

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

Ane Francielly da Silva Santos

**NOVOS COMPLEXOS DE PRATA(I) COM HIDRAZONAS: ATIVIDADES
CITOTÓXICA E ANTIMICROBIANA E ESTUDO DE INTERAÇÕES COM
ALVOS BIOLÓGICOS**

Belo Horizonte
2018

UFMG / ICex / DQ. 1260^a

T. 569^a

Ane Francielly da Silva Santos

**NOVOS COMPLEXOS DE PRATA(I) COM HIDRAZONAS: ATIVIDADES
CITOTÓXICA E ANTIMICROBIANA E ESTUDO DE INTERAÇÕES COM
ALVOS BIOLÓGICOS**

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

Belo Horizonte

2018

S237n
2018
T

Santos, Ane Francielly da Silva

Novos complexos de prata(I) com hidrazonas
[manuscrito] : atividades citotóxica e antimicrobiana
e estudo de interações com alvos biológicos / Ane
Francielly da Silva Santos. 2018.
[xvi], 133 + [29] f.: il.

Orientadora: Heloisa de Oliveira Beraldo.

Coorientadora: Letícia Regina de Souza Teixeira.

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

Inclui bibliografia e anexos.

1. Química inorgânica - Teses 2. Química
bioinorgânica - Teses 3. Schiff, Bases de - Teses 4.
Complexos metálicos - Teses 5. Prata - Teses 6.
Atividade antifúngica - Teses 7. Agentes
antineoplásicos - Teses I. Beraldo, Heloisa de
Oliveira, Orientadora II. Teixeira, Letícia Regina de
Souza, Coorientadora III. Título.

CDU 043



"Novos Complexos de Prata(I) com Hidrazonas: Atividades Citotóxica e Antimicrobiana e Estudo de Interações com Alvos Biológicos"

Ane Francielly da Silva Santos

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Heloisa de Oliveira Beraldo

Profa. Heloisa de Oliveira Beraldo - Orientadora
UFMG

Letícia R. S. Teixeira

Profa. Letícia Regina de Souza Teixeira - Coorientadora
UFMG

Sônia Louro

Profa. Sônia Renaux Wanderley Louro
PUC-RIO

Júlio Santos Rebouças
Prof. Júlio Santos Rebouças
UFPB

Renata Diniz
Profa. Renata Diniz
UFMG

Heveline Silva
Profa. Heveline Silva
UFMG

Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2018.

O trabalho descrito nesta tese foi realizado sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Heloisa de Oliveira Beraldo e co-orientação da Prof^ª. Dr^ª. Letícia Regina de Souza Teixeira

"Encare o desafio de conhecer a si mesmo, de viver seu dom, de superar os obstáculos e de ser reconhecido por isso. Rejeite os sonhos de segunda mão e faça questão de buscar aqueles que dão sentido à sua existência. Você merece ter uma vida apaixonante!"

Trecho retirado do livro "O que falta para você ser feliz?" de Dominique Magalhães.

Agradecimentos

À DEUS que me deu força, sabedoria e acalentou meu coração nos momentos difíceis.

À Profa. Heloisa pela confiança, orientação, dedicação e oportunidade de realizar meu doutorado em seu grupo de pesquisa.

À Profa. Letícia Regina de Souza Teixeira pelos ensinamentos e disposição em ajudar durante a realização desse trabalho.

À Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

Aos pesquisadores Dr. William Rocha, Dr. Carlos B. Pinheiro, Dra. Miriam T. P. Lopes, Dra. Elaine M. S. Fagundes, Dra. Jacqueline A. Takahashi e aos alunos de doutorado Gabriel L. S. Rodrigues e Verlane G. Santos pela colaboração na realização deste trabalho.

Às secretárias da Pós-graduação, Alessandra e Lilian, e aos técnicos de laboratório pela disposição e suporte durante todo o doutorado.

Aos colegas de laboratório Angel, Andrea, Elisa, Gabrieli, Luciana, Lucas, Micael, Alexandre e Camila pelas trocas de ideias, amizade e ajuda. Em especial Ana, Cleidi, Isabella e Lenka por toda demonstração de carinho e vibração com as minhas conquistas.

Às queridas alunas de iniciação científica, Fabiana e Maria Clara, que colaboraram com competência e entusiasmo para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas e professores do Departamento de Química pela amizade e boa convivência ao longo dos anos.

Aos grandes amigos Gilvan, Mariana, Wil, Gabriel, Geisiane, Eduardo, Milena, Jesus, Isabel, Fabrício, Plínio e Bárbara por sempre estarem presentes na minha vida. Obrigada pelos momentos de descontração e alegrias.

Às amigas de república e da vida Ana, Samara e Angélica pelo companheirismo, carinho e longas conversas durante esses anos. Obrigada pelos bons momentos que passamos juntas.

Aos meus amados pais, Cleonice e Edimilson, por todo o apoio, amor, segurança, educação e por nunca medirem esforços para que este sonho se tornasse realidade.

Ao meu irmão Lailson Henrique e minha avó Maria “Nega” pelo amor, incentivo e apoio nas minhas decisões.

Aos meus sogros, Regina e Gilberto, e meus cunhados, Igor e Carol, pelas palavras de incentivo e carinho.

Ao meu amado Douglas Lindemann por todo amor, paciência, compreensão e encorajamento. Sem você seria muito difícil chegar até aqui. Obrigada por tudo vida!

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram nessa etapa de minha vida. Meu sincero Obrigada!

Resumo

Novos complexos de prata(I) com hidrazonas: atividades citotóxica e antimicrobiana e estudo de interações com alvos biológicos

Complexos de prata(I) com hidrazonas têm sido pouco relatados na literatura quanto às suas aplicações terapêuticas. Sendo assim, o presente trabalho consistiu na obtenção de complexos de prata(I) com hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina, 2-benzoilpiridina e 2,6-diacetilpiridina tendo em vista o desenvolvimento de novos candidatos a metalofármacos antifúngicos e antitumorais.

Os complexos $[Ag(H2AcPh)NO_3]$ (**1**), $[Ag(H2AcpCH_3Ph)NO_3]$ (**2**), $[Ag(H2AcpClPh)NO_3]$ (**3**) e $[Ag(H2AcpNO_2Ph)NO_3]$ (**4**) foram obtidos com 2-acetilpiridina benzoil-hidrazona (H2AcPh) e seus derivados *para*-metil- (H2AcpCH₃Ph), *para*-cloro- (H2AcpClPh) e *para*-nitro-benzoil-hidrazona (H2AcpNO₂Ph). Os complexos $[Ag(H2BzPh)NO_3]$ (**5**), $[Ag(H2BzpCH_3Ph)NO_3]$ (**6**), $[Ag(H2BzpClPh)NO_3]$ (**7**) e $[Ag(H2AcpNO_2Ph)NO_3]$ (**8**) foram obtidos com ligantes análogos derivados de 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazona.

Os complexos (**1-4**) apresentaram atividade antifúngica frente as espécies de *Candida* e fungos filamentosos, sendo que (**2**) revelou-se mais ativo do que a nistatina contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus* e *Penicillium citrinum* enquanto (**4**) apresentou efeitos antifúngicos similares à nistatina contra *Penicillium citrinum*. Estudos SAR sugeriram que, em geral, as atividades antifúngicas contra as cepas de *Candida* se correlacionam bem com a energia do orbital HOMO, indicando que um ataque eletrofílico externo a esses compostos ou uma doação de elétrons desses compostos ao receptor pode estar envolvido em seus mecanismos de ação. Por outro lado, para as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, as atividades antifúngicas dos compostos em estudo correlacionam-se bem com o logP. Portanto, sua capacidade de atravessar as membranas biológicas pode ser responsável por seu modo de ação.

Os efeitos citotóxicos dos complexos (**1-4**) foram avaliados contra células tumorais de melanoma (B16F10) e células sadias de melanócitos (Melan-A). Em alguns casos, após a coordenação com a prata (I), a atividade citotóxica e os índices de seletividade aumentaram significativamente. Os complexos (**1-3**) revelaram ser mais ativos que a cisplatina contra células B16F10. Além disso, o complexo (**2**) apresentou maior seletividade para células tumorais de melanoma (B16F10) em relação a células sadias de melanócitos (Melan-A).

As estruturas cristalinas dos complexos (**5-7**) revelaram que as distâncias de ligações Ag-O₁(hidrazona) e Ag-O₃(NO₃⁻) são longas, indicando uma fraca interação desses oxigênios com o centro metálico. Cálculos teóricos mostraram resultados de acordo com os dados cristalográficos. Adicionalmente, os cálculos teóricos demonstraram que as distâncias de ligação Ag-hidrazona aumentam com a aproximação do grupo nitrato ao centro metálico, sugerindo um enfraquecimento da ligação Ag-hidrazona, e que as ligações em torno da prata provavelmente têm alto caráter eletrostático.

A coordenação das hidrazonas a prata(I) resultou em uma excelente estratégia para o aumento da atividade antifúngica. O melhor resultado foi obtido para o complexo (7) que apresentou ação similar a nistatina contra *Candida glabrata* e foi cerca de duas vezes mais ativo que a nistatina contra *Penicillium citrinum*.

Os complexos (5-7) foram mais citotóxicos que a cisplatina contra células B16F10 e foram mais citotóxicos para as células B16F10 do que para as células não tumorais Melan-A. O índice de seletividade do complexo (5) (IS = 23) foi bem superior ao do ligante H2BzPh (IS = 9,5), indicando que a complexação foi capaz de melhorar a seletividade.

Uma outra série de complexos de prata(I), [Ag(H2-2,6AcPh)]NO₃ (9), [Ag(H2-2,6AcpCH₃Ph)]NO₃ (10), [Ag(H2-2,6AcpClPh)]NO₃·2H₂O (11) e [Ag(H2-2,6AcpNO₂Ph)]NO₃ (12) também foi obtida com 2,6-diacetilpiridina *bis*(benzoil-hidrazona) (H2-2,6AcPh) e seus derivados *bis*(*para*-metil-benzoil-hidrazona) (H2-2,6AcpCH₃Ph), *bis*(*para*-cloro-benzoil-hidrazona) (H2-2,6AcpClPh) e *bis*(*para*-nitro-benzoil-hidrazona) (H2-2,6AcpNO₂Ph). Esses compostos foram planejados para apresentarem características estruturais que favorecem sua ação como prováveis metalintercaladores no DNA.

Em alguns casos, a atividade antifúngica aumentou após a coordenação com a prata(I). O complexo (10) provou ser tão ativo quanto o nitrato de miconazol contra *Candida albicans* enquanto que (9) foi mais ativo do que a nistatina contra *Penicillium citrinum*. Além disso, ambos os complexos provaram ser tão eficazes quanto a nistatina contra *Aspergillus parasiticus*. O complexo (10) também apresentou uma seletividade apreciável frente às espécies de *Candida albicans* em comparação aos demais fungos.

Os complexos (1-7) e (9-12) interagem com albumina sérica humana (HSA) por um mecanismo de supressão estático. Os parâmetros termodinâmicos indicaram que as interações ocorrem predominantemente *via* ligações de hidrogênio e/ou forças de van der Waals. Sendo assim, esses compostos poderiam ser transportados na corrente sanguínea até o alvo biológico de interesse. Os compostos interagiram com o DNA provavelmente por um mecanismo de intercalação e não por meio de ligações covalentes. As constantes de ligação dos complexos (9-12) são mais altas em relação aos demais complexos, sendo semelhantes ao agente antitumoral intercalador actinomicina D.

A estratégia de coordenação da prata(I) a ligantes bioativos como as hidrazonas se mostrou promissora para o desenvolvimento de novos candidatos a metalofármacos antifúngicos e antitumorais. Desse modo, o presente trabalho representa uma importante contribuição à Química Medicinal Inorgânica.

Palavras-chave: hidrazonas, complexos de prata(I), ação farmacológica, interação com biomoléculas.

Abstract

New silver(I) complexes with hydrazones: citotoxic and antimicrobial activities and study of interactions with biological targets.

The therapeutic potential of silver(I) complexes with hydrazones has not been fully investigated. Hence, in the present work, silver(I) complexes were obtained with 2-acetylpyridine-, 2-benzoylpyridine and 2,6-diacetylpyridine-derived hydrazones aiming to develop new antifungal and antitumor silver-based drug candidates.

Complexes [Ag(H₂AcPh)NO₃] (**1**), [Ag(H₂AcpCH₃Ph)NO₃] (**2**), [Ag(H₂AcpClPh)NO₃] (**3**) and [Ag(H₂AcpNO₂Ph)NO₃] (**4**) were obtained with 2-acetylpyridine benzoylhydrazone (H₂AcPh) and its *para*-methyl- (H₂AcpCH₃Ph), *para*-chloro- (H₂AcpClPh) e *para*-nitro (H₂AcpNO₂Ph) benzoylhydrazone derivatives. Complexes [Ag(H₂BzPh)NO₃] (**5**), [Ag(H₂BzpCH₃Ph)NO₃] (**6**), [Ag(H₂BzpClPh)NO₃] (**7**) and [Ag(H₂AcpNO₂Ph)NO₃] (**8**) were obtained as well with the 2-benzoylpyridine benzoylhydrazone analogues.

Complexes (**1-4**) showed antifungal activity against *Candida* and filamentous fungal strains. Complex (**2**) revealed to be more active than nystatin against *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium citrinum* while (**4**) was as active as nystatin against *P. citrinum*. SAR studies suggested that in general the antifungal effects against *Candida* strains exhibited good correlation with the HOMO energy, indicating that an external electrophilic attack to these compounds or a donation of electronic density from these compounds to the receptor might be involved in their mode of action. On the other hand, for *Aspergillus* and *Penicillium* strains the activities correlate well with logP, suggesting that the ability of the compounds to cross the cell membrane might be responsible for their antimicrobial activity.

The cytotoxic effects of the complexes (**1-4**) were evaluated against B16F10 melanoma cells and against Melan-A non-malignant melanocyte cells. In some cases upon coordination to silver(I) the cytotoxic activity and the selectivity indexes significantly increased. Complexes (**1-3**) revealed to be more cytotoxic than cisplatin on B16F10 cells. In addition, (**2**) showed higher selectivity against B16F10 melanoma than against Melan-A non-malignant melanocyte cells.

The crystal structures of complexes (**5-7**) show long Ag-O₁(hydrazone) and Ag-O₃(NO₃⁻) bond distances, suggesting a weak interaction of these oxygen atoms with the silver(I) center. Theoretical calculations were in agreement with the crystallographic data. In addition, theoretical calculations revealed that the Ag-hydrazone bond distances increase with the decrease of the nitrate-silver(I) distances, indicating a weakening of the Ag-hydrazone bonds. The theoretical study also demonstrated the predominantly electrostatic nature of the chemical bonds around the silver(I) center.

Coordination to silver(I) in complexes (**5-7**) proved to be a good strategy for antifungal activity improvement, the best results being obtained for complex (**7**), which was as active as nystatin against *Candida glabrata* and 2-fold more active than nystatin against *Penicillium citrinum*.

Complexes (**5-7**) revealed to be more cytotoxic than cisplatin on B16F10 melanoma cells and to be more cytotoxic against melanoma than against Melan-A non-malignant melanocyte cells. Complex (**5**) showed higher selectivity index (SI = 23) than the parent hydrazone H2BzPh (SI = 9.5), suggesting that complexation to silver(I) was a good strategy for increasing selectivity.

A second family of silver(I) complexes, [Ag(H2-2,6AcPh)]NO₃ (**9**), [Ag(H2-2,6AcpCH₃Ph)]NO₃ (**10**), [Ag(H2-2,6AcpClPh)]NO₃·2H₂O (**11**) and [Ag(H2-2,6AcpNO₂Ph)]NO₃ (**12**) were obtained with 2,6-diacetylpyridine *bis*(benzoylhydrazone) (H2-2,6AcPh) and its *bis*(*para*-methyl-benzoylhydrazone) (H2-2,6AcpCH₃Ph), *bis*(*para*-chloro-benzoylhydrazone) (H2-2,6AcpClPh) and *bis*(*para*-nitro-benzoylhydrazone) (H2-2,6AcpNO₂Ph) derivatives. These compounds were designed to show structural characteristics suitable for their interaction with DNA by an intercalative mode.

In some cases the antifungal activity increased upon coordination to silver(I) in complexes (**9-12**). Complex (**10**) was as active as miconazole nitrate against *Candida albicans* while (**9**) was more active than nystatin against *Penicillium citrinum*. In addition, both complexes were as potent as nystatin against *Aspergillus parasiticus*. Complex (**10**) showed selectivity for *Candida albicans*.

Complexes (**1-7**) and (**9-12**) interact with human serum albumin (HSA) by a static suppression mechanism. The thermodynamic parameters indicated that the interactions occur mainly *via* hydrogen bonding and/or van der Waals forces. Hence these complexes might be transported by HSA in the blood stream. The complexes also interact with DNA by an intercalative mode but covalent binding of silver(I) to DNA most probably does not occur. The binding constants for complexes (**9-12**) are higher than those of the remaining complexes, in according to their planar structures.

Coordination of the hydrazones under study to silver(I) proved to be an interesting strategy for the development of new antimicrobial and anticancer metallodrugs candidates. The present work constitutes an important contribution to Medicinal Inorganic Chemistry.

Keywords: hydrazones, silver(I) complexes, pharmacological activity, interaction with biomolecules.

Sumário

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1. Doenças infecciosas causadas por fungos	1
1.1.1. Agentes antifúngicos e mecanismos de ação.....	2
1.2. Doenças neoplásicas e a quimioterapia	3
1.2.1. Agentes antineoplásicos e mecanismos de ação.....	4
1.3. Contribuições da Química Medicinal Inorgânica para terapia de doenças	6
1.3.1. Complexos metálicos com hidrazonas.....	8
1.4. O uso terapêutico de compostos de prata	10
1.5. Principais alvos biológicos de metalofármacos	13
1.5.1. Albumina sérica humana (HSA).....	14
1.5.2. Ácido desoxirribonucleico (DNA).....	15
1.6. Objetivos do presente trabalho	17
Capítulo 2 – Parte experimental	19
2.1. Reagentes e Solventes	19
2.2. Técnicas experimentais de caracterização	19
2.2.1. Temperaturas de Fusão.....	19
2.2.2. Análise elementar (CHN).....	19
2.2.3. Análise termogravimétrica (TG).....	19
2.2.4. Análises condutimétricas.....	19
2.2.5. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	20
2.2.6. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	20
2.2.7. Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS).....	20
2.2.8. Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).....	21
2.2.9. Espectroscopia de fluorescência.....	21
2.2.10. Cristalografia por difração de raios-X.....	21
2.3. Síntese dos ligantes e complexos de prata(I)	22
2.3.1. Síntese de 2-acetil- e 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas.....	22
2.3.2. Síntese de 2,6-diacetilpiridina bis(benzoil-hidrazonas).....	23
2.3.3. Síntese dos complexos de prata(I) com 2-acetil- e 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas.....	24

2.3.4. Síntese dos complexos de prata(I) com bis(benzoil-hidrazonas) derivadas de 2,6-diacetilpiridina.....	25
2.4. Ensaios Biológicos.....	25
2.4.1. Atividade Antifúngica.....	25
2.4.1.1. Equipamentos Utilizados.....	26
2.4.1.2. Condições de Cultivo dos fungos.....	26
2.4.1.3. Triagem microbiológica.....	27
2.4.1.4. Avaliação da atividade antifúngica in vitro pelo método de microdiluição...	27
2.4.2. Atividade citotóxica contra células de melanoma e melanócitos murino.....	28
2.4.2.1. Linhagens de células e condições de cultura.....	29
2.4.2.2. Avaliação da atividade citotóxica.....	29
2.4.2.3. Ensaio da viabilidade e proliferação celular in vitro (método de MTT).....	30
2.4.2.4. Índices de seletividade (IS).....	31
2.5. Estudos da interação com biomoléculas.....	31
2.5.1. Interação com albumina sérica humana (HSA).....	31
2.5.2. Interação com ácido desoxirribonucleico (DNA).....	33
2.5.2.1. Espectroscopia de absorção eletrônica (UV-vis).....	34
2.5.2.2. Espectroscopia de fluorescência.....	34
2.5.2.3. Eletroforese em gel de agarose.....	35
2.6. Estudos teóricos dos compostos.....	36
2.6.1. Estudo teórico das ligações envolvidas na esfera de coordenação da prata.....	36
2.6.2. Estudo de relações estrutura-atividade (SAR).....	38
Capítulo 3 – Complexos de prata(I) com 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas: investigação do perfil farmacológico, mecanismos de ação e estudos SAR.....	39
3.1. Caracterização dos compostos.....	40
3.1.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	40
3.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	42
3.1.3. Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray.....	49
3.1.4. Cristalografia por difração de raios X.....	51
3.2. Avaliação da atividade antifúngica.....	55
3.3. Estudo de relações estrutura-atividade (SAR).....	57
3.4. Avaliação da atividade citotóxica contra células de melanoma e melanócitos murino.....	60

3.5. Avaliação da interação dos complexos de prata(I) com biomoléculas.....	62
3.5.1. Interação com albumina sérica humana (HSA).....	62
3.5.2. Interação com ácido desoxirribonucleico (calf thymus DNA, CT-DNA).....	66
3.5.3. Interação com DNA plasmidial.....	68

Capítulo 4 – Complexos de prata(I) com 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas: estudos teóricos, ação antifúngica, citotóxica e interação com biomoléculas 69

4.1. Caracterização dos compostos.....	70
4.1.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	71
4.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	72
4.1.3. Cristalografia por difração de raios X.....	76
4.2. Estudo teórico das ligações envolvidas na esfera de coordenação da prata.....	80
4.3. Avaliação da atividade antifúngica.....	87
4.4. Avaliação da atividade citotóxica contra células de melanoma e melanócitos murino.....	88
4.5. Avaliação da interação dos complexos de prata(I) com biomoléculas.....	89
4.5.1. Interação com albumina sérica humana (HSA).....	89
4.5.2. Interação com ácido desoxirribonucleico (calf thymus DNA, CT-DNA).....	92
4.5.3. Interação com DNA plasmidial.....	94

Capítulo 5 - Complexos de prata(I) com 2,6-diacetilpiridina bis(benzoil-hidrazonas): avaliação da atividade antifúngica e interação com DNA..... 95

5.1. Caracterização dos compostos.....	95
5.1.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	96
5.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	98
5.1.3. Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (ESI-MS).....	102
5.1.4. Cristalografia por difração de raios X.....	103
5.2. Avaliação da atividade antifúngica.....	106
5.3. Avaliação da interação dos complexos de prata(I) com biomoléculas.....	107
5.3.1. Interação com albumina sérica humana (HSA).....	107
5.3.2. Interação com ácido desoxirribonucleico (calf thymus DNA, CT-DNA).....	111

Capítulo 6 – Discussão e Conclusões..... 114

Anexos..... 118

Artigos publicados no doutorado 133

Lista de abreviaturas e símbolos

\uparrow	Símbolo convenção no DEPT 135 para CH e CH ₃
¹ H	Isótopo do hidrogênio com 1 unidade de massa atômica
¹³ C	Isótopo do carbono com 13 unidades de massa atômica
ϵ	Absortividade molar
λ	Comprimento de onda
δ	Deslocamento químico
ρ	Deformação angular no plano
ν	Estiramento axial de ligação
τ_0	Tempo de vida da fluorescência na ausência do agente supressor
μ	Momento dipolo
Λ_M	Condutividades molares
$\rho(r)$	Densidade eletrônica,
$\nabla^2\rho(r)$	Laplaciano da densidade eletrônica,
$G(r)$	Densidade de energia cinética eletrônica
$V(r)$	Densidade de energia potencial
$H(r)$	Densidade de energia
$\epsilon(r)$	Elipsidade de ligação
$\eta(r)$	Índice eta,
ΔH°	Entalpia padrão
ΔS°	Entropia padrão
ΔG	Energia livre de Gibbs
A.S	Área superficial
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BE	Brometo de etídio
B16F10	Melanoma murino metastático
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BCPs	Pontos críticos da densidade eletrônica
CBS	<i>College of Biological Sciences</i>
CI50	Concentração que inibe 50 % da viabilidade celular
COSX	<i>Chain of Spheres</i>
COSY	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
CT-DNA	<i>calf thymus DNA</i>
CCT	<i>Coleção de Culturas Tropical</i>
d	Dupleto

dd	Dupleto duplo
dt	Dupleto triplo
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimetilformamida
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i>
F e F ₀	Intensidades de fluorescência na presença e ausência do agente supressor
HCT-116	Carcinoma colorretal
HL-60	Leucemia mielóide aguda
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
HSA	<i>Human serum albumin</i>
IV	Infravermelho
<i>J</i> (Hz)	Constante de acoplamento (hertz)
Jurkat	Leucemia linfócitos T
logP	Coefficiente de partição octanol-água
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
<i>K_b</i>	Constante de ligação proteína-agente supressor
<i>K_{sv}</i>	Constante de associação agente supressor/fluoróforo
<i>K_q</i>	Constante de supressão dinâmica ou bimolecular
m	Multiplete
MCF-7	Carcinoma mamário
MDA-MB-231	Carcinoma mamário
Melan-A	Melanócitos murino não-tumorigênicos
MHz	Megahertz
MP2	Teoria de Perturbação de Segunda Ordem
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
MM	Massa molar
m/z	Massa / carga
<i>n</i>	Número de sítios de ligação

NRRL	<i>ARS Culture Collection</i>
PCM	Modelo do Contínuo Polarizável
PES	Superfície de Energia Potencial
PDA	<i>Potato dextrose agar</i>
pUC19	Série de plasmídeos
[Q]	Concentração do agente supressor da fluorescência
QTAIM	<i>Quantum Theory of Atoms in Molecules</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roosevelt Park Memorial Institute</i>
s	Simpleto
SAR	<i>Structure-Activity Relationships</i>
SBD	Sabouraud
t	Tripleto
TBE	Tris-borato-EDTA
TG	Análise termogravimétrica
THP-1	Leucemia monocítica
TMS	Tetrametilsilano
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Trp-214	Triptofano 214
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV-Vis	Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta e Visível
Vero	Rim de macaco verde

Lista de Figuras

Figura 1.1 – Alguns dos agentes antifúngicos disponíveis para a farmacoterapia das micoses...	2
Figura 1.2 – Agentes antineoplásicos cujo mecanismo de ação envolve a interação com DNA..	5
Figura 1.3 – Alguns dos metalofármacos em uso clínico na terapia e diagnóstico de doenças....	7
Figura 1.4 – A) Estrutura genérica das hidrazonas; B) 4-(trifluorometil) benzo-hidrazida hidrazona C) 2-benzoilpiridina- <i>para</i> -cloro-fenilhidrazonato(dicloro)antimônio(III); D) Complexos de Ga(III) com 2-acetil- e 2-benzoilpiridina hidrazonas; E) (2-Acetilpiridina- <i>para</i> -nitro-fenil-hidrazona)cloro(tricarbonil)rênio(I).....	10
Figura 1.5 – A) Sulfadiazina de prata(I); B) Complexo de Ag(I) com <i>bis</i> (carbeno N-heterocíclico) [Ag(NHC)2AgBr2]; C) Complexo de Ag(I) com <i>bis</i> (difenilfosfino) alcanos [Ag2(barb)2(mdppe)(DMSO)2]; D) Complexo de Ag(I) com ftalazina {[Ag(qz-N)][BF4]}n; E) Complexos de Ag(I) com quinazolina {[Ag(R-O)(phtz-N)](μ-phtz-N,N')2}.....	13
Figura 1.6 – Estrutura cristalina da HSA (PDB ID: 1E78) mostrando as posições do sítio I (subdomínio IIA) e sítio II (subdomínio IIIA). A ilustração foi gerada usando PyMOL.....	15
Figura 1.7 – Interação entre o fármaco Actinomicina D e o DNA mostrando os mecanismos de intercalação e ligação no sulco menor (PDB ID: 1FJA). A ilustração foi gerada usando PyMOL.....	17
Figura 2.1 – Esquema de síntese de 2-acetil- e/ou 2-benzoilpiridina hidrazonas.....	23
Figura 2.2 – Esquema de síntese de 2,6-diacetilpiridina <i>bis</i> (benzoil-hidrazonas).....	23
Figura 2.3 – Esquema de síntese dos complexos de prata(I) com 2-acetil- e/ou 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas.....	24
Figura 2.4 – Esquema de síntese dos complexos de prata(I) com 2,6-diacetilpiridina <i>bis</i> (benzoil-hidrazonas).....	25
Figura 2.5 – Representação da microplaca utilizada no teste de atividade antifúngica para a determinação do CI ₅₀ dos compostos (250 a 0,12 μg mL ⁻¹).....	28
Figura 2.6 – Representação da microplaca utilizada no teste de atividade citotóxica para a determinação do CI ₅₀ dos compostos (100 a 0,1 μM).....	30
Figura 3.1 – Resumo gráfico dos principais resultados apresentados no capítulo 3.....	39
Figura 3.2 – Estrutura geral para os complexos de prata(I) com 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas.....	40
Figura 3.3 – Espectros de absorção na região do infravermelho de H2Ac _p CH ₃ Ph e do complexo [Ag(H2Ac _p CH ₃ Ph)NO ₃] (2), obtidos em pastilhas de KBr (4000-400 cm ⁻¹).....	42
Figura 3.4 – Isômeros conformacionais <i>E</i> e <i>Z</i> das 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas. R = H (H2AcPh) e R = <i>p</i> -Cl (H2Ac _p ClPh).....	43
Figura 3.5 – Espectros de RMN de ¹ H de H2Ac _p CH ₃ Ph e do complexo [Ag(H2Ac _p CH ₃ Ph)NO ₃] (2) registrados em DMSO- <i>d</i> ₆ à temperatura ambiente.....	44
Figura 3.6 – Expansão do mapa de contornos COSY (¹ H- ¹ H) do complexo [Ag(H2Ac _p CH ₃ Ph)NO ₃] (2) registrado em DMSO- <i>d</i> ₆ à temperatura ambiente.....	44

Figura 3.7 – Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de $\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph}$ e do complexo $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (2) registrados em $\text{DMSO-}d_6$ à temperatura ambiente.....	46
Figura 3.8 – Expansão do mapa de contornos HMQC do complexo $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (2) registrados em $\text{DMSO-}d_6$ à temperatura ambiente.....	47
Figura 3.9 – Expansão do mapa de contornos HMBC do complexo $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (2) registrados em $\text{DMSO-}d_6$ à temperatura ambiente.....	47
Figura 3.10 – A) Espectros de massas (ESI, modo +) de $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (2) registrados na faixa de 100 a 800 m/z. Comparação entre o padrão isotópico experimental e teórico das espécies catiônicas B) $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})]^+$ e C) $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})_2]^+$	50
Figura 3.11 – Projeção ORTEP dos complexos $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPh})\text{NO}_3]$ (1), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})_2]\text{NO}_3$ (2a), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpClPh})_2]\text{NO}_3$ (3a) e $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpNO}_2\text{Ph})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (4a) com elipsoides em nível de probabilidade de 50%.....	51
Figura 3.12 – Representação dos orbitais HOMO para os complexos de prata(I) (1-4).....	60
Figura 3.13 – Atividade citotóxica das 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas, complexos (1-3), AgNO_3 e cisplatina contra as linhagens celulares A) B16F10 (melanoma murino metastático) e B) Melan-A (melanócitos murino não-tumorigênicos). As células foram tratadas com concentrações dos compostos de 0,1-100 μM por 72 h e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico do MTT. Os valores são expressos como a média \pm desvio padrão ($n = 6$) de percentagem de viabilidade celular em comparação com o controle (RPMI 1640 com 10% de FBS e DMSO 1%). *Os valores de desvio padrão (DP) foram menores do que 0,02.....	61
Figura 3.14 – A) Espectros de fluorescência de HSA (1,84 μM , $\lambda_{\text{em}} = 342 \text{ nm}$) na ausência (linha preta) e presença (linhas coloridas) de quantidades crescentes de $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (2) a 298 K. As setas indicam as mudanças ocorridas nos espectros após cada adição do complexo (2). B) Gráficos de Stern-Volmer para a interação entre HSA e o complexo (2) em diferentes temperaturas. C) Gráficos de $\log[(F_0 - F)/F]$ versus $\log[\text{Complexo}]$ para determinação da constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n) em diferentes temperaturas.....	63
Figura 3.15 – Diagramas de Van' Hoff ($\ln K$ versus $1/T$) da interação complexo-HSA.....	65
Figura 3.16 – A) Espectro de absorção na região do UV-Vis de $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (2) na ausência (linha preta) e na presença (linhas coloridas) de quantidades crescentes de CT-DNA. A seta indica as mudanças ocorridas nos espectros após cada adição de CT-DNA (efeito hipocrômico). B) Gráficos de Scatchard de $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$ para a interação entre os complexos (1-4) e DNA. ($[\text{DNA}] = 0 - 30 \mu\text{M}$, $[\text{Complexos}] = 30 \mu\text{M}$ à 25 °C em tampão Tris-HCl, pH 7,2).....	66

Figura 3.17 – A) Espectros de supressão da fluorescência do sistema BE-DNA na ausência (linha preta) e presença (linhas coloridas) de quantidades crescentes de [Ag(H2AcpCH3Ph)NO ₃] (2). A seta indica as mudanças ocorridas nos espectros após cada adição do complexo (2). B) Gráficos de Stern-Volmer de F ₀ /F versus [complexos] para (1-4). (λ _{exc} = 545 nm; [Complexos] = 0 - 100 μM; [DNA] = 10 μM e [BE] = 10 μM).....	68
Figura 3.18 – Eletroforese em gel de agarose do DNA plasmidial pUC19 de <i>E. coli</i> (150 ng μL ⁻¹) incubado com H2AcPh (HL1), H2AcpCH3Ph (HL2), H2AcpClPh (HL3), H2AcpNO2Ph (HL4), [Ag(H2AcPh)NO ₃] (1), [Ag(H2AcpCH3Ph)NO ₃] (2), [Ag(H2AcpClPh)NO ₃] (3), [Ag(H2AcpNO2Ph)NO ₃] (4), AgNO ₃ e cisplatina (100 μM) por 24 h à 37 °C. *Formas do DNA plasmidial: I (superenovelada), II (circular relaxada) e III (linear).....	68
Figura 4.1 – Resumo gráfico dos principais resultados apresentados no capítulo 4.....	69
Figura 4.2 – Estrutura geral para os complexos de prata(I) com 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas.....	70
Figura 4.3 – Espectros de absorção na região do infravermelho de H2BzPh e do complexo [Ag(H2BzPh)NO ₃] (5), obtidos em pastilhas de KBr (4000-400 cm ⁻¹).....	72
Figura 4.4 – Espectros de RMN de ¹ H de H2BzPh e do complexo [Ag(H2BzPh)NO ₃] (5) registrados em DMSO- <i>d</i> ₆ à temperatura ambiente.....	73
Figura 4.5 – Espectros de RMN de ¹³ C{ ¹ H} de H2BzPh e do complexo [Ag(H2BzPh)NO ₃] (5) registrados em DMSO- <i>d</i> ₆ à temperatura ambiente.....	75
Figura 4.6 – Projeção ORTEP dos complexos [Ag(H2BzPh)NO ₃] (5), [Ag(H2BzpCH3Ph) ₂]NO ₃ (6) e [Ag(H2BzpClPh) ₂]NO ₃ (7) com elipsoides em nível de probabilidade de 50%.....	77
Figura 4.7 – A) Superfície de Energia Potencial para a dissociação de NO ₃ ⁻ no complexo (5). O eixo horizontal indica a distância entre o átomo de prata e o átomo de nitrogênio do grupo nitrato. O eixo vertical direito mostra a variação da energia eletrônica em relação à estrutura de equilíbrio (linha contínua) e o eixo vertical esquerdo mostra o comprimento da ligação entre a prata e o oxigênio da hidrazona (linha tracejada). B) Geometria de equilíbrio do complexo (5) com indicação dos átomos que cercam o átomo de prata.....	81
Figura 4.8 – Gráfico 2-D de ∇ ² ρ(<i>r</i>) para a geometria de energia mínima do complexo (6). As linhas tracejadas indicam um valor negativo de ∇ ² ρ(<i>r</i>) e, portanto, uma região de acumulação de carga enquanto as linhas contínuas indicam uma ∇ ² ρ(<i>r</i>) positiva e, portanto, uma região de depleção de carga. A região entre a prata e os átomos circundantes é uma região de depleção de densidade eletrônica, característica de interações camada fechada.....	86

Figura 4.9 – Gráfico 2-D da densidade eletrônica para A) estrutura de energia mínima e a B) estrutura na qual o NO ₃ ⁻ está dissociado do centro metálico no complexo (6). As áreas em vermelha e azul indicam regiões de alta e baixa densidade eletrônica, respectivamente, enquanto as áreas em branco indicam densidades eletrônicas muito grandes, que fogem da escala.....	86
Figura 4.10 – Gráfico 3-D da diferença na densidade eletrônica para a geometria de equilíbrio do complexo (6) na presença e ausência do ligante NO ₃ ⁻ . As superfícies vermelhas indicam onde a densidade eletrônica é deslocada quando o nitrato se dissocia (maior $\rho(r)$ em forma dissociada), enquanto as superfícies azuis indicam onde a densidade eletrônica é removida após a dissociação do nitrato (inferior $\rho(r)$ em forma dissociada). Nas regiões verdes, a densidade eletrônica permanece inalterada.....	87
Figura 4.11 – A) Espectros de fluorescência de HSA (1,84 μ M, λ_{em} = 342 nm) na ausência (linha preta) e presença (linhas coloridas) de quantidades crescentes de [Ag(H2BzPh)NO ₃] (5) a 298 K. As setas indicam as mudanças ocorridas nos espectros após cada adição do complexo (5). B) Gráficos de Stern-Volmer (F_0/F versus [Complexo]) da interação complexo(5)-HSA. C) Gráficos de $\log[(F_0-F)/F]$ versus \log [Complexo] para determinação da constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n). D) Diagramas de Van' Hoff ($\ln K$ versus $1/T$) para a interação entre complexos (5-7) e a HSA em diferentes temperaturas.....	90
Figura 4.12 – A) Espectro de absorção na região do UV-Vis de [Ag(H2BzPh)NO ₃] (5) na ausência (linha preta) e na presença (linhas coloridas) de quantidades crescentes de CT-DNA. A seta indica as mudanças ocorridas nos espectros após cada adição de CT-DNA (efeito hipocrômico). B) Gráficos de Scatchard de $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus [DNA] para a interação entre os complexos (5-7) e DNA. ([DNA] = 0 – 20 μ M, [complexos] = 30 μ M à 25 °C em tampão Tris-HCl, pH 7,2).....	92
Figura 4.13 – A) Espectros de supressão da fluorescência do sistema BE-DNA na ausência (linha preta) e presença (linhas coloridas) de quantidades crescentes de [Ag(H2BzPh)NO ₃] (5). A seta indica as mudanças ocorridas nos espectros após cada adição do complexo (5). B) Gráficos de Stern-Volmer de F_0/F versus [complexos] para (5-7). (λ_{exc} = 545 nm; [complexos] = 0 - 100 μ M; [DNA] = 10 μ M e [BE] = 10 μ M).....	93
Figura 4.14 – Eletroforese em gel de agarose do DNA plasmidial pUC19 de <i>E. coli</i> (150 ng μ L ⁻¹) incubado com H2BzPh (HL1), H2BzpCH3Ph (HL2), H2BzpClPh (HL3), [Ag(H2BzPh)NO ₃] (1), [Ag(H2BzpCH3Ph)NO ₃] (2), [Ag(H2BzpClPh)NO ₃] (3), AgNO ₃ e cisplatina (100 μ M) por 24 h à 37°C. *Formas do DNA plasmidial: I (superenovelada), II (circular relaxada) e III (linear).....	94
Figura 5.1 – Resumo gráfico dos principais resultados apresentados no capítulo 5.....	95
Figura 5.2 – Estrutura geral para os complexos de prata(I) com bis(benzoil-hidrazonas).....	96
Figura 5.3 – Espectros de absorção na região do infravermelho de H2-2,6AcpCH ₃ Ph e do complexo [Ag(H2-2,6AcpCH ₃ Ph)]NO ₃ (10), obtidos em pastilhas de KBr (4000-400 cm ⁻¹).....	98

Figura 5.4 – Espectros de RMN de ^1H de H2-2,6AcpCH ₃ Ph e do complexo [Ag(H2-2,6AcpCH ₃ Ph)]NO ₃ (10) registrados em DMSO- <i>d</i> 6 à temperatura ambiente.....	99
Figura 5.5 – Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de H2-2,6AcpCH ₃ Ph e do complexo [Ag(H2-2,6AcpCH ₃ Ph)]NO ₃ (10) registrados em DMSO- <i>d</i> 6 à temperatura ambiente.....	99
Figura 5.6 – A) Espectros de massas (ESI, modo +) de [Ag(H2-2,6AcpCH ₃ Ph)]NO ₃ (10) registrados na faixa de 100 a 800 m/z. Comparação entre o padrão isotópico B) experimental (m/z 534,1053) e C) teórico (m/z 534,1013) da espécie catiônica [Ag(H2-2,6AcpCH ₃ Ph)] ⁺ ...	102
Figura 5.7 – Projeção ORTEP dos complexos catiônicos de [Ag(H2-2,6AcpCH ₃ Ph)]NO ₃ (10) e [Ag(H2-2,6AcpClPh)]NO ₃ ·2H ₂ O (11) com elipsoides em nível de probabilidade de 50%.....	103
Figura 5.8 – Espectros de fluorescência de HSA na ausência (linha preta) e presença (linhas coloridas) de quantidades crescentes de [Ag(H2-2,6AcpCH ₃ Ph)]NO ₃ (10) em diferentes temperaturas. [HSA] = 1,84 μM e [complexos] = 0 – 3,0 μM.....	108
Figura 5.9 – A) Gráficos de Stern-Volmer (F_0/F versus [complexo]) B) Gráficos de Scatchard ($\log[(F_0-F)/F]$ versus $\log[\text{complexo}]$) para a interação entre [Ag(H2-2,6AcpCH ₃ Ph)]NO ₃ (10) e HSA em diferentes temperaturas.....	109
Figura 5.10 – Diagramas de Van' Hoff ($\ln K$ versus $1/T$) da interação complexo-HSA.....	109
Figura 5.11 – A) Espectro de absorção na região do UV-Vis de [Ag(H2-2,6AcpCH ₃ Ph)]NO ₃ (10) na ausência (linha preta) e na presença (linhas coloridas) de quantidades crescentes de DNA. A seta indica as mudanças ocorridas nos espectros após cada adição de DNA (efeito hipocrômico). B) Gráficos de Scatchard de $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus [DNA] para a interação entre os complexos e DNA. ([DNA] = 0 – 20 μM, [Complexos] = 30 μM à 25 °C em tampão Tris-HCl, pH 7,2).....	111
Figura 5.12 – A) Espectros de fluorescência do sistema BE-DNA na ausência (linha preta) e presença (linhas coloridas) de quantidades crescentes de [Ag(H2-2,6AcpCH ₃ Ph)]NO ₃ (10). A seta indica as mudanças ocorridas nos espectros após cada adição do complexo (10). B) Gráficos de Stern-Volmer de F_0/F versus [complexos] para (9-12). ($\lambda_{\text{exc}} = 545 \text{ nm}$; [Complexos] = 0 - 100 μM; [DNA] = 10 μM e [BE] = 10 μM).....	112

Lista de Tabelas

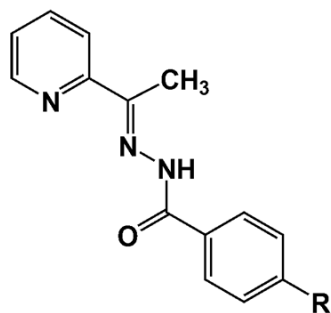
Tabela 2.1 – Atribuição do tipo de eletrólito para soluções de concentração de 1,0 mM.....	20
Tabela 3.1 – Rendimento, massa molar, faixa de fusão, condutividade molar e análise elementar de CHN das 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas e seus complexos de prata(I).....	40
Tabela 3.2 – Atribuição das principais bandas observadas nos espectros de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) das 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas e seus complexos de prata(I)...	41
Tabela 3.3 – Atribuições, número de hidrogênio (n), multiplicidades (M), a constantes de acoplamento (J, Hz) e deslocamento químico (ppm) dos sinais de RMN de ^1H das 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas e seus complexos de prata(I) (400 MHz), em DMSO- <i>d</i> 6.....	45
Tabela 3.4 – Atribuições e deslocamento químico (ppm) dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT 135 das 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas e seus complexos de prata(I) (400 MHz), em DMSO- <i>d</i> 6.....	48
Tabela 3.5 – Relação massa/carga (m/z) das espécies encontradas nos espectros de massas dos complexos de prata(I) (1-4).....	49
Tabela 3.6 – Dados cristalográficos e de refinamento das estruturas dos complexos $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPh})\text{NO}_3]$ (1), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPCH}_3\text{Ph})_2]\text{NO}_3$ (2a), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPClPh})_2]\text{NO}_3$ (3a) e $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPNO}_2\text{Ph})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (4a).....	52
Tabela 3.7 – Distâncias de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados para os complexos $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPh})\text{NO}_3]$ (1), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPCH}_3\text{Ph})_2]\text{NO}_3$ (2a), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPClPh})_2]\text{NO}_3$ (3a) e $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPNO}_2\text{Ph})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (4a) juntamente com dados para H2AcPh e H2AcPClPh.....	54
Tabela 3.8 – Atividade antifúngica (CI_{50}) de 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas, complexos de prata (I) (1-4), nitrato de prata e agentes antifúngicos (nitrato de miconazol e nistatina) frente as espécies de <i>Candida</i> e fungos filamentosos.....	56
Tabela 3.9 – Parâmetros estereo-eletrônicos (EHOMO, μ and logP) e atividade antifúngica (CI_{50}) de 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas e seus complexos de prata(I) (1-4).....	58
Tabela 3.10 – Constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de supressão bimolecular (K_q), constantes logarítmicas de ligação ($\log K_b$) e número de sítios de ligação (n) para a interação entre HSA e os complexos de prata(I) (1-4) a diferentes temperaturas.....	64
Tabela 3.11 – Parâmetros termodinâmicos da interação entre HSA e os complexos de prata(I) (1-4) a diferentes temperaturas.....	65
Tabela 3.12 – Constantes de ligação (K_b), concentração necessária para reduzir 50% da fluorescência do sistema BE-DNA (C_{50}) e constantes de ligação aparente (K_{app}) para os complexos de prata(I) (1-4).....	67

Tabela 4.1 – Rendimento, massa molar, faixa de fusão, condutividade molar e análise elementar de CHN das 2-benzoilpiridina hidrazonas e seus complexos de prata(I).....	70
Tabela 4.2 – Atribuição das principais bandas observadas nos espectros de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) das 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas e seus complexos de prata(I)	71
Tabela 4.3 – Atribuições, número de hidrogênio (n), multiplicidades (M), constantes de acoplamento (J, Hz) e deslocamento químico (ppm) dos sinais de RMN de ^1H das 2-benzoilpiridina hidrazonas e seus complexos de prata(I) (400 MHz), em DMSO- <i>d</i> 6.....	74
Tabela 4.4 – Atribuições e deslocamento químico (ppm) dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT 135 das 2-benzoilpiridina hidrazonas e seus complexos de prata(I) (400 MHz), em DMSO- <i>d</i> 6.....	76
Tabela 4.5 – Dados cristalográficos e de refinamento das estruturas dos complexos $[\text{Ag}(\text{H2BzPh})\text{NO}_3]$ (5), $[\text{Ag}(\text{H2BzpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (6) e $[\text{Ag}(\text{H2BzpClPh})\text{NO}_3]$ (7).....	78
Tabela 4.6 – Distâncias de ligação (Å) e ângulos ($^\circ$) selecionados para os complexos $[\text{Ag}(\text{H2BzPh})\text{NO}_3]$ (5), $[\text{Ag}(\text{H2BzpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (6) e $[\text{Ag}(\text{H2BzpClPh})\text{NO}_3]$ (7) juntamente com dados para H2BzpClPh.....	79
Tabela 4.7 – Comprimentos de ligação calculadas e experimentais em torno do centro metálico para os complexos investigados, na geometria de equilíbrio.....	80
Tabela 4.8 – Comprimentos de ligação entre a prata e todos os átomos coordenados dos ligantes do complexo (5), obtidos para cada ponto da PES.....	82
Tabela 4.9 – Ordem de ligação de Mayer entre os átomos coordenados dos ligantes e o átomo de prata para os complexos (5-8) nas geometrias de mínimo da PES (min.) e com o grupo nitrato dissociado (diss.).....	83
Tabela 4.10 – Propriedades da densidade eletrônica calculadas no ponto crítico de ligação (BCP) envolvendo a prata e os átomos indicados dos ligantes, na geometria de equilíbrio dos complexos.....	84
Tabela 4.11 – Propriedades da densidade eletrônica calculadas no ponto crítico de ligação (BCP) entre a prata e os átomos dos ligantes. Os valores foram obtidos para o complexo (6) em duas geometrias da PES, o ponto P2 e o último ponto P10 quando o NO_3^- é o mais distante do metal.....	85
Tabela 4.12 – Atividade antifúngica (CI_{50}) de 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas, complexos (5-7), nitrato de prata, nitrato de miconazol e nistatina frente as espécies de <i>Candida</i> e fungos filamentosos.....	88

Tabela 4.13 – Atividade citotóxica (CI_{50}) e índices de seletividade (IS) de 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas, complexos (5-7), $AgNO_3$ e cisplatina contra células B16F10 e Melan-A....	89
Tabela 4.14 – Constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de supressão bimolecular (K_q), constantes logarítmicas de ligação ($logK_b$) e número de sítios de ligação (n) para a interação entre HSA e os complexos de prata(I) (5-7) a diferentes temperaturas.....	90
Tabela 4.15 – Parâmetros termodinâmicos da interação entre HSA e os complexos de prata(I) (5-7) a diferentes temperaturas.....	91
Tabela 4.16 – Constantes de ligação (K_b), concentração necessária para reduzir 50% da fluorescência do sistema BE-DNA (C_{50}) e constantes de ligação aparente (K_{app}) para a interação entre DNA e os complexos de prata(I) (5-7).....	93
Tabela 5.1 – Rendimento, massa molar, faixa de fusão, condutividade molar e análise elementar de CHN das <i>bis</i> (benzoil-hidrazonas) e seus complexos de prata(I).....	96
Tabela 5.2 – Atribuição das principais bandas nos espectros de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) das <i>bis</i> (benzoil-hidrazonas) e seus complexos de prata(I).....	97
Tabela 5.3 – Atribuições, número de hidrogênio (n), multiplicidades (M), a constantes de acoplamento (J, Hz) e deslocamento químico (ppm) dos sinais de RMN de 1H das <i>bis</i> (benzoil-hidrazonas) e seus complexos de prata(I) (400 MHz), em $DMSO-d_6$	100
Tabela 5.4 – Atribuições e deslocamento químico (ppm) dos sinais de RMN de $^{13}C\{^1H\}$ e DEPT 135 das <i>bis</i> (benzoil-hidrazonas) e seus complexos de prata(I) (400 MHz), em $DMSO-d_6$	101
Tabela 5.5 – Dados cristalográficos e de refinamento das estruturas dos complexos $[Ag(H_2-2,6AcpCH_3Ph)]NO_3$ (10) e $[Ag(H_2-2,6AcpClPh)]NO_3 \cdot 2H_2O$ (11).....	104
Tabela 5.6 – Distâncias de ligação (Å) e ângulos ($^\circ$) selecionados para os complexos $[Ag(H_2-2,6AcpCH_3Ph)]NO_3$ (10) e $[Ag(H_2-2,6AcpClPh)]NO_3 \cdot 2H_2O$ (11), com desvio padrão entre parênteses.....	105
Tabela 5.7 – Atividade antifúngica (CI_{50}) para as <i>bis</i> (benzoil-hidrazonas), complexos (9-12), nitrato de prata e antifúngicos de uso clínico frente as espécies de <i>Candida</i>	106
Tabela 5.8 – Atividade antifúngica (CI_{50}) para as <i>bis</i> (benzoil-hidrazonas), complexos (9-12), nitrato de prata e antifúngicos de uso clínico frente as espécies de fungos filamentosos.....	107
Tabela 5.9 – Constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de supressão bimolecular (K_q), constantes logarítmicas de ligação ($logK_b$), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos da interação entre HSA e os complexos de prata(I) em diferentes temperaturas.....	110
Tabela 5.10 – Constantes de ligação (K_b), concentração necessária para reduzir 50% da fluorescência do sistema BE-DNA (C_{50}) e constantes de ligação aparente (K_{app}) para os complexos de prata(I) (9-12).....	112

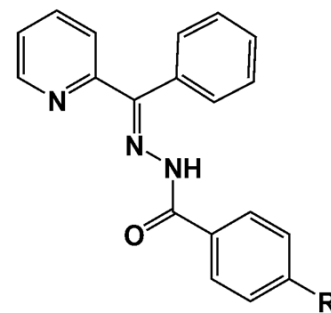
Índice de Estructuras

2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas



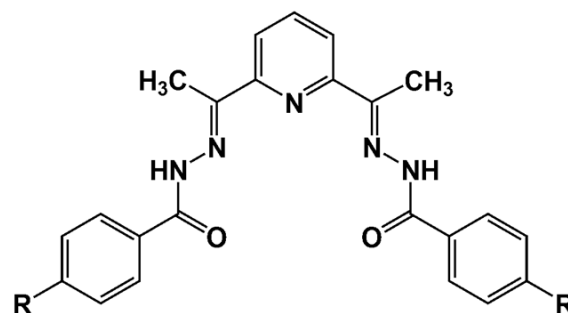
R = H, H2AcPh
CH₃, H2AcpCH₃Ph
Cl, H2AcpClPh
NO₂, H2AcpNO₂Ph

2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas



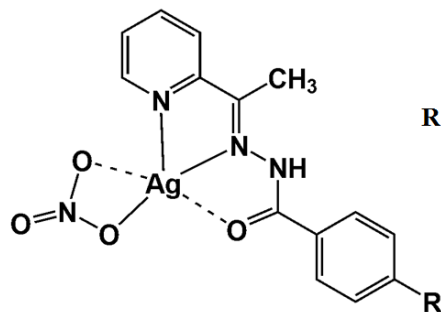
R = H, H2BzPh
CH₃, H2BzpCH₃Ph
Cl, H2BzpClPh
NO₂, H2BzpNO₂Ph

2,6-diacetilpiridina bis(benzoil-hidrazonas)

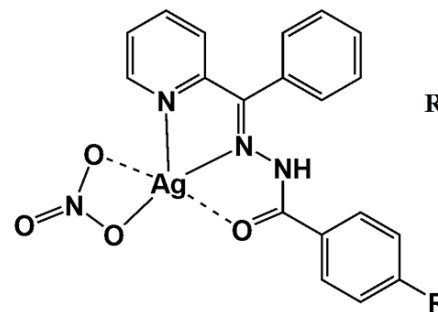


R = H, H2-2,6AcPh
CH₃, H2-2,6AcpCH₃Ph
Cl, H2-2,6AcpClPh
NO₂, H2-2,6AcpNO₂Ph

Complexos de Ag(I) com 2-acetilpiridina- e 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas

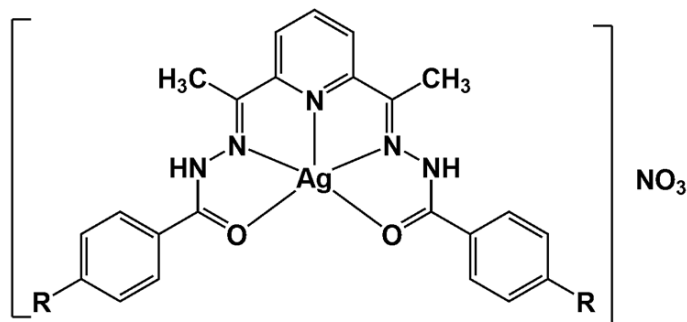


- R** = H, [Ag(H2AcPh)NO₃] (1)
 CH₃, [Ag(H2AcpCH₃Ph)NO₃] (2)
 Cl, [Ag(H2AcpClPh)NO₃] (3)
 NO₂, [Ag(H2AcpNO₂Ph)NO₃] (4)



- R** = H, [Ag(H2BzPh)NO₃] (5)
 CH₃, [Ag(H2BzpCH₃Ph)NO₃] (6)
 Cl, [Ag(H2BzpClPh)NO₃] (7)
 NO₂, [Ag(H2BzpNO₂Ph)NO₃] (8)

Complexos de Ag(I) com 2,6-diacetilpiridina bis(benzoil-hidrazonas)



- R** = H, [Ag(H2-2,6AcPh)NO₃] (9)
 CH₃, [Ag(H2-2,6AcpCH₃Ph)NO₃] (10)
 Cl, [Ag(H2-2,6AcpClPh)NO₃] · 2H₂O (11)
 NO₂, [Ag(H2-2,6AcpNO₂Ph)NO₃] (12)

Capítulo 1 – Introdução

1.1. Doenças infecciosas causadas por fungos

O impacto das doenças infecciosas na saúde humana não é amplamente reconhecido e as mortes resultantes dessas infecções são frequentemente negligenciadas. A incidência de doenças causadas por fungos invasores aumentou nos últimos anos e como consequência a taxa de mortalidade por infecções causadas por fungos foi superior à de doenças como a tuberculose ou malária. Cerca de 90% das mortes são provenientes das espécies de *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e *Pneumocystis*, representando um grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades em razão das dificuldades diagnósticas e terapêuticas dessas infecções.¹

A candidíase é uma micose causada por fungos do gênero *Candida*, em que a lesão pode ser branda, aguda ou crônica, superficial ou profunda, e de espectro clínico bem variável. O principal agente das candidíases é a *Candida albicans*, que são patógenos oportunistas comumente encontrados no trato gastrointestinal, pele e mucosas de indivíduos saudáveis.^{2,3} Em geral, *Candida spp* tendem a manifestações clínicas mais agressivas tornando-se patogênicas quando o sistema imune do hospedeiro se encontra comprometido. Outras espécies de *Candida* comumente associadas a patogenicidade em humanos incluem, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida lusitanae*, dentre outras.⁴

A aspergilose invasiva é infecção fúngica que afeta principalmente o trato respiratório, e o agente causal mais frequentemente encontrado é o *Aspergillus*. Infecções por *Aspergillus* é mais frequente entre os imunodeprimidos neutropênicos, que podem sofrer invasão sanguínea pelo fungo via gastrointestinal.^{1,5} São inúmeros os fatores de risco para uma infecção de forma invasiva, entre os quais destacam-se: hemopatias malignas, receptores de transplante de órgãos ou células tronco hematopoiéticas, pacientes submetidos à quimioterapia e hemodiálise, procedimento cirúrgico abdominal com perfuração gastrointestinal e pacientes com trauma ou grandes queimaduras.^{6,7}

Os fungos de interesse clínico possuem dois tipos distintos de morfologia que se apresentam sob formas de leveduras, como é o caso de *Candida spp* ou bolores, como por exemplo, fungos filamentosos das espécies de *Aspergillus*. Estruturalmente, os fungos são formados por uma membrana celular que é constituída principalmente por ergosterol, que desempenha um papel

¹G.D. Brown, D.W. Denning, N.A.R. Gow, S.M. Levitz, M.G. Netea, T.C. White, *Sci. Transl. Med.* 4 (2012) 165rv13.

²L.S. Barbedo, D. B. G. Sgarbi, *J. bras. Doenças Sex. Transm.* 22 (2010) 22–38.

³A.L. Colombo, T. Guimarães, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36 (2003) 599–607.

⁴D.R. Telles, N. Karki, M. W. Marshall, *Dent. Clin. North Am.* 2 (2013) 270–276.

⁵D.D. Garbee, S. S. Pierce, J.M. Manning, *Crit. Care Nurs. Clin. North Am.* 29 (2017) 67–79.

⁶R.F. Silva, *J. Bras. Pneumol.* 36 (2010) 142–147.

⁷R.R. Richardson, M. D. Richardson, *Medicine.* 45 (2017) 757–762.

importante na integridade da membrana celular regulando a fluidez, permeabilidade e, indiretamente modulando a atividade e distribuição de proteínas associadas à membrana celular.^{8,9}

1.1.1. Agentes antifúngicos e mecanismos de ação

Os fármacos antifúngicos sistêmicos ou tópicos geralmente utilizados na terapia de infecções fúngicas, como é o caso da anfotericina B e outros polienos, como a nistatina, ligam-se ao ergosterol nas membranas celulares fúngicas e aumentam a permeabilidade da membrana. Os imidazóis e triazóis, como o miconazol e o fluconazol, inibem a 14- α -esterol demetilase e, por conseguinte, comprometem a síntese do ergosterol e levam ao acúmulo de 14- α -metilesteróis. As alilaminas, como a naftifina e a terbinafina, inibem a esqualeno epoxidase e impedem a síntese do ergosterol (Figura 1.1).¹⁰

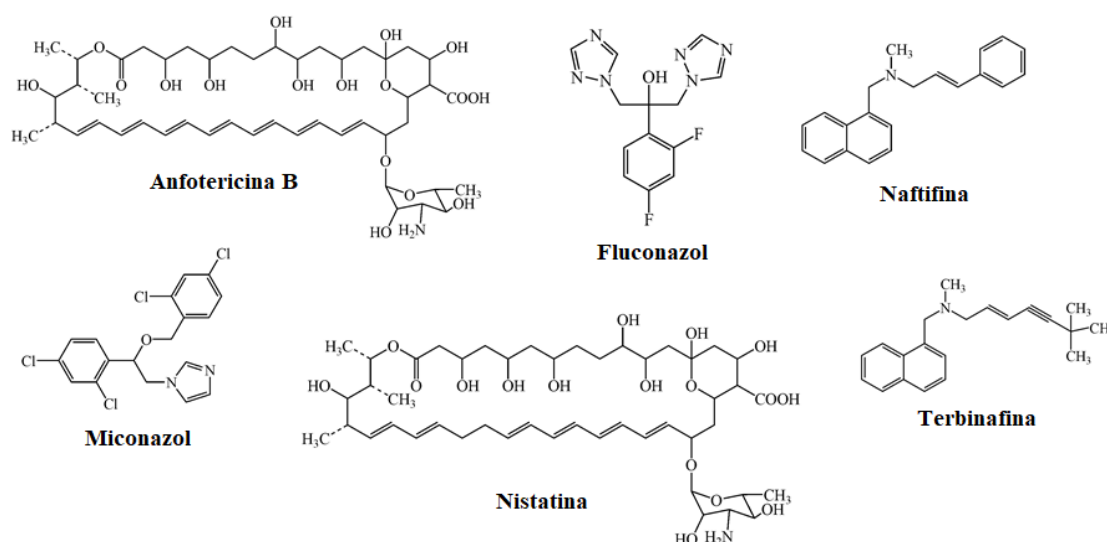


Figura 1.1 – Alguns dos agentes antifúngicos disponíveis para a farmacoterapia das micoses.

Alguns isolados de *Candida* e *Aspergillus* mostraram-se resistentes, principalmente à anfotericina B, durante a terapia com agentes antifúngicos poliênicos. A resistência aos antifúngicos da classe dos azóis tem surgido gradualmente durante a terapia prolongada, principalmente em pacientes com infecção muito avançada pelo HIV e candidíase orofaríngea ou esofágica.^{11,12} Os principais mecanismos de resistência dos fungos estão associados ao aumento do efluxo pelo bombeamento ativo do antifúngico, alteração nas estruturas das proteínas alvos, modificações de

⁸I.P. Ferreira, G.M. De Lima, E.B. Paniago, W.R. Rocha, J.A. Takahashi, C.B. Pinheiro, J.D. Ardisson, *Eur. J. Med. Chem.* 58 (2012) 493-503.

⁹E.M. Carmona, A.H. Limper, *Clin. Chest. Med.* 38 (2017) 393-402.

¹⁰L.L. Brunton, B. A. Chabner, B. C. Knollman, *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*. 12^a Ed. McGraw-Hill, Porto Alegre, 2012, 1571-1591p.

¹¹D. Sanglard, F. C. Odds, *Lancet Infect. Dis.* 2 (2002) 73-85.

¹²A.H. Limper, A. Adenis, T. Le, T.S. Harrison, *Lancet. Infect. Dis.* 17 (2017) 334-343.

esteróis presentes na membrana e aumento da atividade da enzima catalase resultando em uma menor susceptibilidade ao dano oxidativo.¹³

A resistência aos antifúngicos, intrínseca ou adquirida, tornou-se um problema relevante na terapia, evidenciando um sensível aumento de espectro de fungos patogênicos e da sua incidência na prática clínica, sobretudo em pacientes imunodeficientes e imunossuprimidos, e está associada com processo evolutivo das células fúngicas, erros de prescrição ou até mesmo uso indiscriminado de agentes antifúngicos. Assim, torna-se interessante a busca por fármacos inovadores que atuem com mecanismos de ação ainda não explorados, o que pode representar um caminho importante para o sucesso da quimioterapia antifúngica.

1.2. Doenças neoplásicas e a quimioterapia

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde é esperado que, nas próximas décadas, o impacto do câncer na população corresponda a 27 milhões de novos casos e 17 milhões de mortes no mundo.¹⁴ A estimativa mundial, realizada em 2012, pelo projeto Globocan/Iarc, apontou que os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências encontradas foram mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%). Os dados epidemiológicos do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o biênio 2018-2019, estima-se a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer no Brasil, para cada ano.¹⁵

O câncer é um conjunto de doenças causadas pela proliferação descontrolada de células anormais que invadem os tecidos e órgãos, podendo adquirir a capacidade de se desprenderem do tumor e de migrarem para órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases. O crescimento acelerado e desorganizado das células pode levar à formação de tumores ou neoplasias malignas, que geralmente são divididos em tumores sólidos, como carcinomas e sarcomas, ou tumores não sólidos, tais como leucemias e linfomas.^{15,16}

Os tipos mais comuns de câncer são os de pele, mama, próstata, pulmão e estômago, sendo que os últimos quatro são letais e compõem a segunda maior causa de mortes por doença no Brasil. Entre os citados, o câncer de pele é o de maior incidência no país, porém, com exceção do câncer melanoma, é a variedade de menor letalidade.¹⁶

¹³Z. A. Kanafani, J. R. Perfect, *Clin. Infect. Dis.* 46 (2008) 120–128.

¹⁴Instituto Nacional do Câncer (INCA). <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/dia-nacional-combate-cancer.asp>. Acessado em 15 de janeiro de 2018.

¹⁵Instituto Nacional do Câncer (INCA). Website: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>. Acessado em 26 de fevereiro de 2018.

¹⁶F. I. Simplicio, F. Maionchi, N. Hioka, *Quim. Nova.* 25 (2002) 801–807.

Os principais tipos de tratamento para o câncer são: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Outros tratamentos incluem a imunoterapia, fotorradiação, hormonioterapia e transplantes de medula óssea. O objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, normalmente por meio da terapia combinada, onde é associado mais que um tipo de tratamento.¹⁷

A quimioterapia consiste na utilização de fármacos cuja função é destruir, controlar ou inibir o crescimento das células neoplásicas. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais.¹⁸ A baixa especificidade apresentada pelos agentes quimioterápicos explica os efeitos colaterais da quimioterapia, tais como náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções. Porém, o corpo recupera-se destes inconvenientes após o tratamento, e o uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável. Além disso, estima-se que os mecanismos de resistência criados pelas células neoplásicas é a causa principal do fracasso terapêutico.¹⁷ Assim, a busca por novos quimioterápicos eficientes, seletivos e seguros pode resultar em aumento da taxa de sobrevivência de pacientes com câncer.

1.2.1. Agentes antineoplásicos e mecanismos de ação

Os primeiros agentes antineoplásicos submetidos a ensaios clínicos foram as mostardas nitrogenadas, que marcaram o início da era moderna da quimioterapia do câncer. Na atualidade, os agentes alquilantes são considerados os compostos mais estudados e utilizados na terapia oncológica. Esses compostos são conhecidos por interagirem quimicamente com o DNA. De fato, os estudos envolvendo fármacos antitumorais têm como alvo principal o DNA.¹⁷ Os agentes antineoplásicos podem ser classificados de acordo com os mecanismos de ação que envolve a interação com o DNA. Alguns dos importantes modos de interação entre fármacos-DNA são descritos a seguir:

- (a) *Ação metabólica bloqueadora da síntese de DNA*: exercida por agentes antimetabólicos, como por exemplo os análogos do ácido fólico (metotrexato), antagonistas das pirimidinas (fluorouracil) e análogos das purinas (mercaptopurina);¹⁹
- (b) *Interação por formação de ligações cruzadas*: essas ligações podem ocorrer intrafitas, interfitas ou interhélices. As *N*-mostardas (Mecloretamina e Clorambucil) são capazes de formar ligações interfilamentares com o DNA e o principal sítio de alquilação é a posição N7 da guanina. As nitrossuréias (carmustina) e trizenos (dacarbazina) precisam ser biotransformados nos seus derivados alquilantes para exercer ação citotóxica. Os antibióticos naturais, como por exemplo as antraciclinas, representam uma classe de antibióticos

¹⁷V. L. de Almeida, A. Leitão, L. C. B. Reina, C. A. Montanari, C. L. Donnici, M. T. P. Lopes, *Quim. Nova*. 28 (2005) 118–129.

¹⁸C. Holohan, S. V. Schaeysbroeck, D. B. Longley, P. G. Johnston, *Nat. Rev. Cancer*. 13 (2013) 714–726.

¹⁹W. B. Parker, *Chem. Rev.* 109 (2009) 2880–2893.

antitumorais que tem como modo de ação a formação de ligações interfilamentares, o que leva ao bloqueio da síntese do DNA e RNA e diminuição da atividade da topoisomerase II;^{10,20}

(c) *Interação por intercalação*: esse mecanismo se baseia em interações do tipo π entre os intercalantes e os pares de base nitrogenadas adjacentes (citosina e guanina) do DNA. Alguns fármacos com propriedade intercalante ao DNA são as antraciclina (daunorrobicina), actinomicinas (dactinomicina) e acridinas (proflavina). As combilexinas interagem com o DNA por intercalação e ainda através da ligação nos pares de base nitrogenadas que compõem a hélice do DNA.^{21,22}

Embora o uso clínico de compostos orgânicos que atuem no DNA tenha sido uma grande contribuição para a oncologia, a incorporação de compostos de coordenação de platina, como cisplatina e carboplatina, constituem talvez o maior sucesso da quimioterapia. As propriedades citotóxicas da cisplatina, assim como de seus análogos, têm sido atribuídas à sua habilidade de formar ligações covalentes cruzadas em uma mesma fita (intrafita) ou entre duas fitas distintas (interfita) do DNA, bloqueando assim a divisão celular e resultando em morte celular por apoptose.^{23,24}

Contudo, apesar do grande arsenal de agentes antineoplásicos disponíveis que causam danos ao DNA das células doentes (Figura 1.2), muitos compostos apresentam efeitos colaterais graves. Para minimizar esses efeitos, em muitos casos é preciso redução da dose do fármaco para garantir uma menor toxicidade, porém muitas vezes a ação citotóxica também é reduzida.¹⁷ Nesse sentido, as pesquisas na área de Química Medicinal e de Química Medicinal Inorgânica têm-se dedicado ao planejamento de novos agentes citotóxicos que apresentem melhores efeitos terapêuticos e índices de seletividade satisfatórios, permitindo seu uso de forma mais segura.

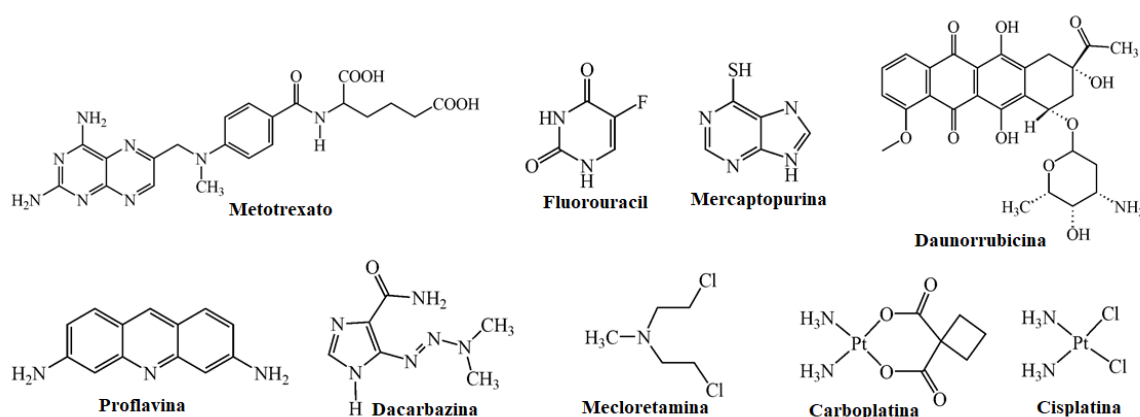


Figura 1.2 – Agentes antineoplásicos cujo mecanismo de ação envolve a interação com DNA.

²⁰W.C. Hahn, R.A. Weinberg, *Nat. Rev. Cancer.* 2 (2002) 331–341.

²¹M.K. Goftar, N.M. Kor, Z.M. Kor, *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.* 2 (2014) 811–822.

²²S. Li, V.R. Cooper, T. Thonhauser, B.I. Lundqvist, D. C. Langreth, *J. Phys. Chem. B*, 113 (2009) 11166–11172.

²³D. Shaloam, P. B. Tchounwou, *Eur. J. Pharmacol.* 740 (2014) 364–378.

²⁴Z.H. Siddik, *Oncogene.* 22 (2003) 7265–7279.

1.3. Contribuições da Química Medicinal Inorgânica para terapia de doenças

A Química Medicinal é tipicamente interdisciplinar e está voltada para racionalizar a ação dos fármacos a nível molecular.²⁵ Segundo definição da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), é uma área da química que envolve aspectos das ciências biológicas, médicas e farmacêuticas, cuja missão é o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos (protótipos), bem como o estudo do metabolismo, interpretação do mecanismo de ação a nível molecular e a construção de relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica (SAR).²⁶ Por sua vez, a Química Medicinal Inorgânica é uma área de importância crescente, tanto na medicina terapêutica quanto na medicina diagnóstica e nos últimos anos teve grande destaque e contribuição para Química Medicinal.²⁷

O uso de metais para o desenvolvimento de agentes quimioterápicos não é algo novo e existe há quase 5000 anos.²⁸ Em 3500 a.C. os Egípcios usavam o cobre para esterilizar água, embora nenhuma eficácia terapêutica tenha sido determinada para este uso. Logo depois, descobriram que zinco promovia a cura de feridas.²⁹ No fim do século XIX, Robert Koch demonstrou os efeitos antimicrobianos *in vitro* de sais de ouro ($K[Au(CN)_2]$) contra o bacilo da tuberculose. Desde então, vários sais de ouro foram amplamente utilizados, especialmente na Europa, para o tratamento da tuberculose até 1930 e atualmente são utilizados na terapia anti-inflamatória.³⁰

A Química Medicinal Inorgânica em sua forma atual teve suas origens nos trabalhos de Paul Ehrlich (fundador da quimioterapia moderna) e Alfred Werner (considerado pai da Química de Coordenação). Ehrlich destacou-se por seus estudos de relação entre estrutura e atividade farmacológica em compostos de arsênio investigados para o tratamento de sífilis, enquanto Werner pelo desenvolvimento da teoria que explica a estrutura e a ligação química em complexos metálicos.²⁷

O desenvolvimento de agentes quimioterápicos à base de metais tornou-se possível após a descoberta, por Barnett Rosenberg, das propriedades antitumorais da cisplatina (*cis*[diaminodicloroplatina(II)]).³¹ Ressalta-se que a cisplatina exibe acentuada atividade antitumoral em diversos tumores, particularmente de testículo, ovário e bexiga; ainda é usada no tratamento de carcinomas escamosos, como de cabeça e pescoço, esôfago e cérvix, bexiga, tireóides, endométrio, estômago ou pâncreas, pulmão, sarcomas, tumores trofoblásticos e coriocarcinoma e, em alguns

²⁵E. J. Barreiro, *Rev. Virtual Quim.* 1 (2009) 26–34.

²⁶International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Website: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem/>. Acessado em 03 de outubro de 2017.

²⁷H. Beraldo, *Quím. Nov. Esc.* 6 (2005) 4–6.

²⁸L. Ronconi, P. J. Sadler, *Coord. Chem. Rev.* 251 (2007) 1633–1648.

²⁹C. Orvig, M. J. Abrams, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2201–2204.

³⁰A. M. C. Benite, S. D. P. Machado, E. J. Barreiro, *Rev. eletrônica farm.* 4 (2007) 131–142.

³¹B. Rosenberg, L. VanCamp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature.* 222 (1969) 385–386.

casos, o índice de cura chega a aproximadamente 90%.^{32,33} Como mencionado anteriormente, o principal alvo de ação da cisplatina é a inibição seletiva da síntese do DNA, em que o principal sítio de ligação é o N7 da guanina, embora também ocorra interação covalente com a adenosina e citosina.³⁴

Com o sucesso da cisplatina na terapia do câncer surgiram novas perspectivas para Química Medicinal com a incorporação de complexos metálicos como possíveis protótipos a agentes terapêuticos. Além dos metalofármacos à base de platina, outros derivados metálicos se destacaram na terapia e diagnóstico de diversas doenças (Figura 1.3).³⁵ Como por exemplo, os radiofármacos, compostos sem ação farmacológica, que têm na sua composição um radionuclídeo, e são utilizados na clínica médica principalmente no diagnóstico por imagem. Dentre eles destacam-se o ^{99m}Tc-cardiolite, utilizado no diagnóstico por imagem de doenças cardíacas, o ¹¹¹In-DTPA que é utilizado na imagiologia cerebral e o ⁶⁷Ga-citrato, utilizado no diagnóstico de neoplasias ou tumores malignos. No que diz respeito à terapia, a carboplatina é usada como agente antitumoral por apresentar menos efeitos colaterais que a cisplatina; a auranofina, um complexo de ouro(I), é um potente agente anti-reumático; os complexos de antimônio(V), estibogluconato de sódio (Pentostam®) e antimoniato de meglumina (Glucantime®), são utilizados clinicamente contra leishmaniose e os complexos de bismuto(III), como o subcitrato de bismuto (De-Nol®) e subsalicilato de bismuto (Pepto-Bismol®) que são usados na prevenção e tratamento de úlceras gástricas.^{35,36}

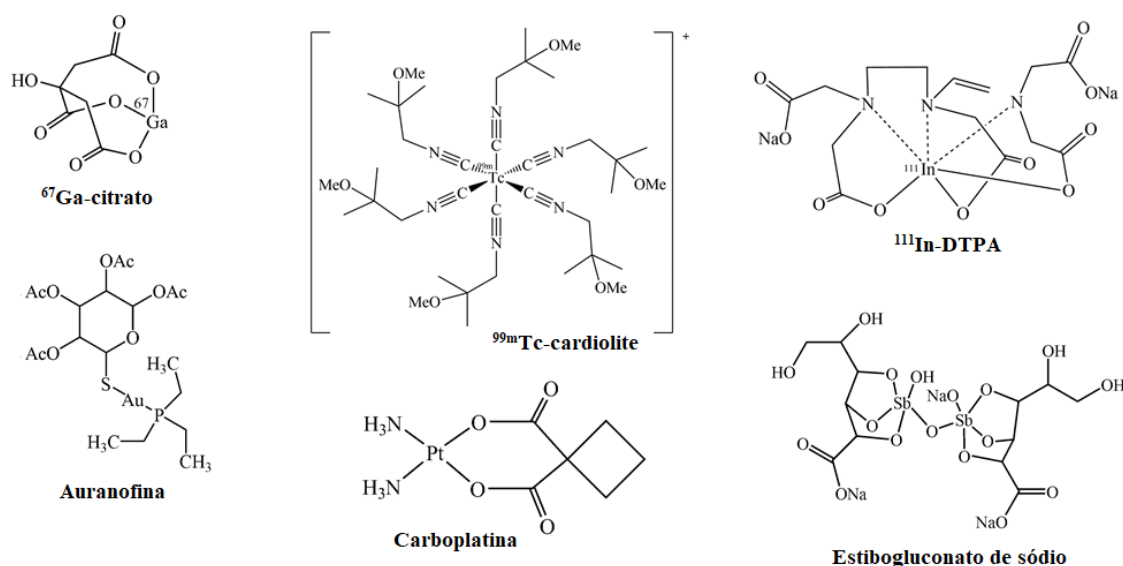


Figura 1.3 – Alguns dos metalofármacos em uso clínico na terapia e diagnóstico de doenças.

³²V. Foltinová, L. Š. Šindlerová, V. Horváth, P. Sova, J. Hofmanová, R. Janisch, *Scr. Med.* 81 (2008) 105–116.

³³W. Guerra, H. Silva, M. V. Almeida, A. P. S. Fontes, *Quim. Nova.* 30 (2007) 56–58.

³⁴A.P.S. Fontes, S.G. Almeida, L.A. Nader, *Quím. Nova.* 20 (1997) 398–406.

³⁵K. H. Thompson, C. Orvig, *Science.* 300 (2003) 936–939.

³⁶E. R. T. Tiekink, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42 (2002) 217–224.

Entretanto, a introdução de novas classes de metalofármacos se torna necessária, uma vez que os atuais têm apresentado problemas clínicos, como alta toxicidade, tratamento prolongado em decorrência da resistência, efeitos colaterais graves devido à baixa seletividade e ação farmacológica reduzida. Sendo assim, pesquisas envolvendo metais e ligantes bioativos ainda constituem um campo a ser explorado, visando aumentar a oferta de agentes terapêuticos mais eficientes. Além disso, a inserção de novos complexos metálicos possibilitaria avanços na clínica médica com diagnósticos precoces de doenças e tratamentos menos agressivos.

1.3.1. Complexos metálicos com hidrazonas

As hidrazonas consistem numa classe de compostos orgânicos pertencentes a família das bases de Schiff, caracterizadas pela presença do grupo $R_1R_2C=N-NR_3R_4$, com inúmeras aplicações químicas e farmacológicas (Figura 1.4A).^{37,38} Dentre as aplicações farmacológicas, as hidrazonas destacam-se como agentes antimicrobianos,³⁹ anti-inflamatórios,⁴⁰ antidiabéticos,⁴¹ antivirais,⁴² antimaláricos,⁴³ antitumorais,⁴⁴ dentre outros.

A ação antimicrobiana das hidrazonas tem sido investigada contra uma variedade de bactérias e fungos. Como exemplo, as nitrofurazonas que exibiram ação antibacteriana equivalente à dos fármacos nitrofurantoína, ciprofloxacina e cefuroxima frente as espécies de *Staphylococcus* e *Bacillus*,⁴⁵ enquanto que hidrazonas derivadas de 4-(trifluorometil) benzo-hidrazida mostraram atividade antifúngica expressiva contra as espécies de *Candida glabrata*, além de ação contra *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 1.4B).⁴⁶ A ação anti-HIV de hidrazonas benzilisotiazólicas e quinolínicas foi bastante significativa, ao passo que essas também exibiram efeito antitumoral pronunciado.⁴⁷ Além disso, as hidrazonas são consideradas bons agentes quelantes de metais, podendo ser empregadas no tratamento de desordens genéticas como talassemia, e no tratamento de desordens neurodegenerativas como a doença de Alzheimer.^{48,49}

³⁷J. R. Anaconda, M. Rincones, *Spectrochim. Acta, Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 141 (2015) 169–175.

³⁸G. Prakash, R. Ramachandran, M. Nirmala, *Inorg. Chim. Acta.* 427 (2015) 203–210.

³⁹P. Rawat, R. N. Singh, A. Ranjan, S. Ahmad, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 179 (2017) 1–10.

⁴⁰T. F. Da Silva, W. B. Júnior, M. S. Alexandre-Moreira, F. N. Costa, C. E. Da Silva Monteiro, F. F. Ferreira, R. C. R. Barroso, F. Noël, R. T. Sudo, G. Zapata-Sudo, L. M. Lima, E. J. Barreiro, *Molecules*, 20 (2015) 3067–3088.

⁴¹G. Zapata-Sudo, I. K. da C. Nunes, J. S. C. Araujo, J. S. da Silva, M. M. Trachez, T. F. da Silva, F. P. da Costa, R. T. Sudo, E. J. Barreiro, L. M. Lima, *Drug Des. Devel. Ther.* 10 (2016) 2869–2879.

⁴²C. Loncle, J. Michel, N. Vidal, M. Dherbomez, Y. Letourneux, *Eur. J. Med. Chem.* 39 (2004) 1067–1071.

⁴³B. Narasimhan, P. Kumar, D. Sharma, *Acta Pharma. Sci.* 52 (2010) 169–180.

⁴⁴D. N. Do Amaral, B. C. Cavalcanti, D. P. Bezerra, P. M. P. Ferreira, R. P. De Castro, J. R. Sabino, C. M. L. Machado, R. Chammas, C. Pessoa, C. M. R. Sant'Anna, E. J. Barreiro, L. M. Lima, *PLoS ONE*. 9 (2014) e85380.

⁴⁵L. Popiołek, A. Biernasiuk, *Saudi Pharm. J.* 25 (2017) 1097–1102.

⁴⁶M. Krátký, S. Bösze, Z. Baranyai, J. Stolaříková, J. Vinšová, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 27 (2017) 5185–5189.

⁴⁷T.H. Cachiba, B.D. Carvalho, D.T. Carvalho, M. Cusinato, C.G. Prado, *Quim. Nova.* 35 (2012) 1566–1569.

⁴⁸T.A. Yousef, G.M.A. El-reash, M. I. Attia, M.N. El-tabai, *Chem. Phys. Lett.* 636 (2015) 180–192.

⁴⁹A.A.R. Despaigne, J.G. Da, A. Cerúlia, M. Carmo, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, *Inorg. Chim. Acta.* 362 (2009) 2117–2122.

Uma excelente estratégia para o desenvolvimento de novos fármacos é associar as propriedades farmacológicas de ligantes, tais como hidrazonas, aos íons metálicos. A complexação pode resultar em compostos mais ativos com diferentes propriedades farmacológicas ou com novos mecanismos de ação e até mesmo atuar como um carreador do ligante para seu alvo biológico. Com essa finalidade, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a estudar a influência da complexação de hidrazonas nas suas atividades biológicas.

Em alguns estudos, os efeitos da coordenação das hidrazonas a íons metálicos foram bem satisfatórios, como é o caso dos complexos de Sb(III) (Figura 1.4C) que provaram ser eficientes para melhorar a atividade antifúngica contra *Candida spp.*,⁵⁰ enquanto que complexos de Bi(III) mostraram-se mais seletivos para espécies de bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Por outro lado, as 2-acetil- e 2-benzoilpiridina hidrazonas mostraram-se ativas contra células de glioma maligno U87 e T98 e, pela coordenação ao Ga(III) a sua ação citotóxica mostrou-se ainda mais pronunciada, principalmente contra células U87 (Figura 1.4D).⁵¹

Em outro trabalho, complexos de Co(III) com 2-acetilpiridina hidrazonas apresentaram resultados interessantes do ponto de vista do desenvolvimento de pró-drogas biorredutíveis, podendo funcionar como carreadores do agente ativo, melhorando a seletividade do mesmo, principalmente em região de hipóxia.⁵² Complexos de Re(I) com as mesmas hidrazonas apresentaram atividade antiproliferativa *in vitro* frente a células de carcinoma pulmonar humano (NCI-H460) (Figura 1.4E). Em alguns casos, foi observado que os complexos induziram apoptose com subsequente ruptura mitocondrial e exibiram alta atividade antioxidante.⁵³

Complexos de *trans*-4-estilbenocarboxaldeído hidrazonas com Ag(I) revelaram ser citotóxicos como a cisplatina contra células de melanoma metastático (B16F10) e menos citotóxicos que a cisplatina para células não tumorais de melanócitos (Melan-A), indicando que esses compostos causam menos danos em células saudáveis, uma característica importante a ser considerada em novos candidatos a agentes antitumorais. Os compostos ainda foram capazes de interagir com albumina sérica bovina (BSA), e parecem se intercalar entre as bases nitrogenadas do DNA.⁵⁴ A partir desses estudos, novas perspectivas na terapia de doenças se abrem com a inserção de complexos metálicos com hidrazonas como possíveis agentes terapêuticos.

⁵⁰E.D.L. Piló, A.A. Recio-Despaigne, J.G. Da Silva, I.P. Ferreira, J. A. Takahashi, H. Beraldo, *Polyhedron*. 97 (2015) 30–38.

⁵¹A.A.R. Despaigne, G.L. Parrilha, J.B. Izidoro, R. Pryscila, G. Raquel, O.E. Piro, E.E. Castellano, W.R. Rocha, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 50 (2012) 163–172.

⁵²C.V. Garcia, G.L. Parrilha, B.L. Rodrigues, P. J.S. Barbeira, R. M. Clarke, T. Storr, H. Beraldo, *Polyhedron*. 124 (2017) 86–95.

⁵³C. V. Garcia, G. L. Parrilha, B. L. Rodrigues, S. F. Teixeira, R. A. Azevedo, A. K. Ferreira, H. Beraldo, *New J. Chem.* 40 (2016) 7379–7387.

⁵⁴L.V. Tamayo, A.F. Santos, I.P. Ferreira, V.G. Santos, M.T.P. Lopes, H. Beraldo, *BioMetals*. 30 (2017) 379–392.

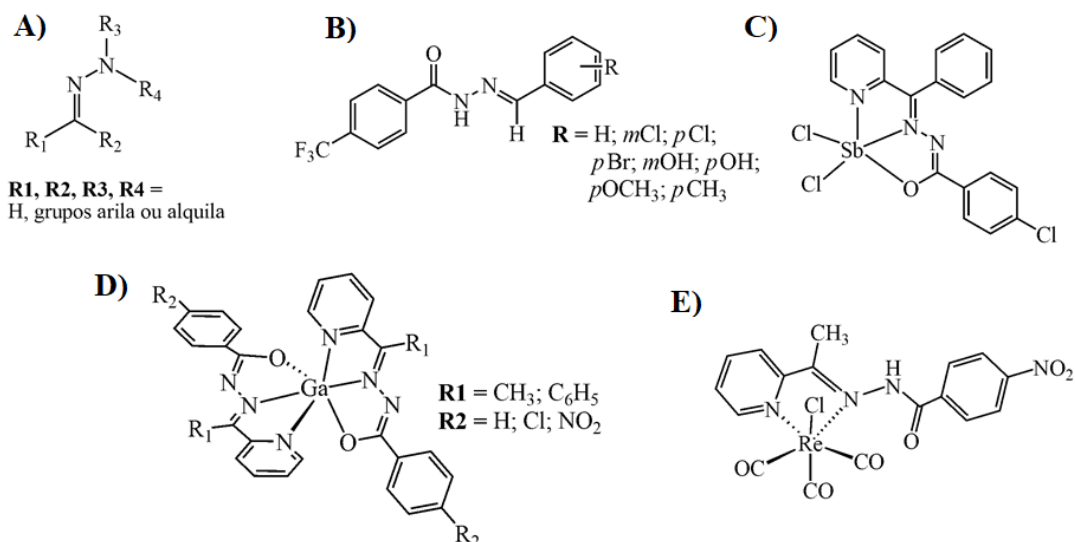


Figura 1.4 – A) Estrutura genérica das hidrazonas; B) 4-(trifluorometil) benzo-hidrazida hidrazona C) 2-benzoilpiridina-*para*-cloro-fenilhidrazonato(dicloro)antimônio(III); D) Complexos de Ga(III) com 2-acetil- e 2-benzoilpiridina hidrazonas; E) (2-Acetilpiridina-*para*-nitro-fenil-hidrazona)cloro(tricarbonil)rênio(I).

1.4. O uso terapêutico de compostos de prata

A prata é um elemento químico de símbolo Ag (em razão da origem do seu nome, que vem do latim *argentum*) e de número atômico 47 e configuração eletrônica [Kr] 4d¹⁰5s¹.⁵⁵ A prata metálica ioniza-se facilmente na presença de água e fluídos corporais (sangue), onde os íons prata podem ser direcionados nas células para exercerem sua ação farmacológica.⁵⁶ Seu estado de oxidação mais comum é +1.⁵⁷ Embora sejam conhecidos alguns poucos compostos onde a prata possui estado de oxidação +2 e +3, somente compostos com estado de oxidação +1 são suficientemente estáveis para serem relevantes como agentes terapêuticos.⁵⁶

As propriedades farmacológicas da prata e de seus compostos são conhecidas e investigadas por muitos anos. As primeiras referências da utilização da prata na medicina para fins terapêuticos, surgiram na Idade Média, quando os egípcios, gregos e romanos usavam vasos de prata para armazenar água, mas sem nenhum conhecimento prévio do efeito do metal na esterilização da água.⁵⁸ Hipócrates (460-370 aC), o pai da medicina, prescreveu preparações de prata para o tratamento de

⁵⁵J.D. Lee, *Química inorgânica não tão concisa*. 5ª ed. Edgard Blücher Ltda, 1999, 415–418p.

⁵⁶G.D.D. Souza, M.A. Rodrigues, P.P. Silva, W. Guerra, *Educación Química*. 24 (2013) 14–16.

⁵⁷D.F. Shriver, P. W. Atkins, *Química Inorgânica*. 3ª ed. Bookman, 2003, 192–196p.

⁵⁸R.E.F.D. Paiva, C. Abbehausen, A. F. Gomes, F. C. Gozzo, W. R. Lustrí, A. L. B. Formiga, P. P. Corbi, *Polyhedron*. 36 (2012) 112–119.

úlceras e para promover a cicatrização de feridas, mas foram os romanos que relataram o primeiro sal de prata (AgNO_3) para fins medicinais em 69 a.C.⁵⁹

Em 1884, o obstetra alemão Karl Crede, introduziu o uso de solução 0,5-1,0% de AgNO_3 , para reduzir a incidência de infecções oculares neonatais. Desde então, a ação antimicrobiana da prata destacou-se na prática clínica. Somente em 1920, foi aprovada a comercialização de soluções de 5% para a utilização como antisséptico. Entretanto, com a introdução da penicilina, um antibiótico de amplo espectro, o uso de compostos de prata para o tratamento de infecções bacterianas reduziu drasticamente.^{60,61}

Nas décadas posteriores, problemas de resistência bacteriana associado ao uso intensivo dos antibióticos disponíveis levou à busca de novas formulações terapêuticas. Então, as pesquisas ressurgiram em 1960 com Moyer e colaboradores introduzindo novamente o uso de soluções de AgNO_3 (0,5%) para o tratamento de infecções bacterianas causadas por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* em pacientes com queimaduras e feridas de pele.^{62,63} Porém, o uso do AgNO_3 apresentou algumas desvantagens como a queda acentuada na concentração dos íons sódio e cloreto no sangue, assim como a presença elevada de prata nos rins, fígado e músculos dos pacientes. Mediante a esse problema, em 1968, Fox e colaboradores combinaram o AgNO_3 com a sulfadiazina, dando origem a sulfadiazina de prata (Figura 1.5A), um agente antibacteriano para uso principalmente contra *Pseudomonas aeruginosa*, microrganismo comumente encontrado em infecções de pele.⁵⁸ O uso clínico da sulfadiazina de prata foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) em 1970 e ainda hoje é um metalofármaco de primeira escolha em centros de queimados pelo mundo, sendo comercializada na forma de 1% de creme ou suspensão aquosa (Dermazine® ou Silvadene®).⁶⁴

Ao longo dos anos a notável ação antimicrobiana da sulfadiazina de prata instigou a aplicação da prata em diferentes áreas da medicina, tais como na produção de dispositivos médicos, que inclui próteses ósseas, suturas cirúrgicas e agulhas, implantes cardíacos e cateteres, dentre outros, e na odontologia, na forma de amalgamas dentárias.⁶⁵ Além disso, complexos de Ag(I) com uma variedade de ligantes orgânicos provaram não somente ter ação antibacteriana, mas efeitos antiproliferativos e

⁵⁹A.B.G. Lansdown, *Biofunctional Textiles and the Skin*. Karger, 2006, 17–34p.

⁶⁰D.J. Barillo, D. E. Marx, *Burns*. 40 S (2014) S3-S8.

⁶¹C. Abbehausen, T.A. Heinrich, E.P. Abrão, C.M. Costa-Neto, W.R. Lustrì, A.L.B. Formiga, P.P. Corbi, *Polyhedron*. 30 (2011) 579–583.

⁶²H.J. Klasen, *Burns*. 26 (2000) 131-138.

⁶³J.Y. Maillard, P. Hartemann, *Crit. Rev. Microbiol.* 39 (2012) 373–383.

⁶⁴C. L. Fox, S. M. Modak, *Antimicrob. Agents Chemother.* 5 (1974) 582–588.

⁶⁵A. B.G. Lansdown, *Biofunctional Textiles and the Skin*. Karger, 2006, 17–34p

antitumorais,⁶⁶ bem como ação antifúngica⁶⁷ e antituberculose,⁶⁸ possibilitando novas aplicações terapêuticas.

Em alguns estudos os autores relatam que a ação farmacológica exibida pelos compostos de prata é exclusiva dos íons Ag(I). Embora o mecanismo de ação dos íons Ag(I) não seja devidamente compreendido e raramente abordado na literatura, o efeito desses íons pode ser observado através de mudanças estruturais e morfológica nas células. Os três possíveis mecanismos de ação propostos são: (1) inibição das funções de transporte na parede celular (respiração); (2) interrupção do metabolismo da célula (mudança na estrutura das enzimas) e (3) inibição da divisão celular (interação com DNA).⁶⁹

Recentemente mostrou-se que um complexo de Ag(I) com *bis*(carbeno N-heterocíclico) (Figura 1.5B) provocou danos na estrutura do DNA por diferentes mecanismos incluindo inibição das enzimas topoisomerase I e tioredoxina redutase (TrxR), e indução na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso, o complexo revelou-se como potente inibidor da enzima poli-(ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1), que é essencial no processo de reparo do DNA, inibiu seletivamente a glicólise de células de carcinoma de ovário (A2780 e OVCAR3) e ocasionou morte celular *via* apoptose. Os danos causados no DNA foram consistentes para melhorar a ação citotóxica preferencialmente contra linhagens celulares A2780 resistentes a cisplatina, tornando esse complexo um promissor agente antitumoral.⁷⁰ Por outro lado, estudos mecanísticos envolvendo complexos de Ag(I) com *bis*(difenilfosfino) alcanos (Figura 1.5C) revelaram indução da apoptose de células de adenocarcinoma de pulmão (A549) e de mama (MCF-7), evidenciado por mudanças morfológicas nas células e associado a produção excessiva de ROS.⁷¹

Em outro estudo, a incorporação da Ag(I) nas estruturas dos ligantes ftalazina (Figura 1.5D) e quinazolina (Figura 1.5E) proporcionou o aumento da atividade antibacteriana contra isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* e atuaram como agentes intercalantes do gDNA, inibindo assim sua replicação.⁷²

⁶⁶C.N. Banti, S.K. Hadjidakou, *Metallomics*. 5 (2013) 569–596.

⁶⁷J.M.S. Cardoso, S.I. Guerreiro, A. Lourenço, M.M. Alves, M.F. Montemor, N.P. Mira, J.H. Leitão, M.F.N.N. Carvalho, *PLoS ONE*. 12 (2017) e0177355.

⁶⁸D.F. Segura, A.V.G. Neto, R.C.G. Frem, A. E. Mauro, P.B.D. Silva, J.A. Fernandes, F.A.A. Paz, A.L.T. Dias, N.C. Silva, *Polyhedron*. 79 (2014) 197–206.

⁶⁹M. Cavicchioli, A. C. Massabni, T. A. Heinrich, C. M. C. Neto, E. P. Abrão, B. A. L. Fonseca, E. E. Castellano, P. P. Corbi, W. R. Lustri, C. Q. F. Leite, *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 533–540.

⁷⁰S.J. Allison, M. Sadiq, E. Baronou, P.A. Cooper, C. Dunnill, N.T. Georgopoulos, A. Latif, S. Shepherd, S.D. Shnyder, I.J. Stratford, R.T. Wheelhouse, C.E. Willans, R.M. Phillips, *Cancer Lett.* 403 (2017) 98–107.

⁷¹V.T. Yilmaz, C. Icel, J. Batur, S. Aydinlik, P. Sahinturk, M. Aygun, *Eur. J. Med. Chem.* 139 (2017) 901–916.

⁷²B. D. Glišić, L. Senerovic, P. Comba, H. Wadepohl, A. Veselinovic, D. R. Milivojevic, M. I. Djuran, J. N. Runic, *J. Inorg. Biochem.* 155 (2016) 115–128.

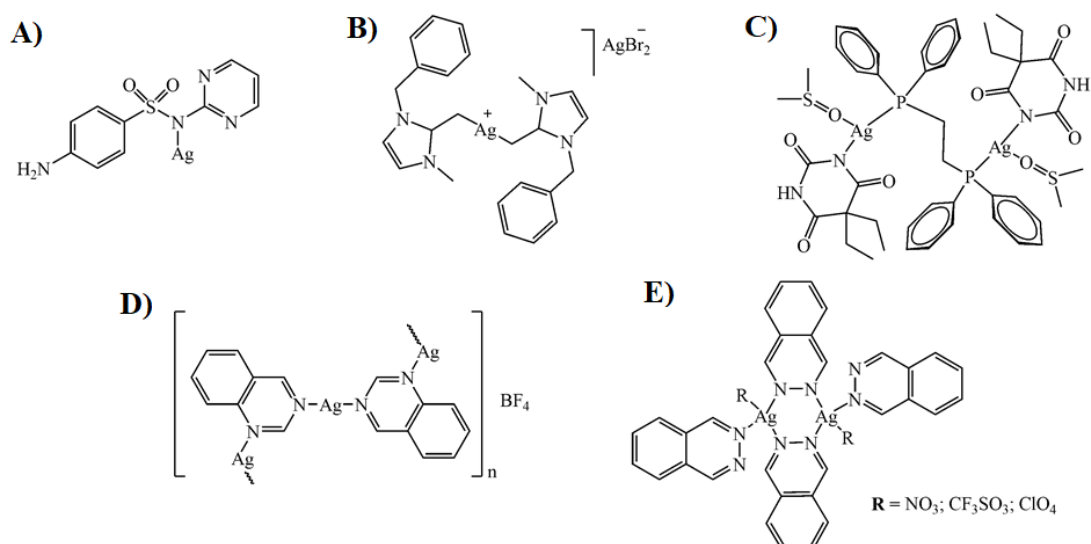


Figura 1.5 – A) Sulfadiazina de prata(I); B) Complexo de Ag(I) com *bis*(carbeno N-heterocíclico) $[Ag(NHC)_2AgBr_2]$; C) Complexo de Ag(I) com *bis*(difenilfosfino) alcanos $[Ag_2(barb)_2(mdpp)(DMSO)_2]$; D) Complexo de Ag(I) com ftalazina $\{[Ag(qz-N)][BF_4]\}_n$; E) Complexos de Ag(I) com quinazolina $\{[Ag(R-O)(phtz-N)](\mu-phtz-N,N')_2\}$.

1.5. Principais alvos biológicos de metalofármacos

Os metalofármacos comumente exercem seu efeito biológico pela interação seletiva com uma determinada biomolécula alvo, como enzimas, proteínas e ácidos nucleicos. O grau de afinidade e especificidade da interação são determinados por forças intermoleculares (eletrostáticas, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações covalentes). A propensão dos metais em perder elétrons é uma característica importante, pois é na forma catiônica que os metais desempenham suas principais funções biológicas.⁷³

A química supramolecular envolvendo as interações entre complexos metálicos com alvos biológicos específicos é fundamental na compreensão dos possíveis mecanismos de ação e farmacocinética dos compostos. O processo de interação com proteínas transportadoras, como as albuminas séricas é essencial para o direcionamento do fármaco no alvo terapêutico, assim como a interação com DNA, que é o principal alvo celular de muitos agentes antitumorais. De fato, a hipótese de que íons metálicos são aptos a atingir alvos biológicos, tais como albuminas e o DNA é lógica do ponto de vista científico e terapêutico.⁷⁴ Nesse sentido, como o presente trabalho envolveu a obtenção de novos complexos de prata(I) como candidatos a agentes antifúngicos e antitumorais, suas habilidades em interagir com biomoléculas foram investigadas.

⁷³A.M.C. Benite, S.P. Machado, E.J. Barreiro, *Quim. Nova.* 30 (2007) 2062–2067.

⁷⁴M. Sakthi, A. Ramu, *Synthesis*, structure, *J. Mol. Struct.* 1149 (2017) 727–735.

1.5.1. Albumina sérica humana (HSA)

No planejamento de novos fármacos é crucial que a etapa inicial envolva o estudo de interação dos compostos com proteínas, como a albumina sérica. No organismo, a albumina é responsável por diversas funções biológicas, das quais destacam-se as ações de armazenar, transportar, metabolizar e excretar ampla gama de ligantes exógenos e endógenos através da formação de adutos.^{75,76} Dentre as proteínas, a albumina sérica humana (HSA) é a mais abundante no plasma sanguíneo e desempenha papel importante na regulação da pressão osmótica no sangue e no transporte de numerosos compostos, tais como fármacos, íons metálicos, ácidos graxos, hormônios e aminoácidos. Por essa razão, a potencial ligação de fármacos à HSA trata-se de um fator importante para compreensão da farmacocinética e farmacodinâmica.^{77,78}

A estrutura da HSA é amplamente estudada e as regiões de ligações preferenciais de fármacos têm sido caracterizadas por cristalografia. Essa proteína é constituída por uma única cadeia polipeptídica contendo em sua sequência 585 resíduos de aminoácidos, sendo 17 grupos de tirosina e apenas um fragmento de triptofano (Trp-214). Os principais sítios de ligação são classificados em três grandes domínios estruturalmente similares, denominados de I, II e III, e cada domínio contém dois subdomínios, classificados de A e B (Figura 1.6).⁷⁹ A maioria dos agentes terapêuticos ligam-se preferencialmente nos sítios I (subdomínios IIA) e sítio II (subdomínio IIIA) da proteína e, geralmente, essas interações são atribuídas às ligações não-covalentes como ligações de hidrogênio, van der Waals, eletrostática e hidrofóbica.^{80,81} Shahsavani *et al.*, sugeriram que fármacos com caráter mais hidrofóbico possuem maior afinidade pelo sítio de ligação I, como é o caso da Varfarina (agente anticoagulante). Por outro lado, fármacos que são capazes de formar ligações de hidrogênio e interação eletrostática são mais atraídos pelo sítio de ligação II, como por exemplo o ibuprofeno (agente anti-inflamatório).⁸²

A albumina humana apresenta uma fluorescência intrínseca associada a três aminoácidos principais: triptofano, tirosina e fenilalanina. Dentre esses fragmentos, a emissão dos resíduos de triptofano é a mais significativa. Assim, a interação de fármacos no sítio de ligação I, normalmente, é investigada *in vitro* por meio das propriedades fluorescentes do resíduo Trp-214 da HSA, que está

⁷⁵T. Peters Jr, A. J. Stewart, *Biochim. Biophys. Acta.* 1830 (2013) 5351–5353.

⁷⁶D. Sleep, J. Cameron, L.R. Evans, *Biochim. Biophys. Acta.* 1830 (2013) 5526–5534.

⁷⁷M. Otagiri, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 20 (2005) 309–323.

⁷⁸G. Fanali, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, *Mol. Aspects Med.* 33 (2012) 209–290.

⁷⁹M.B. Moreira, D.S. Franciscato, K.C.F. Toledo, J.R.B.D. Souza, H.S. Nakatani, V.R.D. Souza, *Quim. Nova.* 38 (2015) 227–232

⁸⁰Y. Wang, H. Yu, X. Shi, Z. Luo, D. Lin, M. Huang, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 15980–15987.

⁸¹Z. Kazemi, H. Amiri, M. Sahihi, V. Mirkhani, M. Moghadam, S. Tangestaninejad, I.M. Baltork, G.Azimi, S. Gharaghani, A.A. Kajani, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 163 (2016) 246–260.

⁸²M.B. Shahsavani, S. Ahmadi, M.D. Aseman, S. M. Nabavizadeh, M.M. Alavianmehr, R. Yousefi, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 164 (2016) 323–334.

um sulco maior e um sulco menor que favorecem sítios para ligação de pequenas moléculas (fármacos).⁸⁶

O DNA apresenta variações estruturais dependentes do meio onde se encontra e sua interação com moléculas bioativas pode modificar a expressão genética (processo de transcrição), causar alterações no crescimento e divisão celular (processo de replicação), bem como inibir as enzimas responsáveis por reparar os danos e assim resultar na morte celular por apoptose.⁸⁷ A maioria dos fármacos utilizados clinicamente que interagem com o DNA provocam danos irreversíveis e/ou reversíveis e podem ligar-se de forma covalente ou não-covalente ao DNA.⁸⁸

As interações covalentes geralmente ocorrem através de ligações diretas entre o fármaco e as bases nitrogenadas ou grupos fosfatos do DNA. Como mencionado na seção 1.2.1, o mecanismo de ação da cisplatina está relacionado com a inibição seletiva da síntese do DNA por meio da ligação cruzada inter e/ou intra-fitas que induzem alterações estruturais. Neste caso, a formação de adutos covalentes na interação cisplatina-DNA são os principais responsáveis pela inibição da proliferação de células tumorais.⁸⁷

Por outro lado, as interações não-covalentes podem ocorrer de três formas: (a) *interações eletrostáticas* – ocorrem devido a interação entre espécies carregadas positivamente com grupos fosfatos carregados negativamente situados na parte exterior da dupla hélice;⁸⁹ (b) *interação nos sulcos do DNA* – a estrutura dos compostos que interagem nos sulcos é caracterizada por anéis aromáticos conectados por ligações que possuem liberdade de movimento e torção. A interação supramolecular não causa mudanças estruturais significativas no DNA e, geralmente é estabilizada por interações hidrofóbicas;⁸⁸ (c) *intercalação* – é o processo de inserção de moléculas entre os pares de bases nitrogenadas adjacentes da estrutura do DNA. O complexo formado é estabilizado por sobreposição de elétrons π juntamente com outras interações não covalentes, tais como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações de van der Waals. A intercalação resulta no alongamento, enrijecimento e desenrolamento na torção da dupla hélice do DNA.⁹⁰

Estudos mais recentes sobre os agentes quimioterápicos que se intercalam com o DNA revelam que essa associação supramolecular é característica de moléculas planares com sistemas de anéis aromáticos fundidos de alta densidade eletrônica. A actinomicina D, isolado de *Streptomyces*, é um exemplo de agente antitumoral com tais propriedades estruturais usada clinicamente em tumores de testículo, sarcomas e neuroblastomas. Esse fármaco pertence à classe das actinomicinas, antibióticos naturais, atuando na inibição da síntese do DNA e RNA ribossômico, assim como na

⁸⁶B.J. Pages, D.L. Ang, E.P. Wright, J.R. Aldrich-Wright, *Dalt. Trans.* 44 (2015) 3505–3526.

⁸⁷K. Smerkova, T. Vaculovic, M. Vaculovicova, J. Kynicky, M. Brtnicky, T. Eckschlager, M. Stiborova, J. Hubalek, V. Adam, *Anal. Biochem.* 539 (2017) 22–28.

⁸⁸K. Mišković, M. Bujak, M. Baus Lončar, L. Glavaš-Obrovac, *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 64 (2013) 593–602.

⁸⁹S.U. Rehman, T. Sarwar, M.A. Husain, H.M. Ishqi, M. Tabish, *Arch. Biochem. Biophys.* 576 (2015) 49–60.

⁹⁰E. Jayanthia, S. Kalaiselvi, V.V. Padmab, N.S.P. Bhuvaneshc, *Inorg. Chim. Acta.* 429 (2015) 148–159.

interação no sulco menor do DNA formando ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. O resultado desses dois modos de ação (intercalação e ligação no sulco menor) é a formação de um complexo estável com elevada ação antitumoral (Figura 1.7).⁹¹

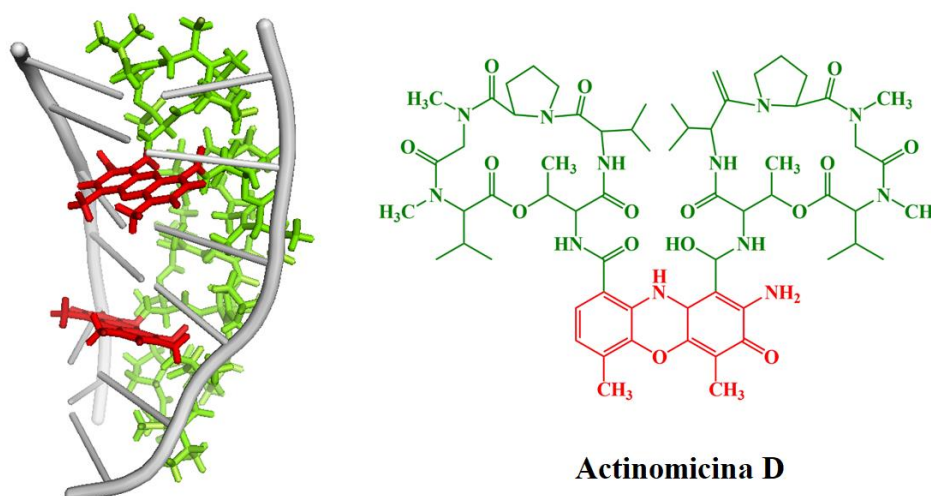


Figura 1.7 – Interação entre o fármaco Actinomicina D e o DNA mostrando os mecanismos de intercalação e ligação no sulco menor (PDB ID: 1FJA). A ilustração foi gerada usando PyMOL.

Outros agentes intercaladores típicos incluem fenantrolinas, fenantridina, acridinas, antraquinonas e antracenos. A incorporação de metais de transição na estrutura desses intercaladores tem sido uma estratégia inovadora na tentativa de aumentar a afinidade de ligação frente ao DNA, auxiliar no transporte do fármaco e/ou alterar a seletividade de seus adutos no DNA. Sendo assim, o estudo da interação metalintercaladores-DNA é de extremo interesse, pois tem apresentado implicações na regulação de ativadores e repressores da expressão gênica *in vivo* e na inibição da transcrição, o que pode dificultar a replicação e crescimento de células doentes.⁹²

1.6. Objetivos do presente trabalho

O desenvolvimento de novos metalofármacos promissores na terapia de doenças tem impulsionado as pesquisas em diversas áreas. Como mencionamos, hidrazonas e seus complexos metálicos apresentam amplo perfil farmacológico. A estratégia de aliar as propriedades terapêuticas das hidrazonas às da prata(I), procurando-se obter, seja um efeito sinérgico metal-ligante, seja uma liberação lenta da prata no meio biológico, pareceu-nos interessante. Além disso, encontram-se poucos trabalhos na literatura científica sobre os aspectos farmacológicos de complexos de prata(I)

⁹¹M. Hasanzadeh, N. Shadjou, *Mater. Sci. Eng. C*. 61 (2016) 1002–1017.

⁹²B.J. Pages, D.L. Ang, E.P. Wright, J.R. Aldrich-Wright, *Dalt. Trans.* 44 (2015) 3505–3526.

com hidrazonas. Desse modo, no presente trabalho pretendeu-se a obtenção e avaliação das atividades antifúngicas e citotóxicas de complexos de prata(I) com hidrazonas derivadas de 2-acetil- e 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas e de 2,6-diacetilpiridina *bis*(benzoil-hidrazonas).

Uma etapa fundamental na concepção de novos metalofármacos é o estudo dos possíveis mecanismos de ação. Sendo assim, realizou-se estudos da interação dos complexos de prata(I) com a albumina sérica humana (HSA), proteína responsável pelo direcionamento de fármacos a um sítio específico, bem como da interação com DNA, alvo terapêutico de muitos agentes antitumorais.

Os objetivos específicos do presente trabalho compreendem:

- (1) Síntese e caracterização de complexos de prata(I) com 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas, 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas e 2,6-diacetilpiridina *bis*(benzoil-hidrazonas);
- (2) Estudos teóricos da natureza das ligações entre centro metálico, hidrazonas e íon nitrato dos complexos de prata(I) (**5-8**);
- (3) Avaliação das atividades antifúngicas dos compostos frente as espécies de *Candida* e fungos filamentosos;
- (4) Investigação dos efeitos citotóxicos e índices de seletividade das 2-acetil- e 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas e seus complexos (**1-7**) contra células de melanoma metastático (B16F10) e melanócitos não-tumorigênicos (Melan-A);
- (5) Estudos de relações estrutura-atividade (SAR) das 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas e seus complexos (**1-4**);
- (6) Avaliação da capacidade dos complexos de prata(I) em interagir com albumina sérica humana (HSA) e o ácido desoxirribonucleico (DNA).

Capítulo 2 – Parte experimental

2.1. Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram adquiridos das empresas Aldrich, Alfa Aesar, Fluka, Merck, Synth, Vetec, Quimex e Strem Chemicals. Os solventes deuterados foram de procedência CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc).

2.2. Técnicas experimentais de caracterização

2.2.1. Temperaturas de Fusão

A determinação das temperaturas de fusão dos compostos foi realizada no aparelho digital Micro-Química Equipamentos LTDA modelo MQAPF302 pertencente ao laboratório da Prof^a. Dr^a Lucienir Pains Duarte no Departamento de Química da UFMG.

2.2.2. Análise elementar (CHN)

As análises elementares de CHN foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP) e no Departamento de Química da UFMG. Em ambos os casos, utilizou-se o equipamento Perkin Elmer, modelo CHN 2400 Elemental Analyser.

2.2.3. Análise termogravimétrica (TG)

As curvas termogravimétricas dos complexos foram obtidas na Termobalança Shimadzu-TGA50H do Departamento de Química da UFMG. Os experimentos foram realizados em atmosfera de N₂, com razão de aquecimento de 10°C min⁻¹. A faixa de temperatura utilizada foi de 25 a 750 °C.

2.2.4. Análises condutimétricas

As medidas de condutividade molar foram realizadas em um condutivímetro YSI Conductivity Bridge, modelo 31, com célula condutimétrica de constante 0,088 cm⁻¹. As soluções dos complexos foram preparadas na concentração de 1,0 mM, utilizando-se solventes de grau espectroscópico, dimetilsulfóxido (DMSO) ($\Lambda_M = 7,0 \mu\Omega$) e/ou dimetilformamida (DMF) ($\Lambda_M = 3,0$

$\mu\Omega$). Os resultados foram analisados conforme a atribuição sugerida na literatura por Geary (1971),¹ a qual é apresentada na tabela 2.1. As condutividades molares do AgNO_3 em DMF e DMSO foram utilizadas para comparação com as medidas obtidas para os complexos de prata(I).

Tabela 2.1 – Atribuição do tipo de eletrólito para soluções de concentração de 1,0 mM.

Tipo de eletrólito	$\Lambda_M (\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1})$	
	DMF	DMSO
Não-eletrólito	< 65	< 50
1:1	65 – 90	50 – 70
2:1	130 – 170	70 – 110
3:1	200 – 240	> 110
AgNO_3 1:1	65	55

2.2.5. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros de IV foram obtidos utilizando um espectrômetro Perkin Elmer FT-IR System-Spectrum GX, pertencente ao Departamento de Química da UFMG. Os espectros foram registrados na região $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ empregando pastilhas de KBr.

2.2.6. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, DEPT 135 (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*), COSY (*Homonuclear Correlation Spectroscopy*), HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) foram obtidos nos espectrômetros Bruker DRX-400 AVANCE (400 MHz) e Bruker AVANCE DPX-200 (200 MHz) à temperatura ambiente. Os equipamentos estão localizados no Laboratório de Ressonância Magnética (LAREMAR) do Departamento de Química da UFMG. As soluções foram preparadas em tubos de 5 mm de diâmetro externo, utilizando-se $\text{DMSO-}d_6$ como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Em alguns casos, a referência interna foi o sinal residual do próprio solvente deuterado.

2.2.7. Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS)

Os espectros de massas foram obtidos no laboratório de Espectrometria de Massas do Departamento de Química (UFMG) utilizando um espectrômetro de massas Shimadzu® LCMS-IT-TOF (225-07100-34) equipado com: degaseificador modelo DGU-20A3, duas bombas modelo LC-

¹J. W Geary, *Coord. Chem. Rev.* 7 (1971) 81-122.

20AD, autosampler modelo SIL-20A, e módulo comunicador CBM-20A. Cerca de 1mg das amostras foram previamente diluídas em DMSO. Após a solubilização, 10 μL dessas soluções foram transferidas para um vial e completadas com 1000 μL de metanol e introduzidas no equipamento por injeção direta. Todos os solventes utilizados foram de grau espectroscópico. 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). Os experimentos foram realizados com temperatura do bloco de aquecimento de 200°C, voltagem no capilar de 4,5 kV e tensão no detector de 1,76 kV. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio e empregou-se um fluxo de 0,15 mL/min e um volume de injeção de 3 μL . Os espectros de massas foram obtidos em um intervalo de m/z 100-1000.

2.2.8. Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

Os estudos de estabilidade dos complexos em solução foram realizados por espectroscopia eletrônica utilizando um espectrofotômetro HP8453 *diode array* – Hewlett Packard e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. As soluções dos complexos foram preparadas na concentração de 10^{-4} a 10^{-5} mol L^{-1} em 5% de DMSO e tampão Tris-HCl (NaCl 50 mM/Tris-HCl 5 mM, pH 7,2) ou DMSO puro (grau espectroscópico). Os espectros eletrônicos foram registrados na faixa de 200-800 nm em função do tempo de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120 minutos e após 24 e 48 horas.

2.2.9. Espectroscopia de fluorescência

Os espectros de fluorescência foram registrados em um espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse, usando uma célula de quartzo de 1 cm de caminho óptico. O preparo das soluções estoques dos compostos e as condições detalhadas de cada análise estão descritas na seção 2.5 deste capítulo.

2.2.10. Cristalografia por difração de raios X

As estruturas cristalográficas dos complexos de prata(I) foram determinadas com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Basílio Pinheiro e da Dra. Isabella Pires Ferreira. Os dados cristalográficos foram coletados no laboratório de cristalografia do Departamento de Física da UFMG (LabCri). Todas as medidas de difração de raios X em monocristal foram realizadas em um difratômetro Oxford GEMINI Ultra, utilizando radiação $K\alpha\text{Mo}$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$), nas temperaturas de 270 K (**1-4a**), (**5**) e (**7**), 120 K (**6**) e 200 K (**10**) e (**11**). Para coleta dos dados, refinamento de célula e redução dos dados utilizou-se o programa CrysAlis Pro.² As correções de absorção analítica foram

²CrysAlisPro: Version 1.171.38.43 (Rigaku OD), Oxford Diffraction, Yarnton, England, 2015.

realizadas utilizando o programa *CRYSTALIS* suíte.² As estruturas dos complexos foram resolvidas por métodos diretos usando *SUPERFLIP*³ ou no caso dos complexos (**2a**) e (**6**) usando *SIR92*⁴ e refinadas pelo método de mínimos quadrados F^2 usando *SHELXL-2017/1*.⁵ Os parâmetros posicionais e deslocamentos anisotrópicos foram refinados para todos os átomos diferentes de hidrogênio, exceto para os átomos desordenados, que foram refinados com parâmetros de deslocamento isotrópico.⁶ Os átomos de hidrogênio ligados aos átomos de carbono e de nitrogênio foram adicionados às estruturas dos compostos em posições geometricamente idealizadas e foram refinados usando um modelo de corpo rígido.⁶ As estruturas cristalográficas dos complexos foram preparadas utilizando ORTEP-3 para Windows.⁷ Os dados cristalográficos foram depositados no Centro de Dados Cristalográficos da Cambridge (CCDC).⁸

2.3. Síntese dos ligantes e complexos de prata(I)

2.3.1. Síntese de 2-acetil- e 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas

Os compostos 2-acetilpiridina-benzoil-hidrazona (H2AcPh), 2-acetilpiridina-*para*-metilbenzoil-hidrazona (H2AcpCH₃Ph), 2-acetilpiridina-*para*-cloro-benzoil-hidrazona (H2AcpClPh), 2-acetilpiridina-*para*-nitro-benzoil-hidrazona (H2AcpNO₂Ph), 2-benzoilpiridina-benzoil-hidrazona (H2BzPh), 2-benzoilpiridina-*para*-metilbenzoil-hidrazona (H2BzpCH₃Ph), 2-benzoilpiridina-*para*-cloro-benzoil-hidrazona (H2BzpClPh) e 2-benzoilpiridina-*para*-nitro-benzoil-hidrazona (H2BzpNO₂Ph) foram obtidos a partir de reações de condensação, conforme reportado na literatura.^{9,10}

Para a síntese das hidrazonas, em um balão de fundo redondo foram adicionados 1 mmol de 2-acetil- e / ou 2-benzoilpiridina com quantidades equimolares da hidrazida desejada dissolvida em metanol (20 mL). Em seguida, à mistura reacional foram adicionadas três gotas de ácido acético, como catalisador. A reação foi mantida sob refluxo com constante agitação por 6 horas. Após este tempo, a reação foi resfriada à temperatura ambiente. Os sólidos obtidos foram filtrados e lavados com metanol e éter etílico, e secados sob vácuo (Figura 2.1).

³L. Palatinus, G. Chapuis, *J. Appl. Crystallogr.* 40 (2007) 786–790.

⁴A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, M. C. Burla, G. Polidori, M. Camalli, *J. Appl. Crystallogr.* 27 (1994) 435–435.

⁵G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* 71 (2015) 3–8.

⁶C. K. Johnson, in *An introduction to thermal-motion analysis*, ed. F. R. Ahmed, S. R. Hall and C. P. Huber, Crystallographic computing, Munksgaard, Copenhagen, 1970, 207–219.

⁷L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 45 (2012) 849–854

⁸CCDC website: <https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures/>.

⁹A. A. R. Despaigne, L. F. Vieira, I. C. Mendes, F. B Da Costa, N. L. Speziali, H. Beraldo, *Chem. Soc.* 21 (2010) 1247-1257.

¹⁰A. A. R. Despaigne, J. G. Da Silva, A. C. M. Do Carmo, O. E. Piro, E. E. Castellano, H. Beraldo, *Inorg. Chim. Acta.* 362 (2009) 2117-2122.

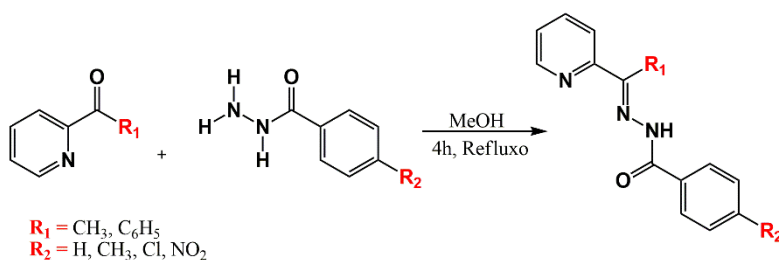


Figura 2.1 – Esquema de síntese de 2-acetil- e/ou 2-benzoilpiridina hidrazonas.

As hidrazonas obtidas possuem coloração branca, exceto para H2AcpNO₂Ph e H2BzpNO₂Ph, de coloração amarela. As medidas de temperaturas de fusão e os espectros de IV e RMN de ¹H, ¹³C e DEPT 135 confirmaram a formação desses ligantes com rendimentos entre 76-97%.

2.3.2. Síntese de 2,6-diacetilpiridina bis(benzoil-hidrazonas)

Para a síntese de 2,6-diacetilpiridina bis(benzoil-hidrazona) (H2-2,6AcPh) e seus derivados bis(*para*-metil-benzoil-hidrazona) (H2-2,6AcpCH₃Ph), bis(*para*-cloro-benzoil-hidrazona) (H2-2,6AcpClPh) e bis(*para*-nitro-benzoil-hidrazona) (H2-2,6AcpNO₂Ph) foram utilizados métodos de preparo já descritos na literatura.¹¹ Em um balão de fundo redondo contendo 10 mmol de 2,6-diacetilpiridina dissolvido em metanol (30 mL) foram adicionadas três gotas de ácido acético, sob agitação. Após a dissolução, acrescentou-se 20 mmol da hidrazida desejada e a reação foi mantida sob refluxo e agitação constante por 4 horas. Os sólidos obtidos foram filtrados e lavados com metanol e éter etílico, e secados sob vácuo (Figura 2.2).

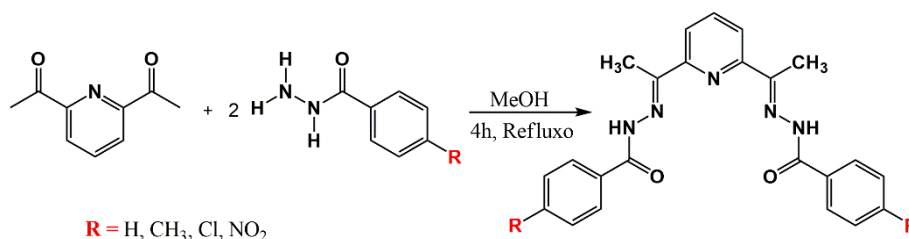


Figura 2.2 – Esquema de síntese de 2,6-diacetilpiridina bis(benzoil-hidrazonas).

As bis(benzoil-hidrazonas) obtidas, de coloração branca (H2-2,6AcPh e H2-2,6AcpClPh), bege (H2-2,6AcpCH₃Ph) ou amarela (H2-2,6AcpNO₂Ph) foram caracterizadas por temperaturas de fusão e por meio de seus espectros de IV e RMN (¹H, ¹³C e DEPT 135). Os rendimentos em relação

¹¹K. S. O. Ferraz, N. F. Silva, G. Jeferson, L. F. De Miranda, C. F. D. Romeiro, E. M. Souza-Fagundes, I. C. Mendes, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 53 (2012) 98-106.

às hidrazidas de partida foram entre 80-90%. O composto H2-2,6AcpCH₃Ph é reportado pela primeira vez no presente trabalho.

2.3.3. Síntese dos complexos de prata(I) com 2-acetil- e 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas

Foram obtidos quatro complexos de prata(I) com 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas: [Ag(H2AcPh)NO₃] (1), [Ag(H2AcpCH₃Ph)NO₃] (2), [Ag(H2AcpClPh)NO₃] (3) e [Ag(H2AcpNO₂Ph)NO₃] (4) e quatro com 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas: [Ag(H2BzPh)NO₃] (5), [Ag(H2BzpCH₃Ph)NO₃] (6), [Ag(H2BzpClPh)NO₃] (7) e [Ag(H2BzpNO₂Ph)NO₃] (8).

Os complexos (1-8) foram preparados pela mistura de uma suspensão metanólica (10 mL) da hidrazona desejada (1 mmol) com solução aquosa (3 mL) de AgNO₃ (1 mmol). O ligante foi solubilizado previamente sob aquecimento e o precursor metálico foi adicionado gota a gota. O meio reacional solubilizou totalmente apresentando uma coloração amarelada. A reação foi protegida da luz e mantida sob agitação constante durante 72 horas à temperatura ambiente. Após o tempo de reação, os sólidos de coloração cinza obtidos foram filtrados, lavados com metanol e éter etílico, e secados sob vácuo (Figura 2.3).

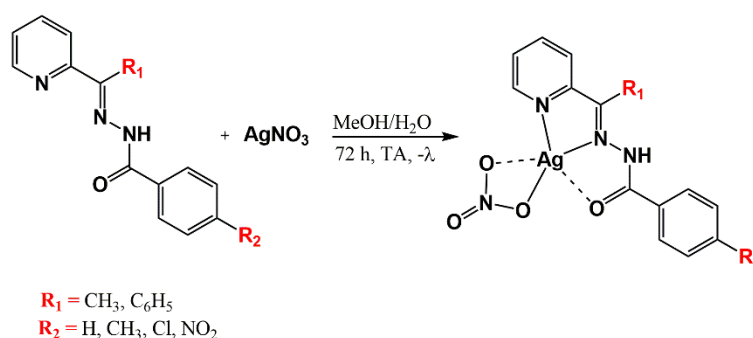


Figura 2.3 – Esquema de síntese dos complexos de prata(I) com 2-acetil- e/ou 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas.

Os complexos de prata(I) com hidrazonas foram caracterizados por temperaturas de fusão, análise elementar de C, H e N, análise termogravimétrica, medidas de condutividade molar e por meio dos seus espectros de IV, massas (ESI, +) e RMN de ¹H, ¹³C, DEPT 135, COSY, HMQC e HMBC.

Cristais dos complexos (1-7) foram obtidos de uma solução de metanol “agua-mãe” proveniente da síntese dos mesmos e as estruturas cristalinas foram determinadas por difração de raios X em monocristal. As estruturas cristalinas obtidas nas sínteses de (2) e (3) são complexos do tipo 1:2 [M(HL)₂]NO₃, rotulados de (2a) e (3a). Em (4) a presença de uma molécula de água de coordenação formou o complexo [M(HL)(H₂O)NO₃] (4a).

2.3.4. Síntese dos complexos de prata(I) com bis(benzoil-hidrazonas) derivadas de 2,6-diacetilpiridina

Foram obtidos quatro complexos de prata(I) com 2,6-diacetilpiridina *bis*(benzoil-hidrazonas): [Ag(H2-2,6AcPh)]NO₃ (**9**), [Ag(H2-2,6AcpCH₃Ph)]NO₃ (**10**), [Ag(H2-2,6AcpClPh)]NO₃·2H₂O (**11**) e [Ag(H2-2,6AcpNO₂Ph)]NO₃ (**12**).

Os complexos (**9-12**) foram preparados pela mistura de uma solução metanólica (10 mL) da *bis*(benzoil-hidrazona) desejada (1 mmol) com solução aquosa (3 mL) de AgNO₃ (1 mmol). O precursor metálico foi adicionado lentamente (gota a gota) e a reação foi protegida da luz e mantida sob agitação constante durante 72 horas à temperatura ambiente. Os sólidos obtidos, de coloração amarela, foram filtrados, lavados com metanol e éter etílico, e secados sob vácuo (Figura 2.4).

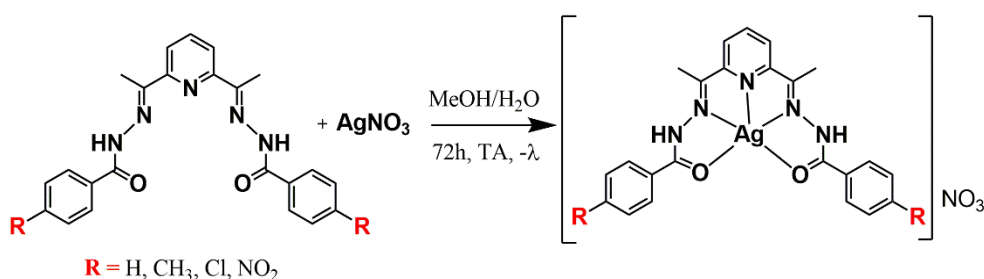


Figura 2.4 – Esquema de síntese dos complexos de prata(I) com 2,6-diacetilpiridina *bis*(benzoil-hidrazonas).

Os complexos de prata(I) com *bis*(benzoil-hidrazonas) foram caracterizados por temperaturas de fusão, análise elementar de C, H e N, medidas de condutividade molar e por meio dos seus espectros de IV, massas (ESI, +) e RMN de ¹H, ¹³C, DEPT 135, COSY, HMQC e HMBC.

Cristais dos complexos [Ag(H2-2,6AcpCH₃Ph)]NO₃ (**10**) e [Ag(H2-2,6AcpClPh)]NO₃·2H₂O (**11**) também foram obtidos de uma solução de metanol “água-mãe” e as estruturas moleculares foram determinadas por difração de raios X em monocristal. A presença de duas moléculas de água na estrutura do complexo (**11**) foi confirmada por análise termogravimétrica.

2.4. Ensaios Biológicos

2.4.1. Atividade Antifúngica

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios no Departamento de Química da UFMG, com a colaboração da Dra. Isabella Pires Ferreira e da Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi.

2.4.1.1. Equipamentos Utilizados

Os materiais utilizados na manipulação dos microrganismos foram esterilizados em autoclave vertical Fanen, modelo 415/3, série J03610. O cultivo e a manipulação dos microrganismos foram feitos em capela de fluxo laminar VECO, modelo JLF 912, série FL 5799. Micropipetas automáticas Digipet de 5-50 μL , série 05012635; Finnpiquette Colour 4027, Lab systems de 200-1000 μL , série E19971; Kacil de 100 μL , série 0037201 foram empregadas para a transferência de pequenas quantidades do meio de cultura, água destilada e soluções dos compostos em estudo. As leituras das absorbâncias do teste de microdiluição foram realizadas em leitora ELISA Thermoplate, modelo TP-READER.

2.4.1.2. Condições de Cultivo dos fungos

As atividades antifúngicas dos compostos obtidos neste trabalho foram investigadas frente a fungos leveduriformes e filamentosos.

➤ Fungos leveduriformes

Os fungos utilizados foram *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). Essas cepas foram obtidas das coleções de ATCC (American Type Culture Collection, USA) e CBS (College of Biological Sciences, USA). As cepas de *Candidas* foram armazenadas e cultivadas em meio SBD (Sabouraud) a 37°C por 24 horas. A concentração final do inóculo no teste deve ser de $1-2 \times 10^8$ ufc mL^{-1} , para isso foram realizadas diluições para ajustar a transmitância entre 74-75% em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm.

➤ Fungos filamentosos

Os fungos utilizados foram *Aspergillus flavus* (CCT 4952), *Aspergillus niger* (NRRL 3), *Aspergillus parasiticus* (ATCC 15517) e *Penicillium citrinum* (ATCC 756), obtidos das coleções CCT (Coleção de Culturas Tropical, São Paulo, Brasil) e ARS (Culture Collection Northern Regional Research Laboratory, NRRL, Illinois, USA). Para o preparo da suspensão de esporos os fungos filamentosos foram incubados a 7 °C por sete dias em meio PDA (potato dextrose agar). Em seguida, retirou-se com auxílio de uma alça estéril, o micélio fúngico que foi transferido para um erlenmeyer, contendo água destilada e esterilizada. Os esporos fúngicos foram contados em Câmara de Neubauer

e realizou-se a diluição adequada para a concentração final de $5,0 \times 10^3$ esporos mL^{-1} . Os testes com fungos filamentosos foram realizados em meio BHI (Broth Heart Infusion).

2.4.1.3. Triagem microbiológica

Para investigar a atividade antifúngica dos compostos frente aos microrganismos de interesse, previamente realizou-se uma triagem em concentração fixa de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. Apenas os compostos que inibiram acima de 80% do crescimento dos microrganismos nessa concentração, foram submetidos à determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento microbiano (CI_{50}).

2.4.1.4. Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* pelo método de microdiluição

A atividade antifúngica dos ligantes e seus complexos de prata(I) foram avaliados pelo método de microdiluição conforme descrito por Zacchino e Gupta.¹² Esta metodologia permite determinar a concentração inibitória de 50% do crescimento fúngico (CI_{50}).

Os compostos que inibiram o crescimento dos fungos na triagem microbiológica foram selecionados para a determinação do CI_{50} em concentrações decrescentes de 250 a $0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os fármacos nitrato de miconazol e nistatina foram utilizados como agentes antifúngicos de referência.

Para avaliar a atividade antifúngica, soluções estoque dos compostos e dos fármacos foram preparadas na concentração de $12,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em DMSO. Em seguida, preparou-se uma solução trabalho ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) por meio da diluição de $40 \mu\text{L}$ da solução estoque em $960 \mu\text{L}$ no meio de cultura adequado (SBD ou BHI). Nas placas do teste, pipetou-se $200 \mu\text{L}$ da solução trabalho dos compostos nos poços da primeira coluna em microplacas contendo 96 poços. Posteriormente, pipetou-se $100 \mu\text{L}$ do meio de cultura adequado nos demais poços. Diluições sucessivas foram realizadas repassando $100 \mu\text{L}$ da solução da primeira coluna para a seguinte contendo $100 \mu\text{L}$ do meio de cultura, obtendo, assim, as diferentes concentrações testadas (250 a $0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$). Finalmente, $100 \mu\text{L}$ da solução do inóculo, na concentração padronizada, foi acrescentada aos poços correspondentes ao teste. A concentração máxima de DMSO não foi superior a 2%. Esse experimento foi realizado em quadruplicata para cada composto testado (Figura 2.5).

¹²A.S. Zacchino, M.P. Gupta, *Manual de técnicas in vitro para la detección de compuestos antifúngicos*. Rosario. Corpus Editorial y Distribuidora. (2007) 85-99.

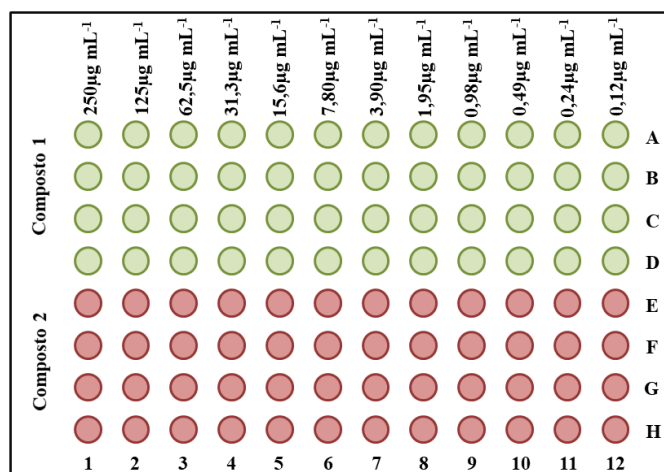


Figura 2.5 – Representação da microplaca utilizada no teste de atividade antifúngica para a determinação do CI₅₀ dos compostos (250 a 0,12 µg mL⁻¹).

Além das placas do teste foram feitas placas do controle dos compostos (CC), controle do crescimento dos fungos (CF) e controle do meio de cultura (CM). As placas do controle dos compostos foram preparadas semelhante as placas do teste, no entanto, foram adicionados 100 µL de água destilada estéril ao invés de adicionar o inóculo. Nas placas do controle do crescimento dos fungos, pipetou-se 100 µL do meio de cultura adequado nos poços e, a seguir, foram adicionados 100 µL do inóculo do microrganismo previamente padronizado. E por fim, nas placas do controle da esterilidade do meio de cultura, pipetou-se 100 µL do meio de cultura adequado nos poços e, a seguir, foram adicionados 100 µL de água destilada estéril.

As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para espécies de *Candidas* e 48 h para os fungos filamentosos. O crescimento dos fungos é evidenciado pela turvação do meio, sendo a absorbância medida em um comprimento de onda fixo de 490 nm, utilizando-se uma leitora ELISA. O cálculo da porcentagem de inibição do crescimento fúngico foi realizado usando a equação 2.1, na qual EC é a densidade óptica dos complexos avaliados e CC, CF e CM são as densidades ópticas dos controles citados no texto acima. Os valores de CI₅₀ foram calculados por meio de regressão não-linear usando o programa GraphPad Prism 6.0 (San Diego, Califórnia, EUA, www.graphpad.com) e os dados foram analisados com curva *FitSigmoidal* (Boltzmann).

$$\% \text{ inibição} = 100 - [(EC - CC) \times 100 / (CF - CM)] \quad \text{Equação 2.1}$$

2.4.2. Atividade citotóxica contra células de melanoma e melanócitos murino

Os testes de atividade citotóxica foram realizados no Departamento de Farmacologia da UFMG em colaboração com a Profa. Dra. Miriam Teresa Paz Lopes e com a doutoranda Verlane Gonçalves Santos.

2.4.2.1. Linhagens de células e condições de cultura

Foram utilizadas as linhagens de células tumorais de melanoma murino metastático (B16F10) fornecidas pelo Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer (São Paulo, Brasil) e células de melanócitos murino não-tumorigênicos (Melan-A), usadas como modelo de células não-tumorais, cedidas pelo Dr. Roger Chamas do Instituto de Câncer (São Paulo, Brasil).

As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab®) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS-Fetal Bovine Serum), 1 % de penicilina/estreptomicina (GIBCO) e 0,5 μ M de Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA, somente para cultivo de Melan-A). Células B16F10 foram cultivadas em pH 7,4 e células Melan-A em pH 6,9. As linhagens foram mantidas em garrafas de cultivo em estufa incubadora em condições de atmosfera úmida e contendo 5 % (v/v) de CO₂ a 37°C.

Ao atingirem aproximadamente 95 % de confluência, procedeu-se à tripsinização das linhagens e quando o meio de cultivo foi removido, as células foram lavadas com 2,0 mL de PBS/EDTA (pH 7,4), aspirando-o logo em seguida. Colocou-se 0,5 mL de solução ATV (solução de tripsina 0,2% e versene 0,02%). A tripsina foi inativada após completo desprendimento das células com 1,5 mL do meio RPMI 1640 a 10 % (v/v) de FBS. Obteve-se, então, uma suspensão celular que, após contagem, foi ajustada à densidade celular apropriada para a realização dos experimentos. A viabilidade celular foi determinada pela exclusão de células coradas com solução de azul de tripano.

2.4.2.2. Avaliação da atividade citotóxica

As linhagens celulares foram semeadas em microplacas com 96 poços (B16F10 - 1×10^3 células/poço e Melan-A - 6×10^3 células/poço) e foram devidamente incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 48 horas para garantir a adesão celular na superfície das placas.

As soluções estoque dos compostos (10^{-2} M) foram preparadas em DMSO. Em seguida, essas soluções foram diluídas adequadamente em meio de cultura RPMI 1640 para a concentração de 10^{-4} M, com máximo de 1% de DMSO. Após a aderência completa das células, concentrações decrescentes (100-0,1 μ M) dos compostos testados foram adicionadas e as placas incubadas em atmosfera úmida com 5% (v/v) de CO₂ a 37°C por 72 h.

Os testes de controle foram realizados incubando células com 1% (v/v) de DMSO (controle negativo) na concentração máxima utilizada nos testes e verificou-se que a viabilidade celular não foi afetada pelo solvente nestas condições. A cisplatina foi utilizada como controle positivo.

2.4.2.3. Ensaio da viabilidade e proliferação celular *in vitro* (método de MTT)

O ensaio para avaliação de viabilidade e proliferação celular é baseado na redução metabólica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) a formazan, pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial. Uma vez que a redução ocorre apenas em células viáveis, a quantidade de formazan formado é diretamente proporcional à quantidade de células vivas.¹³

Após o período de incubação dos compostos, 10 μM de MTT 5 mg/mL (50 mg/poço) foram adicionados em cada poço. A viabilidade celular foi avaliada por meio da redução metabólica do MTT a formazan. Após 4 h de incubação dos compostos com MTT, o sobrenadante foi removido por aspiração e os cristais de sal de tetrazólio foram dissolvidos com DMSO (100 μL /poço). Em seguida, as absorbâncias foram medidas a 570 nm em um leitor de ELISA (Thermo Plate Reader-TP). Todos os compostos foram testados em sextuplicata em dois experimentos independentes (Figura 2.6).

Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis. Os controles contendo RPMI 1640 (10% FBS) e DMSO foram considerados como sendo 100% da viabilidade celular. Os valores CI_{50} (μM) foram calculados por regressão não linear usando o software GraphPad Prism 6.0 e os dados foram analisados com curva *FitSigmoidal* (Boltzmann).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de variância e análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls. O nível aceitável de significância foi de 95% ($p < 0,05$).

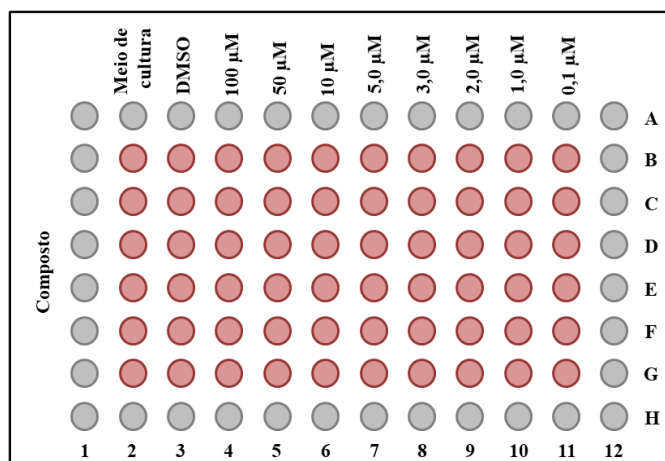


Figura 2.6 – Representação da microplaca utilizada no teste de atividade citotóxica para a determinação do CI_{50} dos compostos (100 a 0,1 μM).

¹³T. Mosmann, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55-63.

2.4.2.4. Índices de seletividade (IS)

As citotoxicidades dos compostos testados contra células tumorais e não tumorais foram comparadas usando o índice de seletividade (IS), que consiste na relação entre a concentração do fármaco que é citotóxica para 50% das células não tumorais e a concentração que inibe 50% da proliferação de células tumorais.¹⁴ Então, para determinar a seletividade citotóxica dos compostos, os valores de IS foram calculados de acordo com a relação, $IS = CI_{50 \text{ Melan-A}} / CI_{50 \text{ B16F10}}$. Foi considerado significativo um valor de IS superior ou igual a 2,0, ou seja, este valor significa que o composto é duas vezes mais ativo na linhagem de células tumorais do que em células saudáveis.

2.5. Estudos da interação com biomoléculas

2.5.1. Interação com albumina sérica humana (HSA)

Os estudos de interação entre HSA e os complexos de prata(I) foram realizados através de titulação espectrofluorimétrica. Os espectros foram registrados na faixa de 300 a 550 nm com excitação de 295 nm.¹⁵ As amostras foram adicionadas em cubetas de quartzo de 1,0 cm de comprimento. Todos os experimentos foram realizados em três temperaturas distintas: 298 K, 303 K e 310 K. Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de HSA (1,84 μM) dissolvida em tampão Tris-HCl (NaCl 50 mM/Tris-HCl 5 mM, pH 7,2). A concentração da solução estoque de HSA foi determinada por espectroscopia de absorção no UV-vis com comprimento de onda de 280 nm e usando o coeficiente de absorção molar ($\epsilon = 35\,353 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).¹⁶

Durante o experimento, 3,0 mL da solução de HSA foram adicionados à cubeta e seu espectro de fluorescência foi registrado. Em seguida, a solução de HSA foi titulada com adições sucessivas das soluções estoque dos complexos (1,0 mM, preparada em DMSO). Após cada adição, as soluções foram incubadas por 5 min. Em todos os experimentos, a quantidade de DMSO foi mantida menor que 1 %. As intensidades máximas de fluorescência em 342 nm foram usadas para calcular as constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de velocidade de supressão bimolecular (K_q), constantes de ligação (K_b), número de sítios ligação (n) e os parâmetros termodinâmicos (ΔH° , ΔS° e ΔG) da interação entre HSA e os complexos de prata(I).

Considerando a absorção dos compostos na região analisada, as intensidades de fluorescência deveriam ser corrigidas caso a absorbância das soluções dos complexos fosse maior que 0,1 para

¹⁴R. B. Badisa, S. F. Darling-Reed, P. Joseph, J. S. Cooperwood, L. M. Latinwo, C. B. Goodman, *Anticancer Res.* 29 (2009) 2993–2996.

¹⁵U.K. Komarnicka, R. Starosta, A. Kyzioł, M. Płotek, M. Puchalska, M. Jeżowska-Bojczuk, *J. Inorg. Biochem.* 165 (2016) 25–35.

¹⁶A. Ray, B. Koley Seth, U. Pal, S. Basu, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 92 (2012) 164–174.

minimizar o efeito de filtro interno.^{17,18} No entanto, como foram utilizadas soluções em baixas concentrações dos complexos, os valores de absorvância também foram baixos (< 0,01), sendo assim o efeito de filtro interno pode ser desprezado e as intensidades de fluorescência não precisam ser corrigidas.

O mecanismo de supressão da fluorescência pode ser classificado como dinâmico ou estático. Em geral, ambos os mecanismos podem ser distinguidos pela dependência dos valores de constantes de supressão com a temperatura. No caso do mecanismo dinâmico, ocorrem colisões entre o agente supressor e o fluoróforo, sendo que o aumento da temperatura induz um aumento das colisões entre os compostos e a HSA e, como consequência, observa-se um aumento das constantes de supressão. Por outro lado, no mecanismo estático, ocorre a formação de um complexo não fluorescente com o fluoróforo, cuja estabilidade é diminuída com o aumento da temperatura e, conseqüentemente, os valores de constantes de supressão diminuem.¹⁹

A equação de Stern-Volmer é amplamente usada para determinar o tipo de mecanismo de supressão ao analisar a relação entre F_0/F e as diferentes temperaturas:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] \quad \text{Equação 2.2}$$

Onde, F_0 e F são as intensidades relativas de fluorescência da HSA na ausência e na presença do supressor, respectivamente, $[Q] = [\text{Complexo}]$ é a concentração do agente supressor, K_{sv} é a constante de Stern-Volmer (M^{-1}).²⁰ O valor de K_{sv} pode ser obtido plotando-se F_0/F versus $[Q]$.

Um método adicional para distinguir se o processo de supressão ocorre *via* mecanismo dinâmico ou estático é a determinação da constante de velocidade bimolecular de supressão (K_q), usando a seguinte equação:

$$K_q = K_{sv}/\tau_0 \quad \text{Equação 2.3}$$

Um processo de supressão por um mecanismo de colisão dinâmico entre biomoléculas considera o τ_0 que é o tempo de vida médio das biomoléculas na ausência de supressor ($\tau_0 = 10^{-8}s$) e geralmente resulta em $K_q \approx 10^{10} M^{-1}s^{-1}$. Assim, valores maiores de K_q sugerem que no processo de supressão está presente alguma forma de ligação, resultado da extinção estática de fluorescência.²¹

Uma vez definido o processo de supressão, e caso esse seja um processo estático, a constante de ligação (K_b) para a interação proteína-agente supressor é determinada pela Equação 2.4, supondo que existe um número de sítios de ligação (n) ocupados pelo supressor na HSA.

¹⁷M. Kubista, R. Sjöback, S. Ericksson, B. Albinsson, *Analyst*. 119 (1994) 417–419.

¹⁸A. V. Fonin, A. I. Sulatskaya, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, *PLoS ONE*. 9 (2014) e103878.

¹⁹M. Saeidifar, H. Mansouri-torshizi, A. A. Saboury, *J. Lumin.*167 (2015) 391–398.

²⁰J. R. LAKOWICZ, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3a ed., Springer Science, 2006.

²¹S. Tabassum, M. Ahmad, M. Afzal, M. Zaki, P.K. Bharadwaj, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 140 (2014) 321–331.

$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K_b + n \log[Q] \quad \text{Equação 2.4}$$

Os valores de K_b e n podem ser obtidos dos coeficientes angular e linear, respectivamente, da plotagem linear de $\log[(F_0 - F)/F]$ versus $\log[Q]$.²²

O estudo de supressão de fluorescência em diferentes temperaturas permite calcular os parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação entre pequenas moléculas e macromoléculas biológicas, tais como proteínas. Geralmente, são descritos quatro tipos de interação: hidrofóbica, eletrostáticas, van der Waals e ligações de hidrogênio.²³

Os valores da variação de entalpia padrão (ΔH°) e entropia padrão (ΔS°) podem ser determinados da equação de Van't Hoff:

$$\ln K_b = -\Delta H^\circ / RT + \Delta S^\circ / R \quad \text{Equação 2.5}$$

Onde K_b é a constante de ligação a uma temperatura T e R é a constante dos gases ideais ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). Os valores de ΔH° e ΔS° são calculados através do coeficiente angular ($-\Delta H^\circ/R$) e linear ($\Delta S^\circ/R$), obtidos no gráfico de $\ln K_b$ versus $1/T$, multiplicando esses coeficientes pela constante dos gases.

A variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°) pode ser expressa conforme a Equação:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b \quad \text{Equação 2.6}$$

Mudanças na energia livre de Gibbs padrão (ΔG°), entalpia padrão (ΔH°) e entropia padrão (ΔS°) são observadas para caracterizar as forças de interação ou tipos de ligação. ΔG° está relacionado à espontaneidade da reação, enquanto ΔH° e ΔS° são utilizados para avaliar a força de uma ligação. As principais contribuições dos parâmetros termodinâmicos são: (1) $\Delta H^\circ > 0$ e $\Delta S^\circ > 0$ são associados com interações hidrofóbicas, (2) $\Delta H^\circ \approx 0$ e $\Delta S^\circ > 0$ resultam em interações eletrostáticas e (3) $\Delta H^\circ < 0$ e $\Delta S^\circ < 0$ sugerem a presença de ligações de hidrogênio e/ou forças de van der Waals.²⁴

2.5.2. Interação com ácido desoxirribonucleico (DNA)

Os estudos de interação dos complexos de prata(I) com o DNA foram investigados usando espectrofotometria, espectrofluorimetria e eletroforese.

²²S. Thangavel, R. Rajamanikandan, H.B. Friedrich, M. Ilanchelian, B. Omondi, *Polyhedron*. 107 (2016) 124–135.

²³N. Cacita, S. Nikolaou, *J. Lumin.* 169 (2016) 115–120.

²⁴P.D. Ross, S. Subramanian, *Biochemistry*. 20 (1981) 3096–3102.

2.5.2.1. Espectroscopia de absorção eletrônica (UV-vis)

A espectroscopia de absorção eletrônica é umas das técnicas mais empregadas nos estudos de interação entre metalofármacos e o DNA.²⁵ Os experimentos de titulação espectrofotométrica foram realizados utilizando um espectrofotômetro HP8453 *diode array* – Hewlett Packard e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Uma solução estoque de CT-DNA em tampão Tris-HCl (NaCl 50 mM/Tris-HCl 5 mM, pH 7,2) foi preparada em shaker sob agitação orbital de 120 rpm a 37°C por 24 h. A concentração da solução de CT-DNA foi determinada usando seu coeficiente de absorção molar ($\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em 260 nm.²⁶ As soluções estoques dos complexos foram preparadas em DMSO na concentração de 1,0 mM e posteriormente, diluídas em tampão Tris-HCl para ajustar a concentração para 30 μM . Em seguida, 2,0 mL da solução dos complexos (fixadas em 30 μM) foram tituladas com adições sucessivas da solução de CT-DNA até alcançar uma relação 1:1 (complexo: DNA). Após cada adição, as soluções foram mantidas em equilíbrio por 5 minutos. Os espectros dos compostos foram obtidos num intervalo de 240 a 400 nm à temperatura ambiente.

A análise dos dados de titulação permite determinar as constantes de ligação intrínseca (K_b) entre o complexo e o CT-DNA. O cálculo das constantes de ligação é baseado na equação de Scatchard, apresentada a seguir:

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad \text{Equação 2.7}$$

Onde, [DNA] é a concentração do par de bases do DNA, ϵ_a é o coeficiente de absorvidade molar do complexo após cada adição do DNA, ϵ_b e ϵ_f são os coeficientes de absorvidades molares do complexo livre em solução (na ausência de DNA) e completamente ligado ao DNA, respectivamente. Plotando-se $[\text{DNA}]/[\epsilon_a - \epsilon_f]$ versus [DNA], a constante de ligação complexo-DNA (K_b) pode ser calculada por meio da razão entre o coeficiente angular ($1/[\epsilon_b - \epsilon_f]$) e o coeficiente linear ($1/K_b[\epsilon_b - \epsilon_f]$) da reta.²⁷

2.5.2.2. Espectroscopia de fluorescência

Uma vez que a interação entre o DNA e um composto ocorre por um mecanismo intercalativo, faz-se necessário o estudo de ligação competitiva entre brometo de etídio (BE) e esse composto pelo DNA. A interação pode ser investigada por fluorescência, pois o sistema BE-DNA é altamente fluorogênico. Assim, quando um composto é capaz de deslocar o BE da estrutura do DNA ocorre

²⁵N. Shahabadi, M. Mahdavi, *Inorg. Chem.* 2013 (2013) 1–7.

²⁶I. Potočná, P. Vranec, V. Farkasová, D. Sabolová, M. Vataščinová, J. Kudláčová, I. D. Radojević, L. R. Čomić, B. S. Marković, V. Volarević, N. Arsenijević, S. R. Trifunović, *J. Inorg. Biochem.* 154 (2016) 67–77.

²⁷M.P. Kesavan, G.G. Vinoth Kumar, J. Dhavethu Raja, K. Anitha, S. Karthikeyan, J. Rajesh, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 167 (2017) 20–28.

uma diminuição da fluorescência, o que sugere um mecanismo de intercalação. Os experimentos de intercalação competitiva foram realizados a 298 K e os espectros foram registrados na faixa de 300 a 800 nm com $\lambda_{excitação} = 545$ nm e $\lambda_{emissão} = 595$ nm.²⁸ Uma solução trabalho de CT-DNA (10 μ M) com BE (10 μ M) foi preparada em tampão Tris-HCl (NaCl 50 mM/Tris-HCl 5 mM, pH 7,2). Durante o experimento, uma porção de 3,0 mL da solução BE-DNA foi titulada com adições sucessivas da solução estoque dos complexos (1,0 mM, preparada em DMSO). Após cada adição, houve um período de incubação de 10 minutos. As concentrações dos complexos variaram de 0 a 100 μ M. Os experimentos foram realizados até a fluorescência atingir 20-40% da intensidade inicial. As mudanças nas intensidades de fluorescência a 602 nm do sistema BE-DNA com adição de concentrações crescentes dos complexos foram utilizadas nos cálculos das constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) e das constantes de ligação aparente (K_{app}).²⁹

A equação clássica de Stern-Volmer, discutida na seção 2.5.1 (Equação 2.3), foi utilizada para determinar os valores das constantes de supressão da fluorescência (K_{sv}). As constantes de ligação aparente (K_{app}) foram calculadas de acordo com a equação a seguir:

$$K_{app} = K_{BE} \times [BE] / C_{50} \quad \text{Equação 2.8}$$

onde, K_{BE} é a constante de ligação entre BE e DNA ($1,0 \times 10^7$ M⁻¹) e BE é a concentração do brometo de etídio (10 μ M) e C_{50} é a concentração do supressor quando a intensidade de fluorescência do sistema BE-DNA é reduzida a 50%.³⁰ O K_{app} pode ser obtido ainda através do gráfico de F_0 / F versus [Q], quando $F_0 / F = 2$.

2.5.2.3. Eletroforese em gel de agarose

Estudos da interação entre os compostos sintetizados e o DNA plasmidial foram realizados por eletroforese em gel de agarose. Assim, 150 ng μ L⁻¹ de DNA plasmidial pUC19 purificado de *Escherichia coli* (Sigma) foram incubados com os compostos (hidrazonas, complexos de prata(I), AgNO₃ e cisplatina, preparados em 5% de DMF) a 100 μ M em tampão Tris-HCl (NaCl 50 mM/Tris-HCl 5 mM, pH 7,2). A mistura foi incubada em shaker sob agitação orbital de 150 rpm a 37 °C por 24 h. Em seguida, as reações foram extintas pela adição de 10 μ L da solução do corante, preparado nas seguintes condições: 50 mM de Tris-HCl pH 7,2, 0,01 % de azul de bromofenol, 50 % de glicerol e 250 mM de EDTA. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de 0,9% de agarose imersa em tampão TBE (0,5X) por 50 minutos a 82 mV. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em

²⁸T. C. Jenkins, in: K. R. Fox (Eds.), *Drug-DNA interaction protocols*, Humana Press, New Jersey, 1997, pp. 195-218.

²⁹S. Mistri, H. Puschmann, S.C. Manna, *Polyhedron*. 115 (2016) 155–163.

³⁰P. Kumar, B. Baidya, S. K. Chaturvedi, R. H. Khan, D. Manna, B. Mondal, *Inorg. Chim. Acta*. 376, (2011) 264–270.

tampão TBE (0,5X) contendo 50 μL da solução de brometo de etídio ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 30 minutos e, posteriormente visualizado por luz UV.³¹

2.6. Estudos teóricos dos compostos

Os cálculos teóricos apresentados nesse trabalho foram realizados em colaboração com o doutorando Gabriel L. S. Rodrigues e o Prof. Dr. Willian Ricardo Rocha do Departamento de Química (UFMG).

2.6.1. Estudo teórico das ligações envolvidas na esfera de coordenação da prata

Os cálculos teóricos de natureza das ligações em torno do centro metálico foram realizados para os complexos (**5-8**). A otimização das geometrias dos complexos foram realizados ao nível da Teoria do Funcional de Densidade (DFT),³² empregando funcional híbrido B3LYP.^{33,34} Os átomos dos ligantes foram tratados com o conjunto de funções de base Def2-SV(P). O átomo de prata foi descrito por pseudo potenciais para os elétrons internos³⁵ e o conjunto de base def2-TZVP foi empregado para tratar os elétrons de valência. Para acelerar os cálculos, a resolução da identidade (RI)³⁶ foi utilizada para a matriz de Coulomb enquanto a aproximação “Chain of Spheres” (COSX)³⁵ foi empregada na parte de troca de matriz de Fock, o conjunto de bases auxiliares def2/J.³⁷

Para investigar a energia da interação entre o grupo nitrato (NO_3^-) e o centro metálico, Superfícies de Energia Potencial (PES) foram construídas, empregando o mesmo nível da teoria utilizado nas otimizações de geometria. A molécula de NO_3^- foi mantida com geometria interna restrita e a distância entre seu centro de massa e o átomo de Ag variou de 2,2 a 5,2 Å em 10 etapas, com otimização de geometria completa em cada etapa. A PES foi construída para cada um dos complexos estudados.

Para melhor compreender a natureza das interações envolvendo o centro metálico e os ligantes, a topologia da densidade eletrônica foi analisada usando a Teoria Quântica dos átomos em moléculas (QTAIM),³⁸ como implementado no software Multiwfn.³⁹ De acordo com o QTAIM, as

³¹K. O. S. Ferraz, G. M. M. Cardoso, C. M. Bertollo, E. M. Souza-Fagundes, N. Speziali, C. L. Zani, I. C. Mendes, M. A. Gomes, H. Beraldo, *Polyhedron*. 30 (2011) 315–321.

³²Parr, R. G.; Yang, W. T. *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*; Oxford University Press: New York, 1989.

³³A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648–5652.

³⁴C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B*. 37 (1988) 785–789.

³⁵F. Neese, F. Wennmohs, A. Hansen, U. Becker, *Chem. Phys.* 356 (2009) 98–109.

³⁶F. Neese, *J. Comput. Chem.* 24 (2003) 1740–1747.

³⁷F. Weigend, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8 (2006) 1057–1065.

³⁸R.F.W Bader, *Encyclopedia of Computational Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2002.

³⁹T. Lu, F. Chen, *J. Comput. Chem.* 33 (2012) 580–592.

características topológicas da densidade eletrônica, $\rho(r)$, podem revelar detalhes importantes sobre a estrutura de uma molécula, usando conceitos construídos de átomos, ligações e alguns parâmetros estruturais.³⁸

Os pontos críticos da densidade eletrônica (BCPs) foram determinados para todos os complexos, não apenas em sua geometria de equilíbrio, mas em todos os pontos gerados nas superfícies de energia potencial calculadas utilizando-se a densidade eletrônica obtida através de cálculos de Teoria de Perturbação de Segunda Ordem (MP2). Uma vez que os pontos críticos são encontrados, várias propriedades calculadas no ponto crítico fornecem informações importantes sobre a natureza da interação. O Laplaciano da densidade eletrônica, $\nabla^2\rho(r)$, determina se $\rho(r)$ é acumulado localmente, quando $\nabla^2\rho(r) < 0$, e existe um máximo local da densidade eletrônica, ou depletada localmente, quando $\nabla^2\rho(r) > 0$ e há um mínimo local. O Laplaciano de $\rho(r)$ pode estar relacionado a uma expressão local do teorema de Virial,^{38,40} conforme indicado a seguir pela equação:

$$\frac{\hbar^2}{4m} \nabla^2 \rho(r) = 2G(r) + V(r) \quad \text{Equação 2.10}$$

Nesta expressão, $G(r)$ é a densidade de energia cinética eletrônica e é sempre positivo, enquanto $V(r)$ é a densidade de energia potencial que é sempre negativa. Assim, quando o Laplaciano é negativo em um determinado CP ou região, temos um domínio local do termo potencial de densidade de energia, resultando em elétrons mais localizados e um acúmulo de carga, o que caracteriza uma interação mais covalente. Por outro lado, quando o laplaciano é positivo, o termo cinético domina a expressão e há uma depleção local da densidade eletrônica. Em uma interação de pares, isso significa que os elétrons concentram a carga perto dos átomos ligados em vez de entre os núcleos, resultando no domínio da energia cinética. Isso acontece nas interações iônicas, hidrogenadas e van der Waals. Para entender melhor esses termos, é comum introduzir outra quantidade para determinar a natureza da interação entre dois átomos, a densidade de energia $H(r)$, mostrada na equação:

$$H(r) = G(r) + V(r) \quad \text{Equação 2.11}$$

O valor local da densidade de energia é determinado pela própria densidade de energia elétrica. Quando $H(r)$ é negativo, existe uma predominância da contribuição do termo $V(r)$, o que indica interações covalentes. Quando $H(r)$ é próximo a zero ou positivo, o termo de energia cinética tem uma contribuição mais proeminente e a ligação tende a ter mais caráter iônico, de ligação de hidrogênio, van der Waals ou outra interação de longo alcance.

⁴⁰R.F.W.A Bader, *Chem. Rev.* 91 (1991) 893–928.

Na análise de QTAIM, a magnitude em que a densidade eletrônica se acumula em um plano de um caminho de ligação em comparação com outro plano perpendicular a ele é dada pela elipsidade de ligação, $\varepsilon(r)$.^{40,41} A elipsidade é um bom indicador da estabilidade da ligação. Normalmente, as ligações estáveis têm baixo valor de ε , bem menores do que 1. Como exemplos, $\varepsilon = 0,23$ entre carbonos ligados no benzeno e $\varepsilon = 0,45$ no eteno, sendo muito próxima de 0 em ligações σ simples, pois não há plano preferencial para se acumular densidade eletrônica. Outra função útil da densidade eletrônica é o índice eta, $\eta(r) = |\lambda_1|/\lambda_3$, que é a relação entre os autovalores mais baixos e mais altos da matriz Hessiana (segundas derivadas) de $\rho(r)$. $\eta(r)$ é menor do que a unidade para interações de camada fechada e aumenta com um maior caráter covalente.^{42,43}

2.6.2. Estudo de relações estrutura-atividade (SAR)

Os cálculos teóricos empregados no estudo de relações estrutura *versus* atividade antifúngica (*Structure-Activity Relationships*-SAR) foram realizados para 2-acetilpiridinas benzoil-hidrazonas e seus complexos (**1-4**). A otimização das geometrias das hidrazonas e seus complexos (**1-4**) foram realizados no mesmo nível do estudo teórico citado acima (seção 2.6.1), utilizando-se as mesmas aproximações. Para os ligantes livres foram analisados os isômeros *Z* e *E*. Os efeitos do solvente foram incluídos por meio do Modelo do Contínuo Polarizável (PCM).⁴⁴ Todos os cálculos de mecânica quântica foram realizados usando o programa ORCA.⁴⁵ As energias dos orbitais HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) e LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) e o momento de dipolo foram obtidos após a otimização das estruturas e utilizados como descritores para estudos SAR. As estruturas tridimensionais obtidas das otimizações dos compostos foram utilizadas como entrada para o software Marvin⁴⁶ para os cálculos da área superficial, o volume molecular e o coeficiente de partição octanol-água (logP). A área superficial, volume molecular e logP também foram usados como descritores nos estudos de SAR.

⁴¹R.F.W. Bader, *J. Phys. Chem. A*. 102 (1998) 7314–7323.

⁴²N.J.M. Amezaga, S.C. Pamies, N.M. Peruchena, G.L. Sosa, *J. Phys. Chem. A*. 114 (2010) 552–562.

⁴³B. Niepötter, R. Herbst-Irmer, D. Kratzert, P. P. Samuel, K. C. Mondal, H. W. Roesky, P. Jerabek, G. Frenking, D. Stalke, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 53 (2014) 2766–2770.

⁴⁴J. Tomasi, B. Mennucci, *Chem.Rev.* 105 (2005) 2999–3093.

⁴⁵F. Neese, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 2 (2012) 73–78.

⁴⁶ChemAxon Program, Budapest, Hungary. (www.chemaxon.com/products.html)

Capítulo 3 – Complexos de prata(I) com 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas: investigação do perfil farmacológico, mecanismos de ação e estudos SAR

Neste capítulo relatamos a caracterização de quatro novos complexos de prata(I) com 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas. Os complexos $[\text{Ag}(\text{H2AcPh})\text{NO}_3]$ (**1**), $[\text{Ag}(\text{H2AcPCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (**2**), $[\text{Ag}(\text{H2AcPClPh})\text{NO}_3]$ (**3**) e $[\text{Ag}(\text{H2AcPNO}_2\text{Ph})\text{NO}_3]$ (**4**) foram obtidos a partir das reações entre AgNO_3 e os ligantes 2-acetilpiridina benzoil-hidrazona (H2AcPh) e seus derivados *para*-metil- ($\text{H2AcPCH}_3\text{Ph}$), *para*-cloro- (H2AcPClPh) e *para*-nitro-benzoil-hidrazona ($\text{H2AcPNO}_2\text{Ph}$). As hidrazonas usadas neste trabalho já foram descritas na literatura.¹⁻³ As estruturas cristalográficas dos complexos foram determinadas. Todos os compostos, incluindo o nitrato de prata e fármacos de referência, tiveram suas atividades antifúngicas avaliadas frente a *Candida spp* e fungos filamentosos. Estudos de relações estrutura-atividade (SAR) dos compostos foram realizados. As atividades citotóxicas (CI_{50}) e os índices de seletividade (IS) dos compostos frente a células tumorais de melanoma murino metastático (B16F10) e células de melanócitos murino não-tumorigênicos (Melan-A) foram investigadas. Os parâmetros físico-químicos das interações dos complexos (**1-4**) com biomoléculas, tais como a albumina sérica humana (HSA) e o ácido desoxirribonucleico (DNA) também foram determinados (Figura 3.1).

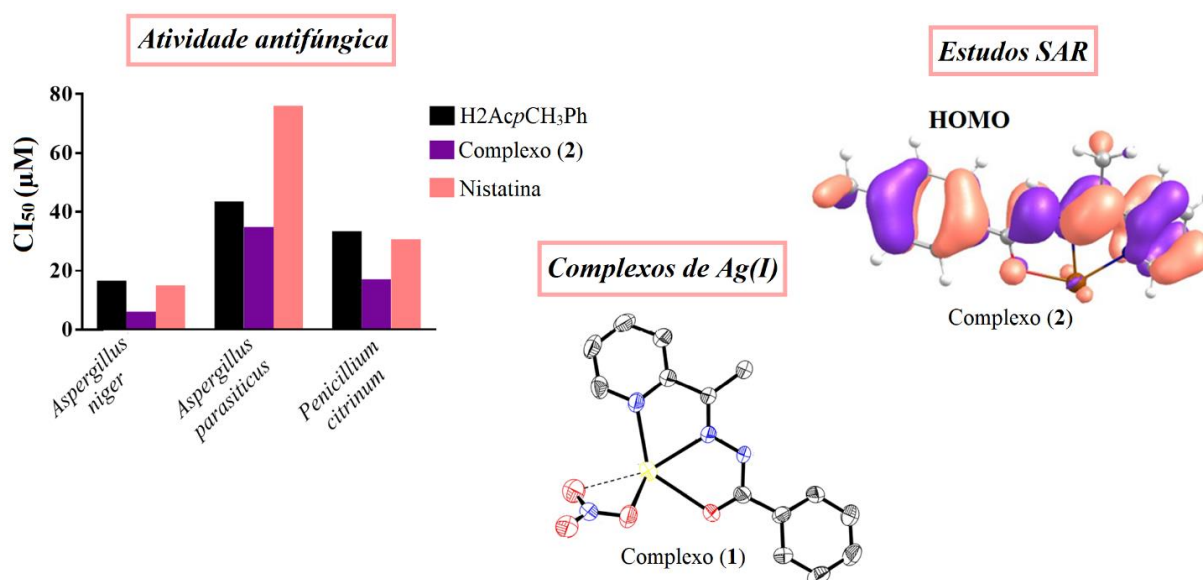


Figura 3.1 – Resumo gráfico dos principais resultados apresentados no capítulo 3.

¹A. A. R. Despaigne, G. L. Parrilha, J. B. Izidoro, P. R. D. Costa, R. G. D. Santos, O. E. Piro, E. E. Castellano, W. R. Rocha, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 50 (2012) 163-172.

²A. A. R. Despaigne, F. B. D. Costa, O. E. Piro, E. E. Castellano, S. R. W. Louro, H. Beraldo, *Polyhedron*. 38 (2012) 285-290.

³A. A. R. Despaigne, L. F. Vieira, I. C. Mendes, F. B. D. Costa, N. L. Speziali, H. Beraldo, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1247-1257.

3.1. Caracterização dos compostos

Os complexos (1-4) formados são de coloração cinza e estáveis quando estocados sem a presença de luz. Em solução de 5% de DMSO e tampão Tris-HCl esses complexos também se mostraram estáveis na ausência de luz. Os resultados das microanálises concordam com a formação de complexos do tipo $[Ag(HL)NO_3]$ em que uma molécula do ligante em sua forma neutra juntamente com o íon nitrato estão coordenados ao átomo de prata. Os valores relativamente elevados das condutividades molares (Λ_M) tanto em DMF quanto em DMSO sugerem uma provável liberação do íon nitrato em solução (Tabela 3.1). As estruturas propostas para os complexos (1-4) estão apresentadas na Figura 3.2.

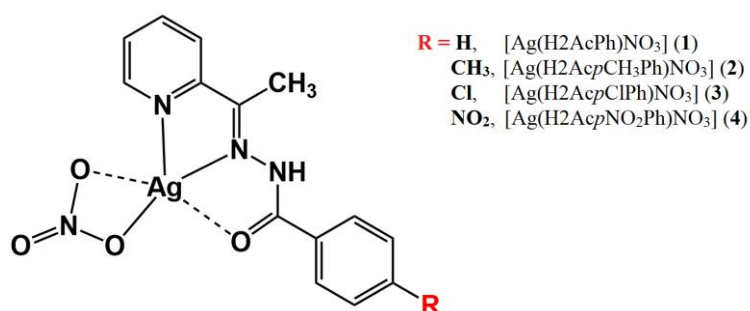


Figura 3.2 – Estrutura geral para os complexos de prata(I) com 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas.

Tabela 3.1 – Rendimento, massa molar, faixa de fusão, condutividade molar e análise elementar de CHN das 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas e seus complexos de prata(I).

Compostos	Rend. (%)	MM (g mol ⁻¹)	Faixa de fusão (°C)	Λ_M^a		Análise Elementar ^b		
				DMF	DMSO	%C	%H	%N
H2AcPh	76	239,27	147,4 – 148,2	–	–	–	–	–
[Ag(H2AcPh)NO ₃] (1)	77	409,15	185,4 – 187,3	36,6	39,8	40,50 (41,10)	3,00 (3,20)	13,58 (13,69)
H2AcPCH ₃ Ph	35	253,30	142,9 – 144,9	–	–	–	–	–
[Ag(H2AcPCH ₃ Ph)NO ₃] (2)	33	423,17	204,7 – 206,7	42,6	23,1	42,30 (42,57)	3,37 (3,57)	13,10 (13,24)
H2AcPClPh	84	273,72	167,0 – 169,0	–	–	–	–	–
[Ag(H2AcPClPh)NO ₃] (3)	67	443,59	190,2 – 191,1	58,1	38,1	37,62 (37,91)	2,41 (2,73)	12,52 (12,63)
H2AcPNO ₂ Ph	97	284,27	220,0 – 224,0	–	–	–	–	–
[Ag(H2AcPNO ₂ Ph)NO ₃] (4)	54	454,14	136,5 – 138,6	57,7	33,7	40,44 (37,03)	2,63 (2,66)	15,49 (15,42)

^a Λ_M ($\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$;

^b Valores calculados entre parênteses.

3.1.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Os principais modos vibracionais dos compostos estão mostrados na Tabela 3.2. Os estiramentos atribuídos a $\nu(\text{N-H})$ em $3286\text{--}3186 \text{ cm}^{-1}$ nos espectros das hidrazonas livres foram

observados em 3264-3204 cm^{-1} nos espectros dos complexos (1-4), o que está de acordo com a presença de ligantes neutros. Os modos vibracionais $\nu(\text{C}=\text{N})$ deslocam-se de 1618-1602 cm^{-1} nos ligantes livres para 1626-1592 cm^{-1} nos complexos, sugerindo que o nitrogênio íminico participa da coordenação ao metal. Observa-se ainda que os modos de deformação do plano do anel piridínico são deslocados de 628-620 cm^{-1} nos ligantes para 630-628 cm^{-1} nos complexos. Essas mudanças sugerem que a coordenação ao metal também ocorra através do nitrogênio piridínico.^{4,5} Adicionalmente, as bandas correspondentes a $\nu(\text{C}=\text{O})$ observadas em 1668-1650 cm^{-1} nas hidrazonas sofrem deslocamentos para 1672-1662 cm^{-1} nos complexos.^{6,7} Além disso, a presença de bandas na região entre 568-538 cm^{-1} nos complexos foram atribuídas ao modo de vibração $\nu(\text{Ag}-\text{O})$,⁸ indicando assim a coordenação do metal *via* oxigênio. As principais mudanças observadas sugerem que as hidrazonas coordenam-se ao centro metálico de modo tridentado através do sistema $\text{N}_{\text{py}}-\text{N}_{\text{imina}}-\text{O}$.

Nos complexos (1-4) ainda é possível atribuir vibrações características de $\nu(\text{NO}_3)$ em 1384 cm^{-1} , que estão ausentes nas hidrazonas livres, sendo um forte indício da presença do íon nitrato nas estruturas dos complexos.⁹

Tabela 3.2 – Atribuição das principais bandas observadas nos espectros de absorção na região do infravermelho (cm^{-1})^a das 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas e seus complexos de prata(I).

Compostos		$\nu(\text{N}-\text{H})$	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{NO}_3)$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{Ag}-\text{O})$
H2AcPh		3222 f	1654 F	1618 f	–	620 f	–
[Ag(H2AcPh)NO ₃]	(1)	3264 f	1662 F	1626 f	1384 m	630 f	554 f
H2AcpCH ₃ Ph		3232 f	1650 F	1608 m	–	630 f	–
[Ag(H2AcpCH ₃ Ph)NO ₃]	(2)	3204 m	1660 F	1610 m	1384 m	628 f	568 f
H2AcpClPh		3286 m	1660 F	1606 f	–	624 f	–
[Ag(H2AcpClPh)NO ₃]	(3)	3218 m	1668 F	1592 F	1384 m	628 f	538 f
H2AcpNO ₂ Ph		3186 m	1668 F	1602 m	–	620 f	–
[Ag(H2AcpNO ₂ Ph)NO ₃]	(4)	3204 f	1672 F	1602 m	1384 m	630 f	544 f

^a Pastilhas de KBr (4000-400 cm^{-1}); F = forte, m = média e f = fraca; ν estiramento e ρ deformação; – Ausência da banda

A Figura 3.3 mostra, como exemplo, o espectro de absorção na região do infravermelho para H2AcpCH₃Ph em comparação com seu complexo [Ag(H2AcpCH₃Ph)NO₃] (2).

⁴H. S. Ibrahim, S. M. Abou-seri, N. S. M. Ismail, M. M. Elaasser, M. H. Aly, H. A. Abdel-Aziz, *Eur. J. Med. Chem.* 108 (2016) 415-422.

⁵R. Anbazhagan, K.R. Sankaran, *Spectrochim. Acta, Part A.* 135 (2015) 984-993.

⁶R. M. Mohareb, D. H. Fleita, O. K. Sakka, *Molecules.* 16 (2011) 16-27.

⁷S. G. Küçüküzümlü, A. Mazi, F. Sahin, S. Oztürk, J. Stables, *Eur. J. Med. Chem.* 38 (2003) 1005-1013.

⁸K. Nakamoto, *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, Willey-Interscience, New York, 1970.

⁹M. G. B. Drew, S. De, S. Nag, D. Datta, *Inorg. Chim. Acta.* 362 (2009) 610-613.

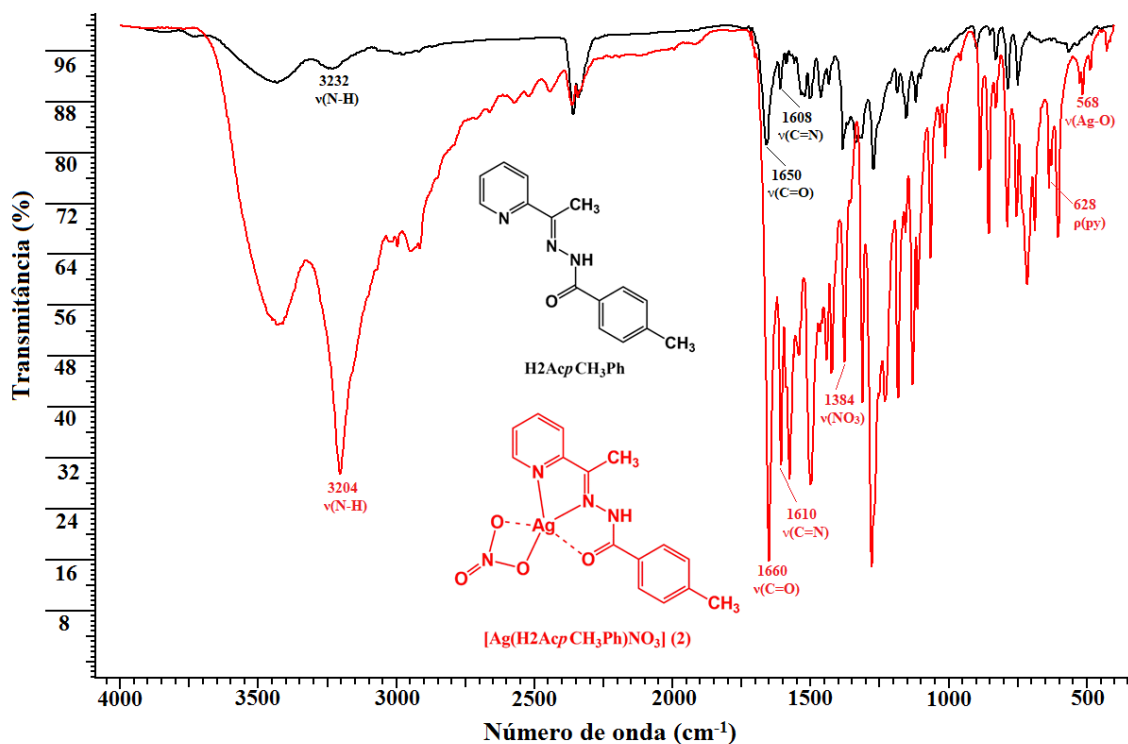


Figura 3.3 – Espectros de absorção na região do infravermelho de H2AcpCH₃Ph e do complexo [Ag(H2AcpCH₃Ph)NO₃] (2), obtidos em pastilhas de KBr (4000-400 cm⁻¹).

3.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN das hidrazonas e seus complexos de prata(I) foram obtidos em DMSO-*d*₆, uma vez que este é o único solvente que dissolve todos os ligantes e complexos. Os sinais de RMN de ¹H foram atribuídos com base nos deslocamentos químicos, multiplicidades e com o auxílio de experimentos de correlação homonucleares COSY. O tipo de carbono (C, CH) foi determinado pelos experimentos DEPT 135. As atribuições dos carbonos protonados foram feitas através de experimentos de RMN bidimensional heteronuclear de HMQC e HMBC.

Nos espectros de RMN de ¹H das hidrazonas H2AcPh e H2AcpClPh foram observados sinais duplicados, indicando a presença dos isômeros *E* e *Z* em solução (Figura 3.4). Os sinais atribuídos ao N3-H, com deslocamento químico entre 15,80-15,86 ppm, são característicos dos isômeros na sua conformação *Z*, nos quais N3-H encontra-se ligado ao nitrogênio piridínico pelo sistema N3-H...N_{py}. Já os sinais atribuídos ao N3-H, para os isômeros na conformação *E*, em que N3-H forma ligação de hidrogênio com o solvente, são observados entre 10,90-10,96 ppm.^{10,11} De forma análoga, nos

¹⁰A.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) 163–172.

¹¹A. Pérez-Rebolledo, G.M. de Lima, N.L. Speziali, O.E. Piro, E.E. Castellano, J.D. Ardisson, H. Beraldo, *J. Organomet. Chem.* 691 (2006) 3919–3930.

espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ são observados que os sinais de todos os carbonos são duplicados, referentes aos isômeros *E* e *Z*. Nos espectros de RMN de ^1H de $\text{H}_2\text{Ac}_p\text{CH}_3\text{Ph}$ e $\text{H}_2\text{Ac}_p\text{NO}_2\text{Ph}$ apenas um sinal foi encontrado para N3-H em 10,90 e 11,21 ppm, respectivamente, indicando a presença somente do isômero *E* em solução.

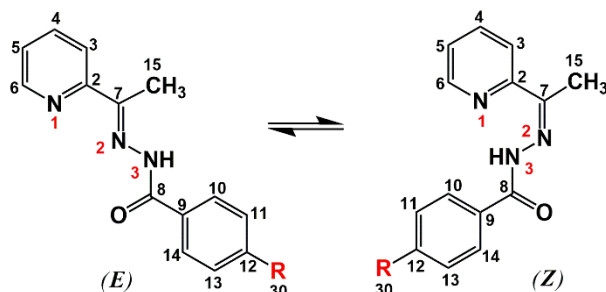


Figura 3.4 – Isômeros conformacionais *E* e *Z* das 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas. R = H (H_2AcPh) e R = *p*-Cl ($\text{H}_2\text{Ac}_p\text{ClPh}$).

Nos espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos de prata(I) apenas um sinal foi observado para cada hidrogênio e carbono, estando de acordo com a presença de uma única forma isomérica. Os sinais de N3-H nos complexos em 11,32-11,86 ppm estão de acordo com a presença de ligantes de configuração *E*. Conforme a Figura 3.5 e dados da Tabela 3.3, todos os sinais dos hidrogênios sofreram alterações significativas nos complexos em relação a sua posição nas hidrazonas livres.

Os sinais de RMN de ^1H dos complexos foram atribuídos com a ajuda dos mapas de contornos COSY (Figura 3.6), nos quais se observam as correlações homonucleares entre hidrogênios vizinhos por ordem de três ligações ($^3J\ ^1\text{H}-^1\text{H}$).

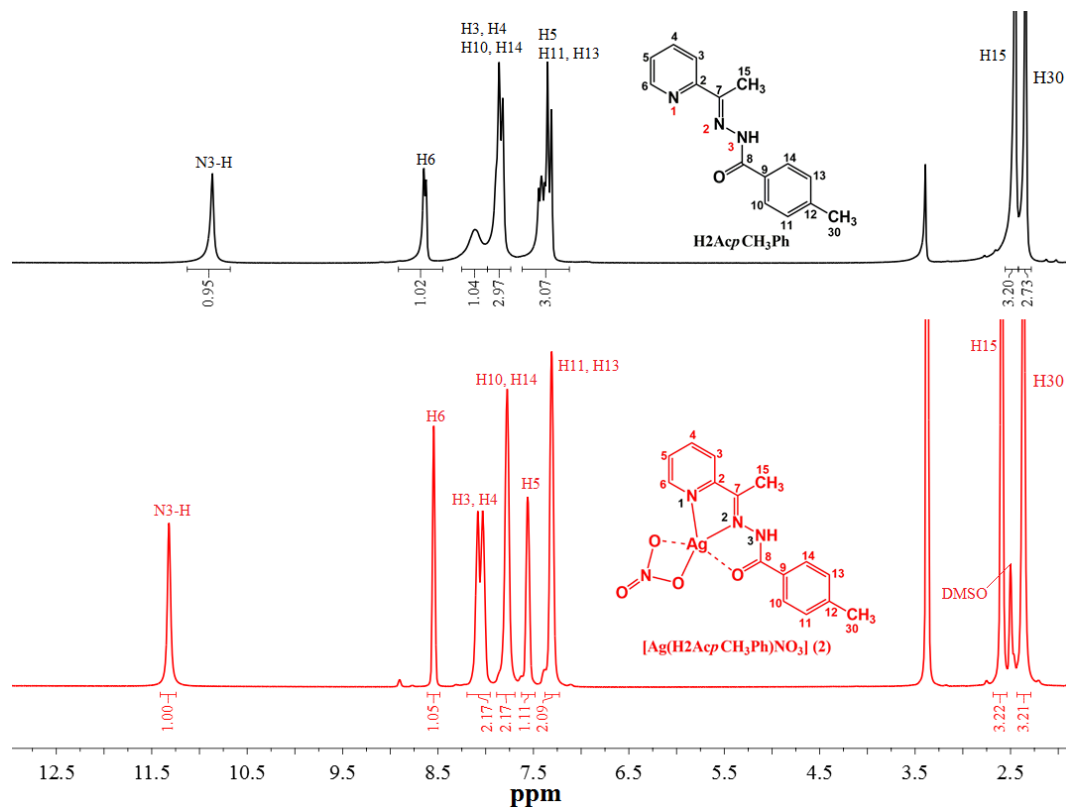


Figura 3.5 – Espectros de RMN de ^1H de $\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph}$ e do complexo $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (2) registrados em $\text{DMSO}-d_6$ à temperatura ambiente.

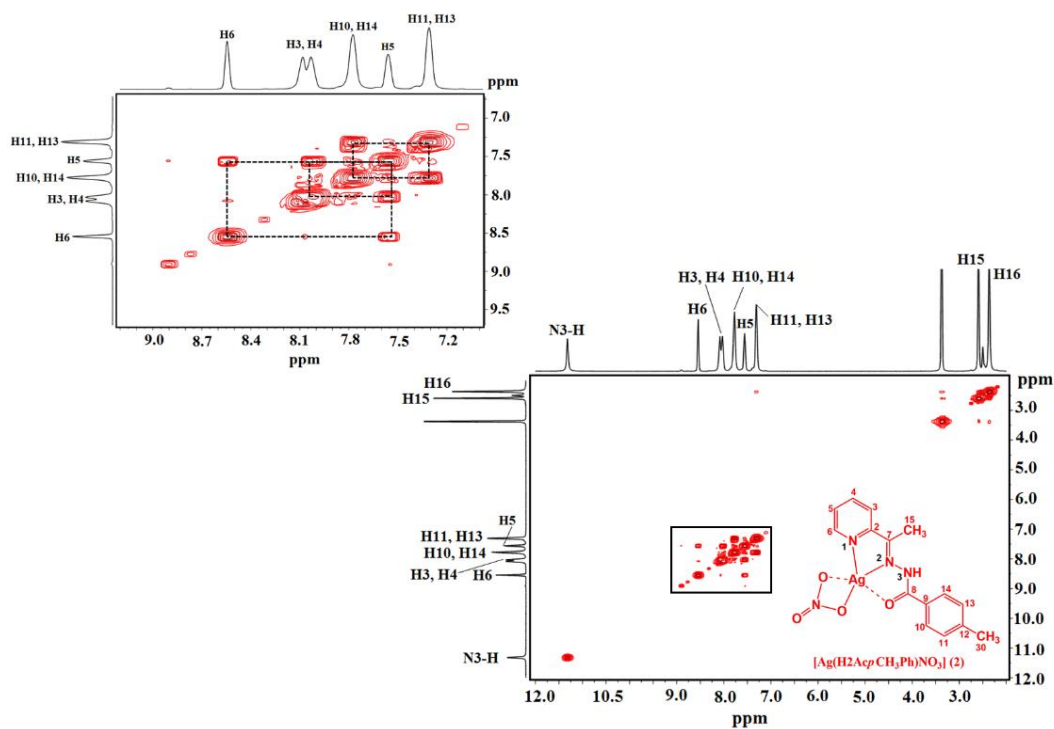
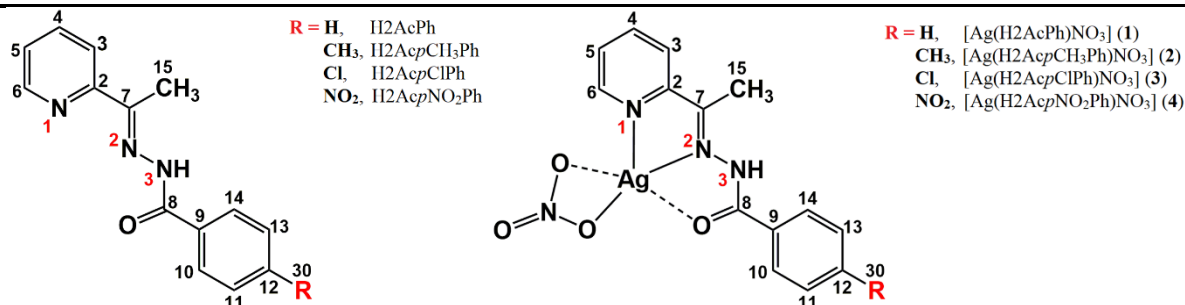


Figura 3.6 – Expansão do mapa de contornos COSY ($^1\text{H}-^1\text{H}$) do complexo $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (2) registrado em $\text{DMSO}-d_6$ à temperatura ambiente.

Tabela 3.3 – Atribuições, número de hidrogênio (n), multiplicidades (M),^a constantes de acoplamento (*J*, Hz) e deslocamento químico (ppm) dos sinais de RMN de ¹H das 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas e seus complexos de prata(I) (400 MHz), em DMSO-*d*₆.

Atribuições	n	H2AcPh		(1)	H2AcpCH ₃ Ph		(2)	H2AcpClPh		(3)	H2AcpNO ₂ Ph		(4)
		<i>Z</i>	<i>E</i>		<i>E</i>		<i>Z</i>	<i>E</i>		<i>E</i>			
N3-H	1	15,80(s)	10,90 (s)	11,60(s)	10,90(s)	11,32(s)	15,86(s)	10,96(s)	11,65(s)	11,21(s)	11,86(s)		
H3	1	8,01-7,73(m)	8,01-7,73(m)	8,20-8,01(m)	8,32-8,05(m)	8,20-7,95(m)	–	8,26-7,71(m)	7,93(d) (<i>J</i> = 7,40)	8,25-7,65(m)	8,11(d) (<i>J</i> = 9,00)		
H4	1	8,29-8,01(m)	8,29-8,01(m)	8,20-8,01(m)	8,05-7,81(m)	8,20-7,95(m)	–	8,26-7,71(m)	7,93(d) (<i>J</i> = 7,40)	8,25-7,65(m)	8,11(d) (<i>J</i> = 9,00)		
H5	1	7,69-7,29(m)	7,69-7,29(m)	7,73-7,60(m)	7,57-7,44(m)	7,62-7,48(m)	–	7,72-7,27(m)	7,72-7,55(m)	7,47(t)	7,71-7,55(m)		
H6	1	8,91(d)	8,66(d)	8,62(d) (<i>J</i> = 4,70)	8,70(d) (<i>J</i> = 4,40)	8,54(s)	8,92(d)	8,62(d)	8,61(d) (<i>J</i> = 4,70)	8,64 (d)	8,59(d) (<i>J</i> = 3,70)		
H10, H14	2	8,01-7,73(m)	8,01-7,73(m)	7,92(d) (<i>J</i> = 6,50)	8,05-7,81(m)	7,89-7,69(m)	–	8,26-7,71(m)	8,10(d) (<i>J</i> = 5,20)	8,25-7,65(m)	8,11(d) (<i>J</i> = 9,00)		
H11, H13	2	7,54(d) (<i>J</i> = 7,42)	7,54(d) (<i>J</i> = 7,42)	7,55(t) (<i>J</i> = 6,90)	7,40(d) (<i>J</i> = 7,90)	7,38-7,23(m)	–	7,60(d)	7,72-7,55(m)	8,50-8,25(m)	8,33(d) (<i>J</i> = 8,00)		
H12	1	7,69-7,29(m)	7,69-7,29(m)	7,73-7,60(m)	–	–	–	–	–	–	–		
H15	3	2,49(s)	2,46(s)	2,61(s)	2,46(s)	2,59(s)	–	2,47(s)	2,61(s)	2,50(s)	2,63(s)		
H30	3	–	–	–	2,57(s)	2,36(s)	–	–	–	–	–		



^a Os desdobramentos dos sinais H3, H5 nos ligantes seriam dupletos, no entanto devido à sobreposição de sinais são observados apenas multipletos; M = (s) simpleto; (d) dupletto; (t) triplete; (m) multipletto.
 – Ausência de sinal

De forma semelhante, todos os sinais dos carbonos sofreram alterações significativas nos complexos em relação a sua posição nas hidrazonas livres. A Figura 3.7 mostra, como exemplo, o espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de $\text{H}_2\text{AcpClPh}$ em comparação com o seu complexo $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (**2**). Os sinais atribuídos aos carbonos C8 (C=O), C7 (C=N) e C2, C3, C4, C5 e C6 (anel piridínico) sofrem deslocamentos químicos significativos, indicando que a coordenação das hidrazonas ao centro metálico ocorre através do sistema quelante $\text{N}_{\text{py}}\text{-N}_{\text{imina}}\text{-O}$. Os subspectros DEPT 135 auxiliaram a caracterização registrando os sinais atribuídos aos carbonos metilênicos e carbonos ligados a apenas um hidrogênio.

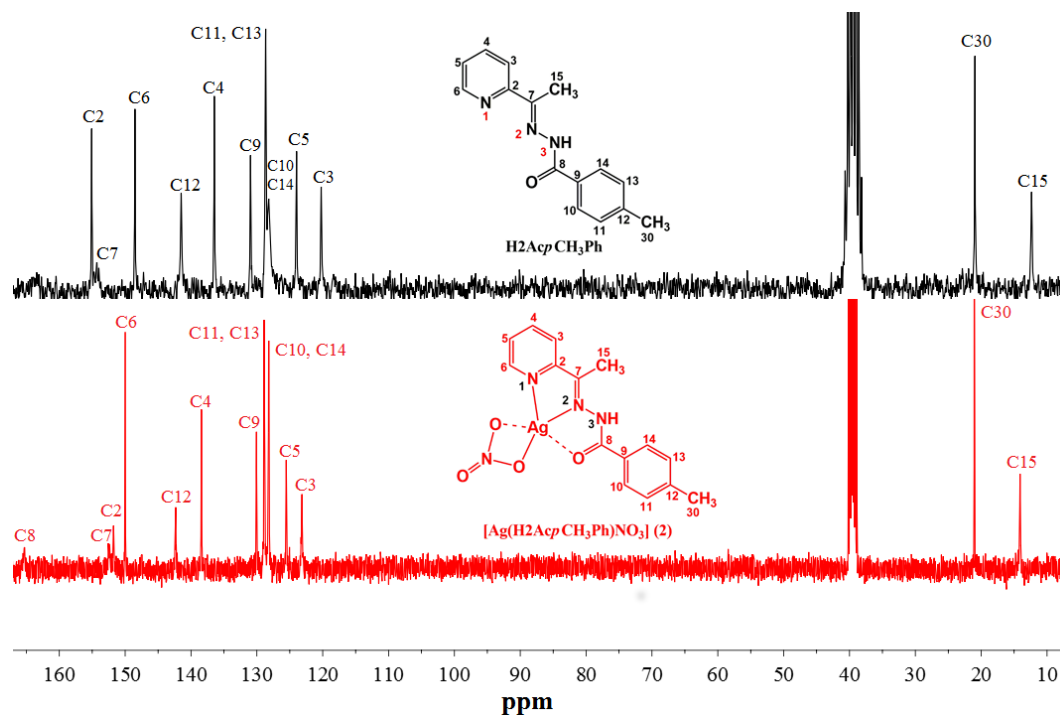


Figura 3.7 – Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de $\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph}$ e do complexo $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (**2**) registrados em $\text{DMSO-}d_6$ à temperatura ambiente.

Os sinais dos carbonos hidrogenados, foram atribuídos pela análise das correlações heteronucleares, $^1J\ ^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$, registradas via mapas de contornos obtidos pela técnica de HMQC (Figura 3.8), onde se observam as correlações entre carbonos e hidrogênios diretamente ligados. Para análise dos carbonos quaternários foram utilizados os experimentos de HMBC (Figura 3.9), que permite determinar as correlações heteronucleares entre hidrogênios e carbonos em maior distância, tais como, $^2J\ ^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$, $^3J\ ^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ e até $^4J\ ^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$.^{12,13} As atribuições de todos os sinais identificados nos espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ para os compostos estão apresentados na Tabela 3.4.

¹²R. M. Silverstein, F. X. Webster, D. J. Kiemle, *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. Editora LCT, 7ª edição, 2006.

¹³Y. Vasavi, N. Parthiban, D. S. Kumar, D. Banji, N. Srisutherson, S. Ghosh, M. V. K. Chakravarthy, *Int. J. PharmTech Res.* 3 (2011) 1410-1422.

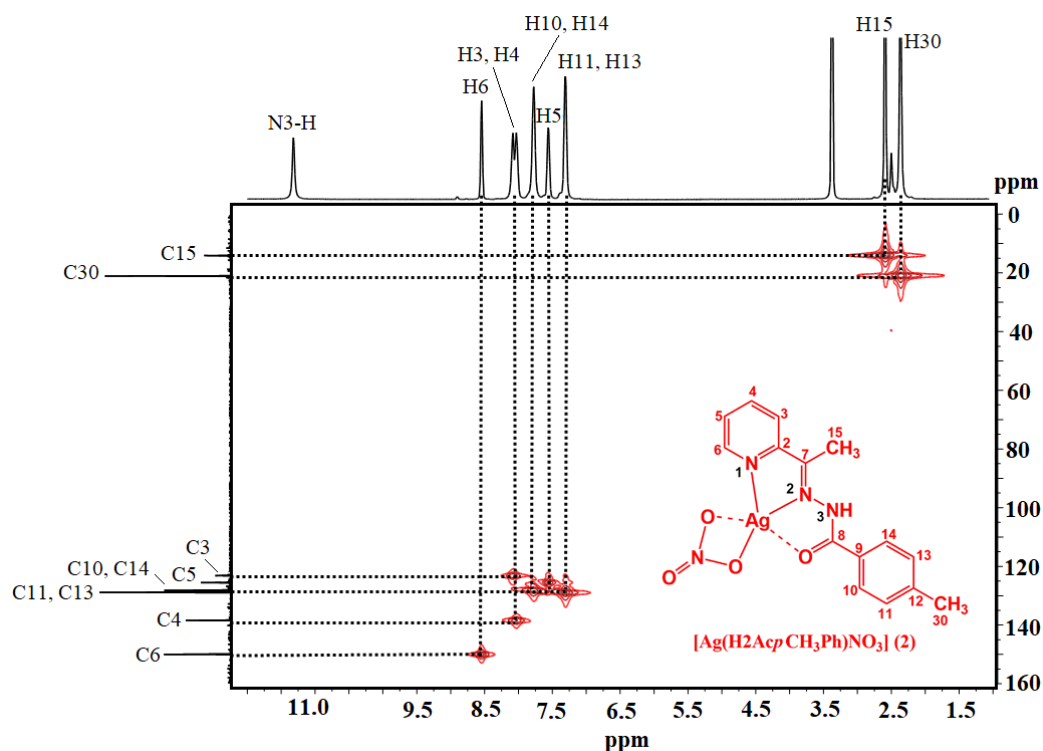


Figura 3.8 – Expansão do mapa de contornos HMQC do complexo $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (2) registrados em $\text{DMSO-}d_6$ à temperatura ambiente.

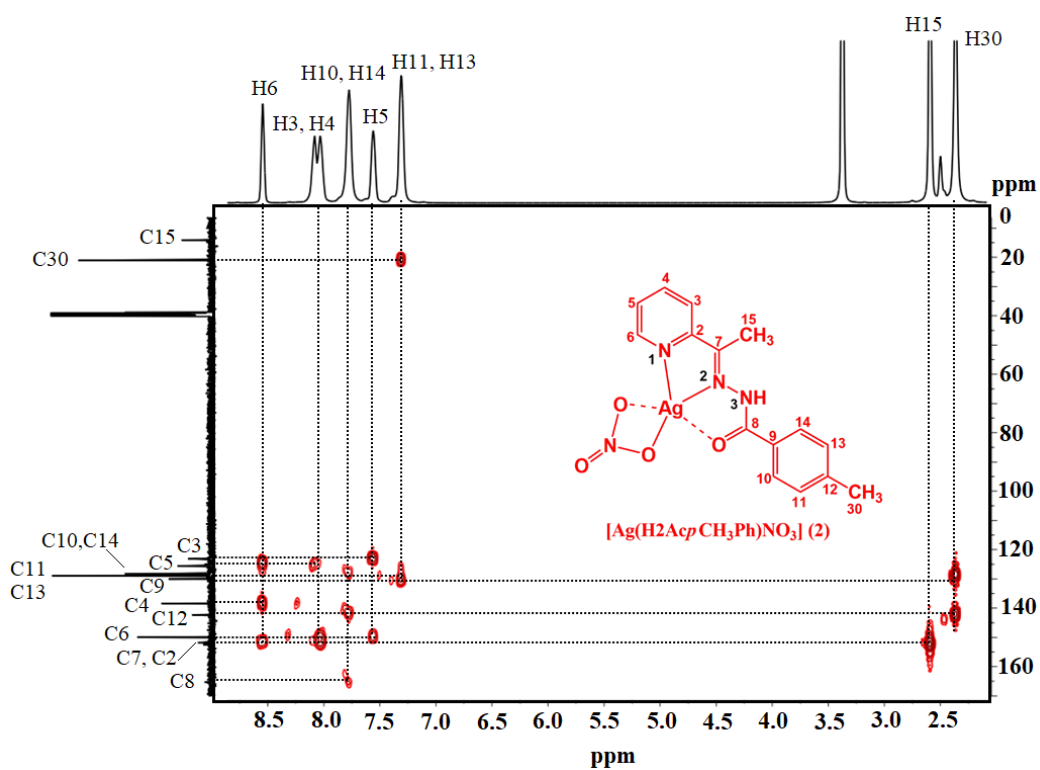
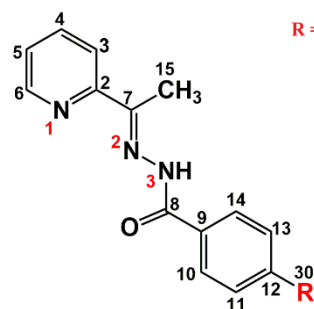


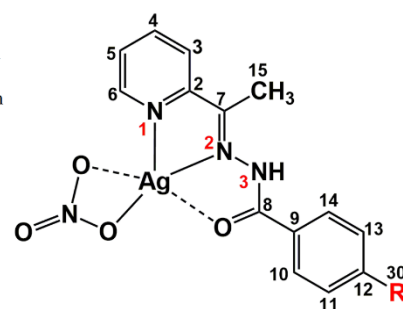
Figura 3.9 – Expansão do mapa de contornos HMBC do complexo $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (2) registrados em $\text{DMSO-}d_6$ à temperatura ambiente.

Tabela 3.4 – Atribuições e deslocamento químico (ppm) dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT 135 das 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas e seus complexos de prata(I) (400 MHz), em $\text{DMSO-}d_6$.

Atribuições	DEPT ^a	H2AcPh		(1)	H2AcpCH ₃ Ph		(2)	H2AcpClPh		(3)	H2AcpNO ₂ Ph		(4)
		Z	E		E		Z	E		E			
C2	–	152,4	155,0	152,5	155,5	151,7	154,9	150,8	154,7	150,9	152,4		
C3	↑	124,7	120,2	123,9	120,6	123,1	120,2	124,0	120,4	124,0	124,7		
C4	↑	138,6	136,4	139,0	136,9	138,4	136,5	139,0	136,6	139,0	138,6		
C5	↑	124,7	123,9	126,0	124,4	125,5	124,2	126,1	124,2	126,2	124,7		
C6	↑	147,6	148,5	150,5	147,9	149,9	148,5	150,5	148,5	150,4	147,6		
C7	–	144,6	143,4	152,6	148,9	152,4	144,3	152,9	149,1	153,9	144,6		
C8	–	164,0	162,4	165,9	163,8	165,4	163,1	164,9	162,6	164,3	164,0		
C9	–	131,9	131,4	132,7	131,4	130,0	132,5	131,4	134,0	138,5	131,9		
C10, C14	↑	128,1	128,1	128,2	128,6	128,1	129,9	130,2	129,5	129,8	128,1		
C11, C13	↑	128,1	128,1	128,5	129,1	128,8	128,1	128,6	123,3	123,5	128,1		
C12	–	133,2	133,8	132,4	141,9	142,3	138,1	137,3	139,6	149,5	133,2		
C15	↑	12,4	22,0	14,5	12,8	14,0	12,5	14,6	12,8	14,7	12,4		
C30	↑	–	–	–	21,4	21,0	–	–	–	–	–		



R = H, H2AcPh
CH₃, H2AcpCH₃Ph
Cl, H2AcpClPh
NO₂, H2AcpNO₂Ph



R = H, [Ag(H2AcPh)NO₃] (1)
CH₃, [Ag(H2AcpCH₃Ph)NO₃] (2)
Cl, [Ag(H2AcpClPh)NO₃] (3)
NO₂, [Ag(H2AcpNO₂Ph)NO₃] (4)

^a ↑ (conversão no DEPT 135 para CH e CH₃)

– Ausência de sinal

3.1.3. Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray

O comportamento em solução dos complexos de prata(I) foi investigado através da espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS), em modo positivo, sendo fundamental para a compreensão das estruturas elucidadas. A análise dos espectros de massas dos complexos (**1-4**) mostrou a presença de duas espécies catiônicas $[\text{Ag}(\text{HL})]^+$ e $[\text{Ag}(\text{HL})_2]^+$, indicando novamente uma possível descomplexação do íon nitrato com formação de AgNO_3 e complexos 1:2 $[\text{Ag}(\text{HL})_2]^+$ durante a ionização (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 – Relação massa/carga (m/z) das espécies encontradas nos espectros de massas dos complexos de prata(I) (**1-4**)

Compostos	Massa molar (g mol^{-1})	Espécies catiônicas (m/z) ^a	
		$[\text{AgHL}]^+$	$[\text{Ag}(\text{HL})_2]^+$
$[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPh})\text{NO}_3]$ (1)	409,15	347,9977 (348,0101)	587,1149 (587,1162)
$[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (2)	423,17	360,0142 (360,0260)	615,1456 (615,1476)
$[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpClPh})\text{NO}_3]$ (3)	443,59	381,9577 (381,9705)	655,0371 (655,0371)
$[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpNO}_2\text{Ph})\text{NO}_3]$ (4)	454,14	390,9882 (390,9954)	677,0851 (677,0864)

^a experimental; (calculado)

HL = H_2AcPh ; $\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph}$; $\text{H}_2\text{AcpClPh}$; $\text{H}_2\text{AcpNO}_2\text{Ph}$.

A Figura 3.10A mostra, como exemplo, o espectro de massas do complexo $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (**2**). Observou-se que a espécie de maior abundância relativa em solução foi $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})_2]^+$ com m/z igual a 615,1456. Ao compararmos o padrão isotópico experimental com o teórico de ambas as espécies catiônicas foram observados padrões isotópicos com valores de m/z equivalentes. Conforme mostrado nas Figuras 3.10B e C, as espécies $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})]^+$ e $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})_2]^+$ apresentaram valores de $m/z_{(\text{experimental})}$ iguais a 360,0142 e 615,1456 e $m/z_{(\text{teórica})}$ de 360,0261 e 615,1476, respectivamente.

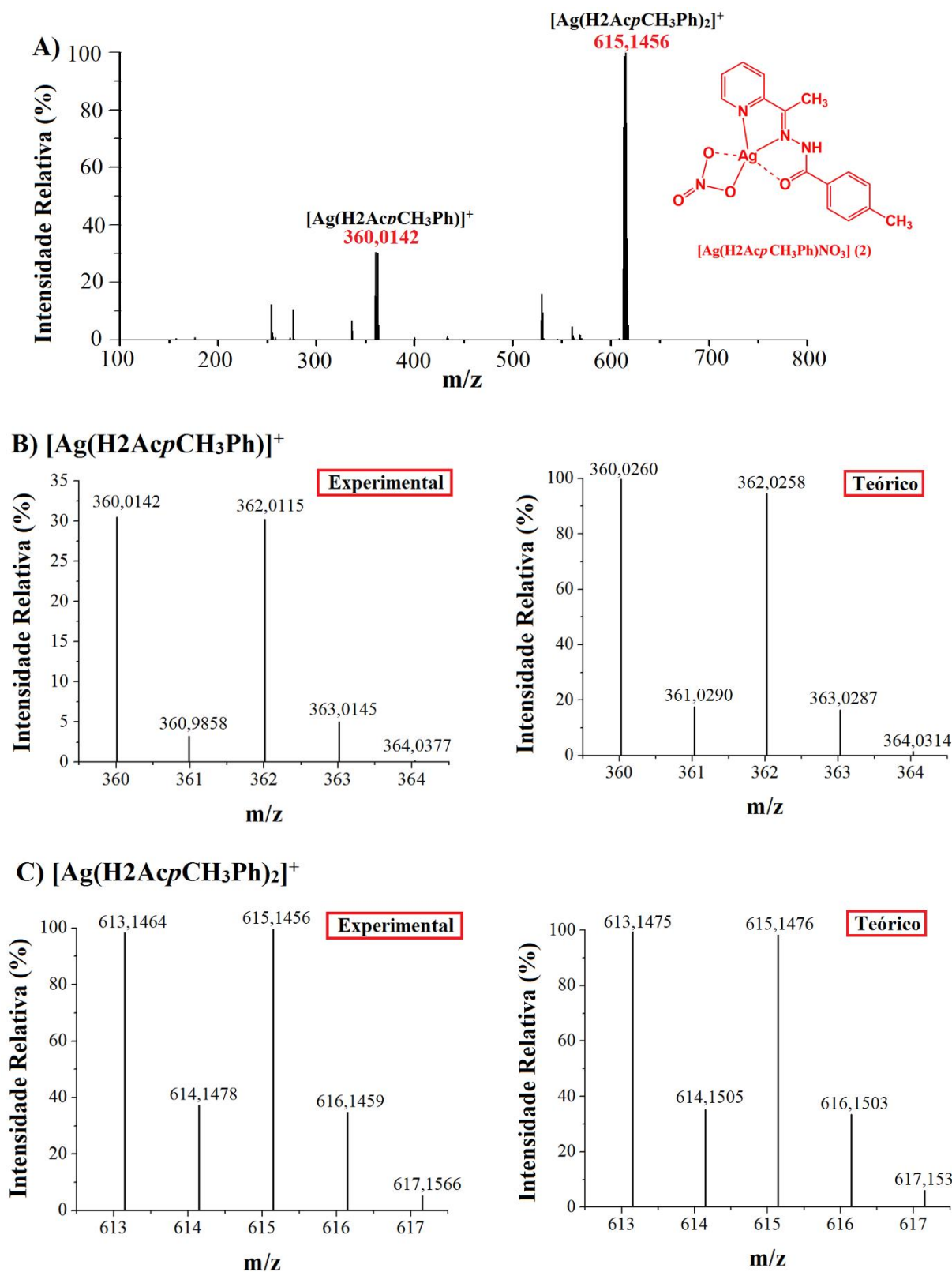


Figura 3.10 – A) Espectros de massas (ESI, modo +) de $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (**2**) registrados na faixa de 100 a 800 m/z. Comparação entre o padrão isotópico experimental e teórico das espécies catiônicas B) $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})]^+$ e C) $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})_2]^+$.

3.1.4. Cristalografia por difração de raios X

Monocristais dos complexos $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPh})\text{NO}_3]$ (**1**), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})_2]\text{NO}_3$ (**2a**), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpClPh})_2]\text{NO}_3$ (**3a**) e $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpNO}_2\text{Ph})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (**4a**) adequados para a análise estrutural por difração de raios X foram obtidos em temperatura ambiente a partir da evaporação lenta da solução-mãe procedente das sínteses de (**1-4**).

As estruturas cristalográficas dos complexos e numeração utilizada são mostradas na Figura 3.11. Os resumos da coleção de dados e dos refinamentos para os compostos estão apresentados na Tabela 3.6. As distâncias e ângulos de ligação dos complexos (**1-4a**), juntamente com os dados das hidrazonas H_2AcPh e $\text{H}_2\text{AcpClPh}$ para comparação, estão apresentados na Tabela 3.7. As interações de hidrogênio presentes nas estruturas (**1-4a**) estão apresentadas na Tabela A1 (anexo).

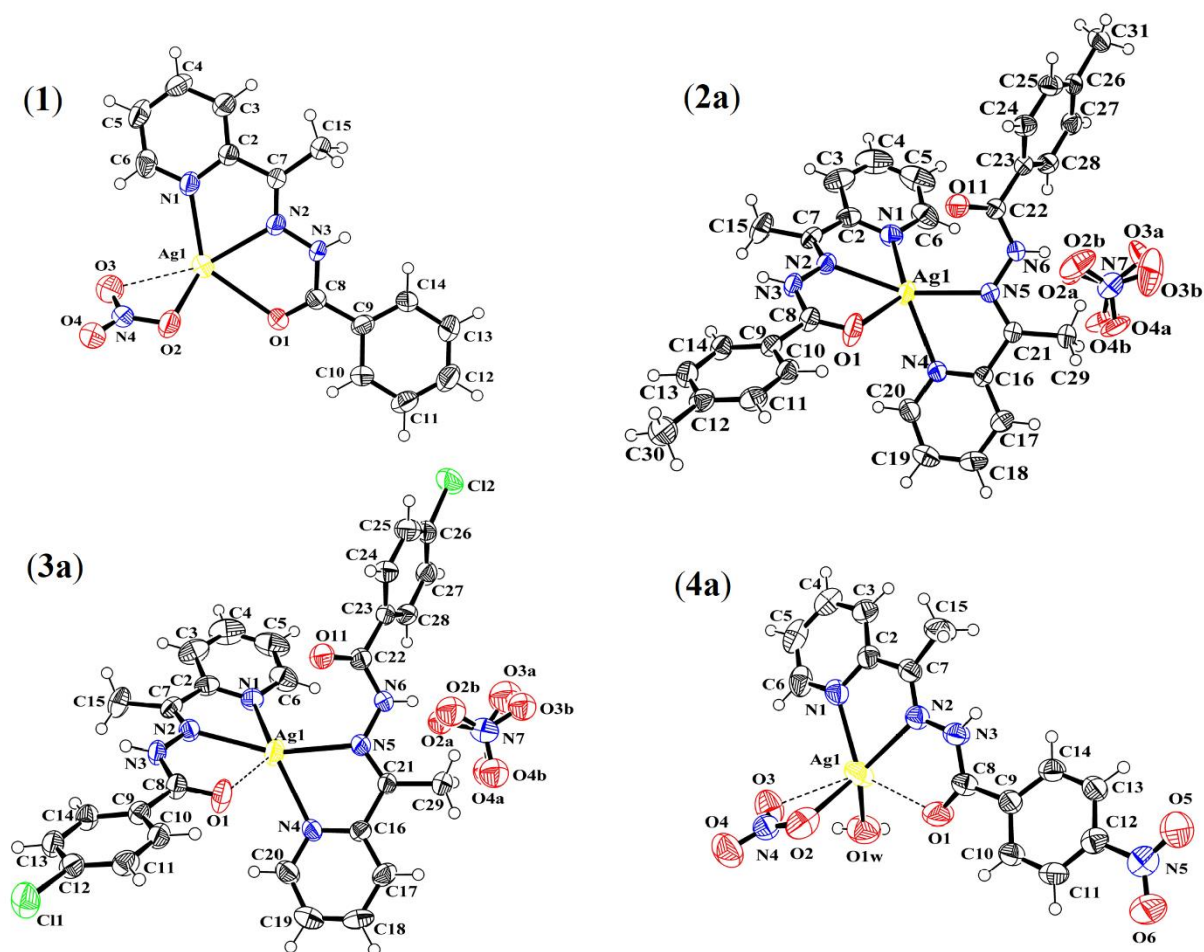


Figura 3.11 – Projeção ORTEP dos complexos $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPh})\text{NO}_3]$ (**1**), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})_2]\text{NO}_3$ (**2a**), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpClPh})_2]\text{NO}_3$ (**3a**) e $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpNO}_2\text{Ph})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]$ (**4a**) com elipsoides em nível de probabilidade de 50%.

Tabela 3.6 – Dados cristalográficos e de refinamento das estruturas dos complexos [Ag(H2AcPh)NO₃] (**1**), [Ag(H2Ac p CH₃Ph)₂]NO₃ (**2a**), [Ag(H2Ac p ClPh)₂]NO₃ (**3a**) e [Ag(H2Ac p NO₂Ph)(H₂O)(NO₃)] (**4a**).

Compostos	(1)	(2a)	(3a)	(4a)
Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₃ N ₄ O ₄ Ag	C ₃₀ H ₃₀ N ₇ O ₅ Ag	C ₂₈ H ₂₄ Cl ₂ N ₇ O ₅ Ag	C ₁₄ H ₁₄ N ₅ O ₇ Ag
Massa molecular (g mol ⁻¹)	409,15	676,48	717,31	472,17
Temperatura (K)	270(2)	270(2)	270(2)	270(2)
Sistema cristalino	Monoclínico	Triclínico	Triclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P 2 ₁ /n	P -1	P -1	P 2 ₁ /c
Parâmetros da célula unitária				
a (Å)	6,7603(7)	8,4416(6)	8,2925(4)	7,2535(4)
b (Å)	13,0051(7)	12,9864(5)	13,1239(7)	13,2543(7)
c (Å)	16,5751(9)	14,7636(6)	14,7518(7)	17,9111(8)
α (°)	90	112,115(4)	112,238(5)	90
β (°)	97,889(7)	99,194(4)	98,638(4)	99,214(4)
γ (°)	90	95,337(4)	96,159(4)	90
a (Å)	1443,46(19)	1459,23(14)	1445,35(13)	1699,76(15)
Número de fórmulas elementares (Z)	4	2	2	4
Densidade calculada (Mg m ⁻³)	1,883	1,540	1,648	1,845
Coeficiente de absorção (mm ⁻¹)	1,424	0,743	0,934	1,237
F(000)	816	692	724	944
Dimensão do cristal (mm)	0,21 x 0,06 x 0,06	0,39 x 0,19 x 0,08	0,43 x 0,13 x 0,05	0,36 x 0,09 x 0,07
Intervalo de θ (°)	2,0 - 26,4	2,5 - 26,4	2,5 - 26,4	1,9 - 29,5
	-8 \leq h \leq 8	-10 \leq h \leq 9	-10 \leq h \leq 10	-10 \leq h \leq 9
Intervalo de índices	-16 \leq k \leq 15	-16 \leq k \leq 16	-16 \leq k \leq 16	-18 \leq k \leq 15
	-20 \leq l \leq 20	-18 \leq l \leq 18	-18 \leq l \leq 18	-24 \leq l \leq 24
Refleções coletadas	12186	12718	22505	13375
Reflexões únicas [R _{int}]	2968 [0,0762]	5972 [0,0283]	5925 [0,0521]	4195 [0,0325]
Integridade para $\theta = 25.242^\circ$ (%)	100	99,9	99,9	100
Dados/restrições/parâmetros	2968/0/209	5972/12/420	5925/12/388	4195/3/ 251
Qualidade de ajuste (S)	1,079	1,032	1,037	1,023
Índices de R final [I > 2 σ (I)]	R ₁ = 0,0625, wR ₂ = 0,1508	R ₁ = 0,0293, wR ₂ = 0,0655	R ₁ = 0,0452, wR ₂ = 0,1024	R ₁ = 0,0623, wR ₂ = 0,1419
Índices de R (todos os dados)	R ₁ = 0,1019 wR ₂ = 0,1764	R ₁ = 0,0409, wR ₂ = 0,0708	R ₁ = 0,0735, wR ₂ = 0,1204	R ₁ = 0,0932, wR ₂ = 0,1617
$\Delta\rho_{\text{máx.}}$ e $\Delta\rho_{\text{mín.}}$ (eÅ ⁻³)	1,562 e -0,668	0,276 e -0,441	1,149 e -0,796	2,549 e -0,894
CCDC	1582668	1582669	1582670	1582671

De acordo com a Tabela 3.6, os complexos **(1)** e **(4a)** cristalizaram em sistemas cristalinos monoclinicos e grupo especial $P 2_1/n$ e $P 2_1/c$, respectivamente, enquanto que as estruturas dos complexos **(2a)** e **(3a)** pertencem ao sistema cristalino triclinico, ambos de grupo especial $P -1$. As células unitárias de **(1)** e **(4a)** possuem quatro fórmulas moleculares ($Z = 4$) e para **(2a)** e **(3a)** são observadas apenas duas fórmulas moleculares ($Z = 2$).

Os cristais de **(1)** e **(4a)** contém uma molécula de hidrazona na sua forma neutra coordenada a prata(I) juntamente com um íon nitrato. Em **(4a)** podemos ainda observar uma molécula de água na esfera de coordenação do centro metálico. Em **(2a)** e **(3a)** duas moléculas de hidrazona neutra estão ligadas ao metal e um nitrato está presente como contra-íon. Assim, além do complexo 1:1 $[M(HL)NO_3]$, também foram formados complexos do tipo 1:2 $[M(HL)_2]NO_3$ provenientes das sínteses de **(2)** e **(3)** (Figura 3.11).

Conforme apresentado na Tabela 3.7, a comparação das distâncias de ligação entre o ligante H_2AcPh^{14} e o complexo **(1)** e de $H_2AcpClPh^{15}$ e o complexo **(3a)** revelaram mudanças significativas após a coordenação das hidrazonas a prata(I). Em **(2a)** e **(3a)** é possível observar que a distância de ligação $Ag1-O1$ [$2,5923(16)$ Å **(2a)** e $2,619(3)$ Å **(3a)**] é muito mais curta em relação a distância de $Ag1-O11$ [$3,0224(17)$ Å **(2a)** e $3,028(3)$ Å **(3a)**]. As distâncias de $Ag1-O11$, mencionadas acima, são ligeiramente mais longas do que as distâncias de $Ag-O$ entre $2,3-2,6$ Å encontradas na literatura, mas são significativamente mais curtas que a soma dos raios de van der Waals da prata e do oxigênio igual a $3,24$ Å (raios de van der Waals para $Ag = 1,72$ Å e $O = 1,52$ Å).¹⁶ Na verdade, esse fato sugere que ocorre uma interação fraca entre $O11$ e o centro metálico em ambos os complexos.

Nos complexos **(1)** e **(4a)**, as distâncias de ligação de $Ag1-O1$ [$2,564(4)$ Å **(1)** e $2,629(4)$ Å **(4a)**] e $Ag1-O3$ [$2,692(6)$ Å **(1)** e $2,665(4)$ Å **(4a)**] são bem maiores do que as distâncias de $Ag1-O2$ [$2,384(6)$ Å **(1)** e $2,488(5)$ Å **(4a)**]. Assim, em **(1)** e **(4a)** são observadas interações mais fracas entre $Ag(I)$ e $O1$ da hidrazona e $O3$ do íon nitrato do que entre a $Ag(I)$ e o $O2$ do íon nitrato. Este efeito provavelmente explica as condutividades molares relativamente altas dos complexos **(1-4)**, que podem ser devidas à liberação do íon nitrato, fracamente coordenado ao centro metálico, em solução. Interessantemente, em **(4a)** a distância de ligação $Ag1-O1w$ de $2,359(4)$ Å é muito mais curta do que as demais distâncias de $Ag-O$, sugerindo uma maior afinidade da $Ag(I)$ pelo oxigênio da água.

¹⁴J. Patole, U. Sandbhor, S. Padhye, D.N. Deobagkar, C.E. Anson, A. Powell, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 51–55.

¹⁵E.D.L. Piló, A.A. Recio-Despaigne, J.G. Da Silva, I.P. Ferreira, J.A. Takahashi, H. Beraldo, *Polyhedron.* 97 (2015) 30–38.

¹⁶H.-L. Hsiao, C.-J. Wu, W. Hsu, C.-W. Yeh, M.-Y. Xie, W.-J. Huang, J.-D. Chen, *CrystEngComm.* 14 (2012) 8143–8152.

Em (**1-4a**), todas as distâncias de ligação de Ag-N e Ag-O (2,3-2,4 Å e 2,3-2,6 Å, respectivamente), e as interações Ag...O (2,6-2,7 Å) e Ag1...O11 (cerca de 3,0 Å) são comparáveis com as distâncias relatadas para complexos análogos de prata(I).¹⁷⁻¹⁹

As diferenças nos ângulos de ligação entre (**1**) e (**4a**) resultam da presença de uma molécula de água adicional em (**4a**). De fato, os ângulos N2-Ag1-O2 são 118,97(18)° (**1**) e 120,45(13)° (**4a**) e O2-Ag1-O1 são 85,17(15)° (**1**) e 90,81(15)° (**4a**) (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 – Distâncias de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados para os complexos [Ag(H2AcPh)NO₃] (**1**), [Ag(H2AcpCH₃Ph)₂]NO₃ (**2a**), [Ag(H2AcpClPh)₂]NO₃ (**3a**) e [Ag(H2AcpNO₂Ph)(H₂O)(NO₃)] (**4a**) juntamente com dados para H2AcPh e H2AcpClPh.

Distâncias (Å)	H2AcPh ¹⁴	(1)	(2a)	H2AcpClPh ¹⁵	(3a)	(4a)
N1-C2	1,325(3)	1,350(8)	1,344(3)	1,3345(19)	1,343(5)	1,342(6)
C2-C7	1,487(2)	1,494(8)	1,492(3)	1,4900(18)	1,496(6)	1,491(7)
C7-N2	1,264(3)	1,280(7)	1,282(3)	1,2860(18)	1,279(5)	1,278(6)
N2-N3	1,375(2)	1,369(7)	1,377(2)	1,3810(15)	1,380(4)	1,369(6)
N3-C8	1,347(3)	1,365(8)	1,367(3)	1,3590(17)	1,364(5)	1,359(6)
C8-O1	1,219(2)	1,219(7)	1,219(3)	1,2260(16)	1,219(4)	1,217(6)
Ag1-N1	–	2,338(5)	2,3709(19)	–	2,372(3)	2,378(4)
Ag1-N2	–	2,378(5)	2,3930(16)	–	2,401(3)	2,372(4)
Ag1-O1	–	2,564(4)	2,5923(16)	–	2,619(3)	2,629(4)
Ag1-O2	–	2,384(6)	–	–	–	2,488(5)
Ag1-O3	–	2,692(6)	–	–	–	2,665(4)
Ag1-N4	–	–	2,3631(17)	–	2,371(3)	–
Ag1-N5	–	–	2,3565(17)	–	2,376(3)	–
Ag1-O1W	–	–	–	–	–	2,359 (4)
Ângulos (°)	H2AcPh ¹⁴	(1)	(2a)	H2AcpClPh ¹⁵	(3a)	(4a)
C2-C7-N2	114,5(1)	114,2(5)	115,23(19)	115,12(12)	115,4(3)	115,8(4)
C7-N2-N3	119,0(1)	120,0(5)	118,86(18)	116,22(11)	118,6(3)	119,5(4)
N2-N3-C8	117,0(1)	118,1(5)	117,51(16)	117,89(11)	117,7(3)	118,0(4)
N3-C8-O1	123,3(2)	122,3(5)	121,82(19)	123,28(13)	122,2(4)	122,8(5)
N1-Ag1-O2	–	118,35(19)	–	–	–	116,77(14)
N1-Ag1-O1	–	133,45(16)	132,39(6)	–	132,01(10)	132,60(13)
N2-Ag1-O1	–	65,27(15)	64,15(5)	–	63,82(10)	64,23(12)
N2-Ag1-O2	–	118,97(18)	–	–	–	120,45(13)
O2-Ag1-O1	–	85,17(15)	–	–	–	90,81(15)
N1-Ag1-O3	–	92,69(18)	–	–	–	93,85(14)
N2-Ag1-O3	–	150,62(18)	–	–	–	152,95(14)
O2-Ag1-O3	–	49,84(16)	–	–	–	48,33(13)

¹⁷J.A. Liu, Q. Li, M.M. Wang, H. Wang, G.Q. Gan, Y. Qu, Z.D. Lin, *Transit. Met. Chem.* 35 (2010) 507–511.

¹⁸Z. Xiao, M. Wen, C. Wang, X. Huang, *Acta Cryst.* C71 (2015) 258–261.

¹⁹J.-L. Du, X.-L. Zhu, P. Li, *Acta Cryst.* C68 (2012) m281–m283.

3.2. Avaliação da atividade antifúngica

Com o intuito de avaliar a ação antifúngica das hidrazonas livres, complexos (**1-4**), nitrato de prata e agentes antifúngicos de uso clínico (nitrato de miconazol e nistatina) foram realizados ensaios de triagem microbiológica, conforme procedimento descrito no capítulo 2 (seção 2.4.1). Nessa etapa, os compostos foram investigados na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ e apenas os compostos que foram capazes de inibir o crescimento antifúngico acima de 80% foram submetidos à determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento dos fungos (CI_{50}) através do método de microdiluição.

Na Tabela 3.8 são apresentados os valores de CI_{50} dos compostos frente às espécies de *Candida* e fungos filamentosos. Os resultados mostram que a ação antifúngica das hidrazonas melhorou significativamente frente a *Candida* com a complexação, exceto nas espécies de *Candida lusitanae*. Observou-se ainda que nas espécies de *Candida dubliniensis* os complexos $[\text{Ag}(\text{H2AcpClPh})\text{NO}_3]$ (**3**) e $[\text{Ag}(\text{H2AcpNO}_2\text{Ph})\text{NO}_3]$ (**4**) apresentaram menores valores de CI_{50} (14,5 e 13,9 μM , respectivamente). Porém, para todas as cepas de *Candida* os valores de CI_{50} exibidos pelos complexos (**1-4**) foram bem superiores aos valores encontrados para os agentes antifúngicos, nitrato de miconazol e nistatina. Embora nenhum dos compostos estudados tenha se revelado mais ativo do que os fármacos de controle frente espécies de *Candida*, alguns compostos demonstraram ser tão ativos quanto a nistatina contra os fungos filamentosos (Tabela 3.8). O ligante $\text{H2AcpCH}_3\text{Ph}$ foi tão ativo como a nistatina contra *Aspergillus niger* e *Penicillium citrinum*, e mais ativo que a nistatina contra *Aspergillus parasiticus*. Além disso, H2AcpClPh ($CI_{50} = 19,9 \mu\text{M}$) mostrou-se muito mais potente que a nistatina ($CI_{50} = 76,0 \mu\text{M}$) contra *A. parasiticus*. Em alguns casos, os complexos provaram ser mais ativos que as hidrazonas livres. A melhor ação antifúngica foi observada para o complexo $[\text{Ag}(\text{H2AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (**2**) que foi mais ativo que a nistatina contra *A. niger* ($CI_{50} = 6,1 \mu\text{M}$), *A. parasiticus* ($CI_{50} = 34,9 \mu\text{M}$) e *P. citrinum* ($CI_{50} = 17,1 \mu\text{M}$). Adicionalmente, o complexo $[\text{Ag}(\text{H2AcpNO}_2\text{Ph})\text{NO}_3]$ (**4**) apresentou efeito antifúngico similar à nistatina contra *P. citrinum*. Por outro lado, o nitrato de prata exibiu atividade antimicrobiana contra alguns dos fungos sob investigação, mas foi menos ativo que a nistatina contra todas as espécies, exceto para as cepas de *P. citrinum*. Em diversos casos, a complexação das hidrazonas resultou no aumento da ação antifúngica.

Em relação às estruturas das 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas, não foi possível identificar uma influência significativa do grupo substituinte na atividade anti-*Candida*, no entanto, o complexo $[\text{Ag}(\text{H2AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (**2**), que contém $p\text{CH}_3$ como substituinte, apresentou uma ação antifúngica superior aos demais complexos contra os fungos filamentosos. Esse fato nos permite sugerir que o complexo (**2**) possivelmente apresente uma maior capacidade em ligar-se ao ergosterol nas membranas celulares fúngicas ou até mesmo de inibir as enzimas responsáveis pela biossíntese do ergosterol.

Tabela 3.8 – Atividade antifúngica (CI₅₀) de 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas, complexos de prata (I) (1-4), nitrato de prata e agentes antifúngicos (nitrato de miconazol e nistatina) frente as espécies de *Candida* e fungos filamentosos.

Compostos	CI ₅₀ (µM) ± DP ^a							
	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida lusitanae</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
H2AcPh	78,5 ± 3,9	–	47,8 ± 1,7	–	48,6 ± 4,7	45,2 ± 6,4	–	72,5 ± 0,2
[Ag(H2AcPh)NO ₃] (1)	40,7 ± 3,4	52,8 ± 3,0	29,1 ± 2,2	45,2 ± 1,8	12,4 ± 1,3	20,1 ± 1,2	61,2 ± 0,4	39,8 ± 7,8
H2AcpCH ₃ Ph	66,5 ± 1,3	> 246	31,6 ± 0,7	> 246	23,6 ± 1,0	16,6 ± 2,0	43,6 ± 5,4	33,4 ± 5,3
[Ag(H2AcpCH ₃ Ph)NO ₃] (2)	44,3 ± 5,4	44,3 ± 1,2	33,7 ± 3,0	60,7 ± 0,1	10,5 ± 0,5	6,1 ± 1,9	34,9 ± 0,6	17,1 ± 0,4
H2AcpClPh	16,7 ± 0,7	102,8 ± 0,1	13,9 ± 0,8	164,1 ± 2,0	> 28	47,5 ± 3,2	19,9 ± 2,1	44,1 ± 1,3
[Ag(H2AcpClPh)NO ₃] (3)	14,5 ± 2,1	42,1 ± 2,0	20,2 ± 2,6	40,5 ± 2,6	41,4 ± 4,0	22,9 ± 5,2	83,4 ± 4,0	> 35
H2AcpNO ₂ Ph	22,7 ± 0,1	77,0 ± 2,7	17,3 ± 0,4	99,0 ± 7,7	42,1 ± 1,7	47,7 ± 3,8	> 27	53,9 ± 4,0
[Ag(H2AcpNO ₂ Ph)NO ₃] (4)	13,9 ± 1,6	52,6 ± 5,5	17,5 ± 3,8	50,8 ± 5,0	32,9 ± 1,2	21,7 ± 6,4	> 68	31,6 ± 2,7
AgNO ₃	> 11	64,2 ± 2,2	20,8 ± 1,8	40,3 ± 1,0	20,1 ± 3,5	> 11	> 183	24,6 ± 3,0
Nitrato de miconazol	1,6 ± 0,5	19,5 ± 4,5	<6,2x10 ⁻⁵	3,6 ± 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Nistatina	4,4 ± 0,8	1,9 ± 0,2	5,3 ± 0,8	7,9 ± 0,7	4,8 ± 3,8	15,0 ± 1,1	76,0 ± 1,1	30,7 ± 1,2

^a CI₅₀ = Concentração inibitória de 50% do crescimento dos fungos;

DP = Desvio padrão;

– Não inibe o crescimento de fungos acima de 80% a 250 µg mL⁻¹.

3.3. Estudo de relações estrutura-atividade (SAR)

Para o estudo de relações estrutura-atividade (SAR) dos ligantes e seus complexos (**1-4**) foram realizados cálculos teóricos para identificar os possíveis parâmetros estruturais e estereo-eletrônicos que possam estar envolvidos no mecanismo de ação antifúngica desses compostos. As propriedades físico-químicas calculadas neste estudo foram as energias dos orbitais HOMO e LUMO, momento de dipolo (μ), coeficiente de partição octanol-água ($\log P$), área superficial (A.S) e o volume molecular (V) (Tabela A2 em anexo).

As energias do HOMO e LUMO estão relacionadas ao potencial de ionização e afinidade eletrônica, respectivamente. As diferenças de energia (ΔE) entre os orbitais de fronteira HOMO e LUMO estão associadas à estabilidade e reatividade das moléculas. A energia do HOMO está intimamente relacionada à susceptibilidade ao ataque eletrofílico, enquanto a energia do LUMO está intimamente relacionada à susceptibilidade ao ataque nucleofílico. O momento de dipolo pode fornecer informações sobre hidrofobicidade/hidrofilicidade e $\log P$ é frequentemente usado como medida de lipofilicidade dos compostos, o que está associado a capacidade de uma molécula atravessar a membrana celular. A área superficial pode oferecer informações sobre características espaciais necessárias para interações entre fármaco e o alvo biológico.²⁰

Todos esses parâmetros foram correlacionados com os valores de CI_{50} da atividade antifúngica dos compostos. Para cada espécie de fungo foram construídas matrizes de correlação considerando as propriedades apenas dos ligantes livres (isômeros *Z* e *E*), apenas dos complexos (**1-4**) e dos ligantes e complexos (**1-4**) em conjunto. Inicialmente, os cálculos para os complexos foram realizados em fase gasosa e assumindo que o íon nitrato (NO_3^-) estaria coordenado ao átomo de prata. No entanto, as propriedades calculadas não exibiram nenhum tipo de correlação com os dados biológicos. As correlações com os dados biológicos foram obtidas apenas quando os cálculos foram realizados em água, utilizando o modelo PCM e assumindo que o íon nitrato deixa a esfera de coordenação do metal após a solvatação. Portanto, todas as propriedades calculadas para os complexos neste trabalho foram obtidas em solução aquosa e na ausência do íon nitrato. As matrizes de correlação envolvendo os parâmetros estereo-eletrônicos e os valores de CI_{50} estão disponíveis nas Tabelas A3-A12 (Anexo).

Os principais parâmetros estereo-eletrônicos (E_{HOMO} , μ and $\log P$) e os valores de CI_{50} dos compostos frente aos fungos investigados estão apresentados na Tabela 3.9.

²⁰G.L. Parrilha, R.P. Dias, W.R. Rocha, I.C. Mendes, D. Benítez, J. Varela, H. Cerecetto, M. González, C. M.L. Melo, J. K.A.L. Neves, V. R.A. Pereira, H. Beraldo, *Polyhedron*. 31 (2012) 614–621.

Tabela 3.9 – Parâmetros estereo-eletrônicos (E_{HOMO} , μ and $\log P$)^a e atividade antifúngica (CI_{50})^b de 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas e seus complexos de prata(I) (**1-4**).

Compostos	E_{HOMO} (eV)	μ (D)	$\log P$	CI_{50} (μM)								
				<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	
H2AcPh	(E) -6,332	4,675	1,98	78,5	–	47,8	–	48,6	45,2	–	72,5	
H2AcpCH ₃ Ph	(E) -6,283	9,332	2,49	66,5	> 246	31,6	> 246	23,6	16,6	43,6	33,4	
H2AcpClPh	(E) -6,300	4,139	2,58	16,7	102,8	13,9	164,1	> 28	47,5	19,9	44,1	
H2AcpNO ₂ Ph	(E) -6,394	6,243	1,92	22,7	77,0	17,3	99,0	42,1	47,7	> 27	53,9	
H2AcPh	(Z) -6,319	9,970	1,98	78,5	–	47,8	–	48,6	45,2	–	72,5	
H2AcpCH ₃ Ph	(Z) -6,277	10,108	2,49	66,5	> 246	31,6	> 246	23,6	16,6	43,6	33,4	
H2AcpClPh	(Z) -6,350	10,064	2,58	16,7	102,8	13,9	164,1	> 28	47,5	19,9	44,1	
H2AcpNO ₂ Ph	(Z) -6,443	11,325	1,92	22,7	77,0	17,3	99,0	42,1	47,7	> 27	53,9	
[Ag(H2AcPh)NO ₃]	(1) -6,894	7,440	2,80	40,7	52,8	29,1	45,2	12,4	20,1	61,2	39,8	
[Ag(H2AcpCH ₃ Ph)NO ₃]	(2) -6,812	7,567	3,27	44,3	44,3	33,7	60,7	10,5	6,1	34,9	17,1	
[Ag(H2AcpClPh)NO ₃]	(3) -6,842	11,170	3,32	14,5	42,1	20,2	40,5	41,4	22,9	83,4	> 35	
[Ag(H2AcpNO ₂ Ph)NO ₃]	(4) -7,007	15,896	2,76	13,9	52,6	17,5	50,8	32,9	21,7	> 68	31,6	

^a Cálculos realizados em água, considerando o NO₃⁻ dissociado e utilizando o modelo PCM;

^b CI_{50} = Concentração inibitória de 50% do crescimento dos fungos;

– Não inibe o crescimento de fungos acima de 80% a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Analisando as hidrazonas livres, os dados mostram que apenas os valores de CI_{50} de *A. niger* e *C. dubliniensis* não apresentam nenhum tipo de correlação com as propriedades dos ligantes. Os valores de CI_{50} para os demais fungos mostram correlação principalmente com o logP das hidrazonas livres, com correlações de -0,781 (*P. citrinum*) e -0,939 (*A. flavus*).

Os dados para os complexos mostram que embora as atividades contra *A. niger* e *C. tropicalis* não exibiram uma correlação apreciável com as propriedades dos complexos, para as outras espécies foram encontradas boas correlações com o momento de dipolo, logP e energia do orbital HOMO. No entanto, não existe uma única propriedade que se correlacione consistentemente com a atividade antifúngica das diferentes cepas. Por exemplo, boas correlações são encontradas para o logP com $R = -0,907$ e $R = 0,993$ para *P. citrinum* e *C. glabrata*, respectivamente. Os valores de CI_{50} contra *C. glabrata*, correlaciona-se bem com a energia do orbital HOMO dos complexos, com $R = -0,786$. Para *C. lusitaniae* e *C. dubliniensis* foram obtidas boas correlações com o momento de dipolo com $R = -0,905$ e $-0,877$, respectivamente.

Quando as propriedades das hidrazonas e dos complexos são analisadas em conjunto, boas correlações são encontradas para cepas de *P. citrinum* ($R = -0,869$ para logP), *C. tropicalis* ($R = 0,905$ para a energia do HOMO) e *C. glabrata* ($R = 0,906$ para a energia do HOMO).

Como mencionado, os parâmetros estereo-eletrônicos correlacionam-se de forma diferente para cada espécie fúngica e não permitem uma conclusão geral. No entanto, quando os dados das hidrazonas e dos complexos foram analisados em conjunto, observou-se que as atividades antifúngicas contra às espécies de *Candida* se correlacionam bem com a energia do orbital HOMO, sugerindo que um ataque eletrofílico externo a esses compostos ou uma doação de elétrons desses compostos para o alvo biológico podem estar envolvidos no mecanismo de ação. Conforme apresentado na Figura 3.12, o orbital HOMO dos complexos está localizado principalmente nos ligantes, com uma pequena participação dos orbitais d do átomo de prata. Portanto, o ataque eletrofílico, se ele realmente ocorre, provavelmente acontece quando o ligante está coordenado ao metal. Por outro lado, para as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, as atividades antifúngicas se correlacionam razoavelmente bem com o logP. Assim, a lipofilicidade dos compostos, geralmente associada à capacidade de atravessar as membranas biológicas, pode ser responsável pelo mecanismo de ação.

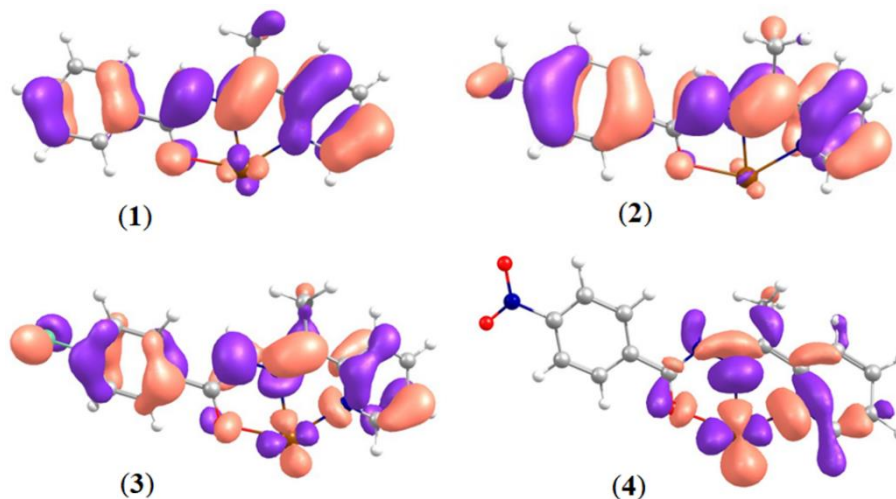


Figura 3.12 – Representação dos orbitais HOMO para os complexos de prata(I) (1-4).

3.4. Avaliação da atividade citotóxica contra células de melanoma e melanócitos murino

Os compostos também foram avaliados em linhagens de células de melanoma metastático (B16F10) e melanócitos não-tumorigênicos (Melan-A) de camundongos. Estudos preliminares foram realizados com os compostos (10 μM) e apenas o ligante $\text{H2AcpNO}_2\text{Ph}$ e o complexo $[\text{Ag}(\text{H2AcpNO}_2\text{Ph})\text{NO}_3]$ (4) exibiram percentagem de inibição da proliferação celular inferior a 50%, não sendo determinados seus valores de CI_{50} .

Os efeitos citotóxicos dos compostos contra células B16F10 estão apresentados na Figura 3.13A. O nitrato de prata apresentou ação antiproliferativa em altas concentrações, com valor de $\text{CI}_{50} = 75,4 \mu\text{M}$. As hidrazonas exibem em geral uma pronunciada ação citotóxica contra células B16F10, sendo mais ativas que a cisplatina. No entanto, essa ação citotóxica é comparável a seus complexos de prata(I) (1-3), indicando que a complexação não foi uma boa estratégia para o aumento da citotoxicidade.

Interessantemente, nos ensaios com células saudáveis (Melan-A), apresentados na Figura 3.13B, o complexo $[\text{Ag}(\text{H2AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (2) mostrou uma diminuição da citotoxicidade ($\text{CI}_{50} = 15,4 \mu\text{M}$) em relação a seu ligante $\text{H2AcpCH}_3\text{Ph}$ ($\text{CI}_{50} = 9,7 \mu\text{M}$). Além disso, foi possível obter um índice de seletividade mais elevado para o complexo (2) ($\text{IS} = 14$) em comparação ao ligante ($\text{IS} = 6$). Esses resultados evidenciam que a estratégia da coordenação de $\text{H2AcpCH}_3\text{Ph}$ a prata(I) resultou numa maior seletividade para células tumorais de melanoma ao invés de células saudáveis de melanócitos.

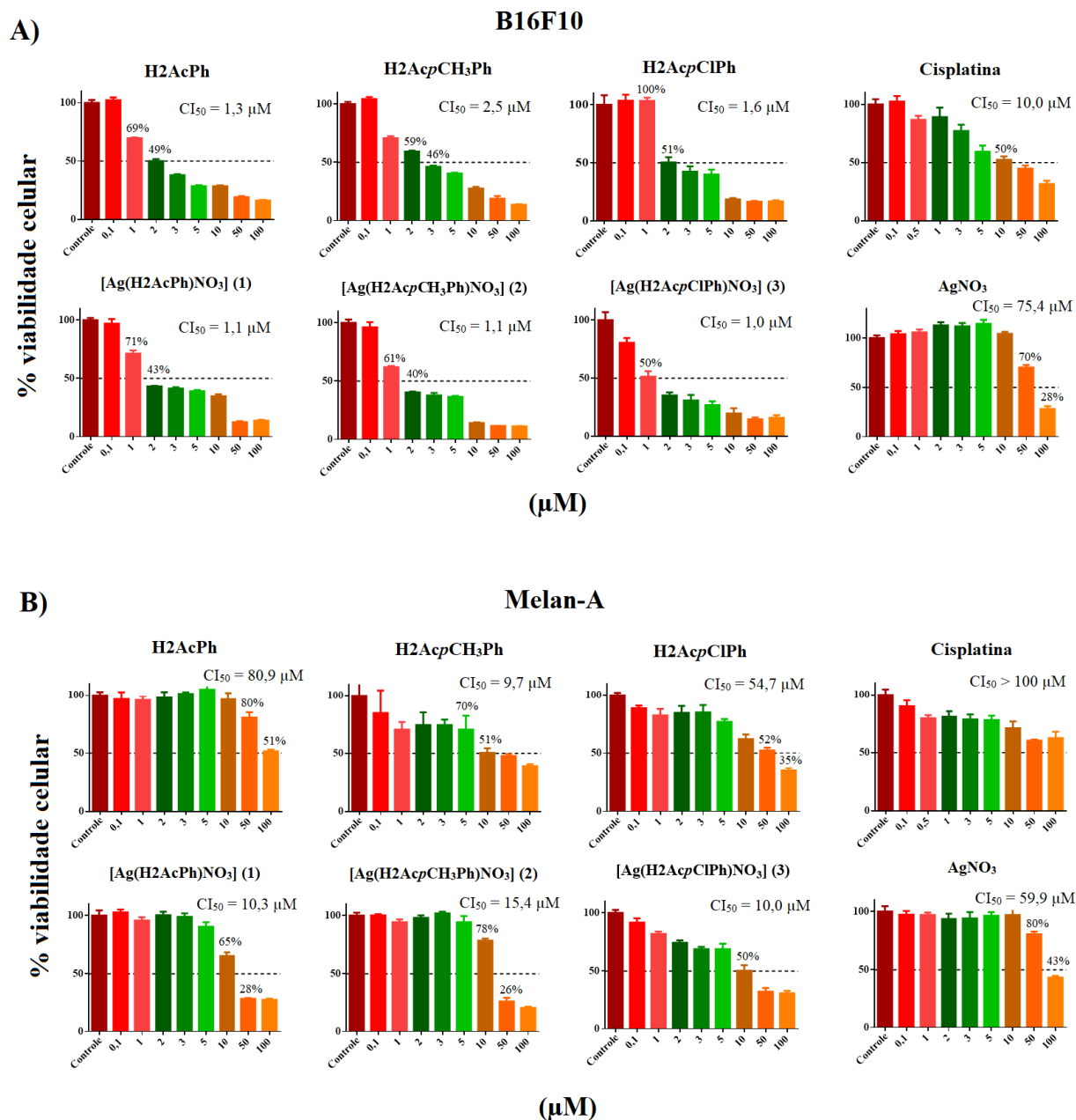


Figura 3.13 – Atividade citotóxica das 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas, complexos (1-3), AgNO_3 e cisplatina contra as linhagens celulares A) B16F10 (melanoma murino metastático) e B) Melan-A (melanócitos murino não-tumorigênicos). As células foram tratadas com concentrações dos compostos de 0,1-100 μM por 72 h e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico do MTT. Os valores são expressos como a média \pm desvio padrão ($n = 6$) de porcentagem de viabilidade celular em comparação com o controle (RPMI 1640 com 10% de FBS e DMSO 1%).

*Os valores de desvio padrão (DP) foram menores do que 0,02.

3.5. Avaliação da interação dos complexos de prata(I) com biomoléculas

3.5.1. Interação com albumina sérica humana (HSA)

Como já sabemos, as albuminas séricas são proteínas muito abundantes no plasma sanguíneo e estão envolvidas principalmente no transporte de fármacos para seus alvos biológicos. Embora existam vários sítios de ligação possíveis na HSA, sugeriu-se que a maioria dos agentes quimioterápicos se liga ao sítio I (localizado no subdomínio IIA) e ao sítio II (localizado no subdomínio IIIA).²¹ As interações no sítio I podem ser evidenciadas *in vitro* investigando as propriedades fluorescentes do resíduo triptofano (Trp-214) presente no subdomínio IIA. A HSA apresenta uma fluorescência intrínseca quando excitada a 295 nm com forte emissão na região de 342 nm devida principalmente à presença de Trp-214.^{22,23} A redução das intensidades de fluorescência está associada a mudanças na natureza do microambiente da proteína. A supressão da fluorescência pode ser induzida por diferentes processos como reações no estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental (mecanismo estático) e colisões moleculares (mecanismo dinâmico).²⁴

Nesse contexto, utilizando-se da técnica de espectroscopia de fluorescência foi investigada a capacidade dos complexos (1-4) em interagir com a biomolécula. A Figura 3.14A apresenta os espectros de fluorescência de HSA na ausência e presença de concentrações crescentes do complexo (2). Observou-se que com o aumento da concentração do complexo (2) as intensidades de fluorescência sofreram uma redução, acompanhada por um deslocamento hipsocrômico de 342 nm para 334 nm em 298K. Essas variações de intensidades indicam que o microambiente próximo ao resíduo de Trp-214 se tornou mais hidrofóbico devido à formação do sistema complexo(2)-HSA.²⁵ Os espectros dos demais complexos exibiram mudanças nas intensidades de fluorescência semelhantes ao complexo (2) nas diferentes temperaturas.

²¹G. Sudlow, D. J. Birkett, D. N. Wade, *Mol. Pharmacol.* 11 (1975) 824–832.

²²S. Bobone, M. Van de Weert, L. Stella, *J. Mol. Struct.* 1077 (2014) 68–76.

²³U.K. Komarnicka, R. Starosta, A. Kyzioł, M. Płotek, M. Puchalska, M. Jeżowska-Bojczuk, *J. Inorg. Biochem.* 165 (2016) 25–35.

²⁴M. Dustkami, H. Mansouri-Torshizi, *Int. J. Biol. Macromol.* 99 (2017) 319–334.

²⁵S. Naveenraj, S. Anandan, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* 14, (2013) 53-71.

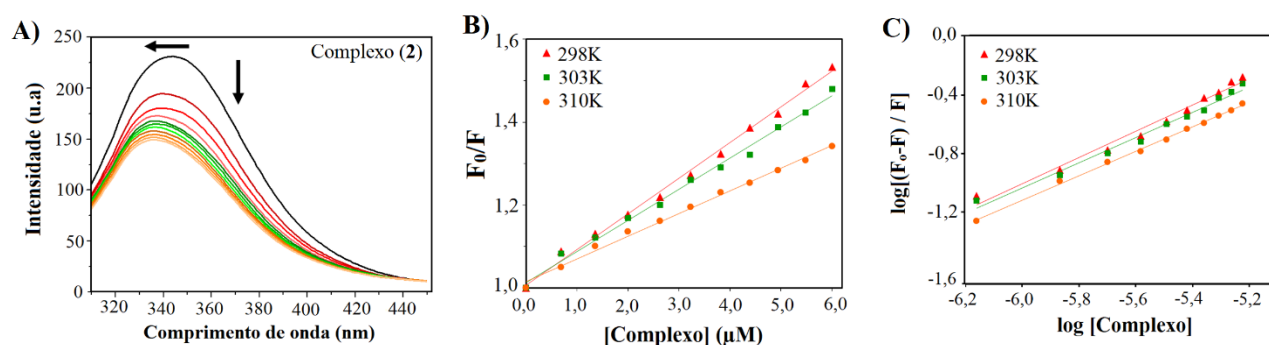


Figura 3.14 – A) Espectros de fluorescência de HSA (1,84 μM, λ_{em} = 342 nm) na ausência (linha preta) e presença (linhas coloridas) de quantidades crescentes de [Ag(H₂AcpCH₃Ph)NO₃] (**2**) a 298 K. As setas indicam as mudanças ocorridas nos espectros após cada adição do complexo (**2**). B) Gráficos de Stern-Volmer para a interação entre HSA e o complexo (**2**) em diferentes temperaturas. C) Gráficos de log[(F₀ - F)/F] versus log [Complexo] para determinação da constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n) em diferentes temperaturas.

O mecanismo de supressão da fluorescência pode ser determinado através das constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) em diferentes temperaturas. Para esse estudo, os experimentos foram realizados em três temperaturas distintas (298 K, 303 K e 310 K). Os valores de K_{sv} foram obtidos aplicando-se a equação clássica de Stern-Volmer (Equação 2.2, seção 2.5.1) e a partir dos coeficientes angulares segundo a relação F₀/F versus [complexo] (Figura 3.14B).

Analisando os dados da Tabela 3.11, observamos que os valores de K_{sv} estão na ordem de 10⁴ M⁻¹, indicando uma boa capacidade dos compostos em interagir com a HSA. Observou-se ainda que em todos os complexos o aumento da temperatura resultou na diminuição dos valores de K_{sv}, sugerindo que a interação complexo-HSA ocorre predominantemente *via* mecanismo de supressão estático. Além disso, a constante de velocidade bimolecular de supressão (K_q) também pode inferir sobre o tipo de mecanismo envolvido na supressão e pode ser calculada através da Equação 2.3. Nota-se que valores obtidos de K_q (10¹² M⁻¹ s⁻¹) para os complexos são maiores que o valor de K_q (≈ 10¹⁰ M⁻¹ s⁻¹) para um mecanismo de colisão dinâmico entre biomoléculas²⁶ (Tabela 3.10), fornecendo evidências adicionais da ocorrência do processo de supressão estático. Resultados similares foram obtidos para a interação entre HSA e outros complexos metálicos.^{27,28}

²⁶J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, 2006.

²⁷M. Saeidifar, H. Mansouri-torshizi, A. Akbar, *J. Lumin.* 167 (2015) 391–398.

²⁸S. Thangavel, R. Rajamanikandan, H.B. Friedrich, M. Ilanchelian, B. Omondi, *Polyhedron.* 107 (2016) 124–135.

Tabela 3.10 – Constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de supressão bimolecular (K_q), constantes logarítmicas de ligação ($\log K_b$) e número de sítios de ligação (n) para a interação entre HSA e os complexos de prata(I) (**1-4**) a diferentes temperaturas.

Compostos		T(K)	$K_{sv}(10^4 M^{-1})$	$K_q(10^{12} M^{-1} s^{-1})$	$\log K_b$	n
[Ag(H2AcPh)NO ₃]	(1)	298	5,25(±0,01)	5,25(±0,01)	3,9(±0,1)	0,84(±0,02)
		303	4,15(±0,01)	4,15(±0,01)	3,5(±0,1)	0,80(±0,02)
		310	4,01(±0,01)	4,01(±0,01)	3,4(±0,3)	0,77(±0,05)
[Ag(H2Ac _p CH ₃ Ph)NO ₃]	(2)	298	8,60(±0,02)	8,60(±0,02)	4,4(±0,1)	0,85(±0,02)
		303	7,51(±0,02)	7,51(±0,02)	3,9(±0,1)	0,81(±0,02)
		310	5,59(±0,01)	5,59(±0,01)	3,7(±0,1)	0,80(±0,02)
[Ag(H2Ac _p ClPh)NO ₃]	(3)	298	7,62(±0,02)	7,62(±0,02)	4,0(±0,1)	0,83(±0,01)
		303	7,17(±0,02)	7,17(±0,02)	3,7(±0,3)	0,79(±0,05)
		310	7,01(±0,02)	7,01(±0,02)	3,5(±0,1)	0,74(±0,03)
[Ag(H2Ac _p NO ₂ Ph)NO ₃]	(4)	298	7,48(±0,02)	7,48(±0,02)	4,7(±0,2)	0,96(±0,03)
		303	6,49(±0,01)	6,49(±0,01)	3,7(±0,2)	0,80(±0,03)
		310	6,38(±0,02)	6,38(±0,02)	3,6(±0,3)	0,76(±0,04)

➤ *Determinação das constantes de ligação e número de sítios de ligação*

Como foi visto que a supressão da fluorescência ocorre por um mecanismo de supressão estático foram determinados os valores de logaritmo da constante de ligação ($\log K_b$) e número de sítios de ligação (n) de acordo com a Equação 2.4. Analisando a Figura 3.14C, as curvas de $\log[(F_0 - F)/F]$ versus $\log[\text{complexo}]$ para o complexo **(2)** apresentam um perfil linear nas diferentes temperaturas. A Tabela 3.10 apresenta os valores de $\log K_b$ e n que foram obtidos por meio dos coeficientes angular e linear da inclinação da reta, respectivamente. Em todos os complexos os valores de $\log K_b$ diminuem em função do aumento da temperatura, o que está associado a uma redução na estabilidade do sistema complexo-HSA. No entanto, os complexos **(2)** e **(4)** possuem valores de $\log K_b$ relativamente mais altos quando comparados com os complexos **(1)** e **(3)**, sugerindo uma interação mais forte com a HSA. Os valores de n próximos de 1 indicam que os complexos de prata(I) ligam-se a HSA por uma razão molar de 1:1 (complexo-HSA).

➤ *Análise dos parâmetros termodinâmicos*

Os parâmetros termodinâmicos são empregados para identificar a natureza da ligação não-covalente envolvida na interação entre compostos e biomoléculas. Os principais tipos de ligação incluem hidrofóbica, eletrostática, van der Waals e ligações de hidrogênio.²⁹ Os valores da entalpia padrão (ΔH°) e entropia padrão (ΔS°) foram obtidos conforme a equação de Van't Hoff (Equação 2.5).

²⁹Z. Kazemi, H. Amiri, M. Sahihi, V. Mirkhani, M. Moghadam, *J. Photochem. Photobiol. B.* 163 (2016) 246–260.

Construindo-se o gráfico de $\ln K_b$ versus $1/T$ (Figura 3.15), foi possível encontrar os valores dos coeficientes angular ($-\Delta H^\circ/R$) e linear ($\Delta S^\circ/R$). A variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°) dos compostos foi determinada a partir das constantes de ligação K_b , usando a equação $\Delta G^\circ = -RT \ln K_b$ (Equação 2.6).

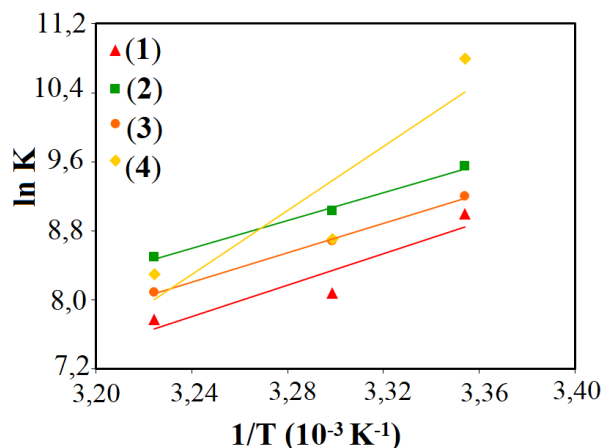


Figura 3.15 – Diagramas de Van' Hoff ($\ln K$ versus $1/T$) da interação complexo-HSA.

Os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos estão apresentados na Tabela 3.11. As variações de ΔH° e ΔS° são negativas, indicando que as ligações de hidrogênio e/ou forças de van der Waals são predominantes para a interação complexo-HSA. Os valores negativos de ΔH° indicam ainda que a interação ocorre por um processo exotérmico.³⁰ Em todos os casos, os valores negativos de ΔG° revelam que a ligação entre os complexos e a HSA acontece espontaneamente.

Tabela 3.11 – Parâmetros termodinâmicos da interação entre HSA e os complexos de prata(I) (1-4) a diferentes temperaturas.

Compostos		T (K)	ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG° (kJ mol ⁻¹)
[Ag(H ₂ AcPh)NO ₃]	(1)	298			-22,30
		303	-75,85	-180,85	-20,37
		310			-20,04
[Ag(H ₂ Ac _p CH ₃ Ph)NO ₃]	(2)	298			-23,66
		303	-67,23	-146,36	-22,75
		310			-21,89
[Ag(H ₂ Ac _p ClPh)NO ₃]	(3)	298			-22,79
		303	-70,94	-161,62	-21,87
		310			-20,84
[Ag(H ₂ Ac _p NO ₂ Ph)NO ₃]	(4)	298			-26,76
		303	-153,76	-429,21	-21,93
		310			-21,39

³⁰A. Ray, B. Koley Seth, U. Pal, S. Basu, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 92 (2012) 164–174.

3.5.2. Interação com ácido desoxirribonucleico (*calf thymus* DNA, CT-DNA)

Os possíveis modos de interação dos complexos (**1-4**) com o CT-DNA foram investigados por duas técnicas distintas: espectroscopia de absorção e de fluorescência.

➤ *Determinação da constante de ligação por espectroscopia de absorção eletrônica*

As interações e a natureza da ligação dos complexos com o DNA são usualmente estudadas por várias técnicas espectroscópicas. A espectroscopia de absorção na região do UV-Vis é uma das técnicas mais simples e eficientes utilizadas para o estudo da possível interação entre complexos metálicos e o DNA, *in vitro*.³¹

Nesse contexto, foram obtidos espectros eletrônicos de absorção dos complexos (**1-4**) na presença e na ausência de concentrações crescentes de DNA. Como exemplo a Figura 3.16A, apresenta os espectros de absorção do complexo $[Ag(H_2AcpCH_3Ph)NO_3]$ (**2**). Nota-se que a medida que alíquotas de DNA são adicionadas, um efeito hipocrômico é observado, evidenciando que os complexos de prata(I) com 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas interagem com o DNA.

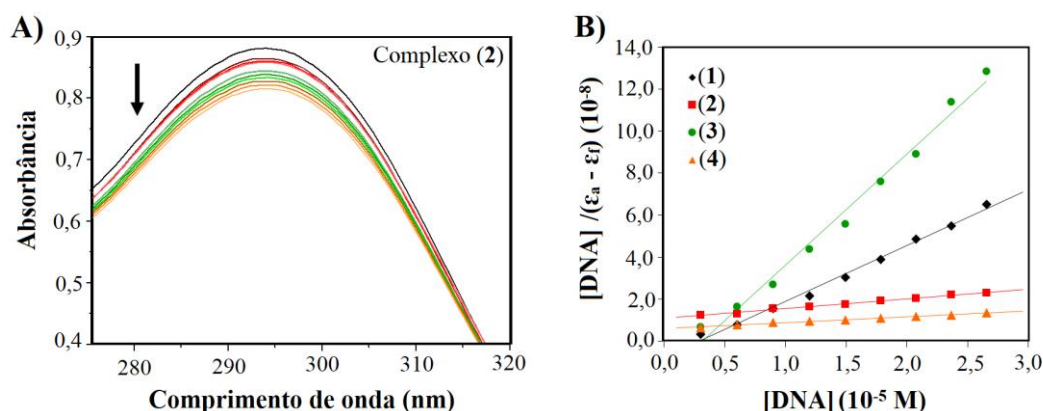


Figura 3.16 – A) Espectro de absorção na região do UV-Vis de $[Ag(H_2AcpCH_3Ph)NO_3]$ (**2**) na ausência (linha preta) e na presença (linhas coloridas) de quantidades crescentes de CT-DNA. A seta indica as mudanças ocorridas nos espectros após cada adição de CT-DNA (efeito hipocrômico). B) Gráficos de Scatchard de $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[DNA]$ para a interação entre os complexos (**1-4**) e DNA. ($[DNA] = 0 - 30 \mu M$, $[Complexos] = 30 \mu M$ à $25^\circ C$ em tampão Tris-HCl, pH 7,2).

As constantes de ligação intrínseca (K_b) para a interação entre complexos (**1-4**) e o DNA foram obtidas graficamente (Figura 3.16B) de acordo com a Equação 2.7 (seção 2.5.2.1). A constante de ligação K_b nos permite avaliar quantitativamente a força das interações não-covalentes entre moléculas e o DNA. Os valores de K_b para os complexos (**1**) e (**3**) ($K_b = 10^5 M^{-1}$) foram mais altos do

³¹C. V. Barra, A. V. G. Netto, *Rev. Virtual Quím.* 7 (2015) 1998–2016.

que os valores apresentados pelos complexos (2) e (4) ($K_b = 10^4 \text{ M}^{-1}$), sugerindo que os complexos (1) e (3) interagem mais fortemente com o DNA quando comparados com os complexos (2) e (4) (Tabela 3.12).

Tabela 3.12 – Constantes de ligação (K_b), concentração necessária para reduzir 50% da fluorescência do sistema BE-DNA (C_{50}) e constantes de ligação aparente (K_{app}) para os complexos (1-4).

Compostos		$K_b \text{ (M}^{-1}\text{)}$	$C_{50} \text{ (} 10^{-5} \text{ M)}$	$K_{app} \text{ (M}^{-1}\text{)}$
[Ag(H2AcPh)NO ₃]	(1)	$(3,60 \pm 0,66) \times 10^5$	20,4	$4,91 \times 10^5$
[Ag(H2AcPCH ₃ Ph)NO ₃]	(2)	$(4,22 \pm 0,52) \times 10^4$	13,4	$7,44 \times 10^5$
[Ag(H2AcPClPh)NO ₃]	(3)	$(3,10 \pm 0,54) \times 10^5$	19,9	$5,02 \times 10^5$
[Ag(H2AcPNO ₂ Ph)NO ₃]	(4)	$(4,80 \pm 0,54) \times 10^4$	19,8	$5,05 \times 10^5$

➤ *Interação competitiva entre brometo de etídio (BE) e complexos pelo CT-DNA*

O modo de interação entre os complexos (1-4) e o DNA foi investigado por experimento de deslocamento competitivo do agente intercalante brometo de etídio (BE). Na Figura 3.17A estão apresentados os espectros de fluorescência do BE ligado ao DNA na ausência e presença do complexo [Ag(H2AcPCH₃Ph)NO₃] (2). Observou-se que o sistema BE-DNA exibe uma forte emissão em 602 nm ($\lambda_{excitação} = 545 \text{ nm}$) e que uma diminuição da intensidade de fluorescência ocorreu a medida que concentrações crescentes do complexo foram adicionadas. Essas mudanças espectrais podem ser associadas a redução no número de locais de ligação do DNA disponíveis para o BE.

Uma análise dos parâmetros físico-químicos de interação foi realizada e as constantes de ligação aparente (K_{app}) foram calculadas de acordo com a equação $K_{app} = K_{EB} \times [BE]/C_{50}$, discutida no capítulo 2 (Equação 2.8, seção 2.5.2.2.). Os valores de C_{50} foram obtidos da relação entre a intensidade de fluorescência em função da concentração dos complexos quando a fluorescência é reduzida em 50% da fluorescência inicial. Na Tabela 3.12 são apresentados os valores de C_{50} e K_{app} . Os valores de K_{app} na ordem de 10^5 M^{-1} são similares ao valor apresentado pelo agente antitumoral actinomicina D ($K_{app} = 9,69 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) cujo seu modo de ação envolve intercalação com o DNA.³² Esse fato sugere que possivelmente o modo de ação dos complexos (1-4) envolve a interação com DNA por meio de um mecanismo de intercalação.

³²A. Kellett, M. O'Connor, M. McCann, M. McNamara, P. Lynch, G. Rosair, V. McKee, B. Creaven, M. Walsh, S. McClean, A. Foltyn, D. O'Shea, O. Howe, M. Devereux, *Dalton Trans.* 40 (2011) 1024–1027.

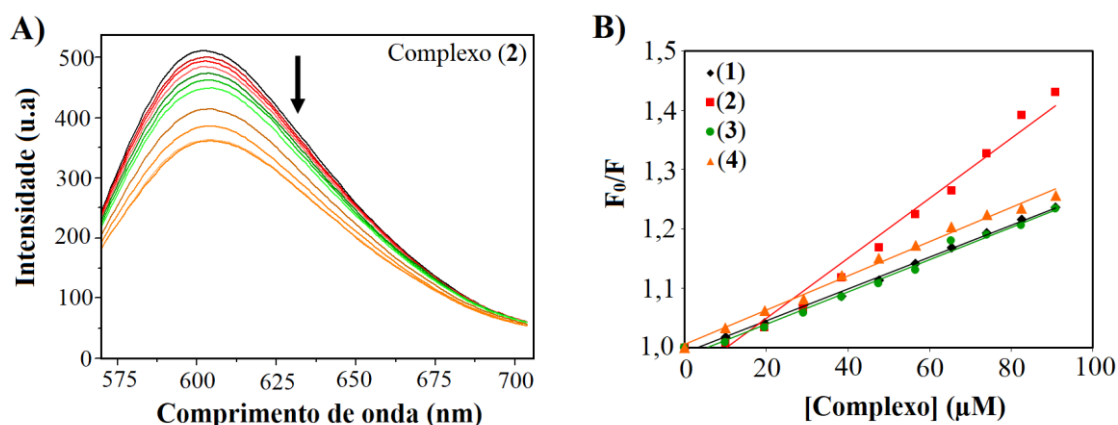


Figura 3.17 – A) Espectros de supressão da fluorescência do sistema BE-DNA na ausência (linha preta) e presença (linhas coloridas) de quantidades crescentes de $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (2). A seta indica as mudanças ocorridas nos espectros após cada adição do complexo (2). B) Gráficos de Stern-Volmer de F_0/F versus [complexos] para (1-4). ($\lambda_{\text{exc}} = 545 \text{ nm}$; [Complexos] = 0 - 100 μM ; [DNA] = 10 μM e [BE] = 10 μM).

3.5.3. Interação com DNA plasmidial

Os experimentos de eletroforese em gel de agarose dos compostos (hidrazona, dos complexos (1-4), AgNO_3 e cisplatina) na concentração de 100 μM foram realizados utilizando o DNA plasmidial pUC19 de *E. coli*. A Figura 3.18 apresenta a corrida eletroforética para os compostos incubados com o DNA pUC19. Os resultados mostram que os compostos não alteraram significativamente na mobilidade eletroforética do DNA, com exceção da cisplatina que tem como alvo principal a ligação covalente com o DNA. Provavelmente o modo de ação desses compostos não ocorre por meio da ligação covalente com o DNA e sim por um mecanismo de intercalação, conforme mostrado nos estudos de interação não-covalente com o DNA.

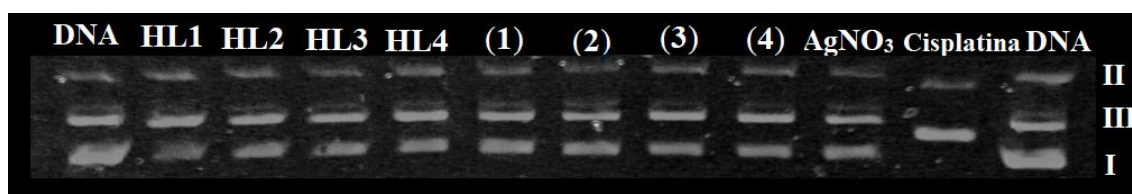


Figura 3.18 – Eletroforese em gel de agarose do DNA plasmidial pUC19 de *E. coli* ($150 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) incubado com H_2AcPh (HL1), $\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph}$ (HL2), $\text{H}_2\text{AcpClPh}$ (HL3), $\text{H}_2\text{AcpNO}_2\text{Ph}$ (HL4), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPh})\text{NO}_3]$ (1), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpCH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (2), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpClPh})\text{NO}_3]$ (3), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcpNO}_2\text{Ph})\text{NO}_3]$ (4), AgNO_3 e cisplatina (100 μM) por 24 h à 37 °C. *Formas do DNA plasmidial: I (superenovelada), II (circular relaxada) e III (linear).

Capítulo 4 – Complexos de prata(I) com 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas: estudos teóricos, ação antifúngica, citotóxica e interação com biomoléculas

Neste capítulo foram estudados quatro novos complexos de prata(I), [Ag(H2BzPh)NO₃] (**5**), [Ag(H2BzpCH₃Ph)NO₃] (**6**), [Ag(H2BzpClPh)NO₃] (**7**) e [Ag(H2BzpNO₂Ph)NO₃] (**8**), com 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazona (H2BzPh) e seus derivados *para*-metil- (H2AcpCH₃Ph), *para*-cloro- (H2AcpClPh) e *para*-nitro-benzoil-hidrazona (H2AcpNO₂Ph). As hidrazonas utilizadas não são inéditas e o processo de síntese tem sido relatado pelo nosso grupo.^{1,2} Estudos teóricos da natureza das ligações em torno do centro metálico foram realizados. Todos os compostos foram submetidos a avaliação das suas atividades antifúngicas e citotóxicas, com exceção do complexo (**8**) que apresentou descomplexação em solução. A atividade antifúngica foi investigada frente a *Candida spp* e fungos filamentosos, enquanto que os efeitos citotóxicos foram avaliados em células modelo de melanoma murino metastático (B16F10) e melanócitos murino não-tumorigênicos (Melan-A) (Figura 4.1). A habilidade dos complexos em serem transportados por HSA na corrente sanguínea foi verificada. Além disso, estudos da interação dos complexos com DNA foram realizados por espectrofotometria, espectrofluorimetria e eletroforese.

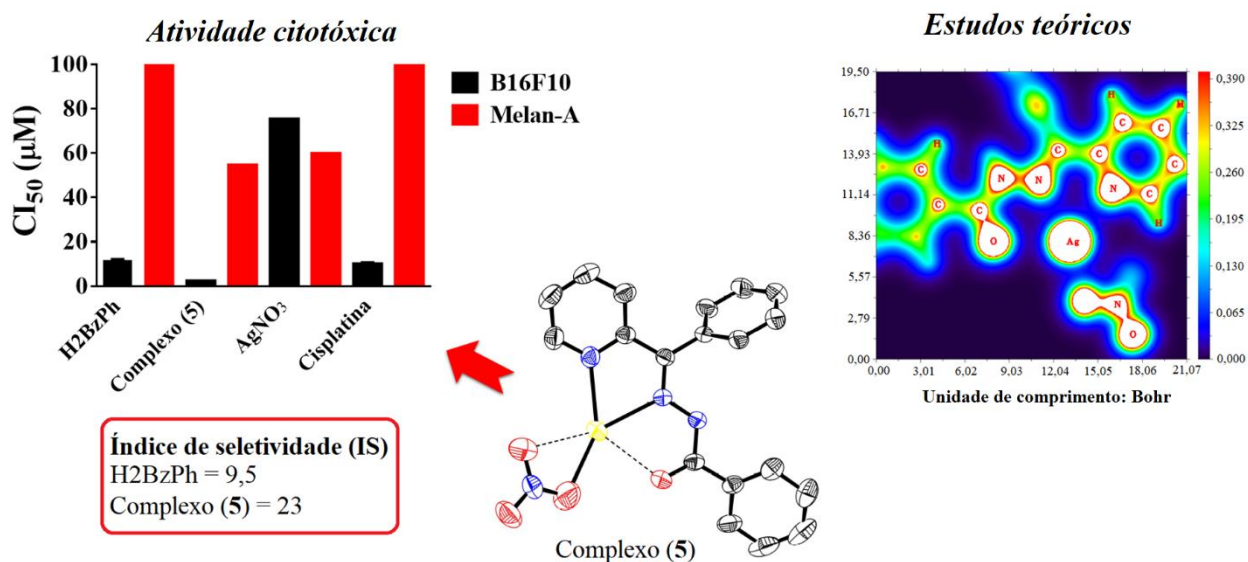


Figura 4.1 – Resumo gráfico dos principais resultados apresentados no capítulo 4.

¹A. A. R. Despaigne, J. G. Da Silva, A. C. M. do Carmo, O. E. Piro, E. E. Castellano, H. Beraldo, *Inorg. Chim. Acta.* 362 (2009) 2117–2122.

²A. A. R. Despaigne, L. F. Vieira, I. C. Mendes, F. B. da Costa, N. L. Speziali and H. Beraldo, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1247–1257.

4.1. Caracterização dos compostos

Todos os complexos apresentaram coloração cinza e os sólidos foram mantidos protegidos da presença de luz. Nos ensaios de estabilidade os complexos (5-7) se mostraram estáveis em solução de 100% DMSO ou 5% DMSO/Tris-HCl, enquanto que o complexo (8) se apresentou instável em solução. Além disso o complexo (8) apresentou descomplexação em solução de DMSO-*d*₆. As microanálises são compatíveis com a formação de complexos do tipo [Ag(HL)NO₃], sugerindo a formação de espécies neutras com uma molécula da hidrazona juntamente com o íon nitrato coordenado à prata(I). Os valores elevados de condutividades em DMF e DMSO sugerem a existência de eletrólitos do tipo 1:1, indicando a provável liberação do íon nitrato em solução (Tabela 4.1). De fato, a presença de espécies catiônicas [Ag(HL)]⁺ em solução foi confirmada por espectrometria de massas para os complexos (5-6). As espécies [Ag(H2BzPh)]⁺ (5) e [Ag(H2BzpCH₃Ph)+Na]⁺ (6) apresentaram valores de m/z (experimental) iguais a 408,0110 e 529,2271 e m/z (teórica) de 408,0266 e 529,0012, respectivamente. As estruturas propostas para os complexos (5-8) estão apresentadas na Figura 4.2.

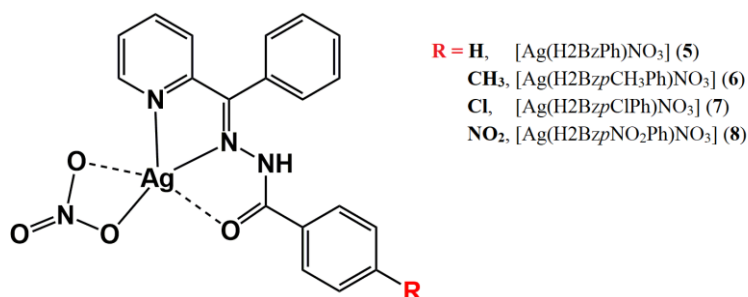


Figura 4.2 – Estrutura geral para os complexos de prata(I) com 2-benzoylpiridina benzoyl-hidrazonas.

Tabela 4.1 – Rendimento, massa molar, faixa de fusão, condutividade molar e análise elementar de CHN das 2-benzoylpiridina hidrazonas e seus complexos de prata(I).

Compostos	Rend. (%)	MM (g mol ⁻¹)	Faixa de fusão (°C)	Λ_M^a		Análise Elementar ^b		
				DMF	DMSO	%C	%H	%N
H2BzPh	77	301,34	140,5 – 142,9	–	–	–	–	–
[Ag(H2BzPh)NO ₃] (5)	54	471,21	196,6 – 197,4	76,8	36,7	48,52 (48,43)	3,21 (3,21)	11,79 (11,89)
H2BzpCH ₃ Ph	68	317,34	175,2 – 177,3	–	–	–	–	–
[Ag(H2BzpCH ₃ Ph)NO ₃] (6)	68	485,24	198,0 – 198,7	72,4	36,7	49,22 (49,50)	3,66 (3,53)	11,65 (11,55)
H2BzpClPh	56	335,79	166,3 – 167,9	–	–	–	–	–
[Ag(H2BzpClPh)NO ₃] (7)	61	505,66	187,7 – 188,6	68,3	37,6	45,20 (45,13)	2,85 (2,79)	11,10 (11,08)
H2BzpNO ₂ Ph	64	346,34	230,0 – 233,0	–	–	–	–	–
[Ag(H2BzpNO ₂ Ph)NO ₃] (8)	53	516,21	160,2 – 161,7	71,2	48,7	45,72 (44,21)	2,72 (2,73)	13,66 (13,57)

^a Λ_M (Ω⁻¹ cm² mol⁻¹) concentração de 1 x 10⁻³ mol L⁻¹;

^b Valores calculados entre parênteses

4.1.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

A Tabela 4.2 apresenta a atribuição das principais bandas observadas nos espectros de infravermelho. As hidrazonas livres apresentam bandas características referente aos seguintes modos vibracionais: $\nu(\text{N-H})$ entre $3350\text{-}3275\text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{C=N})$ do grupo imina entre $1610\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ e $\nu(\text{C=O})$ entre $1686\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$. Após a coordenação das hidrazonas ao metal é possível observar mudanças significativas nesses modos vibracionais. O estiramento $\nu(\text{N-H})$ desloca-se para menores energias nos espectros dos complexos ($3354\text{-}3216\text{ cm}^{-1}$), indício da coordenação do ligante na sua forma neutra. O modo vibracional $\nu(\text{C=N})$ sofre deslocamento para $1610\text{-}1594\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos, sugerindo a coordenação ao metal pelo nitrogênio imínico. Observa-se ainda o deslocamento da banda correspondente ao modo de deformação do plano do anel piridínico que encontra-se entre $614\text{-}628\text{ cm}^{-1}$ nos ligantes para $630\text{-}623\text{ cm}^{-1}$ nos complexos, indicando a participação do nitrogênio piridínico na coordenação ao metal. Nos espectros dos complexos foi observado que o estiramento $\nu(\text{C=O})$ sofre deslocamento para menores energias ($1678\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$) em relação aos espectros dos ligantes livres ($1686\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$). Adicionalmente, o estiramento $\nu(\text{NO}_3)$ em 1384 cm^{-1} é característico da presença do grupo nitrato nas estruturas dos complexos.

Tabela 4.2 – Atribuição das principais bandas observadas nos espectros de absorção na região do infravermelho (cm^{-1})^a das 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas e seus complexos de prata(I).

Compostos		$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu(\text{NO}_3)$	$\rho(\text{py})$
H2BzPh		3350 m	1686 F	1600 f	–	614 f
[Ag(H2BzPh)NO ₃]	(5)	3346 m	1668 F	1600 f	1384 m	630 f
H2BzpCH ₃ Ph		–	1650 F	1608 m	–	628 f
[Ag(H2BzpCH ₃ Ph)NO ₃]	(6)	3354 m	1678 F	1610 m	1384 m	630 f
H2BzpClPh		3283 m	1686 F	1603 f	–	615 f
[Ag(H2BzpClPh)NO ₃]	(7)	3216 m	1660 F	1594 F	1384 m	630 f
H2BzpNO ₂ Ph		3275 f	1674 F	1610 m	–	614 f
[Ag(H2BzpNO ₂ Ph)NO ₃]	(8)	3290 m	1674 F	1608 F	1384 m	623 f

^a Pastilhas de KBr ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$); F = forte, m = média e f = fraca; ν estiramento e ρ deformação; – Ausência da banda

O espectros de infravermelho do complexo [Ag(H2BzPh)NO₃] (5) em comparação com seu ligante H2BzPh estão ilustrados na Figura 4.3.

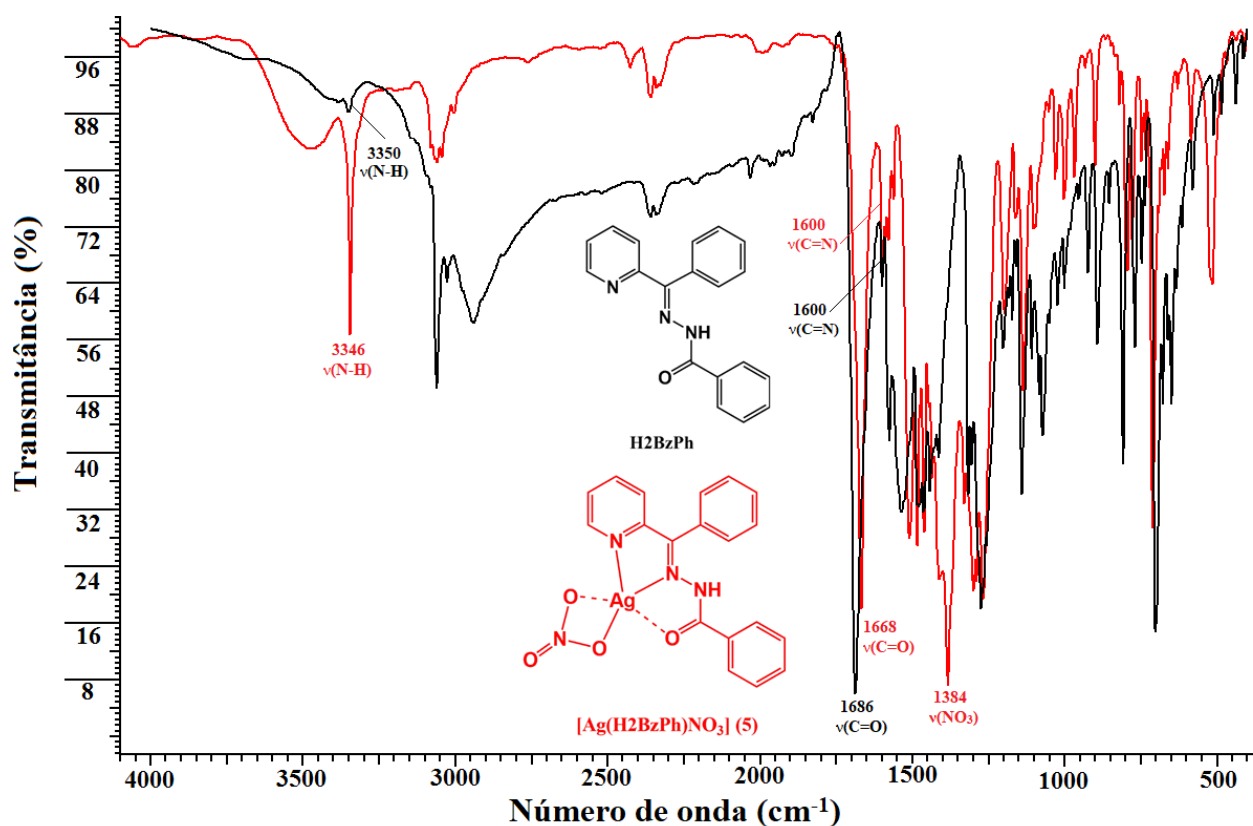


Figura 4.3 – Espectros de absorção na região do infravermelho de H2BzPh e do complexo [Ag(H2BzPh)NO₃] (**5**), obtidos em pastilhas de KBr (4000-400 cm⁻¹).

4.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Nos espectros de RMN de ¹H de todas as hidrazonas foram observados sinais duplicados, o que corresponde à mistura dos isômeros *E* e *Z* em solução de DMSO-*d*₆. Para N3-H na conformação *E* são observados sinais entre 10,37-10,04 ppm e para *Z* foram atribuídos sinais entre 14,75-14,72 ppm. Similarmente, os sinais de RMN de ¹³C{¹H} apresentaram-se duplicados. Nos espectros de RMN de ¹H dos complexos apenas um sinal foi observado para cada hidrogênio, assim como nos espectros de RMN de ¹³C{¹H}. Além disso, o sinal de N3-H indica que as hidrazonas estão coordenadas a prata(I) na forma neutra. Este sinal, nos complexos é observado entre 11,40-11,14 ppm sendo corresponde à presença somente da conformação *E* das hidrazonas em solução. Como exemplo, na Figura 4.4 estão apresentados os espectros de RMN de ¹H de H2BzPh em comparação com o seu complexo [Ag(H2BzPh)NO₃] (**5**).

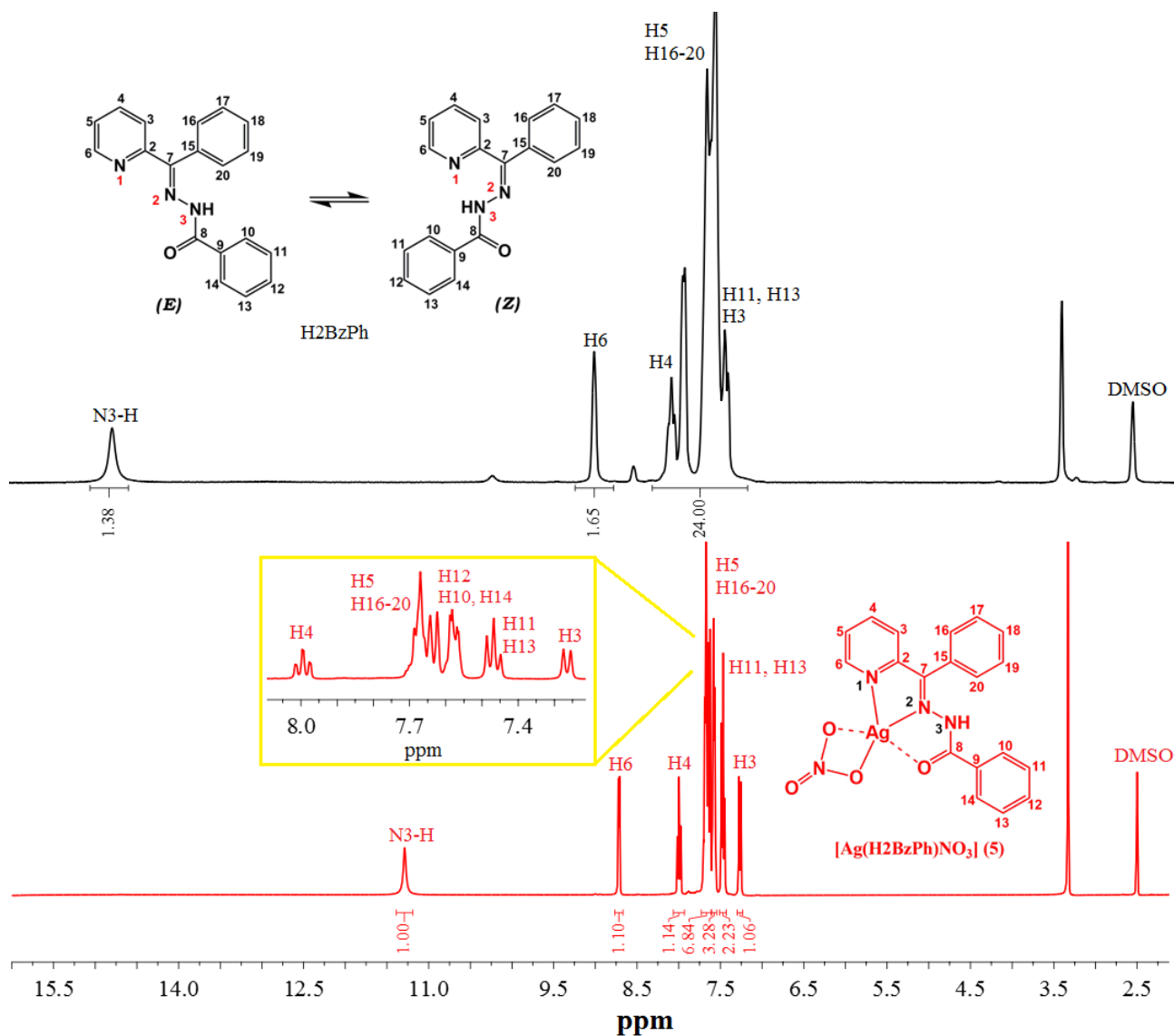


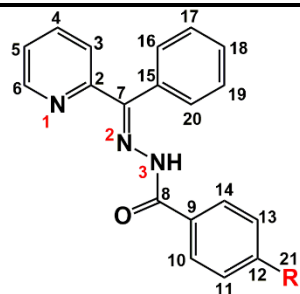
Figura 4.4 – Espectros de RMN de ^1H de H_2BzPh e do complexo $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{BzPh})\text{NO}_3]$ (**5**) registrados em $\text{DMSO-}d_6$ à temperatura ambiente

No caso do complexo (**8**) o espectro de RMN de ^1H apresentou sinais semelhantes ao do espectro do ligante livre, indicando assim a descomplexação do ligante em solução de $\text{DMSO-}d_6$.

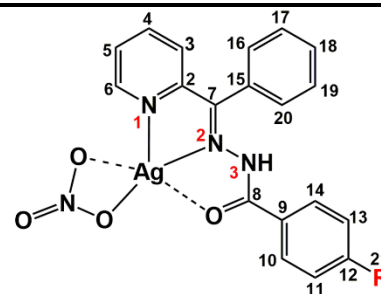
As atribuições para todos os sinais de RMN de ^1H dos compostos sintetizados são mostradas nas Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Atribuições, número de hidrogênio (n), multiplicidades (M),^a constantes de acoplamento (J, Hz) e deslocamento químico (ppm) dos sinais de RMN de ¹H das 2-benzoilpiridina hidrazonas e seus complexos de prata(I) (400 MHz), em DMSO-*d*₆.

Atribuições	n	H2BzPh			H2BzPhCH ₃ Ph			H2BzPhClPh		
		Z	E	(5)	Z	E	(6)	Z	E	(7)
N3-H	1	14,72(s)	10,15(s)	11,28(s)	14,75(s)	10,04(s)	11,14(s)	14,75(s)	10,37(s)	11,40(s)
H3	1	7,73-7,44(m)	7,89(d) (J = 5,00)	7,27(d) (J = 7,90)	7,38(d) (J = 7,30)	7,26(d) (J = 7,70)	7,23(d) (J = 7,80)	7,38(d) (J = 7,80)	–	7,23(d) (J = 7,90)
H4	1	8,03(t) (J = 6,80)	7,90(t) (J = 5,00)	7,99(dt) (J = 7,80)	8,04(t) (J = 7,90)	7,91(t) (J = 7,90)	7,97(t) (J = 7,30)	8,05(t) (J = 7,80)	7,91(t) (J = 8,20)	7,99 (dt) (J = 7,90)
H5	1	7,73-7,44(m)	7,73-7,44(m)	7,73-7,61(m)	7,70-7,59(m)	7,70-7,5(m)	7,75-7,61(m)	7,58-7,43(m)	–	7,74-7,61(m)
H6	1	8,95(s)	8,48(s)	8,72(d) (J = 4,20)	8,96(d) (J = 4,40)	8,48(d) (J = 4,40)	8,71(s)	8,97(d) (J = 4,40)	8,48(d) (J = 4,40)	8,70(d) (J = 4,4)
H10, H14 H12	2/3	7,73-7,44(m)	7,73-7,44(m)	7,58(dd) (J = 7,30)	7,59-7,45(m)	7,59-7,45(m)	7,54(d) (J = 8,50)	7,64(d) (J = 7,80)	7,58-7,43(m)	7,56(d) (J = 7,20)
H11, H13	2	7,73-7,44(m)	7,73-7,44(m)	7,47(t) (J = 7,60)	7,59-7,45(m)	7,59-7,45(m)	7,27(d) (J = 7,40)	7,58-7,43(m)	7,58-7,43(m)	7,53(d) (J = 8,40)
H21	3	–	–	–	2,39(s)	2,33(s)	2,32(s)	–	–	–



R = H, H2BzPh
 CH₃, H2BzPhCH₃Ph
 Cl, H2BzPhClPh
 NO₂, H2BzPhNO₂Ph



R = H, [Ag(H2BzPh)NO₃] (5)
 CH₃, [Ag(H2BzPhCH₃Ph)NO₃] (6)
 Cl, [Ag(H2BzPhClPh)NO₃] (7)
 NO₂, [Ag(H2BzPhNO₂Ph)NO₃] (8)

^a M = (s) simpleto; (d) duplete; (t) tripleto; (m) multiplete; (dd) duplete duplo; (dt) duplete triplo

– Ausência de sinal

Nos espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos complexos os sinais de C7 e C8 deslocam-se para maiores valores de ppm, indicando a coordenação através do nitrogênio iminico e oxigênio das hidrazonas. Os sinais dos carbonos piridínicos também sofrem deslocamentos consideráveis após a complexação, o que sugere a participação do nitrogênio na coordenação ao metal (Figura 4.5). Os estudos teóricos (seção 4.5), sugeriram um fortalecimento da ligação entre a prata(I) e o oxigênio (hidrazona) após a liberação do íon nitrato em solução, o que é compatível com as mudanças observadas nos sinais correspondentes a C=O (C8) nos espectros dos complexos. A partir dessas observações pode-se inferir que as hidrazonas coordenam-se por um sistema quelante $\text{N}_{\text{py}}\text{-N}_{\text{imina}}\text{-O}$ em que o ligante adota uma configuração *EZ* em torno das ligações C7=N e C8=N. As atribuições para todos os sinais de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos compostos sintetizados são mostradas nas Tabela 4.4.

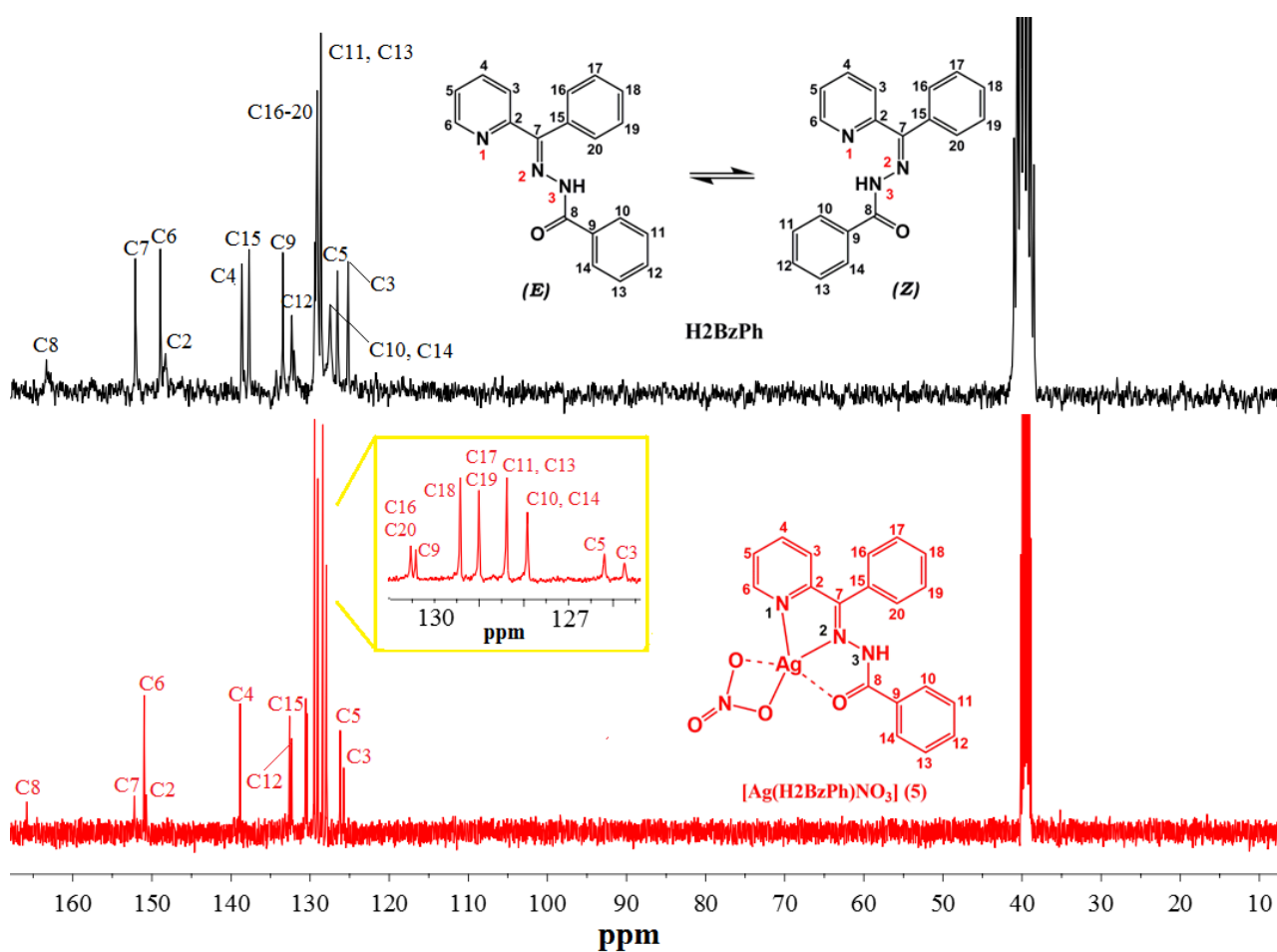
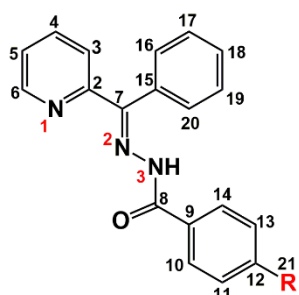


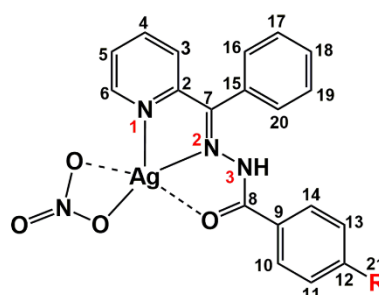
Figura 4.5 – Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de H_2BzPh e do complexo $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{BzPh})\text{NO}_3]$ (5) registrados em $\text{DMSO-}d_6$ à temperatura ambiente.

Tabela 4.4 – Atribuições e deslocamento químico (ppm) dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT 135 das 2-benzoilpiridina hidrazonas e seus complexos de prata(I) (400 MHz), em $\text{DMSO-}d_6$.

Atribuições	DEPT ^a	H2BzPh			H2BzpCH ₃ Ph			H2BzpClPh		
		Z	E	(5)	Z	E	(6)	Z	E	(7)
C2	–	151,7	155,1	150,7	151,7	–	150,6	151,7	–	150,6
C3	↑	127,1	124,9	125,7	124,9	124,0	125,8	124,9	124,0	125,9
C4	↑	138,3	136,6	138,8	138,3	136,7	138,9	138,3	136,7	138,8
C5	↑	126,2	123,9	126,1	126,2	125,9	126,2	126,2	125,9	126,3
C6	↑	148,7	148,5	150,9	148,7	148,6	151,0	148,7	148,6	151,0
C7	–	148,0	–	152,1	148,5	–	151,8	148,5	–	152,4
C8	–	162,8	–	165,8	161,9	–	165,6	161,9	–	165,1
C9	–	133,1	133,3	130,4	131,9	132,2	130,3	131,9	132,2	130,4
C10, C14	↑	–	–	127,9	–	–	127,9	–	–	128,4
C11, C13	↑	–	–	128,3	–	–	129,0	–	–	129,0
C12	–	132,0	131,6	132,3	137,2	–	142,7	137,2	–	137,1
C15	–	137,3	137,3	132,5	136,8	–	129,6	136,8	–	131,3
C21	↑	–	–	–	21,0	–	21,0	–	–	–



R = H, H2BzPh
 CH₃, H2BzpCH₃Ph
 Cl, H2BzpClPh
 NO₂, H2BzpNO₂Ph



R = H, [Ag(H2BzPh)NO₃] (5)
 CH₃, [Ag(H2BzpCH₃Ph)NO₃] (6)
 Cl, [Ag(H2BzpClPh)NO₃] (7)
 NO₂, [Ag(H2BzpNO₂Ph)NO₃] (8)

^a ↑ (conversão no DEPT 135 para CH e CH₃)
 – Ausência de sinal

4.1.3. Cristalografia por difração de raios X

As estruturas cristalográficas dos complexos [Ag(H2BzPh)NO₃] (5), [Ag(H2BzpCH₃Ph)NO₃] (6) e [Ag(H2BzpClPh)NO₃] (7) foram determinadas por difração de raios X. Os monocristais foram obtidos a partir da evaporação lenta da solução-mãe resultante das sínteses de (5-7) à temperatura ambiente.

A projeção ORTEP das estruturas cristalográficas e numeração utilizada estão apresentadas na Figura 4.6. Os resumos da coleção de dados e dos refinamentos para os compostos estão apresentados na Tabela 4.5. As distâncias e ângulos de ligação dos complexos (5-7), juntamente com os dados do ligante H2BzpClPh a fim de comparação, estão apresentados na Tabela 4.6. Os parâmetros das ligações de hidrogênio para o complexo (7) estão apresentados na Tabela A13 (anexo).

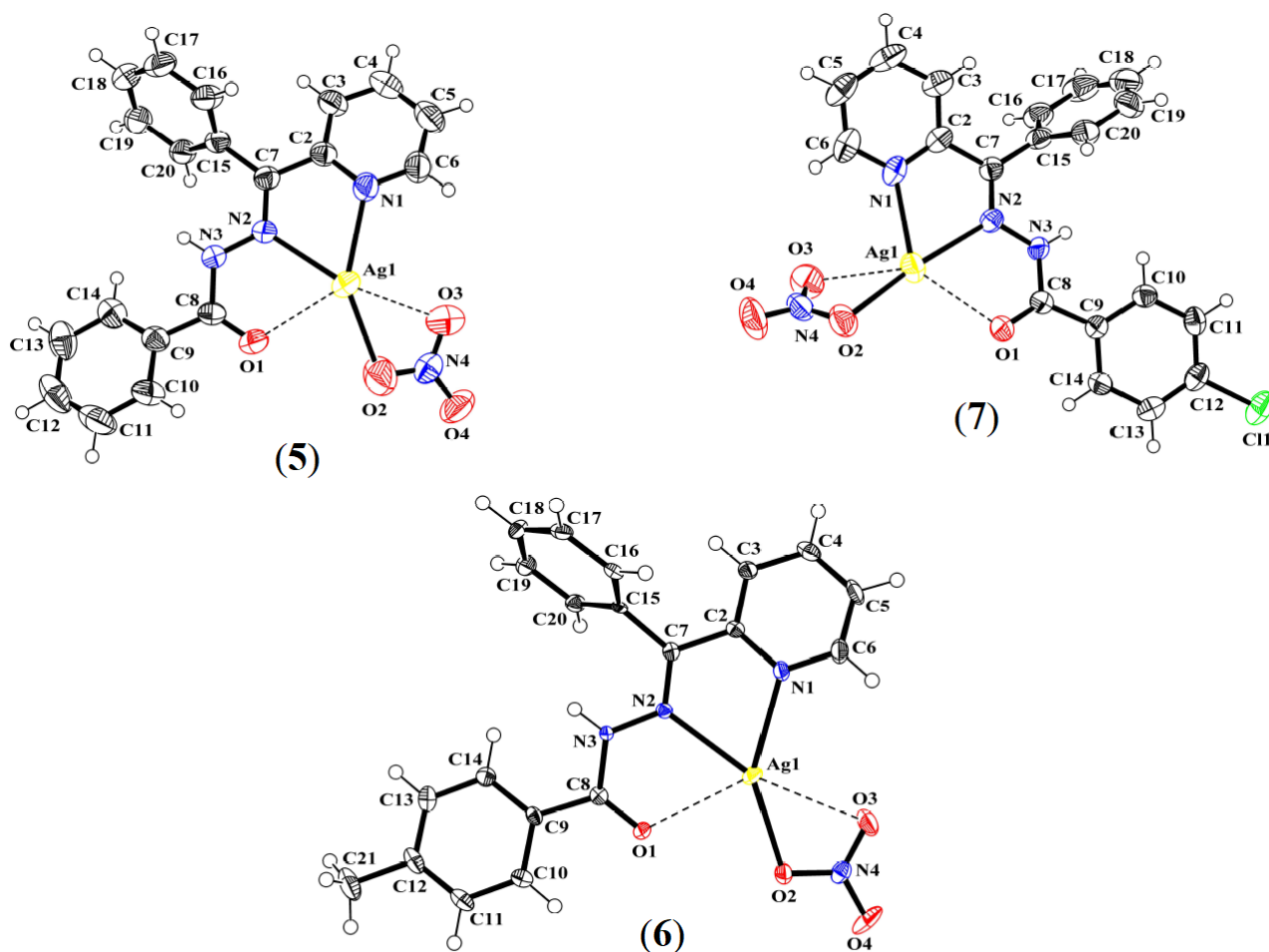


Figura 4.6 – Projeção ORTEP dos complexos $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{BzPh})\text{NO}_3]$ (**5**), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{BzpCH}_3\text{Ph})_2]\text{NO}_3$ (**6**) e $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{BzpClPh})_2]\text{NO}_3$ (**7**) com elipsoides em nível de probabilidade de 50%.

Conforme os dados cristalográficos da Tabela 4.5, os complexos (**5-7**) cristalizaram num sistema monoclinico com grupo especial $P2_1/c$ em (**5**) e (**7**) e $I2/a$ em (**6**). As células unitárias de (**5**) e (**7**) são formadas por quatro unidades assimétricas, enquanto que em (**6**) existem oito unidades assimétricas.

Os cristais de todos os complexos contêm uma hidrazona neutra que está coordenada a prata(I), juntamente com um íon nitrato. Nos complexos (**5-7**), as distâncias e ângulos de ligação nas estruturas das hidrazonas são semelhantes. Contudo, a comparação entre o ligante $\text{H}_2\text{BzpClPh}$ e seu complexo (**5**) revelou que as distâncias e ângulos de ligação sofrem variações significativas (Tabela 4.6).

Tabela 4.5 – Dados cristalográficos e de refinamento das estruturas dos complexos [Ag(H2BzPh)NO₃] (**5**), [Ag(H2BzpCH₃Ph)NO₃] (**6**) e [Ag(H2BzpClPh)NO₃] (**7**).

Compostos	(5)	(6)	(7)
Fórmula molecular	C ₁₉ H ₁₅ N ₄ O ₄ Ag	C ₂₀ H ₁₇ N ₄ O ₄ Ag	C ₁₉ H ₁₄ ClN ₄ O ₄ Ag
Massa molecular (g mol ⁻¹)	471,22	485,24	505,66
Temperatura (K)	270(2)	120(2)	270(2)
Sistema cristalino	Monoclínico	monoclinic	monoclinic
Grupo espacial	P2 ₁ /c	I2/a	P2 ₁ /n
Parâmetros da célula unitária			
a (Å)	9,1867(3)	12,3045(5)	7,1699(4)
b (Å)	9,0633(3)	14,5456(7)	20,7822(10)
c (Å)	22,1189(5)	21,5645(8)	12,9758(7)
α (°)	90	90	90
β (°)	91,427(2)	97,044(4)	102,720(5)
γ (°)	90	90	90
a (Å)	1841,09(10)	3830,4(3)	1886,02(18)
Número de fórmulas elementares (Z)	4	8	4
Densidade calculada (Mg m ⁻³)	1,700	1,683	1,781
Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	1,129	1,088	1,246
F(000)	944	1952	1008
Dimensão do cristal (mm)	0,21 x 0,16 x 0,06	0,09 x 0,05 x 0,03	0,51 x 0,07 x 0,06
Intervalo de θ (°)	1,84 - 29,58	1,69 to 26,37	1,88 to 26,37
	-12 ≤ h ≤ 12	-14 ≤ h ≤ 15	-8 ≤ h ≤ 8
Intervalo de índices	-12 ≤ k ≤ 12	-18 ≤ k ≤ 14	-25 ≤ k ≤ 25
	-29 ≤ l ≤ 30	-26 ≤ l ≤ 26	-16 ≤ l ≤ 16
Refleções coletadas	29853	14044	29541
Reflexões únicas [R _{int}]	4839 (0,050)	3925 (0,053)	3851 (0,066)
Integridade para θ = 25.242° (%)	100	100	100
Dados/restrições/parâmetros	4839/0/253	3925/0/263	3851/0/262
Qualidade de ajuste (S)	1,038	1,023	1,046
Índices de R final [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0,0384, wR ₂ = 0,0654	R ₁ = 0,0337, wR ₂ = 0,0592	R ₁ = 0,0356, wR ₂ = 0,0722
Índices de R (todos os dados)	R ₁ = 0,0743, wR ₂ = 0,0780	R ₁ = 0,0515, wR ₂ = 0,0648	R ₁ = 0,0644, wR ₂ = 0,0862
Δρ _{máx.} e Δρ _{mín.} (eÅ ⁻³)	0,499 e -0,624	0,543 e -0,449	0,682 e -0,613
CCDC	1824087	1824088	1824089

Em todos os casos, as distâncias de ligação de Ag1...O1 [2,617(2) (**5**), 2,7110(19) (**6**) e 2,632(2) (**7**)] e Ag1...O3 [2,608(3) (**5**), 2,774(2) (**6**) e 2,739(3) (**7**)] são bem maiores do que as distâncias de Ag1-O2 [2,358(3) (**5**), 2,2789(19) (**6**) e 2,286(3) (**7**)] (Tabela 4.6). Distâncias semelhantes a Ag1-O2 foram encontradas para a ligação formada entre Ag(I) e o oxigênio do íon nitrato (Ag-O ≈ 2,3Å) para complexos do tipo [Ag₄(L¹)₄(NO₃)₄] com ligantes piridilamida

assimétricos.³ De fato, essas alterações indicam que os átomos O1 e O3 ligam-se fracamente ao centro metálico. Este efeito provavelmente explica os valores altos de condutividade molar obtidos para os complexos (5-7) nos solventes DMSO e DMF (seção 4.1), sugerindo a liberação do íon nitrato em solução. Interessantemente, como será mostrado pelos cálculos teóricos a seguir, a liberação do íon nitrato é seguida pelo fortalecimento da ligação entre a prata(I) e o oxigênio da hidrazona (seção 4.5).

Tabela 4.6 – Distâncias de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados para os complexos [Ag(H2BzPh)NO₃] (5), [Ag(H2BzpCH₃Ph)NO₃] (6) e [Ag(H2BzpClPh)NO₃] (7) juntamente com dados para H2BzpClPh.^a

Distâncias (Å)	(5)	(6)	H2BzpClPh ⁴	(7)
N1-C2	1,350(3)	1,352(3)	1,353(3)	1,337(4)
C2-C7	1,485(4)	1,481(4)	1,484(2)	1,488(4)
C7-N2	1,293(3)	1,297(3)	1,302(2)	1,288(4)
N2-N3	1,365(3)	1,362(3)	1,369(19)	1,373(4)
N3-C8	1,366(3)	1,380(3)	1,366(2)	1,360(4)
C8-O1	1,215(3)	1,220(3)	1,215(2)	1,227(4)
Ag1-N1	2,390(2)	2,366(2)	–	2,439(3)
Ag1-N2	2,388(2)	2,388(2)	–	2,316(3)
Ag1...O1	2,617(2)	2,7110(19)	–	2,632(2)
Ag1-O2	2,358(3)	2,2789(19)	–	2,286(3)
Ag1...O3	2,608(3)	2,774(2)	–	2,739(3)
Ângulos (°)	(5)	(6)	H2BzpClPh ⁴	(7)
N1-C2-C7	117.2(2)	117.3(2)	118,3(2)	116,9(3)
C2-C7-N2	115.2(2)	115.5(2)	127,2(2)	116,0(3)
C7-N2-N3	119.3(2)	118.2(2)	117,7(1)	118,6(3)
N2-N3-C8	118.8(2)	118.6(2)	119,7(1)	119,5(3)
N3-C8-O1	121.7(2)	121.9(3)	124,3(2)	122,2(3)
N1-Ag1-N2	67.99(7)	68.97(8)	–	68,48(9)
N1-Ag1-O2	145.29(8)	147.22(8)	–	117,79(10)
N2-Ag1-O2	138.72(9)	141.85(8)	–	167,27(9)
N1-Ag1...O1	132.16(7)	132.07(7)	–	134,19(9)
N2-Ag1...O1	64.20(6)	63.10(7)	–	65,71(8)
O2-Ag1...O1	78.03(8)	79.77(7)	–	107,07(9)
N1-Ag1...O3	96.86(8)	97.69(8)	–	84,48(9)
O2-Ag1...O3	48.87(9)	49.54(7)	–	49,85(9)

^a Ag...O representando as interações nas estruturas dos complexos.

Em todos os compostos, os ângulos de ligação em torno do centro da Ag(I), considerando as fracas interações entre Ag...O, sugerem uma geometria de coordenação pirâmide de base tetragonal

³H.-L. Hsiao, C.-J. Wu, W. Hsu, C.-W. Yeh, M.-Y. Xie, W.-J. Huang, J.-D. Chen, *Cryst. Eng. Comm.* 14 (2012) 8143–8152.

⁴A. 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) 163–172.

altamente distorcida com número de coordenação igual a 5. Caso essas interações não sejam levadas em consideração, provavelmente os complexos apresentariam uma geometria descrita como trigonal planar altamente distorcida, envolvendo os ângulos N1-Ag1-N2, N1-Ag1-O2 e N2-Ag1-O2, com número de coordenação igual a 3. Em ambas as situações o fato das geometrias serem altamente distorcidas é devido à formação de anéis quelatos envolvendo a hidrazona e Ag(I) (N_{py}-N_{imina}-O e/ ou N_{py}-N_{imina}) e entre o íon nitrato e a Ag(I) (O2-Ag...O3 ≈ 50°) para a geometria pirâmide de base tetragonal.

4.2. Estudo teórico das ligações envolvidas na esfera de coordenação da prata

Os comprimentos de ligação calculados ao nível B3LYP/def2-sv(p) e experimentais que envolvem o centro metálico e os ligantes são citados na Tabela 4.7. Em geral, existe um bom acordo entre os valores calculados e experimentais, mostrando a confiabilidade do método calculado. Em alguns casos, há desvios mais significativos, sendo os mais altos 0,2 Å, o que pode ser atribuído a distorções devidas a efeitos de empacotamento na fase sólida. Observou-se que a ligação Ag-O₍₂₎ é bem mais curta, indicando uma maior interação entre o íon nitrato e a Ag(I). Isso é esperado, pois há uma alta carga negativa nos oxigênios de NO₃⁻. O segundo oxigênio do nitrato permanece muito mais distante do centro metálico. O oxigênio da hidrazona O₍₁₎ seguiu um padrão semelhante, com distâncias comparáveis em todos os complexos.

Tabela 4.7 – Comprimentos de ligação calculadas e experimentais^a em torno do centro metálico para os complexos investigados, na geometria de equilíbrio.

Comprimentos de ligação (Ag-L) ^a	Compostos							
	(5)		(6)		(7)		(8)	
	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.
O ₍₁₎	2,754	2,616(2)	2,729	2,711(2)	2,611	2,632(2)	2,653	NA
N ₍₁₎	2,428	2,390(2)	2,451	2,365(2)	2,453	2,439(3)	2,494	NA
N ₍₂₎	2,478	2,388(2)	2,467	2,388(2)	2,475	2,316(2)	2,417	NA
O ₍₂₎	2,205	2,358(3)	2,228	2,279(2)	2,241	2,286(3)	2,285	NA
O ₍₃₎	2,741	2,607(3)	2,661	2,774(2)	2,613	2,739(3)	2,462	NA

^aValores experimentais obtidos a partir de medidas de difração de raios X.

Todos os valores estão em Angstrom (Å).

No complexo (8), o comprimento da ligação Ag-O₍₃₎ é muito mais curto do que nos outros complexos. A ligação mais curta poderia ser explicada pelo forte efeito da influência do grupo nitro do ligante, levando a uma coordenação NO₃⁻ muito mais forte de ambos os oxigênios ao átomo de

prata e, como veremos mais adiante, uma ligação mais forte do NO_3^- à prata gera uma coordenação mais fraca Ag-hidrazona. Estes resultados poderiam explicar porque no complexo (8) ocorre descomplexação da hidrazona em solução.

A Superfície de Energia Potencial (PES, em inglês) gerada para todos os complexos mostra basicamente o mesmo perfil, que é exemplificado na Figura 4.7A para o complexo (5), indicando uma energia de dissociação NO_3^- de aproximadamente 30 kcal mol^{-1} em fase gasosa. Como pode ser visto, à medida que o íon NO_3^- se dissocia do centro metálico, as distâncias entre o oxigênio da hidrazona e o centro metálico diminuem. De fato, à medida que o íon NO_3^- se dissocia, a coordenação da hidrazona com o centro metálico torna-se mais forte e todas as distâncias de ligação com o metal diminuem, conforme mostrado na Tabela 4.8. A Figura 4.7B, mostra a geometria de equilíbrio para o complexo (5). Estes resultados mostram que, embora o processo de dissociação do íon NO_3^- não seja favorável, no complexo, a Ag(I) tende a adotar uma geometria tricoordenada para adquirir estabilidade termodinâmica.

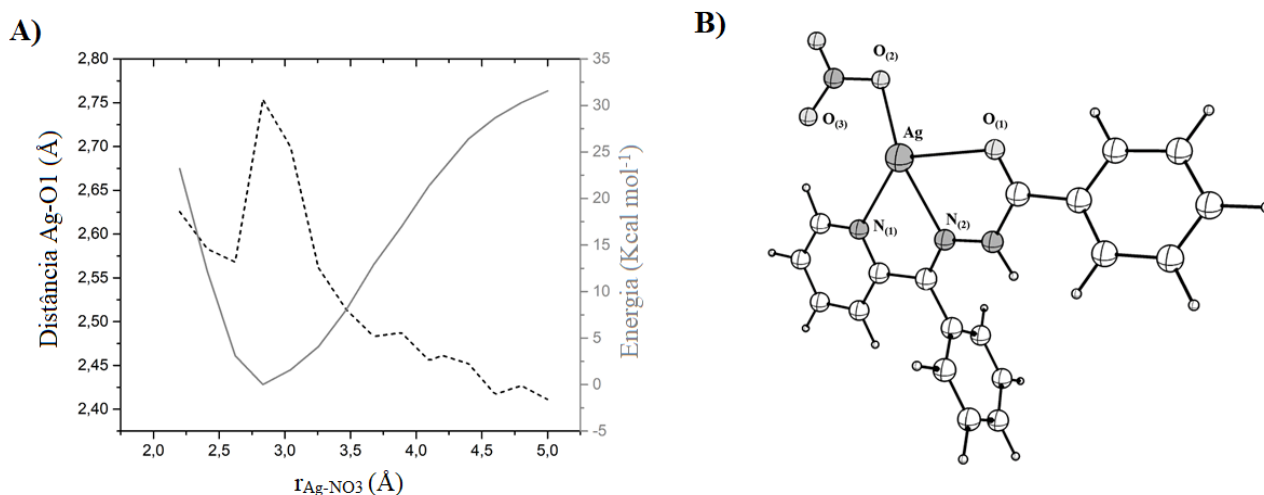


Figura 4.7 – A) Superfície de Energia Potencial para a dissociação de NO_3^- no complexo (5). O eixo horizontal indica a distância entre o átomo de prata e o átomo de nitrogênio do grupo nitrato. O eixo vertical direito mostra a variação da energia eletrônica em relação à estrutura de equilíbrio (linha contínua) e o eixo vertical esquerdo mostra o comprimento da ligação entre a prata e o oxigênio da hidrazona (linha tracejada), $\text{O}_{(1)}$. B) Geometria de equilíbrio do complexo (5) com indicação dos átomos que cercam o átomo de prata.

Tabela 4.8 – Comprimentos de ligação entre a prata e todos os átomos coordenados dos ligantes do complexo (5), obtidos para cada ponto da PES.^a

Comprimentos de ligação (Ag-L) ^b	r(Ag-NO ₃ ⁻)					
	2,830	2,530	3,200	3,870	4,530	5,200
O ₍₁₎	2,729	2,584	2,610	2,489	2,471	2,440
N ₍₁₎	2,451	2,633	2,487	2,437	2,367	2,308
N ₍₂₎	2,467	2,422	2,432	2,429	2,409	2,415
O ₍₂₎	2,228	2,231	2,260	2,631	3,279	4,007
O ₍₃₎	2,661	2,320	3,296	4,347	5,034	5,522

^aPES foi construída variando a distância r(Ag-NO₃⁻) como mencionado na seção 2.6.1.

^bAg-L refere-se aos comprimentos de ligação envolvendo átomos dos ligantes e o átomo de prata. O esquema de nomeação usando todos os valores são em Angstrom (Å).

A Tabela 4.9 mostra a ordem de ligação de Mayer envolvendo os átomos coordenados ao centro metálico em todos os complexos, em seu equilíbrio e geometrias com o NO₃⁻ dissociado. Observou-se que as ordens de ligação entre os ligantes e o átomo de prata variam de 0,1 a 0,3, que são valores pequenos em comparação com os encontrados para ligações covalentes, indicando uma ligação provavelmente com alto caráter eletrostático. Esses valores menores de ordem de ligação, no entanto, são comuns para compostos de coordenação em que o metal possui configuração eletrônica d¹⁰. Para comparação, foram realizados cálculos para os complexos com Zn²⁺ e Cu⁺ com água ou amônia, e os resultados da ordem de ligação foram de 0,35 para Zn(II)-N no complexo [Zn(NH₃)₄]²⁺ e de 0,30 para a ligação Zn(II)-O em [Zn(H₂O)₄]²⁺. Os cálculos para os complexos de cobre(I) do mesmo grupo da prata, [Cu(NH₃)₃]⁺ e [Cu(H₂O)₂]⁺, resultaram em valores de 0,30 e 0,23 para as ligações Cu(I)-N e Cu(I)-O, respectivamente. Portanto, os valores de ordem de ligação de Mayer encontrados nos complexos Ag(I)-hidrazona são um pouco menores do que os encontrados nos complexos de zinco(II) e cobre(I). No entanto, vale ressaltar que os complexos de prata(I) possuem um ligante quelante e, portanto, os átomos coordenados ao centro metálico não têm a mesma liberdade espacial para acomodar os ligantes monodentados. Portanto, eles darão origem a ligações metal-ligante mais distorcidas, com ordens de ligação menores. Ainda é importante mencionar que todas as ordens de ligação envolvendo o metal e os átomos da hidrazona aumentam significativamente quando o NO₃⁻ se dissocia, mostrando novamente que a ligação do nitrato enfraquece todas as outras interações na esfera de coordenação do metal. Interessantemente, em alguns complexos a ordem de ligação entre o oxigênio da hidrazona e a prata é zero (inexistente).

Tabela 4.9 – Ordem de ligação de Mayer entre os átomos coordenados dos ligantes e o átomo de prata para os complexos (5-8) nas geometrias de mínimo da PES (min.) e com o grupo nitrato dissociado (diss.).

Compostos	Geometria	Átomos ligados ao centro metálico				
		O ₍₁₎	N ₍₁₎	N ₍₂₎	O ₍₂₎	O ₍₃₎
(5)	min.	0	0,16	0,12	0,34	0,12
	diss.	0,16	0,27	0,12	NA	NA
(6)	min.	0	0,16	0,12	0,33	0,13
	diss.	0,16	0,28	0,12	NA	NA
(7)	min.	0,10	0,14	0,12	0,31	0,14
	diss.	0,16	0,27	0,13	NA	NA
(8)	min.	0	0,13	0,13	0,28	0,18
	diss.	0,14	0,27	0,14	NA	NA

➤ *Natureza das ligações*

A Tabela 4.10 mostra os valores calculados de $\rho(r)$, $V(r)$, $H(r)$, $\nabla^2\rho(r)$, $\varepsilon(r)$ e $\eta(r)$ para as quatro geometrias otimizadas dos complexos. Com exceção do complexo (6), todos os outros complexos apresentam valores positivos do Laplaciano em todos os pontos críticos de ligação (BCP), juntamente com valores de $\eta(r)$ menores que 1, caracterizando interações de camada fechada. Esses resultados são esperados para Ag^+ , uma vez que todos os orbitais d estão ocupados e, portanto, são incapazes de atuar como receptores eletrônicos no compartilhamento covalente, dando à interação um forte caráter eletrostático. A densidade eletrônica no BCP é uma medida da força de ligação. A Tabela 4.10 também mostra a maior força de ligação entre a prata e um dos átomos de oxigênio do grupo nitrato, em comparação com os outros átomos coordenados, uma vez que neste BCP a $\rho(r)$ tem valores maiores. Outra observação é que o valor de $\varepsilon(r)$ no BCP de um dos oxigênios de NO_3^- tende a ser muito maior do que o valor para o outro. Isso reflete uma ligação distorcida e instável, o que é esperado já que o ângulo entre o oxigênio e a prata é muito inadequado para uma coordenação quelante de NO_3^- .

Tabela 4.10 – Propriedades da densidade eletrônica calculadas no ponto crítico de ligação (BCP) envolvendo a prata e os átomos indicados dos ligantes, na geometria de equilíbrio dos complexos.^a

Compostos	Propriedade	Átomos ligados ao centro metálico				
		O ₍₁₎	N ₍₁₎	N ₍₂₎	O ₍₂₎	O ₍₃₎
(5)	$\rho(r)$	0,13	0,28	0,32	0,47	0,15
	$V(r)$	-0,02	-0,05	-0,06	-0,11	-0,02
	$H(r)$	0,00	0,00	-0,01	-0,01	0,00
	$\nabla^2\rho(r)$	2,00	3,89	4,40	7,74	2,23
	$\varepsilon(r)$	0,06	0,05	0,04	0,05	3,44
	$\eta(r)$	0,15	0,17	0,18	0,18	0,16
(6)	$\rho(r)$	1,84	1,94	2,14	1,94	2,17
	$V(r)$	-0,34	-0,37	-0,49	-0,37	-0,50
	$H(r)$	-0,27	-0,33	-0,37	-0,33	-0,38
	$\nabla^2\rho(r)$	-18,58	-27,40	-25,19	-27,35	-25,70
	$\varepsilon(r)$	0,14	0,01	0,19	0,01	0,19
	$\eta(r)$	1,77	1,74	2,86	1,75	2,94
(7)	$\rho(r)$	0,18	0,28	0,30	0,43	0,19
	$V(r)$	-0,03	-0,05	-0,05	-0,09	-0,03
	$H(r)$	0,00	0,00	-0,01	-0,01	0,00
	$\nabla^2\rho(r)$	2,88	3,95	4,15	7,13	2,92
	$\varepsilon(r)$	0,02	0,07	0,05	0,05	0,21
	$\eta(r)$	0,15	0,17	0,18	0,18	0,15
(8)	$\rho(r)$	0,16	0,32	0,27	0,39	0,26
	$V(r)$	-0,02	-0,06	-0,05	-0,08	-0,05
	$H(r)$	0,00	-0,01	0,00	-0,01	0,00
	$\nabla^2\rho(r)$	2,58	4,51	3,81	6,41	4,19
	$\varepsilon(r)$	0,03	0,07	0,05	0,05	0,02
	$\eta(r)$	0,15	0,18	0,17	0,17	0,16

^aTodos os valores estão em u.a.

O significado de cada propriedade calculada é descrito na seção 2.6.1.

O complexo (6) apresentou um conjunto de características diferentes em seus valores para as propriedades avaliadas, conforme mostrado na Tabela 4.10. Por exemplo, o Laplaciano em todos os BCPs foi negativo, o que é uma indicação de alta contribuição da densidade de energia potencial em detrimento da densidade de energia cinética, consequência de um maior caráter de ligação covalente. Os valores $\eta(r)$ também suportam esta ideia, uma vez que são todos significativamente maiores do que a unidade em todos os BCPs. Esse fato pode ser explicado pela presença do grupo metil, um conhecido doador de densidade eletrônica, ao anel piridínico. A doação desse grupo poderia enriquecer os arredores do centro metálico com densidade eletrônica e aumentar o caráter covalente

das interações. Entretanto, esse caráter covalente não foi evidenciado na maior parte das análises QTAIM realizadas ao longo da superfície de energia potencial, como mostrado pela Tabela 4.11, que contém descritores QTAIM obtidos ao longo da PES, somente para o complexo (6). Como pode ser visto, os valores de $\nabla^2\rho(r)$ e $\eta(r)$ nos BCPs são positivos e menores que 1, respectivamente, e em conjunto com valores de $H(r)$ próximos de zero, reforçam a natureza eletrostática das ligações Ag-hidrazona. A dissociação do íon NO_3^- leva a um aumento da densidade eletrônica nos BCPs dos três átomos coordenados da hidrazona. Como exemplo, $\rho(r) = 0,19$ quando o íon NO_3^- está a uma distância de 2,530 Å da Ag (P2), e $\rho(r) = 0,26$ quando o íon NO_3^- está mais afastado (5,200 Å) em Ag- $\text{O}_{(1)}$ BCP. Estes resultados mostram que, à medida que o íon NO_3^- se dissocia, a interação entre a hidrazona e o centro metálico se torna mais forte.

Tabela 4.11 – Propriedades da densidade eletrônica calculadas no ponto crítico de ligação (BCP) entre a prata e os átomos dos ligantes. Os valores foram obtidos para o complexo (6) em duas geometrias da PES, o ponto P2 e o último ponto P10 quando o NO_3^- é o mais distante do metal.

Propriedade ^a	Átomos ligados ao centro metálico									
	$\text{O}_{(1)}$		$\text{N}_{(2)}$		$\text{N}_{(1)}$		$\text{O}_{(2)}$		$\text{O}_{(3)}$	
	P2	P10	P2	P10	P2	P10	P2	P1	P2	P1
$\rho(r)$	0,19	0,26	0,31	0,32	0,21	0,42	0,44	N/A	0,35	N/A
$V(r)$	-0,03	-0,05	-0,06	-0,06	-0,03	-0,08	-0,10	N/A	-0,07	N/A
$H(r)$	0,00	0,00	-0,01	-0,01	0,00	-0,01	-0,01	N/A	-0,01	N/A
$\nabla^2\rho$	3,08	4,32	4,48	4,51	2,78	5,47	7,39	N/A	6,07	N/A
$\varepsilon(r)$	0,01	0,00	0,09	0,06	0,03	0,04	0,03	N/A	0,07	N/A
$\eta(r)$	0,15	0,16	0,18	0,18	0,17	0,19	0,17	N/A	0,16	N/A

^aTodos os valores estão em u.a.

O significado de cada propriedade calculada é descrito na seção 2.6.1.

A Figura 4.8 mostra o gráfico 2-D de $\nabla^2\rho(r)$ na geometria de equilíbrio do complexo (6). Apesar dos valores negativos de $\nabla^2\rho(r)$ nos BCPs que envolvem os átomos coordenados, a região entre a prata e os átomos coordenados mostra a depleção da densidade eletrônica (baixa densidade de linhas), característica das interações de camada fechada. Um suporte final para esta conclusão vem dos mapas escalados em cores 2-D ou 3-D (Figuras 4.9A e B), que mostram regiões de baixa densidade eletrônica do complexo (6), nos arredores do átomo de prata, ou regiões onde $\rho(r)$ é deslocada após a dissociação do nitrato. Pode-se observar ainda que os arredores do átomo de prata têm maior densidade eletrônica quando o NO_3^- é dissociado. A partir do mapa de densidade eletrônica mostrado na Figura 4.10, é possível observar que $\rho(r)$ é deslocado para regiões próximas dos átomos conectados à prata quando o NO_3^- não está coordenado.

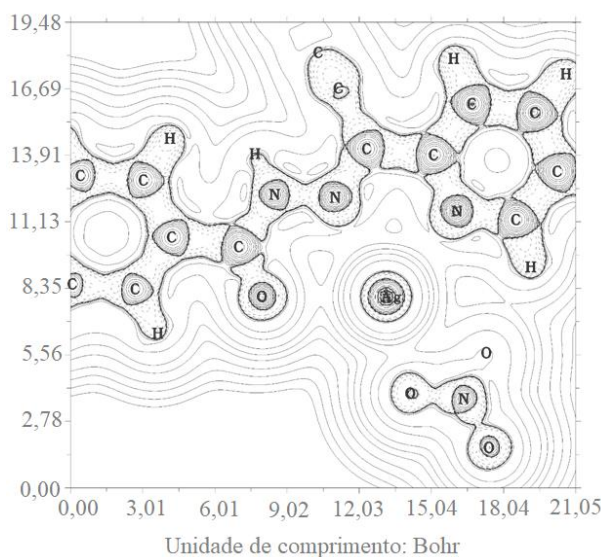


Figura 4.8 – Gráfico 2-D de $\nabla^2\rho(r)$ para a geometria de energia mínima do complexo (6). As linhas tracejadas indicam um valor negativo de $\nabla^2\rho(r)$ e, portanto, uma região de acumulação de carga enquanto as linhas contínuas indicam uma $\nabla^2\rho(r)$ positiva e, portanto, uma região de depleção de carga. A região entre a prata e os átomos circundantes é uma região de depleção de densidade eletrônica, característica de interações camada fechada.

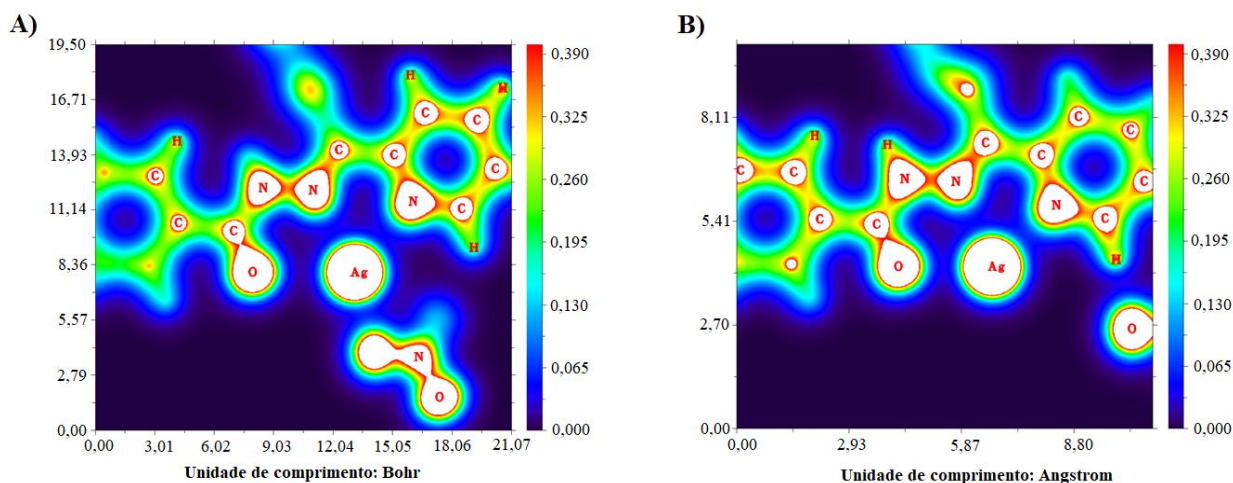


Figura 4.9 – Gráfico 2-D da densidade eletrônica para A) estrutura de energia mínima e a B) estrutura na qual o NO_3^- está dissociado do centro metálico no complexo (6). As áreas em vermelha e azul indicam regiões de alta e baixa densidade eletrônica, respectivamente, enquanto as áreas em branco indicam densidades eletrônicas muito grandes, que fogem da escala.

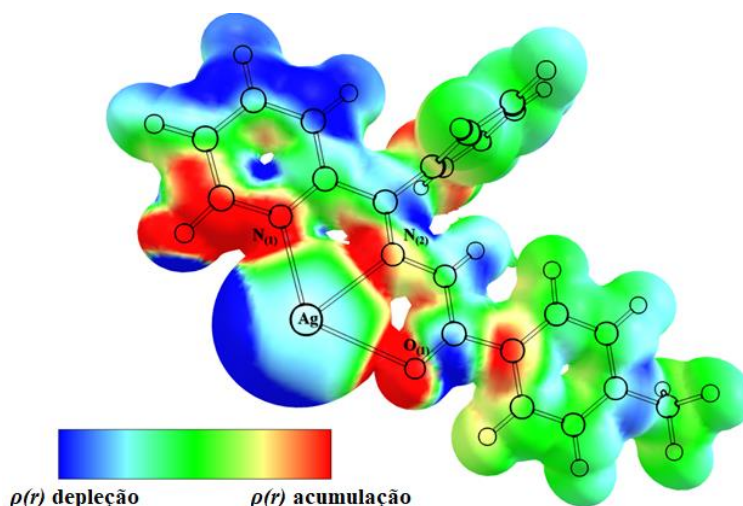


Figura 4.10 – Gráfico 3-D da diferença na densidade eletrônica para a geometria de equilíbrio do complexo (6) na presença e ausência do ligante NO_3^- . As superfícies vermelhas indicam onde a densidade eletrônica é deslocada quando o nitrato se dissocia (maior $\rho(r)$ em forma dissociada), enquanto as superfícies azuis indicam onde a densidade eletrônica é removida após a dissociação do nitrato (inferior $\rho(r)$ em forma dissociada). Nas regiões verdes, a densidade eletrônica permanece inalterada.

4.3. Avaliação da atividade antifúngica

Os ligantes, complexos (5-7), nitrato de prata, nitrato de miconazol e nistatina (fármacos de referência) foram avaliados quanto à atividade antifúngica frente às espécies *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida lusitanae*, *Aspergillus parasiticus* e *Penicillium citrinum*. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.12. As hidrazonas foram inativas nas cepas investigadas, exceto H2BzpClPh que foi ativo contra *C. lusitanae* e *P. citrinum*. No entanto, suas atividades foram inferiores às apresentadas pelos agentes antifúngicos de referência. Por sua vez, o ligante H2BzPh exibiu atividade similar à nistatina contra *P. citrinum*.

Com a coordenação das hidrazonas à prata(I) a atividade antifúngica mostrou-se significativa. Todos os complexos apresentaram valores de CI_{50} menores do que da nistatina frente ao fungo *P. citrinum*. A melhor atividade observada para o nitrato de prata também foi contra *P. citrinum*, sendo semelhante à atividade exibida pela nistatina.

A presença do grupo substituinte *p*-Cl no complexo $[\text{Ag}(\text{H2BzpClPh})\text{NO}_3]$ (7) resultou numa atividade superior em todas as cepas em relação aos outros complexos. Além disso, na maioria dos casos a ação antifúngica demonstrada em (7) foi semelhante ou superior à da nistatina. Como por exemplo, contra *P. citrinum* o complexo (7) ($\text{CI}_{50} = 12,1 \mu\text{M}$) foi cerca de duas vezes mais ativo que a nistatina ($\text{CI}_{50} = 30,7 \mu\text{M}$), enquanto que contra *C. dubliniensis* o complexo (7) ($\text{CI}_{50} = 3,8 \mu\text{M}$)

exibiu perfil antifúngico semelhante à nistatina ($CI_{50} = 4,4 \mu\text{M}$). O único caso em que (7) foi menos ativo que a nistatina foi contra *C. glabrata*, mas nesse caso sua atividade é comparável ao nitrato de miconazol.

Em geral os complexos foram altamente ativos ou exibiram atividade semelhante à nistatina. Uma vez que a maioria das hidrazonas foram inativas e o nitrato de prata apresentou baixa atividade, a associação de ambos resultou em uma excelente estratégia para o aumento da ação antifúngica desses compostos.

Tabela 4.12 – Atividade antifúngica (CI_{50}) de 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas, complexos (5-7), nitrato de prata, nitrato de miconazol e nistatina frente a espécies de *Candida* e fungos filamentosos.

Compostos	$CI_{50} (\mu\text{M}) \pm DP^a$				
	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
H2BzPh	–	–	–	–	29,3 ± 3,4
[Ag(H2BzPh)NO ₃] (5)	22,2 ± 1,2	> 33	35,8 ± 1,4	47,0 ± 1,6	20,6 ± 0,6
H2BzpCH ₃ Ph	–	–	–	–	–
[Ag(H2BzpCH ₃ Ph)NO ₃] (6)	17,6 ± 0,8	> 32	9,2 ± 1,2	51,7 ± 1,0	14,3 ± 2,0
H2BzpClPh	–	–	12,9 ± 2,7	–	66,9 ± 4,1
[Ag(H2BzpClPh)NO ₃] (7)	3,8 ± 0,2	12,2 ± 0,7	3,9 ± 0,3	27,5 ± 1,0	12,1 ± 1,3
AgNO ₃	> 11	64,2 ± 2,2	20,8 ± 1,8	> 183	24,6 ± 3,0
Nitrato de miconazol	1,6 ± 0,5	19,5 ± 4,5	<6,2x10 ⁻⁵	< 0,3	< 0,3
Nistatina	4,4 ± 0,8	1,9 ± 0,2	5,3 ± 0,8	76,0 ± 1,1	30,7 ± 1,2

^a CI_{50} = Concentração inibitória de 50% do crescimento dos fungos;

DP = Desvio padrão;

– Não inibe o crescimento de fungos acima de 80% a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.4. Avaliação da atividade citotóxica contra células de melanoma e melanócitos murino

Os efeitos citotóxicos das hidrazonas e seus complexos (5-7) foram analisados em comparação com cisplatina nas células de B16F10 (melanoma metastático) e Melan-A (melanocitoma não tumorigênico) utilizando o ensaio colorimétrico MTT. Os valores de CI_{50} e IS estão expostos na Tabela 4.13. Com a complexação, observou-se que a atividade citotóxica contra células B16F10 aumentou em todos os casos, sendo maior que a da cisplatina. O nitrato de prata apresentou baixa ação citotóxica contra células B16F10. Os complexos (5-7) revelaram-se mais citotóxicos que o nitrato de prata e a cisplatina. Todos os compostos foram mais citotóxicos para as células B16F10 do que para as células sadias de Melan-A. Interessantemente, o índice de seletividade apresentado pelo complexo [Ag(H2BzPh)NO₃] (5) (IS = 23) foi superior ao do ligante (IS = 9,5), sugerindo que, neste caso, a coordenação à prata(I) foi uma excelente estratégia para melhorar a seletividade.

Tabela 4.13 – Atividade citotóxica (CI₅₀) e índices de seletividade (IS) de 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas, complexos (5-7), AgNO₃ e cisplatina contra células B16F10 e Melan-A.

Compostos	CI ₅₀ ± DP (µM) ^a e IS ^b		
	B16F10	Melan-A	IS
H2BzPh	11,50 ± 0,01	109,30 ± 0,01	9,5
[Ag(H2BzPh)NO ₃] (5)	2,36 ± 0,01	54,63 ± 0,01	23
H2BzpCH ₃ Ph	4,00 ± 0,02	96,30 ± 0,01	24
[Ag(H2BzpCH ₃ Ph)NO ₃] (6)	2,00 ± 0,01	10,23 ± 0,04	5,1
H2BzpClPh	5,00 ± 0,01	>100	–
[Ag(H2BzpClPh)NO ₃] (7)	2,00 ± 0,04	7,87 ± 0,04	3,9
AgNO ₃	75,40 ± 0,01	59,90 ± 0,01	0,8
Cisplatina	10,00 ± 0,01	>100,00	–

^a CI₅₀ = Concentração que inibe 50% da proliferação celular e DP = Desvio padrão;

^b IS = CI₅₀ Melan-A / CI₅₀ B16F10.

4.5. Avaliação da interação dos complexos de prata(I) com biomoléculas

4.5.1. Interação com albumina sérica humana (HSA)

A interação entre a HSA e os complexos (5-7) foi investigada por meio de titulações espectrofluorimétricas, como descrito anteriormente na parte experimental (Capítulo 2, seção 2.5.1).

Como exemplo, a Figura 4.11A mostra os espectros de fluorescência da HSA na presença de concentrações crescentes do complexo [Ag(H2BzPh)NO₃] (5) na temperatura de 298 K. À medida que a concentração de (5) aumenta observa-se uma diminuição no máximo de fluorescência da HSA, juntamente com um deslocamento hipsocrômico, indicando que a interação entre o complexo e a HSA ocorreu e que o microambiente em torno do resíduo triptofano 214 (Trp-214) se tornou mais hidrofóbico. Mudanças similares foram verificadas nos espectros de fluorescência obtidos para os complexos (6) e (7) nas diferentes temperaturas.

Os valores de K_{sv} e K_q obtidos a partir dos espectros de fluorescência e das Equações 2.2 e 2.3 (Capítulo 2, seção 2.5.1) em diferentes temperaturas, estão apresentados na Tabela 4.14. Os gráficos da relação F_0/F versus [complexo] mostraram perfis lineares e foram utilizados nos cálculos das constantes (Figura 4.11B). Em todos os complexos observou-se que o aumento da temperatura resultou na diminuição dos valores de K_{sv} , sugerindo que a interação complexo-HSA ocorre predominantemente *via* mecanismo de supressão estático. Além disso, considerando o tempo de vida fluorescente do fluoróforo Trp-214 não-extinto como sendo 10^{-8} s, foram observados valores de K_q na ordem de $10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o que excede o valor de K_q de $\approx 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ encontrado em um mecanismo de supressão dinâmico. Esse resultado confirma que o processo de supressão da fluorescência é devido à formação da ligação entre o complexo e a HSA, consistente com um mecanismo de supressão estático.

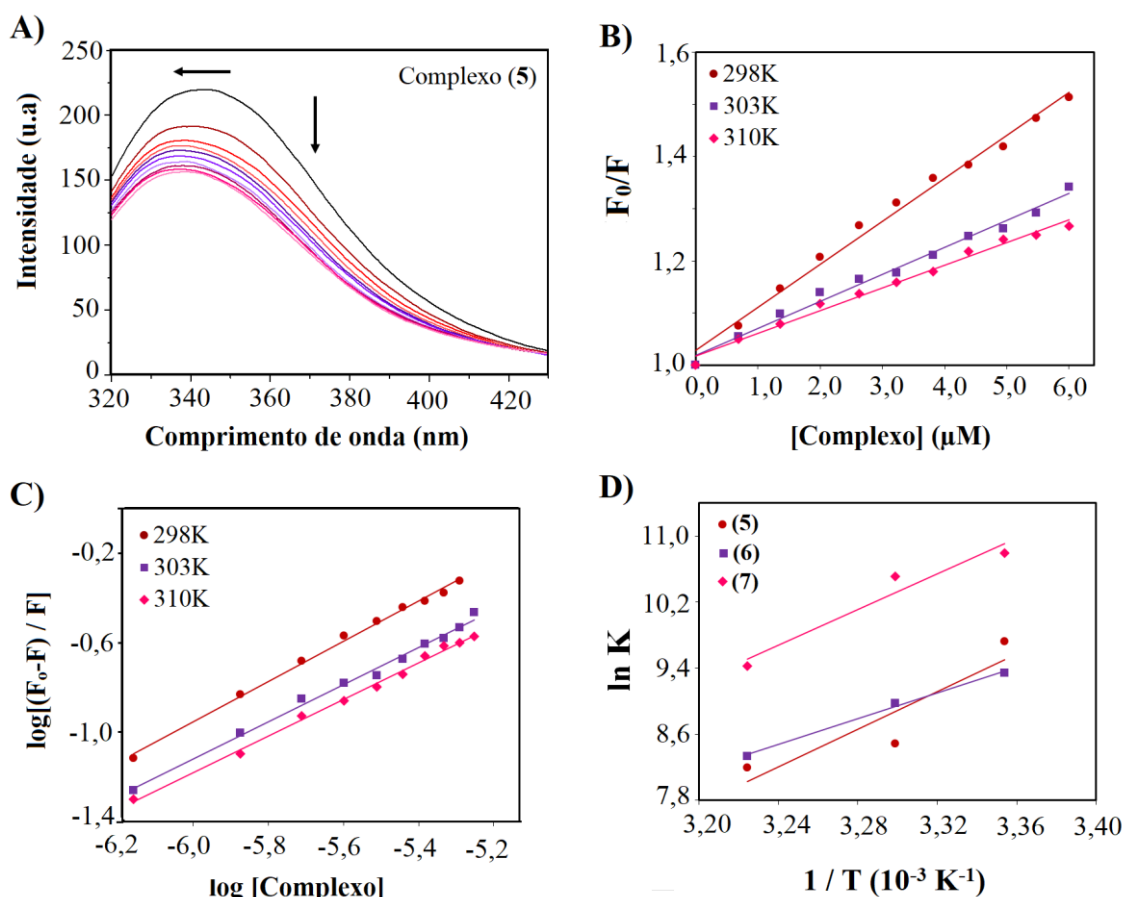


Figura 4.11 – A) Espectros de fluorescência de HSA ($1,84 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{em}} = 342 \text{ nm}$) na ausência (linha preta) e presença (linhas coloridas) de quantidades crescentes de $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{BzPh})\text{NO}_3]$ (**5**) a 298 K. As setas indicam as mudanças ocorridas nos espectros após cada adição do complexo (**5**). B) Gráficos de Stern-Volmer (F_0/F versus $[\text{Complexo}]$) da interação complexo(**5**)-HSA. C) Gráficos de $\log[(F_0-F)/F]$ versus $\log[\text{Complexo}]$ para determinação da constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n). D) Diagramas de Van' Hoff ($\ln K$ versus $1/T$) para a interação entre complexos (**5-7**) e a HSA em diferentes temperaturas.

Tabela 4.14 – Constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de supressão bimolecular (K_q), constantes logarítmicas de ligação ($\log K_b$) e número de sítios de ligação (n) para a interação entre HSA e os complexos de prata(I) (**5-7**) a diferentes temperaturas.

Compostos	T (K)	K_{sv} (10^4 M^{-1})	K_q ($10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	$\log K_b$	n
$[\text{Ag}(\text{H}_2\text{BzPh})\text{NO}_3]$ (5)	298	$8,26(\pm 0,02)$	$8,26(\pm 0,02)$	$4,2(\pm 0,1)$	$0,86(\pm 0,02)$
	303	$5,18(\pm 0,01)$	$5,18(\pm 0,01)$	$3,7(\pm 0,1)$	$0,80(\pm 0,02)$
	310	$4,36(\pm 0,01)$	$4,36(\pm 0,01)$	$3,5(\pm 0,1)$	$0,79(\pm 0,02)$
$[\text{Ag}(\text{H}_2\text{Bz}p\text{CH}_3\text{Ph})\text{NO}_3]$ (6)	298	$8,94(\pm 0,02)$	$8,94(\pm 0,02)$	$4,0(\pm 0,1)$	$0,83(\pm 0,02)$
	303	$8,18(\pm 0,03)$	$8,18(\pm 0,03)$	$3,9(\pm 0,1)$	$0,80(\pm 0,02)$
	310	$4,99(\pm 0,02)$	$4,99(\pm 0,02)$	$3,6(\pm 0,1)$	$0,78(\pm 0,01)$
$[\text{Ag}(\text{H}_2\text{Bz}p\text{ClPh})\text{NO}_3]$ (7)	298	$9,64(\pm 0,03)$	$9,64(\pm 0,03)$	$4,7(\pm 0,1)$	$0,94(\pm 0,02)$
	303	$9,08(\pm 0,02)$	$9,08(\pm 0,02)$	$4,5(\pm 0,2)$	$0,92(\pm 0,03)$
	310	$4,94(\pm 0,02)$	$4,94(\pm 0,02)$	$4,0(\pm 0,3)$	$0,88(\pm 0,05)$

➤ *Determinação das constantes de ligação e número de sítios de ligação*

Uma vez que o tipo de mecanismo de supressão foi estabelecido, o logaritmo da constante de ligação ($\log K_b$) e número de sítios de ligação (n) foram determinados pela Equação 2.4 (seção 2.5.1), segundo a seguinte relação $\log[(F_0-F)/F]$ versus $\log[\text{complexo}]$ (Figura 4.11C). Os valores de $\log K_b$ obtidos estão inversamente correlacionados com a temperatura, indicando redução da estabilidade do sistema complexo-HSA. Os valores de n são próximos de 1, sugerindo que os complexos (5-7) ligam-se a HSA de acordo com a razão molar de 1:1. Os dados são mostrados na Tabela 4.14 acima.

➤ *Análise dos parâmetros termodinâmicos*

Como já vimos, a interação supramolecular entre HSA e moléculas pequenas é geralmente atribuída a interações fracas não-covalentes, como interações hidrofóbica, eletrostática, van der Waals e ligações de hidrogênio. Os parâmetros termodinâmicos envolvidos para determinar o tipo de interação são ΔH° , ΔS° e ΔG° e podem ser obtidos por meio das Equações 2.5 e 2.6 (seção 2.5.1). A Figura 4.11D mostra os diagramas de Van' Hoff ($\ln K$ versus $1/T$) para a interação entre complexos (5-7) e a HSA. Conforme a Tabela 4.15, as variações de ΔH° e ΔS° são negativas, indicando que as ligações de hidrogênio e/ou forças de van der Waals são predominantes para a interação complexo-HSA. Os valores negativos de ΔH° indicam ainda que a interação ocorre por um processo exotérmico. Os valores negativos de ΔG° ($\approx -20 \text{ kJ mol}^{-1}$) para todos os complexos revelam um processo de ligação espontâneo.

Tabela 4.15 – Parâmetros termodinâmicos da interação entre HSA e os complexos de prata(I) (5-7) a diferentes temperaturas.

Compostos		T (K)	ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG° (kJ mol ⁻¹)
[Ag(H2BzPh)NO ₃]	(5)	298			-24,12
		303	-94,55	-238,08	-21,40
		310			-21,14
[Ag(H2BzpCH ₃ Ph)NO ₃]	(6)	298			-23,16
		303	-64,80	-139,44	-22,63
		310			-21,50
[Ag(H2BzpClPh)NO ₃]	(7)	298			-26,77
		303	-89,59	-209,75	-26,49
		310			-24,32

4.5.2. Interação com ácido desoxirribonucleico (*calf thymus* DNA, CT-DNA)

➤ *Determinação da constante de ligação por espectroscopia de absorção eletrônica*

Os espectros de absorção de complexos (5-7) foram registrados na ausência e na presença de concentrações crescentes de DNA. Após a adição de DNA, observou-se um hipocromismo no comprimento de onda de máxima absorção, como o exemplo mostrado pela Figura 4.12A para o complexo [Ag(H2BzPh)NO₃] (5). Essas variações sugerem que os complexos interagem com DNA por um modo de ligação intercalativa.

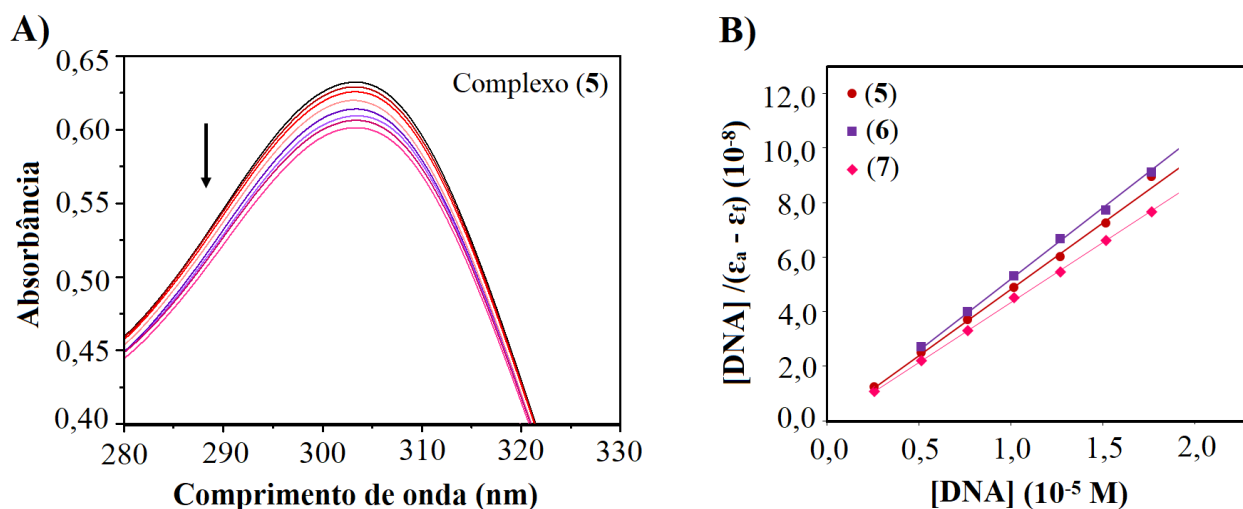


Figura 4.12 – A) Espectro de absorção na região do UV-Vis de [Ag(H2BzPh)NO₃] (5) na ausência (linha preta) e na presença (linhas coloridas) de quantidades crescentes de CT-DNA. A seta indica as mudanças ocorridas nos espectros após cada adição de CT-DNA (efeito hipocrômico). B) Gráficos de Scatchard de [DNA]/(ε_a - ε_f) versus [DNA] para a interação entre os complexos (5-7) e DNA. ([DNA] = 0 – 20 μM, [complexos] = 30 μM à 25 °C em tampão Tris-HCl, pH 7,2).

A fim de avaliar quantitativamente a força da interação entre os complexos e o DNA, as constantes intrínsecas de ligação (K_b) foram obtidas como relatado anteriormente (Capítulo 2, seção 2.5.2), utilizando gráficos de Scatchard (Figura 4.12B). Os valores de K_b obtidos para os complexos foram $2,60 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (5), $1,30 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (6) e $2,24 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (7), sugerindo que esses compostos interagem com o DNA (Tabela 4.16).

Tabela 4.16 – Constantes de ligação (K_b), concentração necessária para reduzir 50% da fluorescência do sistema BE-DNA (C_{50}) e constantes de ligação aparente (K_{app}) para a interação entre DNA e os complexos (5-7).

Compostos		K_b (10^5 M^{-1})	C_{50} (10^{-5} M)	K_{app} (10^5 M^{-1})
[Ag(H2BzPh)NO ₃]	(5)	$2,60 \pm 0,41$	21,0	4,76
[Ag(H2BzpCH ₃ Ph)NO ₃]	(6)	$1,30 \pm 0,33$	19,8	5,04
[Ag(H2BzpClPh)NO ₃]	(7)	$2,24 \pm 0,69$	17,9	5,57

➤ *Interação competitiva entre brometo de etídio (BE) e complexos pelo CT-DNA*

O modo de interação entre os complexos (5-7) e o DNA foi investigado por experimento de deslocamento competitivo do agente intercalante brometo de etídio (BE). Na Figura 4.13A estão apresentados como exemplo os espectros de fluorescência do BE ligado ao DNA na ausência e presença do complexo [Ag(H2BzPh)NO₃] (5). O sistema BE-DNA mostra uma forte emissão em 602 nm quando o comprimento de excitação é de 545 nm. Em todos os casos, a redução na intensidade de fluorescência e um pequeno deslocamento batocrômico foram observados na presença dos complexos de prata(I), supostamente devido à redução no número de locais de ligação no DNA disponíveis para BE. As mudanças espectrais indicam que os complexos em estudo interagem com o DNA por um mecanismo de intercalação atípico.

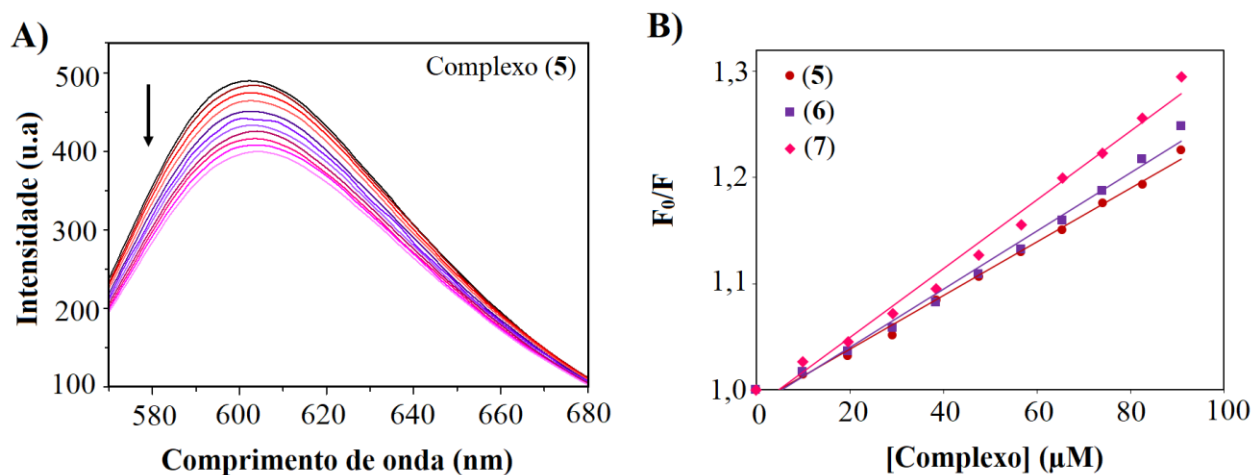


Figura 4.13 – A) Espectros de supressão da fluorescência do sistema BE-DNA na ausência (linha preta) e presença (linhas coloridas) de quantidades crescentes de [Ag(H2BzPh)NO₃] (5). A seta indica as mudanças ocorridas nos espectros após cada adição do complexo (5). B) Gráficos de Stern-Volmer de F_0/F versus [complexos] para (5-7). ($\lambda_{exc} = 545 \text{ nm}$; [complexos] = 0 - 100 μM ; [DNA] = 10 μM e [BE] = 10 μM).

As concentrações necessárias para diminuir em 50% a fluorescência do sistema BE-DNA (C_{50}) foram calculadas utilizando os gráficos da relação entre a intensidade de fluorescência em função da concentração dos complexos. As constantes de ligação aparente (K_{app}) para complexos (5-7) foram calculadas de acordo com a equação $K_{app} = K_{EB} \times [BE]/C_{50}$, discutida no capítulo 2 (Equação 2.8, seção 2.5.2.2.). Os valores de C_{50} e K_{app} são apresentados na Tabela 4.16. Os valores obtidos de K_{app} na ordem de 10^5 M^{-1} são similares ao valor apresentado pelo agente antitumoral actinomicina D ($K_{app} = 9,69 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) cujo seu modo de ação envolve intercalação com o DNA.⁵

4.5.3. Interação com DNA plasmidial

Os efeitos das hidrazona, dos complexos (5-7), AgNO_3 e da cisplatina na conformação do DNA foram avaliados pelas análises da mobilidade eletroforética do DNA plasmidial pUC19 de *E. coli* após a interação com os compostos. A Figura 4.14 apresenta a corrida eletroforética para os compostos incubados com o DNA pUC19. Observamos que na concentração empregada de $100 \mu\text{M}$, os ligantes, sal de prata e os complexos (5-7) não interagem com o DNA, ao passo que a cisplatina interagiu significativamente com o DNA, dificultando sua mobilidade eletroforética. Esses resultados corroboram a hipótese de que os compostos interagem com o DNA de modo intercalativo e não por ligação covalente entre a prata(I) e o DNA. Assim, a ligação covalente entre a prata(I) e o DNA provavelmente não faz parte do mecanismo de ação citotóxica desses compostos.

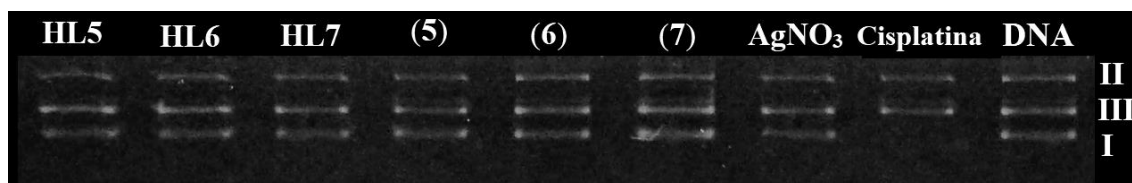


Figura 4.14 – Eletroforese em gel de agarose do DNA plasmidial pUC19 de *E. coli* ($150 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) incubado com H2BzPh (HL1), H2BzpCH₃Ph (HL2), H2BzpClPh (HL3), [Ag(H2BzPh)NO₃] (1), [Ag(H2BzpCH₃Ph)NO₃] (2), [Ag(H2BzpClPh)NO₃] (3), AgNO₃ e cisplatina ($100 \mu\text{M}$) por 24 h à 37°C . *Formas do DNA plasmidial: I (superenovelada), II (circular relaxada) e III (linear).

⁵A. Kellett, M. O'Connor, M. McCann, M. McNamara, P. Lynch, G. Rosair, V. McKee, B. Creaven, M. Walsh, S. McClean, A. Foltyn, D. O'Shea, O. Howe, M. Devereux, *Dalton Trans.* 40 (2011) 1024-1027.

Capítulo 5 - Complexos de prata(I) com 2,6-diacetilpiridina bis(benzoil-hidrazonas): avaliação da atividade antifúngica e interação com DNA

Neste capítulo foram estudados os complexos $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcPh})]\text{NO}_3$ (**9**), $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})]\text{NO}_3$ (**10**), $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpClPh})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**11**) e $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpNO}_2\text{Ph})]\text{NO}_3$ (**12**) obtidos com 2,6-diacetilpiridina bis(benzoil-hidrazona) (H2-2,6AcPh) e os derivados bis(*para*-metilbenzoil-hidrazona) (H2-2,6AcpCH₃Ph), bis(*para*-cloro-benzoil-hidrazona) (H2-2,6AcpClPh), e bis(*para*-nitro-benzoil-hidrazona) (H2-2,6AcpNO₂Ph). As bis(benzoil-hidrazonas) usadas nas sínteses já foram descritas na literatura,¹ exceto H2-2,6AcpCH₃Ph que é um composto inédito. Os compostos foram caracterizados por microanálises, condutividades molares e por seus espectros de infravermelho, RMN e de massas (ESI-MS). Estruturas cristalinas de (**10**) e (**11**) também foram determinadas. As atividades antifúngicas de todos os compostos foram avaliadas contra fungos das espécies de *Candida* e filamentosos. Estudos da interação dos complexos (**9-12**) com albumina sérica humana (HSA) e o ácido desoxirribonucleico (DNA) também foram realizados (Figura 5.1).

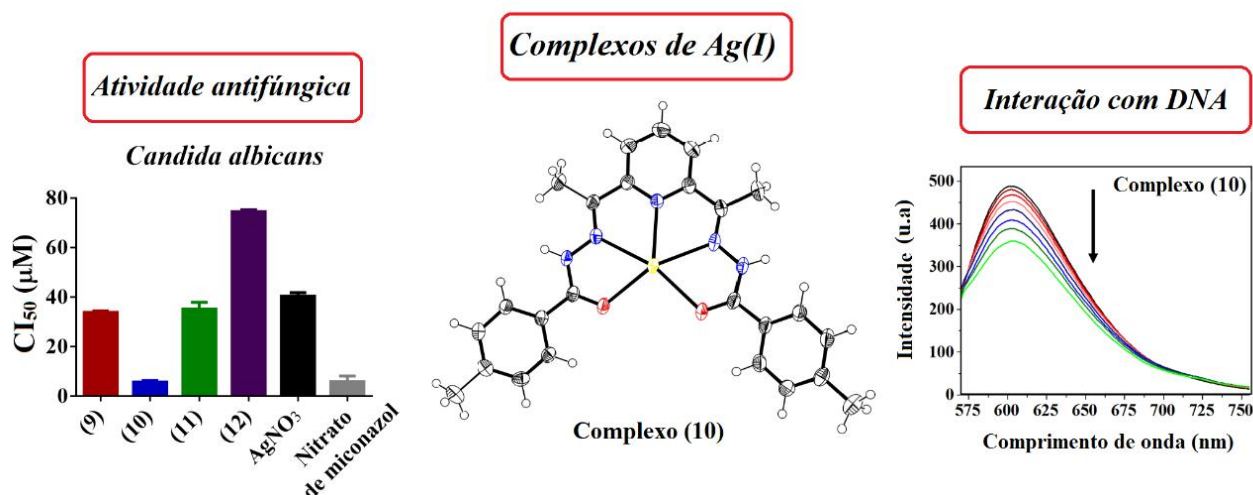


Figura 5.1 – Resumo gráfico dos principais resultados apresentados no capítulo 5.

5.1. Caracterização dos compostos

Os complexos apresentaram-se estáveis no estado sólido e foram guardados sob proteção da luz. Esses compostos também são estáveis em soluções de 5% de DMSO e tampão Tris-HCl (água) por até 48 horas na ausência de luz. Todos os complexos formados são amarelos e foram obtidos com rendimentos entre 34 a 81 %. As estruturas propostas para os complexos (**9-12**) estão apresentadas

¹K.S.O. Ferraz, N.F. Silva, J.G. Da Silva, L.F. De Miranda, C.F.D. Romeiro, E.M. Souza-Fagundes, I.C. Mendes, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 53 (2012) 98–106.

na Figura 5.2. As faixas de fusão, massas molares, microanálises e medidas de condutividade molar estão apresentados na Tabela 5.1. Nos complexos os valores de condutividade molar sugerem a formação de eletrólitos do tipo 1:1. As microanálises indicam que os complexos são do tipo $[Ag(H_2L)]NO_3$, contendo uma molécula de *bis*(benzoil-hidrazona) neutra ligada ao centro metálico e um íon nitrato presente na estrutura como contra-íon. No complexo (**11**) duas moléculas de água de hidratação foram confirmadas pela curva termogravimétrica, que apresenta uma perda de massa de 5,57 % (teórico: 5,33 %) entre 30–100 °C.

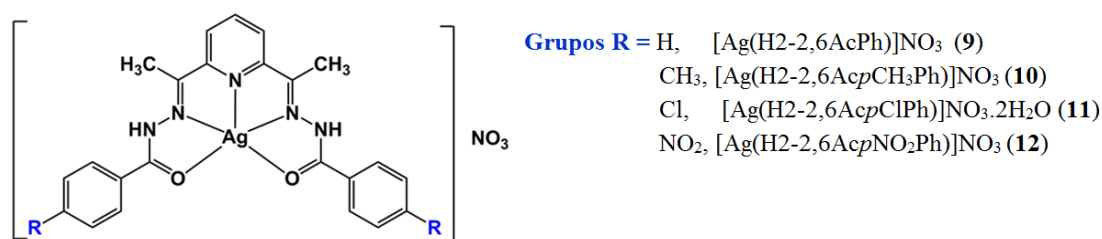


Figura 5.2 – Estrutura geral para os complexos de prata(I) com *bis*(benzoil-hidrazonas).

Tabela 5.1 – Rendimento, massa molar, faixa de fusão, condutividade molar e análise elementar de CHN das *bis*(benzoil-hidrazonas) e seus complexos de prata(I).

Compostos	Rend. (%)	MM (g mol ⁻¹)	Faixa de fusão (°C)	Λ_M^a	Análise Elementar ^b		
					%C	%H	%N
H2-2,6AcPh	73	399,45	236,0 – 237,0	–	–	–	–
$[Ag(H2-2,6AcPh)]NO_3$ (9)	68	569,32	247,4 – 248,8	69,2	48,59 (48,52)	3,69 (3,72)	14,70 (14,76)
H2-2,6AcpCH ₃ Ph	95	427,50	262,0 – 263,0	–	70,12 (70,24)	5,69 (5,89)	16,45 (16,38)
$[Ag(H2-2,6AcpCH_3Ph)]NO_3$ (10)	34	597,37	241,4 – 243,2	72,3	49,90 (50,26)	4,17 (4,22)	14,43 (14,07)
H2-2,6AcpClPh	89	468,34	263,0 – 270,0	–	–	–	–
$[Ag(H2-2,6AcpClPh)]NO_3 \cdot 2H_2O$ (11)	81	674,23	244,6 – 246,3	73,7	41,14 (40,97)	3,47 (3,44)	12,75 (12,46)
H2-2,6AcpNO ₂ Ph	77	489,44	262,0 – 263,0	–	–	–	–
$[Ag(H2-2,6AcpNO_2Ph)]NO_3$ (12)	71	659,31	227,9 – 229,6	71,1	44,86 (41,90)	2,94 (2,90)	16,74 (17,00)

^a Λ_M ($\Omega^{-1}cm^2mol^{-1}$) em DMF na concentração de $1 \times 10^{-3} mol L^{-1}$;

^bValores calculados entre parênteses

5.1.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

As principais atribuições das bandas observadas nos espectros de infravermelho das *bis*(benzoil-hidrazonas) livres foram comparadas com os espectros dos complexos de prata(I) e são apresentadas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Atribuição das principais bandas nos espectros de absorção na região do infravermelho (cm^{-1})^a das *bis*(benzoil-hidrazonas) e seus complexos de prata(I).

Compostos		$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu(\text{NO}_3)$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{Ag-O})$
H2-2,6AcPh		3276 m	1664 F	1568 m	–	658 f	–
[Ag(H2-2,6AcPh)]NO ₃	(9)	3274 f	1624 F	1602 f	1384 F	656 f	530 f
H2-2,6AcpCH ₃ Ph		3232 f	1670 F	1610 m	–	638 f	–
[Ag(H2-2,6AcpCH ₃ Ph)]NO ₃	(10)	3226 f	1650 F	1610 m	1384 F	–	*
H2-2,6AcpClPh		3270 m	1663 F	1592 m	–	660 f	–
[Ag(H2-2,6AcpClPh)]NO ₃ ·2H ₂ O	(11)	3184 f	1648 F	1594 F	1384 F	684 f	534 f
H2-2,6AcpNO ₂ Ph		3226 f	1671 F	1576 m	–	634 f	–
[Ag(H2-2,6AcpNO ₂ Ph)]NO ₃	(12)	3193 f	1703 m	1602 m	1384 F	634 f	597 f

^a Pastilhas de KBr (4000-400 cm^{-1}); F = forte, m = média e f = fraca; ν estiramento e ρ deformação;

* Não foi possível atribuir devido à baixa intensidade das bandas nessa região;

– Ausência da banda.

Nos espectros das *bis*(benzoil-hidrazonas) livres são observadas bandas características do estiramento $\nu(\text{N-H})$ em 3276-3226 cm^{-1} , que estão presentes nos espectros dos complexos em 3274-3184 cm^{-1} , indicando que os ligantes coordenam-se ao metal de forma neutra.

O modo vibracional $\nu(\text{C=O})$, observado na região entre 1671-1663 cm^{-1} nos espectros das *bis*(benzoil-hidrazonas), desloca-se para 1703-1624 cm^{-1} nos espectros dos complexos, sugerindo a coordenação do metal pelo átomo de oxigênio. Esse modo de coordenação também foi evidenciado pelas bandas correspondentes ao estiramento $\nu(\text{Ag-O})$ situadas entre 597-530 cm^{-1} .² As bandas em torno de 1610-1576 cm^{-1} nas *bis*(benzoil-hidrazonas) livres foram atribuídas ao estiramento $\nu(\text{C=N})$ e sofrem deslocamento para 1610-1594 cm^{-1} após a complexação, indicando que a coordenação ao metal ocorre pelo nitrogênio imínico.^{1,3} Bandas atribuídas ao modo de deformação no plano do anel em 634-658 cm^{-1} nos ligantes, que deslocam-se para 684-634 cm^{-1} nos complexos, sugerem que o nitrogênio piridínico também participa da coordenação ao centro metálico.¹

Portanto, as *bis*(benzoil-hidrazonas) encontram-se coordenadas a prata(I) de forma pentadentada, através do sistema quelante O-N-N_{py}-N-O. Adicionalmente, o modo vibracional $\nu(\text{NO}_3)$ observado apenas nos complexos em 1384 cm^{-1} confirma a presença do grupo nitrato como contra-íon.⁴ Como exemplo, a Figura 5.3 mostra os espectros de infravermelho de H2-2,6AcpCH₃Ph em comparação com seu complexo [Ag(H2-2,6AcpCH₃Ph)]NO₃ (10).

²K. Nakamoto, *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, Wiley-Interscience, New York, 1970.

³G. Prakash, R. Ramachandran, M. Nirmala, *Inorg Chim Acta*. 427 (2015) 203-210.

⁴M. S. Refat, *Spectrochim. Acta, Part A*. 68 (2007) 1393-1405.

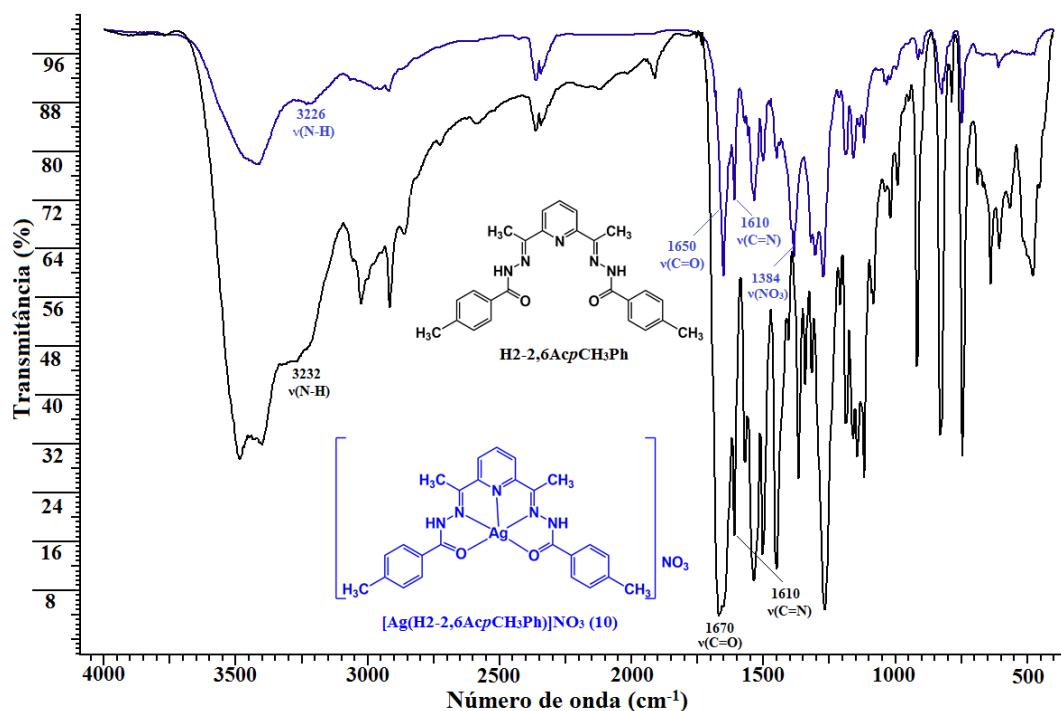


Figura 5.3 – Espectros de absorção na região do infravermelho de H2-2,6AcpCH₃Ph e do complexo [Ag(H2-2,6AcpCH₃Ph)]NO₃ (**10**), obtidos em pastilhas de KBr (4000-400 cm⁻¹).

5.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os complexos (**9-12**) foram caracterizados por RMN de ¹H, ¹³C{¹H}, DEPT 135 e mapas de contorno homonucleares (COSY) e heteronucleares (HMQC e HMBC). Todos os espectros foram obtidos em DMSO-*d*₆, em razão da maior solubilidade dos compostos nesse solvente. Os sinais observados nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C{¹H} assim como as estruturas dos compostos com numeração utilizada para atribuições desses sinais, estão apresentados nas Tabelas 5.3 e 5.4, respectivamente. Nos espectros dos complexos os sinais dos hidrogênios e carbonos sofrem deslocamentos significativos em relação aos das *bis*(benzoil-hidrazonas) livres.

Nos espectros de RMN de ¹H das *bis*(benzoil-hidrazonas) os sinais de N3-H e N5-H entre 10,96-11,30 ppm são característico da configuração *E*, em que N3-H e N5-H formam ligação de hidrogênio com o solvente.⁵ A integração dos sinais de N3-H e N5-H é de, aproximadamente, dois hidrogênios, nos ligantes livres. Com a complexação esses sinais deslocam-se entre 11,50-11,68 ppm e a integração também confirma a presença de dois hidrogênios, o que indica que as *bis*(benzoil-hidrazonas) coordenam-se ao metal de forma neutra.

Conforme apresentado na Figura 5.4, todos os sinais de ¹H sofreram significantes deslocamentos em relação a posição das *bis*(benzoil-hidrazonas) livres.

⁵A. A. R. Despaigne, G. L. Parrilha, J. B. Izidoro, P. R. Costa, R. G. Santos, O. E. Piro, E. E. Castellano, W. R. Rocha, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 50 (2012) 163-172.

Nos espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ os sinais atribuídos aos carbonos do anel piridínico, C7, C9 (C=N) e C8, C10 (C=O) também sofreram mudanças significativas após a complexação (Figura 5.5), indicando que as *bis*(benzoil-hidrazonas) coordenam-se por um sistema quelante O-N-N_{py}-N-O, como confirmado nas estruturas cristalográficas obtidas para os complexos (10) e (11) (seção 5.5).

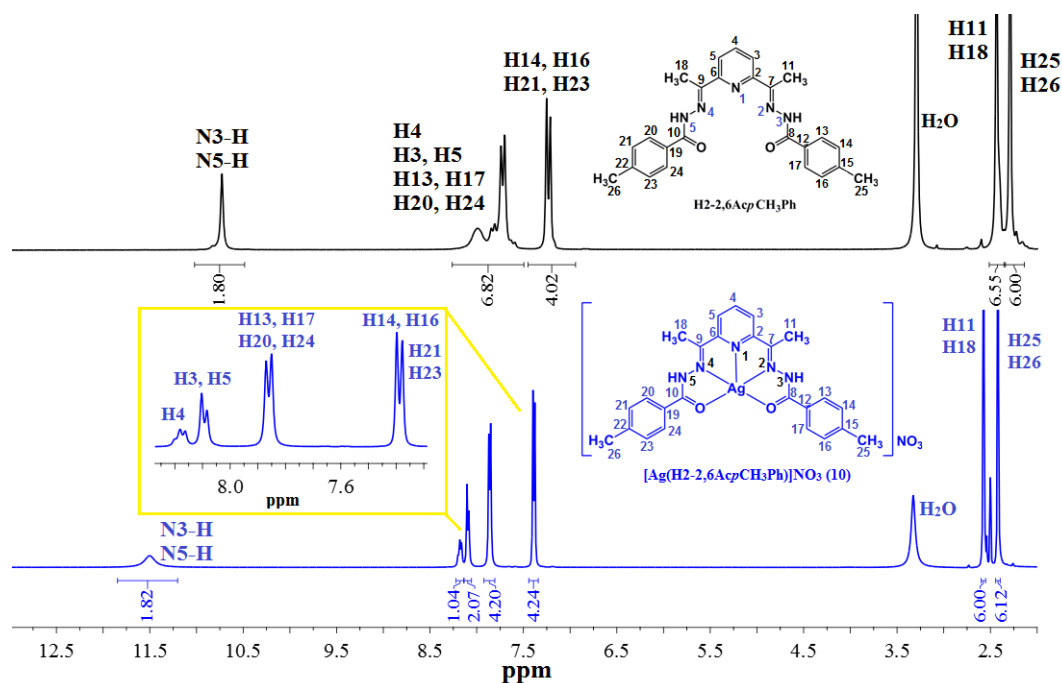


Figura 5.4 – Espectros de RMN de ^1H de H2-2,6AcpCH₃Ph e do complexo [Ag(H2-2,6AcpCH₃Ph)]NO₃ (10) registrados em DMSO-*d*₆ à temperatura ambiente.

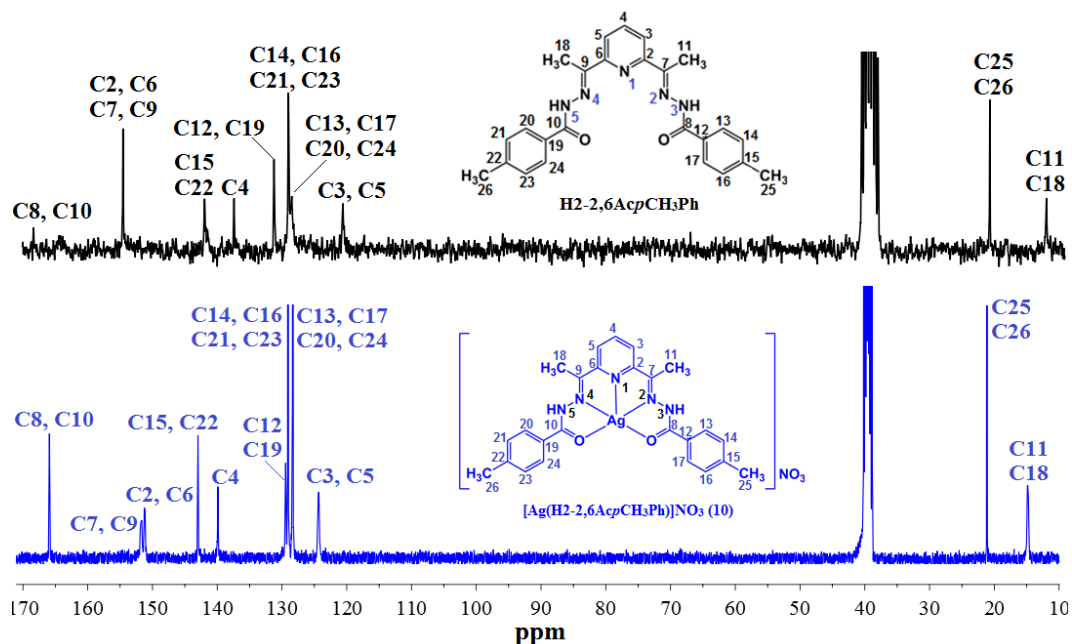
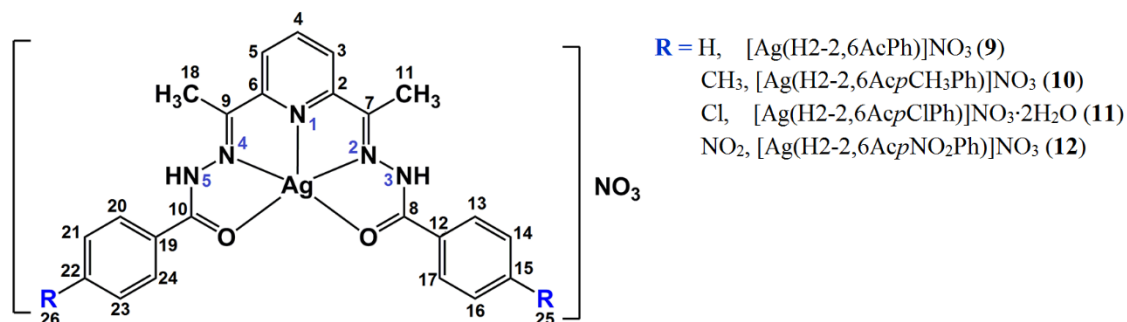


Figura 5.5 – Espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de H2-2,6AcpCH₃Ph e do complexo [Ag(H2-2,6AcpCH₃Ph)]NO₃ (10) registrados em DMSO-*d*₆ à temperatura ambiente.

Tabela 5.3 – Atribuições, número de hidrogênio (n), multiplicidades (M),^a constantes de acoplamento (J, Hz) e deslocamento químico (ppm) dos sinais de RMN de ¹H das bis(benzoil-hidrazonas) e seus complexos de prata(I) (400 MHz), em DMSO-*d*₆.

Atribuições	n	H2-2,6AcPh	(9)	H2-2,6AcpCH ₃ Ph	(10)	H2-2,6AcpClPh	(11)	H2-2,6AcpNO ₂ Ph	(12)
N3-H, N5-H	2	10,92 (s)	11,62 (s)	10,74 (s)	11,50 (s)	10,96 (s)	11,68 (s)	11,30 (s)	11,63 (s)
H3, H5	2	8,37-8,03 (m)	8,11 (d) (J = 7,60)	8,10-7,91 (m)	8,09 (d) (J = 7,60)	8,19-7,99 (m)	8,09 (d) (J = 6,30)	8,73-8,19 (m)	8,07-7,87 (m)
H4	1	7,89 (d) (J = 5,80)	8,23-8,15 (m)	7,84 (d) (J = 7,40)	8,22-8,14 (m)	7,89 (d) (J = 7,40)	8,23-8,13 (m)	8,19-7,63 (m)	8,19 (d) (J = 9,00)
H13, H17, H20, H24	4	7,89 (d) (J = 5,80)	7,91 (d) (J = 7,50)	7,73 (d) (J = 7,70)	7,86 (d) (J = 7,70)	7,89 (d) (J = 7,40)	7,94 (d) (J = 6,80)	8,19-7,63 (m)	8,19 (d) (J = 9,00)
H14, H16 H21, H23	4	7,71-7,39(m)	7,58 (t) (J = 7,60)	7,24 (d) (J = 8,00)	7,39 (d) (J = 7,90)	7,57 (d) (J = 8,40)	7,63 (d) (J = 7,60)	8,73-8,19 (m)	8,39 (d) (J = 7,20)
H15, H22	2	7,71-7,39(m)	7,69 (t) (J = 7,30)	–	–	–	–	–	–
H11, H18	6	2,53 (s)	2,56 (s)	2,30 (s)	2,57 (s)	2,67 (s)	2,55 (s)	2,68 (s)	2,66(s)
H25, H26	6	–	–	2,44 (s)	2,42 (s)	–	–	–	–



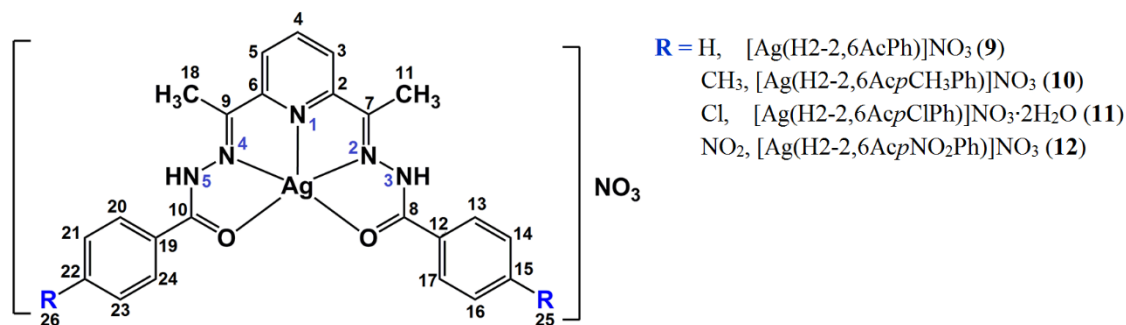
^a Os desdobramentos dos sinais H3, H5 nos ligantes seriam dupletos, no entanto devido à sobreposição de sinais são observados apenas multipletos;

M = (s) simples; (d) duplete; (t) tripete; (m) multipete.

– Ausência de sinal

Tabela 5.4 – Atribuições e deslocamento químico (ppm) dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e DEPT 135 das *bis*(benzoil-hidrazonas) e seus complexos de prata(I) (400 MHz), em $\text{DMSO-}d_6$.

Atribuições	DEPT ^a	H2-2,6AcPh (9)	H2-2,6AcPh (9)	H2-2,6AcPhCH ₃ Ph (10)	H2-2,6AcPhCH ₃ Ph (10)	H2-2,6AcPhClPh (11)	H2-2,6AcPhClPh (11)	H2-2,6AcPhNO ₂ Ph (12)	H2-2,6AcPhNO ₂ Ph (12)
C2, C6	–	–	151,3	154,5	151,2	–	151,1	–	151,9
C3, C5	↑	121,2	124,6	120,7	124,3	120,3	124,0	123,3	123,6
C4	↑	136,8	139,9	137,4	139,8	136,1	140,3	137,7	140,1
C7, C9	–	155,1	152,4	142,0	151,7	154,2	152,5	154,0	152,6
C8, C10	–	165,2	166,2	168,2	165,9	162,8	165,4	163,5	164,8
C12, C19	–	–	132,3	131,3	–	–	131,1	–	–
C13, C17, C20, C24	↑	138,0	128,3	128,6	128,3	128,0	130,4	128,1	129,8
C14, C16, C21, C23	↑	129,0	128,6	129,1	129,0	136,9	128,8	138,6	138,4
C15, C22	–	–	132,7	141,5	–	–	137,7	–	139,4
C11, C18	↑	12,4	15,1	12,7	14,8	12,4	15,1	12,6	14,6
C25, C26	↑	–	–	21,4	21,1	–	–	–	–



^a ↑ (conversão no DEPT 135 para CH e CH₃)

– Ausência de sinal

5.1.3. Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray (ESI-MS)

As análises dos espectros de massa dos complexos, em modo positivo, confirmaram a formação de espécies catiônicas $[\text{Agbis}(\text{benzoil-hidrazonas})]^+$ em solução. Na Figura 5.6A é apresentado o espectro de massas do complexo $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})]\text{NO}_3$ (**10**). A espécie catiônica $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})]^+$ apresentou $m/z_{(\text{experimental})}$ igual a 534,1053 e $m/z_{(\text{teórica})}$ 534,1013, com abundância relativa de 90%. O padrão isotópico experimental de cada espécie foi comparado com o padrão isotópico teórico em que foram observados picos com valores de m/z com erros inferiores a 20 ppm (Figura 5.6B e C). O espectro também mostra a presença do ligante livre $[\text{H}2\text{-}2,6\text{AcPh}+\text{Na}]^+$ (m/z 449,5612, 100%).

Os espectros das demais espécies catiônicas $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcPh})]^+$ e $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpClPh})]^+$ apresentaram valores de $m/z_{(\text{experimental})}$ iguais a 506,0659 e 575,9938 e $m/z_{(\text{teórica})}$ de 506,0740 e 575,9900, respectivamente. Em ambos também é observada a presença das *bis*(benzoil-hidrazonas) livres $[\text{H}2\text{-}2,6\text{AcPh}+\text{Na}]^+$ (m/z 422,1481) e $[\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpClPh}+\text{Na}]^+$ (m/z 490,1230) com abundância relativa entre 80-100%.

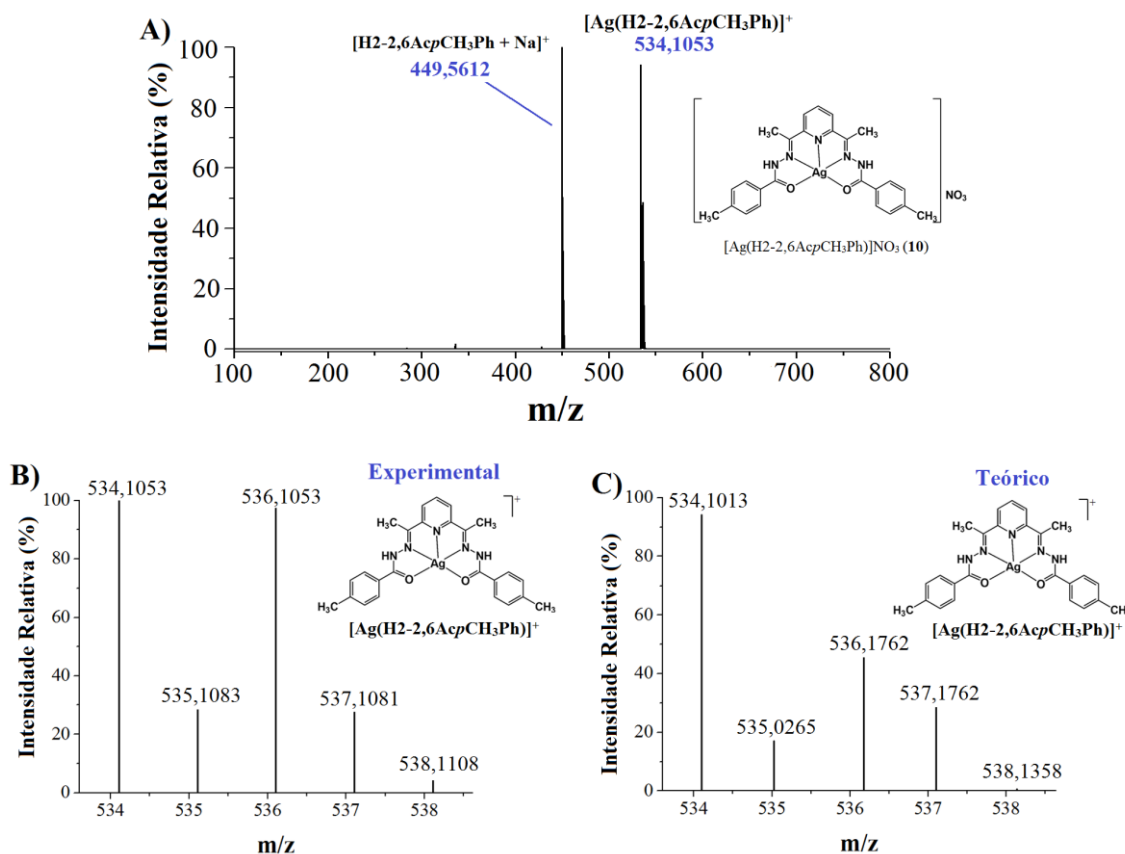


Figura 5.6 – A) Espectros de massas (ESI, modo +) de $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})]\text{NO}_3$ (**10**) registrados na faixa de 100 a 800 m/z . Comparação entre o padrão isotópico B) experimental (m/z 534,1053) e C) teórico (m/z 534,1013) da espécie catiônica $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})]^+$.

5.1.4. Cristalografia por difração de raios X

Monocristais dos complexos $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})]\text{NO}_3$ (**10**) e $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpClPh})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**11**) adequados para difração de raios X foram obtidos a partir da evaporação lenta da solução-mãe procedente das sínteses de (**10**) e (**11**) à temperatura ambiente.

A projeção ORTEP das estruturas moleculares dos complexos (**10**) e (**11**) com esquema de numeração estão apresentadas na Figura 5.7. Os resumos da coleção de dados e dos refinamentos estão dispostos na Tabela 5.5. As distâncias e ângulos de ligação são apresentados na Tabela 5.6. As interações de hidrogênio presentes nas estruturas (**10**) e (**11**) estão apresentadas na Tabela A14 (anexo).

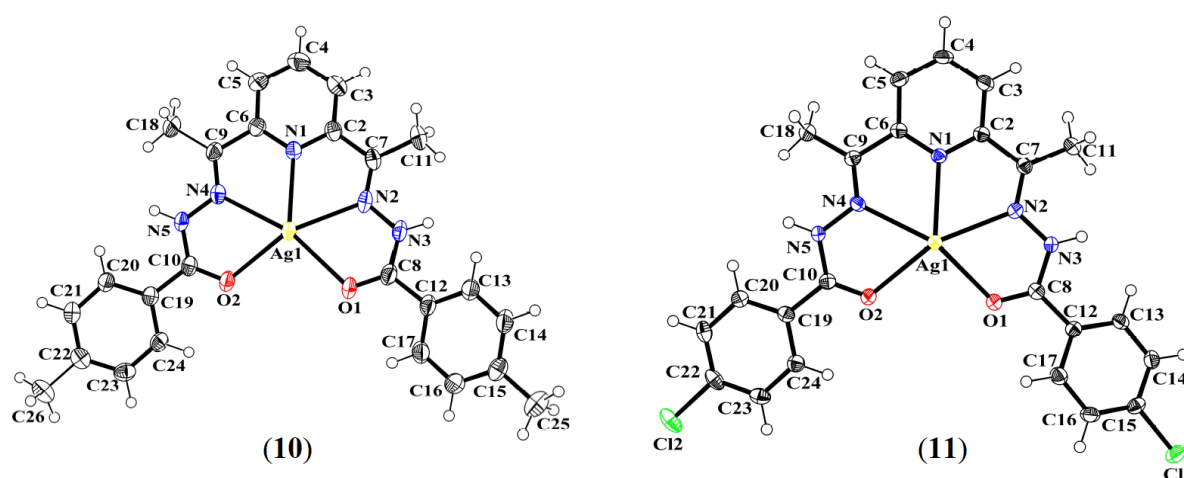


Figura 5.7 – Projeção ORTEP dos complexos catiônicos de $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})]\text{NO}_3$ (**10**) e $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpClPh})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**11**) com elipsoides em nível de probabilidade de 50%.

As estruturas cristalinas dos complexos (**10**) e (**11**) pertencem ao sistema triclinico com grupo espacial $P - 1$ e Z igual a 2, ou seja, a célula unitária possui duas fórmulas moleculares (Tabela 5.5). As unidades assimétricas contém as espécies catiônicas $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})]^+$ (**10**) e $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpClPh})]^+$ (**11**) e um ânion nitrato como contra-íon para ambos os complexos. O íon nitrato apresenta-se desordenado em (**11**). Em (**11**) também é possível observar a presença de duas moléculas de água de hidratação. Os íons nitrato e as moléculas de água foram omitidos das estruturas moleculares para maior clareza nas imagens (Figura 5.7).

Tabela 5.5 – Dados cristalográficos e de refinamento das estruturas dos complexos [Ag(H2-2,6AcpCH₃Ph)]NO₃ (**10**) e [Ag(H2-2,6AcpClPh)]NO₃·2H₂O (**11**)

Compostos	(10)	(11)
Fórmula molecular	C ₂₅ H ₂₅ N ₆ O ₅ Ag	C ₂₃ H ₂₃ Cl ₂ N ₆ O ₇ Ag
Massa molecular (g mol ⁻¹)	597,38	674,24
Temperatura (K)	200(2)	200(2)
Sistema cristalino	Triclínico	Triclínico
Grupo espacial	P -1	P -1
Parâmetros da célula unitária		
a (Å)	6,2408(1)	10,8147(3)
b (Å)	11,8002(3)	11,4278(3)
c (Å)	17,6045(3)	12,2545(3)
α (°)	109,084(2)	114,166(3)
β (°)	94,510(1)	105,724(2)
γ (°)	95,577(2)	98,379(2)
Volume (Å ³)	1210,96(4)	1272,00(7)
Número de fórmulas elementares (Z)	2	2
Densidade calculada (Mg m ⁻³)	1,638	1,76
Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,882	1,06
F(000)	608	680
Dimensão do cristal (mm)	0,36 x 0,22 x 0,04	0,21 x 0,10 x 0,04
Intervalo de θ (°)	2,5 - 26,4	2,3 - 26,4
	-7 ≤ h ≤ 7	-13 ≤ h ≤ 13
Intervalo de índices	-14 ≤ k ≤ 14	-14 ≤ k ≤ 14
	-21 ≤ l ≤ 21	-15 ≤ l ≤ 15
Refleções coletadas	59774	31220
Reflexões únicas [R _{int}]	4949 [0,040]	5209 [0,051]
Integridade para θ = 25,242° (%)	99,9	99,9
Dados/restrições/parâmetros	4949 / 12 / 335	5209 / 6 / 366
Qualidade de ajuste (S)	1,052	1,038
Índices de R final [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0,0345, wR ₂ = 0,0918	R ₁ = 0,0309, wR ₂ = 0,0647
Índices de R (todos os dados)	R ₁ = 0,0382, wR ₂ = 0,0948	R ₁ = 0,0413, wR ₂ = 0,0689
Δρ _{máx.} e Δρ _{mín.} (eÅ ⁻³)	1,694 e -0,899	0,665 e -0,741
CCDC	1566453	1566454

Conforme mostra a Figura 5.7, as *bis*(benzoil-hidrazonas) atuam como ligantes pentadentados que coordenam-se ao metal de forma neutra por meio de dois átomos de oxigênio e três átomos de nitrogênio através do sistema quelante O1-N2-N1-N4-O2. Em todos os complexos, o número de coordenação em torno da Ag(I) é igual a cinco. Em (**10**) e (**11**) as *bis*(benzoil-hidrazonas) são quase planares com desvio médio do plano rms dos átomos em relação ao plano formado por O1-N2-N1-N4-O2 igual a 0,1654 Å (**10**) e 0,1493 Å (**11**).

Em ambos os complexos, as *bis*(benzoil-hidrazonas) assumem para cada braço da molécula uma conformação *EZ* em relação às ligações C7-N2, C9-N4 e N3-C8, N5-C10, como observado em estruturas cristalográficas similares dos complexos de Sb(III) e Bi(III) com *bis*(benzoil-hidrazonas).¹

As distâncias das ligações C8-O1 e C10-O2 são de 1,227(4) Å e 1,228(3) Å (**10**) e 1,231(3) Å e 1,232(3) Å (**11**), permanecem com caráter predominante de ligação dupla. Já as distâncias das ligações C8-N3 e C10-N5 são maiores do que ligações de caráter duplo (C=N aprox. 1,27Å) e menores que ligações de caráter simples (C-N aprox. 1,47Å), porém são mais próximas de uma simples ligação.¹ Esse comportamento das *bis*(benzoil-hidrazonas) suporta a ideia de que esses ligantes estão presentes nas estruturas dos complexos na sua forma neutra.

Conforme a Tabela 5.6, as distâncias das ligações Ag-N_{py} e Ag-N_{imina} encontradas entre 2,407-2,466 Å e Ag-O entre 2,414-2,495 Å nas estruturas de (**10**) e (**11**) são relativamente maiores do que as distâncias de Ag-N e Ag-O observadas em outros complexos de prata(I).^{6,7} Observou-se ainda que o ângulo de ligação O1-Ag1-O2 [99.20(7) ° (**10**) e 92.76(5) ° (**11**)] é maior quando comparado ao ângulo central de um pentágono regular (72 °) e os outros ângulos O-Ag-N e N-Ag-N envolvendo o metal (64,30-66,27 °). Essas diferenças nas distâncias e ângulos de ligação ocorrem provavelmente devido aos requerimentos geométricos exigidos pela coordenação pentadentada das *bis*(benzoil-hidrazonas).

Tabela 5.6 – Distâncias de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados para os complexos [Ag(H2-2,6AcpCH₃Ph)]NO₃ (**10**) e [Ag(H2-2,6AcpClPh)]NO₃·2H₂O (**11**), com desvio padrão entre parênteses.

Distâncias (Å)	(10)	(11)	Ângulos (°)	(10)	(11)
Ag1-O1	2,495(2)	2,414(17)	N2-Ag1-O1	65,24(8)	65,97(6)
Ag1-O2	2,469(2)	2,471(16)	N4-Ag1-O1	163,43(8)	155,07(6)
Ag1-N2	2,450(2)	2,414(19)	O1-Ag1-O2	99,20(7)	92,76(5)
Ag1-N4	2,466(2)	2,407(2)	N4-Ag1-O2	64,30(7)	65,13(6)
Ag1-N1	2,438(2)	2,413(19)	N2-Ag1-O2	154,98(8)	155,16(6)
O1-C8	1,227(4)	1,231(3)	N1-Ag1-O1	130,62(8)	129,18(6)
O2-C10	1,228(3)	1,232(3)	N1-Ag1-O2	127,30(7)	128,73(6)
N3-C8	1,362(4)	1,364(3)	N1-Ag1-N4	64,80(8)	66,27(7)
N5-C10	1,369(4)	1,362(3)	N1-Ag1-N2	65,41(8)	65,62(7)
N3-N2	1,367(3)	1,376(3)	N2-Ag1-N4	129,41(8)	131,71(7)
N5-N4	1,369(3)	1,381(3)	C8-O1-Ag1	117,6(2)	117,24(15)
N2-C7	1,276(4)	1,275(3)	C10-O2-Ag1	118,07(19)	117,20(15)
N4-C9	1,272(4)	1,285(3)	N3-N2-Ag1	116,47(18)	115,72(13)
			N5-N4-Ag1	115,63(16)	116,93(14)
			C7-N2-Ag1	121,88(19)	123,31(16)
			C9-N4-Ag1	121,53(19)	122,71(16)

⁶E.M. Njogu, B. Omondi, V.O. Nyamori. *J. Mol. Struct.* 1135 (2017) 118-128.

⁷S. H. Alisir, N. Dege, *Acta Crystallogr. Sect. E Crystallogr. Commun.* 72 (2016) 1475-1479.

5.2. Avaliação da atividade antifúngica

Os compostos foram investigados quanto às suas atividades contra espécies de *Candida* (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*) e fungos filamentosos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus* e *Penicillium citrinum*). A concentração inibitória de 50% do crescimento dos fungos (CI₅₀) foi determinada para os ligantes, complexos (**9-12**), nitrato de prata, nitrato de miconazol e nistatina (fármacos de referência usados para comparação).

Nas espécies de *Candida* as *bis*(benzoil-hidrazonas) livres não inibiram o crescimento dos fungos acima de 80% na concentração de 250 µg mL⁻¹, sendo consideradas inativas. O sal de prata apresentou baixa atividade contra essas espécies. Por outro lado, os complexos (**9-12**) mostraram-se ativos nas cepas avaliadas. A melhor ação antifúngica foi observada para o complexo [Ag(H2-2,6AcpCH₃Ph)]NO₃ (**10**) (CI₅₀ = 5,7 µM) com atividade similar ao nitrato de miconazol (CI₅₀ = 5,8 µM) contra *C. albicans* (Tabela 5.7). Além disso, o complexo (**10**) também apresentou uma seletividade apreciável frente às espécies de *C. albicans*. De forma geral, a presença do substituinte *para*-CH₃ no complexo (**10**) exerce uma influência significativa sobre sua ação antifúngica quando comparado com os demais substituintes, o que poderia estar associado à maior capacidade de inibição do ergosterol presente nas membranas celulares fúngicas.

Tabela 5.7 – Atividade antifúngica (CI₅₀) para as *bis*(benzoil-hidrazonas), complexos (**9-12**), nitrato de prata e antifúngicos de uso clínico frente as espécies de *Candida*.

Compostos	CI ₅₀ (µM) ± DP ^a			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
H2-2,6AcPh	–	–	–	–
[Ag(H2-2,6AcPh)]NO ₃ (9)	33,8 ± 0,6	62,4 ± 3,2	32,1 ± 2,5	45,3 ± 1,3
H2-2,6AcpCH ₃ Ph	–	–	–	–
[Ag(H2-2,6AcpCH ₃ Ph)]NO ₃ (10)	5,7 ± 0,6	> 52	20,8 ± 4,7	> 26
H2-2,6AcpCIPh	–	–	–	–
[Ag(H2-2,6AcpCIPh)]NO ₃ ·2H ₂ O (11)	35,0 ± 2,9	55,2 ± 5,5	35,7 ± 0,1	37,1 ± 2,3
H2-2,6AcpNO ₂ Ph	–	–	–	–
[Ag(H2-2,6AcpNO ₂ Ph)]NO ₃ (12)	74,4 ± 0,9	63,8 ± 1,0	> 23	> 47
AgNO ₃	40,3 ± 1,5	64,2 ± 2,2	32,8 ± 6,4	40,3 ± 0,9
Nitrato de miconazol	5,8 ± 2,3	19,5 ± 4,5	(8,0 ± 4) × 10 ⁻³	3,6 ± 0,2
Nistatina	4,7 ± 1,2	1,9 ± 0,2	11,8 ± 2,1	7,8 ± 0,6

^a CI₅₀ = concentração inibitória de 50% do crescimento dos fungos;

DP = Desvio padrão;

– Não inibe o crescimento de fungos acima de 80% a 250 µg mL⁻¹.

De forma similar, as *bis*(benzoil-hidrazonas) livres foram inativas ou apresentaram baixa atividade contra as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, exceto para H2-2,6AcPh, que apresentou valor de CI₅₀ inferior a nistatina frente ao fungo *A. parasiticus*. Em alguns casos com a complexação

foi observada uma melhora na atividade, como por exemplo frente às espécies de *A. flavus*. O complexo [Ag(H2-2,6AcPh)]NO₃ (**9**) com valor de CI₅₀ igual a 23,2 μM provou ser bem mais ativo que o antifúngico nistatina (CI₅₀ = 30,7 μM). Adicionalmente, os complexos (**9**) e (**10**) também foram mais ativos que a nistatina frente ao fungo *A. parasiticus* (Tabela 5.8).

A ação antifúngica das *bis*(benzoil-hidrazonas) tanto frente as espécies de *Candida* quanto nos fungos filamentosos foi mais pronunciada após a complexação, o que nos permite sugerir que a inserção da prata(I) nas estruturas desses ligantes é uma boa estratégia no planejamento de novos agentes antifúngicos com maior eficácia terapêutica.

Tabela 5.8 – Atividade antifúngica (CI₅₀) para as *bis*(benzoil-hidrazonas), complexos (**9-12**), nitrato de prata e antifúngicos de uso clínico frente as espécies de fungos filamentosos.

Compostos	CI ₅₀ (μM) ± DP ^a			
	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
H2-2,6AcPh	89,2 ± 4,1	47,7 ± 8,5	47,9 ± 1,9	> 156
[Ag(H2-2,6AcPh)]NO ₃ (9)	39,0 ± 5,1	48,2 ± 0,4	59,9 ± 2,7	23,2 ± 5,0
H2-2,6AcpCH ₃ Ph	129,9 ± 8,4	94,1 ± 7,7	–	68,1 ± 1,3
[Ag(H2-2,6AcpCH ₃ Ph)]NO ₃ (10)	53,7 ± 1,2	49,1 ± 6,3	66,7 ± 1,8	34,6 ± 2,9
H2-2,6AcpClPh	135,8 ± 5,4	–	> 66	–
[Ag(H2-2,6AcpClPh)]NO ₃ ·2H ₂ O (11)	> 95	34,8 ± 4,5	> 95	> 47
H2-2,6AcpNO ₂ Ph	–	–	–	–
[Ag(H2-2,6AcpNO ₂ Ph)]NO ₃ (12)	48,6 ± 1,7	24,3 ± 0,6	> 183	50,6 ± 2,0
AgNO ₃	20,1 ± 3,5	> 11	> 183	24,6 ± 2,9
Nitrato de miconazol	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Nistatina	4,8 ± 3,8	15,0 ± 1,1	76,0 ± 1,1	30,7 ± 1,2

^a CI₅₀ = concentração inibitória de 50% do crescimento dos fungos;

DP = Desvio padrão;

– Não inibe o crescimento de fungos acima de 80% a 250 μg mL⁻¹.

5.3. Avaliação da interação dos complexos de prata(I) com biomoléculas

5.3.1. Interação com albumina sérica humana (HSA)

Os experimentos para investigação da habilidade dos complexos (**9-12**) em interagir com a HSA foram realizados em três temperaturas diferentes, conforme mostrado na Figura 5.8. Os espectros de fluorescência apresentam mudanças espectrais características para um processo de supressão da fluorescência, em que mediante o aumento da concentração do complexo (**10**) nota-se uma diminuição da intensidade de fluorescência. Adicionalmente, observou-se um pequeno

deslocamento hipsocrômico, indicando a diminuição da polaridade e o aumento da hidrofobicidade em torno do resíduo Trp-214.^{8,9}

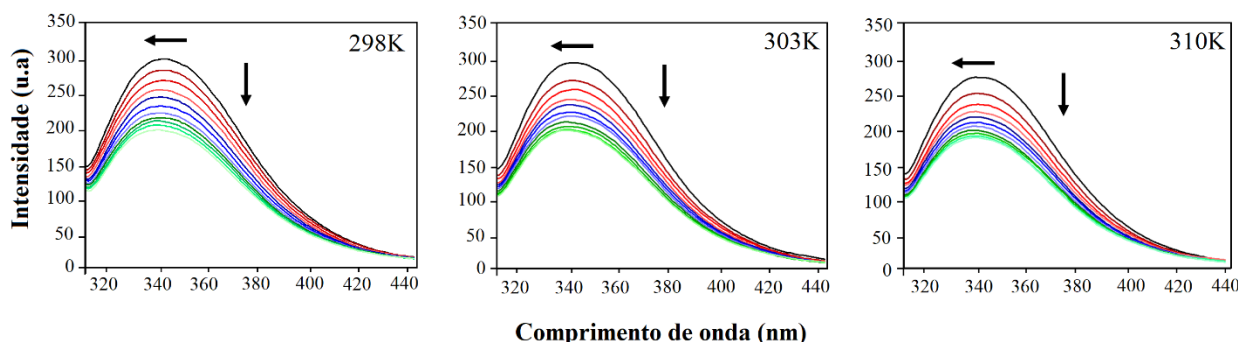


Figura 5.8 – Espectros de fluorescência de HSA na ausência (linha preta) e presença (linhas coloridas) de quantidades crescentes de $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcPCH}_3\text{Ph})]\text{NO}_3$ (**10**) em diferentes temperaturas. $[\text{HSA}] = 1,84 \mu\text{M}$ e $[\text{complexos}] = 0 - 3,0 \mu\text{M}$.

O mecanismo envolvido no processo de supressão da fluorescência foi analisado através da constante de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) e da constante de velocidade bimolecular de supressão (K_q). Os valores de K_{sv} e K_q foram baseados na equação de Stern-Volmer, discutida no capítulo 2 (seção 2.5.1). Os gráficos da relação F_0/F versus $[\text{complexo}]$ mostraram perfis lineares e foram utilizados nos cálculos das constantes (Figura 5.9A). Os resultados estão apresentados na Tabela 5.9. Em todos os casos, o K_{sv} está inversamente correlacionado com a temperatura. Além disso, os valores de K_q na ordem de $10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ foram superiores à taxa máxima de colisão dinâmica entre biomoléculas ($\approx 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Essas observações indicam que o processo de supressão acontece por um mecanismo estático, em que há formação do complexo não fluorescente entre complexo metálico e a proteína.

O logaritmo da constante de ligação ($\log K_b$) e número de sítios de ligação (n) foram determinadas a partir da equação de Scatchard (Equação 2.5), segundo a seguinte relação $\log[(F_0 - F)/F]$ versus $\log[\text{complexo}]$ (Figura 5.9B). Na maioria dos casos, os valores de K_b dos compostos são menores do que o fármaco tolbutamida ($K_b = 4,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$),¹⁰ indicando que os complexos ligam-se fracamente a HSA. Os valores de n são próximos de 1, sugerindo que os complexos (**9-12**) ligam-se a HSA em uma proporção de 1:1.

⁸N. Wang, L. Ye, B. Q. Zhao, J. X. Yu, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41 (2008) 589-595.

⁹F. J. Fard, Z. M. Khoshkhoo, H. Mirtabatabaei, M. R. Housaindokht, R. Jalal, H. E. Hosseini, M. R. Bozorgmehr, A. A. Esmaeili, M. J. Khoshkholgh, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 97 (2012) 74-82.

¹⁰J.J. Vallner, *J. Pharm. Sci.* 66 (1977) 447-465.

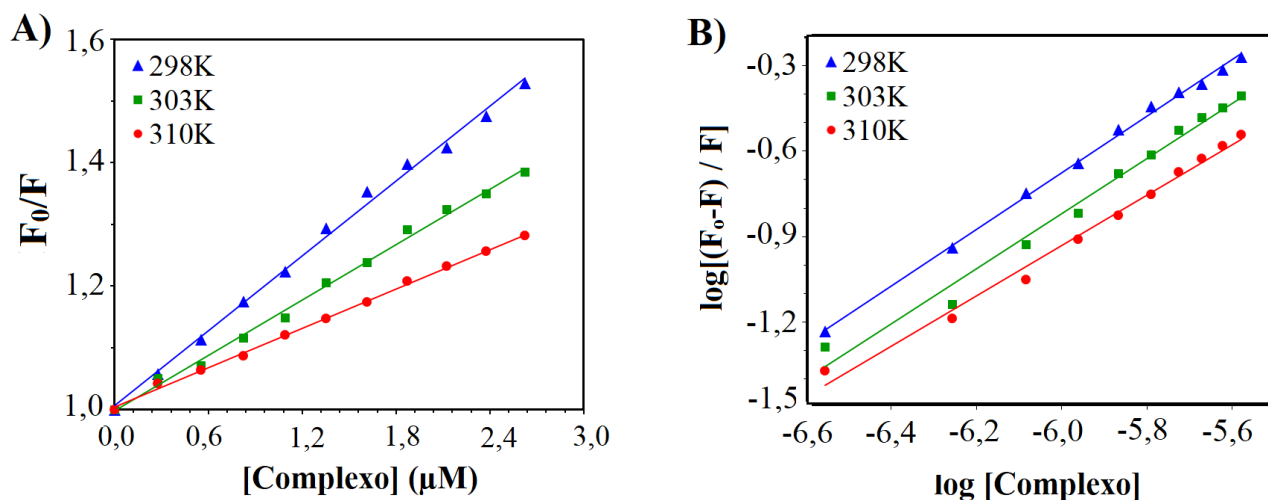


Figura 5.9 – A) Gráficos de Stern-Volmer (F_0/F versus [complexo]) B) Gráficos de Scatchard ($\log[(F_0-F)/F]$ versus $\log[\text{complexo}]$) para a interação entre [Ag(H2-2,6AcPCH3Ph)]NO₃ (10) e HSA em diferentes temperaturas.

Os parâmetros termodinâmicos foram estudados para melhor compreensão da natureza da ligação envolvida entre complexo-HSA. Os diagramas de Van' Hoff ($\ln K$ versus $1/T$) para a interação entre complexos (9-12) e a HSA são mostrados na Figura 5.10. Os dados das propriedades físico-químicas para os complexos (9-12) ($\Delta G^\circ < 0$, $\Delta H^\circ < 0$ e $\Delta S^\circ < 0$) indicam a espontaneidade do processo de ligação e que as ligações de hidrogênio e/ou forças de van der Waals têm um papel fundamental na interação dos complexos com a HSA (Tabela 5.9).

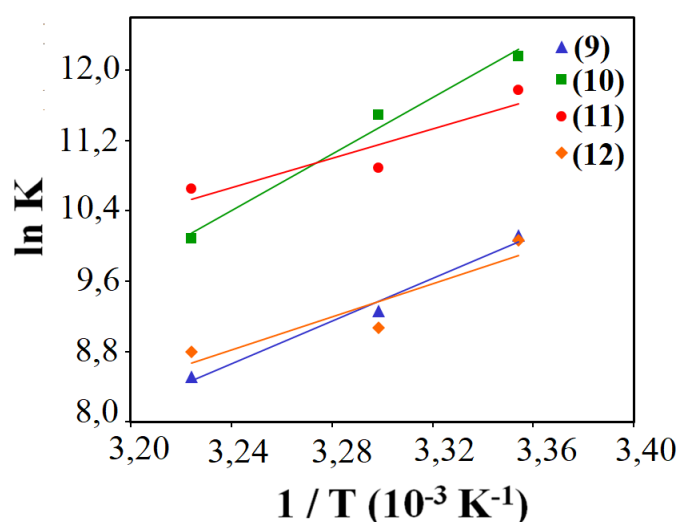


Figura 5.10 – Diagramas de Van' Hoff ($\ln K$ versus $1/T$) da interação complexo-HSA.

Tabela 5.9 – Constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}), constantes de supressão bimolecular (K_q), constantes logarítmicas de ligação ($\log K_b$), número de sítios de ligação (n) e parâmetros termodinâmicos da interação entre HSA e os complexos de prata(I) em diferentes temperaturas.

Compostos	T(K)	K_{sv} (10^5 M^{-1})	K_q ($10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	$\log K_b$	n	ΔH° (kJ mol^{-1})	ΔS° ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)	ΔG° (kJ mol^{-1})	
[Ag(H2-2,6AcPh)]NO ₃	(9)	298	1,43(±0,03)	1,43(±0,03)	4,4(±0,1)	-101,65	-257,37	-25,08	
		303	0,87(±0,06)	0,87(±0,06)	4,0(±0,3)			0,82(±0,05)	-23,34
		310	0,72(±0,02)	0,72(±0,02)	3,7(±0,3)			0,80(±0,06)	-21,96
[Ag(H2-2,6AcpCH ₃ Ph)]NO ₃	(10)	298	2,02(±0,04)	2,02(±0,04)	5,2(±0,1)	-134,29	-348,61	-30,14	
		303	1,50(±0,03)	1,50(±0,03)	5,0(±0,2)			0,96(±0,04)	-28,97
		310	1,06(±0,01)	1,06(±0,01)	4,4(±0,1)			0,88(±0,03)	-26,01
[Ag(H2-2,6AcpClPh)]NO ₃ ·2H ₂ O	(11)	298	2,80(±0,09)	2,86(±0,09)	5,1(±0,1)	-69,42	-136,22	-29,18	
		303	2,34(±0,08)	2,34(±0,08)	4,7(±0,1)			0,88(±0,02)	-27,45
		310	2,31(±0,02)	2,31(±0,02)	4,6(±0,3)			0,86(±0,05)	-27,46
[Ag(H2-2,6AcpNO ₂ Ph)]NO ₃	(12)	298	1,78(±0,09)	1,78(±0,09)	4,4(±0,1)	-78,10	-179,70	-24,95	
		303	1,25(±0,04)	1,25(±0,04)	3,9(±0,1)			0,80(±0,01)	-22,87
		310	1,01(±0,01)	1,01(±0,01)	3,8(±0,2)			0,78(±0,04)	-22,70

5.3.2. Interação com ácido desoxirribonucleico (*calf thymus* DNA, CT-DNA)

➤ *Determinação da constante de ligação por espectroscopia de absorção eletrônica*

Os espectros eletrônicos de absorção dos complexos (**9-12**) foram registrados na presença e na ausência de concentrações crescentes de DNA. Após a adição do DNA observou um efeito hipocrômico bastante pronunciado no comprimento de onda de máxima absorção (Figura 5.11A). Este comportamento está de acordo com um modo de interação via intercalação, uma vez que o hipocromismo ocorre devido às interações não-covalentes (π -stacking) entre grupos aromáticos heterocíclicos e os pares de bases do DNA, como no caso de intercaladores clássicos como o brometo de etídio.¹¹

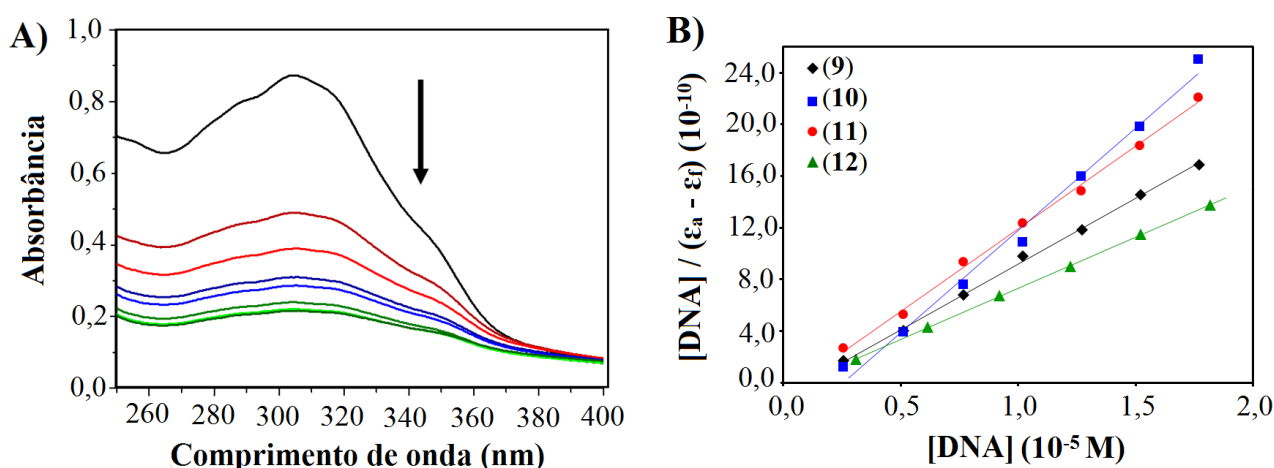


Figura 5.11 – A) Espectro de absorção na região do UV-Vis de $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})]\text{NO}_3$ (**10**) na ausência (linha preta) e na presença (linhas coloridas) de quantidades crescentes de DNA. A seta indica as mudanças ocorridas nos espectros após cada adição de DNA (efeito hipocrômico). B) Gráficos de Scatchard de $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$ para a interação entre os complexos e DNA. ($[\text{DNA}] = 0 - 20 \mu\text{M}$, $[\text{Complexos}] = 30 \mu\text{M}$ à 25°C em tampão Tris-HCl, pH 7,2).

A força de ligação não-covalente entre os complexos (**9-12**) e o DNA foi determinada quantitativamente por meio das constantes de ligação intrínseca (K_b), que são obtidas graficamente (Figura 5.11B), segundo a Equação 2.8 (capítulo 2, seção 2.5.2.1). Conforme apresentado na Tabela 5.10, os valores de K_b para todos os complexos foram na ordem de 10^6 M^{-1} , sugerindo uma forte interação dos complexos com o DNA. Observou-se ainda que os complexos (**9-12**) interagem mais fortemente com o DNA em relação aos complexos de prata(I) com 2-acetil- e 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas (Capítulo 3 e 4).

¹¹E. C. Long, J. K. Barton, *Acc. Chem. Res.* 23 (1990) 271-273.

Tabela 5.10 – Constantes de ligação (K_b), constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), concentração necessária para reduzir 50% da fluorescência do sistema BE-DNA (C_{50}) e constantes de ligação aparente (K_{app}) para os complexos de prata(I) (**9-12**).

Compostos		K_b ($10^6 M^{-1}$)	C_{50} (μM)	K_{app} ($10^6 M^{-1}$)
[Ag(H2-2,6AcPh)]NO ₃	(9)	$1,07 \pm 0,17$	83,97	1,19
[Ag(H2-2,6AcpCH ₃ Ph)]NO ₃	(10)	$3,95 \pm 0,69$	88,87	1,13
[Ag(H2-2,6AcpClPh)]NO ₃ ·2H ₂ O	(11)	$1,54 \pm 0,31$	58,87	1,69
[Ag(H2-2,6AcpNO ₂ Ph)]NO ₃	(12)	$1,34 \pm 0,02$	77,13	1,29

➤ *Interação competitiva entre brometo de etídio (BE) e complexos pelo CT-DNA*

Para melhor compreensão do modo de ligação dos complexos (**9-12**) com DNA foram realizados experimentos de interação competitiva com brometo de etídio (BE). A Figura 5.12A mostra os espectros de fluorescência para o sistema BE-DNA na ausência e presença do complexo [Ag(H2-2,6AcpCH₃Ph)]NO₃ (**10**). O sistema BE-DNA apresenta forte emissão a 602 nm quando o comprimento de excitação é 545 nm. Em todos os casos, observou-se uma redução notável na intensidade de fluorescência na presença dos complexos de prata(I), possivelmente devido à redução no número de sítios de ligação no DNA disponíveis para o BE. As estruturas planares dos complexos, assim como, a presença de anéis aromáticos conferem uma característica importante que favorece o mecanismo de intercalação. O fator estrutural, juntamente com as mudanças observadas nos espectros, apresentam um forte indício de que os complexos de prata(I) interagem com DNA provavelmente *via* intercalação.

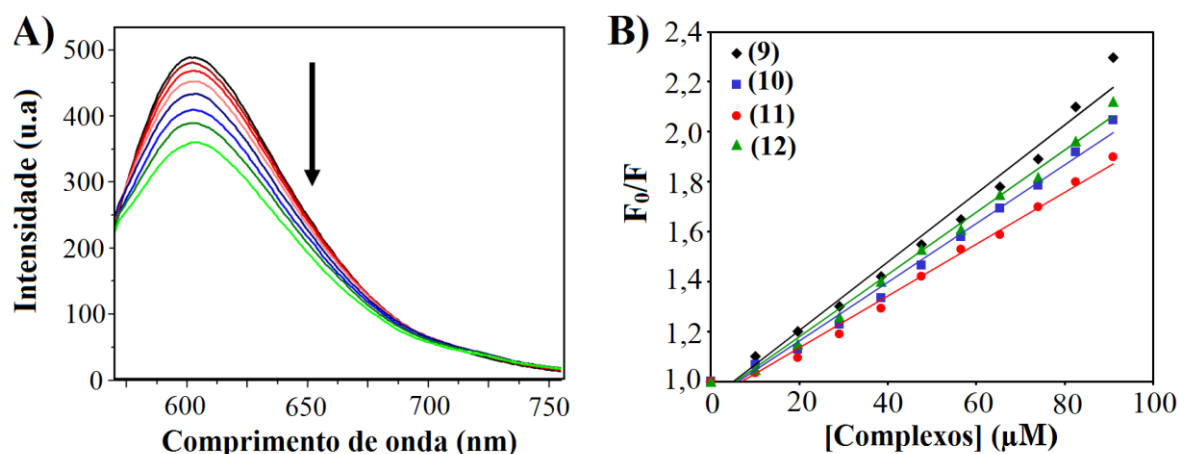


Figura 5.12 – A) Espectros de fluorescência do sistema BE-DNA na ausência (linha preta) e presença (linhas coloridas) de quantidades crescentes de [Ag(H2-2,6AcpCH₃Ph)]NO₃ (**10**). A seta indica as mudanças ocorridas nos espectros após cada adição do complexo (**10**). B) Gráficos de Stern-Volmer de F_0/F versus [complexos] para (**9-12**). ($\lambda_{exc} = 545$ nm; [Complexos] = 0 - 100 μM ; [DNA] = 10 μM e [BE] = 10 μM).

As constantes de ligação aparente (K_{app}) foram calculadas de acordo com a equação $K_{app} = K_{EB} \times [BE]/C_{50}$, discutida no capítulo 2 (seção 2.5.2.2), onde K_{app} foi obtido do gráfico de F_0/F versus [complexo] (Figura 5.12B). Os valores de C_{50} foram obtidos da relação entre a intensidade de fluorescência em função da concentração dos complexos quando a fluorescência é reduzida em 50% da fluorescência inicial. De acordo com a Tabela 5.10, os valores de K_{app} são similares ao valor apresentado pelo agente antitumoral intercalador actinomicina D ($K_{app} = 9,69 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$).¹²

Os altos valores obtidos de K_b e K_{app} indicam uma forte afinidade dos complexos estudados pelo DNA. Esses valores são superiores aos relatados para os complexos de prata(I) contendo ligantes como 5,5-dietilbarbiturato e monofosfina (K_b e K_{app} na ordem de 10^5 M^{-1}).¹³

¹²A. Kellett, M. O'Connor, M. McCann, M. McNamara, P. Lynch, G. Rosair, V. McKee, B. Creaven, M. Walsh, S. McClean, A. Foltyn, D. O'Shea, O. Howe, M. Devereux, *Dalton Trans.* 40 (2011) 1024-1027.

¹³V. T. Yilmaz, C. Iysel, J. Batur, S. Aydinlik, M. Cengiz, O. Buyukgungor, *Dalton Trans.* 46 (2017) 8110-8124.

Capítulo 6 – Discussão e Conclusões

As doenças infecciosas causadas por fungos invasores tem aumentado nos últimos anos, tornando-se um grande problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento. Alguns dos agentes causais mais comuns das micoses oportunistas são os fungos *Candida* e *Aspergillus*, que geralmente acometem pacientes imunodeficientes e imunossuprimidos. Um fator preocupante da terapia antifúngica está relacionado à resistência aos antibióticos comumente usados na clínica, associada à maior causa de mortes por infecções.

Com relação ao câncer, o problema da resistência celular também tem sido recorrente. Além disso, muitos dos agentes antitumorais atuam de forma não-específica, lesando tanto células tumorais quanto células saudáveis, o que resulta em efeitos colaterais graves, sendo uma das causas principais do fracasso terapêutico.

Diante dessas questões, a Química Medicinal Inorgânica tem se dedicado ao planejamento de novos metalofármacos, visando a obtenção de compostos mais eficazes, seletivos e seguros. A complexação de ligantes biologicamente ativos a metais tem contribuído para o aumento da eficácia terapêutica, redução da resistência celular e toxicidade. Novos mecanismos de ação também têm sido verificados para complexos metálicos.

No presente trabalho pareceu-nos uma boa estratégia associar as propriedades farmacológicas de diferentes classes de hidrazonas juntamente com as da prata(I) para o desenvolvimento de possíveis candidatos a metalofármacos antimicrobianos e antitumorais.

A primeira série de compostos obtidos foram os complexos de prata(I) $[Ag(H_2AcPh)NO_3]$ (**1**), $[Ag(H_2AcpCH_3Ph)NO_3]$ (**2**), $[Ag(H_2AcpClPh)NO_3]$ (**3**) e $[Ag(H_2AcpNO_2Ph)NO_3]$ (**4**) a partir das reações entre $AgNO_3$ e os ligantes 2-acetilpiridina benzoil-hidrazona (H_2AcPh) e seus derivados *para*-metil- (H_2AcpCH_3Ph), *para*-cloro- ($H_2AcpClPh$) e *para*-nitro-benzoil-hidrazona (H_2AcpNO_2Ph). Altos valores de condutividade molar (Λ_M) sugeriram uma possível liberação do íon nitrato em solução.

Os cristais de $[Ag(H_2AcPh)NO_3]$ (**1**) e $[Ag(H_2AcpNO_2Ph)(H_2O)(NO_3)]$ (**4a**) contém uma molécula de hidrazona na sua forma neutra coordenada à prata(I) juntamente com um íon nitrato, enquanto que em $[Ag(H_2AcpCH_3Ph)_2]NO_3$ (**2a**) e $[Ag(H_2AcpClPh)_2]NO_3$ (**3a**) duas moléculas de hidrazona neutra estão ligadas ao metal e um nitrato está presente como contra-íon.

As atividades antifúngicas dos complexos (**1-4**) contra espécies de *Candida* revelaram-se inferiores aos agentes antifúngicos de referência nistatina e nitrato de miconazol. Por outro lado, os compostos testados frente aos fungos filamentosos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus* e *Penicillium citrinum*) mostraram-se tão ativos quanto a nistatina. Em alguns casos, a complexação das hidrazonas à prata(I) resultou em aumento da atividade. Embora o nitrato de prata

tenha exibido atividade antifúngica contra algumas das cepas investigadas a sua atividade foi inferior a nistatina, exceto para *P. citrinum*. O complexo (**2**) apresentou a melhor ação antifúngica sendo mais ativo que a nistatina contra *A. niger* ($CI_{50} = 6,1 \mu M$), *A. parasiticus45* ($CI_{50} = 34,9 \mu M$) e *P. citrinum* ($CI_{50} = 17,1 \mu M$). Além disso, o substituinte *p*CH₃ presente na estrutura do complexo (**2**) pode ser responsável por uma ação antifúngica superior aos demais complexos, o que sugeriu uma maior capacidade de (**2**) ligar-se ao ergosterol nas membranas fúngicas ou inibir as enzimas que participam da biossíntese do ergosterol.

No estudo de relações estrutura-atividade (SAR) foram encontradas correlações quando as propriedades físico-químicas dos ligantes e seus complexos (**1-4**) foram analisadas em conjunto. Por exemplo, contra *P. citrinum*, boas correlações foram encontradas para o logP ($R = -0,869$), enquanto que para *C. tropicalis* ($R = 0,905$) e *C. glabrata* ($R = 0,906$) boas correlações foram obtidas para a energia do HOMO. De modo geral, as atividades antifúngicas contra *Candida spp* correlacionaram-se bem com a energia do orbital HOMO e para os fungos filamentosos, as atividades correlacionaram-se razoavelmente bem com o logP, indicando que um ataque eletrofílico externo a esses compostos ou uma doação de elétrons desses compostos para o receptor ou a capacidade de atravessar as membranas biológicas, podem estar envolvidos no mecanismo de ação desses compostos.

Avaliação da atividade citotóxica contra células de melanoma metastático (B16F10) revelou que todos os complexos foram mais ativos que a cisplatina. Além disso, o complexo (**2**) ($IS = 14$) apresentou um índice de seletividade mais elevado em comparação ao ligante ($IS = 6$), sugerindo que a estratégia da coordenação de H₂AcpCH₃Ph a prata(I) foi promissora na obtenção de um composto mais seletivo para células tumorais ao invés de células saudáveis.

Em uma segunda etapa foram preparados os complexos de prata(I) [Ag(H₂BzPh)NO₃] (**5**), [Ag(H₂BzpCH₃Ph)NO₃] (**6**), [Ag(H₂BzpClPh)NO₃] (**7**) e [Ag(H₂BzpNO₂Ph)NO₃] (**8**) com 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas (H₂BzPh) e seus derivados *para*-metil- (H₂AcpCH₃Ph), *para*-cloro- (H₂AcpClPh) e *para*-nitro-benzoil-hidrazona (H₂AcpNO₂Ph). As caracterizações foram compatíveis com a formação de complexos do tipo [Ag(HL)NO₃], em que uma molécula da hidrazona neutra juntamente com o íon nitrato estão coordenados a prata(I). As estruturas cristalográficas dos complexos (**5-7**) foram determinadas e as distâncias das ligações Ag1...O1 e Ag1...O3 são muito maiores do que as distâncias de Ag1-O2, sugerindo que O1 e O3 ligam-se fracamente ao centro metálico.

Esses resultados nos motivaram a investigar a natureza das ligações em torno do átomo de prata por meio de cálculos teóricos. Os resultados mostraram que à medida que o íon NO₃⁻ se dissocia, a coordenação da hidrazona com o centro metálico torna-se mais forte e todas as distâncias de ligação com o metal diminuem. Além disso, as ordens de ligação encontradas para os complexos são menores que os valores para ligações covalentes, indicando uma ligação provavelmente com alto caráter eletrostático.

As 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas e seus complexos (**5-7**) foram investigados quanto às atividades antifúngicas frente às mesmas espécies de *Candida* e de fungos filamentosos. As hidrazonas foram inativas na maioria das cepas testadas. Após a coordenação a prata(I) a atividade melhorou significativamente, sendo que o melhor resultado foi obtido para o complexo (**7**), que mostrou-se duas vezes mais ativo do que a nistatina contra *P. citrinum* e com atividade similar ao fármaco contra *C. dubliniensis*. O único caso em que (**7**) foi menos ativo que a nistatina foi contra *C. glabrata*, no entanto, sua atividade é comparável ao nitrato de miconazol.

Os efeitos citotóxicos das hidrazonas e dos complexos (**5-7**) também foram investigados contra células B16F10 e Melan-A. Com a complexação a atividade aumentou em todos os casos. Os complexos (**5-7**) ainda revelaram-se mais citotóxicos que o nitrato de prata e a cisplatina. O complexo (**5**) apresentou um elevado índice de seletividade (IS = 23), superior ao do ligante (IS = 9,5), o que mostra que, neste caso, a coordenação à prata(I) foi uma excelente estratégia para melhorar a seletividade.

Foram ainda planejados e sintetizados os complexos de prata(I) $[Ag(H_2-2,6AcPh)]NO_3$ (**9**), $[Ag(H_2-2,6AcpCH_3Ph)]NO_3$ (**10**), $[Ag(H_2-2,6AcpClPh)]NO_3 \cdot 2H_2O$ (**11**) e $[Ag(H_2-2,6AcpNO_2Ph)]NO_3$ (**12**) com 2,6-diacetilpiridina *bis*(benzoil-hidrazona) (H2-2,6AcPh) e os derivados *bis*(*para*-metil-benzoil-hidrazona) (H2-2,6AcpCH₃Ph), *bis*(*para*-cloro-benzoil-hidrazona) (H2-2,6AcpClPh), e *bis*(*para*-nitro-benzoil-hidrazona) (H2-2,6AcpNO₂Ph). A escolha desses ligantes foi baseada nas características estruturais e no amplo espectro de propriedades terapêuticas apresentada por eles. Estrategicamente, pensamos no direcionamento desses compostos como possíveis agentes antifúngicos e como metalintercaladores na estrutura do DNA, uma vez que os complexos são razoavelmente planos.

A complexação das *bis*(benzoil-hidrazonas) a prata(I) resultou em complexos do tipo $[Ag(H_2L)]NO_3$, em que os ligantes encontram-se coordenados de forma pentadentada, por meio do sistema quelante O-N-N_{py}-N-O e um íon nitrato está presente na estrutura como contra-íon. Os dados obtidos na cristalografia para os complexos (**10**) e (**11**) confirmaram a proposta citada acima.

Tendo em vista o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos baseados em prata, as atividades antifúngicas das *bis*(benzoil-hidrazonas) e seus complexos (**9-12**) contra *Candida spp* e fungos filamentosos foram avaliadas. Os ligantes mostraram-se inativos e o nitrato de prata exibiu baixa atividade contra as espécies testadas. Os melhores resultados foram verificados para o complexo (**10**) (CI₅₀ = 5,7 µM) que apresentou atividade similar ao nitrato de miconazol (CI₅₀ = 5,8 µM) contra *C. albicans* e complexo (**9**) que provou ser mais ativo que o agente antifúngico nistatina. Adicionalmente, os complexos (**9**) e (**10**) também foram mais ativos que a nistatina frente ao fungo *A. Parasiticus*.

Com a finalidade de estudar os possíveis mecanismo envolvidos na ação antifúngica e antitumoral dos complexos obtidos no presente trabalho, investigamos suas interações com albumina

sérica humana (HSA) e com o ácido desoxirribonucleico (DNA). Todos os complexos foram capazes de interagir com a HSA por meio de um mecanismo de supressão estático e através de ligações de hidrogênio e/ou forças de van der Waals, sugerindo que podem ser transportados pela proteína através do sangue para alcançar seus alvos biológico.

Os estudos de interações covalentes e não-covalentes dos complexos (**1-7**) revelaram a capacidade de interação com DNA possivelmente por um modo intercalativo. Esta interação pode ser favorecida pela presença dos anéis aromáticos de benzeno ou piridina no esqueleto dos ligantes. Apesar da possível habilidade dos complexos (**1-7**) para interagir com o DNA por um processo intercalativo, a prata(I) provavelmente não se liga covalentemente ao DNA, como visto nos ensaios de eletroforese. Assim, a ligação covalente da prata(I) ao DNA provavelmente não é parte do mecanismo da ação desses compostos. No entanto, foi evidenciado que os complexos (**9-12**) interagem mais fortemente por um mecanismo de intercalação com o DNA em relação aos demais complexos, possivelmente em razão da maior planaridade das estruturas desses compostos, que favorece a inserção entre as bases nitrogenadas do DNA.

Considerando que o perfil farmacológico dos complexos de prata(I) continua a ser pouco investigado e que os problemas de resistência e toxicidade apresentada pelos fármacos disponíveis comercialmente é preocupante, o presente trabalho constitui em uma importante contribuição para a compreensão das possíveis aplicações dos candidatos a metalofármacos antifúngicos e antitumorais baseados em prata(I).

ANEXOS

**Capítulo 3 – Complexos de prata(I) com 2-acetilpiridina benzoil-hidrazonas:
investigação do perfil farmacológico, mecanismos de ação e estudos SAR**

Tabela A1 – Parâmetros das ligações de hidrogênio (Å, °) para os complexos [Ag(H2AcPh)NO₃] (**1**), [Ag(H2AcpCH₃Ph)₂]NO₃ (**2a**), [Ag(H2AcpClPh)₂]NO₃ (**3a**) e [Ag(H2AcpNO₂Ph)(H₂O)(NO₃)] (**4a**).

Compostos	D—H...A	D-H	H...A	D...A	D—H...A
(1)	N3-H3N...O2 ⁱ	0,86	2,23	2,996(7)	149
(2a)	N3-H3N...O4A ⁱⁱ	0,86	2,22	3,051(10)	164
(2a)	N3-H3N...O4B ⁱⁱ	0,86	2,52	3,374(17)	173
(2a)	N6-H6N...O2A	0,86	2,33	2,974(12)	132
(2a)	N6-H6N...O2B	0,86	2,21	2,905(13)	138
(3a)	N3-H3N...O4A ⁱⁱ	0,86	2,23	3,079(7)	169
(3a)	N3-H3N...O4B ⁱⁱ	0,86	2,30	3,109(8)	156
(3a)	N6-H6N...O2A	0,86	2,33	2,987(7)	134
(3a)	N6-H6N...O2B	0,86	2,34	3,071(9)	142
(4a)	N3-H3N...O2 ⁱⁱⁱ	0,86	2,33	3,124(6)	154
(4a)	O1W-H1W...O4 ^{vi}	0,82(1)	2,01(4)	2,770(6)	154(8)
(4a)	O1W-H2W...O5 ^v	0,82(1)	2,50(7)	3,122(7)	134(8)
(4a)	O1W-H2W...O6 ^v	0,82(1)	2,51(3)	3,305(7)	164(8)

Operadores de simetria: i = -x+1,-y+2,-z; ii = x,y+1,z; iii = -x+1,-y+1,-z; iv = x+1,y,z; v = x,y-1,z.

Tabela A2 – Parâmetros estereo-eletrônicos calculados para 2-acetilpiridina hidrazonas e seus complexos de prata(I) (1-4).^a

Compostos		E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	S.A (\AA^2)	V (\AA^3)	logP
H2AcPh	(<i>E</i>)	-6,332	-1,767	4,565	4,675	343,76	222,34	1,98
H2AcpCH ₃ Ph	(<i>E</i>)	-6,283	-1,763	4,520	9,332	375,47	239,27	2,49
H2AcpClPh	(<i>E</i>)	-6,300	-1,887	4,413	4,139	359,64	236,23	2,58
H2AcpNO ₂ Ph	(<i>E</i>)	-6,394	-2,871	3,523	6,243	384,56	245,6	1,92
H2AcPh	(<i>Z</i>)	-6,319	-1,920	4,399	9,970	342,03	222,52	1,98
H2AcpCH ₃ Ph	(<i>Z</i>)	-6,277	-1,899	4,378	10,108	374,83	239,38	2,49
H2AcpClPh	(<i>Z</i>)	-6,350	-1,934	4,416	10,064	359,36	236,36	2,58
H2AcpNO ₂ Ph	(<i>Z</i>)	-6,443	-2,828	3,615	11,325	383,97	245,71	1,92
[Ag(H2AcPh)] ⁺	(1)	-6,894	-2,520	4,374	7,440	336,52	239,79	2,80
[Ag(H2AcpCH ₃ Ph)] ⁺	(2)	-6,812	-2,471	4,341	7,567	369,91	256,68	3,27
[Ag(H2AcpClPh)] ⁺	(3)	-6,842	-2,540	4,302	11,170	354,07	253,73	3,32
[Ag(H2AcpNO ₂ Ph)] ⁺	(4)	-7,007	-3,106	3,902	15,896	378,38	263,12	2,76

^a Cálculos realizados em água, considerando o NO₃⁻ dissociado e utilizando o modelo PCM;

Tabela A3 – Matrizes de correlação entre os valores de CI_{50} obtidos para *Aspergillus flavus* e os parâmetros estereo-eletrônicos dos ligantes livres H2AcPh, H2AcpCH₃Ph e H2AcpNO₂Ph (isômeros Z e E).

Compostos		CI_{50}							LogP
		<i>Aspergillus flavus</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	
H2AcPh	Z	48,6	-6,319	-1,920	4,399	9,970	342,03	222,52	1,98
H2AcpCH ₃ Ph	Z	23,6	-6,277	-1,899	4,378	10,108	374,83	239,38	2,49
H2AcpNO ₂ Ph	Z	42,1	-6,443	-2,828	3,615	11,325	383,97	245,71	1,92
H2AcPh	E	48,6	-6,332	-1,767	4,565	4,675	343,76	222,34	1,98
H2AcpCH ₃ Ph	E	23,6	-6,283	-1,763	4,520	9,332	375,47	239,27	2,49
H2AcpNO ₂ Ph	E	42,1	-6,394	-2,871	3,523	6,243	384,56	245,6	1,92

Matriz de correlação

	<i>Aspergillus flavus</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	LogP
<i>Aspergillus flavus</i>	1							
E_{HOMO} (eV)	-0,54497	1						
E_{LUMO} (eV)	-0,27508	0,89878	1					
ΔE (eV)	-0,23329	0,87047	0,99815	1				
μ (D)	-0,38759	-0,02417	-0,09964	-0,10853	1			
A. S. (\AA^2)	-0,53567	-0,38345	-0,65381	-0,68091	0,31922	1		
V (\AA^3)	-0,48824	-0,43295	-0,69820	-0,72389	0,33659	0,99773	1	
LogP	-0,93965	0,78600	0,58460	0,54739	0,30870	0,21464	0,16021	1

Tabela A4 – Matrizes de correlação entre os valores de CI_{50} obtidos para *Penicillium citrinum* e os parâmetros estereo-eletrônicos dos ligantes livres H2AcPh, H2AcpCH₃Ph, H2AcpClPh e H2AcpNO₂Ph (isômeros Z e E).

Compostos	CI_{50}								
	<i>Penicillium citrinum</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	LogP	
H2AcPh	Z	72,5	-6,319	-1,920	4,399	9,970	342,03	222,52	1,98
H2AcpCH ₃ Ph	Z	33,4	-6,277	-1,899	4,378	10,108	374,83	239,38	2,49
H2AcpClPh	Z	44,1	-6,350	-1,934	4,416	10,064	359,36	236,36	2,58
H2AcpNO ₂ Ph	Z	53,9	-6,443	-2,828	3,615	11,325	383,97	245,71	1,92
H2AcPh	E	72,5	-6,332	-1,767	4,565	4,675	343,76	222,34	1,98
H2AcpCH ₃ Ph	E	33,4	-6,283	-1,763	4,520	9,332	375,47	239,27	2,49
H2AcpClPh	E	44,1	-6,300	-1,887	4,413	4,139	359,64	236,23	2,58
H2AcpNO ₂ Ph	E	53,9	-6,394	-2,871	3,523	6,243	384,56	245,6	1,92

Matriz de correlação

	<i>Penicillium citrinum</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	LogP
<i>Penicillium citrinum</i>	1							
E_{HOMO} (eV)	-0,34849	1						
E_{LUMO} (eV)	-0,10861	0,87592	1					
ΔE (eV)	-0,07333	0,84179	0,99777	1				
μ (D)	-0,24292	-0,18460	-0,15718	-0,15034	1			
A. S. (\AA^2)	-0,61756	-0,38830	-0,67268	-0,69896	0,29597	1		
V (\AA^3)	-0,66355	-0,41449	-0,66623	-0,68813	0,25913	0,96790	1	
LogP	-0,78128	0,65584	0,59805	0,57847	0,01541	0,01320	0,13680	1

Tabela A5 – Matrizes de correlação entre os valores de CI_{50} obtidos para *Aspergillus flavus* e os parâmetros estéreo-eletrônicos dos complexos (1-4)

Compostos	CI_{50}							
	<i>Aspergillus flavus</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	LogP
[Ag(H2AcPh)NO ₃] (1)	12,4	-6,894	-2,520	4,374	7,440	336,52	239,79	2.80
[Ag(H2AcpCH ₃ Ph)NO ₃] (2)	10,5	-6,812	-2,471	4,341	7,567	369,91	256,68	3,27
[Ag(H2AcpClPh)NO ₃] (3)	41,4	-6,842	-2,540	4,302	11,170	354,07	253,73	3.32
[Ag(H2AcpNO ₂ Ph)NO ₃] (4)	32,9	-7,007	-3,106	3,902	15,896	378,38	263,12	2,76

Matriz de correlação

	<i>Aspergillus flavus</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	LogP
<i>Aspergillus flavus</i>	1							
E_{HOMO} (eV)	-0,30915	1						
E_{LUMO} (eV)	-0,44226	0,93629	1					
ΔE (eV)	-0,47910	0,87953	0,99063	1				
μ (D)	0,73959	-0,79621	-0,92604	-0,94497	1			
A. S. (\AA^2)	0,23590	-0,32975	-0,62292	-0,71562	0,62611	1		
V (\AA^3)	0,45714	-0,32005	-0,63168	-0,73130	0,72076	0,97010	1	
LogP	0,15092	0,84746	0,62831	0,52156	-0,35444	0,06685	0,15783	1

Tabela A6 – Matrizes de correlação entre os valores de CI_{50} obtidos para *Penicillium citrinum* e os parâmetros estéreo-eletrônicos dos complexos (1), (2) e (4)

Compostos	CI_{50}							
	<i>Penicillium citrinum</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	LogP
[Ag(H2AcPh)NO ₃] (1)	39,8	-6,894	-2,520	4,374	7,440	336,52	239,79	2,80
[Ag(H2AcpCH ₃ Ph)NO ₃] (2)	17,1	-6,812	-2,471	4,341	7,567	369,91	256,68	3,27
[Ag(H2AcpNO ₂ Ph)NO ₃] (4)	31,6	-7,007	-3,106	3,902	15,896	378,38	263,12	2,76

Matriz de correlação

	<i>Penicillium citrinum</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	LogP
<i>Penicillium citrinum</i>	1							
E_{HOMO} (eV)	-0,55528	1						
E_{LUMO} (eV)	-0,22645	0,93580	1					
ΔE (eV)	-0,09691	0,88156	0,99138	1				
μ (D)	0,14531	-0,90352	-0,99659	-0,99881	1			
A. S. (\AA^2)	-0,64098	-0,28243	-0,60247	-0,70183	0,66627	1		
V (\AA^3)	-0,57923	-0,35631	-0,66283	-0,75520	0,72235	0,99696	1	
LogP	-0,90675	0,85419	0,61605	0,50757	-0,54896	0,25754	0,18147	1

Tabela A7 – Matrizes de correlação entre os valores de CI_{50} obtidos para *Candida dubliniensis* e os parâmetros estéreo-eletrônicos dos complexos (1-4)

Compostos	CI_{50}							
	<i>Candida dubliniensis</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	Log P
[Ag(H2AcPh)NO ₃] (1)	40,7	-6,893	-2,519	4,373	7,440	336,52	239,79	2,80
[Ag(H2AcpCH ₃ Ph)NO ₃] (2)	44,3	-6,811	-2,470	4,341	7,566	369,91	256,68	3,27
[Ag(H2AcpClPh)NO ₃] (3)	14,5	-6,842	-2,540	4,302	11,170	354,07	253,73	3,32
[Ag(H2AcpNO ₂ Ph)NO ₃] (4)	13,9	-7,000	-3,105	3,901	15,896	378,38	263,12	2,76

Matriz de correlação

	<i>Candida dubliniensis</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	LogP
<i>Candida dubliniensis</i>	1							
E_{HOMO} (eV)	0,52858	1						
E_{LUMO} (eV)	0,64759	0,93715	1					
ΔE (eV)	0,67205	0,88115	0,99076	1				
μ (D)	-0,87703	-0,79832	-0,92643	-0,94503	1			
A. S. (\AA^2)	-0,34712	-0,33147	-0,62277	-0,71504	0,62608	1		
V (\AA^3)	-0,53839	-0,32244	-0,63179	-0,73077	0,72073	0,97010	1	
LogP	0,05939	0,84565	0,62789	0,52208	-0,35447	0,06685	0,15783	1

Tabela A8 – Matrizes de correlação entre os valores de CI_{50} obtidos para *Candida glabrata* e os parâmetros estéreo-eletrônicos dos complexos (1-4)

Compostos	CI_{50}							
	<i>Candida glabrata</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	LogP
[Ag(H2AcPh)NO ₃] (1)	52,8	-6,894	-2,520	4,374	7,440	336,52	239,79	2,80
[Ag(H2AcpCH ₃ Ph)NO ₃] (2)	44,3	-6,812	-2,471	4,341	7,567	369,91	256,68	3,27
[Ag(H2AcpClPh)NO ₃] (3)	42,1	-6,842	-2,540	4,302	11,170	354,07	253,73	3,32
[Ag(H2AcpNO ₂ Ph)NO ₃] (4)	52,6	-7,007	-3,106	3,902	15,896	378,38	263,12	2,76

Matriz de correlação

	<i>Candida glabrata</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	LogP
<i>Candida glabrata</i>	1							
E_{HOMO} (eV)	-0,78690	1						
E_{LUMO} (eV)	-0,55795	0,93715	1					
ΔE (eV)	-0,45015	0,88115	0,99076	1				
μ (D)	0,25670	-0,79832	-0,92643	-0,94503	1			
A. S. (\AA^2)	-0,09711	-0,33147	-0,62277	-0,71504	0,62608	1		
V (\AA^3)	-0,21152	-0,32244	-0,63179	-0,73077	0,72073	0,97010	1	
LogP	-0,99321	0,84565	0,62789	0,52208	-0,35447	0,06685	0,15783	1

Tabela A9 – Matrizes de correlação entre os valores de CI_{50} obtidos para *Candida lusitaniae* e os parâmetros estéreo-eletrônicos dos complexos (1-4)

Compostos	CI_{50}							
	<i>Candida lusitaniae</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	LogP
[Ag(H2AcPh)NO ₃] (1)	29,1	-6,894	-2,520	4,374	7,440	336,52	239,79	2,80
[Ag(H2AcpCH ₃ Ph)NO ₃] (2)	33,7	-6,812	-2,471	4,341	7,567	369,91	256,68	3,27
[Ag(H2AcpClPh)NO ₃] (3)	20,2	-6,842	-2,540	4,302	11,170	354,07	253,73	3,32
[Ag(H2AcpNO ₂ Ph)NO ₃] (4)	17,5	-7,007	-3,106	3,902	15,896	378,38	263,12	2,76

Matriz de correlação

	<i>Candida lusitaniae</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	LogP
<i>Candida lusitaniae</i>	1							
E_{HOMO} (eV)	0,67426	1						
E_{LUMO} (eV)	0,73494	0,93715	1					
ΔE (eV)	0,73378	0,88115	0,99076	1				
μ (D)	-0,90496	-0,79832	-0,92643	-0,94503	1			
A. S. (\AA^2)	-0,28474	-0,33147	-0,62277	-0,71504	0,62608	1		
V (\AA^3)	-0,45535	-0,32244	-0,63179	-0,73077	0,72073	0,97010	1	
LogP	0,26189	0,84565	0,62789	0,52208	-0,35447	0,06685	0,15783	1

Tabela A10 – Matrizes de correlação entre os valores de CI_{50} obtidos para *Penicillium citrinum* e os parâmetros estereo-eletrônicos dos ligantes H2AcPh, H2AcpCH₃Ph, H2AcpClPh e H2AcpNO₂Ph (isômeros *Z* e *E*) e complexos (**1-4**)

Compostos	CI_{50}								
	<i>Penicillium citrinum</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	LogP	
H2AcPh	<i>Z</i>	72,5	-6,319	-1,920	4,399	9,970	342,03	222,52	1,98
H2AcpCH ₃ Ph	<i>Z</i>	33,4	-6,277	-1,899	4,378	10,108	374,83	239,38	2,49
H2AcpClPh	<i>Z</i>	44,1	-6,350	-1,934	4,416	10,064	359,36	236,36	2,58
H2AcpNO ₂ Ph	<i>Z</i>	53,9	-6,443	-2,828	3,615	11,325	383,97	245,71	1,92
H2AcPh	<i>E</i>	72,5	-6,332	-1,767	4,565	4,675	343,76	222,34	1,98
H2AcpCH ₃ Ph	<i>E</i>	33,4	-6,283	-1,763	4,520	9,332	375,47	239,27	2,49
H2AcpClPh	<i>E</i>	44,1	-6,300	-1,887	4,413	4,139	359,64	236,23	2,58
H2AcpNO ₂ Ph	<i>E</i>	53,9	-6,394	-2,871	3,523	6,243	384,56	245,6	1,92
[Ag(H2AcPh)NO ₃] (1)		39,8	-6,894	-2,520	4,374	7,440	336,52	239,79	2,80
[Ag(H2AcpCH ₃ Ph)NO ₃] (2)		17,1	-6,812	-2,471	4,341	7,567	369,91	256,68	3,27
[Ag(H2AcpNO ₂ Ph)NO ₃] (4)		31,6	-7,007	-3,106	3,902	15,896	378,38	263,12	2,76

Matriz de correlação

	<i>Penicillium citrinum</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	LogP
<i>Penicillium citrinum</i>	1							
E_{HOMO} (eV)	0,49680	1						
E_{LUMO} (eV)	0,23835	0,70106	1					
ΔE (eV)	-0,04445	0,21367	0,84643	1				
μ (D)	-0,26999	-0,40002	-0,45060	-0,31859	1			
A. S. (\AA^2)	-0,42733	0,01954	-0,47457	-0,66473	0,38684	1		
V (\AA^3)	-0,76776	-0,70576	-0,76950	-0,52715	0,50840	0,66692	1	
LogP	-0,86887	-0,61535	-0,07679	0,35431	0,11992	-0,02843	0,56163	1

Tabela A11 – Matrizes de correlação entre os valores de CI_{50} obtidos para *Candida glabrata* e os parâmetros estéreo-eletrônicos dos ligantes H2AcpClPh e H2AcpNO₂Ph (isômeros *Z* e *E*) e complexos (1-4)

Compostos	CI_{50}								
	<i>Candida glabrata</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	LogP	
H2AcpClPh	<i>Z</i>	102,8	-6,350	-1,934	4,416	10,064	359,36	236,36	2,58
H2AcpNO ₂ Ph	<i>Z</i>	77,0	-6,443	-2,828	3,615	11,325	383,97	245,71	1,92
H2AcpClPh	<i>E</i>	102,8	-6,300	-1,887	4,413	4,139	359,64	236,23	2,58
H2AcpNO ₂ Ph	<i>E</i>	77,0	-6,394	-2,871	3,523	6,243	384,56	245,6	1,92
[Ag(H2AcPh)NO ₃] (1)		52,8	-6,894	-2,520	4,374	7,440	336,52	239,79	2,80
[Ag(H2AcpCH ₃ Ph)NO ₃] (2)		44,3	-6,812	-2,471	4,341	7,567	369,91	256,68	3,27
[Ag(H2AcpClPh)NO ₃] (3)		42,1	-6,842	-2,540	4,302	11,170	354,07	253,73	3,32
[Ag(H2AcpNO ₂ Ph)NO ₃] (4)		52,6	-7,007	-3,106	3,902	15,896	378,38	263,12	2,76

Matriz de correlação

	<i>Candida glabrata</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	LogP
<i>Candida glabrata</i>	1							
E_{HOMO} (eV)	0,90610	1						
E_{LUMO} (eV)	0,59964	0,52035	1					
ΔE (eV)	0,00290	-0,16028	0,75951	1				
μ (D)	-0,38215	-0,53503	-0,57311	-0,25489	1			
A. S. (\AA^2)	0,12232	0,26304	-0,53300	-0,81645	0,26905	1		
V (\AA^3)	-0,76774	-0,73458	-0,71121	-0,26251	0,64968	0,40027	1	
LogP	-0,59212	-0,65469	0,21859	0,75137	0,12441	-0,56143	0,4026	1

Tabela A12 – Matrizes de correlação entre os valores de CI_{50} obtidos para *Candida tropicalis* e os parâmetros estéreo-eletrônicos dos ligantes H2AcpClPh e H2AcpNO₂Ph (isômeros *Z* e *E*) e complexos (**1-4**)

Compostos		CI_{50}							
		<i>Candida tropicalis</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	LogP
H2AcpClPh	<i>Z</i>	164,1	-6,350	-1,934	4,416	10,064	359,36	236,36	2,58
H2AcpNO ₂ Ph	<i>Z</i>	99,0	-6,443	-2,828	3,615	11,325	383,97	245,71	1,92
H2AcpClPh	<i>E</i>	164,1	-6,300	-1,887	4,413	4,139	359,64	236,23	2,58
H2AcpNO ₂ Ph	<i>E</i>	99,0	-6,394	-2,871	3,523	6,243	384,56	245,6	1,92
[Ag(H2AcPh)NO ₃] (1)		45,2	-6,894	-2,520	4,374	7,440	336,52	239,79	2,80
[Ag(H2AcpCH ₃ Ph)NO ₃] (2)		60,7	-6,812	-2,471	4,341	7,567	369,91	256,68	3,27
[Ag(H2AcpClPh)NO ₃] (3)		40,5	-6,842	-2,540	4,302	11,170	354,07	253,73	3,32
[Ag(H2AcpNO ₂ Ph)NO ₃] (4)		50,8	-7,007	-3,106	3,902	15,896	378,38	263,12	2,76

Matriz de correlação

	<i>Candida tropicalis</i>	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	ΔE (eV)	μ (D)	A. S. (\AA^2)	V (\AA^3)	LogP
<i>Candida tropicalis</i>	1							
E_{HOMO} (eV)	0,90452	1						
E_{LUMO} (eV)	0,69676	0,52035	1					
ΔE (eV)	0,11636	-0,16028	0,75951	1				
μ (D)	-0,42414	-0,53503	-0,57311	-0,25489	1			
A. S. (\AA^2)	0,11492	0,26304	-0,53300	-0,81645	0,26905	1		
V (\AA^3)	-0,72338	-0,73458	-0,71121	-0,26251	0,64968	0,4002	1	
LogP	-0,45914	-0,65469	0,21859	0,75137	0,12441	-0,5614	0,4026	1

Capítulo 4 – Complexos de prata(I) com 2-benzoilpiridina benzoil-hidrazonas: estudos teóricos, ação antifúngica, citotóxica e interação com biomoléculas

Tabela A13 – Parâmetros das ligações de hidrogênio (Å, °) para o complexo [Ag(H₂BzpClPh)NO₃] (7).

Composto	D—H···A	D-H	H···A	D···A	D—H···A
(7)	N3-H3N···O3 ⁱ	0,86	2,43	3,139(4)	140

Operadores de simetria: i = -x+1,-y+2,-z

**Capítulo 5 - Complexos de prata(I) com 2,6-diacetilpiridina bis(benzoil-hidrazonas):
avaliação da atividade antifúngica e interação com DNA**

11

Tabela A13 – Parâmetros das ligações de hidrogênio (Å, °) para os complexos [Ag(H2-2,6AcpCH₃Ph)]NO₃ (**10**) e [Ag(H2-2,6AcpClPh)]NO₃·2H₂O (**11**).

Compostos	D-H...A	D-H	H...A	D...A	D-H...A
(10)	N5-H5N...O5A ⁱ	0,88	2,40	3,121(5)	139
(10)	N5-H5N...O5B ⁱ	0,88	2,28	3,145(8)	166
(10)	N3-H3N...O3A	0,88	2,29	3,164(6)	171
(10)	N3-H3N...O4B	0,88	2,06	2,749(8)	134
(11)	N3-H3N...O1W	0,88	2,08	2,894(3)	153
(11)	N5-H5N...O3 ⁱⁱ	0,88	2,07	2,879(3)	152
(11)	O1W-H1W...O5 ⁱⁱⁱ	0,84(1)	2,11(1)	2,916(3)	161(3)
(11)	O2W-H3W...O4 ⁱⁱⁱ	0,84(1)	2,10(1)	2,921(4)	166(3)
(11)	O2W-H4W...O2 ⁱⁱⁱ	0,83(1)	2,00(1)	2,823(3)	168(3)
(11)	O1W-H2W...O2W ^{iv}	0,84(1)	1,97(1)	2,785(3)	166(3)

Operadores de simetria: i = x+1,y-1,z; ii = -x+1,-y+1,-z+1; iii = x+1,y,z; iv = -x+2,-y,-z.

ARTIGOS
PUBLICADOS NO DOUTORADO



Cite this: DOI: 10.1039/c7nj04280a

Silver(I) complexes with 2-acetylpyridinebenzoyl-hydrazones exhibit antimicrobial effects against yeast and filamentous fungi†

Ane F. Santos,^a Isabella P. Ferreira,^a Jacqueline A. Takahashi,^a Gabriel L. S. Rodrigues,^a Carlos B. Pinheiro,^b Leticia R. Teixeira,^a Willian R. Rocha^a and Heloisa Beraldo ^{*a}

Complexes [Ag(H2AcPh)NO₃] (**1**) [Ag(H2AcpCH₃Ph)NO₃] (**2**) [Ag(H2AcpClPh)NO₃] (**3**) and [Ag(H2AcpNO₂Ph)NO₃] (**4**) were obtained with 2-acetylpyridinebenzoylhydrazone (H2AcPh) and its *para*-methyl-(H2AcpCH₃Ph), *para*-chloro-(H2AcpClPh) and *para*-nitro-benzoylhydrazone (H2AcpNO₂Ph) derivatives. In general, upon coordination to silver(I) the antimicrobial activity of the hydrazones increased against yeast and filamentous fungi. Several compounds proved to be as or more active than nystatin against the filamentous fungi. SAR studies showed that, in most of the cases, the antifungal activities against the *Candida* strains correlate well with the energy of the HOMO orbital, suggesting that an external electrophilic attack to these compounds or an electron donation from these compounds to the targets might be involved in their biochemical pathways. On the other hand, for the *Aspergillus* and *Penicillium* strains the antifungal activities of the compounds under study correlate well with log *P*. Hence, their ability to transpose biological membranes might be responsible for their capacity to reach the target. Taking into consideration the reported resistance to the current antifungal drugs and their adverse side effects, the compounds under study deserve to be further investigated as antimicrobial drug candidates.

Received 5th November 2017,
Accepted 10th January 2018

DOI: 10.1039/c7nj04280a

rsc.li/njc

Introduction

Some of the most common causative agents of opportunistic mycoses are *Candida* and *Aspergillus* fungi.¹ Although infections caused by *Penicillium*-like fungal strains are infrequent, *Penicillium* species are occasional agents of human and animal mycoses.²

Intrinsic or acquired polyene resistance are observed among *Candida* strains. Similarly, polyene resistance is increasingly encountered in *Aspergillus* species and the prevalence of polyene resistance among *Aspergillus* species has increased remarkably.³ Polyenes act by inserting into the fungal membrane in close association with ergosterol, with subsequent loss of transmembrane potential and impairment of cellular function. Polyene-resistant *Candida* strains have relatively low ergosterol content, compared with that of polyene-susceptible isolates. Resistance to polyene

antifungal agents may also be related to enhanced catalase activity, resulting in decreased susceptibility to oxidative damage.³

The antimicrobial activity of silver compounds has been known since the ancient times. Silver(I) ions are active against a wide range of bacteria, fungi, and viruses.⁴ Silver nitrate and silver sulphadiazine have been efficiently employed as components of balms to prevent infections on wounds or burns.⁵ However, except for silver-containing preparations to treat burn patients, the use of silver compounds has decreased after the introduction of antibiotics into clinical practice.⁴ More recently, due to the emergence of resistant microbial strains there has been a growing interest in the development of silver-based antimicrobial agents. In fact, silver(I) complexes with a variety of organic ligands proved to exhibit high antifungal⁶ and antibacterial effects.⁷

Hydrazones and their metal complexes are well known for their numerous pharmacological applications as anti-inflammatory,^{8,9} antiproliferative,^{10,11} anti-diabetic¹² and antimicrobial^{13,14} agents. In previous works we demonstrated that silver(I) complexes with chromone-derived hydrazones show cytotoxic effects against solid tumor cell lines as well as antifungal effects.¹⁵ In addition, we demonstrated that silver(I) complexes with a family of 2,6-diacetylpyridine bis(benzoyl-hydrazones) present potent antifungal activity.¹⁶

In the context of a research program that aims to contribute to the discovery of new metal-based antimicrobial agents, in the

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. E-mail: hberaldo@ufmg.br, heloisaberaldo@ufmg@gmail.com; Tel: +55 (31) 3409-5740

^b Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available: ¹H and ¹³C{¹H} NMR spectra of (**1–4**) together with the 2D COSY and HMQC contour maps used to support the ¹H and ¹³C attributions. ESI also contains the mass spectra of (**1–4**), X-ray crystallography data and SAR correlation matrices. CCDC 1582668–1582671 contain the supplementary crystallographic data for **1**, **2a**, **3a** and **4a**. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c7nj04280a

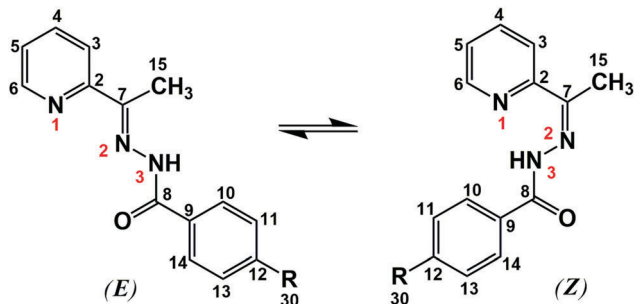


Fig. 1 Structural representation of the 2-acetylpyridine-derived hydrazones (*E* and *Z* isomers) R = H (H2AcPh); R = *p*-CH₃ (H2Ac_pCH₃Ph); R = *p*-Cl (H2Ac_pClPh); R = *p*-NO₂ (H2Ac_pNO₂Ph).

present work silver(i) complexes were obtained with 2-acetylpyridinebenzoylhydrazone (H2AcPh) and its *para*-methyl-(H2Ac_pCH₃Ph), *para*-chloro-(H2Ac_pClPh) and *para*-nitro-(H2Ac_pNO₂Ph) benzoylhydrazone derivatives (Fig. 1). The antimicrobial activity of the compounds under study was evaluated against yeast and filamentous fungal strains. SAR studies were performed in order to investigate the physico-chemical properties that might be related to the antimicrobial action of the compounds.

Materials and methods

Materials and measurements

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification. Melting points were recorded on a Mettler MQAPF-302 apparatus. The molar conductivities (Λ_m) were measured using a YSI model 31 conductivity bridge. Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. Infrared (IR) spectra (4000–400 cm⁻¹) were recorded on a PerkinElmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr pellets. NMR spectra were obtained with a Bruker DPX-400 Advance (400 MHz) spectrometer using DMSO-*d*₆ as the solvent and TMS as internal reference. Electrospray ionization mass spectrum (ESI-MS, + mode) analyses were performed on a Shimadzu[®] liquid chromatography-mass spectrometer (LCMS-IT-TOF).

Single crystal X-ray diffraction measurements were carried out on an Oxford-Diffraction GEMINI-Ultra diffractometer (LabCri-UFMG) using graphite-Enhance Source Mo K α radiation ($\lambda = 0.71073$ Å) at 270(2) K. Data collection, cell refinements, and data reduction were performed using the CrysAlis Pro software package.¹⁷ Analytical absorption corrections were performed using CRYSLIS suite.¹⁷ The structures of complexes (1), (3a) and (4a) (see below) were solved using SUPERFLIP¹⁸ and the structure of complex (2a) (see below) was solved using SIR92.¹⁹ Full-matrix least-squares refinement procedure on F^2 with anisotropic thermal parameters was carried on using SHELXL-2017/1.²⁰ Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all non-hydrogen atoms except for oxygen atoms of the nitrate anion in complex (3a), which were refined with isotropic displacement parameters. The hydrogen atoms bound to carbon and nitrogen atoms were refined

using a riding model.²¹ In complexes (2a) and (3a) the nitrate anion is disordered and was refined with split atomic positions subject to N–O and O–O distances restraints of 1.24(1) Å and 2.150(5) Å, respectively. For complex (4a) the water hydrogen atoms were located in difference Fourier map and refined with distances restrained to O–H = 0.82(1) Å and H–H = 1.30(5) Å, with $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.5U_{\text{eq}}(\text{O})$. The molecular plots of all complexes were prepared using ORTEP-3 for Windows.²² A summary of the crystal data, data collection details and refinement results for these compounds is listed in Table S1, ESI.†

Syntheses of 2-acetylpyridine-derived hydrazones and complexes (1–4)

The hydrazones were prepared as previously reported.^{23–25} The silver(i) complexes were synthesized by mixing 10 mL of a methanol solution of the desired hydrazone (1.0 mM) with 3.0 mL of an aqueous solution of AgNO₃ added dropwise in equimolar amount. The reaction mixture was kept under stirring in the dark at room temperature. After 72 hours the formed gray solids were filtered off, washed with methanol followed by diethyl ether and then dried under reduced pressure.

[(2-Acetylpyridinebenzoylhydrazone(nitrate))]silver(i) [Ag(H2AcPh)NO₃] (1). Gray solid. Anal. calc. for C₁₄H₁₃N₄O₄Ag (%): C. 41.10; H. 3.20; N. 13.69. Found (%): C. 40.50; H. 3.00; N. 13.58. FW: 409.15 g mol⁻¹. Molar conductivity (1.0 mM, DMF): 36.6 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Melting point: 185.4–187.3 °C. IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(\text{N-H})$ 3264, $\nu(\text{C=O})$ 1662, $\nu(\text{C=N})$ 1626, $\nu(\text{NO}_3)$ 1384, $\rho(\text{py})$ 630, $\nu(\text{Ag-O})$ 554. ¹H NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm), J (Hz)]: 11.60 [s, 1H, N(3)H], 8.20–8.01 [m, 2H, H(3), H(4)], 7.73–7.60 [m, 2H, H(5), H(12)], 8.62 [d, 1H, H(6), 4.70], 7.92 [d, 2H, H(10), H(14), 6.50], 7.55 [t, 2H, H(11), H(13), 6.90], 2.61 [s, 3H, H(15)]. ¹³C{¹H} NMR [100 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)]: 165.9 (C8), 152.6 (C7), 150.5 (C6), 126.0 (C5), 139.0 (C4), 123.9 (C3), 152.5 (C2), 132.4 (C12), 128.2 [(C10), (C14)], 128.5 [(C11), (C13)], 14.5 (C15). ESI-MS (m/z): 348.0101 (calc.), 347.9977 (found) for [Ag(H2AcPh)]⁺, 587.1162 (calc.), 587.1149 (found) for [Ag(H2AcPh)₂]⁺. Yield: 77%.

[(2-Acetylpyridine-*para*-methyl-benzoylhydrazone(nitrate))]silver(i) [Ag(H2Ac_pCH₃Ph)NO₃] (2). Gray solid. Anal. calc. for C₁₅H₁₅N₄O₄Ag (%): C. 42.57; H. 3.57; N. 13.24. Found (%): C. 42.30; H. 3.37; N. 13.10. FW: 423.17 g mol⁻¹. Molar conductivity (1.0 mM, DMF): 42.6 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Melting point: 204.7–206.7 °C. IR (KBr, cm⁻¹): $\nu(\text{N-H})$ 3232, $\nu(\text{C=O})$ 1662, $\nu(\text{C=N})$ 1610, $\nu(\text{NO}_3)$ 1384, $\rho(\text{py})$ 630, $\nu(\text{Ag-O})$ 568. ¹H NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm), J (Hz)]: 11.32 [s, 1H, N(3)H], 8.20–7.95 [m, 2H, H(3), H(4)], 7.62–7.48 [m, 1H, H(5)], 8.54 [s, 1H, H(6)], 7.89–7.69 [m, 2H, H(10), H(14)], 7.38–7.23 [m, 2H, H(11), H(13)], 2.59 [s, 3H, H(15)], 2.36 [s, 3H, H(21)]. ¹³C{¹H} NMR [100 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)]: 165.4 (C8), 152.4 (C7), 149.9 (C6), 125.5 (C5), 138.4 (C4), 123.1 (C3), 151.7 (C2), 142.3 (C12), 128.1 [(C10), (C14)], 128.8 [(C11), (C13)], 14.0 (C15), 21.0 (C30). ESI-MS (m/z): 360.0260 (calc.), 360.0142 (found) for [Ag(H2Ac_pCH₃Ph)]⁺, 615.1476 (calc.), 615.1456 (found) for [Ag(H2Ac_pCH₃Ph)₂]⁺. Yield: 33%.

[(2-Acetylpyridine-*para*-chloro-benzoylhydrazone(nitrate))]silver(i) [Ag(H2Ac_pClPh)NO₃] (3). Gray solid. Anal. calc. for C₁₄H₁₂ClN₄O₄Ag

(%): C. 37.91; H. 2.73; N. 12.63. Found (%): C. 37.62; H. 2.41; N. 12.52. FW: 443.59 g mol⁻¹. Molar conductivity (1.0 mM, DMF): 58.1 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Melting point: 190.2–191.1 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(N–H) 3218, ν(C=O) 1668, ν(C=N) 1592, ν(NO₃) 1384, ρ(py) 628, ν(Ag–O) 538. ¹H NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm), *J* (Hz)]: 11.65 [s, 1H, N(3)H], 7.93 [d, 2H, H(3), H(4), 7.40], 8.61 [d, 1H, H(6), 4.70], 8.10 [d, 2H, H(10), H(14), 5.20], 7.72–7.55 [m, 3H, H(5), H(11), H(13)], 2.61 [s, 3H, H(15)]. ¹³C{¹H} NMR [100 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)]: 164.9 (C8), 152.9 (C7), 150.5 (C6), 126.1 (C5), 139.0 (C4), 124.0 (C3), 150.8 (C2), 139.6 (C12), 130.2 [(C10), (C14)], 128.6 [(C11), (C13)], 14.6 (C15). ESI-MS (*m/z*): 381.9705 (calc.), 381.9577 (found) for [Ag(H2AcpClPh)]⁺, 655.0371 (calc.), 655.0371 (found) for [Ag(H2AcpClPh)₂]⁺. Yield: 67%.

[[2-Acetylpyridine-*para*-nitro-benzoylhydrazone(nitrate))]silver(I) [Ag(H2AcpNO₂Ph)NO₃] (4). Gray solid. Anal. Calc. for C₁₄H₁₂N₅O₆Ag (%): C. 37.03; H. 2.66; N. 15.42. Found (%): C. 40.44; H. 2.63; N. 15.49. FW: 454.14 g mol⁻¹. Molar conductivity (1.0 mM, DMF): 57.7 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Melting point: 136.5–138.6 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(N–H) 3204, ν(C=O) 1672, ν(C=N) 1602, ν(NO₃) 1384, ρ(py) 630, ν(Ag–O) 544. ¹H NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm), *J* (Hz)]: 11.86 [s, 1H, N(3)H], 8.11 [d, 4H, H(3), H(4), H(10), H(14), 9.0], 7.71–7.55 [m, 1H, H(5)], 8.59 [d, 1H, H(6), 3.70], 8.33 [d, 2H, H(11), H(13), 8.0], 2.63 [s, 3H, H(15)]. ¹³C{¹H} NMR [100 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)]: 164.3 (C8), 153.9 (C7), 150.4 (C6), 126.2 (C5), 139.0 (C4), 124.0 (C3), 150.9 (C2), 133.2 (C12), 129.8 [(C10), (C14)], 123.5 [(C11), (C13)], 14.7 (C15). ESI-MS (*m/z*): 390.9954 (calc.), 390.9882 (found) for [Ag(H2AcpNO₂Ph)]⁺, 677.0864 (calc.), 677.0851 (found) for [Ag(H2AcpNO₂Ph)₂]⁺. Yield: 54%.

Crystals of [Ag(H2AcPh)NO₃] (1), [Ag(H2AcpCH₃Ph)₂]NO₃ (2a), [Ag(H2AcpClPh)₂]NO₃ (3a) and [Ag(H2AcpNO₂Ph)(H₂O)(NO₃)] (4a) were obtained by slow evaporation of the mother liquor in the syntheses of (1–4).

Antifungal activity

Candida strains were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, USA) and from College of Biological Sciences (CBS, USA). *Aspergillus* and *Penicillium* strains were obtained from Tropical Culture Collection, CCT (housed at Fundação Andre Tosello in São Paulo, Brazil, <http://fat.org.br/>) and ARS Culture Collection Northern Regional Research Laboratory, NRRL (housed within the Mycotoxin Prevention and Applied Microbiology Research Unit at the National Center for Agricultural Utilization Research in Peoria, Illinois, <https://nrll.ncaur.usda.gov/>). *Candida dubliniensis* (clinical isolate 28), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida lusitanae* (CBS 6936), and *Candida tropicalis* (ATCC 750) strains, and *Aspergillus flavus* (CCT 4952), *Aspergillus niger* (NRRL 3), *Aspergillus parasiticus* (ATCC 15517) and *Penicillium citrinum* (ATCC 756) strains were used in the evaluation of the antifungal effect of the studied compounds.

The tests with *Candida* strains 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 1–2 × 10⁸ CFU mL⁻¹ (CFU = colony forming units) determined by a spectrophotometric method. The cell density was determined taking into consideration the turbidity of the

suspension, on a spectrophotometer, according to the guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards for yeasts (M27-A3).

The filamentous fungal strains were maintained in potato dextrose agar (PDA) under refrigeration at 7 °C. The tests were performed in Broth Heart Infusion (BHI) medium. The fungal spores were harvested to give a suspension. The suspension containing the spores was loaded in a Neubauer chamber and the spores were quantified in an optic microscope. Dilutions were carried out to achieve the required final concentration of spores of 5.0 × 10³ spores mL⁻¹.

In vitro susceptibility testing by the microdilution method

The activity of the compounds was evaluated in final concentrations ranging from 250 to 0.12 μg mL⁻¹ in microdilution plates with 96-wells according to Gupta and Zacchino.²⁶ 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 to obtain 500 μg 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 inocula were added and the microplates were incubated at 37 °C for 24 h for *Candida* species and for 48 h for filamentous fungi. The final concentration of DMSO in the wells was not higher than 2% in order to avoid the effect of this solvent in the microorganisms growth.²⁶ 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. The half maximal inhibitory concentrations 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% (IC₅₀) reduction of growth compared with the control growth in the culture medium free of the test compound (positive control). GraphPad Prism version 6.0 for windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com) was used for IC₅₀ determinations.

SAR studies

Computational details. Full geometry optimization of the free ligands and the silver(I) complexes were performed at the Density Functional Theory level,²⁷ the hybrid B3LYP^{28,29} exchange correlation functional and using the Def2-SV(P) all electron basis set³⁰ for H, C, N, Cl and O atoms. The inner shell electrons of the silver atom were described by the associated effective core potential³¹ and the associated Def2-TZVP basis set³⁰ was employed for the valence shell electrons. To speed up calculations the resolution of the identity³² was used for the Coulomb, and the chain of sphere approach³³ for the exchange

part of the Fock matrix, employing the def2-TZVP/J auxiliary basis set.³⁴ For the free ligands, both *E* and *Z* isomers were analyzed. Solvent effects were included by means of the polarized continuum model (PCM).³⁵ All quantum mechanical calculations were performed using the ORCA program.³⁶ HOMO and LUMO energies, and dipole moments, were obtained after full optimization and were used as descriptors for further Structure Activity Relationship (SAR) studies. The three-dimensional structures obtained from optimization of the ligands and the complexes were used as input for the Marvin software³⁷ to calculate the superficial molecular areas, molecular volume and the octanol-water partition coefficients ($\log P$). Superficial molecular area, molecular volumes and $\log P$ were also used as descriptors for SAR studies.

Results and discussion

Formation of the silver(I) complexes (1–4)

Microanalyses are compatible with the formation of complexes [Ag(H2AcPh)NO₃] (1), [Ag(H2AcpCH₃Ph)NO₃] (2), [Ag(H2AcpClPh)NO₃] (3), and [Ag(H2AcpNO₂Ph)NO₃] (4) in which a neutral hydrazone ligand is attached to the metal center together with a nitrate ion. The relatively high values of molar conductivities suggest a likely release of the nitrate ligand in solution. The mass spectra of (1–4) show peaks corresponding to the [Ag(HL)]⁺ and [Ag(HL)₂]⁺ species, indicating again possible decomplexation of the nitrate ligand with formation of AgNO₃ and [Ag(HL)₂]⁺ complexes in solution.

Infrared spectra

The vibrations attributed to $\nu(\text{N-H})$ at 3286–3186 cm⁻¹ in the infrared spectra of the hydrazones are observed at 3264–3204 cm⁻¹ in the spectra of complexes (1–4), in accordance with the presence of neutral ligands. The $\nu(\text{C=N})$ vibration at 1618–1602 cm⁻¹ in the infrared spectra of the hydrazones shift to 1626–1592 cm⁻¹ in the spectra of complexes (1–4), in agreement with coordination of the azomethine nitrogen.²⁴ The $\nu(\text{C=O})$ absorption observed at 1668–1650 cm⁻¹ in the spectra of the free hydrazones shifts to 1672–1662 cm⁻¹ in the spectra of complexes (1–4). The in-plane deformation mode of the pyridine ring at 628–620 cm⁻¹ in the spectra of the uncomplexed hydrazones shifts to 630–628 cm⁻¹ in complexes (1–4), suggesting coordination of the hetero-aromatic nitrogen.²⁴ In addition, an absorption at 1384 cm⁻¹ was attributed to the coordinated nitrate ligand and an absorption at 568–538 cm⁻¹ was assigned to the $\nu(\text{Ag-O})$ vibration mode.³⁸

NMR spectra

The NMR spectra of the hydrazones and their silver(I) complexes were recorded in DMSO-*d*₆ because this is the only solvent which dissolves all ligands and complexes. 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).

The signals of the hydrogens and carbons undergo significant shifts in complexes (1–4) relative to their position in the uncomplexed hydrazones.

In the ¹H NMR spectra of H2AcPh and H2AcpClPh all signals were duplicated, indicating the presence of the *Z* and *E* configurational isomers in the DMSO-*d*₆ solution. In the first, N3-H is hydrogen bonded to the hetero-aromatic nitrogen (δ 15.80–15.86), while in the second N3-H is hydrogen bonded to the solvent (δ 10.90–10.96).^{24,39} Similarly, the signals of all carbons are duplicated in the ¹³C{¹H} NMR spectra of these hydrazones, in accordance with the existence of the *Z* and *E* isomers in DMSO-*d*₆ solution.¹¹ In the ¹H NMR spectra of H2AcpCH₃Ph and H2AcpNO₂Ph only one signal was observed for N3-H at δ 10.90–11.21, in accordance with the presence of the *E* isomer in solution.

In the spectra of the silver(I) complexes only one signal was observed for each hydrogen and each carbon, in accordance with the presence of one isomeric form. The signal of N3-H at δ 11.32–11.86 is characteristic of the *E* configuration. The signals of the pyridine carbons and of C7 and C8 undergo significant shifts in complexes (1–4) in relation to their position in the free hydrazones.

X-ray diffraction analyses

Fig. 2 shows the crystal structures of [Ag(H2AcPh)NO₃] (1), [Ag(H2AcpCH₃Ph)₂]NO₃ (2a), [Ag(H2AcpClPh)₂]NO₃ (3a) and [Ag(H2AcpNO₂Ph)(H₂O)(NO₃)] (4a). Table 1 reports selected bond distances and Table 2 selected bond angles in the structures of (1–4a). A complete set of crystallographic data is available in the ESL.†

In (1) and (4a) a hydrazone ligand is attached to the metal center together with a nitrate ligand. In (4a) a coordination water molecule is also present in the silver(I) coordination sphere. In (2a) and (3a) two hydrazone ligands are attached to the metal center and a nitrate acts as counter-ion. Hence, besides the 1 : 1 [M(HL)NO₃] complex, 1 : 2 [M(HL)₂]NO₃ species were formed as well in the syntheses of (2) and (3).

Comparison of the bond distances in H2AcPh⁴⁰ and complex (1) and in H2AcpClPh¹³ and complex (3a) reveals that the distances and angles undergo significant changes upon coordination of the hydrazones to silver(I).

In both complexes (2a) and (3a) the Ag1–O1 distance [2.5923(16) Å (2a), 2.619(3) Å (3a)] is much shorter than the Ag1–O11 [3.0224(17) Å (2a), 3.028(3) Å (3a)] distance. In fact, O11 weakly interacts with the metal center in both complexes. In complexes (1) and (4a) the Ag1–O1 [2.564(4) Å (1), 2.629(4) Å (4a)] and Ag1–O3 [2.692(6) Å (1), 2.665(4) Å (4a)] distances are quite longer than the Ag1–O2 bond length [2.384(6) Å (1), 2.488(5) Å (4a)]. Hence, in (1) and (4a) weaker interactions are observed between the silver(I) center and the hydrazone carbonyl oxygen and between the silver(I) center and O3 from the nitrate than between the metal center and O2 from nitrate. This effect probably explains the relatively high molar conductivities of complexes (1–4), which might be due to release of the loosely bound nitrate ligand in solution. Interestingly, in (4a) the Ag1–O1w bond length, 2.359(4) Å, is much shorter than the remaining Ag–O

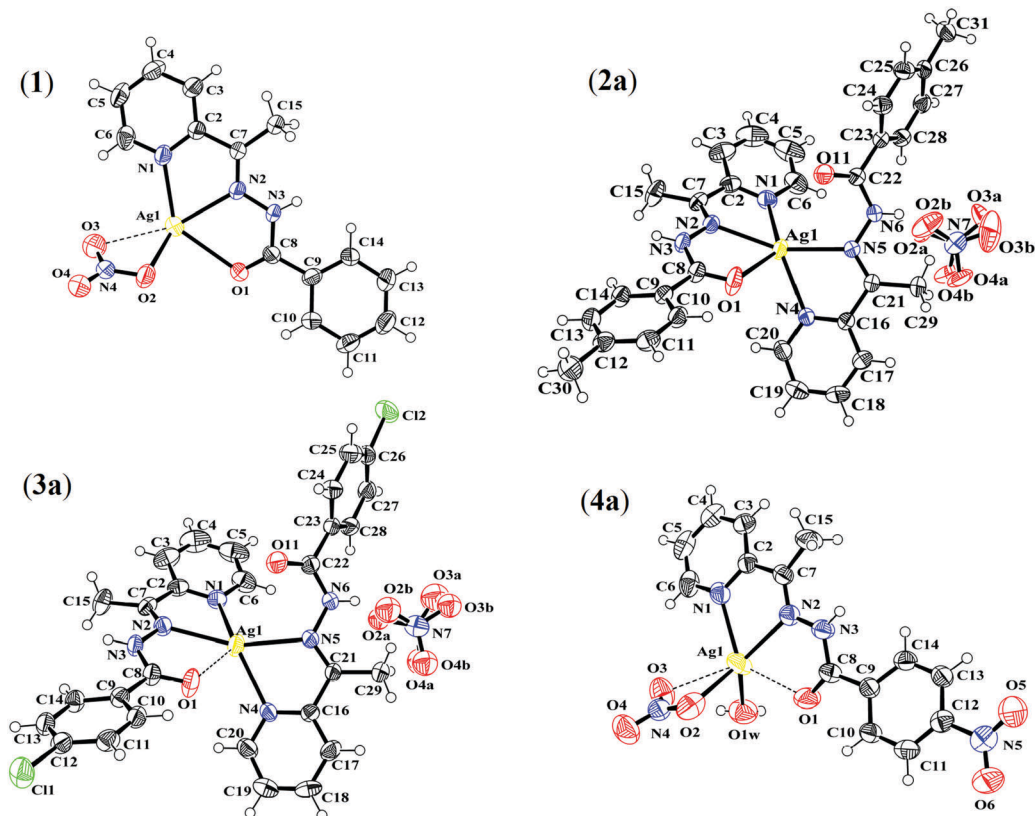


Fig. 2 Molecular plots of $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPh})\text{NO}_3]$ (**1**), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPhCH}_3\text{Ph})_2]\text{NO}_3$ (**2a**), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPhClPh})_2]\text{NO}_3$ (**3a**) and $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPhNO}_2\text{Ph})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)$ (**4a**) showing the labeling scheme of the non-H atoms. Displacement ellipsoids represented at the 50% probability level.

Table 1 Selected bond lengths (Å) for $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPh})\text{NO}_3]$ (**1**), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPhCH}_3\text{Ph})_2]\text{NO}_3$ (**2a**), $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPhClPh})_2]\text{NO}_3$ (**3a**) and $[\text{Ag}(\text{H}_2\text{AcPhNO}_2\text{Ph})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)$ (**4a**) along with data for H_2AcPh and $\text{H}_2\text{AcPhClPh}$

Atoms	$\text{H}_2\text{AcPh}^{40}$ (1)	(2a)	$\text{H}_2\text{AcPhClPh}^{13}$ (3a)	(4a)		
C7–N2	1.264(3)	1.280(7)	1.282(3)	1.2860(18)	1.279(5)	1.278(6)
N2–N3	1.375(2)	1.369(7)	1.377(2)	1.3810(15)	1.380(4)	1.369(6)
N3–C8	1.347(3)	1.365(8)	1.367(3)	1.3590(17)	1.364(5)	1.359(6)
C8–O1	1.219(2)	1.219(7)	1.219(3)	1.2260(16)	1.219(4)	1.217(6)
Ag1–O1	—	2.564(4)	2.5923(16)	—	2.619(3)	2.629(4)
Ag1–O11	—	—	3.0224(17)	—	3.028(3)	—
Ag1–O2	—	2.384(6)	—	—	—	2.488(5)
Ag1–O3	—	2.692(6)	—	—	—	2.665(4)
Ag1–O1w	—	—	—	—	—	2.359(4)

lengths, indicating higher affinity of silver(I) for the water oxygen. Differences in bond angles between (**1**) and (**4a**) result from the presence of an additional water ligand in (**4a**). Indeed, the N2–Ag1–O2 and O2–Ag1–O1 angles are $118.97(18)^\circ$ (**1**), $120.45(13)^\circ$ (**4a**) and $85.17(15)^\circ$ (**1**), $90.81(15)^\circ$ (**4a**).

Antifungal activity

Table 3 reports the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of the studied compounds against *Candida* yeast and against *Aspergillus* and *Penicillium* strains.

The hydrazone ligands and silver nitrate *per se* show antifungal activity. The studied compounds revealed to be less

active than miconazole nitrate. However, several compounds proved to be as or more active than nystatin against the filamentous fungi. $\text{H}_2\text{AcPhCH}_3\text{Ph}$ and $\text{H}_2\text{AcPhClPh}$ were more active than nystatin against *A. parasiticus*. In addition, complex (**2**) proved to be more active than nystatin against *A. niger*, *A. parasiticus* and *P. citrinum*.

Upon coordination to silver(I) the antimicrobial activity of the hydrazones increased in most of the cases against the yeast and filamentous fungal strains. On the other hand, coordination of silver(I) to the hydrazone ligands resulted generally in increased antimicrobial effects.

SAR studies

Theoretical calculations were performed in order to investigate the stereo-electronic properties of the hydrazone ligands and their silver(I) complexes. Since the number of molecules was not enough for a QSAR investigation, SAR studies were carried out, to identify physico-chemical properties that might be involved in the mechanism of the antifungal action of the compounds. Properties of interest in this study were the highest occupied molecular orbital (HOMO) and the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) energies, the dipole moment, the octanol–water partition coefficients ($\log P$), the surface area (SA) and the molecular volume, which were correlated to IC_{50} . HOMO and LUMO energies are related to ionization potential and electron affinity, respectively. These frontier

Table 2 Selected bond angles (°) for [Ag(H2AcPh)NO₃] (**1**), [Ag(H2AcPhCH₃Ph)₂]NO₃ (**2a**), [Ag(H2AcPhClPh)₂]NO₃ (**3a**) and [Ag(H2AcPhNO₂Ph)(H₂O)(NO₃)] (**4a**) along with data for H2AcPh and H2AcPhClPh

Atoms	H2AcPh ⁴⁰	(1)	(2a)	H2AcPhClPh ¹³	(3a)	(4a)
C2–C7–N2	114.5(1)	114.2(5)	115.23(19)	115.12(12)	115.4(3)	115.8(4)
C7–N2–N3	119.0(1)	120.0(5)	118.86(18)	116.22(11)	118.6(3)	119.5(4)
N2–N3–C8	117.0(1)	118.1(5)	117.51(16)	117.89(11)	117.7(3)	118.0(4)
N3–C8–O1	123.3(2)	122.3(5)	121.82(19)	123.28(13)	122.2(4)	122.8(5)
N1–Ag1–O2	—	118.35(19)	—	—	—	116.77(14)
N1–Ag1–O1	—	133.45(16)	132.39(6)	—	132.01(10)	132.60(13)
N2–Ag1–O1	—	65.27(15)	64.15(5)	—	63.82(10)	64.23(12)
N2–Ag1–O2	—	118.97(18)	—	—	—	120.45(13)
O2–Ag1–O1	—	85.17(15)	—	—	—	90.81(15)
N1–Ag1–O3	—	92.69(18)	—	—	—	93.85(14)
N2–Ag1–O3	—	150.62(18)	—	—	—	152.95(14)
O2–Ag1–O3	—	49.84(16)	—	—	—	48.33(13)

Table 3 Antifungal activity (IC₅₀) for the hydrazones and their silver(I) complexes (**1–4**) against *Candida dubliniensis* (clinical isolate 28), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida lusitanae* (CBS 6936), *Candida tropicalis* (ATCC 750) *Aspergillus flavus* (CCT 4952), *Aspergillus niger* (NRRL 3), *Aspergillus parasiticus* (ATCC 15517) and *Penicillium citrinum* (ATCC 756)^a

Compounds	IC ₅₀ ± SD (µM)								
	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida lusitanae</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	
H2AcPh	78.5 ± 3.9	—	47.8 ± 1.7	—	48.6 ± 4.7	45.2 ± 6.4	—	72.5 ± 0.2	
[Ag(H2AcPh)NO ₃] (1)	40.7 ± 3.4	52.8 ± 3.0	29.1 ± 2.2	45.2 ± 1.8	12.4 ± 1.3	20.1 ± 1.2	61.2 ± 0.4	39.8 ± 7.8	
H2AcPhCH ₃ Ph	66.5 ± 1.3	>246	31.6 ± 0.7	>246	23.6 ± 1.0	16.6 ± 2.0	43.6 ± 5.4	33.4 ± 5.3	
[Ag(H2AcPhCH ₃ Ph)NO ₃] (2)	44.3 ± 5.4	44.3 ± 1.2	33.7 ± 3.0	60.7 ± 0.1	10.5 ± 0.5	6.1 ± 1.9	34.9 ± 0.6	17.1 ± 0.4	
H2AcPhClPh	16.7 ± 0.7	102.8 ± 0.1	13.9 ± 0.8	164.1 ± 2.0	>28	47.5 ± 3.2	19.9 ± 2.1	44.1 ± 1.3	
[Ag(H2AcPhClPh)NO ₃] (3)	14.5 ± 2.1	42.1 ± 2.0	20.2 ± 2.6	40.5 ± 2.6	41.4 ± 4.0	22.9 ± 5.2	83.4 ± 4.0	>35	
H2AcPhNO ₂ Ph	22.7 ± 0.1	77.0 ± 2.7	17.3 ± 0.4	99.0 ± 7.7	42.1 ± 1.7	47.7 ± 3.8	>27	53.9 ± 4.0	
[Ag(H2AcPhNO ₂ Ph)NO ₃] (4)	13.9 ± 1.6	52.6 ± 5.5	17.5 ± 3.8	50.8 ± 5.0	32.9 ± 1.2	21.7 ± 6.4	>68	31.6 ± 2.7	
AgNO ₃	>11	64.2 ± 2.2	20.8 ± 1.8	40.3 ± 1.0	20.1 ± 3.5	>11	>183	24.6 ± 3.0	
Miconazole nitrate	1.6 ± 0.5	19.5 ± 4.5	<6 × 10 ⁻⁵	3.6 ± 0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	
Nystatin	4.4 ± 0.8	1.9 ± 0.2	5.3 ± 0.8	7.9 ± 0.7	4.8 ± 3.8	15.0 ± 1.1	76.0 ± 1.1	30.7 ± 1.2	

^a IC₅₀ = concentration that inhibits 50% of fungal cells growth. — no inhibition of fungal growth above 80% at 250 µg mL⁻¹. SD = standard deviation.

orbitals are associated to the molecules reactivity. The HOMO energy is closely related to susceptibility to electrophilic attack, while LUMO energy is closely related to susceptibility to nucleophilic attack. The dipole moment may give some insight on the degree of hydrophobicity/hydrophilicity and log *P* is often used as a measure of lipophilicity of the compounds. The surface area may offer information on stereo features for drug–target interactions. IC₅₀ values for the investigated fungal strains and the computed stereo-electronic parameters are listed in Table 4.

For each fungal strain, correlation matrices involving only the properties of the free ligands, only the properties of the complexes, and the combined properties of the ligands and complexes were created by means of Excel. The correlation matrices involving the stereo-electronic parameters and the IC₅₀ are in ESI.† Initially the calculations for the complexes were performed in gas phase and assuming that the nitrate (NO₃⁻) group was coordinated to the silver atom. However, the computed properties did not exhibit any kind of correlation with the biological data. Correlations with the biological data were obtained only when the calculations were performed in water, using the PCM model, and by assuming that the NO₃⁻ group leaves the coordination sphere of the metal upon solvation.

Therefore, all computed properties of the complexes reported here were performed in water solution in the absence of the NO₃⁻ group.

Analyzing the free ligands, the data show that only the activities against *A. niger* and *C. dubliniensis* do not show any kind of correlation with the properties of the ligands. The activities against the other strains show correlation mainly with log *P* of the ligands, with correlations *R* = -0.781 (*P. citrinum*) and *R* = -0.939 (*A. flavus*).

The data for the complexes show that only the activities against *A. niger* and *C. tropicalis* do not exhibit correlations with the properties of the complexes. For the other strains, good correlations were found with the molecular dipole moment, log *P* and the energy of the HOMO orbital. However, there is not a single property that consistently correlates with the antifungal activity against all fungal strains. For instance, good correlations were found for log *P* with *R* = -0.907 and *R* = -0.993 for *P. citrinum*, and *C. glabrata*, respectively. The activity against *C. glabrata* correlates well with the energy of the HOMO orbital of the complexes, with *R* = -0.787. For *C. lusitanae* and *C. dubliniensis* good correlations were obtained with the dipole moment, with *R* = -0.905 and *R* = -0.877, respectively.

Table 4 Stereo-electronic parameters (E_{HOMO} , μ and $\log P$) and antifungal activity (IC_{50}) for the hydrazones and their silver(i) complexes (1–4)^a

Compound	E_{HOMO} (eV)	μ (D)	$\log P$	IC_{50} (μM)							
				<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida lusitanae</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
H2AcPh	(E) -6.332	4.675	1.98	78.5	—	47.8	—	48.6	45.2	—	72.5
H2AcPCH ₃ Ph	(E) -6.283	9.332	2.49	66.5	> 246	31.6	> 246	23.6	16.6	43.6	33.4
H2AcPClPh	(E) -6.300	4.139	2.58	16.7	102.8	13.9	164.1	> 28	47.5	19.9	44.1
H2AcPNO ₂ Ph	(E) -6.394	6.243	1.92	22.7	77.0	17.3	99.0	42.1	47.7	> 27	53.9
H2AcPh	(Z) -6.319	9.970	1.98	78.5	—	47.8	—	48.6	45.2	—	72.5
H2AcPCH ₃ Ph	(Z) -6.277	10.108	2.49	66.5	> 246	31.6	> 246	23.6	16.6	43.6	33.4
H2AcPClPh	(Z) -6.350	10.064	2.58	16.7	102.8	13.9	164.1	> 28	47.5	19.9	44.1
H2AcPNO ₂ Ph	(Z) -6.443	11.325	1.92	22.7	77.0	17.3	99.0	42.1	47.7	> 27	53.9
[Ag(H2AcPh)NO ₃]	(1) -6.894	7.440	2.80	40.7	52.8	29.1	45.2	12.4	20.1	61.2	39.8
[Ag(H2AcPCH ₃ Ph)NO ₃]	(2) -6.812	7.567	3.27	44.3	44.3	33.7	60.7	10.5	6.1	34.9	17.1
[Ag(H2AcPClPh)NO ₃]	(3) -6.842	11.170	3.32	14.5	42.1	20.2	40.5	41.4	22.9	83.4	> 35
[Ag(H2AcPNO ₂ Ph)NO ₃]	(4) -7.007	15.896	2.76	13.9	52.6	17.5	50.8	32.9	21.7	> 68	31.6

^a IC_{50} = concentration that inhibits 50% of fungal cells growth, - no inhibition of fungal growth above 80% at 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

When the properties of the ligands and the complexes were analyzed together, good correlations were found for *P. citrinum* ($R = -0.869$ for $\log P$), *C. tropicalis* ($R = 0.905$ for the energy of the HOMO) and *C. glabrata* ($R = 0.906$ for the energy of the HOMO).

The stereo-electronic parameters correlate differently for each fungal strain and do not allow a general conclusion. However, when the data of the ligands and the complexes are analyzed together, it is observed that the antifungal activities against *Candida* strains correlate well with the energy of the HOMO orbital, suggesting that an external electrophilic attack to these compounds or an electron donation from these compounds to the targets might be involved in their biochemical pathways. As shown in Fig. 3, the HOMO orbital of the complexes are mainly located at the ligands, with small participation of the d orbitals of the silver atom. Therefore, the electrophilic attack, if it really takes place, may occur at the coordinated ligand. On the other hand, for the *Aspergillus* and *Penicillium* strains the antifungal activity correlates reasonably well with $\log P$. Hence, the lipophilicity of the compounds, usually associated with their ability to transpose biological membranes, might be responsible for their capacity to reach the target.

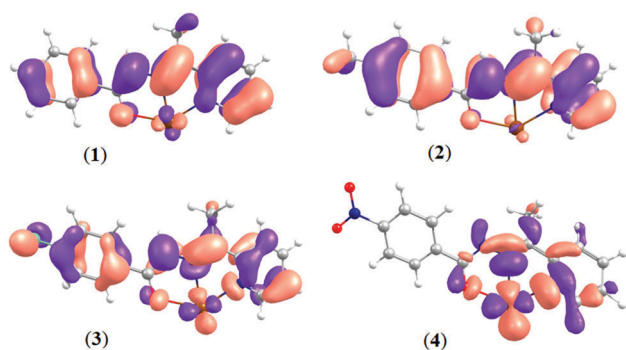


Fig. 3 Highest occupied molecular orbital of silver(i) complexes (1–4).

Conclusions

In the present work we demonstrated that the silver(i) complexes (1–4) were often more active than either the hydrazone ligands and/or silver nitrate against the yeast and filamentous fungal strains. Even if the studied compounds revealed to be less active than nystatin against the *Candida* strains, several compounds proved to be as or more active than nystatin against the filamentous fungi. Silver nitrate *per se* exhibited antimicrobial activity against some of the fungal strains under investigation.

Although studies on the mode of action of the hydrazones and their silver(i) complexes were beyond the scope of the present work, we may suggest that favorable changes in lipophilicity in the complexes in relation to both the free ligands and silver nitrate might explain the activity enhancement upon coordination. In addition, the metal, besides its own antimicrobial action, might exert a structural role by holding the hydrazone ligands in a conformation suitable for their interaction with the biological targets.

Since the hydrazone ligands and their silver(i) complexes herein described are structurally very distinct from the clinically used antifungal agents, they possibly act by a distinct pathway. The obtained results, together with the reported increasing in resistance to antifungal medication encourage further investigation on hydrazones and their silver(i) complexes as leads for the development of new antifungal drug candidates.

Conflicts of interest

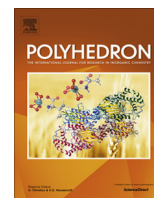
There are no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge CAPES, CNPq, CNPq Proc.1751782016-4 and INCT-INOVAR and INCT-Catalise for financial support and student grants.

References

- 1 A. Srinivasan, J. L. Lopez-ribot and A. K. Ramasubramanian, *Drug Discovery Today: Technol.*, 2014, **11**, 65–71.
- 2 M. Guevara-Suarez, D. A. Sutton, J. F. Cano-Lira, D. García, A. Martin-Vicente, N. Wiederhold, J. Guarro and J. Gené, *J. Clin. Microbiol.*, 2016, **54**, 2155–2161.
- 3 Z. A. Kanafani and J. R. Perfect, *Clin. Infect. Dis.*, 2008, **46**, 120–128.
- 4 F. Velluti, N. Mosconi, A. Acevedo, G. Borthagaray, J. Castiglioni, R. Faccio, D. F. Back, G. Moyna, M. Rizzotto and M. H. Torre, *J. Inorg. Biochem.*, 2014, **141**, 58–69.
- 5 J. M. S. Cardoso, S. I. Guerreiro, A. Lourenço, M. M. Alves, M. F. Montemor, N. P. Mira, J. H. Leitão and M. F. N. N. Carvalho, *PLoS One*, 2017, **12**, 1–15.
- 6 R. M. Gandra, P. M. Carron, M. F. Fernandes, L. S. Ramos, T. P. Mello, A. C. Aor, M. H. Branquinha, M. McCann, M. Devereux and A. L. S. Santos, *Front. Microbiol.*, 2017, **8**, 1–11.
- 7 V. T. Yilmaz, C. Icel, J. Batur, S. Aydinlik, M. Cengiz and O. Buyukgungor, *Dalton Trans.*, 2017, **46**, 8110–8124.
- 8 T. F. Da Silva, W. B. Júnior, M. S. Alexandre-Moreira, F. N. Costa, C. E. Da Silva Monteiro, F. F. Ferreira, R. C. R. Barroso, F. Noël, R. T. Sudo, G. Zapata-Sudo, L. M. Lima and E. J. Barreiro, *Molecules*, 2015, **20**, 3067–3088.
- 9 G. L. Parrilha, R. P. Vieira, A. P. Rebolledo, I. C. Mendes, L. M. Lima, E. J. Barreiro, O. E. Piro, E. E. Castellano and H. Beraldo, *Polyhedron*, 2011, **30**, 1891–1898.
- 10 D. N. Do Amaral, B. C. Cavalcanti, D. P. Bezerra, P. M. P. Ferreira, R. P. De Castro, J. R. Sabino, C. M. L. Machado, R. Chammas, C. Pessoa, C. M. R. Sant'Anna, E. J. Barreiro and L. M. Lima, *PLoS One*, 2014, **9**, e85380.
- 11 I. P. Ferreira, E. D. L. Piló, A. A. Recio-despaigne, J. G. Da, J. P. Ramos, L. B. Marques, P. H. D. M. Prazeres, J. A. Takahashi, E. M. Souza-fagundes, W. Rocha and H. Beraldo, *Bioorg. Med. Chem.*, 2016, **24**, 2988–2998.
- 12 G. Zapata-Sudo, I. K. da, C. Nunes, J. S. C. Araujo, J. S. da Silva, M. M. Trachez, T. F. da Silva, F. P. da Costa, R. T. Sudo, E. J. Barreiro and L. M. Lima, *Drug Des., Dev. Ther.*, 2016, **10**, 2869–2879.
- 13 E. D. L. Piló, A. A. Recio-Despaigne, J. G. Da Silva, I. P. Ferreira, J. A. Takahashi and H. Beraldo, *Polyhedron*, 2015, **97**, 30–38.
- 14 P. Rawat, R. N. Singh, A. Ranjan, S. Ahmad and R. Saxena, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2017, **179**, 1–10.
- 15 L. V. Tamayo, A. F. Santos, I. P. Ferreira, V. G. Santos, M. T. P. Lopes and H. Beraldo, *BioMetals*, 2017, **30**, 379–392.
- 16 A. F. Santos, I. P. Ferreira, C. B. Pinheiro, J. A. Takahashi, L. R. Teixeira and H. Beraldo, *Polyhedron*, 2017, **138**, 270–276.
- 17 CrysAlisPRO, release 22-05-2014 CrysAlis171.NET, Agilent Technologies Ltd, Yarnton, 2014.
- 18 L. Palatinus and G. Chapuis, *J. Appl. Crystallogr.*, 2007, **40**, 786–790.
- 19 A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, M. C. Burla, G. Polidori and M. Camalli, *J. Appl. Crystallogr.*, 1994, **27**, 435.
- 20 G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. C: Struct. Chem.*, 2015, **71**, 3–8.
- 21 C. K. Johnson, in *An introduction to thermal-motion analysis*, Crystallographic computing, ed. F. R. Ahmed, S. R. Hall and C. P. Huber, Munksgaard, Copenhagen, 1970, pp. 207–219.
- 22 L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.*, 2012, **45**, 849–854.
- 23 A. A. R. Despaigne, L. F. Vieira, I. C. Mendes, F. B. Da Costa, N. L. Speziali and H. Beraldo, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2010, **21**, 1247–1257.
- 24 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 and H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, **50**, 163–172.
- 25 A. A. Recio Despaigne, F. B. Da Costa, O. E. Piro, E. E. Castellano, S. R. W. Louro and H. Beraldo, *Polyhedron*, 2012, **38**, 285–290.
- 26 A. S. Zacchino and M. P. Gupta, *Manual de técnicas in vitro para la detección de compuestos antifúngicos*, Corpus Editorial y Distribuidora, Rosario, 2007.
- 27 R. G. Parr and W. Yang, *Density-Functional Theory of Atoms and Molecule*, Oxford University Press, Oxford, 1989.
- 28 A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 5648–5652.
- 29 C. Lee, W. Yang and R. G. Parr, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.*, 1988, **37**, 785–789.
- 30 F. Weigend and R. Ahlrichs, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2005, **7**, 3297–3305.
- 31 D. Andrae, U. Häußermann, M. Dolg, H. Stoll and H. Preuss, *Theor. Chim. Acta*, 1990, **77**, 123–141.
- 32 F. Neese, *J. Comput. Chem.*, 2003, **24**, 1740–1747.
- 33 F. Neese, F. Wennmohs, A. Hansen and U. Becker, *Chem. Phys.*, 2009, **356**, 98–109.
- 34 F. Weigend, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, **8**, 1057–1065.
- 35 J. Tomasi and B. Mennucci, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 2999–3093.
- 36 F. Neese, *Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci.*, 2012, **2**, 73–78.
- 37 ChemAxon Program, Budapest, Hungary, www.chemaxon.com/products.html.
- 38 K. Nakamoto, *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, Wiley-Interscience, New York, 1970.
- 39 A. Pérez-Rebolledo, G. M. de Lima, N. L. Speziali, O. E. Piro, E. E. Castellano, J. D. Ardisson and H. Beraldo, *J. Organomet. Chem.*, 2006, **691**, 3919–3930.
- 40 J. Patole, U. Sandbhor, S. Padhye, D. N. Deobagkar, C. E. Anson and A. Powell, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 51–55.



Silver(I) complexes with 2,6-diacetylpyridine-*bis*(benzoylhydrazones): Antifungal activity and interaction with DNA



Ane F. Santos^a, Isabella P. Ferreira^a, Carlos B. Pinheiro^b, Jacqueline A. Takahashi^a, Letícia R. Teixeira^a, H. Beraldo^{a,*}

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 August 2017

Accepted 15 September 2017

Available online 23 September 2017

Keywords:

Bis(benzoylhydrazones)

Silver(I) complexes

Crystal structures

Antifungal activity

Interaction with DNA

ABSTRACT

Complexes $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcPh})]\text{NO}_3$ (**1**), $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcPCH}_3\text{Ph})]\text{NO}_3$ (**2**), $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcPClPh})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**) and $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcPNO}_2\text{Ph})]\text{NO}_3$ (**4**) were obtained with 2,6-diacetylpyridine *bis*(benzoylhydrazone) (H2-2,6AcPh) and its *bis*(*para*-methylbenzoylhydrazone) (H2-2,6AcPCH₃Ph), *bis*(*para*-chlorobenzoylhydrazone) (H2-2,6AcPClPh), and *bis*(*para*-nitrobenzoylhydrazone) (H2-2,6AcPNO₂Ph) derivatives. Complexes (**1–4**) were characterized by microanalyses, molar conductivities, and by means of their infrared and NMR spectra. The crystal structures of (**2**) and (**3**) were determined. The *bis*(benzoylhydrazones) were inactive or poorly active against yeast and filamentous fungal strains. In several cases the antimicrobial activity increased upon coordination to silver(I). While the parent ligand revealed to be inactive, complex (**2**) proved to be as active as miconazole nitrate against *Candida albicans*. Although the *bis*(benzoylhydrazones) showed no antifungal activity, complex (**1**) proved to be as active as nystatin against *Penicillium citrinum*. In addition, complexes (**1**) and (**2**) proved to be as or more effective than nystatin against *Aspergillus parasiticus*. The silver(I) complexes strongly interact with calf thymus DNA by an intercalative mode.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Silver compounds are successfully used in therapy [1]. Silver nitrate and silver sulphadiazine are employed as components of balms to prevent wounds and burns infections [2]. Silver complexes with a variety of organic ligands proved to present anti-proliferative and antitumor effects [3] and to be active against several fungal [2] and bacterial strains [4]. Silver(I) complexes with 2-mercapto-1-methyl-imidazole, methimazole [5] and with 2-mercaptothiazole derivatives [6] were shown to have antibacterial action against *Gram* positive and *Gram* negative bacteria.

It has been suggested that silver ions react with the $-\text{NH}_2$ groups of the amino acids and proteins and inhibit a number of enzymes. It has also been suggested that silver ions bind to bacterial DNA [1,7].

Hydrazones and their metal complexes present a wide range of bioactivities as antimicrobial [8,9], antitumor [10–12] and anti-inflammatory [13] agents. We recently reported that silver(I) complexes with 3-formyl-6-methylchromone-derived hydrazones

show cytotoxic activity against melanoma tumor cells and exhibit antifungal action [14].

In a previous work we demonstrated that the cytotoxic and antimicrobial effects of *bis*(benzoylhydrazones) significantly increased upon coordination to antimony(III) and bismuth(III) [15]. In the present work silver(I) complexes were obtained with 2,6-diacetylpyridine *bis*(benzoylhydrazone) (H2-2,6AcPh), 2,6-diacetylpyridine *bis*(*para*-methylbenzoylhydrazone) (H2-2,6AcPCH₃Ph), 2,6-diacetylpyridine *bis*(*para*-chlorobenzoylhydrazone) (H2-2,6AcPClPh) and 2,6-diacetylpyridine *bis*(*para*-nitrobenzoylhydrazone) (H2-2,6AcPNO₂Ph), Fig. 1. The antimicrobial effects of the compounds under study were evaluated against *Candida* yeast and filamentous fungi. The interaction of the silver(I) complexes with DNA was investigated.

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.

* Corresponding author.

E-mail address: hberaldo@ufmg.br (H. Beraldo).

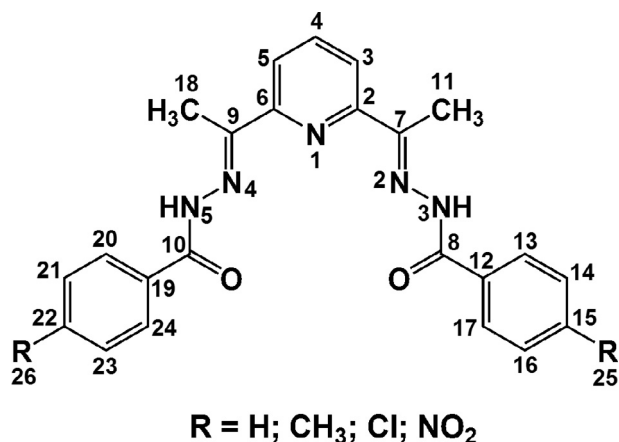


Fig. 1. Structural representation of 2,6-diacetylpyridine *bis*(benzoylhydrazones) and the carbon atoms numbering.

Thermogravimetric curves were obtained using a TGA50H thermobalance (Shimadzu) in the 25–750 °C temperature range, under a dynamic nitrogen atmosphere at a heating rate of 10 °C min⁻¹. A Digimed model DM3 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr pellets (4000–400 cm⁻¹). Electronic spectra were acquired using a Shimadzu UV-2401PC double beam UV-Vis spectrophotometer and 1 cm quartz cells. Fluorescence spectra were recorded on a Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter using a 1 cm quartz cell. NMR spectra were obtained with a Bruker DPX-400 Advance (400 MHz) spectrometer using DMSO-*d*₆ as the solvent and TMS as internal reference.

All single crystal X-ray diffraction measurements were carried out on an Oxford-Diffraction GEMINI-Ultra diffractometer using graphite-Enhance Source Mo K α radiation ($\lambda = 0.71073$ Å) at 200 (2) K. Data collection, cell refinements, and data reduction were performed using the CrysAlisPro software package [16]. Analytical absorption corrections were performed using CRYSLIS suite [16]. The structures were solved by direct methods using SUPERFLIP [17]. Full-matrix least-squares refinement procedure on F^2 with anisotropic thermal parameters was carried on using SHELXL-2017/1 [18]. Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all non-hydrogen atoms. All hydrogen atoms bound to carbon and nitrogen were refined using a riding model [19]. In complex (2) the nitrate anion is disordered over two overlapping positions. The disordered groups were refined with split atomic positions subject to N–O and O...O distances restraints of 1.24 (1) Å and 2.150 (5) Å, respectively. All the disordered atoms were refined with isotropic displacement parameters. For complex (3) the water hydrogen atoms were located in difference Fourier map and refined with distance restrained to O–H = 0.84 (1) Å and H...H = 1.33 (5) Å with $U_{iso}(H) = 1.5 U_{eq}(O)$.

2.2. Chemistry

2.2.1. Syntheses of the hydrazones

The *bis*(benzoylhydrazones) were prepared as previously reported [15]. 2,6-Diacetylpyridine *bis*(*para*-methylbenzoylhydrazone) (H2-2,6AcpCH₃Ph) is reported for the first time in the present work.

2.2.1.1. 2,6-Diacetylpyridine bis(*para*-methylbenzoylhydrazone) (H2-2,6AcpCH₃Ph). Beige solid. *Anal. Calc.* for C₂₅H₂₅N₅O₂ (%): C, 70.24; H, 5.89; N, 16.38. *Found:* C, 70.12; H, 5.69; N, 16.45. *FW:* 427.50 g mol⁻¹. *Melting point:* 262.0–263.0 °C. *IR* (KBr, cm⁻¹):

$\nu(\text{N-H})$ 3226, $\nu(\text{C=O})$ 1670, $\nu(\text{C=N})$ 1610, $\rho(\text{py})$ 638. ¹H NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm), J (Hz)]: 11.74 [s, 2H, N3–H, N5–H], 8.10–7.91 [m, 2H, H3, H5], 7.84 [d, 1H, H4, 7.40], 7.73 [d, 4H, H13, H17, H20, H24, 7.70], 7.24 [d, 4H, H14, H16, H21, H23, 8.00], 2.30 [s, 6H, H11, H18], 2.44 [s, 6H, H25, H26]. ¹³C NMR [100 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)]: 168.28 (C8, C10), 142.02 (C7, C9), 137.49 (C4), 120.77 (C3, C5), 154.54 (C2, C6), 128.62 (C13, C17, C20, C24), 129.14 (C14, C16, C21, C23), 141.57 (C15, C22), 12.74 (C11, C18), 21.43 (C25, C26). *Yield:* 95%.

2.2.2. Syntheses of silver(I) complexes (1–4)

The silver(I) complexes were obtained by stirring a methanol solution (10 mL) of the desired *bis*(benzoylhydrazones) (1.0 mmol) with an aqueous solution of AgNO₃ (3 mL) added dropwise in equimolar amount. The reaction mixture was kept under stirring in the dark at room temperature for 72 h. The obtained solids were vacuum filtered, washed with methanol followed by diethyl ether and then dried under reduced pressure.

2.2.2.1. [(2,6-Diacetylpyridine)*bis*(benzoylhydrazone)]silver(I) nitrate [Ag(H2-2,6AcpPh)]NO₃ (1). Yellow solid. *Anal. Calc.* for C₂₃H₂₁N₆O₅Ag (%): C, 48.52; H, 3.72; N, 14.76. *Found:* C, 48.59; H, 3.69; N, 14.70. *FW:* 569.32 g mol⁻¹. *Molar conductivity* (1 mM, DMF): 69.2 Ω^{-1} cm² mol⁻¹. *Melting point:* 247.4–248.8 °C. *IR* (KBr, cm⁻¹): $\nu(\text{N-H})$ 3274, $\nu(\text{C=O})$ 1624, $\nu(\text{C=N})$ 1602, $\nu(\text{NO}_3)$ 1384, $\rho(\text{py})$ 656, $\nu(\text{Ag-O})$ 530. ¹H NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm), J (Hz)]: 11.62 [s, 2H, N3–H, N5–H], 8.11 [d, 2H, H3, H5 7.60], 8.23–8.15 [m, 1H, H4], 7.91 [d, 4H, H13, H17, H20, H24, 7.50], 7.58 [t, 4H, H14, H16, H21, H23, 7.60], 7.69 [t, 2H, H15, H22, 7.30], 2.56 [s, 6H, H11, H18]. ¹³C NMR [100 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)]: 166.22 (C8, C10), 152.45 (C7, C9), 139.99 (C4), 124.69 (C3, C5), 151.39 (C2, C6), 128.36 (C13, C17, C20, C24), 128.62 (C14, C16, C21, C23), 132.75 (C15, C22), 15.15 (C11, C18). *Yield:* 68%.

2.2.2.2. [(2,6-Diacetylpyridine)*bis*(*para*-methylbenzoylhydrazone)]silver(I) nitrate [Ag(H2-2,6AcpCH₃Ph)]NO₃ (2). Yellow solid. *Anal. Calc.* for C₂₅H₂₅N₆O₅Ag (%): C, 50.26; H, 4.22; N, 14.07. *Found:* C, 49.90; H, 4.17; N, 14.43. *FW:* 597.37 g mol⁻¹. *Molar conductivity* (1 mM, DMF): 72.3 Ω^{-1} cm² mol⁻¹. *Melting point:* 241.4–243.2 °C. *IR* (KBr, cm⁻¹): $\nu(\text{N-H})$ 3232, $\nu(\text{C=O})$ 1650, $\nu(\text{C=N})$ 1610, $\nu(\text{NO}_3)$ 1384. ¹H NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm), J (Hz)]: 11.50 [s, 2H, N3–H, N5–H], 8.09 [d, 2H, H3, H5, 7.60], 8.22–8.14 [m, 1H, H4], 7.86 [d, 4H, H13, H17, H20, H24, 7.70], 7.39 [d, 4H, H14, H16, H21, H23, 7.90], 2.57 [s, 6H, H11, H18], 2.42 [s, 6H, H25, H26]. ¹³C NMR [100 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)]: 165.92 (C8, C10), 151.75 (C7, C9), 139.89 (C4), 124.31 (C3, C5), 151.26 (C2, C6), 128.34 (C13, C17, C20, C24), 129.08 (C14, C16, C21, C23), 142.97 (C15, C22), 14.86 (C11, C18), 21.12 (C25, C26). *Yield:* 34%.

2.2.2.3. [(2,6-Diacetylpyridine)*bis*(*para*-chlorobenzoylhydrazone)]silver(I) nitrate dihydrate [Ag(H2-2,6AcpClPh)]NO₃·2H₂O (3). Yellow solid. *Anal. Calc.* for C₂₃H₂₃Cl₂N₆O₇Ag (%): C, 40.97; H, 3.44; N, 12.46. *Found:* C, 41.14; H, 3.47; N, 12.75. *FW:* 674.23 g mol⁻¹. *Thermogravimetry* (25–750 °C range): *Calc.* weight loss of two water molecules: 5.33%. *Found:* 5.57%. *Molar conductivity* (1 mM, DMF): 73.7 Ω^{-1} cm² mol⁻¹. *Melting point:* 244.6–246.3 °C. *IR* (KBr, cm⁻¹): $\nu(\text{N-H})$ 3184, $\nu(\text{C=O})$ 1648, $\nu(\text{C=N})$ 1594, $\nu(\text{NO}_3)$ 1384, $\rho(\text{py})$ 684, $\nu(\text{Ag-O})$ 534. ¹H NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm), J (Hz)]: 11.68 [s, 2H, N3–H, N5–H], 8.09 [d, 2H, H3, H5 6.30], 8.23–8.13 [m, 1H, H4], 7.94 [d, 4H, H13, H17, H20, H24, 6.80], 7.63 [d, 4H, H14, H16, H21, H23, 7.60], 2.55 [s, 6H, H11, H18]. ¹³C NMR [100 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)]: 165.44 (C8, C10), 152.54 (C7, C9), 140.30 (C4), 124.80 (C3, C5), 151.10 (C2, C6), 130.47 (C13, C17, C20, C24), 128.86 (C14, C16, C21, C23), 137.72 (C15, C22), 15.13 (C11, C18). *Yield:* 81%.

2.2.2.4. [(2,6-Diacetylpyridine)bis(para-nitrobenzoylhydrazone)]silver (I) nitrate [Ag(H2-2,6AcpNO₂Ph)]NO₃ (**4**). Yellow solid. Anal. Calc. for C₂₃H₁₉N₈O₉Ag (%): C, 41.90; H, 2.90; N, 17.00. Found: C, 42.86; H, 2.94; N, 16.74. FW: 659.31 g mol⁻¹. Molar conductivity (1 mM, DMF): 71.1 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Melting point: 227.9–229.6 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(N–H) 3193, ν(C=O) 1703, ν(C=N) 1602, ν(NO₃) 1384, ρ(py) 634, ν(Ag–O) 597. ¹H NMR [400 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm), *J* (Hz)]: 11.63 [s, 2H, N3–H, N5–H], 8.07–7.87 [m, 2H, H3, H5], 8.19 [d, 1H, H4, 9.00], 8.19 [d, 4H, H13, H17, H20, H24, 9.00], 8.39 [d, 4H, H13, H17, H20, H24, 7.20], 2.66 [s, 6H, H11, H18]. ¹³C NMR [100 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 164.80 (C8, C10), 152.69 (C7, C9), 140.11 (C4), 123.61 (C3, C5), 151.95 (C2, C6), 129.89 (C13, C17, C20, C24), 138.47 (C14, C16, C21, C23), 139.44 (C15, C22), 14.64 (C11, C18). Yield: 71%.

2.3. Crystal structures analyses

Crystals of [Ag(H2-2,6AcpCH₃Ph)]NO₃ (**2**) and [Ag(H2-2,6AcpClPh)]NO₃·2H₂O (**3**) were obtained from the mother liquor in the syntheses of (**2**) and (**3**) at room temperature. The crystal structures were determined using single-crystal X-ray diffraction techniques. A summary of the crystal data, data collection details and refinement results for these compounds is listed in Table 1. Molecular graphics were prepared using ORTEP 3 for Windows [20].

2.4. Biological tests

2.4.1. Fungal strains

2.4.1.1. *Yeast. Candida albicans* (ATCC 18804) was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, USA). The tests were per-

Table 1
Crystal data and structure refinement results for [Ag(H2-2,6AcpCH₃Ph)]NO₃ (**2**) and [Ag(H2-2,6AcpClPh)]NO₃·2H₂O (**3**).

Compound	(2)	(3)
Empirical formula	C ₂₅ H ₂₅ N ₆ O ₅ Ag	C ₂₃ H ₂₃ Cl ₂ N ₆ O ₇ Ag
Formula weight (g mol ⁻¹)	597.38	674.24
<i>T</i> (K)	200(2)	200(2)
Crystal system	triclinic	triclinic
Space group	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> $\bar{1}$
<i>Unit cell dimensions</i>		
<i>a</i> (Å)	6.2408(1)	10.8147(3)
<i>b</i> (Å)	11.8002(3)	11.4278(3)
<i>c</i> (Å)	17.6045(3)	12.2545(3)
α (°)	109.084(2)	114.166(3)
β (°)	94.510(1)	105.724(2)
γ (°)	95.577(2)	98.379(2)
<i>V</i> (Å ³)	1210.96(4)	1272.00(7)
<i>Z</i>	2	2
<i>D</i> _{calc} (Mg m ⁻³)	1.638	1.76
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.882	1.06
<i>F</i> (000)	608	680
Crystal size (mm)	0.36 × 0.22 × 0.04	0.21 × 0.10 × 0.04
θ° range for data collection	2.5–26.4	2.3–26.4
Index ranges	–7 ≤ <i>h</i> ≤ 7 –14 ≤ <i>k</i> ≤ 14 –21 ≤ <i>l</i> ≤ 21	–13 ≤ <i>h</i> ≤ 13 –14 ≤ <i>k</i> ≤ 14 –15 ≤ <i>l</i> ≤ 15
Reflections collected	59774	31220
Independent reflections (<i>R</i> _{int})	4949 (0.040)	5209 (0.051)
Completeness to $\theta = 25.242^\circ$ (%)	99.9	99.9
Data/restraints/parameters	4949/12/335	5209/6/366
Goodness-of-fit (GOF) on <i>F</i> ²	1.052	1.038
Final <i>R</i> indices [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0.0345, <i>wR</i> ₂ = 0.0918	<i>R</i> ₁ = 0.0309, <i>wR</i> ₂ = 0.0647
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> ₁ = 0.0382, <i>wR</i> ₂ = 0.0948	<i>R</i> ₁ = 0.0413, <i>wR</i> ₂ = 0.0689
Largest diff. peak and hole (e Å ⁻³)	1.694 and –0.899	0.665 and –0.741

formed in Sabouraud (SBD) medium. The *Candida* strain was 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 1–2 × 10⁸ CFU mL⁻¹ (CFU = colony forming units) determined by a spectrophotometric method.

2.4.1.2. *Filamentous fungi. Aspergillus parasiticus* (ATCC 15517) and *Penicillium citrinum* (ATCC 756) strains were used in the evaluation of the antifungal effect of the studied compounds. The fungal strains were maintained in potato dextrose agar (PDA) under refrigeration at 7 °C. The tests were performed in Broth Heart Infusion (BHI) medium. The fungal spores were counted in a Neubauer chamber. Dilutions were carried out to achieve the required final concentration of spores of 5.0 × 10³ spores mL⁻¹.

2.4.2. 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 [21]. 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 to obtain 500 µg 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 inocula were added and the microplates were incubated at 37 °C for 24 h for *Candida* species and for 48 h for filamentous fungi. 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. The half maximal inhibitory concentrations 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% (IC₅₀) reduction of growth compared with the control growth in the culture medium free of the test compound (positive control). GraphPad Prism version 6.0 for windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com) was used for IC₅₀ determinations.

2.5. DNA binding studies

Stock solution of deoxyribonucleic acid from calf thymus (CT-DNA) in Tris–HCl buffer (NaCl 50 mM/Tris–HCl 5 mM, pH 7.20) was prepared by shaking in an orbital shaker at 120 rpm at 37 °C for 24 h. Then, the concentration of CT-DNA was calculated using the absorption intensity at 260 nm and the molar absorption coefficient (ϵ) value at this wavelength (6600 M⁻¹ cm⁻¹) [22]. The stock solutions of the complexes were freshly prepared by first dissolving the compounds 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.

Absorption titration experiments were performed at 298 K by increasing the concentration of CT-DNA via successive additions of its stock solution on a fixed concentration of complex (ca. 30 µM). 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 5 min before recording each spectrum.

Competitive intercalation experiments were performed at 298 K employing the ethidium bromide (EB) intercalator.

A working solution containing 10 μM of CT-DNA with 10 μM of EB was prepared in Tris–HCl buffer. During the experiment, a portion of 3.0 mL of the DNA-EB solution was titrated with repeated aliquots of the silver(I) complexes (1.0 mM, stock solution freshly prepared 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 [23]. The experiments were carried out until the fluorescence reached 20–40% of the initial intensity.

3. Results and discussion

3.1. Formation of the silver(I) complexes

Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcPh})]\text{NO}_3$ (**1**), $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcPCH}_3\text{Ph})]\text{NO}_3$ (**2**), $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcPClPh})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**) and $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcPNO}_2\text{Ph})]\text{NO}_3$ (**4**), in which a neutral *bis*(benzoylhydrazone) ligand is attached to the metal center and a nitrate acts as counter ion. In complex (**3**) two crystallization water molecules are also present, as confirmed by its thermogravimetric curve, which shows a weight loss of 5.57% (calcd. 5.33%).

3.2. Spectroscopic characterization

3.2.1. Infrared spectra

The vibrations attributed to $\nu(\text{N-H})$ at 3276–3226 cm^{-1} in the infrared spectra of the *bis*(benzoylhydrazones) are observed at 3274–3184 cm^{-1} in the spectra of complexes (**1–4**), in accordance with the presence of neutral ligands. The $\nu(\text{C=N})$ vibration at 1610–1576 cm^{-1} in the infrared spectra of the *bis*(benzoylhydrazones) shifts to 1602–1594 cm^{-1} in the spectra of complexes (**1–4**), in agreement with coordination of the azomethine nitrogen [15]. The $\nu(\text{C=O})$ absorption observed at 1671–1663 cm^{-1} in the spectra of the free ligands shifts to 1703–1624 cm^{-1} in the spectra of complexes (**1–4**), indicating coordination through the oxygen. The in-plane deformation mode of the pyridine ring at 658–634 cm^{-1} in the spectra of the uncomplexed *bis*(benzoylhydrazones) shifts to 684–634 cm^{-1} in complexes (**1–4**), suggesting coordination of the hetero-aromatic nitrogen [15]. Therefore in the complexes the *bis*(benzoylhydrazones) are attached to the metal center through the O–N–N_{py}–N–O chelating system. Additionally, an absorption observed at 1384 cm^{-1} in the spectra of (**1–4**) was attributed to the $\nu(\text{NO}_3)$ vibration [24].

3.2.2. NMR spectra

The NMR spectra of the *bis*(benzoylhydrazones) and their silver (I) complexes were recorded in DMSO-*d*₆ because this is the only solvent which dissolves all ligands and complexes. 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 heteronuclear multiple quantum coherence experiments (HMQC). The signals of the hydrogens and carbons undergo significant shifts in complexes (**1–4**) relative to their position in the uncomplexed *bis*(benzoylhydrazones). In the ¹H NMR spectra of the hydrazones the signals of N3–H and N5–H at δ 10.96–11.30 are characteristic of the *E* configuration, in which N3–H and N5–H are hydrogen bonded to the solvent [12]. Integration is compatible with the presence of two hydrogens. In the spectra of the silver (I) complexes integration also reveals the presence of two hydrogens, indicating that the *bis*(benzoylhydrazones) coordinate as neutral ligands. The signals of the pyridine carbons and of C7, C9

and C8, C10 undergo significant shifts on coordination, in accordance with complexation through the heteroaromatic nitrogen, the carbonyl oxygen and the imine carbon [15].

3.3. Structures analyses

Table 2 shows selected bond distances and angles in the structures of $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcPCH}_3\text{Ph})]\text{NO}_3$ (**2**) and $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcPClPh})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**). Both compounds crystallized in the triclinic space group $P\bar{1}$, with $Z = 2$.

As shown in Fig. 2, in the ORTEP representation of complexes (**2**) and (**3**) a neutral pentadentate *bis*(benzoylhydrazone) ligand is attached to the silver(I) center. Concerning the geometry around the metal, the O1, N2, N1, N4 and O2 atoms are located in one plane. In (**2**) and (**3**) the *bis*(benzoylhydrazone) skeleton is nearly planar [rms deviation of atoms from the Ag1, O1, N2, N1, N4, O2 least-squares plane of 0.1654 Å (**2**) and 0.1493 Å (**3**)] with the metal ion laying close onto this plane at 0.2097 (10) Å in (**2**) and at 0.2949 (8) in (**3**).

The central angle of a regular pentagon is 72° while in the structures of (**2**) and (**3**), due to the geometric requirements of the *bis*(benzoylhydrazone) ligand, the O1–Ag1–O2 angles are 99.20(7)° (**2**) and 92.76(5)° (**3**) and the remaining O–Ag–N and N–Ag–N angles are in the 64.30–66.27° range.

In both complexes (**2**) and (**3**) each arm of the *bis*(benzoylhydrazone) adopts the *EZ* configuration in relation to the C7–N2, C9–N4 and N3–C8, N5–C10 bonds, as previously observed in the structures of antimony(III) and bismuth(III) complexes with *bis*(benzoylhydrazone) ligands [15].

3.4. Antifungal activity

Table 3 reports the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of the studied compounds against *Candida* yeast and against *Aspergillus* and *Penicillium* strains. The *bis*(benzoylhydrazones) were

Table 2
Selected bond lengths (Å) and angles (°) for $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcPCH}_3\text{Ph})]\text{NO}_3$ (**2**) and $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcPClPh})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**3**).

Bond lengths (Å)	(2)	(3)
Ag1–O1	2.495(2)	2.4146(17)
Ag1–O2	2.469(2)	2.4715(16)
Ag1–N2	2.450(2)	2.4145(19)
Ag1–N4	2.466(2)	2.407(2)
Ag1–N1	2.438(2)	2.4131(19)
O1–C8	1.227(4)	1.231(3)
O2–C10	1.228(3)	1.232(3)
N3–C8	1.362(4)	1.364(3)
N5–C10	1.369(4)	1.362(3)
N3–N2	1.367(3)	1.376(3)
N5–N4	1.369(3)	1.381(3)
N2–C7	1.276(4)	1.275(3)
N4–C9	1.272(4)	1.285(3)
Bond Angles (°)	(2)	(3)
N2–Ag1–O1	65.24(8)	65.97(6)
N4–Ag1–O1	163.43(8)	155.07(6)
O1–Ag1–O2	99.20(7)	92.76(5)
N4–Ag1–O2	64.30(7)	65.13(6)
N2–Ag1–O2	154.98(8)	155.16(6)
N1–Ag1–O1	130.62(8)	129.18(6)
N1–Ag1–O2	127.30(7)	128.73(6)
N1–Ag1–N4	64.80(8)	66.27(7)
N1–Ag1–N2	65.41(8)	65.62(7)
N2–Ag1–N4	129.41(8)	131.71(7)
C8–O1–Ag1	117.6(2)	117.24(15)
C10–O2–Ag1	118.07(19)	117.20(15)
N3–N2–Ag1	116.47(18)	115.72(13)
N5–N4–Ag1	115.63(16)	116.93(14)
C7–N2–Ag1	121.88(19)	123.31(16)
C9–N4–Ag1	121.53(19)	122.71(16)

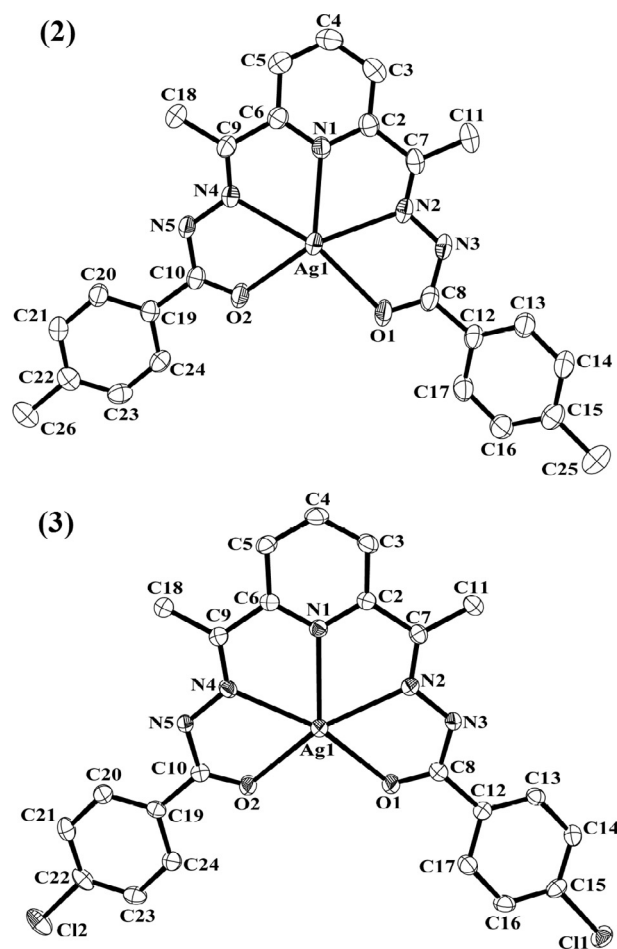


Fig. 2. Molecular plots of $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})]\text{NO}_3$ (2) and $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpClPh})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3), showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level. The hydrogen atoms are omitted for clarity.

inactive against *C. albicans*. In most of the cases the antimicrobial activity against the yeast and filamentous fungi improved upon coordination to silver(I). While the parent ligand revealed to be inactive, complex (2) proved to be as active as miconazole nitrate against *C. albicans*. The bis(benzoylhydrazones) were inactive or poorly active against the *Aspergillus* and *Penicillium* strains. As in the case of the yeast, although the parent bis(benzoylhydrazones) showed no antifungal activity, complex (1) proved to be as active

Table 3
IC₅₀ values for the bis(benzoylhydrazones) and their silver(I) complexes against *Candida albicans* (ATCC 18804), *Aspergillus parasiticus* (ATCC 15517) and *Penicillium citrinum* (ATCC 756).

Compound		IC ₅₀ (μM)		
		<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
H2-2,6AcPh		–	47.9 ± 1.9	>156
$[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcPh})]\text{NO}_3$	(1)	33.8 ± 0.6	59.9 ± 2.7	23.2 ± 5.0
H2-2,6AcpCH ₃ Ph		–	–	68.1 ± 1.3
$[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})]\text{NO}_3$	(2)	5.7 ± 0.6	66.7 ± 1.8	34.6 ± 2.9
H2-2,6AcpClPh		–	>66	–
$[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpClPh})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(3)	35.0 ± 2.9	>95	>47
H2-2,6AcpNO ₂ Ph		–	–	–
$[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpNO}_2\text{Ph})]\text{NO}_3$	(4)	74.4 ± 0.9	>183	50.6 ± 2.0
AgNO ₃		40.3 ± 1.5	>183	24.6 ± 2.9
Miconazole nitrate		5.8 ± 2.3	<0.3	<0.3
Nystatin		4.7 ± 1.2	76.0 ± 1.1	30.7 ± 1.2

IC = inhibitory concentration; – Inactive.

as nystatin against *P. citrinum*. In addition, complexes (1) and (2) proved to be as or more active than nystatin against *A. parasiticus*.

3.5. DNA binding studies

3.5.1. Electronic spectral studies

The absorption spectra of (1–4) were recorded in the absence and in the presence of increasing concentrations of CT-DNA. Upon addition of DNA a significant hypochromism was observed at the wavelength of maximum absorption (Fig. 3A). This behavior is in accordance with an intercalative binding mode, since hypochromism occurs due to π -stacking interactions between aromatic groups and the DNA base pairs, as in the case of classical intercalators such as ethidium bromide (EB) [25].

In order to quantitatively determine the non-covalent binding strength, the intrinsic binding constants (K_b) of (1–4) with CT-DNA were obtained from Eq. (1) as previously reported [26].

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\varepsilon_a - \varepsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} \quad (1)$$

where [DNA] is the concentration of DNA base pairs, ε_a is the molar absorption coefficient of the complex at a given DNA concentration, ε_f is the molar absorption coefficient of the complex in free solution and ε_b is the molar absorption coefficient of the complex when fully bound to DNA. As shown in Fig. 3B, the plot of $[\text{DNA}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ versus [DNA] gives $1/(\varepsilon_b - \varepsilon_f)$ as slope and $1/(K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f))$ as the intercept.

The intrinsic binding constant K_b is calculated as the ratio between slope and intercept. The determined K_b values are shown in Table 4.

3.5.2. Competitive binding between ethidium bromide (EB) and complexes (1–4) for CT-DNA

Steady-state competitive binding experiments were undertaken to get further proof for the binding of the complexes to DNA. Fig. 4A shows the emission spectra of EB bound to DNA in the absence and presence of complex (2). The EB-DNA system shows a strong emission at 602 nm when the excitation wavelength is 545 nm. In all cases a remarkable reduction in the emission intensity was observed in the presence of the silver(I) complexes, presumably due to the reduction in the number of binding sites on DNA available for EB.

The apparent binding constants (K_{app}) were calculated from Eq. (2) [26] where $K_{EB} = 1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $[\text{EB}] = 10^{-5} \text{ M}$, and [Q] is the quencher concentration when the fluorescence intensity of EB is 50%. K_{app} is obtained from the plot F_0/F versus [Q] (Fig. 4B), when $F_0/F = 2$, in which F_0 is the fluorescence intensity in the absence of quencher and F is the fluorescence intensity in the presence of the quencher.

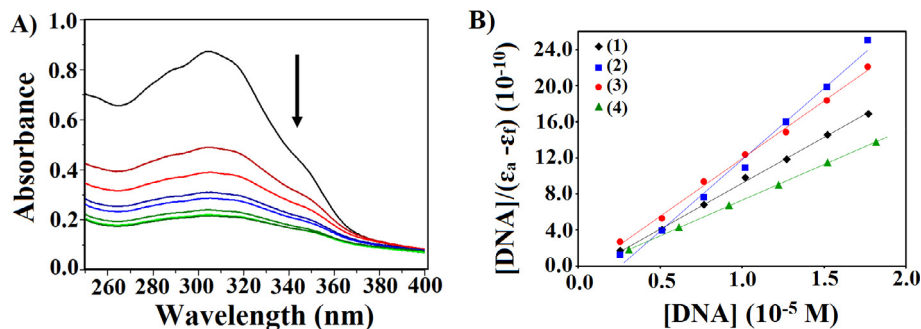


Fig. 3. (A) UV-vis spectra of $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})]\text{NO}_3$ (**2**) in the absence and in the presence of increasing amounts of CT-DNA. The arrows show the changes upon increasing amounts of CT-DNA (hypochromic effect). (B) Scatchard plots of $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$ for silver(I) complexes (**1–4**). ($[\text{DNA}] = 0\text{--}20 \mu\text{M}$, $[\text{Complexes}] = 30 \mu\text{M}$ at 25°C in Tris-HCl buffer, pH 7.2).

Table 4

Intrinsic binding constant (K_b), concentration required to reduce 50% of the fluorescence of EB-DNA system (C_{50}) and apparent binding constant (K_{app}) for the competitive binding between EB bound to CT-DNA and silver(I) complexes (**1–4**).

Compound		K_b (10^6 M^{-1})	K_{sv} (10^4 M^{-1})	C_{50} (μM)	K_{app} (10^6 M^{-1})
$[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcPh})]\text{NO}_3$	(1)	1.07 ± 0.17	0.67 ± 0.02	38.50	2.60
$[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})]\text{NO}_3$	(2)	3.95 ± 0.69	1.25 ± 0.05	38.50	2.60
$[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpClPh})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(3)	1.54 ± 0.31	2.26 ± 0.08	56.60	1.77
$[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpNO}_2\text{Ph})]\text{NO}_3$	(4)	1.34 ± 0.02	1.53 ± 0.05	47.62	2.10

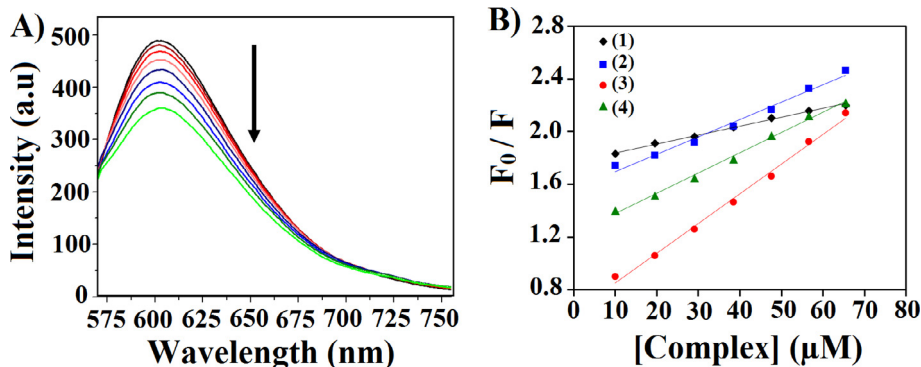


Fig. 4. (A) Fluorescence quenching spectra ($\lambda_{exc} = 545 \text{ nm}$) for EB-DNA in the absence and presence of increasing amounts of $[\text{Ag}(\text{H}2\text{-}2,6\text{AcpCH}_3\text{Ph})]\text{NO}_3$ (**2**). The arrows show the changes in intensity at increasing concentrations of (**2**). (B) Stern-Volmer Plots of relative EB-DNA fluorescence intensity F_0/F versus $[\text{complex}]$ for complexes (**1–4**). ($[\text{Complexes}] = 0\text{--}80 \mu\text{M}$; $[\text{DNA}] = 10 \mu\text{M}$ and $[\text{EB}] = 10 \mu\text{M}$).

$$K_{EB}[\text{EB}] = K_{app}[Q] \quad (2)$$

The quenching Stern-Volmer constant (K_{sv}) was calculated using the classical Stern-Volmer Eq. (3) [27].

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] \quad (3)$$

The C_{50} values were obtained from the plot of fluorescence intensity versus $[\text{complex}]$ when fluorescence is 50% of the initial fluorescence. The C_{50} values (μM) and K_{app} (10^6 M^{-1}) are shown in Table 4.

The Stern-Volmer constants in the order of 10^4 M^{-1} were comparable to the value recently reported by other authors for the $[\text{Ag}(\text{Nam})_2]\text{NO}_3$ complex with nicotinamide [28].

The obtained K_{app} values are similar to the value reported in the literature for the antitumor intercalating agent actinomycin D ($K_{app} = 9.69 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) [29]. The high values obtained for K_b and K_{app} indicate strong affinity of the complexes under study for DNA. These values are higher than those reported by other authors for silver(I) complexes containing 5,5-diethylbarbiturate and monophosphine ligands (K_b and K_{app} values in the order of 10^5 M^{-1}) [30].

4. Conclusions

In the present work Ag(I) complexes with a family of bis(benzoylhydrazones) were obtained and their antimicrobial effects were evaluated against *Candida* yeast and filamentous fungi. Except for H2-2,6AcPh, the bis(benzoylhydrazones) proved to be inactive against *C. albicans*. Upon coordination to silver(I) antifungal activity significantly improved. Although the bis(benzoylhydrazone) ligands proved to be inactive or poorly active against the filamentous fungi, their silver(I) complexes showed antifungal activity against *Aspergillus* and *Penicillium* strains. Some of the complexes were as active as the reference drug nystatin.

The structural planarity of the complexes under study together with the presence of aromatic rings probably favor their binding to DNA by intercalation, with π -stacking interactions between the aromatic groups and the DNA base pairs. In addition, silver(I) ions were shown to covalently bind to DNA [31,32]. Therefore, although investigations on the mechanism of the antimicrobial activity of complexes (**1–4**) were beyond the scope of the present work, intercalation of the planar compounds into DNA together with binding of silver(I) to DNA might be part of their mode of action.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge CNPq, Capes and INCT-INO-FAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6) for financial support and student grants.

Appendix A. Supplementary data

CCDC 1566453 and 1566454 contains the supplementary crystallographic data for (2) and (3). These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, 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 <https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.09.019>.

References

- [1] A. Rusu, G. Hancu, A.C. Munteanu, V. Uivarosi, J. Organomet. Chem. 839 (2017) 19, <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.02.023>.
- [2] J.M.S. Cardoso, S.I. Guerreiro, A. Lourenço, M.M. Alves, M.F. Montemor, N.P. Mira, J.H. Leitão, M.F.N.N. Carvalho, PLoS ONE 12 (2017) 1, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177355>.
- [3] C.N. Banti, S.K. Hadjikakou, Metallomics 5 (2013) 569, <https://doi.org/10.1039/c3mt00046j>.
- [4] W.R. Lustrí, S.C. Lazarini, B.C. Lustrí, P.P. Corbi, M.A.C. Silva, F.A.R. Nogueira, R. Aquino, A.C. Amaral, O.T. Filho, A.C. Massabni, H.S. Barud, J. Mol. Struct. 1134 (2017) 386, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.12.056>.
- [5] I. Sainis, C.N. Banti, A.M. Owczarzak, L. Kyros, N. Kourkoumelis, M. Kubicki, S.K. Hadjikakou, J. Inorg. Biochem. 160 (2016) 114, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.12.013>.
- [6] L. Kyros, C.N. Banti, N. Kourkoumelis, M. Kubicki, I. Sainis, S.K. Hadjikakou, J. Biol. Inorg. Chem. 19 (2014) 449, <https://doi.org/10.1007/s00775-014-1089-6>.
- [7] D. Chudobova, L. Nejdil, J. Gumulec, O. Krystofova, M.A.M. Rodrigo, J. Kynicky, B. Ruttkey-Nedecky, P. Kopel, P. Babula, V. Adam, R. Kizek, Int. J. Mol. Sci. 14 (2013) 13592, <https://doi.org/10.3390/ijms140713592>.
- [8] S. Rollas, S.G. Küçükgülzel, Molecules 12 (2007) 1910, <https://doi.org/10.3390/12081910>.
- [9] Ł. Popiołek, A. Biernasiuk, Saudi Pharm J. (2017), <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.05.006> (in press).
- [10] I.P. Ferreira, E.D.L. Piló, A.A. Recio-Despaigne, J.G.D. Silva, J.P. Ramos, L.B. Marques, P.H.D.M. Prazeres, J.A. Takahashi, E.M. Souza-Fagundes, W. Rocha, H. Beraldo, Bioorg. Med. Chem. 24 (2016) 2988, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.007>.
- [11] C.V. Garcia, G.L. Parrilha, B.L. Rodrigues, S.F. Teixeira, R.A. Azevedo, A.K. Ferreira, H. Beraldo, New J. Chem. 40 (2016) 7379, <https://doi.org/10.1039/c6nj00050a>.
- [12] A.A.R. Despaigne, G.L. Parrilha, J.B. Izidoro, P.R. Costa, R.G. Santos, O.E. Piro, E.E. Castellano, W.R. Rocha, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 50 (2012) 163, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.01.051>.
- [13] T.F.D. Silva, W.B. Júnior, M.S.A. Moreira, F.N. Costa, C.E.S. Monteiro, F.F. Ferreira, R.C.R. Barroso, F. Noêl, R.T. Sudo, G. Zapata-Sudo, L.M. Lima, E.J. Barreiro, Molecules 20 (2015) 3067, <https://doi.org/10.3390/molecules20023067>.
- [14] L.V. Tamayo, A.F. Santos, I.P. Ferreira, V.G. Santos, M.T.P. Lopes, H. Beraldo, Biometals 30 (2017) 379, <https://doi.org/10.1007/s10534-017-0013-2>.
- [15] K.S.O. Ferraz, N.F. Silva, J.G. Silva, L.F. Miranda, C.F.D. Romeiro, E.M. Souza-Fagundes, I.C. Mendes, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 53 (2012) 98, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.03.040>.
- [16] CrysAlisPro: Version 1.171.38.43 (Rigaku OD), Oxford Diffraction, Yarnton, England, 2015.
- [17] L. Palatinus, G. Chapuis, J. Appl. Crystallogr. 40 (2007) 786, <https://doi.org/10.1107/S0021889807029238>.
- [18] G.M. Sheldrick, Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun. 71 (2015) 3, <https://doi.org/10.1107/S2053229614024218>.
- [19] C.K. Johnson, in: F.R. Ahmed, S.R. Hall, C.P. Huber (Eds.), An Introduction to Thermal-Motion Analysis, Crystallographic Computing, Munksgaard, Copenhagen, 1970, pp. 207–219.
- [20] L.J. Farrugia, J. Appl. Cryst. 45 (2012) 849, <https://doi.org/10.1107/S0021889812029111>.
- [21] A.S. Zacchino, M.P. Gupta, Manual de técnicas in vitro para la detección de compuestos antifúngicos, Corpus Editorial y Distribuidora, Rosario, 2007.
- [22] M.E. Reichmann, S.A. Rice, C.A.P. Doty, J. Am. Chem. Soc. 76 (1954) 3047, <https://doi.org/10.1021/ja01640a067>.
- [23] T.C. Jenkins, in: K.R. Fox (Ed.), Drug-DNA interaction protocols, Humana Press, New Jersey, 1997, pp. 195–218.
- [24] M.S. Refat, Spectrochim. Acta, Part A 68 (2007) 1393, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2006.12.078>.
- [25] E.C. Long, J.K. Barton, Acc. Chem. Res. 23 (1990) 271, <https://doi.org/10.1021/ar00177a001>.
- [26] J.G.D. Silva, A.A. Recio-Despaigne, S.R.W. Louro, C.C. Bandeira, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem. 65 (2013) 415, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.04.036>.
- [27] S. Mistry, H. Puschmann, S.C. Manna, Polyhedron 115 (2016) 155, <https://doi.org/10.1016/j.poly.2016.05.003>.
- [28] M. Rendošová, Z. Vargová, J. Kuchár, D. Sabolová, Š. Levoča, J. Kudláčová, H. Paulíková, D. Hudcová, V. Helebrandtová, M. Alnáši, J. Inorg. Biochem. 168 (2017) 1, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.12.003>.
- [29] A. Kellett, M. O'Connor, M. McCann, M. McNamara, P. Lynch, G. Rosair, V. McKee, B. Creaven, M. Walsh, S. McClean, A. Foltyn, D. O'Shea, O. Howe, M. Devereux, Dalton Trans. 40 (2011) 1024, <https://doi.org/10.1039/c0dt01607a>.
- [30] V.T. Yilmaz, C. Işel, J. Batur, S. Aydinlik, M. Cengiz, O. Buyukgungor, Dalton Trans. 46 (2017) 8110, <https://doi.org/10.1039/C7DT01286A>.
- [31] A. Ono, S. Cao, H. Togashi, M. Tashiro, T. Fujimoto, T. Machinami, S. Oda, Y. Miyake, I. Okamoto, Y. Tanaka, Chem. Commun. 39 (2008) 4825, <https://doi.org/10.1039/b808686a>.
- [32] H. Arakawa, J.F. Neault, H.A. Tajmir-Riahi, Biophys. J. 81 (2001) 1580, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75812-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75812-2).

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 / Published online: 13 April 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.

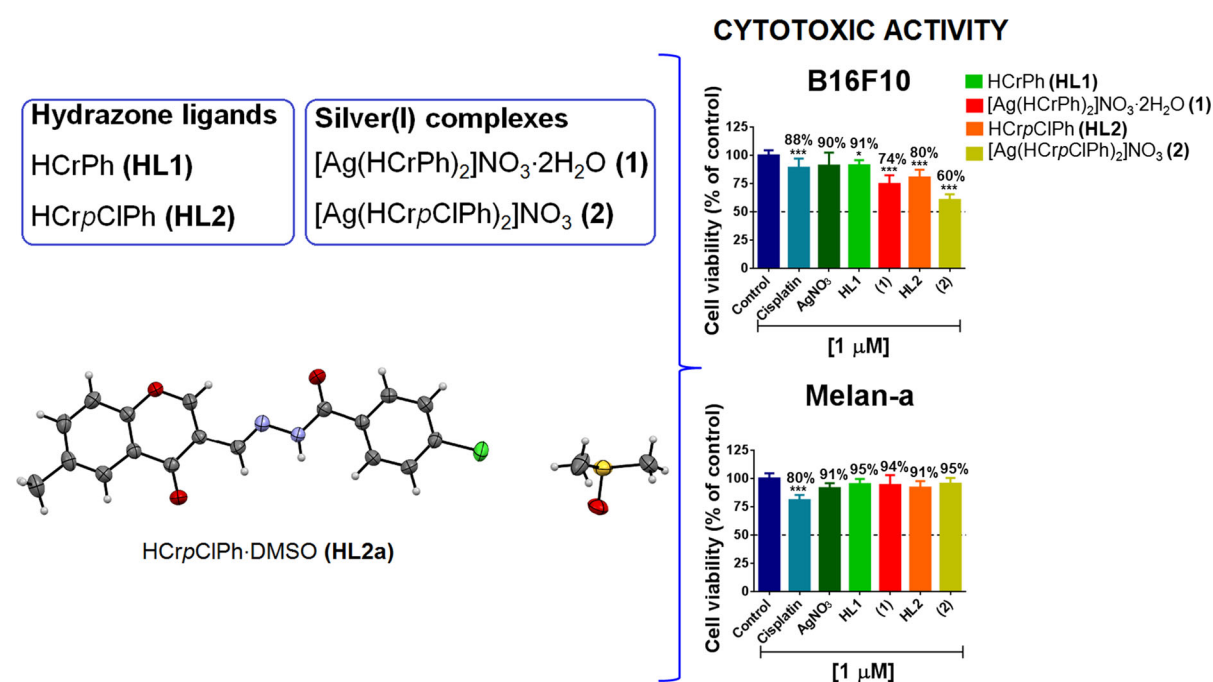
Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10534-017-0013-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

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 benzannulated 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 Küçükgül 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

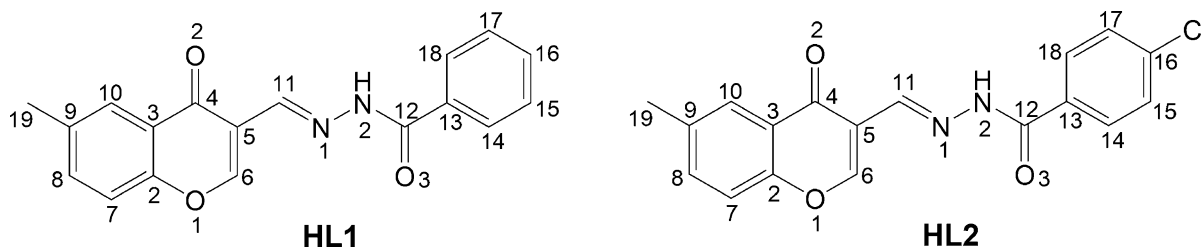


Fig. 1 Structural representation of 3-formyl-6-methylchromone-phenyl hydrazone (HCrPh, **HL1**) and 3-formyl-6-methylchromone-*para*-chloro-phenyl hydrazone (HCrpClPh, **HL2**)

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-UFGM) using graphite-Enhance Source Mo $K\alpha$ 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 (I–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)

Write 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]NO₃·2H₂O (I)

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]NO₃ (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 θ = 26.37° (%)	100.0
Data/restraints/parameters	4035/0/260
Goodness-of-fit on F ²	1.021
Final R indices [I > 2σ(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)_{hidrazonic}, 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

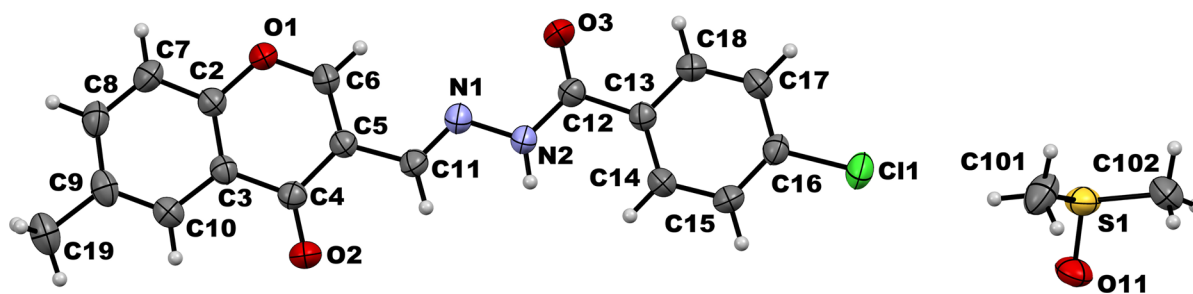


Fig. 2 Molecular plot of HCrpCIPh-DMSO (**HL2a**) showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level

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 (IC₅₀) 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 (μmol 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 ·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 μmol/L

the molecular packing, N2–H···O11 hydrogen bonds are formed involving the hydrazone molecule and the oxygen atom of DMSO [d(N2···O11ⁱ) = 2.898(3) Å, ∠(N2–H···O11ⁱ) = 170(2)°, symmetry operation: *i* = –*x* + 1, –*y* + 1, –*z* + 1].

The C12=O3 (1.217(3) Å) and C11=N1 (1.267(3) Å) bond distances are characteristic of a double bond while the N1–N2 bond distance of 1.384(2) Å 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 μg mL⁻¹. Determination of IC₅₀ 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 IC₅₀ 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).

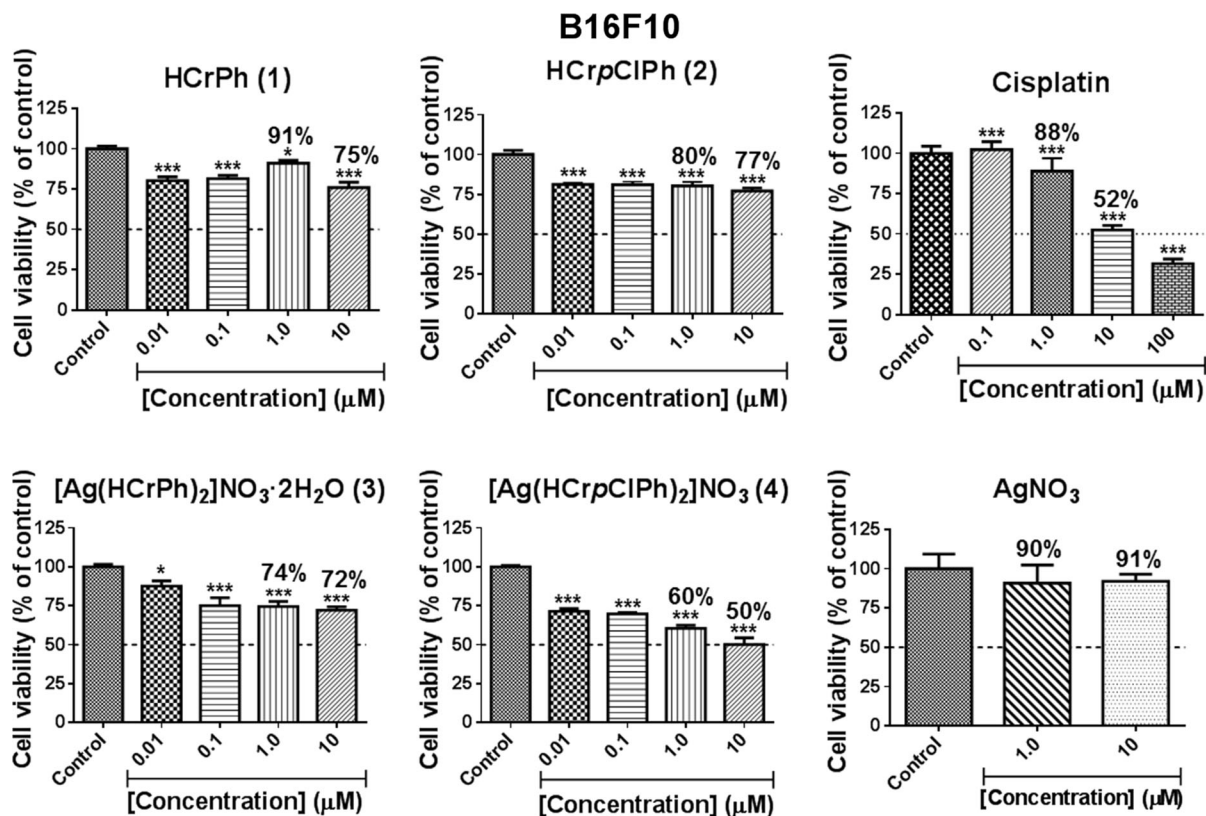


Fig. 3 Cytotoxic activity of hydrazones (HL1–HL2), their silver(I) complexes (1–2), AgNO₃ and cisplatin on B16F10 (metastatic murine melanoma) cells. Cells were treated with increasing concentrations of the compounds (0.01–10 μM) for 72 h and cell viability was determined by the MTT colorimetric

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

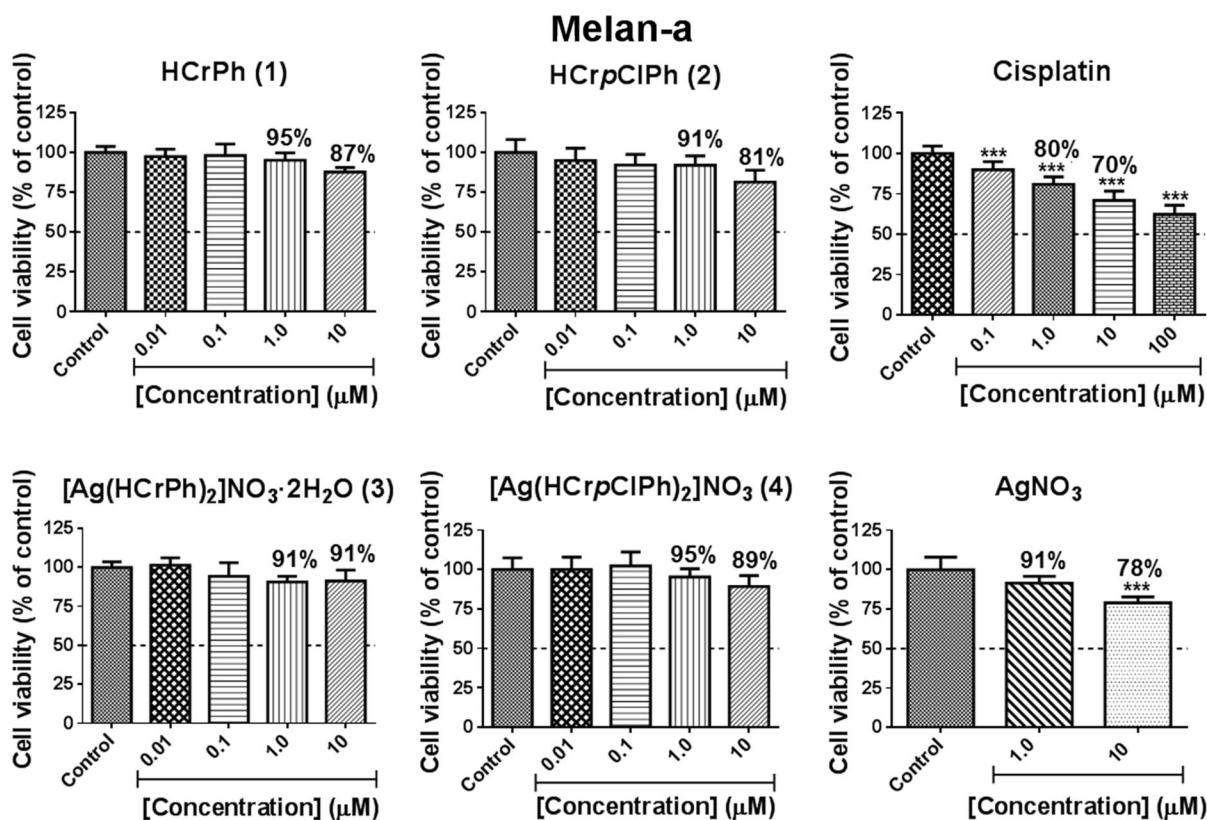


Fig. 4 Cytotoxic activity of hydrazones (HL1–HL2), their silver(I) complexes (1–2), AgNO₃ and cisplatin on Melan-a (non-tumorigenic murine melanocyte) cells. Cells were treated with increasing concentrations of the compounds (0.01–10 μM) for 72 h and cell viability was determined by the MTT

colorimetric assay. Values are expressed as the mean ± 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

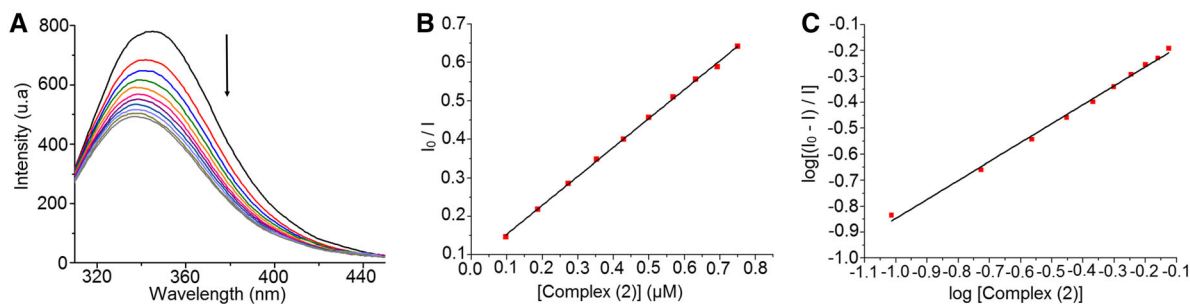


Fig. 5 **A** The emission spectrum of BSA (2.0 μM, Tris–HCl, pH 7.2, T = 25 °C) in the presence of 0 to 0.75 μM of complex (2). The arrow shows the fluorescence quenching upon

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).

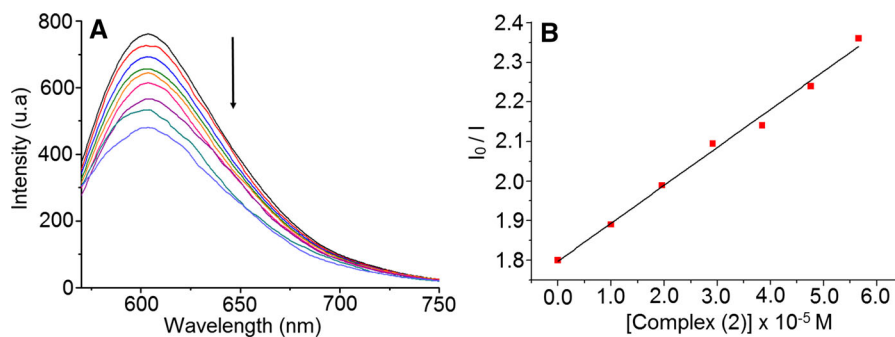


Fig. 6 **A** Emission spectra of EB bound to DNA in the absence and presence of complex (2); the arrow shows the changes in intensity at increasing concentrations of complex (2). **B** Stern–

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, Kruszka 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 Gejji 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, Alzuet 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, Szabłowska-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]NO₃. *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, Cimarelli 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
- Popiołek 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. *Biometals* 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