

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

Jeferson Gomes da Silva

**Derivados modificados de tiossemicarbazonas
e diclofenaco: Perfil farmacológico e efeito da
coordenação a metais**

**Belo Horizonte
2013**

UFMG/ICEx/DQ 957^a
T. 429^a

Jeferson Gomes da Silva

**Derivados modificados de tiossemicarbazonas e diclofenaco:
Perfil farmacológico e efeito da coordenação a metais**

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

Belo Horizonte
2013

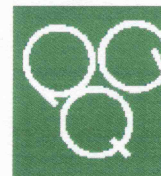
S586e Silva, Jeferson Gomes da
2013 Derivados modificados de tiossemicarbazonas e
T diclofenaco : perfil farmacológico e efeito da
coordenação a metais / Jeferson Gomes da Silva. 2013.
xvii, 126 f. : il.

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. Atividade antifúngica - Teses
4. Atividade antinociceptiva - Teses 5. Agentes
antibacterianos - Teses 6. Schiff, Bases de - Teses
I. Beraldo, Heloisa de Oliveira, Orientadora II.
Título.

CDU 043



"Derivados Modificados de Tiossemicarbazonas e Diclofenaco: Perfil
Farmacológico e Efeito da Coordenação a Metais"

Jeferson Gomes da Silva

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Heloisa de Oliveira Beraldo

Profa. Heloisa de Oliveira Beraldo
UFMG

Antonio Carlos Doriguetto

Prof. Antonio Carlos Doriguetto
UNIFAL-MG

Angelo Márcio Leite Denadai

Prof. Angelo Márcio Leite Denadai
UFJF

Cynthia Peres Demicheli

Profa. Cynthia Peres Demicheli
UFMG

Eufrânio Nunes da Silva Júnior

Prof. Eufrânio Nunes da Silva Júnior
UFMG

Belo Horizonte, 09 de abril de 2013.

O trabalho descrito nesta tese foi realizado sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Heloisa de Oliveira Beraldo.

Agradecimentos

- À Prof^a. Dr^a. Heloisa Beraldo pela orientação, dedicação, apoio e paciência durante todos esses anos.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.
- Aos pesquisadores Dr^a. Sonia R. W. Louro, Dr. José Domingos Ardisson, Dr. Klaus Wilhelm Heinrich Krambrock, Dr. Maurício Veloso Brant Pinheiro, Dr. Paulo Jorge Sanches Barbeira, Dr. Geraldo Magela de Lima, Dr. Nivaldo L. Speziali, Dr^a. Elaine M. Souza-Fagundes e Dr. Márcio Mattos Coelho pela colaboração direta ou por permitirem a utilização de seus laboratórios para a realização de experimentos que compõem este trabalho.
- A todos os alunos de IC que trabalharam para a realização dos experimentos.
- As secretárias do Programa de Pós-graduação em Química da UFMG. Obrigado pela atenção, carinho e boa vontade.
- Aos colegas e amigos do laboratório e do Departamento de Química, Angel, Fabricio, Demetrio, Plínio, Edgar, Isolda, Rafael, Gabriele, Karina, Débora, Josane, Anayive, Mariany, Camila, Sarah e Ana Carolina pelo apoio e companheirismo durante esta longa jornada.
- Aos professores do Departamento de Química pelo aprendizado e ajuda ao longo desses anos.
- A minha esposa, Aline, pela força, paciência, apoio, confiança e amor.
- A meus pais e minha família pelo carinho, confiança e apoio.

RESUMO

O presente trabalho consistiu na síntese e avaliação do perfil farmacológico de tiossemicarbazonas derivadas de chalconas, de uma hidrazona derivada de diclofenaco, bem como de seus complexos metálicos, visando obter novas moléculas capazes de atuar como agentes antimicrobianos, antitumorais e antinociceptivos.

3-fenil-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona tiossemicarbazona [HPyCTPh (**1**)], 3-(4-cloro-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona tiossemicarbazona [HPyCT4ClPh (**2**)], 3-(4-bromo-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona tiossemicarbazona [HPyCT4BrPh (**3**)] e 3-(4-nitro-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona tiossemicarbazona [HPyCT4NO₂Ph (**4**)] foram obtidas a partir das chalconas 3-fenil-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona (PyCPh), 3-(4-cloro-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona (PyC4ClPh), 3-(4-bromo-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona (PyC4BrPh) e 3-(4-nitro-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona (PyC4NO₂Ph).

Os complexos de Ga(III) (**Ga1-Ga4**) e de Fe(III) (**Fe1-Fe4**) com **1-4** são do tipo [M(L)₂]NO₃ e os complexos de Zn(II) (**Zn1-Zn4**) do tipo [Zn(L)₂], HL = tiossemicarbazona. Nesses casos, a tiossemicarbazona coordena-se ao metal através do sistema N_{py}-N-S. Os complexos de Cu(II) (**Cu1-Cu4**) são do tipo [Cu(HL)Cl₂], onde HL é a tiossemicarbazona na forma zwitteriônica ligada ao metal pelo sistema N-S.

As chalconas foram ativas contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* mas inativas contra *Pseudomonas aeruginosa*. Em alguns casos as tiossemicarbazonas mostraram-se mais ativas que as chalconas precursoras. A complexação das tiossemicarbazonas com Ga(III) e Cu(II) resultou em compostos mais ativos.

O efeito citotóxico das chalconas, tiossemicarbazonas e complexos de Ga(III) e Cu(II) foi investigado contra linhagens celulares de tumor sólido HCT-116 (carcinoma colorretal) e MCF-7 ou MDA-MB 231 (carcinomas mamários), e contra leucemias HL-60 (leucemia mieloide) e Jurkat (leucemia linfoide). Em geral, as chalconas mostraram-se menos ativas que as chalcona-tiossemicarbazonas e seus complexos de Ga(III) e Cu(II). **1**, **Ga1**, **2**, **Ga2**, **3** e **Ga3** foram mais ativos contra HCT-116 que a cisplatina. As tiossemicarbazonas e os complexos de Ga(III) inibiram de forma similar ao cisplatina o crescimento de células HL-60. Exceto para **1**, todos os compostos apresentaram valores de CI₅₀ inferiores ao da cisplatina contra células HL-60. Os complexos de Ga(III) apresentaram valores de CI₅₀ menores que as tiossemicarbazonas livres contra essa linhagem celular, indicando que a estratégia da coordenação ao Ga(III) levou a um aumento da atividade citotóxica.

As tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II) foram capazes de inibir 75% ou mais da proliferação de células leucêmicas e de células MDA-MB 231 e HCT-116 (10 µM). Os

resultados sugerem um aumento da citotoxicidade dos compostos com a coordenação ao Cu(II). Vários deles apresentaram atividade citotóxica (CI₅₀) em concentrações nanomolares. As tiossemicarbazonas e **Cu4** induziram fragmentação de ADN em células HL-60, sugerindo que apresentam atividade pró-apoptótica. Analogamente **Cu1-Cu4** induziram 75% de conteúdo de ADN subdiploide em MDA-MB 231 e HCT-116. Na presença das tiossemicarbazonas observou-se baixo conteúdo de ADN subdiploide, ou seja, as tiossemicarbazonas livres agiram por meio de um mecanismo de ação distinto. Os complexos **Cu1-Cu3** apresentaram capacidade de interagir com a albumina do soro bovino e com o ADN por um mecanismo de intercalação.

Foram sintetizados o cloridrato de piridoxal diclofenaco hidrazona (H₃PDHCl, **5**) e seus complexos [Cu(H₂PDH)Cl]Cl·2H₂O (**Cu5**) e [Ga(HPDH)₂]NO₃·4H₂O (**Ga5**). **5** foi ativo no modelo de resposta nociceptiva induzida por *zymosan* A em uma dose quatro vezes maior do que aquela de diclofenaco de sódio (DIC). No entanto, este composto não causa lesões gástricas como as observadas para o grupo de animais tratado com DIC, o que corrobora sua utilização como um potencial protótipo de fármaco anti-inflamatório. **5** não apresentou ação citotóxica ou antimicrobiana e exibiu capacidade de quelatar Zn(II) e Cu(II), tornando-se interessante como candidato a protótipo de fármaco anti-Alzheimer.

Palavras-chave: tiossemicarbazonas, chalconas, aroilhidrazonas, complexos metálicos, perfil farmacológico, atividade antimicrobiana, atividade citotóxica

ABSTRACT

The present work involved the syntheses and an investigation of the pharmacological profile of chalcone-derived thiosemicarbazones, a hydrazone from diclofenac and their metal complexes aiming the preparation of new antimicrobial, antitumor and anti-nociceptive agents.

3-phenyl-1-(2-pyridil)-prop-2-en-1-one thiosemicarbazone [HPyCTPh (**1**)], 3-(4-chloro-phenyl)-1-(2-pyridil)-prop-2-en-1-one thiosemicarbazone [HPyCT4ClPh (**2**)], 3-(4-bromo-phenyl)-1-(2-pyridil)-prop-2-en-1-one thiosemicarbazone [HPyCT4BrPh (**3**)] and 3-(4-nitro-phenyl)-1-(2-pyridil)-prop-2-en-1-one thiosemicarbazone [HPyCT4NO₂Ph (**4**)] were obtained from 3-phenyl-1-(2-pyridil)-prop-2-en-1-one (PyCPh), 3-(4-chloro-phenyl)-1-(2-pyridil)-prop-2-en-1-one (PyC4ClPh), 3-(4-bromo-phenyl)-1-(2-pyridil)-prop-2-en-1-one (PyC4BrPh) and 3-(4-nitro-phenyl)-1-(2-pyridil)-prop-2-en-1-one (PyC4NO₂Ph).

The Ga(III) (**Ga1-Ga4**) and Fe(III) (**Fe1-Fe4**) complexes with **1-4** are of the [M(L)₂]₂NO₃ type and the Zn(II) complexes (**Zn1-Zn4**) of the [Zn(L)₂] type, HL = thiosemicarbazone. In these cases the thiosemicarbazones attach to the metal center through the N_{py}-N-S chelating system. The Cu(II) complexes (**Cu1-Cu4**) are of the [Cu(HL)Cl₂] type, where HL stands for the zwitterionic thiosemicarbazone which binds to the metal through the N-S chelating system.

The chalcones proved to be active against *Staphylococcus aureus* bacteria and *Candida albicans* fungi but were inactive against *Pseudomonas aeruginosa*. In many cases the thiosemicarbazones revealed to be more active than the chalcones. The complexation of the thiosemicarbazones to Ga(III) and Cu(II) resulted in more active compounds.

The cytotoxic effect of the chalcones, thiosemicarbazones and the Ga(III) e Cu(II) complexes was studied against HCT-116 (colorectal carcinoma) and MCF-7 or MDA-MB 231 (mammary carcinomas) solid tumor cell lines, and against HL-60 (myeloid leukemia) and Jurkat (limphoyd leukemia). The chalcones proved to be the less active compounds. In general the thiosemicarbazones were more cytotoxic than the chalcone precursors. **1**, **Ga1**, **2**, **Ga2**, **3** and **Ga3** revealed to be more active than cisplatin against HCT-116 cells. The thiosemicarbazones and the Ga(III) complexes exhibited similar capacity as cisplatin to inhibit the growth of HL-60 cells. Except for **1**, the IC₅₀ of all compounds was lower than that of cisplatin against HL-60 cells. The IC₅₀ of the Ga(III) complexes were lower than those of the free thiosemicarbazones against this cell lineage, indicating that coordination to Ga(III) was a good strategy for cytotoxicity improvement.

In general, the thiosemicarbazones and their Cu(II) complexes were able to inhibit at least 75% of proliferation of leukemia, MDA-MB 231 and HCT-116 cells at 10 μM. Upon coordination to Cu(II) cytotoxicity improved. Many of the studied compounds were active with

IC₅₀ values in the nanomolar range. The thiosemicarbazones and **Cu4** were able to induce DNA fragmentation in HL-60 cells, indicating their pro-apoptotic potential. Similarly all Cu(II) complexes induced the appearance of 75% of subdiploid DNA content in MDA-MB 231 and HCT-116 cells. However a low level of subdiploid DNA content was observed in the presence of the free thiosemicarbazones, suggesting that their mechanism of action might be different from those of the complexes. **Cu1-Cu3** were able to interact with bovine serum albumin and with DNA by an intercalative process.

We prepared pyridoxal diclofenac hydrazone hydrochloride (H₃PDHCl, **5**) and its [Cu(H₂PDH)Cl]Cl·2H₂O (**Cu5**) and [Ga(HPDH)₂]NO₃·4H₂O (**Ga5**) complexes. **5** showed activity in the nociceptive response induced by *zymosan* A at a molar dose fourfold higher than that of sodium diclofenac. However, unlike diclofenac, **5** did not cause the appearance of gastric lesions, suggesting that it could be an anti-inflammatory drug candidate. **5** did not show antimicrobial or cytotoxic properties and was able to chelate Zn(II) and Cu(II). Hence it could be interesting as anti-Alzheimer drug candidate.

Keywords: Thiosemicarbazones, chalcones, aroylhydrazones, metallic complexes, pharmacological profile, antimicrobial activity, cytotoxic activity

Sumário

Capítulo 1. Introdução.....	1
<i>1.1 Química Medicinal e Química Medicinal Inorgânica.....</i>	<i>1</i>
<i>1.2 Doenças causadas por microrganismos.....</i>	<i>3</i>
<i>1.3 Dor.....</i>	<i>4</i>
<i>1.4 Câncer.....</i>	<i>5</i>
<i>1.5 Hidrazonas.....</i>	<i>7</i>
<i>1.6 Tiossemicarbazonas.....</i>	<i>9</i>
<i>1.7 Chalconas.....</i>	<i>12</i>
<i>1.8 O presente trabalho.....</i>	<i>14</i>
<i>1.9 Objetivos do trabalho.....</i>	<i>16</i>
Capítulo 2. Parte experimental.....	17
2.1 Equipamentos e procedimentos.....	17
<i>2.1.1 Determinação de temperaturas de fusão.....</i>	<i>17</i>
<i>2.1.2 Pesagens.....</i>	<i>17</i>
<i>2.1.3 Análise elementar.....</i>	<i>17</i>
<i>2.1.4 Espectros de infravermelho.....</i>	<i>17</i>
<i>2.1.5 Susceptibilidade magnética.....</i>	<i>17</i>
<i>2.1.6 Análises condutimétricas.....</i>	<i>18</i>
<i>2.1.7 Espectros de massas.....</i>	<i>18</i>
<i>2.1.8 Espectros eletrônicos.....</i>	<i>18</i>
<i>2.1.9 Espectros de fluorescência.....</i>	<i>19</i>
<i>2.1.10 Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN).....</i>	<i>19</i>
<i>2.1.11 Espectros Mössbauer.....</i>	<i>19</i>
<i>2.1.12 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE).....</i>	<i>19</i>
<i>2.1.13 Voltametria cíclica.....</i>	<i>20</i>
<i>2.1.14 Determinação do pH.....</i>	<i>20</i>
<i>2.1.15 Análises termogravimétricas.....</i>	<i>20</i>
<i>2.1.16 Estruturas cristalográficas.....</i>	<i>20</i>
<i>2.1.17 Determinação das espécies em solução.....</i>	<i>21</i>
<i>2.1.18 Estabilidade dos compostos em solução tampão.....</i>	<i>21</i>
2.2 Sínteses dos ligantes e complexos.....	22
<i>2.2.1 Reagentes.....</i>	<i>22</i>

2.2.2 <i>Preparação de chalconas: 3-fenil-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona (PyCPh), 3-(4-cloro-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona (PyC4ClPh), 3-(4-bromo-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona (PyC4BrPh) e 3-(4-nitro-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona (PyC4NO₂Ph)</i>	22
2.2.3 <i>Síntese de tiossemicarbazonas derivadas de chalconas: 3-fenil-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona tiossemicarbazona [HPyCTPh (1)], 3-(4-cloro-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona tiossemicarbazona [HPyCT4ClPh (2)], 3-(4-bromo-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona tiossemicarbazona [HPyCT4BrPh (3)] e 3-(4-nitro-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona tiossemicarbazona [HPyCT4NO₂Ph (4)]</i>	22
2.2.4 <i>Síntese dos complexos de Ga(III), de Zn(II) e Fe(III) com tiossemicarbazonas derivadas de chalconas (Ga1-Ga4, Zn1-Zn4 e Fe1-Fe4)</i>	23
2.2.5 <i>Síntese dos complexos de Cu(II) com tiossemicarbazonas derivadas de chalconas (Cu1-Cu4)</i>	23
2.2.6 <i>Síntese do cloridrato de 2-{2-(2,6-diclorofenil)amino}fenil}-N'-{3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metil-4-piridínio}metileno}acetohidrazida, piridoxal diclofenaco hidrazona [H₃PDHCl (5)]</i>	23
2.2.7 <i>Síntese do complexo de Ga(III) com piridoxal diclofenaco hidrazona (Ga5)</i>	24
2.2.8 <i>Síntese do complexo de Cu(II) com piridoxal diclofenaco hidrazona (Cu5)</i>	24
2.3 Testes Biológicos	24
2.3.1 <i>Atividade antimicrobiana</i>	24
2.3.2 <i>Atividade citotóxica</i>	25
2.3.2.1 <i>Linhagens de células e condições de cultura</i>	25
2.3.2.2 <i>Atividade citotóxica contra linhagens tumorais</i>	25
2.3.2.3 <i>Avaliação de efeito citotóxico sobre células mononucleares de sangue periférico humano</i>	26
2.3.2.4 <i>Ensaio de fragmentação de ADN</i>	26
2.3.2.5 <i>Análise estatística</i>	27
2.3.3 <i>Estudos de interação com albuminas séricas</i>	27
2.3.3.1 <i>Técnica de espectroscopia de fluorescência</i>	27
2.3.3.2 <i>O experimento</i>	28
2.3.4 Estudo de interação dos compostos com ácido desoxirribonucleico de timo de vitelo (CT-DNA)	30
2.3.4.1 <i>Estudo de interação com CT-DNA por meio dos dados de espectros eletrônicos</i>	30
2.3.4.2 <i>Ligação competitiva entre compostos e o sistema brometo de etídio-CT-DNA (BE-CT-DNA)</i>	30
2.3.5 <i>Estudos de interação com ADN plasmidial</i>	31
2.3.6 <i>Atividade antinociceptiva</i>	31
2.3.6.1 <i>Animais experimentais</i>	32

2.3.6.2 Soluções e suspensões.....	32
2.3.6.3 Avaliação da resposta nociceptiva induzida por zymosan A em camundongos.....	32
2.3.6.4 Avaliação da resposta nociceptiva pelo modelo de hiperalgesia térmica de Hargreaves m ratos.....	33
2.3.6.5 Análise estatística.....	33
2.3.7 Avaliação da atividade motora em ratos.....	33
2.3.8 Modelo de lesão gástrica induzida pelos compostos estudados.....	34
Capítulo 3. Preparação e investigação do perfil farmacológico de tiossemicarbazonas derivadas de chalconas e seus complexos de Fe(III), Zn(II), Ga(III) e Cu(II).....	35
3.1 Caracterização dos compostos.....	36
3.1.1 Tiossemicarbazonas derivadas de chalconas.....	36
Microanálises.....	36
Espectros de massas.....	37
Espectros eletrônicos.....	38
Espectros na região do infravermelho.....	38
Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN).....	39
Estrutura cristalográfica de HPyCT4NO ₂ Ph (4).....	44
3.1.2 Complexos de Zn(II), Ga(III) e Fe(III) com tiossemicarbazonas derivadas de chalconas.....	47
Microanálises.....	47
Espectros de massas.....	49
Espectros eletrônicos.....	50
Espectros na região do infravermelho.....	51
Espectros de RMN.....	52
Espectros Mössbauer.....	56
Espectros de ressonância paramagnética eletrônica (RPE).....	58
Voltametria cíclica.....	58
3.1.3 Complexos de Cu(II) com tiossemicarbazonas derivadas de chalconas.....	60
Microanálises.....	60
Espectros eletrônicos.....	60
Estrutura cristalográfica de [Cu(PyCTPh)Cl]·DMF (Cu1a).....	61
Espectros na região do infravermelho.....	64
Espectros de RPE.....	65
3.2 Resultados biológicos.....	66
3.2.1 Resultados biológicos para os complexos Zn1-Zn4, Ga1-Ga4 e Fe1-Fe4.....	66
Atividade antimicrobiana.....	66
Atividade citotóxica.....	68
3.2.2 Resultados biológicos dos complexos Cu1-Cu4.....	70

3.2.2.1 Atividade antimicrobiana.....	70
3.2.2.2 Atividade citotóxica.....	71
3.2.2.3 Estudo de interação dos complexos com albumina sérica humana (ASB) e ácido desoxirribonucleico (ADN).....	75
3.2.2.3.1 Interação com albumina sérica humana (ASB).....	75
3.2.2.3.2 Estudo de interação dos complexos com ácido desoxirribonucleico de timo de vitelo (CT-DNA).....	78
Estudo por meio dos dados de espectros eletrônicos.....	78
Ligação competitiva entre complexos de Cu(II) e o sistema brometo de etídio-CT-DNA (BE-CT-DNA).....	79
3.2.2.4 Estudos de interação com ADN plasmidial superenovelado.....	80
Capítulo 4. Preparação e investigação do perfil farmacológico de piridoxal diclofenaco hidrazona e seus complexos metálicos.....	81
4.1 Caracterização dos compostos.....	82
4.1.1 Piridoxal diclofenaco hidrazona (5).....	82
4.1.1.1 Análises no estado sólido.....	82
Análise elementar.....	83
Espectros de infravermelho.....	83
Estruturas cristalográficas de $H_3PDHCl \cdot \frac{1}{2}(CH_3)_2CO$ (5a) e $(H_3PDH)_2SO_4 \cdot 2CH_3OH$ (5b)...	84
4.1.1.2 Análises em solução.....	88
Espectros eletrônicos.....	88
Determinação das espécies em solução.....	89
Estudo da estabilidade em tampões de pH 1,20 e 6,80.....	93
4.1.2 Complexos de Cu(II) (Cu5) e Ga(III) (Ga5) com piridoxal diclofenaco hidrazona (5).....	96
4.1.2.1 Análises no estado sólido.....	96
Microanálises.....	96
Análise térmica.....	97
Espectros de infravermelho.....	97
Espectros de RPE.....	99
Estrutura cristalográfica de $[Ga(HPDH)_2]Cl \cdot 5H_2O$ (Ga5a).....	100
4.1.2.2 Análises em solução.....	103
Condutividade molar.....	103
Espectros eletrônicos.....	103
Espectros de massas.....	104
Espectros de RMN.....	106
Estudo da estabilidade de Ga5 em tampões de pH 1,20 e 6,80.....	108
4.2 Resultados biológicos.....	109

4.2.1 Interação com albuminas	109
4.2.2 Atividade antinociceptiva	113
<i>Avaliação da resposta nociceptiva pelo modelo de hiperalgesia térmica de Hargreaves em ratos</i>	113
<i>Avaliação da resposta nociceptiva induzida por zymosan A em camundongos</i>	114
4.2.3 Avaliação da atividade motora	115
4.2.4 Modelo de lesões gástricas induzidas por diclofenaco de sódio (DIC), cloridrato de piridoxaldéido (PA), diclofenaco hidrazida (DIH), H₃PDHCl (5) em ratos	116
4.2.5 Interação de 5 com íons metálicos	118
4.2.6 Atividade antimicrobiana	120
4.2.7 Atividade citotóxica	120
Capítulo 5. Discussões e conclusões	122
Anexos	126

Índice de Abreviações

↑	Convenção no DEPT135 para CH e CH ₃
↓	Convenção no DEPT135 para CH ₂
¹³ C	Isótopo do carbono com 13 unidades de massa atômica
¹ H	Isótopo do hidrogênio de com 1 unidade de massa atômica
α(N)-	Cadeia lateral no C(2) do anel piridínico
Δλ	Incremento a ser adicionado ao atual valor comprimento de onda de excitação para se registrar o espectro de fluorescência no modo sincrônico
ε _f	Coefficiente de extinção da espécie livre em solução
ε _b	Coefficiente de extinção da espécie quando ligada à molécula alvo
Δρ _{máx.}	Valor máximo de densidade de carga residual presente na unidade assimétrica do cristal após o último ciclo de refinamento
Δρ _{mín.}	Valor mínimo de densidade de carga residual presente na unidade assimétrica do cristal após o último ciclo de refinamento
λ _{exc.}	Comprimento de onda de excitação
f _a	Fração acessível ao agente supressor
τ ₀	Tempo de meia-vida da fluorescência de um grupo fluoróforo
λ _{em.}	Comprimento de onda de emissão
A ₀	Absorbância inicial
ADN	Ácido desoxirribonucleico
A _f	Absorbância final
AINE	Anti-inflamatório não-esteroide
ASB	Albumina de soro bovino
ASH	Albumina de soro humano
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BE	Brometo de etídio
BE-CT-DNA	Sistema brometo de etídio com ácido desoxirribonucleico de timo de vitelo
BHI	Infusão Cérebro Coração
CI ₅₀	Concentração capaz de inibir o desenvolvimento de 50 % dos indivíduos testados
CIM	Concentração inibitória mínima
CMC	carboximetilcelulose
COX	Enzima ciclo-oxigenase
CT-DNA	Ácido desoxirribonucleico de timo de vitelo
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>

DMF	4, 4-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
F	Intensidade de fluorescência final
F[000]	F(000) é o valor do fator de estrutura de ordem zero (h=k=l=0). Ele representa a contagem do número efetivo de elétrons na célula unitária
F ₀	Intensidade de fluorescência inicial
HCT-116	Linhagem de células de carcinoma colorretal humano
HL-60	Linhagem de células de leucemia promielocítica aguda
HPS	Solução fluorocrômica hipotônica
Hz	Hertz
I	Força iônica
Jurkat	Linhagem de células de leucemia de linfócitos T
k'	Constante de velocidade condicional
K _{app}	Constante de ligação aparente do agente supressor ao ácido desoxirribonucleico de timo de vitelo
K _b	Constante de ligação
K _B	Constante de ligação intrínseca
K _{BE}	Constante de ligação do brometo de etídio ao ácido desoxirribonucleico de timo de vitelo
K _{SV}	Constante de Stern-Volmer
k _q	Constante de supressão bimolecular
m	Multiplete
M.M.	Massa Molar
MCF-7	Linhagem de células de carcinoma de mama
MDA-MB 231	Linhagem de células de carcinoma de mama
MetOH	Metanol
MHz	Megahertz
MTT	3-(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2il)-2,5-difenil-2H-3-tetrazólio
n	Número de sítios de ligação
NBut ₄ BF ₄	Tetrafluoroborato de tetrabutílamônio
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i> . Efeito overhauser nuclear
ORTEP	<i>Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot</i>
Diagrama	Tipo de representação gráfica usada em cristalografia para representar os átomos por meio de seus elipsoides térmicos
ORTEP	
WHO	<i>World Health Organization</i>

PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> . Linhagem de células mononucleares do sangue periférico humano
pH	Negativo do logaritmo natural na base 10 da concentração de íons H_3O^+
PHA	Mitógeno fitohemaglutinina
Phe	Resíduo de aminoácido fenilalanina
RDR	Ribonucleosídeo difosfato redutase
RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPE	Ressonância Paramagnética de eletrons
RPMI	Meio de cultura “ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ”
s	Simpleto
S	S é parâmetro que avalia a qualidade do ajuste do quadrado do fator de estrutura (F^2) para todas as reflexões após o último ciclo de refinamento da estrutura. Quanto mais próximo o seu valor de 1 maior a correspondência entre os dados experimentais com os dados obtidos pelo modelo (estrutura cristalográfica refinada)
t	Dupleto
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
TBE	Tampão Tris-borato-EDTA
TG	Análise termogravimétrica
TMS	Tetrametilsilano
Tris	<i>tris</i> (hidroximetil)aminometano
Trp	Resíduo de aminoácido triptofano
Tyr	Resíduo de aminoácido tirosina
<i>Zymozan A</i>	Complexo proteína/carboidrato derivado de paredes celulares de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – Faixa de valores de condutividade molar característicos para diferentes tipos de eletrólitos em solução.....	18
Tabela 3.1 – Análise elementar (valores teóricos entre parênteses), massa molar e faixas de fusão para as tiossemicarbazonas derivadas de chalconas.....	37
Tabela 3.2 – Atribuições e deslocamentos químicos de RMN de ^1H de HPyCTPh (1), HPyCT4ClPh (2), HPyCT4BrPh (3) e HPyCT4NO ₂ Ph (4) (DMSO- <i>d</i> ₆ , 200 MHz). Na parte inferior da página estão representadas as estruturas genéricas numeradas para as tiossemicarbazonas derivadas de chalconas na configuração <i>E</i> (esquerda) e <i>Z</i> (direita).....	40
Tabela 3.3 – Atribuições e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ^{13}C e subespectros DEPT135 de HPyCTPh (1), HPyCT4ClPh (2), HPyCT4BrPh (3) e HPyCT4NO ₂ Ph (4) (DMSO- <i>d</i> ₆ , 50 MHz). Na parte inferior desta página estão representadas as estruturas genéricas numeradas para as tiossemicarbazonas derivadas de chalconas nas configurações <i>E</i> (esquerda) e <i>Z</i> (direita).....	41
Tabela 3.4 – Dados relacionados à coleta, resolução e refinamento da estrutura cristalina de HPyCT4NO ₂ Ph (4).....	45
Tabela 3.5 – Distâncias de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados de HPyCT4NO ₂ Ph (4).....	46
Tabela 3.6 – Parâmetros para as ligações de hidrogênio [Å,°] presentes em HPyCT4NO ₂ Ph (4).....	47
Tabela 3.7 – Análise elementar (valores teóricos entre parênteses), massa molar e condutividade molar (em DMF) para os complexos de Ga(III), Zn(II) e Fe(III) de tiossemicarbazonas derivadas de chalconas.	48
Tabela 3.8 – Atribuição das principais bandas dos espectros de infravermelho para as tiossemicarbazonas derivadas de chalconas e seus complexos de Ga(III), Zn(II) e Fe(III), usando pastilhas de KBr (4000-370 cm ⁻¹).....	52
Tabela 3.9 – Atribuições e deslocamentos químicos de RMN de ^1H de [Ga(PyCTPh) ₂] ₂ NO ₃ (Ga1), [Ga(PyCT4ClPh) ₂] ₂ NO ₃ (Ga2), [Ga(PyCT4BrPh) ₂] ₂ NO ₃ (Ga3), [Ga(PyCT4NO ₂ Ph) ₂] ₂ NO ₃ (Ga4), [Zn(PyCTPh) ₂] (Zn1), [Zn(PyCT4ClPh) ₂] (Zn2), [Zn(PyCT4BrPh) ₂] (Zn3) e [Zn(PyCT4NO ₂ Ph) ₂] (Zn4) (DMSO- <i>d</i> ₆ , 200 MHz). Na parte inferior da página encontra-se uma estrutura genérica com o ligante numerado.....	54
Tabela 3.10 – Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^{13}C e subespectros DEPT135 de [Ga(PyCTPh) ₂] ₂ NO ₃ (Ga1), [Ga(PyCT4ClPh) ₂] ₂ NO ₃ (Ga2), [Ga(PyCT4BrPh) ₂] ₂ NO ₃ (Ga3), [Ga(PyCT4NO ₂ Ph) ₂] ₂ NO ₃ (Ga4), [Zn(PyCTPh) ₂] (Zn1), [Zn(PyCT4ClPh) ₂] (Zn2), [Zn(PyCT4BrPh) ₂] (Zn3) e [Zn(PyCT4NO ₂ Ph) ₂] (Zn4) (DMSO- <i>d</i> ₆ , 50 MHz). Na parte inferior da página encontra-se uma estrutura genérica com o ligante numerado.....	55

Tabela 3.11 – Parâmetros de Mössbauer e informações sobre os sítios obtidos para [Fe(PyCTPh) ₂]NO ₃ (Fe1), [Fe(PyCT4CIPh) ₂]NO ₃ (Fe2), [Fe(PyCT4BrPh) ₂]NO ₃ (Fe3) e [Fe(PyCT4NO ₂ Ph) ₂]NO ₃ (Fe4).....	57
Tabela 3.12 – Dados de voltametria cíclica para [Fe(PyCTPh) ₂]NO ₃ (Fe1), [Fe(PyCT4CIPh) ₂]NO ₃ (Fe2), [Fe(PyCT4BrPh) ₂]NO ₃ (Fe3) e [Fe(PyCT4NO ₂ Ph) ₂]NO ₃ (Fe4) (0,100 V s ⁻¹ , DMSO, 0,1 mol L ⁻¹ NBut ₄ BF ₄).....	59
Tabela 3.13 – Análise elementar (valores teóricos entre parênteses), massa molar, condutividade molar (em DMF) e momento magnético efetivo para os complexos de Cu(II) de tiossemicarbazonas derivadas de chalconas.	60
Tabela 3.14 – Dados relacionados à coleta, resolução e refinamento da estrutura cristalina de [Cu(PyCTPh)Cl]·DMF (Cu1a).....	62
Tabela 3.15 – Distâncias de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados de [Cu(PyCTPh)Cl]·DMF (Cu1a).....	63
Tabela 3.16 – Concentração inibitória mínima (CIM) contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 e <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 das chalconas, tiossemicarbazonas, de seus complexos de Ga(III), Zn(II) e Fe(III) e sais utilizados. Os fármacos de referência utilizados no teste foram o cloridrato de tetraciclina e o fluconazol.....	67
Tabela 3.17 – Efeito citotóxico (CI ₅₀) das tiossemicarbazonas (1-4), dos complexos de Ga(III) (Ga1-Ga4) e cisplatina contra leucemia mieloide (HL-60).....	70
Tabela 3.18 – Concentração inibitória mínima (CIM) contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 e <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 dos complexos de Cu(II) com tiossemicarbazonas derivadas de chalconas e dos fármacos controle (cloridrato de tetraciclina e o fluconazol).....	71
Tabela 3.19 – Efeito citotóxico (CI ₅₀) das tiossemicarbazonas (1-4), dos complexos de Cu(II) (Cu1-Cu4) e cisplatina contra linhagens celulares HCT-116, MDA-MB 231, HL-60 e Jurkat.....	73
Tabela 3.20 – Inibição da proliferação de células PBMC de tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II) (1-4) na concentração igual ao menor valor de CI ₅₀ obtido no teste contra as linhagens HL-60, Jurkat, MDA-MB 231 e HCT-116.....	75
Tabela 3.21 – Constante de supressão por Stern–Volmer (K _{sv}), constante de supressão bimolecular (k _q), constante de ligação (K _b), e número de sítios de ligação (n) para a interação entre os complexos de Cu(II) (Cu1–Cu3) e ASB.....	76
Tabela 3.22 – Constante de supressão por Stern–Volmer (K _{sv}), constante de ligação aparente (K _{app}), constante de ligação (K _b), e número de sítios de ligação (n) para a ligação competitiva entre BE-CT-DNA e os complexos de Cu(II) (Cu1-Cu3).....	79
Tabela 4.1 – Dados relacionados à coleta, resolução e refinamento de 5a e 5b	85
Tabela 4.2 – Distâncias de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados para 5a e 5b	86
Tabela 4.3 – Parâmetros para as ligações de hidrogênio [Å,°] presentes em 5a e 5b	87

Tabela 4.4 – Valores das constantes de ionização ácida (K_a) de 5 obtidos a 298 K em metanol/água 85% e DMSO/água 30%.....	91
Tabela 4.5 – Análise elementar (valores teóricos entre parênteses), massa molar e momento magnético efetivo para complexos Cu(II) (Cu5) e Ga(III) (Ga5) com piridoxal diclofenaco hidrazona (5).....	96
Tabela 4.6 – Dados relacionados à coleta, resolução e o refinamento de Ga5a	101
Tabela 4.7 – Distâncias de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados para Ga5a	102
Tabela 4.8 – Valores de condutividade molar de 5 , Cu5 e Ga5 em metanol (MetOH), dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO).....	103
Tabela 4.9 – Atribuições e deslocamentos químicos de RMN de ^1H , ^{13}C e subspectros DEPT135 de H_3PDHCl (5), e $[\text{Ga}(\text{HPDH})_2]\text{NO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Ga5), em DMSO- d_6 . Na parte inferior da página estão representadas as estruturas genéricas numeradas para o ligante em 5 e Ga5	107
Tabela 4.10 – Constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) e de supressão dinâmica (k_q) para a interação entre as albuminas séricas (HSA e ASB) e 5 a 298 K.....	111
Tabela 4.11 – Constantes de supressão efetiva (K_a), de ligação (K_b), fração da proteína acessível ao agente supressor (f_a) e número de sítios de ligação (n) para a interação as albuminas séricas (HSA e ASB) e 5 a 298 K.....	112

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Representação estrutural do salvarsan.....	2
Figura 1.2 – Representação estrutural dos complexos de platina usados como agentes neoplásicos: cisplatina e seus análogos carboplatina, oxaliplatina e nedaplatina.....	6
Figura 1.3 – Tipos de adutos formados entre complexos de platina e ADN. À esquerda está representada a ligação do tipo intrafita e à direita a ligação do tipo interfita.....	7
Figura 1.4 – Representação do esqueleto básico de hidrazonas.....	7
Figura 1.5 – Representação estrutural da nifuroxazida.....	8
Figura 1.6 – Representação do esqueleto básico de uma aroilhidrazona derivada de piridoxal.....	8
Figura 1.7 – Representação estrutural de isonicotinoil hidrazonas derivadas do: piridoxaldeído (PIH), 2-hidroxi-1-naftaldeído (HNIH), 2-piridinocarbaldeído (HPCIH) e di-2-piridilcetona (HPKIH).....	9
Figura 1.8 – Representação do esqueleto básico de tiossemicarbazonas.....	9
Figura 1.9 – Representação estrutural para os isômeros <i>Z</i> , <i>E</i> e <i>E'</i> para tiossemicarbazonas α (N)-heterocíclicas derivada de piridina.....	10
Figura 1.10 – Representações estruturais da hidroxiiureia e da triapina.....	11
Figura 1.11 – Representação da reação de condensação de Claisen-Schmidt para formação de uma chalcona.....	12
Figura 1.12 - Representação estrutural da licochalcona A.....	13
Figura 1.13 – Esquema simplicado representando os prováveis produtos para a reação envolvendo a carbonila α,β -insaturada de uma chalcona e uma hidrazida.....	13
Figura 3.1 – Representação estrutural das chalconas precursoras utilizadas neste trabalho...	36
Figura 3.2 – Estrutura proposta para as tiossemicarbazonas obtidas neste trabalho.....	36
Figura 3.3 – Comparação entre as distribuições isotópicas dos anions obtidos no espectro de massa para o íon [3-H] e o perfil calculado com base na fórmula proposta para este íon.....	37
Figura 3.4 – Espectro na região do infravermelho de HPyCT4BrPh (3) (KBr).....	39
Figura 3.5 – Espectros de RMN de ^1H de HPyCTPh (1) (DMSO- d_6 , 200 MHz). (A) Espectro obtido imediatamente após dissolução. (B) Experimento de NOEDIFF com irradiação em 11,21 ppm. (C) Espectro obtido 1 h depois da dissolução.....	42
Figura 3.6 – Representação estrutural para as prováveis conformações adotadas pelas tiossemicarbazonas derivadas de chalconas. Em relação à ligação C7–N2: (A) Forma zwitteriônica do isômero <i>Z</i> , (B) isômero <i>Z</i> , e (C) isômero <i>E</i> . R = H (1), Cl (2), Br (3) ou NO ₂ (4).....	44
Figura 3.7 – Diagrama ORTEP de HPyCT4NO ₂ Ph (4) com elipsoides térmicos representados a um nível de probabilidade de 50%.....	45
Figura 3.8 – Diagrama molecular apresentando as ligações de hidrogênio presentes em HPyCT4NO ₂ Ph (4).....	47

Figura 3.9 – Estruturas propostas para os complexos de Zn(II) (Zn1-Zn4), Ga(III) (Ga1-Ga4) e Fe(III) (Fe1-Fe4) com tiossemicarbazonas obtidas neste trabalho.	48
Figura 3.10 – Comparação entre as distribuições isotópicas dos cátions obtidos para os íons $[\text{Ga3-NO}_3]^+$ e $[\text{Fe3-NO}_3]^+$ e os perfis calculados com base na fórmulas propostas para estes íons.....	50
Figura 3.11 – Espectros eletrônicos das tiossemicarbazonas livres e de seus complexos de Zn(II), Ga(III) e Fe(III) em dimetilformamida.....	51
Figura 3.12 – Espectro de RMN de ^1H de HPyCT4ClPh (2) e seus complexos de Zn(II) (Zn2) e de Ga(III) (Ga2) (DMSO- d_6 , 200 MHz).....	56
Figura 3.13 – Espectros Mössbauer dos complexos $[\text{Fe}(\text{PyCTPh})_2]\text{NO}_3$ (Fe1), $[\text{Fe}(\text{PyCT4ClPh})_2]\text{NO}_3$ (Fe2), $[\text{Fe}(\text{PyCT4BrPh})_2]\text{NO}_3$ (Fe3) e $[\text{Fe}(\text{PyCT4NO}_2\text{Ph})_2]\text{NO}_3$ (Fe4) a 80K e 298 K.....	56
Figura 3.14 – Espectros de ressonância paramagnética eletrônica dos complexos de Fe(III) com tiossemicarbazonas derivadas de chalconas (Fe1-Fe4) no estado sólido e em DMSO (1 mM) a 11 e 298 K. Nos espectros a 298K os picos menores são devidos à presença do sal de Mn(II) usado como referência.....	58
Figura 3.15 – Voltamogramas cíclicos de $[\text{Fe}(\text{PyCTPh})_2]\text{NO}_3$ (Fe1), $[\text{Fe}(\text{PyCT4ClPh})_2]\text{NO}_3$ (Fe2), $[\text{Fe}(\text{PyCT4BrPh})_2]\text{NO}_3$ (Fe3) e $[\text{Fe}(\text{PyCT4NO}_2\text{Ph})_2]\text{NO}_3$ (Fe4) (0,100 V s^{-1} , DMSO, 0,1 mol L^{-1} NBut_4BF_4).....	59
Figura 3.16 – Espectros eletrônicos obtidos para as tiossemicarbazonas (1-4) e seus respectivos complexos de Cu(II) (Cu1-Cu4) em dimetilformamida.....	61
Tabela 3.17 – Diagrama ORTEP de $[\text{Cu}(\text{PyCTPh})\text{Cl}]\cdot\text{DMF}$ (Cu1a) com elipsoides térmicos representados a um nível de probabilidade de 50%.....	62
Figura 3.18 – Diagrama molecular de $[\text{Cu}(\text{PyCTPh})\text{Cl}]\cdot\text{DMF}$ (Cu1a) com projeção ao longo do eixo cristalográfico a . A ligação de hidrogênio entre o complexo e a molécula do solvente está apresentada por linhas em azul ou vermelho.....	63
Figura 3.19 – Espectros na região do infravermelho de HPyCTPh (1), $[\text{Cu}(\text{HPyCTPh})\text{Cl}_2]$ (Cu1) e $[\text{Cu}(\text{PyCTPh})\text{Cl}]\cdot\text{DMF}$ (Cu1a) (KBr).....	64
Figura 3.20 – Estrutura proposta para os complexos de Cu(II) (Cu1-Cu4) com tiossemicarbazonas derivadas de chalconas obtidas neste trabalho.....	65
Figura 3.21 – Espectros de ressonância paramagnética eletrônica de $[\text{Cu}(\text{HPyCTPh})\text{Cl}_2]$ (Cu1), $[\text{Cu}(\text{HPyCT4ClPh})\text{Cl}_2]$ (Cu2), $[\text{Cu}(\text{HPyCT4BrPh})\text{Cl}_2]$ (Cu3) e $[\text{Cu}(\text{HPyCT4NO}_2\text{Ph})\text{Cl}_2]$ (Cu4) no estado sólido e em soluções congeladas em DMSO (2 mM) a 77 K.....	66
Figura 3.22 – Efeito citotóxico de chalconas, tiossemicarbazonas (1-4) e seus complexos de Ga(III) (Ga1-Ga4) e cisplatina contra linhagens de células HCT-116, MCF-7, HL-60 e Jurkat. As células foram tratadas com os compostos (10 μM) por 48 h e a proliferação celular foi medida pelo ensaio de MTT. Dados são expressos como média \pm desvio padrão em comparação com o controle (células tratadas com DMSO, 0,1%) de dois experimentos independentes realizados em triplicata.....	69

Figura 3.23 – Efeito citotóxico de tiossemicarbazonas (1-4) e seus complexos de Cu(II) (Cu1-Cu4) e cisplatina contra linhagens de células HCT-116, MDA-MB 231, HL-60 e Jurkat. As células foram tratadas com os compostos (10 μ M) por 48 h e a proliferação celular foi medida pelo ensaio de MTT. Dados são expressos como média \pm desvio padrão em comparação com o controle (células tratadas com DMSO, 0,5%) de dois experimentos independentes realizados em triplicata.....	72
Figura 3.24 – Conteúdo de ADN subdiploide induzido pelas tiossemicarbazonas (1-4) e seus complexos de Cu(II) (Cu1-Cu4) em células HL60, Jurkat, MDA-MB 231 e HCT-116.....	74
Figura 3.25 – Espectros de emissão de ASB (1,00 μ M) na ausência e após adições de quantidades equimolares de Cu1 . Condições da medida: $\lambda_{exc.} = 280$ nm; tampão fosfato pH 7,20; e $T = 298$ K. As setas indicam a modificação no máximo local de intensidade de emissão com o aumento da concentração de Cu1 . Gráficos de F_0/F vs $[Q]$ e $\log((F_0-F)/F)$ vs $\log[Q]$ para os dados de $\lambda_{em.} = 345$ nm.	76
Figura 3.26 – Espectros de fluorescência no modo sincrônico de ASB (1,00 μ M) na ausência e após adições de quantidades equimolares de Cu1 . Condições da medida: faixa de $\lambda_{exc.} = 200$ a 400 nm; tampão fosfato pH 7,20; e temperatura = 298 K. As setas indicam a diminuição da intensidade de emissão com o aumento da concentração de Cu1	77
Figura 3.27 – Espectros eletrônicos de Cu1 (54,5 μ M), Cu2 (46,1 μ M) e Cu3 (42,0 μ M) na ausência e na presença de quantidades crescentes de CT-DNA em 10 diferentes relações molares complexo:CT-DNA variando de 1:1 a 1:10. As setas apresentam as mudanças no máximo de absorvância com o aumento da concentração do CT-DNA na solução.....	78
Figura 3.28 – Espectros de emissão de BE-CT-DNA (10,0 μ M) antes e após a adição de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 μ M de Cu2 . Condições da medida: $\lambda_{exc.} = 545$ nm; tampão Tris-HCl pH 7,20; e $T = 298$ K. A seta indica o sentido da supressão de fluorescência com o aumento da concentração de Cu2 . Gráficos de F_0/F vs [complexo] e $\log((F_0-F)/F)$ vs $\log[complexo]$ para os dados de $\lambda_{em.} = 605$ nm.....	79
Figura 3.29 – Estudo de eletroforese em gel de agarose com o ADN plasmidial pUC 19 tratado com HPyCTPh (1), Cu(HPyCTPh)Cl ₂ (Cu1), cisplatina e CuCl ₂ a 100 μ M em tampão Tris-HCl (pH 7,20). Período de incubação 24h a 37 °C.....	80
Figura 4.1 – Representação estrutural da diclofenaco hidrazida (DIH).....	81
Figura 4.2 – Representações estruturais de compostos pertencentes ao grupo da vitamina B ₆	82
Figura 4.3 – Estrutura proposta para a piridoxal diclofenaco hidrazona, em sua forma de cloridrato [H ₃ PDHCl (5)].....	83
Figura 4.4 – Espectro na região do infravermelho de 5 (KBr).....	84
Figura 4.5 – Diagrama ORTEP das espécies H ₃ PDH ⁺ de 5a e 5b com elipsoides térmicos representados a um nível de probabilidade de 50%.....	86
Figura 4.6 – Diagrama molecular apresentando as ligações de hidrogênio presentes em 5a e 5b	87

Figura 4.7 – Espectros eletrônicos de 5 dissolvido em metanol (MetOH), dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO) variando a concentração. As setas indicam o sentido da alteração em relação ao aumento da concentração do composto.....	88
Figura 4.8 – Espectros eletrônicos obtidos para titulação espectrofotométrica de 5 com a variação do pH. Na parte superior encontram-se os espectros obtidos em metanol/água 85% com força iônica ajustada pela adição de 0,1 M de NaCl (I = 0,1) (concentração de 5 = 36,9 µM). Na parte inferior encontram-se os espectros em DMSO/água 30% com força iônica ajustada (I = 0,1) (concentração de 5 = 48,8 µM). As setas indicam variação dos máximos de absorbância do composto com a diminuição do pH durante o curso do experimento.....	90
Figura 4.9 – Representação estrutural para as espécies de 5 geradas em solução com a variação do pH. R = porção do diclofenaco.....	91
Figura 4.10 – Espectros eletrônicos calculados pelo programa SQUAD para as espécies de 5 em metanol/água 85% (a) e em DMSO/água 30% (b).....	92
Figura 4.11 – Curvas de distribuição das espécies de 5 com a variação do pH em metanol/água 85% (a) e DMSO/água 30% (b), geradas pelo programa SQUAD.....	92
Figura 4.12 – Espectros eletrônicos de 5 em soluções tampão de pH 1,20 e 6,80 com o curso do tempo.....	94
Figura 4.13 – Equação química que representa a hidrólise de 5 em solução.....	94
Figura 4.14 – Gráfico de absorbância ($\lambda = 297$ nm) em função do tempo para 5 em solução tampão de pH 1,20. No detalhe estão apresentados os valores resultantes do ajuste segundo o modelo de decaimento exponencial de primeira ordem.....	96
Figura 4.15 – Curvas TG e DTA para H_3PDHCl (5), $[Cu(H_2PDH)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ (Cu5) e $[Ga(HPDH)_2]NO_3 \cdot 4H_2O$ (Ga5) obtidas em atmosfera de argônio (fluxo 30 mL min ⁻¹) com razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	97
Figura 4.16 – Espectro na região do infravermelho de 5 , Cu5 e Ga5 (KBr).....	98
Figura 4.17 – Estruturas propostas para os complexos $[Cu(H_2PDH)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ (Cu5) e $[Ga(HPDH)_2]NO_3 \cdot 4H_2O$ (Ga5).....	97
Figura 4.18 – Espectros de ressonância paramagnética eletrônica de $[Cu(H_2PDH)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ (Cu5) no estado sólido e em solução congelada de DMSO (2 mM) a 77 K.....	100
Figura 4.19 – Diagrama ORTEP da espécie $[Ga(HPDH)_2]^+$ de $[Ga(HPDH)_2]Cl \cdot 5H_2O$ (Ga5a) com elipsoides térmicos representados a um nível de probabilidade de 50%.....	102
Figura 4.20 – Espectros eletrônicos de Cu5 e Ga5 dissolvidos em metanol (MetOH), dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO) obtidos variando a concentração do composto.....	104
Figura 4.21 – Estrutura proposta para dímero formado a partir de Cu5 em solução.....	105
Figura 4.22 – Espectro de RMN de ¹ H de 5 e Ga5 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 200 MHz).....	108

Figura 4.23 – Espectros eletrônicos de Ga5 em soluções tampão de pH 1,20 e 6,80 com o curso do tempo à T = 303 K.....	109
Figura 4.24 – Espectros de emissão de ASB (1,00 μM) e de ASH (1,00 μM) na ausência (espectro de maior intensidade para cada série) e após sucessivas adições de 5 . Condições da medida: λ _{exc.} = 280 nm; tampão fosfato pH 7,20; e T = 298 K. As setas indicam a diminuição da intensidade de emissão com o aumento da concentração de 5 . Gráficos de F ₀ /F vs [Q] e log((F ₀ -F)/F) vs log[Q] para os dados de λ _{em.} = 345 nm.....	110
Figura 4.25 – Espectros de fluorescência no modo sincrônico de ASB (1,00 μM) e de ASH (1,00 μM) na ausência e após sucessivas adições de 5 . Condições da medida: faixa de λ _{exc.} = 200 a 400 nm; tampão fosfato pH 7,20; e temperatura = 298 K. As setas indicam a diminuição da intensidade de emissão com o aumento da concentração de 5	112
Figura 4.26 – Efeito antinociceptivo de diclofenaco de sódio (DIC), cloridrato de piridoxaldeído (PA), diclofenaco hidrazida (DIH), H ₃ PDHCl (5) e a associação de piridoxaldeído com diclofenaco hidrazida (PA+DIH) (doses equivalentes em mol a 10 mg Kg ⁻¹ de diclofenaco de sódio), <i>p. o.</i> , 2, 4 e 6 horas após a injeção de carragenina (i.pl., 50 μL, 10 mg mL ⁻¹) em ratos. n= 5 a 6. * Estatisticamente significativo com relação ao veículo (p<0,05). **Estatisticamente significativo com relação ao veículo (p<0,01). ***Estatisticamente significativo com relação ao veículo (p<0,001).....	114
Figura 4.27 – (A) Efeito antinociceptivo de diclofenaco de sódio (DIC), cloridrato de piridoxaldeído (PA), diclofenaco hidrazida (DIH), H ₃ PDHCl (5) e a associação (PA+DIH) nas doses equivalentes em mol a 10 mg Kg ⁻¹ de diclofenaco de sódio. (B) Efeito antinociceptivo de 5 nas doses equivalentes em mol a 10, 20 e 40 mg Kg ⁻¹ de DIC. DIC foi usado como controle positivo na dose de 10 mg Kg ⁻¹ . Condições dos experimentos: <i>p.o.</i> , 20 min, resposta nociceptiva induzida por <i>zymosan</i> A (i. p., 40 mg Kg ⁻¹) em camundongos (n = 6 a 7 animais). * Estatisticamente significativo com relação ao veículo (p<0,05).** Estatisticamente significativo com relação ao veículo (p<0,01).....	115
Figura 4.28 – (A) Avaliação da atividade motora de piridoxaldeído (PA) e diclofenaco hidrazida (DIH) em doses equivalentes em mol a 10 mg Kg ⁻¹ de diclofenaco de sódio, <i>p.o.</i> , 3 horas após a administração do composto em ratos. n= 5 a 6. (B) Avaliação da atividade motora de H ₃ PDHCl (5) em doses equivalentes em mol a 10 mg Kg ⁻¹ de diclofenaco de sódio, <i>p. o.</i> , 3 horas após a administração do composto em camundongos. n= 5 a 6. ** Estatisticamente significativo com relação ao veículo (p<0,01).....	116
Figura 4.29 – (A) Comprimento das lesões gástricas induzidas por cloridrato de piridoxaldeído (PA), diclofenaco hidrazida (DIH), H ₃ PDHCl (5) em doses equivalentes a 80 mg Kg ⁻¹ de diclofenaco de sódio (DIC). *** Estatisticamente significativo com relação ao veículo (p<0,001). (B) Valores do pH do estômago obtidos para PA, DIH e 5 em doses equivalentes em mol a 80 mg Kg ⁻¹ de DIC no modelo de lesão gástrica.....	117
Figura 4.30 – Lesões gástricas (pontos circundados de azul) geradas por cloridrato de piridoxaldeído (PA 80 mg kg ⁻¹) e diclofenaco de sódio (DIC 80 mg kg ⁻¹).....	118

Figura 4.31 – Espectros obtidos para titulações espectrofotométrica de **5** em solução metanólica 85% com tampão Tris-HCl (pH = 7,20) com adições sucessivas de soluções de CaCl₂, ZnCl₂, CuCl₂ e Ga(NO₃)₃. Condições: concentração de **5** = 36,9 μM; força iônica ajustada com NaCl (I = 0,1); e T = 298 K..... 119

Figura 4.32 – Efeito citotóxico de diclofenaco de sódio (DIC), cloridrato de piridoxaldeído (PA), diclofenaco hidrazida (DIH), H₃PDHCl (**5**), Ga(NO₃)₃, [Ga(HPDH)₂]NO₃·4H₂O (**Ga5**) e cisplatina contra as linhagens de células HL-60, Jurkat, HCT-116 e MCF-7. As células foram tratadas com os compostos (10 μM) por 48 h e a proliferação celular foi medida pelo ensaio de MTT. Dados são expressos como média ± desvio padrão em comparação com o controle (células tratadas com DMSO, 0,1%) de dois experimentos independentes realizados em triplicata..... 121

Capítulo 1

Introdução

1.1 Química Medicinal e Química Medicinal Inorgânica

O carbono é um elemento “chave” para o desenvolvimento e manutenção da vida. Apesar disso, os compostos inorgânicos, e em particular os metais mesmo representando menos de 1% dos átomos dos organismos vivos, são igualmente essenciais à vida.

Nos sistemas biológicos, os íons metálicos frequentemente encontram-se ligados a espécies ricas em elétrons. Em geral, eles podem desempenhar função estrutural, carregar e transportar elétrons e oxigênio, catalisar reações de oxirredução e ácido-base, dentre outras funções. Entre os metais podemos destacar o ferro, presente na hemoglobina e na mioglobina, atuando no transporte e armazenamento do oxigênio molecular (O_2), respectivamente.¹ O cobre, presente na hemocianina e na enzima dopamina β -hidroxilase, está relacionado ao transporte de oxigênio em moluscos e artrópodes¹ e à produção de neurotransmissores no cérebro.¹ Zinco e manganês, presentes em enzimas superóxido dismutases, participam da eliminação do radical livre superóxido.²

Por outro lado, o uso de metais na prevenção e no tratamento de doenças tem sido praticado desde a Antiguidade. Isto é demonstrado pelos relatos históricos do uso de sais de cobre para esterilização de água pelos egípcios, de compostos contendo ouro, em formulações preparadas por árabes e chineses, de cloreto de mercúrio, empregado como diurético na Europa no período da Renascença, entre outros.³

No entanto o que se observou por muito tempo foi o desinteresse por parte dos pesquisadores no desenvolvimento de aplicações terapêuticas de compostos metálicos, em razão de sua toxidez. O controle da reatividade, a fim de promover o aumento na especificidade e redução da toxidez do metal, ainda é um dos maiores obstáculos para a aplicação dos metais em Medicina. Porém, a busca por maior especificidade e toxidez reduzida não é fundamentalmente diferente no caso do desenvolvimento de fármacos orgânicos.

¹ R.M. Roat-Malone, BIOINORGANIC CHEMISTRY – A SHORT COURSE, John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2002, p. 190.

² R.R. Crichton, BIOLOGICAL INORGANIC CHEMISTRY – AN INTRODUCTION, Elsevier B. V., Oxford, 2008, p.197.

³ C. Orvig, M.J. Abrams, Chem. Rev. 99 (1999) 2201.

O grande salto no uso racional do “conhecimento de química” para a aplicação farmacológica deu-se no começo do século XX, com os trabalhos de Paul Ehrlich, que culminaram na descoberta do “salvarsan” (Figura 1.1), um composto arsenical usado no tratamento da sífilis.⁴ Em seus trabalhos, Ehrlich desenvolveu e aplicou as ideias que hoje fundamentam a Química Medicinal. Um exemplo disso foi o estudo da relação entre a estrutura química e a atividade farmacológica aplicada aos compostos de arsênio por ele estudados.⁴

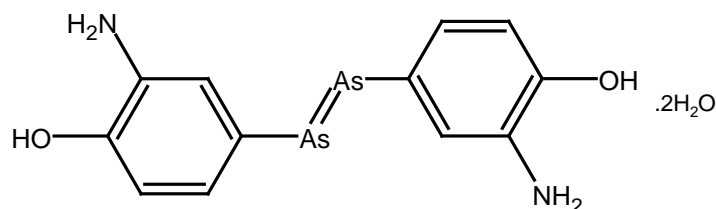


Figura 1.1 – Representação estrutural do salvarsan.

A Química Medicinal Inorgânica só surgiu como uma disciplina a partir da descoberta da atividade antitumoral da cisplatina, *cis*[diaminodicloroplatina(II)], um arquétipo de fármaco puramente inorgânico por não conter nenhum átomo de carbono.³ Desde então, a Química Inorgânica e Bioinorgânica têm dado grandes contribuições para as ciências médicas.^{5,6,7}

O uso de metais em formulações farmacêuticas apresenta, sem dúvida nenhuma, um enorme potencial. Nos últimos 50 anos, observou-se o surgimento de muitos fármacos inorgânicos como o estilbogluconato de sódio usado contra leishmaniose, a auronofina e miocriosina usados no tratamento de artrite;⁶ o nitrato de gálio utilizado clinicamente no tratamento de tumores,⁷ entre outros. Devemos destacar ainda o papel de compostos inorgânicos na medicina diagnóstica, como agentes de contraste, como o BaSO₄, usado em exames de radiografias por raios X, e como agentes de imagem, como complexos de gadolínio, usados em exames por ressonância magnética e os radiofármacos de ^{99m}Tc e citrato de gálio (⁶⁷Ga) utilizados como agentes de imagem por cintilografia.^{7,8}

No presente trabalho foram empregadas estratégias da Química Medicinal Inorgânica para o desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de fármacos antimicrobianos, antitumorais e analgésicos/anti-inflamatórios.

⁴ G.L. Patrick, AN INTRODUCTION TO MEDICINAL CHEMISTRY, Oxford University Press, New York, 1995, p. 154.

⁵ C.X. Zhang, S.J Lippard, Curr. Opin. Chem. Biol. 7 (2003) 481.

⁶ S. Ahmad, A.A. Isab, S. Ali, A.R. Al-Arfaj, Polyhedron 25 (2006) 1633.

⁷ P. Collery, B. Keppler, C. Madoulet, B. Desoize, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 42 (2002) 283.

⁸ G.L. Patrick, AN INTRODUCTION TO MEDICINAL CHEMISTRY, Oxford University Press, New York, 1995, p. 300.

1.2 Doenças causadas por microrganismos

As doenças de origem bacteriana sempre foram um grande problema para a humanidade. Até o início de século XX, eram comuns os relatos de mortes em função de infecções por bactérias. As causas destas doenças eram pouco conhecidas e não havia tratamento efetivo. A descoberta dos agentes antibacterianos foi um dos grandes acontecimentos do século passado.^{9,10}

No entanto, a descoberta de novas formas de tratamento não representou a extinção de mortes por microrganismos. Ainda assim é grande o número de casos registrados e de morte por doenças que teriam origem bacteriana, tais como a cólera e tuberculose, em todo o mundo.¹¹

Entre as espécies de bactérias patogênicas aos humanos encontram-se ainda as gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* e *Clostridium botulinum* e entre as gram-negativas encontram-se *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae* e *Pseudomonas aeruginosa*.¹² Existe ainda um terceiro grupo de bactérias, as micobactérias, entre as quais se encontram as *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*, que têm características semelhantes às das bactérias gram-positivas, mas que não sofrem coloração pelo método de Gram.¹³

Uma das principais preocupações que afetam o sistema de saúde nos últimos anos é o aumento de casos de infecções causadas por bactérias resistentes a agentes antibacterianos. Várias cepas de pneumococos, estafilococos e enterococos são atualmente resistentes à maior parte ou a todos os antibacterianos aos quais eram anteriormente susceptíveis. *Klebsiella* e *Pseudomonas* multirresistentes são prevalentes em muitos hospitais.¹⁴ Este problema é especialmente crítico em países em via de desenvolvimento, onde antibacterianos de segunda linha (mais caros) podem estar indisponíveis no sistema público de saúde ou não existirem recursos para a sua compra.¹⁴

No Brasil, o crescimento de casos de infecções por bactérias resistentes levou a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) a estabelecer uma norma obrigando as farmácias a reterem uma via da receita médica para que seja feita a venda de antimicrobianos.¹⁵

A busca por novos agentes antibacterianos é muito importante, tanto a fim de contornar o problema gerado pelo desenvolvimento da resistência bacteriana quanto para a obtenção de fármacos eficazes e, em alguns casos, mais específicos contra bactérias.

⁹ P.G. Guilfoile, ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA, Chelsea House Press, 2007, p. 10.

¹⁰ G.L. Patrick, AN INTRODUCTION TO MEDICINAL CHEMISTRY, Oxford University Press, New York, 1995, p. 155.

¹¹ Informações disponíveis em: <http://www.who.int/research/en/>. Acessado dia 17/01/13.

¹² P.G. Guilfoile, ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA, Chelsea House Press, 2007, p. 36.

¹³ P.G. Guilfoile, ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA, Chelsea House Press, 2007, p. 37.

¹⁴ Informações disponíveis em: http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsacd/cd49/man_oms.pdf. Acessado dia 16/04/13.

¹⁵ Informações disponíveis em: <http://pfarma.com.br/noticia-setor-farmaceutico/legislacao-farmaceutica/586-rdc-20-2011-anvisa-antimicrobianos.html>. Acessado dia 17/01/13.

Outro grave problema é o aparecimento de infecções relacionadas a fungos patogênicos, principalmente em pacientes imunocomprometidos, como no caso de pacientes com vírus da SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida).¹⁶

Dentre os fungos patogênicos aos humanos estão os do gênero *Candida*, tais como *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*, e outros fungos, tais como *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jiroveci*, *Histoplasma capsulatum*, *Penicilliosis marneffeii*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus rhizopodiformis*, *Rhizomucor pusillus*, *Absidia corymbifera*, *Apophysomyces elegans*, *Mucor circinelloides*, *Cokeromyces recurvatus*, *Saksenaea vasiformis* e *Blastomyces dermatitidis*.¹⁶

Enquanto no tratamento de infecções bacterianas utiliza-se uma terapia combinada de fármacos antimicrobianos de amplo espectro, no tratamento de infecções causadas por fungos faz-se necessário o conhecimento de qual espécie de fungo está causando a infecção para que a terapia seja realmente eficaz. Isto demanda tempo e nem sempre o agente antifúngico escolhido consegue acabar completamente com a infecção, sendo necessária também uma terapia combinada com outro agente antifúngico e até mesmo com antibacterianos.

Além disso, o número de agentes antifúngicos já estudados é muito menor que o de agentes antibacterianos, e boa parte dos antifúngicos são prescritos para o uso como antimicóticos em formulações de uso tópico. Assim, faz-se necessária a busca por novos agentes antifúngicos de uso oral.

1.3 Dor

A dor é uma condição inerente à vida cotidiana e todos nós já a sentimos por algum motivo. No entanto muito mais que uma sensação, segundo a *International Association for the Study of Pain* (IASP), ela é uma experiência desagradável que envolve aspectos sensoriais, emocionais e cognitivos e está associada a uma lesão real ou potencial.¹⁷

Uma vez que a dor pode estar relacionada a diferentes condições patológicas, diversas abordagens terapêuticas têm sido utilizadas com o objetivo de atenuá-la. Entre as diferentes classes farmacológicas usadas no alívio da dor, podemos mencionar os anti-inflamatórios não-esteroides, os analgésicos opioides, os agonistas α_2 -adrenérgicos, os antiepilépticos e os antidepressivos.

¹⁶ Laboratory manual for diagnosis of fungal opportunistic infections in HIV/AIDS patients. Disponível para download em: http://209.61.208.233/LinkFiles/BCT_SEA_HLM_401.pdf. Acessado dia 14/04/13.

¹⁷ Informações disponíveis em: <http://www.iasp-pain.org/Content/NavigationMenu/GeneralResourceLinks/PainDefinitions/default.htm#Pain>. Acessado dia 16/04/13.

Quanto ao aspecto sensorial, a dor pode ser dividida em quatro modalidades principais: dor nociceptiva, inflamatória, neuropática e funcional.^{18,19} Esta última modalidade não está associada a qualquer anormalidade periférica ou disfunção neurológica aparente e pode ser exemplificada pela cefaleia tensional, que é uma dor ou desconforto na cabeça, couro cabeludo ou pescoço, geralmente associada à tensão muscular nessas áreas.

A dor nociceptiva resulta da ativação direta de nociceptores por estímulos mecânicos, térmicos e químicos supralimiares e tem importante papel adaptativo, conferindo proteção aos organismos que a apresentam.^{18,19} Temos como exemplo de resposta nociceptiva, a dor gerada após a perfuração da pele por uma agulha.

A dor inflamatória está associada à lesão tecidual e consequente produção de mediadores inflamatórios que ativam ou sensibilizam os nociceptores.^{18,19} Na maioria das vezes, essas alterações fenotípicas dos nociceptores contribuem para o desenvolvimento de um comportamento de esquia e, assim, facilitam a recuperação do tecido lesado.^{18,19} Como exemplo de dor inflamatória, pode ser mencionada aquela associada à inflamação causada por um procedimento cirúrgico.

A dor neuropática é uma modalidade caracterizada por dor espontânea e intensa sem funções protetoras ou reparadoras aparentes e que resulta de lesões do sistema nervoso periférico ou central.^{18,19} Um exemplo de dor neuropática é a nevralgia do trigêmeo, que é uma dor intensa nos olhos, nariz, couro cabeludo, testa e/ou mandíbula associada ao nervo trigêmeo.

O que incentiva a pesquisa científica na busca da descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é o crescimento dos casos de câncer e doenças autoimunes, tais como artrite reumatoide, doenças inflamatórias ósseas, diabetes tipo I, lúpus e esclerose múltipla, doenças que têm a inflamação como processo secundário²⁰ e cujo tratamento com fármacos ditos anti-inflamatórios, nem sempre consegue atenuar o estímulo doloroso manifestado pelos pacientes.

1.4 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que têm em comum a multiplicação desordenada de células que acomete tecidos e órgãos.²¹ Nas células cancerígenas, em alguns casos mutações no ácido desoxirribonucleico (ADN) levam a esse tipo de descontrole.²¹

A maior dificuldade encontrada no desenvolvimento de um tratamento efetivo para câncer está no fato de as células cancerígenas serem muito semelhantes às normais. O avanço nas técnicas usadas no diagnóstico de tumores e a descoberta de novos indicadores químicos

¹⁸ J. Scholz, C.J Woolf, Nat. Neurosci. 5 (2002) 1062.

¹⁹ C.J. Woolf, Ann. Intern. Med. 140 (2004) 6 441.

²⁰ C.A. Dinarello, Cell 140 (2010) 935.

²¹ L. Lyons, D.M. Bozzone, Diagnosis and Treatment of Cancer (The Biology of Cancer), Chelsea House Pub. 1ª ed. 2007, p. 7-8.

relacionados à presença do câncer levaram a um aumento significativo na expectativa de vida de grupos de pacientes susceptíveis a essas doenças.

Quando esse descontrole celular encontra-se numa região localiza (tumor), dependendo do tamanho e características do tecido, uma intervenção cirúrgica para sua remoção é indicada. No entanto em boa parte dos casos o câncer não pode ser tratado dessa forma, sendo indicadas a radioterapia ou quimioterapia. A vantagem do uso de agentes quimioterápicos é que permitem o tratamento em regiões que não são acessíveis aos procedimentos de terapia localizados (cirurgia e radioterapia).

Entre os quimioterápicos que atuam interagindo sobre o ADN estão os complexos de platina (Figura 1.2). A cisplatina ainda é um dos agentes mais efetivos utilizados contra câncer de testículo, ovário e pescoço, sendo um coadjuvante no tratamento do câncer de pulmão. Porém seu uso apresenta muitas barreiras como o desenvolvimento de resistência celular e a os sérios efeitos colaterais que aparecem durante o tratamento. Há outros complexos de platina de segunda e terceira geração que encontram-se em uso clínico, tais como carboplatina, nedaplatina e oxaliplatina (Figura 1.2).

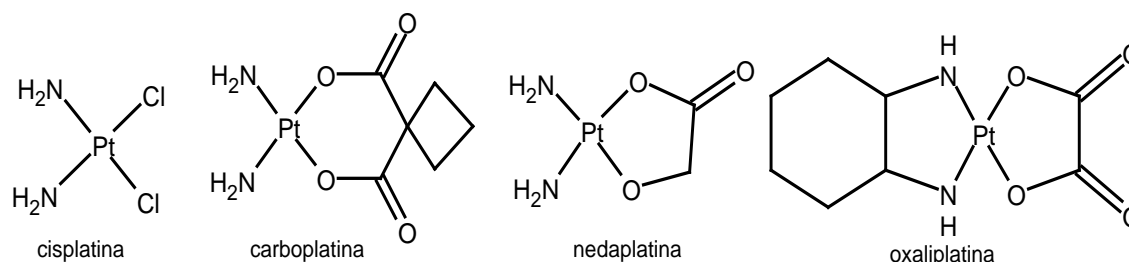


Figura 1.2 – Representação estrutural dos complexos de platina usados como agentes neoplásicos: cisplatina e seus análogos carboplatina, oxaliplatina e nedaplatina.

O mecanismo de ação da cisplatina está relacionado com a inibição da transcrição e replicação do ADN. Os efeitos citotóxicos de muitos compostos são atribuídos à capacidade em formar ligações cruzadas com o ADN, seja do tipo interfitas ou intrafitas (Figura 1.3). Essas ligações mudam a conformação do ADN, inibindo sua replicação, e provocando assim a morte celular. A forma mais citotóxica é a ligação intrafitas. A cisplatina produz preferencialmente ligações intrafitas com o ADN e os mecanismos de resistência à cisplatina podem ocorrer pelo rápido reparo de adutos cisplatina-ADN.²²

²² D. Thurston, CHEMISTRY AND PHARMACOLOGY OF ANTICANCER DRUGS. CRC Press, Boca Raton, 2007, p. 62-64.

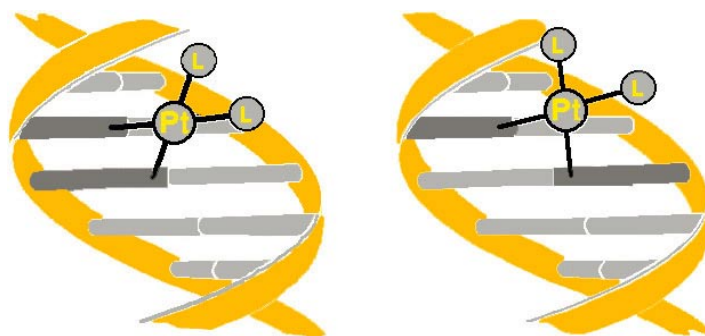


Figura 1.3 – Tipos de adutos formados entre complexos de platina e ADN. À esquerda está representada a ligação do tipo intrafito e à direita a ligação do tipo interfito.

Em razão do estreito espectro de atividades da cisplatina e dos compostos de platina usados na clínica, muitos grupos de pesquisa investigam complexos de outros metais que possam substituir ou serem administrados em conjunto com a cisplatina. Entre esses compostos encontram-se complexos de paládio, rutênio, gálio, zinco, cobre e de vários outros metais.

Uma das abordagens tem sido a preparação de complexos metálicos de ligantes que já sejam fármacos ou de ligantes que apresentem atividade antitumoral. Hidrazonas e tiossemicarbazonas têm sido exploradas como ligantes que mostram ação antineoplásica e que poderiam ser úteis no preparo de novos complexos metálicos para a terapia do câncer.

1.5 Hidrazonas

Hidrazonas são compostos caracterizados pela presença do esqueleto C=N-N (Figura 1.4). Estes compostos são facilmente obtidos a partir da reação de aldeídos [$R_1C(=O)-H$] ou cetonas [$R_1C(=O)R_2$] com hidrazina ($H_2N-N(R_3R_4)$) ou hidrazida ($H_2N-NR_3-X(=O)-R_4$). Além disso, esses compostos apresentam variadas atividades farmacológicas.^{23,24}

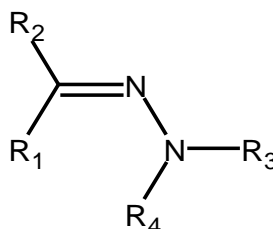


Figura 1.4 – Representação do esqueleto básico de hidrazonas.

²³ S. Rollas, S.G. Küçüküzgel, *Molecules* 12 (2007) 1910.

²⁴ B. Narasimhan, P. Kumar, D. Sharma, *Acta Pharmaceut. Scientia* 52 (2010) 169.

Um composto deste grupo que se encontra em uso clínico é a nifuroxazida (Figura 1.5), comercializada com o nome de PASSIFURIL (Millet Roux) e que é empregado como um agente antimicrobiano de segunda ou terceira escolha para o tratamento de infecções entéricas.²⁵

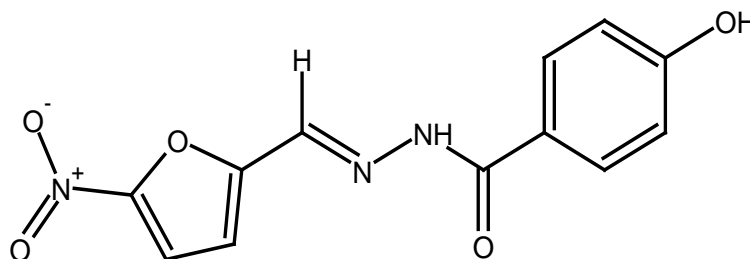


Figura 1.5 – Representação estrutural da nifuroxazida.

Hidrazonas têm sido investigadas como possíveis agentes quelantes de ferro para o controle de distúrbios tais como a talassemia.^{26,27,28} Dentre os compostos mais estudados estão as aroilhidrazonas derivadas de piridoxal (Figura 1.6). Estes ligantes são capazes de coordenar-se ao ferro através do sistema O,N,O formando dois anéis quelatos. O principal representante desse grupo é a piridoxal isonicotinoil hidrazona (PIH, Figura 1.7). Este composto demonstrou eficiência em reduzir os níveis de ferro em pacientes com alta concentração desse metal no sangue após administração por via oral.²⁹

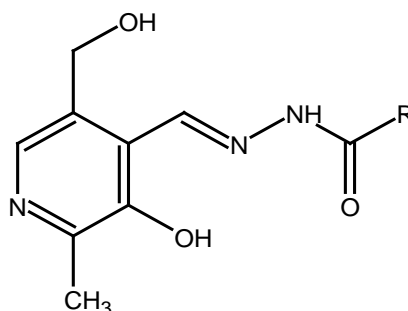


Figura 1.6 – Representação do esqueleto básico de uma aroilhidrazona derivada de piridoxal.

Além disso, na literatura encontram-se diversos trabalhos sobre as diferentes propriedades farmacológicas de hidrazonas e seus complexos metálicos como agentes antimicrobianos, antituberculose e antitumorais.^{30,31} Como exemplo temos que o complexo de gálio(III) com o piridoxal isonicotinoil hidrazona apresenta atividade antiproliferativa superior à do nitrato de gálio, composto este já utilizado na clínica,³² e complexos de ferro de outras

²⁵ A. Masunari, L.C. Tavares, *Bioorg. & Med. Chem.* 15 (2007) 4229.

²⁶ D.K. Johnson, T.B. Murphy, N.J. Rose, W.H. Goodwin, L. Pickart, *Inorg. Chim. Acta* 67 (1982) 159.

²⁷ J.J. Ranford, J.J. Vittal, Y.M. Wang, *Inorg. Chem.* 37 (1998) 1226.

²⁸ L. Pickart, W.H. Goodwin, W. Burgua, T.B. Murphy, D.K. Johnson, *Biochem. Pharmacol.* (1983) 3868.

²⁹ Informações disponíveis em: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00000588>. Acessado dia 20/01/2013.

³⁰ F.R. Pavan, P.I. Maia, S.R.A. Leite, V.M. Deflon, A.A. Batista, D.N. Sato, S.G. Franzblau, C.Q.F. Leite, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1898.

³¹ N. Nawar, N.M. Hosny, *Chem. Pharm. Bull.* 47 (1999) 944.

³² G.M. Knorr, C.R. Chitambar, *Anticancer Res.* 18 (1998) 1733.

isonicotinoil hidrazonas (Figura 1.7) apresentaram-se altamente citotóxicos contra células tumorais.³³

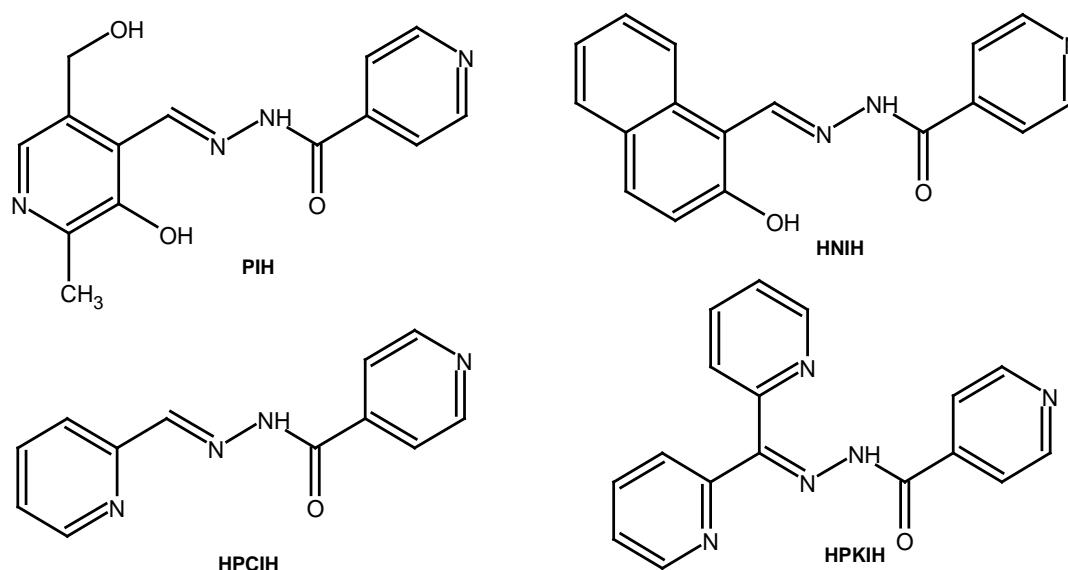


Figura 1.7 – Representação estrutural de isonicotinoil hidrazonas derivadas do: piridoxaldeído (PIH), 2-hidroxi-1-naftaldeído (HNIH), 2-piridinocarbaldeído (HPCIH) e di-2-piridilcetona (HPKIH).

1.6 Tiossemicarbazonas

Tiossemicarbazonas são compostos que apresentam o esqueleto $C=N-N-C(=S)-N$ em sua estrutura (Figura 1.8). Estes compostos são geralmente obtidos pela condensação de tiossemicarbazidas com aldeídos e cetonas.³⁴ Esta reação é bastante conhecida por sua alta quimiosseletividade, versatilidade e rapidez, apresentando geralmente altos rendimentos.³⁴

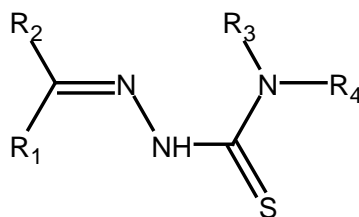


Figura 1.8 – Representação do esqueleto básico de tiossemicarbazonas.

As tiossemicarbazonas podem coexistir nas formas tiona e tiol em equilíbrio tautomérico.³⁴ No caso das tiossemicarbazonas $\alpha(N)$ -heterocíclicas derivada de piridina podem existir ainda na forma de dois isômeros configuracionais *Z* e *E* com relação à ligação $C=N$, dependendo da posição e da natureza do grupo substituinte. Além desses isômeros existe um outro, o isômero *E'* (Figura 1.9), uma forma zwitteriônica de *E* em que o enxofre e o nitrogênio

³³ P.V. Bernhardt, L.M. Caldwell, T.M. Chaston, P. Chin, D.R. Richardson, J. Biol. Inorg. Chem. 8 (2003) 866.

³⁴ R.P. Tenório, A.J. S. Góes, J.G. Lima, A.R. Faria, A.J. Alves, T.M. Aquino, Quím. Nova 28 (2005) 1030.

imínico estão obrigatoriamente na posição *sin*,³⁵ como observada na estrutura cristalográfica da 2-acetilpiridina-*N*4-1-(4-fluorofenil)piperazinil tiossemicarbazona, HAcPipPheF.³⁶

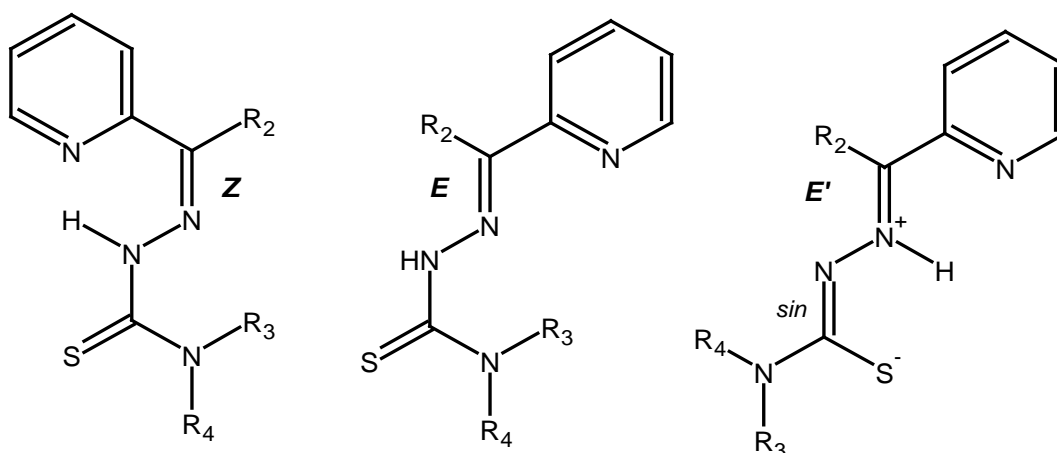


Figura 1.9 – Representação estrutural para os isômeros Z, E e E' para tiossemicarbazonas α (N)-heterocíclicas derivada de piridina.

As propriedades destes compostos têm sido extensivamente estudadas na Química Medicinal Inorgânica,³⁷ em razão de suas múltiplas atividades como agentes antitumorais, antibacterianos, antituberculose, antivirais, antimaláricos, antifúngicos, antiparasitários e anticonvulsivantes, bem como por sua grande afinidade pelos cátions metálicos.^{38,39,40,41,42}

Tiossemicarbazonas α (N)-heterocíclicas e seus complexos metálicos inibem o crescimento de bactérias *gram*-positivas como *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitides*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus faecalis*, *Enterococcus* e outras, mas não são bons inibidores do crescimento de bactérias *gram*-negativas.^{38,39} No entanto, quando tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridina encontram-se complexadas ao gálio os valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos complexos contra bactérias *gram*-negativas *P. aeruginosa* são da mesma ordem de grandeza do cloridrato de tetraciclina.⁴³

Tiossemicarbazonas encontram-se ainda entre os inibidores mais potentes da ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR), uma enzima envolvida na conversão de ribonucleosídeos em desoxirribonucleosídeos, durante a síntese do ADN.³⁸ A RDR tem sua

³⁵ Y. Yu, D.S. Kalinowski, Z. Kovacevic, A.R. Siafakas, P.J. Jansson, C. Stefani, D.B. Lovejoy, P.C. Sharpe, P.V. Bernhardt, D.R. Richardson, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 5271.

³⁶ T.P. Stanojkovic, D. Kovala-Demertzi, A. Primikyri, I. Garcia-Santos, A. Castineiras, Z. Juranic, M.A. Demertzis, *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 467.

³⁷ D.X. West, S.B. Padhye, P.B. Sonawane, *Struct. Bond.* 76 (1991) 1.

³⁸ H. Beraldo, D. Gambino, *Mini Rev. Med. Chem.* 4 (2004) 31.

³⁹ H. Beraldo, *Quím. Nova* 27 (2004) 461.

⁴⁰ D.X. West, A. Liberta, S.B. Padhye, R.C. Chikate, P.B. Sonawane, A.S. Kumbhar, R.G. Yerande, *Coord. Chem. Rev.* 123 (1993) 49.

⁴¹ J. R. Dimmock, S.C. Vashistha, P. Stables, *Eur. J. Med. Chem.* 35 (2000) 241.

⁴² H. Ceretto, R. Di Maio, M. González, M. Risso, G. Sagrera, G. Seoane, A. Denicola, G. Peluffo, C. Quijano, A.O. Stoppani, M. Paulino, C. Olea-Azar, M.A. Basombrío, *Eur. J. Med. Chem.* 35 (2000) 343.

⁴³ J.G. Da Silva, L.S. Azzolini, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, *Polyhedron* 28 (2009) 2301.

atividade aumentada em células tumorais, sendo considerada um alvo atraente para a quimioterapia.

Um dos inibidores de RDR em uso clínico é a hidroxiureia (Figura 1.10). Contudo o composto apresenta várias deficiências relacionadas à sua farmacologia, incluindo-se o aparecimento de células resistentes.³⁴ As tiossemicarbazonas $\alpha(N)$ -heterocíclicas podem ser considerados como os primeiros candidatos a substitutos da hidroxiureia na clínica.³⁹ Entre as tiossemicarbazonas testadas a 3-aminopiridina-2-carboxaldeído tiossemicarbazona (triapina, Figura 1.10) parece ser a mais promissora, sendo que vários ensaios clínicos já foram e outros continuam sendo desenvolvidos com esse composto.⁴⁴

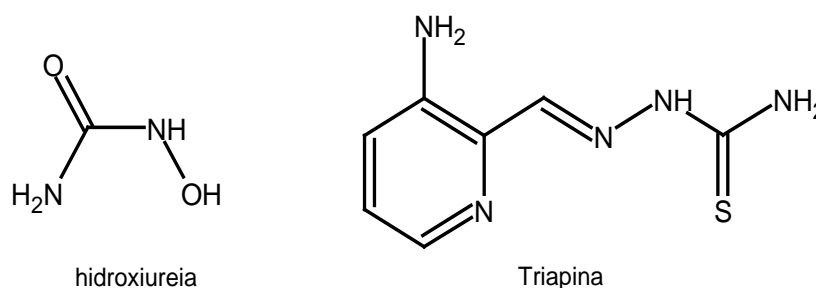


Figura 1.10 – Representações estruturais da hidroxiureia e da triapina.

Nos últimos dez anos, o nosso grupo tem se dedicado ao estudo da atividade citotóxica dessa classe de compostos, e de seus complexos metálicos. Tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina mostraram-se altamente citotóxicas frente a linhagens de gliomas e carcinoma mamário em doses nanomolares.^{45,46} Complexos de tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridina com Sn(IV),⁴⁷ Pd(II),⁴⁸ Ga(III)⁴⁹ e Sb(III)⁵⁰ revelaram-se em vários casos mais citotóxicos que as bases livres contra diferentes linhagens de células tumorais.

No presente trabalho tiossemicarbazonas derivadas de chalconas foram obtidas, assim como seus complexos com diferentes cátions metálicos.

⁴⁴ Informações disponíveis em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=triapine&pg=1>. Acessado dia 11/03/2013.

⁴⁵ M.A. Soares, J.A. Lessa, I.C. Mendes, J.G. Da Silva, R.G. dos Santos, L.B. Salum, H. Daghestani, A.D. Andricopulo, B.W. Day, A. Vogti, J.L. Pesquero, W.R. Rocha, H. Beraldo, *Bioorg. & Med. Chem.* 20 (2012) 3396.

⁴⁶ J.A. Lessa, I.C. Mendes, P.R.O. Da Silva, M. A. Soares, R.G. Santos, N.L. Speziali, N.C. Romeiro, E.J. Barreiro, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 5671.

⁴⁷ I.C. Mendes, J.P. Moreira, J.D. Ardisson, R.G. dos Santos, P.R.O. da Silva, I. Garcia, A. Castiñeiras, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 1454.

⁴⁸ K.O.S. Ferraz, G.M.M. Cardoso, C. M. Bertollo, E.M. Souza-Fagundes, N.L. Speziali, C.L. Zani, I.C. Mendes, M.A. Gomes, H. Beraldo, *Polyhedron* 30 (2011) 315.

⁴⁹ I.C. Mendes, M.A. Soares, R.G. dos Santos, C.B. Pinheiro, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 1870.

⁵⁰ D. C. Reis, M.C.X. Pinto, E.M. Souza-Fagundes, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 3904.

1.7 Chalconas

Chalconas ou 1,3-diaril-2-propen-1-onas (Figura 1.11) são compostos que apresentam como esqueleto dois grupos aromáticos ligados entre si por uma carbonila α,β -insaturada.⁵¹ Apesar de muitos desses compostos serem obtidos em frações oriundas do estudo de produtos naturais, eles podem ser sintetizadas com facilidade através da reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt, como exemplificado na Figura 1.11. Esta reação ocorre entre aldeídos e cetonas aromáticos em solventes orgânicos a temperatura próxima à ambiente, sendo comumente catalisada por uma base forte como o hidróxido de sódio (NaOH).

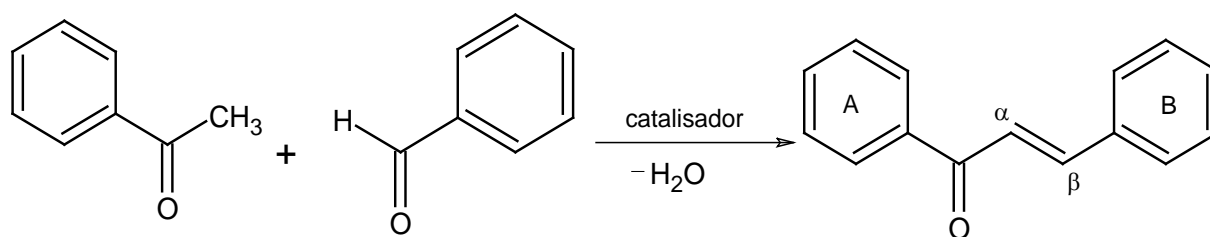


Figura 1.11 – Representação da reação de condensação de Claisen-Schmidt para formação de uma chalcona.

Chalconas têm sido ao longo dos anos alvo de investigação por suas propriedades químicas e farmacológicas. Esses compostos apresentam atividade antibacteriana,⁵² antifúngica,⁵³ antileishmania,⁵⁴ anticâncer,⁵⁵ anti-inflamatória^{56,57} entre outras.

As chalconas mais estudadas são aquelas derivadas de produtos naturais. Estas chalconas têm em comum a presença de um grande número de grupos hidroxilas e ou metoxilas. A licochalcona A (Figura 1.12), de origem natural, apresentou atividade em várias cepas de bactérias *gram*-positivas e *gram*-negativas.⁵¹ Alguns de seus análogos sintéticos promovem ainda uma inibição generalizada da proliferação de linfócitos, causando uma resposta anti-inflamatória, além de diminuir a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória.⁵⁷

⁵¹ Z. Nowakowska, Eur. J. Med. Chem. 42 (2007) 125.

⁵² R.I. Tsukiyama, H. Katsura, N. Tokuriki, M. Kobayashi, Antimicrob. Agents Chemother. 46 (2002) 1226.

⁵³ K.L. Lahtchev, D.I. Batovska, St.P. Parushev, V.M. Ubivovk, A.A. Sibirny, Eur. J. Med. Chem. 43 (2008) 2220.

⁵⁴ C.R. Andrighetti-Fröhner, K.N. Oliveira, D. Gaspar-Silva, L.K. Pacheco, A.C. Joussef, M. Steindel, C. M.O. Simões, A.M.T. Souza, U.O. Magalhaes, I.F. Afonso, C.R. Rodrigues, R.J. Nunes, H.C. Castro, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 755.

⁵⁵ A. Modzelewska, C.Pettit, G. Achanta, N.E. Davidson, P. Huang, S.R. Khan, Bioorg. & Med. Chem. 14 (2006) 3491.

⁵⁶ J.R. Dimmock, D.W. Elias, M.A. Beazely, N.M. Kandepu, Curr. Med. Chem. 6 (1999) 1125.

⁵⁷ M.L. Go, X. Wu, X.L. Liu, Curr. Med. Chem. 12 (2005) 483.

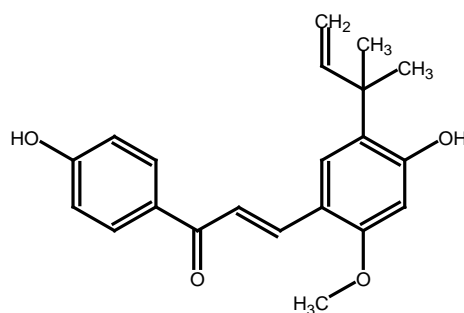


Figura 1.12 - Representação estrutural da licochalcona A.

Além de suas propriedades farmacológicas intrínsecas as chalconas mostram grande potencial como precursores da síntese de outros compostos por serem possíveis modificações envolvendo a carbonila α,β -insaturada. É o caso das reações com hidrazinas, hidrazidas, semicarbazidas e tiossemicarbazidas levando à formação de derivados pirazolínicos (Figura 1.13) que apresentam atividade como antidepressivos e anticonvulsivantes,⁵⁸ atividade antimicrobiana,⁵⁹ antimalárica,⁶⁰ antiamebíca,^{61,62} entre outras. Também podem ser obtidos desta reação derivados de cadeia aberta, como as tiossemicarbazonas, sendo que alguns desses compostos apresentaram atividade antiproliferativa contra linhagens de células tumorais humanas de hepatoma.⁶³

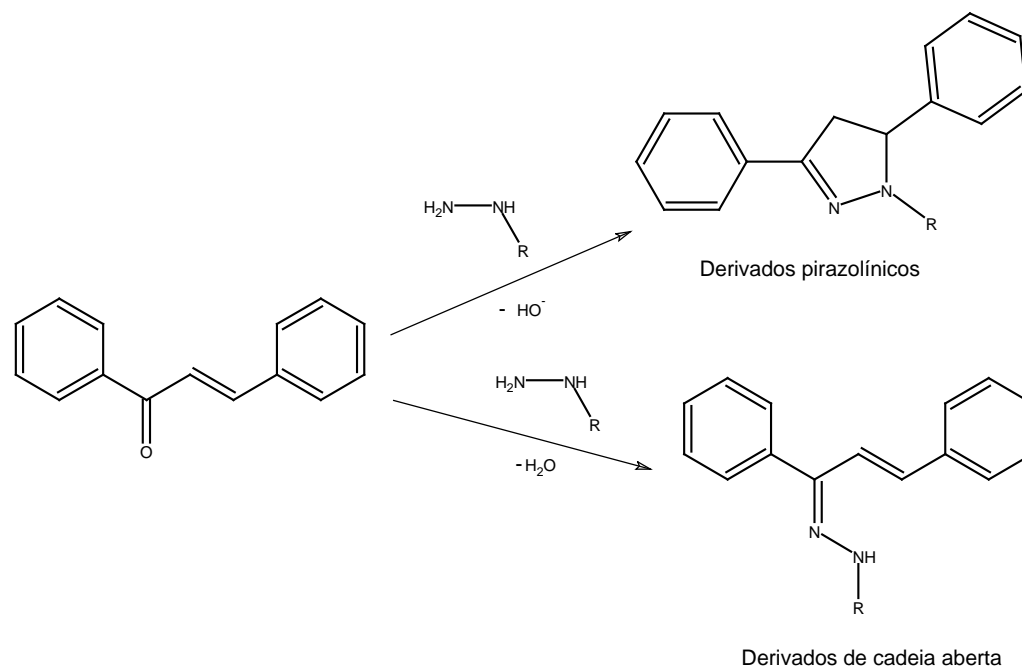


Figura 1.13 – Esquema simplificado representando os prováveis produtos para a reação envolvendo a carbonila α,β -insaturada de uma chalcona e uma hidrazida.

⁵⁸ Z. Özdemir, H.B. Kandilci, B. Gümüsel, Ü Çalış, A.A. Bilgin, Eur. J. Med. Chem.42 (2007) 373-379.

⁵⁹ K.L. Stirrett, J.A. Ferreras, V. Jayaprakash, B.N. Sinha, T. Renc, L.E.N. Quadria, Bioorg. & Med. Chem. Letters 18 (2008) 2662.

⁶⁰ G. Wanare, R. Aher, N. Kawathekar, R. Ranjan, N.K. Kaushik, D. Sahal, Bioorg. Med. Chem. Lett. 20 (2010) 4675.

⁶¹ A. Budakoti, A.R. Bhat, A. Azam, Eur. J. Med. Chem.44 (2009) 1317.

⁶² A.R. Bhat, F. Athar, A. Azam, Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 426.

⁶³ H.-J. Zhang, Y. Qian, D.-D. Zhu, X.-G. Yang, H.-L. Zhu, Eur. J. Med. Chem.46 (2011) 4702.

1.8 O presente trabalho

No presente trabalho, dedicamo-nos à síntese, caracterização e avaliação da atividade farmacológica de tiossemicarbazonas derivadas de chalconas, da hidrazona derivada de piridoxaldeído e diclofenaco e seus complexos metálicos.

Para isso foi preparada uma série de chalconas derivadas de 2-piridina, as quais foram utilizadas na síntese de novas tiossemicarbazonas que funcionam como agentes quelantes tridentados. A inovação estrutural pela presença do grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{Ph}$ como cadeia lateral é pouco relatada na literatura. Também foram preparados os complexos de Ga(III), Zn(II), Fe(III) e Cu(II) dessas tiossemicarbazonas.

Compostos de gálio têm atraído a atenção de muitos pesquisadores por suas aplicações ou potenciais usos no tratamento de várias doenças, tais como distúrbios na reabsorção óssea, com ou sem níveis elevados de cálcio no plasma, doenças autoimunes, certos tipos de cânceres e doenças infecciosas.⁶⁴ O cátion Ga(III) apresenta propriedades tais como carga, diâmetro do íon e número de coordenação equivalentes aos do cátion Fe(III). Assim, muitos sistemas biológicos são incapazes de distinguir entre Fe(III) e Ga(III). Ga(III) apresenta a habilidade de perturbar processos biológicos dependentes de Fe(III) porque, ao contrário de Fe(III), o Ga(III) não sofre redução em condições fisiológicas. Uma vez que Ga(III) pode substituir Fe(III), compostos de Ga(III) mostram efeito antimicrobiano possivelmente relacionado à perturbação do metabolismo do ferro pela presença de gálio.⁶⁵

O potencial farmacológico de compostos de zinco vem sendo estudado ao longo do tempo. Zinco é um elemento essencial presente em mais de 200 enzimas diferentes, sendo encontrado como cofator ou incorporado à estrutura dessas enzimas. Alguns compostos de zinco têm sido utilizados em formulações farmacêuticas, tais como o óxido de zinco (agente adstringente e antisséptico), que em combinação com a nistatina (agente antifúngico) constituem o princípio ativo do Dermodex® empregado no tratamento de dermatites.⁶⁶ O piritionato de zinco é usado em xampus para o tratamento de seborréia.⁶⁷ O propionato e caprilato de zinco são usados como antifúngicos tópicos.⁶⁷

Neste trabalho os complexos de Fe(III), Ga(III) e Zn(II) foram obtidos a fim de compararmos a atividade antimicrobiana destes compostos. Os complexos de Ga(III) também foram avaliados quanto a sua atividade citotóxica, pois outros complexos de Ga(III) de tiossemicarbazonas apresentaram resultados significativos para esta atividade.⁴⁹ O mecanismo de

⁶⁴ Informações disponíveis em: http://www.portaldosfarmacos.ccs.ufrj.br/resenhas_galio.html. Acessado dia 20/01/2013.

⁶⁵ Y. Kaneko, M. Thoendel, O. Olakanmi, B.E. Britigan, P. K. Singh, J. Clin. Invest. 117 (2007) 877.

⁶⁶ Informações disponíveis em: <http://www.bulas.med.br/bula/2421/dermodex.htm>. Acessado dia 04/02/2012.

⁶⁷ T. Nogrady, D.F. Weaver, MEDICINAL CHEMISTRY - A MOLECULAR AND BIOMEDICAL APPROACH, Oxford University press, New York, 2005, p. 535-538.

ação citotóxica de complexos de Ga(III) pareceria envolver a substituição de Fe(III) na estrutura da RDR, com o conseqüente bloqueio de sua ação catalítica e interrupção da síntese de desoxirribonucleotídeos.⁶⁸

Complexos de Cu(II) foram preparados para avaliarmos sua atividade antimicrobiana, e principalmente seu efeito citotóxico. Em trabalhos anteriores pesquisadores de nosso grupo mostraram que a complexação ao Cu(II) faz aumentar significativamente a atividade antimicrobiana de tiossemicarbazonas derivadas de piridina.^{69,70} Por outro lado a literatura relata que complexos de Cu(II) podem exibir ação antitumoral e que Cu(II) tem a habilidade de ligar-se ao ADN.^{71,72} Assim, a capacidade dos complexos de Cu(II) aqui preparados de interagir com o ADN e albuminas séricas foi avaliada a fim de entendermos melhor o mecanismo de ação desses compostos.

Além disso, neste trabalho foi preparada e caracterizada uma nova aroilhidrazona derivada de piridoxaldeído e diclofenaco, a piridoxal diclofenaco hidrazona. O diclofenaco é um anti-inflamatório não-esteróide utilizado no tratamento de dor e inflamação. O piridoxaldeído é um composto que pertence ao grupo da vitamina B₆. Decréscimo nos níveis de piridoxal-5-fosfato, principal metabólito gerado no organismo para compostos que pertencem ao grupo dessa vitamina, em pacientes portadores de artrite reumatóide sugerem que ele esteja relacionado aos mecanismos de prevenção de processos inflamatórios.⁷³

A atividade antinociceptiva da piridoxal diclofenaco hidrazona e seus precursores foi estudada pelos modelos de resposta nociceptiva induzida por *zymosan A* em camundongos e de hiperalgesia térmica de Hargreaves em ratos. Os efeitos desses compostos sobre a atividade motora dos animais foram investigados, assim como a capacidade da piridoxal diclofenaco hidrazona em interagir com albuminas séricas e íons metálicos em solução.

Também foram obtidos complexos de Cu(II) e Ga(III) da piridoxal diclofenaco hidrazona e foi avaliada a atividade antimicrobiana destes compostos juntamente com a da base livre. O complexo de Ga(III) com piridoxal diclofenaco hidrazona foi obtido a fim de avaliarmos, principalmente, sua atividade antiproliferativa.

Esperamos contribuir, com o presente trabalho, para ampliar o leque de possibilidades de aplicações terapêuticas dos compostos das famílias das chalconas, tiossemicarbazonas, hidrazonas e seus complexos metálicos, assim como melhorar a compreensão de seus mecanismos de ação e das características estruturais mais favoráveis à ação farmacológica.

⁶⁸ J.A. Lessa, G.L. Parrilha, H. Beraldo, Inorg. Chim. Acta 393 (2012) 53.

⁶⁹ I.C. Mendes, J.P. Moreira, A.S. Mangrich, S.P. Balena, B.L. Rodrigues, H. Beraldo. Polyhedron 26 (2007) 3263.

⁷⁰ I.C. Mendes, J.P. Moreira, N.L. Speziali, A.S. Mangrich, J.A. Takahashia, H. Beraldo. J. Braz. Chem. Soc. 17 (2006) 1571.

⁷¹ P. Krishnamoorthy, P. Sathyadevi, A.H. Cowley, R.R. Butorac, N. Dharmaraj, Eur. J. Med. Chem. 46 (2011) 3376.

⁷² P.P. Silva, W. Guerra, J.N. Silveira, A.M.C. Ferreira, T. Bortolotto, F.L. Fischer, H. Terenzi, A. Neves, E.C. Pereira-Maia, Inorg. Chem. 50 (2011) 6414.

⁷³ E-P.I. Chiang, P.J. Bagley, J. Selhub, M. Nadeau, R. Roubenoff, Am. J. Med. 114 (2003) 283.

Esperamos igualmente contribuir para a ampliação das possibilidades de aplicações desses compostos nas infecções microbianas, no tratamento de dor, e no tratamento de tumores.

1.9 Objetivos do trabalho

Este trabalho teve como principal objetivo obter novos compostos com atividade antimicrobiana, antinociceptiva e/ou citotóxica. Foram estudados tiossemicarbazonas derivadas de chalconas, uma hidrazona derivada de piridoxaldeído e diclofenaco e seus complexos metálicos.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Sintetizar e caracterizar uma série de chalconas que apresentam um grupo 2-piridinil ligado à carbonila α,β -insaturada e seus complexos de Fe(III), Ga(III), Zn(II) e Cu(II).

- Avaliar a atividade antimicrobiana desses compostos contra as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* e o fungo *C. albicans*.

- Avaliar a atividade citotóxica de chalconas, tiossemicarbazonas e dos complexos metálicos contra linhagens celulares de tumor sólido HCT-116 (carcinoma colorretal) e MCF-7 ou MDA-MB 231 (carcinomas mamários), e contra leucemias HL-60 (leucemia mieloide) e Jurkat (leucemia linfoide).

- Sintetizar e caracterizar a hidrazona derivada de diclofenaco e piridoxaldeído e seus complexos de Cu(II) e Ga(III).

- Avaliar a atividade antinociceptiva da hidrazona derivada de diclofenaco.

- Avaliar a atividade antimicrobiana da hidrazona de diclofenaco e dos seus complexos de Cu(II) e Ga(III) contra bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e o fungo *C. albicans*.

- Avaliar a atividade citotóxica desses compostos contra linhagens celulares de tumor sólido HCT-116 e MCF-7, e contra leucemias HL-60 e Jurkat.

- Avaliar a capacidade dos complexos de Cu(II) e da hidrazona derivada de diclofenaco em interagir com albuminas séricas, DNA e/ou íons metálicos em solução.

Capítulo 2

Parte experimental

2.1 Equipamentos e procedimentos

2.1.1 Determinação de temperaturas de fusão

As temperaturas de fusão foram determinadas em um equipamento Mettler FP90.

2.1.2 Pesagens

As pesagens foram feitas em uma balança analítica Gehaka, modelo AG 200, com sensibilidade de 0,0001 g, ou em uma balança Mettler AE 163, com sensibilidade de 0,00001g.

2.1.3 Análise elementar

As análises elementares foram realizadas no Departamento de Química da UFMG ou via solicitação de serviço externo à Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP). Em ambos os casos, utilizou-se um equipamento CHN 2400, Perkin Elmer.

2.1.4 Espectros de infravermelho

Os espectros de infravermelho foram registrados utilizando-se um espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR System-Spectrum GX nas regiões entre 4000-400 cm^{-1} , a partir de pastilhas de KBr contendo o composto, e entre 710-200 cm^{-1} , a partir de uma emulsão do composto em óleo mineral aplicada sobre placas de CsI.

2.1.5 Susceptibilidade magnética

As medidas de momento magnético dos complexos de Cu(II) foram realizadas utilizando uma balança de Susceptibilidade Magnética - Johnson Matthey- MSB/AUTO.

2.1.6 Análises condutimétricas

O equipamento utilizado nas medidas de condutividade molar foi um condutivímetro YSI Conductivity Bridge, modelo 31, com célula condutimétrica de mesmo fabricante e constante $0,088 \text{ cm}^{-1}$. As medidas foram feitas a partir de uma solução do composto ($\sim 1 \text{ mM}$) no solvente selecionado [dimetilformamida (DMF), metanol (MetOH) ou dimetilsulfóxido (DMSO)]. A atribuição do tipo de eletrólito em solução foi feita comparando os resultados obtidos com os dados da Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Faixa de valores de condutividade molar característicos para diferentes tipos de eletrólitos em solução.

Tipo de eletrólito	Faixa de valores de $\Lambda_M (\text{cm}^2 \Omega^{-1} \text{ mol}^{-1})$ no solvente selecionado		
	DMF ¹	MetOH ¹	DMSO*
1:1	65-90	80-115	31-43
2:1	130-170	160-220	-
3:1	200-240	290-350	-

*Valores obtidos a partir de compostos conhecidos.

2.1.7 Espectrometria de massas

Os espectros de massas foram adquiridos usando um espectrômetro ion trap LCQ FleetTM (Thermo Scientific) (aparelho com baixa resolução na determinação de m/z) ou um espectrômetro LCMS-IT-TOF-MS (Shimadzu) (aparelho com alta resolução na determinação de m/z). Os dois aparelhos são equipados com uma fonte de *electrospray* e a aquisição de espectros no modo positivo ou negativo foi realizada numa faixa de m/z 200-2000. Em ambos os casos, soluções estoque do analito em DMSO foram diluídas a cerca de 20 ppm com metanol grau HPLC e aplicadas por inserção direta através de uma seringa na câmara de ionização do equipamento.

2.1.8 Espectros eletrônicos

Os espectros eletrônicos de soluções dos compostos (10^{-3} - 10^{-6} M) no solvente desejado foram obtidos utilizando-se os espectrofotômetros HP8453 diode array – Hewlett Packard, UV-2401PC – (P/N 206-82201) – Shimadzu, ou CARY100 Bio – (UV1006M29) – VARIAN (Agilent Technologies) em cubetas de quartzo com 1 e 5 cm de caminho óptico.

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

2.1.9 Espectros de fluorescência

Os espectros de fluorescência foram registrados no espectrofluorímetro CARY Eclipse-(FL1006m016)-VARIAN (Agilent Technologies) utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

2.1.10 Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram registrados em um espectrômetro Bruker DPX-200 (200 MHz), usando-se DMSO- d_6 como solvente e TMS como referência interna. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (~ 27 °C).

2.1.11 Espectros Mössbauer

Os espectros Mössbauer das amostras sólidas dos complexos de Fe(III) a 298 e 80 K foram obtidos em colaboração com o pesquisador José Domingos Ardisson, no Laboratório de Física Aplicada do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (LFA/CDTN).

Para efetuar as medidas foi utilizado um espectrômetro Mössbauer convencional, operado no modo de aceleração constante e na geometria de transmissão, com fonte de ^{57}Co em matriz de ródio. Os dados obtidos foram ajustados utilizando-se o programa NORMOS/DISTRI.² Os deslocamentos isoméricos foram determinados relativamente ao α -Fe. As medidas em baixas temperaturas foram realizadas com o auxílio de um criostato de fluxo de N_2 acoplado ao sistema de medidas Mössbauer.

2.1.12 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

Os espectros de RPE foram obtidos em colaboração com a Profa. Sonia R. Louro, do Departamento de Física da PUC-Rio. Essas medidas do espectro de RPE foram realizadas utilizando o espectrômetro Bruker ESP300E, com frequência de modulação de 100 kHz, operando em 1,1 mT. As amostras foram medidas utilizando-se tubos de quartzo de diâmetro interno de 3 mm, a temperatura ambiente (para amostras sólidas) e a temperatura de N_2 líquido, 77K (para soluções do composto em DMSO em concentrações entre 1-2 mM). Alguns espectros de RPE foram obtidos ainda no Departamento de Física da UFMG, em colaboração com os Professores Klaus Wilhelm Heinrich Krambrock e Maurício Veloso Brant Pinheiro.

² R. A. Brand, Nucl. Inst. Meth. B 28 (1987) 398.

2.1.13 Voltametria cíclica

Os voltamogramas dos complexos de Fe(III) foram obtidos no laboratório do Prof. Paulo Jorge Sanches Barbeira (Departamento de Química da UFMG) utilizando-se um potenciostato Eco Chemie μ Autolab equipado com um eletrodo de gota de mercúrio estático (SMDE) de tamanho de gota mínimo (Metrohm 663VA). O sistema de eletrodos utilizado foi um arranjo convencional de três eletrodos, com um contraeletrodo de platina, eletrodo de referência de Ag/AgCl com câmara interna saturada de KCl e câmara externa de NBut₄BF₄ em DMSO e eletrodo de trabalho de carbono vítreo.

As medidas foram realizadas a uma velocidade de 0,100 V s⁻¹ e foi usada uma solução eletrolítica de concentração 0,1 M de NBut₄BF₄ em DMSO. Os voltamogramas foram registrados e analisados usando o programa GPES.

2.1.14 Determinação do pH

As medidas de pH foram realizadas utilizando-se o potenciômetro Marte MB-10 equipado com eletrodo de vidro combinado de Ag/AgCl. Este aparelho foi calibrado utilizando-se dois tampões, um de pH 4,00 e outro de pH 7,00.

2.1.15 Análises termogravimétricas

As análises termogravimétricas foram feitas no laboratório do Prof. Geraldo Magela de Lima (Departamento de Química da UFMG), sob a supervisão do aluno de doutorado Fabrício Vieira Andrade.

Os compostos foram pesados em cadinho de alumina, em balança Termogravimétrica Shimadzu DTG-60H, e analisadas pelo software da TA Instruments (TA-60). As análises foram feitas com fluxo de 30 mL min⁻¹ de argônio, rampa de 10 °C min⁻¹ e faixa de temperatura de aquecimento de 25 a 1000 °C.

2.1.16 Estruturas cristalográficas

As estruturas cristalográficas foram determinadas por meio das medidas realizadas no LabCri (Laboratório de Cristalografia da UFMG) utilizando-se um difratômetro Oxford GEMINI. Essas medidas foram realizadas sob a supervisão do Prof. Nivaldo L. Speziali.

Detalhes e condições experimentais de cada medida estão descritos nos capítulos em que se descreve a caracterização desses compostos.

2.1.17 Determinação das espécies em solução

Titulações espectrofotométricas variando o pH foram realizadas utilizando-se uma solução do composto em uma concentração fixa com força iônica corrigida ($I = 0,1$). Os valores de pH e os espectros eletrônicos da solução foram registrados após cada variação do pH. Os equipamentos utilizados foram o espectrofotômetro UV-2401PC – (P/N 206-82201) – Shimadzu e o potenciômetro Marte MB-10. Outros detalhes e condições experimentais de cada medida estão descritos nos capítulos em que se descreve a caracterização desses compostos.

A análise dos dados espectrofotométricos foi feita usando-se o programa SQUAD.³ Este programa exige uma proposta inicial para o modelo químico, na qual são considerados todos os possíveis equilíbrios envolvidos na formação das diversas espécies, sendo atribuídos valores estimados para as respectivas constantes de ionização. Os valores estimados são refinados pelo método dos mínimos quadrados não linear, procurando minimizar a somatória dos quadrados das diferenças entre os valores de absorvância calculados e os medidos.

Após o término do refinamento o programa permite uma avaliação do resultado através do desvio padrão na absorvância, que deve ser da ordem de 0,01, e dos desvios padrões nos valores das constantes, que devem ser da ordem de 1% do valor da constante. Os desvios padrões nos espectros individuais também são muito úteis, pois valores muito discrepantes sugerem problemas experimentais.

O programa calcula as absorvidades molares e as concentrações de cada espécie com a variação do pH. Estes valores são usados para traçar gráficos de absorvidade molar em função do comprimento de onda e de distribuição das espécies em função do pH, os quais são úteis para verificar a qualidade do resultado.

2.1.18 Estabilidade dos compostos em solução tampão

O estudo da estabilidade dos compostos em solução tampão foi realizado utilizando-se de um espectrofotômetro HP8453 diode array – Hewlett Packard com porta-amostra termostatizado a 303 K. Os espectros eletrônicos foram obtidos com o curso do tempo para soluções de compostos de concentração na ordem de 10^{-4} a 10^{-5} M em tampão. Gráficos de absorvância vs tempo foram utilizados para avaliar a estabilidade do composto em solução. As soluções tampão utilizadas foram preparadas como descrito na farmacopeia americana.⁴

Detalhes e condições das medidas realizadas nesses experimentos estão descritos nos capítulos em que se descreve a caracterização desses compostos.

³ D.J. Leggett, S.L. Kelly, L.R. Shiue, Y. Wu, D. Chang, K.M. Kadish, Talanta 30 (1983) 579.

⁴ US Pharmacopeia XXXI 2008. US Pharmacopeial Convention. Rockville, MD.

2.2 Sínteses dos ligantes e complexos

Chalconas, tiossemicarbazonas derivadas de chalconas, piridoxal diclofenaco hidrazona, e seus complexos metálicos foram obtidos segundo procedimentos mostrados a seguir.

Esses produtos foram caracterizados através de microanálises, medidas da condutividade molar e seus espectros de massas, de infravermelho, eletrônicos, de RMN de ^1H , ^{13}C , e subespectros de DEPT135. Os espectros de RPE foram obtidos para os complexos de Cu(II) e Fe(III). Para os complexos de Fe(III) foram obtidos seus espectros Mössbauer e foi realizado um estudo eletroquímico pela técnica de voltametria cíclica. Cristais obtidos tiveram sua estrutura determinada pela técnica de difração de raios X de monocristal.

2.2.1 Reagentes

As procedências dos reagentes foram as seguintes: os aldeídos, cetonas, tiossemicarbazida, piridoxaldeído e diclofenaco de sódio (Merck e Aldrich), $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich), nitrato de gálio(III) (Aldrich), nitrato de ferro(III) (Vetec), cloreto de zinco(II) (Vetec) e solventes orgânicos (Synth).

2.2.2 Preparação de chalconas: 3-fenil-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona (PyCPh), 3-(4-cloro-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona (PyC4ClPh), 3-(4-bromo-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona (PyC4BrPh) e 3-(4-nitro-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona (PyC4NO₂Ph)

As chalconas foram obtidas usando um procedimento análogo ao descrito na literatura.⁵ Uma solução de NaOH 10% (m/v) (7,5-12,5 mL) foi adicionada gota a gota a uma mistura de 2-acetilpiridina (10 mmol) e do aldeído desejado (10 mmol) em metanol (15 mL). A mistura reacional permaneceu sob agitação magnética por 1 h à temperatura ambiente. O sólido obtido foi filtrado, lavado com água e secado sob pressão reduzida. Os rendimentos dos produtos variaram de 70 a 89%.

2.2.3 Síntese de tiossemicarbazonas derivadas de chalconas: 3-fenil-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona tiossemicarbazona [HPyCTPh (1)], 3-(4-cloro-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona tiossemicarbazona [HPyCT4ClPh (2)], 3-(4-bromo-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona tiossemicarbazona [HPyCT4BrPh (3)] e 3-(4-nitro-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona tiossemicarbazona [HPyCT4NO₂Ph (4)]

⁵ V.V. Zakharychev, A.V. Kuzenkov. Chem. Heterocycl. Comp. 43 (2007) 989.

Cinco gotas de HCl concentrado foram adicionadas a uma mistura da chalcona desejada (4 mmol) e tiossemicarbazida (4 mmol) em metanol (20 mL). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética por 2 h a temperatura ambiente. O sólido resultante foi filtrado, lavado com água e éter etílico, e secado sob pressão reduzida. Os rendimentos dos produtos variaram de 45 a 78%.

2.2.4 Síntese dos complexos de Ga(III), de Zn(II) e Fe(III) com tiossemicarbazonas derivadas de chalconas (Ga1-Ga4, Zn1-Zn4 e Fe1-Fe4)

Nitrato de gálio(III), nitrato de ferro(III) ou cloreto de zinco(II) (0,5 mmol) foi adicionado a uma solução da tiossemicarbazona desejada (1 mmol) em metanol (15 mL). A mistura reacional permaneceu sob agitação magnética e refluxo por 15 min. Então, uma solução contendo acetato de sódio (1 mmol) e um pequeno excesso da tiossemicarbazona (0,05 mmol) em metanol (5 mL) foi adicionada à mistura reacional, que permaneceu em refluxo por 5 h. O sólido obtido foi filtrado, lavado com isopropanol e secado sob pressão reduzida. Os rendimentos dos produtos variaram de 79 a 97%.

2.2.5 Síntese dos complexos de Cu(II) com tiossemicarbazonas derivadas de chalconas (Cu1-Cu4)

Os complexos de Cu(II) foram obtidos a partir da reação entre 2 mmol da tiossemicarbazona desejada e 2 mmol de cloreto de cobre(II) em metanol (25 mL). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética e refluxo por 3 h. O sólido obtido foi filtrado, lavado com metanol e éter etílico, e secado sob pressão reduzida. Os rendimentos dos produtos variaram de 91 a 94%.

2.2.6 Síntese do cloridrato de 2-{2-(2,6-diclorofenil)amino}fenil}-N'-{3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metil-4-piridínio}metileno}acetohidrazida, piridoxal diclofenaco hidrazona [H₃PDHCl (5)]

Para que este composto fosse preparado foi necessário obter o éster do diclofenaco a partir do diclofenaco de sódio, como descrito na literatura;⁶ e a hidrazida do diclofenaco (DIH) a partir do éster do diclofenaco, como descrito na literatura.^{6,7}

A mistura reacional contendo 3 mmol de hidrazida do diclofenaco (DIH) e 3 mmol de cloridrato de piridoxaldeído em metanol (15 mL) foi mantida sob agitação magnética e refluxo

⁶ D. Sriram, P. Yogeewari, R.V. Devakaram, Bioorg. & Med. Chem. 14 (2006) 3113.

⁷ S.V. Bhandari, K.G. Bothara, M.K. Raut, A.A. Patil, A.P. Sarkate, V.J. Mokale, Bioorg. & Med. Chem. 16 (2008) 1822.

por 3 h. O sólido obtido foi filtrado, lavado com água e metanol a frio e secado sob pressão reduzida. O rendimento do produto obtido nesta etapa variou de 80 a 89 %.

2.2.7 Síntese do complexo de Ga(III) com piridoxal diclofenaco hidrazona (Ga5)

Nitrato de gálio(III) (0,5 mmol) foi adicionado a uma solução contendo 1 mmol de H₃PDHCl (**5**) em metanol (20 mL). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética e refluxo por 3 h. O sólido obtido foi filtrado, lavado com isopropanol e secado sob pressão reduzida. O rendimento do produto foi de 87%.

2.2.8 Síntese do complexo de Cu(II) com piridoxal diclofenaco hidrazona (Cu5)

O complexo de Cu(II) foi obtido a partir da reação entre 2 mmol de H₃PDHCl (**5**) e 2 mmol de cloreto de cobre(II) em metanol (20 mL). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética e refluxo por 3 h. O sólido obtido foi filtrado, lavado com metanol e éter etílico, e secado sob pressão reduzida. O rendimento do produto foi de 90%.

2.3 Testes Biológicos

2.3.1 Atividade antimicrobiana

Os testes de atividade antibacteriana e antifúngica foram realizados quantitativamente pelo método de macrodiluição em série.⁸ Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados seguindo os padrões do NCCLS.^{9,10} Cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) foram inoculadas em caldo Mueller Hinton e as cepas do fungo *Candida albicans* (ATCC 10231) inoculadas em caldo Sabouraud, sendo ambas incubadas a 37° C por 18 a 24 h.

A referência para a turbidez do inóculo foi medida pela análise do seu espectro de absorção na região do visível, nos comprimentos de onda 530 nm e 625 nm, devendo fornecer um valor de absorbância entre 0,08 e 0,1 de forma que a concentração do inóculo foi de 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC). Foram retirados 100 µL do inóculo e transferidos para outro tubo contendo 9,9 mL de caldo Mueller Hinton (para bactéria) ou Sabouraud (para fungo), de modo que a concentração de inóculo neste tubo foi de 10⁶ UFC. Foram acrescentados

⁸ J. Pernak, J. Rogoza, I. Mirska, Eur. J. Med. Chem. 36 (2001) 313.

⁹ National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA (2003).

¹⁰ National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, Pennsylvania, USA (2002).

200 µL deste inóculo aos tubos de diluição contendo 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,062 e 0,031 µg mL⁻¹ das substâncias testadas, de modo que a concentração de inóculo em cada tubo foi de 10⁵ UFC.

Como controle positivo usou-se a bactéria ou o fungo no meio de cultura; no controle negativo foi usado a bactéria ou o fungo, o meio de cultura e fluconazol para *C. albicans* ou cloridrato de tetraciclina para *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Após 20 horas de incubação em estufa a 37 °C realizou-se a leitura do teste, sendo determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos compostos.

2.3.2 Atividade citotóxica

Os testes de atividade citotóxica foram realizados no Departamento de Fisiologia da UFMG, em colaboração com a Profa. Elaine M. Souza-Fagundes.

2.3.2.1 Linhagens de células e condições de cultura

Células HL-60 (leucemia mieloide aguda), Jurkat (leucemia de linfócitos T), MCF-7 (carcinoma mamário) e HCT-116 (carcinoma colorretal humano) foram cedidas pelo Dr. Gustavo Amarante-Mendes (USP), e células MDA-MB 231 (carcinoma mamário) foram cedidas pelo Dr. Alfredo Goes (UFMG). Todas as células foram mantidas no meio de cultura RPMI (*Roosevelt Park Memorial Institute*) 1640 enriquecido com 10 % de soro fetal bovino (Cultilab), antibióticos (100 U mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ estreptomicina) e 2 mM de L-glutamina, sob uma atmosfera de 5% CO₂/95% ar a 37 °C por 24 h.

2.3.2.2 Atividade citotóxica contra linhagens tumorais

Células leucêmicas HL-60 (5 x 10⁴ células/poço) e Jurkat (1 x 10⁵ células/poço), e de tumores sólidos HCT-116, MCF-7 e MDA-MB 231 (todas com 1 x 10⁴ células/poço) foram incubadas com os compostos (10 µM) por 48 h em atmosfera de 5% CO₂. Células controles foram tratadas com 0,5 % ou 0,1% DMSO (controle negativo) ou com 10 µM de cisplatina (controle positivo). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução do corante brometo de 3-(4,5-dimetil-1,3-tiazol-2il)-2,5-difenil-2H-tetrazól-3-io (MTT).¹¹

Após 48 h de incubação a 37 °C, o MTT foi adicionado em cada poço e depois de mais 4 h de incubação, adicionou-se HCl 0,04 M em isopropanol para dissolver o formazan precipitado. Após solubilização dos cristais de formazan formados pela metabolização do MTT pelas células viáveis, as placas foram lidas em leitor de ELISA a um comprimento de onda de 595 nm.

¹¹ E.R. Janieson, S.J. Lippard, Chem. Rev. 99 (1999) 2467.

Compostos que inibiram mais de 50% da proliferação celular foram selecionados para determinação de CI_{50} . Para tal, foram utilizados os compostos em concentrações de 100 a 0,001 μM . Foram feitos três experimentos independentes realizados em triplicata.

2.3.2.3 Avaliação de efeito citotóxico sobre células mononucleares de sangue periférico humano

Amostras de sangue foram coletadas de voluntários adultos de ambos os sexos em conformidade com a Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais – HEMOMINAS (protocolo nº 105/2004).

As células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) foram isoladas conforme o método descrito por Gazzinelli e colaboradores.¹² O sangue foi inserido em tubos contendo uma mistura de Histopaque (Sigma) na proporção de uma parte de Histopaque para duas partes de sangue. Essa preparação foi então centrifugada por 40 minutos a 1400 rpm e a 18 °C. Após a centrifugação, as células foram lavadas e a densidade celular foi ajustada para $2,5 \times 10^6$ células mL^{-1} . 100 μL desta suspensão ($2,5 \times 10^5$ células) foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços e as células foram incubadas por 24 h com $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do mitógeno fitohemaglutinina (PHA). Após este período, as células foram cultivadas na presença dos compostos, incluindo a cisplatina, por 72 h em atmosfera de 5% de CO_2 com 100 % de umidade a 37 °C. A concentração utilizada dos compostos foi aquela correspondente ao menor valor de CI_{50} das linhagens celulares testadas. As células foram mantidas em meio de cultivo completo (CMBLAST) contendo RPMI (Sigma), suplementado com 5% de soro humano normal AB Rh+ previamente inativado, 3% de L-Glutamina (solução estoque 200 mM), 2% da uma mistura de antibiótico-antimicótico contendo 1000 U mL^{-1} de penicilina, 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fungisona. Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo utilizada a cisplatina como controle positivo. A proliferação e a viabilidade celular foram determinadas pelo ensaio de redução de MTT, já descrito anteriormente.

2.3.2.4 Ensaio de fragmentação de ADN

As células normais apresentam o conteúdo de ADN igual a 2n ou 4n, dependendo da fase do ciclo celular em que se encontram. Entretanto, as células em apoptose apresentam este conteúdo menor que 2n, uma vez que os fragmentos de pequeno peso molecular irão deixar o interior do núcleo, sendo esta fase chamada de subdiploidia. O conteúdo de ADN subdiploide foi determinado para a quantificação da fragmentação do ADN celular, o qual é uma das características de morte celular por apoptose. Este ensaio foi utilizado como método preditivo do potencial pró-apoptótico dos compostos.

¹² G. Gazzinelli, N. Katz, R.S. Rocha, D.G. Colley, J. Immunol. 130 (1983) 2891.

O estudo foi realizado com base no método descrito por Nicoletti e colaboradores.¹³ As células controle e tratadas com os compostos foram centrifugadas a 200 giros por 5 minutos a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o sedimento foi lisado com 250 µL de uma solução fluorocrômica hipotônica (HFS) contendo 50 µg mL⁻¹ de Iodeto de Propídio (PI, Sigma), 0,1 % de Triton X-100 (Sigma) e 0,1 % de citrato de sódio (Sigma). As amostras foram transferidas para um microtubo, homogeneizadas e incubadas a 8 °C por 4-8 h. Após incubação as amostras foram submetidas à análise por citometria de fluxo.

A incubação das células com a solução de HFS leva à fragilização da membrana celular pela ação do triton-X100 e o choque hipotônico provoca o rompimento da mesma. O material nuclear se torna acessível ao PI, que irá se intercalar no ADN nuclear. O conteúdo de ADN subdiploide foi determinado pelo programa CellQuest (Becton Dickinson).

2.3.2.5 *Análise estatística*

Todos os experimentos foram realizados em no mínimo três replicatas por composto e os resultados são mostrados como a média de três experimentos independentes. Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão da média. A significância foi testada pelo teste *t* de Student.

2.3.3 *Estudos de interação com albuminas séricas*

O estudo da interação dos compostos com albuminas séricas (albumina de soro bovino, ASB, e/ou albumina de soro humano, ASH) foi feito através da espectroscopia de fluorescência.

2.3.3.1 *Técnica de espectroscopia de fluorescência*

Esta técnica baseia-se na medida da intensidade da emissão da fluorescência gerada por um grupo fluoróforo (grupo que origina a fluorescência do composto) presente no meio em estudo, sendo utilizada na análise de sólidos, soluções e suspensões.

Os equipamentos para as medidas de fluorescência são constituídos basicamente por uma fonte de luz para excitar a amostra, um monocromador alinhado diretamente a esta fonte de luz para selecionar o comprimento de onda de excitação, um porta-amostra, um segundo monocromador posicionado a um 90° da direção de irradiação da amostra para selecionar a emissão fluorescente proveniente da amostra, um fotomultiplicador e, finalmente, um registrador para determinar a intensidade da emissão de fluorescência.

¹³ I. Nicoletti, G. Migliorati, M.C. Pagliacci, F. Grignani, C. Riccardi, J. Immunol. Meth. 139 (1991) 271.

Três principais tipos de espectros de fluorescência podem ser obtidos para cada amostra, em função do tipo de informação desejada: o espectro de emissão, o espectro de excitação e o espectro de excitação/emissão sincronizado (modo sincrônico).¹⁴

O espectro de emissão de um composto é registrado irradiando-se a amostra com um comprimento de onda de excitação ($\lambda_{exc.}$) fixo, e mede-se a intensidade da luz reemitida variando o comprimento de onda de emissão ($\lambda_{em.}$), enquanto que o espectro de excitação é obtido variando o valor de $\lambda_{exc.}$ e medindo a intensidade de emissão fluorescente a um $\lambda_{em.}$ fixo.¹⁴

O espectro de fluorescência no modo sincrônico é obtido pela varredura simultânea de uma faixa espectral de comprimentos de onda de excitação e emissão apresentando um interlavo ($\Delta\lambda$) constante entre eles.¹⁴ Esta técnica tem sido empregada no estudo misturas de fluoróforos, uma vez que, o intervalo de $\Delta\lambda$ é um valor que pode ser ajustado para a realização do experimento, sendo que este valor pode ser relacionado ao deslocamento de Stokes. O deslocamento de Stokes, que é a diferença entre os comprimentos para os máximos de excitação e emissão, é característico de um grupo fluoróforo.¹⁵ Um estudo avaliando diferentes valores de $\Delta\lambda$ em uma mesma amostra poderia implicar em obter informações sobre grupos fluoróforos específicos dentro dessa amostra.

Esses três principais tipos de espectros de fluorescência foram utilizados durante o estudo.

2.3.3.2 O experimento

Soluções estoque da albumina sérica foram preparadas em tampão fosfato (8,3 mM, pH 7,20). Soluções estoque dos compostos foram preparadas, primeiro, com dissolução do composto em DMF e depois em tampão. A quantidade de DMF na solução estoque dos compostos foi menor que 5 % v/v, a fim de eliminar sua interferência nos resultados obtidos.

Uma solução da albumina sérica (1,0 μ M) foi titulada através de adições sucessivas de quantidade equimolares dos compostos. Após cada adição os espectros de emissão foram registrados na região de 295 a 600 nm com excitação em 280 nm. As janelas de excitação e emissão, razão de scan e a temperatura (298 K) foram mantidas constantes em todos os experimentos.

A partir dos dados da titulação espectrofluorimétrica foram calculadas constantes relacionadas ao processo de supressão da fluorescência da proteína. Uma delas é a constante de

¹⁴ M.M.S. Sierra, M. Giovanela, *Quim. Nova*, 19 (1993) 294.

¹⁵ Bernad Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and applications*, Wiley-VCH, 2001, 54.

Stern-Volmer (K_{sv}) que foi calculada usando a equação clássica de Stern-Volmer (Equação 2.1);^{16,17}

$$F_0/F = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad (\text{Equação 2.1})$$

onde F_0 é a intensidade de fluorescência na ausência do agente supressor da fluorescência, F é a intensidade de fluorescência na presença do agente supressor, τ_0 é o tempo de vida da fluorescência na ausência do agente supressor, e $[Q]$ é a concentração do agente supressor da fluorescência. O valor de K_{sv} é o coeficiente angular obtido da regressão linear do gráfico F_0/F vs $[Q]$. K_{sv} pode ser escrito como

$$k_q = K_{sv}/\tau_0 \quad (\text{Equação 2.2})$$

onde k_q é a constante de supressão bimolecular.

Aos dados obtidos durante a titulação espectrofluorimétrica pode ser aplicada ainda a equação de Stern-Volmer modificada¹⁸ (Equação 2.3)

$$F_0/\Delta F = 1/f_a + 1/(f_a K_a [Q]) \quad (\text{Equação 2.3})$$

onde ΔF é a diferença entre F e F_0 , f_a é a fração da proteína acessível ao agente supressor e K_a a constante de supressão efetiva análoga à constante de associação para o sistema agente supressor–proteína.¹⁹ O valor de K_a calculado é a razão entre intercepto e o coeficiente angular obtido na regressão linear do gráfico $F_0/\Delta F$ vs $1/[Q]$.

Outros parâmetros avaliados foram o valor da constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n) calculados usando a equação de Scatchard (Equação 2.4)²⁰

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

onde K_b e n podem ser calculados como o antilog do intercepto e o coeficiente angular, respectivamente, da regressão linear do gráfico de $\log[(F_0-F)/F]$ vs $[Q]$.

Espectros de fluorescência no modo sincrônico foram registrados com diferença entre o comprimento de onda de excitação e emissão de emissão ($\Delta\lambda$) de 15 e 60 nm, sendo esses valores de $\Delta\lambda$ atribuídos aos microambientes dos resíduos de aminoácidos tirosina (Tyr) e triptofano

¹⁶ Joseph R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Publishing Corporation, 2ª edição, 1999, 239.

¹⁷ S. Tabassum, W.M. Al-Asbahy, M. Afzal, F. Arjmand, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 114 (2012) 132.

¹⁸ Joseph R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Publishing Corporation, 2ª edição (1999), 248.

¹⁹ X.-L. Han, F.-F. Tian, Y.-S. Ge, F.-L. Jiang, L. Lai, D.-W. Li, Q.-L. Yu, J. Wang, C. Lin, Y. Liu, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 109 (2012) 1.

²⁰ P.B. Kandagal, S. Ashoka, J. Seeytharamappa, S.M.T. Shaikh, Y. Jadegoud, O.B. Ijare, J. Pharm. Biomed. Anal. 41 (2006) 393.

(Trp), respectivamente. No equipamento CARY Eclipse o modo sincrônico é adquirido variando o $\lambda_{exc.}$, logo o que temos representado em nossos experimentos é o espectro de excitação sincronizado na faixa de 200 a 400 nm.

2.3.4 Estudo de interação dos compostos com ácido desoxirribonucleico de timo de vitelo (CT-DNA)

2.3.4.1 Estudo de interação com CT-DNA por meio dos dados de espectros eletrônicos

A interação dos complexos com CT-DNA (Sigma) foi estudada em tampão Tris-HCl (pH 7,20). Soluções estoque de CT-DNA em tampão foram preparadas com agitação por 24h em um agitador orbital a 100 rpm. Então, a solução foi filtrada em um filtro Millipore (0,45 μ m), e sua concentração calculada usando a absorbância da solução a 260 nm e o valor do coeficiente de extinção (ϵ) do CT-DNA neste comprimento de onda ($6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).²¹ As soluções estoque dos compostos foram preparadas de modo similar àquela da seção 2.3.3.2.

Uma solução do composto foi titulada através de adições sucessivas de quantidade equimolares da solução estoque de CT-DNA. Após cada adição, a solução foi agitada e mantida em repouso por 2 min antes de se registrar seu espectro eletrônico. Os dados foram ajustados com a Equação 2.5 para obter a constante de ligação intrínseca (K_B)²²

$$[\text{DNA}]/[\epsilon_a - \epsilon_f] = 1/K_B[\epsilon_b - \epsilon_f] + [\text{DNA}]/[\epsilon_b - \epsilon_f] \quad (\text{Equação 2.5})$$

onde [DNA] é a concentração dos pares de bases do DNA, ϵ_a corresponde à relação entre $A_{obs}/[\text{complexo}]$, ϵ_f é o coeficiente de extinção do complexo livre em solução e ϵ_b é o coeficiente de extinção do complexo completamente ligado ao DNA. Do gráfico de $[\text{DNA}]/[\epsilon_a - \epsilon_f]$ vs [DNA], resulta o coeficiente angular e o intercepto iguais a $1/[\epsilon_b - \epsilon_f]$ e $1/K_B[\epsilon_b - \epsilon_f]$, respectivamente. K_B é calculado pela razão entre o coeficiente angular e o intercepto.

2.3.4.2 Ligação competitiva entre compostos e o sistema brometo de etídio-CT-DNA (BE-CT-DNA)

A constante de ligação aparente (K_{app}) dos complexos foi determinada mediante a análise competitiva da intensidade de fluorescência de uma solução de brometo de etídio (BE) ligado ao CT-DNA em tampão Tris-HCl (pH 7,20). BE não emite fluorescência na solução de Tris-HCl. Na presença do CT-DNA, BE apresenta emissão de fluorescência devida à intercalação com o

²¹ M.E. Reichmann, S.A. Rice, C.A. Thomas, P. Doty, J. Am. Chem. Soc. 76 (1954) 3047.

²² A. Wolfe, G.H. Shimer Jr, T. Meehan, Biochemistry 26 (1987) 26.

DNA. A substituição competitiva do BE ligado ao CT-DNA pelo composto provoca uma diminuição na intensidade da fluorescência. As modificações na intensidade de fluorescência a 603 nm ($\lambda_{exc.} = 545$ nm) após cada adição da solução do composto foram acompanhadas pelos espectros de emissão.

As constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) e de ligação (K_b) e o número de sítios (n) foram calculadas ajustando os dados obtidos pela titulação espectrofluorimétrica às equações 2.1 e 2.4.

K_{app} foi calculada por meio da seguinte equação²³

$$K_{EB} [BE] = K_{app} [Q_{50}] \quad (\text{Equação 2.6})$$

onde $K_{EB} = 1,0 \times 10^{-7}$ M, $[EB]$ é a concentração de brometo de etídio usada no experimento (10 μ M), e $[Q_{50}]$ é a concentração do composto que promove uma supressão de 50% na intensidade de fluorescência do BE. O valor de $[Q_{50}]$ pode ser obtido diretamente do gráfico de F_0/F vs $[Q]$.

2.3.5 Estudos de interação com ADN plasmidial

Foi realizada eletroforese em gel de agarose para identificar possíveis modificações resultantes da interação dos compostos com o ADN.²⁴ 453 ng de ADN plasmidial pGEM®-T purificado (Promega-USA) foram incubados com os compostos (100 μ M) em tampão Tris-HCl (NaCl 50 mM, Tris-HCl 5 mM, pH 7,2) a 37 °C por 24 h. Em seguida, foi adicionada solução de leitura (50 mM de Tris-HCl, pH 7,2, 0,01 % azul de bromofenol, 50 % de glicerol e 250 mM de EDTA). As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de 1% de agarose imersa em tampão Tris-borato-EDTA 0,5X (TBE 0,5X) por 1 h a 75 mV. Após a corrida eletroforética, o gel foi imerso em solução 2,5 μ g mL⁻¹ de BE em tampão TBE 0,5X por 15 min e o ADN foi visualizado por fluorescência em 312 nm.

2.3.6 Atividade antinociceptiva

Os compostos foram testados no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da UFMG do Prof. Márcio Mattos Coelho, pelos alunos Wallace C. Ferreira (iniciação científica) e Rafael P. Vieira (Doutorado DQ-UFMG). As atividades farmacológicas foram testadas em

²³ P. Kumar , B. Baidya, S.K. Chaturvedi, R.H. Khan, D. Manna, B. Mondal, Inorg. Chim. Acta 376 (2011) 264.

²⁴ K.O.S. Ferraz, G.M.M. Cardoso, C.M. Bertollo, E.M. Souza-Fagundes, N. Speziali, C.L. Zani, I.C. Mendes, M.A. Gomes, H. Beraldo, Polyhedron 30 (2011) 315.

modelos experimentais de dor nociceptiva. A classificação dos modelos experimentais de dor foi proposta em 2002.²⁵

2.3.6.1 Animais experimentais

No presente estudo, foram utilizados ratos Wistar (250-350 g) e camundongos Swiss (25-35 g) machos fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Farmácia. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 h e ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados em temperatura de 27 ± 1 °C, correspondente à zona de termoneutralidade para roedores.²⁶ Os animais foram ambientados na sala de experimentação por pelo menos três dias antes da condução dos experimentos, e imediatamente após o término dos experimentos foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações para avaliação de dor experimental em animais acordados,²⁷ e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) – UFMG.

2.3.6.2 Soluções e suspensões

Nos protocolos nos quais os compostos foram administrados *per os*, utilizou-se uma suspensão 0,5% de carboximetilcelulose (CMC) em salina como agente suspensor. Esta suspensão foi administrada nos volumes de 1 ou 4 mL kg⁻¹ em ratos ou camundongos, respectivamente.

A suspensão de *zymosan* A (5 mg mL⁻¹) foi preparada em salina imediatamente antes da realização dos experimentos. O *zymozan* A é um complexo proteína/carboidrato derivado de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* (*Zymosan* A, Sigma, USA) utilizado como estímulo inflamatório.

2.3.6.3 Avaliação da resposta nociceptiva induzida por *zymosan* A em camundongos

Os animais foram colocados sob um funil de vidro transparente (18 cm de diâmetro, 15 cm de altura) para avaliação. *Zymosan* A (40 mg Kg⁻¹) foi administrado por via i.p. 60 minutos após a administração dos compostos. O número de constrições abdominais realizadas pelos animais durante 20 minutos após a administração de *zymosan* A foi determinado. Os resultados foram apresentados em número de contorções.

²⁵ J. Scholz, C.J. Woolf, Nat Neurosci. 5 (2002) 1062.

²⁶ C.J. Gordon, Physiol. Behav. 47 (1990) 963.

²⁷ M. Zimmermann, Pain 16 (1983) 109.

2.3.6.4 Avaliação da resposta nociceptiva pelo modelo de hiperalgesia térmica de Hargreaves em ratos

Neste modelo, após administrar-se *per os* o composto ou veículo (solução fisiológica) ao animal injeta-se carragenina em sua pata (intraplantar), o que causa dor e inflamação, aumentando a sensibilidade à dor do membro em que a carragenina foi aplicada.

Nos intervalos de 2, 4 e 6 horas após a injeção incide-se um feixe de luz infravermelha sob a pata do animal, o que causa sensação de calor e também dor. Então, conta-se o tempo que cada animal leva para sentir o estímulo térmico e retirar por reflexo a pata de sobre o feixe de luz.

Os resultados são apresentados em tempo de latência (diferença de tempo entre o início de um evento e o momento em que seu efeito torna-se perceptível) em segundos. O tempo máximo de exposição à luz infravermelha não deve exceder quinze segundos, o que causaria lesão tecidual na pata do animal. O pico de efeito da carragenina é dado aproximadamente no intervalo de 4 horas após sua injeção.

2.3.6.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Graph Prism 5.0. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média. A comparação entre dois grupos foi realizada empregando-se o teste *t* de Student não pareado. Para a comparação de mais de dois grupos, empregou-se o teste “one way” ANOVA seguido de teste para comparações múltiplas de pequenas amostras. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

2.3.7 Avaliação da atividade motora em ratos

A atividade motora dos animais foi avaliada no aparato da haste girante. Durante três dias antes do experimento, os animais foram treinados a permanecer 120s no equipamento. No dia do experimento, os animais foram colocados no aparato a uma frequência de 14 rpm e o tempo de permanência na haste foi determinado. Determinou-se o tempo de corte em 120 s. Após a determinação dos valores basais, os animais foram tratados com os compostos que apresentaram atividade antinociceptiva no modelo de Hargreaves e dor nociceptiva induzida por *zymosan A*, e, em seguida, avaliados novamente. Os resultados foram apresentados como tempo de permanência na haste girante, em segundos.

2.3.8 Modelo de lesão gástrica induzida pelos compostos estudados

Lesões gástricas provocadas pelos grupos de compostos foram avaliadas como descrito por R. S. Devi e colaboradores.²⁸ Ratos wistar foram devidamente alimentados durante 24 h. Subsequentemente, os compostos foram administrados aos animais e depois de 18 h os animais foram sacrificados e seus estômagos foram removidos e abertos.

As lesões gástricas foram medidas (em milímetros) com um paquímetro digital e esses comprimentos somados para representar as lesões causadas por cada grupo testado. Para a determinação de pH, foram utilizadas fitas indicadoras Merck® imediatamente após a abertura dos órgãos. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média. Para a comparação de mais de dois grupos, empregou-se o teste “one way” ANOVA. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

²⁸ R.S. Devi, S. Narayan, G. Vani, C. S.S. Devi, *Chemico-Biological Interact.* 167 (2007) 71.

Capítulo 3

Preparação e investigação do perfil farmacológico de tiossemicarbazonas derivadas de chalconas e seus complexos de Fe(III), Zn(II), Ga(III) e Cu(II)

As tiossemicarbazonas têm sido largamente investigadas no campo da Química Medicinal e Farmacêutica devido ao amplo espectro de atividades biológicas que apresentam, incluindo atividades antibacteriana, antitumoral, antiviral, antiprotozoária, e outras.¹ O método mais comum para preparação de tiossemicarbazonas é a reação direta de aldeídos ou cetonas com as tiossemicarbazidas.²

Em contrapartida, outra classe de grande interesse farmacológico são as chalconas.^{3,4,5,6} Estes compostos apresentam uma carbonila α,β -insaturada com a capacidade de reagir com tiossemicarbazidas gerando tanto derivados pirazolínicos^{7,8} quanto tiossemicarbazonas.⁹

Com a intenção de verificar se ocorre um efeito sinérgico entre as propriedades biológicas de chalconas e tiossemicarbazonas foram preparadas quatro chalconas derivadas de piridina (Figura 3.1), que poderiam gerar tiossemicarbazonas análogas àquelas amplamente estudadas por nosso grupo,¹⁰ mas contendo um segundo grupo farmacofórico. Em razão do poder quelante das tiossemicarbazonas, seu mecanismo de ação biológica, em muitos casos, envolve os complexos metálicos desses compostos, o que torna o estudo dos complexos tão ou mais importante do que o estudo das bases livres.

¹ H. Beraldo, D. Gambino, *Mini Rev. Med. Chem.* 4 (2004) 31.

² R.P. Tenório, A.J.S. Góes, *Quim. Nova* 28 (2005) 1030.

³ R.I. Tsukiyama, H. Katsura, N. Tokuriki, M. Kobayashi, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 1226.

⁴ K.L. Lahtchev, D.I. Batovska, St.P. Parushev, V.M. Ubiyovok, A.A. Sibirny, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 2220.

⁵ C.R. Andrighetti-Fröhner, K.N. Oliveira, D. Gaspar-Silva, L.K. Pacheco, A.C. Joussef, M. Steindel, C.M.O. Simões, A.M.T. Souza, U.O. Magalhaes, I.F. Afonso, C.R. Rodrigues, R.J. Nunes, H.C. Castro, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 755.

⁶ A. Modzelewska, C. Pettit, G. Achanta, N.E. Davidson, P. Huang, S.R. Khan, *Bioorg. & Med. Chem.* 14 (2006) 3491.

⁷ A.R. Bhat, F. Athar, A. Azam, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 426.

⁸ A. Budakoti, M. Abid, A. Azam, *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 544.

⁹ H.-J. Zhang, Y. Qian, D.-D. Zhu, X.-G. Yang, H.-L. Zhu, H.-L. Zhu, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 4702.

¹⁰ M.A. Soares, J.A. Lessa, I.C. Mendes, J.G. Da Silva, R.G. dos Santos, L.B. Salum, H. Daghestani, A.D. Andricopulo, B.W. Day, A. Vogt, J.L. Pesquero, W.R. Rocha, H. Beraldo, *Bioorg. & Med. Chem.* 20 (2012) 3396.

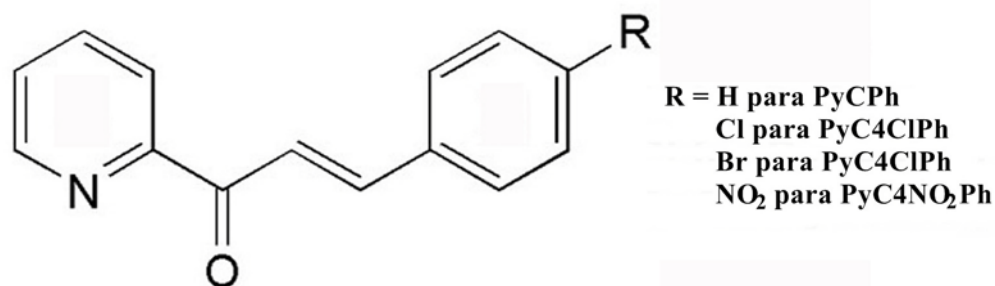


Figura 3.1 – Representação estrutural das chalconas precursoras utilizadas neste trabalho.

Neste capítulo trataremos do estudo de quatro tiossemicarbazonas inéditas derivadas das chalconas (compostos **1-4**, Figura 3.2). Também foram preparados os complexos de Ga(III) (**Ga1-Ga4**), Zn(II) (**Zn1-Zn4**) e Fe(III) (**Fe1-Fe4**) Cu(II) (**Cu1-Cu4**) das chalcona-tiossemicarbazonas. Esses compostos foram caracterizados e todos, incluindo as chalconas de partida que não são inéditas, tiveram suas atividades antimicrobiana e citotóxica avaliadas. No caso dos complexos de Cu(II) foi igualmente avaliada a capacidade desses compostos em interagir com albumina sérica bovina (ASB) e com ácido desoxirribonucleico (ADN).

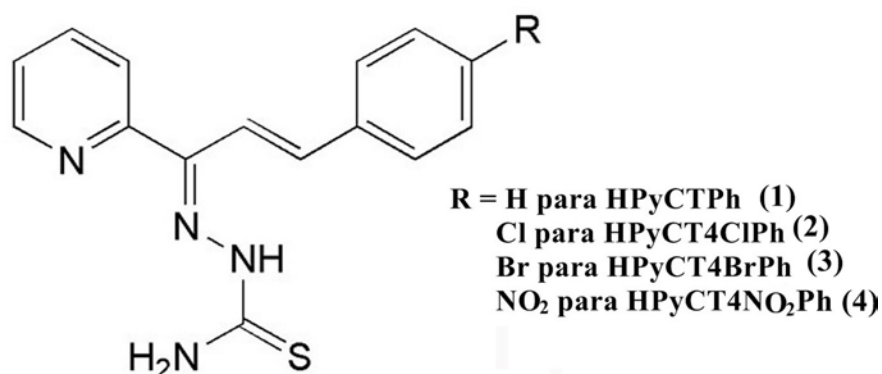


Figura 3.2 – Estrutura proposta para as tiossemicarbazonas obtidas neste trabalho.

3.1 Caracterização dos compostos

A caracterização dos compostos foi dividida em três partes: na primeira, trataremos das tiossemicarbazonas derivadas de chalconas; na segunda, trataremos dos complexos de Zn(II), Ga(III) e Fe(III); e na terceira, dos complexos de Cu(II).

3.1.1 Tiossemicarbazonas derivadas de chalconas

Microanálises

A análise elementar e as temperaturas de fusão dos compostos, apresentadas na Tabela 3.1, indicam a formação das novas tiossemicarbazonas (Figura 3.2).

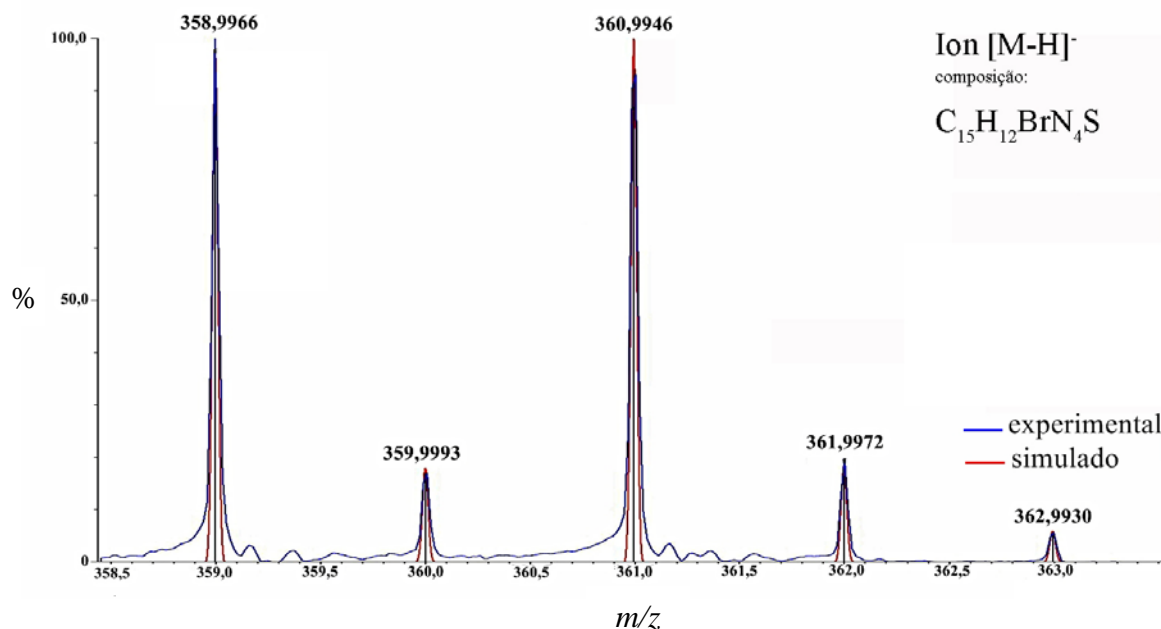
Tabela 3.1 – Análise elementar (valores teóricos entre parênteses), massa molar e faixas de fusão para as tiossemicarbazonas derivadas de chalconas.

Composto	%C	%H	%N	MM [g mol ⁻¹]	Faixa de fusão
HPyCTPh (1)	64,61 (63,80)	4,89 (5,00)	20,10 (19,84)	282,37	208 - 210
HPyCT4ClPh (2)	56,89 (56,87)	3,99 (4,14)	17,74 (17,68)	316,81	187 - 189
HPyCT4BrPh (3)	47,75 (49,87)	3,89 (3,63)	15,21 (15,51)	361,26	199 - 201
HPyCT4NO ₂ Ph (4)	54,83 (55,03)	3,96 (4,00)	21,02 (21,39)	327,36	198 - 200

Espectros de Massas

Os espectros de massas das tiossemicarbazonas exibiram sinais atribuídos aos respectivos isotopólogos de sua forma desprotonada [M-H]⁻. Os valores de m/z dos isotopólogos mais abundantes foram: 281,0866 para [1-H]⁻ (fórmula: C₁₅H₁₃N₄S), 315,0482 para [2-H]⁻ (fórmula: C₁₅H₁₂ClN₄S), 358,9976 para [3-H]⁻ (fórmula: C₁₅H₁₂BrN₄S) e 326,0718 para [4-H]⁻ (fórmula: C₁₅H₁₂N₅O₂S). A formação do íon [M-H]⁻ está associada ao aumento da conjugação pela desprotonação dos compostos.

O perfil observado para a distribuição isotópica dos íons [M-H]⁻ no espectro de massas apresenta uma excelente correspondência com o perfil calculado em função das fórmulas propostas para esses íons, como demonstrado para **3** na Figura 3.3. Estes dados, portanto, correlacionam-se com os dados das microanálises.

**Figura 3.3** – Comparação entre as distribuições isotópicas dos anions obtidos no espectro de massa para o íon [3-H]⁻ e o perfil calculado com base na fórmula proposta para este íon.

Espectros eletrônicos

Nos espectros eletrônicos das chalconas de partida em dimetilformamida (DMF) uma banda foi observada em 316-325 nm atribuída a transições $n \rightarrow \pi^*$ da carbonila α, β -insaturada. No caso dos espectros das tiossemicarbazonas em DMF (os espectros serão apresentados durante a caracterização dos complexos na Figura 3.11), duas bandas foram observadas, uma em 289-313 nm e outra em 356-396 nm. Estas absorções são atribuídas às transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ de anéis aromáticos e transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ dos grupos azometina e tioamida sobrepostas em um mesmo envelope.¹¹ Como efeito da modificação estrutural, **4** apresenta suas bandas deslocadas para região de menor energia (Figura 3.11) sugerindo um aumento na conjugação devido ao efeito eletroretirador do grupo nitro na posição *para*.

Espectros na região do infravermelho

Nos espectros de infravermelho das tiossemicarbazonas ocorre o desaparecimento do modo vibracional $\nu(\text{C}=\text{O})$, em $1670\text{-}1677\text{ cm}^{-1}$ presente nos espectros das chalconas de partida, e o aparecimento de novas absorções em $1560\text{-}1570\text{ cm}^{-1}$ atribuídas ao modo vibracional $\nu(\text{C}=\text{N})$. Além disso, nas tiossemicarbazonas absorções foram observadas em $3150\text{-}3450\text{ cm}^{-1}$, atribuídas ao estiramento $\nu(\text{N-H})$, e em $750\text{-}822\text{ cm}^{-1}$, atribuídas ao modo $\nu(\text{C}=\text{S})$, indicando a presença da porção tioamida.^{12,13} Estes dados confirmam a formação das tiossemicarbazonas.

No espectro de **3** (Figura 3.4), uma nova banda foi observada na região de 2500 a 2800 cm^{-1} . Em um primeiro momento esta banda poderia ser atribuída tanto ao modo $\nu(\text{S-H})$, indicando a presença do tautomerismo tiona-tiol,¹⁴ quanto ao estiramento $\nu(\text{N-H})$ de um íon piridínio.¹⁵ Na discussão sobre os dados de RMN este assunto será retomado.

¹¹ M. Joseph, A. Srekanth, V. Suni, M.R.P. Kurup. Spectrochim. Acta A 64 (2006) 637.

¹² I.C. Mendes, J.P. Moreira, A.S. Mangrich, S.P. Balena, B.L. Rodrigues, H. Beraldo. Polyhedron 26 (2007) 3263.

¹³ I.C. Mendes, J.P. Moreira, N.L. Speziali, A.S. Mangrich, J.A. Takahashia, H. Beraldo. J. Braz. Chem. Soc., 17 (2006) 1571.

¹⁴ P. Sengupta, R. Dinda, S. Ghosh. Transit. Met. Chem. 27 (2002) 665.

¹⁵ 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.

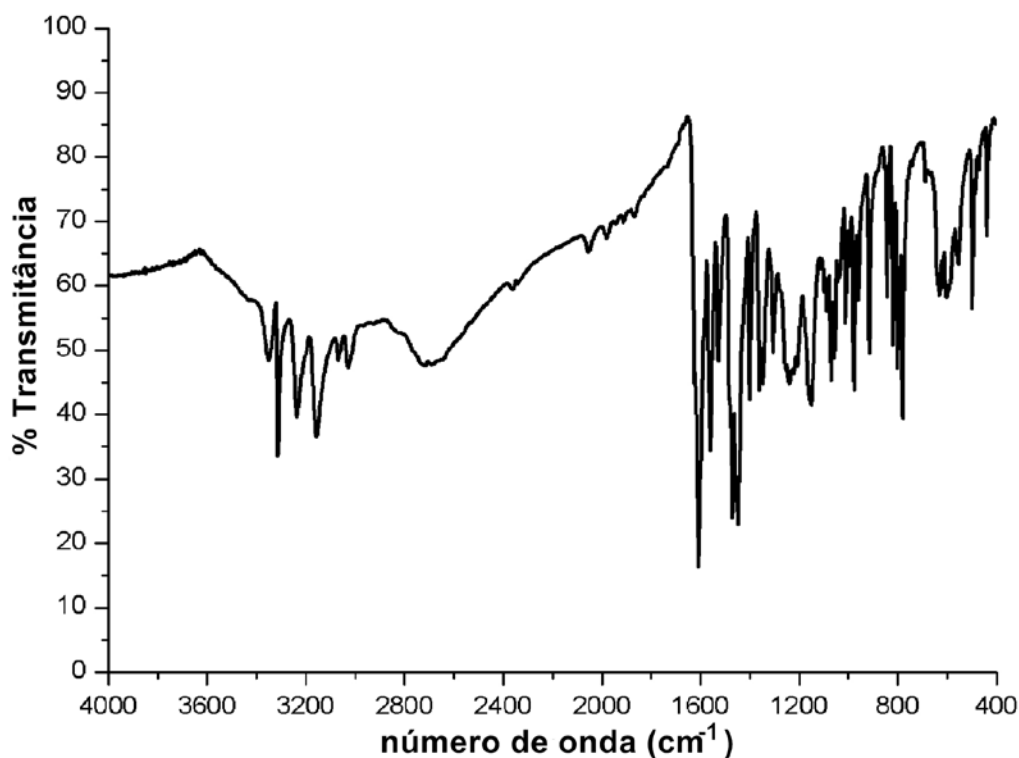


Figura 3.4 – Espectro na região do infravermelho de HPyCT4BrPh (**3**) (KBr).

Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN)

Nas Tabelas 3.2 e 3.3 estão atribuídos os principais sinais observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C das tiossemicarbazonas (**1-4**). As atribuições nos espectros de RMN de ^1H foram feitas com base nos deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento para o espectro de cada composto. Os carbonos do tipo (C, CH) foram determinados pelo experimento DEPT135. As atribuições dos carbonos e prótons foram confirmadas correlacionando os dados obtidos em nossos experimentos com compostos semelhantes relacionados na literatura.

Imediatamente depois de sua dissolução em $\text{DMSO-}d_6$ somente sinais referentes a um isômero de **1**, **2** e **4** em solução foram observados nos espectros de RMN de ^1H . Nesta situação, entre os muitos sinais observados, ocorre o aparecimento daqueles em 11,21 ppm, 11,26 ppm e 11,40 ppm, para **1**, **2** e **4**, respectivamente, atribuídos ao hidrogênio ligado a N3 (H–N3). Para as mesmas amostras os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos após cerca de uma hora, sendo observada a presença de sinais duplicados, indicando a presença de dois isômeros em solução. No caso de **3**, mesmo imediatamente depois da dissolução, já ocorreu a presença de sinais duplicados.

Tabela 3.2 – Atribuições e deslocamentos químicos de RMN de ^1H de HPyCTPh (1), HPyCT4ClPh (2), HPyCT4BrPh (3) e HPyCT4NO₂Ph (4) (DMSO-*d*₆, 200 MHz). Na parte inferior da página estão representadas as estruturas genéricas numeradas para as tiossemicarbazonas derivadas de chalconas na configuração *E* (esquerda) e *Z* (direita).

Atribuições	1	2	3		4
	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>Z</i>	<i>E</i>
H3	8,02-7,92 (m)	8,06-7,94 (m)	8,34-8,03 (m)	8,87-8,72 (m)	8,11-7,81 (m)
H4	7,85 (t, $^3J_{\text{H4-H3}} = ^3J_{\text{H4-H5}} = 7,6$ Hz)	7,86 (t, $^3J_{\text{H4-H3}} = ^3J_{\text{H4-H5}} = 7,4$ Hz)	7,85-7,51 (m)	7,85-7,51 (m)	8,11-7,81 (m)
H5	7,51-7,27 (m)	7,54-7,38 (m)	7,85-7,51 (m)	8,34-8,03 (m)	7,45 (dd, $^3J_{\text{H5-H4}} = 7,2$ Hz)
H6	8,64 (d, $^3J_{\text{H6-H5}} = 4,4$ Hz)	8,62 (d, $^3J_{\text{H6-H5}} = 4,8$ Hz)	8,87-8,72 (m)	7,51-7,37 (m)	8,62 (d, $^3J_{\text{H6-H5}} = 4,1$ Hz)
H9	7,17 (d, $^3J_{\text{H9-H10}} = 16,1$ Hz)	7,17 (d, $^3J_{\text{H9-H10}} = 16,2$ Hz)	7,13 (d, $^3J_{\text{H9-H10}} = 16,4$ Hz)	7,13 (d, $^3J_{\text{H9-H10}} = 16,2$ Hz)	7,32 (d, $^3J_{\text{H9-H10}} = 16,1$ Hz)
H10	7,80-7,60 (m)	7,82-7,70 (m)	7,85-7,51 (m)	8,34-8,03 (m)	8,11-7,81 (m)
H(12,16)	7,80-7,60 (m)	7,82-7,70 (m)	7,85-7,51 (m)	7,85-7,51 (m)	8,11-7,81 (m)
H(13,15)	7,51-7,27 (m)	7,54-7,38 (m)	7,85-7,51 (m)	7,85-7,51 (m)	8,25 (d, $^3J_{\text{H13-H12}} = ^3J_{\text{H15-H16}} = 8,7$ Hz)
H14	7,51-7,27 (m)	–	–	–	–
H–N3	11,25 (s)	11,26 (s)	11,44 (s)	13,07 (s)	11,40 (s)
H–N4H	8,46 (s,1H) e 8,02-7,92 (s,1H)	8,45 (s,1H) e 8,06-7,94 (m)	8,63(s,1H) e 8,42 (s,1H)	8,68(s,1H) e 8,34-8,03 (m)	8,52 (s,1H) e 8,11-7,81(s,1H)

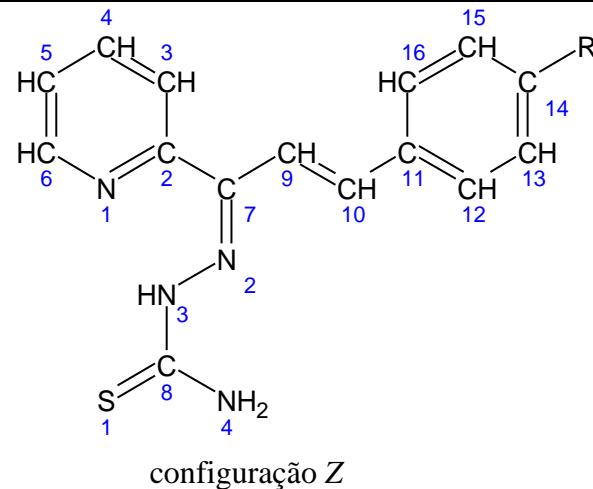
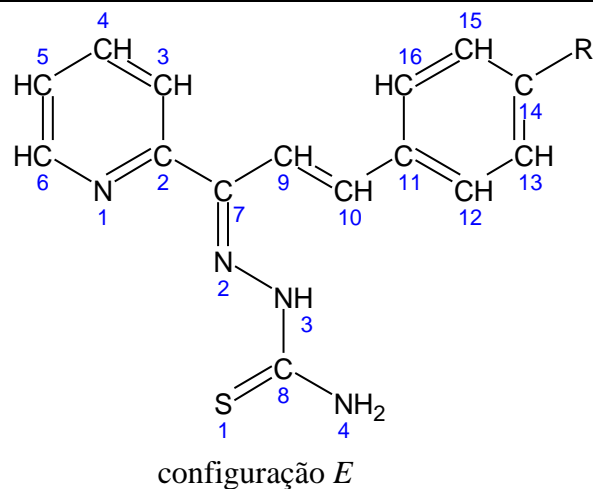
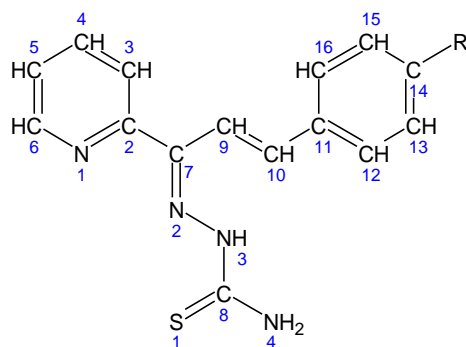


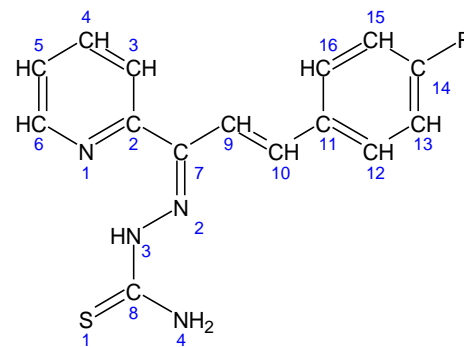
Tabela 3.3 – Atribuições e deslocamentos químicos dos principais sinais de RMN de ^{13}C e subspectros DEPT135 de HPyCTPh (**1**), HPyCT4ClPh (**2**), HPyCT4BrPh (**3**) e HPyCT4NO₂Ph (**4**) (DMSO-*d*₆, 50 MHz). Na parte inferior desta página estão representadas as estruturas genéricas numeradas para as tiossemicarbazonas derivadas de chalconas nas configurações *E* (esquerda) e *Z* (direita).

Atribuições	1		2		3		4			
	<i>E</i>	<i>Z</i>	<i>E</i>	<i>Z</i>	<i>E</i>	<i>Z</i>	<i>E</i>	<i>Z</i>		
	^{13}C	DEPT	^{13}C	DEPT	^{13}C	DEPT	^{13}C	DEPT	^{13}C	DEPT
C2	155,3	–	155,2	–	155,4	–	151,1	–	155,0	–
C3	123,6	↑	123,6	↑	s.s.*	s.s.*	s.s.*	s.s.*	123,8	↑
C4	136,8	↑	136,8	↑	s.s.*	s.s.*	s.s.*	s.s.*	136,9	↑
C5	123,8	↑	123,8	↑	s.s.*	s.s.*	s.s.*	s.s.*	123,8	↑
C6	148,2	↑	148,2	↑	148,7	↑	145,7	↑	148,3	↑
C7=N	145,9	–	145,5	–	141,2	–	s.s.*	–	147,1	–
C8=S	179,0	–	179,1	–	179,2	–	178,2	–	179,2	–

*s.s. = sinais sobrepostos.



configuração *E*



configuração *Z*

Para estudar quais seriam os isômeros formados em solução foi realizado o experimento de NOEDIFF de **1** (Figura 3.5). Neste experimento o sinal referente ao deslocamento químico de H–N3 (11,21 ppm) foi irradiado e a modificação causada no espectro original oriunda do Efeito Overhauser Nuclear (*NOE*) foi avaliada. A escolha do sinal de H–N3 não foi casual, na verdade, a mudança pela saturação deste sinal nos trará informação sobre a configuração em torno da ligação C7=N2.

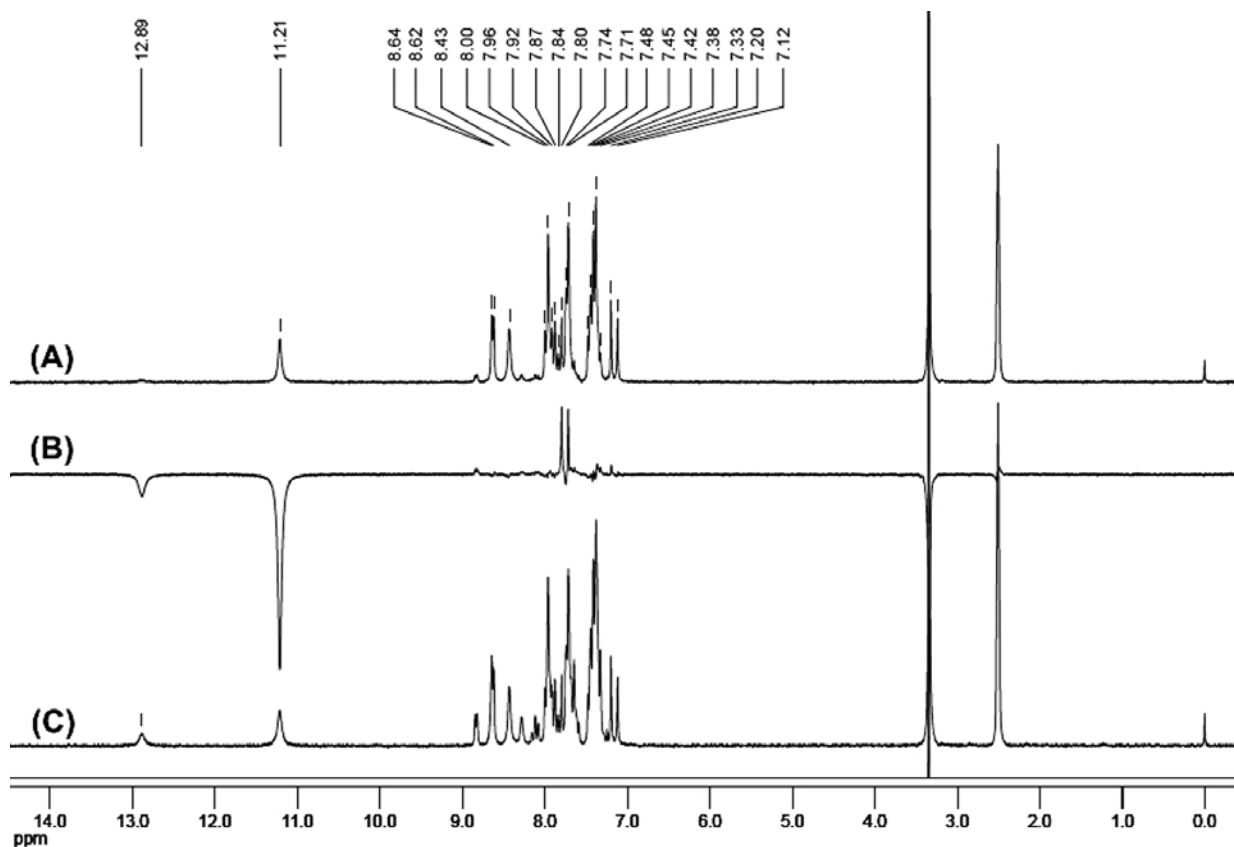


Figura 3.5 – Espectros de RMN de ¹H de HPyCTPh (**1**) (DMSO-d₆, 200 MHz). (A) Espectro obtido imediatamente após dissolução. (B) Experimento de NOEDIFF com irradiação em 11,21 ppm. (C) Espectro obtido 1 h depois da dissolução.

A partir deste experimento foi observado o aparecimento de um sinal devido ao efeito *NOE* em 7,76 ppm, com constante de acoplamento (*J*) de 16 Hz. Após a atribuição dos sinais ficou comprovado que este sinal refere-se ao hidrogênio ligado a C10 (H10), demonstrando que inicialmente o composto adota a configuração *E* em relação à ligação C7=N2. Com isso, podemos sugerir que esta é a configuração predominante para **1**, **2** e **4** imediatamente após sua dissolução. No experimento de NOEDIFF foi observada ainda a transferência de saturação para as moléculas de água e para o outro isômero (*Z*). A transferência de saturação de H–N3 (*E*) para H–N3 (*Z*) deve estar ocorrendo de forma indireta, com a participação de moléculas de solvente

neste processo. Desta forma, o solvente utilizado pode ter um papel fundamental na isomerização desses compostos.

Com base nas informações do experimento de NOEDIFF foi possível atribuir, nos espectros de RMN de ^1H depois de uma hora de dissolução, os sinais referentes ao H-N(3) na configuração *Z* em 12,89 ppm, 13,07 ppm e 13,33 ppm, para **1**, **2** e **4**, respectivamente. A presença de uma mistura de isômeros *E* e *Z* em solução de DMSO- d_6 é frequentemente observada no caso das tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina.^{13,16,17}

Apesar do conhecimento da isomerização em solução, a atribuição completa dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C só foi feita para os compostos **1**, **2** e **4** com base no isômero *E*, espécie majoritária imediatamente após a dissolução. No caso de **3**, devido à sobreposição de sinais, apenas alguns sinais encontram-se atribuídos nas Tabelas 3.2 e 3.3.

No caso de **1**, **2** e **4** a configuração adotada em torno da ligação C9–C10 é *E*, o que pode ser justificado pelos valores das constantes de acoplamento entre os hidrogênios ligados a C9 (H9) e H10 serem de 16 Hz. Desta forma, podemos propor que a configuração desses compostos imediatamente após a dissolução é *EE* em relação às ligações C7=N2 e C9=C10, atingindo após um tempo uma mistura de isômeros *EE* e *ZE* em solução (Figura 3.6). No caso da estrutura cristalina de **4** foi observado que a tiossemicarbazona adota a configuração *ZE*, sugerindo que a isomerização tenha relação com a diminuição da energia interna deste composto.

Os dados de RMN não permitem atribuir a conformação em torno da ligação C8–N3. No entanto, dois sinais foram observados para H–N4H nos espectros de RMN de ^1H de **1**, **2** e **4**, indicando que a rotação é impedida em torno da ligação C8–N4 na porção tioamida devido ao seu caráter de dupla ligação.¹⁸

Em **3**, do mesmo modo que em **1**, **2** e **4**, os sinais em 13,07 ppm e 11,44 ppm são atribuídos ao hidrogênio ligado a N3 nas configurações *Z* e *E*, respectivamente. A ausência de um sinal em 4,0 ppm, que indicaria a presença de um grupo tiol, aliada à presença dos sinais duplicados para H–N3 sugerem que apenas a forma tiona está presente em solução.¹⁹

Correlacionando os dados obtidos pelos espectros de infravermelho e de RMN de ^1H de **3** podemos propor que este composto deve se tratar de uma mistura de isômeros, um deles na forma *Z* zwitteriônica (Figura 3.6) responsável pelo sinal do íon piridínio observado no espectro de infravermelho. No entanto, em solução a barreira de energia para a transferência de próton da forma *Z* zwitteriônica para *Z* deve ser baixa, levando ao aparecimento de apenas uma forma, no

¹⁶ A.P. Rebolledo, G.M. de Lima, L.N. Gambi, N.L. Speziali, D.F. Maia, C.B. Pinheiro, J.D. Ardisson, M.E. Cortés, H. Beraldo. Applied Organomet. Chem. 17 (2003) 945.

¹⁷ J.G. Da Silva, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo. J. Coord. Chem. 62 (2009) 1400.

¹⁸ O.E. Offiong. Spectrochim. Acta A 50 (1994) 2167.

¹⁹ O.M.I. Adlly. Spectrochim. Acta A 79 (2011) 1295.

caso a *Z* (sugerida como a mais estável em solução devido ao seu aparecimento em outras tiossemicarbazonas^{13,16,17}).

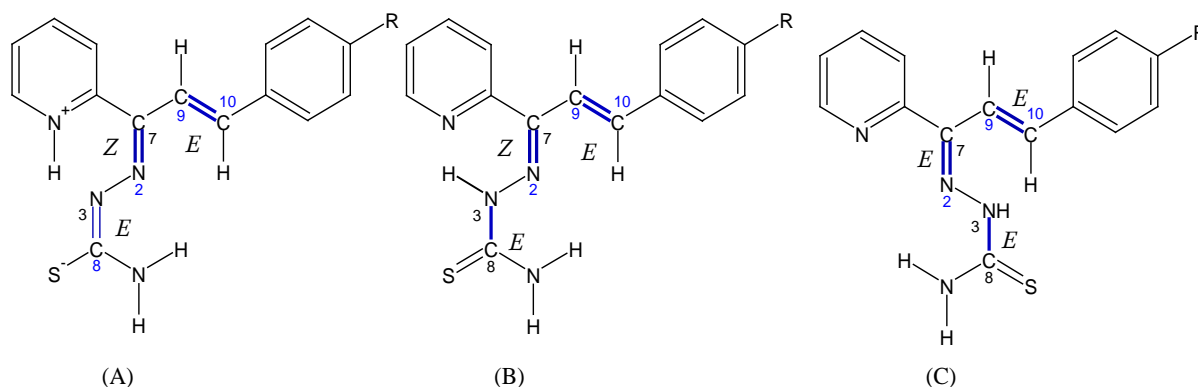


Figura 3.6 – Representação estrutural para as prováveis conformações adotadas pelas tiossemicarbazonas derivadas de chalconas. Em relação à ligação C7–N2: (A) Forma zwitteriônica do isômero *Z*, (B) isômero *Z*, e (C) isômero *E*. R = H (**1**), Cl (**2**), Br (**3**) ou NO₂ (**4**).

Estrutura cristalográfica de HPyCT4NO₂Ph (**4**)

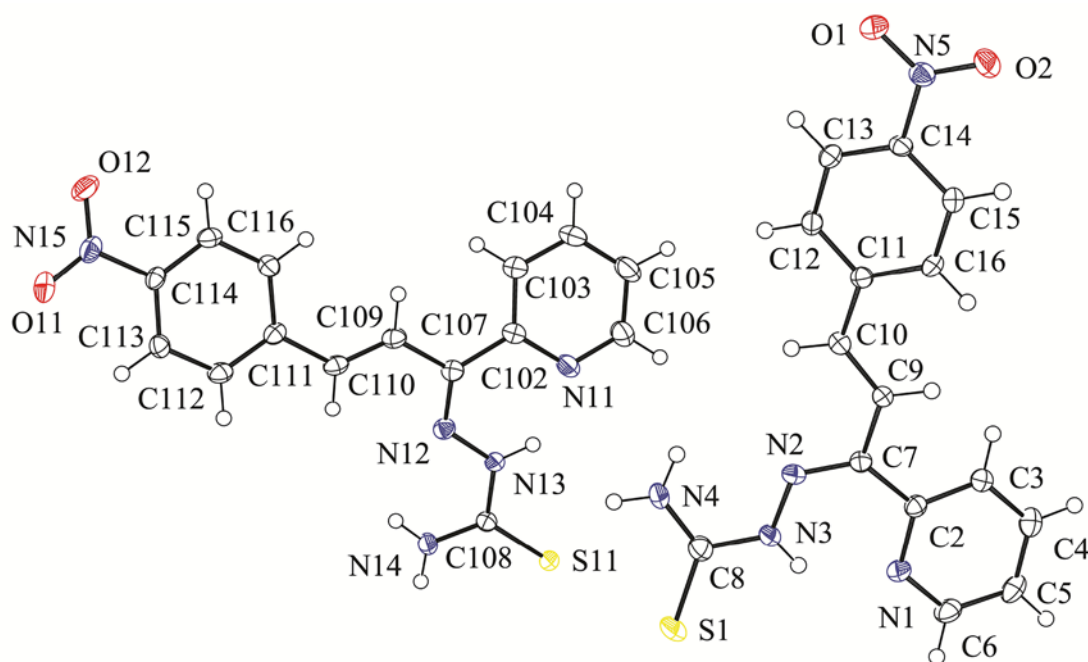
Cristais de **4** foram obtidos a partir da evaporação lenta de uma solução desse composto em DMSO/acetona (1/9). Na Tabela 3.4 estão apresentados os dados relacionados à coleta e refinamento da estrutura cristalina. O diagrama ORTEP de **4** está apresentado na Figura 3.7. Distâncias de ligação e ângulos, bem como os parâmetros para as ligações de hidrogênio estão listados nas Tabelas 3.5 e 3.6, respectivamente. Na Figura 3.8 está apresentada uma projeção para seu empacotamento cristalino.

Este composto cristalizou-se no sistema monoclinico apresentando grupo espacial *Pc* com duas moléculas da tiossemicarbazona por unidade assimétrica. Durante a discussão desta estrutura se faz necessária a comparação entre as duas moléculas independentes. Desta forma, as moléculas nomeadas **A** e **B** referem-se àquelas que contêm os átomos de enxofre nomeados como S1 e S11, respectivamente (Figura 3.7).

Nas moléculas **A** e **B**, o esqueleto da tiossemicarbazona (C=N–N–C(=S)N) é quase planar [o desvio médio da posição de seus átomos em relação ao plano formado por eles foi de 0,0735 Å (para **A**) e 0,0177 Å (para **B**)]. Os ângulos entre o plano gerado pelo esqueleto da tiossemicarbazona e o anel da piridina são relativamente próximos [14,87(8)° em **A** e 13,36(9)° em **B**]. No entanto, o ângulo entre os planos gerados pelo anel da piridina e a cadeia lateral derivada da chalcona em C7 é significativamente diferente nas duas moléculas [32,87(6)° em **A** e 9,00(9)° em **B**].

Tabela 3.4 – Dados relacionados à coleta, resolução e refinamento da estrutura cristalina de HPyCT4NO₂Ph (4).

HPyCT4NO ₂ Ph (4)			
Fórmula empírica	C ₁₅ H ₁₃ N ₅ O ₂ S	Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,235
Massa molar (g mol ⁻¹)	327,36		-9 ≤ h ≤ 9
Sistema cristalino	Monoclínico	Faixa de índices de Miller	-20 ≤ k ≤ 20
grupo espacial	<i>Pc</i>		-14 ≤ l ≤ 14
Radiação; λ (Å)	Mo Kα ; 0,71073	Faixa de θ usada na coleta dos dados (°)	2,86 a 26,37
Temperatura (K)	120(2)	Reflexões coletadas	48255
	a (Å) 7,8859(1)	Reflexões únicas [R _{int}]	3054 [0,0394]
	b (Å) 16,7965(2)	Completeza a θ = 26,37° (%)	99,9
	c (Å) 11,2801(2)	Transmissão máxima e mínima	0,9769 e 0,8837
Parâmetros da célula unitária	α = γ (°) 90	Dados; restrições; parâmetros	3054 ; 2 ; 415
	β (°) 93,427(1)	Índices de R final [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0,0241; wR ₂ = 0,0670
V (Å ³)	1491,44(4)	Índices de R (para todos os dados)	R ₁ = 0,0254; wR ₂ = 0,0675
Z	4	S	1,066
Z'	2	Parâmetro de Configuração absoluta	0,10(5)
Densidade calculada (g cm ⁻³)	1,458	Δρ _{máx.} e Δρ _{min.}	0,222 e -0,171
F(000)	680		

**Figura 3.7** – Diagrama ORTEP de HPyCT4NO₂Ph (4) com elipsoides térmicos representados a um nível de probabilidade de 50%.

Ambas as moléculas adotam a conformação *ZEE* em relação às ligações C7=N2, N3–C8 e C9=C10. A presença da conformação *ZE* em relação às ligações C7=N2 e N3–C8 é

comumente observada em tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina.^{13,16,17} De fato, os valores observados para as distâncias de ligação envolvendo o esqueleto da tiossemicarbazona e o anel da piridina (Tabela 3.5) são similares aos observados para a 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2BPyTSC).²⁰ A presença das ligações de hidrogênio intramoleculares N3–H3···N1 e N13–H13···N11 nas moléculas **A** e **B**, respectivamente, justificam a estabilização da configuração *Z* em relação à ligação C7=N2 no cristal.

Tabela 3.5 – Distâncias de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados de HPyCT4NO₂Ph (**4**).

Distâncias de ligação			
S1–C8	1,681(2)	S11–C108	1,675(2)
N3–C8	1,363(3)	N13–C108	1,360(3)
N3–N2	1,361(2)	N13–N12	1,354(2)
N2–C7	1,309(3)	N12–C107	1,300(3)
N1–C2	1,347(3)	N11–C102	1,348(3)
C7–C2	1,483(3)	C107–C102	1,498(3)
C7–C9	1,473(3)	C107–C109	1,471(3)
C10–C9	1,335(3)	C110–C109	1,328(3)
C11–C10	1,462(3)	C111–C110	1,466(3)
C11–C12	1,397(3)	C111–C112	1,390(3)
C11–C16	1,408(3)	C111–C116	1,407(3)
Ângulos			
N1–C2–C7	117,9(2)	N11–C102–C107	117,4(2)
C9–C7–C2	118,0(2)	C109–C107–C102	118,1(2)
N2–C7–C9	114,8(2)	N12–C107–C109	115,4(2)
C7–N2–N3	119,4(2)	C107–N12–N13	119,4(2)
N2–N3–C8	118,6(2)	N12–N13–C108	120,2(2)
N3–C8–S1	118,8(2)	N13–C108–S11	119,1(2)
N4–C8–N3	116,8(2)	N14–C108–N13	117,3(2)
C10–C9–C7	125,5(2)	C110–C109–C107	124,6(2)
C9–C10–C11	124,9(2)	C109–C110–C111	126,0(2)
C12–C11–C10	119,0(2)	C112–C111–C110	118,2(2)
C13–C12–C11	121,5(2)	C113–C112–C111	121,3(2)
C16–C11–C10	122,8(2)	C116–C111–C110	123,0(2)
C12–C11–C16	118,3(2)	C112–C111–C116	118,9(2)

O empacotamento molecular do composto está diretamente relacionado à formação de ligações de hidrogênio intermoleculares envolvendo os átomos doadores, N4 e N14, e os átomos aceptores, S11, O2 e O12, levando à formação de uma rede bidimensional infinita paralela ao plano (1 0 -1) (ver Figura 3.8 e dados na Tabela 3.6).

²⁰ J.S. Casas, E.E. Castellano, J. Ellena, M.S.G. Tasende, A. Sánchez, J. Sordo, M.J. Vidarte. *Inorg. Chem.* 42 (2003) 258.

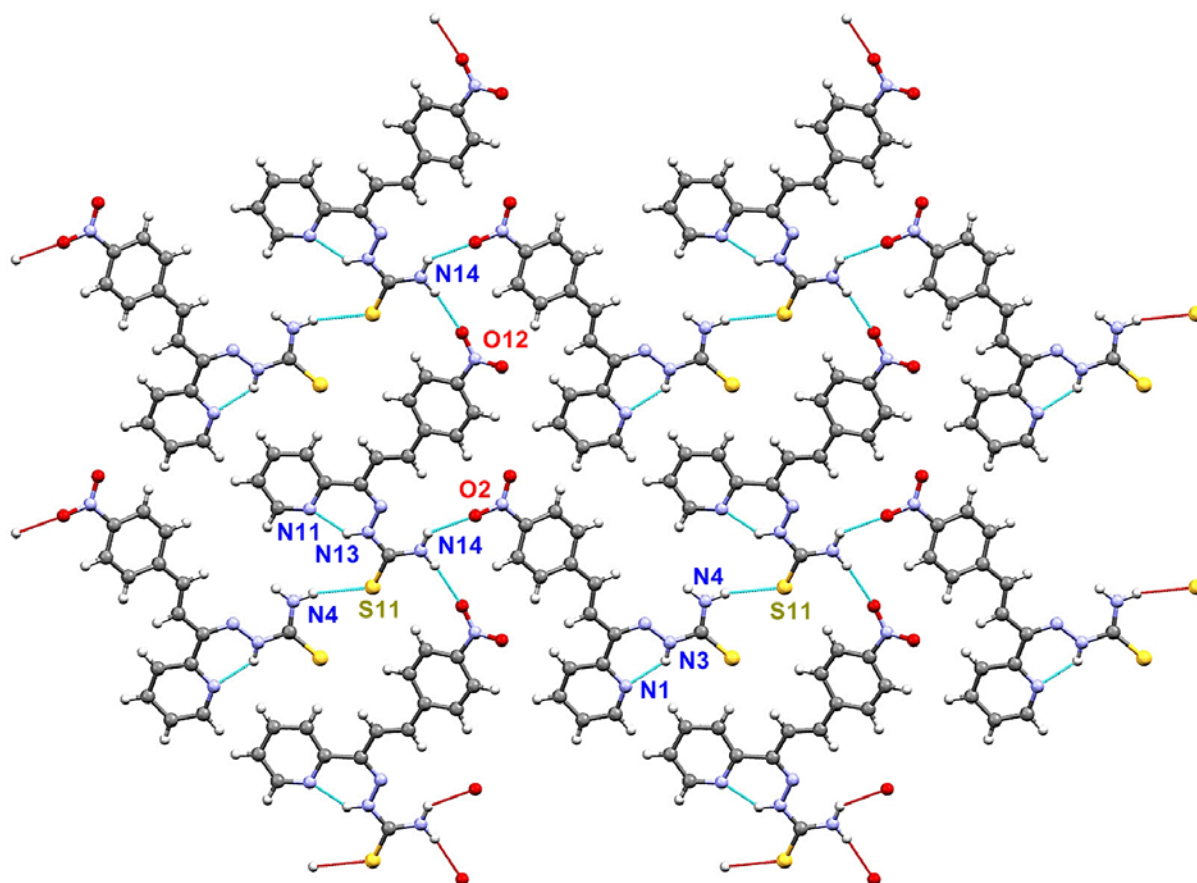


Figura 3.8 – Diagrama molecular apresentando as ligações de hidrogênio presentes em HPyCT4NO₂Ph (4).

Tabela 3.6 – Parâmetros para as ligações de hidrogênio [Å, °] presentes em HPyCT4NO₂Ph (4).

D–H...A	D–H	H...A	D...A	D–H...A
N3–H3...N1	0,88	1,95	2,632(3)	132,9
N4–H4B...S11i	0,88	2,74	3,556(2)	155,5
N13–H13...N11	0,88	1,90	2,598(3)	135,1
N14–H14A...O2ii	0,88	2,44	3,160(2)	139,1
N14–H14B...O12iii	0,88	2,36	3,225(3)	165,7

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

3.1.2 Complexos de Zn(II), Ga(III) e Fe(III) com tiossemicarbazonas derivadas de chalconas

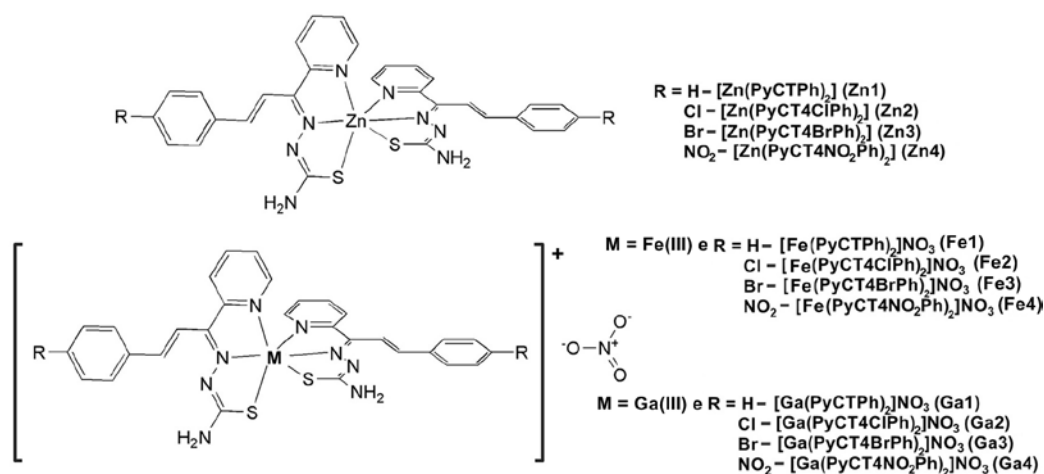
Microanálises

Na Tabela 3.7 estão apresentados os dados de análise elementar e das medidas de condutividade molar para os complexos de Zn(II), Ga(III) e Fe(III) obtidos a partir das tiossemicarbazonas derivadas de chalconas.

Tabela 3.7 – Análise elementar (valores teóricos entre parênteses), massa molar e condutividade molar (em DMF) para os complexos de Ga(III), Zn(II) e Fe(III) de tiossemicarbazonas derivadas de chalconas.

Composto	%C	%H	%N	MM [g mol ⁻¹]	Λ_M [ohm ⁻¹ cm ² mol ⁻¹]
[Ga(PyCTPh) ₂] ₂ NO ₃ (Ga1)	51,95 (51,89)	3,80 (3,77)	18,29 (18,15)	694,44	69,5
[Ga(PyCT4ClPh) ₂] ₂ NO ₃ (Ga2)	47,07 (47,20)	3,19 (3,17)	16,65 (16,51)	763,33	75,8
[Ga(PyCT4BrPh) ₂] ₂ NO ₃ (Ga3)	42,38 (42,28)	2,95 (2,84)	14,75 (14,79)	870,24	67,9
[Ga(PyCT4NO ₂ Ph) ₂] ₂ NO ₃ (Ga4)	45,85 (45,93)	3,03 (3,08)	19,62 (19,64)	784,44	66,3
[Zn(PyCTPh) ₂] (Zn1)	57,30 (57,37)	4,13 (4,17)	17,79 (17,84)	628,10	0,5
[Zn(PyCT4ClPh) ₂] (Zn2)	51,76 (51,70)	3,50 (3,47)	16,12 (16,08)	696,99	0,2
[Zn(PyCT4BrPh) ₂] (Zn3)	45,79 (45,85)	3,11 (3,08)	14,34 (14,26)	785,90	2,7
[Zn(PyCT4NO ₂ Ph) ₂] (Zn4)	50,05 (50,18)	3,34 (3,37)	19,46 (19,51)	718,06	0,5
[Fe(PyCTPh) ₂] ₂ NO ₃ (Fe1)	53,17 (52,94)	3,96 (3,85)	18,40 (18,52)	680,56	68,8
[Fe(PyCT4ClPh) ₂] ₂ NO ₃ (Fe2)	47,87 (48,08)	3,40 (3,23)	16,60 (16,82)	749,45	74,7
[Fe(PyCT4BrPh) ₂] ₂ NO ₃ (Fe3)	42,80 (42,98)	2,70 (2,89)	14,96 (15,04)	838,36	70,0
[Fe(PyCT4NO ₂ Ph) ₂] ₂ NO ₃ (Fe4)	46,81 (46,76)	3,25 (3,14)	20,01 (20,00)	770,56	70,6

Estes dados sugerem a formação de compostos do tipo [Zn(L)₂] e [M(L)₂]NO₃ (Figura 3.9), onde “L” é o ligante em sua forma aniônica e “M” corresponde aos metais Ga(III) ou Fe(III). Os complexos de Zn(II) apresentaram baixos valores de condutividade molar quando dissolvidos em DMF, indicando que são neutros nesta solução. Nos complexos de Ga(III) e Fe(III), os valores de condutividade molar são típicos de eletrólitos 1:1,²¹ demonstrando a formação de complexos catiônicos.

**Figura 3.9** – Estruturas propostas para os complexos de Zn(II) (**Zn1-Zn4**), Ga(III) (**Ga1-Ga4**) e Fe(III) (**Fe1-Fe4**) com tiossemicarbazonas obtidas neste trabalho.²¹ W.J. Geary, Coord. Chem. Rev. 7 (1971) 81.

Espectros de massas

No caso dos complexos de Zn(II) não foi observada a formação de nenhuma espécie carregada que pudesse ser atribuída ao complexos, e a ausência de tais espécies é justificada pelos baixos valores encontrados para a condutividade molar desses compostos.

Os espectros de massas dos complexos de Ga(III) exibiram cátions atribuídos aos isotopólogos do íon $[M-NO_3]^+$, referentes aos complexos do tipo $[GaL_2]^+$ em solução. Um comportamento análogo a este foi observado para os espectros de massas dos complexos de Fe(III), referente a complexos catiônico $[FeL_2]^+$.

Os valores de m/z dos isotopólogos mais abundantes de $[M-NO_3]^+$ foram: 631,0971 para $[Ga1-NO_3]^+$ (fórmula: $C_{30}H_{26}GaN_8S_2$); 699,0208 para $[Ga2-NO_3]^+$ (fórmula: $C_{30}H_{24}GaCl_2N_8S_2$); 786,9188 para $[Ga3-NO_3]^+$ (fórmula: $C_{30}H_{24}GaBr_2N_8S_2$); 721,0667 para $[Ga4-NO_3]^+$ (fórmula: $C_{30}H_{24}GaN_{10}O_4S_2$); 618,1098 para $[Fe1-NO_3]^+$ (fórmula: $C_{30}H_{26}FeN_8S_2$); 686,0314 para $[Fe2-NO_3]^+$ (fórmula: $C_{30}H_{24}FeCl_2N_8S_2$); 775,9285 para $[Fe3-NO_3]^+$ (fórmula: $C_{30}H_{24}FeBr_2N_8S_2$) e 708,0802 para $[Fe4-NO_3]^+$ (fórmula: $C_{30}H_{24}FeN_{10}O_4S_2$).

A presença desses cátions, tanto para os complexos de Ga(III) quanto para os de Fe(III), demonstra que há uma correspondência desses dados com aqueles de condutividade molar, que sugere a formação de complexos catiônicos. Na Figura 3.10 está apresentado o perfil obtido para a distribuição isotópica para os cátions $[Ga3-NO_3]^+$ e $[Fe3-NO_3]^+$ e os perfis calculados para a formula molecular atribuída a esses íons. Esta figura demonstra a alta correspondência entre os valores calculados e os dados obtidos para os espectros dos compostos.

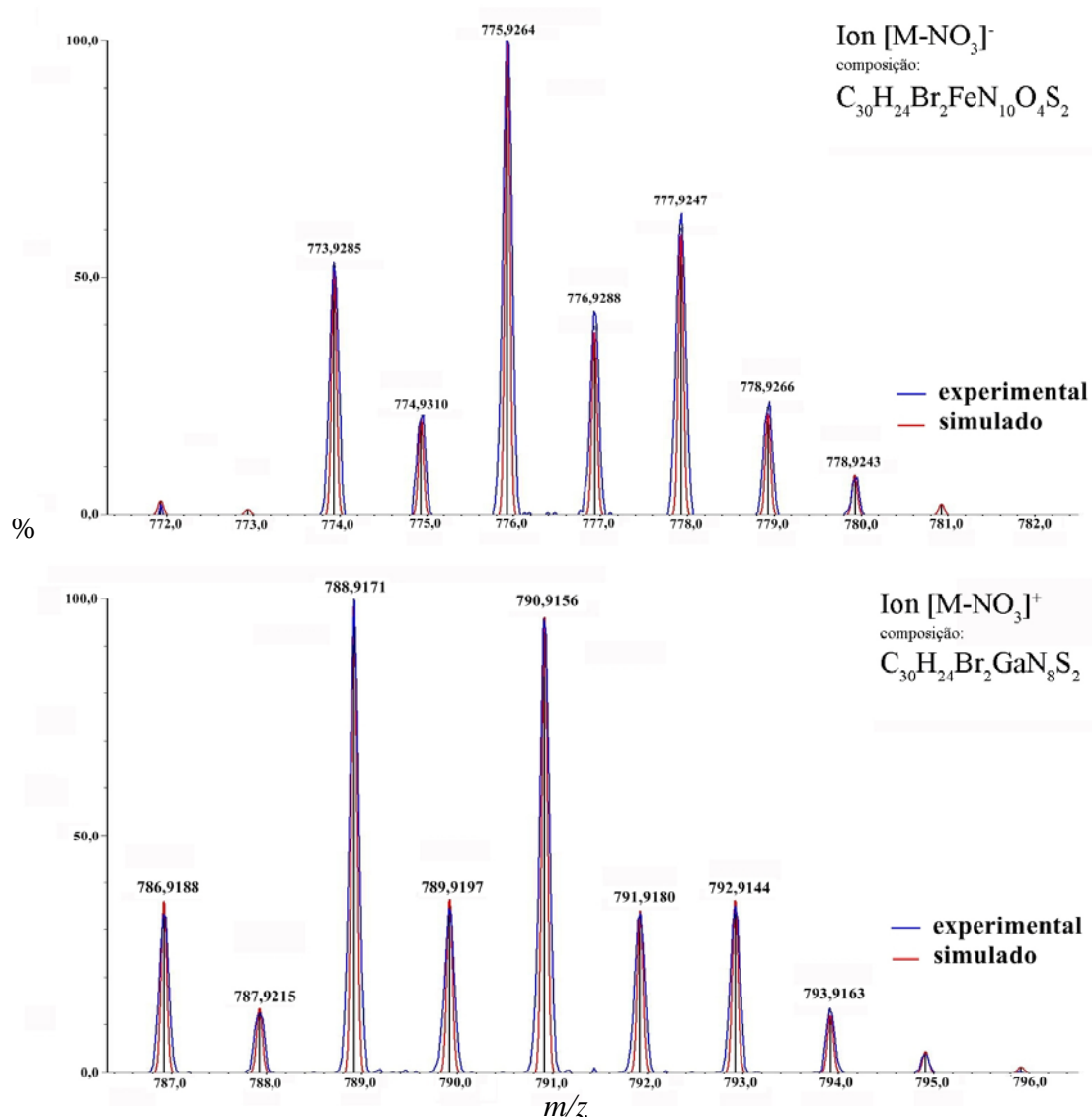


Figura 3.10 – Comparação entre as distribuições isotópicas dos cátions obtidos para os íons [Ga3-NO₃]⁺ e [Fe3-NO₃]⁺ e os perfis calculados com base na fórmulas propostas para estes íons.

Espectros eletrônicos

Com a coordenação a Ga(III), Zn(II) e Fe(III) grandes modificações ocorrem nos espectros eletrônicos em DMF destes compostos em relação ao ligante livre, como pode ser visto na Figura 3.11. Em todos os casos foi observado um deslocamento das transições intraligantes para regiões de menor energia, sugerindo um aumento da conjugação e coplanaridade da cadeia das tiossemicarbazonas com o anel da piridina, o que favorece as transições eletrônicas intraligantes.²²

Nos espectros eletrônicos dos complexos de Ga(III), as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ aparecem em 306-335 nm, e as transições $n \rightarrow \pi^*$ atribuídas aos grupos C=N e C=S em 455-471 nm. Nos complexos de Zn(II) as transições atribuídas aos grupos C=N e C=S foram observadas em

²² V.B. Arion, M.A. Jakupec, M. Galanski, P. Unfried, B.K. Keppler, J. Inorg. Biochem. 91 (2002) 298.

447-478 nm. A similaridade que existe no perfil dos espectros eletrônicos de Ga(III) e Zn(II) se deve ao fato de ambos os metais apresentarem configuração d^{10} .

Nos complexos de Fe(III) uma grande mistura de bandas foi observada devida não somente as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, atribuídas as transições intraligantes, mas também a transições de transferência de carga ligante-metal e bandas de campo ligante (d-d), possivelmente superpostas.

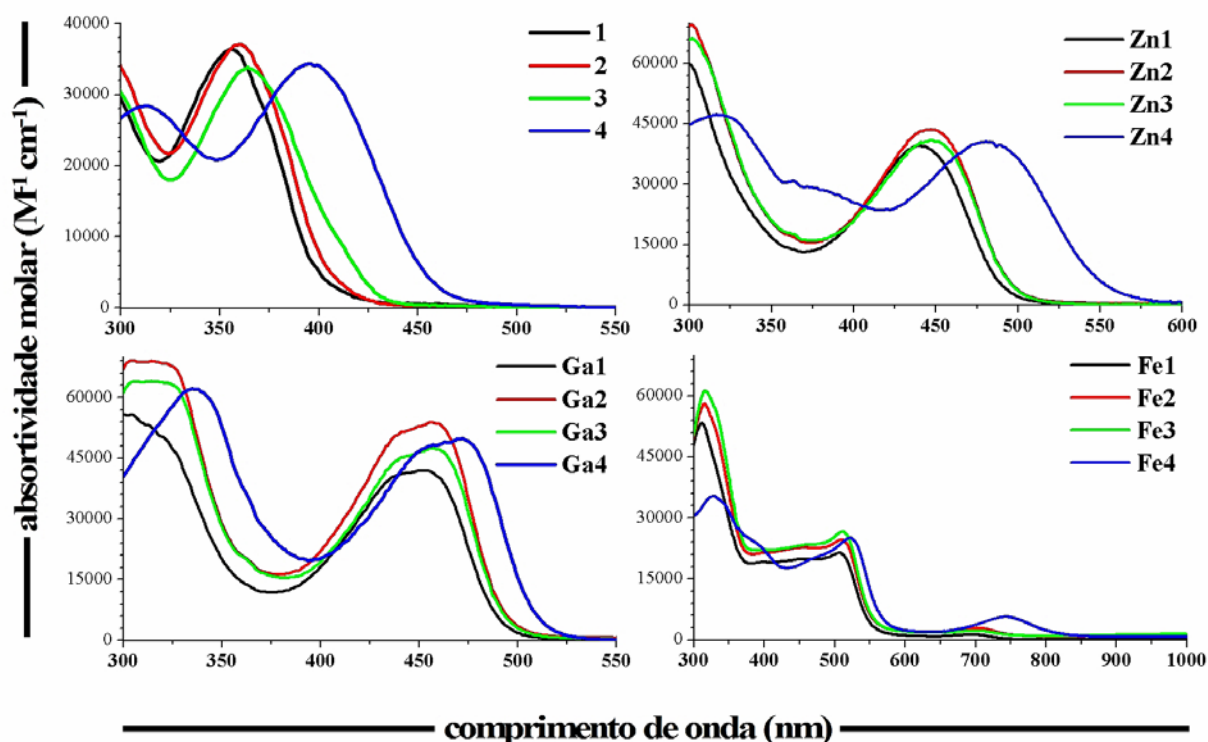


Figura 3.11 – Espectros eletrônicos das tiossemicarbazonas livres e de seus complexos de Zn(II), Ga(III) e Fe(III) em dimetilformamida.

Espectros na região do infravermelho

Na Tabela 3.8 estão apresentados as bandas nos espectros de infravermelho utilizadas para determinar o modo de coordenação das tiossemicarbazonas a Ga(III), Zn(II) e Fe(III).

Nos espectros de infravermelho dos complexos de Zn(II), Ga(III) e Fe(III) alterações com a coordenação foram observadas nos modos $\nu(\text{C}=\text{N})$, $\nu(\text{C}=\text{S})$ e $\rho(\text{Py})$. O modo $\nu(\text{C}=\text{N})$ sofre deslocamento sugerindo que a coordenação ocorre pelo nitrogênio imínico.^{23,24} A banda $\nu(\text{C}=\text{S})$, em $744\text{-}796\text{ cm}^{-1}$ nas bases livres, desloca-se para $721\text{-}728\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos, o que indica o envolvimento do enxofre da porção tioamida na coordenação.¹²

²³ A.P. Rebolledo, M. Vieites, D. Gambino, O. E. Piro, E.E. Castellano, C.L. Zani, E.M. Souza-Fagundes, L.R. Teixeira, A.A. Batista, H. Beraldo, J. Inorg. Biochem. 99 (2005) 698.

²⁴ J. J. López-Garriga, G.T. Babcock, J.F. Harrison, J. Am. Chem. Soc. 108 (1986) 7241.

Tabela 3.8 – Atribuição das principais bandas dos espectros de infravermelho para as tiossemicarbazonas derivadas de chalconas e seus complexos de Ga(III), Zn(II) e Fe(III), usando pastilhas de KBr (4000-370 cm⁻¹).

composto	V _(C=N)	V _(C=S)	ρ _(py)	composto	V _(C=N)	ρ _(py)	V _(C=S)	V _a (NO ₃)
1	1567	750	538	Ga1	1514	724	588	1385;1324
2	1562	778	548	Ga2	1520	728	649	1384;1285
3	1560	780	554	Ga3	1519	728	651	1385;1299
4	1570	822	596	Ga4	1514	728	658	1385;1295
Zn1	1510	726	582	Fe1	1622	726	594	1415; 1336
Zn2	1512	730	636	Fe2	1610	725	613	1416;1344
Zn3	1516	728	635	Fe3	1619	721	645	1413;1327
Zn4	1512	727	630	Fe4	1593	721	658	1406;1336

O modo de deformação do anel da piridina no plano [$\rho(\text{Py})$], em 538-603 cm⁻¹ nos espectros das bases livres, desloca-se para 582-658 cm⁻¹ nos espectros dos complexos, demonstrando a coordenação ao metal pelo nitrogênio heteroaromático.^{13,25}

No caso dos complexos de Ga(III) e Fe(III) novas absorções foram observadas na região de 1385-1416 cm⁻¹ e 1285-1344 cm⁻¹, características dos estiramentos assimétricos e simétricos de grupos nitrato não coordenados.^{26,27,28}

Espectros de RMN

Nas Tabelas 3.9 e 3.10 estão atribuídos os principais sinais observados nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C dos complexos de Ga(III) e Zn(II) das tiossemicarbazonas derivadas de chalconas. As atribuições nos espectros de RMN de ¹H foram feitas com base nos deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento para o espectro de cada composto. Os carbonos do tipo (C, CH) foram determinados pelo experimento DEPT135. As atribuições dos carbonos e prótons foram feitas também correlacionando os dados obtidos em nossos experimentos com os dados obtidos para as tiossemicarbazonas livres.

Mudanças significativas ocorreram nos espectros dos complexos em relação àqueles dos ligantes livres, como observado nos espectros de RMN de ¹H de **Zn2**, **Ga2** e **2**, apresentados na Figura 3.12. A primeira delas foi a ausência do sinal atribuído ao hidrogênio em N3 nos espectros de RMN de ¹H de **Ga1-Ga4** e **Zn1-Zn4**, o que confirma que a tiossemicarbazona encontra-se ligada ao metal em sua forma aniônica (Tabela 3.4). A outra foi o aparecimento de apenas um sinal para cada hidrogênio e cada carbono para o ligante, confirmando que a tiossemicarbazona adota uma única conformação com a coordenação.

²⁵ D.X. West, J.S. Ives, J. Krejci, M.M. Salberg, T.L. Zumbahlen, G.A. Bain, A.E. Liberta, Polyhedron 14 (1995) 2189.

²⁶ J.G. Da Silva, L.S. Azzolini, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo. Polyhedron 28 (2009) 2301.

²⁷ K. Nakamoto, INFRARED AND RAMAN SPECTRA OF INORGANIC AND COORDINATION COMPOUNDS. 4th ed. New York: Wiley, 1986, p. 254.

²⁸ I.C. Mendes, M.A. Soares, R.G. Santos, C. Pinheiro, H. Beraldo. Eur. J. Med. Chem. 44 (2009) 1870.

Nos espectros de RMN de ^1H dos complexos observa-se um deslocamento dos sinais dos hidrogênios da piridina em relação à sua posição nas tiossemicarbazonas livres (Tabela 3.2 e 3.9), o que confirma a coordenação pelo nitrogênio heteroaromático.²⁸ Os sinais referentes aos hidrogênios em N4, que eram duplicados nos ligantes livres, apresentam-se como um simpleto nos espectros dos complexos, o que indica a livre rotação do N4H_2 por consequência do fortalecimento do caráter de dupla ligação em torno de C8–N3 com a desprotonação em N3. Os valores das constantes de acoplamento entre os hidrogênios H9 e H10 não se alteraram pela coordenação (~16 Hz), indicando que a configuração em torno da ligação C9–C10 permanece como *E*.

Nos espectros de RMN de ^{13}C observa-se que o sinal atribuído ao carbono C8 desloca-se em relação à sua posição nas bases livres confirmando que o enxofre participa da coordenação ao metal. Os sinais dos carbonos da piridina sofrem grandes deslocamentos no espectro do complexo, assim como o carbono do grupo azometina (C7), confirmando que a coordenação ocorre também pelo nitrogênio heteroaromático e pelo nitrogênio N2.

Considerando as informações obtidas pelos dados de RMN em correlação com os outros dados, podemos sugerir que esses complexos de Zn(II) e Ga(III) apresentam geometria octaédrica ao redor do centro metálico, como observado para outros complexos de Zn(II) e Ga(III) de tiossemicarbazonas.^{28,29} Neste caso, a tiossemicarbazona deve adotar conformação *EZE* em relação às ligações C7-N2, N3-C8 e C9-C10, conformação esta que possibilita a coordenação pelo sistema $\text{N}_{\text{py}}\text{-N-S}$.

²⁹ D. Kovala-Demertzi, P.N. Yadav, J. Wiecek, S. Skoulika, T. Varadinova, M.A. Demertzi, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1558.

Tabela 3.9 – Atribuições e deslocamentos químicos de RMN de ^1H de $[\text{Ga}(\text{PyCTPh})_2]\text{NO}_3$ (**Ga1**), $[\text{Ga}(\text{PyCT4ClPh})_2]\text{NO}_3$ (**Ga2**), $[\text{Ga}(\text{PycT4BrPh})_2]\text{NO}_3$ (**Ga3**), $[\text{Ga}(\text{PyCT4NO}_2\text{Ph})_2]\text{NO}_3$ (**Ga4**), $[\text{Zn}(\text{PyCTPh})_2]$ (**Zn1**), $[\text{Zn}(\text{PyCT4ClPh})_2]$ (**Zn2**), $[\text{Zn}(\text{PyCT4BrPh})_2]$ (**Zn3**) e $[\text{Zn}(\text{PyCT4NO}_2\text{Ph})_2]$ (**Zn4**)—em (DMSO- d_6 , 200 MHz). Na parte inferior da página encontra-se uma estrutura genérica com o ligante numerado.

Atribuições	Deslocamentos Químicos (ppm)							
	Ga1	Ga2	Ga3	Ga4	Zn1	Zn2	Zn3	Zn4
H3	8,69 (d, $^3J = 8,3$ Hz)	8,69 (d, $^3J = 8,1$ Hz)	8,71 (d, $^3J = 8,3$ Hz)	8,73 (d, $^3J = 8,1$ Hz)	8,04 (d, $^3J = 8,6$ Hz)	8,08 (d, $^3J = 8,1$ Hz)	8,07 (d, $^3J = 8,0$ Hz)	8,28 (d, $^3J = 8,7$ Hz)
H4	8,26 (t, $^3J's = 7,8$ Hz)	8,24 (t $^3J's = 7,7$ Hz)	8,25 (t, $^3J's = 7,8$ Hz)	8,47-8,16 (m)	7,94-7,81 (m)	7,92-7,75 (m)	7,94-7,55 (m)	8,20-7,99 (m)
H5	7,63 (t, $^3J_{\text{H5-H6}} = 5,2$; $^3J_{\text{H5-H4}} = 7,5$ Hz)	7,68-7,51 (m)	7,61 (d, $^3J = 7,0$ Hz)	7,63 (dd, $^3J_{\text{H5-H4}} = 7,1$; $^3J_{\text{H5-H6}} = 5,3$ Hz)	7,51-7,23 (m)	7,28 (t, $^3J = 7,0$ Hz)	7,27 (t, $^3J = 6,4$ Hz)	7,29 (dd, $^3J_{\text{H5-H4}} = 7,2$; $^3J_{\text{H5-H6}} = 5,3$ Hz)
H6	8,04-7,87 (m)	7,92 (d, $^3J = 4,6$ Hz)	8,02-7,86 (m)	8,03-7,83 (m)	7,94-7,81 (m)	7,92-7,75 (m)	7,94-7,55 (m)	7,97-7,61 (m)
H9	7,76 (d, $^3J = 16,2$ Hz)	7,74 (d, $^3J = 15,9$ Hz)	7,84-7,67 (m)	8,03-7,83 (m)	7,66 (d, $^3J = 16,7$ Hz)	7,73 (d, $^3J = 16,6$ Hz)	8,41 (d, $^3J = 16,0$ Hz)	7,97-7,61 (m)
H10	9,10 (d, $^3J = 16,2$ Hz)	9,16 (d, $^3J = 15,9$ Hz)	9,18 (d, $^3J = 15,9$ Hz)	9,28 (d, $^3J = 15,9$ Hz)	8,23 (d, $^3J = 16,7$ Hz)	8,42 (d, $^3J = 16,4$ Hz)	8,41 (d, $^3J = 16,3$ Hz)	8,73 (d, $^3J = 16,2$ Hz)
H(12,16)	8,04-7,87 (m)	8,00 (d, $^3J's = 8,3$ Hz)	8,02-7,86 (m)	8,47-8,16 (m)	7,77 (d, $^3J's = 7,3$ Hz)	7,92-7,75 (m)	7,94-7,55 (m)	7,97-7,61 (m)
H(13,15)	7,57-7,39 (m)	7,68-7,51 (m)	7,84-7,67 (m)	8,47-8,16 (m)	7,51-7,23 (m)	7,55-7,37 (m)	7,94-7,55 (m)	8,20-7,99 (m)
H14	7,57-7,39 (m)	—	—	—	7,51-7,23 (m)	—	—	—
H-N3	—	—	—	—	—	—	—	—
H-N4H	8,50 (s)	8,54 (s)	8,54 (s)	8,88 (s)	7,51-7,23 (m)	7,55-7,37 (m)	7,46 (s)	7,97-7,61 (m)

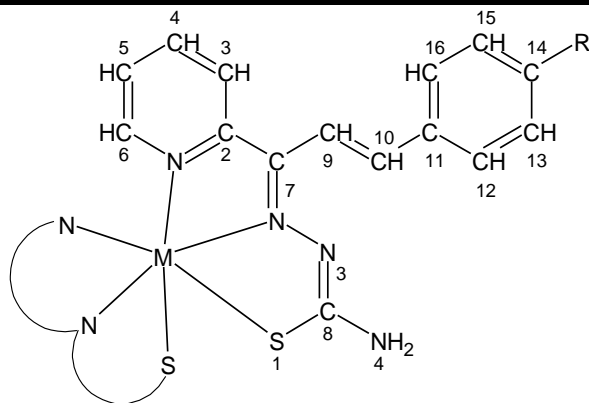
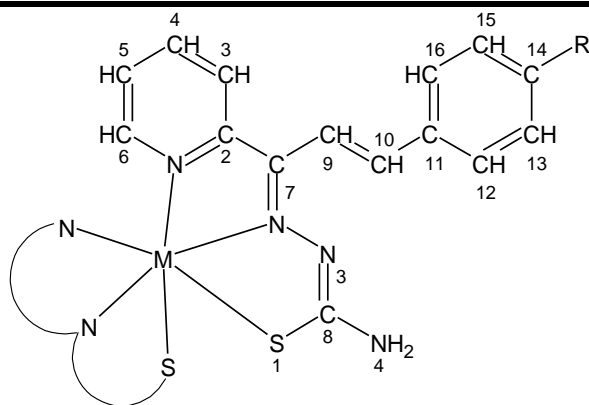


Tabela 3.10 – Atribuições e deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^{13}C e subespectros DEPT135 de $[\text{Ga}(\text{PyCTPh})_2]\text{NO}_3$ (**Ga1**), $[\text{Ga}(\text{PyCT4ClPh})_2]\text{NO}_3$ (**Ga2**), $[\text{Ga}(\text{PyCT4BrPh})_2]\text{NO}_3$ (**Ga3**), $[\text{Ga}(\text{PyCT4NO}_2\text{Ph})_2]\text{NO}_3$ (**Ga4**), $[\text{Zn}(\text{PyCTPh})_2]$ (**Zn1**), $[\text{Zn}(\text{PyCT4ClPh})_2]$ (**Zn2**), $[\text{Zn}(\text{PyCT4BrPh})_2]$ (**Zn3**) e $[\text{Zn}(\text{PyCT4NO}_2\text{Ph})_2]$ (**Zn4**) ($\text{DMSO}-d_6$, 50 MHz). Na parte inferior da página encontra-se uma estrutura genérica com o ligante numerado.

Atribuições	Ga1		Ga2		Ga3		Ga4		Zn1		Zn2		Zn3		Zn4	
	^{13}C	DEPT	^{13}C	DEPT	^{13}C	DEPT	^{13}C	DEPT	^{13}C	DEPT	^{13}C	DEPT	^{13}C	DEPT	^{13}C	DEPT
C2	145,9	–	146,0	–	145,9	–	147,2	–	149,7	–	149,8	–	149,8	–	149,8	–
C3	124,0	↑	123,9	↑	123,8	↑	123,4	↑	121,7	↑	121,4	↑	121,4	↑	121,7	↑
C4	142,8	↑	142,8	↑	142,8	↑	142,5	↑	138,9	↑	138,9	↑	138,9	↑	139,1	↑
C5	127,1	↑	127,0	↑	127,0	↑	126,6	↑	123,5	↑	123,4	↑	123,4	↑	123,4	↑
C6	145,1	↑	144,6	↑	144,6	↑	144,3	↑	146,4	↑	146,3	↑	146,3	↑	146,3	↑
C7=N	139,0	↑	138,5	–	138,4	–	137,3	–	139,5	–	138,6	–	138,6	–	137,4	–
C8=S	178,3	–	178,6	–	178,6	–	178,8	–	183,3	–	183,6	–	183,7	–	184,5	–
C9	115,7	↑	116,2	↑	116,2	↑	119,1	↑	118,5	↑	118,8	↑	118,8	↑	121,2	↑
C10	144,6	↑	143,8	↑	143,9	↑	141,8	↑	137,8	↑	136,8	↑	136,9	↑	135,9	↑
C11	137,0	–	136,0	–	136,4	–	143,4	–	137,3	–	136,4	–	136,8	–	144,7	–
C(12,16)	128,6	↑	129,3	↑	130,5	↑	129,0	↑	127,2	↑	128,6	↑	129,1	↑	128,0	↑
C(13,15)	129,3	↑	130,3	↑	132,2	↑	124,0	↑	128,7	↑	128,8	↑	131,5	↑	123,8	↑
C14	130,4	↑	134,8	–	123,6	–	145,4	–	128,5	↑	132,8	–	121,4	–	146,6	–



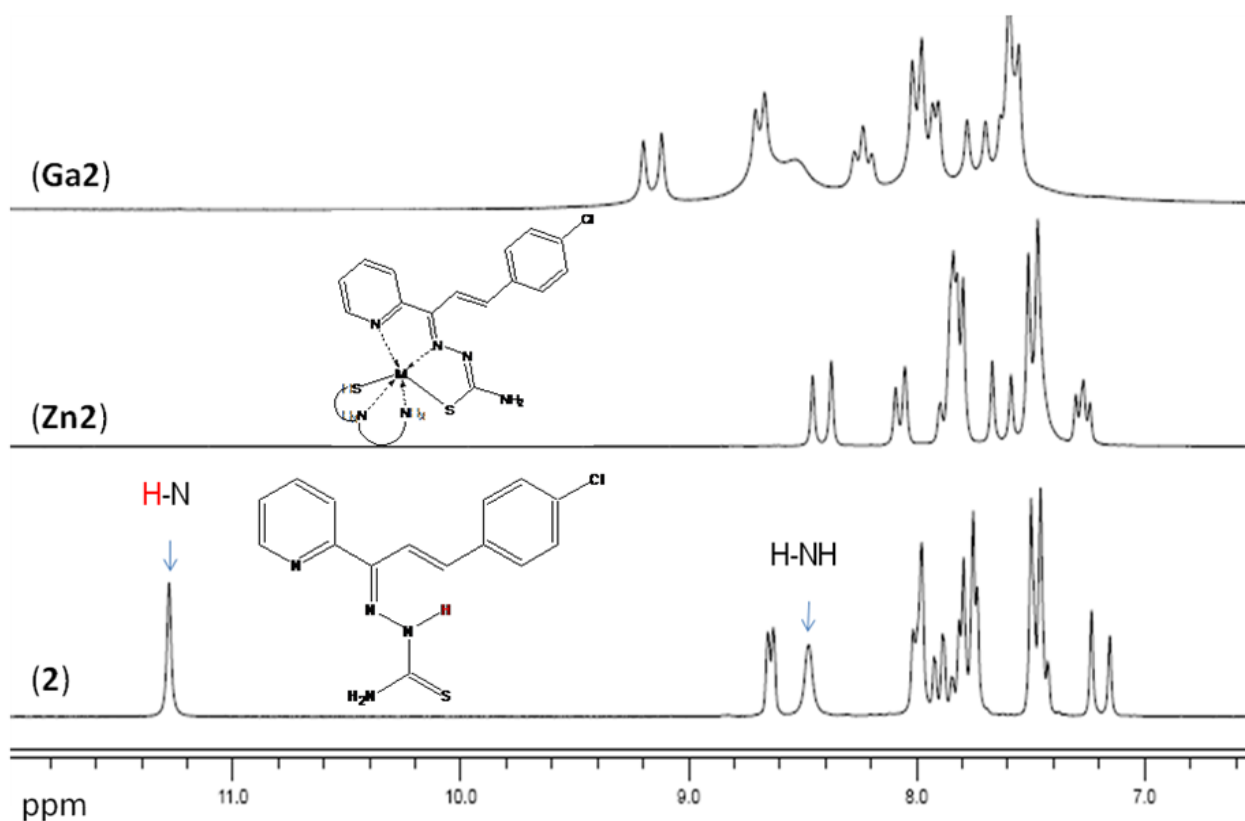


Figura 3.12 – Espectro de RMN de ^1H de HPyCT4ClPh (**2**) e seus complexos de Zn(II) (**Zn2**) e de Ga(III) (**Ga2**) (DMSO- d_6 , 200 MHz).

Espectros Mössbauer

A fim de obtermos informações sobre a geometria em torno do metal foram obtidos os espectros de Mössbauer dos complexos de Fe(III) a 80 e 298 K (ver Figura 3.13). Na Tabela 3.11 estão apresentados os parâmetros Mössbauer obtidos para esses complexos.

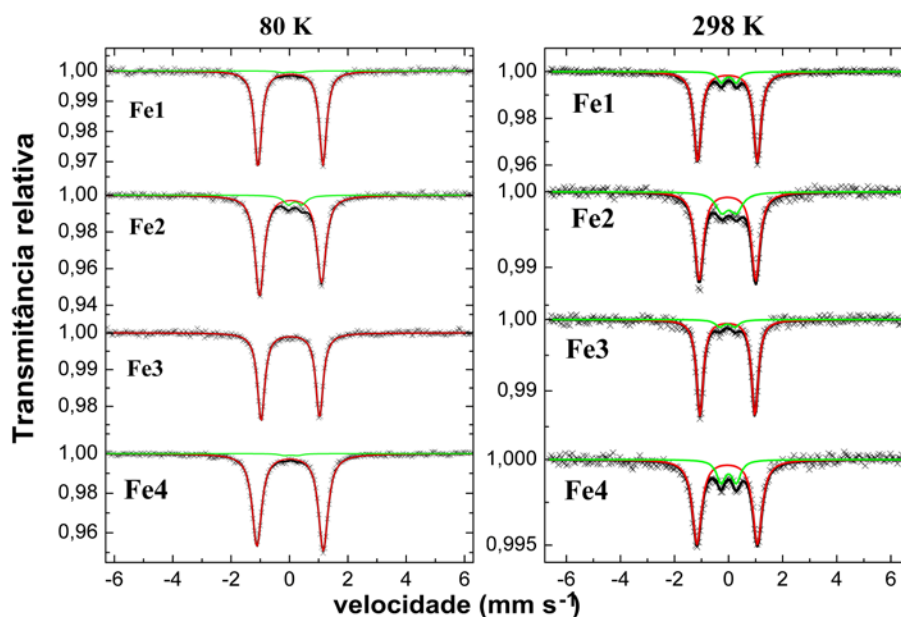


Figura 3.13 – Espectros Mössbauer dos complexos $[\text{Fe}(\text{PyCTPh})_2]\text{NO}_3$ (**Fe1**), $[\text{Fe}(\text{PyCT4ClPh})_2]\text{NO}_3$ (**Fe2**), $[\text{Fe}(\text{PycT4BrPh})_2]\text{NO}_3$ (**Fe3**) e $[\text{Fe}(\text{PyCT4NO}_2\text{Ph})_2]\text{NO}_3$ (**Fe4**) a 80K e 298 K.

Nos espectros de **Fe1-Fe4** a 298 K dois dupletos foram observados para complexo, evidenciando a presença de dois sítios de ferro. Foi observado um sítio predominante com 77 a 91 % da área do espectro (sítio I) e outro, minoritário, com área entre 9 e 23 % (sítio II). Nos espectros de **Fe1-Fe4** a 80 K foi observada uma significativa diminuição da área do sítio II.

Os parâmetros observados para o desvio isomérico e desdobramento quadrupolar do sítio I (Tabela 3.11) sugerem que este composto seja de Fe(III) spin baixo com estado fundamental $^2T_{2g}$.³⁰ No entanto, no caso do sítio II os parâmetros podem ser atribuídos à presença de uma espécie de Fe(II). De fato nosso grupo já demonstrou que tiossemicarbazonas podem reduzir seus próprios complexos de Fe(III) aos de Fe(II).^{31,32} Os parâmetros seriam também compatíveis com a presença de uma espécie de Fe(III) spin alto, originada pelo efeito spin-crossover.³³ Esse efeito é observado em vários complexos de Fe(III),³⁴ incluindo aqueles com tiossemicarbazonas, sendo caracterizado pela mudança após um estímulo externo (temperatura, pressão, irradiação de luz ou influência de um campo magnético) do spin no estado fundamental de uma configuração spin baixo para um estado metastável de spin alto, ou *vice-versa*.^{34,35}

Como foi observada uma dependência da temperatura no processo de formação do sítio II não podemos justificar a sua presença como sendo devida a uma impureza de Fe(II) ou Fe(III) oriunda da síntese dos complexos.

Tabela 3.11 – Parâmetros de Mössbauer e informações sobre os sítios obtidos para [Fe(PyCTPh)₂]₂NO₃ (**Fe1**), [Fe(PyCT4CIPh)₂]₂NO₃ (**Fe2**), [Fe(PyCT4BrPh)₂]₂NO₃ (**Fe3**) e [Fe(PyCT4NO₂Ph)₂]₂NO₃ (**Fe4**).

	Estado de oxidação	Desvio isomérico (δ) (mm/s) ($\pm 0,05$)		Desdobramento quadrupolar (Δ) (mm/s) ($\pm 0,05$)		Largura da linha Γ (mm/s) ($\pm 0,04$)		Área (%) (± 1)	
		80 K	298 K	80 K	298 K	80 K	298 K	80 K	298 K
		Fe1	Fe(III)	0,13	0,04	2,22	2,20	0,33	0,33
	Fe(III) ou Fe(II)	0,15	0,10	0,57	0,55	0,32	0,34	2	10
Fe2	Fe(III)	0,13	0,05	2,12	2,10	0,36	0,37	91	77
	Fe(III) ou Fe(II)	0,15	0,11	0,47	0,54	0,37	0,45	9	23
Fe3	Fe(III)	0,13	0,05	2,22	2,00	0,31	0,33	100	91
	Fe(III) ou Fe(II)	–	0,06	–	0,56	–	0,40	–	9
Fe4	Fe(III)	0,12	0,05	2,27	2,23	0,37	0,39	98	80
	Fe(III) ou Fe(II)	0,11	0,05	0,45	0,56	0,38	0,42	2	20

³⁰ A. Sreekanth, M.R. P. Kurup, Polyhedron 23 (2004) 969.

³¹ R.H.U. Borges, A. Abras, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc. 8 (1997) 33.

³² R.H.U. Borges, E. Paniago, H. Beraldo, J. Inorg. Chem. 65 (1997) 267.

³³ Masayuki Nihei, Takuya Shiga, Yonezo Maeda, Hiroki Oshio, Coord. Chem. Rev. 251 (2007) 2606.

³⁴ P.J. van Koningsbruggen, Y. Maeda, H. Oshio, Top. Curr. Chem. 233 (2004) 259.

³⁵ P. Bera, N. Saha, Transition Met. Chem. 24 (1999) 425.

Espectros de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

A fim de entendermos melhor o comportamento observado nos espectros de Mössbauer foram obtidos os espectros de RPE de **Fe1-Fe4** no estado sólido e em soluções de DMSO (1mM) a temperatura ambiente (298 K) e a 11 K (Figura 3.14).

Para os espectros de RPE dos sólidos a 11 e 298 K foram observados dois tipos de perfis, um que apresenta geometria rômbrica (presente em **Fe1** e **Fe3**), e o outro que apresenta um sinal com anisotropia axial (presente em **Fe2** e **Fe4**). Nos espectros em DMSO temperatura ambiente (298 K) todos os complexos apresentam simetria axial, mas com a diminuição da temperatura para 11K ocorre um alargamento da componente axial.

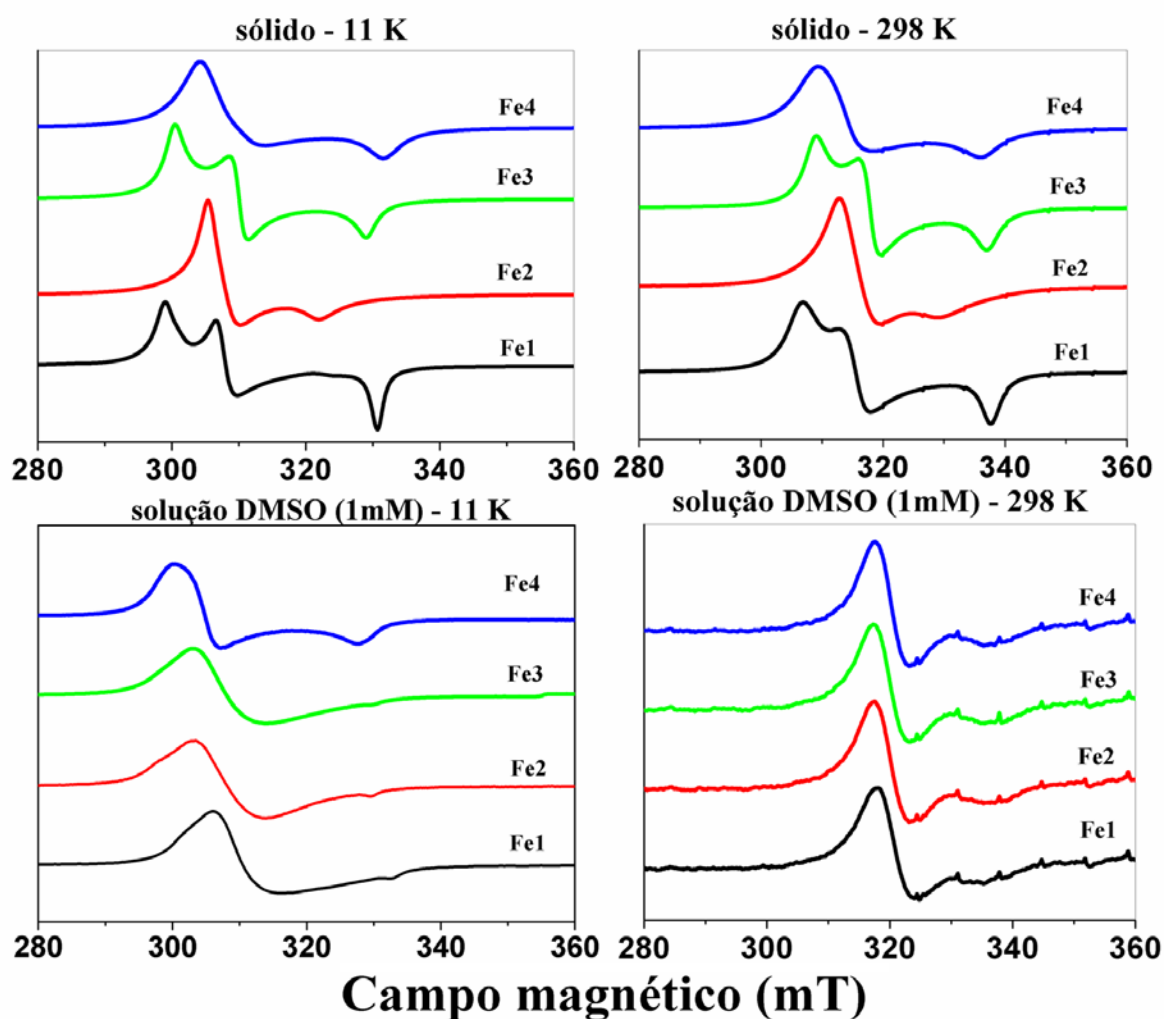


Figura 3.14 – Espectros de ressonância paramagnética eletrônica dos complexos de Fe(III) com tiossemicarbazonas derivadas de chalconas (**Fe1-Fe4**) no estado sólido e em DMSO (1 mM) a 11 e 298 K. Nos espectros a 298K os picos menores são devidos à presença do sal de Mn(II) usado como referência.

Em todas as condições em que foram coletados os espectros de RPE podemos observar a presença de uma espécie paramagnética com $g \sim 2$ atribuída à espécie de Fe(III) spin baixo, e a ausência de uma espécies de Fe(III) spin alto, que deveria ser observada em campo baixo com g

~ 4,3. Isto sugere que o efeito spin-crossover não seja o responsável pela formação do sítio II nos espectros Mössbauer a 298 K, e que esse sítio seria atribuído à presença de uma espécie de Fe(II) que é “silenciosa” no espectro de RPE. No entanto, outros experimentos envolvendo o estudo do comportamento magnético estão sendo realizados para melhor compreendermos este sistema.

Voltametria cíclica

Na Figura 3.15 estão apresentados os voltamogramas cíclicos dos complexos de Fe(III) em DMSO. Na Tabela 3.12 estão apresentados os dados relacionados a essas medidas.

Todos os compostos apresentaram nesta solução eletrolítica um processo reversível (veja valor de ΔE_p na Tabela 3.12) atribuído à redução Fe(III)/Fe(II) e à oxidação Fe(II)/Fe(III). Uma vez que todos esses complexos apresentam a mesma geometria em torno do metal (octaédrica), o deslocamento observado nos potenciais dos picos catódicos e anódicos para valores mais positivos deve estar relacionado ao aumento do efeito eletrorretirador do ligante.

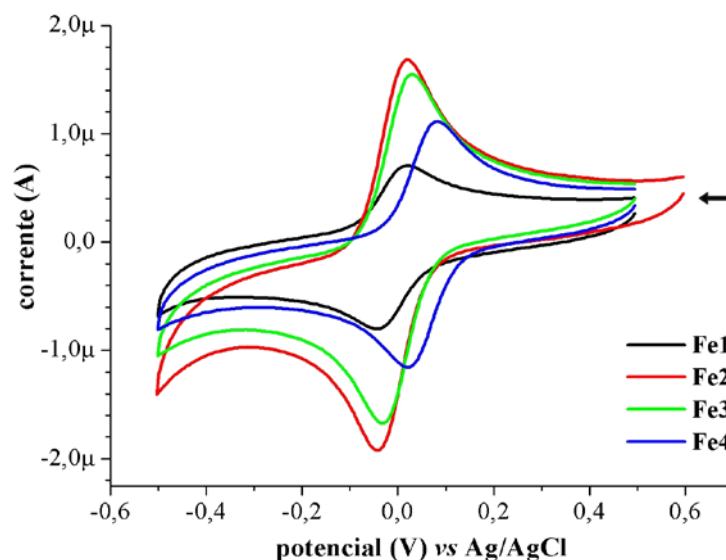


Figura 3.15 – Voltamogramas cíclicos de [Fe(PyCTPh)₂]₂NO₃ (**Fe1**), [Fe(PyCT4CIPh)₂]₂NO₃ (**Fe2**), [Fe(PyCT4BrPh)₂]₂NO₃ (**Fe3**) e [Fe(PyCT4NO₂Ph)₂]₂NO₃ (**Fe4**) (0,100 V s⁻¹, DMSO, 0,1 mol L⁻¹ NBut₄BF₄).

Tabela 3.12 – Dados de voltametria cíclica para [Fe(PyCTPh)₂]₂NO₃ (**Fe1**), [Fe(PyCT4CIPh)₂]₂NO₃ (**Fe2**), [Fe(PyCT4BrPh)₂]₂NO₃ (**Fe3**) e [Fe(PyCT4NO₂Ph)₂]₂NO₃ (**Fe4**) (0,100 V s⁻¹, DMSO, 0,1 mol L⁻¹ NBut₄BF₄).

complexos	E_{pc}^* (V)	E_{pa} (V)	ΔE_p (V)
	Fe(III)/Fe(II)	Fe(II)/Fe(III)	
Fe1	-0,042	0,017	0,059
Fe2	-0,040	0,019	0,059
Fe3	-0,027	0,026	0,053
Fe4	0,026	0,080	0,054

* E_{pc} = potencial de pico catódico; E_{pa} = potencial do pico anódico; ΔE_p = variação do potencial entre picos.

3.1.3 Complexos de Cu(II) com tiossemicarbazonas derivadas de chalconas

Microanálises

Na Tabela 3.13 estão apresentados os dados de análise elementar e das medidas de condutividade molar para os complexos de Cu(II) obtidos a partir de tiossemicarbazonas derivadas de chalconas.

Tabela 3.13 – Análise elementar (valores teóricos entre parênteses), massa molar, condutividade molar (em DMF) e momento magnético efetivo para os complexos de Cu(II) de tiossemicarbazonas derivadas de chalconas.

Composto	%C	%H	%N	MM [g mol ⁻¹]	Λ_M [ohm ⁻¹ cm ² mol ⁻¹]	μ_{ef} [MB]
[Cu(HPyCTPh)Cl ₂] (Cu1)	42,94 (43,22)	3,35 (3,39)	13,28 (13,44)	416,82	23,88	1,85
[Cu(HPyCT4ClPh)Cl ₂] (Cu2)	39,86 (39,92)	2,94 (2,90)	12,21 (12,42)	451,26	25,92	1,83
[Cu(HPyCT4BrPh)Cl ₂] (Cu3)	36,01 (36,34)	2,69 (2,64)	10,97 (11,30)	495,71	33,15	1,78
[Cu(HPyCT4NO ₂ Ph)Cl ₂] (Cu4)	38,69 (39,01)	2,79 (2,84)	14,97 (15,16)	461,81	29,02	1,82

Os dados de análise elementar sugerem a formação de complexos do tipo [Cu(HL)Cl₂]. Estes dados confirmam a formação de compostos com relação metal-ligante de 1:1. **Cu1-Cu4** apresentaram valores de momento magnético na faixa de 1,78 a 1,85 MB, os quais são próximos ao atribuído para o íon Cu(II) (1,73 MB).

Os valores de condutividade molar de **Cu1-Cu4** dissolvidos em DMF não são próximos a zero como no caso dos complexos de Zn(II) (**Zn1-Zn4**). Contudo são significativamente menores que aqueles característicos de eletrólitos do tipo 1:1 no mesmo solvente (65-90 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹).²¹ Nesse caso, o solvente pode coordenar-se parcialmente ao centro metálico, o que explicaria os valores encontrados. Valores intermediários de condutividade molar são comuns em complexos que apresentam cloretos coordenados, os quais são bons grupos abandonadores.^{36,37}

Espectros eletrônicos

Na Figura 3.16 estão apresentados os espectros eletrônicos dos complexos de Cu(II). Nestes espectros foram observadas significativas modificações em relação ao ligante livre. Nos

³⁶ K.S.O. Ferraz, Perfil farmacológico de compostos com aplicações como agentes antineoplásicos, antimicrobianos e contra doenças neurodegenerativas [manuscrito] 2012, UFMG. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/SFSA-8YBW2J>.

³⁷ A.A Recio Despaigne, Estudo do perfil farmacológico de novos complexos de metálicos de hidrazonas de piridina e imidazóis (Tese de doutorado), 2012, UFMG. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/SFSA-8ZBUS8>.

complexos, as bandas em 293–300 nm e 313–331 nm foram atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$, enquanto as bandas em 460–481 nm foram atribuídas às transições $n \rightarrow \pi^*$ sobrepostas às transições de transferência de carga ligante-metal [$N \rightarrow Cu(II)$ e $S \rightarrow Cu(II)$].

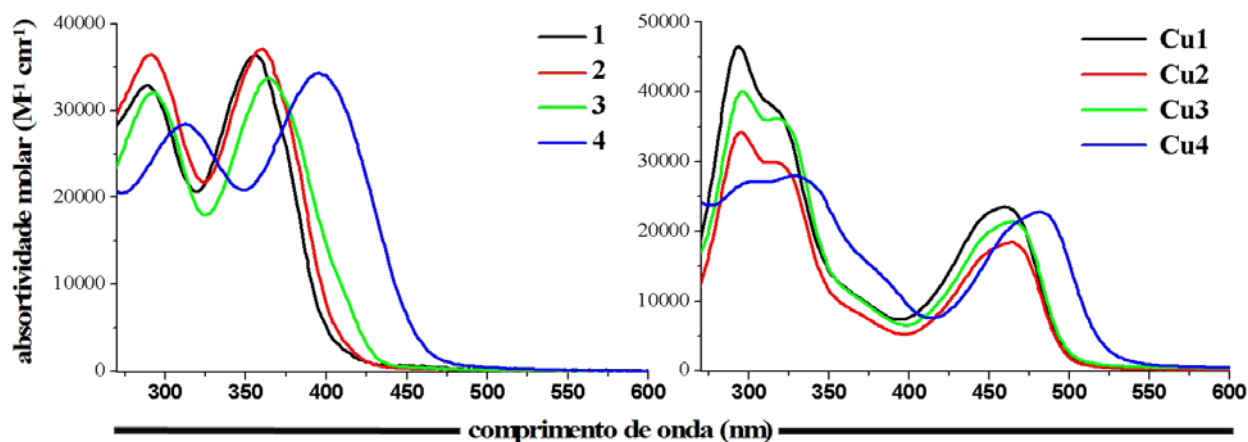


Figura 3.16 – Espectros eletrônicos obtidos para as tiossemicarbazonas (**1-4**) e seus respectivos complexos de Cu(II) (**Cu1-Cu4**) em dimetilformanida.

Estrutura cristalográfica de [Cu(PyCTPh)Cl]·DMF (Cu1a)

Cristais de **Cu1a** foram obtidos a partir da evaporação lenta de uma solução de **Cu1** em DMF. Na Tabela 3.14 estão apresentados os dados relacionados à coleta e refinamento da estrutura cristalina. O diagrama ORTEP de **Cu1a** está apresentado na Figura 3.17. Distâncias de ligação e ângulos selecionadas encontram-se descritas na Tabela 3.15 e a Figura 3.18 mostra seu empacotamento cristalino.

Cu1a cristalizou-se com sistema ortorrômbico e grupo espacial *Pbca* apresentando uma molécula do complexo de Cu(II) e uma de DMF por unidade assimétrica. A geometria em torno do metal no complexo é quadrática distorcida. A tiossemicarbazona em sua forma aniônica encontra-se ligada ao metal através do sistema $N_{py}-N-S$, com um cloreto completando a esfera de coordenação (veja distâncias e ângulos na Tabela 3.15). A tiossemicarbazona aniônica adota a conformação *EZE* em relação às ligações C7–N2, C8–N3 e C9–C10 e seu esqueleto $Py-C=N-NC(=S)-N$ é quase plano. O desvio médio da posição de seus átomos em relação ao plano formado por eles foi de 0,023 Å e os átomos Cl1 e Cu1 encontram-se deslocados desta superfície de 0,073(6) e 0,051(3) Å, respectivamente. O complexo apresenta uma estrutura muito similar àquela observada para o [Cu(2Ac4mT)Cl] ($H_2Ac_4mT = N(4)-meta$ -toluil 2-acetilpiridina-tiossemicarbazona).¹²

Tabela 3.14 – Dados relacionados à coleta, resolução e refinamento da estrutura cristalina de [Cu(PyCTPh)Cl]·DMF (**Cu1a**).

[Cu(PyCTPh)Cl]·DMF (1a)			
Fórmula empírica	C ₁₈ H ₂₀ ClCuN ₅ OS	Coeficiente de absorção (mm ⁻¹)	1,358
Massa molar (g mol ⁻¹)	453,44	Faixa de θ usada na coleta dos dados (°)	4,29 a 26,37
Sistema cristalino	Ortorrômbico	Faixa de índices de Miller	-10 ≤ h ≤ 10
grupo espacial	Pbca		-21 ≤ k ≤ 21
Radiação; λ	Mo K α ; 0,71073		-33 ≤ l ≤ 29
Temperatura (K)	150(2)	Reflexões coletadas	28897
Parâmetros da célula unitária	a (Å)	8,5015(2)	Reflexões únicas [R _{int}]
	b (Å)	17,5962(4)	4039 [0,0325]
	c (Å)	26,5354(6)	Completeza a $\theta = 26,37^\circ$ (%)
$\alpha = \beta = \gamma$ (°)	90	Transmissão máxima e mínima	1,00000 e 0,78167
V (Å ³)	3969,54(16)	Dados; restrições; parâmetros	4039 ; 0 ; 246
Z	8	Índices de R final [I > 2 σ (I)]	R ₁ = 0,0802 ; wR ₂ = 0,1983
Z'	8	Índices de R (para todos os dados)	R ₁ = 0,0861 ; wR ₂ = 0,2026
Densidade calculada (g cm ⁻³)	1,517	S	1,116
F(000)	1864	$\Delta\rho_{\text{máx.}}$ e $\Delta\rho_{\text{mín.}}$	2,649 e -1,080

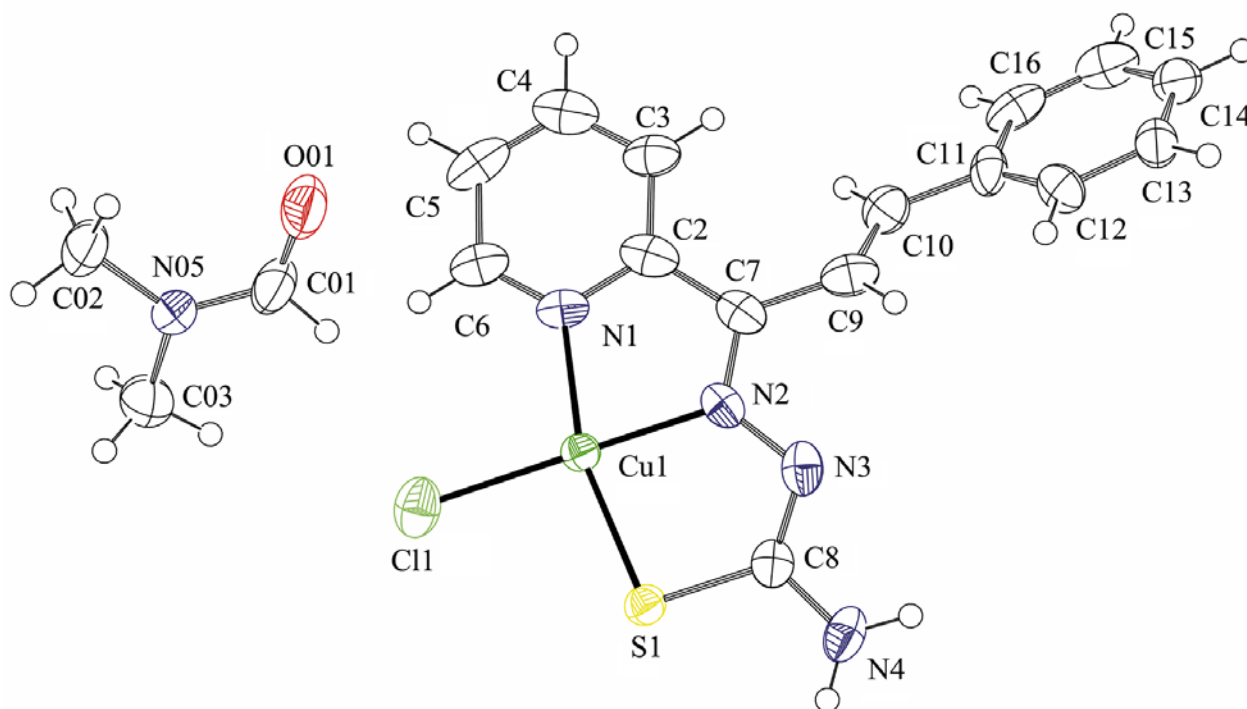
**Figura 3.17** – Diagrama ORTEP de [Cu(PyCTPh)Cl]·DMF (**Cu1a**) com elipsoides térmicos representados a um nível de probabilidade de 50%.

Tabela 3.15 – Distâncias de ligação (Å) e ângulos (°) selecionados de [Cu(PyCTPh)Cl]·DMF (**Cu1a**).

Distâncias de ligação			
C8–S1	1,746(6)	C10–C9	1,305(9)
N3–C8	1,312(8)	C11–C10	1,469(9)
N3–N2	1,366(7)	Cu1–C11	2,2839(19)
N2–C7	1,303(8)	Cu1–N1	2,003(5)
N1–C2	1,358(9)	Cu1–N2	1,974(5)
C7–C2	1,476(10)	Cu1–S1	2,2299(16)
C7–C9	1,515(9)		
Ângulos			
N1–C2–C7	115,6(5)	C7–N2–Cu1	117,5(4)
C2–C7–N2	113,1(5)	N3–N2–Cu1	123,0(4)
C7–N2–N3	119,4(5)	C8–S1–Cu1	96,0(2)
N2–N3–C8	112,3(5)	N1–Cu1–C11	99,57(16)
N3–C8–S1	124,5(5)	N1–Cu1–N2	80,8(2)
C9–C7–N2	128,6(5)	N1–Cu1–S1	164,71(16)
C10–C9–C7	124,3(6)	N2–Cu1–C11	179,51(15)
C9–C10–C11	122,5(7)	N2–Cu1–S1	84,20(15)
C6–N1–Cu1	127,6(5)	C11–Cu1–S1	95,46(7)
C2–N1–Cu1	112,9(4)		

Em relação ao seu empacotamento, a cristalização da molécula do solvente na estrutura está relacionada à presença de ligações de hidrogênio envolvendo moléculas de DMF e do complexo $[N4-H \cdots O01]^i$ ($i = -x+2, -y+1, -z+1$); $d(N4 \cdots O01) = 2,900(7)$ Å; e $\angle(N4H \cdots O01) = 166,8^\circ$, como mostrado na Figura 3.18.

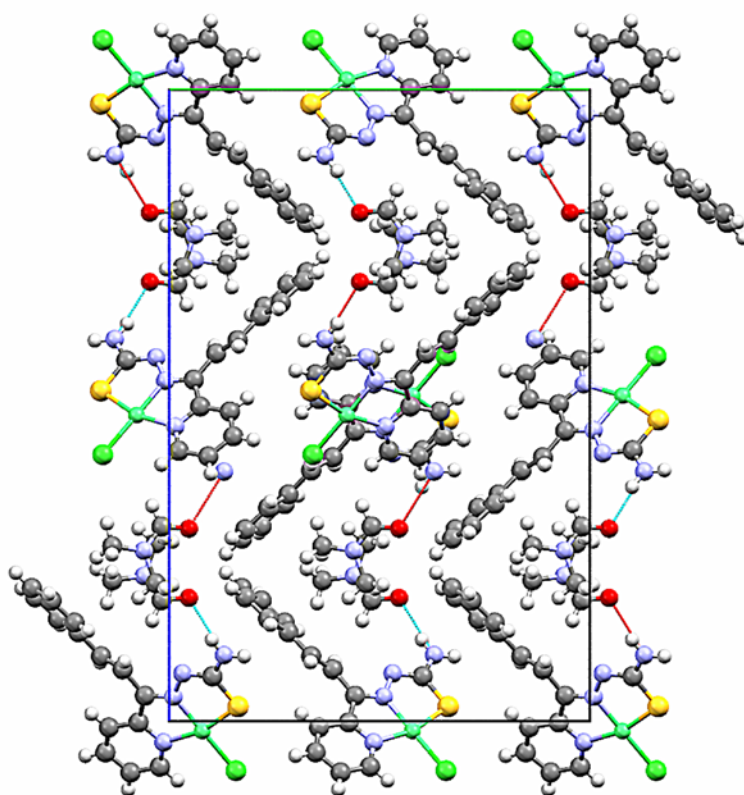


Figura 3.18 – Diagrama molecular de [Cu(PyCTPh)Cl]·DMF (**Cu1a**) com projeção ao longo do eixo cristalográfico **a**. A ligação de hidrogênio entre o complexo e a molécula do solvente está apresentada por linhas em azul ou vermelho.

Espectros na região do infravermelho

Nos espectro de infravermelho o modo atribuído ao $\nu(\text{C}=\text{N})$ em $1560\text{-}1570\text{ cm}^{-1}$ nos espectros da tiossemicarbazona livre desloca-se para $1617\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos, em concordância com a coordenação através do nitrogênio imínico.

Para todos os complexos de Cu(II) foi observada a presença de uma banda próxima a 2675 cm^{-1} (como exemplo, ver Figura 3.19 o espectro de **Cu1**). Este modo já foi observado para o ligante livre (no caso **3**) e trata-se do $\nu(\text{N-H})$ do íon piridínio. Esta banda também já foi relatada na literatura para complexos de Au(I) ¹⁵ e Pt(II) ³⁸ com tiossemicarbazonas. O aparecimento da banda justifica o grande deslocamento observado para o modo $\rho(\text{Py})$, de $538\text{-}596\text{ cm}^{-1}$ nas tiossemicarbazonas livres para $596\text{-}630\text{ cm}^{-1}$ nos complexos.

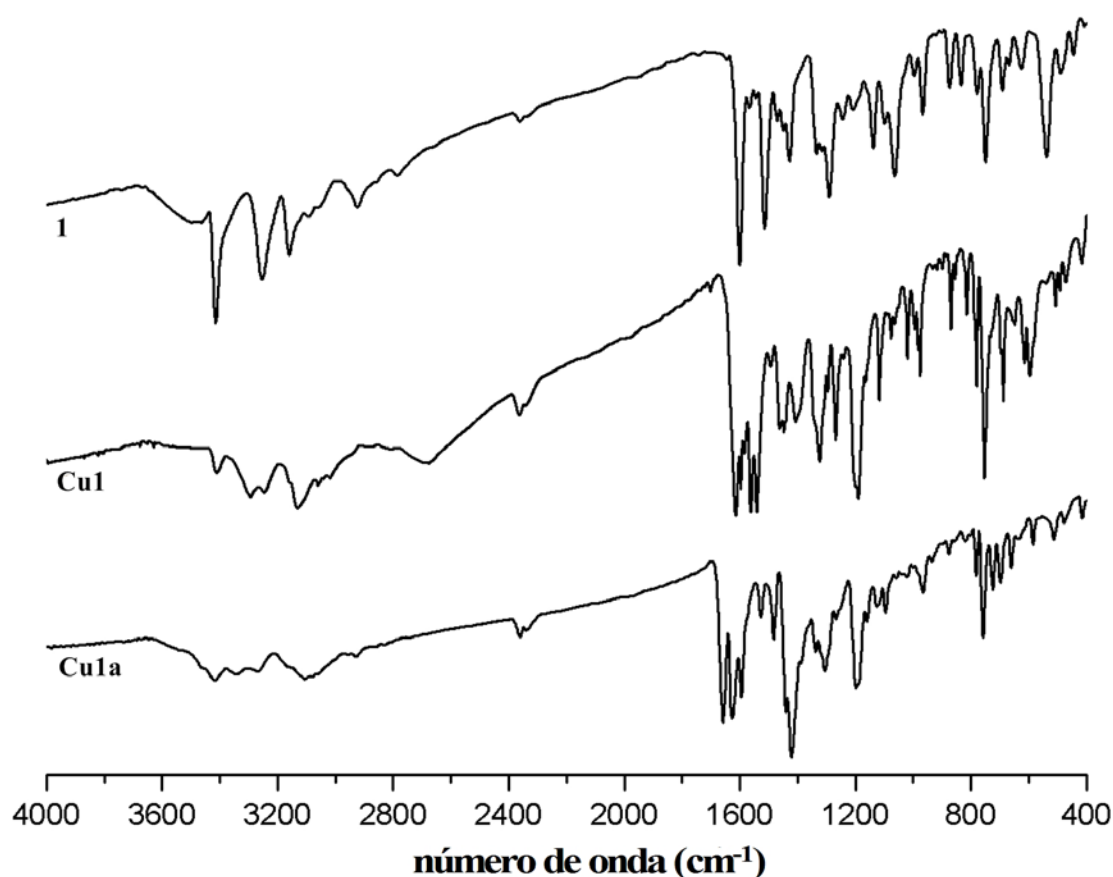


Figura 3.19 – Espectros na região do infravermelho de HPyCTPh (**1**), $[\text{Cu}(\text{HPyCTPh})\text{Cl}_2]$ (**Cu1**) e $[\text{Cu}(\text{PyCTPh})\text{Cl}] \cdot \text{DMF}$ (**Cu1a**) (KBr).

Novas absorções foram observadas nos espectros dos complexos em $471\text{-}497\text{ cm}^{-1}$ e $340\text{-}353\text{ cm}^{-1}$ referentes aos estiramentos $\nu(\text{Cu-N}_{\text{imínico}})$ e $\nu(\text{Cu-S})$, Além de duas novas bandas na região de $304\text{-}329\text{ cm}^{-1}$ atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{Cu-Cl})$ dos dois cloretos em *cis*.¹³ Esses dados reafirmam a coordenação através dos átomos do nitrogênio imínico, enxofre e cloro.

³⁸ D. Kovala-Demertzia, M.A. Demertzia, J.R. Millera, C. Papadopouloub, C. Dodorou, G. Filousis, J. Inorg. Biochem. 86 (2001) 555.

Com base nos dados de microanálises, medidas de condutimetria e nos espectros de infravermelho podemos propor, então que **Cu1-Cu4** teriam a estrutura mostrada na Figura 3.20.

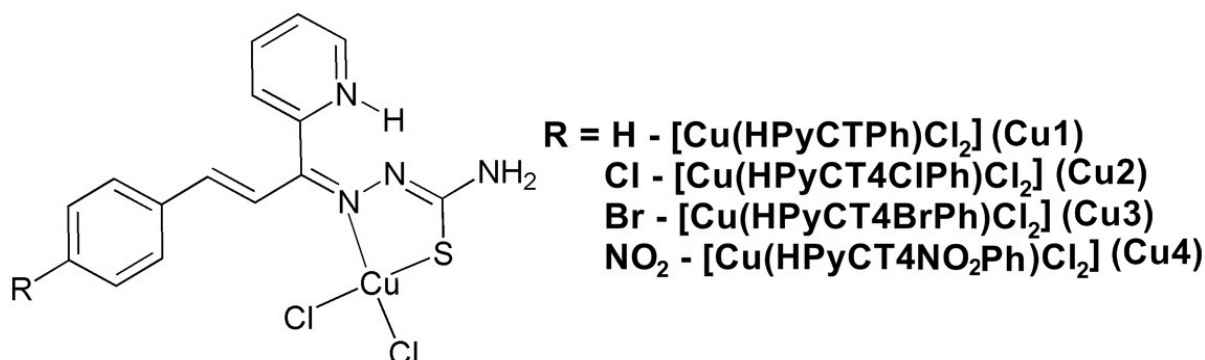


Figura 3.20 – Estrutura proposta para os complexos de Cu(II) (**Cu1-Cu4**) com tiossemicarbazonas derivadas de chalconas obtidas neste trabalho.

Para **Cu1a**, nenhuma banda foi observada na região de 2400 a 2900 cm⁻¹ (Figura 3.19), indicando a ausência do íon piridínio. Além disso, foram observadas novas absorções em 1658, 1442 e 1306 cm⁻¹ atribuídas aos modos $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ e $\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, respectivamente, referentes à presença da molécula de DMF. Desse modo **Cu1** e **Cu1a** teriam estruturas diferentes.

Espectros de RPE

Os espectros de RPE de **Cu1-Cu4** no estado sólido e em soluções congeladas de DMSO (2mM) a 77 K estão apresentados na Figura 3.21. No caso de **Cu1a**, seu espectro não pode ser obtido devido à pequena quantidade de amostra obtida durante a cristalização.

No estado sólido, os espectros apresentam simetria axial, um comportamento característico de complexos mononucleares de Cu(II) de geometria quadrática. Os valores de g_{\parallel} e g_{\perp} (2,19 e 2,06, respectivamente) são característicos de complexos desse tipo.³⁹ Complexos de Cu(II) de estado fundamental $d_{x^2-y^2}$, geralmente exibem quatro linhas referentes ao desdobramento hiperfino na região de g_{\parallel} , em razão da interação com o momento magnético nuclear do Cu(II) ($I = 3/2$). No entanto, como as amostras são concentradas no sólido, interações podem ocorrer levando à diminuição ou até mesmo a ausência desta linha.^{40,41}

Essas informações estão em concordância com os dados de infravermelho, que sugerem a coordenação das tiossemicarbazonas ao metal ocorre através do sistema N-S com cloretos completando a esfera de coordenação. Assim, a geometria em torno do metal deve ser quadrática distorcida.

³⁹ P.R. Bontchev, B.B. Ivanova, R.P. Bontchev, D.R. Mehandjiev, Polyhedron 20 (2001) 231.

⁴⁰ B.J. Hathaway, D.E. Billing, Coord. Chem. Rev. 5 (1970) 143.

⁴¹ K.O. Ferraz, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, S.R.W. Louro, H. Beraldo, Spectrochim. Acta Part A 73 (2009) 140.

Em soluções congeladas de DMSO, os espectros são quase exclusivamente isotrópicos com $g_{\text{iso}} = 2,078$, sugerindo que interações entre Cu(II) e DMSO causam mudanças na simetria local. Contudo, outras informações não podem ser inferidas destes dados.

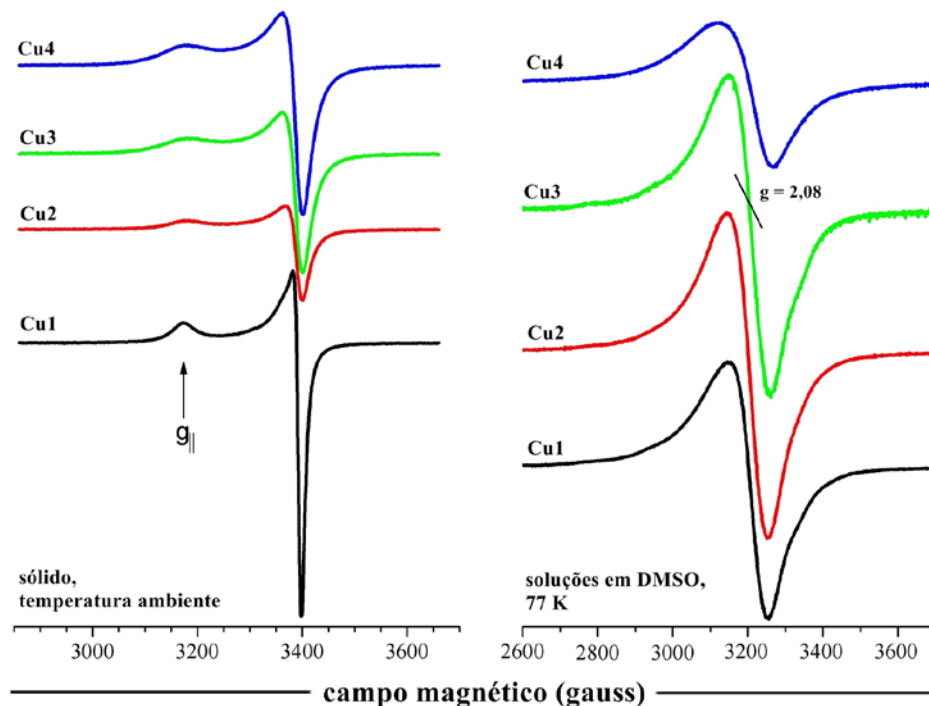


Figura 3.21 – Espectros de ressonância paramagnética eletrônica de [Cu(HPyCTPh)Cl₂] (**Cu1**), [Cu(HPyCT4ClPh)Cl₂] (**Cu2**), [Cu(HPyCT4BrPh)Cl₂] (**Cu3**) e [Cu(HPyCT4NO₂Ph)Cl₂] (**Cu4**) no estado sólido e em soluções congeladas em DMSO (2 mM) a 77 K.

3.2 Resultados biológicos

Nesta parte do trabalho serão apresentados resultados obtidos para a avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica das chalconas, tiossemicarbazonas e seus complexos metálicos.

3.2.1 Resultados biológicos para os complexos Zn1-Zn4, Ga1-Ga4 e Fe1-Fe4

Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das chalconas, tiossemicarbazonas e seus complexos de Ga(III), Fe(III) e Zn(II) foi avaliada contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 10231. Os valores de CIM obtidos para os compostos estão listados na Tabela 3.16, juntamente com os valores determinados para os compostos precursores (sais e tiossemicarbazida) e para os fármacos controle (cloridrato de tetraciclina e fluconazol).

Tabela 3.16 – Concentração inibitória mínima (CIM) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 10231 das chalconas, tiossemicarbazonas, de seus complexos de Ga(III), Zn(II) e Fe(III) e sais utilizados. Os fármacos de referência utilizados no teste foram o cloridrato de tetraciclina e o fluconazol.

Composto	CIM (μM)		
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
PyCPh	30,3	>145	31,1
Py4ClPh	8,13	>119	18,9
PyC4BrPh	6,19	>87,6	18,9
PyC4NO ₂ Ph	6,19	>100	12,8
HPyCTPh (1)	21,3	>84,1	11,3
HPyCT4ClPh (2)	9,96	>88,4	8,76
HPyCT4BrPh (3)	2,21	>68,5	19,6
HPyCT4NO ₂ Ph (4)	>74,1	>79,4	>157
[Ga(PyCTPh) ₂]NO ₃ (Ga1)	4,46	17,8	16,8
[Ga(PyCT4ClPh) ₂]NO ₃ (Ga2)	1,81	16,1	13,4
[Ga(PyCT4BrPh) ₂]NO ₃ (Ga3)	0,96	28,9	14,4
[Ga(PyCT4NO ₂ Ph) ₂]NO ₃ (Ga4)	15,6	29,7	15,2
[Fe(PyCTPh) ₂]NO ₃ (Fe1)	9,50	>76,2	17,9
[Fe(PyCT4ClPh) ₂]NO ₃ (Fe2)	8,30	>78,5	33,7
[Fe(PyCT4BrPh) ₂]NO ₃ (Fe3)	4,85	>72,2	37,8
[Fe(PyCT4NO ₂ Ph) ₂]NO ₃ (Fe4)	8,17	>65,9	37,4
[Zn(PyCTPh) ₂] (Zn1)	5,07	>88,8	22,6
[Zn(PyCT4ClPh) ₂] (Zn2)	4,74	>83,8	19,2
[Zn(PyCT4BrPh) ₂] (Zn3)	2,21	>60,5	>67,8
[Zn(PyCT4NO ₂ Ph) ₂] (Zn4)	36,4	>74,5	>68,6
Tiossemicarbazida	565	>4916	1742
Ga(NO ₃) ₃ ·XH ₂ O	1802	997	>929
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	>9753	>1225	>767
ZnCl ₂	>1067	>2347	467
Cloridrato de tetraciclina	0,37	7,31	–
Fluconazol	–	–	12,9

Nestes experimentos alguns compostos, não tiveram seus valores de CIM determinados em razão de sua baixa solubilidade no meio de cultura.

Dentre os microrganismos testados, os compostos revelaram-se mais ativos contra a bactéria gram-positiva *S. aureus*. A atividade das chalconas segue a ordem PyCPh < PyC4ClPh < PyC4BrPh ~ PyC4NO₂Ph contra *S. aureus* e a ordem PyCPh < PyC4ClPh ~ PyC4BrPh < PyC4NO₂Ph contra *C. albicans*, indicando que a presença dos substituintes halogenados e do

grupo nitro na posição *para* da porção oriunda da chalcona provavelmente levou a um aumento da atividade.

Com exceção de **4**, todas as outras tiossemicarbazonas foram mais ativas que as chalconas de partida contra *S. aureus* e *C. albicans*. A atividade antimicrobiana das tiossemicarbazonas segue a ordem **1** < **2** < **3** contra *S. aureus* e a ordem **3** < **1** < **2** contra *C. albicans*. O derivado nitro (**4**) provou ser inativo contra ambos os microrganismos nas condições estudadas.

Com relação à estratégia de coordenação a metais visando o aumento da atividade, os complexos que apresentam este efeito foram os de Zn(II), sendo que estes foram na maioria dos casos mais ativos que as tiossemicarbazonas contra *S. aureus*, e os de Ga(III), que foram mais ativos que as tiossemicarbazonas contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e, em alguns casos, contra *C. albicans*. Todos os complexos foram melhores que seus respectivos sais de partida.

Um dos objetivos da preparação desses compostos foi obtermos informações sobre o mecanismo da atividade dos complexos de Ga(III). Como sugerido por nosso grupo,²⁶ o mecanismo da atividade antibacteriana e antifúngica dos complexos de Ga(III) provavelmente envolve perturbação do metabolismo de Fe(III), uma vez que Fe(III) e Ga(III) apresentam razões carga/raio muito similares. Já que, ao contrário de Fe(III), Ga(III) não se reduz em meios biológicos, a substituição de Fe(III) por Ga(III) provoca uma interferência no metabolismo de ferro, o qual é uma fonte de vulnerabilidade para microrganismos.

Contudo, os complexos de Fe(III) e os complexos de Zn(II) que apresentam uma mesma geometria e estequiometria que os de Ga(III) também mostraram significativa atividade antimicrobiana, o que nos leva a crer que esta atividade deve estar associada ao complexo como uma entidade.

No entanto, apenas os complexos de Ga(III) foram ativos contra *P. aeruginosa* na faixa de concentração estudada. Podemos então sugerir que o mecanismo envolvendo a perturbação do metabolismo de Fe(III) deve ter uma importância maior nesta situação que nas outras.

Atividade citotóxica

Estudos preliminares do efeito citotóxico das chalconas, tiossemicarbazonas e complexos de Ga(III) na concentração de 10 µM foram realizados contra as linhagens de células de tumor sólido HCT-116 (carcinoma colorretal) e MCF-7 (carcinoma mamário), e contra leucemias HL-60 (leucemia mieloide) e Jurkat (leucemia linfóide). Os efeitos desses compostos sobre a proliferação celular nas diferentes linhagens são apresentados na Figura 3.22.

As chalconas foram os compostos menos ativos nas quatro linhagens testadas. Com exceção da linhagem de MCF-7, as tiossemicarbazonas, em geral, foram mais ativas que as chalconas de partida.

Os melhores resultados para tiossemicarbazonas e seus complexos de Ga(III) foram obtidos contra as linhagens de HCT-116 e HL-60. Para HCT-116, os compostos **1**, **Ga1**, **2**, **Ga2**, **3** e **Ga3** foram mais ativos que a cisplatina utilizada como controle. Para HL-60, as tiossemicarbazonas e os complexos de Ga(III) inibiram de forma similar ao cisplatina o crescimento dessa linhagem celular.

Os resultados obtidos sugerem que as tiossemicarbazonas e seus complexos de Ga(III) apresentam atividade citotóxica, o que nos motivou a determinarmos o valor da concentração para inibir 50% da proliferação celular (CI_{50}) da linhagem de células HL-60. Estes dados encontram-se relacionados na Tabela 3.17.

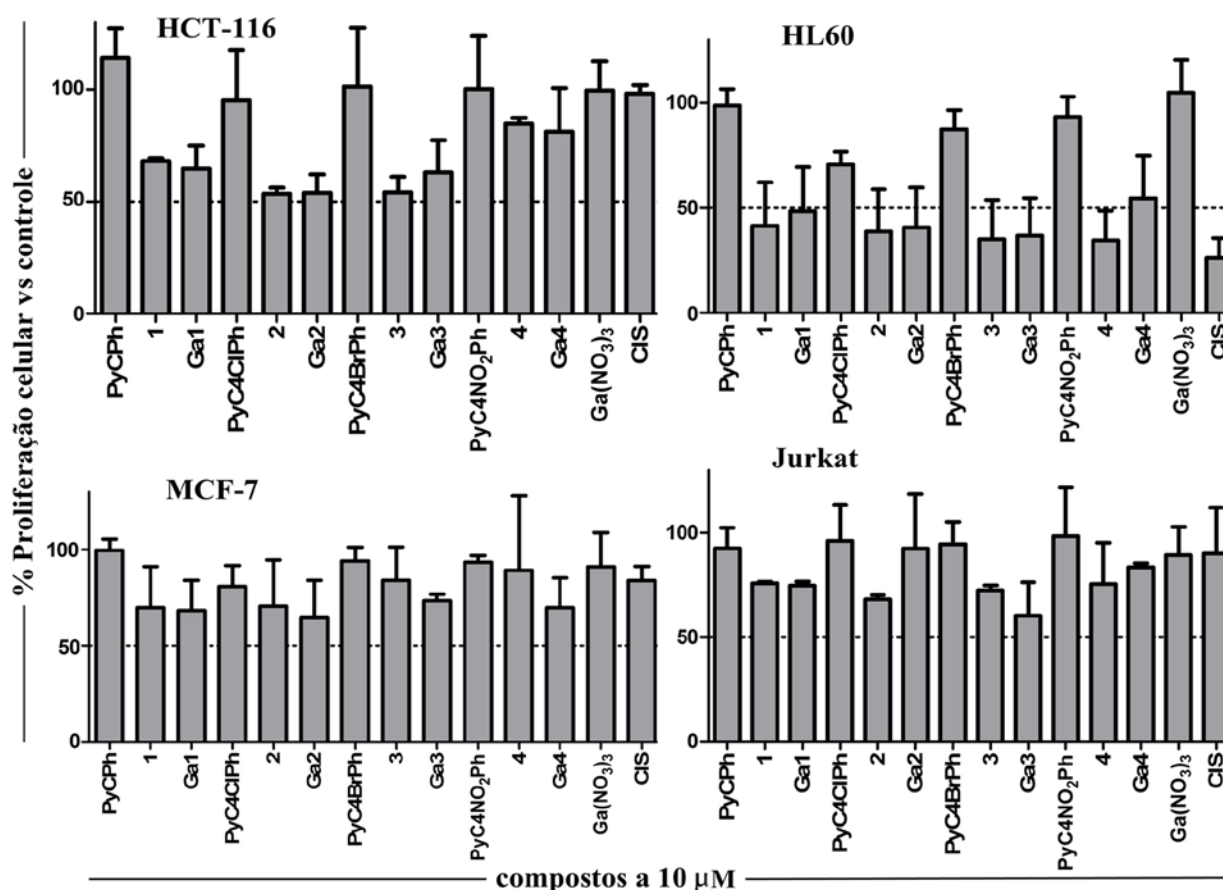


Figura 3.22 – Efeito citotóxico de chalconas, tiossemicarbazonas (**1-4**) e seus complexos de Ga(III) (**Ga1-Ga4**) e cisplatina contra linhagens de células HCT-116, MCF-7, HL-60 e Jurkat. As células foram tratadas com os compostos (10 µM) por 48 h e a proliferação celular foi medida pelo ensaio de MTT. Dados são expressos como média ± desvio padrão em comparação com o controle (células tratadas com DMSO, 0,1%) de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Tabela 3.17 – Efeito citotóxico (CI₅₀) das tiossemicarbazonas (**1-4**), dos complexos de Ga(III) (**Ga1-Ga4**) e cisplatina contra leucemia mieloide (HL-60).

composto	CI ₅₀ (μM) (intervalo de confiança a 95 %)	Composto	CI ₅₀ (μM) (intervalo de confiança a 95 %)
HPyCTPh (1)	>100	[Ga(PyCTPh)Cl ₂] (Ga1)	0,0716 (0,0522 a 0,0983)
HPyCT4CIPh (2)	0,278 (0,066 a 1,180)	[Ga(PyCT4CIPh)Cl ₂] (Ga2)	0,00348 (0,00025 a 0,04868)
HPyCT4BrPh (3)	1,01 (0,03 a 35,19)	[Ga(PyCT4BrPh)Cl ₂] (Ga3)	0,00390 (0,0011 a 0,0150)
HPyCT4NO ₂ Ph (4)	0,438 (0,175 a 1,087)	[Ga(PyCT4NO ₂ Ph)Cl ₂] (Ga4)	0,134 (0,087 a 0,208)
cisplatina	5,73 (2,29 a 14,27)		

Exceto para **1**, todos os compostos apresentaram valores de CI₅₀ inferiores ao da cisplatina. Além disso, os complexos de Ga(III) apresentaram valores de CI₅₀ menores que as tiossemicarbazonas livres, indicando que nesta situação a estratégia da coordenação ao Ga(III) levou a um aumento da atividade citotóxica destes compostos.

Estes resultados sugerem que tanto tiossemicarbazonas quanto seus complexos de Ga(III) são potenciais agentes citotóxicos, o que justificaria a continuidade do estudo de tiossemicarbazonas derivadas de chalconas e seus complexos de Ga(III) visando o desenvolvimento de novos protótipos a fármacos antitumorais.

3.2.2 Resultados biológicos dos complexos Cu1-Cu4

3.2.2.1 Atividade antimicrobiana

As atividades antimicrobianas de complexos de Cu(II) com tiossemicarbazona derivadas de chalconas foram testadas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 10231. Os valores de CIM estão listados na Tabela 3.18, juntamente com os valores para os fármacos de controle (cloridrato de tetraciclina e fluconazol).

Nestes experimentos, todos os complexos de Cu(II) foram tão ou mais ativos que as tiossemicarbazonas de partida. Além disso, cinco deles foram mais ativos que os fármacos usados como controle. Dentre os microrganismos testados, os complexos demonstraram serem mais ativos contra *C. albicans* do que contra as cepas de bactérias testadas, sendo **Cu3** aquele que apresentou maior atividade contra os diferentes microrganismos e **Cu4** o que apresentou a menor atividade.

Tabela 3.18 – Concentração inibitória mínima (CIM) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 10231 dos complexos de Cu(II) com tiossemicarbazonas derivadas de chalconas e dos fármacos controle (cloridrato de tetraciclina e o fluconazol).

Composto	CIM (µM)		
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
HPyCTPh (1)*	21,3	>84,1	11,3
HPyCT4CIPh (2)*	9,96	>88,4	8,76
HPyCT4BrPh (3)*	2,21	>68,5	19,6
HPyCT4NO ₂ Ph (4)*	>74,1	>79,4	>157
[Cu(HPyCTPh)Cl ₂] (Cu1)	7,50	14,9	3,79
[Cu(HPyCT4CIPh)Cl ₂] (Cu2)	7,00	6,86	1,73
[Cu(HPyCT4BrPh)Cl ₂] (Cu3)	3,25	3,22	0,79
[Cu(HPyCT4NO ₂ Ph)Cl ₂] (Cu4)	26,6	27,4	13,8
Cloridrato de tetraciclina	3,18	13,3	–
Fluconazol	–	–	13,8

* Dados da Tabela 3.16.

A atividade dos complexos contra *C. albicans* e *P. aeruginosa* segue a ordem **Cu4 < Cu1 < Cu2 < Cu3**, indicando que a presença dos substituintes cloro e bromo na posição *para* da porção oriunda da chalcona levam a um aumento da atividade em relação ao derivado não substituído, mas a presença do grupo nitro é desfavorável.

Uma vez que neste estudo demonstramos que os complexos de Cu(II) apresentam atividade antimicrobiana, uma projeção para este trabalho seria o estudo em outros microrganismos patogênicos visando a determinação do real espectro de ação antimicrobiano desses compostos.

3.2.2.2 Atividade citotóxica

Estudos preliminares do efeito citotóxico das tiossemicarbazonas e complexos de Cu(II) a uma concentração fixa (10 µM) foram realizados contra as linhagens de células leucêmicas HL-60 (leucemia mieloide) e Jurkat (leucemia linfóide) e de tumor sólido MDA-MB 231 (carcinoma de mamário) e HCT-116 (carcinoma colorretal). Esses resultados estão apresentados na Figura 3.23.

Em geral, as tiossemicarbazonas e seus complexos foram capazes de inibir 75% ou mais da proliferação celular a 10 µM (Figura 3.23). Neste experimento, os dados obtidos contra as células Jurkat, MDA-MB 231 e HCT-116 sugerem um aumento da citotoxicidade dos compostos com a coordenação, ainda que CuCl₂ seja inativo nesta concentração.

O valor de CI_{50} dos compostos foi então determinado nas quatro linhagens anteriormente testadas (Tabela 3.19), sendo observado que vários deles apresentam considerável atividade citotóxica, em concentrações nanomolares. Com exceção das células HL-60, esses compostos foram mais ativos que a cisplatina.

As células HL-60 foram mais suscetíveis as tiossemicarbazonas livres do que as células MDA-MB 231. Contudo, em relação às tiossemicarbazonas livres, os complexos foram mais ativos nas células MDA-MB 231 do que nas células HL-60. De fato, exceto por **Cu4**, não foram observadas diferenças entre as atividades de tiossemicarbazonas e seus respectivos complexos na linhagem celular HL-60. Em relação às linhagens celulares Jurkat e HCT-116 apenas os complexos tiveram seus valores de CI_{50} determinados.

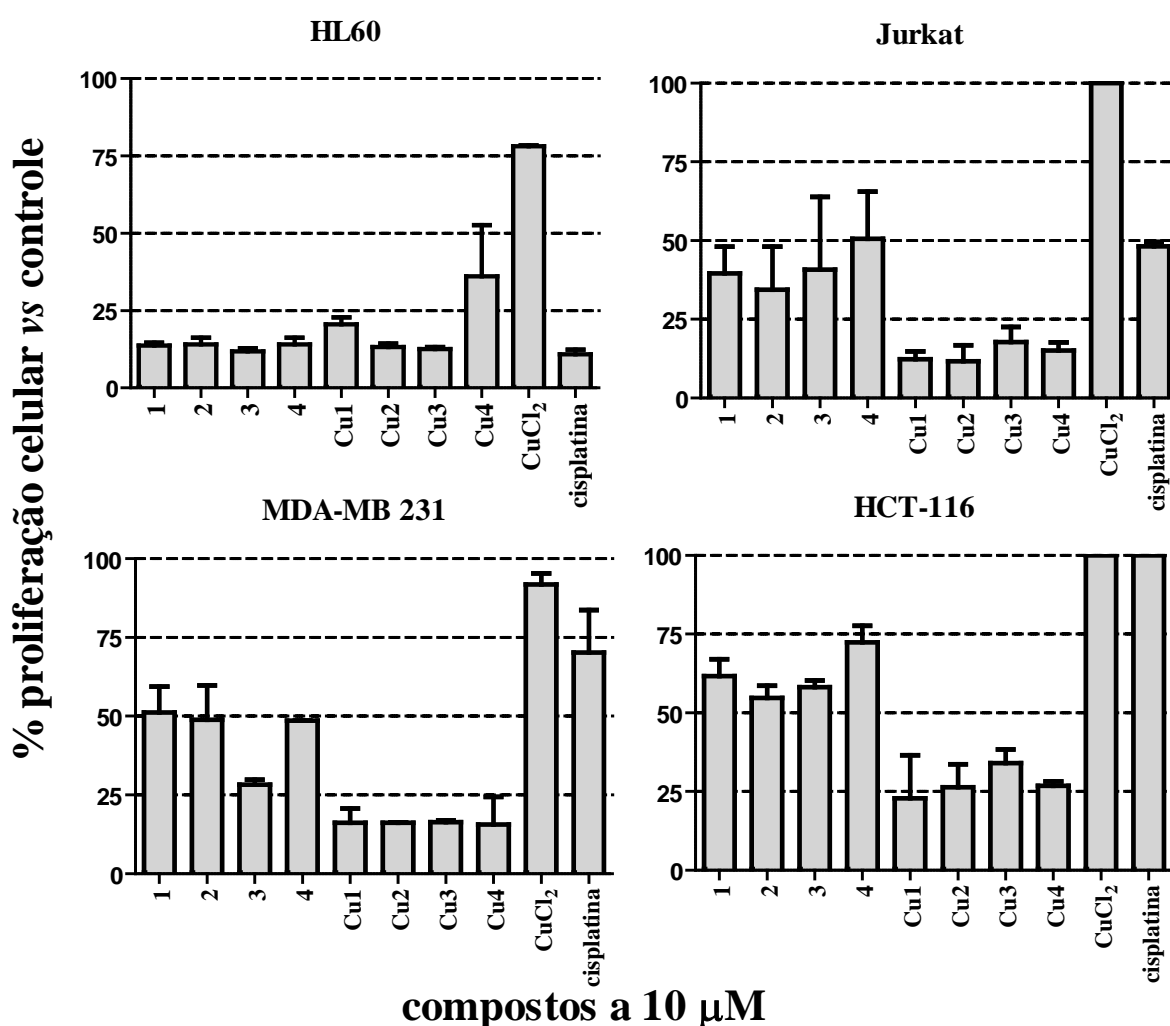


Figura 3.23 – Efeito citotóxico de tiossemicarbazonas (1-4) e seus complexos de Cu(II) (**Cu1-Cu4**) e cisplatina contra linhagens de células HCT-116, MDA-MB 231, HL-60 e Jurkat. As células foram tratadas com os compostos (10 μM) por 48 h e a proliferação celular foi medida pelo ensaio de MTT. Dados são expressos como média ± desvio padrão em comparação com o controle (células tratadas com DMSO, 0,5%) de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Em relação aos complexos, **Cu4** foi o que apresentou o maior valor de CI_{50} contra as linhagens testadas. Este composto também apresentou a menor atividade antimicrobiana. Isto sugere que a preparação do derivado nitro não foi uma boa estratégia para o aumento da atividade antimicrobiana e citotóxica destes compostos.

Tabela 3.19 – Efeito citotóxico (CI_{50}) das tiossemicarbazonas (**1-4**), dos complexos de Cu(II) (**Cu1-Cu4**) e cisplatina contra linhagens celulares HCT-116, MDA-MB 231, HL-60 e Jurkat.

composto	CI_{50} (μ M) (intervalo de confiança a 95 %)			
	HL-60	Jurkat	MDA-MB 231	HCT-116
1	0,0190 (0,0610-0,0064)	ND*	2,97 (10,61-0,84)	ND
Cu1	0,160 (0,644-0,039)	0,620 (1,871-0,203)	0,180 (1,148-0,029)	0,0610(1,5600-0,0024)
2	0,0650 (0,2831-0,0151)	ND	1,48 (3,91-0,55)	ND
Cu2	0,0360 (0,1559-0,0082)	0,290 (2,387-0,039)	0,120 (0,245-0,061)	0,0480 (0,2615-0,0087)
3	0,0380 (0,1559-0,0981)	ND	0,630 (1,688-0,237)	ND
Cu3	0,0200 (0,0646-0,0069)	1,21(3,68-0,41)	0,180 (0,404-0,081)	0,170 (1,335-0,022)
4	0,420 (0,945-0,040)	ND	5,82 (19,17-1,75)	ND
Cu4	5,49 (22,73-1,94)	0,880(1,198-0,652)	2,82 (17,03-0,47)	1,12 (11,17-0,12)
CuCl₂	>100	>100	>100	>100
cisplatina	0,0650 (0,1209-0,0350)	17,4 (34,6-8,9)	75,45 (166,00-34,28)	>100

* Não foi possível obter um perfil sigmoide necessário para determinar a valor de CI_{50} devido à baixa precipitação em concentrações maiores que 50 μ M nas condições do ensaio.

As diferenças observadas quanto à atividade citotóxica entre os vários tipos de célula estudados geralmente estão associadas à morfologia e constituição das células, bem como pela diferença no nível de expressão de proteínas pró-apoptóticas. Deste modo, interessou-nos avaliar a relação entre a inibição de proliferação celular e a indução de morte por apoptose quando as células usadas neste estudo são tratadas com as tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II). O conteúdo de ADN subdiploide foi detectado como indicativo da fragmentação do ADN durante a morte celular pelo mecanismo de apoptose. Na Figura 3.24 estão apresentados os resultados obtidos para os compostos na concentração de 10 μ M. A cisplatina foi usada como controle positivo por induzir morte por apoptose em várias linhagens celulares, mas neste experimento isso só foi observado para as células HL-60.

Nas células HL-60, as tiossemicarbazonas e **Cu4** induziram consideravelmente a fragmentação de ADN sugerindo que eles apresentam atividade pró-apoptótica. Nas células Jurkat somente **Cu4** induziu o aparecimento de ADN subdiploide próximo de 50 %, sugerindo que este complexo induz a morte dessas células por apoptose.

Nas células MDA-MB 231 e HCT-116, enquanto as tiossemicarbazonas não induziram significativa fragmentação do ADN, todos os complexos de Cu(II) induziram mais de 75% de conteúdo de ADN subdiploide, indicando que nessas linhagens de tumores sólido os complexos induzem a morte por apoptose. No entanto, as tiossemicarbazonas exibiram um baixo conteúdo

de ADN subdiploide, o que sugere que seu mecanismo de ação é diferente daquele dos complexos de Cu(II).

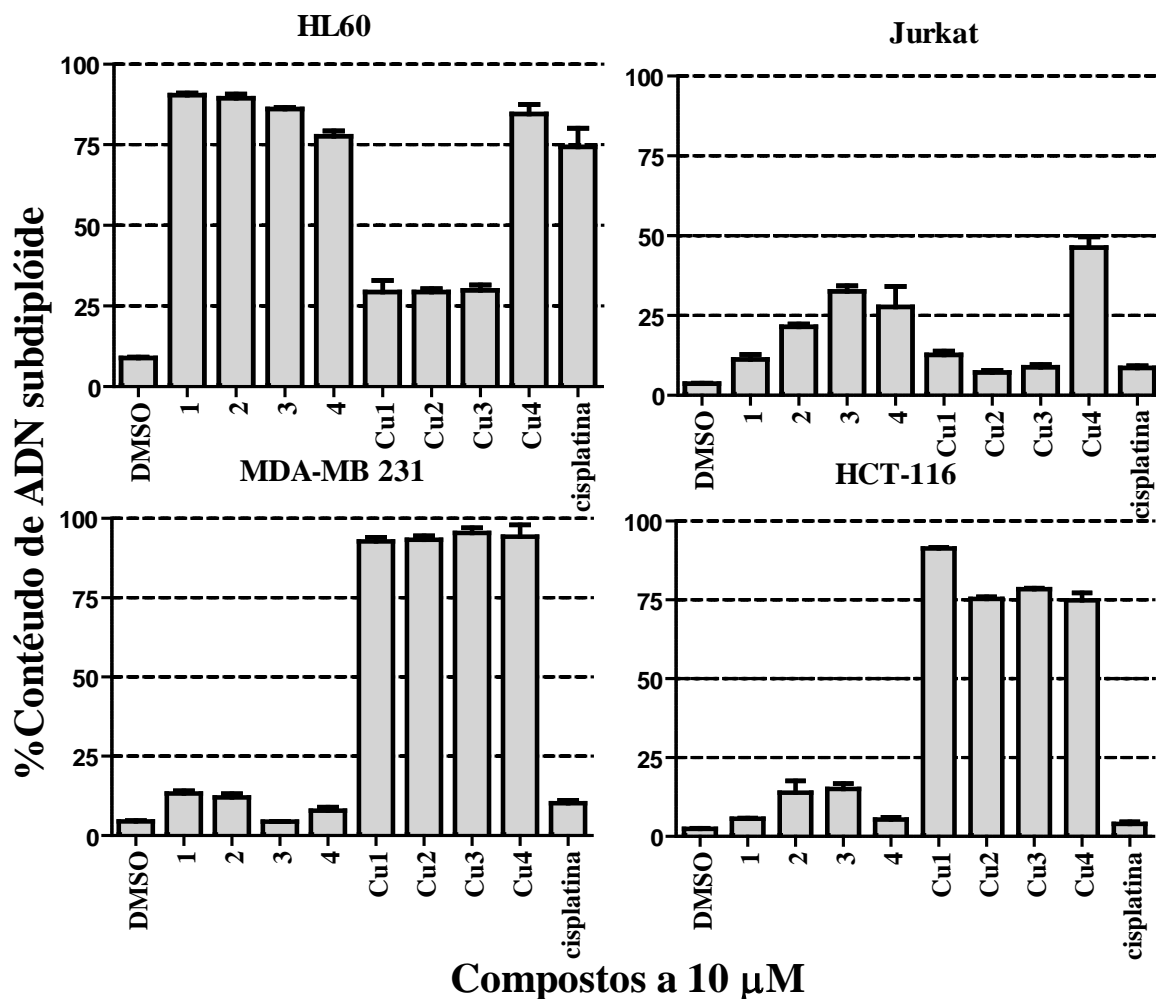


Figura 3.24 – Conteúdo de ADN subdiploide induzido pelas tiossemicarbazonas (1-4) e seus complexos de Cu(II) (Cu1–Cu4) em células HL-60, Jurkat, MDA-MB 231 e HCT-116.

Esses resultados claramente demonstram que existe uma diferença entre o comportamento observado para as linhagens de células leucêmicas e de tumores sólidos quando tratadas com tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II).

Uma vez que o sistema imune é alvo para muitos compostos, incluindo contaminantes ambientais e fármacos com potencial efeito adversos a saúde,⁴² neste trabalho foi investigada a capacidade de tiossemicarbazonas e dos complexos de Cu(II) em inibir a proliferação de células mononucleares do sangue periférico humano estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) (Tabela 3.20). A concentração usada no teste foi igual àquela em que o composto apresentou menor valor de CI₅₀ quando testado nas linhagens de HL-60, Jurkat, MDA-MB 231 e HCT-116.

⁴² M. Carfi', A. Gennari, I. Malerba, E. Corsini, M. Pallardy, R. Pieters, H. Van Loveren, H.W. Vohr, T. Hartung, L. Gribaldo, Toxicology 229 (2007) 11.

Tabela 3.20 – Inibição da proliferação de células PBMC de tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II) (**1-4**) na concentração igual ao menor valor de CI_{50} obtido no teste contra as linhagens HL-60, Jurkat, MDA-MB 231 e HCT-116.

Composto	Concentração (μ M)	% Inibição da proliferação de células PBMC vs controle
1	0,02	52,8 \pm 3,4
Cu1	0,1	53,6 \pm 4,4
2	0,06	46,8 \pm 7,9
Cu2	0,03	47,7 \pm 3,6
3	0,03	21,7 \pm 7,4
Cu3	0,02	43,3 \pm 6,3
4	0,4	16,9 \pm 6,1
Cu4	0,8	52,6 \pm 6,3
cisplatina	0,06	37,0 \pm 1,2

Em geral, todos os compostos apresentaram efeito citotóxico contra as células PBMC estimuladas por PHA, sendo **3** e **4** aqueles com menor citotoxicidade na concentração testada. No entanto, a cisplatina também promove uma considerável inibição da proliferação de células PBMC na concentração testada.

Neste contexto, com relação à atividade citotóxica desses compostos podemos concluir que apesar de alguns complexos terem sido mais ativos que suas respectivas tiossemicarbazonas livres, de um modo geral, todos apresentam potencial para causar danos ao sistema imune.

3.2.2.3 Estudo de interação dos complexos com albumina sérica humana (ASB) e ácido desoxirribonucleico (ADN)

Nestes experimentos, a capacidade dos complexos em interagir com ASB e ADN foi avaliada a partir de titulações espectrofotométricas e espectrofluorimétricas entre complexos e ASB e ADN.

Durante o estudo da estabilidade dos complexos em uma solução 5% DMF/tampão [tampão Tris-HCl (pH 7,20) e tampão fostafo (pH 7,20)] foi observado que **Cu4** rapidamente precipita nesta solução. No entanto, isto não ocorreu nos complexos **Cu1-Cu3** não sendo observada qualquer alteração nos espectros eletrônicos nesta solução durante 1 hora.

Deste modo, nos experimentos descritos abaixo somente os complexos **Cu1**, **Cu2** e **Cu3** puderam ser estudados.

3.2.2.3.1 Interação com albumina sérica humana (ASB)

A albumina sérica bovina (ASB) é extensamente utilizada em estudos de interação de albuminas com compostos, graças à sua semelhança estrutural com a albumina sérica humana

(ASH) e o seu baixo custo. O estudo das interações entre ASB e os complexos de Cu(II) (**Cu1-Cu3**) foi realizado através de titulações espectrofluorimétricas.

A fluorescência intrínseca da ASB é devida aos resíduos de triptofano, tirosina e fenilalanina.⁴³ A supressão da fluorescência de ASB foi usada para investigar a sua interação com os complexos de Cu(II).

A Figura 3.25 apresenta o efeito do aumento da concentração de **Cu1** sobre o espectro de emissão de ASB. Este mesmo efeito foi observado para **Cu2** e **Cu3**. A supressão da fluorescência a 345 nm sugere a formação do sistema ASB-complexo.

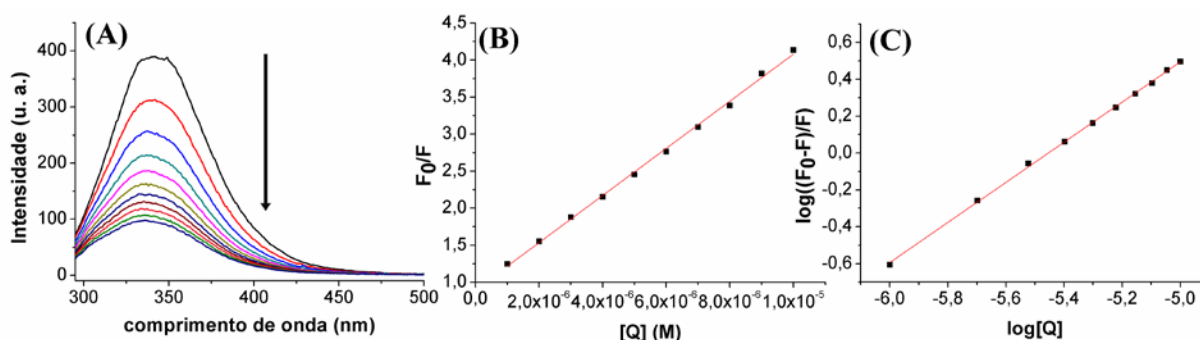


Figura 3.25 – Espectros de emissão de ASB (1,00 μM) na ausência e após adições de quantidades equimolares de **Cu1**. Condições da medida: $\lambda_{exc.} = 280$ nm; tampão fosfato pH 7,20; e $T = 298$ K. As setas indicam a modificação no máximo local de intensidade de emissão com o aumento da concentração de **Cu1**. Gráficos de F_0/F vs $[Q]$ e $\log((F_0-F)/F)$ vs $\log[Q]$ para os dados de $\lambda_{em.} = 345$ nm.

Baseado nos dados de fluorescência a 298 K, as constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) e de supressão bimolecular (k_q), descritas pela equação Stern-Volmer clássica (Equações 2.1 e 2.2, Parte Experimental, seção 2.3.3, τ_0 para ASB = 10 ns⁴⁴); bem como, as constantes de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n), descritos pela equação de Scatchard (Equação 2.4, Parte Experimental, seção 2.3.3), foram calculadas e estão apresentadas na Tabela 3.21.

Tabela 3.21 – Constante de supressão por Stern–Volmer (K_{sv}), constante de supressão bimolecular (k_q), constante de ligação (K_b), e número de sítios de ligação (n) para a interação entre os complexos de Cu(II) (**Cu1–Cu3**) e ASB.

Complexo	K_{sv} em M^{-1}	k_q em $M^{-1} s^{-1}$	K_b (M^{-1})	n
Cu1	$(3,19 \pm 0,05) \times 10^5$	$(3,19 \pm 0,05) \times 10^{13}$	$(8,70 \pm 1,03) \times 10^5$	$1,09 \pm 0,01$
Cu2	$(1,70 \pm 0,14) \times 10^6$	$(1,70 \pm 0,14) \times 10^{14}$	$(2,77 \pm 1,56) \times 10^8$	$1,46 \pm 0,07$
Cu3	$(8,37 \pm 0,28) \times 10^5$	$(8,37 \pm 0,28) \times 10^{13}$	$(4,25 \pm 1,07) \times 10^6$	$1,15 \pm 0,02$

Os valores de k_q obtidos para os sistemas ASB-complexo são maiores do que aquele observado quando o processo de supressão ocorre apenas por colisão para essa biomolécula.⁴⁴

⁴³ M. Ganeshpandian, R. Loganathan, S. Ramakrishnan, A. Riyasdeen, M.A. Akbarsha, M. Palaniandavar, Polyhedron, no prelo.

⁴⁴ N. Shahabadi, M. Mohammadpour, Spectrochim. Acta Part A 86 (2012) 191.

Isto indica que o processo de supressão não ocorreu por colisão dinâmica e sim por supressão estática, através da formação do sistema ASB-complexo.

Espectros de fluorescência no modo sincrônico foram obtidos para estudar as mudanças nos microambientes próximos aos resíduos de aminoácidos tirosina e triptofano na ASB. A fluorescência neste modo é característica para resíduos tirosina quando a diferença entre comprimento de onda de emissão e excitação ($\Delta\lambda$) é 15 nm, e característico para resíduos triptofano quando $\Delta\lambda = 60$ nm.

Neste experimento, para todos os complexos foi observada uma diminuição na intensidade de emissão do ASB com o aumento da concentração do complexo, como apresentado na Figura 3.26 para o sistema ASB-Cu1. Esta modificação indica que os resíduos de aminoácidos triptofano e tirosina estão em um ambiente menos hidrofóbico, ou seja, mais expostos às moléculas do solvente. Essas mudanças sugerem que a formação do sistema ASB-complexos (Cu1-Cu3) poderiam alterar a conformação da proteína.

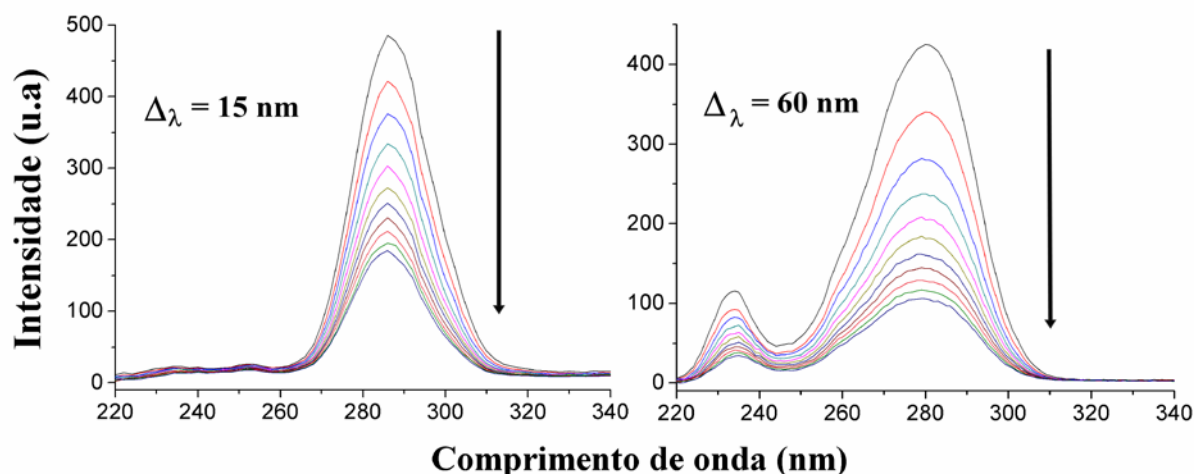


Figura 3.26 – Espectros de fluorescência no modo sincrônico de ASB (1,00 μ M) na ausência e após adições de quantidades equimolares de **Cu1**. Condições da medida: faixa de $\lambda_{exc.}$ = 200 a 400 nm; tampão fosfato pH 7,20; e temperatura = 298 K. As setas indicam a diminuição da intensidade de emissão com o aumento da concentração de **Cu1**.

Além disso, os valores de K_b obtidos sugerem uma afinidade dos complexos pela ASB. Deste modo, considerando os valores de constante de associação para muitos fármacos com ASH⁴⁵ e as similaridades entre ASB e ASH, podemos sugerir que esses complexos poderiam ser transportados por albuminas.

⁴⁵ N.A. Kratochwil, W. Huber, F.Müller, M. Kansy, P.R. Gerber, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 1355.

3.2.2.3.2 Estudo de interação dos complexos com ácido desoxirribonucleico de timo de vitelo (CT-DNA)

Estudo por meio dos dados de espectros eletrônicos

Compostos podem se ligar ao ADN tanto por ligações covalentes quanto não-covalentes, tais como intercalação, interações eletrostáticas ou interações com sulcos do ADN.

Durante a titulação espectrofotométrica, após as sucessivas adições de CT-DNA aos complexos (**Cu1-Cu3**) (Figura 3.27), as bandas dos complexos apresentaram um significativo hipocromismo acompanhado de um deslocamento do máximo de absorção para maiores comprimento de onda. Este comportamento sugere que os complexos interagem com o CT-DNA por intercalação, por apresentarem capacidade fazer interações do tipo π - π com o ADN, como no caso dos intercaladores clássicos [por exemplo, brometo de etídio (BE)].

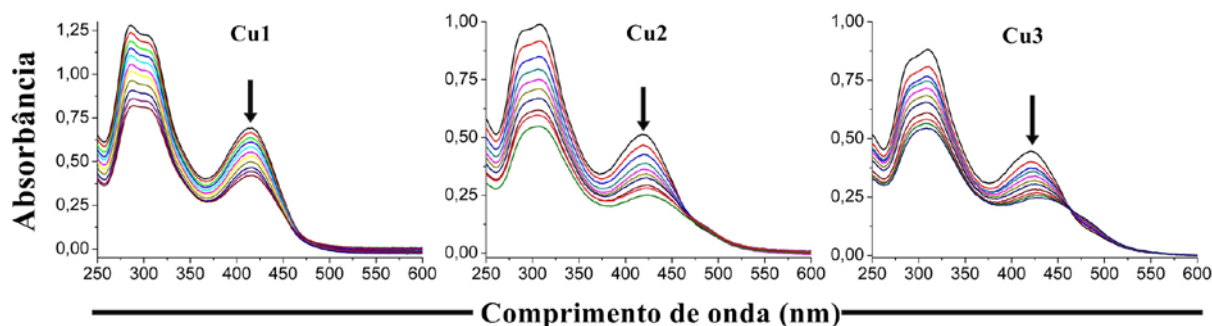


Figura 3.27 – Espectros eletrônicos de **Cu1** (54,5 μM), **Cu2** (46,1 μM) e **Cu3** (42,0 μM) na ausência e na presença de quantidades crescentes de CT-DNA em 10 diferentes relações molares complexo:CT-DNA variando de 1:1 a 1:10. As setas apresentam as mudanças no máximo de absorbância com o aumento da concentração do CT-DNA na solução.

A fim de avaliarmos quantitativamente a força da ligação entre **Cu1-Cu3** e CT-DNA, as constantes de ligação intrínseca (K_B) de **Cu1-Cu3** com CT-DNA foram obtidas usando a Equação 2.5 (Parte Experimental, seção 2.3.4.1). Os valores determinados de K_B foram $(2,52 \pm 0,21) \times 10^3$ (para **Cu1-CT-DNA**), $(1,61 \pm 0,22) \times 10^4$ (para **Cu2-CT-DNA**) e $(2,74 \pm 0,47) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (para **Cu3-CT-DNA**), indicando que a ordem de afinidade de ligação é **Cu2** > **Cu3** > **Cu1**. Contudo, os valores de K_B dos complexos são menores que o observado para a interação CT-DNA com o BE [$K_B = (1,23 \pm 0,07) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$].⁴⁶

⁴⁶ F. Dimiza, F. Perdih, V. Tangoulis, I. Turel, D.P. Kessissoglou, G. Psomas, J. Inorg. Biochem. 105 (2011) 476.

Ligação competitiva entre complexos de Cu(II) e o sistema brometo de etídio-CT-DNA (BE-CT-DNA)

Um experimento de ligação competitiva foi usado para realçar a força da interação entre o sistema CT-DNA-complexo de Cu(II). Este experimento baseia-se no deslocamento de BE ligado ao DNA pela interação com o complexo, ocorrendo assim uma supressão da fluorescência no espectro de emissão da solução.

Durante a titulação espectrofluorimétrica, após adições sucessivas dos complexos (**Cu1-Cu3**), foi observado um decréscimo na intensidade de fluorescência acompanhado de um pequeno deslocamento do máximo de absorbância local para menores energias, como apresentado na Figura 3.28 para **Cu2**. Isto indica que realmente ocorre o deslocamento do BE pelo complexo de Cu(II) nesses experimentos. Os dados foram ajustados às equações de Stern-Volmer (Equação 2.1, Parte experimental seção 2.3.3) e Scatchard (Equação 2.4, Parte Experimental seção 2.3.3), como apresentado na Figura 3.28 para **Cu2**.

Os valores de K_{sv} , K_b e n , bem como da constante ligação aparente do complexo ao CT-DNA (K_{app}) (Equação 2.6, Parte Experimental, seção 2.3.4.2) estão apresentados na Tabela 3.22.

Esses valores sugerem que **Cu2** foi mais efetivo na supressão da fluorescência que os demais complexos, enquanto os valores de K_b refletem a interação com **Cu3** seria a mais estável. Todos estes resultados reafirmam a capacidade dos complexos em interagir com o CT-DNA.

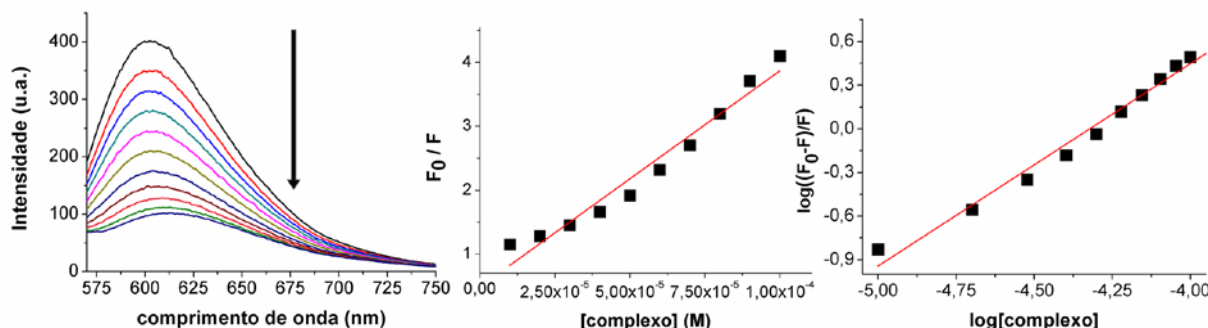


Figura 3.28 – Espectros de emissão de BE-CT-DNA (10,0 μM) antes e após a adição de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 μM de **Cu2**. Condições da medida: $\lambda_{exc.} = 545 \text{ nm}$; tampão Tris-HCl pH 7,20; e $T = 298 \text{ K}$. A seta indica o sentido da supressão de fluorescência com o aumento da concentração de **Cu2**. Gráficos de F_0/F vs [complexo] e $\log((F_0-F)/F)$ vs $\log[\text{complexo}]$ para os dados de $\lambda_{em.} = 605 \text{ nm}$.

Tabela 3.22 – Constante de supressão por Stern–Volmer (K_{sv}), constante de ligação aparente (K_{app}), constante de ligação (K_b), e número de sítios de ligação (n) para a ligação competitiva entre BE-CT-DNA e os complexos de Cu(II) (**Cu1-Cu3**).

Complex	K_{sv} em M^{-1}	K_{app} em M^{-1}	K_b (M^{-1})	n
Cu1	$(1,56 \pm 0,05) \times 10^4$	$1,36 \times 10^6$	$(9,49 \pm 0,05) \times 10^4$	$(1,21 \pm 0,04)$
Cu2	$(3,33 \pm 0,18) \times 10^4$	$2,35 \times 10^6$	$(1,03 \pm 0,43) \times 10^6$	$(1,39 \pm 0,06)$
Cu3	$(2,94 \pm 0,13) \times 10^4$	$2,31 \times 10^6$	$(1,74 \pm 0,44) \times 10^6$	$(1,44 \pm 0,03)$

3.2.2.4 Estudos de interação com ADN plasmidial superenovelado

HPyCTPh (**1**) e $[\text{Cu}(\text{HPyCTPh})\text{Cl}_2]$ (**Cu1**) foram escolhidos com modelos durante a investigação sobre o efeito desses compostos sobre a mobilidade eletroforética do ADN plasmidial pUC 19. Os resultados obtidos deste estudo encontram-se apresentados na Figura 3.29.

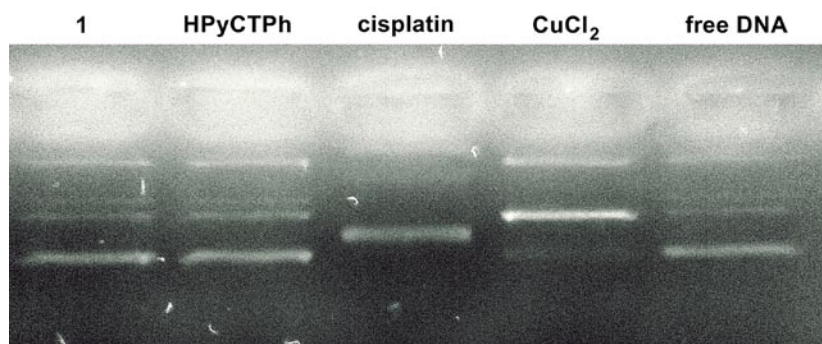


Figura 3.29 – Estudo de eletroforese em gel de agarose com o ADN plasmidial pUC 19 tratado com HPyCTPh (**1**), $[\text{Cu}(\text{HPyCTPh})\text{Cl}_2]$ (**Cu1**), cisplatina e CuCl_2 a $100 \mu\text{M}$ em tampão Tris-HCl (pH 7,20). Período de incubação 24h a 37°C .

Neste experimento, **1** e **Cu1** a $100 \mu\text{M}$ não alteraram a mobilidade eletroforética ADN plasmidial em relação ADN livre, enquanto o cisplatina e CuCl_2 promovem fortes modificações em relação ao ADN plasmidial livre.

Na cisplatina, um decréscimo na mobilidade eletroforética foi observado em todas as formas, o que deve estar associado com sua interação com ADN formando ligações cruzadas intrafitas. No caso de CuCl_2 , interações que modificam a mobilidade eletroforética do ADN também foram observadas, sugerindo a formação de adutos nesta situação.

Para **1** e **Cu1**, a ausência de modificações na mobilidade eletroforética do ADN sugere que estes compostos não formam adutos estáveis com ADN a $100 \mu\text{M}$. De fato, o mecanismo de ação citotóxica de tiossemicarbazonas livres envolve principalmente a inibição de ribonucleosídeo difosfato redutase,⁴⁷ e não a interação direta com o ADN. No caso dos complexos estes resultados sugerem que o mecanismo de sua ação citotóxica não deve envolver ligação direta do cobre à biomolécula.

⁴⁷ K.O.S. Ferraz, G.M.M. Cardoso, C.M. Bertollo, E.M. Souza-Fagundes, N. Speziali, C.L. Zani, I.C. Mendes, M.A. Gomes, H. Beraldo, Polyhedron 30 (2011) 315.

Capítulo 4

Preparação e investigação do perfil farmacológico de piridoxal diclofenaco hidrazona e seus complexos metálicos

Os anti-inflamatórios não-esteroides (AINE's) são fármacos amplamente utilizados no tratamento de dor e inflamação, e no tratamento de artrites.¹ A atividade farmacológica dos AINE's está relacionada à inibição não-seletiva de ciclo-oxigenases (COX). Os efeitos colaterais mais comuns desses fármacos são ocorrência de sangramento, ulceração ou perfuração na mucosa gástrica decorrentes da inibição da COX-1, responsável pela proteção gástrica.²

Uma maneira encontrada para se evitar os problemas gástricos oriundos da falta de seletividade dos AINE's consiste em modificações na porção ácida, tais como a formação de ésteres. Uma modificação química que nos interessou foi a reação de AINE's com hidrazina, o que leva à formação de hidrazidas. Reações desse tipo a partir do diclofenaco levaram à formação da diclofenaco hidrazida (DIH) (Figura 4.1), sendo que compostos derivados dessa hidrazida apresentaram atividade anti-inflamatória semelhante à do diclofenaco, além de promover proteção da mucosa gástrica em ratos.¹

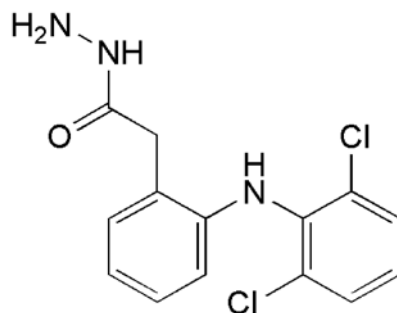


Figura 4.1 – Representação estrutural da diclofenaco hidrazida (DIH).

Outra série de compostos interessantes do ponto de vista de sua atividade antinociceptiva são os que compõem o grupo da vitamina B₆ (ver Figura 4.2).

¹ S.V. Bhandari, K.G. Bothara, M.K. Raut, A.A. Patil, A.P. Sarkate, V.J. Mokale, *Bioorg. Med. Chem* 16 (2008) 1822.

² A.G. Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall, F. Murad, *AS BASES FARMACOLÓGICAS DA TERAPÊUTICA* (ISBN 85-86804-28-2), 10a Ed. Mc Graw-Hill, 2001, p. 521.

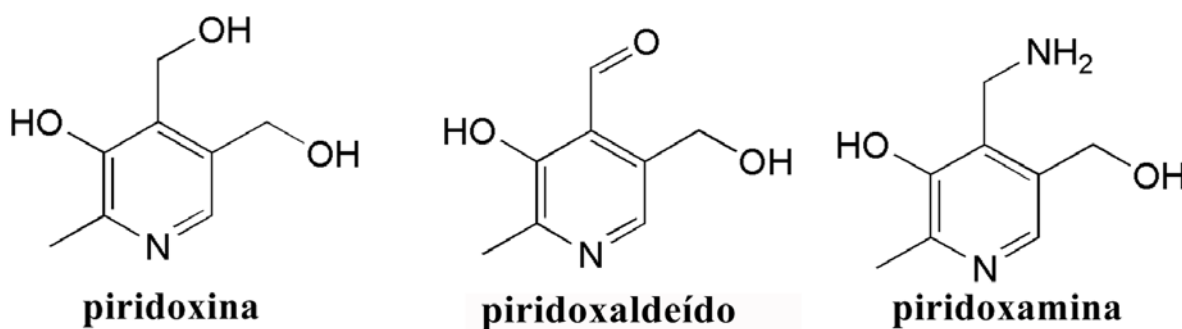


Figura 4.2 – Representações estruturais de compostos pertencentes ao grupo da vitamina B₆.

Como interações entre hidrazidas com compostos do grupo da vitamina B₆ já são conhecidas,³ e relatos na literatura demonstram a existência de um efeito sinérgico com relação à atividade antinociceptiva para associações de AINE's com vitaminas do complexo B.⁴ Interessou-nos o estudo do perfil farmacológico de piridoxal diclofenaco hidrazona (H₃PDHCl, na forma de cloridrato), uma nova hidrazona que possui uma porção oriunda do piridoxal e outra do diclofenaco.

Neste capítulo são relatados estudos de equilíbrios em solução e investigação do perfil farmacológico de piridoxal diclofenaco hidrazona e seus complexos de Cu(II) e Ga(III). Será igualmente descrito o estudo da interação de piridoxal diclofenaco hidrazona com albuminas séricas.

4.1 Caracterização dos compostos

A caracterização dos compostos foi dividida em duas partes: na primeira trataremos da caracterização da piridoxal diclofenaco hidrazona (**5**), e na segunda de seus complexos de Cu(II) e Ga(III), sendo separadas as técnicas que envolvem o uso dos compostos no estado sólido e em solução.

4.1.1 Piridoxal diclofenaco hidrazona (**5**)

4.1.1.1 Análises no estado sólido

³ A.G. Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall, F. Murad, AS BASES FARMACOLÓGICAS DA TERAPÊUTICA (ISBN 85-86804-28-2), 10a Ed. Mc Graw-Hill, 2001, p. 957.

⁴ G. Reyes-García, R. Medina-Santillán, F. Terán-Rosales, E. Mateos-García, C. Castillo-Henkel, J. Pharmacol. Toxicol. 42 (1999) 73.

Análise elementar

A análise elementar de **5** sugere a formação de uma espécie de composição $C_{22}H_{21}Cl_3N_4O_3$, onde os valores para as porcentagens de carbono, hidrogênio, nitrogênio e cloro obtidos foram 53,04, 4,16, 11,50 e 21,55 %, respectivamente (valores teóricos: %C: 53,30; %H: 4,27; %N: 11,30 e %Cl: 21,45). Desta forma, o composto deve se apresentar na forma de um cloridrato (H_3PDHCl , onde H_2PDH seria o composto na forma neutra) (Figura 4.3).

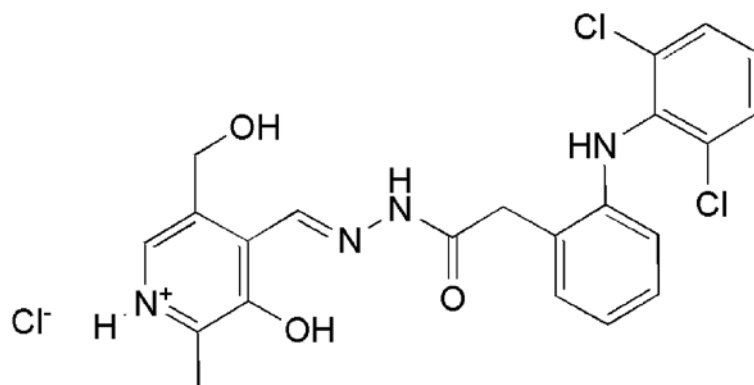


Figura 4.3 – Estrutura proposta para a piridoxal diclofenaco hidrazona, em sua forma de cloridrato [H_3PDHCl (**5**)].

Espectros de infravermelho

Na Figura 4.4 está apresentado o espectro de infravermelho de **5**. Ao compararmos esse espectro com o de DIH foi observado que o $\nu(C=O)$ em 1639 cm^{-1} para DIH desloca-se para 1697 cm^{-1} em **5**, sugerindo a formação da hidrazona.

Outra região interessante do espectro de **5** é aquela de 2300 a 3000 cm^{-1} , onde foi observada uma banda em 2717 cm^{-1} atribuída ao modo $\nu(N-H)$ do íon piridínio. Esta banda é comumente observada para aroilhidrazonas derivadas de piridoxal.⁵ A presença dessa absorção confirma o que foi proposto por meio dos dados de análise elementar, que **5** encontra-se na forma de um cloridrato.

⁵ N. J. Lees-Gayed, M.A. Abou-Taleb, I. A. El-Bitash, M.F. Iskander, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 (1992) 213.

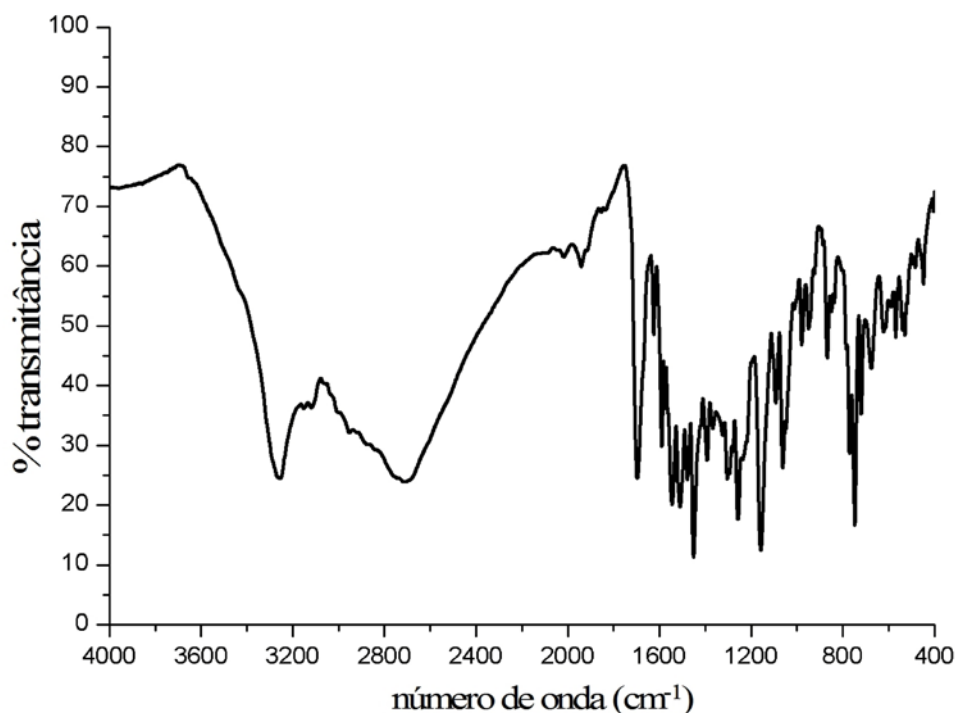


Figura 4.4 – Espectro na região do infravermelho de **5** (KBr).

*Estruturas cristalográficas de $H_3PDHCl \cdot \frac{1}{2}(CH_3)_2CO$ (**5a**) e $(H_3PDH)_2SO_4 \cdot 2CH_3OH$ (**5b**)*

Na tentativa de obtermos a estrutura cristalográfica de **5** várias misturas de solventes foram utilizadas na cristalização deste composto. Cristais aptos a serem medidos por difração de raios X de monocristal foram obtidos para dois sistemas: o primeiro (**5a**), a partir da evaporação lenta de uma solução de **5** em DMSO/acetona (1/9); e o segundo (**5b**), a partir da evaporação lenta de uma solução metanólica de **5** acidificada com H_2SO_4 .

Na Tabela 4.1 estão apresentados os dados relacionados à coleta e ao refinamento de **5a** e **5b**. Diagramas ORTEP para as moléculas de H_3PDH^+ em **5a** e **5b** estão apresentados na Figura 4.5. Distâncias de ligação e ângulos selecionados, bem como os parâmetros para as ligações de hidrogênio estão listados nas Tabelas 4.2 e 4.3, respectivamente. Na Figura 4.6 está apresentada uma projeção para o empacotamento cristalino de **5a** e **5b**.

5a cristalizou-se com sistema ortorrômbico, grupo espacial $Pccn$, apresentando uma molécula da hidrazona na forma catiônica (H_3PDH^+) e meia molécula de acetona por unidade assimétrica. **5b** cristalizou-se com sistema triclinico, grupo espacial $P\bar{1}$, com duas moléculas da hidrazona na forma protonada (H_3PDH^+), um íon sulfato e duas moléculas de metanol por unidade assimétrica.

Tabela 4.1 – Dados relacionados à coleta, resolução e refinamento de **5a** e **5b**.

Parâmetros		5a	5b
Fórmula empírica		C ₄₇ H ₄₈ Cl ₆ N ₈ O ₇	C ₄₆ H ₅₀ Cl ₄ N ₈ O ₁₂ S
Massa molar (g mol ⁻¹)		1049,63	1080,80
Sistema cristalino		Ortorrômbico	Triclínico
Grupo espacial		<i>Pccn</i>	<i>Pī</i>
Radiação; λ (Å)		Mo Kα ; 0,71073	Mo Kα ; 0,71073
Temperatura (K)		120(2)	150(2)
Parâmetros da célula unitária	a (Å)	10,5937(3)	10,6331(3)
	b (Å)	26,9338(7)	11,8842(3)
	c (Å)	17,2699(4)	21,5170(6)
	α (°)	90	87,274
	β (°)	90	85,139(2)
	γ (°)	90	67,212(2)
V (Å ³)		4927,6(2)	2497,44(12)
Z		4	2
Z'		8	2
Densidade calculada (g cm ⁻³)		1,415	1,437
F(000)		2176	1124
Coeficiente de absorção (mm ⁻¹)		0,408	0,348
Faixa de índices de Miller		-13 ≤ h ≤ 12	-13 ≤ h ≤ 13
		-33 ≤ k ≤ 33	-14 ≤ k ≤ 14
		-21 ≤ l ≤ 21	-26 ≤ l ≤ 26
Faixa de θ usada na coleta dos dados (°)		2,07 a 26,37	2,07 a 26,37
Reflexões coletadas		37786	38622
Reflexões únicas [R _{int}]		5039[0,0472]	10209[0,0416]
Completeza a θ = 26,37° (%)		100	100
Transmissão máxima e mínima		0,9720 e 0,8671	0,9594 e 0,7728
Dados; restrições; parâmetros		5039; 4 ; 312	10209 ; 6 ; 647
Índices de R final [I>2σ(I)]		R ₁ = 0,0596; wR ₂ = 0,1512	R ₁ = 0,0663; wR ₂ = 0,1891
Índices de R (para todos os dados)		R ₁ = 0,0791; wR ₂ = 0,1650	R ₁ = 0,0868; wR ₂ = 0,2092
S		1,028	1,035
Δρ _{máx.} e Δρ _{min.}		1,405 e -0,395	2,569 e -2,309

Nas moléculas de H₃PDH⁺ de **5a** e **5b** (Figura 4.5), o esqueleto da hidrazona é quase plano e os valores para as distâncias e ângulos de seus átomos são muito semelhantes (ver Tabela 4.2). Todas as moléculas adotam a conformação *ZE* em relação às ligações C7–N2 e N3–C8, respectivamente. As ligações de hidrogênio intramoleculares O1–H···N2 e N4–H···O2 estabilizam essa conformação no cristal (dados na Tabela 4.3). Esta é a mesma conformação adotada pelo cloridrato de {3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metilpiridínio-4-metileno}benzoilhidrazida monohidratado [(hmmmbH)Cl·H₂O - uma aroilhidrazona derivada de piridoxal].⁶

A presença das moléculas do solvente e a mudança do anion promovem significativas modificações no empacotamento molecular desses compostos, como observado para as ligações de hidrogênio intermoleculares apresentadas na Tabela 4.3 e Figura 4.6.

⁶ D.F. Back, M.A. Ballin, G.M. Oliveira, J. Mol. Struct. 935 (2009) 151.

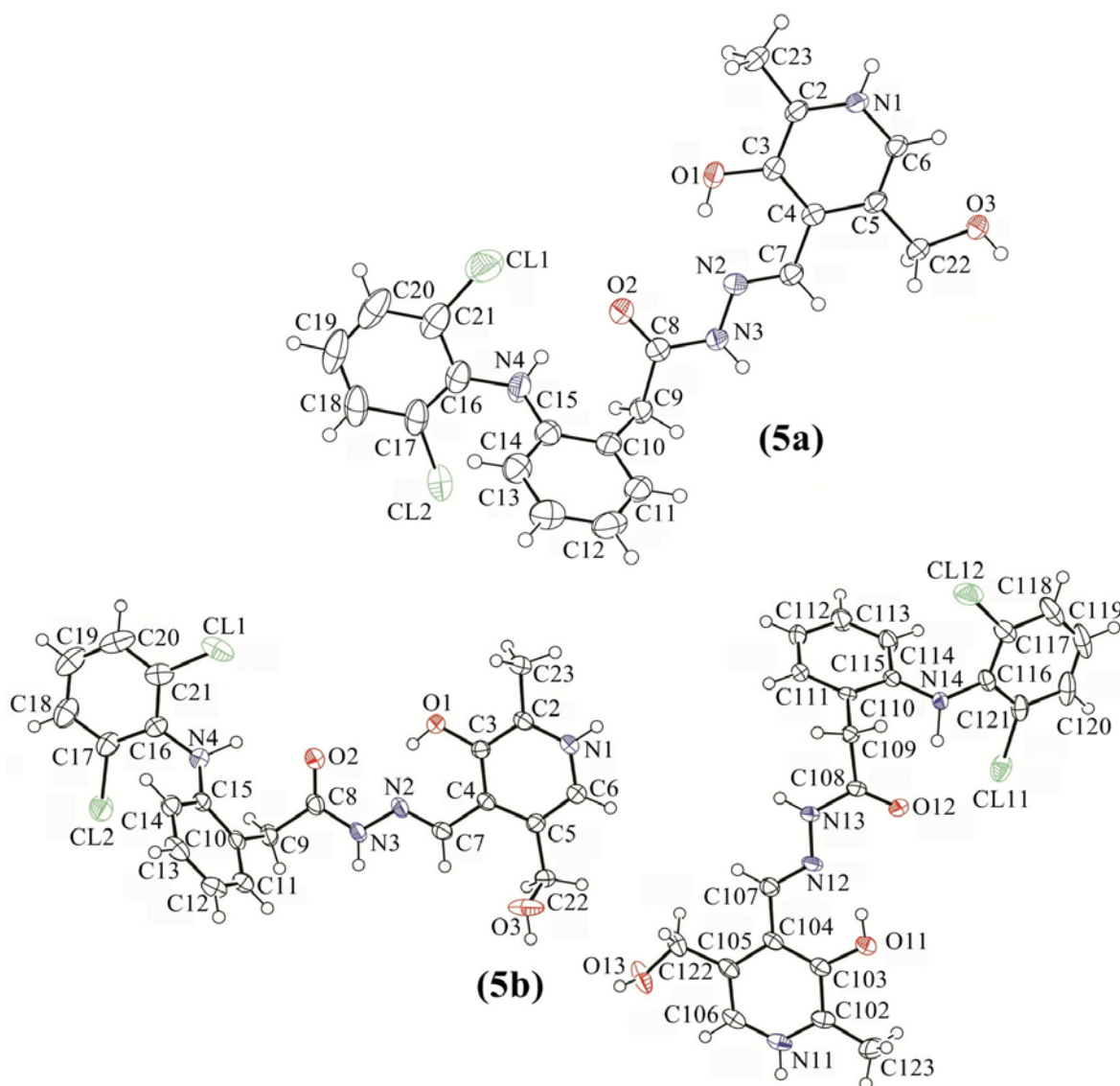


Figura 4.5 – Diagrama ORTEP das espécies H_3PDH^+ de **5a** e **5b** com elipsoides térmicos representados a um nível de probabilidade de 50%.

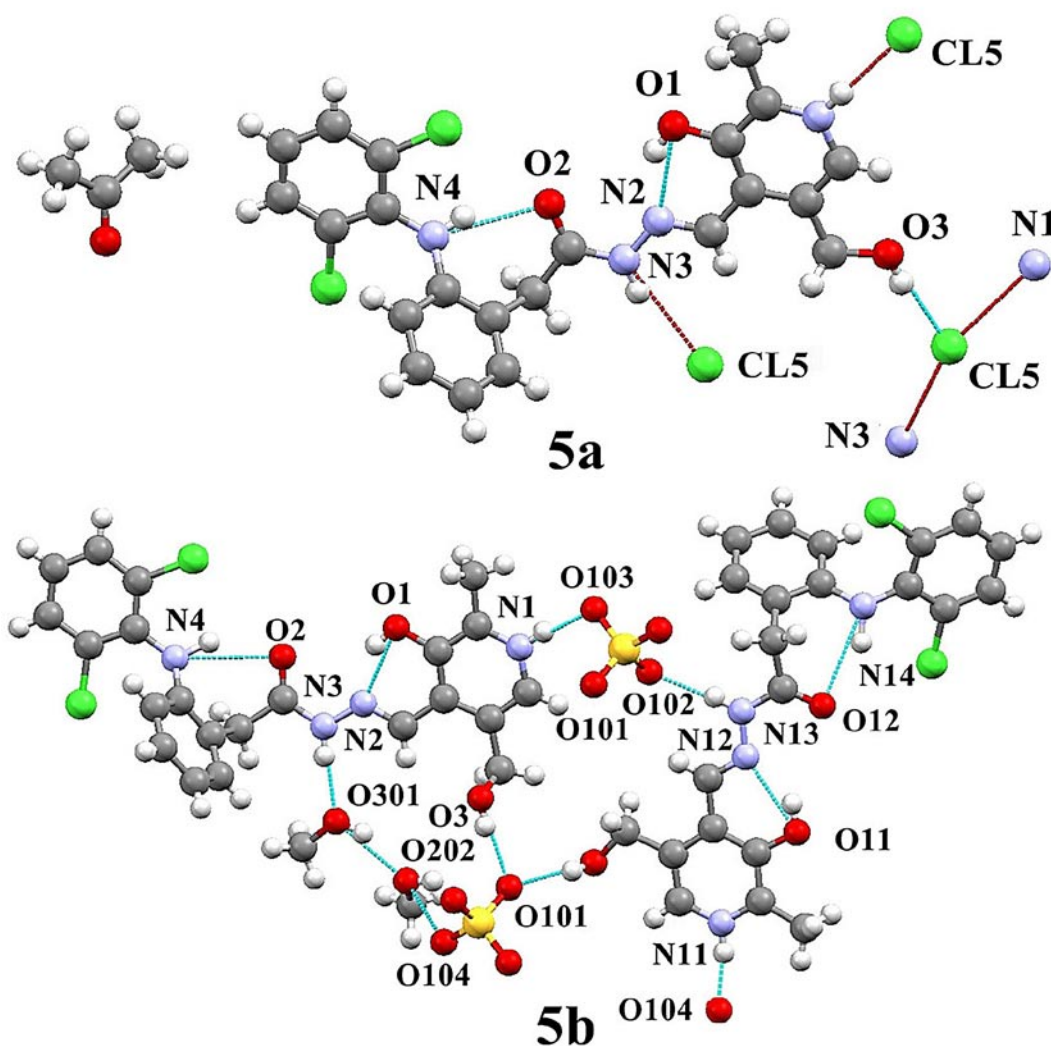
Tabela 4.2 – Distâncias de ligação (Å) e ângulos ($^\circ$) selecionados para **5a** e **5b**.

Distâncias de ligação					
5a		5b			
O1–C3	1,338(3)	O1–C3	1,339(4)	O11–C103	1,337(4)
C3–C4	1,407(4)	C3–C4	1,413(4)	C103–C104	1,407(5)
C4–C7	1,452(4)	C4–C7	1,459(4)	C104–C107	1,463(4)
N2–C7	1,278(4)	N2–C7	1,281(4)	N12–C107	1,287(4)
N2–N3	1,358(3)	N2–N3	1,353(4)	N12–N13	1,351(4)
N3–C8	1,362(4)	N3–C8	1,370(4)	N13–C108	1,483(3)
C8–O2	1,220(4)	C8–O2	1,221(4)	C108–O12	1,215(4)
Ângulos					
O1–C3–C4	123,4(3)	O1–C3–C4	123,8(3)	O11–C103–C104	124,6(3)
C3–C4–C7	121,5(3)	C3–C4–C7	120,4(3)	C103–C104–C107	120,5(3)
C4–C7–N2	118,8(2)	C4–C7–N2	117,4(3)	C104–C107–N12	117,8(3)
C7–N2–N3	117,7(2)	C7–N2–N3	120,8(3)	C107–N12–N13	119,0(3)
N2–N3–C8	118,4(2)	N2–N3–C8	117,3(3)	N12–N13–C108	117,9(3)
N3–C8–O2	121,5(3)	N3–C8–O2	122,1(3)	N13–C108–O12	122,8(3)

Tabela 4.3 – Parâmetros para as ligações de hidrogênio [Å,°] presentes em **5a** e **5b**.

	D–H...A	D–H	H...A	D...A	D–H...A
5a	N1–H1...Cl5 ⁱ	0,88	2,26	3,138(2)	176,6
	N3–H3...Cl5 ⁱⁱ	0,88	2,42	3,252(2)	158,6
	O1–H1A...N2	0,84	1,85	2,582(3)	144,7
	O3–H3A...Cl5	0,84	2,23	3,055(2)	168,1
	N4–H4...O2	0,854(19)	2,10(2)	2,892(4)	155(4)
5b	N1–H1A...O103 ^a	0,88	1,75	2,617(4)	169,0
	N3–H3A...O301	0,88	1,91	2,783(4)	170,3
	N11–H11A...O104 ^b	0,88	1,83	2,702(3)	169,7
	O1–H1...N2	0,84	1,81	2,538(3)	144,6
	O3–H3...O101 ^c	0,84	1,91	2,735(4)	166,8
	O11–H11...N12	0,84	1,84	2,564(4)	144,1
	O13–H13A...O101 ^b	0,84	1,92	2,726(4)	161,0
	O301–H301...O202 ^c	0,84	1,83	2,626(3)	157,0
	N4–H4A...O2	0,865(18)	2,30(3)	3,029(4)	142(3)
	N14–H14A...O12	0,856(18)	2,30(3)	3,040(3)	145(3)

Transformações de simetria usadas para gerar átomos equivalentes: i = -x,-y+1,-z+1; ii = x+1/2,-y+1,-z+1/2; a = 1 x+1,y,z b = -x+1,-y,-z+1; e c = -x+1,-y+1,-z+1.

**Figura 4.6** – Diagrama molecular apresentando as ligações de hidrogênio presentes em **5a** e **5b**.

4.1.1.2 Análises em solução

Espectros eletrônicos

Na Figura 4.7 estão apresentados os espectros eletrônicos de **5** dissolvido em metanol (MetOH), dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO).

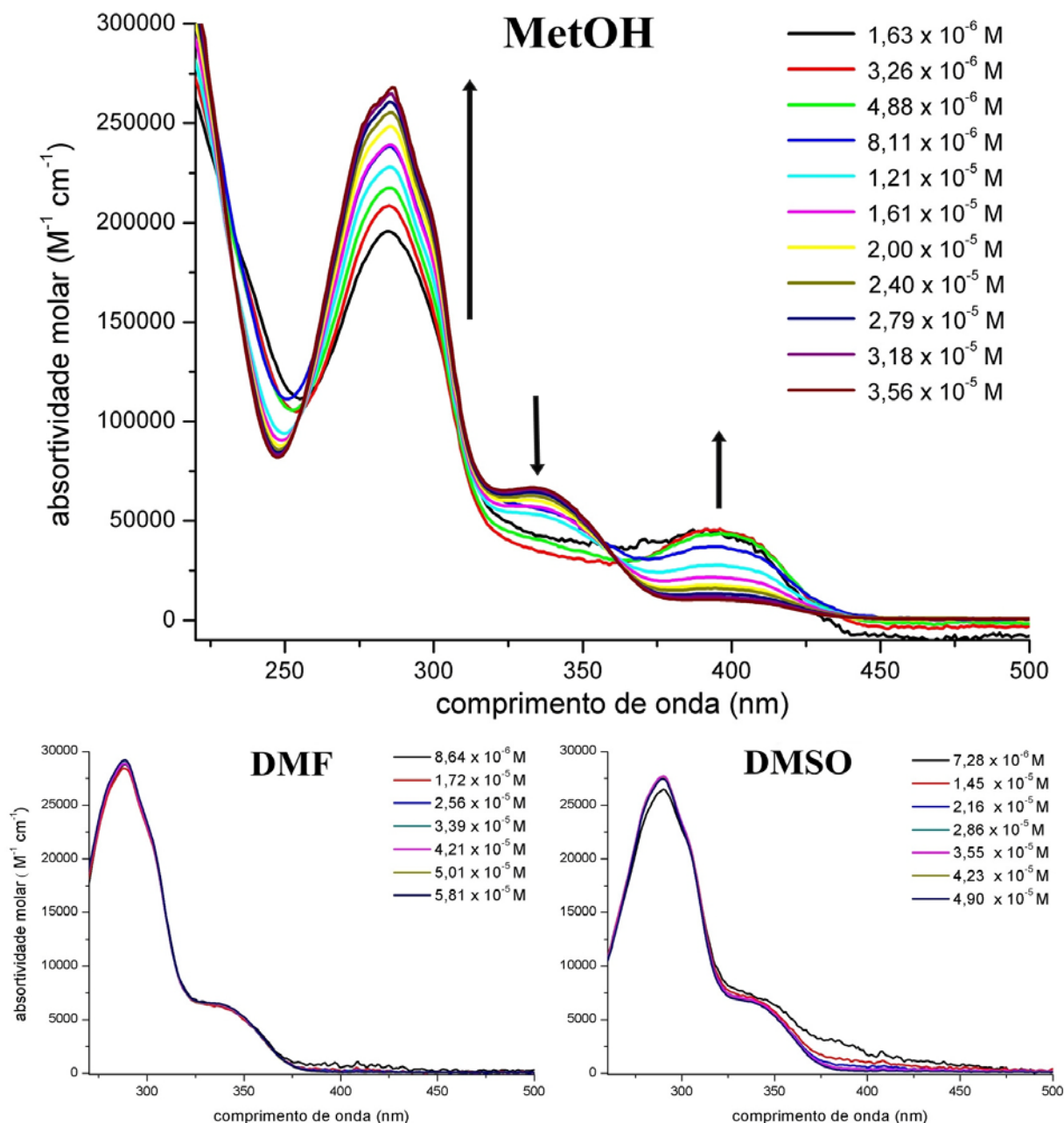


Figura 4.7 – Espectros eletrônicos de **5** dissolvido em metanol (MetOH), dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO) variando a concentração. As setas indicam o sentido da alteração em relação ao aumento da concentração do composto.

Em MetOH, podemos observar claramente a modificação na espécie em solução com a variação da concentração de **5**. No entanto, este mesmo comportamento não foi observado nas

soluções de **5** em DMF e DMSO. Quando a concentração do composto nesses solventes aproxima-se de 30 μM podemos observar que os perfis dos espectros eletrônicos obtidos assemelham-se entre si. As bandas na região de 250 a 375 nm são atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis aromáticos e $n \rightarrow \pi^*$ da porção aldimínica,⁵ respectivamente.

O comportamento observado para **5** em metanol sugere a ocorrência de um equilíbrio ácido-base em solução, o que nos levou a determinar as espécies de **5** em solução.

Determinação das espécies em solução

Aroilhidrazonas derivadas de piridoxal apresentam uma grande dependência do pH e do solvente, como estudado por N.J. Lees-Gayed e colaboradores.⁵ Por isso, o estudo dos equilíbrios ácido-base presentes para **5** foi realizado por meio de titulações espectrofotométrica utilizando-se dois sistemas de solvente, um sistema composto de uma solução metanol/água 85% e o outro por uma solução DMSO/água 30%. A utilização destes dois sistemas de solvente é justificada para verificarmos se ocorrem modificações das espécies em solução com a modificação do solvente (metanol e DMSO, solventes em que **5** é completamente solúvel).

Na Figura 4.8 estão apresentados os espectros eletrônicos de **5** obtidos durante a titulação espectrofotométrica variando-se o pH nos dois sistemas de solventes. Assim como relatado para os compostos estudados por N.J. Lees-Gayed e colaboradores,⁵ significativas alterações também ocorreram para **5** em ambos os sistemas de solventes com a variação do pH. Quando o pH encontra-se próximo de 2 podemos observar duas bandas no espectro eletrônico, uma em torno de 290 nm e outra de 334 nm. Com o aumento do pH para 11 observa-se o deslocamento dessas bandas para 280 e 385 nm. A principal modificação visual observada durante a titulação foi a mudança na coloração da solução com a elevação do pH, passando de incolor a amarela.

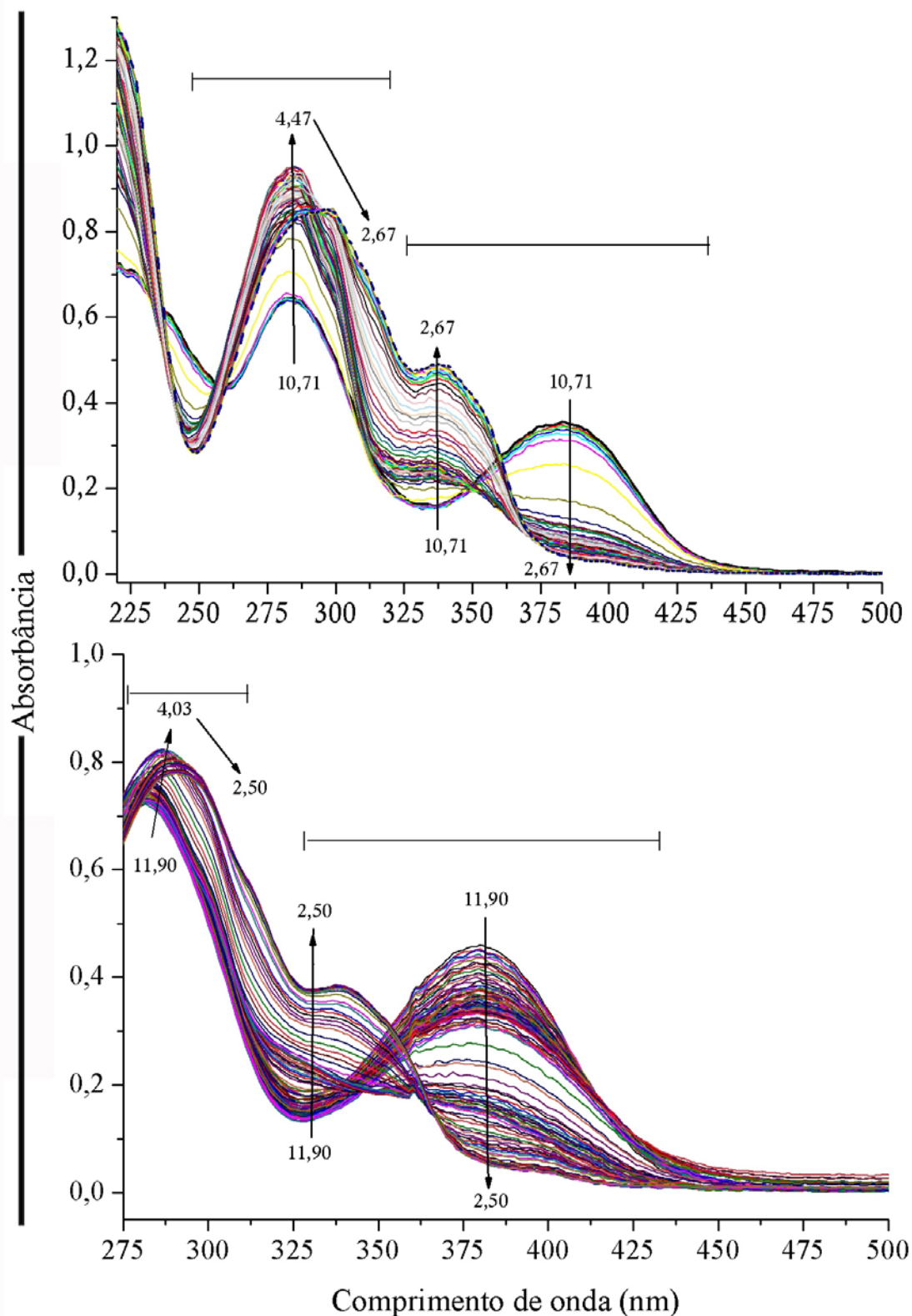


Figura 4.8 – Espectros eletrônicos obtidos para titulação espectrofotométrica de **5** com a variação do pH. Na parte superior encontram-se os espectros obtidos em metanol/água 85% com força iônica ajustada pela adição de 0,1 M de NaCl ($I = 0,1$) (concentração de **5** = 36,9 μM). Na parte inferior encontram-se os espectros em DMSO/água 30% com força iônica ajustada ($I = 0,1$) (concentração de **5** = 48,8 μM). As setas indicam variação dos máximos de absorvância do composto com a diminuição do pH durante o curso do experimento.

Os dados espectrofotométricos foram tratados com o programa SQUAD,⁷ e como proposta inicial para o modelo químico foram utilizadas as constantes de ionização ácida (K_a) de piridoxal aroilhidrazonas obtidas no trabalho de N.J. Lees-Gayed e colaboradores.⁵ As espécies atribuídas aos equilíbrios ácido-base de **5** em solução estão apresentadas na Figura 4.9. Após o término do refinamento o programa gerou os valores das constantes de ionização ácida (Tabela 4.4), os espectros eletrônicos teóricos para as espécies livres em solução (Figura 4.10) e curvas de distribuição de espécies de **5** nos dois sistemas de solventes (Figura 4.11).

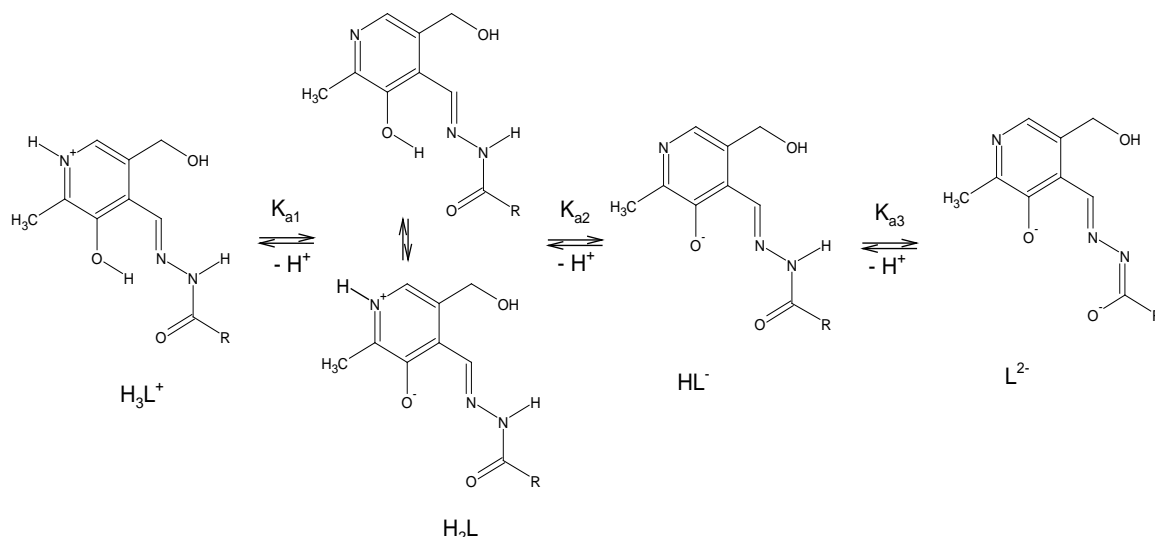


Figura 4.9 – Representação estrutural para as espécies de **5** geradas em solução com a variação do pH. R = porção do diclofenaco.

Tabela 4.4 – Valores das constantes de ionização ácida (K_a) de **5** obtidos a 298 K em metanol/água 85% e DMSO/água 30%.

Espécies envolvidas	Metanol/água 85%			DMSO/água 30%		
	pK_a	σ^*_A	U^{**}	pK_a	σ^*_A	U^{**}
H_3L^+/H_2L	3,66±0,01			4,26±0,06		
H_2L/HL^+	9,05±0,01	$1,02 \times 10^{-2}$	$2,21 \times 10^{-1}$	8,91±0,06	$7,12 \times 10^{-3}$	$1,75 \times 10^{-1}$
HL^-/L^{2-}	–			10,75±0,06		

*desvio padrão da absorvância; **soma das diferenças entre valores calculados e medidas de absorvância.

⁷ D.J. Leggett, S.L. Kelly, L.R. Shiue, Y. Wu, D. Chang, K.M. Kadish, Talanta 30 (1983) 579.

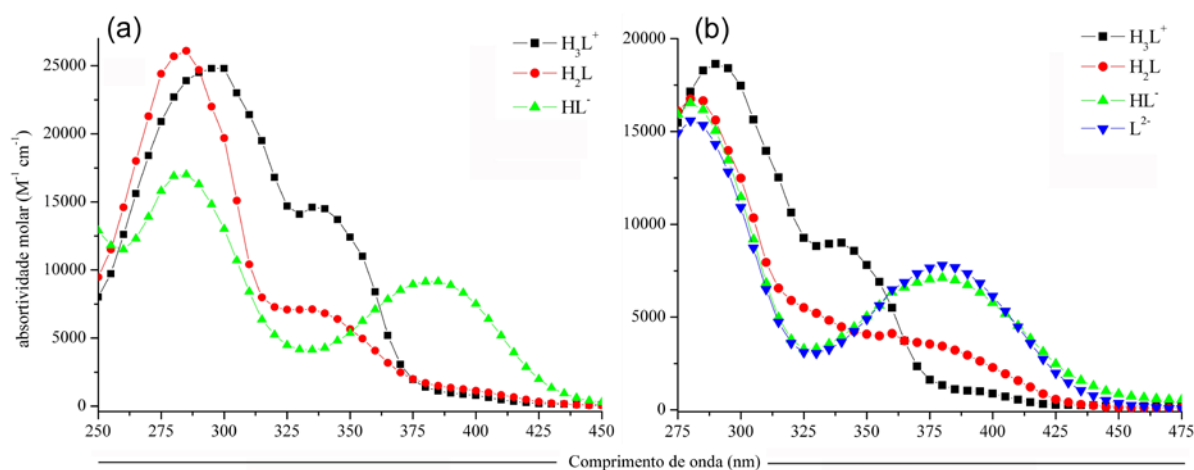


Figura 4.10 – Espectros eletrônicos calculados pelo programa SQUAD para as espécies de **5** em metanol/água 85% (a) e em DMSO/água 30% (b).

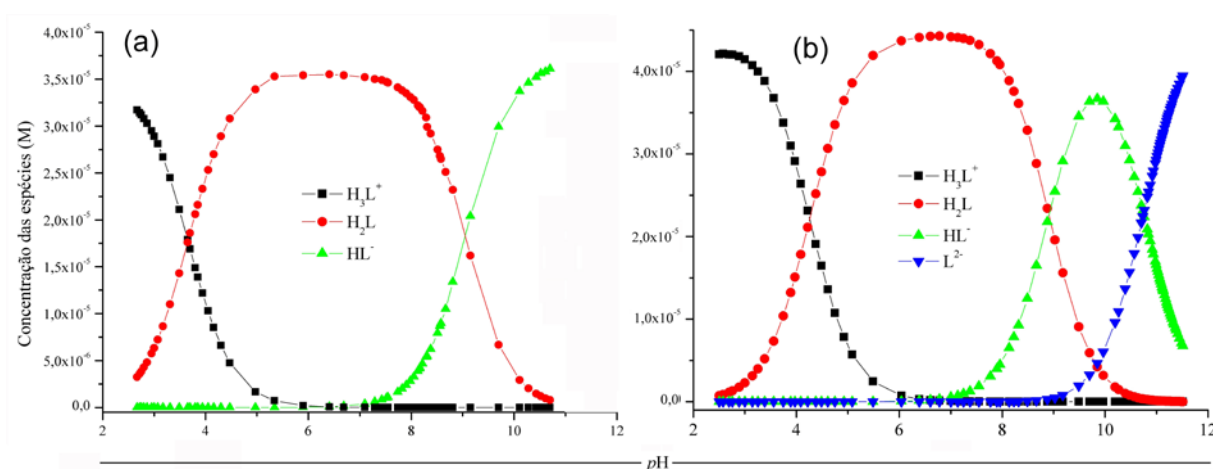


Figura 4.11 – Curvas de distribuição das espécies de **5** com a variação do pH em metanol/água 85% (a) e DMSO/água 30% (b), geradas pelo programa SQUAD.

Pelo fato de atingirmos valores maiores de pH durante a titulação em DMSO/água 30% foi possível estimar nesta situação o valor para o pK_{a3} (Tabela 4.4). Os espectros eletrônicos calculados para espécie H_3L^+ nos dois sistemas de solvente são muito semelhantes. No caso da espécie H_2L , modificações no perfil do espectro eletrônico calculado podem estar associadas ao equilíbrio entre as formas não ionizada e zwitteriônica em solução (ver Figura 4.9) que depende fortemente da natureza das interações intermoleculares de **5** com o solvente.⁵

O conhecimento desses equilíbrios em solução é fundamental, tanto no estudo da estabilidade do composto em condições que mimetizam as condições fisiológicas quanto na investigação de suas propriedades farmacológicas dos mesmos como mostra os dados da Tabela 4.4 e Figura 4.11. Em condições fisiológicas, a espécie H_3L^+ deve ser a mais estável em baixos valores de pH, o que nos sugere por exemplo um aumento na solubilidade de **5** no pH do estômago (pH~1-2). Com aumento do pH, pela passagem para o intestino, deve ocorrer sua

absorção na forma não-ionizada (H_2PDH) cujo valor do logaritmo do coeficiente de partição óleo/água ($\log P$) calculado é $3,83 \pm 0,78$.⁸

Com base nesse resultado podemos sugerir que a administração desse composto poderia ser feita por via oral. Contudo estudaremos ainda a estabilidade de **5** em condições que mimetizam o pH do estômago e intestino.

Estudo da estabilidade em tampões de pH 1,20 e 6,80

Durante o estudo do comportamento de **5** em metanol/água 85% e DMSO/água 30% não foi observada nenhuma alteração que identificasse a hidrólise nessas soluções. Mas ainda assim, aroilhidrazonas derivadas de piridoxal podem sofrer hidrólise sob condições ácidas ou básicas levando à formação de piridoxaldeído e a da hidrazida correspondente.⁹

Deste modo, um estudo foi realizado para avaliar a hidrólise em duas soluções tampão uma de pH 1,20 (Tampão HCl-NaCl), que simulará o pH do estômago, e a outra de pH 6,80 (Tampão Fosfato), que simulará o pH do intestino.¹⁰ As variações no espectro eletrônico de **5** nestes tampões com o curso do tempo foram monitoradas à temperatura de 303 K e estão apresentadas na Figura 4.12.

Relacionando os espectros eletrônicos da Figura 4.12 com o obtido durante o estudo das espécies de **5** em solução tampão podemos sugerir que a espécie predominante, em pH 1,20 é H_3L^+ , e em pH 6,80 é H_2L . Nas duas situações foram observadas alterações nos espectros eletrônicos com o tempo, porém menos significativas em pH 6,80.

Evidências experimentais demonstram a participação de H_3O^+ no processo de hidrólise de aroilhidrazonas derivadas de piridoxal.⁹ A equação química que expressa o processo de hidrólise de **5** em solução está representada pela Figura 4.13.

⁸ ALOGPS versão 2.1. <http://www.vcclab.org>.

⁹ J.L. Buss, P. Ponka, *Biochim. Biophys. Acta* 1619 (2003) 177.

¹⁰ R. Manadas, M.E. Pina, F. Veiga, *Braz. J. Pharm. Sci.* 38 (2002) 375.

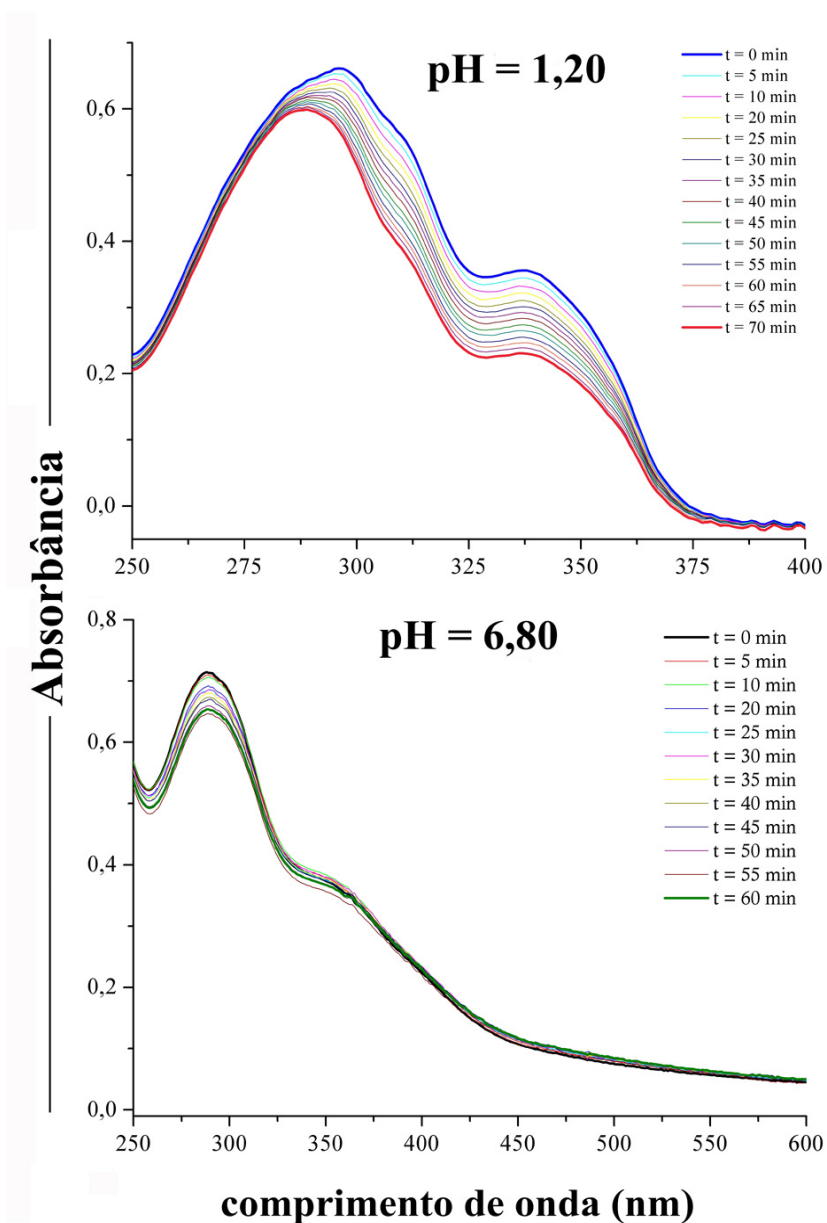


Figura 4.12 – Espectros eletrônicos de **5** em soluções tampão de pH 1,20 e 6,80 com o curso do tempo.

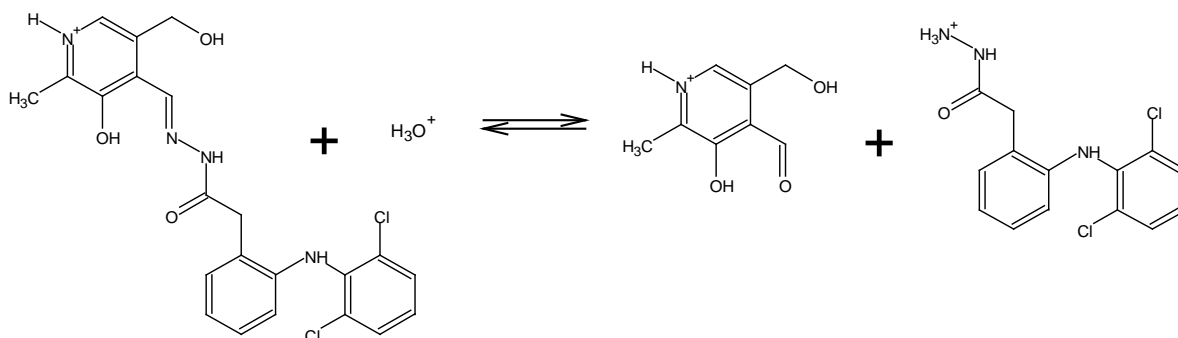


Figura 4.13 – Equação química que representa a hidrólise de **5** em solução.

Como já foi demonstrado por outros autores para a hidrólise de hidrazonas,⁹ a dependência da velocidade da reação em relação à concentração do ligante é de pseudo-primeira ordem. Logo, a velocidade da reação a um dado pH pode ser reduzida a

$$v = k'[H_3PDH^+] \quad (\text{Equação 4.1}).$$

Como a hidrólise da espécie H_3L^+ causa uma diminuição da intensidade da banda no espectro eletrônico em solução, de acordo com a lei de Beer, a partir de transformações algébricas¹¹ temos as seguintes expressões:

$$A_f = A_o e^{-k't} \quad (\text{Equação 4.2})$$

e

$$t_{1/2} = \frac{1}{k'} \ln 2 \quad (\text{Equação 4.3})$$

onde, A_f e A_o são valores de absorvância final e inicial para um comprimento de onda fixo relacionados a t_o e t_f , k' é a constante de velocidade condicional e $t_{1/2}$ é o tempo de meia-vida para o processo de hidrólise a um dado pH.

Os dados espectrofotométricos obtidos nas soluções tampão de pH 1,20 e 6,80 no comprimento de onda de 297 nm foram ajustados segundo um modelo de decaimento exponencial de primeira ordem a fim de calcularmos os valores de k' e $t_{1/2}$. Contudo, o ajuste só foi satisfatório para os dados obtidos em tampão de pH 1,20. Em pH 6,80 o grau de hidrólise foi baixo, demonstrando a dependência da concentração de H_3O^+ e a necessidade da formação da espécie H_3L^+ para que ocorra a hidrólise de **5**. Na Figura 4.14 está apresentada a curva ajustada para a variação da absorvância em $\lambda = 297$ nm com o curso do tempo em solução tampão pH 1,20.

Os valores obtidos para k' e $t_{1/2}$ para **5** em tampão de pH 1,20 são $(6,20 \pm 0,82) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ e 112 ± 21 min. Esses valores foram maiores que os obtidos para a eritromicina B, um composto conhecido por sofrer hidrólise ácida, em pH 2,5 à $T = 303$ K. Os valores de k' em min^{-1} e $t_{1/2}$ em min (dados apresentados entre parênteses) envolvidos na formação de novas espécies a partir da eritromicina B, nas condições acima citadas, são os seguintes: $1,17 \times 10^{-2}$ (59,2); $5,55 \times 10^{-2}$ (12,5); $2,36 \times 10^{-2}$ (29,4) e $2,50 \times 10^{-2}$ (27,7).¹²

Os resultados aqui obtidos sugerem que a hidrólise de **5** não afetaria o estudo da interação com proteínas ou outros alvos biológicos em solução uma vez que o tampão utilizado nesses

¹¹ P.W. Atkins, L. Jones, PRINCÍPIOS DE QUÍMICA: QUESTIONANDO A VIDA MODERNA E O MEIO AMBIENTE (ISBN 8536306688) Porto Alegre, Bookman, 2006, p. 653.

¹² M.N. Mordí, M.D. Pelta, V. Boote, G.A. Morris, J. Barber, J. Med. Chem. 43 (2000) 467.

testes apresentam pH próximo 7. Além disso, como o $t_{1/2}$ observado para **5** em pH 1,20 é relativamente longo ($t_{1/2} \sim 2$ h), podemos sugerir que a administração desse composto por via oral seria a mais recomendada em testes em animais.

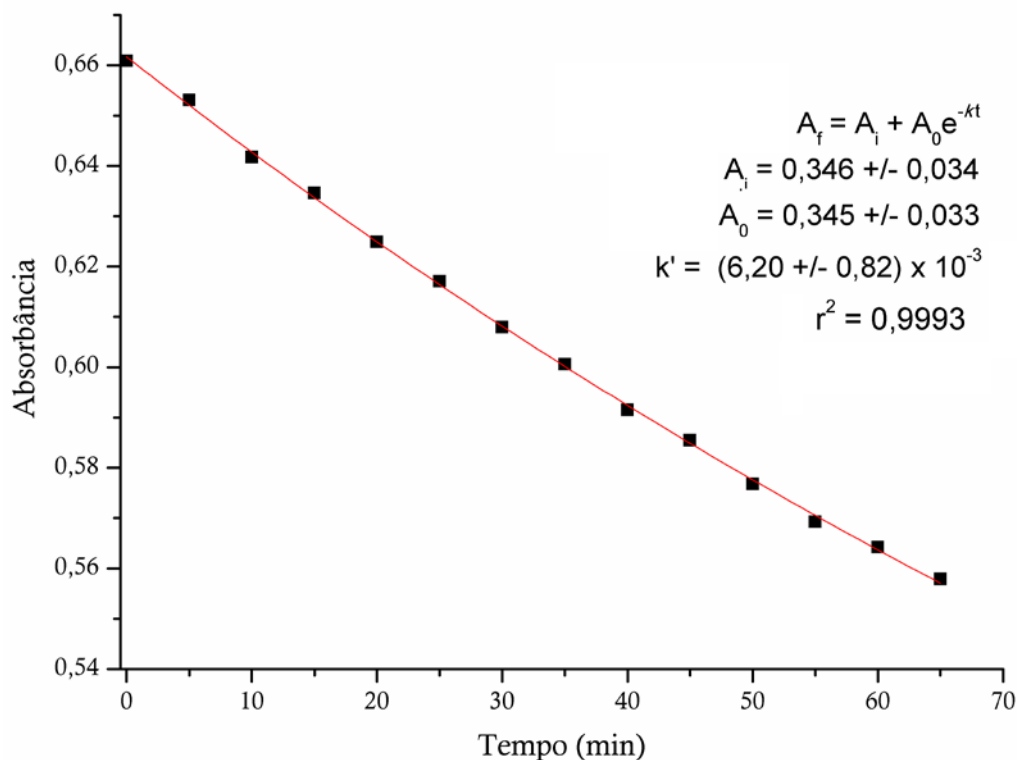


Figura 4.14 – Gráfico de absorvância ($\lambda = 297$ nm) em função do tempo para **5** em solução tampão de pH 1,20. No detalhe estão apresentados os valores resultantes do ajuste segundo o modelo de decaimento exponencial de primeira ordem.

4.1.2 Complexos de Cu(II) (**Cu5**) e Ga(III) (**Ga5**) com piridoxal diclofenaco hidrazona (**5**)

4.1.2.1 Análises no estado sólido

Microanálises

Na Tabela 4.5 estão apresentados os dados de análise elementar para os complexos de Cu(II) (**Cu5**) e Ga(III) (**Ga5**) com piridoxal diclofenaco hidrazona (**5**).

Tabela 4.5 – Análise elementar (valores teóricos entre parênteses), massa molar e momento magnético efetivo para complexos Cu(II) (**Cu5**) e Ga(III) (**Ga5**) com piridoxal diclofenaco hidrazona (**5**).

Composto	%C	%H	%N	MM [g mol ⁻¹]	μ_{ef} [MB]
[Cu(H ₂ PDH)Cl]Cl·2H ₂ O (Cu5)	41,94 (41,95)	3,67 (3,84)	8,84 (8,90)	629,80	1,87
[Ga(HPDH) ₂]NO ₃ ·4H ₂ O (Ga5)	47,55 (47,17)	4,19 (4,14)	11,25 (11,53)	1120,42	–

Os dados de análise elementar corroboram a formação de complexos dos tipos apresentados na Tabela 4.5. A formulação final foi proposta com base também nos espectros de infravermelho e análises termogravimétricas. **Cu5** apresentou um valor de momento magnético efetivo de 1,87 MB, sugerindo que este complexo é paramagnético a 300 K.

Análise térmica

A fim de confirmar a presença das moléculas de água em **Cu5** e **Ga5** foram obtidas as curvas TG e DTA desses compostos (Figura 4.15), bem como de **5** para comparação.

Na curva TG de **5** não foram observadas variação na massa na faixa de 25 a 200 °C, indicado, como esperado, a ausência de moléculas de solvente nesta composto. Em **Cu5** ocorre uma perda de massa de 11,27 %, em duas etapas, na faixa de 25 a 212 °C atribuída a perda de duas moléculas de H₂O e uma de HCl (valor teórico = 11,49 %). Em **Ga5** ocorre uma perda de massa de 6,26 % entre 25 e 121 °C associada a perda de quatro moléculas de água (valor teórico = 6,43 %). Assim, os dados das curvas TG confirmam as moléculas de solvente propostas pelos dados de análise elementar.

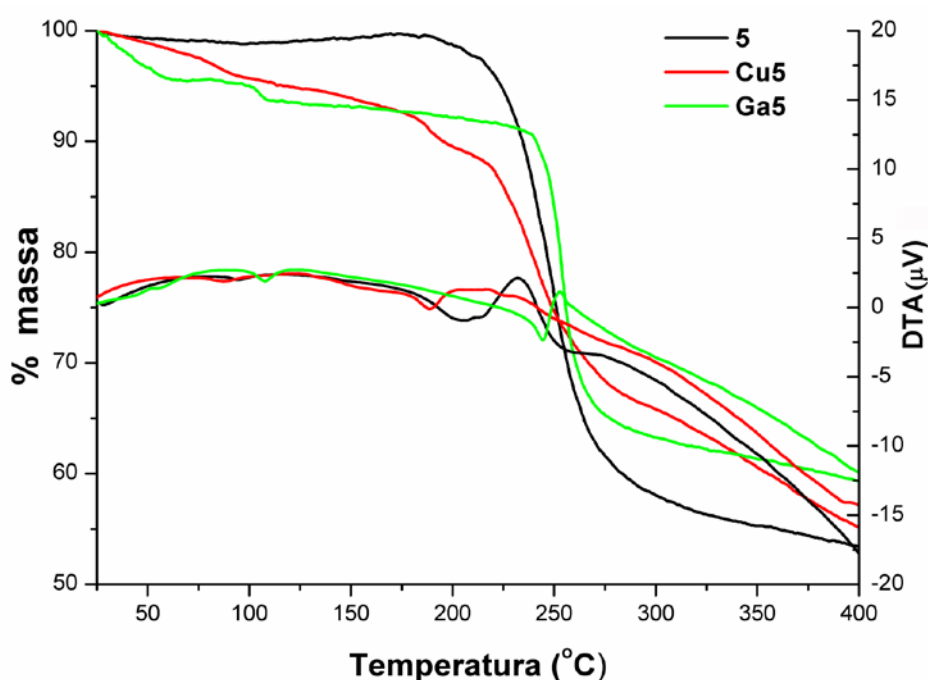


Figura 4.15 – Curvas TG e DTA para H₃PDHCl (**5**), [Cu(H₂PDH)Cl]Cl·2H₂O (**Cu5**) e [Ga(HPDH)₂]NO₃·4H₂O (**Ga5**) obtidas em atmosfera de argônio (fluxo 30 mL min⁻¹) com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

Espectros de infravermelho

Nos espectros de infravermelho de **Cu5** e **Ga5** (Figura 4.16) podemos observar a presença da banda em torno de 2800 cm⁻¹ atribuída ao modo ν(N-H) do íon piridínio, indicando que, mesmo após a coordenação, esta posição permanece protonada no ligante.

Foi observado um significativo deslocamento do modo $\nu(\text{C}=\text{O})$, de 1697 cm^{-1} em **5** para 1600 cm^{-1} em **Cu5**. Esse mesmo comportamento já havia sido notado para o complexo de Cu(II) com 2-formilpiridina *para*-clorobenzoilhidrazona ($[\text{Cu}(\text{H}_2\text{FopClPh})\text{Cl}_2]$).¹³ Para **Ga5** foi observado o desaparecimento desse modo vibracional. Essas modificações no estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$ indicam a coordenação pelo oxigênio carbonílico.

Além disso, novas absorções foram observadas no espectro de **Ga5** em 1455 cm^{-1} e 1385 cm^{-1} , características dos estiramentos assimétricos e simétricos de grupos nitrato não coordenado.¹⁴

A análise dos espectros de infravermelho, juntamente com as análises termogravimétricas e os resultados de microanálises são compatíveis com as estruturas propostas na Figura 4.17.

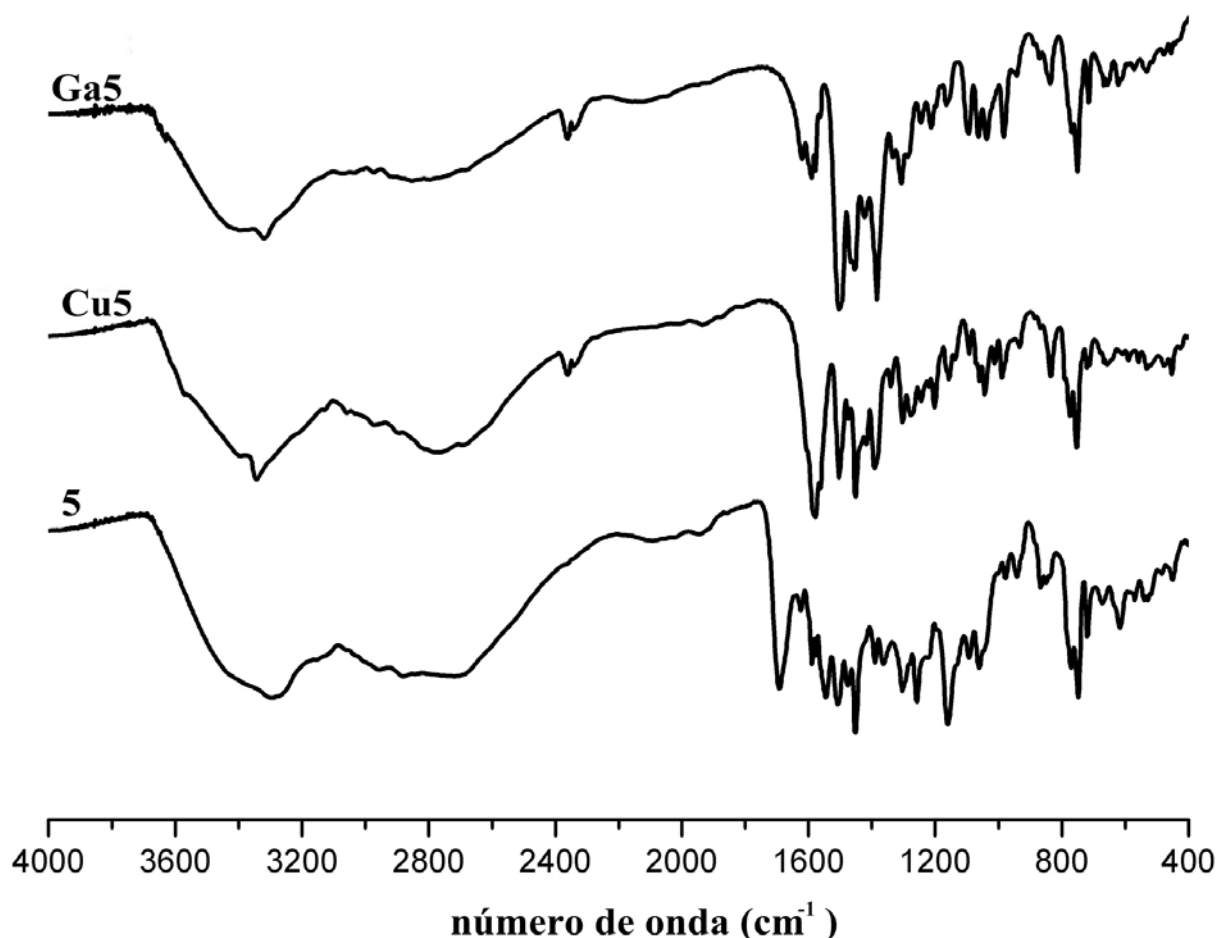


Figura 4.16 – Espectro na região do infravermelho de **5**, **Cu5** e **Ga5** (KBr).

¹³ A.A.R. Despaigne, J.G. Da Silva, A.C.M. Carmo, F. Sives, O.E. Piro, E.E. Castellano, H. Beraldo, Polyhedron 28 (2009) 3797.

¹⁴ K. Nakamoto, INFRARED AND RAMAN SPECTRA OF INORGANIC AND COORDINATION COMPOUNDS. 4th ed. Wiley, New York, 1986, p. 254.

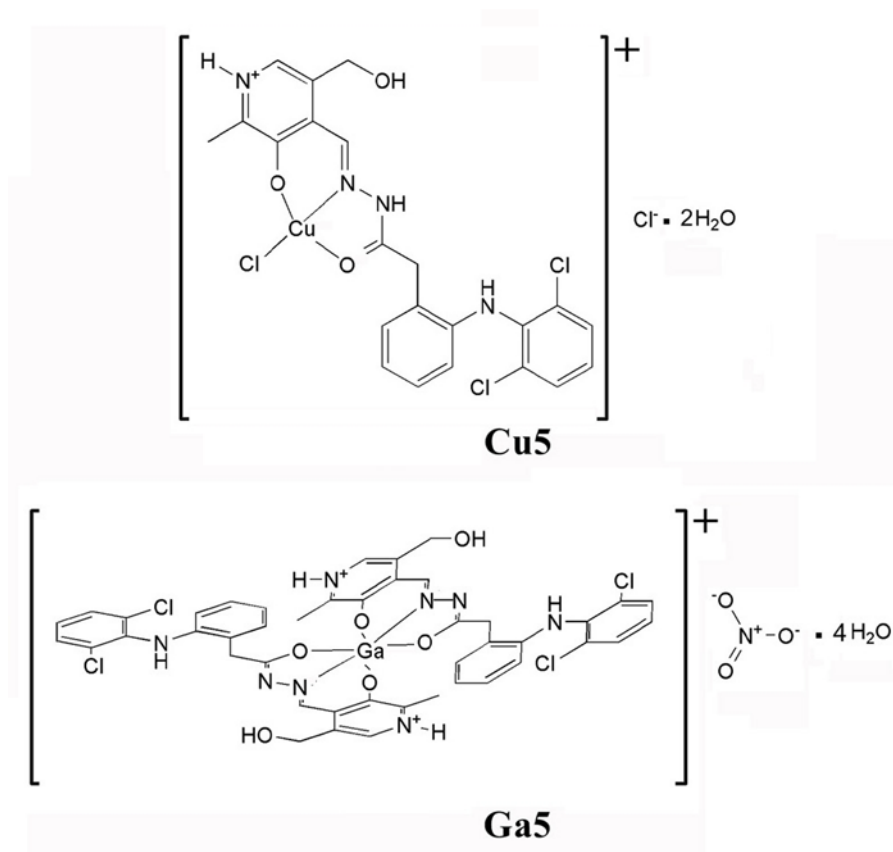


Figura 4.17 – Estruturas propostas para os complexos $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{PDH})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**Cu5**) e $[\text{Ga}(\text{HPDH})_2]\text{NO}_3\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**Ga5**).

Espectros de RPE

Os espectros de RPE de **Cu5** no estado sólido a temperatura ambiente e em soluções congeladas de DMSO (2 mM) a 77 K estão apresentados na Figura 4.18.

No estado sólido, **Cu5** exibe um espectro característico de compostos com simetria axial, um comportamento comum a complexos mononucleares de Cu(II) de geometria quadrática. Os valores de $g_{\parallel} = 2,28$ e $g_{\perp} = 2,08$ estão na faixa deste tipo de complexo.¹⁵ O valor calculado para o $g_{\text{médio}}$, $g_{\text{médio}} = 1/3(g_{\parallel} + 2g_{\perp})$, é de 2,146. Esse valor é maior do que o esperado para o g do elétron livre (2,0023), indicando a natureza covalente das ligações metal-ligante.¹⁶ Complexos de Cu(II) geralmente exibem quatro linhas referentes ao desdobramento hiperfino na região de g_{\parallel} , devido a interação com momento magnético nuclear do Cu(II) ($I = 3/2$). No entanto, como a concentração de Cu(II) é alta no sólido, interações entre os núcleos podem ocorrer levando à diminuição ou até mesmo à ausência destas linhas.^{17,18}

¹⁵ P.R. Bontchev, B.B. Ivanova, R.P. Bontchev, D.R. Mehandjiev, *Polyhedron* 20 (2001) 231.

¹⁶ J.E. Wertz, J.R. Bolton. *ELECTRON SPIN RESONANCE*, McGraw. Hill Book Company, New York, 1972.

¹⁷ B.J. Hathaway, D.E. Billing, *Coord. Chem. Rev.* 5 (1970) 143.

¹⁸ K.O. Ferraz, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, S.R.W. Louro, H. Beraldo, *Spectrochim. Acta Part A* 73 (2009) 140.

Em solução congelada de DMSO (2 mM) a 77 K, o espectro de RPE obtido sugere um acoplamento entre dois núcleos paramagnéticos de Cu(II), sendo a diferença observada entre duas componentes perpendiculares de 350 G e o valor de g_{\perp} de 2,08. Além disso, algumas estruturas hiperfinas foram observadas em torno de 3250 G atribuídas ao acoplamento do spin eletrônico do Cu(II) com o spin nuclear do nitrogênio azometínico.¹⁹ Este resultado sugere que a estrutura do composto em solução pode ser diferente daquela do sólido, o que será melhor esclarecido com os dados do composto em solução.

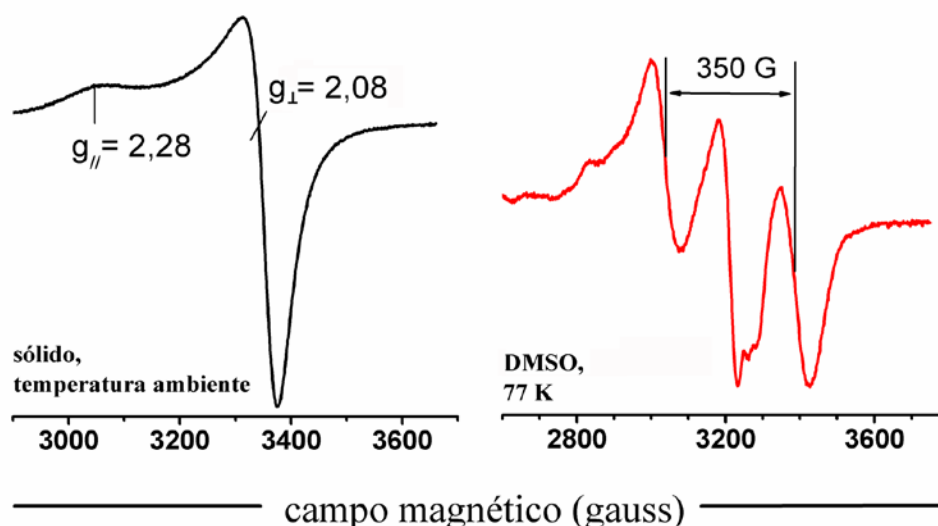


Figura 4.18 – Espectros de ressonância paramagnética eletrônica de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{PDH})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**Cu5**) no estado sólido e em solução congelada de DMSO (2 mM) a 77 K.

*Estrutura cristalográfica de $[\text{Ga}(\text{HPDH})_2]\text{Cl}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (**Ga5a**)*

Cristais aptos a serem medidos por difração de raios X de monocristal foram obtidos durante a evaporação lenta da água-mãe da mistura reacional que levou à formação de **Ga5**. Durante o refinamento desta estrutura foi observada a presença da espécie referente ao complexo de Ga(III). No entanto, nessa estrutura cinco moléculas do solvente encontram-se desordenadas. A estrutura proposta para a unidade assimétrica de **Ga5a** é $[\text{Ga}(\text{HPDH})_2]\text{Cl}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, onde a hidrazona encontra-se ligada ao metal em sua forma aniônica (HPDH⁻). Na Tabela 4.6 estão apresentados os dados relacionados à coleta e ao refinamento da estrutura.

Na Figura 4.19 está apresentado o diagrama ORTEP do complexo de Ga(III) ($[\text{Ga}(\text{HPDH})_2]^+$). Distâncias de ligação e ângulos selecionados para **Ga5a** estão listados na Tabela 4.7.

¹⁹ N.A. Mangalama, S. Sivakumara, M.R.P. Kurup, E. Suresh, Spectrochim. Acta Part A 75 (2010) 686.

Tabela 4.6– Dados relacionados à coleta, resolução e o refinamento de **Ga5a**.

Parâmetros		Ga5a
Fórmula empírica		C ₄₄ H ₃₈ Cl ₅ GaN ₈ O ₁₀
Massa molar (g mol ⁻¹)		1085,79
Sistema cristalino		Monoclínico
Grupo espacial		<i>P2₁/c</i>
Radiação; λ (Å)		Mo Kα ; 0,71073
Temperatura (K)		120(2)
Parâmetros da célula unitária	a (Å)	14,7478(8)
	b (Å)	22,9429(10)
	c (Å)	15,1269(6)
	α = γ (°)	90
	β (°)	103,196(4)
V (Å ³)		4983,1(4)
Z		4
Z'		4
Densidade calculada (g cm ⁻³)		1,447
F(000)		2216
Coeficiente de absorção (mm ⁻¹)		0,883
Faixa de índices de Miller		-14 ≤ h ≤ 18 -28 ≤ k ≤ 27 -18 ≤ l ≤ 18
Faixa de θ usada na coleta dos dados (°)		1,95 a 26,37
Reflexões coletadas		24296
Reflexões únicas [R _{int}]		10194[0,0567]
Completeza a θ = 26,37° (%)		100
Transmissão máxima e mínima		0,9408 e 0,7901
Dados; restrições; parâmetros		110194 ; 0 ; 637
Índices de R final [I > 2σ(I)]		R ₁ = 0,0883; wR ₂ = 0,2343
Índices de R (para todos os dados)		R ₁ = 0,1370; wR ₂ = 0,2737
S		1,012
Δρ _{máx.} e Δρ _{min.}		2,032 e 2,131

Em [Ga(HPDH)₂]⁺ (Figura 4.19), duas moléculas de **5** ligam-se ao metal pelo sistema O-N-O. Em relação ao ligante livre (**5a** e **5b**) não ocorre nenhuma mudança na configuração em torno das ligações C7–N2 e C8–N3. Ao compararmos os valores das ligações C8–O1 e C8–N3 no ligante livre (Tabela 4.2 na seção 4.1.1.1) e no complexo (Tabela 4.7) podemos observar que ocorre o alongamento da ligação C=O e o encurtamento da distância C=N com a coordenação. Isto evidencia a perda do hidrogênio em N3 com a coordenação ao metal formando um sistema de elétrons deslocalizados, como sugerido pelo espectro de infravermelho para **Ga5**, que mostra o desaparecimento do estiramento ν(C=O), que ocorre quando há desprotonação em N3 e passagem de C=O a C–O. Além disso, os valores dos ângulos indicam uma geometria octaédrica distorcida em torno do Ga(III).

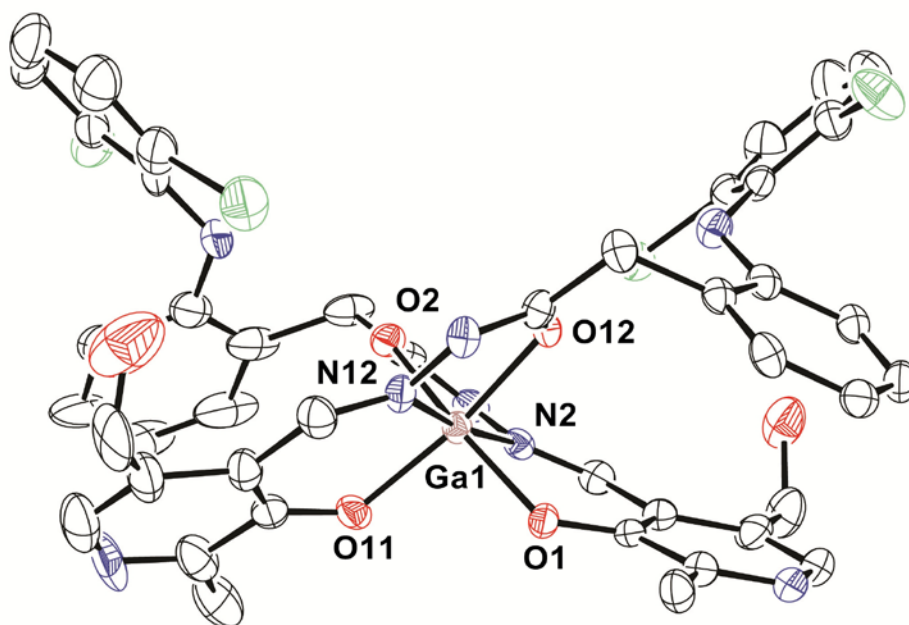


Figura 4.19 – Diagrama ORTEP da espécie $[Ga(HPDH)_2]^+$ de $[Ga(HPDH)_2]Cl \cdot 5H_2O$ (**Ga5a**) com elipsoides térmicos representados a um nível de probabilidade de 50%.

Tabela 4.7 – Distâncias de ligação (Å) e ângulos ($^\circ$) selecionados para **Ga5a**.

Distâncias de ligação			
O1–C3	1,294(7)	O11–C103	1,306(8)
C3–C4	1,416(9)	C103–C104	1,402(10)
C4–C7	1,452(9)	C104–C107	1,452(10)
N2–C7	1,275(8)	N12–C107	1,277(8)
N2–N3	1,397(7)	N12–N13	1,401(7)
N3–C8	1,311(8)	N13–C108	1,316(8)
C8–O2	1,290(8)	C108–O12	1,286(7)
Ga1–O1	1,919(4)	Ga1–O11	1,921(4)
Ga1–N2	2,021(5)	Ga1–N12	2,036(5)
Ga1–O2	1,981(4)	Ga1–O12	1,981(4)
Ângulos			
O1–C3–C4	125,7(5)	O11–C103–C104	126,3(6)
C3–C4–C7	121,3(6)	C103–C104–C107	121,6(6)
C4–C7–N2	121,9(6)	C104–C107–N12	122,6(6)
C7–N2–N3	116,5(5)	C107–N12–N13	116,7(5)
N2–N3–C8	109,3(5)	N12–N13–C108	109,0(5)
N3–C8–O2	124,5(5)	N13–C108–O12	124,7(6)
O1–Ga1–O11	94,27(18)	O11–Ga1–N2	98,7(2)
O1–Ga1–O12	94,27(18)	O12–Ga1–N2	95,37(18)
O1–Ga1–O2	88,70(17)	O2–Ga1–N2	77,82(18)
O11–Ga1–O12	165,69(18)	O1–Ga1–N12	94,24(18)
O1–Ga1–O2	165,34(17)	O11–Ga1–N12	88,2(2)
O11–Ga1–O2	88,02(17)	O2–Ga1–N12	77,63(18)
O12–Ga1–O2	92,65(17)	O2–Ga1–N12	100,30(19)
O1–Ga1–N2	87,53(19)	N2–Ga1–N12	172,7(2)

4.1.2.2 Análises em solução

Condutividade molar

Os valores de condutividade molar de **5**, **Cu5** e **Ga5** dissolvidos em metanol (MetOH), dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO) encontram-se apresentados na Tabela 4.8. Esses valores foram comparados com os dados da Tabela 2.1 na Parte experimental.

Tabela 4.8 – Valores de condutividade molar de **5**, **Cu5** e **Ga5** em metanol (MetOH), dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO).

Compostos	Λ_M [ohm ⁻¹ cm ² mol ⁻¹]		
	MetOH	DMF	DMSO
5	65,1	38,8	32,5
Cu5	189,1	34,4	47,5
Ga5	72,7	48,0	29,6

Para **Ga5** e **5**, os seus valores de condutividade molar tendem a representar uma solução de eletrólitos do tipo 1:1. No caso de **Cu5**, a medida de condutividade molar em metanol tende a representar uma solução de eletrólitos do tipo 1:2, enquanto que em DMF e DMSO tende a representar uma solução de eletrólitos do tipo 1:1.

Em todos os casos, os compostos apresentam no mínimo o íon piridínio protonado no estado sólido. Contudo em solução pode ocorrer a desprotonação do ligante, o que justificaria a variação do valor de condutividade molar obtido com o esperado em cada situação. No caso do complexo de Cu(II), outros efeitos ainda podem estar ocorrendo em solução tais como a perda do hidrogênio em N3 pela ação do solvente ou a coordenação de moléculas do solvente ao centro metálico.

Espectros eletrônicos

Na Figura 4.20 estão apresentados os espectros eletrônicos de **Cu5** e **Ga5** dissolvidos em MetOH, DMSO e DMF. Assim como **5** (Figura 4.7) os espectros de **Cu5** e **Ga5** sofrem modificações com a variação da concentração do composto em MetOH e DMSO, sendo as mais significativas observadas para **Cu5**, onde observa-se a presença de um ponto isobéstico.

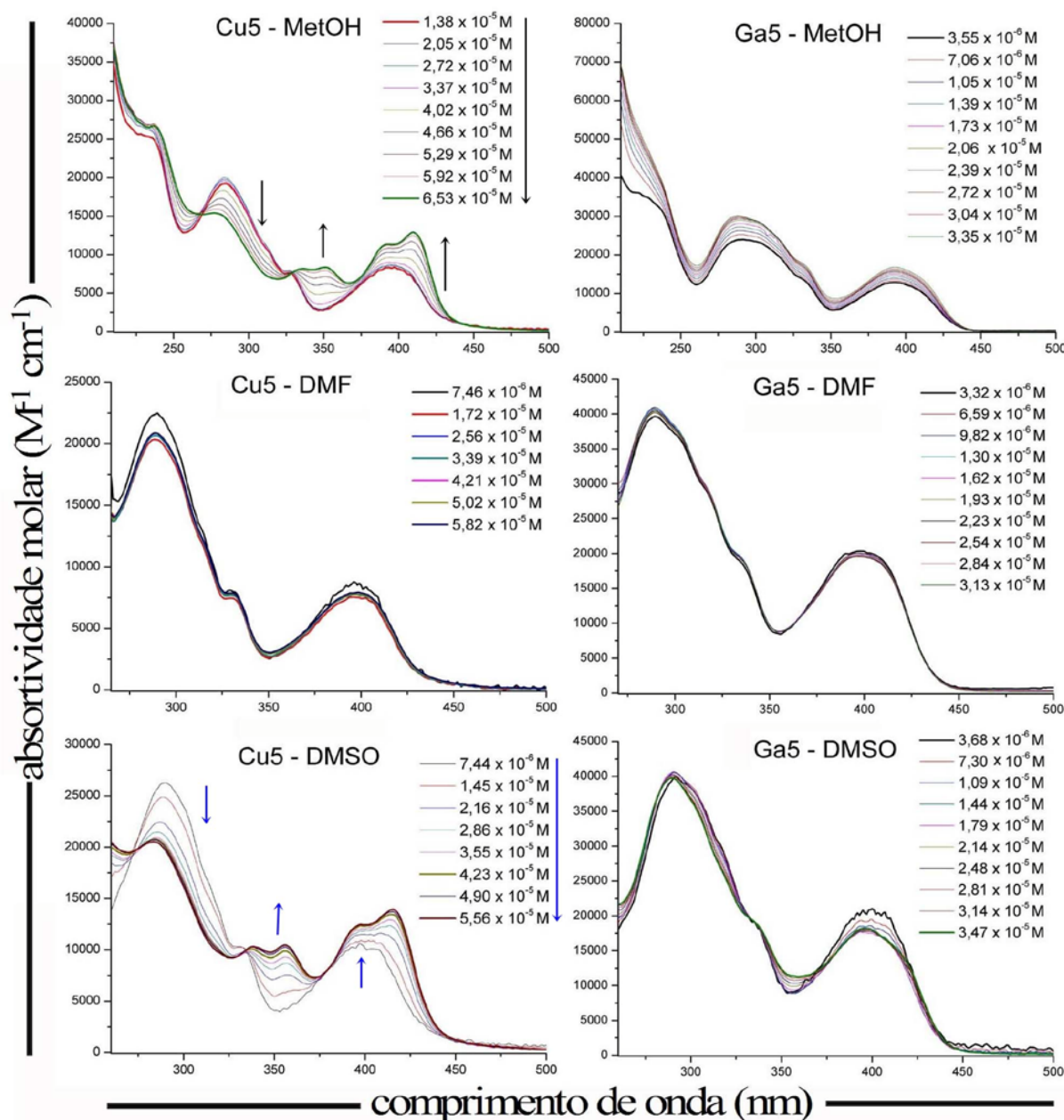


Figura 4.20 – Espectros eletrônicos de **Cu5** e **Ga5** dissolvidos em metanol (MetOH), dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO) obtidos variando a concentração do composto.

Espectros de massas

Espectros de massas de **5**, **Cu5** e **Ga5** dissolvidos em metanol foram obtidos usando o aparelho com detector do tipo quadrupolo (ESI-MS) (aparelho de baixa resolução). No espectro de massa de **5** foi observado no modo positivo um íon de m/z 458,98 atribuído à espécie $[\text{H}_3\text{PDH}]^+$ ($\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_3$), enquanto que no modo negativo foram observados os íons de m/z 457,11 e 492,88 atribuídos às espécies $[\text{HPDH}]^-$ ($\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_3$) e $[\text{H}_2\text{PDHCl}]^-$ ($\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_3$), respectivamente.

No espectro de massa de **Cu5** no modo positivo foi observado íons de m/z 459,04 e 596,47 atribuídos às espécies $[\text{H}_3\text{PDH}]^+$ e $[\text{Cu}(\text{HPDH})\text{Cl}+\text{H}_2\text{O}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{Cl}_3\text{CuN}_4\text{NaO}_4$), enquanto

que no modo negativo foram observados os íons de m/z 457,00, 492,89, 554,01, 1072,67 e 1591,46 atribuídos às espécies $[\text{HPDH}]^-$, $[\text{H}_2\text{PDHCl}]^-$, $[\text{Cu}(\text{HPDH})\text{Cl}]^-$ ($\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{Cl}_3\text{CuN}_4\text{O}_3$), $[(\text{Cu}(\text{HPDH}))_2\text{Cl}]^-$ ($\text{C}_{44}\text{H}_{36}\text{Cl}_5\text{Cu}_2\text{N}_8\text{O}_6$) e $[(\text{Cu}(\text{HPDH}))_3\text{Cl}]^-$ ($\text{C}_{66}\text{H}_{54}\text{Cl}_7\text{Cu}_3\text{N}_{12}\text{O}_9$), respectivamente.

Uma vez que espécies poliméricas com subunidade $(\text{Cu}(\text{HPDH}))$ são observadas em MetOH e as espécies de **Cu5** em solução de MetOH e DMSO parecem apresentar um comportamento semelhante (Figura 4.20), nós podemos sugerir que a formação de dímeros do tipo $[\text{Cu}(\text{HPDH})]_2$ com pontes μ -fenolato poderia ocorrer em DMSO, (Figura 4.21), como observado em outro trabalho na literatura.²⁰ A formação de espécies desse tipo poderia justificar o acoplamento magnético observado no espectro de RPE em solução de DMSO congelada.

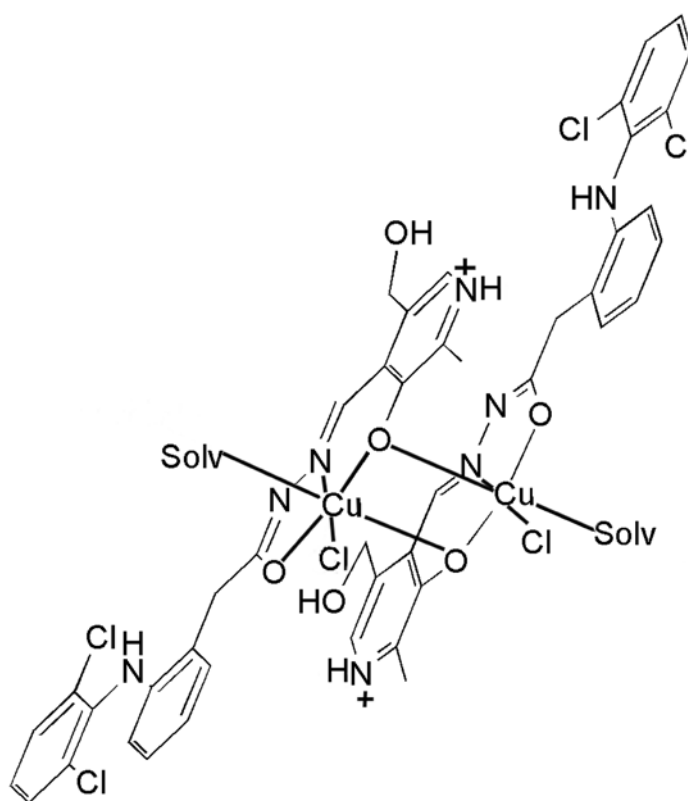


Figura 4.21 – Estrutura proposta para dímero formado a partir de **Cu5** em solução.

No espectro de **Ga5** no modo positivo foi observado o íon de m/z 983,48 atribuído à espécie $[\text{Ga}(\text{HPDH})_2]^+$ ($\text{C}_{44}\text{H}_{38}\text{Cl}_4\text{GaN}_8\text{O}_6$), enquanto que no modo negativo observou-se o íon de m/z 981,23 atribuído à espécie $[\text{Ga}(\text{PDH})_2]^-$ ($\text{C}_{44}\text{H}_{36}\text{Cl}_4\text{GaN}_8\text{O}_6$). Estas espécies reafirmam presença de uma espécie de estequiometria metal-ligante 1:2 conforme prevista pelos dados obtidos nas técnicas utilizadas na caracterização do sólido **Ga5**.

²⁰ D. Vidovic, A. Radulovic, V. Jevtovic, Polyhedron 30 (2011) 16.

Espectros de RMN

Na Tabela 4.9 encontram-se as atribuições os sinais observados nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de **5** e de **Ga5**. As atribuições nos espectros de RMN de ^1H foram feitas com base nos deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento para o espectro de cada composto. Os carbonos do tipo (C, CH) foram determinados pelo experimento DEPT135. As atribuições dos carbonos e prótons foram confirmadas correlacionando os dados obtidos em nossos experimentos com compostos semelhantes relacionados na literatura. A atribuição completa para os sinais de RMN foi feita apenas para o isômero em maior proporção (88 %).

No espectro de RMN de ^1H de **5** em $\text{DMSO-}d_6$ (Figura 4.22), sinais duplicados foram observados devidos ao aparecimento dos isômeros configuracionais *Z* e *E* em relação à ligação $\text{C7}=\text{N2}$.²¹ Nesse espectro não foram observados sinais que pudessem ser atribuídos aos hidrogênios ligados a N1 e O1, possivelmente devido à troca de seus hidrogênios por deutérios em solução. A ausência de um sinal atribuído ao hidrogênio ligado a O1 sugere uma configuração *Z* em torno da ligação $\text{C7}=\text{N2}$. Isto porque nesta forma o hidrogênio estaria mais disponível para troca com deutério proveniente do solvente, diferentemente do que ocorre na configuração *E*, em que esse hidrogênio estaria envolvido na ligação de hidrogênio $\text{O1}-\text{H}\cdots\text{N2}$, como observado nas estruturas cristalinas **5a** e **5b**.

Nos espectros de RMN de ^1H de **Ga5** ocorre o desaparecimento do sinal atribuído ao hidrogênio em N3, o que confirma a desprotonação do ligante nesta posição pela coordenação. Apesar de não ter sido anteriormente observado o sinal de $\text{H}-\text{O1}$, nós podemos observar em **Ga5** uma significativa alteração de H6, sugerindo a coordenação por O1.

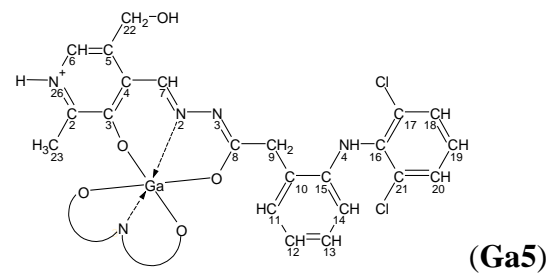
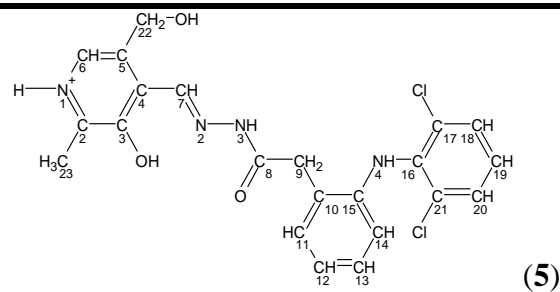
No espectro de RMN de ^{13}C de **Ga5** apenas um sinal foi observado para cada hidrogênio e cada carbono. Observa-se que o sinal atribuído ao carbono C8 desloca-se em relação posição na base livre confirmando que o oxigênio liga-se ao centro metálico (ver Tabela 4.9). Os sinais de RMN referentes ao hidrogênio ligado a C7 e ao carbono C7 sofrem grandes deslocamentos com a complexação, indicando que a coordenação do ligante ocorre também pelo nitrogênio N2. Os dados de RMN indicam que coordenação da hidrazona ao centro metálico ocorre através do sistema O-N-O.

Tanto as técnicas no estado sólido quanto as técnicas em solução indicam a formação de $[\text{Ga}(\text{HPDH})_2]^+$, como mostrado na estrutura cristalográfica de **Ga5a**.

²¹ A.P. Rebolledo, G.M. De Lima, L.N. Gambi, N.L. Speziali, D.F. Maia, C.B. Pinheiro, J.D. Ardisson, M.E. Cortés, H. Beraldo, *Appl. Organometal. Chem.* **17** (2003) 944.

Tabela 4.9 – Atribuições e deslocamentos químicos de RMN de ^1H , ^{13}C e subespectros DEPT135 de H_3PDHCl (**5**) e $[\text{Ga}(\text{HPDH})_2]\text{NO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**Ga5**), em $\text{DMSO}-d_6$. Na parte inferior da página estão representadas as estruturas genéricas numeradas para o ligante em **5** e **Ga5**.

Atribuições	RMN de ^1H (200 MHz)		RMN de ^{13}C (50 MHz)				
	Ga5		5		Ga5		
	δ	δ	δ	DEPT	δ	DEPT	
H6	7,68(s)	7,79(s)	C2	143,3	—	147,9	—
H7	8,23(s)	7,73(s)	C3	153,4	—	159,8	—
H9	3,90(s)	3,60(s)	C4	124,1	—	124,2	—
H11	7,35(d, $^3J_{\text{H11-H12}} = 7,2$ Hz)	7,20-6,95(m)	C5	137,3	—	137,6	—
H12	6,89(t, $^3J_{\text{H12-H11}} = 7,4$ Hz; $^3J_{\text{H12-H14}} = 7,2$ Hz)	6,72(t, $^3J_{\text{H12-H11}} = 7,4$ Hz; $^3J_{\text{H12-H14}} = 7,2$ Hz)	C6	131,2	↑	130,5	↑
H13	7,24-7,02(m)	7,20-6,95(m)	C7	143,4	↑	149,4	↑
H14	6,32(d, $^3J_{\text{H14-H3}} = 8,0$ Hz)	6,23(d, $^3J_{\text{H14-H3}} = 7,4$ Hz)	C8	168,7	—	176,2	—
H18, H20	7,53(d, $^3J_{\text{H18-H19}} = ^3J_{\text{H20-H19}} = 8,0$ Hz)	7,48(d, $^3J_{\text{H18-H19}} = ^3J_{\text{H20-H19}} = 7,8$ Hz)	C9	39,0	↓	37,6	↓
H19	7,24-7,02(m)	7,20-6,95(m)	C10	127,5	—	125,8	—
H22	4,79(s)	4,73(s)	C11	128,1	↑	125,3	↑
H23	2,65(s)	1,95(s)	C12	121,2	↑	121,2	↑
O1—H	n.o.	n.o.	C13	126,0	↑	123,7	↑
O2—H	7,24-7,02(m)	5,77(s,L)	C14	116,4	↑	116,6	↑
N1—H	n.o.	n.o.	C15	143,3	—	143,0	—
N3—H	13,46(s)	—	C16	137,4	—	137,9	—
N4—H	8,87(s)	9,00(s)	C17,C21	130,5	—	129,5	—
			C18,C20	129,6	↑	129,6	↑
			C19	129,4	↑	127,6	↑
			C22	58,4	↓	58,6	↓
			C23	14,8	↑	15,3	↑



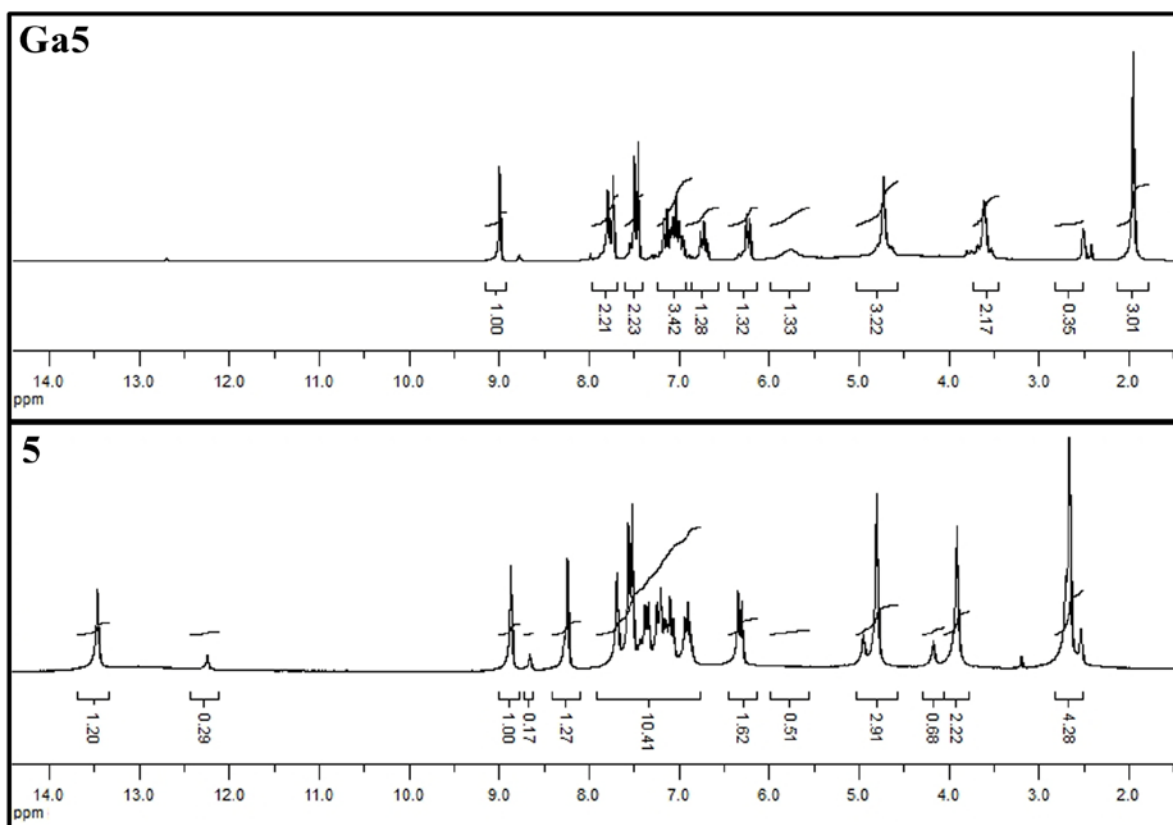


Figura 4.22 – Espectro de RMN de ¹H de **5** e **Ga5** (DMSO-*d*₆, 200 MHz).

Estudo da estabilidade de Ga5 em tampões de pH 1,20 e 6,80

Assim como para o ligante **5**, a estabilidade do complexo **Ga5** foi avaliada em soluções tampão de pH 1,20 e 6,80. Este estudo não foi realizado para **Cu5**, pois dependendo da concentração do composto já ocorre a modificação de sua espécie em solução.

As variações no espectro eletrônico de **Ga5** nas soluções tampão de pH 1,20 e 6,80 com o curso do tempo foram monitoradas à temperatura de 303 K e estão apresentados na Figura 4.23.

Em pH 1,20, podemos observar que o espectro de **Ga5** com o tempo torna-se muito semelhante ao observado para H₃PDH⁺ em pH 1,20 (Figura 4.12). Isto sugere que neste valor de pH o complexo é desfeito pela protonação do ligante, restituindo assim espécie do ligante livre (H₃PDH⁺) que ao ser formada sofre hidrólise a neste valor de pH.

Em pH 6,80, podemos observar que o complexo é estável em solução, mas menos solúvel, o que pode ser sugerido pelas perturbações observadas nos espectros eletrônicos nesta condição.

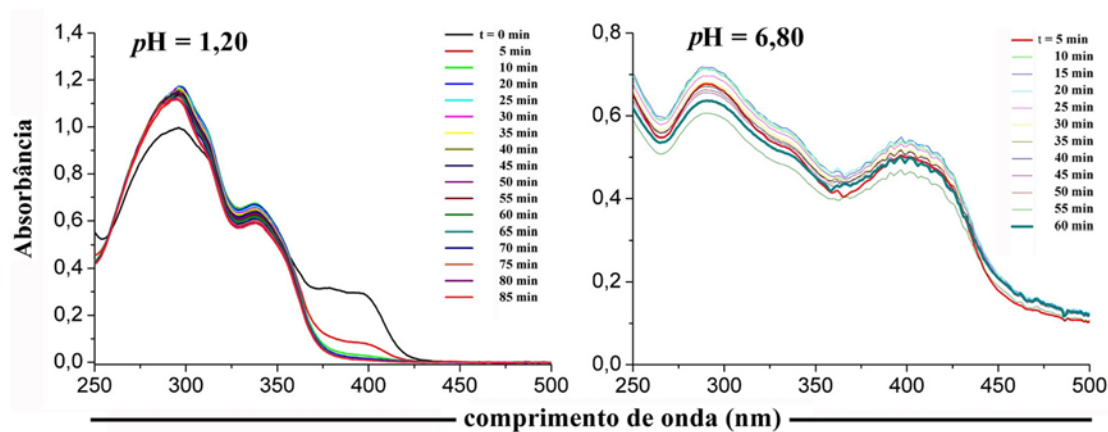


Figura 4.23 – Espectros eletrônicos de **Ga5** em soluções tampão de pH 1,20 e 6,80 com o curso do tempo à $T = 303$ K.

Essas evidências experimentais demonstram a participação de H_3O^+ no processo de degradação do complexo. Por isso, podemos julgar que este complexo pode ser degradado no estômago, o que deve ser levado em consideração nos estudos em animais. Assim a administração deste composto nesta situação deveria ser feita por vias parenterais.

4.2 Resultados biológicos

4.2.1 Interação com albuminas

O estudo da interação entre fármacos e proteínas do plasma tem sido uma importante área de pesquisa em química biológica e farmacologia. As albuminas séricas são as proteínas mais abundantes no plasma, e contribuem para o controle do pH e do equilíbrio da pressão osmótica do sangue, sendo também conhecidas por sua capacidade de ligar-se reversivelmente a uma grande quantidade de compostos, dentre eles fármacos, metais e até mesmos agentes tóxicos (pesticidas, e toxinas endógenas e exógenas).

Como resultado da interação entre composto-albumina pode ocorrer o aumento da solubilidade destes compostos no plasma, diminuição de sua toxicidade e proteção contra oxidação, entre outros efeitos. Como neste trabalho já foi verificado que **5** poderia ser administrado por via oral, interessou-nos investigar a sua afinidade por este tipo de proteína, de forma a entendermos melhor como seria a absorção deste composto no organismo.

Neste trabalho foram utilizadas a albumina de soro humano (ASH) e albumina de soro bovino (ASB). Essas albuminas séricas apresentam fluorescência intrínseca devido à presença dos resíduos de aminoácidos triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) em sua estrutura, onde a razão de intensidade de fluorescência para esses fluorofóros é de 100:9:0,5,

respectivamente.²² A supressão de sua fluorescência foi usada para investigar a afinidade de **5** por essas proteínas.

Na Figura 4.24 está apresentado o efeito do aumento da concentração de **5** sobre a intensidade de fluorescência dos espectros de emissão de ASB e ASH a 298 K. A única diferença observada entre as duas albuminas neste experimento foi uma menor intensidade de fluorescência para ASH, o que deve estar associado à presença de apenas um resíduo triptofano em ASH, Trp214, em um ambiente hidrofóbico, enquanto ASB possui dois resíduos triptofano, Trp134 (localizado na superfície da proteína) e Trp212 (localizado em uma região hidrofóbica dentro da proteína).²³

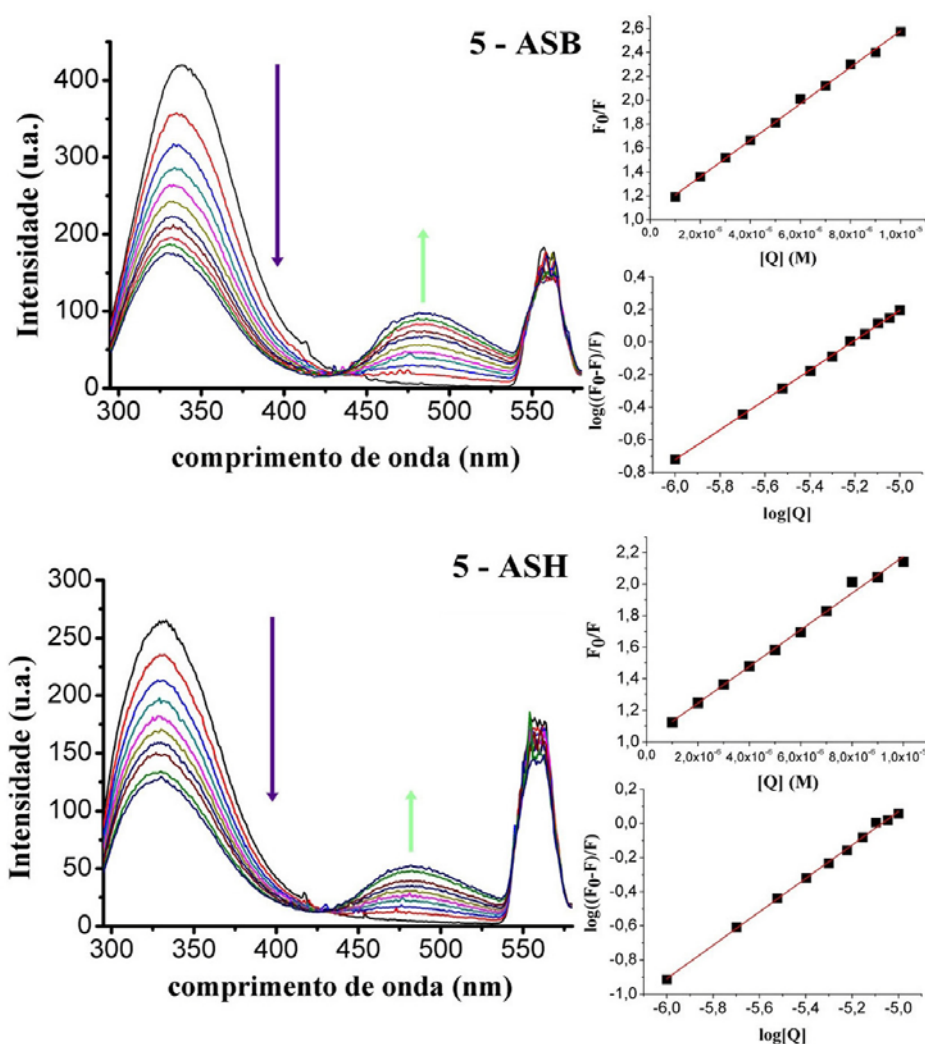


Figura 4.24 – Espectros de emissão de ASB (1,00 μM) e de ASH (1,00 μM) na ausência (espectro de maior intensidade para cada série) e após sucessivas adições de **5**. Condições da medida: $\lambda_{\text{exc.}} = 280 \text{ nm}$; tampão fosfato pH 7,20; e $T = 298 \text{ K}$. As setas indicam a diminuição da intensidade de emissão com o aumento da concentração de **5**. Gráficos de F_0/F vs $[Q]$ e $\log((F_0-F)/F)$ vs $\log[Q]$ para os dados de $\lambda_{\text{em.}} = 345 \text{ nm}$.

²² M. Ganeshpandian, R. Loganathan, S. Ramakrishnan, A. Riyasdeen, M.A. Abarsha, M. Palaniandavar, Polyhedron, no prelo.

²³ X.-L. Han, F.-F. Tian, Y.-S. Ge, F.-L. Jiang, L. Lai, D.-W. Li, Q.-L. Yu, J. Wang, C. Lin, Y.Liu, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 109 (2012) 1.

Durante a titulação de ASB e ASH com **5** foi observado o aparecimento de uma banda com máximo em 478 nm com o aumento da concentração de **5**, atribuída à fluorescência da espécie de **5** em solução. Além disso, foi observada a supressão da fluorescência em 345 nm, o que sugere a formação de um sistema albumina-**5**.

Com base nestes dados foram determinadas as constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) e de supressão bimolecular (k_q), descritas pela equação clássica de Stern-Volmer (Equações 2.1 e 2.2, Parte Experimental, seção 2.3.3) (Tabela 4.10).

Tabela 4.10 – Constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) e de supressão dinâmica (k_q) para a interação entre as albuminas séricas (HSA e ASB) e **5** a 298 K.

sistema	$K_{sv} (M^{-1})$	$k_q (M^{-1} s^{-1})$	R^2
ASB- 5	$(1,53 \pm 0,03) \times 10^5$	$(1,53 \pm 0,03) \times 10^{13}$	0,998
ASH- 5	$(1,16 \pm 0,03) \times 10^5$	$(1,16 \pm 0,03) \times 10^{13}$	0,998

Os valores obtidos de K_{SV} ($\sim 10^5 M^{-1}$) fazem com que os valores de k_q , que refletem a eficiência de supressão ou acessibilidade ao agente supressor, sejam maiores do que os observados em processos controlados por difusão ($k_q \sim 1 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$).²⁴ Deste modo, esses valores de k_q indicam que deve ocorrer uma interação por um sítio específico entre as albuminas séricas (ASB e ASH) e **5** nesses sistemas.

Espectros de fluorescência no modo sincrônico foram obtidos a fim de estudarmos as mudanças nos microambientes próximos aos resíduos de Tyr ($\Delta\lambda = 15$ nm) e Trp ($\Delta\lambda = 60$ nm) em ASB e ASH.

Em todos os casos (ver Figura 4.25), ocorre uma diminuição da intensidade de emissão com excitação próxima a 280 nm após as sucessivas adições de **5**. Esta modificação indica que os resíduos Trp e Tyr estão em um ambiente menos hidrofóbico, sendo assim mais expostos às moléculas do solvente, o que causaria a supressão da fluorescência dessas biomoléculas. Essas mudanças confirmam a interação entre as albuminas séricas (ASB e ASH) e **5**.

²⁴ Joseph R. Lakowicz, PRINCIPLES OF FLUORESCENCE SPECTROSCOPY, Plenum Publishing Corporation, 2^a ed, 1999, p. 241.

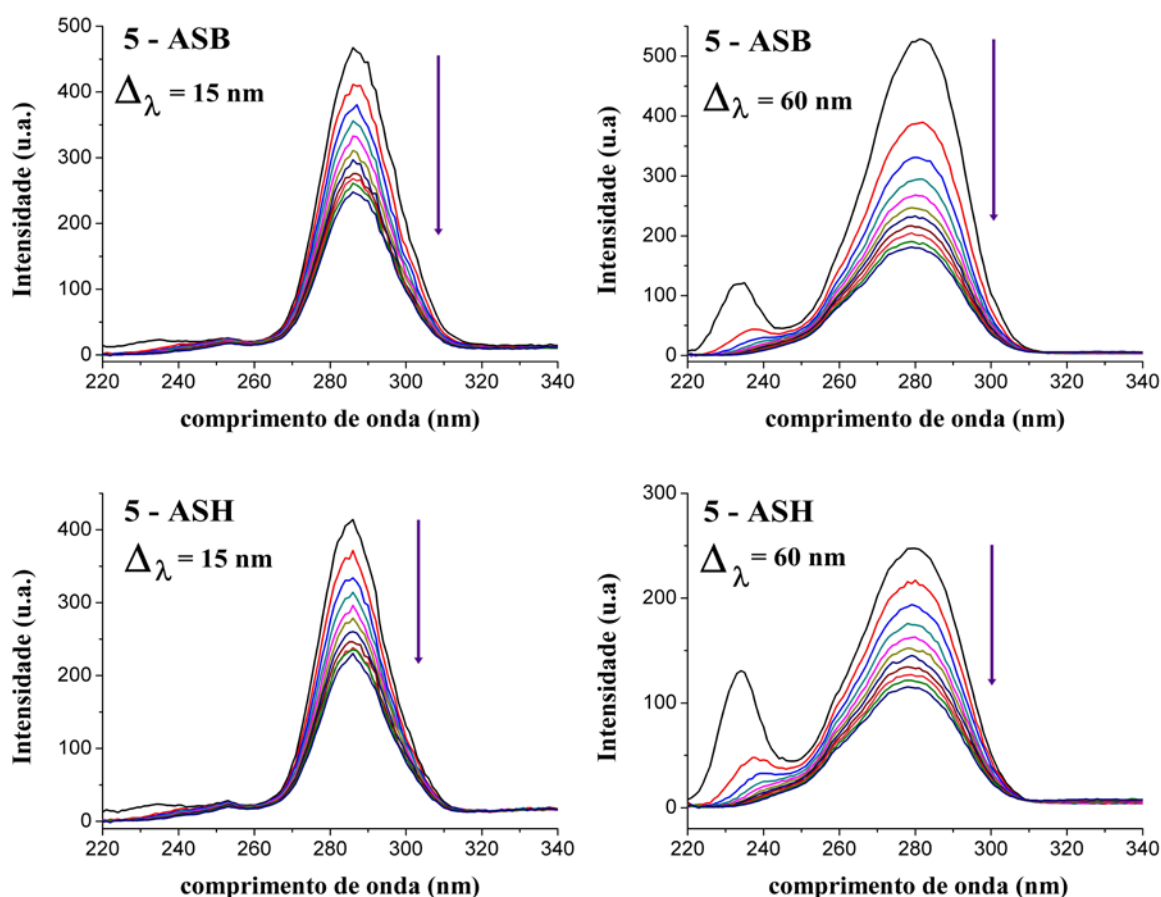


Figura 4.25 – Espectros de fluorescência no modo sincrônico de ASB (1,00 μM) e de ASH (1,00 μM) na ausência e após sucessivas adições de **5**. Condições da medida: faixa de $\lambda_{\text{exc.}}$ = 200 a 400 nm; tampão fosfato pH 7,20; e temperatura = 298 K. As setas indicam a diminuição da intensidade de emissão com o aumento da concentração de **5**.

Os dados da Figura 4.24 com $\lambda_{\text{em.}}$ em 345 nm foram ajustados ainda segundo a equação de Stern-Volmer modificada (Equação 2.3, Parte experimental, seção 2.3.3), sendo determinadas a fração da proteína acessível ao agente supressor (f_a) e a constante de supressão efetiva (K_a), que é análoga à constante de associação para o sistema agente supressor–proteína.²³ A equação de Scatchard (Equação 2.4, Parte experimental, seção 2.3.3) foi empregada para a determinação da constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n). Esses dados estão apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 – Constantes de supressão efetiva (K_a), de ligação (K_b), fração da proteína acessível ao agente supressor (f_a) e número de sítios de ligação (n) para a interação as albuminas séricas (HSA e ASB) e **5** a 298 K.

sistema	K_a (M^{-1})	f_a	R^2	K_b	n	R^2
ASB-5	$(2,28 \pm 0,02) \times 10^5$	$(0,887 \pm 0,016)$	0,999	$(5,95 \pm 0,57) \times 10^4$	$0,92 \pm 0,01$	0,999
ASH-5	$(1,29 \pm 0,01) \times 10^5$	$(0,954 \pm 0,018)$	0,999	$(9,06 \pm 0,30) \times 10^4$	$0,98 \pm 0,02$	0,999

Na faixa de 298 a 303 K, muitas moléculas neutras e carregadas negativamente se ligam às albuminas séricas com constante de associação entre 10^3 e 10^5 M^{-1} . **Erro! Indicador não definido.** Os valores K_a e K_b e f_a para o sistema ASB-**5** e ASH-**5** encontram-se nesta faixa, demonstrando a capacidade de **5** em interagir com albuminas séricas. De fato, os valores de K_b e f_a para o sistema ASH-**5** são próximos aos valores observados para o diclofenaco em sua forma aniônica ($K = 7,94 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $f = 99,5$).²⁵

Todos os resultados obtidos aqui comprovam a interação entre albuminas séricas e **5**, sugerindo que este composto poderia ser transportado por essas proteínas no organismo.

4.2.2 Atividade antinociceptiva

A atividade aninociceptiva de **5** foi avaliada em dois modelos animais, denominados de hiperalgisia térmica de Hargreaves e o modelo de contorção abdominal induzida por *zymozan* A. Além de **5**, outros grupos de compostos foram avaliados nestes testes, e são eles: cloridrato de piridoxaldeído (PA), diclofenaco hidrazida (DIH), H_3PDHCl (**5**) e a associação de cloridrato de piridoxaldeído com diclofenaco hidrazida (PA+DIH). Todos estes compostos foram avaliados em doses equivalentes em mol a de 10 mg Kg^{-1} ($31,4 \text{ } \mu\text{mol Kg}^{-1}$) de diclofenaco de sódio (DIC), fármaco usado como controle positivo.²⁶ O veículo é o grupo constituído de uma solução, nas mesmas condições dos compostos testados, sem o composto dito antinociceptivo (controle negativo). Os complexos não foram avaliados nestes experimentos.

Todos os compostos foram administrados por via oral (*per os*), uma vez que dados em solução atestam a estabilidade destes compostos.

Avaliação da resposta nociceptiva pelo modelo de hiperalgisia térmica de Hargreaves em ratos

Hargreaves é um modelo para avaliar o grau de hiperalgisia térmica em animais previamente tratados com os compostos ditos antinociceptivos. Na Figura 4.26 estão apresentados os resultados obtidos para os grupos propostos durante o experimento realizado com doses equivalentes em mol à dose de 10 mg Kg^{-1} de diclofenaco de sódio. Neste experimento DIC manifesta atividade antinociceptiva nos intervalos de duas e quatro horas após a aplicação da injeção de carragenina.

Nos intervalos de 2, 4 e 6 horas observamos que PA e DIH manifestam efeito antinociceptivo semelhante ao observado para o DIC. De fato, é sabido que a piridoxina (ver

²⁵ M. Yang, Q. Xiao, X. Xi, Chin. J. Chem. 24 (2006) 642.

²⁶ S.V. Bhandari, K.G. Bothara, M.K. Raut, A.A. Patil, A.P. Sarkate, V.J. Mokale, Bioorg. Med. Chem. 16 (2008) 1822.

Figura 4.2) apresenta resposta antinociceptiva nos modelos do formaldeído e ácido acético,²⁷ então podemos sugerir que a atividade antinociceptiva observada para o piridoxaldeído esteja relacionada à sua conversão a piridoxal 5'-fostato. Esta é a principal forma em que são metabolizados os compostos que compõem os grupos das vitaminas B₆.

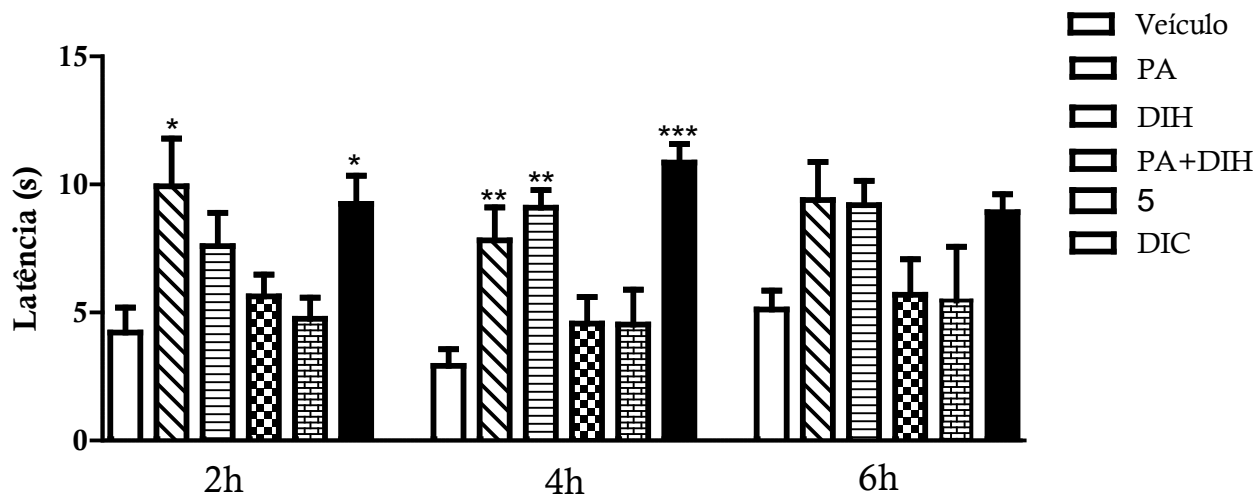


Figura 4.26 – Efeito antinociceptivo de diclofenaco de sódio (DIC), cloridrato de piridoxaldeído (PA), diclofenaco hidrazida (DIH), H₃PDHCl (**5**) e a associação de piridoxaldeído com diclofenaco hidrazida (PA+DIH) (doses equivalentes em mol a 10 mg Kg⁻¹ de diclofenaco de sódio), *p. o.*, 2, 4 e 6 horas após a injeção de carragenina (i. pl., 50 µL, 10 mg mL⁻¹) em ratos. n= 5 a 6. * Estatisticamente significativo com relação ao veículo (p<0,05). **Estatisticamente significativo com relação ao veículo (p<0,01). ***Estatisticamente significativo com relação ao veículo (p<0,001).

Para DIH podemos observar ainda que sua resposta foi melhor após 4 horas, o que sugere que sua farmacocinética é diferente do DIC, ou seja, os níveis do compostos no sangue para manifestar atividade antinociceptiva levam mais tempo para serem atingidos.

PA+DIH e **5** não apresentam atividade antinociceptiva na dose testada, sendo os valores médios obtidos para estes grupos durante o experimento muito próximos ao do veículo. Com base nesses resultados verificou-se que **5** não mostrou atividade antinociceptiva neste modelo na dose testada.

Avaliação da resposta nociceptiva induzida por zymosan A em camundongos

A resposta nociceptiva induzida por *zymosan A* em camundongos foi avaliada para os grupos propostos em doses equivalentes em mol à dose de 10 mg Kg⁻¹ de diclofenaco de sódio (DIC) (Figura 4.27.(A)). Além disso, outro experimento dose-resposta foi realizado para **5** nas doses equivalentes em mol a 10, 20 e 40 mg Kg⁻¹ de DIC (Figura 4.27.(B)).

²⁷ D.S. França, A.L.S. Souza, K.R. Almeida, S.S. Dolabella, C. Martinelli, M.M. Coelho, Eur. J. Pharm. 421 (2001) 157.

A resposta nociceptiva deste modelo está relacionada à migração de macrófagos para a região onde foi aplicado o *zymosan A*, o que leva os animais a manifestarem estímulos dolorosos na forma de contorções da musculatura abdominal.

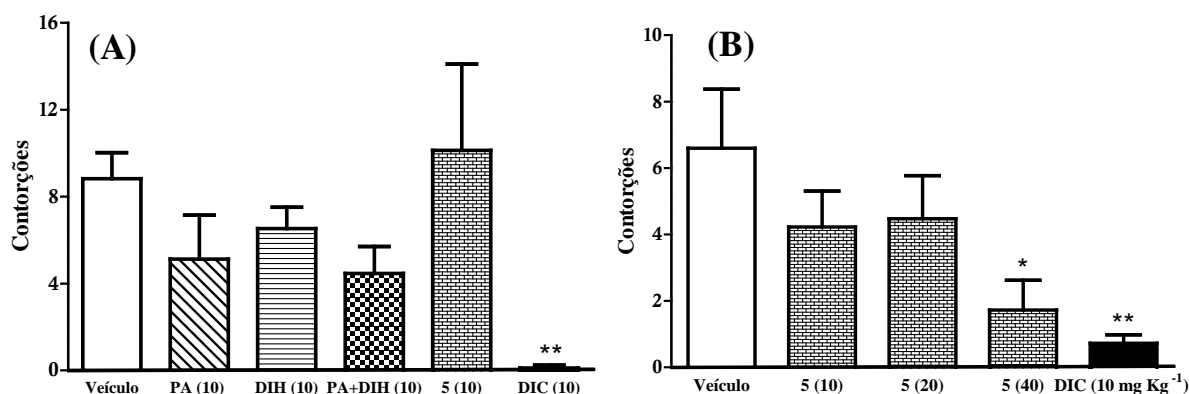


Figura 4.27 – (A) Efeito antinocicepivo de diclofenaco de sódio (DIC), cloridrato de piridoxaldeído (PA), diclofenaco hidrazida (DIH), H₃PDHCl (**5**) e a associação (PA+DIH) nas doses equivalentes em mol a 10 mg Kg⁻¹ de diclofenaco de sódio. (B) Efeito antinocicepivo de **5** nas doses equivalentes em mol a 10, 20 e 40 mg Kg⁻¹ de DIC. DIC foi usado como controle positivo na dose de 10 mg Kg⁻¹. Condições dos experimentos: *p. o.*, 20 min, resposta nociceptiva induzida por *zymosan A* (i. p., 40 mg Kg⁻¹) em camundongos (n = 6 a 7 animais). * Estatisticamente significativo com relação ao veículo (p<0,05). ** Estatisticamente significativo com relação ao veículo (p<0,01).

Como esperado, DIC apresenta atividade antinociceptiva, o que valida o experimento. PA, DIH, e PA+DIH não apresentaram atividade neste modelo, tendo em vista que os valores não são estatisticamente diferentes do veículo. No entanto, se observarmos a Figura 4.27.(A) há uma tendência desses compostos a apresentarem uma resposta nociceptiva, o que poderia ser conseguido num estudo dose-resposta. Este estudo não foi realizado para PA, DIH, pois estes compostos já haviam mostrado atividade no modelo de hiperalgesia térmica de Hargreaves em ratos.

No modelo do *zymozan A 5* não apresenta resposta antinociceptiva em dose equivalentes em mol à dose de 10 mg Kg⁻¹ de DIC. No entanto no experimento dose-resposta realizado para **5**, Figura 4.27.(B), mostrou-se que o composto apresenta uma atividade antinociceptiva em uma dose quatro vezes maior à equivalente em mol de DIC (10 mg Kg⁻¹). Apesar de **5** apresentar uma atividade antinociceptiva menor que seus precursores, procuramos avaliar se sua administração aos animais ocasionaria lesões gástricas.

4.2.3 Avaliação da atividade motora

Para validar os experimentos comportamentais que atestam a atividade antinociceptiva no caso dos modelos de *zymozan A* e *Hargreaves*, o experimento da haste girante foi realizado.

Neste experimento foi avaliado o grau de comprometimento da atividade motora após a administração do composto, seja por ação depressora do sistema nervoso central ou por causar relaxamento muscular.

Na Figura 4.28.(A) estão apresentados os resultados obtidos para PA e DIH (em ratos) e na Figura 4.28.(B) o resultado obtido para **5** (em camundongos), compostos estes que demonstraram atividade antinociceptiva nos modelos de *Hargreaves* e *zymozam A*, respectivamente.

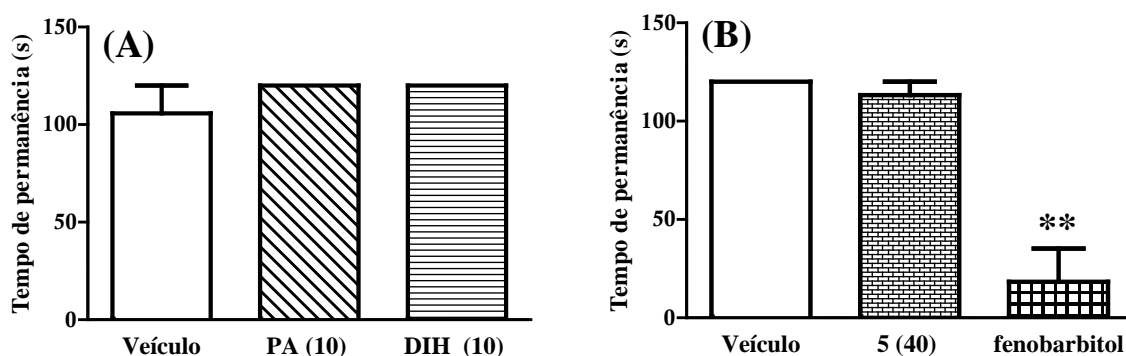


Figura 4.28 – (A) Avaliação da atividade motora de piridoxaldeído (PA) e diclofenaco hidrazida (DIH) em doses equivalentes em mol a 10 mg Kg⁻¹ de diclofenaco de sódio, *p.o.*, 3 horas após a administração do composto em ratos. n= 5 a 6. (B) Avaliação da atividade motora de H₃PDHCl (**5**) em doses equivalentes em mol a 10 mg Kg⁻¹ de diclofenaco de sódio, *p. o.*, 3 horas após a administração do composto em camundongos. n= 5 a 6. ** Estatisticamente significativo com relação ao veículo (p<0,01).

Os resultados aqui obtidos indicam que estes compostos não interferem na coordenação motora dos animais, o que valida a resposta antinociceptiva observada.

4.2.4 Modelo de lesões gástricas induzidas por diclofenaco de sódio (DIC), cloridrato de piridoxaldeído (PA), diclofenaco hidrazida (DIH), H₃PDHCl (**5**) em ratos

Como citado anteriormente, a inibição de ciclo-oxigenases (COX) é um dos mecanismos de ação anti-inflamatória do diclofenaco, o que também explica os efeitos adversos associados a este fármaco. A fim de avaliarmos se cloridrato de piridoxaldeído (PA), diclofenaco hidrazida (DIH) e **5** poderiam apresentar menor gastrotoxicidade que o diclofenaco de sódio (DIC) (controle positivo), todos os composto foram testados no modelo de lesão gástrica em doses equivalente em mol a 80 mg Kg⁻¹ de DIC, como descrito por R.S. Devi e colaboradores.²⁸

²⁸ R.S. Devi, S. Narayan, G. Vani, C. S.S. Devi, *Chemico-Biological Interact.* 167 (2007) 71.

Após a retirada dos estômagos dos animais, a soma dos comprimentos das lesões gástricas e o pH do estômago foram registrados para os grupos analisados e encontram-se apresentado a Figura 4.29.

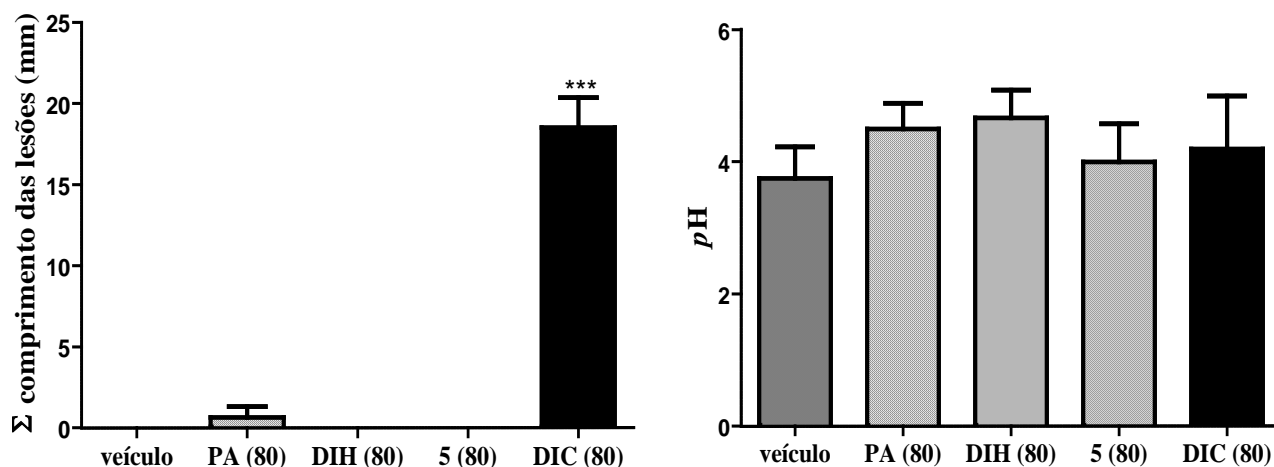


Figura 4.29 – (A) Comprimento das lesões gástricas induzidas por cloridrato de piridoxaldeído (PA), diclofenaco hidrazida (DIH), H₃PDHCl (**5**) em doses equivalentes a 80 mg Kg⁻¹ de diclofenaco de sódio (DIC). *** Estatisticamente significativo com relação ao veículo (p<0,001). (B) Valores do pH do estômago obtidos para PA, DIH e **5** em doses equivalentes em mol a 80 mg Kg⁻¹ de DIC no modelo de lesão gástrica.

A administração oral dos compostos produziu lesões na mucosa gástrica dos ratos do grupo controle (DIC) que puderam ser visualizadas macroscopicamente como pontos circundados de azul na Figura 4.30 (direita), devido às estrias hemorrágicas. No caso de PA, apenas pequenas lesões foram observadas nesta dose (Figura 4.30, esquerda). Para DIH e **5**, não foram observadas lesões após o tratamento (Figura 4.30.A).

Não houve diferença significativa entre o pH gástrico do grupo tratado com veículo (pH 3,8) e os grupos tratados com PA, DIH e **5**. Isto sugere que a adição dos compostos nesta concentração não promoveu nenhuma desordem na secreção gástrica. É importante ressaltar que o pH do suco gástrico dos ratos (pH 3-4)²⁹ é ligeiramente mais elevado que o pH gástrico humano (1-2).

²⁹ E. L. McConnell, A.W. Basit, S. Murdan, J. Pharm. Pharmacol. 60 (2008) 63.

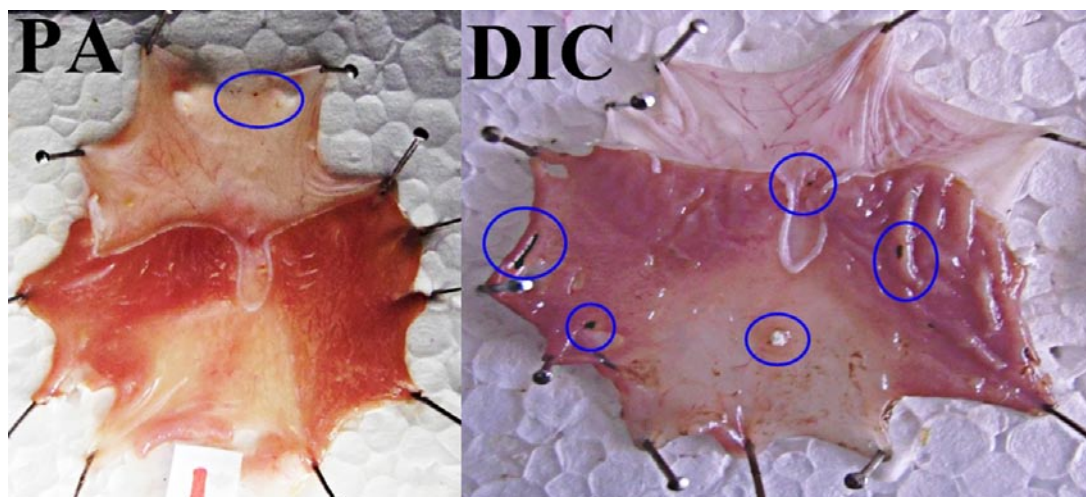


Figura 4.30 – Lesões gástricas (pontos circundados de azul) geradas por cloridrato de piridoxaldéido (PA 80 mg kg⁻¹) e diclofenaco de sódio (DIC 80 mg kg⁻¹).

Os resultados aqui obtidos indicam que PA, DIH e **5** causam menos lesões gástricas que o DIC. No caso de **5**, apesar de apresentar atividade antinociceptiva menor que DIC ele também apresenta menor capacidade em induzir lesões gástricas, um ponto positivo se pensarmos em sua utilização como um agente anti-inflamatório.

4.2.5 Interação de **5** com íons metálicos

A interação entre **5** e íons metálicos foi avaliada através de titulações espectrofotométricas deste composto com soluções de cloretos de cálcio(II), cobre(II) e zinco(II), e nitrato de gálio(III) em relações molares $[M]/[5] = 0,5; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 2,25; 2,5; 2,75$ e 3 à temperatura de 298 K. Na Figura 4.31 estão apresentados os espectros eletrônicos obtidos durante este experimento.

A escolha destes metais foi baseada na sua importância biológicas,^{30,31,32} além de serem bons representantes para os principais estados de oxidação de íons presentes em macromoléculas.³⁰ Todos estes sais são completamente solúveis na solução metanólica (85%) com tampão Tris-HCl (pH = 7,20). Em todos os casos, a principal espécie de **5** inicialmente presente em solução é a H₂PDH (ver dados da seção 2.1.1.2).

Com a adição de Ca(II) não foi observada qualquer alteração nos espectros eletrônicos em relação ao espectro do ligante livre, demonstrando que este ligante não é capaz de interagir com Ca(II). Este mesmo comportamento pode ser esperado para outros cátions de metais

³⁰ Ed. N. Farrel, USES OF INORGANIC CHEMISTRY IN MEDICINE (ISBN 0-8 5404-444-2), The Royal Society of Chemistry, 1999.

³¹ P. Collery, B. Keppler, C. Madoulet, B. Desoize, Crit. Rev. Oncol./Hematol. 42 (2002) 283.

³² L.R. Bernstein, Pharmacol. rev. 50 (1998) 665.

alcalinos terrosos, tais como o Mg(II) que é um importante ativador para mais de 300 enzimas com papéis fundamentais na transferência, estocagem e utilização de energia.³³

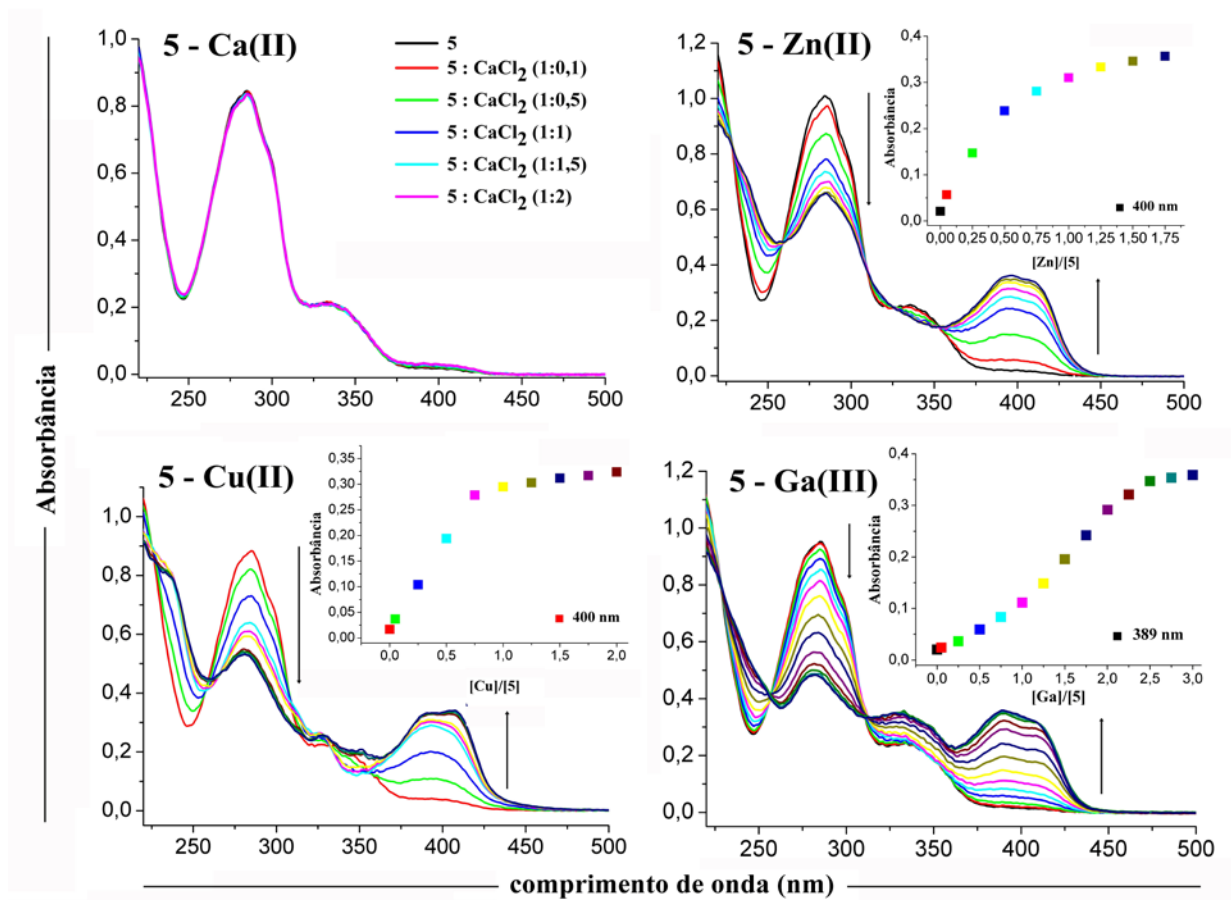


Figura 4.31 – Espectros obtidos para titulações espectrofotométrica de **5** em solução metanólica 85% com tampão Tris-HCl (pH = 7,20) com adições sucessivas de soluções de CaCl₂, ZnCl₂, CuCl₂ e Ga(NO₃)₃. Condições: concentração de **5** = 36,9 μM; força iônica ajustada com NaCl (I = 0,1); e T = 298 K.

Com a adição dos sais de Zn(II), Cu(II) e Ga(III) foram observadas significativas modificações nas transições intraligantes. No caso da titulação com Zn(II) e Cu(II) a estequiometria obtida foi 1:1 (metal: ligante). Como o espectro eletrônico para o sistema **5**-Cu(II) na relação molar (1:1) é muito similar ao observado para **Cu5** (Figura 4.20), podemos sugerir que o ligante encontra-se coordenado ao metal em solução como proposto no sólido.

No caso da titulação com Ga(III) a estequiometria da reação é diferente de 1:1 e 1:2, valores esperados para este tipo de complexo. Além disso, a forma dos espectros eletrônicos nesta situação é diferente daquela observada para o espectro de **Ga5**. Deste modo, não podemos sugerir nada sobre a forma que o ligante se liga ao Ga(III) em solução. No entanto, o ligante é capaz de quelar este tipo de metal, o que pode ser comprovada pela formação de **Ga5**.

³³ Ed. N. Farrel, USES OF INORGANIC CHEMISTRY IN MEDICINE (ISBN 0-8 5404-444-2) The Royal Society of Chemistry, 1999, p. 18.

Os dados aqui obtidos atestam a capacidade de **5** em atuar como um agente quelante de Cu(II), Zn(II) e Fe(III) em solução.

4.2.6 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de **5**, **Cu5** e **Ga5** foi avaliada contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 10231.

No entanto, todos os compostos apresentaram valores de CIM maiores que 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, maior concentração usada no teste. Os valores obtidos para os fármacos de controle foram de 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ contra *S. aureus* ATCC 6538 (cloridrato de tetraciclina), 6,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ contra *P. aeruginosa* ATCC 27853 (cloridrato de tetraciclina) e 4,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ contra *C. albicans* ATCC 10231 (fluconazol). Logo, estes resultados sugerem uma fraca atividade antimicrobiana para estes compostos.

Isto é um resultado interessante no caso de **5**, pois não se espera que durante o tratamento com um composto anti-inflamatório ocorram alterações na microbiota intestinal do indivíduo.

4.2.7 Atividade citotóxica

Estudos preliminares do efeito citotóxico de diclofenaco de sódio (DIC), cloridrato de piridoxaldeído (PA), diclofenaco hidrazida (DIH), H_3PDHCl (**5**), $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ e $[\text{Ga}(\text{HPDH})_2]\text{NO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (**Ga5**) foram realizados contra a linhagem de células leucemias, HL-60 (leucemia mieloide) e Jurkat (leucemia linfoide), e células de tumores sólidos, HCT-116 (carcinoma colorretal) e MCF-7 (carcinoma mamário). Os efeitos desses compostos sobre a proliferação celular nas diferentes linhagens estão mostrados na Figura 4.32.

Todos os compostos avaliados apresentaram valores para atividade proliferativa maiores que 50% a 10 μM , indicando que a concentração inibitória de 50% das células viáveis (CI_{50}) deve ser maior que 10 μM . Isto é um indício de que estes compostos apresentam baixa citotoxicidade.

O único composto que teve o seu valor de CI_{50} determinado foi **Ga5** contra células HL-60, $\text{CI}_{50} = 9,935 \mu\text{M}$ com intervalo de confiança a 95% (IC) entre 3,469-28,45 μM . No entanto, este valor é maior que o observado para a cisplatina usada como controle nesta situação, $\text{CI}_{50} = 0,108 \mu\text{M}$ e $\text{IC} = (0,049-1,945)$.

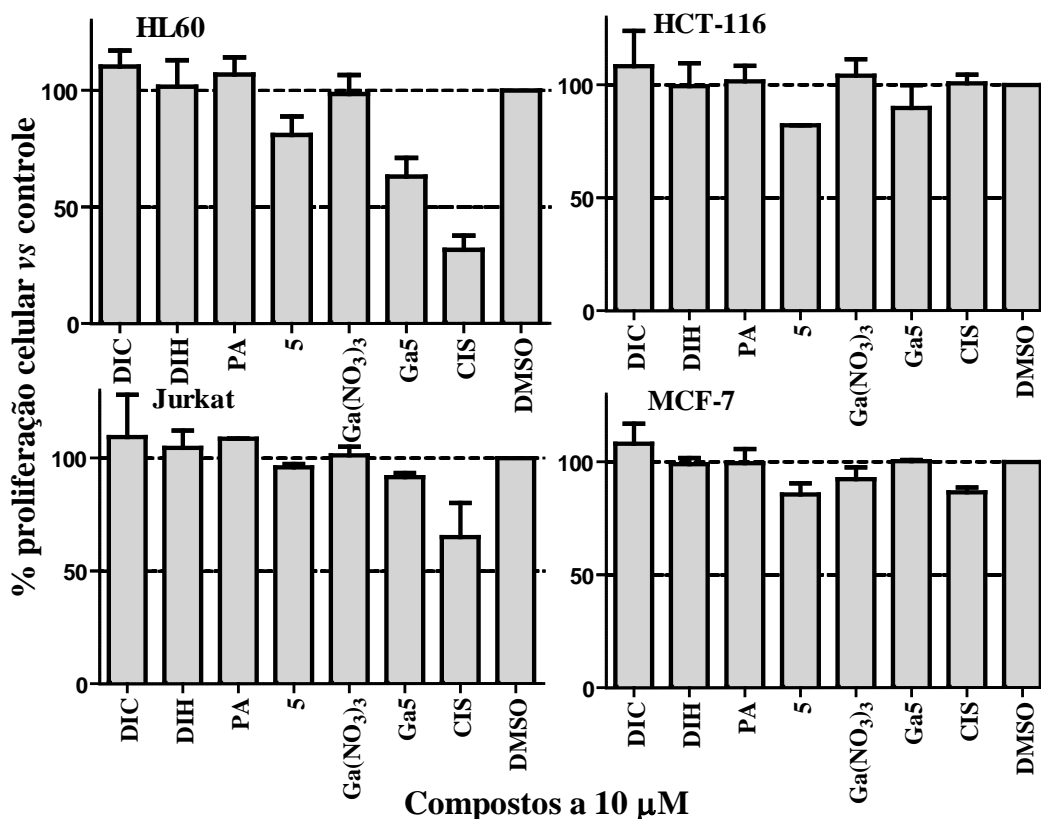


Figura 4.32 – Efeito citotóxico de diclofenaco de sódio (DIC), cloridrato de piridoxaldeído (PA), diclofenaco hidrazida (DIH), H₃PDHCl (**5**), Ga(NO₃)₃, [Ga(HPDH)₂]NO₃·4H₂O (**Ga5**) e cisplatina contra as linhagens de células HL-60, Jurkat, HCT-116 e MCF-7. As células foram tratadas com os compostos (10 μM) por 48 h e a proliferação celular foi medida pelo ensaio de MTT. Dados são expressos como média ± desvio padrão em comparação com o controle (células tratadas com DMSO, 0,1%) de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Como **5** foi fracamente ativo como agentes citotóxicos nas linhagens testadas, apresenta capacidade de quelar Zn(II) e Cu(II), encontra-se na forma neutra em pH = 7,4, e seu $\log P$ ($3,83 \pm 0,78$) seria adequado para atravessar a barreira hematoencefálica ($1,5 < \log P < 5,0$),³⁴ ele poderia ser considerado um interessante de agente quelante para a remoção de metais como Zn(II) e Cu(II) em agregados de proteína β-amiloide, uma das causas relacionadas ao mal de Alzheimer.³⁵ Além disso, como o estresse oxidativo causado pela acumulação dos metais pode gerar processos inflamatórios, o estudo de **5** seria com agente quelante nessa situação seria altamente recomendado.

³⁴ L.E. Scott, C. Orvig, Chem. Rev. 109 (2009) 4885.

³⁵ A. Sereniki, M.A.F. Vital, Rev. Psiquiatr. RS. (2008) 30.

Capítulo 5

Discussão e Conclusões

O presente trabalho consistiu na síntese, caracterização e avaliação do perfil farmacológico de tiossemicarbazonas derivadas de chalconas, da hidrazona derivada de piridoxaldeído e diclofenaco, bem como de seus complexos metálicos visando obter novas moléculas capazes de atuar como agentes antimicrobianos, antitumorais e antinociceptivos.

Obtivemos sucesso em preparar vinte compostos inéditos a partir das chalconas 3-fenil-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona (PyCPh), 3-(4-cloro-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona (PyC4ClPh), 3-(4-bromo-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona (PyC4BrPh) e 3-(4-nitro-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona (PyC4NO₂Ph). Foram obtidas quatro tiossemicarbazonas derivadas das chalconas: 3-fenil-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona tiossemicarbazona [HPyCTPh (**1**)], 3-(4-cloro-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona tiossemicarbazona [HPyCT4ClPh (**2**)], 3-(4-bromo-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona tiossemicarbazona [HPyCT4BrPh (**3**)] e 3-(4-nitro-fenil)-1-(2-piridil)-prop-2-en-1-ona tiossemicarbazona [HPyCT4NO₂Ph (**4**)]. Foram igualmente preparados os complexos de Ga(III), Zn(II), Fe(III) e Cu(II) das tiossemicarbazonas **1-4**.

Os complexos de Ga(III) (**Ga1-Ga4**) e Fe(III) (**Fe1-Fe4**) são do tipo [M(L)₂]NO₃, M = Ga(III) ou Fe(III), e os de Zn(II) (**Zn1-Zn4**), do tipo [Zn(L)₂], em que L = tiossemicarbazona em sua forma aniônica. Nesses casos, a tiossemicarbazona atua como ligante tridentado coordenando-se ao centro metálico através do sistema N_{py}-N-S. Os complexos de Cu(II) são do tipo [Cu(HL)Cl₂] (**Cu1-Cu4**), onde HL é a tiossemicarbazona na forma zwitteriônica (com o nitrogênio da piridina protonado) ligada ao metal pelo sistema N-S.

A atividade antimicrobiana de chalconas, tiossemicarbazonas e seus complexos de Ga(III), Fe(III), Zn(II) e Cu(II) foi avaliada contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo *Candida albicans*. As chalconas de partida foram ativas contra *S. aureus* e *C. albicans* mas inativas contra *P. aeruginosa*. Em alguns casos as tiossemicarbazonas mostraram-se mais ativas que as chalconas precursoras. A coordenação Ga(III), Fe(III), Zn(II) e Cu(II) resultou em compostos mais ativos que as tiossemicarbazonas livres. Os melhores resultados foram obtidos para os complexos de Ga(III) e Cu(II) sendo estes os únicos compostos desta série ativos contra *P. aeruginosa*. Para **Ga1-Ga4** podemos sugerir que o mecanismo de ação desses complexos contra *P. aeruginosa* envolveria a substituição de Fe(III)

pelo Ga(III) no meio biológico, o que justificaria sua maior atividade antimicrobiana em relação aos complexos de Fe(III) e Zn(II) de mesmo número de coordenação. No caso dos complexos de Cu(II), o aumento da atividade antimicrobiana em relação à tiossemicarbazona livre poderia estar associada ao caráter redox do metal. Todos os complexos foram melhores que seus respectivos sais de partida.

Estudos do efeito citotóxico das chalconas, tiossemicarbazonas e complexos de Ga(III) a 10 μ M foram realizados contra linhagens celulares de tumor sólido HCT-116 (carcinoma colorretal) e MCF-7 (carcinoma mamário), e contra leucemias HL-60 (leucemia mieloide) e Jurkat (leucemia linfóide). As chalconas foram os compostos menos ativos nas quatro linhagens testadas. Com exceção da linhagem de MCF-7, as tiossemicarbazonas, em geral, foram mais ativas que as chalconas de partida. Os melhores resultados foram obtidos contra as linhagens de HCT-116 e HL-60. Os compostos **1**, **Ga1**, **2**, **Ga2**, **3** e **Ga3** foram mais ativos contra HCT-116 que a cisplatina utilizada como controle. As tiossemicarbazonas e os complexos de Ga(III) inibiram de forma similar ao cisplatina o crescimento de células HL-60. Os resultados sugerem que as tiossemicarbazonas e seus complexos de Ga(III) apresentam atividade citotóxica. Exceto para **1**, todos os compostos apresentaram valores de CI_{50} inferiores ao da cisplatina contra células HL-60. Além disso, os complexos de Ga(III) apresentaram valores de CI_{50} menores que as tiossemicarbazonas livres contra essa linhagem celular, indicando que a estratégia da coordenação ao Ga(III) levou a um aumento da atividade citotóxica desses compostos. Os resultados sugerem que tanto tiossemicarbazonas quanto seus complexos de Ga(III) são potenciais agentes citotóxicos.

Foi investigado o efeito citotóxico das tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II) a 10 μ M contra linhagens de células leucêmicas HL-60 e Jurkat e de tumor sólido MDA-MB 231 (carcinoma mamário) e HCT-116. Em geral, as tiossemicarbazonas e seus complexos foram capazes de inibir 75% ou mais da proliferação celular. Os resultados sugerem um aumento da citotoxicidade dos compostos com a coordenação ao Cu(II), ainda que $CuCl_2$ tenha se mostrado inativo nessa concentração. O valor de CI_{50} dos complexos foi determinado nas quatro linhagens celulares sendo que vários deles apresentam atividade citotóxica em concentrações nanomolares. As células HL-60 foram mais suscetíveis as tiossemicarbazonas livres do que as células MDA-MB 231. Os complexos foram mais ativos nas células MDA-MB 231 do que na linhagem HL-60. De fato, exceto para **Cu4**, não foram observadas diferenças entre as atividades de tiossemicarbazonas e seus respectivos complexos na linhagem celular HL-60. O maior aumento de atividade citotóxica pela coordenação ao Cu(II) ocorreu contra células MDA-MB 231.

As tiossemicarbazonas e **Cu4** induziram consideravelmente a fragmentação de ADN em células HL-60, sugerindo que apresentam atividade pró-apoptótica. Nas células Jurkat somente

Cu4 induziu o aparecimento de ADN subdiploide próximo de 50 %, sugerindo que esse complexo induz a morte celular por apoptose. Nas células MDA-MB 231 e HCT-116 todos os complexos de Cu(II) induziram 75% de conteúdo de ADN subdiploide, indicando que os complexos induzem a morte dessas células por apoptose. No entanto, na presença das tiossemicarbazonas observou-se baixo conteúdo de ADN subdiploide, ou seja, as tiossemicarbazonas livres agiriam por meio de um mecanismo de ação distinto.

Foi atestado ainda que concentrações muito baixas das tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II) promoveram cerca de 50% de inibição na proliferação de células de sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) estimuladas com PHA, indicando que os compostos poderiam causar danos ao sistema imune, mas isso também ocorreu com as células tratadas com a cisplatina.

Os complexos de Cu(II) (**Cu1-Cu3**) apresentaram ainda capacidade de interagir com a albumina do soro bovino (ASB) e com o ADN. No caso da interação com o ADN os dados obtidos a partir das titulações espectrofotométricas sugerem que pode ocorrer intercalação dos compostos entre os pares de bases do ADN.

Obtivemos sucesso em preparar o cloridrato de piridoxal diclofenaco hidrazona (H_3PDHCl , **5**) e seus complexos $[Cu(H_2PDH)Cl]Cl \cdot 2H_2O$ (**Cu5**) e $[Ga(HPDH)_2]NO_3 \cdot 4H_2O$ (**Ga5**).

Com o estudo dos equilíbrios de **5** em solução verificou-se a formação de, no mínimo, três espécies com a variação do pH, sendo determinadas as constantes de acidez relacionadas às modificações destas espécies no meio. O estudo da estabilidade de **5** em pH 1,20 e 6,80 demonstrou que o composto sofre hidrólise ácida no tampão de pH 1,2. No entanto, a meia-vida para esse processo foi relativamente longa ($t_{1/2} \cong 112$ min), sugerindo que o composto poderia ser administrado por via oral em testes com animais. No caso de **Ga5** o estudo de estabilidade em pH 1,20 e 6,80 demonstrou que o complexo é degradado no tampão de pH 1,2, sugerindo que isso poderá ocorrer no estômago se o composto for administrado a animais por via oral.

Foi verificada a capacidade de **5** em interagir com albuminas do soro bovino e do soro humano, ASB e ASH, sugerindo que o composto poderia ser transportado pelas albuminas séricas. Além disso, observamos que em pH 7,20 a espécie de **5** em solução apresenta fluorescência intrínseca, com máximo no espectro de emissão em 478 nm. Um resultado interessante, pois possibilita o estudo de sua aplicação como marcador fluorescente.

Quanto a atividade antinociceptiva verificou-se pelo modelo de resposta nociceptiva induzida por *zymosan* A que **5** foi ativo em uma dose quatro vezes maior do que aquela equivalente em mol a 10 mg Kg^{-1} de diclofenaco de sódio (DIC). Porém, **5** não causou lesões gástricas como as observadas para o grupo tratado com o DIC. Desse modo, ainda que a dose

necessária ao efeito antinociceptivo tenha sido maior que a DIC, **5** não causa lesões gástricas, um ponto positivo que favoreceria a sua utilização como um potencial protótipo de fármaco anti-inflamatório.

As atividades antimicrobianas de **5**, **Cu5** e **Ga5** foram avaliadas contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, mas esses compostos apresentaram uma atividade muito baixa em relação aos fármacos usados como controle (cloridrato de tetraciclina e fluconazol). Este resultado é interessante, pois não se espera que um composto que possa vir a ser utilizado com anti-inflamatório afete a microbiota normal do paciente.

As atividades citotóxicas de **5** e **Ga5** foram avaliadas frente a células HL-60, Jurkat, HCT-116 e MCF-7 a 10 μ M, sendo obtidos valores maiores que 50% para a proliferação dessas células, o que demonstra a baixa atividade citotóxica dos compostos.

Uma vez que **5** apresenta baixa atividade citotóxica e antimicrobiana aliada à sua capacidade de quelar Zn(II) e Cu(II), esse composto poderia ser considerado um interessante agente quelante para a remoção de metais como Zn(II) e Cu(II) em cérebros de pacientes com o Mal de Alzheimer. De fato, há evidências de que Zn(II) e Cu(II) estariam associados à catálise da agregação da proteína β -amiloide, hipoteticamente responsável pelo desenvolvimento da doença.

Em linhas gerais, este trabalho contribuiu de forma significativa para a compreensão das atividades citotóxica e antimicrobiana das novas tiossemicarbazonas derivadas de chalconas. Além disso, foi demonstrada a eficácia da complexação a metais como estratégia de aumento de atividade farmacológica dos compostos estudados.

No presente trabalho um derivado do anti-inflamatório diclofenaco de sódio (DIC) foi obtido, piridoxal diclofenaco hidrazona (H_3PDHCl , **5**), o qual exibiu atividade a concentrações mais altas que as do DIC, mas que demonstrou não ter impacto sobre a mucosa gástrica. O composto não apresentou ação citotóxica ou antimicrobiana e exibiu capacidade de quelatar Zn(II) e Cu(II), tornando-se interessante como candidato a protótipo de fármaco anti-Alzheimer.

Nossos resultados evidenciam a importância da Química Medicinal Inorgânica para o desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de fármacos.

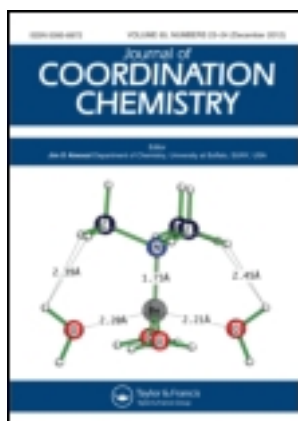
Anexos

This article was downloaded by: [187.27.24.17]

On: 07 February 2013, At: 20:10

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Journal of Coordination Chemistry

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/gcoo20>

Chalcone-derived thiosemicarbazones and their zinc(II) and gallium(III) complexes: spectral studies and antimicrobial activity

JEFERSON G. DA SILVA^a, CAMILA C.H. PERDIGÃO^a, NIVALDO L. SPEZIALI^b & HELOISA BERALDO^a

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^b Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Accepted author version posted online: 11 Dec 2012. Version of record first published: 29 Jan 2013.

To cite this article: JEFERSON G. DA SILVA, CAMILA C.H. PERDIGÃO, NIVALDO L. SPEZIALI & HELOISA BERALDO (2013): Chalcone-derived thiosemicarbazones and their zinc(II) and gallium(III) complexes: spectral studies and antimicrobial activity, *Journal of Coordination Chemistry*, 66:3, 385-401

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/00958972.2012.757762>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae, and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand, or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Chalcone-derived thiosemicarbazones and their zinc(II) and gallium(III) complexes: spectral studies and antimicrobial activity

JEFERSON G. DA SILVA†, CAMILA C.H. PERDIGÃO†, NIVALDO L. SPEZIALI‡ and HELOISA BERALDO†*

†Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ‡Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

(Received 16 July 2012; in final form 16 October 2012)

Chalcone-derived 3-phenyl-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCTPh) (**1**), 3-(4-chlorophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCT4ClPh) (**2**), 3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCT4BrPh) (**3**), and 3-(4-nitrophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCT4NO₂Ph) (**4**) were obtained as well as their gallium(III) and zinc(II) complexes [Ga(PyCTPh)₂](NO₃) (**Ga1**), [Ga(PyCT4ClPh)₂](NO₃) (**Ga2**), [Ga(PyCT4BrPh)₂](NO₃) (**Ga3**), [Ga(PyCT4NO₂Ph)₂](NO₃) (**Ga4**), [Zn(PyCTPh)₂] (**Zn1**), [Zn(PyCT4ClPh)₂] (**Zn2**), [Zn(PyCT4BrPh)₂] (**Zn3**), and [Zn(PyCT4NO₂Ph)₂] (**Zn4**). The chalcones, thiosemicarbazones, and zinc(II) complexes were not active against *Pseudomonas aeruginosa*. The thiosemicarbazones proved to be more active than the parent chalcones against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Coordination to zinc(II) resulted in activity improvement of most thiosemicarbazones against *S. aureus*. Coordination to gallium(III) significantly improved the antimicrobial activity of all thiosemicarbazones against the studied micro-organisms, suggesting this to be an effective strategy for antimicrobial activity enhancement.

Keywords: Chalcones; Thiosemicarbazone; Zinc(II) complexes; Gallium(III) complexes; Antimicrobial

1. Introduction

Chalcones (figure 1) are flavonoid compounds bearing the 1,3-diarylprop-2-en-1-one framework. They are the first isolable compounds from flavonoid biosynthesis in plants, with widespread distribution in fruits, vegetables, spices, tea, and soy [1]. These compounds exhibit a diverse range of pharmacological activities, presenting cytotoxic, antitumor, antiinflammatory, antiplasmodial, immunosuppressive, antimicrobial, and antioxidant properties [1,2].

Thiosemicarbazones also have wide pharmacological versatility and present cytotoxic, antitumor, antimalarial, antimicrobial, and antiviral properties [3]. In many cases, metal coordination leads to an improvement of thiosemicarbazones pharmacological activities and synergistic effects involving both metal and the thiosemicarbazone have been reported [3–7].

*Corresponding author. Email: hberaldo@ufmg.br

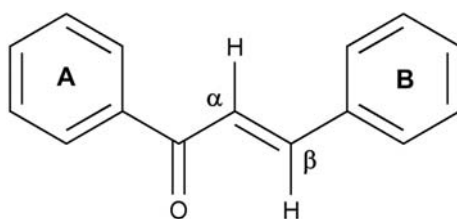


Figure 1. Structural framework of chalcones.

The mechanism of action of metal ions may involve binding to proteins, interaction with microbial membrane with changes in structure and permeability, and interaction with nucleic acids preventing microbial replication [8].

Zinc is the second most prevalent trace element, after iron, and is involved in structure and function of over 300 enzymes. Use of zinc as a nutritional supplement has become common in many countries [9]. Zinc salts, primarily zinc citrate, are widely used as antimicrobials. Zinc exhibits activity against oral *Streptococci*, particularly *Streptococcus mutans* [8]. Zinc supplementation shows beneficial effects against infectious diseases, especially diarrhea, and it has been shown that zinc supplementation can improve mucosal innate immunity through induction of antimicrobial peptide secretion from intestinal epithelial cells [10].

Gallium has efficacy in the treatment of disorders such as accelerated bone resorption, autoimmune diseases and allograft rejection, certain cancers, and infectious diseases [11]. The antimicrobial properties of gallium compounds have been demonstrated by other authors [11] and by our group [6,12,13].

The mechanism of antimicrobial action of gallium(III) is related to iron metabolism. Gallium(III) mimics iron(III) due to their similar charge-to-radius ratio. Hence, gallium(III)

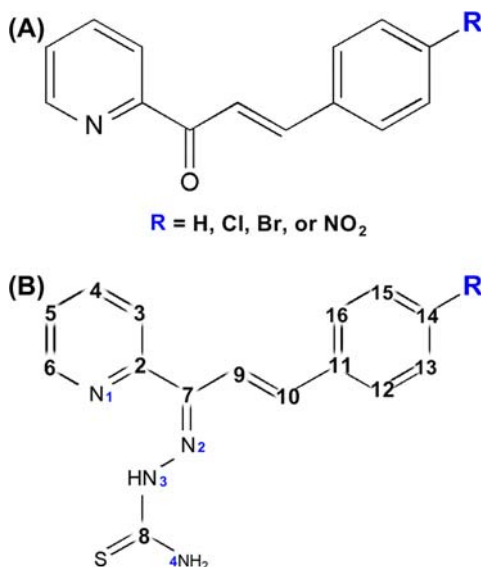


Figure 2. Structural representation for the chalcone precursors (A) and chalcone-derived thiosemicarbazones (B).

binds to ferric sites on transferrin and is acquired from transferrin by certain bacteria. However, unlike iron(III), it is not reducible to a divalent form under physiological conditions, which precludes its participation in crucial bacterial iron-dependent DNA-synthetic pathways [14]. Iron metabolism is a key vulnerability of infecting bacteria because organisms require iron for growth. A “Trojan horse” strategy that used gallium to disrupt bacterial iron metabolism has been reported in an experiment which showed that gallium inhibits *Pseudomonas aeruginosa* growth and biofilm formation and kills planktonic and biofilm bacteria *in vitro* [15].

Coordination of thiosemicarbazones to gallium(III) leads to improvement of antimicrobial properties [6,12,13] as well as their cytotoxic activity [16]. Combining a chalcone with a thiosemicarbazone framework could lead to compounds with interesting pharmacological profile. Thus, in the present work, a family of four chalcone-derived thiosemicarbazones were obtained (see figure 2) as well as their zinc(II) and gallium(III) complexes. The antimicrobial activities of the chalcone precursors (see figure 2) and the corresponding thiosemicarbazones and their zinc(II) and gallium(III) complexes were investigated.

2. Experimental

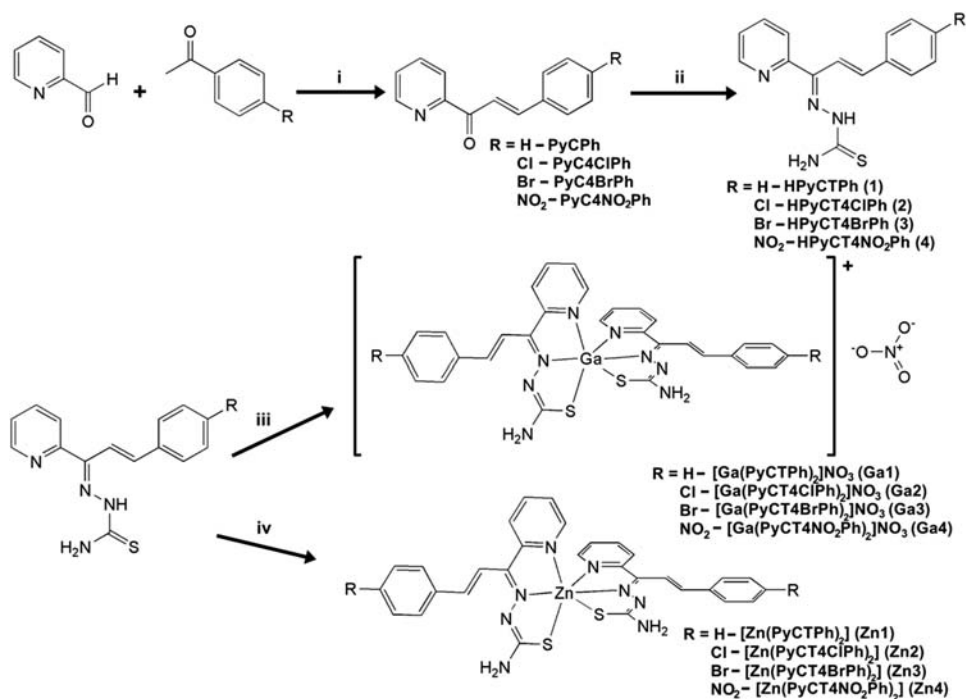
2.1. Materials and measurements

All chemicals were purchased from Aldrich and used without purification.

Elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. A YSI model 31 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. High resolution mass spectra (HRMS) were recorded with a Shimadzu IT-TOF mass spectrometer. DMSO solutions of the compounds were diluted in methanol and applied in the electrospray ionization source for direct injection. Mass spectra were obtained in the full scan mode within the m/z 100–1000 range. Electronic spectra were obtained with an UV-2401PC – (P/N 206-82201) – Shimadzu. Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using KBr pellets. NMR spectra were obtained at room temperature with a Bruker DRX-400 Avance (200 MHz) spectrometer using deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO- d_6) as the solvent and tetramethylsilane as internal reference. ^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. Single-crystal X-ray diffraction measurements were carried out on a GEMINI-Ultra diffractometer (LabCri-UFGM) using graphite-Enhance Source Mo $K\alpha$ radiation ($\lambda=0.71073 \text{ \AA}$) at 120 K. Data collection, cell refinement results, and data reduction were performed using CRYALISPRO software [17]. The semi-empirical from equivalents absorption correction method was applied [17]. Structures were solved by direct methods using SHELXS-97 [18]. Full-matrix least-squares refinement procedure on F^2 with anisotropic thermal parameters was carried out using SHELXL-97 [18]. Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all nonhydrogen atoms. Hydrogen atoms were placed geometrically and the positional parameters were refined using a riding model.

2.2. Syntheses

All compounds were obtained as described in scheme 1.



Scheme 1. General syntheses of chalcone-derived thiosemicarbazones (1–4) and their complexes (Ga1–Ga4 and Zn1–Zn4). (i) NaOH 10%; (ii) thiosemicarbazide; (iii) gallium nitrate; (iv) zinc chloride; and sodium acetate.

2.2.1. Synthesis of the chalcone precursors: 3-phenyl-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one (PyCPh), 3-(4-chlorophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one (PyC4ClPh), 3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one (PyC4BrPh), and 3-(4-nitrophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one (PyC4NO₂Ph). The chalcones were obtained as previously reported [19]. A solution of NaOH 10% (7.5–12.5 mL) was added dropwise to a mixture of 2-acetylpyridine (10 mmol) and the desired aldehyde (10 mmol) in methanol (15 mL). The reaction mixture was kept under stirring for 1 h at room temperature. The resulting solids were filtered off, washed with water, and dried *in vacuo*.

2.2.2. Synthesis of the chalcone-derived thiosemicarbazones. To a mixture of the desired chalcone (4 mmol) and thiosemicarbazide (4 mmol) in methanol (20 mL), five drops of HCl were added to catalyze the reaction. The reaction mixture was kept under stirring for 2 h at room temperature. The resulting solids were filtered off, washed with water and diethyl ether, and dried *in vacuo*.

2.2.2.1. 3-phenyl-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCTPh) (1). Pale canary yellow solid. Anal. Calcd for C₁₅H₁₄N₄S (%): C, 63.80; H, 5.00; N, 19.84. Found: C, 63.61; H, 4.89; N, 20.10. FW: 282.37 g mol⁻¹. HRMS: *m/z* [M – H]⁻ calcd for C₁₅H₁₃N₄S: 281.0861. Found: 281.0866. UV–vis [DMF, cm⁻¹ (log ε)]: 28,011 (4.37). Selected IR bands (KBr, cm⁻¹): (NH_{NH2}) 3416, 3254, (C=N) 1567, (C=S) 750, ρ(py) 538. ¹H NMR [200 MHz, DMSO-d₆, ppm]: 11.25 (s, 1H, N3–H), 8.64 (d, 1H, H6,

$^3J_{\text{H6-H5}} = 4.4$ Hz), 8.46 (s, 1H, N4-H), 8.02–7.92 (m, 2H, H3 and N4-H), 7.85 (t, 1H, H4, $^3J_{\text{H4-H3}} = ^3J_{\text{H4-H5}} = 7.6$ Hz), 7.80–7.60 (m, 3H, H10, H12 and H16), 7.51–7.27 (m, 4H, H5, H13, H14 and H15), 7.17 (d, 1H, H9, $^3J_{\text{H9-H10}} = 16.1$ Hz). ^{13}C NMR [50 MHz, DMSO- d_6 , ppm]: 179.0 (C8=S), 155.3 (C2), 148.2 (C6), 145.9 (C7=N), 140.0 (C10), 136.8 (C4), 136.2 (C11), 129.1 (C14), 128.6 (C13 and C15), 127.8 (C12 and C16), 123.8 (C5), 123.6 (C3), 117.1 (C9). Yield: 69%.

2.2.2.2. *3-(4-chlorophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCT4ClPh) (2)*. Pale canary yellow solid. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{S}$ (%): C, 56.87; H, 4.14; N, 17.68. Found: C, 56.89; H, 3.99; N, 17.74. FW: $316.81 \text{ g mol}^{-1}$. HRMS: m/z $[\text{M} - \text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{ClN}_4\text{S}$: 315.0471. Found: 315.0482. UV-vis [DMF, cm^{-1} (log ϵ): 27,548 (4.45). Selected IR bands (KBr, cm^{-1}): (NH_{NH_2}) 3422, 3268, (C=N) 1562, (C=S) 778, $\rho(\text{py})$ 548. ^1H NMR [200 MHz, DMSO- d_6 , ppm]: 11.26 (s, 1H, N3-H), 8.62 (d, 1H, H6, $^3J_{\text{H6-H5}} = 4.8$ Hz), 8.45 (s, 1H, N4-H), 8.06–7.94 (m, 2H, H3, N4-H), 7.86 (t, 1H, H4, $^3J_{\text{H4-H3}} = ^3J_{\text{H4-H5}} = 7.4$ Hz), 7.82–7.70 (m, 3H, H10, H12 and H16), 7.54–7.38 (m, 3H, H5, H13 and H15), 7.17 (d, 1H, H9, $^3J_{\text{H9-H10}} = 16.2$ Hz). ^{13}C NMR [50 MHz, DMSO- d_6 , ppm]: 179.1 (C8=S), 155.2 (C2), 148.2 (C6), 145.5 (C7=N), 138.5 (C10), 136.8 (C4), 135.2 (C11), 133.5 (C14), 129.4 (C13 and C15), 128.6 (C12 and C16), 123.8 (C5), 123.6 (C3), 117.8 (C9). Yield: 61%.

2.2.2.3. *3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCT4BrPh) (3)*. Yellow solid. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrN}_4\text{S}$ (%): C, 49.87; H, 3.63; N, 15.51. Found: C, 49.75; H, 3.89; N, 15.21. FW: $361.26 \text{ g mol}^{-1}$. HRMS: m/z $[\text{M} - \text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{BrN}_4\text{S}$: 358.9966. Found: 358.9976. UV-vis [DMF, cm^{-1} (log ϵ): 27,548 (4.45). Selected IR bands (KBr, cm^{-1}): (NH_{NH_2}) 3350, 3312, 3236, ($\text{NH}_{\text{pyridinium}}$) 2690 (broad), (C=N) 1560, (C=S) 780, $\rho(\text{py})$ 554. ^1H NMR [200 MHz, DMSO- d_6 , ppm]: *E* configuration = 11.44 (s, 1H, N3H), 8.87–8.72 (m, 1H, H6), 8.63 (s, 1H, N4-H), 8.42 (s, 1H, N4-H), 8.34–8.03 (m, 1H, H5), 7.85–7.51 (m, 7H, H5, H3, H12, H16, H13, H15, and H10), 7.13 (d, 1H, H9, $^3J_{\text{H9-H10}} = 16.2$ Hz); *Z* configuration = 13.07 (s, 1H, SH), 8.87–8.72 (m, 1H, H3), 8.68 (s, 1H, N4-H), 8.34–8.03 (m, 3H, H5, H10, and N4-H), 7.85–7.51 (m, 5H, H4, H12, H16, H13, and H15), 7.37 (m, 1H, H6), 7.13 (d, 1H, H9, $^3J_{\text{H9-H10}} = 16.2$ Hz). ^{13}C NMR [50 MHz, DMSO- d_6 , ppm] main signals: *E* configuration = 179.2 (C8=S), 155.4 (C2), 148.7 (C6), 141.2 (C7=N), 135.7 (C11), 121.4 (C14); *Z* configuration = 178.2 (C8=S), 151.1 (C2), 145.7 (C6), 135.1 (C11), 122.6 (C14). Yield: 75%.

2.2.2.4. *3-(4-nitrophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCT4NO₂Ph) (4)*. Citrine solid. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$ (%): C, 55.03; H, 4.00; N, 21.39. Found: C, 54.83; H, 3.96; N, 21.02. FW: $327.36 \text{ g mol}^{-1}$. HRMS: m/z $[\text{M} - \text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$: 326.0712. Found: 326.0718. UV-vis [DMF, cm^{-1} (log ϵ): 32,154 (4.27), 25,316 (4.40). Selected IR bands (KBr, cm^{-1}): (NH_{NH_2}) 3418, 3270, (C=N) 1570, (C=S) 822, $\rho(\text{py})$ 596. ^1H NMR [200 MHz, DMSO- d_6 , ppm]: 11.40 (s, 1H, N3-H), 8.62 (d, 1H, H6, $^3J_{\text{H6-H5}} = 4.1$ Hz), 8.52 (s, 1H, N4-H), 8.25 (d, 2H, H13 and H15, $^3J_{\text{H13-H12}} = ^3J_{\text{H15-H16}} = 8.7$ Hz), 8.11–7.81 (m, 6H, N4-H, H3, H12, H16, H10, and H4), 7.45 (dd, 1H, H5, $^3J_{\text{H5-H4}} = 7.2$ Hz, $^3J_{\text{H5-H3}} = 4.9$ Hz), 7.32 (d, 1H, H9, $^3J_{\text{H9-H10}} = 16.1$ Hz). ^{13}C NMR [50 MHz, DMSO- d_6 , ppm]: 179.2 (C8=S), 155.0 (C2), 148.3 (C6), 147.1 (C7=N), 144.7 (C14), 143.0 (C11), 137.4 (C10), 136.9 (C4), 128.7 (C12 and C16), 123.8 (C3, C5, C13 and C15), 121.1 (C9). Yield: 68%. Upon slow evaporation in 9:1 acetone/DMSO solution, crystals of HPyCT4NO₂Ph were formed.

2.2.3. Synthesis of gallium(III) and zinc(II) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones. Gallium nitrate or zinc chloride (0.5 mmol) was added to a solution of the desired thiosemicarbazone (1 mmol) in methanol (15 mL). The reaction mixture was kept under reflux and stirring for 15 min. Then, a solution containing sodium acetate (1.0 mmol) and the thiosemicarbazone (0.05 mmol) in 5 mL of methanol was added to the reaction mixture which was kept under reflux for 5 h. The obtained solids were filtered off, washed with isopropanol, and dried *in vacuo*.

2.2.3.1. Bis[3-phenyl-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazonato] gallium(III) nitrate [Ga(PyCTPh)₂]NO₃ (Ga1). Yellow solid. Anal. Calcd for C₃₀H₂₆GaN₉O₃S₂ (%): C, 51.89; H, 3.77; N, 18.15. Found: C, 51.95; H, 3.80; N, 18.29. FW: 694.44 g mol⁻¹. HRMS *m/z* [M - NO₃]⁺ calcd for C₃₀H₂₆GaN₈S₂: 631.0978. Found: 631.0971. UV-vis [DMF, cm⁻¹ (log ε)]: 32,680 (4.74), 22,779 (4.61), 21,978 (4.62). Selected IR bands (KBr, cm⁻¹): (NH_{NH2}) 3448, 3248, (C=N) 1514, (C=S) 724, ρ(py) 588, (NO₃) 1385, 1324. ¹H NMR [200 MHz, DMSO-d₆, ppm]: 9.10 (d, 1H, H10, ³J_{H10-H9} = 16.2 Hz), 8.69 (d, 1H, H3, ³J_{H3-H4} = 8.3 Hz), 8.50 (s, 2H, N4-H₂), 8.26 (t, 1H, H4, ³J_{H4-H3} = ³J_{H4-H5} = 7.8 Hz), 8.04–7.87 (m, 3H, H6, H12, and H16), 7.76 (d, 1H, H9, ³J_{H9-H10} = 16.2 Hz), 7.63 (t, 1H, H5, ³J_{H5-H4} = 5.2 Hz, ³J_{H5-H3} = 7.5 Hz), 7.57–7.39 (m, 3H, H13, H14, and H15). ¹³C NMR [50 MHz, DMSO-d₆, ppm]: 178.3 (C8=S), 145.9 (C2), 145.1 (C6), 144.6 (C10), 142.8 (C4), 139.0 (C7=N), 137.0 (C11), 130.4 (C14), 129.3 (C13 and C15), 128.6 (C12 and C16), 127.1 (C5), 124.0 (C3), 115.7 (C9). Molar conductivity (1 mmol L⁻¹, DMF): 69.5 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Yield: 70%.

2.2.3.2. Bis[3-(4-chlorophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazonato] gallium(III) nitrate [Ga(PyCT4ClPh)₂]NO₃ (Ga2). Yellow solid. Anal. Calcd for C₃₀H₂₄Cl₂GaN₉O₃S₂ (%): C, 47.20; H, 3.17; N, 16.51. Found: C, 47.07; H, 3.19; N, 16.65. FW: 763.33 g mol⁻¹. HRMS: *m/z* [M - NO₃]⁺ calcd for C₃₀H₂₄Cl₂GaN₈S₂: 699.0198. Found: 699.0208. UV-vis [DMF, cm⁻¹ (log ε)]: 32,051 (4.84), 22,728 (4.71), 21,930 (4.73). Selected IR bands (KBr, cm⁻¹): (NH_{NH2}) 3454, 3278, (C=N) 1520, (C=S) 728, ρ(py) 649, (NO₃) 1384, 1285. ¹H NMR [200 MHz, DMSO-d₆, ppm]: 9.16 (d, 1H, H10, ³J_{H10-H9} = 15.9 Hz), 8.69 (d, 1H, H3, ³J_{H3-H4} = 8.1 Hz), 8.54 (s, 2H, N4-H₂), 8.24 (t, 1H, H4, ³J_{H4-H3} = ³J_{H4-H5} = 7.7 Hz), 8.00 (d, 2H, H12 and H16, ³J_{H13-H12} = ³J_{H15-H16} = 8.3 Hz), 7.92 (d, 1H, H6, ³J_{H6-H5} = 4.6 Hz), 7.74 (d, 1H, H9, ³J_{H9-H10} = 15.9 Hz), 7.68–7.51 (m, 3H, H5, H13, and H15). ¹³C NMR [50 MHz, DMSO-d₆, ppm]: 178.6 (C8=S), 146.0 (C2), 144.6 (C6), 143.8 (C10), 142.8 (C4), 138.5 (C7=N), 136.0 (C11), 134.8 (C14), 130.3 (C13 and C15), 129.3 (C12 and C16), 127.0 (C5), 123.9 (C3), 116.2 (C9). Molar conductivity (1 mmol L⁻¹, DMF): 75.8 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Yield: 65%.

2.2.3.3. Bis[3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazonato] gallium(III) nitrate [Ga(PyCT4BrPh)₂]NO₃ (Ga3). Yellow solid. Anal. Calcd for C₃₀H₂₄Br₂GaN₉O₃S₂ (%): C, 42.28; H, 2.84; N, 14.79. Found: C, 42.38; H, 2.95; N, 14.75. FW: 870.24 g mol⁻¹. HRMS: *m/z* [M - NO₃]⁺ calcd for C₃₀H₂₄Br₂GaN₈S₂: 786.9188. Found: 786.9213. UV-vis [DMF, cm⁻¹ (log ε)]: 31,949 (4.81), 22,831 (4.65), 21,930 (4.68). Selected IR bands (KBr, cm⁻¹): (NH_{NH2}) 3456, 3277, (C=N) 1519, (C=S) 728, ρ(py) 651, (NO₃) 1385, 1299. ¹H NMR [200 MHz, DMSO-d₆, ppm]: 9.18 (d, 1H, H10, ³J_{H10-H9} = 15.9 Hz), 8.71 (d, 1H, H3, ³J_{H3-H4} = 8.3 Hz), 8.54 (s, 2H, N4-H₂), 8.25 (t, 1H, H4, ³J_{H4-H3} = ³J_{H4-H5} = 7.8 Hz), 8.02–7.86 (m, 3H, H6, H12, and H16), 7.84–7.67 (m, 3H, H9, H13, and H15), 7.61 (d, 1H, H5, ³J_{H5-H4} = ³J_{H5-H6} = 7.0 Hz). ¹³C NMR [50 MHz,

DMSO- d_6 , ppm]: 178.6 (C8=S), 145.9 (C2), 144.6 (C6), 143.9 (C10), 142.8 (C4), 138.4 (C7=N), 136.4 (C11), 132.2 (C13 and C15), 130.5 (C12 and C16), 127.0 (C5), 123.6 (C14), 123.8 (C3), 116.2 (C9). Molar conductivity (1 mmol L⁻¹, DMF): 67.9 Ω^{-1} cm² mol⁻¹. Yield: 72%.

2.2.3.4. *Bis[3-(4-nitrophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazonato] gallium(III) nitrate* [*Ga(PyCT4NO₂Ph)₂*]*NO₃* (**Ga4**). Orange solid. Anal. Calcd for C₃₀H₂₄GaN₁₁O₇S₂ (%): C, 45.93; H, 3.08; N, 19.64. Found: C, 45.85; H, 3.03; N, 19.62. FW: 784.44 g mol⁻¹. HRMS: *m/z* [*M* - NO₃]⁺ calcd for C₃₀H₂₄GaN₁₀O₄S₂: 721.0679. Found: 721.0667. UV-vis [DMF, cm⁻¹ (log ϵ): 29,851 (4.79), 21,787 (4.68), 21,231 (4.70). Selected IR bands (KBr, cm⁻¹): (NH_{NH2}) 3446, 3296, (C=N) 1514, (C=S) 728, ρ (py) 658, (NO₃) 1385, 1295. ¹H NMR [200 MHz, DMSO- d_6 , ppm]: 9.28 (d, 1H, H10, ³*J*_{H10-H9} = 15.9 Hz), 8.88 (s, 2H, N4-H₂), 8.73 (d, 1H, H3, ³*J*_{H3-H4} = 8.1 Hz), 8.47–8.16 (m, 5H, H13, H15, H4, H12, and H16), 8.03–7.83 (m, 2H, H6, and H9), 7.63 (dd, 1H, H5, ³*J*_{H5-H4} = 7.1 Hz, ³*J*_{H5-H6} = 5.3 Hz). ¹³C NMR [50 MHz, DMSO- d_6 , ppm]: 178.8 (C8=S), 147.2 (C2), 145.4 (C14), 144.3 (C6), 143.4 (C11), 142.5 (C4), 141.8 (C10), 137.3 (C7=N), 129.0 (C12 and C16), 126.6 (C5), 124.0 (C13 and C15), 123.4 (C3), 119.1 (C9). Molar conductivity (1 mmol L⁻¹, DMF): 66.3 Ω^{-1} cm² mol⁻¹. Yield: 84%.

2.2.3.5. *Bis[3-phenyl-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazonato] zinc(II) [Zn(PyCTPh)₂]* (**Zn1**). Yellow solid. Anal. Calcd for C₃₀H₂₆N₈S₂Zn (%): C, 57.37; H, 4.17; N, 17.84. Found: C, 57.30; H, 4.13; N, 17.79. FW: 628.10 g mol⁻¹. UV-vis [DMF, cm⁻¹ (log ϵ): 22,676 (4.60). Selected IR bands (KBr, cm⁻¹): (NH_{NH2}) 3442, 3304, (C=N) 1510, (C=S) 726, ρ (py) 582. ¹H NMR [200 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm): 8.23 (d, 1H, H10, ³*J*_{H10-H9} = 16.7 Hz), 8.04 (d, 1H, H3, ³*J*_{H3-H4} = 8.6 Hz), 7.94–7.81 (m, 2H, H4, and H6), 7.77 (d, 2H, H12 and H16, ³*J*_{H12-H13} = ³*J*_{H16-H15} = 7.3 Hz), 7.66 (d, 1H, H9, ³*J*_{H9-H10} = 16.7 Hz), 7.51–7.23 (m, 6H, H14, N4-H₂, H13, H15, and H5). ¹³C NMR [50 MHz, DMSO- d_6 , ppm]: 183.3 (C8=S), 149.7 (C2), 146.4 (C6), 139.5 (C7=N), 138.9 (C4), 137.8 (C10), 137.3 (C11), 128.7 (C13 and C15), 128.5 (C14), 127.2 (C12 and C16), 123.5 (C5), 121.7 (C3), 118.5 (C9). Molar conductivity (1 mmol L⁻¹, DMF): 0.5 Ω^{-1} cm² mol⁻¹. Yield: 92%.

2.2.3.6. *Bis[3-(4-chlorophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazonato] zinc(II) [Zn(PyCT4ClPh)₂]* (**Zn2**). Yellow solid. Anal. Calcd for C₃₀H₂₄Cl₂N₈S₂Zn (%): C, 51.70; H, 3.47; N, 16.08. Found: C, 51.76; H, 3.50; N, 16.12. FW: 696.99 g mol⁻¹. UV-vis [DMF, cm⁻¹ (log ϵ): 22,371 (4.64). Selected IR bands (KBr, cm⁻¹): (NH_{NH2}) 3448, 3288, (C=N) 1512, (C=S) 730, ρ (py) 636. ¹H NMR [200 MHz, DMSO- d_6 , ppm]: 8.42 (d, 1H, H10, ³*J*_{H10-H9} = 16.4 Hz), 8.08 (d, 1H, H3, ³*J*_{H3-H4} = 8.1 Hz), 7.92–7.75 (m, 4H, H4, H6, H12, and H16), 7.73 (d, 1H, H9, ³*J*_{H9-H10} = 16.6 Hz), 7.55–7.37 (m, 4H, N4-H₂, H13, and H15), 7.28 (t, 1H, H5, ³*J*_{H5-H6} = ³*J*_{H5-H4} = 7.0 Hz). ¹³C NMR [50 MHz, DMSO- d_6 , ppm]: 183.6 (C8=S), 149.8 (C2), 146.3 (C6), 138.9 (C4), 138.6 (C7=N), 136.8 (C10), 136.4 (C11), 132.8 (C14), 128.8 (C13 and C15), 128.6 (C12 and C16), 123.4 (C5), 121.4 (C3), 118.8 (C9). Molar conductivity (1 mmol L⁻¹, DMF): 0.2 Ω^{-1} cm² mol⁻¹. Yield: 96%.

2.2.3.7. *Bis[3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazonato] zinc(II) [Zn(PyCT4BrPh)₂]* (**Zn3**). Yellow solid. Anal. Calcd for C₃₀H₂₄Br₂N₈S₂Zn (%): C, 45.85; H, 3.08; N, 14.26. Found: C, 45.79; H, 3.11; N, 14.34. FW: 785.90 g mol⁻¹. UV-vis [DMF, cm⁻¹ (log ϵ): 22,321 (4.61). Selected IR bands (KBr, cm⁻¹): (NH_{NH2}) 3436, 3290, (C=N) 1516, (C=S) 728, ρ (py) 635. ¹H NMR [200 MHz, DMSO- d_6 , ppm]: 8.41 (d,

¹H, H10, ³J_{H10-H9} = 16.3 Hz), 8.07 (d, 1H, H3, ³J_{H3-H4} = 8.0 Hz), 7.94–7.55 (m, 7H, H4, H6, H12, H16, H3, H13, and H15), 7.46 (s, 2H, N4–H₂), 7.27 (t, 1H, H5, ³J_{H5-H4} = ³J_{H5-H6} = 6.4 Hz). ¹³C NMR [50 MHz, DMSO-d₆, ppm]: 183.7 (C8=S), 149.8 (C2), 146.3 (C6), 138.9 (C4), 138.6 (C7=N), 136.9 (C10), 136.8 (C11), 131.5 (C13 and C15), 129.1 (C12 and C16), 123.4 (C5), 121.4 (C3 and C14), 118.8 (C9). Molar conductivity (1 mmol L⁻¹, DMF): 2.7 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Yield: 73%.

2.2.3.8. *Bis[3-(4-nitrophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazonato] zinc(II) [Zn(PyCT4NO₂Ph)₂] (Zn4)*. Orange-red solid. Anal. Calcd for C₃₀H₂₄N₁₀O₄S₂Zn (%): C, 50.18; H, 3.37; N, 19.51. Found: C, 50.05; H, 3.34; N, 19.46. FW: 718.06 g mol⁻¹. UV–vis [DMF, cm⁻¹ (log ε)]: 31,348 (4.67), 26,385 (4.46), 20,877 (4.61). Selected IR bands (KBr, cm⁻¹): (NH_{NH2}) 3446, 3296, (C=N) 1512, (C=S) 727, ρ(py) 630. ¹H NMR [200 MHz, DMSO-d₆, ppm]: 8.73 (d, 1H, H10, ³J_{H10-H9} = 16.2 Hz), 8.28 (d, 1H, H3, ³J_{H3-H4} = 8.7 Hz), 8.20–7.99 (m, 3H, H3, H13, and H15), 7.97–7.61 (m, 6H, H6, H12, H16, H9, and N4–H₂), 7.29 (dd, 1H, H5, ³J_{H5-H4} = 7.2 Hz, ³J_{H5-H6} = 5.3 Hz). ¹³C NMR [50 MHz, DMSO-d₆, ppm]: 184.5 (C8=S), 149.8 (C2), 146.6 (C14), 146.3 (C6), 144.7 (C11), 139.1 (C4), 137.4 (C7=N), 135.9 (C10), 128.0 (C12 and C16), 123.8 (C13 and C15), 123.4 (C5), 121.7 (C3), 121.2 (C9). Molar conductivity (1 mmol L⁻¹, DMF): 0.5 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Yield: 95%.

2.3. Crystal structure determination

The crystal structure of **4** was determined using single-crystal X-ray diffractometry. Molecular plot and crystal packing figures were prepared using ORTEP [20] and MERCURY [21], respectively. Tables were generated using WINGX suite [22]. A summary of the crystal data, data collection details, and refinement results are listed in table 1.

2.4. In vitro antimicrobial activity

Antibacterial activity was evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC) using the macrodilution test [23,24]. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 or *P. aeruginosa* ATCC 27853 stored in Mueller Hinton broth were subcultured for testing in the same medium and grown at 37 °C. Then, the bacterial cells were suspended, according to the McFarland protocol [24] in saline solution, to produce a suspension of 10⁵ colony-forming units/mL (CFU mL⁻¹). Serial dilutions of the compounds, previously dissolved in DMSO, were prepared in test tubes to final concentrations of 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 and 1 μg mL⁻¹. A 24-h-old inoculum (100 μL) was added to each tube. The MIC, defined as the lowest concentration of the test compound which inhibits the visible growth after 20 h, was determined visually after incubation for 20 h at 37 °C. Tests using tetracycline as reference and DMSO as negative control were carried out in parallel. All tests were performed in triplicate with full agreement between the results.

Antifungal activity was evaluated by MIC using the macrodilution test [23,25]. *Candida albicans* ATCC 10231 stored in Sabouraud broth was subcultured for testing in the same medium and grown at 37 °C. Then, yeast cells were suspended according to the McFarland protocol [25] in saline solution to produce a suspension of 10⁵ CFU mL⁻¹. Serial dilutions of the compounds, previously dissolved in DMSO, were prepared in test tubes to final concentrations of 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, and 1 μg mL⁻¹. A 24-h-old inoculum

Table 1. Crystal data and structure refinement results for **4**.

Compound	HPyCT4NO ₂ Ph (4)
Empirical formula	C ₁₅ H ₁₃ N ₅ O ₂ S
Molecular weight (g mol ⁻¹)	327.36
Crystal system, space group	Monoclinic, <i>Pc</i>
<i>Unit cell dimensions</i>	
<i>a</i> (Å)	7.8859(1)
<i>b</i> (Å)	16.7965(2)
<i>c</i> (Å)	11.2801(2)
α (°)	90
β (°)	93.427(1)
γ (°)	90
<i>V</i> (Å ³)	1491.44(4)
<i>Z</i>	4
<i>D</i> _{calc} (g cm ⁻³)	1.458
<i>F</i> (000)	680
Crystal size (mm)	0.54 × 0.24 × 0.10
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.235
θ range for data collection (°)	2.86 to 26.37
Index ranges	-9 ≤ <i>h</i> ≤ 9 -20 ≤ <i>k</i> ≤ 20 -14 ≤ <i>l</i> ≤ 14
Reflections collected	48,255
Reflections unique/ <i>R</i> (int)	3054/0.0394
Completeness to $\theta = 26.37^\circ$ (%)	99.9
Max. and min. transmission	0.9769 and 0.8837
Final <i>R</i> indices [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> 1 = 0.0241, <i>wR</i> 2 = 0.0670
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> 1 = 0.0254, <i>wR</i> 2 = 0.0675
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.066
Absolute structure parameter	0.10(5)
Largest diff. peak and hole (e Å ⁻³)	0.222/-0.171

(100 μ L) was added to each tube. The MIC was determined visually after incubation for 20 h at 37 °C. Tests using fluconazole as reference and DMSO as negative control were carried out in parallel. No inhibition was observed with 5% v/v DMSO. All tests were performed in triplicate with full agreement between the results.

3. Results and discussion

3.1. Formation of chalcone-derived thiosemicarbazones and their metal complexes

Formation of the thiosemicarbazones (**1–4**) was confirmed by microanalyses, infrared, NMR, and HRMS data. Microanalyses and molar conductivities were compatible with the formation of the gallium(III) complexes [Ga(PyCTPh)₂]₂NO₃ (**Ga1**), [Ga(PyCT4CIPh)₂]₂NO₃ (**Ga2**), [Ga(PyCT4BrPh)₂]₂NO₃ (**Ga3**), and [Ga(PyCT4NO₂Ph)₂]₂NO₃ (**Ga4**) and the zinc(II) complexes [Zn(PyCTPh)₂] (**Zn1**), [Zn(PyCT4CIPh)₂] (**Zn2**), [Zn(PyCT4BrPh)₂] (**Zn3**), and [Zn(PyCT4NO₂Ph)₂] (**Zn4**). In all complexes, the thiosemicarbazone is attached to the metal center as an anion.

3.1.1. HRMS data. HRMS data were used to further characterize the thiosemicarbazones and their complexes. The thiosemicarbazones exhibited a peak at *m/z* 281.0866 (**1**),

315.0482 (**2**), 358.9976 (**3**), and 326.0718 (**4**) in the negative ionization mode which was attributed to the ion fragment $[M-H]^-$, indicating the presence of an anionic thiosemicarbazone. The appearance of this ion is associated with the high stability of the anionic form resulting from increased conjugation.

In spectra of the gallium(III) complexes, a peak at m/z 631.0971 (**Ga1**), 699.0208 (**Ga2**), 786.9213 (**Ga3**), and 721.0667 (**Ga4**) was observed in the positive ionization mode, due to formation of $[Ga(L)_2]^+$. The presence of this peak is in accordance with molar conductivity data that indicated that the complexes are 1 : 1 electrolytes in solution.

For the zinc(II) complexes, no peaks attributable to ionization were observed, in accordance with molar conductivity data which indicated that the complexes are nonelectrolytes.

3.1.2. Electronic spectra. The electronic spectra of the chalcone precursors showed an absorption at *ca.* 30,769–31,546 cm^{-1} , attributable to the $n \rightarrow \pi^*$ transition of the enone function. Upon formation of the thiosemicarbazones, absorptions at 25,316–28,011 cm^{-1} , attributable to $n \rightarrow \pi^*$ transitions of the azomethine and thioamide functions overlapped in the same envelope, were observed [26]. In the case of **4**, the transitions appeared at lower energies and a $\pi \rightarrow \pi^*$ transition was also noticed at 32,154 cm^{-1} , which could not be observed in spectra of **1–3**. This difference is probably due to the presence of the electron-withdrawing NO_2 group in **4**.

In spectra of the gallium(III) complexes, the $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions of the aromatic rings are at *ca.* 29,851–32,680 cm^{-1} . Two $n \rightarrow \pi^*$ transitions attributed to C=N and C=S were observed at *ca.* 21,787–22,831 cm^{-1} and *ca.* 21,231–21,978 cm^{-1} , respectively. In the zinc(II) complexes, the C=N and C=S $n \rightarrow \pi^*$ transitions were observed at *ca.* 20,877–22,371 cm^{-1} .

Upon coordination to both metals, the $n \rightarrow \pi^*$ transitions of the azomethine and thioamide functions shifted to lower energies due to the formation of a highly delocalized system upon deprotonation of the ligand [27,28].

3.1.3. Infrared spectra. Upon formation of the thiosemicarbazones, the $\nu(C=O)$ vibration at 1670–1677 cm^{-1} in infrared spectra of the chalcones disappeared along with the appearance of a new absorption at 1560–1570 cm^{-1} , attributed to $\nu(C=N)$ [29]. New absorptions were observed at 3150–3450 cm^{-1} , which were attributed to $\nu(N-H)$ of the thioamide [5,29], and a strong absorption at 750–822 cm^{-1} that was assigned to $\nu(C=S)$ [29]. In the spectrum of **3**, a new absorption was observed at 2500–2800 cm^{-1} which was attributed to $\nu(S-H)$, indicating the presence of thione-thiol tautomerism [30], or to $\nu(N-H)$ of a pyridinium ion [31].

The $\nu(C=N)$ absorption underwent a shift in spectra of the complexes, suggesting coordination of the imine nitrogen [5,6,32]. The $\nu(C=S)$ vibration at 750–822 cm^{-1} in the uncomplexed thiosemicarbazones shifted to 724–730 cm^{-1} in spectra of the complexes, indicating coordination of sulfur [5,6,16]. The in-plane deformation mode of the pyridinering at 538–596 cm^{-1} in spectra of the free bases shifted to 588–658 cm^{-1} in the complexes, suggesting coordination of the heteroaromatic nitrogen [16,29].

For the gallium(III) complexes, new absorptions attributed to the symmetric and asymmetric stretching of NO from nitrate were observed at *ca.* 1385 cm^{-1} and 1285–1324 cm^{-1} , respectively [6,16,33].

3.1.4. NMR spectra. Immediately after dissolution, only one signal was observed for each hydrogen atom in spectra of **1**, **2**, and **4**, but duplicate signals were found for carbon atoms due to the time required for recording ^{13}C NMR spectra. The signal of N3–H was observed at 11.21, 11.26, and 11.40 ppm for **1**, **2**, and **4**, respectively. ^1H NMR spectra registered one hour after dissolution showed duplicated signals, in accordance with the presence of two species in solution. The signals of all hydrogen and carbon atoms are duplicated in ^1H and ^{13}C NMR spectra of **3**, even immediately after dissolution, indicating the presence of two isomers in DMSO-d_6 .

An NOEDIFF experiment was recorded for **1** immediately after dissolution by irradiating at 11.21 ppm (figure 3), which is the position of N3–H. One NOE signal at 7.76 ppm ($J=16\text{ Hz}$), attributed to H10, indicates that the compound adopts the *E* configuration in relation to the C7–N2 bond. Hence, the predominant form of **1** is *E*. Similarly, the *E* configuration is dominant for **2** and **4**. ^1H NMR spectra of **1**, **2**, and **4** registered one hour after dissolution showed a signal at 12.89, 13.07, and 13.33 ppm, respectively, which is characteristic of the *Z* isomer, in which N3–H is hydrogen bonded to the pyridine nitrogen. The presence of the *E* and *Z* isomers is frequently observed for 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones [31,34,35].

Hereafter, attributions are given only for the main isomer (*E*) of **1**, **2**, and **4**. The high value of the H9/H10 coupling constant ($J=16\text{ Hz}$) indicates that these two hydrogen atoms are *trans* to each other in relation to the C9–C10 bond and that the configuration is *E* in relation to this bond. Thus, immediately after dissolution, the compounds adopt the *EE* configuration in relation to C7–N2 and C9–C10. After one hour, one observes the presence of the *EE* and *ZE* configurations in equilibrium in the solution. Crystal structure determination of **4** revealed that the compound adopts the *ZE* configuration.

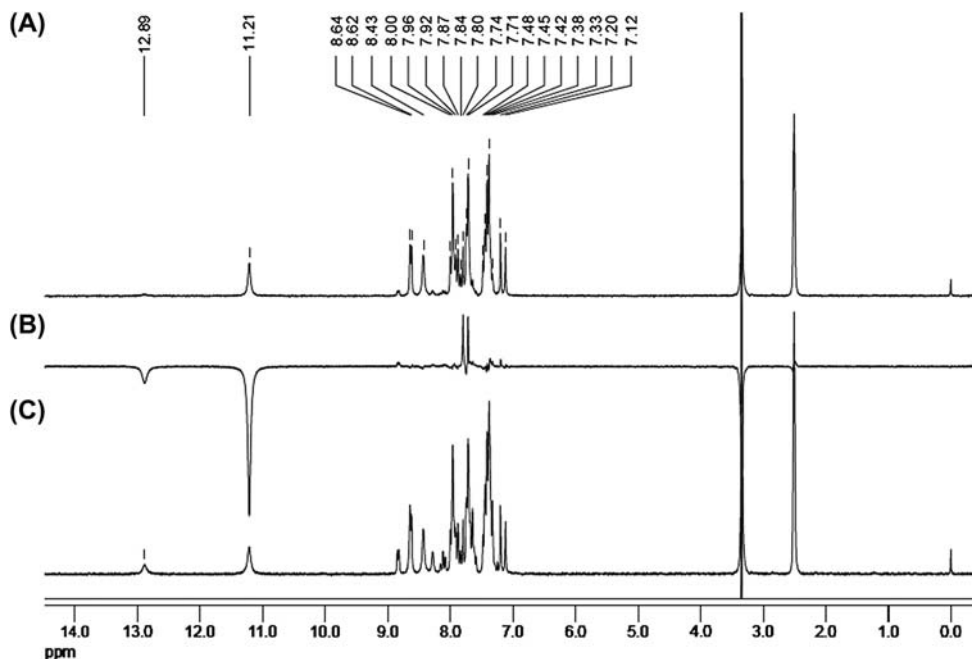


Figure 3. ^1H NMR spectra of HPyCTPh (**1**) (DMSO-d_6 , 200 MHz). (a) Spectrum obtained immediately after dissolution. (b) NOEDIFF spectrum (irradiation at 11.21 ppm). (c) Spectrum obtained 1 h after dissolution.

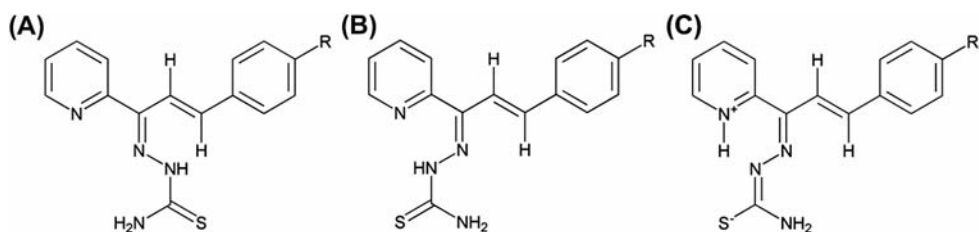


Figure 4. Generic structure of chalcone-derived thiosemicarbazones showing the *E* (A) and *Z* (B) configurational isomers, and the *Z* zwitterionic form (C).

NMR data do not allow the attribution of the conformation in relation to the C8–N3 bond. The two resonances observed for N4H₂ in the ¹H NMR spectra of **1**, **2**, and **4** indicated hindered rotation around the –C=S–NH₂ bond due to its partial double bond character [36].

Signals at 13.07 and 11.44 ppm in the spectrum of **3** may be attributed to N3–H of the *Z* and *E* isomers, respectively. The absence of the signal at 4.0 ppm attributable to S–H proton in the spectrum of **3** provided strong evidence for the presence of the thione form in solution [37]. Since the *Z* isomer is present, transference of the hydrogen from N3–H to the pyridine nitrogen could have occurred. Therefore, the broad absorption at 2500–2800 cm⁻¹ in the infrared spectrum of **3** is most likely attributable to ν(N–H) of the pyridinium ion, with formation of a zwitterion containing a sulfur in the thiolate form in a highly delocalized system involving the heteroaromatic ring and the thiosemicarbazone chain (figure 4).

Only one signal was observed for each hydrogen atom and each carbon atom in the NMR spectra of the complexes. In the ¹H NMR spectra of all complexes, the signal of N3–H was no longer observed, indicating deprotonation upon complexation and the presence of an anionic thiosemicarbazones. Only one signal was observed for N4H₂ in accord with the higher rigidity of the C8–N3 bond in the complexes, which acquired double bond character upon deprotonation at N3.

In ¹³C NMR spectra of the complexes, the signals of C7 and C8 shifted in relation to their positions in the free thiosemicarbazone, suggesting coordination through the sulfur and the imine nitrogen. The ¹H and ¹³C signals of the pyridine hydrogen and carbon atoms underwent significant shifts in the spectra of the complexes, suggesting coordination through the aromatic nitrogen. Hence, in all complexes, two thiosemicarbazone ligands are attached to the metal through the Npy–N–S chelating system and adopt the *EZE* conformation in relation to the C7–N2, N3–C8, and C9–C10 bonds.

3.2. Crystal structure of HPyCT4NO₂Ph (**4**)

The ORTEP diagram of **4** is shown in figure 5. Selected intramolecular bond lengths and angles and hydrogen bonding parameters in the structure are given in tables 2 and 3, respectively. Figure 6 shows a perspective view of the crystal packing.

4 crystallized in the monoclinic system, space group *Pc*, with two independent molecules (**A** and **B**) in the asymmetric unit (figure 5). In **A**, sulfur was numbered S1 and in molecule **B**, S11. In these molecules, the C=N–N–C(=S)N skeleton is almost planar (*rms* deviation from the least-squares plane of 0.0735 and 0.0177 Å for **A** and **B**,

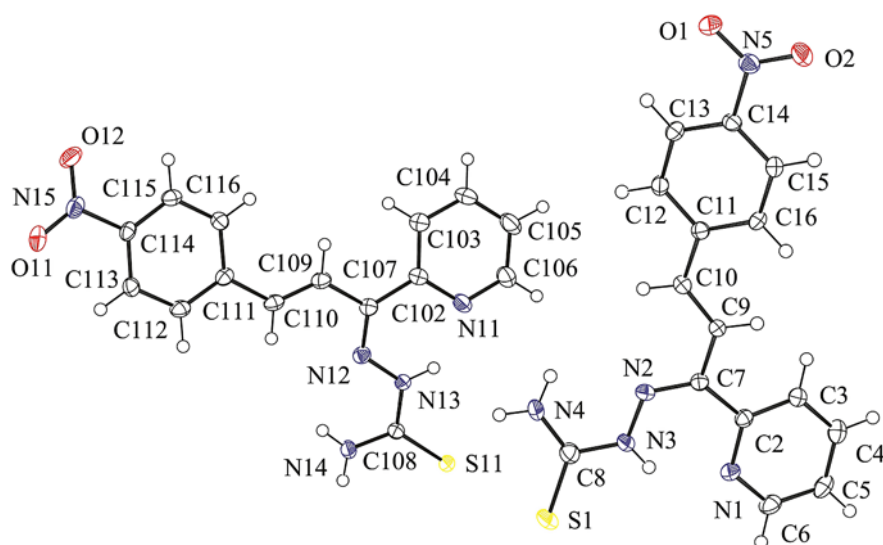


Figure 5. ORTEP diagram for HPyCT4NO₂Ph (**4**) with thermal ellipsoids at the 50% probability level and labeling scheme of the nonhydrogen atoms. Hydrogen atoms are drawn as circles of arbitrary radii.

respectively). The angles between the plane of the thiosemicarbazone moiety and the plane of the pyridine ring are quite similar in the two molecules, i.e. 14.87(8)° and 13.36(9)° in **A** and **B**, respectively. However, the angle between the plane of the chalcone-derived chain

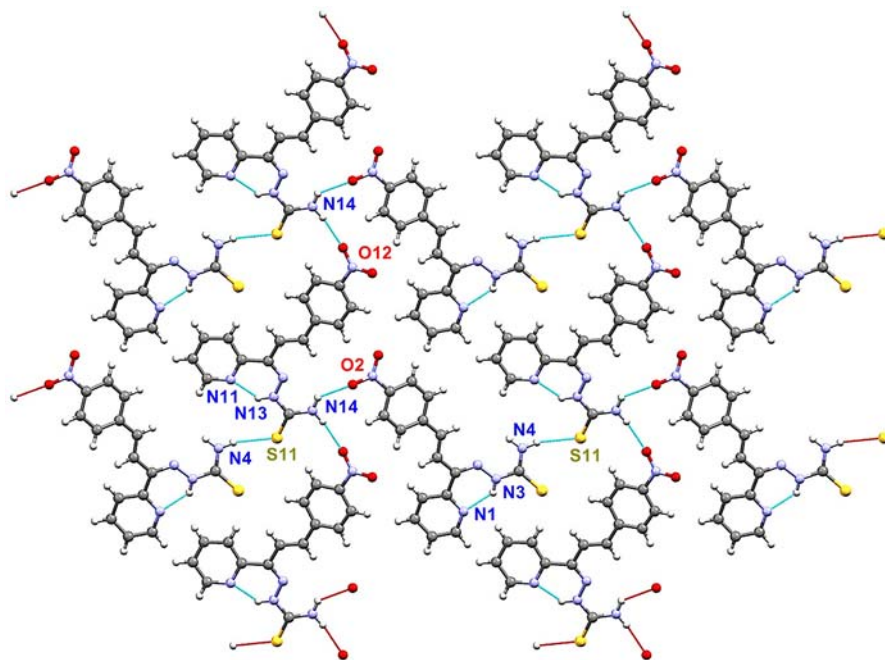
Table 2. Selected bond lengths (Å) and angles (°) for **4**.

<i>Bond lengths</i>			
S1–C8	1.681(2)	S11–C108	1.675(2)
N3–C8	1.363(3)	N13–C108	1.360(3)
N3–N2	1.361(2)	N13–N12	1.354(2)
N2–C7	1.309(3)	N12–C107	1.300(3)
N1–C2	1.347(3)	N11–C102	1.348(3)
C7–C2	1.483(3)	C107–C102	1.498(3)
C7–C9	1.473(3)	C107–C109	1.471(3)
C10–C9	1.335(3)	C110–C109	1.328(3)
C11–C10	1.462(3)	C111–C110	1.466(3)
C11–C12	1.397(3)	C111–C112	1.390(3)
C11–C16	1.408(3)	C111–C116	1.407(3)
<i>Angles</i>			
N1–C2–C7	117.9(2)	N11–C102–C107	117.4(2)
C9–C7–C2	118.0(2)	C109–C107–C102	118.1(2)
N2–C7–C9	114.8(2)	N12–C107–C109	115.4(2)
C7–N2–N3	119.4(2)	C107–N12–N13	119.4(2)
N2–N3–C8	118.6(2)	N12–N13–C108	120.2(2)
N3–C8–S1	118.8(2)	N13–C108–S11	119.1(2)
N4–C8–N3	116.8(2)	N14–C108–N13	117.3(2)
C10–C9–C7	125.5(2)	C110–C109–C107	124.6(2)
C9–C10–C11	124.9(2)	C109–C110–C111	126.0(2)
C12–C11–C10	119.0(2)	C112–C111–C110	118.2(2)
C13–C12–C11	121.5(2)	C113–C112–C111	121.3(2)
C16–C11–C10	122.8(2)	C116–C111–C110	123.0(2)
C12–C11–C16	118.3(2)	C112–C111–C116	118.9(2)

Table 3. Hydrogen bonds for **4** [\AA and $^\circ$].

D–H–A	D–H	H–A	D–A	D–H–A
N3–H3–N1	0.88	1.95	2.632(3)	132.9
N4–H4B–S11 ^a	0.88	2.74	3.556(2)	155.5
N13–H13–N11	0.88	1.90	2.598(3)	135.1
N14–H14A–O2 ^b	0.88	2.44	3.160(2)	139.1
N14–H14B–O12 ^c	0.88	2.36	3.225(3)	165.7

Notes: Symmetry transformations used to generate equivalent atoms: ^a $=x-1, y, z$; ^b $=x+1, y-1, z$; ^c $=x+1, y, z+1$.

Figure 6. View of the crystal packing of HPyCT4NO₂Ph (**4**).

attached to C7 and the plane of the pyridine ring is different for the two molecules, i.e. $32.87(6)^\circ$ and $9.00(9)^\circ$, for **A** and **B**, respectively.

The molecule of **4** adopts the *ZEE* conformation in relation to the C7–N2, N3–C8, and C9–C10 bonds. The presence of the *ZE* conformation in relation to C7–N2 and N3–C8 is quite common in 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones [29,34,38]. In fact, bond lengths within the pyridine ring and the thiosemicarbazone chain in **4** (table 2) are very similar to those of 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone (H2BPYTSC) [38]. Intramolecular N3–H3 \cdots N1 and N13–H13 \cdots N11 hydrogen bonds were observed in molecules **A** and **B**, respectively, which result in the *Z* configuration in relation to the C7–N2 bond.

In the molecular packing of **4**, intermolecular hydrogen bonds involving N4–H or N14–H and S11, O2, and O12 lead to formation of an infinite 2D network parallel to the (1 0 –1) plane (see table 3 and figure 6).

3.3. *In vitro* antimicrobial activity

Table 4 reports the MIC of the studied compounds against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *C. albicans*, together with MIC values for the reference drugs tetracycline hydrochloride and fluconazole.

The chalcones, thiosemicarbazones (**1–4**), and zinc(II) complexes (**Zn1–Zn4**) are not active against *P. aeruginosa* in the assayed conditions. The activity of the chalcones followed the order PyCPh < PyC4ClPh < PyC4BrPh ~ PyC4NO₂Ph against *S. aureus* and the order PyCPh < PyC4ClPh ~ PyC4BrPh < PyC4NO₂Ph against *C. albicans*, indicating that the presence of the halogen or the nitro substituent in the *para* position of the chalcone phenyl ring leads to activity improvement. The chalcone-derived thiosemicarbazones, except **4**, were in general more active than the parent compounds against *S. aureus* and *C. albicans*. The activities of the thiosemicarbazones followed the order **1** < **2** < **3** against *S. aureus* and the order **3** < **1** < **2** against *C. albicans*. Interestingly, the nitro derivative (**4**) proved to be inactive against both micro-organisms in the assayed conditions. The low solubility of **4** may, at least in part, account for its lack of activity.

Coordination to zinc(II) resulted in activity improvement of the thiosemicarbazones against *S. aureus*, but was not a good strategy for activity enhancement against *C. albicans*. Although gallium nitrate proved to be inactive against the assayed micro-organisms, coordination of gallium(III) to the thiosemicarbazones significantly enhanced antimicrobial activity. Coordination to gallium(III) resulted in activity improvement of all thiosemicarbazones against the three studied micro-organism strains, indicating this to be an effective strategy for antimicrobial activity enhancement. As previously suggested, the mechanism of antibacterial [6] and antifungal [13] activity of gallium(III) complexes probably involves perturbation of iron metabolism.

Table 4. MIC against *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and *C. albicans* ATCC 10231 for the chalcones, thiosemicarbazones, their metal complexes, the metal salts, tetracycline, and fluconazole.

Compounds	MIC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
PyCPh	30.3	>145	31.1
HPyCTPh (1)	21.3	>84.1	11.3
[Ga(PyCTPh) ₂] ₂ NO ₃ (Ga1)	4.46	17.83	16.8
[Zn(PyCTPh) ₂] (Zn1)	5.07	>88.8	22.6
PyC4ClPh	8.13	>119	18.9
HPyCT4ClPh (2)	9.96	>88.4	8.76
[Ga(PyCT4ClPh) ₂] ₂ NO ₃ (Ga2)	1.81	16.08	13.5
[Zn(PyCT4ClPh) ₂] (Zn2)	4.74	>83.8	19.2
PyC4BrPh	6.19	>87.63	18.94
HPyCT4BrPh (3)	2.21	>68.51	19.55
[Ga(PyCT4BrPh) ₂] ₂ NO ₃ (Ga3)	0.96	28.85	14.36
[Zn(PyCT4BrPh) ₂] (Zn3)	2.21	>60.5	>67.8
PyC4NO ₂ Ph	6.19	>100	12.8
HPyCT4NO ₂ Ph (4)	>74.1	>79.4	>157
[Ga(PyCT4NO ₂ Ph) ₂] ₂ NO ₃ (Ga4)	15.6	29.7	15.21
[Zn(PyCT4NO ₂ Ph) ₂] (Zn4)	36.4	>74.5	>68.6
Thiosemicarbazide	565	4916	1742
Gallium nitrate	1802	997	>929
Zinc chloride	>1067	>2346	467
Tetracycline hydrochloride	0.37	7.31	–
Fluconazole	–	–	12.9

4. Conclusion

Chalcone-derived thiosemicarbazones were obtained, which present antibacterial and antifungal activities. In some cases, the thiosemicarbazones proved to be more potent as antimicrobial agents than the chalcone counterparts. Coordination of the thiosemicarbazones to zinc(II) resulted in activity improvement against *S. aureus*, but not against *C. albicans*. Coordination of the thiosemicarbazones to gallium(III) resulted in activity improvement against all studied micro-organisms. The thiosemicarbazones proved to be active against *gram*-positive *S. aureus* bacteria while their gallium(III) complexes were active against both *gram*-positive *S. aureus* and *gram*-negative *P. aeruginosa* strains. Hence, complexation to gallium(III) led to a broadening of the antibacterial spectrum of the studied thiosemicarbazones. Since gallium nitrate is inactive against all micro-organisms, coordination to the thiosemicarbazones resulted in significant improvement of gallium's antimicrobial profile.

The literature contains many reports on the antimicrobial properties of both chalcones [1] and thiosemicarbazones [3] and their metal complexes [39–43]. The preparation of chalcone-derived thiosemicarbazones and their zinc(II) and gallium(III) complexes revealed to be an effective strategy of obtaining potent antimicrobial agents which could constitute interesting drug candidate prototypes.

Supplementary data

CCDC 890760 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Center via http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq and INCT-INOVAR (Proc. CNPq 988573.364/2008-6) from Brazil.

References

- [1] Z. Nowakowska. *Eur. J. Med. Chem.*, **42**, 125 (2007).
- [2] M.L. Go, X. Wu, X.L. Liu. *Curr. Med. Chem.*, **12**, 483 (2005).
- [3] H. Beraldo, D. Gambino. *Mini Rev. Med. Chem.*, **4**, 31 (2004).
- [4] A.E. Liberta, D.X. West. *Biometals*, **5**, 121 (1992).
- [5] I.C. Mendes, J.P. Moreira, A.S. Mangrich, S.P. Balena, B.L. Rodrigues, H. Beraldo. *Polyhedron*, **26**, 3263 (2007).
- [6] J.G. Da Silva, L.S. Azzolini, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo. *Polyhedron*, **28**, 2301 (2009).
- [7] W.B. Júnior, M.S. Alexandre-Moreira, M.A. Alves, A. Perez-Reboleleo, G.L. Parrilha, E.E. Castellano, O.E. Piro, E.J. Barreiro, H. Beraldo. *Molecules*, **16**, 6902 (2011).
- [8] J. Sheng, P.T.M. Nguyen, R.E. Marquis. *Arch. Oral Biol.*, **50**, 747 (2005).
- [9] Y. Oyama, H. Matsui, M. Morimoto, Y. Sakanashi, Y. Nishimura, Y. Okano. *Toxicol. Lett.*, **171**, 138 (2007).
- [10] P. Talukder, T. Satho, K. Irie, T. Sharmin, D. Hamady, Y. Nakashima, F. Miake. *Int. Immunopharmacol.*, **11**, 141 (2011).
- [11] L.R. Bernstein. *Pharmacol. Rev.*, **50**, 665 (1998).
- [12] J.A. Lessa, G.L. Parrilha, H. Beraldo. *Inorg. Chim. Acta.*, **393**, 53 (2012).
- [13] T.O. Bastos, B.M. Soares, P.S. Cisalpino, I.C. Mendes, R.G. dos Santos, H. Beraldo. *Microbiol. Res.*, **573**, 165 (2010).
- [14] R.J. Martens, N.A. Miller, N.D. Cohen, J.R. Harrington, L.R. Bernstein. *J. Equine Vet. Sci.*, **27**, 341 (2007).
- [15] Y. Kaneko, M. Thoendel, O. Olakanmi, B.E. Britigan, P.K. Singh. *J. Clin. Invest.*, **117**, 877 (2007).
- [16] I.C. Mendes, M.A. Soares, R.G. Santos, C. Pinheiro, H. Beraldo. *Eur. J. Med. Chem.*, **44**, 1870 (2009).

- [17] Oxford Diffraction. *CrysAlis PRO CCD and CrysAlis PRO RED: Version 1.171.33.55 (release 05 01 2010 CrysAlis171.NET)*, Oxford Diffraction Ltd., Yarnton, Oxfordshire, England (2010).
- [18] G.M. Sheldrick. *Acta Cryst.*, **A64**, 112 (2008).
- [19] V.V. Zakharychev, A.V. Kuzenkov. *Chem. Heterocycl. Comp.*, **43**, 989 (2007).
- [20] L.J. Farrugia. *J. Appl. Cryst.*, **30**, 565 (1997).
- [21] C.F. Macrae, I.J. Bruno, J.A. Chisholm, P.R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, P.A. Wood. *J. Appl. Cryst.*, **41**, 466 (2008).
- [22] L.J. Farrugia. *J. Appl. Cryst.*, **32**, 837 (1999).
- [23] J. Pernak, J. Rogoza, I. Mirska. *Eur. J. Med. Chem.*, **36**, 313 (2001).
- [24] National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard*, 6th Edn, NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA (2003).
- [25] National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard*, 2nd Edn, NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, Pennsylvania, USA (2002).
- [26] M. Joseph, A. Sreeranth, V. Suni, M.R.P. Kurup. *Spectrochim. Acta A*, **64**, 637 (2006).
- [27] K.S.O. Ferraz, N.F. Silva, J.G. Da Silva, N.L. Speziali, I.C. Mendes, H. Beraldo. *J. Mol. Struct.*, **1008**, 102 (2012).
- [28] E.B. Seena, M.R.P. Kurup. *Spectrochim. Acta, Part A*, **69**, 726 (2008).
- [29] I.C. Mendes, J.P. Moreira, N.L. Speziali, A.S. Mangrich, J.A. Takahashia, H. Beraldo. *J. Braz. Chem. Soc.*, **17**, 1571 (2006).
- [30] P. Sengupta, R. Dinda, S. Ghosh. *Transition Met. Chem.*, **27**, 665 (2002).
- [31] J.A. Lessa, J.C. Guerra, L.F. de Miranda, C.F.D. Romeiro, J.G. Da Silva, I.C. Mendes, N.L. Speziali, H. Beraldo. *J. Inorg. Biochem.*, **105**, 1729 (2011).
- [32] A.P. Rebolledo, M. Vieites, D. Gambino, O.E. Piro, E.E. Castellano, C.L. Zani, E.M. Souza-Fagundes, L.R. Teixeira, H. Beraldo. *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 698 (2005).
- [33] K. Nakamoto. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 4th Edn, p. 254, John Wiley and Sons, New York, NY (1986).
- [34] A.P. Rebolledo, G.M. de Lima, L.N. Gambi, N.L. Speziali, D.F. Maia, C.B. Pinheiro, J.D. Ardisson, H. Beraldo. *Appl. Organomet. Chem.*, **17**, 945 (2003).
- [35] J.G. Da Silva, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell, H. Beraldo. *J. Coord. Chem.*, **62**, 1400 (2009).
- [36] O.E. Offiong. *Spectrochim. Acta, Part A*, **50**, 2167 (1994).
- [37] O.M.I. Adlly. *Spectrochim. Acta, Part A*, **79**, 1295 (2011).
- [38] J.S. Casas, E.E. Castellano, J. Ellena, M.S.G. Tasende, A. Sánchez, M.J. Vidarte. *Inorg. Chem.*, **42**, 2584 (2003).
- [39] U. El-Ayann. *J. Coord. Chem.*, **65**, 629 (2012).
- [40] N.V. Savawant, J.B. Biswal, S.S. Garje. *J. Coord. Chem.*, **64**, 1758 (2011).
- [41] M. Muthukumar, P. Viswanathamurthi. *J. Coord. Chem.*, **63**, 1263 (2010).
- [42] S. Sumathi, P. Tharmaraj, C.D. Sheela, R. Ebenezer. *J. Coord. Chem.*, **64**, 1707 (2011).
- [43] S. Sumathi, P. Tharmaraj, C.D. Shella, R. Ebenezer, P.S. Bhava. *J. Coord. Chem.*, **64**, 1673 (2011).

From: Herve Galons <ejmc.els@gmail.com>

Date: 2013/4/15

Subject: Your Submission

To: hberaldo@ufmg.br

Ms. Ref. No.: EJMECH-D-13-00259R1

Title: Cytotoxic activity, albumin and DNA binding of new copper(II) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones

European Journal of Medicinal Chemistry

Dear Dr. Heloisa Beraldo,

Thank you very much for acting on the referee's comments.

Consequently, it is a pleasure for us to inform you that your manuscript has now been accepted for publication.

Sincerely,

Antonio Monge

Editor

European Journal of Medicinal Chemistry\

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Manuscript Number:

Title: Cytotoxic activity, albumin and DNA binding of new copper(II) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones

Article Type: Original Paper

Keywords: chalcones; thiosemicarbazones; copper(II) complexes; cytotoxic activity; interaction with albumin; interaction with DNA, apoptosis.

Corresponding Author: Dr. Heloisa Beraldo,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Minas Gerais

First Author: Jeferson G Da Silva

Order of Authors: Jeferson G Da Silva; Angel Recio Despaigne; Sonia R Louro; Cristiano C Bandeira; Elaine Souza Fagundes; Heloisa Beraldo

Abstract: [Cu(HL)Cl₂] complexes of chalcone-derived thiosemicarbazones were obtained with 3-phenyl-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCTPh), complex (1), 3-(4-chlorophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCT4ClPh), complex (2), 3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCT4BrPh), complex (3), and 3-(4-nitrophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCT4NO₂Ph), complex (4). 1-3 showed interaction with bovine serum albumin (BSA) and deoxyribonucleic acid from calf thymus (CT-DNA). The cytotoxic activities of the thiosemicarbazones and complexes (1-4) were tested against HL60 (wild type human promyelocytic leukemia), Jurkat (human immortalized line of T lymphocyte), MDA-MB 231 (human breast carcinoma) and HCT-116 (human colorectal carcinoma) tumor cell lineages. Upon coordination to copper(II) cytotoxicity significantly increased in Jurkat, MDA-MB 231 and HCT-116 cells. Unlike the free thiosemicarbazones, 1-4 induced DNA fragmentation in solid tumor cells indicating their pro-apoptotic potential.

February 6th 2013

Professor

Antonio Monge-Vega

Editor

European Journal of Medicinal Chemistry

Dear Professor Monge-Vega,

Please find in attachment our manuscript entitled "**Cytotoxic activity, albumin and DNA binding of new copper(II) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones**", submitted for publication in European Journal of Medicinal Chemistry. The article is original and unpublished, and is not being considered for publication elsewhere.

Looking forward to hearing from you,

Yours sincerely,

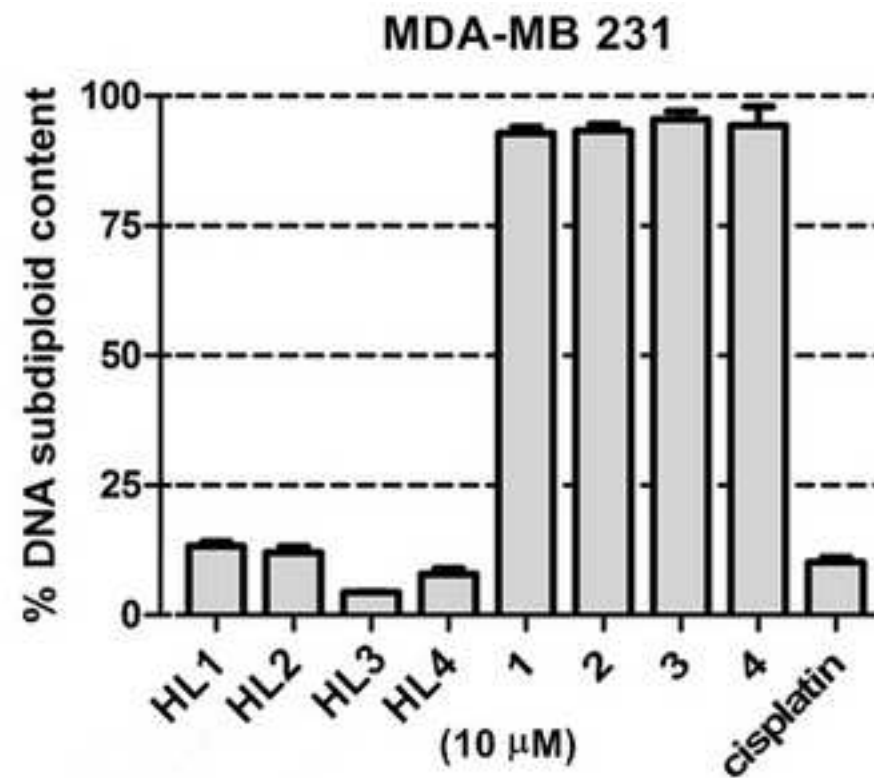
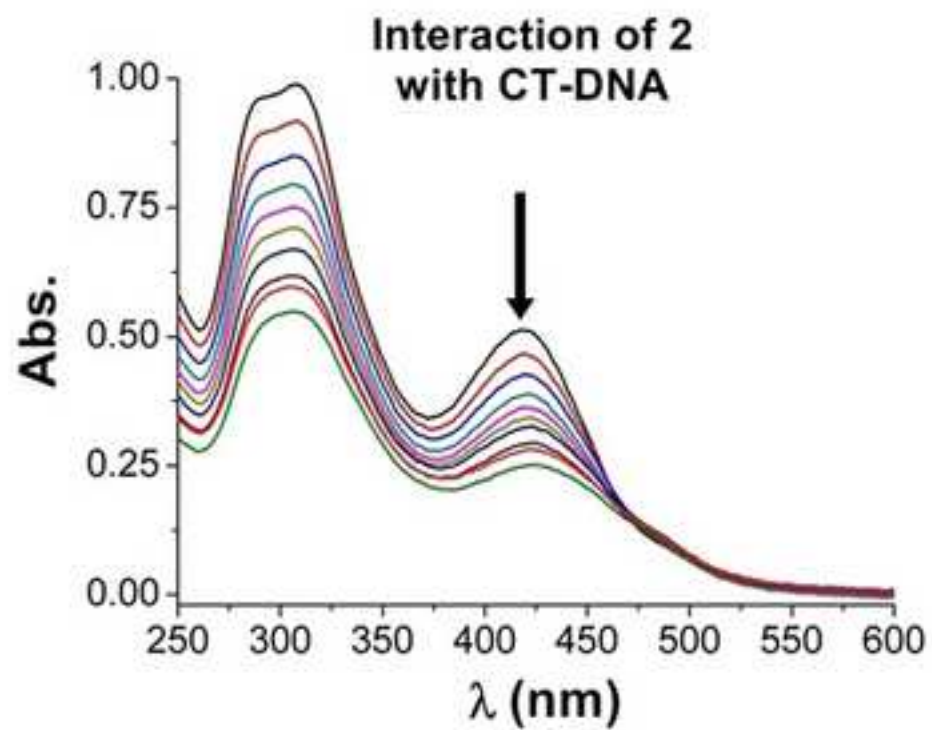
Heloisa Beraldo

Professor of Chemistry

Departamento de Química

Universidade Federal de Minas Gerais

31270-901 Belo Horizonte Brazil



Highlights

- [Cu(HL)Cl₂] complexes of chalcone-derived thiosemicarbazones were obtained
- The compounds were considerably cytotoxic against tumor cell lineages
- The Cu(II) complexes interact with DNA and bovine serum albumin (BSA)
- On coordination to Cu(II) cytotoxic activity significantly increased
- Coordination to Cu(II) was a good strategy to promote apoptosis in solid tumor cells

1 **Cytotoxic activity, albumin and DNA binding of new copper(II) complexes with**
2 **chalcone-derived thiosemicarbazones**

3

4 Jeferson G. Da Silva^a, Angel A. Recio Despaigne^a, Sonia R.W. Louro^b, Cristiano C. Bandeira^c,
5 Elaine M. Souza-Fagundes^c and Heloisa Beraldo^{a*}

6 ^a*Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG*
7 *Brazil*

8 ^b*Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 22453-900 Rio de Janeiro,*
9 *RJ, Brazil*

10 ^c*Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo*
11 *Horizonte, MG, Brazil*

12

13 hberaldo@ufmg.br

14

15 **Abstract**

16 [Cu(HL)Cl₂] complexes of chalcone-derived thiosemicarbazones were obtained
17 with 3-phenyl-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCTPh), complex
18 **(1)**, 3-(4-chlorophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone
19 (HPyCT4ClPh), complex **(2)**, 3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one
20 thiosemicarbazone (HPyCT4BrPh), complex **(3)**, and 3-(4-nitrophenyl)-1-pyridin-2-
21 ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone (HPyCT4NO₂Ph), complex **(4)**. **1-3** showed
22 interaction with bovine serum albumin (BSA) and deoxyribonucleic acid from calf
23 thymus (CT-DNA). The cytotoxic activities of the thiosemicarbazones and complexes
24 **(1-4)** were tested against HL60 (wild type human promyelocytic leukemia), Jurkat
25 (human immortalized line of T lymphocyte), MDA-MB 231 (human breast carcinoma)
26 and HCT-116 (human colorectal carcinoma) tumor cell lineages. Upon coordination to
27 copper(II) cytotoxicity significantly increased in Jurkat, MDA-MB 231 and HCT-116

28 cells. Unlike the free thiosemicarbazones, **1-4** induced DNA fragmentation in solid
29 tumor cells indicating their pro-apoptotic potential.

30

31 **Keywords:** chalcones; thiosemicarbazones; copper(II) complexes; cytotoxic activity;
32 interaction with albumin; interaction with DNA, apoptosis.

33

34 **1. Introduction**

35 Chalcones (1,3-diaryl-2-propen-1-ones) are a class of flavonoid natural products
36 consisting of two aryl rings linked by an α,β -unsaturated ketone moiety which present
37 several bioactivities as anti-inflammatory [1], antimicrobial [2], antileishmanial,
38 antioxidant [3], antimalarial [4], and anticancer [5] agents. The widespread distribution
39 in fruits, vegetables, spices, tea and soy and ease of synthesis has generated great
40 interest for possible therapeutic uses of chalcones [6].

41 Thiosemicarbazones are also a class of compounds with a wide range of
42 pharmacological applications as antitumor, antiviral, antimicrobial, and anti-parasitic
43 agents [7]. Thiosemicarbazones possessing a great diversity of structural scaffolds have
44 been extensively investigated but there are not many reports in the literature on
45 chalcone-derived thiosemicarbazones. Recently a series of chalcone-based
46 thiosemicarbazones were reported, which proved to possess antiproliferative properties
47 against human hepatoma cancer cells [8].

48 In many circumstances upon coordination to metal ions the pharmacological
49 activities of thiosemicarbazones are improved. In previous works we demonstrated that
50 coordination of thiosemicarbazones to tin(IV) [9], palladium(II) and platinum(II) [10],
51 gallium(III) [11], and antimony(III) [12] resulted in higher cytotoxic activity against
52 human tumor cell lines. We also demonstrated that upon complexation to copper(II) the

53 antimicrobial properties of a family of thiosemicarbazones strongly enhanced [13]. In
54 addition, the literature reports several copper(II) complexes with thiosemicarbazones
55 which show cytotoxic activity against human cancer cells [14-16].

56 Investigations on the interactions between metal complexes of
57 thiosemicarbazones and biological targets such as serum albumins and DNA are
58 important to further understand their pharmacological activity.

59 Since DNA is an important cellular receptor, many compounds exert their
60 antitumor effects through binding to DNA thereby changing its replication and
61 inhibiting cell growth [17].

62 Serum albumins are multifunctional proteins with high ligand binding ability,
63 which act as transporters for a diverse range of metabolites, drugs, nutrients, and metals.
64 Bovine serum albumin (BSA) is usually employed as a model protein due to its low cost
65 and ready availability. Moreover, bovine and human serum albumins are homologous
66 proteins [18].

67 Chalcone-derived thiosemicarbazones were prepared by us in a previous work
68 [19]. In the present work copper(II) complexes of these thiosemicarbazones were
69 obtained and assayed for their cytotoxic effects against leukemia and solid tumor cell
70 lineages. The pro-apoptotic potential of the studied compounds was investigated
71 together with their interactions with DNA and albumin biological targets.

72

73 **2. Results and discussion**

74 *2.1 Synthesis and characterization of the copper(II) complexes (1-4 and 1a)*

75 All steps involved in the formation of the new copper(II) complexes (**1-4**) are
76 summarized in Scheme 1 together with the process of formation of complex (**1a**),
77 obtained during crystallization of complex (**1**) in dimethylformamide (DMF) solution

78

Insert Scheme 1

79 Microanalyses suggest the formation of [Cu(HL)Cl₂] complexes (**1–4**).
80 Complexes (**1–4**) showed magnetic moments in the 1.78-1.85 BM range, which is
81 compatible with d⁹ electronic configuration.

82

83 *2.1.1 Structural characterization of [Cu(PyCTPh)Cl]·DMF (1a)*

84 A summary of the crystal data, data collection details and refinement results for
85 **1a** is listed in Table 1. An ORTEP [20] drawing is shown in Figure 1. Selected bond
86 lengths and angles around the metal are given in Table 2. **1a** crystallized in the
87 orthorhombic system, *Pbca*, with one molecule of the copper(II) complex and one DMF
88 molecule in the asymmetric unit.

89

Insert Table 1

90 In **1a** the geometry around the copper(II) ion is nearly square-planar. The
91 anionic thiosemicarbazone is attached to the metal center through the N_{py}-N-S
92 coordination system [d(Cu1-N1) = 2.003(5) Å, d(Cu1-N2) = 1.974(5) Å, d(Cu1-S1) =
93 2.2299(16) Å], and a chloride ion [d(Cu1-Cl1) = 2.2840(19) Å] occupies the fourth
94 coordination position. The thiosemicarbazone ligand adopts the *EZ* conformation in
95 relation to the C7-N2 and C8-N3 bonds. The Py-C=NNC(=S)-N skeleton is nearly
96 planar [*rms* deviation of atoms from the least-squares plane of 0.023 Å] with the
97 chlorine and the metal center laying close onto this plane [at 0.073(6) and 0.051(3) Å,
98 respectively]. The structure of the complex is very similar to that of [Cu(2Ac4mT)Cl]
99 [chloro(*N*(4)-*meta*-tolyl-2-acetylpyridine-thiosemicarbazonato) copper(II)] [13].

100

Insert Figure 1 and Table 2

101 In the packing of **1a** (Figure 2) intermolecular hydrogen bonds involving
102 molecules of DMF and the copper(II) complexes led to co-crystallization of this solvent

103 [N4–H··O01ⁱ (i = -x+2, -y+1, -z+1); d(N4··O01) = 2.900(7) Å; and ∠(N4H··O01) =
104 166.8 °].

105 **Insert Figure 2**

106 2.1.2 Infrared Spectra

107 Upon complexation the absorption attributed to $\nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{C}=\text{N})$ at 1560-1570
108 cm^{-1} in the spectra of the free thiosemicarbazones shifted to 1617-1630 cm^{-1} in the
109 spectra of **1-4**, in agreement with coordination *via* the azomethine nitrogen [21].
110 Additionally, a broad band at *ca.* 2675 cm^{-1} was observed in the spectra of **1-4** which
111 was attributed to the $\nu(\text{NH})$ vibration of the pyridinium ion, as previously observed in
112 gold(I) and platinum(II) complexes with pyridine-derived thiosemicarbazones [22,23], as
113 well as in pyridine-derived organic compounds [24]. The formation of a pyridinium ion
114 can also explain the great shift observed for the in-plane deformation mode of the
115 pyridine ring, $\rho(\text{py})$, from 538-596 cm^{-1} in the free thiosemicarbazones [19] to 596-630
116 cm^{-1} in the complexes.

117 New absorptions at 471-497 cm^{-1} and 340-353 cm^{-1} observed in the spectra of **1-**
118 **4** were attributed to the $\nu(\text{Cu}-\text{N}_{\text{imine}})$ and $\nu(\text{Cu}-\text{S})$ vibrations, respectively. Bands at
119 318-329 cm^{-1} and 304-313 cm^{-1} were assigned to $\nu(\text{Cu}-\text{Cl})$ vibrations of two chloride
120 ligands in *cis*-position to each other [21]. Hence the infrared data indicated coordination
121 of the thiosemicarbazones through the azomethine nitrogen and the sulfur, and the
122 presence of chloride ions in the metal coordination sphere (see Scheme 1).

123 In the infrared spectrum of **1a** no absorption in the 2400-2900 cm^{-1} region
124 attributable to $\nu(\text{NH}_{\text{pyridinium}})$ was found. Furthermore, new absorptions at 1658, 1442,
125 and 1306 cm^{-1} attributable to $\nu(\text{C}=\text{O})$, $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, and $\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, respectively, from DMF
126 solvate were observed.

127

128 2.1.3 EPR spectra

129 The EPR spectra of **1–4** in the solid state at room temperature and in frozen
130 DMSO solution at 77 K are presented in Figure 3. No EPR data for **1a** was obtained due
131 to the small quantity of this sample. In solid state, the spectra are very similar, and they
132 are axially symmetric, characteristic of mononuclear copper(II) complexes with
133 tetragonal or square-planar geometry. The values of g_{\parallel} and g_{\perp} , 2.19 and 2.06,
134 respectively, are in the range for this kind of complexes [25]. This is in agreement with
135 the infrared data for the complexes, which indicate coordination through the N-S
136 chelating system and two chloride ions to form a square planar geometry around the
137 copper(II) ion. Copper complexes with tetragonal distortion usually exhibit a 4-line
138 hyperfine splitting at the g_{\parallel} region due to interaction with the Cu(II) nuclear magnetic
139 moment ($I = 3/2$). The spectra in Figure 3 lack the hyperfine splitting, as it is frequently
140 the case for concentrated solid samples where exchange interactions are present [26].

141 In DMSO solution, the spectra are almost exclusively of the isotropic type with
142 $g_{\text{iso}} = 2.078$, which suggests that the interaction between Cu(II) and DMSO changes the
143 local symmetry. However, other information cannot be inferred from these data.

144 **Insert Figure 3**

145 2.1.4 Electronic spectra

146 The UV-vis spectra of the chalcone-derived thiosemicarbazones in DMF exhibit
147 absorptions at 289–313 nm attributed to $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions from the aromatic rings.
148 Absorptions at and 356–396 nm were assigned to $n \rightarrow \pi^*$ transitions from the azomethine
149 and thioamide functions overlapped in the same envelope [27].

150 In the spectra of **1–4** in DMF the $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions of the aromatic rings
151 appeared at 293–300 nm and at 313–331 nm. The $n \rightarrow \pi^*$ transitions attributed to C=N
152 and C=S were observed at 460–481 nm. These transitions are probably overlapped to

153 N→Cu(II) and S→Cu(II) ligand-to-metal charge transfer (LMCT) transitions [21]. In
154 concentrated solutions (10^{-3} M) ligand field ($d-d$) transitions were noticed as shoulders
155 at *ca.* 636 nm.

156 The electronic spectra of **1-3** in Tris-HCl (*pH* 7.20) and phosphate (*pH* 7.20)
157 buffer presented two or three well-resolved bands in the 270–500 nm range. A strong
158 blue shift in the absorption from 460–464 nm in DMF to 414–420 nm in buffer was
159 observed. Due to the poor solubility of **4** in DMF/buffer solutions it was not possible to
160 record its electronic spectra.

161

162 2.2 Albumin binding studies

163 2.2.1. Fluorescence quenching of BSA by copper(II) complexes (**1-3**)

164 BSA shows intrinsic fluorescence due to the tryptophan, tyrosine, and
165 phenylalanine residues. Hence, quenching of BSA fluorescence was used to investigate
166 the interaction between BSA and the copper(II) complexes.

167 Figure 4 shows the effect of increasing the concentration of **1** on the
168 fluorescence emission of BSA. A similar effect was observed for **2** and **3**. Quenching of
169 fluorescence emission at 345 nm suggests the formation of a BSA-complex system.

170

170 **Insert Figure 4**

171 Based on fluorescence data for $\lambda_{em.} = 345$ nm at 25 °C, the Stern-Volmer
172 quenching constant (K_{sv}) and bimolecular quenching rate constant (k_q) were obtained
173 using the classical Stern-Volmer equation (Equation 1) [28,29]

$$174 \quad F_0/F = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad (\text{Equation 1});$$

175 in which F_0 is the fluorescence intensity in the absence of quencher, F is the
176 fluorescence intensity in the presence of quencher, τ_0 is the average lifetime of the
177 fluorophore in absence of quencher ($\tau_0 = 10$ ns for BSA [29]) and $[Q]$ is the quencher

178 concentration. K_{sv} , is the slope, obtained from the linear fit from the plot of F_0/F vs $[Q]$,
179 and k_q is calculated as the K_{sv}/τ_0 ratio.

180 The K_{sv} values found for BSA-1, BSA-2, and BSA-3 systems were (3.19 ± 0.05)
181 $\times 10^5$, $(1.70 \pm 0.14) \times 10^6$, and $(8.37 \pm 0.28) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectively. The calculated
182 values of k_q for the BSA-complex systems are in the order of $10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ which is
183 higher than $2.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, the maximum scatter collision quenching constant of
184 quenchers with BSA [29]. Hence, it may be suggested that the quenching mechanism
185 was not originated from dynamic collision but it might have been caused by a specific
186 interaction between BSA and the complexes, a static quenching mechanism.

187 Synchronous fluorescence spectroscopy was used to study the changes in the
188 microenvironment of tyrosine and tryptophan amino acid residues. The synchronous
189 fluorescence of BSA is characteristic of tyrosine residues when the difference between
190 excitation and emission wavelength ($\Delta\lambda$) is *c.a.* 15 nm and characteristic of tryptophan
191 residues if $\Delta\lambda$ is *c.a.* 60 nm. Figure 5 shows the effect of increasing the concentration of
192 **1** on the synchronous spectra of BSA at $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ and $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$. In all cases a
193 decrease in emission intensity of BSA with increasing in complex concentration was
194 observed. This indicates that additions of the complexes affect the microenvironment of
195 both tyrosine and tryptophan residues during the binding process and synchronous
196 measurements confirmed the effective binding of all complexes with BSA. Similar
197 behavior was observed for the interaction between the BSA and copper(II) complexes
198 with hydrazones [30].

199 **Insert Figure 5**

200 The values of the binding constant (K) and number of binding sites (n) were
201 calculated using the Scatchard equation (Equation 2) [30]:

202
$$\log [(F_0-F)/F] = \log K + n \log [Q] \quad (\text{Equation 2})$$

203 where K is the antilog of the intercept and n is the slope obtained from the plot of
 204 $\log[(F_0-F)/F]$ vs [Q].

205 The obtained binding constants (K) and number of binding sites (n) were [K =
 206 $(8.70 \pm 1.03) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $n = 1.09 \pm 0.01$] (BSA-1), [K = $(2.77 \pm 1.56) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, $n =$
 207 1.46 ± 0.07] (BSA-2), and [K = $(4.25 \pm 1.07) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $n = 1.15 \pm 0.02$] (BSA-3). The
 208 K values indicate interaction between the complexes and BSA, suggesting that they
 209 could be transported by serum albumin proteins.

210

211 2.3 DNA binding studies

212 2.3.1 Electronic spectral studies

213 The absorption spectra of **1-3** in the absence and in the presence of CT-DNA (at
 214 a constant concentration of the complex) are given in Figure 6.

215 **Insert Figure 6**

216 Complexes can bind to DNA *via* both covalent and/or non-covalent
 217 (intercalation, electrostatic or groove binding) interactions. Upon addition of DNA, the
 218 bands of complexes (**1-3**) showed significant hypochromism accompanied by a small
 219 red shift. This behavior is in accordance with an intercalative binding mode, since
 220 hypochromism occurs due to π -stacking interactions between aromatic heterocyclic
 221 groups and the DNA base pairs (intercalation), as in the case of classic intercalators
 222 such as ethidium bromide (EB) [31].

223 In order to quantitatively compare the binding strength of the complexes, the
 224 intrinsic binding constants (K_b) of **1-3** with CT-DNA were obtained using Equation 3
 225 [30].

$$226 \quad [\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{DNA}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/(K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)) \quad (\text{Equation 3});$$

227 where [DNA] is the concentration of DNA base pairs, ϵ_a is the extinction coefficient of
 228 the complex at a given DNA concentration, ϵ_f is the extinction coefficient of the
 229 complex in free solution and ϵ_b is the extinction coefficient of the complex when fully
 230 bound to DNA. A plot of $[\text{DNA}]/[\epsilon_a - \epsilon_f]$ vs [DNA] gives $1/[\epsilon_b - \epsilon_f]$ as slope and $1/(K_b[\epsilon_b -$
 231 $\epsilon_f])$ as the intercept. The intrinsic binding constant K_b is calculated as the ratio between
 232 slope and intercept.

233 The determined K_b values were $(2.52 \pm 0.21) \times 10^3$ (**1**), $(1.61 \pm 0.22) \times 10^4$ (**2**),
 234 and $(2.74 \pm 0.47) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (**3**), indicating that the order of binding affinity between
 235 complexes is **2** > **3** > **1**. However, the K_b values of all complexes are lower than that of
 236 ethidium bromide (EB) ($K_b = (1.23 \pm 0.07) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) [32].

237

238 2.3.2 Competitive binding between EB and complexes (**1-3**) for CT-DNA

239 Steady-state competitive binding experiments using complexes (**1-3**) were
 240 undertaken to get further proof for the binding of the complexes to DNA. The
 241 displacement technique is based on the decrease of EB fluorescence resulting from the
 242 competitive displacement of EB from a DNA groove by a compound that competes for
 243 the same site.

244 In all cases upon the addition of complex the bands in the emission spectra of
 245 EB bound to CT-DNA showed a decrease in fluorescence intensity with a red shift,
 246 indicating that the EB molecules are displaced from their DNA binding sites and are
 247 replaced by the metal complexes under investigation.

248 As can be seen in Figure 7, the displacement of EB bound to CT-DNA (EB-CT-
 249 DNA) by the complexes provides further evidence that **1-3** bind to DNA. The apparent
 250 binding constants (K_{app}) were calculated from Equation 4 [33]:

$$251 \quad K_{EB}[EB] = K_{app} [\text{complex}] \quad (\text{Equation 4}),$$

252 where K_{EB} is $1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $[EB] = 10 \text{ }\mu\text{M}$, and $[\text{complex}]$ is the complex concentration
253 when the fluorescence intensity of EB is 50%. This value is obtained from the plot F_0/F
254 vs $[\text{complex}]$ when $F_0/F = 2$.

255 The values of K_{sv} , K (calculated with Equations (1) and (2), respectively) and
256 K_{app} are shown in Table 3. Once again the results clearly show that complex (1) and
257 mainly complexes (2) and (3) possess strong tendency to bind to DNA.

258 **Insert Figure 7 and Table 3**

259 *2.3.3. Studies of interactions with supercoiled plasmid DNA*

260 HPyCTPh and **1** were chosen as probes in the investigation on the effect of these
261 compounds in the electrophoretic mobility of pUC 19 plasmid DNA. As shown in
262 Figure 8, at $100 \text{ }\mu\text{M}$ both HPyCTPh and **1** did not alter the electrophoretic mobility of
263 DNA (Figure 8) while cisplatin and CuCl_2 promote strong modification in relation to
264 free DNA.

265 **Insert Figure 8**

266 In the presence of cisplatin, decrease in mobility of all forms was observed,
267 which is associated with interaction forming intra-strand crosslinks. In the presence of
268 CuCl_2 interaction was also observed, indicating a possible formation of adducts. For
269 HPyCTPh and **1** the absence of modifications in the electrophoretic mobility suggests
270 that these compounds do not form stable adducts with DNA at $100 \text{ }\mu\text{M}$. In fact, the
271 mode of cytotoxic action of free thiosemicarbazones involves mainly inhibition of
272 ribonucleoside diphosphate reductase, and not direct interaction with DNA [10]. In the
273 case of the studied complexes the results suggest that, unlike cisplatin, they probably do
274 not bind directly to DNA but rather act by intercalation between the DNA base pairs.

275

276 *2.4 Cytotoxic activity and investigation on the pro-apoptotic potential of the*
277 *thiosemicarbazones and their copper(II) complexes (1-4)*

278 The cytotoxic activities of the free thiosemicarbazones, complexes (**1-4**) and
279 copper(II) chloride were assayed on HL-60 (human promyelocytic leukemia) and Jurkat
280 (an immortalized line of T lymphocyte) leukemia cell lines, and on MDA-MB 231
281 (human breast carcinoma) and HCT-116 (human colorectal carcinoma) solid tumor cell
282 lineages.

283 The antiproliferative effect of the compounds was evaluated by the MTT
284 colorimetric assay at 10 μ M. The results, expressed as percentage of cell proliferation
285 compared with control (cells treated with vehicle, DMSO 0.5%) are depicted in Figure
286 9. Cisplatin, a reference drug currently used on clinic, was assayed as positive control.

287 **Insert Figure 9**

288 In general, at 10 μ M the thiosemicarbazones were more active against HL-60
289 than against the other tested cell lines. In contrast, complexes (**1-3**) were able to inhibit
290 75% or more of cell proliferation in all assayed cell lineages. In this experiment,
291 although CuCl_2 was inactive at this concentration, the activity of the
292 thiosemicarbazones against Jurkat, MDA-MB 231 and HCT-116 cell lines increased
293 upon coordination to copper(II).

294 The IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) values against the four cell
295 lines are shown in Table 4. The compounds were considerably cytotoxic against the
296 tested lineages, several of them at nanomolar concentration. In general upon
297 coordination to copper(II) the cytotoxic activity significantly increased, mainly in
298 Jurkat, MDA-MB 231 and HCT-116 cells. Except in Jurkat cells, **4** showed poor
299 cytotoxic effect compared to **1-3**, suggesting that the presence of the nitro group
300 promoted a decrease in activity.

325 Analysis of DNA fragmentation in the solid tumor cell lines clearly showed that
326 only the complexes possess pro-apoptotic activity. Hence coordination to copper(II) was
327 a good strategy to promote apoptosis induction by otherwise apoptosis-inactive
328 thiosemicarbazones.

329 In order to evaluate the impact of the compounds on normal cells, we used PHA-
330 stimulated PBMC as a model. PBMC comprise cells including lymphocytes and
331 monocytes, and are key cells in immune system homeostasis. Therefore we used this
332 assay as indicative of the cytotoxicity of compounds as well as of their immunotoxic
333 potential. The results obtained suggest that the thiosemicarbazones and their copper(II)
334 complexes which inhibited cell proliferation close to 50% or higher could cause
335 suppression of immune response and are cytotoxic to PBMC cells (see Table 5).

336 **Insert Table 5**

337 The immune system can be a target by many chemicals including environmental
338 contaminants and drugs with potential adverse effects on human health. Compounds
339 may affect lymphocytes, which are the primary effectors and regulators of acquired
340 immunity [35].

341 In this context, although coordination to copper(II) revealed to be a successful
342 strategy to increase the cytotoxicity of the studied thiosemicarbazones, this gain also
343 increases their immunotoxic potential. However it is worth noticing that cisplatin revealed
344 to be cytotoxic to PBMC as well.

345

346 **3. Conclusions**

347 Chalcone-derived thiosemicarbazones proved to be highly cytotoxic to HL-60
348 leukemia cells but were not as potent as cytotoxic agents against Jurkat, MDA-MB 231

349 and HCT-116 tumor cell lineages. Upon coordination to copper(II) cytotoxicity
350 significantly improved against these cell lines.

351 Similar cytotoxic effects were observed for the free thiosemicarbazones and
352 complexes (**1-4**) against HL60 leukemia cells but only the free thiosemicarbazones and
353 **4** presented pro-apoptotic activity. Only complex (**4**) activates the apoptosis pathway in
354 Jurkat leukemia cells.

355 Although the thiosemicarbazones were unable to induce apoptosis in the studied
356 solid tumor cell lines their copper(II) complexes possess pro-apoptotic activity. Hence
357 coordination to copper(II) was a good strategy for apoptosis induction by otherwise
358 apoptosis-inactive thiosemicarbazones.

359 Our results showed that the copper(II) complexes interact with CT-DNA by an
360 intercalative mechanism, but the metal probably does not directly bind to DNA.
361 Complexes (**1-4**) but not the free thiosemicarbazones were able to induce DNA
362 fragmentation in the investigated solid tumor cell lineages.

363 We demonstrated that **1-3** interact with BSA indicating that serum albumins
364 could act as transporters of the complexes.

365

366 **4. Experimental**

367 *4.1. Materials and equipment*

368 All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and used without further
369 purification. Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400
370 analyzer. An YSI model 31 conductivity bridge was employed for molar conductivity
371 measurements. Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX
372 spectrometer using KBr pellets (4000-400 cm^{-1}) and nujol mulls between CsI plates
373 (700-200 cm^{-1}). Magnetic susceptibility measurements were carried out on a Johnson

374 Matthey MSB/AUTO balance. Electronic spectra were acquired with a Shimadzu
375 double beam UV-Vis spectrophotometer UV-2401PC (P/N 206-82201) using 1 cm
376 quartz cells. Measurements of fluorescence were performed on a Varian Cary Eclipse
377 spectrofluorimeter (FL1006m016)-VARIAN (Agilent Technologies) using a 1 cm
378 quartz cell. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectra were obtained on a Bruker
379 ESP300E equipment with a magnetic field modulation amplitude of 0.4-1 mT and
380 modulation frequency of 100 kHz. Room temperature spectra of the samples in the solid
381 state were obtained in glass capillaries of 1.2 mm internal diameter. Frozen DMSO
382 solution spectra were acquired at liquid N₂ temperature (77 K) in 3 mm internal
383 diameter Teflon[®] tubes. Single crystal X-ray diffraction measurements were carried out
384 on an Oxford-Diffraction GEMINI-Ultra diffractometer (LabCri-UFMG) using
385 graphite-Enhance Source Mo K_α radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). The data collection, cell
386 refinements, and data reduction were performed using the CrysAlisPro software
387 package [36]. An absorption correction based on a multi-scan method was applied [36].
388 The crystal structure was solved by direct methods using SHELXS-97 [37]. Full-matrix
389 least-squares refinement procedure on F^2 with anisotropic thermal parameters was
390 carried on using SHELXL-97 [37]. Positional and anisotropic atomic displacement
391 parameters were refined for all non-hydrogen atoms. Hydrogen atoms were placed
392 geometrically and the positional parameters were refined using a riding model.
393 Molecular graphics and packing figures were prepared using ORTEP [20] and Mercury
394 [38].

395

396 4.2 Syntheses of the compounds

397 4.2.1 Preparation of 3-phenyl-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone
398 (HPyCTPh), 3-(4-chlorophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone

399 (HPyCT4ClPh), 3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone
 400 (HPyCT4BrPh), and 3-(4-nitrophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one
 401 thiosemicarbazone (HPyCT4NO₂Ph)

402 The preparation of all chalcone-derived thiosemicarbazones was performed as
 403 previously reported [19].

404

405 4.2.2 Syntheses of the copper(II) complexes with HPyCTPh, HPyCT4ClPh,
 406 HPyCT4BrPh and HPyCT4NO₂Ph

407 The copper(II) complexes were obtained by refluxing a methanol solution of the
 408 desired ligand with copper(II) chloride in 1:1 ligand-to-metal molar ratio. The resulting
 409 solids were washed with methanol followed by diethylether and then dried *in vacuo*.

410

411 [dichlorido(3-phenyl-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone)copper(II)]
 412 [Cu(HPyCTPh)Cl₂] (**1**)

413 Green solid. Yield: 92 %. Anal. Calcd. for C₁₅H₁₄Cl₂CuN₄S (%): C, 43.22; H, 3.39; N,
 414 13.44. Found: C, 42.94; H, 3.35; N, 13.28. FW: 416.82 g mol⁻¹. Selected IR bands
 415 (cm⁻¹): ν(NH_{pyridinium}) 2675 (broad); ν(C=N) 1613; ρ(py) 596; ν(Cu–N_{imine}) 471;
 416 ν(Cu–S) 342; ν(Cu–Cl) 318 and 304. UV-Vis [DMF, nm (ε, M⁻¹ cm⁻¹): 293 (46535);
 417 313 (38305); 460 (23530); 636 (378). Molar conductivity (DMF at 1 mM):
 418 23.88 Ω⁻¹ cm² mol⁻¹. Magnetic moment at 300 K [μ_{eff}, BM]: 1.85.

419 During crystallization of **1** by slow evaporation in dimethylformamide (DMF) solution
 420 crystals of [Cu(PyCTPh)Cl]·DMF (**1a**) were formed.

421 [chlorido(3-phenyl-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazonato)copper(II)]
 422 N,N-dimethylformamide solvate [Cu(HPyCTPh)Cl]·DMF (**1a**)

423 Dark green crystals. $C_{18}H_{20}ClCuN_5OS$. FW: 453.45 g mol⁻¹. Selected IR bands (cm⁻¹):
424 $\nu(C=O)$ 1658; $\delta_{as}(CH_3)$ 1442; $\delta_s(CH_3)$ 1306; $\nu(C=N)$ 1628; $\rho(py)$ 512.

425

426 [dichlorido(3-(4-chlorophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone)
427 copper(II)] [Cu(HPyCT4ClPh)Cl₂] (**2**)

428 Green solid. Yield: 94 %. Anal. Calcd. for $C_{15}H_{13}Cl_3CuN_4S$ (%): C, 39.92; H, 2.90; N,
429 12.42. Found: C, 39.86; H, 2.94; N, 12.21. FW: 451.26 g mol⁻¹. Selected IR bands
430 (cm⁻¹): $\nu(NH_{pyridinium})$ 2675 (broad); $\nu(C=N)$ 1630; $\rho(py)$ 609; $\nu(Cu-N_{imine})$ 472;
431 $\nu(Cu-S)$ 340; $\nu(Cu-Cl)$ 325 and 313. UV-Vis [DMF, nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹)]: 294 (34227);
432 316 (29957); 465 (18417); 636 (305). Molar conductivity (DMF at 1 mM):
433 25.92 $\Omega^{-1} cm^2 mol^{-1}$. Magnetic moment at 300 K [μ_{eff} , BM]: 1.83.

434

435 [dichlorido(3-(4-bromophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone)
436 copper(II)] [Cu(HPyCT4BrPh)Cl₂] (**3**)

437 Green solid. Yield: 93 %. Anal. Calcd. for $C_{15}H_{13}BrCl_2CuN_4S$ (%): C, 36.34; H, 2.64;
438 N, 11.30. Found: C, 36.01; H, 2.69; N, 10.97. FW: 495.71 g mol⁻¹. Selected IR bands
439 (cm⁻¹): $\nu(NH_{pyridinium})$ 2675 (broad); $\nu(C=N)$ 1628; $\rho(py)$ 609; $\nu(Cu-N_{imine})$ 472;
440 $\nu(Cu-S)$ 341; $\nu(Cu-Cl)$ 325 and 304. UV-Vis [DMF, nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹)]: 296 (40078);
441 321 (35933); 464 (21423); 636 (273). Molar conductivity (DMF at 1 mM):
442 33.15 $\Omega^{-1} cm^2 mol^{-1}$. Magnetic moment at 300 K [μ_{eff} , BM]: 1.78.

443

444 [dichlorido(3-(4-nitrophenyl)-1-pyridin-2-ylprop-2-en-1-one thiosemicarbazone)
445 copper(II)] [Cu(HPyCT4NO₂Ph)Cl₂] (**4**)

446 Green solid. Yield: 91 %. Anal. Calcd. for $C_{15}H_{13}Cl_2CuN_5O_2S$ (%): C, 39.01; H, 2.84;
447 N, 15.16. Found: C, 38.69; H, 2.79; N, 14.97. FW: 461.81 g mol⁻¹. Selected IR bands

448 (cm^{-1}): $\nu(\text{NH}_{\text{pyridinium}})$ 2678 (broad); $\nu(\text{C}=\text{N})$ 1617; $\rho(\text{py})$ 630; $\nu(\text{Cu}-\text{N}_{\text{imine}})$ 497;
449 $\nu(\text{Cu}-\text{S})$; 353 $\nu(\text{Cu}-\text{Cl})$ 329 and 304. UV-Vis [DMF, nm (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)]: 300 (27053);
450 331 (27868); 481 (22831); 637 (375). Molar conductivity (DMF at 1 mM):
451 $29.02 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$. Magnetic moment at 300 K [μ_{eff} , BM]: 1.82.

452

453 *4.3 Albumin binding studies*

454 The interaction of the complexes with bovine serum albumin (BSA) was studied
455 in phosphate buffer (8.3 mM, pH 7.20). Stock solution of BSA (0.5 mM) was prepared
456 in phosphate buffer and stored in the dark in the refrigerator for further use. The stock
457 solutions of complexes were freshly prepared by first dissolving the compounds in
458 DMF and then making the dilutions with buffer. The amount of DMF was kept less than
459 5% (by volume) for each set of experiment and had no effect on any experimental
460 results.

461 The binding of metal complexes to BSA was studied using fluorescence spectra.
462 The emission spectra were recorded in the 295 to 600 nm range with excitation at 280
463 nm. The excitation and emission slit widths and scan rates were constantly maintained
464 for all the experiments. BSA solution (1.0 μM) was titrated by successive additions of a
465 stock solution of complexes (50 mM) using a micropipette. All experiments were
466 performed at 25 °C.

467 The synchronous fluorescence spectra of BSA varying the concentration of
468 complexes **1-3** were recorded at $\Delta\lambda$ (difference between excitation and emission
469 wavelength) = 15 nm and $\Delta\lambda = 60$ nm.

470

471

472

473 *4.4 DNA binding studies*

474 The interaction of the complexes with deoxyribonucleic acid from calf thymus
475 (CT-DNA) was studied in Tris–HCl buffer (NaCl 50 mM, Tris–HCl 5 mM pH 7.20).
476 Stock solution of CT-DNA in Tris–HCl buffer was prepared upon shaking in an orbital
477 shaker at 120 rpm at 37 °C for 24 h. Then, the solution was filtered with a Millipore
478 filter (0.45 µm), and its concentration was calculated using absorption intensity at 260
479 nm and the molar absorption coefficient (ϵ) value at this wavelength ($6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
480 [39]. The stock solutions of the complexes were freshly prepared by first dissolving
481 complexes in DMF and then diluting with buffer. The amount of DMF was kept less
482 than 5% (by volume) for each set of experiments and it presented no effect on any of the
483 experimental results.

484 Absorption titration experiments were performed by increasing the concentration
485 of the CT-DNA *via* successive additions of its stock solutions on a fixed concentration
486 of complex. Upon additions in each cuvette (sample and blank) of a same aliquot of CT-
487 DNA (double beam mode), the samples were shaken and left in equilibrium for 2 min,
488 before recording each spectrum.

489 The affinity of the complex for DNA was evaluated by a fluorescence technique
490 using ethidium bromide (EB) bound to CT-DNA (EB-CT-DNA) solution in Tris-HCl
491 buffer (pH = 7.20). EB shows an increase in the emission intensity due to its
492 intercalative binding to CT-DNA. The changes in the fluorescence intensity at 602 nm
493 (excitation at 545 nm) of EB-CT-DNA were measured with respect to the concentration
494 of the copper(II) complexes. In fact, when it is removed, EB is non-emissive in Tris-
495 HCl buffer solution (pH 7.20), due to fluorescence quenching of the free EB by solvent
496 molecules. A competitive binding of the complexes to CT-DNA resulted in the
497 displacement of the bound EB, thereby decreasing its emission intensity.

498 *4.5 Studies of interactions between complexes and supercoiled plasmid DNA*

499 Agarose gel electrophoresis was employed to identify the modifications resulting
500 from DNA-complex interaction [10]. 453 ng of purified pUC 19 plasmid DNA (Sigma-
501 Aldrich) were incubated with selected compounds at 100 μM in Tris-HCl buffer at 37
502 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h. Then the reactions were quenched by adding 5 μL of a loading buffer
503 solution (50% glycerol/Tris-HCl buffer solution with 0.01% bromophenol blue and 250
504 mM EDTA). The samples were analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis in 0.5X
505 TBE (Tris/Borate/EDTA) buffer for 1 h at 75 mV. The gel was stained after
506 electrophoresis in 0.5X TBE buffer with 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ EB for 15 min and visualized by
507 UV light.

508

509 *4.6 Cytotoxicity activity*

510 *4.6.1 Materials*

511 Cisplatin, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
512 (MTT), RPMI-1460, and L-glutamine were purchased from Sigma.
513 Antibiotic/Antimicotic Solution and fetal calf serum were purchased from Gibco (Grand
514 Island, NY).

515

516 *4.6.2 Cell lines*

517 HL60 (wild type human promyelocytic leukemia) and Jurkat (human
518 immortalized line of T lymphocyte) cell lines were kindly given by Dr. Gustavo
519 Amarante-Mendes (São Paulo University, Brazil). MDA-MB 231 (human breast
520 carcinoma) line was kindly given by Dr. Alfredo Goes (Federal University of Minas
521 Gerais, Brazil) and HCT-116 (human colorectal carcinoma) cells were purchased from
522 ATCC. All lineages were maintained in the logarithmic phase of growth in RPMI 1640

523 or DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 100 U mL⁻¹
524 penicillin and 100 mg mL⁻¹ streptomycin (GIBCO BRL, Grand Island, NY) enriched
525 with 2 mM of L-glutamine and 10% (for leukemia cells) or 5% (for adherent cells) of
526 fetal bovine serum. All cultures were maintained at 37 °C in a humidified incubator with
527 5% CO₂ and 95% air. The media were changed twice weekly and they were regularly
528 examined.

529

530 *4.6.3 Evaluation of the cytotoxic effect against human tumor cell lines*

531 HL60 and Jurkat cells were inoculated at 50,000 and 100,000 cells/well, and
532 MDA-MB 231 and HCT-116 cells were inoculated at 10,000 cells/well. The plates were
533 pre-incubated for 24 h at 37 °C to allow adaptation of cells prior to the addition of the
534 test compounds. Freshly prepared solutions of the different compounds were tested at
535 10 µM. Subsequently, the plates were inoculated for 48 h in an atmosphere of 5% CO₂
536 and 100% relative humidity. Control groups included treatment with 0.5% DMSO
537 (negative control) and 10 µM of cisplatin (positive control). Cell viability was estimated
538 by measuring the rate of mitochondrial reduction of MTT. All substances were
539 dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) prior to dilution. Compounds that inhibited the
540 proliferation in more than 50% were selected for determination of the half maximal
541 inhibitory concentration (IC₅₀). IC₅₀ values were determined over a range of ten-fold
542 concentrations (100-0.001 µM). All compounds were tested in triplicate, in three
543 independent experiments.

544

545 *4.6.4 In vitro cell viability assay - MTT assay*

546 MTT is a tetrazolium salt that is reduced to purple formazan crystals mainly by
547 mitochondrial succinate dehydrogenase and the color intensity of the formazan dye is
548 correlated to the number of viable cells [40]. Briefly, after 4 h of the end of incubation

549 of cells with different compounds, 20 μL of MTT solution (2.5 mg mL^{-1} in phosphate-
550 buffered saline) were added to each well, the supernatant was removed and 200 μL of
551 0.04 M HCl in isopropyl alcohol were added to dissolve the formazan crystals. The
552 optical densities (OD) were evaluated in a spectrophotometer at 595 nm. Controls
553 included drug-containing medium (background) and drug-free complete medium. Drug-
554 free complete medium was used as control (blank) and was treated in the same way as
555 the drug-containing media. Results were expressed as percentage of cell proliferation,
556 comparing with 0.5% DMSO control and were calculated as follows: viability (%) =
557 $(\text{mean OD treated} - \text{mean OD background}) / (\text{mean OD untreated cultured, i.e. 0.5\%}$
558 $\text{DMSO} - \text{mean OD blank wells}) \times 100$. Interactions of compounds and media were
559 estimated on the basis of the variations between drug-containing medium and drug-free
560 medium to escape from false-positive or false-negative [41].

561

562 *4.6.5 DNA fragmentation assay*

563 Subdiploid DNA content was determined for the quantification of cellular DNA
564 fragmentation, which is characteristic of apoptosis. This experiment was used as a
565 predictive method of the pro-apoptotic potential of compounds. Subdiploid DNA
566 content was evaluated in HL60, Jurkat, MDA-MB and HCT-116 cells subjected to
567 different treatments with selected compounds, according to the method described by
568 Nicoletti et al. [42]. For this study, 200,000 cells in suspension treated or not with
569 compounds for 24 h were centrifuged for 5 min at 200 g, 4 °C. After centrifugation,
570 cells were re-suspended in hypotonic fluorochrome solution-HFS [50 mg mL^{-1}
571 propidium iodide (Sigma), 0.1% sodium citrate (Sigma) and 0.1% Triton X-100
572 (Sigma)]. The samples in HFS were incubated at 8 °C for 4-8 h and immediately taken
573 to the flow cytometer. Incubation of cells with a hypotonic fluorochrome solution (HFS)

574 leads to the weakening of the cell membrane by the action of triton-X100 and hypotonic
575 shock causes its lysis. The nuclear material becomes accessible to PI, which will
576 intercalate in nuclear DNA. Normal cells have DNA content equal to 2n or 4n,
577 depending on the phase of the cell cycle. In apoptotic cells, the DNA content is lower
578 than 2n, because the fragments of small molecular weight leave the inner core, which is
579 the subdiploid phase. The subdiploid DNA content was determined by the CellQuest
580 program (Becton Dickinson).

581

582 *4.6.6 Evaluation of the cytotoxic effect against human peripheral blood mononuclear* 583 *cells*

584 Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated as described
585 by Gazzinelli et al., with modifications [43]. In brief, PBMC samples were obtained
586 through agreement with Minas Gerais Hematology and Hemotherapy Center
587 Foundation – HEMOMINAS (protocol n° 105/2004) from healthy adult volunteers of
588 both sexes by centrifugation of heparinized venous blood over Ficoll cushion (Sigma-
589 Aldrich, St. Louis, MO). Mononuclear cells were collected from the interphase after
590 Ficoll separation and washed three times in RPMI-1640 before further processing. The
591 cells were washed and the cell density was adjusted to 2.5×10^6 cells mL⁻¹. 100 µL of
592 this suspension (250,000 cells) were added to 96-well plate and incubated for 24 h in
593 the presence of 2.5 µg mL⁻¹ of phytohemagglutinin (PHA) for stabilization. After this
594 period, cells were incubated for 72 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing
595 5% CO₂, in the presence of the compounds at concentrations corresponding to the
596 lowest IC₅₀ value in the tested cell lines. The cells were maintained in culture medium
597 containing RPMI (Sigma) supplemented with 5% normal human serum AB Rh+,
598 previously inactivated, 2 mM L-glutamine and an antibiotic/anti-mycotic solution

599 containing 1000 U mL⁻¹ penicillin, 1000 µg mL⁻¹ streptomycin and 25 µg mL⁻¹
600 fungisone (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) was added to control fungal and bacterial
601 contamination.

602 All experiments were performed in triplicate. We conducted a solvent control
603 (DMSO) at the same concentration of the tested samples (0.5%). Proliferation and
604 viability were evaluated by the MTT assay.

605

606 *4.6.7 Statistical analyses*

607 All experiments were performed in at least three replicates per compound and
608 results shown are the average of three independent experiments. Data are represented as
609 mean ± SEM. Significance was tested by the Student's t-test.

610

611 **Acknowledgements**

612 This work was supported by CNPq and INCT-INOVAR (Proc. CNPq
613 988573.364/2008-6) from Brazil. The authors thank Prof. Eliane Wajnberg for the use
614 of the EPR spectrometer at CBPF, Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, and useful
615 discussions.

616

617 **Supplementary data**

618 CCDC 919666 contains the supplementary crystallographic data for this paper.
619 These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data
620 Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

621

622

623

624 **References**

- 625 [1] J.H. Cheng, C.F. Hung, S.C. Yang, J.P. Wang, S.J. Won, C.N. Lin, Synthesis and
626 cytotoxic, anti-inflammatory, and anti-oxidant activities of 2',5'-dialkoxylchalcones as
627 cancer chemopreventive agents, *Bioorg. & Med. Chem.* 16 (2008) 7270–7276.
- 628 [2] S.F. Nielsen, T. Boesen, M. Larsen, K. Schonning, H. Kromann, Antibacterial
629 chalcones–bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group, *Bioorg. & Med. Chem.* 12
630 (2004) 3047–3054.
- 631 [3] C. Zhan, J. Yang, Protective effects of isoliquiritigenin in transient middle cerebral
632 artery occlusion-induced focal cerebral ischemia in rats, *Pharmacol. Res.* 53 (2006)
633 303–309.
- 634 [4] M. Liu, P. Wilairat, M.L. Go, Antimalarial alkoxyated and hydroxylated chalcones:
635 structure-activity relationship analysis, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 4443–4452.
- 636 [5] M.L. Go, X. Wu, X.L. Liu, Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective
637 properties, *Curr. Med. Chem.* 12 (2005) 481–499.
- 638 [6] Z. Nowakowska, A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones, *Eur. J.*
639 *Med. Chem.* 42 (2007) 125–137.
- 640 [7] H. Beraldo, D. Gambino, The wide pharmacological versatility of semicarbazones,
641 thiosemicarbazones and their metal complexes, *Mini Rev. Med. Chem.* 4 (2004) 31–39.
- 642 [8] H.-J. Zhang, Y. Qian, D.-D. Zhu, X.-G. Yang, H.-L. Zhu, Synthesis, molecular
643 modeling and biological evaluation of chalcone thiosemicarbazide derivatives as novel
644 anticancer agents, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 4702–4708.
- 645 [9] I.C. Mendes, J.P. Moreira, J.D. Ardisson, R.G. dos Santos, P.R.O. da Silva, I.
646 Garcia, A. Castiñeiras, H. Beraldo, Organotin(IV) complexes of 2-pyridineformamide-
647 derived thiosemicarbazones: antimicrobial and cytotoxic effects, *Eur. J. Med. Chem.* 43
648 (2008) 1454–1461.

- 649 [10] K.O.S. Ferraz, G.M.M. Cardoso, C. M. Bertollo, E.M. Souza-Fagundes, N.L.
650 Speziali, C.L. Zani, I.C. Mendes, M.A. Gomes, H. Beraldo, *N*(4)-tolyl-2-
651 benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones and their palladium(II) and platinum(II)
652 complexes: cytotoxicity against human solid tumor cells, *Polyhedron* 30 (2011) 315–
653 321.
- 654 [11] I.C. Mendes, M.A. Soares, R.G. dos Santos, C.B. Pinheiro, H. Beraldo,
655 Gallium(III) complexes of 2-pyridineformamide thiosemicarbazones: cytotoxic activity
656 against malignant glioblastoma, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 1870–1877.
- 657 [12] D. C. Reis, M.C.X. Pinto, E.M. Souza-Fagundes, S.M.S.V. Wardell, J.L. Wardell,
658 H. Beraldo, Antimony(III) complexes with 2-benzoylpyridine-derived
659 thiosemicarbazones: cytotoxicity against human leukemia cell lines, *Eur. J. Med. Chem.*
660 45 (2010) 3904–3910.
- 661 [13] I.C. Mendes, J. P. Moreira, A.S. Mangrich, S.P. Balena, B.L. Rodrigues, H.
662 Beraldo, Coordination to copper(II) strongly enhances the in vitro antimicrobial activity
663 of pyridine-derived *N*(4)-tolyl thiosemicarbazones, *Polyhedron* 26 (2007) 3263–3270.
- 664 [14] M.C. Miller, C.N. Stineman, J.R. Vance, D.X. West, I.H. Hall, The cytotoxicity of
665 copper(II) complexes of 2-acetyl-pyridyl-4*N*-substituted thiosemicarbazones,
666 *Anticancer Res.* 18 (1998) 4131–4139.
- 667 [15] D.S. Raja, N.S.P. Bhuvanesh, K. Natarajan, Biological evaluation of a novel water
668 soluble sulphur bridged binuclear copper(II) thiosemicarbazone complex, *Eur. J. Med.*
669 *Chem.* 46 (2011) 4584–4594.
- 670 [16] V.M. Leovac, G.A. Bogdanović, L.S. Jovanović, L. Joksović, V. Marković, M.D.
671 Joksović, S.M. Denčić, A. Isaković, I. Marković, F.W. Heinemann, S. Trifunović, I.
672 Đalović, Synthesis, characterization and antitumor activity of polymeric copper(II)
673 complexes with thiosemicarbazones of 3-methyl-5-oxo-1-phenyl-3-pyrazolin-4-

- 674 carboxaldehyde and 5-oxo-3-phenyl-3-pyrazolin-4-carboxaldehyde, *J. Inorg. Biochem.*
675 105 (2011) 1413–1421.
- 676 [17] Y.-H. Li, B.-D. Waang, Z.-Y. Yang, Infrared and DNA-binding on ultraviolet and
677 fluorescence spectra of new copper and zinc complexes with a naringenin Schiff-base
678 ligand, *Spectrochim. Acta A* 67 (2007) 395–401.
- 679 [18] X. Hua, S. Cuia, J. Q. Liu, Fluorescence studies of interaction between flavonol p-
680 coumaroylglucoside tiliroside and bovine serum albumin, *Spectrochim. Acta Part A* 77
681 (2010) 548–553.
- 682 [19] J.G. Da Silva, C.C.H. Perdigão, N.L. Speziali, H. Beraldo, Chalcone-derived
683 thiosemicarbazones and their zinc(II) and gallium(III) complexes: spectral studies and
684 antimicrobial activity, *J. Coord. Chem.* 66 (2013) 385–401.
- 685 [20] L.J. Farrugia. *ORTEP-3 for Windows* - a version of *ORTEP-III* with a Graphical
686 User Interface (GUI), *J. Appl. Cryst.* 30 (1997) 565–566.
- 687 [21] I.C. Mendes, J.P. Moreira, N.L. Speziali, A.S. Mangrich, J.A. Takahashia, H.
688 Beraldo, *N*(4)-tolyl-2-benzoylpyridine thiosemicarbazones and their copper(II)
689 complexes with significant antifungal activity. Crystal Structure of *N*(4)-para-tolyl-2-
690 benzoylpyridine thiosemicarbazone, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 1571–1577.
- 691 [22] J.A. Lessa, J.C. Guerra, L.F. de Miranda, C.F.D. Romeiro, J.G. Da Silva, I.C.
692 Mendes, N.L. Speziali, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, Gold(I) complexes with
693 thiosemicarbazones: cytotoxicity against human tumor cell lines and inhibition of
694 thioredoxin reductase activity, *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 1729–1739.
- 695 [23] D. Kovala-Demertzia, M.A. Demertzisa, J.R. Millera, C. Papadopouloub, C.
696 Dodorou, G. Filousis, Platinum(II) complexes with 2-acetyl pyridine
697 thiosemicarbazone. Synthesis, crystal structure, spectral properties, antimicrobial and
698 antitumour activity, *J. Inorg. Biochem.* 86 (2001) 555–563.

- 699 [24] N.J. Lees-Gayed, M.A. Abou-Taleb, I.A. El-Bitash, M.F. Iskander, Studies on
700 biologically active acylhydrazones. Part 1. Acid–base equilibria and acid hydrolysis of
701 pyridoxal aroylhydrazones and related compounds, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*
702 (1992) 213–217.
- 703 [25] P.R. Bontchev, B.B. Ivanova, R.P. Bontchev, D.R. Mehandjiev, Complexes of
704 Cu(II) with 1-(4-amino-6,7-dimethoxy-2-quinazoliny)-4-(2-furanylcarbonyl)-
705 piperazine (prazosin): synthesis, properties, crystal structure, *Polyhedron* 20 (2001)
706 231–236.
- 707 [26] B.J. Hathaway, D.E. Billing, The electronic properties and stereochemistry of
708 mono-nuclear complexes of the copper(II) ion, *Coord. Chem. Rev.* 5 (1970) 143–207.
- 709 [27] I.C. Mendes, L.R. Teixeira, R. Lima, H. Beraldo, N.L. Speziali, D.X. West,
710 Structural and spectral studies of thiosemicarbazones derived from 3- and 4-
711 formylpyridine and 3- and 4-acetylpyridine, *J. Mol. Struct.* 559 (2001) 355–360.
- 712 [28] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, second ed., Kluwer
713 Academic Press/Plenum Publishers, New York, 1999, p. 239.
- 714 [29] N. Shahabadi, M. Mohammadpour, Study on the interaction of sodium morin-5-
715 sulfonate with bovine serum albumin by spectroscopic techniques, *Spectrochim. Acta*
716 *Part A* 86 (2012) 191–195.
- 717 [30] P. Krishnamoorthy, P. Sathyadevi, Alan H. Cowley, R.R. Butorac, N. Dharmaraj,
718 Evaluation of DNA binding, DNA cleavage, protein binding and in vitro cytotoxic
719 activities of bivalent transition metal hydrazone complexes, *Eur. J. Med. Chem.* 46
720 (2011) 3376–3387.
- 721 [31] N.C. Garbett, N.B. Hammond, D.E. Graves, Influence of the amino substituents in
722 the interaction of ethidium bromide with DNA, *Biophys. J.* 87 (2004) 3974–3981.

- 723 [32] F. Dimiza, F. Perdih, V. Tangoulis, I. Turel, D.P. Kessissoglou, G. Psomas,
724 Interaction of copper(II) with the non-steroidal anti-inflammatory drugs naproxen and
725 diclofenac: synthesis, structure, DNA- and albumin-binding, *J. Inorg. Biochem.* 105
726 (2011) 476–489.
- 727 [33] P. Kumar, B. Baidya, S.K. Chaturvedi, R.H. Khan, D. Manna, B. Mondal, DNA
728 binding and nuclease activity of copper(II) complexes of tridentate ligands, *Inorg.*
729 *Chim. Acta* 376 (2011) 264–270.
- 730 [34] C. Riccardi, I. Nicoletti, Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and
731 flow cytometry, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 1458–1461.
- 732 [35] M. Carfi[†], A. Gennari, I. Malerba, E. Corsini, M. Pallardy, R. Pieters, H. Van
733 Loveren, H.W. Vohr, T. Hartung, L. Gribaldo, *In vitro* tests to evaluate immunotoxicity:
734 a preliminary study, *Toxicology* 229 (2007) 11–22.
- 735 [36] Oxford Diffraction, CrysAlisPro CCD and CrysAlisPro RED: Version 1.171.35.21
736 (release 20-01-2012 CrysAlis171 .NET), Oxford Diffraction Ltd, Yarnton, Oxfordshire,
737 England (2010).
- 738 [37] G.M. Sheldrick. A short history of *SHELX*, *Acta Cryst., A* 64 (2008) 112–122.
- 739 [38] C.F. Macrae, I.J. Bruno, J.A. Chisholm, P.R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock,
740 L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, J. van de Streek, P.A. Wood, *Mercury CSD 2.0* - new
741 features for the visualization and investigation of crystal structures, *J. Appl. Cryst.* 41
742 (2008) 466–470.
- 743 [39] M.E. Reichmann, S.A. Rice, C.A. Thomas, P. Doty, A further examination of the
744 molecular weight and size of desoxypentose nucleic acid, *J. Am. Chem. Soc.* 76
745 (1954) 3047–3053.

746 [40] T.J. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:
747 application to proliferation and cytotoxicity assays, *Immunol. Methods* 65 (1983) 55–
748 63.

749 [41] E. Ulukaya, M. Colakogullari, E.J. Wood, Interference by anti-cancer
750 chemotherapeutic agents in the MTT-tumor chemosensitivity assay, *Chemotherapy* 50
751 (2004) 43–50.

752 [42] I. Nicoletti, G. Migliorati, M.C. Pagliacci, F. Grignani, C. Riccardi, A rapid and
753 simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and
754 flow cytometry, *J. Immunol. Methods* 139 (1991) 271–279.

755 [43] G. Gazzinelli, N. Katz, R.S. Rocha, D.G. Colley, Immune responses during human
756 schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of an antigen-induced
757 mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated, but not active
758 cases of schistosomiasis, *J. Immunol.* 130 (1983) 2891–2895.

759

760 **Caption to Figures**

761

762 Scheme 1. Schematic representation for the formation of the thiosemicarbazones (A),
763 and their copper(II) complexes **1-4** (B) and **1a** (C).

764

765 Figure 1. ORTEP diagram of [Cu(PyCTPh)Cl]·DMF (**1a**) showing the labeling scheme
766 of the non-H atoms and their displacement ellipsoids at the 50% probability level. The
767 H atoms are shown as small spheres of arbitrary radii.

768

769 Figure 2. Crystal packing of [Cu(PyCTPh)Cl]·DMF (**1a**) along the crystallographic a-
770 axis showing the hydrogen bonds between the copper(II) complex and DMF molecules.

771

772 Figure 3. EPR spectra of the copper(II) complexes (**1–4**) in the solid state at room
773 temperature and in frozen DMSO solution (2mM) at 77 K.

774

775 Figure 4. (A) Fluorescence emission spectra excited at 280 nm for BSA-**1** system
776 (phosphate buffer, pH 7.20, T = 25 °C); (a) 1.0 μM of BSA; (b-k) 1.0 μM of BSA in
777 the presence of 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, and 10.0 μM of **1**, respectively;
778 (B) Plot of F_0/F vs $[Q]$, ($\lambda_{em.} = 345$ nm); (C) Plot of $\log [(F_0-F)/F]$ vs $\log [Q]$ ($\lambda_{em.} = 345$
779 nm).

780

781 Figure 5. Synchronous spectra of BSA (1.0 μM, phosphate buffer, pH 7.20) in the
782 absence (a) and in the presence of 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, and 10.0 μM
783 (b–k) of **1** at $\Delta\lambda = 15$ nm (A) and $\Delta\lambda = 60$ nm (B). Arrows indicate that the emission
784 intensity decreases with increasing concentrations of **1**.

785

786 Figure 6. Electronic absorption spectra of **1** (54.5 μM), **2** (46.1 μM) and **3** (42.0 μM),
787 Tris-HCl buffer, pH 7.20, in the absence and in the presence of increasing amounts of
788 CT-DNA (ten different complex:DNA molar ratios ranging from 1:1 to 1:10). Arrows
789 show the changes in absorbance with increasing DNA concentration.

790

791 Figure 7. Emission spectra of EB-CT-DNA (10 μM Tris-HCl buffer, pH 7.20), in the
792 presence of 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 μM of **2**. Arrow indicates the
793 changes in the emission intensity with increasing complex concentration. Plot of F_0/F vs
794 $[\text{complex}]$ ($\lambda_{em.} = 605$ nm). Plot of $\log [(F_0-F)/F]$ vs $\log [\text{complex}]$ ($\lambda_{em.} = 605$ nm).

795

796 Figure 8. Agarose gel electrophoresis of pUC 19 plasmid DNA treated with selected
797 compounds at 100 μM in Tris–HCl buffer (pH 7.20) incubated at 37 °C for 24 h.

798

799 Figure 9. Cytotoxic effect of thiosemicarbazones and their complexes (**1–4**) on HL60,
800 Jurkat, MDA-MB 231, and HCT-116 cell lines. Cells were treated with compounds (10
801 μM) for 48 h and the cell proliferation/cell survival was measured by the MTT assay as

802 described in Methods. Data are expressed as mean \pm SEM of percentage of cell
803 proliferation compared to control (cells treated with DMSO 0.5%). Representative data
804 of at least three independent experiments performed in triplicate.

805

806 Figure 10. DNA fragmentation induced by thiosemicarbazones and their complexes (**1**–
807 **4**) on HL60, Jurkat, MDA-MB 231, and HCT-116 cell lines. Cells were incubated with
808 10 μ M of each compound, at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere for 24 h. DNA content was
809 assessed by flow-cytometric analysis of cells labeled with propidium iodide. Each data
810 represents mean \pm SEM from two different experiments (*P < 0.05, Student's t-test).

Table 1. Crystal data and structure refinement results for [Cu(PyCTPh)Cl]·DMF (**1a**).

Compound	[Cu(PyCTPh)Cl]·DMF (1a)	
Empirical formula	C ₁₈ H ₂₀ ClCuN ₅ OS	
Molecular weight (g mol ⁻¹)	453.44	
Crystal system, space group	Orthorhombic, Pbc _a	
Unit cell dimensions	a (Å)	8.5015(2)
	b (Å)	17.5962(4)
	c (Å)	26.5354(6)
	$\alpha = \beta = \gamma$ (°)	90
V (Å ³) / Z	3969.54(16) / 8	
D _{calc} (g cm ⁻³)	1.517	
F(000)	1864	
Crystal size (mm ³)	0.50 x 0.13 x 0.11	
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	1.358	
θ range for data collection (°)	4.29 to 26.37	
Index ranges	-10 ≤ h ≤ 10	
	-21 ≤ k ≤ 21	
	-33 ≤ l ≤ 29	
Reflections collected	28897	
Independent reflections / R(int)	4039 / 0.0325	
Completeness to $\theta = 26.37^\circ$ (%)	99.5	
Max. and min. transmission	1.00000 and 0.78167	
Data / restraints / parameters	4039 / 0 / 246	
Final R indices [I > 2 σ (I)]	R ₁ = 0.0802, wR ₂ = 0.1983	
R indices (all data)	R ₁ = 0.0861, wR ₂ = 0.2026	
Goodness-of-fit on F ²	1.116	
Largest diff. peak and hole (e Å ⁻³)	2.649 / -1.080	

Table 2. Selected bond lengths (Å) and angles (°) for [Cu(PyCTPh)Cl]·DMF (**1a**).

bond lengths			
C8–S1	1.746(6)	C10–C9	1.305(9)
N3–C8	1.312(8)	C11–C10	1.469(9)
N3–N2	1.366(7)	Cu1–Cl1	2.2839(19)
N2–C7	1.303(8)	Cu1–N1	2.003(5)
N1–C2	1.358(9)	Cu1–N2	1.974(5)
C7–C2	1.476(10)	Cu1–S1	2.2299(16)
C7–C9	1.515(9)		
angles			
N1–C2–C7	115.6(5)	C7–N2–Cu1	117.5(4)
C2–C7–N2	113.1(5)	N3–N2–Cu1	123.0(4)
C7–N2–N3	119.4(5)	C8–S1–Cu1	96.0(2)
N2–N3–C8	112.3(5)	N1–Cu1–Cl1	99.57(16)
N3–C8–S1	124.5(5)	N1–Cu1–N2	80.8(2)
C9–C7–N2	128.6(5)	N1–Cu1–S1	164.71(16)
C10–C9–C7	124.3(6)	N2–Cu1–Cl1	179.51(15)
C9–C10–C11	122.5(7)	N2–Cu1–S1	84.20(15)
C6–N1–Cu1	127.6(5)	Cl1–Cu1–S1	95.46(7)
C2–N1–Cu1	112.9(4)		

Table 3. The Stern–Volmer quenching constant (K_{sv}), apparent binding constant (K_{app}), binding constant (K) and number of binding sites (n) for the competitive binding between EB bound to CT-DNA and copper(II) complexes (**1–3**).

Complex	$K_{sv} (M^{-1})$	$K_{app} (M^{-1})$	$K (M^{-1})$	n
1	$(1.56 \pm 0.05) \times 10^4$	1.36×10^6	$(9.49 \pm 0.05) \times 10^4$	(1.21 ± 0.04)
2	$(3.33 \pm 0.18) \times 10^4$	2.35×10^6	$(1.03 \pm 0.43) \times 10^6$	(1.39 ± 0.06)
3	$(2.94 \pm 0.13) \times 10^4$	2.31×10^6	$(1.74 \pm 0.44) \times 10^6$	(1.44 ± 0.03)

Table 4. Cytotoxic activity (IC_{50}) of the thiosemicarbazones and copper(II) complexes (**1–4**) on HL60, Jurkat, MDA-MB 231 and HCT-116 cell lines.

compound	IC_{50} (μ M) 95% Confidence interval in parenthesis			
	HL60	Jurkat	MDA-MB 231	HCT-116
HPyCTPh	0.0190 (0.0610-0.0064)	ND*	2.97 (10.61-0.84)	ND
1	0.160 (0.644-0.0392)	0.620 (1.871-0.203)	0.180 (1.148-0.029)	0.0610(1.5600-0.0024)
HPyCT4ClPh	0.0650 (0.2831-0.0151)	ND	1.48 (3.91-0.55)	ND
2	0.0360 (0.1559-0.0082)	0.290 (2.387-0.039)	0.120 (0.245-0.061)	0.0480 (0.2615-0.0087)
HPyCT4BrPh	0.0380 (0.1559-0.0981)	ND	0.630 (1.688-0.237)	ND
3	0.0200 (0.0646-0.0069)	1.21(3.68-0.41)	0.180 (0.404-0.081)	0.170 (1.335-0.022)
HPyCT4NO₂Ph	0.420 (0.945-0.040)	ND	5.82 (19.17-1.75)	ND
4	5.49 (22.73-1.94)	0.880(1.198-0.652)	2.82 (17.03-0.47)	1.12 (11.17-0.12)
CuCl₂	>100	>100	>100	>100
cisplatin	0.0650 (0.1209-0.0350)	17.4 (34.6-8.9)	75.45 (166.00-34.28)	>100

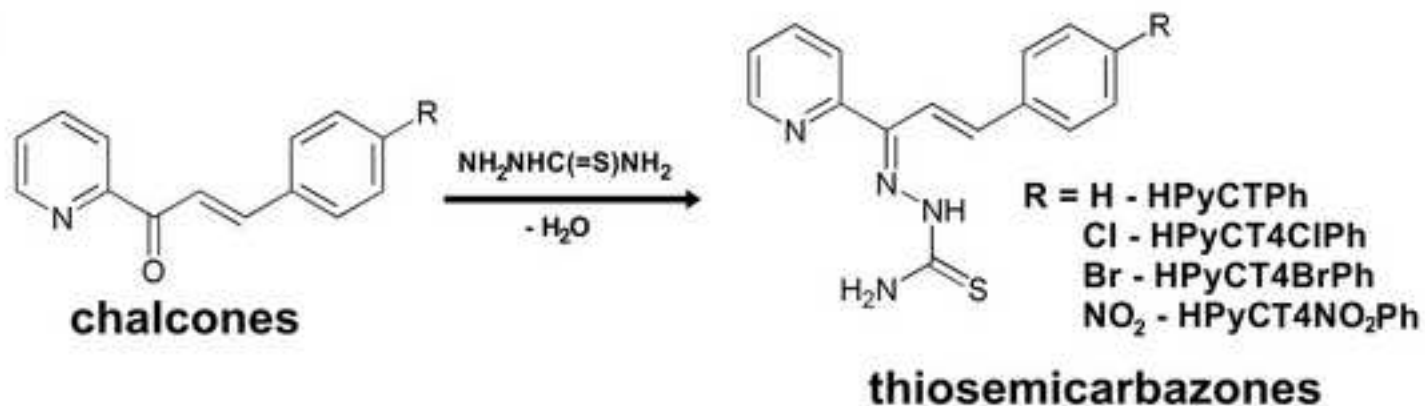
*It was not possible to obtain the sigmoidal profile necessary for determination of IC_{50} value due to poor solubility at concentration higher than 50 μ M in the assay conditions.

Table 5. Inhibition of PBMC proliferation by thiosemicarbazones and their copper(II) complexes (**1–4**) at fixed concentration.

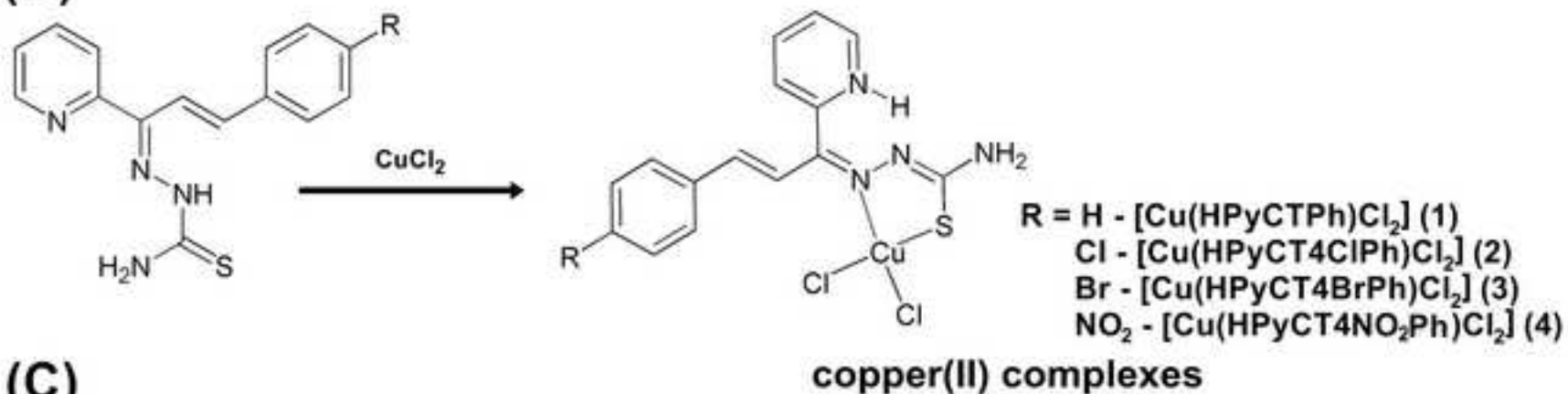
Compound	Concentration (μM)*	% inhibition of cell proliferation vs control
HPyCTPh	0.02	52.8 ± 3.4
1	0.1	53.6 ± 4.4
HPyCT4ClPh	0.06	46.8 ± 7.9
2	0.03	47.7 ± 3.6
HPyCT4BrPh	0.03	21.7 ± 7.4
3	0.02	43.3 ± 6.3
HPyCT4NO₂Ph	0.4	16.9 ± 6.1
4	0.8	52.6 ± 6.3
Cisplatin	0.06	37.0 ± 1.2

* Concentration corresponding to the lowest IC₅₀ value in the tested cell lines (see Table 4).

(A)



(B)



(C)

During crystallization:

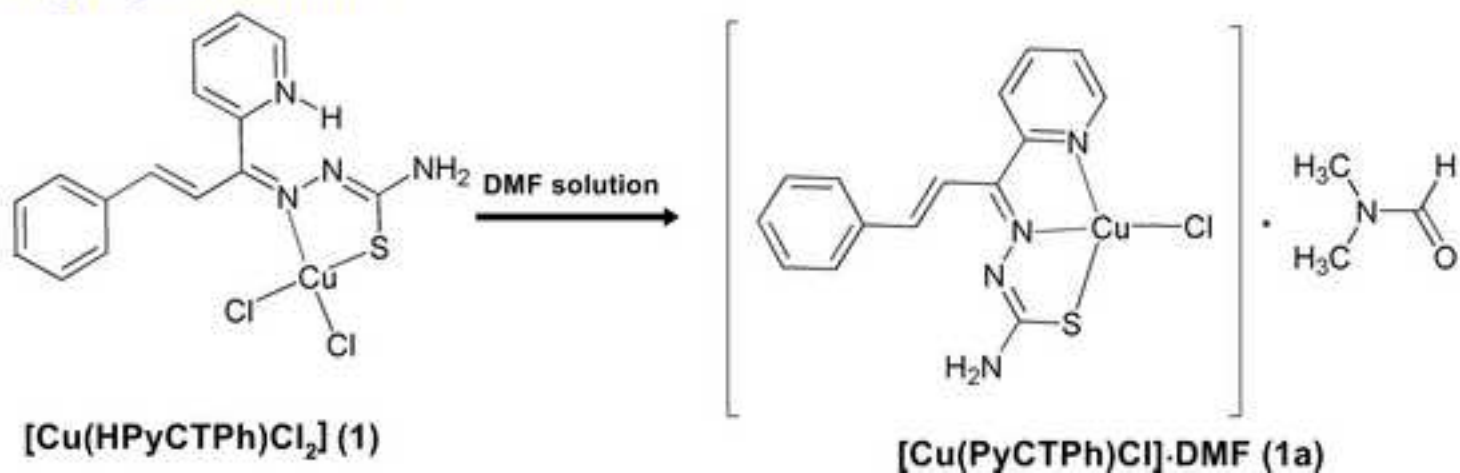


Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

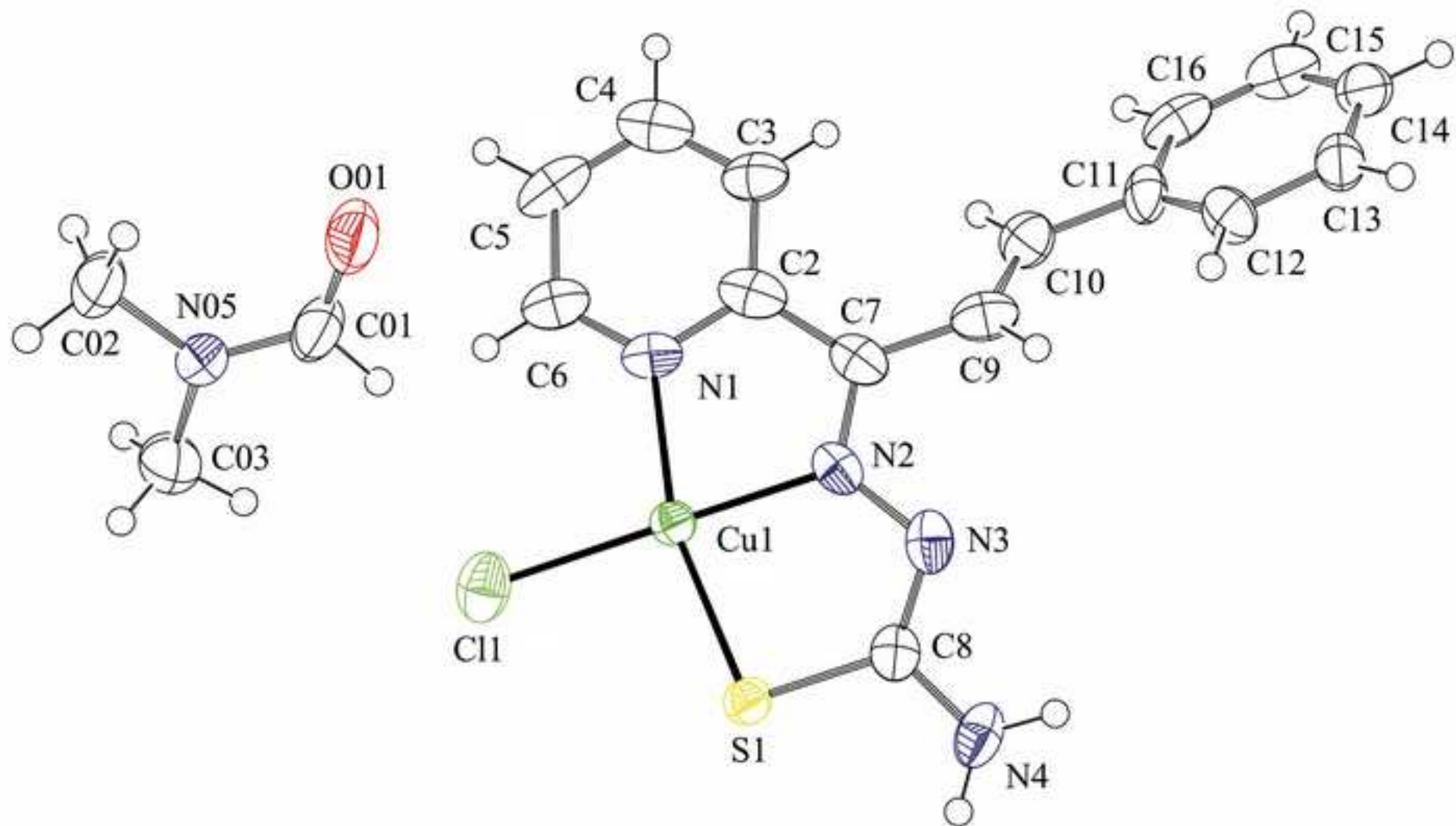


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

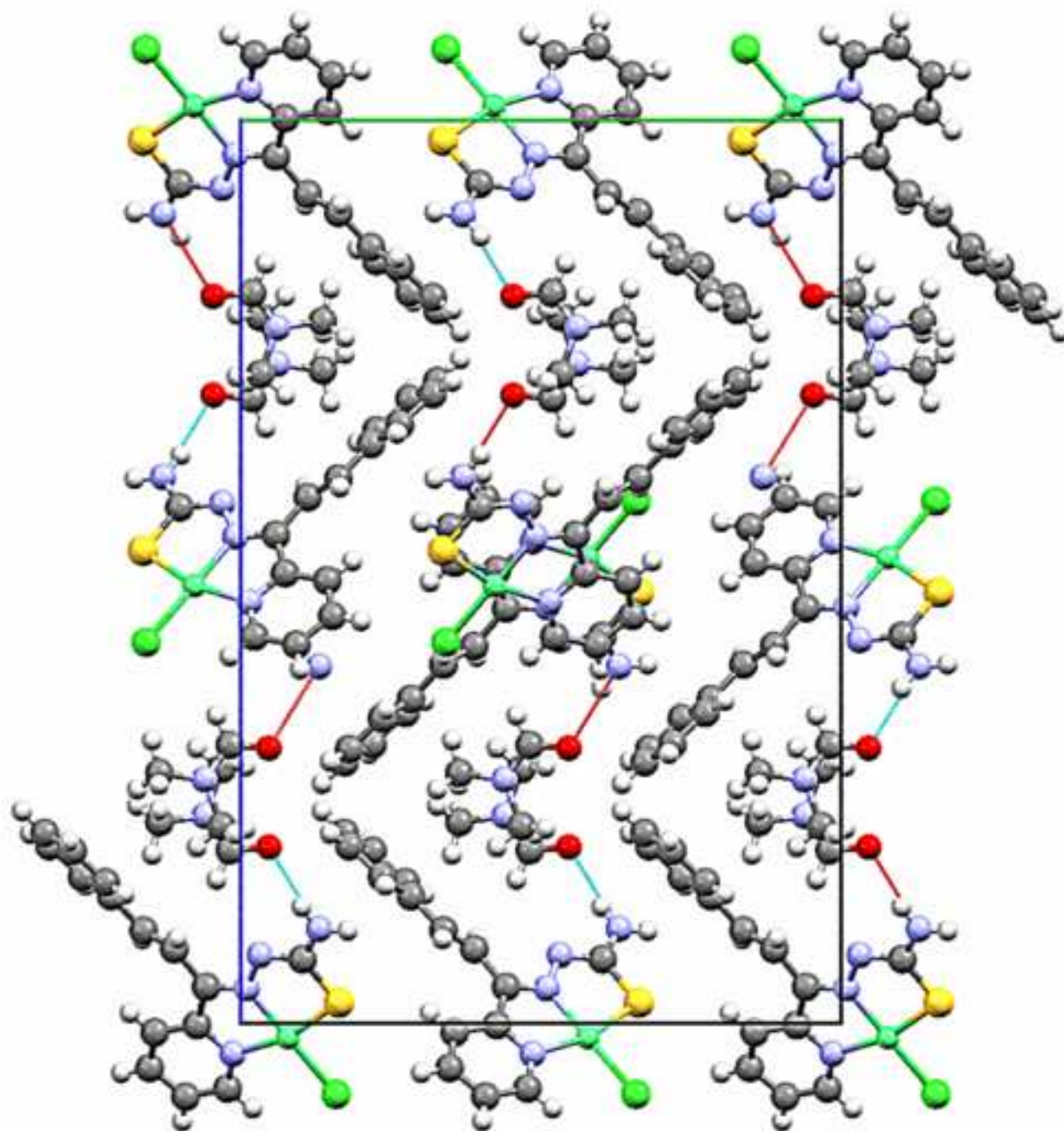


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

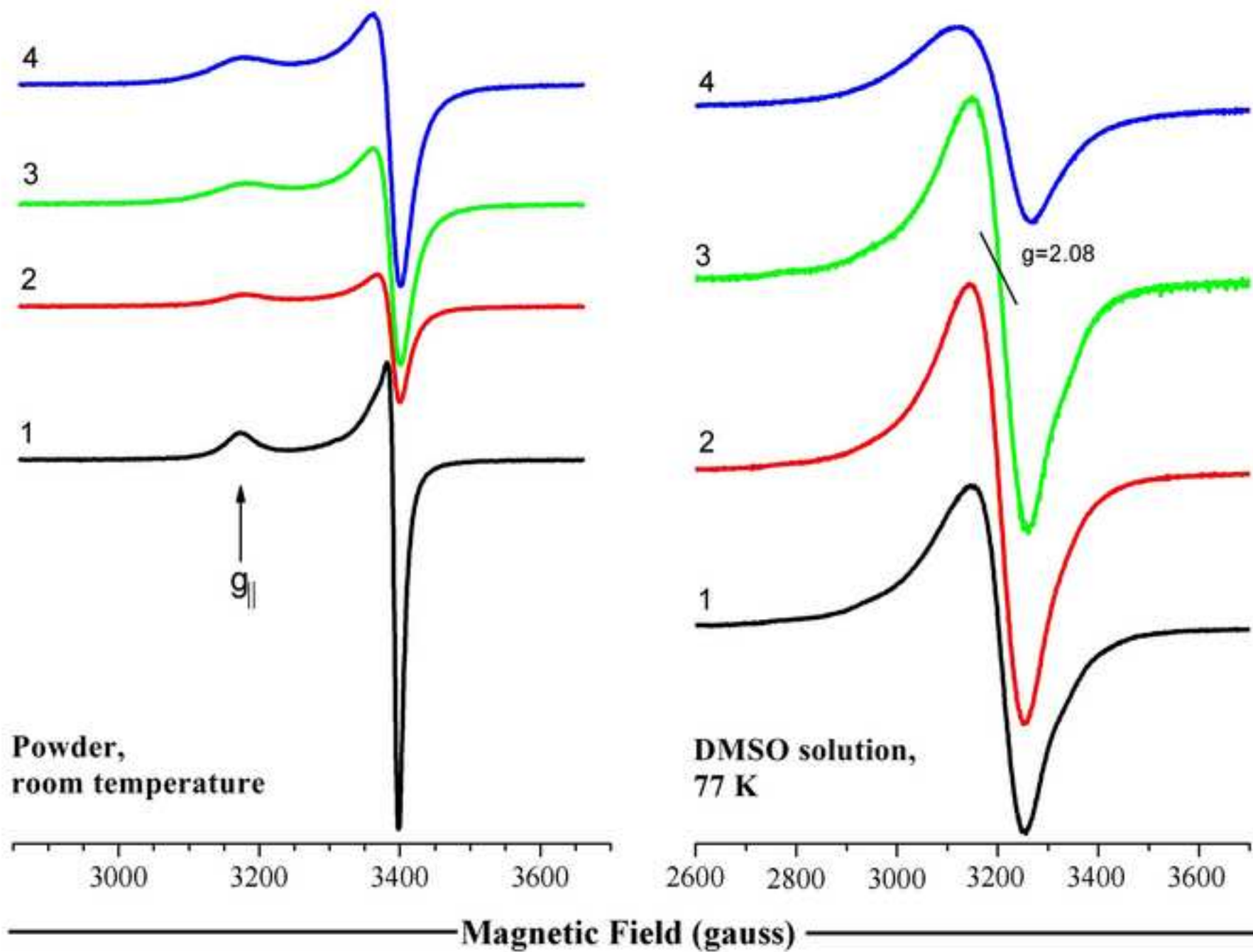


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

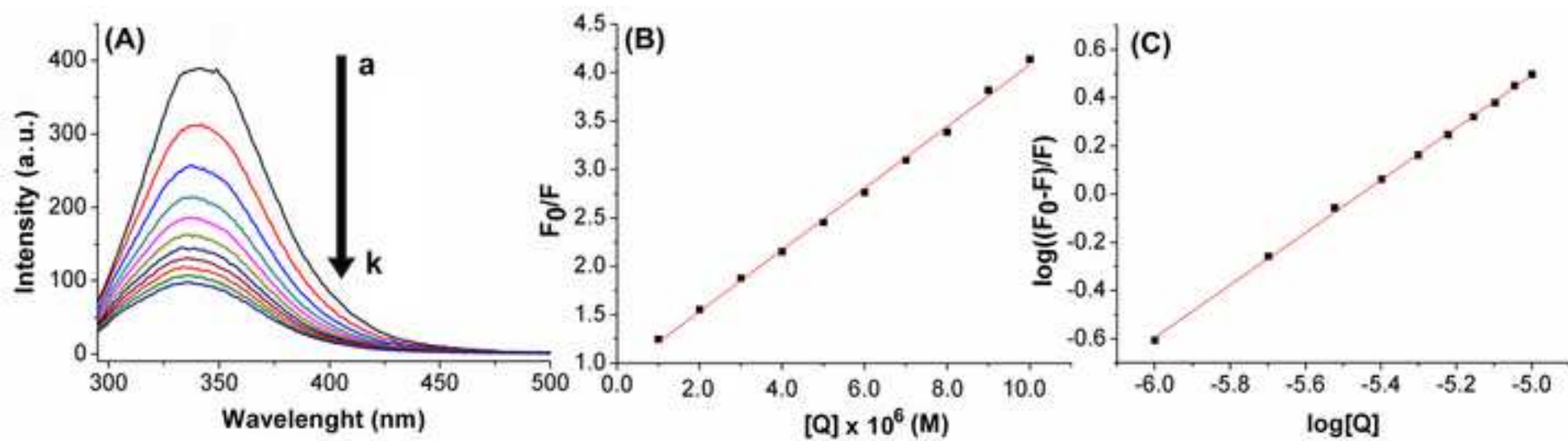


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

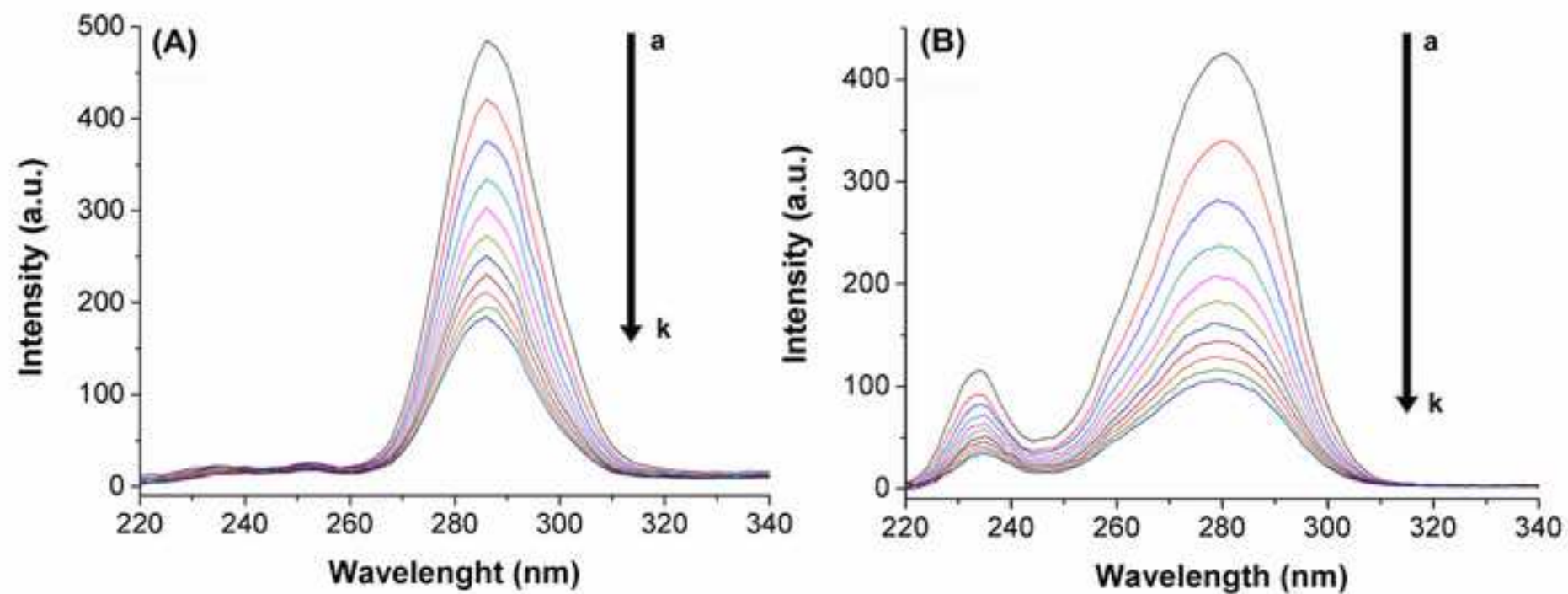


Figure 6
[Click here to download high resolution image](#)

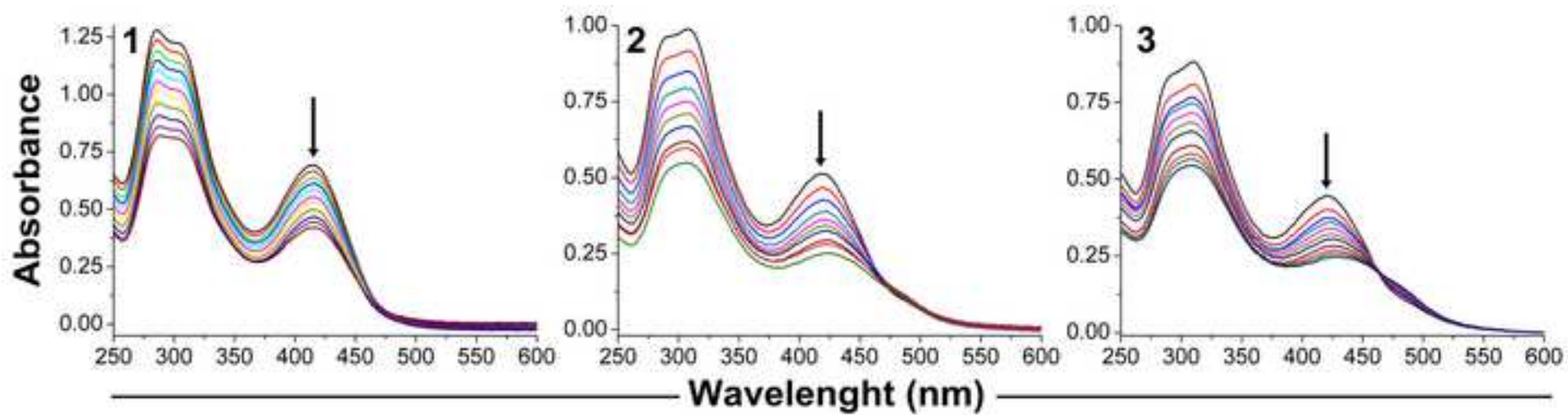


Figure 7
[Click here to download high resolution image](#)

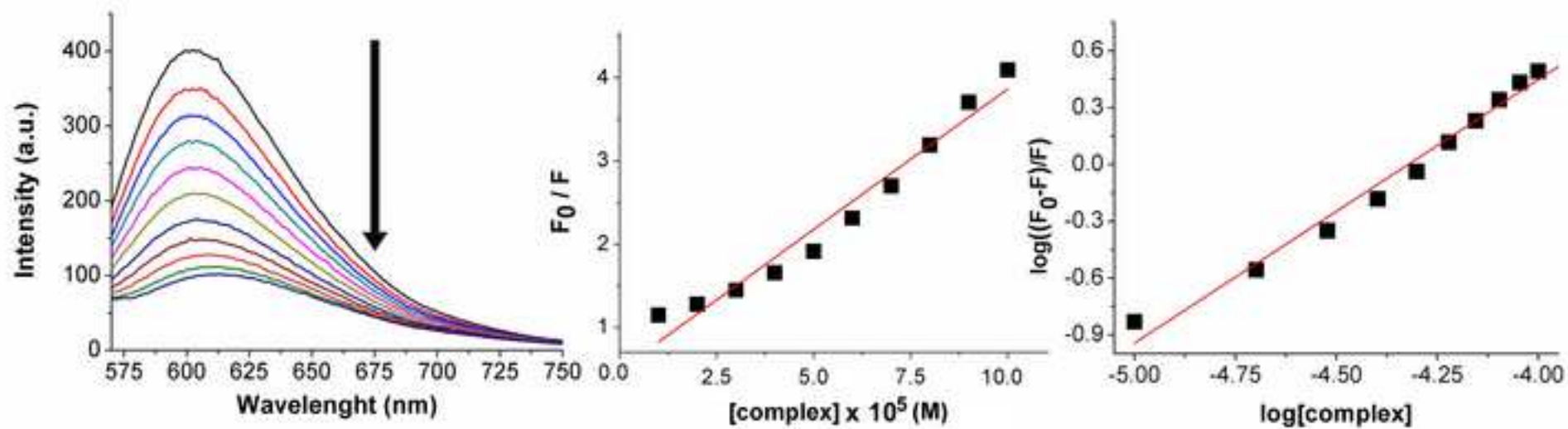


Figure 8
[Click here to download high resolution image](#)

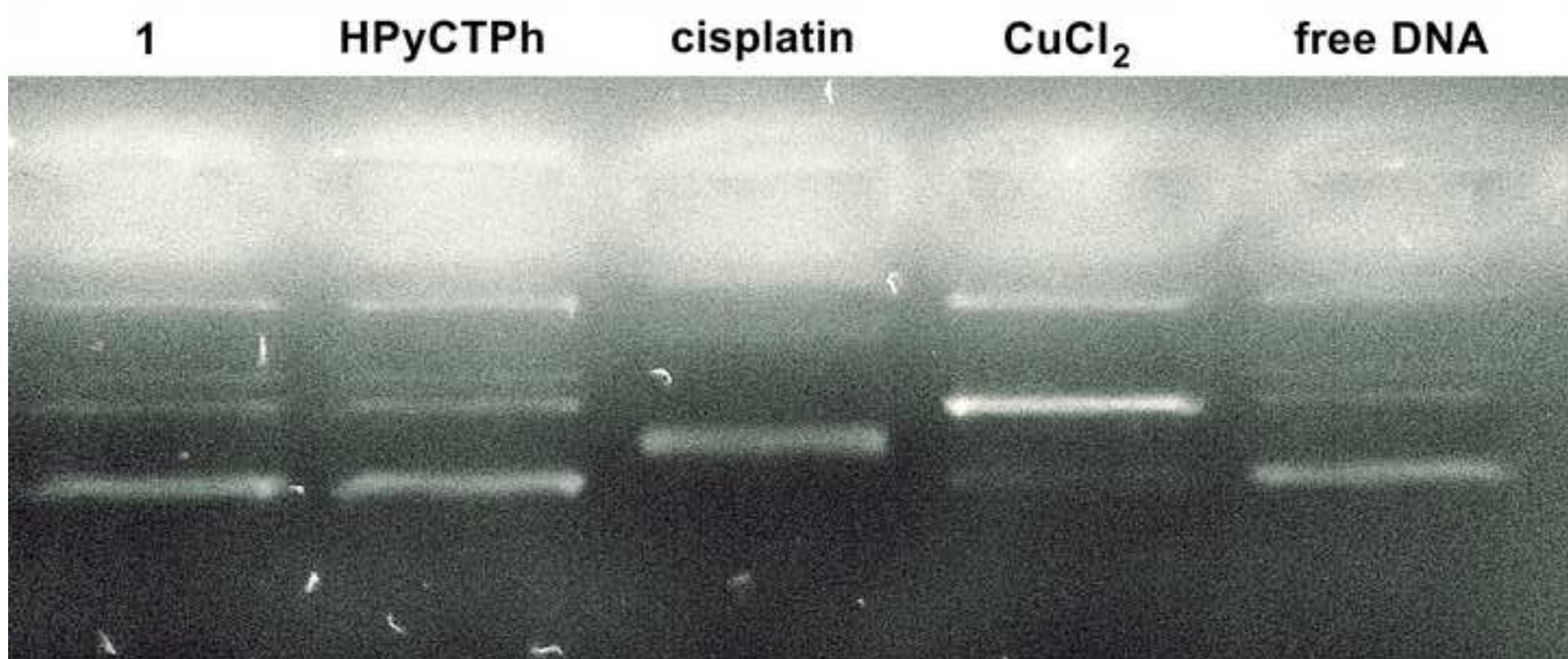


Figure 9

[Click here to download high resolution image](#)

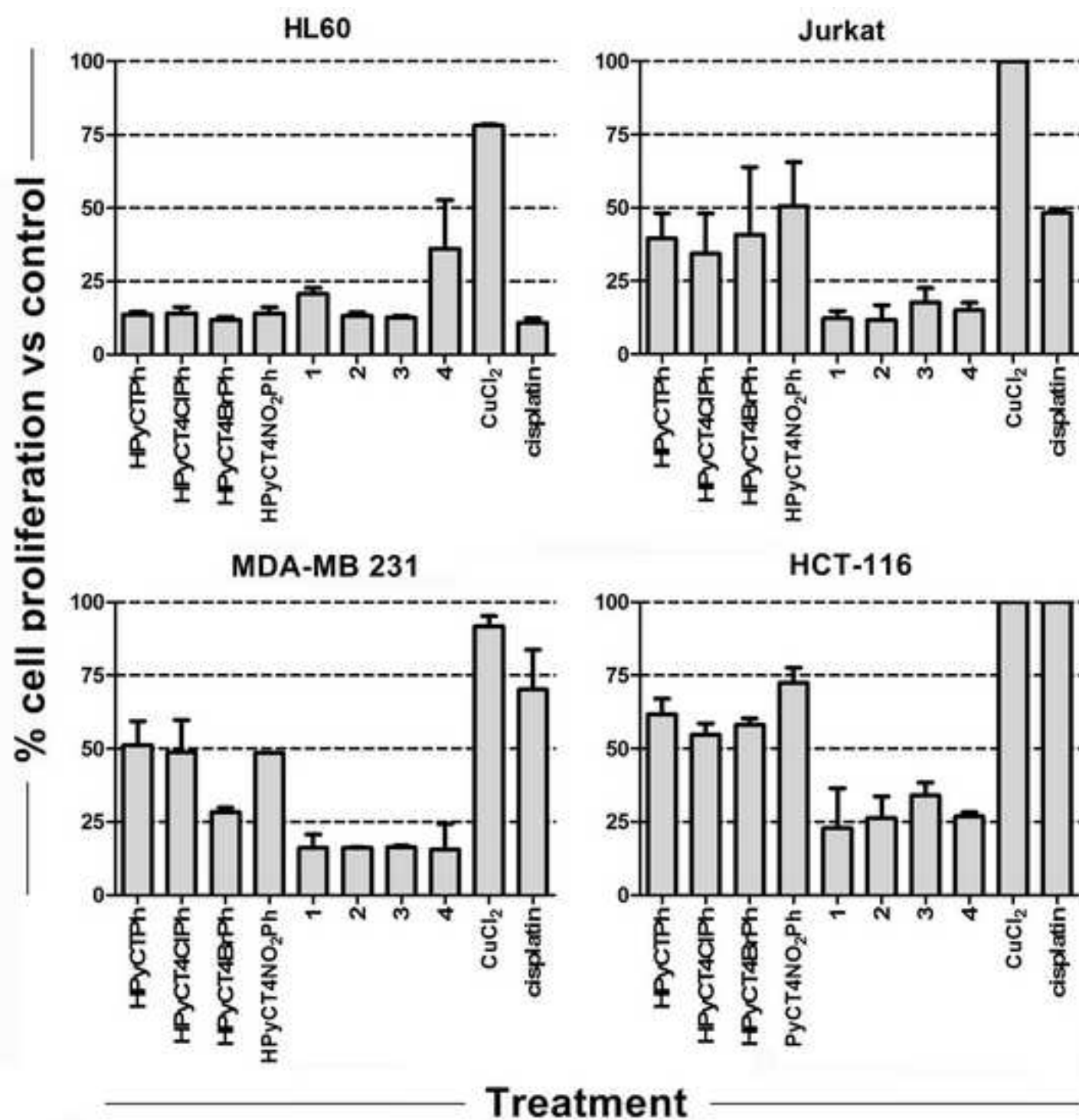
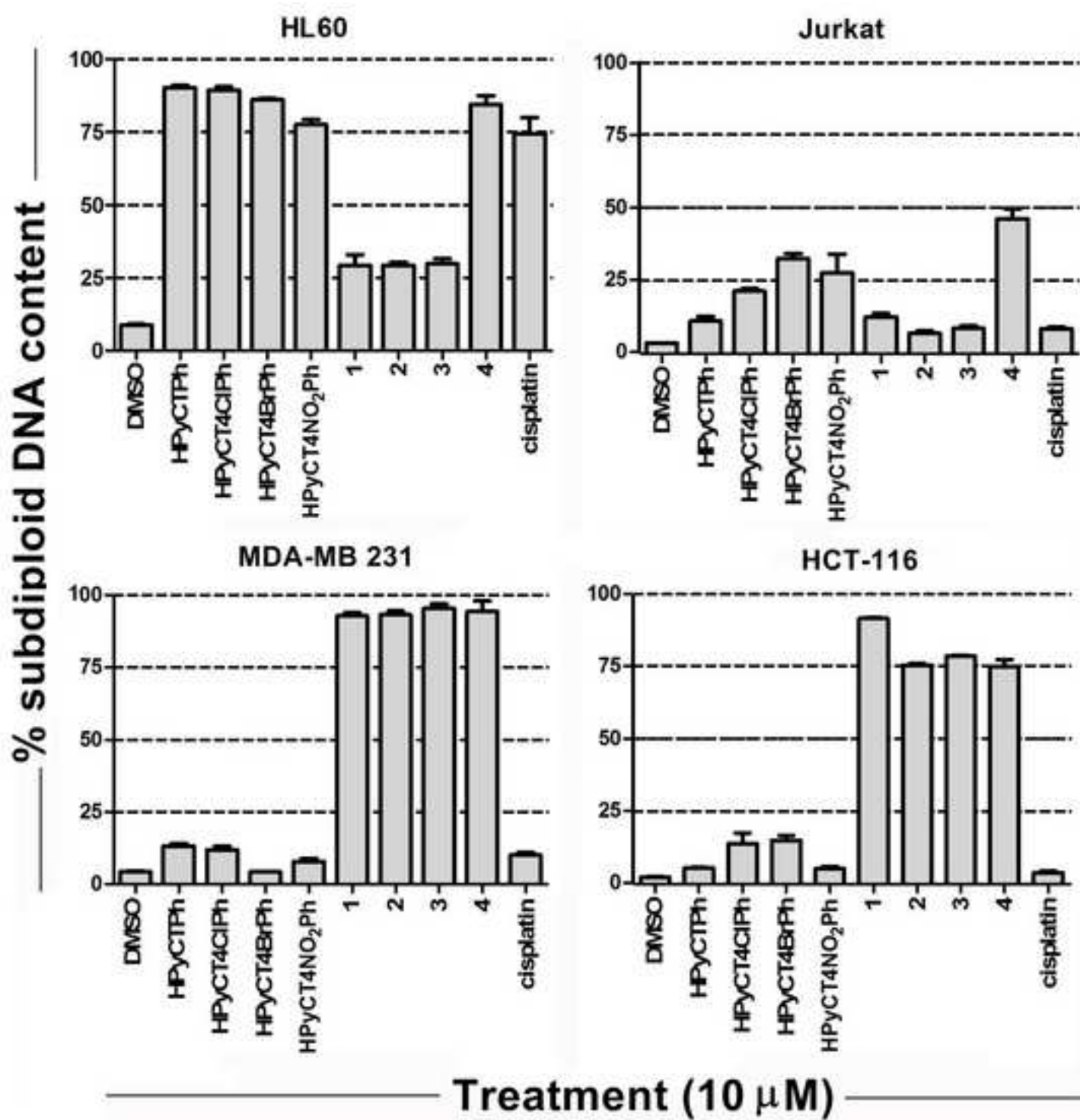


Figure 10

[Click here to download high resolution image](#)



Supplementary Material - For Review Purposes Only

[Click here to download Supplementary Material - For Review Purposes Only: CCDC 919666.cif](#)

Supplementary Material - For Review Purposes Only

[Click here to download Supplementary Material - For Review Purposes Only: CHECKCIF CCDC 919666.pdf](#)