ C. L. Fox Jr. *Int. Surg.* 60(1975)275.

¹⁰⁷ N. Mariagrazi, C. Saturnino, E. Immacolata Cianciulli, M. Varcamonti, A. Zanfardino, G. Tommonaro, P. Longo. *J. Organomet. Chem.* 725(2013)46.

a bactérias *Gram*-negativas como *Escherichia coli*,¹⁰⁸ *Enterobacter*, *Klebsiella sp*, *Pseudomonas aeruginosa*,¹⁰⁹ mas também sobre algumas *Gram*-positivas como *Staphylococcus aureus*,^{96,110} que são os principais organismos responsáveis pelas infecções decorrentes de queimaduras.¹⁰⁹ Embora, a sulfadiazina de prata(I) venha sendo utilizada durante muitos anos, o fármaco provoca importantes efeitos colaterais, incluindo discrasia sanguínea, reações gastrointestinais e alergias.^{111,112}

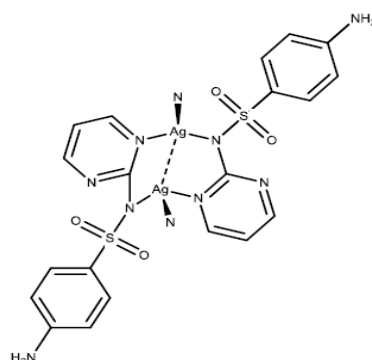


Figura 1.8- Estrutura do composto sulfadiazina da prata(I).

O mecanismo de ação antimicrobiana dos derivados de prata(I) ainda não está completamente esclarecido. Apesar disso, acredita-se que está relaciona-se com a interação dos íons prata(I) com ácidos nucleicos no citoplasma, onde interagem com moléculas de DNA ocasionando a inibição da divisão celular.¹¹³ Por outro lado, os íons prata(I) interagem também com a membrana celular e interferem com o sistema de transporte de elétrons na célula por meio da reação com grupos tiol encontrados nas enzimas respiratórias de células bacterianas.¹⁰¹ O íon prata liga-se à parede celular e à membrana celular bacteriana e inibe o processo de respiração.¹⁰⁷

¹⁰⁸ I. Sainis, C. N. Bantis, A. M. Owczarzak, L. Kyros, N. Kourkoumelis, M. Kubicki, S. K. Hadjikakou. J. Inorg. Biochem. 160(2016)114.

¹⁰⁹ H. Vermeulen, J. M. van Hattem, M. N. Storm-Versloot, D. T. Ubbink, S. J. Westerbos. Cochrane Wounds Group. 1(2007). doi:10.1002/14651858.CD005486.pub.

¹¹⁰ V. J. Khojasteh, S. Alfakhri, H. A. Foster. Iran. J. Pharm. Res. 15(2016)653.

¹¹¹ A. A. Garcia, A. M. Rodriguez Martinez, E. Serra Baldrich, E. Manubens Mercade, L. Puig Saez. JEADV. 30(2016)320. doi 10.1111/jdv 12785.

¹¹² <http://www.accessdata.fda.gov/spl/data/d47a0bcf-60c2-4e3d-b1a7-6eb02e165591/d47a0bcf-60c2-4e3d-b1a7-6eb02e165591.xml> Accesado 02 Fevereiro 2017.

¹¹³ L. Thornton, V. Dixit, L. O. N. Assad, T. P. Ribeiro, D. D. Queiroz, A. Kellett, A. Casey, J. Colleran, M. D. Pereira, G. Rochford, M. McCann, D. O'Shea, R. Dempsey, S. McClean, A. Foltyn-Arfa, M. Walsh, B. Creaven, O. Howe, M. Devereux. J. Inorg. Biochem. 159(2016)120.

A atividade antitumoral dos complexos de prata(I) ainda é pouco estudada ao comparar com os outros complexos dos metais de transição. Apesar disso, uma quantidade de compostos de prata(I) tem sido sintetizada com ligantes de átomos doadores de O, N, P, S e com ligantes carbenos N-heterocíclicos⁹⁸ que têm mostrado uma maior atividade citotóxica do que a cisplatina, com uma toxicidade relativamente baixa para as células humanas normais.¹⁰¹ Os complexos de prata(I) apresentam seletividade para diversas células tumorais que vai depender do tipo de ligante ligado aos íons prata(I).¹¹⁴ Se bem que o mecanismo da atividade antitumoral não esteja especificado, pressupõe-se que os complexos exercem interação com o DNA e proteínas.¹¹⁴

1.5 Contribuições da Química Medicinal Inorgânica para o desenvolvimento de compostos anticâncer e antimicrobianos

Complexos metálicos têm sido amplamente investigados como candidatos a fármacos para o tratamento de câncer e de doenças causadas por bactérias e fungos, como foi proposto no presente trabalho.

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo.¹¹⁵ Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo todo. Em 2012 ocorreram cerca de 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes relacionadas com a câncer. Prevê-se que os casos de câncer aumentarão cerca de 70% ao longo dos próximos 20 anos.¹¹⁶

Apesar dos grandes esforços para melhorar a terapia antineoplásica e os avanços recentes, a quantidade de fármacos efetivos disponíveis é limitada, fazendo-se necessário desenvolver novos medicamentos e alternativas para seu tratamento.¹¹⁷ Os três principais tipos de tratamento do câncer são a radioterapia, a cirurgia e a

¹¹⁴ U. Kalinowska-Lis, A. Felczak, L. Chęcińska, I. Szabłowska-Gadomska, E. Patyna, M. Małecki, K. Lisowska, J. Ochocki. *Molecules*. 21(2016)87.

¹¹⁵ http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322 . Acessado 13 Julho 2016.

¹¹⁶ <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>. Informe mundial sobre el cáncer 2014, IARC. Acessado 13 Julho 2016.

¹¹⁷ I. Ott. *Coord. Chem. Rev.*253(2009)1670.

quimioterapia, sendo esse último objeto de estudo nas últimas quatro décadas.¹¹⁸ Atualmente a quimioterapia do câncer utiliza-se tanto de compostos orgânicos (por exemplo: taxol e vimblastina) quanto de complexos metálicos (por exemplo: cisplatina e carboplatina).¹¹⁸

Desde o descobrimento de agentes antitumorais baseados em metais como cisplatina, carboplatina ou oxaliplatina, tem sido motivo de estudo complexos metálicos baseados neste metal com o fim de desenvolver novos fármacos. Apesar disso, os efeitos adversos tais como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade e a toxicidade gastrointestinal, como também a resistência adquirida, resultam na limitação do uso clínico de compostos de platina.¹¹⁹

Como consequência, nos últimos anos complexos metálicos não baseados na platina para uso na quimioterapia, tem tido rápido crescimento e têm estimulado a possibilidade de desenvolver novos agentes antitumorais com modos de ação e perfis clínicos diferentes.¹²⁰ Dentre eles, os compostos contendo gálio,¹²¹ como por exemplo KP46 tris(8-quinolato)galio(III) que tem apresentado propriedades antitumorais e sua formulação oral está em fase clínica I nos EUA.¹²² O gálio é o segundo íon metálico, depois da platina a ser usado no tratamento de câncer.¹²² O complexo de rutênio, NAMI-A *trans*-imidazoldimetilsulfóxidotetraclororutenato(III) de imidazólio apresenta atividade frente a células cancerígenas metastáticas e encontra-se em ensaios clínicos.¹²³

As doenças infecciosas são causadas por micro-organismos patogênicos (bactérias, vírus, fungos e parasitas) que invadem as células do hospedeiro para a sua reprodução. Essas doenças representam graves problemas de saúde pública que afetam uma fração significativa da população mundial. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças infecciosas são responsáveis por aproximadamente um terço das causas de mortalidade no mundo.¹²⁴

¹¹⁸ A. P. Soares, E. Teixeira, H. Beraldo. Cadernos temáticos de Química Nova na Escola. 6(2005)13.

¹¹⁹ M. Galanski, M.A. Jakupec, B.K. Keppler. Curr. Med. Chem. 12(2005)2075.

¹²⁰ I. Ott, R. Gust. Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 340(2007)117.

¹²¹ A. R. Timerbaev. Metallomics. 1(2009)193.

¹²² J. A. Lessa, G. L. Parrilha, H. Beraldo. Inorg. Chim. Acta. 393(2012)53.

¹²³ S. Leijen, S. A. Burgers, P. Baas, D. Pluim, M. Tibben, E. van Werkhoven, E. Alessio, G. Sava, J.H. Beijnen, J. H. Schellens. Invest. New Drugs. 33(2015)201. doi: 10.1007/s10637-014-0179-1.

¹²⁴ R. V. C. Guido, A. D. Andricopulo, G. Oliva. Estud. av. 24(2010)70.

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano.¹²⁵

Os antibióticos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos compreendem a maioria daqueles em uso clínico e podem ser classificados em β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas etc). Os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas.¹²⁵

Na atualidade existe uma enorme preocupação na saúde pública, porque uma classe de bactérias e fungos têm desenvolvido resistência aos medicamentos, como por exemplo a resistência de um número crescente de cepas de *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA). Tem sido também relatada a resistência a fluoroquinolonas, amplamente utilizadas para o tratamento de infecções do trato urinário causadas por *Escherichia coli*.¹²⁶

Diferentes argumentos justificam a procura por novos agentes antimicrobianos as doenças infecciosas são a segunda maior causa de mortalidade;¹²⁴ a alta taxa de resistência microbiana (ambientes hospitalares);¹²⁷ o decréscimo no número total de novos compostos aprovados pelo FDA, entre outros fatores.

Complexos metálicos com ação antimicrobiana consistem uma classe de candidatos a fármacos de grande interesse, uma vez que poderiam, em princípio, contornar o problema da resistência, uma vez que os mecanismos de ação seriam distintos daqueles de drogas em uso clínico.

¹²⁵ D. O. Guimarães, L. da Silva, M. T. allarico Pupo. Quim. Nova. 33(2010)667.

¹²⁶ <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. Acessado 16 de Julho 2016.

¹²⁷ N. de Queiroz. Texto Contexto Enferm. 13(2004)64.

1.6 Contribuições do presente trabalho à Química Medicinal Inorgânica

No presente trabalho propusemo-nos a investigar os efeitos da coordenação com cobre(II) e prata(I) a ligantes bioativos derivados de estilbenos e de cromonas sobre as atividades antimicrobianas e citotóxicas desses ligantes. Procuramos igualmente realizar um estudo preliminar dos possíveis alvos desses complexos, por meio de estudos de suas interações com a albumina e com o DNA. A albumina é uma proteína presente no plasma sanguíneo, que tem a função de transportar compostos para dentro e para fora dos tecidos. O DNA é um dos principais alvos de agentes antitumorais, ligando-se a diferentes metais como platina(II) e cobre(II).

Em razão da participação de derivados de estilbeno e de flavonóides em processos redox envolvendo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, foi também investigada a capacidade dos compostos aqui estudados de sequestrar radicais livres. Os radicais livres são moléculas que na sua estrutura apresentam um elétron desemparelhado como ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), o radical óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) e o radical dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2^\bullet$). Em razão da instabilidade na configuração eletrônica, espécies radicalares são geralmente muito reativas. Esta reatividade é a base de sua toxicidade.¹²⁸

Os radicais livres podem ser gerados em organelas citoplasmáticas onde são metabolizados o oxigênio e nitrogênio.¹²⁹ Por outro lado, os radicais livres possuem diferentes funções no organismo e estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes.¹³⁰

Mesmo que uma quantidade de radicais livres seja necessária para o sustento da vida, a produção excessiva deles, maior do que a sua velocidade de remoção, pode induzir danos celulares irreversíveis por exemplo câncer,¹³¹ envelhecimento precoce,¹³² doenças cardiovasculares,¹³³ choque hemorrágico, catarata, disfunções

¹²⁸ M. L. P. Bianchi, L. M. G. Antunes. Rev. Nutr. 12(1999)123.

¹²⁹ N. J. I. E. Shami, E. A. M. Moreira. Rev. Nutr. 17(2004)227.

¹³⁰ C. Q. Alves, J. M. David, J. P. David, M. V. Bahia, R. M. Aguiar. Quim. Nova. 33(2010)2202.

¹³¹ B. Tekiner-Gulbas, A.D. Westwell, S. Suzen. Curr. Med. Chem. 36(2013)4451.

¹³² M. Lagouge, N.G. Larsson. J. Intern. Med. 273(2013)529.

¹³³ B. Halliwell. B.M.J. 307(1993)885.

cognitivas, inflamatórias e neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer,¹³⁴ dentre outras.¹³⁵

Dessa forma, muitos são os estudos que se dedicam a busca de novas substâncias que apresentem atividades antioxidantes, para assim retardar e prevenir o desenvolvimento dessas doenças. Por esse motivo, os estudos de compostos como os flavonóides,⁶³ o resveratrol,¹³⁶ os derivados de estilbeno⁴⁶ e cromonas,⁵⁵ têm grande relevância.

Complexos de cobre(II) são também conhecidos por apresentarem atividade antioxidante e capacidade de sequestrar radicais livres,¹³⁷ sendo esta característica responsável por seus mecanismos de ação biológica.

O presente trabalho constitui, assim, uma importante contribuição ao desenvolvimento da Química Medicinal Inorgânica

1.7 Objetivo Geral e objetivos específicos

O presente trabalho teve como objetivo geral o estudo de complexos metálicos de ligantes bioativos como flavonóides e os derivados de estilbenos e cromonas, procurando-se compreender suas interações com alvos e processos biológicos.

Objetivos específicos:

- Sintetizar e caracterizar por técnicas espectroscópicas, técnicas físico-químicas e cristalografia de Raios X as novas hidrazonas derivadas de *trans*-4-estilbenocarboxaldeído e seus complexos de cobre(II);
- Realizar estudos teóricos (em colaboração) para os complexos de cobre(II) derivados de *trans*-4-estilbenocarboxaldeído;
- Avaliar as atividades antimicrobiana e citotóxica dos derivados de *trans*-4-estilbenocarboxaldeído;
- Avaliar a capacidade sequestradora de radicais livres dos derivados de *trans*-4-estilbenocarboxaldeído;

¹³⁴ M. B. França, K. C. Lima, E. C. Eleutherio. J. Cell. Biochem. 9999(2016)1. doi: 10.1002/jcb.25803.

¹³⁵ B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, C. E. Cross. J. Lab. Clin. Med. 119(1992)598.

¹³⁶ L. Kuršvietienė, I. Stanevičienė, A. Mongirdienė, J. Bernatoniene. Medicina. 3(2016)148.

¹³⁷ C. Sánchez-Moreno. Food. Sci. Technol. Int. 8(2002)121.

- Estudar as interações dos complexos de cobre(II) de derivados de *trans*-4-estilbenocarboxaldeído com o DNA e com albumina;
- Sintetizar e caracterizar por técnicas espectroscópicas, técnicas físico-químicas os complexos de cobre(II) com os flavonoides hesperetina e naringenina com co-ligante 1,10-fenantrolina;
- Avaliar a atividade citotóxica dos complexos de cobre(II) de flavonoides frente a células tumorais e sadias;
- Avaliar a apoptose pelo teste Anexina V/Iodeto de propídeo (em colaboração) dos complexos de cobre(II) de flavonoides por citometria de fluxo;
- Avaliar o potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) (em colaboração) para os complexos de cobre(II) de flavonoides;
- Avaliar a produção de ROS (em colaboração) dos complexos de cobre(II) de flavonoides;
- Estudar as interações dos complexos de cobre(II) de flavonoides com o DNA e com albumina;
- Estudar a atividade antioxidante dos complexos de cobre(II) de flavonoides (capacidade de sequestrar radicais livres);
- Sintetizar e caracterizar por técnicas espectroscópicas, técnicas físico-químicas e cristalografia de Raios X as novas hidrazonas derivadas de 3-formil-6-metilcromona e seus complexos de prata(I);
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos derivados de 3-formil-6-metilcromona assim como seu efeito citotóxico frente a células tumorais e sadias;
- Estudar as interações entre os complexos de prata(I) derivados de 3-formil-6-metilcromona hidrazona com alvos biológicos como DNA e albumina (BSA).

CAPÍTULO 2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Equipamentos, materiais e procedimentos

➤ Temperaturas de fusão

As temperaturas de fusão foram determinadas utilizando os equipamentos Mettler FP 90 e digital Micro-Química Equipamentos LTDA modelo MQAPF302 dos laboratórios do Professor Geraldo Magela de Lima e da Profa. Lucienir Pains Duarte do Departamento de Química da UFMG.

➤ Pesagens

As massas foram determinadas em uma balança Gehaka, modelo AG 200, do Laboratório do Professor Ruben Sinisterra do Departamento de Química da UFMG.

➤ Análise Elementar (CHN)

As análises elementares foram realizadas no Departamento de Química da UFMG e na Central Analítica do Instituto de Química da USP, utilizando-se os equipamentos C,H,N-2400 Perkin Elmer.

➤ Análises Condutimétricas

As medidas de condutividade molar dos complexos foram feitas em soluções de DMF e DMSO, a partir de uma concentração na ordem de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a uma temperatura de 25 °C, utilizando-se os condutivímetros modelo Q405M da Quimis do laboratório da Profa. Leticia Teixeira e Digimed DM 31 da Profa. Cynthia Peres Demicheli do Departamento de Química da UFMG. Os resultados foram analisados conforme a atribuição apresentada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1-Atribuições de tipo eletrólito em solução¹³⁸.

Solvente	$\Lambda_M (\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1})$	Tipo de eletrólito
DMF	65-90	1:1
	130-170	2:1
	200-240	3:1
DMSO	50-70	1:1

¹³⁸ J. Geary. Coord. Chem. Rev. 7(1971)81.

➤ **Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros RMN foram obtidos nos espectrômetros Brucker DRX-400 Avance (400 MHz) e Brucker DPX-200 (200 MHz) localizados no Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (Laremar) do Departamento de Química da UFMG, utilizando DMSO- d_6 como solvente.

➤ **Espectros de absorção na região de Infravermelho (IV)**

Os espectros de IV foram obtidos em pastilhas de KBr, na região de 400-4000 cm^{-1} . Foi utilizado o espectrômetro Perkin Elmer FT-IR System-Spectrum GX pertencente ao Departamento de Química da UFMG.

➤ **Espectrometria de Massas por Ionização Electrospray (ESI-MS)**

Para obtenção dos espectros de massas os compostos foram solubilizados em DMSO grau espectroscópico. Posteriormente, foram conduzidos à agitação em vortex a 300 rpm por 3 minutos. As amostras foram individualmente injetadas em um cromatógrafo a líquido Shimadzu® LCMS-IT-TOF (225-07100-34) pertencente ao Departamento de Química da UFMG, equipado com: degaseificador in line modelo DGU- 20A3, duas bombas modelo LC-20AD, autosampler modelo SIL-20A, e módulo comunicador CBM-20A. A ionização foi realizada a partir do emprego de fonte de electrospray (ESI), com acumulador Íon Trap (IT). O analisador de massas empregado foi Time of Flight (TOF). A temperatura do bloco de aquecimento foi de 200°C, a voltagem no capilar foi 4,5 kV e a tensão no detector foi de 1,76 kV. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio. O fluxo empregado e o volume de injeção foram respectivamente 0,15 mL/min e 3 μL .

➤ **Espectros eletrônicos no Ultravioleta-Visível (UV-Vis) e Fluorescência**

Os espectros de UV-Vis foram registrados utilizando-se uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico, em soluções de DMSO de concentração da ordem de $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC pertencente ao Laboratório 290.

Os espectros de fluorescência foram registrados no espectrofotômetro CARY Eclipse-(FL1006m016)-VARIAN (Agilent Technologies) pertencente ao Departamento de Química da UFMG. Utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico, em soluções de DMSO de concentração da ordem de $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

➤ **Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)**

Os espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) foram obtidos no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), em colaboração com a Profa. Sônia R. Louro, do Departamento de Física da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio). Utilizou-se um espectrômetro Bruker ESP300E, com frequência de modulação de 100 KHz, operando em 0,5 mT. As amostras, no estado sólido foram medidas utilizando-se capilares de diâmetro interno de 1 mm, à temperatura ambiente (para amostras no pó). As amostras em solução foram medidas em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de $5,0 \times 10^{-4}$ M, empregando-se tubos de Teflon de diâmetro interno 3 mm, a uma temperatura de 77 K (nitrogênio líquido, N₂).

➤ **Susceptibilidade magnética**

As medidas de momento magnético dos compostos de cobre(II) foram realizadas utilizando uma balança de Susceptibilidade Magnética - Johnson Matthey - MSB/AUTO pertencente ao Laboratório 290.

➤ **Análises térmicas**

As curvas termogravimétricas foram obtidas utilizando-se a termo balança Mettler TA-4000 com um analisador TG50 pertencente ao Departamento de Química da UFMG. As análises foram feitas em atmosfera de nitrogênio com uma razão de aquecimento de 10 °C/min, numa faixa de temperatura de 25-750 °C.

➤ **Estruturas Cristalográficas**

As estruturas cristalográficas foram determinadas em colaboração com Prof. Dr. Jefferson Gomes Da Silva, do Departamento de Farmácia Universidade Federal de Juiz de Fora e a Dra. Isabella Pires Ferreira do Departamento de Química da UFMG, em colaboração do pesquisador Dr. Nivaldo Speziali do Departamento de Física da UFMG. Os detalhes e condições experimentais de cada medida estão descritos nos capítulos.

➤ **Reagentes**

Todos os reagentes usados nas sínteses e estudos de atividade biológica foram de alto grau de pureza, adquiridos de fontes comerciais (Sigma-Aldrich, Synth, Vetec, Fluka). A naringenina e a hesperetina foram adquiridos da fonte comercial (Sigma-Aldrich).

2.2. Síntese dos ligantes e complexos

2.2.1 Sínteses de *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-acetilhidrazona (HStAc), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-fenilhidrazona (HStPh), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-*para*-cloro-fenilhidrazona (HStpClPh), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-*para*-nitro-fenilhidrazona (HStpNO₂Ph), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-*para*-toluil-hidrazona (HStpT), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-benzilhidrazona (HStBz) e a *trans*-4-estilbenocarboxaldeído- *para*-hidroxi-fenilhidrazona (HStpOHPh).

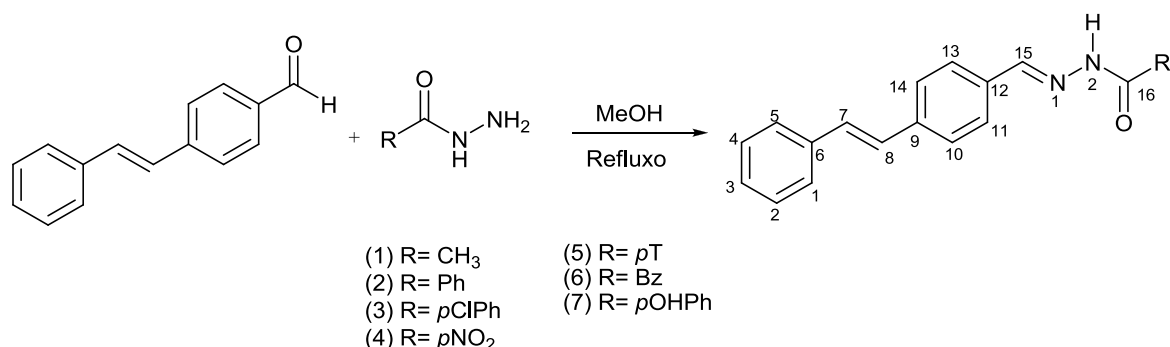


Figura 2.1- Sínteses das hidrazonas derivadas do *trans*-4-estilbenocarboxaldeído.

Foram obtidas 6 hidrazonas inéditas a partir da reação de condensação entre quantidades equimolares (1mmol) de *trans*-4-estilbenocarboxaldeído com a hidrazida desejada em metanol, adicionando três gotas de ácido acético glacial como catalisador. A mistura da reação foi mantida em refluxo durante 24 horas. Depois o sólido obtido foi filtrado e lavado com metanol e éter sob pressão reduzida.¹³⁹ Esses compostos foram caracterizados por temperatura de fusão, por seus espectros de absorção na região do infravermelho, RMN de ¹H, ¹³C, DEPT 135, análise elementar e análise de difração raios X de monocristal para os compostos HStpNO₂Ph (4) e HStpT (5). O composto HStpOHPh (7) encontra-se descrito na literatura.⁴⁷ Os sólidos obtidos são de cor branca, com exceção de (3), que é de cor amarela.

¹³⁹ B. S. Furniss, A. J. Hannaford, P. E. G. Smith, A. R. Tatchell. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, 5th ed. ELBS: Longman, UK. (1989)1269.

2.2.2 Sínteses dos complexos de cobre(II) [Cu(HStAc)₂Cl₂] (8), [Cu(HStpClPh)₂Cl₂] (9), [Cu(HStpNO₂Ph)₂Cl₂] (10), [Cu(HStpT)₂Cl₂] (11), [Cu(HStBz)₂Cl₂] (12), e [Cu(HStpOHPh)₂Cl₂] (13).

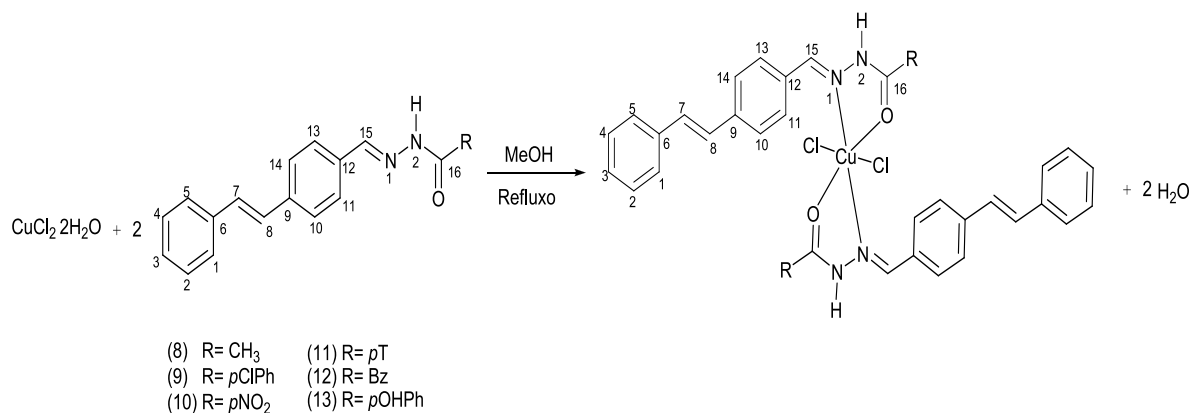
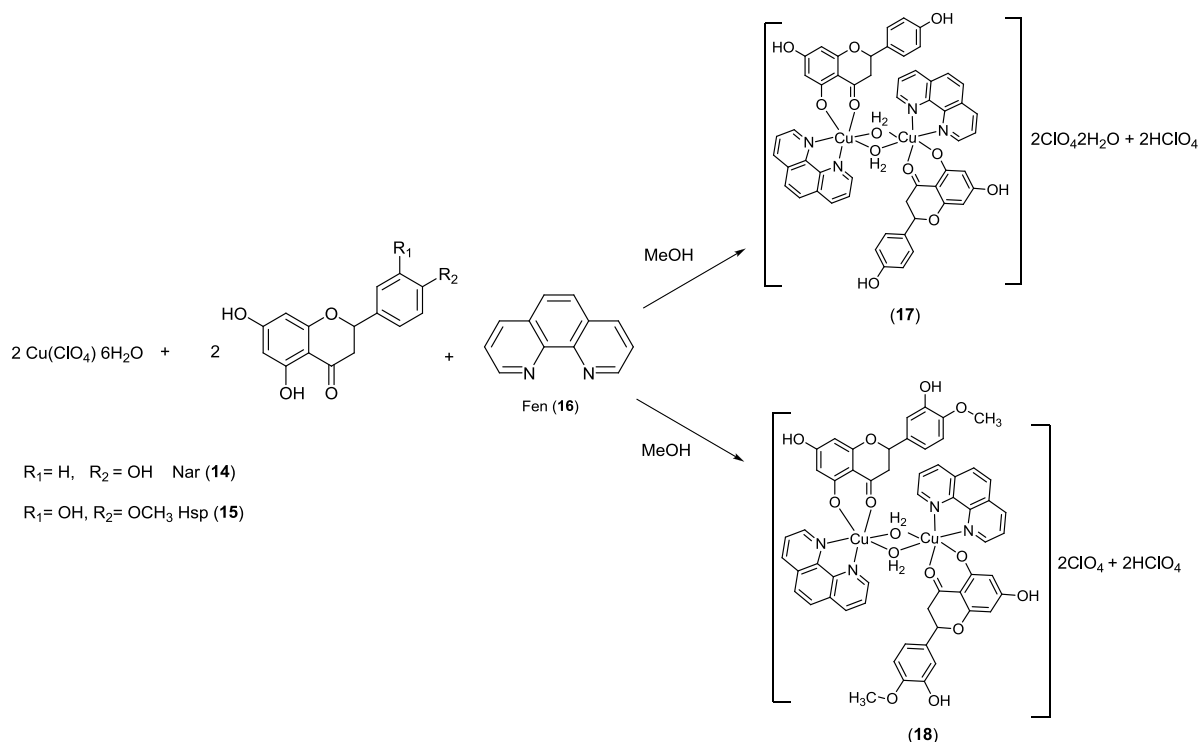


Figura 2.2- Sínteses dos complexos de cobre(II) com hidrazonas derivadas de *trans*-4-estilbenocarboxaldeído.

Os seis complexos de cobre(II) (8-13) foram sintetizados a partir da reação entre 1 mmol do sal do metal CuCl₂·2H₂O em 5mL de solução metanólica e quantidade equimolar da hidrazona desejada em metanol. A mistura formada foi mantida em refluxo por 8 horas. Depois de resfriamento à temperatura ambiente o sólido obtido foi filtrado e lavado com metanol e éter para ser secado sob pressão reduzida. Embora a síntese tinha sido feita na proporção 1:1 metal:ligante os complexos obtidos apresentam proporção molar 1:2 metal:ligante.

Os complexos foram caracterizados por temperatura de fusão, análise elementar, medidas de condutividade molar, medidas de susceptibilidade magnética, espectroscopia de absorção na região de infravermelho, espectroscopia eletrônica e espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE). Os sólidos obtidos dos complexos (8) a (11) são de cor amarela e o complexo (13) é de cor marrom.

2.2.3 Sínteses dos complexos de cobre(II) com Naringenina e Hesperetina.



Esquema 2.1- Sínteses e estrutura binuclear proposta para os complexos de cobre(II) $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2] \cdot \text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)] \cdot (18)$.

Os dois complexos de cobre(II) $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2] \cdot \text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)] \cdot (18)$ foram obtidos seguindo a metodologia de Manikandamathavan e colaboradores¹⁴⁰ a partir da reação entre quantidades equimolares (1mmol) do sal do metal $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 5 mL de solução metanólica com naringenina (Nar) ou hesperetina (Hsp) em 10 mL de solução metanólica a quente. Após 30-40 minutos adicionaram-se 5 mL de solução metanólica de 1,10-fenantrolina (Fen), numa relação 1:1:1 metal:ligante:co-ligante. A mistura formada foi mantida em refluxo por 8 horas. Depois de resfriamento à temperatura ambiente o sólido obtido foi filtrado e lavado com metanol e éter para ser secado sob pressão reduzida.

Os complexos obtidos são de cor verde e foram caracterizados por temperatura de fusão, por seus espectros de absorção na região do infravermelho, análise

¹⁴⁰ V. M. Manikandamathavan, R. P. Parameswari, T. Weyhermüller, H. R. Vasanthi, B. U. Nair. Eur. J. Med. Chem. 46(2011)4537.

elementar, medidas de condutividade molar, medidas de susceptibilidade magnética e espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE).

2.2.4 Sínteses de 3-formil-6-metilcromona-fenil hidrazona (HCrPh) e 3-formil-6-metilcromona-*para*-cloro-fenil hidrazona (HCrpClPh).

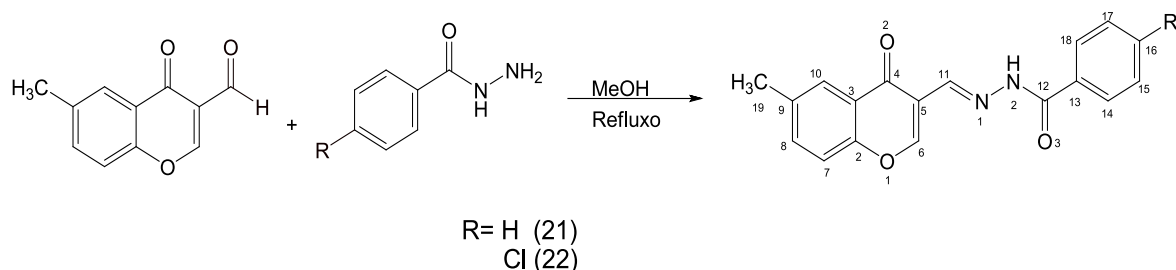


Figura 2.3- Sínteses das hidrazonas derivadas de 3-formil-6-metilcromona.

As hidrazonas foram obtidas mediante a mistura de quantidades equimolares (1mmol) de 3-formil-6-metilcromona com as hidrazidas correspondentes em meio metanólico. A mistura foi colocada em refluxo por 24 h. Depois que a mistura reacional foi resfriada à temperatura ambiente, os sólidos obtidos de cor branca foram filtrados e lavados sob pressão reduzida com metanol e éter.

Os compostos HCrPh (19) e HCrpClPh (20) foram caracterizados por temperatura de fusão, análise elementar, RMN de ^1H , ^{13}C , subespectro DEPT 135, mapas de contorno HMQC e HMBC, espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) e análise de difração de raios X de monocristal para o composto HCrpClPh (20).

2.2.5 Sínteses dos complexos de $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21) e $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22).

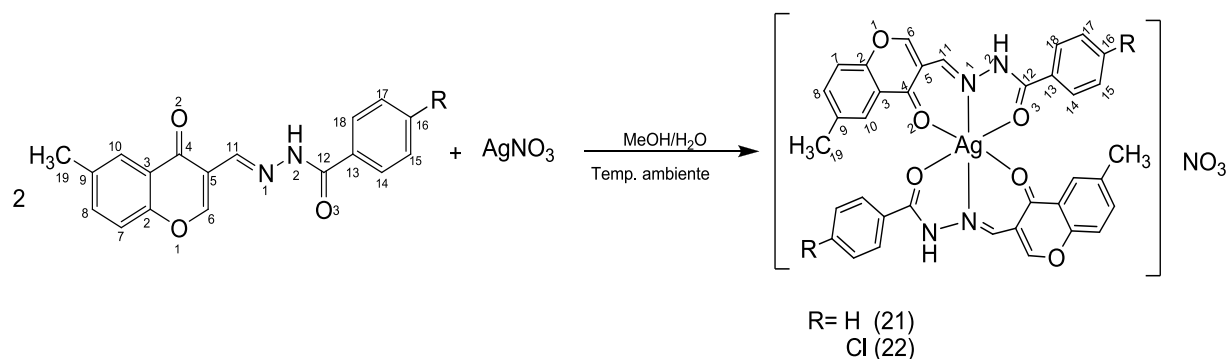


Figura 2.4- Síntese dos complexos de prata(I) com hidrazonas derivadas de 3-formil-6-metilcromona.

Os complexos de prata(I) foram obtidos a partir de uma reação de 1:1 metal:ligante. Foi adicionado 1 mmol da hidrazona desejada dissolvido em 10 mL de metanol. Após, acrescentou-se gota a gota 3 mL de uma solução aquosa de 1 mmol de AgNO_3 . A reação foi mantida sob agitação durante 72 h à temperatura ambiente, protegida da luz. Embora a síntese tinha sido feita na proporção 1:1 metal:ligante os complexos obtidos apresentam proporção molar 1:2 metal:ligante.

Os sólidos obtidos de cor cinza foram filtrados e lavados com metanol e éter etílico, secos a pressão reduzida e caracterizados por temperatura de fusão, análise elementar, análise termogravimétrica, medidas de condutividade molar, RMN de ^1H , ^{13}C , subespectro DEPT 135, mapas de contorno HMQC, HMBC e espectrometria de massas.

2.3 Testes Biológicos

2.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição^{141,142}

Os testes de atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição foram feitos em parceria com a Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi do Departamento de Química da UFMG.

Para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos compostos sintetizados, foram utilizadas cepas da coleção do ATCC (American Type Culture Collection, USA), CBS (College of Biological Sciences, USA), dos seguintes micro-organismos:

- Bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 49456), *Bacillus cereus* (ATCC 11778) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313).
- Bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Salmonella entérica* (ATCC 14028) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).
- Fungos Leveduriforme: *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida dubliniensis* (Isolado clínico 28), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida lusitanae* (CBS 6936), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida tropicalis* (ATCC 750).

A avaliação da atividade dos compostos foi realizada pelo método da microdiluição, empregando placas de 96 poços com o meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) para o crescimento das bactérias e o meio SDB (Sabouraud Dextrose Broth) para o crescimento dos fungos leveduriformes tanto na triagem quanto na determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento microbiano (IC₅₀).¹⁴² Os dois testes foram realizados a partir da dissolução dos compostos testes em DMSO colocados em placas de microdiluição com 96 poços e meio líquido BHI (bactérias) ou SBD (fungos leveduriformes) e, em seguida uma solução contendo o inóculo padronizado foi acrescentada e as placas foram incubadas a 37 °C. A resposta do micro-organismo é evidenciada pela turvação do meio, no qual é medida a transmitância em um espectrofotômetro.

¹⁴¹ I. P. Ferreira. Tese de Doutorado, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais. 2013.

¹⁴² N. C. F. C. L. Standards, in: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 5th ed. 20. (2000)M7-A5.

➤ **Preparo das Soluções Estoque dos Compostos**

Utilizaram-se soluções estoque em dimetilsulfóxido (DMSO), com concentração de 12,5 mg mL⁻¹ dos compostos a serem avaliados.

➤ **Solução de Trabalho**

Para o preparo da solução de trabalho foi diluído 40 µL da solução estoque em 960 µL de meio de BHI (Brain Heart Infusion) para as bactérias e SDB (Sabouraud Dextrose Broth) para fungos leveduriformes.

➤ **Preparação dos Inóculos**

Para a preparação dos inóculos dos micro-organismos as cepas foram incubadas por 24 h e 48 h a 37 °C em meio BHI ou SDB. A turvação foi ajustada em 75-76% de transmitância em um comprimento de onda fixo de 492 nm. A concentração final do inóculo no teste foi de 4,16 x10³ células mL⁻¹.

2.3.1.1 Triagem Microbiológica ¹⁴³

No estudo da atividade dos compostos sintetizados frente aos micro-organismos para serem testados, foi feita previamente uma triagem conforme o procedimento descrito abaixo. A atividade foi avaliada em uma concentração fixa de 250 µg mL⁻¹. Somente os compostos que inibiram o crescimento dos micro-organismos nessa concentração, foram submetidos à determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento microbiano (IC₅₀).

➤ **Preparação das Microplacas**

➤ **Avaliação da atividade dos compostos**

Foram adicionados 100 µL da solução de trabalho nos poços e, a seguir, adicionou-se 100 µL da solução do inóculo padronizada. Realizou-se o experimento em quadruplicata para cada composto.

➤ **Controle dos compostos**

Foram adicionados 100 µL da solução de trabalho nos poços e, a seguir, acrescentou-se 100 µL de água destilada estéril. O experimento em quadruplicata para cada composto.

¹⁴³ A. S. Zacchino, M. P. Gupta. In: Manual de técnicas in vitro para la detección de compuestos antifúngicos. Corpus Editorial y Distribuidora Rosario. (2007)99.

➤ **Controle do crescimento dos micro-organismos**

Foram adicionados 100 µL do meio de cultura BHI ou SDB nos poços e, a seguir, foram adicionados 100 µL do inóculo do micro-organismos.

➤ **Controle do meio de cultura**

Para o controle da esterilidade do meio de cultura, foram adicionados 100 µL do meio de cultura BHI ou SDB nos poços e, a seguir, foram adicionados 100 µL de água destilada estéril.

➤ **Leitura das microplacas**

As microplacas foram incubadas a 37 °C durante 48 h. Realizaram-se leituras em uma leitora de microplaca no comprimento de onda fixo de 492 nm com 24 h e 48 h para os testes antibacterianos.

2.3.1.2 Cálculo da Percentagem de Inibição

A percentagem de inibição foi calculada pela seguinte relação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{EC - CC}{CH - CM} \right) \times 100$$

Onde:

EC= absorvância dos compostos avaliados;

CC= absorvância do composto controle em água;

CH= absorvância da solução contendo o micro-organismo em ágar;

CM= absorvância do meio de cultura.

2.3.1.3 Determinações da Concentração Inibitória Mínima

Para a determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento microbiano (IC50), concentrações decrescentes do composto em meio de cultura foram colocadas em placas de microdiluição com 96 poços. A atividade foi avaliada na faixa de concentração de 250 µg mL⁻¹ a 0,12 µg mL⁻¹, conforme o procedimento descrito abaixo que está de acordo com o método de Gupta e Zacchino.¹⁴³

➤ **Preparação das Microplacas**

➤ **Avaliação da atividade dos compostos**

Este experimento foi realizado em quadriplicata para cada composto de estudo. Colocaram-se 200 µL da solução de trabalho dos compostos nos poços nas microplacas. Em seguida, diluições sucessivas foram realizadas repassando 100 µL da

solução da primeira coluna para a seguinte contendo 100 μL do meio de cultura previamente pipetado obtendo, assim, as diferentes concentrações testadas.

Finalmente, 100 μL da solução do inóculo na concentração padronizada foi acrescentada aos poços correspondentes ao teste (Figura 2.5).

➤ **Controle dos compostos**

Para o controle dos compostos nas diferentes diluições acrescentaram-se 100 μL de água destilada estéril nos poços.

➤ **Controle do crescimento dos micro-organismos**

Pipetaram-se 100 μL do meio de cultura BHI ou SDB nos poços e, a seguir, foram adicionados 100 μL do inóculo do micro-organismo.

➤ **Controle do meio de cultura**

Para o controle da esterilidade do meio de cultura, pipetaram-se 100 μL do meio de cultura BHI ou SDB nos poços e, a seguir, foram adicionados 100 μL de água destilada estéril. As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 48 h. Realizaram-se leituras em leitora de microplacas, em comprimento de onda fixo de 492 nm com 24 h e 48 h para os testes antibacteriana e antifúngica. O cálculo da percentagem de inibição foi feito usando o cálculo de percentagem de inibição.

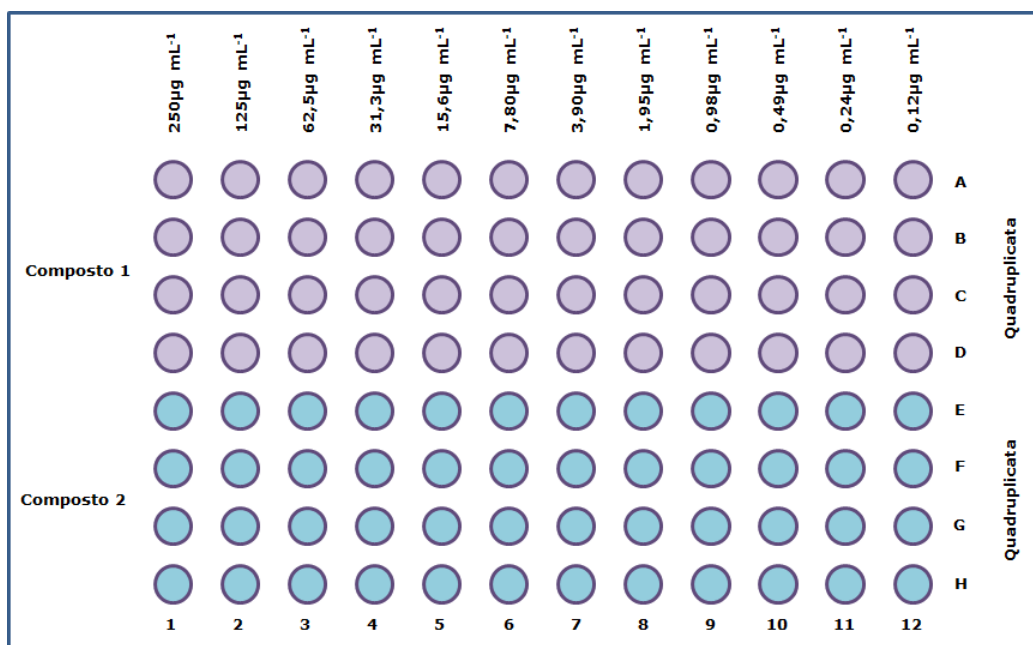
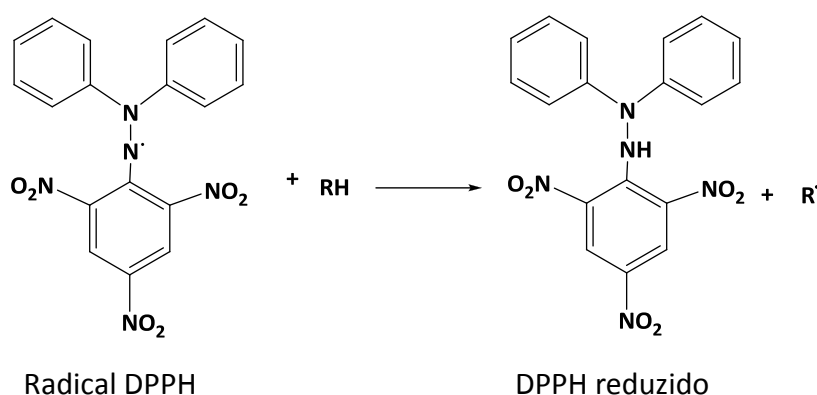


Figura 2.5-Preparação das microplacas da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição.

2.3.2 Avaliação da atividade sequestradora de radicais DPPH[•] e ânions superóxido

O DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilidrazil) é um radical livre estável que apresenta deslocalização de um elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere à molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em 520 nm em solução etanólica. Quando uma substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, forma-se a hidrazina, observando-se uma mudança de cor a amarelo pálido, devido à formação de difenil-picril-hidrazina (Esquema 2.2).^{130,144,145}

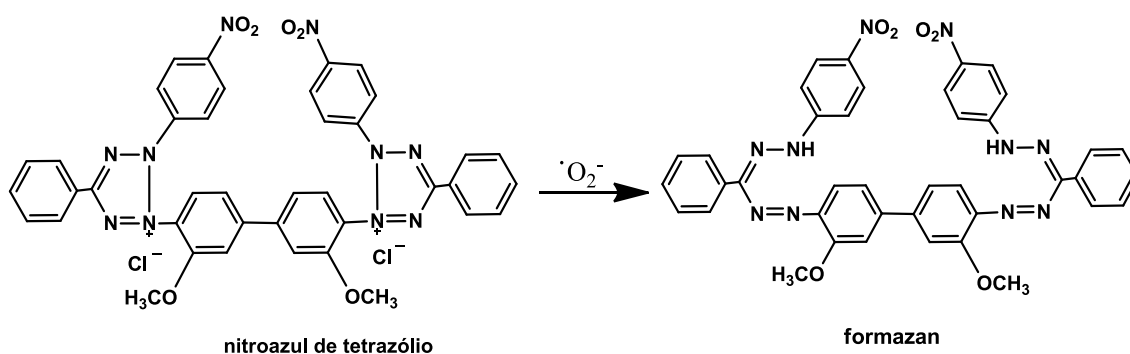


Esquema 2.2- Reação do radical DPPH[•] com e um agente doador de H[•] (R-H).

O método de avaliação do sequestro de radical ânion superóxido consiste na medida da inibição do ânion [•]O₂⁻ gerado pelo sistema riboflavina/metionina sob irradiação de lâmpadas fluorescentes. A riboflavina irradiada tem a capacidade de oxidar a metionina do meio, e através desta reação fotoquímica formam-se espécies reativas de oxigênio no meio de reação. A reação colorimétrica baseia-se na redução do nitroazul de tetrazólio (NBT) pelo ânion superóxido (Esquema 2.3).^{130,144} A variação de coloração do meio permite o monitoramento do sequestro dos radicais ânion superóxido através do decréscimo de absorvância a 525 nm.

¹⁴⁴ I. Gülçin. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 11(2010)210.

¹⁴⁵ B. Sagar Kedare, R.P. Singh. J. Food. Sci.Technol. 48(2011)412.



Esquema 2.3- Formação do ânion superóxido pelo sistema riboflavina/metionina/iluminação.

A avaliação da atividade sequestradora de radicais DPPH[•] e de ânions superóxido das hidrazonas derivadas de *trans*-4-estilbenocarboxaldeído, a Naringenina, a Hesperetina e seus respectivos complexos de cobre(II) foi realizada no Laboratório de Bioquímica de Plantas do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG em colaboração com a Professora Luzia Valentina Modolo.

2.3.2.1 Métodos DPPH[•]

Inicialmente preparou-se uma solução etanólica de DPPH[•] na concentração de 200 µM e soluções estoque do composto teste e do resveratrol (controle positivo) ambos a 2 mM em etanol 92%/DMSO 8%. Foram pipetados volumes de cada uma das soluções até obter-se uma solução a 320 e 80 µM diluindo-se em etanol 98,72%/DMSO 1,28% (não tóxica e não gera radicais livres).

Em seguida, numa microplaca foram incubados 50 µL da solução dos compostos testes e do resveratrol a 320 e 80 µM com 50 µL de DPPH 200 µM. O branco é constituído por 50 µL de DPPH e 50 µL de Etanol 98,72%/DMSO 1,28%.¹⁴⁶

Os sistemas de reação foram mantidos sob agitação a 600 rpm por 30 min, à temperatura ambiente e na ausência de luz. Posteriormente, a partir de medidas de

¹⁴⁶ W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset. LWT. Food Sci. Technol. 28(1995)25.

absorvância a 520 nm em um leitor de microplaca, foram calculadas as porcentagens de sequestro dos compostos nas diferentes concentrações, empregando-se a seguinte equação:

$$\text{Porcentagem de Sequestro} = (A_c - A_s/A_c) \times 100$$

A_c = absorvância do controle (solução de DPPH)

A_s = absorvância da amostra (solução DPPH na presença do composto teste)

Curva de DPPH:

Prepara-se uma curva de calibração por meio das absorvâncias de DPPH^{*} a partir de uma solução estoque do composto em etanol absoluto para se obter as concentrações de 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 μM , usando Etanol 98,72%/DMSO 1,28% para fazer as diluições. A curva deve apresentar R^2 acima de 0,99.

2.3.2.2 Produção de ânions superóxido

A capacidade de sequestro de ânions superóxido dos compostos de estudo foi realizada nas concentrações de 320 e 80 μM em metanol 92%/DMSO 8%, o resveratrol foi usado como controle positivo.

Incubou-se numa microplaca 10 μL dos compostos de estudo e controle positivo nas concentrações (320 e 80 μM) individualmente em meio contendo 1,0 μL EDTA (100 μM), 17,0 μL L-metionina (13,3 μM), 10 μL nitroazul de tetrazólio (NBT) (200 μM), 2,0 μL riboflavina (40 μM), em 60,0 μL etanol, por 10 min a 25 °C na presença de luz fluorescente. Como controle, utilizou-se um conjunto idêntico de reações que foi mantido na ausência de luz (recobertos com papel alumínio) por 10 min a 25 °C.¹⁴⁶ Após o período de incubação, as reações foram submetidas à análise espectrofotométrica a 525 nm.

Para determinar o percentual da capacidade dos compostos em capturar radicais superóxidos, realizou-se a subtração das absorvâncias da solução contendo o composto e a solução contendo o branco. As porcentagens de sequestro dos compostos nas diferentes concentrações foram calculadas empregando-se a seguinte equação:

$$\text{Porcentagem de Sequestro} = (A_c - A_s/A_c \times 100) - 100$$

A_c = absorvância do controle (no escuro)

A_s = absorvância da amostra (solução exposta a luz)

2.3.3 Atividade citotóxica

Os ensaios foram realizados em parceria com o Dr. Adilson Kleber Ferreira do Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), as Professoras Dra. Miriam Teresa Paz Lopes e Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes do Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

➤ Linhagens de células malignas humanas

Para a avaliação da viabilidade e proliferação celular para os compostos (1) a (13) foram utilizadas as linhagens células HL-60 (leucemia mielóide aguda), Jurkat (leucemia de linfócitos T), THP-1 (leucemia monocítica aguda) MDA-MB-231 (tumor de mama), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HCT-116 (carcinoma colorretal). Foram plaqueadas na concentração de 50.000 (HL-60), 100.000 (Jurkat e THP-1) e células MDA-MB-231, MCF-7 e HCT-116 foram utilizados na concentração de 10.000 células por poço (placa de 96 poços) e pré - incubadas overnight.

Para a avaliação da viabilidade e proliferação celular dos compostos (14) a (18) foram utilizadas as linhagens celulares de MDA-MB-231 (câncer de mama), A2058 (melanoma) e A549 (carcinoma de pulmão), as quais foram obtidas do American Type Culture Collection. Para a avaliação da viabilidade e proliferação celular dos compostos (19) a (22) foi utilizada a linhagem celular B16-F10 (melanoma murino).

Todas as células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Todas as linhagens foram mantidas em uma estufa incubadora em condições de 5% (v/v) de CO₂ e 37 °C.

➤ Linhagens de células sadias

Foi utilizada uma linhagem de células sadias VERO (rins de macaco verde africano) para os compostos (1) a (13) pré-incubadas overnight para estabilização em incubadora de CO₂.

Foram utilizadas células normais de fibroblastos de pulmão LL-24 e células endoteliais HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial) para os compostos (14) a (18). As quais foram obtidas do American Type Culture Collection. As células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB).

Para os compostos (19) a (22) foi utilizada uma linhagem de células sadias Melan-a (melanócito murino) que foi cultivada em meio RPMI-1640 a 10 % (v/v) de FBS.

Todas as linhagens foram incubadas a 37 °C, sob atmosfera úmida com 5% de CO₂.

➤ **Avaliação de viabilidade e proliferação celular pelo método de 3-(4,5dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)**

Foi utilizado o método colorimétrico de 3-(4,5dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) que mede indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas.¹⁴⁷

➤ **Ensaio de MTT para os compostos (1) a (13)**

Os compostos testes (1) a (13) na concentração de 1 µM foram incubados overnight, após deste período foram adicionados a cada poço 20 µL de uma solução de MTT a 2,5 mg/mL em PBS 1X. As células foram incubadas durante 4 h e, após a formação dos cristais de formazan, o sobrenadante foi retirado em cada poço por meio de sucção de uma seringa com agulha acoplada a uma bomba a vácuo, de maneira a preservar os cristais. Estes foram solubilizados com 200 µL de uma solução de HCl 0,04 M em isopropanol. Posteriormente, a leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada a 595 nm em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição de viabilidade em relação ao controle negativo (DMSO, 0,5%), calculados da seguinte forma: porcentagem da inibição da viabilidade celular (%) = 100 – [(DO média do tratado/ DO controle negativo) x 100], sendo DO densidade ótica. As interações entre as substâncias e o meio foram estimadas com base nas diferenças entre o meio contendo substâncias e o meio isento de substâncias para evitar falso-positivos ou falso-negativos.

➤ **Ensaio de MTT para os compostos (14) a (18)**

As células foram incubadas em placas de 96 poços numa concentração de 1x10⁴ células/poço, as células foram deixadas em incubação por 2 h. Posteriormente, cada poço foi tratado com os compostos teste numa concentração de 0 - 50 µM por 24 h, adicionou-se em cada poço 10 µL de MTT (5mg/mL em solução de tampão fosfato PBSx1) e as placas foram incubadas durante 3 h. Após, as placas foram centrifugadas e os cristais roxos de formazan resultantes da redução do MTT nas células vivas foram

¹⁴⁷ D. Monks, P. Scudiero, R. Skehan, K. Shoemaker, D. Paull, C. Vistica, J. Hose, P. Langley, A. Cronise, M. G. VaigroWolff, H. Goodrich, J. Campbell, M. Mayo. J. Boyd. Natl. Cancer Inst. 83(1991)757.

dissolvidos 100 µL de DMSO. Realizou-se a medição da absorvância num leitor de microplacas a 538 nm.

Finalmente, a porcentagem de viabilidade celular foi obtida através da fórmula:
% viabilidade celular = (Absorbância das células das amostras / Absorbância de células controle) x 100.

Com a finalidade de compreender o mecanismo de ação dos compostos teste, as células A549 (carcinoma de pulmão) foram incubadas em placas de 96 poços numa concentração de 1×10^4 células/poço, após do tempo de adesão as células foram pré-tratadas com 2 µM de wortmanina por uma hora, seguido do tratamento por 12 h a uma concentração de 16 µM ou 6 µM. Adicionou-se em cada poço 10 µL de MTT (5mg/mL em solução de tampão fosfato PBSx1) e as placas foram incubadas durante 3 h. Realizou-se o ensaio de MTT como foi descrito anteriormente.

➤ Ensaio de MTT para os compostos (19) a (22)

Para a determinação da citotoxicidade das amostras (19) a (22) frente às linhagens celulares normais e tumorais, foi preparada uma suspensão celular, e, em seguida, foram semeadas 1×10^3 células/100 µL/cavidade em placas de poliestireno de 96 cavidades. As culturas celulares foram mantidas em estufa por 24 h, garantido a adesão celular à superfície das cavidades. As células foram expostas por 72 h a concentrações crescentes das amostras, utilizando-se como controle de viabilidade celular máxima, células expostas apenas a meio RPMI-1640 a 10 % (v/v) de FBS. Após esse período, os efeitos citotóxicos dos compostos foram medidos através da adição de 10,0 µL de uma solução de sal de tetrazólio (5mg/mL) em cada cavidade, incubadas por 4 h foi realizada a leitura espectrofotométrica, a 570 nm. Previamente à leitura, os cristais de sal de tetrazólio foram dissolvidos com 100 µL de DMSO.¹⁴⁸

2.3.4 Avaliação da apoptose pelo teste Anexina V/Iodeto de propídeo por citometria de fluxo para os compostos (17) e (18)

Para a avaliação do processo de apoptose foi realizado o ensaio de Anexina V). Primeiro, foram semeadas $1,0 \times 10^5$ células de A549 (carcinoma de pulmão) em 12 poços, depois da adesão, foram tratadas por 12 h com diferentes concentrações dos compostos testes (24, 16, 8, 6 e 3 µM). Utilizou-se como controle positivo para

¹⁴⁸ F. Denizot, R. Lang. J. Immunol. Methods. 89(1986)271.

apoptose TRAIL recombinante murino numa concentração de 2 µg/mL. Posteriormente, as células foram recolhidas com um raspador de células, lavadas com solução tampão PBS-Anexina e foram marcadas com 1,5 µL de Anexina V conjugado ao Isotiocianato de fluoresceína (FITC) e 0,4 µL da solução estoque de Iodeto de propídeo (PI) a uma concentração de 100 µg/mL em solução tampão por 30 min a 4 °C no escuro. A análise das células em apoptose foi realizada através de citometria de fluxo. Foram analisados 10.000 eventos por amostra em um citômetro de fluxo e pelo programa FlowJo.

2.3.5 Avaliação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) para os compostos (17) e (18)

Para a avaliação do potencial elétrico das mitocôndrias, as células A549 foram plaqueadas na concentração $5,0 \times 10^5$ células por poço na placa de 12 poços e cultivadas por 12 h. Após tratamento, as células foram recolhidas, lavadas com tampão PBS e marcadas com tetrametil rodamina etil ester (TMRE) por 15 min a 37 °C. Seguidamente, as células foram novamente lavadas com PBS/BSA a 0,5 % e mantidas a 4 °C durante as medições.

O potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) foi medido usando um citômetro de fluxo. Foram analisados 10.000 eventos por amostra e foi registrada a intensidade de fluorescência máxima. Os dados foram processados utilizando o programa FlowJo.

2.3.6 Avaliação da produção de ROS para os compostos (17) a (18)

A produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi avaliada utilizando uma sonda fluorescente sensível a superóxido, a dihidroetidina (DHE). As células A549 foram semeadas em placas de 12 poços (5×10^5 células/poço), foram tratadas durante 12 h com diferentes concentrações dos compostos teste após adesão. Em seguida, as células foram descoladas com tripsina a 0,5% lavadas suavemente com PBS/BSA a 0,5% e incubadas com 5 µM DHE a 37 °C durante 15 min. A produção de ROS pelas células foi analisada usando um citômetro de fluxo e um total de 10.000 eventos por amostra foram adquiridos. Os dados foram analisados usando o programa FlowJo.

2.3.7 Análises Estatísticas

➤ Para os compostos (1) a (13)

Todas as substâncias foram testadas em triplicata em três experimentos independentes e como controle foi utilizado o solvente DMSO (0,5%). O valor da IC₅₀ foi determinado através de uma regressão não linear utilizando software GraphPad Prism® Version 5.01.

➤ Para os compostos (14) a (18)

Todos os experimentos foram realizados por triplicata. Os dados são apresentados com o valor da média ± desvio padrão (DP). Os valores de IC₅₀ foram calculados representando graficamente a percentagem de inibição da viabilidade celular, avaliado pelo ensaio de MTT, em função da concentração logarítmica dos compostos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t-Student para comparação entre os grupos de amostra e ANOVA de duas vias, seguido pelo teste post hoc Bonferroni para determinar diferenças entre os vários grupos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo ($p^* < 0,05$, $^{**}p < 0,01$, $^{***}p < 0,001$). Todas as análises foram realizadas utilizando software Graph-Pad Prism, versão 5.04.

➤ Para os compostos (19) a (22)

Todas as substâncias foram testadas em sextuplicata em três experimentos independentes e como controle meio suplementar. O valor da IC₅₀ foi determinado através de uma regressão não linear utilizando software GraphPad Prism® Version 5.01.

2.4 Estudos de ligação ao DNA

2.4.1 Determinação da constante de ligação por espectroscopia de absorção eletrônica na região UV-Vis

A espectroscopia eletrônica de absorção é uma das técnicas mais utilizadas para o estudo da ligação entre o calf-thymus CT-DNA e os compostos de interesse.

Os experimentos de titulação por absorção eletrônica foram realizados em cubetas de 1 cm de caminho ótico com concentrações dos compostos ($\sim 10^{-5}$ molL⁻¹ e $\sim 10^{-6}$ molL⁻¹) em solução tampão de Tris-HCl (pH=7,40). Foram tituladas com volumes de solução de DNA (CT-DNA) no mesmo tampão até alcançar uma relação 1:1

(complexo: CT-DNA). Após cada adição de CT-DNA o espectro de absorção foi registrado. Os dados foram ajustados com a equação Scatchard:¹⁴⁹

$$[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{DNA}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f),$$

Onde:

[DNA]= Concentração dos pares de bases do DNA;

ϵ_a = Corresponde a relação entre $A_{\text{obs}}/[\text{composto}]$ (A_{obs} = absorvância observada);

ϵ_f = Coeficiente de extinção do composto livre em solução;

ϵ_b = Coeficiente de extinção do composto completamente ligado ao DNA.

Do gráfico de $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ vs($[\text{DNA}]$), a constante de ligação intrínseca (K_b) é calculada pela razão entre o coeficiente angular $[(\epsilon_b - \epsilon_f)]$ e o intercepto $[1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)]$.

2.4.2 Determinação da constante de ligação por Fluorescência

A constante de ligação dos compostos testes foi determinada mediante o experimento de competição com o intercalador Brometo de etídio (BE) ligado ao CT-DNA e soluções dos compostos testes em tampão Tris-HCl (pH=7,40).

A fluorescência do BE aumenta cerca de 30 vezes na presença de DNA, como consequência da forte intercalação que ocorre.¹⁵⁰ A presença de outro composto intercalador reduz a fluorescência emitida pelo sistema BE-DNA, em função da competição pelos sítios do biopolímero. Desse modo, a fluorescência do BE-DNA é medida na ausência e na presença do composto estudado¹⁵¹ onde observa-se as modificações na intensidade de fluorescência a 603 nm (545 nm de excitação) depois da adição de volumes constantes de solução dos compostos foram registradas.

O método consiste em determinar a constante de supressão da fluorescência (K_{SV}) mediante a equação de Stern-Volmer:¹⁵²

$$I_0/I = K_{SV} [Q] + 1,$$

Onde:

I_0 = Intensidade de emissão em ausência do supressor;

I = Intensidade de emissão na presença do supressor;

¹⁴⁹ A. Wolfe, G.H. Shimer, T. Meehan. Biochemistry. 26(1987)6392.

¹⁵⁰ J. Olmsted, D. R. Kearns. Biochemistry. 16(1977)3647.

¹⁵¹ C. V. Barra, A. V. G. Netto. Rev. Virtual Quim.7(2015)1998. doi: 10.5935/1984-6835.20150118.

¹⁵² F. Dimiza, F. Perdih, V. Tangoulis, I. Turel, D. P. Kessissoglou, G. Psomas. J. Inorg. Biochem. 105(2011)476.

K_{SV} = Constante de supressão Stern-Volmer;

$[Q]$ = Concentração do supressor.

O K_{SV} é o coeficiente angular obtido do gráfico de I_0/I vs $[Q]$.

A constante aparente de ligação (K_{app}) foi calculada da equação:¹⁵³

$$K_{EB} [BE] = K_{app} [\text{composto}]$$

Onde:

$$K_{EB} = 10^7 \text{ molL}^{-1};$$

$[\text{composto}]$ = Concentração quando for suprimida 50% da fluorescência ou $I_0/I = 2$ ou $1/K_{SV}$.

2.5 Interação com albumina sérica bovina (BSA) e com albumina do soro humano (HSA)

O estudo das interações dos compostos com a albumina bovina foi realizado por Espectroscopia de fluorescência e por Ressonância paramagnética eletrônica (RPE).

2.5.1 Estudos de interação com a Albumina Sérica Bovina (BSA) utilizando fluorescência

Os compostos testes foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$. Posteriormente, as soluções foram diluídas em tampão Tris-HCl pH=7,4 na concentração de $2,0 \mu\text{M}$. As soluções de BSA foram preparadas numa concentração $1,0 \mu\text{M}$, diretamente, no mesmo tampão e pH. No experimento $2,0 \text{ mL}$ da solução da BSA, sob agitação magnética foram tituladas com alíquotas de $0,1 \text{ mL}$ das soluções dos compostos em estudo. Após cada adição foram feitas leituras na faixa de 250 a 800 nm , com uma excitação a 285 nm para a BSA. Após a adição do composto em estudo, observa-se uma supressão de fluorescência dos triptofanos que a proteína possui em sua estrutura. Esta supressão pode ser descrita pela equação de Stern-Volmer: ¹⁵²

$$I_0/I = K_{SV} [Q] + 1$$

A constante de ligação do complexo com BSA é obtida do gráfico $\log[(I_0-I)/I]$ vs $\log [Q]$ na equação:¹⁵⁴

¹⁵³ Y. C. Liu, K. J. Zhang; R. X. Lei, J. N. Liu, T. L. Zhou, Z. Y. Yang. J. Coord. Chem. 65(2012)2041.

$$\log[(I_0-I)/I] = \log K_b + n\log[Q]$$

Onde:

I_0 = Intensidade de fluorescência inicial;

I = Intensidade de fluorescência depois de adição do composto teste;

n = igual ao número de sítios de ligação;

K_b = Constante de ligação.

A constante é obtida do intercepto da curva.

2.5.2 Estudos de interação com a Albumina Sérica Bovina (BSA) e Albumina Sérica Humana (HSA) por Ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

Os espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) foram obtidos no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), em colaboração com a Profa. Sônia R. Louro, do Departamento de Física da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio).

No caso dos estudos das interações por RPE dos complexos de cobre(II) com Albumina Sérica Bovina (BSA) e Albumina Sérica Humana (HSA), foram preparadas soluções equimolares dos compostos testes e das albuminas (BSA ou HSA) a $0,4 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ em tampão de fosfato $0,010 \text{ M}$ pH 7,4. Os espectros de RPE foram obtidos operando em banda X a 77 K.

2.6 Estudos teóricos

Os cálculos computacionais foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Hélio Duarte e o estudante Matheus C. Quintão do Departamento de Química da UFMG.

Foi realizada a otimização da estrutura do complexo de cobre(II) $[\text{Cu}(\text{HStAc})_2\text{Cl}_2]$ (8) utilizando-se o programa Avogadro.¹⁵⁵ A obtenção dos dados termodinâmicos e espectroscópicos foi através do pacote computacional Gaussian versão 2009¹⁵⁶

¹⁵⁴ F. Xue, C. Z. Xie, Y. W. Zhang, Z. Qiao, X. Qiao, J. Y. Xu, S. P. Yan. J. Inorg. Biochem. 115(2012)78.

¹⁵⁵ Avogadro: an open-sourcer molecular builder and visualization tool. Version 20.8.0. <http://avogadro.openmolecules.net>

¹⁵⁶ Gaussian 09, Revision E.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.;

empregando-se o funcional de troca/correlação híbrido CAM- B3LYP com o conjunto de base LanL2DZ e os efeitos de solvatação foram incluídos como o Modelo de Polarização (PCM) em DMSO.

Posteriormente, a partir das estruturas otimizadas, realizou-se os cálculos de frequência (infravermelho), em fase gás, e TDDFT (Time Dependent DFT) para obtenção das excitações eletrônicas.

Para a obtenção dos parâmetros RPE, as estruturas foram otimizadas no programa ADF (SCM)¹⁵⁷ versão 2010 como o funcional PBE na base TZP e como modelo de solvatação COSMO com DMSO. Após a otimização o cálculo RPE foi realizado com BLYP/TZ2P COSMO/DMSO e utilizando correção para efeitos relativísticos ZORA com acoplamento Spin Orbita.

Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J.J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ort, J.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

¹⁵⁷ ADF2013, SCM, Theoretical Chemistry, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands. <http://www.scm.com>.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO 3. HIDRAZONAS DERIVADAS DO *TRANS*-4-ESTILBENOCARBOXALDEÍDO.

Neste capítulo, serão apresentados e discutidos os resultados experimentais referentes à sínteses, caracterização e avaliação de atividades biológicas de hidrazonas derivadas de *trans*-4-estilbenocarboxaldeído.

Foram sintetizadas sete hidrazonas derivadas de *trans*-4-estilbenocarboxaldeído (Figura 3.1) usando o método descrito na seção 2.2.1 das quais seis são inéditas. Os compostos sintetizados foram: *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-acetilhidrazona HStAc (1), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-fenilhidrazona HStPh (2), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-*para*-cloro-fenilhidrazona HStpClPh (3), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-*para*-nitro-fenilhidrazona HStpNO₂Ph (4), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-*para*-toluil-hidrazona HStpT (5), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-benzilhidrazona HStBz (6) e a *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-*para*-hidroxi-fenilhidrazona HStpOHPh (7). Esta última encontra-se descrita na literatura.⁴⁷ Os compostos obtidos foram caracterizados através de análise elementar e por meio de análise de seus espectros de absorção na região do infravermelho, RMN de ¹H, ¹³C e DEPT 135. Foram obtidos monocristais das hidrazonas (4) e (5) e as estruturas cristalinas foram determinadas por análise de difração de Raios-X.

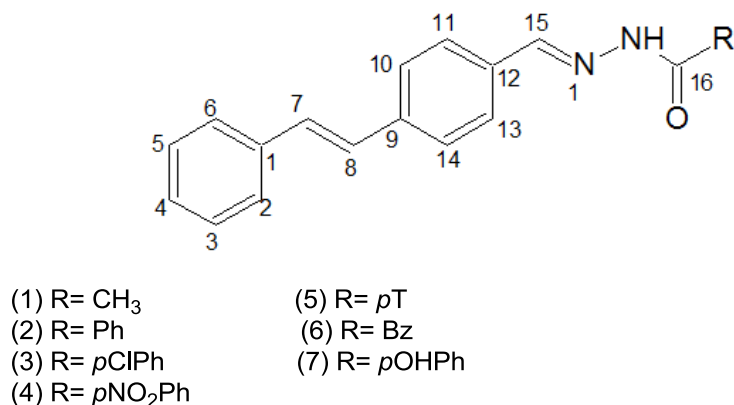


Figura 3.1- Estruturas genéricas das hidrazonas derivadas do *trans*-4-estilbenocarboxaldeído e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes.

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS HIDRAZONAS DERIVADAS DO *TRANS*-4-ESTILBENOCARBOXALDEÍDO.

Os rendimentos das reações, temperaturas de fusão, análises elementares e massas molares dos compostos sintetizados encontram-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1- Formula molecular, temperatura de fusão, análises elementar*, massa molar e rendimentos das reações para as hidrazonas derivadas do *trans*-4-estilbenocarboxaldeído HStAc (1), HStPh (2), HStpClPh (3), HStpNO₂Ph (4), HStpT (5), HStBz (6) e HStpOHPh (7).

Composto	Formula molecular	Temp. de fusão (°C)	% C	%H	%N	MM (gmol ⁻¹)	Rend. (%)
(1)	HStAc C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O	239,2-241,2	77,25 (77,25)	6,01 (6,10)	10,19 (10,6)	264,32	61,1
(2)	HStPh C ₂₂ H ₁₈ N ₂ O	241,1-242,8	80,95 (80,96)	5,46 (5,56)	8,59 (8,58)	326,39	87,5
(3)	HStpClPh C ₂₂ H ₁₇ ClN ₂ O	276,1- 277,0	73,07 (73,23)	4,49 (4,75)	7,68 (7,76)	360,83	85,2
(4)	HStpNO ₂ Ph C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₃	274,8-278,5	68,15 (67,86)	4,77 (4,92)	10,73 (10,79)	389,40	94,9
(5)	HStpT C ₂₃ H ₂₀ N ₂ O	252,9-253,8	81,15 (80,96)	5,78 (5,56)	8,29 (8,58)	340,41	82,6
(6)	HStBz C ₂₃ H ₂₀ N ₂ O	216,2-217,4	80,87 (81,15)	5,78 (5,92)	8,23 (8,23)	340,42	83,0
(7)	HStpOHPh C ₂₃ H ₁₈ N ₂ O ₂	270,1-271,8				343,39	60,3

*Valores teóricos entre parênteses

3.1.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho das hidrazonas (1) a (7) foram obtidos na região de 4000 a 400 cm⁻¹ em pastilhas de KBr. As bandas mais representativas das hidrazonas encontram-se na Tabela 3.2.

Nos espectros de infravermelho (IV) das hidrazonas (A1 a A6 Anexo pág. 144 a 149) observou-se na região entre 1678-1650 cm⁻¹ a banda atribuída ao estiramento carbonila $\nu(\text{C}=\text{O})$; a banda referente ao estiramento do grupo azometino $\nu(\text{C}=\text{N})$ é observada na região entre 1600-1608 cm⁻¹. Entre 3078-3294 cm⁻¹ observaram-se os estiramentos característicos das vibrações N-H. A Figura 3.2 apresenta o espectro IV da hidrazona HStAc (1).

Tabela 3.2- Bandas selecionadas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das hidrazonas HStAc (1), HStPh (2), HStpClPh (3), HStpNO₂Ph (4), HStpT (5), HStBz (6), HStpOHPh (7).

Composto	ν (C=O)	ν (C=N)	ν (N-H)	ν (O-H)
HStAc (1)	1678 F	1608 F	3184 m	-----
HStPh (2)	1658 F	1600 F	3294 m	-----
HStpClPh (3)	1654 F	1600 F	3290 m	-----
HStpNO ₂ Ph (4)	1660 F	1602 F	3244 m	-----
HStpT (5)	1652 F	1608 m	3280 m	-----
HStBz(6)	1672 F	1600 F	3184 m	-----
HStpOHPh (7)	1650 F	1604 F	3078 m	sobreposta com N-H

Intensidade: F= forte, m= média, f= fraca

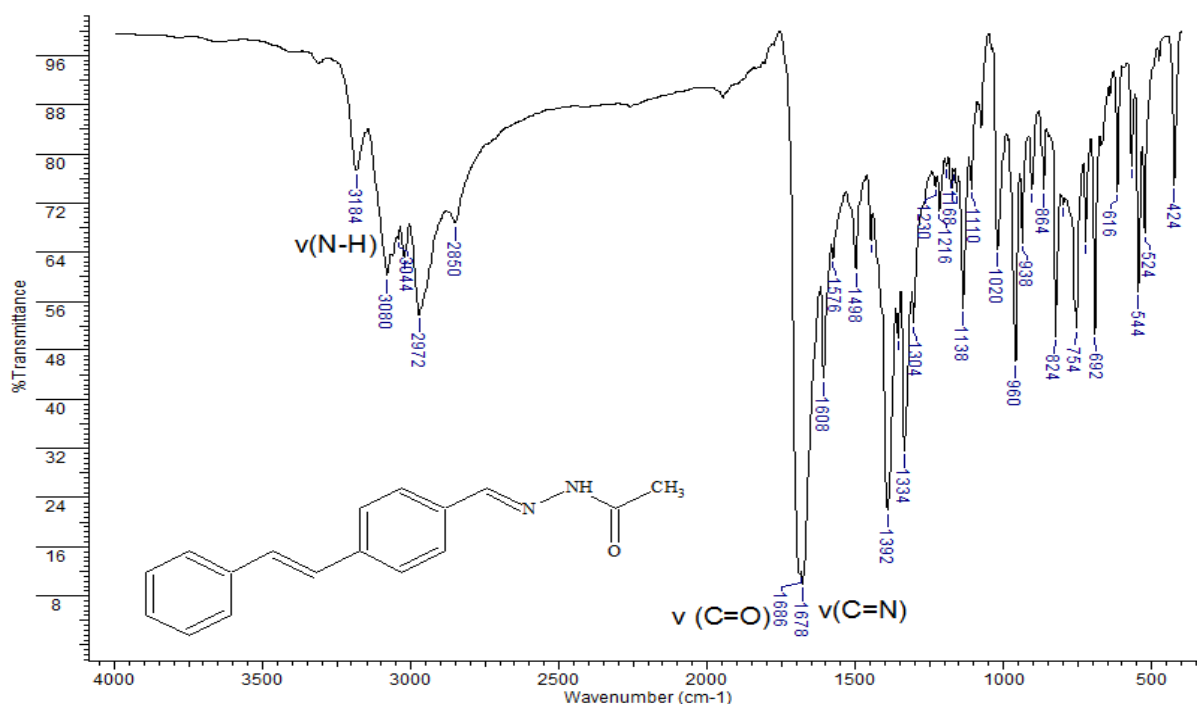


Figura 3.2- Espectro de absorção na região do Infravermelho do composto HStAc (1) em pastilhas de KBr.

3.1.2 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de todos os compostos foram feitos em DMSO-*d*₆. Os espectros de RMN de ¹H foram analisados com base nos deslocamentos químicos e multiplicidades. A numeração adotada para a atribuição dos átomos constituintes encontra-se na Figura 3.1.

Analisando os espectros RMN de ¹H e ¹³C dos compostos HStAc (1) e HStBz (6) (Anexo A14 e A15 pág.158 e 159) pode-se observar a presença de possíveis isômeros em equilíbrio na solução (Tabela 3.3). Os espectros de RMN de ¹H dos compostos (1) e

(6) apresentaram dois simpletos integrados cada um para um hidrogênio, em δ 11,38 (N2-H) e 11,25 (O-H) e em δ 11,63 (N2-H) e 11,40 (O-H) respectivamente, sugerindo a presença de tautomeria amido-iminol (Figura 3.3).¹⁵⁸

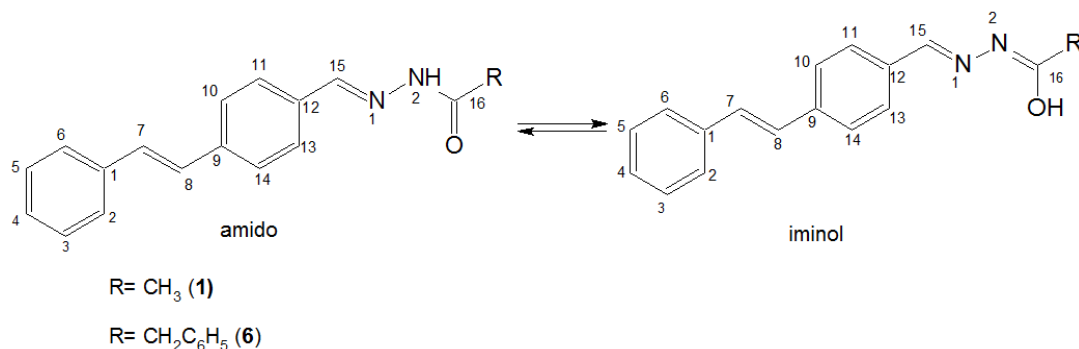


Figura 3.3- Representação do equilíbrio amido-iminol dos compostos HStAc (1) e HStBz (6).

Nos espectros de RMN ¹H de HStPh (2), HStpClPh (3), HStpNO₂Ph (4) e HStpT (5) (A16 a A19, Anexo pág 160 a 163), os sinais do grupo N-H aparecem como um único simpleto integrado para um hidrogênio em δ 11,90, 11,92, 12,14 e 11,78 respectivamente, indicando que os compostos (2), (3), (4) e (5) não apresentam tautomeria amido-iminol. Na Tabela 3.3 apresentam-se os deslocamentos químicos, multiplicidade e constantes de acoplamento para os compostos (2), (3), (4) e (5). O espectro RMN ¹H de HStpOHPh (7) (Anexo A20, pág. 164) apresenta os deslocamentos químicos de acordo com a literatura.⁴⁷

Devido à baixa solubilidade dos compostos HStpClPh (3), HStpNO₂Ph (4) e HStpT (5) nos solventes testados não foi possível obter seus espectros de RMN de ¹³C. HStPh (2) apresentou um sinal em δ 163,52, que foi atribuído ao grupo C=O e outro sinal em δ 147,78 atribuído ao carbono do grupo azometínico C=N. Não foi possível atribuir os sinais dos outros carbonos por meio dos mapas de contorno heteronuclear HMQC e HMBC devido à baixa solubilidade do composto.

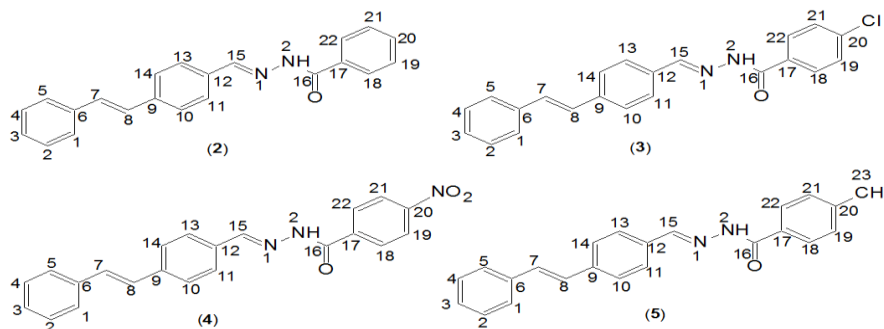
Nos espectros de RMN de ¹³C e no subespectro DEPT 135 para os compostos HStAc (1) (Anexo A21 pág 165) e HStBz (6) (Anexo A22 pág 166), apresentam-se os sinais correspondentes ao C=O e C-OH, em 165,61, δ 171,98 e em δ 166,70, 172,42 para os compostos (1) e (6) respectivamente.

¹⁵⁸ L. Skulski, G. C. Palmer, M. Calvin. Tetrahedron Letters. 26(1963)1773.

Para o composto (1) observou-se a presença do grupo metila (-CH₃) em δ 21,66 e 20,27 (Anexo pág 165).

No caso de HStBz (6) (Anexo pág 166), observaram-se sinais com fase negativa no subespectro de DEPT 135 em δ 41,30 e 39,06, atribuídos ao carbono metilênico.

Tabela 3.3- Atribuição, deslocamentos químicos e constantes de acoplamento J [], multiplicidade^a dos principais sinais de RMN de ¹H das hidrazonas (2), (3), (4) e (5).



Atribuições	HStPh (2)	HStpClPh (3)	HStpNO ₂ Ph (4)	HStpT (5)
N2-H	11,87 (s)	11,92 (s)	12,13 (s)	11,78 (s)
H-1, H-2,H-3, H-4, H-5	7,42 -7,24 (m)	7,42-7,24 (ss)	7,42-7,28 (m)	7,42-7,32 (m)
H-7, H-8	7,9 (d)	7,64 -7,59 (ss)	7,64 (d) [7.3 Hz]	7,43-7,28 (ss)
H-10	7,72 (ss)	7,72(ss)	7,71 (d) [8,34 Hz]	7,71 (ss)
H-11	7,72 (ss)	7,72(ss)	7,77 (d) [8,3 Hz]	7,71 (ss)
H-13	7,72 (ss)	7,72(ss)	7,77 (d) [8,3 Hz]	7,71 (ss)
H-14	7,72 (ss)	7,72(ss)	7,71 (d) [8,34 Hz]	7,71 (ss)
H-15	8,45 (s)	8,44 (s)	8,46(s) 8,15 (d)	8,42(s) 7,63 (d)
H-18	7,64-7,52 (m)	7,64 -7,59 (ss) 7,94(d)	[8,97 Hz] 8,37 (d)	[8,08 Hz] 7,83 (d)
H-19	7,64-7,52 (m)	[8,46 Hz] 7,94(d)	[8,6 Hz] 8,37 (d)	[8,21 Hz] 7,83 (d)
H-21	7,64-7,52(m)	[8,46 Hz]	[8,6 Hz] 8,15 (d)	[8,21 Hz] 7,63 (d)
H-22	7,64-7,52(m)	7,64 -7,59 (ss)	[8,97 Hz]	[8,08 Hz]

^aInformações sobre multiplicidade se encontram entre parêntesis. s=simpleto; d=duplete; t= tripeteo; m=multiploteo, ss= sobreposição de sinais.

3.1.3 Estruturas cristalográficas

Os cristais dos compostos HStpNO₂Ph·DMSO (4a) e HStpT (5) foram obtidos por evaporação lenta de uma solução 1:9 DMSO-acetona e a partir da água mãe da filtragem, respectivamente. O composto HStpNO₂Ph (4) cristalizou-se com uma molécula de dimetilsulfóxido (DMSO). As Figuras 3.4 e 3.5 mostram os diagramas ORTEP^{159,160} das estruturas resolvidas dos compostos.

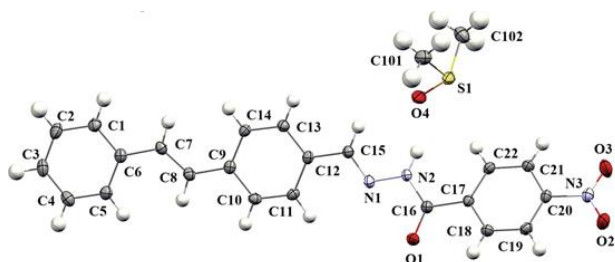


Figura 3.4- Representação ORTEP da estrutura molecular de HStpNO₂Ph·DMSO (4a). Elipsóides 50% de probabilidade para todos os átomos não hidrogenoides.

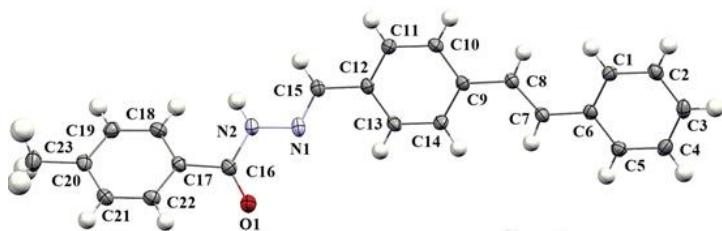


Figura 3.5- Diagrama ORTEP da estrutura molecular de HStpT (5). Elipsóides com 50% de probabilidade para todos os átomos não hidrogenoides.

As Tabelas Anexo A30 e A34 (pág 175 e 177) mostram um resumo dos dados dos cristais, detalhes e resultados experimentais das estruturas HStpNO₂Ph·DMSO (4a) e HStpT (5). As duas hidrazonas cristalizaram no sistema monoclinico, com uma molécula por unidade assimétrica. Os parâmetros geométricos (distâncias e ângulos de ligação) para os compostos (4a) e (5) justificam a formação da hidrazona na forma ceto (Tabelas A31 e A35 Anexo pág 176 e 178).

¹⁵⁹L. J. Farrugia. J. Appl. Crystallogr. 32(1999)837.

¹⁶⁰ L. J. Farrugia. J. Appl. Crystallogr. 30(1997)565.

De acordo com dados das Tabelas Anexo A32 e A36 (pág 176 e 178) os compostos (4a) e (5) adotaram a configuração *E* (*trans*) no cristal com respeito à ligação dupla C(15)-N(1) com um ângulo de torção próximo de 180° e a conformação *Z* em relação à ligação C(16)-N(2). Além disso, também é importante ressaltar o ângulo de torção próximo de 180° em torno da dupla ligação C(7)-C(8) que sugere configuração *E* (*trans*).

No caso do composto (4a), a conformação *Z* em torno da ligação C(15)-N(1) possibilita a ligação de hidrogênio entre N2-H com o átomo de oxigênio da molécula de DMSO. A conformação *Z* em torno da ligação C(15)-N1 para o composto (5) possibilita a ligação de hidrogênio entre N2-H com o átomo de oxigênio de uma outra molécula da hidrazona. Em relação ao empacotamento do cristal, na estrutura de HStpNO₂Ph·DMSO (4a), vários contatos curtos (ligações de hidrogênio não-clássicas) podem ser observados entre a molécula de DMSO e a da hidrazona, justificando a estabilidade da estrutura com a molécula de DMSO co-cristalizada. A presença de interações do tipo π - π favorece o empacotamento.

Em relação ao empacotamento do cristal na estrutura de HStpT (5) (Figura 3.6), observamos a formação de cadeias infinitas de hidrazonas ao longo do eixo cristalográfico *b*, interligadas entre si por meio da ligação de hidrogênio entre N2-H e O1. Observamos ainda interações do tipo π - π entre os esqueletos da hidrazonas no plano perpendicular ao eixo cristalográfico *b*.

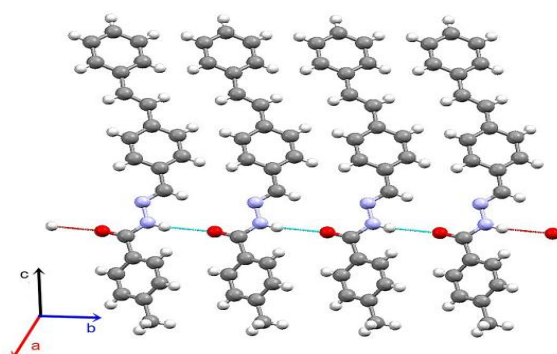


Figura 3.6- Empacotamento na estrutura de HStpT (5).

3.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição

Os compostos HStAc (1), HStPh (2) HStpClPh (3), HStpNO₂Ph (4), HStpT (5), HStBz (6), HStpOHPh (7) foram testados frente a:

- Bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923, *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) ATCC 49456
- Bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (*E.coli*) ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) ATCC 13311.
- Fungo Leveduriforme: *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 18804.

A determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento microbiano (IC₅₀) foi realizada de acordo com o procedimento descrito na parte experimental (2.3.1). Os resultados obtidos da triagem revelaram que as hidrazonas são inativas frente a *E. coli*. Na Tabela 3.4 estão apresentados os resultados do teste microbiológico.

As hidrazonas mostraram fraca atividade contra os micro-organismos testados com valores de IC₅₀ maiores do que os dos fármacos de controle Ampicilina para bactérias, Nistatina e Nitrato de miconazol para o fungo leveduriforme.

Tabela 3.4- Valores de IC₅₀ (μmolL⁻¹) das hidrazonas HStAc (1), HStPh (2) HStpClPh (3), HStpNO₂Ph (4), HStpT (5), HStBz (6), HStpOHPh (7) pelo método de microdiluição.

Composto	IC ₅₀ (μmolL ⁻¹)				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>
HStAc (1)	NA*	NA	NA	NA	NA
HStPh (2)	NA	NA	NA	NA	NA
HStpClPh (3)	NA	136,1 ± 8,0	NA	NA	NA
HStpNO ₂ Ph (4)	NA	NA	NA	>505,5	NA
HStpT (5)	NA	NA	NA	NA	NA
HStBz (6)	361,5 ± 12,3	289,8 ± 20,0	312,6 ± 13,0	121,6 ± 11,9	NA
HStpOHPh (7)	>135,5	383,9 ± 22,9	236,1 ± 5,8	181,4 ± 6,7	NA
Ampicilina	2,2 ± 0,1	9,03 ± 0,31	8,3 ± 0,2		
Tetraciclina					<0,55
Nistatina				5,6 ± 0,5	
Nitrato de miconazol				16,9 ± 0,7	

*NA= Não ativo

3.2.2 Avaliações da atividade sequestradora de radicais DPPH• e ânions superóxido

Biologicamente, os antioxidantes desempenham um papel importante para a saúde e seus mecanismos para desativar as espécies radicalares podem ser via transferência de um átomo de hidrogênio (TAH) ou um elétron (e⁻) (ET). A viaTAH é a capacidade de um antioxidante para eliminar os radicais livres por doação de um átomo de hidrogênio e o ET a capacidade de um potencial antioxidante de transferir um elétron para reduzir os radicais livres.¹⁶¹

Os ensaios de atividade antioxidante mimetizam esses mecanismos; ou seja, os antioxidantes são medidos pela transferência de um átomo de hidrogênio e/ou transferência de elétron nos compostos teste.

Vale ressaltar que a capacidade de sequestro de radicais DPPH• é devida aos mecanismos (TE) e/ou transferência de um átomo de hidrogênio (TAH).¹⁶²

Para as avaliações da atividade sequestradora de radicais DPPH• e ânions superóxido foi realizada uma triagem das hidrazonas sintetizadas na concentração de 320 µM. O derivado de estilbeno resveratrol conhecido como antioxidante foi empregado como controle positivo.

➤ Sequestros de espécies reativas de nitrogênio (DPPH•)

O percentual de sequestro de DPPH• para as hidrazonas derivadas do *trans*-4-estilbenocarboxaldeído é apresentada na Figura 3.7. O composto HStAc (1) mostrou um percentual de captura de radicais livres DPPH• melhor do que o controle positivo resveratrol (80,0%) a 320 µM. O composto HStpT (5) apresentou um sequestro de aproximadamente 50% dos radicais DPPH• presentes no meio. No Esquema 3.1 se apresenta um possível mecanismo para captura do radical DPPH• para os compostos (1) e (5).¹⁶³

¹⁶¹ R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, E. Çapanoğlu. J. Agric. Food Chem. 64(2016)1028.

¹⁶² G. Litwinienko, K. U. Ingold. Acc.Chem.Res. 40(2007)222.

¹⁶³ H. S. Kareem, N. Nordin, T. Heidelberg, A. Abdul-Aziz, A. Ariffin. Molecules. 21(2016)224.

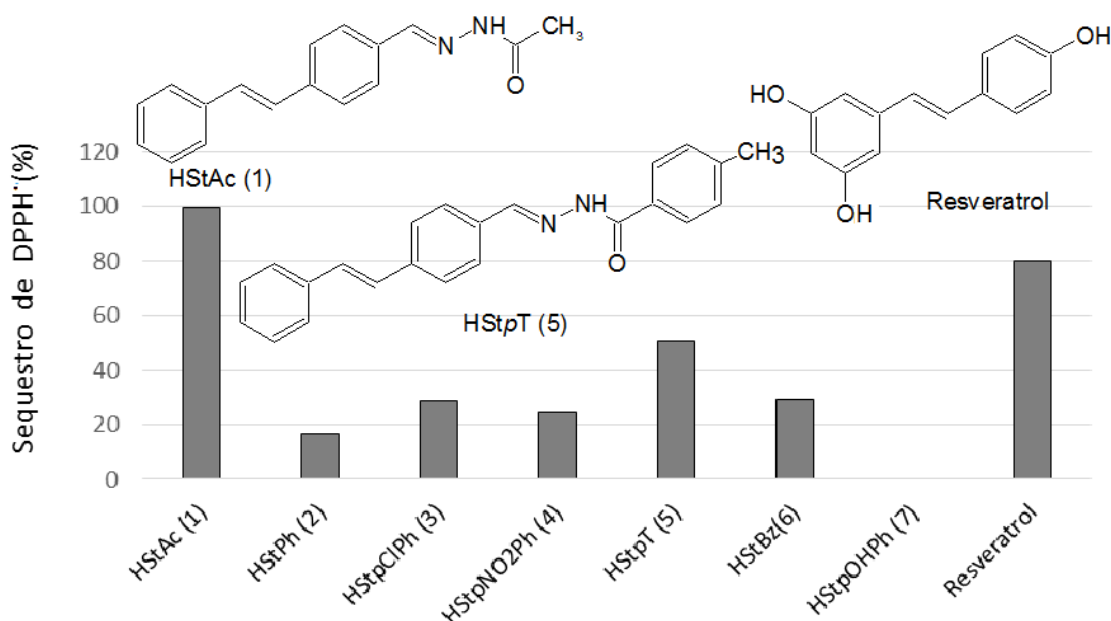
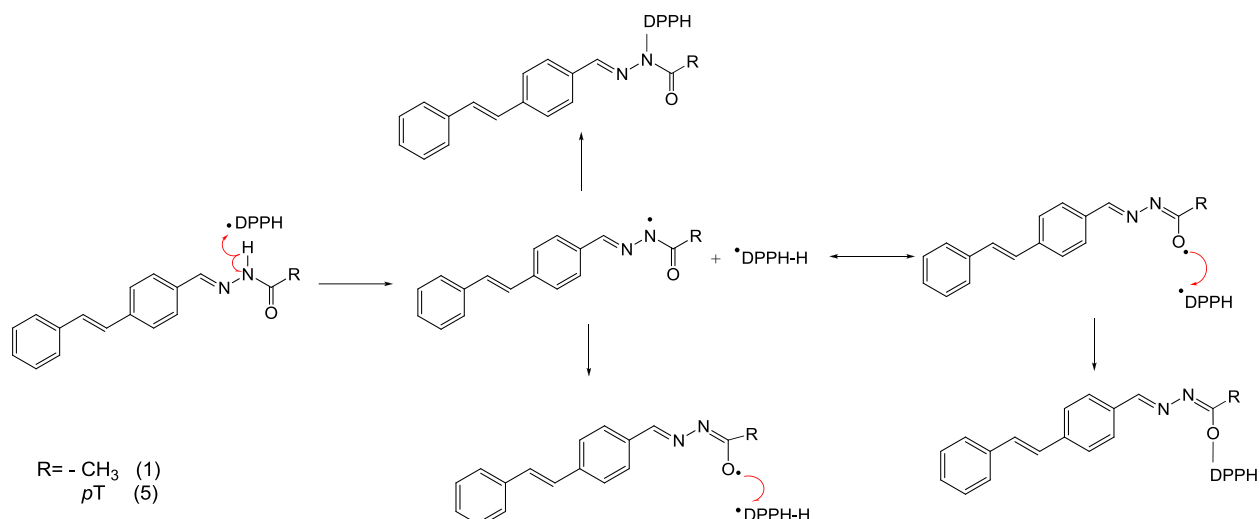


Figura 3.7- Triagem da atividade de sequestro de radicais DPPH[•] das hidrazonas HStAc (1), HStPh (2), HStpClPh (3), HStpNO₂Ph (4), HStpT (5), HStBz (6), HStpOHPh (7) derivadas de *trans*-4-estilbenocarboxaldeído a uma concentração de 320 µM.

Uma justificativa plausível da boa atividade antioxidante do composto (1) pode ser a presença na sua estrutura de um grupo doador de elétrons por indução, como é o grupo metila, que pode facilitar a doação de H e/ou e⁻. Por outro lado, o composto (1) pode apresentar menos impedimento estérico, o que seria determinante para a reação por transferência de átomos de H ou transferência de elétron ao radical DPPH[•].

Os outros compostos avaliados apresentaram valores inferiores a 30% quando comparados ao controle positivo resveratrol (80,0%). Outro aspecto interessante para salientar é o composto HStpOHPh (7), que apresenta uma hidroxila fenólica em posição *para* no anel aromático e não apresentou captura de radicais DPPH[•], o que claramente indica que o grupo hidroxila nessa posição não é um requerimento necessário para o efeito antioxidante como foi relatado por Hernández-Vásquez e colaboradores.¹⁶⁴

¹⁶⁴ E. Hernández-Vásquez, S. Salgado-Barrera, J. J. Ramírez-Espinosa, S. Estrada-Soto, F. Hernández-Luis. Bioorg.Med.Chem. 24(2016)2298.



Esquema 3.1- Proposta de mecanismo de captura do radical DPPH• para as hidrazonas (1) e (5).

➤ Sequestros de radical ânion superóxido •O₂⁻

Os percentuais de sequestro de •O₂⁻ pelas hidrazonas (1) a (7) são mostrados na Figura 3.8. Os compostos HStpNO₂Ph (4) e HStpOHPh (7) apresentaram os maiores percentuais de captura dos ânions superóxidos (•O₂⁻) com 48,36% e 33,90 % respectivamente, ao comparar com o controle positivo resveratrol (25,25%).

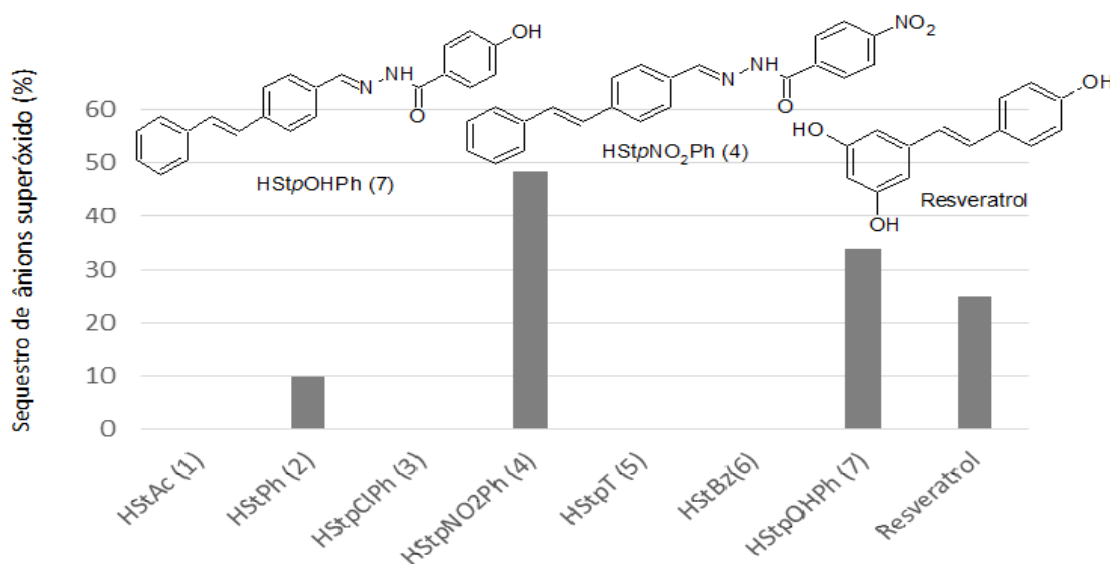


Figura 3.8- Triagem das hidrazonas HStAc (1), HStPh (2), HStpClPh (3), HStpNO₂Ph (4), HStpT (5), HStBz (6), HStpOHPh (7) derivadas de *trans*-4-estilbenocarboxaldeído para a atividade sequestradora ânions superóxido a uma concentração de 320 µM.

Vale salientar que o grupo nitro no anel aromático apresenta um forte efeito retirador de elétrons por ressonância que pode estar associado a sua alta atividade na captura dos ânions superóxidos ($\text{O}_2^{\cdot-}$).

A atividade “scavenger” $\text{O}_2^{\cdot-}$ da hidrazona HStpOHPh (7) concorda com dados existentes na literatura, que relatam uma relação estrutura-atividade com a presença de grupos hidroxila fenólica na molécula.¹⁶⁵ Por outro lado, é importante ressaltar que a hidrazona com um grupo halogênio HStpClPh (3) e os compostos com substituintes alquila, fenila e benzila não tiveram atividade na captura de radicais de oxigênio (ROS).

Os resultados obtidos de captura dos radicais DPPH $\cdot$ e ânion superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$ indicam que não existem indícios que a interação (inibição) dos diferentes compostos seja idêntica, sugerindo que existem possíveis fatores como: as diferenças estruturais, cinética reacional, efeitos estéricos e potencial redox .

¹⁶⁵ A. Kładna, P. Berczyński, I. Kruk, T. Michalska, H. Y. Aboul-Enein. Luminescence. 28(2013)450.

CAPÍTULO 4. COMPLEXOS DE COBRE(II) DE HIDRAZONAS DERIVADAS DE *TRANS*-4-ESTILBENOCARBOXALDEÍDO.

Neste capítulo, apresentam-se as sínteses e caracterizações dos complexos $[bis(trans\text{-}4\text{-etilbenocarboxaldeído acetilhidrazona})diclorocobre(II)]$ $[Cu(HStAc)_2Cl_2]$ (8), $[bis(trans\text{-}4\text{-etilbenocarboxaldeído-}para\text{-cloro-fenilhidrazona})diclorocobre(II)]$ $[Cu(HStpClPh)_2Cl_2]$ (9), $[bis(trans\text{-}4\text{-etilbenocarboxaldeído-}para\text{-nitro-fenilhidrazona})diclorocobre(II)]$ $[Cu(HStpNO_2Ph)_2Cl_2]$ (10), $[bis(trans\text{-}4\text{-etilbenocarboxaldeído-}para\text{-toluil-hidrazona})diclorocobre(II)]$ $[Cu(HStpT)_2Cl_2]$ (11), $[bis(trans\text{-}4\text{-etilbenocarboxaldeído-benzilhidrazona})diclorocobre(II)]$ $[Cu(HStBz)_2Cl_2]$ (12), $[bis(trans\text{-}4\text{-etilbenocarboxaldeído-}para\text{-hidroxi-fenilhidrazona})diclorocobre(II)]$ $[Cu(HStpOHPh)_2Cl_2]$ (13).

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE COBRE(II) DE HIDRAZONAS DERIVADAS DE *TRANS*-4-ESTILBENOCARBOXALDEÍDO.

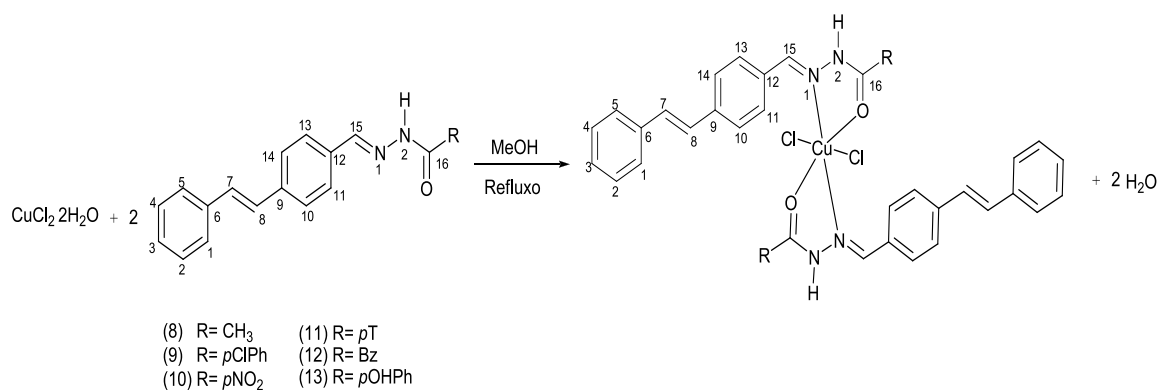


Figura 4.1- Síntese geral dos complexos de cobre(II) (8) a (13).

Os dados de análises elementares, medidas de condutividades molar, temperaturas de fusão, e momento magnético apresentados na Tabela 4.1, sugerem a formação dos compostos (8) a (13) (Figura 4.1), onde duas moléculas de hidrazona encontram-se coordenadas como ligantes neutros. Os valores obtidos do momento magnético para os compostos (8) a (13) estão entre 1,80 - 2,30 MB característicos do íon cobre(II).¹⁶⁶ Os valores de condutividades molares em DMF ¹³⁸ revelam que todos os compostos são não-eletrolíticos, de acordo com as formulações propostas. Os

¹⁶⁶ R. P Sharma, A. Saini, P. Venugopalan, S. Khullar, S. Mandal. Polyhedron 56(2013)34.

resultados sugerem que os cloretos estão coordenados. No entanto, com esses dados não é possível determinar se os cloretos se encontram em posição *cis* ou *trans*.

4.1.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

As principais bandas no espectro de infravermelho das hidrazonas e seus complexos de cobre(II) encontram-se na Tabela 4.2, os espectros encontram-se no Anexo A7 a A11 (pág 150 a 154). A banda de vibração entre 1678 e 1650 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação $\nu(\text{C}=\text{O})$ nos espectros das hidrazonas livres, deslocou-se para 1602-1620 cm^{-1} , sugerindo a coordenação pelo oxigênio carbonílico.¹⁶⁷ Nos espectros dos ligantes a banda referente ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$ observada entre 1602 e 1610 cm^{-1} e nos complexos essa banda desloca-se para 1600-1630 cm^{-1} , indicando a coordenação pelo nitrogênio do grupo azometino.¹⁶⁸ A banda referente ao estiramento $\nu(\text{N}-\text{H})$ nos ligantes livres é observada 3170-3290 cm^{-1} , nos espectros dos complexos a banda é deslocada para 3160-3212 cm^{-1} , sugerindo a coordenação do íon etalico ao oxigênio da carbonila e mostrando que após a complexação não ocorre desprotonação da ligação N-H.

A Figura 4.2 apresenta os espectros do ligante HStAc (1) e do complexo $[\text{Cu}(\text{HStAc})_2\text{Cl}_2]$ (8) onde observa-se claramente que houve um deslocamento das bandas do estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$ e $\nu(\text{C}=\text{N})$ indicando a coordenação pelo oxigênio carbonílico e nitrogênio azometínico.

¹⁶⁷ K. Nakamoto. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, 4th ed., Wiley, New York. 1986.

¹⁶⁸ A. Perez-Rebolledo, O. E. Piro, E. E. Castellano, L. R. Teixeira, A. A. Batista, H. Beraldo. J. Mol. Struct. 794(2006)18.

Tabela 4.1- Formula molecular, análises elementares (valores calculados entre parênteses), temperaturas de fusão (°C)^a, massas molar e condutividades molar (Λ_M , $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$)^b, momento magnético e porcentagens de rendimento, para os compostos [Cu(HStAc)₂Cl₂] (8), [Cu(HStpClPh)₂Cl₂] (9), [Cu(HStpNO₂Ph)₂Cl₂] (10), [Cu(HStpT)₂Cl₂] (11), [Cu(HStBz)₂Cl₂] (12) e [Cu(HStpOHPh)₂Cl₂] (13).

Composto	Formula molecular	Temp.de fusão (°C)	% C	%H	%N	MM (gmol ⁻¹)	Λ_M^b	μ_{eff} (MB)	Rend. (%)
[Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8)	C ₃₄ H ₃₂ Cl ₂ CuN ₄ O ₂	Decomp. ^a	63,73 (61,58)	4,86 (4,86)	8,19 (8,45)	663,09	28,9	1,82	85,7
[Cu(HStpClPh) ₂ Cl ₂] (9)	C ₄₄ H ₃₄ Cl ₄ CuN ₄ O ₂	Decomp. ^a	61,46 (61,73)	3,90 (4,00)	6,73 (6,54)	856,12	40,3	1,95	94,5
[Cu(HStpNO ₂ Ph) ₂ Cl ₂] (10)	C ₄₄ H ₃₄ Cl ₂ CuN ₆ O ₆	Decomp. ^a	60,26 (60,24)	3,86 (3,91)	9,50 (9,58)	877,23	46,2	2,14	90,8
[Cu(HStpT) ₂ Cl ₂] (11)	C ₄₆ H ₄₀ Cl ₂ CuN ₄ O ₂	272,9- 273,5	67,67 (67,77)	4,89 (4,95)	6,80 (6,87)	815,28	37,9	2,09	92,8
[Cu(HStBz) ₂ Cl ₂] (12)	C ₄₆ H ₄₀ Cl ₂ CuN ₄ O ₂	201,3-203,3	68,82 (67,77)	4,93 (4,95)	6,97 (6,87)	815,29	28,7	2,23	87,6
[Cu(HStpOHPh) ₂ Cl ₂] (13)	C ₄₄ H ₃₆ Cl ₂ CuN ₄ O ₄	249,6 -250,3	63,70 (64,51)	4,89 (4,43)	6,66 (6,84)	819,23	35,6	2,29	81,3

^a Decomposição, ^b Λ_M : ($\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$) DMF~ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ nos valores de condutividade tabelados já foi corrigido a condutividade do solvente.

Tabela 4.2- Principais bandas dos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das hidrazonas e dos complexos $[\text{Cu}(\text{HStAc})_2\text{Cl}_2]$ (8), $[\text{Cu}(\text{HStpClPh})_2\text{Cl}_2]$ (9), $[\text{Cu}(\text{HStpNO}_2\text{Ph})_2\text{Cl}_2]$ (10), $[\text{Cu}(\text{HStpT})_2\text{Cl}_2]$ (11), $[\text{Cu}(\text{HStBz})_2\text{Cl}_2]$ (12) e $[\text{Cu}(\text{HStpOHPh})_2\text{Cl}_2]$ (13).

Composto	ν (N-H)	ν (C=O)	ν (C=N)
HStAc (1)	3184f	1678F	1608F
$[\text{Cu}(\text{HStAc})_2\text{Cl}_2]$ (8)	3160m	1618F	1600F
HStpClPh (3)	3290m	1654F	1600F
$[\text{Cu}(\text{HStpClPh})_2\text{Cl}_2]$ (9)	3204m	1602F	1564F
HStpNO ₂ Ph (4)	3244m	1660F	1602F
$[\text{Cu}(\text{HStpNO}_2\text{Ph})_2\text{Cl}_2]$ (10)	3198m	1622m	1590F
HStpT (5)	3280m	1652F	1608m
$[\text{Cu}(\text{HStpT})_2\text{Cl}_2]$ (11)	3200m	1602F	1572F
HStBz (6)	3184m	1672m	1650F
$[\text{Cu}(\text{HStBz})_2\text{Cl}_2]$ (12)	3212m	1626F	1602m
HStpOHPh (7)	3078	1650F	1604F
	Sobreposta com ν (O-H)		
$[\text{Cu}(\text{HStpOHPh})_2\text{Cl}_2]$ (13)	3170m	1606F	1592F

Intensidade: F= forte, m= média, f= fraca

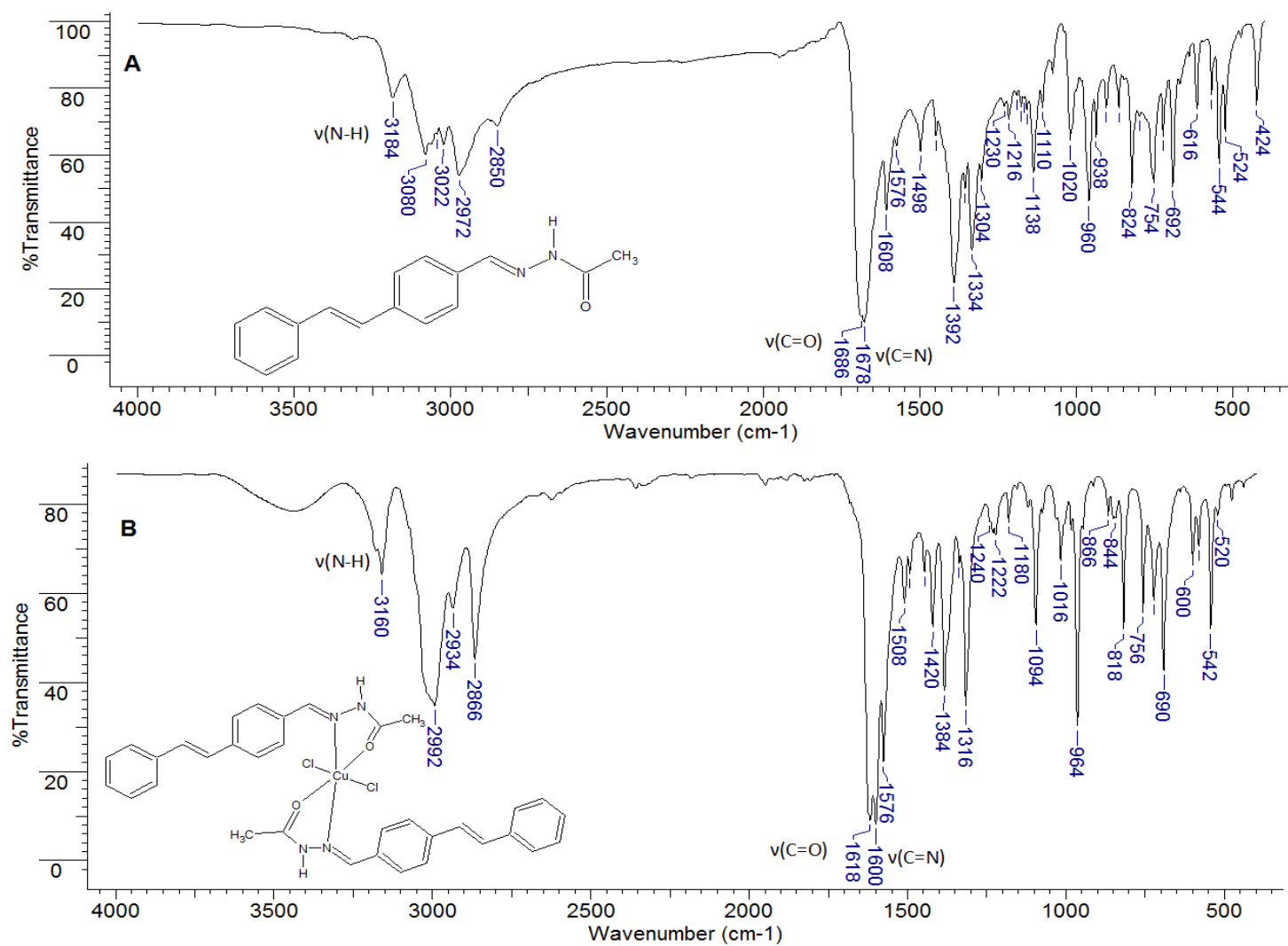


Figura 4.2- Espectros de absorção na região do Infravermelho de HStAc (1) **(A)** e [Cu(HStAc)₂Cl₂] (8) **(B)**, em pastilhas de KBr.

4.1.2 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é uma técnica de grande importância para os complexos com elétrons desemparelhados como por exemplo os complexos de cobre(II). A interpretação dos espectros RPE permite obter informações tais como configuração eletrônica do íon metálico paramagnético, estado de oxidação e características estruturais.^{169,170}

Os espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) foram obtidos em pó à temperatura ambiente e em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 77 K.

Na Figura 4.3 apresenta os espectros de RPE da banda X à temperatura ambiente dos complexos $[\text{Cu}(\text{HStAc})_2\text{Cl}_2]$ (8), $[\text{Cu}(\text{HStpClPh})_2\text{Cl}_2]$ (9), $[\text{Cu}(\text{HStpNO}_2\text{Ph})_2\text{Cl}_2]$ (10), $[\text{Cu}(\text{HStpT})_2\text{Cl}_2]$ (11), $[\text{Cu}(\text{HStBz})_2\text{Cl}_2]$ (12) e $[\text{Cu}(\text{HStpOHPh})_2\text{Cl}_2]$ (13) em pó.

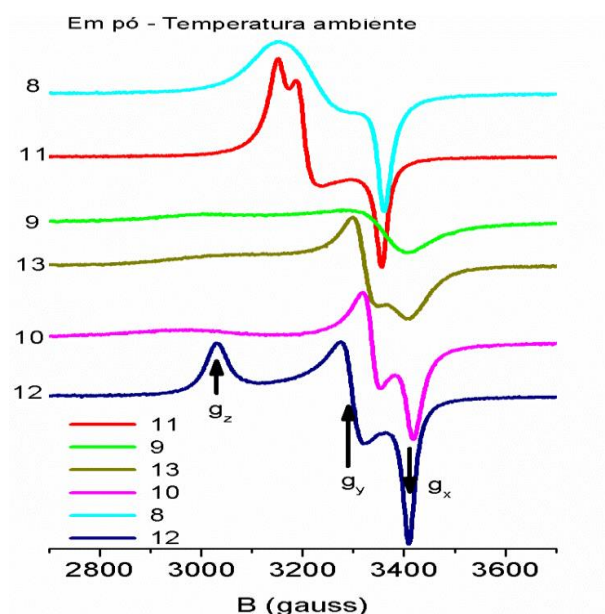


Figura 4.3- Espectros de RPE dos complexos de cobre(II) $[\text{Cu}(\text{HStAc})_2\text{Cl}_2]$ (8), $[\text{Cu}(\text{HStpClPh})_2\text{Cl}_2]$ (9), $[\text{Cu}(\text{HStpNO}_2\text{Ph})_2\text{Cl}_2]$ (10), $[\text{Cu}(\text{HStpT})_2\text{Cl}_2]$ (11), $[\text{Cu}(\text{HStBz})_2\text{Cl}_2]$ (12) e $[\text{Cu}(\text{HStpOHPh})_2\text{Cl}_2]$ (13) no estado sólido a temperatura ambiente.

¹⁶⁹ S. C. Larsen, A. Aylor, A. T. Bell, J.A. Reimer. J. Phys. Chem. 98(1994)11533.

¹⁷⁰ L. Gala, M. Lawson, K. Jomova, L. Zelenicky, A. Congradyova, M. Mazur, M. Valko. Molecules. 19(2014)980.

O íon cobre(II) apresenta um spin nuclear $I = 3/2$. Os espectros RPE apresentam 4 linhas na região de $g_{||}$ correspondente ao sinal hiperfino ($n=2I + 1$) e uma linha mais larga que corresponde $g_{\perp}$.

Na Tabela 4.3 encontram-se os parâmetros obtidos. A ausência de desdobramento hiperfino sugestiva de agregação é frequentemente observada em espectros de complexos de cobre(II) em pó. Este é o caso do complexo (9), que mostra um espectro característico de simetria axial.

Os complexos apresentam espectros com anisotropia suficientemente grande para serem resolvidos nos três principais componentes g ($g_x < g_y < g_z$), obtidas a partir das amostras orientadas aleatoriamente.

Tabela 4.3- Parâmetros dos espectros de RPE dos complexos $[\text{Cu}(\text{HStAc})_2\text{Cl}_2]$ (8), $[\text{Cu}(\text{HStpClPh})_2\text{Cl}_2]$ (9), $[\text{Cu}(\text{HStpNO}_2\text{Ph})_2\text{Cl}_2]$ (10), $[\text{Cu}(\text{HStpT})_2\text{Cl}_2]$ (11), $[\text{Cu}(\text{HStBz})_2\text{Cl}_2]$ (12) e $[\text{Cu}(\text{HStpOHPh})_2\text{Cl}_2]$ (13) no estado sólido a temperatura ambiente.

Composto	g_x	g_y	g_z
$[\text{Cu}(\text{HStAc})_2\text{Cl}_2]$ (8)	2,083	2,16	2,22
$[\text{Cu}(\text{HStpClPh})_2\text{Cl}_2]$ (9)	2,09	2,09	2,33
$[\text{Cu}(\text{HStpNO}_2\text{Ph})_2\text{Cl}_2]$ (10)	2,053	2,12	2,31
$[\text{Cu}(\text{HStpT})_2\text{Cl}_2]$ (11)	2,085	2,182	2,22
$[\text{Cu}(\text{HStBz})_2\text{Cl}_2]$ (12)	2,053	2,16	2,22
$[\text{Cu}(\text{HStpOHPh})_2\text{Cl}_2]$ (13)	2,053	2,107	2,32

Na Figura 4.4 encontram-se os espectros de RPE dos complexos em dissolução de DMSO a 77 K, que mostram as 4 linhas características da região $g_{||}$. Todos os compostos de cobre(II) apresentaram simetria axial. Além disso, os parâmetros $g_{||}$ e $g_{\perp}$ (Tabela 4.4) são iguais para todos os compostos e são característicos desse tipo de complexos.¹⁷¹ A Tabela 4.4, mostra os dados obtidos de $g_{||} > g_{\perp}$ que indicam a presença do estado fundamental $d_{x^2-y^2}$.^{172, 173}

¹⁷¹ A. A. Recio, F. da Costa, O. E. Piro, E. E. Castellano, S. R. Louro, H. Beraldo. Polyhedron. 38(2012)290.

¹⁷² E. Pahonțu, C. Paraschivescu, D-C. Ilieș, D. Poirier, C. Oprean, V. Păunescu, A. Gulea, T. Roșu, O. Bratu. Molecules. 21(2016)674.

¹⁷³ N. Mathew, M. Sithambaresan, M. R. Prathapachandra. Spectrochim. Acta Part A. Molec. Biomolec. Spectrosc. 79(2011)1154.

Tabela 4.4- Parâmetros dos espectros de RPE dos complexos [Cu(HStAc)₂Cl₂] (8), [Cu(HStpClPh)₂Cl₂] (9), [Cu(HStpNO₂Ph)₂Cl₂] (10), [Cu(HStpT)₂Cl₂] (11), [Cu(HStBz)₂Cl₂] (12) e [Cu(HStpOHPh)₂Cl₂] (13) em DMSO a 77 K.

Composto	$g_{ }$	$g_{\perp}$	$A_{ }$ (gauss)
(8) - (13)	2,414	2,086	115

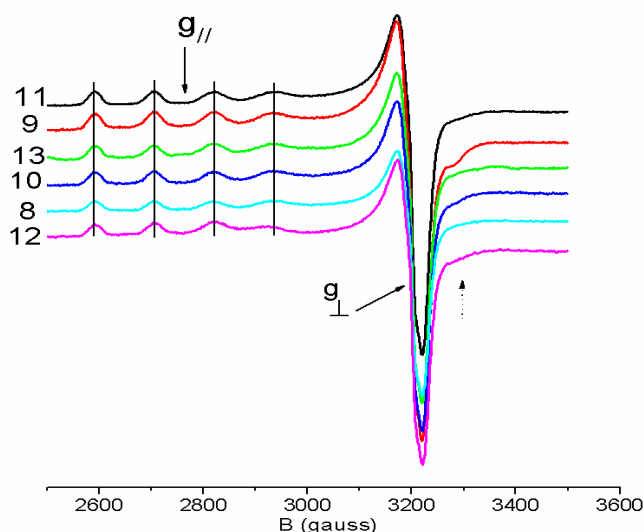


Figura 4.4- Espectros de RPE dos complexos [Cu(HStAc)₂Cl₂] (8), [Cu(HStpClPh)₂Cl₂] (9), [Cu(HStpNO₂Ph)₂Cl₂] (10), [Cu(HStpT)₂Cl₂] (11), [Cu(HStBz)₂Cl₂] (12) e [Cu(HStpOHPh)₂Cl₂] (13) em DMSO a 77 K.

4.1.3 Estudos Teóricos

Foram realizados cálculos teóricos com o objetivo de obter as estruturas otimizadas dos possíveis isômeros dos complexos, utilizando o complexo [Cu(HStAc)₂Cl₂] (8) como modelo (Figura 4.5). A seguir encontram-se resumidas as principais informações sobre o estudo teórico, que foi realizado pelo o Prof. Dr. Hélio Duarte e o aluno Matheus C. Quintão do Departamento de Química da UFMG.

As propriedades termodinâmicas e espectroscópicas do complexo (8) foram estimadas por meio de cálculos DFT Density Functional Theory (DFT) utilizando-se o Gaussian 09 package.¹⁵⁶ Os cinco isômeros (Figura 4.5) foram otimizados através do funcional B3LYP^{174,175} e do conjunto de bases cc-pVDZ¹⁷⁶ para todos os átomos.

¹⁷⁴ A. D Becke. J. Chem. Phys. 98(1993)5648.

¹⁷⁵ C.T. Lee, W.T. Yang, R.G. Parr. Physical Review B. 37(1988)785.

A energia livre é a soma de três termos: energia eletrônica + energia nuclear (ΔE_{ele}), energia de solvatação (ΔG_{solv}) e a contribuição térmica (ΔG_{therm}). A energia de solvatação foi calculada pelo Polarizable Continuum Model (PCM)¹⁷⁷ usando DMSO ($\epsilon=46.826$) como solvente. A contribuição térmica foi estimada usando frequências vibracionais da mecânica quântica a 298K.¹⁷⁸ Foram realizados cálculos de “single point” usando B3LYP/cc-pVDZ. As frequências harmonicas foram calculadas na fase gasosa e os valores reais de frequência foram obtidos assumindo um mínimo de energia potencial na superfície. O DFT dependente do tempo (TD-DFT) foi calculado para todas as estruturas otimizadas para os 60 primeiros estados. Os parâmetros RPE foram calculados usando o ADF package.^{157,175} Os efeitos de solvente foram incluídos usando COSMO/DMSO. Os parâmetros RPE foram determinados por meio do BLYP/TZ2P XC.

Os dados espectroscópicos não permitiram inferir qual seria a geometria dos complexos no estado sólido e em solução. A Figura 4.5 mostra as estruturas otimizadas para o complexo (8). A Tabela 4.5 contém os valores de energia livre com relação ao isômero mais estável 8d e os valores calculados de frequências vibracionais e de parâmetros RPE. Apesar de que o isômero 8d tenha sido o mais estável, todos os outros são praticamente degenerados e diferem em energia com relação a 8d em apenas $\sim 3 \text{ kcal mol}^{-1}$. A análise termodinâmica sugere que todos os isômeros estariam em equilíbrio em solução, não sendo possível determinar qual seria predominante. No estado sólido diferenças em energia de rede e em interações de empacotamento poderiam favorecer uma estrutura diferente de 8d. As frequências vibracionais e os parâmetros RPE estão em excelente concordância com os valores experimentais.

¹⁷⁶ T. H Dunning. J. Chem. Phys. 90(1989)1007.

¹⁷⁷ J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi. Chem. Rev. 105(2005) 2999.

¹⁷⁸ D. A. McQuarrie, J. D. Simon. Molecular Thermodynamics. 1999, Sausalito, CA: University Science Books.

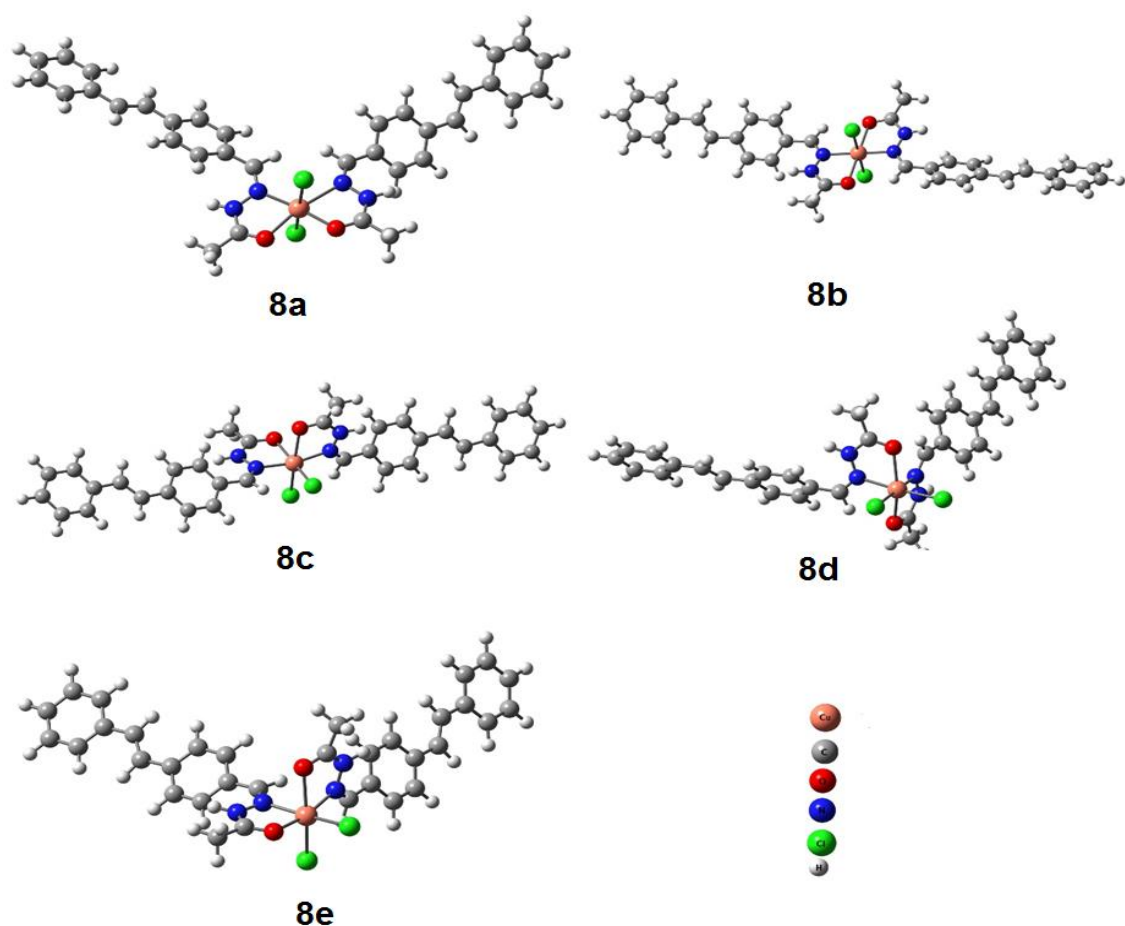


Figura 4.5- Estruturas otimizadas para o complexo $[\text{Cu}(\text{HStAc})_2\text{Cl}_2]$ (8).

Tabela 4.5- Energias livres relativas, frequências vibracionais e parâmetros RPE calculados para o complexo $[\text{Cu}(\text{HStAc})_2\text{Cl}_2]$ (8).

Propriedade	Isômeros				
	8a	8b	8c	8d	8e
ΔG_{rel} (kcalmol ⁻¹)	2,9	0,8	0,5	0,0	0,1
Frequências vibracionais					
$\nu(\text{N-H})$ (cm ⁻¹)	3521 (111) 3552 (92)	3550 (93,0)	3554 (136)	3548 (98) 3552 (98)	3530 (96) 3550 (87)
$\nu(\text{C=O})$ (cm ⁻¹)	1666 (1005) 1721 (563)	1732 (350)	1656 (350) 1728 (623)	1706 (732)	1664 (793) 1717 (635)
$\nu(\text{C=N})$ (cm ⁻¹)	1679 (103) 1684 (22)	1681 (35)	1674 (35) 1690 (19)	1676 (196) 1677 (173)	1680 (164) 1685 (16)
Parâmetros RPE					
g_{xx}	2,151771	2,142456	2,152469	2,151285	2,154060
g_{yy}	2,052317	2,054013	2,054599	2,046055	2,058290
g_{zz}	2,044178	2,039156	2,039156	2,044927	2,044625

4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição

Os compostos foram testados frente a bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) e Gram-negativas *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) e o Fungo Leveduriforme *Candida albicans* (*C. albicans*). A determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento microbiano (IC₅₀) foi realizada de acordo com o procedimento descrito na parte experimental 2.3.1.

Os ligantes e complexos de cobre(II) mostraram-se inativos ou fracamente ativos frente a todos os micro-organismos.

Tabela 4.6- Valores de IC₅₀ (μmolL⁻¹) dos ligantes hidrazonas e seus complexos [Cu(HStAc)₂Cl₂] (8), [Cu(HStpClPh)₂Cl₂] (9), [Cu(HStpNO₂Ph)₂Cl₂] (10), [Cu(HStpT)₂Cl₂] (11), [Cu(HStBz)₂Cl₂] (12) e [Cu(HStpOHPh)₂Cl₂] (13).

Composto	IC ₅₀ (μmolL ⁻¹)				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>
HStAc (1)	NA*	NA	NA	NA	NA
[Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8)	NA	NA	NA	NA	NA
HStpClPh (3)	NA	136,1 ± 8,0	NA	NA	NA
[Cu(HStpClPh) ₂ Cl ₂] (9)	161,7 ± 33,2	60,1 ± 6,4	144,6 ± 17,1	NA	NA
HStpNO ₂ Ph (4)	NA	NA	NA	>505,5	NA
[Cu(HStpNO ₂ Ph) ₂ Cl ₂] (10)	113,7 ± 7,4	NA	NA	>283,9	NA
HStpT (5)	NA	NA	NA	NA	NA
[Cu(HStpT) ₂ Cl ₂] (11)	NA	NA	>121,4	NA	NA
HStBz (6)	361,5 ± 12,3	289,8 ± 20,0	312,6 ± 13,0	121,6 ± 11,9	NA
[Cu(HStBz) ₂ Cl ₂] (12)	208,3 ± 10,8	NA	NA	124,0 ± 8,8	NA
HStpOHPh (7)	>135,5	383,9 ± 22,9	236,1 ± 5,8	181,4 ± 6,7	NA
[Cu(HStpOHPh) ₂ Cl ₂] (13)	>217,8	126,3 ± 16,3	73,0 ± 2,7	95,7 ± 9,5	NA
CuCl ₂ ·2H ₂ O	NA	NA	NA	NA	NA
Ampicilina	2,2 ± 0,1	9,03 ± 0,3	8,3 ± 0,2		NA
Tetraciclina					<0,55
Nistatina				5,6 ± 0,5	
Nitrato de Miconazol				16,9 ± 0,7	

*NA= Não ativo

4.2.2 Avaliações da atividade sequestradora de radicais DPPH• e ânions superóxido

Como descrito na seção 2.3.2.1 foi realizado o estudo da atividade sequestradora de radicais DPPH• para os complexos (8)-(13) a 320 e 80 µM.

A Tabela 4.7 apresenta o percentual de sequestro de DPPH• para os complexos e seus respectivos ligantes avaliados nas concentrações de 80 e 320 µM. Nesta concentração os complexos [Cu(HStAc)₂Cl₂] (8), [Cu(HStpClPh)₂Cl₂] (9) e [Cu(HStpT)₂Cl₂] (11) precipitaram em solução. O composto [Cu(HStpNO₂Ph)₂Cl₂] (10) apresentou uma percentagem de sequestro de 46,51%, melhor que a do ligante livre (4) que foi de 24,78%, o que indica que a coordenação ao cobre(II) fez aumentar a captura de radicais livres DPPH•. O complexo [Cu(HStpOHPh)₂Cl₂] (13), assim como o ligante livre, não apresentaram captura de radicais livres de DPPH•.

Tabela 4.7- Percentagem de sequestro de DPPH• dos ligantes hidrazonas e seus complexos [Cu(HStAc)₂Cl₂] (8), [Cu(HStpClPh)₂Cl₂] (9), [Cu(HStpNO₂Ph)₂Cl₂] (10), [Cu(HStpT)₂Cl₂] (11), [Cu(HStBz)₂Cl₂] (12) e [Cu(HStpOHPh)₂Cl₂] (13) nas concentrações de 80 e 320 µM.

Compostos	Sequestro de DPPH (%) [320 µM]	Sequestro de DPPH (%) [80 µM]
HStAc (1)	99,53	54,29
[Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8)	*	47,17
HStpClPh (3)	28,428	0
[Cu(HStpClPh) ₂ Cl ₂] (9)	*	67,33
HStpNO ₂ Ph (4)	24,78	0
[Cu(HStpNO ₂ Ph) ₂ Cl ₂] (10)	46,51	45,44
HStpT (5)	50,42	0
[Cu(HStpT) ₂ Cl ₂] (11)	*	68,81
HStBz (6)	29,03	0
[Cu(HStBz) ₂ Cl ₂] (12)	*	57,98
HStpOHPh (7)	0	0
[Cu(HStpOHPh) ₂ Cl ₂] (13)	0	0
resveratrol	80,0	71,8

* = o composto não é solúvel a 320µM

No caso dos complexos (8), (9), (11) e (12) foi necessário avaliar o percentual de sequestro de DPPH• a uma concentração menor (80 µM), uma vez que precipitaram no meio de reação como foi dito anteriormente. Seus respectivos ligantes não foram

avaliados visto que à maior concentração (320 μM) apresentaram percentagens de sequestro inferiores a 30%.

Os percentuais de captura de radicais livres DPPH $\cdot$ obtidos a 80 μM (Figura 4.6) para os compostos (8) foi 47,17%, (9) 67,33%, (10) 45,44%, (11) 68,81% e (12) 57,98% indicaram que os complexos de cobre(II) derivados de *trans*-4-estilbenocarboxaldeído promovem a captura dos radicais livres de DPPH $\cdot$ numa concentração mais baixa do que os ligantes livres.

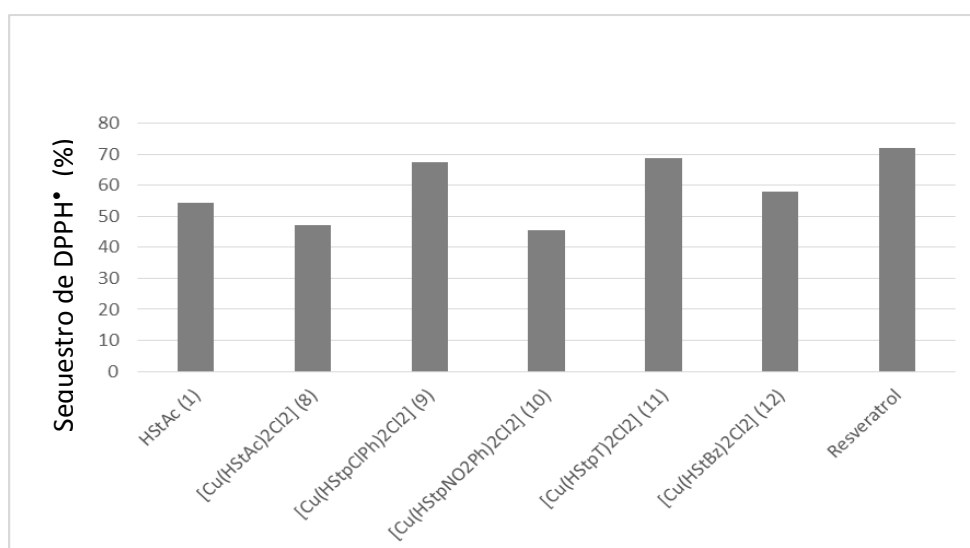


Figura 4.6- Porcentagem de sequestro de DPPH $\cdot$ dos complexos [Cu(HStAc) $_2$ Cl $_2$] (8), [Cu(HStpClPh) $_2$ Cl $_2$] (9), [Cu(HStpNO $_2$ Ph) $_2$ Cl $_2$] (10), [Cu(HStpT) $_2$ Cl $_2$] (11), [Cu(HStBz) $_2$ Cl $_2$] (12) e [Cu(HStpOHPh) $_2$ Cl $_2$] (13) e o ligante HStAc (1) a uma concentração de 80 μM .

De modo geral, os complexos [Cu(HStpT) $_2$ Cl $_2$] (11) e [Cu(HStpClPh) $_2$ Cl $_2$] (9) demonstraram atividade sequestradora de DPPH $\cdot$ comparável com o controle positivo resveratrol (71,8%) a 80 μM , sugerindo que a ligação com o cobre(II) incrementa a atividade sequestradora.¹⁷⁹

Conjuntamente, avaliou-se a uma concentração de 80 μM o ligante HStAc (1) por ser o único que apresentou uma porcentagem de sequestro de DPPH $\cdot$ melhor ao controle positivo.

¹⁷⁹ H. Wu., F. Kou, F. Jia, B. Liu, J. Yuan, Y. Bai. Bioinorg. Chem. Appl. 2011(2011)105431. doi:10.1155/2011/105431

HStAc (1) apresentou uma percentagem de sequestro de DPPH• 54,29% e seu complexo [Cu(HStAc)₂Cl₂] (8) 47,17%, o que comprovou que o ligante apresenta maior atividade sequestradora na máxima concentração da triagem e que a complexação não resulta em aumento de atividade.

Continuando com os estudos de sequestro de radicais livres, o experimento a seguir foi a avaliação da capacidade dos complexos de cobre(II) para sequestrar radicais ânions superóxidos ([•]O₂⁻). Como aconteceu no teste de DDPH alguns compostos precipitaram a 320 µM e foi necessário avaliar à concentração de 80 µM.

A percentagem obtida no sequestro de espécies reativas de oxigênio (Tabela 4.8) para o composto [Cu(HStpOHPh)₂Cl₂] (13) foi de 66,24%, e assim percebe-se que a complexação do ligante ao centro metálico melhora a capacidade de captura.

Tabela 4.8- Porcentagem de sequestro de ânions superóxido dos ligantes hidrazonas e seus complexos [Cu(HStAc)₂Cl₂] (8), [Cu(HStpClPh)₂Cl₂] (9), [Cu(HStpNO₂Ph)₂Cl₂] (10), [Cu(HStpT)₂Cl₂] (11), [Cu(HStBz)₂Cl₂] (12) e [Cu(HStpOHPh)₂Cl₂] (13) nas concentrações de 80 e 320 µM .

Composto	Sequestro de ânions superóxido (%) a [320µM]	Sequestro de ânions superóxido (%) a [80µM]
HStAc (1)	0	0
[Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (8)	*	0
HStpClPh (3)	0	0
[Cu(HStpClPh) ₂ Cl ₂] (9)	*	72,93
HStpNO ₂ Ph (4)	48,36	0
[Cu(HStpNO ₂ Ph) ₂ Cl ₂] (10)	*	84,14
HStpT (5)	0	0
[Cu(HStpT) ₂ Cl ₂] (11)	*	2,43
HStBz (6)	0	0
[Cu(HStBz) ₂ Cl ₂] (12)	*	9,05
HStpOHPh (7)	33,90	25,16
[Cu(HStpOHPh) ₂ Cl ₂] (13)	66,24	0
resveratrol	25,24	10,50

*= o composto não é solúvel a 320µM

A Figura 4.7 mostra as porcentagens de sequestro de ânions superóxido dos compostos estudados. Os ligantes (1), (3), (5), (6) não foram avaliados na concentração de 80 μM visto que à maior concentração (320 μM) não apresentaram captura de radicais $\cdot\text{O}_2^-$. Os compostos (4), (8) e (13) mostram-se inativos na captura de radicais $\cdot\text{O}_2^-$ na concentração de 80 μM . O composto (11) apresenta uma capacidade de captura menor que o resveratrol. O ligante (7) apresentou uma porcentagem de captura superior ao controle numa menor concentração.

Os melhores resultados foram obtidos para os compostos (9) e (10), sugerindo que, nesses casos, a complexação aumenta a capacidade de captura de radicais $\cdot\text{O}_2^-$.

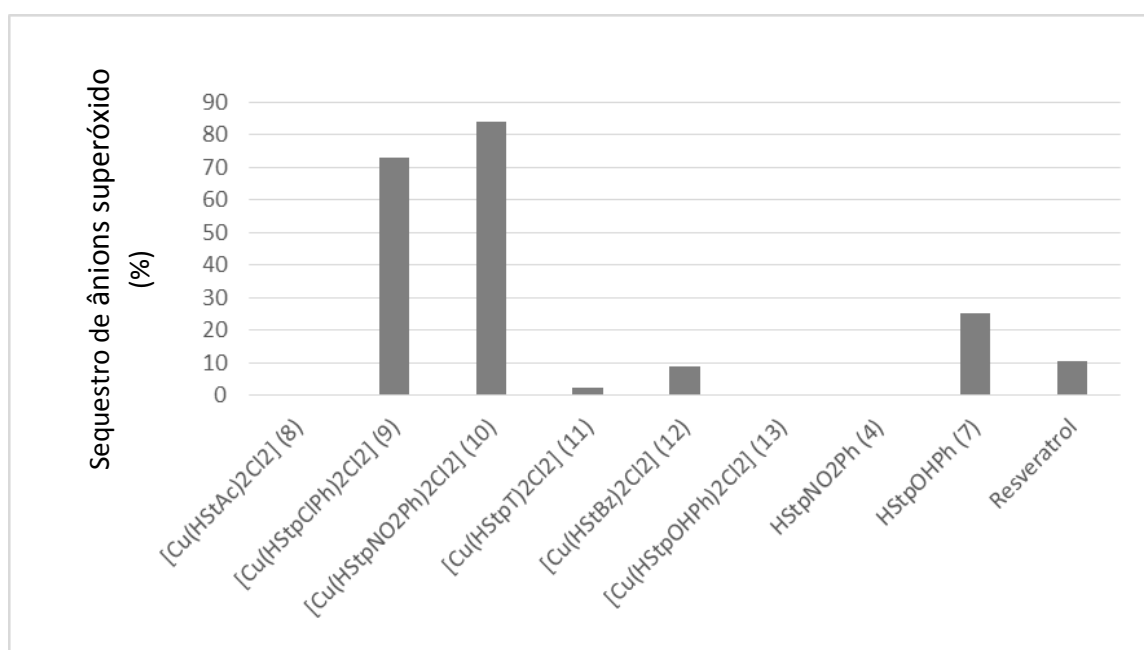


Figura 4.7- Porcentagem de sequestro de ânions superóxido dos complexos [Cu(HStAc)2Cl2] (8), [Cu(HStpClPh)2Cl2] (9), [Cu(HStpNO2Ph)2Cl2] (10), [Cu(HStpT)2Cl2] (11), [Cu(HStBz)2Cl2] (12), [Cu(HStpOHPh)2Cl2] (13) e os ligantes HStpNO2Ph (4) e HStpOHPh (7) a uma concentração de 80 μM .

4.2.3 Avaliação da atividade citotóxica

No estudo da avaliação da atividade citotóxica dos ligantes e seus complexos de cobre(II) nas linhagens celulares HL-60 (leucemia mielóide aguda), Jurkat (leucemia de linfócitos T), THP-1 (leucemia monocítica aguda) MDA-MB-231 (tumor de mama), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HCT-116 (carcinoma colorretal) e na linhagem de

células sadia VERO (rins de macaco verde africano) foram usados como controles positivos os fármacos antitumorais etoposídeo e cisplatina.

Em geral, os resultados obtidos da triagem a 1 μ M mostraram que os ligantes livres e seus complexos de cobre(II) exibem uma atividade citotóxica fraca, com valores de porcentagem de inibição do crescimento celular muito baixos.

4.3 Estudos de interação com a Albumina Sérica Bovina (BSA) e Albumina Sérica Humana (HSA) por ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

Albumina sérica bovina (BSA) está composta por 583 aminoácidos e exibe uma sequência homóloga de 80% e semelhança de 76% na estrutura terciária quando comparada a albumina sérica humana (HSA).^{180,181} Ambas as albuminas têm como função o transporte e armazenamento de diferentes substratos.¹⁸² A HSA pode se ligar com vários compostos endógenos e exógenos em diferentes sítios da molécula como ácidos graxos de cadeia longa, fármacos por exemplo ibuprofeno e agentes de contraste para Imagem por ressonância magnética (IRM),¹⁸³ como também íons metálicos como cobre, zinco entre outros.¹⁸⁴ Cada um destes compostos apresenta sítios preferenciais de ligação para inserir-se às proteínas, causando alterações conformacionais, modificações metabólicas e, no caso de medicamentos, afetando sua eficácia e comportamento farmacocinético.¹⁸⁵

Neste trabalho foi estudada a ligação dos complexos $[\text{Cu}(\text{HStBz})_2\text{Cl}_2]$ (12) e $[\text{Cu}(\text{HStpOHPh})_2\text{Cl}_2]$ (13) com HSA e BSA por ressonância paramagnética eletrônica (RPE), uma técnica espectroscópica muito apropriada para o estudo do comportamento eletrônico e mudança estrutural de complexos de cobre(II) em condições biologicamente relevantes.

As albuminas do soro bovino (BSA) e do soro humano (HSA) apresentam pelo menos dois sítios de ligação aos íons cobre(II) numa região com maior quantidade de resíduos negativamente carregados onde encontram-se os sítios de coordenação a

¹⁸⁰ D. C. Carter, X. M. He. Science 249(1990)302.

¹⁸¹ J. Lin, Y. Liu, M. Chen, H. Huang, L. Song. J. Lumin. 146(2014)114.

¹⁸² X. L. Han, F. F. Tian, Y. S. Ge, F. L. Jiang, L. Lai, D. W. Li, Q. L. Yu, J. Wang, C. Lin, Y. Liu. J. Photochem. Photobiol. B. 109(2012)1.

¹⁸³ K. W. Y. Chan, W. T. Wong. Coord. Chem. Rev. 251(2007)2428.

¹⁸⁴ F. Kratz, B. Elsadek. J. Control. Release 161(2012)429.

¹⁸⁵ V. C. Silveira, M. P. Abbott, M. Cavicchioli, M. B. Gonçalves, H. M. Petrilli, L. de Rezende, A. T. Amaral, D. E. P. Fonseca, G. F. Caramori, A. M. da Costa Ferreira. Dalton Trans. 42(2013)6386.

íons metálicos (Figura 4.8)¹⁸⁶: o sítio 1 N-terminal designados Cu₍₁₎ e o sítio 2 do aminoácido cisteína, que apresenta o grupo sulfidríla (-SH), na posição 34 (Cys-34) nomeado Cu₍₂₎.¹⁸⁷

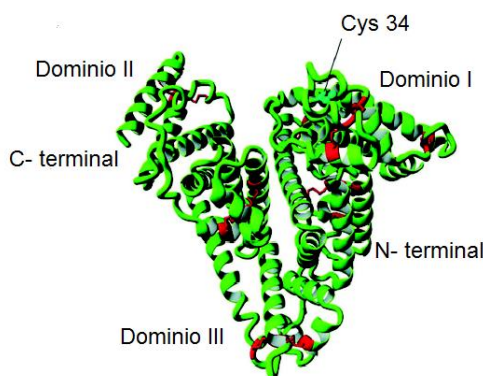


Figura 4.8- Estrutura cristalográfica da HSA modificada do Z. Liu e colaboradores,¹⁸⁶ ressaltando as regiões da Cys-34 e o sítio de N-terminal.

O sítio 1 (Cu₍₁₎) se liga a cobre(II) em uma geometria quadrática via quatro nitrogênios, na α -NH₂, os átomos de nitrogênio das duas primeiras ligações peptídicas e o nitrogênio N₃ de His-3.^{187,188,189} Este sítio é bastante específico para metais de transição e liga-se a cobre(II) e níquel(II) sob formas que não geram espécies reativas.¹⁹⁰ O sítio 1 é análogo nas albuminas humana e bovina. O segundo sítio Cu₍₂₎ de ligação das albuminas humana e bovina envolve a Cys-34.¹⁹¹ A Cys-34 é a única cisteína com um grupo sulfidríla que não participa de ligações dissulfeto com ligantes externos.¹⁹² Os restantes formam 17 pontes dissulfetos que contribuem a manter a estrutura terciária das albuminas.¹⁹²

A interação entre os complexos [Cu(HStBz)₂Cl₂] (12) e [Cu(HStpOHPh)₂Cl₂] (13) com BSA e HSA foi acompanhada por espectroscopia de RPE (Figura 4.9). Os espectros de RPE de cobre-albuminas foi simulado utilizando EasySpin e os parâmetros são listados na Tabela 4.9.

¹⁸⁶ Z. Liu, X.Chen. Chem. Soc. Rev. 45(2016)1432.

¹⁸⁷ G. Rakhit, W. E. Antholine, W. Froncisz, J. S. Hyde, J. R. Pilbrow, G. R. Sinclair, B. Sarker. J. Inorg. Biochem. 25(1985)217.

¹⁸⁸ P. J. Sadler, A. Tucker, J.H. Viles. Eur. J. Biochem. 220(1994)193.

¹⁸⁹ A. Zgirski, E. Frieden. J. Inorg. Biochem. 39(1990)137.

¹⁹⁰ D. A. Martins, L. R. Gouvea, G. S. Muniz, S. R. W. Louro, D. da Gama, J. Batista, M. de N. Soeiro, L. R. Teixeira. Bioinorg. Chem. Appl. 2016(2016)5027404.

¹⁹¹ Y. Zang, D. E. Wilcox. J. Biol. Inorg. Chem. 7(2002)327. doi: 10.1007/s00775-001-0302-6.

¹⁹² S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi. Protein Eng. Des. Sel. 12(1999)439.

Tabela 4.9- Parâmetros de RPE do composto $[\text{Cu}(\text{HStpOHPh})_2\text{Cl}_2]$ (13) na presença de BSA e HSA.

Composto		$g_{\parallel}$	$g_{\perp}$	$A_{\parallel}$ (MHz)
Cu(BSA) ou Cu(HSA)	sítio 1	2,046	2,190	601 (196 G)
	sítio 2	2,070	2,299	505 (157 G)
(13)-(BSA) ou (13)-(HSA)	sítio 1	2,046	2,190	612 (200 G)
	sítio 2'	2,062	2,276	540 (170 G)

A Figura 4.9 mostra os espectros de RPE do sal CuCl_2 e dos complexos (12) e (13), na presença equimolar das albuminas BSA e HSA. Os espectros apresentam uma superposição dos dois sítios de ligação (linhas hiperfinas assinaladas como 1 e 2 da região $g_{\parallel}$). Percebe-se na região $g_{\perp}$ uma superposição das linhas dos dois sítios.

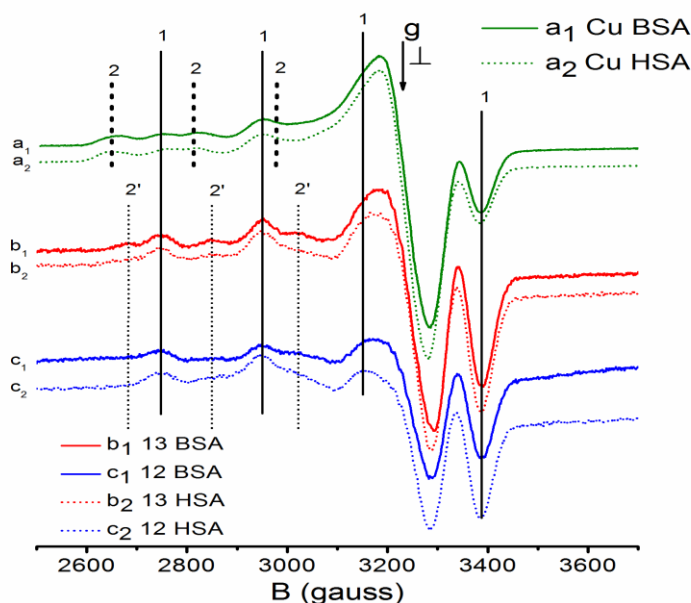


Figura 4.9- Espectros de RPE dos compostos $[\text{Cu}(\text{HStBz})_2\text{Cl}_2]$ (12) e $[\text{Cu}(\text{HStpOHPh})_2\text{Cl}_2]$ (13) na presença de BSA e HSA. Os compostos testes e as albuminas (BSA ou HSA) foram preparados a $0,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão de fosfato $0,010 \text{ M}$ pH 7,4. Os espectros de RPE foram obtidos operando em banda X a 77 K.

Pode-se observar na Figura 4.9 que a linha 1 encontra-se na mesma posição em ambos os complexos, indicando o mesmo sítio de ligação ao sítio 1 no nitrogênio terminal da BSA e HSA, sugerindo o mesmo ambiente de ligação. Este efeito pode dever-se ao deslocamento de um ou dos dois ligantes pelo nitrogênio terminal da proteína para o metal se ligar neste sítio. As linhas hiperfinas do sítio 2 nos complexos

(linha denominada 2' b₁, b₂, c₁ e c₂) encontram-se deslocadas para campo mais alto (g_{||}) (valores mais baixos) em relação ao sítio de cobre(II) em ambas as albuminas.

O espectro RPE do complexo (12) com a (BSA) foi simulado usando o programa EasySpin.¹⁹³ O deslocamento de g para o sítio 2 sugere a formação de complexos com ligantes mistos base de Schiff e sítio 2 da albumina. A contribuição do sítio 1 é maior para os complexos (12) e (13) (espectros b₁, b₂, c₁, c₂) do que para o cobre(II) em ambas as albuminas (espectros a₁ e a₂).

Concluiu-se a partir dos experimentos de RPE, que os complexos sob estudo modificam os sítios de ligação com a proteína formando complexos mistos.

¹⁹³ S. Stoll, A. Schweiger. J. Magn. Reson. 178(2006)42.

CAPÍTULO 5. COMPLEXOS DE COBRE(II) DERIVADOS DE NARINGENINA E HESPERETINA.

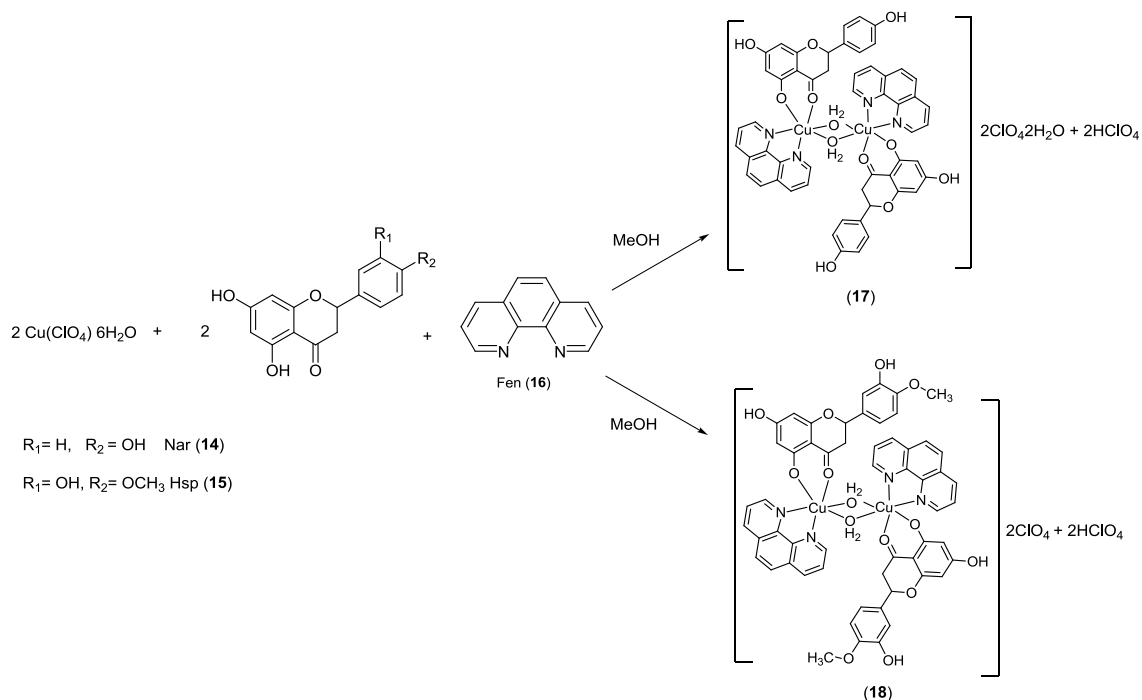
Neste capítulo apresenta-se a caracterização dos complexos perclorato de di- μ -aqua-*bis* [fenantrolina(naringenato)cobre(II)] diidratado $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]_2 \cdot 2\text{ClO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (17) e perclorato de di- μ -aqua-[fenantrolina(hesperetinato)cobre(II)] $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]_2 \cdot 2\text{ClO}_4$ (18), contendo os flavonoides naringenina (Nar) e hesperetina (Hsp) e o co-ligante 1,10-fenantrolina, assim como a avaliação de suas atividades citotóxicas frente a células tumorais e não tumorais.

Os compostos naringenina⁶⁰ (Nar) (14), hesperetina⁶⁰ (Hsp) (15) e o co-ligante o 1,10-fenantrolina (Fen) (16) são conhecidos e suas caracterizações encontram-se descritas na literatura.

Os complexos foram sintetizados por meio da reação entre o perclorato de cobre(II) hexaidratado com naringenina (Nar) (14) e hesperetina (Hsp) (15) usando como co-ligante 1,10-fenantrolina (Fen) (16). As sínteses foram feitas de acordo com o procedimento descrito no item 2.2.3.

Foram avaliadas a atividade sequestradora de radicais DPPH• e ânions superóxido, a atividade citotóxica e a interação dos complexos de cobre(II) com as albuminas (BSA) e (HSA) e com o DNA.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE COBRE(II) DERIVADOS DE NARINGENINA E HESPERETINA .



Esquema 5.1- Sínteses e estruturas binucleares propostas para os compostos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2] \cdot \text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)] \cdot \text{ClO}_4$ (18).

Os resultados obtidos de análise elementar quantitativa, medidas de condutividade molar, temperaturas de fusão e momentos magnéticos são apresentados na Tabela 5.1. Estes dados sugerem a formação dos complexos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2] \cdot \text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)] \cdot \text{ClO}_4$ (18) onde naringenina e hesperetina coordenam-se como ligantes aniônicos e 1,10-fenantrolina (16) como co-ligante. A proposta de estruturas contendo complexos binucleares $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]_2 \cdot 2\text{ClO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]_2 \cdot 2\text{ClO}_4$ (Esquema 5.1), baseou-se na análise dos parâmetros obtidos da espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica RPE no estado sólido (ver seção 5.1.2). As condutividades molares em DMF¹³⁸ dos compostos (17) e (18) mostram que os compostos são eletrolíticos e concordam com as estruturas propostas.

Tabela 5.1- Análise elementar (valores calculados entre parênteses), temperaturas de fusão^a (°C), condutividades molares (Λ_M , $\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$)^b e porcentagem de rendimento, para os compostos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18).

Composto	Temp. de fusão (°C)	%C	%H	%N	μ_{eff} (MB)	Λ_M^b	Rend. (%)
$[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17)	Decomp. ^a	49,85 (49,85)	3,25 (3,56)	4,26 (4,31)	1,77	66,52	79,2
$[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18).	Decomp. ^a	50,76 (51,16)	3,50 (3,06)	4,23 (4,13)	1,84	67,05	62,7

^a Decomposição, ^b Λ_M : ($\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$) DMF $\sim 1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ nos valores de condutividade tabelados já foi corrigido a condutividade do solvente.

5.1.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

No espectro de infravermelho (IV) do co-ligante 1,10-fenantrolina (Fen) (16) (Figura 5.1) observam-se em 3058 e 3030 cm^{-1} os modos vibracionais dos estiramentos assimétrico e simétrico $\nu(\text{C-H})$ respectivamente, característicos dos anéis aromáticos. Na região entre 1504-1422 cm^{-1} verificou-se a presença dos modos vibracionais característicos de estiramentos $\nu(\text{C}=\text{C})$ e $\nu(\text{C}=\text{N})$ do anel aromático. As bandas em 854 e 738 cm^{-1} foram atribuídas aos modos de deformação angular fora do plano do anel $\gamma(\text{CCN}, \text{CCC})$ e a banda em 624 cm^{-1} é referente à deformação angular no plano $\delta(\text{CCN}, \text{CCC})$.¹⁴⁰

As atribuições das principais bandas dos espectros de infravermelho para a determinação do modo de coordenação da naringenina (14), hesperetina (15) e o co-ligante 1,10-fenantrolina (16) ao átomo cobre(II) encontram-se na Tabela 5.2. Devido à semelhança estrutural apresentada por (17) e (18), serão discutidos mais detalhadamente os dados de caracterização obtidos para (17). O espectro de infravermelho para o composto (18) encontra-se no Anexo pág.155 (Figura 5.3).

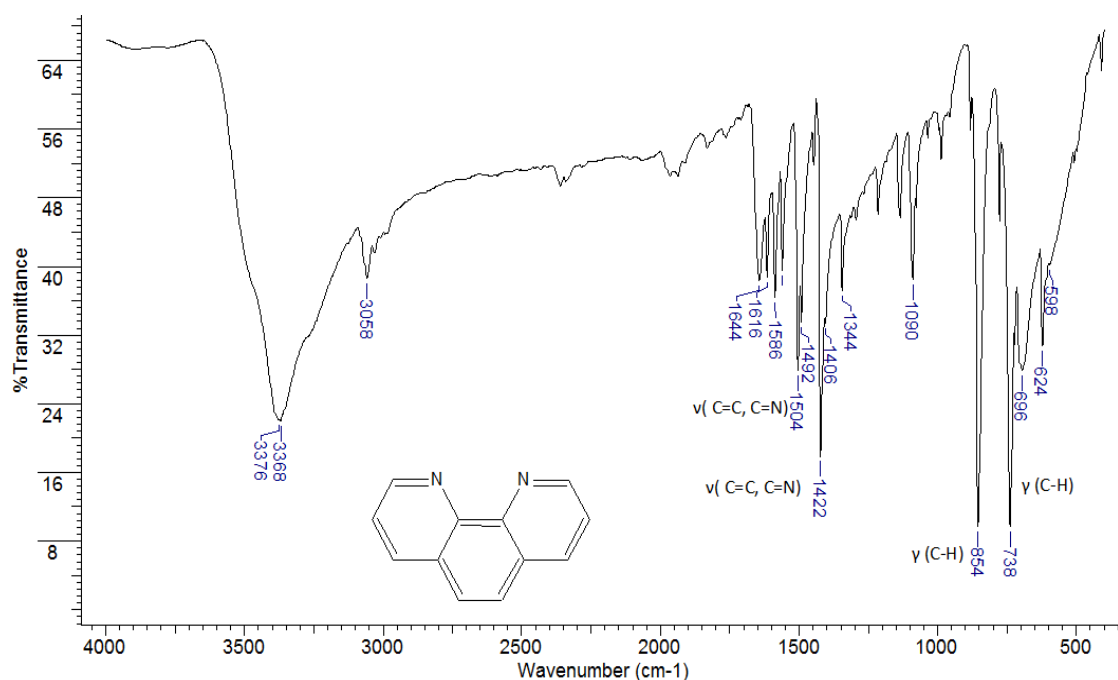


Figura 5.1- Espectro de absorção na região do Infravermelho do infravermelho para o co-ligante 1,10-fenantrolina (16) em pastilhas de KBr.

Na Figura 5.2 comparou-se o espectro de infravermelho da naringenina (14) e de seu respectivo complexo (17). As bandas de vibração a 1630 e 1636 cm^{-1} , são atribuídas ao estiramento da ligação $\nu(\text{C}=\text{O})$ dos ligantes livres (14) e (15) respectivamente, que se deslocam para 1614 cm^{-1} nos espectros dos complexos (17) e (18), sugerindo a coordenação do íon metálico ao oxigênio carbonílico. As bandas referentes ao estiramento $\nu(\text{O}-\text{H})$ fenólico, observadas em 3284 e 3498 cm^{-1} nos espectros da naringenina⁷⁷ (14) e hesperetina⁷⁷ (15) respectivamente, apresentaram deslocamentos significativos nos espectros dos complexos de cobre(II). Entretanto, uma vez que há mais de uma hidroxila fenólica, e que as bandas da água¹⁹⁴ também se encontram na mesma região, não é simples atribuir as mudanças ocorridas em razão da complexação ao cobre(II).

¹⁹⁴ H. Temel, Ü. Çakir, B. Otludil, H. İbrâhim. Uğraş. Synth. React. Inorg. Metal-Org. Chem. 31(2001)1323.

Tabela 5.2- Principais bandas dos espectros de infravermelho (cm^{-1}) de naringenina (Nar) (14), hesperetina (Hsp) (15), 1,10-fenantrolina (Fen) (16) e dos complexos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18).

Composto	$\nu(\text{O-H})$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C=C})$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu(\text{Cl-O})$
naringenina (14)	3284m	1630F	1602F	-----	-----
$[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17)	3406m	1614F	1574F	1520F	1070,1092, 1120F
hesperetina (15)	3498m	1636F	1582- 1504F	-----	
$[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18)	3416m	1614F	1574F	1520F	1122,1092, 1060F
1,10-fenantrolina (16)	-----	-----	1502F	1422F	-----

Intensidade: F= forte, m= média, f= fraca

Nos espectros dos complexos (17) e (18), quando comparados com 1,10-fenantrolina livre (16), observou-se o deslocamento das bandas características dos modos vibracionais de estiramento $\nu(\text{C-C})$, $\nu(\text{C=N})$ e deformação angular no plano $\delta(\text{C-H})$ para regiões de maior número de onda, indicando a coordenação ao centro metálico.¹⁴⁰

As bandas observadas em 1070, 1092, 1120 cm^{-1} no espectro do complexo $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17) e em 1122, 1092, 1060 cm^{-1} para o $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18) são atribuídas para ao estiramento $\nu(\text{Cl-O})$ do íon perclorato.¹⁴⁰

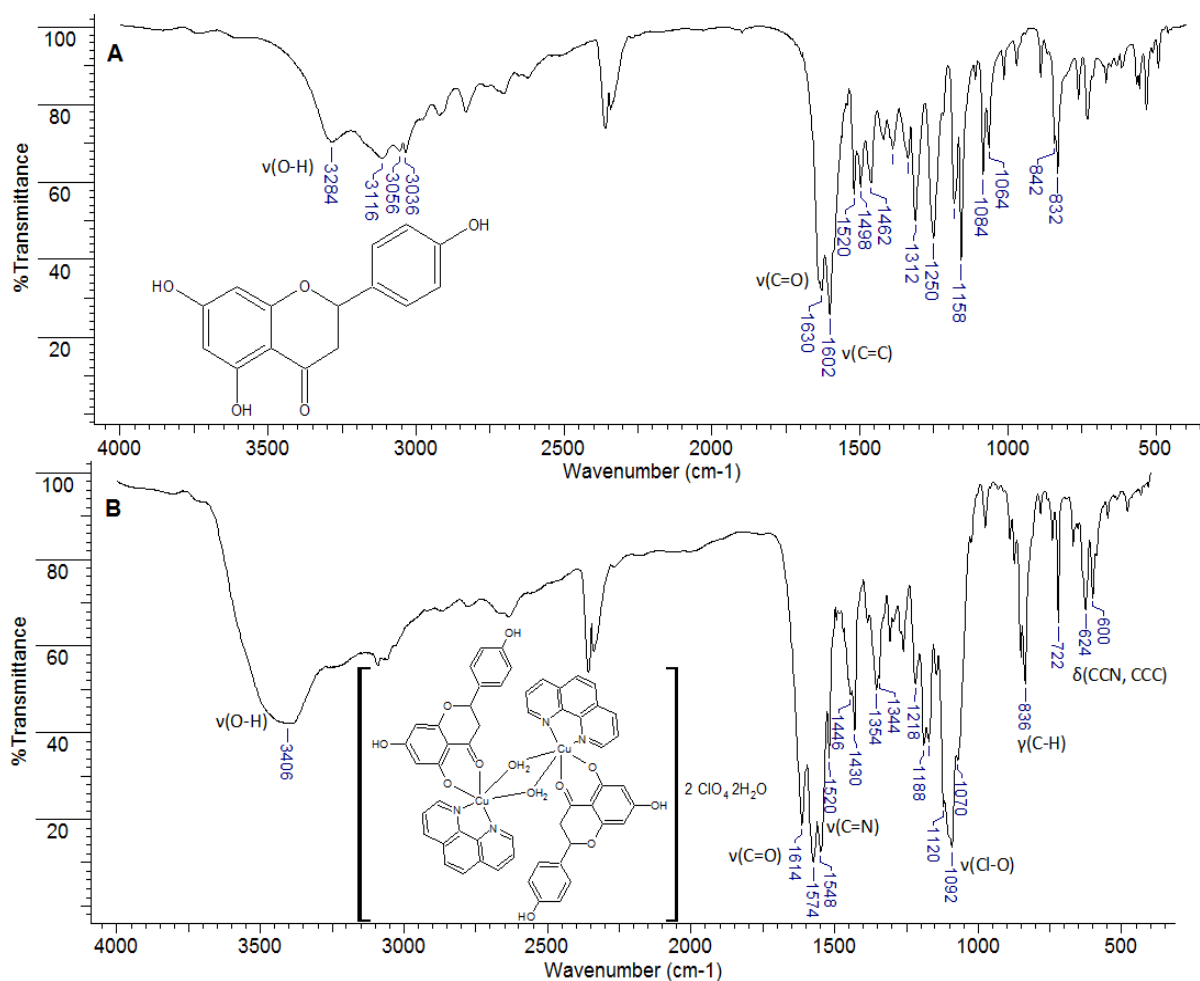


Figura 5.2- Espectros de absorção na região do Infravermelho do infravermelho de Nar (14) (A) e do complexo $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2] \cdot \text{ClO}_4$ (17) (B) em pastilhas de KBr.

5.1.2 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Na Figura 5.3 são mostrados os espectros RPE dos compostos (17) e (18) no estado sólido à temperatura ambiente. Os espectros dos complexos (17) e (18) são alargados, especialmente o do complexo (17), com características de espécies binucleares,¹⁹⁵ e parâmetros de desdobramento em campo zero $D(17) = 630 \text{ G}$ e $D(18) = 580 \text{ G}$. A distância média r (angstroms) entre os dois íons cobre(II) pode ser estimada a partir dos valores de D (gauss) usando-se a equação:

$$D = \frac{3}{2} \frac{g\beta}{r^3} = 1,39 \times 10^4 \frac{g}{r^3}$$

¹⁹⁵ J. A. Weil, J. R. Bolton, J. E. Wertz. *Electron Paramagnetic Resonance, Elementary Theory and Practical Applications*, John Wiley & Sons, Inc., 1993 (Chapter 6.3).

As distâncias calculadas para os complexos (17) e (18) foram 3,6 e 3,7 Å respectivamente. Essas distâncias são similares àquelas obtidas para outros complexos binucleares de cobre(II).^{196,197} Os parâmetros calculados para os complexos (17) e (18) encontram-se na Tabela 5.3 assim como os três principais componentes g (g_x, g_y, g_z), que indicam simetria axial.

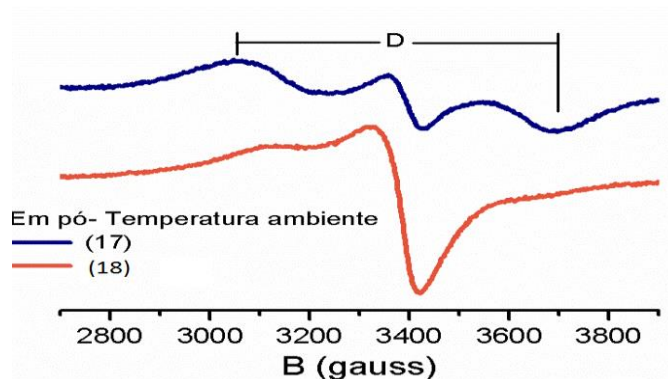


Figura 5.3- Espectros de RPE dos complexos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2] \cdot \text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)] \cdot \text{ClO}_4$ (18) em pó a temperatura ambiente.

Tabela 5.3- Parâmetros obtidos dos espectros de RPE dos complexos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2] \cdot \text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)] \cdot \text{ClO}_4$ (18) em pó a temperatura ambiente.

Composto	g_x	g_y	g_z	D (Gauss)
(17)	1,896	2,063	2,29	630
(18)	2,045	2,074	2,26	580

Os espectros RPE dos compostos estudados também foram registrados em solução de DMSO a 77 K. Nos parâmetros calculados (Tabela 5.4), observa-se que $g_{||} > g_{\perp}$, consistente com a configuração $3d^9$ do cobre(II) e correspondente à presença de um elétron desaparelhado no orbital $d_{x^2-y^2}$.¹⁹⁸

Na Figura 5.4 os compostos (17) e (18) apresentam duas componentes de simetria axial (1 e 2) e uma terceira componente a campo alto característica de

¹⁹⁶ S. S. Eaton, K. M. More, B. M. Sawant, G. R. Eaton. J. Am. Chem. Soc. 105(1983)6560.

¹⁹⁷ D. G. J. Batista, P. B. Silva, L. Stivanin, D. R. Lachter, R. S. Silva, J. Felcman, S. R.W. Louro, L. R. Teixeira, M. N. C. Soeiro. Polyhedron. 30(2011)1718.

¹⁹⁸ E. B. Seená, R. Maliyeckal, M. R. P. Kurup. Polyhedron. 26(2007)829.

espécies binucleares (3). Os parâmetros de RPE do complexo $[\text{CuCl}_2(\text{Fen})]^{199}$ encontram-se também na Tabela 5.4, para comparação com os dois complexos de estudo.

É preciso ressaltar que ambas as amostras policristalinas e em solução de DMSO, consistem numa superposição de sinais devidos à presença de espécies mononucleares e binucleares. A contribuição da espécie binuclear em solução é menor do que em pó. O complexo binuclear não está completamente dissociado em DMSO pelo menos a 77 K. Nos testes biológicos assumiu-se que as espécies monoméricas devem ser predominantes a 37 °C em concentração micromolar.

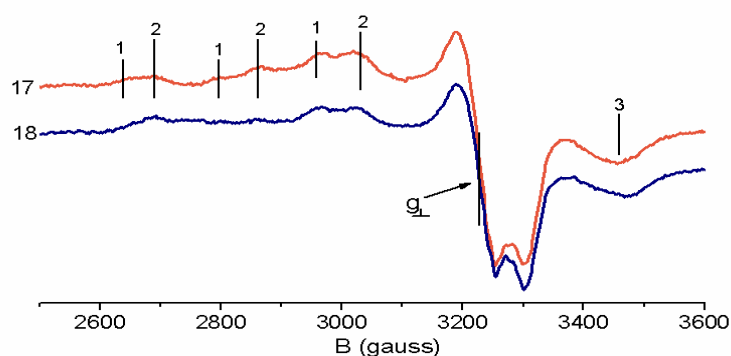


Figura 5.4- Espectros de RPE dos complexos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2] \cdot \text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)] \cdot \text{ClO}_4$ (18) em DMSO a 77 K.

Tabela 5.4- Parâmetros obtidos dos espectros de RPE dos complexos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2] \cdot \text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)] \cdot \text{ClO}_4$ (18) em DMSO a 77 K.

Composto	$g_{ }$	$g_{\perp}$	$A_{ }$ (gauss)
(17), (18) (1)	2,32	2,08	160
(17), (18) (2)	2,26	2,08	175
$[\text{CuCl}_2(\text{Fen})]$	2,292	2,074	155

5.1.3 Análise termogravimétrica

As curvas TG/DTG (A42 e A43 Anexo pág 182) para os complexos (17) e (18) respectivamente, foram registradas entre 25 e 750 °C, em atmosfera de nitrogênio, com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹. Com essas as curvas foi possível confirmar a presença das moléculas de água presentes nas estruturas dos complexos.

¹⁹⁹ D. G. J. Batista, P. B Silva, L. Stivanin, D. R Lachter, R. S. Silva, J. Felcman, S. R. W. Louro, L. R. Teixeira, M. N. C. Soeiro. Polyhedron. 30(2011)1718.

A análise das curvas TG/DTG (Tabela 5.5) indica um processo de perda de massa observado entre 28,70°C a 171,31°C para o complexo $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17) e entre 32,24°C a 238,27°C para $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18), com perdas de massa associadas de 5,2 % (17) e 2,9 % (18). Essas perdas correspondem a uma 5,5% (17) e 2,7 % (18), indicando um processo de desidratação de duas moléculas de água para o composto (17) e uma molécula de água para o composto (18).

Tabela 5.5- Dados obtidos a partir da análise das curvas TG/DTG dos complexos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18).

Composto	Temp.de desidratação (°C)			Temp. de decomposição (°C)		
	T1	T2	Perda de massa (%)	T3	T4	Perda total de massa (%)
$[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17)	28	171	5,2	390	746	41,4
$[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18)	32	238	2,9	424	747	50,2

T1-T2: Intervalo de temperatura que corresponde à desidratação dos complexos.

T3-T4: Intervalo de temperatura que corresponde à decomposição dos complexos.

5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.2.1 Avaliações da atividade sequestradora de radicais DPPH• e ânions superóxido

A redução do radical DPPH• foi medida pelo monitoramento do declínio da absorbância a 520 nm, com uma mudança de coloração violeta para o amarelo. Analisando as porcentagens de sequestro de DPPH• a uma concentração de 320 µM (Tabela 5.6), observou-se que o complexo (17) apresenta uma captura de radicais de nitrogênio muito semelhante à naringenina, mas não é melhor que 1,10-fenantrolina, o que significa que a complexação não fez melhorar a capacidade de captura de DPPH• ao comparar com o controle positivo (resveratrol).

O complexo (18) precipitou na solução e avaliou-se sua atividade a uma concentração de 80 µM (Tabela 5.7). Na Tabela 5.7 verifica-se que o composto (18) mostrou-se tão eficiente quanto o resveratrol nesta concentração, sugerindo assim que a complexação melhora a atividade de captura de DPPH•.

A naringenina e a hesperetina também possuem alguma atividade antioxidante, embora menor em comparação com muitos outros polifenóis.

Tabela 5.6- Porcentagem de sequestro de DPPH• dos compostos naringenina (Nar) (14), hesperetina (Hsp) (15), 1,10-fenantrolina (Fen) (16) e os complexos [Cu(Nar)(Fen)(OH₂)₂].ClO₄ (17) e [Cu(Hsp)(Fen)(OH₂)].ClO₄ (18) a uma concentração de 320 µM.

Composto	Sequestro de DPPH (%)
Nar (14)	25,02
[Cu(Nar)(Fen)(OH ₂) ₂].ClO ₄ (17)	24,78
Hsp (15)	64,82
[Cu(Hsp)(Fen)(OH ₂)].ClO ₄ (18)	*
Fen (16)	47,88
resveratrol	80,00

* = o composto não é solúvel a 320µM

Tabela 5.7- Porcentagem de sequestro de DPPH• do complexo [Cu(Hsp)(Fen)(OH₂)].ClO₄ (18) a uma concentração de 80 µM.

Composto	Sequestro de DPPH (%)
[Cu(Hsp)(Fen)(OH ₂)].ClO ₄ (18)	75,92
resveratrol	71,98

Os resultados obtidos das medidas de percentual de sequestro de radicais •O₂⁻ para os compostos estudados a 320 µM encontram-se na Tabela 5.8. Verifica-se que 1,10-fenantrolina (Fen) (16) e [Cu(Hsp)(Fen)(OH₂)].ClO₄ (18) não apresentaram valores significativos quando comparados ao controle positivo.

Tabela 5.8- Porcentagem de sequestro de ânions superóxido dos compostos naringenina (Nar) (14), hesperetina (Hsp) (15), 1,10-fenantrolina (Fen) (16) e os complexos [Cu(Nar)(Fen)(OH₂)₂].ClO₄ (17) e [Cu(Hsp)(Fen)(OH₂)].ClO₄ (18) a uma concentração de 320 µM.

Composto	Sequestro de ânions superóxido (%)
Nar (14)	11,87
[Cu(Nar)(Fen)(OH ₂) ₂].ClO ₄ (17)	27,76
Hsp (15)	8,29
[Cu(Hsp)(Fen)(OH ₂)].ClO ₄ (18)	0
Fen (16)	0
resveratrol	25,25

Analisando a Tabela 5.9 observa-se que o complexo (17) é tão efetivo quanto o resveratrol em sua capacidade de sequestro de espécies reativas de oxigênio. Os compostos mostram baixa capacidade de sequestro de ânions superóxido. Neste experimento de sequestro de ânions superóxido variou-se a concentração para 80 μM (Tabela 5.9). Observou-se que a atividade do complexo (17) é semelhante à do resveratrol na concentração de 320 μM .

Tabela 5.9- Porcentagem de sequestro de ânions superóxido para o $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17) uma concentração de 80 μM .

Composto	Sequestro de ânions superóxido (%)
$[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17)	7,74
resveratrol	10,50

5.2.2 Avaliação da atividade citotóxica pelo método de 3-(4,5dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)

A atividade citotóxica dos compostos naringenina (Nar) (14), hesperetina (Hsp) (15), 1,10-fenantrolina (Fen) (16), $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17), $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18) e do sal de perclorato de cobre(II) foi testada nas linhagens MDA-MB-231 (câncer de mama), A2058 (melanoma) e A549 (carcinoma de pulmão) pelo método MTT. Os estudos foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa do Dr. Adilson Kleber Ferreira da USP.

Foi realizado um screening a 10 μM dos complexos (17) e (18) e dos precursores nas linhagens anteriormente ditas. Os resultados mostram que os complexos apresentaram atividade frente às células A549 (carcinoma de pulmão), demonstrando assim que são seletivos para este tipo de célula, uma vez que ligantes livres e o co-ligante (Fen) mostraram-se inativas.

Foram então determinados os valores de IC_{50} para os complexos (17) e (18) frente às células A549 e contra células normais de carcinoma de pulmão LL-24. Os compostos foram ainda testados contra células endoteliais HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial) (não tumorais) (Tabela 5.10).

Tabela 5.10- Valores de IC₅₀ (μM) ± DP para os complexos (17) e (18) frente às células A549 e células normais de carcinoma de pulmão LL-24 e HUVEC.

Composto	Linhagem celular tumoral	Células não tumorais	
	A549 (carcinoma de pulmão)	LL-24 (fibroblastos de pulmão)	HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial)
[Cu(Nar)(Fen)(OH ₂) ₂].ClO ₄ (17)	16,42 ± 2,44	24,14 ± 2,97	31,02 ± 3,95
[Cu(Hsp)(Fen)(OH ₂)].ClO ₄ (18)	5,82 ± 0,83	18,17 ± 1,44	17,55 ± 3,66

Os resultados apresentados na Tabela 5.10 mostram os valores obtidos de IC₅₀ para os compostos (17) e (18) de 16,42 e 5,82 μM respectivamente. Os compostos (17) e (18), especialmente o composto (18), apresenta especificidade para a linhagem A549. O complexo (18) exibe um melhor efeito citotóxico considerando que requer uma dose três vezes menor do que o complexo (17) para conseguir o mesmo efeito. O complexo (18) foi mais citotóxico e mais seletivo que o complexo (17).

5.2.2.1 Avaliação da apoptose pelo teste Anexina V/Iodeto de propídeo por citometria de fluxo

Alguns complexos de cobre(II) são capazes de induzir a apoptose celular por meio de interação com o DNA e por mostrarem atividades antioxidantes.²⁰⁰ Com a finalidade de identificar os mecanismos relacionados com a atividade citotóxica dos complexos de (17) e (18), foi empregado o iodeto de propídio (PI) conjugado à Anexina V. Essa dupla marcação permite a discriminação entre as células apoptóticas e necróticas.

Após o tratamento durante a noite com os compostos testes depois da marcação, as imagens das células foram registadas utilizando um microscópio ótico (Figura 5.5).

²⁰⁰ T. Ma, J. Xu, Y. Wang, H. Yu, Y. Yang, Y. Liu, W. Ding, W. Zhu, R. Chen, Z. Ge, Y. Tan, L. Ji, T. Zhu. J. Inorg. Biochem. 144(2015)38.

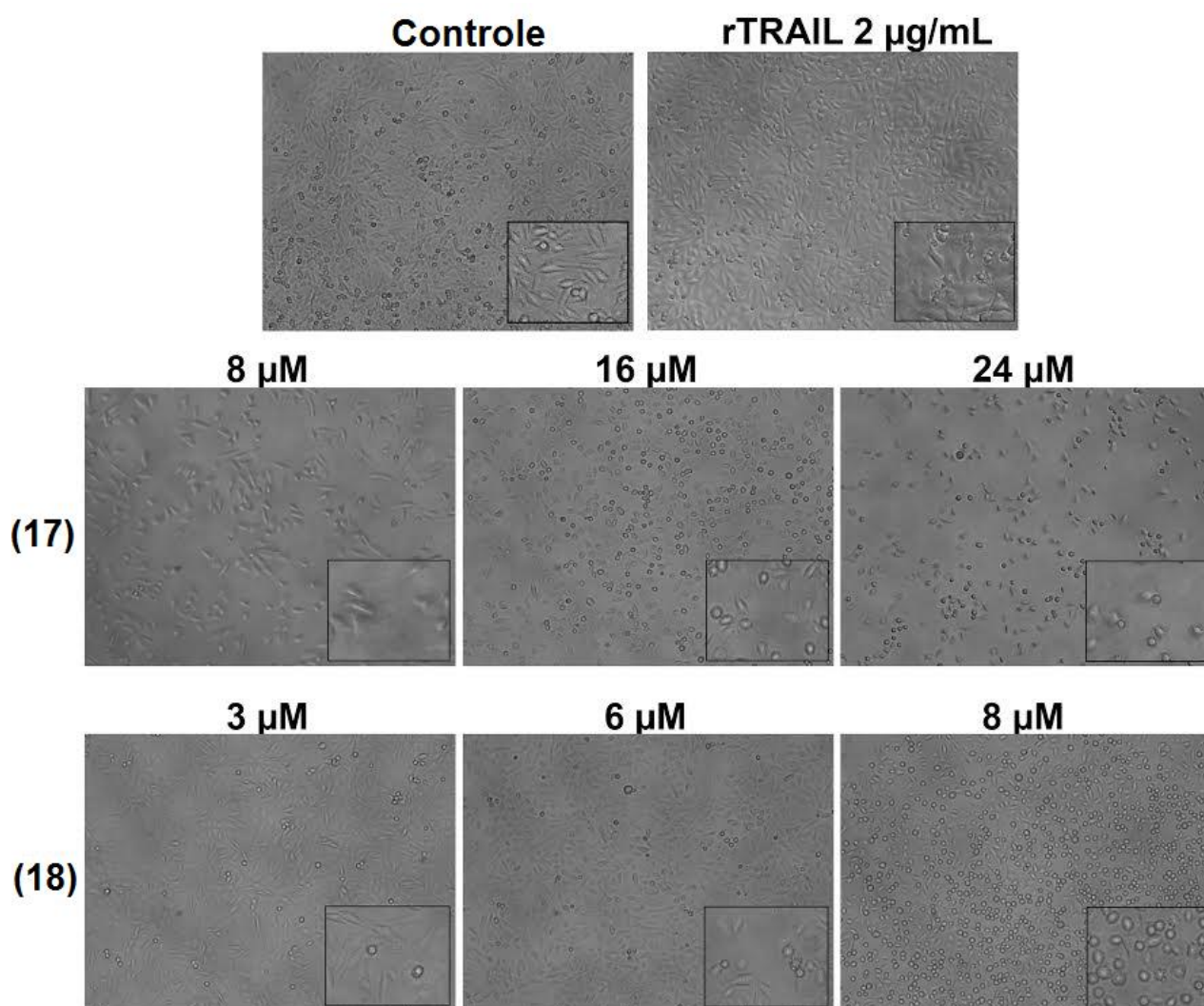


Figura 5.5- Avaliação morfológica de apoptose através do teste de PI/Anexina V observado durante 24 h de tratamento dos compostos (17) e (18) em três diferentes concentrações. As imagens são representativas de três experimentos independentes. (Aumento x 100).

A atividade citotóxica dos complexos (17) e (18) foi demonstrada em células A549. Na Figura 5.5 pode-se observar que os complexos (17) e (18) provocam alterações morfológicas típicas de apoptose (morte celular programada) em células A549. A morfologia celular foi observada por 24 h após tratamento em três diferentes concentrações dos compostos (17) e (18). Nesta experiência utilizou-se TRAIL como controle positivo para a apoptose. TRAIL é uma proteína citotóxica que induz apoptose rápida em células tumorais, mas não em células normais. Todos os tratamentos

induziram alterações celulares de morfologia típica por apoptose: encolhimento e aglomeração celular.

Segundo os dados obtidos na análise por citometria de fluxo para os complexos (17) e (18) demonstrou-se que induzem apoptose e necrose tardia (Figura 5.6). As células A549 são uma linhagem celular bem conhecida que mostra resistência ao indutor de apoptose TRAIL. Os compostos (17) e (18) em doses baixas são capazes de induzir efeitos apoptóticos máximos e de necrose em células A549. No entanto, o complexo (18) apresenta um efeito mais potente do que o complexo de (17). De acordo com o ensaio de MTT, estes resultados indicam que o complexo (18) tem melhores efeitos citotóxicos frente às células A549.

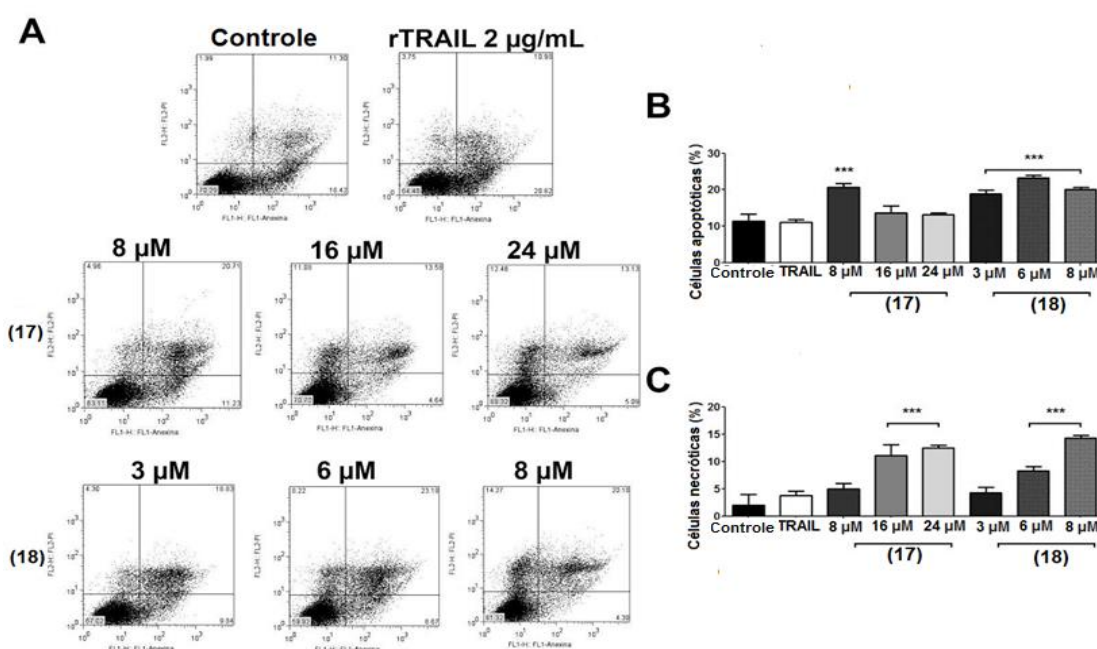


Figura 5.6- A. Citometria de fluxo das células A549 tratadas com PI/AnexinaV depois de 12 h em diferentes concentrações dos complexos (17) e (18). **B.** Gráficos de barra representativos da distribuição de porcentagem de células apoptóticas dos compostos (17) e (18). **C.** Histogramas representativos da distribuição de porcentagem de células necróticas dos compostos (17) e (18).

5.2.2.2 Avaliação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta m\Psi$)

A integridade mitocondrial, avaliada por meio da medição do potencial de membrana, é um parâmetro importante na fisiologia celular, para a manutenção da cadeia respiratória mitocondrial (responsável pela formação de ATP). Por tanto, uma

diminuição do potencial de membrana mitocondrial conduz a uma fosforilação oxidativa deficiente, o que leva a uma falta de reservas energéticas nas células e, conseqüentemente à liberação de fatores apoptóticos, culminando num aumento da morte celular. A manutenção do potencial de membrana é, portanto, fundamental para a função normal e sobrevivência das células.²⁰¹

A avaliação das alterações da bioenergética mitocondrial foi determinada com o uso da sonda tetrametilrodamina etil éster (TMRE), que não interfere no metabolismo mitocondrial. As células A549 foram tratadas durante 12 h com os complexos de cobre(II) e coradas com (TMRE), com o fim de investigar se a apoptose está relacionada com uma via mitocondrial (Figura 5.7). No entanto, os tratamentos não foram capazes de reduzir o potencial de membrana mitocondrial, demonstrado que os complexos agem por indução de apoptose por mecanismo independente de despolarização de mitocôndria. A Figura 5.7 mostra que a atividade mitocondrial não tem correlação com a morte celular observada nos testes anteriores.

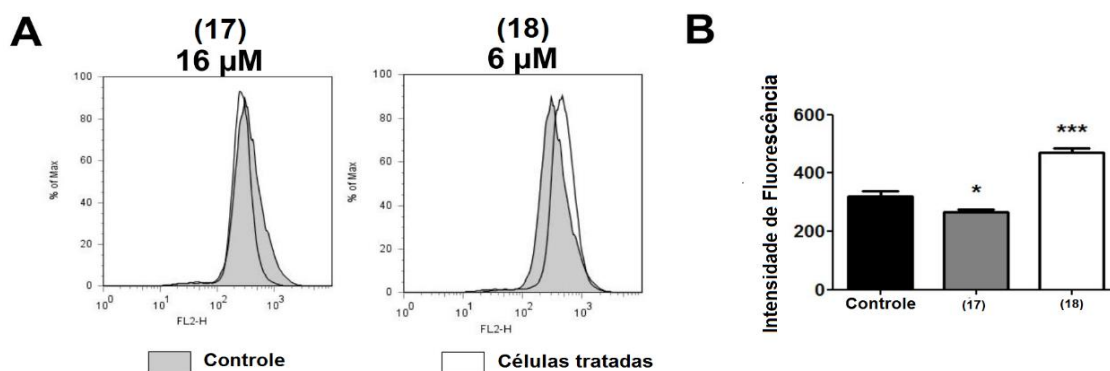


Figura 5.7- A. Histogramas representativos das células A549 tratadas com TMRE, controle (cinza) e células tratadas (branco). B. Gráficos de barra da intensidade de fluorescência dos compostos (17) e (18).

²⁰¹ A. K. S. Camara, E. J. Lesnfsky, D. F. Stowe. Antioxid. Redox. Signal. 13(2010)279.

5.2.2.3 Avaliação da produção de ROS para os compostos (17) e (18) por citometria de fluxo

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um mecanismo fisiológico que pode resultar em estresse oxidativo.²⁰² Isto pode estar associado a respostas de regulação do funcionamento celular, tais como: proliferação celular, diferenciação e apoptose.²⁰³ Dessa forma, foi avaliada a produção intracelular de ROS nas células A549 com os complexos (17) e (18) e se existiria uma relação com a apoptose. Neste estudo, as células A549 foram coradas com a sonda fluorescente dihidroetídio (DHE) após 12 h de tratamento com os compostos de estudo (Figura 5.8 A, B).

As células A549 tratadas com os compostos de estudo apresentam redução na produção de ROS, indicando que exibem atividade antioxidante sobre as células. Na literatura existem vários relatos que mostram que o íon cobre(II), a naringenina e a hesperetina exibem propriedades antioxidantes, mostrando um efeito de captura do radical superóxido.⁷⁸ No entanto, nas condições de teste (seção 5.2.1), os compostos mostraram baixa capacidade de captura dos radicais superóxido *in vitro*, na ausência das células.

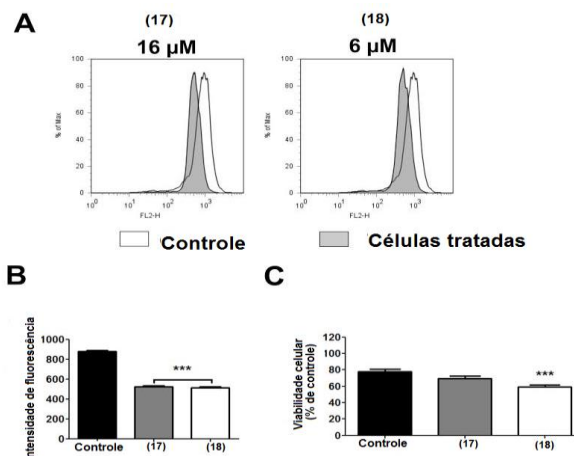


Figura 5.8- A. As células A549 foram tratadas com os compostos (17) e (18), coradas com DHE. Os resultados estão representados em histogramas com o controle (branco) e células tratadas (cinza). **B.** Gráficos de barra da intensidade de fluorescência dos complexos (17) e (18) e o controle positivo. **C.** Gráficos de barra da percentagem de viabilidade celular das células A549 pré-tratadas com 2 μM wortmanina e os complexos (17) e (18).

²⁰² L. J. Yan. Redox Biol. 2(2014)165.

²⁰³ P. V. Raninga, G. Di Trapani, K. F. Tonissen. Oncoscience. 1(2014)95.

A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR (fosfatidil inositol 3 quinase/ proteína quinase B/ alvo da rapamicina em mamíferos) regula uma variedade de processos celulares, incluindo a progressão do ciclo celular, sobrevivência celular, migração e síntese proteica. Recentes relatos comprovam que a desregulação dessa via está associada com a autofagia ou estímulo que desencadeia a autofagia.²⁰⁴

Neste estudo, foi analisada a relação do mecanismo antioxidante dos complexos de cobre(II) e a via PI3K (Figura 5.8 C). Utilizou-se a wortmanina, um inibidor potente e seletivo desta via.²⁰⁵ A viabilidade celular (Figura 5.8 C) foi avaliada por meio do ensaio MTT. O pré-tratamento com wortmanina não foi capaz de reduzir os efeitos citotóxicos dos complexos (17) e (18) em células A549, indicando que os efeitos anti-oxidantes dos complexos poderiam fazer aumentar sua ação apoptótica por um mecanismo de redução de autofagia independente de PI3K.

5.2.3 Estudos de ligação ao DNA

Com o fim de entender os possíveis mecanismos de ação dos complexos (17) e (18) optou-se por realizar estudos de interação com o CT-DNA e experimentos de competição com o intercalador brometo de etídio (BE). Esses testes vem sendo amplamente empregados para proporcionar informações a respeito do modo de interação com o DNA.

5.2.3.1 Determinação da constante de ligação (K_b) por espectroscopia de absorção eletrônica

A interação dos complexos metálicos com o DNA tem sido objeto de estudo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.²⁰⁶ Alguns relatos têm mostrado a capacidade de compostos em ligar-se ao DNA por diversos mecanismos como intercalação, por predisposição em se auto-associar em solução via interações π - π ou ligações de hidrogênio. A afinidade de associação dos complexos metálicos com o DNA geralmente segue a ordem: intercalação ($K_b > 10^6 \text{ M}^{-1}$)²⁰⁷ > interação

²⁰⁴ F. Janku, D. J. McConkey, D. S. Hong, R. Kurzrock. Nat. Rev. Clin. Oncol. 8(2011)528. doi:10.1038/nrclinonc.2011.71.

²⁰⁵ A. Carnero, J. C. Lacal. FEBS Letters. 422(1998)155.

²⁰⁶ B. J. Pages, D. L. Ang, E. P. Wright, J. R. Aldrich-Wright. Dalton Trans. 44(2015)3505.

hidrofóbica ($K_b > 10^5 \text{ M}^{-1}$) > interação eletrostática ($K_b > 10^3 \text{ M}^{-1}$)²⁰⁷, onde K_b = constante de ligação (associação) intrínseca.

A constante de ligação DNA/composto (K_b) para o complexo (18) foi obtida pelo monitoramento das mudanças ocorridas na absorbância a 272 nm. O espectro de absorção do complexo (18) na presença de concentrações crescentes do CT-DNA apresenta-se na Figura 5.9, onde observou-se um efeito hipercrômico, indicando interação com o DNA, o hipercromismo está associado a uma desestabilização ou dano a dupla hélice do DNA.²⁰⁸ Aplicando a equação de Scatchard¹⁴⁹ (Seção 2.4.1) obtém-se uma linha reta, onde a constante de ligação DNA-composto é obtida através da razão entre o coeficiente angular e o coeficiente linear dessa reta.

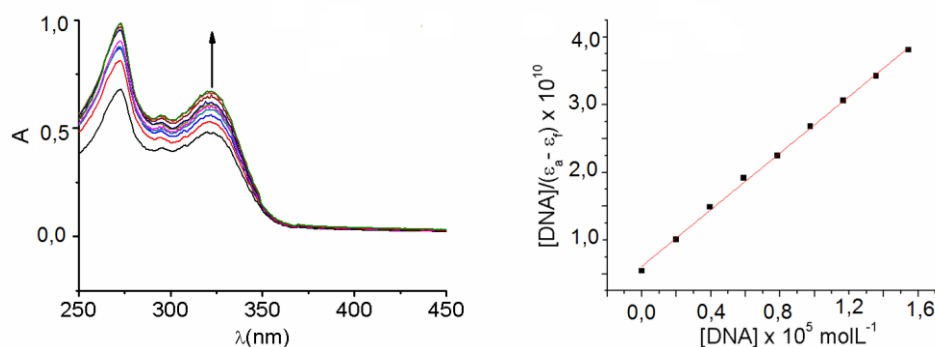


Figura 5.9- A. Espectro de absorção eletrônica do composto (18) na ausência e presença de concentrações crescentes de CT-DNA (período de incubação de 5 min). As setas mostram as mudanças na absorção do composto após a adição de CT-DNA. **B.** Gráfico de $[DNA]/(\epsilon_f - \epsilon_a)$ vs $[DNA]$ $\{[DNA] = 0 - 1,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $[Composto] = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a 25°C do composto (18)}.

Com relação ao complexo (17) observou-se no espectro de absorção um efeito hipocrômico. O rápido decréscimo das absorbâncias fez que não fosse possível obter suficientes dados para determinar a constante de ligação ao DNA.

Na Tabela 5.11 é apresentado o valor da constante de ligação (K_b) do complexo (18) com o CT-DNA. Observa-se que o complexo possui uma constante de ligação com

²⁰⁷ A. Mahmood Dar, Shamsuzzaman, S. Khan. J. Fluoresc. 26(2016)639. doi: 10.1007/s10895-015-1750-7.

²⁰⁸ N. Shahabadi, S. Kashanian, A. Fatahi. Bioinorg. Chem. Appl. 2011(2011)687571. doi:10.1155/2011/687571.

o DNA de $1,05 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, o que significa que existe uma interação forte.²⁰⁹ A constante de ligação do complexo (18) encontra-se na ordem do brometo de etídio ($K_b = 1,23 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)^{210,211} que é um forte intercalador. O K_b obtido para o composto (18) é maior do que para o complexo de cobre(II) $[\text{Cu}(\text{sal-L-val})\text{Fen}]$ (sal-L-val= base de Schiff derivada de salicaldeído e L-valina, Fen= 1,10-fenantrolina, $K_b = 6,48 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$).²¹²

Tabela 5.11- Constante de ligação (K_b), coeficiente de regressão linear (R^2) para a interação do composto $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)] \cdot \text{ClO}_4$ (18) com o CT-DNA.

Composto	$K_b (\text{M}^{-1})$	* R^2
$[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)] \cdot \text{ClO}_4$ (18)	$1,05 \times 10^6$	0,999

*Regressão Linear

5.2.3.2 Estudos de ligação ao DNA por fluorescência.

Com o fim de melhor investigar o modo de interação dos complexos (17) e (18) com o CT-DNA, realizou-se o estudo de ligação competitiva por fluorescência com o brometo de etídio (BE). A fluorescência do BE aumenta cerca de 30 vezes na presença de DNA, como consequência da forte intercalação que ocorre.¹⁵¹ A presença de outro composto intercalador reduz a fluorescência emitida em razão da competição pelos sítios do biopolímero. Desse modo, a fluorescência do BE-DNA é medida na ausência e na presença dos compostos testes.¹⁵¹

Os espectros de fluorescência do CT-DNA ligado ao BE pelos complexos (17) e (18) encontram-se na Figura 5.10. Após a adição dos complexos (17) e (18) as bandas do espectro de emissão do BE ligado ao CT-DNA mostraram uma diminuição da intensidade de fluorescência, indicando que as moléculas BE foram substituídas pelos complexos sob estudo.

²⁰⁹ A. Rambabu, M. Pradeep Kumar, S. Tejaswi, N. Vamsikrishna, Shivaraj. J. Photochem. Photobiol. B. 165(2016)147.

²¹⁰ L. Tabrizi, M. Fooladivanda, H. Chiniforoshan. Biometals. 29(2016)981.

²¹¹ A. Dimitrakopoulou, C. Dendrinou-Samara, A. A. Pantazaki, M. Alexiou, E. Nordlander, D.P. Kessissoglou. J. Inorg. Biochem. 102(2008)618.

²¹² L. Li, Q. Guo, J. Dong, T. Xu, J. Li. J. Photochem. Photobiol. B. 125(2013)56.

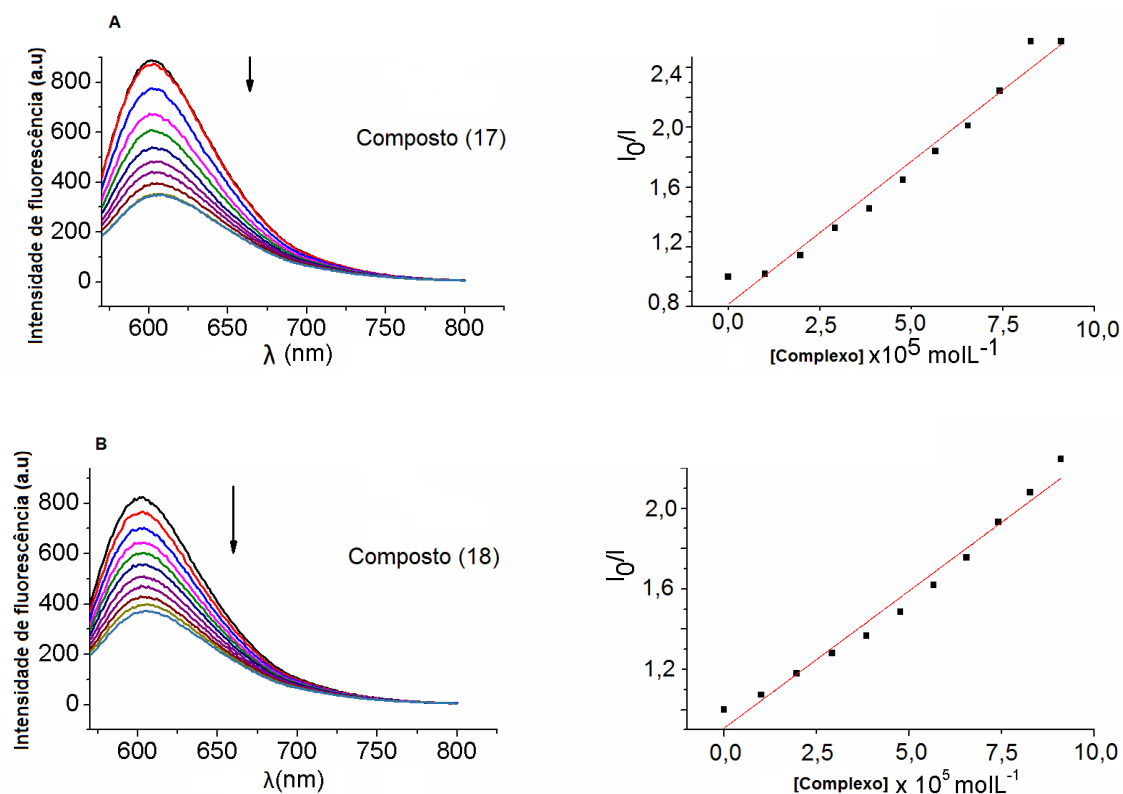


Figura 5.10- Espectros de emissão do BE-CT-DNA (10 μM Tampão Tris-HCl, pH 7,20, T = 25 $^\circ\text{C}$), na presença de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 μM dos complexos (17) **A.** e (18) **B.** Na direita gráficos de I_0/I vs $[Q]$. As setas indicam o sentido das mudanças na intensidade em função do aumento da concentração dos complexos. ($\lambda_{\text{emi}} = 605 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 545 \text{ nm}$).

Dos resultados obtidos a partir da análise das equações descritas no item 2.4.2 obtiveram-se os valores da constante de supressão da fluorescência (K_{sv}) e de ligação aparente (K_{app}) (Tabela 5.12) para os complexos (equações se encontram na seção 2.4.2). Os valores obtidos de K_{app} para os complexos (17) e (18) são da ordem de 10^6 indicando que podem se ligar ao DNA via intercalação,²¹³ o que indica que são capazes de substituir moléculas do BE ligado ao DNA. O resultado é lógico pelas características estruturais dos complexos, já que apresentam o co-ligante 1,10-fenantrolina que tem estrutura planar.

²¹³ S. S. Bhat, A. A. Kumbhar, H. Heptullah, A. A. Khan, V. V. Gobre, S. P. Gejji, V. G. Puranik. Inorg. Chem. 50(2011)545.

Os valores de K_{sv} sugerem que os complexos induzem supressão da fluorescência indicando claramente que os complexos possuem uma considerável tendência a ligar-se com o DNA.^{214,215}

Tabela 5.12- Constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) de ligação aparente (K_{app}) e coeficiente de determinação da regressão linear (R^2) dos complexos $[Cu(Nar)(Fen)(OH_2)_2] \cdot ClO_4$ (17) e $[Cu(Hsp)(Fen)(OH_2)] \cdot ClO_4$ (18).

Composto	$K_{sv} (M^{-1})$	$K_{app}(M^{-1})$	* R^2
$[Cu(Nar)(Fen)(OH_2)_2] \cdot ClO_4$ (17)	$1,90 \times 10^4$	$1,59 \times 10^6$	0,9699
$[Cu(Hsp)(Fen)(OH_2)] \cdot ClO_4$ (18)	$1,36 \times 10^4$	$1,25 \times 10^6$	0,9766

* R^2 = Regressão Linear

Na literatura existem relatos de complexos de cobre(II) com ligantes intercaladores ao DNA que exibem atividade citotóxica frente às células tumorais A549. Por exemplo, o complexo $[Cu(TPQ)_2(H_2O)_2](ClO_4)_2$, (TPQ= tripiridoquinoxalina) revelou possuir citotoxicidade *in vitro* frente às células tumorais A549.²¹⁶ Por outro lado, o complexo $[Cu(Que)_2(H_2O)_2]$ contendo como ligante o flavonoide quercetina (Que), que apresenta semelhanças estruturais com complexos (17) e (18), inibe fortemente a proliferação das células A549. O composto induz lesões oxidativas relacionadas com a intercalação ao DNA, o que pode contribuir significativamente para o mecanismo de sua ação antitumoral por apoptose.²¹⁷

Neste sentido, os complexos (17) e (18) devem ser investigados como candidatos a fármacos antineoplásicos para o tratamento de adenocarcinoma do pulmão humano.

²¹⁴ P. Krishnamoorthy, P. Sathyadevi, A. H. Cowley, R. R. Butorac, N. Dharmaraj. Eur. J. Med. Chem. 46(2011)3376.

²¹⁵ M. Anjomshoa, M. Torkzadeh-Mahani. Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. 150(2015)390.

²¹⁶ V. M. Manikandamathavan, M. Kavitha, V. Uma, R. P. Parameswari, H. R. Vasanthi, B. U. Nair. Polyhedron. 30(2011)1604.

²¹⁷ J. Tan, B. Wang, L. Zhu. J. Biolog. Inorg. Chem. 14(2009)727.

5.2.4 Estudos de interação com a albumina do soro bovino (BSA) e com albumina do soro humano (HSA)

O estudo de interação entre macromoléculas biológicas com diversos compostos entre eles os complexos metálicos, tem se tornado de grande interesse para os pesquisadores durante nos últimos anos.²¹⁸ As albuminas de soro bovino (BSA) e a humana (HSA) têm sido amplamente empregadas para estudos biomiméticos, em razão a sua capacidade de transporte e armazenamento de compostos orgânicos e inorgânicos incluindo íons metálicos como o cobre(II).^{219,220} Esses estudos são considerados um modelo *in vitro* para estudar o comportamento das ambas albuminas e sua ligação a agentes terapêuticos, já que fornecem informação importante sobre o transporte e/ ou metabolismo.

As albuminas BSA e HSA estão constituídas por cadeias simples de aminoácidos e o microambiente da estrutura secundária da cadeia proteica pode ser alterado pela interação das proteínas com moléculas pequenas.²²¹ Neste trabalho foram estudadas essas alterações por meio de medidas de fluorescência e por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) para os compostos (17) e (18).

5.2.4.1 Estudos de interação com a Albumina Sérica Bovina (BSA) utilizando fluorescência

Albumina sérica bovina (BSA) está composta por 583 aminoácidos e exibe uma sequência homóloga de 80% e semelhança de 76% na estrutura terciária quando comparada a HSA.²²² BSA possui dois resíduos de triptofano que possuem fluorescência intrínseca: Trp-212 que está localizado dentro de uma cavidade hidrofóbica da proteína e Trp-134 sobre a superfície da molécula, ou seja na região hidrofílica,²²³ o triptofano, homólogo a HSA, encontra-se na posição 214. O Trp-134 possui 7 resíduos de tirosina (Tyr) próximos, que não apresenta o resíduo de Trp na posição 213 (Na HSA, o Trp-214 não tem resíduos de Tyr próximos). Ambas as

²¹⁸ T. Topală, A. Bodoki, L. Oprean, R. Oprean. Clujul. Med. 87(2014)215. doi: 10.15386/cjmed-357.

²¹⁹ G. Vignesh, S. Arunachalam, S. Vignesh, R. A. James. Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc. 96(2012)108.

²²⁰ R. A. Løvstad. Biometals. 15(2002)351.

²²¹ M. B. Moreira, D. S. Franciscato, K. C. F. Toledo, J. R. B. de Souza, H. S. Nakatani, V. R. de Souza. Quim. Nova. 38(2015)227.

²²² H. F. Crouse, J. Potoma, F. Nejrab, D. L. Snyder, B. S. Chohan, S. Basu. Dalton Trans. 41(2012) 2720.

²²³ A. Papadopoulou, R. J. Green, R. A. Frazier. J. Agric. Food Chem. 53(2005)158.

albuminas apresentam uma banda intensa e larga, centrada em 350 nm, quando excitadas em 280 nm, associada aos resíduos de triptofano,²²⁴ a tirosina e a fenilalanina²²⁵ com intensidade da emissão de fluorescência dos três resíduos de aminoácidos de 100:9:0,5.²²⁶ Os fragmentos de triptofano da BSA (Trp-134 e Trp-212) e HSA (Trp-214) (Figura 5.11)²²⁷ são os que apresentam emissão de fluorescência mais significativa, já que a fluorescência da tirosina é quase totalmente suprimida se ela estiver ionizada e o rendimento quântico da fenilalanina nas proteínas é baixo.^{227,228}

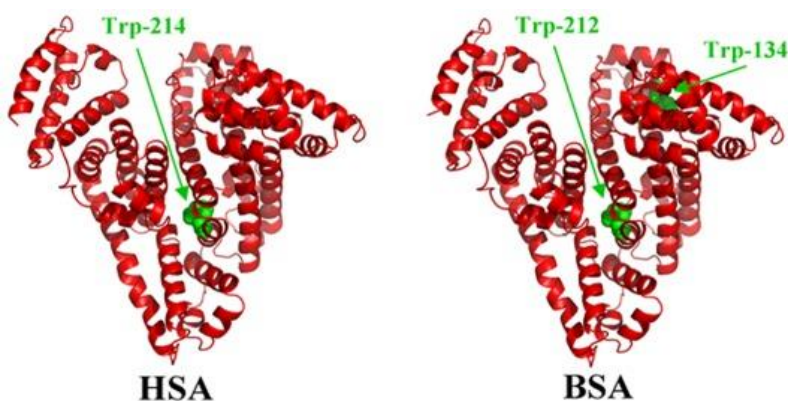


Figura 5.11- Estrutura tridimensional das albuminas BSA e HSA com os resíduos de triptofano de A. Belatik e colaboradores (A. Belatik e colaboradores. PLoS One. 7(2012)5e36723).²²⁷

Neste trabalho foi estudada a interação entre os complexos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2] \cdot \text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)] \cdot \text{ClO}_4$ (18) como também a interação de naringenina (Nar) (14), hesperetina (Hsp) (15) e 1,10-fenantrolina (Fen) (16) com a BSA. Nas condições experimentais a BSA apresentou uma banda intensa e larga na região de 350 nm, quando excitada em 280 nm. A adição de alíquotas de solução dos compostos testes levou a uma diminuição gradativa da intensidade dessa banda, como é observado na Figura 5.12. A variação da emissão na intensidade de

²²⁴ M. Ganeshpandian, R. Loganathan, E. Suresh, A. Riyasdeen, M. A. Akbarshad, M. Palaniandavar. Dalton Trans. 43(2014)1203.

²²⁵ C. Y. Gao, X. Qiao, Z. Y. Ma, Z. G. Wang, J. Lu, J. L. Tian, J. Y. Xu, S. P. Yan. Dalton Trans. 41(2012) 12220.

²²⁶ M. Ganeshpandian, R. Loganathan, S. Ramakrishnan, A. Riyasdeen, M. A. Akbarsha, M. Palaniandava. Polyhedron. 52(2013)924.

²²⁷ A. Belatik, S. Hotchandani, R. Carpentier, H. A. Tajmir-Riahi. PLoS One. 7(2012)5e36723.

²²⁸ D. Mahendiran, R. S. Kumar, V. Viswanathan, D. Velmurugan, A. K. Rahiman. Dalton Trans. 45(2016)7794.

fluorescência é devida às mudanças conformacionais no ambiente proteico próximo aos resíduos dos aminoácidos, em especial, aos fragmentos de triptofano.²²¹ Em vista disso, pode-se supor que os compostos sob estudo interagem com a proteína.

A partir da equação de Stern-Volmer modificada (Seção 2.5.1), construiu-se o gráfico de $\log[(I_0-I)/I]$ em função do logaritmo da concentração do composto, para os sistemas BSA/compostos teste e foram determinados a constante de associação (K_b) e o número de sítios ligação (n), apresentados na Tabela 5.13.

A constante de associação (K_b) tem relação com o grau de interação entre os compostos e a proteína BSA. Os valores de K_b para (14), (15), (17) e (18) estão na ordem de 10^5 e 10^6 M^{-1} , comparáveis com alguns relatos na literatura que indicam uma forte interação com a proteína. Por exemplo para os complexos: $[\text{CuL}(\text{Fen})_2](\text{NO}_3)$,²²⁹ onde L=fenilcarbohidrazona derivada de 2-oxoindolina, $K_b=1,25 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, e para o complexo $[\text{CuL}(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})] \cdot (\text{H}_2\text{O})$,²³⁰ onde L= base de Schiff derivada de fenilcarbohidrazona, $K_b= 1,24 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Por outro lado, Singha Roy e colaboradores²³¹ relatam um complexo de cobre(II) com o flavonoide quercetina com um K_b na ordem de 10^5 M^{-1} com as proteínas BSA e HSA, comparável aos valores encontrados para (17) e (18), que também apresentam um flavonoide na sua estrutura.

É oportuno salientar que vários fármacos e moléculas bioativas pequenas ligam-se reversivelmente à BSA com valores de K_b na ordem de 10^4 e 10^6 M^{-1} . Dessa forma, pode-se inferir que os compostos de estudo podem ser facilmente transportados pela proteína.²³²

²²⁹ S. Anbu, A. Paul, R. Ravishankaran, M. F. C. Guades da Silva, A. A. Karande, A. J. L. Pombeiro. *Inorg. Chim. Acta.* 423(2014)183.

²³⁰ S. Anbu, A. Paul, A. P.C. Ribeiro, M. F. C. Guades da Silva, M. L. Kuznetsov, A. J. L. Pombeiro. *Inorg. Chim. Acta.* 450(2016)426.

²³¹ A. Singha Roy, D. R. Tripathy, A.K. Ghosh, S. Dasgupta. *J. Lumin.* 132(2012)2943.

²³² N. M. Urquiza, M. S. Islas, S. T. Ariza, N. Jori, J. J. Martinez Medina, M. J. Lavecchia, L. L. López Tévez, L. Lezama, T. Rojo, P. A. Williams, E. G. Ferrer. *Chem. Biol. Interac.* 229(2015)64.

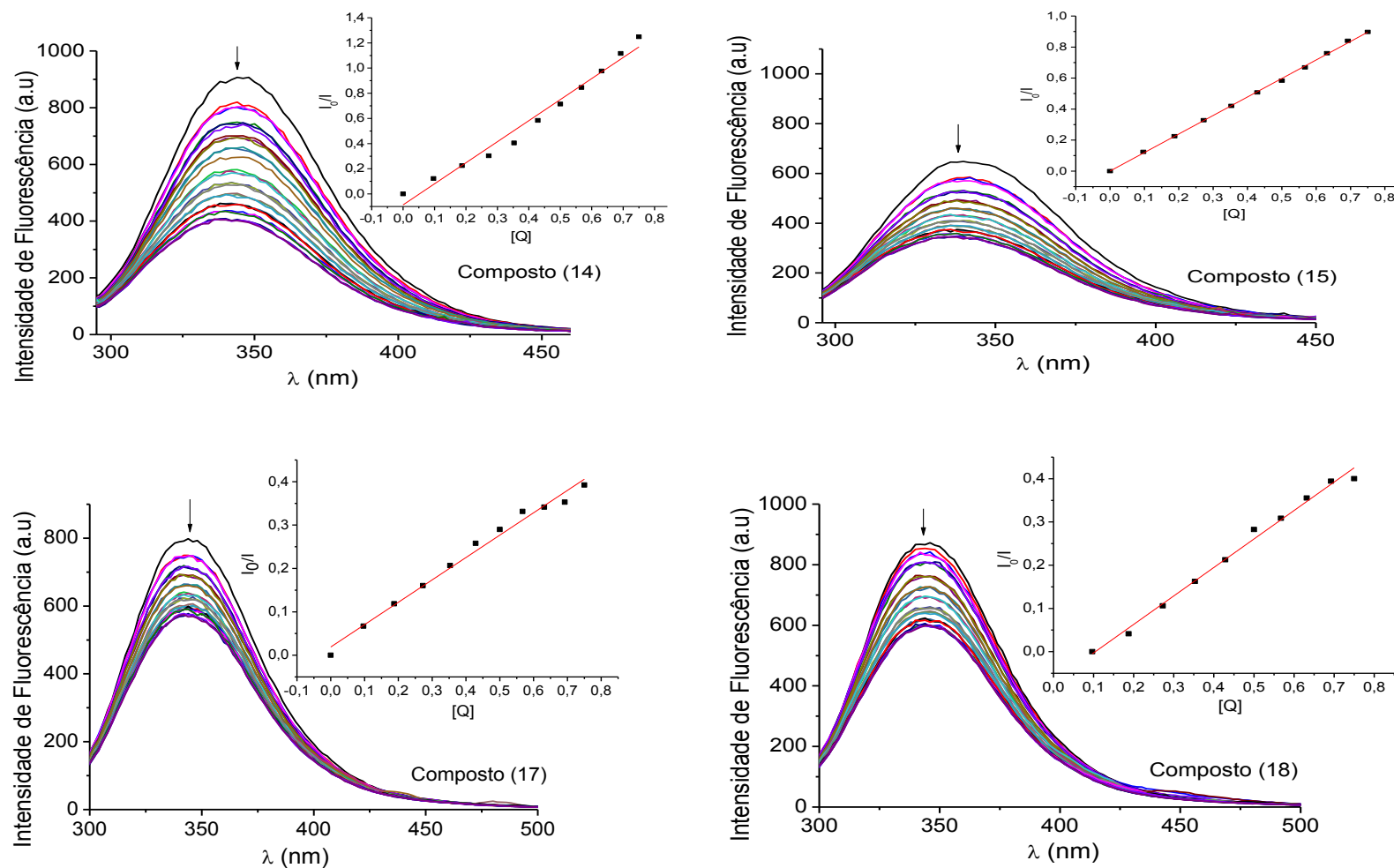


Figura 5.12- Espectros de emissão de BSA na presença de concentrações crescentes dos compostos naringenina (Nar) (14), hesperetina (Hsp) (15), $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2] \cdot \text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)] \cdot \text{ClO}_4$ (18) (esquerda). Reta inserida: $[(I_0-I)]$ vs [composto] dos composto (14), (15), (17) e (18). $\{[\text{BSA}] = 2,0 \mu\text{M}$ e $[\text{composto}] = 0 - 0,75 \mu\text{M}$, a 25°C . $(\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}; \lambda_{\text{emi}} = 342 \text{ nm})$.

Em geral, os valores obtidos de n (número de ligação com a BSA) são próximos a um, indicando que houve um sítio de ligação dos compostos em estudo à proteína BSA. Como foi dito anteriormente a BSA possui dois resíduos de triptofano, o Trp-212 localizado numa cavidade hidrofóbica e o Trp-134 que se encontra sobre a superfície da molécula.²²³ A emissão de fluorescência é principalmente do Trp-212 porque o Trp-134 está mais exposto a um ambiente hidrofílico e sua fluorescência pode ser suprimida por moléculas de água.²¹² Por esse motivo podemos considerar que os compostos testes se ligam à BSA possivelmente ao resíduo Trp-212 localizado na cavidade hidrofóbica do sub domínio II.¹⁶⁶

Tabela 5.13- Constantes de ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n) obtidos para os compostos naringenina (Nar) (14), hesperetina (Hsp) (15), $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18).

Composto	n	$K_b \text{ (M}^{-1}\text{)}$	$*R^2$
naringenina (14) /BSA	1,6	$6,8 \times 10^5$	0,981
$[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17)/BSA	0,9	$5,4 \times 10^5$	0,995
hesperetina (15) /BSA	0,9	$1,2 \times 10^6$	0,993
$[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18)/BSA	1,6	$9,1 \times 10^5$	0,964

*Regressão Linear

A aplicação da equação de Stern-Volmer descrita no item 2.5.1 permite calcular a constante de supressão (K_{sv}) e constante de velocidade de supressão bimolecular K_q da proteína em presença dos compostos testes. Existem dois principais processos que podem ser atribuídos à supressão da fluorescência: a supressão estática,²³³ formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor e a supressão dinâmica,²¹⁴ consiste na desativação da fluorescência pela colisão do fluoróforo com o supressor.

Os valores de K_{sv} e K_q para os compostos testes estão listados na Tabela 5.14. Observou-se que os valores de K_{sv} e K_q para os complexos (17) e (18) são menores quando comparados com os valores de naringenina (Nar) (14) e hesperetina (Hsp) (15). O valor de K_{sv} significa a capacidade dos compostos testes em suprimir a intensidade de fluorescência da proteína, que é uma medida de afinidade dos compostos para ligar-se à proteína.¹⁶⁶ Para os sistemas compostos teste/BSA os valores de K_{sv} encontram-se na ordem de magnitude de 10^5 e 10^6 M^{-1} , comparáveis com alguns complexos descritos de cobre(II) como

²³³ J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy. Second Ed., Plenum Press, New York, 1999.

[Cu(TPMP)(Fen)NCS],²³⁴ onde TPMP = 5-metil-4-(4-metil-benzoil)-2-fenil-2,4-dihidro-pirazol-3-ona com $K_{sv} = 0,21 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, o que segundo a literatura indica uma forte interação com a proteína.²³⁵

A constante de velocidade de colisão de difusão (K_q) representa a probabilidade de colisão entre os compostos e a proteína. O valor máximo de K_q esperado para um processo de colisão por difusão é $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.²³² Se K_q for maior que esse valor o processo de supressão é considerado estático, formação de um complexo não fluorescente entre a albumina e os compostos testes. Na Tabela 5.14 observou-se que os valores obtidos são maiores do que $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e encontram-se na ordem de magnitude de $10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para os complexos de cobre(II) e $10^{14} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para a naringenina e hesperetina, indicando assim que é um processo de supressão estático.^{166,214}

Tabela 5.14- Constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de velocidade de supressão (K_q) e coeficientes de determinação da regressão linear (R^2) obtidas para os compostos [Cu(Nar)(Fen)(OH₂)₂].ClO₄ (17) e [Cu(Hsp)(Fen)(OH₂)].ClO₄ (18), naringenina (Nar) (14), hesperetina (Hsp) (15).

Composto	$K_{sv} (\text{M}^{-1})$	$K_q (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	* R^2
naringenina (14)/BSA	$1,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^{14}$	0,977
[Cu(Nar)(Fen)(OH ₂) ₂].ClO ₄ (17)/BSA	$5,1 \times 10^5$	$5,1 \times 10^{13}$	0,986
hesperetina (15)/BSA	$1,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{14}$	0,999
[Cu(Hsp)(Fen)(OH ₂)].ClO ₄ (18)/BSA	$6,6 \times 10^5$	$6,6 \times 10^{13}$	0,991

*Regressão Linear

²³⁴ K. M. Vyas, R. N. Jadeja, D. Patel, R. V. Devkar, V. K. Gupta. Polyhedron. 80(2014)20.

²³⁵ A. Pascual-Álvarez, T. Topala, F. Estevan, F. Sanz, G. Alzuet-Piña. Eur. J. Inorg. Chem. (2016)982.

5.2.4.2 Estudos de interação com a Albumina Sérica Bovina (BSA) e Albumina Sérica Humana (HSA) por ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

A interação entre os complexos (17) e (18) com BSA e HSA foi acompanhada por meio de espectroscopia de RPE. A Figura 5.13 mostra os espectros de RPE do sal CuCl_2 na presença equimolar das albuminas BSA e HSA. Os espectros, característicos de simetria axial, apresentam uma superposição dos dois sítios de ligação (linhas hiperfinas assinaladas como 1 e 2 da região $g_{\parallel}$). Percebe-se na região $g_{\perp}$ uma superposição das linhas dos dois sítios. Os espectros de BSA e HSA apresentam semelhança e os sítios de ligação ao íon cobre(II) estão ocupados a uma razão molar 1:1, como já foi relatado por Patel e colaboradores.²³⁶ Os espectros de RPE complexos de cobre-albuminas foi simulado utilizando EasySpin¹⁹³ e os parâmetros são listados na Tabela 5.15.

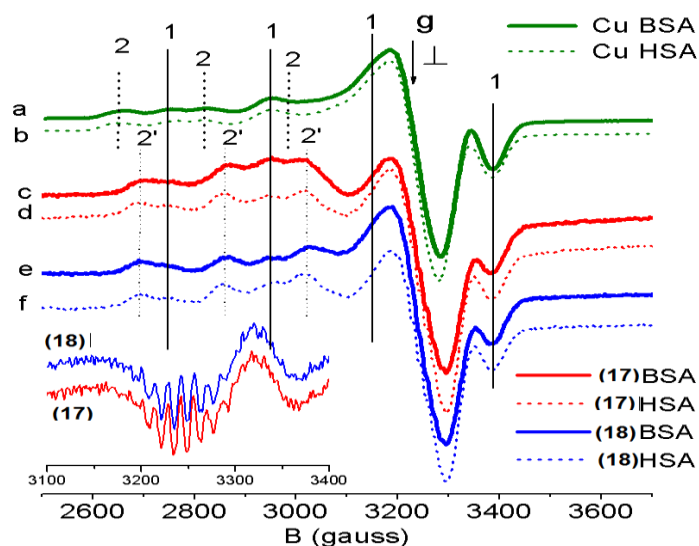


Figura 5.13- Espectros de RPE dos compostos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2] \cdot \text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)] \cdot \text{ClO}_4$ (18) na presença de BSA e HSA. As soluções dos compostos testes e das albuminas (BSA ou HSA) foram preparadas a $0,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão de fosfato 0,010 M pH 7,4. Os espectros de RPE foram obtidos operando em banda X a 77 K.

²³⁶ R. N. Patel, K. B Pandeya. Indian J. Biochem. Biophys. 37(2000)251.

Tabela 5.15- Parâmetros de RPE dos compostos $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)_2]\cdot\text{ClO}_4$ (17) e $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]\cdot\text{ClO}_4$ (18) na presença de BSA e HSA.

Composto		$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ (MHz)
$[\text{CuCl}_2(\text{Fen})]$		2,07	2,29	497 (155 G)
Cu(BSA) ou Cu(HSA)	sítio 1	2,05	2,19	601 (196 G)
	sítio 2	2,07	2,30	505 (157 G)
(17)-(BSA) e (18)-(BSA)/ ou (17)-(HSA) e (18)-(HSA)	sítio 1	2,05	2,19	612 (200 G)
	sítio 2'	2,064	2,27	534 (168 G)

A Figura 5.13 mostra os espectros de RPE dos complexos (17) e (18), na presença de quantidades equimolares de BSA e HSA. Os espectros dos compostos (17) e (18) também apresentam superposição das linhas de ambos os sítios de ligação (linhas hiperfinas identificadas como 1 e 2 da região $g_{\parallel}$). Observou-se ao comparar os espectros da Figura 5.13 com o espectro de RPE em solução dos complexos (Figura 5.4, item 5.1.2), que os complexos binucleares foram completamente dissociados em presença das albuminas.

Na Figura 5.13 pode-se observar que a linha 1 apresenta a mesma posição em ambos os complexos, indicando o mesmo sítio de ligação ao sítio 1 no nitrogênio terminal de BSA e HSA, sugerindo o mesmo ambiente de ligação. Este efeito pode ser devido ao deslocamento de um ou dos dois ligantes pelo nitrogênio terminal da proteína para se ligar ao metal neste sítio.

As linhas hiperfinas do sítio 2 (linha denominada 2' em c, d, e e f) encontram-se deslocadas para campo mais alto ($g_{\parallel}$) em relação ao sítio de cobre(II) em ambas as albuminas.

A contribuição do sítio 2 é maior para os complexos (17) e (18) do que para o cobre(II) em ambas as albuminas. Os espectros também apresentam uma estrutura hiperfina de 7 linhas na região $g_{\perp}$ (ver o segundo espectro inserido na Figura 5.13), com uma constante de desdobramento superhiperfino $A_N = 13,6$ G, que pode ser causada pela interação dos átomos de nitrogênio. Uma vez que esta estrutura não aparece nos espectros da Figura 5.5 e no espectro cobre-albuminas Figura 5.13 (a, b), pode-se sugerir a formação de complexos de ligantes mistos envolvendo átomos de nitrogênio das proteínas. Os espectros dos complexos com as albuminas também apresentam incremento da população do sítio 2' em relação ao

sítio 1, indicando maior afinidade dos complexos (17) e (18) para se ligar ao segundo sítio de ligação que está relacionado com a Cys-34. A mudança nos parâmetros de RPE (Tabela 5.15) no sítio 2 confirma a formação de um complexo misto entre os complexos de estudo com o sítio 2 das albuminas. Concluiu-se que os complexos de estudo modificam os sítios de ligação com a proteína formando complexos mistos.

CAPÍTULO 6. HIDRAZONAS DERIVADAS DE 3-FORMIL-6-METILCROMONA.

Este capítulo trata da caracterização e dos testes biológicos das hidrazonas derivadas de 3-formil-6-metilcromona. Foram sintetizadas 3-formil-6-metilcromona-fenilhidrazona HCrPh (19) e 3-formil-6-metilcromona-*para*-cloro-fenilhidrazona HCrpClPh (20) usando o método descrito na seção 2.24 (Figura 6.1). As hidrazonas obtidas foram devidamente caracterizadas através da medida de temperaturas de fusão, análises termogravimétricas, espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C), mapas de contorno HMQC e HMBC e análise elementar. O composto HCrpClPh (20) apresenta meia molécula de água na sua estrutura, que foi confirmada por análise termogravimétrica (TG/DTG). Foram obtidos monocristais da hidrazona HCrpClPh (20) e a estrutura cristalina foi determinada por análise de difração de Raios-X.

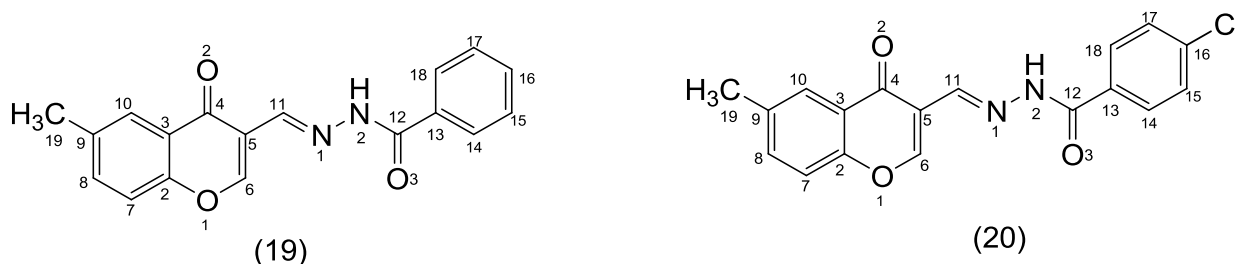


Figura 6.1- Estruturas de 3-formil-6-metilcromona-fenilhidrazona HCrPh (19) e 3-formil-6-metilcromona-*para*-cloro-fenilhidrazona HCrpClPh (20) e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes.

6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS HIDRAZONAS DERIVADAS DE 3-FORMIL-6-METILCROMONA.

Os rendimentos das reações, temperaturas de fusão, análise elementar e massa molar dos compostos sintetizados encontram-se na Tabela 6.1.

Tabela 6.1- Temperatura de fusão, análise elementar*, massa molar e rendimentos das reações para 3-formil-6-metilcromona-fenilhidrazona HCrPh (19) e 3-formil-6-metilcromona-*para*-cloro-fenilhidrazona HCrpClPh (20).

Composto	Temp. de fusão (°C)	% C	%H	%N	MM (g/mol)	Rend. (%)
HCrPh (19)	188- 189	71,36 (70,58)	4,88 (4,61)	9,15 (9,10)	306,31	88,6
HCrpClPh·0,5H ₂ O (20)	218 -220	60,39 (61,81)	4,38 (4,03)	7,79 (8,01)	349,76	89,3

*Valores teóricos entre parênteses

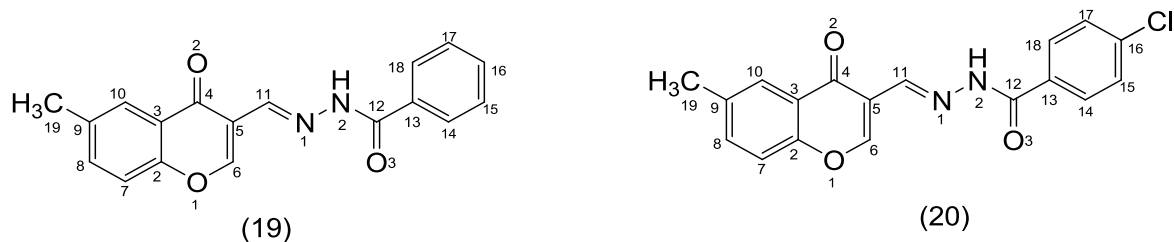
6.1.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho das hidrazonas (19) e (20) foram obtidos na região de 4000 a 400 cm⁻¹ em pastilhas de KBr. As bandas mais características das hidrazonas encontram-se na Tabela 6.2.

Nos espectros de infravermelho (IV) das hidrazonas (19) e (20) (Figura 6.2) observou-se a 1640 e 1671 cm⁻¹ respectivamente a banda atribuída ao estiramento C=O da carbonila do anel pirano $\nu(\text{C=O})_{\text{pirano}}$.⁴⁸ Verificou-se a banda referente ao estiramento C=O da carbonila hidrazônica em 1640 cm⁻¹ sobreposta com banda do $\nu(\text{C=O})_{\text{pirano}}$ para o composto (19) e a 1645 cm⁻¹ para o composto (20).

A banda atribuída ao estiramento do grupo azometino $\nu(\text{C=N})$ é observada em 1622 e 1631 cm⁻¹ para os compostos (19) e (20) respectivamente. Observaram-se os estiramentos característicos das vibrações N-H em 3204 cm⁻¹ e 3249 cm⁻¹ para os compostos (19) e (20) respectivamente.

Tabela 6.2- Bandas selecionadas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das hidrazonas HCrPh (19) e HCrpClPh (20).



Composto	ν (C=O) hidrazona	ν (C=O) pirano	ν (C=N)	ν (N-H)
HCrPh (19)	1640 F	1640 F	1622 F	3204 m
HCrpClPh (20)	1645 F	1671 F	1631 F	3249 m

Intensidade: F= forte, m= média, f= fraca

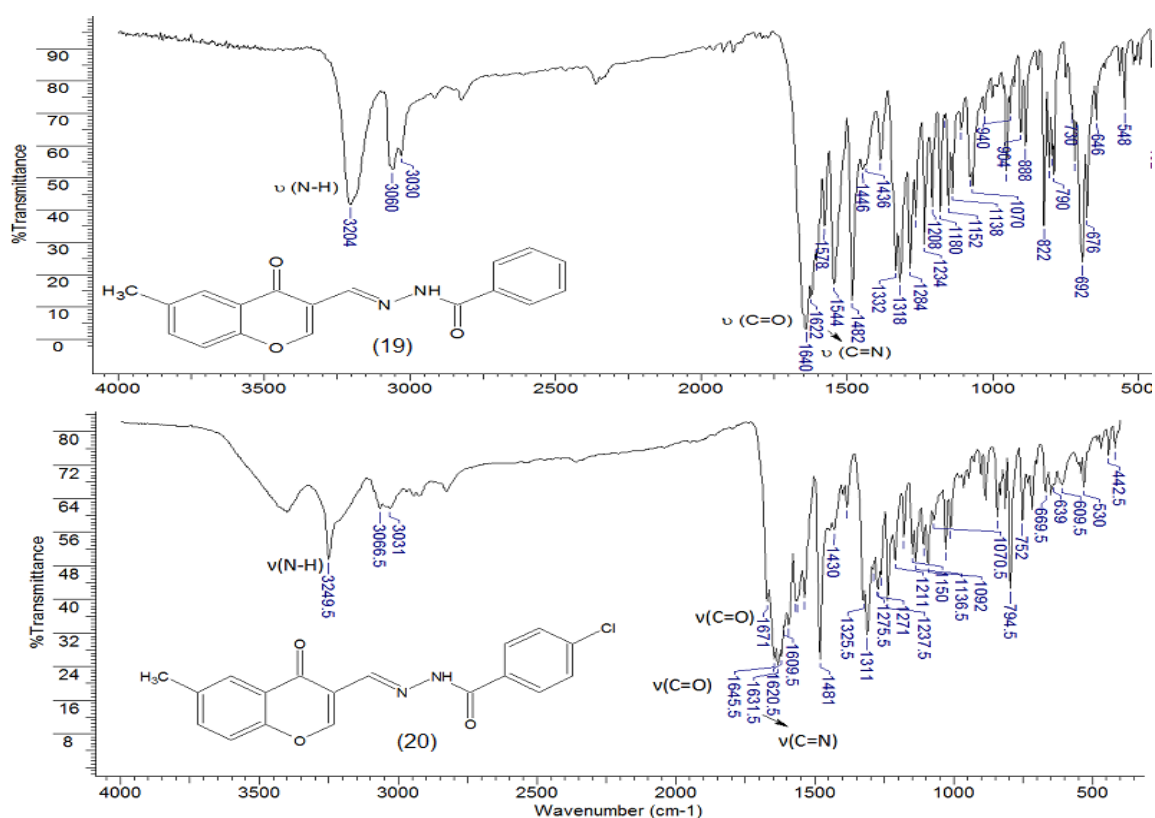


Figura 6.2- Espectros de absorção na região do Infravermelho para 3-formil-6-metilcromona-fenilhidrazona HCrPh (19) e 3-formil-6-metilcromona-*para*-cloro-fenilhidrazona HCrpClPh (20) em pastilhas de KBr.

6.1.2 Análises termogravimétrica

As curvas TG/DTG para o composto (20) apresentadas no Anexo A44 (pág. 183), foram registradas entre 25 e 750 °C, em atmosfera de nitrogênio com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹. Com as curvas TG/DTG foi possível verificar a presença de meia molécula de água na estrutura do composto HCrpClPh·0,5H₂O (20).

A análise das curvas TG/DTG indica um processo de perda de massa observado 32,06 °C e 100,40 °C para o composto (20) com perda de massa associadas de 2,57 %. Essa perda corresponde a uma porcentagem da perda de água calculada de 2,57 % indicando um processo de desidratação de meia molécula de água.

6.1.3 Ressonância Magnética Nuclear

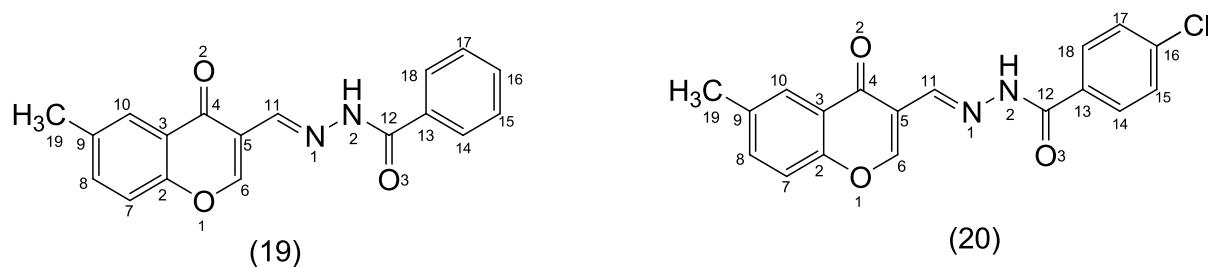
Os espectros de RMN dos compostos 3-formil-6-metilcromona-fenilhidrazona HCrPh (19) e 3-formil-6-metilcromona-*para*-cloro-fenilhidrazona HCrpClPh (20) foram feitos em DMSO-*d*₆. A numeração adotada para a atribuição dos átomos constituintes encontra-se na Figura 6.1.

No espectro de RMN de ¹H (Anexo A23 pág. 167) observaram-se dois simpletos em δ 11,90 e 11,97 para os compostos (19) e (20) respectivamente, integrando para um hidrogênio, que foram atribuídos ao N2-H. Em δ 8,63 para ambos os compostos foi observado um simpleto integrando para um hidrogênio referente ao H-10 do grupo azometino. Verificou-se a presença do grupo –CH₃ (H-19) das hidrazonas (19) e (20) em δ 2,44 e 2,45 respectivamente, como um simpleto integrando para três hidrogênios. As atribuições dos outros hidrogênios das hidrazonas foram realizadas com auxílio dos mapas de contorno HMQC, HMBC e encontram-se na Tabela 6.3.

No que concerne aos espectros de RMN de ¹³C (Anexo A24 pág. 168) das hidrazonas (19) e (20) foram confirmados todos os carbonos esperados para as estruturas (Tabela 6.4). Os carbonos do grupo metila foram atribuídos em δ 20,45 e 20,43 para os compostos (19) e (20) respectivamente. Os sinais que correspondem ao C-11 do grupo azometino nas hidrazonas (19) e (20) observaram-se em δ 140,49 e 140,94. As carbonilas hidrazônicas em C-12 foram atribuídas em δ 162,99 e 161,82, como também as carbonilas do anel pirona C-4 em δ 174,93 e 174,91 para as hidrazonas (19) e (20) respectivamente. As atribuições de RMN

de ^{13}C foram realizadas com o auxílio dos mapas de contornos HMBC e subespectro DEPT 135.

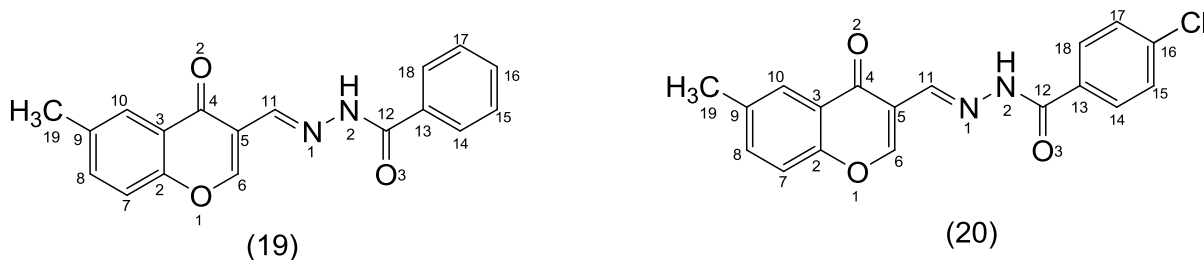
Tabela 6.3- Atribuições, deslocamentos químicos e constantes de acoplamento J [], multiplicidade^a dos principais sinais de RMN de ^1H das hidrazonas (19) e (20).



Atribuições	HCrPh (19)	HCrpClPh (20)
N2-H	11,90 (s)	11,97 (s)
H-6	8,78 (s)	8,80 (s)
H-11	8,63(s)	8,63 (s)
H-14, H-18	-----	7,95 (d) [8,32Hz]
H-10	7,94 (s)	7,92 (s)
H-8	7,91 (d) [4,80 Hz]	7,67 (d) [8,60 Hz]
H-7	7,65 (d) [10,3 Hz]	7,63 (s)
H-15, H-17	-----	7,60 (d) [7,90 Hz]
H-14, H-15, H-16,	7,62 - 7,50 (m)	-----
H-17 e H-18		
H-19 (CH ₃)	2,43 (s)	2,45 (s)

^aInformações sobre multiplicidade se encontram entre parêntesis. s=simpleto; d=dupleto; t=tripleto; m=multiplero, ss= sobreposição de sinais.

Tabela 6.4- Atribuições e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ^{13}C das hidrazonas (19) e (20).



Atribuições	HCrpPh (19)	HCrpClPh (20)
C-12	162,99	161,82
C-13	133,19	136,59
C-14, C-18	128,41	129,47
C-15, C-17	127,58	128,49
C-16	118,44	131,83
C-11	140,49	140,94
C-5	118,17	118,06
C-6	154,25	154,49
C-2	154,04	154,12
C-7	135,63	135,66
C-8	124,37	118,54
C-9	123,05	123,05
C-10	124,39	124,37
C-3	135,68	135,74
C-4	174,93	174,91
C-19	20,45	20,43

6.1.4 Estruturas cristalográficas

O cristal do composto HCrpClPh-DMSO (20a) foi obtido pela evaporação lenta em DMSO- d_6 , o que justifica a presença desse solvente na estrutura cristalina do composto. A Figura 6.3 mostra o diagrama ORTEP da estrutura resolvida do composto.

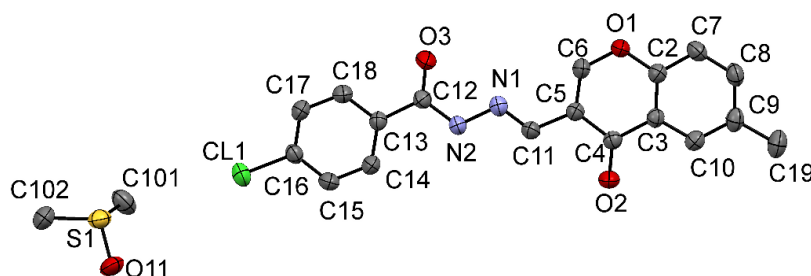


Figura 6.3- Representação ORTEP da estrutura molecular de 3-formil-6-metilcromona-*para*-cloro-fenilhidrazona HCrpClPh-DMSO (20a). Elipsoides com 50% de probabilidade; os átomos de hidrogênio foram omitidos para obter maior clareza nas imagens.

O composto (20a) cristalizou-se no sistema triclinico, grupo espacial P-1, com duas moléculas por célula unitária ($Z = 2$). O valor da distância de ligação C12=O3 de 1,267(3) Å é característico de ligação dupla [C=O (1,22Å)]. A distância de ligação C11=N1 é de 1,217(3) Å característico de ligação dupla [C=N (1,28Å)]. A distância de ligação N1-N3 tem o valor 1,384(2), intermediário entre uma ligação simples N-N (1,45Å) e uma ligação dupla N=N (1,25Å).²³⁷ Os dados cristalográficos e de refinamento encontram-se no Anexo (Tabelas A38 a A41 pág. 179 e 180).

Interações de hidrogênio (Figura 6.4) envolvendo o átomo de oxigênio da molécula de DMSO a um átomo hidrogênio ligado ao nitrogênio N2 são observadas na molécula HCrpClPh DMSO (20a), com os seguintes parâmetros: $[d(N2 \cdots O11^i)] = 2,898(3)$ Å, $\angle(N2-H \cdots O11^i) = 170(2)^\circ$ (operador de simetria: $i = -x+1, -y+1, -z+1$).

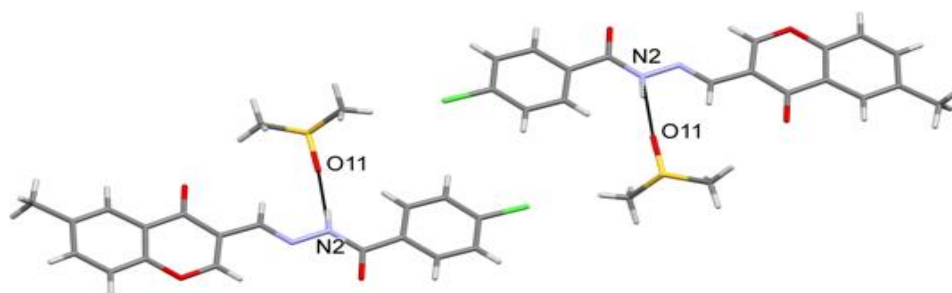


Figura 6.4- Visão das interações de hidrogênio para o composto HCrpClPh-DMSO (20a).

6.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

6.21 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição

As hidrazonas (19) e (20) foram testadas frente às bactérias *Gram*-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 49456), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Gram*-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Salmonella entérica* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e fungos leveduriformes: *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida*

²³⁷ L. C. Dias, G. M. de Lima, C. B. Pinheiro, B. L. Rodrigues, C. L. Donnici, R. T. Fujiwara, D. C. Bartholomeu, R. A. Ferreira, S. R. Ferreira, T. A. O. Mendes, J. G. da Silva, M. R. A. Alves. J. Molec. Struct. 1079(2015)298.

dubliniensis (Isolado clínico 28), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida lusitanae* (CBS 6936), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida tropicalis* (ATCC 750).

A determinação das concentrações inibitórias de 50% (IC₅₀) foi realizada de acordo com o procedimento descrito na parte experimental (2.3.1). Os resultados obtidos revelaram que as hidrazonas (19) e (20) não apresentam atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados.

6.2.2 Avaliação da atividade citotóxica

Os efeitos citotóxicos das hidrazonas (19) e (20) foram avaliados frente a células tumorais B16-F10 (melanoma murino) e frente a células não tumorais Melan-a (melanócito murino) nas concentrações 10⁻⁸ a 10⁻⁵ M. Neste teste foi usado como controle positivo o fármaco antitumoral cisplatina. As hidrazonas revelaram baixa citotoxicidade, reduzindo só ao redor do 20% da viabilidade celular a uma concentração de 10⁻⁶M (Figura 6.5).

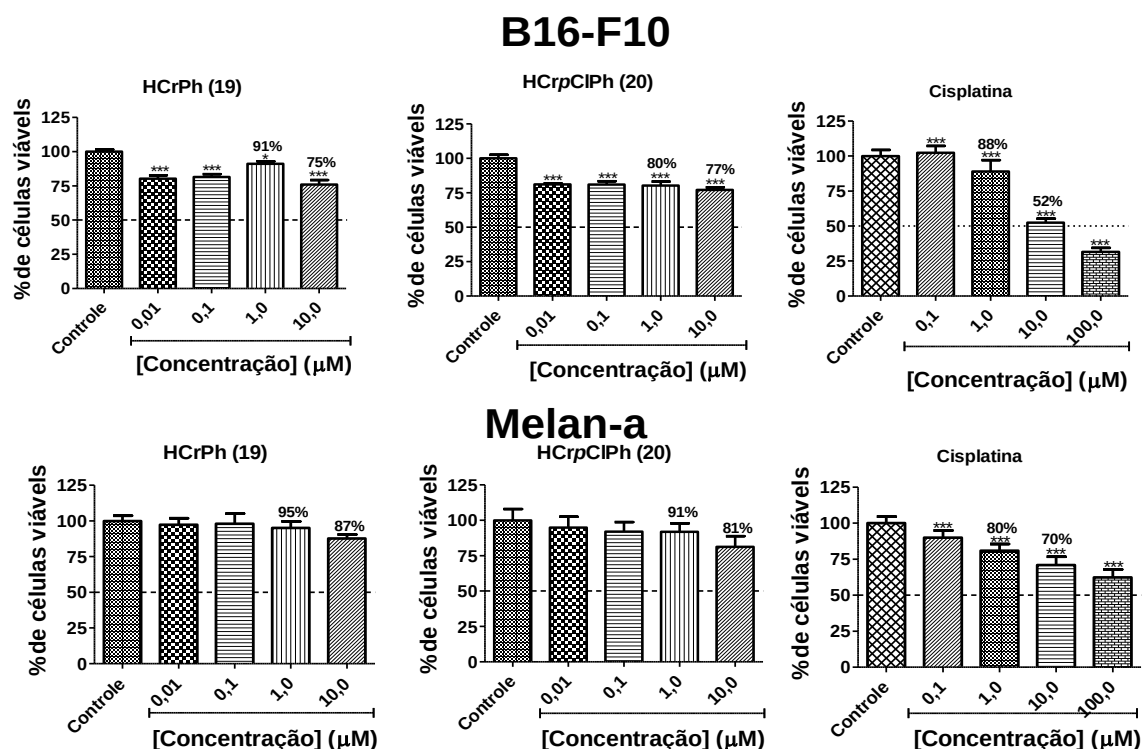


Figura 6.5- Atividade citotóxica de 3-formil-6-metilcromona-fenilhidrazona HCrPh (19) e 3-formil-6-metilcromona-*para*-cloro-fenilhidrazona HCrcPIPh (20) contra células B16-F10 (melanoma murino) e Melan-a (melanócito murino) (Viabilidade celular medida através do método MTT).

CAPÍTULO 7. COMPLEXOS DE PRATA(I) COM HIDRAZONAS DERIVADAS DE 3-FORMIL-6-METILCROMONA.

Este capítulo trata da caracterização dos complexos de prata(I) com os ligantes HCrPh (19) e HCrpClPh (20) e do estudo de suas atividades biológicas e de interações com o DNA e a albumina.

A análise elementar e as medidas de condutimetria indicam a formação de complexos de prata(I) com razão molar 1:2 (metal/ligante): nitrato de [*bis*(3-formil-6-metilcromona-fenilhidrazona)prata(I)]diidratado $[Ag(HCrPh)_2]NO_3 \cdot 2H_2O$ (21) e nitrato de [*bis*(3-formil-6-metilcromona-*para*-cloro-fenilhidrazona)prata(I)] $[Ag(HCrpClPh)_2]NO_3$ (22), contendo duas moléculas de hidrazonas na sua forma neutra e um nitrato como contra-íon (Figura 7.1).

O complexo $[Ag(HCrPh)_2]NO_3 \cdot 2H_2O$ (21) apresenta duas moléculas de água na sua estrutura, que foram confirmadas por análise termogravimétrica.

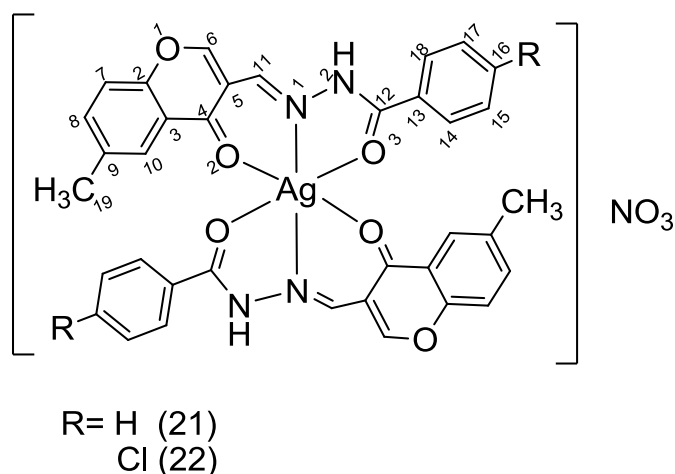


Figura 7.1- Estrutura dos complexos de prata(I) (21) e (22) com as hidrazonas derivadas de 3-formil-6-metilcromona e numeração adotada para atribuição dos átomos constituintes.

7.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE PRATA(I) DERIVADOS DE 3-FORMIL-6-METILCROMONA.

Os rendimentos das reações, as temperaturas de fusão, a análise elementar e as massas molares dos compostos sintetizados encontram-se na Tabela 7.1.

Tabela 7.1- Temperatura de fusão (°C), análises elementar*, condutimetria molar^a, massa molar e rendimentos das reações para [Ag(HCrPh)₂]₂NO₃·2H₂O (21) e [Ag(HCrpClPh)₂]₂NO₃ (22).

Composto	Massa molar (g/mol)	Temp. de fusão (°C)	% C	%H	%N	Λ _M ^a	Rend. (%)
[Ag(HCrPh) ₂] ₂ NO ₃ ·2H ₂ O (21)	818,53	162- 164	53,60 (52,82)	3,92 (3,94)	8,55 (8,56)	62,4	56,5
[Ag(HCrpClPh) ₂] ₂ NO ₃ (22)	851,39	213- 214	50,92 (50,79)	3,12 (3,08)	8,12 (8,23)	60,3	70,3

^aΛ_M: (Ω⁻¹cm²mol⁻¹) DMSO ~ 1,0 x 10⁻³ molL⁻¹ nos valores de condutividade tabelados já foi corrigido a condutividade do solvente. *Valores teóricos entre parênteses

7.1.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

As principais bandas no espectro de infravermelho (na região de 4000 a 400 cm⁻¹ em pastilhas de KBr) das hidrazonas e seus complexos de prata(I) encontram-se na Tabela 7.2. Visto que os compostos apresentam grande similaridade estrutural, será apenas mostrado o espectro do composto [Ag(HCrpClPh)₂]₂NO₃ (22) e seu respectivo ligante (20) (Figura 7.2). O espectro infravermelho para o [Ag(HCrPh)₂]₂NO₃ (21) (Anexo A13 pág. 156).

Nos espectros de infravermelho (IV) das hidrazonas livres (19) e (20), a banda atribuída ao estiramento C=O da carbonila do anel pirano em 1640 e 1671 cm⁻¹ respectivamente, deslocam-se para 1672 e 1662 cm⁻¹ nos espectros dos complexos, sugerindo a coordenação pelo átomo de oxigênio.⁵⁵

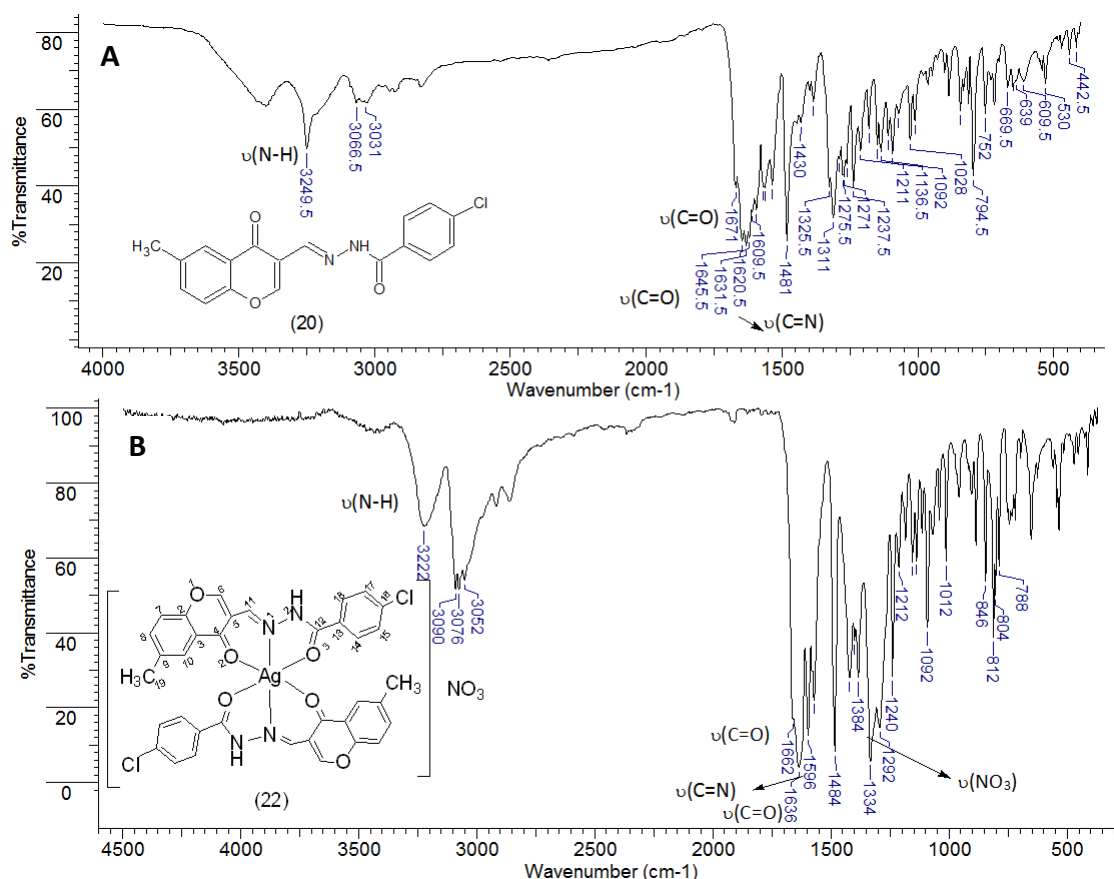


Figura 7.2- Espectros de absorção na região do Infravermelho de HCrpClPh (20) (A) e de seu complexo [Ag(HCrpClPh)₂](NO₃) (22) (B) em pastilhas de KBr.

A banda referente ao estiramento C=O da carbonila hidrazônica encontra-se sobreposta em 1640 cm⁻¹ com banda do $\nu(\text{C=O})_{\text{pirano}}$ para o composto (19) e observou-se a 1645 cm⁻¹ para o composto (20). Nos espectros dos complexos de prata(I) são deslocadas a baixa frequência a 1624 e 1636 cm⁻¹ respectivamente, sugerindo a coordenação do íon metálico ao oxigênio deste grupo. As bandas referentes ao estiramento N-H nos espectros dos complexos (21) e (22) foram observadas em 3198 e 3222 cm⁻¹ mostrando que após a complexação não ocorre desprotonação da ligação N-H, que também é confirmada pelos espectros de RMN ¹H, que serão discutidos no item 7.1.3.

A banda atribuída ao estiramento do grupo azometino $\nu(\text{C=N})$ observada em 1622 e 1631 cm⁻¹ para as hidrazonas livres, deslocam-se a 1598 e 1596 cm⁻¹ para os complexos (21) e (22) respectivamente, sugerindo a coordenação pelo átomo de nitrogênio do grupo azometino.

A presença da vibração do grupo $\nu(\text{NO}_3)$ nos espectros dos complexos, é observada como uma banda de intensidade média em 1384 e 1386 cm^{-1} , que se encontra ausentes nos espectros dos ligantes livres, o que, junto com as medidas de condutividade molar em DMSO, confirmam sua presença como contra-íon nas estruturas proposta para os complexos (21) e (22).

Tabela 7.2-Bandas selecionadas nos espectros de infravermelho (cm^{-1}) das hidrazonas HCrPh (19), HCrpClPh (20) e seus complexos de prata(I) $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21) e $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22).

Composto	$\nu(\text{C}=\text{O})$ hidrazona	$\nu(\text{C}=\text{O})$ pirona	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{N}-\text{H})$	$\nu(\text{NO}_3)$
HCrPh (19)	1640 F	1640 F	1622 F	3204 m	
$[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21)	1624 F	1672 F	1568 F	3188 m	1386 m
HCrpClPh (20)	1645 F	1671 F	1631 F	3249 m	
$[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22)	1636 F	1662 F	1596 F	3222 m	1384 m

Intensidade: F= forte, m= média, f= fraca

7.1.2 Análise termogravimétrica

As curvas TG/DTG para o complexo (21) mostradas no Anexo A44 (pág. 183), foram feitas entre 25 e 750 $^{\circ}\text{C}$, em atmosfera de nitrogênio, com taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Com as curvas TG/DTG foi possível corroborar a presença de moléculas de água na estrutura do complexo. A análise das curvas TG/DTG indica um processo de perda de massa observado em 80,93 $^{\circ}\text{C}$ a 174,31 $^{\circ}\text{C}$ para o complexo (21) com perdas de massa de 4,67 % (calculado: 4,39%), indicando desidratação de duas moléculas de água para o composto (21).

7.1.3 Ressonância Magnética Nuclear

Os complexos de prata(I) com hidrazonas derivadas de 3-formil-6-metilcromona foram caracterizados por RMN de ^1H , ^{13}C , subespectro DEPT 135, COSY H-H, HMQC e HMBC. Todos os espectros foram obtidos em DMSO- d_6 . As atribuições de todos os sinais nos espectros de RMN ^1H dos complexos (21) e (22) encontram-se listados nas Tabelas 7.3 e 7.4. Observou-se que os principais sinais atribuídos nos espectros de RMN de ^1H dos complexos apresentam pequenos deslocamentos químicos ao comparar com os ligantes livres o que é esperado para um metal d^{10} como a prata(I).

Dado que os complexos (21) e (22) apresentam semelhança estrutural, será mostrado o espectro de RMN de ^1H (Figura 7.3) para o complexo $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22), o espectro do (21) encontra-se no Anexo A25 pág. 169 .

Nos espectros de RMN de ^1H dos complexos, verificou-se um pequeno deslocamento de todos os sinais de hidrogênio das hidrazonas, sugerindo, portanto, a coordenação ao íon metálico. É importante salientar que no espectro dos complexos observaram-se os simpletos integrando para dois hidrogênios, que foram atribuídos ao N2-H, confirmando que não ocorre desprotonação da ligação N-H, o que também é verificado pelos espectros de infravermelho que já foram discutidos. As atribuições dos outros hidrogênios foram realizadas com auxílio dos mapas de contorno HMQC e HMBC. No Anexo A29 (pág.173) encontra-se o mapa de contorno HMQC do composto (22).

Nos espectros de RMN de ^{13}C dos complexos (21) e (22) (Anexos A26, A27 pág. 170 e 171) os sinais atribuídos aos carbonos C-12 ($\text{C}=\text{O}_{\text{hidrazona}}$), C-4 ($\text{C}=\text{O}_{\text{pirona}}$) e C-11 ($\text{C}=\text{N}$) sofrem pequenos deslocamentos a campo baixo, ou seja, apresentam menor densidade eletrônica, sugerindo que a coordenação das hidrazonas ao íon metálico, ocorre através do sistema quelante $\text{O}_{\text{hidrazona}}-\text{N}_{\text{azometino}}-\text{O}_{\text{pirona}}$. Os outros sinais são apresentados nas Tabelas 7.5 e 7.6. Os subespectros DEPT 135 auxiliaram a identificar os sinais de carbonos ligados a apenas um hidrogênio e os carbonos quaternários, já que não aparecem no espectro. O Anexo A28 (pág. 172) mostra o subespectro DEPT 135 para o composto (22).

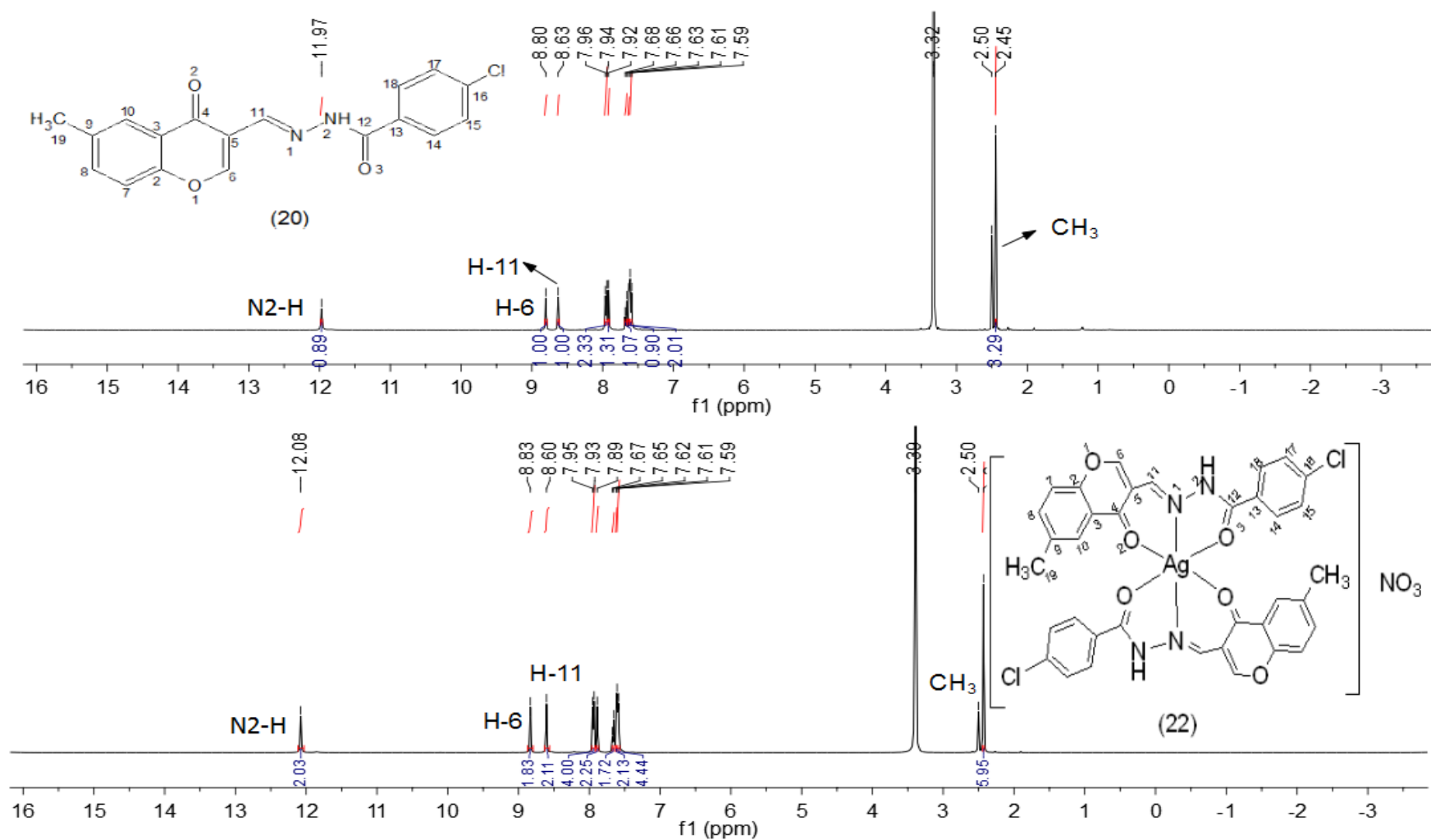


Figura 7.3- Espectros de RMN ^1H (400 MHz em $\text{DMSO-}d_6$) do ligante livre HCpClPh (20) e o complexo $[\text{Ag}(\text{HCpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22).

Tabela 7.3- Atribuições, deslocamento químico (δ , ppm), constantes de acoplamento J [Hz] e multiplicidades dos principais sinais de RMN ^1H da hidrazona HCrPh (19) (400 MHz) e de seu complexo de prata(I) $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21) (400 MHz), em $\text{DMSO}-d_6$.

Atribuições	$\delta(\text{ppm})$, HCrPh (19)	$\delta(\text{ppm})$, $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21)	$\Delta\delta$ (ppm)
N2-H	11,90 (s)	12,00 (s)	-0,1
H-6	8,78 (s)	8,83 (s)	-0,05
H-11	8,63(s)	8,63 (s)	0
H-10	7,94 (s)	7,94 (s)	0
H-8	7,91 (d) [4,80 Hz]	7,92 (s)	-0,01
H-7	7,65 (d) [10,30 Hz]	7,68 (d) [8,30 Hz]	0,01
H-14, H-15, H-16, H-17 e H-18	7,62 - 7,50 (m)	7,61- 7,51 (m)	0,01
H-19 (CH_3)	2,43 (s)	2,44 (s)	-0,01

Tabela 7.4- Atribuições, deslocamento químico (δ , ppm), constantes de acoplamento J [Hz] e multiplicidades dos principais sinais de RMN ^1H da hidrazona HCrcpClPh (20) (400 MHz) e de seu complexo de prata(I) $[\text{Ag}(\text{HCrcpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22) (400 MHz), em $\text{DMSO}-d_6$.

Atribuições	$\delta(\text{ppm})$, HCrcpClPh (20)	$\delta(\text{ppm})$, $[\text{Ag}(\text{HCrcpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22)	$\Delta\delta$ (ppm)
N2-H	11,97 (s)	12,08 (s)	-0,11
H-6	8,80(s)	8,83 (s)	-0,03
H-11	8,63(s)	8,60 (s)	-0,03
H-14, H-18	7,95 (d) [8,32Hz]	7,94 (d) [8,30 Hz]	0,01
H-10	7,92 (s)	7,89 (s)	0,03
H-8	7,67 (d) [8,60 Hz]	7,66 (d) [8,50 Hz]	0,01
H-7	7,63 (s)	7,62 (s)	0,01
H-15, H-17	7,60 (d) [7,90 Hz]	7,60 (d) [8,30 Hz]	0,00
H-19 (CH_3)	2,45 (s)	2,43 (s)	0,02

Tabela 7.5- Atribuições, deslocamento químico (δ , ppm) dos principais sinais de RMN ^{13}C e subespectro DEPT 135 da hidrazona HCrPh (19) (100 MHz) e de seu complexo de prata(I) $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21) (100 MHz), em $\text{DMSO-}d_6$.

Atribuições	DEPT 135	$\delta(\text{ppm})$, HCrPh (19)	$\delta(\text{ppm})$, $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21)	$\Delta\delta$ (ppm)
C-12	---	162,99	163,18	-0,19
C-13	---	133,19	133,70	-0,51
C-14, C-18	↑	128,41	128,49	-0,08
C-15, C-17	↑	127,58	127,62	-0,04
C-16	↑	118,44	118,49	-0,05
C-11	↑	140,49	141,21	-0,72
C-5	---	118,17	118,06	0,11
C-6	↑	154,25	154,88	-0,63
C-2	---	154,04	154,08	-0,04
C-7	↑	135,63	135,88	-0,25
C-8	↑	124,37	124,44	-0,07
C-9	---	123,05	123,06	-0,01
C-10	↑	124,39	124,44	-0,05
C-3	---	135,68	135,70	-0,02
C-4	---	174,93	175,06	-0,13
C-19	↑	20,45	20,44	0,01

Tabela 7.6- Atribuições, deslocamento químico (δ , ppm) dos principais sinais de RMN ^{13}C e subespectro DEPT 135 da hidrazona HCrcIPh (20) (100 MHz) e de seu complexo de prata(I) $[\text{Ag}(\text{HCrcIPh})_2]\text{NO}_3$ (22) (100 MHz), em $\text{DMSO-}d_6$.

Atribuições	DEPT 135	$\delta(\text{ppm})$, HCrcIPh (20)	$\delta(\text{ppm})$, $[\text{Ag}(\text{HCrcIPh})_2]\text{NO}_3$ (22)	$\Delta\delta$ (ppm)
C-12	---	161,82	162,25	-0,43
C-13	---	136,59	136,88	-0,29
C-14, C-18	↑	129,47	129,61	-0,14
C-15, C-17	↑	128,49	128,69	-0,2
C-16	---	131,83	131,69	0,14
C-11	↑	140,94	141,76	-0,82
C-5	---	118,06	118,61	-0,55
C-6	↑	154,49	155,31	-0,82
C-2	---	154,12	154,07	0,05
C-7	↑	135,66	135,96	-0,3
C-8	↑	118,54	117,99	0,55
C-9	---	123,05	123,07	-0,02
C-10	↑	124,37	124,48	-0,11
C-3	---	135,74	135,86	-0,12
C-4	---	174,91	175,06	-0,15
C-19	↑	20,43	20,51	-0,08

7.1.4 Espectrometria de Massas por Ionização Electrospray (ESI-MS)

Os espectros de massas dos complexos $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21) e $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22), foram de primordial importância para compreender o comportamento dos complexos obtidos em solução. Foi realizada espectrometria de massas com ionização por electrospray no modo positivo (ESI-MS) para os complexos (21) e (22), em solução de DMSO. As análises dos complexos (21) e (22) na Tabela 7.7.

No espectro do composto $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21) (Anexo A46 pág.185) é observado um pico com relação massa/carga $m/z_{(\text{experimental})}$ 412,9143 como o sinal mais abundante, que foi atribuído à espécie $[\text{Ag}(\text{HCrPh})]^+$ compatível com a $m/z_{(\text{teórica})}$ 413,0050, da mesma maneira que o íon molecular da espécie $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]^+$ com $m/z_{(\text{experimental})}$ 719,1636 e $m/z_{(\text{teórica})}$ 719,1054.

O espectro de massas do complexo $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22) apresenta-se no Anexo A47 (pág.186), onde foi observado um pico com relação $m/z_{(\text{experimental})}$ 446,9411 referente à espécie $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})]^+$ que corresponde com a $m/z_{(\text{teórica})}$ 446,9660. No espectro também pode-se observar a presença do íon molecular da espécie $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]^+$ com $m/z_{(\text{experimental})}$ 787,1027 e $m/z_{(\text{teórica})}$ 787,0275.

Tabela 7.7- Relação massa/carga (m/z) das espécies encontradas nos espectros de massas dos complexos de prata(I) $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21) e $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22).

Composto	Massa Molar (g/mol)	(m/z)*	
		$[\text{Ag}(\text{HL})_2]^+$	$[\text{Ag}(\text{HL})]^+$
$[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21)	818,53	719,1636 (719,1054)	412,9143 (413,0050)
$[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22)	851,39	789,0346 (789,0265)	448,9667 (448,9651)
HL = HCrPh (19) e HCrpClPh (20)		*experimental; (calculado)	

7.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

7.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição

A atividade antimicrobiana foi avaliada de acordo com o procedimento descrito no item 2.3.1. Os complexos $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21) e $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22) foram testados frente os seguintes micro-organismos:

- Bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 49456), *Bacillus cereus* (ATCC 11778) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313).
- Bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Salmonella entérica* (ATCC 14028) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).
- Fungos Leveduriformes: *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida dubliniensis* (Isolado clínico 28), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida lusitanae* (CBS 6936), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida tropicalis* (ATCC 750).

A determinação das concentrações inibitórias de 50% (IC₅₀) para as hidrazonas livres e seus complexos de prata(I) foi realizada com a finalidade de investigar, a capacidade de inibição *in vitro* do crescimento dos micro-organismos a serem testados. A atividade antimicrobiana dos compostos testes foi comparada com o nitrato de prata (AgNO₃), a sulfadiazina de prata, dois antibióticos ciprofloxacina e tetraciclina e dois antifúngicos, nitrato de miconazol e nistatina, utilizados como controles positivos.

Os resultados obtidos da avaliação da Concentração Inibitória de 50% do crescimento microbiano (IC₅₀) pelo método da microdiluição, com os valores de IC₅₀ em µmolL⁻¹ dos compostos de estudo frente aos micro-organismos são apresentados nas Tabelas 7.8 e 7.9. Na Tabela 7.8 pode-se observar que os compostos não apresentam atividade antibacteriana.

Os ligantes hidrazonas derivadas de 3-formil-6-metilcromona livres não apresentaram atividade frente aos fungos leveduriformes (Tabela 7.9). Após a complexação ao íon metálico a capacidade de inibição do crescimento dos micro-organismos melhora consideravelmente. De modo geral, o complexo [Ag(HCrPh)₂]NO₃·2H₂O (21) foi o mais ativo frente a todos os fungos leveduriformes testados, e mostrou melhor atividade frente à *Candida parapsilosis* com um IC₅₀ = 0,976 µmol L⁻¹ ao comparar com a sulfadiazina de prata IC₅₀= 24,28 µmolL⁻¹, o sal nitrato de prata IC₅₀= 32,81 µmolL⁻¹ e nistatina IC₅₀= 11,87 µmolL⁻¹. O complexo [Ag(HCrpClPh)₂]NO₃ (22) também apresentou atividade relevante frente à *Candida parapsilosis* com IC₅₀= 7,312 µmolL⁻¹ quando comparado com aos resultados de IC₅₀ para os fármacos de referência sulfadiazina de prata, o sal nitrato de prata e nistatina.

Por outro lado, o complexo (21) apresentou também atividade frente à *Candida dubliniensis* $IC_{50}= 11,22$ ao comparar com a sulfadiazina de prata $IC_{50}= 53,19 \mu\text{molL}^{-1}$. O complexo (21) mostrou ser ativo frente à *Candida tropicalis* com $IC_{50}= 23,54 \mu\text{molL}^{-1}$ quando comparado com o nitrato de prata $IC_{50}= 40,32 \mu\text{molL}^{-1}$.

Tabela 7.8- Valores de IC₅₀ (μmolL⁻¹) das hidrazonas derivadas de 3-formil-6-metilcromona (19), (20) e de seus complexos de [Ag(HCrPh)₂]NO₃·2H₂O (21) e [Ag(HCrpClPh)₂]NO₃ (22) frente a bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguinis* e Gram-negativas *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella entérica* e *Salmonella typhimurium*.

Composto	IC ₅₀ (μmolL ⁻¹)								
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella entérica</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
HCrPh (19)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
[Ag(HCrPh) ₂]NO ₃ ·2H ₂ O (21)	> 305,424	>152,712	>305,424	> 692,835	>305,424	>305,424	>305,424	>305,424	>305,424
HCrpClPh (20)	NA	NA	NA	NA	NA	> 734,32	NA	NA	NA
[Ag(HCrpClPh) ₂]NO ₃ (22)	> 692,835	NA	>692,835	>305,424	NA	> 692,835	> 692,835	NA	> 692,835
Nitrato de prata	> 367	> 183	>183	>367	>367	>183	>367	>367	>367
Ciprofloxacina	0,95 ± 0,06	0,62 ± 0,14	1,64 ± 0,23	1,70 ± 0,27	2,46 ± 0,32	<0,37	1,46 ± 0,19	0,52± 0,07	3,54± 0,92
Tetraciclina	0,33 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,61± 0,10	0,87 ± 0,07	0,61 ± 0,12	<0,55	0,53± 0,04	<0,27	0,60± 0,07

*NA= Não ativo

Tabela 7.9- Valores de IC₅₀ (μmolL⁻¹) das hidrazonas derivadas de 3-formil-6-metilcromona (19), (20) e de seus complexos de [Ag(HCrPh)₂]NO₃·2H₂O (21) e [Ag(HCrpClPh)₂]NO₃ (22) frente a fungos patogênicos *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis*, *Candida lusitaniae* e *Candida glabrata*.

Composto	IC ₅₀ (μmolL ⁻¹)					
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Candida glabrata</i>
HCrPh (19)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
[Ag(HCrPh) ₂]NO ₃ ·2H ₂ O (21)	> 38,178	0,976 ± 0,165	11,22± 0,69	23,54 ± 1,98	> 19,089	> 19,089
HCrpClPh (20)	NA	> 734,32	NA	> 734,32	NA	NA
[Ag(HCrpClPh) ₂]NO ₃ (22)	> 692,835	7,312 ± 1,175	>21,65	112,50 ± 2,21	> 43,302	> 43,302
Nitrato de prata	40,33 ± 1,46	32,81 ± 6,43	>11	40,32 ± 0,93	20,79 ± 1,76	64,24 ± 2,21
Sulfadiazina de prata	76,93± 2,48	24,28 ± 3,01	53,19 ± 2,69	>175	78,78 ± 1,21	46,91 ± 3,61
Nitrato de miconazol	5,84 ± 2,27	(8,0 ± 4) x10 ⁻³	1,58 ± 0,51	3,58 ± 0,27	< 0,062 x 10 ⁻³	19,50 ± 4,53
Nistatina	4,75 ± 1,24	11,87 ± 2,10	4,44 ± 0,76	7,87 ± 0,68	5,31 ± 0,84	1,92 ± 0,22

*NA= Não ativo

7.2.2 Avaliação da atividade citotóxica pelo método de 3-(4,5dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)

Nesse trabalho realizou-se um estudo preliminar do efeito citotóxico dos ligantes (19), (20) e dos complexos de prata(I) (21) e (22) nas concentrações 10^{-8} a 10^{-5} M, frente às duas linhagens celulares B16-F10 (melanoma murino) e Melan-a (melanócito murino não-tumorigênico). A cisplatina, foi utilizada como controle positivo. Os resultados são apresentados nas Figuras 7.4 e 7.5.

Como foi mencionado anteriormente as hidrazonas livres (19) e (20) não mostraram relevante atividade citotóxica frente às linhagens celulares testadas. Os complexos (21) e (22) foram mais citotóxicos nas células B16-F10 exibindo uma redução da viabilidade celular de 25 e 40% respectivamente (Figura 7.13), sendo o complexo (22) o que apresenta melhor atividade. O nitrato de prata mostrou redução da viabilidade celular de 9% a 10^{-6} M.

Os resultados sugerem que a complexação das hidrazonas derivadas de 3-formil-6-metilcromona com prata(I) promovem um aumento da atividade citotóxica. Além disso, observou-se que a citotoxicidade do $[Ag(HCrpClPh)_2]NO_3$ (22) a $10\ \mu M$ sobre células tumorais BF6-B10 é similar do que a cisplatina (Figura 7.4). É interessante mencionar que os complexos de prata(I) são menos ativos frente às células sadias Melan-a (Figura 7.5) em comparação com a cisplatina, indicando que os complexos provocam menos dano celular em células normais, o que é muito importante na busca de novos agentes quimioterápicos.

B16-F10

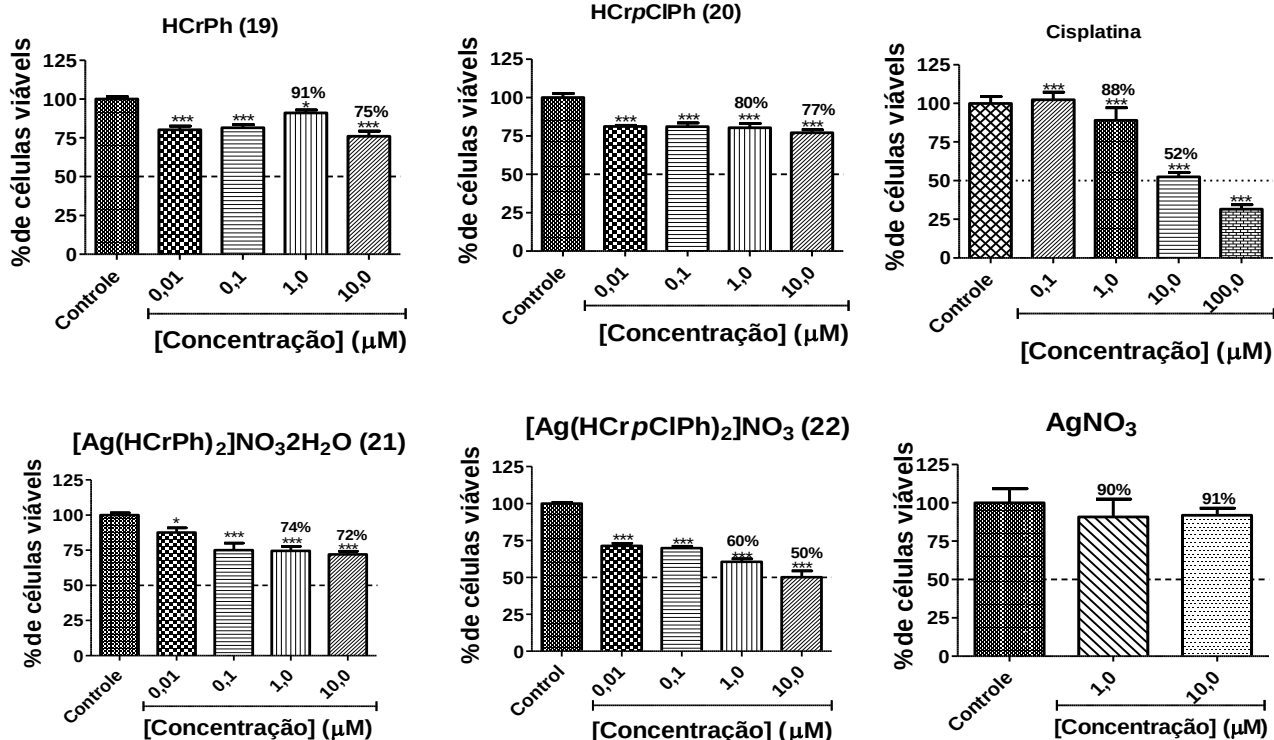


Figura 7.4- Efeito citotóxico das hidrazonas (19) e (20) derivadas de 3-formil-6-metilcromona e seus respectivos complexos de prata(I) (21) e (22) frente as linhagens celular BF6-B10 -a nas concentrações de 10^{-8} a 10^{-5} M. A sobrevivência celular foi medida pelo método MTT.

Melan-a

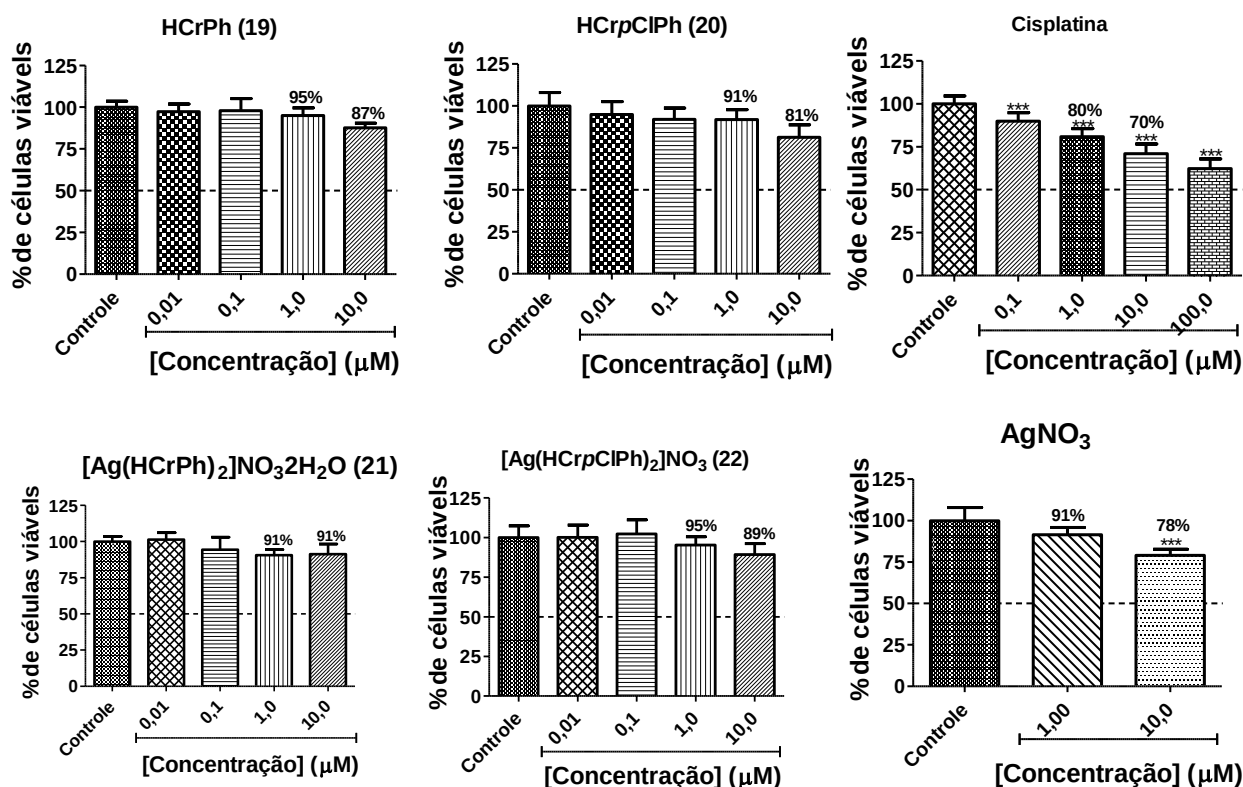


Figura 7.5- Efeito citotóxico das hidrazonas (19) e (20) derivadas de 3-formil-6-metilcromona e seus respectivos complexos de prata(I) (21) e (22) frente as linhagens celular Melan-a nas concentrações de 10^{-8} a 10^{-5} M. A sobrevivência celular foi medida pelo método MTT.

7.2.3 Estudos de ligação ao DNA

Com o propósito de entender os possíveis mecanismos de ação do complexo (22) realizou-se estudos de competição com o intercalador brometo de etídio (BE), o que será discutido a seguir.

7.2.3.1 Estudos de ligação do complexo [Ag(HCrpClPh)₂]NO₃ (22) ao DNA por método fluorimétrico

O brometo de etídio (BE) é um corante catiônico planar amplamente utilizado como uma sonda de fluorescência sensível para o DNA.²³⁸ O BE emite luz fluorescente

²³⁸ Y. Ma, G. Zhang, J. Pan. J. Agric. Food Chem. 60(2012)10867.

intensa na presença de DNA em razão de sua intercalação entre os pares de bases.^{239,240}

A técnica de competição baseia-se na diminuição da fluorescência do BE na presença de outro intercalador, indicando claramente que as moléculas do BE são deslocadas dos sítios de ligação do DNA e são substituídos pelos compostos teste.

No presente trabalho realizou-se o estudo de ligação competitiva entre o brometo de etídio (BE) e o complexo de prata(I) $[Ag(HCrpClPh)_2]NO_3$ (22) visto que este apresentou atividade citotóxica significativa sobre a linhagem celular BF6-B10.

Os espectros de fluorescência do BE-CT-DNA na presença do complexo (22) encontram-se na Figura 7.6 (λ_{emi} = 605 nm, λ_{exc} = 545 nm), onde pode-se observar claramente que após da adição do composto (22) a banda de emissão do BE ligado ao CT-DNA apresentou uma diminuição da intensidade de fluorescência, sugerindo que as moléculas BE foram substituídas pelo composto teste.

Na Tabela 7.10 são apresentados os valores das constantes de supressão da fluorescência (K_{sv}) e de ligação aparente (K_{app}) para o composto, obtidas utilizando as equações apresentadas no item 2.4.2. O valor de K_{app} é da ordem de 10^6 , sugerindo ligação ao DNA via intercalação,²¹³ o que indica que o composto é capaz de substituir as moléculas do BE ligado ao DNA.²¹⁴

Por outro lado, o valor de K_{sv} da ordem de 10^3 sugere possivelmente uma interação moderada com o DNA.

²³⁹ V. M. Leovac, M. V. Rodić, L. S. Jovanović, M. D. Joksović, T. Stanojković, M. Vujčić, D. Sladić, V. Marković, L. S. Vojinović-Ješić. Eur. J. Inorg. Chem. 5(2015)882. doi: 10.1002/ejic.201403050.

²⁴⁰ X. F. Zhao, Y. Ouyang, Y. Z. Liu, Q. J. Su, H. Tian, C. Z. Xie, J. Y. Xu. New J. Chem. 38(2014)955.

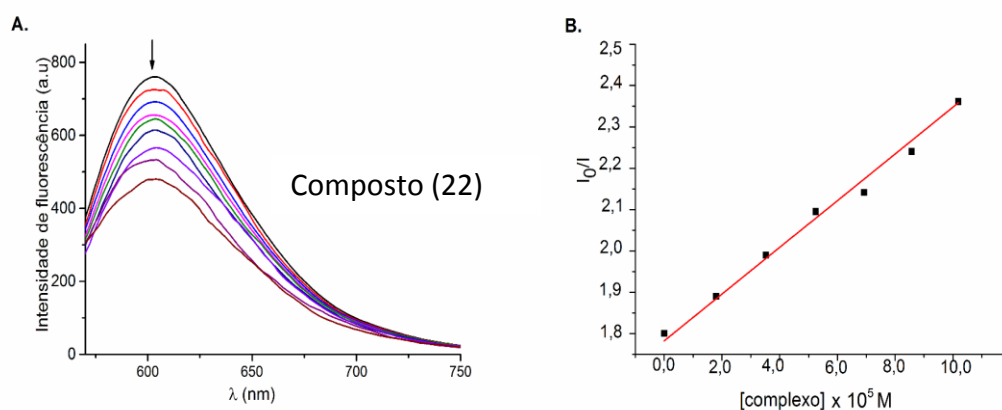


Figura 7.6- A. Espectros de emissão do BE-CT-DNA 10 μ M Tampão Tris-HCl, pH 7,20, T = 25 $^{\circ}$ C), na presença de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 μ M do complexo (22) **B.** Na direita gráficos de I_0/I vs $[Q]$. As setas indicam o sentido das mudanças na intensidade em função do aumento da concentração do composto. (λ_{emi} = 605 nm, λ_{exc} = 545 nm).

Tabela 7.10- Constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de (K_{app}) e coeficientes de determinação da regressão linear (R^2) obtidas para o complexo $[Ag(HCrpClPh)_2]NO_3$ (22).

Composto	$K_{sv} (M^{-1})$	$K_{app} (M^{-1})$	* R^2
$[Ag(HCrpClPh)_2]NO_3$ (22)	$5,6 \times 10^3$	$2,6 \times 10^6$	0,962

*Regressão Linear

7.3 Estudos de interação do complexo $[Ag(HCrpClPh)_2]NO_3$ (22) com a albumina sérica bovina (BSA) utilizando fluorescência

Neste trabalho realizou-se um estudo da ligação do complexo $[Ag(HCrpClPh)_2]NO_3$ (22) com a BSA mediante a análise dos espectros de fluorescência (Figura 7.7) e as equações descritas no item 2.5.1. A BSA apresenta uma banda intensa e larga na região de 350 nm, quando excitada em 280 nm. A adição de alíquotas de solução do composto teste provocou uma diminuição gradual da intensidade dessa banda. Essa variação é o resultado de alterações na conformação do ambiente da proteína particularmente nos fragmentos de triptofano BSA (Trp-134 e Trp-212), indicando que o composto avaliado apresenta interação com a proteína.^{221,222,223}

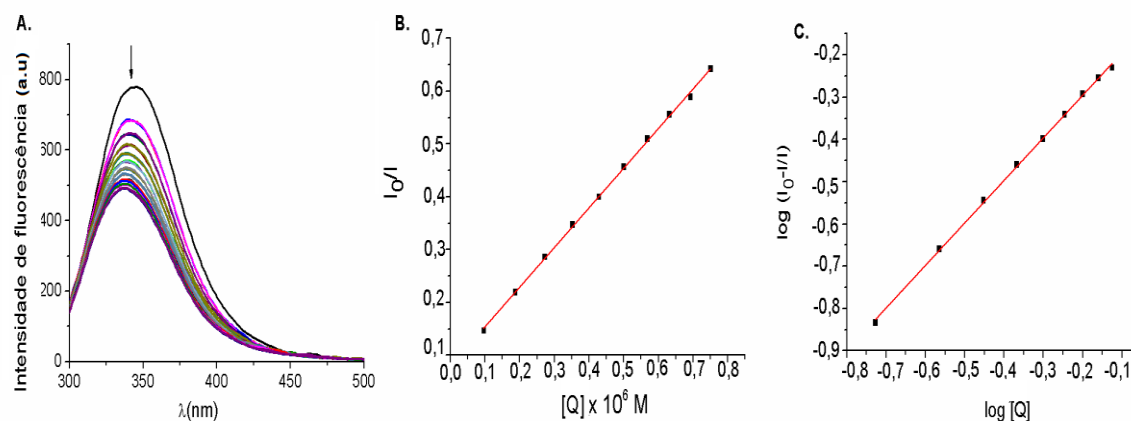


Figura 7.7- A. Espectros de emissão da BSA (2,0 μM , Tris-HCl, pH 7,2, T= 25 $^{\circ}\text{C}$) em presença de 0 – 0,75 μM do complexo $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22). A seta mostra a supressão da fluorescência após a adição de concentrações crescentes do complexo. B. Gráfico de (I_0/I) vs [complexo]. C. Gráfico de $(\log [(I_0-I)/I])$ vs $\log[\text{complexo}]$. ($\lambda_{\text{exc}} = 285$ nm; $\lambda_{\text{emi}} = 342$ nm).

Utilizando as equações citadas no item 2.5.1 foram determinadas as constantes de Stern-Volmer (K_{SV}), de velocidade de supressão (K_q), de ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n) que são listados nas Tabelas 7.11 e 7.12.

A constante de associação (K_b) está relacionada com a capacidade de interação dos compostos em estudo com a proteína BSA. O valor de K_b para composto (22) é da ordem de 10^6 M^{-1} (Tabela 7.12), comparável com alguns relatos na literatura que indicam uma forte interação com a proteína para $[\text{Ag}(2,9\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})_2](\text{NO}_3) \cdot \text{H}_2\text{O}$, que apresenta um valor de $K_b = 2,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.²⁴¹ É adequado ressaltar que vários fármacos e moléculas bioativas pequenas ligam-se à BSA com valores de K_b na ordem de 10^4 e 10^6 M^{-1} , podendo inferir que o complexo de prata(I) de estudo é capaz de ser transportado pela proteína.

O valor obtido de número de ligação com a BSA (n) do composto próximo a um indica um sítio de ligação à proteína BSA. Segundo a literatura sugere-se que os compostos estudados se ligam à BSA possivelmente ao resíduo Trp-212 localizado na cavidade hidrofóbica do sub domínio II.¹⁶⁶

²⁴¹ N. Shahabadi, M. Maghsudi, Z. Ahmadipour. Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc. 92(2012)184.

A constante de supressão (K_{sv}) e a constante de velocidade de supressão bimolecular K_q foram calculadas aplicando-se a equação de Stern-Volmer descrita no item 2.5. Os valores de K_{sv} e K_q para o composto avaliado encontram-se na Tabela 7.11.

Tabela 7.11- Constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), constante de velocidade de supressão (K_q) e coeficientes de determinação da regressão linear (R^2) obtidas para o composto $[Ag(HCrpClPh)_2]NO_3$ (22).

Composto	$K_{sv} (M^{-1})$	$K_q (M^{-1} s^{-1})$	* R^2
$[Ag(HCrpClPh)_2]NO_3$ (22)/ BSA	$7,5 \times 10^4$	$7,5 \times 10^{12}$	0,999

*Regressão Linear

Tabela 7.12- Constantes de ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n) obtidas para o composto $[Ag(HCrpClPh)_2]NO_3$ (22).

Composto	n	$K_b (M^{-1})$	* R^2
$[Ag(HCrpClPh)_2]NO_3$ (22)/BSA	1,0	$1,2 \times 10^6$	0,997

*Regressão Linear

O valor de K_{sv} é uma medida de afinidade dos compostos para ligar-se à proteína e relaciona-se à habilidade dos compostos em suprimir a intensidade de fluorescência da BSA.²⁴² Observou-se que o valor de K_{sv} (Tabela 7.11) para o composto avaliado se encontra na ordem de magnitude de $10^4 M^{-1}$ sugerindo que existe uma interação com a proteína. Este valor ligeiramente baixo pode ser atribuído a efeitos estéricos, resultando de pouca acessibilidade do complexo à BSA.²⁴³

K_q é a constante de velocidade de colisão de difusão e representa a probabilidade de colisão entre os compostos a serem avaliados e a proteína. O valor máximo de K_q esperado para um processo de colisão por difusão é $2,0 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$. Se K_q for maior que esse valor o processo de supressão é considerado estático, formação de um complexo não fluorescente entre a albumina e os compostos testes. Na Tabela 7.11 observou-se que o valor obtido para o complexo (22) foi maior do que $2,0 \times 10^{10}$

²⁴² A. Abedi, Z. Mehri Lighvan, S. Nasser Ostad. Monatsh Chem. 147(2016)1651. doi:10.1007/s00706-015-1652-z

²⁴³ M. Hong, H. Geng, M. Niu, F. Wang, D. Li, J. Liu, H. Yin. Eur. J. Med. Chem. 86(2014)550.

$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e encontra-se na ordem de magnitude de 10^{12} a $10^{14} \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, sugerindo tratar-se de um processo de supressão é estático, ou seja, formação de um complexo não fluorescente entre a albumina e $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22).²⁴⁴

²⁴⁴ M. Alagesan, N. S. P. Bhuvanesh, N. Dharmaraj. Dalton Trans. 42(2013)7210.

CAPÍTULO 8. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS.

O presente trabalho teve como objetivo geral o estudo de complexos de cobre(II) e prata(I) de ligantes contendo os grupos farmacofóricos estilbeno e cromona funcionalizados com um sistema quelante hidrazona. Foram também estudados complexos de cobre(II) de flavanonas, que também contêm um grupo cromona e que já são agentes quelantes e não foram submetidos a funcionalização. Complexos de cobre(II) são conhecidos por suas inúmeras bioatividades, enquanto aqueles de prata(I) são conhecidos por sua atividade antimicrobiana. No entanto, são poucos os estudos a respeito da atividade citotóxica de complexos de prata(I) contra células tumorais.

Foram sintetizadas as hidrazonas: *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-acetilhidrazona HStAc (1), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-fenilhidrazona HStPh (2), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-*para*-cloro-fenilhidrazona HStpClPh (3), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-*para*-nitro-fenilhidrazona HStpNO₂Ph (4), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-*para*-toluol-hidrazona HStpT (5), *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-benzilhidrazona HStBz (6) e *trans*-4-estilbenocarboxaldeído-*para*-hidroxi-fenilhidrazona HStpOHPh (7) assim como seus complexos de cobre(II): [Cu(HStAc)₂Cl₂] (8), [Cu(HStpClPh)₂Cl₂] (9), [Cu(HStpNO₂Ph)₂Cl₂] (10), [Cu(HStpT)₂Cl₂] (11), [Cu(HStBz)₂Cl₂] (12), [Cu(HStpOHPh)₂Cl₂] (13).

Uma vez que complexos do tipo [Cu(L)₂Cl₂] (L = ligante bidentado) podem apresentar isômeros e que não foi possível obter estruturas cristalográficas do complexos (8-13), foram realizados cálculos teóricos, tomando-se [Cu(HStAc)₂Cl₂] (8) como modelo, para se verificar quais seriam as estruturas dos complexos. No entanto, os cálculos revelaram que os diferentes isômeros apresentam energias muito próximas, tornando inviável determinar qual seria a estrutura mais provável.

Os ligantes (1) a (7) e os complexos (8) a (13) apresentaram fraca atividade antimicrobiana frente a bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas e frente a fungos leveduriformes do gênero *Candida*. Os ligantes e complexos mostraram fraca ação citotóxica a 1 µM.

As hidrazonas e seus complexos mostraram ser capazes de capturar *in vitro* espécies radicalares de nitrogênio (DPPH•) e oxigênio (•O₂⁻). O ligante (1) foi melhor na captura de radicais de nitrogênio a 320 µM. Os compostos (8) a (12) a 80 µM promovem a captura dos

radicais livres de DPPH• numa concentração mais baixa do que os ligantes livres. Os complexos [Cu(HStpClPh)₂Cl₂] (9) e [Cu(HStpT)₂Cl₂] (11) apresentam atividade sequestradora de DPPH• comparável com o controle positivo resveratrol a 80 µM, sugerindo que a ligação com o cobre(II) incrementa a atividade sequestradora.

No caso da atividade de captura de espécies reativas de oxigênio, a 80 µM o ligante (7) apresentou uma porcentagem de captura quase duas vezes superior ao controle, e os compostos (9) e (10) apresentaram as melhores atividades, sugerindo que a complexação faz aumentar a capacidade de captura de radicais.

O núcleo *trans*-estilbeno é capaz de fazer interações de tipo π-π stacking e se ligar às placas Aβ amiloides, marcadores da Doença de Alzheimer (DA). Considerando-se que hidrazonas derivadas de *trans*-4-estilbenocarboxaldeído apresentam atividade moderada na captura de espécies radicalares, e mostram fraca atividade antimicrobiana e citotóxica, esses compostos tornam-se interessantes como agentes quelantes de cobre(II) com aplicações como moduladores da agregação do peptídeo Aβ, com potenciais aplicações no tratamento da DA.

Os complexos [Cu(HStBz)₂Cl₂] (12) e [Cu(HStpOHPh)₂Cl₂] (13) interagem com as albuminas do soro bovino (BSA) e do soro humano (HSA) sugerindo que poderiam ser transportados por essas proteínas formando complexos mistos.

Os complexos [Cu(Nar)(Fen)(OH₂)]₂·2ClO₄·2H₂O (17) e [Cu(Hsp)(Fen)(OH₂)]₂·2ClO₄ (18) contendo naringenina (Nar) ou hesperetina (Hsp) e o co-ligante 1,10-fenantrolina foram obtidos e caracterizados por diferentes técnicas. A análise de seus espectros de RPE no estado sólido sugere que se trata de espécies binucleares. Em solução de DMSO a 77 K ocorre significativa redução da presença de dímeros, com predominância de espécies mononucleares. Sendo assim, consideramos que nos testes biológicos, realizados em DMSO/água a 37 °C, haveria essencialmente a presença de espécies mononucleares.

Os complexos (17) e (18) foram estudados quanto às suas atividades citotóxicas frente a células de carcinoma de pulmão A549 e não tumorais LL-24 (fibroblastos de pulmão humano) e HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). O complexo (18) exibe maior atividade citotóxica contra células A549, considerando que requer uma dose três vezes menor do que o complexo (17) para conseguir o mesmo efeito. O índice de seletividade (IS)

do complexo (18) calculado como IC_{50} sadia/ IC_{50} A549 é de 3 para células LL-24 e HUVEC, enquanto $IS = 1,5$ e $2,0$ para o complexo (17) nas mesmas linhagens celulares, sugerindo que (18) seria um melhor candidato a fármaco antitumoral.

Os complexos (17) e (18) provocam alterações morfológicas típicas de apoptose em células A549. No entanto, o complexo (18) apresenta um efeito mais potente do que o complexo de (17). A manutenção do potencial de membrana é fundamental para a função normal e sobrevivência das células. O tratamento de células A549 com os complexos (17) e (18) não foi capaz de reduzir o potencial de membrana mitocondrial, demonstrado que os complexos agem por indução de apoptose através de mecanismo independente de despolarização de mitocôndria. As células A549 tratadas com os complexos (17) e (18) apresentaram redução na produção de ROS, indicando que esses compostos exibem atividade antioxidante.

Embora a literatura contenha vários relatos que mostram que cobre(II), naringenina e hesperetina exibem propriedades antioxidantes com efeito de captura do radical superóxido, nas condições de teste, os compostos mostraram baixa capacidade de captura desses radicais *in vitro*, na ausência das células. O complexo (18) mostrou capacidade de captura de radicais DPPH (nitrogênio) semelhante ao resveratrol (72%).

Os dois complexos interagem com o DNA, provavelmente por meio de intercalação, uma vez que são capazes de competir com o agente intercalante brometo de etídeo. A presença do co-ligante 1,10-fenantrolina favorece a intercalação. O complexo $[Cu(Que)_2(H_2O)_2]$ contendo como ligante o flavonoide quercetina (Que), que apresenta semelhanças estruturais com complexos (17) e (18) e foi investigado por outros autores, inibe fortemente a proliferação das células A549 e induz lesões oxidativas relacionada com a intercalação ao DNA, o que pode contribuir significativamente para o mecanismo antitumoral por apoptose. Neste sentido, os complexos (17) e (18) devem ser investigados como candidatos a fármacos antineoplásicos para o tratamento de adenocarcinoma do pulmão humano.

Demonstramos que os complexos (17) e (18) interagem com as albuminas do soro bovino (BSA) e do soro humano (HSA), sugerindo que poderiam ser transportados por essas proteínas.

No presente trabalho foram também estudadas 3-formil-6-metilcromona-fenilhidrazona HCrPh (19) e 3-formil-6-metilcromona-*para*-cloro-fenilhidrazona HCpClPh (20), que contêm o núcleo benzo- γ -pirona, também presente nas flavononas. As hidrazonas (19) e (20) não apresentam atividade antimicrobiana frente a diferentes cepas de bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas e frente a cepas de fungos filamentosos e leveduriformes. Os compostos (19) e (20) revelaram baixa citotoxicidade frente a células tumorais B16-F10 (melanoma murino) e frente a células não tumorais Melan-a (melanócito murino).

Após a complexação à prata(I) com formação dos complexos $[Ag(HCrPh)_2]NO_3 \cdot 2H_2O$ (21) e $[Ag(HCpClPh)_2]NO_3$ (22) a atividade antibacteriana não aumenta, mas o efeito antifúngico melhora consideravelmente. De modo geral, o complexo (21) foi o mais ativo frente a todos os fungos leveduriformes testados, e mostrou melhor atividade frente a *Candida parapsilosis* com um valor de $IC_{50} = 0,976 \mu M$, significativamente inferior aos valores para sulfadiazina de prata $IC_{50} = 24,28 \mu M$, e nitrato de prata $IC_{50} = 32,81 \mu M$.

Os complexos (21) e (22) foram mais citotóxicos frente a células B16-F10 do que os ligantes livres, exibindo uma redução da viabilidade celular de 25 e 40% respectivamente, sendo o complexo (22) o que apresenta melhor atividade. Nas mesmas condições ($10^{-6} M$) a cisplatina induziu uma redução de apenas 11% da viabilidade celular e o nitrato de prata mostrou redução da viabilidade celular de 9%.

Os resultados sugerem que a complexação das hidrazonas derivadas de 3-formil-6-metilcromona com prata(I) promove um aumento da atividade citotóxica. Os complexos de prata(I) revelaram-se menos ativos frente às células saudáveis Melan-a em comparação com a cisplatina, indicando que provocam menos dano celular em células normais, o que é muito importante na busca de novos agentes quimioterápicos.

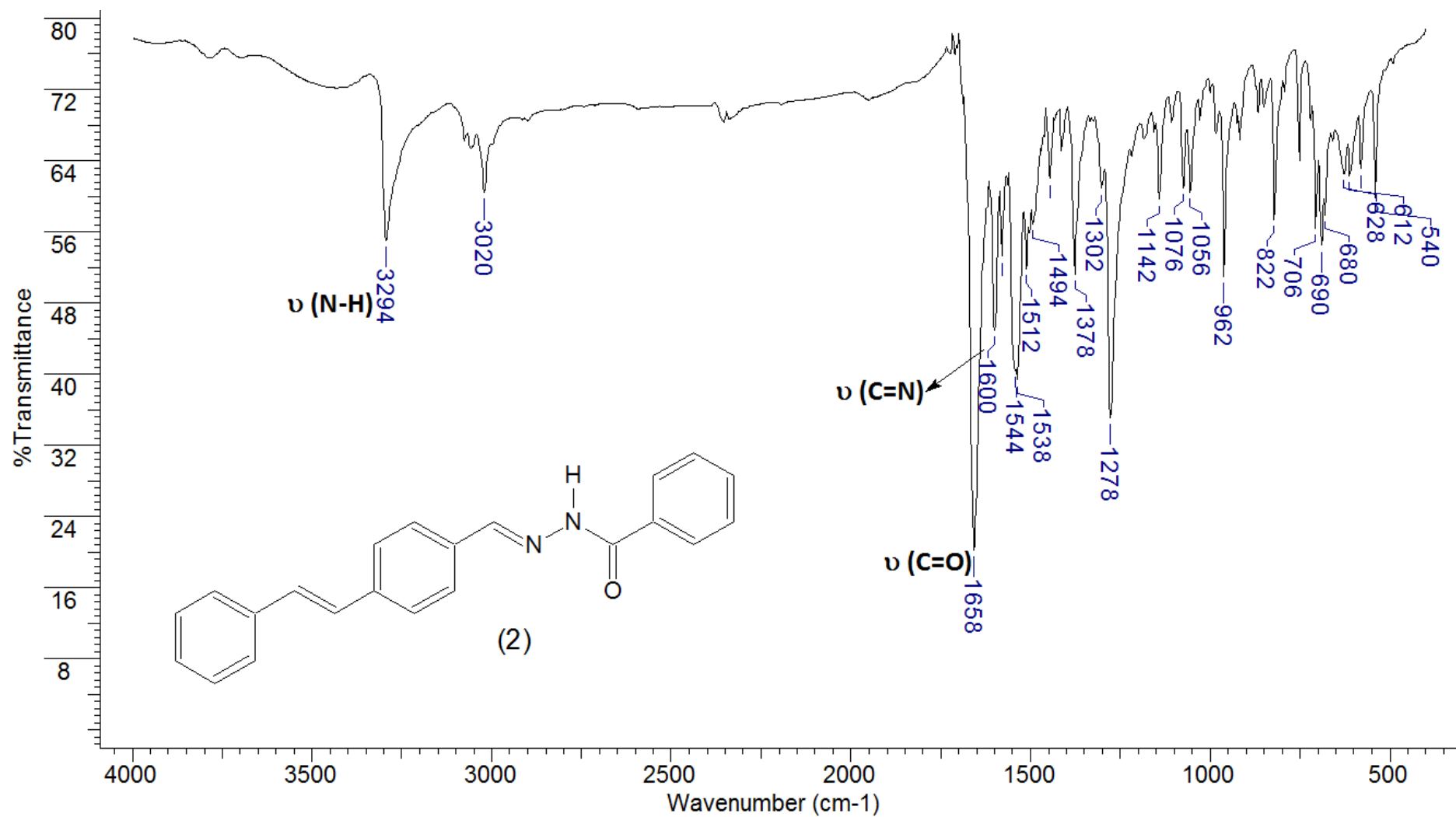
Os resultados sugerem que a coordenação à prata(I) constituiu importante estratégia para fazer aumentar a atividade citotóxica das hidrazonas frente a células tumorais sem contudo aumentar seu efeito citotóxico frente a células normais.

Estudos com o complexo (22) revelaram que este interage moderadamente com o DNA por um processo de intercalação, e que interage também com BSA.

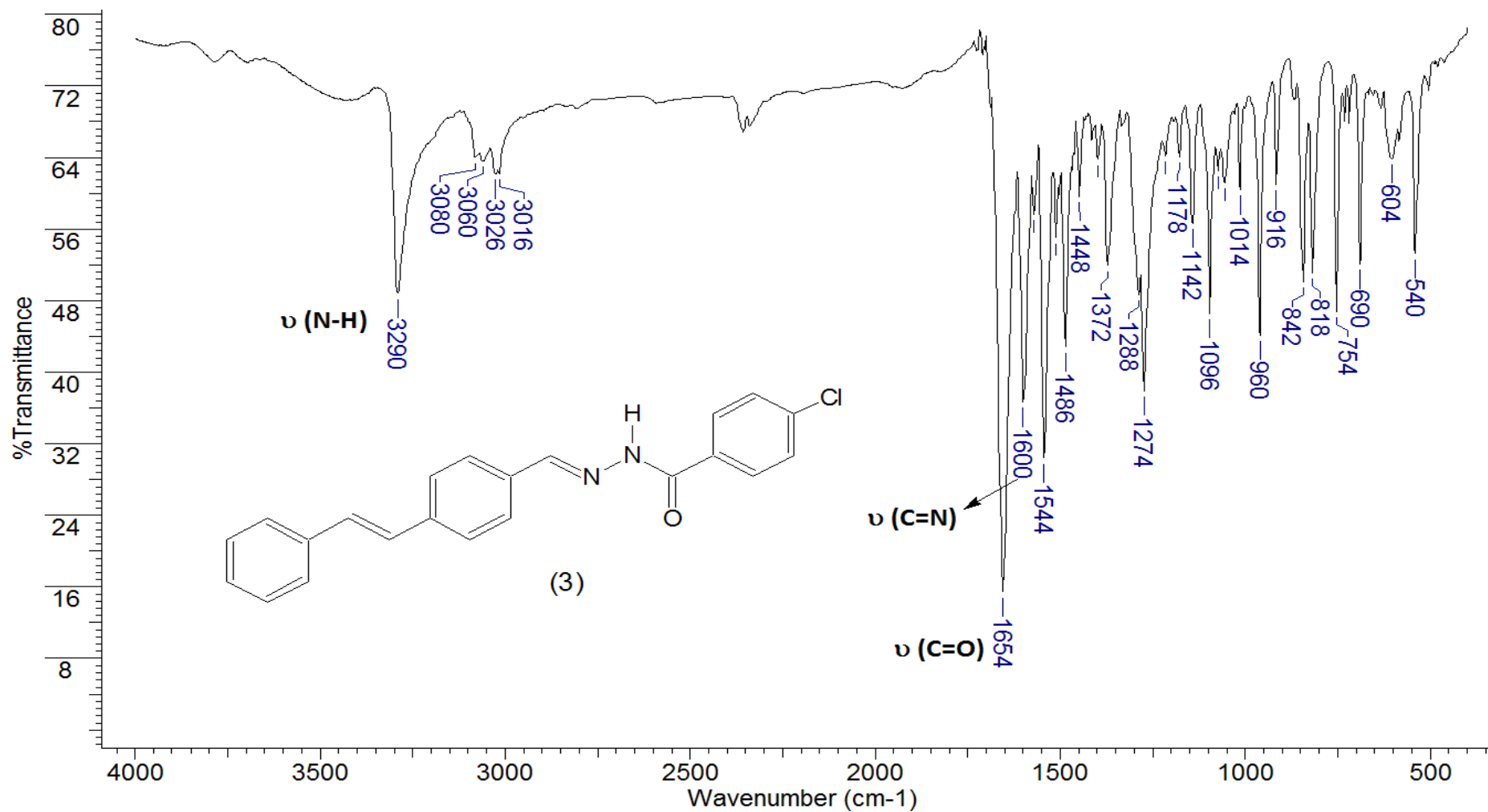
O presente trabalho representa uma importante contribuição à Química Medicinal Inorgânica na procura de novos compostos potencialmente úteis como candidatos a protótipos de fármacos e metalofármacos antimicrobianos e antitumorais.

ANEXOS

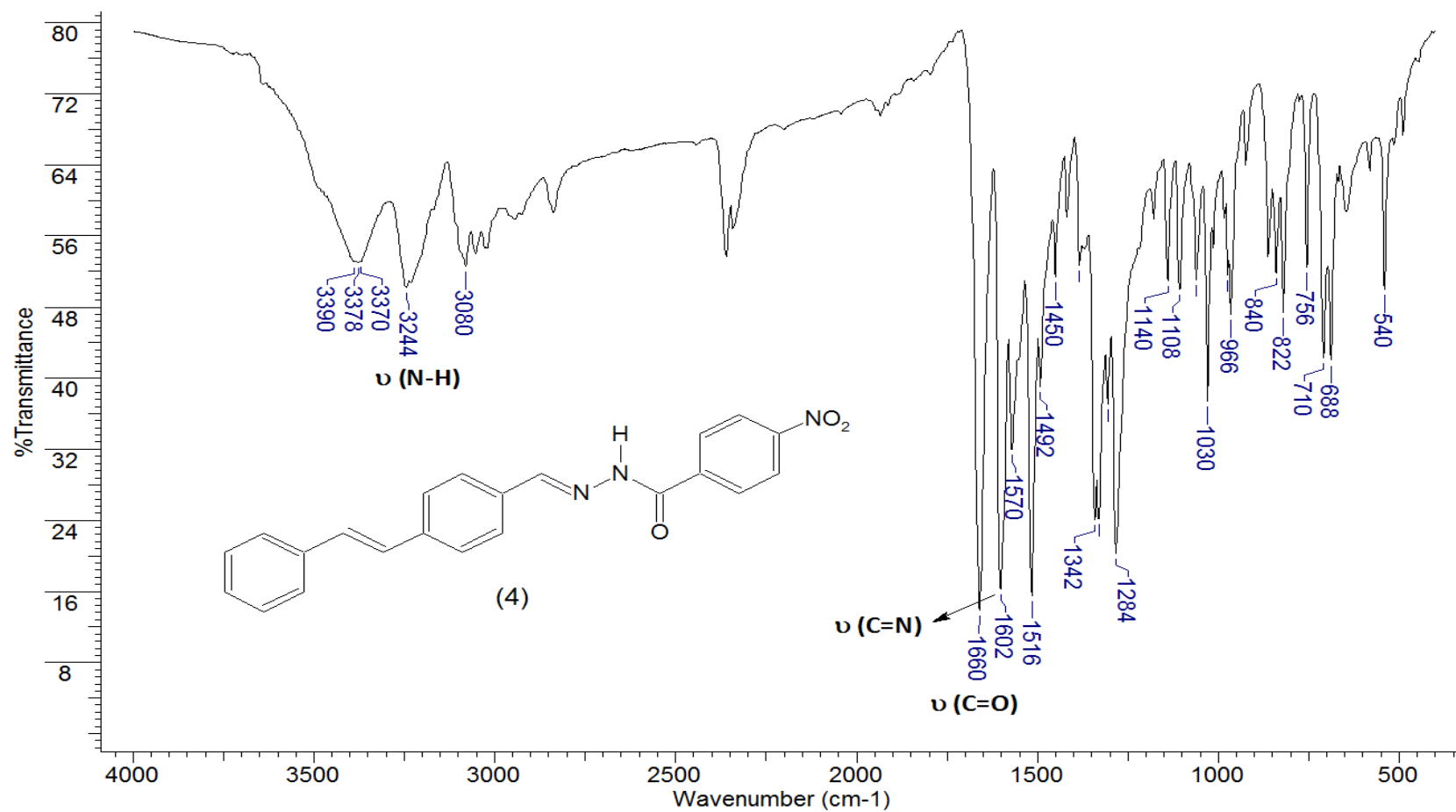
Espectros de absorção na região do Infravermelho (IV)



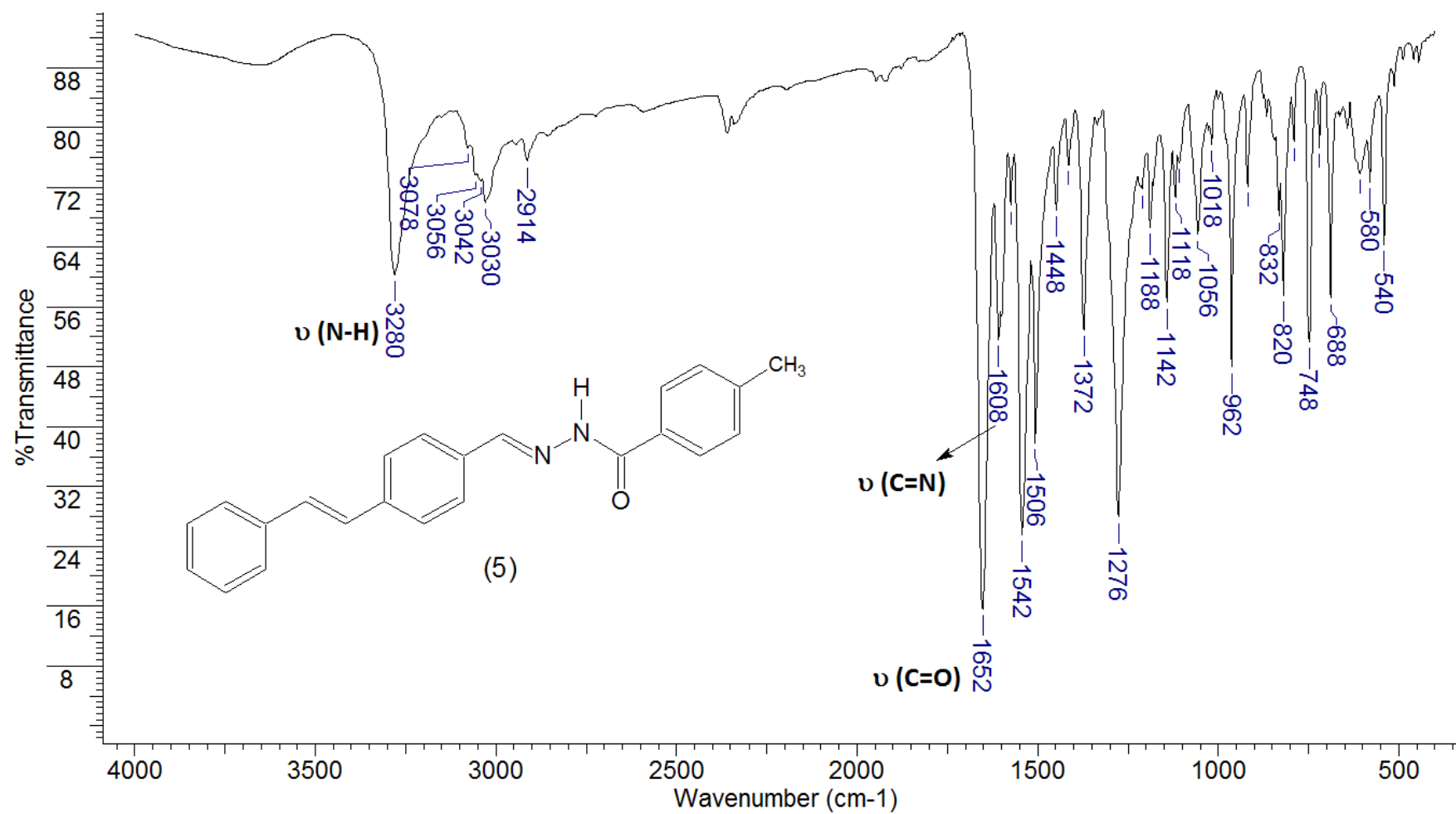
A1- Espectro de absorção na região do Infravermelho do composto HStPh (2).



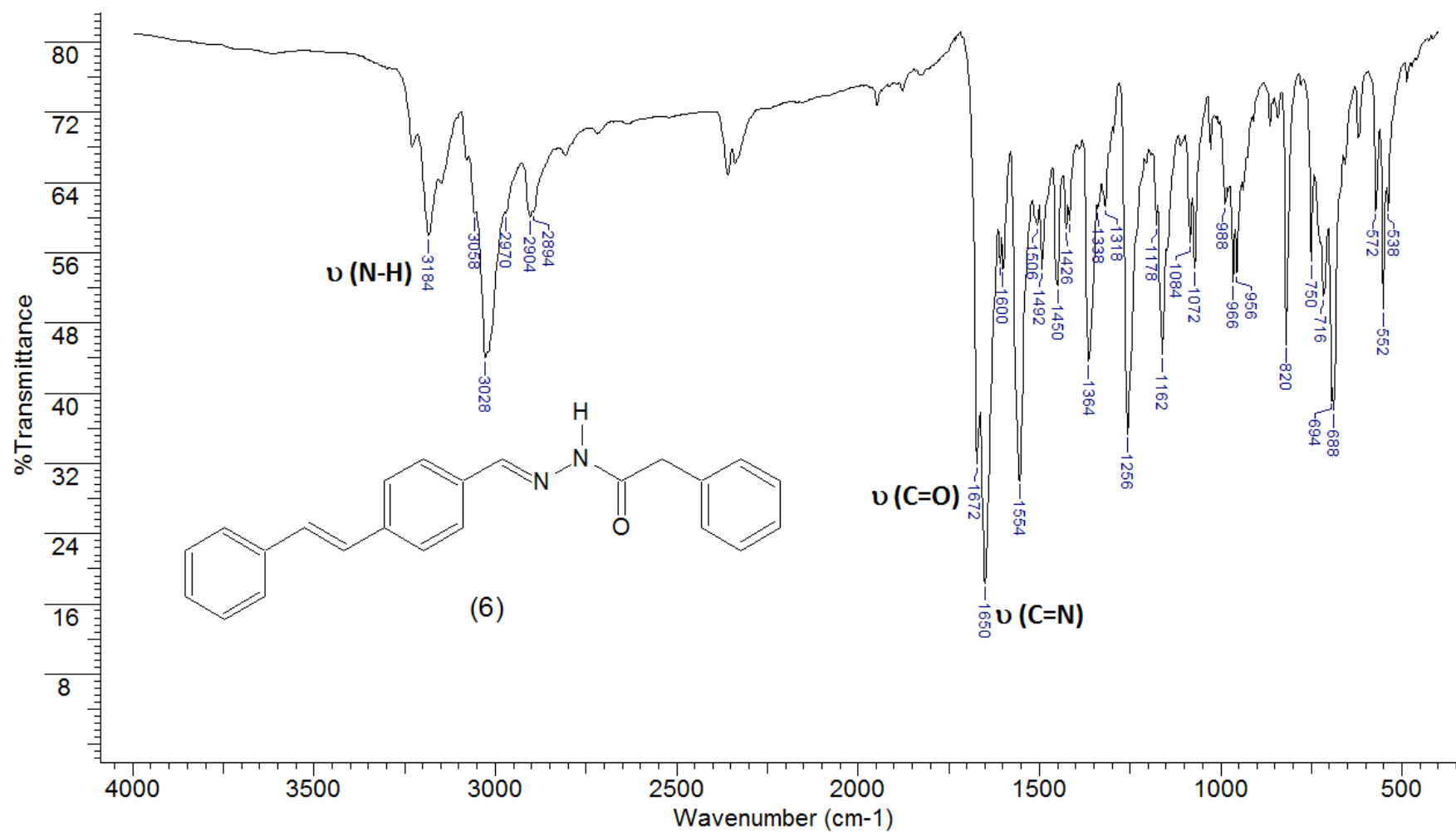
A2- Espectro de absorção na região do Infravermelho do composto HStpClPh (3).



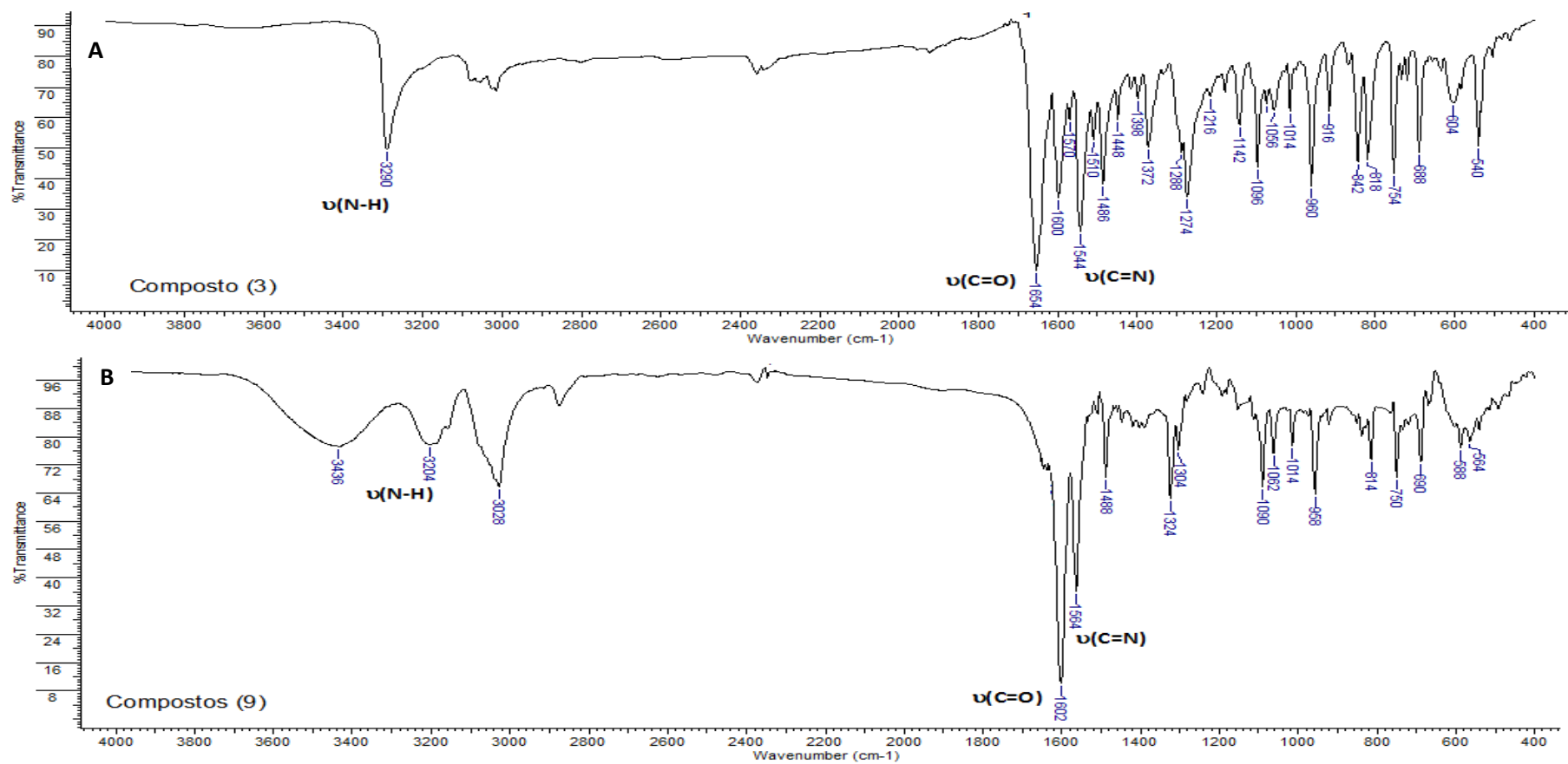
A3- Espectro de absorção na região do Infravermelho do composto HStpNO₂Ph (4).



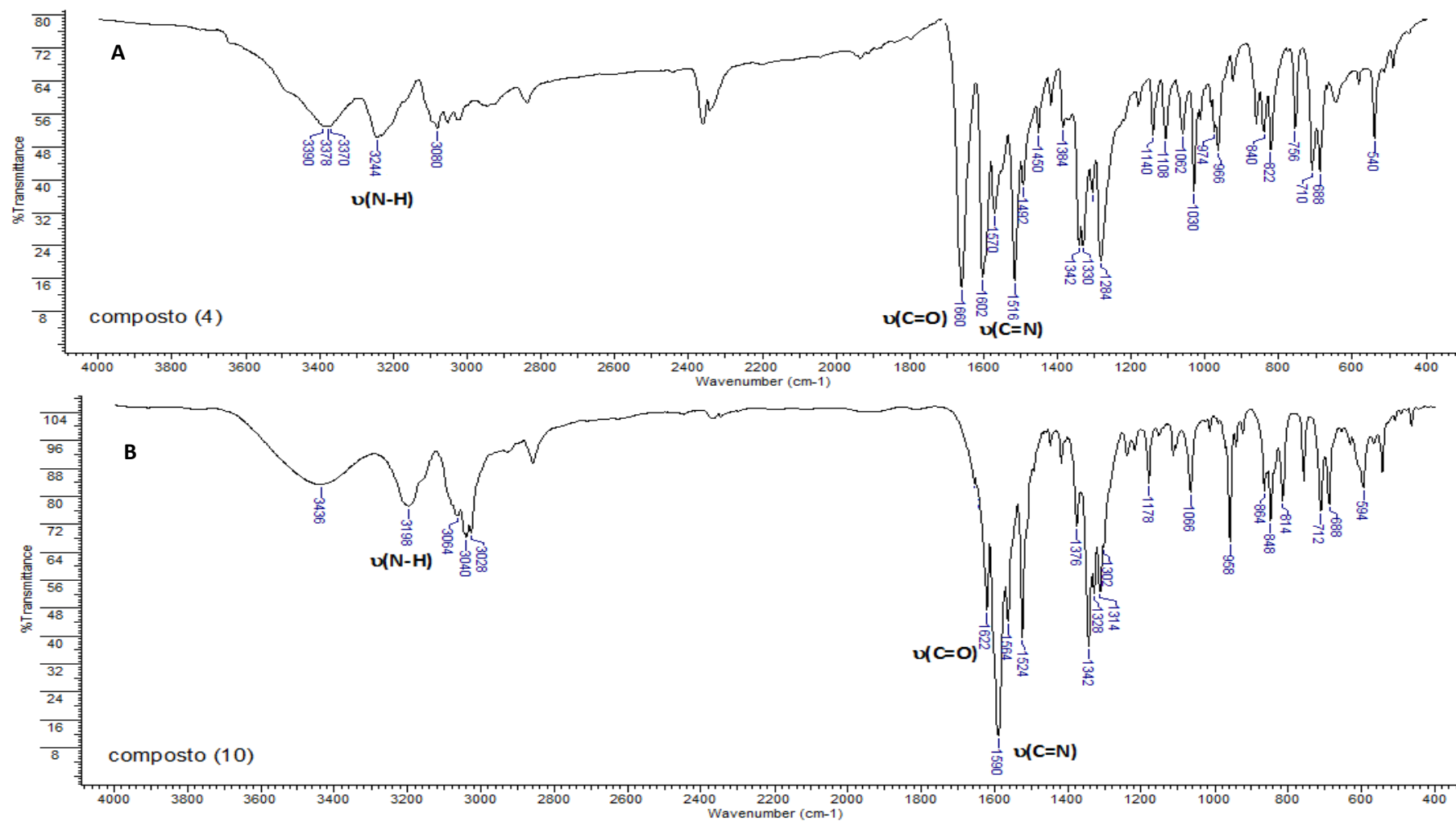
A4- Espectro de absorção na região do Infravermelho do composto HStpT (5).



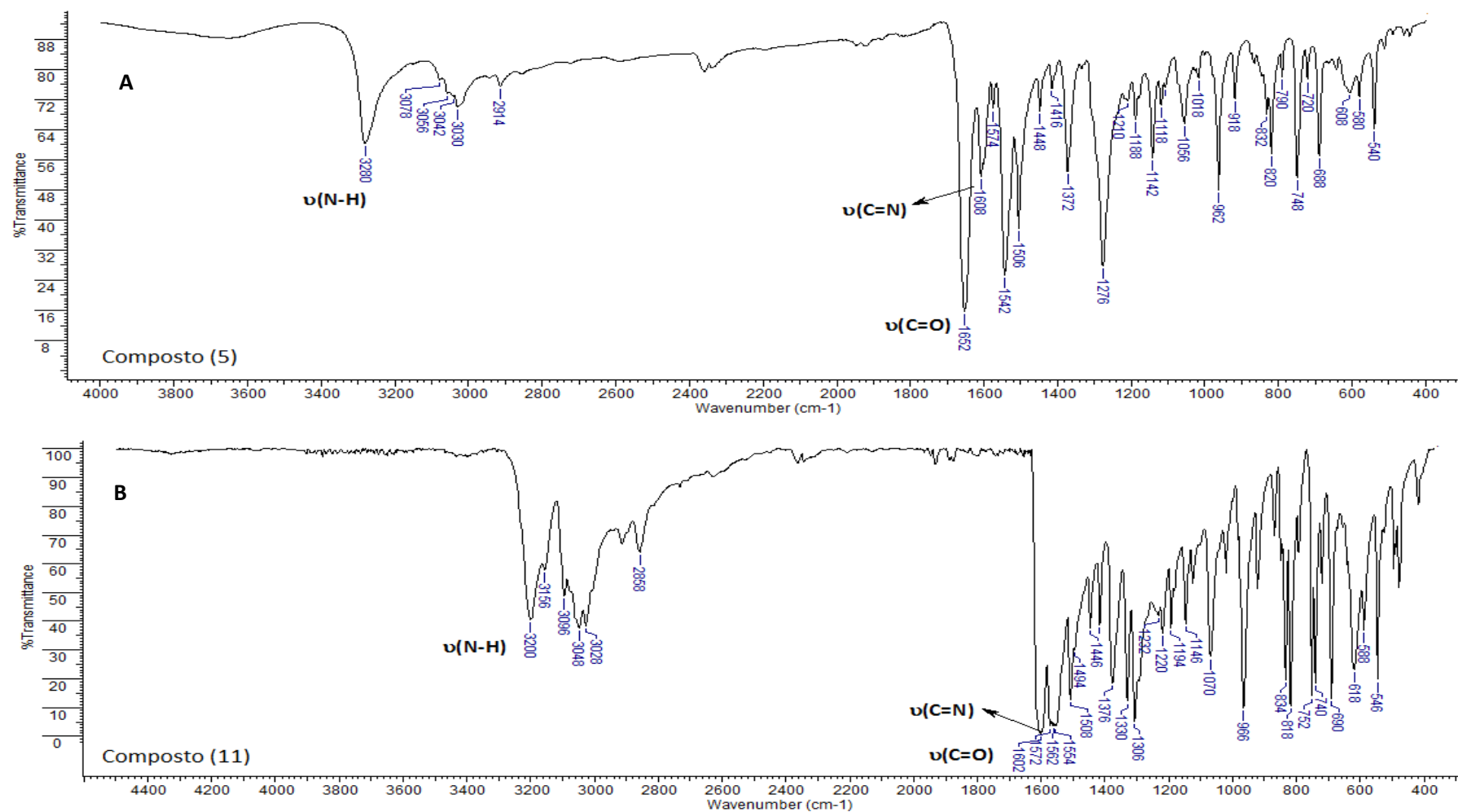
A5- Espectro de absorção na região do Infravermelho do composto HStBz (6).



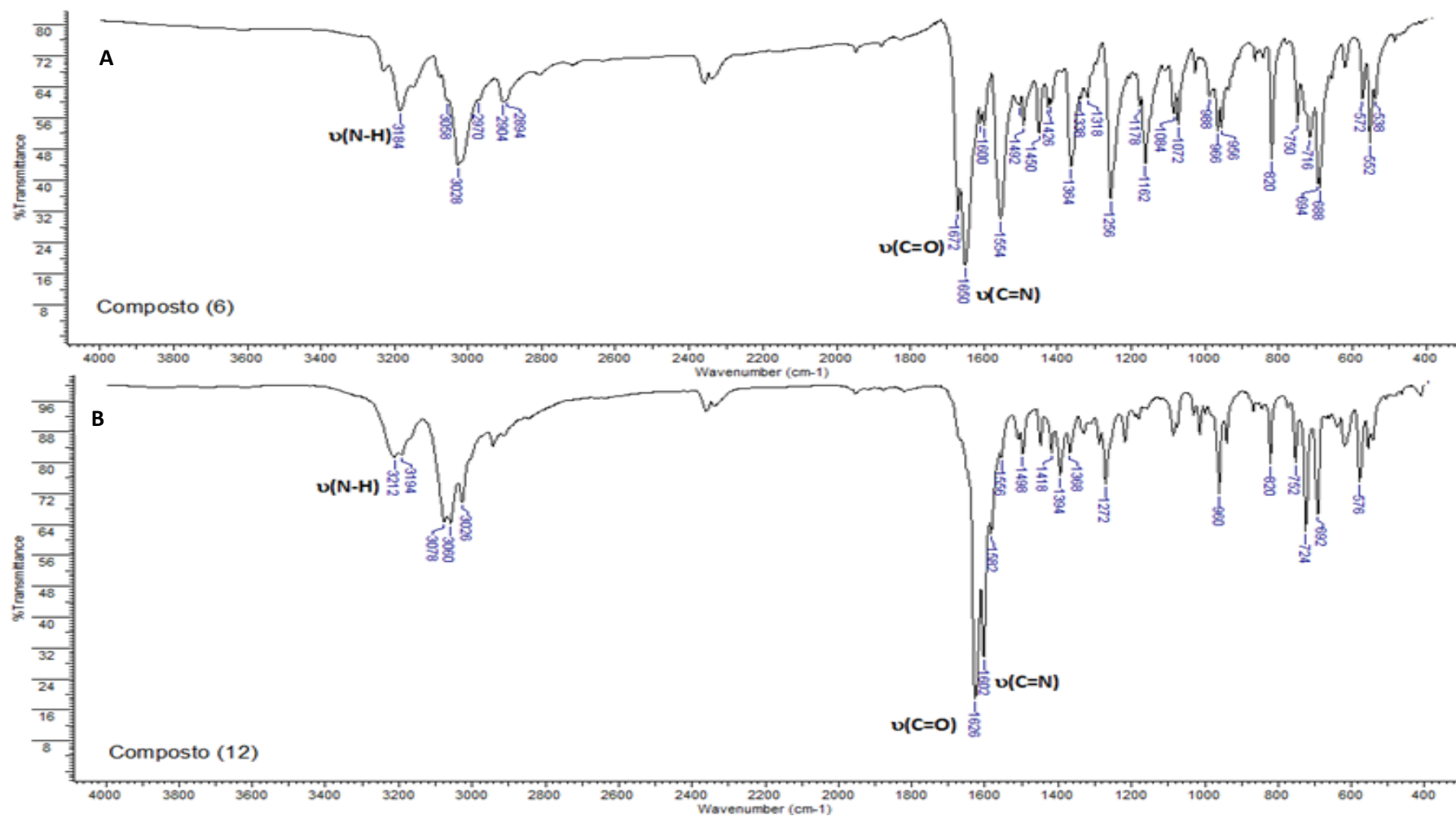
A7- Espectros de absorção na região do Infravermelho de HStpClPh (3) (**A**) e [Cu(HStpClPh)₂Cl₂] (9) (**B**), em pastilhas de KBr.



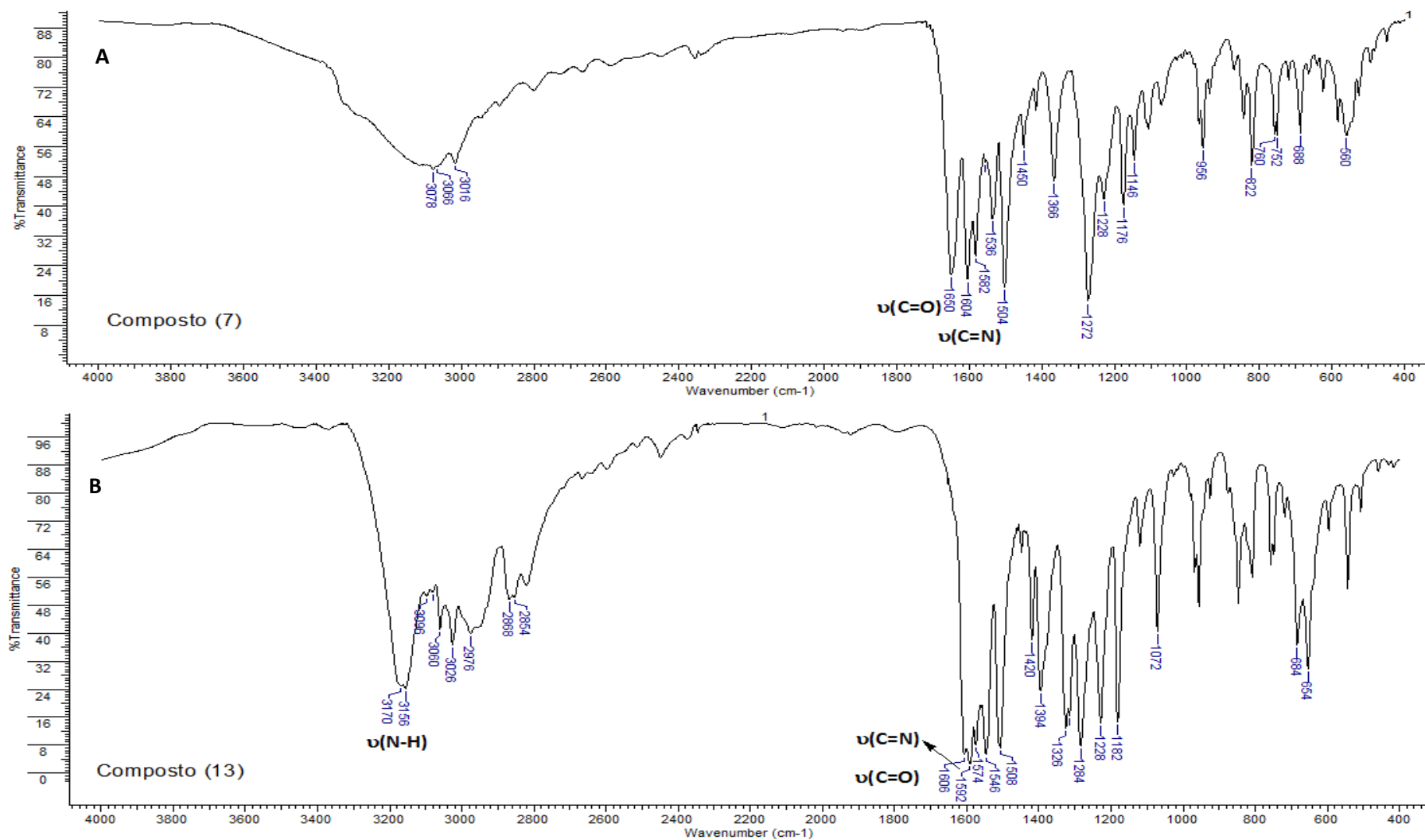
A8- Espectros de absorção na região do Infravermelho de HStpNO₂Ph (4) (**A**) e [Cu(HStpNO₂Ph)₂Cl₂] (10), (**B**), em pastilhas de KBr.



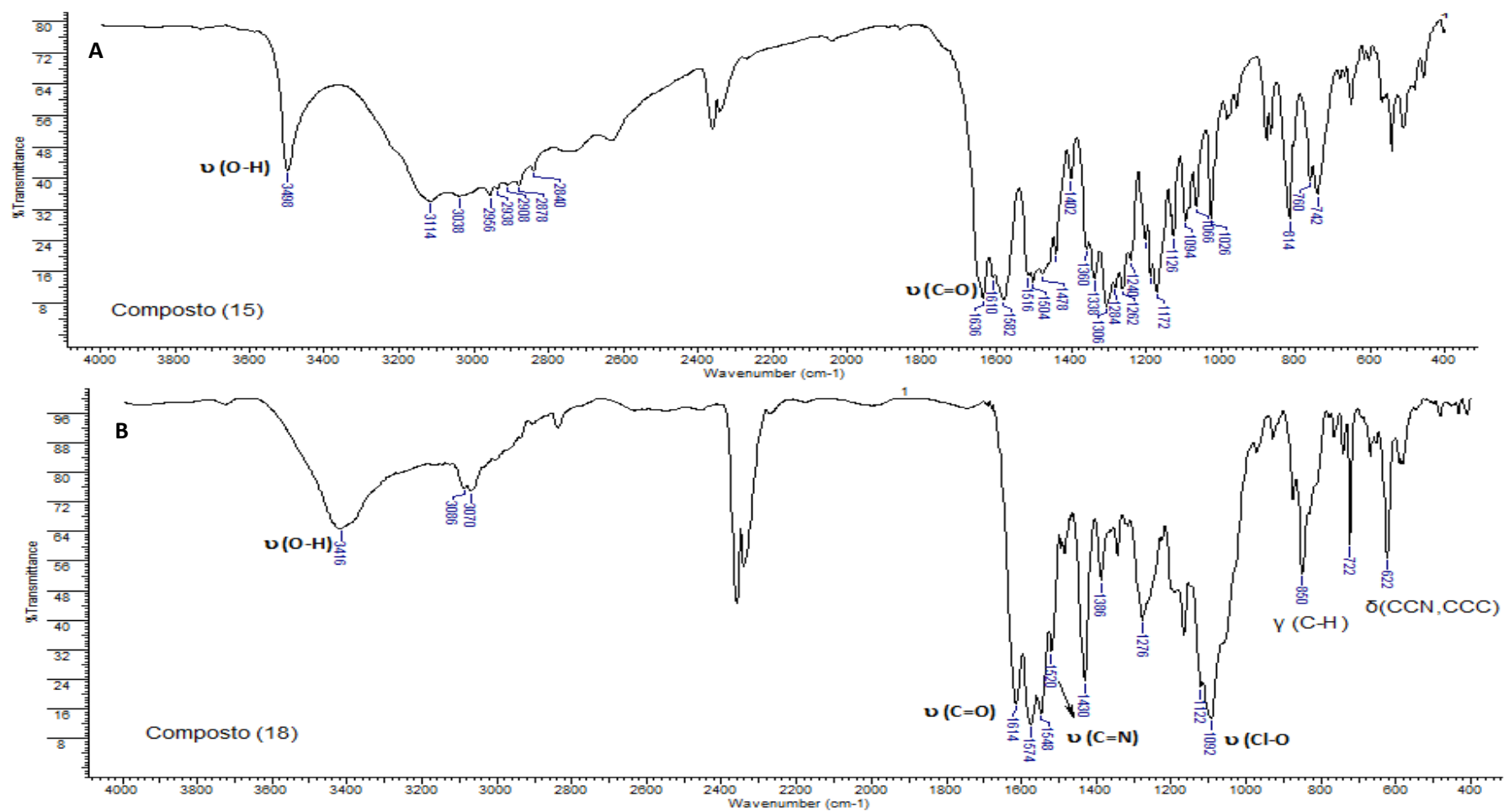
A9- Espectros de absorção na região do Infravermelho de HStpT (5) (**A**) e [Cu(HStpT)₂Cl₂] (11) (**B**), em pastilhas de KBr.



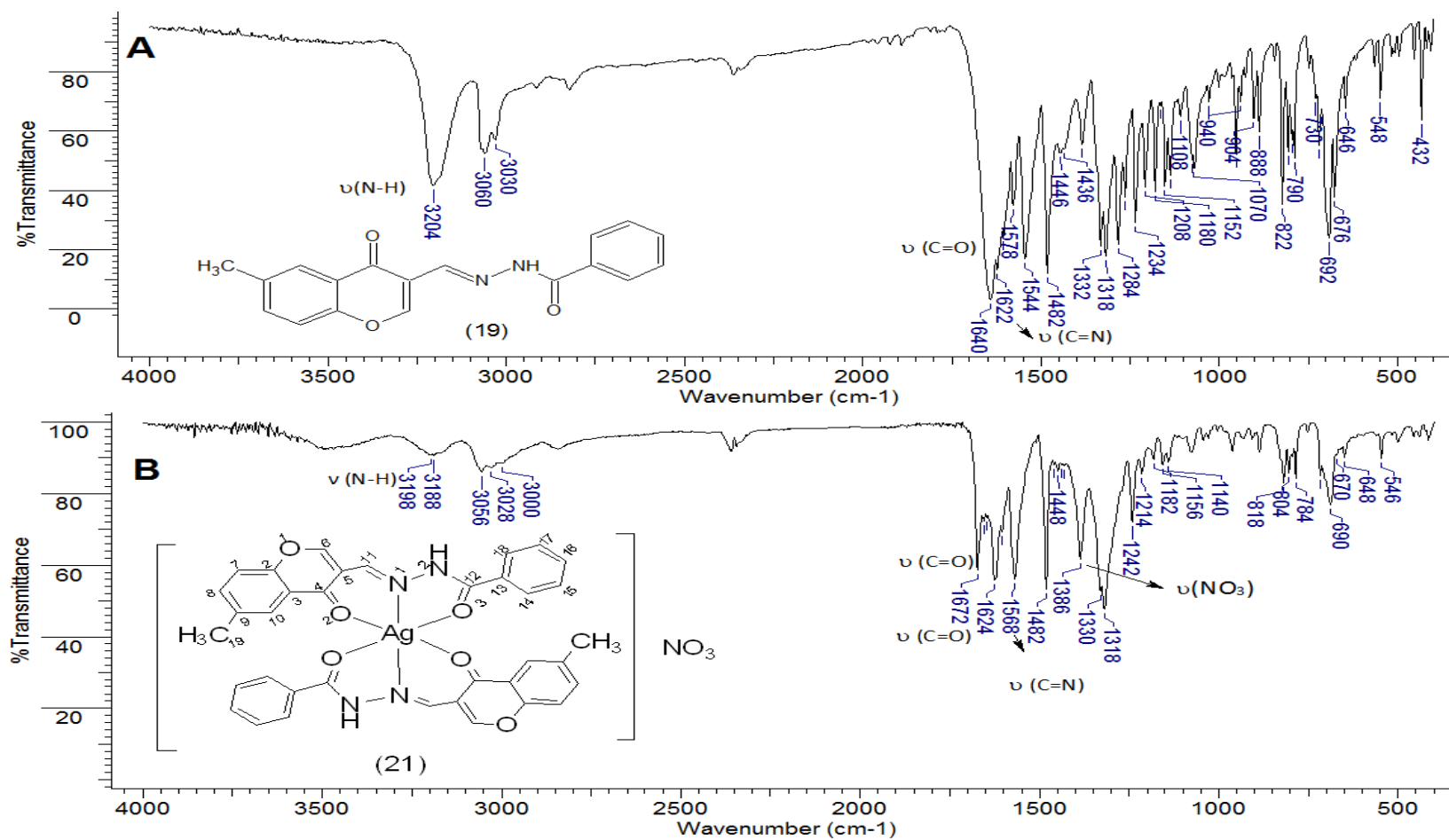
A10- Espectros de absorção na região do Infravermelho de HStBz (6) (A) e [Cu(HStBz)₂Cl₂] (12) (B), em pastilhas de KBr.



A11- Espectros de absorção na região do Infravermelho de HStpOHPh (7) (A) e [Cu(HStpOHPh)₂Cl₂] (13) (B), em pastilhas de KBr.

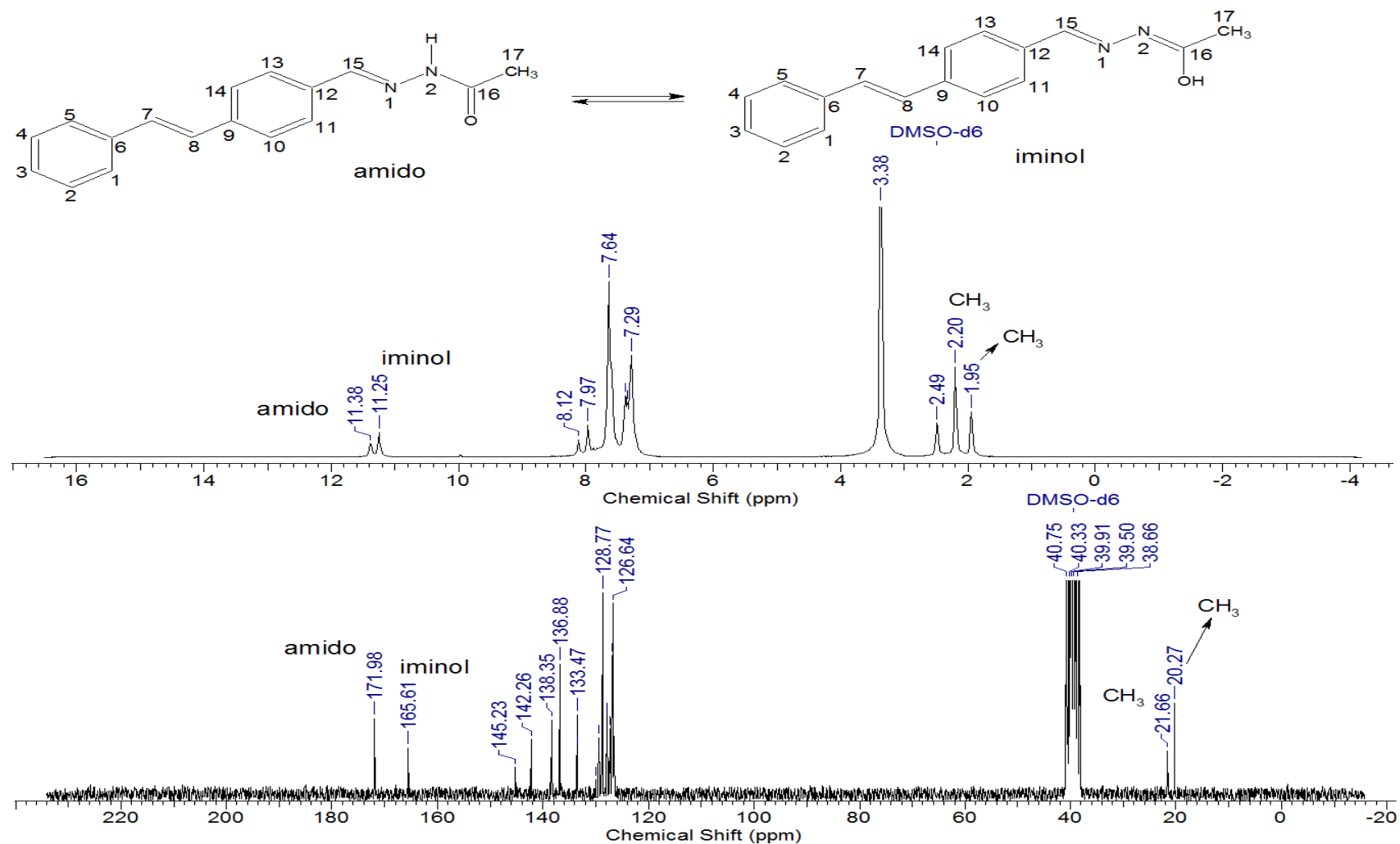


A12- Espectros de absorção na região do Infravermelho de Hsp (15) (**A**) e complexo [Cu(Hsp)(Fen)(OH₂)]₂ · 2ClO₄ (18) (**B**), em pastilhas de KBr.

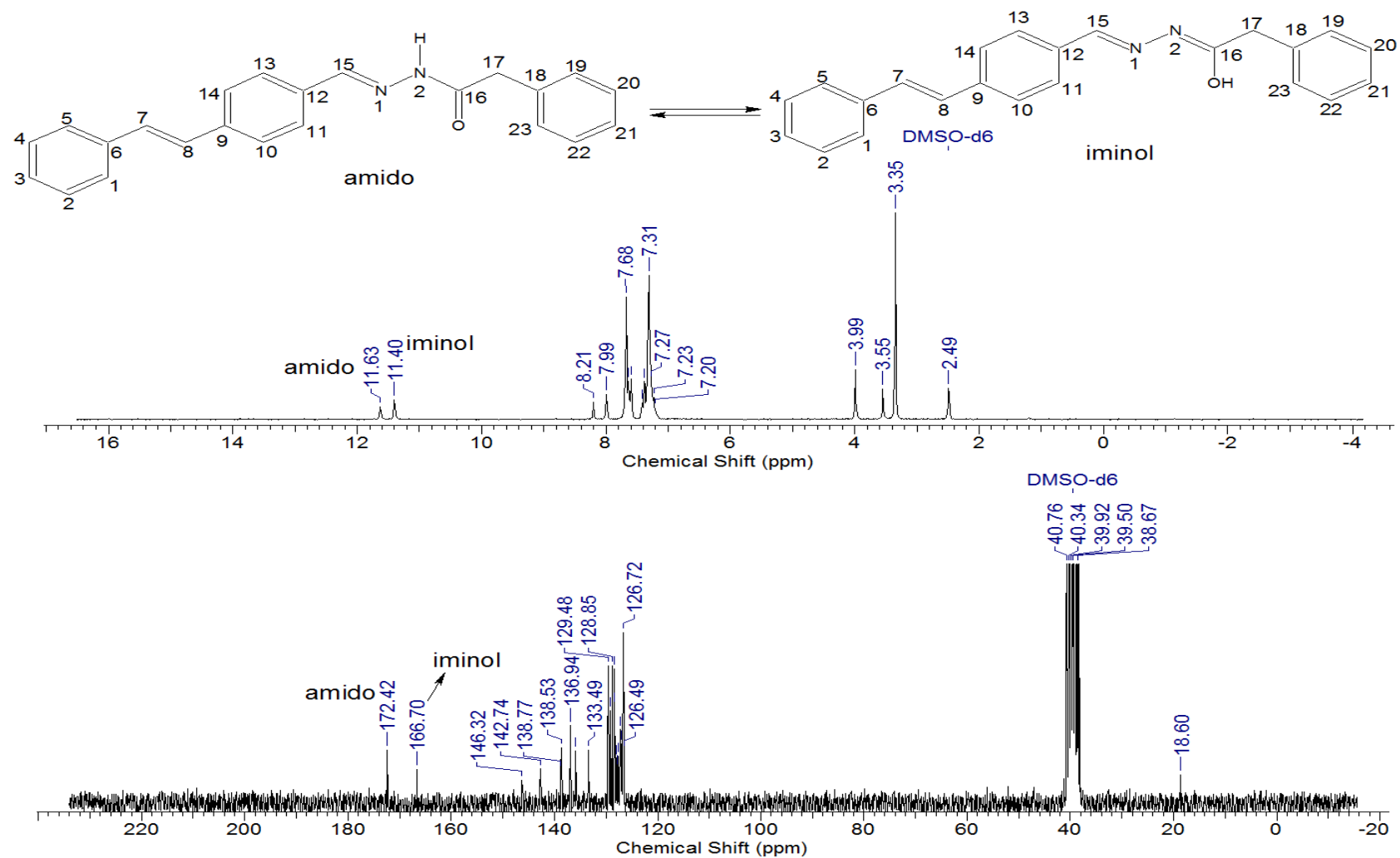


A13- Espectros de absorção na região do Infravermelho de HCrPh (19) (**A**) e de seu complexo $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21) (**B**) em pastilhas de KBr.

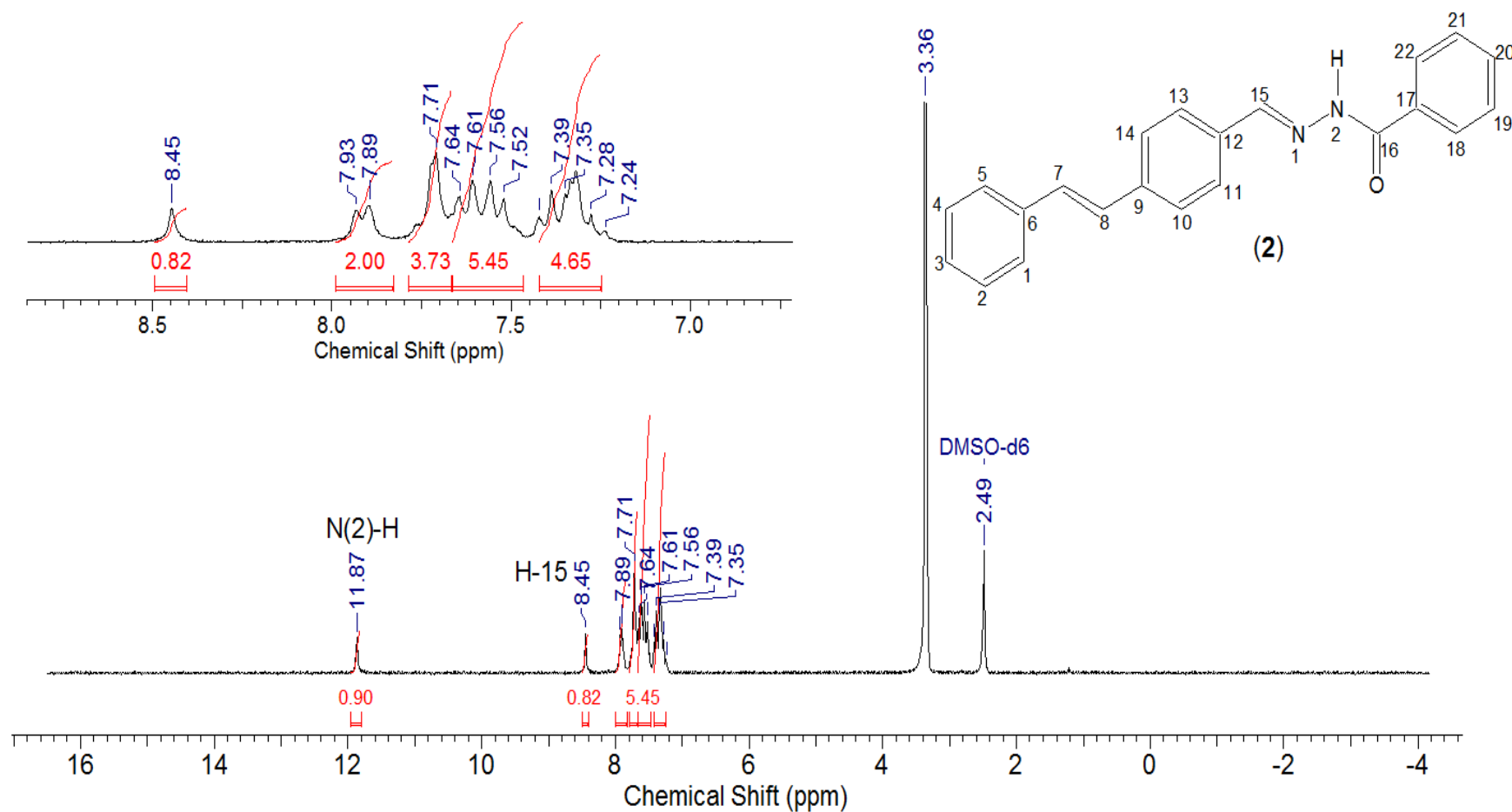
Espectros de RMN



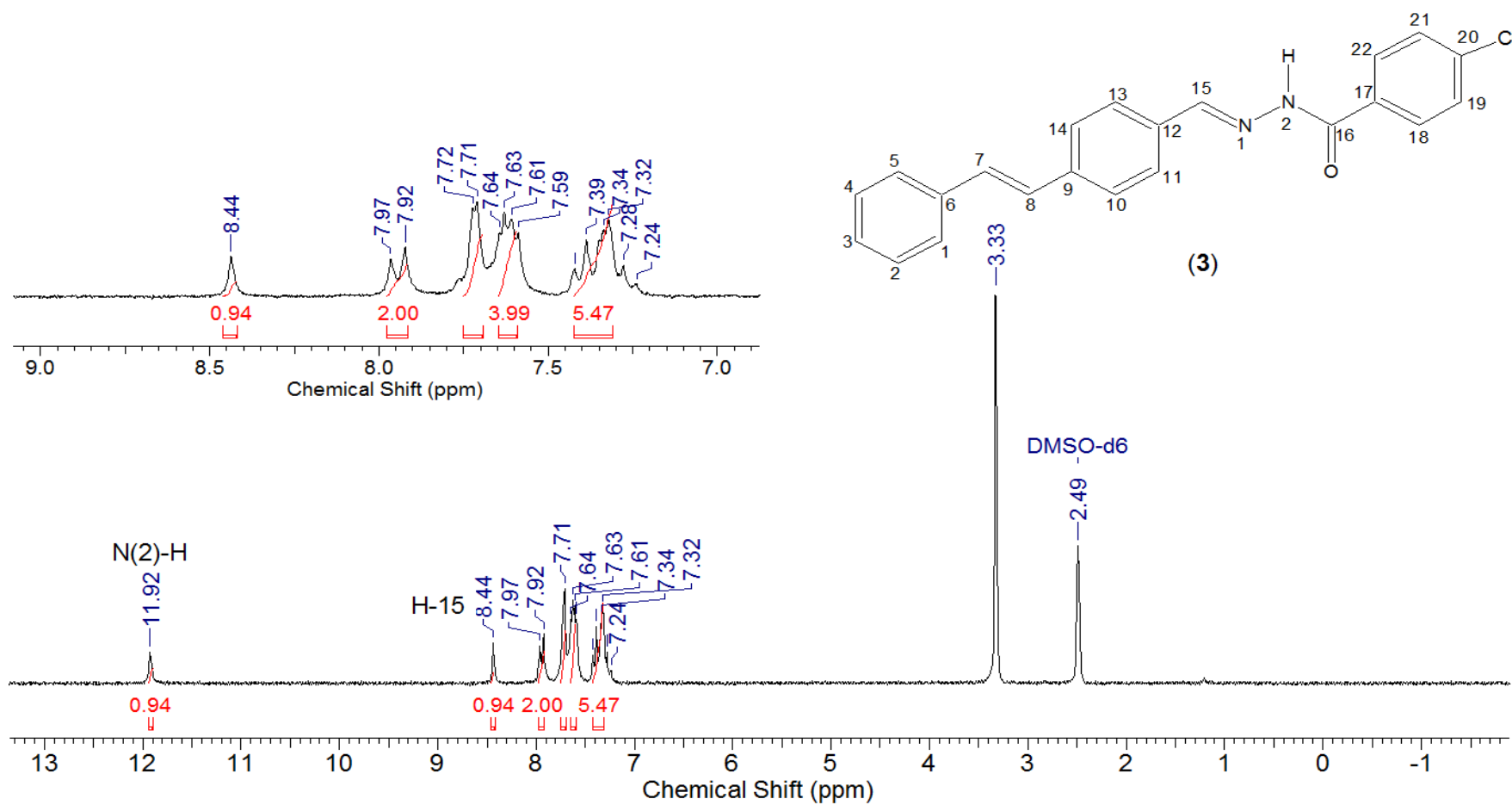
A14- Espectros de RMN ¹H (400 MHz; DMSO-*d*₆) e ¹³C (100 MHz; DMSO-*d*₆) do composto HStAc (1).



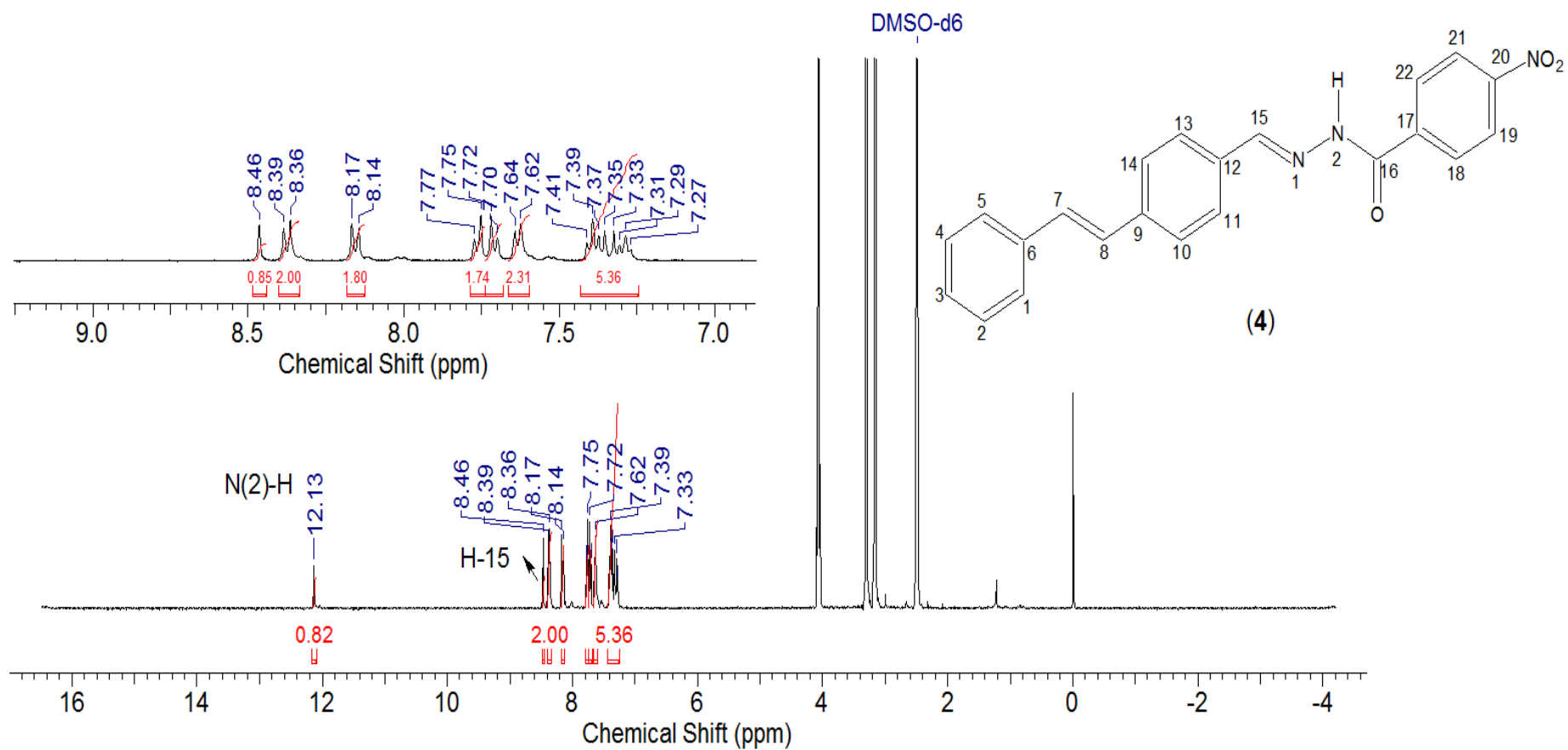
A15- Espectros de RMN ¹H (400 MHz; DMSO-*d*₆) e ¹³C (100 MHz; DMSO-*d*₆) do composto HStBz (6).



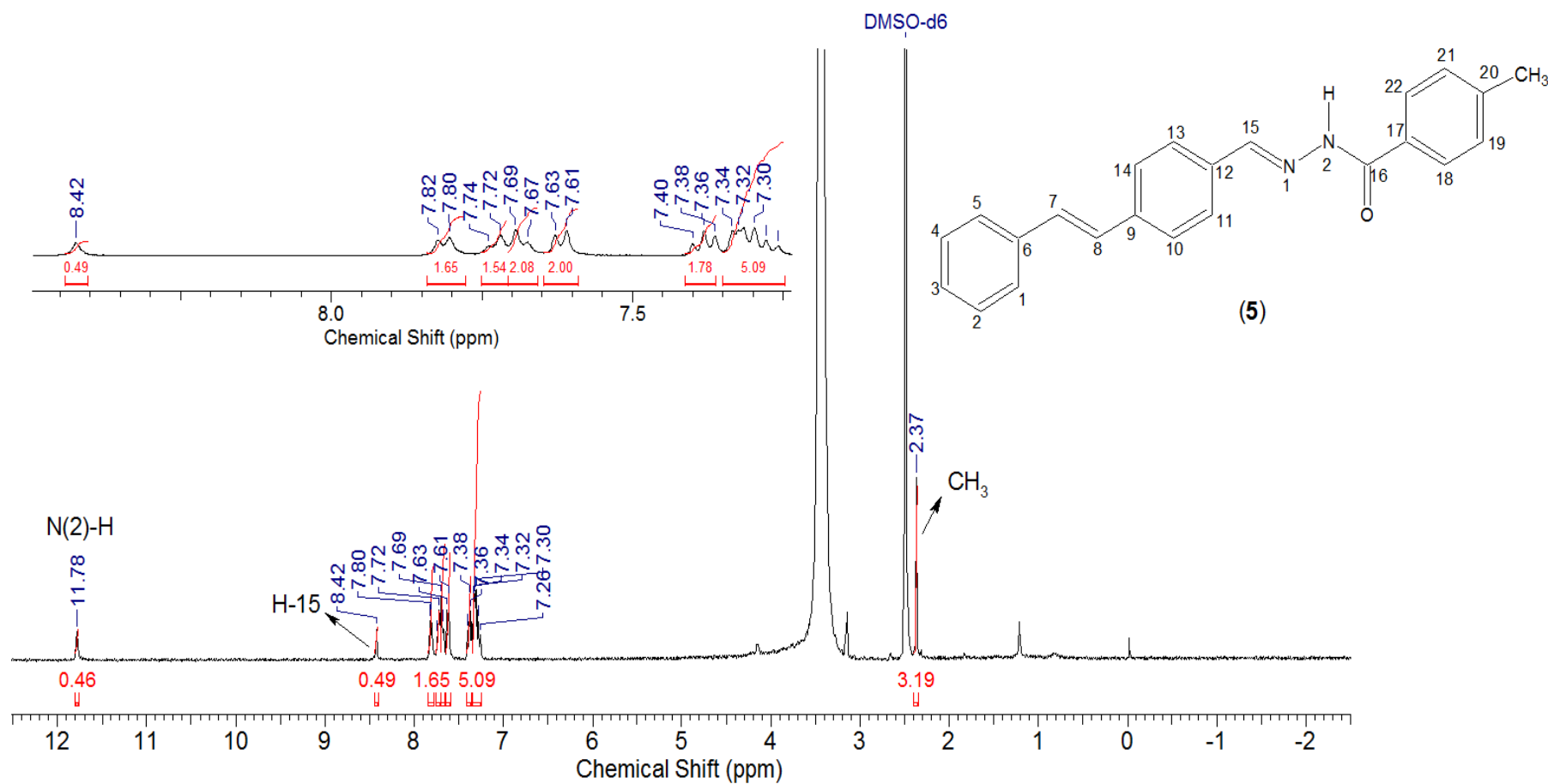
A16- Espectro de RMN ¹H (400 MHz; DMSO-*d*₆) do composto HStPh (2).



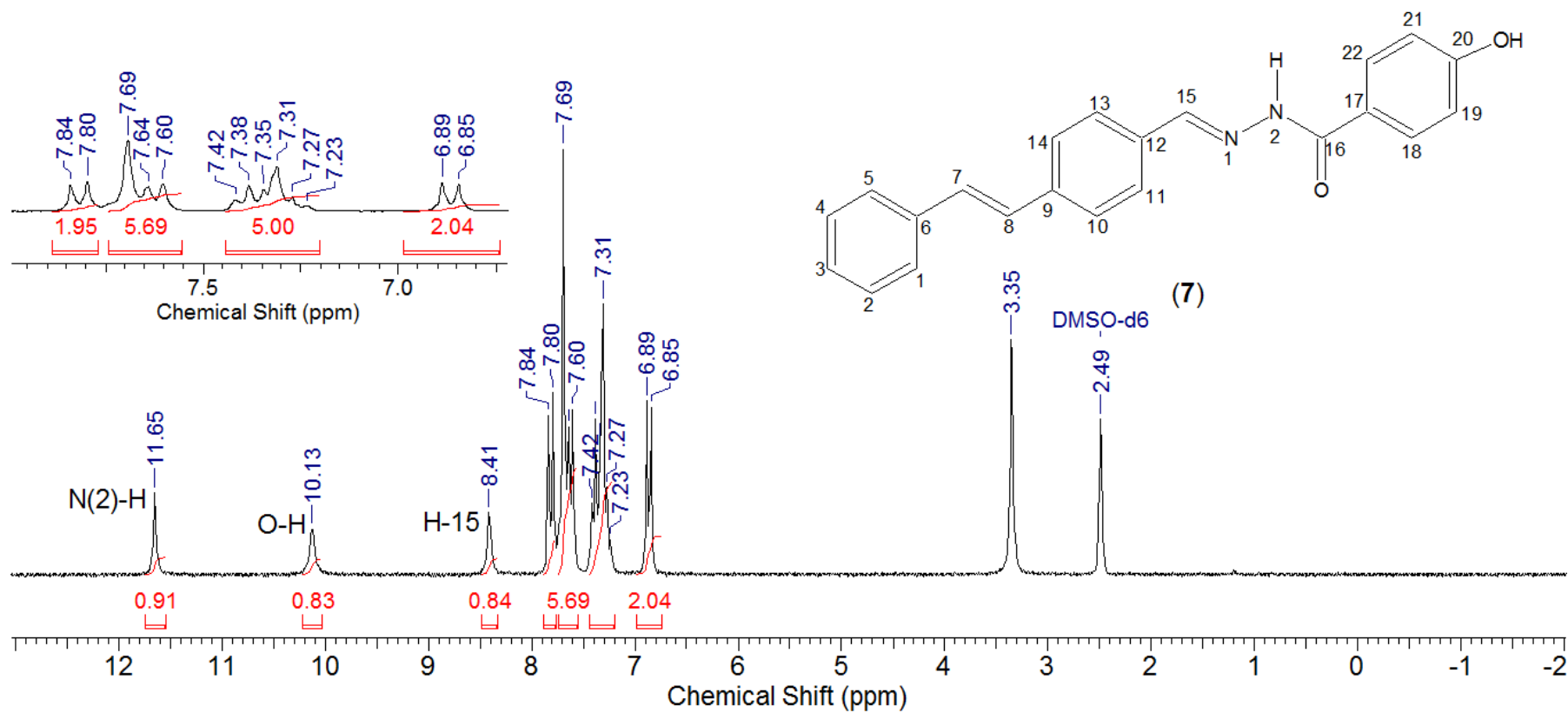
A17- Espectro de RMN ^1H (400 MHz; $\text{DMSO}-d_6$) do composto HStpClPh (**3**).



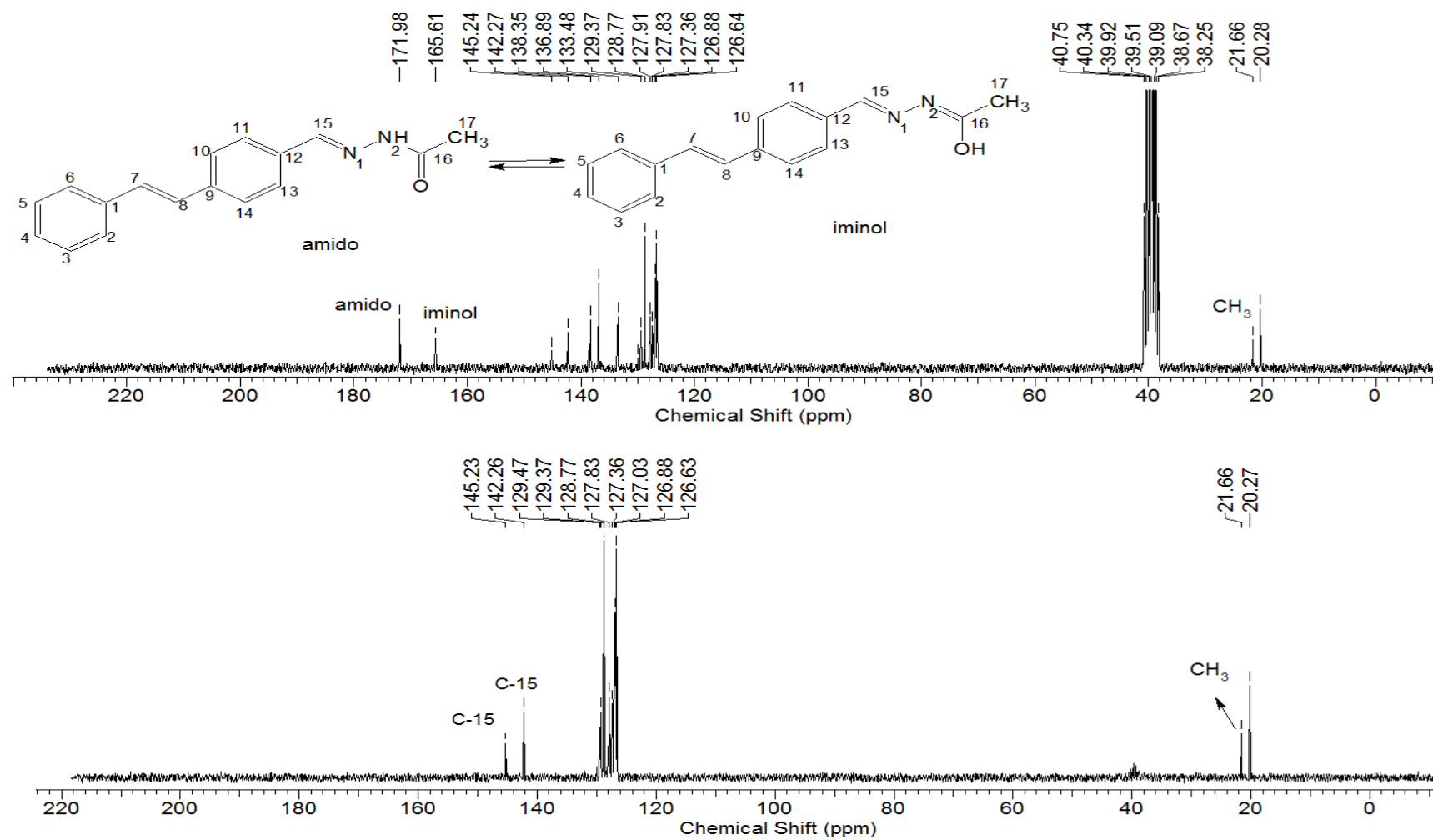
A18- Espectro de RMN ¹H (400 MHz; DMSO-d₆) do composto HStpNO₂Ph (4).



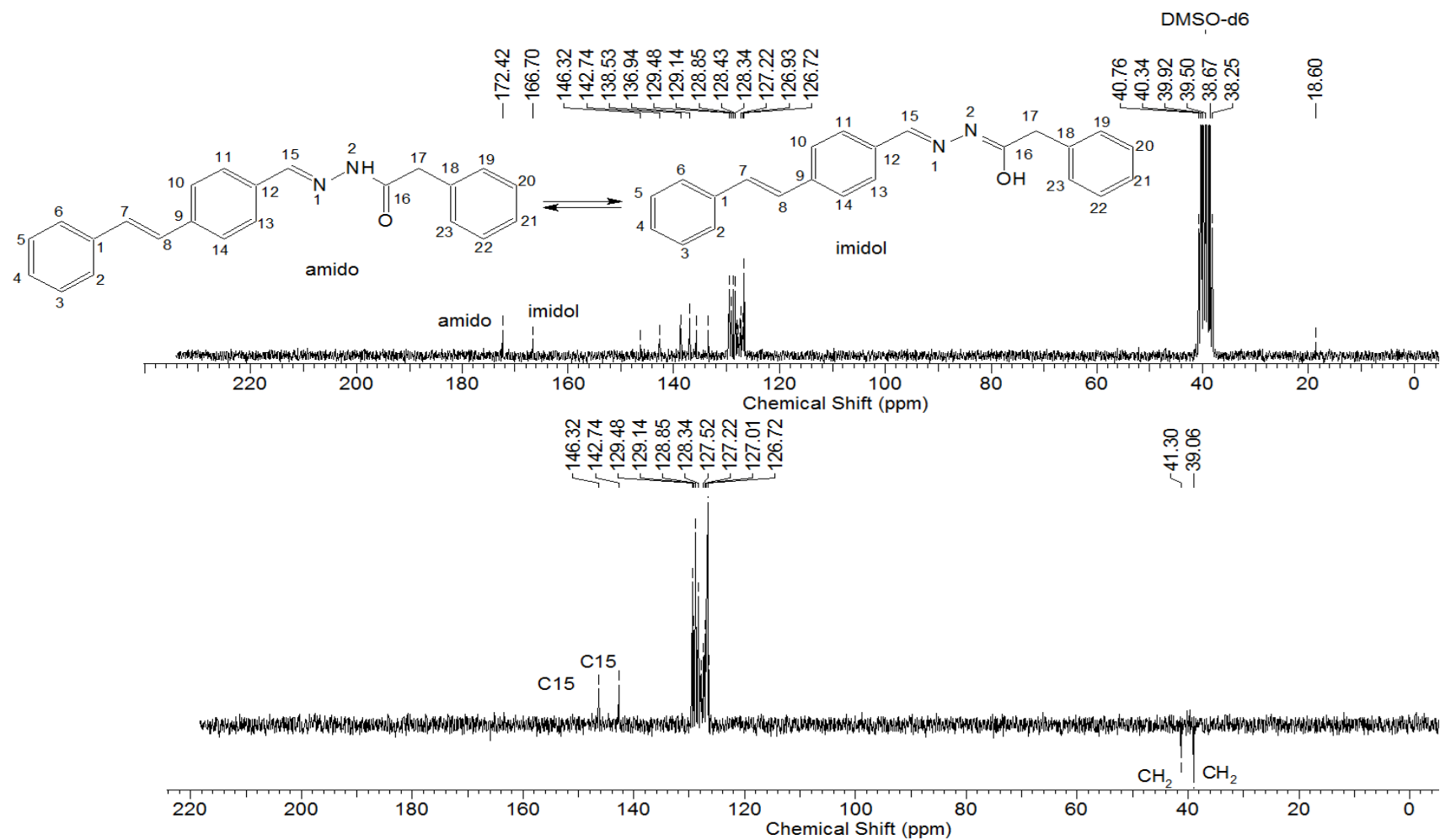
A19- Espectro de RMN ¹H (400 MHz; DMSO-*d*₆) do composto HStpT (5).



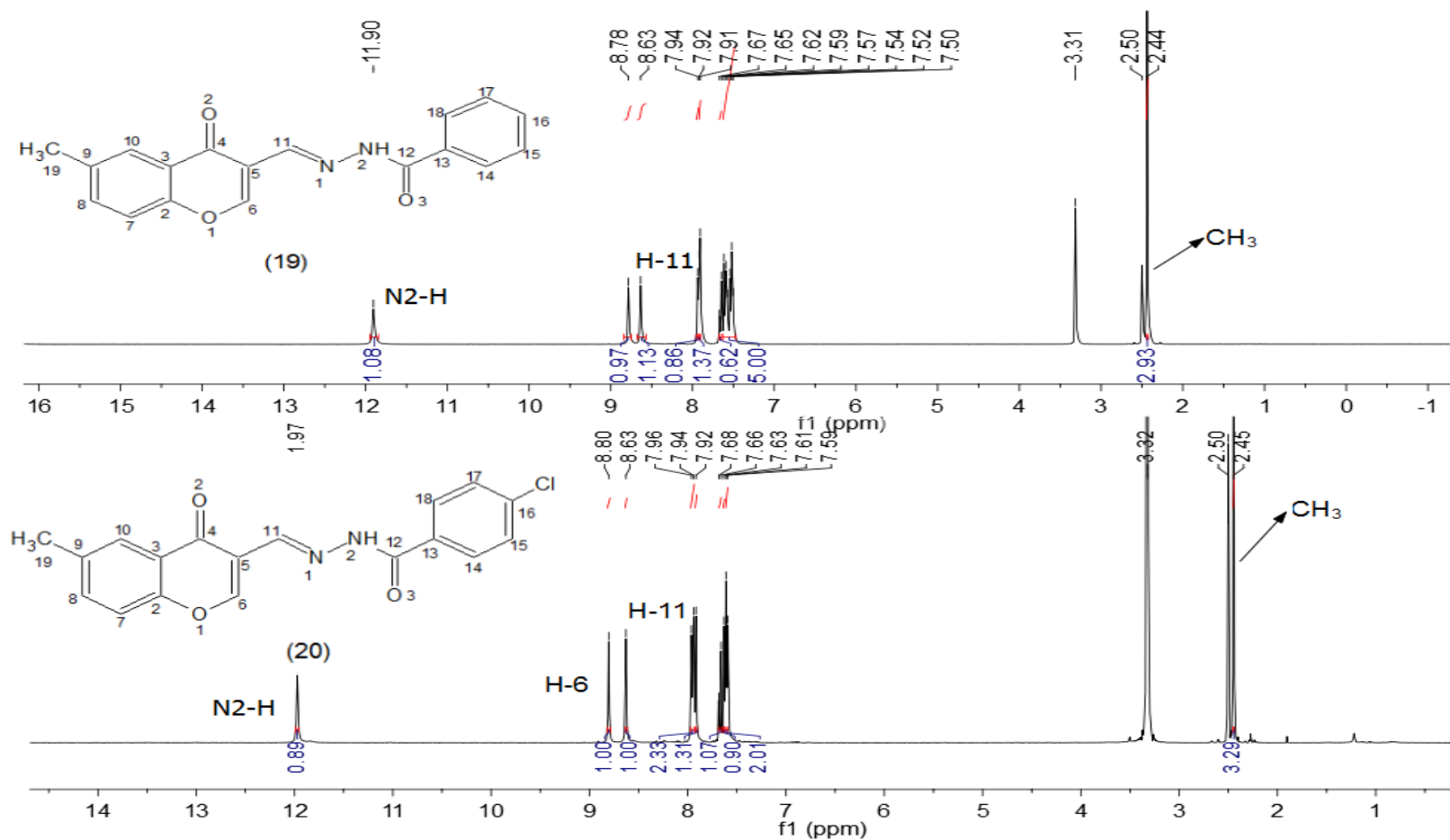
A20- Espectro de RMN ^1H (400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) do composto HStpOH (7).



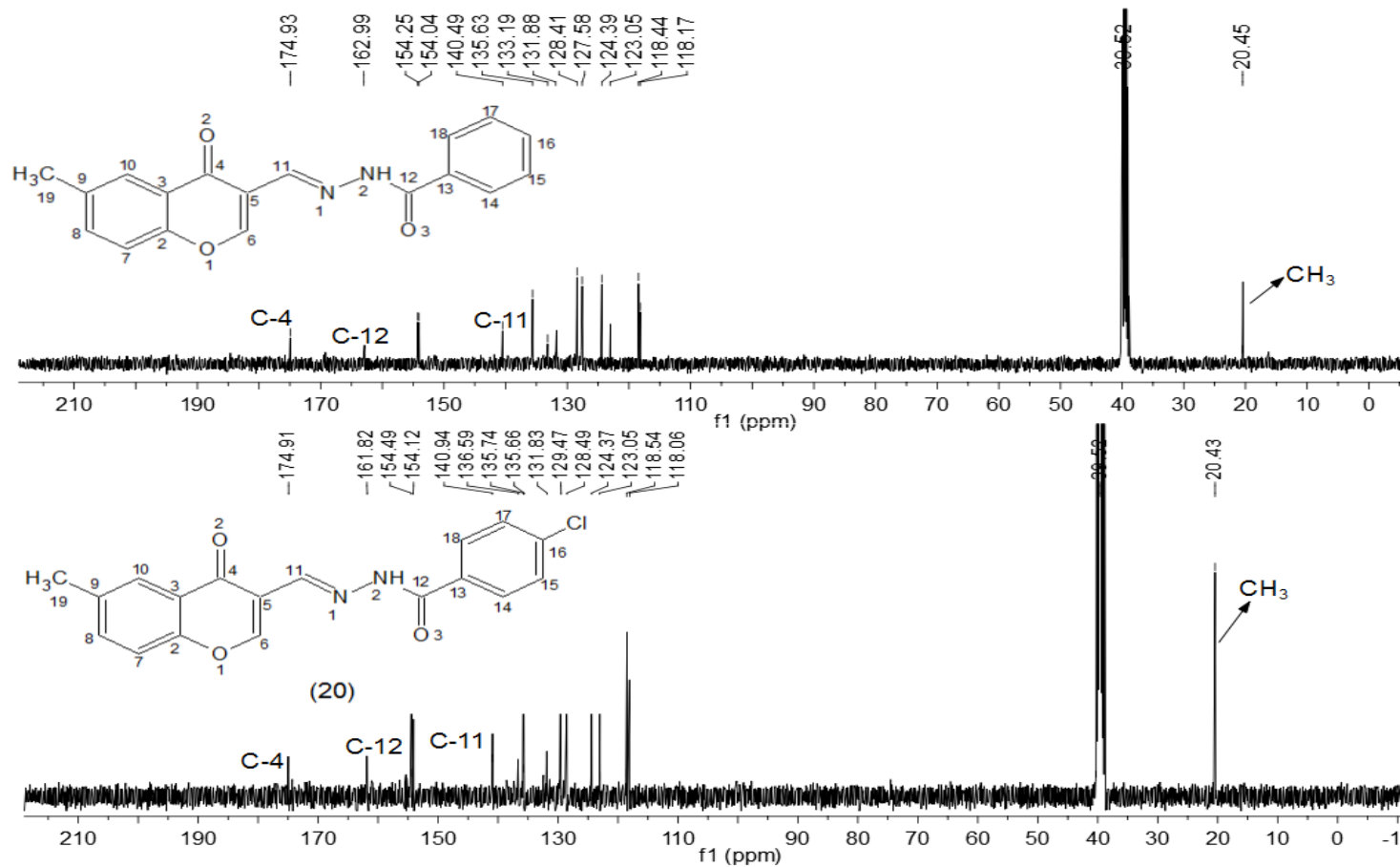
A21- Espectro de RMN de ^{13}C (acima) e subspectro DEPT 135 (abaixo), (100 MHz, DMSO- d_6) para o composto HStAc (1).



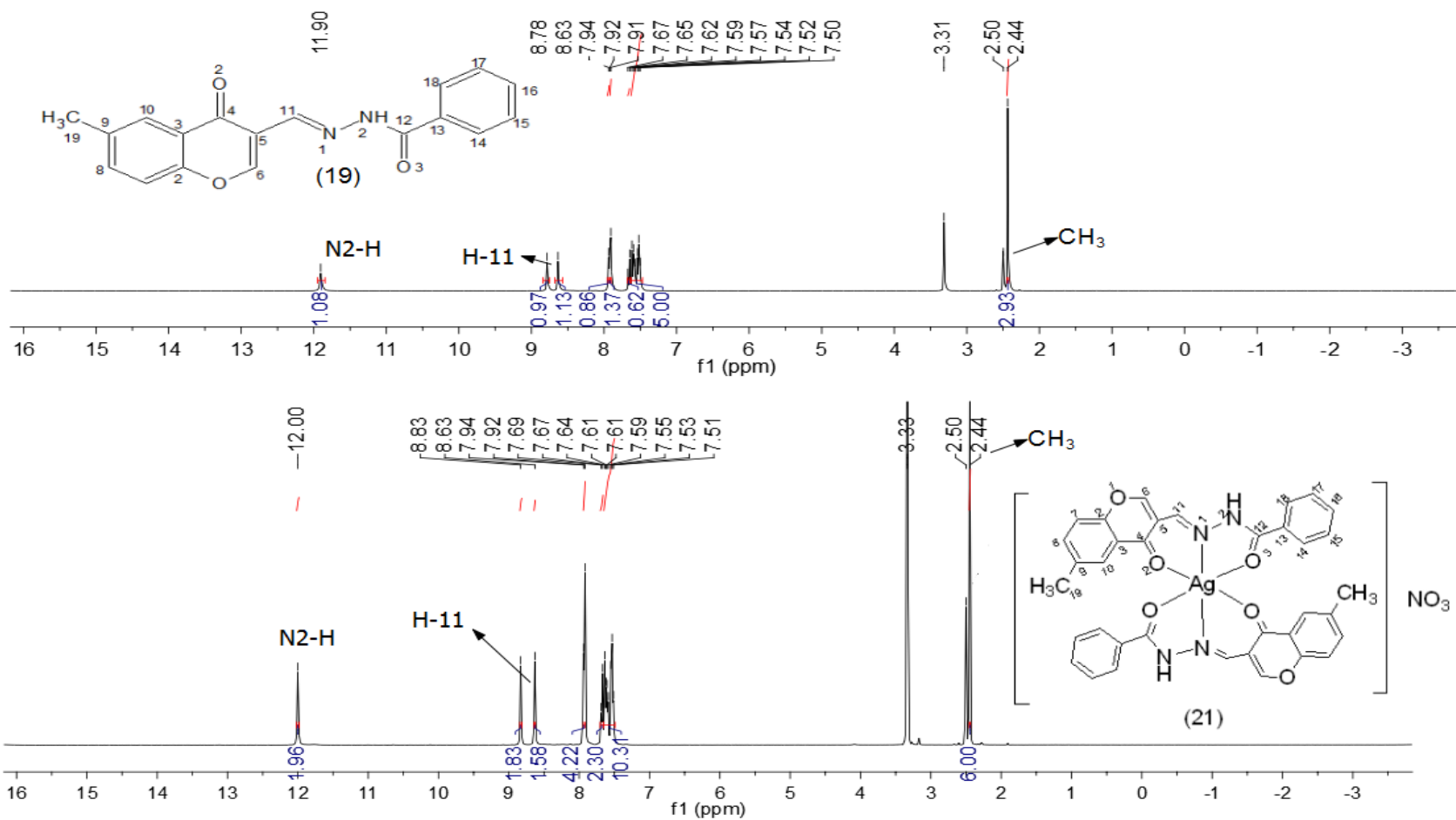
A22- Espectro de RMN de ^{13}C (acima) e subespectro DEPT 135 (abaixo), (100 MHz, DMSO- d_6) para o composto HStBz (6).



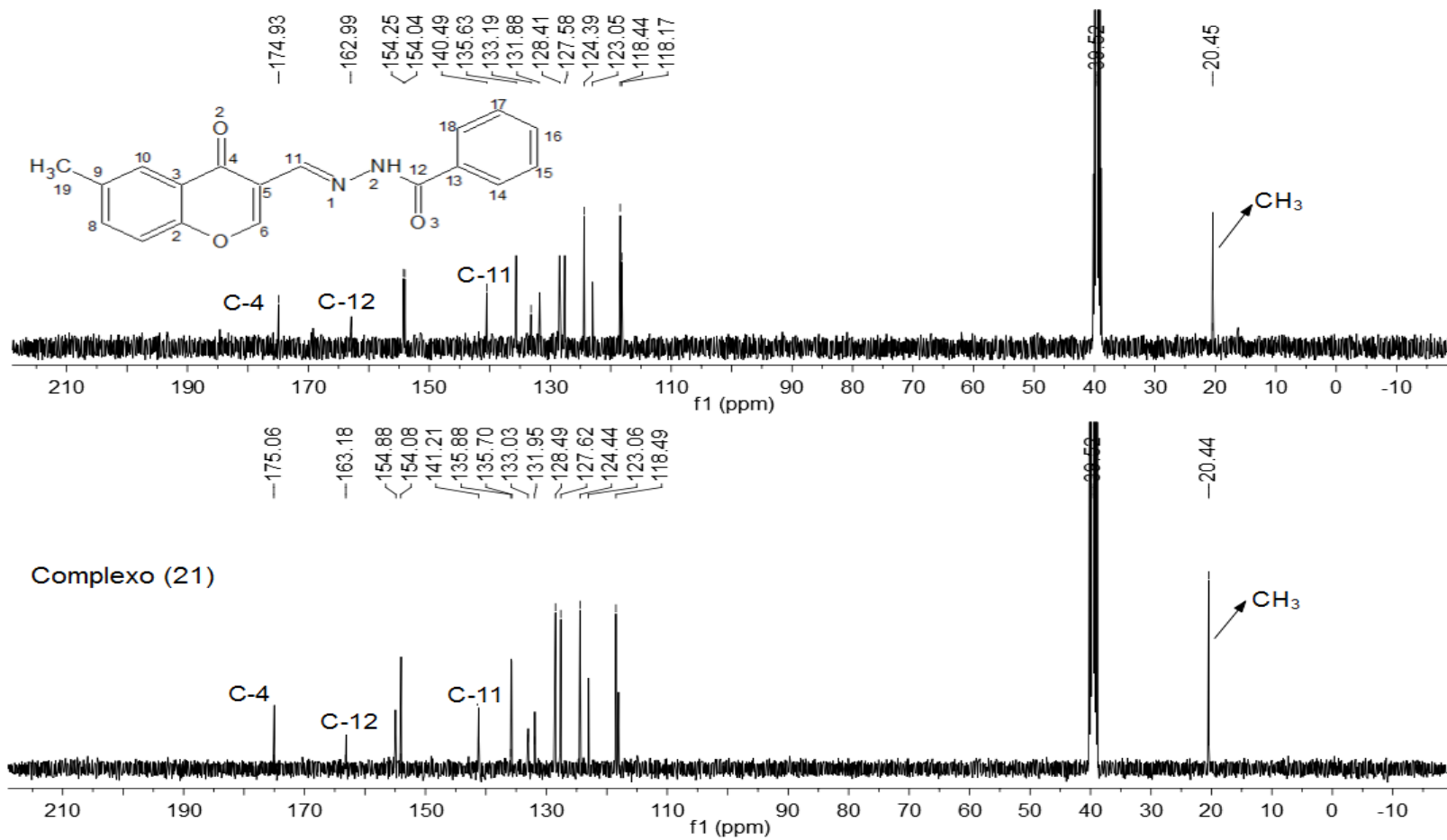
A23- Espectros de RMN ^1H (400 MHz; DMSO- d_6) para 3-formil-6-metilcromona-fenilhidrazona HCrPh (19) e 3-formil-6-metilcromona-*para*-cloro-fenilhidrazona HCrpClPh (20).



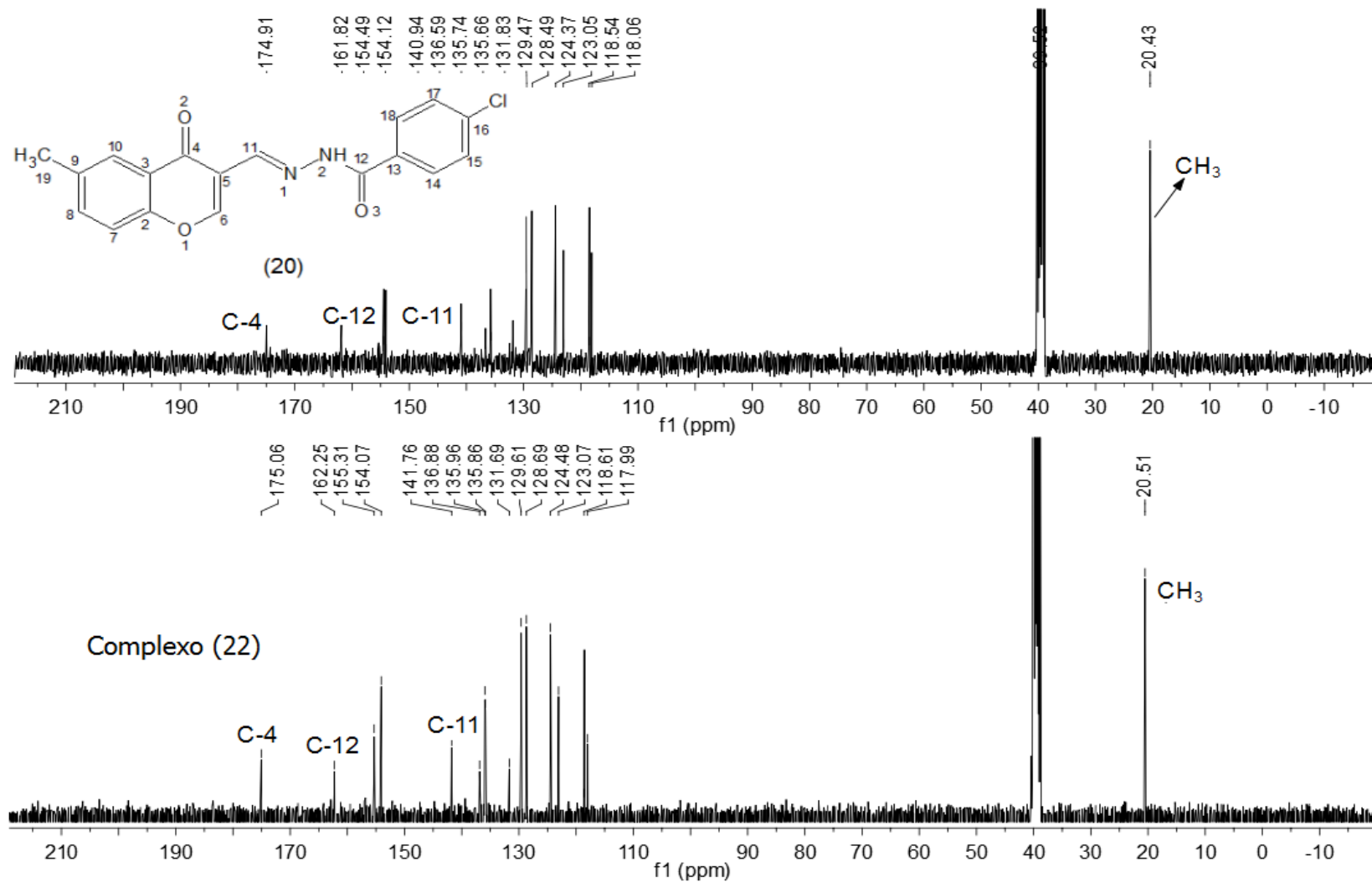
A24- Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz; $\text{DMSO}-d_6$) para 3-formil-6-metilcromona-fenilhidrazona HCrPh (19) e 3-formil-6-metilcromona-*para*-cloro-fenilhidrazona HCrpClPh (20).



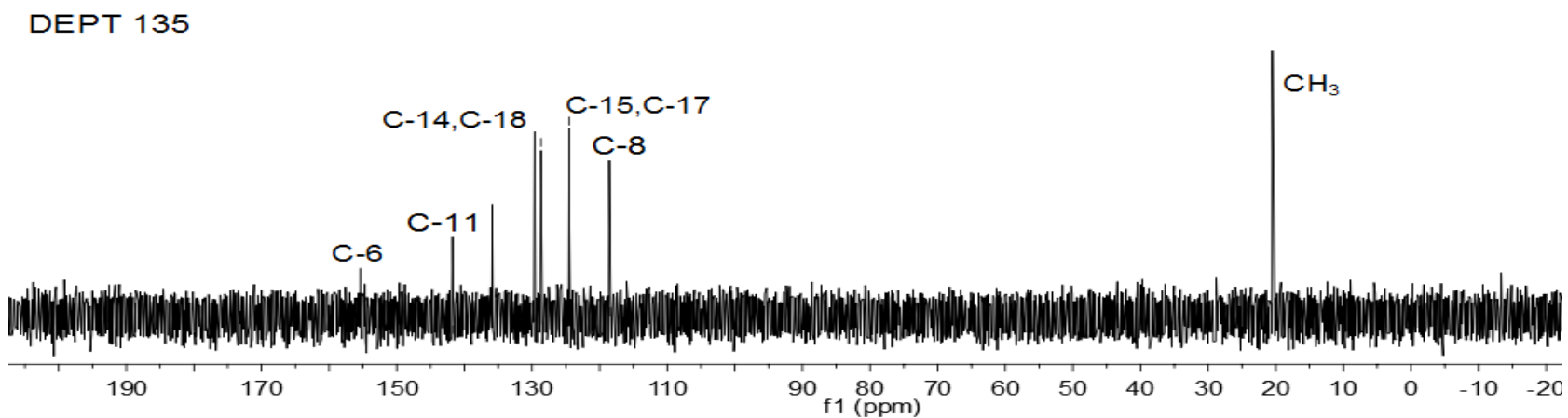
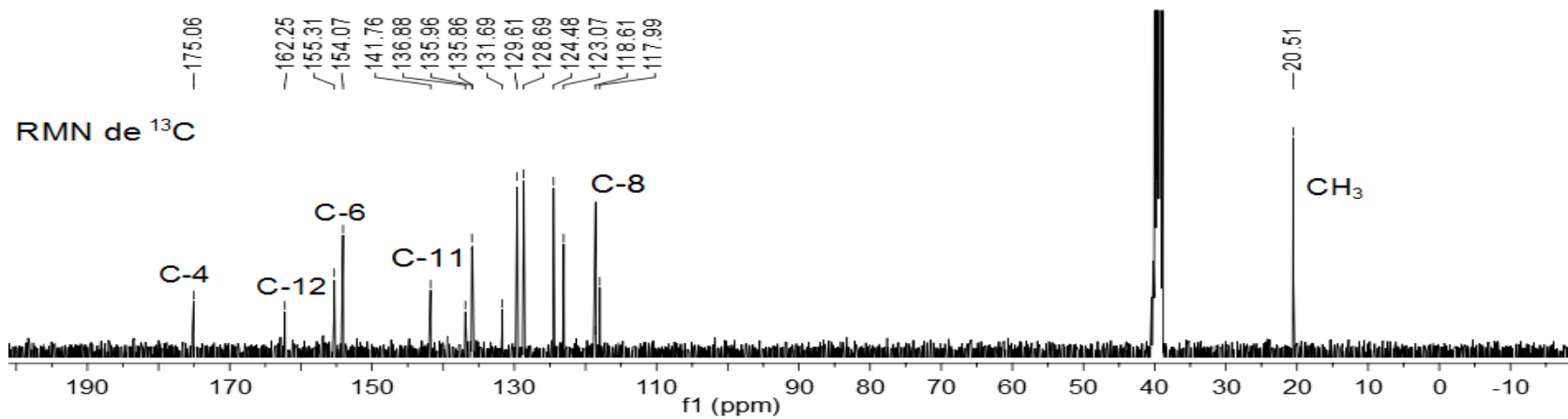
A25- Espectros de RMN ^1H (400 MHz em $\text{DMSO-}d_6$) do ligante livre HCrPh (19) e do complexo $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21).



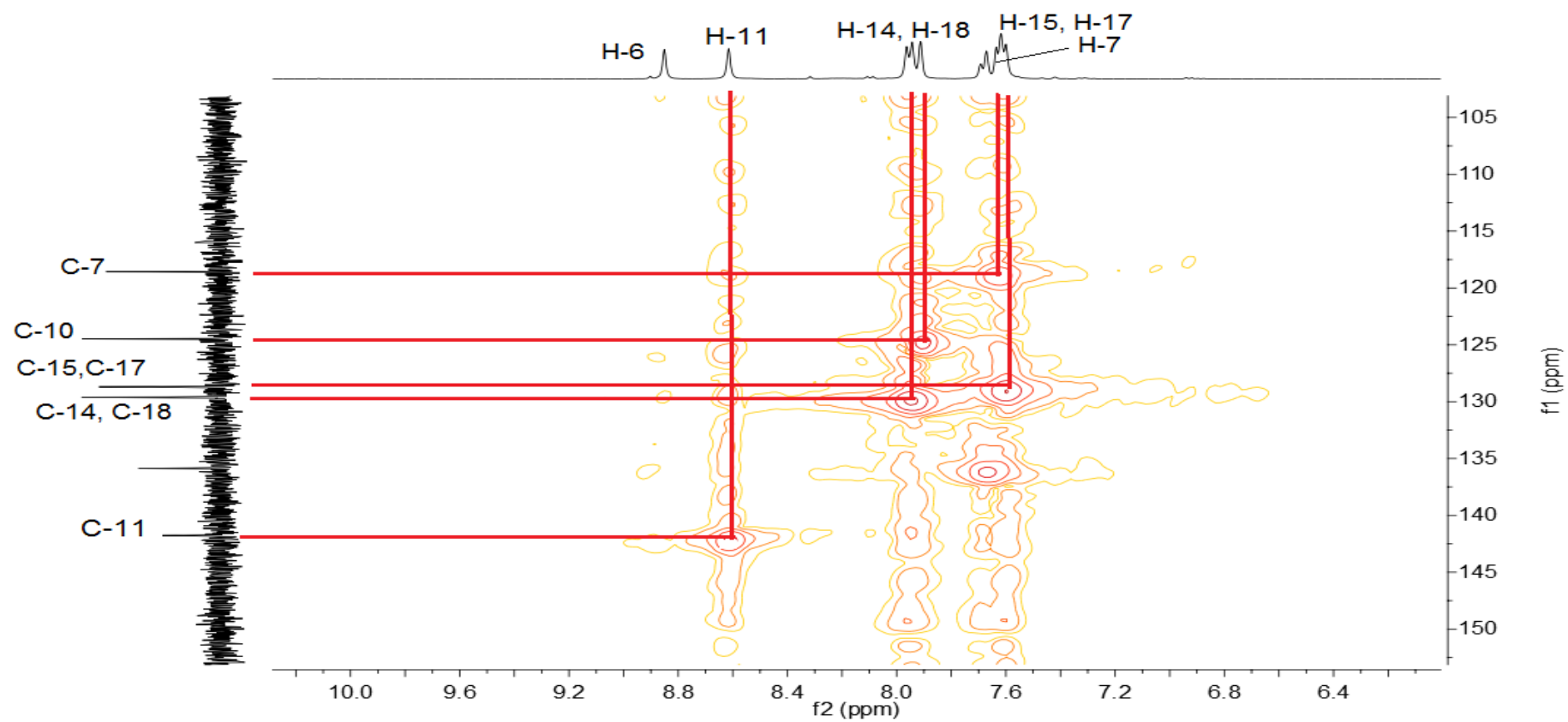
A26- Espectros de RMN ¹³C (100 MHz em DMSO-*d*₆) do ligante livre HCrPh (19) e do complexo [Ag(HCrPh)₂]NO₃ 2H₂O (21).



A27- Espectros de RMN ¹³C (100 MHz em DMSO-*d*₆) do ligante livre HC₂r₂pClPh (20) e do complexo [Ag(HC₂r₂pClPh)₂]NO₃ (22).



A28- Espectros de RMN ^{13}C e subespectro DEPT 135 (100 MHz em $\text{DMSO}-d_6$) do complexo $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22).



A29- Expansão do mapa de contorno HMQC do complexo $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22), 400 MHz em $\text{DMSO-}d_6$.

Dados cristalográficos

Tabela A30- Dados cristalográficos e de refinamento para HStpNO₂Ph·DMSO (4a).

Composto	HStpNO ₂ Ph·DMSO (4a)
Fórmula Empírica	C ₂₄ H ₂₃ N ₃ O ₄ S
Massa molecular	449,51
Temperatura, K	150(2) K
Comprimento de onda, Å	0,71073 Å
Sistema cristalino	Monoclinico
Grupo espacial	P 2 ₁ /c
Dimensões da célula unitária	a, Å 24,5924(8) b, Å 6,8610(2) c, Å 13,1952(4) α, °90 β, °102,513(3) γ, °90
Volume, Å ³	2173,52(12)
Z/ Densidade calc., Mg/m ³	4/1,374
Coeficiente de Absorção, mm ⁻¹	0,186
F(000)	944
Dimensões do cristal, mm ³	0,472 x 0,411 x 0,159
Faixa de θ para os dados coletados, °	2,545 a 26,370
Faixa de hkl	-30 ≤ h ≤ 30 -8 ≤ k ≤ 8 -16 ≤ l ≤ 16
Reflexões coletadas/ únicas [R _{int}]	67230/ 4449 [R(int) = 0,0361]
Max. e min. de transmissão	1,00000 e 0,71148
Dado / restrições /parâmetros	4449 / 0 / 291
Qualidade de ajuste S	1,039
Índices R (todos)	R ₁ = 0,0350, wR ₂ = 0,0865
Índices R (final)[I > 2σ(I)]	R ₁ = 0,0320, wR ₂ = 0,0842
Picos de intensidade residual de carga, e Å ⁻³	0,267 e -0,334

Tabela A31- Valores de distância de ligação (Å) e ângulos selecionados (°) na estrutura de HStpNO₂Ph·DMSO (4a).

Ligação (Å)	
C(15)-N(1)	1,2764(16)
C(16)-O(1)	1,2172(15)
C(16)-N(2)	1,3591(15)
C(16)-C(17)	1,5024(16)
N(1)-N(2)	1,3755(13)
Ângulos (°)	
O(1)-C(16)-N(2)	123,01(11)
O(1)-C(16)-C(17)	120,67(11)
N(2)-C(16)-C(17)	116,30(10)
C(15)-N(1)-N(2)	117,32(10)
C(16)-N(2)-N(1)	116,27(9)
C(8)-C(7)-H(7)	117,0
C(6)-C(7)-H(7)	117,0

Tabela A32- Ângulos de Torção selecionados [°] na estrutura de HStpNO₂Ph·DMSO (4a).

C(2)-C(1)-C(6)-C(7)	179,13 (12)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	-179,39 (11)
C(1)-C(6)-C(7)-C(8)	-176,37 (12)
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	-178,59 (11)
O(1)-C(16)-N(2)-N(1)	-3,54 (19)
C(15)-N(1)-N(2)-C(16)	170,53 (11)

Tabela A33- Interações de hidrogênio [Å] e ângulos [°] observados na estrutura de HStpNO₂Ph DMSO (4a).

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
C(15)-H(15)...O(4)	0,95	2,52	3,2828(15)	137,0
C(21)-H(21)...O(1)#1	0,95	2,41	3,0936(15)	128,5
C(101)-H(10A)...N(1)#1	0,98	2,65	3,5873(18)	161,3
C(102)-H(10E)...O(1)#2	0,98	2,60	3,5591(18)	167,6
C(102)-H(10F)...O(2)#3	0,98	2,56	3,2502(17)	127,9
N(2)-H(2A)...O(4)	0,88	1,95	2,7811(13)	155,9

Códigos de simetria: #1 x,-y+3/2,z-1/2 #2 x,-y+1/2,z-1/2 #3 -x,y-1/2,-z+1/2 .

Tabela A34- Dados cristalográficos e de refinamento para HStpT (5).

Composto	HStpT (5)
Fórmula Empírica	C ₂₃ H ₂₀ N ₂ O
Massa molecular	340,41
Temperatura, K	150(2) K
Comprimento de onda, Å	0,71073 Å
Sistema cristalino	Monoclinico
Grupo espacial	P 21/c
Dimensões da célula unitária	a, Å 20,7840(13) b, Å 5,5248(3) c, Å 16,1747(9) α , °90 β , °109,915(7) γ , °90
Volume, Å ³	1746,23(19)
Z/ Densidade calc., Mg/m ³	4/1,295
Coeficiente de Absorção, mm ⁻¹	0,080
F(000)	720
Dimensões do cristal, mm ³	0,453 x 0,236 x 0,095
Faixa de θ para os dados coletados, °	2,084 a 26,371
Faixa de hkl	-25 ≤ h ≤ 25 -6 ≤ k ≤ 5 -20 ≤ l ≤ 19
Reflexões coletadas/ únicas[R _{int}]	13411/ 3557 [R(int) = 0,0296]
Max. e min. de transmissão	1,00000 e 0,84210
Dado / restrições /parâmetros	3557 / 0 / 236
Qualidade de ajuste S	1,043
Índices R (todos)	R1 = 0,0481, wR2 = 0,1069
Índices R (final)[I>2 σ (I)]	R1 = 0,0395, wR2 = 0,1010
Picos de intensidade residual de carga, e Å ⁻³	0,253 e -0,214

Tabela A35- Valores de distância de ligação (Å) e ângulos selecionados (°) na estrutura de HStpT (5).

Ligação (Å)	
C(15)-N(1)	1,2817(17)
C(16)-O(1)	1,2262(17)
C(16)-N(2)	1,3670(17)
C(16)-C(17)	1,4885(18)
N(1)-N(2)	1,3706(14)
Ângulos (°)	
C(15)-N(1)-N(2)	116,17(12)
C(16)-N(2)-N(1)	118,66(11)
N(1)-C(15)-H(15)	120,6
C(12)-C(15)-H(15)	120,6
O(1)-C(16)-N(2)	122,42(12)
O(1)-C(16)-C(17)	122,59(12)
N(2)-C(16)-C(17)	114,99(12)

Tabela A36- Ângulos de Torção selecionados [°] na estrutura de HStpT (5).

C(2)-C(1)-C(6)-C(7)	-178,86(12)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	-175,75(13)
C(1)-C(6)-C(7)-C(8)	4,3(2)
O(1)-C(16)-N(2)-N(1)	4,82(19)
C(17)-C(16)-N(2)-N(1)	-175,49(11)
C(15)-N(1)-N(2)-C(16)	-172,91(12)

Tabela A37- Interações de hidrogênio [Å] e ângulos [°] observados na estrutura de HStpT (5).

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(2)-H(2A)...O(1)#1	0,88	2,51	3,3770(16)	168,4

Códigos de simetria: #1 x,y+1,z

Tabela A38- Dados cristalográficos e de refinamento para HCrpClPh·DMSO (20a).

Composto	HCrpClPh·DMSO (20a)
Fórmula Empírica	C ₂₀ H ₁₉ ClN ₂ O ₄ S
Massa molecular	418,88
Temperatura, K	270(2) K
Comprimento de onda, Å	0.71073 Å
Sistema cristalino	Triclinico
Grupo espacial	P-1
Dimensões da célula unitária	a, Å 8,5179(7) b, Å 11,5982(11) c, Å 11,7365(12) α , ° 107,126(9) β , ° 109,813(9) γ , ° 101,494(8)
Volume, Å ³	983,10(16)
Z/ Densidade calc., Mg/m ³	2/1,415
Coeficiente de Absorção, mm ⁻¹	0,330
F(000)	436
Dimensões do cristal, mm ³	0,66 x 0,17 x 0,14
Faixa de θ para os dados coletados, °	1,95 a 26,37
Faixa de hkl	-10 ≤ h ≤ 10 -11 ≤ k ≤ 14 -13 ≤ l ≤ 14
Reflexões coletadas/ únicas [R _{int}]	7099 / 4035 [R(int) = 0,0298]
Max. e min. de transmissão	0,9542 e 0,8115
Dado / restrições /parâmetros	4035 / 0 / 260
Qualidade de ajuste S	1,021
Índices R (todos)	R1 = 0,0780, wR2 = 0,1224
Índices R (final)[I > 2σ(I)]	R1 = 0,0468, wR2 = 0,1023
Picos de intensidade residual de carga, e Å ⁻³	0,214 e -0,333

Tabela A39- Valores de distância de ligação (Å) e ângulos selecionados (°) na estrutura de HCrpClPh·DMSO (20a).

Ligação (Å)	
O(3)-C(12)	1,217(3)
N(1)-C(11)	1,267(3)
C(11)-H(11)	0,9300
N(1)-C(11)	1,267(3)
N(2)-N(1)	1,384(2)
Ângulos (°)	
O(3)-C(12)-N(2)	122,08(19)
N(1)-C(11)-H(11)	120,1
C(11)-N(1)-N(2)	117,04(19)
N(1)-N(2)-H(1N)	116,0(16)
O(3)-C(12)-C(13)	120,88(19)

Tabela A40- Ângulos de Torção selecionados [°] na estrutura de HCrpClPh·DMSO (20a).

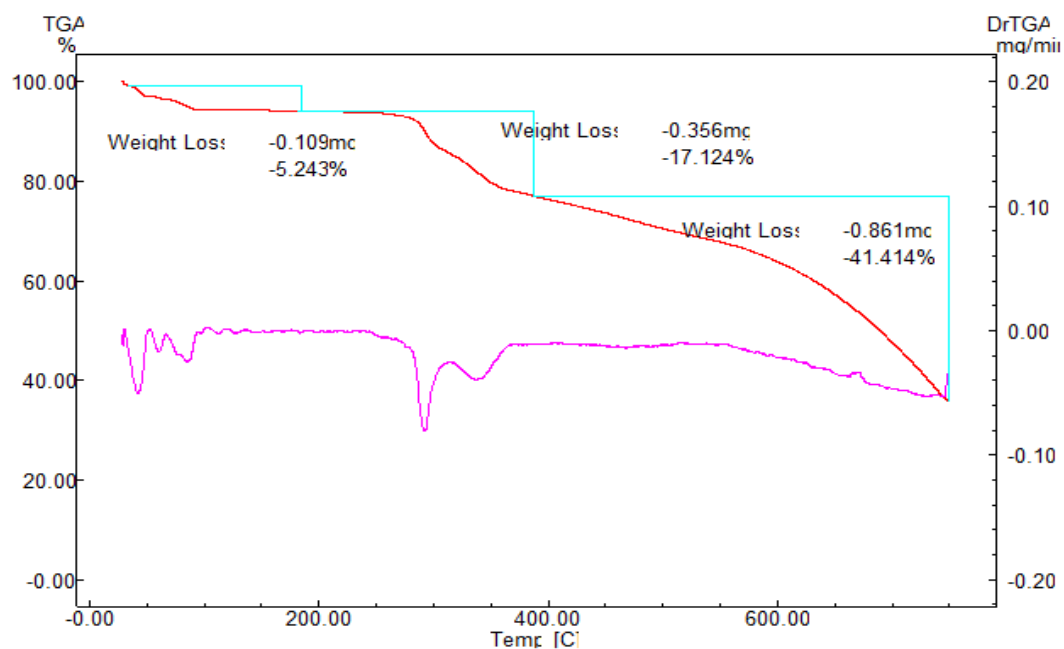
C(12)-N(2)-N(1)-C(11)	-176,5(2)
N(1)-N(2)-C(12)-O(3)	0,5(4)
N(2)-N(1)-C(11)-C(5)	179,83(19)

Tabela A41- Interações de hidrogênio [Å] e ângulos [°] observados na estrutura de HCrpClPh·DMSO (20a).

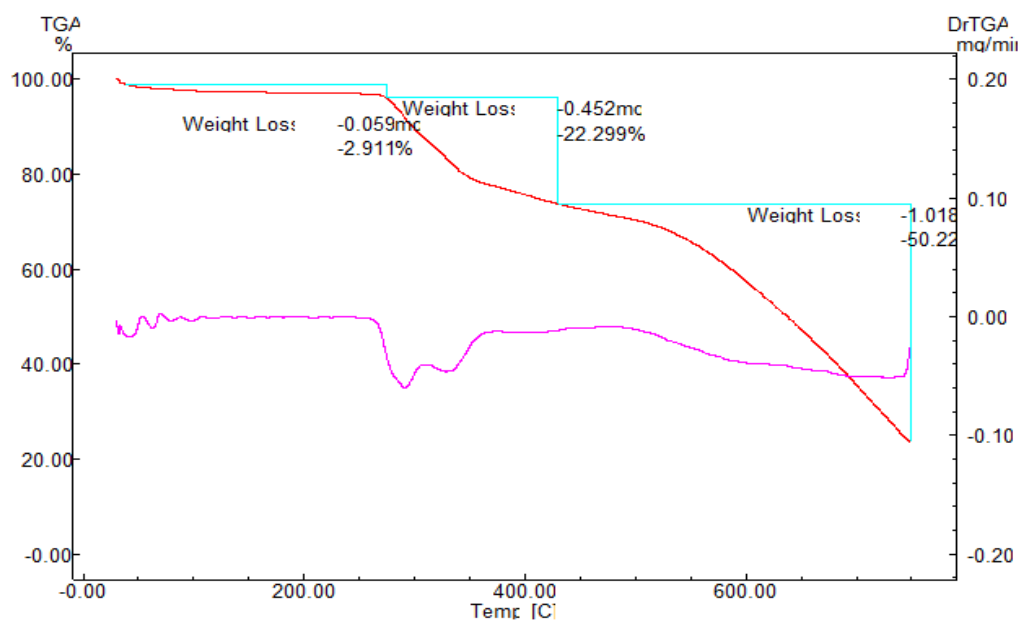
D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(2)-H(1N)...O(11)#1	0,86(3)	2,04(3)	2,898(3)	170(2)

Códigos de simetria: #1 -x+1,-y+1

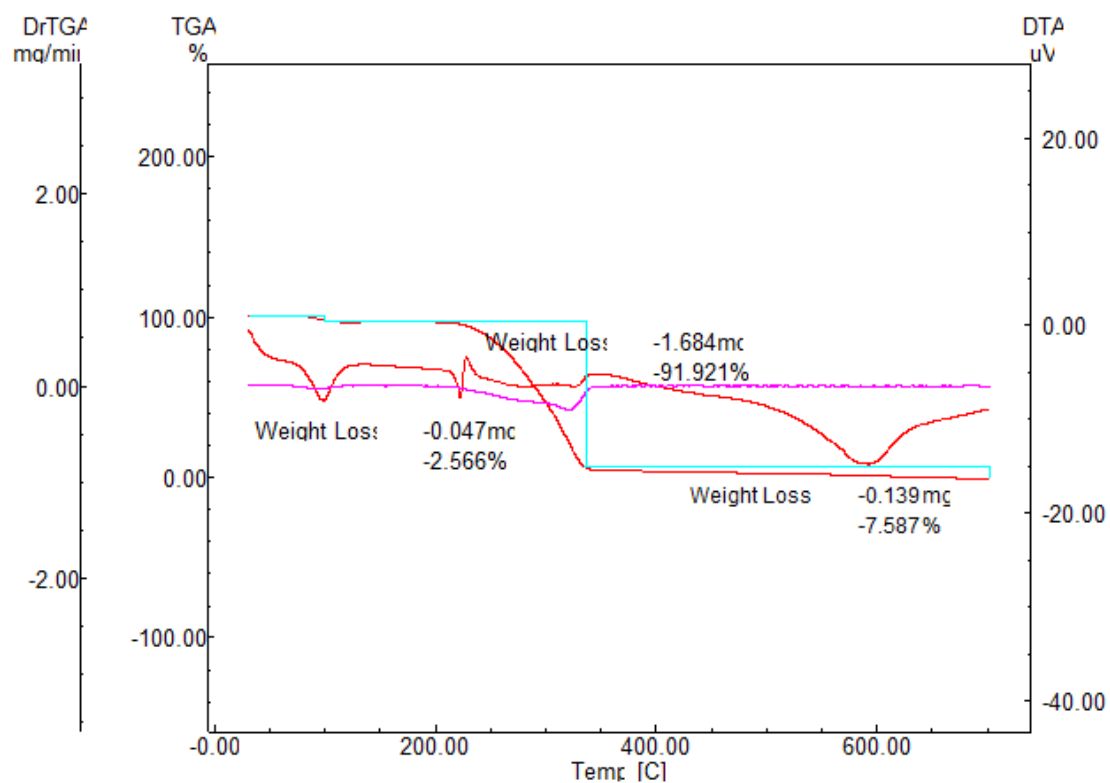
Curvas de TG/DTG



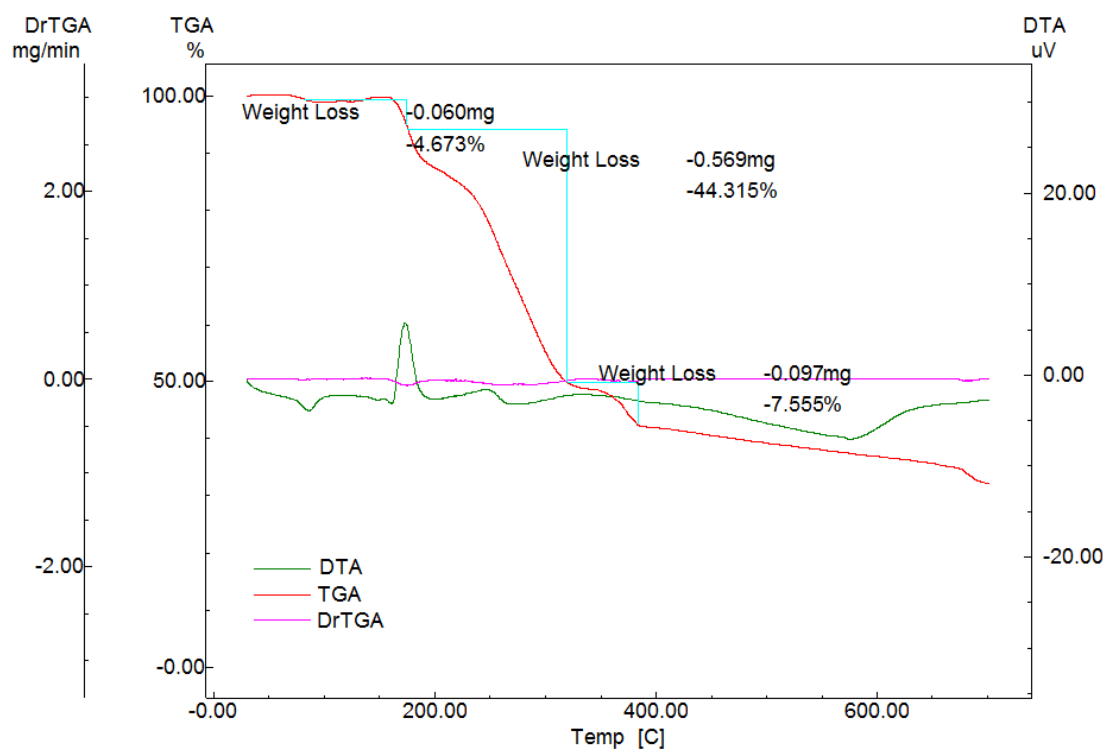
A42- Curva TG/DTG para o complexo $[\text{Cu}(\text{Nar})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \cdot 2\text{ClO}_4$ (17).



A43- Curva TG/DTG para o complexo $[\text{Cu}(\text{Hsp})(\text{Fen})(\text{OH}_2)]_2 \cdot 2\text{ClO}_4$ (18).

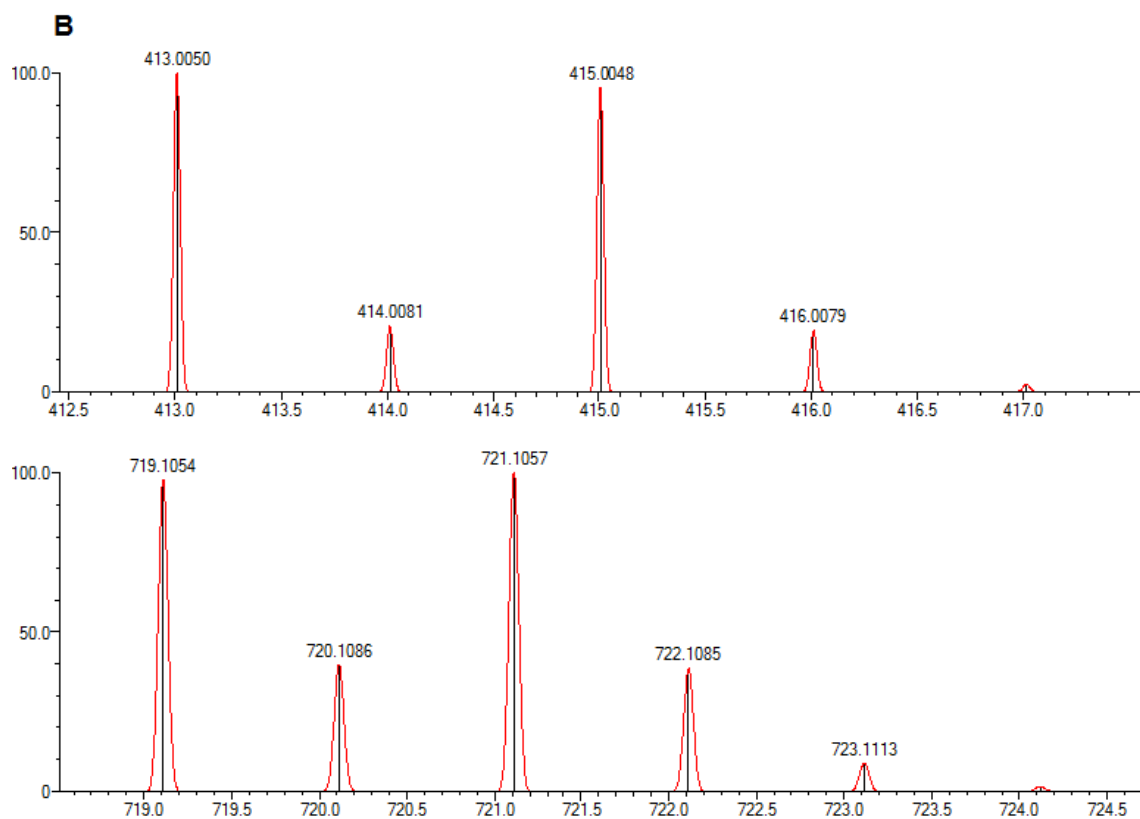
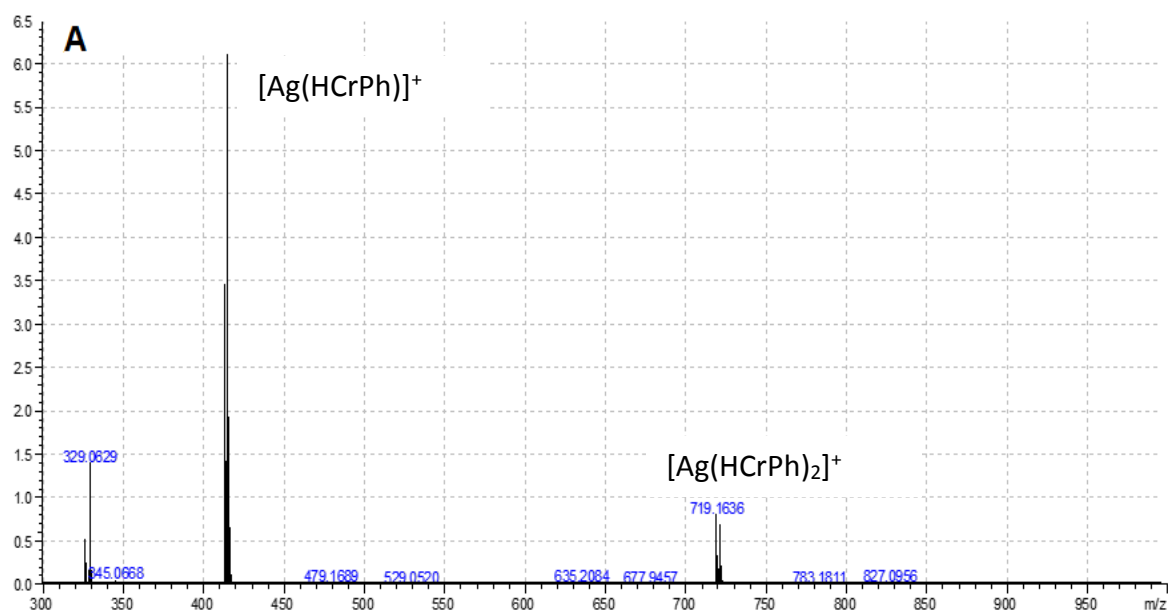


A44- Curva TG/DTG para o composto $\text{HCrClPh} \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ (20).

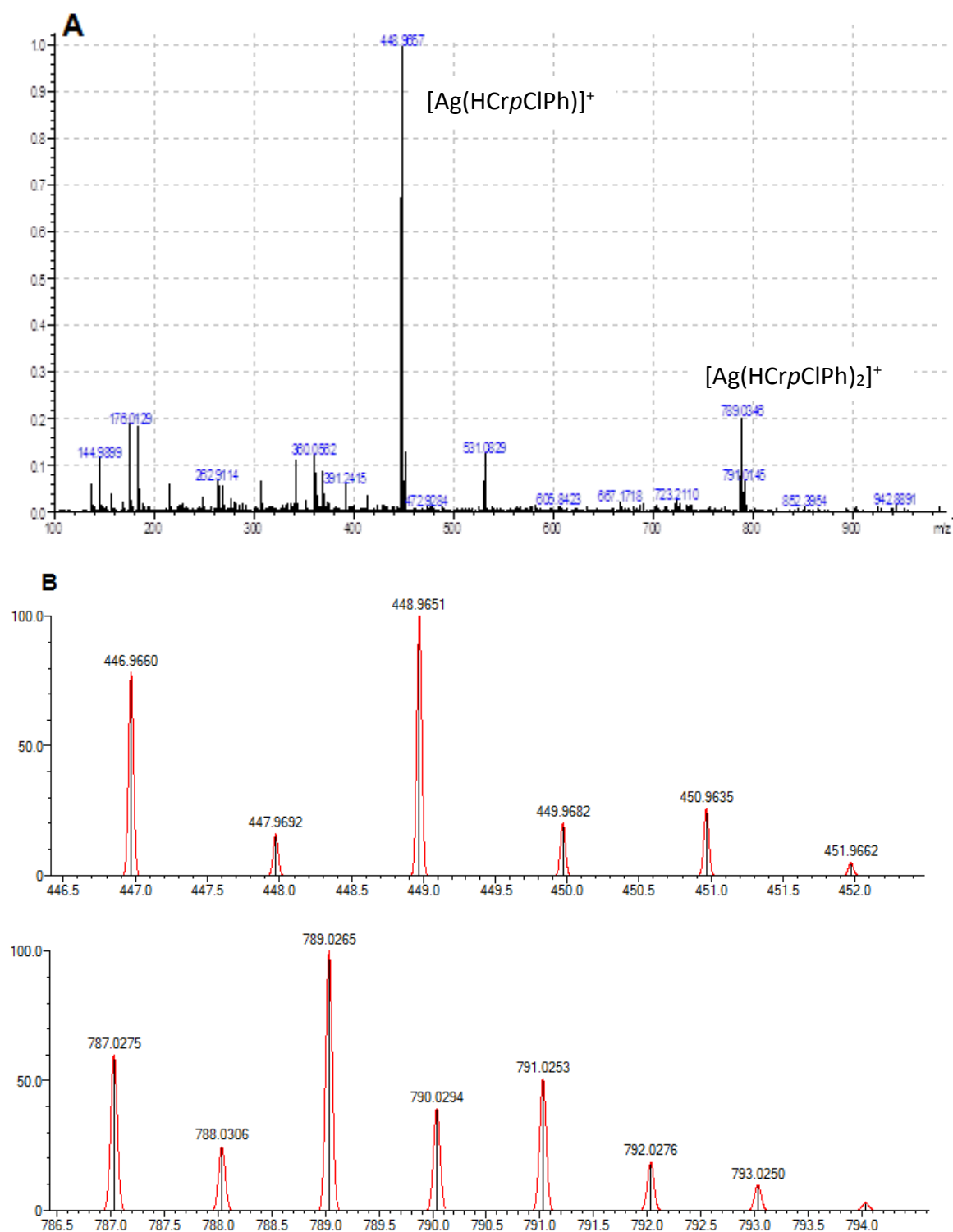


A45- Curva TG/DTG para o complexo $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21).

Espectros de massas



A46- A. Espectro de massas (ESI-MS) do complexo $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21), em modo positivo, de 200 a 900 m/z . **B.** Comparação entre os padrões isotópicos experimentais (m/z 412,9143 e 719,1636) e teórico (m/z 413,0029 e 719,1054) dos íons moleculares $[\text{Ag}(\text{HCrPh})]^+$ e $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]^+$.



A47- Espectro de massas (ESI-MS) do complexo $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (22), em modo positivo, de 200 a 900 m/z. **B.** Comparação entre os padrões isotópicos experimentais (m/z 448,9667 e 789,0346) e teórico (m/z 448,9651 e 789,0265) dos íons moleculares $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})]^+$ e $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]^+$.

Artigos

Copper(II) complexes with naringenin and hesperetin: cytotoxic activity against A 549 human lung adenocarcinoma cells and investigation on the mode of action

**Lenka V. Tamayo, Ligiane
R. Gouvea, Anna C. Sousa, Ronniel
M. Albuquerque, Sarah Fernandes
Teixeira, Ricardo Alexandre de A. do,**

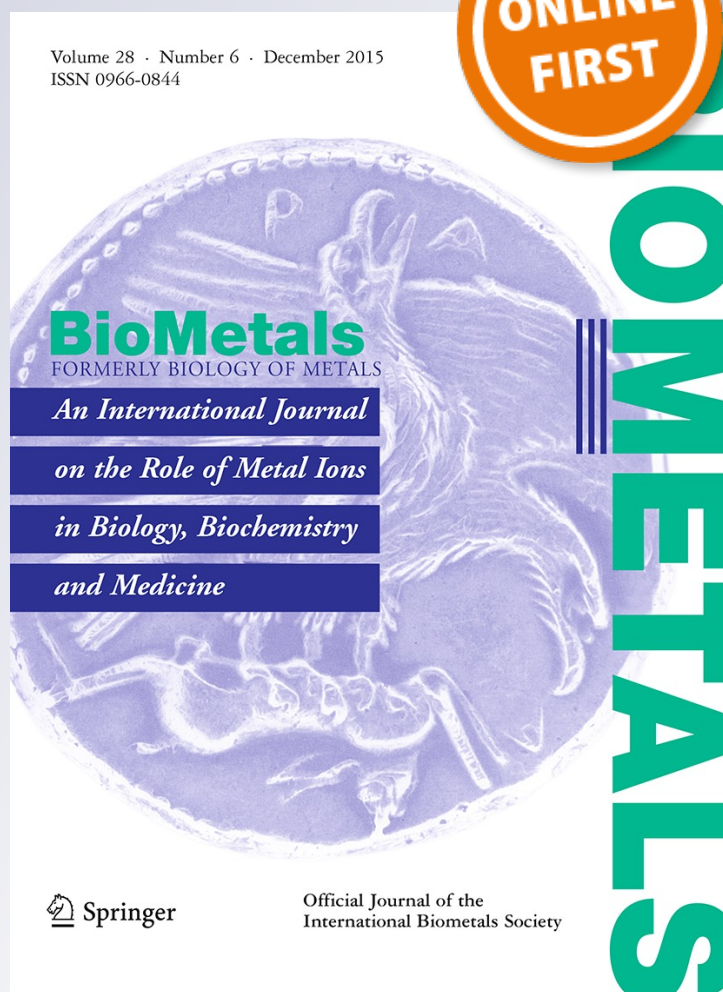
BioMetals

An International Journal on the Role of
Metal Ions in Biology, Biochemistry and
Medicine

ISSN 0966-0844

Biometals

DOI 10.1007/s10534-015-9894-0



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Copper(II) complexes with naringenin and hesperetin: cytotoxic activity against A 549 human lung adenocarcinoma cells and investigation on the mode of action

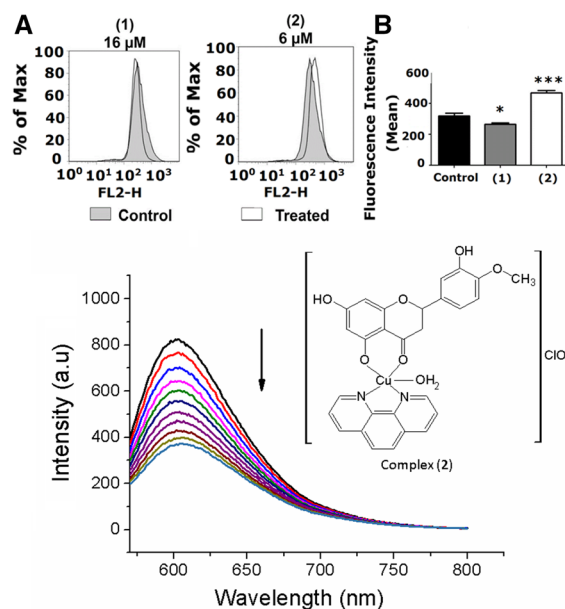
Lenka V. Tamayo · Ligiane R. Gouvea · Anna C. Sousa ·
Ronniel M. Albuquerque · Sarah Fernandes Teixeira · Ricardo Alexandre de
Azevedo · Sonia R. W. Louro · Adilson Kleber Ferreira · Heloisa Beraldo

Received: 18 June 2015 / Accepted: 9 November 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Copper(II) complexes $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{L1})(\text{phen})](\text{ClO}_4)$ (**1**) and $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{L2})(\text{phen})](\text{ClO}_4)$ (**2**) (HL1 = naringenin; HL2 = hesperetin) were obtained, in which an anionic flavonoid ligand is attached to the metal center along with 1,10-phenanthroline (phen) as co-ligand. Complexes (**1**) and (**2**) were assayed for their cytotoxic activity against A549 lung carcinoma and against normal lung fibroblasts (LL-24) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). We found $\text{IC}_{50} = 16.42 \mu\text{M}$ (**1**) and $\text{IC}_{50} = 5.82 \mu\text{M}$ (**2**) against A549 tumor cells. Complexes (**1**) and (**2**) exhibited slight specificity, being more cytotoxic against malignant than against non-malignant cells. **1** and **2** induced apoptosis on A549

cells in a mitochondria-independent pathway, and showed antioxidant activity. The antioxidant effect of the complexes could possibly improve their apoptotic action, most likely by a PI3K-independent reduction of autophagy. Complexes (**1**) and (**2**) interact in vitro with calf thymus DNA by an intercalative binding mode. EPR data indicated that **1** and **2** interact with human serum albumin (HSA) forming mixed ligand species.

Graphical abstract



L. V. Tamayo · L. R. Gouvea · A. C. Sousa ·
R. M. Albuquerque · H. Beraldo (✉)
Departamento de Química, Universidade Federal de
Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil
e-mail: hberaldo@ufmg.br

S. F. Teixeira · R. A. de Azevedo · A. K. Ferreira
Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências
Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo,
SP 05508-900, Brazil

S. R. W. Louro
Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica
do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 22653-900, Brazil

A. K. Ferreira
Department of Medical Oncology, University of
Groningen, University Medical Center Groningen,
Hanzeplein 1, Groningen 9713, The Netherlands

Keywords Naringenin · Hesperetin · Copper(II) complexes · Cytotoxic activity · Mode of action

Introduction

Cancers figure among the leading causes of morbidity and mortality worldwide, with approximately 14 million new cases and 8.2 million cancer related deaths in 2012. The number of new cases is expected to rise by about 70 % over the next two decades (Stewart and Wild 2014). *Cis*[diamminedichloroplatinum(II)], “cisplatin”, was the first metal based drug to enter into worldwide clinical use for the treatment of cancer (Mjos and Orvig 2014). Today cisplatin therapy is a standard treatment against testicular cancer and plays an essential role in the treatment of ovarian, head and neck, bladder, cervical, melanoma, and lymphoma tumors (Wong and Giandomenico 1999).

Flavonoids are a group of polyphenols ubiquitously distributed in vegetables, fruits, seeds, nuts, grains, bark, roots, stems, flowers and plant-derived beverages (Selvaraj et al. 2012; Hegde et al. 2011). Flavonoids present numerous pharmacological activities, as anti-cancer, anti-diabetic, anti-atherosclerotic, anti-oxidant and anti-inflammatory agents (Selvaraj et al. 2012). These compounds have promising chemopreventive properties against different cancer types (Conceição Filho et al. 2014). Flavonoids act as antioxidants able to scavenge free radicals and reactive oxygen species (ROS) that are associated with several forms of tissue damage and disease, including cancer, atherosclerosis, neuronal degeneration, rheumatoid arthritis and aging (Hegde et al. 2011).

Flavonoids are strong metal chelating agents and their metal complexes have attracted attention in recent years due to their enhanced pharmacological activities when compared with the free ligands (Selvaraj et al. 2012). Metal complexes with flavonoids proved to possess antimicrobial, anticancer and antioxidant properties, among others (Selvaraj et al. 2012; Tan et al. 2009a, b).

Hesperetin (Hes) (3,5,7-trihydroxy-4-methoxyflavanone) (Fig. 1A) is the aglycone form of hesperidin, occurring in citrus fruits. Hesperetin shows antioxidant, anti-inflammatory, anti-allergic, hypolipidemic, vasoprotective and anti-carcinogenic effects (Hegde et al. 2011). Naringenin (Nar) (4,5,7-trihydroxyflavanone) (Fig. 1B), a metabolite of naringin, presents anticancer,

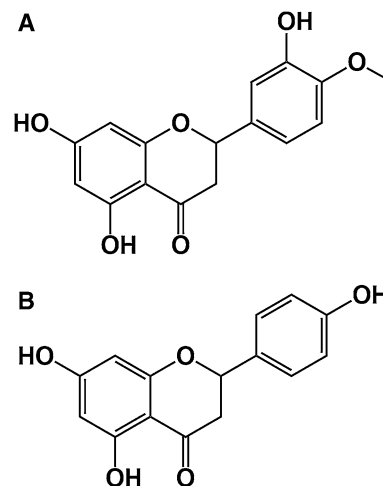


Fig. 1 Structures of naringenin (A) and hesperetin (B)

antioxidant, anti-inflammatory and antiviral activities (Conceição Filho et al. 2014).

The anticancer properties of several copper(II) complexes with bioactive ligands have been extensively investigated. We demonstrated that copper(II) complexes with Schiff base-derived ligands present cytotoxic activity against Jurkat leukemia, and MDA-MB and HCT-116 solid tumor cells (Da Silva et al. 2013). It has also been recently shown that a copper(II) complex with naringenin is highly cytotoxic to MDA-MB-231 tumor cells (Conceição Filho et al. 2014). In addition, copper(II) complexes with hesperetin, naringenin, and apigenin proved to be cytotoxic to hepatocellular (HepG-2) and gastric (SGC-7901) carcinoma cells (Tan et al. 2009b).

In the present work copper(II) complexes containing hesperetin or naringenin and the DNA-intercalating compound 1,10-phenanthroline as co-ligand were obtained and evaluated for their cytotoxic activities against A549 adenocarcinoma and against normal lung fibroblasts (LL-24) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). A preliminary investigation was carried out on the mechanisms of action of the complexes under study.

Materials and methods

Chemistry

All common chemicals were purchased from Aldrich and used without further purification.

Synthesis of the copper(II) complexes

The copper(II) complexes were obtained by adding a solution of copper(II) perchlorate to a solution of the desired flavonoid both in methanol under stirring. After 30–40 min, a methanol solution of 1,10-phenanthroline was added in 1:1:1 molar ratio. The reaction mixture was kept under reflux for eight hours. The obtained solids were washed with methanol and ether and then dried in vacuo. **[Cu(H₂O)₂(L1)(phen)] (ClO₄) (1)**.

Green solid. Anal. Calc. for [CuC₂₇H₂₃ClN₂O₁₁] (FW = 650.48 g mol⁻¹): C, 49.85; H, 3.56; N, 4.31. Found: C, 49.85; H, 3.25; N, 4.26. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹ DMF): 66.52 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Decomposition at 350 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(C=O) 1614 s; ν(C=N) 1520 s, ν(O–H) 3406, ν(Cl–O) 1070, 1092, 1120 s. Yield: 79 %. **[Cu(H₂O)(L2)(phen)] (ClO₄) (2)**.

Green solid. Anal. Calc. for [CuC₂₈H₂₃ClN₂O₁₁] (FW = 662.49 g mol⁻¹): C, 50.76; H, 3.50; N, 4.23. Found: C, 51.16; H, 3.06; N, 4.13. Molar conductivity (1 × 10⁻³ mol L⁻¹ DMF): 67.05 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Decomposition at 350 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(C=O) 1614 s; ν(C=N) 1520 s, ν(O–H) 3416, ν(Cl–O) 1122, 1092, 1060 s. Yield: 63 %.

Physical measurements

Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. Thermogravimetric curves were obtained with a TGA50H thermobalance (Shimadzu) in the 25–750 °C temperature range, under dynamic nitrogen atmosphere, at a heating rate of 5 °C·min⁻¹. An YSI model 31 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr plates (4000–400 cm⁻¹). X-band electron paramagnetic resonance (EPR) spectra were obtained with a Bruker ESP300E spectrometer with a modulation frequency of 100 kHz and a modulation amplitude of 0.5 mT. Powder samples were measured at ambient temperature in 1 mm diameter capillaries. Solutions of the complexes (5 × 10⁻⁴ M in DMSO) were measured at liquid N₂ temperature (77 K) in Teflon[®] tubes with a 3 mm internal diameter.

Biological activity

Cell lines and culture conditions

Human lung adenocarcinoma cell line A549, human normal lung fibroblasts LL-24 and human umbilical vein endothelial HUVEC cells were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MA, USA). Cells were maintained in RPMI-1640 supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), and incubated at 37 °C in humidified atmosphere with 5 % CO₂.

Cytotoxic activity

The cellular viability was evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay to determinate the half maximal inhibitory concentration of cellular viability (IC₅₀) values in the presence of complexes (1) and (2). A549 cells were seeded, at the concentration of 1 × 10⁴ cells/well, in 96-flat bottom wells culture plates and cells were allowed to adhere for 2 h. Thereafter, cells were treated with each copper(II) complex (0–50 μM) for 24 h, followed by the exposure for 3 h to 10 μL of MTT (5 mg/mL in phosphate buffer solution, PBS, 1X) in each well and plate incubation for an additional 3 h. Subsequently, the plate was centrifuged and the formazan crystal formed by viable cells was dissolved in 100 μL dimethyl sulfoxide (DMSO). The absorbance, optical density (OD) values, was measured on a microplate reader (VERSAmax Tunable Microplate Reader, Molecular Devices, CA, USA) at 538 nm. Finally, the cellular viability (%) relative to control group was calculated using the equation ODT/ODC × 100 %, where ODT represents the OD value of the treatment group and ODC represents the OD value of control group.

In order to better comprehend the mechanism of action of both copper(II) complexes, A549 cells were seeded in 96-well plates (1 × 10⁴ cells/well) and, after adherence, the cells were pre-treated with wortmannin 2 μM for an hour followed by the treatment for 12 h with 1 (16 μM) or 2 (6 μM). Thereafter, cells were exposed for 3 h to 10 μL of MTT (5 mg/mL in PBS 1X) in each well and plate incubation for an additional 3 h. The analysis of the MTT assay was performed as described previously.

Annexin V/Propidium iodide apoptosis assay

The apoptotic features were determined using the FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen Inc., UK). First, 5×10^5 A549 cells were planted in 12-well plates and, after adherence, the cells treated for 12 h with **1** (24, 16 or 8 μ M) or **2** (8, 6 or 3 μ M). Recombinant Murine TRAIL (PeproTech, NJ, USA) 2 μ g/mL was used as positive control for apoptosis. Subsequently, cells were harvested with cell scarper, washed in annexin-binding buffer and stained with 1.5 μ L of fluorescein isothiocyanate (FITC) annexin V and 0.4 μ L of the 100 μ g/mL propidium iodide (PI) working solution in binding buffer for 30 min at 4 °C in dark. The apoptotic cells were detected using FACScalibur cytofluorometer (Becton–Dickinson, CA, USA) and a total of 10,000 events per sample were acquired. Data analyses were performed using FlowJo software (TreeStar, CA, USA). Before the harvest, cellular monolayer morphologic features were captured using Nikon Elipse TE 200 (Nikon, Japan).

Measurement of mitochondrial membrane potential

A549 cells (5×10^5 cells/well) were seeded in 12-well plates and incubated for 12 h with (**1**) 16 μ M or (**2**) 6 μ M. After treatment, cells were harvested and washed once with PBS and stained with tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) for 15 min at 37 °C. Then, cells were washed once with PBS/BSA 0.5 % and kept at 4 °C during measurements. The mitochondrial membrane potential was measured by flow cytometry using FACScalibur cytofluorometer (Becton–Dickinson, CA, USA). A total of 10,000 cells/sample were analyzed, and the mean fluorescence intensity was recorded. Data analyses were performed using FlowJo software (TreeStar, CA, USA).

Measurement of ROS production

Intracellular production of reactive oxygen species (ROS) was assessed using dihydroethidium (DHE) probe. A549 cells seeded in 12-well plates (5×10^5 cells/well) were treated for 12 h with **1** (16 μ M) or **2** (6 μ M) after adherence. Then, cells were detached with trypsin 0.5 %, gently washed with PBS/BSA 0.5 % and incubated with 5 μ M DHE at 37 °C for 15 min. The production of ROS by the cells was analyzed by FACScalibur cytofluorometer (Becton–

Dickinson, CA, USA) and a total of 10,000 events per sample were acquired. Data analyses were performed using FlowJo software (TreeStar, CA, USA).

Statistical analyses

All the experiments were performed three times. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). The IC₅₀ values were calculated by plotting the percentage of inhibition of cellular viability, assessed by the MTT assay, versus logarithmic concentration of the compounds. Statistical analyses were performed using the Student's *t* test to compare between sample groups, and two-way ANOVA's were performed followed by the post hoc Bonferroni test to determine differences among multiple groups. A *p* value < 0.05 was considered significant (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001). All analyses were performed using Graph-Pad Prism software, version 5.04 (LaJolla, CA, USA).

EPR Studies on the interaction of complexes (1) and (2) and bovinum serum albumin (BSA) and human serum albumin (HSA)

For the EPR studies on the interaction of the complexes with BSA and HSA, equimolar solutions (0.4×10^{-3} mol L⁻¹) of BSA or HSA with the complexes (**1**) or (**2**) were prepared in 0.010 M phosphate buffer at pH 7.4. EPR spectra were obtained at 77 K.

DNA binding studies

The interaction of complexes (**1**) and (**2**) with deoxyribonucleic acid from calf thymus (CT-DNA) was studied in Tris–HCl buffer (NaCl 50 mM, Tris–HCl 5 mM pH 7.20). Stock solution of CT-DNA in Tris–HCl buffer was prepared by shaking in an orbital shaker at 120 rpm at 37 °C for 24 h. Then, the solution was filtered with a Millipore filter (0.45 μ m), and its concentration was calculated using absorption intensity at 260 nm and the molar absorption coefficient (ϵ) value at this wavelength ($6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Reichmann et al. 1954). The stock solutions of complexes (**1**) and (**2**) were freshly prepared by first dissolving the compound in DMSO and then diluting with buffer. The amount of DMSO was kept less than 5 % (by volume) for each set of experiments and it presented no effect on any of the experimental results.

Absorption titration experiments were performed by increasing the concentration of the CT-DNA via successive additions of its stock solutions on a fixed concentration of complex. Upon addition in each cuvette (sample and blank) of a same aliquot of CT-DNA (double beam mode), the samples were shaken and left in equilibrium for 2 min, before recording each spectrum.

The affinity of complexes (1) and (2) for DNA was evaluated by a fluorescence technique, using ethidium bromide (EB) bound to CT-DNA (EB-CT-DNA) solution in Tris-HCl buffer (pH 7.20). EB shows an increase in the emission intensity due to its intercalative binding to CT-DNA. The changes in the fluorescence intensity at 602 nm (excitation at 545 nm) of EB-CT-DNA were measured with respect to the concentration of the complex. In fact, when it is removed, EB is non-emissive in Tris-HCl buffer solution (pH 7.20), due to fluorescence quenching of the free EB by solvent molecules. A competitive binding of the complexes to CT-DNA resulted in the displacement of the bound EB, thereby decreasing its emission intensity.

Results and discussion

Formation of the copper(II) complexes

Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{L1})(\text{phen})]\text{ClO}_4$ (1), and $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{L2})(\text{phen})]\text{ClO}_4$ (2) in which an anionic flavonoid ligand (HL1 = Nar; HL2 = Hes) and 1,10-phenanthroline are attached to the metal center, and a perchlorate acts as counter ion. The presence of water molecules in complexes (1) and (2) was confirmed by their thermogravimetric curves which show weight losses of 5.21 % (Calc. 5.53 %) for complex (1); and 2.95 % (Calc. 2.71 %) for complex (2), corresponding to the release of two and one water molecules, respectively. The analyses of the EPR spectra indicated that complexes (1) and (2) are mainly binuclear in the solid state (see “EPR spectroscopy” section).

Spectroscopic characterization

Infrared Spectroscopy

The vibrations attributed to $\nu(\text{C}=\text{O})$ at 1630–1636 cm^{-1} in the infrared spectra of the free flavonoids shift

to 1614 cm^{-1} in the spectra of the complexes, in agreement with coordination of the carbonyl oxygen (Wang et al. 2006). A new absorption at 1520 cm^{-1} in the spectra of complexes (1) and (2) was attributed to the $\nu(\text{C}=\text{N})$ vibration of the 1,10-phenanthroline co-ligand (Nakamoto 1986). In addition, new absorptions at 1060–1122 cm^{-1} were attributed to $\nu(\text{Cl}-\text{O})$ vibrations from perchlorate (Manikandamathavana et al. 2011). The vibrations assigned to $\nu(\text{OH})$ were found in the 3400–3300 cm^{-1} range.

EPR spectroscopy

Room temperature X-band EPR spectra of complexes (1) and (2) powder samples are presented in Fig. 2. The determined g values were 2.063 (1) and 2.074 (2).

The wide spectra of complexes (1) and (2) present a large contribution characteristic of binuclear species, especially complex (1) (Weil et al. 1993; Krishnapriya et al. 2008) as indicated by their zero field splitting parameter $D_{(1)} = 630$ G and $D_{(2)} = 580$ G. The distance between the two copper(II) ions can be estimated from this parameter. The average distance r between the two coupled unpaired electrons can be calculated by using Eq. (1)

$$D = \frac{3g\beta}{2r^3} = 1.39 \times 10^4 \frac{g}{r^3} \quad (1)$$

for D in gauss and r is in angstroms (Eaton et al. 1983). The calculated distance r for the binuclear complexes (1) and (2) are 3.6 and 3.7 Å. These distances are similar to those obtained for other copper(II) binuclear complexes (Batista et al. 2011; Saha et al. 2004; Psomas et al. 2006).

The EPR spectra of complexes (1) and (2) in DMSO solution at 77 K are presented in Fig. 3 (parameters in Table 1). The complexes present two axially symmetric mononuclear components, denoted a and b. Figure 3 shows the positions of the first three hyperfine lines in the parallel region of components a and b. A third component due to binuclear copper can be noticed by the high field line labeled c, and the corresponding low field line superimposed to the parallel region of the axial components. It can be noted that complex (2) has a much smaller contribution of component a than complex (1). The EPR parameters of $[\text{CuCl}_2(\text{phen})]$ (Batista et al. 2011) appear in Table 1, for comparison. They are

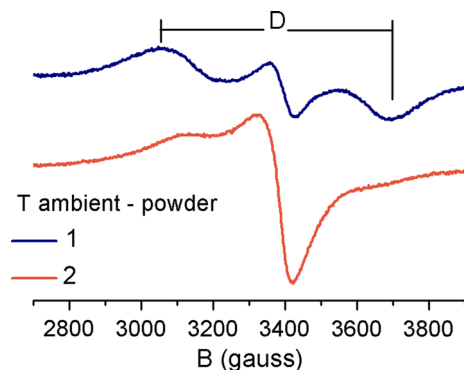


Fig. 2 Room temperature X-band EPR spectra of complexes (1) and (2) powder samples

Table 1 EPR parameters of DMSO solutions of complexes (1) and (2) at 77 K

	$g_{\parallel}$	$g_{\perp}$	$A_{\parallel}(\text{gauss})$
a	2.32	2.08	160
b	2.26	2.08	175
$[\text{CuCl}_2(\text{phen})]^*$	2.292	2.074	155

* Batista et al. (2011)

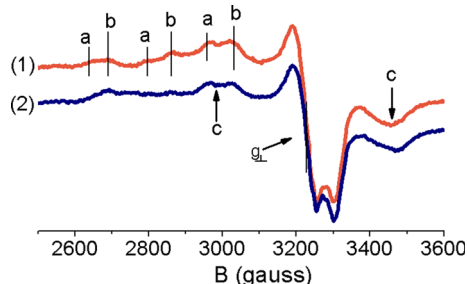


Fig. 3 EPR spectra of complexes (1) and (2) in DMSO solution at 77 K

different from those of the two types of flavonoid-phenanthroline complexes under study.

It can be mentioned that both polycrystalline samples and DMSO solutions consist of a superposition of signals due to mononuclear and binuclear complexes. The contribution of binuclear copper complex in DMSO solution is less than in powder, but the binuclear complex is not completely dissociated in DMSO solution at least at 77 K. In the biological tests we assumed that the monomeric species should be largely predominant at 37 °C and concentrations in the micromolar range.

Biological activity

Copper(II) complexes (1) and (2) have anti-proliferative effect on non-small cell lung carcinoma (NSCLC)

Naringenin (Nar), Hesperetin (Hes), 1,10-phenanthroline (phen), copper perchlorate, and complexes (1) and (2) were assayed for their ability to reduce cellular viability at 10 μM against human malignant melanoma, A2058 and against human lung carcinoma, A549 cells. Although Nar, Hes, phen and copper perchlorate reduced cellular viability in A2058 cells, complexes (1) and (2) revealed to possess poor cytotoxic effects. In contrast, complexes (1) and (2) but not the organic ligands nor copper perchlorate showed strong cytotoxic activity against A549 cells. Hence, coordination to copper(II) strongly modified the cytotoxic properties of the flavonoid ligands.

Considering this first screening, we selected complexes (1) and (2) which showed better cytotoxic effects against A549 cells. To evaluate anti-proliferative effects, 1 and 2 were tested in vitro on A549 cells and its parental lineage, the normal human lung, LL 24 cells. The compounds under study were tested as well against human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) to determinate anti-proliferative effects and the specificity of these two compounds.

After 24 h treatment, both compounds suppressed viability of A549 cells showing IC_{50} of 16.42 and 5.82 μM , respectively for compounds (1) and (2) (Table 2), in accordance with studies of other copper(II) complexes in A549 cells (Ma et al. 2015; İnci et al. 2015). Compounds (1) and (2), specially compound (2), presented also a slight specificity, shown by the determined IC_{50} values against LL-24 cells and against HUVEC as well. Thereby, besides the interesting results of both compounds, complex (2) displays a better profile considering that it needs almost 3 times lower dose than complex (1) to achieve the same effect and it is also more specific for malignant cells than complex (1).

Copper(II) complexes (1) and (2) induce apoptosis on A549 cells in a mitochondria independent pathway

Some copper(II) complexes are able to induce cellular apoptosis due to their DNA interacting and antioxidant activities (Ma et al. 2015; İnci et al. 2015; Ali et al.

Table 2 In vitro cell viability assay of complexes (1) and (2) against A549, LL-24 and HUVEC cells

Cell line	IC ₅₀ (μM) ± SD	
	Complex (1)	Complex (2)
A549	16.42 ± 2.44	5.82 ± 0.83
LL-24	24.14 ± 2.97	18.17 ± 1.44
HUVEC	31.02 ± 3.95	17.55 ± 3.66

Data presented as mean ± standard deviation of three independent experiments. Data are expressed as concentrations of the monomeric species, which are largely predominant in aqueous solution at room temperature. IC₅₀ = half maximal inhibitory concentration. SD standard deviation

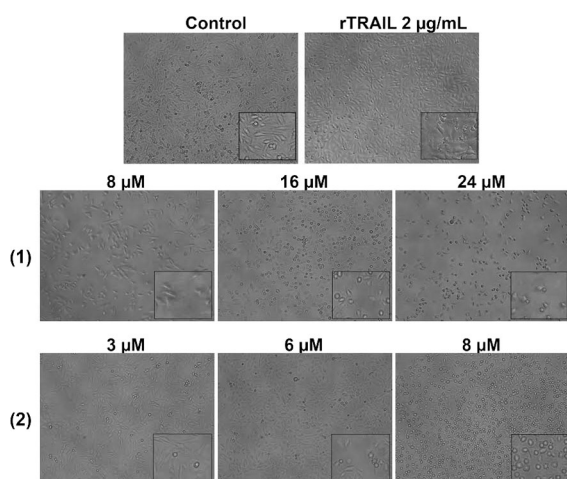


Fig. 4 Complexes (1) and (2) trigger morphological changes typical of apoptosis on A549 cells. Cellular morphology was observed after 24 h of treatment with (1) or (2) in three different concentrations. This experiment used recombinant murine TRAIL 2 μg/mL overnight treatment as a positive control for apoptosis. All treatments induced morphological changes typical of apoptosis (evidenced in *enlarged panels*): cellular shrinkage and cellular agglomeration. The images are representative of three independent experiments (original magnification, ×100)

2014; Lu et al. 2014; Raja et al. 2012). In order to identify the mechanisms related to the cytotoxic activity of complexes (1) and (2), Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) staining were employed. After overnight treatment with the compounds before the staining, images of cells were registered using an optical microscope (Fig. 4). Cytotoxic activity of both complexes was shown in A549 cells. All treatments induced cellular morphology changes typical of apoptosis: cellular shrinkage and cellular agglomeration. The images are representative of three independent experiments.

Consistently, the flow-cytometry data show that treatment with complexes (1) and (2) induces apoptosis (Fig. 5). A549 cells are a well-known cell lineage that shows resistance to recombinant murine rTRAIL apoptosis inducer. TRAIL is a cytotoxic protein, which activates rapid apoptosis in tumor cells, but not in normal cells. Of note, the lowest doses of complexes (1) and (2) are able to induce the maximum apoptotic effects and necrosis in A549 cells. However, complex (2) is more potent than complex (1). According to the MTT assay, these results indicated that complex (2) has better cytotoxic effects against A549 cells.

Afterwards, A549 cells treated with the copper(II) complexes were stained with tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) in order to investigate if apoptosis was related to a mitochondrial pathway (Fig. 6). However, the treatments were not able to reduce the mitochondrial membrane potential, indicating that apoptosis induced by these compounds is not related to mitochondrial depolarization.

Copper(II) complexes (1) and (2) have antioxidant activity on A549 cells

The production of reactive oxygen species (ROS) is a physiological mechanism which can culminate in oxidative stress (Yan 2014; Lushchak 2014). Generation of ROS can be associated to the regulation of several cellular responses, even cell proliferation, differentiation, and apoptosis (Raniga, et al. 2014). Thus, we evaluated if interference with ROS production could be associated to apoptosis induced by the copper(II) complexes under study. To this purpose, A549 cells were stained with dihydroethidium (DHE) probe after 12 h treatment with both compounds (Fig. 7A, B). A549 cells treated with both complexes showed reduction of ROS production, indicating that the two compounds have antioxidant activity over these cells.

In fact, several studies show that copper(II) complexes, naringenin and hesperetin exhibit antioxidant properties, displaying an effect of scavenging the superoxide radical (Li et al. 2007; Cavia-Saiz et al. 2010; McPhail et al. 2003). Furthermore, during cancer development, ROS levels also play a role in autophagy, a multi-step complex process which, according to the stage, tissue damaged and cells targeted, can prevent the transformation of healthy cells into cancerous cells but can also induce

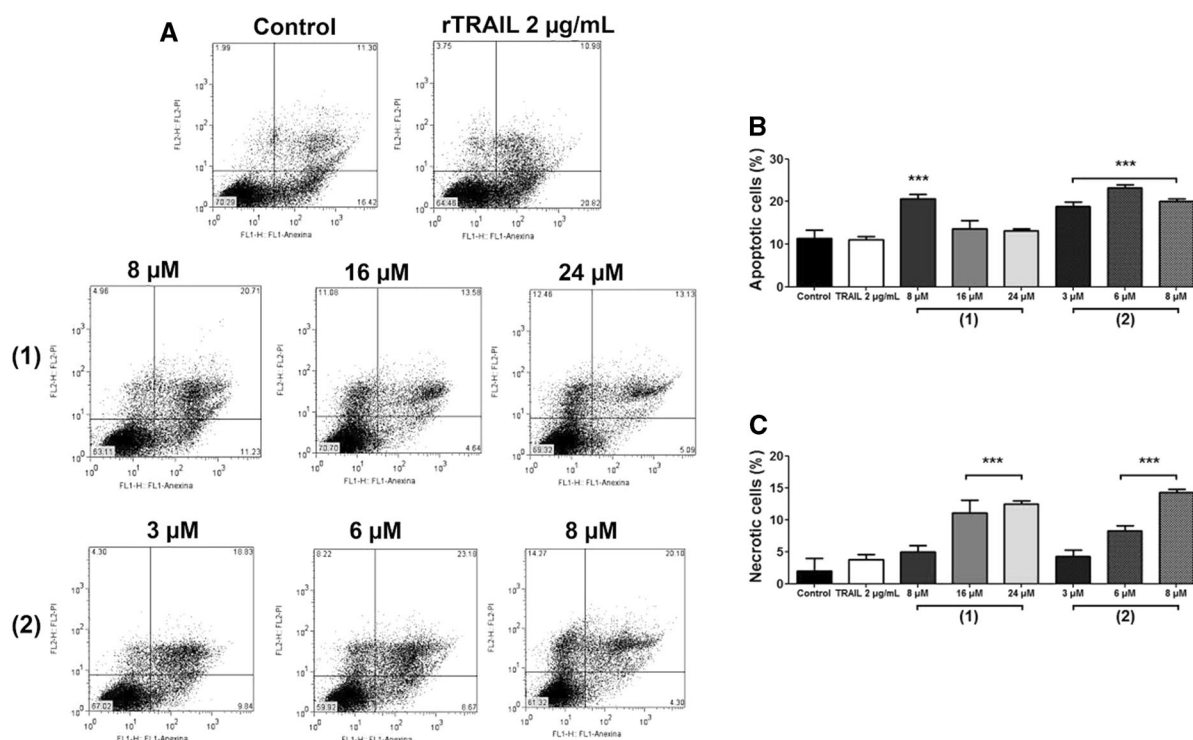


Fig. 5 Complexes (1) and (2) induce late apoptosis and necrosis. **A** Flow-cytometry of A549 cells staining with annexin V/PI was performed 12 h after treatment with complexes (1) or (2) in three different concentrations. rTRAIL 2 µg/mL treatment was used as positive control for apoptosis. **B** Apoptotic cells

treated with complexes (1) or (2) (stained with annexin V+/PI+) were quantified. **C** Necrotic cells treated with complexes (1) or (2) (stained with annexin V−/PI+) were quantified, as well. The data shown are the mean ± SD from three independent experiments. *** $p < 0.001$ versus control

resistance to chemotherapeutic treatment (Poillet-Perez et al. 2015; Filomeni et al. 2015). Therefore, the antioxidant activity of complexes (1) and (2) could as well be related to autophagy reduction, inhibiting the tumor progression effects of autophagy, and providing energy during unfavorable metabolic circumstances.

PI3 K/Akt/mTOR pathway is closely related to autophagy and inhibition of this axis putatively stimulates autophagy (Janku et al. 2011; Sui et al. 2013). Thus, we analyzed the relation of the antioxidant effect of both copper(II) complexes and this pathway by the inhibition of PI3K with wortmannin (Fig. 7C). Nevertheless, the pre-treatment with wortmannin was not able to reduce the cytotoxic effects of the copper(II) complexes on A549 cells. Overall, the antioxidant effect of these two compounds can improve the apoptotic action most likely by a PI3 K-independent reduction of autophagy.

EPR Studies of interactions between the copper(II) complexes (1-2) and human serum albumin (HSA)

Anticancer activity is strongly affected by drug-protein interactions in the bloodstream. Human serum albumin (HSA) is the major transport protein, which presents extraordinary ligand binding ability being capable of reversibly binding many endogenous and exogenous drugs. In addition, it may aid in the selective delivery of drugs to the tumor region and facilitate drug access into the cell (Recio Despaigne et al. 2014).

The human (HSA) and bovine (BSA) serum albumins have at least two copper(II) binding sites. Site 1 is the strong N-terminal site that binds copper(II) in a square-planar geometry via four nitrogen ligands (Rakhit et al. 1985; Sadler et al. 1994; Zgierski and Frieden 1990). This highest affinity binding site for the metal ion is formed by the α -NH₂ N atom, the N atoms of the first two peptide bonds and

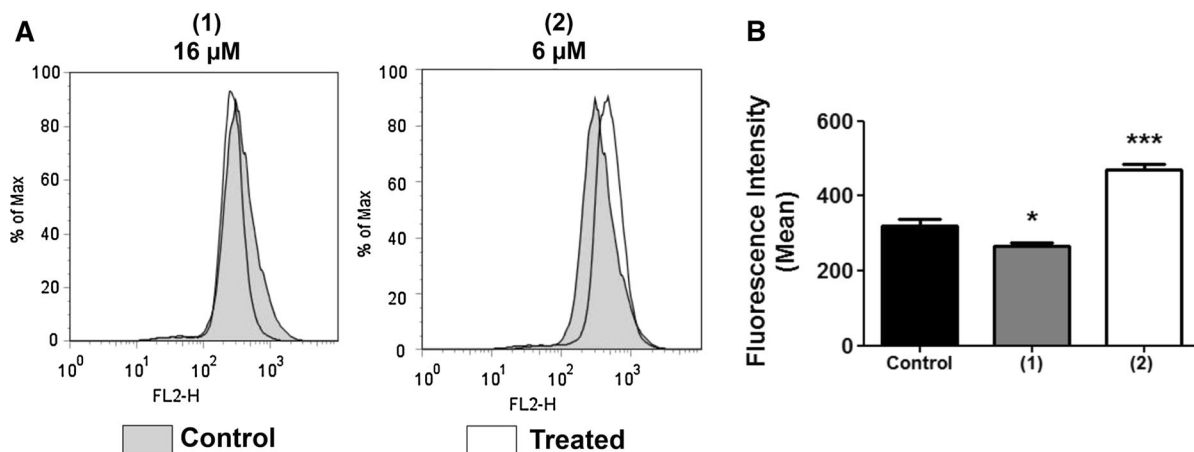


Fig. 6 Complexes (1) and (2) induce apoptosis in a mitochondrial independent manner. A549 cells were treated for 12 h with complexes (1) and (2) and stained with TMRE to assess changes in the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$ m) observed in apoptotic cells by flow-cytometry. **A** The results are represented as histograms of the control (in grey) and treated (in white) cells.

B The mean fluorescence of positive cells was also assessed. The data show that mitochondrial activity had no correlation to the cell death observed in the previous tests. The data shown are the mean $\pm$ SD from three independent experiments. *** $p < 0.001$ versus control and * $p < 0.05$ versus control

the N₃ atom of histidine His-3. This N-terminal site is fairly specific for transition metal ions and binds copper(II) and nickel(II) in forms that will not generate reactive species (Fasano et al. 2005). Cys-34 is the only cysteine with a free sulfhydryl group, which does not participate in a disulfide linkage with any external ligand (Sugio et al. 1999). Cys-34 is involved in the second copper binding site (Zang and Wilcox 2002).

The spectra of CuCl₂ BSA (a) and CuCl₂ HSA (b) solutions are presented in Fig. 8. These are characteristic of two EPR components with axial symmetry. The two sets of hyperfine lines are labeled 1 and 2 in the $g_{\parallel}$ region, in Fig. 8. This tells us that at pH 7.4 both sites are occupied even at a 1:1 molar ratio, as already noticed by Patel and co-workers (Patel and Pandeya 2000). The $g_{\perp}$ region is a superposition of the lines from both sites. The Cu(HSA) and Cu(BSA) spectra are very similar (same parameters). The copper(II)-albumin EPR spectra were simulated using EasySpin (Stoll and Schweiger 2006) and the parameters appear in Table 3.

Figure 8 shows the EPR spectra of complexes (1) and (2) in the presence of equimolar amounts of BSA or HSA. The spectra of the complexes also show a superposition of two binding sites, but comparing with the spectra in Fig. 3 it is observed that binuclear complexes were completely dissociated in the presence of albumins. The lines labeled 1 have the same

positions in both complexes, and same parameters as copper(II) site 1 at the N-terminal of BSA and HSA, suggesting the same binding environment. This can be due to the displacement of one copper(II) ligand or both by the protein N-terminal to bind the metal at this site.

The hyperfine lines of site 2 for the complexes (labeled 2' in c, d, e and f) are displaced to higher field values ($g_{\parallel}$ shifts to lower values) relative to copper(II) site 2 in both albumins. The spectra also present a superhyperfine structure of 7 lines in the $g_{\perp}$ region (see the second derivative spectra in the inset) due to the interaction with nitrogen atoms (probably 3) with hyperfine splitting parameter $A_N = 13.6$ G. Since the nitrogen structure does not appear in either spectra of complexes (1) and (2) (Fig. 3) or BSA and HSA copper(II) complexes (Fig. 8a, b) it can be concluded that new mixed ligand copper complexes are formed with BSA and HSA involving protein nitrogen atoms.

The EPR spectra of complexes (1) and (2) with BSA/HSA were simulated using EasySpin (Stoll and Schweiger 2006) (excluding nitrogen structure), and the parameters for both sites appear in Table 3. The spectra of the complexes with albumins also show increased population of site 2' relative to site 1, indicating a higher affinity of complexes (1) and (2) for the copper site involving Cys-34. The shift in the EPR parameters of site 2 confirms that mixed-ligand

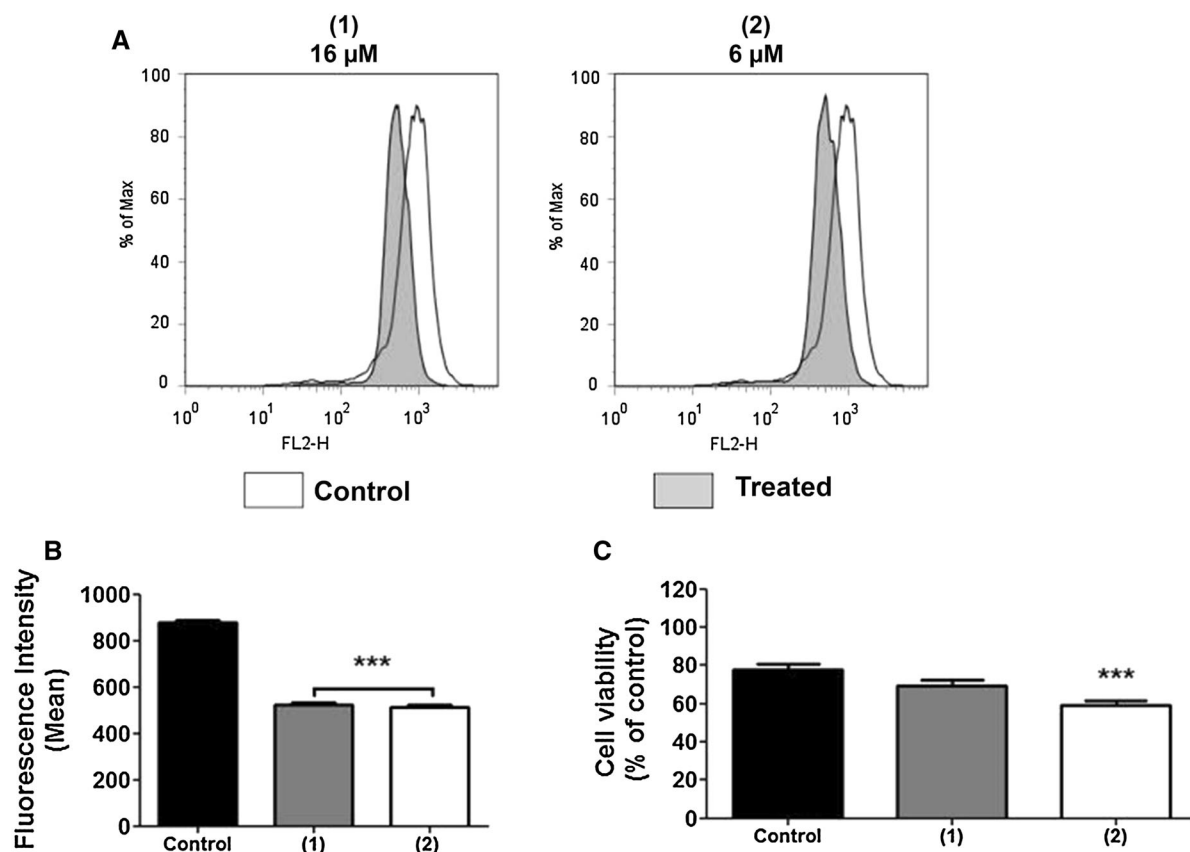


Fig. 7 Complexes (1) and (2) induce ROS scavange. **A** A549 cells were treated with complexes (1) and (2) and staining with DHE was used to assess changes in ROS production by flow-cytometry. The results are represented as histograms of the control (in white) and the treated (in grey) cells. **B** The mean fluorescence of positive cells was also assessed. **C** A549 cells

were pre-treated with wortmannin 2 μM, followed by the treatment for 12 h with both complexes. The cellular viability was assessed by the MTT assay. The data shown are the mean $\pm$ SD from three independent experiments. *** $p < 0.001$ versus control and * $p < 0.05$ versus control

complexes between the flavonoid copper(II) complex and albumin at site 2 are formed.

The EPR experiments show that the studied flavonoid copper complexes modify the protein sites by forming mixed-ligand complexes and it is likely that the structural modifications change proteins function.

DNA binding studies for complexes (1) and (2)

Electronic spectral studies Upon addition of increasing concentrations of DNA to a solution of complex (1) the absorption peaks of the complex showed slight hypochromism. However, saturation occurs after few additions and we were unable to collect enough data to accurately determine its intrinsic binding constant (K_b).

The absorption spectra of complex (2) in the absence and in the presence of calf thymus (CT-DNA) (at a constant concentration of the complex) are given in Fig. 9.

Upon addition of DNA, the absorption bands of complex (2) showed significant hyperchromism suggesting interaction with DNA (Dimiza et al. 2011). The intrinsic binding constant (K_b) of complex (2) with CT-DNA was obtained using Eq. 2 (Krishnamoorthy et al. 2011).

$$[\text{DNA}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f) = [\text{DNA}]/(\varepsilon_b - \varepsilon_f) + 1/K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f) \quad (2)$$

where [DNA] is the concentration of DNA base pairs, ε_a is the extinction coefficient of the complex at a given DNA concentration, ε_f is the extinction

coefficient of the complex in free solution and ϵ_b is the extinction coefficient of the complex when fully bound to DNA. A plot of $[\text{DNA}]/[\epsilon_a - \epsilon_f]$ vs $[\text{DNA}]$

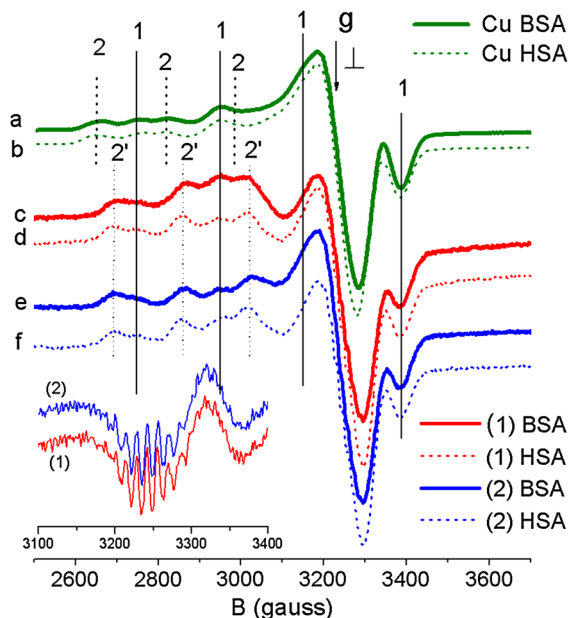


Fig. 8 EPR spectra of the copper(II) complexes (1) and (2) in the presence of equimolar amounts of BSA (d_1 , e_1) and HSA (d_2 , e_2)

Table 3 The copper(II)-albumin EPR parameters

Complex		$g_{\perp}$	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}/\text{MHz}$
$[\text{CuCl}_2(\text{phen})]$		2.07	2.29	497 (155 G)
Cu (BSA) or Cu(HSA)	Site 1	2.05	2.19	601 (196 G)
	Site 2	2.07	2.30	505 (157 G)
Complexes (1) and (2) (BSA) or (HSA)	Site 1	2.05	2.19	612 (200 G)
	Site 2'	2.064	2.27	534 (168 G)

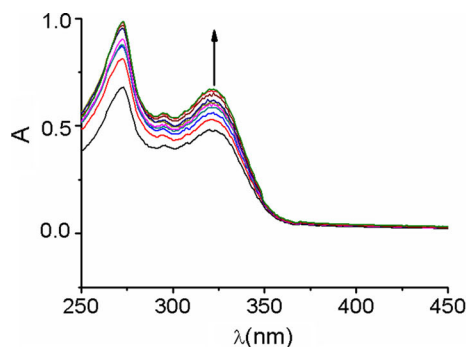


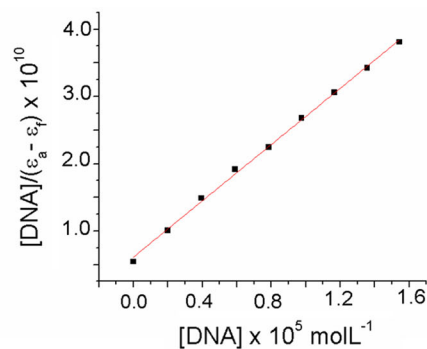
Fig. 9 (Left) Electronic absorption spectra of complex (2) (20.2 μM) in Tris-HCl buffer (pH 7.20) in the absence and in the presence of increasing amounts of CT-DNA (ten different

gives $1/[\epsilon_b - \epsilon_f]$ as slope and $1/(K_b[\epsilon_b - \epsilon_f])$ as the intercept. The intrinsic binding constant K_b is calculated as the ratio between slope and intercept. We found $K_b = 1.05 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Competitive binding between ethidium bromide (EB) and complexes (1) and (2) for CT-DNA Steady-state competitive binding experiments were undertaken to get further proof for the binding of complexes (1) and (2) to DNA. The displacement technique is based on the decrease of EB fluorescence resulting from the competitive displacement of EB from a DNA groove by a compound that competes for the same site.

Upon the addition of complexes (1) and (2) the bands in the emission spectra of EB bound to CT-DNA showed a decrease in fluorescence intensity, indicating that the EB molecules were displaced from their DNA binding sites and replaced by the complexes under investigation. As can be seen in Fig. 10, the displacement of EB bound to CT-DNA (EB-CT-DNA) by the complexes provides further evidence that they bind to DNA. The apparent binding constant (K_{app}) was calculated from Eq. 3 (Kumar et al. 2011):

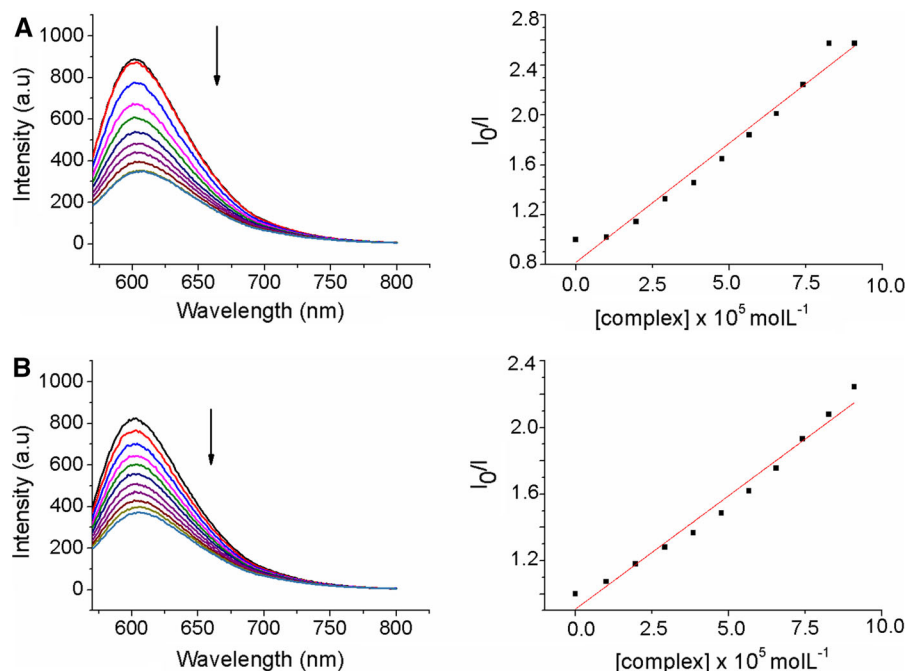
$$K_{\text{EB}}[\text{EB}] = K_{\text{app}}[\text{complex}] \quad (3)$$



complex: DNA molar ratios ranging from 1:1 to 1:10). Arrow shows the changes in absorbance with increasing DNA concentration. (Right) Plot of $[\text{DNA}]/[\epsilon_a - \epsilon_f]$ versus $[\text{DNA}]$

Fig. 10 A (Left) Emission spectra of EB-CT-DNA (10 μ M Tris-HCl buffer, pH 7.20, $T = 25^\circ\text{C}$), in the presence of 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 μ M of complex (1). Arrow indicates the changes in the emission intensity with increasing complex concentration. (Right) Plot of I_0/I versus [complex].

B (Left) Emission spectra of EB-CT-DNA (10 μ M Tris-HCl buffer, pH 7.20, $T = 25^\circ\text{C}$), in the presence of 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 μ M of complex (2). Arrow indicates the changes in the emission intensity with increasing complex concentration. (Right) Plot of I_0/I versus [complex]



where K_{EB} is $1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $[\text{EB}] = 10^{-5} \text{ M}$, and $[\text{complex}]$ is the complex concentration when the fluorescence intensity of EB is 50 %. This value is obtained from the plot I_0/I versus $[\text{complex}]$ when $I_0/I = 2$, in which I_0 is the fluorescence intensity in the absence of quencher, I is the fluorescence intensity in the presence of the quencher.

According to the classical Stern-Volmer equation (Eq. 4) (Dimiza et al. 2011):

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[Q] \quad (4)$$

$[Q]$ = quencher concentration, we obtained $K_{SV} = 1.90 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; $K_{app} = 1.59 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ for complex (1) (Fig. 10A) and $K_{SV} = 1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; $K_{app} = 1.25 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ for complex (2) (Fig. 10B), suggesting that both complexes possess strong tendency to bind to DNA most probably by an intercalative mode.

The literature reports that copper(II) complexes with other DNA-intercalating ligands also exhibit cytotoxic activity against A549 tumor cells. In fact, $[\text{Cu}(\text{tpq})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_2$, (tpq = tripyridoquinoxaline) revealed to possess in vitro cytotoxicity against A 549 cancer cells (Manikandamathavan et al. 2011).

More importantly, complex $[\text{Cu}(\text{Que})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ containing the quercetin flavonoid (Que) ligand, which shows structural similarities with complexes (1) and (2) under study in the present work, strongly

inhibited growth and proliferation of A549 cells. It was suggested that the quercetin complex could induce oxidative DNA damage related to its intercalation into DNA, which might significantly contribute to the mechanism of its anticancer and apoptosis-inducing activities (Tan et al. 2009a, b).

Hence, copper(II) complexes with flavonoids should be further investigated as antineoplastic drug candidates for the treatment of human lung adenocarcinoma.

Conclusions

Altogether, the results show that complexes (1) and (2) have an interesting antitumor activity, exhibiting anti-proliferative effect on A549 non-small cell lung carcinoma (NSCLC). 1 and 2 exhibit strong tendency to bind to DNA most probably by an intercalative mode and are able to induce apoptotic effects and necrosis in A549 cells. The compounds act by a mitochondria-independent apoptotic mechanism. A549 cells treated with both complexes showed reduction of ROS production, indicating that the complexes under study have antioxidant activity over these cells. Overall, the antioxidant effect of these two compounds could possibly improve their apoptotic action most likely by a PI3 K-independent reduction of autophagy.

The foregoing results suggest that further investigation on the antitumor properties and mode of action of the complexes under study are of great interest.

Acknowledgments The authors are grateful to CNPq, INCT-INOVAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6), CAPES PEC-PG and FAPESP (Grants: 2013/07273-2 and 2009/54599-5).

References

- Ali SMH, Yan YK, Lee PPF, Khong KZX, Sk MA, Hwa LK, Klejvskajac B, Vilarc R (2014) Copper(II) complexes of substituted salicylaldehyde dibenzyl semicarbazones: synthesis, cytotoxicity and interaction with quadruplex DNA. *Dalton Trans* 43:1449–1459
- Batista DGJ, Silva PB, Stivanin L, Lachter DR, Silva RS, Felcman J, Louro SRW, Teixeira LR, Soeiro MNC (2011) Co(II), Mn(II) and Cu(II) complexes of fluoroquinolones: synthesis, spectroscopic studies and biological evaluation against *Trypanosoma cruzi*. *Polyhedron* 30:1718–1725
- Cavia-Saiz M, Busto MD, Pilar-Izquierdo MC, Ortega N, Perez-Mateos M, Muñiz P (2010) Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *J Sci Food Agric* 90:1238–1244
- Conceição Filho JCC, Sarria ALF, Becceneri AB, Fuzer AM, Batalhão JR, Paranhos Da Silva CM, Carlos RM, Vieira PC, Fernandes JB, Cominetti MR (2014) Copper (II) and 2,2-bipyridine complexation improves chemopreventive effects of naringenin against breast tumor cells. *PLoS ONE* 9:e107058
- Da Silva JG, Recio-Despaigne AA, Louro SRW, Bandeira CC, Souza-Fagundes EM, Beraldo H (2013) Cytotoxic activity, albumin and DNA binding of new copper(II) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones. *Eur J Med Chem* 65:415–426
- Dimiza F, Perdihi F, Tangoulis V, Turel I, Kessissoglou DP, Psomas G (2011) Interaction of copper(II) with the non-steroidal anti-inflammatory drugs naproxen and diclofenac: synthesis, structure, DNA- and albumin-binding. *J Inorg Biochem* 105:476–489
- Eaton SS, More KM, Sawant BM, Eaton GR (1983) Use of the ESR half-field transition to determine the interspin distance and the orientation of the interspin vector in systems with two unpaired electrons. *J Am Chem Soc* 105:6560–6567
- Fasano M, Curry S, Terreno E, Galliano M, Fanali G, Narciso P, Notari S, Ascenzi P (2005) The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life* 57:787–796
- Filomeni G, De Zio D, Cecconi F (2015) Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ* 22:377–388
- Hegde AH, Sandhya B, Seetharamappa J (2011) Evaluation of binding and thermodynamic characteristics of interactions between a citrus flavonoid hesperitin with protein and effects of metal ions on binding. *Mol Biol Rep* 38:4921–4929
- İnci D, Aydın R, Yılmaz D, Gençkal HM, Vatan Ö, Çinkılıç N, Zorlu Y (2015) New water-soluble copper (II) complexes including 4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline and L-tyrosine: synthesis, characterization, DNA interactions and cytotoxicities. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 136:761–770
- Janku F, McConkey DJ, Hong DS, Kurzrock R (2011) Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 8:528–539
- Krishnamoorthy P, Sathyadevi P, Cowley AH, Butorac RR, Dharmaraj N (2011) Evaluation of DNA binding, DNA cleavage, Protein binding and in vitro cytotoxic activities of bivalent transition metal hydrazone complexes. *Eur J Med Chem* 46:3376–3387
- Krishnapriya KR, Saravanakumar D, Arunkumar P, Kandswamy M (2008) Synthesis of new oxamide-based ligand and its coordination behavior towards copper(II) ion: spectral and electrochemical studies. *Spectrochim Acta Part A* 69:1077–1081
- Kumar P, Baidya B, Chaturvedi SK, Khan RH, Manna D, Mondal B (2011) DNA binding and nuclease activity of copper(II) complexes of tridentate ligands. *Inorg Chim Acta* 376:264–270
- Li TR, Yang ZY, Wang BD (2007) Synthesis, characterization and antioxidant activity of naringenin schiff base and its Cu(II), Ni(II), Zn(II) complexes. *Chem Pharm Bull* 55:26–28
- Lu J, Sun Q, Li JL, Jiang L, Gu W, Liu X, Tian JL, Yan SP (2014) Two water-soluble copper(II) complexes: synthesis, characterization, DNA cleavage, protein binding activities and in vitro anticancer activity studies. *J Inorg Biochem* 137:46–56
- Lushchak VI (2014) Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 224:164–175
- Ma T, Xu J, Wang Y, Yu H, Yang Y, Liu Y, Ding W, Zhu W, Chen R, Ge Z, Tan Y, Jia L, Zhu T (2015) Ternary copper(II) complexes with amino acid chains and heterocyclic bases: DNA binding, cytotoxic and cell apoptosis induction properties. *J Inorg Biochem* 144:38–46
- Manikandamathavan VM, Kavitha M, Uma V, Parameswari RP, Vasanthi HR, Nair BU (2011) Cytotoxic copper(II) complex of tripyridoquinoxaline with DNA hydrolase activity. *Polyhedron* 30:1604–1611
- Manikandamathavana VM, Parameswaric RP, Weyhermüller T, Vasanthi HR, Nair BU (2011) Cytotoxic copper(II) mixed ligand complexes: crystal structure and DNA cleavage activity. *Eur J Med Chem* 46:4537–4547
- McPhail DB, Hartley RC, Gardner PT, Duthie GG (2003) Kinetic and stoichiometric assessment of the antioxidant activity of flavonoids by electron spin resonance Spectroscopy. *J Agric Food Chem* 51:1684–1690
- Mjos KD, Orvig C (2014) Metallo drugs in medicinal inorganic chemistry. *Chem Rev* 114:4540–4563
- Nakamoto K (1986) Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds. Wiley, New York
- Patel RN, Pandeya KB (2000) X-band electron paramagnetic resonance spectra of pig serum albumin-copper(II) and pig serum albumin-copper(II)-amino acid system. *Indian J Biochem Biophys* 37:251–255

- Poillet-Perez L, Despouy G, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M (2015) Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biol* 4:184–192
- Psomas G, Tarushi A, Efthimiadou EK, Sanakis Y, Raptopoulou CP, Katsaros N (2006) Synthesis, structure and biological activity of copper(II) complexes with oxolinic acid. *J Inorg Biochem* 100:1764–1773
- Raja DS, Bhuvanesh NSP, Natarajan K (2012) Structure-activity relationship study of copper(II) complexes with 2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde (4'-methylbenzoyl) hydrazone: synthesis, structures, DNA and protein interaction studies, antioxidative and cytotoxic activity. *J Biol Inorg Chem* 17:223–237
- Rakhit G, Antholine WE, Froncisz W, Hyde JS, Pilbrow JR, Sinclair GR, Sarker B (1985) Direct evidence of nitrogen coupling in the copper(II) complex of bovine serum albumin by S-band electron spin resonance technique. *J Inorg Biochem* 25:217–224
- Raniga PV, Di Trapani G, Tonissen KF (2014) Cross talk between two antioxidant systems, Thioredoxin and DJ-1: consequences for cancer. *Oncoscience* 1:95–110
- Recio Despaigne AA, Da Silva JG, Da Costa PR, Dos Santos RG, Beraldo H (2014) ROS-mediated cytotoxic effect of copper(II) hydrazone complexes against Human Glioma Cells. *Molecules* 19:17202–17220
- Reichmann ME, Rice SA, Thomas CA, Doty P (1954) A further examination of the molecular weight and size of desoxyribose nucleic acid. *J Am Chem Soc* 76:3047–3053
- Sadler PJ, Tucker A, Viles JH (1994) Involvement of a lysine residue in the N-terminal Ni^{2+} and Cu^{2+} binding site of serum albumins. Comparison with Co^{2+} , Cd^{2+} and Al^{3+} . *Eur J Biochem* 220:193–200
- Saha DK, Sandbhor U, Shirisha K, Padhye S, Deobagkar D, Anson CE, Powell AK (2004) A novel mixed-ligand antimycobacterial dimeric copper complex of ciprofloxacin and phenanthroline. *Bioorg Med Chem Lett* 14:3027–3032
- Selvaraj S, Krishnaswamy S, Devashya V, Sethuraman S, Krishnan UM (2012) Membrane fluidization & eryptotic properties of hesperidin-copper complex. *RSC Adv* 2: 11138–11146
- Stewart BW, Wild CP World Cancer Report (2014) IARC Nonserial Publication World Health Organization website <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Accessed on 9 Jan 2015
- Stoll S, Schweiger A (2006) EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J Magn Reson* 178:42–55
- Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K (1999) Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng* 12:439–446
- Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, Han W, Lou F, Yang J, Zhang Q, Wang X, He C, Pan H (2013) Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis* 4:e838
- Tan J, Wang B, Zhu L (2009a) DNA binding and oxidative DNA damage induced by a quercetin copper(II) complex: potential mechanism of its antitumor properties. *J Biol Inorg Chem* 14:727–739
- Tan M, Zhu J, Pan Y, Chen Z, Liang H, Liu H, Wang H (2009b) Synthesis, cytotoxic activity, and DNA binding properties of copper(II) complexes with Hesperetin, Naringenin, and Apigenin. *Bioinorg Chem Appl*. doi:10.1155/2009/347872
- Wang HL, Yang ZY, Wang BD (2006) Synthesis, characterization and the antioxidative activity of copper(II), zinc(II) and nickel(II) complexes with naringenin. *Trans Met Chem* 31:470–474
- Weil JA, Bolton JR, Wertz JE (1993) Electron paramagnetic resonance, elementary theory and practical applications. Wiley, New York
- Wong E, Giandomenico CM (1999) Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev* 99:2451–2466
- Yan LJ (2014) Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biol* 2:165–169
- Zang Y, Wilcox DE (2002) Thermodynamic and spectroscopic study of Cu(II) and Ni(II) binding to bovine serum albumin. *J Biol Inorg Chem* 7:327–337
- Zgierski A, Frieden E (1990) Binding of Cu(II) to non-prosthetic sites in ceruloplasmin and bovine serum albumin. *J Inorg Biochem* 39:137–148

Silver(I) complexes with chromone-derived hydrazones: investigation on the antimicrobial and cytotoxic effects

**Lenka V. Tamayo, Ane F. Santos,
Isabella P. Ferreira, Verlane G. Santos,
Miriam T. P. Lopes & Heloisa Beraldo**

BioMetals

An International Journal on the Role of
Metal Ions in Biology, Biochemistry and
Medicine

ISSN 0966-0844

Biometals

DOI 10.1007/s10534-017-0013-2



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Silver(I) complexes with chromone-derived hydrazones: investigation on the antimicrobial and cytotoxic effects

Lenka V. Tamayo · Ane F. Santos · Isabella P. Ferreira · Verlane G. Santos · Miriam T. P. Lopes · Heloisa Beraldo

Received: 10 March 2017 / Accepted: 24 March 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract Complexes $[\text{Ag}(\text{HCrPh})_2]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**1**) and $[\text{Ag}(\text{HCrpClPh})_2]\text{NO}_3$ (**2**) were obtained with 3-formyl-6-methylchromone-phenyl hydrazone (HCrPh, **HL1**) and 3-formyl-6-methylchromone-*para*-chlorophenyl hydrazone (HCrpClPh, **HL2**). Although the hydrazones were inactive, upon coordination to silver(I) antifungal activity significantly improved against several *Candida* strains. Complexes (**1–2**) revealed to be more active than silver nitrate, silver sulfadiazine and the reference drug nystatin against *Candida parapsilosis*. The cytotoxic activities of the hydrazones and their silver(I) complexes were evaluated in comparison with cisplatin on B16F10

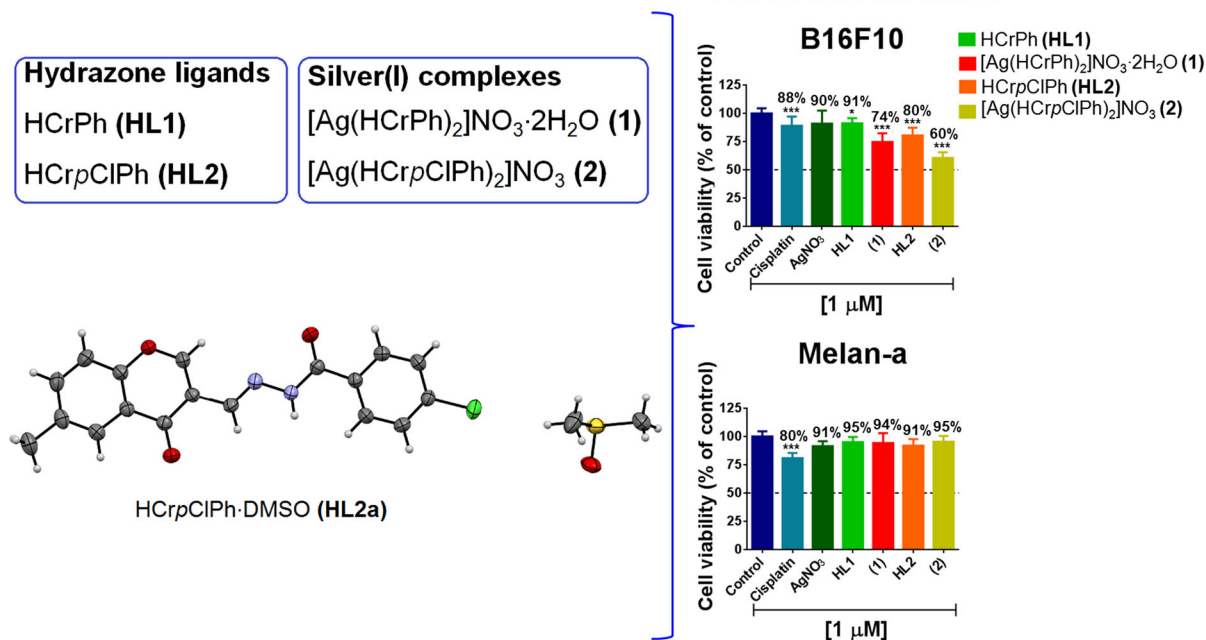
(metastatic melanoma) and Melan-a (non-tumorigenic melanocyte) cells. The hydrazones showed low cytotoxicity against B16F10 cells, reducing only about 20% of cell viability at the concentration of 10 μM . Upon coordination to silver(I) the cytotoxic effect did not appreciably change in complex (**1**) while complex (**2**) proved to be as cytotoxic as cisplatin and much more cytotoxic than both the free ligand and silver nitrate at 1 μM . Both complexes (**1**) and (**2**) were less active than cisplatin on non-malignant Melan-a cells, indicating that these compounds might promote less damage on normal cells.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10534-017-0013-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. V. Tamayo · A. F. Santos · I. P. Ferreira · H. Beraldo (✉)
Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil
e-mail: hberaldo@ufmg.br

V. G. Santos · M. T. P. Lopes
Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

Graphical abstract



Keywords Chromone · Hydrazones · Silver(I) complexes · Antifungal · Cytotoxic activity

Introduction

Chromones are a group of oxygen-containing heterocyclic compounds that are ubiquitous in nature, especially in plants. Chromones contain the benzooannelated γ -pyrone ring. Chromone (4H-chromen-4-one, 4H-1-benzopyran-4-one) is the parent compound, the chromone ring system being present in the structure of several flavonoids such as flavones and isoflavones. Numerous biological activities have been attributed to chromones, which exhibit anti-inflammatory, antiplatelet, anticancer, and antimicrobial effects. In addition, chromones proved to be inhibitors of topoisomerase (I, II) and protein kinases (Gaspar et al. 2014). Metal complexes with chromone-derived ligands also show a wide range of bioactivities (Li et al. 2009, 2010; Tamayo et al. 2016; Selvaraj et al. 2012; Tan et al. 2009; Conceição Filho et al. 2014).

Hydrazones constitute an important class of compounds with a wide range of pharmacological applications as antiviral, antimicrobial, (Rollas and Küçükgülzel 2007; Popiolek 2017) anti-inflammatory (Fraga and Barreiro 2006) and cytotoxic (Despaigne et al. 2012, 2014) agents. The pharmacological profiles of several chromone-derived hydrazones (Wang et al. 2006) and thiosemicarbazones (Li et al. 2010) and their metal complexes have been studied. The bioactivities of these compounds have been attributed in part to their ability to bind DNA through an intercalative mode, which is favored by the planarity of the chromone framework (Li et al. 2010).

Silver(I) compounds are known for their antimicrobial properties and are widely used in the treatment of wounds and burn infections (Kalinowska-Lis et al. 2016). Silver(I) sulfadiazine is the most popular silver drug used in wound therapy and medicinal devices (Kalinowska-Lis et al. 2016 and references therein). Silver(I) compounds proved to influence the metabolic behavior of bacteria, viruses and eukaryotic microorganisms. It has been suggested that silver(I) ions modify pathogenic activity through their interaction with

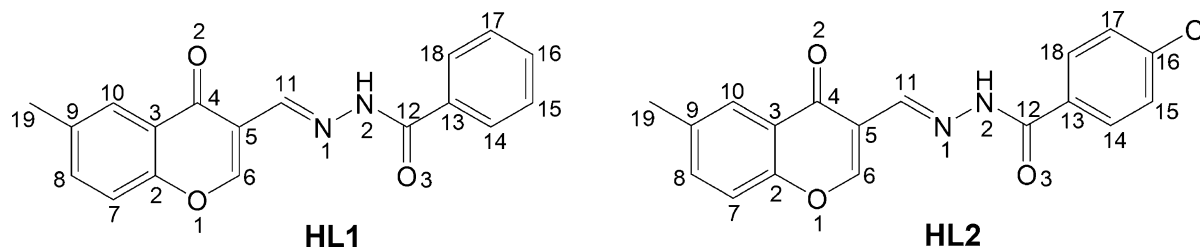


Fig. 1 Structural representation of 3-formyl-6-methylchromone-phenyl hydrazone (HCrPh, **HL1**) and 3-formyl-6-methylchromone-*para*-chloro-phenyl hydrazone (HCrpClPh, **HL2**)

electron transport systems, cell membranes and the DNA-binding machinery. Silver(I) ions are also supposed to interact with nucleic acids, cell wall components or sulfhydryl groups of enzymes. In addition, silver(I) ions show low toxicity in normal mammalian cells. In fact, it has been shown that high levels of silver nitrate did not result in high renal toxicity in mice (Kaplan et al. 2016 and references therein).

Since the discovery of the antitumor properties of cisplatin, several platinum and non-platinum metal-based anticancer drug candidates have been investigated. However, although the recent literature reports some silver(I) complexes with cytotoxic activity against tumor cells (Marinelli et al. 2016; Adamski et al. 2016; Kalinowska-Lis et al. 2016), the antineoplastic effects of silver(I) complexes remains poorly explored.

In the present work silver(I) complexes were obtained with 3-formyl-6-methylchromone-phenyl hydrazone (HCrPh, **HL1**) and 3-formyl-6-methylchromone-*para*-chloro-phenyl hydrazone (HCrpClPh, **HL2**) (see Fig. 1). The antimicrobial and cytotoxic effects of the hydrazones and their silver(I) complexes were evaluated. An investigation on the ability of the complexes to bind to DNA and to bovine serum albumin (BSA) was also carried out.

Experimental

Materials and measurements

All common chemicals were purchased from Aldrich and were used without further purification. Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. A Quimis model Q405 M conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. Infrared spectra were recorded

on a Perkin Elmer FT-IR 1000 spectrometer using KBr pellets ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$). Thermogravimetric curves were obtained with a TGA50H thermobalance (Shimadzu) in the $25\text{--}750\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperature range, under dynamic nitrogen atmosphere, at a heating rate of $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. NMR spectra were obtained with a Bruker DPX-400 Advance (400 MHz) spectrometer using $\text{DMSO-}d_6$ as the solvent and tetramethylsilane (Me_4Si) as internal reference. Electronic spectra were recorded on a Shimadzu UV-2401PC UV-Visible spectrophotometer using a 1 cm beam path quartz cuvette. Fluorescence spectra were recorded on a Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer-L1006m016 (Agilent Technologies), using a 1 cm quartz cell. Mass spectra were recorded on a LCMS-IT-TOF (225-07100-34) liquid chromatograph mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) source, operating in the negative and positive modes. The spectra were acquired by scanning over the $100\text{--}1000\text{ m/z}$ range.

Single crystal X-ray diffraction measurements were carried out on an Oxford-Diffraction GEMINI-Ultra diffractometer (LabCri-UFMG) using graphite-Enhance Source Mo $\text{K}\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71073\text{ \AA}$) at $270(2)\text{ K}$. Data collection, cell refinements and data reduction were performed using the CrysAlisPro software package (Agilent 2014). An absorption correction based on a multi-scan method was applied (Agilent 2014). The structures were solved by direct methods using SUPERFLIP (Palatinus and Chapuis 2007). Full-matrix least-squares refinement procedure on F^2 with anisotropic thermal parameters was carried on using SHELXL-97 (Sheldrick 2015). Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all non-hydrogen atoms. Hydrogen atoms were placed geometrically and the positional parameters were refined using a riding model (Johnson 1970).

Chemistry

Syntheses of 3-formyl-6-methylchromone-derived hydrazones (**HL1**–**HL2**)

The hydrazone ligands **HL1** and **HL2** were obtained by mixing equimolar amounts (1 mmol) of 3-formyl-6-methylchromone with the desired hydrazide in methanol under reflux for 24 h. The solids which precipitated after cooling to room temperature were washed with methanol followed by diethyl ether and then dried under reduced pressure.

Syntheses of silver(I) complexes (**1**–**2**)

To 10.0 mL of a methanol solution of the desired hydrazone (1.0 mmol) were added dropwise 3.0 mL of an aqueous solution of silver nitrate in equimolar amount. The reaction mixture was kept under stirring in the dark at room temperature for 72 h. The obtained solids were washed with methanol followed by diethyl ether and then dried under reduced pressure.

3-Formyl-6-methylchromone-phenyl hydrazone (**HCrPh**, **HL1**)

White solid. Anal. Calc. for $C_{18}H_{14}N_2O_3$ (FW: 306.31 g mol⁻¹): C, 70.58; H, 4.61; N, 9.10. Found: C, 71.36; H, 4.88; N, 9.15. M.p.: 188–189 °C. IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(C=O)_{\text{pyrone}}$ and $\nu(C=O)_{\text{hydrazonic}}$ 1640 s, $\nu(C=N)$ 1622 s, $\nu(N-H)$ 3204 m. δ^1H NMR (DMSO-*d*₆): 11.90 (s, 1H, N(2)H), 8.78 (s, 1H, H6), 8.63 (s, 1H, H11), 7.94 (s, 1H, H10), 7.91 (d, 1H, H8, *J* = 4.80 Hz), 7.65 (d, 1H, H7, *J* = 10.30 Hz), 7.62–7.50 (m, 5H, H14, H15, H16, H17, H18), 2.44 (s, 3H, H19). $\delta^{13}C$ NMR (DMSO-*d*₆): 174.9 (C(4)=O)_{pyrone}, 162.9 (C(12)=O)_{hydrazonic}, 154.2 (C6), 154.0 (C2), 140.4 (C11), 135.7 (C3), 135.6 (C7), 133.1 (C13), 128.4 (C14, C18), 127.5 (C15, C17), 124.4 (C10), 124.3 (C8), 123.0 (C9), 118.4 (C16), 118.1 (C5), 20.4 (C19). Yield: 88%.

3-Formyl-6-methylchromone-para-chloro-phenyl hydrazone hemihydrate (**HCrpClPh**·0.5H₂O, **HL2**)

Write solid. Anal. Calc. for $C_{18}H_{13}N_2O_3Cl \cdot 0.5H_2O$ (FW: 349.76 g mol⁻¹): C, 63.44; H, 3.85; N, 8.22. Found: C, 61.81; H, 4.03; N, 8.01. M.p.: 218–220 °C. Thermogravimetry Calc. for weight loss of water molecules (32–100 °C range): 2.57%. Found: 2.56%.

IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(C=O)_{\text{pyrone}}$ 1671 s, $\nu(C=O)_{\text{hydrazonic}}$ 1645 s, $\nu(C=N)$ 1631 s; $\nu(N-H)$ 3249 m. δ^1H NMR (DMSO-*d*₆): 11.97 (s, 1H, N(2)H), 8.80 (s, 1H, H6), 8.63 (s, 1H, H11), 7.95 (d, 2H, H14, H18, *J* = 8.32 Hz), 7.92 (s, 1H, H10), 7.67 (d, 1H, H8, *J* = 8.60 Hz), 7.63 (s, 1H, H7), 7.60 (d, 2H, H15, H17, *J* = 7.90 Hz), 2.45 (s, 3H, H19). $\delta^{13}C$ NMR (DMSO-*d*₆): 174.9 (C(4)=O)_{pyrone}, 161.8 (C(12)=O)_{hydrazonic}, 154.4 (C6), 154.1 (C2), 140.9 (C11), 136.5 (C13), 135.7 (C3), 135.6 (C7), 131.8 (C16), 129.4 (C14, C18), 128.4 (C15, C17), 124.3 (C10), 123.0 (C9), 118.5 (C8), 118.0 (C5), 20.4 (C19). Yield: 89%.

Bis[(3-formyl-6-methylchromone-phenylhydrazone)]silver(I) nitrate di-hydrate [**Ag**(**HCrPh**)₂]**NO**₃·2H₂O (**1**)

Grey solid. Anal. Calc. for $C_{36}H_{28}N_5O_9Ag \cdot 2H_2O$ (FW: 818.53 g mol⁻¹): C, 52.82; H, 3.94; N, 8.56. Found: C, 53.60; H, 3.92; N, 8.55. Thermogravimetry Calc. for weight loss of water molecules (80–174 °C range): 4.67%. Found: 4.39%. Molar conductivity (1×10^{-3} mol L⁻¹ DMSO): 62.4 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. M.p.: 162–164 °C. IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(C=O)_{\text{pyrone}}$ 1672 s, $\nu(C=O)_{\text{hydrazonic}}$ 1624 s, $\nu(C=N)$ 1568 s, $\nu(N-H)$ 3188 m, $\nu(NO_3)$ 1386 m. δ^1H NMR (DMSO-*d*₆): 12.00 (s, 1H, N(2)H), 8.83 (s, 1H, H6), 8.63 (s, 1H, H11), 7.94 (s, 1H, H10), 7.92 (s, 1H, H8), 7.68 (d, 1H, H7, *J* = 8.30 Hz), 7.61–7.51 (m, 5H, H14, H15, H16, H17, H18), 2.44 (s, 3H, H19). $\delta^{13}C$ NMR (DMSO-*d*₆): 175.0 (C(4)=O)_{pyrone}, 163.1 (C(12)=O)_{hydrazonic}, 154.8 (C6), 154.0 (C2), 141.2 (C11), 135.8 (C7), 135.7 (C3), 133.7 (C13), 128.4 (C14, C18), 127.6 (C15, C17), 124.4 (C10), 124.4 (C8), 123.0 (C9), 118.5 (C16), 118.0 (C5), 20.4 (C19). Yield: 56%.

Bis[(3-formyl-6-methylchromone-para-chloro-phenylhydrazone)]silver(I) nitrate [**Ag**(**HCrpClPh**)₂]**NO**₃ (**2**)

Grey solid. Anal. Calc. for $C_{36}H_{26}Cl_2N_5O_9Ag$ (FW: 851.39 g mol⁻¹): C, 50.92; H, 3.12; N, 8.12. Found: C, 50.79; H, 3.08; N, 8.23. Molar conductivity (1×10^{-3} mol L⁻¹ DMSO): 60.3 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. M.p.: 213–214 °C. IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(C=O)_{\text{pyrone}}$ 1662 s, $\nu(C=O)_{\text{hydrazonic}}$ 1636 s, $\nu(C=N)$ 1596 s, $\nu(N-H)$ 3222 m, $\nu(NO_3)$ 1384 m. δ^1H NMR (DMSO-*d*₆): 12.08 (s, 1H, N(2)H), 8.83 (s, 1H, H6), 8.60 (s, 1H, H11), 7.94 (d, 2H, H14, H18, *J* = 8.32 Hz), 7.89 (s, 1H,

Table 1 Crystal data and structure refinement for HCrpClPh·DMSO (**HL2a**)

Compound	HCrpClPh·DMSO (HL2a)
Empirical formula	C ₂₀ H ₁₉ ClN ₂ O ₄ S
Molecular weight (g mol ⁻¹)	418.88
T (K)	270(2)
λ (Å)	0.71073
Crystal system	Triclinic
Space group	P $\bar{1}$
Unit cell dimensions	
a (Å)	8.5179(7)
b (Å)	11.5982(11)
c (Å)	11.7365(12)
α (°)	107.126(9)
β (°)	109.813(9)
γ (°)	101.494(8)
V (Å ³)	983.10(16)
Z	2
Density calculated (g cm ⁻³)	1.415
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.330
F(000)	436
Crystal size (mm ³)	0.66 × 0.17 × 0.14
θ range for data collection (°)	1.95 to 26.37
Index ranges	−10 ≤ h ≤ 10 −11 ≤ k ≤ 14 −13 ≤ l ≤ 14
Reflections collected	7099
Independent reflections	4035 [R(int) = 0.0298]
Completeness to $\theta = 26.37^\circ$ (%)	100.0
Data/restraints/parameters	4035/0/260
Goodness-of-fit on F ²	1.021
Final R indices [I > 2 σ (I)]	R ₁ = 0.0468, wR ₂ = 0.1023
R indices (all data)	R ₁ = 0.0780, wR ₂ = 0.1224
Largest diff. peak and hole (e Å ⁻³)	0.214 and −0.333

H10), 7.66 (d, 1H, H8, $J = 8.50$ Hz), 7.62 (s, 1H, H7), 7.60 (d, 2H, H15, H17, $J = 8.30$ Hz), 2.43 (s, 3H, H19). δ ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 175.0 (C(4)=O)_{pyrone}, 162.2 (C(12)=O)_{hydrazonic}, 155.3 (C6), 154.0 (C2), 141.7 (C11), 136.8 (C13), 135.8 (C3), 135.9 (C7), 131.6 (C16) 129.6 (C14,C18), 128.6 (C15,C17), 124.4 (C10), 123.0 (C9), 117.9 (C8), 118.6 (C5), 20.5 (C19). Yield: 70%.

X-ray crystallography

Crystals of HCrpClPh·DMSO (**HL2a**) were obtained from slow evaporation of the compound in DMSO-*d*₆. The crystal structure of **HL2a** was determined using single-crystal X-ray diffractometry. A summary of the

crystal data, data collection details and refinement results for the compound is listed in Table 1. Molecular graphics were prepared using Mercury (Macrae et al. 2008).

Studies on the interaction of [Ag(HCrpClPh)₂]NO₃ (**2**) with biological targets

Interaction of complex (2) with bovine serum albumin (BSA)

The fluorescence of BSA is due to intrinsic characteristics of the tyrosine and tryptophan residues.

Fluorescence quenching is induced by environmental alteration around the fluorophore, which can reveal the nature of the BSA binding interaction. The protein-binding study was performed by following the tryptophan fluorescence quenching using a BSA solution (2.0 μM) prepared in Tris-HCl buffer at pH 7.2. The extinction of the tryptophan residue emission intensity at 342 nm (excitation wavelength of 285 nm) was monitored in the presence of complex (2) at different concentrations from 0 to 0.75 μM in DMSO. Fluorescence spectra were recorded in the 300–500 nm range. The experiment was carried out in triplicate.

Competitive binding of ethidium bromide and complex (2) for calf thymus DNA (CT-DNA)

The competitive binding of ethidium bromide (EB) and complex (2) for calf thymus DNA (CT-DNA) was evaluated by a fluorescence technique using a solution of EB bound to CT-DNA. In the presence of DNA, EB exhibits fluorescence enhancement due to its intercalative binding to DNA. Competitive binding of complex (2) with CT-DNA results in fluorescence quenching due to release of EB from CT-DNA. The emission spectra were recorded at 602 nm, with an excitation wavelength of 545 nm.

Stock solution of deoxyribonucleic acid from calf thymus (CT-DNA) in Tris-HCl buffer (NaCl 50 mM/Tris-HCl 5 mM, pH 7.2) was prepared by shaking in an orbital shaker at 120 rpm at 37 °C for 24 h. Then, its concentration was calculated using absorption intensity at 260 nm and the molar absorption coefficient (ϵ) value at this wavelength ($6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Reichmann et al. 1954). The stock solution of the complex was freshly prepared by first dissolving the compound in DMSO and then diluting with buffer. The amount of DMSO was kept less than 3% (by volume) for each set of experiments and it presented no effect on any of the experimental results.

A working solution containing 10.0 μM of CT-DNA with 10.0 μM of ethidium bromide (EB) was prepared in Tris-HCl buffer. During the experiment, a portion of 2.0 mL of the DNA-EB solution was titrated with repeated aliquots of complex (2) (0–80 μM , 1.0 mM stock solution in DMSO) and, after equilibrium, the fluorescence spectra were recorded. The changes in the fluorescence intensity at 602 nm (excitation at 545 nm) were measured

with respect to the concentration of the complex (Jenkins 1997). The experiments were carried out until the fluorescence reached 20–40% of the initial intensity.

Antimicrobial activity

Yeast

Candida strains were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, USA) and from College of Biological Sciences (CBS, USA). *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida dubliniensis* (clinical isolate 28), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida lusitanae* (CBS 6936), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) and *Candida tropicalis* (ATCC 750) strains were used in the evaluation of the antifungal effect of the studied compounds. The tests were performed in Sabouraud (SBD) medium. The *Candida* strains were stored and sub-cultured for testing in the same medium and incubated at 37 °C for 24 h. Dilutions were carried out to achieve the required final concentration of $1\text{--}2 \times 10^8 \text{ CFU mL}^{-1}$ (CFU = colony forming units) determined by a spectrophotometric method.

In vitro susceptibility testing by the microdilution method

The activity of the compounds was evaluated in final concentrations ranging from 250 to 0.12 mg mL^{-1} in microdilution plates with 96-wells according to Gupta and Zacchino (Zacchino and Gupta 2007). The compounds under study and the negative controls (nystatin and miconazole nitrate) were prepared as 12.5 mg mL^{-1} stock solutions in DMSO. Subsequently, the stock solutions were diluted in culture medium obtaining 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ solutions. Further dilutions of each compound were performed. The wells of the microdilution plates were filled with 100 μL of solutions with decreasing concentrations of the compounds in culture medium. Then 100 μL of the solution containing the standardized inoculum were added and the microplates were incubated at 37 °C for 24 h. Three control tests were performed as follows: (i) with the microorganisms in culture medium alone (positive control), (ii) with the compounds in culture medium without microorganisms and (iii) with only the culture medium.

The experiments were carried out in triplicate and the absorbances were determined on an ELISA tray reader (Thermoplate, Brazil) at fixed wavelength of 490 nm. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were calculated based on the quantity of the microorganism present after the experiments, i.e., the lowest concentration of compounds that resulted in a 50% (IC_{50}) reduction of growth compared with the control growth in the culture medium free of the test compound (positive control). The results were processed by GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

Cytotoxic activity

Cell cultures

The metastatic murine melanoma cell line (B16F10) was a gift from Ludwig Institute for Research about Cancer (São Paulo, Brazil) and the non-tumorigenic murine melanocyte cell line (Melan-a) was kindly provided by Dr. Roger Chamas, Cancer Institute (São Paulo, Brazil).

Cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Cultilab) and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco), 1% penicillin/streptomycin (Sigma). B16F10 cells were cultured at pH 7.4 and Melan-a cells culture was prepared at pH 6.9, in the presence of 200 nM Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA—Sigma). The cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 .

Evaluation of the cytotoxic activity

Cell lines were seeded in 96-well plates (B16F10— 1×10^3 cells/well and Melan-a— 6×10^3 cells/well) and after complete adhesion of the cells on the surface plates, the media were replaced with fresh medium containing the test compounds in increasing concentrations (10^{-8} – 10^{-5} M). Cisplatin was used as positive control. After 72 h of incubation, 10 μ L of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT—Sigma—5 mg mL^{-1}) were added in each well and the cells were maintained for 4 h at culture conditions. Cell viability was evaluated by measuring the rate of mitochondrial reduction of MTT in formazan. The formazan precipitate was dissolved

after replacing the culture medium by DMSO (100 μ L/well) and then the absorbance at 570 nm was measured. The results were expressed as percentage of viable cells. The control containing RPMI 1640 plus 10% FBS and DMSO 1% was considered to result in 100% cell viability.

Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA test, followed by Student–Newman–Keuls *post-test* (GraphPad Prism 5.0, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). The acceptable level of significance was 95% ($p < 0.05$).

Results and discussion

Formation of the silver(I) complexes

Microanalyses and molar conductivity data were compatible with the formation of $[Ag(HCrPh)_2]NO_3 \cdot 2H_2O$ (**1**) and $[Ag(HCrpClPh)_2]NO_3$ (**2**) in which two neutral hydrazone HL ligands are attached to the metal center and a nitrate acts as counter-ion. The presence of two crystallization water molecules in (**1**) was confirmed by its thermogravimetric curve, which shows a weight loss of 4.39% (calc. 4.67%).

Spectroscopic characterization

The absorptions attributed to $\nu(N-H)$ at 3204 and 3249 cm^{-1} in the infrared spectra of the free hydrazones shift to 3188 and 3222 cm^{-1} in the spectra of complexes (**1**) and (**2**), respectively, in agreement with coordination of a neutral hydrazone (Piló et al. 2015). The vibrations attributed to $\nu(C=N)$ at 1622 and 1631 cm^{-1} in the infrared spectra of the hydrazones shift to 1568 and 1596 cm^{-1} , respectively in the spectra of complexes (**1**) and (**2**), in accordance with coordination of the azomethine nitrogen (Mendu et al. 2015). The hydrazones show absorptions attributed to $\nu(C=O)$ of the hydrazone and the pyrone groups at 1640 cm^{-1} (overlapped) for **HL1** and at 1645 and 1671 cm^{-1} for **HL2**. These bands are observed at 1624 and 1672 cm^{-1} for complex (**1**) and at 1636 and 1672 cm^{-1} for complex (**2**), in accordance to complexation through the carbonyl oxygen (Despaigne et al. 2012). In complex (**1**) a broad absorption at 3500 cm^{-1} is attributable to the $\nu(O-H)$ stretching vibration (Nakamoto 1986). Therefore, in the

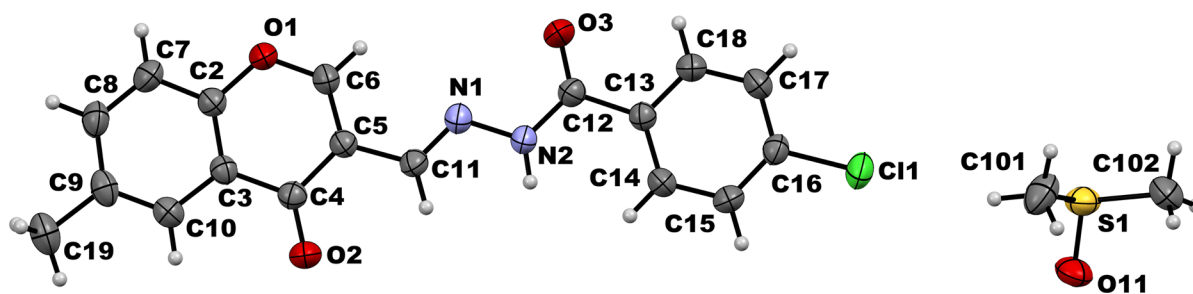


Fig. 2 Molecular plot of HCrpCIPh-DMSO (**HL2a**) showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level

Table 2 Selected bond lengths (Å) and angles (°) for HCrpCIPh-DMSO (**HL2a**)

Bond lengths (Å)	
O3–C12	1.217(3)
N1–C11	1.267(3)
N2–N1	1.384(2)
Bond angles (°)	
O3–C12–N2	122.08(19)
N1–C11–H11	120.1
C11–N1–N2	117.04(19)
N1–N2–H1N	116.0(16)
O3–C12–C13	120.88(19)

complexes the hydrazones are attached to the metal center through the O–N–O chelating system, as previously reported for other metal complexes with formyl-chromone hydrazones (Elsayed et al. 2015). In addition, the absorptions at 1386 and 1384 cm^{-1} were attributed to the $\nu(\text{NO}_3)$ stretching vibration of the nitrate group (see Supplementary Material, Figs. S1–S4).

The NMR spectra of the hydrazones and their silver(I) complexes were recorded in DMSO- d_6 . The ^1H resonances were assigned on the basis of chemical shifts and multiplicities. The carbon type (C, CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT 135) experiments. The assignments of the protonated carbons were made by 2D hetero-nuclear multiple quantum coherence experiments (HMQC).

Upon coordination to silver(I) in complexes (**1**) and (**2**) the ^1H and ^{13}C NMR spectra remain practically unchanged in relation to the free ligands. This occurs probably due to the fact that the hydrazones coordinate

to the metal center as neutral species and to the d^{10} electronic configuration of the metal. A similar pattern has been observed for silver(I) complexes with other Schiff base ligands (Paiva et al. 2013) (see Supplementary Material, Figs. S5–S12).

To verify the stability of complexes (**1**) and (**2**) in DMSO solution the electronic spectra of both complexes were recorded as a function of time. No significant variations were observed, suggesting that the complexes are stable in the assayed conditions. In addition, the mass spectra of the complexes showed a peak at 719.16 (calc. 719.11) (**1**) and 789.09 (calc. 789.03) (**2**) corresponding to the intact $[\text{Ag}(\text{L})_2]^+$ complex (see Supplementary data, Figs. S13–S14).

X-ray crystallography

The crystal structure of HCrpCIPh-DMSO (**HL2a**) was determined. As mentioned before **HL2a** was obtained by slow evaporation of the compound in DMSO, which justifies the presence of a solvent molecule. The atom arrangements and atom numbering scheme are shown in Fig. 2. Selected intramolecular bond distances and angles for **HL2a** are listed in Table 2.

HCrpCIPh-DMSO (**HL2a**) crystallized in the triclinic system, space group $P\bar{1}$, with $Z = 2$. The asymmetric unit of **HL2a** consists of a single molecule of the hydrazone and one molecule of DMSO, see Fig. 2. The bond lengths and angles of the hydrazone skeleton are similar to those of other hydrazones (Despaigne et al. 2012 and references therein).

The compound adopts the *EE* conformation in relation to the C11–N1, and N2–C12 bonds. The presence of the *EE* conformation is quite common in aldehyde-derived hydrazones (Wardell et al. 2007). In

Table 3 Antifungal activity (IC_{50}) for hydrazones **HL1–HL2** and their Ag(I) complexes (**1–2**) against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae* and *Candida glabrata*

Compound	IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)					
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida lusitanae</i>	<i>Candida glabrata</i>
HCrPh (HL1)	–	–	–	–	–	–
[Ag(HCrPh) ₂](NO ₃) ₂ ·2H ₂ O (1)	>38	0.976 ± 0.165	11.22 ± 0.69	23.54 ± 1.98	>19	>19
HCrpClPh·0.5H ₂ O (HL2)	–	>734	–	>734	–	–
[Ag(HCrpClPh) ₂](NO ₃) (2)	>693	7.312 ± 1.175	>22	112.50 ± 2.21	>43	>43
Silver nitrate	40.33 ± 1.46	32.81 ± 6.43	>11	40.32 ± 0.93	20.79 ± 1.76	64.24 ± 2.21
Silver sulfadiazine	76.93 ± 2.48	24.28 ± 3.01	53.19 ± 2.69	>175	78.78 ± 1.21	46.91 ± 3.61
Miconazole nitrate	5.84 ± 2.27	(8.0 ± 4) × 10 ^{−3}	1.58 ± 0.51	3.58 ± 0.27	<62 × 10 ^{−6}	19.50 ± 4.53
Nystatin	4.75 ± 1.24	11.87 ± 2.10	4.44 ± 0.76	7.87 ± 0.68	5.31 ± 0.84	1.92 ± 0.22

IC inhibitory concentration, “–” no inhibition of fungal growth above 80% at 250 $\mu\text{mol/L}$

the molecular packing, N2–H···O11 hydrogen bonds are formed involving the hydrazone molecule and the oxygen atom of DMSO [$d(\text{N2} \cdots \text{O11}^i) = 2.898(3) \text{ \AA}$, $\angle(\text{N2} - \text{H} \cdots \text{O11}^i) = 170(2)^\circ$, symmetry operation: $i = -x + 1, -y + 1, -z + 1$].

The C12=O3 (1.217(3) $\text{\AA}$) and C11=N1 (1.267(3) $\text{\AA}$) bond distances are characteristic of a double bond while the N1–N2 bond distance of 1.384(2) $\text{\AA}$ is intermediate between a single and a double bond (Dias et al. 2015). (See Supplementary crystallographic data in the Supplementary Material).

Antimicrobial activity

Preliminary screening was performed by cultivating microorganisms in the presence of the compounds in a concentration of 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Determination of IC_{50} was only performed for those compounds that displayed 80–100% inhibition growth of the microorganism at the screening concentration. The hydrazones and complexes (**1**) and (**2**) proved to be inactive against several *Gram*-positive and *Gram*-negative bacterial strains (data not shown).

Table 3 reports the IC_{50} values for the hydrazones (**HL1–HL2**) and complexes (**1–2**) against the studied *Candida* strains. The hydrazones were inactive against all *Candida* strains. Upon coordination to silver(I) antifungal activity significantly improved for complex (**1**) against *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis* and *Candida tropicalis* and for complex (**2**) against

Candida parapsilosis. Complexes (**1–2**) revealed to be more active than the reference drug nystatin against *Candida parapsilosis*, being more active than silver nitrate and silver sulfadiazine. The antimicrobial activity could be attributed to an effect of the complex *per se*. However, since the hydrazones were inactive, the ligands might act as carriers of the metal into the cell.

Cytotoxic activity

The cytotoxic activities of hydrazones (**HL1–HL2**) and their silver(I) complexes (**1–2**) were evaluated in comparison with cisplatin on B16F10 (metastatic melanoma) and Melan-a (non-tumorigenic melanocyte) cells by the MTT colorimetric assay. The hydrazones showed low cytotoxicity against B16F10 cells, reducing only about 20% of cell viability at the concentration of 10 μM . Upon coordination to silver(I) the cytotoxic effect did not appreciably change in complex (**1**) while complex (**2**) proved to be as cytotoxic as cisplatin and much more cytotoxic than both the free ligand and silver nitrate at 1 μM (see Fig. 3).

Interestingly, both complexes (**1**) and (**2**) were less active than cisplatin on non-malignant Melan-a cells, indicating that these compounds might promote less damage on normal cells, which is an important characteristic of new anticancer drug candidates (see Fig. 4).

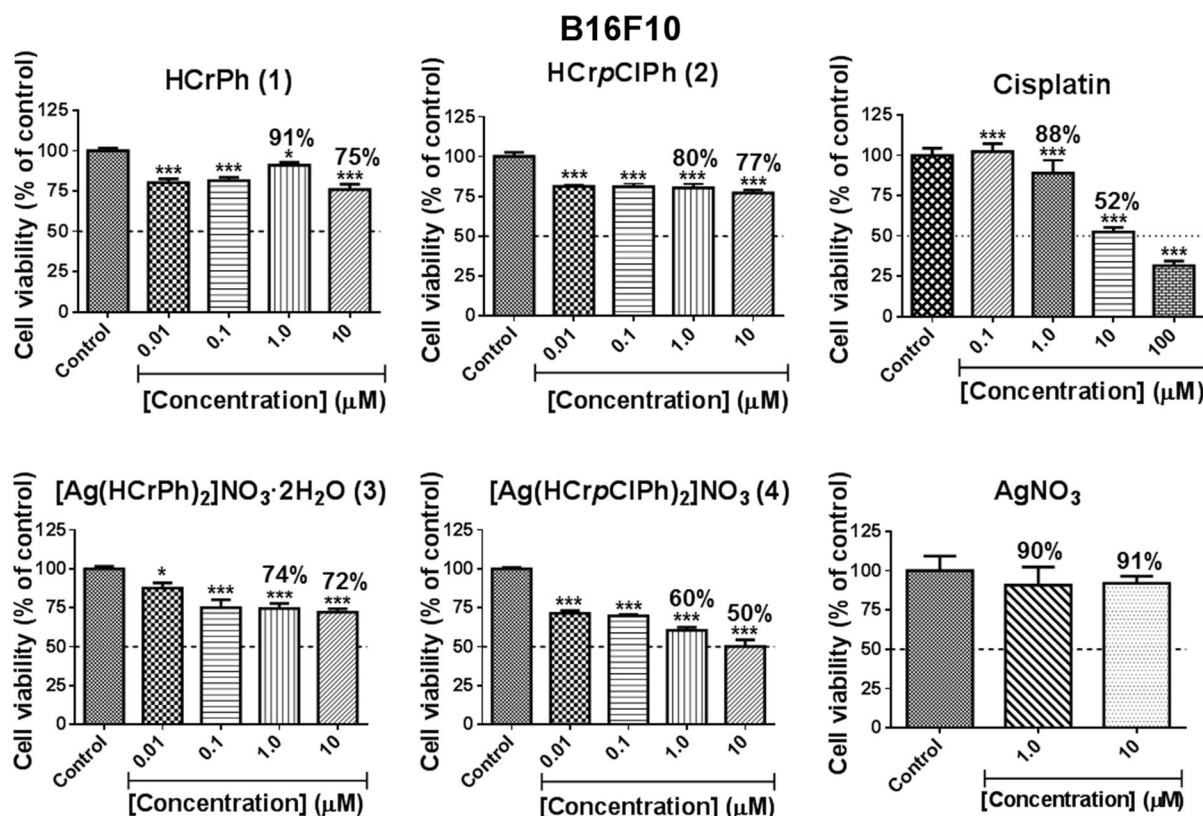


Fig. 3 Cytotoxic activity of hydrazones (HL1–HL2), their silver(I) complexes (1–2), AgNO₃ and cisplatin on B16F10 (metastatic murine melanoma) cells. Cells were treated with increasing concentrations of the compounds (0.01–10 μM) for 72 h and cell viability was determined by the MTT colorimetric

assay. Values are expressed as the mean ± SD (n = 6) of percentage of cell viability compared to control (RPMI 1640 plus 10% FBS and DMSO 1%). *p < 0.05; ***p < 0.0001, ANOVA, Student–Newman–Keuls post test

Fluorescence quenching of BSA by complex (2)

Fluorescence spectroscopy is an important method to probe the structure and dynamics of biomacromolecules (Li et al. 2013). The interaction of complex (2) with BSA was studied by following tryptophan fluorescence quenching in the presence of the complex. Fluorescence spectra of BSA in the presence of increasing amounts of complex (2) are shown in Fig. 5A.

A significant decrease of the fluorescence intensity at 342 nm was observed upon addition of increasing concentrations of complex (2) to the BSA solution, indicating the formation of a complex (2)–BSA system, which could cause changes in the tryptophan environment (Li et al. 2015; Bhat et al. 2011).

Fluorescence quenching can be analyzed by using the Stern–Volmer Eq. (1):

$$I_0/I = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (1)$$

where I_0 and I represent the fluorescence intensities of BSA in the absence and in the presence of the quencher, respectively, K_{sv} is the Stern–Volmer quenching constant (M^{-1}), k_q is the bimolecular quenching rate constant ($M^{-1} s^{-1}$), τ_0 is the emission lifetime of the fluorescent biomolecule in the absence of quencher ($\tau_0 = 10^{-8}$ s) (Lakowicz and Webber 1973) and $[Q]$ is the concentration of the quencher $[Q] = [\text{complex (2)}]$. According to Eq. (1), the relation between K_{sv} and k_q is:

$$K_{sv} = k_q\tau_0$$

The Stern–Volmer quenching constant (K_{sv}) is obtained as the slope of the linear plot of I_0/I vs $[Q]$ ($[Q] = [\text{complex (2)}]$) in Fig. 5B). The determined

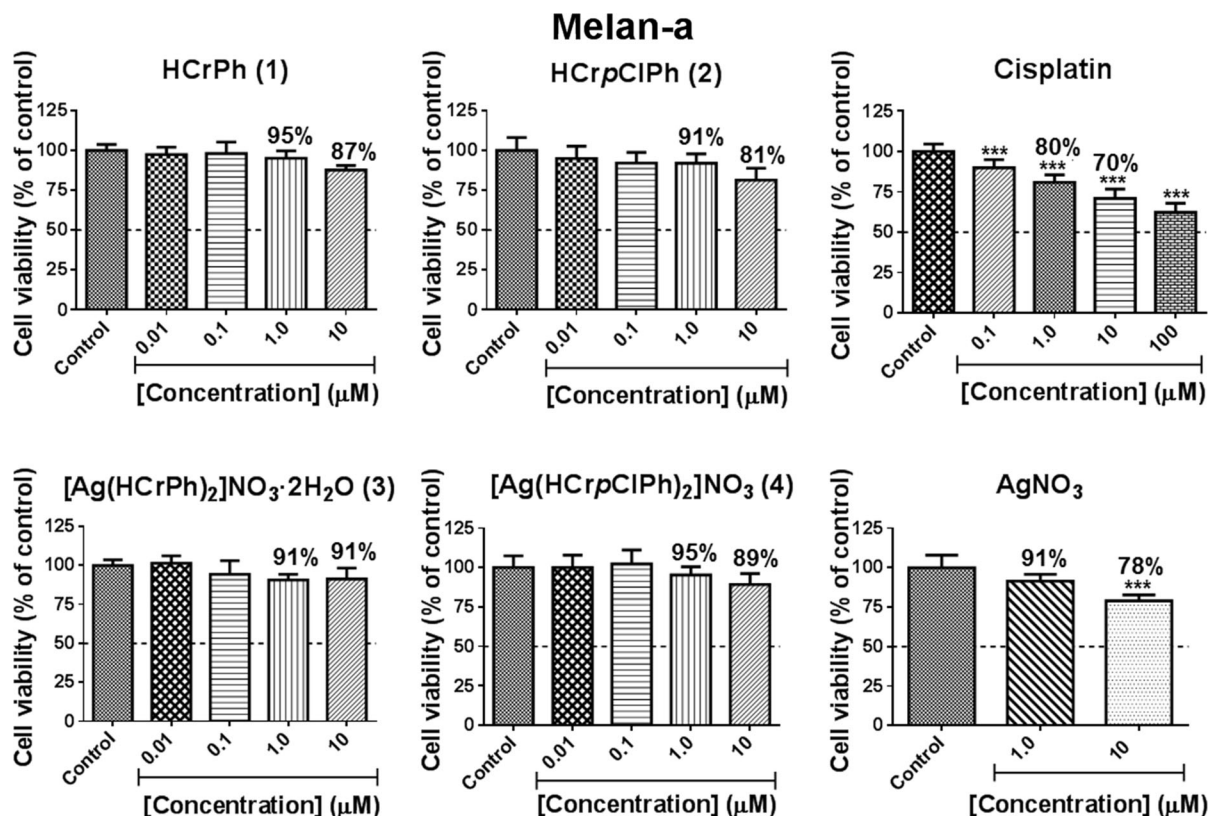


Fig. 4 Cytotoxic activity of hydrazones (**HL1–HL2**), their silver(I) complexes (**1–2**), AgNO_3 and cisplatin on Melan-a (non-tumorigenic murine melanocyte) cells. Cells were treated with increasing concentrations of the compounds (0.01–10 μM) for 72 h and cell viability was determined by the MTT

colorimetric assay. Values are expressed as the mean $\pm$ SD ($n = 6$) of percentage of cell viability compared to control (RPMI 1640 plus 10% FBS and DMSO 1%). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$, ANOVA, Student–Newman–Keuls test

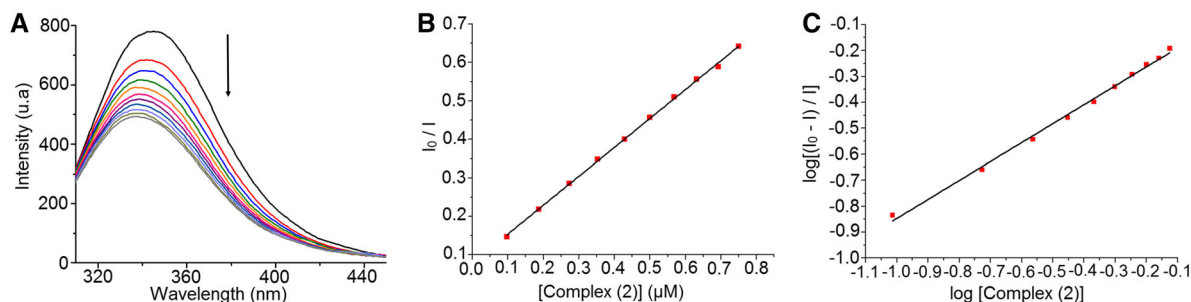


Fig. 5 **A** The emission spectrum of BSA (2.0 μM , Tris–HCl, pH 7.2, $T = 25^\circ\text{C}$) in the presence of 0 to 0.75 μM of complex (2). The arrow shows the fluorescence quenching upon

increasing the concentration of the complex. **B** Stern–Volmer plots (I_0/I vs [complex (2)]). **C** Scatchard plots ($\log [(I_0 - I)/I]$ vs $\log [\text{complex (2)}]$). $\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 342 \text{ nm}$

value of K_{sv} for complex (2)–BSA interaction was $7.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, indicating good protein-binding ability (Saha et al. 2017).

The bimolecular quenching rate constant k_q depends upon the probability of collision between

fluorophore and quencher. The obtained value of $k_q = 7.5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for complex (2) is higher than the maximum k_q value for dynamic quenching [$k_q = 2.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$], indicating the occurrence of a static quenching mechanism (Lakowicz 2006; Dewey 1991).

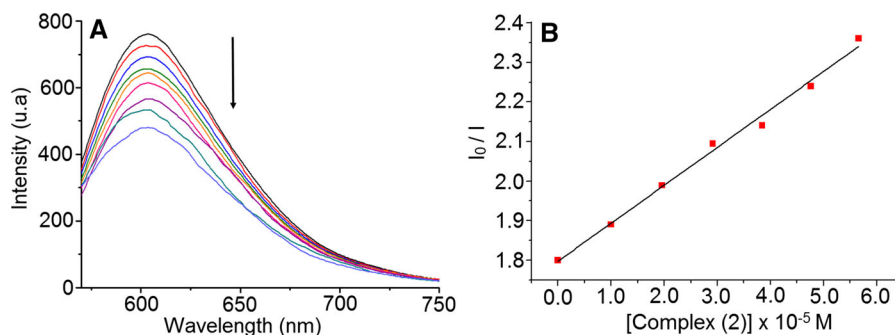


Fig. 6 **A** Emission spectra of EB bound to DNA in the absence and presence of complex (2); the arrow shows the changes in intensity at increasing concentrations of complex (2). **B** Stern–

Volmer plot (I_0/I vs [complex (2)]). Conditions: [CT-DNA-EB] = 10 μ M, Tris-HCl buffer, pH 7.20, T = 25 $^{\circ}$ C

Analysis of binding sites with BSA

The binding constant (K_b) and the number of binding sites (n) can be determined using the Scatchard Eq. (2):

$$\log[(I_0 - I)/I] = \log K_b + n \log[Q] \quad (2)$$

where K_b is the binding constant of the quencher with BSA, n is the number of binding sites, I_0 and I are the fluorescence intensity in the absence and the presence of the quencher. The plot of $\log [(I_0 - I)/I]$ vs $\log[Q]$ gives n and K_b as the slope and the intercept, respectively ($[Q] = [\text{complex (2)}]$ in Fig. 5C). The obtained values of $K_b = 1.2 \times 10^6$ and $n = 1$ suggest strong binding of complex (2) to BSA with formation of a 1:1 2-BSA system (Li et al. 2015).

Competitive binding between ethidium bromide (EB) and complex (2) for CT-DNA

The fluorescence spectral titration method was used to investigate the interaction between complex (2) and CT-DNA. The competitive study with ethidium bromide (EB) is based on the decrease of EB fluorescence band at 595 nm resulting from the competitive displacement of EB from the DNA groove by a compound that competes for the same site. Upon addition of complex (2) the band in the emission spectra of EB bound to CT-DNA showed a decrease in fluorescence intensity, indicating that the EB molecules were displaced from their DNA binding sites and replaced by the complex under investigation (Fig. 6).

The apparent binding constant (K_{app}) of complex (2) was calculated from Eq. (3) (Kumar et al. 2011) where $K_{EB} = 1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $[EB] = 10^{-5} \text{ M}$, and

$[Q]$ is the quencher concentration when the fluorescence intensity of EB is 50%. K_{app} is obtained from the plot I_0/I vs $[Q]$ when $I_0/I = 2$, in which I_0 is the fluorescence intensity in the absence of quencher and I is the fluorescence intensity in the presence of the quencher.

$$K_{EB}[EB] = K_{app}[Q] \quad (3)$$

The quenching Stern–Volmer constant (K_{sv}) was calculated using the classical Stern–Volmer Eq. (4) (Mistri et al. 2016).

$$I_0/I = 1 + K_{sv}[Q] \quad (4)$$

where I_0 and I are the emission intensity in absence and in presence of complex (2), K_{sv} is the Stern–Volmer constant, and $[Q]$ is the concentration of the quencher ($[Q] = [\text{complex (2)}]$). The obtained values $K_{sv} = 5.6 \times 10^3$ and $K_{app} = 2.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ indicate that complex (2) binds to DNA most probably by an intercalative mode (Despaigne et al. 2014; García-Giménez et al. 2013). In fact, the presence of the chromone moiety in the hydrazone ligand scaffold should favor intercalation of complex (2) into the DNA molecule.

Conclusions

The foregoing results suggest that upon coordination to silver(I) the antifungal activity of 3-formyl-6-methylchromone-phenyl hydrazone (**HL1**) and 3-formyl-6-methylchromone-*para*-chlorophenyl hydrazone (**HL2**) strongly increases. Coordination to silver(I) also resulted on enhancement of the cytotoxic

effect against B16F10 (metastatic melanoma) cells in complex (2), which proved to be as cytotoxic as cisplatin. Complex (2) was less active than cisplatin on non-malignant Melan-a cells, indicating that it might promote less damage on normal cells, which is an important characteristic of new anticancer drug candidates. In addition, complex (2) binds to BSA, the most extensively studied serum albumin due to its structural homology with human serum albumin (HSA). Hence, complex (2) might be transported by albumin proteins. The preliminary study on the biological targets of complex (2) indicated that it interacts with DNA by an intercalative mode, probably favored by the presence of the planar chromone group in the hydrazone ligand backbone.

Considering that the cytotoxic effects of silver(I) complexes against tumor cells are so far poorly investigated, the present work constitutes important contribution to the understanding of their pharmacological profile. Moreover, the selectivity of complex (2) for malignant cells suggests that further studies on silver(I) complexes with hydrazones as anticancer drug candidates are of relevance.

Supplementary crystallographic data

CCDC reference number 1536725 contains the supplementary crystallographic data for **HL2a**. These data can be obtained free of charge from the Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/structures.

Acknowledgements The authors are grateful to CNPq, INCT-INOVAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6), and CAPES PEC-PG.

References

Adamski A, Fik MA, Kubicki M, Hnatejko Z, Gurda D, Fedoruk-Wyszomirska A, Wyszko E, Kruska D, Dutkiewicz Z, Patroniak V (2016) Full characterization and cytotoxic activity of new silver(I) and copper(I) helicates with quaterpyridine. *New J Chem* 40:7943–7957

Agilent (2014) CrysAlisPRO. Agilent Technologies Ltd, Yarnton

Bhat SS, Kumbhar AA, Heptullah H, Khan AA, GobreVV Geji SP, Puranik VG (2011) Synthesis, electronic structure, DNA and protein binding, DNA cleavage, and anticancer activity of fluorophore-labeled copper(II) complexes. *Inorg Chem* 50:545–558

Conceição Filho JCC, Sarria ALF, Becceneri AB, Fuzer AM, Batalhão JR, Paranhos Da Silva CM, Carlos RM, Vieira PC, Fernandes JB, Cominetti MR (2014) Copper (II) and 2,2-bipyridine complexation improves chemopreventive effects of naringenin against breast tumor cells. *PLoS ONE* 9:e107058

Despaigne AAR, Parrilha GL, Izidoro JB, da Costa PR, dos Santos RG, Piro OE, Castellano EE, Rocha WR, Beraldo H (2012) 2-Acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones and their gallium(III) complexes are highly cytotoxic to glioma cells. *Eur J Med Chem* 50:163–172

Despaigne AAR, Da Silva JG, da Costa PR, dos Santos RG, Beraldo H (2014) ROS-mediated cytotoxic effect of copper(II) hydrazone complexes against human glioma cells. *Molecules* 19:17202–17220

Dewey TG (1991) Fluorescence quenching reaction: probing biological. In: Eftink MR (ed) *Macromolecular structures, biophysical and biochemical aspects of fluorescence spectroscopy*. Plenum Press, New York, pp 1–41

Dias LC, De Lima GM, Pinheiro CB, Rodrigues BL, Donnici CL, Fujiwara RT, Bartholomeu DC, Ferreira RA, Ferreira SR, Mendes TAO, Da Silva JG, Alves MRA (2015) Design, structural and spectroscopic elucidation of new nitroaromatic carboxylic acids and semicarbazones for the in vitro screening of anti-leishmanial activity. *J Mol Struct* 1079:298–306

Elsayed SA, Butler IS, Claude BJ, Mostafa SI (2015) Synthesis, characterization and anticancer activity of 3-formylchromone benzoylhydrazone metal complexes. *Transit Met Chem* 40:179–187

Fraga CAM, Barreiro EJ (2006) Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: new lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs. *Curr Med Chem* 13:167–198

García-Giménez JL, Hernández-Gil J, Martínez-Ruiz A, Castiñeiras A, Liu-González M, Pallardó FV, Borrás J, Alzueta Piña G (2013) DNA binding, nuclease activity, DNA photocleavage and cytotoxic properties of Cu(II) complexes of N-substituted sulfonamides. *J Inorg Biochem* 121:167–178

Gaspar A, Matos MJ, Garrido J, Uriarte E, Borges F (2014) Chromone: a valid scaffold in medicinal chemistry. *Chem Rev* 114:4960–4992

Jenkins TC (1997) Drug-DNA interaction protocols. In: Fox KR (ed) *Methods in molecular biology*, vol 90. Humana Press, Totowa, pp 195–218

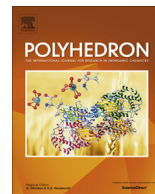
Johnson CK (1970) An introduction to thermal-motion analysis. In: Ahmed FR, Hall SR, Huber CP (eds) *Crystallographic computing*. Munksgaard, Copenhagen, pp 207–219

Kalinowska-Lis U, Felczak A, Chęcińska L, Szablowska-Gadomska I, Patyna E, Małeck M, Lisowska K, Ochocki J (2016) Antibacterial activity and cytotoxicity of silver(I) complexes of pyridine and (Benz)imidazole derivatives. X-ray crystal structure of [Ag(2,6-di(CH₂OH)py)₂]₃NO₃. *Molecules* 21:87

Kaplan A, Akalin Ciftci G, Kutlu HM (2016) Cytotoxic, anti-proliferative and apoptotic effects of silver nitrate against H-ras transformed 5RP7. *Cytotechnology* 68:1727–1735

Kumar P, Baidya B, Chaturvedi SK, Khan RH, Manna D, Mondal B (2011) DNA binding and nuclease activity of

- copper(II) complexes of tridentate ligands. *Inorg Chim Acta* 376:264–270
- Lakowicz R (2006) Principles of fluorescence spectroscopy. Springer, New York
- Lakowicz JR, Webber G (1973) Quenching of fluorescence by oxygen. Probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry* 12:4161–4170
- Li Y, Yang ZY, Wang MF (2009) Synthesis, characterization, DNA binding properties and antioxidant activity of Ln(III) complexes with hesperetin-4-one-(benzoyl) hydrazine. *Eur J Med Chem* 44:4585–4595
- Li Y, Yang ZY, Wu JC (2010) Synthesis, crystal structures, biological activities and fluorescence studies of transition metal complexes with 3-carbaldehyde chromone thiosemicarbazone. *Eur J Med Chem* 45:5692–5701
- Li L, Guo Q, Dong J, Xu T, Li J (2013) DNA binding, DNA cleavage and BSA interaction of a mixed-ligand copper(II) complex with taurine Schiff base and 1,10-phenanthroline. *J Photochem Photobiol B* 125:56–62
- Li Z, Niu M, Chang G, Zhao C (2015) Chiral manganese (IV) complexes derived from Schiff base ligands: synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity and DNA/BSA interaction. *J Photochem Photobiol B* 153:473–482
- Macrae CF, Bruno IJ, Chisholm JA, Edgington PR, McCabe P, Pidcock E, Rodriguez-Monge L, Taylor R, van de Streek J, Wood PA (2008) Mercury CSD 2.0—new features for the visualization and investigation of crystal structures. *J Appl Cryst* 41:466–470
- Marinelli M, Pellei M, Cimarrelli C, Rasika Dias HV, Marzano C, Tisato F, Porchia M, Gandin V, Santini C (2016) Novel multicharged silver(I)–NHC complexes derived from zwitterionic 1,3-symmetrically and 1,3-unsymmetrically substituted imidazoles and benzimidazoles: synthesis and cytotoxic properties. *J Organomet Chem* 806:45–53
- Mendu P, Kumari CG, Ragi R (2015) Synthesis, characterization, DNA binding, DNA cleavage and antimicrobial studies of Schiff base ligand and its metal complexes. *J Fluoresc* 25:369–378
- Mistri S, Puschmann H, Manna SC (2016) DNA/protein binding, cytotoxicity and catecholase activity studies of a piperazinyl moiety ligand based nickel(II) complex. *Polyhedron* 115:155–163
- Nakamoto K (1986) Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds, 4th edn. Wiley, New York, pp 227–229
- Paiva IL, de Carvalho GSG, da Silva AD, Corbi PP, Bergamini FRG, Formiga ALB, Diniz R, Diniz R, Leite CQF, do Carmo WR, Cuin A (2013) Silver(I) complexes with symmetrical Schiff bases: synthesis, structural characterization, DFT studies and antimycobacterial assays. *Polyhedron* 62:104–109
- Palatinus L, Chapuis G (2007) SUPERFLIP—a computer program for the solution of crystal structures by charge flipping in arbitrary dimensions. *J Appl Crystallogr* 40:786–790
- Piló EDL, Recio-Despaigne AA, Da Silva JG, Ferreira IP, Takahashi JA, Beraldo H (2015) Effect of coordination to antimony(III) on the antifungal activity of 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones. *Polyhedron* 97:30–38
- Popiolek Ł (2017) Hydrazide–hydrazones as potential antimicrobial agents: overview of the literature since 2010. *Med Chem Res* 26:287–301
- Reichmann ME, Rice SA, Doty CAP (1954) A further examination of the molecular weight and size of desoxypentose nucleic acid. *J Am Chem Soc* 76(11):3047–3053
- Rollas S, Küçükgüzel SG (2007) Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules* 12:1910–1939
- Saha M, Malviya N, Das M, Choudhuri I, Mobin SM, Pathak B, Mukhopadhyay S (2017) Effect on catecholase activity and interaction with biomolecules of metal complexes containing differently tuned 5-substituted ancillary tetrazolato ligands. *Polyhedron* 121:155–171
- Selvaraj S, Krishnaswamy S, Devashya V, Sethuraman S, Krishnan UM (2012) Membrane fluidization & eryptotic properties of hesperidin-copper complex. *RSC Adv* 2:11138–11146
- Sheldrick GM (2015) Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Cryst C* 71:3–8
- Tamayo LV, Gouvea LR, Sousa AC, Albuquerque RM, Teixeira SF, de Azevedo RA, Louro SR, Ferreira AK, Beraldo H (2016) Copper(II) complexes with naringenin and hesperetin: cytotoxic activity against A549 human lung adenocarcinoma cells and investigation on the mode of action. *Biomaterials* 29:39–52
- Tan J, Wang B, Zhu L (2009) DNA binding and oxidative DNA damage induced by a quercetin copper(II) complex: potential mechanism of its antitumor properties. *J Biol Inorg Chem* 14:727–739
- Wang BD, Yang ZY, Wang Q, Cai TK, Crewdson P (2006) Synthesis, characterization, cytotoxic activities, and DNA-binding properties of the La(III) complex with Naringenin Schiff-base. *Bioorg Med Chem* 14:1880–1888
- Wardell SMSV, de Souza MVN, Wardell JL, Low JN, Glidewell C (2007) Supramolecular structures in N-isonicotinoyl arylaldehydehydrazones: multiple hydrogen-bonding modes in series of geometric isomers. *Acta Cryst B* 63:879–895
- Zacchino AS, Gupta MP (2007) Manual de técnicas in vitro para la detección de compuestos antifúngicos. Corpus Editorial y Distribuidora, Rosario



Investigation on the physicochemical properties of *trans*-4-stilbenecarboxaldehyde-derived hydrazones and their copper(II) complexes

Lenka V. Tamayo^a, Jeferson G. Da Silva^b, Matheus C. Quintão^a, Helio A. Duarte^a, Sonia R.W. Louro^c, Heloisa Beraldo^{a,*}

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, 35010-177 Governador Valadares, MG, Brazil

^c Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 22653-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2017

Accepted 9 June 2017

Available online 15 June 2017

Keywords:

Trans-4-stilbenecarboxaldehyde hydrazones

Copper(II) complexes

Theoretical calculations

EPR spectra

Albumin binding

ABSTRACT

[Cu(HL)₂Cl₂] complexes (**1–6**) were prepared with *trans*-4-stilbenecarboxaldehyde-*para*-tolyl-hydrazone HStpT (**HL1**), *trans*-4-stilbenecarboxaldehyde-*para*-chloro-phenylhydrazone HStpClPh (**HL2**), *trans*-4-stilbenecarboxaldehyde-*para*-hydroxy-phenylhydrazone HStpOHPh (**HL3**), *trans*-4-stilbenecarboxaldehyde-*para*-nitro-phenylhydrazone HStpNO₂Ph (**HL4**), *trans*-4-stilbenecarboxaldehyde-acetylhydrazone HStAc (**HL5**), and *trans*-4-stilbenecarboxaldehyde-benzoylhydrazone HStBz (**HL6**). Infrared spectra suggested that the hydrazones act as bidentate ligands which bind to the copper(II) center through the N_{imine}-O chelating system. EPR spectra of complexes (**1–6**) were recorded at room temperature for powder samples and at 77 K for DMSO solution. The EPR parameters were compatible with the presence of copper(II). Since the spectroscopic data for complexes (**1–6**) did not allow the unambiguous determination of the exact geometry of the complexes in the solid state or in solution, theoretical studies were carried out considering five possible isomers, in order to get information on the predominant species. However, although one of the isomers revealed to be the most thermodynamically favorable, free energy differences were not larger than 3 kcal·mol^{−1}. Hence, differences in lattice energy or packing forces could influence the geometry adopted in the solid. The thermodynamic analysis of the five isomers indicated that all of them are in equilibrium in solution. EPR studies suggested that complexes (**1–6**) interact with bovine (BSA) and human (HSA) serum albumin, with displacement of the hydrazone ligands and coordination of copper(II) to site 1, together with formation of hydrazone-cysteine mixed-ligand copper(II) complexes at site 2 of the albumins.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Stilbene derivatives exhibit a wide range of pharmacological applications as anti-leukemia, antimicrobial, anti-inflammatory and anti-oxidative agents. These compounds proved to act as inhibitors of cellular processes associated with cancer initiation, promotion, and progression [1]. Resveratrol (*trans*-3,4',5-trihydroxystilbene), a polyphenolic phytoalexin present in grapes, peanuts, and mulberry, has been shown to inhibit platelet aggregation, lipid peroxidation, and to have antioxidant and neuroprotective properties [2]. In addition, stilbene-based compounds have been shown to bind to plaques of the amyloid Aβ amino acid peptide, supposed

to be involved in Alzheimer's disease (AD), a progressive neurodegenerative disorder that leads to synaptic failure and neuronal death [3]. Evidence from several studies corroborates the amyloid cascade hypothesis that associates the accumulation of insoluble aggregates of Aβ peptide as one of the main components in the pathogenesis of AD [4].

It has been suggested that copper(II) ions promote Aβ aggregation and induce oxidative stress that is also a putative cause of neuronal degeneration [5]. Copper(II) binding agents can promote the disaggregation of Aβ plaques and have demonstrated promise as AD therapeutics [6]. With the aim to obtain compounds that act as antioxidants, Aβ aggregation inhibitors and biochelators, several hybrid derivatives have been obtained by other authors by combining the stilbene framework with the 8-hydroxyquinoline chelating system or by incorporating two N donor atoms as a

* Corresponding author.

E-mail address: hberaldo@ufmg.br (H. Beraldo).

bidentate metal coordination site directly into the stilbene scaffold [5].

Hydrazones are Schiff base compounds that, as well as their metal complexes, show numerous bioactivities as antiviral, antimicrobial, anti-inflammatory [7] and cytotoxic agents [8]. Copper(II) complexes with a variety of hydrazones exhibit cytotoxic [9], antimicrobial [10] and antioxidant [11] activities.

In a previous work some of us demonstrated that Schiff base chelating agents derived from 8-hydroxyquinoline show ability to modulate copper-mediated A β peptide aggregation [6]. In the present work a family of *trans*-4-stilbenecarboxaldehyde derivatives were obtained, by functionalization of the *trans*-stilbene framework with a chelating hydrazone moiety (see Fig. 1). We also obtained copper(II) complexes with the *trans*-4-stilbenecarboxaldehyde-derived hydrazone ligands. Theoretical calculations combined with sophisticated experimental techniques were used to provide insights about the structural and thermodynamic properties of the copper(II) complexes. An EPR investigation on the interactions of the copper(II) complexes with bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins was performed as well.

2. Experimental

2.1. Materials and measurements

All common chemicals were purchased from Aldrich and were used without further purification. Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. A Quimis model Q405M conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-IR 1000 spectrometer using KBr pellets (4000–400 cm⁻¹). NMR spectra were obtained with a Bruker DPX-400 Advance (400 MHz) spectrometer using DMSO-*d*₆ as the solvent and tetramethylsilane (Me₄Si) as internal reference. X-band electron paramagnetic resonance (EPR) spectra were obtained with a Bruker ESP300E spectrometer with a modulation frequency of 100 kHz and a modulation amplitude of 0.5 mT. Powder samples were measured at ambient temperature in 1 mm diameter capillaries. Solutions of the complexes were measured at liquid N₂ temperature (77 K) in Teflon® tubes of 3 mm internal diameter.

Crystallographic analysis were carried out on an Oxford-Diffraction GEMINI-Ultra diffractometer (LabCri-UFMG, Brazil) using a graphite-enhance source Mo K α radiation (λ = 0.71070 Å) at 150 K. Data collection, cell refinements and data reduction were performed using the CrysAlisPro software package [12]. An absorption correction based on the multi-scan method was applied. The structures were solved by direct methods using SHELXS-2013/1 [13]. Full-matrix least-squares refinement procedure on *F*² with anisotropic thermal parameters was carried on using SHELXL-2014/7 [14]. Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all non-hydrogen atoms. Hydrogen atoms were placed geometrically and the positional parameters

were refined using a riding model. Molecular graphics were prepared using Mercury [15].

2.2. Syntheses

2.2.1. Syntheses of hydrazones (HL1–HL6)

The hydrazones were prepared by mixing equimolar amounts (1 mmol) of *trans*-4-stilbenecarboxaldehyde with the desired hydrazide in methanol with addition of 3 drops of acetic acid. The reaction mixture was kept under reflux for 24 h. The obtained solids were filtered off, washed with methanol and diethyl ether and then dried under reduced pressure. HStpOHPh (HL3) has been previously described by other authors [16].

2.2.2. Syntheses of copper(II) complexes (1–6)

Copper(II) complexes (1–6) were prepared by stirring under reflux a methanol solution of the desired hydrazone (1.0 mmol) with CuCl₂·2H₂O (1.0 mmol) for 8 h. After cooling to room temperature the obtained solids were washed with methanol followed by ethanol and diethyl ether and then dried under reduced pressure.

2.2.2.1. HStpT (HL1). White solid. *Anal.* Calc. for C₂₃H₂₀N₂O (FW = 340.42 g mol⁻¹): C, 81.15; H, 5.92; N, 8.23. Found: C, 80.96; H, 5.78; N, 8.29. M.p.: 252.9–253.8 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν (N–H) 3280; ν (C=O) 1652; ν (C=N) 1608. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) [δ (ppm)] main signals: 11.78 [s, 1H, N(2)H]; 8.42 [s, 1H, H15]; 7.81 [d, 2H, H19, H21 (*J* = 7.3 Hz)]; 7.73 [d, 2H, H11–H13 (*J* = 8.1 Hz)]; 7.68 [d, 2H, H10–H14 (*J* = 8.1 Hz)]; 7.62 [d, 2H, H18, H22 (*J* = 7.6 Hz)]; 7.40–7.26 [m, H1–H5, H7, H8]; 2.37 [s, 3H, CH₃]. Yield: 83%.

Single-crystals of HL1 were obtained by slow evaporation of its mother liquor at room temperature.

2.2.2.2. HStpClPh (HL2). White solid. *Anal.* Calc. for C₂₂H₁₇ClN₂O (FW = 360.83 g mol⁻¹): C, 73.23; H, 4.75; N, 7.76. Found: C, 73.07; H, 4.49; N, 7.68. M.p.: 276.1–277.0 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν (N–H) 3290; ν (C=O) 1654; ν (C=N) 1600. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) [δ (ppm)] main signals: 11.92 [s, 1H, N(2)H]; 8.44 [s, 1H, H15]; 7.94 [d, 2H, H19, H21 (*J* = 8.4 Hz)]; 7.72 [brs, 4H, H10–H14]; 7.64–7.59 [m, 4H, H7, H8, H18, H22]; 7.42–7.24 [m, 5 H, H1–H5]. Yield: 85%.

2.2.2.3. HStpOHPh (HL3). Experimental data for this compound are in accordance with those previously published by other authors [16].

2.2.2.4. HStpNO₂Ph (HL4). Yellow solid. *Anal.* Calc. for C₂₂H₁₇N₃O₃ (FW = 371.38 g mol⁻¹): C, 71.15; H, 4.61; N, 11.31. Found: C, 68.15; H, 4.77; N, 11.00. M.p.: 274.8–278.5 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν (N–H) 3244; ν (C=O) 1660; ν (C=N) 1602. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) [δ (ppm)] main signals: 12.13 [s, 1H, N(2)H]; 8.46 [s, 1H, H15]; 8.37 [d, 2H, H19, H21, (*J* = 8.6 Hz)]; 8.15 [d, 2H,

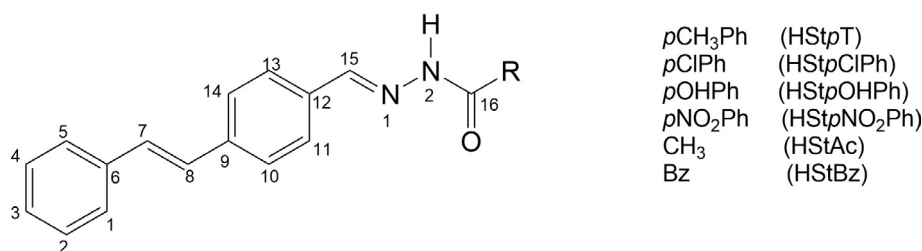


Fig. 1. Structural representation of *trans*-4-stilbenecarboxaldehyde-derived hydrazones.

H18, H22, ($J = 8.6$ Hz)]; 7.76 [d, 2H, H11, H13, ($J = 8.3$ Hz)]; 7.71 [d, 2H, H10–H14, ($J = 8.3$ Hz)]; 7.63 [d, 2H, H7, H8, ($J = 7.3$ Hz)]; 7.41–7.27 [m, 5H, H1–H5]. Yield: 95%. Single crystals of HStpNO₂Ph-DMSO (**HL4a**) were obtained by slow evaporation of a solution of **HL4** in 9:1 acetone / DMSO at room temperature.

2.2.2.5. HStAc (HL5). White solid. *Anal.* Calc. for C₁₇H₁₆N₂O (FW = 264.32 g mol^{−1}): C, 77.25; H, 6.10; N, 10.60. Found: C, 77.25; H, 6.01; N, 10.19. M.p.: 239.2–241.2 °C. IR (KBr, cm^{−1}): ν (N–H) 3184; ν (C=O) 1678; ν (C=N) 1608. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) [δ (ppm)] main signals: 11.38 (ceto), 11.25 (enol) [s, 1H, N(2)H]; 8.12 (ceto), 7.97 (enol) [s, 1H, H15]; 7.64 [brs, 4H, H7, H8, H10–H14 (ceto and enol)]; 7.38–7.29 [m, 5H, H1–H6 (ceto and enol)]; 2.20 (ceto), 1.95 (enol) [s, 3H, CH₃ (ceto and enol)]. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) [δ (ppm)] main signals: 171.98 (ceto), 165.61 (enol) [C16 (ceto and enol)]; 145.23 (ceto), 142.26 (enol) [C15 (ceto and enol)]; 21.66 (ceto), 20.27 (enol) [CH₃ (ceto and enol)]. Yield: 61%.

2.2.2.6. HStBz (HL6). White solid. *Anal.* Calc. for C₂₃H₂₀N₂O (FW = 340.42 g mol^{−1}): C, 81.15; H, 5.92; N, 8.23. Found: C, 80.87; H, 5.78; N, 8.23. M.p.: 216.2–217.4 °C. IR (KBr, cm^{−1}): ν (N–H) 3184; ν (C=O) 1672; ν (C=N) 1650. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) [δ (ppm)] main signals: 11.63 (ceto), 11.40 (enol) [s, 1H, N(2)H]; 8.21 (ceto), 7.99 (enol) [s, 1H, H15]; 7.68 [brs, 4H, H10–H14, (ceto and enol)]; 7.61 [d, 2H, H7, H8 (7.3 Hz)]; 7.42–7.20 [m, 5H, H1–H6, H18–H22, (ceto and enol)]; 3.99 (ceto), 3.55 (enol) [s, 2H, CH₂ (ceto and enol)]. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) [δ (ppm)] main signals: 172.42 (ceto), 166.70 (enol) [C16 (ceto and enol)]; (C8), 146.32 (ceto), 142.74 [C15 (ceto and enol)]; 41.30 (ceto), 39.06 (enol) [CH₂ (ceto and enol)]. Yield: 83%.

2.2.2.7. [Cu(HStpT)₂Cl₂] (1). Yellow solid. *Anal.* Calc. for C₄₆H₄₀Cl₂CuN₄O₂ (FW = 815.28 g mol^{−1}): C, 67.77; H, 4.95; N, 6.87. Found: C, 67.67; H, 4.89; N, 6.80. Molar conductivity (1×10^{-3} mol L^{−1} DMF): 37.9 Ω^{-1} cm² mol^{−1}. M.p.: 272.9–273.5 °C. IR (KBr, cm^{−1}): ν (N–H) 3200; ν (C=O) 1602; ν (C=N) 1572. Yield: 93%.

2.2.2.8. [Cu(HStpClPh)₂Cl₂] (2). Yellow solid. *Anal.* Calc. for C₄₄H₃₄Cl₄CuN₄O₂ (FW = 856.12 g mol^{−1}): C, 61.73; H, 4.00; N, 6.54. Found: C, 61.46; H, 3.90; N, 6.73. Molar conductivity (1×10^{-3} mol L^{−1} DMF): 40.3 Ω^{-1} cm² mol^{−1}. IR (KBr, cm^{−1}): ν (N–H) 3204; ν (C=O) 1602; ν (C=N) 1564. Yield: 94%.

2.2.2.9. [Cu(HStpOHPh)₂Cl₂] (3). Brown solid. *Anal.* Calc. for C₄₄H₃₆Cl₂CuN₄O₄ (FW = 819.23 g mol^{−1}): C, 64.51; H, 4.43; N, 6.84. Found: C, 63.70; H, 4.89; N, 6.66. Molar conductivity (1×10^{-3} mol L^{−1} DMF): 35.6 Ω^{-1} cm² mol^{−1}. M.p.: 249.6–250.3. IR (KBr, cm^{−1}): ν (N–H) 3170; ν (C=O) 1606; ν (C=N) 1592. Yield: 81%.

2.2.2.10. [Cu(HStpNO₂Ph)₂Cl₂] (4). Yellow solid. *Anal.* Calc. for C₄₄H₃₄Cl₂CuN₆O₆ (FW = 877.23 g mol^{−1}): C, 60.24; H, 3.91; N, 9.58. Found: C, 60.26; H, 3.86; N, 9.50. Molar conductivity (1×10^{-3} mol L^{−1} DMF): 46.2 Ω^{-1} cm² mol^{−1}. IR (KBr, cm^{−1}): ν (N–H) 3190; ν (C=O) 1622; ν (C=N) 1590. Yield: 91%.

2.2.2.11. [Cu(HStAc)₂Cl₂] (5). Yellow solid. *Anal.* Calc. for C₃₄H₃₂Cl₂CuN₄O₂ (FW = 663.09 g mol^{−1}): C, 61.58; H, 4.86; N, 8.45. Found: C, 63.73; H, 4.86; N, 8.19. Molar conductivity (1×10^{-3} mol L^{−1} DMF): 28.9 Ω^{-1} cm² mol^{−1}. IR (KBr, cm^{−1}): ν (N–H) 3160; ν (C=O) 1618; ν (C=N) 1600. Yield: 86%.

2.2.2.12. [Cu(HStBz)₂Cl₂] (6). Yellow solid. *Anal.* Calc. for C₄₆H₄₀Cl₂CuN₄O₂ (FW = 815.29 g mol^{−1}): C, 67.77; H, 4.95; N,

6.87. Found: C, 68.82; H, 4.93; N, 6.97. Molar conductivity (1×10^{-3} mol L^{−1} DMF): 29.7 Ω^{-1} cm² mol^{−1}. M.p.: 201.3–203.3 °C. IR (KBr, cm^{−1}): ν (N–H) 3212; ν (C=O) 1626; ν (C=N) 1602. Yield: 88%.

2.3. Computational methods

The thermodynamic and spectroscopic properties of complex (**5**) were estimated by means of Density Functional (DFT) calculations as implemented in GAUSSIAN 09 package [17]. The five different tautomers (Section 3.4) were fully optimized using the hybrid exchange–correlation functional (XC) B3LYP [18,19] and the cc-pVDZ [20] basis sets for all atoms. The free energy is the sum of three terms: electronic plus nuclear repulsion energy (ΔE_{ele}), the solvation energy (ΔG_{solv}) and the thermal contribution (ΔG_{therm}). The solvation energy was calculated using the Polarizable Continuum Model (PCM) [21] with DMSO ($\epsilon = 46.826$) as solvent. The thermal contribution was calculated using quantum mechanical vibrational frequencies at 298 K [22]. Single point calculations using the B3LYP/cc-pVDZ geometries were performed using the PBE [23,24] exchange–correlation functional and cc-pVTZ basis sets (see Supplementary Material). The harmonic frequencies were calculated at the gas phase and the real frequency values assure that a minimum at the potential energy surface (PES) was found. The time-dependent DFT (TD-DFT) was calculated for all optimized structures for the first 60 states. The electron paramagnetic resonance (EPR) parameters were calculated using the ADF package [25]. The XC functional BLYP [19,26] with TZP basis sets was used for geometry optimization. The solvent effects were included using the continuum model COSMO/DMSO. The EPR parameters were obtained with the BLYP/TZ2P XC potential including zero order regular approximation effects (ZORA) with spin–orbit coupling.

3. Results and discussion

3.1. Formation of the hydrazones and copper(II) complexes

Microanalyses and the IR and NMR data are in accordance with the formation of the ligands **HL1–HL6**. Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of [Cu(HL)₂–Cl₂] complexes (**1–6**), in which two neutral hydrazone ligands are attached to the metal center together with two chloride ions. EPR parameters were compatible with the presence of copper(II) complexes (Section 3.3).

3.2. X-ray crystallography

A summary of the crystal data, data collection details and refinement results for HStpT (**HL1**) and HStpNO₂Ph-DMSO (**HL4a**) are listed in Table 1. The atom arrangements and atom numbering scheme for **HL1** and **HL4a** are shown in Fig. 2. Selected bond lengths, angles and torsion angles for the compounds are given in Table 2. More crystallographic data are reported in Supplementary Material (Tables S19–S23).

HL1 crystallized in the monoclinic system, space group P2₁/c, with one molecule of the hydrazone *per* asymmetric unit. **HL4a** also crystallized in the monoclinic system, space group P2₁/c, but with one molecule of the hydrazone and one DMSO molecule *per* asymmetric unit. The bond lengths and angles of the hydrazone skeleton are similar in the two structures (see Table 2). These geometric parameters are also similar in other hydrazones [8].

In **HL1** and **HL4a** the hydrazone adopts the *EEZ* conformation in relation to the C7–C8, C15–N1, and N2–C16 bonds (see torsion angles in Table 2). In fact, the presence of the *EZ* conformation in

Table 1
Crystal data and structure refinement for HStpT (**HL1**) and HStpNO₂Ph-DMSO (**HL4a**).

Compound	HL1	HL4a
Empirical formula	C ₂₃ H ₂₀ N ₂ O	C ₂₄ H ₂₃ N ₃ O ₄ S
Formula weight (g mol ⁻¹)	340.41	449.51
Temperature (K)	150(2)	150(2)
Wavelength (Å)	0.71073	0.71073
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic
Space group	P 2 ₁ /c	P 2 ₁ /c
Unit cell dimensions		
<i>a</i> (Å)	20.7840(13)	24.5924(8)
<i>b</i> (Å)	5.5248(3)	6.8610(2)
<i>c</i> (Å)	16.1747(9)	13.1952(4)
α (°)	90	90
β (°)	109.915(7)	102.513(3)
γ (°)	90	90
<i>V</i> (Å ³)	1746.23(19)	2173.52(12)
<i>Z</i>	4	4
Density calculated (Mg m ⁻³)	1.295	1.374
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.080	0.186
<i>F</i> (000)	720	944
Crystal size (mm ³)	0.453 × 0.236 × 0.095	0.472 × 0.411 × 0.159
θ range for data collection (°)	2.084 to 26.371	2.545 to 26.370
Index ranges	−25 ≤ <i>h</i> ≤ 25, −6 ≤ <i>k</i> ≤ 5, −20 ≤ <i>l</i> ≤ 19	−30 ≤ <i>h</i> ≤ 30, −8 ≤ <i>k</i> ≤ 8, −16 ≤ <i>l</i> ≤ 16
Reflections collected	13411	67230
Independent reflections	3557 [0.0296]	4449 [0.0361]
Completeness to $\theta = 25.242^\circ$	100%	99.9%
Data/restraints/parameters	3557/0/236	4449/0/291
Final <i>R</i> indices [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0.0395, <i>wR</i> ₂ = 0.1010	<i>R</i> ₁ = 0.0320, <i>wR</i> ₂ = 0.0842
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> ₁ = 0.0481, <i>wR</i> ₂ = 0.1069	<i>R</i> ₁ = 0.0350, <i>wR</i> ₂ = 0.0865
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.043	1.038
$\Delta\rho_{\max}$ and $\Delta\rho_{\min}$ (e Å ⁻³)	0.253 and −0.214	0.267 and −0.334

relation to the C15–N1 and N2–C16 bonds is quite common in hydrazones [27,28].

3.3. Spectroscopic characterization

The vibrations attributed to $\nu(\text{N–H})$ at 3290–3078 cm⁻¹ in the spectra of the free bases are found at 3212–3160 cm⁻¹ in the spectra of complexes (**1–6**), in accordance with the presence of neutral hydrazone ligands [8]. The $\nu(\text{C=N})$ absorption, observed in the 1650–1600 cm⁻¹ range in the spectra of the ligands, shifts to 1602–1572 cm⁻¹ in the spectra of the complexes, in accordance with coordination of the azomethine nitrogen [8]. The $\nu(\text{C=O})$ absorption which is found in the 1678–1650 cm⁻¹ range in the infrared spectra of the uncomplexed hydrazones shifts to 1626–1602 cm⁻¹ in the spectra of complexes (**1–6**), suggesting coordination of the oxygen [8,10,28].

The NMR spectra of the hydrazones were recorded in DMSO-*d*₆. The ¹H resonances were assigned on the basis of chemical shifts and multiplicities. The carbon type (C, CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT 135) experiments.

In the ¹H NMR spectra of **HL1–HL6** (DMSO-*d*₆) the presence of the signal at δ 11.38–12.13 is characteristic of the *E* isomer in which N2–H is hydrogen bonded to the solvent. In fact, the crystal structures of HStpT (**HL1**) and HStpNO₂Ph-DMSO (**HL4a**) reveal that the compounds adopt the *EZ* conformation in relation to the C15–N1 and N2–C16 bonds.

Room temperature X-band EPR spectra of complexes (**1–6**) powder samples are presented in Fig. 3 and the EPR parameters are listed in Table 3. The absence of hyperfine splitting due to exchange is frequently observed in powder spectra of copper(II) complexes [29]. Complex (**2**) has a very wide axially symmetric spectrum, but the spectra of complexes (**1**) and (**3–6**) present a sufficiently large anisotropy to resolve the three principal *g* components (with $g_x < g_y < g_z$ in Table 1), which can be obtained from the randomly oriented samples.

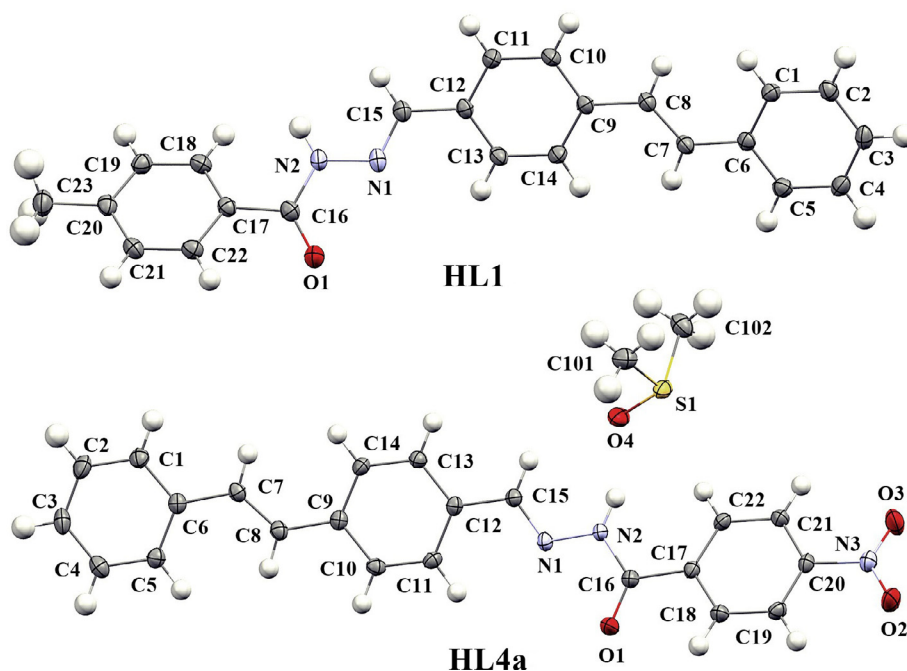


Fig. 2. Molecular plots of HStpT (**HL1**) and HStpNO₂Ph-DMSO (**HL4a**) showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.

Table 2

Selected bond distances [Å], angles [°] and torsion angles [°] for HStpT (**HL1**) and HStpNO₂Ph·DMSO (**HL4a**).

	HL1	HL4a
Bonds		
C7–C8	1.3375(19)	1.3342(17)
C15–N1	1.2817(17)	1.2764(16)
N1–N2	1.3706(14)	1.3755(13)
C16–N2	1.3670(17)	1.3591(15)
C16–O1	1.2262(17)	1.2172(15)
C16–C17	1.4885(18)	1.5024(16)
Angles		
C15–N1–N2	116.17(12)	117.32(10)
C16–N2–N1	118.66(11)	116.27(9)
O1–C16–N2	122.42(12)	123.01(11)
O1–C16–C17	122.59(12)	120.67(11)
N2–C16–C17	114.99(12)	116.30(10)
Torsion angles		
C6–C7–C8–C9	–175.84(12)	–178.59(11)
C12–C15–N1–N2	–179.10(10)	–178.53(10)
O1–C16–N2–N1	4.82(19)	–3.54(19)

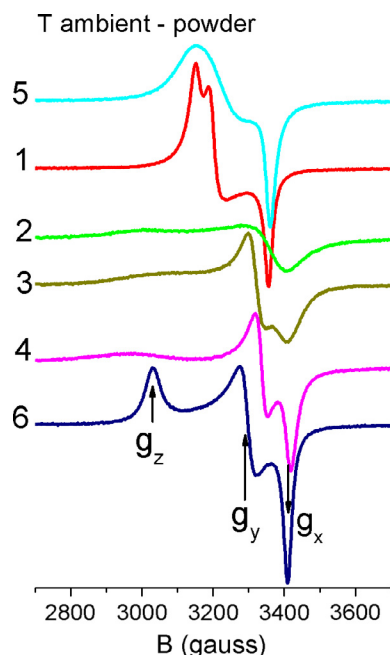


Fig. 3. X-band EPR spectra of complexes (**1–6**) powder samples at room temperature.

Table 3

EPR parameters of powder samples of complexes (**1–6**).

Complex	g_x	g_y	g_z
[Cu(HStpT) ₂ Cl ₂] (1)	2.085	2.182	2.22
[Cu(HStpClPh) ₂ Cl ₂] (2)	2.09	2.09	2.33
[Cu(HStpOHPh) ₂ Cl ₂] (3)	2.053	2.107	2.32
[Cu(HStpNO ₂ Ph) ₂ Cl ₂] (4)	2.053	2.12	2.31
[Cu(HStAc) ₂ Cl ₂] (5)	2.083	2.16	2.22
[Cu(HStBz) ₂ Cl ₂] (6)	2.053	2.16	2.22

The EPR spectra of complexes (**1–6**) in DMSO solution at 77 K are presented in Fig. 4 (parameters in Table 4). Complexes (**1–6**) show EPR spectra characteristic of axial symmetry with the same EPR parameters.

3.4. Theoretical calculations

The spectroscopic data for complexes (**1–6**) did not allow the unambiguous determination of the exact geometry of the com-

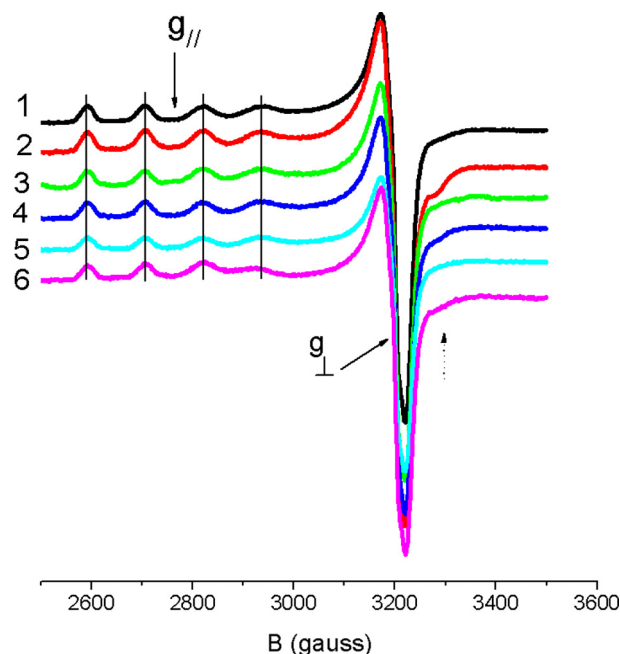


Fig. 4. EPR spectra of complexes (**1–6**) in DMSO at 77 K (0.5×10^{-3} M). Parameters in Table 4.

Table 4

EPR parameters of complexes (**1–6**) in DMSO at 77 K.

Complex	$g_{ }$	$g_{\perp}$	$A_{ }$ (gauss)
(1–6)	2.414	2.086	115

plexes in the solid state or in solution. Hence, theoretical studies were carried out in order to get information on the predominant isomers. Fig. 5 shows the optimized structures of the different isomers of complex (**5**). Table 5 lists the relative free energies with respect to the most stable isomer, and the calculated infrared frequencies and EPR parameters. Isomer **5d** is the most stable, while the other structures are almost degenerated with free energy differences not larger than 3 kcal·mol^{–1}. This is cumbersome for the density functional calculations. In fact, larger basis sets and different exchange–correlation functionals lead to the same conclusion (see Table S24, Supplementary Material). The thermodynamic analysis of the five isomers indicated that all of them are in equilibrium in solution, and due to the small energy differences, it is not possible to indicate which one is the predominant isomer at solution.

The main frequencies attributed to the $\nu(\text{N–H})$, $\nu(\text{C=N})$, $\nu(\text{C=O})$ are in very good agreement with the experimental data and the differences are not larger than 10%. The calculated EPR parameters are similar between the different isomers and one cannot distinguish between them based on this property. The values follow the sequence $g_{xx} > g_{yy} \sim g_{zz}$. The experimental parameters are about 0.10 au larger than the calculated g_{yy} and g_{zz} and about 0.08 au smaller for g_{xx} .

3.5. EPR studies on albumin binding to complexes (**1–6**)

The human and bovine serum albumins have at least two copper(II) binding sites. Site 1 is the strong N-terminal site that binds copper(II) in a square-planar geometry via four nitrogen ligands [30–32]. This highest affinity binding site for the metal is formed by the α -NH₂ N atom, the N atoms of the first two peptide bonds and the N₃ atom of His-3. This N-terminal site is fairly specific

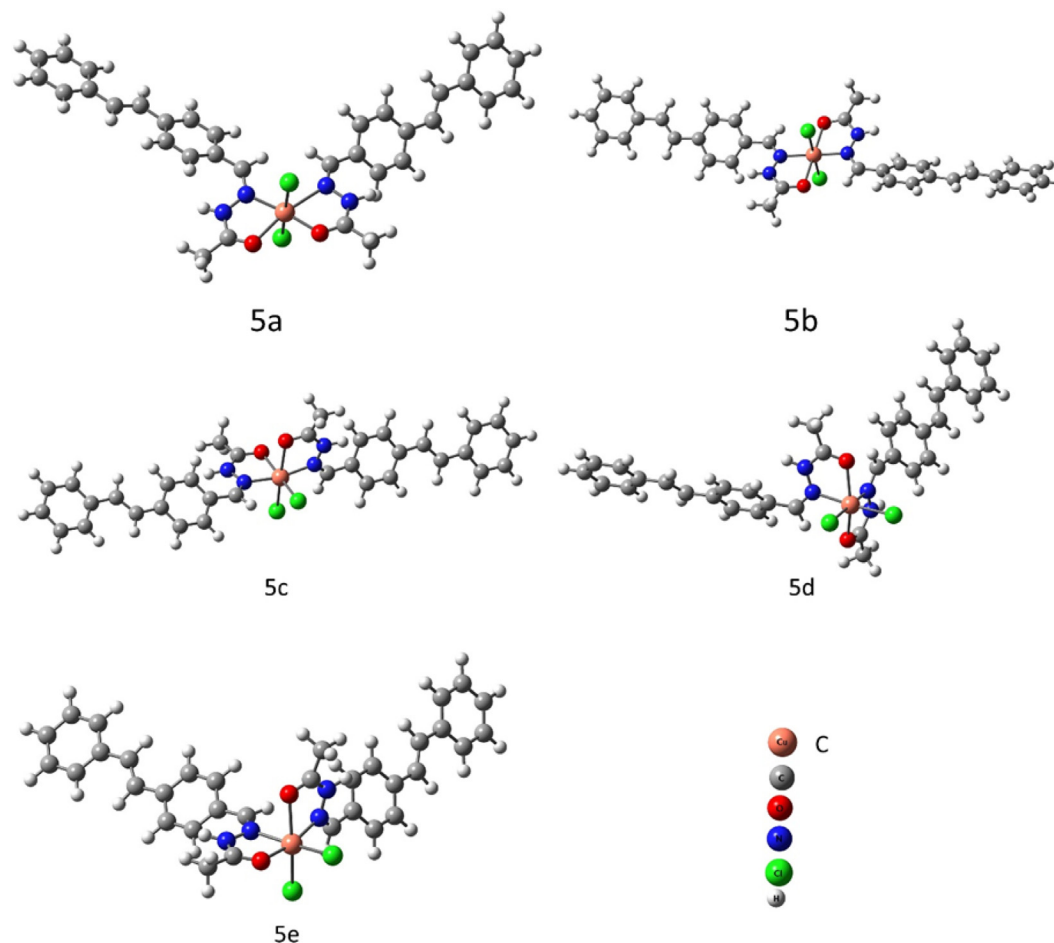


Fig. 5. Optimized structures for $[\text{Cu}(\text{HStAc})_2\text{Cl}_2]$ (**5**).

Table 5
Relative free energy, infrared frequencies and EPR parameters for $[\text{Cu}(\text{HStAc})_2\text{Cl}_2]$ (**5**).

Property	Isomers				
	5a	5b	5c	5d	5e
ΔG_{rel} (kcal mol ⁻¹)	2.9	0.8	0.5	0.0	0.1
Infrared frequencies and relative intensities (arbitrary units)					
$\nu(\text{N-H})$ (cm ⁻¹)	3521 (111) 3552 (92)	3550 (93.0)	3554 (136)	3548 (98) 3552 (98)	3530 (96) 3550 (87)
$\nu(\text{C=O})$ (cm ⁻¹)	1666 (1005) 1721 (563)	1732 (350)	1656 (350) 1728 (623)	1706 (732)	1664 (793) 1717 (635)
$\nu(\text{C=N})$ (cm ⁻¹)	1679 (103) 1684 (22)	1681(35)	1674 (35) 1690 (19)	1676(196) 1677(173)	1680 (164) 1685 (16)
Calculated EPR parameters					
g_{xx}	2.151771	2.142456	2.152469	2.151285	2.154060
g_{yy}	2.052317	2.054013	2.054599	2.046055	2.058290
g_{zz}	2.044178	2.039156	2.039156	2.044927	2.044625

for transition metal ions and binds copper(II) and nickel(II) in forms that will not generate reactive species [33]. Cys-34 is the only cysteine with a free sulfhydryl group, which does not participate in a disulfide linkage with any external ligand [34]. Cys-34 is involved in the second copper binding site [35].

The spectra of CuCl_2BSA (a_1) and CuCl_2HSA (a_2) solutions are presented in Fig. 6. These are characteristic of two EPR components with axial symmetry. The two sets of hyperfine lines are labeled 1 and 2 in the $g_{\parallel}$ region. This tells us that at pH 7.4 both sites are occupied even at a 1:1 M ratio, as Patel et al. [36] have already noticed. The $g_{\perp}$ region is a superposition of the lines from both

sites. The $\text{Cu}(\text{HSA})$ and $\text{Cu}(\text{BSA})$ spectra are very similar. The copper(II)-BSA EPR spectrum was simulated [37] and the parameters of the two copper sites appear in Table 6.

Fig. 6 also shows the EPR spectra of complexes (**3**) and (**6**) in the presence of equimolar amounts of BSA (b_1 , c_1) and HSA (b_2 , c_2). The spectra of the complexes show a superposition of two binding sites. The lines labeled 1 have the same positions in all complexes (same EPR parameters), suggesting the same binding environment, i.e., site 1 at the N-terminal. This can be due to the displacement of one or both of the copper(II) ligands by the protein's N-terminal to bind copper(II) at the first site. Displacement of ligands like

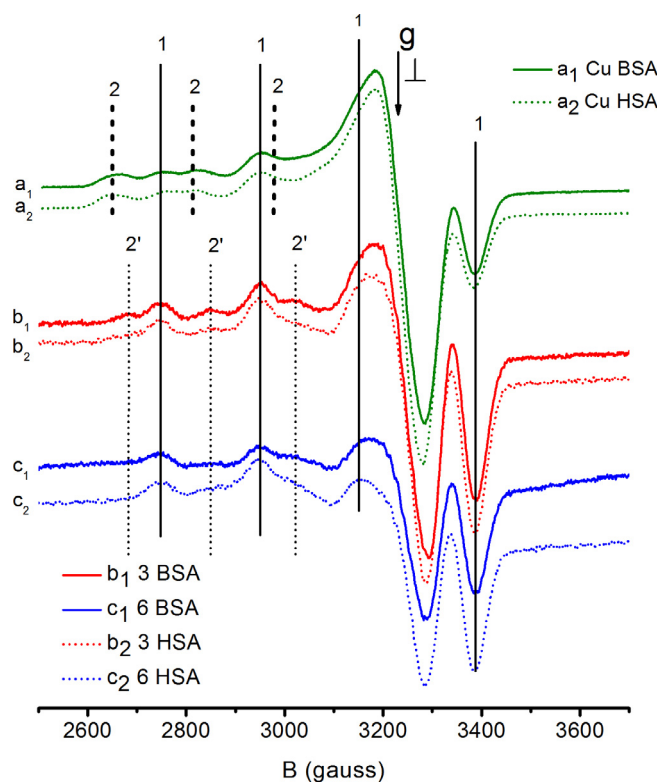


Fig. 6. EPR spectra of copper(II) complexes (3)-BSA(b_1) and (6)-BSA(c_1) and of complexes (3)-HSA(b_2) and (6)-HSA(c_2) in phosphate buffer 20 mM, pH 7.4 at 77 K (concentration of the complexes and albumins, 0.5×10^{-3} M).

Table 6

EPR parameters of copper(II)-BSA and copper(II)-HSA complexes.

Complex	$g_{\parallel}$	$g_{\perp}$	$A_{\parallel}$ (gauss)
Cu(II)-BSA or Cu(II)-HSA site 1*	2.046	2.190	196 G
Cu(II)-BSA or Cu(II)-HSA site 2*	2.070	2.299	157 G
(3)-BSA site 1	2.046	2.190	196 G
(3)-BSA site 2'	2.062	2.276	167 G

* Ref. [37].

bipyridine and phenanthroline in copper(II) complexes by BSA and HSA have already been verified [37]. Since the same EPR parameters were observed for complexes (3) and (6) and for Cu(II)-BSA-site 1 or Cu(II)-HSA-site 1 we may infer that release of the hydrazone ligands might have occurred, with coordination of the metal to the nitrogen atoms of site 1 in the albumins.

The hyperfine lines of the second albumin site for the complexes (labeled 2') are displaced to higher field values ($g_{\parallel}$ shift to lower values) relative to copper(II) (labeled 2) in both albumins. This g shift suggests formation of mixed-ligand complexes between the Schiff base copper(II) complexes and the albumins' site 2. In this case, since the hyperfine lines are displaced in relation to their position in Cu-BSA and Cu-HSA, we may suggest that one hydrazone and/or chloride ligands were released from the complexes, with subsequent coordination of the metal center to the cysteine at site 2, with formation of hydrazone-cysteine mixed-ligand copper(II) complexes. The EPR parameters for both sites (1 and 2') of complex (3)-BSA appear in Table 6.

The EPR spectra in Fig. 6 show that complexes (3) and (6) with albumins (b_1 , b_2 , c_1 , c_2) present increased contribution of site 1 relative to the second site, compared to copper(II) albumin complexes (a_1 and a_2). Hence, interaction of the complexes with albumins probably mainly involve displacement of the hydrazone ligands in (3) and (6) by site 1, but also the formation of mixed-ligand

complexes upon release of one hydrazone and/or the chloride ligands and attachment of the metal to site 2. In contrast, in previously published works [37,38], the interaction of bipyridine, phenanthroline, naringenin and hesperitin copper(II) complexes with BSA and HSA resulted in increased population of site 2' relative to site 1.

Interestingly, as shown by the theoretical calculations, the five isomers of the complexes exist in equilibrium in solution, interconversion being possible. For this to occur, labilization of the ligands followed by re-coordination must take place, in accordance with the EPR data, which suggested release of the hydrazone or chloride ligands with subsequent complexation of the copper(II) center to the albumins.

4. Conclusions

Data obtained by other authors suggest that stilbene binds to amyloid A β plaques through π - π stacking interactions involving electron transfer between stilbene and the phenyl groups in the side chain of the A β -peptide [3,39]. *Trans*-stilbene derivatives have been widely used as probes of amyloid plaques because of their high binding affinity for the amyloid peptide and their lipophilic character, which allows these compounds to cross the blood brain barrier. *Trans*-stilbene derivatives are also amenable for structural modification, including the addition of a chelating function [4] as performed in the present work.

The *trans*-4-stilbenecarboxaldehyde-derived hydrazones (HL) under study are able to chelate copper(II) forming $[\text{Cu}(\text{HL})_2\text{Cl}_2]$ complexes. Since the hydrazones act as N-O bidentate ligands, five different isomers of complexes (1–6) are possible. Thermodynamic analysis of the isomers indicated that all of them are in equilibrium in solution, and due to the small energy differences, interconversion following labilization of the hydrazone and/or chloride ligands should be possible.

EPR studies suggested that complexes (1–6) bind to sites 1 and 2 in BSA and HSA. Therefore, they could be transported by these proteins. The highest-affinity binding site 1 is formed by the α -NH $_2$ N atom, the N atoms of the first two peptide bonds and the N $_3$ atom of His-3. Interestingly, NMR and EPR studies carried out by other authors suggested that copper(II) binds to histidine residues in the A β -peptide [40]. Hence, the ability of the complexes under study to interact with histidine-containing site 1 of the albumins indicates that these compounds might as well be able to interact with the A β -peptide.

In conclusion, the investigated stilbene-derived hydrazones or their analogues might be of interest as copper(II) chelating agents, which form complexes that interact with albumins and possibly with the A β -peptide. Hence, these compounds might have applications as modulators of copper(II) mediated A β -peptide aggregation. Investigations on this subject are underway.

Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq, CAPES PEC-PG. The authors acknowledge the use of the Bruker EPR spectrometer at CBPF and are grateful to Dr. O. C. Alves and E. Wajnberg for the help with the instrument.

Appendix A. Supplementary data

CCDC contains 1540493 and 1540494 the supplementary crystallographic data for HStpT (HL1) and HStpNO $_2$ Ph-DMSO (HL4a), respectively. These data can be obtained free of charge via <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2017.06.008>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223-336-033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2017.06.008>.

References

- [1] M. Gao, M. Wang, K.D. Miller, G.W. Sledge, G.D. Hutchins, Q.H. Zheng, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 5767, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.08.088>.
- [2] F. Orsini, L. Verotta, K. Klimo, C. Gerhäuser, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 49 (2016) 414, <http://dx.doi.org/10.1002/ardp.201600022>.
- [3] S. Lim, B.M. Paterson, M.T. Fodero-Tavoletti, G.J. O'Keefe, R. Cappai, K.J. Barnham, V.L. Villemagne, P.S. Donnelly, *Chem. Commun.* 46 (2010) 5381, <http://dx.doi.org/10.1039/c0cc01175d>.
- [4] C. Rodríguez-Rodríguez, M. Telpoukhovskaia, C. Orvig, *Coord. Chem. Rev.* 256 (2012) 2308, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.008>.
- [5] E. Giacomini, S. Rupiani, L. Guidotti, M. Recanatini, M. Roberti, *Curr. Med. Chem.* 23 (2016) 2439, <http://dx.doi.org/10.2174/092986732366616031612508>.
- [6] M.F.L. Gomes, R.P. Vieira, M.R. Jones, M.C. Wang, C. Dyrager, E.M. Souza-Fagundes, J.G. Da Silva, T. Storr, H. Beraldo, J. Inorg. Biochem. 139 (2014) 106, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.04.011>.
- [7] R. Narang, B. Narasimhan, S.A. Sharma, *Curr. Med. Chem.* 19 (2012) 569, <http://dx.doi.org/10.2174/092986712798918789>.
- [8] A.A. Despaigne, G.L. Parrilha, J.B. Izidoro, P.R. da Costa, R.G. dos Santos, O.E. Piro, E.E. Castellano, W.R. Rocha, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 50 (2012) 163, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.01.051>.
- [9] M.V. Rodić, V.M. Leovac, L.S. Jovanović, V. Spasojević, M.D. Joksović, T. Stanojković, I.Z. Matic, L.S. Vojinović-Ješić, V. Marković, *Eur. J. Med. Chem.* 115 (2016) 75, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.003>.
- [10] 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, <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2012.03.017>.
- [11] A.A. Recio Despaigne, J.G. Da Silva, P.R. da Costa, R.G. dos Santos, H. Beraldo, *Molecules* 19 (2014) 17202, <http://dx.doi.org/10.3390/molecules191117202>.
- [12] CRYALISPRO, CrysAlisPro CCD and CrysAlisPro RED: Version 1.171.35.21 (Release 20–01–2012 CrysAlis171.NET), Oxford Diffraction Ltd., Abingdon, Oxfordshire, England.
- [13] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. A* 64 (2008) 112, <http://dx.doi.org/10.1107/S0108767307043930>.
- [14] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. C: Struct. Chem.* 71 (2015) 3, <http://dx.doi.org/10.1107/S2053229614024218>.
- [15] 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, J. Appl. Crystallogr. 41 (2008) 466, <http://dx.doi.org/10.1107/S0021889807067908>.
- [16] Y. Kim, M. Koh, D.K. Kim, H.S. Choi, S.B. Park, *J. Comb. Chem.* 11 (2009) 928, <http://dx.doi.org/10.1021/cc9000081j>.
- [17] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, *Gaussian 09*, Gaussian Inc., Wallingford CT, 2009.
- [18] A.D. Becke, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648, <http://dx.doi.org/10.1063/1.464913>.
- [19] C.T. Lee, W.T. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B Condens. Matter.* 37 (1988) 785, <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>.
- [20] T.H. Dunning, *J. Chem. Phys.* 90 (1989) 1007, <http://dx.doi.org/10.1063/1.456153>.
- [21] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, *Chem. Rev.* 105 (2005) 2999, <http://dx.doi.org/10.1021/cr9904009>.
- [22] D.A. McQuarrie, J.D. Simon, *Molecular Thermodynamics*, University Science Books, Sausalito CA, 1999.
- [23] J.P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.* 77 (1996) 3865, <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevLett.77.3865>.
- [24] J.P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.* 78 (1997) 1396, <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevLett.78.1396>.
- [25] ADF2010, SCM, Theoretical Chemistry, Vrije Universiteit, Amsterdam. 2010; Available from: <http://www.scm.com>.
- [26] A.D. Becke, *Phys. Rev. A* 38 (1988) 3098, <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevA.38.3098>.
- [27] S.M. Wardell, M.V. de Souza, J.L. Wardell, J.N. Low, C. Glidewell, *Acta Crystallogr. B* 63 (2007) 879, <http://dx.doi.org/10.1107/S0108768107036270>.
- [28] E.D.L. Piló, A.A. Recio-Despaigne, J.G. Da Silva, I.P. Ferreira, J.A. Takahashi, H. Beraldo, *Polyhedron* 97 (2015) 30, <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2015.05.004>.
- [29] D.A. Martins, L.R. Gouvea, J.B.D. Da Gama, P.B. Da Silva, S.R. Louro, C.S.M. de Nazaré, L.R. Teixeira, *Biomaterials* 25 (2012) 951, <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-012-9565-3>.
- [30] G. Rakhit, W.E. Antholine, W. Francis, J.S. Hyde, J.R. Pilbrow, G.R. Sinclair, B. Sarker, *J. Inorg. Biochem.* 25 (1985) 217, [http://dx.doi.org/10.1016/0162-0134\(85\)80015-5](http://dx.doi.org/10.1016/0162-0134(85)80015-5).
- [31] P.J. Sadler, A. Tucker, J.H. Viles, *Eur. J. Biochem.* 220 (1994) 193, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18614.x>.
- [32] A. Zgirski, E. Frieden, *J. Inorg. Biochem.* 39 (1990) 137, [http://dx.doi.org/10.1016/0162-0134\(90\)80022-P](http://dx.doi.org/10.1016/0162-0134(90)80022-P).
- [33] M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M. Galliano, G. Fanali, P. Narciso, S. Notari, P. Ascenzi, *IUBMB Life* 57 (2005) 787, <http://dx.doi.org/10.1080/15216540500404093>.
- [34] S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi, *Protein Eng.* 12 (1999) 439, <http://dx.doi.org/10.1093/protein/12.6.439>.
- [35] Y. Zang, D.E. Wilcox, *J. Biol. Inorg. Chem.* 7 (2002) 327, <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-001-0302-6>.
- [36] R.N. Patel, K.B. Pandeya, *Indian J. Biochem. Biophys.* 37 (2000) 251.
- [37] D.A. Martins, L.R. Gouvea, G.S. Muniz, S.R. Louro, D. da G. Batista, M. de N. Soeiro, L.R. Teixeira, *Bioinorg. Chem. Appl.* 2016 (2016) 5027404, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5027404>.
- [38] L.V. Tamayo, L.R. Gouvea, A.C. Sousa, R.M. Albuquerque, S.F. Teixeira, R.A. de Azevedo, S.R. Louro, A.K. Ferreira, H. Beraldo, *Biomaterials* 29 (2016) 39, <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-015-9894-0>.
- [39] X. Chen, *THEOCHEM* 763 (2006) 83, <http://dx.doi.org/10.1016/j.theochem.2006.01.028>.
- [40] C.D. Syme, R.C. Nadal, S.E.J. Rigby, J.H. Viles, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 18169.