

**Estudos de Citotoxicidade e Ação Antimicrobiana
de Tiossemicarbazonas derivadas de Piridina:
Efeitos da Coordenação a Metais**

Karina Silva de Oliveira Ferraz

UFMG-ICEX/DQ. 696^a
D. 429^a

Karina Silva de Oliveira Ferraz

**Estudos de Citotoxicidade e Ação Antimicrobiana
de Tiossemicarbazonas derivadas de Piridina:
Efeitos da Coordenação a Metais**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências-Química, na área de concentração de Química-Inorgânica.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE-MG-BRASIL
2008

O trabalho descrito nesta
dissertação foi realizado sob a orientação da
Prof.a. Dra. Heloisa de Oliveira Beraldo.

Dedico este trabalho ao meu esposo Jarbas.

AGRADECIMENTOS

- Ao Senhor da minha vida, Jesus Cristo, pois todas as coisas acontecem por meio dele.
- Ao meu amado esposo Jarbas pelo amor, apoio e paciência sem medida.
- Aos meus amados pais, Jair e Maura, pelo investimento e amor, aos meus irmãos Aline e Léo pelo carinho e apoio, e aos cunhados Fagner e Milla. Aos meus cunhados Margarete e Fabinho pelo incentivo.
- À minha querida tia Dinha pelo cuidado de mãe e aos primos Renato e Ronaldo. À amada tia Matilde e família pelo carinho, e a todos os familiares.
- À Prof^ª. Dra Heloisa Beraldo pela orientação, dedicação, apoio e paciência durante esse tempo de trabalho.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.
- Aos pesquisadores Dr. Nivaldo Speziali (UFMG), Dra. Solange M.S.V. Wardell (Fiocruz), Dr. James L. Wardell (UFMG), Dra. Elaine M. S. Fagundes (Fiocruz-CPqRR), Dra. Clésia Cristina Nascentes, Dra. Sonia R.W. Louro (PUC-RJ), Ana Paula Maia Urzedo, Dra. Hállen Daniel Rezende Calado (UFMG) pela colaboração durante este trabalho.
- Aos colegas do laboratório 290, Ana Cerúlia, Anayive, Angel, Débora, Fernanda, Gabrieli, Isolda, Jeferson, Joice, Josane, Juliana, Lucas, Lúcia, Nayane e Rafael pela amizade, ajuda e carinho demonstrados no dia-a-dia.
- Aos colegas do laboratório 131, Dinho (Wdeson), Gilmar, Rangel, Raquel e Tati pelos momentos de descontração, e principalmente à minha amiga Bia pela amizade e carinho durante esse tempo.
- Aos novos amigos que ganhei em BH (célula e Carisma) e aos antigos de Vitória pelo carinho e incentivo.
- Aos professores do Departamento de Química da UFMG que fizeram parte da
- minha formação profissional.
- À Kátia, Paulete, Lílian e Raquel secretárias da Pós-graduação, pelo carinho e apoio, atenção e boa vontade na resolução de diversos problemas.
- Aos funcionários do Departamento de Química pela ajuda durante todo este trabalho.

RESUMO

Neste trabalho foi feito um estudo do efeito da coordenação a metais sobre o perfil farmacológico de duas famílias de tiossemicarbazonas: 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e de 2-benzoilpiridina.

Foram obtidos os complexos [Cu(H2Am4DH)Cl₂] (**1**), [Cu(H2Am4Me)Cl₂] (**2**), [Cu(H2Am4Et)Cl]Cl (**3**) e [Cu(2Am4Ph)Cl] (**4**) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH) e de seus derivados *N*(4)-metil (H2Am4Me), *N*(4)-etil (H2Am4Et) e *N*(4)-fenil (H2Am4Ph), os quais foram testados, juntamente com as tiossemicarbazonas de origem, contra o crescimento de duas cepas de bactérias gram-negativas. A coordenação a Cu(II) leva a uma diminuição para a metade do valor da concentração inibitória mínima (MIC) contra *Salmonella typhimurium* no caso dos complexos **1** e **2** em relação às tiossemicarbazonas livres. No entanto, a coordenação ao Cu(II) provoca uma diminuição na atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*. Esses resultados mostram que a coordenação a Cu(II) não seria uma boa estratégia para aumentar a atividade antibacteriana dessa classe de tiossemicarbazonas.

A toxidez das 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II) frente a *Artemia salina* foi estudada como uma pré-avaliação de citotoxidez em tumores sólidos. Dentre as tiossemicarbazonas, H2Am4Ph apresentou o menor valor de DL₅₀ = 2,2 µM (DL₅₀, dose letal que causa a morte de 50% do grupo de animais testados), sendo este valor inferior ao apresentado pelo Lapachol (DL₅₀ = 281µM) usado como referência. Pela coordenação a Cu(II), a toxidez aumenta, principalmente para os complexos **2** e **3** (DL₅₀ = 1,2 µM e DL₅₀ = 1,6 µM respectivamente). Esses resultados sugerem que tais complexos poderiam apresentar atividade antitumoral.

Foram obtidos os complexos [Pd(2Ac4oT)Cl] (**1**), [Pd(2Ac4mT)Cl] (**2**), [Pd(2Ac4pT)Cl] (**3**), [Pd(2Bz4oT)Cl] (**4**), [Pd(2Bz4mT)Cl] (**5**), [Pd(2Bz4pT)Cl] (**6**), e os complexos [Pt(2Bz4oT)Cl] (**7**), [Pt(2Bz4mT)Cl] (**8**) e [Pt(2Bz4pT)Cl] (**9**), de tiossemicarbazonas derivadas de *N*(4)-orto, *N*(4)-meta e *N*(4)-para-toluil derivadas de 2-acetilpiridina (H2Ac4oT, H2Ac4mT, H2Ac4pT) e de 2-benzoilpiridina (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT), os quais foram testados, juntamente com as tiossemicarbazonas de origem, quanto à toxidez frente a células de tumores sólidos e leucemias. Foram usadas as linhagens de células de tumores sólidos humanos – hepatoma (HepG2), melanoma

(UACC-62) e carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (A431) e as linhagens leucêmicas HL60 resistente a quimioterápicos e Jurkat.

Numa concentração de 50 μ M, H2Ac4pT e H2Bz4mT mostraram-se os compostos mais ativos nas células de tumores sólidos, inibindo a proliferação celular em torno de 50% na linhagem HepG2 e 70-80% em células A431, sendo mais ativos que a cisplatina. Todas as tiossemicarbazonas apresentaram atividades semelhantes sobre a proliferação de células UACC-62, inibindo a proliferação em torno de 50% a 50 μ M.

No entanto as *N*(4)-toluol 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas, testadas também em células leucêmicas, inibiram apenas 6 a 48% da proliferação celular a 50 μ M, sugerindo uma certa preferência desses compostos por tumores sólidos.

Pela coordenação ao Pd(II) a atividade antiproliferativa das 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas frente às três linhagens de tumores sólidos sofre uma diminuição. Os complexos de Pd(II) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas mostraram-se menos ativos que as tiossemicarbazonas livres frente à linhagem UACC-62, mais ativos do que as tiossemicarbazonas livres frente à linhagem HepG2 no caso dos complexos **4** e **6** e o complexo **6** mostrou-se mais ativo do que a tiossemicarbazona livre frente à linhagem de carcinoma A431. No caso das linhagens UACC-62 e A431 a atividade antiproliferativa segue a ordem **6**>**5**>**4**. A coordenação a Pt(II) leva a um decréscimo de atividade frente às linhagens HepG2 e UACC62 e a um pequeno acréscimo frente à linhagem A431 no caso do complexo **9**.

De modo geral, a coordenação a Pd(II) e Pt(II) levou a um decréscimo na atividade antiproliferativa das tiossemicarbazonas frente às linhagens de tumores sólidos. No entanto, a coordenação das *N*(4)-toluol-2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas a Pd(II) levou a um significativo aumento da atividade citotóxica frente às linhagens de leucemias. Em ambas as linhagens leucêmicas a ordem de atividade dos complexos de Pd(II) é **4**>**5**>**6**. Já que a ordem exatamente inversa foi observada para a ação dos complexos frente à linhagem de tumor sólido A431 e que o complexo **6** é o mais ativo nas linhagens de tumores sólidos e o menos ativo nas linhagens de leucemias, pode-se sugerir que os mecanismos de ação antiproliferativa são diferentes nos dois tipos de tumores.

Os compostos aqui estudados, por apresentarem preferência seja por linhagens de células de tumores sólidos, seja por leucemias, poderiam constituir alternativas interessantes para o desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de fármacos.

ABSTRACT

The present work reports an investigation on the effect of metal coordination on the pharmacological profile of two thiosemicarbazone families: 2-pyridinoformamide thiosemicarbazones and *N*(4)-tolyl thiosemicarbazones derived from 2-acetylpyridine and 2-benzoylpyridine.

Complexes [Cu(H2Am4DH)Cl₂] (1) [Cu(H2Am4Me)Cl₂] (2), [Cu(H2Am4Et)Cl]Cl (3) e [Cu(2Am4Ph)Cl] (4) with 2-pyridinoformamide thiosemicarbazone (H2Am4DH) and its *N*(4)-methyl (H2Am4Me), *N*(4)-ethyl (H2Am4Et) and *N*(4)-phenyl (H2Am4Ph) derivatives were obtained. The Cu(II) complexes as well as the original thiosemicarbazones were tested against the growth of two *gram*-negative bacteria strains. Coordination to Cu(II) lead to a 50% decrease of minimum inhibitory concentration (MIC) against *Salmonella typhimurium* in the case of complexes 1 and 2 relative to the values obtained for the free thiosemicarbazones. However, an increase in MIC was observed against the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. The results suggest that complexation to Cu(II) would not be a good strategy for enhancement of the antibacterial activity for this class of thiosemicarbazones

The toxicity of 2-pyridinoformamide thiosemicarbazones and their Cu(II) complexes against *Artemia salina* was evaluated as a pre-screening of cytotoxicity against solid tumors. Among the thiosemicarbazones H2Am4Ph showed the lowest value of DL₅₀ = 2.2 μM (DL₅₀, dose which kills 50% of the animals). This value is lower than that determined for lapachol (DL₅₀ = 281μM) which has been used as reference. Upon coordination to Cu(II) toxicity increases mainly for complexes 2 and 3 (DL₅₀ = 1.2 μM and DL₅₀ = 1.6 μM respectively), indicating that these compounds could present activity against solid tumors.

Complexes [Pd(2Ac4oT)Cl] (1), [Pd(2Ac4mT)Cl] (2), [Pd(2Ac4pT)Cl] (3), [Pd(2Bz4oT)Cl] (4), [Pd(2Bz4mT)Cl] (5), [Pd(2Bz4pT)Cl] (6), [Pt(2Bz4oT)Cl] (7), [Pt(2Bz4mT)Cl] (8) and [Pt(2Bz4pT)Cl] (9) were obtained with *N*(4)-*ortho*, *N*(4)-*meta* and *N*(4)-*para*-tolyl thiosemicarbazones derived from 2-acetylpyridine (H2Ac4oT, H2Ac4mT, H2Ac4pT) and 2-benzoylpyridine (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT). The complexes as well as the original thiosemicarbazones were tested for their antiproliferative activity against solid tumors and leukemia. HepG2, (hepatoma), UACC-62 (melanoma) and A 431 (head and neck epidermoid carcinoma) solid tumor cell lines and HL60 (resistant) and Jurkat leukemia cell lines were used in the screening.

At 50 μM , H2Ac4pT and H2Bz4mT proved to be the most active among the thiosemicarbazones against solid tumors, being able to inhibit 50% of proliferation of HepG2 cells and 70-80% of A431 cells. The two compounds proved to be more active than cisplatin. All thiosemicarbazones showed similar activity against UACC-62 cells, inhibiting 50% of proliferation at 50 μM .

However, *N*(4)-tolyl-2-benzoylpyridine thiosemicarbazones, which have also been tested against leukemia, only inhibited 6-48% of cell proliferation at 50 μM , indicating preference of these compounds for solid tumors.

Upon coordination to Pd(II) the antiproliferative activity of 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazone decreased in all solid tumor cell lines. The Pd(II) complexes with 2-benzoylpyridine thiosemicarbazones presented lower activity than the free thiosemicarbazones against UACC-62 cells; complexes **4** and **6** were more active than the free thiosemicarbazones against HepG2 cells and complex **6** was more active than the free ligand against A431 cells. The order of antiproliferative activity against UACC-62 and A431 cells was **6**>**5**>**4**. Coordination to Pt(II) led to a decrease in activity against HepG2 and UACC62 cells and to a small increase in activity against A431 cells in the case of complex **9**.

In general coordination to Pd(II) and Pt(II) resulted in a decrease of the antiproliferative activity of the thiosemicarbazones against solid tumor cell lines. However, coordination of 2-benzoylpyridine thiosemicarbazones led to a significant increase of the antiproliferative activity against leukemia. In both leukemia cell lines the order of activity of the complexes was **4**>**5**>**6**. Since the inverse order of activity has been found against the A431 solid tumor cells and considering that complex **6** was found to be the most active against solid tumors and the least active against leukemia we may suggest that the mechanisms of proliferation inhibition are different for solid tumors and leukemia.

Since the studied compounds showed preference either for solid tumors or leukemia they could be good alternatives for the development of new drug candidates.

SIGLAS E ABREVIATURAS

μg	microgramas
μL	microlitro
μM	micromolar
molar	mol L^{-1}
mmol	milimol
M. M.	massa molar
dec.	decompõe
BM	magneton de Bohr
gII	g paralelo
ϵ	absortividade molar
g	gramas
calc	calculado
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
DMF	4, 4-dimetilformamida
TMS	Tetrametilsilano
M	Multiplicidade

t	tripleto
s	simpleto
d	dupleto
$\alpha(N)$ -	cadeia lateral no C(2) do anel piridínico
HepG2	Linhagem de célula - tumor hepático
UACC-62	Linhagem de célula - melanoma
A431	Linhagem de célula - carcinoma de cabeça e pescoço
HL60.bcl2	Linhagem de célula - leucemia resistente a quimioterápicos
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
ADN	ácido desoxirribonucleico
BHI	Infusão Cérebro Coração
RPMI	Roswell Park Memorial Instituto
RDR	Ribonucleosídeo Difosfato Redutase
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
CIM	Concentração inibitória mínima
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Sumário

Capítulo 1: Introdução.....	1
Capítulo 2: Parte Experimental.....	9
2.1 - Equipamentos e procedimentos.....	9
2.2 - Síntese dos ligantes e complexos.....	10
2.2.1 - Síntese de 2-acetil e 2-benzoil <i>N(4)-orto</i> , <i>N(4)-meta</i> e <i>N(4)-para</i> toluil tiossemicarbazonas (H2Ac4oT, H2Ac4mT e H2Ac4pT, H2Bz4oT, H2Bz4mT e H2Bz4pT).....	11
2.2.2 - Síntese dos complexos de paládio de <i>N(4)-o</i> , <i>N(4)-m</i> e <i>N(4)-p</i> toluil 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas.....	11
2.2.3 - Síntese dos complexos de platina de <i>N(4)-o</i> , <i>N(4)-m</i> e <i>N(4)-p</i> -toluil 2-formil, 2-acetil e 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona.....	12
2.2.4 - Síntese de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH) e de seus derivados <i>N(4)-metil</i> (H2Am4Me), <i>N(4)-etil</i> (H2Am4Et) e <i>N(4)-fenil</i> (H2Am4Ph).....	12
2.2.5 - Síntese dos complexos de cobre de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona e de seus derivados <i>N(4)-metil</i> , <i>N(4)-etil</i> e <i>N(4)-fenil</i>	12
2.3 - Testes Biológicos.....	13
2.3.1 - Atividade antimicrobiana.....	13
2.3.2 - Toxicidade em <i>Artemia salina</i>	13
2.3.3 - Atividade Citotóxica.....	14
Capítulo 3: Complexos de Pd(II) e Pt(II) de <i>N(4)-o</i>-toluil, <i>N(4)-m</i>-toluil e <i>N(4)-p</i>-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona e 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona.....	17
3.1- Caracterização dos complexos de Pd(II) e Pt(II) de <i>N(4)-o</i> -toluil, <i>N(4)-m</i> -toluil e <i>N(4)-p</i> -toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona e 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona.....	18
3.2- Estruturas Cristalográficas.....	38
3.3- Atividade Citotóxica.....	45
Capítulo 4: Complexos de cobre(II) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH) e seus derivados <i>N(4)-metil</i> (H2Am4Me), <i>N(4)-etil</i> (H2Am4Et) e <i>N(4)-fenil</i> (H2Am4Ph).....	54
4.1- Caracterização dos complexos de cobre(II) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH) e seus derivados <i>N(4)-metil</i> (H2Am4Me), <i>N(4)-etil</i> (H2Am4Et) e <i>N(4)-fenil</i> (H2Am4Ph).....	55
4.2- Estrutura Cristalográfica de [Cu(2Am4Ph)Cl] (4).....	74
4.4- Toxicidade em <i>Artemia salina</i>	77
Capítulo 5: Discussões e conclusões.....	80
Anexo: Artigo.....	86

Índice de tabelas

Tabela 3.1. 1 - Dados analíticos obtidos para os complexos de Pd(II) e Pt(II).....	19
Tabela 3.1. 2 - Atribuições das principais bandas de infravermelho (cm^{-1}) de <i>N</i> (4)-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de Pd(II).....	24
Tabela 3.1. 3 - Atribuições das principais bandas de infravermelho (cm^{-1}) de <i>N</i> (4)-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina e seus complexos de Pd(II).....	24
Tabela 3.1. 4 - Atribuições das principais bandas de infravermelho (cm^{-1}) de <i>N</i> (4)-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina e seus complexos Pt(II).....	25
Tabela 3.1. 5 - Atribuições, número de hidrogênios (n°), deslocamentos químicos (δ ppm) e multiplicidade (M) dos sinais de RMN de ^1H de <i>N</i> (4)- <i>o</i> -toluil, <i>N</i> (4)- <i>m</i> -toluil e <i>N</i> (4)- <i>p</i> -toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de Pd(II) (DMSO- d_6).....	28
Tabela 3.1. 6 - Atribuições, número de hidrogênios (n°), deslocamentos químicos (δ ppm) e multiplicidade (M) dos sinais de RMN de ^1H de <i>N</i> (4)- <i>o</i> -toluil, <i>N</i> (4)- <i>m</i> -toluil e <i>N</i> (4)- <i>p</i> -toluil 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de Pd(II) (DMSO- d_6).....	29
Tabela 3.1. 7 - Atribuições, número de hidrogênios (n°), deslocamentos químicos (δ ppm) e multiplicidade (M) dos sinais de RMN de ^1H de <i>N</i> (4)- <i>o</i> -toluil, <i>N</i> (4)- <i>m</i> -toluil e <i>N</i> (4)- <i>p</i> -toluil 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de Pt(II) (DMSO- d_6).....	30
Tabela 3.1. 8 - Atribuições e deslocamentos químicos (δ ppm) dos sinais de RMN de ^{13}C de <i>N</i> (4)- <i>o</i> -toluil, <i>N</i> (4)- <i>m</i> -toluil e <i>N</i> (4)- <i>p</i> -toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de Pd(II). (DMSO- d_6).....	33
Tabela 3.1. 9 - Atribuições e deslocamentos químicos (δ ppm) dos sinais de RMN de ^{13}C de <i>N</i> (4)- <i>o</i> -toluil, <i>N</i> (4)- <i>m</i> -toluil e <i>N</i> (4)- <i>p</i> -toluil 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de Pd(II) (DMSO- d_6).....	34
Tabela 3.1. 10 - Atribuições e deslocamentos químicos (δ ppm) dos sinais de RMN de ^{13}C de <i>N</i> (4)- <i>o</i> -toluil, <i>N</i> (4)- <i>m</i> -toluil e <i>N</i> (4)- <i>p</i> -toluil 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de Pt(II) (DMSO- d_6).....	35
Tabela 4.1. 1 - Dados analíticos obtidos para os complexos de Cu(II).....	56
Tabela 4.1. 2 - Atribuições das principais bandas de infravermelho (cm^{-1}) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II).....	58

Tabela 4.1. 3 - Bandas dos espectros eletrônicos de complexos de cobre(II) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona e derivados em solução (DMF).....	63
Tabela 4.1. 4 - Parâmetros de EPR para os complexos 1-4 (sólido a temperatura ambiente e em DMF a 77K).....	66
Tabela 4.2. 1 – Resumo da coleção de dados e refinamento do complexo [Cu(2Am4Ph)Cl].....	71
Tabela 4.2. 2 – Distâncias (Å) e ângulos (°) selecionados de [Cu(2Am4Ph)Cl] (4). Desvio padrão entre parênteses.....	72
Tabela 4.2. 3 – Parâmetros de ligações de hidrogênio (Å, °) para 4	73
Tabela 4.3.1 - Concentração inibitória mínima para 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e seus complexos de cobre(II) contra <i>Salmonella typhimurium</i>	75
Tabela 4.3.2 - Concentração inibitória mínima para 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e seus complexos de cobre(II) contra <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	75
Tabela 4.4. 1 - Toxicidade de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e seus complexos de cobre(II) contra <i>Artemia salina</i>	78

Índice de figuras

Figura 1. 1 - Estrutura geral de <i>N</i> (4) tiossemicarbazonas.....	3
Figura 1. 2 - Estrutura geral de <i>N</i> (4)-toluil (a) e 2-piridinoformamida (b) tiossemicarbazonas.....	6
Figura 1. 3 - <i>Artemia salina</i>	8
Figura 3. 1 - Isômeros configuracionais <i>Z</i> e <i>E</i>	18
Figura 3. 2 - Espectro de infravermelho de H2Bz4oT na faixa de 4000 a 600 cm ⁻¹ , em KBr.....	21
Figura 3. 3 - Espectro de infravermelho de [Pd(2Bz4oT)Cl] na faixa de 4000 a 600 cm ⁻¹ , em KBr.....	22
Figura 3. 4 - Espectro de infravermelho de [Pd(2Bz4oT)Cl] na faixa de 700 a 250 cm ⁻¹ , suporte CsI.....	23
Figura 3. 5 - Espectro de RMN de ¹ H do ligante H2Bz4mT.....	31
Figura 3. 6 - Espectro de RMN de ¹ H do complexo [Pd(2Bz4mT)Cl] (5).....	32
Figura 3. 7 - Espectro de RMN de ¹³ C para o ligante H2Bz4mT.....	36
Figura 3. 8 - Espectro de RMN de ¹³ C para o complexo [Pd(2Bz4mT)Cl] (5).....	37
Figura 3. 9 - Diagrama ORTEP do complexo [Pd(2Bz4oT)Cl]•DMSO (4).....	38
Figura 3. 10 - Diagrama ORTEP do complexo [Pd(2Bz4mT)Cl]•DMSO (5).....	39
Figura 3. 11 - Diagrama ORTEP do complexo [Pd(2Bz4pT)Cl]•DMSO (6).....	40
Figura 3. 12 - Efeito de <i>N</i> (4)- <i>orto</i> , <i>N</i> (4)- <i>meta</i> e <i>N</i> (4)- <i>para</i> toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina (H2Ac4oT, H2Ac4mT, H2Ac4pT) e de 2-benzoilpiridina (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT) e seus complexos de Pd(II) sobre a proliferação de células de hepatoma humano HepG2.....	45
Figura 3. 13 - Efeito de <i>N</i> (4)- <i>orto</i> , <i>N</i> (4)- <i>meta</i> e <i>N</i> (4)- <i>para</i> toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina (H2Ac4oT, H2Ac4mT, H2Ac4pT) e de 2-benzoilpiridina (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT) e seus complexos de Pd(II) sobre a proliferação de células de melanoma humano UACC-62.....	47
Figura 3. 14 - Efeito de <i>N</i> (4)- <i>orto</i> , <i>N</i> (4)- <i>meta</i> e <i>N</i> (4)- <i>para</i> toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina (H2Ac4oT, H2Ac4mT, H2Ac4pT) e de 2-benzoilpiridina (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT) e seus complexos de Pd(II) sobre a proliferação de células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço A431.....	48

Figura 3. 15 - Efeito de <i>N(4)-orto</i> , <i>N(4)-meta</i> e <i>N(4)-para</i> toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT) e seus complexos de Pd(II) em linhagens de células de leucemia humana HL60.bcl2.....	49
Figura 3. 16 - Efeito de <i>N(4)-orto</i> , <i>N(4)-meta</i> e <i>N(4)-para</i> toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT) e seus complexos de Pd(II) em linhagens de células de leucemia humana Jurkat.....	50
Figura 3. 17 - Efeito de <i>N(4)-orto</i> , <i>N(4)-meta</i> e <i>N(4)-para</i> toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT) e seus complexos de Pt(II) em linhagens de células de hepatoma humano HepG2.....	51
Figura 3. 18 - Efeito de <i>N(4)-orto</i> , <i>N(4)-meta</i> e <i>N(4)-para</i> toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT) e seus complexos de Pt(II) em linhagens de células de melanoma humano UACC-62.....	52
Figura 3. 19 - Efeito de <i>N(4)-orto</i> , <i>N(4)-meta</i> e <i>N(4)-para</i> toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT) e seus complexos de Pt(II) em linhagens de células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço A431.....	53
Figura 4. 1 – Fórmula estrutural de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona.....	55
Figura 4. 2 - Espectro de infravermelho de H2Am4Ph na região de 4000-400 cm ⁻¹ , suporte CsI/nujol.....	59
Figura 4. 3 - Espectro de infravermelho de [Cu(2Am4Ph)Cl] na região de 4000-400 cm ⁻¹ , suporte CsI/nujol.....	60
Figura 4. 4 - Espectro de infravermelho de [Cu(2Am4Ph)Cl] e H2Am4Ph na região de 500-200 cm ⁻¹ , suporte CsI/nujol.....	61
Figura 4. 5 - Espectro eletrônico de 2-piridinoformamida e seu complexo de cobre (DMF).....	64
Figura 4. 6 -Espectro eletrônico de 2-piridinoformamida <i>N(4)</i> -fenil e seu complexo de cobre.....	64
Figura 4. 7.a - Espectros EPR de compostos 1 – 4 no estado sólido (cinza) e simulações (linhas pontilhadas) utilizando EasySpin (S = 1 / 2, simetria axial) a temperatura ambiente.....	67
Figura 4. 7.b - Espectros EPR dos compostos 1 - 4 (2 mg/mL) em DMF e a simulação de 4 , sem a estrutura superhiperfina do nitrogênio, usando EasySpin (g = 2.165, g _⊥ = 2.038).....	68

Figura 4. 7.c - Espectro de EPR dos compostos 1 – 4 (2 mg/ml) em DMF a 77 K, e a simulação de 1 e 4 , sem a estrutura superhiperfina do nitrogênio, usando EasySpin	69
Figura 4. 8 – Diagrama ORTEP do complexo [Cu(2Am4Ph)Cl].....	70
Figura 4. 9 – Diagrama ORTEP do complexo [Cu(2Am4Ph)Cl].....	73

Capítulo 1

Introdução

Os princípios da Química Inorgânica são relevantes para o entendimento dos sistemas biológicos, já que, em muitos casos, complexos metálicos formados por ligantes macromoleculares e íons metálicos apresentam diversas funções biológicas como o armazenamento e liberação de oxigênio. O conhecimento de estruturas da natureza em reações inorgânicas tem estimulado a síntese e a caracterização de novos compostos inorgânicos a fim de melhorar o conhecimento sobre as funções dos metais e dos ligantes nos sistemas vivos¹.

A Química Medicinal dedicava-se principalmente ao estudo de compostos orgânicos e produtos naturais. O grande interesse pelas aplicações farmacológicas de complexos metálicos apareceu depois da descoberta das propriedades antitumorais de *cis*-diaminodichloroplatina(II), a cisplatina².

Este composto apresenta grande atividade contra diversos tipos de câncer, principalmente o de ovário e o de testículo, sendo a droga mais usada no tratamento desses tumores e também de outros tipos tais como câncer de pulmão, cabeça, estômago, linfomas e melanoma³.

Contudo, seu limitado espectro de atividade, o aparecimento de resistência ao medicamento e os sérios efeitos colaterais provocados pelo uso de cisplatina levaram à procura por novos fármacos análogos variando a natureza do grupo abandonador e a do ligante não abandonador.

Atualmente, pesquisas se destinam à descoberta de novos compostos com atividade semelhante à da cisplatina através de alterações na estrutura dos ligantes, da mudança do metal e seu estado de oxidação. Complexos de tiossemicarbazonas têm sido sugeridos como alternativas ao uso ou à reversão da resistência celular à cisplatina⁴.

Tiossemicarbazonas são compostos obtidos pela reação de condensação de um aldeído ou uma cetona com uma tiossemicarbazida. A estrutura genérica das tiossemicarbazonas encontra-se na Figura 1.1. Do ponto de vista sintético, apresentam

¹ D.F. Shriver, P. W. Atkins; Langford, Cooper Harold. Inorganic chemistry. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1994 683.

² H. Beraldo, Quím. Nova, 27 (2004) 461-471.

³ A.P. Fontes, E.T. César, H. Beraldo, Química Nova na Escola, 6 (2005) 13-18.

⁴ A.I. Matesanza, P. Souza, J Inorg. Biochem., 101 (2007) 245-253.

como característica principal sua versatilidade de obtenção, assim como sua vasta aplicação como intermediários de muitos núcleos importantes. Geralmente, apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, já que, com exceção da água que é liberada na sua obtenção, todos os outros átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final ⁵.

As tiossemicarbazonas têm grande capacidade quelante e apresentam-se como ligantes versáteis tanto na forma neutra quanto na forma aniônica, podendo formar ligação coordenada com metais através do átomo de enxofre e do átomo de nitrogênio azometínico (C=N). Esta capacidade de formar ligação coordenada é aumentada se houver grupos doadores de elétrons ligados ao carbono da função azometina ⁵.

Estes compostos apresentam amplo interesse científico devido às suas importantes propriedades químicas e suas aplicações farmacológicas como agentes antitumorais, antibacterianos, antivirais, antiprotozoários, citotóxicos, dentre outras. Seus complexos metálicos são também bastante conhecidos por apresentar um amplo perfil farmacológico e por esse motivo são alvos de muitas pesquisas, principalmente em Química Medicinal Inorgânica⁶.

As tiossemicarbazonas agem, geralmente, como inibidores de enzimas através da complexação de metais endógenos ou através de reações redox; interagem com o ADN e podem inibir sua síntese. Alguns complexos metálicos de tiossemicarbazonas apresentam a capacidade de inibir a ação de determinadas enzimas e por isso é importante o estudo de suas possíveis aplicações no tratamento de doenças².

Tiossemicarbazonas α (N)-heterocíclicas mostram importantes propriedades farmacológicas⁵ acima. Estas propriedades estão relacionadas com a natureza do anel heteroaromático, a posição de ligação da cadeia ao anel e a presença de substituintes⁷. Tiossemicarbazonas α (N)-heterocíclicas derivadas de piridina têm sido amplamente estudadas. Estudos anteriores mostraram que a substituição em N4 (figura 1.1) por grupos alquila ou arila exerce influência na atividade de tais compostos devido a um aumento na lipofilia ².

⁵ R.P. Tenório, A.J. S. Góes, J.G. Lima, A.R. Faria, A.J. Alves, T.M. Aquino, Quím. Nova, 28 (2005) 1030-1037.

⁶ H. Beraldo, D. Gambino, Mini Rev. Med. Chem., 4 (2004) 159-165.

⁷ D.X West, S.B. Padhye, P.B. Sonawane, Structure and Bonding, Springer Verlag, 76 (1991) 1-47.

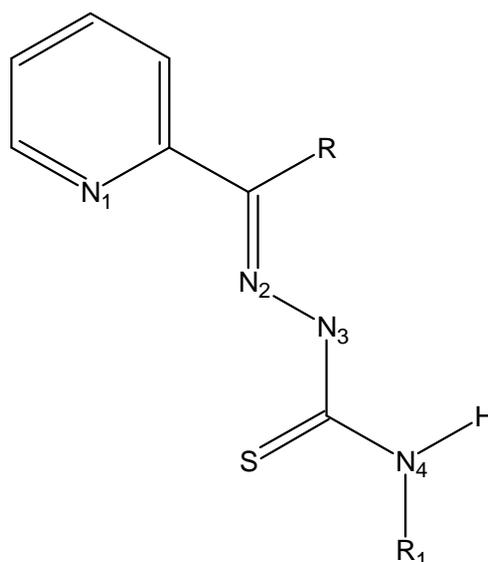


Figura 1. 1 – Estrutura geral de *N*(4) tiossemicarbazonas.

A literatura é rica em estudos das propriedades citotóxicas ou antitumorais de tiossemicarbazonas e seus complexos metálicos. As tiossemicarbazonas são potentes inibidores da ribonucleosídeo difosfato redutase (RDR), uma enzima envolvida na síntese do DNA das células. Estudos mostram que modificações na atividade dessa enzima podem alterar a velocidade de mutação das células. No câncer a atividade da RDR é aumentada, tornando-a um alvo interessante para a quimioterapia. Foi demonstrado que a forma ativa das tiossemicarbazonas como inibidores de RDR seria seus complexos de ferro².

Complexos de tiossemicarbazonas poderiam também apresentar ação antitumoral funcionando como análogos de cisplatina. Estudos recentes na literatura revelaram que complexos de paládio(II) e platina(II) de uma variedade de tiossemicarbazonas mostram-se ativos como agentes citotóxicos em células tumorais humanas resistentes à cisplatina⁸.

O mecanismo de ação da cisplatina envolve a promoção de vários tipos de lesões no DNA. Cisplatina forma com o DNA principalmente ligações intrafita, mas ocorre igualmente a formação, em menor extensão, de ligações interfitas. Foi demonstrado que a ação citotóxica de complexos de platina(II) e paládio(II) de tiossemicarbazonas contra células resistentes a cisplatina se deve ao fato de que estes complexos fazem ligações interfitas com o DNA³.

⁸ A.G. Quiroga, J.M. Perez, E.I. Montero, J.R. Masaguer, C. Alonso, C. Navarro-Ranninger, J. Inorg. Biochem. 70 (1998) 117-123.

Nosso grupo de pesquisa tem-se interessado há muitos anos pela investigação do perfil farmacológico de tiossemicarbazonas e seus complexos metálicos. Estudos revelaram que tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina e seus complexos de paládio(II) apresentam atividade citotóxica contra linhagens de células de tumores humanos MCF-7 (tumor mamário), TK-10 (carcinoma renal) e UACC-62 (melanoma). 2-benzoilpiridina *N*(4)-fenil tiossemicarbazona mostrou resultados promissores, sendo os valores de IG_{50} (“inhibition growth”, concentração que inibe 50% do crescimento das células, efeito citostático) e LC_{50} (“lethal concentration”, concentração que mata 50% das células, efeito citotóxico) menores do que os apresentados pelo etoposídeo, medicamento de referência usado para comparação ⁹.

Uma das primeiras aplicações de compostos inorgânicos na Medicina foi como agentes antissépticos e antimicrobianos¹⁰. Tiossemicarbazonas constituem exemplos de compostos cuja atividade pode ser modificada pela coordenação aos metais, e um dos aspectos interessantes apresentados pelas tiossemicarbazonas e seus complexos metálicos é o amplo espectro de atividade antimicrobiana ⁶.

A literatura relata uma variedade de 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas que são capazes de inibir o crescimento de bactérias *gram* positivas tais como, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitides*, *Staphylococcus faecalis*, *Streptococcus faecalis* e *D. Enterococcus*. No entanto, os compostos não mostraram boa atividade contra bactérias *gram* negativas ⁵.

Um outro estudo encontrado na literatura foi feito com 2-benzoilpiridina *N*(4)-fenil tiossemicarbazona e seus complexos de cobre(II) preparados a partir de diferentes sais. Os compostos foram testados contra duas cepas de bactérias *gram*-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus sp.*) e três cepas de bactérias *gram* negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi* e *Vibrio cholerae* O1). A tiossemicarbazona livre foi ativa contra *Staphylococcus aureus* e inativa nos outros microorganismos. Os complexos $[CuLCl]CH_3OH$, $[CuLBr].2H_2O$, $[CuLNCS].H_2O$ e $[CuL(HL)](ClO_4)$ foram ativos apenas contra *V. cholerae* O1, enquanto que $[CuLN_3]$ mostrou atividade contra *V. cholerae* O1 e *S. paratyphi* ¹¹.

⁹ 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) 698-706.

¹⁰ A. Y. Louie, T.J. Meade, Chem. Rev., 99 (1999) 2711-2734.

¹¹ M. Joseph, M. Kuriakose, M.R. Prathapachandra Kurup, E. Suresh, A. Kishore, S.G. Bhat, Polyhedron, 25 (2006) 61-70.

Nosso grupo testou a atividade de 2-formil, 2-acetil e 2-benzoilpiridina N(4)-*orto*, N(4)-*meta* e N(4)-*para* toluil tiossemicarbazonas e seus complexos de cobre(II) contra o crescimento de *Salmonella typhimurium*, obtendo resultados interessantes. Para as tiossemicarbazonas foram encontrados valores de concentração inibitória mínima (CIM) na faixa 225-1478 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, sugerindo baixa atividade. Pela coordenação ao cobre(II), foi observada uma considerável diminuição nos valores de CIM para 5-30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, indicando que a complexação seria uma interessante estratégia de redução de doses e ampliação do espectro de atividade dessas tiossemicarbazonas^{12,13}.

Entre as tiossemicarbazonas livres, os valores de CIM mais baixos foram encontrados para os derivados de 2-acetilpiridina, mas entre os complexos os menores valores foram encontrados para aqueles com os derivados de 2-benzoilpiridina. O maior efeito de redução de doses pela coordenação foi observado para os derivados de 2-benzoilpiridina. Esse resultado é um dos poucos casos encontrados na literatura de tiossemicarbazonas com atividade contra bactérias *gram*-negativas, indicando novas possibilidades de ação para essa classe de compostos^{12,13}.

No presente trabalho foram investigados complexos metálicos de duas famílias de tiossemicarbazonas contendo diferentes substituintes no nitrogênio terminal da cadeia, N(4): 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas contendo um grupo toluil em N(4) (Figura 1.2a) e 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e seus derivados N(4)-alquil ou N(4) aril substituídos (Figura 1.2b). No primeiro caso foram investigados aspectos relacionados à atividade citotóxica de ligantes e complexos de paládio(II) e platina(II) e no segundo aspectos relacionados à atividade antimicrobiana e ação citotóxica.

¹² I.C. Mendes, J.P. Moreira, A.S. Mangrich, S.P. Balena, B.L. Rodrigues, H. Beraldo, Polyhedron, 26 (2007) 3263-3270.

¹³ I.C. Mendes, J.P. Moreira, N.L. Speziali, A.S. Mangrich, J.A. Takahashia, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc., 17 (2006) 1571-1577.

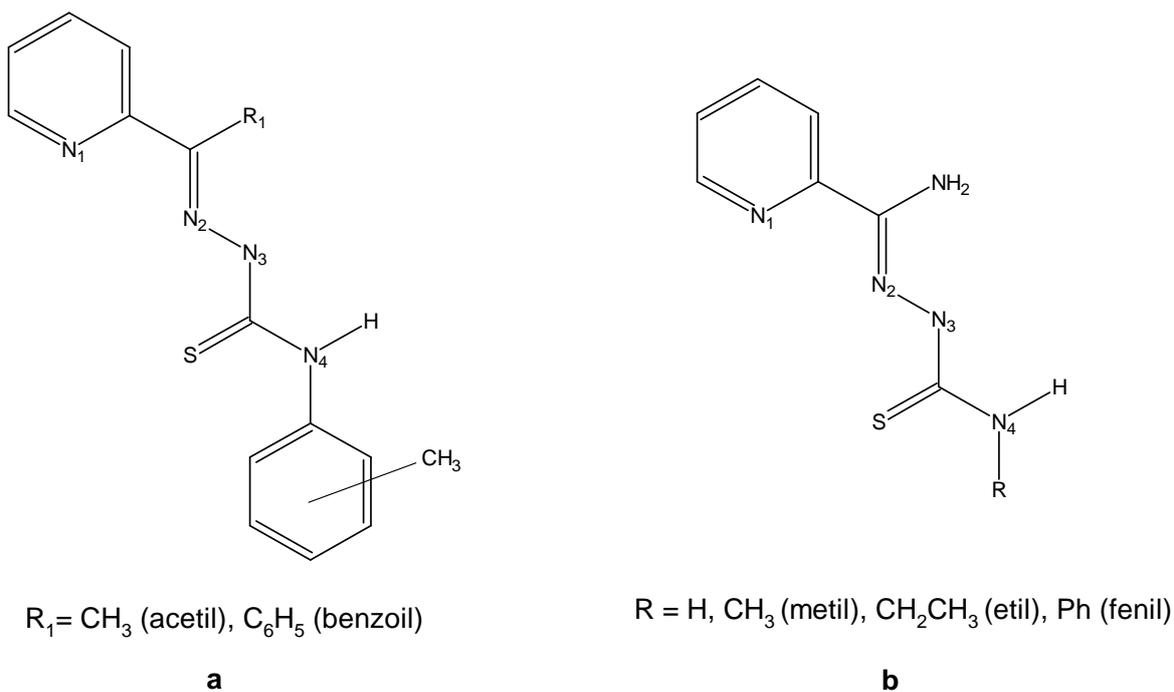


Figura 1. 2 – Estrutura geral de N(4)-toluil (a) e 2-piridinoformamida (b) tiossemicarbazonas.

Uma vez que complexos de tiossemicarbazonas têm sido sugeridos como possíveis alternativas à cisplatina, no caso das N(4) toluil tiossemicarbazonas, foram preparados os complexos de paládio(II) e platina(II), os quais foram testados, juntamente com os ligantes, quanto à atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais humanas Hep-G2 (tumor hepático), UACC-62 (melanoma), A431 (carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço) e contra leucemias HL60 resistente a quimioterápicos e Jurkat procurando-se avaliar o efeito da coordenação sobre a atividade.

As neoplasias malignas ou cânceres representam um conjunto de doenças responsáveis por sete milhões de mortes anuais, ou seja, 12,5% de todos os óbitos no mundo. No Brasil, as neoplasias estão em segundo lugar como causa de mortalidade geral (15,1%), superadas apenas pelas doenças cardiovasculares (31,6%) e à frente das causas externas (14,6%). A compreensão dos mecanismos básicos envolvidos no crescimento tumoral é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, especialmente para as formas mais avançadas da doença para as quais as opções atuais têm impacto limitado na sua progressão.¹⁴

¹⁴ T. Torrezini, D.A. Athanazio, Rev. Bras. Câncer. 1(2008) 63-77.

Carcinoma hepatocelular (HCC) é a terceira causa de morte mais comum entre as mortes de câncer relatadas. De acordo com as estatísticas, mais de 600.000 pessoas morrem de HCC por ano no mundo. Portanto, o desenvolvimento de drogas terapêuticas mais efetivas para o tratamento de HCC é de grande interesse.

Outro tipo de câncer com uma estimativa de cerca de 10.000 novos casos em 2008 só no Brasil é a leucemia, uma doença maligna dos glóbulos brancos (leucócitos) de origem, na maioria das vezes, não conhecida. Ela tem como principal característica o acúmulo de células jovens (blásticas) anormais na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais.¹⁵

Desta forma, as tiossemicarbazonas e complexos de paládio(II) e platina(II) foram testados quanto à atividade citotóxica frente a células de tumor hepático e leucemias.

No caso das tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida foi feita uma investigação do efeito da coordenação ao cobre(II) sobre a ação antimicrobiana, procurando-se verificar se a estratégia da complexação levaria a uma redução de doses, como observado anteriormente por outros membros de nossa equipe para *N(4)*-toluil tiossemicarbazonas^{12,13}. Uma vez que de modo geral tiossemicarbazonas não mostram boa atividade contra bactérias *gram* negativas e que nosso grupo obteve bons resultados nestas cepas para complexos de cobre(II), utilizamos no presente trabalho as colônias *gram* negativas *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*. O estudo pareceu-nos interessante, considerando-se o crescente problema de resistência aos antibióticos usados clinicamente.

A literatura relata que compostos com toxidez frente a *Artemia salina* (Figura 1.3) mostram-se igualmente tóxicos frente a células de tumores sólidos, sugerindo que este bioensaio poderia constituir uma avaliação prévia de citotoxicidade¹⁶. Considerando que outros membros de nossa equipe mostraram que tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida apresentam toxidez frente a *Artemia salina* e que a coordenação ao ferro(III) faz aumentar a atividade¹⁷, foi realizado no presente trabalho o estudo de toxidez dos complexos de cobre(II).

¹⁵ Estimativa /2008 – Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>. Acesso em: 03 jun. 2008.

¹⁶ L.P. Santos Pimenta, G.B. Pinto, J.A. Takahashi, L.G.F. Silva, M.A.D. Boaventura, *Phytomedicine*, 10 (2003) 209.

¹⁷ A.E. Graminha, F.S. Vilhena, A.A. Batista, S.R.W. Louro, R.L. Ziolli, L.R. Teixeira, H. Beraldo, *Polyhedron*, 27 (2008) 547-551.

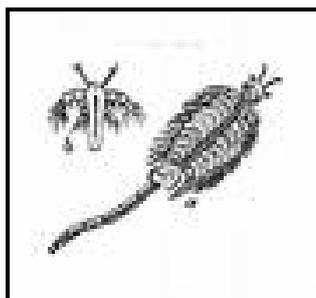


Figura 1. 3 – *Artemia salina*.z

A investigação do perfil farmacológico de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas tem sido feita de forma pioneira pela nossa equipe, já que a literatura não trazia nenhum estudo de bioatividades para esta família de compostos.

Esperamos que o presente trabalho possa contribuir para um melhor entendimento da química das tiossemicarbazonas e do efeito da coordenação aos metais sobre sua atividade farmacológica.

Capítulo 2

Parte Experimental

2.1 - Equipamentos e procedimentos

Determinação de temperatura de fusão

- Equipamento Mettler FP 90.

Determinação de massa

- Balança Gehaka, modelo AG 200, precisão 10mg.

Análise Elementar

- Perkin Elmer, modelo CHN-2400

Análises Térmicas

As análises foram feitas em atmosfera de ar com razão de aquecimento de 10°C/min, na faixa de temperatura de 25-750°C.

- Termobalança Mettler TA-4000 com analisador TG50.

Análises Condutimétricas

As medidas de condutividade dos complexos foram realizadas em soluções de DMF de concentração na ordem de 10^{-3} a 10^{-4} mol.L⁻¹.

- Condutivímetro YSI Conductivity Bridge, modelo 31, com célula condutimétrica do mesmo fabricante, de constante 0,088cm⁻¹.

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN foram registrados usando-se TMS ($\delta=0$) como padrão interno e DMSO como solvente.

- Espectrofotômetro Bruker Avance DRX200 (200 MHz).

Espectros de Infravermelho

Os espectros de IV foram registrados na região de 200-4000 cm⁻¹.

Perkin Elmer FT-IR System-Spectrum GX empregando pastilhas de KBr ou emulsões de nujol em janelas de CsI.

Espectros de Ultravioleta-Visível

Os espectros de UV-Vis foram registrados utilizando-se uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico, em soluções de DMF de concentração da ordem de 10^{-3} a 10^{-5} mol.L⁻¹.

- Espectrofotômetro HP8453 diode array – Hewlett Packard

Estruturas de Cristalográficas

As estruturas cristalográficas foram determinadas em colaboração com professor Dr Nivaldo Speziali (Departamento de Física, UFMG) e em colaboração com a Dra. Solange Wardell (Departamento de Síntese, Farmanguinhos – Fiocruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Far-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro).

Os detalhes e condições experimentais de cada medida estão descritos nos capítulos.

Reagentes

Todos os reagentes usados foram de alto grau de pureza. As procedências dos reagentes foram as seguintes: tiossemicarbazidas (Merck e Aldrich), N₂H₄H₂O (Aldrich), *o*-, *m*-, *p*-toluilisotiocianato (Aldrich), cloreto de cobre(II) (Merck), cloreto de paládio (Strem Chemicals), tetracloropaladato(II) de potássio (Strem Chemicals e Sigma), tetracloroplatinato(II) de potássio (Strem Chemicals), metanol (Synth), etanol (Synth), éter etílico (Grupo Química), acetona (Quimex), DMF (Synth), DMSO (Synth).

2.2 - Síntese dos ligantes e complexos

As tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina *N*(4)-substituídas com grupos toluil em posição *orto*, *meta* e *para*, foram obtidas por procedimento análogo ao descrito na literatura para *N*(4)-fenil tiossemicarbazonas¹.

2-piridinoformamida tiossemicarbazona e seus derivados *N*(4)-substituídos com os grupos metil, etil e fenil, foram preparados a partir de método descrito por outros autores².

¹ D.X. West, N.M. Kozub e G.A. Bain, Transition Met. Chem. 21 (1996) 52.

² A. Castinheiras, I. Garcia, E. Bermejo, D.X. West, Z. Naturforsch, Teil. B 55 (2000) 511.

As tiossemicarbazonas foram caracterizadas por temperatura de fusão e seus espectros RMN de ^1H , ^{13}C , e DEPT 135, por seus espectros de absorção na região do infravermelho e ultravioleta-visível.

2.2.1 - Síntese de 2-acetil e 2-benzoil *N*(4)-orto, *N*(4)-meta e *N*(4)-para toluil tiossemicarbazonas (H2Ac4oT, H2Ac4mT e H2Ac4pT, H2Bz4oT, H2Bz4mT e H2Bz4pT).

A reação de síntese ocorre em duas etapas:

Primeiramente, ocorre a etapa de preparo da hidrazona de 2-acetilpiridina ou 2-benzoilpiridina, que foi realizada adicionando-se hidrazina (15 mmol) em 50 mL de etanol sob leve agitação e aquecimento. Em seguida, acrescenta-se 2-acetilpiridina ou 2-benzoilpiridina (15 mmol), deixando a mistura em refluxo por aproximadamente 7h. O produto foi isolado deixando-o na geladeira até a cristalização, e em seguida, tratado com éter etílico.

A segunda etapa é a de preparo das tiossemicarbazonas, que foi feita adicionando 3 mmol do toluilisotiocianato desejado (*orto*, *meta* ou *para*) em 20 mL da solução etanólica de hidrazona (3 mmol) obtida anteriormente. As misturas foram deixadas em refluxo por mais 24h. Os sólidos obtidos foram filtrados e lavados com éter etílico e secados sob vácuo.

2.2.2 - Síntese dos complexos de paládio de *N*(4)-o, *N*(4)-m e *N*(4)-p toluil 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas.

Primeiramente foi preparado o precursor $[\text{PdCl}_2(\text{DMSO})_2]$. Uma solução de 1 mmol de PdCl_2 em 5 mL de DMSO foi mantida a 50°C sob agitação por 24h, e o precipitado laranja obtido foi lavado com acetona e secado sob vácuo.

Os complexos de paládio(II) foram preparados a partir da reação entre 1 mmol da tiossemicarbazona desejada e 1 mmol de $[\text{Pd}(\text{DMSO})_2\text{Cl}_2]$ em etanol. As misturas foram agitadas por 24h à temperatura ambiente. Os complexos obtidos foram filtrados, lavados com etanol quente e éter e secados sob vácuo.

Os complexos de paládio sintetizados a partir do tetracloropaladato(II) de potássio foram preparados conforme o método descrito na literatura³ misturando-se 5 mL de uma solução aquosa de K_2PdCl_4 (1,12 mmol) com 30 mL de uma solução etanólica da

³ A. Castineiras, M. Gil, E. Bermejo, D.X. West, Zeit. Naturforsch. B: Chem. Sci. 55 (2000) 863-870.

tiossemicarbazona desejada (1,12 mmol). A mistura foi levemente aquecida sob refluxo por 2h. Os sólidos obtidos foram filtrados e lavados com éter etílico, e secados a vácuo.

2.2.3 - Síntese dos complexos de platina de *N(4)-o*, *N(4)-m* e *N(4)-p*-toluil 2-formil, 2-acetil e 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona.

Os complexos de platina com tetracloroplatinato(II) de potássio foram preparados conforme o método descrito na literatura³, misturando-se 5 mL de uma solução aquosa de K_2PtCl_4 (1,12 mmol) com 20 mL de uma solução etanólica da tiossemicarbazona desejada (1,12 mmol). A mistura foi levemente aquecida sob refluxo por 2h. Os sólidos obtidos foram filtrados e lavados com éter etílico, e secados a vácuo.

Os complexos de platina a partir do precursor $[PtCl_2(COD)]$, COD = ciclooctadieno foram preparados em proporção 1:1. O precursor (1 mmol) foi dissolvido em 5 mL de metanol sob leve aquecimento, até dissolver-se completamente. Em seguida, o ligante (1,5 mmol) desejado foi adicionado, mantendo-se a mistura sob agitação e temperatura ambiente durante 24h. Os sólidos foram lavados com etanol a quente e secados a vácuo.

2.2.4 - Síntese de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH) e de seus derivados *N(4)-metil* (H2Am4Me), *N(4)-etil* (H2Am4Et) e *N(4)-fenil* (H2Am4Ph).

As tiossemicarbazonas foram preparadas conforme método descrito a seguir². Em 30 mL de metanol seco adicionou-se 4 mmol de sódio metálico, sob agitação. Após a dissolução, acrescentou-se 24 mmol de 2-cianopiridina e a solução foi agitada por meia hora. Depois da redução de 2-cianopiridina, adicionou-se, em pequenas quantidades, durante 1/2h, 24 mmol da tiossemicarbazida desejada. A mistura foi deixada em refluxo por 4h e os sólidos obtidos foram filtrados, lavados com etanol e secados sob vácuo.

2.2.5 - Síntese dos complexos de cobre de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona e de seus derivados *N(4)-metil*, *N(4)-etil* e *N(4)-fenil*.

Os complexos de cobre foram obtidos a partir da reação entre 2 mmol de tiossemicarbazona desejada e 2 mmol de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, em etanol. A mistura resultante foi deixada em refluxo por 4h. Os sólidos obtidos foram filtrados, lavados com etanol e éter e secados sob vácuo.

2.3 - Testes Biológicos

2.3.1 - Atividade antimicrobiana

Os testes de inibição de crescimento foram realizados seguindo os padrões do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Cepas de bactérias *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* foram inoculadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 37° C por 18 a 24 h.

A efetividade antimicrobiana foi determinada por diluições sucessivas em tubos contendo 1 mL de BHI, os quais foram inoculados com 100 µL de cultura com turvação correspondente a 0.5 na escala de McFarland, em concentrações aproximadas de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 µg mL⁻¹ das substâncias testadas. Como controle positivo foi usada a bactéria no meio de cultura; no controle negativo foram usados a bactéria, o meio de cultura e o antibiótico amoxicilina ou tetraciclina. Após 20 horas de incubação em estufa a 37° C, foram feitas as análises da inibição e determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) do fármaco.

2.3.2 - Toxicidade em *Artemia salina*

Os testes foram realizados seguindo a metodologia encontrada na literatura e as normas da CETESB-SP.^{4, 5}

Incubação

Cerca de 500 mL de meio de cultura preparado com sal marinho sintético (Scientific Grade) 38 gL⁻¹ foram colocados em um recipiente retangular contendo uma divisória e parcialmente iluminado por uma lâmpada fluorescente. A solução salina foi oxigenada com o auxílio de um compressor de ar. Os cistos de *Artemia salina* foram colocados na área coberta com papel alumínio, para que os organismos vivos, após a eclosão, fossem atraídos pela luz do outro lado do recipiente. A incubação foi feita por um período de 48 horas, monitorando-se a temperatura durante todo ensaio.

Bio-ensaios

Após o período de incubação, os náuplios de *A. salina* foram expostos aos compostos de interesse por 48 horas. Foram utilizados tubos de ensaio graduados, em

⁴ B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, J.L. McLaughlin, J. Med. Plant Res. 45 (1982) 31.

⁵ I.A. Nascimento, M.M.S. Araújo, Ecotoxicol. Environ. Restor. 2 (1999) 41.

cinco concentrações feitas em triplicata, sendo repetidos no mínimo três experimentos. Com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur* foram colocadas 10 larvas de *Artemia* em cada tubo de ensaio. Em seguida, as soluções dos compostos a serem testadas foram adicionadas, mantendo-se a proporção de 1% de DMSO/solução salina, completando-se o volume com solução salina, para um volume final em cada frasco de 5 mL. Os testes para controle também foram feitos em triplicata, sendo repetidos no mínimo três experimentos utilizando uma solução de DMSO 1% diluído em solução salina.

Contagem

Após 48 horas de exposição, foi feita a contagem de náuplios vivos, considerados como vivos todos aqueles que apresentassem qualquer tipo de movimento quando observados próximos à fonte luminosa. Só foram considerados para controle os casos em que a mortalidade foi inferior a 20% da população.

Os resultados dos testes foram submetidos a um tratamento estatístico utilizando o programa PROBIT⁶, que forneceu os valores de DL₅₀ (dose letal para 50% da população) e os desvios padrão.

2.3.3 - Atividade Citotóxica

Foram empregadas na realização do projeto linhagens de células tumorais HepG2 originada de um hepatoma humano, HL60.bcl2 e Jurkat originadas de leucemia humana, UACC-62 originada de um tumor sólido de melanoma e A431 originada de um carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.

Preparo das soluções estoque

As soluções estoque das amostras selecionadas para a realização dos experimentos foram preparadas em DMSO na concentração 0,1 M (100 mM) e estocadas a -20° C. As amostras foram preparadas em DMSO a 20 mg mL⁻¹ e estocadas a -20° C.

Preparo das soluções de uso

As soluções estoque foram diluídas na proporção 1:200 para obtenção de soluções de uso de concentração 0,5 mM (500 µM).

Controles positivos

Selecionou-se a cisplatina como controle positivo para a realização dos experimentos indutores apoptóticos, a qual já possui seu mecanismo de ação bem caracterizado na literatura⁷ e é utilizada na terapia do câncer.

⁶ D.J. Finney, Probit Analysis, Cambridge University Press, Cambridge, 1971.

Avaliação da atividade citotóxica dos compostos

Após a contagem de células, a suspensão foi preparada de forma que 100 µL dessa suspensão contivessem 40.000 células (densidade de inóculo). Cada poço foi preenchido com 100 µL da suspensão de células, 20 µL de amostra (concentração em cada poço = 50 µM) ou do controle positivo e 80 µL de meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), utilizado para células Hep-G2, HL60 e Jurkat, enriquecido com 5% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina, estreptomicina e anfotericina (volume final do poço = 200 µL) ou o meio de cultura RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Instituto). Nos poços destinados ao controle de células, foram aplicados 100 µL da suspensão de células e 100 µL de meio DMEM ou RPMI-1640 enriquecido com 5% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina, estreptomicina e anfotericina. As amostras foram plaqueadas no poço após aproximadamente 24hs de prévia incubação das células (estabilização). A avaliação da proliferação celular foi realizada após 48hs de tratamento das células com as amostras, pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) descrito a seguir. Os testes foram realizados em triplicata, sendo repetidos no mínimo três experimentos independentes.

Ensaio de viabilidade metabólica - MTT

Os efeitos citotóxicos foram quantificados através do ensaio colorimétrico com o brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazolium (MTT). O MTT é um sal de coloração amarela capaz de captar elétrons em uma reação de oxi-redução, formando um produto de coloração roxa, insolúvel em água (Formazan)⁸. As células de glioblastoma na proporção de 500 células/poço foram cultivadas em placas de fundo plano de 96-poços e incubadas sob atmosfera de 5% CO₂/ 95% ar a 37°C por 24 horas para aderência. As células foram tratadas com diferentes concentrações das tiosemicarbazonas dissolvidas em DMSO. Depois de 48 horas de incubação a 37 °C, o MTT foi adicionado em cada poço e após mais 4 horas de incubação, adicionou-se dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver o Formazan precipitado. A absorbância das soluções resultante foi medida a 570 nm. A medida da absorbância é uma medida da viabilidade metabólica celular, sendo as duas grandezas diretamente proporcionais. Controles negativos usando DMSO foram feitos em paralelo.

⁷ E.R. Janieson, S.J. Lippard, Chem. Rev. 99 (1999) 2467-2498.

⁸ A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull et al. J Natl Cancer I 83 (1991) 757-766.

Avaliação da viabilidade e proliferação celular

Foi utilizada a metodologia descrita na literatura⁸, com modificações. Resumidamente, faltando 4 horas para o final do período de incubação das culturas, foram adicionados em cada poço 20 μL de uma solução de MTT (5mg mL^{-1}) em meio DMEM para células HepG2, preparada na hora do uso. Após as 4 horas de incubação, o conteúdo dos poços foi cuidadosamente retirado com pipeta multicanal e em cada poço foram adicionados 200 μL de uma solução de HCl 0,04M em isopropanol. Após solubilização dos cristais de formazan formados pela metabolização do MTT pelas células viáveis, as placas foram lidas em leitor de ELISA a um comprimento de onda de 590 nm.

Capítulo 3

Complexos de Pd(II) e Pt(II) de *N*(4)-*o*-toluil, *N*(4)-*m*-toluil e *N*(4)-*p*-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona e 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona

Complexos de Pd(II) e Pt(II) são alvo de muitos estudos na literatura devido à sua atividade citotóxica ou antitumoral ¹. Em trabalhos anteriores, nosso grupo demonstrou que complexos de paládio de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas apresentam atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais humanas MCF-7 (tumor mamário), TK-10 (tumor renal) e UACC-62 (melanoma) ². Recentemente a ação citotóxica de *N*(4)-*para* toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-formilpiridina, 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina foi verificada contra as mesmas linhagens celulares ³. No presente trabalho testamos a citotoxicidade destas tiossemicarbazonas e de seus complexos de Pd(II) e Pt(II) contra linhagens Hep-G2 (tumor hepático), UACC-62 (melanoma), A431 (carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço), HL60.bcl2 (leucemia humana, resistente a quimioterápicos) e Jurkat (leucemia humana).

As *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas livres foram caracterizadas anteriormente por outros pesquisadores de nosso grupo ⁴. A notação empregada será a seguinte: *N*(4)-*orto*, *N*(4)-*meta* e *N*(4)-*para* toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas: H2Ac4oT, H2Ac4mT, H2Ac4pT; *N*(4)-*orto*, *N*(4)-*meta* e *N*(4)-*para* toluil 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas: H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT. Essas tiossemicarbazonas apresentam-se na configuração *Z* ou *E* em relação à ligação C7=N2, conforme a figura 3.1. No isômero *Z* a parte formada por N3-CS-N4 aparece na posição *cis* com relação à piridina, facilitando a formação de ligação de hidrogênio entre N3-H e o nitrogênio heteroaromático. No isômero *E*, a piridina encontra-se em posição *trans* ao grupo N3-CS-N4 e, portanto não há a formação de ligação de hidrogênio.

¹ H. Beraldo, D. Gambino, Mini Rev. Med. Chem., 4 (2004) 159-165.

² A.P. Rebolledo, J.D. Ayala, G.M. de Lima, N. Marchini, G. Bombieri, C.L. Zani, E.M. Souza-Fagundes, H. Beraldo, Eur. J. Med. Chem., 40 (2005) 467-472.

³ MENDES, Isolda C. **Estudo do perfil farmacológico de tiossemicarbazonas derivadas de piridina e piridinoformamida**: Efeitos da coordenação a metais. Belo Horizonte: UFMG, 2007. 236-237. Tese (Doutorado) – Programa de pós – Química, Belo Horizonte, 2007.

⁴ I.C. Mendes, J.P. Moreira, N.L. Speziali, A.S. Mangrich, J.A. Takahashia, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc., 17 (2006) 1571-1577.

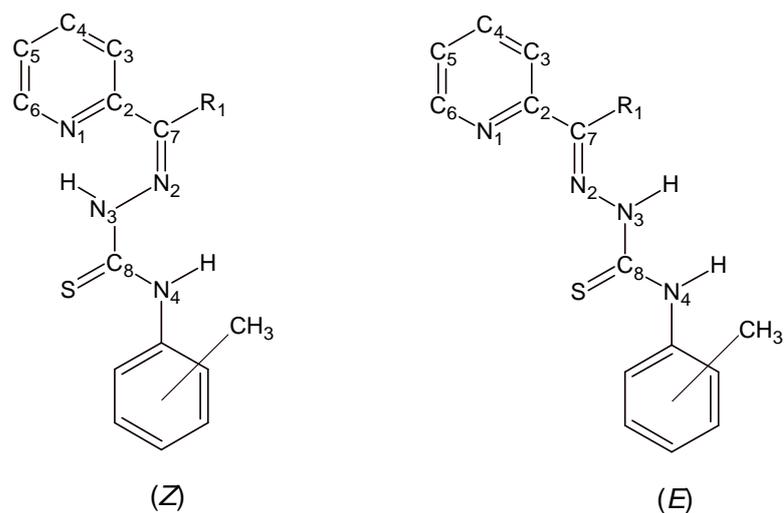


Figura 3. 1 – Isômeros configuracionais Z e E.

Uma série de seis complexos de Pd(II) e Pt(II) de *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas foi sintetizada utilizando diferentes sais de partida: K_2PdCl_4 , $[Pd(COD)Cl_2]$ e $[Pd(DMSO)_2Cl_2]$ no primeiro caso, e K_2PtCl_4 , $[Pt(COD)Cl_2]$ e $[Pt(DMSO)_2Cl_2]$ no segundo. No entanto, independentemente do sal de partida obtivemos os mesmos complexos.

Os compostos obtidos foram caracterizados através de análise elementar, condutividades molares, e por meio de seus espectros de infravermelho e RMN de 1H , ^{13}C , Cosy, HMQC e Dept 135. Foram obtidos monocristais de alguns complexos e a estrutura cristalina determinada por difração de Raios-X.

3.1- Caracterização dos complexos de Pd(II) e Pt(II) de *N*(4)-*o*-toluil, *N*(4)-*m*-toluil e *N*(4)-*p*-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazona e 2-benzoilpiridina tiossemicarbazona

Microanálises, cores, massas molares e condutividade molar

A Tabela 3.1.1 apresenta os rendimentos das reações assim como as cores, massas molares, análise elementar, condutividades molares e fórmulas moleculares propostas. Os resultados indicam a formação de complexos do tipo $[M(L)Cl]$, nos quais a tiossemicarbazona coordena-se na forma aniônica.

Tabela 3.1. 1 – Dados analíticos obtidos para os complexos de Pd(II) e Pt(II).

Composto	Rendimento (%)	Cor	MM g mol ⁻¹	Análise Elementar (%)*			Λ_M ($\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$) DMF~ $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L
				C	H	N	
1 [Pd(2Ac4oT)Cl]	87	Amarelo	425,24	42,11 (42,37)	3,27 (3,56)	12,70 (13,18)	5
2 [Pd(2Ac4mT)Cl]	85	Amarelo	425,24	42,22 (42,37)	3,61 (3,56)	12,89 (13,18)	4
3 [Pd(2Ac4pT)Cl]	85	Amarelo	425,24	41,81 (42,37)	3,61 (3,56)	12,98 (13,18)	15
4 [Pd(2Bz4oT)Cl]	76	Alaranjado	487,21	48,85 (49,29)	3,22 (3,52)	11,08 (11,50)	3
5 [Pd(2Bz4mT)Cl]	64	Amarelo	487,21	48,89 (49,29)	3,62 (3,52)	11,05 (11,50)	3
6 [Pd(2Bz4pT)Cl]	98	Alaranjado	487,21	46,45 (49,29)	3,87 (3,52)	10,90 (11,50)	18
7 [Pt(2Bz4oT)Cl]	63	Vinho	575,97	41,50 (41,71)	2,71 (2,97)	9,86 (9,73)	1
8 [Pt(2Bz4mT)Cl]	94	Marrom	575,97	41,39 (41,71)	3,03 (2,97)	9,78 (9,73)	16
9 [Pt(2Bz4pT)Cl]	68	Marrom	575,97	41,54 (41,71)	3,01 (2,97)	9,58 (9,73)	14,5

*Valores teóricos em parênteses

Espectros de Infravermelho

As atribuições das bandas no espectro infravermelho das tiossemicarbazonas e de seus complexos de Pd(II) estão apresentadas nas tabelas 3.1.2 e 3.1.3.

A banda atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$, que aparece entre 1594-1581 cm^{-1} nos espectros dos ligantes livres, desloca-se para 1598-1587 cm^{-1} nos espectros dos complexos de Pd(II), sugerindo a coordenação pelo nitrogênio N2. Uma banda de baixa intensidade atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{S})$ ocorre entre 849-821 cm^{-1} nos espectros dos ligantes livres enquanto que nos complexos a banda aparece entre 809-762 cm^{-1} , indicando a coordenação através do enxofre. O modo de deformação do anel da piridina no plano, observado entre 639-613 cm^{-1} nas tiossemicarbazonas livres, desloca-se para 673-636 cm^{-1} nos espectros dos complexos, sugerindo a coordenação através do átomo de nitrogênio heteroaromático. A coordenação do metal ao ligante também pode ser evidenciada pelo surgimento de novas bandas na região de baixa energia, que são atribuídas a ligações metal-ligante: 380-369 cm^{-1} , $\nu(\text{Pd}-\text{N})$; 349-331 cm^{-1} , $\nu(\text{Pd}-\text{S})$; 322-297 cm^{-1} , $\nu(\text{Pd}-\text{Cl})$; 254-248 cm^{-1} , $\nu(\text{Pd}-\text{Npy})$. Assim, as tiossemicarbazonas coordenam-se ao paládio através do sistema quelante Npy-N-S.

As figuras 3.2 e 3.3 mostram os espectros de H2Bz4mT e do complexo [Pd(2Bz4mT)Cl] (**5**).

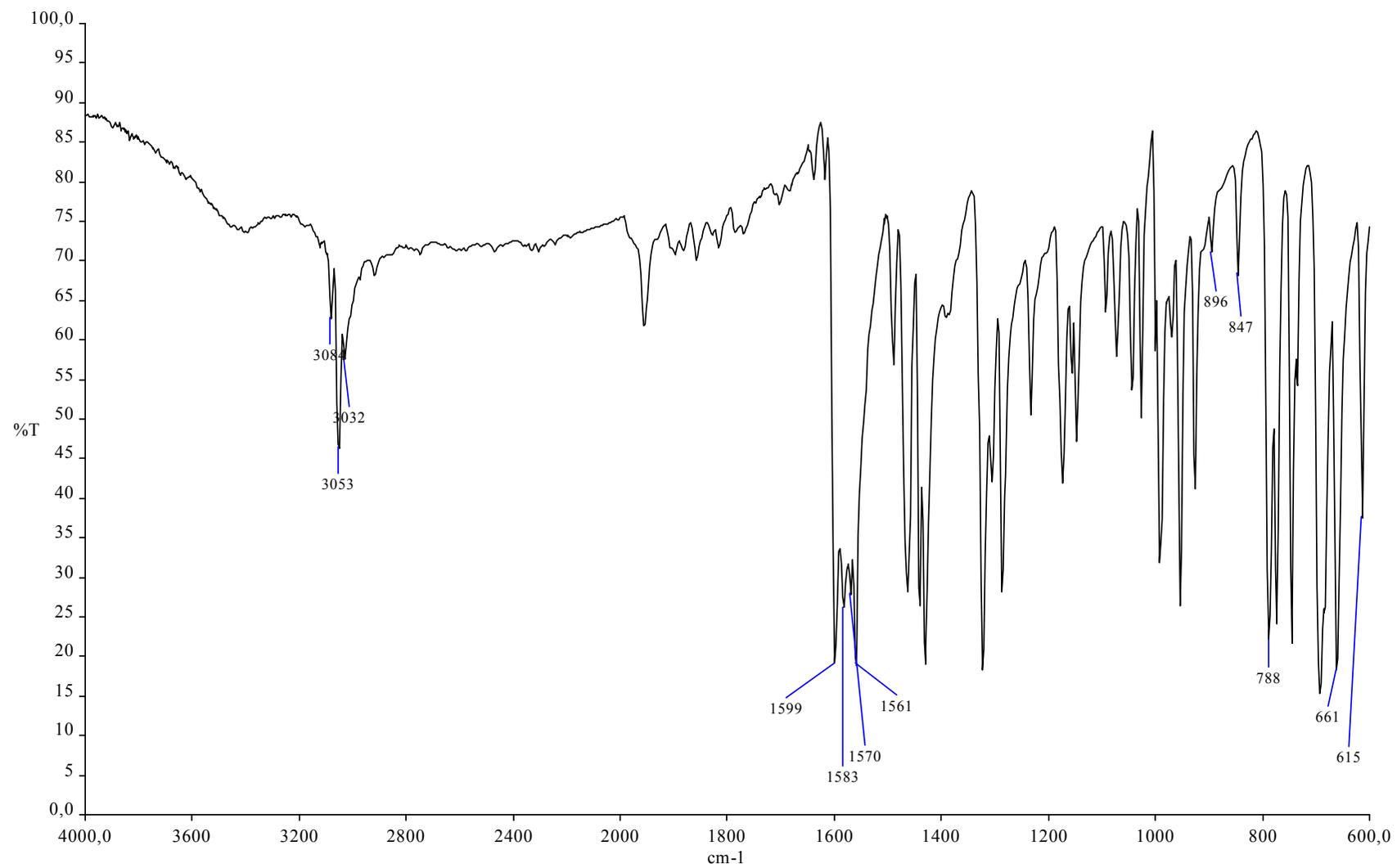


Figura 3. 2 - Espectro de infravermelho de H2Bz4oT na faixa de 4000 a 600 cm⁻¹, em KBr.

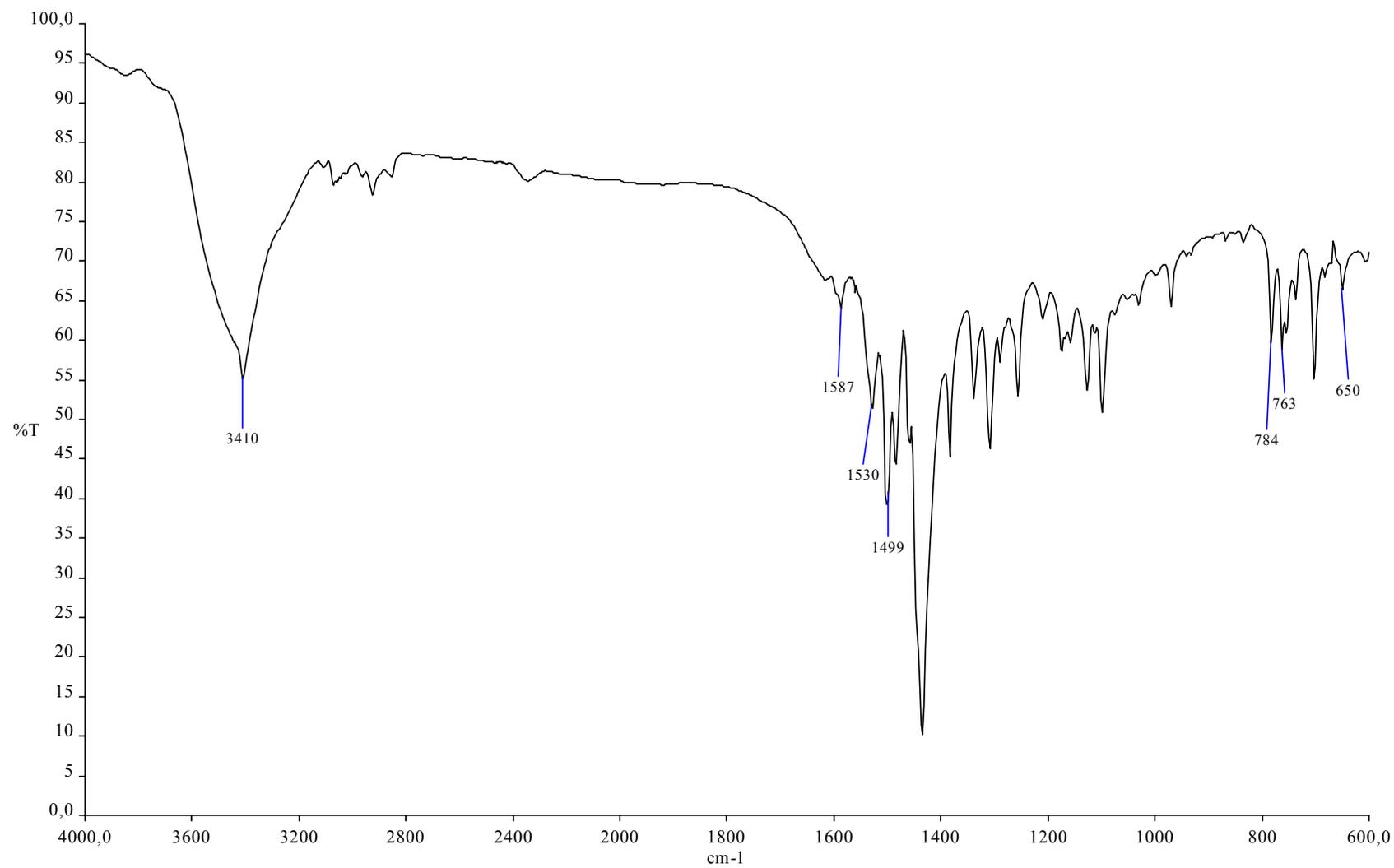


Figura 3. 3 - Espectro de infravermelho de [Pd(2Bz4oT)Cl] na faixa de 4000 a 600 cm⁻¹, em KBr.

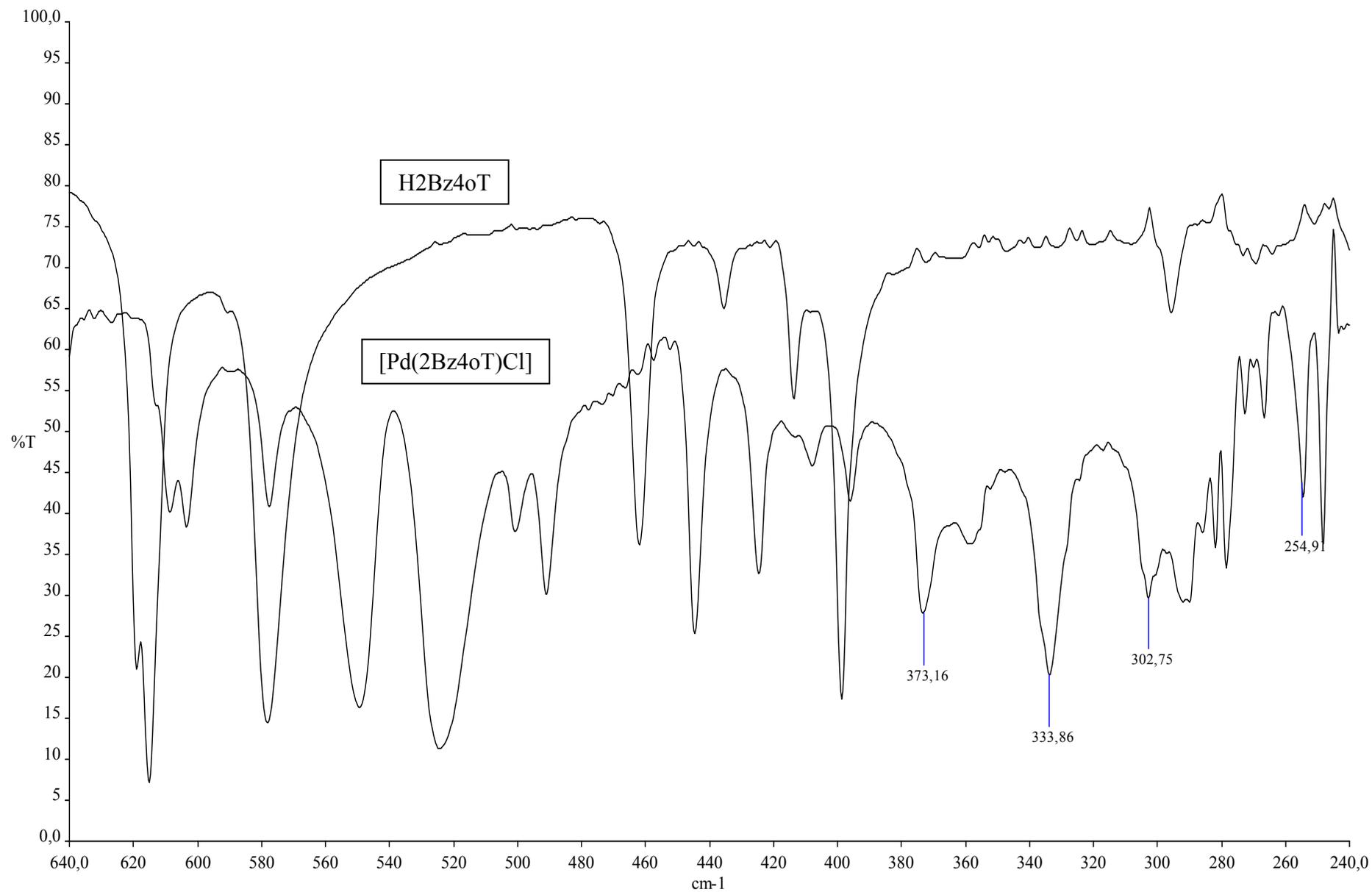


Figura 3. 4 - Espectro de infravermelho de [Pd(2Bz4oT)Cl] na faixa de 700 a 250 cm^{-1} , suporte CsI .

Tabela 3.1. 2 - Atribuições das principais bandas de infravermelho (cm^{-1}) de *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de Pd(II).

Composto		$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C}-\text{S})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{M}-\text{N})$	$\nu(\text{M}-\text{N}_{\text{py}})$	$\nu(\text{M}-\text{S})$	$\nu(\text{M}-\text{Cl})$
H2Ac4oT		1581F	822m	639f	-	-	-	-
(1)	[Pd(2Ac4oT)Cl]	1587m	762m	655f	373f	253f	345f	302f
H2Ac4mT		1590m	837m	632f	-	-	-	-
(2)	[Pd(2Ac4mT)Cl]	1594m	792f	665f	377f	254f	349f	322f
H2Ac4pT		1587m	821m	622f	-	-	-	-
(3)	[Pd(2Ac4pT)Cl]	1598m	768m	673f	380f	248f	347f	318f

m = média; f = fraca; F = forte

Tabela 3.1. 3 - Atribuições das principais bandas de infravermelho (cm^{-1}) de *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina e seus complexos de Pd(II).

Composto		$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C}-\text{S})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{M}-\text{N})$	$\nu(\text{M}-\text{N}_{\text{py}})$	$\nu(\text{M}-\text{S})$	$\nu(\text{M}-\text{Cl})$
H2Bz4oT		1583m	847m	615f	-	-	-	-
(4)	[Pd(2Bz4oT)Cl]	1587m	784f	650f	373f	255f	334m	303f
H2Bz4mT		1583m	846m	615f	-	-	-	-
(5)	[Pd(2Bz4mT)Cl]	1595m	778f	651f	375f	254f	335f	302f
H2Bz4pT		1594m	849m	613f	-	-	-	-
(6)	[Pd(2Bz4pT)Cl]	1595m	809f	636f	369f	254f	331m	297f

m = média; f = fraca; F = forte

Tabela 3.1. 4 - Atribuições das principais bandas de infravermelho (cm^{-1}) de *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina e seus complexos de Pt(II).

Composto		$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{C}-\text{S})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{M}-\text{N})$	$\nu(\text{M}-\text{N}_{\text{py}})$	$\nu(\text{M}-\text{S})$	$\nu(\text{M}-\text{Cl})$
H2Bz4oT		1583m	813m	615f	-	-	-	-
(7)	[Pt(2Bz4oT)Cl]	1615mf	777f	701f	380f	257m	343m	303mf
H2Bz4mT		1583m	846m	615f	-	-	-	-
(8)	[Pt(2Bz4mT)Cl]	1595m	781m	642f	384f	278m	350m	302f
H2Bz4pT		1594m	849m	613f	-	-	-	-
(9)	[Pt(2Bz4pT)Cl]	1603m	753m	682f	384f	280m	350f	304f

m = média; f = fraca; F = forte;

Nos espectros dos complexos de Pt(II) podemos observar características semelhantes às dos complexos de Pd(II). A banda atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$, que aparece na região entre $1594\text{-}1583\text{ cm}^{-1}$ nas tiossemicarbazonas livres, sofre um deslocamento para $1603\text{-}1594\text{ cm}^{-1}$ nos complexos, indicando a coordenação através do nitrogênio imínico. A banda característica do estiramento C-S desloca-se da região de $846\text{-}813\text{ cm}^{-1}$ nos ligantes livres para $820\text{-}753\text{ cm}^{-1}$ nos complexos; a ligação torna-se mais fraca devido à coordenação do metal pelo átomo de enxofre de tiolato. O modo de deformação do anel da piridina no plano, que aparece em $615\text{-}613\text{ cm}^{-1}$ nas tiossemicarbazonas livres, desloca-se para $682\text{-}642\text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos, sugerindo outro ponto de coordenação do metal através do nitrogênio heteroaromático. As bandas que surgem na região de baixa energia são atribuídas aos estiramentos $\nu(\text{M}-\text{N})$ em $384\text{-}380\text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{M}-\text{Npy})$ em $280\text{-}257\text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{M}-\text{S})$ em $350\text{-}342\text{ cm}^{-1}$ e $\nu(\text{M}-\text{Cl})$ em $304\text{-}302\text{ cm}^{-1}$.

Espectros de RMN

Os sinais nos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135 das tiossemicarbazonas e seus complexos de Pd(II) e Pt(II) encontram-se nas Tabelas 3.1.5 a 3.1.10. Nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de 2-benzoilpiridina *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas (DMSO- d_6) os sinais de hidrogênio e carbono aparecem duplicados, indicando a presença dos sinais dos isômeros *E* e *Z*, porém em maior proporção do isômero *Z* (~70%). Já nos espectros de 2-acetilpiridina *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas os sinais predominantes são do isômero *E* (~96%), dificultando a atribuição dos sinais para o isômero *Z*.

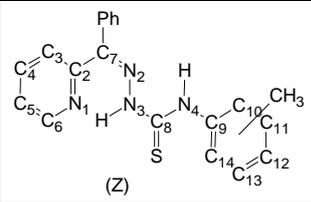
Ao analisar os sinais dos espectros dos complexos, verifica-se a presença de um único sinal para os hidrogênios e carbonos, característico das tiossemicarbazonas na configuração *E*. Em todos os complexos os sinais de hidrogênio da piridina deslocam-se em relação às suas posições nas tiossemicarbazonas livres, indicando a coordenação através do nitrogênio heteroarômico. Além disso, a ausência do sinal de hidrogênio do N3-H confirma que as tiossemicarbazonas encontram-se sob a forma aniônica nos complexos.

Nas Figuras 3.5 e 3.6 encontram-se os espectros de ^1H RMN de ligante H2Bz4mT e seu complexo.

Tabela 3.1. 5 - Atribuições, número de hidrogênios (n°), deslocamentos químicos (δ ppm) e multiplicidade (M) dos sinais de RMN de ^1H de *N*(4)-*o*-toluil, *N*(4)-*m*-toluil e *N*(4)-*p*-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de Pd(II) (DMSO- d_6).

	Atribuições (M)						
	n°						
Composto	H3 (d) 1	H4 (t) 1	H5 (t) 1	H6 (d) 1	N(3)H (s) 1	N(4)H (s) 1	H15 (s) 3
H2Ac4oT	8,59	7,79	7,39	8,59	10,65	10,08	2,26
[Pd(2Ac4oT)Cl] (1)	7,84	8,21	7,60	8,56	-	9,766	2,28
H2Ac4mT	8,53	7,82	7,40	8,61	10,63	10,13	2,33
[Pd(2Ac4mT)Cl] (2)	7,94	8,21	7,48	8,60	-	10,15	2,29
H2Ac4pT	8,54	7,81	7,39	8,61	10,61	10,13	2,32
[Pd(2Ac4pT)Cl] (3)	7,93	8,20	7,69	8,59	-	10,15	2,62

Tabela 3.1. 6 - Atribuições, número de hidrogênios (n°), deslocamentos químicos (δ ppm) e multiplicidade (M) dos sinais de RMN de ^1H de $N(4)$ -*o*-toluil, $N(4)$ -*m*-toluil e $N(4)$ -*p*-toluil 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de Pd(II) (DMSO- d_6).

		Atribuições (M)						
		n°						
Composto		H3 (d) 1	H4 (t) 1	H5 (t) 1	H6 (d) 1	N(3)H (s) 1	N(4)H (s) 1	H15 (s) 3
H2Bz4oT	Z	7,28	8,05	7,64	8,89	12,98	10,21	2,27
	E	8,73	7,89	7,40	8,48	10,46	8,98	2,23
[Pd(2Bz4oT)Cl] (4)		7,21	8,05	7,65	8,65	-	9,85	2,17
H2Bz4mT	Z	7,26	8,03	7,62	8,88	13,13	10,23	2,33
	E	8,68	7,90	7,57	8,48	10,50	8,99	2,34
[Pd(2Bz4mT)Cl] (5)		7,22	8,08	7,68	8,69	-	10,20	2,04
H2Bz4pT	Z	7,43	8,03	7,62	8,88	13,03	10,22	2,31
	E	8,66	7,92	7,58	8,45	10,48	8,93	2,32
[Pd(2Bz4pT)Cl] (6)		7,29	8,10	7,71	8,69	-	10,24	2,18

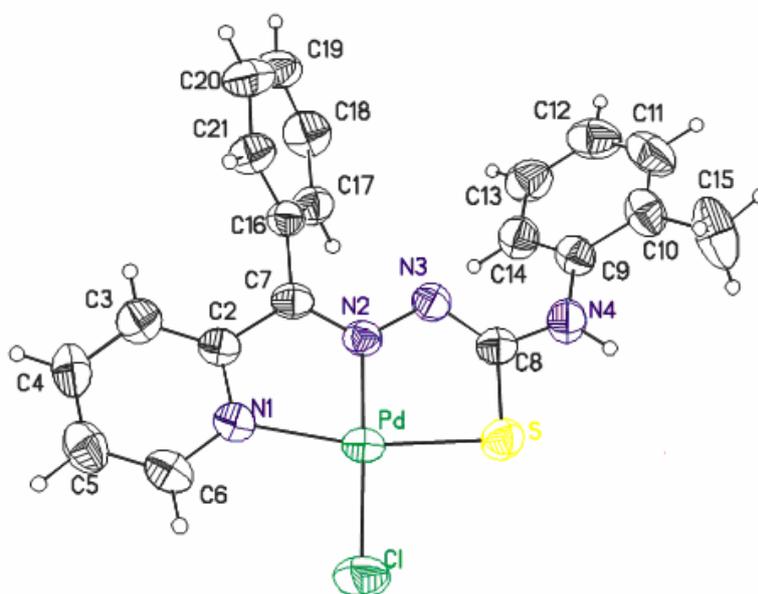
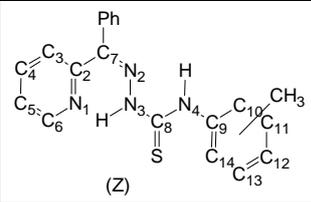


Tabela 3.1. 7 - Atribuições, número de hidrogênios (n°), deslocamentos químicos (δ ppm) e multiplicidade (M) dos sinais de RMN de ^1H de $N(4)$ -o-toluil, $N(4)$ -m-toluil e $N(4)$ -p-toluil 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de Pt(II) (DMSO- d_6).

		Atribuições (M)						
		n°						
Composto		H3 (d) 1	H4 (t) 1	H5 (t) 1	H6 (d) 1	N(3)H (s) 1	N(4)H (s) 1	H15 (s) 3
H2Bz4oT	Z	7,28	8,05	7,64	8,89	12,98	10,21	2,27
	E	8,73	7,87	7,40	8,48	10,46	8,98	2,23
[Pt(2Bz4oT)Cl] (7)		7,22	8,05	7,71	8,87	-	9,92	2,18
H2Bz4mT	Z	7,26	8,03	7,62	8,88	13,13	10,23	2,33
	E	8,68	7,90	7,57	8,48	10,50	8,99	2,34
[Pt(2Bz4mT)Cl] (8)		7,60	8,10	7,77	8,92	-	10,29	2,04
H2Bz4pT	Z	7,44	8,03	7,62	8,88	13,03	10,22	2,31
	E	8,66	7,92	7,58	8,47	10,48	8,93	2,32
[Pt(2Bz4pT)Cl] (9)		7,37	8,07	7,72	8,88	-	9,93	2,19

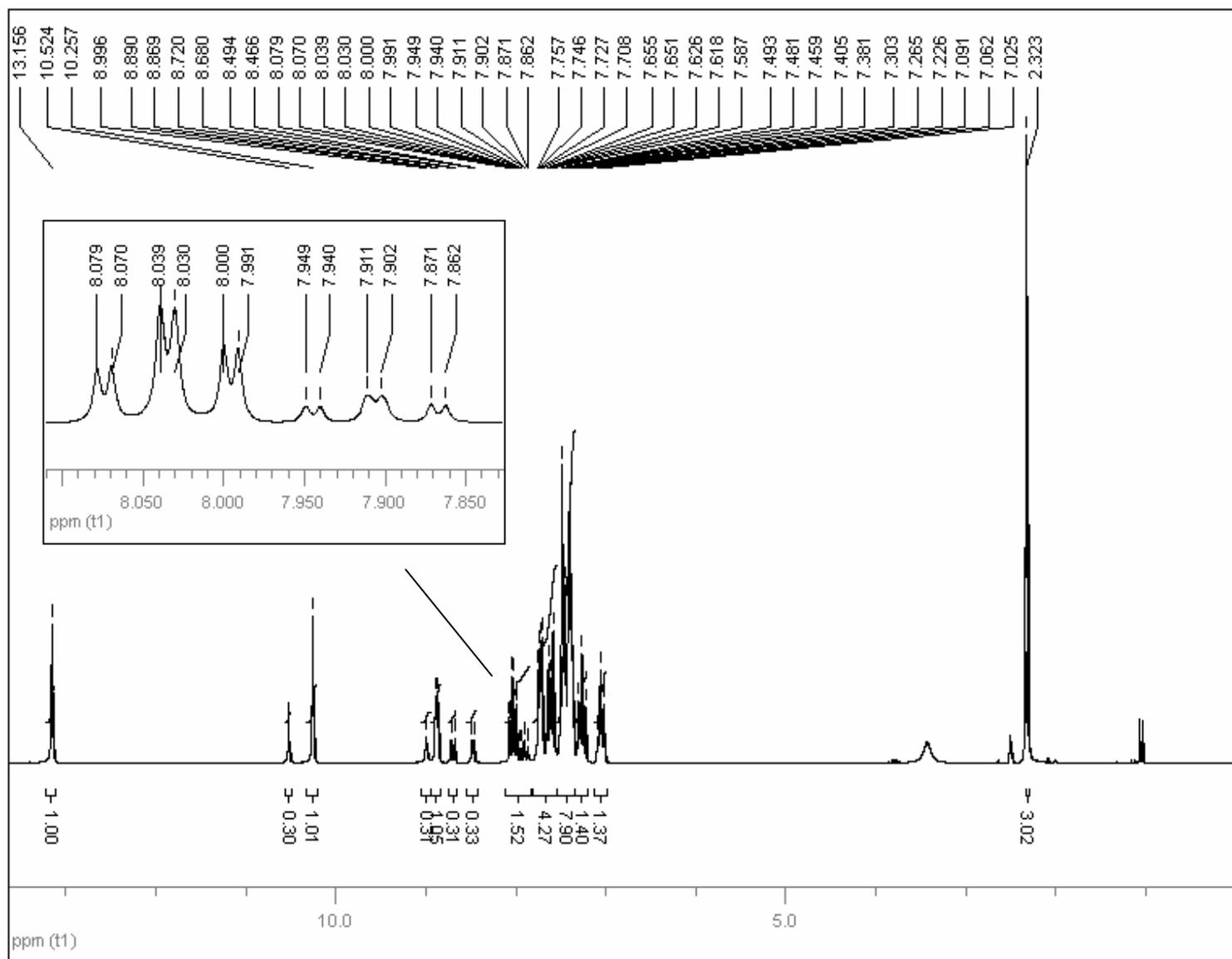


Figura 3. 5 – Espectro de RMN de ^1H do ligante $\text{H}_2\text{Bz}_4\text{mT}$.

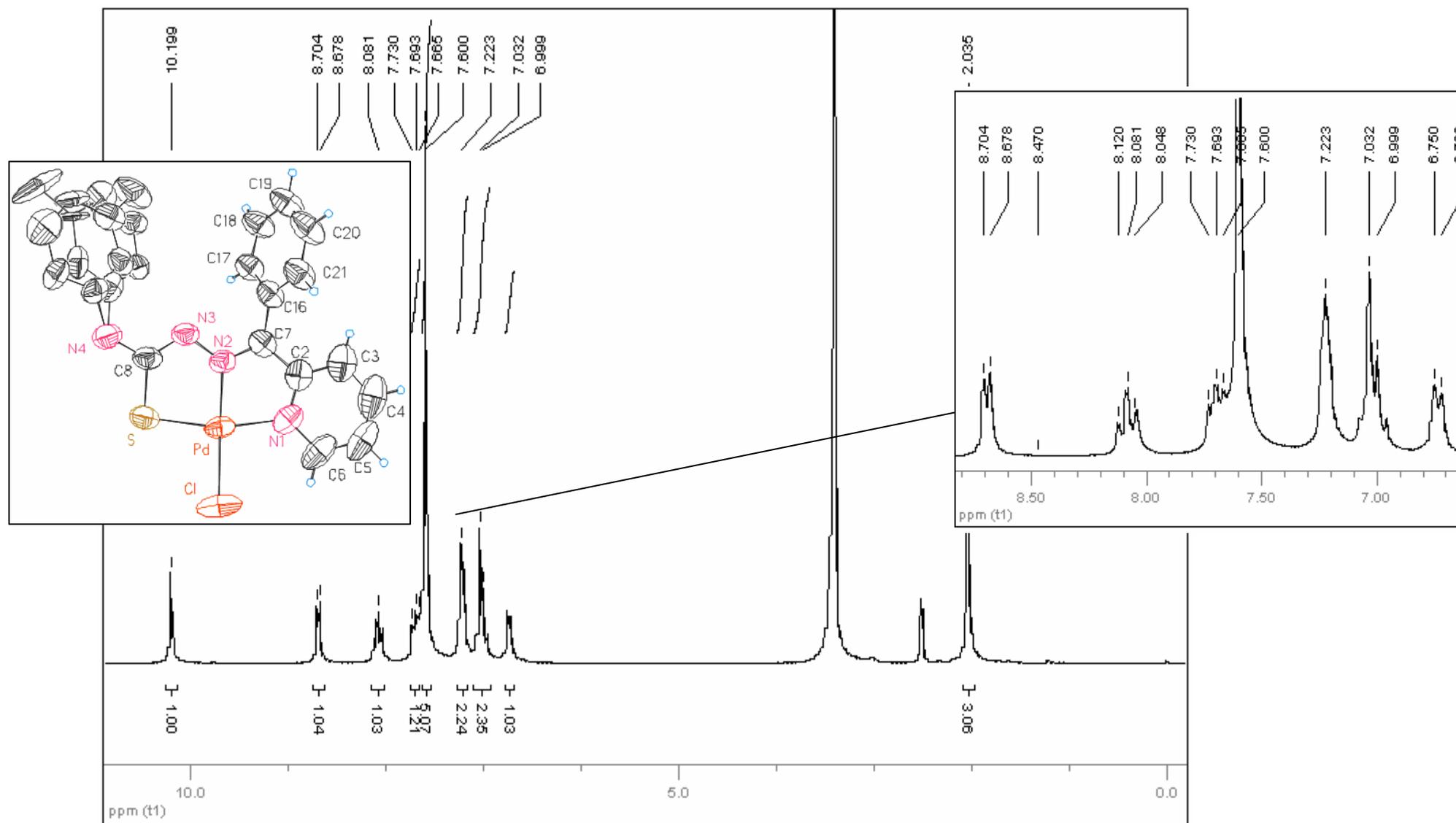


Figura 3. 6 – Espectro de RMN de ^1H do complexo $[\text{Pd}(\text{2Bz4mT})\text{Cl}]$ (5).

Em seguida, os sinais observados nos espectros de RMN de ^{13}C são apresentados para os mesmos compostos.

Tabela 3.1. 8 - Atribuições e deslocamentos químicos (δ ppm) dos sinais de RMN de ^{13}C de *N*(4)-*o*-toluil, *N*(4)-*m*-toluil e *N*(4)-*p*-toluil 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de Pd(II). (DMSO- d_6).

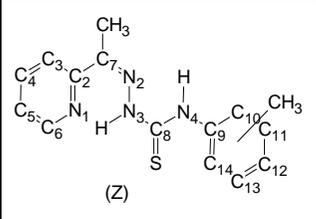
	Atribuições							
	C2	C3	C4	C5	C6	C7=N	C8=S	C16
H2Ac4oT	154,59	121,11	136,23	123,93	148,36	148,58	177,90	12,55
[Pd(2Ac4oT)Cl] (1)	158,26	125,05	140,95	126,62	147,83	156,65	178,50	13,15
H2Ac4mT	154,51	121,25	136,52	124,11	148,46	149,70	177,15	12,49
[Pd(2Ac4mT)Cl] (2)	157,77	116,73	140,65	120,10	147,57	147,60	168,95	13,45
H2Ac4pT	154,52	121,19	136,31	124,02	148,42	148,97	177,26	12,47
[Pd(2Ac4pT)Cl] (3)	158,47	119,89	137,83	127,63	148,38	157,95	178,56	13,71

Tabela 3.1. 9 - Atribuições e deslocamentos químicos (δ ppm) dos sinais de RMN de ^{13}C de *N*(4)-*o*-toluil, *N*(4)-*m*-toluil e *N*(4)-*p*-toluil 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de Pd(II) (DMSO- d_6).

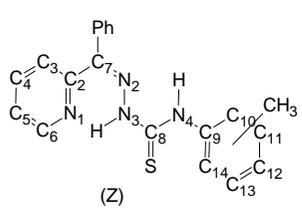
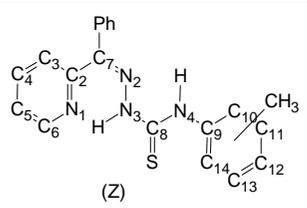
		Atribuições							
Composto		C2	C3	C4	C5	C6	C7=N	C8=S	C15
H2Bz4oT	Z	151,28	126,13	138,16	126,01	148,83	143,52	177,20	17,75
	E	154,35	121,98	136,42	124,95	148,53	149,22	176,96	17,72
[Pd(2Bz4oT)Cl] (4)		158,48	125,86	138,04	129,51	148,18	155,20	166,55	17,76
H2Bz4mT	Z	151,38	126,26	138,70	125,05	148,85	143,69	176,36	20,96
	E	154,32	122,11	136,52	124,13	148,59	149,53	176,21	20,96
[Pd(2Bz4mT)Cl] (5)		158,16	126,73	141,05	126,61	157,83	148,43	175,16	21,31
H2Bz4pT	Z	151,40	125,26	138,29	125,26	148,89	143,70	176,52	20,62
	E	154,37	122,80	136,48	124,12	148,63	149,56	176,34	20,62
[Pd(2Bz4pT)Cl] (6)		153,78	126,54	141,91	126,45	148,32	146,99	176,13	21,23

Tabela 3.1. 10 - Atribuições e deslocamentos químicos (δ ppm) dos sinais de RMN de ^{13}C de *N*(4)-*o*-toluil, *N*(4)-*m*-toluil e *N*(4)-*p*-toluil 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas e seus complexos de Pt(II) (DMSO- d_6).

		Atribuições							
Composto		C2	C3	C4	C5	C6	C7=N	C8=S	C15
H2Bz4oT	Z	151,28	126,13	138,16	126,01	148,83	143,52	177,20	17,75
	E	154,35	121,98	136,42	124,95	148,53	149,22	176,96	17,72
[Pt(2Bz4oT)Cl] (7)		158,13	127,61	141,64	126,66	147,60	142,86	169,51	17,63
H2Bz4mT	Z	151,38	126,26	138,70	125,05	148,85	143,69	176,36	20,96
	E	154,32	122,11	136,52	124,13	148,59	149,53	176,21	20,96
[Pt(2Bz4mT)Cl] (8)		159,12	127,19	140,72	127,10	146,77	158,06	178,25	21,17
H2Bz4pT	Z	151,40	125,26	138,29	125,26	148,89	143,70	176,52	20,62
	E	154,37	122,80	136,48	124,12	148,63	149,56	176,34	20,62
[Pt(2Bz4pT)Cl] (9)		160,55	127,58	141,56	126,64	149,26	141,68	179,68	18,58

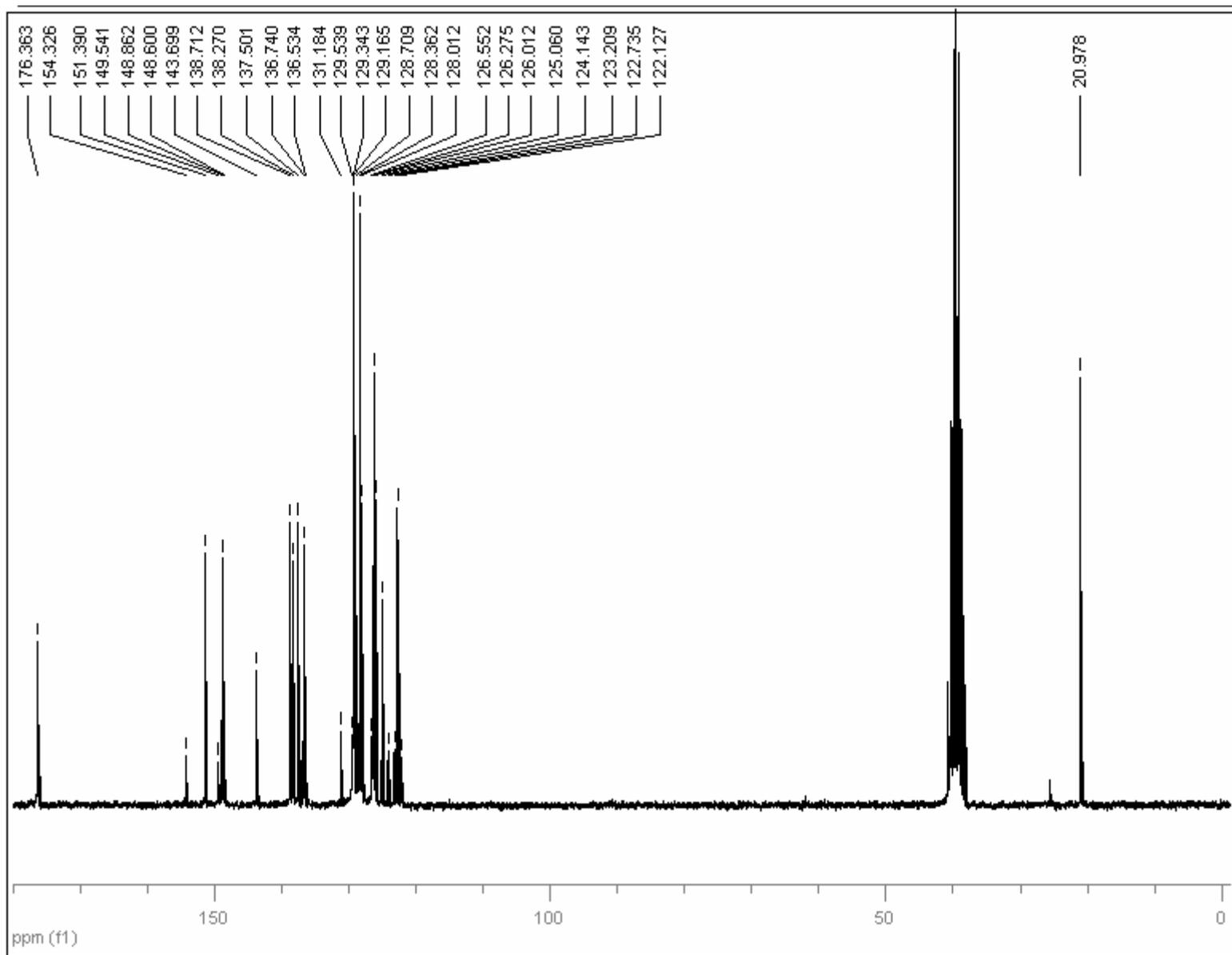


Figura 3. 7 – Espectro de RMN de ^{13}C para o ligante H2Bz4mT.

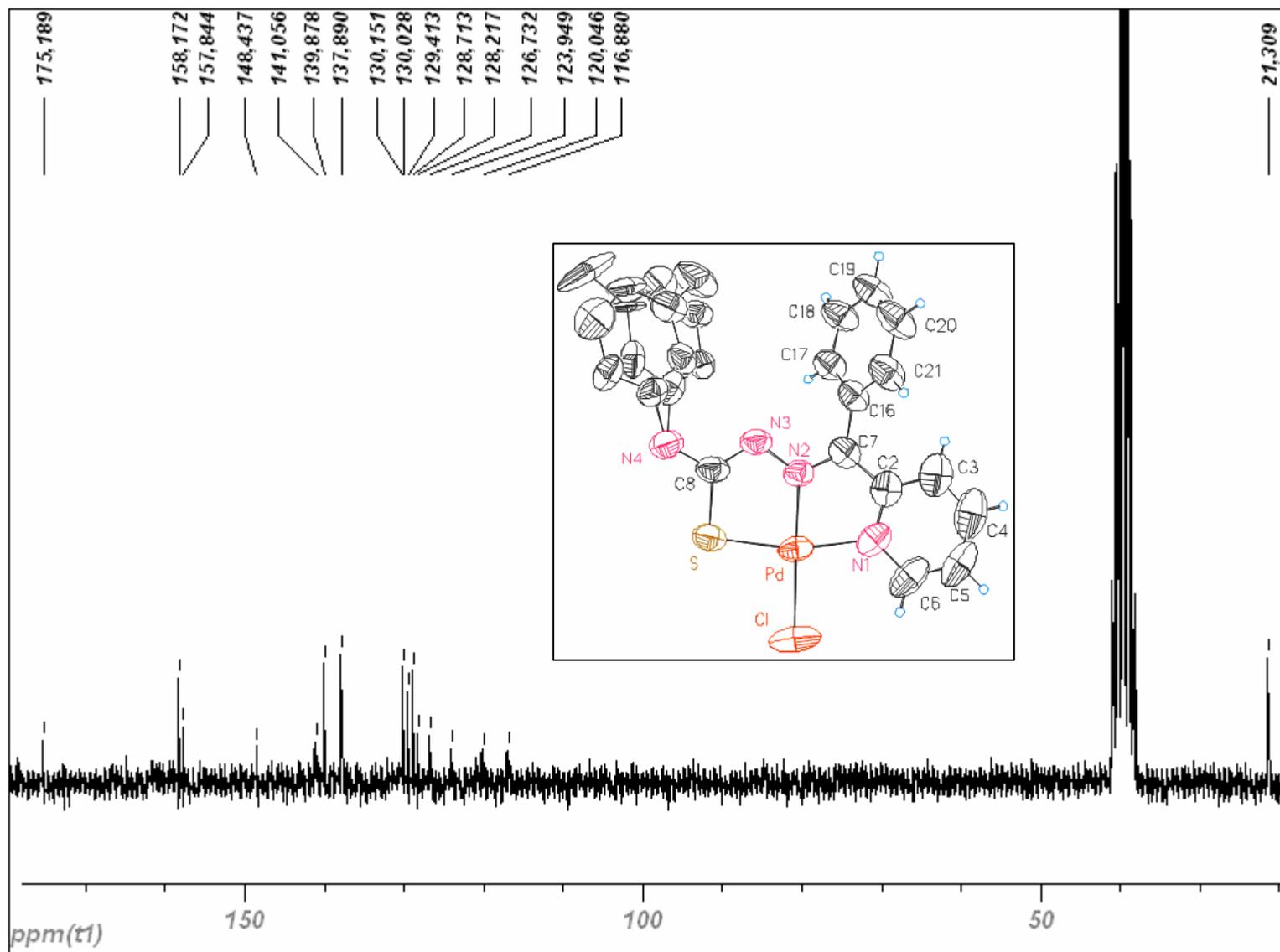


Figura 3. 8 – Espectro de RMN de ^{13}C para o complexo $[\text{Pd}(\text{2Bz4mT})\text{Cl}]$ (5).

3.2- Estruturas Cristalográficas

Foram determinadas estruturas cristalográficas dos complexos $[\text{Pd}(\text{2Bz4oT})\text{Cl}]\cdot\text{DMSO}$ (**4**) $[\text{Pd}(\text{2Bz4mT})]\cdot\text{DMSO}$ (**5**) e $[\text{Pd}(\text{2Bz4pT})]\cdot\text{DMSO}$ (**6**), obtidos por difusão lenta em uma solução de DMSO/acetona. Para as determinações estruturais foi utilizado um difratômetro KappaCCD11.

Os dados cristalográficos e de refinamento para os complexos estão apresentados na tabela 3.2.1. As figuras 3.9 - 3.11 mostram o diagrama Ortep para as estruturas cristalográficas dos complexos.

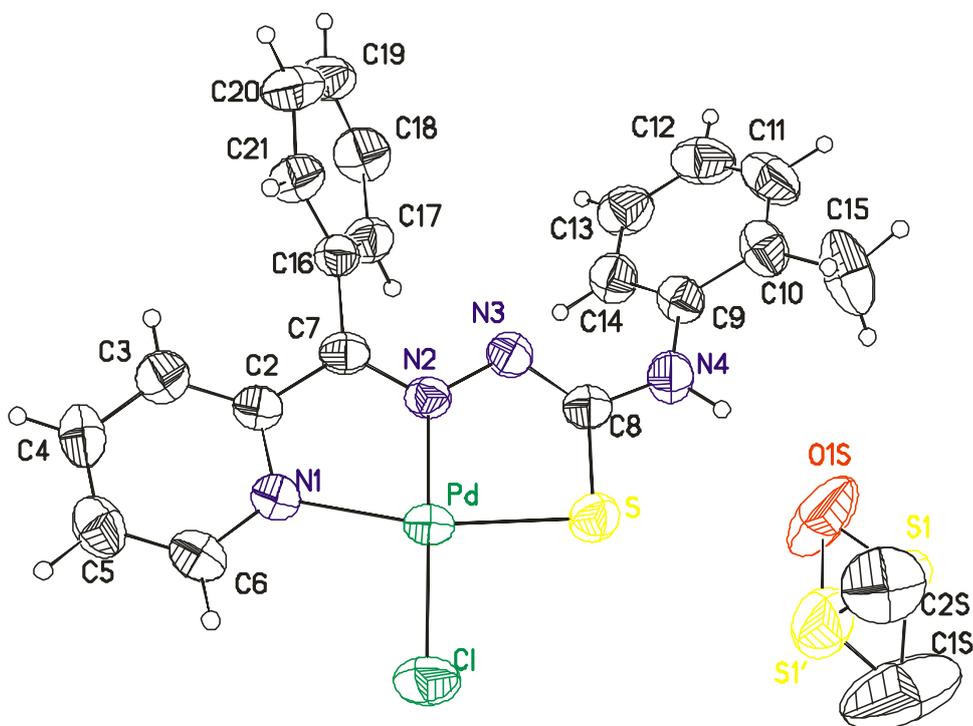


Figura 3. 9 – Diagrama ORTEP do complexo $[\text{Pd}(\text{2Bz4oT})\text{Cl}]\cdot\text{DMSO}$ (**4**).

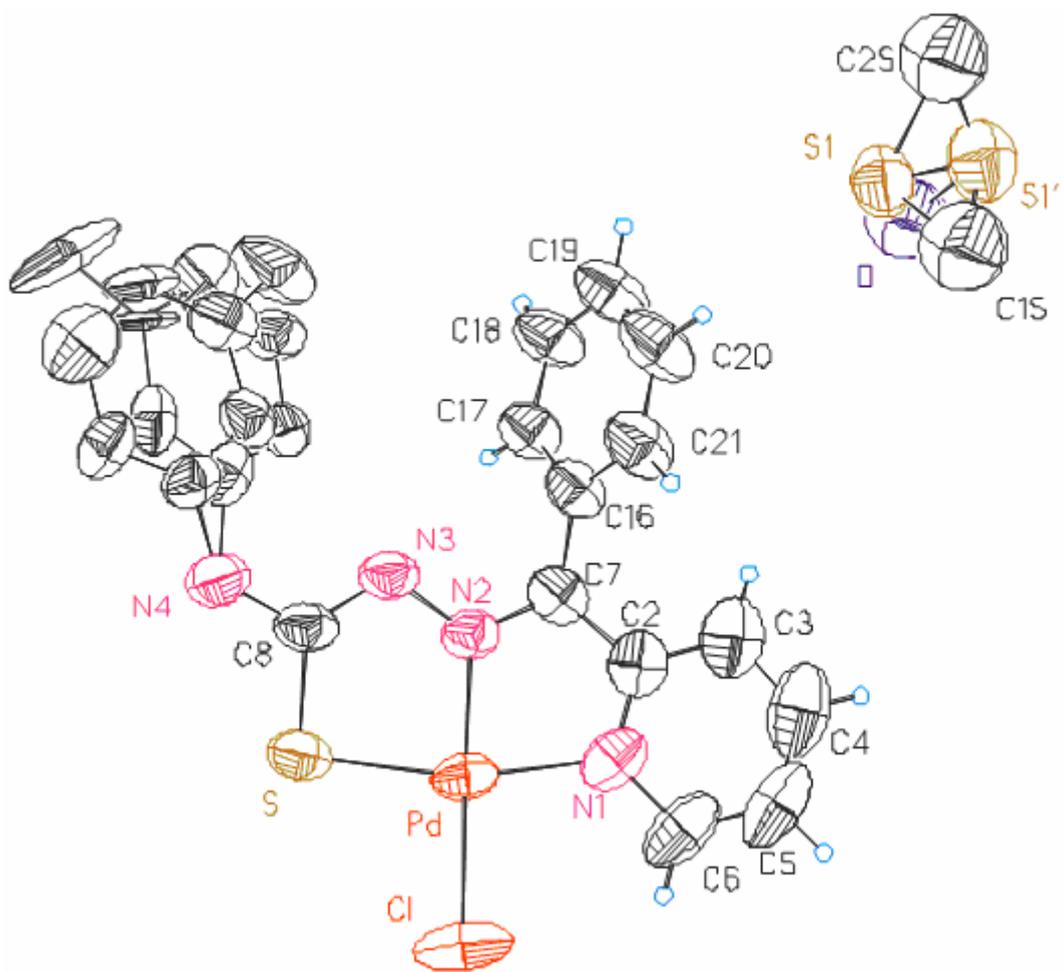


Figura 3. 10 – Diagrama ORTEP do complexo [Pd(2Bz4mT)Cl]·DMSO (5).

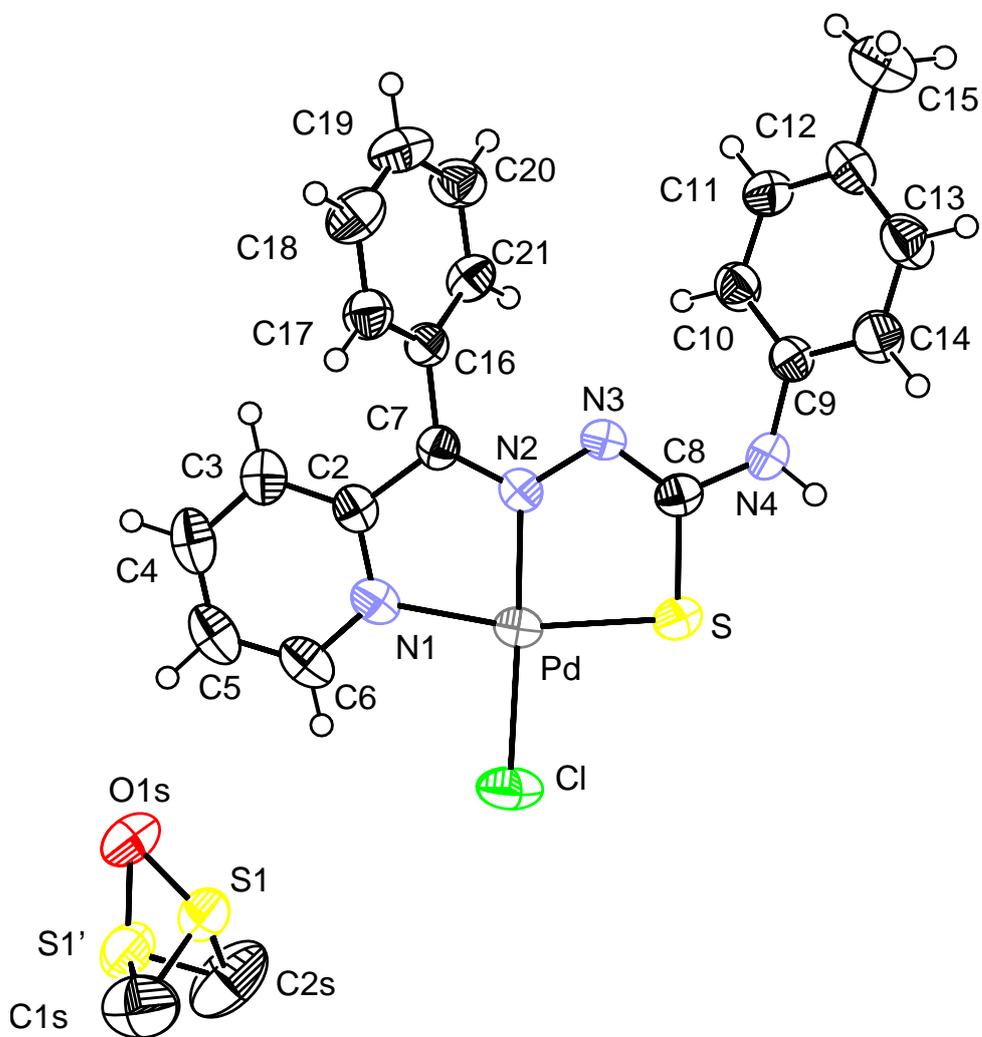


Figura 3. 11 – Diagrama ORTEP do complexo $[Pd(2Bz4pT)Cl] \cdot DMSO$ (**6**).

Tabela 3.2.1 – Resumo da coleção de dados e refinamento dos complexos [Pd(2Bz4oT)Cl].DMSO (4), [Pd(2Bz4mT)Cl].DMSO (5) e [Pd(2Bz4pT)Cl].DMSO (6).

Complexos	(4)	(5)	(6)
Fórmula empírica	$C_{22} H_{17} Cl N_4 O Pd S_2$		
Massa molar (g.mol ⁻¹)	559.37	564.41	565.41
Cor	Alaranjado	Alaranjado	Alaranjado escuro
Dimensões do cristal	0.3 x 0.2 x 0.2 mm ³	0.3 x 0.2 x 0.2 mm ³	0.30 x 0.20 x 0.15
Temperatura (K)	298(2)	293(2)	293(2)
Radiação, λ (Å)	0.71073	0.71073	0.71073
Intervalo de θ (°)	1.90 a 25.00	1.96 a 25.50	1.99 to 20.03
Intervalos de hkl	-1 ≤ h ≤ 14, -1 ≤ k ≤ 19, -15 ≤ l ≤ 14	-1 ≤ h ≤ 14, -1 ≤ k ≤ 21, -15 ≤ l ≤ 14	-1 ≤ h ≤ 11, -1 ≤ k ≤ 17, -11 ≤ l ≤ 11
Sistema cristalino	P2(1)/c	P2(1)/n	P2(1)/n
Grupo espacial	monoclínico	monoclínico	monoclínico
a (Å)	11.7840(10)	11.9120(10)	11.957(2)
b (Å)	16.619(2)	17.6230(10)	17.7370(10)
c (Å)	13.2450(10)	12.666(2)	12.307(2)
α (°)	90	90	90
β (°)	114.380(10)	115.720(10)	115.340(10)
γ (°)	90	90	90
Volume (Å ³)	2362.6(4)	2395.5(4)	2359.0(6)
Z	4	4	4
F(000)	1120	1140	1144
Densidade calculada (Mg.m ⁻³)	1.573	1.565	1.592
Coefficiente de absorção μ (mm ⁻¹)	1.097	1.082	1.099
Reflexões coletadas	5093	5487	2861
Reflexões únicas/ R(int)	4105 / 0.0391	4453 / 0.0341	2212 / 0.0304
Parâmetros refinados/ restrições	289 / 0	309 / 0	275 / 0
R [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0436, wR2 = 0.1250	R1 = 0.0522, wR2 = 0.1462	R1 = 0.0370, wR2 = 0.0927
R (all)	R1 = 0.0578, wR2 = 0.1377	R1 = 0.0831, wR2 = 0.1703	R1 = 0.0484, wR2 = 0.1000
S	0.984	1.079	1.062
$\Delta\rho$ min/max (e.Å ³)	-0.594 / 0.551	-0.497 / 0.707	-0.407 / 0.734

O complexo [Pd(2Bz4oT)Cl].DMSO (**4**) cristaliza-se no grupo espacial P2(1)/c, enquanto que [Pd(2Bz4mT)Cl].DMSO (**5**) e [Pd(2Bz4pT)Cl].DMSO (**6**) cristalizam-se no grupo espacial P2(1)/n. Nos três complexos o ligante encontra-se na conformação *EZ* em relação às ligações C7=N2 e C8=N3. Em todas as estruturas o número de coordenação do metal é igual a quatro. A ligação da tiossemicarbazona ao metal ocorre através do nitrogênio da piridina, do nitrogênio imínico e do enxofre; o quarto sítio de coordenação é ocupado por um cloreto.

Pesquisadores de nosso grupo determinaram anteriormente a estrutura de *N*(4)-*p*-toluil-2-benzoilpiridina tiossemicarbazona (H2Bz4pT)⁴. Distâncias e ângulos de ligação selecionados para H2Bz4pT e seu complexo [Pd(2Bz4pT)Cl] (**6**) encontram-se na tabela 3.2. 3. Na tiossemicarbazona livre a distância C8-S é de 1,650 Å. No complexo esta distância é 1,755 Å, em razão da mudança na ordem da ligação, que tem caráter de dupla no ligante e um caráter predominantemente de ligação simples no complexo, já que ocorre desprotonação em N(3), com a formação de um sistema extensamente deslocalizado envolvendo a cadeia da tiossemicarbazona e o anel da piridina. Do mesmo modo as ligações N2-C7 e N2-N3 adquirem maior caráter de simples, passando de 1,293 Å e 1,351 Å respectivamente na tiossemicarbazona para 1,309 Å e 1,371 Å respectivamente no complexo. A ligação N3-C8 passa de 1,360 Å no ligante para 1,318 Å no complexo, em razão da mudança de uma ligação simples em H2Bz4pT para uma ligação com caráter predominante de dupla em **6**.

Os ângulos de ligação da tiossemicarbazona sofrem igualmente importantes variações pela complexação ao paládio. Assim, o ângulo N2-N3-C8 passa de 120,5 ° em H2Bz4pT a 111,5 ° no complexo (**6**); N3-C8-S passa de 117,9 ° em H2Bz4pT a 126,2 ° em **6**; N4-C8-S passa de 120,6 ° em H2Bz4pT a 115,1 ° em **6**, e C7-N2-N3 de 132,3 ° em H2Bz4pT a 127,4 ° em **6**, em consequência da coordenação e passagem do ligante da conformação *ZE* para a conformação *EZ* no complexo, para atender aos requerimentos espaciais da coordenação ao paládio. As distâncias e ângulos de ligação nos três complexos de paládio são muito semelhantes, como esperado. Os ângulos de ligação são praticamente os mesmos, a não ser os ângulos C8-N4-C9 e N2-Pd-Cl. As distâncias N4-C9 são diferentes nos três complexos, como consequência das diferentes posições de ligação do grupo metila no substituinte *N*(4)-toluil. Algumas variações são observadas entre os três compostos nas distâncias Pd-N1, Pd-S, N2-C7 e N2-N3.

Tabela 3.2. 2 - Distâncias (Å) e ângulos (°) selecionados de [Pd(2Bz4oT)Cl].DMSO (4), [Pd(2Bz4mT)Cl].DMSO (5) e [Pd(2Bz4pT)Cl].DMSO (6). Desvio padrão entre parênteses.

Átomos	Distancias (Å)		
	(4)	(5)	(6)
Pd-N2	1.952(3)	1.959(4)	1.960(4)
Pd-N1	2.069(4)	2.051(5)	2.050(4)
Pd-S	2.242(1)	2.243(2)	2.250(1)
Pd-Cl	2.290(1)	2.292(2)	2.296(2)
S-C8	1.751(4)	1.754(6)	1.755(5)
C2-C7	1.469(6)	1.462(9)	1.469(6)
N2-C7	1.307(5)	1.316(7)	1.309(6)
N2-N3	1.379(5)	1.361(6)	1.371(5)
N3-C8	1.317(5)	1.322(7)	1.318(6)
N4-C8	1.355(6)	1.354(8)	1.360(6)
N4-C9	1.439(6)	1.386(8)	1.416(6)
Átomos	Ângulos (°)		
N1-C2-C7	115.6(4)	115.7(6)	115.2(4)
N2-C7-C2	115.1(4)	114.8(5)	115.1(6)
C7-N2-N3	119.5(4)	119.7(5)	120.2(4)
N2-N3-C8	111.1(4)	111.4(4)	111.5(4)
N4-C8-N3	118.3(4)	118.9(5)	119.3(4)
C8-N4-C9	126.8(4)	134.2(6)	127.4(4)
N3-C8-S	125.9(3)	125.3(5)	126.2(4)
N2-Pd-N1	81.0(1)	81.0(2)	80.9(2)
N1-Pd-S	166.1(1)	165.9(2)	166.2(1)
N2-Pd-S	85.1(1)	84.9(2)	85.3(2)
N1-Pd-Cl	97.9(1)	97.7(2)	97.4(1)
N2-Pd-Cl	177.4(1)	175.7(1)	175.9(1)

Tabela 3.2. 3- Distâncias (Å) e ângulos (°) selecionados de H2Bz4pT e seu complexo **6**.
Desvio padrão entre parênteses.

Distâncias (Å)		
Átomos	H2Bz4pT	(6)
S1-C8	1,650(2)	1.755(5)
N2-C7	1,293(3)	1.309(6)
N2-N3	1,351(3)	1.371(5)
N3-C8	1,360(3)	1.318(6)
N4-C8	1,342(3)	1.360(6)
N4-C9	1,404(3)	1.416(6)
Ângulos (°)		
Átomos	H2Bz4pT	(6)
N2-N3-C8	120,5(2)	111.5(4)
N3-C8-S1	117,9(2)	126.2(4)
N4-C8-N3	113,5(2)	119.3(4)
N4-C8-S1	128,6(2)	115,1(5)
C7-N2-N3	120,6(2)	120.2(4)
C8-N4-C9	132,3(2)	127.4(4)
N2-N3-C8	120,5(2)	111.5(4)

3.3- Atividade Citotóxica

Neste trabalho foram feitos estudos preliminares do efeito citotóxico das tiossemicarbazonas livres e seus complexos de Pd(II) e Pt(II) contra as linhagens de células de tumores sólidos humanos hepatoma (HepG2), melanoma (UACC-62) e carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (A431), e contra leucemias HL60 resistente a quimioterápicos e Jurkat. Os efeitos das tiossemicarbazonas e seus complexos de Pd(II) e Pt(II) sobre a proliferação celular (em porcentagem em relação ao controle) nas diferentes linhagens estão mostrados nas figuras 3.12 a 3.19.

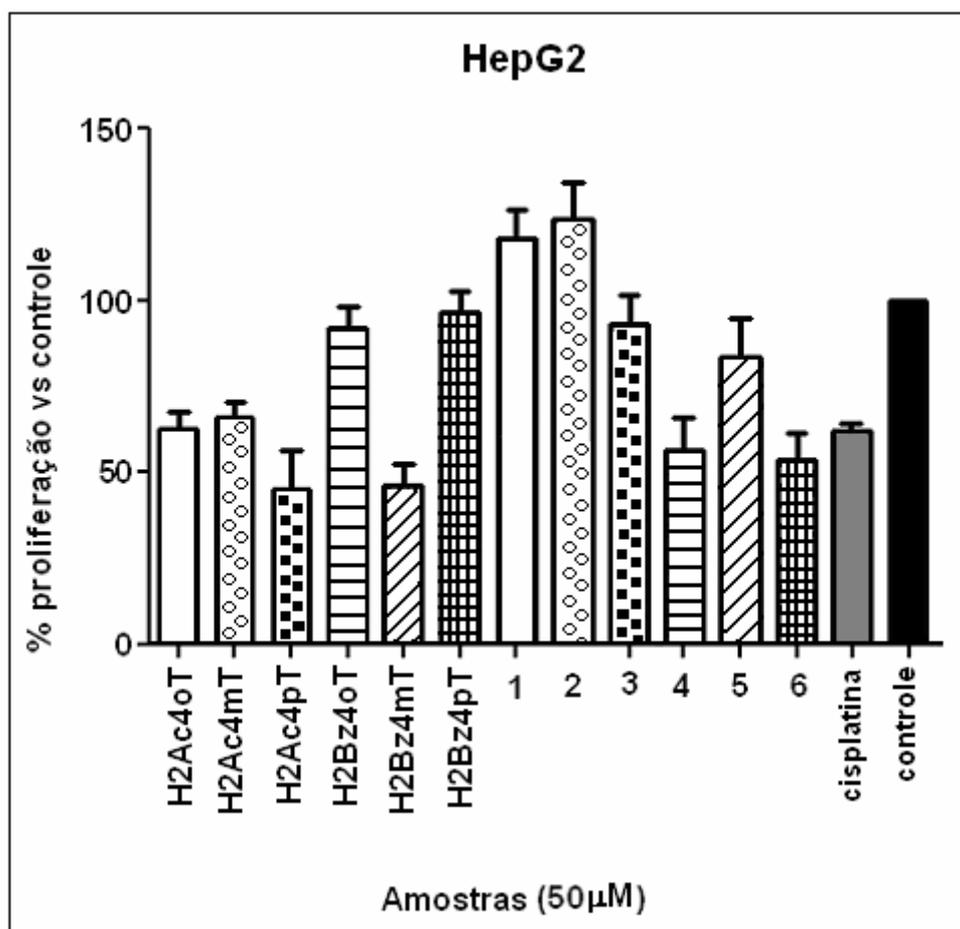


Figura 3. 12 – Efeito de *N*(4)-*orto*, *N*(4)-*meta* e *N*(4)-*para* toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina (H2Ac4oT, H2Ac4mT, H2Ac4pT) e de 2-benzoilpiridina (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT) e seus complexos de Pd(II) sobre a proliferação de células de hepatoma humano HepG2.

Entre as seis tiossemicarbazonas H2Ac4pT e H2Bz4mT revelaram-se os compostos mais ativos e apresentaram atividades semelhantes em células HepG2. Estimativas preliminares de caráter lipofílico, feitas com o programa ACDlabs

forneceram $\log P = 4,54$ para as benzoil tiossemicarbazonas e $\log P = 2,78$ para as acetil tiossemicarbazonas, sugerindo que as diferenças em lipofilia não seriam fator determinante para a atividade citotóxica. No entanto, os complexos de Pd(II) de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas mostraram-se mais ativos do que os análogos de 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas.

Pela coordenação ao paládio a atividade antiproliferativa das 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas sofre uma diminuição. De fato os complexos **1-3** pareceriam apresentar um efeito de estimular a proliferação celular. No entanto, os complexos **4 e 6** mostram-se mais ativos contra a proliferação celular do que os respectivos ligantes, com um efeito antiproliferativo semelhante àquele observado para a cisplatina, que foi usada como controle positivo.

Os resultados dos testes em linhagem de células de melanoma UACC-62 são apresentados na figura 3.13. Todas as tiossemicarbazonas apresentaram atividades semelhantes entre si e superiores à da cisplatina. Pela coordenação a ação antiproliferativa sofreu uma diminuição em todos os casos.

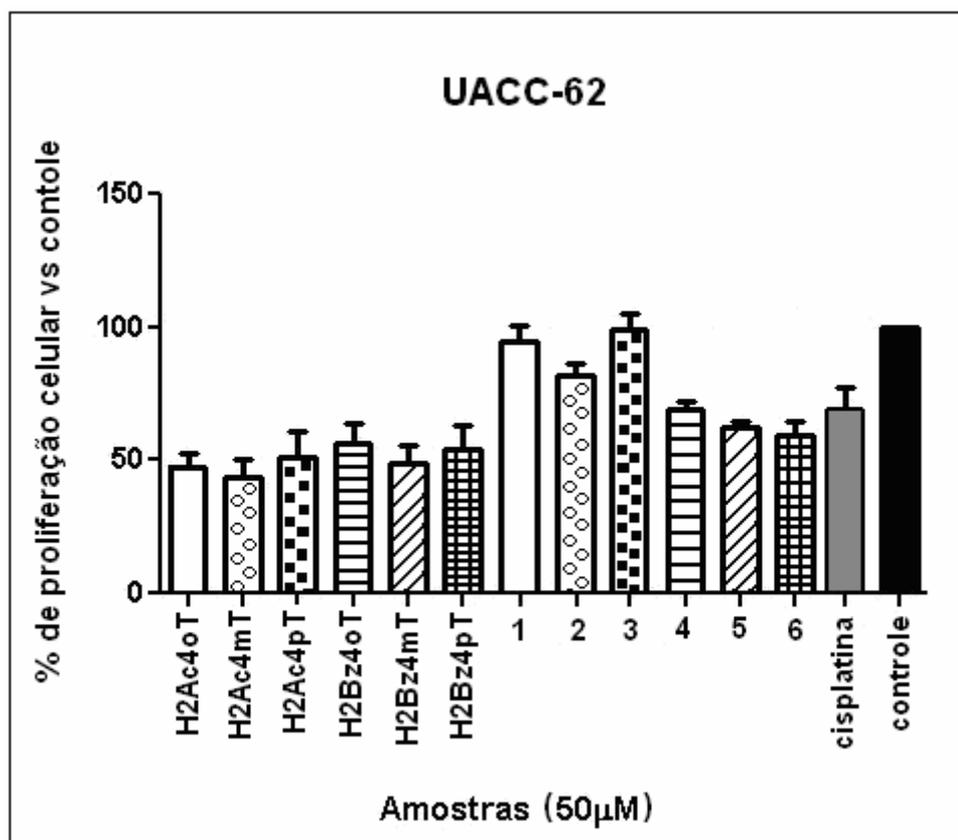


Figura 3. 13 – Efeito de *N*(4)-*orto*, *N*(4)-*meta* e *N*(4)-*para* toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina (H2Ac4oT, H2Ac4mT, H2Ac4pT) e de 2-benzoilpiridina (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT) e seus complexos de Pd(II) sobre a proliferação de células de melanoma humano UACC-62.

O efeito citotóxico das 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas em linhagens de células de carcinoma A431 pareceria seguir a ordem H2Ac4oT < H2Ac4mT < H2Ac4pT. Esta última mostrou-se particularmente ativa, inibindo 75-80% da proliferação celular. Entre as 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas a mesma ordem não se verifica, já que nesta série a ordem do efeito citotóxico seria H2Bz4pT < H2Bz4oT < H2Bz4mT. De qualquer modo, os compostos estudados pareceriam ser de modo geral mais ativos contra esta linhagem celular do que contra as duas outras linhagens de tumores sólidos.

Pela coordenação ao paládio a citotoxicidade diminuiu em todos os casos, à exceção do complexo (6), que se mostrou ligeiramente mais ativo que a tiossemicarbazona de origem.

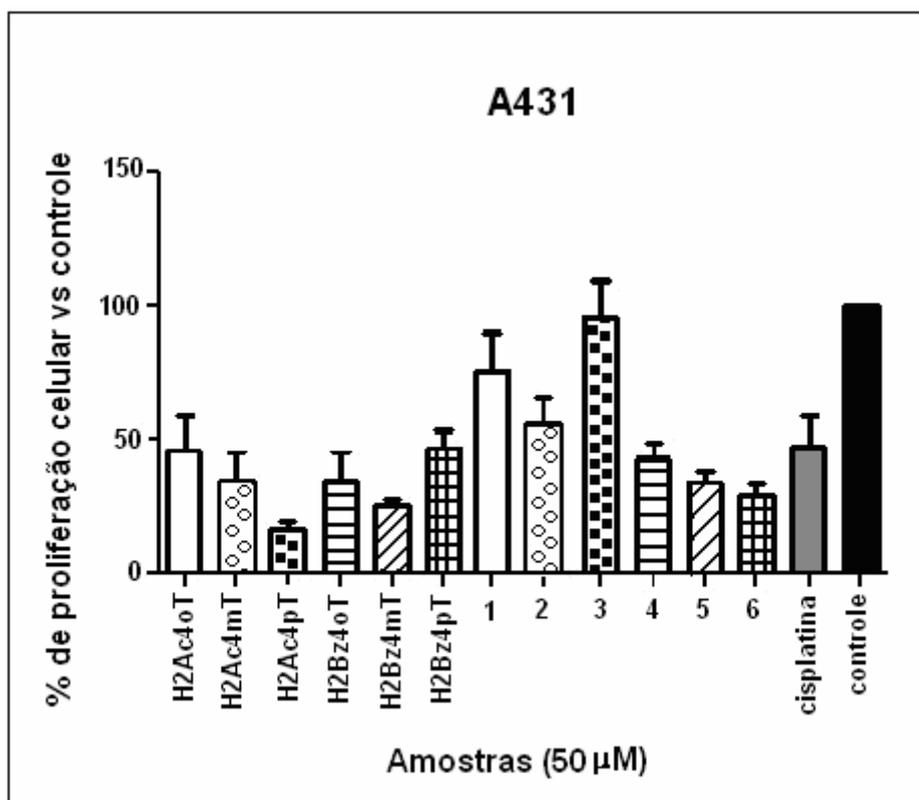


Figura 3. 14 – Efeito de *N*(4)-*orto*, *N*(4)-*meta* e *N*(4)-*para* toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina (H2Ac4oT, H2Ac4mT, H2Ac4pT) e de 2-benzoilpiridina (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT) e seus complexos de Pd(II) sobre a proliferação de células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço A431.

As 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas foram testadas em duas linhagens de leucemias. Apenas o derivado *N*(4)-*meta*-toluil (H2Bz4mT) apresentou efeito citotóxico moderado na linhagem HL-60 resistente a quimioterápicos (Figura 3.15). No entanto, a coordenação ao paládio levou a um significativo aumento da atividade citotóxica, sendo os complexos **4** e **5** aqueles que apresentaram os maiores efeitos de inibição da proliferação celular.

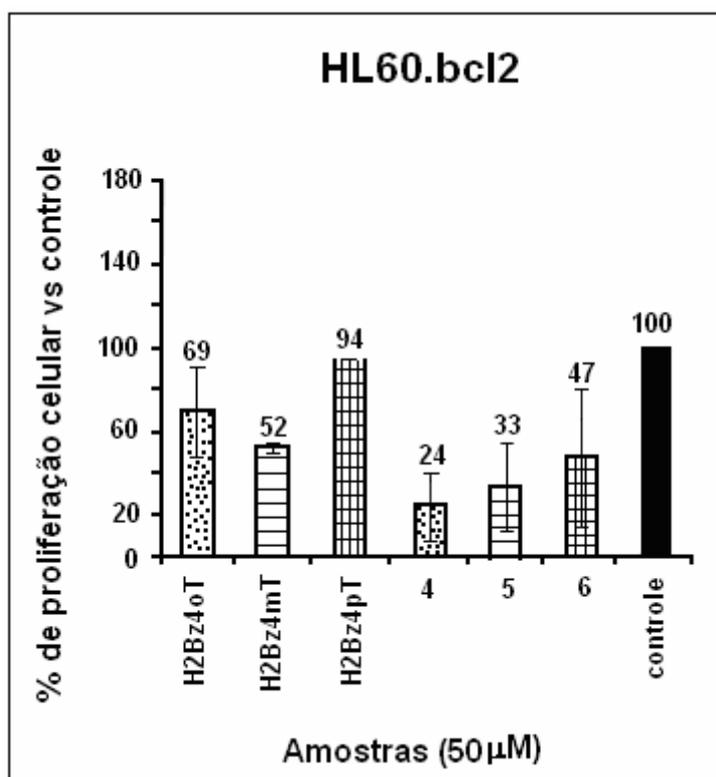


Figura 3. 15 – Efeito de *N*(4)-*orto*, *N*(4)-*meta* e *N*(4)-*para* tolul tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT) e seus complexos de Pd(II) em linhagens de células de leucemia humana HL60.bcl2.

O efeito citotóxico apresentado por 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas em linhagens de células de leucemia Jurkat foi semelhante ao mostrado em células HL60. H2Bz4mT revelou-se razoavelmente ativo contra a proliferação celular. Com a coordenação ao paládio ocorreu um considerável aumento na citotoxicidade, sendo os complexos **4** e **5** os que apresentaram melhores efeitos antiproliferativos (Figura 3.16).

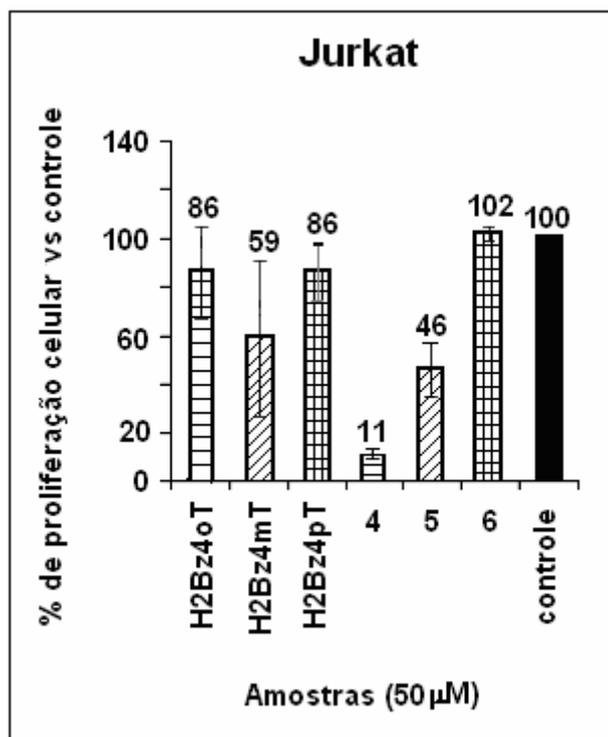


Figura 3. 16 – Efeito de *N*(4)-*orto*, *N*(4)-*meta* e *N*(4)-*para* toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT) e seus complexos de Pd(II) em linhagens de células de leucemia humana Jurkat.

Os resultados aqui apresentados sugerem que as tiossemicarbazonas em geral são mais ativas como agentes citotóxicos frente a células de tumores sólidos do que seus complexos de Pd(II). No entanto, a coordenação favorece a atividade citotóxica frente a leucemias, indicando uma certa seletividade dos complexos por essas linhagens celulares. Assim, a complexação pareceria ser uma estratégia interessante de direcionamento das tiossemicarbazonas para células leucêmicas.

Como observado para a coordenação ao paládio, a coordenação à platina faz diminuir a ação citotóxica das tiossemicarbazonas estudadas frente a células de tumores sólidos (ver figuras 3.17 a 3.19). Testes de atividade dos complexos de Pt(II) frente a leucemias estão em curso.

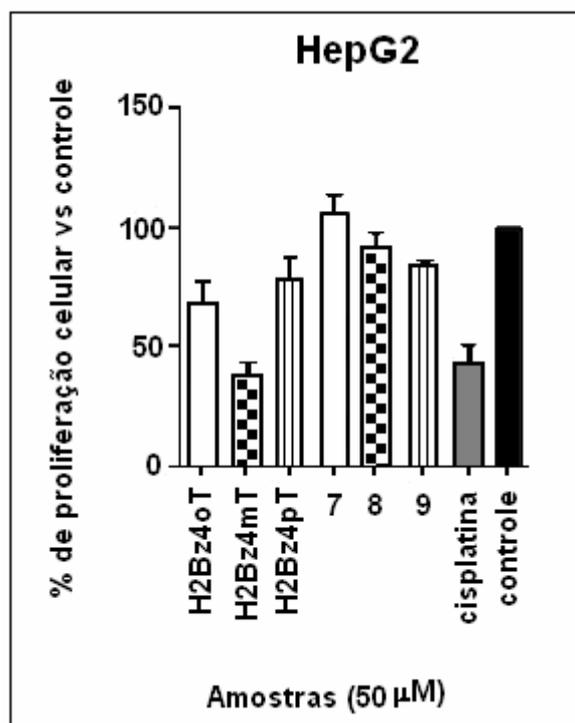


Figura 3. 17 – Efeito de *N*(4)-*orto*, *N*(4)-*meta* e *N*(4)-*para* toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT) e seus complexos de Pt(II) em linhagens de células de hepatoma humano HepG2.

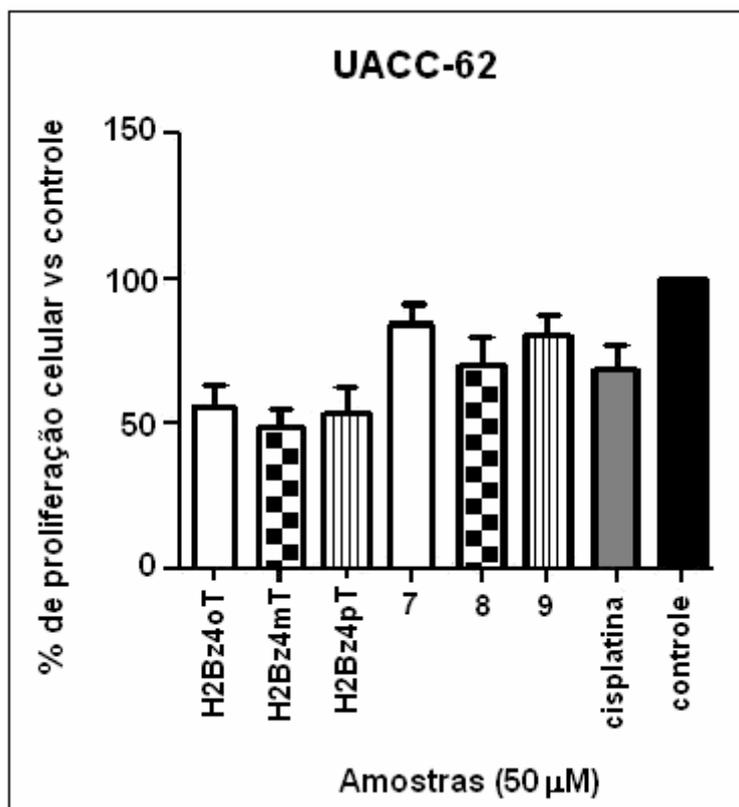


Figura 3. 18 – Efeito de *N*(4)-*orto*, *N*(4)-*meta* e *N*(4)-*para* tolúil tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT) e seus complexos de Pt(II) em linhagens de células de melanoma humano UACC-62.

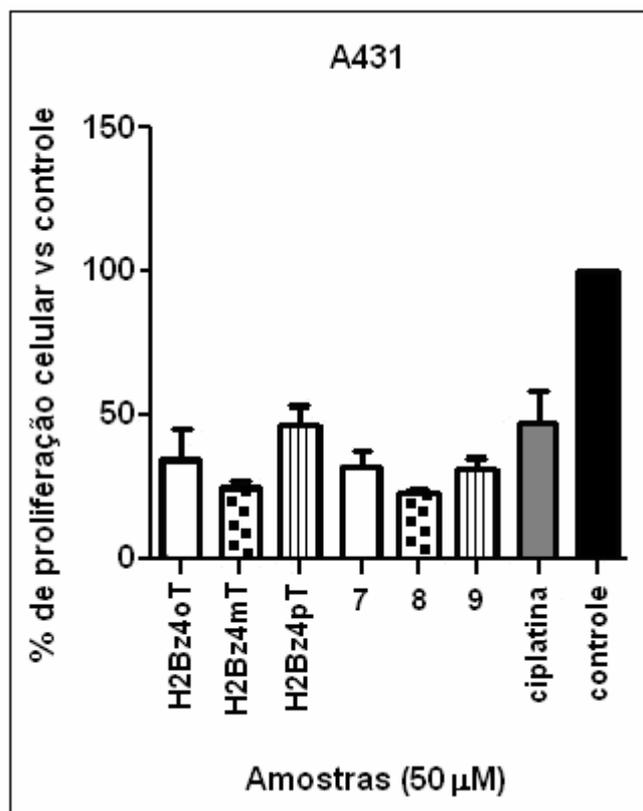


Figura 3. 19 – Efeito de *N*(4)-*orto*, *N*(4)-*meta* e *N*(4)-*para* toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT) e seus complexos de Pt(II) em linhagens de células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço A431.

Capítulo 4

Complexos de cobre(II) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH) e seus derivados N(4)-metil (H2Am4Me), N(4)-etil (H2Am4Et) e N(4)-fenil (H2Am4Ph)

Cobre(II) é um íon essencial. Suas habilidades em formar quelatos e seu potencial redox permitem sua participação em processos de transporte nos meios biológicos. A atividade farmacológica de complexos de cobre(II) com tiossemicarbazonas tem sido intensamente investigada na literatura. Em trabalhos anteriores realizados por nosso grupo mostrou-se que a atividade de N(4)-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetil, 2-formil e 2-benzoilpiridina contra o crescimento de bactérias *Salmonella typhimurium* sofre um aumento considerável pela coordenação ao cobre(II)^{1,2}.

Com o intuito de se verificar efeitos da coordenação sobre a ação antimicrobiana, no presente trabalho foram obtidos complexos de cobre(II) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH) e seus derivados N(4)-metil (H2Am4Me), N(4)-etil (H2Am4Et) e N(4)-fenil (H2Am4Ph) substituídos e suas atividades frente a colônias de *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* foram avaliadas, assim como as das tiossemicarbazonas livres. Também foi avaliada a toxidez frente à *Artemia salina* dessa classe de compostos.

Piridinoformamida tiossemicarbazonas são compostos que apresentam como inovação estrutural um grupo -NH₂ ligado ao C7 (Fig.4.1). São pouco estudados na literatura e nosso grupo iniciou pela primeira vez a investigação de seu perfil farmacológico. Esses compostos inibem o crescimento de *Salmonella typhimurium* em doses relativamente baixas (300µM). Apresentam citotoxidez frente a células tumorais humanas MCF-7 (tumor mamário), TK-10 (tumor renal) e UACC-62 (melanoma) em uma concentração de 80-100 µM.

¹ I.C. Mendes, J.P. Moreira, A.S. Mangrich, S.P. Balena, B.L. Rodrigues, H. Beraldo, Polyhedron, 26 (2007) 3263-3270.

² I.C. Mendes, J.P. Moreira, N.L. Speziali, A.S. Mangrich, J.A. Takahashia, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc., 17 (2006) 1571-1577.

Em concentração 40-50 μM esses compostos induziram morte celular por apoptose em células UACC-62, sendo o H2Am4Me o mais promissor (60%)³.

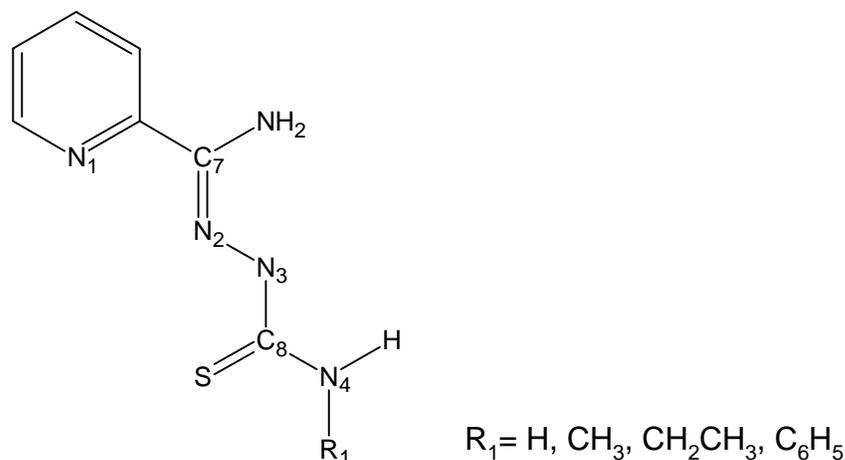


Figura 4. 1 – Fórmula estrutural de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona.

4.1- Caracterização dos complexos de cobre(II) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH) e seus derivados *N*(4)-metil (H2Am4Me), *N*(4)-etil (H2Am4Et) e *N*(4)-fenil (H2Am4Ph)

Microanálises, massas molares, momento magnético e condutividade molar

Os complexos de Cu(II) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas foram caracterizados por meio de análise elementar, espectros de infravermelho, ultravioleta, ressonância paramagnética eletrônica, medidas de momento magnético e condutividade molar.

Os resultados de massa molar, análise elementar, suscetibilidade magnética e condutividade molar para estão dispostos na tabela 4.1.1.

³ MENDES, Isolda C. **Estudo do perfil farmacológico de tiossemicarbazonas derivadas de piridina e piridinoformamida**: Efeitos da coordenação a metais. Belo Horizonte: UFMG, 2007. 236-237. Tese (Doutorado) – Programa de pós – Química, Belo Horizonte, 2007.

Tabela 4.1. 1 - Dados analíticos obtidos para os complexos de Cu(II).

Composto	Análise elementar (%)*			MM (g.mol ⁻¹)	μ_{Bohr} MB	Λ_M ($\Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$) DMF~ $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L
	C	H	N			
1 [Cu(H2Am4DH)Cl ₂]	25,39 (25,50)	2,69 (2,75)	20,19 (20,24)	329,70	1,79	19
2 [Cu(H2Am4Me)Cl ₂].1,5H ₂ O	25,84 (25,92)	3,70 (3,81)	19,13 (18,89)	370,74	1,72	33
3 [Cu(H2Am4Et)Cl]Cl	29,87 (30,22)	2,99 (3,66)	19,26 (19,58)	357,75	1,79	55
4 [Cu(2Am4Ph)Cl]	41,81 (42,28)	2,97 (3,27)	18,10 (18,96)	369,33	1,84	10

* Valores teóricos em parênteses

Os complexos **1** e **2** já haviam sido obtidos por outros grupos^{4,5}, mas foram novamente preparados para o estudo de seu perfil farmacológico.

Espectros de Infravermelho

Os espectros de infravermelho dos complexos foram comparados com os das bases livres a fim de se verificar o modo de coordenação do centro metálico. A tabela 4.1.2 mostra as atribuições das bandas de cada composto. A banda do modo composto ν (C=N) + ν (C=C), que aparece na região entre 1611-1587 cm⁻¹ nas bases livres, desloca-se para 1643-1591 cm⁻¹ nos complexos, indicando a coordenação do nitrogênio imínico⁵.

A banda de estiramento ν (C=S) nas bases livres H2Am4DH, H2Am4Me e H2Am4Et encontra-se na região entre 853-847 cm⁻¹ enquanto que nos complexos **1-3** ela aparece entre 853-843 cm⁻¹, indicando a coordenação através do átomo de enxofre na forma de tiona. Essa banda sofre um deslocamento de 860 cm⁻¹ em H2Am4Ph para 811

⁴ M.C. Aguirre, J. Borrás, A. Castiñeiras, J.M. García-Monteagudo, I. García-Santos, J. Niclós, D.X. West, Eur J. Inorg., Chem. 2006 (2006) 1231-1244.

⁵ D.X. West, J.K. Swearingen, A. K. El-Sawaf, Transition Met. Chem., 25 (2000) 80-83.

cm^{-1} em **4**, sugerindo a coordenação pelo enxofre na forma de tiolato. O deslocamento observado de 49 cm^{-1} está de acordo com a coordenação de tiossemicarbazona desprotonada⁶.

A banda característica de deformação angular no plano do anel piridínico, que aparece entre $622\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$ nas bases livres, desloca-se para $649\text{-}624 \text{ cm}^{-1}$ nos espectros dos complexos, sugerindo a coordenação do nitrogênio heteroaromático. A banda referente à deformação angular fora do plano para as bases livres aparece na região de 400 cm^{-1} , aproximadamente, porém é difícil detectá-la nos espectros dos complexos, pois é uma região de grande quantidade de bandas⁵.

Outras bandas surgem nos espectros dos complexos, na região entre $460\text{-}200 \text{ cm}^{-1}$, características dos estiramentos entre o metal e os átomos de cloro, enxofre e o nitrogênio heteroaromático que são: $\nu(\text{M-N})$ em $484\text{-}445 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{M-N}_{\text{py}})$ em $246\text{-}224 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{M-S})$ em $353\text{-}342 \text{ cm}^{-1}$ e $\nu(\text{M-Cl})$ em $319\text{-}302 \text{ cm}^{-1}$ ^{7,8}.

⁶ A.E. Graminha, F.S. Vilhena, A.A. Batista, S.R.W. Louro, R.L. Zioli, L.R. Teixeira, H. Beraldo, *Polyhedron*, 27 (2008) 547-551.

⁷ D.X. West, J.S. Ives, J. Krejci, M.M. Salberg, T.L. Zumbahlen, G.A. Bain, A.E. Liberta, *Polyhedron*, 14 (1995) 2189-2200.

⁸ M. Joseph, M. Kuriakose, M.R.P. Kurup, E. Suresh, A. Kishore, S.G. Bhat, *Polyhedron* 25 (2006) 61-70.

Tabela 4.1. 2 - Atribuições das principais bandas de infravermelho (cm^{-1}) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e seus complexos de Cu(II).

Complexo	$\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{C}=\text{N})+\nu(\text{C}=\text{C})$	$\nu(\text{C}=\text{S})$	$\rho(\text{py})$	$\nu(\text{M}-\text{N})$	$\nu(\text{M}-\text{Npy})$	$\nu(\text{M}-\text{S})$	$\nu(\text{M}-\text{Cl})$
H2Am4DH	3420F	1611F	854m	617m	-	-	-	-
1 [Cu(H2Am4DH)Cl₂]	3440m	1605f	853 m	649m	484f	225F	350F	319m
H2Am4Me	3364F	1606m	855m	600m	-	-	-	-
2 [Cu(H2Am4Me)Cl₂]	3418F	1640m	844m	648f	445m	225F	353F	302f
H2Am4Et	3340m	1608m	847m	622m	-	-	-	-
3 [Cu(H2Am4Et)Cl]Cl	3320m	1643f	843f	648m	482f	224F	347F	315m
H2Am4Ph	3108m	1584m	860f	606F	-	-	-	-
4 [Cu(2Am4Ph)Cl]	3146m	1591m	811m	624m	468F	246F	342F	318F

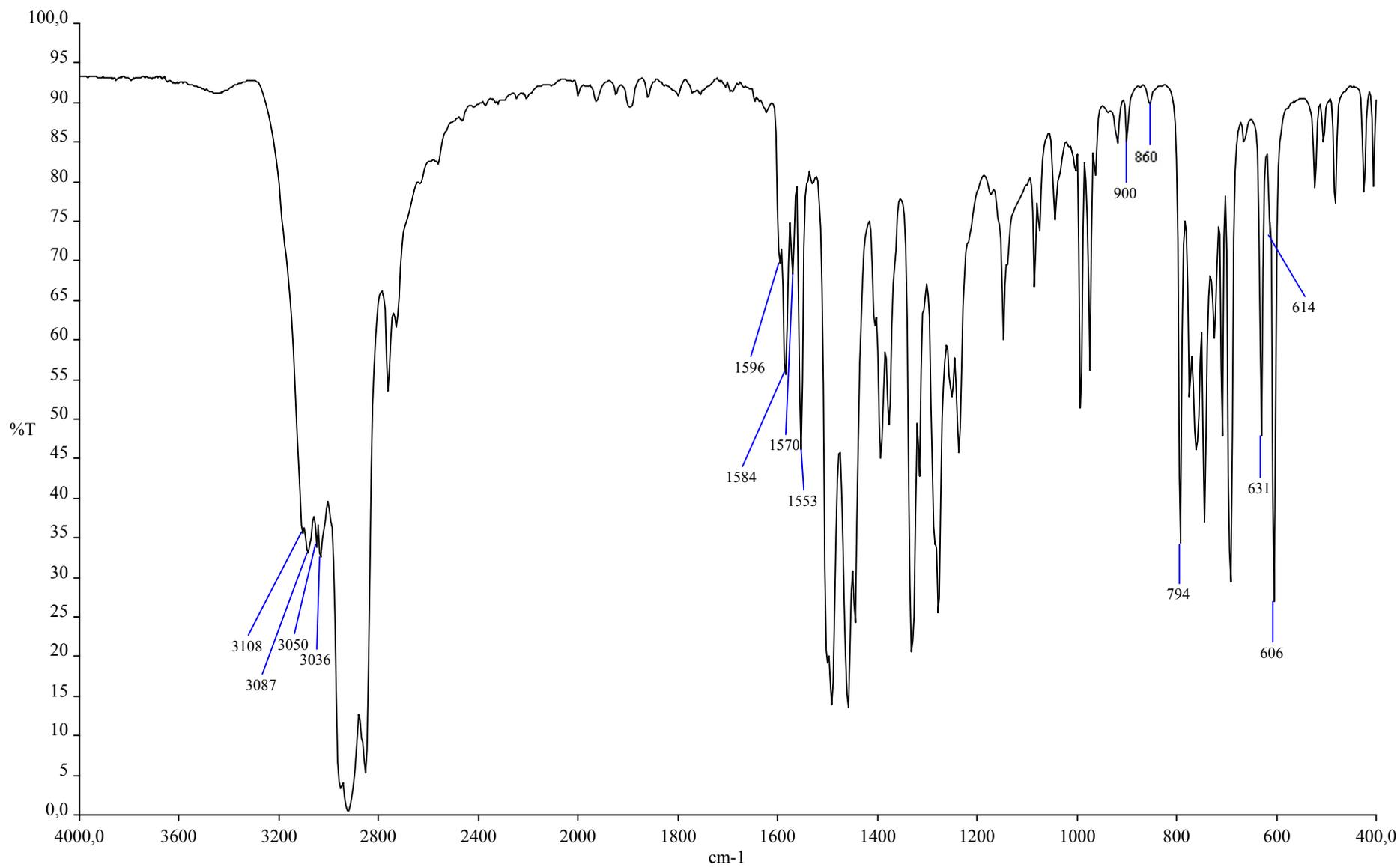


Figura 4. 2 - Espectro de infravermelho de H2Am4Ph na região de 4000-400 cm⁻¹, suporte CsI/nujol.

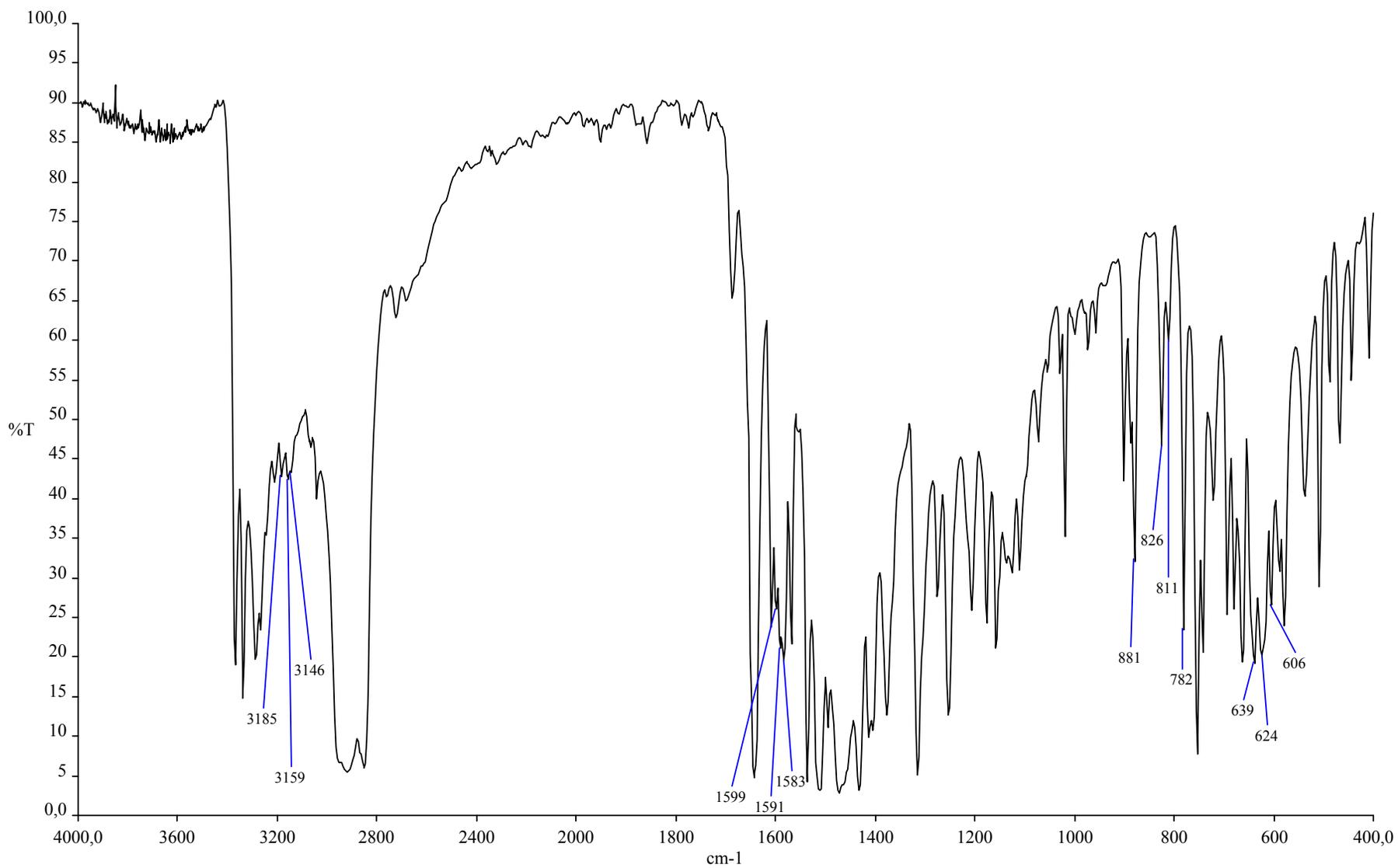


Figura 4. 3 - Espectro de infravermelho de [Cu(2Am4Ph)Cl] na região de 4000-400 cm⁻¹, suporte CsI/nujol.

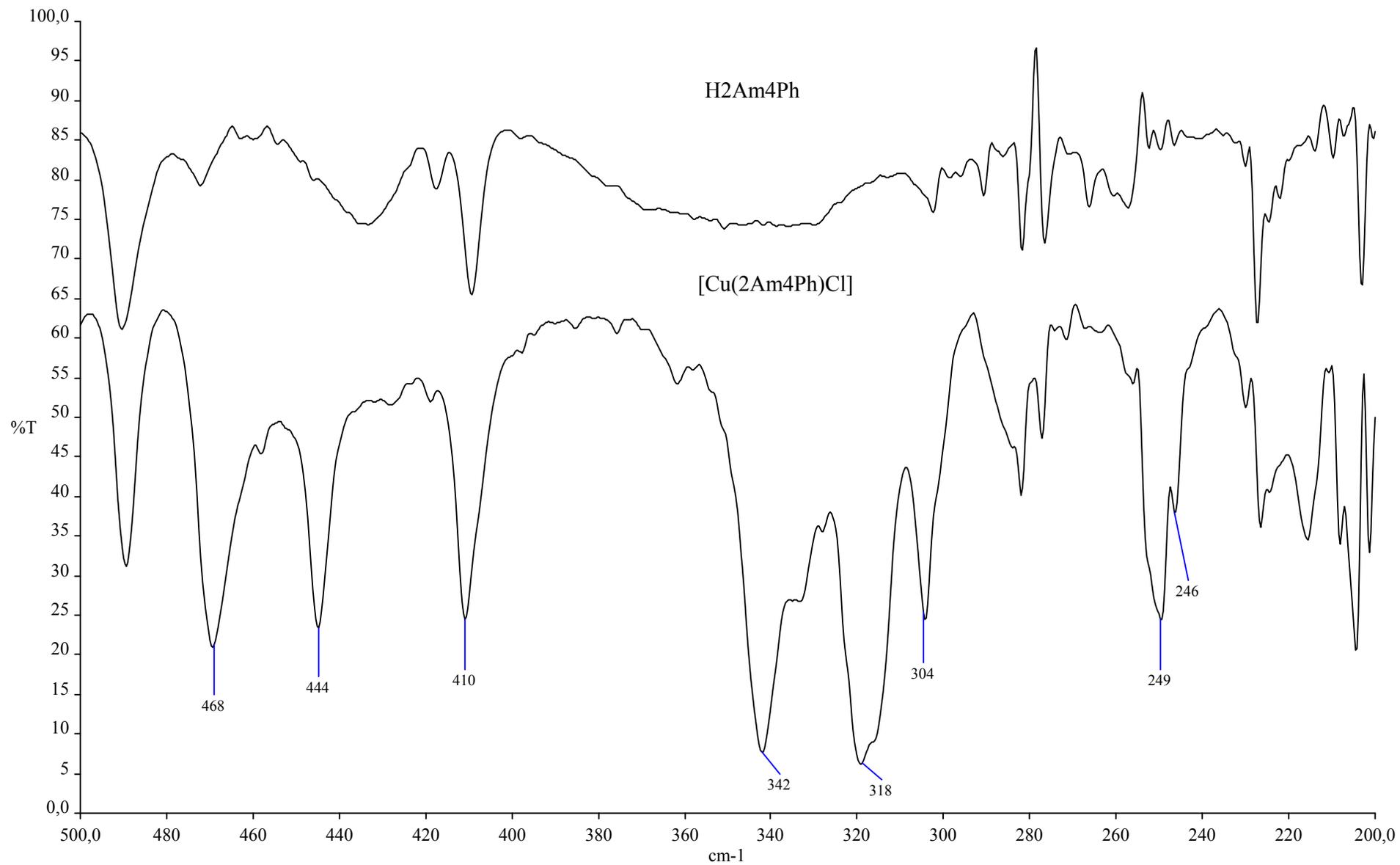


Figura 4. 4 - Espectro de infravermelho de [Cu(2Am4Ph)Cl] e H2Am4Ph na região de 500-200 cm^{-1} , suporte CsI/nujol.

Espectros Eletrônicos

Os espectros eletrônicos permitem visualizar modificações na estrutura de um composto através de bandas de absorção de energia necessária para que a transição eletrônica ocorra. Pode ocorrer o surgimento de novas bandas, deslocamentos ou mudanças na intensidade das mesmas.

As principais bandas características de complexos metálicos nesse tipo de espectroscopia são atribuídas a basicamente três tipos de transições eletrônicas: LT ($n \rightarrow \pi$ e $\pi \rightarrow \pi^*$) que são as que ocorrem na região do ultravioleta de alta energia relacionadas às transições ligante-ligante, onde n é o orbital não-ligante, π é o orbital ligante e π^* é o orbital anti-ligante; CT que são as transferências de carga na região do ultravioleta próximo entre orbitais ligantes e orbitais metálicos e podem ser classificadas em LMCT ($\pi \rightarrow d\pi$), transferência de carga do ligante para o metal, e MLCT ($d\pi \rightarrow \pi^*$), transferência de carga do metal para o ligante; transições $d-d$ que aparecem na região do visível e são de baixa intensidade⁹.

As posições das principais bandas de absorção das tiossemicarbazonas livres bem como as de seus complexos de cobre(II) são apresentadas na tabela 4.1.3.

⁹ D.F Shriver, P.W. Atkins, Inorganic Chemistry, 3th ed. (1999) 484-487.

Tabela 4.1. 3 - Bandas dos espectros eletrônicos de complexos de cobre(II) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona e derivados em solução (DMF).

Composto	Transições n- π^* e de transferência de carga cm^{-1} (log ϵ)	Transições d-d cm^{-1} (log ϵ)
H2Am4DH	32680 (4,18)	-
1 [Cu(H2Am4DH)Cl₂]	33112 (4,02), 23866 (3,73)	15873 (2,31)
H2Am4Me	29760 (4,10)	-
2 [Cu(H2Am4Me)Cl₂]	32679 (3,96), 23980 (3,67)	16129 (2,25)
H2Am4Et	29770 (4,15)	-
3 [Cu(H2Am4Et)Cl]Cl	32679 (4,04), 23981 (3,74)	17452 (3,26)
H2Am4Ph	29762 (3,94)	-
4 [Cu(2Am4Ph)Cl]	31847 (4,12), 24155 (3,93)	16806 (1,47)

Nos espectros das tiossemicarbazonas livres observa-se uma única banda de absorção de maior intensidade na região entre 32680 e 29760 cm^{-1} relacionada às transições n- π^* do anel da piridina e dos grupos C=N e C=S superpostas em um mesmo envelope. Pela coordenação a banda das transições n- π^* já sofre um deslocamento para a região de mais baixa energia (33112- 31874 cm^{-1}). Uma outra banda aparece nos espectros dos complexos entre 24155 e 23866 cm^{-1} atribuída à transição de transferência de carga S \rightarrow Cu(II). A terceira banda nos espectros dos complexos entre 17452 e 15873 cm^{-1} é associada às transições d-d (Figura 4.5). No complexo **4** essa banda é sobreposta pela banda de transferência de carga, dificultando a visualização (Figura 4.6).

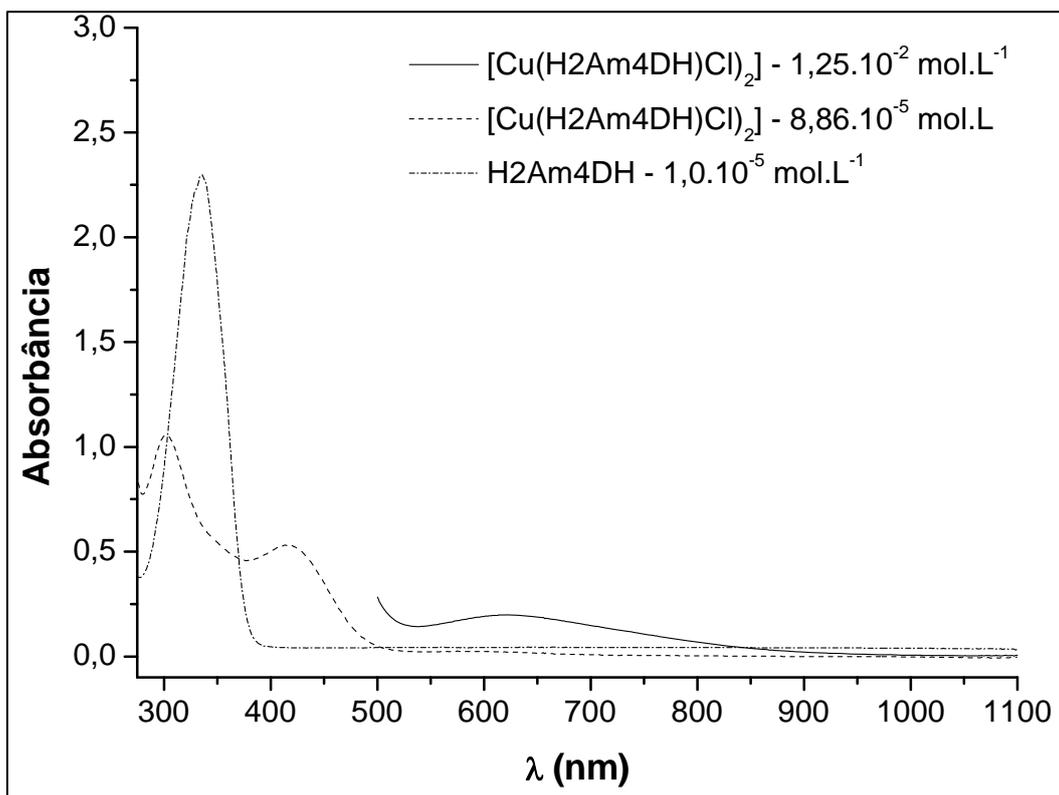


Figura 4. 5 – Espectro eletrônico de 2-piridinoformamida e seu complexo de cobre (DMF).

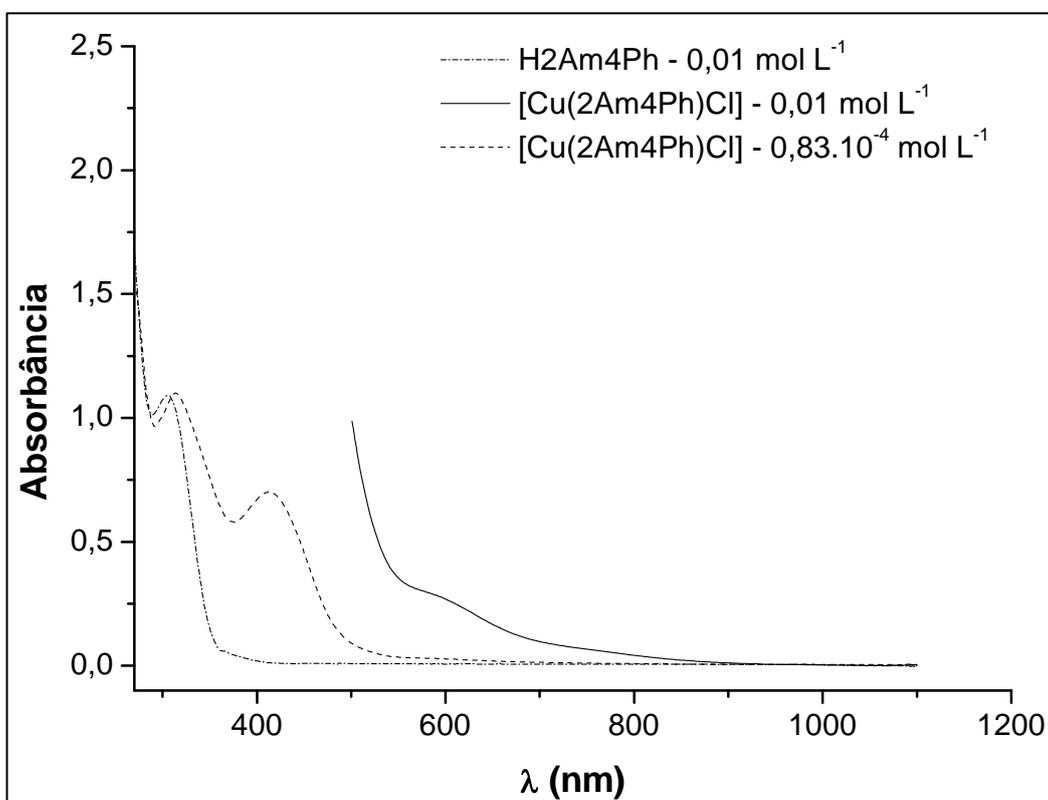


Figura 4. 6 – Espectro eletrônico de 2-piridinoformamida *N*(4)-fenil e seu complexo de cobre.

Ressonância Paramagnética Eletrônica

Alguns átomos e moléculas contêm um ou mais elétrons com spins não emparelhados, que podem interagir com um campo magnético aplicado externamente; essas espécies são sensíveis à espectroscopia por ressonância de spin eletrônico (ESR - electron spin resonance). Como tais espécies são também paramagnéticas, esse tipo de espectroscopia é também chamado de ressonância paramagnética eletrônica (EPR - electron paramagnetic resonance).¹⁰

O fenômeno físico básico implícito à espectroscopia de EPR é o efeito Zeeman, que envolve a interação entre o spin de um elétron desemparelhado e um campo magnético externo. Um elétron tem um momento magnético associado igual ao magnéton Bohr, μ_B . Quando colocado num campo magnético externo de intensidade B_0 , esse momento magnético pode tomar duas orientações: paralela e antiparalela ao sentido do campo magnético. A orientação paralela encontra-se num estado de menor energia que a antiparalela (o chamado efeito Zeeman), sendo a diferença de energia entre os dois estados, ΔE , dada por $\Delta E = g\mu_B B_0$. A separação de energia entre os estados de spins é chamada de separação Zeeman e a constante de proporcionalidade g (fator- g) é a razão entre o momento angular e o momento magnético do elétron.¹¹

Para um elétron livre, não influenciado por qualquer campo externo, o valor de $g = 2.00232$. Porém, para um elétron num cristal um desvio no valor medido de g pode ser provocado pelo efeito do campo cristalino ou pela interação spin-órbita. Muitas vezes, o valor do fator- g fornece um meio de identificação da espécie paramagnética e permite conhecer o estado fundamental do íon no sistema.¹² Três valores característicos, g_x , g_y e g_z , podem ser obtidos, e estes valores fornecem informações a respeito dos eixos principais de simetria do orbital contendo o elétron desemparelhado. No caso de simetria axial, $g_x = g_y$ e ambos são designados por g_{\perp} (g perpendicular), e g_z é designado g_{\parallel} (g paralelo)¹¹

Os espectros de EPR dos complexos **1 - 4** no estado sólido (300 K) são apresentados na figura 4.7.a juntamente com a simulação usando o programa EasySpin. São complexos mononucleares de Cu (II). Os valores de g_{\parallel} e g_{\perp} estão na faixa para esse tipo de complexos. Os parâmetros de EPR g_{\parallel} e g_{\perp} característicos de simetria axial estão

¹⁰ L.K. Ono, Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) e análise do vidro aluminato de cálcio. *Instituto de Física, USP*.

¹¹ T. Valle, **Nova Metodologia de Fracionamento e Caracterização de Huminas e suas Interações com Constituintes Inorgânicos de Solos**. Curitiba: UFPR, 2006. 12-14p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós – Química, Curitiba, 2006.

¹² J.P. Donoso, G.E. Barberis, Rev. Bras. Ens. Física, 19 (1997) 125-135.

listados na Tabela 4.1.4, onde $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2$ para todos os complexos. Os valores são coerentes com um estado fundamental dx^2-y^2 .

Tabela 4.1. 4 - Parâmetros de EPR para os complexos **1-4** (sólido a temperatura ambiente e em DMF a 77K).

Complexo estado sólido, ~ 300 K	g_{\parallel}	g_{\perp}
(1)	2,202	2,051
(2)	2,190	2,058
(3)	2,205	2,053
(4)	2,163	2,045

Complexo em DMF 77K	g_{\parallel}	g_{\perp}
(1)*, (2), (3)	2,20	2,05
(4)†	2,163	2,044

* largura de banda 4 mT (lorentzian, gaussian); † largura de banda 6 mT (gaussian).

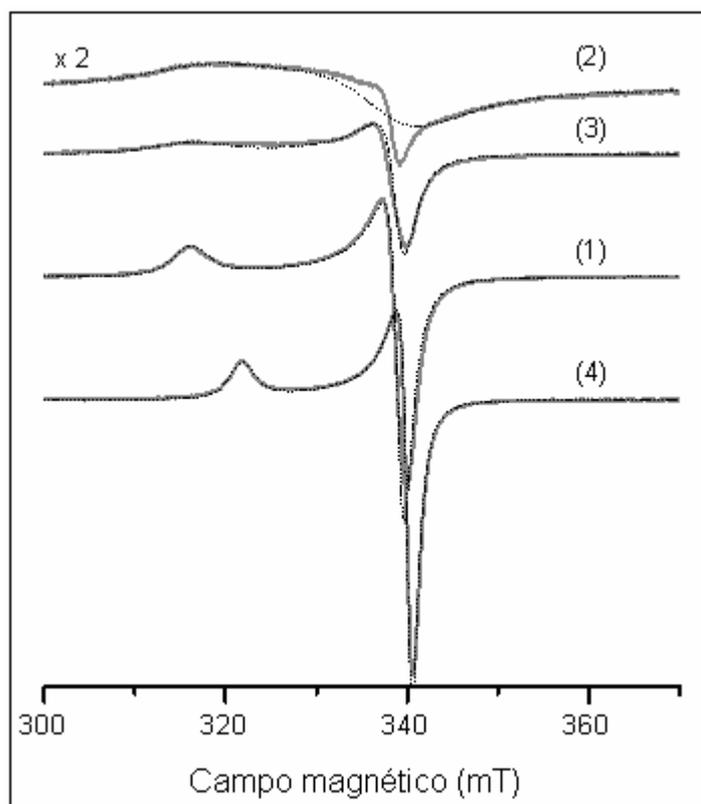


Figura 4. 7.a - Espectros EPR de compostos **1** – **4** no estado sólido (cinza) e simulações (linhas pontilhadas) utilizando EasySpin ($S = 1 / 2$, simetria axial) a temperatura ambiente. Apenas os principais componentes de **2** é apresentado na simulação.

Os espectros EPR dos complexos em DMF (300 K) são muito similares (Fig.4.7.b). São praticamente isotrópicos e mostram estrutura hiperfina com desdobramento em 4 linhas devido a interação com os momentos nucleares de ^{63}Cu (ou ^{65}Cu , ~30% de abundância) ($I=3/2$). A interação superhiperfina com os núcleos de nitrogênio ^{14}N ($I=1$) provoca um desdobramento da linha de campo alto ($M_I = 3/2$) em nove.

Os espectros dos complexos em DMF a 77 K são característicos de simetria axial (Fig.4.7.c). Os parâmetros de **1-3** são muito similares. O espectro de **3** apresenta uma segunda componente similar ao espectro de **4**. A região perpendicular dos quarto espectros mostra uma estrutura superhiperfina. Há pelo menos dois nitrogênios não equivalentes (N1 e N2, Fig. 4.8) interagindo com o elétron desemparelhado do cobre.

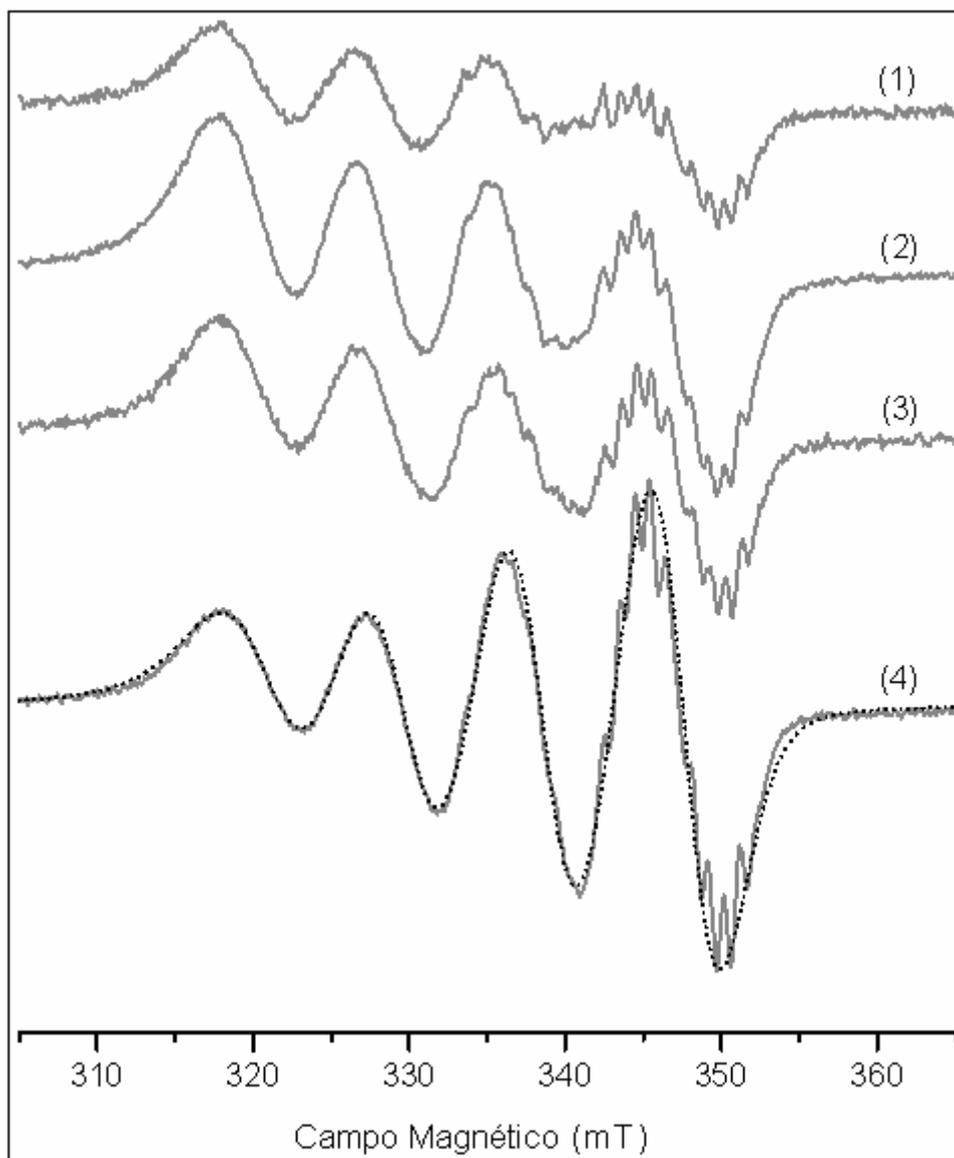


Figura 4.7. a - Espectros EPR dos compostos **1** - **4** (2 mg/mL) em DMF e a simulação de **4**, sem a estrutura superhiperfina do nitrogênio, usando EasySpin ($g_{\parallel} = 2.165$, $g_{\perp} = 2.038$).

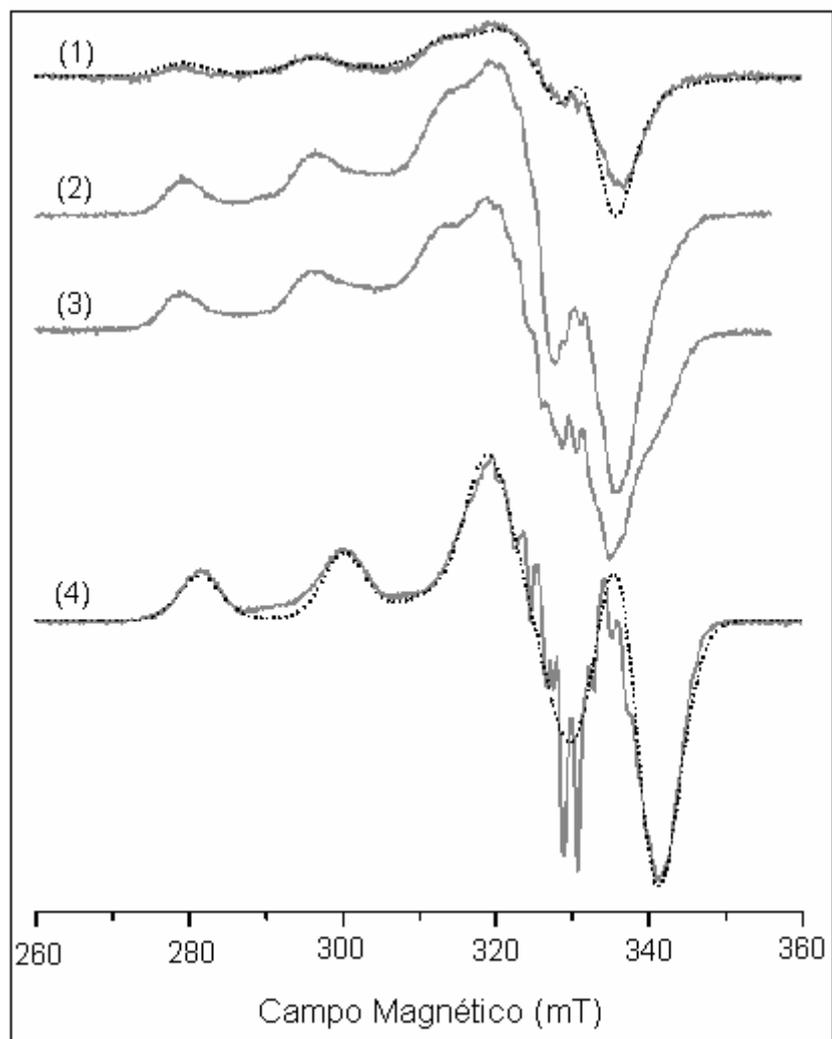


Figura 4.7. b – Espectro de EPR dos compostos **1** – **4** (2 mg/ml) em DMF a 77 K, e a simulação de **1** e **4**, sem a estrutura superhiperfina do nitrogênio, usando EasySpin (parâmetros na tabela 4.1.4).

Tabela 4.2. 1 – Resumo da coleção de dados e refinamento do complexo [Cu(2Am4Ph)Cl].

Fórmula empírica	C ₁₃ H ₁₂ Cl Cu N ₅ S
Massa molar (g.mol ⁻¹)	369,33
Temperatura	120(2) K
Radiação, λ (Å)	0,71073
Sistema cristalino	Ortorrômbico
Grupo espacial	Pna2(1)
a (Å)	15,0981(7)
b (Å)	6,9286(3)
c (Å)	13,4507(7)
α (°)	90
β (°)	90
δ (°)	90
Volume (Å ³)	1407,06(12)
Z	4
Densidade calculada (Mg m ⁻³)	1,743
Coeficiente de absorção μ (mm ⁻¹)	1,889
F(000)	748
Dimensões do cristal (mm)	0,16 x 0,09 x 0,06
Intervalo de θ (°)	3,03 a 27,49
Intervalos de hkl	-19 ≤ h ≤ 18; -8 ≤ k ≤ 6; -17 ≤ l ≤ 17
Reflexões coletadas	9569
Reflexões independentes / R(int)	3057/ 0,0385
Reflexões observadas (>2sigma)	2811
Total em theta	99,9%
Correção de absorção	Nenhuma
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²
Dados / restrições / parâmetros	3057 / 1 / 199

O complexo [Cu(2Am4Ph)Cl] (**4**) cristaliza-se no grupo espacial Pna2(1). O número de coordenação do metal é igual a quatro. A coordenação da tiossemicarbazona ao metal ocorre através do nitrogênio da piridina, do nitrogênio imínico e do enxofre; o quarto

sítio de coordenação é ocupado por um cloreto. Na tabela 4.2.2 encontram-se as distâncias de ligação e os ângulos de ligações do cristal.

Tabela 4.2. 2 – Distâncias (Å) e ângulos (°) selecionados de [Cu(2Am4Ph)Cl] (4). Desvio padrão entre parênteses.

Átomos	Distâncias (Å)	Átomos	Distâncias (Å)
Cu1-N2	1,930(3)	Cu1-N1	2,029(3)
Cu1-Cl1	2,2405(11)	Cu1-S1	2,2694(11)
N1-C2	1,352(5)	C(2)-C(7)	1,473(6)
N2-N3	1,381(5)	N3-C1	1,310(5)
S(1)-C(1)	1,749(4)	N(2)-N(3)	1,381(5)
N2-C7	1,300(5)		
Átomos	Ângulos (°)	Átomos	Ângulos (°)
N2-Cu1-N1	80,34(15)	N2-Cu1-Cl1	171,61(11)
N1-Cu1-Cl1	96,65(11)	N2-Cu1-S1	83,73(10)
N1-Cu1-S1	163,71(11)	Cl1-Cu1-S1	99,60(4)

[Cu(2Am4Ph)Cl] (4) contém uma tiossemicarbazona aniônica que coordena-se ao centro metálico através do sistema N_{py}-N-S, com a formação de dois anéis quelato de cinco membros. A geometria em torno do metal é quadrática distorcida. As distorções de um arranjo quadrático ideal surgem principalmente a partir dos ângulos N(2)-Cu(1)-N(1) = 80,34° (15) e N(2)-Cu(1)-S(1) = 83,73 (10)°.

O fragmento da molécula formado pelo o anel da piridina e pelos anéis quelato (átomos C6, C5 C4, C3, C2, N1, C2, C7, N2, N3, S1 e Cu) é essencialmente planar: o melhor plano do grupo fenil [C8-C13] faz um ângulo de 21,53 (7) Å com esse plano. Ligações de hidrogênio intramoleculares, N5-H5B --- N3, C6-H6 --- Cl1 e C9-H9 --- N3, ajudam a fixar a estrutura da molécula. As moléculas são unidas por ligações de hidrogênio, bem como pelas interações C-H...π e π-π empilhadas. A Figura 4.9 ilustra as ligações moleculares formadas por ligações de hidrogênio intermoleculares N5-H5a --- S1, N5-H5b--- Cl e N4-H4a---Cl.

Tabela 4.2. 3 – Parâmetros de ligações de hidrogênio (Å, °) para 4.

D-H---A	D-H	H---A	D---A	D-H---A
N4-H4A---Cl1 ⁱ	0,72(5)	2,80(5)	3,506 (3)	167(5)
N5-H5B---Cl1 ⁱⁱ	0,77(5)	2,82(5)	3,436(4)	139(4)
N5-H5A---S1 ⁱⁱⁱ	0,94(5)	2,54(5)	3,466(3)	167(3)
N5-H5B---N3	0,77(5)	2,32(5)	2,682(4)	110(4)
C6-H6---Cl1	0,95	2,77	3,333(5)	119
C9-H9---N3	0,95	2,35	2,873(7)	115

Operações de simetria: (i) $1-x, 1-y, -1/2+z$, (ii) $1/2-x, 1/2+y, -1/2+z$, (iii) $-1/2+x, 3/2-y, z$

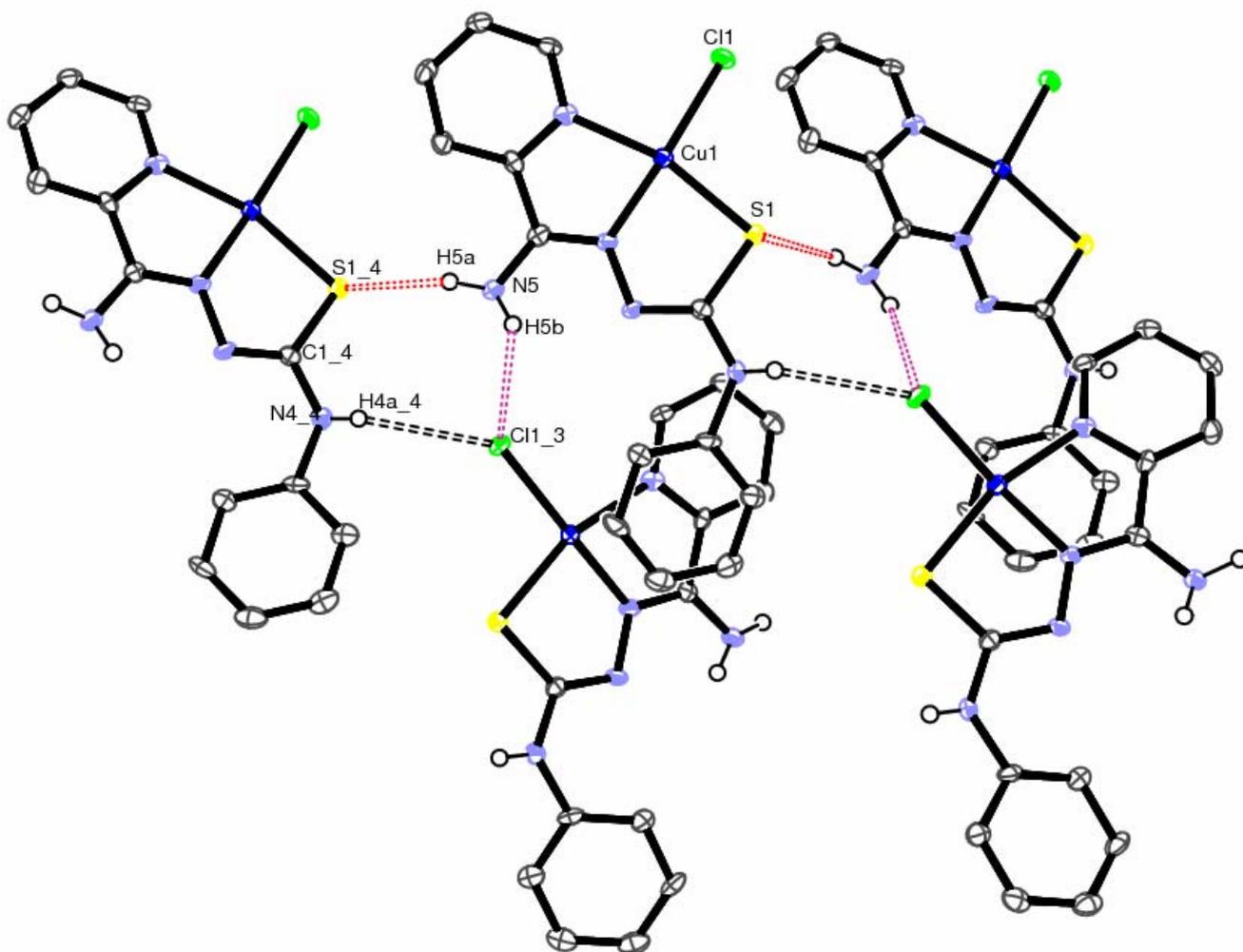


Figura 4. 9 – Diagrama ORTEP do complexo [Cu(2Am4Ph)Cl] (4).

4.3- Atividade Antibacteriana

A atividade das tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida e de seus complexos com Cu(II) foi testada contra o crescimento de bactérias *gram*-negativas dos gêneros *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*.

As infecções causadas por *S. typhimurium* variam de acordo com o tipo sorológico, idade e condições de saúde do hospedeiro, sendo que o homem é o único reservatório natural dessas bactérias. Já as bactérias *P. aeruginosa* habitam em solo, água e vegetais, podendo ser encontradas também na pele, fezes e garganta dos humanos. Em pacientes hospitalares a população desses microorganismos pode ser muito elevada. Causam infecções tipicamente oportunistas em processos cirúrgicos, queimaduras, pneumonias, principalmente após processos de entubação, podendo levar a doenças mais severas.

Os agentes antimicrobianos podem agir sobre a parede celular e/ou membrana celular e sobre a atividade enzimática, bloqueando certas reações ou sínteses de enzimas na célula microbiana, podendo levar a destruição desses microorganismos.¹⁷

Os valores de concentração inibitória mínima (MIC = minimum inhibitory concentration) obtidos para as tiossemicarbazonas e seus complexos de cobre contra *S. typhimurium* e *P. aeruginosa* são apresentados na tabela 4.3.1 e 4.3.2.

¹⁷ H.P. Rang, M.M. Dale, J.M Ritter. Farmacologia. 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1997. 692.

Tabela 4.3.1 - Concentração inibitória mínima para 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e seus complexos de cobre(II) contra *Salmonella typhimurium*.

Composto	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MIC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
H2Am4DH	272,5	1396
[Cu(H2Am4DH)Cl₂] (1)	250,0	758
H2Am4Me	285	1363
[Cu(H2Am4Me)Cl₂] (2)	255	671
H2Am4Et	260	1246
[Cu(H2Am4Et)Cl]Cl (3)	505	1412
H2Am4Ph	260	1165
[Cu(2Am4Ph)Cl] (4)	500	1350
CuCl ₂ . 2H ₂ O	540	3167
Amoxicilina	1,0	2,75

Todos os complexos revelaram baixa atividade contra *S. typhimurium*. Os valores de MIC apresentam-se na faixa de 671-1350 $\mu\text{mol L}^{-1}$ que é uma dosagem relativamente alta. Pela coordenação ao metal os valores de MIC diminuem nos casos dos complexos **1** e **2**, mas aumentam naqueles dos complexos **3** e **4**.

Tabela 4.3.2 - Concentração inibitória mínima para 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e seus complexos de cobre(II) contra *Pseudomonas Aeruginosa*.

Composto	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MIC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
H2Am4DH	257,5	1320
[Cu(H2Am4DH)Cl₂] (1)	505,0	1532
H2Am4Me	277,5	1330
[Cu(H2Am4Me)Cl₂] (2)	510,0	1340
H2Am4Et	272,5	1220
[Cu(H2Am4Et)Cl]Cl (3)	510,0	1430
H2Am4Ph	560	2060
[Cu(2Am4Ph)Cl] (4)	505	1357
CuCl ₂ . 2H ₂ O	410	1110
Tetraciclina	16,25	42,76

As tiosemicarbazonas livres apresentam valores de MIC entre 1320-2060 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que os complexos mostram uma atividade mais baixa com valores de MIC entre 1340-1530 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Aqui a coordenação ao cobre(II) levou a maiores valores de MIC em todos os casos, com exceção no caso do complexo 4.

Estes resultados sugerem que a complexação ao cobre(II) não seria uma boa estratégia de ampliação do espectro antibacteriano dessas tiosemicarbazonas.

4.4- Toxicidade em *Artemia salina*

Artemia salina é um microcrustáceo de baixo custo e os bioensaios de toxidez em *A. salina* são de fácil execução, podendo ser realizados sem a necessidade de equipamentos especiais, sem condições rígidas de assepsia. Estes bio-ensaios têm sido utilizados como pré “screening”, uma vez que apresentam boa correlação com alterações mitóticas em culturas de células, além de servirem como indicadores de toxicidade no estudo de compostos com potencial atividade biológica¹⁸.

Em estudos anteriores, testes realizados com 2-piridinoformamida tiossemicarbazona e derivados *N*(4)-metil (H2Am4Me), *N*(4)-etil (H2Am4Et) e seus complexos de ferro(III) indicaram que tais compostos teriam potencial atividade antineoplásica, devido à alta toxicidade observada para estes compostos com baixos valores de DL₅₀. ([Fe(2Am4DH)₂]Cl, 30.14 ± 1.93 μM; [Fe(2Am4Me)₂]Cl, 14.12 ± 0.98 μM; [Fe(2Am4Et)₂]Cl, >90 μM). Como se pode observar, os valores de DL₅₀ dos complexos de ferro foram menores que o do lapachol (DL₅₀ = 68μg.mL⁻¹ = 281 μM)⁶ usado como controle positivo.

Os complexos de cobre(II) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona e seus derivados *N*(4)-metil (H2Am4Me), *N*(4)-etil (H2Am4Et) mostraram-se ainda mais tóxicos do que os complexos de ferro(III).

¹⁸ J.M. Siqueira, M.D. Bomm, N.F.G. Pereira, W.S. Garcez, M.A.D. Boaventura, Quím. Nova, 21 (1998) 557-559.

Tabela 4.4. 1 - Toxicidade de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e seus complexos de cobre(II) contra *Artemia salina*.

Compostos	DL ₅₀ [*] , μmol L ⁻¹ ± SD
H2Am4DH	36,6 ± 4,4
[Cu(H2Am4DH)Cl₂] (1)	12,1 ± 1,4
H2Am4Me	50,0 ± 3,8
[Cu(H2Am4Me)Cl₂] (2)	1,2 ± 0,2
H2Am4Et	26,0 ± 5,3
[Cu(H2Am4Et)Cl]Cl (3)	1,6 ± 0,7
H2Am4Ph	2,2 ± 0,5
[Cu(2Am4Ph)Cl] (4)	7,2 ± 0,7
CuCl ₂ . 2H ₂ O	7,0 ± 1,7

* DL₅₀, dose letal que causa a morte de 50% do grupo de animais testados; SD, desvio padrão.

Todos os compostos apresentam baixos valores de DL₅₀ se comparados ao valor do lapachol⁶, indicando maior toxidez. Dentre as tiossemicarbazonas livres, H2Am4Ph mostrou o resultado mais promissor. A coordenação ao cobre(II) promoveu um decréscimo significativo nos valores de DL₅₀. Os complexos **2** e **3** apresentam os melhores resultados, já que suas toxicidades são superiores às das tiossemicarbazonas livres e à do sal de partida, o qual também revelou-se muito tóxico. No caso dos complexos **2** e **3** a toxidez poderia ser atribuída ao complexo como uma entidade, já que os valores de DL₅₀ são mais baixos do que aqueles da base livre ou do metal.

De acordo com estudos comparativos efetuados no Instituto Nacional do Câncer (EUA), em geral, alta toxicidade (ou seja, baixa DL₅₀) de substâncias em larvas de *A. salina* é correlacionada à alta inibição (ou baixa concentração que inibe 50% do crescimento de células, CI₅₀) *in vitro* em linhagens de células provenientes de tumores

sólidos¹⁹. Nesse contexto, esse resultado revela os compostos como potenciais agentes citotóxicos e antitumorais.

¹⁹ K.S. Souza, J.S. Chaar, K.M.T. Oliveira, E.O. Gomes, C.N. Portela, A.M. Pohlit, E.L.J. Quignard, S.M. Nunomura, W.P. Tadei, V.E. Mouchrek Filho, D.D. Silva, M.S. Galhiane, G.O. Chierice, Rev. Bras. Pl. Med. 9 (2007) 1-7.

Capítulo 5

Discussões e conclusões

Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito da coordenação a metais sobre o perfil farmacológico de duas famílias de tiossemicarbazonas: 2-piridinoformamida tiossemicarbazona (H2Am4DH) e seus derivados *N*(4)-metil (H2Am4Me), *N*(4)-etil (H2Am4Et) e *N*(4)-fenil (H2Am4Ph) substituídos, e de *N*(4)-*orto*, *N*(4)-*meta* e *N*(4)-*para*-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina (H2Ac4oT, H2Ac4mT, H2Ac4pT) e de 2-benzoilpiridina (H2Bz4oT, H2Bz4mT, H2Bz4pT). Foram feitos estudos de atividades citotóxica, antimicrobiana, e de toxidez em *Artemia salina*, comparando-se os efeitos das tiossemicarbazonas livres com aqueles observados para os complexos metálicos.

Trabalhos feitos por outros membros de nossa equipe mostraram que a coordenação de *N*(4)-toluil 2-formil-, 2-acetil- a 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas a Cu(II) leva a uma significativa diminuição de valores de concentração inibitória mínima (MIC) contra o crescimento de colônias de bactérias *gram*-negativas *Salmonella typhimurium* e de fungos (leveduras) *Candida albicans*.^{1,2}

Recentemente foi demonstrado um efeito semelhante para a coordenação de 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas a gálio(III), a qual levou a um importante aumento na atividade antibacteriana contra bactérias *gram*-negativas do gênero *Pseudomonas aeruginosa* e da atividade antifúngica contra uma variedade de cepas de *cryptococcus*.³

No presente trabalho preparamos complexos de Cu(II) de tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida, como parte do estudo do perfil farmacológico dessa classe de compostos, que tem sido feito pioneiramente em nosso laboratório. Investigamos a ação das tiossemicarbazonas contra o crescimento de *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* para verificar se a coordenação ao cobre levaria a um aumento da atividade antimicrobiana, como observado em outras famílias de tiossemicarbazonas.

Assim quatro complexos foram obtidos, [Cu(H2Am4DH)Cl₂] (**1**) e [Cu(H2Am4Me)Cl₂] (**2**), [Cu(H2Am4Et)Cl]Cl (**3**) e [Cu(2Am4Ph)Cl] (**4**) (os dois últimos inéditos), nos quais a tiossemicarbazona coordena-se ao metal através do sistema quelante

¹ I.C. Mendes, J.P. Moreira, A.S. Mangrich, S.P. Balena, B.L. Rodrigues, H. Beraldo, Polyhedron, 26 (2007) 3263-3270.

² I.C. Mendes, J.P. Moreira, N.L. Speziali, A.S. Mangrich, J.A. Takahashia, H. Beraldo, J. Braz. Chem. Soc., 17 (2006) 1571-1577.

³ J. G. da Silva, H. Beraldo, (2008) dados não publicados.

N_{py} -N-S, como um ligante neutro em (1-3) e sob a forma aniônica em 4. A estrutura cristalográfica de 4 confirma os sítios de ligação ao cobre e a complexação da tiossemicarbazona contendo um enxofre de tiolato.

A coordenação a Cu(II) levou a uma diminuição para a metade do valor de MIC contra *S. Typhimurium* no caso de dois dos quatro complexos testados (1 e 2) em relação às tiossemicarbazonas livres. No entanto, esta diminuição não foi tão grande quanto aquela observada anteriormente por outros pesquisadores de nossa equipe para complexos de Cu(II) de *N*(4)-toluil-tiossemicarbazonas derivadas de 2-formil-, 2-acetil- e 2-benzoilpiridina, para os quais os valores de MIC sofreram decréscimos de 20 a 150 vezes em relação aos valores determinados para as tiossemicarbazonas livres. Uma vez que complexos dos tipos [Cu(HL)Cl₂] e [Cu(L)Cl] foram obtidos para as duas classes de tiossemicarbazonas, as diferenças de comportamento não poderiam ser atribuídas a diferenças na esfera de coordenação ao metal. Diferenças em potenciais redox envolvendo a porção tiossemicarbazona e o metal poderiam talvez influir no comportamento frente à bactéria, assim como a presença de um grupo amino em C7 nas tiossemicarbazonas derivadas de piridinoformamida, no lugar dos grupos H, metila ou fenila nas *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-formil-, 2-acetil- e 2-benzoilpiridina. Um aumento dos valores de MIC contra *P. aeruginosa* foi observado pela coordenação a Cu(II) para todas as tiossemicarbazonas, a exceção do complexo 4, para o qual o valor de MIC diminuiu em relação ao valor obtido para a tiossemicarbazona livre.

Os resultados sugerem então que a coordenação a Cu(II) não seria uma boa estratégia para melhorar a ação antibacteriana de tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida contra bactérias *gram*-negativas.

Outra parte deste trabalho consistiu em investigar a toxidez dos complexos de Cu(II) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas em *Artemia salina*, já que resultados desses bio-ensaios podem apresentar boa correlação com atividade antitumoral. Outros membros de nosso grupo mostraram que a coordenação de 2-piridinoformamida tiossemicarbazona e seus derivados *N*(4)-metil e *N*(4)-etil a Fe(III) é uma boa estratégia para diminuir os valores de DL₅₀ contra *Artemia salina*.⁴

Os baixos valores de DL₅₀, na faixa 12.1 – 1.6 μM, encontrados para os complexos de cobre indicam uma toxidez maior que a dos complexos de Fe(III) (DL₅₀ = 14 – 90 μM) e também maior que a do lapachol (DL₅₀ = 281 μM) usado como referência. Pela

⁴ A.E. Graminha, F.S. Vilhena, A.A. Batista, S.R.W. Louro, R.L. Ziolli, L.R. Teixeira, H. Beraldo, *Polyhedron*, 27 (2008) 547-551.

complexação a Cu(II), a toxidez das 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas - principalmente nos complexos **2** e **3** - aumenta. Para **2** e **3** a toxidez poderia ser atribuída ao complexo como uma entidade, já que os valores de DL₅₀ são mais baixos do que aqueles encontrados para a base livre ou para o sal do metal, este último também muito tóxico (DL₅₀ = 7 µM).

Esses resultados sugerem que tais complexos poderiam apresentar atividade antitumoral. No caso do complexo **4** não foi observado um aumento de toxidez em relação à base livre H2Am4Ph. O baixo valor de DL₅₀ apresentado por H2Am4Ph (DL₅₀ = 2,2 µM) indica que estudos adicionais de citotoxicidade contra linhagens de células tumorais deveriam ser realizados.

Considerando-se que a literatura relata que complexos de Pd(II) e Pt(II) de uma variedade de tiossemicarbazonas apresentam atividade citotóxica em células tumorais resistentes ao cisplatina, e que esses compostos podem ser menos tóxicos ou apresentar um espectro de atividade mais amplo⁵, foram obtidos seis novos complexos de Pd(II) de *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-acetilpiridina e 2-benzoilpiridina e três novos complexos de Pt(II) de *N*(4)-toluil tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina. Procurou-se estabelecer a influência, sobre a atividade, da posição do grupo metila no substituinte toluil, assim como a influência da variação do substituinte em C7 (metil ou fenil). Em seguida foi investigada a influência da coordenação ao metal sobre a ação citotóxica das tiossemicarbazonas frente a células de tumores sólidos e leucemias.

Formaram-se os complexos [Pd(2Ac4oT)Cl] (**1**), [Pd(2Ac4mT)Cl] (**2**) [Pd(2Ac4pT)Cl] (**3**) [Pd(2Bz4oT)Cl] (**4**) [Pd(2Bz4mT)Cl] (**5**) e [Pd(2Bz4pT)Cl] (**6**) com Pd(II) e [Pt(2Bz4oT)Cl] (**7**) [Pt(2Bz4mT)Cl] (**8**) e [Pt(2Bz4pT)Cl] (**9**), nos quais a tiossemicarbazona liga-se ao metal sob a forma aniônica através do sistema quelante N_{py}-N-S, como confirmado pelas estruturas cristalográficas dos complexos **4-6**.

Estudos preliminares do efeito citotóxico das tiossemicarbazonas livres e seus complexos de Pd(II) e Pt(II) foram realizados contra as linhagens de células de tumores sólidos humanos hepatoma (HepG2), melanoma (UACC-62) e carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (A431), e contra leucemias HL60 resistente a quimioterápicos e Jurkat.

Na concentração testada (50 µM) H2Ac4pT e H2Bz4mT revelaram-se os compostos mais ativos e apresentaram atividades semelhantes sobre a proliferação de células HepG2, inibindo a proliferação em cerca de 50%. Estimativas preliminares de

⁵ A.C. Caires, E.T. Almeida, A.E. Mauro, J.P. Hemerly, S.R. Valentini, Quim. Nova 22 (1999) 329-334.

caráter lipofílico para as tiossemicarbazonas indicaram que as diferenças em lipofilia não seriam fator determinante para a atividade citotóxica. Nessa concentração H2Ac4pT e H2Bz4mT mostraram-se também os compostos mais ativos contra a linhagem de carcinoma A431, inibindo a proliferação em 70-80 % na concentração de 50 µM. Nas duas linhagens as tiossemicarbazonas com maior efeito citotóxico foram mais ativas que cisplatina. As seis tiossemicarbazonas apresentaram um efeito semelhante frente à linhagem UACC-62, inibindo em torno de 50% da proliferação a 50 µM.

O efeito citotóxico das 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas em linhagens de células de carcinoma A431 pareceria seguir a ordem H2Ac4oT < H2Ac4mT < H2Ac4pT. Esta última mostrou-se particularmente ativa, inibindo 75-80% da proliferação celular. Entre as 2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas a mesma ordem não se verifica, já que nesta série a ordem do efeito citotóxico seria H2Bz4pT < H2BzoT < H2Bz4mT. H2BzmT inibiu a proliferação celular em cerca de 75%. De qualquer modo, os compostos estudados pareceria ser de modo geral mais ativos contra esta linhagem celular do que contra as duas outras linhagens de tumores sólidos.

As N(4)-toluil-2benzoilpiridina tiossemicarbazonas mostraram-se menos ativas frente às linhagens de leucemias do que frente às linhagens de tumores sólidos, inibindo de 6 a 48% da proliferação celular nas leucemias. Desse modo, uma certa preferência pelos tumores sólidos pareceria se verificar.

Pela coordenação ao paládio a atividade antiproliferativa das 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas frente às três linhagens de tumores sólidos sofre uma diminuição. Na linhagem de tumor hepático HepG2 os complexos de paládio de 2-acetilpiridina tiossemicarbazonas pareceria apresentar um efeito de estimular a proliferação celular.

Os complexos de Pd(II) de tiossemicarbazonas derivadas de 2-benzoilpiridina mostraram-se menos ativos que as tiossemicarbazonas livres frente à linhagem UACC-62, mais ativos do que as tiossemicarbazonas livres frente à linhagem HepG2 no caso dos complexos com H2Bz4oT (**4**) e H2Bz4pT (**6**) e o complexo com H2Bz4pT (**6**) mostrou-se mais ativo do que a tiossemicarbazona livre frente à linhagem de carcinoma A431. No caso das linhagens UACC-62 e A431 a atividade antiproliferativa segue a ordem **6**>**5**>**4**.

A coordenação à platina leva a um decréscimo de atividade frente às linhagens HepG2 e UACC62 e a um pequeno acréscimo frente à linhagem A431 no caso do complexo **9**. Como mencionamos, os complexos de platina foram menos ativos do que as tiossemicarbazonas livres frente à linhagem HepG2, mas foi possível estabelecer uma ordem de atividade: **9**>**8**>**7**.

De modo geral, salvo algumas exceções, a coordenação a Pd(II) e Pt(II) levou a um decréscimo na atividade antiproliferativa das tiossemicarbazonas frente às linhagens de tumores sólidos. No entanto, a coordenação das *N*(4)-toluol-2-benzoilpiridina tiossemicarbazonas a Pd(II) levou a um significativo aumento da atividade citotóxica frente às linhagens de leucemias, com exceção do complexo **6**, que apresentou um efeito de estimulação da proliferação celular na linhagem Jurkat. Em ambas as linhagens leucêmicas a ordem de atividade dos complexos de Pd(II) é **4**>**5**>**6**. Aqui seria interessante comentar que a ordem exatamente inversa foi observada para a ação dos complexos frente à linhagem A431 e que o complexo **6** é o mais ativo nas linhagens de tumores sólidos e o menos ativo nas linhagens de leucemias. Esses resultados indicam que os mecanismos de ação antiproliferativa são diferentes nos dois tipos de tumores.

Foi possível estabelecer uma relação entre estrutura e atividade nos complexos mas não nos ligantes, provavelmente porque em todos os complexos a tiossemicarbazona encontra-se sob a forma aniônica e na conformação *EZ*. Em trabalhos anteriores demonstrou-se que H2AcM_T e H2AcP_T encontram-se na conformação *EE* e H2BzP_T na conformação *ZE* no sólido.⁶ As diferenças de conformação das tiossemicarbazonas livres são talvez um dos fatores que contribuem para que a atividade não siga a ordem *orto-meta-para*.

A significativa atividade citotóxica dos complexos **4-6** frente à linhagem HL60.bcl2 mostra-se particularmente interessante, uma vez que esta linhagem é resistente aos quimioterápicos. Células de leucemias mielóide humanas resistentes a múltiplos estímulos apoptóticos como células HL60.bcl2 que super-expressam a proteína antiapoptótica Bcl2 têm sido utilizadas em muitos estudos para triagem de novas substâncias antitumorais. Nestas células apoptose e multi-resistência a drogas mostram-se secundárias a diversos mecanismos, incluindo, entre outros, a expressão de proteínas antiapoptóticas como Bcl2. Vários trabalhos têm demonstrado que células multiresistentes a drogas são resistentes a apoptose. Tornam-se, portanto, um alvo interessante para a triagem de substâncias citotóxicas e pro-apoptóticas e a descoberta de uma molécula ativa pode representar a descoberta de protótipo útil no desenvolvimento de uma nova classe de potentes indutores de apoptose ativos contra malignidades multiresistentes.

⁶ MENDES, Isolda C. **Estudo do perfil farmacológico de tiossemicarbazonas derivadas de piridina e piridinoformamida**: Efeitos da coordenação a metais. Belo Horizonte: UFMG, 2007. 236-237. Tese (Doutorado) – Programa de pós – Química, Belo Horizonte, 2007.

A aparente preferência das tiosemicarbazonas pelos tumores sólidos e dos complexos por leucemias torna esta classe de compostos particularmente interessante. Investigações de indução de apoptose e estudos de mecanismo de ação encontram-se em curso atualmente em nossa equipe, para que possamos melhor explorar os possíveis usos dos compostos aqui estudados como candidatos a protótipos de fármacos.

ANEXO: Artigo

Elsevier Editorial System(tm) for Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Copper(II) complexes with 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones: spectral studies and toxicity against *Artemia salina*

Article Type: Full Length Article

Keywords: 2-pyridineformamide thiosemicarbazones, copper(II) complexes, toxicity, *Artemia salina*

Corresponding Author: Professor Heloisa Beraldo,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Karina O Ferraz

Order of Authors: Karina O Ferraz; Solange M Wardell, PhD; James L Wardell, Professor of Chemistry; Sonia R Louro, PhD; Heloisa Beraldo

Abstract: In the present work the copper(II) complexes [Cu(H₂Am₄DH)Cl₂] (1) [Cu(H₂Am₄Me)Cl₂] (2), [Cu(H₂Am₄Et)Cl]Cl (3) and [Cu(2Am₄Ph)Cl] (4) with 2-pyridineformamide thiosemicarbazone (H₂Am₄DH) and its N(4)-methyl (H₂Am₄Me), N(4)-ethyl- (H₂Am₄Et) and N(4)-phenyl (H₂Am₄Ph) derivatives were studied by means of infrared and EPR spectral techniques. The crystal structure of 4 was determined. The complexes proved to be toxic to *Artemia salina*, suggesting that they could present cytotoxic activity against solid tumors.

Suggested Reviewers: Antonio S Mangrich

Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná 81.531-990 Curitiba, Brazil

mangrich@quimica.ufpr.br

Professor mangrich is an expert on copper EPR

Alfonso Castiñeras

Professor Of Chemistry, Departamento de Quimica Inorganica, Universidad de Santiago de Compostela, E-15706 Santiago de Compostela, Spain

qiac01@usc.es

Professor Castiñeras is an expert on crystallography and has published many works on structural and spectral properties of 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones and their metal complexes

**Copper(II) complexes with 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones:
spectral studies and toxicity against *Artemia salina***

Karina O. Ferraz^a, Solange M.S.V. Wardell^b, James L. Wardell^a, Sonia R.W. Louro^c and
Heloisa Beraldo^{a*}

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

^bDepartamento de Síntese, Farmanguinhos – Fiocruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos,
Far-Manguinhos, FIOCRUZ, CEP 21041-250 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^cDepartamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 22453-900 Rio
de Janeiro, Brazil

Abstract

In the present work the copper(II) complexes [Cu(H₂Am₄DH)Cl₂] (**1**) [Cu(H₂Am₄Me)Cl₂] (**2**), [Cu(H₂Am₄Et)Cl]Cl (**3**) and [Cu(2Am₄Ph)Cl] (**4**) with 2-pyridineformamide thiosemicarbazone (H₂Am₄DH) and its *N*(4)-methyl (H₂Am₄Me), *N*(4)-ethyl- (H₂Am₄Et) and *N*(4)-phenyl (H₂Am₄Ph) derivatives were studied by means of infrared and EPR spectral techniques. The crystal structure of **4** was determined. The complexes proved to be toxic to *Artemia salina*, suggesting that they could present cytotoxic activity against solid tumors.

Keywords: 2-pyridineformamide thiosemicarbazones, copper(II) complexes, toxicity, *Artemia salina*

1. Introduction

Thiosemicarbazones and their metal complexes represent an interesting class of compounds with a wide range of pharmacological applications [1,2]. Due to their chelating ability thiosemicarbazones play an important role in Inorganic Medicinal Chemistry. α (N)-heterocyclic thiosemicarbazones derived from 2-formyl-, 2-acetyl-, and 2-benzoylpyridine have been extensively investigated, as well as the effects of metal coordination in their mechanism of action [1-4].

In recent years some structural and spectral studies on 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones have been undertaken [5-11] but to our knowledge their pharmacological profile has not so far been investigated. Our group recently started the study of the pharmacological properties of this class of compounds. We demonstrated that 2-pyridineformamide thiosemicarbazones as well as their organotin complexes are active as antimicrobials against the growth of *Candida albicans* and *Salmonella typhimurium* and are highly active against malignant glioblastoma [12]. We also demonstrated that iron(III) complexes with this class of thiosemicarbazones are toxic to *Artemia salina*, indicating that they could present antineoplastic activity [13].

Copper(II) complexes with a variety of ligands such as aminoacids [14], peptides [15], quinoxalines [16], mono- and bis(thiosemicarbazones) [17,18] proved to be effective as cytotoxic agents in cell cultures as well as *in vivo*. Therefore in the present work, copper(II) complexes with 2-pyridineformamide thiosemicarbazone (H₂Am₄DH) and its *N*(4)-methyl (H₂Am₄Me), *N*(4)-ethyl (H₂Am₄Et) and *N*(4)-phenyl derivatives (Fig. 1) were obtained. The toxicity of the complexes against *Artemia salina* was assayed as a pre-screening of antitumoral action.

Insert Figure 1

2. Experimental

2.1. Apparatus

Partial elemental analyses were performed on a Perkin Elmer CHN 2400 analyzer. Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum GX spectrometer using CsI pellets; an YSI model 31 conductivity bridge was employed for molar conductivity measurements. Magnetic susceptibility measurements were carried out on a Johnson Matthey MSB/AUTO balance. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectra were obtained on a Bruker ESP300E equipment with modulation frequency of 100 kHz and modulation amplitude of 0.4 to 1 mT, where appropriate. Ambient temperature spectra of the samples in the solid state and as DMF solutions (1 mg.mL⁻¹) were obtained in glass capillaries of 1.2 mm internal diameter. Frozen DMF solution spectra were acquired at liquid N₂ temperature (77 K) in 3 mm internal diameter Teflon® tubes. Spectral simulations were performed using EasySpin [19].

2.2. Synthesis of the copper(II) complexes with 2-pyridinoformamide thiosemicarbazone (H2Am4DH) and its N(4)-methyl (H2Am4Me) and N(4)-ethyl (H2Am4Et) and N(4)-phenyl derivatives (H2Am4Ph).

The thiosemicarbazones were obtained as reported in the literature [5]. The copper(II) complexes with H2Am4DH and H2Am4Me had already been obtained by other authors [10,11] but were prepared again in the present work to be studied for their EPR spectral properties and their pharmacological profile. The copper(II) complexes with H2Am4Et and H2Am4Ph were obtained by mixing the desired thiosemicarbazone with CuCl₂·2H₂O in ethanol at room temperature in 1:1 metal-to-ligand molar ratio. The solids which precipitate were filtered off and washed with diethyl ether.

2.2.1. *Dichloro(2-pyridineformamidethiosemicarbazone)copper(II)* [$\text{Cu}(\text{H2Am4DH})\text{Cl}_2$] (1) and *dichloro(N(4)-methyl-2-pyridineformamidethiosemicarbazone)copper(II)* [$\text{Cu}(\text{H2Am4Me})\text{Cl}_2$] $1.5\text{H}_2\text{O}$ (2)

These complexes have been prepared by other authors [10,11].

2.2.2. *Chloro(N(4)-ethyl-2-pyridineformamidethiosemicarbazone)copper(II) chloride* [$\text{Cu}(\text{H2Am4Et})\text{Cl}$] Cl (3)

Green solid. *Anal.* Calc. for $\text{CuC}_9\text{H}_{13}\text{SCl}_2\text{N}_5$: C, 30.22; H, 3.66; N, 19.58. Found: C, 29.87; H, 2.99; N, 19.26%; FW: $357.75 \text{ g mol}^{-1}$. IR (CsI/Nujol, cm^{-1}): $\nu(\text{C}=\text{N}) + \nu(\text{C}=\text{C})$ 1643, $\nu(\text{C}=\text{S})$ 843, $\rho(\text{py})$ 648, $\nu(\text{Cu}-\text{N})$ 482, $\nu(\text{Cu}-\text{S})$ 347, $\nu(\text{Cu}-\text{Cl})$ 315, $\nu(\text{Cu}-\text{N}_{\text{py}})$ 224. Molar conductivity ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ DMF): $55.1 \Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$. Effective magnetic moment = 1.79 (BM). Yield: 95%.

2.2.3. *Chloro(N(4)-phenyl-2-pyridineformamidethiosemicarbazonato)copper(II)* [$\text{Cu}(\text{2Am4Ph})\text{Cl}$] (4)

Green solid. *Anal.* Calc. for $\text{CuC}_{13}\text{H}_{13}\text{SClN}_5$: C, 42.28; H, 3.27; N, 18.96. Found: C, 41.91; H, 2.97; N, 18.84%; FW: $369.33 \text{ g mol}^{-1}$. IR (CsI/Nujol, cm^{-1}): $\nu(\text{C}=\text{N}) + \nu(\text{C}=\text{C})$ 1591, $\nu(\text{C}=\text{S})$ 811, $\rho(\text{py})$ 624, $\nu(\text{Cu}-\text{N})$ 468, $\nu(\text{Cu}-\text{S})$ 342, $\nu(\text{Cu}-\text{Cl})$ 318, $\nu(\text{Cu}-\text{N}_{\text{py}})$ 246. Molar conductivity ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ DMF): $10.0 \Omega^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$. Effective magnetic moment = 1.84 (BM). Yield: 95%.

2.3 Crystallography

[$\text{Cu}(\text{2Am4Ph})\text{Cl}$] (4) was re-crystallized from a mixture of 1:1 acetone:DMF (DMF = dimethylformamide). Data were obtained at 120 K with Mo- $\text{K}\alpha$ radiation by means of the Enraf Nonius KappaCCD area detector diffractometer of the EPSRC crystallographic service, based at the University of Southampton. Data collection was carried out under the control of the program COLLECT [20] and data reduction and unit

cell refinement were achieved with the COLLECT [20] and DENZO programs [21].

Correction for absorption, by comparison of the intensities of equivalent reflections, was applied using the program SADABS [22]. The program ORTEP-3 for Windows [23] was used in the preparation of Figure 3 and SHELXL-97 [24] and PLATON [25] in the calculation of molecular geometry. The structure was solved by direct methods using SHELXS-97 [26] and fully refined by means of the program SHELXL-97 [24]. Difference map peaks provided positions for the hydrogen atoms of the NH groups for which the coordinates, along with isotropic displacement parameters, were fully refined. All other hydrogen atoms were placed initially in calculated positions. Crystal data and structure refinement details are listed in Table 2.

2.4. Assay of toxicity against Artemia salina

The *Artemia salina* (brine shrimp) lethality test was employed as an antitumor prescreen. Lethality towards brine shrimp was assayed using procedures related in the literature [27,28]. Lethal dose (LD₅₀) is the amount of a substance which causes the death of 50% of a group of test animals. Determination of LD₅₀ is an indication of the short-term poisoning potential (acute toxicity) of a compound.

Artemia salina encysted eggs (10 mg) were incubated in 500 mL of seawater under artificial light at 28 °C, pH 7–8. After incubation for 24 h, nauplii were collected with a Pasteur pipette and kept for an additional 24 h under the same conditions to reach the metanauplii stage. The samples to be assayed were dissolved in 1% DMSO (dimethylsulfoxide) and diluted in five different concentrations in seawater. About 10 nauplii were added to each set of tubes containing the samples. Controls containing 1% DMSO in seawater were included in each experiment. Forty-eight hours later, the number of survivors was counted, recorded and the lethal dose 50% (LD₅₀ value) and

95% confidence intervals were calculated by Probit analysis [29]. The repeatability of the method was evaluated using at least five replicates of concentration of each sample.

3. Results and discussion

Microanalyses and molar conductivity data suggest the formation of $[\text{Cu}(\text{HL})\text{Cl}_2]$ complexes with $\text{HL} = \text{H}_2\text{Am}_4\text{DH}$ and $\text{H}_2\text{Am}_4\text{Me}$ (complexes **1** and **2** respectively), and of $[\text{Cu}(\text{HL})\text{Cl}]\text{Cl}$, with $\text{HL} = \text{H}_2\text{Am}_4\text{Et}$ (complex **3**), in which a neutral thiosemicarbazone is attached to the metal centre along with one or two chloride ions. $[\text{Cu}(\text{L})\text{Cl}]$ is formed with $\text{H}_2\text{Am}_4\text{Ph}$ (complex **4**), in which the thiosemicarbazone coordinates as an anionic ligand. In **3** and **4** only one chloride ion is attached to the metal centre, probably due steric restrictions imposed by the bulky ethyl and phenyl substituents at $N(4)$. Crystal structure determinations confirmed the proposed formulation for complex **4**. The values of magnetic moments in the 1.72–1.84 BM range are close to the calculated value of 1.73 BM, characteristic of the presence of one unpaired electron as in copper(II) complexes.

3.1. Infrared spectra

The $\nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{C}=\text{N})$ composed mode observed in the 1608–1587 cm^{-1} range in the spectra of the thiosemicarbazones shifts to 1643–1591 cm^{-1} in the spectra of complexes **3** and **4**, indicating coordination of the azomethine nitrogen N_2 [5,30]. The $\nu(\text{C}=\text{S})$ absorption at 847 cm^{-1} in the spectrum of free $\text{H}_2\text{Am}_4\text{Et}$ is observed at 843 cm^{-1} in that of complex **3**, indicating coordination of a thione sulfur. This absorption goes from 860 cm^{-1} in $\text{H}_2\text{Am}_4\text{Ph}$ to 811 cm^{-1} in complex **4**, in accordance with coordination through a thiolate sulfur. The 49 cm^{-1} shift observed upon complexation is compatible with coordination of an anionic thiosemicarbazone [13]. The pyridine in-plane deformation mode at 622–600 cm^{-1} in the spectra of the free bases shifts to 648–

624 cm⁻¹ in those of complexes **3** and **4**, suggesting coordination of the heteroaromatic nitrogen [5,30]. In addition, new absorptions at 468–482 cm⁻¹ and 246–224 cm⁻¹ have been attributed to $\nu(\text{Cu-N})$ and $\nu(\text{Cu-N}_{\text{py}})$, respectively, and bands in the 347–342 cm⁻¹ range have been assigned to $\nu(\text{Cu-S})$ [5,30-32]. The infrared data for the complexes indicate coordination of the thiosemicarbazones through the N_{py}-N-S chelating system, which was confirmed by the X-ray structure determination for **4**.

3.2. EPR spectra

The EPR spectra of **1-4** in the solid state (300 K) are presented in Fig. 2a together with their simulation using EasySpin. They are due to mononuclear Cu(II) complexes. Values of g_{\parallel} and g_{\perp} are in the range for this kind of complexes. The EPR parameters g_{\parallel} and g_{\perp} characteristic of axial symmetry are listed in Table 1: $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2$ for all complexes. The values are consistent with a $d_{x^2-y^2}$ ground state. The spectra do not show hyperfine coupling. Given that these are magnetically non-dilute systems, dipole-dipole interactions and exchange coupling normally occur. The lines of **2** (two components) and **3** are markedly broadened suggesting a strong dipole-dipole interaction. On the contrary, the lines of compounds **1** and **4** appear quite sharp. This is surprising because there is no reason to believe that the Cu²⁺ ions would be more separated in **1** and **4** than in **2** and **3**. One explanation for this result is that the lines of **1** and **4** are exchange narrowed, suggesting an exchange interaction between crystallographically equivalent ions, while for **2** and **3** it would occur between crystallographically non-equivalent ions [33]. The values of the geometric parameter $G = (g_{\parallel} - 2.0023) / (g_{\perp} - 2.0023)$, which measures the degree of exchange interaction between the copper centers in polycrystalline compounds [33], indicate some exchange

($G < 4.4$) for all **1** – **4**. Compounds **1** – **3** show similar g factors but very different line-widths. Compound **4** presents lower g_{\parallel} and g_{\perp} .

Insert Table 1

The EPR spectra of the complexes in DMF solution at ambient temperature (300 K) are very similar (Fig. 2b). They are almost isotropic due to fast rotation, and show the 4-line hyperfine splitting due to the interaction with ^{63}Cu (or ^{65}Cu , ~30% abundance) nuclear magnetic moments ($I=3/2$). The line shapes of the four hyperfine lines are well reproduced using the fast-motion regime with a correlation time of 7×10^{11} s (dotted line in Fig. 2c). Super hyperfine splitting due to the interaction with ^{14}N nuclei ($I=1$) splits the high-field hyperfine line ($M_I = 3/2$) into nine with $A_N \approx 1.0$ mT (~30 MHz), suggesting a super hyperfine interaction with four nitrogen atoms (equivalent due to fast rotation), but the relative intensities of the nitrogen lines (at the high-field region) could not be reproduced by including this interaction in the hamiltonian.

Insert Figure 2a, Figure 2b and Figure 2c

The spectra of the complexes in DMF at 77 K are characteristic of axial symmetry (Fig. 2c). The EPR parameters of **1** – **3** are very similar. The spectrum of **3**, however, presents a second component similar to the spectrum of **4**. The perpendicular region of all four spectra exhibits a nitrogen super hyperfine structure. There are at least two non equivalent N atoms, (N1 and N2 in Fig. 1) interacting with the unpaired electron, but the unresolved perpendicular hyperfine splitting due to ^{63}Cu and ^{65}Cu and a possible deviation from the axial symmetry make it difficult to reliably simulate the nitrogen structure. The main spectral features were simulated using the spin hamiltonian of a spin 1/2 with axial symmetry and nuclear hyperfine interaction with ^{63}Cu or ^{65}Cu in natural abundance, and the results for **1** and **4** are presented in Fig. 2c, dotted lines. The

EPR parameters are listed in Table 1. The empirical factor $f = g_{\parallel}/A_{\parallel}$ (with A_{\parallel} in cm^{-1}) is a convenient empirical index of distortion from planar toward tetrahedral [34] and vary from 105-135 for small to extreme distortion. It shows that compounds **1**, **2** and **3** ($f \sim 129$) are more distorted than compound **4** ($f = 116$).

The EPR results are in agreement with other studies of homologous thiosemicarbazones [35,36], which showed that copper complexes of mono(thiosemicarbazones) are less stable than the corresponding with bis(thiosemicarbazones) presenting, especially at room temperature, more than one species in solution.

3.3. Crystallography

The atom arrangements and atom numbering scheme for **4** are shown in Figure 3, while selected geometric parameters are listed in Table 2. The compound contains a tridentate deprotonated thiosemicarbazone-*N,N,S* ligand, with formation of two 5-membered chelate rings. The distorted square planar geometry about copper is completed by a chloride group. Distortions from an ideal square planar arrangement mainly arise from the small chelate bite angles, $\text{N}(2)\text{-Cu}(1)\text{-N}(1) = 80.34(15)$ and $\text{N}(2)\text{-Cu}(1)\text{-S}(1) = 83.73(10)^{\circ}$.

Insert Table 2 and Figure 3

The fragment of the molecule comprising the pyridine ring and the chelate rings [C6,C5,C4,C3,C2,N1,C2,C7,N2,N3, S1 and Cu atoms] is essentially planar: the best plane of the remaining phenyl group [C8-C13] makes an angle of $21.53(7)^{\circ}$ with this plane. Intramolecular hydrogen bonds, $\text{N5-H5B} \cdots \text{N3}$, $\text{C6-H6} \cdots \text{Cl1}$ and $\text{C9-H9} \cdots \text{N3}$, help cement the molecular structure, see Table 3.

The molecules are linked by hydrogen bonds, as well as by C-H... π interactions and π - π stacking interactions into a 3-D framework. The important intermolecular hydrogen bonds, detected by the PLATON program, are listed in Table 3, while Figure 4 illustrates the molecular connections formed by the N5-H5a---S1, N5-H5b---Cl and N4-H4a---Cl intermolecular H-bonds. Listings of the C-H... π interactions and π - π stacking interactions can be found in the Supplementary Tables. N5-H5a---S1, N5-H5b---Cl and N4-H4a---Cl hydrogen bonds.

Insert Table 3 and Figure 4

3.4. Toxicity against Artemia salina

LD₅₀ average values for the thiosemicarbazones and their copper(II) complexes are reported in Table 4. We obtained LD₅₀ in the 50.00-2.18 μ M range for the free thiosemicarbazones and in the 12.00 -1.24 μ M range for the copper(II) complexes. The tested compounds were found to be more active than lapachol (LD₅₀ = 281 μ M), which is known as reference [37]. Among the free thiosemicarbazones H2Am4Ph proved to be the most promising compound. Upon coordination with formation of **1-3** the values of LD₅₀ significantly decrease, indicating higher toxicity for the complexes. Since the value of LD₅₀ for CuCl₂.2H₂O was very low, the effect of coordination is probably mainly due to the presence of the metal. However, in the case of complexes **2** and **3** the values of LD₅₀ are lower than that of the copper salt, indicating that toxicity is probably attributable to the complex as an entity or to a synergistic effect involving the thiosemicarbazone and copper. In the case of H2Am4Ph coordination revealed not to be a good strategy for increasing toxicity.

Comparison between the data obtained in the present work with those previously reported by us for the iron(III) complexes with H2Am4DH, H2Am4Me, H2Am4Et [13], indicates that coordination to copper(II) would be a better strategy for increasing

toxicity. Moreover, the low values of LD₅₀ obtained for H2Am4Ph and complexes **2** and **3** suggest that these compounds should be selected for further studies of cytotoxicity against tumor cell lines.

Insert Table 4

4. Conclusions

The toxicity against *Artemia salina* bioassay has a good correlation with cytotoxic activity in some human tumors [37]. The low LD₅₀ values obtained for the studied compounds in this assay indicate that they could present antineoplastic properties.

Acknowledgements

We thank the EPSRC X-Ray Crystallographic Service based at the University of Southampton, England for the data collection. This work was supported by Capes, CNPq and Instituto do Milênio-Inovação e Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos (IM-INOVAR, Proc. CNPq 420015/05-1). We acknowledge Dr. Clesia Nascentes (Departamento de Química UFMG) for helpful discussions and suggestions.

Supplementary Material

CCDC 684883 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

References

- [1] H. Beraldo and D. Gambino, *Mini-rev. Med. Chem.* 4 (2004) 31-39.
- [2] D.X. West, A. Liberta, S.B. Padhye, R.C. Chikate, P.B. Sonawane, A.S. Kumbhar and R.G. Yerande, *Coord. Chem. Rev.* 123 (1993) 49-71.
- [3] A.E. Liberta and D.X. West, *Biometals* 5 (1992) 121-126.
- [4] D.X. West, S. Padhye and P.B. Sonawane, *Struct. Bond.* 76 (1991) 1-50.
- [5] D.X. West, J.K. Swearing, J. Valdés-Martínez, S. Hernández-Ortega, A.K. El-Sawaf, F. van Merus, A. Castiñeiras, I. Garcia and E. Bermejo, *Polyhedron* 18 (1999) 2919-2929.
- [6] A. Castiñeiras, I. Garcia, E. Bermejo, D.X. West, *Zeit. Naturforsch. B: Chem. Sci.* 55 (2000) 511-518.
- [7] E. Bermejo, A. Castiñeiras, I. Garcia-Santos, D.X. West, *Zeit. Anorgan. Allg. Chem.* 631 (2005) 728-738.
- [8] E. Bermejo, A. Castiñeiras, L.M. Fostiak, I. Garcia-Santos, J.K. Swearingen and D.X. West, *Polyhedron* 23 (2004) 2303-2313.
- [9] I. Garcia, E. Bermejo, A.K. El Sawaf, A. Castiñeiras, D.X. West, *Polyhedron* 21 (2002) 729-737.
- [10] M.C. Aguirre, J. Borrás, A. Castiñeiras, J.M. García-Monteagudo, I. García-Santos, J. Niclós, D.X. West, *Eur J. Inorg. Chem.* 06 (2006) 1231-1244.
- [11] D.X. West, J.K. Swearingen, A.K. El-Sawaf, *Transition Met. Chem.* 25 (2000) 80-83.
- [12] I.C. Mendes, J.P. Moreira, J.D. Ardisson, R.G. Santos, P. R.O. Silva, I. Garcia, A. Castiñeiras, H. Beraldo, *Eur J. Med. Chem.* 43 (2008) 1454-1461.
- [13] A.E. Graminha, F.S. Vilhena, A.A. Batista, S.R.W. Louro, R. L. Ziolli, L.R. Teixeira, H. Beraldo, *Polyhedron* 27 (2008) 547-551.

- [14] E.J. Baran, *Acta Farm. Bonaerense* 4 (1985) 125-133
- [15] L. Pickart and M. Thaler, *Nature* 288 (1980) 71-717.
- [16] C. Urquiola, D. Gambino, M. Cabrera, M. L. Lavaggi, H. Cerecetto, M. González, A. López de Cerain, A. Monge, A. J. Costa-Filho, M. H. Torre *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 119-126.
- [17] N.P. Farrell, *Uses of Inorganic Chemistry in Medicine*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge (1999) 133-153.
- [18] M. Baldini, M. Belicchi-Ferrari, F. Bisceglie, P.P. Dall' Aglio, G. Pelosi, S. Pinelli and P. Tarasconi, *Inorg. Chem.* 43 (2004) 7170-7179.
- [19] S. Stoll, A. Schweiger, *J. Magn. Reson.* 178 (2006) 42-55.
- [20] R.W.W. Hooft, COLLECT. Nonius BV, Delft, The Netherlands. 1998.
- [21] C.W. Carter Jr., R.M. Sweet (Eds.), *Methods in Enzymology, Macromolecular Crystallography Part A*, 307-326, Academic Press, New York, 1997.
- [22] G.M. Sheldrick, SADABS. Version 2.10. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA, 2003.
- [23] L.J. Farrugia, *J. Appl. Cryst.* 32 (1999) 837-838.
- [24] G.M. Sheldrick, SHELXL-97. Program for Crystal Structure Refinement. University of Göttingen, Germany, 1997.
- [25] A.L. Spek, *J. Appl. Cryst.* 36 (2003) 7-13.
- [26] G.M. Sheldrick, SHELXS-97. Program for the Solution of Crystal Structures. University of Göttingen, Germany, 1997.
- [27] B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, J.L. McLaughlin, *J. Med. Plant Res.* 45 (1982) 31-34.
- [28] I.A. Nascimento, M.M.S. Araújo, *Ecotoxicol. Environ. Restor.* 2 (1999) 41.
- [29] D.J. Finney, *Probit Analysis*, Cambridge University Press, Cambridge, 1971.

- [30] M. Joseph, A. Sreekanth, V. Suni, M.R. Prathapachandra Kurup, *Spectrochim. Acta Part A* 64 (2006) 637.
- [31] A. Sreekanth, M.R. Prathapachandra Kurup, *Polyhedron* 23 (2004) 969-978.
- [32] A. Sreekanth, Hoong-Kun Fun, M.R. Prathapachandra Kurup, *J. Mol. Struct.* 737 (2005) 61-67.
- [33] I.M. Procter, B.J. Hathaway, P. Nicholls, *J. Chem. Soc. (A)* (1968) 678-1684.
- [34] U. Sakaguchi, A.W. Addison, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1979) 600-608.
- [35] R. Pogni, M.C. Baratto, A. Diaz, R. Basosi, *J. Inorg. Biochem.* 79 (2000) 333-337.
- [36] A. Diaz, R. Pogni, R. Cao, R. Basosi, *Inorg. Chim. Acta* 552 (1998) 275-276.
- [37] L.P. Santos Pimenta, G.B. Pinto, J.A. Takahashi, L.G.F. Silva, M.A.D. Boaventura, *Phytomedicine* 10 (2003) 209-212.

Captions to Figures

Figure 1. General structure of 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones: R = H (H2Am4DH); R = CH₃ (H2Am4Me); R = CH₂CH₃ (H2Am4Et); R = C₆H₅ (H2Am4Ph).

Figure 2a. Ambient temperature EPR spectra of polycrystalline compounds **1** – **4** (gray) and simulations (dotted lines) using EasySpin (S=1/2, axial symmetry). Only the main components of (**2**) is presented in the simulation.

Figure 2b. Ambient temperature EPR spectra of compounds **1** – **4** (2 mg/ml) in DMF and the simulation of **4**, without the nitrogen superhyperfine structure, using EasySpin (function garlic, with $g_{\parallel} = 2.165$, $g_{\perp} = 2.038$; for ⁶³Cu $A_{\parallel} = 180 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, $A_{\perp} = 30 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$; correlation time $7.0 \times 10^{-11} \text{ s}$, lorentzian linewidth 1.5 mT and gaussian linewidth 4.5 mT).

Figure 2c. EPR spectra of compounds **1** – **4** (2 mg/ml) in DMF at 77 K, and the simulations of **1** and **4**, without the nitrogen superhyperfine structure, using EasySpin (function pepper, parameters in Table 1).

Figure 3. Atom connections and atom numbering scheme for **4**. Ellipsoids are drawn at the 50% probability level, hydrogen atoms are drawn as spheres of arbitrary radius. Intramolecular hydrogen bonds are drawn as dashed lines

Figure 4. Molecules of **4** linked by intermolecular N5-H5a---S1, N5-H5b---Cl and N4-H4a---Cl hydrogen bonds. Symmetry operations see Table 3b.

Table 1 EPR spectral parameters for complexes **1-4** (polycrystalline at room temperature and DMF solution at 77 K) obtained by spectral simulation using EasySpin [12]. ΔB_{\parallel} and ΔB_{\perp} are the parallel and perpendicular magnetic field strain, respectively.

Polycrystalline complex, ~ 300 K	g_{\parallel}	g_{\perp}	g_{av}	ΔB_{\parallel} (mT)	ΔB_{\perp} (mT)	G	
(1)	2.202	2.051	2.101	6.0	2.7	4.1	
(2)	2.190	2.058	2.102	20	18	3.4	
(3)	2.205	2.053	2.104	12	3.7	4.0	
(4)	2.163	2.045	2.084	4.4	2.0	3.8	

Complex in DMF 77K	g_{\parallel}	g_{\perp}	g_{av}	A_{\parallel} (10^{-4} cm^{-1})	A_{\perp} (10^{-4} cm^{-1})	G	f
(1)*, (2), (3)	2.20	2.05		170	20		129
(4)†	2.163	2.044		186	30		116

* line width 4 mT (lorentzian, gaussian); $g_{\parallel \text{strain}} = 0.02$

† line width 6 mT (gaussian); $B_{\text{strain}_{\perp}} = 7.5 \text{ mT}$

Table 2 Crystal data and structure refinement for 4.

Identification code	01995
Empirical formula	C13 H12 Cl Cu N5 S
Formula weight	369.33
Temperature	120(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system	Orthorhombic
Space group	Pna2(1)
Unit cell dimensions	a = 15.0981(7)Å α = 90deg b = 6.9286(3)Å β = 90deg c = 13.4507(7)Å δ = 90deg
Volume	1407.06(12) Å ³
Z	4
Density (calculated)	1.743 Mg/m ³
Absorption coefficient	1.889 mm ⁻¹
F(000)	748
Crystal size	0.16 x 0.09 x 0.06 mm
Theta range for data collection	3.03 to 27.49 deg.
Index ranges	-19<=h<=18; -8<=k<=6; -17<=l<=17
Reflections collected	9569
Independent reflections	3057 [R(int) = 0.0385]
Reflections observed (>2sigma)	2811
Data Completeness	0.999
Absorption correction	None
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	3057 / 1 / 199

Table 3 Selected geometric parameters (Å, °) for **4**.

(a) Bond lengths and angles				
Cu1-N2	1.930(3)	Cu1-N1	2.029(3)	
Cu1-Cl1	2.2405(11)	Cu1-S1	2.2694(11)	
N1-C2	1.352(5)	C(2)-C(7)	1.473(6)	
N2-N3	1.381(5)	N3-C1	1.310(5)	
S(1)-C(1)	1.749(4)	N(2)-N(3)	1.381(5)	
N2-C7	1.300(5)			
N2-Cu1-N1	80.34(15)	N2-Cu1-Cl1	171.61(11)	
N1-Cu1-Cl1	96.65(11)	N2-Cu1-S1	83.73(10)	
N1-Cu1-S1	163.71(11)	Cl1-Cu1-S1	99.60(4)	
(b) Hydrogen bonding parameters, (Å, °) for 4 .				
D-H---A	D-H	H---A	D---A	D-H---A
N4-H4A---Cl1 ⁱ	0.72(5)	2.80(5)	3.506 (3)	167(5)
N5-H5B---Cl1 ⁱⁱ	0.77(5)	2.82(5)	3.436(4)	139(4)
N5-H5A---S1 ⁱⁱⁱ	0.94(5)	2.54(5)	3.466(3)	167(3)
N5-H5B---N3	0.77(5)	2.32(5)	2.682(4)	110(4)
C6-H6---Cl1	0.95	2.77	3.333(5)	119
C9-H9---N3	0.95	2.35	2.873(7)	115

Symmetry operations : (i) 1-x,1-y,-1/2+z , (ii) 1/2-x,1/2+y,-1/2+z, (iii) -1/2+x,3/2-y,z

Table 4 LD₅₀ values for 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones and their copper(II) complexes against *Artemia salina*.

Compound	LD ₅₀ ^a , μmol L ⁻¹ ± SD
H2Am4DH	36.6 ± 4.4
[Cu(H2Am4DH)Cl ₂] (1)	12.1 ± 1.4
H2Am4Me	50.0 ± 3.8
[Cu(H2Am4Me)Cl ₂] (2)	1.2 ± 0.2
H2Am4Et	26.0 ± 5.3
[Cu(H2Am4Et)Cl]Cl (3)	1.6 ± 0.7
H2Am4Ph	2.2 ± 0.5
[Cu(2Am4Ph)Cl] (4)	7.2 ± 0.7
CuCl ₂ .2H ₂ O	7.0 ± 1.7

^a LD₅₀, lethal dose which causes the death of 50% of a group of test animals; SD, standard deviation.

June 30th, 2008

Professor

Professor J.R. Durig

Editor

Spectrochimica Acta Part A

Dear Professor Durig,

Please find in attachment our manuscript entitled "**Copper(II) complexes with 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones: spectral studies and toxicity against *Artemia salina***" submitted for publication in Spectrochimica Acta Part A.

Looking forward to hearing from you,

Yours sincerely,

Heloisa Beraldo

Heloisa Beraldo

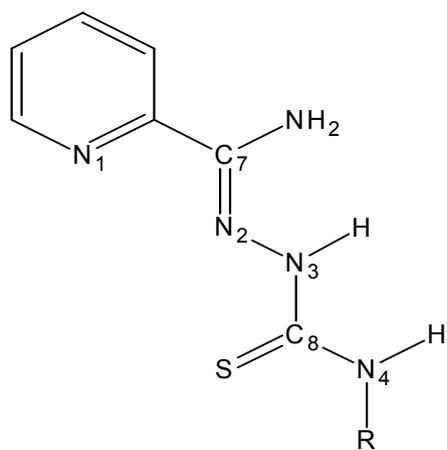
Professor of Chemistry

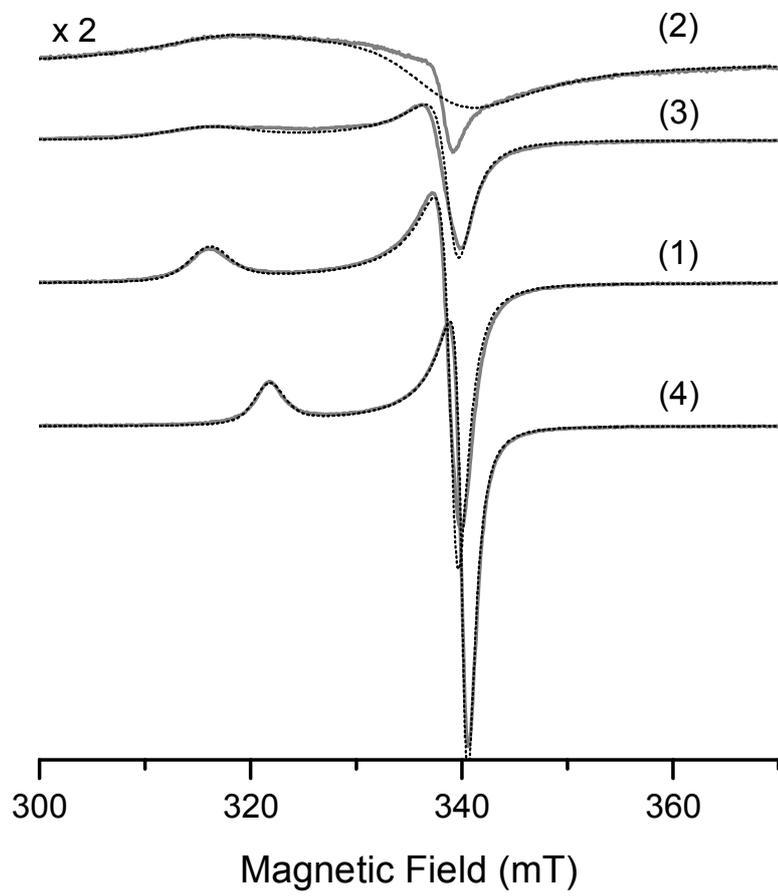
Departamento de Química

Universidade Federal de Minas Gerais

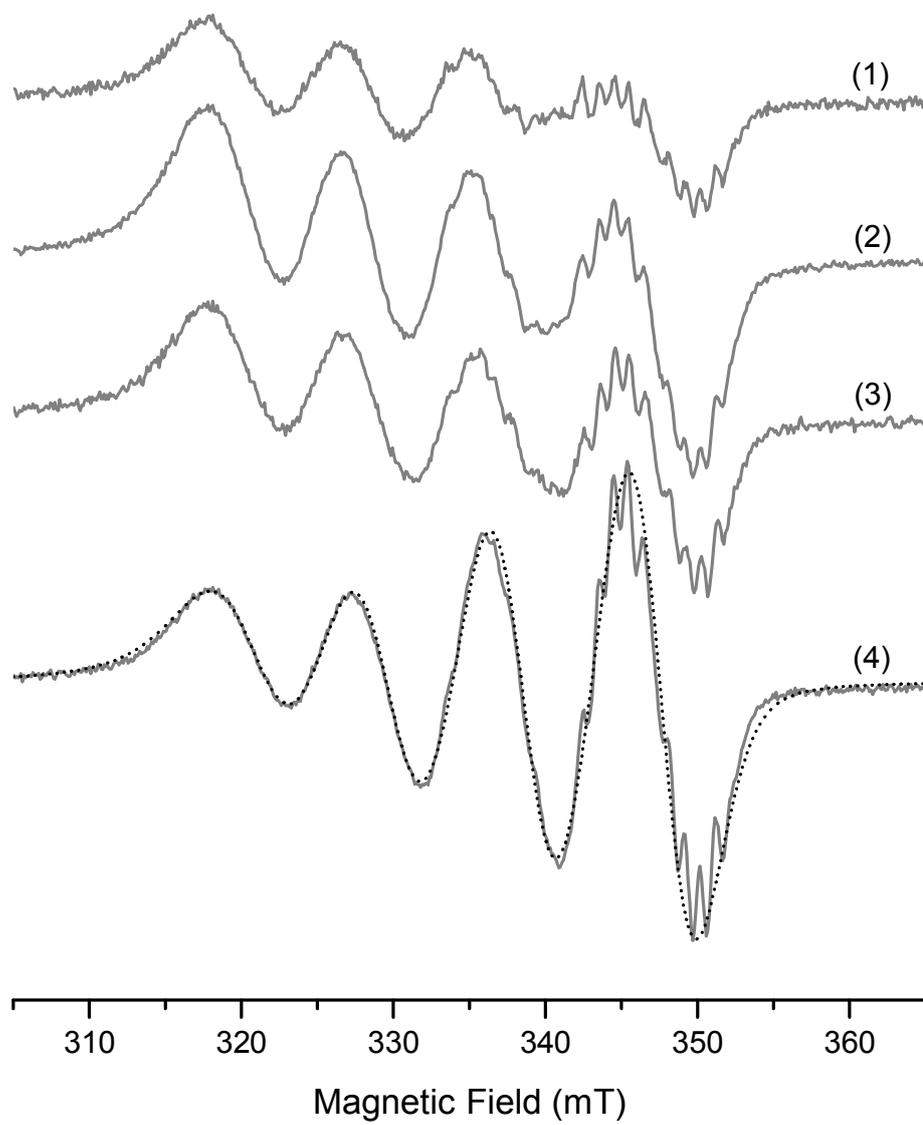
31270-901 Belo Horizonte Brazil

Figure(s)

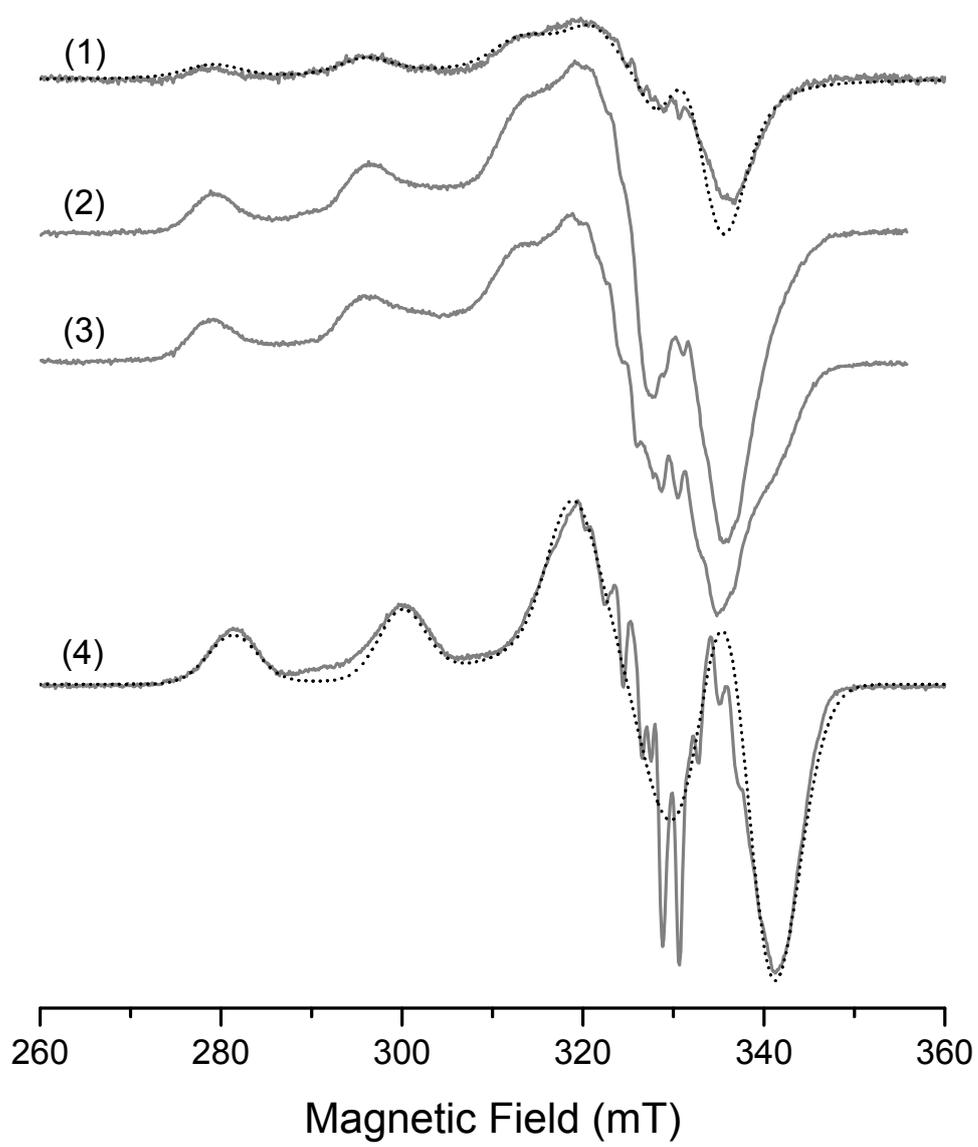




Figure(s)



Figure(s)



Figure(s)

