

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

Ana Paula Araujo de Oliveira

**Novos candidatos a protótipos de fármacos e metalofármacos antimicrobianos e
antineoplásicos biorredutíveis à base de hidrazonas e tiossemicarbazonas
funcionalizadas com nitroimidazol e nitrobenzeno**

**Belo Horizonte
2020**

UFMG/ICEx/DQ – 1.399^a

T. 636^a

Ana Paula Araujo de Oliveira

Novos candidatos a protótipos de fármacos e metalofármacos antimicrobianos e antineoplásicos biorredutíveis à base de hidrazonas e tiossemicarbazonas funcionalizadas com nitroimidazol e nitrobenzeno

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.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Heloisa de Oliveria Beraldo

**Belo Horizonte
2020**

Ficha Catalográfica

O48n Oliveira, Ana Paula Araujo de
2020 Novos candidatos a protótipos de fármacos e
T metalofármacos antimicrobianos e antineoplásicos
biorredutíveis à base de hidrazonas e
tiossemicarbazonas funcionalizadas com nitroimidazol e
nitrobenzeno [manuscrito] / Ana Paula Araujo de
Oliveira. 2020.
[xix], 126 f.: il.

Orientadora: Heloisa de Oliveira Beraldo.

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

1. Química inorgânica - Teses 2. Complexos metálicos
- Teses 3. Antimicrobianos - Teses 4. Agentes
antineoplásicos - Teses 5. Antiparasitários - Tese I.
Beraldo, Heloisa de Oliveira - Orientadora II. Título

CDU 043

**"Novos Candidatos a Protótipos de Fármacos e Metalofármacos
Antimicrobianos e Antineoplásicos Biorredutíveis à Base de Hidrazonas e
Tiossemicarbazonas Funcionalizadas com Nitroimidazol e Nitrobenzeno"**

Ana Paula Araujo de Oliveira

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Heloisa de Oliveira Beraldo
Prof. Heloisa de Oliveira Beraldo - Orientadora

UFMG

Lidia Moreira Lima
Prof. Lidia Moreira Lima

UFRJ

Julio Santos Rebouças
Prof. Julio Santos Rebouças

UFPB

Rosimíriam Pereira de Freitas
Prof. Rosimíriam Pereira de Freitas

UFMG

Cynthia Peres Demicheli
Prof. Cynthia Peres Demicheli

UFMG

Belo Horizonte, 04 de março de 2020.

Esse trabalho é dedicado ao meu pai (*in
memoriam*), minha mãe e meus irmãos
que sempre cuidaram de mim, apesar da
distância. Obrigada!

Agradecimentos

A Deus pela proteção, e por ter me fortalecido durante toda minha caminhada.

Aos meus pais Maria Célia e Raimundo (*in memoriam*) e meus irmãos Neto, Rene, Raiana e Estela, obrigada pelo investimento, por acreditar em mim e me apoiar em todos os momentos.

Aos meus sobrinhos Gabriel, Luisa, Mathias, Helena e Ana Liz, e afilhado Davi pelo carinho e paciência com minha ausência, e por sempre me receber com muito amor e alegria.

Aos meus familiares e cunhados que sempre me incentivaram, obrigada por tudo!

Ao meu namorado Odilon por todo companheirismo, compreensão, atenção e amor.

À professora Heloisa Beraldo pela orientação, confiança, dedicação, apoio e incentivo durante toda a minha jornada da pós-graduação.

Aos colegas e amigos do laboratório 290, em especial Gabrieli, Jennifer, Andrea, Victoria, Gabriel, Graziela e Clara pela ajuda, amizade, apoio e cafês durante todo esse tempo.

Aos professores do Departamento de Química pela ajuda e aprendizado ao longo desses seis anos.

A todos os funcionários da pós-graduação em Química da UFMG. Obrigada pelo acolhimento, atenção e carinho.

Aos meus novos amigos de Belo Horizonte, que trouxe leveza para minha vida e amenizaram a saudade de casa. Em especial à Samara por estar comigo durante esses 10 anos.

Aos meus antigos amigos que, embora longe, sempre esteve presente na minha vida.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

Resumo

Foram obtidas 2-acetilpiridina-4-nitroimidazolhidrazona (HL1), 2-acetilpiridina-2-nitroimidazolhidrazona (HL2) e 2-benzoilpiridina-4-nitroimidazolhidrazona (HL3). Os compostos foram inativos contra células de macrófagos J774.A1. HL1 e HL3 exibiram atividade contra *Leishmania chagasi*, enquanto HL2 mostrou-se inativo, sugerindo que a presença do grupo 4-nitro provavelmente favorece a ação antiparasitária.

2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitroimidazolhidrazona (H₂L4) e 2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitrobenzenohidrazona (H₂L5) e seus complexos [Sb(HL)Cl₂] (**1-2**), e [Bi(HL)Cl₂] (**3-4**) foram sintetizados. Enquanto H₂L5 foi inativo, H₂L4 e os complexos (**1-4**) inibiram formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Todos os complexos apresentaram atividade similar ou superior à do benznidazol, sendo que **2** (CE₅₀ = 0,33 µM) e (**4**, CE₅₀ = 0,06 µM) apresentaram as atividades mais altas contra tripomastigotas. **2** (CE₅₀ = 3,05 µM) e **4** (CE₅₀ = 2,31 µM) também exibiram as atividades mais altas contra amastigotas. A atividade citotóxica dos compostos foi investigada em células não infectadas de fibroblastos humanos hFIB e de macrófagos de camundongos. Em todos os casos, os complexos de Bi(III) mostraram os maiores índices de seletividade contra tripomastigotas. A investigação do modo de ação do complexo (**4**) em tripomastigotas sugeriu a ocorrência de morte celular por necrose.

Foram também sintetizados (1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazonacarboxamida (HL6), (1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)acetilhidrazona (HL7) e (1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)benzoilhidrazona (HL8) (1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida (HL9), (*N*-metil-1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida (HL10) e (1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)-*N*-fenil-hidrazinocarbotioamida (HL11) e [Cu(HL6)₂Cl₂] (**5**), [Cu(HL7)Cl₂] (**6**), [Cu(HL8)₂Cl₂] (**7**), [Cu(HL9)Cl₂]·½H₂O (**8**), [Cu(HL10)Cl₂] (**9**), [Cu(HL11)Cl₂] (**10**), [Ag(HL)NO₃] HL = HL7-HL10 (**11-14**), e [Bi(HL)Cl₃] HL = HL 9-HL11(**15-17**). Todos os compostos revelaram-se inativos contra diferentes cepas de bactérias aeróbicas. Os ligantes exibiram atividade antibacteriana *in vitro* contra bactérias anaeróbicas *Gram-positivas* *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides ovatus*, *Parabacteroides distasonis* e *Fusubacterium nucleatum*. Para os complexos de Cu(II), Ag(I) e Bi(III), a atividade antibacteriana

aumentou significativamente em vários casos mostrando assim, a alta seletividade dos compostos para bactérias anaeróbicas. Estudos eletroquímicos da redução do grupo nitro produzindo o ânion radical NO_2^- revelaram que os compostos apresentam potenciais de redução comparáveis aos dos fármacos biorredutíveis secnidazol e benznidazol, indicando que suas atividades antimicrobianas podem estar relacionadas à biorredução intracelular do grupo nitro. Os complexos de Ag(I) também apresentaram atividade contra *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida lusitanae* e *Candida glabrata*, enquanto os ligantes e os complexos de cobre(I) e bismuto(III) foram inativos, sugerindo que seus efeitos antifúngicos provavelmente se devem à presença de prata(I).

Os complexos (**11-17**) foram ainda avaliados quanto à ação citotóxica frente a células de leucemia humana HL60 e de tumores sólidos HCT-116 (tumor colorretal), PC3 (tumor de próstata), SNB-19 (glioblastoma) e células saudáveis HEK-203 (células de rim embrionário humano). O complexo (**13**) apresentou atividade citotóxica contra todas as linhagens celulares testadas, enquanto os demais compostos foram inativos. Esses resultados sugerem que os compostos deveriam ser testados no futuro contra células de tumores sólidos em ambiente de hipóxia.

Os complexos $[\text{Au}(\text{HL})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ HL = HL9-HL11 (**18-20**) foram obtidos e testados quanto às suas atividades citotóxicas contra células de carcinoma colorretal HCT-116 sob condições de normóxia e hipóxia, e contra células saudáveis de rim embrionário humano HEK-293 em condições de normóxia. HL9-HL11 foram inativos contra células HCT-116 sob hipóxia. HL9 e HL10 provaram ser citotóxicos contra as linhagens celulares em condições de normóxia, enquanto HL11 foi inativo. Os complexos (18-20) e o precursor trietilfosfinaouro(I) apresentaram atividades contra células HCT-116 em normóxia e em hipóxia. Porém, exceto HL11, os compostos também revelaram ser ativos contra as células saudáveis HEK-293. O complexo (**19**) mostrou-se mais ativo contra células HCT-116 sob hipóxia do que sob normóxia e foi mais ativo contra as células HCT-116 sob condições de hipóxia que contra células HEK-293, com índice de seletividade ($\text{IS} = \text{IC}_{50 \text{ HEK-293}} / \text{IC}_{50 \text{ HCT-116 hipoxia}}$) igual a 3,7, semelhante ao valor obtido para o fármaco biorredutível tirapazamina (TPZ, IS = 4). Embora os compostos apresentem atividades citotóxicas distintas, os comportamentos eletroquímicos de HL9 – HL11 foram muito semelhantes quanto ao potencial de redução do grupo nitro, assim como os comportamentos eletroquímicos dos complexos (**18-20**).

Palavras-chave: tiosemicarbazonas; hidrazonas; nitroimidazol; nitrobenzeno; complexos metálicos; antimicrobianos; antiparasitários; antineoplásicos.

Abstract

2-acetylpyridine-4-nitroimidazolhydrazone (HL1), 2-acetylpyridine-2-nitroimidazolhydrazone (HL2) and 2-benzoylpyridine-4-nitroimidazolhydrazone (HL3) were obtained. The compounds did not show cytotoxic effects against J774.A1 macrophage cells. Only HL1 and HL3 exhibited antileishmanial activity against *Leishmania chagasi*, while HL2 proved to be inactive, indicating that the presence of the 4-nitro group probably favors the antiparasitic effects.

2-formyl-8-hydroxyquinoline-4-nitroimidazolhydrazone (H₂L4), 2-formyl-8-hydroxyquinoline-4-nitrobenzenohydrazone (H₂L5), [Sb(HL4)Cl₂] (**1**), [Sb(HL5)Cl₂] (**2**), [Bi(HL4)Cl₂] (**3**) and [Bi(HL5)Cl₂] (**4**) were synthesized. While H₂L5 was inactive, H₂L4 and complexes (**1-4**) inhibited the growth of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. All complexes showed activities similar or superior to that of benzimidazole used as control. Complexes (**2**), CE₅₀ = 0.33 μM) and (**4**) CE₅₀ = 0.06 μM) proved to be the most active against trypomastigotes and as expected, (**2**) and (**4**) were also the most effective against the amastigote form, with de EC₅₀ = 3.05 μM (**2**) and EC₅₀ = 2.31 μM (**4**). The cytotoxic activities of the compounds were also evaluated against non-infected human hFIB fibroblasts cells and against mouse macrophage cells. In both cases the Bi(III) complexes showed the highest selectivity indexes against trypomastigotes. Investigations on the mode of action of complex (**4**) on trypomastigotes suggested the occurrence of cell death by necrosis

(1-(2-methyl-5-nitroimidazole)propan-2-ylidene)hydrazonocarboxamide (HL6), (1-(2-methyl-5-nitroimidazole)propan-2-ylidene)acetylhydrazone (HL7), (1-(2-methyl-5-nitroimidazole)propan-2-ylidene)benzoylhydrazone (HL8), (1-(2-methyl-5-nitroimidazole)propan-2-ylidene)hydrazinocarbothioamide (HL9), (*N*-methyl-1-(2-methyl-5-nitroimidazole)propan-2-ylidene)hydrazinocarbothioamide (HL10) and (1-(2-methyl-5-nitroimidazole)propan-2-ylidene)-*N*-phenyl-hydrazinocarbothioamide (HL11) were obtained as well as [Cu(HL6)₂Cl₂] (**5**), [Cu(HL7)Cl₂]·½CH₃OH (**6**), [Cu(HL8)₂Cl₂] (**7**), [Cu(HL9)Cl₂]·½H₂O (**8**), [Cu(HL10)Cl₂] (**9**), [Cu(HL11)Cl₂]·½H₂O (**10**), [Ag(HL7)NO₃] (**11**), [Ag(HL8)NO₃] (**12**), [Ag(HL9)NO₃] (**13**), [Ag(HL10)NO₃] (**14**), [Bi(HL9)Cl₃] (**15**), [Bi(HL10)Cl₃] (**16**) and [Bi(HL11)Cl₃]·2H₂O (**17**).

All compounds revealed to be inactive against several strains of aerobic bacteria. In contrast, the secnidazole-derived ligands showed *in vitro* antibacterial activity against Gram-positive *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides*

vulgatus, *Bacteroides ovatus*, *Parabacteroides distasonis* and *Fusubacterium nucleatum* anaerobic bacteria. Upon coordination to Cu(II), Ag(I) and Bi(III), the antimicrobial activity significantly increased in several cases suggesting selectivity of the compounds for anaerobic strains. Electrochemical studies on the nitro group reduction generating the nitro anion radical NO_2^- showed that the compounds have reduction potentials similar to the bio-reducible drugs secnidazole and benznidazole, suggesting that their antibacterial effects might be related to the intracellular reduction of the nitro group. While the secnidazole-derived ligands and the Cu(II) and Bi(III) complexes were devoid of activity, the silver(I) complexes and silver nitrate exhibited antifungal action against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida lusitanae* and *Candida glabrata*, indicating that the antifungal effects are due to the presence of silver.

Complexes (**11-17**) were evaluated for their antiproliferative activities against HL60 leukemia and HCT-116 (colorectal cancer), PC3 (prostate cancer), SNB-19 (glioblastoma) and non-malignant HEK-203 (human embryonic kidney) cells. Complex (**13**) showed cytotoxic activity against all cell lineages while all other compounds were inactive. The results suggest that further studies on the cytotoxic effects of the compounds on solid tumor cells should be investigated under hypoxia conditions.

$[\text{Au}(\text{HL9})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (**18**), $[\text{Au}(\text{HL10})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (**19**) and $[\text{Au}(\text{HL11})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (**20**) were obtained and evaluated for their cytotoxicity against HCT-116 colorectal cancer cells under normoxia and hypoxia conditions, as well as against non-malignant HEK-293 human embryonic kidney cell under normoxia. HL9 and HL10 proved to be cytotoxic to both cell lineages under normoxia while HL11 was inactive. Complexes (**18-20**) and the triethylphosphinegold(I) precursor showed cytotoxic activity against HCT-116 cells under normoxia and hypoxia conditions as well as against the HEK-293 healthy cells. Complex (**19**) deserves special interest since it was more active against HCT-116 cells under hypoxia than under normoxia conditions and was more potent against HCT-116 cells under hypoxia than against HEK-293 cells in normoxia, with selectivity index ($\text{SI} = \text{IC}_{50 \text{ HEK-293}} / \text{IC}_{50 \text{ HCT-116 hypoxia}}$) = 3.7, similar to the value obtained for the bio-reducible control drug tirapazamine (TPZ, SI = 4). Regarding the reduction of the nitro group, although the compounds presented distinct cytotoxic effects, the electrochemical behaviors of HL9 – HL11 were very similar, as were the electrochemical behaviors of complexes (**18-20**).

Keywords: thiosemicarbazones; hydrazones; nitroimidazole; nitrobenzene; metal complexes; antimicrobial; antiparasitic; antineoplastic.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
Ag-SD	Sulfadiazina de prata(I)
AR	Artrite Reumatoide
ATCC	Coleção de cultura americana
BHI	Infusão Cérebro Coração
CHN	Análise Elementar
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50% do crescimento microbiano
Cisplatina	<i>cis</i> -diaminodicloroplatina(II)
d	Dupleto
dec.	Decompõe
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMF-d ₇	<i>N,N</i> -Dimetilformamida deuterado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
F	Banda na região do infravermelho com intensidade forte
f	Banda na região do infravermelho com intensidade fraca
FBS	Soro fetal bovino
HCT-116	Linhagem de células de carcinoma colorretal
HEK-293	Linhagem de células sadias de rim embrionário humano
hFIB	Células de fibroblastos humanos
HL-60	Linhagem de células de leucemia
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IV	Infravermelho
m	Multiplete, quando relacionado a espectroscopia de RMN
m	Banda na região do infravermelho com intensidade média
M	Multiplicidade
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

MM	Massa molecular
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PC3	Linhagem de células de carcinoma da próstata
PDC	Dicromato de piridínio
PI	Iodeto de propídio
ppm	Partes por milhão
RDR	Ribonucleosídeo difosfato redutase
Rend.	Rendimento
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Simpleto
SDB	Caldo Sabouraud
SH	Superfícies de Hirshfeld
SNB-19	Linhagem de células de glioblastoma - Sistema Nervoso Central
t	Tripleto
TG	Análise termogravimétrica
TrxR	Tiorredoxina Redutase
WHO	Organização Mundial de Saúde
v	Número de Onda
δ	Deslocamento químico
ΔM	Condutividade molar
μ_{eff}	Susceptibilidade magnética

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Compostos de platina usados no tratamento do câncer.....	4
Figura 1.2 - Nitroimidazois: agentes citotóxicos seletivos em hipóxia.....	5
Figura 1.3 - Compostos utilizados no tratamento de infecções anaeróbicas.....	7
Figura 1.4 - Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
Figura 1.5 - Compostos que apresentam atividade anti- <i>T. cruzi</i>	10
Figura 1.6 - Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	12
Figura 1.7 - Estrutura química do fexinidazol.....	13
Figura 1.8 - Estrutura genérica da hidrazona (A) e tiossemicarbazona (B), onde R, R ₁ , R ₂ e R ₃ = H, grupos alquila ou arila.....	13
Figura 1.9 - Mecanismo geral simplificado proposto para a reação da obtenção de bases de Schiff, onde R, R ₁ e R ₂ = H, grupos alquila ou arila.....	14
Figura 1.10 - Estrutura química da Triapina.....	15
Figura 1.11 - Estruturas químicas de derivados de nitrocompostos.....	17
Figura 1.12 - Processo biorredutivo de nitrocompostos nas células.....	18
Figura 1.13 - Estrutura da sulfadiazina de prata(I).....	22
Figura 1.14 - Compostos de ouro usados para tratamento de artrite reumatoide.....	26
Figura 2.1 - Esquema de síntese das hidrazonas HL1, HL2, HL3 e H ₂ L4.....	32
Figura 2.2 - Esquema de síntese da hidrazona H ₂ L5.....	33
Figura 2.3 - Esquema de síntese dos complexos de antimônio(III) [Sb(HL4)Cl ₂] (1), [Sb(HL5)Cl ₂] (2).....	34
Figura 2.4 - Esquema de síntese dos complexos de bismuto(III) [Bi(HL4)Cl ₂] (3), [Bi(HL5)Cl ₂] (4).....	35
Figura 2.5 - Esquema de síntese de 1-(2-metil-5-nitroimidazol)acetona.....	35
Figura 2.6 - Esquema de síntese das hidrazonas: HL6, HL7, HL8 e tiossemicarbazonas: HL9, HL10 e HL11.....	36
Figura 2.7 - Esquema de síntese do complexo de cobre(II) [Cu(HL6)Cl ₂] (5).....	37
Figura 2.8 - Esquema de síntese dos complexos de cobre(II) [Cu(HL7)Cl ₂]·½CH ₃ OH (6), [Cu(HL8) ₂ Cl ₂] (7), [Cu(HL9)Cl ₂]·½H ₂ O (8), [Cu(HL10)Cl ₂] (9) e [Cu(HL11)Cl ₂]·½H ₂ O (10).....	38
Figura 2.9 - Esquema de síntese dos complexos de prata(I): [Ag(HL7)NO ₃] (11), [Ag(HL8)NO ₃] (12), [Ag(HL9)NO ₃] (13) e [Ag(HL10)NO ₃] (14).....	39

Figura 2.10 - Esquema de síntese dos complexos de bismuto(III): [Bi(HL9)Cl ₃] (15), [Bi(HL10)Cl ₃] (16) e [Bi(HL11)Cl ₃] (17).....	40
Figura 2.11 - Esquema de síntese dos complexos de ouro(I): [Au(HL9)P(CH ₂ CH ₃) ₃]PF ₆ (18), [Au(HL10)P(CH ₂ CH ₃) ₃]PF ₆ (19) e [Au(HL11)P(CH ₂ CH ₃) ₃]PF ₆ (20).....	41
Figura 3.1 - Estruturas das hidrazonas derivadas de nitroimidazois HL1, HL2 e HL3.....	51
Figura 3.2 - Estruturas moleculares de HL1, HL2, (Z)-HL3 e (E)-HL3. Elipsoides com 50% de probabilidade; os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza nas imagens.....	52
Figura 3.3 - (a) Superfície de Hirshfeld (b) gráfico de impressão digital de HL1, HL2, (Z)-HL3 e (E)-HL3 para a) H···H, b) O···H e c) N···H.....	53
Figura 3.4 - Voltamogramas do composto HL1 em meio aprótico (TBAP 0,1 M em DMF) vs. Ag/AgCl, Cl ⁻ (3,0 M); taxa de varredura de 250 mV s ⁻¹ . E região expandida em vermelho mostra uma varredura curta com o par RNO ₂ /R-NO ₂ ⁻ isolado.....	54
Figura 4.1 - Estruturas das hidrazonas derivadas de 8-hidroxiquinolina H ₂ L4 e H ₂ L5.....	59
Figura 4.2 - Estrutura molecular do complexo [Sb(HL5)(DMF)Cl ₂]·3DMF (2a). Elipsoides com 50% de probabilidade; os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza nas imagens.....	60
Figura 4.3 - Dímeros formados por interações intermoleculares NH···O e CH···Cl no cristal do complexo [Sb(HL5)(DMF)Cl ₂]·3DMF (2a). Código de simetria: i (1 - x, -y, 1 - z).....	62
Figura 4.4 - Análise da morte celular dos tripomastigotas por citometria de fluxo. Os histogramas representam a população de tripomastigotas não tratados (cinza) e tratados com o complexo (4) (preto) 0,06 μM após 6 horas de incubação.....	65
Figura 4.5 - Alterações ultraestruturais em tripomastigotas visualizadas por MEV. (A) sem tratamento; (B) após o tratamento com o complexo (4) por 24 h a 0,06 μM e (C) 1 μM.....	65
Figura 5.1 - Curva TG do composto [Cu(HL9)Cl ₂]·½H ₂ O (8), obtida em atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL.min ⁻¹), a 10 °C.min ⁻¹	71
Figura 5.2 - Estruturas propostas para os complexos [Cu(HL7)Cl ₂]·½ CH ₃ OH (6),	

[Cu(HL9)Cl ₂] $\cdot\frac{1}{2}$ H ₂ O (8), [Cu(HL11)Cl ₂] $\cdot\frac{1}{2}$ H ₂ O (10) e [Bi(HL11)Cl ₃] $\cdot 2$ H ₂ O (17)...	72
Figura 5.3 - Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante HL10 e do complexo [Cu(HL10)Cl ₂] (9).....	75
Figura 5.4 - Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante HL10 e do complexo [Ag(HL10)NO ₃] (14).....	75
Figura 5.5 - Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante HL10 e do complexo [Bi(HL10)Cl ₃] (16).....	76
Figura 5.6 - Espectros de RMN de ¹ H de HL10 e de seu complexo [Ag(HL10)NO ₃] (14), em DMSO- <i>d</i> ₆	80
Figura 5.7 - Espectros de RMN de ¹ H de HL10 e de seu complexo [Bi(HL10)Cl ₃] (16), em DMSO- <i>d</i> ₆	80
Figura 5.8 - Espectros de RMN de ¹³ C de HL10 e de seu complexo [Ag(HL10)NO ₃] (14), em DMSO- <i>d</i> ₆	83
Figura 5.9 - Espectros de RMN de ¹³ C de HL10 e de seu complexo [Bi(HL10)Cl ₃] (16), em DMSO- <i>d</i> ₆	84
Figura 5.10 - Espectros eletrônicos ao longo do tempo do complexo [Cu(HL11)Cl ₂] $\cdot\frac{1}{2}$ H ₂ O (10) em DMSO.....	85
Figura 5.11 - Espectros eletrônicos ao longo do tempo do complexo [Cu(HL11)Cl ₂] $\cdot\frac{1}{2}$ H ₂ O (10) em solução 5% DMSO/Tris-HCl.....	85
Figura 5.12 - Voltamogramas dos complexos [Cu(HL10)Cl ₂] (9), [Ag(HL7)NO ₃] (11) e [Bi(HL9)Cl ₃] (15) em meio aprótico (TBAP 0,1 M em DMF) vs. Ag/AgCl, Cl ⁻ (3,0 M); taxa de varredura de 250 mV s ⁻¹ . E região expandida em vermelho mostra uma varredura curta com o par RNO ₂ /R-NO ₂ ⁻ isolado.....	87
Figura 6.1 - Espectros vibracionais na região do infravermelho do ligante HL10 e do complexo [Au(HL10)P(CH ₂ CH ₃) ₃]PF ₆ (19).....	100
Figura 6.2 - Espectros de RMN de ¹ H de HL10 e de seu complexo [Au(HL10)P(CH ₂ CH ₃) ₃]PF ₆ (19), em DMSO- <i>d</i> ₆	102
Figura 6.3 - Espectros de RMN ¹³ C de HL10 e de seu complexo [Au(HL10)P(CH ₂ CH ₃) ₃]PF ₆ (19), em DMSO- <i>d</i> ₆	103
Figura 6.4 - Espectros de RMN ³¹ P do [AuP(CH ₂ CH ₃) ₃ Cl] e o complexo [Au(HL10)P(CH ₂ CH ₂) ₃]PF ₆ (19), em DMSO- <i>d</i> ₆	105
Figura 6.5 - Representação das estruturas moleculares de HL10 e HL11, elipsoides com 50% de probabilidade, os átomos de hidrogênio foram omitidos para obter	

maior clareza nas imagens.....	106
Figura 6.6 - Interações intermoleculares de HL10 mostrando o esquema da ligação de hidrogênio.....	109
Figura 6.7 - Interações intermoleculares de HL11 mostrando o esquema da ligação de hidrogênio.....	109
Figura 6.8 - Superfície de Hirshfeld (em cima) e gráficos de impressões digitais (em baixo) de a) HL10 e b) HL11.....	110
Figura 6.9 - Gráfico de impressão digital de HL10 (esquerda) e HL11 (direita) para a) H···H, b) O···H e c) N···H.....	111
Figura 6.10 - Espectros eletrônicos ao longo do tempo do complexo [Au(HL10)P(CH ₂ CH ₃) ₃]PF ₆ (19), em DMSO.....	112
Figura 6.11 - Espectros eletrônicos ao longo do tempo do complexo [Au(HL10)P(CH ₂ CH ₃) ₃]PF ₆ (19), em solução 5% DMSO/Tris-HCl.....	112
Figura 6.12 - Voltamograma do complexo [Au(HL10)P(CH ₂ CH ₃) ₃]PF ₆ (19) em meio aprótico (TBAP 0,1 M em DMF) vs. Ag/AgCl, Cl ⁻ (3,0 M); taxa de varredura de 250 mV s ⁻¹ . E região expandida em vermelho mostra uma varredura curta com o par RNO ₂ /R-NO ₂ ⁻ isolado.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Atribuição de tipo de eletrólito para soluções de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$	29
Tabela 3.1 - Parâmetros de voltametria cíclica correspondentes ao par redox $\text{R-NO}_2/\text{R-NO}_2^-$ para os compostos (HL1-HL3) a 250 mV s^{-1}	55
Tabela 3.2 - Viabilidade celular (citotoxicidade) nos macrófagos J774.A1 no ensaio MTT após 24 horas.....	56
Tabela 3.3 - Efeito dos compostos (HL1-HL3) nas formas amastigotas intracelulares da <i>L. chagasi</i> a $10 \mu\text{M}$ após 24 horas de tratamento e o potencial de redução do R-NO_2^- (EpIc).....	57
Tabela 4.1 - Dado cristalográfico e parâmetros de refinamento estrutural para o complexo $[\text{Sb}(\text{HL5})(\text{DMF})\text{Cl}_2] \cdot 3\text{DMF}$ (2a).....	60
Tabela 4.2 - Principais distâncias de ligação (Å) e ângulos interatômicos da estrutura molecular do complexo $[\text{Sb}(\text{HL5})(\text{DMF})\text{Cl}_2] \cdot 3\text{DMF}$ (2a).....	61
Tabela 4.3 - Parâmetros geométricos das interações intermoleculares na estrutura molecular do $[\text{Sb}(\text{HL5})(\text{DMF})\text{Cl}_2] \cdot 3\text{DMF}$ (2a).....	63
Tabela 4.4 - Atividade antiparasitária e citotóxica dos compostos.....	63
Tabela 5.1 - Fórmula molecular, massa molar (MM), temperatura de fusão (TF(°C)), análise elementar de C, H e N (valores teóricos em parêntesis), condutividade (ΛM), momento magnético (μ_{eff}) e rendimento (Rend.) dos complexos de cobre(II), prata(I) e bismuto(III) com tiossemicarbazonas e hidrazonas derivadas de 5-nitroimidazol.	69
Tabela 5.2 - Fórmula molecular, massa molar (MM), temperatura de fusão (TF(°C)), análise elementar de C, H e N (valores teóricos em parêntesis), condutividade (ΛM) e rendimento (Rend.), dos complexos de prata(I) e bismuto(III) com tiossemicarbazonas e hidrazonas derivadas de 5-nitroimidazol.....	70
Tabela 5.3 - Porcentagem de perda de massa referente à água e metanol na TG.....	72
Tabela 5.4 - Valores de números de ondas das bandas, nos espectros no infravermelho (cm^{-1}), dos complexos de cobre(II), prata(I) e bismuto(III) com suas respectivas tiossemicarbazonas e hidrazonas, usando como suporte KBr ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$).....	73
Tabela 5.5 – Atribuição de número de hidrogênios (N°), deslocamento químico δ	

(ppm), multiplicidade (M)* dos principais sinais de RMN de ^1H das hidrazonas e tiossemicarbazonas derivadas 5-nitroimidazol e seus complexos de prata(I) em $\text{DMSO}-d_6$	77
Tabela 5.6 - Atribuição de número de hidrogênios (N°), deslocamento químico δ (ppm), multiplicidade (M)* dos principais sinais de RMN de ^1H das tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol e seus complexos de bismuto(III) em $\text{DMSO}-d_6$	78
Tabela 5.7 - Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C das tiossemicarbazonas e hidrazonas derivadas de 5-nitroimidazol e seus complexos de prata(I) em $\text{DMSO}-d_6$	81
Tabela 5.8 - Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C das tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol e seus complexos de bismuto(III) em $\text{DMSO}-d_6$	82
Tabela 5.9 - Parâmetros da voltametria cíclica correspondentes aos processos $\text{R}-\text{NO}_2/\text{R}-\text{NO}_2^-$, $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$, $\text{Ag}^{\text{I}}/\text{Ag}^{\text{II}}$, $\text{Ag}^{\text{I}}/\text{Ag}^0$ e $\text{Bi}^{\text{III}}/\text{Bi}^{\text{IV}}$ vs. Ag/AgCl , Cl^- (3.0 M) eletrodo de referência, a 250 mV s^{-1}	89
Tabela 5.10 – Atividade antifúngica (valores de CI_{50} em $\mu\text{mol L}^{-1}$) dos complexos de prata(I) com tiossemicarbazonas e hidrazonas derivadas de 5-nitroimidazol, com seus respectivos desvios padrão.....	91
Tabela 5.11 – Atividade antibacteriana (valores de CIM^* em $\mu\text{mol L}^{-1}$) para os complexos de cobre(II) prata(I) e bismuto(III) e seus ligantes derivados de 5-nitroimidazol frente a bactérias anaeróbicas.....	93
Tabela 5.12 - Atividade citotóxica (IC_{50} , $\mu\text{mol L}^{-1}$) dos compostos de prata(I) frente as linhagens de células (HCT-1116, HL-60, PC3 e SNB19) e células saudáveis (HEK-293).....	95
Tabela 6.1 - Fórmula molecular, massa molar (MM), temperatura de fusão ($\text{TF}(\text{°C})$), análise elementar de C, H e N (valores teóricos em parêntesis), condutividade (ΛM) e rendimento (Rend.), dos complexos de ouro(I) com tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol.....	98
Tabela 6.2 - Valores de números de ondas das bandas, nos espectros do infravermelho (cm^{-1}), dos complexos de ouro(I) e de suas respectivas tiossemicarbazonas, usando como suporte KBr ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$).....	99
Tabela 6.3 – Atribuição de número de hidrogênios (N°), deslocamento químico δ (ppm), multiplicidade (M)* dos principais sinais de RMN de ^1H das	

tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol e seus complexos em DMSO- <i>d</i> ₆ ..	101
Tabela 6.4 - Atribuição dos principais sinais de RMN de ¹³ C das tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol e seus complexos de ouro(I) em DMSO- <i>d</i> ₆	104
Tabela 6.5 - Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento estrutural para os ligantes HL10 e HL11.....	106
Tabela 6.6 - Principais distâncias de ligação (Å) e ângulos (°) das estruturas moleculares dos HL10 e HL11.....	108
Tabela 6.7 - Comprimentos de ligação de hidrogênio (Å) e ângulos (°) para HL10..	109
Tabela 6.8 - Comprimentos de ligação de hidrogênio (Å) e ângulos (°) para HL11.	109
Tabela 6.9 - Parâmetros da voltametria cíclica correspondentes ao par redox RNO ₂ /R-NO ₂ ⁻ e do ouro(I) a 250 mV s ⁻¹	114
Tabela 6.10 - Atividade citotóxica (CI ₅₀ , μM) e índices de seletividade (IS) dos compostos nas células HCT - 116 e HEK - 293 e o potencial de redução do R-NO ₂ ⁻ (EpIc).....	115

SUMÁRIO

Capítulo 1- Introdução	1
1.1 - Química Medicinal Inorgânica.....	1
1.2 - Câncer e a Química Medicinal.....	2
1.3 - Infecções por bactérias anaeróbicas e a Química Medicinal.....	5
1.4 - Doença de Chagas e a Química Medicinal.....	7
1.5 – Leishmaniose e a Química Medicinal.....	10
1.6 – Utilização de Bases de Schiff na Química Medicinal.....	13
1.6.1 - Tiossemicarbazonas.....	14
1.6.2 - Hidrazonas.....	15
1.7 – Utilização de nitrocompostos na Química Medicinal.....	16
1.8 – Utilização de compostos de cobre na Química Medicinal.....	19
1.9 – Utilização de compostos de prata na Química Medicinal.....	20
1.10 – Utilização de compostos de bismuto na Química Medicinal.....	23
1.11 – Utilização de compostos de antimônio na Química Medicinal.....	24
1.12 – Utilização de compostos de ouro na Química Medicinal.....	25
1.13 - Objetivos do presente trabalho.....	27
Capítulo 2 - Parte experimental	28
2.1 - Reagentes e solventes.....	28
2.2 - Técnicas Experimentais.....	28
2.2.1 - Pontos de fusão.....	28
2.2.2 - Análise elementar (CHN).....	28
2.2.3 - Análises condutimétricas.....	29
2.2.4 - Termogravimetria (TG).....	29
2.2.5 - Espectros no infravermelho (IV).....	29
2.2.6 - Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN).....	29
2.2.7 - Estudo preliminar de estabilidade dos complexos por meio de espectros eletrônico de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).....	30
2.2.8 - Estudos Eletroquímicos de voltametria cíclica.....	30
2.2.9 - Susceptibilidade magnética.....	31
2.1.10 - Difração de raios-x em monocristais.....	31
2.3 - Sínteses de ligantes e complexos.....	32

2.3.1 – Sínteses da hidrazonas derivadas de 4-nitroimidazol.....	32
2.3.2 – Síntese de 2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitrobenzenohidrazona (H ₂ L5)..	32
2.3.3 - Sínteses dos complexos de antimônio(III) das hidrazonas derivadas de 8-hidroquinolina.....	33
2.3.4 – Sínteses dos complexos de bismuto(III) das hidrazonas derivadas de 8-hidroquinolina.....	34
2.3.5 – Síntese de 1-(2-metil-5-nitroimidazol)acetona.....	35
2.3.6 - Sínteses de hidrazonas e tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol	36
2.3.7 - Sínteses dos complexos de cobre(II) com as tiossemicarbazonas e hidrazonas derivadas de 5-nitroimidazol.....	36
2.3.8 - Sínteses dos complexos de prata(I) com as tiossemicarbazonas e hidrazonas derivadas de 5-nitroimidazol.....	38
2.3.9 – Sínteses dos complexos de bismuto(III) com as tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol.....	39
2.3.10 - Sínteses dos complexos de ouro(I) com tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol.....	40
2. 4 - Testes biológicos.....	41
2.4.1 - Atividade antileishmania.....	41
2.4.1.1 - Avaliação da atividade citotóxica com macrófagos.....	41
2.4.1.2 - Infecção de macrófagos por <i>Leishmania chagasi</i>	42
2.4.2 - Atividade anti- <i>T. cruzi in vitro</i>	43
2.4.2.1 - Parasitos.....	43
2.4.2.2 - Avaliação da viabilidade dos parasitos.....	43
2.4.2.3 - Avaliação da viabilidade do <i>T. cruzi</i> em macrófagos.....	43
2.4.2.4 - Citotoxicidade em células de mamíferos.....	44
2.4.2.5 - Análise por citometria de fluxo.....	44
2.4.2.6 - Estudos de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	45
2.4.3 - Avaliações da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição.....	45
2.4.3.1 - Materiais e equipamentos.....	45
2.4.3.2 - Micro-organismos testados.....	45
2.4.3.3 - Determinações da concentração inibitória mínima.....	46
2.4.3.4 - Preparações das microplacas.....	46
2.4.4 - Avaliações da atividade antimicrobiana com microrganismos	

anaeróbios.....	47
2.4.5 - Avaliação do potencial citotóxico em células tumorais.....	48
2.4.6 - Avaliação da atividade citotóxica contra células HCT-116 (normóxia e hipóxia) e HEK-293 (normóxia).....	49

Capítulo 3 - Resultados e discussão:

Hidrazonas derivadas de nitroimidazol: estudos estruturais e investigação da atividade antileishmania.....	50
3.1 - Caracterizações das hidrazonas derivadas de nitroimidazol.....	50
3.1.1 - Análise estrutural de superfícies de Hirshfeld dos compostos.....	51
3.1.2 - Estudos eletroquímicos.....	53
3.2 - Atividade citotóxica contra macrófagos J774.A1.....	56
3.3 - Atividade antileishmania.....	56

Capítulo 4 - Resultados e discussão:

Complexos de antimônio(III) e bismuto(III) de hidrazonas derivadas de 4-nitroimidazol e 4-nitrobenzeno: avaliação da atividade antitripanossoma.....	58
4.1 - Caracterizações dos complexos de antimônio(III) e bismuto(III) de hidrazonas derivadas de 4-nitroimidazol e 4-nitrobenzeno.....	58
4.1.1 - Análise estrutural por difração de raios X por monocristal.....	59
4.2 - Avaliação da citotoxicidade frente a células de mamíferos e atividade anti- <i>T. cruzi in vitro</i>	63
4.3 - Marcação de células apoptóticas e necróticas.....	64
4.4 - Avaliação de alterações ultraestruturais nos parasitos.....	65

Capítulo 5 - Resultados e discussão:

Complexos de cobre(II), prata(I) e bismuto(III) de tiossemicarbazonas e hidrazonas de derivadas 5-nitroimidazol.....	66
5.1 - Caracterização dos complexos de cobre(II) prata(I) e bismuto(III) de tiossemicarbazonas e hidrazonas de derivadas 5-nitroimidazol.....	67
5.1.1 - Análises dos complexos de cobre(II), prata(I) e bismuto(III) de tiossemicarbazonas e hidrazonas derivadas 5-nitroimidazol.....	67
5.1.2 Termogravimetria (TG).....	71

5.1.3 - Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (IV)...	72
5.1.4 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	76
5.1.5 - Estudo preliminar de estabilidade dos complexos por meio de espectros eletrônicos de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).....	84
5.1.6 - Estudos eletroquímicos.....	86
5.2 - Avaliação da atividade antimicrobiana frente a bactérias aeróbicas e fungos leveduriformes.....	90
5.3 - Avaliação da atividade antimicrobiana frente a espécies de bactérias anaeróbicas.....	91
5.4 - Avaliação da atividade citotóxica.....	94
Capítulo 6 - Resultados e discussão:	
Complexos de ouro(I) de tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol: avaliação da atividade citotóxica em condições de normóxia e de hipóxia.....	95
6.1 - Caracterização dos complexos de ouro(I) de tiossemicarbazonas de derivadas 5-nitroimidazol.....	96
6.1.1 - Análises dos complexos de ouro(I) de tiossemicarbazonas derivadas 5-nitroimidazol.....	96
6.1.2 - Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (IV).....	99
6.1.3 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	100
6.1.4 - Determinações das estruturas cristalográficas.....	105
6.1.5 – Estudo preliminar de estabilidade dos complexos por meio de espectros eletrônico de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).....	111
6.1.6 - Estudos eletroquímicos.....	112
6.2 - Avaliação da atividade citotóxica contra células de carcinoma colorretal.....	114
Capítulo 7 - Conclusões e Discussão.....	116
Anexo I - Lista de estruturas.....	123
Anexo II - Artigos e capa do artigo.....	126

Capítulo 1

Introdução

1.1 - Química Medicinal Inorgânica

Química Medicinal é uma disciplina baseada no estudo dos aspectos relacionados às Ciências Farmacêuticas, Médicas e Biológicas para a descoberta e preparação de substâncias bioativas de interesse terapêutico, incluindo o estudo da compreensão da relação entre estrutura química e atividade.¹

Neste contexto, a Química Medicinal Inorgânica dedica-se à busca por complexos metálicos com propriedades farmacológicas.² É um campo de pesquisa em desenvolvimento, e tem mostrado que novos complexos apresentam amplo impacto na medicina como agentes terapêuticos e de diagnóstico, e no tratamento de várias enfermidades.³ Os medicamentos à base de metais representam um grande potencial no mercado farmacêutico para o tratamento de doenças incuráveis.⁴

Nos últimos anos, uma maior conscientização sobre o papel fisiológico e patológico dos íons metálicos permitiu abordagens modernas da Química Medicinal Inorgânica. Porém, estudos mostraram que os egípcios já usavam cobre para esterilizar a água em 3000 a.C.. Na Arábia e China, o ouro era usado como medicamento há 3500 anos. O zinco e vários medicamentos de ferro foram utilizados no Egito cerca de 1500 a.C..⁵

No entanto, só nos últimos 100 anos a Química Medicinal Inorgânica foi estudada de forma racional. Por exemplo, o composto inorgânico dicianoaurato(I) de potássio, $K[Au(CN)_2]$, foi usado clinicamente contra o bacilo da tuberculose no começo do século XX. Atualmente muitos compostos inorgânicos foram introduzidos na clínica, como compostos de antimônio, empregados no tratamento de leishmaniose, compostos de bismuto usados como agentes antimicrobianos, compostos de ouro empregados no tratamento de artrite reumatoide e complexos de platina na terapia do câncer.^{6,7,8}

¹ A. T. do Amaral, C. H. Andrade, A. E. Kümmerle, R. V. C. Guido. Quím. Nova 40 (2017) 694-700.

² H. Beraldo. Cienc e Cult. 63 (2011) 29-32.

³ Z. J. Guo, P. J. Sadler. Angew. Chem. Int. Edit. 38 (1999) 1513-1531.

⁴ D. La Mendola, E. Rizzarelli. Curr. Top. Med. Chem. 16 (2016) 3019-3020.

⁵ C. Orvig, M. J. Abrams. Chem. Rev. 99 (1999) 2201-2203.

⁶ B. Merchant. Biologicals 26 (1998) 49-59.

⁷ D. Gaynor, D.M. Griffith. Dalton Trans. 41 (2012) 13239-13257.

Com a descoberta das propriedades anticancerígenas da cisplatina, *cis*[diaminodicloroplatina(II), (Figura 1.1, pagina 4), em 1965 por Barnett Rosenberg, houve um grande impulso na Química Medicinal Inorgânica, uma vez que, com o uso clínico da cisplatina, a partir de 1978, diminuiu-se em aproximadamente 80% o número de casos de morte por tumor de testículos. A partir dessa descoberta, ocorreram incentivos para investigar o desenvolvimento de novos complexos metálicos com propriedades farmacológicas.^{3,9} Sendo assim, torna-se importante a escolha de íons metálicos e ligantes adequados tendo como objetivo direcionar o composto para os locais almejados, aumentando o índice terapêutico, diminuindo a resistência de algumas doenças como câncer e doenças negligenciadas, e evitando danos às células saudáveis.

1.2 - Câncer e a Química Medicinal

O câncer é um conjunto de doenças caracterizadas por um crescimento desordenado de células, que invadem os tecidos e órgãos, podendo ocorrer metástase, espalhando para outros locais do corpo. O acúmulo de células pode ser benigno, quando ocorre a multiplicação vagarosa de uma massa de células, raramente constituindo um risco de vida. Pode também ser maligno, quando tais células se dividem rapidamente de forma agressiva, incontrolável e desorganizada. Assim, o câncer é a denominação de tumor maligno.¹⁰

Entre 80% a 90% dos casos de câncer estão relacionados com ambiente, seja o meio ambiente em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (quando insalubre), o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida) ou ambiente de consumo (alimentos, medicamentos). É estimado que entre 10% a 20% dos cânceres também podem estar relacionados à hereditariedade. Apesar de o câncer ser essencialmente um processo genético, são raros os casos de cânceres que ocorrem exclusivamente a partir de fatores hereditários.¹¹

De acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, atrás apenas das doenças cardíacas, e

⁸ H. Beraldo. Quím. Nova Esc. 6 (2005).

⁹ B. Rosenberg, L. Vancamp, T. Krigas. Nature 205 (1965) 698-699.

¹⁰ Instituto Nacional de Câncer (INCA), ABC DO CÂNCER - Abordagens Básicas para o Controle do Câncer, Rio de Janeiro 2011.

¹¹ <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>. Instituto Nacional do Câncer. Acessado em 02 de Dezembro de 2019.

representou 9,6 milhões de mortes em 2018. A nível global, uma em cada seis mortes são relacionadas à doença, sendo de maior ocorrência os cânceres de pulmão, próstata, colorretal, estomacal e hepático, os mais comuns nos homens, enquanto os cânceres mamário, colorretal, pulmonar, cervical e estomacal, os mais comuns entre as mulheres.¹² Segundo a OMS, o câncer é um problema de saúde pública, principalmente entre países em desenvolvimento. A estimativa para o Brasil em 2018-2019 foi de cerca de 600 mil casos novos de câncer.¹¹

Os principais tipos de tratamento para o câncer são cirurgia, radioterapia e quimioterapia, podendo ocorrer a realização das terapias combinadas, ou seja, associando mais de um tipo de tratamento. Na cirurgia ocorre a remoção de tumores, porém, só é possível realizar se não houver metástase. A radioterapia, que é uma terapia que pode ser utilizada para tumores radiosensíveis localizados, pode ser realizada em conjunto com a cirurgia para uma maior eficácia no tratamento. Caso ocorra a realização apenas da radioterapia, pode ser observada a diminuição de tumores grandes, diminuindo a chance de metástase.¹⁰

A quimioterapia é baseada na utilização de fármacos denominados quimioterápicos, ou seja, agentes antineoplásicos, que podem ser administrados intravenosos, intramusculares, subcutâneos ou intracraniais. Contudo os agentes antineoplásicos também acabam lesionando as células normais ao combater as células malignas, ocorrendo assim os efeitos colaterais como náusea e perda de cabelo.¹¹

Em função da baixa eficiência dos agentes terapêuticos em uso clínico e da baixa eficácia dos tratamentos disponíveis, o câncer é um dos principais alvos de pesquisas em Química Medicinal.

Atualmente a cisplatina está entre os três fármacos mais utilizados como antitumorais para o tratamento de neoplasias de ovário e de testículo, principalmente, sendo um componente dos protocolos utilizados no tratamento de câncer de pulmão e como paliativo em outras neoplasias.^{10,13} No entanto, a cisplatina possui efeitos colaterais significativos e intrínsecos, podendo ocorrer a resistência de vários tumores.^{14,15}

¹² <http://www.who.int/cancer/en/>. World Health Organization. Acessado em 02 de Dezembro de 2019.

¹³ P. Heffeter, U. Jungwirth, M. Jakupec, C. Hartinger, M. Galanski, L. Elbling, M. Micksche, B. Keppler, W. Berger. *Drug. Resist. Update* 11 (2008) 1-16.

¹⁴ E. Wong, C.M. Giandomenico. *Chem. Rev.* 99 (1999) 2451-2466.

¹⁵ M. Coluccia, G. Natile. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 7 (2007) 111-123.

A partir dos estudos químicos e da ação farmacológica da cisplatina, foi possível desenvolver análogos com diferentes propriedades farmacocinéticas. Vários complexos de platina foram sintetizados e selecionados para atividade antitumoral, mas pouco sucesso foi alcançado até o momento na procura de novos fármacos de platina, que sejam ativos para tumores resistentes à cisplatina. Vários compostos de platina entraram em ensaios clínicos nos últimos tempos. Carboplatina e oxaliplatina (Figura 1.1) receberam aprovação mundial e nedaplatina foi aprovada para uso clínico no Japão (Figura 1.1).¹⁴

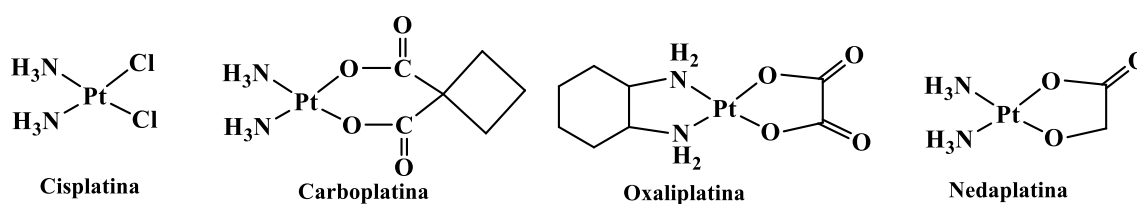


Figura 1.1 - Compostos de platina usados no tratamento do câncer.¹⁴

As células neoplásicas ocupam menos da metade do volume total do tumor e os vasos sanguíneos que se entrelaçam dentro da massa tumoral preenchem de 1 a 10% do seu volume.¹⁶ A compressão dos vasos sanguíneos em decorrência do crescimento tumoral ocasiona regiões com diferentes concentrações de oxigênio, como a camada externa composta por células oxigenadas, região intermediária (região de hipóxia) de baixa concentração de oxigênio e células em necrose, distantes da vascularização.¹⁷ O espaço restante é preenchido por uma matriz rica em colágeno, que envolve as células neoplásicas e pode separá-las da vascularização. Assim, os tumores sólidos são caracterizados pela baixa concentração de oxigênio gerando um ambiente mais redutor em comparação com os tecidos normais.^{18,19}

A pouca vascularização em tumores sólidos, ou seja, o ambiente hipóxico, está relacionado com a fraca eficiência da quimioterapia, pois dificulta o transporte do

¹⁶ F. L. S. Bustamante, E. T. Souza, M. Lanznaster, M. Scarpellini. *Rev. Virtual Quim.* 1 (2009) 138-148.

¹⁷ I. N. Fleming, R. Manavaki, P. J. Blower, C. West, K. J. Williams, A. L. Harris, J. Domarkas, S. Lord, C. Baldry, F. J. Gilbert. *Br. J. Cancer* 112 (2015) 238–250.

¹⁸ R. B. de Oliveira, *Quim. Nova* 25 (2008) 976-984.

¹⁹ M. R. Horsman, L. S. Mortensen, J. B. Petersen, M. Busk, J. Overgaard, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9 (2012) 674-687.

fármaco para a região tumoral.²⁰ A baixa concentração de oxigênio também limita a eficácia da radioterapia, uma vez que a mesma funciona por meio da geração de radicais superóxido, e em seguida outros radicais como peroxila e hidroxila.²¹

Por isso, pesquisas recentes têm sido direcionadas para o desenvolvimento de drogas biorredutíveis que são seletivamente ativadas em tecidos hipóxicos (Pró-Fármacos Ativadas por Hipóxia - PDAHs).²² As pró-fármacos são fármacos que sofrem uma transformação enzimática e/ou química *in vivo* para liberar o fármaco ativo, que pode então exercer o efeito farmacológico desejado. Em geral, a lógica por trás do uso de pró-fármacos é otimizar a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade indesejada dos medicamentos.²³

Agentes citotóxicos que são seletivos em hipóxia como nitroimidazóis têm sido estudados por serem biorredutíveis. O metronidazol e o misonidazol (Figura 1.2), por exemplo, possuem alta afinidade pelos tumores hipóxicos *in vitro* e *in vivo*.¹⁸ A evofosfamida (Figuras 1.2) encontra-se em fase clínica II. Sua atividade se deve à redução do grupo nitro pelas redutases intracelulares em condições de hipóxia com liberação do bromo alquilante.²³

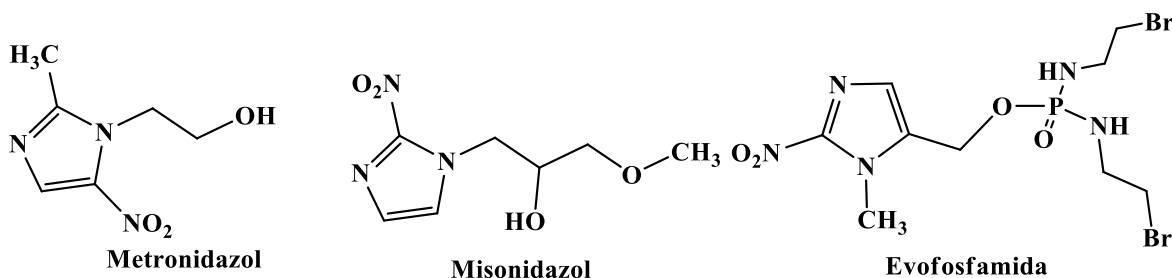


Figura 1.2 – Nitroimidazóis: agentes citotóxicos seletivos em hipóxia.

1.3 - Infecções por bactérias anaeróbicas e a Química Medicinal

Quase todas as superfícies do corpo humano são colonizadas por micro-organismos. Em circunstâncias normais, a presença desses organismos não é prejudicial. Pelo contrário, há consideráveis evidências de que eles são benéficos para o seu

²⁰ N. Graf, S. J. Lippard, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 993-1004.

²¹ C. P. Guise, A. M. Mowday, A. Ashoorzadeh, R. Yuan, W. H. Lin, D. H. Wu, J. B. Smaill, A. V. Patterson, K. Ding, *Chin. J. Cancer* 33 (2014) 80-86.

²² Q. Zhang, Y. Guan, S. Liu, Q. Chen, X. Li. *Med Sci Monit.* 22 (2016) 3778-3791.

²³ J. D. Sun, Q. Liu, D. Ahluwalia, D. J. Ferraro, Y. Wang, D. Jung, M. D. Matteucci, C. P. Hart. *Cancer Biol Ther.* 17 (2016) 371–380.

hospedeiro. Porém, apenas algumas dessas espécies causam infecções.²⁴ As espécies anaeróbicas, que predominam em infecções clínicas, incluem as espécies *Bacteroides fragilis*, *Prevotella melaninogenica*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium ramosum* e *Fusobacterium nucleatum*. Estes grupos representam cerca de dois terços dos anaeróbios de infecções clinicamente significativas e, cada uma dessas espécies de bactérias tem um ou mais fatores de virulência.²⁵ As superfícies habitadas do corpo humano incluem a pele, boca, nariz, garganta, trato intestinal inferior, vagina e parte externa da uretra. Os micro-organismos que colonizam essas regiões estão presentes em números apreciáveis e se multiplicam ativamente.²⁶

Para que exista infecção causada por bactérias anaeróbicas, é preciso que ocorra a interrupção das barreiras cutâneas (por doença maligna ou outra, cirurgia ou trauma), injúria tecidual (isto reduz o potencial de redução e oxidação, portanto, favorece o crescimento de anaeróbios), fraco fornecimento de sangue e necrose de tecido, favorecendo o crescimento de anaeróbios. É também causa de infecção qualquer condição que reduza o suprimento de sangue para uma área afetada, incluindo: trauma, corpo estranho, malignidade, cirurgia, edema, choque, colite e doença vascular.^{25,27}

As bactérias anaeróbicas são responsáveis por doenças pleuropulmonares, intra-abdominais e hepáticas. São isoladas frequentemente em infecção do trato genital feminino. Com frequência, são também encontradas bactérias anaeróbicas em infecção da pele, tecidos moles e ossos e em casos de infecção adjacente a uma superfície mucosa, com liberação de secreção com mau cheiro, formação necrótica de tecido gangrenoso e abscesso, e em infecções relacionadas a tumores ou outros processos destrutivos, tromboflebite, e infecção após picadas.²⁸

A terapia antimicrobiana de infecções anaeróbicas deve ser prolongada para evitar recaídas, devido à tendência de anaeróbios causarem necrose tecidual, formação de abscessos e tromboflebite séptica. Os medicamentos comumente utilizados no tratamento de infecções anaeróbicas, exceto os antibióticos beta-lactâmicos, são cloranfenicol, clindamicina e metronidazol (Figura 1.3).²⁷

²⁴ I. Brook. J. Infect. Chemother. (2015) 1-13.

²⁵ M. Hedberg, C.E. Nord. J. Chemother. 8 (1996) 3-16.

²⁶ D. J. Hentges. Oxford University Press. 16 (1993) S175-S180.

²⁷ S. M. Finegold. Anaerobe 1(1995) 3-9.

²⁸ D. L. Kasper, A. S. Fauci. Doenças infecciosas de Harrison. 2ª edição 2015.

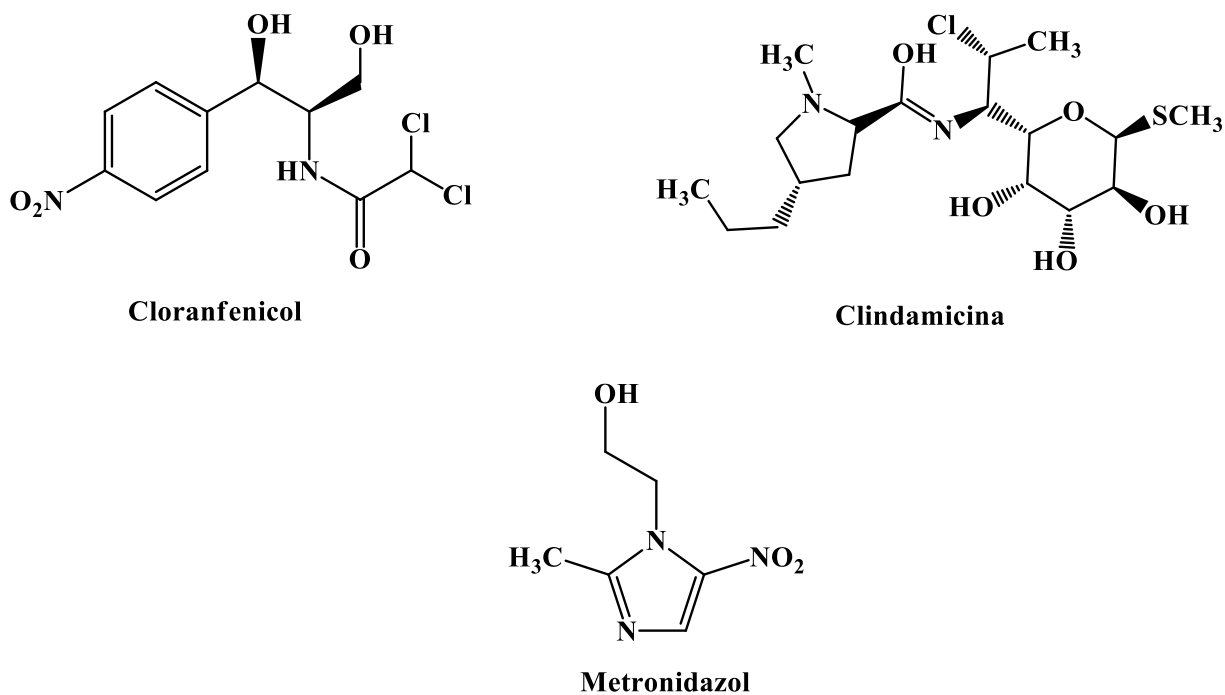


Figura 1.3 - Compostos utilizados no tratamento de infecções anaeróbicas.

O metronidazol possui excelente atividade contra anaeróbios; no entanto, ele é ineficaz contra aeróbios e facultativos. Uma limitação para o tratamento efetivo com utilização dos medicamentos, incluindo o metronidazol, é o aumento das taxas de resistência de bactérias anaeróbicas a esses agentes antimicrobianos, o que leva à busca por novos fármacos que sejam tóxicos para estas bactérias.²⁹

1.4 - Doença de Chagas e a Química Medicinal

Doença de Chagas é uma doença infecciosa causada por protozoário chamado *Trypanosoma cruzi*, nome dado por seu descobridor em 1909, o cientista brasileiro Carlos Chagas. O *T. cruzi* geralmente é transmitido de um hospedeiro a outro por insetos. No caso humano, o principal vetor é um percevejo popularmente conhecido como barbeiro ou chupão, que são insetos das espécies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*, dentre mais de 300 espécies que podem transmitir o *T. cruzi*.³⁰

²⁹ J. A. Garcia-Rodriguez, J. E. García-Sánchez, L. Muñoz-Bellido. *Anaerobe* 1 (1995) 69-80.

³⁰ <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>. Acessado em 05 de Dezembro de 2019

A infecção chagásica humana é caracterizada por duas fases, a aguda e a crônica. Na fase aguda, que é a mais leve, a pessoa pode apresentar sinais moderados como, febre prolongada (mais de sete dias), dor de cabeça, fraqueza intensa, inchaço no rosto e pernas, ou até mesmo não sentir nada. Já na fase crônica, a maioria dos casos não apresenta sintomas, porém algumas pessoas podem apresentar problemas cardíacos, como insuficiência cardíaca e problemas digestivos.^{31,32}

A doença de Chagas é uma condição crônica e endêmica nos países das Américas, afetando aproximadamente 12 milhões de pessoas, com incidência anual de 30 mil novos casos, ocasionando em média, 14.000 mortes por ano. No Brasil estima-se que existam aproximadamente cerca de 2 milhões de casos.³³

A transmissão do *T. cruzi* ocorre no momento da alimentação do vetor, transmissão vetorial clássica, expelindo os protozoários e colocando-os em contato com a ferida e a pele do hospedeiro. Porém, existem outras formas de transmissão como transfusão de sangue ou durante a gravidez, da mãe contaminada para o filho, e pela ingestão de alimentos contaminados com vetores triturados ou com seus dejetos.^{34,35}

O parasita possui uma variação de morfologia funcional. As formas replicativas incluem os epimastigotas presentes no tubo digestivo do inseto vetor, e os amastigotas, observados no interior das células de mamíferos. As formas não replicativas e infectantes compreendem os tripomastigotas metacíclicos, encontrados nas fezes e urina do inseto vetor e os tripomastigotas, circulantes no sangue de mamíferos.³⁶

O ciclo biológico do parasita (Figura 1.4) ocorre no momento da alimentação do vetor infectado. Assim que o barbeiro termina de se alimentar do sangue do homem, ele defeca, eliminando os protozoários tripomastigotas metacíclicos e colocando-os em contato com a ferida e a pele do homem. Após a penetração o parasita invade as células e perde o flagelo, passando para a forma amastigota. Os amastigotas multiplicam-se por divisão binária, até que a célula infectada fique repleta de amastigotas. Os protozoários

³¹ L. C. Dias, M. A. Dessoy, J. J. N. Silva, O. H. Thiemann, G. Oliva, A. D. Andricopulo. *Quim. Nova* 32 (2009) 2444-2457.

³² A. J. Rassi, A. Rassi, J. M. de Rezende. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26 (2012) 275-291.

³³ M. A. F. Barreto, M. A. F. Cavalcanti, C. M. Andrade, E. G. C. do Nascimento, W. O. Pereira. *Ciênc. saúde colet.* 24 (2019) 1483-1493.

³⁴ <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas>, Doença de Chagas. Acessado em 05 de Dezembro de 2019.

³⁵ J. R. Coura, P. A. Viñas. *Nature* (2010) S6 e S7.

³⁶ <http://chagas.fiocruz.br/ciclo-evolutivo/>, Acessado em 05 de Dezembro de 2019.

se transformam em tripomastigotas circulantes e rompem a célula se deslocando para infectar novas células.

No estômago do inseto, a forma tripomastigota transforma-se em epimastigotas. Em seguida os parasitas migram para o intestino do vetor, onde se multiplicam e posteriormente transformam-se em tripomastigotas metacíclicos, que são eliminados junto às fezes do triatomíneo fechando assim o ciclo do *T. cruzi*.^{34,35}

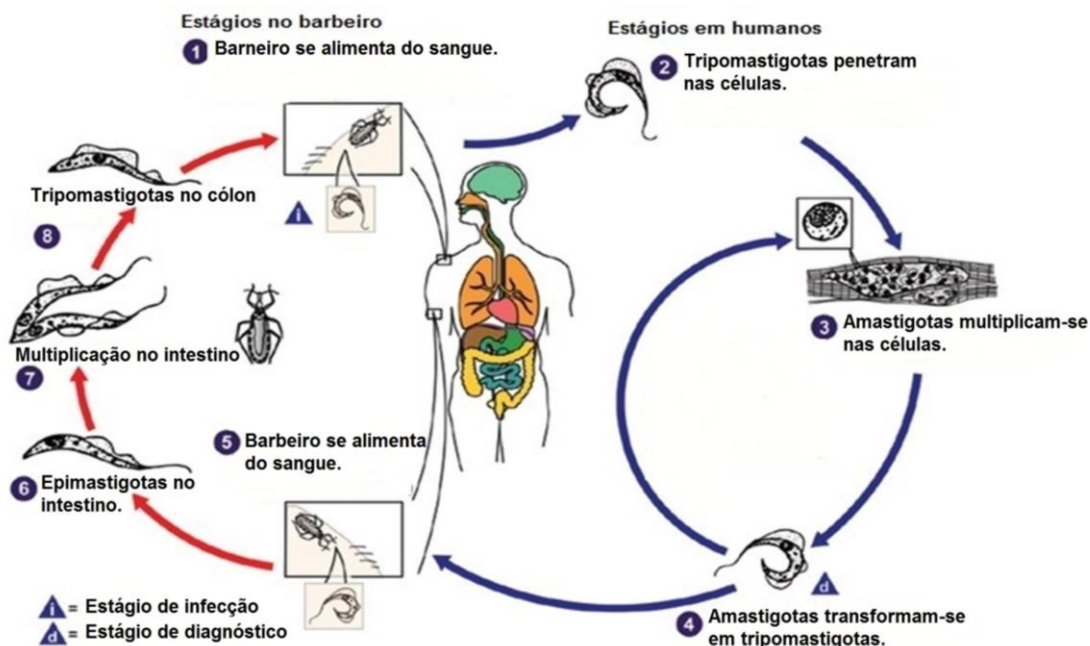


Figura 1.4 - Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.³⁷

O tratamento da doença de Chagas passou a ser investigado mediante ensaios clínicos controlados a partir de 1961. Nitrofurazona (Figura 1.5) foi o primeiro composto a apresentar eficácia contra o *T. cruzi*. Contudo, metade dos indivíduos tratados voltou a manifestar a presença do parasita após o tratamento.³⁸ Por volta do início da década de 70, dois fármacos foram adicionados na clínica, apresentando novas perspectivas para o tratamento da doença de Chagas, o nifurtimox e o benznidazol (Figura 1.5), sendo o benznidazol o mais utilizado no Brasil.³⁹

Nifurtimox e benznidazol atuam através da formação de radicais livres, ou seja, o grupo nitro presente nessas moléculas é reduzido ao grupo amino (NH₂) pela ação de

³⁷ J. Clayton. Nature 465 (2010) S4-S5.

³⁸ J. R. Coura, L. F. Ferreira, J. R. Silva. O Hospital 62 (1962), 957-964.

³⁹ J. R. Coura, L. L. d. Abreu, H. P. F. Willcox, W. Petana. Ver. Soc. Bras. Med. 30 (1997)139-144.

enzimas do tipo nitrorredutases, que atuam especificamente em sistemas moleculares do tipo R-NO₂, e podem levar à formação de um intermediário nitro radicalar (R-NO₂⁻) com subsequente formação de (R-NHOH) e (R-NO), espécies que são tóxicas para o parasita.³¹

Os dois fármacos apresentam excelentes resultados com altas taxas de cura parasitológica durante a fase aguda, mas sua eficácia decai com o avanço da infecção, pois o parasita é capaz de desenvolver resistência.⁴⁰ Por isso a importância de estudar novos compostos que sejam seletivos e diminuam a resistência dos parasitas.

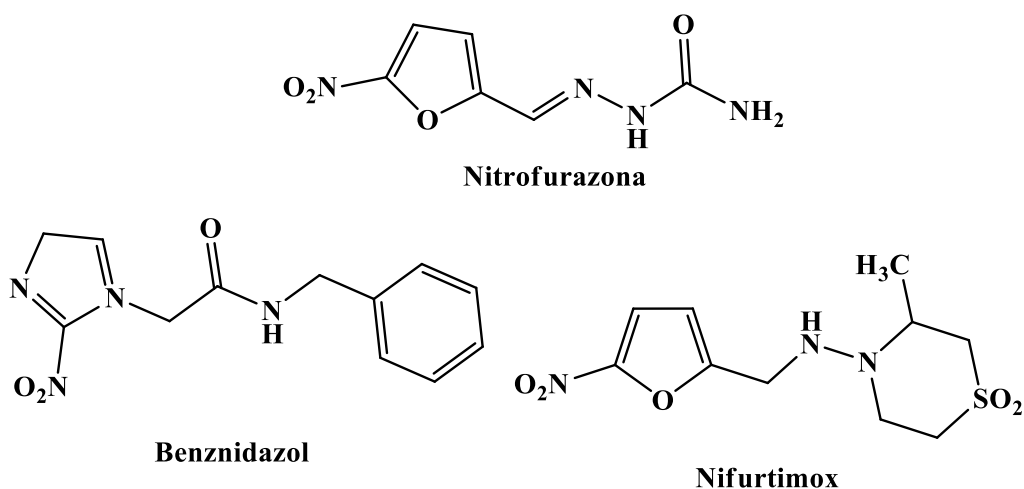


Figura 1.5 - Compostos que apresentam atividade anti-*T. cruzi*.

1.5 – Leishmanioses e a Química Medicinal

As leishmanioses são um conjunto de doenças tropicais e subtropicais, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, e transmitidas por diferentes espécies de flebotomíneos. De modo geral, essas enfermidades se apresentam basicamente de duas formas, leishmaniose tegumentar americana, que ataca a pele e as mucosas, e leishmaniose visceral (ou calazar), que ataca órgãos internos. A partir da picada dos mosquitos-palha infectados o parasita pode infectar muitas espécies de mamíferos como cão, gato, canídeos silvestres, marsupiais, roedores e o homem.⁴¹

Segundo a OMS, a leishmaniose é uma das sete doenças tropicais mais endêmicas e representa um sério problema de saúde mundial com um amplo espectro de

⁴⁰ <http://chagas.fiocruz.br/tratamento/>. Acessado em 06 de Dezembro de 2019.

⁴¹ L. Anvers, M. G. S. Tiburcio, V. B. Richini-Pereira, L. Ed. Ramirez. Rev. Assoc. Med. Bras. 64 (2018) 281-289.

manifestações clínicas levando a um resultado potencialmente fatal.⁴² Quando a doença progride, ocorre a manifestação de dois a oito meses após a infecção, com sintomas que variam de acordo com o tipo da doença. No caso da leishmaniose visceral, os sintomas são febre irregular, anemia, indisposição, palidez da pele e mucosas, perda de peso, inchaço abdominal devido ao aumento do fígado e do baço. No caso da leishmaniose tegumentar, pode ocorrer elevação avermelhada na pele, que vai aumentando até tornar-se uma ferida, lesões inflamatórias no nariz ou na boca.⁴³

A leishmaniose é uma doença com distribuição mundial, encontrada em cerca de 90 países. É endêmica na Ásia, África, nas Américas e na região do Mediterrâneo. No continente americano, pode ser encontrada em muitos países, desde o sul dos Estados Unidos até às províncias do norte de Argentina, com exceção do Chile, Uruguai e El Salvador.⁴⁴

Entre 12 e 15 milhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo parasita e 350 milhões estão em risco de contrair a doença. A estimativa é de 1,5 a 2 milhões de novos casos a cada ano e causa 70.000 mortes por ano. No Brasil foram registrados 4,1 mil casos da doença em 2017. Em todo o país, o número de mortes chegou a 327 neste período. O Brasil é um dos países mais afetados do mundo e concentra mais de 90% das notificações do continente.⁴¹

O parasita possui duas formas evolutivas, a forma promastigota, que é flagelada e extracelular, e a forma amastigota, que é intracelular e sem movimentos.⁴⁵

Assim como no ciclo de biológico do *T. cruzi*, o ciclo da *Leishmania* (Figura 1.6) ocorre a partir da picada do flebótomo infectado, no ato do repasto de sangue no mamífero. As formas promastigotas metacíclicas do parasita são eliminadas pelo vetor, infectando o hospedeiro vertebrado. Os parasitas são fagocitados por células do sistema fagocítico-mononuclear e transformam-se em formas amastigotas, que se multiplicam levando ao rompimento da célula e posterior disseminação, com infecção de outras células. Já no vetor a infecção ocorre ao realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, que pode liberar os parasitas e os mesmos se multiplicam no trato alimentar do vetor.⁴⁶

⁴² <https://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acessado em 06 de Dezembro de 2019.

⁴³ <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose>. Acessado em 07 de Dezembro de 2019.

⁴⁴ E. Torres-Guerrero, M. R. Quintanilla-Cedillo, J. Ruiz-Esmenjaud, R. Arenas. *F1000 Research* 6 (2017) 1- 15.

⁴⁵ N. C. Hepburn. *Clin. Exp. Dermatol.* 25 (2000) 363–370.

⁴⁶ E. Handman. *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (2001) 229-243.

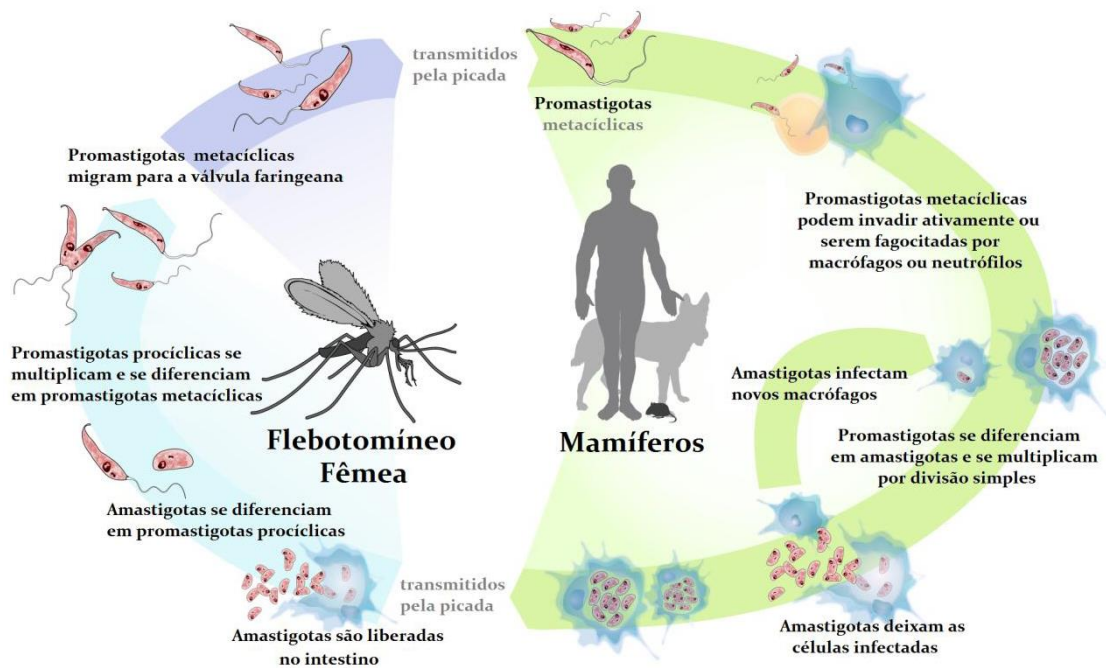


Figura 1.6 - Ciclo biológico do *Leishmania*⁴⁷

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento de leishmaniose são os antimoniais pentavalentes, glucantime e pentostam, que são administrados por via intramuscular ou endovenosa. O glucantime é o medicamento de primeira escolha no Brasil. Porém os antimoniais são bastante tóxicos. Em casos de resistência ao tratamento com esses fármacos, é recomendável a administração do fármaco de segunda escolha, anfotericina B, que também possui uma alta toxicidade. Por isso a importância de identificar novos compostos menos tóxicos e que reduzam o risco de resistência.⁴⁸

O composto nitroimidazólico fexinidazol (Figura 1.7) foi redescoberto pela DNDi (drugs for neglected diseases initiative) e agora está sendo considerado para o tratamento da doença de Chagas e tripanossomíase humana africana. Esse composto apresentou atividade antileishmania e perfil pré-clínico preliminar como candidato ao tratamento de leishmaniose visceral.⁴⁹

⁴⁷ G. G. Almeida. Dissertação de Mestrado – Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2012.

⁴⁸ M. M. Bastos, N. Boechat, L. V. B. Hoelz, A. P. de Oliveira. Rev. Virtual Quim. 8 (2016) 2072-2104.

⁴⁹ S. Wyllie, A. J. Roberts, S. Norval, S. Patterson, B. J. Foth, M. Berriman, K. D. Read, A. H. Fairlamb. Sci. Transl. Med. 4 (2012) 119–126.

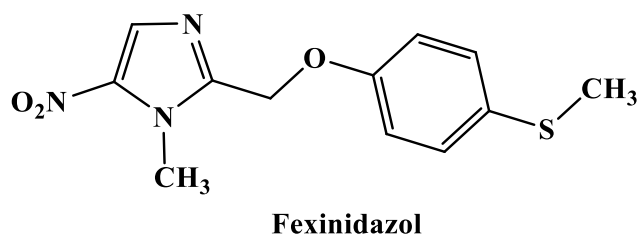


Figura 1.7 - Estrutura química do fexinidazol.

1.6 – Utilização de Bases de Schiff na Química Medicinal

Hidrazonas e tiossemicarbazonas são bases de Schiff conhecidas como iminas, que constituem uma classe de compostos com a presença de uma ligação dupla entre o carbono e o nitrogênio, conforme mostrado na (Figura 1.8). São obtidas a partir da reação de condensação de tiossemicarbazidas ou hidrazidas com aldeídos ou cetonas. Esses compostos são conhecidos também pelas suas excelentes propriedades de formarem complexos metálicos, comportando-se como agentes quelantes.^{50,51} As bases de Schiff apresentam-se como ligantes versáteis, tanto na forma neutra quanto na forma aniônica, podendo formar ligação coordenada com metais por meio do átomo de nitrogênio azometínico (C=N) e do átomo de enxofre, no caso das tiossemicarbazonas e do átomo de oxigênio, no caso das hidrazonas.⁵²

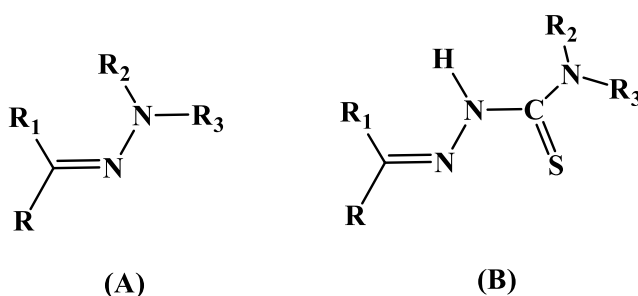


Figura 1.8 - Estrutura genérica de hidrazonas **(A)** e tiossemicarbazonas **(B)**, onde R, R₁, R₂ e R₃ = H, grupos alquila ou arila.

⁵⁰ J. S. Casas, M. S. García-Tasende, J. Sordo. *Coordin. Chem. Rev.* 209 (2000) 197–261.

⁵¹ A. Hameed, M. Al-Rashida, M. Uroos, S. A. Ali, K. M. Khan. *Expert. Opin. Ther. Pat.* 27 (2017) 63-79.

⁵² R. P. Tenório, A. J. S. Góes, J. G. Lima, A. R. Faria, A. J. Alves, T. M. Aquino. *Quim. Nova* 28 (2005) 1030-1037.

A síntese das bases de Schiff é bastante conhecida por sua alta quimiosseletividade, apresentando geralmente altos rendimentos. Seu mecanismo (Figura 1.9) ocorre a partir da protonação do oxigênio da carbonila do aldeído ou cetona, seguida de um ataque nucleofílico da amina, logo após, ocorre prototropismo (troca de prótons dentro da mesma molécula) e a liberação de uma molécula de água. Na última etapa ocorre a remoção do hidrogênio ligado ao nitrogênio, com a formação da imina.^{52,53}

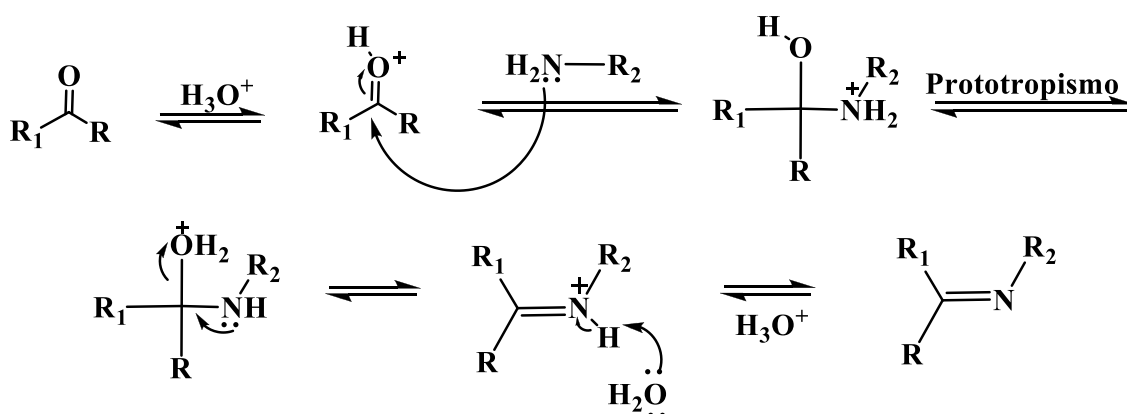


Figura 1.9 - Mecanismo geral simplificado proposto para a reação da obtenção de bases de Schiff, onde R, R₁ e R₂ = H, grupos alquila ou arila.^{52,53}

1.6.1 - Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas apresentam, entre outras, atividades como agentes antitumorais,⁵⁴ antivirais,⁵⁵ antifúngicos,⁵⁶ antibacterianos,⁵⁷ antitripanossoma,⁵⁴ antituberculoses⁵⁸ e antimaláricos⁵⁹. A atividade antitumoral tem sido, sem dúvida, a mais estudada.

⁵³ F. A. Carey, R. J. Sundberg. *Advanced Organic Chemistry*. 5ª ed. Virginia: Charlottesville, 2007.

⁵⁴ T. A. R. dos Santos, A. C. da Silva, E. B. Silva, P. Gomes, J. W. P. Espindola, M. V. D. Cardoso, D. R. M. Moreira, A. C. L. Leite, V. R. A. Pereira. *Biomed. Pharmacother* 82 (2016) 555-560.

⁵⁵ M. C. S. Santacruz, M. Fabiani, E. F. Castro, L. V. Cavallaro, L. M. Finkielstein. *Bioorgan. Med. Chem.* 25 (2017) 4055-4063.

⁵⁶ L. N. D. Neto, M. D. A. de Lima, J. F. de Oliveira, E. R. de Souza, M. D. S. Buonafina, M. N. V. Anjos, F. A. Brayner, L. C. Alves, R. P. Neves, F. J. B. Mendonca. *Chem-Biol. Interact.* 272 (2017) 172-181.

⁵⁷ N. Sharma, D. P. Pathak. *Int. J. Pharm. Sci. Drug. Res.* 8 (2017) 667-678.

⁵⁸ V. Velezheva, P. Brennan, P. Ivanov, A. Kornienko, S. Lyubimov, K. Kazarian, B. Nikonenko, K. Majorov, A. Apt. *Bioorgan. Med. Chem. Lett.* 26 (2016) 978-985.

Por exemplo, a Triapina (Figura 1.10) é uma tiossemicarbazona (*N*)-heterocíclica que está em fase clínica III, e apresenta atividade citotóxica contra alguns tumores. O mecanismo de ação da Triapina envolve a inibição da atividade da ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR), uma enzima é responsável pela biossíntese e reparo ao DNA. A atividade catalítica da enzima que é inibida a partir do contato da Triapina com o íon ferro(III), que está presente em uma subunidade da RDR, ocorrendo a coordenação do composto ao centro metálico de ferro.^{60,61}

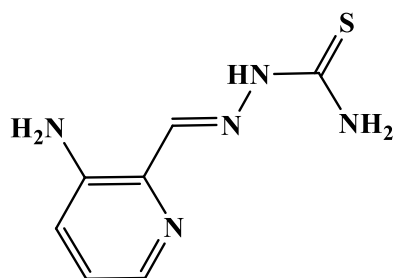


Figura 1.10 - Estrutura química da Triapina.

As tiossemicarbazonas, por possuírem capacidade quelante e uma ampla faixa de bioatividades, têm sido investigadas na Química Medicinal Inorgânica por vários autores e por nosso grupo de pesquisa. Os estudos revelam que, em muitos casos, a atividade farmacológica desses compostos é potencializada pela complexação aos metais.^{62,63}

1.6.2 - Hidrazonas

Hidrazonas têm sido pesquisadas em várias áreas além das aplicações farmacológicas, em razão de sua alta habilidade quelante, como por exemplo, na química analítica, em que são utilizadas como reagentes para a determinação de cobre em águas naturais.⁶⁴

⁵⁹ O. Prakash, M. P. Tanwar, R. M. Moriarty, Indian. J. Chem. B. 31 (1992) 470-471.

⁶⁰ R. A. Finch, M. C. Liu, S. P. Grill, W. C. Rose, R. Loomis, K. M. Vasquez, Y. C. Cheng, A. C. Sartorelli. Biochem. Pharmacol. 59 (2000) 983-991.

⁶¹ H. Beraldo. Quim. Nova. 27 (2004) 461-471.

⁶² L. B. P. Sâmia, G. L. Parrilha, J. G. Da Silva, J. P. Ramos, E. M. Souza-Fagundes, S. Castelli, V. Vutey, A. Desideri, H. Beraldo. Biometals 29 (2016) 515-526.

⁶³ J. G. Da Silva, C. C. H. Perdigão, N. L. Speziali, H. Beraldo. J. Coord. Chem. 66 (2013) 385-401.

⁶⁴ R. R. Singh, P. Jam, R. P. Singh. Talanta 29 (1982) 77-84.

Na área medicinal, as hidrazonas apresentam atividade antitumoral,⁶⁵ antimicrobiana,⁶⁶ antimalárica,⁶⁷ anti-inflamatória,⁶⁸ antituberculose,⁶⁹ anticonvulsivante,⁷⁰ analgésica,⁷¹ anti-HIV,⁷² dentre outras.

Assim como as tiossemicarbazonas, as hidrazonas, quando complexadas aos metais em muitos casos, têm suas bioatividades potencializadas.^{73,74,75}

1.7 – Utilização de nitrocompostos na Química Medicinal

Em 1947, Paul R. Burkholder e colaboradores descobriram o cloranfenicol (Figura 1.3), um nitrocomposto isolado inicialmente de uma cultura de *Streptomyces venezuelae*, a partir de uma amostra de solo venezuelano. Em 1949 foi aprovada a sua comercialização para tratamento de infecções bacterianas, porém a toxicidade do cloranfenicol também foi reconhecida muito cedo e seu uso limitado.⁷⁶

Os nitroimidazóis foram descobertos em 1953 por Maeda e colaboradores, com o isolamento do 2-nitroimidazol, também chamado de azomicina (Figura 1.11). Desde então, vários nitroimidazóis foram sintetizados com interesse na Química Medicinal. Em 1957, foi sintetizado o metronidazol (Figura 1.3) a partir da modificação da estrutura química da azomicina, o qual se mostrou bastante efetivo contra o *Trichomonas vaginalis* e, a partir de 1960, começou a ser comercializado com nome Flagyl[®], para tratamento contra infecções por protozoários.⁷⁷

⁶⁵ T. Nasr, S. Bondock, M. Youns. Eur. J. Med. Chem. 76 (2014) 539-548.

⁶⁶ H. Aslan, S. Özcan, N. Karacan. Spectro. Chim. Acta. A 98 (2012) 329–336.

⁶⁷ P. Melnyk, V. Leroux, C. Sergheraert, P. Grellier. Bioorg. Med. Chem. Lett. 16 (2006) 31–35.

⁶⁸ M. A. Abdelgawad, M. B. Labib, M. Abdel-Latif. Bioorg. Chem. 74 (2017) 212–220.

⁶⁹ V. E. Kataeva, I. Y. Strobkykina, O. V. Andreeva, B. F. Garifullin, R. R. Sharipova, V. F. Mironov, R. V. Chestnova. Russ. J. Bioorg. Chem. 37 (2011) 483–491.

⁷⁰ V. Angelova, V. Karabeliov, P. A. Andreeva-Gateva, J. Tchekalarova. Drug. Develop. Res. (2016)

⁷¹ C. A. M. Fraga, E. J. Barreiro. Curr. Med. Chem. 13 (2006) 167-198.

⁷² P. Vicini, M. Incerti, P. L. Colla, R. Loddo. Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1801-1807.

⁷³ I. P. Ferreira, E. D. L. Piló, A. A. Recio-Despaigne, J. G. Da 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) 2988–2998.

⁷⁴ A. A. R. Despaigne, J. G. Da Silva, P. R. da Costa, R. G. dos Santos, H. Beraldo. Molecules 19 (2014) 17202-17220.

⁷⁵ E. D. Piló, A. A. Recio-Despaigne, J. G. Da Silva, I. P. Ferreira, J. A. Takahashi, H. Beraldo. Polyhedron 97 (2015) 30–38.

⁷⁶ J. Ehrlich, Q. R. Bartz, R. M. Smith, D. A. Joslyn, P. R. Burkholder. Science 106 (1947) 417-417.

⁷⁷ M. Moreth, D. Ornelas, C. R. B. Gomes, M. V. N. Souza. Rev. Virtual Quim. 2 (2010) 105-117.

Estudos posteriores demonstraram a atividade do metronidazol contra infecções causadas por diferentes protozoários, como por exemplo, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolitica*, dentre outros. Com o sucesso do metronidazol, outros derivados de 5-nitroimidazol foram desenvolvidos, como os fármacos: tinidazol, ornidazol, secnidazol e benznidazol (Figura 1.11), usados para o tratamento de casos críticos de infecções causadas por protozoários e bactérias anaeróbicas.⁷⁸

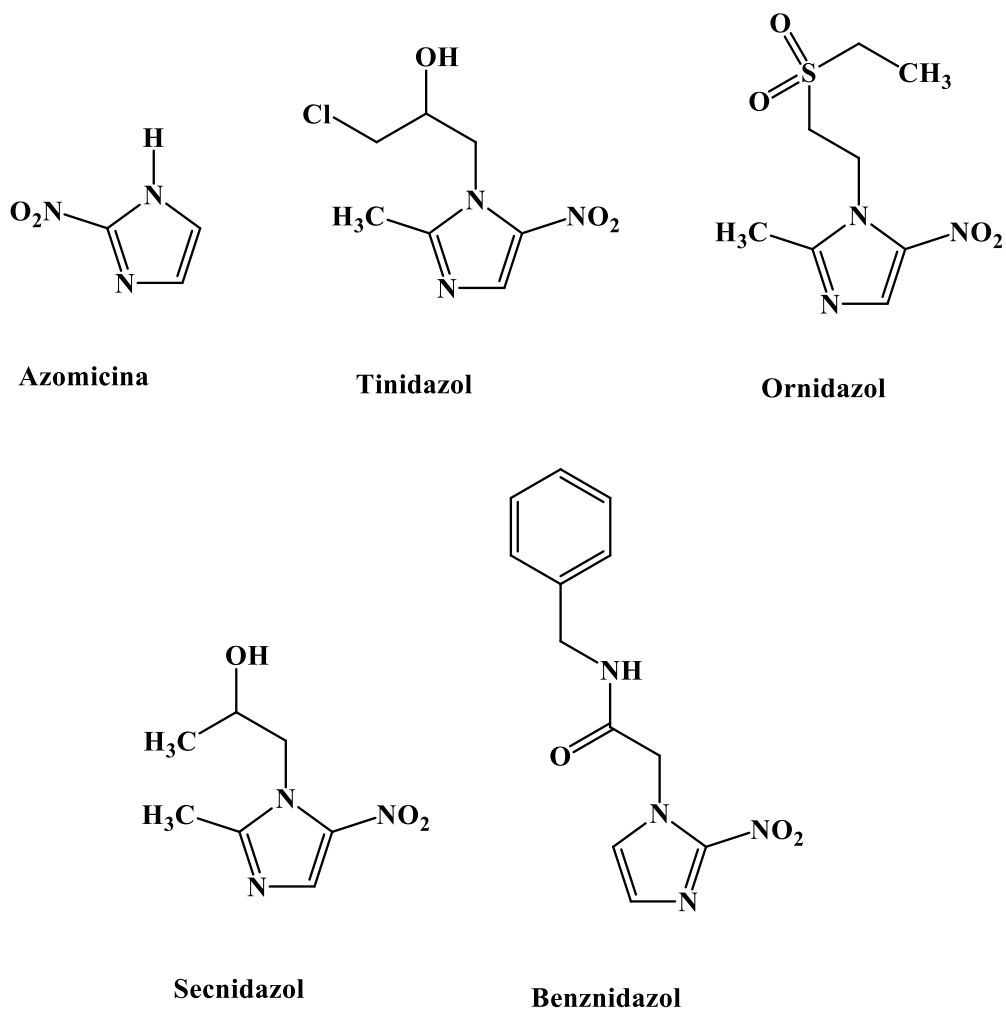


Figura 1.11 - Estruturas químicas de derivados de nitrocompostos.

O secnidazol apresenta um espectro de ação similar ao do metronidazol contra micro-organismos anaeróbicos, e também é eficaz no tratamento de amebíase, giardíase, tricomoníase e vaginose bacteriana. Estudos demonstraram que o secnidazol apresentava parâmetros farmacocinéticos mais apropriados que o metronidazol, como melhor absorção e tempo de meia vida significativamente maior, permitindo a

⁷⁸ A. Anthwal, D.S. Rawat, M.S.M. Rawat. Res. J. Chem. Sci. 3 (2013) 104-113.

administração de menores doses. Além disso, tratamentos com secnidazol mostraram-se bastante efetivos e acarretaram menos efeitos colaterais.⁷⁹

Em 1995, Rozenski e colaboradores relacionaram a ação antibacteriana dos nitroimidazóis com o processo de redução, comprovando que esta bioatividade é decorrente da redução do grupo nitro.⁸⁰

Mais recentemente foi proposto que derivados de 5-nitroimidazóis são pró-fármacos cuja redução ocorre no ambiente intracelular nos micro-organismos anaeróbios, via flavoproteínas, ferredoxinas e algumas enzimas redutases, como NADPH-citocromo P450 redutase, tiorredoxina redutase e superóxido dismutase, que atuam na ativação biorredutiva dos nitroimidazóis.⁸¹

Nas reações de ativação dos nitroimidazóis, a adição do primeiro elétron para formar um ânion nitro radical é reversível na presença de oxigênio molecular (Figura 1.12) e acredita-se que este passo seja a base da dependência de oxigênio da ativação e ligação biorredutiva de nitroimidazóis. Em condições aeróbias, o ânion nitro radical é reoxidado para o nitro composto precursor, resultando em um “ciclo inútil”, sem a geração de um intermediário reativo. A presença de O₂ pode resultar na competição entre o caminho de redução adicional do radical e a reação de transferência de um elétron a partir do O₂ intracelular para resultar no íon radical superóxido e o nitro composto regenerado.⁸²

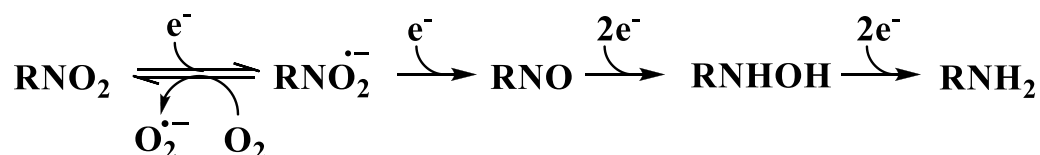


Figura 1.12 - Processo biorredutivo de nitrocompostos nas células.

Como a atividade dos nitroimidazóis está relacionada à redução do grupo nitro, que ocorre em ambiente de baixa concentração de oxigênio, a literatura relata também estudos de atividade antiproliferativa desses compostos contra células tumorais na região de hipóxia, que possui baixo teor de oxigênio. A atividade ocorre pela tendência dos compostos de penetrar e se acumularem nos tumores, com a biorredução do grupo

⁷⁹ J.C. Gillis, L.R. Wiseman. *Drugs* 51 (1996) 621-638.

⁸⁰ J. Rozenski, C. J. De Raunter, H. Verplanken. *Quant. Struct.-Act. Relat.* 14 (1995) 134-141.

⁸¹ D. Leitsch, A. G. Burgess, L. A. Dunn, K. G. Krauer, K. Tan, M. Duchêne, P. Upcroft, L. Eckmann, J. A. Upcroft. *J. Antimicrob. Chemother.* 66 (2011) 1756–1765.

⁸² D. Leitsch, S. Schlosser, A. Burgess, M. Duchene. *Int. J. Parasitol-Drug.* 2 (2012) 166-170.

nitro gerando espécies como o nitro radical ($R\text{-NO}_2^{\cdot-}$) e hidroxilamina ($R\text{-NHOH}$) que podem causar danos às proteínas e aos ácidos nucleicos.⁸³

Trabalhos relatados na literatura descrevem atividade antimicrobiana e antiparasitária de bases de Schiff derivadas de 5-nitroimidazol em micro-organismos anaeróbios. Bases de Schiff derivadas de 5-nitroimidazol também apresentaram atividade antiproliferativa contra células tumorais.^{84,85,86,87,88} Assim, é interessante a obtenção de novas bases de Schiff contendo como substituinte o grupo 5-nitroimidazol, assim como os complexos desses ligantes com diferentes metais.

1.8 – Utilização de compostos de cobre na Química Medicinal

O cobre é um metal de número atômico 29, com configuração $[\text{Ar}] 3d^{10}4s^1$, com estado de oxidação mais estável (II). Assim, cobre(I) se oxida facilmente a cobre(II). Os estados de oxidação (III) e (IV) são pouco comuns. Cobre(II) forma complexos com uma grande variedade de ligantes com diferentes átomos doadores, pois é considerado, na escala de Pearson, um ácido intermediário.⁸⁹ Os complexos de cobre(II) são paramagnéticos e apresentam uma variedade de geometrias e número de coordenação. Essa variedade pode ser atribuída à sua configuração eletrônica ser d^9 , em que o elétron desemparelhado no orbital e_g proporciona uma distorção da geometria, causada pelo efeito Jahn-Teller.⁹⁰

O cobre é muito importante e possui uma gama de funções nos sistemas biológicos. Nos processos enzimáticos, o cobre está envolvido na catálise de reações de redução e oxidação, na catálise de oxidação de fenóis, na tirosinase (enzima responsável pela síntese de pigmento de melanina), entre outras funções.⁹¹

⁸³ O. Mazuryk, F. Suzenet, C. Kieda, M. Brindell. *Metallomics* 7 (2015) 553-566.

⁸⁴ F. Zhang, Q. Wen, S. F. Wang, B. S. Karim, Y. S. Yang, J. J. Liu, W. M. Zhang, H. L. Zhu. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 90-95.

⁸⁵ X. Zhang, C. B. Sangani, L. X. Jia, P. X. Gong, F. Wang, J. F. Wang, H. L. Zhu. *Rsc. Adv.* 4 (2014) 54217-54225.

⁸⁶ H. A. Saadeh, E. A. Abu Shaireh, I. M. Mosleh, A. G. Al-Bakri, M. S. Mubarak. *Med. Chem. Res.* 21 (2012) 2969-2974.

⁸⁷ J. A. Makawana, C. B. Sangani, L. Lin, H. L. Zhu. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 1734-1736

⁸⁸ J. A. Makawana, J. Sun, H. L. Zhu. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 6264-6268

⁸⁹ M. Sutradhar, M. V. Kirillova, M. F. C. Guedes da Silva, C. M. Liuc, A. J. L. Pombeiro. *Dalton Trans.* 42(2013)16578.

⁹⁰ D. F. Shriver, P. Atkins. *Química Inorgânica*, 4ª Edição, Porto Alegre Bookman, 2008.

⁹¹ M. C. Linder, M. HazeghAzam. *Am. J. Clin. Nutr.* 63 (1996) 797-811.

Por outro lado, níveis altos de cobre no corpo provocam distúrbios como a doença de Wilson, caracterizada por acumulação excessiva de cobre no fígado, cérebro, córnea e, posteriormente, em rins e outros órgãos,⁹² e a doença de Menkes, que se trata de um erro inato do metabolismo do cobre, caracterizado clinicamente por grave retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, síndrome convulsiva, alterações ósseas e alterações arteriais.⁹³ Além disso, resultados mostram que existe uma relação entre a doença de Alzheimer e o metabolismo do cobre.^{94,95}

Em razão da importância fisiológica do cobre e de sua singularidade na atividade redox, muitos complexos de cobre foram sintetizados e investigados por sua terapêutica e potencial de diagnóstico em doenças humanas. Assim, complexos de cobre(II) apresentaram atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, antineurodegenerativa, antioxidante, antituberculose, antileishmaniose, entre outras.⁹⁶

Complexos de cobre(II) com bases de Schiff foram extensivamente estudados em virtude de sua forte interação com o DNA via superfície, associação ou intercalação e potenciais atividades de clivagem do DNA via mecanismos hidrolíticos ou oxidativos.⁹⁷ Complexos de cobre(II) com bases de Schiff também têm mostrado atividade antifúngica⁹⁸ e antibacteriana.⁹⁹

1.9 – Utilização de compostos de prata na Química Medicinal

A prata é um metal de número atômico 47, que possui a configuração eletrônica [Kr] 4d¹⁰ 5s¹. A prata é obtida por meio de extração direta, através de minérios como Argentita (Ag₂S) e a Cloroargirita (AgCl). O estado de oxidação (I) é o mais comum, assim o íon prata(I) pode formar uma variedade de complexos, com número de coordenação igual a 2, 3, 4 e 6, e geometria linear, trigonal plana, tetraédrica e octaédrica. A prata(I) tende a complexar com ligantes nitrogenados, sulfurados e íons

⁹² G. Q. Hou, X. L. Liang, R. Chen, L. W. Tang, Y. Wang, P. Y. Xu, Y. R. Zhang, C. H. Ou. *World. J. Gastroentero.* 7 (2001) 846-851.

⁹³ H. Shim, Z. L. Harris. *J. Nutr.* 133 (2003) 1527S-1531S.

⁹⁴ A. Hordyjewska, L. Popiolek, J. Kocot. *Biometals* 27 (2014) 611-621.

⁹⁵ S. Rivera-Mancia, I. Perez-Neri, C. Rios, L. Tristan-Lopez, L. Rivera-Espinosa, S. Montes. *Chem-Biol. Interacts.* 186 (2010) 184-199.

⁹⁶ C. Duncan, A. R. White. *Metallomics* 4 (2012) 127-138.

⁹⁷ P. R. Reddy, S. Rajeshwar, B. Satyanarayana. *J. Photoch. Photobio. B.* 160 (2016) 217-224.

⁹⁸ A. Rambabu, M. P. Kumar, S. Tejaswi, N. Vamsikrishna. *Ibid.* 165 147-156.

⁹⁹ K. Jana, T. Maity, T. S. Mahapatra, P. K. Das Mohapatra, S. C. Debnath, S. Das, M. Hossain, B. C. Samanta. *Transit. Metal. Chem.* 42 (2017) 69-78.

haletos como doadores, sendo essa característica explicada pela teoria de ácidos e bases de Pearson, um ácido macio.^{100,101}

O estado de oxidação (II) ocorre a partir da oxidação de uma solução de prata(I), podendo formar complexos com estrutura quadrado planar e paramagnéticos. Já o estado de oxidação (III) é raro e pode ser encontrado a partir da oxidação eletrolítica de prata(I) gerando Ag_2O_3 .¹⁰²

A prata foi utilizada na Ásia como moeda em 700 a.C.. Na Segunda Guerra Mundial foi empregada como eletrodo no processo de purificação de urânio devido à sua maior condutividade elétrica dentre todos os metais. O emprego da prata e de seus compostos na medicina e na purificação da água se deve à atividade antibacteriana e antifúngica dos íons prata(I).¹⁰⁰

As primeiras aplicações tópicas de AgNO_3 , nitrato de prata, foram provavelmente para o tratamento de feridas crônicas, infecções venéreas, acne e úlceras. O nitrato de prata parece ter sido usado na forma sólida, endurecida, conhecida sob muitos nomes diferentes no século XVII.¹⁰³ No final do século 19, 1% de solução de nitrato de prata era usada para reduzir às infecções oculares pós-parto. No final da década de 1960 foi introduzida uma solução de 0,5% de nitrato de prata para o tratamento de queimaduras.¹⁰⁴

No final da década de 60, o creme de sulfadiazina de prata(I) (Ag-SD), Figura 1.13, foi introduzido na clínica para tratamento de pacientes com queimaduras, o que revolucionou a conduta terapêutica, com redução significativa da incidência de infecção e sepse.¹⁰⁵ Ag-SD possui um amplo espectro de atividades, sendo muito eficiente contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, principais organismos responsáveis pelas infecções decorrentes de queimaduras.^{106,107} Sua atividade antimicrobiana é mediada pela reação do íon prata(I) com DNA microbiano. Além disso, age sobre a membrana e paredes celulares dos micro-organismos, promovendo o enfraquecimento

¹⁰⁰ G. D. de Souza, M. A. Rodrigues, P. P. Silva, W. Guerra. Educ. Quím. 24(2013)14-16.

¹⁰¹ H. J. Hao, D. Sun, Y-H. Li, F-J. Liu, R-B. Huang, L-S. Zheng. Cryst. Growth Des. 11 (2011) 3564-3578.

¹⁰² J. D. Lee, Química inorgânica não tão concisa. 5. ed. São Paulo: Edgard Blücher,1999.

¹⁰³ H. J. Klasen. Burns 26 (2000) 117-130.

¹⁰⁴ J. Fong, F. Wood. Int. J. Nanomed. 1 (2006) 441-449.

¹⁰⁵ H. Moser, R. R. Pereira, M. J. L. Pereira. Rev. Bras. Queimaduras 12 (2013) 60-67.

¹⁰⁶ G. D. de Souza, M. A. Rodrigues, P. P. Silva, W. Guerra. Educ. Quím. 24 (2013)14-16.

¹⁰⁷ H. Vermeulen, J. M. van Hattem, M. N. Storm-Versloot, D. T. Ubbink, S. J. Westerbos. Cochrane Wounds Group. 1 (2007).

destas. Porém, este fármaco provoca importantes efeitos colaterais como discrasia sanguínea, reações gastrointestinais e alergias.¹⁰⁸

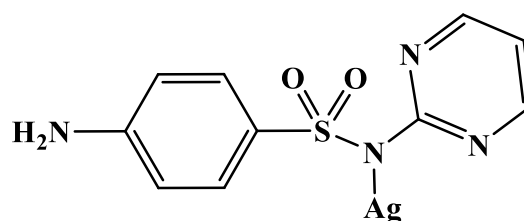


Figura 1.13 - Estrutura da sulfadiazina de prata(I).

Com base nos méritos associados à prata(I) e aos desafios emergentes em tratamento de doenças, há um grande interesse no desenvolvimento de novos compostos de prata(I) com atividade antitumoral, antiulcerosa, antibacteriana e antifúngica.¹⁰⁸ Assim, complexos de prata(I) com base de Schiff mostraram atividade pronunciada contra bactérias *Gram-negativas* e *Gram-positivas* e contra fungos, alguns com ação mais potente ou comparável às de agentes antibacterianos e antifúngicos utilizados na clínica médica.¹⁰⁹

A atividade antitumoral dos complexos de prata(I) ainda é pouco estudada. Apesar disso, compostos de prata(I) têm sido sintetizados e têm demonstrado atividade antitumoral com uma toxicidade relativamente baixa para as células humanas normais.¹¹⁰ Tan e colaboradores, por exemplo, descreveram um estudo preliminar de novas bases de Schiff derivadas de 2-acetilpirazina e 2-acetilpirazina juntamente com os seus complexos de prata(I), os quais inibiram fortemente a reprodução de células de câncer de pulmão, enquanto as bases de Schiff livres mostraram atividade muito baixa.¹¹¹

¹⁰⁸ E. M. Njogu, B. Omondi, V. O. Nyamori. *J. Mol. Struct.* 1135 (2017) 118-128.

¹⁰⁹ N.V. Loginova, T. V. Koval, A. T. Gres, N. P. Osipovich, G. I. Polozov, Y. S. Halauko, Y. V. Faletrov, H. I. Harbatsevich, A. V. Hlushko, I. I. Azarko, Y. V. Bokshits. *Polyhedron* 88 (2015) 125-137.

¹¹⁰ L. Ortego, M. Meireles, C. Kasperc, A. Laguna, M. D. Villacampa, M. C. Gimeno. *J. Inorg. Biochem.* 156 (2016) 133-144.

¹¹¹ X. J. Tan, H. Z. Liu, C. Z. Ye, J. F. Lou, Y. Liu, D. X. Xing, S. P. Li, S. L. Liu, L. Z. Song. *Polyhedron* 71 (2014) 119-132.

1.10 – Utilização de compostos de bismuto na Química Medicinal

O bismuto é um metal de número atômico 83, que possui a configuração eletrônica [Xe] 4f¹⁴ 5d¹⁰6s²6p³. O estado de oxidação (III) é o estado mais estável e (V) o menos estável. Bismuto foi confundido com chumbo e estanho durante séculos devido à sua localização na tabela periódica tendo algumas propriedades semelhantes e só foi distinguido apenas em 1739. O que é completamente diferente é a toxicidade do chumbo e estanho em relação ao bismuto, já que o bismuto e seus compostos têm uma toxicidade excepcionalmente baixa.¹¹²

O primeiro medicamento contendo bismuto foi relatado em 1786 para o tratamento de dispepsia, marcando o início do uso médico de complexos de bismuto. Baseados nesses estudos, outros complexos de bismuto foram explorados no tratamento de várias doenças como distúrbios gastrointestinais e infecções microbianas, incluindo sífilis, diarreia, gastrite e colite, com boa eficácia e uma toxicidade baixa.¹¹³

O bismuto é utilizado no tratamento de doenças do trato gastrointestinal relacionadas à bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) desde 1970. *H. pylori* é uma bactéria Gram-negativa de forma espiralada, que se aloja na mucosa gastrointestinal e causa danos a células epiteliais, causando infecções graves e crônicas com espectro diverso de distúrbios gastrointestinais, incluindo gastrite crônica e úlcera péptica. Estima-se que é afetada cerca de 80% da população em países subdesenvolvidos. Atualmente o tratamento consiste na erradicação da bactéria e, neste aspecto, são empregadas diversas associações farmacêuticas contendo os complexos citrato de bismuto coloidal (De-nol[®]), subsalicilato de bismuto (Pepto-Bismol[®]) e citrato de bismuto ranitidina (Pylorid[®]).^{114,115}

Devido às atividades farmacológicas, a pesquisa da química do bismuto tem sido alvo de muitos estudos. Assim, vários complexos de bismuto desenvolvidos ao longo dos anos foram avaliados por sua atividade antibacteriana e antifúngica.¹¹⁶

¹¹² P. J. Sadler, H. Y. Li, H. Z. Sun. *Coord. Chem. Rev.* 185-6 (1999) 689-709.

¹¹³ Y. Yang, R. Z. Ouyang, L. N. Xu, N. Guo, W. W. Li, K. Feng, L. Ouyang, Z. Y. Yang, S. Zhou, Y. Q. Miao. *J. Coord. Chem.* 68 (2015) 379-397.

¹¹⁴ G. G. Briand, N. Burford. *Chem. Rev.* 99 (1999) 2601-2657.

¹¹⁵ D. P. Rocha, G. F. Pinto, R. Ruggiero, C. A. Oliveira, W. Guerra, A. P. S. Fontes, T. T. Tavares, I. M. Marzano, E. C. Pereira-Maia. *Quim. Nova* 34 (2011) 111-118.

¹¹⁶ N. Yang, H. Sun. *Coord. Chem. Rev.* 251 (2007) 2354-2366.

O principal alvo para biocoordenação de compostos de bismuto não é o DNA, oferecendo oportunidades para novos mecanismos de ação em compostos contendo bismuto para tratamento do câncer. Várias moléculas sintéticas de bismuto apresentaram atividades antiproliferativas *in vitro*.¹¹⁷

Compostos dos radioisótopos de bismuto, ^{212}Bi ($t_{1/2} = 61\text{min}$) e ^{213}Bi ($t_{1/2}=46\text{min}$), que são radionuclídeos emissores de partículas- α capazes de transferir energia de forma linear com mais eficiência do que emissores de partículas- β , têm sido alvo de investigações como agentes para terapia do câncer.¹¹⁸

1.11 – Utilização de compostos de antimônio na Química Medicinal

O antimônio é um metal de número atômico 51, que possui a configuração eletrônica $[\text{Kr}] 4d^{10}5s^25p^3$ e vários estados de oxidação (-III, III e V), sendo mais comum o estado de oxidação (III), que é o mais estável.¹¹⁹ Na natureza o antimônio é encontrado em vários minerais, principalmente na forma de óxidos e sulfetos. O antimônio e seus compostos são amplamente utilizados na fabricação de cerâmica, vidro, baterias, tinta, material de fogo de artifício e munição.¹²⁰

Os compostos de antimônio são amplamente usados na medicina, sendo o principal uso clínico no tratamento de leishmanioses. O tártaro hemético, por exemplo, um antimonial trivalente, foi introduzido na clínica em 1912 pelo cientista brasileiro Gaspar Viana para o tratamento dessas patologias. Porém, seu uso foi suspenso pela alta toxicidade, e a partir de 1945 esse composto foi substituído por antimoniais pentavalentes, que apresentaram menor toxicidade.¹²¹

Atualmente, encontram-se em uso clínico para o tratamento de leishmanioses o gluconato de antimônio(V) (pentostam), comercializado nos países de língua inglesa, e o antimoniato de meglumina (glucantime), comercializado no Brasil e nos países de língua francesa e espanhola. Estudos sugerem que esses complexos de antimônio(V)

¹¹⁷ A. Islam, B. L. Rodrigues, I. M. Marzano, E. C. Perreira-Maia, D. Ditz, M. T. P. Lopes, M. Ishfaq, F. Frezard, C. Demicheli. *Eur. J. Med. Chem.* 109 (2016) 254-267.

¹¹⁸ E. Dadachova, M. C. Patel, S. Toussi, C. Apostolidis, A. Morgenstern, M. W. Brechbiel, M. K. Gorny, S. Zolla-Pazner, A. Casadevall, H. Goldstein. *Plos Medicine* 3 (2006) 2094-2103.

¹¹⁹ M. Filella, N. Belzile, Y. W. Chen. *Earth-Science Reviews* 57 (2002) 125-176.

¹²⁰ B. Wen, J. Zhou b, A. Zhou, C. Liu, L. Li. *Int. Biodeter. Biodegr.* 128 (2018) 109-116.

¹²¹ S. Rath, L. A. Trivelin, T. R. Imbrunito, D. M. Tomazela, M. N. de Jesús, P. C. Marzal. *Quím. Nova* 26 (2003) 550-555.

atuam como pró-fármacos, ou seja, que o antimônio(V) converte-se em antimônio(III), que é a forma tóxica, a partir de enzimas celulares que atuam como agentes redutores.¹²³

Embora o principal uso dos antimoniais seja no tratamento das leishmanioses, estudos relatam que esses complexos têm sido extensivamente estudados na medicina como agentes antimicrobianos,¹²² e anticâncer.¹²³ Como *Leishmania* e *Trypanosoma* apresentam muitas semelhanças bioquímicas, a busca por antimoniais com atividade antitripanossoma também tem sido estimulada.¹²⁴

1.12 – Utilização de compostos de ouro na Química Medicinal

O ouro é um metal de número atômico 79, configuração eletrônica [Xe] 5d¹⁰6s¹ e vários estados de oxidação, de (I) a (V). Os compostos com os estados de oxidação (I) e (III) são dominantes na química e na maioria das pesquisas biológicas. Ouro(I) forma complexos de geometria linear com número de coordenação igual a 2, sendo que também existem complexos tri e tetra coordenados de ouro(I), embora sejam menos comuns.¹²⁵ Ouro(III) forma complexos quadrado planares com número de coordenação igual a 4. O ouro(I) é classificado como um ácido macio, enquanto o ouro(III) possui características intermediárias. A estabilidade de seus complexos diminui com o aumento da eletronegatividade dos átomos doadores do ligante, assim têm a tendência de complexar-se com ligantes nitrogenados, sulfurados e íons haletos.^{126,127}

A utilização de compostos de ouro na medicina tem sido explorada em toda história da civilização, desde a antiguidade, para o tratamento de várias enfermidades. Na Europa medieval, por exemplo, existiam inúmeras receitas para elixir de ouro. Nos séculos 17 e 19, o ouro foi usado para tratar febres e sífilis, respectivamente. O uso do ouro na medicina moderna começou em 1890, quando Robert Koch relatou o uso do complexo [Au(CN)₂] para inibição *in vitro* do bacilo da tuberculose pulmonar. Isso conduziu posteriormente ao tratamento da tuberculose com ouro no início do século XX. Artrite reumatoide (AR), uma doença crônica que causa inflamação articular de

¹²² E. P. S. Martins, G. B. Rocha, J. A. Simoni, J. G. P. Espínola. *Thermochim Acta* 676 (2019) 234-240.

¹²³ H. Wu, X. Sun, Y. Lu, X. Fang, M. Li. *Synth. React. Inorg. M.* (2015) 45, 1859–1863.

¹²⁴ J. Varela, J. A. Lessa, M. L. Lavaggi, H. Beraldo, H. Cerecetto, M. González. *Med. Chem. Res.* 21 (2012) 4120-4128.

¹²⁵ C. Khin, A. S. K. Hashmi, F. Rominger. *Eur. J. Inorg. Chem.* (2010) 1063-1069.

¹²⁶ S. Medici, M. Peana, V. M. Nurchi, J. I. Lachowicz, G. Crisponi, M. A. Zoroddu. *Coordin. Chem. Rev.* 284 (2015) 329-350.

¹²⁷ M. D. Durovic, Z. D. Bugarcic, R. V. Eldik. *Ibid* 338 (2017) 186-206.

forma progressiva, inicialmente era considerada uma forma atípica de tuberculose, o complexo $[\text{Au}(\text{CN})_2]$ foi usado para tratamento de AR nos anos 1920.¹²⁸

Contudo, o grande impulso para utilização medicinal dos complexos de ouro ocorreu durante a década de 1970, quando outros compostos de ouro foram estudados, como por exemplo, a auranofina, Figura 1.14, a qual foi aprovada para uso clínico em 1985, como uma opção de tratamento oral para AR.¹²⁹ Desde então, complexos de ouro que contêm em sua estrutura ligantes com átomos de enxofre, especialmente os derivados de tióis, vêm sendo utilizados no tratamento de AR. São exemplos desses compostos: aurotioglicose (solganol), aurotiomalato (miocrisina), aurotiosulfato (sanocrisina) e sulfonato de aurotiopropanol (alocrisina) (Figura 1.14).¹³⁰

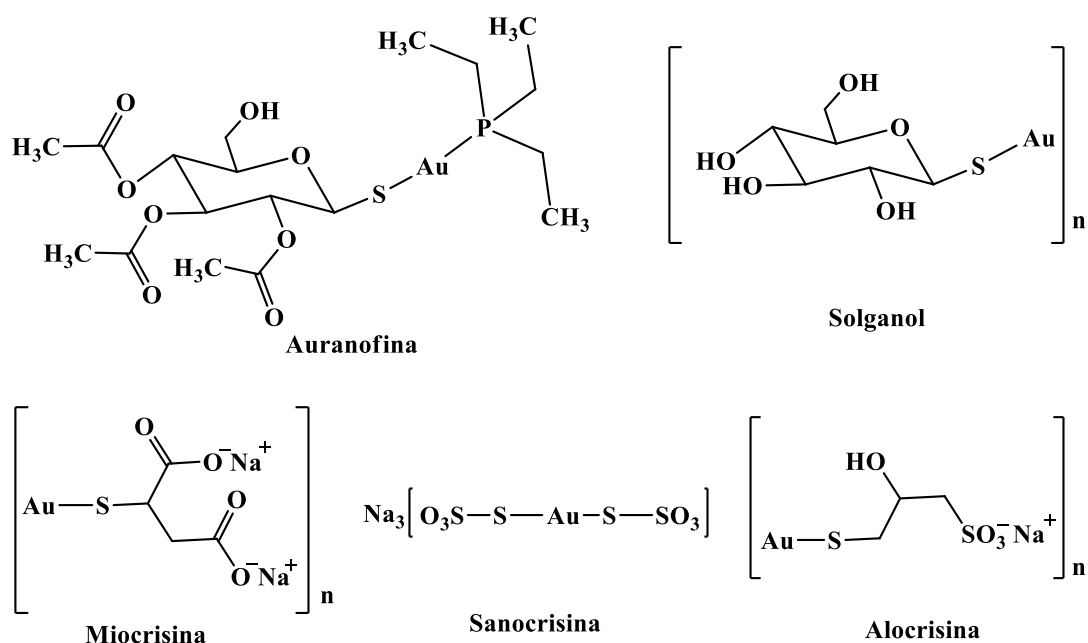


Figura 1.14 - Compostos de ouro usados para tratamento de artrite reumatoide.

O declínio do uso da auranofina para o tratamento de artrite reumatoide pode ser devido, em parte, aos seus efeitos adversos, a maioria dos quais está associada ao uso prolongado para doença crônica. A auranofina pode não ser mais a droga de escolha para artrite reumatoide, mas existem novas pesquisas para novas aplicações no tratamento de alguns tipos de cânceres, infecções parasitárias, infecções bacterianas,

¹²⁸ A. S. Thakor, J. Jokerst, C. Zavaleta, T. F. Massoud, S. S. Gambhir. *Nano Lett.* 11 (2011) 4029-4036.

¹²⁹ B. M. Sutton. *Gold Bull.* 19 (1986) 15-16.

¹³⁰ I. Ott. *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 1670-1681.

HIV e até distúrbios neurodegenerativos como a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer.¹³¹

Complexos de ouro(I) com tiossemicarbazonas como ligantes apresentaram atividade citotóxica *in vitro* contra linhagens celulares tumorais.¹³² Complexos de ouro(I) com bases de Schiff também têm mostrado atividade antimalária.¹³³ Sabe-se que o principal alvo biológico de compostos de ouro é a enzima tiorredoxina redutase, envolvida na síntese de DNA e em vários outros processos biológicos.¹³⁴

1.13 - Objetivos do presente trabalho

Objetivos gerais

O presente trabalho envolveu o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos e metalofármacos antimicrobianos, antitumorais e antiparasitários com base em hidrazonas e tiossemicarbazonas funcionalizadas com os grupos farmacofóricos nitroimidazol e nitrobenzeno e a avaliação das bioatividades dos compostos obtidos, assim como uma investigação preliminar do papel da redução do grupo nitro como parte de seus mecanismos de ação.

Objetivos específicos

- (1) Síntese e caracterização de complexos metálicos de hidrazonas e tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol com cobre(II), prata(I) e bismuto(III);
- (2) Síntese e caracterização de complexos de ouro(I) com tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol;
- (3) Estudos estruturais e avaliação da atividade antileishmania das hidrazonas derivadas de 4-nitroimidazol e 2-nitroimidazol;

¹³¹ C. Roder, M. J. Thomson. *Drugs* 15 (2015) 13–20.

¹³² J. S. Casas, E. E. Castellano, M. D. Couce, J. Ellena, A. Sanchez, J. Sordo, C. Taboada. *Ibid* 100 (2006) 1858-1860.

¹³³ S. D. Khanye, G. S. Smith, C. Lategan, P. J. Smith, J. Gut, P. J. Rosenthal, K. Chibale. *Ibid* 104 (2010) 1079-1083.

¹³⁴ G. L. Parrilha, K. S. O. Ferraz, J. A. Lessa, K. N. de Oliveira, B. L. Rodrigues, J. P. Ramos, E. M. Souza-Fagundes, I. Ott, H. Beraldo. *Eur. J. Med. Chem.* 84 (2014) 537-544.

- (4) Avaliação da atividade antitripanossoma das hidrazonas derivadas de 4-nitroimidazol e seus complexos de antimônio(III) e bismuto(III);
- (5) Avaliação das atividades antimicrobianas dos complexos de prata(I), cobre(II) e bismuto(III) frente a colônias de bactérias anaeróbicas e frente a culturas de fungos;
- (6) Investigação dos efeitos citotóxicos, em células tumorais e sadias, das tiossemicarbazonas e hidrazonas e seus complexos de prata(I) e bismuto(III).
- (7) Avaliação dos efeitos citotóxicos, em células tumorais em condições de normóxia e de hipóxia e células sadias, das tiossemicarbazonas e seus complexos de ouro(I);
- (8) Estudos eletroquímicos de voltametria cíclica dos compostos através de seus potenciais redox, para avaliação da capacidade dos compostos de sofrerem biorredução do grupo nitro.

Capítulo 2

Parte experimental

2.1 - Reagentes e solventes

As reações foram realizadas utilizando reagentes adquiridos de fontes comerciais (Aldrich, Alfa Aesar, Fluka, Merck, Synth, Vetec, Quimex e Strem Chemicals). Os solventes deuterados utilizados foram de procedência CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc).

2.2 - Técnicas Experimentais

2.2.1 - Pontos de fusão

As temperaturas de fusão dos compostos foram determinadas em um equipamento digital Micro-Química Equipamentos LTDA modelo MQAPF-302.

2.2.2 - Análise elementar (CHN)

As microanálises foram realizadas em equipamento Perkin Elmer, modelo CHN-2400, na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP) e no Departamento de Química da UFMG.

2.2.3 - Análises condutimétricas

As medidas de condutividade molar eletrolítica (Λ_M) dos complexos foram realizadas em soluções de dimetilsulfóxido (DMSO) de concentração na ordem de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, à temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. O equipamento utilizado foi um condutivímetro YSI Conductivity Bridge, modelo 31, com célula condutimétrica do mesmo fabricante, de constante $0,088 \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram analisados conforme as atribuições apresentadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Atribuição de tipo de eletrólito para soluções de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.¹³⁵

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

2.2.4 - Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas dos complexos foram obtidas na Termobalança Shimadzu-TGA50H do Departamento de Química da UFMG. Os experimentos foram realizados em atmosfera dinâmica de N_2 , com fluxo de 50 mL min^{-1} e razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. A faixa de temperatura utilizada foi de 25 a $750 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.5 - Espectros no infravermelho (IV)

Os espectros no IV foram registrados na região $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, usando-se KBr como suporte. Os espectros foram obtidos em um espectrômetro Perkin Elmer FT-IR System-Spectrum GX, pertencente ao Departamento de Química da UFMG.

2.2.6 - Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C , DEPT-135, COSY, HMQC e ^{31}P foram registrados em $\text{DMSO-}d_6$ e $\text{DMF-}d_7$. Os espectros foram

¹³⁵ J. W. Geary. Coord. Chem. Rev. 7 (1971) 81.

obtidos no LAREMAR - Laboratório de Ressonância Magnética do Departamento de Química - UFMG, nos espectrômetros Bruker DPX200 (200 MHz) e Bruker Avance III 400 (400MHz).

2.2.7 - Estudo preliminar de estabilidade dos complexos por meio de espectros eletrônicos 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} mol L⁻¹ em 5% de DMSO e tampão Tris-HCl (NaCl 50 mM/Tris-HCl 5 mM, pH 7,2) e em DMSO ou DMF puro (grau espectroscópico). Os espectros eletrônicos foram registrados na faixa de 200 - 600 nm em função do tempo: 0, 30, 60, 120 minutos e após 24 horas.

2.2.8 - Estudos Eletroquímicos de voltametria cíclica

As medidas de voltametria cíclica foram realizadas no laboratório do prof. Paulo J. S. Barbeira (Dep. de Química - UFMG), utilizando-se um potenciostato/galvanostato μ -Autolab da Eco Chemie acoplado a um microcomputador, que registra e armazena os dados obtidos, utilizando o software de controle GPES 4.9. Foi utilizada uma célula eletroquímica de vidro Pyrex® com capacidade total de 5,0 mL, provida de tampa de teflon com cinco orifícios, para o encaixe dos três eletrodos e entrada e saída para o sistema de borbulhamento de gás nitrogênio. Os eletrodos empregados foram: eletrodo de trabalho de carbono vítreo (d = 4 mm), eletrodo de referência Ag/AgCl em KCl saturado e eletrodo auxiliar de platina. Antes de cada medida experimental, o eletrodo de trabalho foi previamente polido utilizando-se Alumina N° 2 (óxido de alumínio - granulometria 0,3 μ m). Em seguida, esse eletrodo foi ativado utilizando-se uma solução de Na₂SO₄ (0,5 M) em água deionizada. As soluções dos compostos foram preparadas na concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em DMF contendo o eletrólito de suporte perclorato de tetrabutilamônio ([TBAP] = 0,1 mol L⁻¹). Os experimentos de voltametria cíclica foram feitos à temperatura ambiente (25 °C). Inicialmente, um potencial entre -2500 a 2500 mV foi empregado para analisar o potencial adequado para as medidas de voltametria cíclica dos complexos. Posteriormente, as medidas foram realizadas com velocidade de varredura de 250 mV s⁻¹. Antes de iniciar as medidas foi feito o processo

de desaeração, no qual borbulhou-se, por 15 minutos, nitrogênio gasoso para a eliminação de oxigênio dissolvido. Esse procedimento de desaeração é importante, porque os sinais correspondentes aos processos de oxirredução do oxigênio dissolvido podem interferir nas curvas voltamétricas.

2.2.9 - Susceptibilidade magnética

As medidas de momento magnético dos complexos de cobre(II) foram realizadas utilizando uma balança de susceptibilidade Magnética - Johnson Mattley - MSB/AUTO.

2.2.10 - Difração de raios-x em monocristais

Os dados para as determinações estruturais através da técnica de difração de raios-X em monocristal foram coletados no laboratório de cristalografia do Departamento de Física da UFMG (LabCri), em parceria com a professora Renata Diniz do Departamento de Química da UFMG. Utilizou-se o difratômetro Xcalibur, Atlas, Gemini. A integração de dados e o escalonamento das reflexões dos compostos foram feitos utilizando o programa CrysAlis¹³⁶ e correções de absorção analítica¹³⁷ empregando o programa CrysAlis suite.¹³⁹ As estruturas dos compostos foram resolvidas utilizando programa SHELXS.¹³⁸ Os refinamentos foram realizados utilizando o programa SHELXL.¹³⁹ Todos os átomos com exceção dos hidrogênios foram refinados anisotropicamente. Os átomos de hidrogênio foram adicionados às estruturas dos compostos em posições geometricamente idealizadas e refinadas. O programa Mercury¹⁴⁰ foi utilizado na preparação das Figuras. As análises supramoleculares e a determinação das interações intermoleculares foram feitas com a ajuda do programa Platon.¹⁴¹

¹³⁶ O. CrysAlis PRO: Agilent Technologies (2014). Agilent Technologies UK Ltd., UK, Xcalibur/ CCD system, CrysAlis PRO Software system, Version 1.171.37.34.

¹³⁷ R. C. Clark, J. S. Reid. Acta Crystallogr. 51 (1995) 887-897.

¹³⁸ G.M. Sheldrick. SHELXS-97, Program for the Solution of Crystal Structures, University of Göttingen, Germany, 1997.

¹³⁹ G. M. Sheldrick. SHELXL-97, Program for Crystal Structure Refinement, University of Göttingen, Germany, 1997.

¹⁴⁰ C. F. Macrae, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, G. P. Shields, R. Taylor, M. Towler, J. Van De Streek. J. Appl. Crystallogr. 39 (2006) 453-457.

¹⁴¹ A. L. Spek. J. Appl. Crystallogr. 36 (2003) 7-13.

2.3 - Sínteses de ligantes e complexos

2.3.1 – Sínteses das hidrazonas derivadas de 4-nitroimidazol

Foram preparadas três hidrazonas derivadas de 4-nitroimidazol: 2-acetilpiridina-4-nitroimidazolhidrazona (HL1), 2-acetilpiridina-2-nitroimidazolhidrazona (HL2), 2-benzoilpiridina-4-nitroimidazolhidrazona (HL3) e 2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitroimidazolhidrazona (H₂L4), Figura 2.1.

As hidrazonas foram obtidas a partir da reação entre quantidades equimolares (1 mmol) de 2-acetilpiridina, 2-benzoilpiridina ou 8-hidroxiquinolinacetaldeído com as hidrazidas derivadas de nitroimidazol, em álcool metílico, adicionando-se três gotas de ácido acético glacial como catalisador. A mistura foi colocada em refluxo por 4 horas. Depois que a mistura reacional foi resfriada à temperatura ambiente, o sólido obtido foi filtrado e lavado com metanol e éter etílico, todos gelados. Em seguida, o sólido foi seco em pistola de secagem com acetona. Os ligantes foram caracterizados por espectroscopia de RMN de ¹H e de ¹³C e na região do infravermelho.

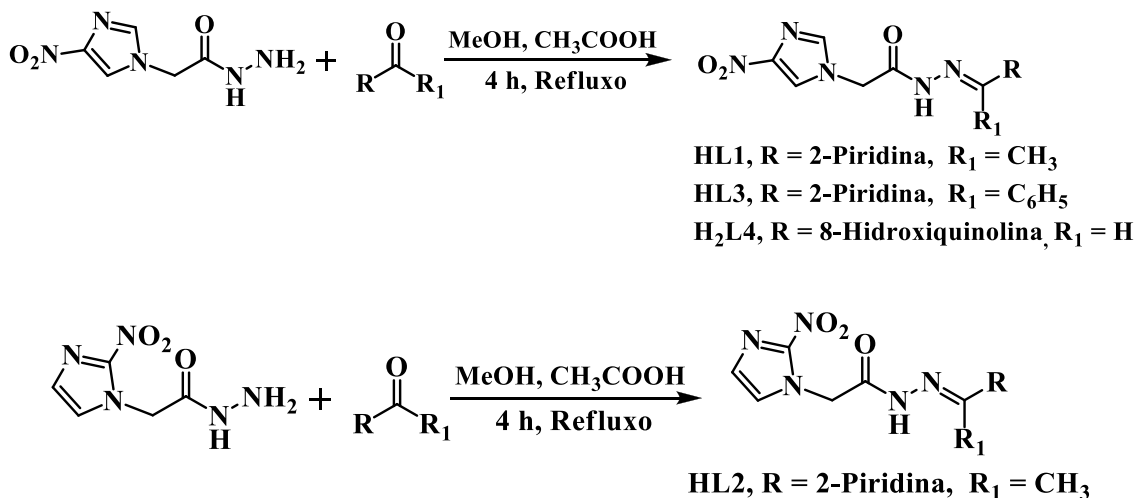


Figura 2.1 - Esquema de síntese das hidrazonas HL1, HL2, HL3 e H₂L4.

2.3.2 – Síntese de 2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitrobenzenohidrazona (H₂L5)

A hidrazona H₂L5 foi obtida a partir da adição de quantidades equimolares (1 mmol) de nitrofenil-hidrazida comercial com 8-hidroxiquinolina carboxaldeído, em álcool metílico, adicionando-se três gotas de ácido acético glacial como catalisador (Figura 2.2). A mistura foi colocada em refluxo por 4 horas. Depois que a mistura reacional foi resfriada à temperatura ambiente, o sólido obtido foi isolado por filtração a

vácuo e lavado com metanol e éter etílico, todos gelados. Em seguida, o sólido foi secado em pistola com acetona. O composto foi caracterizado por espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C e na região do infravermelho.

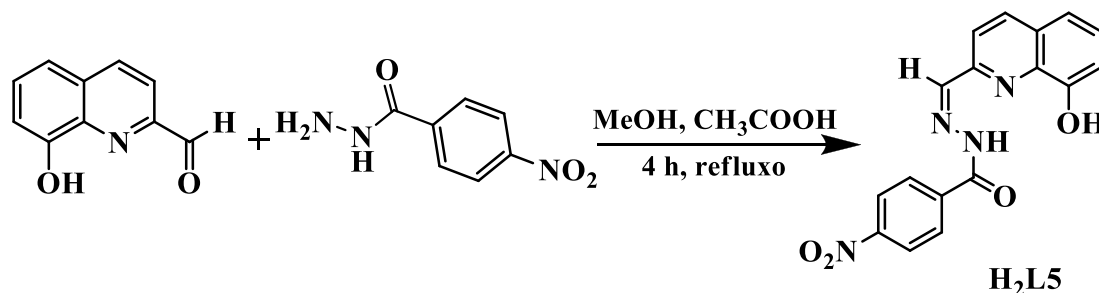


Figura 2.2 - Esquema de síntese da hidrazona $\text{H}_2\text{L5}$.

2.3.3 - Sínteses dos complexos de antimônio(III) das hidrazonas derivadas de 8-hidroquinolina

Foram preparados dois complexos de antimônio(III): [2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitroimidazolidazona](dicloro)antimônio(III) [$\text{Sb}(\text{HL4})\text{Cl}_2$] (**1**) e [2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitrobenzenohidrazona](dicloro)antimônio(III), [$\text{Sb}(\text{HL5})\text{Cl}_2$] (**2**) (Figura 2.3).

Os complexos de antimônio(III) foram obtidos a partir da adição de quantidades equimolares (1 mmol) da hidrazona desejada e do cloreto de antimônio(III). A mistura foi submetida a refluxo e agitação por 24 horas. Decorrido este período, o precipitado amarelo formado foi isolado por filtração a vácuo e lavado com etanol e éter etílico, todos gelados. Em seguida, o sólido foi seco em pistola de secagem com acetona.

Os novos compostos foram caracterizados por temperatura de fusão, análise elementar, medidas de condutimetria, RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT-135, HMQC e HMBC, por seus espectros de absorção na região do infravermelho e análise de difração de raios-X de monocristal.

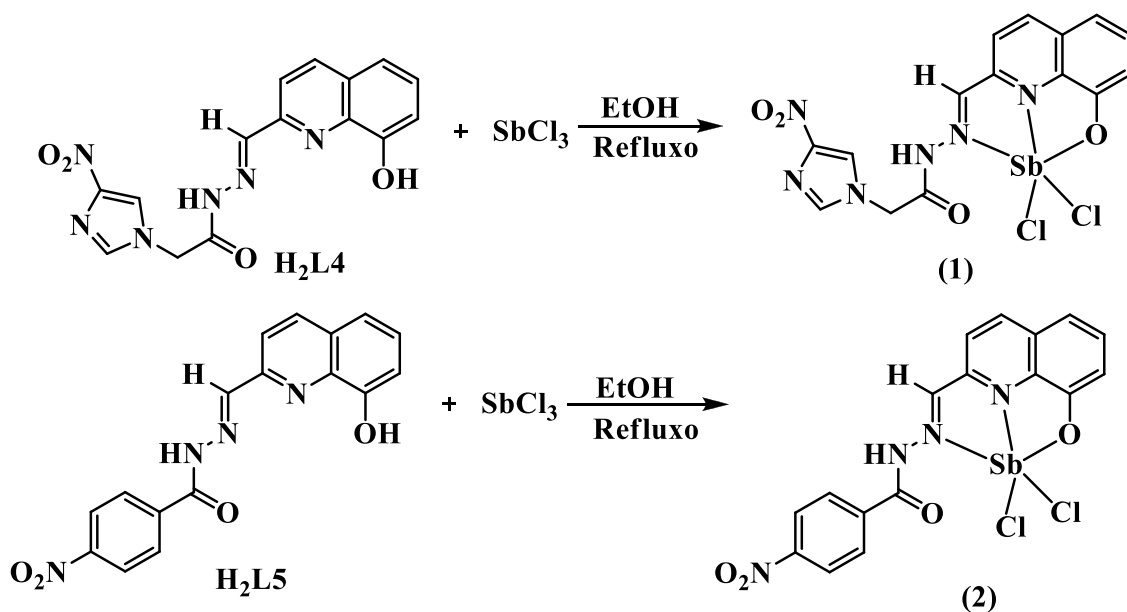


Figura 2.3 - Esquema de síntese dos complexos de antimônio(III) [Sb(HL₄)Cl₂] (1), [Sb(HL₅)Cl₂] (2).

2.3.4 – Sínteses dos complexos de bismuto(III) das hidrazonas derivadas de 8-hidroquinolina

Foram preparados dois complexos de bismuto(III) [2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitroimidazolidrazona](dicloro)bismuto(III), [Bi(HL₄)Cl₂] (3) e [2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitrobenzenohidrazona](dicloro)bismuto(III), [Bi(HL₅)Cl₂] (4), Figura 2.4.

Os complexos de bismuto(III) foram obtidos a partir da adição de quantidades equimolares (1 mmol) da hidrazona desejada e do cloreto de bismuto(III). A mistura foi submetida a refluxo e agitação por 24 horas. Decorrido este período, o precipitado amarelo formado foi isolado por filtração a vácuo e lavado com etanol e éter etílico, todos gelados. Em seguida, o sólido foi secado em pistola com acetona.

Os compostos foram caracterizados por temperatura de fusão, análise elementar, medidas de condutimetria, RMN de ¹H, ¹³C, DEPT-135, HMQC e HMBC e por seus espectros de absorção na região do infravermelho.

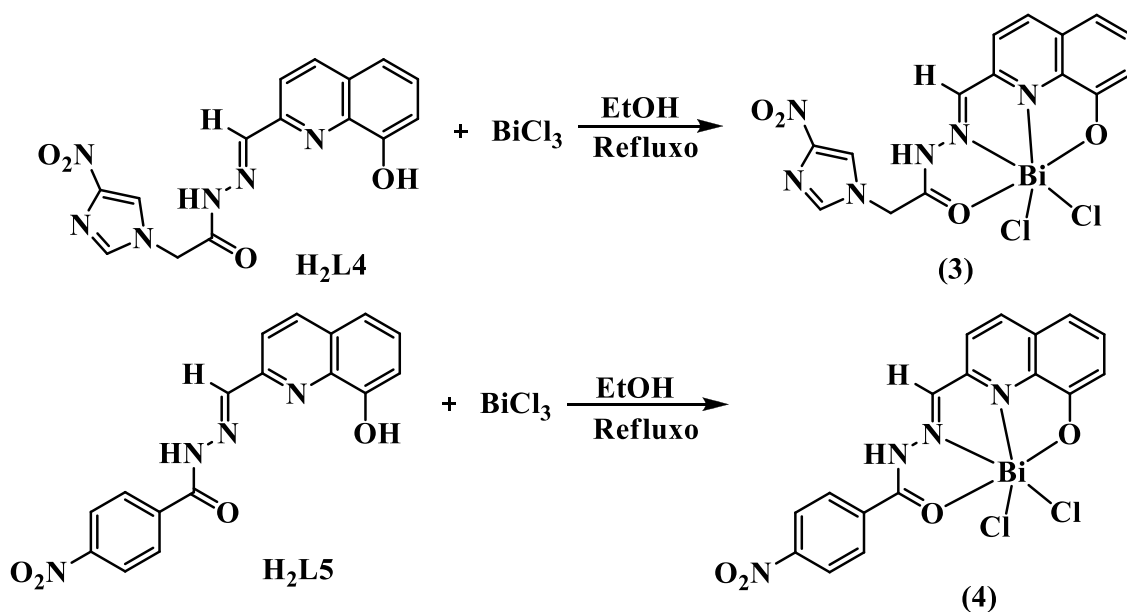


Figura 2.4 - Esquema de síntese dos complexos de bismuto(III) [Bi(HL4)Cl₂] (3), [Bi(HL5)Cl₂] (4).

2.3.5 – Síntese de 1-(2-metil-5-nitroimidazol)acetona.

O precursor 1-(2-metil-5-nitroimidazol)acetona, Figura 2.5, foi preparado a partir da oxidação do secnidazol, conforme método adaptado da literatura.¹⁴² Em um balão de fundo redondo de 250 mL contendo 50 mL de diclometano anidro foram adicionados 2,04 g de secnidazol (11 mmol), 8,28 g de dicromato de piridínio (PDC, 22 mmol) e celite (9,10 g, 1,1 eq. m/m PDC). A mistura foi mantida sob atmosfera de nitrogênio e agitação por 48 horas à temperatura ambiente. Após a completa remoção do solvente, o sólido foi lavado com 200 mL de água destilada à quente. Posteriormente realizou-se extração líquido-líquido por 10 vezes com 50 mL de clorofórmio. A fase orgânica foi tratada com Na₂SO₄ e filtrada em coluna de florisil. Em seguida, a solução foi evaporada e o sólido foi armazenado sob vácuo no dessecador. O composto foi caracterizado por espectroscopia de RMN de ¹H e na região do infravermelho.

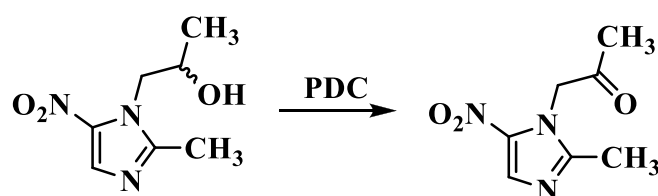


Figura 2.5 - Esquema de síntese de 1-(2-metil-5-nitroimidazol)acetona.

¹⁴² E.J. Corey, G. Schmidt. Tetrahedron Lett. 5 (1979) 399-402.

2.3.6 - Sínteses de hidrazonas e tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol

Foram preparadas três hidrazonas: (1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazonacarboxamida (HL6), (1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)acetilhidrazona (HL7) e (1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)benzoilhidrazona (HL8), e três tiossemicarbazonas: (1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida (HL9), (*N*-metil-1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida (HL10) e (1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)-*N*-fenil-hidrazinocarbotioamida (HL11) (Figura 2.6).

Em um balão de fundo redondo, dotado de aquecimento e agitação magnética, foram adicionados 2,73 mmol da cetona 1-(2-metil-5-nitroimidazol)acetona em 10,0 mL de metanol. Em seguida, foram adicionadas três gotas de ácido acético glacial, usado como catalisador da reação. Após 5 minutos sob agitação, adicionaram-se 2,73 mmol da hidrazida ou tiossemicarbazida apropriada. Em todos os casos, a mistura reacional foi mantida sob agitação magnética e refluxo por 4 horas. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, foram adicionados 20 mL de éter etílico e o sólido formado foi filtrado, lavado com éter etílico, sendo posteriormente secado sob pressão reduzida. Os compostos foram caracterizados por espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C e na região do infravermelho.

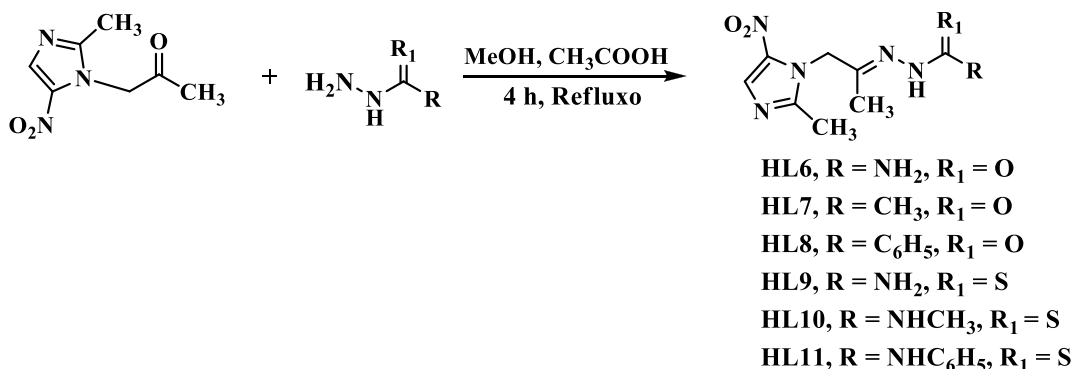


Figura 2.6 - Esquema de síntese das hidrazonas: HL6, HL7, HL8 e tiossemicarbazonas: HL9, HL10 e HL11.

2.3.7 - Sínteses dos complexos de cobre(II) com hidrazonas e tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol

Foram preparados seis novos complexos de cobre(II): *bis*[(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazonacarboxamida](dicloro)cobre(II)]

[Cu(HL6)₂Cl₂] (5), [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)acetilhidrazona](dicloro)cobre(II) hemi-metanol [Cu(HL7)Cl₂]·½CH₃OH (6), [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)benzoilhidrazona](dicloro)cobre(II) [Cu(HL8)₂Cl₂] (7), [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida](dicloro)cobre(II) hemi-hidratado [Cu(HL9)Cl₂]·½H₂O (8), [(N-metil-1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida](dicloro)cobre(II) [Cu(HL10)Cl₂] (9) e [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)-N-fenil-hidrazinocarbotioamida](dicloro)cobre(II) [Cu(HL11)Cl₂]·½H₂O (10), (Figura 2.7) e (Figura 2.8).

Os complexos de cobre(II) foram obtidos a partir da reação entre 0,5 mmol de tiossemicarbazona ou hidrazona apropriada com 0,5 mmol de cloreto de cobre(II) hidratado em 10 mL de metanol, num balão de fundo redondo. Essa mistura foi submetida a refluxo e agitação constante por 8 horas. Decorrido este período, o precipitado verde formado foi isolado por filtração sob pressão reduzida e lavado com metanol e éter etílico. Em seguida, o sólido foi secado e guardado no dessecador. Os complexos foram caracterizados por temperatura de fusão, análise elementar, momentos magnéticos, análise termogravimétrica, medidas de condutividade molar e por meio dos seus espectros na região do infravermelho.

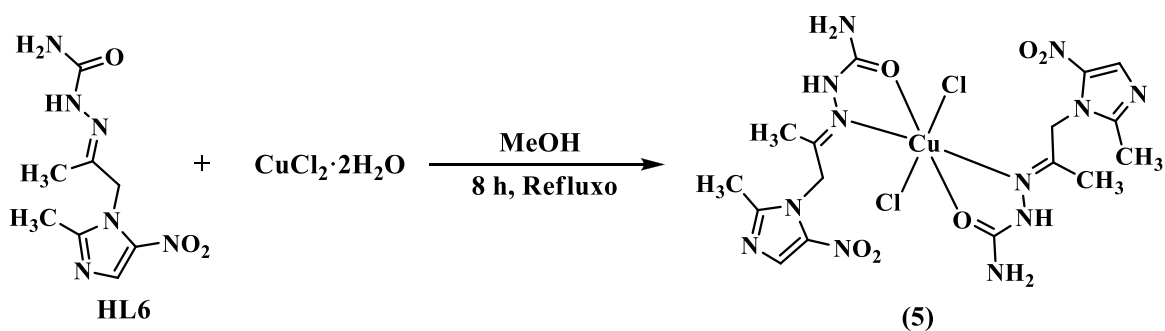


Figura 2.7 - Esquema de síntese do complexo de cobre(II) [Cu(HL6)Cl₂] (5)

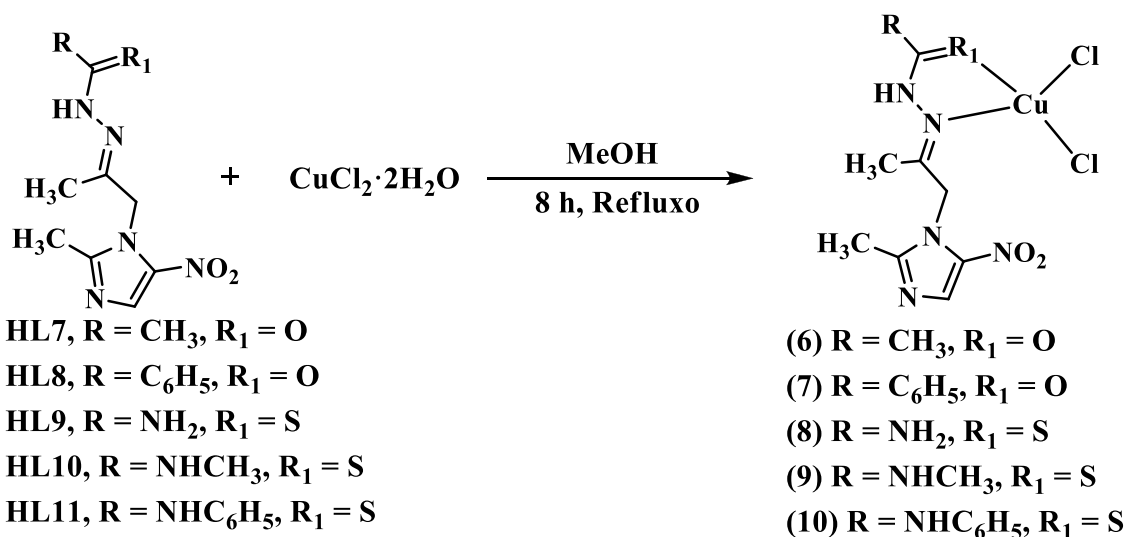


Figura 2.8 - Esquema de síntese dos complexos de cobre(II): [Cu(HL7)Cl₂] \cdot $\frac{1}{2}$ CH₃OH (6), [Cu(HL8)₂Cl₂] (7), [Cu(HL9)Cl₂] \cdot $\frac{1}{2}$ H₂O (8), [Cu(HL10)Cl₂] (9) e [Cu(HL11)Cl₂] \cdot $\frac{1}{2}$ H₂O (10)

2.3.8 - Sínteses dos complexos de prata(I) com hidrazonas e tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol

Foram preparados quatro novos complexos de prata(I): [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)acetilhidrazona)(nitrato)prata(I)] [Ag(HL7)NO₃] (11), [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)benzoilhidrazona)(nitrato)prata(I)] [Ag(HL8)NO₃] (12) [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida)(nitrato)prata(I)] [Ag(HL9)NO₃] (13) e [(N-metil-1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida)(nitrato)prata(I)] [Ag(HL10)NO₃] (14) (Figura 2.9).

Os complexos de prata(I) foram obtidos a partir da reação entre 0,5 mmol de tiossemicarbazona ou hidrazona apropriada com 0,5 mmol de nitrato de prata(I) em 10 mL de metanol, em balão de fundo redondo. Essa mistura foi mantida sob agitação durante 24 horas à temperatura ambiente, sendo completamente protegida da luz. Decorrido esse período, o precipitado amarelo formado foi isolado por filtração sob pressão reduzida e lavado com metanol e éter etílico. Em seguida, o sólido foi colocado no dessecador. Os complexos foram caracterizados por temperatura de fusão, análise elementar, análise termogravimétrica, medidas de condutividade molar e por meio dos seus espectros na região do infravermelho e RMN de ¹H, de ¹³C, DEPT 135, COSY e HMQC.

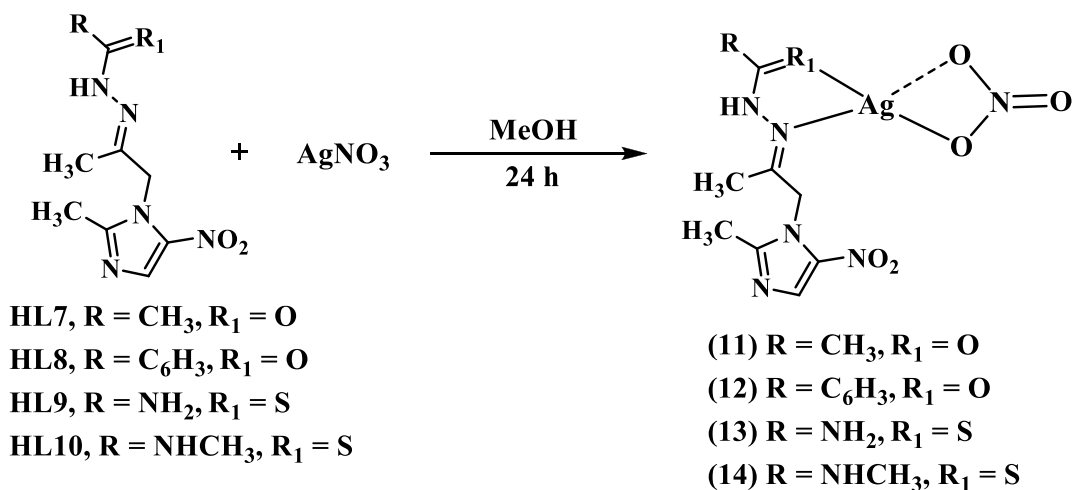


Figura 2.9 - Esquema de síntese dos complexos de prata(I): [Ag(HL7)NO₃] (**11**), [Ag(HL8)NO₃] (**12**), [Ag(HL9)NO₃] (**13**) e [Ag(HL10)NO₃] (**14**).

2.3.9 – Sínteses dos complexos de bismuto(III) com tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol

Foram preparados três novos complexos de bismuto(III) com tiossemicarbazonas:

[((1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida)(tricloro)bismuto(III)] [Bi(HL9)Cl₃] (**15**), [((N-metil-1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida)(tricloro)bismuto(III)] [Bi(HL10)Cl₃] (**16**) e [((1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)-N-fenil-hidrazinocarbotioamida)(tricloro)bismuto(III)] diidratado [Bi(HL11)Cl₃].2H₂O (**17**), (Figura 2.10).

Os complexos foram obtidos a partir da reação entre 0,5 mmol da tiossemicarbazona apropriada com 0,5 mmol de cloreto de bismuto(III) em 10 mL de metanol, em balão de fundo redondo. Essa mistura foi mantida sob refluxo durante 24 h. Decorrido este período, o precipitado amarelo formado foi isolado por filtração sob pressão reduzida e lavado com metanol e éter etílico. Em seguida, o sólido foi armazenado em dessecador. Os complexos foram caracterizados por temperatura de fusão, análise elementar, análise termogravimétrica, medidas de condutividade molar e por meio dos seus espectros na região do infravermelho e RMN de ¹H, ¹³C, DEPT 135, COSY e HMQC.

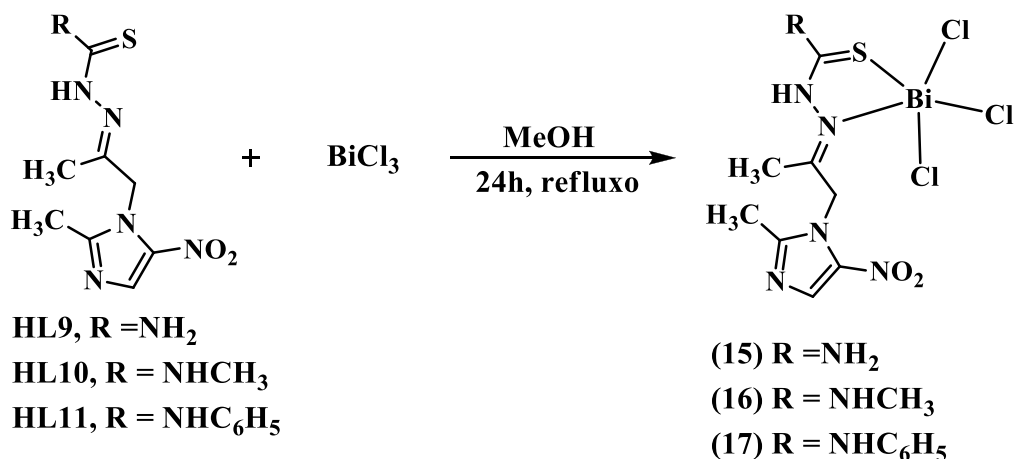


Figura 2.10 - Esquema de síntese dos complexos de bismuto(III): [Bi(HL9)Cl₃] (**15**), [Bi(HL10)Cl₃] (**16**) e [Bi(HL11)Cl₃]·2H₂O (**17**).

2.3.10 - Sínteses dos complexos de ouro(I) com tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol

Foram preparados três novos complexos de ouro(I) com as tiossemicarbazonas: hexafluorofosfato de [((1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida)(trietilfosfina)ouro(I)] [Au(HL9)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (**18**), hexafluorofosfato de [((*N*-metil-1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida) (trietilfosfina)ouro(I)] [Au(HL10)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (**19**) e hexafluorofosfato de [((1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)-*N*-fenilhidrazinocarbotioamida)(trietilfosfina)ouro(I)] [Au(HL11)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (**20**), (Figura 2.11).

Em um balão de fundo redondo, 0,5 mmol de [AuP(CH₂CH₃)₃Cl] foi solubilizado em uma mistura de 6 mL de metanol e 6 mL de diclorometano. Em seguida, adicionou-se 0,7 mmol de KPF₆ e 0,7 mmol da tiossemicarbazona apropriada. Essa mistura foi mantida sob agitação e refluxo a 55 °C por 2 horas, sendo completamente protegida da luz. Decorrido este período, o solvente foi reduzido e obtido um precipitado amarelo, que foi isolado por filtração sob pressão reduzida e lavado com éter etílico e, em seguida, o sólido foi colocado no dessecador. Os complexos foram caracterizados por temperaturas de fusão, análise elementar (CHN), análise termogravimétrica, medidas de condutividade, e por meio dos seus espectros na região do infravermelho e RMN de ¹H, de ¹³C, DEPT 135, COSY, HMQC e ³¹P.

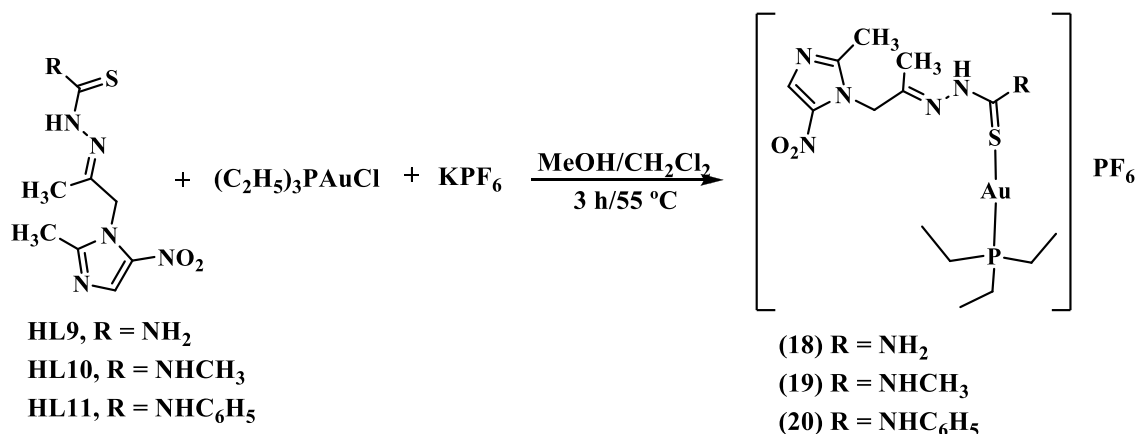


Figura 2.11 - Esquema de síntese dos complexos de ouro(I): [Au(HL9)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (18), [Au(HL10)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (19) e [Au(HL11)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (20).

2.4 - Testes biológicos

2.4.1 - Atividade antileishmania

A avaliação da atividade antileishmania foi realizada no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFAL em parceria com Prof^a. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira.

2.4.1.1 - Avaliação da atividade citotóxica com macrófagos

Os macrófagos de linhagem J774.A1 foram mantidos em frascos de cultura contendo 10 mL com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e L-glutamina 2 mM, aminoácidos e piruvato. Para os experimentos, as células foram contadas, ajustadas em meio RPMI suplementado com 10% de FBS e depois plaqueadas em uma placa de 96 poços.

Foi realizada a investigação do potencial citotóxico *in vitro* dos compostos frente aos macrófagos de linhagem J774.A1, utilizando o método de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio).^{143,144} Este método consiste na avaliação da atividade metabólica dos macrófagos, através da quantificação da redução do metabolismo do MTT, realizada pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Este processo metabólico resulta na formação de cristais de formazan, que é um sal insolúvel em água e possui coloração arroxeadada, sendo possível a sua quantificação

¹⁴³ T. Mosmann, J. Immunol. Methods. 65 (1983) 55–63.

¹⁴⁴ R. F. Hussain, A. M. Nouri, R. T. J. Oliver. J. Immunol. Methods, 160 (1993) 89–96.

através de espectrofotometria (densidade óptica de 550 nm). A viabilidade celular das culturas tratadas com os compostos foi comparada ao padrão de morte obtido nas culturas controle.

Neste ensaio, os macrófagos da linhagem J774.A1 foram plaqueados (1×10^5 por poço) e expostos aos compostos e ao fármaco padrão, pentamidina (0,1, 1, 10 e 100 μM), por um período de 24 horas. Os poços controles negativos continham células cultivadas somente com meio de cultura e células cultivadas na presença do diluente dos compostos (DMSO a 0,1%). Após o período de incubação em estufa a 37 °C e a 5% de CO_2 , o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 μL de DMSO P.A. para solubilizar o MTT (formazan). Em seguida, as células foram reincubadas durante 2 horas.

2.4.1.2 – Infecção de macrófagos por *Leishmania chagasi*.

Os macrófagos de linhagem J774.A1 foram plaqueados em placas de 24 poços contendo 5×10^4 células/poço usando meio RPMI. As células foram incubadas por 1 h a 37 °C e a 5% de CO_2 . Para macrófagos infectados por promastigotas de *L. chagasi* foi utilizada a proporção de 10 parasitas para 1 macrófago. Foi necessário um período de 6 horas para a infecção das células, incubadas a 37 °C e a 5% de CO_2 . Depois da infecção, os macrófagos foram 'lavados' com solução salina tamponada (PBS, pH 7,2) para remoção dos parasitas. Os macrófagos infectados foram cultivados em RPMI suplementado com 10% de FBS, 2 mM de l-glutamina, 2 mM aminoácidos e piruvato 2 mM, na presença ou ausência de uma concentração de 10 μM dos compostos, e foram mantidos por 24 horas em uma incubadora a 37 °C e a 5% de CO_2 . Após esse período de cultura, os poços foram lavados com PBS e as células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa-May-Grunwald.¹⁴⁵ A avaliação da infecção foi feita observando-se o número de macrófagos infectados e o número de amastigotas em 100 macrófagos. A contagem de células foi realizada usando-se um microscópio óptico com uma objetiva 100x.

¹⁴⁵ M. P. Nunes, L. Cysne-Finkelstein, B. B. Monteiro, D. M. de Souza, N. A. Gomes, G. A. Dos Reis. *Microbes Infect.* 7 (2005) 78–85.

2.4.2 - Atividade anti-*T. cruzi* in vitro

Os ensaios de atividade anti-*T. cruzi* in vitro foram realizados no Instituto Gonçalo Moniz - Fiocruz em parceria com Prof. Diogo Rodrigo M. Moreira.

2.4.2.1 - Parasitas

Avaliação da atividade anti-*T. cruzi* foi realizada utilizando tripomastigotas da cepa Y. A manutenção dos parasitas in vitro ocorreu a partir do cultivo em meio de cultura DMEM (Gibco/Life Technologies, Grand Island, NE, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal e penicilina-estreptomicina (100 U/mL) (Gibco/Life Technologies), juntamente com células da linhagem de epitélio de rim de macaco (MK2) em estufa à 37°C e 5% de CO₂.

2.4.2.2 - Avaliação da viabilidade dos parasitas

As atividades antiparasitárias dos compostos foram investigadas contra tripomastigotas e amastigotas intracelulares usando o protocolo previamente estabelecido por Bastos *et al.*¹⁴⁶ Em resumo, os tripomastigotas (2 x 10⁶ células/mL) foram incubados em placas de 96 poços no DMEM na presença ou ausência (controle negativo) dos compostos em diferentes concentrações, com máximo concentração de 50 µM, e as placas foram incubadas por 24 horas. Após esse período de incubação, os parasitas viáveis (células refringentes e em movimento) foram contados em câmara de Neubauer. A atividade antiparasitária foi expressa como concentração inibitória mínima de 50% (EC₅₀) em comparação com os parasitas não tratados.

2.4.2.3 - Avaliação da viabilidade do *T. cruzi* em macrófagos

A avaliação da viabilidade dos parasitas foi realizada em macrófagos peritoneais isolados de camundongos. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética local (Hospital São Rafael, CAAE: 20032313.6.0000.0048) e Comitê de Ética Animal (Instituto Gonçalo Moniz, número do protocolo: 001/2015). Os macrófagos peritoneais (5 x 10⁵ células/mL) foram plaqueados em placas de 96 poços e mantidos durante a noite a 37 °C com 5% de CO₂. As células foram infectadas com tripomastigotas (10 parasitas:1 célula hospedeira) por 24 horas. A cultura foi lavada

¹⁴⁶ T. M. Bastos, H. M. Russo, N. S. Moretti, S. Schenkman, L. Marcourt, M. P. Gupta, J. L. Wolfender, E. F. Queiroz, M. B. P. Soares, *Molecules* 24 (2019) 24, 1299–1312.

com solução salina para remover os parasitas não internalizados e compostos em diferentes concentrações, com uma concentração máxima de 50 μM e incubados por 72 horas.

As células foram fixadas e coradas pela adição de 50 mL de uma solução contendo 4% paraformaldeído e 4 μM corante Draq5 (BioStatus, Shepshed, Reino Unido) por poço. A porcentagem de parasitas intracelulares foi determinada e comparada com o controle negativo, e as atividades antiparasitárias dos compostos também foram expressas como EC_{50} . Cada concentração de composto foi testada em triplicata. O fármaco de referência benznidazol foi usado como o controle positivo. Análise de regressão não linear foi realizada com o GraphPad Prism versão 5.01 (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA) que foi utilizado para calcular os valores de EC_{50} .

2.4.2.4 - Citotoxicidade em células de mamíferos

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados usando hFIB (células de fibroblastos humanos) e macrófagos peritoneais. Um volume de 100 μL de hFIB (3×10^4 células/mL) e macrófagos peritoneais (5×10^5 células/mL) foram plaqueados em placas de 96 poços e tratados com os compostos por 72 h de tempo de incubação. Após o tratamento as células foram lavadas duas vezes em solução salina e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio Alamar Blue (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Após 24 horas, foram realizadas leituras colorimétricas em 570 e 600 nm. Os valores de 50% da concentração citotóxica (CC_{50}) foram calculados usando pontos de dados coletados de três experimentos. Violeta genciana foi usada como um controle positivo. A análise de regressão não linear foi realizada com o Prism GraphPad versão 5.01 (Graph Pad Software), que foi usado para calcular valores CC_{50} .

2.4.2.5 - Análise por citometria de fluxo

Os parasitas na forma tripomastigota (2×10^6 células/mL) foram ressuspensos em meio DMEM e tratados com o composto a 0,06 μM por 6 horas. Os parasitas foram marcados com iodeto de propídio (PI) e anexina V, usando o Kit Anexina V-FITC (Biosource, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

2.4.2.6 - Estudos de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os parasitas foram cultivados por 24 h em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) tamponado a pH 7,5 e suplementados com HEPES (20 mM), soro fetal bovino a 10%, penicilina (100 U mL⁻¹) e estreptomicina (100 mg mL⁻¹), contendo o complexo na concentração de CE₅₀ e 1 μM. Os parasitas foram coletados, lavados em PBS e fixados com 2,5% de glutaraldeído, 4% de formaldeído e 0,1 M tampão cacodilato pH 6,8. Eles foram pós-fixados em 2% tetróxido de ósmio (OsO₄), em um tampão de cacodilato 0,1 M pH 6,8 e processado para microscopia eletrônica de varredura. Para a análise de MEV, os parasitas foram desidratados em etanol seco e submetidos ao ponto crítico, metalizados com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura na unidade de microscopia eletrônica - Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ.

2.4.3 - Avaliações da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição¹⁴⁷

2.4.3.1 - Materiais e equipamentos

O cultivo e a manipulação dos micro-organismos foram efetuados em capela de fluxo laminar (Capela VECO, modelo JLF 912, série FL 5799). Os materiais utilizados na manipulação dos micro-organismos foram autoclavados em autoclave vertical Fanen, modelo 415/3, série J03610. As transferências de pequenas quantidades de soluções líquidas, assim como as diluições, foram feitas por meio de micropipetas automáticas Digipet de 5 - 50 μL, série 05012635; Finnpipette Colour 4027, Lab systems de 200 - 1000 μL, série E19971 e Kacil de 100 μL, série 0037201. Os testes com bactérias e fungos utilizaram incubação em estufa Quimis Q 316.12, série 807.131. A leitura da absorvância dos ensaios biológicos, realizados em microplacas, foi feita em leitora ELISA (Thermoplate, modelo: TP-READER).

2.4.3.2 – Micro-organismos testados

Para estudar a atividade antibacteriana e antifúngica dos compostos, foram utilizadas cepas das coleções ATCC (*American Type Culture Collection*, USA), CBS (*College of Biological Sciences*, USA), CCT (*Coleção de Culturas Tropical* (Brasil)),

¹⁴⁷ I.P. Ferreira. Tese de Doutorado, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais. 2013.

NRRL (*ARS Culture Collection* (NRRL, USA)) e LABB (Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios Departamento de química, UFMG). Os micro-organismos testados foram: **Bactérias Gram-positivas:** *Bacillus cereus* (ATCC 11778); *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Streptococcus sanguinis* (ATCC 49456). **Bactérias Gram-negativas:** *Citrobacter freundii* (ATCC 8090); *Escherichia coli* (ATCC 25723); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311). **Fungos não filamentosos:** *Candida albicans* (ATCC 18804); *Candida dubliniensis* (isolado clínico 28); *Candida glabrata* (ATCC 90030); *Candida lusitanae* (CBS 6936).

2.4.3.3 - Determinações da concentração inibitória mínima

Para a determinação da concentração inibitória mínima – CIM pelo método da microdiluição, concentrações decrescentes do composto em meio de cultura foram colocadas em placas de microdiluição com 96 poços. A atividade foi avaliada na faixa de concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 0,12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, conforme o procedimento descrito abaixo que está de acordo com o método relatado por Gupta e Zacchino.¹⁴⁸

Considerou-se como CI_{50} a concentração mínima dos compostos avaliados ($\mu\text{mol mL}^{-1}$) que reduziu em 50% o crescimento das cepas estudadas em comparação com o controle do crescimento dos micro-organismos (placa sem adição dos compostos). Foi usado, para a determinação do CI_{50} , o programa GraphPad Prism version 5.00 for windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

2.4.3.4 - Preparações das microplacas

- **Avaliação da atividade dos compostos**

Este experimento foi realizado em quadruplicata para cada composto testado. Colocaram-se 200 μL da solução de trabalho dos compostos nos poços das microplacas. Em seguida, diluições sucessivas foram realizadas repassando 100 μL da solução da primeira coluna para a seguinte contendo 100 μL do meio de cultura previamente pipetado obtendo, assim, as diferentes concentrações testadas. Finalmente, 100 μL da solução do inóculo na concentração padronizada foram acrescentados aos poços correspondentes ao teste.

¹⁴⁸ A.S. Zacchino, M.P. Gupta. Corpus Editorial y Distribuidora Rosario (2007) 99.

2.4.4 - Avaliações da atividade antimicrobiana com micro-organismos anaeróbicos

Os ensaios biológicos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG com a colaboração do professor Luiz de Macêdo Farias, da professora Paula Prazeres Magalhães e do estudante de doutorado em Ciências Biológicas João Fernando Gonçalves Ferreira.

A metodologia empregada para avaliar a susceptibilidade de bactérias anaeróbicas aos compostos baseia-se no procedimento da referência CLSI M100-S25.¹⁴⁹ Foram utilizadas seis cepas de bactérias *Gram*-negativas da coleção ATCC: *Bacteroides fragilis* - ATCC 25285; *Bacteroides thetaiotaomicron* - ATCC 23745; *Bacteroides vulgatus* - ATCC 8482; *Bacteroides ovatus* - ATCC 8483; *Parabacteroides distasonis* – ATCC 1945; *Fusobacterium nucleatum* – ATCC 25586.

As cepas bacterianas foram cultivadas em meio de cultura Brucella ágar, suplementado com hemina (5 µg/mL), menadiona (1 µg/mL) e sangue de carneiro (5% v/v). As culturas foram incubadas em anaerobiose a 37 °C por 48 horas em uma estufa bacteriológica sob atmosfera de N₂ 85%, H₂ 10% e CO₂ 5%. Posteriormente, os inóculos foram preparados em água destilada estéril, sendo padronizados de forma a obter turbidez visual comparável à da solução padrão 0,5 da escala de McFarland, a qual fornece uma concentração aproximada de 1,5 x 10⁸ UFC/mL. Realizou-se uma diluição 1:10 do inóculo em solução salina 0,9% m/v estéril, resultando em uma concentração de 1,5 x 10⁷ UFC/mL. As suspensões ajustadas foram usadas até 30 minutos após o preparo.

A avaliação da ação antimicrobiana dos compostos foi realizada pelo método da diluição em ágar. Os compostos foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima (CIM), expressa como sendo a menor concentração do composto capaz de inibir a formação visual de colônias dos micro-organismos em comparação com o crescimento nas placas de controle positivo. Para a determinação da CIM, oito concentrações do agente antimicrobiano (de 32 a 0,12 µg/mL) foram avaliadas. Os testes foram realizados em duplicatas e os valores de CIM foram expressos em µM.

No preparo das soluções trabalho dos compostos, empregou-se DMSO como solvente e água destilada estéril como diluente, de forma que a concentração final de DMSO foi inferior a 0,5% em todos os testes.

¹⁴⁹ Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25, Pennsylvania, USA, 2015.

A técnica consistiu na adição de 4,0 mL de solução trabalho 320 µg/mL dos compostos em frascos contendo 36 mL do meio de cultura completo, seguindo-se o plaqueamento. Posteriormente, foram adicionados, aproximadamente, 10⁵ UFC de cada bactéria em cada ponto de inoculação com a utilização do replicador de Steers e as placas foram incubadas em anaerobiose a 37 °C por 48 h. Placas controle foram preparadas, incluindo o controle positivo (ausência de composto antimicrobiano, contendo 4 mL de água destilada no lugar de solução trabalho) e o controle negativo (ausência de inóculo para verificar a esterilidade do meio de cultura). Adicionalmente, o controle da interferência de DMSO na viabilidade celular foi avaliado.

2.4.5 - Avaliação do potencial citotóxico em células tumorais

Os ensaios biológicos foram conduzidos no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, com a colaboração do professor Manoel Odorico de Moraes, da professora Cláudia do Ó. Pessoa e da estudante de doutorado Sarah Sant' Anna Maranhão.

A metodologia empregada para avaliar potencial citotóxico *in vitro* contra linhagens de células tumorais dos compostos baseia-se no procedimento descrito primeiramente por Mosman e colaboradores.¹⁵⁰ O ensaio para avaliação de viabilidade e o estado metabólico da célula é uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.¹⁵¹

As células foram plaqueadas na concentração de 0,1 x 10⁶ cél/mL para as linhagens PC3 (carcinoma de próstata), SNB-19 (glioblastoma- Sistema Nervoso Central), HEK-293 (célula sadia de rim embrionário humano), HL-60 (células leucêmicas) e HCT-116 (carcinoma colo-retal). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium) e as placas foram incubadas por 3 h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

¹⁵⁰ T. J. Mossmann. Immunol. Methods 65 (1983) 55-63.

¹⁵¹ M. V. Berridge, A. S. Tan, K. D. McCoy, R. Wang. Biochemica 4 (1996) 14-19.

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril, e testadas na concentração única de 10 µg/mL. As amostras que mostraram atividade contra as linhagens tumorais foram testadas em diluição seriada com intervalo de concentrações 0,31 - 10,0 µg/mL.

2.4.6 – Avaliação da atividade citotóxica contra células HCT-116 (normóxia e hipóxia) e HEK-293 (normóxia)

Os ensaios de atividade citotóxica foram realizados no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG em parceria com Prof^a. Elaine Maria de Souza-Fagundes, do Departamento de Fisiologia, UFMG.

As células do carcinoma colorretal (HCT-116) e rim embrionário humano (HEK-293) foram mantidas em meio DMEM (Sigma Aldrich, EUA) com soro fetal a 10% (GIBCO BRL, Grand Island, NY) e enriquecidas com solução antibiótica a 1% (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO BRL, Grand Island, NY)). A atividade citotóxica foi baseada na taxa de redução mitocondrial de 3-(4 Brometo de 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em cristais de formazan.¹⁴⁵ Resumidamente, as células HCT-116 e HEK-293 foram plaqueadas na densidade de 5×10^3 células por poço (placa de 96 poços) e pré-incubadas durante a noite para estabilização em condições de hipóxia (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂ a 37 °C) e normóxia (5% de CO₂, 95% de ar atmosférico a 37 °C), conforme descrito por Harrison *et al.*¹⁵² Após a estabilização, todas as células foram incubadas com os compostos e o controle positivo Tirapazamine (TPZ) por 72 h, utilizando sete diluições em série (100 - 0,0064 µM), sob condições de hipóxia e normóxia. O IC₅₀ (concentração inibitória mínima de 50% de proliferação celular) foi calculado por regressão não linear usando o software GraphPad Prism Versão 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

Todos os compostos foram testados em quatro experimentos independentes realizados em triplicado e o solvente DMSO 0,5% foi usado como controle. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média da porcentagem de viabilidade em relação ao controle negativo (DMSO, 0,5%).

¹⁵² L. R. Harrison, D. Micha, M. Brandenburg, K. L. Simpson, C. J. Morrow, O. Denny, C. Hodgkinson, Z. Yunus, C. Dempsey, D. Roberts, F. Blackhall, G. Makin, C. Dive, . J. Clin. Invest. 121 (2011) 1075-1087.

Capítulo 3

Resultados e discussão

Hidrazonas derivadas de nitroimidazol: estudos estruturais e investigação da atividade antileishmania

Hidrazonas constituem uma classe de compostos que apresentam numerosas bioatividades, entre as quais a ação contra *Leishmania*.¹⁵³ A atividade de compostos derivados de nitroimidazol como agentes antiprotozoários já está bem estabelecida.¹⁵⁴ A literatura relata que esses compostos apresentam atividade antileishmania.¹⁵⁵ Desse modo, foram obtidas 2-acetilpiridina-4-nitroimidazolhidrazona (H2Ac4NO₂Im, HL1), 2-acetilpiridina-2-nitroimidazolhidrazona (H2Ac2NO₂Im, HL2) e 2-benzoilpiridina-4-nitroimidazolhidrazona (HL3), funcionalizadas com os grupos farmacofóricos 2-nitroimidazol e 4-nitroimidazol,¹⁵⁶ e suas atividades antileishmania e seus efeitos citotóxicos em macrófagos foram avaliados.¹⁵⁷

3.1 - Caracterizações das hidrazonas derivadas de nitroimidazol

As sínteses e caracterizações das hidrazonas HL1, HL2 e HL3 (Figura 3.1) foram descritas anteriormente por nós.¹⁵⁶ No presente capítulo são apresentados estudos eletroquímicos, e estudos cristalográficos envolvendo análises de superfícies de Hirshfeld, e a avaliação das atividades antileishmania dos compostos. O trabalho completo originou uma publicação em *Acta Crystallographica C*.¹⁵⁷

¹⁵³ Y. Al-kahraman, M. Yasinzi, G. S. Singh. *Arch Pharm Res.* 35 (2012) 1009-1013.

¹⁵⁴ H. B. Fung, T. L. Doan. *Clin. Ther.* 27 (2005) 1859-1884.

¹⁵⁵ S. Wyllie, S. Patterson, L. Stojanovski, F. R. C. Simeons, S. Norval, R. Kime, K. D. Read, A. H. Fairlamb. *Sci. Transl. Med.* 4 (2012) 119-126.

¹⁵⁶ A. P. A. Oliveira. Dissertação de Mestrado Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2016.

¹⁵⁷ A P. A. Oliveira, I P. Ferreira, A. A. Recio-Despaigne, J. G. da Silva, A. C. S. Vieira, M. S Santos, M. S. Alexandre-Moreira, R. Diniz H. Beraldo. *Acta Cryst. C* 75(2019) 320–328.

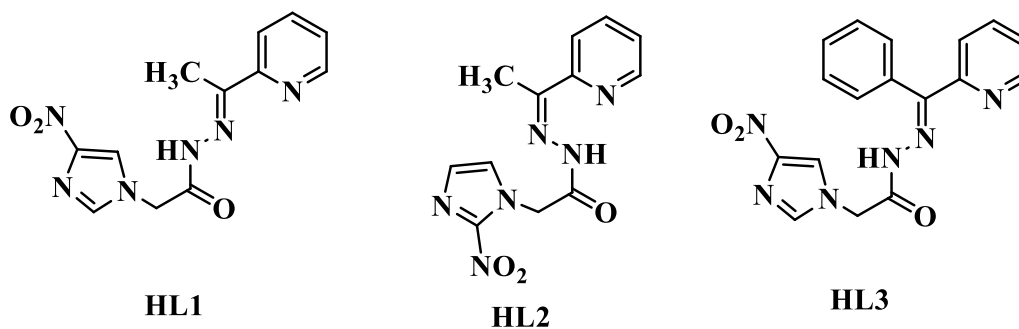


Figura 3.1 - Estruturas das hidrazonas derivadas de nitroimidazóis HL1, HL2 e HL3.

3.1.1 - Análise estrutural de superfícies de Hirshfeld dos compostos

Cristais apropriados de HL1, HL2 e (*Z*)-HL3 foram obtidos das águas mães das sínteses, e o cristal de (*E*)-HL3 foi obtido por evaporação lenta do composto em DMSO-*d*₆ (Figura 3.2).

Em trabalho anterior¹⁵⁶ discutimos as estruturas cristalográficas dos compostos e mostramos tabelas com os dados dos cristais e resultados dos refinamentos, assim como as distâncias e ângulos de ligação selecionados. Esses dados se encontram no artigo que publicamos em Acta Crystallographica C (Anexo). Para melhor compreensão das análises de superfícies de Hirshfeld as estruturas de HL1-HL3 encontram-se na Figura 3.2.

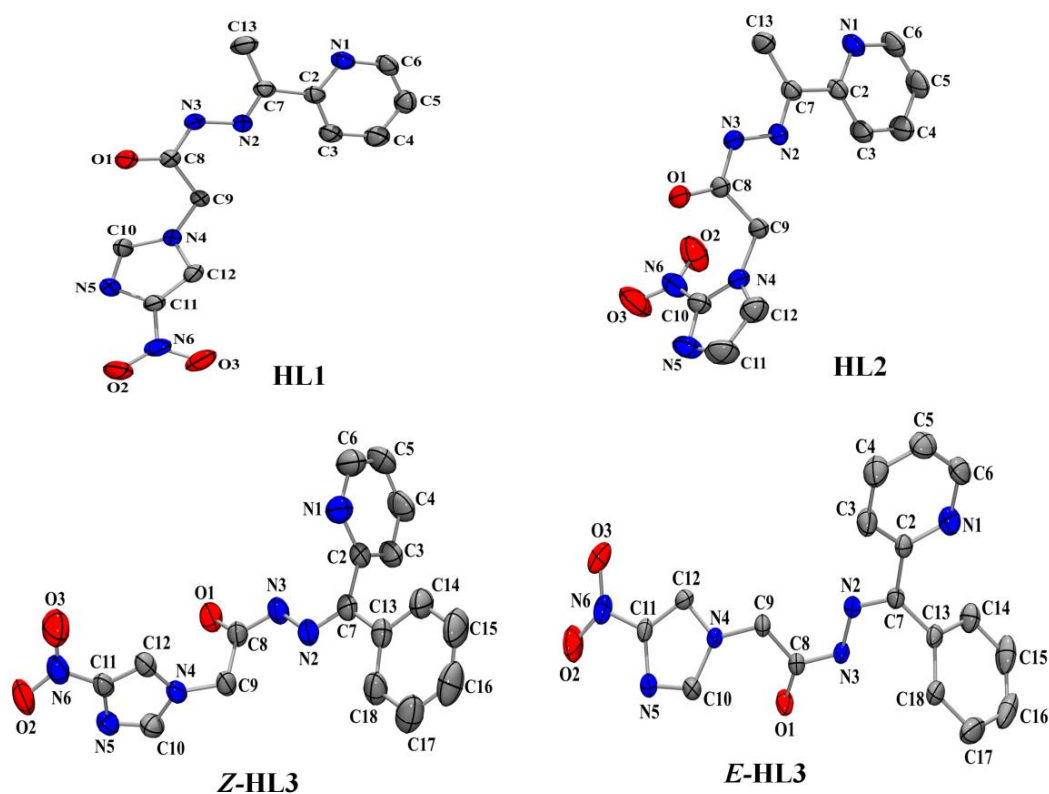


Figura 3.2 - Estruturas moleculares de HL1, HL2, (*Z*)-HL3 e (*E*)-HL3. Elipsoides com 50% de probabilidade; os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza nas imagens.

HL1, HL2 e HL3 adotam a configuração *E* enquanto HL3 também adota a configuração *Z* no cristal. As Superfícies de Hirshfeld (SH) e os gráficos de impressão digital para todos compostos foram gerados e analisados (Figura 3.3).^{158,159} Em todos os casos os contatos mais próximos nas SH (regiões em vermelho) são observados para N–H···O em HL1, HL2 e (*E*)-HL3 e para N–H···N em (*Z*)-HL3.

A análise de impressão digital da superfície mostra que as ligações intermoleculares de hidrogênio são responsáveis por cerca de 30% das interações na superfície de Hirshfeld para os compostos HL1 e HL2, 25% para (*E*)-HL3 (interações H···O) e 13% para (*Z*)-HL3 (interações H···N). Essas interações são exibidas em gráficos de impressões digitais, que relacionam as menores distâncias internas de um dado ponto na superfície (d_i) e externas (d_e) (distância externa mais próxima de um dado ponto na Superfície de Hirshfeld), além de fornecer uma porcentagem de recorrência que esses contatos apresentam sobre a superfície.

¹⁵⁸ M.A. Spackman, D. Jayatilaka. Cryst. Eng. Comm. 11 (2009) 19-32.

¹⁵⁹ M.A. Spackman, J.J. McKinnon. Cryst. Eng. Comm. 4 (2002) 378-392.

Os contatos não-direcionais H···H e os contatos convencionais das ligações de hidrogênio são responsáveis por mais da metade das interações dos cristais (em torno de 60% para os compostos HL1, HL2 e (*Z*)-HL3, e 56% para (*E*)-HL3).

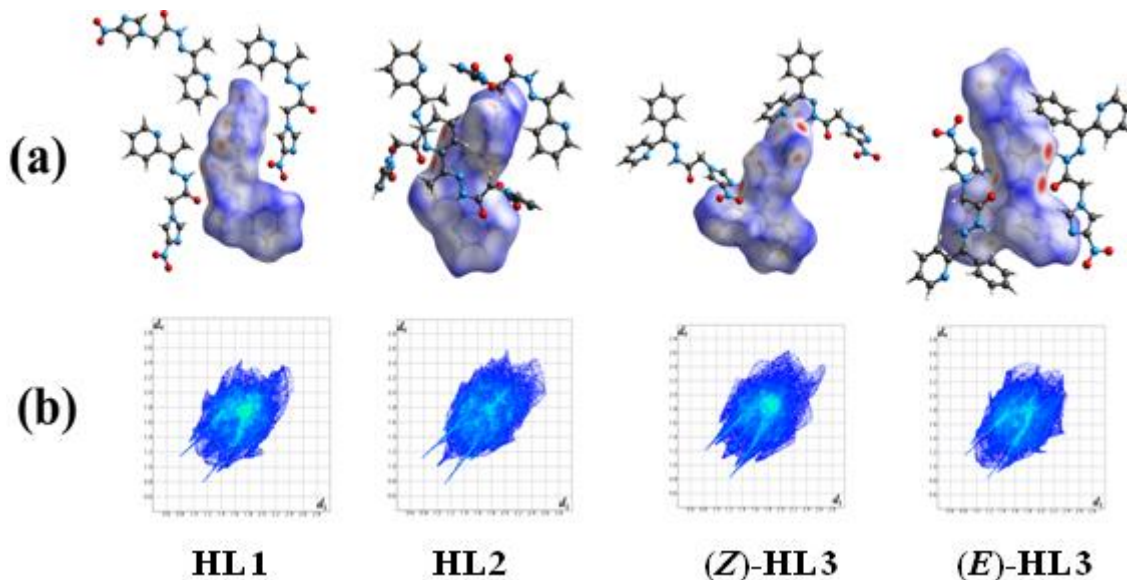


Figura 3.3 – (a) Superfície de Hirshfeld (b) gráfico de impressão digital de HL1, HL2, (*Z*)-HL3 e (*E*)-HL3 para a) H···H, b) O···H e c) N···H.

3.1.2 - Estudos eletroquímicos

Os estudos de voltametria cíclica foram realizados empregando-se DMF para solubilizar os compostos HL1-HL3 ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e perclorato de tetrabutilamônio $[\text{Bu}_4\text{N}]^+[\text{ClO}_4]^-$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrólito de suporte, com o objetivo de obter as melhores condições experimentais que garantam a estabilidade do ânion nitro-radical. Observou-se que todos os três compostos apresentaram processos de redução similar, típicos de nitroaromáticos em meio aprótico. Assim, será apresentado apenas o voltamograma cíclico do composto HL1 a 250 mV s^{-1} , de -2500 a 1500 mV , e região expandida de -1800 a -200 mV (Figura 3.4), para mostrar o comportamento eletroquímico dos compostos. Os voltamogramas cíclicos apresentam pares de picos anódicos e catódicos bem definidos, descritos na Tabela 3.1.

Em geral os compostos exibiram um par estável bem definido (sistema I_c/I_a) com E_{pIc} próximo de -1200 mV para HL1 e HL3, e E_{pIc} em -1020 mV para HL2, o qual corresponde a um processo de transferência monoelétrônica *quasi-reversível*,

atribuído ao ânion nitro-radical estável ($R\text{-NO}_2^-$). Esses valores são semelhantes aos relatados para os medicamentos biorredutíveis como metronidazol¹⁶⁰ e benznidazol.¹⁶¹

Os voltamogramas cíclicos também mostraram um processo de redução irreversível (Ic) próximo de -2500 mV atribuído à formação de hidroxilamina (R-NHOH). Os demais processos foram atribuídos a efeitos redox ocorrendo no esqueleto da base de Schiff.

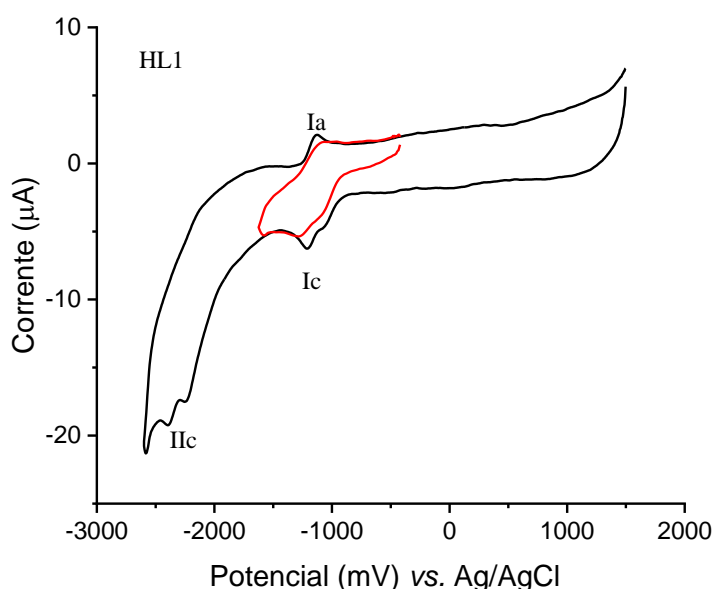
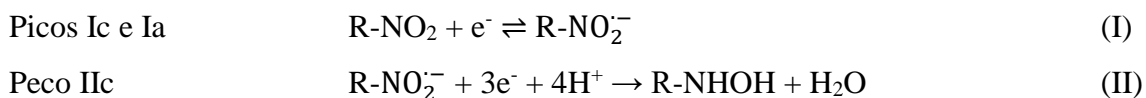


Figura 3.4 - Voltamogramas do composto HL1 em meio aprótico (TBAP 0,1 M em DMF) vs. Ag/AgCl, Cl^- (3,0 M); velocidade de varredura de 250 mV s^{-1} . A região expandida em vermelho mostra uma varredura curta com o par $RNO_2/R\text{-NO}_2^-$ isolado.

A Tabela 3.1 mostra os valores de potenciais de pico catódico e anódico ($EpIa$ e $EpIc$), variações de potenciais entre picos catódicos e anódicos [$\Delta E = (EpIa - EpIc)$] e a

¹⁶⁰ M. H. Livertoux, P. Lagrange, A. Minn. Brain Res. 725 (1996) 207-216.

¹⁶¹ S. Bollo, L.J. Núñez-Vergara, M. Bontá, G. Chauviere, J. Périé, J.A. Squella. J. Electroanal. Chem. 511 (2001) 46-54.

corrente de pico I_{pa}/I_{pc} , de acordo com o procedimento de diagnóstico proposto por Nicholson.¹⁶²

Para um processo ser considerado reversível (sistema no qual a velocidade de transferência de elétrons é alta) as varreduras na direção catódica e anódica originam os mesmos números de picos. A espécie formada é estável, a separação entre os potenciais de pico ΔE será igual a 59 mV a 25°C.¹⁶³ Nos voltamogramas, observa-se que os potenciais dos picos catódicos e anódicos variaram ligeiramente com a varredura para o processo $RNO_2/R-NO_2^-$, e os valores de ΔE para a primeira onda estão entre 83 - 105 mV a 250 mV s⁻¹. Além disso, para um processo ser reversível, independentemente da velocidade de varredura, teremos $I_{pa}/I_{pc} = 1$.¹⁶⁴ Nos experimentos, pôde-se observar que os valores de I_{pa}/I_{pc} estão entre 0,53 - 0,90 A, os quais aumentam ligeiramente à medida que a taxa de varredura aumenta, sugerindo um comportamento típico de sistemas *quasi-reversíveis*.

Os valores obtidos de E_{pIc} para os compostos HL1 – HL3, revelam que os comportamentos eletroquímicos correspondentes ao ânion nitro-radical não diferem muito daqueles dos medicamentos metronidazol e benznidazol, os quais possuem mecanismo de ação dependente da ativação biorredutiva do grupo nitro.

Tabela 3.1 - Parâmetros de voltametria cíclica correspondentes ao par redox $R-NO_2/R-NO_2^-$ para os compostos (HL1-HL3) a 250 mV s⁻¹.

Compostos	E_{pIc} (mV)	E_{pIa} (mV)	ΔE (mV)	I_{pa}/I_{pc}
HL1	-1203	-1120	83	0,58
HL2	-1025	-920	105	0,90
HL3	-1162	-1067	95	0,53
Metronidazol ¹⁶⁰	-1160	--	--	--
Benznidazol ¹⁶¹	-1019	--	--	--

-- Não foram estudados os processos

¹⁶² R.S. Nicholson, I. Shain. Anal. Chem. 36 (1964) 706-723.

¹⁶³ A. J. Bard, L. R. Faulkner. Electrochemical methods: fundamentals and applications. 2 ed. New York: Wiley, 2001.

¹⁶⁴ L. S. Andrade, R. C. Rocha-Filho, N. Bocchi, S. R. Biaggio. Quim. Nova 27 (2004) 866.

3.2 - Atividade citotóxica contra macrófagos J774.A1

A citotoxicidade celular dos compostos HL1 – HL3 foi testada em macrófagos J774.A1. Os compostos não apresentaram toxicidade no nível mais alto da concentração testados (100 μ M), enquanto que a pentamidina, usada como controle positivo, provou ser citotóxica, com $CI_{50} = 44,1 \pm 0,4 \mu$ M e citotoxicidade máxima de $93,2 \pm 0,8\%$ (Tabela 3.2). Portanto, apesar das diferenças estruturais entre os compostos, como por exemplo, a posição do grupo nitro, diferentemente da pentamidina, nenhum dos derivados apresenta toxicidade para as células de mamífero.

Tabela 3.2 - Viabilidade celular (citotoxicidade) nos macrófagos J774.A1 no ensaio MTT após 24 horas.

Compostos	Macrófago J774.A1 CI_{50} (μ M) ^a	Citotoxicidade máxima (%) ^b
Pentamidina	$44,1 \pm 0,4$	$93,2 \pm 0,8^{***}$
HL1	>100	$16,02 \pm 1,24$
HL2	>100	$18,09 \pm 2,73$
HL3	>100	$18,60 \pm 2,73$

Os resultados se referem a: ^a Concentração 50% letal para macrófagos calculada em curvas dose-resposta; ^b Média \pm desvio padrão da média da citotoxicidade máxima (experimentos feitos em triplicata). Os valores de efeito máximo foram considerados significativos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em comparação com o veículo 0,1% DMSO.

3.3 - Atividade antileishmania

Para investigar a atividade antileishmania dos compostos sobre formas amastigotas foi realizado o ensaio de viabilidade celular *in vitro* utilizando a espécie *Leishmania chagasi*. Deste modo, foi possível calcular o efeito máximo dos derivados de nitroimidazol e do fármaco padrão pentamidina frente a essa espécie amastigota através do ensaio colorimétrico de MTT.

Diferenças estruturais no grupo nitroimidazol (2-nitroimidazol ou 4-nitroimidazol) têm uma influência considerável na atividade antileishmania. Apenas HL1 e HL3 apresentaram atividade estatisticamente significativa na forma amastigota intracelular de *L. chagasi* (Tabela 3.3), enquanto HL2 se mostrou inativo na

concentração testada (10 μ M). De fato, o composto HL1 apresentou efeito máximo de $83,67 \pm 2,75\%$ e HL3 exibiu um efeito máximo de $45,22 \pm 2,82\%$. Como ambos HL1 e HL3 são hidrazonas derivadas de 4-nitroimidazol, enquanto HL2 é uma hidrazona derivada de 2-nitroimidazol, essa alteração estrutural provavelmente resulta no efeito antileishmania diminuído.

Uma vez que HL2 não apresentou atividade enquanto HL1 e HL3 foram ativos, a presença dos grupos metila ou fenila pareceria não ser um fator determinante. Além disso, uma vez que HL2 sofre redução ao ânion radical nitro mais facilmente (EpIc = -1025 mV) do que HL1 e HL3 (EpIc = -1203 e -1162 mV, respectivamente), essas diferenças também parecem não influenciar tanto a atividade quanto a posição do grupo nitro. No entanto, para se estabelecer relações entre estrutura e atividade, um maior número de compostos necessitaria ser investigado.

Tabela 3.3 - Efeito dos compostos (HL1-HL3) nas formas amastigotas intracelulares da *L. chagasi* a 10 μ M após 24 horas de tratamento e o potencial de redução do R-NO₂⁻ (EpIc)

Compostos	Efeito máximo (%)	EpIc (mV)
Glucantime	$49,75 \pm 2,25$ ***	--
Pentamidina	NA	--
HL1	$83,67 \pm 2,75$ ***	-1203
HL2	NA	-1025
HL3	$45,23 \pm 2,82$ ***	-1162

Os resultados se referem ao efeito máximo expresso como a média do efeito máximo \pm desvio padrão (triplicatas). Os efeitos foram considerados significativos quando * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001 em comparação com o grupo tratado com o veículo 0,1% DMSO. NA: a substância não apresentou efeito letal na concentração de 10 μ M.

Os resultados apresentados neste capítulo deram lugar ao artigo intitulado “Structural studies and antileishmanial activity of 2-acetylpyridine and 2-benzoylpyridine nitroimidazole-derived hydrazones” Ana P. A. Oliveira, Isabella P. Ferreira, Angel A. Recio Despaigne, Jeferson G. da Silva, Ana Carolina S. Vieira, Mariana S Santos, Magna S. Alexandre-Moreira, Renata Diniz and Heloisa Beraldo Acta Cryst. (2019). C75, 320–328 (Anexo II)

Capítulo 4

Resultados e discussão

Complexos de antimônio(III) e bismuto(III) de hidrazonas derivadas de 4-nitroimidazol e 4-nitrobenzeno: avaliação da atividade antitripanossoma

Como citado anteriormente, a literatura relata que compostos contendo o grupo nitroimidazol podem sofrer biorredução do grupo nitro gerando o ânion nitro-radical, que é altamente tóxico para parasitas.¹⁶⁵ Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa demonstrou que compostos possuindo como substituinte 4-nitrobenzeno e seus complexos exibem potente atividade antitripanossoma.^{166,167}

Compostos derivados de 8-hidroxiquinolina (8-HQ) também apresentam um amplo espectro de aplicações farmacológicas.¹⁶⁸ Estudos demonstraram que a coordenação a metais interfere nos efeitos biológicos desses compostos. Nosso grupo demonstrou que complexos de antimônio(III) com 8-HQ apresentaram atividade antitripanossoma.¹⁶⁹

4.1 – Caracterizações dos complexos de antimônio(III) e bismuto(III) de hidrazonas derivadas de 4-nitroimidazol e 4-nitrobenzeno

As sínteses e caracterizações das hidrazonas (Figura 4.1) 2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitroimidazolidrazona (H₂L4) e 2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitrobenzenohidrazona H₂L5 e dos complexos [2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitroimidazolidrazona](dicloro)antimônio(III), [Sb(HL4)Cl₂] (1) e [2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitrobenzenohidrazona](dicloro)antimônio(III), [Sb(HL5)Cl₂] (2) e [2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitroimidazolidrazona](dicloro)bismuto(III), [Bi(HL4)Cl₂] (3) e [2-formil-8-hidroxiquinolina-4-

¹⁶⁵ J. R. Coura, S. L. Castro, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97 (2002) 3–24.

¹⁶⁶ A. Perez-Rebolledo, L. R. Teixeira, A. A. Batista, A. S. Mangrich, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. Gonzalez, P. Hernandez, A. M. Ferreira, N. L. Speziali, H. Beraldo. Eur. J. Med. Chem. 43 (2008) 939-948.

¹⁶⁷ C. Rodrigues, A. A. Batista, J. Ellena, E. E. Castellano, D. Benitez, H. Cerecetto, M. Gonzalez, L. R. Teixeira, H. Beraldo. Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 2847–2853.

¹⁶⁸ Y. Song, H. Xu, W. Chen, P. Zhan, X. Liu. Med. Chem. Commun. 6 (2015) 61–74.

¹⁶⁹ D. C. Reis, M. C. X. Pinto, E. M. Souza-Fagundes, L. F. Rocha, V. R. A. Pereira, C. M. L. Melo, H. Beraldo. Biometals 24 (2011) 595–601.

nitrobenzenohidrazona)(dicloro)bismuto(III)], [Bi(HL5)Cl₂] (**4**) já foram descritas anteriormente por nós.¹⁷⁰ No presente capítulo discutimos os estudos cristalográficos e a investigação da atividade antitripanossoma dos compostos.

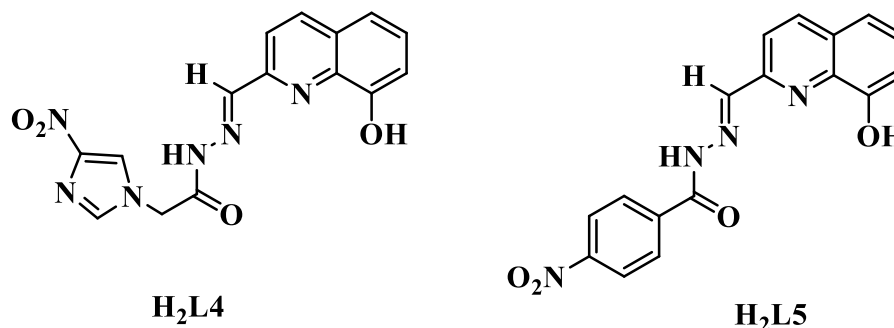


Figura 4.1 - Estruturas das hidrazonas derivadas de 8-hidroxiquinolina H₂L4 e H₂L5.

4.1.1 – Análise estrutural por difração de raios-X por monocristal

Em trabalho anterior foi relatada a estrutura cristalográfica do complexo (**2**)¹⁷⁰, porém, o refinamento foi refeito e descrevemos aqui os novos resultados.

Cristais apropriados para a difração de raios-X foram obtidos a partir da evaporação lenta da solução de DMF do complexo [Sb(HL5)Cl₂] (**2**) resultando na sua conversão em [Sb(HL5)(DMF)Cl₂].3DMF (**2a**) (Figura 4.2). A estrutura do complexo foi determinada por cristalografia de raios-X. A Tabela 4.1 apresenta alguns dos parâmetros da coleta de dados e refinamento do monocristal obtido para o complexo [Sb(HL5)(DMF)Cl₂].3DMF (**2a**). O composto cristaliza-se no sistema triclinico, P-1, com duas moléculas do complexo e seis de DMF por célula unitária (Z = 2).

No complexo, o ligante H₂L5 coordena-se ao centro metálico de modo tridentado através dos átomos de oxigênio e nitrogênio da quinolina e de um nitrogênio do grupo imina. H₂L5 sofre desprotonação no oxigênio do grupo quinolina, enquanto o nitrogênio do esqueleto hidrazônico continua protonado. A distância entre o antimônio(III) e o oxigênio do esqueleto da hidrazona, Sb1-O2 = 3,181(2) Å, é muito próxima à soma dos raios de Van der Waals do antimônio(III) e do oxigênio, 3,5 Å,¹⁷¹ indicando que o átomo de oxigênio O2 não se encontra coordenado ao centro metálico.

¹⁷⁰ A. P. A. Oliveira. Dissertação de Mestrado Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2016.

¹⁷¹ A. Bondi. J. Phys. Chem. 68 (1964) 441-451.

Os comprimentos e ângulos de ligação estão resumidos na Tabela 4.2, enquanto o diagrama Ortep está apresentado na Figura 4.2.

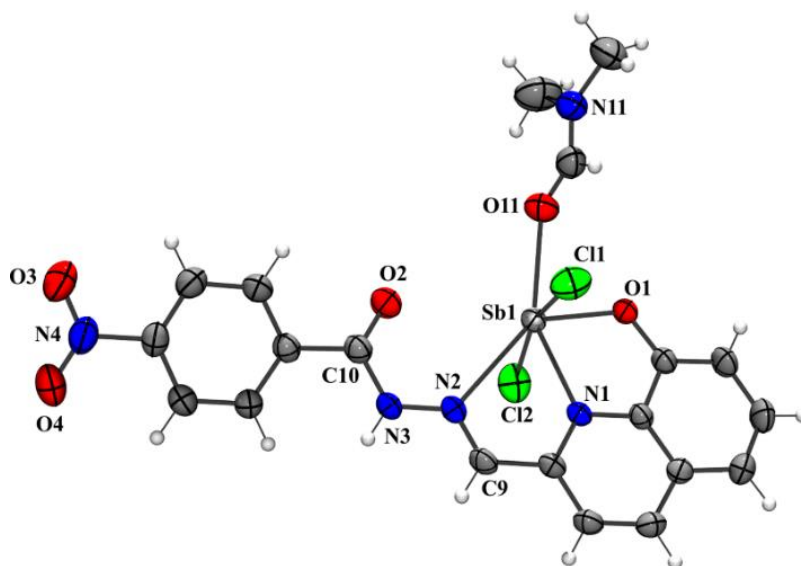


Figura 4.2 - Estrutura molecular do complexo $[\text{Sb}(\text{HL5})(\text{DMF})\text{Cl}_2]\cdot 3\text{DMF}$ (**2a**). Elipsóides com 50% de probabilidade; os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza nas imagens.

Tabela 4.1 - Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento estrutural para o complexo $[\text{Sb}(\text{HL5})(\text{DMF})\text{Cl}_2]\cdot 3\text{DMF}$ (**2a**)

Complexo	$[\text{Sb}(\text{HL5})(\text{DMF})\text{Cl}_2]\cdot 3\text{DMF}$ (2a)
Formula molecular	$\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{Cl}_2\text{N}_8\text{O}_8\text{Sb}$
Massa molecular (g mol^{-1})	820,33
Temperatura (K)	270(2)
Radiação ($\text{MoK}\alpha$) (Å)	0,71073
Sistema cristalino, grupo espacial	Triclínico, P-1
a (Å); b (Å); c (Å)	9,5820(5); 12,0943(6); 16,3348(8)
α ($^\circ$); β ($^\circ$); γ ($^\circ$)	102,036(4); 100,383(4); 93,829(4)
Volume (Å^3) / Z	1810,32(16), 2
Densidade calculada (Mg m^{-3})	1,505
μ (mm^{-1})	0,967
F(000)	836
Dimensões do cristal (mm)	0,48 x 0,06 x 0,03
Intervalo de θ ($^\circ$)	1,92 – 30,51

	-13<=h<=13
Intervalo de Índices	-17<=k<=17
	-23<=l<=23
Reflexões medidas/únicas/Rint	21771 / 11054 [R(int) = 0,0336]
Integralidade em $\theta=26.37^\circ$	100,0 %
Dados/restrições/parâmetros	11054 / 2 / 456
S (Goodness-of-fit on F2)	1,045
Índices finais R [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0,0394, wR2 = 0,0782
Índices finais R (todos os dados)	R1 = 0,0647, wR2 = 0,0906
$\Delta\rho$ min/máx ($e\text{\AA}^{-3}$)	0,636 e -0,690

O fragmento da molécula que corresponde ao sistema quelante da hidrazona ao centro do antimônio(III) é essencialmente plano. O átomo de antimônio(III) desvia-se deste plano por 0,00141 Å. A esfera de coordenação do metal contém o ligante tridentado, dois cloretos, uma molécula de DMF e o par isolado de antimônio(III), em uma geometria “pseudo” piramidal pentagonal.

As distâncias de ligação C10=O2, 1,210(3) Å e C9=N2, 1,271(3) Å, são características de ligações duplas [C=O (1,22Å) e C=N (1,28Å)] e a distância da ligação N2-N3, 1,357(3) Å é intermediária entre uma ligação simples N-N (1,45Å) e uma ligação dupla N=N (1,25Å). A distância da ligação N3-C10, 1,368(3) Å é característica de uma ligação simples. Esses valores estão de acordo com o fato de o N3-H permanecer protonado no complexo.

Tabela 4.2 - Principais distâncias de ligação (Å) e ângulos interatômicos da estrutura molecular do complexo [Sb(HL5)(DMF)Cl₂].3DMF (**2a**)

Ligação / Å		Ângulo / °	
[Sb(HL5)(DMF)Cl ₂].3DMF (2a)		[Sb(HL5)(DMF)Cl ₂].3DMF (2a)	
Sb1-O1	2,0444(16)	O1-Sb1-N2	139,44(6)
Sb1-N2	2,7587(18)	N2-Sb1-N1	63,70(6)
Sb1-N1	2,2601(18)	N1-Sb1-Cl1	84,16(5)
Sb1-Cl1	2,5370(7)	N1-Sb1-Cl2	80,48(5)
Sb1-Cl2	2,6578(7)	N2-Sb1-Cl2	85,54(4)

Sb1-O11	2,5454(19)	N3-N2-Sb1	129,36(14)
N2-N3	1,357(3)	Cl1-Sb1-Cl2	164,54(3)
N1-C2	1,337(3)	C8-O1-Sb1	118,36(13)
O1-C8	1,338(3)	C9-N2-N3	118,53(19)
N2-C9	1,271(3)	C2-N1-Sb1	128,30(15)
N1-C8A	1,358(3)	O11-Sb1-N2	144,84(7)
C10-O2	1,210(3)	N2-N3-C10	118,68(19)
N3-C10	1,368(3)	O1-Sb1-N1	75,77(6)
		O1-Sb1-O11	75,63(7)

O complexo (**2a**) apresenta uma interação de hidrogênio intermolecular envolvendo o nitrogênio da hidrazona e o oxigênio de uma molécula de DMF. Interações intermoleculares de hidrogênio não clássicas do tipo C-H...Cl e C-H...O no empacotamento do complexo formam um arranjo estrutural dimérico, Figura 4.3 e Tabela 4.3.

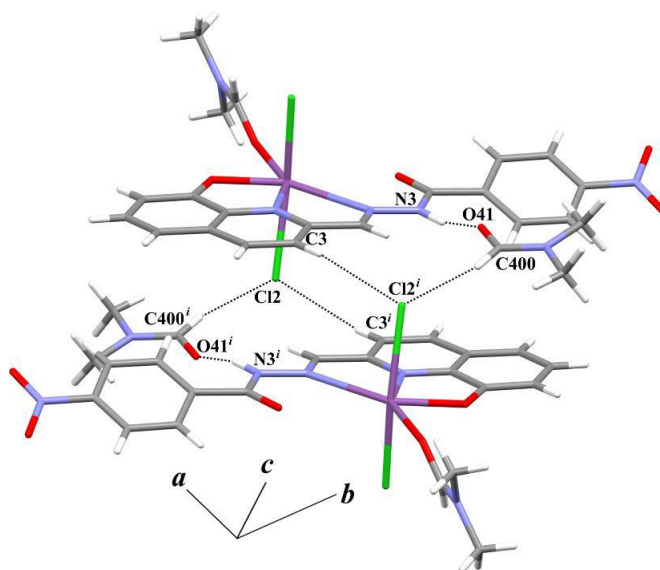


Figura 4.3 - Dímeros formados por interações intermoleculares NH...O e CH...Cl no cristal do complexo [Sb(HL5)(DMF)Cl₂] \cdot 3DMF (**2a**). Código de simetria: i (1 - x, -y, 1 - z).

Tabela 4.3 - Parâmetros geométricos das interações intermoleculares na estrutura molecular do [Sb(HL5)(DMF)Cl₂] \cdot 3DMF (**2a**)

H (D-H...A)	d(D-H) /Å	d(H...A) /Å	d(D...A) /Å	D-H...A/°
N3-H3N...O41	0,86	1,93	2,737(3)	157,0
C3--H(3)...Cl2 ⁱ	0,93	2,81	3,692(2)	158,0
C400-H400 ...Cl2	0,93	2,62	3,535(3)	167,0

Código de simetria: *i* (1 - x, -y, 1 - z)

4.2 - Avaliação da citotoxicidade frente a células de mamíferos e atividade anti-*T. cruzi* *in vitro*

Foi avaliada a atividade citotóxica dos compostos em células não infectadas humanas, fibroblastos humanos (hFIB) e de camundongos, macrófagos peritoneais. O composto H₂L4 e seus complexos [Sb(HL4)Cl₂] (**1**) e [Bi(HL4)Cl₂] (**3**) não apresentaram atividade citotóxica em célula hFIB quando testados na concentração máxima de 50 µM. Apenas o complexo (**3**) apresentou citotoxicidade no macrófago, com atividade de CC₅₀ de 49,17 µM.

O ligante H₂L5 também não foi citotóxico em hFIB e em macrófagos, mas por outro lado, os complexos [Sb(HL5)Cl₂] (**2**) e [Bi(HL5)Cl₂] (**4**) apresentaram citotoxicidade contra hFIB com CC₅₀ de 21,62 µM e 6,13 µM, respectivamente, e contra macrófagos de camundongo com CC₅₀ de 10,30 µM e 5,71 µM, respectivamente. Já o controle positivo, violeta de genciana, apresentou CC₅₀ de 13,5 µM (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Atividade antiparasitária e citotóxica dos compostos.

Compostos	EC ₅₀ ± EPM(µM)		CC ₅₀ ± EPM (µM)		IS
	tripomastigotas	MØ infectados	hFIB	MØ	
H ₂ L4	30,05 ± 1,21	14,98 ± 6,96	>100	>100	>3 (>5)
H ₂ L5	NA	12,69 ± 0,91	>100	>100	(>7)
[Sb(HL4)Cl ₂] (1)	13,01 ± 4,52	13,76 ± 2,93	>100	>100	>7 (>7)
[Sb(HL5)Cl ₂] (2)	0,33 ± 0,10	3,05 ± 0,49	21,62 ± 4,29	10,30 ± 0,35	31 (3)
[Bi(HL4)Cl ₂] (3)	1,21 ± 0,53	14,71 ± 4,63	>100	49,17 ± 2,05	40 (3)
[Bi(HL5)Cl ₂] (4)	0,06 ± 0,04	2,31 ± 0,17	6,13 ± 0,56	5,71 ± 1,11	95 (2)
Benznidazol	14,36 ± 3,81	1,43 ± 0,21	>100	>100	>7 (>70)
Violeta de genciana	ND	ND	13,51 ± 3,21	0,4 ± 0,04	ND

EC₅₀ = concentração que induz metade do efeito máximo; CC₅₀ = concentração citotóxicas a 50%; EPM = erro padrão da média; MØ = Macrófagos; NA = Não ativo em concentração máxima testada (50µM); ND = Não determinado; IS = Índice de seletividade. Entre parênteses, índice de seletividade contra macrófagos infectados

Apenas o ligante H₂L5 não exibiu atividade contra a forma tripomastigota do parasita *T. cruzi*, enquanto todos os outros compostos apresentaram uma excelente atividade. O ligante H₂L4 e todos os complexos (1-4) apresentaram EC₅₀ na faixa 0,06 - 30,05 µM. Os complexos (2) e (4) exibiram maiores atividades contra os parasitas extracelulares, exibindo EC₅₀ de 0,33 e 0,06 µM, respectivamente, enquanto o fármaco de referência, benznidazol apresentou EC₅₀ = 14,36 µM. O complexo (1) (EC₅₀ = 13,01 ± 4,52) foi tão ativo quanto o benznidazol. Ao observar o índice de seletividade o complexo (4) foi 95 vezes mais seletivo, apresentando melhor seletividade dentre todos os compostos.

Os compostos também foram testados contra a forma amastigota do parasita (intracelular), e todos os compostos reduziram a proporção de macrófagos infectados, com valores de EC₅₀ variando de 2,31 a 14,98 µM. Os complexos (2) e (4) também apresentaram as mais altas atividades anti-*T. cruzi* contra a forma amastigota, com valores de EC₅₀ de 3,05 e 2,31 µM, respectivamente (Tabela 4.4).

4.3 - Marcação de células apoptóticas e necróticas

Como o complexo (4) apresentou a maior atividade contra a forma tripomastigota, foi realizada a investigação do mecanismo de morte celular induzida pelo complexo. Assim, os tripomastigotas foram incubados por 6 h a 37 °C com (4) na concentração de 0,06 µM, que foi o valor do EC₅₀. Em seguida os parasitas foram marcados com anexina-V e iodeto de propídio (PI) e analisados por citometria de fluxo.

Dos tripomastigotas não tratados, 2,2% foram positivos para coloração de iodeto de propídio, enquanto os parasitas tratados com o complexo (4) apresentaram 53,0% para coloração PI (Figura 4.4). Não foi observada coloração positiva com anexina-V após o tratamento dos parasitas com o complexo (4), sugerindo que seus efeitos antiparasitários ocorram com a indução de morte celular por necrose. Além disso, é possível confirmar a potente atividade antiparasitária de (4) contra tripomastigotas, uma vez que neste ensaio apresentaram 53,0% de morte dos parasitas.

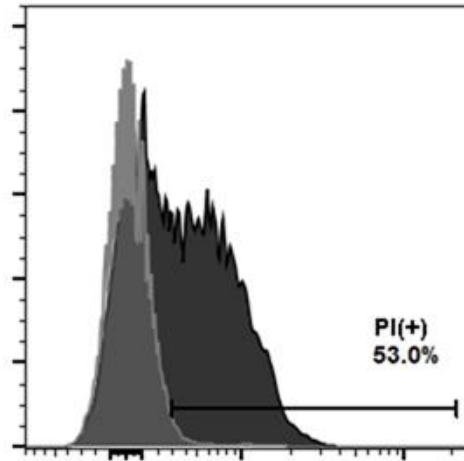


Figura 4.4 – Análise da morte celular dos tripomastigotas por citometria de fluxo. Os histogramas representam a população de tripomastigotas não tratados (cinza) e tratados com o complexo (4) (preto) 0,06 μM após 6 horas de incubação.

4.4 - Avaliação de alterações ultraestruturais nos parasitas

Os efeitos do complexo (4) sobre tripomastigotas foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), 24 horas após o tratamento, nas concentrações de 0,06 μM e 1 μM . A análise ultraestrutural mostrou encurtamento do flagelo e fragmentação da membrana enquanto o grupo controle mantinha sua morfologia típica. Após tratamento com 1 μM do complexo (4), pode-se observar uma degradação total do parasita (Figura 4.5).

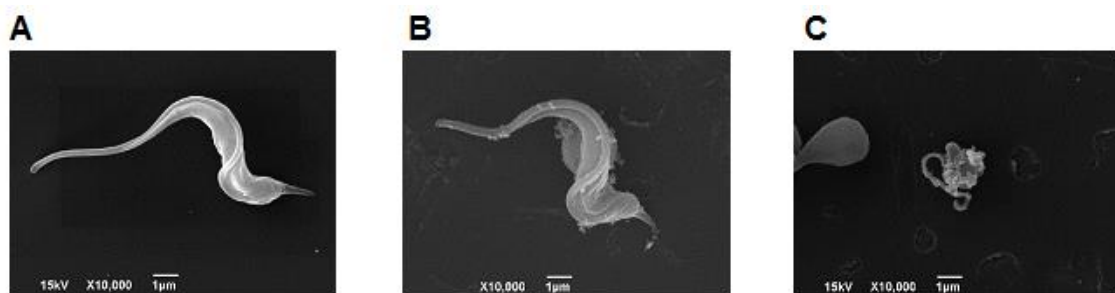


Figura 4.5 - Alterações ultraestruturais em tripomastigotas visualizadas por MEV. (A) sem tratamento; (B) após o tratamento com o complexo (4) por 24 h a 0,06 μM e (C) 1 μM .

Sendo assim, a estratégia de complexação das bases de Schiff funcionalizadas com nitroimidazol com antimônio(III) e especialmente com bismuto(III) revelou-se interessante na busca por novos candidatos a fármacos antitripanossoma.

Os resultados que foram abordados neste capítulo deram lugar ao artigo intitulado “Investigation of the antitrypanosomal effects of 2-formyl-8-hydroxyquinoline-derived hydrazones and their antimony(III) and bismuth(III) complexes” Ana Paula A. Oliveira, Angel A. Recio-Despaigne, Isabella P. Ferreira, Renata Diniz, Karoline A. F. Sousa, Tanira M. Bastos, Milena B. Pereira Soares, Diogo Rodrigo M. Moreira and Heloisa Beraldo. *New J. Chem.* (2019). (Anexo II)

Capítulo 5

Resultados e discussão

Complexos de cobre(II), prata(I) e bismuto(III) de tiossemicarbazonas e hidrazonas derivadas do 5-nitroimidazol

Tiossemicarbazonas e hidrazonas apresentam uma ampla gama de aplicações terapêuticas.^{172,173} A coordenação desses compostos ao cobre(II), em muitos casos, resulta em aumento significativo das atividades farmacológicas.^{174,175}

Compostos de prata(I) tendo como ligantes hidrazonas exibem atividade antifúngica, apresentando valores de CI_{50} menores ou comparáveis com alguns agentes antifúngicos em uso clínico.¹⁷⁶ Complexos de prata(I) com hidrazonas também mostraram atividade antiproliferativa, com uma baixa toxicidade para as células normais.¹⁷⁷

¹⁷² N. P. Prajapati, H. D. Patel. *Synth. Commun.* 49 (2019) 2767-2804.

¹⁷³ J. Wahbeh, S. Milkowski. *Slas Technol.* 24 (2019) 161-168.

¹⁷⁴ D. Rogolino, A. Cavazzoni, A. Gatti, M. Tegoni, G. Pelosi, V. Verdolino, C. Fumarola, D. Cretella, P. G. Petronini, M. Carcelli. *Eur. J. Med. Chem.* 128 (2017) 140-153.

¹⁷⁵ J. Xu, T. Zhou, Z. Xu, X. Gu, W. Wu, H. Chen, Y. Wang, L. Jia, T. Zhu, R. Chen. *J. Mol. Struct.* 1128 (2017) 448-454.

¹⁷⁶ A. F. Santos, I. P. Ferreira, J. A. Takahashi, G. L. S. Rodrigues, C. B. Pinheiro, L. R. Teixeira, W. R. Rocha, H. Beraldo. *New J. Chem.* (2018).

¹⁷⁷ L. V. Tamayo, A. F. Santos, I. P. Ferreira, V. G. Santos, M. T. P. Lopes, H. Beraldo. *Biometals* 30 (2017) 379 – 392.

Compostos à base de bismuto já são utilizados no tratamento de doenças do trato gastrointestinal e de infecções causadas pela bactéria *Helicobacter pylori*¹⁷⁸ e contra outros micro-organismos, e também exibiram ação citotóxica contra células tumorais.¹⁷⁹

5.1 - Caracterização dos complexos de cobre(II) prata(I) e bismuto(III) de tiossemicarbazonas e hidrazonas derivadas do 5-nitroimidazol

As sínteses das tiossemicarbazonas e hidrazonas utilizadas para complexar o cobre(II), a prata(I) e o bismuto(III) já foram descritas pelo nosso grupo de pesquisa.¹⁸⁰ As sínteses dos complexos foram realizadas de acordo o procedimento descrito no Capítulo 2, página 36. Os compostos foram caracterizados por análise elementar, faixas de fusão, medidas de condutimetria, espectroscopias no infravermelho e de RMN, momento magnético, análise termogravimétrica e medidas eletroquímicas. Os complexos obtidos e caracterizados foram testados para determinar sua atividade antimicrobiana, frente a bactérias aeróbicas e anaeróbicas e fungos leveduriformes, e suas atividades citotóxicas em linhagens de células tumorais e sadias foram avaliadas.

5.1.1 - Análises dos complexos de cobre(II), prata(I) e bismuto(III) de tiossemicarbazonas e hidrazonas derivadas do 5-nitroimidazol

Foram obtidos seis complexos inéditos de cobre(II): bis[1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazonacarboxamida](dicloro)cobre(II) [Cu(HL6)₂Cl₂] (5), [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)acetilhidrazona](dicloro)cobre(II) hemi-metanol [Cu(HL7)Cl₂]·½CH₃OH (6), [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)benzoilhidrazona](dicloro)cobre(II) [Cu(HL8)₂Cl₂] (7), [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida](dicloro)cobre(II) hemi-hidratado [Cu(HL9)Cl₂]·½H₂O (8), [(N-metil-1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida](dicloro)cobre(II) [Cu(HL10)Cl₂] (9) e [(1-(2-metil-5-

¹⁷⁸ G. G. Briand, N. Burford. Chem. Rev. 99 (1999) 2601.

¹⁷⁹ I. P. Ferreira, E. D. L. Piló, A. A. Recio-Despaigne, J. G. Da 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) 2988–2998.

¹⁸⁰ A. A. Oliveira, A. P. A. Oliveira, L. L. Franco, M. O. Ferencs, J. Ferreira, S. Bachi, N. L. Speziali, L. M. Farias, P. P. Magalhaes, H. Beraldo. Biometals 31 (2018) 571-584.

nitroimidazol)propan-2-ilideno)-*N*-fenil-hidrazinocarbotioamida)(dicloro)cobre(II)] [Cu(HL11)Cl₂] \cdot ½H₂O (**10**). Foram igualmente sintetizados quatro complexos inéditos de prata(I), [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)acetilhidrazona)(nitrato)prata(I)] [Ag(HL7)NO₃] (**11**), [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)benzoilhidrazona)(nitrato)prata(I)] [Ag(HL8)NO₃] (**12**) e [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida)(nitrato)prata(I)] [Ag(HL9)NO₃] (**13**) e [((*N*-metil-1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida)(nitrato)prata(I)] [Ag(HL10)NO₃] (**14**) e três complexos inéditos de bismuto(III): [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida)(triclouro)bismuto(III)] [Bi(HL9)Cl₃] (**15**), [(*N*-metil-1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida)(triclouro)bismuto(III)] [Bi(HL10)Cl₃] (**16**) e ((1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)-*N*-fenil-hidrazinocarbotioamida)(triclouro)bismuto(III)] diidratado [Bi(HL11)Cl₃] \cdot 2H₂O (**17**).

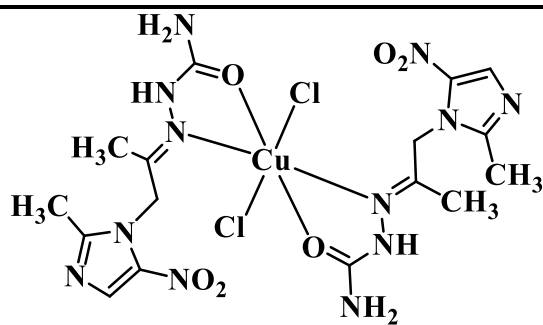
Os dados de análise elementar quantitativa e as medidas de condutimetria (Tabelas 5.1 e 5.2) sugerem a formação de complexos do tipo [Cu(HL)₂Cl₂] para HL6 e [Cu(HL)Cl₂] para (HL7 - HL11), [Ag(HL)NO₃] para (HL7 - HL10) e [Bi(HL)Cl₃] para (HL9 - HL11), nos quais os ligantes (HL) coordenam-se de forma neutra, e formam complexos não eletrolíticos. De acordo com a literatura, um composto eletrolítico 1:1, utilizando DMSO como solvente, possui uma condutividade molar de 50-70 cm² Ω⁻¹ mol⁻¹.¹⁸¹ Assim, os resultados estão consistentes com a presença de não-eletrólitos, de acordo com as estruturas sugeridas. Os valores do momento magnético para os complexos (**5** - **10**) na faixa de 1,60 - 2,00 MB, são característicos do íon cobre(II) com um elétron desemparelhado na configuração d⁹.¹⁸²

¹⁸¹ J. W. Geary. Coord. Chem. Rev. 7 (1971) 81.

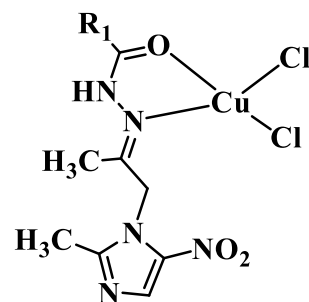
¹⁸² K. Jayakumar, M. Sithambaresan, A. A. Aravindakshan, M.R. P. Kurup. Polyhedron 75 (2014) 50-56.

Tabela 5.1 - Fórmula molecular, massa molar (MM), temperatura de fusão (TF(°C)), análise elementar de C, H e N (valores teóricos em parêntesis), condutividade (ΛM), momento magnético (μ_{eff}) e rendimento (Rend.) dos complexos de cobre(II), prata(I) e bismuto(III) com tiossemicarbazonas e hidrazonas derivadas de 5-nitroimidazol.

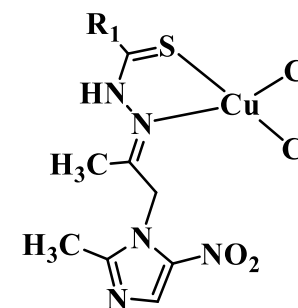
Compostos	Formula molecular	MM (g mol^{-1})	TF (°C)	Análise elementar*			ΛM ($\text{cm}^2 \Omega^{-1} \text{mol}^{-1}$)	μ_{eff} (MB)	Rend. (%)
				%C	%H	%N			
[Cu(HL6)2Cl2] (5)	C ₁₆ H ₂₄ Cl ₂ CuN ₁₂ O ₆	614,89	183,0-184,5	31,36(31,25)	3,70(3,93)	27,25(27,34)	18,83	2,00	50
[Cu(HL7)Cl2]·½CH ₃ OH (6)	C _{9,5} H ₁₅ Cl ₂ CuN ₅ O _{3,5}	389,70	Dec. 195,0	30,33(29,28)	3,58(3,88)	17,76(17,97)	28,82	1,60	51
[Cu(HL8)Cl2] (7)	C ₁₄ H ₁₅ Cl ₂ CuN ₅ O ₃	435,75	Dec. 210,0	38,09(38,59)	3,21(3,47)	16,39(16,07)	33,18	1,63	50
[Cu(HL9)Cl2]·½H ₂ O (8)	C ₈ H ₁₃ Cl ₂ CuN ₆ O _{2,5} S	399,74	Dec. 160,0	23,91(24,04)	3,20(3,28)	21,28(21,02)	43,57	1,60	75
[Cu(HL10)Cl2] (9)	C ₉ H ₁₄ Cl ₂ CuN ₆ O ₂ S	404,76	Dec. 180,0	26,81(26,71)	3,73(3,49)	20,20(20,76)	26,75	1,63	65
[Cu(HL11)Cl2]·½H ₂ O (10)	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ CuN ₆ O _{2,5} S	475,84	Dec. 205,0	35,18(35,34)	3,25(3,45)	17,22(17,66)	46,82	1,67	61



(5)



R₁ = CH₃ (6), C₆H₅ (7)



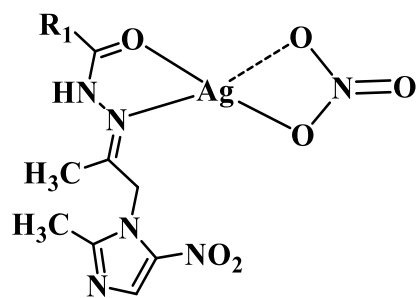
R₁ = NH₂ (8), NHCH₃ (9), NHC₆H₅ (10)

*Experimental(calculado)

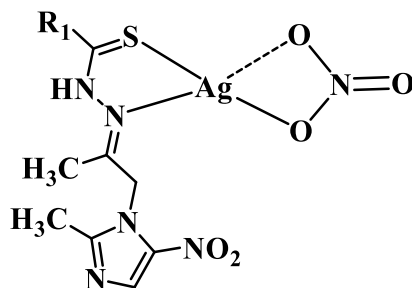
Dec.= decomposição

Tabela 5.2 - Fórmula molecular, massa molar (MM), temperatura de fusão (TF(°C)), análise elementar de C, H e N (valores teóricos em parêntesis), condutividade (ΔM) e rendimento (Rend.), dos complexos de prata(I) e bismuto(III) com tiossemicarbazonas e hidrazonas derivadas de 5-nitroimidazol.

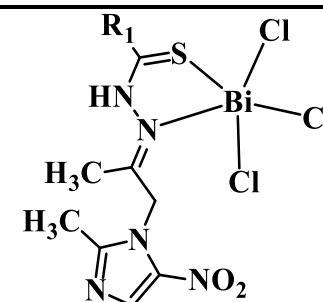
Compostos	Formula molecular	MM (g mol^{-1})	T F (°C)	Análise elementar*			ΔM ($\text{cm}^2 \Omega^{-1} \text{mol}^{-1}$)	Rend. (%)
				%C	%H	%N		
[Ag(HL7)NO ₃] (11)	C ₉ H ₁₃ AgN ₆ O ₆	409,10	Dec. 135,0	26,44(26,42)	3,15 (3,20)	20,38(20,54)	39,86	61
[Ag(HL8)NO ₃] (12)	C ₁₄ H ₁₅ AgN ₆ O ₆	471,17	184,1 - 184,3	35,38(35,69)	3,09(3,21)	17,72(17,84)	38,10	78
[Ag(HL9)NO ₃] (13)	C ₈ H ₁₂ AgN ₇ O ₅ S	426,16	Dec. 125,0	22,71(22,55)	2,79 (2,84)	23,27(23,01)	29,30	89
[Ag(HL10)NO ₃] (14)	C ₉ H ₁₄ AgN ₇ O ₅ S	440,18	190,0 - 191,0	23,97(24,56)	3,17(3,21)	21,22(22,27)	33,70	68
[Bi(HL9)Cl ₃] (15)	C ₈ H ₁₂ BiCl ₃ N ₆ O ₂ S	571,62	Dec.153,0	16,88(16,81)	2,19(2,12)	14,40(14,70)	10,03	84
[Bi(HL10)Cl ₃] (16)	C ₉ H ₁₄ BiCl ₃ N ₆ O ₂ S	585,65	141,0-142,2	18,47(18,46)	2,49(2,41)	14,63(14,35)	5,72	66
[Bi(HL11)Cl ₃]·2H ₂ O (17)	C ₁₄ H ₂₀ BiCl ₃ N ₆ O ₄ S	683,75	134,0-135,0	23,81(24,59)	2,94(2,95)	12,75(12,29)	9,24	79



R₁ = CH₃ (11), C₆H₅ (12)



R₁ = NH₂ (13), NHCH₃ (14)



R₁ = NH₂ (15), NHCH₃ (16), NHC₆H₅ (17)

*Experimental, (calculado) Dec.= decomposição

5.1.2 - Termogravimetria (TG)

A presença da molécula de água nos complexos (8), (10) e (17), e da molécula de metanol no complexo (6) foram confirmadas através da curva termogravimétrica. A perda de massa pode ser verificada na Figura 5.1 para o complexo (8). Na curva TG dos complexos (8) e (10) ocorreu uma perda de massa de 1,93% e 2,29%, respectivamente, referente a $\frac{1}{2}$ molécula de H₂O, e a perda de massa de 5,23% é referente a duas moléculas de H₂O para o complexo (17). No complexo (6) ocorre uma perda de massa de 4,08% referente a $\frac{1}{2}$ molécula de CH₃OH (Tabela 5.3).

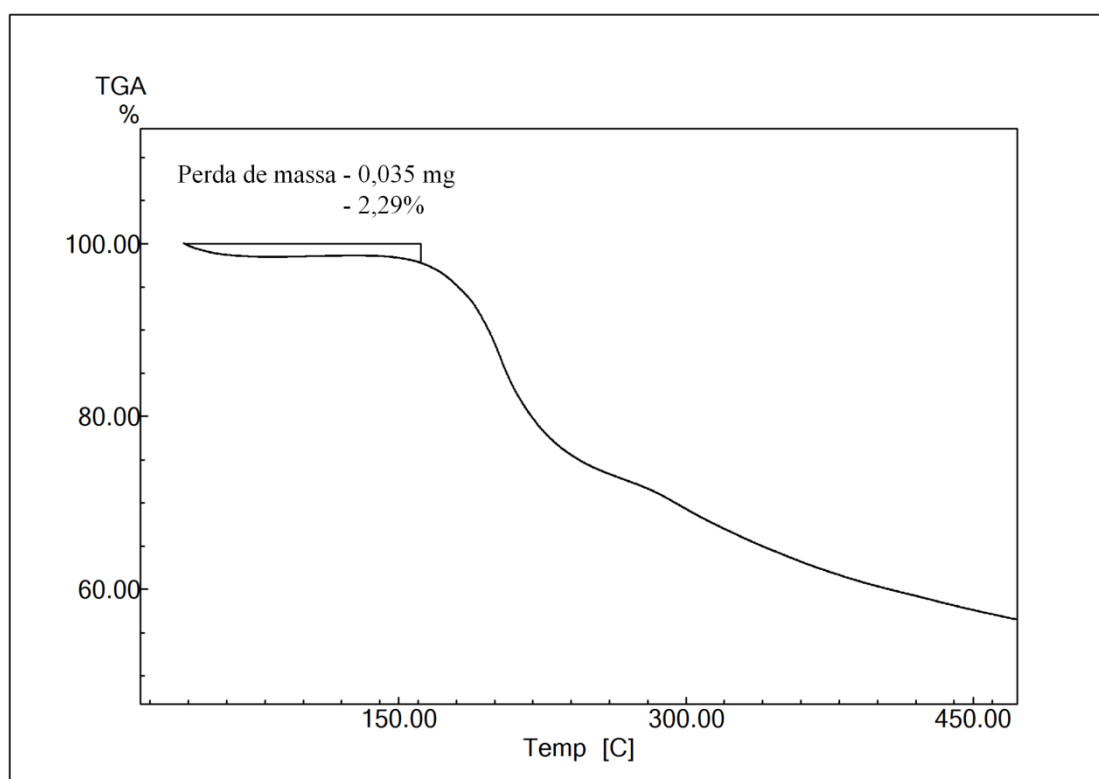


Figura 5.1 - Curva TG do composto [Cu(HL9)Cl₂] $\cdot\frac{1}{2}$ H₂O (8), obtida em atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL.min⁻¹), a 10 °C.min⁻¹.

A Figura 5.2 mostra as estruturas propostas para os complexos considerando as análises elementares e curvas termogravimétricas.

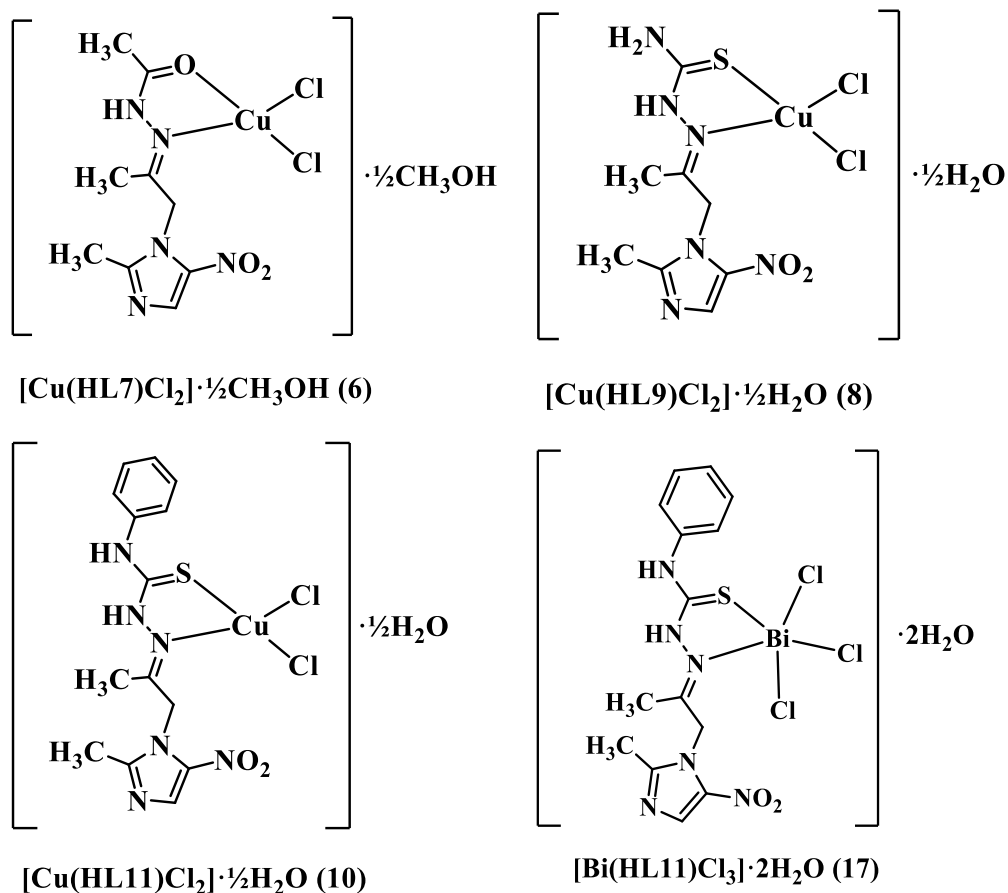


Figura 5.2 - Estruturas propostas para os complexos $[\text{Cu}(\text{HL7})\text{Cl}_2] \cdot \frac{1}{2}\text{CH}_3\text{OH}$ (6), $[\text{Cu}(\text{HL9})\text{Cl}_2] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (8), $[\text{Cu}(\text{HL11})\text{Cl}_2] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (10) e $[\text{Bi}(\text{HL11})\text{Cl}_3] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (17).

Tabela 5.3 - Porcentagem de perda de massa referente à água e metanol na TG.

Composto	Curva termogravimétrica (TG)	
	% Solvente calculado	% Solvente experimental *
$[\text{Cu}(\text{HL7})\text{Cl}_2] \cdot \frac{1}{2}\text{CH}_3\text{OH}$ (6)	4,10	4,09
$[\text{Cu}(\text{HL9})\text{Cl}_2] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (8)	2,25	2,29
$[\text{Cu}(\text{HL11})\text{Cl}_2] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (10)	1,89	1,93
$[\text{Bi}(\text{HL11})\text{Cl}_3] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (17)	5,26	5,23

* Faixa de temperatura: 35 - 165 °C

5.1.3 - Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) dos complexos de cobre(II), prata(I) e bismuto(III) foram obtidos em pastilhas de KBr e as atribuições baseadas em comparações com os espectros dos ligantes. As principais bandas de

vibrações analisadas nos espectros foram: $\nu(\text{N-H})$, $\nu(\text{C=N})$, $\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=S})$, $\nu_s(\text{NO}_3)$ e $\nu_{as}/\nu_s(\text{NO}_2)$, Tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Valores de números de ondas das bandas, nos espectros no infravermelho (cm^{-1}), dos complexos de cobre(II), prata(I) e bismuto(III) com suas respectivas tiossemicarbazonas e hidrazonas, usando como suporte KBr (4000 - 400 cm^{-1}).

Composto	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu(\text{C=S})$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu_{as}/\nu_s(\text{NO}_2)$	$\nu_s(\text{NO}_3)$
HL6	3180 m	1540 F	--	1698 F	1461/1361 F	--
[Cu(HL6) ₂ Cl ₂] (5)	3434 m	1566 F	--	1712 F	1484/1390 F	--
HL7	3266 m	1530 F	--	1678 F	1471/1362 F	--
[Cu(HL7)Cl ₂] $\cdot\frac{1}{2}\text{CH}_3\text{OH}$ (6)	3126 m	1550 F	--	1736 F	1476/1388 F	--
[Ag(HL7)NO ₃] (11)	3300 m	1554 F	--	1678 F	1488/1380	1380 F
HL8	3185 F	1526 F	--	1670 F	1461/1355 F	--
[Cu(HL8)Cl ₂] (7)	3126 m	1556 F	--	1736 F	1480/1386 F	--
[Ag(HL8)NO ₃] (12)	3144 m	1552 F	--	1654 F	1486/1388 F	1388 F
HL9	3170 m	1530 F	804 f	--	1463/1360 F	--
[Cu(HL9)Cl ₂] $\cdot\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (18)	3224 m	1594 F	788 f	--	1474/1390 F	--
[Ag(HL9)NO ₃] (13)	3176 m	1530 F	794 f	--	1466/1377 F	1384 F
[Bi(HL9)Cl ₃] (15)	3258 m	1524 F	742 f	--	1430/1368 F	--
HL10	3183 m	1531 F	786 f	--	1471/1362 F	--
[Cu(HL10)Cl ₂] (9)	3374 m	1562 F	784 f	--	1474/1370 F	--
[Ag(HL10)NO ₃] (14)	3260 m	1548 F	772 f	--	1486/1384 F	1384 F
[Bi(HL10)Cl ₃] (16)	3342 m	1550 F	774 f	--	1486/1368 F	--
HL11	3296 F	1530 F	772 f	--	1471/1362 F	--
[Cu(HL11)Cl ₂] (10)	3300 F	1552 F	760 f	--	1496/1368 F	--
[Bi(HL11)Cl ₃] $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (17)	3296 m	1544 F	764 f	--	1496/1366 F	--

Intensidade das bandas: F = forte, m = média, f = fraca. -- Ausência da banda

A banda de estiramento da vibração $\nu(\text{N-H})$ ocorre na região de 3188 - 3266 cm^{-1} nos espectros das hidrazonas livres, enquanto nos complexos é possível observar o deslocamento dessa banda para 3126 - 3434 cm^{-1} . Nos espectros das hidrazonas livres, as bandas atribuídas ao estiramento $\nu(\text{C=O})$ são observadas em 1670 - 1698 cm^{-1} , e nos espectros dos complexos de cobre(II) e prata(I), observa-se deslocamentos desse modo vibracional para 1654 - 1736 cm^{-1} . A complexação causa deslocamentos na banda

atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$, que ocorre na região de 1526 - 1540 cm^{-1} nas hidrazonas livres, e aparece entre 1550 - 1566 cm^{-1} nos complexos, indicando a complexação pelo nitrogênio imínico.

Assim, nos complexos ocorre a coordenação do oxigênio da carbonila e do nitrogênio imínico ao cobre(II) e à prata(I) através do sistema quelante $\text{N}_{\text{imina}}\text{-O}$.^{183,184}

As bandas de vibração $\nu(\text{N-H})$, que nas tiossemicarbazonas livres encontram-se na faixa 3170 - 3296 cm^{-1} , são observadas nos complexos entre 3176 - 3374 cm^{-1} , indicando que os ligantes permanecem protonados.

Nos espectros na região do IV das tiossemicarbazonas livres as bandas atribuídas ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{S})$ são encontrados entre 772 - 804 cm^{-1} e nos espectros do IV dos complexos de cobre(II), prata(I) e bismuto(III) observam-se deslocamentos para 742 - 794 cm^{-1} . Ao serem comparadas as bandas atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{C}=\text{N})$, observadas na região de 1530 - 1531 cm^{-1} nos espectros dos ligantes, são observados deslocamentos para 1524 - 1594 cm^{-1} nos complexos. A coordenação também é indicada pelo aparecimento de novas bandas atribuídas ao modo vibracional $\nu(\text{NO}_3)$ nos complexos de prata(I), próximo de 1384 cm^{-1} , que estão ausentes nos espectros dos ligantes livres. Assim, é possível sugerir que as tiossemicarbazonas estão ligadas ao cobre(II), prata(I) e bismuto(III) através do sistema quelante $\text{N}_{\text{imina}}\text{-S}$.^{185,186}

Os espectros de absorção na região do infravermelho para a tiossemicarbozona HL10 e seus complexos $[\text{Cu}(\text{HL10})\text{Cl}_2]$ (**9**), $[\text{Ag}(\text{HL10})\text{NO}_3]$ (**14**) e $[\text{Bi}(\text{HL10})\text{Cl}_3]$ (**16**), na região de 4000 - 400 cm^{-1} são mostrados nas Figuras 5.3, 5.4 e 5.5, respectivamente.

¹⁸³ L. V. Tamayo, J. G. Da Silva, M. C. Quintão, H. A. Duarte, S. R.W. Louro, H. Beraldo. *Polyhedron* 134 (2017) 199-206.

¹⁸⁴ C. S. Rocha, L. F. O. Bomfim, A. E. de Souza, R. Diniz, A. M. L. Denadai, H. Beraldo, L. R. Teixeira. *Polyhedron* 170 (2019) 723-730.

¹⁸⁵ D. C. Reis, A. A. R. Despaigne, J. G. Da Silva, N. F. Silva, C. F. Vilela, I. C. Mendes, J. A. Takahashi, H. Beraldo. *Molecules* 18 (2013) 12645-12662.

¹⁸⁶ A. D. Khalaji, E. Shahsavani, N. Feizi, M. Kucerakova, M. Dusek, R. Mazandarani. *C. R. Chimie*. 20 (2017) 534 - 539.

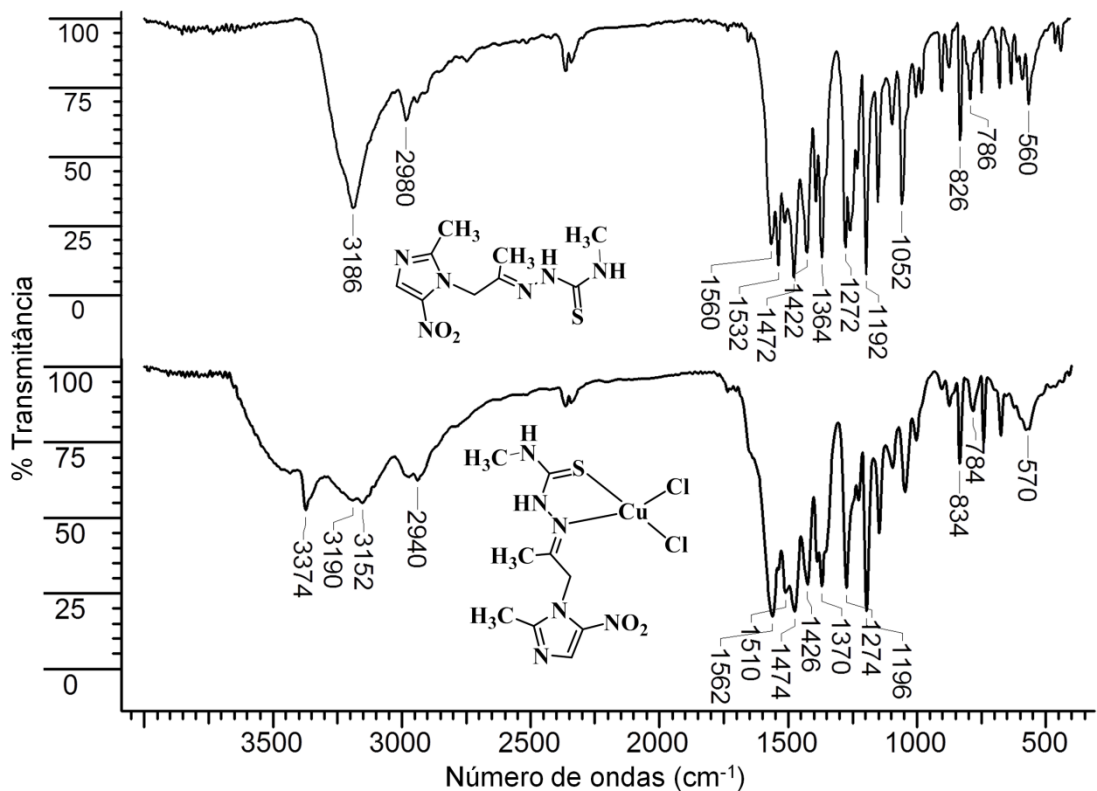


Figura 5.3 - Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante HL10 e do complexo [Cu(HL10)Cl₂] (**9**).

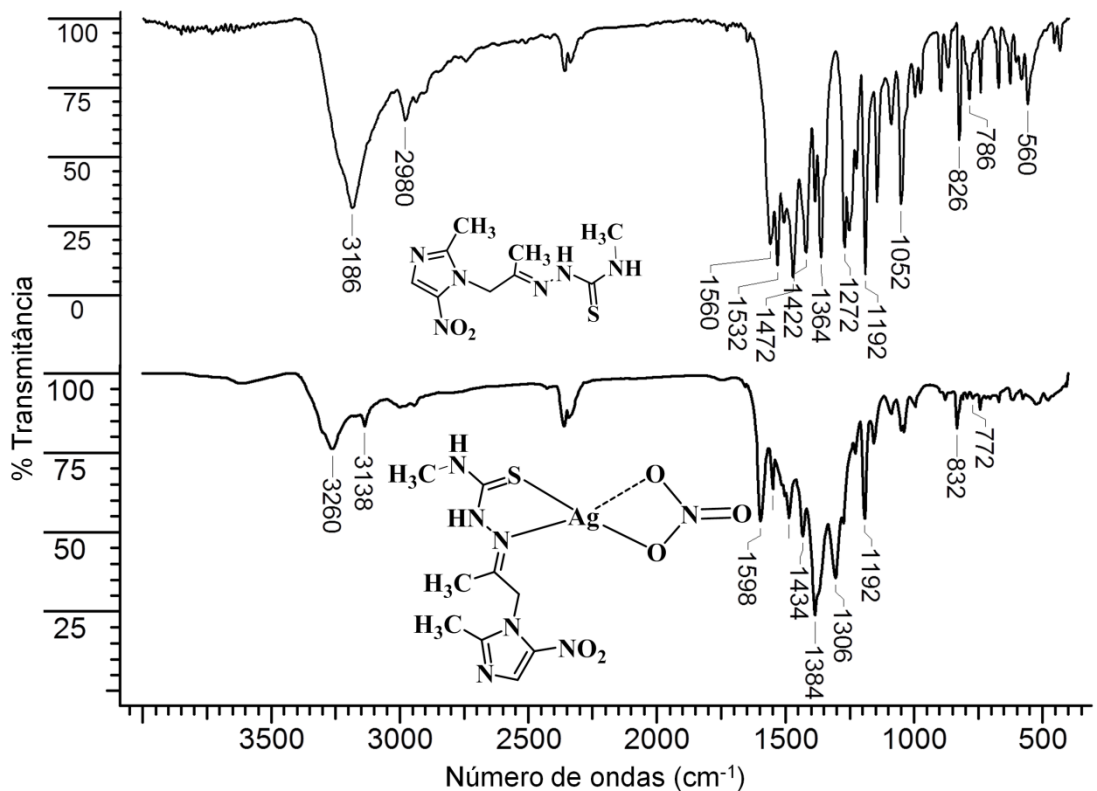


Figura 5.4 - Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante HL10 e do complexo [Ag(HL10)NO₃] (**14**).

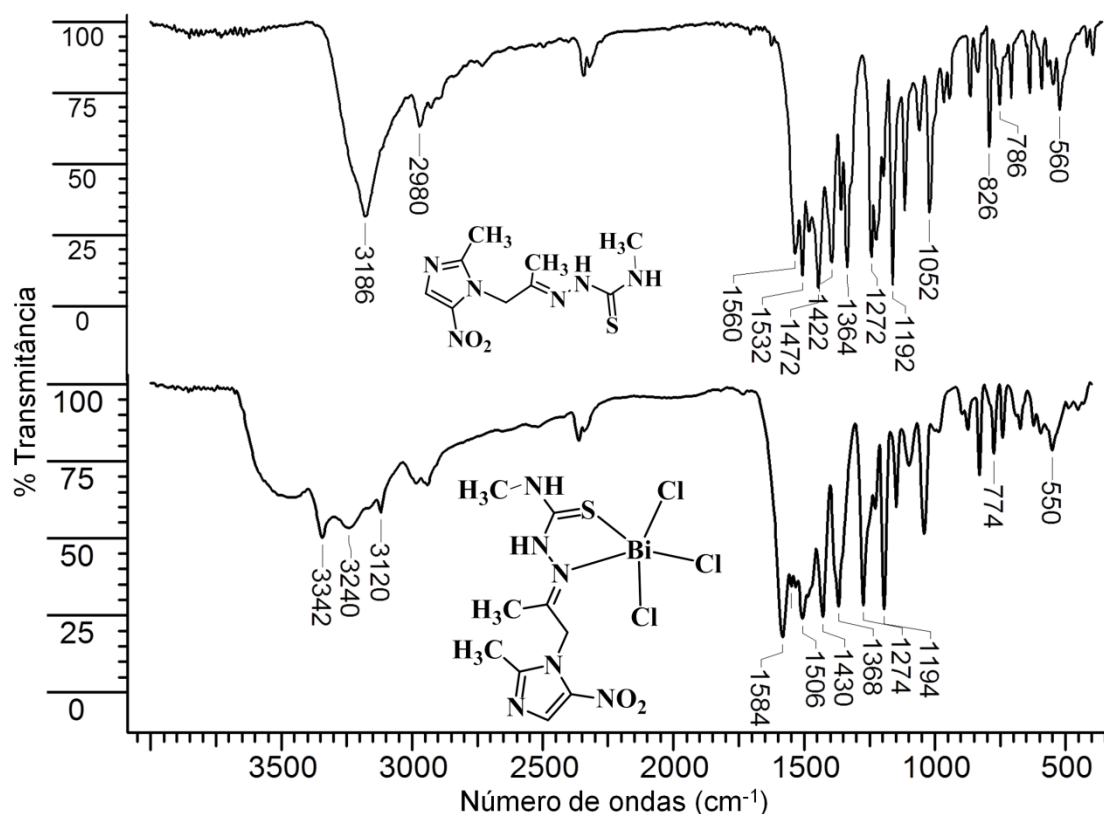


Figura 5.5 - Espectro vibracional na região do infravermelho do ligante HL10 e do complexo $[\text{Bi}(\text{HL10})\text{Cl}_3]$ (**16**).

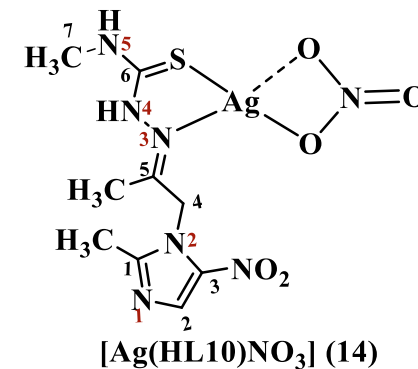
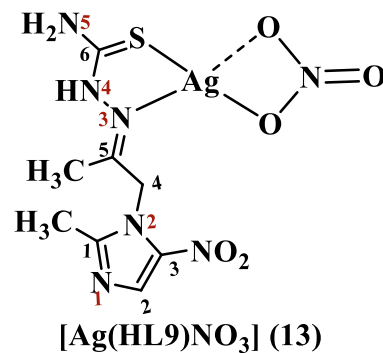
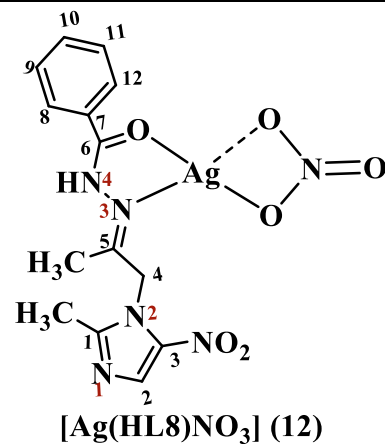
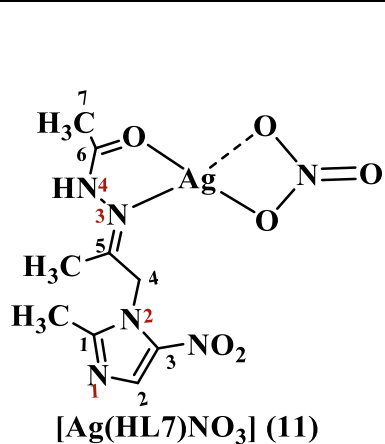
5.1.4 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Nos espectros de RMN de ^1H , os sinais foram atribuídos usando como base o deslocamento químico, multiplicidade e a correlação homonuclear COSY. Os sinais de RMN de ^{13}C foram atribuídos utilizando o DEPT-135 para determinar o deslocamento químico e tipo de carbono (C, CH) e suas atribuições foram feitas também com o auxílio de RMN bidimensional heteronuclear de HMQC. Todos os espectros foram obtidos em $\text{DMSO-}d_6$.

Os principais sinais atribuídos nos espectros de RMN de ^1H dos complexos de prata(I) e bismuto(III) e das hidrazonas e tiossemicarbazonas livres encontram-se listados nas Tabela 5.5 e 5.6

Tabela 5.5 – Atribuição de número de hidrogênios (N° de H), deslocamento químico δ (ppm), multiplicidade (M)* dos principais sinais de RMN de ^1H das hidrazonas e tiossemicarbazonas derivadas 5-nitroimidazol e seus complexos de prata(I) em $\text{DMSO-}d_6$.

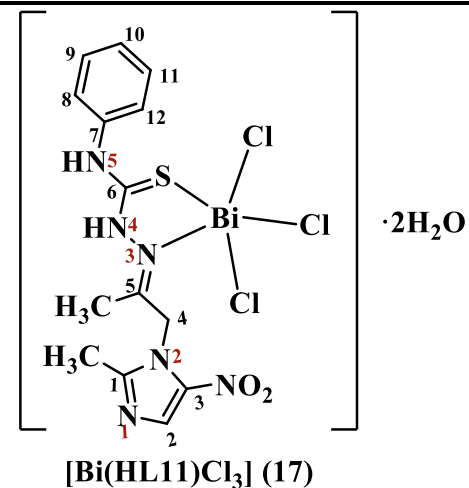
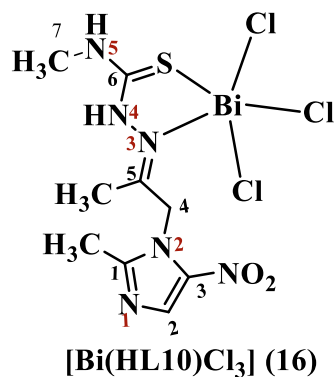
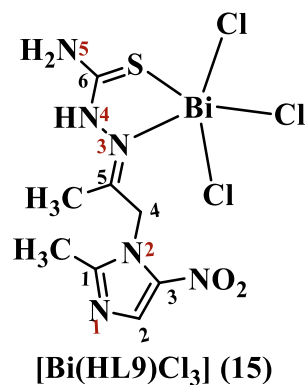
Atribuição	N° de H	HL7	(11)	$\Delta\delta$ (ppm)	HL8	(12)	$\Delta\delta$ (ppm)	HL9	(13)	$\Delta\delta$ (ppm)	HL10	(14)	$\Delta\delta$ (ppm)
N4-H	1	10,32(s)*	10,38(s)	0,04	10,70(s)	10,72(s)	0,02	10,42 (s)	10,87(s)	0,45	10,31(s)	10,45(s)	0,14
N5-H	2/1	--	--	--	--	--	--	8,16/6,41(s)	8,82/7,32(s)	0,66/0,91	7,24 (s)	8,15 (s)	0,91
C1CH ₃	3	2,37(s)	2,42(s)	0,05	2,42(s)	2,50 (s)	0,08	2,38 (s)	2,41(s)	0,03	2,39 (s)	2,45(s)	0,06
H2	1	8,04(s)	8,08(s)	0,04	8,06(s)	8,11(s)	0,05	8,07 (s)	8,08(s)	0,01	8,07 (s)	8,10(s)	0,03
H4	2	5,15(s)	5,12(s)	0,03	5,22(s)	5,27 (s)	0,05	5,13 (s)	5,19(s)	0,06	5,12 (s)	5,19(s)	0,07
C5CH ₃	3	1,93(s)	1,94(s)	0,01	2,04(s)	2,06 (s)	0,02	2,01 (s)	2,05(s)	0,04	1,96 (s)	2,02(s)	0,06
H7	3	1,66(s)	1,64(s)	0,02	--	--	--	--	--	--	2,89 (d)	3,02(s)	0,12
H8 e 12	2	--	--	--	7,78(s)	7,79 (s)	0,01	--	--	--	--	--	--
H9 e 11	2	--	--	--	7,17-7,58(m)	7,17-7,58(m)	0	--	--	--	--	--	--
H10	1	--	--	--	7,17-7,58(m)	7,17-7,58(m)	0	--	--	--	--	--	--



*M = (s) simpleto; (d) dupleto; (t) tripleto; (m) multipleto -- Ausência de sinal

Tabela 5.6 - Atribuição de número de hidrogênios (N° de H), deslocamento químico δ (ppm), multiplicidade (M)* dos principais sinais de RMN de ^1H das tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol e seus complexos de bismuto(III) em DMSO- d_6 .

Atribuição	N° de H	HL9	(15)	$\Delta\delta$ (ppm)	HL10	(16)	$\Delta\delta$ (ppm)	HL11	(17)	$\Delta\delta$ (ppm)
N4-H	1	10,42 (s)	10,38 (s)	0,04	10,31(s)	10,32 (s)	0,01	10,87 (s)	10,92 (s)	0,05
N5-H	2/1	8,16/6,41(s)	8,13/6,42(s)	0,03/0,01	7,24 (s)	7,24 (s)	0	8,83 (s)	8,83 (s)	0
C1CH ₃	3	2,38 (s)	2,38 (s)	0	2,39 (s)	2,39 (s)	0	2,43 (s)	2,43 (s)	0
H2	1	8,07 (s)	8,06 (s)	0,01	8,07 (s)	8,08 (s)	0,01	8,15 (s)	8,16 (s)	0,01
H4	2	5,13 (s)	5,13 (s)	0,01	5,12 (s)	5,12 (s)	0	5,23 (s)	5,23 (s)	0
C5CH ₃	3	2,01 (s)	2,01 (s)	0	1,96 (s)	1,96 (s)	0	2,10 (s)	2,09 (s)	0,01
H7	3	--	--	--	2,89 (d)	2,89 (s)	0	--	--	--
H8 e 12	2	--	--	--	--	--	--	7,51 (d)	7,49 (s)	0,02
H9 e 11	2	--	--	--	--	--	--	7,35 (t)	7,35 (s)	0
H10	1	--	--	--	--	--	--	7,16 (t)	7,16 (s)	0



*M = (s) simples; (d) duplo; (t) triplo; (m) multiplo -- Ausência de sinal

Foi observado que os principais sinais atribuídos nos espectros de RMN de ^1H dos complexos de prata(I) com as tiossemicarbazonas apresentam deslocamentos significativos. Já os complexos de prata(I) com hidrazonas apresentam pequenos deslocamentos químicos ao comparar com os sinais dos ligantes livres o que já é esperado em complexos de prata(I) com hidrazonas.¹⁸³ Os sinais dos complexos de bismuto(III) também permanecem praticamente inalterados ou com pouco deslocamento nos espectros de RMN de ^1H . Nosso grupo já demonstrou que a complexação de tiossemicarbazonas com bismuto(III) pode não afetar os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos das tiossemicarbazona.¹⁸⁷ A coordenação dos ligantes neutros não acarreta grandes variações de densidade eletrônica, o que poderia se refletir na semelhança entre os espectros das hidrazonas e seus complexos de prata(I) e das tiossemicarbazonas e os de seus complexos de bismuto(III).

Nos espectros de RMN de ^1H dos complexos é possível observar um simpleto que foi atribuído ao N4-H, mostrando que não ocorre a desprotonação da ligação N-H após a coordenação. Os sinais de hidrogênio N4-H que são observados entre δ 10,31 - 10,87 ppm no ligante livre, sofreram pequenos deslocamentos para δ 10,38 - 10,89 ppm nos complexos. O sinal de hidrogênio N5-H é observado no ligante HL10 em δ 7,24 ppm, e se desloca para δ 8,15 ppm no complexo (**14**). Este sinal é observado no ligante HL9 em δ 8,16 e 6,41 ppm, e no complexo (**13**) sofre deslocamentos para δ 9,84 e 7,33 ppm.¹⁸⁸

As Figuras 5.6 e 5.7 apresentam os espectros de RMN de ^1H da tiossemicarbazona HL10 e de seus complexos $[\text{Ag}(\text{HL10})\text{NO}_3]$ (**14**) e $[\text{Bi}(\text{HL10})\text{Cl}_3]$ (**16**), respectivamente.

¹⁸⁷J. A. Lessa, D. C. Reis, J. G. Da Silva, L. T. Paradizzi, N. F. da Silva, M. F. A. Carvalho, S. A. Siqueira, H. Beraldo. *Chem. Biodivers* 9 (2012) 1955 – 1966.

¹⁸⁸N. V. Loginova, T. V. Koval'chuk, A. T. Gres, N. P. Osipovich, G. L. Polozov, Y. S. Halauko, Y. V. Faletrov, H. I. Harbatsevich, A. V. Hlushko, I. I. Azarko, Y. V. Bokshits. *Polyhedron* 88 (2015) 125-137.

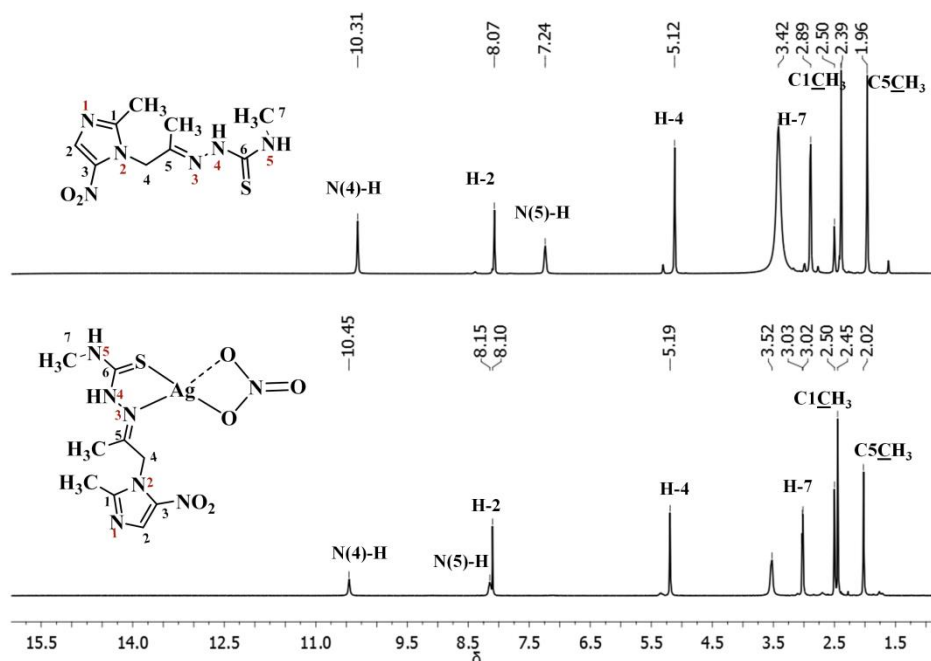


Figura 5.6 - Espectros de RMN de ^1H de HL10 e de seu complexo $[\text{Ag}(\text{HL10})\text{NO}_3]$ (14), em $\text{DMSO-}d_6$.

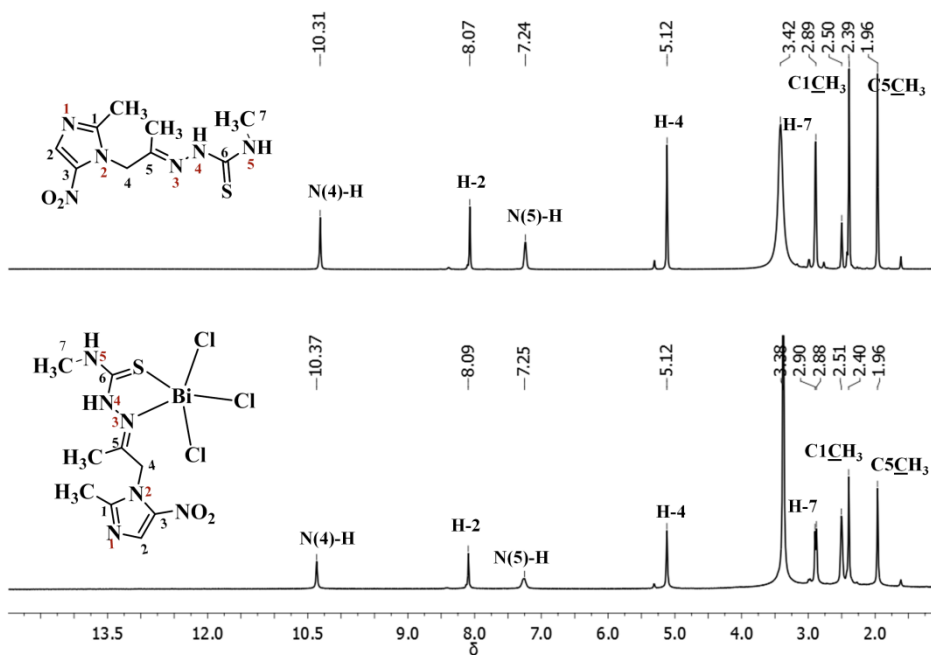
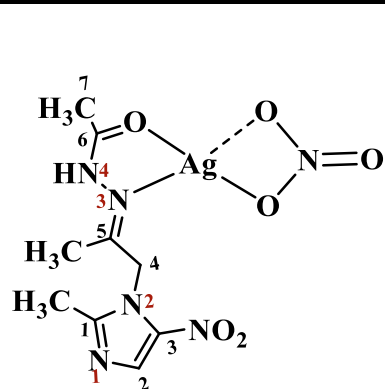


Figura 5.7 - Espectros de RMN de ^1H de HL10 e de seu complexo $[\text{Bi}(\text{HL10})\text{Cl}_3]$ (16), em $\text{DMSO-}d_6$.

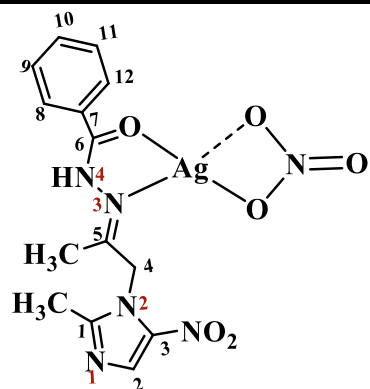
Os principais sinais atribuídos nos espectros de RMN de ^{13}C dos complexos de prata(I) e bismuto(III) e das hidrazonas e tiossemicarbazonas livres encontram-se listados nas Tabela 5.7 e 5.8.

Tabela 5.7 - Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C das tiossemicarbazonas e hidrazonas derivadas de 5-nitroimidazol e seus complexos de prata(I) em $\text{DMSO-}d_6$.

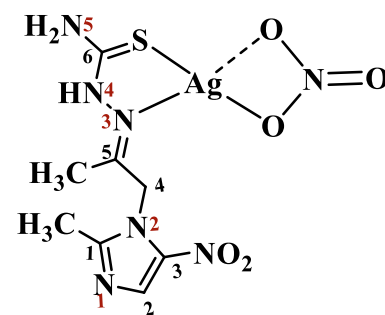
Atribuição	HL7	(11)	$\Delta\delta$ (ppm)	HL8	(12)	$\Delta\delta$ (ppm)	HL9	(13)	$\Delta\delta$ (ppm)	HL10	(14)	$\Delta\delta$ (ppm)
C1	151,5	151,9	0,4	157,0	156,4	0,6	151,8	152,0	2,0	151,9	153,3	1,4
C1 $\underline{\text{C}}\text{H}_3$	13,5	13,9	0,4	13,7	14,0	0,3	13,6	13,9	0,3	13,8	14,0	0,2
C2	132,4	132,0	0,4	132,7	132,1	0,6	132,5	132,7	0,2	132,7	132,7	0
C3	138,6	138,6	0	138,5	138,4	0,1	138,5	138,4	0,1	138,6	138,4	0,2
C4	49,9	50,2	0,3	50,1	50,4	0,3	50,1	50,2	0,1	50,3	50,4	0,1
C5	144,9	144,8	0,1	151,7	152,1	0,4	147,4	153,4	4,5	147,0	152,0	5,0
C5 $\underline{\text{C}}\text{H}_3$	14,4	14,4	0	15,8	15,7	0,1	15,1	15,6	0,5	14,8	15,4	0,6
C6	172,2	172,2	0	163,1	163,1	0	178,9	174,4	4,5	178,9	174,3	4,6
C7	19,9	20,0	0,1	133,7	133,6	0,1	--	--	--	30,7	31,7	1,0
C8, 12	--	--	--	127,7	127,7	0	--	--	--	--	--	--
C9, 11	--	--	--	128,3	128,2	0,1	--	--	--	--	--	--
C10	--	--	--	131,5	131,4	0,1	--	--	--	--	--	--



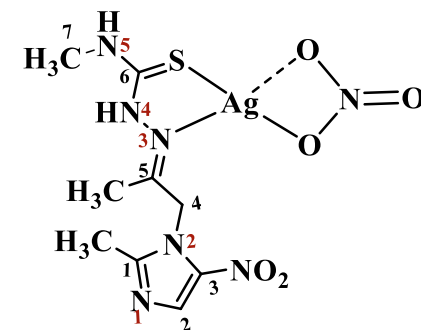
[Ag(HL7)NO₃] (11)



[Ag(HL8)NO₃] (12)



[Ag(HL9)NO₃] (13)

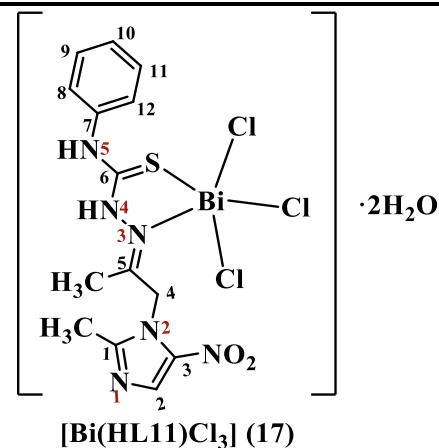
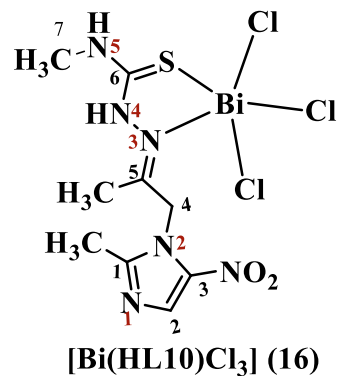
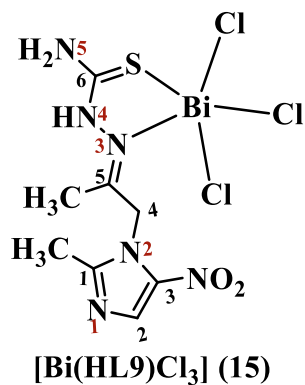


[Ag(HL10)NO₃] (14)

-- Ausência de sinal

Tabela 5.8 - Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C das tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol e seus complexos de bismuto(III) em $\text{DMSO-}d_6$.

Atribuição	HL9	(15)	$\Delta\delta$ (ppm)	HL10	(16)	$\Delta\delta$ (ppm)	HL11	(17)	$\Delta\delta$ (ppm)
C1	151,8	151,8	0	151,9	151,8	0,1	152,1	152,0	0,1
C1CH ₃	13,6	13,6	0	13,8	13,8	0	13,7	13,6	0,1
C2	132,5	132,5	0	132,7	132,7	0	132,6	132,6	0
C3	138,5	138,5	0	138,6	138,5	0,1	138,7	138,6	0,1
C4	50,1	50,0	0,1	50,3	50,2	0,1	50,2	50,0	0,2
C5	147,4	147,4	0	147,0	147,0	0	148,1	148,0	0,1
C5CH ₃	15,1	15,1	0	14,8	14,8	0	15,3	15,2	0,1
C6	178,9	178,8	0,1	178,9	178,8	0,1	175,8	175,7	0,1
C7	--	--	0	30,7	30,6	0,1	138,2	138,1	0,1
C8, 12	--	--	--	--	--	--	122,7	122,6	0,1
C9, 11	--	--	--	--	--	--	128,5	128,4	0,1
C10	--	--	--	--	--	--	125,0	124,9	0,1



-- Ausência de sinal

Nos espectros de RMN de ^{13}C dos complexos de prata(I) (**11**), (**12**) e complexos de bismuto(III) (**15**) - (**17**) em $\text{DMSO-}d_6$, também não foi observada uma variação significativa dos sinais de C(5) e C(6) das hidrazonas e tiossemicarbazonas com a complexação.

No espectro de RMN de ^{13}C para os complexos de prata(I) com as tiossemicarbazonas (**13**) e (**14**), os sinais correspondentes do C6 (C=S) em δ 178,9 ppm para as tiossemicarbazonas livres, sofrem deslocamentos para δ 174,3 ppm nos complexos. Os sinais de (C=N) C5 entre δ 147,0-147,4 ppm, sofrem deslocamentos para δ 151,9-152,0 ppm, sugerindo assim a coordenação das tiossemicarbazonas ao íon metálico, através do sistema quelante $\text{N}_{\text{imina}}\text{-S}$.¹⁸⁸

As Figuras 5.8 e 5.9 apresentam os espectros de RMN de ^{13}C da tiossemicarbazona HL10 e de seus complexos $[\text{Ag}(\text{HL10})\text{NO}_3]$ (**14**) e $[\text{Bi}(\text{HL10})\text{Cl}_3]$ (**16**).

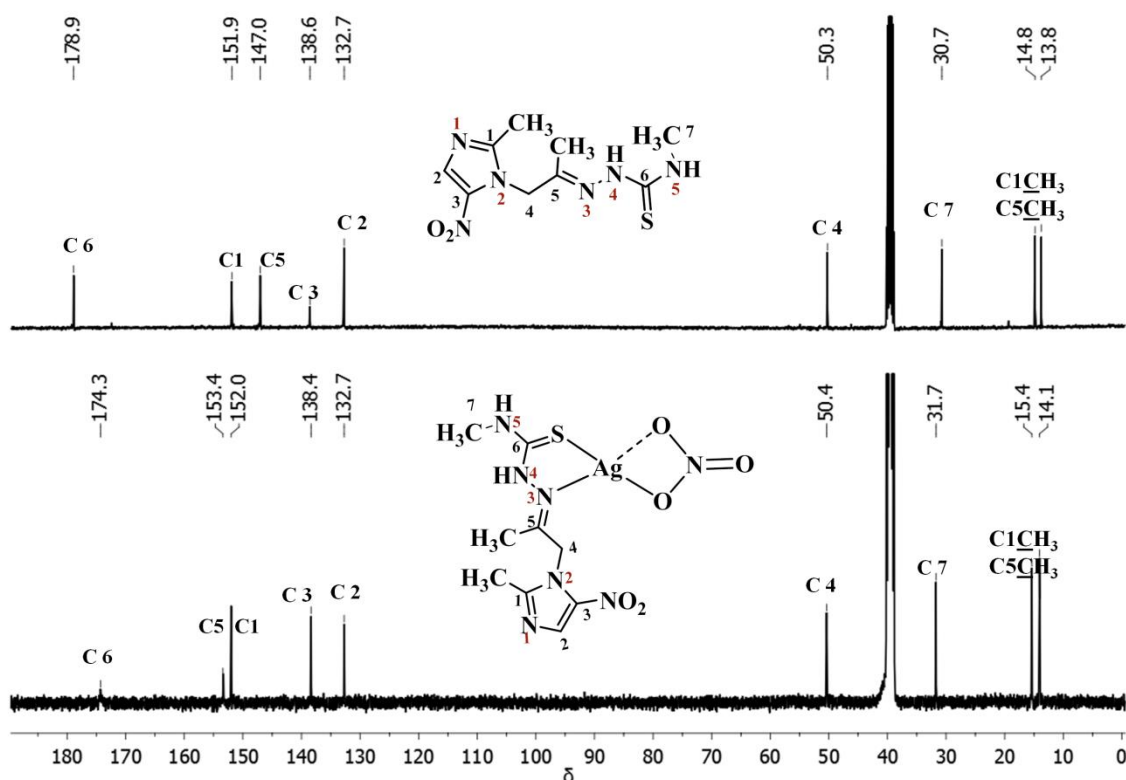


Figura 5.8 - Espectros de RMN de ^{13}C de HL10 e de seu complexo $[\text{Ag}(\text{HL10})\text{NO}_3]$ (**14**), em $\text{DMSO-}d_6$.

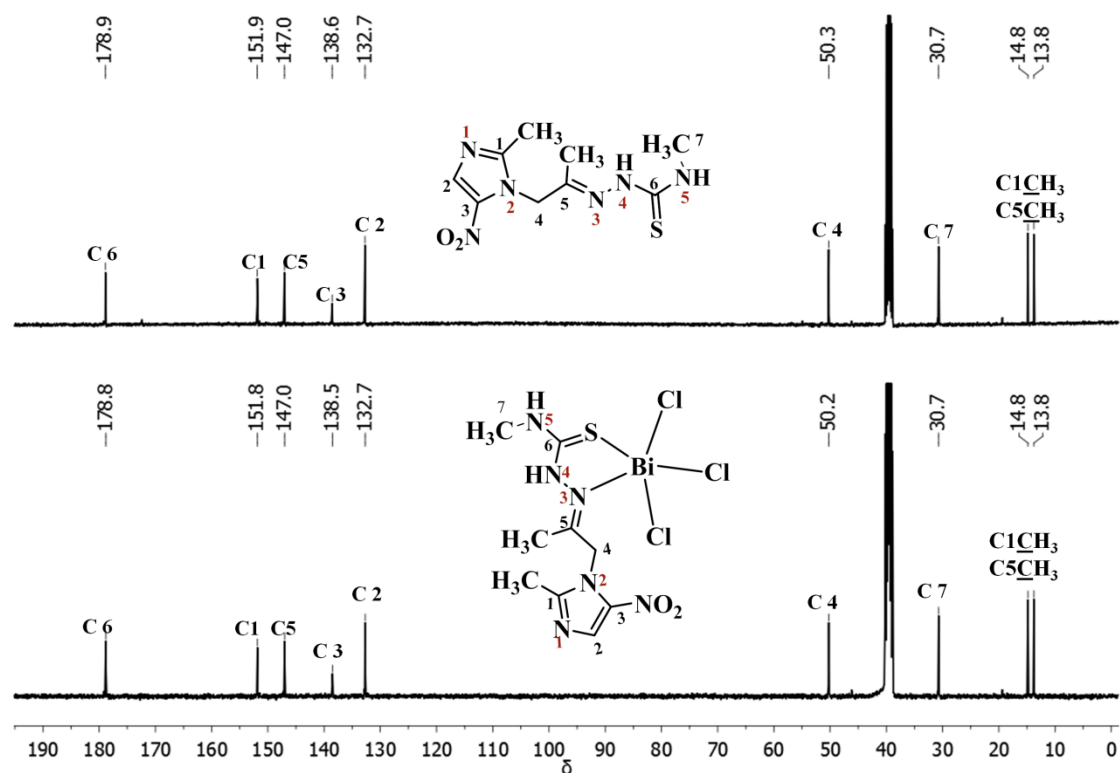


Figura 5.9 - Espectros de RMN de ^{13}C de HL10 e de seu complexo $[\text{Bi}(\text{HL10})\text{Cl}_3]$ (**16**), em $\text{DMSO-}d_6$.

5.1.5 – Estudo preliminar de estabilidade dos complexos por meio de espectros eletrônicos de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

Os estudos de estabilidade realizados no UV-vis para os complexos de cobre(II), prata(I) e bismuto(III) demonstraram que os complexos são estáveis em solução 100% DMSO e em solução 5% DMSO/Tris-HCl em pH 7,2.

A Figura 5.10 mostra os espectros eletrônicos do complexo $[\text{Cu}(\text{HL11})\text{Cl}_2] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (**10**) ao longo do tempo em DMSO e a Figura 5.11 os espectros eletrônicos do complexo (**10**) em solução de 5% DMSO/Tris-HCl em pH 7,2.

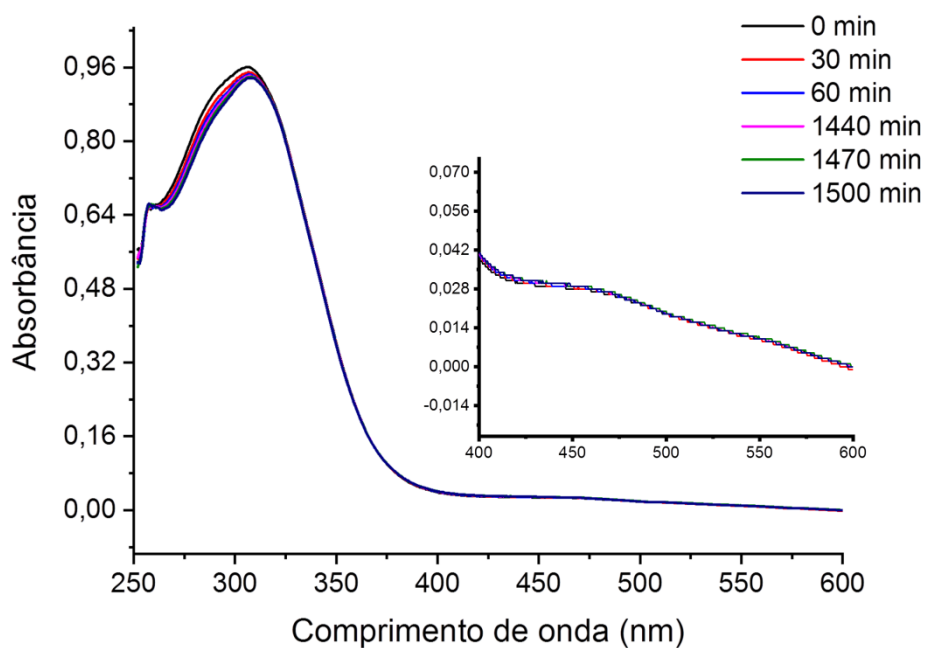


Figura 5.10 – Espectros eletrônicos ao longo do tempo do $[\text{Cu}(\text{HL11})\text{Cl}_2] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (10) em DMSO.

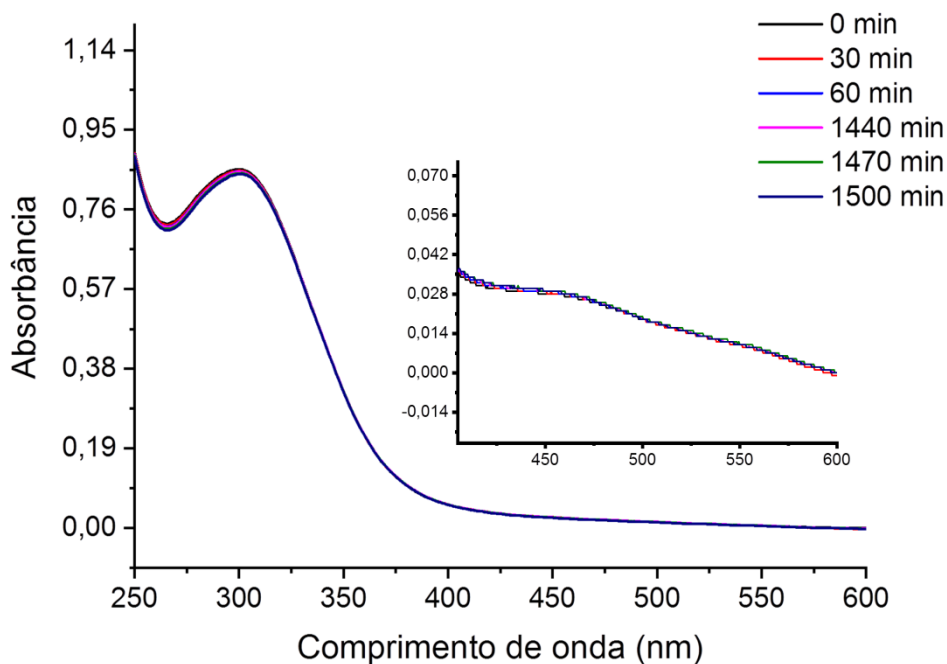


Figura 5.11 - Espectros eletrônicos ao longo do tempo do complexo $[\text{Cu}(\text{HL11})\text{Cl}_2] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (10) em solução 5% DMSO/Tris-HCl.

5.1.6 - Estudos eletroquímicos

Estudos de voltametria cíclica foram realizados com os complexos de cobre(II), prata(I) e bismuto(III) em disco de eletrodo de platina. As medidas foram realizadas usando $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de perclorato de tetrabutilamônio $[\text{Bu}_4\text{N}]^+[\text{ClO}_4]^-$ como eletrólito de suporte, em soluções de DMF ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

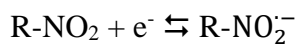
Como os voltamogramas de todos os complexos são parecidos, serão apresentados apenas os voltamogramas cíclicos dos complexos $[\text{Cu}(\text{HL}10)\text{Cl}_2]$ (**9**), $[\text{Ag}(\text{HL}7)\text{NO}_3]$ (**11**) e $[\text{Bi}(\text{HL}9)\text{Cl}_3]$ (**15**) a 250 mV s^{-1} , de -1500 a 1500 mV , e região expandida de -1800 a -200 mV (Figura 5.12), para mostrar o comportamento eletroquímico para essas famílias de complexos. Os voltamogramas cíclicos dos complexos apresentam pares de picos anódicos e catódicos bem definidos.

O principal intuito deste estudo foi verificar a formação e a estabilidade do ânion nitro-radical, já que trabalhos mostraram as relações entre ação biológica de compostos biorredutíveis e a viabilidade de redução, representada por Epc (potencial de pico catódico). Daí a relevância dos estudos eletroquímicos dos derivados de 5-nitroimidazóis em meio aprótico.¹⁸⁹

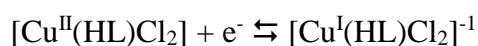
De modo geral, os complexos apresentaram um processo *quasi-reversível*, atribuído ao par redox $\text{RNO}_2/\text{R-NO}_2^-$ (picos Ic e Ia). Os complexos de cobre(II) exibiram um outro processo *quasi-reversível*, $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$ (picos IIc e IIa). Para os complexos de prata(I) ainda é observado um processo de oxidação irreversível (IIIa) entre $770 - 860 \text{ mV}$, atribuído ao processo $\text{Ag}^{\text{I}}/\text{Ag}^{\text{II}}$, e um processo de redução irreversível (IIIc) entre $375 - 430 \text{ mV}$ atribuído ao par $\text{Ag}^{\text{I}}/\text{Ag}^0$. Já os complexos de bismuto(III), apresentaram também um processo de oxidação irreversível (IVa) entre $133 - 206 \text{ mV}$ atribuído ao $\text{Bi}^{\text{III}}/\text{Bi}^{\text{IV}}$.

Com isso, os pares de picos Ic/Ia e IIc/IIa e os picos IIIa, IIIc e IVa são representados pelas Equações (1), (2), (3), (4) e (5), respectivamente, onde (HL) representa os ligantes hidrazonas ou tiossemicarbazonas.

¹⁸⁹ F. C. de Abreu, F. S. de Paula, A. F. dos Santos, A. E. G. Sant'Ana, M. V. de Almeida, E. t. César, M. N. Trindade, M. O. F. Goulart. Bioorg. Med. Chem. 9 (2001) 659-664.



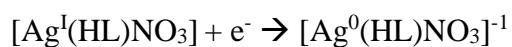
Equação (1)



Equação (2)



Equação (3)



Equação (4)



Equação (5)

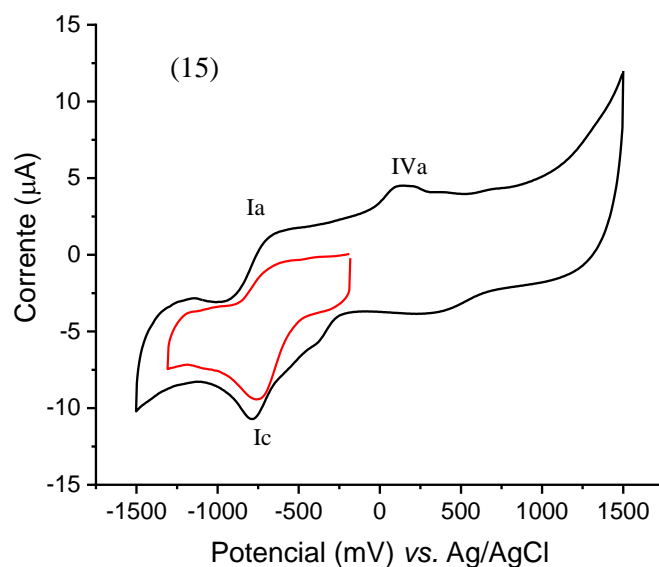
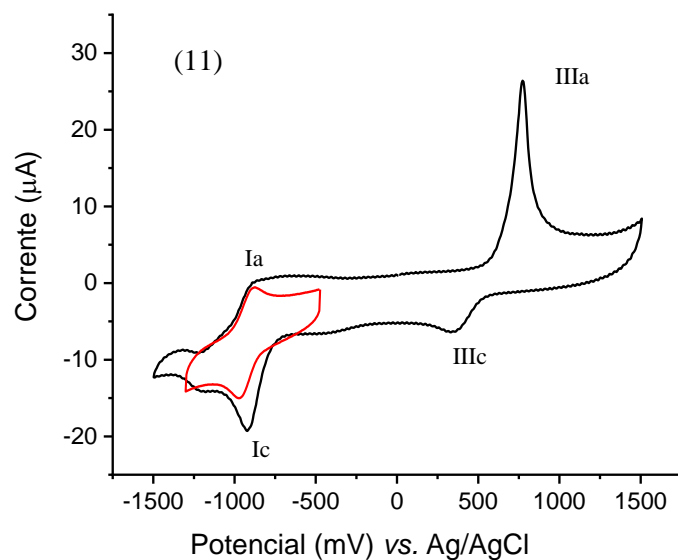
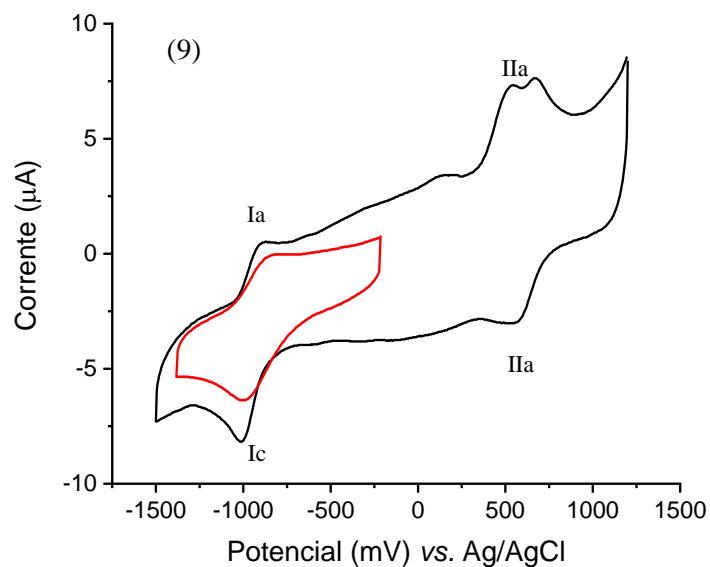


Figura 5.12 - Voltamogramas dos complexos $[\text{Cu}(\text{HL}_{10})\text{Cl}_2]$ (9), $[\text{Ag}(\text{HL}_7)\text{NO}_3]$ (11) e $[\text{Bi}(\text{HL}_9)\text{Cl}_3]$ (15) em meio aprótico (TBAP 0,1 M em DMF) vs. Ag/AgCl, Cl^- (3,0 M); taxa de varredura de 250 mV s^{-1} . E região expandida em vermelho mostra uma varredura curta com o par $\text{RNO}_2/\text{R-NO}_2^-$ isolado.

A Tabela 5.9 mostra os valores de potenciais de pico catódico e anódico (E_{pIa} e E_{pIc}), variações de potenciais entre picos catódicos e anódicos [$\Delta E_p = (E_{pIa} - E_{pIc})$] e a corrente de pico I_{pa}/I_{pc} . Nos voltamogramas, observa-se que os potenciais dos picos catódicos e anódicos variaram ligeiramente com a varredura para os processos $RNO_2/R-NO_2^-$, de modo que o parâmetro ΔE para a primeira onda diminui com o decréscimo da taxa de varredura, atingindo valores entre 34 - 98 mV a 250 mV s⁻¹. Nos experimentos, pôde-se observar que os valores de I_{pa}/I_{pc} eram 0,37- 0,95 A, os quais aumentam ligeiramente à medida que a taxa de varredura aumenta. Esses comportamentos são típicos de sistemas *quasi-reversíveis*.

Os valores de potenciais de redução (E_{pIc}) dos complexos de cobre(II), prata(I) e bismuto(III) com ligantes derivados de 5-nitroimidazol encontram-se na faixa de - (742 - 1033) mV. Já os ligantes livres também exibiram processos *quasi-reversíveis* estáveis bem definidos, condizentes com processos de transferência monoelétrica (sistema I_c/I_a) com E_{pIc} próximo de -1100 mV, correspondente ao ânion nitro-radical estável ($R-NO_2^-$). Assim, os complexos apresentaram potenciais de redução mais favoráveis que os dos ligantes. Com isso, os estudos eletroquímicos sugerem que os complexos poderiam ser reduzidos mais facilmente do que os ligantes no ambiente intracelular.

Tabela 5.9 - Parâmetros da voltametria cíclica correspondentes aos processos $R\text{-NO}_2/R\text{-NO}_2^-$, $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$, $\text{Ag}^{\text{I}}/\text{Ag}^{\text{II}}$, $\text{Ag}^{\text{I}}/\text{Ag}^0$ e $\text{Bi}^{\text{III}}/\text{Bi}^{\text{IV}}$ vs. Ag/AgCl , Cl^- (3.0 M) eletrodo de referência, a 250 mV s^{-1} .

Composto	$R\text{NO}_2/R\text{-NO}_2^-$				$\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$				$\text{Ag}^{\text{I}}/\text{Ag}^{\text{II}}$	$\text{Ag}^{\text{I}}/\text{Ag}^0$	$\text{Bi}^{\text{III}}/\text{Bi}^{\text{IV}}$
	EpIc	EpIIa	ΔE_p	IpIa/IpIc	EpIIc	EpIIa	ΔE_p	IpIa/IpIc	EpIIIa	EpIIIc	EpIVa
HL6*	-1135	-954	181	0,87	--	--	--	--	--	--	--
[Cu(HL6) ₂ Cl ₂] (5)	-1033	-959	74	0,89	515	667	152	1,35	--	--	--
HL7	-1101	-979	122	0,87	--	--	--	--	--	--	--
[Cu(HL7)Cl ₂] $\cdot\frac{1}{2}\text{CH}_3\text{OH}$ (6)	-985	-907	78	0,95	478	663	185	1,36	--	--	--
[Ag(HL7)NO ₃] (11)	-928	-870	58	0,80	--	--	--	--	770	375	--
HL8	-1115	-1037	78	0,82	--	--	--	--	--	--	--
[Cu(HL8)Cl ₂] $\cdot\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (7)	-880	-791	89	0,75	622	774	152	1,32	--	--	--
[Ag(HL8)NO ₃] (12)	-873	-839	34	0,54	--	--	--	--	860	430	--
HL9	-1120	-1037	83	0,83	--	--	--	--	--	--	--
[Cu(HL9)Cl ₂] $\cdot\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (8)	-1025	-927	98	0,75	435	660	225	0,94	--	--	--
[Ag(HL9)NO ₃] (13)	-831	-787	44	0,45	--	--	--	--	849	401	--
[Bi(HL9)Cl ₃] (15)	-843	-775	68	0,37	--	--	--	--	--	--	206
HL10	-1125	-984	141	0,92	--	--	--	--	--	--	--
[Cu(HL10)Cl ₂] (9)	-1000	-903	97	0,76	560	689	129	1,31	--	--	--
[Ag(HL10)NO ₃] (14)	-826	-768	58	0,62	--	--	--	--	785	390	--
[Bi(HL10)Cl ₃] (16)	-742	-654	88	0,37	--	--	--	--	--	--	133
HL11	-1130	-1032	98	0,85	--	--	--	--	--	--	--
[Cu(HL11)Cl ₂] (10)	-994	-911	83	0,58	466	656	190	0,90	--	--	--
[Bi(HL11)Cl ₃] $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (17)	-820	-772	68	0,37	--	--	--	--	--	--	143

* Os valores dos ligantes foram determinados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa. -- Ausência de processos

5.2 - Avaliação da atividade antimicrobiana frente a bactérias aeróbicas e fungos leveduriformes

Foi realizada a triagem para as tiossemicarbazonas, hidrazonas e seus complexos de cobre(II), prata(I) e bismuto(III). A triagem foi utilizada como um teste preliminar para avaliar o potencial inibitório dos complexos [Cu(HL6)₂Cl₂] (**5**), [Cu(HL7)Cl₂] $\cdot\frac{1}{2}$ CH₃OH (**6**), [Cu(HL8)Cl₂] (**7**), [Cu(HL9)Cl₂] $\cdot\frac{1}{2}$ H₂O (**8**), [Cu(HL10)Cl₂] (**9**), [Cu(HL11)Cl₂] $\cdot\frac{1}{2}$ H₂O (**10**), [Ag(HL7)NO₃] (**11**), [Ag(HL8)NO₃] (**12**), [Ag(HL9)NO₃] (**13**), [Ag(HL10)NO₃] (**14**), [Bi(HL9)Cl₃] (**15**), [Bi(HL10)Cl₃] (**16**) e [Bi(HL11)Cl₃] $\cdot 2$ H₂O (**17**), frente às bactérias *Gram*-positivas: *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus sanguinis*, bactérias *Gram*-negativas: *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e frente aos fungos leveduriformes: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida lusitanae*. Para fins de comparação, também foram testadas as atividades do sal de cobre(II) (CuCl₂ $\cdot 2$ H₂O), do sal de prata(I) (AgNO₃) e dos fármacos nitrato de miconazol e nistatina, empregados como controle positivo. Não foi testada a sua atividade do sal de bismuto(III) (BiCl₃) por não ser solúvel no meio.

Os resultados da triagem mostraram que todos os complexos não apresentaram atividades frente às bactérias *Gram*-negativas e *Gram*-positivas, pois apresentaram uma porcentagem inibitória do crescimento desses micro-organismos muito baixa na concentração de 250 $\mu\text{g L}^{-1}$. Portanto, esses compostos não foram submetidos ao ensaio da Concentração Inibitória Mínima - CIM, pelo método da microdiluição.

Os complexos de prata(I) foram ativos somente frente aos fungos leveduriformes. O ensaio de CIM para os complexos de prata(I) forneceu valores da concentração inibitória mínima de 50% do crescimento do micro-organismo, CI₅₀ em μM , apresentados na Tabela 5.10.

Enquanto os ligantes foram inativos, os complexos de prata(I) mostraram atividade antifúngica, com valores de CI₅₀ de 28,49 - 5,29 μM . Foi possível observar que todos os complexos foram mais ativos contra *C. dubliniensis* (CI₅₀ = 8,00 - 5,29 μM), atividade muito próxima ao fármaco de referência, nistatina (CI₅₀ = 4,44 μM). O complexo [Ag(HL10)NO₃] (**14**) também apresentou atividade significativa contra *C. glabrata*, com atividade semelhante ao fármaco de referência, nitrato de miconazol (CI₅₀ = 19,50 μM).

Embora os ligantes livres tenham se mostrado inativos, os complexos de prata(I) mostraram efeitos antimicrobianos contra leveduras de *Candida*, sendo mais ativos do que nitrato de prata. Alguns complexos foram tão ativos quanto a nistatina contra *C. dubliniensis*. Como o nitrato de prata mostrou atividade antifúngica, os efeitos observados para os complexos (**11** - **14**) possivelmente não ocorrem em razão da presença do grupo farmacofórico nitro, mas provavelmente estão relacionados à presença de prata(I), sendo o papel da coordenação possivelmente aumentar a lipofilicidade, permitindo ao metal atravessar a membrana celular fúngica.

Tabela 5.10 – Atividade antifúngica (valores de CI_{50} em μM) dos complexos de prata(I) com tiossemicarbazonas e hidrazonas derivadas de 5-nitroimidazol, com seus respectivos desvios padrão.

Compostos	CI_{50} (μM)			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. lusitaniae</i>
HL7	--	--	--	--
[Ag(HL7)NO ₃] (11)	16,43 ± 1,96	5,29 ± 0,33	27,20 ± 2,79	9,57 ± 0,22
HL8	--	--	--	--
[Ag(HL8)NO ₃] (12)	> 8	8,00 ± 0,20	28,49 ± 1,17	8,59 ± 0,13
HL9	--	--	--	--
[Ag(HL9)NO ₃] (13)	10,55 ± 0,42	5,63 ± 0,23	24,35 ± 5,18	10,31 ± 0,21
HL10	--	--	--	--
[Ag(HL10)NO ₃] (14)	11,50 ± 0,39	7,88 ± 0,17	19,39 ± 0,05	8,59 ± 0,15
AgNO ₃	40,33 ± 1,46	> 11	64,24 ± 2,21	20,79 ± 1,76
Nitrato de Miconazol	5,84 ± 2,27	1,58 ± 0,51	19,50 ± 4,53	< 0,062 x10 ⁻³
Nistatina	4,75 ± 1,24	4,44 ± 0,76	1,92 ± 0,22	5,31 ± 0,84

CI_{50} = Concentração Inibitória mínima de 50% do micro-organismo -- Inativo

5.3 - Avaliação da atividade antimicrobiana frente a espécies de bactérias anaeróbicas

A atividade antimicrobiana dos complexos de cobre(II), prata(I) e bismuto(III) foi avaliada frente às espécies de bactérias anaeróbicas Gram-negativas: *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides ovatus*,

Parabacteroides distasonis e *Fusubacterium nucleatum*. Para fins de comparação, também foram testadas as atividades do sal de cobre ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), do sal de prata(I) (AgNO_3) e do fármaco metronidazol empregado como controle positivo.

Os compostos foram submetidos ao ensaio da Concentração Inibitória Mínima – CIM em μM , com intuito de avaliar a sua capacidade de inibição *in vitro* do crescimento dos micro-organismos, e comparar a atividade após a complexação dos ligantes aos metais. Os resultados da avaliação são apresentados na Tabela 5.11.

Os ligantes livres e complexos de cobre(II) e prata(I) apresentaram atividade antimicrobiana significativa frente as cepas bactérias anaeróbicas. Exceto para HL10, mediante coordenação com cobre(II), prata(I) e bismuto (III) a atividade antibacteriana aumentou em vários casos. Embora cloreto de cobre e nitrato de prata tenham se mostrado inativos, a maioria dos complexos foram igualmente ou mais ativos do que ligantes originais e foram tão ativos quanto o metronidazol (CIM de 1,46 - 6,34 μM).

As atividades mais significativas contra as bactérias foram observadas para os complexos $[\text{Cu}(\text{HL}6)_2\text{Cl}_2]$ (**5**) e $[\text{Cu}(\text{HL}8)\text{Cl}_2]$ (**7**) com valores de CIM de 6,64 - \leq 3,32 μM e 4,18 - \leq 2,08 μM , respectivamente, menores que os ligantes HL6 (CIM 14,18 - 4,16 μM) e o HL8 (CIM 13,28 - 6,64 μM).

Os efeitos antimicrobianos provavelmente são devidos à presença do grupo nitro nos ligantes. Conforme demonstrado nos estudos de eletroquímica, após a complexação com cobre(II), prata(I) e bismuto(III) a redução do grupo nitro foi favorecida o que pode, em parte, ter contribuído para aumentar os efeitos antibacterianos.

Tabela 5.11 – Atividade antibacteriana (valores de CIM* em μM) para os complexos de cobre(II) prata(I) e bismuto(III) e seus ligantes derivados de 5-nitroimidazol frente a bactérias anaeróbicas e o potencial de redução do R-NO_2^- (EpIc).

Compostos	CIM (μM)						EpIc
	<i>B. fragilis</i>	<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. ovatus</i>	<i>P. distasonis</i>	<i>F. nucleatum</i>	
HL6	14,18	14,18	7,09	7,09	14,18	4,16	-1135
[Cu(HL6) ₂ Cl ₂] (5)	3,32	6,64	3,32	3,32	$\geq 13,26$	3,32	-1033
HL7	29,78	7,45	3,72	3,72	7,45	8,36	-1101
[Cu(HL7)Cl ₂] (6)	3,32	6,64	3,32	3,32	$\geq 13,27$	3,32	-985
[Ag(HL7)NO ₃] (11)	4,18	4,18	4,18	$\leq 2,09$	16,72	4,18	-928
HL8	13,28	13,28	13,28	6,64	13,28	6,64	-1115
[Cu(HL8)Cl ₂] (7)	4,18	4,18	$\leq 2,08$	4,18	$\geq 33,43$	$\leq 2,08$	-880
[Ag(HL8)NO ₃] (12)	3,32	3,32	3,32	1,66	6,64	3,32	-873
HL9	25,36	25,36	12,68	3,17	6,34	3,90	-1120
[Cu(HL9)Cl ₂] (8)	7,80	7,80	3,90	3,90	$\geq 31,22$	1,95	-1025
[Ag(HL9)NO ₃] (13)	3,90	7,80	3,90	3,90	15,60	3,90	-831
[Bi(HL9)Cl ₃] (15)	7,80	15,61	7,80	7,80	1,95	7,80	-843
HL10	3,24	6,47	3,24	3,24	6,47	3,24	-1125
[Cu(HL10)Cl ₂] (9)	3,70	3,70	3,70	1,85	7,40	3,70	-1000
[Ag(HL10)NO ₃] (14)	3,70	3,70	3,70	3,70	$\geq 7,38$	3,70	-826
[Bi(HL10)Cl ₃] (16)	3,70	7,40	3,70	3,70	$\geq 7,40$	3,70	-742
HL11	4,84	4,84	4,84	4,84	2,42	12,03	-1130
[Cu(HL11)Cl ₂] (10)	$\geq 6,02$	$\geq 6,02$	6,02	3,01	$\geq 6,02$	6,02	-994
[Bi(HL11)Cl ₃] (17)	$\geq 6,02$	$\geq 6,02$	6,02	6,02	6,02	6,02	-820
CuCl ₂ ·2H ₂ O	$\geq 187,77$	$\geq 187,77$	$\geq 187,77$	$\geq 187,77$	187,77	187,77	--
AgNO ₃	$\geq 187,77$	$\geq 187,77$	$\geq 187,77$	187,77	94,19	187,77	--
BiCl ₃	NT	NT	NT	NT	NT	NT	--
Metronidazol	3,17	3,17	3,17	3,17	6,34	1,46	-1160

*CIM = concentração inibitória mínima NT = não testado

Os compostos derivados de 5-nitroimidazóis não apresentaram atividade frente às bactérias aeróbicas, porém apresentaram atividades bastante significativas frente às bactérias anaeróbicas. Isto pode ocorrer, pois estudos já demonstraram que os nitroimidazóis são bioativos clássicos em condições de anaerobiose, que podem atuar

como pró-fármacos, como já foi comentado no Capítulo 1, e podem ser ativados no ambiente intracelular por flavoproteínas, ferredoxinas e algumas enzimas, como NADPH-citocromo P450 redutase, tioredoxina redutase e superóxido dismutase.^{190,191}

Essa ativação ocorre com a adição de um primeiro elétron para formar um ânion nitro-radical ($R\text{-NO}_2^-$), que é a etapa crucial na ativação desses nitroimidazóis. Já em condições aeróbicas o ânion ($R\text{-NO}_2^-$) é re-oxidado para forma percussora, resultando em um “ciclo inútil”, não apresentando atividade. Os processos redox mais favoráveis dos complexos derivados de 5-nitroimidazóis poderiam, em parte, explicar suas atividades antimicrobianas mais elevadas que as dos ligantes livres.

5.4 - Avaliação da atividade citotóxica

A atividade citotóxica das tiosemicarbazonas e hidrazonas livres e de seus complexos de prata(I) e bismuto(III), foi testada frente à linhagem de carcinoma colorretal (HCT-116), células leucêmicas (HL-60), carcinoma da próstata (PC3), glioblastoma- Sistema Nervoso Central (SNB-19) e células saudáveis de rim embrionário humano (HEK-293). Apenas o complexo $[\text{Ag}(\text{HL9})\text{NO}_3]$ (**13**) e AgNO_3 foram ativos, inibindo em mais de 50% a proliferação celular.

A Tabela 5.12 mostra os valores de CI_{50} para o complexo $[\text{Ag}(\text{HL9})\text{NO}_3]$ (**13**) e AgNO_3 . Os resultados dos testes mostraram que todos os ligantes foram inativos contra todas as células, e apenas o complexo (**13**) mostrou-se ativo para todas as linhagens ($\text{CI}_{50} = 12,08 - 22,71 \mu\text{M}$). Porém, este composto não apresentou seletividade para células tumorais quando comparadas às células saudáveis ($\text{CI}_{50} = 13,70 \mu\text{M}$). O AgNO_3 apresentou resultado próximo ao complexo (**13**), e foi menos ativo apenas para a linhagem HCT-116, com $\text{CI}_{50} = 31,10 \mu\text{M}$, enquanto o complexo (**13**) apresentou $\text{CI}_{50} = 20,91 \mu\text{M}$, mostrando assim, que a atividade ocorre pela presença do nitrato de prata.

Os resultados demonstram que os compostos foram de modo geral inativos em condições de aerobiose. Se forem ativados em meio de hipóxia, poderiam constituir interessantes candidatos a fármacos para o tratamento de tumores sólidos.

¹⁹⁰ D. Leitsch, A.G. Burgess, L.A. Dunn, K.G. Krauer, K. Tan, M. Duche, P. Uproft, L. Eckmann, J.A. Uproft. *J Antimicrob. Chemother.* 66 (2011) 1756 – 1765.

¹⁹¹ D. Leitsch, D. Kolarich, I.B.H. Wilson, F. Altmann, M. Duchene. *PLoS Biol* 5 (2007) 1820 - 1834.

Tabela 5.12 - Atividade citotóxica (IC₅₀, µM) dos compostos de prata(I) frente as linhagens de células (HCT-1116, HL-60, PC3 e SNB19) e células saudáveis (HEK-293).

Compostos	CI ₅₀ (µM)				
	HCT-1116	HL-60	PC3	SNB-19	HEK-293
HL9	--	--	--	--	--
[Ag(HL9)NO ₃] (13)	20,91 ±3,16	12,08 ±0,07	22,71 ±0,44	>23	13,70 ±0,79
AgNO ₃	31,10 ±0,86	10,01 ±0,47	17,78 ±0,47	>58	21,07 ±1,29

CI₅₀= Concentração Inibitória mínima de 50% -- Inativo

Parte dos resultados apresentados neste capítulo foram publicados nos artigos intitulados:

“Antimicrobial Effects of Silver(I) and Bismuth(III) Complexes with Secnidazole Derived Schiff Base Ligands: the Role of the Nitro Group Reduction” Ana P. A. Oliveira, João F. G. Ferreira, Luiz M. Farias, Paula P. Magalhães, Leticia R. Teixeira and Heloisa Beraldo J. Braz. Chem. Soc. 30 (2019) 2299-2307. (Anexo II)

E “5-Nitroimidazole-derived Schiff bases and their copper(II) complexes exhibit potent antimicrobial activity against pathogenic anaerobic bacteria” Alexandre A. Oliveira, Ana P. A. Oliveira, Lucas L. Franco, Micael O. Ferencs, João F. G. Ferreira, Sofia M. P. S. Bachi, Nivaldo L. Speziali, Luiz M. Farias, Paula P. Magalhães, Heloisa Beraldo. Biometals. 31 (2018) 571-584. (Anexo II)

Capítulo 6

Resultados e discussão

Complexos de ouro(I) de tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol: avaliação da atividade citotóxica em condições de normóxia e de hipóxia

Complexos de ouro(I) são utilizados no tratamento de artrite reumatoide.¹⁹² Esses complexos também vêm ganhando cada vez mais atenção em função de seus efeitos citotóxicos contra células tumorais, através da inibição da enzima Tiorredoxina

¹⁹² V. Gandin, A. P. Fernandes, M. P. Rigobello, B. Dani, F. Sorrentino, F. Tisato, M. Bjornstedt, A. Bindoli, A. Sturaro, R. Rella, C. Marzano. Biochem. Pharmacol. 79 (2010) 90-101.

Redutase (TrxR), envolvida na biossíntese do DNA.¹⁹³ Nosso grupo de pesquisa já demonstrou que a complexação de tiossemicarbazonas com ouro(I) originou compostos ativos contra células de tumores sólidos e leucemias.¹⁹⁴

6.1 - Caracterização dos complexos de ouro(I) de tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol

As sínteses dos complexos de ouro(I) com as tiossemicarbazonas foram realizadas de acordo com o procedimento descrito no capítulo 2, página 40. Os compostos foram caracterizados por análise elementar, faixas de fusão, medidas de condutimetria, por seus espectros de absorção na região do infravermelho, RMN, medidas eletroquímicas e análise de difração raios-X de monocristal. Os complexos obtidos e caracterizados foram testados para determinar sua atividade citotóxica contra tumores sólidos em condições de normóxia e hipóxia e contra células saudáveis sob condições de normóxia.

6.1.1 - Análises dos complexos de ouro(I) de tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol

Foram obtidos três complexos inéditos de ouro(I): hexafluorofosfato de [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida](trietilfosfina)ouro(I) [Au(HL9)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (**18**), hexafluorofosfato de [(*N*-metil-1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida] (trietilfosfina)ouro(I), [Au(HL10)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (**19**) e hexafluorofosfato de [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)-*N*-fenil-hidrazinocarbotioamida](trietilfosfina)ouro(I), [Au(HL11)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (**20**).

Os rendimentos das sínteses dos complexos (**18** - **20**), as massas molares, resultados de microanálises e condutividades molares são apresentados na Tabela 6.1. Os resultados das análises sugerem que, nos complexos, as tiossemicarbazonas estão coordenadas em sua forma neutra (HL) ao íon metálico, juntamente com o ligante a trietilfosfina, com as fórmulas propostas do tipo [Au(HL)P(CH₂CH₃)₃]PF₆. A proposta

¹⁹³ I. Ott. Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 1670.

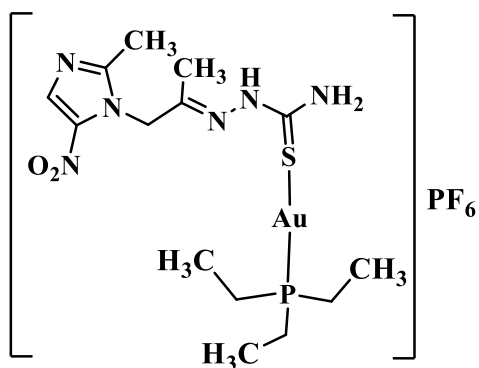
¹⁹⁴ J. A. Lessa, J. C. Guerra, L. F. de Miranda, C. F. D. Romeiro, J. G. Da Silva, I. C. Mendes, N. L. Speziali, E. M. Souza-Fagundes, H. Beraldo. J. Inorg. Biochem. 105 (2011) 1729-1739.

da presença de tiossemicarbazonas nas formas neutras nas estruturas dos complexos é amparada por dados de infravermelho e de RMN. As análises condutimétricas realizadas em DMF indicam que os complexos são eletrólitos (1:1), pois possuem uma condutividade molar entre 51,63 - 60,49 $\text{cm}^2 \Omega^{-1} \text{mol}^{-1}$.¹⁹⁵

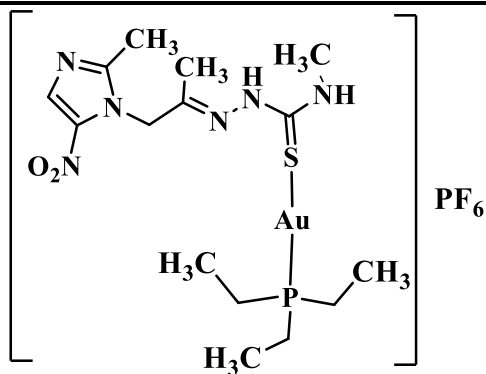
¹⁹⁵ J. W. Geary. *Coord. Chem. Rev.* 7 (1971) 81.

Tabela 6.1 - Fórmula molecular, massa molar (MM), temperatura de fusão (TF(°C)), análise elementar de C, H e N (valores teóricos em parênteses), condutividade (ΛM) e rendimento (Rend.), dos complexos de ouro(I) com tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol.

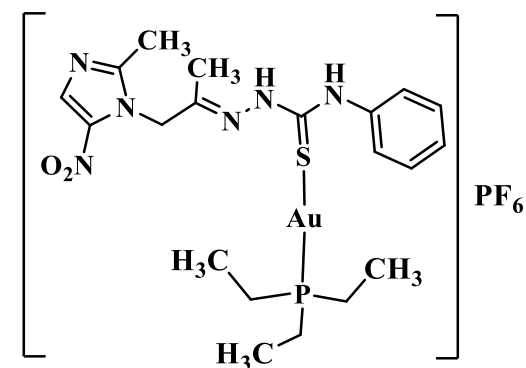
Compostos	Formula molecular	MM ($g\text{mol}^{-1}$)	T F (°C)	Análise elementar*			ΛM ($\text{cm}^2\Omega^{-1}\text{mol}^{-1}$)	Rend (%)
				%C	%H	%N		
[Au(HL9)P(CH ₂ CH ₃) ₃]PF ₆ (18)	C ₁₄ H ₂₇ AuF ₆ N ₆ O ₂ P ₂ S	716,37	Dec. 135,0	23,02(23,47)	3,65(3,80)	11,25(11,73)	64,49	40
[Au(HL10)P(CH ₂ CH ₃) ₃]PF ₆ (19)	C ₁₅ H ₂₉ AuF ₆ N ₆ O ₂ P ₂ S	730,40	105,0-106,3	25,29(24,67)	4,09(4,00)	11,21(11,51)	51,63	63
[Au(HL11)P(CH ₂ CH ₃) ₃]PF ₆ (20)	C ₂₀ H ₃₁ AuF ₆ N ₆ O ₂ P ₂ S	792,47	117,5-118,5	31,27(30,31)	3,91(3,94)	10,24(10,60)	54,30	57



[Au(HL9)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (**18**)



[Au(HL10)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (**19**)



[Au(HL11)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (**20**)

*experimental(calculado)

Dec.= decomposição

6.1.2 - Espectroscopia vibracional de absorção na região do infravermelho (IV)

A espectroscopia no infravermelho foi utilizada como ferramenta complementar para a caracterização dos complexos de ouro(I) sintetizados, e as atribuições foram baseadas em comparações com os espectros dos ligantes. As principais bandas analisadas nos espectros foram: $\nu(\text{N-H})$, $\nu(\text{C=N})$, $\nu(\text{C=S})$, $\nu(\text{P-F})$ e $\nu_{\text{as}}/\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$ e encontram-se na Tabela 6.2.

Tabela 6.2 - Valores de números de ondas das bandas, nos espectros na região do infravermelho (cm^{-1}), dos complexos de ouro(I) e de suas respectivas tiossemicarbazonas, usando como suporte KBr (4000 - 400 cm^{-1}).

Composto	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu(\text{C=S})$	$\nu(\text{P-F})$	$\nu_{\text{as}}/\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$
HL9	3170 F	1530 F	804 f	--	1463/1360 F
[Au(HL9)P(CH ₂ CH ₃) ₃]PF ₆ (18)	3138 m	1528 F	--	842 F	1464/1366 F
HL10	3183 m	1555 F	786 f	--	1471/1362 F
[Au(HL10)P(CH ₂ CH ₃) ₃]PF ₆ (19)	3344 m	1540 F	--	846 F	1470/1368 F
HL11	3296 m	1554 F	772 f	--	1471/1362 F
[Au(HL11)P(CH ₂ CH ₃) ₃]PF ₆ (20)	3298 m	1540 F	--	844 F	1472/1366 F

Intensidade das bandas: F = forte, m = média, f = fraca. -- Ausência da banda

Os espectros de absorção na região do infravermelho para as tiossemicarbazonas e seus complexos foram registrados na região de 4000 - 400 cm^{-1} . As bandas atribuídas ao estiramento $\nu(\text{C=N})$, observadas na região de 1530 - 1554 cm^{-1} nos espectros dos ligantes livres, deslocam-se para 1528 - 1540 cm^{-1} nos espectros dos complexos. Deslocamentos também podem ser observados nas bandas de vibração $\nu(\text{N-H})$, que nas tiossemicarbazonas livres encontram-se em 3170 - 3296 cm^{-1} , e nos complexos em 3138 - 3344 cm^{-1} .¹⁹⁶ Já os estiramentos $\nu(\text{C=S})$, encontrados nos espectros das tiossemicarbazonas livre na região de 772 - 804 cm^{-1} , não puderam ser observados nos espectros dos complexos de ouro(I), pois, o aparecimento de uma nova banda bem mais larga e forte é observada na mesma região. Esta nova banda intensa que surgiu nos espectros dos complexos é referente ao estiramento $\nu(\text{P-F})$, e ocorre na região de 842 -

¹⁹⁶ T. T. Tavares, G. C. Azevedo, A. Garcia, A. G. Carpanez, P. M. Lewer, D. Paschoal, B. L. Muller, H. F. Dos Santos, R. C. Matos, H. Silva, R. M. Grazul, A. P. S. Fontes. Polyhedron 132 (2017) 95-104.

846 cm^{-1} .¹⁹⁷ A Figura 6.1 mostra, como exemplo, os espectros de absorção na região do infravermelho para a tiossemicarbazona (HL10) e de seu complexo (**19**).

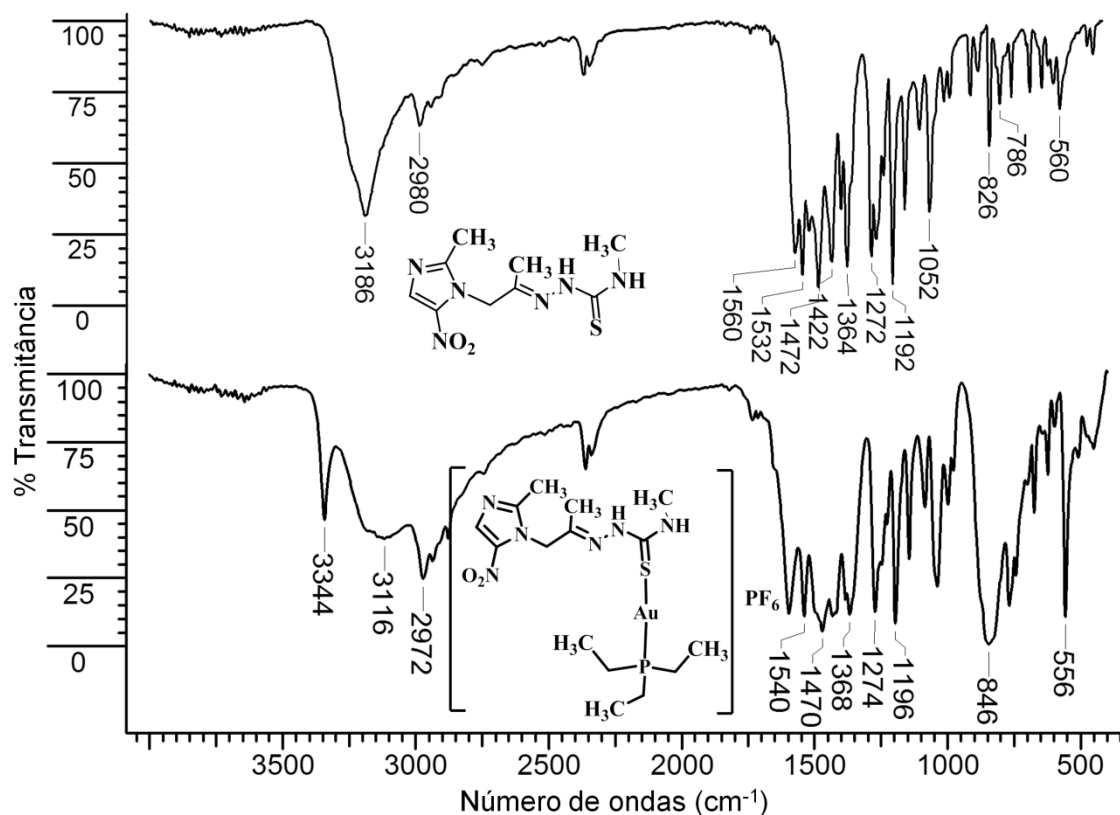


Figura 6.1 - Espectros vibracionais na região do infravermelho do ligante HL10 e do complexo [Au(HL10)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (**19**).

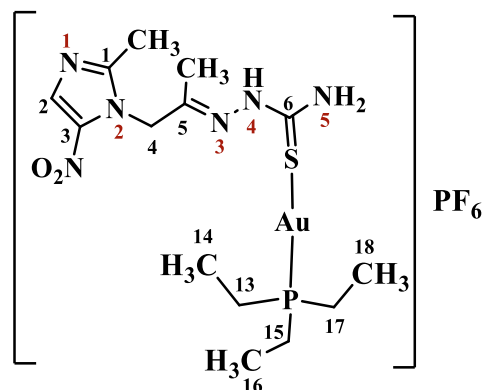
6.1.3 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os complexos de ouro(I) com as tiossemicarbazonas foram caracterizados por RMN de ¹H, ¹³C, DEPT 135, COSY, HMQC e ³¹P. Todos os espectros foram obtidos em DMSO-*d*₆. Os principais sinais atribuídos nos espectros de RMN de ¹H dos complexos e das tiossemicarbazonas livres são apresentados na Tabela 6.3.

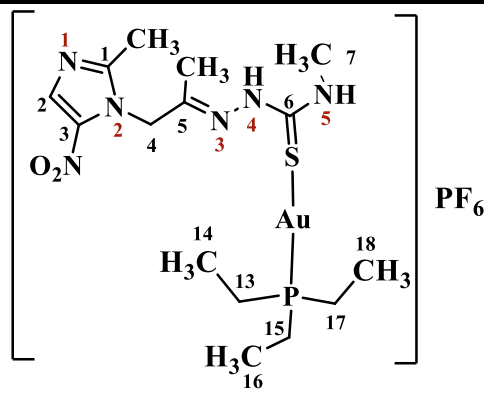
¹⁹⁷ A. Ferle, L. Pizzuti, S. D. Inglez, A. R. L. Caires, E. S. Lang, D. F. Back, A. F. C. Flores, A. M. Junior, V. M. Deflon, G. A. Casagrande. *Polyhedron* 63 (2013) 9-14.

Tabela 6.3 – Atribuição de número de hidrogênios (Nº de H), deslocamento químico δ (ppm), multiplicidade (M)* dos principais sinais de RMN de ^1H das tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol e seus complexos em $\text{DMSO-}d_6$.

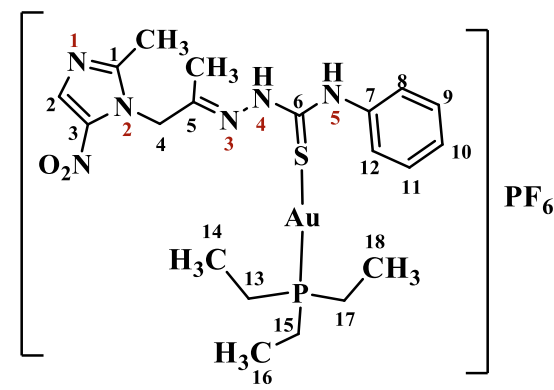
Atribuição	Nº de H	$[\text{AuP}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3\text{Cl}]$	HL9	(18)	HL10	(19)	HL11	(20)
N4-H	1	--	10,42 (s)	11,39 (s)	10,31 (s)	10,73 (s)	10,87 (s)	11,40 (s)
N5-H	1	--	8,16 e 6,41(s)	9,21 e 7,69 (s)	7,24 (s)	7,85 (s)	8,83 (s)	9,56 (s)
C1CH ₃	3	--	2,38 (s)	2,40 (s)	2,39 (s)	2,40 (s)	2,43 (s)	2,44 (s)
H2	1	--	8,07 (s)	8,06 (s)	8,07 (s)	8,09 (s)	8,15 (s)	8,12 (s)
H4	1	--	5,13 (s)	5,20 (s)	5,12 (s)	5,15 (s)	5,23 (s)	5,24 (s)
C5CH ₃	3	--	2,01 (s)	2,06 (m)	1,96 (s)	1,99 (m)	2,10 (s)	2,10 (s)
H7	3	--	--	--	2,89 (d)	2,99 (d)	--	--
H8 e 12	2	--	--	--	--	--	7,51 (d)	7,41 (s)
H9 e 11	2	--	--	--	--	--	7,35 (t)	7,41 (s)
H10	1	--	--	--	--	--	7,16 (t)	7,41 (s)
H13, 15 e 17	6	1,97-1,88 (m)	--	2,06-1,87 (m)	--	2,02-1,86 (m)	--	1,91-1,83 (m)
H14, 16 e 18	9	1,12/1,07 (m)	--	1,16/1,07 (m)	--	1,15/1,05 (m)	--	1,10/1,01 (m)



$[\text{Au}(\text{HL9})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (18)



$[\text{Au}(\text{HL10})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (19)



$[\text{Au}(\text{HL11})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (20)

M = (s) simpleto, (d) dubleto, (m) multipeto, (dt) duplo tripleto; -- Ausência de sinal

Foi observado que os principais sinais nos espectros de RMN de ^1H dos complexos apresentam deslocamentos químicos significativos ao comparar com os sinais dos ligantes livres. Nos espectros dos complexos os sinais dos hidrogênios correspondentes ao N4-H e N5-H sofrem deslocamentos significativos em relação aos das tiossemicarbazonas livres. Os sinais entre δ 10,31 - 10,87 ppm referentes ao N4-H nos ligantes, deslocam-se para δ 10,39 - 11,40 ppm, e os sinais entre δ 6,41- 8,83 ppm referentes ao N5-H nos ligantes, deslocam-se para δ 7,69 - 9,56 ppm nos espectros dos complexos, sugerindo a coordenação da tiocarbonila (C=S) ao centro metálico de Au(I).¹⁹⁸

Nos espectros dos complexos também é possível identificar os novos sinais dos hidrogênios referentes ao CH_3 da trietilfosfina entre δ 1,01 - 1,16 ppm, e os sinais de seis hidrogênios referentes ao CH_2 da trietilfosfina entre δ 1,83 - 2,06 ppm.¹⁹⁷ A Figura 6.2 apresenta os espectros de RMN de ^1H , comparando a tiossemicarbazona HL10 ao seu complexo (**19**).

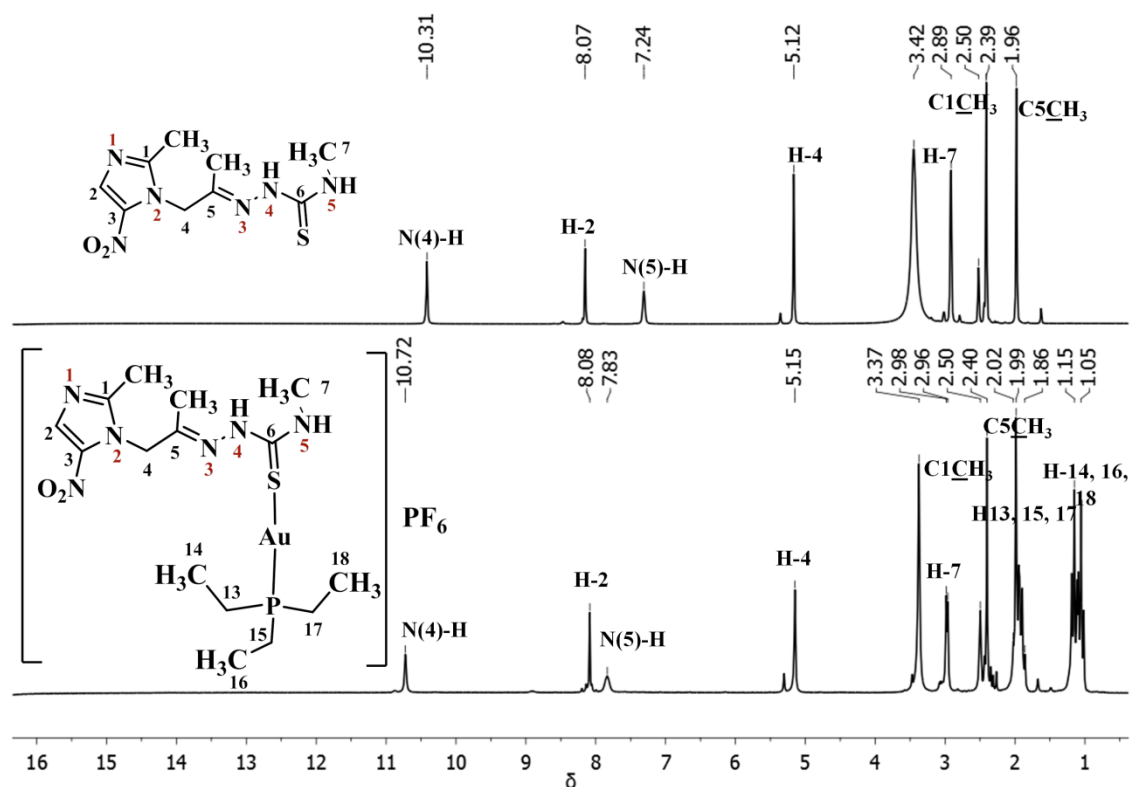


Figura 6.2 - Espectros de RMN de ^1H de HL10 e de seu complexo [Au(HL10)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (**19**), em DMSO-*d*₆.

¹⁹⁸ J. A. Lessa, K. S. O. Ferraz, J. C. Guerra, L. F. de Miranda, C. F. D. Romeiro, E. M. Souza-Fagundes, P. J. S. Barbeira, H. Beraldo. *Biometals* 25 (2012) 587-598.

A Figura 6.3 exibe os espectros de RMN de ^{13}C , comparando a tiossemicarbazona HL10 ao seu complexo (**19**). Os espectros de RMN de ^{13}C também confirmam a coordenação das tiossemicarbazonas ao centro metálico de forma monodentada, devido ao deslocamento químico significativo do carbono C6 (C=S) observado para os ligantes livres entre δ 175,8 - 178,9 ppm e entre δ 171,2 - 176,8 ppm nos complexos.¹⁹⁸ A complexação também foi confirmada com o aparecimento dos sinais referentes aos carbonos CH_3 entre δ 8,8 - 8,9 ppm e os sinais de carbonos CH_2 entre δ 16,4 - 17,0 da trietilfosfina.¹⁹⁹

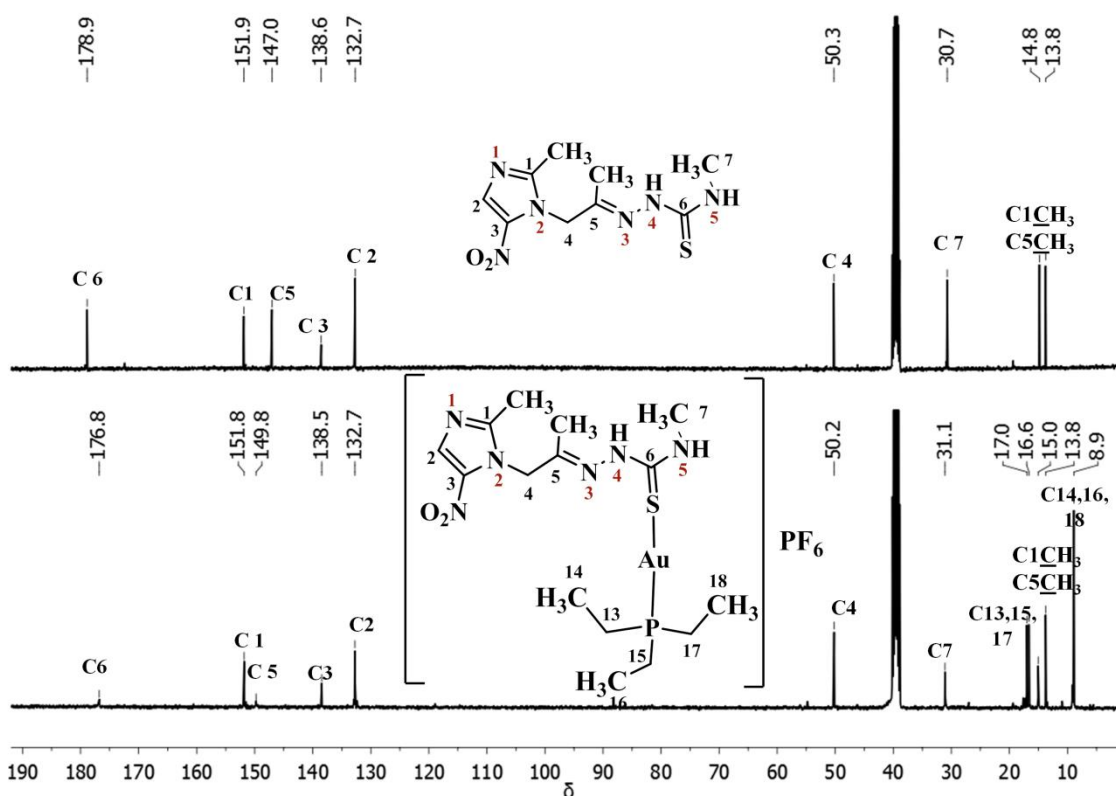
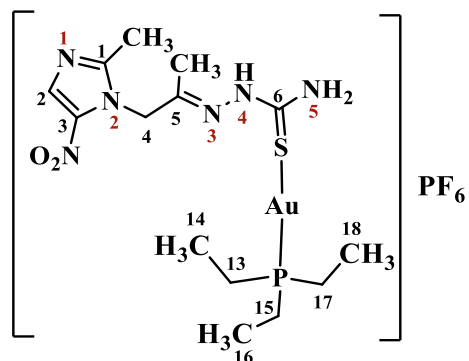


Figura 6.3 - Espectros de RMN ^{13}C de HL10 e de seu complexo $[\text{Au}(\text{HL10})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (**19**), em $\text{DMSO}-d_6$.

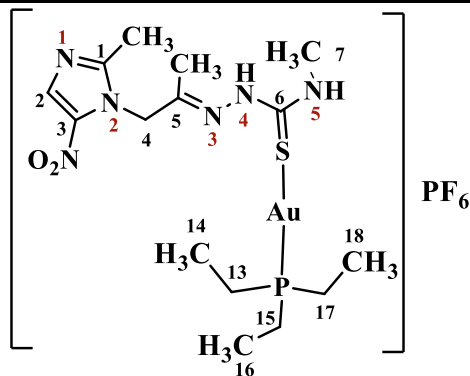
Os principais sinais atribuídos nos espectros de RMN de ^{13}C dos complexos e das tiossemicarbazonas livres são apresentados na Tabela 6.4.

Tabela 6.4 - Atribuição dos principais sinais de RMN de ^{13}C das tiossemicarbazonas derivadas de 5-nitroimidazol e seus complexos de ouro(I) em $\text{DMSO-}d_6$.

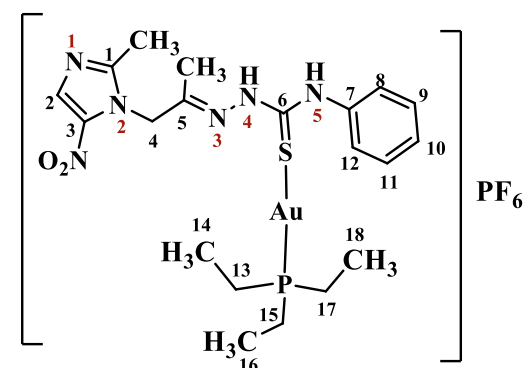
Atribuição	[AuP(CH ₂ CH ₃) ₃ Cl]	HL9	(18)	HL10	(19)	HL11	(20)
C1	--	151,8	157,0	151,9	151,8	152,1	153,4
C1CH ₃	--	13,6	13,8	13,8	13,8	13,7	13,8
C2	--	132,5	132,8	132,7	132,7	132,6	132,7
C3	--	138,5	138,4	138,6	138,5	138,7	138,5
C4	--	50,1	50,1	50,3	50,2	50,2	50,2
C5	--	147,4	151,8	147,0	149,8	148,1	152,0
C5CH ₃	--	15,1	15,9	14,8	15,0	15,3	15,7
C6	--	178,9	171,2	178,9	176,8	175,8	173,5
C7	--	--	30,71	30,7	31,1	138,2	137,7
C8, 12	--	--	--	--	--	122,7	124,8
C9, 11	--	--	--	--	--	128,5	128,8
C10	--	--	--	--	--	125,0	126,5
C13, 15 e 17	17,1 e 16,7	--	16,8/16,4	--	17,0/16,6	--	16,9/16,6
C14, 16 e 18	9,0	--	8,8	--	8,9	--	8,9



[Au(HL9)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (18)



[Au(HL10)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (19)



[Au(HL11)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (20)

-- Ausência de sinal

Os complexos de ouro(I) com as tiossemicarbazonas também foram caracterizados por RMN de ^{31}P . Todos os espectros foram obtidos em $\text{DMSO-}d_6$. Todos os complexos apresentam um sinal de fósforo em δ 36,8 ppm, δ 36,6 ppm e δ 38,8 ppm para os complexos (18), (19) e (20), respectivamente, enquanto esse sinal aparece em δ 34,2 ppm no precursor $[\text{AuP}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3\text{Cl}]$. Também foi observado sinal de fósforo em δ -143,8 ppm, que é sinal típico de (PF_6^-) , correspondente ao contra íon dos complexos.

A Figura 6.4 apresenta os espectros de RMN de ^{31}P , comparando o sal organometálico $[\text{AuP}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3\text{Cl}]$ com o complexo (19).

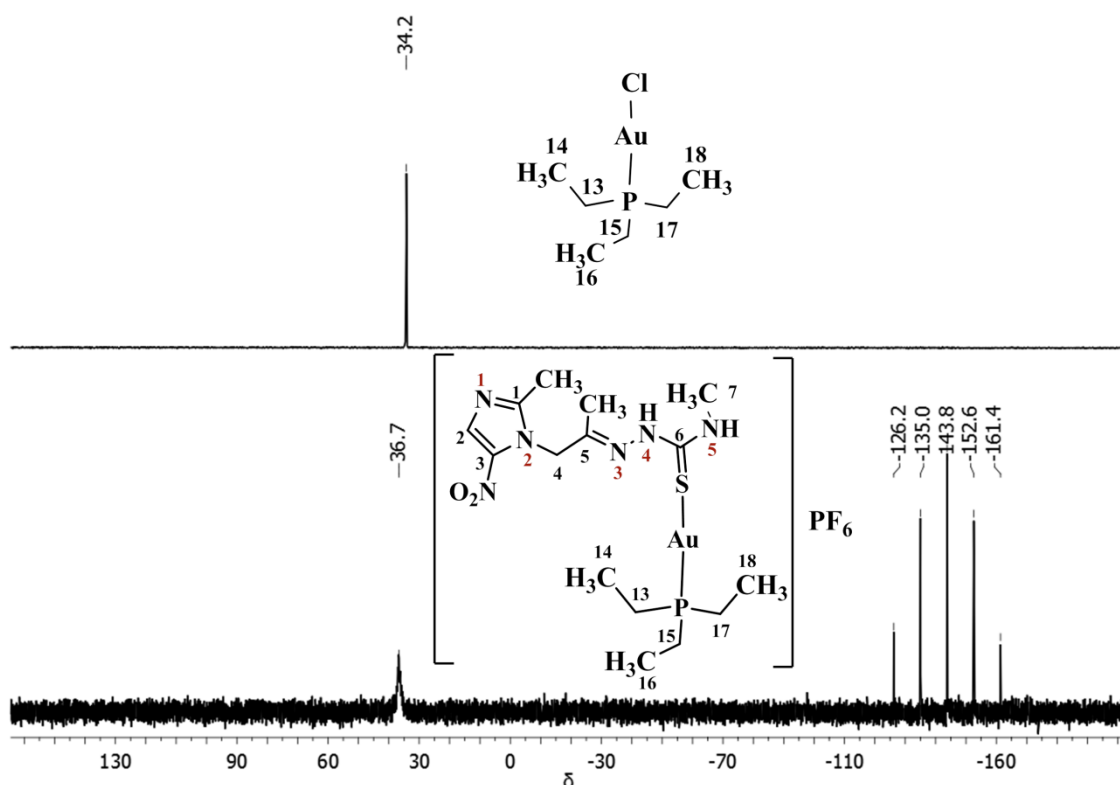


Figura 6.4 - Espectros de RMN ^{31}P do $[\text{AuP}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{Cl}]$ e o complexo $[\text{Au}(\text{HL10})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{PF}_6$ (19), em $\text{DMSO-}d_6$.

6.1.4 - Determinações das estruturas cristalográficas

As estruturas cristalinas de duas novas tiossemicarbazonas contendo o grupo 5-nitroimidazol (HL10 e HL11) foram determinadas. A Tabela 6.5 apresenta alguns dos parâmetros da coleta de dados e o refinamento dos monocristais. Os cristais de HL10 e HL11 foram obtidos durante a recristalização dos complexos (19) e (20) em DMF.

A análise dos dados cristalográficos indica que o ligante HL10 cristalizou-se no sistema triclinico P-1, enquanto o HL11 cristalizou-se no grupo espacial ortorrômbico Pbca. HL10 formou cristais geminados com a mesma composição e célula unitária, mas com orientações diferentes (Figura 6.5).

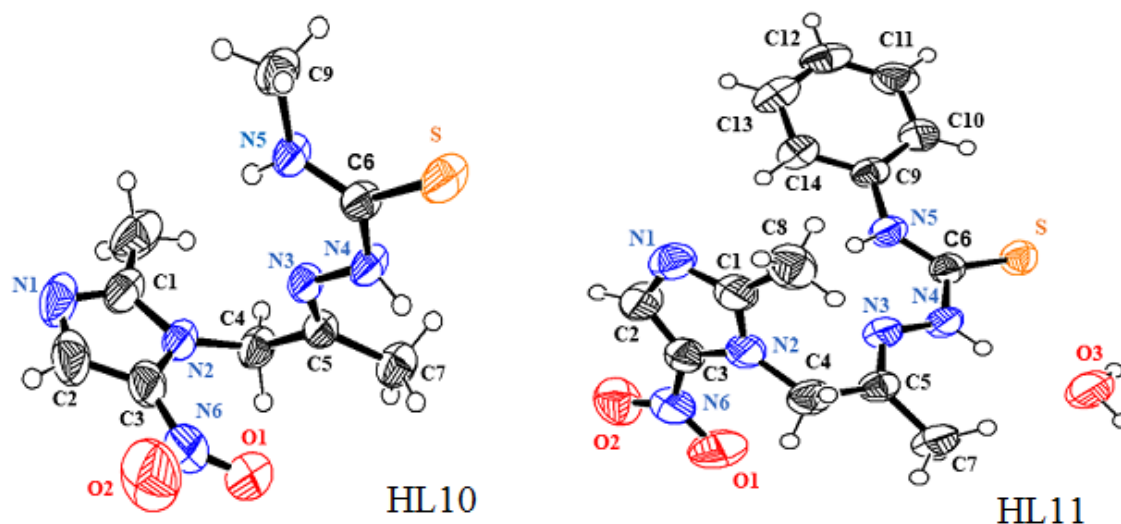


Figura 6.5 - Representação das estruturas moleculares de HL10 e HL11, elipsoides com 50% de probabilidade, os átomos de hidrogênio foram omitidos para obter maior clareza nas imagens.

Tabela 6.5 - Dados cristalográficos e parâmetros de refinamento estrutural para os ligantes HL10 e HL11.

Composto	HL10	HL11
Fórmula molecular	C ₉ H ₁₄ N ₆ O ₂ S	C ₁₄ H ₁₈ N ₆ O ₃ S
Massa molecular (g.mol ⁻¹)	270,32	350,40
Comprimento de onda (λ)	0,71073	0,71073
Sistema cristalino	Triclinico	Ortorrômbico
Grupo espacial	<i>P</i> -1	<i>Pbca</i>
Temperatura (K)	298(2)	298(2)
<i>a</i> (Å)	8,1536(4)	15,3961(5)
<i>b</i> (Å)	8,7320(6)	13,6020(4)
<i>c</i> (Å)	9,8349(5)	16,0574(4)
<i>α</i> (°)	89,139(5)	90

β (°)	81,378(4)	90
γ (°)	68,290(6)	90
V (Å ³)	642,57(7)	3362,70(17)
Z	2	8
Densidade calculada (g.cm ⁻³)	1,397	1,384
Dimensões do cristal (mm ³)	0,241x0,214x 0,125	0,723x0,468x 0,425
F(000)	284,0	1472,0
Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,257	0,219
T _{min} /T _{máx}	0,614 /1	0,475 /1
Intervalo de θ (°)	3,18 - 27,033	3,214 - 29,291
Reflexões coletadas	14624	4639
Reflexões independentes	11169	3439
Número de parâmetros	164	217
Índices finais R [$I > 2\sigma(I)$]	R ₁ = 0,0659 wR ₂ = 0,1960	R ₁ = 0,0489 wR ₂ = 0,1538
Índices finais R (todos os dados)	0,086	0,0678
<i>Goodness-of-fit on F²</i>	1,127	1,027
$\Delta\rho_{max}$. e $\Delta\rho_{min}$.	0,384 e -0,396	0,309 e -0,256

As distâncias e os ângulos de ligação selecionados nas estruturas de HL10 e HL11 estão na Tabela 6.6. Nos dois compostos, as distâncias de ligação C6-S e N3-C5 (1,689(4) e 1,275(5) Å para HL10 e 1,6709(16) e 1,272(2) para HL11, respectivamente) indicam a presença de ligações dupla C=S e C=N, conforme o esperado.¹⁹⁹

A conformação molecular em ambos os compostos é semelhante. O ângulo diédrico entre o anel imidazol e o fragmento de tiossemicarbazona é de 77,2(1)° em HL10 e 83,88(5) em HL11. Em HL11, o ângulo diédrico entre o anel benzênico e o fragmento de tiossemicarbazona é 14,43(8)°.

¹⁹⁹ F.H. Allen, O. Kennard, D.G. Watson, L. Brammer, A.G. Orpen, R. Taylor. J. Chem. Soc. Perkin Trans. II 12 (1987) S1-S19.

Tabela 6.6 - Principais distâncias de ligação (Å) e ângulos (°) das estruturas moleculares dos HL10 e HL11

Compostos	HL10	HL11
S - C6	1,689(4)	1,6709(16)
N3 - N4	1,384(4)	1,3744(19)
N4 - H4	0,8273	0,8821
N5 - C6	1,316(5)	1,3418(19)
N5 - C9	1,448(5)	1,4123(19)
N5 - H5	0,8923	0,8294
N6 - O2	1,209(5)	1,216(2)
N6 - O1	1,231(6)	1,227(2)
N3 - C5	1,275(5)	1,272(2)
C1 - C8	1,499(8)	1,481(3)
C5 - C7	1,492(6)	1,501(2)
N3 - N4 - H4	117,9	123,9
C6 - N5 - C9	123,6(3)	133,20(14)
C6 - N5 - H5	117,8	114,6
C9 - N5 - H5	118,5	112,2
N5 - C6 - N4	117,5(3)	113,28(14)
H3A - O3 - H3B	-	109
C14 - C9 - C10	-	119,34(15)
C14 - C9 - N5	-	115,75(15)
C10 - C9 - N5	-	124,88(15)
C9 - C10 - H10	-	120,5
C9 - C14 - H14	-	119,8

O empacotamento cristalino dos compostos (Figuras 6.6 e 6.7) é muito distinto, principalmente devido à presença da molécula de água e do fenil em HL11. No empacotamento cristalino de HL10, foi observada a ligação intermolecular de hidrogênio N5-H...N1($d(N5\cdots N1) = 2,960(6)$ Å), com formação de um arranjo estrutural dimérico, Tabela 6.7. No empacotamento cristalino de HL11 não foram observadas fortes interações intermoleculares, e a estabilização no sólido é devida às

ligações de hidrogênio N4-H...O3 ($d(N4\cdots O3) = 2,937(2) \text{ \AA}$) e O3-H...N1 ($d(O3\cdots N1) = 2,853(2) \text{ \AA}$) entre as moléculas de água (Tabela 6,7 e 6,8).

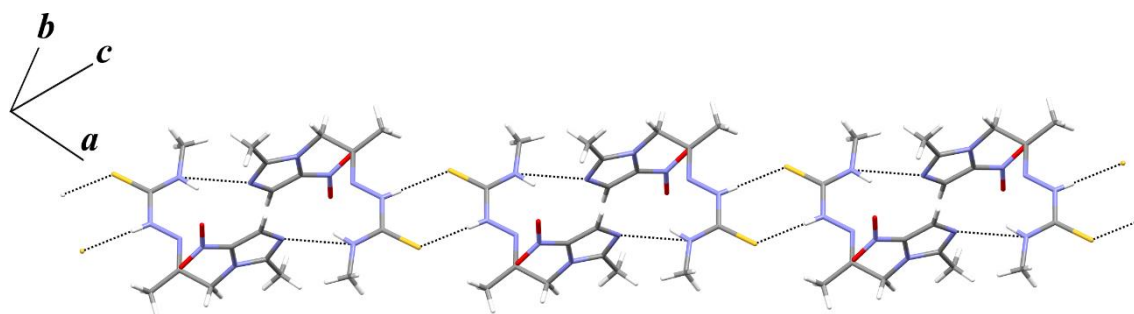


Figura 6.6 - Interações intermoleculares de HL10 mostrando o esquema da ligação de hidrogênio.

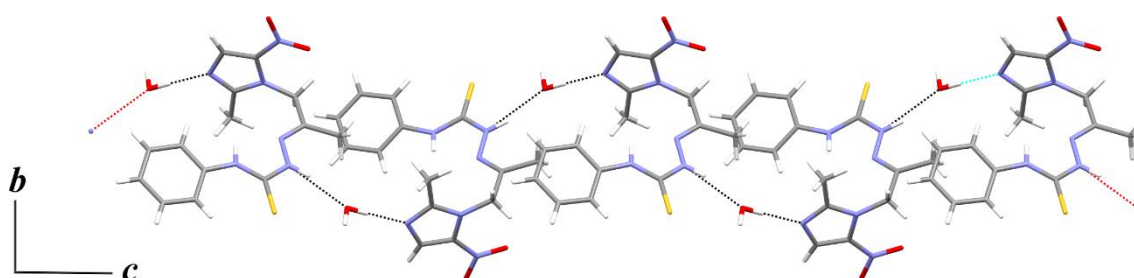


Figura 6.7 - Interações intermoleculares de HL11 mostrando o esquema da ligação de hidrogênio.

Tabela 6.7 - Comprimentos de ligação de hidrogênio (\AA) e ângulos ($^\circ$) para HL10.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	$\angle(D-H\cdots A)$	Operadores de simetria
N5- H...N1	0,89	2,20	2,960(6)	143,0	$[-1 - x, 1 - y, - z]$
N4-H4...S	0,83	2,63	3,457(4)	174,0	$[- x, 1 - y, 1 - z]$

Tabela 6.8 - Comprimentos de ligação de hidrogênio (\AA) e ângulos ($^\circ$) para HL11.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	$\angle(D-H\cdots A)$	Operadores de simetria
N4-H...O3	0,88	2,08	2,937(2)	165,0	$[x, y, z]$
O3-H...N1	0,92	1,93	2,853(2)	177,0	$[\frac{1}{2} - x, 1 - y, - \frac{1}{2} + z]$

As superfícies de Hirshfeld (SH) e análise dos gráficos de impressões digitais mostraram que a mudança de metil, em HL10, para fenil em HL11 promove modificações relevantes no estado sólido. Comparando a SH dos compostos (Figura

6.8) é possível notar a diferença em suas formas e, como esperado, em volume (HL10 = 314,64 Å³ e HL11 = 388,79 Å³). A distribuição das interações intermoleculares também é distinta nos compostos. Em HL11, as interações intermoleculares são mais fortes do que em HL10, uma vez que a distância ($d_i + d_e$) é 4,7 Å, em HL10 e 4,5 Å em HL11. No entanto, as interações mais fortes estão relacionadas a N···H nos dois compostos.

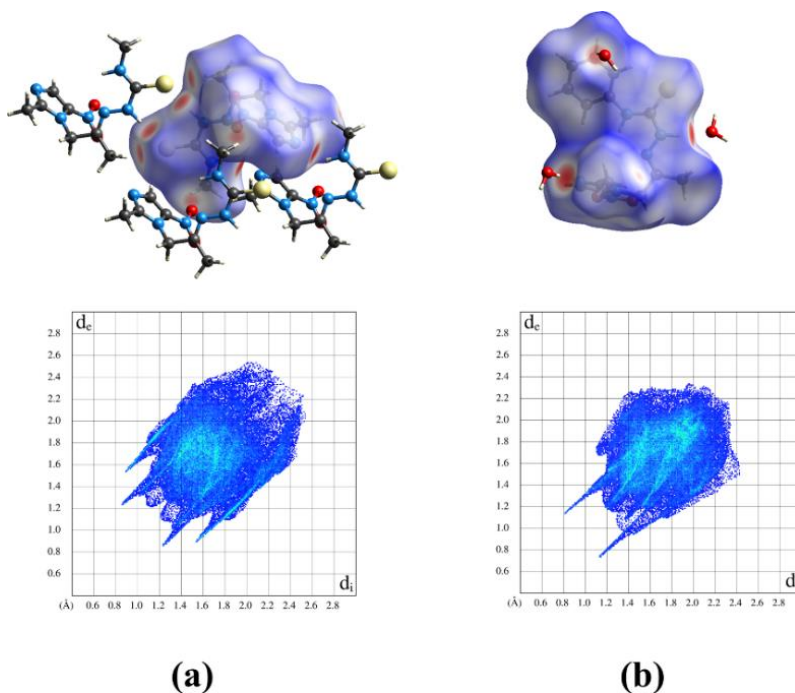


Figura 6.8 - Superfície de Hirshfeld (em cima) e gráficos de impressões digitais (em baixo) de a) HL10 e b) HL11.

As interações mais representativas são os contatos H···H não direcionais, que representam 39,1 e 39,9% para HL10 e HL11, respectivamente (Figura 6.9(a)). A contribuição da interação do O···H (Figura 6.9(b)) é semelhante nos compostos (20,5% em HL10 e 22,1% em HL11). No entanto, devido à presença da molécula de água, os gráficos de impressões digitais de HL11 são assimétricos, bem como para a interação N···H (Figura 6.9(c)). As interações de N···H e S···H correspondem a 14,2% e 15,3%, respectivamente para HL10 e 5,0% e 9,0% para HL11. Os gráficos de impressões digitais não mostraram um padrão de asa característico, indicando que interações CH··· π não estão presentes nesses compostos.

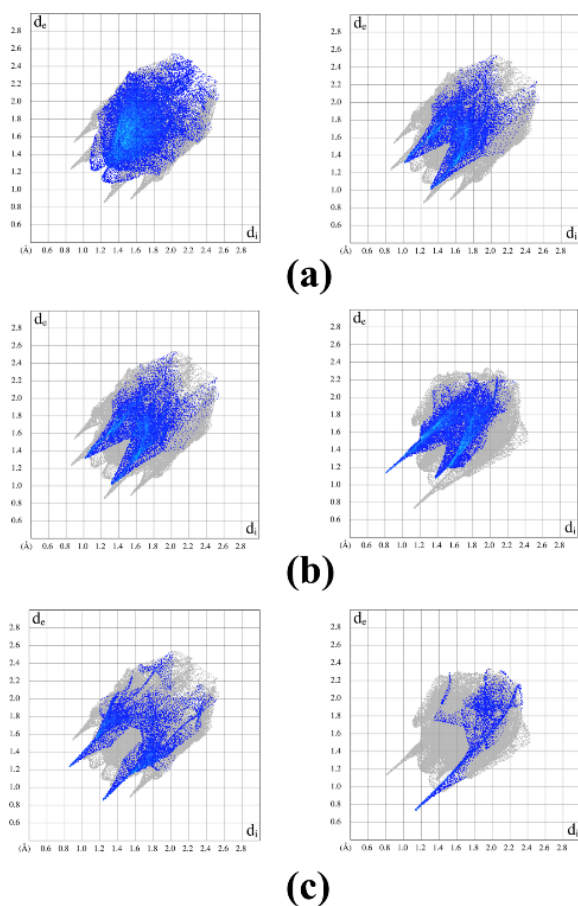


Figura 6.9 - Gráfico de impressão digital de HL10 (esquerda) e HL11 (direita) para a) H...H, b) O...H e c) N...H.

6.1.5 – Estudo preliminar de estabilidade dos complexos por meio de espectros eletrônicos de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

Os complexos (**18** - **20**) mostraram-se estáveis em solução de 100% DMSO e em solução 5% DMSO/Tris-HCl, em estudo no UV-vis. A Figura 6.10 mostra os espectros eletrônicos do complexo $[\text{Au}(\text{HL10})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (**19**), ao longo do tempo em DMSO e a Figura 6.11 os espectros eletrônicos do complexo (**19**) em solução de 5% DMSO/Tris-HCl em pH 7,2.

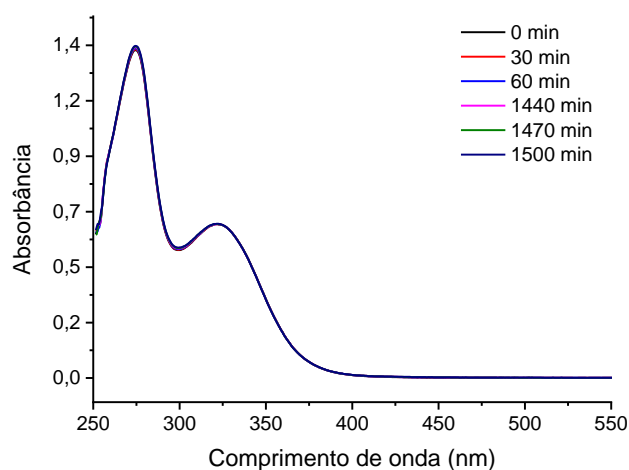


Figura 6.10 - Espectros eletrônicos ao longo do tempo do complexo $[\text{Au}(\text{HL10})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (**19**), em DMSO.

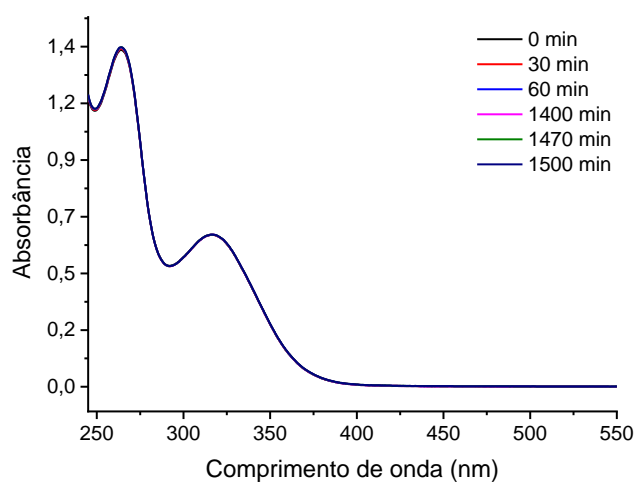


Figura 6.11 - Espectros eletrônicos ao longo do tempo do complexo $[\text{Au}(\text{HL10})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (**19**), em solução 5% DMSO/Tris-HCl.

6.1.6 - Estudos eletroquímicos

Como a voltametria é uma importante ferramenta eletroquímica para estudar mecanismo no processo de oxidação/redução, principalmente para compostos orgânicos e inorgânicos, foi possível observar a estabilidade do ânion nitro-radical presente nas tiossemicarbazonas complexadas com organometálico de ouro(I). O estudo eletroquímico foi realizado utilizando disco de eletrodo de platina, usando $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

de perclorato de tetrabutilamônio $[\text{Bu}_4\text{N}]^+[\text{ClO}_4]^-$ como eletrólito de suporte e os compostos com concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em DMF. Será apresentado o voltamograma cíclico do complexo $[\text{Au}(\text{HL}10)\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (**19**) a 250 mV s^{-1} de -1500 a 1500 mV e região expandida de -1200 a -200 mV (Figura 6.12), já que todos os voltamogramas apresentaram comportamentos eletroquímicos semelhantes para todos os compostos. Os voltamogramas cíclicos dos complexos apresentam pares de picos anódicos e catódicos bem definidos e estão descritos na Tabela 6.9.

No geral, os complexos apresentaram processos *quasi*-reversíveis atribuídos ao par redox $\text{RNO}_2/\text{R-NO}_2^-$ (picos Ic e Ia). Partindo do potencial negativo para potencial positivo é observado um processo de oxidação irreversível (IIa) entre 1137 - 1410 mV, atribuído ao processo de oxidação do ouro(I). Os picos Ic/Ia e Va são representados pelas Equações (1) e (6), respectivamente, onde (HL) representa as tiossemicarbazonas.

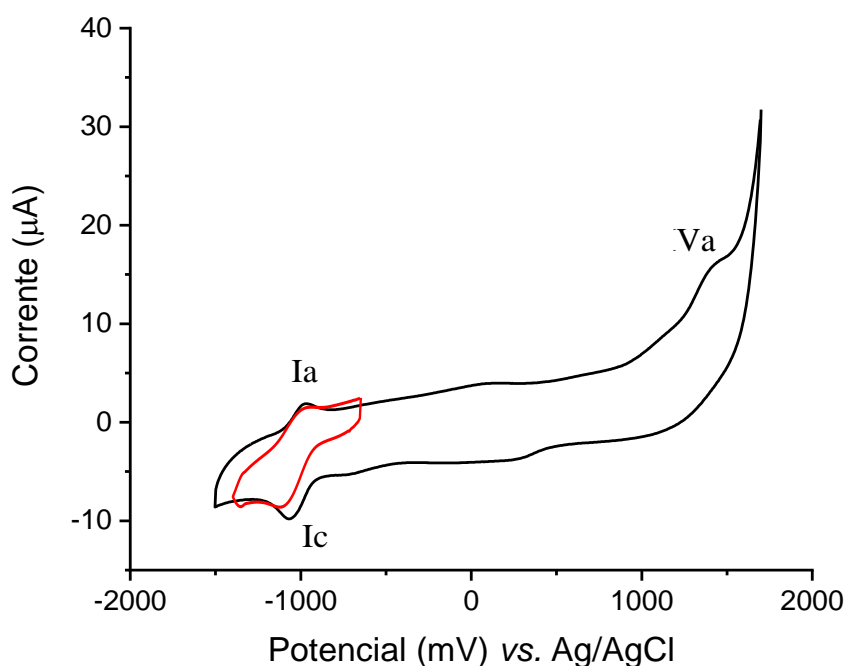
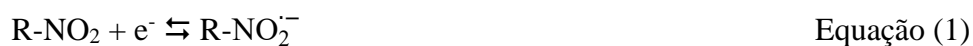


Figura 6.12 - Voltamograma do complexo $[\text{Au}(\text{HL}10)\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (**19**) em meio aprótico (TBAP 0,1 M em DMF) vs. Ag/AgCl, Cl^- (3,0 M); taxa de varredura de 250 mV s^{-1} . E região expandida em vermelho mostra uma varredura curta com o par $\text{RNO}_2/\text{R-NO}_2^-$ isolado.

A Tabela 6.9 mostra os valores de potenciais de pico catódico e anódico (E_{pIa} e E_{pIc}), variações de potenciais entre picos catódicos e anódicos [$\Delta E = (E_{pIa} - E_{pIc})$] e corrente, I_{pa}/I_{pc} . Pôde-se observar que nos voltamogramas os potenciais dos picos catódicos e anódicos variaram ligeiramente com a varredura, de modo que o parâmetro ΔE para a primeira onda diminui com a diminuição da taxa de varrimento, assim, atingindo valores entre 92 - 133 mV a 250 $mV s^{-1}$. Foi possível observar também que os valores de I_{pa}/I_{pc} variaram de 0,66 a 0,82 A, e aumentam ligeiramente à medida que a taxa de varredura aumenta. Como foi discutido no Capítulo 3, os comportamentos descritos acima demonstraram que os complexos de ouro(I) apresentam sistemas *quasi-reversíveis*.

Os valores de potenciais de redução (E_{pIc}) dos complexos de ouro(I) encontram-se na faixa de -978 a -1065 mV, enquanto os ligantes exibiram potencial de redução (E_{pIc}) próximo de -1100 mV. Assim, os complexos de ouro(I) apresentam potenciais de redução mais favoráveis, sugerindo que esses complexos poderiam ser reduzidos mais facilmente do que os ligantes.

Tabela 6.9 - Parâmetros da voltametria cíclica correspondentes ao par redox $RNO_2/R-NO_2^-$ e do ouro(I) a 250 $mV s^{-1}$.

Composto	$RNO_2/R-NO_2^-$			Au^I/Au^{II}	
	E_{pIc}	E_{pIa}	ΔE_p	I_{pIa}/I_{pIc}	E_{pIIa}
$[Au(HL9)P(CH_2CH_3)_3]PF_6$ (18)	- 978	- 845	133	0,82	1173
$[Au(HL10)P(CH_2CH_3)_3]PF_6$ (19)	- 1065	- 974	92	0,73	1410
$[Au(HL11)P(CH_2CH_3)_3]PF_6$ (20)	- 987	- 894	93	0,66	1137

6.2 - Avaliação da atividade citotóxica contra células de carcinoma colorretal

Levando-se em consideração que o grupo farmacofórico 5-nitroimidazol poderia, em princípio, sofrer redução em condições anaeróbicas, gerando espécies tóxicas aos tumores, avaliações das atividades citotóxicas dos complexos de ouro(I) e das tiossemicarbazonas livres foram realizadas contra linhagens celulares de carcinoma colorretal (HCT-116), em condições de normóxia e hipóxia e contra células não malignas de rim embrionário humano (HEK-293), em normóxia. A Tabela 6.10

apresenta a concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular (CI_{50} , μM) dos compostos frente às linhagens estudadas.

Tabela 6.10 - Atividade citotóxica (CI_{50} , μM) e índices de seletividade (IS) dos compostos nas células HCT - 116 e HEK - 293 e o potencial de redução do $R-NO_2^-$ (EpIc).

Compostos	HCT-116				HEK-293	
	Normóxia	IS	Hipóxia	IS	Normóxia	EpIc
HL9	5,6±1,7	0,8	> 100	ND	4,7±0,4	-1120
[Au(HL9)P(CH ₂ CH ₃) ₃]PF ₆ (18)	1,2±0,3	3,7	5,7±2,5	0,8	4,5±2,0	- 978
HL10	4,4±1,9	1,0	> 100	ND	4,3±0,8	-1125
[Au(HL10)P(CH ₂ CH ₃) ₃]PF ₆ (19)	11,3±1,7	1,1	3,5±0,9	3,7	12,8±2,1	- 1065
HL11	> 100	ND	> 100	ND	> 100	- 1130
[Au(HL11)P(CH ₂ CH ₃) ₃]PF ₆ (20)	6,9±2,4	1,3	6,0±2,2	1,5	8,9±0,8	- 987
[AuP(CH ₂ CH ₃) ₃ Cl]	8,9±2,1	0,4	5,2±0,7	0,6	3,3±1,2	--
Tirapazamina	45,9±7,2	0,6	7,2±1,1	4,0	28,9±9,2	--

ND = não determinado; IS = $CI_{50HEK-293}/CI_{50HCT-116hipoxia}$

Os ligantes HL9 - HL11 foram inativos contra células HCT-116 sob condições de hipóxia. HL11 também foi inativo contra células HCT-116 sob condições de normóxia. HL9 e HL10 apresentaram atividade contra as células HCT 116 e HEK 293 sob normóxia, com valores de CI_{50} de 5,6 e 4,4 μM , respectivamente. Provavelmente, como mostrado pelas análises de SH, HL10 e HL11 apresentam formas e volumes moleculares muito diferentes no sólido, e essas diferenças podem permanecer no meio aquoso, o que em parte poderia explicar seus efeitos citotóxicos distintos.

O complexo (**19**) revelou-se ativo contra as células HCT-116 e HEK-293, sendo ligeiramente mais ativo contra as células HCT-116 em normóxia do que em hipóxia, com valores de CI_{50} de 1,2 e 4,7 μM , respectivamente. Já os complexos (**18**) e (**20**) foram ativos contra as duas linhagens celulares, sendo tão ativo em normóxia quanto em hipóxia, contra as células HCT-116. A atividade do complexo (**20**) pode ser atribuída à presença do trietiofosfinaouro(I), pois HL11 foi inativo contra as linhagens celulares.

A inatividade dos ligantes HL9 - HL11 sob hipóxia pode ser ligada aos potenciais de redução mais desfavoráveis que seus complexos, como pode ser visto na

Tabela 6.10. Após coordenação com o ouro(I), os potenciais de redução tornam-se menos negativos, de modo que os complexos (**18** - **20**) foram ativos contra as duas linhagens celulares em normóxia e também em condições de hipóxia. O precursor do trietilfosfinaouro(I) também foi ativo contra as duas linhagens celulares.

No entanto, o complexo (**19**) foi mais ativo contra o HCT-116 em hipóxia do que em condições de normóxia, com índice de seletividade $IS = CI_{50HEK-293}/CI_{50HCT-116hipóxia}$ igual a 3,7, valor semelhante ao fármaco controle tirapazamina, um medicamento anticâncer que é ativado apenas em áreas hipóxicas de tumores sólidos,²⁰⁰ com $IS = 4,0$. O precursor $[AuP(CH_2CH_3)_3Cl]$ também mostrou-se um pouco mais ativo contra células HCT-116 em hipóxia, porém seu índice de seletividade foi muito menor, $IS = 0,6$.

Os resultados sugerem que novos estudos do complexo (**19**) visando testes *in vivo* seriam de grande relevância.

Os resultados descritos neste capítulo foram publicados no artigo intitulado: “Triethylphosphinegold(I) Complexes with Secnidazole-Derived Thiosemicarbazones: Cytotoxic Activity against HCT-116 Colorectal Cancer Cells under Hypoxia Conditions” Ana P. A. Oliveira, Jennifer T. J. Freitas, Renata Diniz, Claudia Pessoa, Sarah S. Maranhão, Juliana M. Ribeiro, Elaine M. Souza-Fagundes, Heloisa Beraldo. ACS Omega 5 (2020) 2939-2946 (Anexo II).

Capítulo 7

Discussão e Conclusões

Doenças negligenciadas, como por exemplo leishmaniose e doença de Chagas não têm a devida atenção das indústrias farmacêuticas. Desta forma, os fármacos utilizados no tratamento dessas doenças não são mais tão eficazes, pois pode ocorrer resistência a esses medicamentos e podem também surgir efeitos colaterais severos à saúde humana. A resistência aos antimicrobianos também constitui ameaça importante à saúde.

Apesar de muitos esforços no desenvolvimento de compostos antitumorais à base de platina, os fármacos que estão em uso provocam efeitos colaterais adversos, e o

²⁰⁰ W. Denny, B. Wilson. Expert opin. Inv. Drugs 9 (2000) 2889-2901.

aparecimento de resistência celular a esses compostos impulsiona a investigação de novos fármacos que sejam mais eficazes e seletivos, e que possam substituir os complexos de platina.

Assim, no presente trabalho procuramos contribuir para a Química Medicinal na procura de novos candidatos a protótipos de fármacos e metalofármacos antimicrobianos, antiparasitários e antitumorais com base em hidrazonas e tiossemicarbazonas funcionalizadas com os grupos farmacofóricos nitroimidazol e nitrobenzeno, assim como estudos de bioatividades desses compostos e uma investigação preliminar do papel da redução do grupo nitro em seus mecanismos de ação.

Na busca de funcionalizar hidrazonas com nitrocompostos para serem testadas frente à espécie *Leishmania chagasi in vitro*, foram obtidas 2-acetilpiridina-4-nitroimidazolhidrazona (HL1), 2-acetilpiridina-2-nitroimidazolhidrazona (HL2) e 2-benzoilpiridina-4-nitroimidazolhidrazona (HL3). Apesar das diferenças estruturais dos compostos, nenhum dos derivados apresentou citotoxicidade para células de macrófagos de mamíferos, diferentemente da pentamidina, fármaco de referência. Por outro lado, HL2 não apresentou atividade antileishmania contra forma amastigota intracelular de *L. chagasi*, enquanto HL1 e HL3 foram ativos nas condições experimentais. Assim, a presença do grupo 4-nitroimidazol, mas não o grupo 2-nitroimidazol, pode ser um fator determinante para o efeito farmacológico, enquanto a escolha entre os grupos metila ou fenila parece não interferir significativamente na atividade.

Além disso, os resultados indicaram que, no caso de HL1 e HL3, ocorre redução do grupo nitro para formar o ânion nitro-radical com $E_{pIc} = -1203$ e -1162 mV, respectivamente, enquanto no caso de HL2, esse processo ocorreu em $E_{pIc} = -1025$ mV. Essas diferenças também parecem não influenciar tanto na atividade quanto a posição do grupo nitro. Protozoários e mamíferos apresentam capacidades distintas para a redução de compostos nitroimidazólicos, e a posição do grupo nitro influencia fortemente o perfil farmacológico de derivados biorredutíveis de nitroimidazol, o que pode explicar por que nenhum dos compostos apresentou toxicidade para células de macrófagos.²⁰¹ Assim, HL1 e HL3 podem ser considerados bons candidatos a pró-fármacos antileishmaniais biorredutíveis.

²⁰¹ J. A. Squella, A. Campero, J. Maraver, J. Carbajo. *Electrochim. Acta* 52 (2006) 511–518.

No presente trabalho, também foi estudado, a funcionalização de hidrazonas derivadas de 8-hidroxiquinolina (8-HQ), 2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitroimidazolidrazona (H₂L4) e 2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitrobenzenohidrazona (H₂L5) e seus complexos de antimônio(III): [2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitroimidazolidrazona)(dicloro)antimônio(III)], [Sb(HL4)Cl₂] (1) e [2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitrobenzenohidrazona)(dicloro)antimônio(III)], [Sb(HL5)Cl₂] (2) e bismuto(III): [2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitroimidazolidrazona)(dicloro)bismuto(III)], [Bi(HL4)Cl₂] (3) e [2-formil-8-hidroxiquinolina-4-nitrobenzenohidrazona)(dicloro)bismuto(III)], [Bi(HL5)Cl₂] (4). A obtenção das hidrazonas (H₂L4) e (H₂L5) e seus complexos [Sb(HL4)Cl₂] (1), [Sb(HL5)Cl₂] (2), [Bi(HL4)Cl₂] (3) e [Bi(HL5)Cl₂] (4) visou, principalmente, a obtenção de compostos com atividade antitripanossoma *in vitro*.

H₂L4, H₂L5 e os complexos (1) e (3) não apresentaram atividade citotóxica nas células de fibroblastos humanos hFIB. O complexo (3) apresentou citotoxicidade apenas nos macrófagos, enquanto os complexos (2) e (4) apresentaram atividade citotóxica contra hFIB, e contra macrófagos de camundongo, quando testados na concentração máxima de 50 µM.

O composto H₂L4 apresentou efeitos antitripanossômicos e, mediante a coordenação com antimônio(III) e bismuto(III), a atividade antiparasitária aumentou, principalmente para o complexo (3). H₂L5 mostrou-se ativo contra amastigotas (forma intracelular), mas inativo contra tripomastigotas (forma extracelular), enquanto seus complexos (2) e (4) foram ativos contra ambas as formas do parasita, sendo o complexo (4) o mais ativo, exibindo EC₅₀ de 0,06 µM. Em todos os casos, os complexos de bismuto(III) apresentaram os maiores índices de seletividade contra tripomastigotas.

Como o complexo (4) foi o mais ativo contra a forma tripomastigota, foi realizada a investigação do mecanismo de morte celular induzida pelo complexo, sugerindo que seus efeitos antiparasitários ocorram com a indução de morte celular causada por necrose. A partir de estudos com microscopia eletrônica de varredura (MEV), a análise ultraestrutural mostrou encurtamento do flagelo e fragmentação da membrana do parasita quando tratado com a concentração de 0,06 µM do complexo (4). Além disso, pôde-se observar uma degradação total do parasita, após tratamento com 1 µM do complexo.

O secnidazol é um potencial fármaco contra micro-organismos anaeróbicos. Apresenta farmacocinética apropriada, sendo rápido e completamente absorvido após

administração oral.²⁰² Esse fármaco requer bioativação do grupo nitro para exercer seu efeito antimicrobiano e seu mecanismo de ação envolve a redução do grupo nitro, gerando espécies radicalares reativas, principalmente o ânion nitro-radical, que reage com componentes celulares, como DNA ou proteínas.²⁰³ Funcionalizar este composto com Bases de Schiff é uma excelente estratégia para melhorar atividade e diminuir a resistência das bactérias anaeróbicas.

Deste modo, foram obtidos (1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazonacarboxamida (HL6), (1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)acetilhidrazona (HL7), (1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)benzoilhidrazona (HL8), (1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida (HL9), (*N*-metil-1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida (HL10) e (1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)-*N*-fenil-hidrazinocarbotioamida (HL11), bem como seus complexos de cobre(II): bis[1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazonacarboxamida)(dicloro)cobre(II)] [Cu(HL6)₂Cl₂] (**5**), [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)acetilhidrazona)(dicloro)cobre(II)] hemi-metanol [Cu(HL7)Cl₂]·½CH₃OH (**6**), [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)benzoilhidrazona)(dicloro)cobre(II)] [Cu(HL8)₂Cl₂] (**7**), [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida)(dicloro)cobre(II)] hemi-hidratado [Cu(HL9)Cl₂]·½H₂O (**8**), [(*N*-metil-1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida)(dicloro)cobre(II)] [Cu(HL10)Cl₂] (**9**) e [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)-*N*-fenil-hidrazinocarbotioamida)(dicloro)cobre(II)] [Cu(HL11)Cl₂]·½H₂O (**10**), de prata(I): [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)acetilhidrazona)(nitrato)prata(I)] [Ag(HL7)NO₃] (**11**), [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)benzoilhidrazona)(nitrato)prata(I)] [Ag(HL8)NO₃] (**12**) e [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida)(nitrato)prata(I)] [Ag(HL9)NO₃] (**13**) e [((*N*-metil-1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida)(nitrato)prata(I)] [Ag(HL10)NO₃] (**14**) e de bismuto(III) [(1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida)(triclouro)bismuto(III)] [Bi(HL9)Cl₃] (**15**), [(*N*-metil-1-

²⁰² C. W. Ang, A. M. Jarrad, M. A. Cooper, M. A. T. Blaskovich, J. Med. Chem. 60 (2017) 7636–7657.

²⁰³ Y. Miyamoto, J. Kalisiak, K. Korthals, T. Lauwaet, D. Y. Cheung, R. Lozano, E. R. Cobo, P. Upcroft, J. A. Upcroft, D. E. Berg, F. D. Gillin, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, L. Eckmann. Proc. Nat. Acad. Sci. 110 (2013) 17564–17569.

(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida)(tricloro)bismuto(III) [Bi(HL10)Cl₃] (**16**) e ((1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)-*N*-fenilhidrazinocarbotioamida)(tricloro)bismuto(III)] diidratado [Bi(HL11)Cl₃].2H₂O (**17**). Os efeitos antimicrobianos dos compostos foram avaliados contra bactérias anaeróbicas *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides ovatus*, *Parabacteroides distasonis* e *Fusubacterium nucleatum*. Também foram realizados estudos eletroquímicos sobre a redução do grupo nitro, para investigar a capacidade dos compostos sofrerem ativação de biorredução.

Os compostos HL6-HL11 exibiram atividade antibacteriana *in vitro* contra as seis cepas avaliadas. Em alguns casos, os ligantes apresentaram concentrações inibitórias mínimas (CIM) inferiores aos dos fármacos de referência, o secnidazol e o metronidazol. Como os compostos em estudo mostraram potenciais de redução na mesma faixa que os medicamentos biorredutíveis secnidazol e benznidazol, suas atividades biológicas também podem estar relacionadas à biorredução intracelular. O comportamento eletroquímico semelhante pode explicar parcialmente a razão pela qual os valores de CIM dos compostos em estudo são comparáveis entre si e com os do secnidazol e metronidazol.

Com a coordenação dos derivados de secnidazol com o cobre(II), prata(I) e bismuto(III), a atividade antibacteriana aumentou em vários casos. Os potenciais de redução do grupo nitro, em geral, foram menos negativos para os complexos que para os ligantes de partida, sugerindo que essa poderia ser uma das razões para sua ação antimicrobiana melhorada. O fato de os ligantes e seus complexos de cobre(II), prata(I) e bismuto(III) não apresentarem atividade antimicrobiana contra bactérias aeróbicas, mas serem altamente ativos contra cepas anaeróbicas sugere fortemente a formação do ânion nitro-radical (R-NO₂⁻) sob condições anaeróbicas e a possível participação dessas espécies na atividade antibacteriana, mostrando, assim, que esses compostos são altamente seletivos.

Além disso, os complexos de prata(I) apresentaram efeitos antifúngicos, diferentemente dos ligantes livres e dos complexos de cobre(II) e bismuto(III), sugerindo que os complexos de prata(I) exibem um espectro de ação mais amplo. As atividades antifúngicas dos complexos (**11-14**) provavelmente se devem à presença da prata(I), uma vez que o nitrato de prata também apresentou atividade.

Foi verificada também a atividade citotóxica dos ligantes livres e dos complexos de prata(I) e bismuto(III) frente às linhagens de carcinoma colorretal (HCT-116), células leucêmicas (HL-60), carcinoma da próstata (PC3), glioblastoma-Sistema Nervoso Central (SNB-19) e células sadias de rim embrionário humano (HEK-293). Apenas o complexo $[Ag(HL9)NO_3]$ (**13**) e $AgNO_3$ foram ativos, demonstrando que, de modo geral, os compostos derivados de secnidazol são inativos em condições de aerobiose, podendo ser ativados em meio de hipóxia.

Por fim, foram testadas as atividades antineoplásicas dos ligantes derivados de secnidazol e seus complexos de ouro(I) contra linhagens celulares de carcinoma colorretal (HCT-116) e células sadias de rim embrionário humano (HEK-293). As atividades destes compostos estão relacionadas com a capacidade de redução do grupo nitro sob condições de baixa concentração de oxigênio, gerando espécies reativas de oxigênio tóxicas, que resultam em danos ao DNA e outras biomoléculas.²⁰⁴ Portanto, a presença de nitroimidazol pode resultar em seletividade hipóxica. Assim, complexos hexafluorofosfato de $[(1-(2\text{-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida})(\text{trietilfosfina})\text{ouro(I)}]$ $[Au(HL9)P(CH_2CH_3)_3]PF_6$ (**18**), hexafluorofosfato de $[(N\text{-metil-1-(2-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida})(\text{trietilfosfina})\text{ouro(I)}]$, $[Au(HL10)P(CH_2CH_3)_3]PF_6$ (**19**) e hexafluorofosfato de $[(1-(2\text{-metil-5-nitroimidazol)propan-2-ilideno)-N\text{-fenil-hidrazinocarbotioamida})(\text{trietilfosfina})\text{ouro(I)}]$, $[Au(HL11)P(CH_2CH_3)_3]PF_6$ (**20**), foram obtidos com tiossemicarbazonas derivadas de secnidazol. As atividades citotóxicas dos compostos foram investigadas em condições de normóxia e hipóxia. Tirapazamina (TPZ), uma pró-fármaco ativada por hipóxia usada clinicamente,²⁰⁵ foi utilizada como fármaco de referência.

Os ligantes HL9 - HL11 foram inativos contra células HCT-116 sob condições de hipóxia. HL11 também foi inativo contra células HCT-116 sob condições de normóxia. Por sua vez, os complexos de ouro(I) foram ativos contra as células HCT-116 tanto em condições de normóxia como de hipóxia. Além disso, o complexo (**19**) foi mais seletivo contra as células tumorais HCT-116 em hipóxia que contra as células sadias HEK-293, com índice de seletividade ($IS = CI_{50HEK-293}/CI_{50HCT-116hipóxia}$) igual a 3,7, sendo tão seletivo quanto o fármaco tirapazamina ($IS = 4$). Assim, a complexação

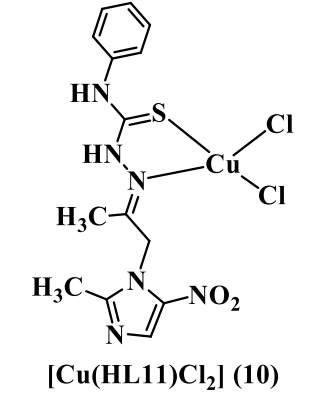
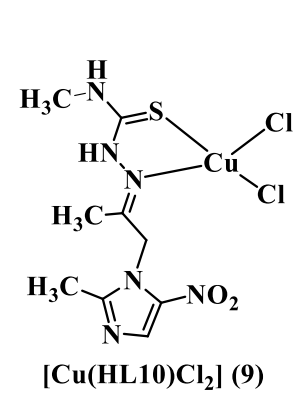
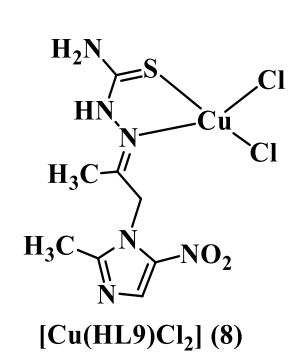
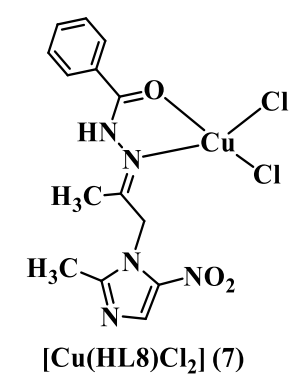
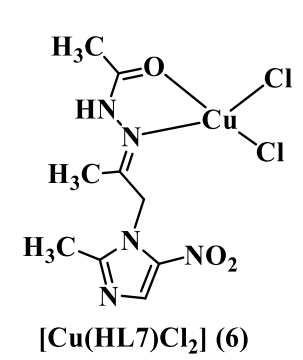
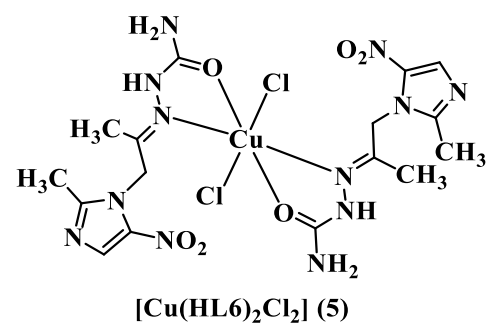
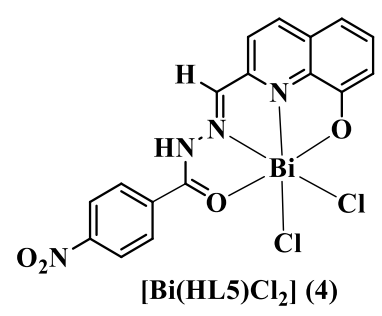
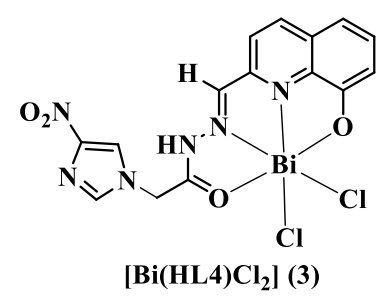
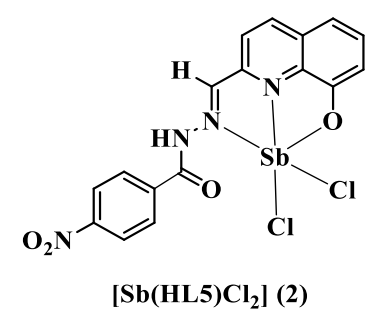
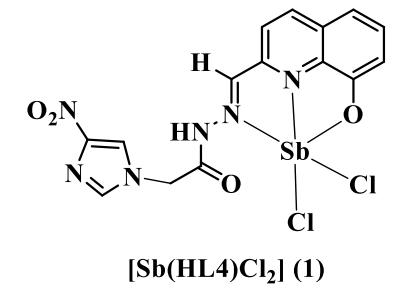
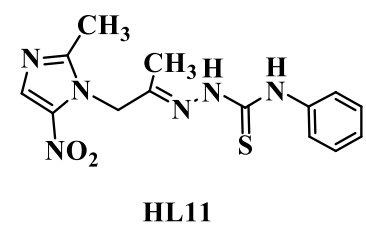
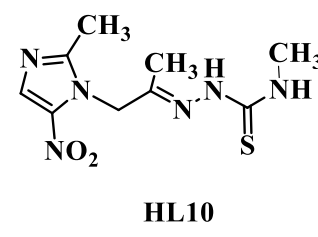
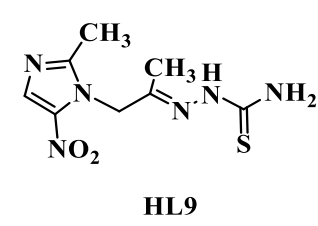
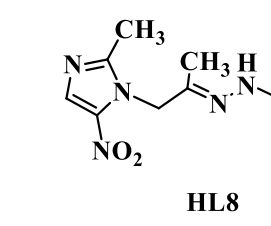
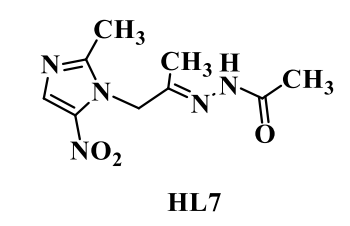
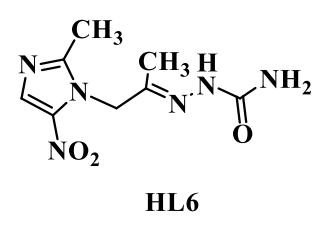
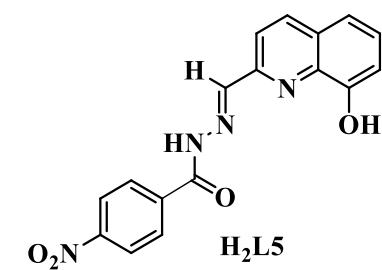
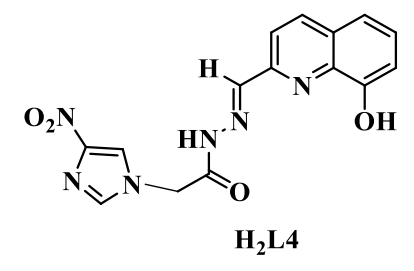
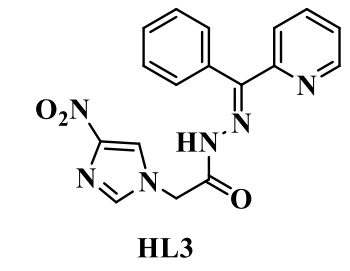
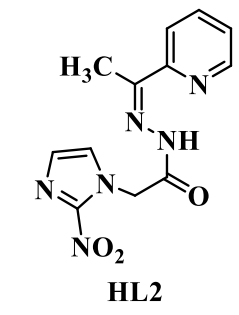
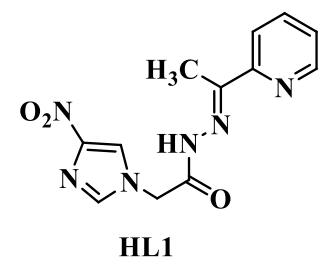
²⁰⁴ P. D. Bonnitca, A. L. Vajvere, J. S. Lewis, J. R. Dilworth. *J. Med. Chem.* 51 (2008) 2985-2991.

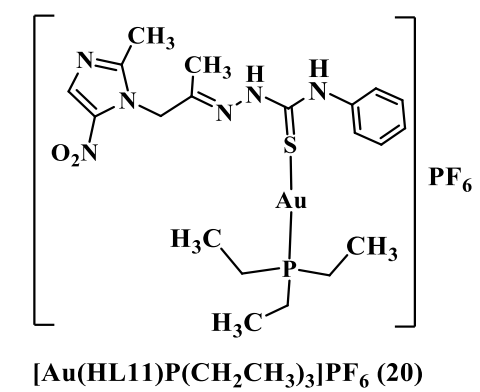
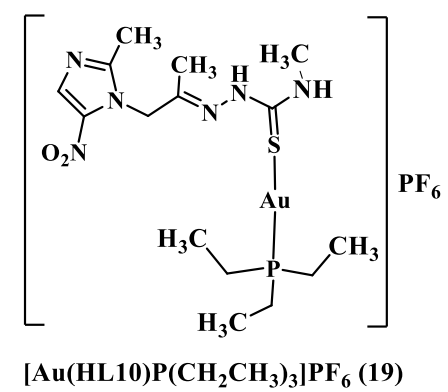
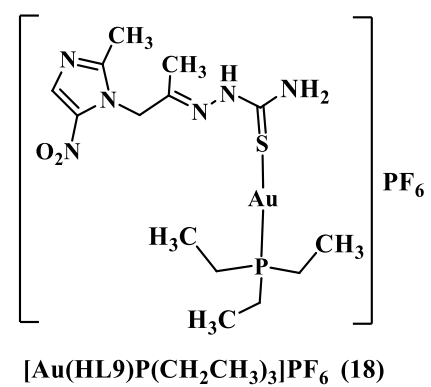
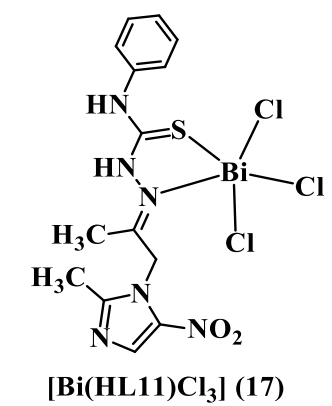
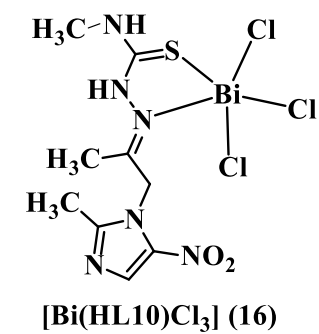
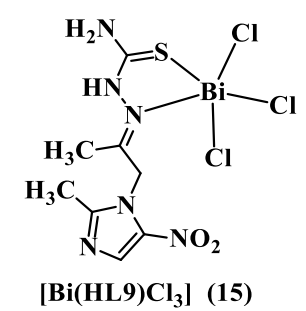
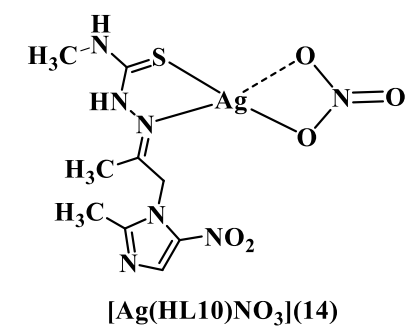
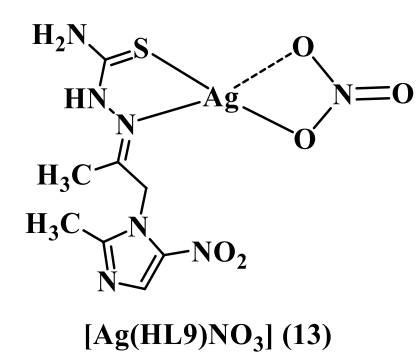
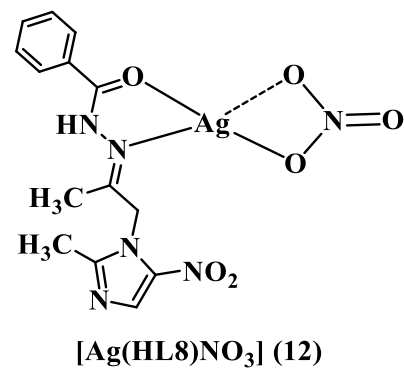
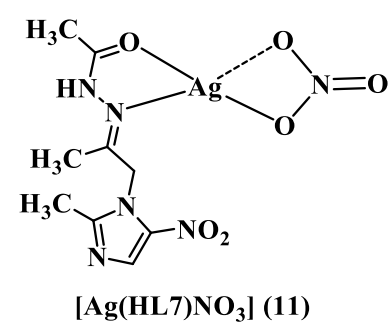
²⁰⁵ J. M. Brown, W. R. Wilson. *Nat. Rev. Cancer* 4 (2004) 437-447.

de HL10 com ouro(I) mostrou-se uma estratégia valiosa para melhorar a seletividade contra células cancerígenas HCT116.

Nossos resultados sugerem que a estratégia de unir bases de Schiff aos grupos farmacofóricos nitroimidazol e nitrobenzeno no planejamento de fármacos e metalofármacos biorredutíveis mostrou-se muito importante. Levando-se em conta a resistência das doenças e baixa seletividade apresentadas pelos medicamentos em uso clínico, este trabalho representa uma importante contribuição para o desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de fármacos e metalofármacos antimicrobianos, antiparasitários e antineoplásicos.

ANEXO I: LISTA DE ESTRUTURAS





ANEXO II: ARTIGOS E CAPA DO ARTIGO

Structural studies and antileishmanial activity of 2-acetylpyridine and 2-benzoylpyridine nitroimidazole-derived hydrazones

Ana P. A. Oliveira,^a Isabella P. Ferreira,^a Angel A. Recio Despaigne,^b Jeferson G. da Silva,^c Ana Carolina S. Vieira,^d Mariana S Santos,^d Magna S. Alexandre-Moreira,^d Renata Diniz^a and Heloisa Beraldo^{a*}

Received 22 November 2018

Accepted 27 January 2019

Edited by A. R. Kennedy, University of Strathclyde, Scotland

Keywords: antileishmanial activity; electrochemistry; imidazole; antiprotozoal activity; hydrazone; acetohydrazide; crystal structure.

CCDC references: 1893830; 1893829; 1893828; 1893827

Supporting information: this article has supporting information at journals.iucr.org/c

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil,

^bDepartamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, MG, Brazil, ^cDepartamento de Farmácia, Campus Governador Valadares, Universidade Federal de Juiz de Fora 35010173—Governador Valadares, MG, Brazil, and ^dLaFI—Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL 57072-900, Brazil. *Correspondence e-mail: heloisaberaldoufmg@gmail.com

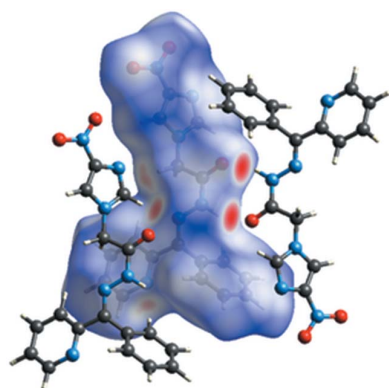
Three imidazole hydrazone compounds, namely 2-(4-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)-*N'*-[1-(pyridin-2-yl)ethylidene]acetohydrazide, C₁₂H₁₂N₆O₃, (**1**), 2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)-*N'*-[1-(pyridin-2-yl)ethylidene]acetohydrazide, C₁₂H₁₂N₆O₃, (**2**), and 2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)-*N'*-[(phenyl)(pyridin-2-yl)methylidene]acetohydrazide, C₁₇H₁₄N₆O₃, (**3**), were obtained and fully characterized, including their crystal structure determinations. While all the compounds proved not to be cytotoxic to J774.A1 macrophage cells, (**1**) and (**3**) exhibited activity against *Leishmania chagasi*, whereas (**2**) was revealed to be inactive. Since both (**1**) and (**3**) exhibited antileishmanial effects, while (**2**) was devoid of activity, the presence of the acetyl or benzoyl groups was possibly not a determining factor in the observed antiprotozoal activity. In contrast, since (**1**) and (**3**) are 4-nitroimidazole derivatives and (**2**) is a 2-nitroimidazole-derived compound, the presence of the 4-nitro group probably favours antileishmanial activity over the 2-nitro group. The results suggested that further investigations on compounds (**1**) and (**3**) as bio-reducible antileishmanial prodrug candidates are called for.

1. Introduction

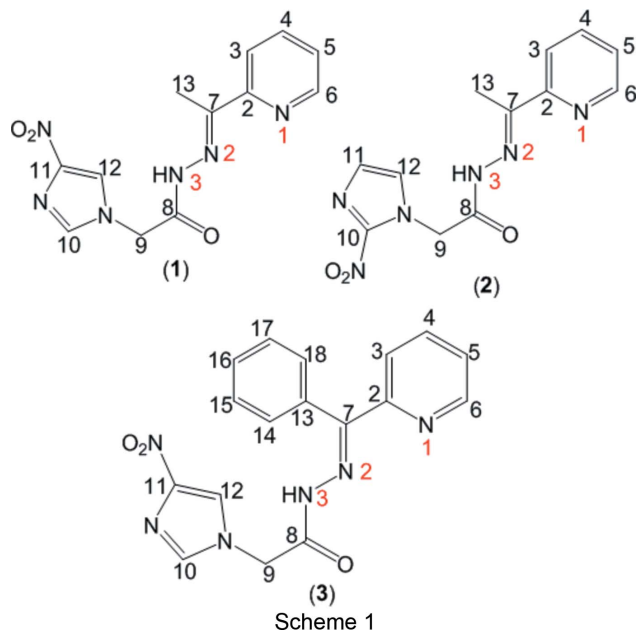
Neglected Tropical Diseases (NTDs) are a group of diseases that are prevalent in tropical and subtropical regions, causing social and economic damage. These diseases are considered neglected by lack of funding, research and concern by health authorities (Engelman *et al.*, 2016; WHO, 2015). Among the NTDs, leishmaniasis is a complex of diseases caused by different species of the genus *Leishmania*, which are endemic in 98 countries. In the most severe form, leishmaniasis can lead to death (WHO, 2013, 2014). It is estimated that around 20 to 40 thousand people die each year from leishmaniasis and that 400 million are at risk of developing the disease (Alvar *et al.*, 2012; WHO, 2013).

Currently, pentavalent antimonials are the drugs of choice for the treatment of all forms of leishmaniasis, followed by amphotericin B and pentamidine salts. All these therapies have a high cost, adverse side effects and varied therapeutic response (Amato *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2015; WHO, 2014).

The activity of nitroimidazole-derived compounds as anti-protozoal agents is well established (Trunz *et al.*, 2011). Fexinidazole (or 1-methyl-2-[[4-(methylsulfonyl)phenoxy]methyl]-5-nitro-1*H*-imidazole; Hoe 239) has been rediscovered by the Drugs for Neglected Disease Initiative (DNDi) and is now



being considered for the treatment of Chagas disease and human African trypanosomiasis. Its leishmanicidal activity and preliminary preclinical profile as a candidate for the treatment of visceral leishmaniasis have been investigated (Wyllie *et al.*, 2012).



Hydrazones are a class of compounds which show numerous bioactivities as antimicrobial (Popiołek, 2017), anticancer (Despaigne *et al.*, 2012), anti-inflammatory (Bispo Júnior *et al.*, 2011) and antiparasitic agents (Romero & López, 2017). 4-Chloro-1-phthalazinylaryl- and heteroarylhydrazones exhibit potent activity against *Leishmania braziliensis* (Romero *et al.*, 2017).

In previous work, we demonstrated that secnidazole-derived hydrazones and thiosemicarbazones present potent antimicrobial activity against pathogenic anaerobic bacteria (Oliveira *et al.*, 2018).

In the present work, a family of compounds containing the nitroimidazole and hydrazone pharmacophoric groups was synthesized, namely 2-(4-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)-*N'*-[1-(pyridin-2-yl)ethylidene]acetohydrazide, H2Ac4NO₂Im, (**1**), 2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)-*N'*-[1-(pyridin-2-yl)ethylidene]acetohydrazide, H2Ac2NO₂Im, (**2**), and 2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)-*N'*-[(phenyl)(pyridin-2-yl)methylidene]acetohydrazide, H2Bz4NO₂Im, (**3**) (Scheme 1). Structural studies on these compounds, as well as an investigation of their antileishmanial activities and their cytotoxic effects on J774.A1 macrophage cells, were carried out.

2. Experimental

2.1. Materials and methods

All common chemicals were purchased from Aldrich and were used without further purification. Partial elemental analyses were performed on a PerkinElmer CHN 2400 analyzer. IR spectra were recorded on a PerkinElmer FT-IR 1000 spectrometer using KBr pellets (4000–400 cm⁻¹). NMR

spectra were obtained with a Bruker DPX-200 Advance (200 MHz) spectrometer using DMSO-*d*₆ as the solvent and tetramethylsilane (Me₄Si) as the internal reference.

2.2. Synthesis and crystallization

The title hydrazones were prepared by reacting equimolar amounts (1 mmol) of 2-acetylpyridine or 2-benzoylpyridine with 2-nitroimidazole-1-carbohydrazide or 4-nitroimidazole-1-carbohydrazide in methanol (10 ml), with the addition of three drops of acetic acid as catalyst. The reaction mixtures were kept under reflux for 4 h. After cooling to room temperature, the obtained solids were filtered off, washed with methanol and ethyl ether, and dried under reduced pressure.

2.2.1. Analytical data for (1). White solid. Analysis calculated for C₁₂H₁₂N₆O₃ (%): C 50.11, H 4.03, N 29.15; found: C 50.00, H 4.20, N 29.15. M.p. 240.2–240.6 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(N–H) 3190; ν(C=O) 1686; ν(C=N) 1536; ν(N–O) 1488, 1336; ρ(py) 622. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 11.31, 11.03 [*s*, 1H, N(3)H], 8.14 (*d*, 1H, H3), 7.87 (*s*, 1H, H4), 7.43 (*t*, 1H, H5), 8.62 (*m*, 1H, H6), 5.53, 5.12 (*s*, 2H, H9), 8.39 (*s*, 1H, H10), 7.87 (*s*, 1H, H12), 2.42, 2.37 (*s*, 3H, H13). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 149.84 (C2), 124.19 (C3), 136.68 (C4), 120.17 (C5), 149.84 (C6), 154.69 (C7), 168.92 (C8), 49.31 (C9), 123.26 (C10), 146.71 (C11), 138.68 (C12), 12.05 (C13). Yield: 89%.

2.2.2. Analytical data for (2). White solid. Analysis calculated for C₁₂H₁₂N₆O₃ (%): C 50.21, H 4.46, N 29.17; found: C 50.00, H 4.20, N 29.15. M.p. 239.4–240.9 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(N–H) 3187; ν(C=O) 1686; ν(C=N) 1546; ν(N–O) 1495, 1377; ρ(py) 622. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 11.33, 11.11 [*s*, 1H, N(3)H], 8.14, 8.01 (*d*, 1H, H3), 7.86 (*t*, 1H, H4), 7.43 (*t*, 1H, H5), 8.61 (*d*, 1H, H6), 5.78, 5.39 (*s*, 2H, H9), 7.24 (*s*, 1H, H11), 7.69 (*s*, 1H, H12), 2.42, 2.38 (*s*, 3H, H13). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 145.27 (C2), 120.20 (C3), 136.67 (C4), 124.22 (C5), 148.68 (C6), 154.70, 154.70 (C7), 168.51, 163.40 (C8), 51.69 (C9), 150.02 (C10), 127.71 (C11), 128.71 (C12). Yield: 62%.

2.2.3. Analytical data for (3). White solid. Analysis calculated for C₁₇H₁₄N₆O₃ (%): C 57.45, H 4.04, N 24.09; found: C 58.28, H 4.03, N 23.99. M.p. 208.0–208.3 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν(N–H) 3196; ν(C=O) 1686; ν(C=N) 1540; ν(N–O) 1492, 1336; ρ(py) 624. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 12.45, 10.72, 10.58 [*s*, 1H, N(3)H], 8.20 (*d*, 1H, H3), 8.04, 7.97 (*m*, 1H, H4), 7.28 (*t*, 1H, H5), 8.85, 8.70, 8.48 (*d*, 1H, H6), 5.61, 5.04 (*s*, 2H, H9), 8.37 (*s*, 1H, H10), 7.85 (*s*, 1H, H12), 7.62–7.38 (*m*, 5H, H14/15/16/17/18). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 146.68 (C2), 121.38 (C3), 136.90, 136.76 (C4), 129.55, 129.22 (C5), 147.11, 146.68 (C6), 155.45, 155.06 (C7), 168.59, 168.43 (C8), 49.31, 48.97 (C9), 124.10, 123.21 (C10), 149.53, 148.97 (C11), 138.66, 138.07 (C12), 129.22–124.91 (C13/14/15/16/17/18). Yield: 65%.

2.3. Crystal structure determination

Crystal data, data collection and structure refinement details are summarized in Table 1. H atoms connected to C atoms were placed in idealized positions and treated using a rigid model, with $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2U_{\text{eq}}(\text{C})$ and C–H = 0.93 and 0.97 Å for aromatic CH and CH₂, respectively. The methyl H atoms [compounds (**1**) and (**2**)] were modelled as disordered

Table 1
Experimental details.

	(1)	(2)	(3a)	(3b)
Crystal data				
Chemical formula	C ₁₂ H ₁₂ N ₆ O ₃	C ₁₂ H ₁₂ N ₆ O ₃	C ₁₇ H ₁₄ N ₆ O ₃	C ₁₇ H ₁₄ N ₆ O ₃
<i>M_r</i>	288.28	288.28	350.34	350.34
Crystal system, space group	Monoclinic, <i>P2₁/c</i>	Monoclinic, <i>I2/a</i>	Monoclinic, <i>P2₁/c</i>	Triclinic, <i>P$\bar{1}$</i>
Temperature (K)	270	270	270	270
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	5.9284 (4), 13.6918 (7), 16.0601 (12)	12.189 (1), 18.7185 (11), 12.4701 (9)	13.1965 (5), 14.0718 (6), 8.9747 (5)	5.8656 (4), 10.3304 (12), 13.7224 (16)
α , β , γ (°)	90, 96.721 (7), 90	90, 106.612 (8), 90	90, 92.596 (4), 90	74.736 (10), 88.725 (8), 87.006 (8)
<i>V</i> (Å ³)	1294.65 (15)	2726.4 (4)	1664.88 (13)	801.04 (15)
<i>Z</i>	4	8	4	2
Radiation type	Mo <i>K</i> α	Mo <i>K</i> α	Mo <i>K</i> α	Mo <i>K</i> α
μ (mm ⁻¹)	0.11	0.11	0.10	0.11
Crystal size (mm)	0.42 × 0.28 × 0.06	0.41 × 0.08 × 0.02	0.25 × 0.19 × 0.12	0.18 × 0.13 × 0.07
Data collection				
Diffractometer	Rigaku Xcalibur Gemini ultra diffractometer with an Atlas detector	Rigaku Xcalibur Gemini ultra diffractometer with an Atlas detector	Rigaku Xcalibur Gemini ultra diffractometer with an Atlas detector	Rigaku Xcalibur Gemini ultra diffractometer with an Atlas detector
Absorption correction	Multi-scan (<i>CrysAlis PRO</i> ; Rigaku OD, 2015)	Multi-scan (<i>CrysAlis PRO</i> ; Agilent, 2014)	Multi-scan (<i>CrysAlis PRO</i> ; Rigaku OD, 2015)	Multi-scan (<i>CrysAlis PRO</i> ; Agilent, 2014)
<i>T_{min}</i> , <i>T_{max}</i>	0.666, 1.000	0.807, 1.000	0.778, 1.000	0.859, 1.000
No. of measured, independent and observed [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)] reflections	8641, 2653, 2015	9783, 2786, 1955	26042, 3410, 2323	5468, 3273, 2094
<i>R_{int}</i>	0.027	0.036	0.051	0.032
(sin θ/λ) _{max} (Å ⁻¹)	0.625	0.625	0.625	0.625
Refinement				
<i>R</i> [<i>F</i> ² > 2σ(<i>F</i> ²)], <i>wR</i> (<i>F</i> ²), <i>S</i>	0.041, 0.113, 1.05	0.044, 0.119, 1.05	0.047, 0.134, 1.04	0.060, 0.166, 1.04
No. of reflections	2653	2786	3410	3273
No. of parameters	215	203	235	211
No. of restraints	0	0	0	6
H-atom treatment	H atoms treated by a mixture of independent and constrained refinement	H atoms treated by a mixture of independent and constrained refinement	H-atom parameters constrained	H-atom parameters constrained
$\Delta\rho_{\max}$, $\Delta\rho_{\min}$ (e Å ⁻³)	0.16, -0.21	0.19, -0.20	0.15, -0.18	0.37, -0.44

Computer programs: *CrysAlis PRO* (Rigaku OD, 2015), *SHELXS2017* (Sheldrick, 2015a), *SHELXL2017* (Sheldrick, 2015b), *Mercury* (Macrae *et al.*, 2008), *ORTEP-3 for Windows* (Farrugia, 2012), *WinGX* (Farrugia, 2012) and *publCIF* (Westrip, 2010).

over two sites. For amine groups, riding models with N–H = 0.86 Å and *U*_{iso}(H) = 1.2*U*_{eq}(N) were applied. Characterizations using Hirshfeld surfaces and fingerprint plots were carried out using *CrystalExplorer* (Turner *et al.*, 2017). The surfaces are shown transparent to allow a clear view of the molecules and the interaction environment of the crystals. The fingerprint plots are displayed in the standard 0.4–3.0 Å range for the *d_e* and *d_i* axes.

2.4. Electrochemistry studies

Cyclic voltammetry experiments were carried out at room temperature by means of a conventional three-electrode cell (with a volumetric capacity of 10 ml) in a μAutolab type II potentiostat (Echo Chemie, Utrecht, the Netherlands) using the *GPES* (Version 4.9; <https://www.ecochemie.nl/>) software. The working electrode was a Metrohm glassy carbon electrode, the auxiliary electrode was a platinum wire and Ag/AgCl, Cl⁻ (3.0 M) was used as the reference electrode. The glassy carbon electrode was previously fine-polished with 0.3 μm alumina slurry on a polishing felt for 10 min. Solutions

for analysis were prepared in spectroscopic dimethylformamide (DMF) containing 1 mM of analyte and 0.1 M of tetrabutylammonium perchlorate (TBAP) as the supporting electrolyte. Before recording the voltammograms, the test solution was thoroughly purged with high-purity nitrogen gas to remove any traces of dissolved oxygen. Cyclic voltammograms were recorded in the 1.00 to -2.50 V potential range using a 250 mV s⁻¹ scan rate.

2.5. Evaluation of the cytotoxic activity against macrophage cells and of the antileishmanial effects of compounds (1)–(3)

2.5.1. Macrophage culture. J774.A1 lineage macrophages were maintained in culture bottles containing 10 ml of RPMI medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 2 mM L-glutamine, non-essential amino acids and pyruvate. For the experiments, cells were counted, adjusted in RPMI medium supplemented with 10% FBS and then plated on a 96-well plate.

2.5.2. Macrophage viability assay. The MTT {3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide} tetra-

zolium reduction assay was used for the study of cell viability of macrophages (Mosmann, 1983; Hussain *et al.*, 1993). J774A.1 macrophages were plated in 96-well plates for 1 h (5×10^4 per well) and exposed to different concentrations of diluted compounds in supplemented RPMI (0.1, 1, 10 and $100 \mu\text{M}$) medium for 24 h in an incubator at 37°C and 5% CO_2 humid atmosphere. Cells cultivated with culture medium and cells cultured in the presence of the vehicle used in the dilution of the compounds (0.1% DMSO) were used as controls. After the incubation period, the supernatant was discarded and then $100 \mu\text{l}$ of the MTT solution (0.5 mg ml^{-1}) were added. The plates were again incubated for 1 h at 37°C and 5% CO_2 , after which the supernatant was removed and $100 \mu\text{l}$ of DMSO P.A. added to solubilize the MTT (formazan) metabolism product. The spectrophotometric reading was performed at 550 nm. The cell viability in the wells treated with the different compounds was compared to the death standard obtained from the control cultures.

2.5.3. Macrophage infection with *Leishmania chagasi*. Macrophages from the J774A.1 lineage were plated in a 24-well plate containing 13 mm-diameter glass coverslips at 5×10^4 cells/well using RPMI medium. The cells were then incubated for 1 h at 37°C and 5% CO_2 humid atmosphere for cell adherence. For macrophage infection, promastigotes of *L. chagasi* were used in the proportion 10 parasites to 1 macrophage. A 6 h period was required for the infection of the cells, incubated at 37°C and 5% CO_2 humid atmosphere. After infection, the macrophages were 'washed' with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) for removal of the nonphagocytized parasites. Infected macrophages were cultured within RPMI supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 2 mM non-essential amino acids and 2 mM pyruvate, in the presence or absence of a $10 \mu\text{M}$ concentration of the compounds, and were kept for 24 h in an incubator at 37°C and a 5% CO_2 atmosphere. After this culture period, the wells containing the coverslips were washed with PBS and the cells were fixed with ice-methanol and stained with Giemsa-May-Grünwald. The infection evaluation was performed by observing the number of infected macrophages and the number of amastigotes in 100 macrophages. Cell counting was performed using a $100\times$ objective (immersion) optical microscope (Nunes *et al.*, 2005).

2.6. Assessment of the antileishmanial effect of compounds (1)–(3) with promastigote culture

The parasites from Gonçalo Moniz Research Center–Fiocruz–BA, assigned by Dr Valéria de Matos Borges (MCAN/BR/89/BA262), were used to perform the culture of *L. chagasi* promastigotes. Promastigotes were maintained *in vitro* in Schneider's medium supplemented with 10% FBS and 2% male human urine at 27°C in a Biochemical Oxygen Demand (BOD) incubator. For the experiments, the parasites were placed in Falcon tubes and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Subsequently, the supernatant was discarded and the pellet which formed was resuspended in Schneider's medium. The parasites were then counted in a Neubauer chamber for plating and subsequent assays.

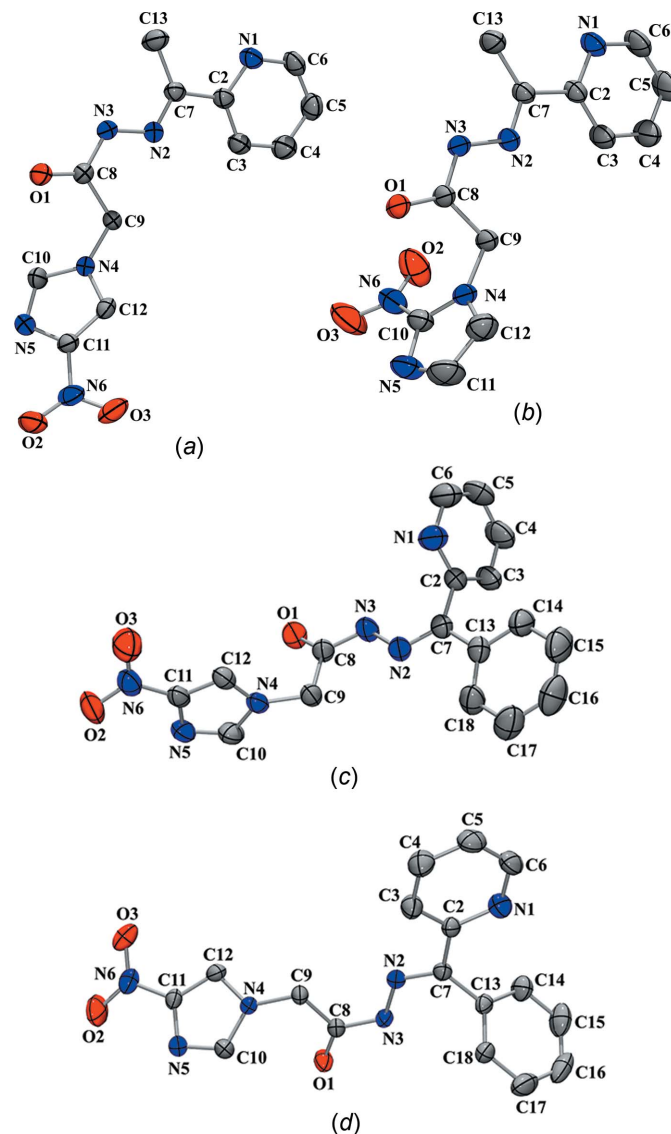


Figure 1
The molecular structures of (a) $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{NO}_2\text{Im}$, (1), (b) $\text{H}_2\text{Ac}_2\text{NO}_2\text{Im}$, (2), (c) $(Z)\text{-H}_2\text{Bz}_4\text{NO}_2\text{Im}$, (3a), and (d) $(E)\text{-H}_2\text{Bz}_4\text{NO}_2\text{Im}$, (3b), showing the labelling schemes of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.

3. Results and discussion

Microanalyses and IR and NMR spectra were compatible with the formation of $\text{H}_2\text{Ac}_4\text{NO}_2\text{Im}$, (1), $\text{H}_2\text{Ac}_2\text{NO}_2\text{Im}$, (2), and $\text{H}_2\text{Bz}_4\text{NO}_2\text{Im}$, (3). In the IR spectra of the hydrazones, the $\nu(\text{C}=\text{N})$ vibrational mode was observed at $1546\text{--}1536 \text{ cm}^{-1}$, while the $\nu(\text{C}=\text{O})$ absorption was observed at 1686 cm^{-1} and the in-plane deformation mode of the pyridine ring was found at $624\text{--}622 \text{ cm}^{-1}$ (Despaigne *et al.*, 2010).

The NMR spectra of the hydrazones were recorded in $\text{DMSO-}d_6$. The ^1H resonances were assigned on the basis of chemical shifts, multiplicities and by using 2D homonuclear $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ correlation spectroscopy (COSY). The carbon type (C or CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT135) experiments and the assignments were made by 2D heteronuclear multiple

Table 2
Selected bond lengths (Å) and angles (°) in the structures of **(1)**, **(2)**, **(3a)** and **(3b)**.

Bond/angle	H2Ac4NO ₂ Im, (1)	H2Ac2NO ₂ Im, (2)	(<i>E</i>)-H2Bz4NO ₂ Im, (3a)	(<i>Z</i>)-H2Bz4NO ₂ Im, (3b)
O1—C8	1.2219 (18)	1.2219 (19)	1.218 (2)	1.226 (3)
O3—N6	1.2273 (19)	1.210 (2)	1.228 (2)	1.235 (3)
O2—N6	1.225 (2)	1.214 (2)	1.226 (2)	1.224 (3)
N3—C8	1.3471 (19)	1.3381 (19)	1.346 (2)	1.349 (3)
N3—N2	1.3738 (17)	1.3744 (18)	1.372 (2)	1.373 (3)
N2—C7	1.2814 (19)	1.2806 (19)	1.285 (2)	1.289 (3)
C7—C2	1.486 (2)	1.488 (2)	1.494 (3)	1.472 (3)
C8—N3—N2	118.87 (12)	118.27 (13)	118.84 (14)	117.5 (2)
N2—N3—H3N	120.6	120.9	120.6	121.2
C10—N4—C12	106.68 (13)	105.05 (14)	107.09 (15)	107.5 (2)
C7—N2—N3	119.24 (13)	118.58 (13)	118.41 (15)	119.6 (2)
O2—N6—O3	124.08 (15)	123.90 (19)	124.02 (18)	124.1 (3)
C6—N1—C2	117.44 (15)	117.27 (16)	116.76 (19)	120.0
N2—C7—C2	114.94 (13)	114.37 (14)	124.35 (17)	114.2 (2)

quantum coherence (HMOC) and heteronuclear multiple bond coherence (HMBC) experiments.

Duplicated signals were observed in the ¹H NMR spectra of the hydrazones. The N3—H signals at δ 11.31 and 11.03 for **(1)**, 11.33 and 11.11 for **(2)**, and 10.72 and 10.52 for **(3)** are in accordance with the presence of the *Z* (88, 90, 45%) and *E* (12, 10, 42%) configurational isomers in DMSO-*d*₆ solution (Despaigne *et al.*, 2009). In the spectrum of **(3)**, an additional signal of N3—H at δ 10.58 was attributed to the presence of the enol form (13%) in equilibrium with the keto tautomer. For **(3)**, three signals of H6 were observed in the ¹H NMR spectrum at δ 8.85, 8.70 and 8.48, attributed to the *Z*, *E* and enol forms, while duplicated signals were noticed for atoms C4, C5, C6, C7 and C8 in the ¹³C NMR spectrum, in accordance with the presence of *Z* and *E* configurational isomers.

3.1. Crystal structure determination

Crystals of H2Ac4NO₂Im, **(1)**, H2Ac2NO₂Im, **(2)**, and (*Z*)-H2Bz4NO₂Im **(3a)**, were obtained from the mother liquor in

the syntheses, and crystals of (*E*)-H2Bz4NO₂Im, **(3b)**, were obtained by slow evaporation of the compound in DMSO-*d*₆. A summary of the crystal data, data collection and refinement details for **(1)**–**(3)** is listed in Table 1. The atom arrangements and atom-numbering schemes are shown in Fig. 1. Selected bond lengths and angles for the title compounds are given in Table 2.

H2Ac4NO₂Im, **(1)**, and (*Z*)-H2Bz4NO₂Im, **(3a)**, crystallized in the monoclinic space group *P*2₁/*c*, with four molecules per unit cell (*Z* = 4). H2Ac2NO₂Im, **(2)**, crystallized in the monoclinic space group *I*2/*a* (*Z* = 8) and (*E*)-H2Bz4NO₂Im, **(3b)**, crystallized in the triclinic space group *P* $\bar{1}$ (*Z* = 2).

Hydrazones **(1)**, **(2)** and **(3b)** adopt the *E* configuration, while **(3a)** adopts the *Z* configuration in the crystal. The C8=O1 and C7=N2 bond lengths [1.2219 (18) and 1.2814 (19) Å, respectively, in **(1)**; 1.2219 (19) and 1.2806 (19) Å in **(2)**; 1.218 (2) and 1.285 (2) Å in **(3a)**; and 1.226 (3) and 1.289 (3) Å in **(3b)**] are characteristic of C=O and C=N double bonds. The N2—N3 bond lengths of 1.3738 (17), 1.3744 (18), 1.372 (2) and 1.373 (3) Å in **(1)**, **(2)**,

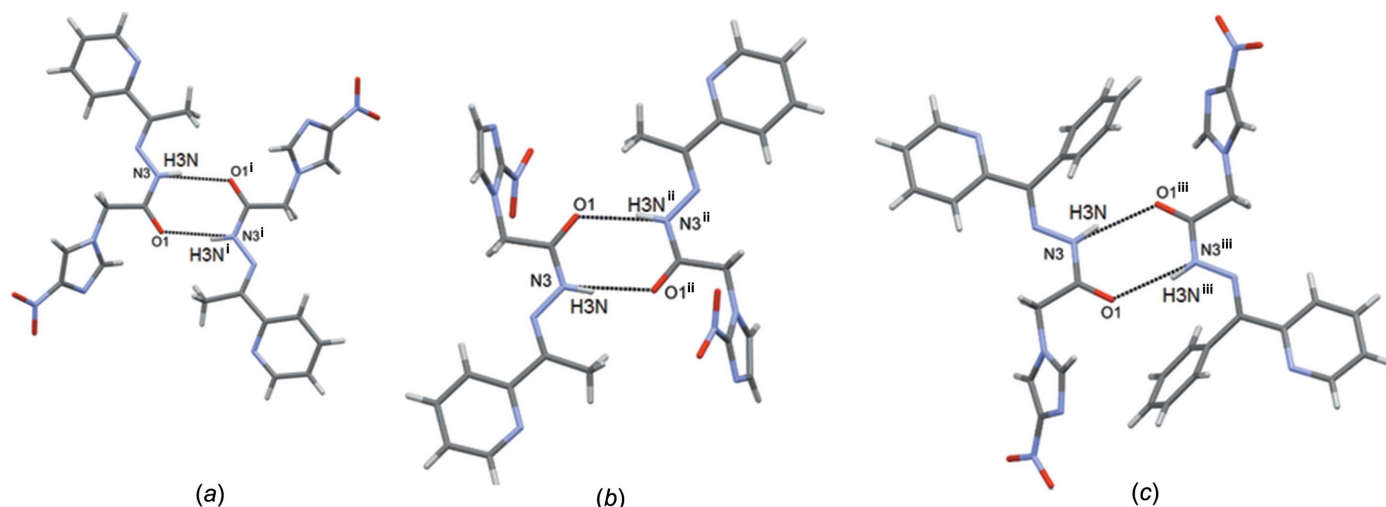


Figure 2
Intermolecular N—H...O interactions in the crystal packing of (a) H2Ac4NO₂Im, **(1)**, (b) H2Ac2NO₂Im, **(2)**, and (c) (*E*)-H2Bz4NO₂Im, **(3b)**. [Symmetry codes: (i) $-x, -y, -z + 1$; (ii) $-x + 1, -y, -z + 1$; (iii) $-x + 2, -y, -z$.]

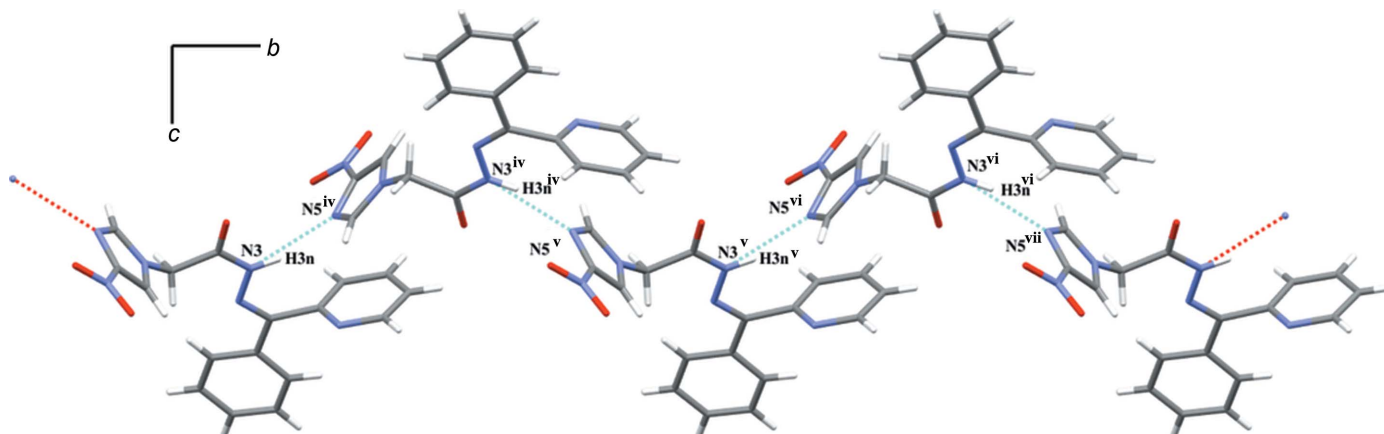


Figure 3

$N\cdots N$ intermolecular interactions in the crystal packing of (*Z*)-H₂Bz₄NO₂Im, (**3a**), along the *a* axis. [Symmetry codes: (iv) $-x + 1, y + \frac{1}{2}, -z + \frac{1}{2}$; (v) $x, y + 1, z$; (vi) $-x + 1, y - \frac{1}{2}, -z + \frac{1}{2}$; (vii) $x, y - 1, z$.]

(**3a**) and (**3b**), respectively, are intermediate between single N—N and double N=N bonds. This effect probably results from the π -delocalization in the hydrazone skeleton. The bond lengths are similar to those reported in the literature for hydrazones of the same type (Dias *et al.*, 2015).

The hydrazone [CC(O)NNC] skeleton is essentially planar in all the structures, with an r.m.s. deviation from the C7/N2/N3/C8/O1/C9 least-squares plane of 0.0142 Å in (**1**), 0.0184 Å in (**2**), 0.0201 Å in (**3a**) and 0.0390 Å in (**3b**).

The *E* conformation in H₂Ac₄NO₂Im, (**1**), H₂Ac₂NO₂Im, (**2**), and H₂Bz₄NO₂Im, (**3b**), is stabilized by a strong intermolecular N—H \cdots O interaction [$N3\cdots O1^i = 2.9166$ (16) Å and $N3-H3N\cdots O1^i = 165^\circ$] [symmetry code: (i) $-x, -y, -z + 1$] in (**1**), $N3\cdots O1^{ii} = 2.8754$ (17) Å and $N3-H3N\cdots O1^{ii} = 164^\circ$] [symmetry code: (ii) $-x + 1, -y, -z + 1$] in (**2**), and $N3\cdots O1^{iii} = 2.994$ (3) Å and $N3-H3N\cdots O1^{iii} = 162^\circ$] [symmetry code: (iii) $-x + 2, -y, -z$] in (**3b**). These inter-

actions lead to the formation of dimeric structural arrangements (Fig. 2). In the crystal packing of (*Z*)-H₂Bz₄NO₂Im, (**3a**), the intermolecular N3—H \cdots N5 interaction [$N3\cdots N5^{iv} = 3.009$ (2) Å and $N3-H3N\cdots N5^{iv} = 160^\circ$; symmetry code: (iv) $-x + 1, y + \frac{1}{2}, -z + \frac{1}{2}$], results in a zigzag structural arrangement, with the formation of chains along the crystallographic *b* axis (Fig. 3). Nonclassical intermolecular C—H \cdots N and C—H \cdots O interactions are also observed in the crystal packings of (**1**), (**2**), (**3a**) and (**3b**).

The Hirshfeld surfaces (Spackman & Jayatilaka, 2009) and fingerprint plots (Spackman & McKinnon 2002) for all the title compounds have been generated and analyzed (Fig. 4). In all the compounds, the closest contact (red region in Fig. 4a) in the Hirshfeld surfaces are observed for N—H \cdots O in (**1**), (**2**) and (**3b**), and for N—H \cdots N in (**3a**). The fingerprint analysis of these surfaces show that hydrogen bonds are responsible for around 31% of the close contacts in the Hirshfeld surfaces for

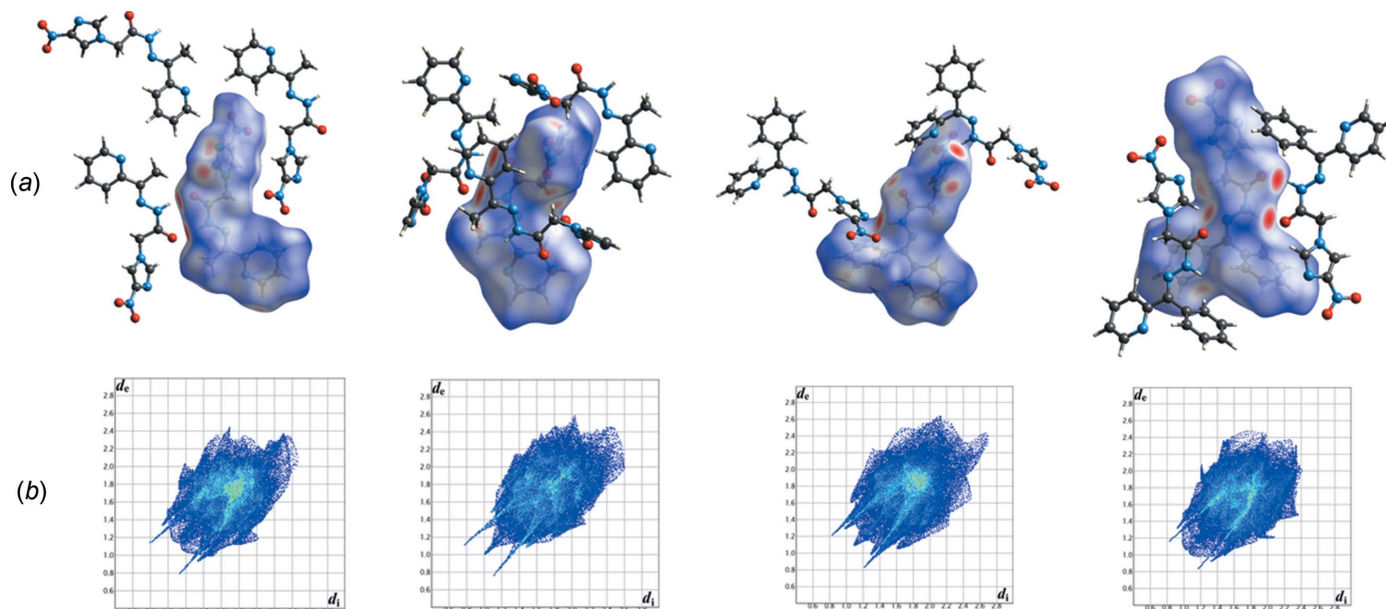


Figure 4

(a) Hirshfeld surfaces and (b) fingerprint plots for (**1**), (**2**), (**3a**) and (**3b**), shown left to right.

Table 3

Cyclic voltammetry parameters^a corresponding to the $R-\text{NO}_2/R-\text{NO}_2^{\cdot-}$ couple for compounds (1)–(3) versus the Ag/AgCl, Cl^- (3.0 M) reference electrode.

Compound ^b	E_{pIC} (mV)	ΔE_1 (mV)	$I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}}$
(1)	−1203	83	0.58
(2)	−1025	105	0.90
(3)	−1162	95	0.53
Metronidazole	−1160	—	—
Benznidazole	−1019	—	—

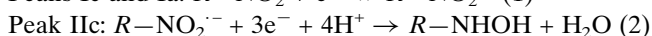
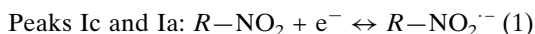
Notes: (a) scan rate of 250 mV s^{−1}; (b) compounds at 1 mM dissolved in DMF using 0.1 M of TBAP as the supporting electrolyte.

compounds (1) and (2), 25% for (3b) (H···O contacts) and 13% for (3a) (H···N contacts). These interactions are displayed in fingerprint plots at smaller distances of d_i (closest internal distance from a given point on the Hirshfeld surface) and d_e (closest external distance from a given point on the Hirshfeld surface), forming a symmetric distribution. The nondirectional H···H contacts and the conventional hydrogen bonds are responsible for more than half of the interactions in the crystals [around 60% for compounds (1), (2) and (3a), and 56% for (3b)]. The C···H and H···C contacts exhibit the characteristic wing pattern only in the fingerprint plots of compounds (1) and (3b), indicating that C–H··· π interactions are significant in these compounds (Clausen *et al.*, 2011).

3.2. Electrochemistry studies

Nitroimidazoles are prodrugs that require bioactivation by reduction of the nitro group in the intracellular environment in order to exert their pharmacological effect. The formation of the nitro anion radical is presumed to trigger a series of reduction steps, resulting in the production of nitroso, hydroxylamine and amine metabolites (Fig. 5), which interact with different biomolecules, including DNA, proteins and lipids (Ang *et al.*, 2017; Miyamoto *et al.*, 2013).

Compounds (1) and (3) exhibited a process with $E_{\text{pIC}} = -1200$ mV, while (2) exhibits a process with $E_{\text{pIC}} = -1020$ mV, corresponding to a quasi-reversible monoelectronic transfer with the formation of $R-\text{NO}_2^{\cdot-}$. These values are similar to those reported for the bioreducible drugs metronidazole (Livertoux *et al.* 1996) and benznidazole (Bollo *et al.*, 2001). The cyclic voltammograms also showed a reversible reduction at −2500 mV attributed to the formation of hydroxylamine. The remaining processes were attributed to redox effects occurring in the Schiff base skeleton (Table 3).



3.3. Cytotoxic activity against J774 macrophages

The cell-viability assay of the title compounds on macrophages J774A.1 showed no toxicity at the highest assayed concentration (100 μM), whereas pentamidine, used as the positive control, proved to be cytotoxic, with $\text{IC}_{50} =$

Table 4

Cell viability (toxicity) on macrophages J774A.1 in the MTT assay after 24 h.

Treatment	J774A.1 macrophage IC_{50} (μM) ^a	Maximum cytotoxicity (%) ^b
Pentamidine	44.1±0.4	93.2±0.8*
	>100	16.02±1.24
	>100	18.09±2.73
	>100	18.60±2.73

The results refer to: (a) the 50% lethal concentration of macrophages (LC_{50}) calculated by concentration–toxic response curves; (b) mean \pm standard error of the mean maximum cytotoxicity in triplicate of a representative experiment. The maximum effect values were considered significant when (*) $p < 0.001$ compared to the 0.1% DMSO group.

Table 5

Effect of compounds (1)–(3) on the intracellular forms of *Leishmania chagasi* amastigotes at 10 μM after 24 h of treatment.

Treatment	Maximum effect (%)
Glucantime	49.75±2.25*
Pentamidine	NA > 10
(1)	83.67±2.75*
(2)	NA > 10
(3)	45.23±2.82*

The results refer to: maximum effect (ME), which is expressed as a mean of the maximum cytotoxicity \pm standard error of the mean in triplicate of a representative experiment. The values were considered significant when (*) $p < 0.001$ compared to the 0.1% DMSO group. NA means the substance showed no significant lethal activity over *L. chagasi* amastigotes up to the concentration of 10 μM in relation to the DMSO group.

44.1±0.4 μM and a maximum cytotoxicity of 93.2±0.8% (Table 4). Hence, despite the structural differences between the compounds, unlike pentamidine, none of the derivatives presented cytotoxicity towards the mammalian cells.

3.4. Antileishmanial activity

Structural differences in the nitroimidazole group (2-nitroimidazole or 4-nitroimidazole) have a considerable influence on the antileishmanial activity. Only (1) and (3) showed statistically significant activity on intracellular amastigote forms of *L. chagasi* (Table 5), while (2) proved to be inactive at the assayed concentration (10 μM). In fact, compound (1) presented a maximum effect of 83.67±2.75% and (3) exhibited a maximum effect of 45.22±2.82%. Since both (1) and (3) are 4-nitroimidazole derivatives, while (2) is a 2-nitroimidazole hydrazone, this structural change probably results in the decreased antileishmanial effect.

4. Conclusions

Structural studies revealed that H2Ac4NO₂Im, (1), and H2Ac2NO₂Im, (2), crystallized in the *E* configuration, while

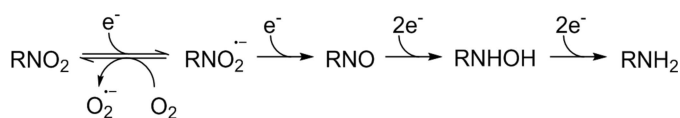


Figure 5

Bio-reductive processes of nitroimidazole compounds involving the production of the nitro anion radical and of the nitroso, hydroxylamine and amine species.

H2Bz4NO₂Im, (**3**), crystallized in both the *Z*, (**3a**), and *E*, (**3b**), configurations. Interestingly, NMR data indicated the predominance of the *Z* isomer in DMSO-*d*₆ for both (**1**) and (**2**), while for (**3**), the two isomers are present in equivalent amounts.

Hirshfeld surface and fingerprint plot analyses indicated that in all the compounds the H···H and H···O interactions are responsible for crystal packing stabilization.

Despite the structural differences between the compounds, unlike pentamidine, none of the derivatives presented cytotoxicity towards mammalian macrophage cells. In contrast, compounds (**1**) and (**3**) exhibited antileishmanial effects against *L. chagasi*, whereas (**2**) proved to be inactive under the experimental conditions, suggesting that the presence of the 4-nitroimidazole group (but not the 2-nitroimidazole group) might be a determining factor for the pharmacological effect. Since (**2**) was devoid of activity while both (**1**) and (**3**) proved to exhibit antileishmanial effects, the presence of the acetyl or benzoyl groups was possibly not a determining factor for the observed antileishmanial activity.

In addition, the results indicated that, in the case of (**1**) and (**3**), reduction of the nitro group to form the nitro anion radical occurs with $E_{\text{pic}} = -1203$ and 1162 mV, respectively, while in the case of (**2**), this process takes place at $E_{\text{pic}} = -1.025$ mV.

The literature reports that the position of the nitro group strongly influences the pharmacological profile of bioreducible nitroimidazole derivatives (Squella *et al.*, 2006). In addition, protozoa and mammals show distinct capacities for the reduction of nitroimidazole compounds (Edwards, 1993a,b), which might explain why none of the title compounds presented toxicity towards macrophage cells.

In conclusion, (**1**) and (**3**) or their analogues deserve to be investigated further as bioreducible antileishmanial prodrug candidates. Studies involving a greater number of compounds are needed in order to establish structure–activity relationships.

Funding information

Funding for this research was provided by: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant No. 988573.364/2008-6); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

References

Agilent (2014). *CrysAlis PRO*. Agilent Technologies Ltd, Yarnton, Oxfordshire, England.

Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M. & WHO Leishmaniasis Control Team (2012). *PLoS One*, **7**, e35671.

Amato, V. S., Tuon, F. F., Siqueira, A. M., Nicodemo, A. C. & Neto, V. A. (2007). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**, 266–274.

Ang, C. W., Jarrad, A. M., Cooper, M. A. & Blaskovich, M. A. T. (2017). *J. Med. Chem.* **60**, 7636–7657.

Bollo, S., Núñez-Vergara, L. J., Bontá, M., Chauviere, G., Périé, J. & Squella, J. A. (2001). *J. Electroanal. Chem.* **511**, 46–54.

Clausen, H. F., Chen, Y.-S., Jayatilaka, D., Overgaard, J., Koutsantonis, G. A., Spackman, M. A. & Iversen, B. B. (2011). *J. Phys. Chem. A*, **115**, 12962–12972.

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

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

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

Dias, L. C., de Lima, G. M., Pinheiro, C. B., Rodrigues, B. L., Donnici, C. L., Fujiwara, R. T., Bartholomeu, D. C., Ferreira, R. A., Ferreira, S. R., Mendes, T. A. O., da Silva, J. G. & Alves, M. R. A. (2015). *J. Mol. Struct.* **1079**, 298–306.

Edwards, D. I. (1993a). *J. Antimicrob. Chemother.* **31**, 9–20.

Edwards, D. I. (1993b). *J. Antimicrob. Chemother.* **31**, 201–210.

Engelman, D., Fuller, L. C., Solomon, A. W., McCarthy, J. S., Hay, R. J., Lammie, P. J. & Steer, A. C. (2016). *Trends Parasitol.* **32**, 843–854.

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

Hussain, R. F., Nouri, A. M. & Oliver, R. T. (1993). *J. Immunol. Methods*, **160**, 89–96.

Júnior, W. B., Alexandre-Moreira, M. S., Alves, M. A., Perez-Rebolledo, A., Parrilha, G. L., Castellano, E. E., Piro, O. E., Barreiro, E. J., Lima, L. M. & Beraldo, H. (2011). *Molecules*, **16**, 6902–6915.

Livertoux, M. H., Lagrange, P. & Minn, A. (1996). *Brain Res.* **725**, 207–216.

Machado, P. R., Rosa, M. E., Guimarães, L. H., Prates, F. V., Queiroz, A., Schriefer, A. & Carvalho, E. M. (2015). *Clin. Infect. Dis.* **61**, 945–949.

Macrae, C. F., Bruno, I. J., Chisholm, J. A., Edgington, P. R., McCabe, P., Pidcock, E., Rodriguez-Monge, L., Taylor, R., van de Streek, J. & Wood, P. A. (2008). *J. Appl. Cryst.* **41**, 466–470.

Miyamoto, Y., Kalisiak, J., Korthals, K., Lauwaet, T., Cheung, D. Y., Lozano, R., Cobo, E. R., Upcroft, P., Upcroft, J. A., Berg, D. E., Gillin, F. D., Fokin, V. V., Sharpless, K. B. & Eckmann, L. (2013). *Proc. Natl Acad. Sci.* **110**, 17564–17569.

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

Nunes, M. P., Cysne-Finkelstein, L., Monteiro, B. B., de Souza, D. M., Gomes, N. A. & DosReis, G. A. (2005). *Microbes Infect.* **7**, 78–85.

Oliveira, A. A., Oliveira, A. P. A., Franco, L. L., Ferencs, M. O., Ferreira, J. F. G., Bachi, S. M. P. S., Speziali, N. L., Farias, L. M., Magalhães, P. P. & Beraldo, H. (2018). *Biomaterials*, **31**, 571–584.

Popiolek, Ł. (2017). *Med. Chem. Res.* **26**, 287–301.

Rigaku OD (2015). *CrysAlis PRO*. Rigaku Oxford Diffraction, Yarnton, Oxfordshire, England.

Romero, A. H. & López, S. E. (2017). *J. Mol. Graph. Model.* **76**, 313–329.

Romero, A. H., Medina, R., Alcalá, A., García-Marchan, Y., Núñez-Duran, J., Leañez, J., Mijoba, A., Ciangherotti, C., Serrano-Martín, X. & López, S. E. (2017). *Eur. J. Med. Chem.* **127**, 606–620.

Sheldrick, G. M. (2015). *Acta Cryst.* **C71**, 3–8.

Spackman, M. A. & Jayatilaka, D. (2009). *CrystEngComm*, **11**, 19–32.

Spackman, M. A. & McKinnon, J. J. (2002). *CrystEngComm*, **4**, 378–392.

Squella, J. A., Campero, A., Maraver, J. & Carbajo, J. (2006). *Electrochim. Acta*, **52**, 511–518.

Trunz, B. B., Jędrzyśiak, R., Tweats, D., Brun, R., Kaiser, M., Suwiński, J. & Torrelee, E. (2011). *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 1524–1535.

Turner, M. J., McKinnon, J. J., Wolff, S. K., Grimwood, D. J., Spackman, P. R., Jayatilaka, D. & Spackman, M. A. (2017). *CrystalExplorer*. Version 17. University of Western Australia. <http://crystalexplorer.scb.uwa.edu.au/>.

Westrip, S. P. (2010). *J. Appl. Cryst.* **43**, 920–925.

WHO (2013). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases, http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/.

WHO (2014). Strategic framework for leishmaniasis control in the WHO European Region 2014–2020, <http://www.euro.who.int/en/publications/abstracts/strategic-framework-for-leishmaniasis-control-in-the-who-european-region-20142020-2014>.

WHO (2015). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO report on neglected tropical diseases, http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564861/en/.

Wyllie, S., Patterson, S., Stojanovski, L., Simeons, F. R. C., Norval, S., Kime, R., Read, K. D. & Fairlamb, A. H. (2012). *Sci. Transl. Med.* **4**, 119–126.



Cite this: DOI: 10.1039/c9nj02676b

Investigation of the antitrypanosomal effects of 2-formyl-8-hydroxyquinoline-derived hydrazones and their antimony(III) and bismuth(III) complexes†

Ana Paula A. Oliveira,^a Angel A. Recio-Despaigne,^b Isabella P. Ferreira,^a Renata Diniz,^a Karoline A. F. Sousa,^{cd} Tanira M. Bastos,^{ibcd} Milena B. Pereira Soares,^c Diogo Rodrigo M. Moreira^{ibc} and Heloisa Beraldo^{ib*^a}

In the present work 8-hydroxyquinoline-derived hydrazones were obtained, namely 2-formyl-8-hydroxyquinoline-4-nitroimidazolhydrazone (H₂Q4NO₂Im) (**H₂La**, **1**) and 2-formyl-8-hydroxyquinoline-4-nitrobenzenehydrazone (H₂Q4NO₂Ph·H₂O) (**H₂Lb**, **2**), as well as their antimony(III) [Sb(L)Cl₂] (**3**, **4**) and bismuth(III) [Bi(L)Cl₂] (**5**, **6**) complexes. The cytotoxic concentration range of the compounds was first determined in non-infected human and mouse cells. Furthermore, their antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, was evaluated. While **H₂Lb** (**2**) was inactive, **H₂La** (**1**) and complexes **3–6** inhibited *T. cruzi* trypomastigotes with EC₅₀ values ranging from 0.06 to 30.05 μM. Complex **3** proved to be as potent as the reference drug benznidazole whereas complexes **4–6** were more potent than benznidazole as antiparasitic agents. The antimony(III) (**4**, EC₅₀ = 0.33 μM) and bismuth(III) (**6**, EC₅₀ = 0.06 μM) complexes presented the highest activities against the extracellular parasites. As expected, complexes **4** and **6** also exhibited the highest anti-*T. cruzi* activity against the amastigote form, with EC₅₀ values of 3.05 and 2.31 μM, respectively. Investigation of the mode of action of complex **6** on trypomastigotes suggested the occurrence of cell death by necrosis.

Received 23rd May 2019,
Accepted 11th October 2019

DOI: 10.1039/c9nj02676b

rsc.li/njc

Introduction

Chagas disease is a neglected disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae). It is estimated that about 6 to 7 million people live with Chagas disease worldwide, mainly in Latin America, where it is endemic in 21 countries.¹ Since the end of the 1960s and the beginning of the 1970s nifurtimox and benznidazole have been used for the treatment of Chagas disease.² However, both drugs cause severe side effects and are mostly effective during the acute phase of the disease.³ Moreover, strains resistant to these drugs have already been reported.⁴ In spite of several studies aiming to develop efficient antiparasitic drugs, an ideal treatment for Chagas disease is still lacking. Different approaches have been

used for drug discovery against trypanosomatids, including target-based approaches, compound repositioning and phenotypic screening, which involves screening for growth inhibitors directly against an intact parasite.⁵

8-Hydroxyquinoline (8-HQ) is considered as a privileged structure in medicinal chemistry.⁶ In fact, 8-HQ and its derivatives present a wide spectrum of pharmacological applications as antimicrobial, antineoplastic, anti-neurodegenerative, anti-inflammatory⁷ and antioxidant⁸ agents. Some of the therapeutic effects of these compounds are believed to rely on metal coordination.⁷ We demonstrated that antimony(III) complexes with 8-HQ derivatives present antitrypanosomal activity.⁹

Functionalization of the 8-HQ scaffold with different groups leading to bioactive derivatives is reported in the literature.¹⁰ In previous studies some of us carried out the syntheses of 8-HQ-derived Schiff bases which showed promise for modulating copper- α B peptide interactions, believed to take part in the development of Alzheimer's disease.¹¹

In the modes of action of both nifurtimox and benznidazole the nitro group is supposed to undergo bio-reduction generating the nitro anion radical, which is highly toxic to the parasite.¹² In previous studies we demonstrated that 4-nitrobenzaldehyde- and 4-nitroacetophenone thiosemicarbazones and their copper(II) and ruthenium(II) complexes exhibit potent antitrypanosomal

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil. E-mail: hberaldo@ufmg.br

^b Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, MG, Brazil

^c Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, 40296-710, Salvador, BA, Brazil

^d Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, 40290-000, Salvador, BA, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available: NMR and IR spectra of all compounds, the thermogravimetric curve of **H₂Lb** (**2**) and data on the crystal packing of complex **4a**. CCDC 1912682 (**4a**). For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c9nj02676b

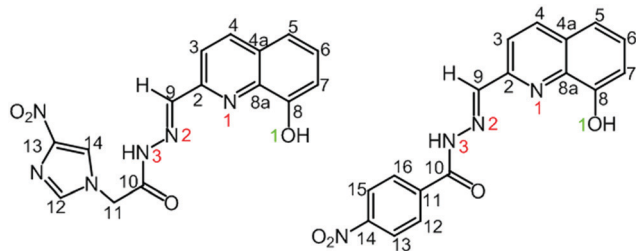


Fig. 1 Structural representations of 2-formyl-8-hydroxyquinoline-4-nitroimidazolhydrazone (H₂Q4NO₂Im) (H₂La, **1**) and 2-formyl-8-hydroxyquinoline-4-nitrobenzenehydrazone (H₂Q4NO₂Ph) (H₂Lb, **2**).

effects^{13,14} and that nitroimidazole-derived hydrazones and their metal complexes exhibit antimicrobial effects.¹⁵ Hence, in the present work functionalization of 8-HQ with the 4-nitroimidazole or 4-nitrobenzene pharmacophoric groups attached to a hydrazone chelating system was carried out (Fig. 1).

Antimony-based drugs are used in the therapy of parasitic leishmaniasis. In addition, antimony(III) complexes present antimicrobial,¹⁶ antineoplastic¹⁷ and antiparasitic¹⁸ effects. Bismuth(III) complexes were also shown to exhibit anti-protozoal,¹⁹ antimicrobial and antitumor activities.^{20,21}

In order to investigate the antiparasitic activities of 8-HQ derivatives, antimony(III) and bismuth(III) complexes with the novel 8-HQ-derived hydrazones were obtained, and the compounds under study were evaluated for their antitrypanosomal effects.

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. Molar conductivities (Λ_M) were measured using a YSI model 31 conductivity bridge. Partial elemental analyses were performed on a PerkinElmer 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 using a Bruker DPX-400 Advance (400 MHz) spectrometer using DMF-*d*₇ as the solvent and TMS as the internal reference. Thermogravimetric curves were obtained using a TGA50H thermobalance (Shimadzu) in the 25–600 °C temperature range under a dynamic nitrogen atmosphere at a heating rate of 10 °C min⁻¹.

Single crystal X-ray diffraction measurements were carried out on an Oxford-Rigaku Diffraction GEMINI-A Ultra diffractometer (LabCri-UFMG) using graphite-enhance source Mo K α radiation ($\lambda = 0.71073$ Å) at 270(2) K. Data collection, cell refinements, data reduction and analytical absorption corrections were performed using the CrysAlis Pro software package.²² The structure of complex **4a** was solved using SUPERFLIP.²³ The full-matrix least-squares refinement procedure on F^2 with anisotropic thermal parameters was carried out using SHELXL-2018/3.²⁴ Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all non-hydrogen atoms. The hydrogen atoms bound to carbon and nitrogen atoms were refined using a riding model.

Table 1 Crystal data and refinement parameters for complex **4a**

Complex	[Sb(HQ4NO ₂ Ph)(DMF)Cl ₂] \cdot 3DMF (4a)
Molecular formula	C ₂₅ H ₃₉ Cl ₂ N ₈ O ₈ Sb
Molecular mass (g mol ⁻¹)	820.33
Temperature (K)	270(2)
Radiation (MoK α) (Å)	0.71073
Crystal system, space group	Triclinic, P $\bar{1}$
<i>a</i> (Å); <i>b</i> (Å); <i>c</i> (Å)	9.5820(5); 12.0943(6); 16.3348(8)
α (°); β (°); γ (°)	102.036(4); 100.383(4); 93.829(4)
Volume (Å ³)/Z	1810.32(16), 2
Density (Mg m ⁻³)	1.505
μ (mm ⁻¹)	0.967
<i>F</i> (000)	836
Crystal size (mm)	0.48 × 0.06 × 0.03
θ range (°)	1.92–30.51
<i>hkl</i> range	–13 \leftarrow <i>h</i> \leftarrow 13 –17 \leftarrow <i>k</i> \leftarrow 17 –23 \leftarrow <i>l</i> \leftarrow 23
Measured reflections/unique/ <i>R</i> _{int}	21 771/11 054 [<i>R</i> (int) = 0.0336]
Complete $\theta = 26.37^\circ$	100.0%
Data/restraints/parameters	11 054/2/456
<i>S</i> (goodness-of-fit on F^2)	1.045
Statistic parameters [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ = 0.0394. w <i>R</i> ₂ = 0.0782
Statistic parameters [all]	<i>R</i> ₁ = 0.0647. w <i>R</i> ₂ = 0.0906
$\Delta\rho$ min/max (e Å ⁻³)	0.636 and –0.690

The molecular plots were prepared using ORTEP-3 for Windows,²⁵ Pov-Ray²⁶ and Mercury.²⁷ A summary of the crystal data, data collection details and refinement results for the compound is listed in Table 1.

Syntheses of 2-formyl-8-hydroxyquinoline-4-nitroimidazolhydrazone (H₂Q4NO₂Im) (H₂La, **1) and 2-formyl-8-hydroxyquinoline-4-nitrobenzenehydrazone (H₂Q4NO₂Ph·H₂O) (H₂Lb, **2**).** Hydrazones were obtained by mixing equimolar amounts (1 mmol) of 8-hydroxyquinoline carbaldehyde with 4-nitroimidazole hydrazide or 4-nitrobenzene hydrazide in methanol, with addition of 3 drops of acetic acid as the catalyst. The reaction mixture was kept under reflux for 4 hours. The obtained solids were filtered off, washed with cold methanol and diethyl ether, and dried under reduced pressure.

Syntheses of complexes 3–6. Complexes 3–6 were obtained by mixing equimolar amounts (1 mmol) of the desired hydrazone with SbCl₃ or BiCl₃ in methanol. The reaction mixture was kept under reflux for 24 h. The obtained solids were filtered off, washed with cold methanol and diethyl ether, and dried under reduced pressure.

2-Formyl-8-hydroxyquinoline-4-nitroimidazolhydrazone (H₂Q4NO₂Im) (H₂La, **1).** Yellow solid. Anal. calc. for C₁₅H₁₂N₆O₄ (FW = 340.29 g mol⁻¹): C, 52.94; H, 3.55; N, 24.70. Found: C, 52.41; H, 3.67; N, 24.48. Fusion point: 272.0–272.8 °C. IR (KBr, cm⁻¹): ν (N–H) 3127; ν (O–H) 3254; ν (C=O) 1679; ν (C=N) 1533; ν_{as} , ν_s (N–O₂) 1489–1331; ρ (py) 720. δ ¹H NMR (DMF-*d*₇): 12.08 (s, 1H, N(3)H), 9.82 (s, 1H, O1H), 8.50 (d, 1H, H12), 8.44 (s, 1H, H4), 8.37 (s, 1H, H9), 8.21 (d, 1H, H3), 8.01 (s, 1H, H14), 7.54 (t, 1H, H6), 7.49 (d, 1H, H5), 7.22 (d, 1H, H7), 5.75 (s, 2H, H11). δ ¹³C NMR (DMF-*d*₇): 169.5 (C10), 154.9 (C8), 152.6 (C13), 148.5 (C2), 146.0 (C9), 139.8 (C8a), 139.4 (C14), 137.8 (C4), 130.2 (C4a), 129.6 (C6), 124.1 (C12), 119.0 (C5), 118.7 (C3), 112.9 (C7), 50.1 (C11). Yield: 95%.

2-Formyl-8-hydroxyquinoline-4-nitrobenzenehydrazone (H₂Q4NO₂Ph·H₂O) (H₂Lb, **2).** Yellow solid. Anal. calc. for C₁₇H₁₄N₄O₅ (FW = 354.32 g mol⁻¹): C, 57.63; H, 3.98; N, 15.85. Found: C, 57.05;

H, 4.10; N, 15.46. Fusion point: 237.1–238.0 °C. IR (KBr, cm^{-1}): $\nu(\text{N-H})$ 3242; $\nu(\text{O-H})$ 3370; $\nu(\text{C=O})$ 1648; $\nu(\text{C=N})$ 1558; $\nu_{\text{as}}, \nu_{\text{s}}(\text{N-O}_2)$ 1522–1330; $\rho(\text{py})$ 712. $\delta^1\text{H NMR}$ (DMF- d_7): 12.57 (s, 1H, N(3)H), 9.83 (s, 1H, O1H), 8.79 (d, 1H, H9), 8.45 (m, 3H, H4, 13, 15), 8.32 (d, 2H, H12, 16), 8.24 (d, 1H, H3), 7.54 (t, 1H, H6), 7.49 (d, 1H, H5), 7.21 (d, 1H, H7). $\delta^{13}\text{C NMR}$ (DMF- d_7): 163.3 (C10), 154.8 (C8), 153.0 (C14), 150.2 (C9), 140.3 (C2), 139.5 (C8a), 137.7 (C4), 130.4 (C12, 16), 130.3 (C4a), 129.7 (C6), 124.8 (C13, 15), 119.1 (C3, 5), 112.9 (C7). Yield: 82%.

[2-Formyl-8-hydroxyquinoline-4-nitroimidazolhydrazone-dichloro]antimony(m) [Sb(HQ4NO₂Im)Cl₂] (3). Red solid. Anal. calc. For $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{Sb}$ (FW = 531.95 g mol^{-1}): C, 33.87; H, 2.08; N, 15.80. Found: C, 33.75; H, 2.03; N, 15.27. Decomposition at 252 °C. Molar conductivity (1.0×10^{-3} mol L^{-1} DMF): 8.81 $\text{cm}^2 \Omega^{-1} \text{mol}^{-1}$. IR (KBr, cm^{-1}): $\nu(\text{N-H})$ 3157; $\nu(\text{C=O})$ 1716; $\nu(\text{C=N})$ 1545; $\nu_{\text{as}}, \nu_{\text{s}}(\text{N-O}_2)$ 1490–1336; $\rho(\text{py})$ 748. $\delta^1\text{H NMR}$ (DMF- d_7): 13.49 (s, 1H, N(3)H), 8.95 (d, 1H, H4), 8.93 (s, 1H, H9), 8.54 (s, 1H, H12), 8.29 (d, 1H, H3), 8.03 (s, 1H, H14), 7.73 (t, 1H, H6), 7.51 (d, 1H, H5), 7.26 (d, 1H, H7), 5.46 (s, 2H, H11). $\delta^{13}\text{C NMR}$ (DMF- d_7): 165.9 (C10), 158.5 (C8), 148.6 (C2), 147.1 (C13), 142.8 (C9), 142.2 (C4), 139.7 (C14), 132.4 (C8a), 131.4 (C6), 124.7 (C4a), 123.8 (C3), 123.6 (C12), 117.0 (C5), 116.9 (C7), 50.0 (C11). Yield: 88%.

[2-Formyl-8-hydroxyquinoline-4-nitrobenzenehydrazone-dichloro]antimony(m) [Sb(HQ4NO₂Ph)Cl₂] (4). Red solid. Anal. calc. For $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_4\text{Sb}$ (FW = 527.96 g mol^{-1}): C, 37.40; H, 2.40; N, 10.26. Found: C, 37.42; H, 2.34; N, 9.76. Decomposition at 271 °C. Molar conductivity (1.0×10^{-3} mol L^{-1} DMF): 15.18 $\text{cm}^2 \Omega^{-1} \text{mol}^{-1}$. IR (KBr, cm^{-1}): $\nu(\text{N-H})$ 3345; $\nu(\text{C=O})$ 1688; $\nu(\text{C=N})$ 1540; $\nu_{\text{as}}, \nu_{\text{s}}(\text{N-O}_2)$ 1523–1349; $\rho(\text{py})$ 743. $\delta^1\text{H NMR}$ (DMF- d_7): 13.72 (s, 1H, N(3)H), 9.16 (s, 1H, H9), 8.93 (d, 1H, H4), 8.47 (s, 2H, H13, 15), 8.43 (s, 2H, H12, 16), 8.33 (d, 1H, H3), 7.73 (t, 1H, H6), 7.51 (d, 1H, H5), 7.28 (d, 1H, H7). $\delta^{13}\text{C NMR}$ (DMF- d_7): 163.3 (C10), 158.5 (C8), 151.3 (C14), 147.1 (C2), 143.3 (C9), 142.7 (C4), 138.4 (C11), 132.4 (C6), 131.5 (C8a), 130.9 (C12, 16), 125.0 (C4a, 13, 15), 124.8 (C3, 5), 117.0 (C7). Yield: 81%.

[2-Formyl-8-hydroxyquinoline-4-nitroimidazolhydrazone-dichloro]bismuth(m) [Bi(HQ4NO₂Im)Cl₂] (5). Red solid. Anal. calc. For $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{BiCl}_2\text{N}_6\text{O}_4$ (FW = 619.17 g mol^{-1}): C, 29.10; H, 1.79; N, 13.57. Found: C, 29.20; H, 1.79; N, 13.33. Decomposition at 318 °C. Molar conductivity (1.0×10^{-3} mol L^{-1} DMF): 13.33 $\text{cm}^2 \Omega^{-1} \text{mol}^{-1}$. IR (KBr, cm^{-1}): $\nu(\text{N-H})$ 3156; $\nu(\text{C=O})$ 1698; $\nu(\text{C=N})$ 1546; $\nu_{\text{as}}, \nu_{\text{s}}(\text{N-O}_2)$ 1489–1338; $\rho(\text{py})$ 741. $\delta^1\text{H NMR}$ (DMF- d_7): 13.93 (s, 1H, N(3)H), 9.12 (s, 1H, H9), 8.94 (d, 1H, H4), 8.56 (s, 1H, H12), 8.37 (d, 1H, H3), 8.06 (s, 1H, H14), 7.74 (t, 1H, H6), 7.21 (d, 1H, H5), 6.93 (d, 1H, H7), 5.53 (s, 2H, H11). $\delta^{13}\text{C NMR}$ (DMF- d_7): 167.7 (C10), 163.3 (C8), 162.6 (C2), 148.7 (C13), 148.1 (C8a), 145.2 (C9), 142.0 (C4), 139.7 (C14), 134.1 (C4a), 133.5 (C6), 124.5 (C3), 123.8 (C12), 120.4 (C7), 115.0 (C5), 49.7 (C11). Yield: 91%.

[2-Formyl-8-hydroxyquinoline-4-nitrobenzenehydrazone-dichloro]bismuth(m) [Bi(HQ4NO₂Ph)Cl₂] (6). Red solid. Anal. calc. For $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{BiCl}_2\text{N}_4\text{O}_4$ (FW = 615.18 g mol^{-1}): C, 33.19; H, 1.80; N, 9.11. Found: C, 34.33; H, 1.86; N, 9.14. Decomposition at 303 °C. Molar conductivity (1.0×10^{-3} mol L^{-1} DMF): 10.12 $\text{cm}^2 \Omega^{-1} \text{mol}^{-1}$. IR (KBr, cm^{-1}): $\nu(\text{N-H})$ 3202; $\nu(\text{C=O})$ 1648; $\nu(\text{C=N})$ 1599;

$\nu_{\text{as}}, \nu_{\text{s}}(\text{N-O}_2)$ 1520–1333; $\rho(\text{py})$ 740. $\delta^1\text{H NMR}$ (DMF- d_7): 9.35 (s, 1H, H9), 8.98 (d, 1H, H4), 8.48 (m, 5H, H3, 12, 13, 15, 16), 7.72 (t, 1H, H6), 7.31 (d, 1H, H5), 7.05 (d, 1H, H7). Yield: 76%.

Biological activity

Parasites

All experiments were performed with the Y strain of *T. cruzi*. Trypomastigote forms of the parasite were obtained from the supernatant of infected LLC-MK2 cells and maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin–streptomycin (100 U mL^{-1}) (all from Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY, USA) at 37 °C with 5% CO_2 .

Activity against *T. cruzi*

The antiparasitic activities of the compounds under study were investigated against trypomastigotes and intracellular amastigotes using the protocol previously established by Bastos *et al.*²⁸ In brief, trypomastigotes (2×10^6 cells per mL) were incubated in 96-well plates in DMEM in the presence or absence (negative control) of the compounds at different concentrations, with a maximum concentration of 50 μM , and the plates were incubated for 24 hours. After this incubation period, the viable parasites (refringent and moving cells) were counted in a hemocytometer. The antiparasitic activity was expressed as 50% effective concentration (EC_{50}) in comparison to the untreated parasites.

T. cruzi infection assay

An *in vitro* parasite infection assay was performed using human primary skin fibroblasts (hFIB) obtained from patient skin biopsy, as well as in peritoneal macrophages isolated from BALB/c mice stimulated with 3% sodium thioglycolate (Sigma-Aldrich). All experiments were carried out in accordance with the recommendations of Ethical Issues Guidelines and were approved by the local Ethics Committee (Hospital São Rafael, CAAE: 20032313.6.0000.0048) and Animal Ethics Committee (Instituto Gonçalo Moniz, protocol number: 001/2015). hFIB (3×10^4 cells per mL) and peritoneal macrophages (5×10^5 cells per mL) were plated in 96-well plates and maintained overnight at 37 °C with 5% CO_2 . Cells were infected with trypomastigotes (10 parasites:1 host cell) for 24 hours. The culture was washed with saline solution in order to remove non-internalized parasites. Fresh medium was added, with or without (negative control) compounds at different concentrations, with a maximum concentration of 50 μM , and incubated for 72 hours. Cells were fixed and stained by the addition of 50 μL of a solution containing 4% paraformaldehyde and 4 μM Draq5 DNA dye (BioStatus, Shephed, UK) per well. The analysis was performed on an Operetta High Content Imaging System (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) confocal microscope using a 10x air objective. The percentage of intracellular parasites was determined and compared with the negative control, and the compounds' antiparasitic activities were also expressed as EC_{50} . Each compound concentration was tested in triplicate, and three independent experiments

were performed. The reference drug benznidazole was used as the positive control. Nonlinear regression analysis performed with GraphPad Prism version 5.01 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) was used to calculate EC_{50} values.

Mammalian cell toxicity

Cytotoxicity assays were carried out using hFIB and peritoneal macrophages. A volume of 100 μ L of hFIB (3×10^4 cells per mL) and peritoneal macrophages (5×10^5 cells per mL) was plated in 96-well plates and treated with the drugs for 72 h of incubation time. Following drug treatment, the cells were washed twice in saline solution, and the cell viability was determined by the Alamar Blue assay (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. After 24 h, colorimetric readings were performed at 570 and 600 nm. Fifty-percent cytotoxic concentration (CC_{50}) values were calculated using data points gathered from three independent experiments. Gentian violet (Synth, São Paulo, Brazil) was used as a positive control. Nonlinear regression analysis performed with GraphPad Prism version 5.01 (Graph Pad Software) was used to calculate CC_{50} values.

Flow cytometry analysis

Trypomastigotes (2×10^6 cells per mL) were resuspended in supplemented DMEM medium and treated with the compounds at 0.06 μ M for 6 hours. Parasites were labeled with propidium iodide (PI) and annexin V using the annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) apoptosis detection kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The experiment was performed using a BD LSR Fortessa SORP (San Jose, CA, USA) by acquiring 10 000 events, and the data were analyzed using FlowJo VX (Ashland, OR, USA).

Scanning electron microscopy studies

The parasites were cultured for 24 h in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) buffered to pH 7.5 and supplemented with HEPES (20 mM), 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U mL^{-1}), and streptomycin (100 μ g mL^{-1}), containing complex **6** at the EC_{50} concentration and twice the value of EC_{50} . The parasites were collected, washed in PBS and fixed with 2.5% glutaraldehyde, 4% formaldehyde, and 0.1 M cacodylate buffer at pH 6.8. They were then post-fixed in 2% osmium tetroxide (OsO_4) in a 0.1 M cacodylate buffer at pH 6.8 and processed for scanning electron microscopy (SEM). For SEM analysis, the parasites were dehydrated in graded ethanol and dried by the critical point method with CO_2 . The samples were mounted on aluminum stubs, coated with gold, and examined under a JEOL-5600LV microscope.

Results and discussion

Microanalyses and the 1H and ^{13}C NMR spectra are in accordance with the formation of $H_2Q_4NO_2Im$ (**H₂La, 1**) and $H_2Q_4NO_2Ph-H_2O$ (**H₂Lb, 2**). The crystallization water molecule in **2** was confirmed from its thermogravimetric curve, which shows a weight loss of

5.15% (calcd. 5.09%). Microanalyses and molar conductivity data are compatible with the formation of $Sb(HQ_4NO_2Im)Cl_2$ (**3**), $Sb(HQ_4NO_2Ph)Cl_2$ (**4**), $Bi(HQ_4NO_2Im)Cl_2$ (**5**) and $Bi(HQ_4NO_2Ph)Cl_2$ (**6**), in which an anionic hydrazone ligand is attached to the antimony(III) (**3, 4**) or bismuth(III) (**5, 6**) center together with two chloride ions.

Spectroscopic characterization

Infrared spectra. The absorption peaks assigned to the $\nu(O-H)$ vibration at 3254 cm^{-1} (**H₂La, 1**) and 3370 cm^{-1} (**H₂Lb, 2**) in the infrared spectra of the hydrazones are absent in the spectra of complexes **3–6**, due to deprotonation and coordination through the phenolate oxygen.^{9,29} The vibrations attributed to $\nu(N-H)$ at 3127 (**H₂La, 1**) and 3242 (**H₂Lb, 2**) cm^{-1} in the infrared spectra of the hydrazones shift to 3157 and 3345 cm^{-1} in the spectra of complexes **3** and **4**, respectively, and to 3156 and 3202 cm^{-1} in the spectra of **5** and **6**, respectively. The $\nu(C=N)$ vibrations at 1533 (**H₂La, 1**) and 1558 (**H₂Lb, 2**) cm^{-1} in the infrared spectra of the hydrazones shift to 1545 and 1540 cm^{-1} in the spectra of complexes **3** and **4** and to 1546 and 1599 cm^{-1} in complexes **5** and **6**, respectively, in agreement with the coordination of the azomethine nitrogen.³⁰ The $\nu(C=O)$ absorption observed at 1679 (**H₂La, 1**) and 1648 (**H₂Lb, 2**) cm^{-1} in the spectra of the free hydrazones shifts to 1716 and 1688 cm^{-1} in the spectra of complexes **3** and **4** and to 1698 and 1648 cm^{-1} in the spectra of **5** and **6**, respectively. The in-plane deformation mode of the pyridine ring at 712–720 cm^{-1} in the spectra of the uncomplexed hydrazones shifts to 748–740 cm^{-1} in complexes **3–6**, suggesting coordination of the hetero-aromatic nitrogen.³¹

NMR spectra. The NMR spectra of the hydrazones and their antimony(III) and bismuth(III) complexes were recorded in $DMF-d_7$. 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 attributed to N3-H at δ 12.08 (**H₂La, 1**) and δ 12.57 (**H₂Lb, 2**) in the 1HNMR spectra of the hydrazones shift to δ 13.49 and δ 13.72 in the spectra of **3** and **4** and to δ 13.93 in the spectrum of **5**. This signal is not observed in the spectrum of **6**, possibly due to deprotonation in solution.²⁰ The signals of the phenolic hydrogen at δ 9.82 (**H₂La, 1**) and δ 9.83 (**H₂Lb, 2**) are absent in the spectra of the complexes in accordance with deprotonation and coordination through the oxygen.⁹ The signals of all hydrogens in the quinoline rings undergo significant shifts on complexation.

Complex **6** was not soluble enough to allow recording of its ^{13}C NMR spectrum. The signals of C9 at δ 146.0 (**H₂La, 1**) and δ 150.2 (**H₂Lb, 2**) in the ^{13}C NMR spectra of the hydrazones shift to δ 142.8 (**3**), δ 143.3 (**4**) and to δ 145.2 (**5**), indicating coordination through the imine nitrogen. Similarly, the signals of C8 at δ 154.9 (**H₂La, 1**) and δ 154.8 (**H₂Lb, 2**) in the spectra of the hydrazones shift to δ 158.5 (**3**), δ 158.5 (**4**), and δ 163.4 (**5**), in accordance with coordination through the phenolate carbon. The signals of C10=O at δ 169.5 (**H₂La, 1**) and δ 163.3 (**H₂Lb, 2**)

in the spectra of the hydrazones are found at δ 165.9 (3), δ 163.3 (4), and δ 167.7 (5).

X-ray diffraction analyses

Crystals of $[\text{Sb}(\text{HQ4NO}_2\text{Ph})(\text{DMF})\text{Cl}_2]\cdot 3\text{DMF}$ (**4a**) were obtained by slow evaporation of a DMF- d_7 solution. Table 2 shows selected bond distances and angles in the crystal structure of complex **4a**.

$[\text{Sb}(\text{HQ4NO}_2\text{Ph})(\text{DMF})\text{Cl}_2]\cdot 3\text{DMF}$ (**4a**) crystallized in the triclinic system, $P\bar{1}$, with two molecules of the complex and six molecules of DMF per unit cell ($Z = 2$). The asymmetric unit corresponds to the molecular formula of the complex and three DMF molecules. The disordered C20 (methyl group) carbon atom belongs to a non-coordinated DMF molecule and presents an occupational value of 0.72 and 0.28 for each site.

In **4a** the anionic tridentate ligand is attached to the antimony(III) center through the quinoline oxygen and nitrogen atoms, and through the hydrazone imine nitrogen. The Sb1–O2 bond distance, 3.181(2) Å, is close to the sum of the van der Waals radii, 3.5 Å,³² indicating that the hydrazone oxygen is not coordinated to the metal, in accordance with the NMR data. The molecular structure of **4a** is displayed in Fig. 2.

Table 2 Selected bond distances and angles in the crystal structure of complex **4a**

Bond distance/Å		Bond angle/°	
Sb1–O1	2.0444(16)	O1–Sb1–N2	139.44(6)
Sb1–N2	2.7587(18)	N2–Sb1–N1	63.70(6)
Sb1–N1	2.2601(18)	N1–Sb1–Cl1	84.16(5)
Sb1–Cl1	2.5370(7)	N1–Sb1–Cl2	80.48(5)
Sb1–Cl2	2.6578(7)	N2–Sb1–Cl2	85.54(4)
Sb1–O11	2.5454(19)	N3–N2–Sb1	129.36(14)
N2–N3	1.357(3)	Cl1–Sb1–Cl2	164.54(3)
N1–C2	1.337(3)	C8–O1–Sb1	118.36(13)
O1–C8	1.338(3)	C9–N2–N3	118.53(19)
N2–C9	1.271(3)	C2–N1–Sb1	128.30(15)
N1–C8A	1.358(3)	O11–Sb1–N2	144.84(7)
C10–O2	1.210(3)	N2–N3–C10	118.68(19)
N3–C10	1.368(3)	O1–Sb1–N1	75.77(6)
		O1–Sb1–O11	75.63(7)

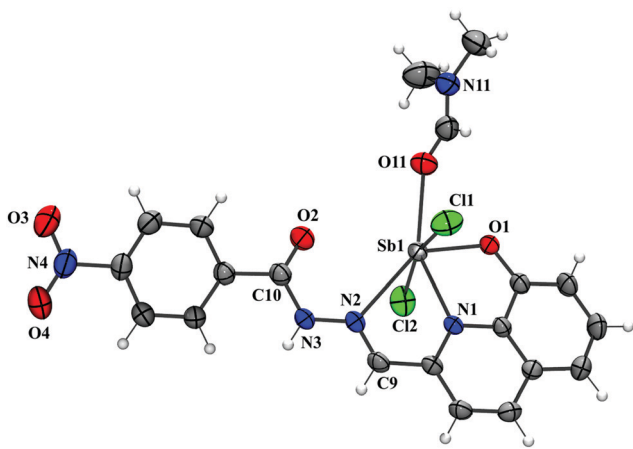


Fig. 2 Ortep representation of $[\text{Sb}(\text{HQ4NO}_2\text{Ph})(\text{DMF})\text{Cl}_2]\cdot 3\text{DMF}$ (**4a**). The H atoms and non-coordinated DMF molecules are omitted for clarity. The thermal ellipsoids are drawn with the 50% probability level.

The fragment of the molecule which corresponds to the hydrazone chelating system and the antimony(III) center is essentially planar with rms deviation from the plane formed by the Sb1, O1, C8, C8A, N1, C2, C9, and N2 plane of 0.0218 Å; the antimony atom deviates 0.00141 Å from this plane. The metal coordination sphere contains the tridentate hydrazone ligand, two chlorides, a DMF molecule and the antimony lone pair, in a “pseudo” pentagonal pyramidal geometry. The bond angles around the metal in the basal plane are O1–Sb1–N1 = 75.77(6)°, N2–Sb1–N1 = 63.70(6)°, O1–Sb1–O11 = 75.63(7)° and O11–Sb1–N2 = 144.84(7)°. The sum of these angles is 359.94°, close to the theoretical value of 360°, indicating a pseudo distorted pentagonal pyramidal geometry. The angles in the basal plane differ from 72°, the angle of a regular pentagonal pyramidal structure. Similarly, the Cl1–Sb1–Cl2 angle is 164.54(3)°, differing from 180°, in accordance with a distortion due to repulsion between the antimony lone pair and the electrons from the covalent Sb–L bonds and due to the formation of five membered rings involving antimony(III) and the O_{quinoline}–N_{quinoline}–N_{imine} chelating system.

The C10=O2, 1.210(3) Å, and C9=N2, 1.271(3) Å, distances are characteristic of double bonds [C=O (1.22 Å) and C=N (1.28 Å)]. The N2–N3 bond distance, 1.357(3) Å, is intermediate between a single N–N (1.45 Å) and a double N=N (1.25 Å) bond. The N3–C10 bond distance, 1.368(3) Å, is characteristic of a single bond. These values are in accordance with the fact that N3–H remains protonated in the complex.

Discussion of the crystal packing of complex **4a** is provided in the ESI.†

Biological activity

Cytotoxicity to mammalian cells. The cytotoxic activities in non-infected cells were assessed in human and mouse cells. No cytotoxicity was observed in hFIB when treated with **H₂La** (**1**) and its antimony (**3**) and bismuth (**5**) complexes. However, complex **5** was cytotoxic to mouse macrophages with $CC_{50} = 49.17 \mu\text{M}$. **H₂Lb** (**2**) was non-cytotoxic to hFIB while its antimony (**4**) and bismuth (**6**) complexes were cytotoxic against hFIB with a CC_{50} of 21.62 μM and 6.13 μM , respectively, and also against mouse macrophages with a CC_{50} of 10.30 μM and 5.71 μM , respectively (Table 3). Nonetheless, the observed concentration range of cytotoxicity to mammalian cells was acceptable for further assessing the antiparasitic activity of the compounds under study.

Antiparasitic activity. As shown in Table 3, **H₂Lb** (**2**) was the only compound that had no activity against trypanosomes, while all other compounds presented substantial antiparasitic activity. **H₂La** (**1**) and complexes **3–6** inhibited trypanosomes with EC_{50} values ranging from 0.06 to 30.05 μM . Complexes **4–6** were more potent as antiparasitic agents than benzimidazole (EC_{50} of 14.36 μM), while complex **3** was as potent as benzimidazole. The antimony (**4**) and bismuth (**6**) complexes with **H₂Lb** (**2**) presented the highest activities against the extracellular parasites, displaying EC_{50} values of 0.33 and 0.06 μM , respectively (Table 3).

Furthermore, the compounds were tested against the intracellular (amastigote) form of the parasite. All compounds reduced the ratio of infected macrophages, with EC_{50} values

Table 3 Antiparasitic and cytotoxic activities of the compounds

Compounds	EC ₅₀ ± SEM ^a (μM)		CC ₅₀ ± SEM ^a (μM)		SI ^e
	Trypomastigote	Infected MØ ^b	hFIB ^c	MØ ^d	
H ₂ La (1)	30.05 ± 1.21	14.98 ± 6.96	>100	>100	3 (>5)
H ₂ Lb (2)	NA	12.69 ± 0.91	>100	>100	(>7)
3	13.01 ± 4.52	13.76 ± 2.93	>100	>100	7 (>7)
4	0.33 ± 0.10	3.05 ± 0.49	21.62 ± 4.29	10.30 ± 0.35	31 (3)
5	1.21 ± 0.53	14.71 ± 4.63	>100	49.17 ± 2.05	40 (3)
6	0.06 ± 0.04	2.31 ± 0.17	6.13 ± 0.56	5.71 ± 1.11	95 (2)
Benznidazole	14.36 ± 3.81	1.43 ± 0.21	>100	>100	7 (>70)
GV	ND	ND	13.51 ± 3.21	0.4 ± 0.04	ND

^a Values were calculated based on at least three distinct experiments, performed in triplicate. SEM = mean standard error. ^b MØ = infected peritoneal macrophages. ^c hFIB = human fibroblasts. ^d MØ = non-infected peritoneal macrophages. ^e SI = selectivity index against trypomastigotes. In parentheses, selectivity index against infected macrophages. NA = not active at the maximum tested concentration (50 μM). ND = not determined. GV = gentian violet.

ranging from 2.31 to 14.98 μM. As expected, given their high activity against trypomastigote forms, complexes **4** and **6** presented also the highest anti-*T. cruzi* activity against the amastigote form, with EC₅₀ values of 3.05 and 2.31 μM, respectively (Table 3).

Since complex **6** had the highest activity against trypomastigotes, we investigated the mechanism of cell death induced by the compound. Trypomastigotes were incubated with **6** at a

concentration of 0.06 μM (EC₅₀ value) for 6 h at 37 °C, and then double labeled with annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) and propidium iodide (PI). Individual cellular data were acquired and analyzed by flow cytometry.

Untreated trypomastigotes showed 2.2% PI positive staining, while parasites treated with complex **6** showed 53.0% (Fig. 3). No annexin V positive staining was observed after treatment of parasites with **6**, suggesting that its antiparasitic effects occur with the induction of cell death by necrosis. In addition, it confirms the potent antiparasitic activity of **6** against trypomastigotes, since this assay was performed for 6 h of incubation time.

In order to investigate the effects of the compounds on the parasite morphology, the ultrastructural effects of **6** on trypomastigotes after 24 h were analyzed by SEM at the EC₅₀ and twice the EC₅₀ concentrations. The ultrastructural analysis showed shortening of the flagellum and membrane fragmentation while the control group retained its typical morphology (Fig. 4).

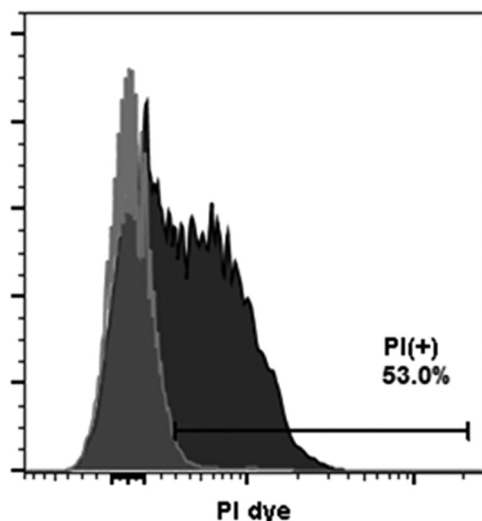


Fig. 3 Trypomastigote cell death analysis by flow cytometry. Histograms represent the population of trypomastigotes not treated (gray) and treated with 0.06 μM complex **6** (black) after 6 hours of incubation. After this period, cells treated with **6** presented 53.0% PI (+) cells, indicating that cell death was induced by necrosis.

Conclusions

In conclusion, in the present work we demonstrated that 2-formyl-8-hydroxyquinoline-4-nitroimidazolhydrazone (**H₂La**, **1**) shows anti-trypansomal effects and that upon coordination to both antimony(III) and bismuth(III) the antiparasitic activity increases, mainly for the bismuth(III) complex (**4**). 2-Formyl-8-hydroxyquinoline-4-nitrobenzenhydrazone (**H₂Lb**, **2**) proved to be active against amastigotes but inactive against trypomastigotes while its antimony(III) (**5**) and bismuth(III) (**6**) complexes were active against both forms of the parasite, with the bismuth(III) complex

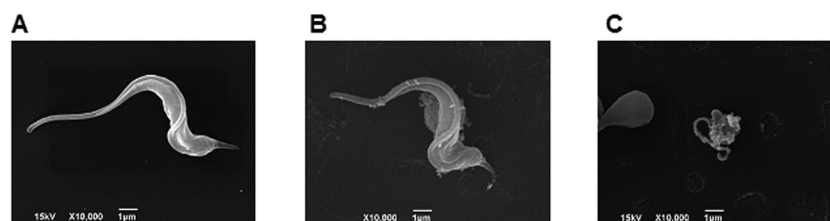


Fig. 4 Ultrastructural alterations in trypomastigotes visualized by SEM. Treatment of trypomastigotes with complex **6** induced membrane fragmentation and shortening of the flagellum. (A) No treatment; after treatment with complex **6** for 24 h at 0.06 μM (B) and 1 μM (C).

(6) being the most active. In all cases the bismuth(III) complexes showed the highest selectivity indexes against trypanosomes. Hence, 8-hydroxyquinoline-derived hydrazones and their antimony(III) and bismuth(III) complexes should be further investigated as an interesting platform for the development of new drugs and metal-based antitrypanosomal drug candidates.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.


Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge CNPq, CAPES, FAPEMIG, INCT-INOVAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6) and FAPESB (PRO-NEX, PNX0002/2014) for financial support and student grants.

References

- J. D. Stanaway and G. Roth, *Global Heart*, 2015, **10**, 139–144.
- J. R. Coura and S. L. Castro, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2002, **97**, 3–24.
- M. J. Field and E. L. Romero, *Nanomedicine*, 2015, **10**, 465–481.
- J. A. Urbina, *Acta Trop.*, 2010, **115**, 55–68.
- M. C. Field, D. Horn, A. H. Fairlamb, M. A. Ferguson, D. W. Gray, K. D. Read, M. Rycker, L. S. Torrie, P. G. Wyatt, S. Wyllie and I. H. Gilbert, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2017, **15**, 217–231.
- Y. Song, H. Xu, W. Chen, P. Zhan and X. Liu, *Med. Chem. Commun.*, 2015, **6**, 61–74.
- V. F. S. Pape, N. V. May, G. T. Gál, I. Szatmári, F. Szeri, F. Fülöp, G. Szakács and É. A. Enyedy, *Dalton Trans.*, 2018, **47**, 17032–17045.
- R. Cherdtrakulkiat, S. Boonpangrak, N. Sinthupoom, S. Prachayasittikul, S. Ruchirawat and V. Prachayasittikul, *Biochem. Biophys. Rep.*, 2016, **6**, 135–141.
- D. C. Reis, M. C. X. Pinto, E. M. Souza-Fagundes, L. F. Rocha, V. R. A. Pereira, C. M. L. Melo and H. Beraldo, *Biometals*, 2011, **24**, 595–601.
- V. Oliveri and G. Vecchio, *Eur. J. Med. Chem.*, 2016, **120**, 252–274.
- L. M. F. Gomes, R. P. Vieira, M. R. Jones, M. C. P. Wang, C. Dyrager, E. M. Souza-Fagundes, J. G. Da Silva, T. Storr and H. Beraldo, *J. Inorg. Biochem.*, 2014, **139**, 106–116.
- J. D. Maya, B. K. Cassels, P. Iturriaga-Vásquez, J. Ferreira, M. Faúndez, N. Galanti, A. Ferreira and A. Morello, *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.*, 2007, **146**, 601–620.
- A. Perez-Rebolledo, L. R. Teixeira, A. A. Batista, A. S. Mangrich, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. González, P. Hernández, A. M. Ferreira, N. L. Speziali and H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.*, 2008, **43**, 939–948.
- C. Rodrigues, A. A. Batista, J. Ellena, E. E. Castellano, D. Benítez, H. Cerecetto, M. González, L. R. Teixeira and H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 2847–2853.
- A. A. Oliveira, A. P. A. Oliveira, L. L. Franco, M. O. Ferencs, J. F. G. Ferreira, S. M. P. S. Bachi, N. L. Speziali, L. M. Farias, P. P. Magalhães and H. Beraldo, *Biometals*, 2018, **31**, 571–584.
- S. Bhatiya, H. P. S. Chauhan and N. Carpenter, *Appl. Organomet. Chem.*, 2018, **32**, 1–13.
- S. K. Hadjikakou, I. I. Ozturk, C. N. Banti, N. Kourkoumelis and N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.*, 2015, **153**, 293–305.
- B. Wang, W. Yu, J. Guo, X. Jiang, W. Lu, M. Liu and X. Pang, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2015, **352**, 129–138.
- Y. C. Ong, L. Kedzierski and P. C. Andrews, *Future Med. Chem.*, 2018, **10**, 1721–1733.
- I. P. Ferreira, E. D. L. Piló, A. A. Recio-Despaigne, J. G. Da Silva, 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.
- K. 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 and H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, **53**, 98–106.
- Rigaku Oxford Diffraction, CrysAlis Pro. Rigaku Corporation, Tokyo (Japan), 2015.
- L. Palatinus and G. Chapuis, *J. Appl. Crystallogr.*, 2007, **40**, 786–790; L. Palatinus, S. J. Prathapa and S. van Smaalen, *J. Appl. Crystallogr.*, 2012, **54**, 575–580.
- G. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. C: Struct. Chem.*, 2015, **71**, 3–8.
- L. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.*, 1997, **30**, 565.
- POV-Ray for windows – version 3.7.0.msvc10.win64 (1991–2013).
- C. F. Macrae, I. J. Bruno, J. A. Chisholm, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, J. Streek and P. A. Wood, *J. Appl. Crystallogr.*, 2008, **41**, 466–470.
- T. M. Bastos, H. M. Russo, N. S. Moretti, S. Schenkman, L. Marcourt, M. P. Gupta, J. L. Wolfender, E. F. Queiroz and M. B. P. Soares, *Molecules*, 2019, **24**, 1299–1312.
- K. S. O. Ferraz, D. C. Reis, J. G. Da Silva, E. M. Souza-Fagundes, E. J. Baran and H. Beraldo, *Polyhedron*, 2013, **63**, 28–35.
- A. A. Recio Despaigne, J. G. Da Silva, A. C. M. do Carmo, O. E. Piro, E. E. Castellano and H. Beraldo, *Inorg. Chim. Acta*, 2009, **362**, 2117–2122.
- A. F. Santos, I. P. Ferreira, C. B. Pinheiro, V. G. Santos, M. T. P. Lopes, L. R. Teixeira, W. R. Rocha, G. L. S. Rodrigues and H. Beraldo, *ACS Omega*, 2018, **3**, 7027–7035.
- A. Bondi, *J. Phys. Chem.*, 1964, **68**, 441–451.

5-Nitroimidazole-derived Schiff bases and their copper(II) complexes exhibit potent antimicrobial activity against pathogenic anaerobic bacteria

Alexandre A. Oliveira · Ana P. A. Oliveira · Lucas L. Franco · Micael O. Ferencs ·
João F. G. Ferreira · Sofia M. P. S. Bachi · Nivaldo L. Speziali ·
Luiz M. Farias · Paula P. Magalhães · Heloisa Beraldo 

Received: 27 February 2018 / Accepted: 23 April 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract In the present work a family of novel secnidazole-derived Schiff base compounds and their copper(II) complexes were synthesized. The antimicrobial activities of the compounds were evaluated against clinically important anaerobic bacterial strains. The compounds exhibited in vitro antibacterial activity against *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides ovatus*, *Parabacteroides distasonis* and *Fusubacterium nucleatum* pathogenic anaerobic bacteria. Upon coordination to copper(II) the antibacterial activity significantly increased in several cases. Some derivatives were even more active than the antimicrobial drugs secnidazole and metronidazole. Therefore,

the compounds under study are suitable for in vivo evaluation and the microorganisms should be classified as susceptible to them. Electrochemical studies on the reduction of the nitro group revealed that the compounds show comparable reduction potentials, which are in the same range of the bio-reducible drugs secnidazole and benzimidazole. The nitro group reduction potential is more favorable for the copper(II) complexes than for the starting ligands. Hence, the antimicrobial activities of the compounds under study might in part be related to intracellular bio-reduction activation. Considering the increasing resistance rates of anaerobic bacteria against a wide range of antimicrobial drugs, the present work constitutes an important contribution to the development of new antibacterial drug candidates.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10534-018-0106-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. A. Oliveira · A. P. A. Oliveira · L. L. Franco ·
M. O. Ferencs · S. M. P. S. Bachi · H. Beraldo (✉)
Departamento de Química, Universidade Federal de
Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil
e-mail: hberaldo@ufmg.br;
heloisaberaldo@gmail.com

J. F. G. Ferreira · L. M. Farias · P. P. Magalhães
Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de
Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

N. L. Speziali
Departamento de Física, Universidade Federal de Minas
Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

Keywords 5-Nitroimidazole · Copper(II) complexes · Schiff bases · Anaerobic bacteria · Antimicrobial activity · Bio-reduction

Introduction

The importance of nitro compounds in medicinal chemistry emerged with the discovery of chloramphenicol, an antibacterial agent containing a nitrophenyl group, first isolated in 1947 from a culture of *Streptomyces venezuelae* (Ehrlich et al. 1947). Since

then, nitro-heterocyclic compounds have been extensively investigated as antimicrobial agents (Patterson and Wyllie 2014; O'Shea et al. 2016).

2-Nitroimidazole (azomycin, Fig. 1a), isolated in 1953 from the bacterium *Nocardia mesenterica*, was found to be active against *Trichomonas vaginalis*, the causative parasite of trichomoniasis (Anderson et al. 2012). After this finding, the synthesis and biological evaluation of nitroimidazole derivatives led to the discovery of metronidazole in 1957 (Fig. 1b), a potent antiprotozoal agent with greater activity than azomycin and acceptable toxicity (Anderson et al. 2012; Wright et al. 2014).

In 1960 metronidazole became the first drug to be introduced into human therapy for the treatment of trichomoniasis and later, for treating infections caused by a variety of anaerobic bacteria (Wright et al. 2014). Metronidazole is classified as an essential medicine by the World Health Organization (WHO 2018). It is widely used for the treatment of infections caused by *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* and *Blastocystis* sp. protozoa, as well as against *Clostridium difficile* and *Bacteroides fragilis* anaerobic bacteria and the microaerophilic species *Helicobacter pylori* (Dunn et al. 2010).

Afterwards, different derivatives of nitroimidazoles were synthesized and a second-generation of 5-nitroimidazole antimicrobial agents has been developed, including secnidazole (Fig. 1c), tinidazole (Fig. 1d) and ornidazole (Fig. 1e) (Nagata et al. 2012; Kapoor et al. 2003).

Secnidazole proved to be a very promising alternative for metronidazole due to its broad spectrum of activity and potency against anaerobic microorganisms. Secnidazole presents appropriate pharmacokinetics, being rapidly and completely absorbed after oral administration. It has a long terminal elimination

half-life, which allows the administration of lower doses and makes single-dose applications possible (Gillis and Wiseman 1996; De Backer et al. 2010; Ang et al. 2017).

Anaerobic bacteria are the most predominant components of the human indigenous microbiota and the most frequent cause of endogenous bacterial infections. Anaerobic infections are often considered as life threatening and may occur at the central nervous system, oral cavity, head and neck, chest, abdomen, pelvis, skin and soft tissues. The most relevant anaerobes associated with the etiopathogenesis of approximately 95% of anaerobic infections are Gram-negative rods, among them *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Bilophila* and *Sutterella* (Brook 2016).

The polymicrobial etiology of anaerobic infections, mainly an association between anaerobes and facultative bacteria, results in difficulties in treating these infections (Brook 2016). Another obstacle for the effective treatment is the increasing resistance rates of anaerobic bacteria against a wide range of antimicrobial agents, including metronidazole, frequently employed in clinics (Akhi et al. 2015; Tan et al. 2017; Hastey et al. 2016).

5-Nitroimidazoles are prodrugs that require bioactivation of the nitro group in the intracellular environment in order to exert their biological effect. After these compounds enter the cells the nitro group is reduced to a short-lived nitro anion radical ($R-NO_2^-$), the critical step in the activation of nitroimidazoles (Ang et al. 2017).

While the nitro group is crucial for the activity of 5-nitroimidazoles against anaerobic bacteria, different substituents in the imidazole side chains may result in different spectra of activity and pharmacokinetic properties.

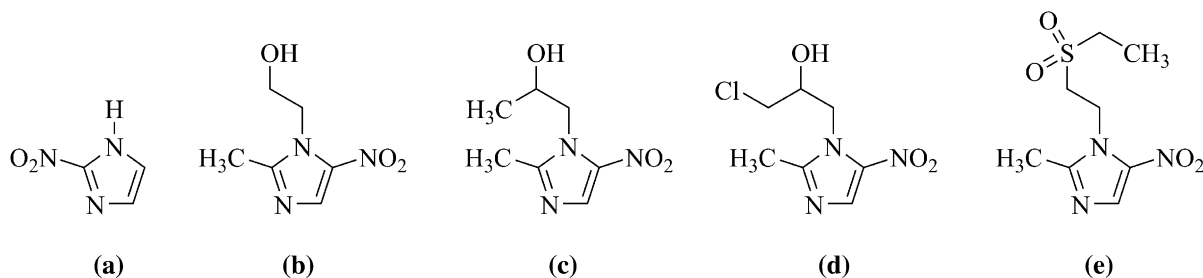
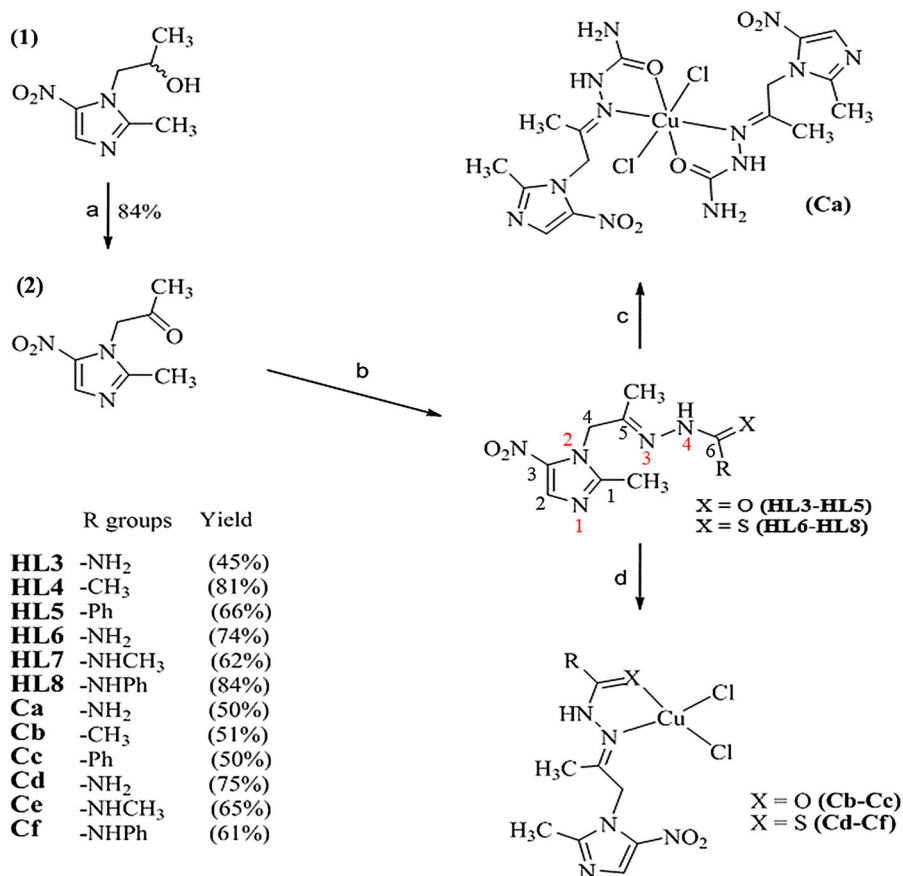


Fig. 1 Chemical structures of nitroimidazole derivatives **a** 2-nitroimidazole, **b** metronidazole, **c** secnidazole, **d** tinidazole and **e** ornidazole

Hydrazones and thiosemicarbazones are Schiff base compounds which show potent antimicrobial activity (Divar et al. 2017; Abdelrahman et al. 2017; Popiolek 2017). In several cases the antimicrobial activity of these compounds increases upon metal coordination (Ferreira et al. 2016). In particular, complexation to copper(II) often results in antibacterial activity enhancement (Recio-Despaigne et al. 2012; Mendes et al. 2007).

In this way, in the present work novel secnidazole-derived compounds functionalized with different Schiff base groups were obtained (Fig. 2) as well as their copper(II) complexes. The antimicrobial effects of the compounds were evaluated against *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides ovatus*, *Parabacteroides distasonis* and *Fusubacterium nucleatum* pathogenic anaerobic bacteria. Electrochemistry studies on the reduction of the nitro group were performed as well, aiming to investigate the ability of the compounds to undergo bio-reduction activation.

Fig. 2 Syntheses of secnidazole-derived compounds **2**, (**HL3–HL8**) and copper(II) complexes (**Ca–Cf**). Reagents and conditions: (a) PDC, CH_2Cl_2 , r.t. 48 h; (b) **HL3–HL5**: NH_2NHCOR , AcOH, MeOH, reflux, 4 h; **HL6–HL8**: $\text{NH}_2\text{NH}_2\text{CSNHR}$, AcOH, MeOH, reflux, 4 h; (c, d) CuCl_2 , MeOH, reflux, 8 h



Materials and methods

Equipment and reagents

All reagents were purchased from Aldrich and Merck and used as received. Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. Melting points were determined with a Mettler MQAPF-302 apparatus. Magnetic susceptibility measurements were performed with a Johnson Matthey MSB/AUTO balance. An YSI model 31 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer Spectrum One employing the attenuated total reflectance (ATR) method ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$). NMR spectra were obtained at $25\text{ }^\circ\text{C}$ with a Bruker DPX-400 Advance (400 MHz) spectrometer using $\text{DMSO-}d_6$ as solvent. Mass spectra were recorded with a Shimadzu LCMS-IT-TOF instrument working at high-resolution.

Electrochemical studies

Cyclic voltammetry was carried out at room temperature with a conventional three-electrode cell (with volumetric capacity of 10 mL) in a μ Autolab type II potentiostat (Echo Chemie, Utrecht, the Netherlands) using the GPES 4.9 software. The working electrode was a Metrohm glassy carbon electrode, the auxiliary electrode was a platinum wire and Ag/AgCl, Cl^- (3.0 M) was used as the reference electrode. The glassy carbon electrode was previously fine-polished with 0.3 μm alumina slurry on a polishing felt during 5 min. Solutions for analysis were prepared in spectroscopic dimethylformamide (DMF) containing 1 mM of analyte and 0.1 M of tetrabutylammonium perchlorate (TBAP) as supporting electrolyte. Before recording the voltammograms, the test solution was thoroughly purged with high purity nitrogen gas to remove any traces of dissolved oxygen. Cyclic voltammograms were recorded in the 1.50 to -2.50 V potential range using 250 mV s^{-1} scan rate.

Syntheses of the 5-nitroimidazole-derived Schiff bases and their copper(II) complexes

Compounds (**HL3–HL8**) were synthesized from the intermediate (**2**), prepared by oxidation of secnidazole (**1**) with pyridinium chlorochromate (PCC) or pyridinium dichromate (PDC), according to procedures described in the literature (Fig. 2) (Corey and Schmidt 1979; Breuning et al. 2009). **HL3–HL8** were obtained by stirring under reflux a methanol solution (5 mL) of **2** with an equimolar amount of the desired hydrazine derivative (0.55 mmol) for 4 h, with addition of few drops of acetic acid as catalyst. After cooling to room temperature, 10 mL of ethyl ether and 10 mL of isopropanol were added and the obtained precipitate was filtered off, washed with ethyl ether and dried in a desiccator under reduced pressure.

Copper(II) complexes (**Ca–Cf**) were obtained by reacting equimolar amounts (0.5 mmol) of the desired thiosemicarbazone or hydrazone with $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in methanol (10 mL) under reflux for 8 h. The resulting solids were filtered off and washed with methanol and ethyl ether, and dried under reduced pressure.

The Schiff base ligands were characterized by elemental analysis and by means of their infrared, NMR and HRMS spectra. Complexes (**Ca–Cf**) were characterized by microanalyses, molar conductivities,

magnetic susceptibilities and by means of their infrared spectra. All data that support the chemical characterization of the compounds are reported in Supplementary Information (SI).

1-(2-Methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)propan-2-one (**2**) White solid. Yield: 77% (oxidant: PCC) and 84% (oxidant: PDC). Anal. Calc. for $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$ (%): C, 45.90; H, 4.95; N, 22.94. Found: C, 46.22; H, 4.83; N, 22.96. FW: $183.17 \text{ g mol}^{-1}$. IR (ATR, cm^{-1}): 3110 (ν C2-H), 1726 (ν C=O), 1529 (ν C=N), 1456/1361 ($\nu_{\text{ass}}/\nu_{\text{s}}$ NO_2). ^1H NMR [400.13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, $\delta(\text{ppm})$]: 8.05 [s, 1H, H2], 5.31 [s, 2H, H4], 2.35 [s, 3H, C1CH₃], 2.27 [s, 3H, C5CH₃]. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR [100.61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, $\delta(\text{ppm})$]: 200.8 [C5], 151.3 [C1], 138.3 [C3], 132.3 [C2], 54.8 [C4], 27.0 [C5CH₃], 13.5 [C1CH₃]. HRMS [ESI(+), IT-TOF] calculated for $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_3$, $[\text{M} + \text{H}]^+$: 184.0722, found: 184.0722.

(E)-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarboxamide (**HL3**) White-yellowish solid. Yield: 45%. Melting point: 211.8–213.2 °C. Anal. Calc. for $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_3$ (%): C, 40.00; H, 5.04; N, 34.98. Found: C, 39.75; H, 4.64; N, 34.08. FW: $240.22 \text{ g mol}^{-1}$. IR (ATR, cm^{-1}): 3180 (ν N4-H), 3123 (ν C2-H), 1698 (ν C=O), 1670 (ν C=C), 1576, 1540 (ν C=N), 1461/1361 ($\nu_{\text{ass}}/\nu_{\text{s}}$ NO_2). ^1H NMR [400.13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, $\delta(\text{ppm})$]: 9.39 [s, 1H, N4H], 8.40 [s, 1H, H2], 6.13 [sl, 2H, N5H], 5.13 [s, 2H, H4], 2.50 [s, 3H, C1CH₃], 1.92 [s, 3H, C5CH₃]. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR [100.61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, $\delta(\text{ppm})$]: 156.8 [C6], 150.7 [C1], 142.3 [C5], 138.3 [C3], 128.8 [C2], 50.3 [C4], 14.5 [C5CH₃], 12.8 [C1CH₃]. HRMS [ESI(+), IT-TOF] calculated for $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_6\text{NaO}_3$, $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 263.0869, found: 263.0885.

(E)-N'-(1-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)acetohydrazide (**HL4**) White-yellowish solid. Yield: 81%. Melting point: 165.4–167.8 °C. Anal. Calc. for $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3$ (%): C, 45.18; H, 5.48; N, 29.27. Found: C, 44.10; H, 5.19; N, 28.34. FW: $239.24 \text{ g mol}^{-1}$. IR (ATR, cm^{-1}): 3264 (ν N4-H), 3142 (ν C2-H), 1674 (ν C=O), 1653 (ν C=C), 1530 (ν C=N), 1471/1362 ($\nu_{\text{ass}}/\nu_{\text{s}}$ NO_2). ^1H NMR [400.13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, $\delta(\text{ppm})$]: 10.32 [s, 1H, N4H], 8.04 [s, 1H, H2], 5.10 [s, 2H, H4], 2.37 [s, 3H, C1CH₃], 1.93 [s, 3H, C5CH₃], 1.66 [s, 3H, H7]. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR [100.61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, $\delta(\text{ppm})$]: 172.2 [C6], 151.5 [C1], 144.9 [C5], 138.6 [C3], 132.4 [C2], 49.9 [C4], 19.9 [C7], 14.4 [C5CH₃], 13.5

[C1 $\underline{\text{C}}\text{H}_3$]. HRMS [ESI(+), IT-TOF] calculated for C₉H₁₄N₅O₃, [M + H]⁺: 240.1097, found: 240.1103.

(*E*)-*N'*-(1-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)benzohydrazide (**HL5**) Yellow solid. Yield: 66%. Melting point: 205.1–206.2 °C. Anal. Calc. for C₁₄H₁₅N₅O₃ (%): C, 55.81; H, 5.02; N, 23.24. Found: C, 56.43; H, 4.88; N, 23.49. FW: 301.31 g mol⁻¹. IR (ATR, cm⁻¹): 3185 (ν N4-H), 3123 (ν C2-H), 1670 (ν C=O), 1585 (ν C=C), 1578/1526 (ν C=N), 1461/1355 (ν_{ass}/ν_s NO₂). ¹H NMR [400.13 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 10.70 [s, 1H, N4H], 8.06 [s, 1H, H2], 7.78 [sl, 2H, H8, H12], 7.58–7.17 [m, 3H, H9, H10, H11], 5.22 [s, 2H, H4], 2.42 [s, 3H, C1CH₃], 2.04 [s, 3H, C5CH₃]. ¹³C{¹H} NMR [100.61 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 163.1 [C6], 157.0 [C1], 151.7 [C5], 138.5 [C3], 133.7 [C7], 132.7 [C2], 131.5 [C10], 128.3 [C9, C11], 127.7 [C8, C12], 50.1 [C4], 15.8 [C5CH₃], 13.7 [C1CH₃]. HRMS [ESI(+), IT-TOF] calculated for C₁₄H₁₅N₅NaO₃, [M + Na]⁺: 324.1073, found: 324.1072.

(*E*)-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamide (**HL6**) White solid. Yield: 74%. Melting point: 168.4–171.2 °C. Anal. Calc. for C₈H₁₂N₆O₂S (%): C, 37.49; H, 4.72; N, 32.79. Found: C, 38.26; H, 4.79; N, 31.32. FW: 256.28 g mol⁻¹. IR (ATR, cm⁻¹): 3170 (ν N4-H), 3083 (ν C2-H), 1644 (ν C=C), 1611/1530 (ν C=N), 1463/1360 (ν_{ass}/ν_s NO₂), 804 (ν C=S). ¹H NMR [400.13 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 10.42 [s, 1H, N4H], 8.16 [s, 1H, N5H], 8.07 [s, 1H, H2], 6.41 [s, 1H, N5H], 5.13 [s, 2H, H4], 2.38 [s, 3H, C1CH₃], 2.01 [s, 3H, C5CH₃]. ¹³C{¹H} NMR [100.61 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 178.9 [C6], 151.8 [C1], 147.4 [C5], 138.5 [C3], 132.6 [C2], 50.1 [C4], 15.1 [C5CH₃], 13.6 [C1CH₃]. HRMS [ESI(+), IT-TOF] calculated for C₈H₁₃N₆O₂S, [M + H]⁺: 257.0820, found: 257.0796.

(*E*)-*N*-methyl-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamide (**HL7**) Yellow solid. Yield: 62%. Melting point: 194.2–196.9 °C. Anal. Calc. for C₉H₁₄N₆O₂S (%): C, 39.99; H, 5.22; N, 31.09. Found: C, 39.86; H, 5.41; N, 30.45. FW: 270.31 g mol⁻¹. IR (ATR, cm⁻¹): 3183 (ν N4-H), 1555/1531 (ν C=N), 1471/1362 (ν_{ass}/ν_s NO₂), 786 (ν C=S). ¹H NMR [400.13 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 10.31 [s, 1H, N4H], 8.07 [s, 1H, H2], 7.24 [s, 1H, N5H], 5.12 [s, 2H, H4], 2.89 [d, 3H, H7], 2.39 [s, 3H, C1CH₃], 1.96 [s, 3H, C5CH₃]. ¹³C{¹H} NMR [100.61 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 178.9 [C6], 151.9 [C1], 147.0 [C5], 138.6 [C3], 132.7 [C2], 50.3 [C4], 30.7 [C7], 14.8

[C5CH₃], 13.8 [C1CH₃]. HRMS [ESI(+), IT-TOF] calculated for C₉H₁₄N₆NaO₂S, [M + Na]⁺: 293.0797, found: 293.0796.

(*E*)-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)-*N*-phenylhydrazinecarbothioamide (**HL8**) White-yellowish solid. Yield: 84%. Melting point: 116.2–118.0 °C. Anal. Calc. for C₁₄H₁₆N₆O₂S (%): C, 50.59; H, 4.85; N, 25.28. Found: C, 48.40; H, 4.92; N, 24.17. FW: 332.38 g mol⁻¹. IR (ATR, cm⁻¹): 3296 (ν N4-H), 3138 (ν C2-H), 1593 (ν C=C), 1554/1530 (ν C=N), 1471/1362 (ν_{ass}/ν_s NO₂), 772 (ν C=S). ¹H NMR [400.13 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 10.87 [s, 1H, N4H], 8.83 [s, 1H, N5H], 8.15 [s, 1H, H2], 7.51 [d, 2H, H8, H12], 7.35 [t, 2H, H9, H11], 7.16 [t, 1H, H10], 5.23 [s, 2H, H4], 2.43 [s, 3H, C1CH₃], 2.10 [s, 3H, C5CH₃]. ¹³C{¹H} NMR [100.61 MHz, DMSO-*d*₆, δ(ppm)]: 175.8 [C6], 152.1 [C1], 148.1 [C5], 138.7 [C3], 138.2 [C7], 132.6 [C2], 128.5 [C9, C11], 125.0 [C10], 122.7 [C8, C12], 50.2 [C4], 15.3 [C5CH₃], 13.7 [C1CH₃]. HRMS [ESI(+), IT-TOF] calculated for C₁₄H₁₆N₆NaO₂S, [M + Na]⁺: 355.0953, found: 355.0940.

Bis[(*E*)-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarboxamide]dichlorocopper(II), [Cu(HL3)₂Cl₂] (**Ca**) Dark blue solid. Yield: 50%. Melting point: 183.0–184.5 °C. Anal. Calc. for C₁₆H₂₄Cl₂CuN₁₂O₆ (%): C, 31.25; H, 3.93; N, 27.34. Found: C, 31.36; H, 3.70; N, 27.25. FW: 614.89 g mol⁻¹. Molar conductivity (DMSO, 1 mM): 18.83 cm² Ω⁻¹ mol⁻¹. IR (ATR, cm⁻¹): 3434 (ν N4-H), 1712 (ν C=O), 1683 (ν C=C), 1566/1520 (ν C=N), 1484/1390 (ν_{ass}/ν_s NO₂). Magnetic moment: 2.00 μ_B.

[(*E*)-*N'*-(1-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)acetohydrazidedichlorocopper(II)] [Cu(HL4)Cl₂]·½CH₃OH (**Cb**) Green solid. Yield: 51%. Melting point: decomposition at 195 °C. Anal. Calc. for C_{9.5}H₁₅Cl₂CuN₅O_{3.5} (%): C, 29.28; H, 3.88; N, 17.97. Found: C, 30.33; H, 3.58; N, 17.76. FW: 389.70 g mol⁻¹. Molar conductivity (DMSO, 1 mM): 28.82 cm² Ω⁻¹ mol⁻¹. IR (ATR, cm⁻¹): 3126 (ν N4-H), 1736 (ν C=O), 1634 (ν C=C), 1550 (ν C=N), 1476/1388 (ν_{ass}/ν_s NO₂). Magnetic moment: 1.60 μ_B.

[(*E*)-*N'*-(1-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)benzohydrazidedichlorocopper(II)] [Cu(HL5)Cl₂] (**Cc**) Green solid. Yield: 50%. Melting point: decomposition at 210 °C. Anal. Calc. for C₁₄H₁₅Cl₂CuN₅O₃ (%): C, 38.59; H, 3.47; N, 16.07. Found: C,

38.09; H, 3.21; N, 16.39. FW: 435.75 g mol⁻¹. Molar conductivity (DMSO, 1 mM): 33.18 cm² Ω⁻¹ mol⁻¹. IR (ATR, cm⁻¹): 3126 (ν N4-H), 1736 (ν C=O), 1585 ν(C=C), 1556/1526 ν(C=N), 1480/1386 (ν_{ass}/ν_s NO₂). Magnetic moment: 1.63 μ_B.

[(E)-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamidedichlorocopper(II)] [Cu(HL6)Cl₂].½H₂O (**Cd**) Dark green solid. Yield: 75%. Melting point: decomposition at 160 °C. Anal. Calc. for C₈H₁₃Cl₂CuN₆O_{2.5}S (%): C, 24.04; H, 3.28; N, 21.02. Found: C, 23.91; H, 3.20; N, 21.28. FW: 399.74 g mol⁻¹. Molar conductivity (DMSO, 1 mM): 43.57 cm² Ω⁻¹ mol⁻¹. IR (ATR, cm⁻¹): 3224 (ν N4-H), 788 (ν C=S), 1640 ν(C=C), 1594/1526 (ν C=N), 1474/1390 (ν_{ass}/ν_s NO₂). Magnetic moment: 1.60 μ_B.

[(E)-N-methyl-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamidedichlorocopper(II)] [Cu(HL7)Cl₂] (**Ce**) Dark green solid. Yield: 65%. Melting point: decomposition at 180 °C. Anal. Calc. for C₉H₁₄Cl₂CuN₆O_{2.5}S (%): C, 26.71; H, 3.49; N, 20.76. Found: C, 26.81; H, 3.73; N, 20.20. FW: 404.76 g mol⁻¹. Molar conductivity (DMSO, 1 mM): 26.75 cm² Ω⁻¹ mol⁻¹. IR (ATR, cm⁻¹): 3374 (ν N4-H), 784 (ν C=S), 1562/1530 ν(C=N), 1474/1370 (ν_{ass}/ν_s NO₂). Magnetic moment: 1.63 μ_B.

[(E)-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)-N-phenylhydrazinecarbothioamidedichlorocopper(II)] [Cu(HL8)Cl₂].½H₂O (**Cf**) Dark green solid. Yield: 61%. Melting point: decomposition at 205 °C. Anal. Calc. for C₁₄H₁₇Cl₂CuN₆O_{2.5}S (%): C, 35.34; H, 3.45; N, 17.66. Found: C, 35.18; H, 3.25; N, 17.22. FW: 475.84 g mol⁻¹. Molar conductivity (DMSO, 1 mM): 46.82 cm² Ω⁻¹ mol⁻¹. IR (ATR, cm⁻¹): 3300 (ν N4-H), 760 (ν C=S), 1596 ν(C=C), 1552 ν(C=N), 1496/1368 (ν_{ass}/ν_s NO₂). Magnetic moment: 1.63 μ_B.

Crystal structure determination

Single crystal X-ray diffraction measurements were carried out on an Oxford-Diffraction GEMINI-Ultra diffractometer (LabCri-UFMG) using graphite-Enhance Source Mo Kα radiation (λ = 0.71073 Å) at 293(2) K. Data collection, cell refinements and data reduction were performed using the CrysAlisPro software package (Oxford 2010). An absorption correction based on a multi-scan method was applied. The structure was solved by direct methods using

SHELXS-2013/1 (Sheldrick 2013, 2015). Full-matrix least-squares refinement procedure on F² with anisotropic thermal parameters was carried on using SHELXL-2014/7 (Sheldrick 2014). 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.

A suitable single crystal of **HL6** was obtained at room temperature from slow evaporation of the mother liquor. A summary of the crystal data, data collection details and refinement results is listed in Table 1. Molecular graphics were plotted using PLATON (Spek 2009).

Antimicrobial activity

In vitro susceptibility to the compounds under study was evaluated according to Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (2015). Six reference strains of Gram-negative anaerobic bacteria were tested: *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Bacteroides thetaiotaomicron* (ATCC 29741), *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482), *Bacteroides ovatus* (ATCC 8483), *Parabacteroides distasonis* (ATCC 1295) and *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586).

In order to evaluate the minimum inhibitory concentration of each compound, bacterial strains were cultured in Brucella Agar supplemented with hemin (5 μg/mL), vitamin K1 (1 μg/mL) and horse blood (5% v/v) (BA-S), at 37 °C for 48 h in an anaerobic chamber (85% N₂, 10% H₂ and 5% CO₂). The inoculum was prepared in sterile saline solution 0.9% w/v and standardized to obtain visual turbidity comparable to that of the standard 0.5 of the McFarland scale, which provides a concentration of approximately 1.5 × 10⁸ CFU (colony forming units)/mL. A 1:10 dilution of the inoculum was prepared in sterile saline solution 0.9% w/v, resulting in a concentration of approximately 1.5 × 10⁷ CFU/mL. The adjusted suspensions were used in the final inoculation up to 30 min after preparation.

The compounds under evaluation were tested for determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by the agar dilution method. Briefly, the technique consisted of adding 4.0 mL of working solution of the compounds containing nine different concentrations (ranging from 320 to 1.25 μg/mL) in flasks containing 36 mL of the culture medium

Table 1 Crystal data and structure refinement results for **HL6**

Compound	HL6
Empirical formula	C ₈ H ₁₂ N ₆ O ₂ S
Formula weight (g mol ⁻¹)	256.30
Crystal system	Triclinic
Space group	P-1
Wavelength (Å)	0.71073
Temperature (K)	293 (2)
Unit cell dimensions	
a (Å)	7.2881 (3)
b (Å)	8.5774 (4)
c (Å)	10.1348 (4)
$\alpha/\beta/\gamma$ (°)	$\alpha = 90.017(4)/\beta = 103.727(4)/\gamma = 104.761(4)$
V (Å ³)	593.91 (5)
Z	2
Density calculated (mg m ⁻³)	1.433
Crystal size (mm ³)	0.02 × 0.02 × 0.02
F(000)	268
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.274
Index ranges	– 10 ≤ h ≤ 10 – 12 ≤ k ≤ 12 – 14 ≤ l ≤ 14
2 θ range for data collection (°)	4.146 to 62.07
Reflections collected	31726
Independent reflections [R _{int} , R _{sigma}]	3532 [0.0621, 0.0413]
Completeness to $\theta = 31.035^\circ$ (%)	93.1
Data/restraints/parameters	3532/0/154
Final R indexes [I > 2 σ (I)]	R ₁ = 0.0555, wR ₂ = 0.1407
Final R indexes (all data)	R ₁ = 0.0994, wR ₂ = 0.1684
Goodness-of-fit on F ²	1.019
$\Delta\rho_{\text{max}}$. and $\Delta\rho_{\text{min}}$.	0.40 and – 0.36

followed by plating. In the preparation of the working solutions of the compounds, DMSO was used as the solvent and sterile distilled water as the diluent, so that the final concentration of DMSO was less than 0.5% in all tests. Inoculation was performed by adding approximately 10⁵ CFU/spot of each bacterial strain using the Steers replicator and subsequent anaerobic incubation at 37 °C for 48 h.

The minimum inhibitory concentration (MIC) was expressed as the lowest concentration that resulted in visual inhibition of the microorganism growth compared with the growth in the culture medium free of the tested compound (positive control). In addition, incubation in the absence of inoculum was performed to confirm the sterility of the culture medium (negative

control) as well as the control to assure the non-interference of DMSO in cell viability. The tests were performed in duplicate with absolute agreement of the results and the MIC values were expressed in μM .

Results and discussion

Characterization

Microanalyses and high-resolution mass spectra were compatible with the formation of **2** and **HL3–HL8**. Microanalyses and molar conductivity data were in accordance with the formation of [Cu(HL3)₂Cl₂] (**Ca**). In all other cases (**Cb–Cf**) the data were compatible

with formation of [Cu(HL)Cl₂] complexes. Complexes (**Ca–Cf**) showed magnetic moments in the 1.63–2.00 BM range, in accordance with d⁹ electronic configuration. The presence of crystallization solvent molecules in complexes **Cb**, **Cd** and **Cf** was confirmed by their thermogravimetry curves, which showed weight losses of 4.09% (calcd. 4.10%), 2.29% (calcd. 2.25%) and 1.93% (calcd. 1.89%), respectively.

In the infrared spectra of **HL3–HL8** three common features associated with the imidazole nucleus were observed: a vibration attributed to $\nu(\text{C2-H})$ in the 3083–3142 cm⁻¹ range, a vibration attributed to $\nu(\text{C=N})$ near 1520–1540 cm⁻¹ and two bands near 1470 cm⁻¹ and 1360 cm⁻¹ corresponding to the asymmetric and symmetric stretching modes of the NO₂ group, respectively (Rodrigues et al. 2010). Upon coordination to copper(II) the $\nu(\text{C2-H})$ vibration shifts to 3098–3282 cm⁻¹. The $\nu(\text{C=N})$ absorption shifts to 1500–1525 cm⁻¹ and the asymmetric and symmetric stretching modes of NO₂ shift to 1496–1368 cm⁻¹.

In addition, in all compounds absorptions at 1600–1670 cm⁻¹ were attributed to the $\nu(\text{C=C})$ vibration and absorptions at 1550–1580 cm⁻¹ were attributed to $\nu(\text{C=N3})$. The vibrations attributed to $\nu(\text{C=O})$ and $\nu(\text{C=S})$, observed at 1661–1714 cm⁻¹ (**HL3–HL5**) (Recio-Despaigne et al. 2010) and 804–772 cm⁻¹ (**HL6–HL8**) (Mendes et al. 2001), respectively, are observed at 1712–1736 cm⁻¹ (**Ca–Cc**) and 788–760 cm⁻¹ (**Cd–Cf**), respectively.

The NMR spectra were recorded in DMSO-*d*₆. The ¹H resonances were doubtless assigned on the basis of chemical shifts, multiplicities and by using 2D homonuclear ¹H–¹H correlation spectroscopy (COSY). The carbon type (C, CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT-135) experiments and the assignments were made by 2D heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) and heteronuclear multiple bond coherence (HMBC) experiments.

In the ¹H NMR spectra of **2** and **HL3–HL8** two signals characteristic of the imidazole nucleus were observed: a singlet near to 2.40 ppm and another near to 8.00 ppm, corresponding to C1CH₃ and H2, respectively. In addition, a singlet around 2.00 ppm attributed to C5CH₃, and a singlet corresponding to the methylene H4 near to 5.10 ppm were observed. Formation of the Schiff bases was evidenced by the presence of a signal corresponding to N4H in the region between 9.08 and 11.01 ppm. In the ¹³C{¹H}

NMR spectra the signal at 200.8 ppm associated to the C5 nucleus in **2** is not present in the spectra of **HL3–HL8**, while a signal close to 150 ppm was assigned to the iminic carbon.

In order to define the stereochemistry of the compounds in solution, two-dimensional Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY) was employed. Contour maps showed intramolecular ¹H–¹H coupling involving C5CH₃ and N4H, in accordance with *E* stereochemistry around the azomethine double bond.

X-ray crystallography

The atom arrangements and atom numbering scheme for **HL6** are shown in Fig. 3. Selected intramolecular bond lengths and angles are listed in Table 2. The thiosemicarbazone **HL6** crystallizes in the triclinic system, space group P-1, with two molecules per unit cell. The C6–S and N3–C5 bond distances are 1.690(2) and 1.275(3) Å, as expected for C=S and C=N double bonds (Allen et al. 1987). The compound crystallized in the *EE* conformation in relation to the N3–C5 and C6–N4 bonds.

In the crystal packing N5–H···O2 and N5–H···N1 inter-molecular hydrogen bonds were observed (see Table S1 and Fig. S35).

Antimicrobial activity

Secnidazole (**1**), the intermediate ketone (**2**), Schiff bases (**HL3–HL8**) and the copper(II) complexes (**Ca–Cf**) were evaluated in vitro by the agar dilution method for their ability to inhibit the growth of six strains of *Gram*-negative anaerobic bacterial species. For comparison, metronidazole was also investigated. The lowest concentrations of the studied compounds that resulted in visual inhibition of the microorganism growth (MIC values) are listed in Table 3.

The bacterial strains were quite susceptible to the antimicrobial action of **2** and **HL3–HL8**. Indeed, low micromolar MIC values were obtained. In some cases the compounds under study proved to be more potent than secnidazole (**1**) and metronidazole. Although CuCl₂ per se was devoid of activity against the tested bacterial strains, upon coordination to copper(II) the antibacterial activity significantly increased in several cases. In fact, MIC = 29.78 μM (**HL4**) and MIC = 25.36 μM (**HL6**), while MIC = 3.32 μM (**Cb**) and

Fig. 3 Molecular plot of **HL6** showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level

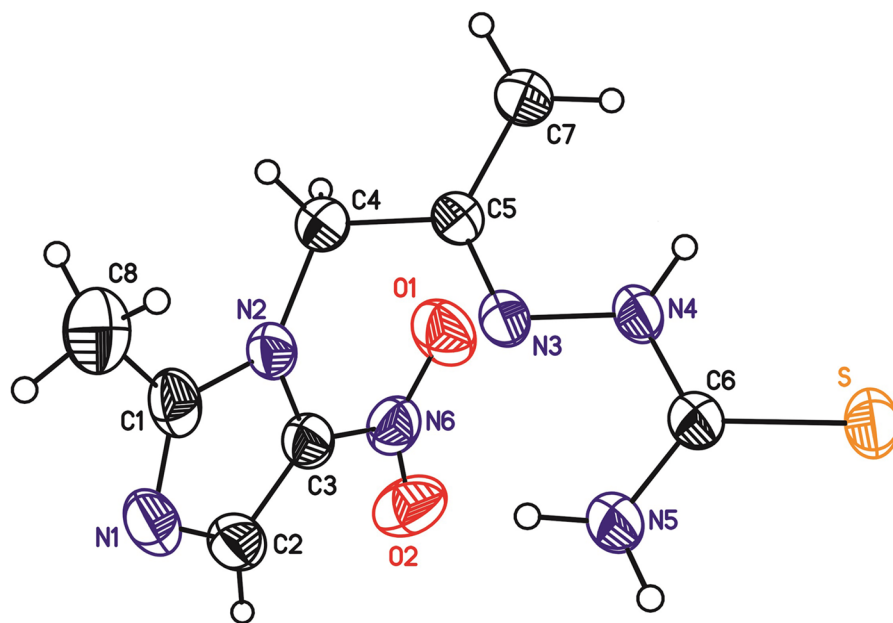


Table 2 Selected bond lengths (Å) and angles (°) for **HL6**

Bonds		Angles	
C6–S	1.690 (2)	N5–C6–N4	118.2 (2)
N5–C6	1.317 (3)	N5–C6–S	122.68 (17)
C6–N4	1.348 (3)	N4–C6–S	119.13 (16)
N4–N3	1.387 (2)	C6–N4–N3	118.41 (17)
N3–C5	1.276 (3)	C5–N3–N4	116.69 (18)
C7–C5	1.490 (3)	N3–C5–C7	127.4 (2)
C5–C4	1.507 (3)	N3–C5–C4	117.49 (19)
C4–N2	1.460 (3)	C7–C5–C4	115.07 (19)
		N2–C4–C5	113.72 (18)

MIC = 7.80 μM (**Cd**) against *Bacteroides fragilis*. Similarly, MIC = 12.68 μM (**HL6**), while MIC = 3.90 μM (**Cd**) against *Bacteroides vulgatus*.

Electrochemistry studies on the reduction of the nitro group

5-Nitroimidazoles are prodrugs that require bioactivation by reduction of the nitro group in the intracellular environment in order to exert their biological effect. Electron donors, including ferredoxins and reductase enzymes have been suggested to participate

in the bio-reductive activation of 5-nitroimidazoles (Ang et al. 2017; Leitsch et al. 2007).

The formation of the nitro radical anion is presumed to trigger a series of reduction steps, leading to the production of nitroso, hydroxylamine and amine species, thought to contribute to the pharmacological action of nitroimidazole derivatives (Fig. 4). Although the metabolites can form adducts with different biomolecules, including DNA, proteins and lipids, the exact molecular target of action of nitroimidazole compounds has not so far been completely elucidated (Ang et al. 2017; Miyamoto et al. 2013).

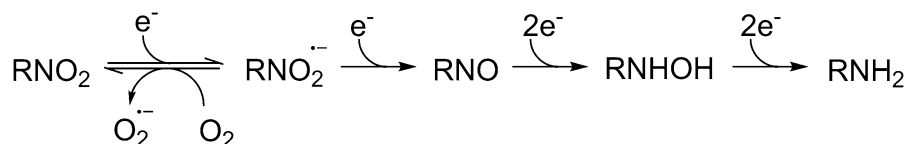
In aerobic conditions, the bio-reductive activation of 5-nitroimidazoles becomes reversible and the radical anion is reoxidized, in a process resembling a “futile” cycle which results in decreased biological effects of the nitroimidazoles (Ang et al. 2017). Indeed, 5-nitroimidazole derivatives have $E^\circ \approx -0.47$ V versus normal hydrogen electrode in water at pH 7, significantly lower than the one-electron reduction potential exhibited by molecular oxygen, $E^\circ \approx -0.15$ V, which explains why effective doses of activated 5-nitroimidazole are only achieved in environments with low oxygen concentration, as it occurs in some microaerophilic or anaerobic microorganisms (Kizaka-Kondoh and Konse-Nagasawa 2009).

Table 3 Minimum inhibitory concentration (MIC) values for the 5-nitroimidazole-derived compounds, their copper(II) complexes and CuCl_2 against *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Bacteroides thetaiotaomicron* (ATCC 29741),

Bacteroides vulgatus (ATCC 8482), *Bacteroides ovatus* (ATCC 8483), *Parabacteroides distasonis* (ATCC 1295) and *Fusubacterium nucleatum* (ATCC 25586)

Compound	MIC (μM)					
	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Bacteroides ovatus</i>	<i>Parabacteroides distasonis</i>	<i>Fusubacterium nucleatum</i>
1	2.64	5.27	2.64	5.27	5.27	2.64
2	5.46	5.46	2.73	5.46	43.68	–
HL3	14.18	14.18	7.09	7.09	14.18	4.16
Ca	3.32	6.64	3.32	3.32	≥ 13.26	3.32
HL4	29.78	7.45	3.72	3.72	7.45	8.36
Cb	3.32	6.64	3.32	3.32	≥ 13.27	3.32
HL5	13.28	13.28	13.28	6.64	13.28	6.64
Cc	13.28	13.28	13.28	6.64	13.28	6.64
HL6	25.36	25.36	12.68	3.17	6.34	3.90
Cd	7.80	7.80	3.90	3.90	≥ 31.22	1.95
HL7	3.24	6.47	3.24	3.24	6.47	3.24
Ce	3.70	3.70	3.70	1.85	7.40	3.70
HL8	4.84	4.84	4.84	4.84	2.42	12.03
Cf	≥ 6.02	≥ 6.02	6.02	3.01	≥ 6.02	6.02
CuCl_2	≥ 187.77	≥ 187.77	≥ 187.77	≥ 187.77	187.77	187.77
Metronidazole	3.17	3.17	3.17	3.17	6.34	1.46

Fig. 4 Bio-reductive processes of nitroimidazole compounds



Taking into consideration that the biological assays were performed in anaerobic conditions, electrochemistry studies on the reduction of the nitro group of the nitroimidazole derivatives were performed. The redox potentials E° ($\text{RNO}_2/\text{R-NO}_2^{\cdot-}$) of nitroimidazole derivatives and of complexes (**Ca–Cf**) were determined aiming to evaluate the ability of the compounds to be reduced in anaerobic media. The complete set of cyclic voltammograms are shown in Supplementary Information (SI).

Using the non-usual pulse radiolysis technique, the mono-electronic transfer process $\text{RNO}_2/\text{R-NO}_2^{\cdot-}$ can be observed and measured in aqueous solution. However, usual electrochemical techniques are not very useful due to the limited stability of the produced $\text{R-NO}_2^{\cdot-}$ radical. This radical may be sufficiently

stable only at $\text{pH} > 7$ or by adding an aprotic co-solvent (Carbajo et al. 2002). Therefore, in order to achieve the best experimental conditions that ensure the nitro radical anion stability, a medium formed by DMF and tetrabutylammonium perchlorate (TBAP) as supporting electrolyte was employed in the cyclic voltammetry studies.

Secnidazole (**1**), **2** and (**HL3–HL8**) displayed a similar electrochemical reduction process, typical of nitroimidazoles in aprotic medium (Cavalcanti et al. 2004). As shown in Fig. 5, in general the compounds exhibited a stable well-defined couple (system Ic/Ia) with E_{pIc} near -1100 mV, corresponding to a mono-electronic transfer process attributed to the formation, in the timescale of the experiment, of a stable nitro radical anion ($\text{R-NO}_2^{\cdot-}$).

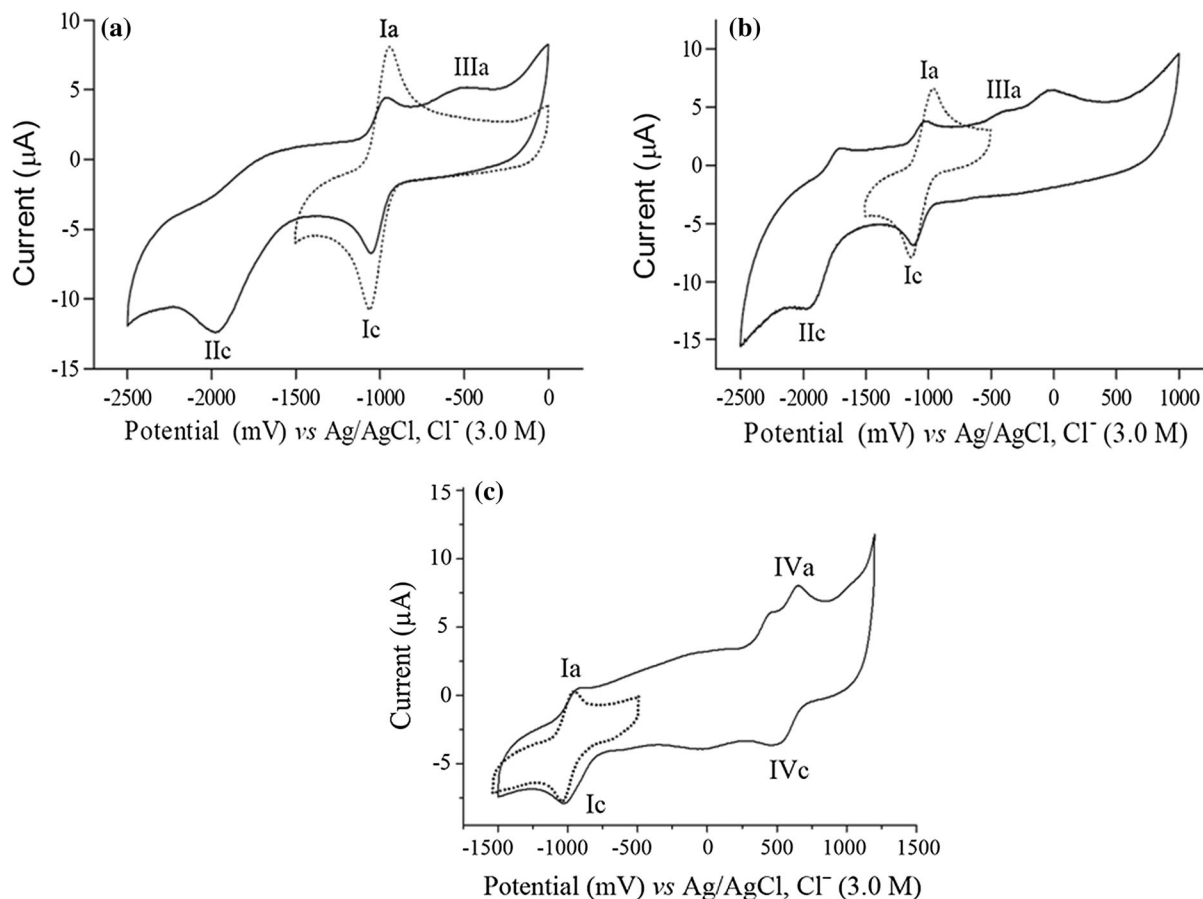
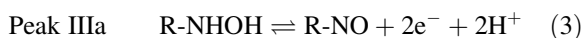
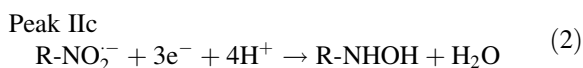
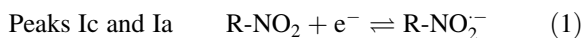


Fig. 5 Cyclic voltammogram of (a) secnidazole (**1**), (b) **HL3** and (c) complex (**Ca**) in aprotic media (TBAP 0.1 M in DMF) versus Ag/AgCl, Cl⁻ (3 M); scan rate of 250 mV s⁻¹. Dotted line shows a short sweep with the isolated RNO₂/R-NO₂⁻ couple

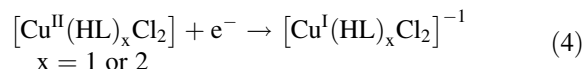
The voltammograms also exhibited a second wave near -2000 mV, assigned to the generation of hydroxylamine (R-NHOH) species and, in some cases, an irreversible oxidation near to -500 mV, related to formation of nitroso (R-NO) species was observed. The electrochemical processes related to the nitroimidazole moiety of the structures are represented by Eqs. 1–3. The remaining processes in **HL3–HL8** are related to the Schiff base moiety (Table 4).



The characterization of the voltammetric first wave was performed by using the parameters $I_{p_{Ia}}/I_{p_{Ic}}$ and

ΔE_I ($E_{p_{Ia}} - E_{p_{Ic}}$) (Table 4) (Brett and Brett 1993). $I_{p_{Ia}}/I_{p_{Ic}}$ values higher than 0.82 in most of the cases and ΔE values for the first wave in the 74–181 mV range at 250 mV s⁻¹ suggest a behavior typical of *quasi-reversible* systems.

The voltammograms of the copper(II) complexes (Fig. 5c) show two *quasi-reversible* processes which were attributed to the RNO₂/R-NO₂⁻ (peaks Ic and Ia) and Cu^I/Cu^{II} (peaks IVc and IVa) couples [see Eq. (4)].



As shown in Table 4, the obtained $E_{p_{Ic}}$ values for the intermediate ketone (**2**) and the novel nitroimidazole-derivatives (**HL3–HL8**) show that the electrochemical behaviors of the compounds within the nitroimidazole moiety are very similar, meaning a similar

Table 4 Cyclic voltammetry parameters^a corresponding to the RNO₂/R-NO₂⁻ and Cu^{II}/Cu^I couples for **1**, **2**, **HL3**–**HL8** and complexes **Ca**–**Cf** versus Ag/AgCl, Cl⁻ (3.0 M) reference electrode

Compounds ^b	RNO ₂ /R-NO ₂ ⁻			Cu ^{II} /Cu ^I		
	E _{p1c} (mV)	ΔE _I (mV)	I _{p1a} /I _{p1c}	E _{p1c} (mV)	ΔE _I (mV)	I _{p1a} /I _{p1c}
1	-1090	146	0.83	-	-	-
2	-1105	87	0.93	-	-	-
HL3	-1135	181	0.87	-	-	-
Ca	-1033	74	0.89	515	152	1.35
HL4	-1101	122	0.87	-	-	-
Cb	-985	78	0.95	478	185	1.36
HL5	-1115	78	0.82	-	-	-
Cc	-880	89	0.50	622	152	1.32
HL6	-1120	83	0.83	-	-	-
Cd	-1025	98	0.75	435	225	0.94
HL7	-1125	141	0.92	-	-	-
Ce	-1000	97	0.76	560	129	1.31
HL8	-1130	98	0.85	-	-	-
Cf	-994	83	0.58	466	190	0.90

^aScan rate of 250 mV s⁻¹;

^bcompounds at 1 mM dissolved in DMF using 0.1 M of TBAP as supporting electrolyte

tendency for nitro radical anion formation. Upon coordination to copper(II) the E_{p1c} values become more favorable, suggesting a higher tendency to the formation of the nitro anion radical in the complexes. Furthermore, the E_{p1c} values of complexes (**Ca**–**Cf**) did not differ much from those of the well-known enzymatic reducible drugs secnidazole (compound **1**, E_{p1c} = -1076 mV) and benznidazole (E_{p1c} = -1019 mV) (Bollo et al. 2001).

Conclusions

In conclusion, compounds **HL3**–**HL8** exhibited in vitro antibacterial activity against the six reference strains evaluated in this study. In some cases, the compounds were even more active than secnidazole and metronidazole, presenting lower minimum inhibitory concentrations than those of the reference drugs.

Since the compounds under study showed reduction potentials in the same range as the bio-reducible drugs secnidazole and benznidazole, their biological activities might also be related to intracellular bio-reduction activation.

Although according to Lipinski's rules, an absolute correlation of a single parameter with the biological activity is not expected, the similar electrochemical behaviors at least partially explain the reason why the

MIC values of the compounds under study are comparable to each other and to those of secnidazole and metronidazole.

Upon coordination to copper(II) the antibacterial activity increased in several cases. Interestingly, the reduction potentials of the nitro group were in general more favorable for the complexes than for the starting ligands, suggesting that this might be one of the reasons for their improved antimicrobial action.

Previous works by other authors indicated that Schiff base derivatives of metronidazole (Zhang et al. 2014) and secnidazole (Li et al. 2013) present antibacterial effects against *Gram*-positive and *Gram*-negative aerobic bacteria. The novel derivatives investigated in the present work showed potent activity against *Gram*-negative pathogenic anaerobic bacterial strains. Therefore, we may consider these compounds suitable for in vivo evaluation and the microorganisms should be classified as susceptible to them.

The literature reports decreased clinical susceptibility to metronidazole and other antimicrobials among *Bacteroides* species (Löfmark et al. 2010; Liu et al. 2008). Considering the increasing resistance to antimicrobial agents among anaerobic pathogens, the present work constitutes an important contribution to the development of new antibacterial drug candidates.

Acknowledgements The authors gratefully acknowledge CNPq, CAPES-PNPD, FAPEMIG and INCT-INOVAR (Proc. CNPq 573.364/2008-6) for financial support and student grants. Funding was provided by CNPq (Grant Numbers 421902/2016-7 and 303746/2013-0).

References

- Abdelrahman MA, Salama I, Gomaa MS, Elaasser MM, Abdel-Aziz MM, Soliman DH (2017) Design, synthesis and 2D QSAR study of novel pyridine and quinolone hydrazone derivatives as potential antimicrobial and antitubercular agents. *Eur J Med Chem* 138:698–714
- Akhi MT, Ghotaslou R, Beheshtirouy S, Asgharzadeh M, Pirzadeh T, Asghari B, Alizadeh N, Ostadgavahi AT, Somesaraei VS, Memar MY (2015) Antibiotic susceptibility pattern of aerobic and anaerobic bacteria isolated from surgical site infection of hospitalized patients. *Jundishapur J Microbiol* 8:e20309
- Allen FH, Kennard O, Watson DG, Brammer L, Orpen AG, Taylor R (1987) Tables of bond lengths determined by X-ray and neutron diffraction. Part 1. Bond lengths in organic compounds. *J Chem Soc Perkin Trans 2*:S1–S19
- Anderson RJ, Groundwater PW, Todd A, Worsley AJ (2012) Nitroimidazole antibacterial agents. *Antibacterial agents: chemistry, mode of action, mechanisms of resistance and clinical applications*. Wiley, Chichester, pp 85–101
- Ang CW, Jarrad AM, Cooper MA, Blaskovich MAT (2017) Nitroimidazoles—molecular fireworks that combat a broad spectrum of infectious diseases. *J Med Chem* 60:7636–7657
- Bollo S, Núñez-Vergara LJ, Bontá M, Chauviere G, Périé J, Squella JA (2001) Cyclic voltammetric studies on nitro radical anion formation from megalol and some related nitroimidazole derivatives. *J Electroanal Chem* 511:46–54
- Brett CMA, Brett AMO (1993) *Electrochemistry—principles, methods and applications*, 1st edn. Oxford University Press Inc., New York
- Breuning M, Häuser T, Mehler C, Däschlein C, Strohmann C, Oechsner A, Braunschweig H (2009) Enantioselective synthesis of tricyclic amino acid derivatives based on a rigid 4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]decane skeleton. *Beilstein J Org Chem* 5:81
- Brook I (2016) Spectrum and treatment of anaerobic infections. *J Infect Chemother* 22:1–13
- Carbajo J, Bollo S, Núñez-Vergara LJ, Campero A, Squella JA (2002) Cyclic voltammetric study of the disproportionation reaction of the nitro radical anion from 4-nitroimidazole in protic media. *J Electroanal Chem* 53:187–194
- Cavalcanti JCM, Abreu FC, Oliveira NV, Moura MABF, Chaves JG, Alves RJ, Bertinaria M, Fruttero R, Goulart MOF (2004) Effect of the leaving group on the electrocyclic reduction mechanism of anti-*Helicobacter pylori* metronidazole derivatives, in aprotic and protic media. *Bioelectrochemistry* 63:353–357
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2015) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S25, Pennsylvania, USA
- Corey EJ, Schmidt G (1979) Useful procedures for the oxidation of alcohols involving pyridinium dichromate in aprotic media. *Tetrahedron Lett* 5:399–402
- De Backer E, Dubreuil L, Brauman M, Acar J, Vaneechoutte M (2010) *In vitro* activity of secnidazole against *Atopobium vaginae*, an anaerobic pathogen involved in bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Infect* 16:470–472
- Divar M, Khalafi-Nezhad A, Zomorodian K, Sabet R, Faghiz Z, Jamali M, Pournaghz H, Khabnadideh S (2017) Synthesis of some novel semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives of isatin as possible biologically active agents. *J Pharm Res Int* 17:1–13
- Dunn LA, Burgess AG, Krauer KG, Erkmann L, Vanelle P, Crozet MD, Gillin FD, Upcroft P, Upcroft JA (2010) A new-generation 5-nitroimidazole can induce highly metronidazole-resistant *Giardia lamblia* in vitro. *Int J Antimicrob Agents* 36:37–42
- Ehrlich J, Bartz QR, Smith RM, Joslyn DA, Burkholder PR (1947) Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. *Science* 106:417
- Ferreira IP, Piló EDL, Recio-Despaigne AA, Da Silva JG, Ramos JP, Marques LB, Prazeres PHDM, Takahashi JA, Souza-Fagundes EM, Rocha W, Beraldo H (2016) Bismuth(III) complexes with 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones: antimicrobial and cytotoxic activities and effects on the clonogenic survival of human solid tumor cells. *Bioorg Med Chem* 24:2988–2998
- Gillis JC, Wiseman LR (1996) Secnidazole. *Drugs* 51:621–638
- Hastey CJ, Boyd H, Schuetz AN, Anderson K, Citron DM, Dzink-Fox J, Hackel M, Hecht DW, Jacobus NV, Jenkins SG, Karlsson M, Knapp CC, Koeth LM, Wexler H, Roe-Carpenter DE (2016) Changes in the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria from 2007–2009 to 2010–2012 based on the CLSI methodology. *Anaerobe* 42:27–30
- Kapoor VK, Chadha R, Venisetty PK, Prasanth S (2003) Medicinal significance of nitroimidazoles—some recent advance. *J Sci Ind Res* 62:659–665
- Kizaka-Kondoh S, Konse-Nagasawa H (2009) Significance of nitroimidazole compounds and hypoxia-inducible factor-1 for imaging tumor hypoxia. *Cancer Sci* 100:1366–1373
- Leitsch D, Kolarich D, Wilson IBH, Altmann F, Duchêne M (2007) Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: a central role for thioredoxin reductase. *PLoS Biol* 5:1820–1834
- Li Y, Zhao CP, Ma HP, Zhao MY, Xue YR, Wang XM, Zhu HL (2013) Design, synthesis and antimicrobial activities evaluation of Schiff base derived from secnidazole derivatives as potential FabH inhibitors. *Bioorg Med Chem* 21:3120–3126
- Liu CY, Huang YT, Liao CH, Yen LC, Lin HY, Hsueh PR (2008) Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and *bacteroides fragilis* isolates causing nosocomial infections: emerging resistance to carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3161–3168
- Löfmark S, Edlund C, Nord CE (2010) Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clin Infect Dis* 50:S16–S23
- Mendes IC, Teixeira LR, Lima R, Beraldo H, Speziali NL, West DX (2001) Structural and spectral studies of

- thiosemicarbazones derived from 3- and 4-formylpyridine and 3- and 4-acetylpyridine. *J Mol Struct* 559:355–360
- Mendes IC, Moreira JP, Mangrich AS, Balena SP, Rodrigues BL, Beraldo H (2007) Coordination to copper(II) strongly enhances the in vitro antimicrobial activity of pyridine-derived N(4)-tolyl thiosemicarbazones. *Polyhedron* 26:3263–3270
- Miyamoto Y, Kalisiak J, Korthals K, Lauwaet T, Cheung DY, Lozano R, Cobo ER, Upcroft P, Upcroft JA, Berg DE, Gillin FD, Fokin VV, Sharpless KB, Eckmann L (2013) Expanded therapeutic potential in activity space of next-generation 5-nitroimidazole antimicrobials with broad structural diversity. *Proc Nat Acad Sci* 110:17564–17569
- Nagata N, Marriott D, Harkness J, Ellis JT, Stark D (2012) Current treatment options for *Dientamoeba fragilis* infections. *Int. J Parasitol Drugs Drug Resist* 2:204–215
- O'Shea IP, Shahed M, Aguilera-Venegas B, Wilkinson SR (2016) Evaluating 5-nitrothiazoles as trypanocidal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 60:1137–1140
- Oxford Diffraction (2010) CrysAlisPro CCD and CrysAlisPro RED: Version 1.171.35.21 (Release 20-01-2012 CrysAlis171.NET), Oxford Diffraction Ltd, Yarnton, Oxfordshire, England
- Patterson S, Wyllie S (2014) Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends Parasitol* 30:289–298
- Popiolek L (2017) Hydrazide–hydrazones as potential antimicrobial agents: overview of the literature since 2010. *Med Chem Res* 26:287–301
- Recio-Despaigne AA, Vieira LF, Mendes IC, da Costa FB, Speziali NL, Beraldo H (2010) Organotin(IV) complexes with 2-acetylpyridine benzoyl hydrazones: antimicrobial activity. *J Braz Chem Soc* 21(7):1247–1257
- Recio-Despaigne AA, da Costa FB, Piro OE, Castellano EE, Louro SRW, Beraldo H (2012) Complexation of 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones to copper(II) as an effective strategy for antimicrobial activity improvement. *Polyhedron* 38:285–290
- Rodrigues C, Batista AA, Ellena J, Castellano EE, Benítez D, Hugo Cerecetto, González M, Teixeira LR, Beraldo H (2010) Coordination of nitro-thiosemicarbazones to ruthenium(II) as a strategy for anti-trypanosomal activity improvement. *Eur J Med Chem* 45:2847–2853
- Sheldrick GM (2013) SHELXS-2013/1: program for crystal structure solution. University of Göttingen, Göttingen
- Sheldrick GM (2014) SHELXL-2014/7: program for the solution of crystal structures. University of Göttingen, Göttingen
- Sheldrick GM (2015) Crystal structure refinement with *SHELXL*. *Acta Cryst C* 71:3–8
- Spek AL (2009) Structure validation in chemical crystallography. *Acta Crystallogr Sect D* 65:148–155
- Tan TY, Ng LS, Kwang LL, Rao S, Eng LC (2017) Clinical characteristics and antimicrobial susceptibilities of anaerobic bacteremia in an acute care hospital. *Anaerobe* 43:69–74
- WHO Model Lists of Essential Medicines (2018) <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>. Accessed 28 Jan 2018
- Wright PM, Seiple IB, Myers AG (2014) The evolving role of chemical synthesis in antibacterial drug discovery. *Angew Chem Int Ed Engl* 53:8840–8869
- Zhang X, Sangani CB, Jia LX, Gong PX, Wang F, Wang JF, Zhu HL (2014) Synthesis and antibacterial evaluation of novel Schiff's base derivatives of nitroimidazole nuclei as potent *E. coli* FabH inhibitors. *RSC Adv* 4:54217–54225

Antimicrobial Effects of Silver(I) and Bismuth(III) Complexes with Secnidazole-Derived Schiff Base Ligands: the Role of the Nitro Group Reduction

Ana P. A. Oliveira,^a João F. G. Ferreira,^b Luiz M. Farias,^b Paula P. Magalhães,^b
Leticia R. Teixeira^a and Heloisa Beraldo[✉]*,^a

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais,
31270-901 Belo Horizonte-MG, Brazil

^bDepartamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais,
31270-901 Belo Horizonte-MG, Brazil

[Ag(HL)NO₃] complexes (**1-4**) were obtained with (*E*)-*N'*-(1-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)acetohydrazide (**HL1**); (*E*)-*N'*-(1-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)benzohydrazide (**HL2**); (*E*)-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamide (**HL3**) and (*E*)-*N*-methyl-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamide (**HL4**) secnidazole-derived Schiff bases. In addition, complexes [Bi(HL3)Cl₃] (**5**) and [Bi(HL4)Cl₃] (**6**) were also prepared. The silver(I) complexes (**1-4**) showed antifungal activity against *Candida* fungal strains while the uncomplexed ligands and the bismuth(III) complexes (**5-6**) were inactive, suggesting that the antifungal effects are probably due to the presence of silver. Although the Schiff base ligands and complexes (**1-6**) revealed to be inactive against *Gram*-positive and *Gram*-negative aerobic bacteria, all compounds exhibited potent antimicrobial effects against several anaerobic bacterial strains, indicating that their mode of action probably involves anaerobic bio reduction of the nitro group, with formation of metabolites which are toxic to the microorganisms. Electrochemistry studies showed that bio reduction of the nitro group is favored in complexes (**1-6**) in comparison to the free ligands, which might, at least in part, explain their increased antimicrobial effects.

Keywords: secnidazole Schiff bases, silver(I) complexes, bismuth(III) complexes, antifungal, antibacterial, anaerobic bacteria

Introduction

Thiosemicarbazones and hydrazones are compounds possessing a wide range of pharmacological applications as antitumor, antiviral, antiparasitic, antifungal and antibacterial agents.^{1,2} Their metal complexes also exhibit antineoplastic^{3,4} and antimicrobial⁵ activities, among others.

Silver compounds are well known for their applications as antimicrobial agents. Silver nitrate and silver sulphadiazine are employed in balms to prevent wounds and burns infections.⁶ The literature reports that a series of silver(I) complexes with 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazole (metronidazole) exhibit antibacterial and antifungal properties.⁷ In addition, silver(I) complexes with 4(5)-(hydroxymethyl)imidazole show antibacterial activity against *Gram*-positive bacteria.⁸

Bismuth compounds also have been shown to exhibit numerous antimicrobial activities.⁹ Bismuth containing therapies are recommended as the first-line treatment of *Helicobacter pylori* infection in several countries.¹⁰ Bismuth complexes with a variety of organic ligands proved to show antimicrobial affects.^{9,11}

Secnidazole (1-(2-hydroxypropyl)-2-methyl-5-nitroimidazole), an orally available antimicrobial drug, is a recent generation 5-nitroimidazole derivative. Secnidazole and other 5-nitroimidazole antimicrobial agents show bactericidal activity against susceptible pathogens by diffusing into the organism, where the inactive parent prodrug compound undergoes reduction of the nitro group to cytotoxic metabolites, leading to DNA damage, disruption of bacterial protein synthesis and replication, and ultimately, cell death.^{12,13}

In a previous work¹⁴ we reported the syntheses of thiosemicarbazones and hydrazones containing

*e-mail: hberaldo@ufmg.br, heloisaberaldoufmg@gmail.com

the antimicrobial secnidazole pharmacophoric group functionalized with the Schiff base chelating moiety. These compounds and their copper(II) complexes proved to present antibacterial activity against anaerobic bacterial strains.

Aiming to further understand the effects of metal complexation on the antimicrobial activities of nitroimidazole-derived compounds, in the present work [Ag(HL)NO₃] complexes (**1-4**) were obtained with (*E*)-*N'*-(1-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene) acetohydrazide (**HL1**), (*E*)-*N'*-(1-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)benzohydrazide (**HL2**), (*E*)-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamide (**HL3**) and (*E*)-*N*-methyl-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamide (**HL4**), as well as complexes [Bi(HL3)Cl₃] (**5**) and [Bi(HL4)Cl₃] (**6**) (see Figure 1).

Taking into consideration that 5-nitroimidazoles are prodrugs that require intracellular bioactivation of the nitro group in order to exert their biological action,¹³ the electrochemical behavior of the compounds under study was investigated along with their antimicrobial effects against yeast and against aerobic and anaerobic bacterial strains.

Experimental

Materials and measurements

All common chemicals were purchased from Aldrich and were used without further purification. Partial elemental analyses were performed on a PerkinElmer CHN 2400

analyzer. A Digimed model DM3 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. Infrared spectra were recorded on a PerkinElmer FTIR Spectrum GX spectrometer using KBr pellets (4000-400 cm⁻¹). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were obtained with a Bruker DPX-400 Advance (400 MHz) spectrometer using dimethyl sulfoxide (DMSO-*d*₆) as the solvent and TMS (tetramethylsilane) as internal reference. Cyclic voltammetry experiments were carried out at room temperature with a conventional three-electrode cell (with volumetric capacity of 10 mL) in an Autolab type PGSTAT30 equipment, using the Nova 2.1.3 software. The working electrode was a Metrohm glassy carbon electrode, the auxiliary electrode was a platinum wire and Ag / AgCl, Cl⁻ (3.0 M) was used as the reference electrode. The glassy carbon electrode was previously fine-polished with 0.3 μm alumina slurry on a polishing felt during 5 min. Solutions for analysis were prepared in spectroscopic dimethylformamide (DMF) containing 1 mM of analyte and 0.1 M of tetrabutylammonium perchlorate (TBAP) as supporting electrolyte. Before recording the voltammograms, the test solution was thoroughly purged with high purity nitrogen gas to remove any traces of dissolved oxygen. Cyclic voltammograms were recorded in the 1.50 to -1.50 V potential range using 250 mV s⁻¹ scan rate.

Chemistry

Syntheses of secnidazole-derived hydrazones and thiosemicarbazones

The secnidazole-derived hydrazones and thiosemicarbazones were prepared as previously reported.¹⁴

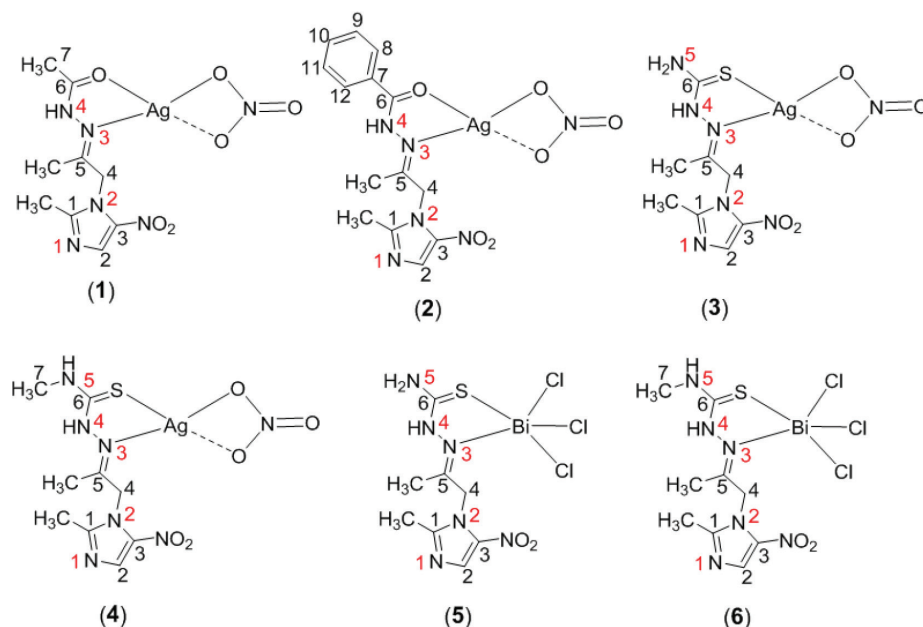


Figure 1. Structural representations of complexes (1-6).

Syntheses of silver(I) complexes (1-4)

The silver(I) complexes were obtained by stirring a methanol solution (10 mL) of the desired ligand (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 24 h. The obtained solids were vacuum filtered, washed with methanol followed by diethyl ether and then dried under reduced pressure.

[(*E*)-*N'*-(1-(2-Methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)acetohydrazidenitrate]silver(I) [Ag(HL1)NO₃] (1)

Yellow solid; anal. calc. for C₉H₁₃AgN₆O₆ (FW: 409.10 g mol⁻¹): C, 26.42; H, 3.20; N, 20.54; found: C, 26.44; H, 3.15; N, 20.38; decomposition at 135 °C; molar conductivity (1.0 × 10⁻³ mol L⁻¹ DMSO) 39.86 cm² Ω⁻¹ mol⁻¹; IR (KBr) ν / cm⁻¹ 3300 (ν N4–H), 1678 (ν C=O), 1554 (ν C5=N), 1488/1380 (ν_{ass} / ν_s NO₂), 1380 (ν NO₃); ¹H NMR (400.13 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm 10.38 (s, 1H, N4H), 8.08 (s, 1H, H2), 5.12 (s, 2H, H4), 2.42 (s, 3H, C1CH₃), 1.94 (s, 3H, C5CH₃), 1.64 (s, 3H, H7); ¹³C{¹H} NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm 172.2 (C6), 151.9 (C1), 144.8 (C5), 138.6 (C3), 132.0 (C2), 50.2 (C4), 20.0 (C7), 14.4 (C5CH₃), 13.9 (C1CH₃); yield 61%.

[(*E*)-*N'*-(1-(2-Methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)benzohydrazidenitrate]silver(I) [Ag(HL2)NO₃] (2)

Yellow solid; anal. calc. for C₁₄H₁₅AgN₆O₆ (FW: 471.17 g mol⁻¹): C, 35.69; H, 3.21; N, 17.84; found: C, 35.38; H, 3.09; N, 17.72; melting point: 184.1–184.3 °C; molar conductivity (1.0 × 10⁻³ mol L⁻¹ DMSO) 38.10 cm² Ω⁻¹ mol⁻¹; IR (KBr) ν / cm⁻¹ 3144 (ν N4–H), 1654 (ν C=O), 1552 (ν C5=N), 1486/1388 (ν_{ass}/ν_s NO₂), 1388 (ν NO₃); ¹H NMR (400.13 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm 10.72 (s, 1H, N4H), 8.11 (s, 1H, H2), 7.79 (s, 2H, H8, H12), 7.58–7.17 (m, 3H, H9, H10, H11), 5.27 (s, 2H, H4), 2.50 (s, 3H, C1CH₃), 2.06 (s, 3H, C5CH₃); ¹³C{¹H} NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm 163.1 (C6), 156.4 (C1), 152.1 (C5), 138.4 (C3), 133.6 (C7), 132.1 (C2), 131.4 (C10), 128.2 (C9, C11), 127.7 (C8, C12), 50.4 (C4), 15.7 (C5CH₃), 14.0 (C1CH₃); yield 78%.

[(*E*)-2-(1-(2-Methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamidenitrate]silver(I) [Ag(HL3)NO₃] (3)

Yellow solid; anal. calc. for C₈H₁₂AgN₇O₅S (FW: 426.16 g mol⁻¹): C, 22.55; H, 2.84; N, 23.01; found: C, 22.71; H, 2.79; N, 23.27; decomposition at 125 °C; molar conductivity (1.0 × 10⁻³ mol L⁻¹ DMSO) 29.30 cm² Ω⁻¹ mol⁻¹; IR (KBr) ν / cm⁻¹ 3176 (ν N4–H), 1530 (ν C5=N), 1466/1377 (ν_{ass} / ν_s NO₂), 794 (ν C=S), 1384 (ν NO₃); ¹H NMR (400.13 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm 10.87 (s, 1H, N4H), 8.82

(s, 1H, N5H), 8.08 (s, 1H, H2), 7.32 (s, 1H, N5H), 5.19 (s, 2H, H4), 2.41 (s, 3H, C1CH₃), 2.05 (s, 3H, C5CH₃); ¹³C{¹H} NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm 174.4 (C6), 153.8 (C1), 151.9 (C5), 138.4 (C3), 132.7 (C2), 50.2 (C4), 15.6 (C5CH₃), 13.9 (C1CH₃); yield 89%.

(*E*)-*N*-Methyl-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamidenitrate]silver(I) [Ag(HL4)NO₃] (4)

Brown solid; anal. calc. for C₉H₁₄AgN₇O₅S (FW: 440.18 g mol⁻¹): C, 24.56; H, 3.21; N, 22.27; found: C, 23.97; H, 3.17; N, 21.22; melting point: 190.0–191.0 °C; molar conductivity (1.0 × 10⁻³ mol L⁻¹ DMSO) 33.70 cm² Ω⁻¹ mol⁻¹; IR (KBr) ν / cm⁻¹ 3262 (ν N4–H), 1560 (ν C5=N), 1486/1384 (ν_{ass} / ν_s NO₂), 788 (ν C=S), 1384 (ν NO₃); ¹H NMR (400.13 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm 10.45 (s, 1H, N4H), 8.15 (s, 1H, N5H), 8.10 (s, 1H, H2), 5.19 (s, 2H, H4), 3.02 (d, 3H, H7, *J* 4.50 Hz), 2.45 (s, 3H, C1CH₃), 2.02 (s, 3H, C5CH₃); ¹³C{¹H} NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm 174.3 (C6), 153.3 (C1), 152.0 (C5), 138.4 (C3), 132.7 (C2), 50.4 (C4), 31.7 (C7), 15.4 (C5CH₃), 14.0 (C1CH₃); yield 68%.

Syntheses of bismuth(III) complexes (5-6)

The bismuth(III) complexes were obtained by mixing equimolar amounts (0.5 mmol) of the desired ligand with BiCl₃ in methanol. The reaction mixture was kept under reflux for 24 h. The obtained solids were vacuum filtered, washed with methanol followed by diethyl ether and then dried under reduced pressure. **HL1** and **HL2** did not react with BiCl₃ under the experimental conditions.

[(*E*)-2-(1-(2-Methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamidetrichloro]bismuth(III) [Bi(HL3)Cl₃] (5)

Yellow solid; anal. calc. for C₈H₁₂BiCl₃N₆O₂S (FW: 571.62 g mol⁻¹): C, 16.81; H, 2.12; N, 14.70; found: C, 16.88; H, 2.19; N, 14.40; melting point: decomposition at 153.0 °C; molar conductivity (1.0 × 10⁻³ mol L⁻¹ DMSO) 10.03 cm² Ω⁻¹ mol⁻¹; IR (KBr) ν / cm⁻¹ 3258 (ν N4–H), 742 (ν C=S), 1524 (ν C5=N), 1430/1368 (ν_{ass} / ν_s NO₂); ¹H NMR (400.13 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm 10.38 (s, 1H, N4H), 8.13 (s, 1H, N5H), 8.06 (s, 1H, H2), 6.42 (s, 1H, N5H), 5.13 (s, 2H, H4), 2.38 (s, 3H, C1CH₃), 2.01 (s, 3H, C5CH₃); ¹³C{¹H} NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm 178.8 (C6), 151.8 (C1), 147.4 (C5), 138.5 (C3), 132.5 (C2), 50.0 (C4), 15.1 (C5CH₃), 13.6 (C1CH₃); yield 84%.

(*E*)-*N*-Methyl-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamidetrichloro]bismuth(III)[Bi(HL4)Cl₃] (6)

Yellow solid; anal. calc. for C₉H₁₄BiCl₃N₆O₂S

(FW: 585.65 g mol⁻¹): C, 18.46; H, 2.41; N, 14.35; found: C, 18.47; H, 2.49; N, 14.63; melting point: 141.0-142.2 °C; molar conductivity (1.0 × 10⁻³ mol L⁻¹ DMSO) 5.72 cm² Ω⁻¹ mol⁻¹; IR (KBr) ν / cm⁻¹ 3342 (ν N4-H), 774 (ν C=S), 1540 (ν C5=N), 1486/1368 (ν_{ass} / ν_s NO₂); ¹H NMR (400.13 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm 10.32 (s, 1H, N4H), 8.08 (s, 1H, H2), 7.24 (s, 1H, N5H), 5.12 (s, 2H, H4), 2.89 (d, 3H, H7, *J* 4.08 Hz) 2.39 (s, 3H, C1CH₃), 1.96 (s, 3H, C5CH₃); ¹³C{¹H} NMR (100.61 MHz, DMSO-*d*₆) δ / ppm 178.8 (C6), 151.8 (C1), 147.0 (C5), 138.5 (C3), 132.7 (C2), 50.2 (C4), 30.6 (C7), 14.8 (C5CH₃), 13.8 (C1CH₃); yield 66%. Several attempts to grow crystals of complexes (**1-6**) were unsuccessful.

Antimicrobial activity

Yeast cell cultures

Candida albicans (ATCC 18804), *Candida dubliniensis* (clinical isolate 28), *Candida lusitanae* (CBS 6936) and *Candida glabrata* (ATCC 90030) strains were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, USA) and from Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Netherlands).

The tests with *Candida* strains were performed in Sabouraud dextrose (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 is defined as 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 (NCCLS) for yeasts (M27-A3).

Antifungal activity - *In vitro* susceptibility testing by the microdilution method

The antifungal activity of the compounds was evaluated in final concentrations ranging from 250 to 0.12 mg mL⁻¹ in microdilution plates with 96-wells. The compounds under study and the negative controls were prepared as 12.5 mg mL⁻¹ stock solutions in DMSO. Subsequently, the stock solutions were diluted in culture medium containing Tween 80 (0.5% v/v) in order 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. Three control tests were prepared, 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 performed in triplicate and the absorbances were determined on an ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) tray reader (Thermoplate, Brazil) at a 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 inhibition of 50% of growth (IC₅₀) compared with the positive control test. The results were processed by OriginPro 9.0[®] software¹⁵ using dose-response curves. For comparison, IC₅₀ values were converted to μM.

Antibacterial activity

In vitro susceptibility to the compounds under study was evaluated according to Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI).¹⁶ Six reference strains of Gram-negative anaerobic bacteria were tested: *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Bacteroides thetaiotaomicron* (ATCC 23745), *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482), *Bacteroides ovatus* (ATCC 8483), *Parabacteroides distasonis* (ATCC 1945) and *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586).

In order to evaluate the minimum inhibitory concentration of each compound, bacterial strains were cultured in Brucella Agar supplemented with hemin (5 μg mL⁻¹), vitamin K1 (1 μg mL⁻¹) and horse blood (5% v/v) (BA-S), at 37 °C for 48 h in an anaerobic chamber (85% N₂, 10% H₂ and 5% CO₂). The inoculum was prepared in sterile saline solution 0.9% m/v and standardized to obtain visual turbidity comparable to that of the standard 0.5 of the McFarland scale, which provides a concentration of approximately 1.5 × 10⁸ CFU mL⁻¹. A 1:10 dilution of the inoculum was prepared in sterile saline solution 0.9% m/v, resulting in a concentration of approximately 1.5 × 10⁷ CFU mL⁻¹. The adjusted suspensions were used in the final inoculation up to 30 min after preparation.

The compounds were tested for determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by the agar dilution method. Briefly, the technique consisted of adding 4.0 mL of working solution of the compounds containing nine different concentrations (ranging from 320 to 1.25 μg mL⁻¹) in flasks containing 36 mL of the culture medium followed by plating. In the preparation of the working solutions of the compounds, DMSO was used as the solvent and sterile distilled water as the diluent, so that the final concentration of DMSO was less than 0.5% in all tests. Inoculation was performed by adding, approximately 10⁵ CFU *per* spot of each bacterial strain using the Steers

replicator and subsequent anaerobic incubation at 37 °C for 48 h.

The minimum inhibitory concentration (MIC) was expressed as the lowest concentration that resulted in visual inhibition of the microorganism growth compared with the growth in the culture medium free of the tested compound (positive control). In addition, incubation in the absence of inoculum was performed to confirm the sterility of the culture medium (negative control) as well as the control to assure the non-interference of DMSO in cell viability. The tests were performed in duplicate with absolute agreement of the results and the MIC values were expressed in μM .

Results and Discussion

Formation of silver(I) complexes (**1-4**) and of bismuth(III) complexes (**5-6**)

Microanalyses and molar conductivity data were compatible with the formation of $[\text{Ag}(\text{HL})\text{NO}_3]$ (**1-4**) and $[\text{Bi}(\text{HL})\text{Cl}_3]$ (**5-6**) complexes, in which one neutral thiosemicarbazone or hydrazone ligand is attached to the metal center together with a nitrate ion (**1-4**) or three chloride ions (**5-6**). The relatively high values of molar conductivities of **1-4** suggest nitrate release in solution, as previously observed for silver(I) complexes with 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones.^{5,17}

Spectroscopic characterization

Infrared spectra

The $\nu(\text{C}=\text{N})$ absorption, observed at 1526-1532 cm^{-1} in the infrared spectra of the free bases, shifts to 1524-1560 cm^{-1} in those of complexes (**1-6**), in accordance with coordination through the imine carbon. The $\nu(\text{C}=\text{O})$ absorption at 1678 cm^{-1} in the spectrum of **HL1** does not shift in complex (**1**), while this absorption shifts from 1670 cm^{-1} in **HL2** to 1654 cm^{-1} in complex (**2**). The vibrations attributed to $\nu(\text{C}=\text{S})$, observed at 804 and 786 cm^{-1} in **HL3** and **HL4**, respectively, shift to 794 and 788 cm^{-1} in complexes (**3**) and (**4**), respectively, and to 742 and 774 cm^{-1} in (**5**) and (**6**), respectively, suggesting coordination through the sulfur.¹⁴ In addition, an absorption at 1380-1388 cm^{-1} was observed in the spectra of complexes (**1-4**), corresponding to the presence of nitrate in the metal coordination sphere.¹⁸

NMR spectra

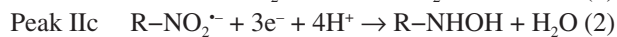
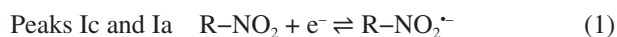
NMR spectra were recorded in $\text{DMSO}-d_6$. The ^1H resonances were doubtless assigned on the basis of chemical

shifts, multiplicities and by using 2D homonuclear $^1\text{H}-^1\text{H}$ correlation spectroscopy (COSY). The carbon type (C, CH) was determined by using distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT-135) experiments and the assignments were made by 2D heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) experiments.

In the ^1H NMR spectra of the free thiosemicarbazones and hydrazones a signal corresponding to N4-H was observed at δ 10.31-10.69. This signal was found at δ 10.32-10.87 in complexes (**1-6**). The signal of N5-H, observed at δ 6.41 and δ 8.16 in **HL3** shifts to δ 7.32 and δ 8.82 in complex (**3**) and to δ 6.42 and δ 8.13 in complex (**5**). This signal, observed at δ 7.24 in **HL4**, shifts to δ 8.15 in complex (**4**) and to δ 7.24 in complex (**6**). In the $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of the Schiff bases the signal at δ 144.9 -151.7 was assigned to carbon C5. This signal was found at δ 144.8-152.1 in complexes (**1-4**), suggesting coordination through the imine nitrogen. The C5 signal was observed at δ 147.4 in complexes (**5**) and (**6**). The signal of C=O was noticed at δ 172.2 and δ 163.1 for **HL1** and **HL2**, respectively. This signal does not shift upon coordination, suggesting that the carbonyl oxygen is probably feebly attached to the silver center, as previously observed in silver(I) complexes with 2-acetyl- and 2-benzoylpyridine hydrazones.^{5,17} The signals of C=S were observed at δ 178.9 for both **HL3** and **HL4**. Upon complexation this signal shifts to δ 174.4 and δ 174.3 in complexes (**3**) and (**4**), respectively, and to 178.8 in (**5**) and (**6**), indicating coordination through the sulfur.¹⁷

Electrochemistry studies

Secnidazole and **HL1-HL4** displayed a stable well-defined couple (system Ic/Ia, anodic (Ia) and cathodic (Ic) peak currents) with $E_{p\text{Ic}}$ near -1100 mV, corresponding to a monoelectronic transfer process attributed to the formation of a stable nitro radical anion ($\text{R}-\text{NO}_2^{\cdot-}$). The voltammograms also exhibited a second wave near -2000 mV, assigned to the generation of hydroxylamine ($\text{R}-\text{NHOH}$) and, in some cases, an irreversible oxidation near to -500 mV, related to the formation of nitroso ($\text{R}-\text{NO}$) species (see equations 1-3).¹⁴



The voltammograms of complexes (**1-6**) (see Figure 2 and S19, Supplementary Information (SI)) show two *quasi*-reversible processes which were attributed to the $\text{R}-\text{NO}_2/\text{R}-\text{NO}_2^{\cdot-}$ (peaks Ic and Ia). The $E_{p\text{Ic}}$ values suggest that the formation of $\text{R}-\text{NO}_2^{\cdot-}$ is favored in

complexes (**1-6**) in comparison to the Schiff base ligands (Table 1).

In complexes (**1-4**) an irreversible oxidation process (IVa) in the 770-860 mV range was attributed to the silver(I) \rightarrow silver(II) oxidation and an irreversible process at 375-430 mV range was assigned to the silver(I) \rightarrow silver(0) reduction, in accordance with processes reported in the literature for other silver(I) complexes.¹⁹ In complexes (**5-6**) the processes (Va) at 206 and 133 mV were attributed to the bismuth(III) \rightarrow bismuth(IV) oxidation.

Antimicrobial activity

Although the free ligands were inactive, silver(I) complexes (**1-4**) showed antimicrobial effects against *Candida* yeast strains (Table 2), being more active than silver nitrate. Some complexes were as active as nystatin against *C. dubliniensis*. Since silver nitrate showed

antifungal activity, the observed effects of complexes (**1-4**) are probably due to the presence of silver(I). Unlike complexes (**1-4**), complexes (**5-6**) did not show antifungal effects, corroborating the assumption that the antifungal properties of (**1-4**) are due to the presence of silver(I). Interestingly, copper(II) complexes with the same ligands did also not show antifungal activity against the *Candida* strains.¹⁴ Hence, in the case of the silver(I) complexes (**1-4**), the antifungal activity is not due to the nitro pharmacophoric group, but it is probably related to the presence of silver(I), the role of coordination being possibly to increase lipophilicity, allowing the metal to cross the fungal cell membrane.

The Schiff base ligands and their silver(I) and bismuth(III) complexes proved to be inactive against *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Streptococcus sanguinis* (ATCC 49456) Gram-positive and

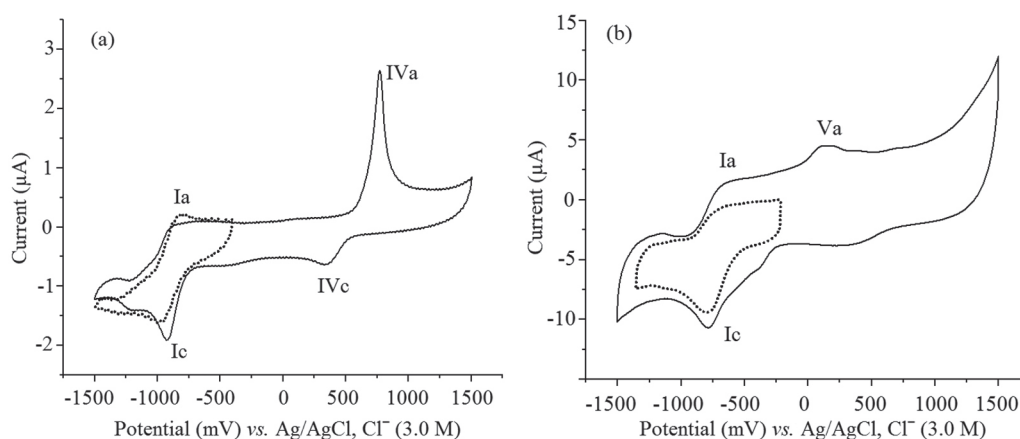


Figure 2. Cyclic voltammogram of (a) complex (**1**), (b) complex (**5**) in aprotic media (1 M TBAP in DMF) vs. Ag / AgCl, Cl⁻ (3.0 M); scan rate of 250 mV s⁻¹. Dotted line shows a short sweep with the isolated RNO₂ / R-NO₂⁻ couple.

Table 1. Cyclic voltammetry parameters^a corresponding to the R-NO₂ / R-NO₂⁻, Ag^I / Ag^{II}, Ag^I / Ag⁰ and Bi^{III} / Bi^{IV} processes vs. Ag / AgCl, Cl⁻ (3.0 M) reference electrode

Compound ^b	R-NO ₂ / R-NO ₂ ⁻			Ag ^I / Ag ^{II}	Ag ^I / Ag ⁰	Bi ^{III} / Bi ^{IV}
	Ep _{Ic} / mV	ΔEp / mV	Ip _{Ia} / Ip _{Ic}	Ep _{IVa} / mV	Ep _{IVc} / mV	Ep _{Va} / mV
HL1	-1101	122	0.87	-	-	-
[Ag(HL1)NO ₃] (1)	-928	58	0.80	770	375	-
HL2	-1115	78	0.82	-	-	-
[Ag(HL2)NO ₃] (2)	-873	34	0.54	860	430	-
HL3	-1120	83	0.83	-	-	-
[Ag(HL3)NO ₃] (3)	-831	44	0.45	849	401	-
[Bi(HL3)Cl ₃] (5)	-843	68	0.37	-	-	206
HL4	-1125	141	0.92	-	-	-
[Ag(HL4)NO ₃] (4)	-826	58	0.62	785	390	-
[Bi(HL4)Cl ₃] (6)	-742	88	0.37	-	-	133

^aScan rate of 250 mV s⁻¹; ^bcompounds at 1 mM dissolved in DMF using 1 M TBAP as supporting electrolyte, anodic (Ia) and cathodic (Ic) peak currents, and the corresponding potential (Ep).

Table 2. Antifungal activity (IC₅₀) of compounds against *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida dubliniensis* (clinical isolate 28), *Candida lusitanae* (CBS 6936) and *Candida glabrata* (ATCC 90030)

Compound	IC ₅₀ / μM			
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida lusitanae</i>
HL1	–	–	–	–
[Ag(HL1)NO ₃] (1)	16.43 ± 1.96	5.29 ± 0.33	27.20 ± 2.79	9.57 ± 0.22
HL2	–	–	–	–
[Ag(HL2)NO ₃] (2)	> 8	8.00 ± 0.20	28.49 ± 1.17	8.59 ± 0.13
HL3	–	–	–	–
[Ag(HL3)NO ₃] (3)	10.55 ± 0.42	5.63 ± 0.23	24.35 ± 5.18	10.31 ± 0.21
HL4	–	–	–	–
[Ag(HL4)NO ₃] (4)	11.50 ± 0.39	7.88 ± 0.17	19.39 ± 0.05	8.59 ± 0.15
AgNO ₃	40.33 ± 1.46	> 11	64.24 ± 2.21	20.79 ± 1.76
Miconazole nitrate	5.84 ± 2.27	1.58 ± 0.51	19.50 ± 4.53	< 0.062 × 10 ⁻³
Nystatin	4.75 ± 1.24	4.44 ± 0.76	1.92 ± 0.22	5.31 ± 0.84

IC₅₀: half maximal inhibitory concentration.

against *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Escherichia coli* (ATCC 25723), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) Gram-negative aerobic bacteria.

In contrast, the free ligands and complexes (**1-6**) exhibited potent antimicrobial effects against the studied anaerobic bacterial strains (Table 3). Except for **HL4**, upon coordination of the Schiff base ligands to both silver(I) and bismuth(III), the antibacterial activity increased in several cases. While silver nitrate revealed to be inactive, complexes (**1-4**) proved to be equally or more active than

the original ligands and to be as active as metronidazole. Likewise, complex (**5**) revealed to be more effective than the parent thiosemicarbazone against several bacterial strains. Comparison of the MIC values of complexes (**1-6**) and of the previously reported copper(II) analogues¹⁴ shows that the complexes exhibit similar antibacterial effects, which are due to the presence of the nitro pharmacophoric group in the ligands. As already mentioned, upon complexation to copper(II), silver(I) and bismuth(III) reduction of the nitro group is favored, which might in part account for the improved antibacterial effects of the complexes

Table 3. Antibacterial activity (MIC values) of compounds against *Bacteroides fragilis* (ATCC25285), *Bacteroides thetaiotaomicron* (ATCC 23745), *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482), *Bacteroides ovatus* (ATCC 8483), *Parabacteroides distasonis* (ATCC 1945) and *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586)

Compound	MIC / μM					
	<i>B. fragilis</i>	<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. ovatus</i>	<i>P. distasonis</i>	<i>F. nucleatum</i>
HL1	29.78	7.45	3.72	3.72	7.45	8.36
[Ag(HL1)NO ₃] (1)	4.18	4.18	4.18	≤ 2.09	16.72	4.18
HL2	13.28	13.28	13.28	6.64	13.28	6.64
[Ag(HL2)NO ₃] (2)	3.32	3.32	3.32	1.66	6.64	3.32
HL3	25.36	25.36	12.68	3.17	6.34	3.90
[Ag(HL3)NO ₃] (3)	3.90	7.80	3.90	3.90	15.60	3.90
[Bi(HL3)Cl ₃] (5)	7.80	15.61	7.80	7.80	1.95	7.80
HL4	3.24	6.47	3.24	3.24	6.47	3.24
[Ag(HL4)NO ₃] (4)	3.70	3.70	3.70	3.70	≥ 7.38	3.70
[Bi(HL4)Cl ₃] (6)	3.70	7.40	3.70	3.70	≥ 7.40	3.70
AgNO ₃	≥ 187.77	≥ 187.77	≥ 187.77	187.77	94.19	187.77
BiCl ₃	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metronidazole	3.17	3.17	3.17	3.17	6.34	1.46

ND: not determined since BiCl₃ forms insoluble hydroxylated species in aqueous media. MIC: minimum inhibitory concentration.

Conclusions

Nitroimidazoles are prodrugs that require bioactivation of the nitro group in order to exert their antimicrobial effect. The mechanism of action of these compounds involves reduction of the nitro group generating reactive radical species, mainly the nitro anion radical $R-NO_2^{\cdot-}$ which reacts with cellular components such as DNA or proteins. Under anaerobic conditions, the redox potential of the electron-transport system in microbes is sufficiently negative to reduce the nitro group. However, in the presence of oxygen, the nitro radical anion is rapidly re-oxidized to its parent precursor in a futile cycling, with impairment of the bactericidal effects.¹²

The fact that the Schiff base ligands and their silver(I) and bismuth(III) complexes did not show antimicrobial activity against aerobic bacteria but were highly active against anaerobic strains strongly suggests formation of the $R-NO_2^{\cdot-}$ nitro anion radical under anaerobic conditions and the possible participation of these species in the mode of antibacterial effect of the compounds under study.

The redox potential for the formation of the $R-NO_2^{\cdot-}$ nitro anion radical for the copper(II),¹⁴ silver(I) and bismuth(III) complexes are more favorable than in the case of the free ligands, which, at least in part, might account for the higher antimicrobial activity of the complexes. Considering the fact that silver(I) and bismuth(III) compounds are already clinically employed as antimicrobial agents and the relatively acceptable toxicity of these compounds, coordination to silver(I) and bismuth(III) might probably constitute better strategies than coordination to copper(II) for the design of new antimicrobial drug candidates to treat infection originated from anaerobic bacteria.

In addition, complexes (**1-4**) showed antifungal effects, unlike their copper(II) and bismuth(III) congeners, suggesting that the silver(I) complexes exhibit a broader spectrum of action. Since the free Schiff bases and their bismuth(III) and copper(II) complexes do not show antifungal properties, the antifungal activities of complexes (**1-4**) are probably due to the presence of silver(I).

Increased use of nitro-heterocyclic drugs has resulted in drug resistance to a number of these agents in *Bacteroides* and other bacterial strains.²⁰ In fact, several studies have reported decreased susceptibility among *Bacteroides* species to nitroimidazole derivatives. Since anaerobes can cause infections at almost all anatomic sites and are an important cause of bloodstream infections, accounting for up to 17% of positive blood cultures,²¹ investigation on novel antibacterial agents is of utmost relevance.

Supplementary Information

Supplementary data (infrared, ¹H and ¹³C NMR spectra and the cyclic voltammograms of complexes **1-6**) are available free of charge at <http://jbcs.sbq.org.br> as PDF file.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge CNPq, CAPES, FAPEMIG and INCT-INOVAR (proc. CNPq 573.364/2008-6) for financial support and students grants.

References

- Beraldo, H.; Gambino, D.; *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 31.
- Thota, S.; Rodrigues, D. A.; Pinheiro, P. S. M.; Lima, L. M.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 2797.
- da Silva, J. G.; Recio-Despaigne, A. A.; Louro, S. R. W.; Bandeira, C. C.; Souza-Fagundes, E. M.; Beraldo, H.; *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *65*, 415.
- Ferreira, I. P.; Piló, E. D. L.; Recio-Despaigne, A. A.; da Silva, J. G.; Ramos, J. P.; Marques, L. B.; Prazeres, P. H. D. M.; Takahashi, J. A.; Souza-Fagundes, E. M.; Rocha, W.; Beraldo, H.; *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 2988.
- Santos, A. F.; Ferreira, I. P.; Takahashi, J. A.; Rodrigues, G. L. S.; Pinheiro, C. B.; Teixeira, L. R.; Rocha, W. R.; Beraldo, H.; *New J. Chem.* **2018**, *42*, 2125.
- Cardoso, J. M. S.; Guerreiro, S. I.; Lourenço, A.; Alves, M. M.; Montemor, M. F.; Mira, N. P.; Leitão, J. H.; Carvalho, M. F. N. N.; *PLoS One* **2017**, *12*, e0177355.
- Kalinowska-Lis, U.; Felczak, A.; Chęcińska, L.; Zawadzka, K.; Patyna, E.; Lisowska, K.; Ochockia, J.; *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 8178.
- Kalinowska-Lis, U.; Felczak, A.; Chęcińska, L.; Małecka, M.; Lisowska, K.; Ochockia, J.; *New J. Chem.* **2016**, *40*, 694.
- Luqman, A.; Blair, V. L.; Brammananth, R.; Crellin, P. K.; Coppel, R. L.; Andrews, P. C.; *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, *2015*, 4935.
- Keogan, D. M.; Twamley, B.; Fitzgerald-Hughes, D.; Griffith, D. M.; *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 11008.
- Ferraz, K. S. O.; Silva, N. F.; Da Silva J. G.; Miranda, L. F.; Romeiro, C. F. D.; Souza-Fagundes, E. M.; Mendes, I. C.; Beraldo H.; *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *53*, 98.
- Nyirjesy, P.; Schwebke, J. R.; *Future Microbiol.* **2018**, *13*, 507.
- Ang, C. W.; Jarrad, A. M.; Cooper, M. A.; Blaskovich, M. A. T.; *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7636.
- Oliveira, A. A.; Oliveira, A. P. A.; Franco, L. L.; Ferencs, M. O.; Ferreira, J. F. G.; Bachi, S. M. P. S.; Speziali, N. L.; Farias, L. M.; Magalhães, P. P.; Beraldo, H.; *Biomaterials* **2018**, *31*, 571.

15. *OriginPro 9.0*; OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA, 2012.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*, CLSI document M100-S25; CLSI: Pennsylvania, USA, 2015.
17. Santos, A. F.; Ferreira, I. P.; Pinheiro, C. B.; Santos, V. G.; Lopes, M. T. P.; Teixeira, L. R.; Rocha, W. R.; Rodrigues, G. L. S.; Beraldo, H.; *ACS Omega* **2018**, *3*, 7027.
18. Nakamoto, K.; *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*; Wiley-Interscience: New York, USA, 1970.
19. Movahedi, E.; Rezvani, A. R.; *J. Mol. Struct.* **2017**, *1139*, 407.
20. Townson, S. M.; Boreham, P. F. L.; Upcroft, P.; Upcroft, J. A.; *Acta Trop.* **1994**, *56*, 173.
21. Brook, I.; *Anaerobe* **2010**, *16*, 183.

Submitted: February 2, 2019

Published online: June 6, 2019



Triethylphosphinegold(I) Complexes with Secnidazole-Derived Thiosemicarbazones: Cytotoxic Activity against HCT-116 Colorectal Cancer Cells under Hypoxia Conditions

Ana P. A. Oliveira, Jennifer T. J. Freitas, Renata Diniz, Claudia Pessoa, Sarah S. Maranhão, Juliana M. Ribeiro, Elaine M. Souza-Fagundes, and Heloisa Beraldo*

Cite This: *ACS Omega* 2020, 5, 2939–2946

Read Online

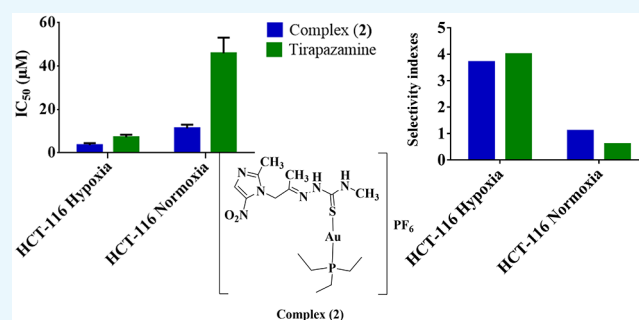
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Triethylphosphinegold(I) complexes [Au(HL1)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (1), [Au(HL2)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (2), and [Au(HL3)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (3) were obtained with (*E*)-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamide (HL1), (*E*)-*N*-methyl-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamide (HL2), and (*E*)-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)-*N*-phenylhydrazinecarbothioamide (HL3). All compounds were assayed for their cytotoxic activities against HCT-116 colorectal carcinoma cells under normoxia and hypoxia conditions and against nonmalignant HEK-293 human embryonic kidney cells under normoxia conditions. The thiosemicarbazone ligands HL1–HL3 were inactive against HCT-116 cells under hypoxia but while HL3 was inactive, HL1 and HL2 proved to be cytotoxic to both cell lineages under normoxia conditions. Complexes (1–3) and the triethylphosphinegold(I) precursor proved to be active against both cell lineages in normoxia as well as in hypoxia. While 1 and 3 revealed to be active against HEK-293 and HCT-116 cells, being approximately as active against HCT-116 cells in normoxia as under hypoxia, complex (2) proved to be more active against HCT-116 cells under hypoxia than under normoxia conditions, and more active against HCT-116 cells than against the nonmalignant HEK-293 cells, with the selectivity index, calculated as $SI = IC_{50HEK-293}/IC_{50HCT-116hypoxia}$, equal to 3.7, similar to the value obtained for the control drug tirapazamine (tirapazamine (TPZ), SI = 4). Although the compounds showed distinct cytotoxic activities, the electrochemical behaviors of HL1–HL3 were very similar, as were the behaviors of complexes (1–3). Complex (2) deserves special interest since it was significantly more active under hypoxia than under normoxia conditions. Hence, in this case, selective reduction of the nitro group in a low oxygen pressure environment, resulting in toxic reactive oxygen species (ROS) and damage to DNA or other biomolecules, might operate, while for the remaining compounds, other modes of action probably occur.



INTRODUCTION

Thiosemicarbazones are an important class of bioactive compounds that show antimicrobial, antiviral, antiparasitic, and antineoplastic activities.¹ Functionalization of thiosemicarbazones with a variety of pharmacophoric groups aiming to design new drug candidates has been extensively investigated.^{2,3}

Nitroimidazole-containing compounds show antimicrobial,^{4,5} antiparasitic,⁶ and antineoplastic⁷ activities related to their ability to undergo a reduction of the nitro group, generating toxic reactive oxygen species (ROS) such as the nitro anion radical, NO₂^{•-}, under conditions of low oxygen concentration, which result in damage of DNA and other biomolecules. Hence, the presence of nitroimidazole may result in hypoxic selectivity.⁸

Hypoxia is frequently a characteristic of late-stage solid tumors. In solid tumor tissues, which grow and proliferate, oxygen consumption is higher than oxygen supply and

transport, and the distance between cells and the abnormal vasculature increases, weakening oxygen circulation.^{9,10} Hence, hypoxia-selective compounds may in principle exhibit anticancer effects with reduced systemic toxicity.

Metal complexes with thiosemicarbazones also show pharmacological applications as antineoplastic^{11–13} antimicrobial,¹⁴ antitrypanosomal,^{15,16} and antiviral¹⁷ agents.

Gold(I, III) complexes with different ligands have shown in vitro and in vivo antitumor activities.¹⁸ Gold(I) and gold(III) complexes with thiosemicarbazones and bis-(thiosemicarbazones) have been shown to exhibit antiprolifer-

Received: November 6, 2019

Accepted: January 22, 2020

Published: February 6, 2020

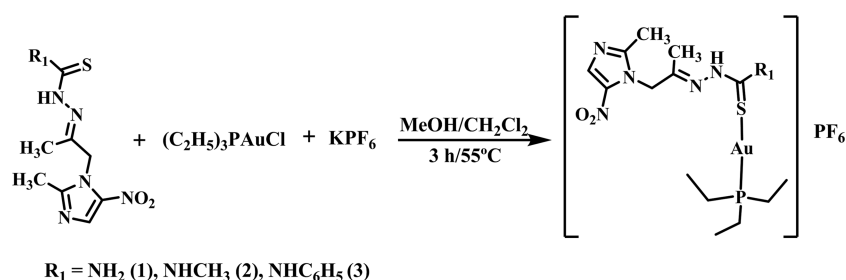


Figure 1. Syntheses of triethylphosphinegold(I) complexes with secnidazole-derived thiosemicarbazones $[\text{Au}(\text{HL}1)\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (1), $[\text{Au}(\text{HL}2)\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (2) and $[\text{Au}(\text{HL}3)\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (3).

ative activity against cancer cells^{19–21} and to act as inhibitors of the seleno-enzyme thioredoxin reductase (TrxR).^{19–21}

Auranofin, triethylphosphine (2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-thiopyranosato-*S*)gold(I), was the first metal–phosphine complex to be introduced into clinics for the treatment of rheumatoid arthritis.²² After the introduction of auranofin for the treatment of rheumatoid arthritis, numerous gold(I) complexes with thiolate, phosphine, *N*-heterocyclic carbene (NHC), and thiourea have been evaluated for their antiproliferative activities.²³ In a previous work, we demonstrated that gold(I) complexes with 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones were cytotoxic to leukemia and solid tumor cells.¹⁹

We also demonstrated that hydrazones and thiosemicarbazones derived from secnidazole, a 5-nitroimidazole-containing compound, as well as their copper(II),²⁴ silver(I), and bismuth(III)²⁵ complexes were inactive against aerobic bacteria but proved to be highly active against anaerobic strains, indicating that reduction of the nitro group under low oxygen concentrations might be part of their antimicrobial mode of action.

Tirapazamine (TPZ) is a hypoxia-activatable bio-reducible prodrug, which can be transformed from a nontoxic into a toxic species via a one-electron reduction in the hypoxic environment, resulting in selective antineoplastic effects against hypoxic tumors with minimal toxicity to nonmalignant tissues.²⁶

In the present work, triethylphosphinegold(I) complexes were obtained with secnidazole-derived thiosemicarbazones (Figure 1) and their cytotoxic activities against solid tumor and healthy cells under normoxia and hypoxia conditions were evaluated in comparison with TPZ.

RESULTS AND DISCUSSION

Crystal Structure Determinations. The crystal data analysis indicates that **HL2** crystallized in the *P*-1 triclinic, while **HL3** crystallized in the *Pbca* orthorhombic space group. **HL2** formed twin crystals with the same composition and unit cell but with different orientations, indicating a pseudomerohedral twin. Of all reflections, 45.9% were indexed as component one, 20.4% as component two, 18% as overlapping reflections belonging to both components, and 15.7% were nonindexed.

Selected bond distances and angles in the structures of **HL2** and **HL3** are shown in Table 1. In both compounds, the C6–S and N3–C5 bond distances (1.689(4) and 1.275(5) Å for **HL2** and 1.6709(16) and 1.272(2) Å for **HL3**, respectively) indicate the presence of C=S and C=N double bonds, as expected.²⁷ Structural representations and the atom numbering scheme for **HL2** and **HL3** are shown in Figure 2. The molecular

Table 1. Selected Bond Distances (Å) and Angles (deg) in the Crystal Structures of **HL2** and **HL3**

compound	HL2	HL3
S–C6	1.689(4)	1.6709(16)
N3–N4	1.384(4)	1.3744(19)
N4–H4	0.8273	0.8821
N5–C6	1.316(5)	1.3418(19)
N5–C9	1.448(5)	1.4123(19)
N5–H5	0.8923	0.8294
N6–O2	1.209(5)	1.216(2)
N6–O1	1.231(6)	1.227(2)
N3–C5	1.275(5)	1.272(2)
C1–C8	1.499(8)	1.481(3)
C5–C7	1.492(6)	1.501(2)
N3–N4–H4	117.9	123.9
C6–N5–C9	123.6(3)	133.20(14)
C6–N5–H5	117.8	114.6
C9–N5–H5	118.5	112.2
N5–C6–N4	117.5(3)	113.28(14)
H3A–O3–H3B		109
C14–C9–C10		119.34(15)
C14–C9–N5		115.75(15)
C10–C9–N5		124.88(15)

conformation in both compounds is similar. The dihedral angle between the imidazole ring and the thiosemicarbazone fragment is 77.2(1)° in **HL2** and 83.88(5)° in **HL3**. In **HL3**, the dihedral angle between the benzenic ring and the thiosemicarbazone fragment is 14.43(8)°.

The crystal packings of the compounds are very distinct, mainly due to the presence of water molecules and of the phenyl ring in **HL3** (see Figures S1 and S2, Supporting Information). In the crystal packing of **HL2**, an N5–H⋯N1 intermolecular hydrogen bond was observed ($d(\text{N5}\cdots\text{N1}) = 2.960(6)\text{Å}$), with the formation of a dimeric motif (see Table S1, Supporting Information). An N4–H⋯S interaction is also observed in this compound ($d(\text{N4}\cdots\text{S}) = 3.457(4)\text{Å}$) that gives rise to a one-dimensional (1-D) network arrangement. In the crystal packing of **HL3**, strong intermolecular interactions among **HL3** molecules were not observed and stabilization of the solid is due to N4–H⋯O3 ($d(\text{N4}\cdots\text{O3}) = 2.937(2)\text{Å}$) and O3–H⋯N1 ($d(\text{O3}\cdots\text{N1}) = 2.853(2)\text{Å}$) intermolecular hydrogen bonds among **HL3** and water molecules (see Table S2, Supporting Information).

The Hirshfeld surfaces (HS) as the fingerprint plot analysis^{28,29} show that changing from methyl in **HL2** to phenyl in **HL3** promotes relevant modifications in the solid state. Comparing the HS of the compounds (Figure 3), it is possible to notice the difference in their shapes and, as

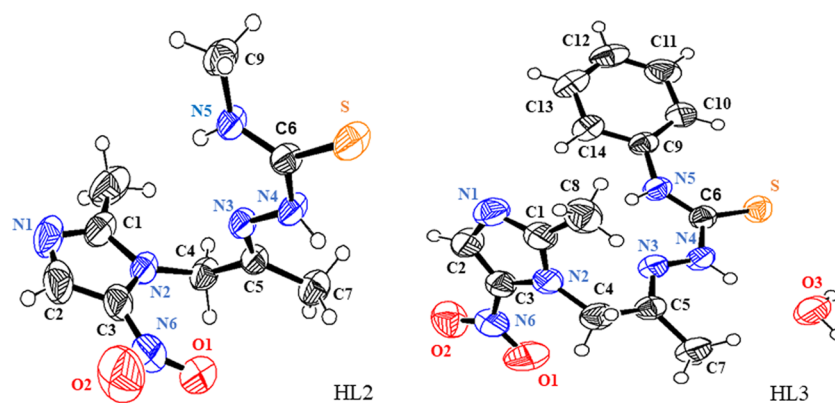


Figure 2. Molecular plots of HL2 and HL3 showing the labeling scheme of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level.

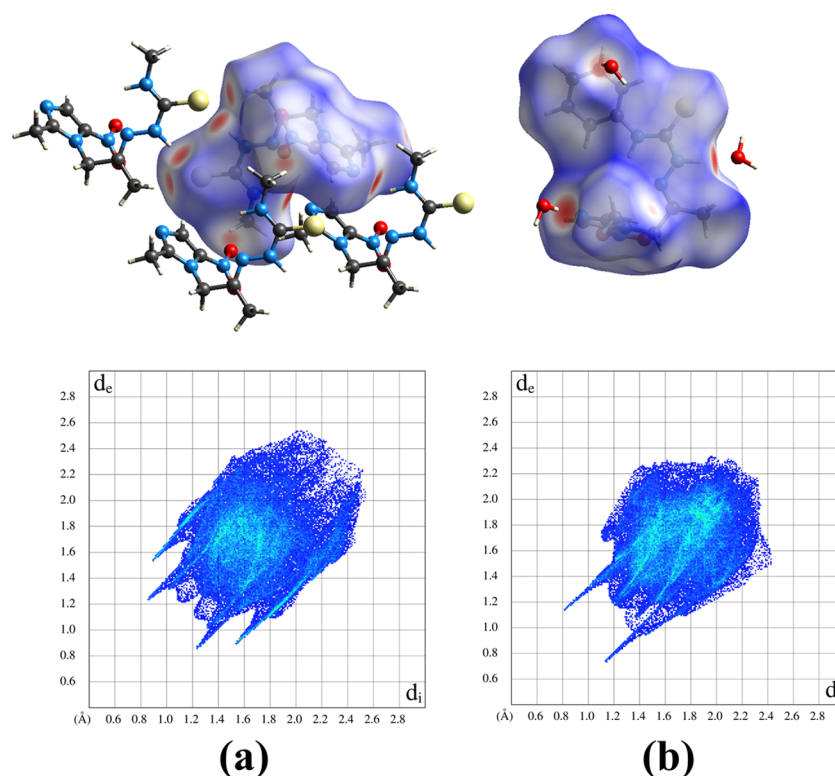


Figure 3. Hirshfeld surface (top) and fingerprint plots (bottom) of (a) HL2 and (b) HL3.

expected, in volume (HL2 = 314.64 Å³ and HL3 = 388.79 Å³). The distribution of the intermolecular interactions is also distinct in the compounds. In HL3, the intermolecular interactions are stronger than those in HL2, since the $d_i + d_e$ distance is 4.7 Å in HL2 and 4.5 Å in HL3. However, the strongest interactions are related to N⋯H contacts in both compounds. The most representative interactions in these solids are the nondirectional H⋯H contacts that represent 39.1 and 39.9% for HL2 and HL3, respectively (Figure S3a). The O⋯H contacts' contributions (Figure S3b) are similar in HL2 and HL3: 20.5% in HL2 and 22.1% in HL3, respectively. However, due to the presence of water molecules, the fingerprint plots in HL3 are asymmetric for these contacts as well as for the N⋯H contacts (Figure S3c). The N⋯H and S⋯H contributions correspond to 14.2 and 15.3%, respectively, for HL2 and 5.0 and 9.0% for HL3. The fingerprint plots did

not show the characteristic wing pattern, indicating that CH⋯ π interactions are not present in these compounds.

Formation of the Triethylphosphinegold(I) Complexes. C, H, and N analyses, as well as molar conductivity data, are in accordance with the formation of [Au(HL)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ complexes in which one thiosemicarbazone ligand and one triethylphosphine ligand are attached to the gold(I) center.

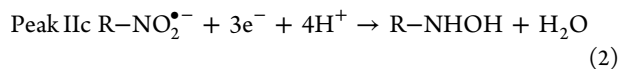
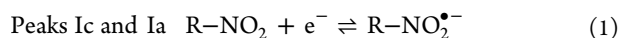
Spectroscopic Characterization. Infrared Spectra. The vibrations attributed to $\nu(\text{C}=\text{S})$, observed at 804–772 cm⁻¹ in HL1–HL3, could not be attributed in 1–3 due to overlapping with the PF₆ vibrations. However, the $\nu(\text{C}=\text{N})$ absorption, observed at 1530–1555 cm⁻¹ in the infrared spectra of the free bases, shifts to 1528–1540 cm⁻¹ in those of complexes (1–3), probably as a consequence of coordination through the sulfur.

NMR Spectra. NMR spectra were recorded in dimethyl sulfoxide (DMSO)- d_6 . The ^1H resonances were attributed based on chemical shifts and multiplicities, and using two-dimensional (2D) homonuclear ^1H - ^1H correlation spectroscopy (COSY). The carbon type (C, CH) was defined by means of distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT-135) experiments and the attributions were made using 2D heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) experiments.

In the ^1H NMR spectra of the free thiosemicarbazones, a signal corresponding to N4-H was observed at δ 10.31–10.87. This signal was found at δ 10.73–11.40 in complexes (1–3). The signal of N5-H, observed at δ 6.41–8.83 in the free thiosemicarbazones, shifts to δ 7.69–9.56 in complexes (1–3) as a consequence of coordination through the sulfur.²⁵

In the $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of HL1–HL3, the signal at δ 147.0–148.1 was assigned to carbon C5. This signal was found at δ 149.8–152.0 in complexes (1–3). The signals of C=S, observed at δ 175.8–178.9 in the spectra of the thiosemicarbazones,²⁴ shift to δ 171.2–176.8 in complexes (1–3), indicating coordination through the sulfur.²⁵

Electrochemistry Studies. Secnidazole and HL1–HL3 display a stable well-defined couple (system Ic/Ia), with EpIc in the –1120 to –1130 mV range, related to a one-electron transfer process attributed to the formation of a stable nitro radical anion ($\text{R-NO}_2^{\bullet-}$). The voltammograms also exhibit a wave near –2000 mV, assigned to the generation of hydroxylamine (R-NHOH) and, in some cases, an irreversible oxidation close to –500 mV, assigned to the formation of nitroso (R-NO) species (see eqs 1–3).²⁴



The voltammograms of complexes (1–3) (see Figures 4 and S16, Supporting Information) exhibit two quasi-reversible

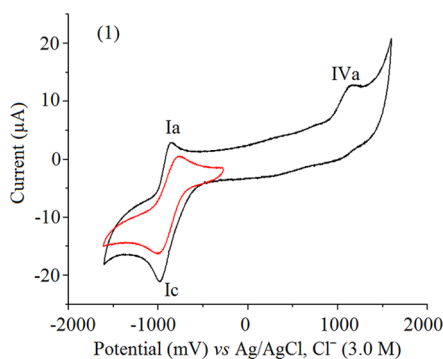


Figure 4. Cyclic voltammogram of $[\text{Au}(\text{HL1})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (1) at 250 mV s^{-1} . The red line shows a short sweep with the isolated $\text{RNO}_2/\text{R-NO}_2^{\bullet-}$ couple.

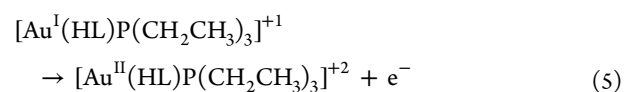
processes that were assigned to $\text{R-NO}_2/\text{R-NO}_2^{\bullet-}$ (peaks Ic and Ia), eq 4. The EpIc values indicate that the formation of $\text{R-NO}_2^{\bullet-}$ is favored in (1–3) in comparison to the thiosemicarbazone ligands (Table 2).

An irreversible oxidation process (IVa) was also observed at 1137–1410 mV, which was attributed to the Au(I)–Au(II) oxidation, eq 5.

Table 2. Cyclic Voltammetry Parameters^a Relative to the $\text{R-NO}_2/\text{R-NO}_2^{\bullet-}$ and $\text{Au}^{\text{I}}/\text{Au}^{\text{II}}$ Processes versus the Ag/AgCl , Cl^- (3.0 M) Reference Electrode; 250 mV s^{-1}

compound	$\text{RNO}_2/\text{R-NO}_2^{\bullet-}$			$\text{Au}^{\text{I}}/\text{Au}^{\text{II}}$
	EpIc	ΔE_p	IpIa/IpIc	EpIVa
HL1	–1120	83	0.83	
$[\text{Au}(\text{HL1})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (1)	–978	133	0.82	1173
HL2	–1125	141	0.92	
$[\text{Au}(\text{HL2})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (2)	–1065	92	0.73	1410
HL3	–1130	98	0.85	
$[\text{Au}(\text{HL3})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (3)	–987	93	0.66	1137

^aScan rate 250 mV s^{-1} ; compounds at 1 mM dissolved in dimethylformamide (DMF) using 0.1 M tetrabutylammonium perchlorate (TBAP) as the supporting electrolyte, anodic (Ia, IVa) and cathodic (Ic) peak currents, and the corresponding potential (E_p).



The EpIc for complexes (1–3) were found in the – (978–1065) mV range, while for the thiosemicarbazone ligands, these values were in the – (1120–1130) mV range, indicating that reduction of the nitro group is favored in the complexes.

Cytotoxic Activity. Taking into consideration that the nitroimidazole pharmacophoric group could, in principle, undergo reduction under anaerobic conditions resulting in the release of ROS that provokes DNA and protein damage, the cytotoxic effects of the compounds under study were evaluated against HCT-116 (colorectal cancer) cells under normoxia and hypoxia conditions and against HEK-293 (human embryonic kidney) nonmalignant cells in normoxia (see Table 3).

Although ligands HL1–HL3 and complexes (1–3) were designed to undergo a selective reduction of the nitro group under hypoxia, HL1–HL3 were not active against HCT-116 cells under hypoxia conditions. However, while HL3 was inactive against all of the tested cell lineages under normoxia

Table 3. Cytotoxic Activity (IC_{50} , μM)^a and Selectivity Indexes (SI)^b of the Compounds on HCT-116 and HEK-293 Cells

compound	HCT-116		HEK-293		
	normoxia	SI	hypoxia	SI	
HL1	5.6 ± 1.7	0.8	>100	ND	4.7 ± 0.4
HL2	4.4 ± 1.9	1	>100	ND	4.3 ± 0.8
HL3	>100	ND	>100	ND	>100
1	1.2 ± 0.3	3.7	5.7 ± 2.5	0.8	4.5 ± 2.0
2	11.3 ± 1.7	1.1	3.5 ± 0.9	3.7	12.8 ± 2.1
3	6.9 ± 2.4	1.3	6.0 ± 2.2	1.5	8.9 ± 0.8
$[\text{AuPEt}_3\text{Cl}]$	8.9 ± 2.1	0.4	5.2 ± 0.7	0.6	3.3 ± 1.2
TPZ	45.9 ± 7.2	0.6	7.2 ± 1.1	4	28.9 ± 9.2

^a IC_{50} : concentration that reduced 50% of cell proliferation; >100: at the highest concentration tested (100 μM), inhibition of 50% of cell viability was not verified and hence IC_{50} is above that value. ^bSI: selectivity indexes ($\text{IC}_{50}^{\text{HEK-293}}/\text{IC}_{50}^{\text{HCT-116}}$ normoxia and hypoxia); ND: not determined, since the compound was inactive in the experimental conditions.

and hypoxia conditions, **HL1** and **HL2** were active against HCT 116 and HEK-293 cells under normoxia but not under hypoxia conditions. The values of log P are 1.06 (**HL1**), 1.39 (**HL2**) and 3.24 (**HL3**), indicating that **HL3** is probably too lipophilic to reach the target.

As shown in Table 2, **HL1–HL3** exhibit very unfavorable reduction potentials, and this might be the reason why they did not show cytotoxic activity under hypoxia. Upon coordination to gold(I), the reduction potentials become less negative so that complexes (1–3) and the triethylphosphinegold(I) precursor were active against both cell lineages in normoxia as well as under hypoxia conditions. Complex (1) was revealed to be active against HEK-293 and HCT-116 cells, being slightly more active against HCT-116 cells in normoxia than under hypoxia. Complex (3) was active against both cell lineages, being as active in normoxia as in hypoxia against the malignant HCT-116 cells. Since **HL3** was inactive against all cell lineages, the cytotoxic effects of its organogold(I) complex (3) are probably due to the presence of the triethylphosphinegold(I) precursor, which shows cytotoxic effects against HCT-116 cells with IC_{50} values similar to those of complex (3), being more cytotoxic than 3 against HEK-293 cells.

In contrast, complex (2) proved to be more active against HCT-116 in hypoxia than in normoxia conditions, with the selectivity index, calculated as $SI = IC_{50HEK-293} / IC_{50HCT-116\ hypoxia}$, equal to 3.7, similar to the value obtained for the control drug tirapazamine (TPZ, $SI = 4$). Interestingly, $[AuP(CH_2CH_3)_3Cl]$ also proved to be slightly more active against HCT-116 cells in hypoxia but its selectivity index was much lower, $SI = 0.6$.

The electrochemical behaviors of **HL1–HL3** are very similar, as are the behaviors of their triethylphosphinegold(I) complexes (1–3), although the compounds showed distinct cytotoxic activities. The behavior of complex (2), however, deserves interest, since it was significantly more active against HCT-116 cells under hypoxia than under normoxia conditions and, hence, in this case, selective reduction of the nitro group in a low oxygen pressure milieu might operate, while in the remaining compounds, other modes of action probably occur.

In fact, complex (2) exhibited a selective index similar to that of tirapazamine, an experimental anticancer drug that is only activated in hypoxic areas of solid tumors.³⁰ Hypoxia-activated prodrugs such as nitroimidazoles, nitrobenzenes, and *N*-oxides are inert prodrugs that diffuse through the extravascular tissue to hypoxic sites before their activation by means of a bio-reductive process. The common mode of action within these classes is the mono-electronic reduction of the bio-reducible prodrug by a reductase, with the formation of a radical anion. Under hypoxia conditions, the radical anion undergoes further reduction to an active agent that provokes cellular toxicity, fragments, or rearranges to produce a reactive species or activated drug.³¹

In the presence of oxygen, this radical is reoxidized, releasing superoxide, which is easily processed by the cell-protective systems. This “futile” redox cycling results in low amounts of the prodrug radical in aerobic cells, leading to hypoxia-selective cell killing. Inhibition of drug reduction by oxygen through the redox cycling process was initially shown for nitro compounds and was later demonstrated to be responsible for the hypoxia-selective cytotoxicity of nitroimidazoles.³²

A common characteristic of the bio-reductive nitro-containing prodrugs presently in development is that their

active metabolites are DNA-reactive cytotoxins.³² Hence, a plausible hypothesis to explain the cytotoxic activity of complex (2) against HCT-116 cells under hypoxia may involve its bio-reduction with the formation of the toxic nitro anion radical $NO_2^{\bullet-}$. In fact, evidence for the formation of the nitro anion radical in a cell-free medium was obtained from the electrochemical studies of this complex. In addition, we previously demonstrated that the same 5-nitroimidazole ligands and their copper(II),²⁴ silver(I), and bismuth(III)²⁵ complexes were inactive against *Gram*-positive and -negative aerobic bacteria but proved to be active against anaerobic bacterial strains, suggesting reduction of the nitro group under low oxygen concentrations with production of the toxic nitro anion radical to be part of their mode of action.

Although complexes (1) and (3) showed electrochemical behaviors similar to that of complex (2), being also able to form the nitro anion radical in a cell-free medium, the lack of hypoxia selectivity of (1) and (3) might be related to distinct intrinsic sensitivities of their radical anion to oxygen, which influence the kinetic balance between the forward reactions and the back reaction with oxygen.³¹

Taking into consideration the hypoxia-selective cytotoxicity of complex (2) and the resistance of tumor cells to radiotherapy and to most anticancer drugs in hypoxic regions, further investigations on this complex are of utmost relevance. In fact, gold compounds have been suggested as a potential alternative to platinum-based chemotherapeutic agents for colon tumor treatment.³³

CONCLUSIONS

The foregoing results suggest that coordination of the secnidazole-derived (*E*)-*N*-methyl-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamide (**HL2**) to triethylphosphinegold(I) as in complex (2) was a valuable strategy for improving selectivity against HCT-116 cancer cells under hypoxia conditions. Indeed, since complex (2) proved to be as selective as the bio-reducible control drug tirapazamine, and considering that this complex contains the secnidazole and triethylphosphinegold(I) structural motifs, which are already used in the clinics, it deserves to be further investigated for its antitumor effects in vivo and its mechanism of action.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials and Measurements. All common chemicals were purchased from Aldrich and were used as received. Microanalyses were performed on a PerkinElmer CHN 2400 analyzer. A Digimed model DM3 conductivity bridge was used for molar conductivity measurements. Infrared spectra ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) were recorded on a PerkinElmer Fourier transform infrared (FT-IR) Spectrum GX spectrometer using KBr pellets. NMR spectra were obtained with a Bruker DPX-400 Advance (400 MHz) and a Bruker DPX200 (200 MHz) spectrometer using $DMSO-d_6$ as the solvent and TMS as the internal reference.

Cyclic voltammetry experiments were performed at room temperature with a three-electrode cell (with a volumetric capacity of 10 mL) in an Autolab type PGSTAT30 equipment using Nova 2.1.3 software. A Metrohm glassy carbon electrode was used as the working electrode, and the auxiliary electrode was a platinum wire. $Ag/AgCl$, Cl^- (3.0 M) was employed as the reference electrode. The glassy carbon electrode was

previously fine-polished with a 0.3 μm alumina slurry on a polishing felt for 5 min. Solutions were prepared in spectroscopic dimethylformamide (DMF) containing 1 mM analyte and 0.1 M tetrabutylammonium perchlorate (TBAP) as supporting electrolyte. Before recording the voltammograms, the test solution was thoroughly purged with high-purity nitrogen to remove any traces of dissolved oxygen. Cyclic voltammograms were recorded in the 2.00 to -2.00 V potential range using a scan rate of 250 mV s^{-1} .

Syntheses of Triethylphosphinegold(I) Complexes (1–3). Complexes (1–3) were obtained by reacting $[\text{AuP}(\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3)\text{Cl}]$ with the desired thiosemicarbazone in a 1:1 M/L ratio. Hence, 0.5 mmol of $[\text{AuP}(\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3)\text{Cl}]$ was dissolved in a mixture of 6 mL of methanol and 6 mL of dichloromethane, followed by the addition of 0.7 mmol of KPF_6 and a slight excess (0.7 mmol) of the appropriate thiosemicarbazone. The reaction mixture was kept under reflux and stirring in the dark for 3 h (see Figure 1). The yellow solid formed after solvent evaporation was filtered off and washed with diethylether, and dried under reduced pressure. The complexes were characterized by means of microanalyses and their infrared, and their de ^1H , ^{13}C , DEPT 135, COSY, HMQC, and ^{31}P NMR spectra.

(E)-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamide tris-(triethylphosphine)gold(II) hexafluorophosphate $[\text{Au}(\text{HL1})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (1). Yellow solid. Anal. Calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{AuF}_6\text{N}_6\text{O}_2\text{P}_2\text{S}$ (FW = $716.37 \text{ g mol}^{-1}$): C, 23.47; H, 3.80; N, 11.73. Found: C, 23.02; H, 3.65; N, 11.25. Decomposition at $135.0 \text{ }^\circ\text{C}$. Molar conductivity ($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ DMF): $64.49 \text{ cm}^2 \Omega^{-1} \text{ mol}^{-1}$. IR (KBr, cm^{-1}): 3138 (ν N4-H), 1528 (ν C5=N), 1464/1366 ($\nu_{\text{ass}}/\nu_{\text{s}}$ NO_2), 842 (ν P-F). ^1H NMR [400.13 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]: 11.39 [s, 1H, N4H], 9.21, 7.69 [s, 2H, NSH], 8.06 [s, 1H, H2], 5.20 [s, 2H, H4], 2.40 [s, 3H, C1CH₃], 2.06 [m, 3H, C5CH₃], 1.87–2.06 [m, 6H, H13/15/17], 1.07–1.16 [m, 9H, H14/16/18]. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR [100.61 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]: 171.2 [C6], 157.0 [C1], 151.8 [C5], 138.4 [C3], 132.8 [C2], 50.1 [C4], 16.8, 16.4 [C13/15/17], 15.9 [C5CH₃], 13.8 [C1CH₃], 8.8 [C14/16/18]. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR [80.98 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]: 38.8. Yield: 40%.

(E)-N-methyl-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamide tris-(triethylphosphine)gold(II) hexafluorophosphate $[\text{Au}(\text{HL2})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (2). Yellow solid. Anal. Calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{AuF}_6\text{N}_6\text{O}_2\text{P}_2\text{S}$ (FW = $730.40 \text{ g mol}^{-1}$): C, 24.67; H, 4.00; N, 11.51. Found: C, 25.29; H, 4.09; N, 11.21. Melting point: $105.0\text{--}106.3 \text{ }^\circ\text{C}$. Molar conductivity ($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ DMF): $51.63 \text{ cm}^2 \Omega^{-1} \text{ mol}^{-1}$. IR (KBr, cm^{-1}): 3344 (ν N4-H), 1540 (ν C5=N), 1470/1368 ($\nu_{\text{ass}}/\nu_{\text{s}}$ NO_2), 846 (ν P-F). ^1H NMR [400.13 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]: 10.73 [s, 1H, N4H], 8.09 [s, 1H, H2], 7.85 [s, 1H, NSH], 5.15 [s, 2H, H4], 2.99 [d, 3H, H7], 2.40 [s, 3H, C1CH₃], 1.99 [m, 3H, C5CH₃], 1.86–2.02 [m, 6H, H13/15/17], 1.05–1.15 [m, 9H, H14/16/18]. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR [100.61 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]: 176.8 [C6], 151.8 [C1], 149.8 [C5], 138.5 [C3], 132.7 [C2], 50.2 [C4], 31.1 [C7], 17.0, 16.6 [C13/15/17], 15.0 [C5CH₃], 13.8 [C1CH₃], 8.9 [C14/16/18]. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR [80.98 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]: 36.8. Yield: 63%.

(E)-2-(1-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)propan-2-ylidene)-N-phenylhydrazinecarbothioamide tris-(triethylphosphine)gold(II) hexafluorophosphate $[\text{Au}(\text{HL3})\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3]\text{PF}_6$ (3). Yellow solid. Anal. Calc. for

$\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{AuF}_6\text{N}_6\text{O}_2\text{P}_2\text{S}$ (FW = $792.47 \text{ g mol}^{-1}$): C, 30.31; H, 3.94; N, 10.60. Found: C, 31.27; H, 3.91; N, 10.24. Melting point: $117.5\text{--}118.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Molar conductivity ($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ DMF): $54.30 \text{ cm}^2 \Omega^{-1} \text{ mol}^{-1}$. IR (KBr, cm^{-1}): 3298 (ν N4-H), 1540 (ν C5=N), 1472/1366 ($\nu_{\text{ass}}/\nu_{\text{s}}$ NO_2), 844 (ν P-F). ^1H NMR [400.13 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]: 11.40 [s, 1H, N4H], 9.56 [s, 1H, NSH], 8.12 [s, 1H, H2], 7.41 [s, 5H, H8/9/10/11/12], 5.24 [s, 2H, H4], 2.44 [s, 3H, C1CH₃], 2.09 [s, 3H, C5CH₃], 1.83–1.91 [m, 6H, H13/15/17], 1.01–1.10 [m, 9H, H14/16/18]. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR [100.61 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]: 173.5 [C6], 153.4 [C1], 152.0 [C5], 138.5 [C3], 137.7 [C7], 132.7 [C2], 128.8 [C9/11], 126.5 [C10], 124.8 [C8/12], 50.2 [C4], 16.9, 16.6 [C13/15/17], 15.7 [C5CH₃], 13.8 [C1CH₃], 8.9 [C14/16/18]. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR [80.98 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)]: 36.6. Yield: 57%.

Crystal Structure Determinations. Crystals of HL2 and HL3 were obtained during the recrystallization of complexes (2) and (3) in DMF. Crystals' data, data collection details, and refinement results are listed in Table 4. The single-crystal data

Table 4. Crystal Data and Structure Refinement Results for HL2 and HL3

compound	HL2	HL3
empirical formula	$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$	$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}$
formula weight (g mol ⁻¹)	270.32	350.40
wavelength (λ)	0.71073	0.71073
crystal system	triclinic	orthorhombic
space group	<i>P</i> -1	<i>Pbca</i>
temperature (K)	298(2)	298(2)
<i>a</i> (angstrom)	8.1536(4)	15.3961(5)
<i>b</i> (angstrom)	8.7320(6)	13.6020(4)
<i>c</i> (angstrom)	9.8349(5)	16.0574(4)
α (deg)	89.139(5)	90
β (deg)	81.378(4)	90
γ (deg)	68.290(6)	90
<i>V</i> (\AA^3)	642.57(7)	3362.70(17)
<i>Z</i>	2	8
density (calculated) (g cm ⁻³)	1.397	1.384
crystal size (mm ³)	0.241 \times 0.214 \times 0.125	0.723 \times 0.468 \times 0.425
<i>F</i> (000)	284.0	1472.0
absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.257	0.219
<i>T</i> _{min} / <i>T</i> _{max}	0.614 / 1	0.475 / 1
2 θ range for data collection (deg)	3.18 to 27.033	3.214 to 29.291
reflections collected	14624	4639
independent reflections	11 169	3439
number of parameters	164	217
final <i>R</i> indexes [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	$R_1 = 0.0659$ $wR_2 = 0.1960$	$R_1 = 0.0489$ $wR_2 = 0.1538$
final <i>R</i> indexes (all data)	0.086	0.0678
goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.127	1.027
$\Delta\rho_{\text{max}}$ and $\Delta\rho_{\text{min}}$	0.384 and -0.396	0.309 and -0.256

for compounds were collected using an Agilent SuperNova diffractometer with Mo $K\alpha$ ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) radiation at room temperature (298 K). The data collection, cell refinements, and data reduction were performed using CRYSA LISPRO software.³⁴ The structures were solved by direct methods and refined using SHELXL-2018/3.³⁵ All nonhydrogen atoms were

refined with anisotropic thermal parameters. H atoms connected to carbon were placed in idealized positions and treated by a rigid model, with $U_{iso}(H) = 1.2U_{eq}(C)$, while H atoms from NH groups were obtained directly by difference maps and fixed with a N–H distance around 0.88 Å and $U_{iso}(H) = 1.2U_{eq}(N)$. CCDC 1949760 and 1949761 contain the supplementary crystallographic data for HL2 and HL3, respectively. The figures were drawn using ORTEP-3 for Windows³⁶ and Mercury.³⁷

Evaluation of the Cytotoxic Effects of the Compounds. Colorectal carcinoma (HCT-116) and human embryonic kidney (HEK-293) cells were donated by Dr. Marcel Leist, University of Konstanz/Germany, and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) medium (Sigma Aldrich) with 10% fetal serum (GIBCO BRL, Grand Island, NY) and enriched with a 1% antibiotic solution (100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (GIBCO BRL, Grand Island, NY)). Cytotoxic activity was based on the mitochondrial reduction rate of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to formazan crystals.³⁸ HCT-116 and HEK-293 cells were seeded at the density of 5×10^3 cells per well (96-well plate) and preincubated overnight for stabilization under hypoxia conditions (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂ at 37 °C) and normoxia (5% CO₂, 95% atmospheric air at 37 °C) as described by Harrison and co-workers.³⁹ After stabilization, cells were incubated for 72 h with the compounds and with tirapazamine (TPZ) as a positive control, using seven serial 1:5 dilutions (100–0.0064 µM), under conditions of hypoxia and normoxia. The IC₅₀ (inhibitory concentration of 50% cell proliferation) was determined by nonlinear regression using GraphPad Prism Version 5.01 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). All compounds were tested in four independent experiments performed in triplicate and the solvent (DMSO 0.5%) was used as the control. The results were expressed as mean ± standard deviation of the mean of the percentage of viability in relation to the negative control (DMSO, 0.5%), calculated as follows: percentage of cell viability (%) = [(OD of treated mean/OD negative control) x100].³⁸

Selectivity indexes (SI) of the compounds were also evaluated using the ratio between the 50% inhibitory concentration of cell viability for nonmalignant and tumor cells, $SI = IC_{50HEK-293}/IC_{50HCT-116}$, under normoxia and hypoxia conditions.

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.9b03778>.

X-ray crystallographic data for HL2 (CIF)

X-ray crystallographic data for HL3 (CIF)

¹H and ¹³C NMR and FT-IR spectra of HL1–HL3 and their organometallic gold(I) complexes [Au(HL1)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (1), [Au(HL2)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (2), and [Au(HL3)P(CH₂CH₃)₃]PF₆ (3); electrochemical data (cyclic voltammograms) of complexes (1–3) and X-ray crystallographic data for HL2 and HL3 (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Heloisa Beraldo – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901,

Brazil; orcid.org/0000-0001-8593-4555;

Email: hberaldo@ufmg.br, heloisaberaldoufmg@gmail.com

Authors

Ana P. A. Oliveira – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

Jennifer T. J. Freitas – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

Renata Diniz – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

Claudia Pessoa – Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) - Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE 60020-181, Brazil

Sarah S. Maranhão – Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) - Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE 60020-181, Brazil

Juliana M. Ribeiro – Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

Elaine M. Souza-Fagundes – Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acsomega.9b03778>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

CCDC reference numbers 1949760 and 1949761 contain the supplementary crystallographic data for HL2 and HL3. These data can be obtained free of charge from the CCDC via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the Alexander von Humboldt Foundation (Germany, Process 99999.008121/2014–01) and CNPq, Capes, INCT-INOVAR (Proc. CNPq 465.249/2014-0), FAPEMIG, and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazil) for financial support and student grants, and LAREMAR UFMG for the NMR facilities.

■ REFERENCES

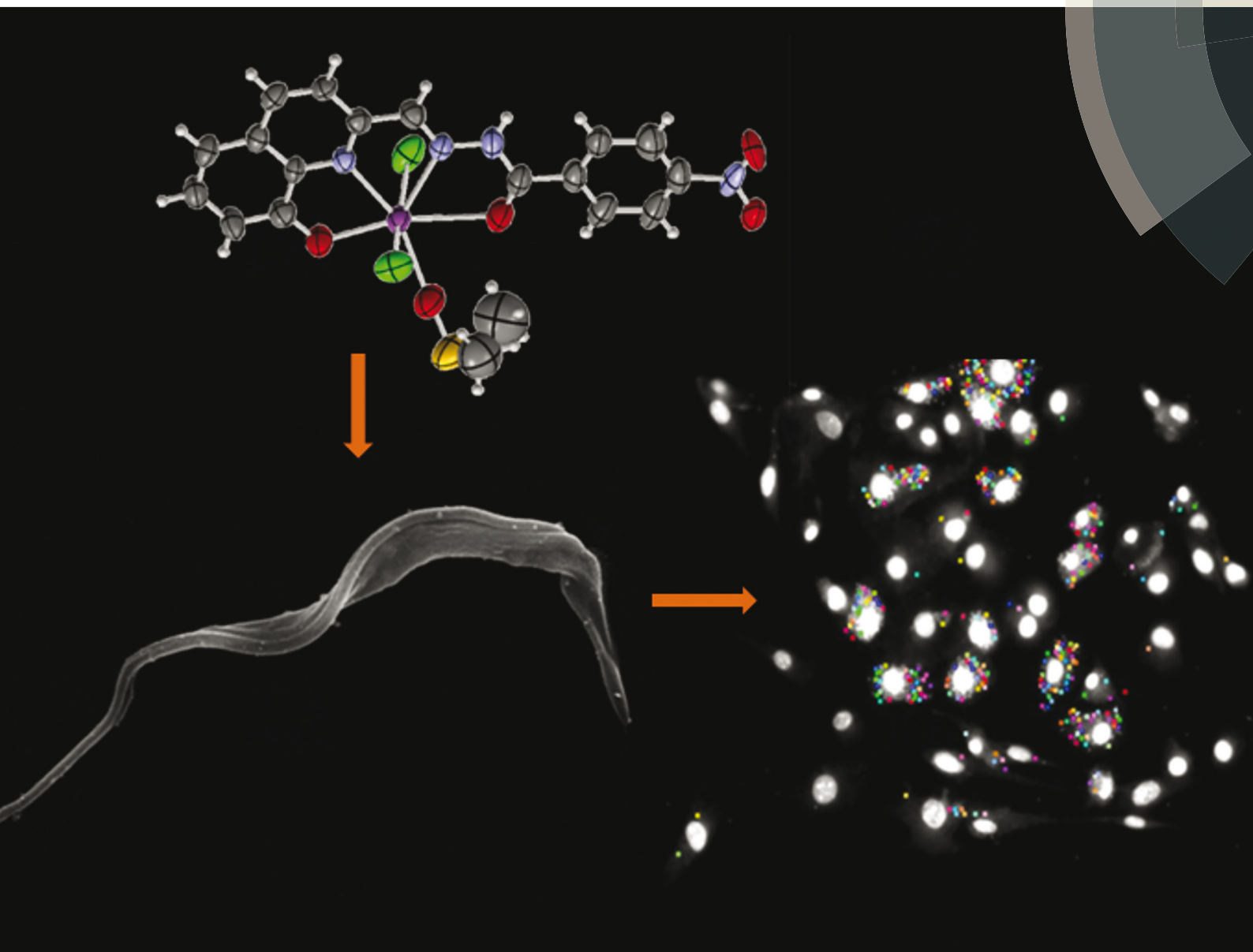
- (1) Beraldo, H.; Gambino, D. The Wide Pharmacological Versatility of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 31–39.
- (2) Moorthy, N. S.; Cerqueira, N. M.; Ramos, M. J.; Fernandes, P. A. Aryl- and Heteroaryl-Thiosemicarbazone Derivatives and Their Metal Complexes: A Pharmacological Template. *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discovery* **2013**, *8*, 168–182.
- (3) Camarada, M. B.; Echeverria, C.; Ramirez-Tagle, R. Medicinal organometallic compounds with antichagasic activity. *Med. Chem. Commun.* **2016**, *7*, 1307–1315.
- (4) Nyirjesy, P.; Schwebke, J. R. Secnidazole: next-generation antimicrobial agent for bacterial vaginosis treatment. *Future Microbiol.* **2018**, *13*, 507–524.
- (5) Ang, C. W.; Jarrad, A. M.; Cooper, M. A.; Blaskovich, M. A. T. Nitroimidazoles: Molecular Fireworks That Combat a Broad Spectrum of Infectious Diseases. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7636–7657.

- (6) Kaiser, M.; Bray, M. A.; Cal, M.; Trunz, B. B.; Torrelee, E.; Brun, R. Antitrypanosomal Activity of Fexinidazole, a New Oral Nitroimidazole Drug Candidate for Treatment of Sleeping Sickness. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 5602–5608.
- (7) Kumar, S.; Saha, S. T.; Gu, L.; Palma, G.; Perumal, S.; Singh-Pillay, A.; Singh, P.; Anand, A.; Kaur, M.; Kumar, V. 1H-1,2,3-Triazole Tethered Nitroimidazole–Isatin Conjugates: Synthesis, Docking, and Anti-Proliferative Evaluation against Breast Cancer. *ACS Omega* **2018**, *3*, 12106–12113.
- (8) Bonnitca, P. D.; Vajvere, A. L.; Lewis, J. S.; Dilworth, J. R. In Vitro and In Vivo Evaluation of Bifunctional Bisthiosemicarbazone ⁶⁴Cu-Complexes for the Positron Emission Tomography Imaging of Hypoxia. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2985–2991.
- (9) Zwawiak, J.; Zaprutko, L. The Structure and Activity of Double-Nitroimidazoles. A Mini-Review. *Sci. Pharm.* **2018**, *86*, 30.
- (10) Zhu, R.; He, H.; Liu, Y.; Cao, D.; Yan, J.; Duan, S.; Chen, Y.; Yin, L. Cancer-Selective Bioreductive Chemotherapy Mediated by Dual Hypoxia-Responsive Nanomedicine upon Photodynamic Therapy-Induced Hypoxia Aggravation. *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 2649–2656.
- (11) Oliveira, A. A.; Perdigão, G. M. C.; Da Silva, J. G.; Souza-Fagundes, E. M.; Beraldo, H. Indium(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones exhibit cytotoxic activity against human leukemia and solid tumor cell lines. *Polyhedron* **2017**, *135*, 72–78.
- (12) Ferraz, K. S. O.; Fernandes, L.; Carrilho, D.; Pinto, M. C. X.; Leite, M. F.; Souza-Fagundes, E. M.; Speziali, N. L.; Mendes, I. C.; Beraldo, H. 2-Benzoylpyridine-*N*(4)-tolyl thiosemicarbazones and their palladium(II) complexes: Cytotoxicity against leukemia cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7138–7144.
- (13) Muralisankar, M.; Dheepika, R.; Haribabu, J.; Balachandran, C.; Aoki, S.; Bhuvanesh, N. S. P.; Nagarajan, S. Design, Synthesis, DNA/HSA Binding, and Cytotoxic Activity of Half Sandwich Ru(II)-Arene Complexes Containing Triarylamine–Thiosemicarbazone Hybrids. *ACS Omega* **2019**, *4*, 11712–11723.
- (14) Kaushal, M.; Lobana, T. S.; Nim, L.; Bala, R.; Arora, D. S.; Garcia-Santos, I.; Duff, C. E.; Jasinski, J. P. Synthesis of 2-acetylpyridine-*N*-substituted thiosemicarbazones of copper(II) with high antimicrobial activity against methicillin resistant *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *C. albicans*. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 11727–11742.
- (15) Rodrigues, C.; Batista, A. A.; Ellena, J.; Castellano, E. E.; Benítez, D.; Cerecetto, H.; González, M.; Teixeira, L. R.; Beraldo, H. Coordination of nitro-thiosemicarbazones to ruthenium(II) as a strategy for anti-trypanosomal activity improvement. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2847–2853.
- (16) Pérez-Rebolledo, A.; Teixeira, L. R.; Batista, A. A.; Mangrich, A. S.; Aguirre, G.; Cerecetto, H.; González, M.; Hernández, P.; Ferreira, A. M.; Speziali, N. L.; Beraldo, H. 4-Nitroacetophenone-derived thiosemicarbazones and their copper(II) complexes with significant in vitro anti-trypanosomal activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 939–948.
- (17) Pelosi, G.; Bisceglie, F. B.; Bignami, F.; Ronzi, P.; Schiavone, P.; Re, M. C.; Casoli, C.; Pilotti, E. Antiretroviral Activity of Thiosemicarbazone Metal Complexes. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8765–8769.
- (18) Ronconi, L.; Fregona, D. The Midas touch in cancer chemotherapy: from platinum- to gold-dithiocarbamate complexes. *Dalton Trans.* **2009**, *55*, 10670–10680.
- (19) Lessa, J. A.; Guerra, J. C.; Miranda, L. F.; Romeiro, C. F. D.; Da Silva, J. G.; Mendes, I. C.; Speziali, N. L.; Souza-Fagundes, E. M.; Beraldo, H. Gold(I) complexes with thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human tumor cell lines and inhibition of thioredoxin reductase activity. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 1729–1739.
- (20) Rodríguez-Fanjul, V.; Lopez-Torres, E.; Mendiola, M. A.; Pizarro, A. M. Gold(III) bis(thiosemicarbazone) compounds in breast cancer cells: Cytotoxicity and thioredoxin reductase targeting. *J. Med. Chem.* **2018**, *148*, 372–383.
- (21) Lessa, J. A.; Ferraz, K. S. O.; Guerra, J. C.; Miranda, L. F.; Romeiro, C. F. D.; Souza-Fagundes, E. M.; Barbeira, P. J. S.; Beraldo, H. Spectroscopic and electrochemical characterization of gold(I) and gold(III) complexes with glyoxaldehyde bis(thiosemicarbazones): cytotoxicity against human tumor cell lines and inhibition of thioredoxin reductase activity. *Biomaterials* **2012**, *25*, 587–598.
- (22) Gandin, V.; Fernandes, A. P.; Rigobello, M. P.; Dani, B.; Sorrentino, F.; Tisato, F.; Björnstedt, M.; Bindoli, A.; Sturaro, A.; Rella, R.; Marzano, C. Cancer cell death induced by phosphine gold(I) compounds targeting thioredoxin reductase. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *79*, 90–101.
- (23) Yeo, C. I.; Ooi, K. K.; Tiekink, E. R. T. Gold-Based Medicine: A Paradigm Shift in Anti-Cancer Therapy? *Molecules* **2018**, *23*, No. 1410.
- (24) Oliveira, A. A.; Oliveira, A. P. A.; Franco, L. L.; Ferencs, M. O.; Ferreira, J. F. G.; Bachi, S. M. P. S.; Speziali, N. L.; Farias, L. M.; Magalhães, P. P.; Beraldo, H. 5-Nitroimidazole-derived Schiff bases and their copper(II) complexes exhibit potent antimicrobial activity against pathogenic anaerobic bacteria. *Biomaterials* **2018**, *31*, 571–584.
- (25) Oliveira, A. P. A.; Ferreira, J. F. G.; Farias, L. M.; Magalhães, P. P.; Teixeira, L. R.; Beraldo, H. Antimicrobial Effects of Silver(I) and Bismuth(III) Complexes with Secnidazole-Derived Schiff Base Ligands: the Role of the Nitro Group Reduction. *J. Braz. Chem. Soc.* **2019**, *30*, 2299–2307.
- (26) Brown, J. M.; Wilson, W. R. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 437–447.
- (27) Allen, F. H.; Kennard, O.; Watson, D. G.; Brammer, L.; Orpen, A. G.; Taylor, R. Tables of bond lengths determined by X-ray and neutron diffraction. Part 1. Bond lengths in organic compounds. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* **1987**, *12*, S1–S19.
- (28) Spackman, M. A.; Jayatilaka, D. Hirshfeld surface analysis. *Cryst. Eng. Comm.* **2009**, *11*, 19–32.
- (29) Spackman, M. A.; McKinnon, J. J. Fingerprinting intermolecular interactions in molecular crystals. *CrystEngComm* **2002**, *4*, 378–392.
- (30) Denny, W.; Wilson, B. Tirapazamine: A bioreductive anticancer drug that exploits tumour hypoxia. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9*, 2889–2901.
- (31) Jackson, R. K.; Liew, L. P.; Hay, M. P. Overcoming Radioresistance: Small Molecule Radiosensitisers and Hypoxia-activated Prodrugs. *Clin. Oncol.* **2019**, *31*, 290–302.
- (32) Wilson, W. R.; Hay, M. P. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 393–410.
- (33) Mármol, I.; Quero, J.; Rodríguez-Yoldi, M. J.; Cerrada, E. Gold as a Possible Alternative to Platinum-Based Chemotherapy for Colon Cancer Treatment. *Cancers* **2019**, *11*, 780.
- (34) Rigaku Oxford Diffraction *CrysAlis Pro*; Rigaku Corporation: Tokyo (Japan), 2015.
- (35) Sheldrick, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. C. Struct. Chem.* **2015**, *71*, 3–8.
- (36) Farrugia, L. J. ORTEP-3 for Windows - a version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI). *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, No. 565.
- (37) Macrae, C. F.; Bruno, I. J.; Chisholm, J. A.; Edgington, P. R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Rodriguez-Monge, L.; Taylor, R.; Streek, J.; Wood, P. A. Mercury CSD 2.0 – new features for the visualization and investigation of crystal structures. *J. Appl. Crystallogr.* **2008**, *41*, 466–470.
- (38) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- (39) Harrison, L. R.; Micha, D.; Brandenburg, M.; Simpson, K. L.; Morrow, C. J.; Denny, O.; Hodgkinson, C.; Yunus, Z.; Dempsey, C.; Roberts, D.; Blackhall, F.; Makin, G.; Dive, C. Hypoxic human cancer cells are sensitized to BH-3 mimetic-induced apoptosis via downregulation of the Bcl-2 protein Mcl-1. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 1075–1087.

NJC

New Journal of Chemistry
rsc.li/njc

A journal for new directions in chemistry



ISSN 1144-0546



ROYAL SOCIETY
OF CHEMISTRY

Celebrating
IYPT 2019

PAPER

Heloisa Beraldo *et al.*

Investigation of the antitrypanosomal effects of 2-formyl-8-hydroxyquinoline-derived hydrazones and their antimony(III) and bismuth(III) complexes

